

苎麻 UDPGDH 基因的 cDNA 克隆及表达分析

刘 峰¹, 黄 好², 郭清泉¹, 张学文², 李良勇³, 邓 晶², 谢玲玲¹

(¹湖南农业大学苎麻研究所, 长沙 410128; ²湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128;

³长沙市烟草公司浏阳市营销部, 湖南浏阳 410300)

摘要:【目的】分离苎麻尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶 (UDPGDH) 基因。【方法】通过简并引物 RT-PCR 结合 RACE 技术和半定量 RT-PCR。【结果】成功克隆苎麻 *Boehmeria nivea* (Linn.) Gaud. 尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶 (UDPGDH) 基因 cDNA 序列, 序列长 1 837 bp, 编码一 480 个氨基酸的蛋白质 (GenBank No. EF178294)。半定量 RT-PCR 分析显示, UDPGDH 在苎麻根、皮、茎和叶组织中均有表达, 其表达量为茎 > 皮 > 叶 > 根, 相对表达量依次为 0.7075, 0.3051, 0.2651, 0.1490。【结论】苎麻 UDPGDH 与其它植物相应序列具有较高同源性, 在苎麻茎中有较高的表达。

关键词: 苎麻; 尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶 (UDPGDH) 基因; cDNA 克隆; 表达分析

Cloning and Expression of UDP-glucose Dehydrogenase (UDPGDH) cDNA in Ramie (*Boehmeria nivea* (Linn.) Gaud.)

LIU Feng¹, HUANG Yu², GUO Qing-quan¹, ZHANG Xue-wen², LI Liang-yong³, DENG Jing², XIE Ling-ling¹

(¹Institution of Ramie, Hunan Agricultural University, Changsha 410128; ²College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128; ³Liuyang Marketing Department of Changsha Tobacco Company, Liuyang 410300, Hunan)

Abstract: 【Objective】This research attempted to isolate UDP-glucose dehydrogenase gene in ramie (*Boehmeria nivea*). 【Method】Degenerate primer was designed to amplify a fragment of UDPGDH gene so as to obtain the full length cDNA using RACE. The expression of UDPGDH gene in different tissues of ramie was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. 【Result】Full length ramie UDPGDH cDNA of 1 837 bp, encoding protein of 480 amino acids in reading frame (GenBank No. EF178294) was cloned. The expression of UDPGDH was found in leaf, stem, root and phloem in ramie. The expression levels in different tissues from stem, phloem, leaf, and root ranking high to low, with the relative content of 0.7075, 0.3051, 0.2651, 0.1490, respectively. 【Conclusion】Ramie (*Boehmeria nivea*) UDPGDH cDNA is homologous with other plants with the highest expression level in stem.

Key words: Rmaie (*Boehmeria nivea*); UDP-glucose dehydrogenase (UDPGDH; UGDH); cDNA cloning; Expression analysis

0 引言

【研究意义】苎麻是中国重要的纤维纺织原料作物之一^[1]。苎麻单纤维粗而长、强度高、品质好^[2]。但苎麻原麻中除含大量的纤维素外, 还含有数量不等的非纤维素物质(脂腊质、水溶物、果胶、半纤维素、木质素等), 必须通过脱胶才能获得可供纺织利用的苎麻纤维。对于苎麻纺织业中, 胶质已是脱胶工艺和

纺织品质量的制约因子^[1~4]。果胶和半纤维素是细胞壁的重要组成部分。在半纤维素和果胶中大部分糖(树胶醛糖、芹菜糖、半乳糖醛酸和木糖等)等直接或间接来源于由 UDPGDH 催化葡萄糖的产物尿苷二磷酸葡萄糖醛酸^[5]。因此, UDPGDH 是形成半纤维和果胶的关键酶。**【前人研究进展】**Deborah 等人利用特异型启动子将大豆 UDPGDH cDNA 正向导入紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 植物, 在温室内转基因植株的

收稿日期: 2007-11-08; 接受日期: 2008-01-23

基金项目: 国家自然科学基金 (30571186)

作者简介: 刘 峰 (1978-), 男, 湖南岳阳人, 博士, 研究方向为植物分子生物学。通讯作者郭清泉 (1957-), 男, 湖南长沙人, 教授, 研究方向为苎麻遗传育种。E-mail: qingqg@yahoo.com

