

甜杨葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因的电子克隆及其功能预测

林元震^{1,2}, 张志毅², 林善枝²

(1. 华南农业大学林学院, 广东广州 510642; 2. 北京林业大学林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要 [目的]对甜杨葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)进行克隆及功能预测。[方法]采用电子克隆和 RT-PCR 相结合的方法首次从甜杨中分离了 G6PDH 基因,通过 Blast 和其他生物信息学软件进行功能预测。[结果]甜杨 G6PDH 基因的 cDNA 长 1 697 bp,可编码 510 个氨基酸,cDNA 序列及其推导的氨基酸序列均与其他植物 G6PDH 存在着较高的同源性,说明所获得的 cDNA 是甜杨 G6PDH 基因(PsG6PDH,AY445917)。同时,运用 PCR 扩增技术获得了甜杨 G6PDH 基因组序列,测序结果表明,基因组 DNA 长度为 5 040 bp,含有 15 个外显子和 14 个内含子。Southern 杂交结果表明,G6PDH 基因在甜杨的基因组中可能是单拷贝或者低拷贝。通过网络服务器平台进行 PsG6PDH 的功能预测,结果显示,PsG6PDH 为 G6PDH 的成员之一,含有 NADP 结合区和 G6P 结合区 2 个保守功能域,具有多个磷酸化位点和跨膜区域,但不含有信号肽,表明 PsG6PDH 可能作为膜受体而起作用。另外,G6PDH 的电子表达谱分析结果发现,G6PDH 在多种组织和不同发育过程均表达,并涉及各种逆境胁迫应答反应,这也说明了 G6PDH 在植物生长反育中的重要地位。[结论]可为下一步研究 PsG6PDH 基因的分子功能提供参考。

关键词 甜杨;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;电子克隆

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)29-14054-05

In Silico Cloning and Function Prediction of a Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Gene from Populus suaveolens

LIN Yuan-zhen et al (College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract [Objection] *In silico* cloning and function prediction of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene (G6PDH) was researched in the paper. [Method] The G6PDH gene was cloned from *P. suaveolens* by electronic PCR and RT-PCR, and function prediction was carried out by Blast and other bioinformatics softwares. [Result] The full length PsG6PDH was 1 697 bp and encoded 510 amino acids. cDNA and amino acid sequences showed high identity with other plant G6PDH genes. *P. suaveolens* (fragrant poplar) G6PDH genomic DNA was isolated by PCR and its sequence contained 15 exons and 14 introns. In addition, Southern analysis revealed that PsG6PDH is single or low copies in the fragrant poplar genome. Function prediction showed that PsG6PDH was a new member of plant G6PDH family, containing NADP-binding domain and G6P-binding domain, with some phosphorylation sites. It had no signal peptide, but one transmembrane domain in N terminal, indicating that PsG6PDH was acted as a receptor in membrane. Moreover, electronic expression profiles revealed that G6PDH expressed in whole plants and varied development stage, and involved in different abiotic stresses, suggesting that G6PDH played an important role in the growth and development of plants. [Conclusion] The report provided important information for the further molecular function research of PsG6PDH.

Key words *Populus suaveolens*; Glucose-6-phosphate dehydrogenase; *In silico* cloning

电子克隆(*in silico* cloning)是近年来伴随着基因组计划和 EST 计划而发展起来的基因克隆新方法^[1],主要原理是利用日益发展的生物信息学技术,借助电子计算机的巨大运算能力,通过 EST 或基因组的序列组装和拼接,进一步利用 RT-PCR 的方法快速克隆功能基因。近年来,已有很多学者利用电子克隆的方法相继克隆了人和鱼的功能基因 *ILF2*、水稻 G6PDH 基因、老鼠 *Muc 5ac* 基因、稻瘟菌 I 型烯醇化酶基因^[1-3]。由于受到序列资料的限制,植物领域的基因克隆仍以常规的试验方法为主。2003 年底杨树基因组序列资料的公布以及丰富的杨树 EST 数据库,使得利用生物信息学技术进行杨树功能基因的电子克隆已经成为可能^[4-5]。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是磷酸戊糖途径的关键性调控限速酶,主要功能是为脂肪酸合成、氮还原和谷胱甘肽等生物分子合成提供 NADPH 还原力,也为核酸合成提供戊糖,此外,还参加非生物逆境胁迫应答反应,因此,对植物的生长发育起着非常重要的作用^[6-8]。笔者的前期研究结果发现,低温胁迫下胞质 G6PDH 的活性提高,进而增强 OPPP 代谢途径,其中间产物 NADPH,可用于激活一些 NADPH 依赖的抗氧化酶的活性,促进了许多重要的酶催化反应,进而保护了细胞膜的稳定,达到提高植物抗寒冻性的作用^[9]。但关于 G6PDH 活性与植物抗寒冻性之间关系的分子机理尚未清

楚,在分子水平上,低温胁迫下 G6PDH 怎样被激活,G6PDH 互作信号是什么,G6PDH 如何发挥代谢调控作用,进而提高植物抗寒冻性。要解答这些问题,首先得分离出甜杨 G6PDH 的基因。

