

· 药材与资源 ·

金龙胆草 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的克隆及序列分析

孙 蓉¹, 高静雷¹, 刘 珊^{1,2}, 唐自钟¹, 李成磊¹, 陈 惠^{1*}

1. 四川农业大学生命科学与理学院, 四川 雅安 625014

2. 攀枝花学院生物与化学工程学院, 四川 攀枝花 617000

摘要: 目的 对金龙胆草 *Conyza blinii* 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 基因进行克隆及序列分析, 并检测其是否可作为金龙胆草的内参基因。方法 采用 RACE 技术克隆金龙胆草 GAPDH 基因的 cDNA 全长序列, 利用 DNAMAN、BLAST、MEGA 等工具对序列进行生物信息学分析, 并以其为内参进行半定量 RT-PCR。结果 克隆获得了 1 个全长 1 418 bp 的 GAPDH 基因, 完整开放阅读框 1 020 bp, 编码 340 个氨基酸, 命名为 GLGAPDH。序列比对结果显示, 金龙胆草的 GAPDH 基因与紫背天葵的同源序列相似性达到 96%, 与薇甘菊的同源序列相似性为 93%。通过系统进化树分析发现其与紫背天葵的亲缘关系最近。半定量 RT-PCR 分析 GLGAPDH 作为内参基因在不同组织中表达稳定, 扩增效果良好, 重复性强。结论 首次克隆了金龙胆草 GAPDH 基因的全长 cDNA 序列, 并通过半定量实验验证了其可作为内参基因用于基因表达量分析, 为金龙胆草次生代谢物合成过程中关键酶表达分析及调控机制的研究奠定了基础。

关键词: 金龙胆草; 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因; 克隆; 序列分析; 内参基因

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)19-2732-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.019

Cloning and sequence analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Conyza blinii*

SUN Rong¹, GAO Jing-lei¹, LIU Shan^{1,2}, TANG Zi-zhong¹, LI Cheng-lei¹, CHEN Hui¹

1. College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

2. Department of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua 617000, China

Abstract: Objective To clone and analyze glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene from *Conyza blinii* and detect whether it can be the reference gene for *C. blinii*. **Methods** Full length GAPDH was cloned by RACE. DNAMAN, BLAST, and MEGA bioinformatic tools were used to analyze its open reading frame (ORF), homology, and phylogenetic tree. The sequence was acted as internal control gene for semi-quantitative RT-PCR. **Results** The gene designated GLGAPDH was 1 418 bp in length. It contained a 1 020 bp ORF encoding 340 amino acids. It shared 96% similarity with *Gynura bicolor* GAPDH and shared 93% similarity with *Mikania micrantha* GAPDH. GLGAPDH had closer relationship with GAPDH in *G. bicolor*. When the sequence acted as internal control gene, the semi-quantitative RT-PCR had benign amplification and good reproducibility. **Conclusion** GAPDH is cloned from *C. blinii* for the first time. The semi-quantitative RT-PCR results prove that GAPDH gene is able to be the reference gene for gene expression analysis. The result of this study will provide the basis for the key enzyme expression and regulate the mechanism analysis in *C. blinii* effective components biosynthesis pathway.

Key words: *Conyza blinii* Lévl.; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene; clone; sequence analysis; internal control gene

金龙胆草 *Conyza blinii* Lévl. 为一种分布于川西南、滇北地区的菊科白酒草属植物, 是 20 世纪 70 年代四川省发掘的民间草药, 已收录于《中国药典》2010 年版一部^[1]。金龙胆草具有清热解毒、消炎祛

痰、止咳平喘的功效。目前研究较多的是关于金龙胆草化学成分及药理作用^[2]。在金龙胆草中发现了较为少见的芹糖、双芹糖皂苷以及二萜类化合物苦蒿素等天然产物, 为创新药物的研制提供了前体化

收稿日期: 2013-05-15

基金项目: 四川省科技创新苗子工程资助项目 (2012ZZ046)

作者简介: 孙 蓉 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。Tel: (0835)2886134 E-mail: miaolei071019@163.com

