

朱守晶, 史文娟. 苎麻镉响应基因 *BnG6PDH1* 的克隆和表达分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2) : 262-270.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.004

## 苎麻镉响应基因 *BnG6PDH1* 的克隆和表达分析

朱守晶<sup>1,2</sup>, 史文娟<sup>1</sup>

(1. 宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000; 2. 江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西 宜春 336000)

**摘要:** 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (*G6PDH*) 是磷酸戊糖代谢途径的关键限速酶, 为探讨 *G6PDH* 基因在苎麻耐镉机制中的作用, 本研究在苎麻镉胁迫转录组的基础上, 采用 RACE 方法从苎麻 (*Boehmeria nivea* L.) 品种中苎一号中克隆到 *BnG6PDH1* 基因 (GenBank 登录号为 MG941010) 的全长 cDNA 序列, 该基因开放阅读框为 1 554 bp, 编码 517 个氨基酸, 蛋白质分子量为 59 250, 等电点为 5.92。 *BnG6PDH1* 编码的氨基酸与川桑 (XP\_010111634.1)、枣 (XP\_015878928.1)、甜樱桃 (XP\_021825040.1)、苹果 (XP\_008362117.1) 和梅 (XP\_008231184.1) 的胞质型 *G6PDH* 蛋白的相似性较高, 相似度分别为 92%、91%、89%、88% 和 88%。组织表达特异性分析结果表明, *BnG6PDH1* 在苎麻叶中的表达量最高, 其次为茎, 根部的表达量最低。镉胁迫诱导表达分析结果表明, *BnG6PDH1* 的显著表达受镉的诱导, 表达量随着镉质量浓度的增加而增加。以上结果表明, *BnMYB1* 是一个镉应答基因, 可能在植物对镉胁迫的适应中发挥重要作用。

**关键词:** 苎麻; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 镉响应基因 *BnG6PDH1*; 基因克隆; 表达分析

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)02-0262-09

## Cloning and expression analysis of cadmium-responsive gene *BnG6PDH1* from ramie (*Boehmeria nivea* L.)

ZHU Shou-jing<sup>1,2</sup>, SHI Wen-juan<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University, Yichun 336000, China; 2. Jiangxi Key Laboratory of Regulation and Control of Crop Growth and Development, Yichun 336000, China)

**Abstract:** Glucose-6-phosphate dehydrogenase is a main regulatory enzyme for pentose phosphate pathway. In this paper, a *G6PDH* gene named *BnG6PDH1* (GenBank accession: MG941010) was isolated from ramie (*Boehmeria nivea* L.) by amplification of cDNA ends (RACE) based on the analysis of expression profiling of cadmium response genes in ramie. The open reading frame of *BnG6PDH1* was 1 554 bp, and 517 amino acid residues were encoded. The predicted protein was 59 250 with isoelectric point of 5.92. The similarity comparison revealed that the deduced amino acid sequence shared 92%, 91%, 89%, 88% and 88% of similarity with *Morus notabilis* (XP\_010111634.1), *Ziziphus jujuba* (XP\_015878928.1), *Prunus avium* (XP\_021825040.1), *Malus domestica* (XP\_008362117.1) and *Prunus mume* (XP\_008231184.1). The results of specificity analysis showed that the expression of *BnG6PDH1* was in leaf and the lowest in root. Furthermore, *BnG6PDH1* gene was significantly induced by cadmium stress, and the expression of *BnG6PDH1* increased with the increase of Cd<sup>2+</sup> concentration. Collectively, the results suggest that *BnG6PDH1* is a cadmium-responsive factor and may play an important role in the plant adaption to cadmium stress.

**Key words:** *Boehmeria nivea*; glucose-6-phosphate dehydrogenase; cadmium-responsive gene *BnG6PDH1*; gene clone; expression analysis

收稿日期: 2018-06-26

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ161008); 江西省作物生长发育调控重点实验室开放基金项目 (KFJJ201703)

作者简介: 朱守晶 (1985-), 男, 安徽淮南人, 博士, 讲师, 主要从事苎麻耐镉分子机理研究。 (E-mail) zhushj85@sina.com

近年来随着采矿、冶金等工业的发展, 以及农业生产中化肥农药的过量施用, 中国农田土壤的重金属污染问题日益显现<sup>[1-4]</sup>。镉 (Cd) 是一种常见的有

毒重金属,生物迁移性很强。土壤中的镉易被植物根系吸收并积累,不仅造成作物生长减缓,产量和品质降低,还可通过食物链在人体组织器官中积累,严重威胁人类健康<sup>[5-7]</sup>。植物修复技术因其成本低、环境友好等特点,是农田镉污染修复的有效方法之一,研究植物耐受和积累重金属镉的分子机制,对于吸镉植物的遗传改良具有重要意义<sup>[8]</sup>。

戊糖磷酸途径(Pentose phosphate pathway, PPP)是植物糖代谢的重要途径,主要提供核酸代谢所需的磷酸戊糖及还原力[即还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)],一些中间产物则参与脂肪酸和氨基酸的代谢<sup>[9-11]</sup>。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(*G6PDH*)是植物戊糖磷酸途径的关键限速酶,在植物的生长发育中起到非常重要的作用<sup>[12]</sup>。1994年,Græve等<sup>[13]</sup>首次从马铃薯cDNA文库中获得了质体*G6PDH*基因。随后,研究者们陆续从拟南芥<sup>[14]</sup>、小麦<sup>[15]</sup>、烟草<sup>[16]</sup>、苜蓿<sup>[17]</sup>中克隆到了植物*G6PDH*基因。近年来的许多研究结果表明,*G6PDH*与植物的生长发育和对多种外界环境胁迫的应答有密切关系。Scharte等<sup>[18]</sup>将拟南芥*G6PDH*基因转入烟草,提高了转基因烟草的耐旱性,其原因可能是*G6PDH*能够通过调节抗坏血酸(Ascorbic acid, ASA)和谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量来清除植物体内多余的ROS,增强了植物的耐旱性<sup>[19]</sup>。林元震等<sup>[20]</sup>在烟草中超表达甜杨*PsG6PDH*基因,增强了转基因烟草的抗寒性。此外,盐胁迫<sup>[21]</sup>、氧化胁迫<sup>[22]</sup>、金属离子胁迫<sup>[23]</sup>、低温胁迫<sup>[24]</sup>、水分胁迫<sup>[25]</sup>、病原菌侵染<sup>[26]</sup>等生物或非生物胁迫,均可引起植物*G6PDH*活性或基因表达水平发生显著变化。