笔者采用电子克隆的方法,以拟南芥胞质 G6PDH cDNA 为信息探针,从 GenBank 的杨树核酸库中找到与之高度同源的杨树 EST 序列,通过人工序列拼接得到杨树 G6PDH 的全长 cDNA 序列,结合毛果杨基因组和杨树 EST 序列信息,进一步采用 RT-PCR 的方法克隆了甜杨 G6PDH 基因。在此基础上,还分离了甜杨 G6PDH 基因组 DNA 和进行 Southern 杂交分析了甜杨 G6PDH 基因的拷贝数,并采用生物信息学方法预测了甜杨 G6PDH 基因的功能,为下一步研究其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 采取北京林业大学苗圃的多年生甜杨(*P. suaveolens*)幼苗的嫩枝条作为外植体,消毒后接种到启动培养基(改良 MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L)上,培养温度(25 ± 2) °C,光照 16 h/d,光照强度 2 200 lx。等启动培养基的芽萌动并长出 1 ~ 2 片小叶,这时将芽转接到增殖培养基(改良 MS + BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L + GA 0.1 mg/L)快繁,然后接到生根培养基(1/4 改良 MS + IBA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L)上进行生根^[10]。生根无菌苗作为提取 RNA 的试材。

1.2 方法

1.2.1 甜杨总 RNA 的提取。取 3 g 甜杨组培苗,4 °C 处理

基金项目 国家自然科学基金资助课题(30271093,30771759)。

作者简介 林元震(1979 -),男,福建仙游人,博士,讲师,从事林木抗逆分子遗传与生物信息学研究。

收稿日期 2009-06-03

24 h 后,加 10% PVPP,用液氮研磨成细末,加入 15 ml 65 °C 预热的 CTAB 提取液[2% CTAB,3% PVP-40,25 mmol/L EDTA,2 mol/L NaCl,100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),3% β -巯基乙醇],振荡 1 min,65 °C 继续水浴 5 min。向上述混合液中加入等体积氯仿抽提 2 次,每次振荡 10 min,18 °C 12 000 \times g 离心 20 min。取上相,加 1/3 体积 8 mol/L LiCl,混匀,4 °C 沉淀过夜。12 000 \times g 4 °C 离心 20 min,用 800 μ l 0.5% SDS 溶解沉淀,加等体积的氯仿抽提 2 次。取上清,加 2 倍体积 -20 °C 预冷的 100% 乙醇,-20 °C 放置 2 h。12 000 \times g 4 °C 离心 20 min,70% 漂洗沉淀 2~3 次后,晾干沉淀,用适量 DEPC 处理后的无菌水溶解(改良 CTAB 法)^[11]。

1.2.2 杨树葡萄糖-6-磷酸脱氢酶全长基因的电子克隆。从 TAIR 数据库(<http://www.arabidopsis.org/>)获得拟南芥 *G6PDH* 基因的全长 cDNA 序列为信息探针,运用 Blastn2.0 程序搜索杨树 ESTs 数据库 PopulusDB(<http://mycor.nancy.inra.fr/populardb/>),选择相似性得分最高的 EST 序列,将此 EST 序列作为原始种子序列,再运行 Blastn2.0 程序搜索 NCBI 的 EST-others 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>),下载所获得的杨树 ESTs 序列运用 DNAMAN 进行装配,保存装配后产生的新序列,即是假定的杨树 *G6PDH* 基因。以 DNAMAN 预测其蛋白编码框,验证该基因是否为全长基因。根据电子克隆到的杨树 *G6PDH* 全长基因为模板,Blastn 搜索毛果杨基因组匹配序列(<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>)和 NCBI 的杨树 ESTs,用 Clustal W 1.83 多序列比对寻找高度保守区域设计引物,进行甜杨 *G6PDH* 基因的扩增。

1.2.3 甜杨葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因的全长 cDNA 扩增、克隆及其鉴定。以甜杨组培苗 4 °C 处理 24 h 的总 RNA 为模板,采用 Access One-Step RT-PCR (Promega)试剂盒进行 RT-PCR。上游引物 PFLi01:5'-GGTTACAGGACCTCTGA-GAAA-CAA-3';下游引物 PFLi02:5'-CAGGCTACATTTCTACAATG-TAGGAGG-3'。扩增程序:第一链 cDNA 合成 48 °C 45 min;PCR 二次扩增,94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 1 min,68 °C 延伸 2 min,30 次循环,68 °C 最后延伸 10 min。获得的 cDNA 片段采用 Winzard PCR Preps DNA Purification System 试剂盒回收,然后克隆至 pGEM-T Easy 载体。挑取阳性克隆交由上海基康生物技术有限公司测序,cDNA 序列用 DNAMAN 和 GenBank 的 Blast 软件进行分析。

1.2.4 甜杨 *G6PDH* 基因组 DNA 的分离和 Southern 分析。根据甜杨 cDNA 在毛果杨基因组 Blast 结果显示,杨树 *G6PDH* 基因组序列大概有 6 kb 左右,为了便于 PCR、克隆和测序,将甜杨 *G6PDH* 基因组分成两部分(gG1、gG2)进行克隆,这样设计了 2 对引物,gG1 的上游引物 PsgG1u:5'-GGT-TACAGGACCTCTGAGAAACAA-3',下游引物 PsgG1d:5'-AAG-TACAAGGCTGAGCTATTTTCGA-3',gG2 的上游引物 PsgG2u:5'-AATCAAGAAGTCACAAGCAGTAACC-3',下游引物 PsgG2d:5'-TTATACATATTCGAGTGGAGACTG-3'。用 BamH I、EcoR I、Hind III 和 Xba I 限制性内切酶对甜杨 *G6PDH* 基因组进行过夜酶切,以甜杨 *G6PDH* 基因组序列为目的片段,按 Roche 提供的试剂盒进行探针制备和杂交检测。

1.2.5 甜杨 *G6PDH* 蛋白序列的系统发育树构建。在进行 NCBI 网站初步 Blast 后,选择与甜杨 *G6PDH* 同源性较高的其他植物 *G6PDH* 基因从蛋白水平进行 N-J 聚类分析,对蛋白序列用 Clustal W 1.83 进行多重比对并生成系统发育树^[12],图形用 TREEVIEW 3.2 生成。

