

刺五加 *GAPDH* 基因的克隆及序列分析

邢朝斌*, 吴 鹏, 陈 龙, 梁能松, 何 闪

河北联合大学生命科学学院, 河北 唐山 063000

摘要:目的 对刺五加 *Eleutherococcus senticosus* *GAPDH* 基因进行克隆及序列分析, 使其成为可用的内参照基因。方法 采用改良的异硫氰酸胍法提取刺五加总 RNA, 运用 RT-PCR 法克隆 *GAPDH* 基因的部分序列, 并以其为内参照基因进行半定量 PCR。结果 克隆了长度为 627 bp 的刺五加 *GAPDH* 基因, 推测其编码 209 个氨基酸, 与三七、人参、拟南芥的 *GAPDH* 氨基酸序列同源性分别为 97%、93%、93%, 核苷酸同源性分别为 94%、86%、84%。其作为内参照基因的半定量 PCR 具有良好的扩增效果和重现性。结论 首次分离并克隆了刺五加 *GAPDH* cDNA, 证实该序列可以作为基因表达分析的内参照基因, 为刺五加苷生物合成中关键酶的表达分析及调控机制研究奠定基础。

关键词: 刺五加; *GAPDH* 基因; 克隆; 序列分析; 内参照基因

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0155-04

Cloning and sequence analyses of *Eleutherococcus senticosus* *GAPDH*

XING Zhao-bin, WU Peng, CHEN Long, LIANG Neng-song, HE Shan

College of Life Science, Hebei United University, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective In order to make the gene a valuable internal control gene, *GAPDH* of *Eleutherococcus senticosus* was cloned and analyzed in sequence. **Methods** Total RNA of *E. senticosus* was extracted using improved isothiocyanate method. Part sequence of *GAPDH* was cloned by RT-PCR, and the sequence was acted as internal control gene for semiquantitative PCR. **Results** Length 627 bp of *E. senticosus* *GAPDH* was cloned, speculating coding 209 amino acids. To compare the amino acid sequence of *E. senticosus* *GAPDH* with those of *Panax notoginseng*, *P. ginseng*, and *Arabidopsis thaliana*, the amino acid homology was 97%, 93%, and 93%, respectively, and the nucleotide homology was 94%, 86%, and 84%, respectively. When the sequence acted as internal control gene, the semiquantitative PCR has benign amplification effect and good reproducibility. **Conclusion** The cDNA clone of *E. senticosus* *GAPDH* is first reported, the results prove that the sequence is able to be internal control gene for analysis on gene expression. This study could make a foundation for the key enzyme expression and regulate mechanism analysis in eleutheroside biosynthesis pathway.

Key words: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms; *GAPDH* gene; cloning; sequence analysis; internal control gene

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*) 是高等植物糖酵解过程中的关键酶, 是维持生命活动能量形成的最基本酶之一, 具有高度的保守性^[1]。*GAPDH* 作为管家基因在不同个体及组织细胞中的表达相对恒定, 因此经常和 β -肌动蛋白 (β -actin)、核糖体 RNA (rRNA) 等管家基因在半定量 RT-PCR、Real-time PCR 等基因表达量的研究中作为内参照基因^[1-2]。

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 是我国医药珍品, 需求量较大^[3], 目前对其研究主要集中在化学成分, 药理作用等方面^[4-7], 国内外关于刺五加 *GAPDH* 基因的研究尚未见报道。本研究采用 RT-PCR 法克隆了刺五加 *GAPDH*

基因的部分序列, 使其成为可用的内参照基因, 并进行序列分析和半定量 PCR 条件的探索, 为 real-time PCR 技术在刺五加研究中的应用提供科学依据。

1 材料

刺五加分别采自吉林省伊通满族自治县、穆棱市、梅河口市、珲春市、黑龙江省鸡西市、辽宁省本溪市和河北省雾灵山国家级自然保护区, 分别编号为 1~7。经河北联合大学生命科学学院邢朝斌副教授鉴定为五加科植物刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms。以清水冲洗杂质, 滤纸吸干水分后的叶片作为刺五加总 RNA 提取的材料。

RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit

收稿日期: 2011-08-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30701086); 河北省自然科学基金资助项目 (C2009001252)

