

铁皮石斛丙酮酸激酶基因的克隆与表达分析

张琳¹, 蔡茜¹, 张大为², 张岗^{1,2*}, 郭顺星^{2*}

1. 陕西中医学院药学院 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 西安 712046

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 克隆珍稀濒危药用植物铁皮石斛丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 基因 (*DoPK*), 并进行生物信息学分析及检测基因在不同器官中的表达情况。方法 采用 RACE 技术获得基因的全长 cDNA; 利用生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域及亚细胞定位等分子特性; 用 DNASTAR 6.0 和 MEGA 4.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 借助实时荧光 (real-time quantitative) PCR (RT-qPCR) 分析基因在不同器官中的表达情况。结果 克隆获得 *DoPK* (GenBank 注册号 KC178572) 的 cDNA 全长 1 895 bp, 编码一条由 511 个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量为 55 040, 等电点 7.00; *DoPK* 基因与江南卷柏、拟南芥、马铃薯和葡萄等植物的 PK 基因有 71%、86%、89% 和 91% 的相似性; *DoPK* 蛋白包含保守的丙酮酸激酶结构域 (21~497) 和活性位点 (235~247); *DoPK* 属于胞质型的 CYTOSOLIC-1 亚类, 与单子叶植物亲缘关系较近; *DoPK* 基因为组成型表达, 其转录本在石斛茎中的相对表达量较高, 为叶中的 2.29 倍, 根中次之, 为叶中的 1.28 倍。结论 克隆了胞质型的铁皮石斛 *DoPK* 基因的全长 cDNA 序列, 为进一步研究其在铁皮石斛生长发育中的作用奠定基础。

关键词: 铁皮石斛; 丙酮酸激酶; 基因克隆; 表达分析; 生物信息学

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)07-0990-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.018

Cloning and expression analysis of pyruvate kinase gene in *Dendrobium officinale*

ZHANG Lin¹, CAI Xi¹, ZHANG Da-wei², ZHANG Gang^{1,2}, GUO Shun-xing²

1. Shaanxi Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Basis & New Drugs Research, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To clone the pyruvate kinase (PK) gene *DoPK* in a rare and endangered medicinal plant *Dendrobium officinale*, followed by bioinformatic analysis and to detect the expression in different organs. **Methods** RT-PCR and RACE technologies were used to clone the full length cDNA of *DoPK* gene. The molecular characteristics such as physiochemical properties, conserved domain, and sub-cellular localization of the deduced *DoPK* protein were determined using a series of bioinformatic tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using DNASTAR 6.0 and MEGA 4.0 softwares, respectively. Real time quantitative PCR (RT-qPCR) was used for gene expression analysis in different organs. **Results** The full length cDNA of *DoPK* was 1 895 bp in length (GenBank accession KC178572) and encoded the protein of 511 amino acids with a molecular weight of 55 040 and an isoelectric point (PI) of 7.00. Sequence analysis demonstrated that *DoPK* was similar to PK genes from *Selaginella moellendorffii*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, and *Vitis vinifera* with the identities of 71%, 86%, 89%, and 91%, respectively. The deduced *DoPK* protein contained the conserved PK domain (21—497) and the active site (235—247). Phylogenetic analysis indicated that *DoPK* was grouped into the CYTOSOLIC-1 subfamily and was closely related to monocots. The transcription level of *DoPK* in the stems of *D. officinale* was the highest (2.29-fold higher than that in the leaves), followed by that in the roots (1.28-fold). **Conclusion** The full length cDNA sequence in a CYTOSOLIC *DoPK* gene is identified, facilitating further functional analysis of the gene involving in the growth and development of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; pyruvate kinase; gene cloning; expression analysis; bioinformatics

收稿日期: 2013-11-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31070300, 31101608); 陕西省科技计划青年科技新星项目 (2012KJXX-44)

作者简介: 张琳, 女, 硕士, 实验师, 主要从事药用植物资源学研究。E-mail: 34368230@qq.com

*通信作者 张岗, 男, 博士, 副教授, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: zhanggang2006@gmail.com

