

李晓燕, 李成双, 金业程, 等. 茎瘤芥 *BjuGAPC* 基因序列特征及其参与茎发育的糖酸含量调控[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(6): 1474-1483.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.06.004

## 茎瘤芥 *BjuGAPC* 基因序列特征及其参与茎发育的糖酸含量调控

李晓燕, 李成双, 金业程, 魏小涵, 李梦瑶

(四川农业大学园艺学院, 四川 成都 611130)

**摘要:** 为明确茎瘤芥瘤状茎形成过程中的糖酸含量变化, 揭示茎瘤芥甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)的主要生理功能, 并进一步探究 *BjuGAPC* 基因的表达模式对糖酸含量的调控机制, 首先对 *BjuGAPC* 基因进行克隆, 同时, 利用生物信息学方法对 *BjuGAPC* 的理化性质、系统进化发育等多方面进行系统分析, 并使用 qRT-PCR 比较分析 *BjuGAPC* 基因在茎瘤芥茎不同发育阶段的表达规律。结果显示: (1) *BjuGAPC* 基因开放阅读框全长 1 038 bp, 是一个稳定的亲水性蛋白质, 同时具有多个蛋白质糖基化位点、磷酸化位点和特异性蛋白质激酶的结合位点; *BjuGAPC* 与其他物种的 *GAPDH* 具有高度相似性, 亲缘关系与同科的芜菁、油菜、萝卜较近。(2) qRT-PCR 分析结果表明, *BjuGAPC* 基因在茎瘤芥茎膨大不同时期的相对表达量差异显著且随着器官膨大相对表达量下调, 与转录组的表达丰度一致。(3) 相关性分析结果显示, 基因表达量与可溶性糖和可滴定酸含量均呈正相关关系, 并与糖酸比呈显著正相关关系。说明 *BjuGAPC* 基因参与甘油醛-3-磷酸脱氢酶中  $\text{NAD}^+$ -*GAPDH* 的合成, *BjuGAPC* 基因对糖酸含量有正调控作用, 可能参与了糖酸的合成过程。

**关键词:** 茎瘤芥; 茎膨大; 糖酸含量; *BjuGAPC* 基因; 理化性质; 表达分析

**中图分类号:** S637.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)06-1474-10

## Characteristics of *BjuGAPC* gene sequence in *Brassica juncea* var. *tumida* and its regulation of sugar and acid content in stem development

LI Xiao-yan, LI Cheng-shuang, JIN Ye-cheng, WEI Xiao-han, LI Meng-yao

(College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** The aim of the study was to clarify the changes of sugar and acid contents during the formation of tuberculate stem in *Brassica juncea* var. *tumida* and reveal the main physiological functions of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), and to further explore the regulation mechanism of *BjuGAPC* gene expression mode on sugar and acid content. *BjuGAPC* gene was cloned first, and its physicochemical properties, system evolution development and other aspects were systematically analyzed by bioinformatics methods at the same time. qRT-PCR method was used to compare and analyze the expression pattern of *BjuGAPC* gene in different development stages of *B. juncea* var. *tumida* stem. The results showed that, firstly, the overall length of open reading frame of *BjuGAPC* gene was 1 038 bp, and it was a stable and hydrophilic protein with multiple glycosylation sites, phosphorylation sites and specific protein kinase binding sites. *BjuGAPC* had a high similarity with *GAPDH* of other species, and its genetic relationship was closely related to crops of the same family, such as *Brassica rapa*, *Brassica napus* and *Raphanus sativus*. Secondly, results of qRT-

收稿日期: 2022-04-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(32002027)

作者简介: 李晓燕(1999-), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜栽培生理与遗传育种研究。(E-mail) Lxy2324804342@163.com

通讯作者: 李梦瑶, (E-mail) limy@sicau.edu.cn

hydrophilic protein with multiple glycosylation sites, phosphorylation sites and specific protein kinase binding sites. *BjuGAPC* had a high similarity with *GAPDH* of other species, and its genetic relationship was closely related to crops of the same family, such as *Brassica rapa*, *Brassica napus* and *Raphanus sativus*. Secondly, results of qRT-

PCR analysis showed that, the relative expression level of *BjuGAPC* gene at different stages of *B. juncea* var. *tumida* stem swelling was significantly different and was down-regulated with the organ swelled, which was consistent with the expression abundance of transcriptome. Thirdly, correlation analysis revealed that, gene expression was positively correlated with soluble sugar content and titratable acid content, and was significantly positively correlated with sugar-acid ratio. The study revealed that, *BjuGAPC* gene participated in the synthesis of  $\text{NAD}^+$ -*GAPDH* in *GAPDH*, and showed positive regulatory role in sugar and acid contents, which may be involved in the synthesis process of sugar and acid in *Brassica juncea*.

**Key words:** *Brassica juncea* var. *tumida*; stem swelling; sugar and acid content; *BjuGAPC* gene; physical and chemical properties; expression analysis

茎瘤芥 (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee) 属于十字花科,是芸薹属芥菜种的变种之一,也是榨菜生产的主要原料<sup>[1]</sup>。茎瘤芥的产品器官为膨大的瘤状茎,既可鲜食,又宜加工,具有极高的营养和经济价值。茎瘤芥的生长和发育过程受到外部条件、内源激素等共同调控<sup>[2-3]</sup>。已有研究结果证明,许多关键基因可以调控果实发育过程中有机酸和糖代谢的合成<sup>[4]</sup>,但在茎瘤芥茎膨大过程中有关糖酸含量的调控基因以及关键基因的生物信息分析较少。因此,结合茎瘤芥茎膨大过程中糖酸含量的变化,克隆与之相关的基因并研究其表达模式与调控作用,能够给茎瘤芥的分子育种和改良茎瘤芥品种提供一定的理论依据。

在植物体内,糖不仅是能量代谢的物质来源,同时可调控植物生长发育和环境应答<sup>[5]</sup>。果蔬及其制品中糖和有机酸的种类、数量以及糖酸比会影响其风味品质。可溶性糖是淀粉合成的底物,也直接关系到变态茎的营养状况,还原糖是蔗糖、淀粉等合成过程中光合作用的必需物质。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*) 是高等植物糖酵解和糖异生反应中的关键酶,大致可以归为 2 种类型,一类是  $\text{NADP}^+$ -*GAPDH*, 参与植物的卡尔文循环<sup>[6]</sup>, 另一类是  $\text{NAD}^+$ -*GAPDH*, 参与糖酵解和糖异生过程<sup>[7]</sup>。

