

苹果 L-半乳糖脱氢酶基因 cDNA 全长的 克隆与序列分析

肖妮娜, 马锋旺, 张军科, 梁 东

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] L-半乳糖脱氢酶(L-Galactose dehydrogenase, GalDH)是维生素 C 合成的 L-半乳糖途径中,催化 L-半乳糖生成 L-半乳糖内酯的关键酶。根据 GenBank 中登录的 *GalDH* cDNA 序列设计 1 对扩增引物,以嘎拉苹果叶片为材料,采用 RT-PCR 法扩增出 *GalDH* cDNA 全长。将获得的基因片段克隆到 pMD18-T 载体上,转入大肠杆菌 DH5 α 筛选阳性克隆,经酶切和 PCR 鉴定,并对插入片段进行序列分析,结果表明,本试验获得的 cDNA 片段长为 1 111 bp,是苹果 *GalDH* cDNA 全长。

[关键词] 苹果; *GalDH*; RT-PCR; 克隆; 序列分析

[中图分类号] S651.036; Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)04-0175-04

Cloning and sequence analysis of full-length cDNA encoding L-Galactose dehydrogenase from apple

XIAO Ni-na, MA Feng-wang, ZHANG Jun-ke, LIANG Dong

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: L-Galactose dehydrogenase (L-GalDH) is the key enzyme of ascorbate biosynthesis and oxidizing L-Gal to L-galactono-1,4-lactone. Full-length cDNA encoding *L-GalDH* was cloned from Royal Gala apple (*Malus Pumila* Mill cv. Royal Gala) leaves by RT-PCR method according to the homologous gene in GenBank. Then the target fragment was purified from agarose gels and integrated into pMD18-T cloning vector. After being transformed into *E. coli* DH 5 α , tested by restriction endonuclease digestion and PC, the screened positive clone was sequenced. Sequencing analysis shows that the length of the cDNA of apple GalDH is 1 111 bp, which is the full-length cDNA of *GalDH*.

Key words: apple; L-Galactose dehydrogenase; RT-PCR; cloning; sequencing analysis

维生素 C 又叫抗坏血酸(Ascorbic acid, AsA), 是植物和大多数动物体内合成的一类己糖内酯化合物。植物中的 AsA 不仅为人类提供丰富的维生素 C 源,同时对植物自身也有非常重要的生理作用。由于人类缺乏其合成的关键酶而只能从食物中获取 AsA,因此 AsA 含量已成为衡量农产品品质的重要

指标。

近年来的研究表明,AsA 是一种普遍存在于植物组织的高丰度小分子抗氧化物质,在植物抗氧化、光合保护以及调节生长发育等方面具有非常重要的生理功能,其作用主要体现在以下几个方面^[1-7]:(1) 在植物抗氧化和清除自由基中具有重要作用;(2) 参

[收稿日期] 2006-03-19

[基金项目] 西北农林科技大学“拔尖人才支持计划”项目

[作者简介] 肖妮娜(1979-),女,陕西长安人,在读硕士,主要从事果树生物技术研究。

[通讯作者] 马锋旺(1964-),男,山东汶上人,教授,博士,博士生导师,主要从事果树抗性生理与生物技术改良研究。

E-mail: fwm64@sina.com

与植物细胞氧化还原平衡的调节,是一种重要的氧化还原缓冲剂;(3)参与某些基因转录和翻译的调节;(4)调节酶的活性,可作为一些酶的辅酶;(5)参与植物细胞壁的合成、伸长和交联;(6)调节细胞的分裂和伸长;(7)参与某些次生代谢物和乙烯的合成。

目前对高等植物的研究表明,AsA 合成可能有碳链倒位途径、邻酮醛糖途径、L-半乳糖途径及糖醛酸转变途径等共存途径^[3,8-9],但主要以 L-半乳糖途径(Smirnof-Wheeler 途径)合成 AsA^[1,10-11]。在该途径中,L-半乳糖脱氢酶(GalDH)直接催化 L-半乳糖形成 L-半乳糖内酯,起着关键酶的作用^[12]。

