

一个陆地棉类烯醇酶基因的克隆及其表达分析

王亦学^{1,3}, 孙毅^{1,3}, 田颖川², 吴家和^{2*}

(1. 山西农业大学农学院, 太谷 030801; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101;

3. 山西省农业生物技术研究中心, 太原 030031)

摘要:采用改良的 CTAB 法提取陆地棉总 RNA, 运用 RT-PCR 技术首次克隆了陆地棉类烯醇酶基因的 CDS 序列, 该基因已经在 GenBank 上登录, 登录号为 EU169604, 其开放阅读框为 1338 bp, 编码 445 个氨基酸残基。对其序列和进化分析表明, 陆地棉烯醇酶基因与其它植物中的烯醇酶基因有较高的相似性, 该基因在进化过程中是相当保守的。半定量 RT-PCR 表达分析结果显示该基因在陆地棉的叶、根、茎中均有表达, 但在根中的表达量高于叶和茎。

关键词:陆地棉; 烯醇酶; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S562.035 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2009)04-0275-04

Cloning and Expressing of Putative Enolase Gene from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

WANG Yi-xue^{1,3}, SUN Yi^{1,3}, TIAN Ying-chuan², WU Jia-he^{2*}

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. The Agri-Biotechnology Research Center of Shanxi Province, Taiyuan 030031, China)

Abstract: The total RNA of *Gossypium hirsutum* was extracted by modified CTAB method and the open reading frame of enolase gene from *Gossypium hirsutum* was cloned by RT-PCR, named *GhEno*, which was 1338 bp long and encoded 445 amino acids. The *GhEno* gene was registered in GenBank with the access number of EU169604. Sequence analysis alignment indicated that *GhEno* gene had high homology with those of other plants. The phylogenetic tree analysis showed that the *GhEno* was clustered in the same group with *Hevea brasiliensis* and *Ricinus communis*. Semi-quantity RT-PCR analysis indicated that expression of *GhEno* was detected in roots, stems and leaves, however it was stronger in roots than in leaves and stems.

Key words: cotton (*Gossypium hirsutum* L.); enolase; gene cloning; gene expression

糖酵解途径是植物在逆境条件下物质和能量代谢的重要途径, 该途径中的关键酶与植物的抗逆性有着密切的关系。烯醇酶(enolase)是糖酵解途径中的一个重要酶类, 其可以催化磷酸甘油酸脱水形成磷酸烯醇式丙酮酸, 该反应是糖酵解途径中唯一的一步脱水反应。有研究表明, 植物在厌氧、高盐、干旱、高温、低温等胁迫条件下, 烯醇酶基因的表达量及酶活均会产生相应的变化, 从而为逆境条件下植物产生大量自由基而导致的光合系统损伤的修复提供能量, 因而该基因被广

泛认为是与植物抗逆性相关的基因。

目前, 烯醇酶基因已在不同的植物中被克隆, 如玉米^[1]、番茄^[2]、蓖麻^[3]、松叶菊等^[4], 有关该蛋白酶的研究也有不少报道^[5-7]。但是对于陆地棉的烯醇酶基因的研究较少。本文是从本实验室已经建立的陆地棉黄萎病诱导差减 cDNA 文库中挑选在病菌诱导下高表达抗病相关基因——类烯醇酶基因进行同源序列法克隆, 并对其进行了序列、进化和表达分析, 为进一步进行遗传操作和转基因抗逆研究提供基础。

注: 该文所有实验均在中国科学院微生物研究所完成, 所有产生的知识产权均属于该单位。

收稿日期: 2008-04-25

作者简介: 王亦学(1982-), 男, 在读硕士; * 通讯作者, wujiahe@im.ac.cn.

