

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201601013

引文格式: 申明明,程志远,陈疏影,等. 割手密醛脱氢酶 *ScALDH* 基因的克隆与表达分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(3):380-387SHEN MM, CHEN ZY, CHEN SY, et al. Cloning and expression analysis on the *ScALDH* gene of *Saccharum spontaneum* [J]. Guihaia, 2017, 37(3):380-387

割手密醛脱氢酶 *ScALDH* 基因的克隆与表达分析

申明明¹, 程志远^{1,2}, 陈疏影¹, 王先宏¹, 何丽莲¹, 李富生^{1*}

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 本研究从甘蔗细茎野生种(割手密 *Saccharum spontaneum*)中克隆抗旱相关的基因 *ScALDH*, 并分析其在干旱处理条件下的表达情况和序列特征。利用 RT-PCR 技术克隆甘蔗的 *ALDH* 基因片段, 并对其核苷酸和氨基酸序列进行分析。使用 NCBI Blastx、ORF finder、Mega、NCBI Conserved Domain Search 等程序对其分别进行不同物种氨基酸比较、开放阅读框(ORF)寻找、进化树及保守序列分析, 并用 Real Time-PCR 分析所克隆基因在干旱胁迫前后的表达差异。结果表明: 克隆出甘蔗的 *ALDH* 基因片段, 总长度为 1 996 bp, 其中蛋白质编码区(CDS)全长 1 524 bp, 编码 508 个氨基酸; 与其它物种 *ALDH* 类蛋白氨基酸序列有很高的同源性, 有 *ALDH* 家族的保守序列, 并含有完整的开放阅读框, 系统进化树分析显示与玉米的蛋白质亲缘关系最近; Real time-PCR 数据表明, 在干旱胁迫下, 随着干旱时间的延长, 该基因的表达量呈持续积累的表达模式。总体来说, 该基因对于干旱胁迫显著表达。利用 RT-PCR 技术克隆的甘蔗 *ALDH* 基因, 属于 *ALDH* 蛋白家族的一员, 具有其典型的功能域, 该基因在干旱胁迫过程中参与抗旱作用。该研究结果为野生种资源开发、优良抗旱亲本选择和培育抗旱性强甘蔗品种提供了参考依据。

关键词: 割手密, 基因克隆, 序列分析, 干旱胁迫, real time-PCR

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)03-0380-08

Cloning and expression analysis on the *ScALDH* gene of *Saccharum spontaneum*

SHEN Ming-Ming¹, CHENG Zhi-Yuan^{1,2}, CHEN Shu-Ying¹,WANG Xian-Hong¹, HE Li-Lian¹, LI Fu-Sheng^{1*}

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Institute of Crop Sciences of CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: We cloned a drought resistant *ALDH* gene with RT-PCR gene from *Saccharum spontaneum*, detected the gene expression level under different drought conditions, and analyzed the nucleotide and amino acid sequences with Blastx, Conserved Domain Search, ORF finder and MEGA. We compared the amino acids among different species, and tried to find reading frames in the sequence, to search conserved Domain and to make evolutionary tree. We analyzed the gene expression level of the cloned gene in drought stress with real time-PCR. The total length of the *ALDH* gene fragment

收稿日期: 2016-03-28 修回日期: 2016-04-30

基金项目: 国家自然科学基金(31560417); 云南省应用基础研究重点项目(2015FA024); 云南省现代农业甘蔗产业技术体系建设项目(2009-2015); 云南省重点新产品开发计划项目(2012BB014); 云南省高原山地作物可持续生产系统研究创新团队项目(云科人发[2012]18号) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(31560417); the Yunnan Applied Basic Research Program(2015FA024); the Industry Technology System of Cane in Yunnan; Yunnan Provinc Key Program for New Product Development; Yunnan Plateau Mountain Sustainable Crop Production Team Innovation System Research Program([2012] No. 18)]。

作者简介: 申明明(1991-), 男, 河南周口人, 硕士, 主要从事生物分子的研究工作, (E-mail) 960414850@qq.com。

通信作者: 李富生, 博士, 教授, 从事甘蔗种质资源的研究与利用, (E-mail) lfs810@sina.com。

cloned was 1 996 bp, including 1 524 bp coding sequence, which was encoded 508 amino acids. The cloned sequence had a very high homology with other species' amino acid sequences and had the conserved sequences of ALDH family, a complete open reading frame as well. Phylogenetic tree analysis showed that protein had the closest relationship with corn. The real time-PCR data showed that the expression of the gene was expressed in a continuous accumulation mode. On the whole, the gene responds to drought stress. The cloned gene belong to the ALDH protein family, which has its typical function domain. The expression pattern analysis showed that the gene was involved in the process of drought stress. The results of this study aimed at developing the excellent resources of wild species, as well as to explore the drought resistance of these resources. The study provides the basis for the selection of the parents of the fine and drought resistance in the future.