郭顺星, 博士, 研究员, 主要从事药用植物菌根生物学研究。Tel/Fax: (010)62829619 E-mail: sxguo1986@163.com

糖酵解 (glycolysis) 是所有生物细胞糖代谢过程中的首个重要生化途径, 即葡萄糖在细胞质中经一系列酶促反应分解成丙酮酸, 伴有少量 ATP 和 NADH 的合成^[1]。丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 是糖酵解途径最后一步关键限速酶, 催化磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 将高能磷酸键转移给 ADP 生成 ATP 和一分子丙酮酸, 丙酮酸作为重要的前体代谢物参与细胞三羧酸循环 (TCA)、萜类甲基赤藓醇磷酸途径 (MEP) 和部分氨基酸合成等多种生理生化反应过程^[2]。因此, PK 在细胞基础代谢过程中起重要作用。

植物 PK 存在胞质型 (CYTOSOLIC) 和质体型 (PLASTIDIAL) 2 种同工酶: PK_c 和 PK_p, 通常由 PK 基因家族的不同成员编码, 以满足植物生长发育的需要^[2]。大量研究证实 PK 在植物细胞生理代谢和生长发育过程起关键调控作用。转基因烟草叶片缺乏 PK_c 导致植株生长、碳元素和暗呼吸的改变^[3]。利用 RNAi 技术抑制 PK_c 基因的马铃薯植株, 呈现丙酮酸、有机酸量以及异养植物组织交替氧化蛋白水平下降等表型^[4]。拟南芥和油菜 PK 调控光合产物转化为油^[5-6]。最近的研究发现, 水稻 *OsPK1* 基因的 T-DNA 插入失活突变体矮化、有鞘包穗、结实率严重降低^[7], 且表现出 ABA/GA 平衡的变化以及抗氧化压力增加^[8]。可见, PK 通过细胞糖代谢、能量代谢以及激素信号转导等多途径调控植物体的生长发育。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生草本植物, 药用部位为新鲜或干燥茎, 具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳、明目强身等作用, 是石斛属药用植物中最为珍稀名贵的种^[9]。石斛属植物普遍含有倍半萜类、菲酚类、双苯酚类、萜酮类、生物碱以及多糖等主要活性成分。多糖是药用石斛最重要的有效成分之一, 具有抗氧化、抗肿瘤、调节免疫及降低血糖等功效^[10]。解析石斛多糖的生物合成以及分子调控具有重要的理论和实践意义。PK 作为细胞糖代谢的重要元件, 可能对石斛多糖合成代谢调控有一定作用。前期, 本课题组分离得到一条 569 bp 的 EST (未发表资料), 与玉米丙酮酸激酶基因 (GenBank 注册号 NP_001150269) 有很高的相似性 (92%)。本研究首次进行铁皮石斛丙酮酸激酶基因 (*DoPK*) 的分子克隆及生物信息学序列分析, 旨在为深入研究该基因在石斛糖代谢以及生长发育中的生物学作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

材料采自云南西双版纳, 经笔者鉴定为野生铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 全株, 取石斛根、茎、叶组织样品, 液氮速冻后置 -80 °C 保存备用。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, 中国) 操作说明制备各样品总 RNA, NanoDrop™ 2000 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 分析 RNA 质量、纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测完整性。按照 M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Promega, 美国) 操作说明, 逆转录合成 cDNA 第一链, -20 °C 保存备用。