基金项目: 山西省科技攻关项目(042005)资助

1 材料和方法

1.1 材料

供试陆地棉品种中棉所 35 和大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 DH5a 均由本实验室保存; 克隆载体 pGEM-T 购自 Promega 公司; 限制性内切酶、Taq 酶和 Agarose Gel DNA Purification Kit 购自 Takara 公司; RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司。

1.2 方法

叶、根、茎的获取。将陆地棉种子用水培法培养至 3~5 片真叶, 分别取幼嫩的叶、根、茎用液氮冷冻后置于 -80℃ 保存待用。

总 RNA 的提取。用改良的 CTAB 法分别提取高质量的叶、根、茎的总 RNA, 参照文献[8]。

烯醇酶基因的克隆。反转录反应采用 RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, 按照其方法进行的操作, 获得 cDNA。根据候选基因的保守序列设计一对 PCR 扩增引物, 获得 *GhEno* 的 CDS 序列, 引物为: ENO-F1: 5'. atggctgctactatcgtctc . 3' 和 ENO-R1: 5'. ttaatagggtgcaactggag . 3'。引物的合成由北京三博志远生物技术有限责任公司完成。以反转录得到的 cDNA 为模板, 按以下反应体系: cDNA 1 μ L、10 \times PCR Buffer(Mg Plus) 2 μ L、dNTP Mixture(2 mmol \cdot L⁻¹) 2 μ L、TaKaRa Taq 0.3 μ L、Primer ENO-F (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.3 μ L、Primer ENO-R(10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.3 μ L、H₂O 14.1 μ L, 总体积 20 μ L 进行如下 PCR 反应: 94℃, 50 s, 55℃, 50 s, 72℃, 1 min 30 s, 30 个循环, 循环前 95℃ 预变性 5 min, 循环结束后 72℃ 终延伸 10 min。

PCR 产物的回收、连接、转化和鉴定。按 Agarose Gel DNA Purification Kit 的说明书进行 PCR 产物的回收。PCR 产物的连接按 pGEM-T Vector 的说明书进行。大肠杆菌感受态的制备参照文献[9], 采用电击转化的方法进行转化。质粒的提取采用碱裂解小量提取法, 用 EcoR I 进行酶切电泳鉴定。

序列的测定由北京三博志远生物技术有限责任公司完成。用 Clustal X 进行序列比对分析, 用 MEGA4 构建进化树, 软件均来源于互联网。

陆地棉烯醇酶基因的表达分析。采用半定量 RT-PCR 技术对陆地棉烯醇酶基因进行表达分析。首先利用 DNAMAN 设计合成一对扩增 *GhUBI* 基因的引物: UBI-F: ctgaatcttcgctttcacgttattc; UBI-R: gggatgcaaatcttcgtaagac。

分别用陆地棉叶、根、茎的 cDNA 作为模板进行扩增, 得到扩增产物。以棉花 polyubiquitin

基因 (*GhUBI*) 作为 RT-PCR 反应的内标。然后在克隆得到的陆地棉烯醇酶基因序列内部利用 DNAMAN 设计合成另一对引物: ENO-F2: cattcttgccgtgtcccttgc; ENO-R2: agtccttcctgtttctctgg, 再分别用陆地棉叶、根、茎的 cDNA 作为模板进行扩增, 用得到的扩增产物对陆地棉烯醇酶基因进行表达分析。

2 结果与分析

2.1 陆地棉叶根茎总 RNA 的质量分析

由图 1 可以看出, 通过改良的 CTAB 法提出的陆地棉叶根茎总 RNA 在电泳条件下看不到有基因组 DNA 的污染, 28 S 核糖体 RNA 与 18 S 核糖体 RNA 的带型比较整齐, 无拖尾的现象, 该 RNA 质量适合作为 RT-PCR 克隆基因的要求。为了进一步确定此 RNA 的质量, 对其进行分光光度法测定, 结果显示 OD₂₆₀/OD₂₃₀ > 200, 表明 RNA 的纯度较高, 蛋白质的污染少。