Key words: *Saccharum spontaneum*, gene cloning, sequence analysis, drought stress, real Time-PCR

甘蔗 (*Saccharum officinarum*) 是甘蔗属、多年生高大实心草本植物, 是热带和亚热带农作物, 是制造蔗糖的原料, 也是国计民生必需品 (张华和陈如凯, 2003)。除制糖外, 其副产品的利用范围非常广泛, 如生产纤维板和饲料 (黄东杰和孙继华, 2012)。此外, 一些国家还把甘蔗作为一种高产的生物能源作物, 用全茎制造酒精代替部分化石燃料 (赵丽萍等, 2010)。发展甘蔗生产, 对提高人民生活、促进农业及相关产业的发展都具有重要作用。

目前, 干旱对作物生产有普遍影响, 其所造成的产量损失超过其它各种胁迫因素造成的总和 (闫志利和牛俊义, 2009)。轻度水分胁迫时甘蔗叶片光合速率有所下降, 到中度干旱、严重干旱时叶片光合速率呈显著性下降, 叶肉细胞光合能力降低, 甘蔗的生理性状受到较严重影响 (罗明珠和梁计南, 2005)。此外, 甘蔗在伸长期的中后期受到干旱胁迫时, 蔗茎的生长速度明显降低, 植株变矮, 单茎重明显降低 (陆国盈和韩世健, 2002)。我国蔗区 85% 以上分布在无灌溉条件的旱坡地, 甘蔗品种的抗旱性很大程度上决定着甘蔗生产的效益 (李奇伟和邓海华, 2011)。甘蔗传统育种方法主要是利用栽培种/品种与野生种 (如割手密) 杂交, 野生种的抗逆性 (抗旱、耐寒) 较强, 是提高甘蔗品种抗逆性的重要基因源。

醛脱氢酶基因 (Aldehyde dehydrogenase, *ALDH*) 是一类编码将醛脱氢氧化为相应羧酸的基因, 可有效减少醛类物质在细胞内的积累, 增加细胞的抗逆性, 减少干旱胁迫对植物的产生的影响。目前在植物中发现的 *ALDH* 蛋白是一个大家族, 包括 14 个家族: *ALDH2*、*ALDH3*、*ALDH5*、*ALDH6*、*ALDH7*、*ALDH10*、*ALDH11*、*ALDH12*、*ALDH18*、*ALDH19*、*ALDH21*、*ALDH22*、*ALDH23*、*ALDH24*, 其中 *ALDH11*、*ALDH19*、*ALDH22*、*ALDH23* 和 *ALDH24* 为

植物所特有 (Zhang et al, 2012; Wood & Duff, 2009)。相对于人类、动物, 植物的乙醛脱氢酶研究来说较少, 从植物中克隆到的乙醛脱氢酶家族的基因不是很多。李新玲等 (2007) 从羊草中克隆出一个乙醛脱氢酶基因, 与从水稻中克隆的 *ALDH1a* 家族基因的同源性最高, 该基因对盐、冷冻、干旱均有响应。杨红兰等 (2010) 成功从齿肋赤藓克隆了 *ALDH21* 家族的基因, 其研究得出, 该基因在干旱胁迫状态时的表达量显著高于水合状态, 可能参与干旱胁迫应答。沈一等 (2013) 从花生中挖掘出一个 *ALDH7* 基因, 发现该基因在盐胁迫下, 根、叶中的表达量明显上升。到目前为止, 尚未见在甘蔗野生种印度割手密中克隆出 *ALDH* 家族基因的报道。本研究以甘蔗野生种——印度割手密 ($2n=64$) 为材料, 克隆到一个 *ALDH* 家族基因, 通过生物信息学分析和定量 PCR 技术检测在干旱胁迫前后基因的诱导情况, 旨在开发野生种的优良资源, 以及探索这些资源的抗旱性, 为今后利用优良抗旱亲本的选择和培育抗旱性强的甘蔗品种提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及干旱处理

植物材料: 印度割手密 ($2n=64$), 取材自云南省农科院甘蔗所 (开远) 的国家甘蔗资源圃。

干旱处理: 供试植物材料种植于云南农业大学温室大棚中, 花盆大小在直径 50 cm, 高 30 cm 的花盆中, 分为四组, 对照组, 正常浇水, 保持湿润; 实验组, 待苗长到 15~20 cm 高时, 分别干旱处理 2、4、6 d 后取叶片提取总 RNA。

1.2 试剂

TRNzol A⁺ 总 RNA 提取试剂、FastQuant cDNA

第一链合成试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、pLB Vector、T4 DNA Ligase、DNA 高保真酶、dNTP、TOP10 感受态细胞、荧光定量试剂盒 SuperReal PreMix Pius ,均购自天根生化试剂有限公司。引物合成由 Introvigen 公司合成,测序由擎科生物公司完成。

1.3 总 RNA 提取与 cDNA 合成

等到甘蔗在温室生长至 15~20 cm,剪取叶片,迅速放在液氮中,备用。利用 Tigen Trizol 试剂盒,提取叶片总 RNA (-80 ℃ 保存)。用紫外分光光度计检测 RNA 浓度,用琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。后采用 Fast Quant RT Super Mix (Tiangen, KR108)试剂盒反转录获得 cDNA 第一链。

1.4 ScALDH 全长的克隆

使用天根公司 FastQuant RT Super Mix (Tiangen, KR108)快速反转录形成 cDNA ,放入 -80 ℃ 超低温冰箱备用。利用高保真酶进行 PCR 扩增。以甘蔗割手密材料 cDNA 产物为模板,克隆 ScALDH 基因。参考本实验室的转录组信息,设计基因特异引物引物序列(表 1)。