作者简介: 邢朝斌 (1975—), 男, 副教授, 研究方向为分子生药学、药用植物细胞工程。

Tel: (0315)3726238 Fax: (0315)3726341 E-mail: xingzhaobin@yahoo.com.cn

*通讯作者 邢朝斌 Tel: (0315)3726238 E-mail: xingzhaobin@yahoo.com.cn

(Fermentas)、IPTG、X-gal、异硫氰酸胍、LA *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、质粒小量提取试剂盒购自北京拜尔迪生物技术有限公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PGM-T 克隆试剂盒、TOP-10 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取

采用改良的异硫氰酸胍法提取刺五加叶片总 RNA。称取 0.7 g 叶片和 10 mg PVP 置于液氮预冷的研钵中,加入液氮研磨成粉末。将粉末转移至加入 2 mL 异硫氰酸胍提取缓冲液(4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 柠檬酸钠 pH 7.0, 0.5% 十二烷基肌胺酸钠,用前加 β -巯基乙醇至终体积分数 2%)冰上预冷的 10 mL 离心管中,震荡混匀。依次加入 200 μ L 2 mol/L NaAc(pH 4.0)、2 mL 饱和酚、400 μ L 氯仿-异戊醇(24:1),涡旋震荡混匀 3 min,冰浴 15 min, 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min 离心 30 min。将上层水相转移入另一离心管。加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)涡旋震荡混匀,冰浴 5 min, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min,重复 2 次。吸取上层水相加入 1/3 体积的 5 mol/L KAc,混匀,冰浴 15 min, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 15 min,取上清。加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇,缓慢混匀。 -70° C 放置 30 min, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 30 min,弃上清。沉淀用 70%乙醇漂洗 2 次,晾干。加入 20 μ L DEPC 水溶解沉淀, -70° C 保存。

2.2 刺五加 *GAPDH* 基因的克隆

2.2.1 总 RNA 的逆转录 逆转录反应按照 RevertAidTM First strand cDNA synthesis Kit (Fermentas) 说明书进行,反应产物 -20° C 保存。

2.2.2 PCR 扩增 PCR 反应体系 50 μ L,参照文献方法^[8]设计引物,上游引物 5'-GCCACTTGAAGGGTG-G-3',下游引物 5'-CCATTCGTTGTCGTACCA-3'各 1.0 μ L, 10 $\times$ *Taq* 缓冲液(含 15 mmol/L MgCl₂)5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L,模板 cDNA 和 LA *Taq* 酶各 1.5 μ L,补 ddH₂O 至 50 μ L。反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C、5 min;变性 94 $^{\circ}$ C、1 min;退火 54 $^{\circ}$ C、30 s;延伸 72 $^{\circ}$ C、30 s。30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 10 μ L 扩增产物在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳鉴定。

2.2.3 PCR 产物回收、克隆及序列测定 PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳后,紫外光下切下目的条带,按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行回收纯化后,与 PGM-T Vector 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,将

重组质粒转化 TOP-10 感受态细胞。涂布在含 IPTG、X-gal 和 AMP 的 LB 平板上。37 $^{\circ}$ C 培养 14 h,随机挑选 10 个白斑,摇菌培养 10~12 h,用质粒小量提取试剂盒提取质粒,PCR 扩增验证为阳性的质粒送 Takara 公司测序,PCR 条件同“2.2.2”项。

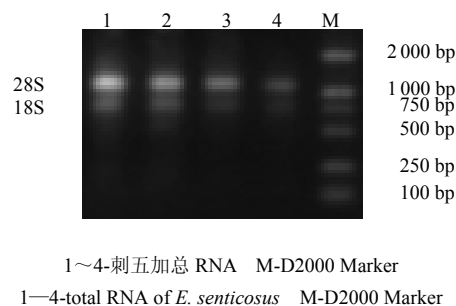
2.2.4 序列分析 将获得的序列通过 DNAMAN 6.0 翻译成氨基酸序列,利用 BLAST 搜索 NCBI 上的核苷酸数据库和氨基酸数据库中近缘物种的 *GAPDH* 序列信息,并进行系统进化分析。