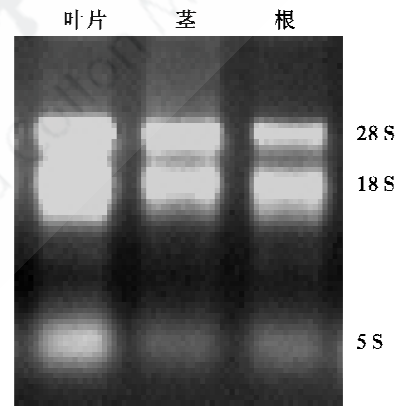
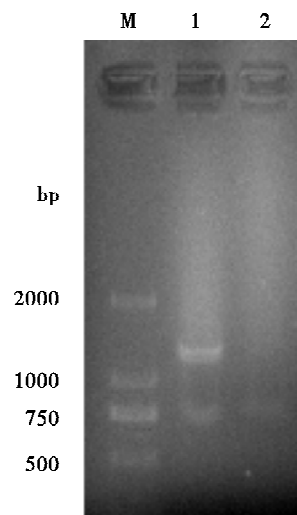


图 1 棉花总 RNA 的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis check of total RNA



M. DL-200bp DNA marker; 1. cotton cDNA; 2. ddH₂O.

图 2 烯醇酶基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 Detection of PCR for enolase gene

2.2 陆地棉烯醇酶基因的克隆

以 cDNA 第一链为模板,用合成的引物进行 PCR 反应,经电泳检测,扩增出大约 1.3 kb 大小的条带(图 2)。对此片段回收连接后进行序列测定。将测定的序列和 GenBank 中登记的同源序列进行比较,发现该基因与其它生物的烯醇酶基因同源性极高,并且发现大多生物的烯醇酶基因序列同源性也很高,所以我们把该基因定名为陆地棉类烯醇酶基因 *GhEno*(*Gossypium hirsutum* L. enolase gene, *GhEno*)。其开放阅读框长度为 1338 个碱基,推导的氨基酸序列为 445 个氨基酸残基,具体基因和氨基酸序列见 GenBank 中登录

序列,登录号为 EU169604。

2.3 陆地棉类烯醇酶同源性和进化分析

用 Clustal X 将陆地棉类烯醇酶基因的核苷酸序列与已经登录于 GenBank 中其它植物的烯醇酶基因的核苷酸序列进行多重比较,可以发现陆地棉烯醇酶基因的核苷酸序列与一些木本植物的核苷酸序列较为相似,如蓖麻、橡胶树、赤杨等,但与番茄、菠菜、油菜等草本植物也有比较高的相似性(表 1)。在进行陆地棉烯醇酶基因的氨基酸序列多重比较时,也发现同样的结果,表明植物之间的烯醇酶基因的序列差异不大,在植物的进化过程中该基因的 DNA 序列保守性很强。

表 1 植物烯醇酶的核苷酸序列比较

Table 1 Aligned score of nucleotides of *GhEno* gene

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	100							
2	84.8	100						
3	82.8	90.8	100					
4	82.7	84.0	84.5	100				
5	81.1	80.7	80.2	80.3	100			
6	79.9	81.2	80.8	79.8	80.6	100		
7	79.3	79.5	78.8	77.8	79.9	78.9	100	
8	76.5	77.8	76.7	78.9	96.4	76.9	74.3	100

注:1. *Gossypium hirsutum*; 2. *Ricinus communis*; 3. *Hevea brasiliensis*; 4. *Alnus glutinosa*; 5. *Solanum lycopersicum*; 6. *Spinacia oleracea*; 7. *Brassica rapa*; 8. *Solanum tuberosum*。

将陆地棉烯醇酶基因的氨基酸序列与 GenBank 中已经登陆的蛋白质库进行比对后,获取许多与其同源相似的其它植物的烯醇酶基因的氨基酸相应序列。所有同源性氨基酸序列的 E-值都在 0.01 以下,因此我们共选 15 条生物来源不同氨基酸序列(在同一生物中如有多个序列,一般选取序列同源的 score 值最高的一条),利用 MEGA4 软件,采用邻连法(NJ 法)绘制进化树(图 3)。序列比较表明,烯醇酶基因在进化过程