过去认为 *GAPDH* 基因在所有植物组织中几乎都是高水平表达且表达量相对稳定,所以常被用作研究其他功能性基因表达的内参基因<sup>[8]</sup>。然而,新的研究结果表明,*GAPDH* 是一种多功能酶<sup>[9]</sup>,除了参与植物基础的新陈代谢外,也参与逆境胁迫下的抵御反应<sup>[10-11]</sup>。*GAPDH* 还广泛参与植株的生长发育进程,如拟南芥 *GAPDH* 基因缺失突变体表现为根不能正常生长和花粉败育<sup>[12-13]</sup>,生理型雄性不育小麦发育过程中种子在不同生长发育阶段 *GAPDH* 基因表达量存在显著差异<sup>[14]</sup>,拟南芥 *gapc1-1*、*gapc2-1* 基因双敲除突变体的种子含油量与敲除前相比下降 3%<sup>[15]</sup>。

当前已有多种植物的 *GAPDH* 基因被克隆,如

拟南芥<sup>[16]</sup>、番茄<sup>[17]</sup>、水稻<sup>[18]</sup>等,但是在芥菜中还未见相关报道。本研究基于芥菜的基因组和转录组数据库<sup>[19]</sup>,克隆芥菜 *GAPDH* 基因,利用生物信息学方法对其编码的蛋白质氨基酸组成、蛋白质结构及系统进化等方面进行全面预测和分析,并结合茎瘤芥不同膨大时期的糖酸含量变化,对 *BjuGAPC* 基因的表达进行相关性分析,为阐明该基因的表达在茎瘤芥茎膨大过程中的调控作用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

植物材料为涪杂 2 号茎瘤芥,采自四川农业大学(成都校区)第五教学实验楼楼顶大棚。从瘤茎发育始期(2021 年 12 月)开始取样,横径间隔 2 cm 取样 1 次,每次取 3 个生物学重复,共取样 4 次。取样完立即放入冰盒带回实验室,所取样品用清水将杂质除净,晾干水分,用液氮速冻后放于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 茎瘤芥总 RNA 的提取和反转录 利用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取茎瘤芥总 RNA,利用 TSINGKE 公司研发的 Goldenstar<sup>TM</sup> RT6 cDNA Synthesis Mix 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。

1.2.2 *BjuGAPC* 基因的克隆 利用 Primer 6.0 软件设计用于克隆 *BjuGAPC* 基因编码区全长和检测该基因表达量的引物(表 1)。以芥菜的 cDNA 为模板进行克隆,扩增程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,53  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  10 s,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查条带大小,对大小正确的条带切胶后用 DNA 凝胶回收试剂盒(OMEGA 公司)对 PCR 产物进行纯化回收,连接转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞,挑选菌落 PCR 检测,将筛选到的阳性菌落送至北京

擎科生物科技有限公司进行测序验证。

表1 *BjuGAPC* 基因引物信息

Table 1 Primer information of *BjuGAPC* gene

引物名称	引物序列 (5'→3')	用途
<i>BjuGAPC</i> -F	ATGGCTAACGCTAAGATCAAGATCG	克隆
<i>BjuGAPC</i> -R	TAAGCCAACAAACCATACGATATGA	
<i>BjuGAPC</i> -RT-F	GCACTCCATCACCGCTACTCAG	荧光定量 PCR
<i>BjuGAPC</i> -RT-R	ATCTGCAACTTACGACCAGATC	
<i>TUB</i> -F	ATGAGAGAGATCCTCCACATC	内参基因
<i>TUB</i> -R	TCAAGCCTCATCGTATTCTCT	

1.2.3 *BjuGAPC* 基因在瘤茎膨大不同时期的表达分析 以茎瘤芥不同发育阶段的 cDNA 为模板,以芥菜 *TUB* 基因为内参基因<sup>[20]</sup>。反应程序:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 5 s,53 °C 退火 30 s,70 °C 延伸 10 s,35 个循环;72 °C 延伸 5 min。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算 *BjuGAPC* 基因的相对表达量。

1.2.4 *BjuGAPC* 基因的生物信息学分析 首先使用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 在线工具 ORF finder 查找 *BjuGAPC* 基因的开放阅读框。*BjuGAPC* 蛋白的氨基酸组成和理化性质分析用在线分析工具 ProtParam 来完成。用在线分析软件 NetPhos3.1Server 分析磷酸化位点和激酶特异性。采用糖基化位点在线预测软件 YinOYang1.2Server 和 NetNGlyc1.0Server 对 *BjuGAPC* 基因编码氨基酸的糖基化位点进行预测分析。利用 ProtScale 在线工具对 *BjuGAPC* 基因编码的氨基酸序列进行亲水性和疏水性分析。利用软件 PSORT Prediction 分析 *BjuGAPC* 的亚细胞定位。用 TMHMM 在线工具预测 *BjuGAPC* 蛋白的跨膜结构域。用 SignalP 在线工具预测分析 *BjuGAPC* 蛋白中的信号肽。使用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 在线工具预测蛋白质的二、三级结构。*BjuGAPC* 基因编码蛋白质的保守结构域分析通过 Pfam 在线软件进行。在 NCBI 的蛋白质序列数据库中进行 BLASTP,并用 DNAMAN 软件进行氨基酸多重序列比对,用 MEGA7 构建系统进化树<sup>[21]</sup>。

1.2.5 糖酸含量的测定及统计分析 选择长势良好且一致的试验材料,测定不同时期的糖酸含量,均进行 3 个生物学重复。可溶性糖、葡萄糖、蔗糖、果糖含量采用试剂盒测定,蔗糖试剂盒购自北京索莱宝有限公司,其他试剂盒购自南京建成生物工程研究所。试

验数据采用 Excel 和 SPSS 22.0 进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BjuGAPC* 基因全长 cDNA 的克隆

以茎瘤芥涪杂 2 号 cDNA 为模板,设计特异性引物进行 PCR 扩增,扩增得到大小正确的条带,将其命名为 *BjuGAPC* 基因 (GenBank 登录号: OM100056),见图 1。通过 ORF Finder 分析发现,茎瘤芥 *GAPDH* 基因包含 1 个 1 038 bp 的完整开放阅读框,编码 345 个氨基酸以及包含 1 个终止密码子。