苧麻(*Boehmeria nivea* L.)为荨麻科苧麻属多年生宿根性草本植物,其纤维是中国重要的纺织原料,因其优越的纤维品质而被广泛应用于纺织,具有较高的经济价值<sup>[27]</sup>。同时,苧麻还具有生物量大、生长迅速、耐瘠薄、适应性强等特点,特别是对重金属镉具有较强的耐受能力<sup>[28-32]</sup>。*G6PDH*广泛参与植物生长发育和对逆境胁迫响应等多种生理过程,但关于*G6PDH*在苧麻耐镉分子机制中的研究报道较少。本研究拟从镉胁迫下苧麻转录组<sup>[33]</sup>中筛选出一个受镉胁迫诱导表达的*G6PDH*基因,利用RACE技术克隆该基因的全长cDNA序列,在生物信息学分析的基础上,利用荧光定量PCR(RT-qPCR)技术

研究该基因在苧麻不同组织器官及镉胁迫下的表达特性,为苧麻耐镉分子机制的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及其处理

供试植物材料为苧麻栽培品种中苧一号,来自宜春学院苧麻资源圃。在中苧一号旺长期,选取一苑中的3个单株,分别取其须根、中段茎及嫩梢叶,作为3个生物学重复,液氮速冻后置于-80℃保存,用于基因的组织特异性表达特性分析;选取株高15 cm左右,长势较为一致的中苧一号扦插苗,置于装有1/2 Hoagland营养液的三角瓶中,于培养室中进行预培养(培养条件:温度28℃,相对湿度50%~60%,光周期为12 h光照/12 h黑暗,每2 d更换1次营养液),约14 d后向营养液中添加CdCl<sub>2</sub>进行胁迫处理,镉处理质量浓度分别为0 mg/L、10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L,处理24 h,剪取叶片,-80℃保存,用于镉胁迫下的基因表达分析。

### 1.2 生化试剂

植物总RNA提取试剂pBIOZOL购自北京Bio Flux公司,PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR® Premix Ex Taq™ II、pMD18-T载体购自TaKaRa公司(日本),TransTaq-T DNA Polymerase、DNA Marker、Trans-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,引物合成及测序由上海生工生物技术有限公司完成,其余试剂均为国产分析纯或者化学纯。

### 1.3 RNA提取及cDNA合成

苧麻不同组织器官和不同质量浓度镉处理样品总RNA的提取按照pBIOZOL植物总RNA提取试剂的操作流程进行;第一链cDNA的合成按照PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒的说明书进行。

### 1.4 *BnG6PDH1* 基因3'端的克隆

根据镉胁迫下苧麻转录组中的Unigene序列,利用Primer Premier 5.0软件设计2条巢式正向特异性引物*BnG6PDH1*-F1和*BnG6PDH1*-F2,对应的反向引物为QO和QI。利用接头引物QT以苧麻根、茎、叶的混合总RNA为模版,合成cDNA第一链。正向外侧引物*BnG6PDH1*-F1: 5'-ATCTTGCTG-

GATGGACTCGGGTTG-3',正向内侧引物 *BnG6PDH1*-F2: 5'-CTATTTGGGAAGGAGTTGCTGC-3',反向外侧引物 QO: 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3',反向内侧引物 QI: 5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3',接头引物 QT: 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'。3'端 PCR 扩增:采用巢式 PCR 扩增方式,进行 2 轮 PCR 扩增。第一轮扩增以第一链 cDNA 为模版,以 *BnG6PDH1*-F1 和 QO 为上下游引物,第一轮扩增产物稀释 50 倍后作为第二轮扩增的模版。PCR 反应体系:10×Buffer 2.5 μl,第一链 cDNA 1.0 μl、上下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μl、dNTP (2.5 μmol/L) 2.0 μl、Trans Taq-T DNA Polymerase 0.2 μl,灭菌水 17.3 μl。反应程序:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,65/60℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 90 s,共 32 个循环,72℃ 延伸 7 min,反应终止于 4℃ 保温。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶回收目的条带,将回收产物连接至 pMD18-T 载体,转化 Trans-T1 大肠杆菌感受态细胞,经 PCR 鉴定后,送上海生工生物技术有限公司测序。

### 1.5 *BnG6PDH1* 基因的开放读码框 PCR 验证

用 DNAMAN 8 软件将获得的 3'端序列与原有序列进行拼接,得到含有开放读码框的 *BnG6PDH1* 基因 cDNA 序列,为验证序列的可靠性,在其开放读码框两侧设计一对正反向特异引物(*BnG6PDH1*-F: 5'-TTTGAGAACTTGTGGAGATTAGAAGATGG-3',*BnG6PDH1*-R: 5'-CACGCCACACAACATGCTTATTC-CG-3'),以中苎一号的根、茎、叶混合 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,回收 PCR 产物并连接 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌感受态 Trans-T1,经 PCR 鉴定后送阳性克隆测序。

### 1.6 *BnG6PDH1* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 数据库的 ORF Finder 程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找 *BnG6PDH1* 基因的开放读码框,并对核苷酸序列进行翻译;采用 ExPASy 网站的 ProtParam 程序(<https://www.expasy.org/>)对 *BnG6PDH1* 蛋白的基本理化性质进行分析;利用 PRABI 网站 SOPMA 程序(<https://npsa-prabi.ibcp.fr>)对 *BnG6PDH1* 蛋白的二级结构进行预测;利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)程序预测 *BnG6PDH1* 蛋白的信号肽序列;利用 TMHMM Server v2.0 软件