1.3 RACE 与 RT-PCR 验证

根据原 EST 序列, 设计两条基因特异引物, 按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本) 说明书进行 5'/3'-RACE PCR 反应。以 1 μg 铁皮石斛叶总 RNA 为模板, 利用 SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (Clontech, 日本) 进行逆转录合成 5'/3'-RACE ready cDNA。5'-RACE 引物为 DoPK-GSP-R 5'-GCGTTGGGCG-TGGAGACTTGATCATA-3'; 3'-RACE 引物为: DoPK-GSP-F 5'-GAAATCCTACGGGAGACGGAC-GCCTT-3'。DoPK-GSP-F/R 分别与 UPM 引物组合, 按照试剂盒中 Program 1 程序进行 5'/3'-RACE。反应体系为: 2.0 μL 10× Advantage® 2 PCR buffer, 0.4 μL、10 mmol/L dNTPs, 0.4 μL 10 μmol/L DoPK-GSP-F/R/UPM, 0.5 μL 5'-RACE ready cDNA, 0.4 μL, 5 U/μL 50× Advatange® 2 Polymerase Mix, 补 ddH₂O 至 20 μL。PCR 产物经电泳分析, 回收目的条带、克隆并测序, 与原序列拼接分析后, 设计跨开放阅读框 (open reading frame, ORF) 引物 DoPK-ORF-F 5'-TCTTAGGTTTTGGCCGCG-3' 和 DoPK-ORF-R 5'-TCCCGGCGATGCTTATGT-3', 以铁皮石斛叶 cDNA 第一链为模板, *Ex Taq*™ DNA 聚合酶 (Takara, 中国) 进行 RT-PCR。反应体系为: 2.0 μL 10× *Ex Taq*™ PCR 缓冲液, 0.4 μL、10 mmol/L dNTPs, 10 μmol/L DoPK-ORF-F/R 引物各 0.4 μL, 1 μL cDNA, 0.4 μL 5 U/μL *Ex Taq*™ DNA Polymerase, 补 ddH₂O 至 20 μL。PCR 程序为 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保温。PCR 产物

经克隆、测序分析以验证基因 cDNA 全长的可靠性。

1.4 基因克隆和序列分析

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, TianGen 胶回收试剂盒 (TianGen, 中国) 纯化目的条带, 连接至 pMD18-T vector (Takara, 中国), 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 感受态细胞, 随机挑选 3 个克隆送上海生工测序。使用 BLASTX、ORF Finder 进行 cDNA 序列分析; InterProScan 和 PROSITE SCAN 在线分析 DoPK 蛋白质的结构域和基元; ProtParam 和 SOPMA 分析蛋白质理化性质和二级结构; SignalP 4.0 和 TMpred 预测蛋白质信号肽和跨膜区域; PSORT 进行蛋白质亚细胞定位分析。采用 DNASTAR 6.0 进行氨基酸序列比对分析; 借助 MEGA 4.0 构建系统进化树。

1.5 实时定量 PCR 分析

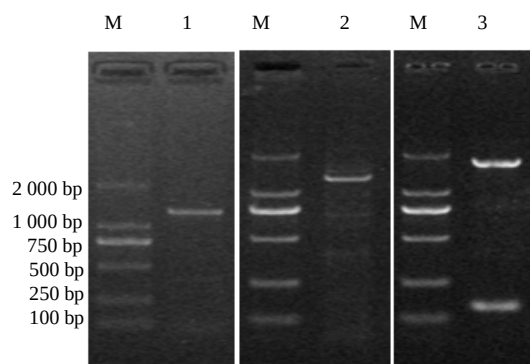
分别用 2 μ g 根、茎、叶样品总 RNA 反转录合成 cDNA, 以铁皮石斛延伸因子 1 α (elongation factor, EF1 α)^[9] 作为内参基因, qPCR 分析 DoPK 基因的组织表达模式。qPCR 引物 DoPK-qPCR-F 5'-GTGGTGGTTCTGTGCTGAC-3' 和 DoPK-qPCR-R 5'-CCTAAGTATGCTGGTGTTCGCT-3' 的扩增产物长 376 bp。将 cDNA 第一链原液稀释 20 倍作为 qPCR 反应的模板。用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行 qPCR。反应体系 25 μ L 包括 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Master Mix (Takara, 中国) 12.5 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, ROX 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 9 μ L。每个反应重复 3 次, 包括不加模板的对照, 实验重复 3 次。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、45 s, 40 个循环, 反应结束绘制溶解曲线。根据 ABI PRISM 7500 SDS 软件 (Applied Biosystems, 美国) 生成的循环阈值 (cycle threshold, CT), 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[11] 计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 DoPK 基因克隆和全长验证

