2011年10月 201133(5):451-458

# 蓖麻三磷酸甘油脱氢酶基因 (*RcGPDH*)的克隆及功能分析

**弭宪杰<sup>12</sup> 徐荣华<sup>2</sup> 刘爱忠<sup>2</sup> 吴 丁<sup>13</sup>,田 波<sup>2\*</sup>** (1. 江西农业大学园林与艺术学院,江西 南昌 330045;2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 昆明 650223;3. 江西省景德镇高等专科学校,江西 景德镇 333000)

摘要:为了阐明蓖麻三磷酸甘油脱氢酶基因(glycerol – 3 – phosphate dehydrogenase *RcGPDH*) 在蓖麻油累积过 程中的作用,本研究根据已报道的蓖麻种子表达序列标签(Expressed Sequence Tags,EST) 设计引物,通过 RACE (rapid – amplification of cDNA ends) 方法克隆蓖麻 *RcGPDH* 基因的全长并对其序列进行分析,构建了该基因的酵母 表达载体 pYES2.1/V5 – His – TOPO – RcGPDH,以载体 pYES2.1/V5 – His/lacZ 质粒 DNA 为对照,转化酵母野生型 菌株 BY4742,运用分光光度法测定转基因酵母的生长曲线,通过香草醛法测定稳定生长期的转基因酵母的油脂含 量。结果表明,转基因菌株比转空载体对照菌株生长慢,两者均在培养18h 后进入平台期;两个菌株的油脂含量没 有明显的差别,表明 *RcGPDH* 基因对酵母油脂的累积没有起到积极的作用,在蓖麻种子中可能还存在另一个 *GPDH* 同源基因参与三脂酰甘油(TAG)的合成。

关键词:蓖麻;三磷酸甘油脱氢酶;三脂酰甘油 中图分类号:Q786\_\$565.6.1 文献标识码:A 文章编号:1007-9084(2011)05-0451-08

Cloning and characterization of glycerol -3 – phosphate dehydrogenase gene (*RcGPDH*) from castor bean MI Xian – jie<sup>1,2</sup>, XU Rong – hua<sup>2</sup>, LIU Ai – zhong<sup>2</sup>, WU Ding<sup>1,3</sup>, TIAN Bo<sup>2\*</sup>

(1. Department of Horticulture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Xishuangbanna Tropic Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

3. Jingdezhen Comprehensive College, Jingdezhen 333000 China)

Abstract: In order to elucidate the role of glycerol -3 – phosphate dehydrogenase gene (*RcGPDH*) from castor bean in castor oil accumulation, we designed primers according to express sequence tags (EST) and cloned the full cDNA of *RcGPDH* gene by RACE (rapid – amplification of cDNA ends). The yeast expression vector pY–ES2.1 /V5 – His – TOPO – RcGPDH was constructed and transformed to wild yeast strain BY4742, using plasmid pYES2.1 / V5 – His/lacZ as control. We drew the growth curves of transformed yeast strains with spectrophotometer at 600nm, and determined their oil content using vanillin method. Results showed that they grew stably after cultured 18h, but the strain with *RcGPDH* gene grew slower than control. The oil content didn't change between the two yeast strains, which suggested that *RcGPDH* gene was not involved in yeast oil accumulation. These results suggested that other *GPDH* homologous genes may be involved in triacylglycerls (TAG) synthesis in castor seeds.

Key words: Castor bean; Glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase; Triacylglycerls

蓖麻油粘度高、酸度低,在500~600℃高温下 不变质、不燃烧,-18℃的低温下不凝固,被广泛应 用于工业、国防、农业、医药、造纸、橡胶等各个领 域<sup>[1]</sup>。蓖麻油不仅是重要的化工原料,还是重要的

收稿日期:2011-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(30900908); 云南省自然科学基金项目(2008CD166); 中国科学院"西部之光"项目

作者简介: 弭宪杰(1983 - ) ,女 ,山东泰安人, 硕士 ,主要从事植物分子遗传育种研究

<sup>\*</sup> 通讯作者:田 波(1975-) 男 湖南常德人 博士 研究方向植物分子遗传育种 ,Tel: 0871-5160669 , E-mail: tianbo@ xtbg. ac. cn

能源原料。从石油中得到的系列产品中,许多也可 以从蓖麻油中深加工得到,同时利用蓖麻油还可以 生产出多种与汽油柴油相近的优质低污染燃料。在 世界石油、煤炭日益短缺的今天,蓖麻(*Ricinus communis* L.)是目前唯一能大量生产工业用油的油料 植物,其种子含油量最高可达50%。蓖麻油被视为 有开发潜力又可再生的"绿色石油"能源<sup>[2]</sup>。