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)对 *BnG6PDH1* 蛋白跨膜结构域进行预测;利用 WoLF PSORT 软件(<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>)对 *BnG6PDH1* 蛋白的亚细胞定位进行预测;通过 NCBI 数据库的 CD search 程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)和 ExPASy 数据库的 PROSITE 程序(<https://prosite.expasy.org/>)对 *BnG6PDH1* 蛋白的保守功能域进行预测;利用 NCBI 的 BLAST 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行 *BnG6PDH1* 蛋白的同源性比对分析;*BnG6PDH1* 与其他植物物种 G6PDH 蛋白的多重比对分析用 DNAMAN 8 软件完成;系统进化树的构建利用 MEGA 5.0 软件完成,采用 Neighbor-Joining 方法进行分子系统学分析,1 000 次 bootstrap 统计学检验。

### 1.7 *BnG6PDH1* 基因的表达分析

根据 *BnG6PDH1* 基因的 cDNA 序列设计实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 引物(*BnG6PDH1*-QF: 5'-TGAGCTAAAACCGCTTCCATACA-3',*BnG6PDH1*-QR: 5'-TTGAACATCCGACACGCCAC-3'),采用 ABI 公司的 StepOnePlus Real-Time PCR System 实时荧光定量 PCR 系统,分析苎麻根、茎、叶中以及不同质量浓度镉胁迫下 *BnG6PDH1* 基因的表达情况。反应体系:第一链 cDNA 模版 1.0 μl,上下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μl,SYBR Premix Ex Taq II 10.0 μl,ROX Reference Dye 0.4 μl,灭菌水 7.0 μl。反应程序:95℃ 预变性 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环。每个处理设置 3 个生物学重复。以苎麻 Actin 为内参基因(*BnActin*-F: 5'-GTTGAACCCTAAGGCTAACAGAG-3',*BnActin*-R: 5'-GGAATCCAGCACGATACCAG-3'),计算 *BnG6PDH1* 基因的相对表达量,数据分析按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法,采用 StepOnePlus system 和 Excel2007 软件进行。利用 SPSS 16.0 软件进行相对表达量的差异显著性分析(Duncan's 法)。

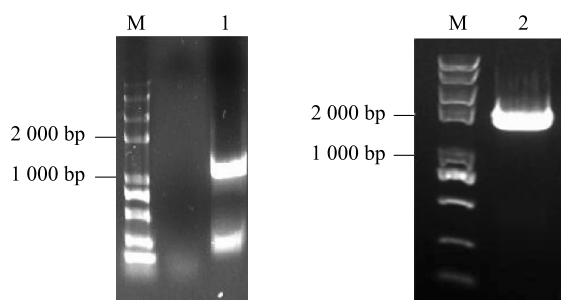
## 2 结果与分析

### 2.1 *BnG6PDH1* 基因全长 cDNA 的克隆

提取营养生长期的苎麻根、茎、叶的总 RNA,等量混合后反转录为 cDNA 模版,采用 RACE 方法获得大小为 1 119 bp 的 3'RCAE PCR 产物,用 DNAMAN 8.0 软件将其与已知 Unigene 片段进行拼接,得到大小为 1 872 bp 的 cDNA 序列。为进一步验证



序列的可靠性,在开放读码框两侧设计特异性引物进行 PCR 扩增,获得 1 条大小为 1 805 bp 的特异扩增条带(图 1),测序验证了读码框序列的准确性。GenBank 数据库检索结果表明,该基因与已登录的其他植物的胞质型 *G6PDH* 的相似性较高,将其命名为 *BnG6PDH1*,GenBank 登录号为 MG941010。



M: DNA marker; 1; 3'RACE 片段; 2: 特异性片段。

图 1 苎麻 *BnG6PDH1* 基因 cDNA 全长序列扩增

Fig.1 PCR amplification of full-length sequence of *BnG6PDH1* cDNA in ramie

## 2.2 *BnG6PDH1* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 数据库的 ORF finder 软件对获得的序列进行分析,结果表明 *BnG6PDH1* 基因 5'端非编码区的长度为 102 bp,3'端非编码区的长度为 216 bp,开放读码框长度为 1 554 bp,终止密码子为 TAG,含有 34 bp 的 PolyA 序列,编码 517 个氨基酸(图 2)。应用 ExPASy 网站的 ProtParam 程序对 *BnG6PDH1* 基因推导的氨基酸序列进行分析发现,该蛋白质的分子量为 59 250,等电点为 5.92,含有 20 种氨基酸,其中 Leu (11.4%) 含量最高,Cys 含量最低(0.8%),分子式为  $C_{2673}H_{4195}N_{719}O_{777}S_{13}$ 。利用 PRABI 网站 SOPMA 程序(<https://npsa-prabi.ibcp.fr>)对 *BnG6PDH1* 蛋白进行二级结构预测,推测该蛋白质主要由  $\alpha$  螺旋( $\alpha$ -helix)、无规则卷曲(Random coil)和延伸链(Extended strand)结构组成,比例分别为 39.65%、43.13%和 17.21%。

SignalP 4.1 Server 软件分析结果表明,*BnG6PDH1* 蛋白不含信号肽序列,不属于分泌型蛋白。利用 TMHMM Server v2.0 软件预测 *BnG6PDH1* 的跨膜结构域,结果表明,*BnG6PDH1* 蛋白不存在跨膜区域。利用 WoLF PSORT 软件对 *BnG6PDH1* 的亚细胞定位进行预测,结果表明 *BnG6PDH1* 蛋白主要位于细胞质中。