目前国内对苹果 AsA 积累机理的研究尚未涉及,对其合成和积累 AsA 这一复杂过程中所涉及的酶在分子水平上的作用机制也有待进一步研究。本试验拟从苹果中克隆出 GalDH 基因,探讨其与其他植物同源基因的相似性,为今后苹果的抗性育种、提高其营养品质及研究苹果 AsA 积累的分子机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为苹果(*Malus pumila* Mill.)品种“皇家嘎拉”的幼嫩叶片,采自西北农林科技大学园艺场苹果资源圃。采集后用液氮速冻,然后保存于-70℃冰箱中备用。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中登录的苹果 GalDH cDNA 序列的保守区域,用 Primer 5.0 设计 1 对扩增引物,上游扩增引物为:5'-AAACAATG-GCTTCACAACCG-3',下游扩增引物为:5'-CT-TAGCATTTACATCTCACCCA-3'。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 RNA 提取与质量检测 取快速冷冻保存的幼嫩嘎拉苹果叶片,用改良的 SDS-酚法提取总 RNA^[13]。用 9 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取质量,用紫外分光光度计测其在 230,260 和 280 nm 下的 OD 值以定量。

1.2.3 RT-PCR 反应 将提取的 RNA 70℃水浴 10 min 后用于反转录。反转录引物用六碱基随机引物,反应体系为:25 mmol/L 的 MgCl₂ 1.6 μL,5×RT 缓冲液 4 μL,10 mmol/L 的 dNTP 2 μL,RNA 酶抑制剂 20 U,M-MLV 反转录酶 150 U,10 mmol/L 的六聚随机引物 2 μL,RNA 1 μg,加入

DEPC 水使终体积为 20 μL。反应参数为:室温放置 10 min→42℃,15 min→95℃,5 min→0~5℃,5 min,最后于-20℃保存备用。

取 1 μL 反转录液为模板,用设计的 2 条特异引物进行 PCR 反应。反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,51℃退火 40 s,72℃延伸 90 s,循环 38 次;最后 72℃延伸 7 min。

1.2.4 产物回收与目的片段的克隆 将 PCR 产物用 12 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,切下约 1 100 bp 的目的条带,用 B 型小量 DNA 片段快速回收试剂盒回收(方法按试剂盒说明进行,BioDev)。将回收产物与 pMD 18-T 载体(TaKaRa)在 16℃连接 1.5 h。体系为:50 ng/μL 载体 1 μL,回收片段 50 ng,反应连接液 5 μL,然后转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,并涂布在含有 100 mg/L Amp、24 mg/L IPTG 和 40 mg/L X-Gal 的 LB 固体平板上,37℃避光培养 14~16 h。

1.2.5 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定 挑取培养基上的白色菌斑置于含 100 mg/L Amp 的 LB 液体培养基中,于 37℃、200 r/min 条件下培养 12~14 h,用质粒微量抽提试剂盒(U-gene)提取质粒 DNA,然后用 EcoR I 和 Sal I 对质粒 DNA 进行双酶切鉴定和 PCR 检测。

1.2.6 目的片段的序列测定 将经过酶切和 PCR 检测的确定带有目的片段的菌落穿刺培养,送于上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 “皇家嘎拉”苹果叶片的 RNA 提取与质量鉴定

RNA 的质量对反转录的影响很大。从图 1 可以看出,用改良的 SDS-酚法提取的“皇家嘎拉”苹果叶片 RNA,其 28 S 和 18 S rRNA 2 条主带较亮,也可见跑在最前面的 5 S rRNA 带,且 28 S 带的亮度约为 18 S 带的 2 倍。其不同波长下的吸光度比值为 $OD_{260}/OD_{280}=1.81$, $OD_{260}/OD_{230}=2.40$ 。以上结果说明,提取的总 RNA 纯度较高,无明显降解,质量较好。