UDPGDH 酶活性是对照的 7 倍, 在室外是 1.9 倍^[6]。Anna 等^[7]利用玉米 UDPGDH 的突变明显地抑制了其酶活性和下游聚多糖的合成。【本研究切入点】植物半纤维素和果胶代谢关系到纤维的产量和质量的问题, 研究韧皮纤维植物的半纤维素和果胶代谢利于定向改良纤维品质。目前在经济作物中, 杨树、烟草、玉米的 UDPGDH 研究较深入, 并对其功能结构进行了详细的研究^[7~10], 但尚未见关于芒麻 UDPGDH 相关研究的报道。【拟解决的关键问题】本文通过对芒麻 UDPGDH 的分离、序列分析及表达研究, 为芒麻纤维品质的分子遗传改良打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

芒麻 *Boehmeria nivea* (Linn.) Gaud. 栽培种湘芒 3 号。

1.2 方法

研究采用生物信息学辅助分析, 通过简并 PCR 结合 RACE 技术克隆芒麻尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶 (UDPGDH) 基因, 并通过半定量 RT-PCR 的方法研究其在芒麻不同组织中的相对表达量。

1.3 芒麻 UDPGDH cDNA 序列的克隆

1.3.1 芒麻 UDPGDH cDNA 序列中间片段的克隆 取田间芒麻茎杆上部幼嫩茎段组织约 100 mg, 按安比奥公司 RNA 提取试剂说明书操作, 提取总 RNA。运用 BLAST 程序对 GenBank 进行联机搜索所有已克隆的有关基因序列, 选取 SCORE 和 E 值较高的前 10 个序列以在线 CLUSTALW1.82 程序进行序列多重比对分别在 N 末端和 C 末端找到两个高度保守的氨基酸区域, 设计简并引物 Forward primer U1 5'-ACHATG GCWGTSATYGCCT-3'; Reverse primer U2: 5'-GTT VACAAAYCGRTCTTCTG-3'。采用 RevertAidTM First Strand Synthesis Kit (Fermentas) 合成 cDNA 第一链。使用 Eppendorf 5331 梯度 PCR 仪进行 PCR, 反应程序为 95℃ 预变性 4 min、94℃ 变性 1 min、53℃ 退火 50 s、72℃ 延伸 3 min 共 35 循环, 最后 72℃ 延伸 15 min。

将 PCR 产物采用安比奥公司凝胶回收试剂盒进行切胶、回收、纯化。连接到 pMD18-T (TaKaRa) 载体上, 热激转化到大肠杆菌 InvαF 感受态细胞, 进行 Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选。选取白色菌落做菌落 PCR, 将检测为阳性的菌落进行液体培养, 强碱法进行质粒 DNA 分离, 以限制性内切酶

*Eco*R I 和 *Hind*III 酶切, 检测重组质粒插入目的片段的情况。选取 PCR 检测及酶切检测均为阳性的菌落送英骏生物技术公司测序。

1.3.2 芒麻 UDPGDH cDNA 5'端和 3'端序列的克隆 采用 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience, Clontech) 试剂盒进行 3' 端和 5' 端的 RACE 反应。3'RACE 反应根据获得的芒麻 UDPGDH 中间片段设计基因特异引物 GSP2: 5'-GCGTTGAAG GCTGTTTATGCTAACTGGG-3'; 5'RACE 根据获得的芒麻 UDPGDH 合成酶基因中间序列设计特异扩增引物 GSP1: 5'-GACCTGTTCCAGTATTCTGCCACCT CC-3'。将 3' RACE 产物和 5' RACE 产物分别回收, 并连接到 pMD18-T 载体上, 按照 1.3.1 的方法经过菌落 PCR 及双酶切鉴定, 分别挑取阳性单菌落, 送上海英骏生物技术公司测序。

1.3.3 芒麻 UDPGDH 序列拼接及生物信息学分析 序列比对、序列拼接在 Clustal X 软件上进行, GenBank BLAST 和蛋白质序列的 CDD 搜索在 NCBI 网站上进行, 蛋白质结构分析在 <http://www.predictprotein.org/> 网站上进行。

1.4 芒麻 UDPGDH 在芒麻不同组织中的表达

以 Actin 为内参基因, UDPGDH 非保守区域为检测目的基因, 应用 RT-PCR 技术对芒麻 UDPGDH 的表达进行半定量, 建立一个特异、稳定的 RT-PCR 半定量检测体系, 重复 3 次。

1.4.1 芒麻不同组织总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 分别提取芒麻侧根、茎、皮(韧皮部)和叶总 RNA (样品均为三麻幼嫩组织), 各别取 10 μg 总 RNA 采用 RevertAidTM First Strand Synthesis Kit (Fermentas) 以随即引物进行反转录合成 cDNA 第一链。