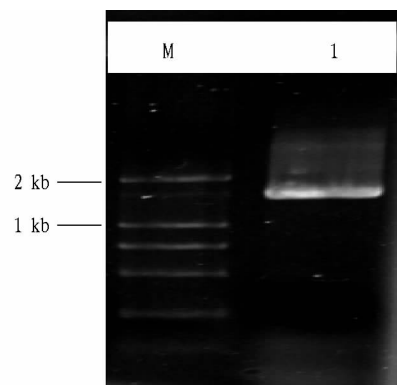
1.2.6 甜杨 *G6PDH* 基因的功能预测。

1.2.6.1 新蛋白 motif/Prosite 分析。在 ProfileScan 服务器进行结构位点(Prosite)、膜体(Motif)分析。

1.2.6.2 新基因的电子表达谱分析。以目的基因序列检索 NCBI 数据库,获得待分析序列的 UniGene 编号后,就可通过参与形成 UniGene Cluster 序列的组织/细胞来源间接地分析序列在何种组织中表达。

2 结果与分析

2.1 甜杨 *G6PDH* 基因全长 cDNA 的获得 根据上述设计的引物 PFLi01 和 PFLi02,以合成的第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得一条 1.7 kb 左右特异的预期 cDNA 片段(图 1),通过克隆、筛选、测序,对测序结果用 DNAMAN 分析,表明目的基因 cDNA 长 1 697 bp,具有一个最大完整编码框,可编码 510 个氨基酸,分子量为 58.4 kD,等电点 pI 为 6.17(图 2)。编码的氨基酸序列中,Leu 含量最高,达 10.59%,Glu 含量其次(为 8.43%),Gly 含量居第三(7.25%),含量最低的是 Trp 和 Cys(都为 1.18%);进一步分析发现,非极性(疏水)氨基酸含量为 39.8%,极性(亲水)氨基酸含量为 60.2%,极性(亲水)氨基酸含量明显高于非极性的,由此可见,所编码的蛋白为亲水性蛋白,这与冷调节蛋白(cold regulated proteins,CORPs)的氨基酸组成相似(康国章等,2002)。另外,PsG6PDH 编码的氨基酸序列中含有 6 个 Cys,分别位于第 32、155、160、161、276 和 378 位氨基酸(图 2),说明 PsG6PDH 编码产物中可能含有二硫键,这也许对维持其结构稳定及功能行使具有重要意义。



注:M. DNA 标准分子量;1. 全长 *G6PDH* 扩增产物。

Note:M,2 kb DNA ladder; 1,Full length cDNA of *G6PDH* from *P. suaveolens* by PCR.