2.2.5 相对定量 PCR 利用 Premier 5.0 软件,在已克隆的刺五加 *GAPDH* 基因、鲨烯合酶基因的保守区段设计扩增长度分别为 372、349 bp 的引物。*GAPDH* 基因上游引物 GS: 5'-GATTGCGCATTGT-TGAGGG-3'、下游引物 GX: 5'-TGCTATCGCCTA-TGAAGTCC-3'。PCR 反应体系 25 μ L: 上、下游引物、模板 cDNA 和 *Taq* 酶各 1.5 μ L, 10 $\times$ *Taq* 缓冲液(含 15 mmol/L MgCl₂) 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,补 ddH₂O 至 25 μ L。反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C、5 min;变性 94 $^{\circ}$ C、1 min;退火 51 $^{\circ}$ C、30 s;延伸 72 $^{\circ}$ C、30 s。35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将 4 μ L PCR 产物加样至 1.2%琼脂糖凝胶样品孔中,在 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液中电泳鉴定 PCR 产物,紫外灯下观察,并照相记录实验结果。用凝胶影像分析软件(Quantity One)测定每个条带的吸光度值,并计算样品条带与内参基因 *GAPDH* 条带的吸光度比值,该值为半定量 RT-PCR 的结果。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 质量分析

采用改良的异硫氰酸胍法提取的刺五加叶片总 RNA 完整性好、无降解。28S 和 18S RNA 条带明亮清晰,28S RNA 条带的亮度约为 18S RNA 条带的 2 倍(图 1),紫外分光光度法测得 RNA 得率为 72~85 μ g/g, A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0,表明总 RNA 的



1~4-刺五加总 RNA M-D2000 Marker

1—4-total RNA of *E. senticosus* M-D2000 Marker

图 1 刺五加总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of *E. senticosus* total RNA

质量较高,可用于后续实验。

3.2 刺五加 *GAPDH* 基因的扩增与克隆

RT-PCR 扩增刺五加各样本的 cDNA 均获得长度约 600 bp 的片段(图 2),与预期片段长度相符。将扩增片段重组入 PGM-T Vector 后,PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测到与刺五加总 RNA 的 RT-PCR 产物大小相等的片段(图 3),说明上述片段已经与载体连接,*GAPDH* 基因的 cDNA 已克隆。

3.3 刺五加 *GAPDH* 基因 cDNA 序列分析

测序结果表明,所获得的 *GAPDH* 基因 cDNA 片段的长度为 627 bp,与预计的结果相符。推测其共编码 209 个氨基酸。利用 Clustal W 进行比对,该片段的核苷酸序列与三七、人参、拟南芥的 *GAPDH* 核苷酸序列同源性分别为 94%、86%、84%,氨基酸序列的同源性分别为 97%、93%、93%(图 4)。说明成功克隆了刺五加 *GAPDH* 基因的部分序列。该序列已登录 Genbank,登录号为 HQ184063。同时在 GenBank 中未查询到刺五加的 *GAPDH* 基因,因此本实验首次分离刺五加 *GAPDH* 基因并报道了其 cDNA 克隆。

3.4 相对定量 PCR 分析

相对定量 PCR 的扩增结果表明,刺五加的 *GAPDH* 基因和鲨烯合酶基因均获得了清晰的片段,无非特异性扩增,引物二聚体少(图 5、6),扩增长度与预期相符,测序结果与目的片段相同。7 个不同产地刺五加 *GAPDH* 基因的吸光度值分别为:6 860.03±356.82、7 676.77±483.05、8 349.46±

535.67、4 646.99±245.54、2 613.44±176.33、8 510.49±528.49、9 459.59±604.47,鲨烯合酶基因的相对表达量分别为:1.26±0.14、1.58±0.18、1.73±0.16、1.40±0.15、3.29±0.42、1.77±0.17、1.94±0.22。*GAPDH* 基因在同一产地各重复间的吸光度值、鲨

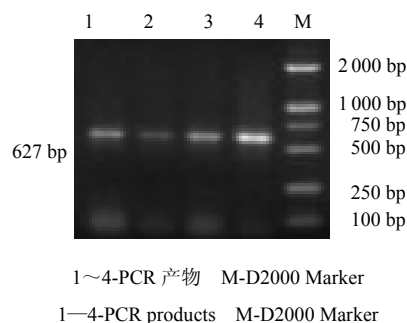


图 2 刺五加 *GAPDH* 基因 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of RT-PCR products of *E. senticosus GAPDH* gene