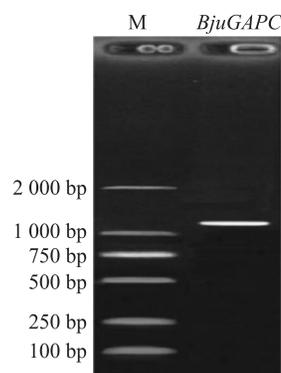


图1 *BjuGAPC* 基因扩增电泳结果

Fig.1 Electrophoretic results of *BjuGAPC* gene amplification

### 2.2 *BjuGAPC* 蛋白的理化性质预测

利用 ProtParam 对 *BjuGAPC* 蛋白的理化性质进行分析,结果显示,组成 *BjuGAPC* 蛋白的氨基酸共有 20 种,其中缬氨酸 (Val) 所占比例最高,为 11.3%,半胱氨酸 (Cys) 所占比例最低,为 0.6% (图 2)。*BjuGAPC* 蛋白的分子式为  $C_{1684}H_{2675}N_{453}O_{506}S_{10}$ ,氨基酸数为 345,脂肪族氨基酸指数为 87.51,相对分子质量为  $3.768 \times 10^4$ ;理论等电点为 7.10,属于碱性蛋白质类;从不稳定系数为 19.97 和总平均亲水性为 -0.161 来看,*BjuGAPC* 蛋白属于稳定、亲水性蛋白质。

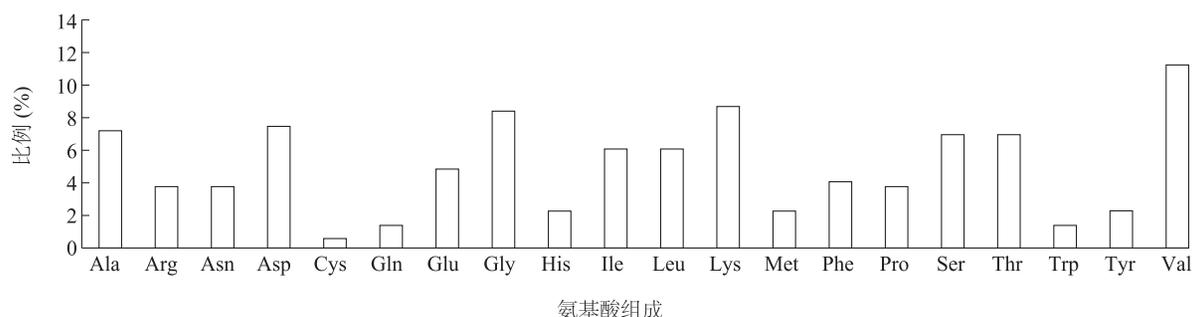
### 2.3 *BjuGAPC* 蛋白的糖基化位点预测和磷酸化位点预测

糖基化位点预测结果表明,*BjuGAPC* 蛋白有 7 个 *O*-GlcNAc 糖基化位点 (图 3A) 和 2 个 *N*-糖基化位点 (图 3B),7 个 *O*-GlcNAc 糖基化位点分别在第 152 位、287 位丝氨酸 (Ser) 和第 191 位、215 位、288 位、341 位、344 位苏氨酸 (Thr) 处,2 个 *N*-糖基化位点分别在 153~155 aa (天冬氨酸-丝氨酸-丙氨酸, N-A-S) 和 342~344 aa (天冬氨酸-组氨酸-苏氨酸, N-H-T) 处。

磷酸化位点和激酶特异性分析结果(图 3C)表明, *BjuGAPC* 蛋白存在 33 个潜在的磷酸化位点, 包括 18 个丝氨酸(Ser)、11 个苏氨酸(Thr)和 4 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点。根据上述磷酸化位点对应的磷酸激酶预测结果, 该蛋白质可能有 10 个蛋白激酶 C(PKC)、5 个酪蛋白激酶 II(CK II)、4 个周期蛋白质依赖性蛋白激酶(*cdc2*)、2 个蛋白激酶 G(PKG)、1 个 DNA 依赖性蛋白激酶(DNAPK)、1 个

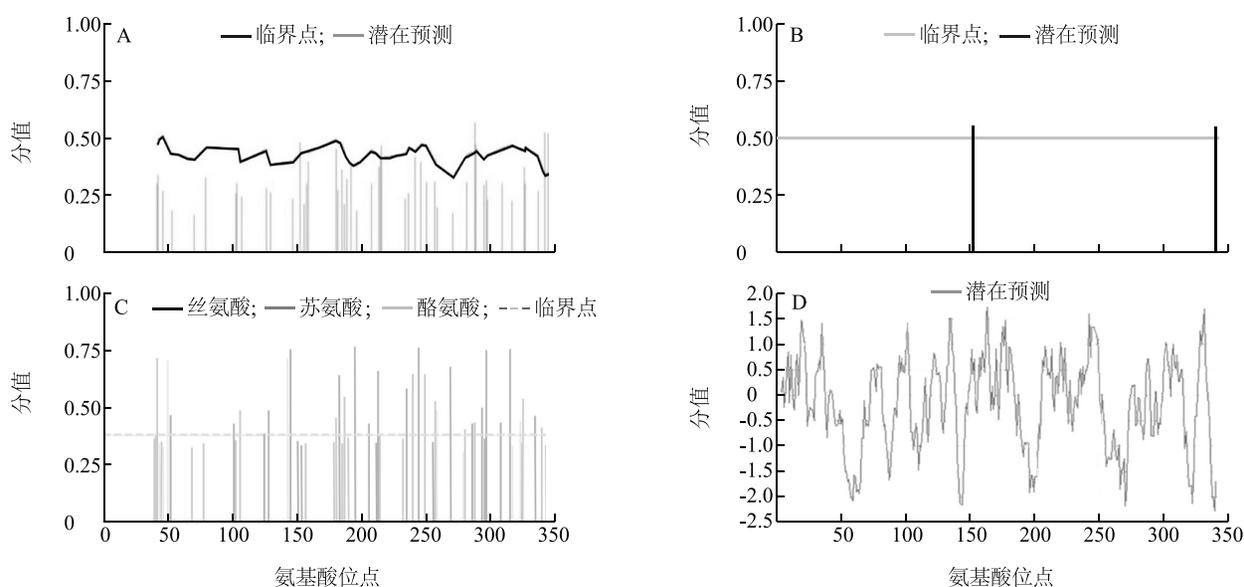
核糖体 S6 激酶(RSK)和 1 个酪蛋白激酶 I(CK I)等 7 种保守的特异性蛋白激酶的结合位点。

蛋白质氨基酸序列的亲水性和疏水性分析结果(图 3D)表明, 该蛋白质的第 340 位脯氨酸(Pro)分值最低, 亲水性最强; 第 164 位亮氨酸(Leu)分值最高, 疏水性最强。从总体上来看, *BjuGAPC* 蛋白的亲水氨基酸数量稍多于疏水氨基酸, 所以 *BjuGAPC* 基因编码的蛋白质最终表现为亲水性。