图 1 甜杨 *G6PDH* 基因全长 cDNA 的 PCR 电泳检测

Fig. 1 PCR electrophoresis of full length cDNA of *G6PDH* from *P. suaveolens*

Blast 结果表明,甜杨 cDNA 序列与苜蓿(*Medicago sativa*,U18238)、马铃薯(*S. tuberosum*,DQ252509)、烟草(*N. tabacum*,AJ001769)、石松(*Lycopodium esculentum*,BT013545)、石芹(*Petroselinum crispum*,AF012862)、小麦(*T. aestivum*,AB029454)、水稻(*O. sativa*,AY078072)、松叶菊(*Mesembryan-*

```

1   GGTTACAGGAOCTCTGAGAAACAAGT TTT TAGT ATCTOGATT TGTAGCCAA TAT TTT TGTG TTAGTAAATCAGATCAGGA AAGGOGGTGCTGGGGA AAGGAAGC
106 AAATCTTGTATATATCAAAGACATGGGA TOCGGTC AATGGA TGGTAGAGAAAGAGATCTGGT TTAGAA AATGAT TOGT TTCGAA AOCG AACATGAGAC TCGCTC TGAA
1   M G S G Q W M V E K R S G L E N D S F R N E H E T A S E
211 AGTGGGTGCOCTTTC AATTATTGTTCTTGGTGTCTCTGGTGATCTAGCCAAAGAAGAAGACTTTCOCTGCTCTCTAOCATCTTTATCGOCAGGGGTTTCTGGACTCA
29  S G C L S I I V L G A S G D L A K K K T F P A L Y H L Y R Q G F L D S
316 AA TGAAGTGCACAT TTTCCGATATGCAAGGACTAAGA TTT CAGATGA TGA ACT TAGAGATOGAATCOGTGGA TATCTTGGAAAAGAAGCTGA AGT TGTATCAAAG
64  N E V H I F G Y A R T K I S D D E L R D R I R G Y L G K E A E V V S K
421 TTCTTGC ACTGATCAAA TATGTAAGTGGTCTTATGATACTGAGGA TGGCTTTCAGCTATTTGGAT AAGGAAGTTTACAGCATGAAGTATCAA AAAACAGTGCAC
99  F L Q L I K Y V S G S Y D T E D G F Q L L D K E V L Q H E V S K N S A
526 GAAGGATC ATCTOGAAGACTATTTTATCTTGCAC TOCOOCTCAGTGTATOCATCTGTCTGCAAGGATGATCAGAA AATGTTGCA TGAATAAAATC TGA TCTTGGT
134 E G S S R R L F Y L A L P P S V Y P S V C R M I R K C C M N K S D L G
631 GGATGGACTAGAAAT TGTCTATTGAGAAAACCTTTTGGCA AAGATT TGGAAATCTGCAGA AAAATCTCAGTGCCCATATTGGAGAGT TGT TGAAGA AGCACA ACTTTTT
169 G W T R I V I E K P F G K D L E S A E N L S A H I G E L F E E A Q L F
736 CGTATOGA TCACACTTGGGA AAGAA TGGTGCAGA ACTTGC TAGT TCTOCTGTTT TCGAAAATGCTTCTTTTACCTCTTTGGA AOCGGACAAACATTTCCAAT
204 R I D H Y L G K E L V Q N L L V L R F A N R F F L P L W N R D N I S N
841 GTTCAGAT TGTGTT TGGGAAA AATTTTGGAACTGA AAGGTCGTGGTGGATA TTT TGA TGAATATGGGATT ATTOGAGATA TTAATCAAATCACTT ATTACAGATT
239 V Q I V F R E N F G T E G R G G Y F D E Y G I I R D I I Q N H L L Q I
946 CTTTGCTGGT TGCCATGAAA AAGOOCTTTTCTC TCA AACCTGAATA TAT TOGAGA TGAGAAAGTGA AAGGTTCTTCAATCAGTACTTCCAATCAGAGA TGAAGAT
274 L C L V A M E K P V S L K P E Y I R D E K V K V L Q S V L P I R D E D
1051 GTTGTCTTGGACAGTATGAAAGCTACAGGGATGAOCCCAACAGTTC TCGA TCAATC AAAATACCCCAACA TTTGCTACTGTTGTTCTTGAGAAAT TCA TAA TGA AAGA
309 V V L G Q Y E G Y R D D P T V P D Q S N T P T F A T V V L R I H N E R
1156 TGGGAAGGGGT TOCTTTCATACTA AAGGCAGGAAA AAGCAT TAAATTC AAGCAAGGCAGAGATAOCTGTTCAA TTTAAGG AOGTTCCTGGTGTATATTOCAATGT
344 W E G V P F I L K A G K A L N S S K A E I R V Q F K D V P G D I F Q C
1261 CA AAGCAAGG AAGGAATGAG TTTGTAATACGOC TGC AACCOCTCAGA AGCCATGTACATGAAACTT AOCGTCA AAGCAGCCTGGACTOGAGATGTC TACTGT TCAA
379 Q K Q G R N E F V I R L Q P S E A M Y M K L T V K Q P G L E M S T V Q
1366 AGTGA ACTGGAOCTGTCA TATATGCAAOGTT ATCAAGGGG TCOCTCAGGAGGC ATATGAAOCTCTGATTCTTGACACAA TTAGGGGOGA TCAAGCAGCATTTT
414 S E L D L S Y M Q R Y Q G V P I P E A Y E R L I L D T I R G D Q Q H F
1471 GTTOGAGAGA TGAATTGAAGGCAGCA TGGGAGA TCTTCACACCOCT TCTGCACAGGATTGAC AATGGTGA AATTGAAGCCAAAGGAAT AOC AOCAGGCAGOOGG
449 V R R D E L K A A W E I F T P L L H R I D N G E L K P K E Y Q P G S R
1576 GGTOCAGTGA AGCAGATGAGCTGCTGGCAA AAGCTGTTATG TTCAAACACA TGGCTATATCTGGATTCTOCTACAT TGTAGGA AATGTAGCOCTGAAATCACTAG
484 G P V E A D E L L A K A G Y V Q T H G Y I W I P P T L *
1681 TGAATTGCGCGCGOCT

```

注:G6PDH 的起始子和终止子用下划线表示。

Note: The promoter and terminator of G6PDH are underlined.

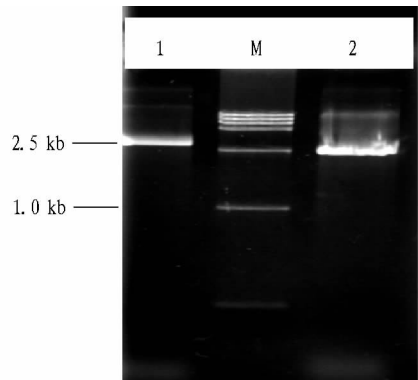
图2 甜杨 *PsG6PDH* 基因的 cDNA 和编码蛋白序列

Fig. 2 cDNA sequence and its coding amino acid sequence of *PsG6PDH* gene in *P. suaveolens*

themum crystallinum, AF097663) 和拟南芥 (*A. thaliana*, AJ010971) 等植物 *G6PDH* 基因的同源性分别为 82%、82%、82%、82%、80%、80%、80%、80% 和 80%。甜杨 cDNA 序列所编码的氨基酸序列与拟南芥 (*A. thaliana*, AJ010971)、马铃薯 (*S. tuberosum*, X74421)、烟草 (*N. tabacum*, AJ001769)、松叶菊 (*M. crystallinum*, AF097663)、石芹 (*P. crispum*, AF012862)、小麦 (*T. aestivum*, AB029454) 和水稻 (*O. sativa*, AY078072) 等同源性分别为 82%、84%、83%、79%、79%、77% 和 80%。此外,甜杨 cDNA 序列编码的蛋白两端分别有 G6PD_N 和 G6PD_C 的保守区域,并存在 G6PDH 的两个典型结构域,分别为底物结合位点 (substrate-binding site, IDHYLG) 和 NADP 结合位点 (NADP-binding site, NEFVIRLQP),与已有植物胞质 *G6PDH* 基因相似,而且在 cDNA 5'端缺少一段信号肽序列 (为质体 *G6PDH* 所特有),这表明所得到的 cDNA 序列可能是甜杨胞质 *G6PDH* 基因,命名为 *PsG6PDH*,基因登记号为 AY445917。由上可知,cDNA 序列与蛋白序列的 Blast 结果虽然存在一定差异,但两者 Blast 同源性都高达 80%,说明植物 *G6PDH* 不管在核酸序列上还是蛋白序列上,都是一个比较保守的基因家族。

2.2 甜杨 *G6PDH* 基因组 DNA 的克隆和 Southern 杂交分析 在获得全长 cDNA 后,对甜杨 *G6PDH* 基因组 DNA 进行了克隆。根据设计的引物,分别获得了 2.9 kb 和 2.4 kb 的

预期片段 (图 3),经克隆、测序、分析以及拼接后,得到甜杨 *G6PDH* 全长基因组序列,为 5 040 bp,命名为 *PsgG6PDH*。在 SoftBerry 上对 *PsgG6PDH* 进行基因结构分析,结果发现,



注:M. DNA 标准分子量; 1,2. G6PDH PCR 扩增产物。

Note: M, 15 kb DNA ladder; 1 and 2, G6PDH genomic DNA fragment from *P. suaveolens* by PCR.