三脂酰甘油(Triacylglycerls,TAG)是植物种子 中油脂储存的主要化学形式。在植物种子中,TAG 的合成主要在内质网中通过 Kennedy 途径<sup>[3]</sup>完成, 即以三磷酸甘油 (glycerol - 3 - phosphate ,Gly3P) 和 酰基辅酶 A(acyl-CoA) 作为初始底物 ,先后在甘油 -3-磷酸酰基转移酶(sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶 (lysophosphatidic acid acyltransferase LPAAT)、磷脂酸 磷酸水解酶(phosphohydrolase)、二脂酰甘油酰基转 移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)的作用 下 Gly3P 甘油骨架上的三个磷酸基团逐步被三个 酰基链替代而生成 TAG,最终在内质网中形成油体 贮存在种子中。到目前为止,针对提高种子油含量 分子机制的研究主要集中在如何调控 Kennedy 途径 酰基转移过程中相关产物的量以及脂肪酸链合成过 程中相关前体的量<sup>[4]</sup> 而 Gly3P 在 TAG 合成中的作 用一直不受关注。在种子发育过程中,Gly3P作为 Kennedy 途径的初始底物及 TAG 合成的碳骨架, 是 TAG 合成必不可少的前体。Vigeolas 和 Geigenberger<sup>[5]</sup>向油菜种子中注射适当浓度的甘油,检测到 Gly3P 含量的增加,同时也检测到 TAG 合成速率的 增加。随后, Vigeolas 等<sup>[6]</sup>将酵母中编码三磷酸甘 油脱氢酶的 GPD1 基因转化到油菜中异位表达,转 基因油菜中 Gly3P 的含量增加了 3~4 倍 油含量增 加了 40% ,而且 Gly3P 的含量与种子油的累积量之 间存在一定的协同关系。由此可见,Gly3P含量的 多少影响种子 TAG 的累积。在植物体内, Gly3P 主 要通过两条代谢途径生成,一是糖酵解中间产物磷 酸二羟丙酮(dihydroxyacetone phosphate,DHAP) 在 三磷酸甘油脱氢酶(glycerol-3-phosphate dehydrogenases ,GPDH) 的催化下获得<sup>[7~9]</sup>。二是 glycerol 在甘油激酶 glycerol kinase (GlyK)的作用下产生。 研究表明 GlyK 主要在种子萌发时参与甘油代谢过 程。在 Vigeolas 和 Geigenberger 向油菜种子中添加 外源甘油的实验<sup>[5]</sup>中 Gly3P 的量并没有迅速增加, 而是滞后一定时间,而且当甘油的浓度超过 10mmol/L时,Gly3P的量增加不明显,据此推测, Gly3P 含量的增加可能不是 GlyK 直接作用的结果。

因此,作为 Kennedy 途径初始底物的 Gly3P 可能主要是由 GPDH 酶催化而来,GPDH 基因可能是影响 植物种子含油量的重要基因。近年来的研究结果表明,GPDH 基因在植物对抗非生物逆境方面具有非常重要的作用<sup>[10]</sup>,而关于其在植物种子油脂合成方面的作用还缺乏研究。

近年来 随着工业化程度的迅速提高,全球范围 内对蓖麻油的需求量呈急剧上升趋势,供应远远不 能满足需求。但是,由于对蓖麻育种及相关分子生 物学研究的相对滞后,品种混乱而不稳定,不同品种 含油量差异较大,因此,研究与蓖麻含油量相关基因 的功能,将有助于通过生物工程技术获得含油量高 而稳定的蓖麻品种。本研究根据已报道的蓖麻种子 *GPDH* 基因的表达序列标签(Expressed Sequence Tags *EST*)<sup>[11]</sup>设计引物,通过 RACE 方法克隆了蓖 麻 *GPDH* 基因的全长,并构建了该基因的酵母表达 载体,通过酵母表达系统对该基因在油脂合成上的 功能进行了初步分析。

## 1 材料与方法

#### 1.1 材料

植物材料: 蓖麻(*Ricinus communis* L.)(云蓖 3 号)种子由云南省农科院经作所提供。取开花后发 育至第 26d 的种子立即放于液氮中并于 - 80℃保 存。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)野生型菌株 BY4742 由加拿大 Saskatchewan 大学 Zou Jitao 教授 赠送。所有引物均由上海生物工程技术有限公司合 成 测序由上海生物工程技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 蓖麻总 RNA 的提取 将 – 80℃冻存的种子 在液氮中研磨成粉,采用 Trizol 法进行总 RNA 提 取 操作步骤按 Trizol 试剂(TaKaRa RNAiso Reagent) 说明进行。沉淀用适量的 DEPC 水溶解,经 DNA 酶消化和 RNA 纯化试剂盒纯化后 2% 甲醛变 性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,超微量紫外 分光光度计(NanoDrop<sup>®</sup> ND – 1000) 测定纯度和浓 度。

1.2.2 *RcGPDH* 基因的克隆及序列分析 根据 PrimeScript<sup>™</sup> RT – PCR Kit(TaKaRa) 试剂盒说明进行 反转录获得 cDNA。根据已报道的 EST 序列<sup>[11]</sup>,设 计 5' RACE 和 3' RACE 引物(表 1)。以蓖麻种子 cDNA 为模板,按照 Clontech 公司的 SMARTerTM RACE cDNA Amplication Kit 和 Advantage 2 Polymerase Mix 的说明进行 RACE 扩增。RACE 扩增产物 用 1% 的琼脂糖凝胶检测,然后克隆到 pGM – T 载 体(Tiangen) 并转化大肠杆菌 TOP 10,在含氨卞青 霉素的 LB 培养基上生长过夜,挑取阳性克隆进行 PCR 检测后测序。将获得的 5' RACE 和 3' RACE 序列进行拼接,分别从 5'和 3' 端设计 cDNA 全长扩 增引物 RcGPDH – S 和 RcGPDH – A (表 1),以 cD- NA 为模板进行 PCR 扩增,获得全长 cDNA。将 cD-NA 全长片段克隆到 pGM - T 载体(Tiangen),转化 大肠杆菌 TOP 10,在含氨卞青霉素的 LB 培养基上 生长过夜,挑取阳性克隆 PCR 检测后测序验证。