1.4.2 以 cDNA 为模板的 PCR 以随机引物进行反转录, 以 Actin 基因为内参进行 PCR 扩增。目的基因扩增引物为 Forward primer UDPGDH1 : 5'-ATTGTATTCGTCTGTCAA-3'; Reverse primer UDPGDH2: 5'-ACGGCAGGCATGTCCTTGAGCC-3'。Actin 基因扩增引物为 Forward primer Actin1 : 5'-GGACGTGACCTCACAGATTCCCT-3' ; Reverse primer Actin2: 5'-TCCGATTGTGATGATTGGCCAT-3'。Actin 基因与目的基因采用同机分管扩增, PCR 体系 25 μl, 含无菌去离子水 (16.2 μl)、10×PCR buffer (2.5 μl)、10 mmol·L⁻¹ dNTP Mix (2.5 mmol·L⁻¹, 1 μl)、100 μmol·L⁻¹ Forward primer (0.15 μl)、100 μmol·L⁻¹ Reverse primer (0.15 μl)、1 U·μl⁻¹ Taq DNA polymerase

(1 μl)、25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ (3 μl)、RT mixture (1 μl)。

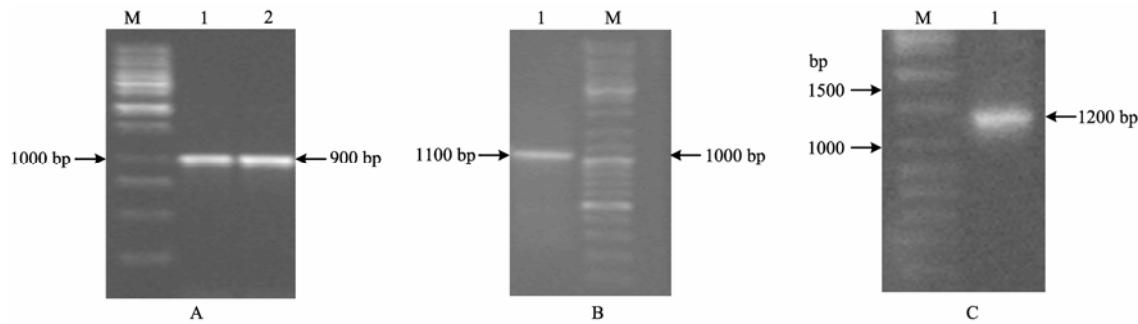
PCR 程序为 95°C 预变性 4 min、94°C 变性 1 min、53°C 退火 50 s、72°C 延伸 1 min, 循环 25~30 次, 最后 72°C 延伸 10 min。

1.4.3 PCR 产物电泳和分析 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并凝胶成像系统成像, 以凝胶定量分析软件 Bandscan 对电泳图进行条带密度扫描, 分别获得不同组织、不同反应循环数的 UDPGDH 和 Actin 基因的条带整合光密度值 (Integrated Optical Density, IOD)。

2 结果与分析

2.1 芒麻 UDPGDH cDNA 序列的克隆

UDPGDH cDNA 序列中间片段、5' 端序列和 3' 端序列的克隆结果分别见图 1。以 cDNA 为模板, 中间片段扩增反应中, 以 U1 与 U2 引物扩增得到约 900 bp 的条带; 3'RACE 扩增反应中, 以 GSP2 与 UPM 引物扩增得到约 1.2 kb 的条带; 5'RACE 扩增反应中, 以 GSP1 与 UPM 引物扩增得到约 1.1 kb 的条带。



A: 基因片段; B: 5' 端序列 RACE 结果; C: 3' 端序列 RACE 结果
A: Fragment of UDPGDH; B: 5' RACE result; C: 3' RACE result

图 1 UDPGDH 基因片段扩增结果

Fig. 1 PCR product of UDPGDH

2.2 芒麻 UDPGDH cDNA 序列测定及生物信息学分析

2.2.1 测序结果与序列分析 对序列测序结果进行拼接后获得长 1 837 bp 的核酸序列, 编码一段 480 个氨基酸的推导性蛋白质 (图 2)。将 UDPGDH cDNA 全部序列及推导性蛋白质与 GenBank 中的序列进行同源性比较, 发现该基因核苷酸序列与大豆 (*Glycine max* U53418)、杨树 (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* AF053973)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* AC119411)、烟草 (*Nicotiana tabacum* AY619949)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* AK226539)、芋头 (*Colocasia esculenta* AY222335) 和毛叶樟 (*Cinnamomum osmophloeum* AY49607) 等植物中的 UDPGDH 基因具有较高的同源性, 同源性为 78%; 氨基酸水平上与烟草 (*Nicotiana tabacum* AAT40105.)、毛叶樟 (*Cinnamomum osmophloeum* AAR84297)、水稻 (*Oryza sativa* ABA97736)、大豆 (*Glycine max* AAB58398)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* NP_197053)、杨树 (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* AAF04455) 等植物的 UDPGDH cDNA 同