图3 甜杨 *G6PDH* 基因组 DNA 的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of *G6PDH* genomic DNA from *P. suaveolens*

PsgG6PDH 编码区全长为 4 748 bp,含有 15 个外显子,14 个内含子,以及 1 个 polyA 区域。在甜杨基因组 DNA 序列中含有 *Bam*H I、*Hind* III、*Pst* I 各 3 个酶切位点,2 个 *Xba* I、*Eco*R V 酶

切位点, *Sac* I、*Sac* II、*Nco* I 位点各 1 个(图 4)。另外, 酶切完全后的基因组 DNA 经转膜、固定、杂交, 结果如图 5B, *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III 和 *Xba* I 酶切后的基因组 DNA, 均呈现出 2~4 条不等的杂交信号, 其中, *Hind* III 酶切泳道的杂交条带最多, 并处于 1~5 kb 之间, *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切泳道杂交信号均出现 3 条, 其中信号最强的是 *Bam*H I 酶切泳道, 大概 5 kb 处, 中间一条比较弱。而 *Xba* I 酶切泳道, 仅出现 2 条。根据 *PsgG6PDH* 基因的酶切图谱, 酶切完全后, *Hind* III 应产生 4 条带, *Bam*H I、*Xba* I 均为 3 条带, *Eco*R I 可能为 1 条带。 *Bam*H I 和 *Hind* III 杂交条带信号与酶切结果相符, 而 *Xba* I 和 *Eco*R I 杂交信号与酶切结果不一致。上述杂交结果表明, *G6PDH* 基因在甜杨的基因组中可能是单拷贝或者低拷贝, 这也与甜杨 *G6PDH* cDNA 和毛果杨基因组 Blast 的结果相符合。

2.3 *PsgG6PDH* 蛋白的系统进化树分析 在 BLASTp 分析的基础上, 选择与其同源性较高的蛋白质序列(表 1)做 N-J

聚类分析, 以期对 *PsgG6PDH* 蛋白的功能和进化做进一步分析。用 Clustal X 1.83 程序先进行多重序列比对, 然后用 TreeView 生成系统发生树。N-J 聚类分析(图 6)表明, 所建立的系统进化树分出了 2 个大分支, 一为质体 *G6PDH*, 一为胞质 *G6PDH*。其中 *Nt*2、*Nt*3、*Sl*2、*st*3、*Pc*1、*At*2、*At*3、*Os*1、*Os*2 聚类成 P1 形式 *G6PDH*; *Nt*1、*St*1、*So*、*At*1、*Os*3 聚类成 P2 形式 *G6PDH*; *At*4 单独为一个质体 *G6PDH*; *Nt*4、*Nt*5、*St*4、*Pc*2、*Pc*3、*Ps*、*Pt*1、*Pt*2、*At*5、*At*6 聚类成双子叶胞质 *G6PDH*; *Os*4、*Os*5、*Os*6、*Ta*1、*Ta*2 聚类成单子叶胞质 *G6PDH*。从中可以看出, 该研究所克隆的 *PsgG6PDH* 蛋白属于胞质 *G6PDH*, 而且与毛果杨假想 *G6PDH* 聚在一起, 另外, *PsgG6PDH* 蛋白与毛果杨假想 *G6PDH* *Pt*2、*Pt*1 的同源性分别为 97%、94%, 说明杨树的 *G6PDH* 在进化上比较保守, 且可能具有较高的亲缘关系。上述结果表明, 不同的胞质 *G6PDH* 源自同一个祖先, 但它们出现的时间不同, 进而它们的功能也可能不同。

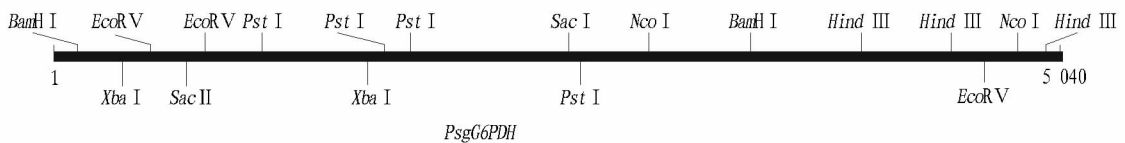
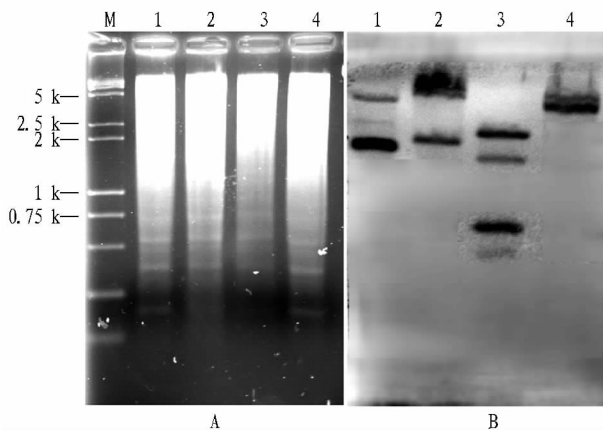