*通信作者 陈 惠 Tel: (0835)2886134 Fax: (0835)2886136 E-mail: chen62hui@aliyun.com

合物,对次生代谢产物合成途径的研究将有利于该药材的开发利用。

3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是高等植物糖酵解过程中的关键酶,其催化糖酵解过程的第一个氧化反应,在 NAD^+ 和无机磷酸(Pi)的参与下,氧化3-磷酸甘油醛为1,3-二磷酸甘油酸^[3]。近年来对GAPDH研究不断深入,发现其mRNA在细胞中的表达水平一般相对恒定,具有高度保守性,因此与 β -肌动蛋白(β -actin)基因、核糖体RNA(rRNA)基因等被用作Real-time RT-PCR、半定量RT-PCR等技术中的内参基因,以确定目标基因的相对表达量^[4]。本研究采用cDNA末端快速扩增技术(RACE)技术克隆了金龙胆草GAPDH基因的全长序列,利用DNAMAN、BLAST、MEGA等生物信息学工具对其开放阅读框、同源性及系统进化树进行分析,旨在为金龙胆草次生代谢产物合成过程中关键酶基因的表达分析提供内参基因,为合成调控机制的研究奠定基础。

1 材料

金龙胆草采自攀枝花会理县。经四川农业大学生命科学与理学院丁春邦教授鉴定为菊科白酒草属金龙胆草 *Conyza blinii* Lévl.,以苗期全株植物为材料。

柱式植物RNA_{out}试剂盒, DNA纯化回收试剂盒,固相RNase清除剂、Taq酶、dNTPs均购自天恩泽基因科技有限公司、PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit、pMD[®]19-T Simple Vector均购自TaKaRa(宝生物)公司,氨苄青霉素购自学校医务室,大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 为四川农业大学生物化学实验室保存,其他生化试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 叶、茎、根总RNA的提取

利用柱式植物RNA_{out}试剂盒提取同一新鲜植株叶、茎、根的总RNA,为防止RNA酶污染,降低RNA的质量,提取RNA用的陶瓷器皿用固相RNase清除剂过夜处理后180℃处理16h,塑料制品等工具用0.1%DEPC水浸泡,于室温下过夜后,高压灭菌处理。操作台、药匙、涡旋器都用酒精擦拭灭菌。RNA保存于-70℃。

2.2 cDNA第一链的合成

根据PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)和SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit试剂盒说明书进行,产物保存在-20℃。

2.3 金龙胆草GAPDH全长基因的克隆

根据NCBI上已公布的其他物种GAPDH基因的保守序列设计兼并引物GBS和GBX扩增GAPDH基因的部分片段,根据所获得的片段设计3'端引物GPS1和GPS2,5'端引物GPS3和GPS4(表1)。部分片段扩增以叶的cDNA为模板,25 μL 反应体系中上下游引物GBS和GBX各1 μL ,dNTP(2.5 mmol/L)和10 \times Tag Reaction缓冲液各2.5 μL ,MgCl₂(25 mmol/L)1.5 μL ,模板cDNA和Taq DNA Polymerase(2.5 U/ μL)各0.5 μL ,补ddH₂O至25 μL 。反应程序为94℃预变性4 min;94℃变性50 s,48℃退火30 s,72℃延伸50 s;30个循环后72℃延伸8 min。参照SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit说明书进行GAPDH基因的RACE扩增。1.5%琼脂糖凝胶上电泳鉴定扩增产物。

PCR产物经回收、纯化,连接到pMD19-T载体,转化DH5 α 感受态细胞,经含有氨苄抗性的平板筛选,阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。利用DNAMAN 6.0软件拼接保守区、3'RACE和5'RACE扩增序列,获得金龙胆

表1 基因克隆及半定量RT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequence used in gene cloning and semi-quantitative RT-PCR

引物	序列(5'→3')	用途
GBS	TGGAGTCTACYGGWGTBTTC	保守区上游引物
GBX	GCAATTCCTCCGCTTBTGCRTC	保守区下游引物
GPS1	CACGCCATGACTGCTACCCAAAAGACTG	3'RACE第1轮引物
GPS2	GCCATCAAGGAGGAATCAGAAGGCAAAC	3'RACE第2轮引物
GPS3	AGTCTTTTGGGTAGCAGTCATGGCGTGG	5'RACE第1轮引物
GPS4	GCAGAGATAACAACCTTCTTGGCACCACCC	5'RACE第2轮引物
GAPDHS	ACTACCAACTGCCTTGCTCC	GAPDH半定量上游引物
GAPDHX	GCTCTCCACCTCTCCAGTC	GAPDH半定量下游引物

草 GAPDH 基因的 cDNA 全长序列。

2.4 序列分析

获得的序列利用 DNAMAN、BLAST、MEGA 等生物信息学工具对其开放阅读框、同源性及系统进化树进行分析。

2.5 半定量 RT-PCR

根据已获得的金龙胆草 GAPDH 基因和 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS) 基因的全长 cDNA 序列, 按照半定量引物设计原则, 利用 Permier 5.0 软件分别设计 GAPDH 基因的半定量引物 GAPDHS 和 GAPDHX (表 1) 和 DXS 基因半定量引物。利用 2% 琼脂糖凝胶检测 PCR 结果。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 质量分析

