

# 牡丹 *PsMDH* 基因的克隆、表达及载体构建

任磊,王雁,周琳,彭镇华

(中国林业科学研究院 林业研究所 国家林业局林木培育重点实验室 北京 100091)

**摘要:**以牡丹品种赵粉为试材,采用 RT-PCR 和 RACE 方法从雄蕊中获得了一个牡丹苹果酸脱氢酶基因 cDNA 全长,命名为 *PsMDH*,GenBank 登录号为 HQ449567。其 cDNA 全长 1 283 bp,包含 80 bp 的 5'非编码区、203 bp 的 3'非编码区和一个长度为 999 bp 编码 332 个氨基酸的开放阅读框。序列比对和系统进化分析表明 *PsMDH* 与毛果杨的亲缘关系最近,相似性达 93.37% 以上。相对荧光定量 PCR 分析表明 *PsMDH* 在心皮中的表达量最高,在雄蕊中表达量最低。成功构建植物表达载体,为牡丹品种改良提供基础。

**关键词:**牡丹;苹果酸脱氢酶基因克隆;表达;载体构建

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)04-0032-06

## Cloning, Expression and Vector Construction of *PsMDH* Gene in Tree Peony

REN Lei, WANG Yan, ZHOU Lin, PENG Zhen-hua

(Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration,  
Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract:** In this work, a full-length cDNA sequence of *MDH* gene was obtained from petals of tree peony (*Paeonia suffruticosa* L. cv. Zhao Fen) using RT-PCR and RACE, named *PsMDH* (GenBank accession No. HQ449567). The full length of *PsMDH* cDNA is 1 283 bp, containing a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 80 bp, a 3'-UTR of 203 bp, and an opening reading frame (ORF) of 999 bp encoding a 332 predicted amino acids. Subsequently, sequence comparison and phylogenetic analysis revealed that *PsMDH* shared more than 93.37% homology with *Populus trichocarpa*. Relative Real-time PCR analysis indicated that *PsMDH* showed the highest transcript abundance in carpels and the lowest levels in stamens. Construction of plant expression vector lay a foundation for variety improvement in tree peony.

**Key words:** Tree peony; Cloning of malate dehydrogenases; Bioinformatics analysis; Expression; Construction of vector

苹果酸是植物代谢的关键产物,其功能多种多样,不仅参与呼吸作用、能量的产生、光合合成(包括 C3 和 C4 植物)、脂肪酸氧化、木质素的生物合成、氮的固定、氨基酸的合成,还在离子平衡的维护、磷和铁的吸收、耐铝能力的提高等方面发挥作用。苹果酸的合成主要是由苹果酸脱氢酶通过可逆地还原草酰乙酸来完成<sup>[1-3]</sup>。苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenases, MDH)广泛分布于生物体内,是生物糖代谢中的关键酶之一。苹果酸脱氢酶可催化草酰乙酸盐氧化形成苹果酸盐,提高植物体苹果酸的含量,提高植物耐酸和耐铝性,对提高植物的抗性具有

重要意义。

到目前为止,研究人员已经从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、苹果(*Malus domestica*)、桃(*Prunus persica*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、香橙(*Citrus junos*)等多种植物中分离克隆了 MDH 同源基因全长 cDNA。但是,关于牡丹的 MDH 基因尚未见报道。

牡丹(*Paeonia suffruticosa* L.)是我国的十大名花之一,也是我国的候选国花,具有较高的观赏价值和丰富的象征意义<sup>[4]</sup>。牡丹较耐碱,在 pH 为 8 的土壤中可以生长,不能更好的满足市场的要求,制约

收稿日期:2011-05-26

基金项目:国家“863”项目(2006AA100109)

作者简介:任磊(1982-),男,山东人,博士研究生,主要从事花卉分子辅助育种研究。

通讯作者:王雁(1969-),女,山东人,研究员,博士,博士生导师,主要从事花卉栽培与育种研究。

了牡丹产业化发展。本研究在此基础上,选取著名的牡丹品种赵粉(*Paeonia suffruticosa* L. cv. Zhao Fen),通过 RT-PCR 和 RACE 技术获得基因全长,为后续转基因工作的开展,特别是为创造抗性更强的牡丹新品种创新提供新的理论依据和基因资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验材料为种植在中国林业科学研究院北京良乡牡丹基地的四年生牡丹品种赵粉,于盛花期<sup>[5]</sup>采收雄蕊,锡箔纸包装后,置于 -80℃ 冰箱保存。