Ala: 丙氨酸; Arg: 精氨酸; Asn: 天冬酰胺; Asp: 天冬氨酸; Cys: 半胱氨酸; Gln: 谷氨酰胺; Glu: 谷氨酸; Gly: 甘氨酸; His: 组氨酸; Ile: 异亮氨酸; Leu: 亮氨酸; Lys: 赖氨酸; Met: 甲硫氨酸; Phe: 苯丙氨酸; Pro: 脯氨酸; Ser: 丝氨酸; Thr: 苏氨酸; Trp: 色氨酸; Tyr: 酪氨酸; Val: 缬氨酸。

图 2 *BjuGAPC* 蛋白的氨基酸序列组成  
Fig.2 Amino acid sequence composition of *BjuGAPC* protein



A: O-GlcNAc 糖基化位点预测; B: N-糖基化位点预测; C: 激酶特异性预测; D: 亲疏水性预测。

图 3 *BjuGAPC* 蛋白的糖基化位点、磷酸化位点预测和亲疏水性预测

Fig.3 Prediction of glycosylation site, phosphorylation site, hydrophilicity and hydrophobicity of *BjuGAPC* protein

## 2.4 *BjuGAPC* 蛋白的信号肽、跨膜结构域和亚细胞定位预测

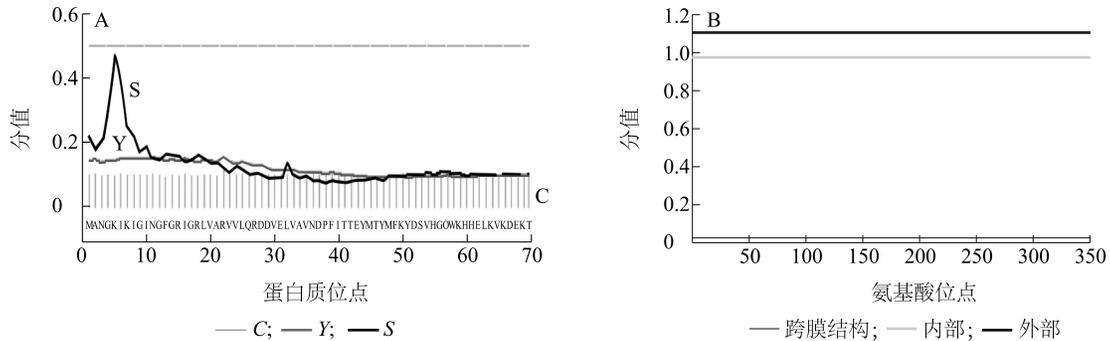
信号肽分析结果(图 4A)表明, *BjuGAPC* 基因编码的蛋白质序列中不存在已知的信号肽。跨膜结构域预测结果(图 4B)表明, 在整个 *BjuGAPC* 氨基酸序列中, 没有发现可以与膜结合的区域或者跨膜结

构, 因此推测该蛋白质属于非跨膜蛋白质。结合信号肽预测分析结果可知, 跨膜结构和信号肽的缺失说明 *BjuGAPC* 蛋白不是分泌蛋白质, 而是一种由游离核糖体合成再进入细胞质的蛋白质。因此推测 *BjuGAPC* 蛋白可能定位于细胞质。

亚细胞定位分析结果表明, *BjuGAPC* 基因最有

可能在微体和细胞质中发挥功能,有极小可能定位于叶绿体基质和叶绿体类囊体薄膜中,这与信号肽

预测结果一致。由此分析,BjuGAPC 蛋白可能在细胞质中合成,在糖酸合成过程中有一定的调控作用。



A: BjuGAPC 蛋白的信号肽预测; B: BjuGAPC 蛋白的跨膜结构预测。图 A 中 C 代表剪切位置分值, S 代表信号肽分值, Y 代表综合剪切位置分值。

图 4 BjuGAPC 蛋白的信号肽预测和跨膜结构域预测

Fig.4 Prediction of signal peptide and transmembrane domain of BjuGAPC protein

## 2.5 BjuGAPC 蛋白的二、三级结构预测

蛋白质二级结构预测结果表明, BjuGAPC 蛋白的二级结构有  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、延伸链和无规则卷曲 4 种。其中构成  $\alpha$ -螺旋(Hh)结构的有 111 个氨基酸, 占比 32.17%; 构成  $\beta$ -折叠(Tt)结构的有 22 个氨基酸, 占比 6.38%; 构成延伸链(Ee)结构的有 83 个氨基酸, 占比 24.06%; 构成无规则卷曲(Cc)结构的有 129 个氨基酸, 占比 37.39%。

BjuGAPC 蛋白三级结构的预测结果(图 5)显示, 用于建立其三级结构模型的氨基酸残基位于第 5~338 位, 覆盖度高达 96%, 表明 BjuGAPC 蛋白能够形成同源四聚体, 并且结合 4 个 NAD<sup>+</sup> 配体。