	表1 引物信息	
Table 1	Primer information used in t	this study

引物名称 Primer	序列 Sequence	退火温度 Annedling temp/℃
3'RACE	5' – GAGCCACAGCTGAGCATTTGTTTGAAGT – 3'	70.0
5'RACE	5' - AGCAGTAAAGACACTACCCCAAGCACC - 3'	67.0
RcGPDH – S	5' - TATCTCCCAAACCGACTTCC - 3'	56.0
RcGPDH – A	5' – TAATGTGAAAGGAAAATCCAGTT – 3'	56.0
RcGPDH YeastS	5' – GAAATGGCTAAAAATACTGAAACA – 3'	56.2
RcGPDH YeastA	5' – AGGTTTCTTTCCCAGGAGTGA – 3'	57.9
Yeast Clone S	5' – TCGGTTTGTATTACTTCTTATTC – 3'	51.5
RcGPDH – YcloneA	5' – TAGGTGACCATAACTATCTTGC – 3'	51.9

利用 NCBI 的 Blast. ORF finder 和 BankIt 服务 器进行核酸和蛋白质序列比较、阅读框架确定及序 列在线提交。通过 SubLoc v1.0 软件在线分析对 *RcGPDH* 基因的编码蛋白质进行亚细胞定位(http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/)。

将 ReGPDH 蛋白质序列与拟南芥、酵母、盐藻 等物种的蛋白序列用 ClustalX 1.8 进行序列多重比 对 ,分析 ReGPDH 基因与其它物种 GPDH 基因的同 源性。系统树运用 DNASTAR 软件包中的 MegAlign 程序构建。

1.2.3 酵母表达载体的构建及酵母遗传转化 将 得到的 RcGPDH 基因通过 TOPO TA 克隆法克隆到 载体 pYES2.1/V5 - His - TOPO(Invitrogen) ,所用引 物为 RcGPDH YeastS 和 RcGPDH YeastA(表 1),引 物 RcGPDH YeastS 从启动子 ATG 开始,并在前面增 加了三个外源碱基 GAA,以增强表达效率,引物 RcGPDH YeastA 不含基因的终止子。转化酵母野 生型菌株 BY4742,同时将 pYES2.1/V5 - His/lacZ 质粒 DNA 转化酵母菌株 BY4742 作为对照,于 Sc u(配方见 pYES2.1 TOPO TA Expression Kit 操作手 册) 平板培养基上 28℃ 生长 2~4d。以上操作均根 据 Ivitrogen 公司 的 pYES2.1 TOPO TA Expression Kit及S. c. EasyComp. Transformation Kit 说明书进 行。挑取酵母菌斑通过引物 Yeast Clone S 和 RcGP-DH – YcloneA(表 1)进行 PCR 检测,引物 Yeast CloneS 位于载体的启动子内,引物 RcGPDH – YcloneA 位于基因 RcGPDH 上。

1.2.4 目的基因在酵母中的表达分析 酵母 RNA 的提取 具体操作如下:离心收集一定量的酵母菌 液 用蒸馏水洗涤 3 次 ,离心收集菌体 ,加入同体积

的盐酸洗玻璃珠,加入 1mL Trizol,在涡旋仪上振荡 10min,每振荡 30s 在冰上静止 30s,加入 0.2mL 氯 仿,继续振荡 1~2min,室温放置 2~5min,12 000 rpm 离心 10min,取上清转入 RNasefree 的离心管,加 入 0.6~1 倍体积的异丙醇,置于 -80℃快速沉淀 5 ~10min,12 000rpm 离心 10min 收集沉淀,用 1.5mL 70% 乙醇(RNase - free)洗涤一次,12 000rpm 离心 2min 去乙醇,室温干燥 10~15min,加入 50μL DEPC 水溶解,DNase I 消化后 2% 甲醛变性琼脂糖凝胶电 泳检测 RNA,通过 RT - PCR 检测基因的表达。

1.2.5 转基因酵母生长曲线的绘制及转基因酵母 油脂百分含量的测定 将转基因和转对照质粒的酵 母首先在含有葡萄糖的 Scu 抑制培养基(配方见 pYES2.1 TOPO TA Expression Kit 操作手册)中 250rpm 30℃过夜培养,紫外分光光度计测 OD<sub>600</sub>值, 用含有棉籽糖和半乳糖的 Sc – u 诱导培养基(配方 见 pYES2.1 TOPO TA Expression Kit 操作手册)将上 述菌液稀释至 OD<sub>600</sub> = 0.4,于 250rpm、30℃的条件 下培养,在 30h 的时间内每隔 6h 测一次 OD<sub>600</sub>值,观 察其生长状况,绘制生长曲线。

通过香草醛的方法<sup>[12]</sup> 检测酵母的油脂百分含 量,分别取2mL诱导培养基中培养18h的转基因酵 母和对照菌液离心收集沉淀,称干重作为参照。另 取1mL菌液蒸馏水洗涤3次去除其中的糖分,取  $50\mu$ L酵母菌液于1mL18mol/L的硫酸中,以 $50\mu$ L 水做对照, $100^{\circ}$ 洗水浴中10min,快速置于自来水 中冷却,加入磷酸 – vanilin试剂2.5mL, $37^{\circ}$  反应 1h,恢复到室温,测定 OD<sub>530</sub>值。每个处理均做3次 重复。利用回归方程:浓度=0.05359+1.815× OD<sub>530</sub>,计算油脂的浓度,结合干重计算酵母中油脂 454

