

葛永强, 张利娟, 杜小姣, 等. 大叶落地生根组氨酸脱氢酶基因克隆及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 280-287.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.007

大叶落地生根组氨酸脱氢酶基因克隆及表达分析

葛永强¹, 张利娟², 杜小姣¹, 朱敏群¹, 黄慧青¹, 梁小红³, 钟天秀⁴

(1.深圳市日昇园林绿化有限公司, 广东 深圳 518040; 2.暨南大学深圳旅游学院, 广东 深圳 518053; 3.北京林业大学林学院草坪研究所, 北京 100083; 4.华南农业大学林学与风景园林学院草业科学系/广东省草业工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要: 组氨酸脱氢酶将组氨酸氧化成组氨酸, 是组氨酸合成途径中的最后一步, 调控植物的生长和发育过程。为了更好地理解大叶落地生根中胎生苗调控的分子机制, 利用 RACE-PCR 技术从大叶落地生根中克隆了 1 个新的组氨酸脱氢酶基因 *KdHDH*。该基因编码的蛋白质具有 483 个氨基酸残基, 分子量为 52 130, 等电点为 5.78, 其开放阅读框长度为 1 452 bp。KdHDH 蛋白与葡萄、拟南芥、蓖麻等植物的蛋白相似性都很高, 聚类分析结果表明该蛋白与甜菜和菠菜的遗传距离最近。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, 该蛋白基因在大叶落地生根的根中表达量最高, 且受渗透胁迫(甘露醇)的诱导下调表达。

关键词: 大叶落地生根; 组氨酸脱氢酶(*HDH*); 基因表达

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0280-08

Cloning and expression analysis of histidinol dehydrogenase (*KdHDH*) gene in *Kalanchoe daigremontiana*

GE Yong-qiang¹, ZHANG Li-juan², DU Xiao-jiao¹, ZHU Min-qun¹, HUANG Hui-qing¹, LIANG Xiao-hong³, ZHONG Tian-xiu⁴

(1.Shenzhen Risheng Landscape Company Limited, Shenzhen 518040, China; 2.Shenzhen Tourism College of Ji'nan University, Shenzhen 518053, China; 3.Turfgrass Research Institute, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 4.College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University/Guangdong Engineering Research Center of Grassland Science, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Catalyzing histidinol to histidine by histidinol dehydrogenase (HDH) is the final step of his biosynthetic pathway, playing an important role in plant growth and development. To better understand the molecular mechanisms of plantlet formation involved in *Kalanchoe daigremontiana*, a *KdHDH* gene was identified using rapid amplification of cDNA end (RACE) PCR. *KdHDH* gene consists of an ORF of 1 452 bp that was predicted to encode a 483 amino acid residue-long protein of 52 130 with an isoelectric point of 5.78. KdHDH was related most closely to VvHDH, AtHDH and RcHDH, and phylogenetic analysis showed the closest genetic distance with BvHDH and SoHDH. Real-time PCR analysis revealed that

KdHDH transcript was expressed highly in root and down-regulated under osmotic stress.

Key words: *Kalanchoe daigremontiana*; histidinol dehydrogenase (*HDH*); gene expression

收稿日期: 2016-07-07

基金项目: 深圳市知识创新项目(基 20160093); 北京林业大学与厦门日懋城建园林建设股份有限公司产学研合作项目

作者简介: 葛永强(1986-), 男, 山东曹县人, 本科, 主要从事园林绿化工作。(Tel) 13410273126; (E-mail) 261484794@qq.com

通讯作者: 钟天秀, (E-mail) zhongxinbi@163.com

组氨酸(L-histidine)是合成蛋白质过程中必不

可少的氨基酸,在植物生长和发育中十分关键^[1]。1986年,Kossel和Hedin第一次发现组氨酸,这个氨基酸属于碱性或杂环氨基酸,包含一个咪唑基(即1,3-二氮杂戊环,去掉第一位或第三位的氮原子上的氢原子所剩余的部分)。由于咪唑基解离常数为6.0,即解离的质子浓度与水的相近,因此组氨酸即可作为质子供体,又可作为质子受体,参与大部分的酸碱催化反应。除此之外,咪唑基与重氮苯磺酸能形成棕红色化合物,即波利(Pauly)反应。一般情况下,组氨酸作为酶的活性位点,如在锌指蛋白等金属蛋白中调控金属离子^[2-3]。在镍超积累植物中,游离的组氨酸作为镍结合配体在耐重金属镍污染中起到了重要作用^[4-5]。利用镍与组氨酸紧密结合的特性,在色谱分析中用固定的镍柱子来分析纯化带有组氨酸标签的重组蛋白。