表 1 ScALDH 基因全长扩增所需引物序列

Table 1 PCR primers used in ScALDH gene cloning

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
GP1	ATGAGCGGCGGCGGTCAGG
GP2	CTACTGCATCCCAGATGTG

使用 Tigen 公司的高保真 pfu 酶进行扩增 ScALDH 目的基因。PCR 仪使用 ABI 公司 Veriti 96 孔梯度。PCR 反应体系:Template 1 μL;Primer F 1 μL;Primer R 1 μL;Buffer 2 μL;dNTP 2 μL;Pfu 酶 0.5 μL;ddH₂O 13.5 μL,补足到 20 μL;总体积为 20 μL。PCR 仪反应程序:96 ℃ 预变性 2 min;96 ℃ 变性 30 s;55 ℃ 退火 30 s;72 ℃ 延伸 4 min;72 ℃ , 10 min,后 4 ℃ 保存。

1.5 PCR 产物的克隆纯化与筛选

对 PCR 产物的目的大小片段使用 Tigen 的回收试剂盒,切胶、回收、纯化。采用平末端连接方法,配制反应体系。连接到 pLB vector 克隆载体上,后导入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,进行 Amp 抗性筛选,培养 16 h 后,对菌落进行检测,采用快速检测方法,做菌落 PCR,扩增程序:95 ℃ 预变性 2 min;95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s,72 ℃ 4 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。测序

服务有北京擎科生物公司提供,2 次重复。

1.6 ScALDH 基因的 Real time-PCR 分析

根据 ALDH 基因序列,用实时荧光定量 PCR 软件 Beacon Designer 7.0,设计实时荧光定量引物 QF、QR,内参基因选择 β-actin(肌动蛋白),引物为 ACT-INF、ACTINR;特异性引物序列见表 2。

表 2 Real time-PCR 所需的内参引物和特异性
目的基因引物特异性引物

Table 2 Internal primers and specific primer
used in quantitative real-time PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
QF	AAGGATTGAGCAGTCTAT
QR	TTCAGCACCATTAGTAGG
ACTIN F	CTGGAATGGTCAAGCGTGGT
ACTIN R	TCCTTCTGTCCCATCCCTACC

使用仪器 ABI 公司 7500 荧光量 PCR 仪,对于旱处理前后的基因表达情况进行分析。采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行、Real Time PCR 的专用试剂。反应体系(20 μL 体系):2×SuperReal PreMix Pius 10 μL;正向引物(10 μmol · L⁻¹) 0.6 μL;反向引物(10 μmol · L⁻¹) 0.6 μL;cDNA 模板 1 μL;50× ROX Reference Dye 0.4 μL;加 RNase-free ddH₂O 7.4 μL,补足到 20 μL。采用三步法 PCR 扩增反应,反应程序如下。预变性:95 ℃ ,15 min。PCR 反应:95 ℃ 变性 ,10 sec;50 ℃ 退火,20 sec;72 ℃ 延伸,32 sec;40 个循环。同时在 60~95 ℃ 进行融解曲线分析。利用 2^{-ΔΔCT}法计算基因的相对表达量。每个样品进行 4 次重复,取其平均值。

1.7 ALDH 序列分析

对 ALDH 核苷酸和氨基酸序列进行分析,使用 NCBI Blastx、ORF finder、Mega、NCBI Conserved Domain Search 等程序对其进行氨基酸序列相似性分析、开放阅读框(ORF)、进化树、及结构域分析与功能结构域查找。采用 ProtParam 计算蛋白质的相对分子量和理论等电点。用 Clustal X 进行氨基酸序列比对与相似序列分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 的检测结果

利用 trizol 抽提试剂盒提取的甘蔗总 RNA 如图

1。并利用紫外分光光度计检测, RNA 样品的 OD260/280 均在 1.9~2.1 之间,纯度较高可以用于后续的实验。

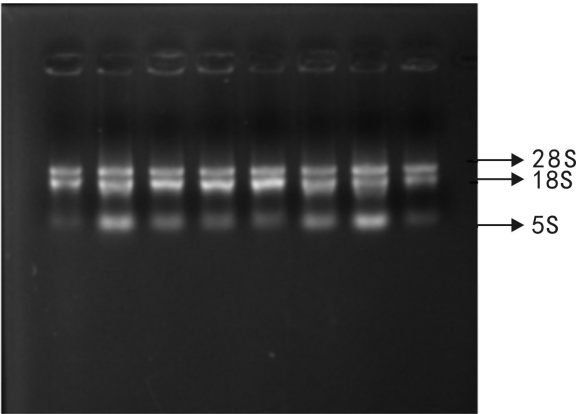


图 1 RNA 样品琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 RNA testing result of RNA

2.2 *ALDH* 基因的扩增

PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖 TAE 凝胶电泳(图 2),在 2 000 bp 左右处显示一条清晰的条带与预计大小一致。使用天根公司提供的 DNA 回收试剂盒,对目的片段进行切胶回收。

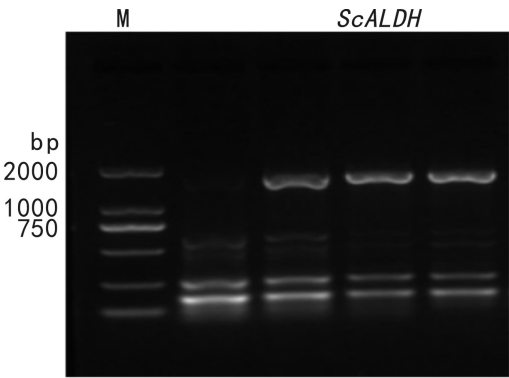


图 2 目的基因的扩增结果 M. Marker; *ScALDH*. 目的片段。
Fig. 2 Amplification results of the target gene
M. Marker; *ScALDH*. Target gene.