源性均大于 95%。核酸水平和蛋白质水平上均与烟草 UDPGDH cDNA 同源性最高, 分别为 81% 和 95%, 与来自人肝和果蝇的 UDPGDH cDNA 同源性约在 60%。因为由 UDPGDH 反应的产物尿苷二磷酸葡萄糖醛酸生成不同的多聚糖, 在植物中主要是半纤维素和果胶, 在昆虫和动物中主要是类蛋白、包层、肝磷脂以及各种晶体产物^[11], 这表明它们在蛋白质结构上也有很大的相似性。同时也表明笔者已经成功地克隆了芒麻 UDPGDH cDNA 全序列。也是报道的第一个荨麻科 (*Urticaceae*) 植物 UDPGDH。将该基因登陆到 GenBank, 登录号: EF178294。

2.2.2 芒麻 UDPGDH 编码蛋白结构特征分析 通过对芒麻 UDPGDH 蛋白质结构特征进行分析, 结果显示在芒麻 UDPGDH 蛋白质序列中包含了 N-糖基化位点 (aa #243、263)、粘多糖结合位点 (aa #93)、依赖 cAMP 和 cGMP 蛋白激酶磷酸化位点 (aa #335、398)、蛋白激酶 C 磷酸化位点 (aa #119、323、396)、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (aa #70、77、104、117、154、361、420)、酪氨酸激酶磷酸化位点 (aa #99)、N-