组氨醇脱氢酶(HDH, EC1.1.1.23)将组氨醇氧化成组氨酸,是组氨酸合成途径中的最后一步。由于组氨醇脱氢酶复合物的解离常数很小,所以很难游离出组氨醇^[6],所以组氨酸合成中的最后一步几乎是不可逆的。目前已经从多种植物中得到组氨醇脱氢酶蛋白,如小麦^[7]、甘蓝^[8]、卷心菜^[9]等。定点突变研究表明卷心菜和鼠伤寒沙门菌中组氨醇脱氢酶的半胱氨酸残基(Cys)不是催化活性位点,而His261是Zn²⁺结合配体必须的氨基酸位点^[10]。NMR结果也证明组氨醇脱氢酶活性位点中的Zn²⁺是底物结合所必须的^[11]。虽然,在植物中也克隆得到一些组氨醇脱氢酶的基因序列。如已从拟南芥基因组中,克隆得到单一的组氨醇脱氢酶基因,At5g63890(HISN8),但是该基因的功能还未得到准确鉴定^[12]。

大叶落地生根胎生苗的发育过程兼具胚胎发生途径和器官发生途径,是研究植物发生发育的理想模型^[13]。为揭示大叶落地生根胎生苗发育机制,采用抑制消减杂交技术(SSH)构建了大叶落地生根胎生苗和普通叶片的SSH-cDNA文库^[14],并从该差减文库中筛选出1条与组氨醇脱氢酶片段同源的表达序列标签(EST)。本研究以该EST片段为基础,采用RACE-PCR技术克隆出大叶落地生根组氨醇脱氢酶的cDNA基因(命名为*KdHDH*)全长,利用生物信息学方法分析*KdHDH*基因的碱基序列,编码蛋白质结构以及系统发育,并研究该基因在大叶落地生根不同组织和渗透胁迫诱导下

的表达变化,为该基因的进一步研究利用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料的培养

大叶落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)种植于北京林业大学草坪研究所温室,培养基质为腐叶土、蛭石和珍珠岩按4:2:1混合,在16 h光照/8 h黑暗,光照度为25 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 $(30 \pm 3)^\circ\text{C}$ 下培养。采集叶片后快速在液氮中固定,置于 -80°C 超低温冰箱保存。

1.2 总RNA的提取以及反转录

使用TaKaRa MiniBEST universal RNA Extraction Kit (Code No.9769)提取落地生根叶片的总RNA,并在 -80°C 下保存。

1.3 *KdHDH*基因的克隆和测序

根据差减文库的测序结果,分别设计上游引物F1和下游引物R1(表1)。以总RNA为模板,按照Prime Script™ II High Fidelity RT-PCR Kit (TaKaRa Code No.R023A)的操作说明合成第一链cDNA,使用TaKaRa TksGflex DNA polymerase (Code No.R060A)进行PCR扩增。PCR反应体系为50 μl ,包括1 μl cDNA模板,1 μl TksGflex DNA Polymerase(1.25 U/ μl),F1 Primer (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μl ,R1 Primer (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μl ,2 \times Gflex Buffer (mg^{2+} ,dNTP plus) 25 μl ,dH₂O 21 μl 。反应程序为:98 $^\circ\text{C}$ 变性10 s,55 $^\circ\text{C}$ 退火30 s,68 $^\circ\text{C}$ 延伸1 min,共30个循环。以上述PCR产物为模板,进行二次PCR,反应体系及条件同上。取5 μl PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳。用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 (Code No.9762)回收,用F1为特异引物对回收后的DNA测序。

根据获得的*HDH*基因cDNA片段序列设计5' RACE Outer PCR特异引物R01和Inner PCR R02(表1)。使用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech Cat. No.634923)对反转录总RNA合成cDNA。使用TaKaRa TksGflex DNA polymerase (Code No.R060A)进行PCR扩增。Outer PCR反应完成后,立即取反应液1 μl 进行Inner PCR反应。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0

(Code No.9762)回收。接着用 TaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (Code No.6022) 中的连接酶,将 PCR 产物与 T-Vector pMD™ 18 (Code No.3271) 进行连接,热转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 JM109 (Code No.9052) 中,涂布平板,37 ℃ 过夜培养。挑选阳性菌落,提取质粒,用 M13-47 引物对进行测序。

根据获得的 *HDH* 基因 cDNA 片段序列设计 3' RACE Outer PCR 特异引物 F01 和 Inner PCR 特异引物 F02 (表 1)。以 1 μl 的 RNA 为模板,使用 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase (Code No.6106) 反转录合成 cDNA。使用 TaKaRa TksGflex DNA polymerase (Code No.R060A) 进行 PCR 反应。2 轮 PCR 反应完成后,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。经胶回收和连接克隆,用 F02、F1seq (表 1) 引物对质粒进行测序分析。

对 *HDH* 基因的 cDNA 片段的 5' 端和 3' 端序列进行拼接,获得 *KdHDH* 基因的全长序列。并分别设计上游引物 YZF1 和 YZF2 及下游引物 YZR1 (表 1),以验证试验中使用的 cDNA 为模板,进行 2 轮 PCR 反应。第 1 轮 PCR 反应使用引物 YZF1 和 YZR1。第 2 轮 PCR 反应使用 YZF2 和 YZR1。使用 TaKaRa TksGflex DNA polymerase (Code No.R060A) 进行 PCR 扩增。取 5 μl PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。用 YZR1、YZF2、F02 进行测序分析。