RNA 提取所用药品均购自北京拜尔迪生物公司, M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, *Taq* DNA 聚合酶、DNA 凝胶回收试剂盒、大肠杆菌 TOP10 感受态细胞、质粒 DNA 提取试剂盒和 DNase I 酶等购自天根生化科技(北京)有限公司, SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 为 Clontech 公司产品,克隆载体 pMD-19 T Vector 购自 Takara 公司。T<sub>4</sub> DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sal* I 购自 NEB 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成 采用改良的 CTAB 法<sup>[6]</sup>提取雄蕊的总 RNA。DEPC 水溶解 RNA,用分光光度计测定 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 数值,根据 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值判断 RNA 的质量,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。cDNA 反转录按照 Promega 的 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行。

1.2.2 中间片段的扩增 根据 GenBank 核酸数据库中已经登录的其他物种的 *MDH* 基因序列片段序列设计一对简并引物 P1 (5'-T(C/G)TTAAAGGTGTT-GTTGCTACAAC-3') 和 P2 (5'-T(C/G)(A/G/T)GGAGTTCCAAG(A/C)ACCCAATC-3'),以盛花期牡丹品种赵粉的雄蕊的 cDNA 第一链为模板进行中间片段的扩增。扩增程序:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,35 个循环,72℃ 延伸 7 min。

1.2.3 两端序列 RACE 扩增 根据中间片段序列,设计 3' 和 5' 引物 P3 (5'-CTGCCTGTGACCACAT-ACGTGATTGG-3') 和 P4 (5'-TCGGGATATTGAGTT-GAAGAGTGTTT-3'),按照试剂盒 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行 RACE 扩增。扩增程序:94℃ 变性 30 s,72℃ 延伸 3 min,5 个循环;94℃ 变性 30 s,70℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 3 min,5 个循环;94℃ 变性 30 s,68℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 3 min,25 个循环。

1.2.4 ORF 扩增 应用 DNAMAN 软件对基因的 3'

端和 5' 端序列进行拼接,并在 NCBI 网站上预测其 ORF。根据 ORF 序列设计两对特异引物 P5 (5'-AT-GGCGAAAGATCCAGTTCGCGTCC-3') 和 P6 (5'-GGATTTATGAAAGGCAAGAGTATGCC-3') 进行 ORF 扩增验证。PCR 反应程序:94℃ 变性 5 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环,72℃ 延伸 7 min。

1.2.5 生物信息学分析 在瑞士生物信息学研究所网站(<http://us.expasy.org/>)上运用 Compute pI/Mw 软件对目的基因编码蛋白等电点和分子量进行预测,并运用其 ProtScale 和 ScanProsite 软件对编码蛋白疏水性和作用位点进行预测分析。采用 NCBI 数据库 BLAST 对编码蛋白结构域进行预测。采用 PBIL LYON-GERLAND 信息库对蛋白质序列进行二级结构预测(Secondary structure prediction)。利用 Swiss-Model 对其三维结构进行预测。

1.2.6 基因在四轮花器官中的表达 分别提取赵粉萼片、花瓣、雄蕊和心皮等器官的总 RNA,用 DNase I 酶(RNase free)消化基因组 DNA 后,各取 500 ng 为模板,反转录合成 cDNA 第一链。按照荧光定量 PCR 引物设计原则在 *PsMDH* 的 3' 非翻译区附近设计一对特异引物 P7 (5'-ACGGCAGAG-GAGCTTAGTGA-3') 和 P8 (5'-TAGCCATCTTCGCC-CATAAG-3'),获得的扩增片段为 196 bp。以牡丹  $\beta$ -微管蛋白基因 *beta-Tubulin* (EF608942) 为内参<sup>[7]</sup>,设计其特异引物 Tub-F (5'-TGAGCACCAAAGAAGT-GGACGAAC-3') 和 Tub-R (5'-CACACGCCTGAA-CATCTCCTGAA-3'),获得的扩增片段为 182 bp,进行相对荧光定量分析。