图 4 *PsgG6PDH* 基因的核酸限制性内切酶图谱

Fig. 4 Restriction enzyme patterns of *PsgG6PDH* gene



注: A. 甜杨基因组 DNA 酶切电泳检测; B. 甜杨 *G6PDH* 基因的 Southern 杂交。M. 15 kb + 2 kb DNA ladder; 1, 2, 3, 4. *P. suaveolens* genomic DNA digested by *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III 和 *Xba* I。

Note: A, Restriction electrophoresis detection of genomic DNA in *P. suaveolens*; B, Southern blotting results of *G6PDH* gene in *P. suaveolens*. M: 15 kb + 2 kb DNA ladder; 1, 2, 3, 4: *P. suaveolens* genomic DNA digested by *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III and *Xba* I。

图 5 甜杨 *G6PDH* 基因的 Southern 杂交分析

Fig. 5 Southern blot analysis of *P. suaveolens* *G6PDH* gene

2.4 *PsgG6PDH* 蛋白 motif、Prosite 分析 在 ProfileScan 服务器进行结构位点 (Prosite)、膜体 (Motif) 分析。结果显示 *PsgG6PDH* 中存在 7 种结构位点: 5 个 N-糖基化位点 (N-glycosylation site), 1 个依赖 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点 (cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site), 6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (Protein kinase C phosphorylation site), 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (Casein kinase II

phosphorylation site), 3 个 N-十四酰化位点 (N-myristoylation site), 1 个细胞附着序列 (Cell attachment sequence), 1 个葡萄糖-6-磷酸活性位点 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase active site)。由上可知, 蛋白激酶磷酸化位点最多, 总共有 13 个, 蛋白激酶磷酸化位点的存在, 表明 *PsgG6PDH* 行使功能前可能需要磷酸化活化。

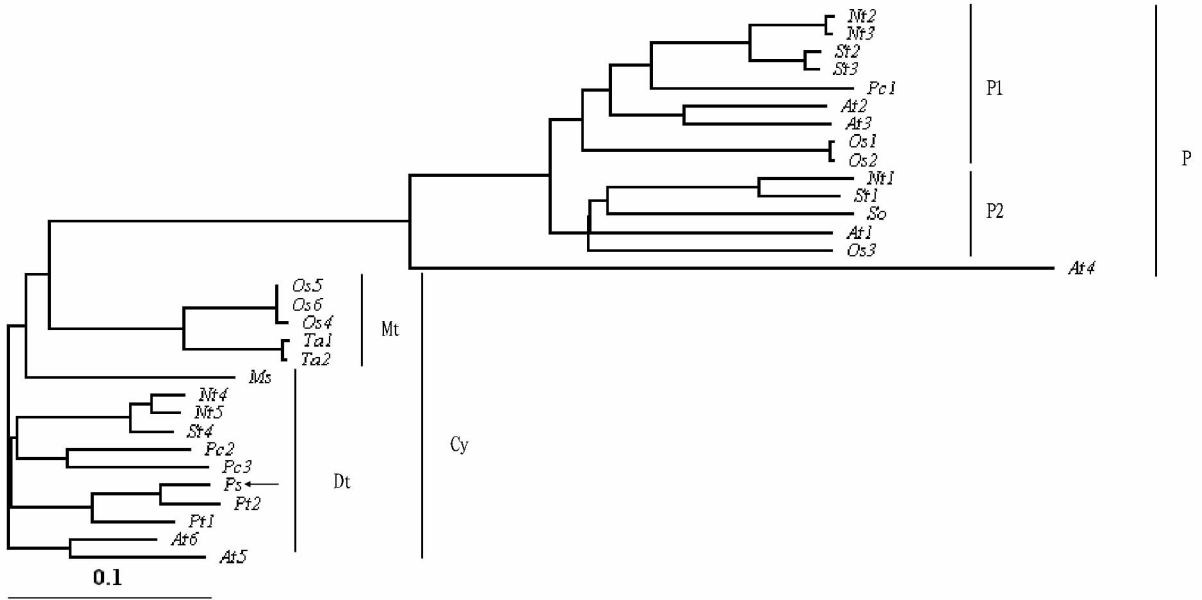
2.5 *PsgG6PDH* 基因的电子表达谱 利用 UniGene 数据库进行电子表达谱和染色体定位分析。选择 NCBI 的 Blastn 程序, 用 *PsgG6PDH* 检索 UniGene, 通过 UniGene 进行 *G6PDH* 的表达分析, 结果显示, *G6PDH* 在所能检索到的植物中, 如拟南芥 (*A. thaliana*)、玉米 (*Zea mays*)、水稻 (*O. sativa*)、小麦 (*T. aestivum*)、马铃薯 (*S. tuberosum*) 和石苣 (*L. esculentum*), 几乎都是整株表达, 在根、叶、茎、花、种子 (萌发, 休眠) 以及愈伤组织等多种组织和细胞中表达, 而且在不同的发育时期以及在各种逆境胁迫 (盐、低温、干旱、病原侵染、水分胁迫、紫外线照射等) 下也表达。另外, 还检索到一个杨树 (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) EST 的 UniGene Ptp. 2628, 发现 *G6PDH* 也涉及杨树的木材形成过程。上述结果充分说明了 *G6PDH* 对植物的生长反应具有非常重要的作用。