1.4 *KdHDH* 基因的生物信息学分析

应用 NCBI 数据库中 ORF Finder 软件寻找 *KdHDH* 序列中的 ORF,推导编码的氨基酸序列。应用 Expasy 的 ScanProsite、ProtParam、TMpred、ProtScale 程序分析 *KdHDH* 蛋白的保守结构域、分子量、等电点、跨膜结构域和亲疏水性^[15]。利用 BLAST 程序检索相似蛋白,利用 ClustalX 2.1 软件对不同物种的氨基酸序列进行多重比对^[16],利用 MEGA 6.0 分析氨基酸序列,用邻接法构建进化树,并用 Bootstrap 校正^[17]。根据 NPS@ web server 网站中的 PHD 方法预测蛋白质的二级结构^[18]。应用在线分析工具 Phyre 分析蛋白质三级结构^[19]。

1.5 *KdHDH* 表达的荧光定量分析

以大叶落地生根 *actin* 作为内参基因(上下游引物见表 1),根据 *KdHDH* 的序列信息设计

荧光定量的上游引物 F2 和下游引物 R2 (表 1)。以大叶落地生根中的根、茎、叶片、叶柄为总 RNA 材料分析 *KdHDH* 基因在不同组织中的表达情况。对大叶落地生根幼苗进行渗透胁迫处理(300 mmol/L 甘露醇),分别在处理的 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h 采集叶位相同叶片,每个处理设 3 个重复,混合取样,提取总 RNA 分析 *KdHDH* 基因在渗透胁迫下的表达情况。按照 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 试剂盒操作说明合成 cDNA,根据 SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2×) Universal (KAPA Biosystems) 试剂盒进行 PCR 扩增。荧光定量反应体系为:SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2×) Universal 5.0 μl,上下游引物 (10 μmol/L) 0.2 μl, cDNA 1.0 μl, ROX 校正染料 0.2 μl, dH₂O 3.6 μl,共 10 μl。反应在 ABI7900HT 实时定量 PCR 仪上进行,反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析结果。

表 1 *KdHDH* 基因克隆和鉴定中所用的引物序列

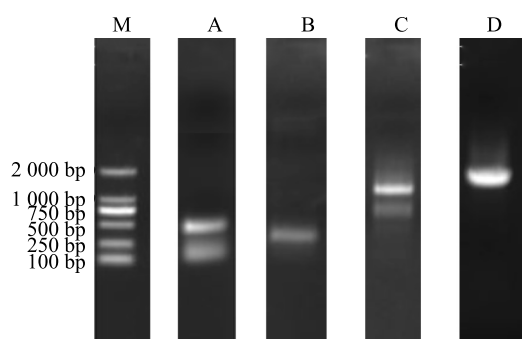
Table 1 PCR primer sequences used in cloning and identification of *KdHDH* gene

名称	序列(5'→3')	长度 (bp)
F1	CTCCACCCTGTCGGAATGAGCA	22
R1	TTCCAACAGACCCAATGCTCCT	22
R01	ATTCTCTCAGCCGACTTTTGGG	22
R02	CCTCTCCTTCGGACATCATCGA	22
F01	AAGTCTTATCGCCTATCTGAGC	22
F02	TGAATTGCCAGACCCAGAGCTT	22
F1seq	GCCAAAGCCTTCCAAGAGGAGA	22
YZF1	CATGGGGACAAACGCAGATAGA	22
YZF2	ACAAACGCAGATAGAAAGGGAC	22
YZR1	ACGGGATATCATTGCATGCTCT	22
F2	ACTTGCTGGGGATGGTGT	18
R2	CCTTCCCACTTCTCAGCATC	20
Actin-F	GACTATGAGGCTGAGTTGGAGAC	23
Actin-R	TCAATGAAGGCTGGAAAAGG	20

2 结果与分析

2.1 *KdHHDH* cDNA 克隆与测序

以大叶落地生根叶片第1链cDNA为模板,并用引物F1和R1进行PCR扩增,获得约500 bp的目的片段(图1A)。根据获得的*HDH*基因cDNA片段序列分别设计3'RACE和5'RACE特异引物,获得约300 bp和1 200 bp的目的片段(图1B、图1C)。将获得的cDNA片段的5'端和3'端序列进行拼接,以大叶落地生根叶片第1链cDNA为模板,设计验证引物,获得约1 800 bp的目的片段(图1D)。因此,大叶落地生根*HDH*基因的cDNA全长为1 826 bp (GenBank 登录号:KU740359),命名为*KdHHDH*,含有1 452 bp完整开放阅读框(ORF),编码483个氨基酸(图2),不包括PolyA尾的长度为1 817 bp,5'UTR(非编码区)92 bp,3'UTR 273bp。



M: D2000 DNA marker; A:根据差减文库的结果设计引物验证*KdHHDH*基因; B:5' RACE得到约300 bp的片段; C:3' RACE得到约1 200 bp的片段; D:RACE结果验证得到约1 800 bp的片段。

图1 大叶落地生根*KdHHDH*同源扩增和RACE克隆以及序列验证

Fig.1 RT-PCR amplification, RACE cloning and sequence verification of *KdHHDH* gene in *Kalanchoe daigremontiana*