经过 5'/3'-RACE 反应, 扩增产生长度约为 1 200 bp 的目标条带 (图 1), 克隆、测序分别获得 1 035、1 041 bp 的序列, 拼接分析获得了一条 1 895 bp 的 cDNA。BLASTx 分析表明, 其与 GenBank 中已注册的江南卷柏 *Selaginella moellendorffii* Hieron.、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.、马铃薯 *Solanum tuberosum* Linn. 和葡萄 *Vitis vinifera* Linn. 的 PK 基因 (XM_002982399、NM_120944、

P22200、XM_002270364) 分别有 71%、86%、89% 和 91% 的相似性, 因此定名为 DoPK, 提交 GenBank 并获得注册号 KC178572。DoPK 基因的 ORF 长 1 533 bp, 5'-UTR 长 101 bp, 3'-UTR 长 233 bp, 具有真核生物特有的 polyA 尾巴结构, 起始密码子附近碱基序列 GTGATGG 遵循 KOZAK 规则, 即 A/GNNATGG^[12]。使用 DoPK-ORF-F/R 引物, RT-PCR 扩增产生特异目标条带 (图 1), 克隆、测序获得 1 712 bp 的序列包含完整 ORF, 与拼接序列一致, 进而验证成功获得 DoPK 基因的全长 cDNA。



1-5'-RACE 产物 2-3'-RACE 产物 3-全长基因 M-Marker
1-5'-RACE product 2-3'-RACE product 3-Full length gene M-Marker

图 1 DoPK 基因全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Clone of full length cDNA of DoPK in *D. officinale*

2.2 DoPK 基因的编码蛋白理化特性分析

ProtParam 预测 DoPK 基因编码蛋白的分子式为 C₂₄₂₅H₄₀₂₁N₆₅₅O₇₃₅S₂₉, 等电点 7.00、相对分子质量 55 040; DoPK 蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 为 61, 负电残基 (Asp+Glu) 为 61。该蛋白的不稳定系数为 29.52, 脂肪系数为 103.25, 亲水性系数为 0.066。SOPMA 分析表明, DoPK 蛋白的二级结构主要由 α 螺旋 (35.69%)、延伸链 (20.98%)、 β 转角 (8.63%) 和随机卷曲 (34.71%) 组成。

2.3 DoPK 蛋白结构域、定位和跨膜区分析

InterProScan 分析显示, DoPK 基因编码蛋白含有保守的丙酮酸激酶结构域 (21~497) 和活性位点 (235~247)。PROSITE Scan 分析表明, DoPK 蛋白含有数目不等的基元 (motif), 包括 1 个 N-糖基化 (52~55), 1 个 cAMP-cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点 (216~219), 8 个依赖蛋白激酶 C 磷酸化位点 (116~118、127~129、161~163、191~193、307~309、407~409、460~462、476~478), 8 个酪蛋

白激酶 II 磷酸化位点 (189~192、191~194、239~242、311~314、357~360、377~380、436~439、464~467), 7 个 N-端酰基位点 (45~50、106~111、121~126、160~165、202~207、404~409、459~464), 1 个细胞附着序列 (264~266) 和 1 个异戊烯基结合位点 (507~510), 这些保守基元可能对蛋白结构和功能有重要作用。

SignalP 4.0 和 TMpred 分析 DoPK 蛋白不含信号肽或跨膜结构域。PSORT 预测 DoPK 蛋白定位于叶绿体间质的可能性较高为 63.8%, 定位于内质网质和质膜的可能性分别为 85%和 44.0%, 定位于叶绿体类囊体膜和过氧化物酶体的几率分别为 30.6%和 30.0%。