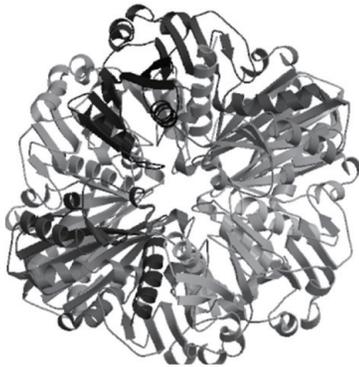


图 5 BjuGAPC 蛋白的三级结构预测

Fig.5 Prediction of tertiary structure of BjuGAPC protein

## 2.6 BjuGAPC 的蛋白质结构域分析和氨基酸序列的同源性分析

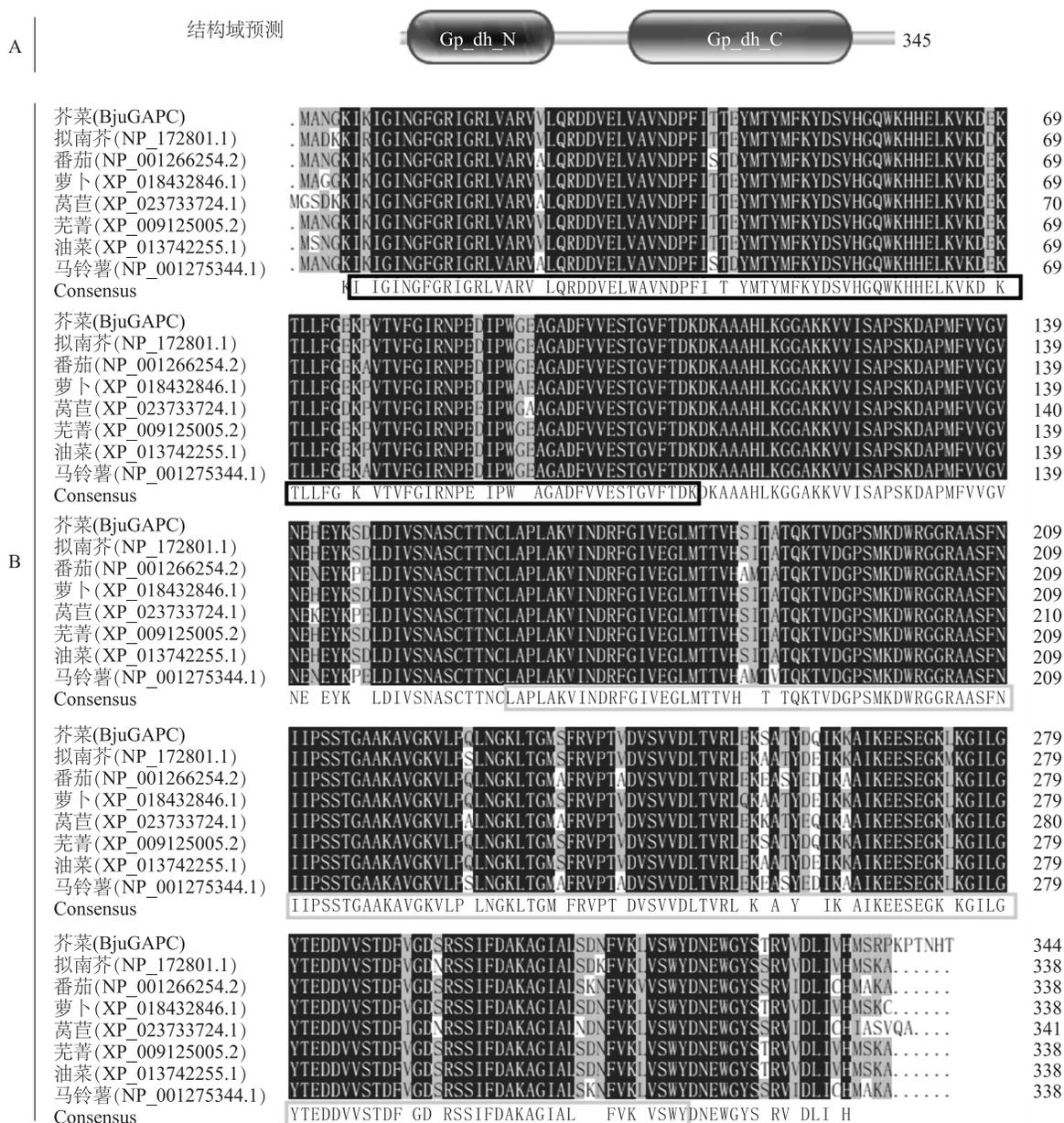
由蛋白质结构域分析结果(图 6A)可知, Bju-

GAPC 蛋白上有 2 个高度保守的超家族结构域 Gp\_dh\_N(NAD<sup>+</sup>结合结构域)和 Gp\_dh\_C(C 端甘油醛-3-磷酸脱氢酶亚家族结构域), 分别位于第 6~109 位和第 161~318 位氨基酸残基, 表明 BjuGAPC 基因属于 GAPDH 基因家族。

利用 BjuGAPC 的氨基酸序列在 NCBI 上进行 BLASTP, 结果显示 BjuGAPC 蛋白的氨基酸序列与芜菁(XP\_009125005.2)、油菜(XP\_013742255.1)、萝卜(XP\_018432846.1)、番茄(NP\_001266254.2)、莴苣(XP\_023733724.1)、马铃薯(NP\_001275344.1)、拟南芥(NP\_172801.1)的 GAPDH 基因编码的氨基酸序列具有高度相似性, 其中与同科的芜菁、油菜、萝卜的序列相似度高达 98% 以上, 与其他物种的序列相似度均为 92% 以上。采用 DNAMAN 软件将上述 7 个物种的 GAPDH 与 BjuGAPC 的蛋白质氨基酸序列进行多重比对, 结果(图 6B)显示: 芥菜 BjuGAPC 的氨基酸序列与其他物种的 GAPDH 基因编码的氨基酸序列相似度极高。表明 BjuGAPC 同源蛋白质具有相似性和保守性, 尤其表现在 Gp\_dh\_N 和 Gp\_dh\_C 两个保守结构域, 因此猜测它们之间可能有着相同的生物学功能。

## 2.7 BjuGAPC 蛋白的系统进化分析

为了探究 BjuGAPC 蛋白质的系统进化关系, 从 GenBank 数据库中选取了 19 个物种的 GAPDH 蛋白氨基酸序列。在 MEGA 7 中用邻接法(Neighbor-joining)对 20 个蛋白质氨基酸序列进行分析, 设置校验 bootstrap=1 000, 构建系统进化树(图 7)。



A: BjuGAPC 蛋白的结构域预测; B: BjuGAPC 与其他植物 GAPDH 氨基酸序列比对。图中黑色方框中的区域为 Gp\_dh\_N 结构域, 灰色方框中的区域为 Gp\_dh\_C 结构域。Consensus: 共有序列。

图 6 BjuGAPC 蛋白的结构域预测和同源性分析

Fig.6 Domain prediction and homology analysis of BjuGAPC protein

结果表明, *BjuGAPC* 蛋白与同为芸薹属的芜菁 (*Brassica rapa*) 的亲缘关系最近, 其次是甘蓝 (*Brassica oleracea*) 和油菜 (*Brassica napus*), 与同为十字花科的高山南芥 (*Arabis alpina*)、白芥 (*Sinapis alba*)、萝卜 (*Raphanus sativus*) 的亲缘性也较高, 与罂粟 (*Papaver somniferum*)、水青树 (*Tetracentron sinense*)、松蒿 (*Phtheirospermum japonicum*)、博落回 (*Macleaya cordata*) 等其他物种的关系较远。

## 2.8 不同时期瘤状茎糖酸含量变化与 *BjuGAPC* 基因表达的关系

分别以膨大到横径为 2 cm、4 cm、6 cm、8 cm (S1、S2、S3 和 S4 时期) 的茎瘤芥瘤茎为材料, 测定不同时期瘤状茎糖酸含量、糖酸比。结果(表 2)表明: 糖酸的含量变化随着瘤状茎的发育有所不同, 在发育前期茎中可溶性糖大量积累, 还原糖(葡萄糖和果糖)含量较低; 在发育后期, 蔗糖和还原糖在茎