2.2 *KdHHDH* 蛋白氨基酸序列分析及系统进化树的构建

*KdHHDH*蛋白质与葡萄(XP_010664989.1)、拟南芥(AAM65533.1)、蓖麻(XP_002523482.1)、可可(XP_007011324.1)的相似性分别为85%、82%、79%、78%。通过ScanProsite在线软件分析,发现

该蛋白质具有1个保守的结构域:组氨酸脱氢酶结构域(274~306)。通过SIB中的Motif Scan,预测得到一些不同的基序,包括6个casein kinase II phosphorylation site (56~59、76~79、302~305、402~405、439~442、454~457)、1个MYRISTYL N-myristoylation site (229~234)、6个protein kinase C phosphorylation site (46~48、49~51、62~64、97~99、151~153、469~471)、1个RGDCell attachment sequence (88~90)、1个tyrosine kinase phosphorylation site (126~132)、1个SAM domain profile (398~464)、1个Sensor protein DegS (466~482)。

将大叶落地生根*KdHHDH*与其他4种植物中的*HDH*蛋白进行了氨基酸序列比对,可以看出,不同植物组氨酸脱氢酶氨基酸序列保守性很高(图3)。选取20种植物的*HDH*氨基酸序列,利用Mega6.0中的相邻连接法构建系统进化树(图4),采用默认参数,自检举1 000次,对生成的系统树进行Bootstrap校正。结果表明,进化树分为3个大枝,大叶落地生根*KdHHDH*被聚类在第二大枝上,与甜菜、菠菜的遗传距离最近。与葡萄、苹果共同组成第二大枝。

2.3 *KdHHDH* 蛋白的理化性质及三级结构预测

*KdHHDH*蛋白的理论分子量为52 130,理论等电点为5.78。脂溶指数为92.69,总平均亲水性为0.062,不稳定系数为44.59,表明该蛋白质不稳定。二级结构预测结果表明,*KdHHDH*含有35.40%的 α -螺旋,22.98%的 β -折叠和41.61%的随机卷曲,没有信号肽及其剪切位点,是非分泌型蛋白,有6个明显的跨膜区(表2)被定位于叶绿体上(预测精度为96%)。

通过Phyre在线预测网站预测结果表明,*KdHHDH*的三维结构包括3个小叶结构,其中2个小叶对称排列,形成一个等腰三角形。一共有21个 α -螺旋和12个 β -折叠(图5)。