3 结论与讨论

戊糖磷酸途径是植物中重要的代谢途径, *G6PDH* 是其关键性调控限速酶, 在植物的生长发育中起着非常重要的作用, 不仅为生物合成提供还原力 NADPH, 为核酸的合成提供五碳糖, 还涉及到多种环境胁迫引起的植物应答反应, 如与一些金属离子 (如 Al^{3+}) 的胁迫^[13]、水分胁迫^[14]、盐胁迫^[15]、低温胁迫^[9]、病原菌侵染^[16] 等有关; 也有报道指出, *G6PDH* 还可以抑制 H_2O_2 诱导的细胞死亡^[17]。植物 *G6PDH* 存在 2 种形式, 一种存在于胞质中, 另一种存在于质体的基质中。

笔者克隆的 PsG6PDH 编码的氨基酸序列与植物胞质 G6PDH、烟草质体 G6PDH 的氨基酸一致率分别为 80% 和 40% 左右,而且质体 G6PDH 氨基酸的 N 端显著长于胞质 G6PDH, 编码一个转运肽 (transit peptide) 序列^[18], 但

PsG6PDH 编码蛋白序列没有转运肽,因此笔者认为,该文克隆的 PsG6PDH 编码的 G6PDH 为胞质 G6PDH。另外,笔者进行了系统发生树分析,发现 PsG6PDH 与毛果杨假想 G6PDH PtGP1 和 PtGp2 聚在一起,并隶属于胞质 G6PDH 家族,而且



注:箭头表示 PsG6PDH 在系统进化树中的位置。Mt: Monocotyledon; Dt: Dicotyledon; P: plastidic; Cy: cytosolic。

Note: The arrow indicated the PsG6PDH position in phylogeny tree. Mt: Monocotyledon; Dt: Dicotyledon; P: plastidic; Cy: cytosolic.

图 6 PsG6PDH 蛋白的系统进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis of G6PDH protein

表 1 用于构建 G6PDH 系统发生树的其他蛋白

Table 1 Other proteins from other constructing the phylogenetic tree of G6PDH

物种 Species	基因 Gene	代码 Code	蛋白类型 Protein type	物种 Species	基因 Gene	代码 Code	蛋白类型 Protein type
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtG6PD1	At1	P2	<i>O. sativa</i>	OsG6PD5	Os5	Cy
<i>A. thaliana</i>	AtG6PD2	At2	P1	<i>O. sativa</i>	OsG6PD6	Os6	Cy
<i>A. thaliana</i>	AtG6PD3	At3	P1	<i>Petroselinum crispum</i>	PsG6PD1	Pc1	P1
<i>A. thaliana</i>	AtG6PD4	At4	P	<i>P. crispum</i>	PsG6PD2	Pc2	Cy
<i>A. thaliana</i>	AtG6PD5	At5	Cy	<i>P. crispum</i>	PsG6PD3	Pc3	Cy
<i>A. thaliana</i>	AtG6PD6	At6	Cy	<i>Solanum tuberosum</i>	StG6PD1	St1	P1
<i>Medicago sativa</i>	MsG6PD	Ms	Cy	<i>S. tuberosum</i>	StG6PD2	St2	P1
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtG6PD1	Nt1	P2	<i>S. tuberosum</i>	StG6PD3	St3	P2
<i>N. tabacum</i>	NtG6PD2	Nt2	P1	<i>S. tuberosum</i>	StG6PD4	St4	Cy
<i>N. tabacum</i>	NtG6PD3	Nt3	P1	<i>Spinacia oleracea</i>	SoG6PD	So	P2
<i>N. tabacum</i>	NtG6PD4	Nt4	Cy	<i>Triticum aestivum</i>	TaG6PD1	Ta1	Cy
<i>N. tabacum</i>	NtG6PD5	Nt5	Cy	<i>T. aestivum</i>	TaG6PD2	Ta2	Cy
<i>Oryza sativa</i>	OsG6PD1	Os1	P1	<i>Populus suaveolens</i>	PsG6PD	Ps	Cy
<i>O. sativa</i>	OsG6PD2	Os2	P1	<i>P. trichocarpa</i>	PtG6PD1	Pt1	Cy
<i>O. sativa</i>	OsG6PD3	Os3	P2	<i>P. trichocarpa</i>	PtG6PD2	Pt2	Cy
<i>O. sativa</i>	OsG6PD4	Os4	Cy				

在氨基酸水平上,杨树 G6PDH 的同源性非常高,在 94% 以上,另外,与拟南芥、马铃薯、水稻、小麦等植物的胞质 G6PDH 同源性也在 80% 以上,这说明胞质 G6PDH 在植物界里都是比较保守的,可能预示着胞质 G6PDH 在植物的生长发育中起着重要作用。功能预测的结果显示,PsG6PDH 没有信号肽结构,因此它可能不是分泌型蛋白,不被分泌到细胞外;但其蛋白序列含有跨膜区,表明它可能作为膜受体起作用,也可能是定位于膜上的锚定蛋白。进一步分析发现,PsG6PDH 具

有多个磷酸化位点,并具有 G6PDH 家族的结构功能域及 G6PDH 蛋白的活性中心。这些证据都表明,PsG6PDH 是植物 G6PDH 蛋白家族的一个新成员。电子表达谱分析表明,G6PDH 在植物中几乎整株表达,而且在多种组织和不同发育过程中均表达,并涉及到逆境胁迫应答反应,同时,Southern 杂交结果显示,PsG6PDH 可能是单拷贝或者低拷贝,这也充分表明了 G6PDH 在植物生长发育中的重要地位。上述结果

(下转第 14097 页)

表 2 2008 年油菜品种六 020327A 和六 020327B (H16-1) 的抗逆性表现

Table 2 The resistance performance of rape varieties Liu 020327A and Liu 020327B (H16-1) in 2008