中具有保守性较高,进化速度缓慢的特点,这与糖酵解途径中的大多数酶是一致的。因此,该基因的每个氨基酸的变化都需要漫长的时间。从绘制的进化图上可以看出,在进行分析的几种植物中,烯醇酶的进化关系可以分别聚合为三大类,其中陆地棉、蓖麻、赤杨等物种的烯醇酶序列相似性较高,可以聚合为一类;拟南芥、番茄、油菜等可以聚合为另一类,水稻单独为第三类。

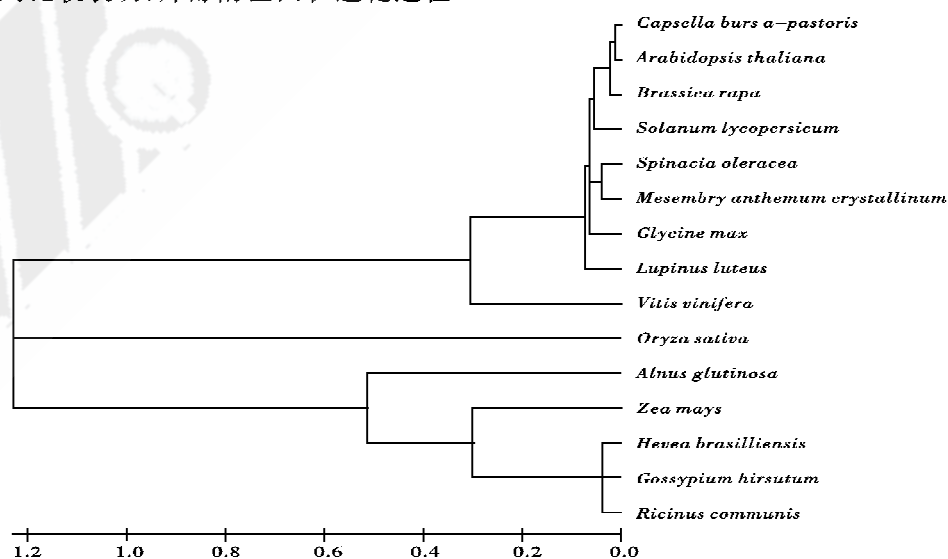


图 3 根据烯醇酶氨基酸序列绘出的 15 个物种的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 15 species using enolase amino acid sequences

2.4 *GhEno* 的理化性质和二级结构

在拟南芥、番茄等烯醇酶中的第 47 位氨基酸残基为 Tyr, 该位点是酶的磷酸化、去磷酸化的功能活性位点, 并且在这附近的氨基酸残基均较为保守。同样 *GhEno* 在第 47 位氨基酸残基也为 Tyr, 在这附近的氨基酸残基和其它物种的同源性很高。该蛋白的 pI 为 5.35, 其中以 Ala、Gly、Lys、Val、Leu 等为主组成的蛋白酶占氨基酸总量的一半左右。软件预测其亲水性和疏水性发现该蛋白酶基本上属于中等亲水和疏水, 是典型存在于细胞质中的蛋白酶。二级结构预测采用 DNAMAN 算法, 含螺旋 17%、转角 29%、卷曲 54%。表明该蛋白酶结构的不规则性。磷酸化和去磷酸化位点 Tyr 位于一个小螺旋中, 螺旋的两侧均为卷曲结构。

2.5 陆地棉烯醇酶基因的表达分析

利用半定量 RT-PCR 技术研究了陆地棉类烯醇酶基因在叶、根、茎中的表达情况。由图 4 可以看出扩增的产物 *GhUBI* 基因作为内标。陆地棉类烯醇酶基因在扩增 30 个循环时的表达情况显示, 该基因在陆地棉的根、茎、叶中均表达, 但在根中的表达量要高于叶和茎。