2.3 *ALDH* 的序列分析

将获得的测序结果在 NCBI 上进行 ORF 的寻找和 Blastx 分析。寻找结果共获得 14 个大小不一的 ORF,其中最长的一个 ORF 和其他物种的 *ALDH* 基因核苷酸序列长度相似,可判断该位点就是 *ALDH* 基因

的 ORF。该 ORF 有一个起始密码子 ATG,终止密码子 TAA,编码 508 个氨基酸,5'端非编码区长 171 bp,3'端非编码区长 298 bp,CDS 全长 1 524 bp(图 3)。

利用 ProtParam 软件分析表明,该基因编码蛋白质的分子式为 (Formula) C₂₄₁₄ H₃₈₄₇ N₆₅₇ O₇₁₀ S₂₅,分子量为 54 235.5 kD,理论等电点 pI 为 6.22。负电荷的氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 45,带正电荷的氨基酸残基总数 (Arg+Lys) 为 42,亲水性平均系数 (instability index II) 为 34.22,是一类稳定的蛋白。通过 Blastx 分析,分析结果发现与其它物种的 *ALDH* 基因所编码的氨基酸序列,具有较高的同源性。推导该基因编码的氨基酸序列 (g:甘蔗),与玉米 (y:玉米,gi|226531366|)、小麦 (x:小麦,gi|814937256|)、拟山羊草 (n:拟山羊草,gi|814937260|)、多年生黑麦草 (h:黑麦草,gi|769748345|)、可可 (k:可可,gi|769748345|)、野生大豆 (d:野生大豆,gi|226531366|)、苹果 (p:苹果,gi|658309736|) *ALDH* 一致性分别为 98%、92%、91%、91%、82%、82%、80%。序列对比如图 4。用 MEGA5.0 做系统进化树(图 5)结果显示,8 个物种的 *ALDH* 基因被聚为两大类群:I 类有小麦、拟山羊草、黑麦草。II 类有可可、野生大豆、苹果。从图中发现 *ScALDH* 与玉米的 *ALDH7A1* 编码的蛋白质亲缘关系最近,而且 9 个物种的蛋白氨基酸同源性均很高,因此该蛋白应属于醛脱氢酶 *ALDH* 家族蛋白,而且 *ALDH* 是一类非常保守的基因家族。使用 NCBI 在线软件对 *ScALDH* 蛋白的保守区进行预测,预测结果表明,在保守结构域上,目标序列和其他物种都存在 NAD⁺ 结合位点,TA FN、KGAP、FTGSTRAGLM 和 LEL。以及特有的 4 个特有的催化残基 N、E、G、C 分别位于 165、266、297、299 位点上。将暂该序列命名为 *ScALDH*,提交 GenBank, GeneBank 登录号 ku517650。

2.4 干旱胁迫下 *ALDH* 基因的表达分析

为揭示 *ALDH* 基因在干旱胁迫过程中其表达量的变化,以不同时间处理的 cDNA 材料为模板,进行分析,用甘蔗的看家基因 *ACTIN* 为内参。取如下处理材料:WET 组正常浇水、DRY2 组干旱处理 2 d、DRY4 组干旱处理 4 d、DRY6 组干旱处理 6 d,反转录成 cDNA 用于实时荧光定量 PCR 实验。结果如图 6,从图中可以看出,*ALDH* 在叶片中的表达量存在明显差异。干旱处理两天的材料 (DRY2),其 *ALDH* 基因的相对表达量明显高于对照组 (WET),是对照组的 17.67 倍。干旱处理 4 d 的材料 (DRY4),