GATACACTC

```

TCTTCCTCATTTCTCTCTCTCTCTCGTGAAAGACAAAAACAGACTCAGAATTGAGGAGGTTATAGAGTGTGATCAGAACAG
1 M V K I C C I G A G Y V G G P T M A V I A L K C P A I E V A
1 ATGGTGAAGATCTGCTGCATTGGTCCGGATATGTTGGTGGCCAACAATGGCTTATTGACTTAAGTGCCCGCCATTGAAGTGGCT
31 V V D I S V S R I T A W N S D Q L P I Y E P G L D A V V K Q
91 GTCGTGCGATATCTGCTCTCGGATCACAGCGTGGAAACAGCGACCAGCTCCCATCTACGACCGCTGGCTTGATGCTGTGGTGAAGCAA
61 C R G K N L F F S T D V E K H V S E A D I V F V S V N T P T
181 TGCCGTGGCAAGAACCTCTCTCAGCACCGATGTTGAGAAGCAGCTCTGAAGCTGATATTGATTTGTCTCTGCAACACACCAACC
91 K T S G L G A G K A A D L T Y W E S A A R M I A D V S K S D
271 AAAACTAGTGGTCTGGAGCTGGCAAAGCCGAGACTGACTATTGGAAAGCGCAGCCGTATGATGTGCTGAAAGTCAGAC
121 K I V V E E S T V P V K T A E A I E K I L T H N S K G I K F
361 AAGATTGTTGAGAACATCACAGTCCCCTGCAAGACTGCTGAAGCCATTGAGAAAATTCTGACCCACAACAGCAAGGGTATCAAGTTC
151 Q I L S N P E F L A E G T A I Q D L F S P D R V L I G G R E
451 CAAATCCTTCAAACCCAGAATTCTGCGGAGGGAACTGCAATTCAAGATCTGTTAGCCCCGACCGTGTCTTATCGTGGCAGGGAA
181 T P E G E K A I Q A L K A V Y A N W V P E D R I L T T N L W
541 ACCCCAGAGGGCGAGAACGCTCAAGCGTTGAAGGCTGTTAGCTAAGCTGGTCCCGAAGACAGAACATCTGACCAATCTG
211 S A E L S K L A A A N A F L A Q R I S S V N A M S A L C E A T
631 TCTGCCGAGCTCTCAAGCTCGTGCAAGCCTTCTGGCCAGAGGATTCTCTGCAATGCCATGTCAGCTCTTGAGGCCACC
241 G A N I T E V S Y A V G K D S R I G P K F L N A S V G F G G
721 GGGGCAACATCACCGAGGTCTATGCCGTGAAAGGACTCAAGAACGCGCCAAGTCTCTCAATGCTAGTGTGTTTCGGTGG
271 S C F Q K D I L N L V Y I C E C N G L P E V A E Y W K Q V I
811 TCCTGCTCCAGAAGGATATTCTGAACCTGGTTACATCTGCGAATGTAATGGCTCCGGAGGTGGCAGAATACTGGAAACAGGTATC
301 K I N D Y Q K N R F V N R V V S S M F N T V S N K K I A V L
901 AAGATCAATGACTACCAGAGAACCCGTTGTGAACCGTGTGCTCTCTCATGTCACACGGCTCGAACAGAACATTGCGTTCT
331 G S A F K K D T G D T R E T P A I D V C K G L L G G K A R L
991 GGGTCTGCGTTCAAGAACAGACCCGGTACACGAGAGAGACCCAGCCATTGATGCTGCAAGGGCTTTGGTGGCAAGGCCGCTG
361 S I Y D P Q V T E D Q I Q R D L V M N K F D W D H P L H L Q
1081 AGCATCTACGACCCCGAGGTACTGAGGACAGATCCAGAGGGACCTCGTGTGAACAAATTGACTGGGACCACCCCTTCACCTGCAG
391 P M S P T T V K R V S V V W D A Y E A T K G A H G V C I L T
1171 CCAATGAGCCCCACGACCGTGAAGCGAGTCAGCGTGGCTGGACGCCCTACGAGGCCACAAAGGCCTCACGGTGTGTCATCCTGACC
421 E W D E F K N L D Y K K I Y D N M Q K P A F I F D G R N I A
1261 GAGTGGGATGAGTCAGAACATCGACTACAAGAAGATATCGACAAACATGCAAGAACACAGCGTTATTCGACGGTAGGAACATGCC
451 D M D K L R E I G F I V Y S I G K P L D G W L K D M P A V A
1351 GACATGGACAAGCTCGTGAATCGGATTCTGTATACTCCATTGGCAAGCCCTCGACGGCTGGCTCAAGGACATGCCGTGGCT
481 *
1441 TAGAAGTGGACACTCGGCTCCACCGCTCTCGCGTGAATCTAACACTCATACCTTGAGGCGAGTCAGTTAACATTCTTACAAAATT
TTAATGGTTTTGTTCTGACTTCCCGTAGTGTGTGTCAGGATAATGGTACAACATGGTAAAGTAAGAAGCTATGTTGCTT
TGCATTGAATTGATTATATTGTCTGTTACCTTTGTTAGAACACATCATATGATATTGGTGGTCAATCTACTATCATTACTACAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 芒麻 UDPGDH 基因 cDNA 及推导氨基酸序列

Fig. 2 Full length cDNA and putative amino-acid sequences of UDPGDH in ramie

肉豆蔻酰化位点 (aa #94、241、352)、蛋白剪接信号 (aa #138) 和原核膜脂蛋白脂结合位点 (aa #262) 等功能性模体。