2.4 *KdHHDH* 基因的组织表达分析

利用荧光实时定量PCR对*KdHHDH*在大叶落地生根中的表达情况进行检测,结果如图6所示,*KdHHDH*在根中的表达量大约是叶柄的3倍。表达量由高到低依次为:根>叶片>茎>叶柄。这些结果表明,*KdHHDH*在各组织中均有表达,在根中表达量最高。


```

1      ACATGGGGACAAACGAGATAGAAAGGGACCGGATATTGACGAGGCTGGCCGGAGACGCA
61     ATCTGACCTGAGCGAGGCTCCACCTGTCGGAAATGAGCACTCAGCCGTTCATTTTAAAT
1      M S T Q P F N F K
121    TGAGAAACAACCCATTTTCCAGCCACTCTTCTCCAGCCTCCTACCTTTAACCAAGT
10     L R N N P F F P S H S S P A S S P L T T
181    TTTCTTTGTCAAATTTCCAGCAGTTGGTAGAGAAGTCATAAGTTCTTCAATGAAGTCTT
30     F S F V K F P A V G R E V I S S S M K S
241    ATCGCCTATCTGAGCTCAGTCACACTGAAATGACAGCCTCAAGGCTCGCCCGCGCATTG
50     Y R L S E L S H T E I D S L K A R P R I
301    ATTTTCTTCCATTTTCAGCATTGTGGAACCCATAGTCGATGATGTCGGAAGGAGAGGTG
70     D F S S I F S I V E P I V D D V R R R G
361    ACTCTGCTGTCAAAGATTACACAGCTCGGTTTACTTAGTCCAGTTAGATGACATAGTCA
90     D S A V K D Y T A R F D L V Q L D D I V
421    TTGAGGTCGTGAATGCCAGACCCAGAGCTTGATGTACAGTAACAAAAGCTTTTGATG
110    I E V A E L P D P E L D V T V T K A F D
481    TTGCCCTACGATAACATATACGCTTTTCAATGCTGCCCAAAAGTCGGCTGAGAGAATTGTTG
130    V A Y D N I Y A F H A A Q K S A E R I V
541    AAACTATGAAGGTGTTAAATGCAAAAGGTTAGCTAGGAGCATTGGGTCTGTGTTGAATTT
150    E T M K G V K C K R V A R S I G S V G I
601    ATGTTCCAGGTGAACCTGCTTCTACCTTCAACTGCTCTGATGCTTGACAGTCCAGCTC
170    Y V P G G T A V L P S T A L M L A V P A
661    AAAATGCTGGATGCAAAATGTTGTGCTTGCAGCTCCACCTAGTAAAGATGGAACATAT
190    Q I A G C K I V V L A T P P S K D G N I
721    GCAAGGAAGTACTTTATTGTGCCAAGAAAGCTGGAGTCACTCATATTTTGAAGCTGGCG
210    C K E V L Y C A K K A G V T H I L K A G
781    GAGCACAGGCTATTTCTGCCATGGCTTGGGGTACAGCTTCTTGCTAAGGTGGAGAAAA
230    G A Q Q A I S A M A W G T A S C P K V E K
841    TTTTGGGGCTGGGAATCARTATGTGACAGCTGCAAAAATGATTCTCCAAAATAGTGAAAG
250    I F G P G N Q Y V T A A K M I L Q N S E
901    CCATGATTTCAATTGACATGCTGCTGGGCCATCAGAAGTTCTTGTATCGCTGACAAAC
270    A M I S I D M P A G P S E V L V I A D K
961    ATGCGAATCCCGTGCATATTGCTGCAGATTGCTATCCAGGCGGAGCATGGCCCTGATA
290    H A N P V H I A A D L L S Q A E H G P D
1 021  GTCAGGTGTCTTTGTACTTGCTGGGGATGGTGTGGACCTTGTGGCTATTGAGGAGCAAA
310    S Q V V L V L A G D G V D L V A I E E A
1 081  TCACTAGGCAGTGCCAAAGCCTTCCAAGAGGAGAGTTTGCTAAAGAGGCACTGAGTCACH
330    I T R Q C Q S L P R G E F A K E A L S H
1 141  GTTMTATTGTTTTGTAGAGACATGGTTGAGGCAATCTCTTCTCGAACITGTATGCAC
350    S X I V F A R D M V E A I S F S N L Y A
1 201  CAGAACATTTAATTATAAATGTTGTCGATGTGAGAAAGTGGGAAGGCTTCATAAAAAATG
370    P E H L I I N V V D A E K W E G F I K N
1 261  CAGGTTCCGTATTTATGGGACAAATGGACACCTGAAAGTGTGGAGACTATGCCAGCGGAA
390    A G S V F M G Q W T P E S V G D Y A S G
1 321  CAAACCATGTCTTCTCATATGATATGCAAGAAATGATGGTGGCGTATCCCTGGACT
410    T N H V L P T Y G Y A R M Y G G V S L D
1 381  CATTTGTAAATATATAACAATTCAGTCTTTGACAGAGGAAGGATTGAGCAACCTTGGCC
430    S F V K Y I T I Q S L T E E G L S N L G
1 441  CGCACGTGTCTACCATGGCAGAAAGTTGAGGACTTGAAGCTCACAAAGAGCAGTCACCC
450    P H V A T M A E V E G L E A H K R A V T
1 501  TAAGACTTGAGGATATTAAGCGAAGCAAGCTTGACGATGTCGAATTTGCCATCTAAGT
470    L R L E D I K A K Q A C S M *
1 561  GGCAATAACTTGGTATAAACTACCATCATGCCCAACATCCCAAGACAGTTGTTCTGT
1 621  GCTGCAAAAATCTGAAAATCAGCAAAATTTGATTGTTGTCGAAGGATCTTATGGGGGA
1 681  TGAATCTTTTGGGGTTTGAGGGTGTCTGATAAAGTTTGATATATGTTACATGCATTATT
1 741  TCAGGTATTTGTCAGAGTGACTATTGCTCTCATTTGAGAGCATGCAATGATATCCCGTT
1 801  GAATTTGTTTTTCACAGAAAAAAA

```

加框的 ATG 为起始密码子;TGA 为终止密码子。

图 2 大叶落地生根 *KdHHDH* 基因的核苷酸序列及编码的蛋白质氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and amino acid sequences of *KdHHDH* gene of the *Kalanchoe daigremontiana*

表 2 *KdHHDH* 蛋白跨膜区域

Table 2 Predicted *KdHHDH* membrane-spanning regions

类型	预测的跨膜螺旋(aa)		中心	分数
	起始位置	终止位置		
膜内向膜外	163(169)	192(185)	177	1 174
	225(227)	243(243)	235	761
膜外向膜内	15(15)	33(33)	25	29
	168(168)	189(186)	177	1 204
	225(225)	244(244)	234	257
	413(417)	437(435)	427	4

中心指的是跨膜螺旋的中心;分数代表预测出的跨膜结构的可信度,分数越高,可信度越高;括号中指的是另一种可能,以第 1 行为例,起始位置从 169 个氨基酸开始,到 185 个氨基酸结束。

2.5 *KdHHDH* 基因的诱导表达分析

用 300 mmol/L 甘露醇对大叶落地生根进行渗透胁迫,以实时荧光定量 PCR 法分析其表达动态。结果(图 7)显示,*KdHHDH* 基因在甘露醇处理下存在下调表达的趋势。在处理 12 h 后,*KdHHDH* 基因的表达量达到最低值。在 3 h 时,*KdHHDH* 的表达量受到胁迫处理出现显著下降,随着胁迫时间的延长,有 1 个缓慢升高的过程,在 6 h 时,*KdHHDH* 的表达量上升,但随着胁迫时间的进一步延长,*KdHHDH* 的表达量继续下降,总体呈现先下降再上升,再下降再上升的过程。但是,在整个胁迫处理过程中,*KdHHDH* 的表达量总体呈现下降趋势。