2.4 氨基酸序列比对和进化分析

运用 DNASTar 6.0 中的 MegAlign 程序, 对 DoPK 基因编码蛋白与 4 种植物的 4 个 PK 蛋白进行多序列比对的结果表明 (图 2), DoPK 与葡萄 (*Vitis vinifera* L., Vv, XP_002270400)、番茄 (*Solanum lycopersicum* Mill., Sl, XP_004236881)、百合 (*Lilium longiflorum* Thunb., Ll, AAF44707) 和蓖麻 (*Ricinus communis* Linn., Rc, XP_002513157) PK 蛋白的一致性分别为 90.6%、89.6%、89.2 和 87.7%。

按照 Oliver 等^[4]构建的 PK 蛋白分子进化树, 下

载具有代表性的拟南芥、水稻 *Oryza sativa* Linn.、啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen 和贝酵母 *Saccharomyces bayanus* Sacc. 等物种 PK 氨基酸序列, 使用 MEGA 4.0 软件邻接法 (Neighbour-joining, NJ) 构建系统进化树 (图 3)。结果表明, 26 条 PK 蛋白分为 PLASTIDIAL 和 CYTOSOLIC 两大类群, DoPK 隶属于 CYTOSOLIC-1 亚类, 与水稻 PK (LOC_Os4g58110) 聚在一起, 表明其与单子叶植物亲缘关系较近。

2.5 DoPK 基因在不同器官中的表达分析

分别提取铁皮石斛根、茎、叶等样品总 RNA, 利用 qPCR 技术检测 DoPK 基因在不同器官中的表达。图 4 结果表明, DoPK 基因在 3 种器官中为组成型表达, 在茎中表达量较高, 为叶中的 2.29 倍, 根中次之 (1.28 倍), 叶中表达量最低。

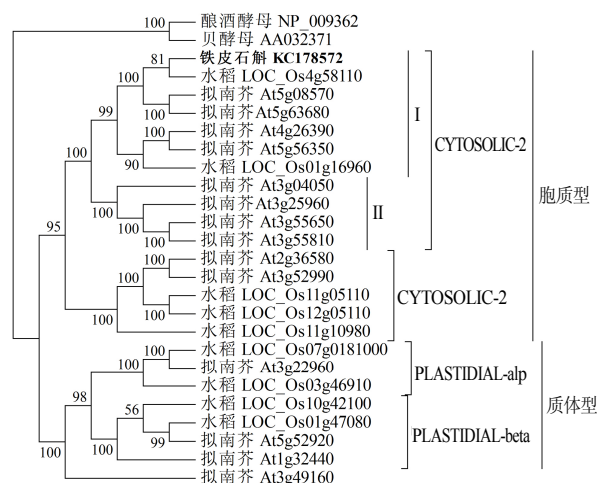
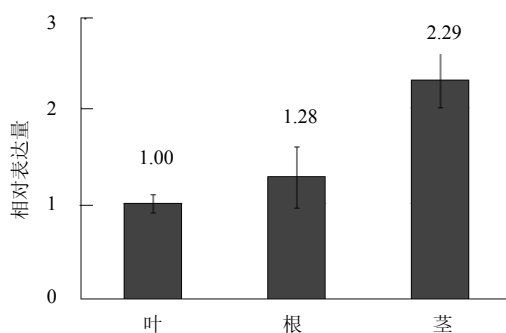
3 讨论

PK 通过糖酵解途径调控植物糖代谢、能量代谢以及生长发育等多种生命活动过程。现已有油菜^[2,13-14]、烟草^[3]、马铃薯^[4]、拟南芥^[6]和水稻^[7-8]等经济或模式植物 PK 基因的相关报道, 药用植物中仅有琵琶 *Eriobotrya japonica* Lindl. PK 基因克隆及表达谱分析的研究^[15]。植物的 PK 为多基因家族, 如拟南芥、烟草、番茄和水稻等植物中现已报道分