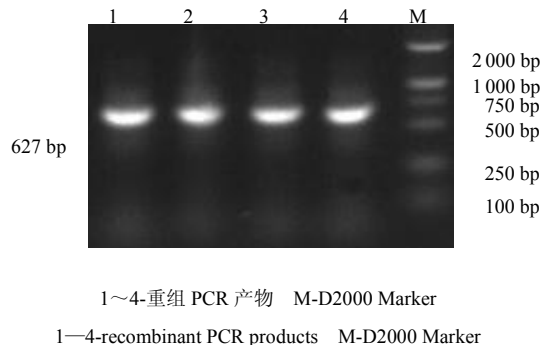
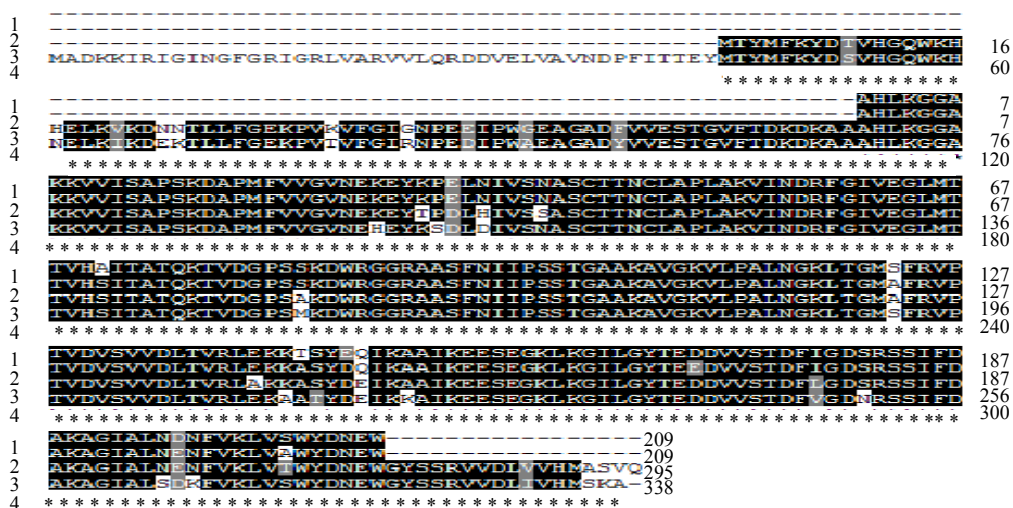


图 3 刺五加 *GAPDH* 基因重组质粒 PCR 电泳图

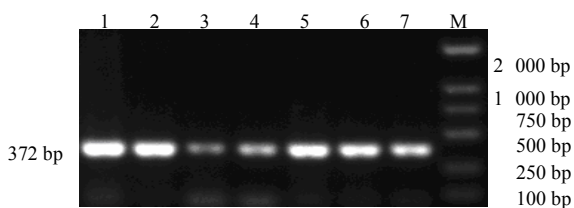
Fig. 3 Electrophoretogram of recombinant plasmid PCR of *E. senticosus GAPDH* gene



1-刺五加 *GAPDH* 2-三七 *GAPDH* 3-人参 *GAPDH* 4-拟南芥 *GAPDH* *代表保守氨基酸
1-*E. senticosus GAPDH* 2-*P. notoginseng GAPDH* 3-*P. ginseng GAPDH* 4-*A. thaliana GAPDH* *stands for conserved amino acids

图 4 刺五加 *GAPDH* 基因 cDNA 序列分析及与三七、人参、拟南芥氨基酸序列比对

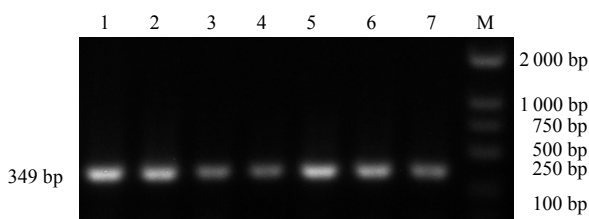
Fig. 4 Amino acid sequence alignment of *GAPDH* gene in *E. senticosus* with those in *P. notoginseng*, *P. ginseng*, and *A. thaliana*



1~7-7个不同产地样本的PCR扩增产物 M-D2000 Marker
1—7-PCR amplification products of seven different producing areas
M-D2000 Marker