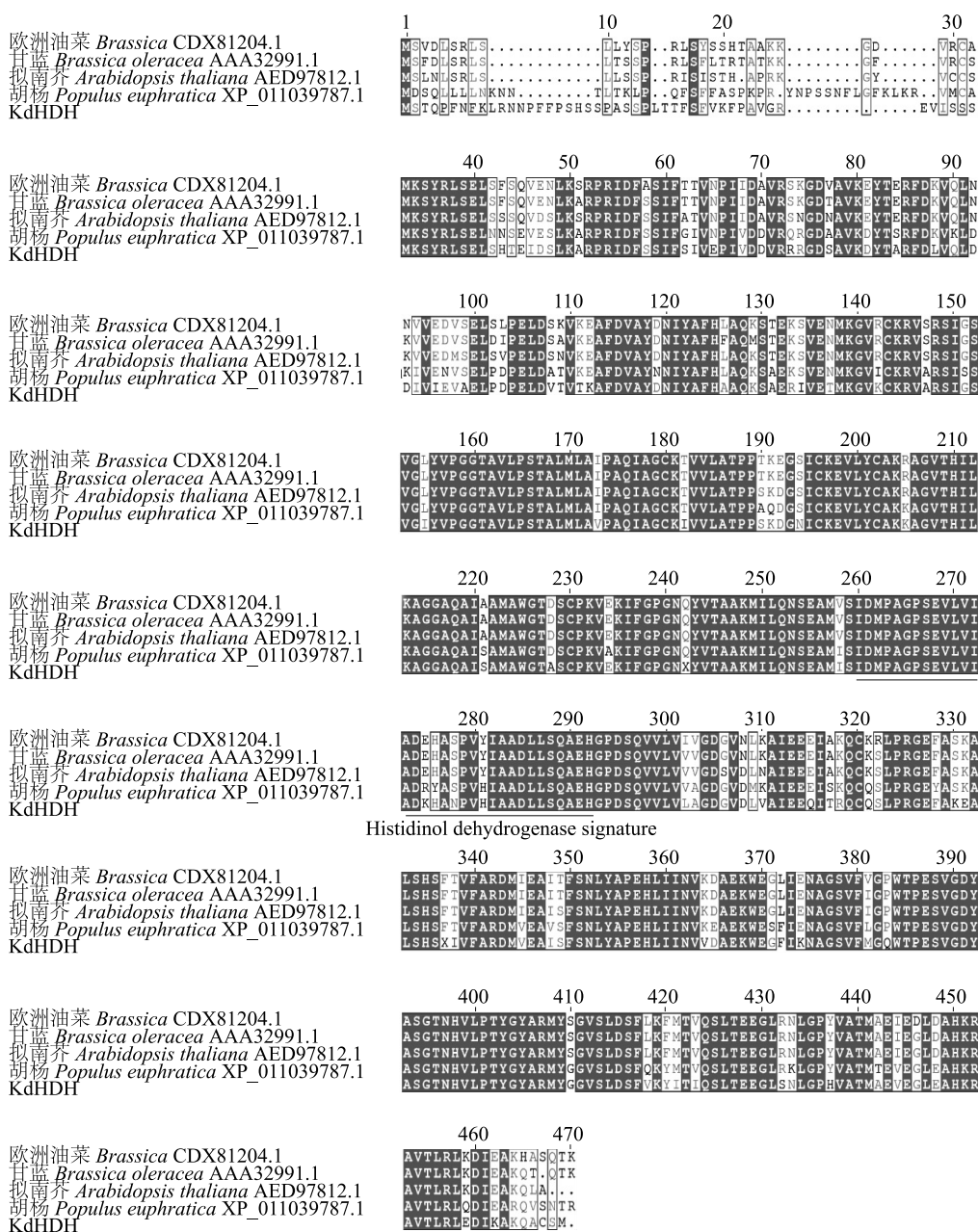


图3 大叶落地生根 KdHHDH 蛋白与其他植物的蛋白依赖激酶氨基酸序列比对

Fig.3 Multiple alignment of amino acid sequences of KdHHDH and other known HDHs of plant origins

3 讨论

组氨醇脱氢酶是组氨酸合成过程中的关键酶,但是关于组氨醇脱氢酶的研究主要集中在微生物中,植物中关于该酶的研究一直被忽略。虽然已经从一些植物中克隆出组氨醇脱氢酶基因,但是关于组氨醇脱氢酶的三维结构、功能、互作关系仍然不清楚。大叶落地生根组氨醇脱氢酶基因定位于叶绿体

上,与 Tada 等^[20]的研究结果一致。因为组氨酸合成途径与 ATP 循环途径密切相关,磷酸核糖焦磷酸 (PRPP) 是 ATP 循环的前体,在经历 3 步催化反应之后,形成 PRFAR (Phosphoribulose formimino-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide),即可通过催化反应再合成 ATP,也可通过组氨酸合成途径合成组氨酸。组氨酸突变体^[1,21]无法产生配子体可能是由于组氨酸合成途径的受阻导致 ATP 合成