利用 DNAMAN 8 软件对苎麻 *BnG6PDH1* 蛋白和其他植物物种的 *G6PDH* 进行多序列比对(图 3)发现,苎麻 *BnG6PDH1* 与川桑、枣、甜樱桃、苹果和梅的胞质型 *G6PDH* 蛋白的相似性较高,相似度分别为 92%、91%、89%、88%和 88%。利用 NCBI 的 CD-search 和 ExPASy 数据库的 PROSITE 分析氨基酸序列的保守结构域,发现 *BnG6PDH1* 蛋白的 35~223 位氨基酸属于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的 NAD 结合区域,227~503 位氨基酸为该酶的 C 端保守结构域,213~219 位氨基酸序列为 *G6PDH* 蛋白保守的 DHYLCGE 活性位点。

利用 MEGA 5.0 软件将苎麻 *BnG6PDH1* 与其他植物的 *G6PDH* 蛋白进行多重比对,并构建系统进化树(图 4)。结果表明,来源于不同植物的 *G6PDH* 蛋白可被聚类为两大类。其中,一类为质体型 *G6PDH* 蛋白,该类 *G6PDH* 的 N 端含有信号肽,主要定位于细胞质体当中;另一类为胞质型 *G6PDH* 蛋白,该类蛋白不含信号肽,主要位于细胞质当中。在系统进化树中,苎麻 *BnG6PDH1* 与胞质型 *G6PDH* 蛋白聚为一类,其中苎麻 *BnG6PDH1* 与川桑 *G6PDH* 蛋白的亲缘关系最近。

## 2.3 苎麻 *BnG6PDH1* 基因的表达分析

为研究 *BnG6PDH1* 基因在苎麻不同组织中的表达特性,提取苎麻根、茎、叶的总 RNA,以苎麻 *Actin* 基因为内参基因,利用荧光定量 PCR 对 *BnG6PDH1* 基因在苎麻不同组织中的表达进行分析。结果表明,*BnG6PDH1* 基因的表达具有明显的组织特异性,其在苎麻叶中的表达量最高,其次为茎,根部的表达量最低,叶和茎中 *BnG6PDH1* 基因的表达量分别为根部的 8.75 倍和 2.83 倍,差异达到显著水平(图 5)。