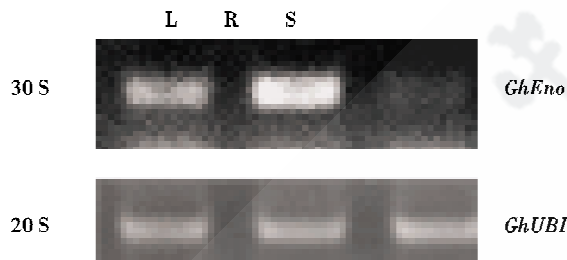


图 4 烯醇酶基因在棉花不同器官中的表达

Fig. 4 Expression of enolase gene in various organs of *G. hirsutum*

3 讨论

在干旱、高盐、低温、强光照等逆境条件下, 植物会产生大量的自由基, 从而损伤光合系统, 这对于植物来说是致命的, 特别是对于植物中的非绿色组织或是处于厌氧环境的组织(如根), 需要经糖酵解途径来提供能量^[10]。烯醇酶作为糖酵解途径的一个关键性的酶在抗逆反应中起着重要作用, 比如玉米在厌氧条件下烯醇酶的转录水平和酶活均会有明显的提高, 油菜在盐诱导的条件下烯醇酶基因的表达量也会有所提高。

通过 RT-PCR 方法, 首次从陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 中克隆到了编码烯醇酶的全长基因, 该基因的登录号为 EU169604。序列分析表明该基因全长 cDNA 为 1338 bp, 拥有一个由 445 个氨基酸组成的开放读码框, 所编码的蛋白

质理论分子量为 47.77 kD, 等电点为 5.37。经过分析发现, 陆地棉烯醇酶基因与已登录的其它植物烯醇酶基因的序列有较高的相似性, 该基因在进化上相对比较保守, 与蓖麻、橡胶等的烯醇酶基因相似性较高, 可以聚合为一类。表达分析显示, 陆地棉烯醇酶基因在棉花根、茎、叶中均有表达, 但在根中的表达量要高于叶和茎, 这可能与根部相对处于缺氧的环境有关。陆地棉烯醇酶基因的克隆和表达分析为我们通过转基因方法改良棉花和其它作物的抗逆性提供了一定的基础。

参考文献:

- [1] SHAILESH K L, Chwenfang L, Martin M S. Differential regulation of enolase during anaerobiosis in maize[J]. *Plant Physiol*, 1998, 118:1285-1293.
- [2] VAN DER S D, Rodrigues R A, Goodman H M, et al. Plant enolase: gene structure, expression, and evolution [J]. *Plant Cell*, 1991, 3:719-735.
- [3] JAN A M, David T D. A developmental analysis of the enolase isozymes from *Ricinus communis* [J]. *Plant Physiol*, 1992, 99:748-750.
- [4] FORSTHOEL N R, Cushman M A F, Cushman J C. Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108:1185-1195.
- [5] BOSER H. Zur heterogenitat von enzymen. I. uber enolase aus kartoffelknollen [J]. *Z Physiol Chem*, 1959, 315:163-170.
- [6] SINHA S, Brewer J M. Purification and comparative characterization of an enolase from spinach [J]. *Plant Physiol*, 1984, 74:834-840.
- [7] MUJER C V, Fox T C, Williams A S, et al. Purification, properties and phosphorylation of anaerobically induced enolase in *Echinochloa phyllopogon* and *E. crusgavonis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36:1459-1470.
- [8] 蒋建雄, 张天真. 利用 CTAB/酚法提取棉花组织总 RNA [J]. *棉花学报*, 2003, 15(3):166-167. JIANG Jian-xiong, ZHANG Tian-zhen. Extraction of total RNA in cotton tissues with CTAB-acidic phenolic method [J]. *Cotton Science*, 2003, 15(3):166-167.
- [9] SAMBROOK J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning-a laboratory manual [M]. 2nd Edition. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] FORSTHOEFFEL N R, Cushman M A, Cushman J C. Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum Crystallinum* L. [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108:1185-1195. ●