百分含量 比较油脂变化情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 蓖麻总 RNA 的提取

5µg 蓖麻种子总 RNA 样品进行凝胶电泳检测,

28SrRNA、18SrRNA 条带清晰明显(图 1),18SrRNA 的量是 28SrRNA 的 1/2,紫外分光光度法测得 A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub> = 2.09, A<sub>260</sub> / A<sub>230</sub> = 1.90,说明总 RNA 的完整性 好、纯度高,可以用于反转录获得 cDNA。



M ,100bp plus DNA 分子量参照;1 ,总 RNA;2 5' RACE;3 3' RACE;4 基因全长 M ,100bp plus DNA ladder;1 ,Total RNA;2 5' RACE;3 3' RACE;4 full gene 图 1 蓖麻种子总 RNA 及基因克隆



#### 2.2 RcGPDH 基因的克隆及序列分析

测序结果显示 5' RACE 片段为 1 176bp,3' RACE 片段 1 512bp,基因全长为 2 372bp(图 1),与 3'和 5' RACE 片段的拼接结果一致,命名为 *RcGP-DH*(GenBank 登录号:GU969273),阅读框(ORF) 位于全长 cDNA 的 702 位到 2 105 位,长度为1 404 bp,序列与 Chan 等注册的完全一致(序列号:XM\_ 002513073),编码 467 个氨基酸,5<sup>2</sup> 非编码区(UTR)和3<sup>2</sup> 非编码区(UTR)长度分别为 701bp 和 267bp(图 2)。该 cDNA 的起始密码子 ATG 的 -3 位和 +4 位核苷酸均为嘌呤,符合 Kozak 规律,由此确定克隆到的 *RcGPDH* 包含一个完整的阅读框架。 亚细胞定位的在线分析结果表明该基因编码的蛋白质可能存在于线粒体上。

```
TATCTCCCAAACCGACTTCCGTTAGACGGAATTCTCTTGCTTTAGTCCACTTCTGGTAAT
1
61 ACCCATTGTGTGAATGAATGAGCACAAGCTAACAAAAACATAAAAATAGAAAAAAGTCTAG
121 AATCAGTATCACCGCGTTGAGGAAGCTGACAAACAAAGAGGTGGTTTCGCTTTCTCTTC
241 GCTTTAGACTAAGTTCATTCTTGCATTTCTTTCTGTAATATCTTACTCGGATTGTCATTA
301
   GATATGCTGATGGCGGCATAAAGTACCATGAAAAACCCCGTGTAGCAAAATTCAGTTTCGA
361 TCAATGTTTTAGAGTTTCTAAGTTCTAGATCAATGTTCTAGAAACAACAACAAATCTAGCTG
421 TTGTTATGTTTGATAGCTAATTTGATGATCTAAGCCCTTACACTTGATGAGGGATGTAGC
481 CTCTATATATATATATATACCTGGAAATTGGGTTACTTTAAGATCCATAGAAATTGTTAG
541 GAATCTGTTGTCTCTAGACAGCAATATAATTTTTGTGTGTTGAGCTTAGTAAATATCGAC
601 AGAAGAGATCCTTTCTTTGGTATTGGTGCTACGTTTCCTAGTTCTATATAAAGGTTCATC
661 ACACAAGACTTAATAACGGTAGTGTAAGTCGAGAGGAGAAAATGGCTAAAAATACTGAAA
                                          М
                                             А
                                                Κ
                                                  Ν
                                                     Т
                                                        E
                                                           6
721 CAGAGAGTCACAATGTACATTCAAATGGATCAATTCATAATCAGAACTCGAATGGTGCTT
      ESHNVH
                      S N G S I H N O N
                                                S
                                                  Ν
                                                     G
                                                        А
                                                           26
781 TAGAAGAAAAGCTAGATGAGCTTCGACGTCTCATGGGCAAATCGGAAGGTGATCCTTTGA
    LEEKLDE
                       L
                          R R L M G K S E
                                                        L
                                               G
                                                  D
                                                    Р
                                                          46
841 GGATTGTTGGCGTCGGTGCTGGTGCTTGGGGTAGTGTCTTTACTGCTTTGTTGCAAGATA
                                    V
                   A G A W
                              G
                                  \mathbf{S}
                                        F
                                                        D
                                                           66
    R
     I V
           G V G
                                         Т
                                             A
                                               L
                                                  L
                                                     0
901 GTTATGGTCACCTAAGAGATAAGGTTCTAATAAGGTTATGGAGAAGGCCTGGAAAATCAG
   SYGHL
                 R D
                         V
                           LI
                                 R
                                       W
                                         R
                                                           86
                      Κ
                                   L
                                            R P
                                                  G
                                                     Κ
                                                        S
961 TTGATAGAGCCACAGCTGAGCATTTGTTTGAAGTGATTAATTCCAGGGAAGACGTATTAA
   V D R A
              Т
                 Α
                   E
                      Η
                         L
                            F
                               Е
                                 V
                                    Ι
                                       Ν
                                          S
                                            R
                                               Е
                                                  D
                                                     V
                                                        L
                                                          106
1021 GGAGATTGATTAGGCGTTGTGCATACTTAAAGTATGTTGAAGCAAGATTAGGTGATAGGA
   R R L
              R
                    С
                               Κ
                                    V
                                          А
                                                          126
           I
                 R
                      А
                         Y
                            L
                                 Y
                                       Е
                                            R
                                               L
                                                  G
                                                     D
                                                        R
L Y
          A D
                Е
                    Ι
                      L
                         K D
                              G
                                 F
                                    С
                                      L N
                                            М
                                               T
                                                  D
                                                     Т
                                                        Р
                                                          146
   Т
1141 TTTGCCCTTTAAAGGTTGTAACCAATTTGCAGGAAGCGGTGTGGGATGCTGATATTGTTA
```