来源于不同真核生物的 UDPGDH 比较保守，蛋白质分子量为 52~53 kD^[11~15]，在蛋白质结构序列 89 和 156 被认为是主链折曲位点。在 216~219 和 335~338 位点有两个 Lys 残基，其中的某个残基涉及到前半个酶促反应 (conversion of UDP-glucose to UDP-aldehydoglucose)；在 (aa #272) 有一个重要的 Cys 残基，可能是涉及到后半个酶促反应 (conversion of

UDP-aldehydoglucose to UDP-glucuronate)^[11]，真核生物的 UDPGDH 蛋白质的中间部分有一个催化位点 (GFGGSCFQKDIL) 也可能涉及到后半个酶促反应。通过对牛的 UDPGDH 蛋白质的化学改造已经证明，在 N-terminus (aa #8~14) 具有辅酶结合特征的 GXGXXGG 位点^[16]。这些特点与在其它真核生物 UDPGDH 蛋白中的研究结果较一致，而与原核生物表现出很少的同源性 (图 3)。其差异可能是由于进化导致了不同的反应机制。

另外，在芒麻 UDPGDH cDNA 序列 5'UTR 中还

苎麻 Ramie	8	G A G Y V G G P T M A	18	267	G F G G S C F Q K D I L	278
大豆 Soybean	8	G A G Y V G G P T M A	18	267	G F G G S C F Q K D I L	278
白杨 Poplar	8	G A G Y V G G P T M A	18	267	G F G G S C F Q K D I L	278
拟南芥 <i>A. thaliana</i>	8	G A G Y V G G P T M A	18	267	G F G G S C F Q K D I L	278
牛 Bovine	11	G A G Y V G G P T C S	21	270	G F G G S C F Q K D V L	291
果蝇 Fruit fly	7	G A G Y V G G P T C A	17	267	G F G G S C F Q K D I L	278
蓝细菌 <i>Synechocystis</i>	7	G [T] G Y V G [L V] T C S	17	277	G [W] G G S C F P K D I L	288
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	11	G A G Y V G L S N C S	21	252	G Y G G Y C L P K D I L	263

A. UDPGDH 的 NAD-辅助因子结合位点 NAD-cofactor binding site of UDPGDH

B. 催化位点 Catalytic site

图 3 不同物种 NAD-辅助因子结合位点和 UDPGDH 催化位点比较

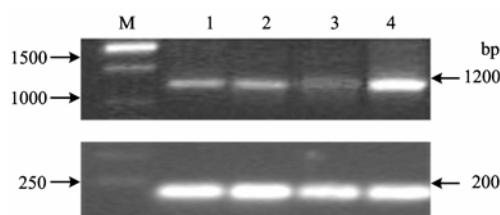
Fig. 3 Comparison of amino acid motifs for (A) a putative NAD-cofactor binding site and (B) a catalytic site of UDPGDH from various sources

发现了逆境胁迫响应元件(富含 TC 重复序列(TC rich repeats), 核心序列为 ATTTTCTTCT)^[17]。

2.3 半定量 RT-PCR 结果

通过对目的基因 UGDH1-2 和苎麻 Actin 基因引物最佳退火温度、镁离子浓度优化, 以及 PCR 反应循环数的确定, 得到目的基因及 Actin 基因扩增体系中最佳镁离子浓度为 2.5 mmol·L⁻¹, 退火温度为 49℃, 反应循环数为 35 个循环。在此反应条件下, 以不同苎麻组织 cDNA 为模板, 每一组样品以 Actin 作为内参照, 分别在相同反应条件下进行 3 次平行 PCR 扩增。PCR 产物电泳结果表明, 目的基因扩增产物只在约 1.2 Kb 处有一特异性条带, 内参 Actin 基因扩增产物只在约 200 bp 处有一特异性条带, 其均与预期大小一致(图 4)。

从数据来看(图 4, 图 5), 苧麻 UDPGDH 在苎



M: 1 kb DNA 分子量标准; 1: 皮; 2: 叶; 3: 根; 4: 茎
M: 1 kb DNA marker; 1: Phloem; 2: Stem; 3: Leaf; 4: Root

图 4 苧麻不同组织中 *Udpgh* 和 *Actin* 基因 RT-PCR 扩增产物电泳分析

Fig. 4 Gel electrophoresis result of UDPGDH and Actin gene RT-PCR products from different ramie tissues

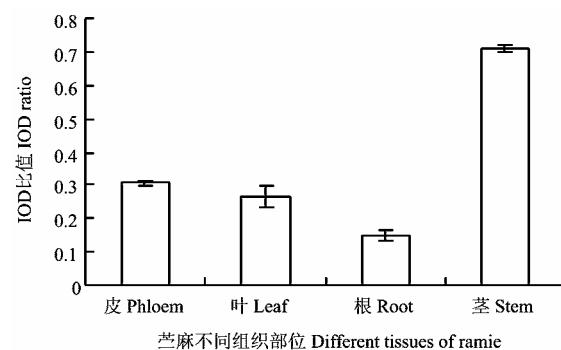


图 5 苧麻不同组织 UDPGDH 基因表达的相对含量

Fig. 5 Relative content of ramie UDPGDH gene expression in different tissues

麻多个组织中均有表达。苎麻 UDPGDH 根、茎、叶和皮的相对表达量分别为 0.1490、0.7075、0.2650 和 0.3051, 即茎>皮>叶>根。表明苎麻 UDPGDH 主要在茎中表达, 其次在韧皮部和叶中, 在根中表达最少。

3 讨论

除了植物外, 一些细菌、真菌和动物也可以合成半纤维素或果胶^[18], 形成果胶和半纤维素的一些重要前体物如: GalUA, Xyl, Ara 都要经过 UDP-GlcUA, 而 UDP-GlcUA 又需要 UDPGDH 酶催化^[5,19-21]。UDPGDH 在原核生物中 1993 年被分离, 1994 年首次在真核生物(牛肝)中被克隆^[22], 1996 年第一次在高等植物(大豆)中分离^[5], 其后 UDPGDH 在杨树、芋头、樟树、葡萄、香蕉、苎麻等植物中相继被克隆。

来源于不同物种的 UDPGDH 比较保守，在植物中该基因核酸序列的同源性较高，但与原核生物基因间同源性较低。UDPGDH 序列包含了一个 NAD 结合位点和一个催化中心^[22]，在氨基酸序列 272 存在一个 Cys 残基在其周围的几个氨基酸无论在原核还是真核生物的核苷糖脱氢酶序列中都高度保守，两个 Pro 残基(氨基酸序列的 89 和 156)被认为是此蛋白质结构的拐点^[5]。在 UDPGDH cDNA 序列 5'UTR 中还发现了逆境胁迫响应元件(富含 TC 重复序列, (TC rich repeats), 核心序列为 ATTTTCTTCT)^[17]，在其它植物 UDPGDH 序列的 5'UTR 中也发现了类似的 TC 重复序列。在玉米、烟草中均发现了两个高度相似的 UDPGDH 序列，研究表明玉米 UDPGDHA 比 UDPGHB 具有更强的活性^[7,8]。