L1-AAF44707	MANIDIEGILKELPNDGRVPKTKIVCTLGPSRSVPMLEKLLRAGMNTARFNFSGHTEYHQETLNLRIAMQNTQILCAVMLDT	85
Rc-XP_002513157	MANIDIEGILKELPNDGRVPKTKIVCTLGPSRSVPMLEKLLRAGMNVARFNFSGHTEYHQETLNNLRIAMQNTQILCAVMLDT	85
Sl-XP_004236881	MANIDIEGILKELPNDGRIPKTKIVCTLGPSRSVPMLEKLLRAGMNVARFNFSGHTEYHQETLNNLRIAMQNTQILCAVMLDT	85
Vv-XP_002270400	MANIDIEGILKELPNDGRIPKTKIVCTLGPSRSVPMLEKLLRAGMNVARFNFSGHTEYHQETLNNLRIAMQNTQILCAVMLDT	85
Do-KC178572	MANIDIEGILKELPNDGRIPKTKIVCTLGPSRSVPMLEKLLRAGMNVARFNFSGHTEYHQETLNLRIAMQNTQILCAVMLDT	85
L1-AAF44707	KGPEIRTFGLKDGKPIQLKKGQETITVTDYSIKGDTMISMSYKKLPVDLKPNGNTILCADGTTITLTVLSCDPEAGTVRCRCNTA	170
Rc-XP_002513157	KGPEIRTFGLKDGKPIQLKKGQETITVTDYSIKGDTMISMSYKKLPVDLKPNGNTILCADGTTITLTVLSCDPEAGTVRCRCNTA	170
Sl-XP_004236881	KGPEIRTFGLKDGKPIQLKKGQETITVTDYSIKGDTMISMSYKKLPVDLKPNGNTILCADGTTITLTVLSCDPEAGTVRCRCNTA	170
Vv-XP_002270400	KGPEIRTFGLKDGKPIQLKKGQETITVTDYSIKGDTMISMSYKKLPVDLKPNGNTILCADGTTITLTVLSCDPEAGTVRCRCNTA	170
Do-KC178572	KGPEIRTFGLKDGKPIQLKKGQETITVTDYSIKGDTMISMSYKKLPVDLKPNGNTILCADGTTITLTVLSCDPEAGTVRCRCNTA	170
L1-AAF44707	LLGERKNVNLPGVVVDLPTLTTEKDKEDILEWGVNPNIDMIALSFVRKGSGLVNVRLVLSHAKRIQLMSKVENQEGVINFEDEILR	255
Rc-XP_002513157	MLGERKNVNLPGVVVDLPTLTTEKDKEDILEWGVNPNIDMIALSFVRKGSGLVNVRLVLSHAKRIQLMSKVENQEGVINFEDEILR	253
Sl-XP_004236881	MLGERKNVNLPGVVVDLPTLTTEKDKEDILEWGVNPNIDMIALSFVRKGSGLVNVRLVLSHAKRIQLMSKVENQEGVINFEDEILR	255
Vv-XP_002270400	LLGERKNVNLPGVVVDLPTLTTEKDKEDILEWGVNPNIDMIALSFVRKGSGLVNVRLVLSHAKRIQLMSKVENQEGVINFEDEILR	255
Do-KC178572	ILGERKNVNLPGVVVDLPTLTTEKDKEDILEWGVNPNIDMIALSFVRKGSGLVNVRLVLSHAKRIQLMSKVENQEGVINFEDEILR	255
L1-AAF44707	ETDPMVARGDLGMEIPVEKIFLAQKMMIYKCNLAGKPVVVTATQMLESMIKSPRPRAEATDVANAVLDGTDVCMVLSGESAAAGAY	340
Rc-XP_002513157	ETDPMVARGDLGMEIPVEKIFLAQKMMIYKCNLAGKPVVVTATQMLESMIKSPRPRAEATDVANAVLDGTDVCMVLSGESAAAGAY	338
Sl-XP_004236881	ETDPMVARGDLGMEIPVEKIFLAQKMMIYKCNLAGKPVVVTATQMLESMIKSPRPRAEATDVANAVLDGTDVCMVLSGESAAAGAY	340
Vv-XP_002270400	ETDPMVARGDLGMEIPVEKIFLAQKMMIYKCNLAGKPVVVTATQMLESMIKSPRPRAEATDVANAVLDGTDVCMVLSGESAAAGAY	340
Do-KC178572	ETDPMVARGDLGMEIPVEKIFLAQKMMIYKCNLAGKPVVVTATQMLESMIKSPRPRAEATDVANAVLDGTDVCMVLSGESAAAGAY	340
L1-AAF44707	PELAVKIMRIRICIEAESSLDYDAIFKEMIRSTPLMSPLESASSAVRTANKAKAALIVVLTRGGTTAKLVAKYRPAVPILSVVV	425
Rc-XP_002513157	PELAVKIMRIRICIEAESSLDYDAIFKEMIRSTPLMSPLESASSAVRTANKAKAALIVVLTRGGTTAKLVAKYRPAVPILSVVV	423
Sl-XP_004236881	PELAVKIMRIRICIEAESSLDYDAIFKEMIRSTPLMSPLESASSAVRTANKAKAALIVVLTRGGTTAKLVAKYRPAVPILSVVV	425
Vv-XP_002270400	PELAVKIMRIRICIEAESSLDYDAIFKEMIRSTPLMSPLESASSAVRTANKAKAALIVVLTRGGTTAKLVAKYRPAVPILSVVV	425
Do-KC178572	PELAVKIMRIRICIEAESSLDYDAIFKEMIRSTPLMSPLESASSAVRTANKAKAALIVVLTRGGTTAKLVAKYRPAVPILSVVV	425
L1-AAF44707	PVLTSDSFDWNTCSDETTPARHSLIYRGLIPLLAEGSAKATDAESTEVILEAALKSATERGLCKPGDAVALHRIGASVVIKICIVK	510
Rc-XP_002513157	PVLTSDSFDWNTCSDETTPARHSLIYRGLIPLLAEGSAKATDAESTEVILEAALKSATERGLCKPGDAVALHRIGASVVIKICIVK	508
Sl-XP_004236881	PVLTSDSFDWNTCSDETTPARHSLIYRGLIPLLAEGSAKATDAESTEVILEAALKSATERGLCKPGDAVALHRIGASVVIKICIVK	510
Vv-XP_002270400	PVLTSDSFDWNTCSDETTPARHSLIYRGLIPLLAEGSAKATDAESTEVILEAALKSATERGLCKPGDAVALHRIGASVVIKICIVK	510
Do-KC178572	PVLTSDSFDWNTCSDETTPARHSLIYRGLIPLLAEGSAKATDAESTEVILEAALKSATERGLCKPGDAVALHRIGASVVIKICIVK	510