2.2 “皇家嘎拉”苹果叶片 GalDH cDNA 全长的 RT-PCR 扩增

取 1 μg “皇家嘎拉”苹果叶片 RNA 进行 RT-PCR 反应,扩增产物用 12 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,在约 1 100 bp 处获得特异条带,其大小与预期目的片段大小一致,见图 2。

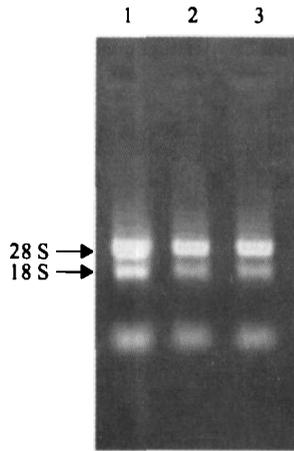


图 1 “皇家嘎啦”苹果叶片总 RNA 凝胶电泳结果

1~3. RNA 电泳结果; M. DNA marker

Fig. 1 Total RNA from leaves of Royal Gala

1-3. Total RNA; M. DNA marker

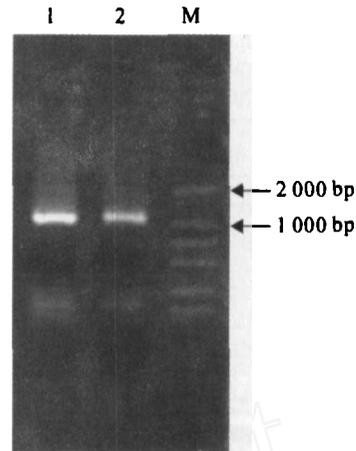


图 2 “皇家嘎啦”苹果叶片 GalDH 的 RT-PCR 扩增结果

1. 2. RT-PCR 扩增结果; M. DNA marker

Fig. 2 RT-PCR product of GalDH

1. 2. RT-PCR product; M. DNA marker

2.3 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

以提取的阳性重组质粒为模板,用相同的引物对插入片段进行 PCR 检测。从图 3 可以看出,重组质粒的 PCR 产物与目的条带大小相同。从图 4 可

以看出,重组质粒用双酶酶切出的片段与目的条带大小也相同,这与预期的结果完全一致。由此可以判断,目的 cDNA 序列克隆成功。

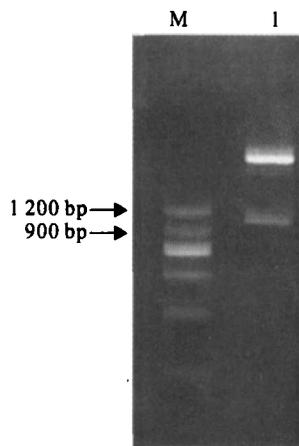


图 3 重组质粒的 PCR 产物

1. PCR 结果; M. DNA marker

Fig. 3 PCR product of recombinant plasmid

1. PCR product; M. DNA marker

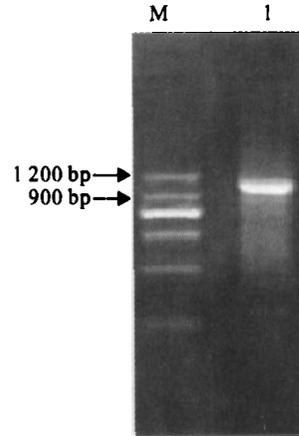


图 4 重组质粒 EcoRI 和 SalI 酶切结果

1. 酶切结果; M. DNA marker

Fig. 4 The recombinant plasmid digested by EcoRI and SalI

1. Recombinant plasmid; M. DNA marker

2.4 “皇家嘎啦”苹果 GalDH cDNA 序列核苷酸与氨基酸序列分析

将从凝胶中回收的目的片段克隆到 T 载体测序后,获得 1 111 bp 的序列,结果见图 5。

将获得的“皇家嘎啦”苹果的 GalDH 与 GenBank 中登录的拟南芥、菠菜、猕猴桃的 GalDH 进行了同源性比较,结果表明,“皇家嘎啦”苹果与拟南芥、菠菜、猕猴桃的同源性分别为 81%, 78% 和