中均有积累现象,而糖酸比整体出现先降低后升高的趋势。

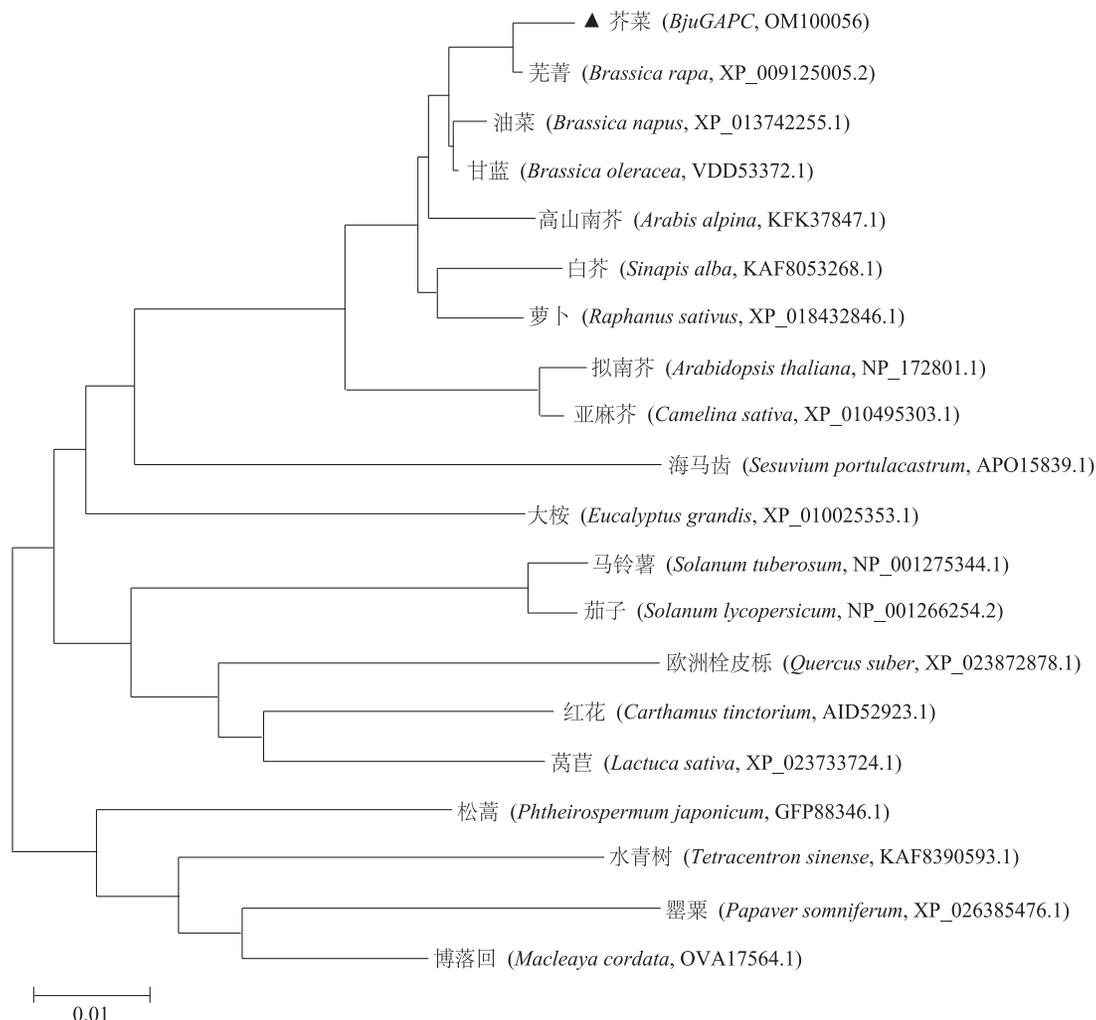


图7 基于20个物种GAPDH蛋白的氨基酸序列构建的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of GAPDH proteins in 20 species

由 *BjuGAPC* 基因的转录组数据(图8A)和 qRT-PCR 分析得出的基因相对表达量(图8B)看出;转录组数据和 qRT-PCR 分析结果呈现一致趋势,*BjuGAPC* 基因在瘤茎膨大过程中不同时期的相对表达量不同,且差异达到显著水平;随着瘤茎的逐步膨大,*BjuGAPC* 基因的相对表达量逐渐减少,在瘤茎横径膨大到 6 cm 时基因的相对表达量降至最低值,之后小幅度上升。

相关性分析结果(表3)显示,可溶性糖含量与糖酸比呈显著正相关关系,可滴定酸含量与糖酸比呈显著负相关关系,基因的相对表达量与可溶性糖含量、可滴定酸含量和糖酸比均呈显著正相关关系。结果表明,*BjuGAPC* 基因对不同时期瘤状茎糖酸含量起到一定的正向调控作用,且在横径为 2 cm、4

cm 时相对表达量较高,横径为 6 cm、8 cm 时相对表达量较低。

由此可见,*BjuGAPC* 基因在瘤茎膨大的不同时期有明显的表达特异性,推测其在茎瘤芥茎生长发育过程中具有特定的表达模式,并在一定程度上影响了糖酸比。*BjuGAPC* 蛋白在该过程中也发挥一定的功能,主要在瘤茎膨大前期起作用。

### 3 讨论与结论

为进一步了解 *GAPDH* 在茎瘤芥茎膨大过程中的作用,本试验基于芥菜的基因组数据库,克隆得到 *BjuGAPC* 基因。预测 *BjuGAPC* 蛋白相对分子质量为  $3.768 \times 10^4$ , 是一个具有碱性、亲水性的稳定蛋白质。*GAPDH* 是高等植物糖酵解反应中的关键酶,能

够维持植物的生命活动,按照生化特性可分为磷酸化 *GAPDH* 和非磷酸化 *GAPDH* 两大类<sup>[22]</sup>。通过分析 *BjuGAPC* 蛋白的磷酸化位点,发现该蛋白质存在

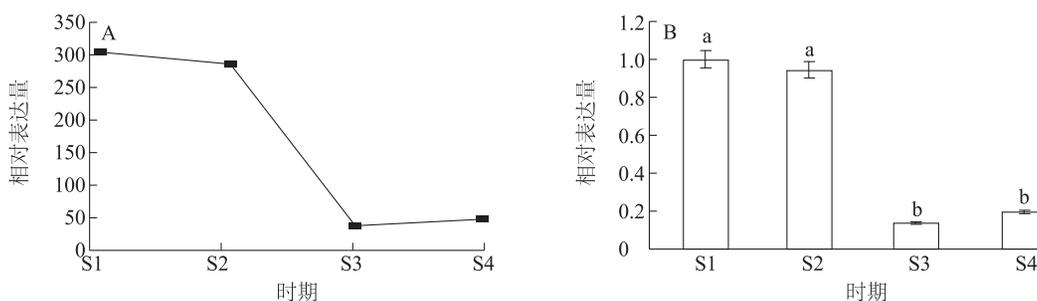
33个潜在的磷酸化位点,推测其可能参与糖酵解途径,对糖酸合成起到一定的调控作用。