	L	С	Р	L	Κ	V	V	Т	Ν	L	Q	Е	А	V	W	D	А	D	Ι	V	166
1201	201 TTAATGGGTTGCCTTCCACTGAGACCAGTGAGG <b>GVT</b> CCAGCAAATTAGTAGGTATTGGA																				
		Ν	G	L	Р	$\mathbf{S}$	Т	Е	Т	$\mathbf{S}$	Е	$\mathbf{V}$	F	Q	Q	Ι	$\mathbf{S}$	R	Y	W	186
1261	AAG	GAGA	GGA	TAA	CAG	ТАС	CAG	GTTA	TCA	тст	СТТ	TGG	GCAA	AAG	GGCA	TAG	AGG	СТС	AGT	TTGG	÷
	Κ	Е	R	Ι	Т	V	Р	$\mathbf{V}$	Ι	Ι	S	L	А	K	G	Ι	Е	Α	Е	L	206
1321	AGO	СТС	GAGC	СТС	GCA	TAA	TA	АСТС	CCA	СТС	AAA	TGA	TAA	ATC	CGAG	CAA	CTG	GAG	TCC	CCAA	
	Е	Р	Е	Р	R	Ι	Ι	Т	Р	Т	Q	М	Ι	Ν	R	Α	Т	G	V	Р	226
1381	TGG	GAGA	ACA	TCC	ТСТ	ATO	СТТС	GGAG	GAC	СТА	ACA	TCC	GCCI	CGG	GAGA	ТТТ	ACA	ATA	AGG	GAAT	,
	М	Е	Ν	Ι	L	Y	L	G	G	Р	Ν	Ι	А	$\mathbf{S}$	Е	Ι	Y	Ν	Κ	Е	246
1441	ATC	СТА	ATG	CCC	GAA	TAT	GT (	GGCG	CAG	AAA	AAT	GGA	GGA	AAG	СТТ	TGG	CAA	AGT	TTT	ГТGA	
	Y	Α	Ν	А	R	Ι	С	G	Α	Е	Κ	W	R	K	Р	L	Α	Κ	F	L	266
1501	GGC	CAAC	CCC	ATT	ТТА	TAC	GTG	rgge	GATA	ATA	GTG	GATO	СТАС	GTTA	АСТС	ATG	AAG	ТСА	TGG	GGTG	r
	R	Q	Р	Н	F	Ι	$\mathbf{V}$	W	D	Ν	$\mathbf{S}$	D	L	V	Т	Н	Е	V	Μ	G	286
1561	GAT	TAA	AGA	ATG	TAT	ATO	GCA	ATT (	GAG	СТС	GAA	TGG	GTAC	GCAG	GCTC	TGA	CCA	ACG	AGA	AGTG	r r
	G	L	Κ	Ν	V	Y	Α	Ι	G	А	G	М	V	А	А	L	Т	Ν	Е	$\mathbf{S}$	306
1621	CAA	CAA	GTA	AAT	CAG	TGT	TAC 1	ГТТС	СТС	ACT	GTA	CAT	CAC	GAAA	ATGA	TAT	ТТА	ТСА	CGG	CATT	•
	А	Т	$\mathbf{S}$	K	$\mathbf{S}$	V	Y	F	А	Н	С	Т	$\mathbf{S}$	Е	М	Ι	F	Ι	Т	Η	326
1681	TGT	TGG	CAG	AGG	AAC	СТС	GAG	AGAC	TTG	CGG	GTC	CCC	СТТТ	TAC	GCTG	ACA	СТТ	ATG	TCA	ACCT	•
	L	L	А	Е	Е	Р	Е	R	L	А	G	Р	L	L	А	D	Т	Y	V	Т	346
1741	TAT	TGA	AAG	GCC	GTA	ATC	GCA	ГGGI	ACG	GTC	AGC	CAGI	TGG	GCCA	AAG	GGG	GGT	TGA	ACO	CTTG	r
	L	L	Κ	G	R	Ν	А	W	Y	G	Q	Q	L	А	Κ	G	G	L	Ν	L	366
1801	ATA	TGG	GTG	ACA	GCA	TCA	AGG	GGCG	GAGG	GGA	TGA	TTC	CAGO	GGT	GTCT	CTG	CAG	TGA	AAG	GCAT	
	D	М	G	D	$\mathbf{S}$	Ι	Κ	G	Е	G	М	Ι	Q	G	V	S	А	V	Κ	А	386
1861	ТСТ	ATG	GAAC	TGC	TGA	GTO	CAG	ГСТТ	GCT	TAA	GTG	TCC	CTAC	CATO	CCTG	AAG	AAA	AGA	AGG	ССТС	r
	F	Y	Е	L	L	$\mathbf{S}$	Q	$\mathbf{S}$	С	L	$\mathbf{S}$	V	L	Н	Р	Е	Е	Κ	Κ	Р	406
1921	TAC	CCC	CTG	TTG	AAC	TTT	GCO	CCCA	TAT	TGA	AGA	TGC	CTAT	TAT A	GAA	TAC	TCA	TAA	CGA	AGGG	r r
	V	А	Р	V	Е	L	С	Р	Ι	L	Κ	М	L	Y	R	Ι	L	Ι	Т	R	426
1981	AGT	TTC	CGG	CAC	AGG	CTA	ATT (	CTTC	CAAG	СТТ	TAA	GGG	GATO	GAAA	ACGA	TGA	ATG	ACC	CAA	AGAG	r
	Е	F	Р	А	Q	А	Ι	L	Q	А	L	R	D	Е	Т	М	Ν	D	Р	R	446
2041	ATC	CGCA	TTG	AGA	TTG	CAC		ACCO	CATG	TAT	ТСТ	ACA	GAG	GCAT	CAC	TCC	TGG	GAA	AGA	AAAC	4
	D	R	Ι	Е	Ι	А	Q	$\mathbf{S}$	Н	V	F	Y	R	А	$\mathbf{S}$	L	L	G	K	Κ	466
2101	СТТ	GAC	GAT	ATA	CTG	ACT	CAA'	ГТТТ	GCA	TGT	TGC	TGT	TGT	CAA	ATCG	ATA	TGA	TGT	GAT	ГААG	r
	Р	*																			467
2161	СТА	CAT	<b>AAT</b>	GTA	GTT	CCA	ACA A	1TT	CAG	AAA	GTA	TCA	GGA	ACAA	AGGA	CGC	TAG	ATT	GCC	GAGT	
2221	TGG	TTG	ТТА	AGT	TTG	TTC	GTT(	GTAT	CAA	TTG	CTT	TAT	TTT	GTTO	GAGT	TTG	GCC	ATG	CAC	GAAC	
2281	AGT	GAA	ATG	AAC	AGA	TTT	<b>IGT</b>	CAAA	CTG	GAT	TTT	ССЛ	TTT	CACA	ATTA	ATG	ТТА	AAT	CGA	AATT	
2341	GAA	ТСТ	GTT	AAA	AAA	AAA	AAA	AAAA	AAA	AAA	AA										