82%。与 GenBank 中登录的苹果 GalDH cDNA 序列的相似性达 99%,只在 213 位和 744 位有 2 个碱基的差别,但是表达的氨基酸相同,这是由于密码子存在简并性的缘故。该基因的起始密码子和终止密码子分别在第 6 位和第 978 位碱基处,其最大开放阅读框编码 324 个氨基酸,所对应的氨基酸序列如图 6 所示,与其他几种植物该基因的氨基酸序列同源性高达 77%~85%。

```

1   AAACAATGGC TTCACAACCG CTGCCAAAGG TTGAACTCCG AGAGCTTGGC AACACAGGCC
61  TCAAGCTCAG CTGTGTCGGC TTCGGGGCCT CCCCTCTCGG CAACGTCTTC GGTCCCCTCT
121 CCGATGACGA AGCCATCGGC TCTGTTCGCG AAGCCTTCCG CCGAGGCATC AACTTCTTTG
181 ACACCTCTCC GTATTATGGA GGGACTTGTG CGGAAAAGGT GCTTGGTAAA ACGCTAAAAG
241 CTCTAGGTGT GCCGAGAAGC GAGTACGTGT TGGCAACCAA GTGTGGACGC TATGCTGACG
301 GTTTTGATTT CAGTGTGAT AGAGTGACTA AGAGCATTGA TGAGAGCTTG GAGAGATTGC
361 AGCTAGATTA CGTCGATATA CTGCAATGCC ATGACATTGA ATTTGGGTCT CTGGACCAGA
421 TTGTAAACGA GACAATCCCT GCCTTAAAGA AACTGAAAGA AGCTGGGAAG ATTCGTTTCA
481 TTGGTATCAC AGGACTTCCA TTGGGAATTT TCACATATGT TCTTGATCGT ATACCAGCTG
541 GCATGGTGGG CGTGGTCCTG TCATATTGCC ACTACGGTAT TAATGATTCA ACATTGGAGG
601 ATCTAATACC ATACCTCAAG AGCAAAGGTG TTGGAATCAT TAGTGCTTCT CCACTTGCAA
661 TGGGTCTGCT TACTGAGAAT GGTCTCCAG AATGGCACCC TGCATCTGCT GAACTGAAGT
721 CTGCTTGCCG AGCTGCTGCT GTTTATGTGA AAGAGAGAGG GAATAATATT TCAAAGTTAG
781 CTCTGCAATA CAGCTTGTC AATAAGGATA TCTCATCAGT GCTGGTCCGC ATGAACTCTA
841 TTAATCAGGT TGAGGAAAAT GTCGCTGCTG CTGTGGAGCT CGCGACCATT GGCAAGAATG
901 AGAAAATTC AGCAGAGGTT GAAGCTATTC TGAACCAGT GAAGAATCAG ACATGGCCTA
961 GCGGACTCCA GCAGAGCTGA CAACTTGTCT CTTGTATGTA ACCATCTGTA TCCTGTACTT
1021 ATTTTAATG CTTTTCAGTC GCCTGTAAAG GTTTGTCAA AATAAATGAA GGATTGTGAA
1081 TTTTTCATTT GGGTGAGATG TAAAGCTAA G

```

图 5 从“皇家嘎拉”苹果获得的 *GalDH* cDNA 核苷酸序列Fig. 5 *GalDH* cDNA nucleotide acid sequence of Royal Gala

```

M A S Q P L P K V E L R E L G N T G L K L S C V G F G A S P L G
N V F G P V S D D E A I G S V R E A F R R G I N F F D T S P Y Y
G G T L S E K V L G K T L K A L G V P R S E Y V V A T K C G R Y
A D G F D F S A D R V T K S I D E S L E R L Q L D Y V D I L Q C
H D I E F G S L D Q I V N E T I P A L K K L K E A G K I R F I G
I T G L P L G I F T Y V L D R I P A G M V D V V L S Y C H Y G I
N D S T L E D L I P Y L K S K G V G I I S A S P L A M G L L T E
N G P P E W H P A S A E L K S A C R A A A V Y C K E R G N N I S
K L A L Q Y S L S N K D I S S V L V G M N S I N Q V E E N V A A
A V E L A T I G K N E K I L A E V E A I L K P V K N Q T W P S G
L Q Q S *