反应在 ABI 7500 实时定量 PCR 仪上进行,方法参照《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪相对定量实验入门指南》和荧光定量试剂盒 SYBR PrimeScript<sup>TM</sup> RT-PCR Kit 说明书。反转录的反应体系为:总 RNA 2  $\mu$ L,5  $\times$  PrimeScript<sup>TM</sup> Buffer 4  $\mu$ L,PrimeScript<sup>TM</sup> RT Enzyme Mix I 1  $\mu$ L,Random primer (100  $\mu$ mol/L) 和 Oligo dT primer (50  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L,加水(RNase free)补足 20  $\mu$ L。荧光定量 PCR 扩增的反应体系为:cDNA 模板 2  $\mu$ L,2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 10  $\mu$ L,特异引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ L,50  $\times$  ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ L,用水补足 20  $\mu$ L。采用两步法标准程序:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 复性 34 s,共 45 个循环。

每个试验设 3 次重复,利用 ABI 7500 PCR 仪 Sequence Detection software 软件进行数据分析。

1.2.7 正义表达载体的构建 根据拼接得到的序

列,设计引物 P9 (5'-AGTCAGATTCATCCATGGCG-3') 和 P10 (5'-CAAAGGAAAGTACCAAATGA-3') 进行扩增,反应条件为 95℃ 预变性 5 min,然后 95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物纯化后连接到 pMD-19 T Vector,利用 pMD-19 T Vector 带有的 *Xba* I 和 *Sal* I 位点进行正向测序筛选,得到的阳性克隆质粒分别命名为质粒 pMD-19*PsMDH*。经限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sal* I 消化后,从胶中回收小片段,与经 *Xba* I 和 *Sal* I 消化的质粒载体 pBI121 回收的大片段经  $T_4$  连接酶连接,重组质粒命名为 pBI121*PsMDH*。

1.2.8 测序 所有 PCR 产物凝胶电泳后回收目的片段,与 pMD-19TVector 连接并转化 TOP10 感受态细胞,重组质粒鉴定后委托北京华大基因公司进行测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 检测及 cDNA 第一链的合成

本试验采用改进的 CTAB 法提取 RNA,其中 28S rRNA 条带的亮度大约为 18S rRNA 的 2 倍,说明总 RNA 良好的完整性。经过 NANODROP8000 的分光检测, $OD_{260}/OD_{280}$  为 2.0,纯度较高,可以用于后续试验。

### 2.2 基因全长的克隆及序列分析

以赵粉雄蕊 RNA 逆转录的 cDNA 为模板,以特异引物 P1 和 P2 为引物,进行中间片段的 PCR 扩增,经测序其核苷酸序列为 597 bp (图 1-1)。根据该保守区片段,设计特异引物 P3 和 P4 分别进行 3' 与 5' 端的扩增,测序结果表明 3' 与 5' 端分别为 454 bp 和 710 bp (图 1-2,3)。序列拼接后,设计 P5 和 P6 进行 ORF 验证,经测序其核苷酸序列大小为 1 003 bp (图 1-4)。

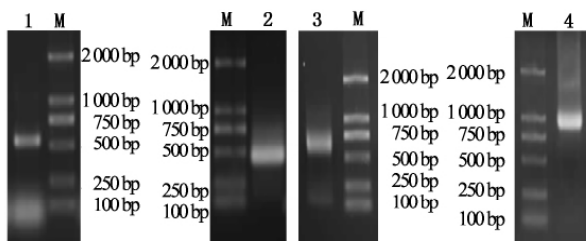


图 1 *PsMDH* 基因 RT-PCR 及 RACE 扩增电泳图

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis analysis of *PsMDH* gene fragments in tree peony

### 2.3 *PsMDH* 基因生物信息学分析

对牡丹 *MDH* 基因的全长 cDNA 序列进行分析表明,该基因全长 1 283 bp,包含一个 999 bp 编码 332 个氨基酸的开放阅读框和一个 poly (A) 结构,3'UTR 和 5'UTR 分别为 80 bp 和 203 bp。GenBank 登录号为 HQ449567,命名为 *PsMDH*。预测该蛋白的分子量是 35.64 kDa,理论等电点为 6.11。*PsMDH* 其编码蛋白的疏水性分析结果表明,疏水性最大值为 2.111,最小值为 -2.867,其大部分区域为亲水区 (图 2-A)。二级结构预测表明,*PsMDH* 蛋白由 122 个  $\alpha$  螺旋,72 个延伸链和 138 个随意卷曲构成,它们分别占到 36.75%,21.69% 和 41.57% (图 2-B)。Swiss-Model 对其蛋白结构进行预测,与 5mdhB 模型相似度最高,达到 60.91% (图 2-C)。*PsMDH* 基因编码的蛋白质具有具有 MDH 家族其特征序列 (图 2-D,3)。