表 2 不同采样时期茎瘤芥瘤状茎的糖酸含量

Table 2 Sugar and acid content in tuberculate stem of *Brassica juncea* var. *tumida* in different sampling stages

时期	可溶性糖含量 (mg/g)	可滴定酸含量 (mg/g)	糖酸比	蔗糖含量 (mg/g)	果糖含量 (mg/g)	葡萄糖含量 (mg/g)
S1	20.83±1.13a	25.70±0.33a	0.81	16.61±0.52a	0.78±0.07d	2.42±0.28bc
S2	14.93±1.10c	24.66±0.19b	0.61	6.28±0.09cd	1.74±0.30b	1.06±0.10d
S3	13.60±0.33bc	21.49±0.06c	0.63	6.77±0.04bc	3.10±0.09a	3.50±0.60a
S4	18.82±0.53b	18.81±0.06d	1.00	7.33±0.23d	1.36±0.16c	2.40±0.42bc

S1、S2、S3 和 S4 时期分别指瘤状茎膨大到 2 cm、4 cm、6 cm、8 cm 的时期。同列数据后标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。



S1、S2、S3 和 S4 时期分别指瘤状茎膨大到横径为 2 cm、4 cm、6 cm、8 cm 的时期。不同时期对应的柱上标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 8 *BjuGAPC* 基因不同时期的表达丰度 (A) 与 qRT-PCR 表达分析 (B)

Fig.8 Expression abundance (A) and qRT-PCR expression analysis (B) of *BjuGAPC* gene at different stages

表 3 不同时期茎瘤芥瘤状茎糖酸含量与基因表达量间的相关性

Table 3 Correlation between sugar and acid content in tuberculate stem of *Brassica juncea* var. *tumida* and gene expression in different periods

类别	基因相对表达量	可溶性糖含量	可滴定酸含量	糖酸比
基因相对表达量	1.000			
可溶性糖含量	0.353*	1.000		
可滴定酸含量	0.214*	0.142	1.000	
糖酸比	0.269*	0.753*	-0.538*	1.000

\*表示在 0.05 级别(双尾)相关性显著( $P < 0.05$ )。

蔗糖是植物生长发育过程中各种调控机制的信号,它还影响编码转运蛋白、贮藏蛋白和应激反应的基因的表达<sup>[23-27]</sup>。在瘤状茎发育期间,在发育前期茎中蔗糖大量积累,还原糖含量较低。在发育后期,蔗糖和还原糖在茎中均有积累现象。这说明 *BjuGAPC* 基因在前期相对表达量较多,同时由于叶片中还原糖能较快地转化为蔗糖,所以能迅速输送到茎中用于其他物质的合成,而在发育后期,由于植株机体机能逐渐衰退,

*BjuGAPC* 基因相对表达量降低,瘤状茎中其他物质合成能力减弱,合成的蔗糖减少,还原糖含量相对下降。

根据磷酸化的 *GAPDH* 在细胞中的不同定位可将其分为 *GAPC*、*GAPCp* 和 *GAPA/B* 三类<sup>[28-29]</sup>。试验中发现 *BjuGAPC* 的蛋白质序列中不存在已知的信号肽,并且没有任何跨膜结构或膜结合区域,说明该蛋白质不是分泌蛋白,不经过跨膜转运,而是在细胞质中直接形成,亚细胞定位预测结果也证实了这一点。因此, *BjuGAPC* 蛋白属于 *GAPC*,定位于细胞质中。从系统进化树可以看出,分支点越接近,物种间的亲缘性越相似,说明编码这些蛋白质的基因间的功能也具有一定的相似性,同时说明 *GAPDH* 基因家族蛋白质遗传进化比较保守。 *BjuGAPC* 蛋白之所以能行使生物学功能是因为其特定的空间结构。通过三级结构预测发现, *BjuGAPC* 蛋白能够形成同源四聚体,并且结合 4 个  $NAD^+$  配体。由蛋白质结构域分析结果可知, *BjuGAPC* 的 2 个超家族结构域 *Gp\_dh\_N* 和 *Gp\_dh\_C* 中,前者是辅酶  $NAD^+$  的结合域,后者是行使糖运输和代谢的功能域,

推测 *BjuGAPC* 基因的表达产物在茎瘤芥细胞质中参与糖酵解过程,符合上述所推测的 *BjuGAPC* 的结构和功能特征。

以前的多种研究结果普遍表明,*GAPDH* 基因在同一组织的不同生理状态下或同一生物体的不同组织中均相对稳定且高水平表达,因此可以作为内参基因来进行其他功能基因的表达差异分析。但是,本研究通过 qRT-PCR 技术检测发现,*BjuGAPC* 基因在茎瘤芥茎膨大不同时期有明显的表达特异性,不同时期糖酸比测定结果显示,*BjuGAPC* 基因相对表达量随不同时期变化与糖酸比含量呈现出一致趋势,说明 *BjuGAPC* 基因参与了茎瘤芥的生长发育过程,并且主要在瘤茎膨大前期发挥功能。*GAPDH* 基因可以作为多物种分子生物学的内参基因,但是在本试验的芥菜发育过程中表达差异较大,这可能是由于物种不同导致的特异性差异所决定的。

在对 *BjuGAPC* 蛋白的磷酸化位点分析中,发现了植物抗逆相关特异性蛋白质激酶的结合位点,也可以说明 *GAPDH* 在功能上与植物的生长发育密切相关。一些研究者的转基因试验结果也表明,*GAPDH* 缺失或过表达均会在一定程度上影响植物的代谢和生长发育<sup>[30]</sup>,并且 *GAPDH* 基因的表达水平会随着内外源诱导因子的变化而变化,推测 *BjuGAPC* 蛋白中参与信号转导和激素调控等的 *O*-GlcNAc 糖基化位点和 *N*-糖基化位点与此有关<sup>[31-32]</sup>。糖酸含量分析结果表明,*BjuGAPC* 蛋白参与了糖代谢过程。目前,有关芥菜 *GAPDH* 功能和作用机制的相关报道还很少,本试验对 *BjuGAPC* 基因的克隆可以为分析逆境胁迫条件下 *BjuGAPC* 基因的表达模式、探讨 *BjuGAPC* 在茎瘤芥茎膨大过程中的作用奠定基础,后续还可以进一步构建植物表达载体,通过转基因等途径深入探究 *BjuGAPC* 基因在逆境胁迫和茎瘤芥茎膨大过程中的功能。此外,本研究结合不同时期糖酸比变化趋势,验证了茎瘤芥 *BjuGAPC* 基因确实对糖酸含量起到正向调控作用。