图2 DoPK 与植物 PK 蛋白的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of DoPK and PK proteins from other plants

图 3 *DoPK* 与不同物种来源 *PK* 基因的进化树分析Fig. 3 Phylogenetic tree of *DoPK* with *PK* genes from other species图 4 qPCR 分析 *DoPK* 在不同器官中的表达Fig. 4 qPCR Analysis expression of *DoPK* in different organs

别含有 14、9、6、9 个成员^[4]。本研究以前期构建的 cDNA 文库中的一条 EST 为基础^[16], 利用 RACE 技术首次从珍稀濒危药用铁皮石斛克隆获得一个 *PK* 编码基因。*DoPK* 与多种植物的 *PK* 基因高度同源, 编码蛋白具有典型的丙酮酸激酶结构域和活性位点, 和已报道的 *PK* 蛋白一致^[2]。进化树构建分析表明 *DoPK* 基因所在分支隶属于胞质型 CYTOSOLIC-1 亚类 (图 4)。这些结果说明 *DoPK* 是编码铁皮石斛丙酮酸激酶的新成员。随着现代高通量测序技术和生物信息学分析在铁皮石斛功能基因组学研究中应用^[17], 将有更多的 *PK* 编码基因被鉴定, 有利于从整体上解析 *PK* 的分子作用。

目前, 利用蛋白免疫组化分析、RNAi 或者过量表达等技术, 已经初步明确了烟草^[3]、马铃薯^[4]、拟南芥^[6]和水稻^[7-8]等植物 *PK* 的生物学功能。对琵琶