采用柱式植物 RNA_{out} 试剂盒提取的叶、茎、根中的总 RNA 完整性好、无降解, 28 S 和 18 S 清晰可辨, 且 28 S 的量接近 18 S 的 2 倍 (图 1), 紫外分光光度分析 A_{260}/A_{280} 值为 1.8~2.0, 表明总 RNA 可用于后续实验。

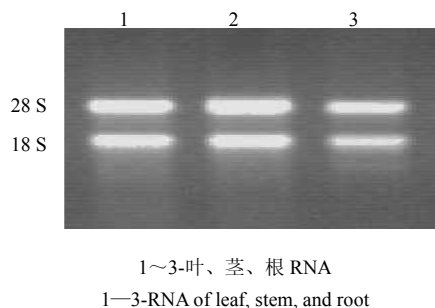


图 1 金龙胆草叶、茎、根的总 RNA 电泳图
Fig. 1 Total RNA electrophoretogram of leaf, stem, and root in *C. blinii*

3.2 GAPDH 基因部分片段克隆

从 PCR 产物电泳图 (图 2) 可以看出, 在兼并引物的扩增下得到了清晰的特异性条带, 其长度与预测的 620 bp 吻合。扩增产物具有唯一性, 无其他扩增带出现, 说明特异性扩增的效果良好。

3.3 GAPDH 基因全长 cDNA 的克隆

以叶 cDNA 为模板, 把 GPS1 和 GPS2 分别作为外侧引物和内侧引物, 与试剂盒提供的 3'RACE 引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 3), 将产物纯化回收后送测序公司测序, 同方法获得 5'端序列。对 3 个片段进行拼接获得全长 1 418 bp 的 cDNA 序列, CDS 区为 1 020 bp。起

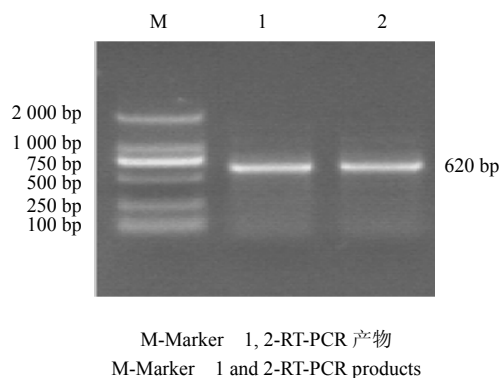


图 2 GAPDH 基因 RT-PCR 电泳图
Fig. 2 Electrophoretogram of RT-PCR products of GAPDH gene

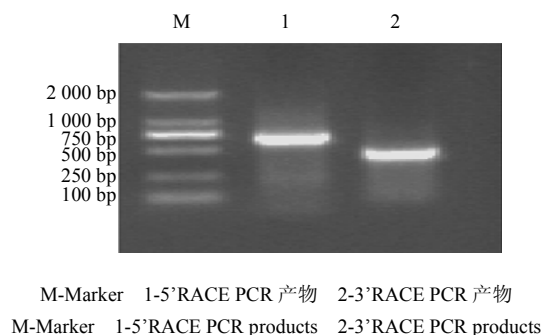


图 3 GAPDH 基因 RACE 电泳图
Fig. 3 Electrophoretogram of RACE products of GAPDH gene

始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA, 含有 18 个 A 组成的 polyA 尾巴。命名为 GLGAPDH, GenBank 登录号为 KF027475。

3.4 GAPDH 基因全长 cDNA 序列分析

序列比对发现, 金龙胆草的 GAPDH 基因与同为菊科的紫背天葵的同源序列的相似性最高达到 96%, 与薇甘菊的同源序列相似性为 93%, 与水稻、小麦、玉米的同源序列相似性均为 88%。保守区分析发现其含有 2 个保守区: Gp_dh_N superfamily 和 Gp_dh_C superfamily (图 4)。与其他植物中的 GAPDH 基因保守区相符, 说明该基因较为保守。2 个保守区分别为 N 末端 NAD^+ 结合区及 C 末端催化区。通过 MEGA 软件进行系统进化树分析, 发现金龙胆草与同为双子叶纲菊科的紫背天葵的亲缘关系最近, 与单子叶纲的玉米、水稻等亲缘关系较远 (图 5)。