为研究苎麻 *BnG6PDH1* 基因在镉胁迫条件下的表达特性,采用不同浓度的  $Cd^{2+}$  对苎麻幼苗进行处理,提取叶片总 RNA,以苎麻 *Actin* 基因为内参基因,利用荧光定量 PCR 对 *BnG6PDH1* 基因在不同质量浓度镉胁迫下的表达进行分析。结果(图 6)表明,苎麻 *BnG6PDH1* 基因的表达受镉胁迫的诱导,随着镉质量浓度的增加,*BnG6PDH1* 基因的表达量逐步增加,当  $Cd^{2+}$  质量浓度增加到 100 mg/L 时,*BnG6PDH1* 基因的表达量达到最大,为对照的 5.15 倍;当  $Cd^{2+}$  质量浓度继续增加到 150 mg/L 时,*BnG6PDH1* 的表达量略有下降,为对照的 4.62 倍。

```

1 TCTCTCTCTCTC
13 TTTCTCTCTGATTCCCGTGGATTTCGGAACACGATTCTGATCTCCTCTGATCAGTTGTGCTCATTGGAGAACTTGTGGAGATTAGAAG
103 ATGGAATCAGGTTTCATGGCACATTGAGAAAAGAGCTAGCTTTAGAAACGATTCTTCTCGAAAGAAATCGATAATGTGCTTGAATATGGC
1 MES GSWHI EK RASFR NDSFS KE IDNVLE NG
193 TCTCTCTCGATCATCGTCCTCGGTGCTTCGGGTGATCTTGCCAAGAAGAAGACTTTTCCAGCGCTCTTCAACCTTTTCCGCCAGGGATTC
31 SL SII VLG AS GDL AK KKT FP AL FNL FR QGF
283 CTTCAACCAACGAAGTTCACATTTTGGATATGCAAGGACTAAGATTACAGATGAGGAGCTAAGAGACCGTCTTCGTGGATATCTTGTC
61 LQP NEV HI FG YAR TK IT DE EL RDR LR GYL V
373 AATGATAAAGGCGCTTCGCCTAAGGACTTGGAAGACGTAGCAAATTTTTGTCAGCTGATCAAATATGTAAGTGGTTCTTATGATTCTGGA
91 NDK GAS PK DLE DV AN FL QL IK YVS GS YDS G
463 GAGGGGTTTCAACTATTAGATAAGGAAATCTCAGAGCATGAGGTCTTAAAAAATAGCACTGAAGGGTCATCTAGAAGACTCTTCTATCTT
121 EGF QLL DK EISE HE VL KNS TE GS SR RL FYL
553 GCACTTCCTCCTCAGTGTATCCATCCGTGTGCAAGATGATCAGGCATTTCTGCATGAATAAACTGATCTTGGTGGATGGACTCGGGTT
151 AL PPSV YP SV C KM I RH FCM NK TDL GGW TRV
643 GTTGTGAGAAGCCTTTCGGAAGGATTTCGAAAAGTGTGAGGAACTCAGTTCTCAGATTGGAGAGTTGTTTGATGAACACAGATCTAT
181 VVE KPF GK DL QS AE EL SS QIG EL FDE PQIY
733 CGCATAGATCACTATTGGGGAAGGAGTTGGTGCAAAATTTGTTGGTACTTCGATTGCAAACCGCATGTTTCTCCCTTTTGAACCGT
211 RID HYLG KE LV QNL LV LR FAN RM FL PL WN R
823 GACAACATTGACAACGTACAGATTGTTTTCGGGAGGACTTTGGAACGAAGGTCGTGGTGGATATTTTGATCAGTACGGGATTATCCGT
241 DNI DNV QIV FRE DFG TE GR GG YFD QYGIIR
913 GATATTATTCAAATACCTATTGCAGGTTCTCTGCCTGGTTGCCATGGAAAAACCTGTTTCACTTAAACCTGAGCATATTCGAGATGAG
271 DII QNHL LQV LC LV AME KPV SL KPE HIR DE
1 003 AAAGTGAAGGTTCTTCAATCTGTACTTCCAATCAAGGATGATGAAGTTGTTCTTGGACAATATGATGGCTACAAAGATGATCCAACAGTC
301 KVK VL QS VLP IK DDE VVL GQ YDGY KD DP TV
1 093 CCTGATCTGTCAAATACCAACTTTTGCAAGTATGATTCTGCGAATTCATAATGAACGATGGGAAGGTGTGCCGTTTATTTAAAGGCA
331 PDL SNT PTF ASM IL RI HNE RWE GV PFI LKA
1 183 GGGAAAGCATTGAGTTCACGAAAGGCTGAAATCCGAGTTCAATTTAAGGACGTTTCTGGTGACATATCAAATGTAAGGAAGCAAGGAAGA
361 GKA LSS RK AE IRV QFK DVP GD IF KCK KQG R
1 273 AACGAGTTTGTAAATTCGCTGCAACCTTCAGAAGCCATGTACATGAAGCTTACGGTAAAGCAGCCAGGACTGGATATGTTGACGGTCCAA
391 NEF VIR LQPS EAMY MKL TVK QP GL DML TVQ
1 363 AGTGAATTGGATTGTTCATATAGGCAACGTTATCAAGGGGTTACAATCCCAGAAGCTTATGAGCGTCTAATACTCGACACGATAAGGGGC
421 SEL DLS YR QRY QGV TI PE AYE RL IL DTIRG
1 453 GATCAGCAACACTTTGTTGCAAGGGATGAGTTGAAGGCAGCGTGGGAGATCTTACACCTCTTCTGCACAGAATTGATGACGGTGAGCTA
451 DQQ HFV RR DEL KAA WE IFT PLL HRI DDGEL
1 543 AAACCGCTTCCATACAAACCAGGCAGTCGAGGCCAGATGCAGCGGATGAGCTTCTGAAAAAGCTGGTTACGTCCAAACTCTCGGCTAT
481 KPL PYK PG SR GP DAA DEL LE KAG YVQ TLGY
1 633 ATCTGGATTCTCCTACATTGTAGAGTGCTATAGCCTCTTCTATGTCTTGGTTTAGCACAATGAGAGAAAAATATTTATTTGCTTTTAGT
511 IWI PPTL *
1 723 ATTGTAATCCTTATAAACTAACCATCATCTTTTCGGAATAAGCATGTTGTGTGGCGTGTGCGATGTTCAATAATTGAGTAATTTTTTAAT
1 813 GCAATTCGTAGAATAATGTTTGGATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

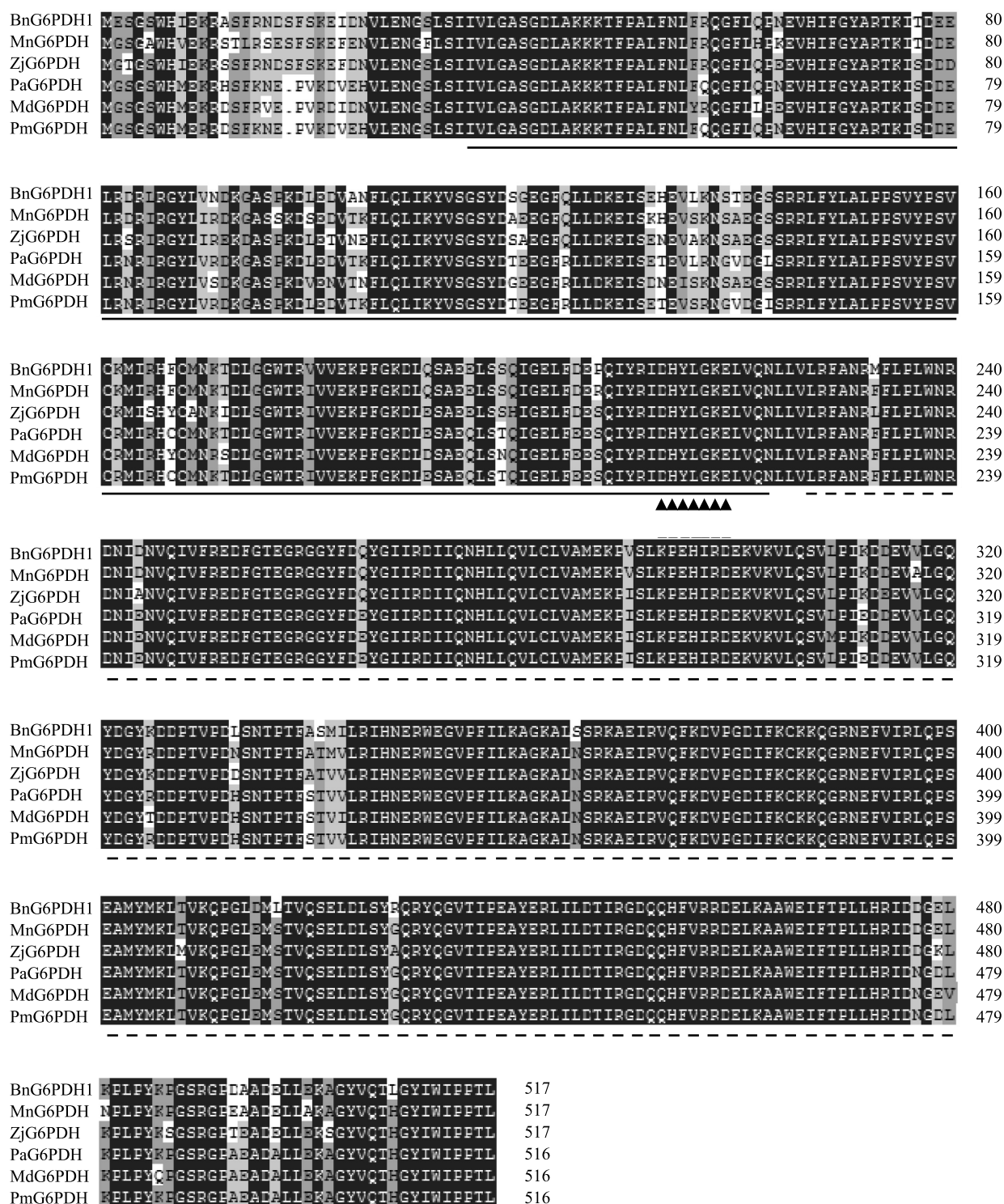
```