```

图 6 从 *GalDH* 的编码框核苷酸序列推导的氨基酸序列Fig. 6 Amino acid arrangement deduced from the sequence of *GalDH*

3 讨论

抗坏血酸普遍存在于植物组织中,其可以直接与单线态氧(O_2^{\cdot})、超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基(HO^{\cdot})等活性氧反应,因此在植物抵抗氧化胁迫中具有重要作用。抗坏血酸的重要生理功能是其氧化还原状态以及生物合成、代谢、再生和转运的相关酶类活性的变化密切相关^[4]。研究表明,L-半乳糖途径已被公认是高等植物合成AsA的主要途径^[1,14-15]。L-半乳糖脱氢酶是该途径中催化抗坏血酸合成倒数第二步的惟一酶。

最近几年对AsA在植物中的功能及AsA生物合成途径的研究较多,特别是AsA生物合成新途径的提出,澄清了过去合成途径的争议并为更加全面地认识AsA提供了重要信息。尽管如此,有关AsA在植物细胞分裂、环境适应性和生长发育过程中的作用,以及AsA在植物体内的运输机制、植物合成AsA的多条途径在不同植物种类及不同发育

时期的地位及其之间的相互关系,特别是植物中AsA的合成和代谢机制及其遗传调控等方面仍需深入研究。苹果因营养丰富、口感佳而广受人们青睐,研究AsA自然成为苹果选种育种工作的重要指标。本试验从苹果叶片中克隆到*GalDH*,经分析其与已知的其他植物的同源基因有较高的保守性,这说明该基因在高等植物中是普遍存在的。本研究结果为今后进一步研究该酶的分子结构、功能和表达特点奠定了基础,同时也为研究*GalDH*与AsA积累的可能关系以及苹果合成和积累AsA的生理机制、分子机理奠定了基础。在此基础上,还将有望通过基因工程方法提高苹果的抗逆性、改善苹果果品的营养品质。

[参考文献]

- [1] Conklin P L. Recent advance in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants [J]. *Plant Cell and Environment*, 2001, 24: 383-394.

(下转第 184 页)

ASA^[16]。本研究中 ASA 含量在盐胁迫前期急剧下降,其原因可能是 APX 催化 ASA 清除 H₂O₂,而 MDHAR 酶活性很低,难以还原 MDHA,所以导致 ASA 含量急剧下降。但盐胁迫后期 ASA 含量下降的原因有待进一步研究。总之,叶片和根系的 ASA 含量变化幅度再次证明了百合根部较叶片耐盐。

综上所述,百合根系比其叶片具有更强的耐盐胁迫能力;对百合而言,脯氨酸含量只能作为一种辅助指标,不宜用于抗盐性评定,但电导率和 MDA 含量与百合的抗盐性有密切关系,可以作为百合抗盐性评价的稳定指标。

[参考文献]