1 GCCACCCCCATTCTCCGCGCCCGGCTCCTTCGTTTCTTCCCGGAGCAGTTACAGTCCCCACTCCACCTCCTTCT
1 A T P I P P R P A S F V S F P E Q F T V P T P P P S
79 ACAAATAATACACAGTACCTCACCACACCTGCGCTCCCCTGCCTTCCGCTTCCCTATCCCCGTCATCGTACGGAACCT
27 T N N T Q Y L T T P A L P C L P L P Y P L H R T E P
157 GCCAACGCCGCGGCCATGCGGCGCTTCGCGAAGGAGCACCAGTTCTCGCCGAGCTCGGCTCGCGCAGCGCAACCCG
53 A N A G A M G A F A K E H Q F L A E L G L A Q R N P
235 GCGCGTTTCGATCGCGCGCTGGGCGGCTCAGGCCCGCGTCACCTCCACCAGCCGACCAACACAGGTCATC
79 G A F A C G A W G G S G P A V T S T S P T N N Q V I
313 GCGGAGGTTGTGGAGGCGTCCGTGCAGGACTATGAGGAGGGCATGCGCGCTTCTCGATGCCGCAAGACATGGATG
105 A E V V E A S V Q D Y E E G M R A C F D A A K T W M
391 GCGATTCTGCTCCAAAGCGAGGAGATTGTTAGGCAAATCGGTGATGCACTGCGAGCAAAGCTCCATCACCTTGGC
131 A I P A P K R G E I V R Q I G D A L R A K L H H L G
469 AGGCTTGTGCTACTTGAGATGGGAAAATTCTTCTGAAGGGATCGGTGAGGTTGAGAAATCATCGACATGTGTGAT
157 R L V S L E M G K I L P E G I G E V Q E I I D M C D
547 TATGCTGTGGGGCTAAGTCGCCAACTAAATGGATCCATTATACCATCTGAACGACCAACCATATGATGATGGAGGTA
183 Y A V G L S R Q L N G S I I P S E R P N H M M M E V
625 TGGAATCCCCTTGGAGTTGTGGGTGTTATAACGGCATTTAATTTTCTTGCCTGTGCTTGGTTGGAATGCTTGCAAT
209 W N P L G V V G V I T A F N F P C A V L G W N A C I
703 GCTTTGGTCTGTGGAATAGCGTTGTCTGGAAGGTGCTCCAACGACTCCACTGATCACTATTGCAATGACAAAAATA
235 A L V C G N S V V W K G A P T T P L I T I A M T T K I
781 GTGCTAGTGTATTGGAGAACAACACTTGCAGGCGCAATTTTCACATCTTTTGTGGGGCAGTCAAATTTGGTCAA
261 V A S V L E K N N L P G A I F T S F C G G T E I G Q
859 GCAATTGCCCTTGACACTAGGATACCTTTGGTTTCATTCACTGGAAGTACAAGGGCTGGTCTGATGGTTTCAGAACAA
287 A I A L D T R I P L V S F T G S T R A G L M V Q Q Q
937 GTTAATGCAAGATTGGTAAATGCCTTCTTGAACCTAGCGGAAACAATGCCATCATTGTTATGGATGACGCAGATATC
313 V N A R F G K C L L E L S G N N A I I V M D A D I
1015 CAGCTAGCTGTGCGTTCTGTCTTGTTCGCTGCTGTTGGTACAGCAGGACAACGCTGCACTACATGCCGTAGGCTGATT
339 Q L A V R S V L F A A V G T A G Q R C T T C R R L I
1093 CTTTCATGAAAGCATATATCAAACCTTCTTCTGATCAACTTGTGAGGTATACAAACAAGTCCGAATTGGGGATCCGTTG
365 L H E S I Y Q T F L D Q L V E V Y K Q V R I G D P L
1171 GAGAAAGGCTTACTTGGGACCCTGCACACTCCTGTTCAAAGAGAATTTTGAAGGGCTCAGACCATCAAA
391 E K G T L L G P L H T P A S K E N F L K G V Q T I K
1249 TCTCAGGGAGGGAAAATCCTTTTTGGAGGATCTGCCATTGAATCAGAAGGAACTTTGTGCAACCAACGATTGTGGAA
417 S Q G G K I L F G G S A I E S E G N F V Q P T I V E
1327 ATTACACCTTCTGCACCACTTGTGAAAGAAGAACTTTGGCCCTGTCCTTTATGTTATGAAATTTAGACCTTGAAG
443 I T P S A P V V K E E L F G P V L Y V M K F Q T L K
1405 GAAGCAATCGAAATCAATAACTCTGTTCTCAAGGATTGAGCAGTTCTATATTTACAAAGAGGCCAGATATAATTTTT
469 E A I E I N N S V P Q G L S S S I F T K R P D I I F
1483 AAGTGGCTCGGGCCCCATGGTAGTGATTGTGGTATAGTGAATGTGAACATACCTACTAATGGTGTGAAATCGGTGGA
495 K W L G P H G S D C G I V N V N I P T N G A E I G G
1561 GCATTGGTGAGAAAAAGCTACTGGTGGTGAGCAGAGGAGCGATTCTTGGAAAGCAGTACATGAGGAGGCA
521 A F G G E K A T G G G R E A G S D S W K Q Y M R R A
1639 ACTTGTACAATCAACTATGGGAGCGAGCTACCTCTAGCTCAGGGAATCAATTTTGGTTAATCCTGCAGGAGGGTTGCG
547 T C T I N Y G S E L P L A Q G I N F G * S C R R V A
1717 CATGGATCTCGGTGTTTTCTGCGAGCGTGATGACGTATGGGGGAAGTATGCAACCGCGTTTGAGATATCTGCAGAG
573 H G T C F C T G T W M T Y G G T D A T A F E I S A E
1795 ACTTGAGCATCGTTTATGGGCGTCAGTTGTCAAACCTAAATTGCAGGACAGCAGTATTAGCATGTGTACATAAAATAA
599 T * A S F M G V S C Q T * I A G Q Q Y * H V Y I K *
1873 GATGTTTGTGCTCGTGGTCCGTGGTCTGTGGAACGTTTAGGTGCCGGTGTCCAGTCTACTAATAAACTGGCTCTTC
625 D V C C S W S V V C G T F R C R C P S L L I N W L F
1951 TAAAAGAGTAAATCTTCCCATGTACCTTCAAATGGACATTAA
651 * K S K S S H V T F K M D H L

图3 *ScALDH* 基因的核酸及推导的氨基酸序列 终止子用“*”表示,ATG为起始密码子,TAA终止密码子。
Fig. 3 Nucleic acid and deduced amino acid sequence of *ScALDH* gene Stop codon is indicated
by asterisk,ATG for the start codon,TAA for the stop codon.