%

材料 Materials	抗倒性 Lodging resistance	抗寒性 Cold resistance		病毒病 Virus disease		菌核病 Sclerotinia rot	
		受冻率 Freezing rate	冻害指数 Freezing index	发病率 Incidence rate	病情指数 Disease index	发病率 Incidence rate	病情指数 Disease index
六 020327A	强	52.50	16.50	0.83	0.21	7.50	4.17
六 020327B	强	57.50	18.80	2.50	0.83	8.60	3.35
皖油 14(CK)	强	60.70	21.10	2.50	1.04	10.70	4.46

2.4 不育系配置组合的杂种优势表现 2006、2007 年用引进的恢复系和安徽省六安市农业科学研究所选育的恢复系进行杂交配组,六 020327A 具有很强的配合力,所配组合六

0601、六 0608、六 0703、六 0715 性状表现稳定,产量水平较高。2008~2009 年度进行比较试验,均比对照皖油 14 增产,增产幅度在 6.00%~18.20%(表 3)。

表 3 六 020327A 所配组合在比较试验中的表现

Table 3 The performance of Liu 020327A combinations in the comparison test

组合 Combinations	株高 cm Plant height	分枝高度 cm Branch height	一次有效分枝数//个 The number of the first effective branches	单株有效角果数//个 Effective silique number per plant	每角粒数//个 Grain number per silique	千粒重//g 1 000-grain weight	产量 kg/hm ² Yield	比 CK 增产//% Increased yield than CK
六 0601	168.30	45.80	9.60	487.30	21.50	3.79	2 941.50	6.10
六 0608	174.80	56.20	10.10	497.50	21.20	4.01	3 019.50	8.90
六 0703	165.20	35.60	10.60	507.30	20.00	4.29	3 277.50	18.20
六 0715	170.80	54.30	9.20	468.20	19.50	3.95	2 938.50	6.00
皖油 14(CK)	164.20	41.50	10.00	473.80	18.20	3.69	2 772.00	-

3 讨论

在众多胞质雄性不育系的研究报道中,一致认为微粉是胞质雄性不育类型中存在的普遍现象,多受环境因子的影响较大。不育系六 020327A 为细胞质雄性不育类型,虽败育程度高,但在初花期遇较强低温,个别花序仍有少量微粉现象,影响制度纯度,需进一步研究不育株的育性转化温度和适宜制度环境。对其雄性不育性的遗传控制原理以及微粉在单

株间存在差异的原因,也还需要进一步的研究探讨。

参考文献

(上接第 14058 页)

可为下一步研究 *PsG6PDH* 基因的分子功能提供参考。

参考文献

- [1] GILL R W, SANSEAU P. Rapid *in silico* cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs) [J]. *Biotechnol Annu Rev*, 2000, 5: 25-44.
- [2] OBRIEN K P, TAPIA-PAEZ L, STAHL-BACKDAHL M, et al. Characterization of five novel human genes in llq13-q22 region [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273: 90-94.
- [3] 黄骥, 王建飞, 张红生, 等. 水稻葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 cDNA 的电子克隆 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(11): 1012-1016.
- [4] 林元震. 甜杨葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的基因克隆及结构与功能鉴定 [D]. 北京: 北京林业大学, 2006: 44-66.
- [5] 林元震, 张志毅, 林善枝, 等. 运用基因组和 EST 数据库进行电子克隆分离杨树功能基因的策略 [J]. *分子植物育种*, 2007, 5(4): 583-587.
- [6] COPELAND L, TURNER J F. The regulation of glycolysis and the pentose-phosphate pathway [M] // STUMPT P K, CONN E E. *The biochemistry of plants*, Volume 11. New York: Academic Press, 1987: 107-125.
- [7] GRAEVE K, VON SCHAEWEN A, SCHEIBE R. Purification, characterization and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Plant J*, 1994, 5: 353-361.
- [8] DENNIS D T, HUANG Y, NEGM F B. Glycolysis, the pentose phosphate pathway and anaerobic respiration [M] // DENNIS D T. *Plant metabolism*. Harlow: Longman, 1997: 105-123.
- [9] LIN S Z, ZHANG Z Y, LIU W F, et al. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens* [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2005, 31(1): 34-40.

- [1] 傅廷栋. 油菜杂种优势研究利用的现状与思考 [J]. *中国油料作物学报*, 2008(30): 1-5.
- [2] 董振生, 刘绚霞, 董军刚, 等. 甘蓝型油菜细胞质雄性不育系 212A 的选育与研究 [J]. *中国油料作物学报*, 2003, 25(4): 31-34.
- [3] 傅廷栋. 杂交油菜的育种与利用 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1995.
- [10] 林元震, 林善枝, 张志毅, 等. 甜杨的组织培养和快速繁殖 [J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(4): 463.
- [11] LIN Y Z, LIN S Z, ZHANG Z Y, et al. One rapid and efficient method for isolation of total RNA from shoots regenerated in vitro of *Populus suaveolens* [J]. *Forestry Studies in China*, 2004, 6(1): 18-21.
- [12] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [13] SLASKI J J, ZHANG G, BASU U, et al. Aluminum resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) is associated with rapid, Al-induced changes in activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in root apices [J]. *Physiol Plant*, 1996, 98: 477-484.
- [14] 彭克勤, 夏石头, 李阳生. 涝害对早中稻生理特性及产量的影响 [J]. *湖南农业大学学报*, 2001, 27(3): 173-176.
- [15] NEMOTO Y, SASAKUMA T. Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Sci*, 2000, 158(1/2): 53-60.
- [16] LUDEK S M, LENKA B. Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissues and protoplasts [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37: 195-201.
- [17] TIAN W N, BRAUNSTEIN L D, APSE K, et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276: 1121-1131.
- [18] WAKAO S, BENNING C. Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2005, 41: 243-256.