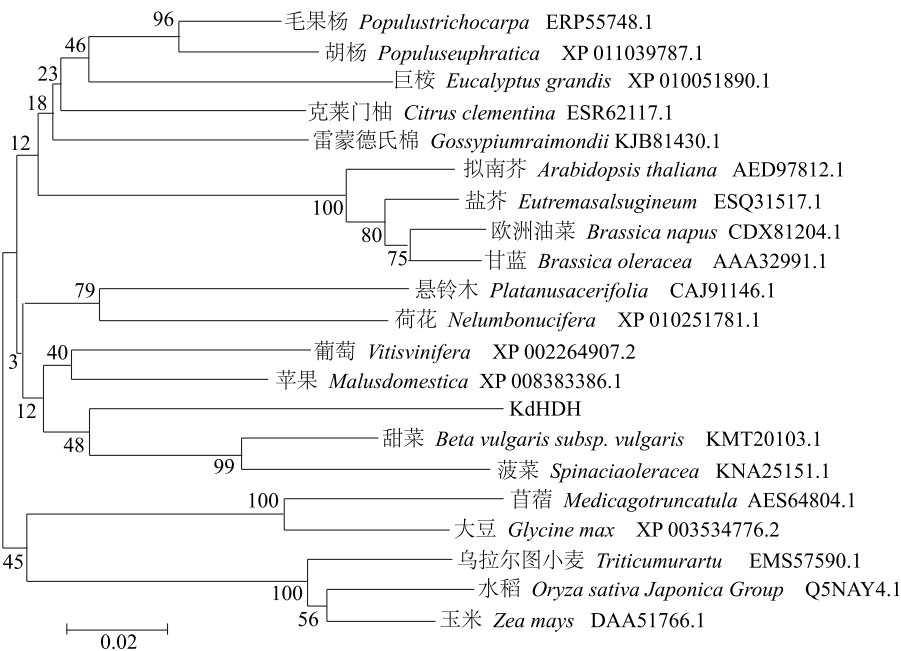
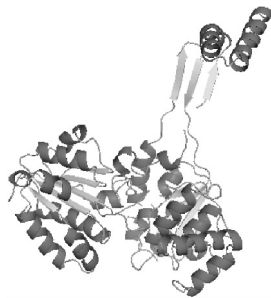


图 4 大叶落地生根 KdHDH 蛋白与其他植物中 HDH 蛋白氨基酸序列的进化分析

Fig.4 Phylogenetic tree of HDH of *Kalanchoe daigremontiana* and other plants based on amino acid sequence



螺旋为 α -螺旋, 箭头为 β -折叠, 线为无规则卷曲。

图 5 KdHDH 蛋白的三维结构示意图

Fig.5 The three-dimensional structure of KdHDH

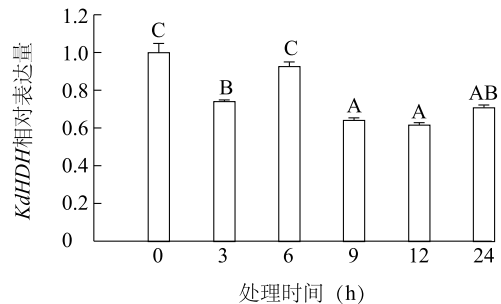


图 7 KdHDH 基因在 300 mmol/L 甘露醇诱导下的表达情况

Fig.7 Expression profiling of KdHDH gene in response to 300 mmol/L mannitol treatment in *Kalanchoe daigremontiana* leaves

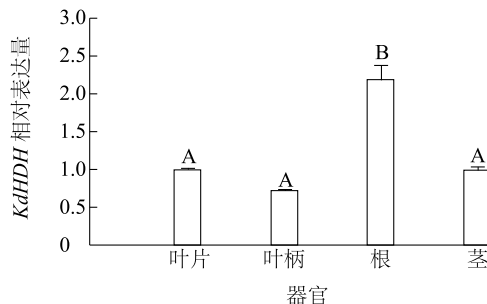


图 6 KdHDH 基因在大叶落地生根不同器官中的表达

Fig.6 Expression profiling of KdHDH gene in different organs in *Kalanchoe daigremontiana*

减少, 从而造成配子体合成效率降低。但是在组氨酸脱氢酶突变体 (*hisn8*) 中, 配子体缺陷的原因可能是组氨酸积累过多, 对细胞造成了毒害^[22], 也不排除是因为组氨酸脱氢酶是合成途径中的最后一步, 其他组氨酸合成前体无法挽救突变的细胞。

KdHDH 蛋白中酸性氨基酸有 54 个, 碱性氨基酸有 45 个, 等电点为 5.78, 为酸性蛋白。当采用计算机分析蛋白质的稳定性时, 当一个蛋白质的不稳定系数 > 40 时, 该蛋白质不稳定, KdHDH 蛋白不稳定系数为 44.59, 说明该蛋白为不稳定蛋白, 而许多