又高于 DRY2 处理的,是 DRY2 的 2.08 倍。而 DRY6 的表达量又是 DRY4 的 1.4 倍。由此可见,随着干旱胁迫时间的延长,*ALDH* 基因的表达量在逐渐升高,处理 6 d 后的材料的表达量,竟然是对照组的 51.79 倍。该基因在干旱胁迫下,呈明显上调趋势。

3 讨论与结论

随着测序技术的不断发展,RNA-Seq 高通量测序技术应用在了转录组领域中,高通量测序技术能够全面快速地获取某一物种特定器官或组织在某一

[illegible]

图 4 割手密 *ScALDH* 蛋白氨基酸序列与所列物种的 *ALDH* 蛋白氨基酸序列同源性比较结果
(*)代表蛋白质中相同的或保守的氨基酸; (:)代表可替代的序列保守片段; (.)代表可替代的半保守

序列片段；下划线指的是 NAD⁺结合位点；双下划线指的是其序列上特有的催化残基。

Fig. 4 Comparison results of amino acid sequence homology with several listed species of *Saccharum spontaneum*

Asterisk (*) indicates identical or conserved amino acids in all of the aligned proteins are indicated by;

A colon (;) indicates conserved substitutions; dot (.) indicates semi-conserved substitutions.

状态下的几乎所有转录本,反映出它们的表达水平。特别是用于挖掘和筛选抗病、抗逆、农艺性状、代谢途径相关的基因研究,它可以初步识别未知基因。但是该方法的不足之处就是,挖掘和筛选的相关基因仍需要在实验中验证。本研究通过转录组测序结果,所获得的甘蔗野生种割手密 *ALDH* 基因片段,属于醛脱氢酶基因家族,具有乙醛脱氢酶特异的保守序列。经 NCBI Blastx 比对和做进化树分析之后,其

与玉米的 *ALDH7A1* 编码的蛋白质亲缘关系最近,相似度达到了 98%,与小麦、拟山羊草、多年生黑麦草、可可、木本棉、野生大豆、苹果 *ALDH* 一致性分别为 92%、91%、91%、82%、82%、82%、80%。ScALDH 其与已知的 ALDH 家族有极高的同源性,含有 NAD⁺ 的结合位点,又有 ALDH 家族保守序列,可确认为其 ALDH 家族,暂命名为 ScALDH。ALDH 是一类非常保守的基因家族。

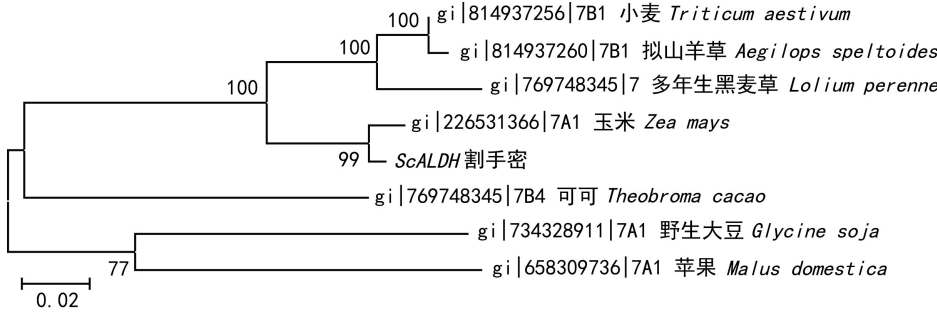


图 5 割手密 *ScALDH* 基因表达的蛋白与所列出植物的 *ALDH* 蛋白的进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the *ScALDH* and several listed *ALDH* proteins of *Saccharum spontaneum*