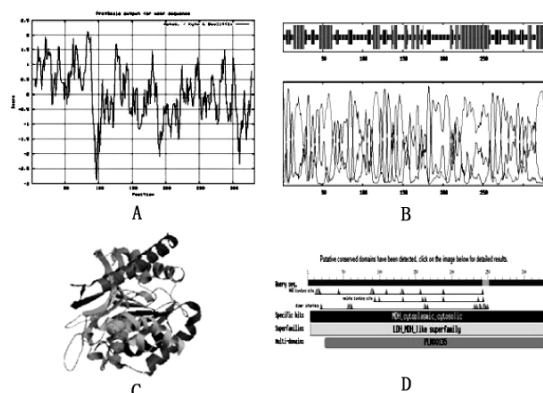


图 2 *PsMDH* 基因生物信息学分析

Fig. 2 Bioinformatics analysis analysis of *PsMDH* gene in tree peony

### 2.4 同源性比较与系统进化分析

牡丹 *PsMDH* 氨基酸序列提交 NCBI 在线比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),选择与其同源性较高的 10 个物种的 MDH 氨基酸,蓖麻 (*Ricinus communis* XP002533463.1)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* ABC01890.1)、毛果杨 (*Populus trichocarpa* XP\_002312583.1)、桃 (*Prunus persica* AAL11502.1)、烟草 (*Nicotiana tabacum* CAC12826.1)、葡萄 (*Vitis vinifera* XP002278712.1)、大豆 (*Glycine max* AAS18241.1)、苹果 (*Malus domestica* ABB36659.1)、大车前 (*Plantago major* CAH58641.1)、白羽扇豆 (*Lupinus albus*

AAO15574.1)。使用 DNAMAN 软件将这些序列进行比对(图 4)发现:不同植物的氨基酸序列同源性

较高,其中牡丹与毛果杨的同源性最高,达到93.37%。

ACATGGGGGGCCCACTCGACTCTTGTAGATTCTTGTGTCGGGGCGCTCTCTCCTTGCTTCCGATTTCAGTTCAGATTCA

TCCATGGCGAAAGATCCAAGTTCGCGTCTCTGTCACAGGAGCTGCAGGACAAATGGTTATGCACTTGTTCCCAATGATT  
H A K D P V R V L V T G A A A G Q I G Y A L V P H I

GGCGGGGGGGTGATGTTGGGTTCTGACAGCGGCTGTAATACTTCACATGCTTGATATAGCGGCTGCTGCAGAGGGCTTG  
A R G G V H L G S D Q F V I L H M L D I F P A A E A L

AATGGGTGA AAAATGGAGTTGGTAGATGCTCTTCTTCTTAAAGGTGTTGTGTACAACTGAIGTCACGGAG  
N G V K M E L V D A A F P L L K G V V A T T D V T E

GCATCGCGCTGCTCAATATCTCTATCATGTTGCTGGTGGTTC CCAAGCAAAAGCAAGGAATGCAAAAGAAACATCTGATG  
A C A G V N I A I M V G G F P R K E G M E R K D V M

TCAAAAATATGTTTCCATCTATAAGTCGCAAGGCTTCTGCACTTGAAAAGCATGCTGCTGCAAACTGCAAGGTTTGGTT  
S K N V S I V K S Q A S A G L E K H A A A N C K V L V

GTTGCTAACCCAGCAACGGAATGCTTGATCCGTAAGGAGTGTTGGCGCTTCTATCCGAGAGAAAACATATCTTG  
V A N P A A N T A A L I L K E F A P S I P E K N I S C

CTGACAAGGCTGGACCAIAATAGGGCATGGGTCAAGGCTCGGAAAAATTAATGTTCAAGTTTGTAIGTTAAGAAI  
L T R L D M K N R A L G Q V S E K L N V Q V C D V K N

GTATCATCAATAGGGGAAAGCACTCTTCAACTCAATATCCGATGTCACCGATGCCACAGTTAAACCCGACGTGGTGAA  
V I L W G N M S I S T Q Y P D V N M A T V K T P A G E