- [1] 华春,王仁雷,刘友良. 外源 ASA 对盐胁迫下水稻叶绿体活性氧清除系统的影响[J]. 作物学报,2004,30(7):692-696.
- [2] 朱晓军,梁永超,杨劲松,等. 钙对盐胁迫下水稻幼苗抗氧化酶活性和膜脂过氧化作用的影响[J]. 土壤学报,2005,42(3):453-458.
- [3] 贺岩,李志岗,李新鹏,等. 盐胁迫条件下两种基因型小麦生长及保护酶活性的反应[J]. 山西农业大学学报,2005,25(3):42-44.
- [4] 马纯艳,沈男男,李朝莹,等. 丹 2100、沈单 16 两个玉米品种生理生化指标的比较[J]. 杂粮作物,2005,25(3):158-161.
- [5] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2003:258-263.
- [6] Asish K P, Anath B D, Prasanna M. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes[J]. Journal of Plant Physiology,2004,161(12):531-542.
- [7] Sarita V, Shyam N M. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system[J]. Journal of Plant Physiology,2005,162(8):669-677.
- [8] 孙群. 植物生理学研究技术[M]. [出版地不详]:[出版者不详],2004:133-134.
- [9] 张施军,周厚高,孔翠颜,等. 高温胁迫对抽薹期新铁炮百合的生理影响[J]. 中国农学通报,2004,5(3):191-193.
- [10] 金赞敏,王长海,刘兆普. 盐胁迫对芦荟几项生理生化指标的影响[J]. 食品与发酵工业,2004,30(10):1-4.
- [11] 王洪春. 植物逆境生理[J]. 植物生理学通讯,1981(6):72-81.
- [12] Lerner H R. Adaption to salinity at the plant cell level[J]. Plant and Soil,1985,7(1):49-54.
- [13] 汤章城. 逆境条件下植物脯氨酸的积累及可能的意义[J]. 植物生理学通讯,1984(3):51-54.
- [14] Lyer V, Fernands T A, Apte S K. A role for osmotic stress induced proteins in the osmitolerance of a nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anadaena* sp. Strain L-31[J]. J Bacteriol,1994,176(18):5868-5870.
- [15] 何文亮,黄承红,杨颖丽,等. 盐胁迫过程中抗坏血酸对植物的保护功能[J]. 西北植物学报,2004,24(12):2196-2201.
- [16] Virginia P, Sundus A. Stress tolerance in transgenic tobacco seedings that overexpress glutathione transferase and glutathione peroxidase[J]. Plant Cell Physiol,2000,41(11):1229-1234.
- [1] 安华明,陈力耕,樊卫国,等. 高等植物中维生素 C 的功能、合成及代谢研究进展[J]. 植物通报,2004,21(5):608-617.
- [2] 安华明,陈力耕,樊卫国,等. 刺梨果实半乳糖内酯脱氢酶基因 cDNA 片段的克隆及在不同器官的表达[J]. 中国农业科学,2005,38(3):571-575.
- [3] 陈坤明,宫海军,王锁民,等. 植物抗坏血酸的生物合成、转运及其生物学功能[J]. 西北植物学报,2004,24(2):329-336.
- [4] Stephan G, Glen L, Wheeler, et al. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis[J]. The Plant Journal, 2002, 30(4):541-553.
- [5] Takahiro Mieda, Yukinori Yabuta, Madhusudhan Rapolu, et al. Feedback inhibition of spinach L-Galactose dehydrogenase by L-Ascorbate[J]. Plant and Cell Physiology,2004,45(9):1271-1279.
- [6] William A L, Nicky F, Sean B, et al. Kiwifruit L-galactose dehydrogenase: molecular, biochemical and physiological aspects of the enzyme [J]. Functional Plant Biology, 2004, 31(10):1015-1025.
- [7] Agius F, Lamoth R G, Caballero J L, et al. Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D-galacturonic acid reductase[J]. Nature Biotech,2003,21:177-181.
- [8] Lorence A, Chevone B I, Mendes P. Myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis[J]. Plant Physiology,2004,134(3):1200-1205.
- [9] Mark W D, Marc V M, Dirk I. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing[J]. Sci Food Agric,2000,80:825-860.
- [10] Glen L, Wheeler, Mark A, et al. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants[J]. Nature,1998,393:365-369.
- [11] Oba K, Ishikawa S, Nishikawa M, et al. Purification and properties of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, a key enzyme of ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots[J]. Biochem,1995,117:120-124.
- [12] 侯义龙,张开春,吴禄平,等. 果树组织中总 RNA 提取的新方法[J]. 沈阳农业大学学报,2002,33(2):122-125.
- [13] Davey M W, Sanmartin M, Kanellis A, et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing [J]. Sci Food Agric,2000,80: 825-860.
- [14] 何文亮,黄承红,杨颖丽,等. 盐胁迫过程中抗坏血酸对植物的保护功能[J]. 西北植物学报,2004,24(12):2196-2201.

(上接第 178 页)