3.5 半定量分析

半定量 PCR 的扩增结果表明, GAPDH 基因和 DXS 基因均获得了清晰的片段, 无非特异性扩增, 无引物二聚体 (图 6), 扩增长度与预期相符。

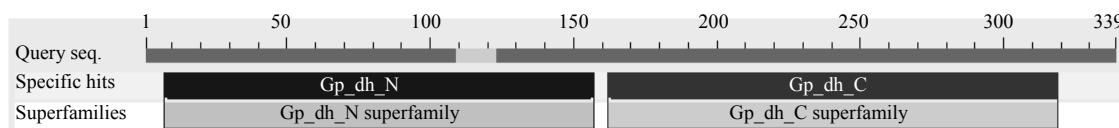


图4 GLGAPDH的保守区

Fig. 4 Conservative domains of GLGAPDH

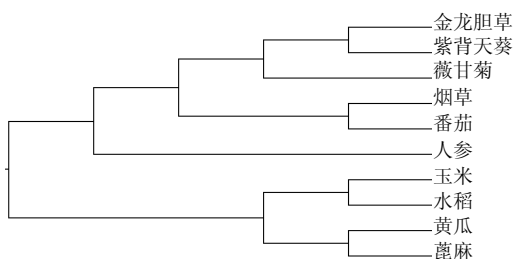
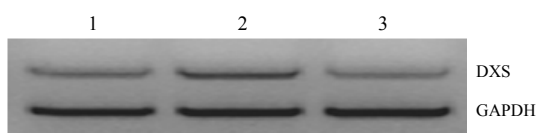


图5 GLGAPDH的分子进化分析

Fig. 5 Molecular evolution analysis on GLGAPDH



1~3-叶、茎、根 DXS 基因和 GAPDH 基因的半定量 PCR 产物
1-3-DXS and GAPDH gene semi-quantitative PCR products of leaf, stem, and root

图6 DXS 和 GAPDH 基因半定量结果

Fig. 6 Semi-quantitative results of DXS and GAPDH

GAPDH 基因在各组织中表达稳定，可以作该植物基因表达分析的内参基因。

4 讨论

GAPDH 是生物体内非常重要的一个酶，其与糖酵解、呼吸链等生命活动息息相关。由于其在细胞代谢中的重要作用，越来越多的植物完成了该基因的克隆。通过序列比对发现 GAPDH 基因在不同植物中具有较高的保守性。本研究克隆获得的金龙胆草 GAPDH 基因序列，通过 BLAST 比对发现其与紫背天葵和薇甘菊的同源序列相似性较高，而与小麦、水稻的同源序列相似性较低。系统进化树分析也得到相似结果，金龙胆草与双子叶植物亲缘关系近，与单子叶植物较远。因金龙胆草与紫背天葵及薇甘菊均属于双子叶纲菊科植物，所以该 GAPDH

基因与它们同源序列相似性较高，而与单子叶植物同源性相对低。因薇甘菊是外来物种，金龙胆草的 GAPDH 基因与紫背天葵的同源序列相似性更高。

GAPDH 几乎在所有组织中都高水平表达，且受其他因素影响小，表达量恒定，因此常被作为标准化的内参基因用于定量、半定量表达分析。邢朝斌等^[5]以其为内参基因对刺五加中的鲨烯合酶表达量进行了分析。李东等^[6]以 GAPDH 基因为内参，采用荧光定量 PCR 技术对热胁迫下丹参迷迭香酸代谢途径关键酶基因表达进行了研究。本研究根据已获得的 GAPDH 基因设计了一对扩增产物 150 bp 的半定量引物，首次在该植物中以此基因为内参，进行了半定量实验，发现 GAPDH 基因在金龙胆草不同组织中表达稳定、重现性好，可作为内参基因使用。

本研究首次克隆了金龙胆草 GAPDH 基因的全长 cDNA 序列，并通过半定量实验验证了其可作为内参基因用于基因表达分析，为金龙胆草次生代谢物合成过程中关键酶表达分析及调控机制的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 王国军. 金龙胆草研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(6): 496-499.
- [3] 郭嵩光, 王宪泽, 王晓云, 等. 基础生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.
- [4] 侯志军, 张长生, 金辛. 貉 GAPDH 基因的克隆与序列分析 [J]. 经济动物学报, 2012, 16(1): 35-37.
- [5] 邢朝斌, 吴鹏, 陈龙, 等. 刺五加 GAPDH 基因的克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 155-158.
- [6] 李东, 吴先军, 陈新. 热胁迫下丹参迷迭香酸代谢途径关键酶基因的表达研究 [J]. 核农学报, 2012, 26(1): 60-67.