#### 图 2 蓖麻 *RcGPDH* 基因序列及其推导的氨基酸序列 Fig. 2 Nucleotide and deduced amino sequences of *RcGPDH* from *Ricinus communis*

AtGPDH1 GKSEKDPLRIVSVGAGAWGSVFAALLQESYGGFRDKFQIRIWRRAGRAVDRETAEHLFEV AtGPDH2 GCNDDSKSKVTVVGSGNWGSVAAKLIASNALKLP-----SFHDEVRMWVFEEV AtGPDH3 GKADDDPLRIVGVGAGAWGSVFIAMLOENYGKFRGKVSVRIWRRGGRAIDKATAEHLFEV DvGPDH ----AEKVNVCIVGSGNNGSAIAKIVGANAAALP-----EFEERVTMFVYEEM OsGPDH1 GKADGDLLRIVGVGGGAWGSAFCALLQDAYGRHRDKAQVRVWRRPGRAVDRATAEHLFEV OsGPDH2 GKSDGDLLKIVGIGAGAWGSVFAALLQDAYGRFREKVQIRIWRRAGRSVDRTTAEHLFEV OsGPDH3 GKADGDPLRIVGVGAGAWGSVFCALMQDAYGHLRDKVQVRIWRRPGRAVDRATAEHLFEV OsGPDH4 ----HAKNLVAVIGSGNWGSVASRLIASNTAKLP-----SFHDEVRMWVFEEI PIGPDH2 GKAEGDPLRIVGIGAGAWGSVFTALLQDSYGHLRDKVLIRIWRRPGRSVDRSTAEHLFEV GKAEGDPLRIVGIGAGAWGSVFTALLQESYGHLRDKVLIRIWRRPGRSVDRATAEHLFEV PtGPDH RcGPDH2 GKADGDPLRIAGVGAGAWGSVFAALLQDSYSQFRDKVQIRIWRRPGRAVDRATAEHLFEV SbGPDH GKSEGDLLKIVSVGAGAWGSVFAALLQDAYGHFRDKVQIRIWRRPGRTVDRSTAEHLFEV VvGPDH GKAEGDPMRIVGVGAGAWGSVFAAMLQDSYGHLRDKVQIRIWRRPGRFVDRATAEHLFEV RcGPDH GKSEGDPLRIVGVGAGAWGSVFTALLQDSYGHLRDKVLIRLWRRPGKSVDRATAEHLFEV GXGXXG

图 3 RcGPDH 基因与其它物种 GPDH 同源基因氨基酸序列结构域分析 Fig. 3 Domain analysis of deduced amino acid sequences of RcGPDH and GPDH homologoue of other species 氨基酸序列与来自于某些其它物种的 GPDH 基 因氨基酸序列比较的结果显示,它们有一个共同的 GPDH 结构域,其序列为 GXGXXG(图3,表2)。序

列一致性分析表明 *RcGPDH* 基因与其它高等植物的 *GPDH* 基因有较高的同源性 但与拟南芥的 *AtGPDH2* 和水稻的 *OsGPDH4* 基因同源性较低(表 2)。

表 2 *RcGPDH* 基因与其它物种 *GPDH* 同源基因氨基酸序列同源性比较 Table 2 Multi – alignment of deducde amino acid sequences of *RcGPDH* and *GPDH* from various species

		1	L
物种名称 Species	基因名称 Gene	序列号 Accession number	同源性/% Homology
Ricinus communis	RcGPDH2	XP_002533846	85.6
Escherichia coli	EcGPDH	P37606	20.4
Vitis vinifera	<b>VvGPDH</b>	XP_002271029	86.7
Sorghum bicolor	SbGPDH	XP_002456915	85.4
Populus trichocarpa	PtGPDH	XP_002332423	90.4
	PtGPDH2	XP_002304772	89.7
Drosophila virilis	DvGPDH	EC1.1.1.8	21.6
Arabidopsis thaliana	AtGPDH1	CAC69665	83.8
	AtGPDH2	NP_198877	24.8
	AtGPDH3	NP_187426	80.7
Oryza sativa	OsGPDH1	NP_001055933	78.8
	OsGPDH2	NP_001045350	83.2
	OsGPDH3	NP_001044541	81.4
	OsGPDH4	NP_001045535	26.2