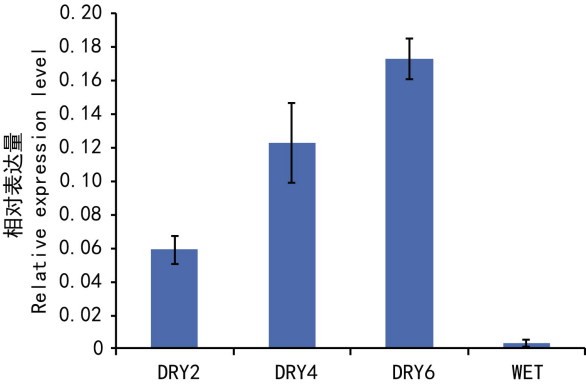


图 6 干旱胁迫对 *ScALDH* 基因在甘蔗叶片中相对表达量

Fig. 6 Expression analysis of *ScALDH* gene under drought stress

实时荧光定量 PCR 结果发现,该基因在割手密中表现出持续积累的表达模式,即随着干旱胁迫时间的延长,其表达量增加。表明 *ScALDH* 基因的表达在割手密抗逆境过程中可能起着重要的作用。拟南芥、烟草、中过量表达的大豆 *ALDH7* 能提高转基因植株的抗氧化胁迫能力 (Rodrigues et al ,2006)。*ALDH* 基因导入并整合到番茄的基因组中,在干旱、高盐 and 低温胁迫条件下,转 *ALDH* 基因番茄对环境胁迫造成的伤害表现出较强的抗性,即 *ALDH* 基因具有提高植物抗氧化胁迫的功能 (张海玲等,2010)。An et al(2014)发现玉米的根部的 *ALDH7* 在多重环境胁迫下,起着排除醛类物质的作用。另外,*ALDH7* 的主要功能可能是参与调控胁迫反应和组织膨胀压力,或参与清除引起脂质过氧化反应的醛类物质 (Kirch et al ,2004)。植物 *ALDH7* 家族基因的表达受到干旱和高盐等非生物逆境胁迫诱导

(Kotchoni et al ,2006)。*ALDH7a1* 还可通过产生渗透调节物质如甜菜碱和氧化脂质过氧化产物保护细胞免于损伤 (Brocker et al,2011)。但可以确认的是 *ALDH* 家族与抗性有非常密切的关系。

从本研究结果可以得出,割手密 *ScALDH* 蛋白基因其表达量与干旱胁迫的时间呈正相关。这与陈加敏和朱承慧 (2013)、Kirch et al (2001)、Sunkar et al (2003) 得出了相似的结论。植物在受到干旱等逆境胁迫时,体内的 *ALDH7* 基因持续积累地表达,表明 *ALDH7* 蛋白家族基因参与干旱胁迫应答,在抗逆中担任着重要角色。*ALDH* 蛋白家族基因能够提高植物的抗逆性,是较理想的抗逆基因工程候选基因。

参考文献:

AN X, DUAN FY, GUO S, et al,2014. Transcriptional regulation of expression of he maize aldehyde dehydrogenase 7 gene (*ZmALDH7B6*) in response to abiotic stresses [J]. *Integr Agr*, 13(9): 1900–1908.

BROCKER C, CANTORE M, FAILLI P, et al,2011. Aldehyde dehydrogenase 7A1 (*ALDH7A1*) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity [J]. *Chem-Biol Integr*,191 (1–3):269–277.

CHEN JM, ZHU CH,2013. Cloning and expression analysis of sorghum resistance gene *SbALDH7* [J]. *Chin Agric Sci Bull*,29 (12): 62–68. [陈加敏,朱承慧,2013. 高粱耐逆基因 *SbALDH7* 的克隆与表达分析 [J]. *中国农学通报*,29(12): 62–68.]

HUANG DJ,SUN JH,2012. Research on sugarcane breeding [J]. *Chin J Trop Agric*,32(1):46–53. [黄东杰,孙继华,2012. 甘蔗育种研究进展 [J]. *热带农业科学*,32(1):46–53.]

KIRCH HH, BARTELS D, WEI Y, et al,2004. The *ALDH* gene superfamily of *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*,9(8):371–377.

KIRCH HH, NAIR A, BARTELS D,2001. Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*,28(5):555–567.

KOTCHONI SO, KUHN C, DITZER A, et al,2006. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis*

- thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress [J]. *Plant Cell Environ.* (29):1033–1048.
- LI QW, DENG HH, 2011. Major problems and strategy in sugarcane breeding and variety extension in China [J]. *Sugarcane Sugar*, 4:70–76. [李奇伟, 邓海华, 2011. 当前我国甘蔗品种选育与推广中存在的突出问题及对策 [J]. *甘蔗糖业*, 4:70–76.]
- LI XL, YANG CP, XU XL, 2007. Molecular cloning and expression analysis of aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene segment in *Leymus chinensis* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 23(6):115–120. [李新玲, 杨传平, 徐香玲, 2007. 羊草乙醛脱氢酶 (ALDH) 基因片段的克隆及表达分析 [J]. *中国农学通报*, 23(6):115–120.]
- LUO GY, HAN SJ, 2002. Effects of drought stress on yield and quality of sugarcane in the middle and late stage of sugarcane elongation [J]. *Guangxi Sugarcane Sugar*, (4):3–5. [陆国盈, 韩世健, 2002. 甘蔗伸长中后期干旱胁迫对产量和工艺品质的影响 [J]. *广西蔗糖*, (4):3–5.]
- LUO MZ, LIANG JN, 2005. Responses of sugarcane to drought stress during seedling stage [J]. *Chin J Trop Crop*, 26(4):38–40. [罗明珠, 梁计南, 2005. 苗期甘蔗对于干旱胁迫的反应 [J]. *热带作物学报*, 26(4):38–40.]
- RODRIGUES SM, ANDRADE MO, GOMES AP, et al, 2006. *Arabidopsis* and tobacco plants ectopically expressing the soybean anti-tiquitin-like *ALDH7* gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress [J]. *J Exp Bot*, 57:1909–1918.
- SHEN Y, LIU YH, CHEN YH, 2013. Identification and salt stress expression of *ALDH7* gene in peanut [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, (5):979–984. [沈一, 刘永惠, 陈志德, 2013. 花生 *ALDH7* 基因的鉴定与盐胁迫表达 [J]. *江苏农业学报*, 29(5):979–984.]
- SUNKAR P, BARTELS D, KIRCH HH, 2003. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance [J]. *Plant J*. (35):452–464.
- WOOD AJ, DUFF RJ, 2009. The aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily of the moss *Physcomitrella patens* and the algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Ostreococcus tauri* [J]. *Bryologist*, 112(1):1–11.
- YANG HL, ZHANG DY, LIU Y, et al, 2010. Cloning of *ALDH21* from *Syntrichia caninervis* and expressing analysis [J]. *Genomics Appl Biol*, 29(1):24–30. [杨红兰, 张道远, 刘燕, 2010. 齿肋赤藓乙醛脱氢酶基因 *ALDH21* 的克隆与表达分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 29(1):24–30.]
- YAN ZL, NIU JY, 2009. Progress on the response mechanism of crop to drought stress [J]. *J Hebei Agric Sci*, 13(4):6–10. [闫志利, 牛俊义, 2009. 作物对于干旱胁迫的响应机制研究进展 [J]. *河北农业科学*, 13(4):6–10.]
- ZHANG H, CHEN RK, 2003. Research on enhancing the core technology competitiveness of sugarcane in China [J]. *Sugarcane*, 10(3):49–54. [张华, 陈如凯, 2003. 提升我国甘蔗核心技术竞争力的研究 [J]. *甘蔗*, 10(3):49–54.]
- ZHANG HL, SHANG C, LI SK et al, 2010. Studies on transformation of aldehyde dehydrogenase (ALDH) into tomato [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 26(13):23–29. [张海玲, 尚晨, 李佑恺, 2010. 乙醛脱氢酶基因 (ALDH) 转化番茄的研究 [J]. *中国农学通报*, 26(13):23–29.]
- ZHANG Y, MAO L, WANG H, et al, 2012. Genome-wide identification and analysis of grape aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily [J]. *PLoS ONE*, 7(2):e32153.
- ZHAO LP, ZHANG YB, WU YL, 2010. Discussion on development and utilization of bio-energy sugarcane [J]. *Sugar Crop Chin*, 4:72–74. [赵丽萍, 张跃彬, 吴彦兰, 2010. 生物能源甘蔗开发利用探讨 [J]. *中国糖料*, 4:72–74.]

(上接第 379 页 Continue from page 379)

- 刘法涛, 2011. 麻疯树鲨烯合酶基因 *SQS* 的克隆及生物信息学分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 19(5):391–399.]
- PANDIT J, DANLEY DE, GAYLE K, et al. 2000. Crystal structure of human squalene synthase [J]. *Biol Chem*, 275:30610–30617.
- KIM TD, HAN JY, HUH GH, et al. Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax/ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(1):125–137
- LIU Y, WU YS, HU YL, 2013. The positively selected site analysis of squalene synthase for the adaptive evolution in terrestrial plants [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 29(1):91–97. [刘墉, 吴耀生, 胡艳玲, 2013. 陆生植物鲨烯合酶适应性进化正选择位点分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 29(1):91–97.]
- RONG QX, JIANG D, ZHA LP, 2015. Cloning and prokaryotic expression analysis of squalene synthase 2 (*SQS2*) from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 40(7):1259–1265. [荣齐仙, 姜丹, 查良平, 2015. 白花丹参鲨烯合酶 *SQS2* 的克隆与原核表达分析 [J]. *中国中药杂志*, 40(7):1259–1265.]
- TAO C, MA CT, WU YS, 2015. Cloning and sequence analysis of squalene synthase gene from *Trichosanthes rubriflos* [J]. *Chin Trad Herb Drug*, 46(7):1034–1041. [陶晨陈, 马成通, 吴耀生, 2015. 红花栝楼鲨烯合酶基因的克隆及其序列分析 [J]. *中草药*, 46(7):1034–1041.]
- WANG LM, YAO M, 2015. Research progress on content determination method of cucurbitacins [J]. *Chin J Biochem Pharm*, 35(1):185–188. [王莉梅, 姚铭, 2015. 葫芦素类化合物含量测定方法的研究进展 [J]. *中国生化药物杂志*, 35(1):185–188.]
- WU YS, ZHU H, LI K, 2007. Transcription expression of squalene synthase gene in root, stem and rootstock of *panax notoginseng* and synthesis of triterpenoids [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 23(12):1000–1005. [吴耀生, 朱华, 李坤, 2007. 三七鲨烯合酶基因在三七根、茎、芦头中的转录表达与三萜皂苷合成 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 23(12):1000–1005.]
- YIN XM, BAI ZC, NIU YY, 2012. Cloning and analysis of squalene synthase (*HsSQS1*) gene in *Huperzia serrata* [J]. *Acta Pharm Sin*, 47(8):1079–1084. [殷秀梅, 白志川, 牛云云, 2012. 蛇足石杉鲨烯合酶 *HsSQS1* 基因克隆和序列分析 [J]. *药学报*, 47(8):1079–1084.]
- ZHANG MZ, WANG ZH, ZHANG MP, 2010. Gene cloning of *SQS* and *SE* enzyme and construction of expression vector in *Ginseng* [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2010(4):20–22. [张明哲, 王真慧, 张美萍, 2010. 人参 *SQS* 和 *SE* 酶基因的克隆及其表达载体的构建 [J]. *现代农业科技*, 2010(4):20–22.]