图5 刺五加 *GAPDH* 基因相对定量 PCR 电泳结果

Fig. 5 Electrophoretogram of relative quantification PCR in *E. senticosus GAPDH* gene



1~7-7个不同产地样本的PCR扩增产物 M-D2000 Marker
1—7-PCR amplification products of seven different producing areas
M-D2000 Marker

图6 刺五加鲨烯合酶基因相对定量 PCR 电泳结果

Fig. 6 Electrophoretogram of relative quantification PCR in *E. senticosus squalene synthase*

烯合酶基因各重复间的相对表达量均无显著性差异。说明所克隆的刺五加 *GAPDH* 基因表达相对恒定，可作为基因表达定量的内参照基因。

4 讨论

GAPDH 是一种古老的酶，在很多物种中均有分布，主要存在于细胞质、线粒体和叶绿体中^[1]。高等植物中 *GAPDH* 蛋白存在 2 种，一种严格依赖 NAD^+ 存在于胞液中，在糖酵解中起作用，由 4 个相同的亚基组成，每一个亚基均有 GapC 基因（即依赖 NAD^+ 的胞质型 *GAPDH* 基因）编码^[9-10]。另一种存在于叶绿体中，是叶绿体内的标记酶，在 $\text{NAPD}(\text{H})$ 的存在下起作用^[1]。两种形式的 *GAPDH* 氨基酸同源性 < 45%，其编码基因的同源性也很低^[1,11]。本实验克隆的刺五加 *GAPDH* 基因所推测的氨基酸序列与三七、拟南芥的胞质型依赖 NAD^+ 的 *GAPDH* 基因同源性高达 97%、93%，因而初步推断所克隆的刺五加 *GAPDH* 基因为胞质型依赖 NAD^+ 的 *GAPDH* 基因。

GAPDH 基因在生物体的不同组织、细胞中，或同一组织、细胞的不同生理状态下表达量相对稳定，在定量、半定量 PCR 试验中常作为内参照基因。本实验中设计的扩增长度为 372 bp 的一对引物可特异

性地扩增目的基因，且引物二聚体少，可用于基因表达的定量分析。因此，虽然本实验仅获得了刺五加 *GAPDH* 基因的部分序列，但已经能够满足半定量 PCR 试验中引物设计的要求。同时利用上述引物，采用 Real-time PCR 技术对不同产地刺五加鲨烯合酶基因表达的定量分析也获得较好的结果。

本研究获得了刺五加长度为 627 bp 的 *GAPDH* 基因片段，且其定量、半定量 PCR 的引物具有较好的扩增效果和重现性，对刺五加皂苷生物合成中关键酶的表达分析及调控机制研究具有重要的意义。

参考文献

- [1] 位明明, 王俊生, 张改生, 等. *GAPDH* 基因表达与小麦生理型雄性不育花粉败育的关系 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(4): 679-684.
- [2] 朱 华, 李 珅, 赵瑞强, 等. 三七植物 *GAPDH* 基因克隆及序列分析 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1316-1319.
- [3] 邢朝斌, 劳风云, 田春迎, 等. 刺五加叶柄的体细胞胚胎发生研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1302-1305.
- [4] 李志峰, 杨金火, 张武岗, 等. 刺五加的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 852-855.
- [5] 梁启明, 曲绍春, 于晓风, 等. 刺五加叶皂苷 B 对急性心肌梗死大鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 444-447.
- [6] 钟世红, 卫莹芳, 古 锐. HPLC 法测定红毛五加中刺五加苷 E [J]. 中草药, 2009, 40(6): 979-981.
- [7] 涂正伟, 周渭渭, 单 淇, 等. 刺五加的研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [8] 罗志勇, 刘水平, 陈湘晖, 等. 人参植物高质量 RNA 的分离及其皂苷生物合成相关新基因 GBR6 的表达分析 [J]. 生命科学研究, 2004, 8(1): 52-57.
- [9] Martin W, Brinkmann H, Savona 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: 8692-8696.
- [10] Russell D A, Sachs M M. The maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis [J]. *Mol Gen Genet*, 1991, 229(2): 219-228.
- [11] 马凌波, 张凤英. 条斑紫菜细胞质甘油醛-3-磷酸脱氢酶的 cDNA 克隆和序列分析 [J]. 海洋渔业, 2004, 26(4): 300-305.