研究已经表明 UDPGDH 在不同的物种和组织中，其表达的部位和水平有较大差异。在大豆主根尖和侧根中有高量表达，上胚轴和幼叶次之，在主根、下胚轴及成熟叶中最少^[5]。而杨树主要存在于幼叶和未成熟的木质部中，在成熟叶中有少量表达，在成熟韧皮部中几乎没有表达。其蛋白质的表达量无论哪个生育阶段在木质部和叶中都较高，而在韧皮部表达量最低^[9]。在拟南芥不同的组织合成 UDP-GlcA 的主导途径也不一样，在出苗后 5 d UDPGDH 主要在根部表达，然而成熟的植株主要在维管束系统表达^[19,23]。本试验在三麻时期芒麻的侧根、茎、叶、韧皮部 4 种组织中均检测到了 UDPGDH 的表达，结果表明芒麻 UDPGDH 主要在茎中表达，其次在韧皮部和叶中，在根中表达最少。目前的研究已经证明 UDPGDH 在幼嫩的组织有非常高的表达，特别是茎形成层以内的部分，而在植物成熟组织中表达量很少，这说明此酶在形成细胞壁半纤维素前体物过程中起着非常重要的作用。事实也证明在生长组织中 UDPGDH 的活性与组织对半纤维素或果胶前体物的需求具有很强的相关性。如果 UDPGDH 在细胞壁半纤维素、果胶和在细胞壁结构、功能特点上起着重要的作用^[24,25]，那么通过分子生物技术调控半纤维素、果胶含量 UDPGDH 将是一个重要的靶酶。因此，对 UDPGDH 的表达规律及功能有待进一步研究。

4 结论

首次成功克隆芒麻 UDPGDH 基因全部 cDNA 序列，序列长 1 837 bp，编码区长 1 440 bp，编码一段 480 个氨基酸的蛋白质。其蛋白质序列包含植物

UDPGDH 全部功能性基序 (motif)。UDPGDH 在三麻时期芒麻的侧根、茎、叶、皮四种组织中均有表达，茎中表达量最高。

References

- [1] 郭清泉, 胡日生, 孙焕良. 芒麻胶质的基因型差异与成因及育种中利用研究(I). 湖南农业大学学报(自然科学版), 2000, (5): 341-342.
Guo Q Q, Hu R S, Sun H L. Genotype differences or Non-cellulose matter in ramie and its contributing factors and its application in ramie breeding(I). *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2000, (5): 341-342. (in Chinese)
- [2] 郭清泉, 胡日生, 孙焕良. 芒麻胶质的基因型差异与成因及育种中利用研究(II). 湖南农业大学学报(自然科学版), 2000, (6): 421-424.
Guo Q Q, Hu R S, Sun H L. Genotype differences of non-cellulose matter in ramie and its contributing factors and its application in ramie breeding (II). *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2000, (6): 421-424. (in Chinese)
- [3] 郭清泉, 胡日生, 孙焕良. 芒麻胶质的基因型差异与成因及育种中利用研究(III). 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001, (4): 268-230.
Guo Q Q, Hu R S, Sun H L. Genotype differences of non-cellulose matter in ramie and its contributing factors and its application in ramie breeding (III). *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2001, (4): 268-230. (in Chinese)
- [4] 陈建荣, 郭清泉, 张学文. 芒麻 CCoAOMT 基因全长 cDNA 克隆与序列分析. 中国农业科学, 2006, (5): 1058-1063.
Chen J R, Guo Q Q, Zhang X W. Cloning full length of ramie caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase cDNA and sequence analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, (5): 1058-1063. (in Chinese)
- [5] Raimund Tenhaken, Oliver Thulke. Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide-sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean: UDP-glucose dehydrogenase. *Plant Physiology*, 1996, 112: 1127-1134.
- [6] Debora. Samac Lynn Litterer. Expression of UDP-glucose dehydrogenase reduces cell-wall polysaccharide concentration and increases xylose content in Alfalfa stems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, 116: 1167-1182.
- [7] Anna K-Ark Onen. UDP-glucose dehydrogenases of maize: a role in cell wall pentose biosynthesis. *Biochemistry*, 2005, 391: 409-415.
- [8] Bindschedler L V. Characterisation and expression of the pathway from UDP-glucose to UDP-xylose in differentiating tobacco tissue. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57: 285-301.