具有生物活性的蛋白质往往是不稳定蛋白^[23]。组氨酸脱氢酶是一种含 Zn^{2+} 的同型二聚体蛋白,利用脲变性作用或螯合剂除掉 Zn^{2+} 后,组氨酸脱氢酶便丧失催化活性,加入 Zn^{2+} 后又具有催化活性^[24]。

本研究发现 *KdHHDH* 基因在各个组织中的表达情况是根>叶片>茎>叶柄,该基因片段是在大叶落地生根胎生苗差减文库中得到,推测该基因可能参与胎生苗中不定根的发育调控。在渗透胁迫下,大叶落地生根在 24 h 时,出现明显的萎蔫表型,*KdHHDH* 的表达量变化总体趋势为下调表达。说明在渗透胁迫这种非生物胁迫下,*KdHHDH* 基因可能是通过下调表达来参与胁迫过程的。本研究对大叶落地生根组氨酸脱氢酶基因进行克隆和生物信息学分析,证明该基因在序列结构和功能上相对保守,在分裂组织根中表达量最高,并且受渗透胁迫的抑制,说明 *KdHHDH* 在大叶落地生根发育和抵抗非生物胁迫中起重要的调控作用,关于 *KdHHDH* 在大叶落地生根中的具体功能还需要进一步验证。

参考文献:

- [1] MURALLA R, SWEENEY C, STEPANSKY A, et al. Genetic dissection of histidine biosynthesis in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2007, 144(2): 890-903.
- [2] FRAÚSTO D A, SILVA J J R, WILLIAMS R J P. The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life[M]. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- [3] HARDING M M. The architecture of metal coordination groups in proteins[J]. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2004, 60(5): 849-859.
- [4] KRAMER U, COTTER-HOWELLS J D, CHARNOCK J M, et al. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel[J]. Nature, 1996, 379(6566): 635-638.
- [5] PERSANS M W, YAN X, PATNOE J M, et al. Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *thlaspi goesingense* (Hálácsy)[J]. Plant Physiology, 1999, 121(4): 1117-1126.
- [6] KHEIROLOMOOM A, MANO J, NAGAI A, et al. Steady-state kinetics of cabbage histidinol dehydrogenase[J]. Arch Biochem Biophys, 1994, 312(2): 493-500.
- [7] WONG Y, MAZELIS M. Detection and properties of l-histidinol dehydrogenase in wheat germ[J]. Phytochemistry, 1981, 20(8): 1831-1834.
- [8] NAGAI A, SCHEIDEGGER A. Purification and characterization of histidinol dehydrogenase from cabbage[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1991, 284(1): 127-132.
- [9] NAGAI A, SUZUKI K, WARD E, et al. Overexpression of plant histidinol dehydrogenase using a baculovirus expression vector system[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1992, 295(2): 235-239.
- [10] NAGAI A, OHTA D. Histidinol dehydrogenase loses its catalytic function through the mutation of His261→Asn due to its inability to ligate the essential Zn[J]. J Biochem, 1994, 115(1): 22-25.
- [11] KANAORI K, UODOME N, NAGAI A, et al. ¹¹³Cd nuclear magnetic resonance studies of cabbage histidinol dehydrogenase[J]. Biochemistry, 1996, 35(19): 5949-5954.
- [12] INGLE R A. Histidine biosynthesis[J]. The Arabidopsis Book, 2011, 9: e141.
- [13] GARCES H, SINHA N. The mother of thousands (*Kalanchoe daigremontiana*): a plant model for asexual reproduction and CAM studies[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2009(10): pdb.emo133.
- [14] ZHONG T, ZHU C, ZENG H, et al. Analysis of gene expression in *Kalanchoe daigremontiana* leaves during plantlet formation under drought stress[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2013, 16(6): 4.
- [15] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, et al. The proteomics protocols handbook[M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2005.
- [16] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [17] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [18] COMBET C, BLANCHET C, GEOURJON C, et al. NPS@: network protein sequence analysis[J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(3): 147-150.
- [19] KELLEY L A, STERNBERG M J E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server[J]. Nature Protocols, 2009, 4(3): 363-371.
- [20] TADA S, HATANO M, NAKAYAMA Y, et al. Insect cell expression of recombinant imidazoleglycerolphosphate dehydratase of Arabidopsis and wheat and inhibition by triazole herbicides[J]. Plant Physiol, 1995, 109(1): 153-159.
- [21] NEGRUTIU I, HINNISDAELS S, CAMMAERTS D, et al. Plant protoplasts as genetic tool: selectable markers for developmental studies[J]. Int J Dev Biol, 1992, 36(1): 73-84.
- [22] HANSEN B S, VAUGHAN M H, WANG L. Reversible inhibition by histidinol of protein synthesis in human cells at the activation of histidine[J]. J Biol Chem, 1972, 247(12): 3854-3857.
- [23] 李世崇,陈昭烈. 不稳定蛋白质的分离纯化[J]. 药物生物技术, 2002,9(3): 175-177.
- [24] 刘瑞卿,金瑞良,王虹军,等. 结核分枝杆菌 H37Rv 组氨酸脱氢酶基因的克隆、表达及酶学性质分析[J]. 复旦学报(自然科学版), 2007,46(3): 384-389.

(责任编辑:陈海霞)