AAGCGCTGTCGAGAGCTTGTTGCTGATGATGAATGGTTGAAGGGTGAGTTCATAGCCACAGTACAACAGCGCGGTGCT  
K P V R C E L V A D D E W L K G E F I A T V Q Q R G

GCTATTATCAAAAGCCGGAATTTCTCGAGTCTCTGCTGCTGCCAGTTTCTGCTGTGACCCACATCGTGAATGGTT  
A I I K A R R K F S S A L S A A S C A C D H I R D N V

CTTGGGACTCCAGAGGGCACCTGGGTTTCCATGGGCGTGTACTCTGATGGCTCATACATGTGCCACGGGACTCATC  
L G T F E G I W V S H G V Y S D G S Y N V F P T G L I

TATTCGTTCCCTGTAATCTGCAAGTAGGTGAATGGTCAATGTTCAAGGATGGGTATGATGAGTACTCGAGGAAG  
Y S F P V T C R N G E W S I V Q G L G I D E Y S R K

AAGCTGGACTTGACGGCAGAGAGCTTAGTGAGGAAAAAGCTCTGCCATACTCTTGCCTTTCATAAATCCTTTTTCGC  
K L D L T A E E L S Z E K A L A Y S C L S -

CAAGCCTAAAATTTGTTATGATCAGGTTTCTGAGATTAGGGTATTGTCTTCAGTGATGAATAAGAACTTGTTTTACCTT

ATAGTGTGTTTCATTGTTGTTACTTTCCTTGTCTTATGGGCGAAGATGGCTAACTTTGTATTTATGGATGACGGTGT

CTTTTTCACAAAAA

下划线部分为 NAD 结合单元;方框区域为 NAD 催化单元。

The NAD-binding regions are underlined; The catalytic motif are framed.

图3 *PsMDH* 基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

**Fig. 3** Nucleotide and deduced amino acid sequences of the complete cDNA of *PsMDH*

|           |      |                                            |                                   |                           |                             |     |              |         |         |     |
|-----------|------|--------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----|--------------|---------|---------|-----|
| 烟草        | MAKP | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| 白羽扇豆      | WARN | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| 蓖麻        | MAKP | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| 大豆        | MAKP | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| 马铃薯       | MAKP | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| 毛果杨       | MAKP | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| 牡丹        | MAKP | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| 苹果        | MAKP | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| 葡萄        | MAKP | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| 桃         | MAKP | PVRV                                       | LVTGAAGQIGYALVPMIARGMIGADQPVLHLDI | FPAAE                     | INGVKMELVDAAFPILKGVVATTVEAC | GYN | IAVMGGGFFRKE | MERKDVM | SKNSIYK | 111 |
| Consensus | mak  | prvrvtlvtgaagqigyalvpmiargmigmigadqpvlhldi | fpaae                             | ingvkmelvdadafpilkgvvattd | ead                         | gyn | iavmgggffrke | merkdvm | sknsiyk | 111 |

|           |        |           |                    |               |                  |            |              |         |            |           |            |         |         |     |
|-----------|--------|-----------|--------------------|---------------|------------------|------------|--------------|---------|------------|-----------|------------|---------|---------|-----|
| 烟草        | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| 白羽扇豆      | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| 蓖麻        | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| 大豆        | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| 马铃薯       | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| 毛果杨       | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| 牡丹        | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| 苹果        | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| 葡萄        | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| 桃         | SQASAL | HPAANCKVL | VWANFANTNALIK      | REAPSTPEKNTSL | CLTR             | LDNRALGQIS | RPNVOVSDVKNM | ITGNHSS | GYPDVNEATV | HPACERVRE | VDADW      | 222     |         |     |
| Consensus | sqa    | aleha     | nccklvwanpantnalil | reapstpekn    | tscltrldnrnralgq | se         | l            | qvq     | dvn        | ia        | vmgggffrke | merkdvm | sknsiyk | 111 |