- [9] Johansson H. Molecular cloning and characterization of a cDNA

- encoding poplar UDP-glucose dehydrogenase, a key gene of hemicellulose/pectin formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1576: 53-58.
- [10] Xue G, Penney L C. Active site residues and mechanism of UDP-glucose dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271: 14-22.
- [11] Hempel J, Perozich J, Romovacek H, Hinich A, Kuo I, Feingold D S. UDP-glucose dehydrogenase from bovine liver—primary structure and relationship to other dehydrogenases. *Protein Science*, 1994, 3: 1074-1080.
- [12] He Q H, Qiao D R, Zhang Q L. Cloning and expression studies of the *Dunaliella salina* UDP-glucose dehydrogenase cDNA. *DNA Sequence*, 2005, 3: 202-206.
- [13] Lind T, Falk E, Hjertson E. cDNA cloning and expression of UDP-glucose dehydrogenase from bovine kidney. *Oxford University*, 1999, 6: 595-600.
- [14] Griffith C L, Klutts J S, Zhang L, Levery S B, Doering T L. UDP-glucose dehydrogenase plays multiple roles in the biology of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biology Chemistry*, 2004, 279: 51669-51676.
- [15] Elisabet R, Ian R, Kerstin L. Overexpression of UDP-glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* results in decreased biosynthesis of K5 polysaccharide. *Biochemistry Journal*, 2003, 374: 767-772.
- [16] Franzen B, Carruba C, Feingold D S, Ashcom J, Franzen J S. Amino acid sequence of the tryptic peptide containing the catalytic-site thiol of bovine UDP-glucose dehydrogenase. *Biochemistry Journal*, 1981, 199: 599-602.
- [17] Diaz-De-Leon F, Klotz L K, Lagrimini L M. Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. *Plant Physiology*, 1993, 101: 1117-1118.
- [18] Gibeaut D M, Carpita N C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB*, 1994, 8: 904-915.
- [19] Seitz B, Kloot C, Wurm M. Matrix polysaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. *The Plant Journal*, 2000, 21: 537-546.
- [20] Verweris C, Georghiou K, Christodoulakis N, Santas P, Santas R. Fiber dimensions, lignin and cellulose content of various plant materials and their suitability for paper production. *Industrial Crops and Products*, 2004, 19: 245-254.
- [21] Wróbel-Kwiatkowska M, Zebrowski J, Starzycki M, Oszmiański J, Szopa J. Engineering of PHB synthesis caused improved elastic properties of flax fibres. *Biotechnology Progress*, 2007, 23: 269-277.
- [22] Campbell R E, Sala R F. Properties and kinetic analysis of UDP-glucose dehydrogenase from group A *Streptococci*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 6: 3416-3422.
- [23] Kanter U, Usadel B, Guerineau F. The inositol oxygenase gene family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides. *Planta*, 2005, 2: 243-254.
- [24] Kärkönen A. Biosynthesis of UDP-GlcA: Via UDPGDH or the myo-inositol oxidation pathway? *Plant Biosystems*, 2005, 1: 46-49.
- [25] Wróbel M, Źebrowski J, Szopa J. Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax. *Biotechnology*, 2004, 107: 41-54.

(责任编辑 于 竞)