#### 参考文献:

- [1] QI X H, ZHANG M F, YANG J H. Molecular phylogeny of Chinese vegetable mustard (*Brassica juncea*) based on the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54(8): 1709-1716.
- [2] ZHANG L, LI Z, GARRAWAY J, et al. The casein kinase 2  $\beta$  subunit CK2B1 is required for swollen stem formation via cell cycle control in vegetable *Brassica juncea*[J]. Plant, 2020, 104(3): 706-717.
- [3] XU Z, WANG Q, GUO Y, et al. Stem-swelling and photosynthate partitioning in stem mustard are regulated by photoperiod and plant hormones[J]. Environmental and Experimental Botany, 2008, 62(2): 160-167.
- [4] UMERM J, BIN S L, ZHAO S J, et al. Identification of key gene networks controlling organic acid and sugar metabolism during watermelon fruit development by integrating metabolic phenotypes and gene expression profiles[J]. Horticulture Research, 2020, 7(1): 3-7.
- [5] DOIDY J, GRACE E, WIPF D, et al. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi[J]. Trends Plant Sci, 2012, 17(7): 13-22.
- [6] SUZUKI Y J, ISHIYAMA K K, SUGAWARA M K, et al. Overproduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase improves photosynthesis slightly under elevated [CO<sub>2</sub>] conditions in rice[J]. Plant & cell physiology, 2020, 62(1): 156-165.
- [7] MARTIN W, BRINKMANN H, SAVONNA C, et al. Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(18): 8692-8696.
- [8] WU Y H, WU M, HE G W, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for western blots in prokaryotic and eukaryotic cells[J]. Anal Biochem, 2012, 423(1): 15-22.
- [9] PENALOZA E, GUTIERREZ A, MARTINE J, et al. Differential gene expression in proteoid root clusters of white lupin (*Lupinus albus*)[J]. Plant Physiology, 2002, 116(1): 28-36.
- [10] JEONG M J, PARK S C, BYUN M O. Improvement of salt tolerance in transgenic potato plants by glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene transfer[J]. Molecules and Cells, 2001, 12(2): 185-189.
- [11] DAVOUDI M, MORAD-SARDAREH H, PAKNEJAD M, et al. The possible effect of silver nanoparticles on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and formation of amyloid-like aggregates in MCF-7 cell line[J]. IUBMB Life, 2020, 72(10): 2214-2224.
- [12] MUNOZ B J, CASCALES M B, IRLLES S A, et al. The plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is critical for viable pollen development in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2010, 152(5): 1830-1841.
- [13] KOPECKOVA M, PAVKOVA I, STULIK J. Diverse localization and protein binding abilities of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in pathogenic bacteria: the key to its multifunctionality[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 19.
- [14] PIATTONI C V, FERRERO D M L, VEGETTI A, et al. Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated during seed development[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 518-522.
- [15] SEBASTIAN P R, PAULA C, ALBERTO A I, et al. Characterization of *Arabidopsis* lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. Plant Physiol, 2008, 148(3): 1655-1667.
- [16] NAKASHIMA K, SHINWARI Z K, SAKUMA Y, et al. Organization and expression of two *Arabidopsis* *DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and high-salinity-responsive gene ex-

- pression[J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(4): 657-665.
- [17] LI C W, SU R C, CHENG C P, et al. Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP mediated defense pathway[J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(1): 213-227.
- [18] KITOMI Y, ITO H, HOBO T, et al. The auxin responsive AP2/ERF transcription factor CROWN ROOTLESS5 is involved in crown root initiation in rice through the induction of OsRR1, a type-A response regulator of cytokinin signaling[J]. *Plant*, 2011, 67(3): 472-484.
- [19] 李 彤,邵慧慧,韩嘉宁,等. 金鱼草 *AmPIF4* 基因克隆及调控花香物质合成释放功能分析[J]. *西北植物学报*, 2021, 41(12): 1994-2001.
- [20] LI M Y, XIE F J, HE Q, et al. Expression analysis of XTH in stem swelling of stem mustard and selection of reference genes[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(1):113-116.
- [21] KUMAR S, STECHER G, KNYAZ C, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [22] TAKEDA T, FUKUI Y. Possible role of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in growth promotion of *Arabidopsis* seedlings by low levels of selenium[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79(10): 1579-1586.
- [23] YOON J, CHO L H, TUN W, et al. Sucrose signaling in higher plants [J]. *Plant Sci*, 2021, 302: 110703.
- [24] 严志祥,杨海燕,樊苏帆,等. 黑莓果实发育过程中蔗糖磷酸合成酶基因的表达分析[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2022, 46(1): 179-186.
- [25] 李东霞,徐中亮,符海泉,等. 糖对椰枣组织培养物的影响[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(11): 3059-3066.
- [26] 田双燕,张应龙,何天久,等. 马铃薯间作玉米对马铃薯生长、产量及糖类物质的影响[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(5): 1198-1205.
- [27] 姜楠南,张启翔,王 媛,等. 赤霉素对大富贵芍药休眠解除及内源激素和糖类代谢的影响[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2020, 44(3): 26-32.
- [28] BACKHAUSEN J E, VETTER S, BAALMANN E, et al. NAD-dependent malate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes play an important role in dark metabolism of various plastid types[J]. *Planta*, 1998, 205: 359-366.
- [29] AVILAN L, MABERLY C S, MEKHALF M, et al. Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the eustigmatophyte *Pseudocharaciopsis ovalis* is intermediate between a chlorophyte and a diatom [J]. *Eur J Phycol*, 2012, 47(3): 207-215.
- [30] SEBASTIAN P R, PAULA C, ALBERTO A I, et al. Characterization of *Arabidopsis* lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(3): 1655-1667.
- [31] HART G W, HOUSLEY M P, SLAWSON C. Cycling of *O*-linked beta-*N*-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins [J]. *Nature*, 2007, 446(7139): 1017-1022.
- [32] Woodward A W, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction [J]. *Ann Bot*, 2005, 95(5): 707-735.

(责任编辑:张震林)