|           |      |                |          |      |       |      |    |       |     |            |      |           |     |     |     |     |      |    |      |       |     |     |     |   |
|-----------|------|----------------|----------|------|-------|------|----|-------|-----|------------|------|-----------|-----|-----|-----|-----|------|----|------|-------|-----|-----|-----|---|
| 烟草        | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| 白羽扇豆      | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| 蓖麻        | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| 大豆        | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| 马铃薯       | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| 毛果杨       | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| 牡丹        | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| 苹果        | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| 葡萄        | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| 桃         | EFIS | TVQORGA        | AIITKARK | SFSA | SAASA | ACDH | RW | VLGTG | CTG | WSMGVSDGSY | VEAG | LYSFPVTCN | GEW | IVQ | GID | BSR | KKLD | IT | ABEL | SEKAL | AYS | CIT | 332 |   |
| Consensus | fi   | tvqorgaaiikark | s        | f    | s     | a    | l  | e     | a   | s          | a    | a         | s   | a   | c   | d   | h    | r  | w    | l     | e   | g   | t   | g |

图4 PsMDH 与其他植物氨基酸序列的同源性比较

**Fig.4 Homology comparison of PsMDH in tree peony and other plants**

在多重比对的基础上,为更好的了解 *PsMDH* 与其他植物 *MDH* 之间的进化关系,用上述 11 个 *MDH*

的氨基酸序列构建系统进化树,结果表明:*PsMDH* 的进化基本符合 APG 分类系统,呈现出一定的种属特性(图 5)。例如,豆科的大豆(*Glycine max*)和白羽扇豆(*Lupinus albus*)聚为一束,蔷薇科的苹果(*Malus domestica*)和桃(*Prunus persica*)聚为一束。

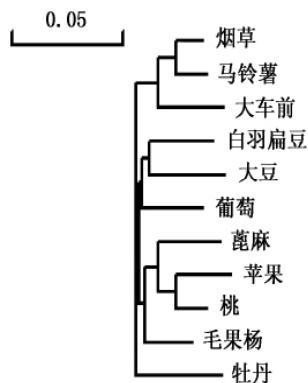


图 5 *PsMDH* 与其他物种氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 5 A phylogenetic tree of the *PsMDH* in tree peony and MDH proteins from other species

## 2.5 相对荧光定量 PCR 分析

以牡丹  $\beta$ -*Tubulin* 基因为内参照,采用荧光定量 PCR 的方法对牡丹四轮花器官中 *PsMDH* 的表达进行了检测,结果表明, *PsMDH* 在心皮中的表达量最高,其次为花瓣,再次为萼片,雄蕊中最低(图 6)。从相对表达量上来看,心皮中的表达水平为雄蕊中的 5.3 倍,花瓣是雄蕊的 3.7 倍,萼片是雄蕊的 1.6 倍。

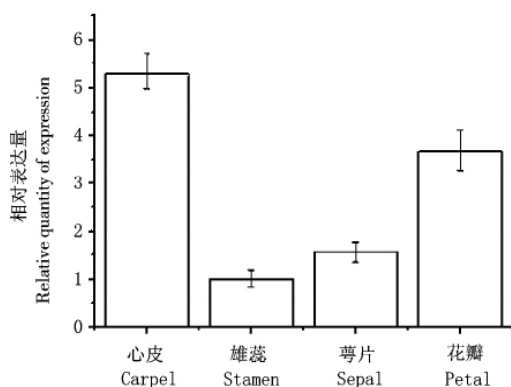
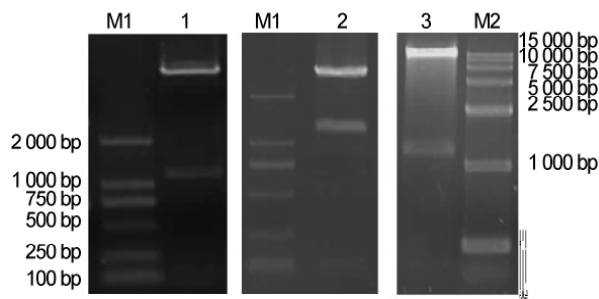


图 6 四轮花器官中 *PsMDH* 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative quantity of *PsMDH* expression in four floral organs

## 2.6 重组载体酶切鉴定

图 7 所示,把图 7(1)切下的 pBI121 大片段与图 7(2) pMD-49*PsMDH* 的小片段相连,构建成新的正义表达载体 pBI121*PsMDH*,酶切鉴定图 7(3)后,经过测序检测后,序列正确。



M1. DNA 标准分子量 DL2000; M2. DNA 标准分子量 DL15000; 1. pBI121 载体的酶切图谱; 2. *PsMDH* 连接 T 载体后的酶切图谱; 3. *PsMDH* 与 pBI121 重组载体的酶切图谱。

M1. DNA marker DL2000; M2. DNA Marker DL15000; 1. Digestion of pBI121 vector; 2. Digestion of the T-vector taking *PsMDH*; 3. Digestion of the pBI121 reconstruct vector taking *PsMDH*.