图2 苎麻 *BnG6PDH1* 基因 cDNA 序列全长及推测的氨基酸序列Fig.2 The full-length sequence of *BnG6PDH1* cDNA and the deduced amino acid sequence

### 3 讨论

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是磷酸戊糖代谢途径的关键限速酶,调控 NADPH 和碳流的产生<sup>[34]</sup>。*G6PDH* 催化生成的 NADPH 不仅为生物细胞中一

些生物大分子的生物合成提供所需的还原力,同时还是与抗氧化及解毒有关的还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)再生的唯一还原力<sup>[35]</sup>,可见 *G6PDH* 在植物生长发育过程中起到至关重要的作用。本研究从苎麻品种中苎一号中成功克隆了 *BnG6PDH1*



BnG6PDH1: 苧麻 *Boehmeria nivea* MG941010; MnG6PDH: 川桑 *Morus notabilis* XP\_010111634.1; ZjG6PDH: 枣 *Ziziphus jujuba* XP\_015878928.1; PaG6PDH: 甜樱桃 *Prunus avium* XP\_021825040.1; MdG6PDH: 苹果 *Malus domestica* XP\_008362117.1; PmG6PDH: 梅 *Prunus mume* XP\_008231184.1. 实线表示 NAD 结合区域; 虚线表示 C 端保守结构域; ▲ 表示活性位点。

图3 苧麻 BnG6PDH1 蛋白与其他植物 G6PDH1 蛋白氨基酸序列的同源性比较

Fig.3 Amino acid sequence alignment between BnG6PDH1 protein of ramie and G6PDH1 protein of other plants

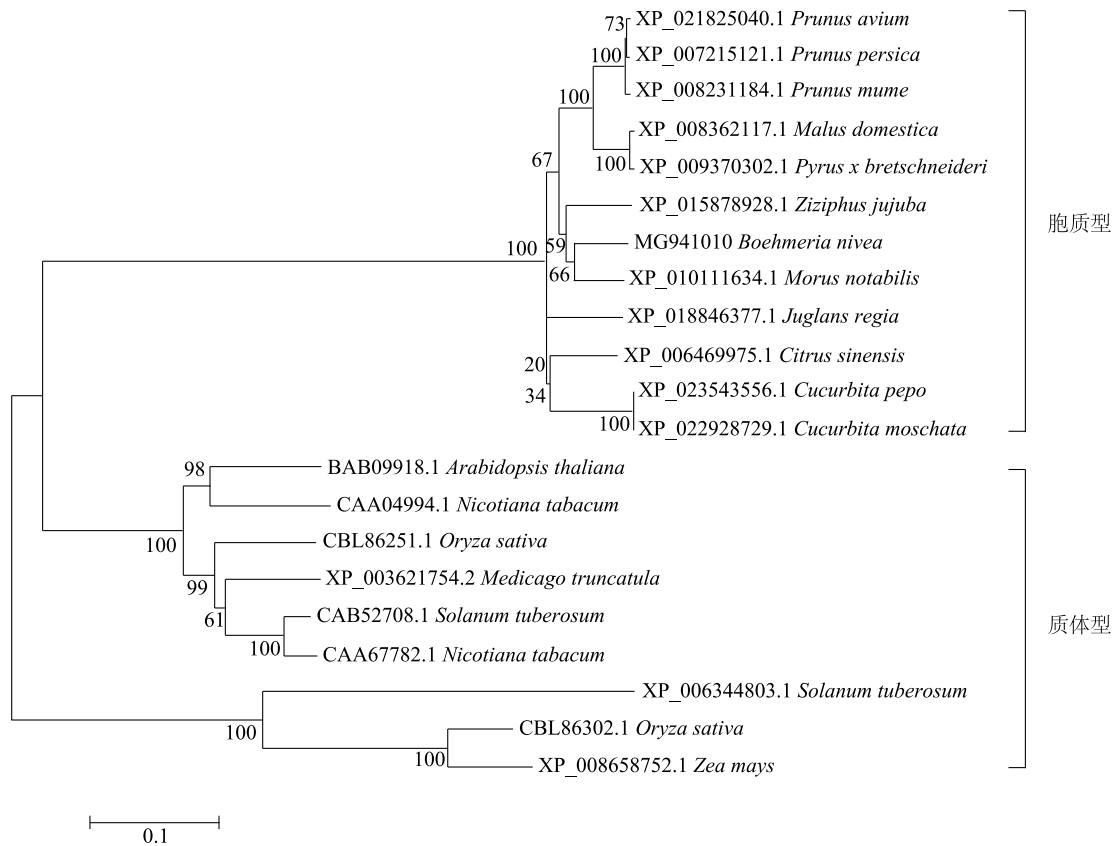
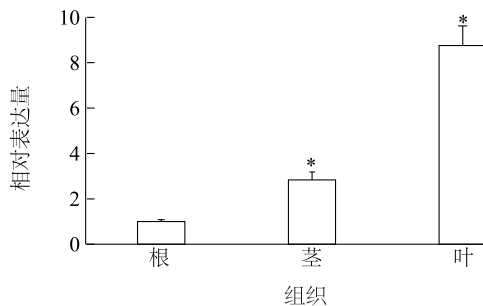