EjPK 的基因表达分析发现, 在果实成熟第一阶段转向第二阶段 (授粉后 135 d) 时, 该基因瞬时高强度诱导表达, 与 TA 酸消耗和蔗糖累积有一定相关性; 同时, *EjPK* 基因表达丰度在高糖品种中远高于低糖品种, 表明其在果实成熟过程的重要作用^[15]。本研究 qPCR 分析表明, *DoPK* 为组成型表达, 在 3 种器官中的表达量依次为茎>根>叶。铁皮石斛的药用部位茎富含生物碱和多糖等多种有效成份。*DoPK* 在石斛茎中的高丰度表达特征, 似乎和茎中多糖的量高正相关, 暗示该基因很可能在石斛茎中执行重要的糖代谢调节功能。本研究的后续工作将包括 *DoPK* 的转基因功能分析以及铁皮石斛 *PK* 基因家族其他成员的分子鉴定, 进一步分析 *DoPK* 和其他成员之间是否存在相互作用, 以期对铁皮石斛糖代谢和生长发育的分子调控研究提供物质基础。

参考文献

- [1] Schwender J, Ohlrogge J B. Probing *in vivo* metabolism by stable isotope labeling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(1): 347-361.
- [2] Ambasht P K, Kayastha A M. Plant pyruvate kinase [J]. *Biol Plant*, 2002, 45(1): 1-10.
- [3] Knowles V L, McHugh S G, Hu Z Y, *et al.* Altered growth of transgenic tobacco lacking leaf cytosolic pyruvate kinase [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(1): 45-51.
- [4] Oliver S N, Lunn J E, Urbanczyk-Wochniak E, *et al.* Decreased expression of cytosolic pyruvate kinase in potato tubers leads to a decline in pyruvate resulting in an *in vivo* repression of the alternative oxidase [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(3): 1640-1654.
- [5] Sangwan R S, Gauthier D A, Turpin D H, *et al.* Pyruvate-kinase isoenzymes from zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus*: Developmental profiles and subunit composition [J]. *Planta*, 1992, 187(2): 198-202.
- [6] Andre C, Froehlich J E, Moll M R, *et al.* A heteromeric plastidic pyruvate kinase complex involved in seed oil biosynthesis in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(6): 2006-2022.
- [7] Zhang Y, Xiao W K, Luo L J, *et al.* Downregulation of *OsPK1*, a cytosolic pyruvate kinase, by T-DNA insertion causes dwarfism and panicle enclosure in rice [J]. *Planta*, 2012, 235(1): 25-38.
- [8] Zhang Y, Xiao W K, Luo L J, *et al.* Downregulation of

- OsPK1* contributes to oxidative stress and the variations in ABA/GA balance in rice [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30(4): 1006-1013.
- [9] Zhang G, Song C, Zhao M M, *et al.* Characterization of an A-type cyclin-dependent kinase gene from *Dendrobium candidum* [J]. *Biologia*, 2012, 67: 360-368.
- [10] 沈明花, 李 巍, 金梅花. 小黄蘑多糖对 H₂₂ 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2013, 44(17): 2433-2436.
- [11] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [12] Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucl Acids Res*, 1987, 15(20): 8125-8132.
- [13] 罗 茜, 谢禄山, 谭晓风, 等. 油菜丙酮酸激酶基因全长 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(5): 85-90.
- [14] 付三雄, 张 超, 陈 松, 等. 甘蓝型油菜丙酮酸激酶基因 RNA 干扰载体的构建 [J]. 江苏农业学报, 2013, 29(1): 20-27.
- [15] Qin Q P, Kaas Q T, Zhang L L, *et al.* Isolation and characterization of a cytosolic pyruvate kinase cDNA from Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31(1): 109-119.
- [16] 李 标, 唐 坤, 张 岗, 等. 菌根真菌诱导的铁皮石斛根差减 cDNA 文库构建 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(22): 1790-1796.
- [17] Guo X, Li Y, Li C F, *et al.* Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthesis genes and genetic markers [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 131-138.