氨基酸替换 Amino acid substitutions(×100)



Fig. 4 Phylogenetic tree based on alignment of deduced amino - acid sequences of GPDH homologues



注:1 转基因酵母菌株总 RNA; 2 ,对照酵母菌株总 RNA; 3 ,转基因菌株 PCR 检测; 4 ,转基因菌株 RT – PCR 检测; 5 ,对照菌株 RT – PC 检测; 6 ,转基因菌株总 RNA 的 PCR 检测; M ,100bp plus DNA 分子量参照

Note: 1. Total RNA of transgenic yeast strain; 2. Total RNA of control yeast strain;

3. PCR analysis of transgenic yeast strain; 4. RT - PCR analysis of transgenic yeast strain;

5. RT - PCR analysis of control yeast strain; 6. PCR analysis of total RNA of transgenic yeast strain; M. 100bp plus DNA ladder

图 5 转基因酵母菌菌株表达分析

Fig. 5 Expression analysis of transgenic yeast strains

2.3 *RcGPDH* 基因在酵母菌株 BY4742 中的表达分析 挑取酵母菌落的 PCR 检测的结果表明 *,RcGP*-

*DH* 基因已经正向克隆到载体 pYES2.1/V5 – His – TOPO,并已转化到酵母菌株(图 5)。提取转 *RcGP*–

DH 基因酵母菌株 BG 和转空载体酵母菌株 BV 的 RNA, PCR 检测结果显示以 RNA 为模板时没有扩增 产物,说明 RNA 中无 DNA 污染。RT – PCR 检测结 果显示转化目的基因 *RcGPDH* 的菌株有目的条带, 而转化空载体的菌株没有扩增产物(图 5),说明目 的基因已经在酵母中表达。

#### 2.4 转基因酵母菌株生长曲线和油脂百分含量

转基因酵母和对照菌株在培养 12h 前均处于对 数生长期,而后逐渐进入稳定生长期,在 18h 左右进 入平台期,转空载体的对照菌株比转基因的菌株生 长速度快(图6)。取诱导培养 18h 的菌体进行油脂 百分含量的测定,结果显示,转基因菌株和对照菌株 的油脂含量没有明显变化,三次重复的平均值分别 为 5.26% 和 5.16%。





## 3 讨论

RcGPDH 基因蛋白质结构分析结果表明,RcGP-DH 基因与其它 NADH 依赖型 GPDH 基因一样,都 具有一个保守的 GPDH(Glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase)结构域<sup>[14~16]</sup>,而且与其它高等植物的 GPDH 基因高度同源,由此可见,RcGPDH 是一个 NADH 依赖型的基因。

在不同的 GPDH 酶作用下,细胞液和质体中均 能生成 Gly-3-P,作为一个中间代谢物,Gly-3-P参与细胞的多个代谢过程,除了为 TAG 提供碳骨 架而参与 TAG 合成代谢外,还参与细胞膜脂合成、 甘油合成、线粒体呼吸、葡萄糖合成、以及调节细胞 氧化还原平衡等生理代谢过程。本研究中,转目的 基因菌株比转空载体菌株生长慢,说明 *RcGPDH* 基 因的表达对酵母的生长起到了一定的抑制作用,可 能是由于该基因的表达打破了膜脂合成与 TAG 合

成及其它代谢过程中的平衡,从而对细胞造成了伤 害而抑制了细胞的生长<sup>[12]</sup>; RcGPDH 基因在酵母野 生型菌株中异位表达没有导致酵母细胞油脂含量的 明显变化,说明 RcGPDH 基因可能对蓖麻种子油脂 合成没有显著的贡献。该结果与已报道的研究结果 相似 最新的研究表明 ,大肠杆菌的 GPDH 酶基因 gpsA 在拟南芥中高表达时,Gly-3-P 的含量增加 了几倍 但种子中油脂的含量及组成没有变化[13]。 与 TAG 合成相关的 GPDH 酶主要在细胞质中,而 RcGPDH 基因亚细胞定位在线粒体上 推测 RcGPDH 基因主要参与线粒体呼吸代谢。另外, Vigeolas 等<sup>[6]</sup>转化油菜的基因是酵母 Drosophila virilis 的 GP-DH 基因 DvGPDH 不同物种 GPDH 同源基因聚类结 果表明 DvGPDH 基因与拟南芥的 AtGPDH2 基因聚 为一支 而与 RcGPDH 基因的亲缘关系较远。RcGP-DH 基因与拟南芥的 AtGPDH1 和 AtGPDH3 的同源 性相对较高 由此推测 蓖麻种子中可能还存在一个 与AtGPDH2 基因高度同源的基因参与蓖麻 TAG 的 合成。

参考文献:

- [1] 朱保葛. 蓖麻生物工程研究进展 [J]. 中国生物工程杂
   志 2007, 27(10):98 102.
- [2] 潘国才,丁爱华. 蓖麻的综合利用现状 [J]. 农业科技 与装备 2009(1): 1 – 2 5.
- [3] Kennedy E P. Biosynthesis of complex lipids [J]. Federation Proceedings, 1961, 20(4): 934.
- [4] Baud S, Lepiniec L. Physiological and developmental regulation of seed oil production [J]. Progress in Lipid Research 2010 49(3): 235 - 249.
- [5] Vigeolas H, Geigenberger P. Increased levels of glycerol - 3 – phosphate lead to a stimulation of flux into triacylg– lycerol synthesis after supplying glycerol to developing seeds of *Brassica napus* L. in planta [J]. Planta ,2004, 219(5):827-835.
- [6] Vigeolas H, Waldeck P, Zank T, et al. Increasing seed oil content in oil – seed rape (*Brassica napus* L.) by over – expression of a yeast glycerol – 3 – phosphate dehydro– genase under the control of a seed – specific promoter [J]. Plant Biotechnology Journal 2007 5(3):431 – 441.
- Ben Amotz A, Avron M. Isolation, characterization and partial purification of a reduced nicotinamide adenine di– nucleotide phosphate – dependent dihydroxyacetone re– ductase from the hal – ophilic alga *Dunaliella parva* [J]. Plant Physiology ,1974 53(4):628 – 631.
- [8] Sussman I , Avron M. Characterization and partial purification of DL – glycerol – phosphatase from *Dunaliella sali*-

na [J]. Biochim Biophys Acta ,1981 ,661(2): 199 - 204.

- [9] Goyal A. Osmoregulation in Dunaliella , part I: effects of osmotic stress on photosynthesis , dark respiration and glycerol metabolism in *Dunaliella tertiolecta* and its salt – sensitive mutant [J]. Plant Physiol Biochem ,2007 ,45 (9):696-704.
- [10] He Y, Meng X, Fan Q, et al. Cloning and characterization of two novel chloroplastic glycerol – 3 – phosphate dehydrogenases from *Dunaliella viridis* [J]. Plant Molecular Bology 2009, 71(1-2): 193 – 205.
- [11] Lu C , Wallis J G , Browse J. An analysis of expressed sequence tags of developing castor endosperm using a full – length cDNA library [J]. BMC Plant Biology , 2007 7:42.
- [12] Petschnigg J, Wolinski H, Kolb D, et al. Good fat, essential cellular requirements for triacylglycerol synthesis to maintain membrane homeostasis in yeast [J]. J Biolog-

ical Chemistry 2009 284(45): 30 981 - 30 993.

- [13] Wang J, Li R et al. A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast [J]. World J Microbiol Biotechnol 2009 25(5):921-925.
- [14] Remize F, Barnavon L, Dequin S. Glycerol export and glycerol – 3 – phosphate dehydrogenase ,but not glycerol phospha – tase ,are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Metab Eng ,2001 ,3 (4):301 – 312.
- [15] Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast [J]. Microbiol MolBiol Rev ,2002 ,66(2): 300 - 372.
- [16] Shen W Y , Li J Q , Dauk M , et al. Metabolic and transcriptional responses of glycerolipid pathways to a perturbation of glycerol 3 phosphate metabolism in *Arabidopsis* [J]. J Biological Chemistry ,2010 ,285 (52) : 22 957 22 965.

## 欢迎订阅 2012 年《中国农业科学》中、英文版

《中国农业科学》中、英文版由农业部主管、中国农业科学院主办。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究论文、综述、简报等。设有作物遗传育种;耕作栽培·生理生化;植物保护;土壤肥料·节水灌溉 ·农业生态环境;园艺;园林;贮藏·保鲜·加工;畜牧·兽医等栏目。读者对象是国内外农业科研院(所)、 农业大专院校的科研、教学人员。

《中国农业科学》中文版影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。1999 年起连续10年获"国家自然科学基金重点学术期刊专项基金"资助;2001年入选中国期刊方阵双高期刊; 1999年获"首届国家期刊奖"2003、2005年获"第二、三届国家期刊奖提名奖";2004-2006年连续荣获第 四、五届全国农业优秀期刊特等奖;2002年起7次被中信所授予"百种中国杰出学术期刊"称号;2008年获 中国科技信息研究所"精品科技期刊"称号,及武汉大学中国科学评价中心"权威期刊"称号;2010年荣获 "第二届中国出版政府奖期刊提名奖"。在北京大学《中文核心期刊要目总览(2008年版)》中位居"农业综 合类核心期刊表"首位。2010年1月起中文版改为半月刊,将有更多最新农业科研成果通过《中国农业科 学》及时报道。

《中国农业科学》英文版(Agricultural Sciences in China) 2002 年创刊 2006 年 1 月起正式与国际著名出版 集团 Elsevier 合作 ,海外发行由 Elsevier 全面代理 ,全文数据在 ScienceDirect 平台面向世界发行。2010 年 1 月起英文版页码增至 160 页。2010 年 Agricultural Sciences in China 被 SCIE 收录 ,拟于 2012 年 1 月更名为 Journal of Integrative Agriculture。

《中国农业科学》中文版大16开,每月1、16日出版,国内外公开发行。每期224页,定价49.50元,全年 定价1188.00元,国内统一刊号: CN11-1328/S,国际标准刊号: ISSN0578-1752,邮发代号:2-138,国外代 号: BM43。

《中国农业科学》英文版大 16 开,每月 20 日出版 国内外公开发行。每期 160 页 国内订价 36.00 元,全年 432.00 元 国内统一刊号: CN11 – 4720/S 国际标准刊号: ISSN1671 – 2927 邮发代号: 2 – 851 国外代号: 1591M。 地址:北京中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部 邮编:100081

电话:010-82109808 82106280 82106281 82106282 传真:010-82106247

网址:www.ChinaAgriSci.com E - mail: zgnykx@mail.caas.net.cn