图 4 BnG6PDH1 蛋白及其他植物 G6PDH 蛋白的系统进化树

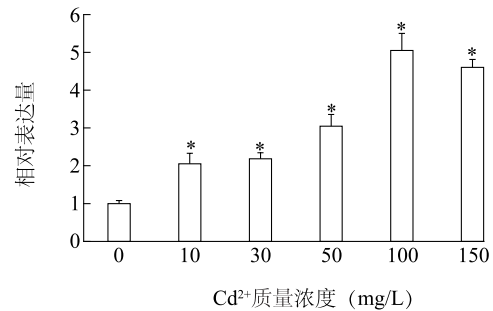
Fig.4 Phylogenetic tree of BnG6PDH1 protein and G6PDH protein from other plants



\* 表示与根相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 5 BnG6PDH1 在苧麻不同组织中的表达分析

Fig.5 Expression analysis of BnG6PDH1 in different tissues of ramie



\* 表示与 0 mg/L 相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 6 BnG6PDH1 基因在不同浓度镉胁迫下的表达

Fig.6 The expression of BnG6PDH1 under different concentration of cadmium

基因的完整开放读码框。保守结构域分析结果表明,在推导的氨基酸序列中,35~223 位氨基酸属于 G6PDH 蛋白的 NAD 结合区域,227~503 位氨基酸为 G6PDH 蛋白的 C 端保守结构域,213~219 位氨基酸序列为 G6PDH 蛋白保守的 DHYLGKE 活性位

点,以上结果表明它是一个典型的 G6PDH 蛋白。

植物体内同时存在胞质和质体氧化戊糖磷酸途径,即植物细胞中的 G6PDH 同工酶可分为胞质型和质体型 2 种类型<sup>[36-37]</sup>,胞质型 G6PDH 的氨基酸序列比质体 G6PDH 少一段约 60 个氨基酸左右的转



运肽序列。这 2 种类型的 G6PDH 在调节方式上有所不同,胞质 G6PDH 受到代谢产物调节,而质体 G6PDH 只有在夜晚才具有活性。目前,在不同植物中发现了多种类型的 *G6PDH* 同工酶,比如拟南芥中发现了 6 个 G6PDH 蛋白中,有 4 种为质体型,2 种为胞质类型<sup>[14]</sup>。本研究中,对苎麻 *BnG6PDH1* 蛋白的生物信息学分析结果表明,*BnG6PDH1* 与其他植物的胞质 G6PDH 蛋白相似性较高,不含质体 G6PDH 所具有的信号肽序列,也不存在跨膜区域。亚细胞定位预测结果表明,*BnG6PDH1* 蛋白主要位于细胞质中。系统进化树分析结果表明,*BnG6PDH1* 蛋白与胞质类 G6PDH 亲缘关系较近。因此,综合以上结果可以推测,苎麻 *BnG6PDH1* 为胞质型蛋白。

一些研究结果表明,*G6PDH* 基因的表达存在组织特异性。王晓晖等<sup>[38]</sup>研究发现,腊梅 *G6PDH1* 基因主要在花和根中表达,在叶和茎中表达量较低。侯夫云<sup>[39]</sup>利用半定量 RT-PCR 分析了水稻胞质型 *OsG6PDH1* 基因在水稻根、茎、叶和幼穗中的表达情况,结果发现 *OsG6PDH1* 在根、茎和穗中呈高丰度表达,而在叶中的表达量较低。本研究中,苎麻 *BnG6PDH1* 基因在叶中表达量最高,而在根中表达量最低。这表明 *G6PDH* 在不同植物中的表达存在差异,推测 *BnG6PDH1* 基因主要在苎麻的叶片生长发育和防御机制中起作用。

大量研究结果表明,外界的一些生物或非生物胁迫能够诱导植物 *G6PDH* 的表达,包括重金属胁迫。Van 等<sup>[40]</sup>研究发现,菜豆在锌或镉离子刺激后,*G6PDH* 及其他酶的活性也被诱导,因而认为 *G6PDH* 等酶可作为土壤是否受到锌或镉离子污染的检测指标。李焱<sup>[41]</sup>对大豆的研究结果表明,高质量浓度的铝胁迫可以诱发大豆胞质型 G6PDH 蛋白活性的增加,2 个编码胞质 G6PDH 蛋白的基因 *G6PDH1* 和 *G6PDH2* 在铝胁迫下也能够被显著地诱导表达。钱立生等<sup>[42]</sup>采用不同质量浓度的镍处理小麦幼苗并测定根系抗氧化酶的活性,结果发现,小麦 *G6PDH* 的活性随着镍处理质量浓度的提高而逐渐提高。本研究中,苎麻 *BnG6PDH1* 基因的表达显著受镉的诱导,表达量随镉质量浓度的增加而增加,暗示 *BnG6PDH1* 基因可能在苎麻耐镉耐受机制中具有重要功能,这一结论将为后续苎麻耐镉生理及分子机制研究提供线索和思路。