图 7 pBI121*PsMDH* 表达载体构建

Fig. 7 Construction of sense expression vectors of pBI121*PsMDH*

## 3 讨论

本研究通过同源克隆的方法,运用 RT-PCR 和 RACE 技术,成功克隆获得牡丹的 *PsMDH* 基因。通过生物信息学分析表明,其具有 MDH 家族特有的特征位点<sup>[8,9]</sup>,而且与其他物种的同源性也较高, MDH 基因在进化过程中是比较保守的。

相对荧光定量结果表明, *PsMDH* 基因在四轮花器官中均有表达,说明 *PsMDH* 基因广泛参与各个花器官的代谢活动。其中心皮表达量最高,推测可能与取材的时期有关。因为是盛花期取材,心皮发育的最为旺盛,因此表达量最高。

在苜蓿中超量表达苹果酸脱氢酶基因,能够提高转基因植株中苹果酸脱氢酶活性,增加根系有机酸的分泌量,从而提高转基因植株对环境铝毒的耐受能力<sup>[10]</sup>。罗小英等<sup>[11]</sup>将促根瘤苹果酸脱氢酶基因转入苜蓿,转基因苜蓿较对照表现出明显对铝的耐受性。张觅等<sup>[12]</sup>将香橙的苹果酸脱氢酶转入烟草中,表达量高的转基因株系进行耐铝试验,初步结果表明,在烟草中超量表达 *CjMDH* 可以提高植株对铝毒的耐受能力。

本研究已成功克隆得到牡丹的苹果酸脱氢酶基因 *PsMDH*,成功构建正义植物表达载体,下一步将通过转基因技术,进一步探讨 *PsMDH* 的功能,进一步揭示其作用机理,为创造出更多抗性更强的牡丹新品种奠定基础。

## 参考文献:

- [1] Gietl C. Malate dehydrogenase isoenzymes Cellular locations and role in the flow of metabolites between the cyto-

- plasm and cellorganelles[J]. Biochimicaet Biophysica Acta ,1993 ,1100:217-234.
- [2] Martinoia E , Rentsch D. Malate compartmentation-responses to a complex metabolism[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology ,1994 ,45: 447-467.
- [3] Kochian L V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology ,1995 ,46: 237-260.
- [4] 王莲英. 中国牡丹品种图志 [M]. 北京: 中国林业出版社 ,1997.
- [5] 袁 涛 ,赵孝之 ,李丰刚 ,等. 牡丹 [M]. 北京: 中国林业出版社 2004.
- [6] 孟 丽 ,周 琳 ,张明珠 ,等. 一种有效的花瓣总 RNA 的提取方法 [J]. 生物技术 2006 ,16(1): 38 - 40.
- [7] 周 琳 ,王 雁 ,彭镇华. 牡丹查耳酮合酶基因 *Ps-CHSI* 的克隆及其组织特异性表达 [J]. 园艺学报 , 2010 ,37(8):1295 - 1302.
- [8] 姚玉新. 苹果果实酸度相关基因的筛选、克隆以及表达分析 [D]. 泰安: 山东农业大学 2006.
- [9] 张龙雨 ,李红霞 ,张改生 ,等. 黏类小麦细胞质雄性不育相关基因 *cMDH* 的克隆与表达分析 [J]. 作物学报 , 2009 ,35(9):1620-1627.
- [10] TesfayeM ,Temple S J ,AllanD L *et al.* Over expression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum [J]. Plant Physiology 2001 ,127: 1836-1844.
- [11] 罗小英 ,崔衍波 ,邓 伟 ,等. 超量表达苹果酸脱氢酶基因提高苜蓿对铝毒的耐受性 [J]. 分子植物育种 , 2004 2 (5): 621-626.
- [12] 张 觅 ,罗小英 ,白文钦 ,等. 香橙苹果酸脱氢酶 *CjMDH* 基因表达特性及转基因烟草的耐铝性分析 [J]. 园艺学报 2008 ,35(12):1751-1758.