## 参考文献:

- [1] 徐奕,梁学峰,彭亮,等. 农田土壤重金属污染黏土矿物钝化修复研究进展[J]. 山东农业科学, 2017, 49(2): 156-162, 167.
- [2] 陈怀满. 土壤-植物系统中的重金属污染[M]. 北京: 北京出版社, 2005.
- [3] 公勤,康群,王玲,等. 重金属铜对植物毒害机理的研究现状及展望[J]. 南方农业学报, 2018, 49(3): 469-475.
- [4] 刘晨,贾凤安,吕睿. 我国耕地重金属污染现状及固氮菌在其修复中的作用[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(3): 21-27.
- [5] CHRISTENSEN T H. Cadmium soil sorption at low concentrations: V. Evidence of competition by other heavy metals[J]. Water Air and Soil Pollution, 1987, 34(3): 293-303.
- [6] TOPPI L S D, GABBRIELLI R. Response to cadmium in higher plants[J]. Environmental and Experimental Botany, 1999, 41(2): 105-130.
- [7] CHANEY R L, REEVES P G, RYAN J A, et al. An improved understanding of soil Cd risk to humans and low cost methods to phytoextract Cd from contaminated soils to prevent soil Cd risks[J]. Biometals, 2004, 17(5): 549-553.
- [8] SHAH K, NONGKYNRIH J M. Metal hyperaccumulation and bioremediation[J]. Biologia Plantarum, 2007, 51(4): 618-634.
- [9] BOWSER C G, HUCKLESBY D P, EMES M J. Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in plastids purified from roots of *Pisum sativum* L.[J]. Planta, 1989, 177(3): 359-366.
- [10] ESPOSITO S, MASSARO G, VONA V, et al. Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase[J]. Planta, 2003, 216(4): 639-647.
- [11] HUTCHINGS D, RAWSTHORNE S, EMES M J. Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.)[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(412): 577-585.
- [12] LIN Y Z, ZHANG Z Y, LIN S Z, et al. High level expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene *PsG6PDH* from *Populus suaveolens* in *E. coli*[J]. Forest Ecosystems, 2005, 7(3): 35-38.
- [13] GRAEVE K, SCHAEWEN A, SCHEIBE R. Purification, characterization, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. The Plant Journal, 1994, 5(3): 353-361.
- [14] WAKAO S, BENNING C. Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2005, 41(2): 243-256.
- [15] NEMOTO Y, SASAKUMA T. Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PDH*) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Plant Science, 2000, 158(2): 53-61.
- [16] KNIGHT J S, EMES M J, DEBNAM P M. Isolation and characterisation of a full-length genomic clone encoding a plastidic glucose



- 6-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum* [J]. *Planta*, 2001, 212(4): 499-507.
- [17] FAHRENDORF T, NI W, SHORROSH B S, et al. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavonoid phytoalexin response [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28(5): 885-900.
- [18] SCHARTE J, SCHÖN H, TJADEN Z, et al. Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(19): 8061-8066.
- [19] WANG H, YANG L, LI Y, et al. Involvement of ABA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase in maintaining redox homeostasis in soybean roots under drought stress [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 107: 126-136.
- [20] 林元震, 张志毅, 郭海, 等. 甜杨 *PsG6PDH* 基因超表达对提高烟草抗寒冻性的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(3): 125-131.
- [21] CARRERAS A. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants [J]. *Plant Cell and Environment*, 2006, 29(7): 1449-1459.
- [22] DEBNAM P M, FERNIE A R, LEISSE A, et al. Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves [J]. *Plant Journal*, 2004, 38(1): 49-59.
- [23] SLASKI J J, ZHANG G C, BASU U, et al. Aluminum resistance in wheat (*Triticum aestivum*) is associated with rapid, Al-induced changes in activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in root apices [J]. *Physiologia Plantarum*, 1996, 98(3): 477-484.
- [24] LIN S Z, ZHANG Z Y, LIU W F, et al. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens* [J]. *Acta Photophysiolica Sinica*, 2005, 31(1): 34-40.
- [25] LIU J, WANG X M, HU Y F, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in tolerance to drought stress in soybean roots [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(3): 415-429.
- [26] ŠINDELÁR L, ŠINDELÁROVÁ M, BURKETOVÁ L. Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissues and protoplasts [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999, 37(3): 195-201.
- [27] 李宗道. 麻作的理论与技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 124-256.
- [28] 雷梅, 岳庆玲, 陈同斌, 等. 湖南柿竹园矿区土壤重金属含量及植物吸收特征 [J]. *生态学报*, 2005, 25(5): 1146-1151.
- [29] 曹德菊, 周世杯, 项剑. 苎麻对土壤中镉的耐受和积累效应研究 [J]. *中国麻业科学*, 2004, 26(6): 272-274.
- [30] 朱守晶, 史文娟, 揭雨成. 不同苎麻品种对土壤中镉、铅富集的差异 [J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(2): 320-326.
- [31] 余玮, 揭雨成, 邢虎成, 等. 湖南石门、冷水江、浏阳 3 个矿区的苎麻重金属含量及累积特征 [J]. *生态学报*, 2011, 31(3): 874-881.
- [32] 朱守晶, 余伟林, 石朝燕, 等. 苎麻谷胱甘肽还原酶基因 (*BnGR1*) 的克隆和表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(10): 1318-1326.
- [33] SHE W, ZHU S J, JIE Y C, et al. Expression profiling of cadmium response genes in ramie (*Boehmeria nivea* L.) root [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2015, 94(4): 453-459.
- [34] GEIGENBERGER P, KOLBE A, TIESSEN A. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56(416): 1469-1479.
- [35] ZHANG Z, LIEW C W, HANDY D E, et al. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis [J]. *FASEB Journal*, 2010, 24(5): 1497.
- [36] DENNIS D T, MIERNYK J A. Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1982, 33(1): 27-50.
- [37] SAKAI A, RCHER W. Frost survival of plants responses and adaptation to freezing stress [M]. New York: Springer Verlag, 1987: 210-222.
- [38] 王晓晖, 刘晓, 高博闻, 等. 腊梅葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (*G6PDH1*) 基因的克隆及表达分析 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(21): 4160-4164.
- [39] 侯夫云. 水稻戊糖磷酸途径两个关键酶基因的克隆与功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [40] VAN A F, CARDINAELS C, CLIJSTERS H. Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L. treated with zinc and cadmium [J]. *Environmental Pollution*, 1988, 52(2): 103-115.
- [41] 李焱. NO 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在大豆铝胁迫响应中的调节作用研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2017.
- [42] 钱立生, 王松华, 何庆元. 小麦幼苗根系抗氧化酶对镍胁迫的响应 [J]. *核农学报*, 2014, 28(9): 1708-1714.

(责任编辑: 陈海霞)