

黄瓜 *Cs-ppc* 基因的组织表达分析及光强对其在叶片中转录水平的影响

郭芳,谭峥,刘兴旺,刘丽英,任华中

(中国农业大学 农学与生物技术学院蔬菜系,北京 100193)

摘要: 为了解黄瓜中 *ppc* 基因在各组织的转录水平及不同光强对叶片中该家族基因转录水平的影响,本研究对已克隆得到的 *Cs-ppc1*、*Cs-ppc2* 和 *Cs-ppc3* 基因的转录水平进行荧光定量 PCR 分析。*Cs-ppc1* 和 *Cs-ppc3* 在多个组织中的表达量均较高,*Cs-ppc2* 基因的组织表达差异性较大,花中的表达量高而在其他组织中的表达量均很低。对光强的响应中,*Cs-ppc1* 的表达量及生物周期受光强的影响比其他两个 *Cs-ppc* 基因明显。*Cs-ppc2* 基因的组织表达差异性较大,可能在花发育过程中发挥重要作用,而推测 *Cs-ppc1* 在适应不同光强调节的过程中发挥着重要作用。

关键词: 黄瓜; PEPC; *Cs-ppc* 基因; 光强; 表达分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)05-0021-04

Transcriptional Analyzing of *Cs-ppc* Genes and Their Response to Light Intensity in Cucumber Leaves

GUO Fang, TAN Zheng, LIU Xing-wang, LIU Li-ying, REN Hua-zhong

(College of Agronomy & Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To study the transcription level of *ppc* genes in organizations of cucumber and influences of light intensity on them in leaves, we used fluorescence quantitative PCR to detect the transcription level three cucumber *ppc* genes. It showed that the transcription level of *Cs-ppc1* and *Cs-ppc3* in many tissues were all high, while its level of *Cs-ppc2* was very high in flowers and low in other tissues. By contrast, the effect of light intensity on *Cs-ppc1* transcription was more obvious than the other *ppc* genes. *Cs-ppc2*'s high transcription level in flowers suggest its function in floral development, while *Cs-ppc1* may play an important role in the adaption to different light intensity.

Key words: Cucumber; Phosphoenolpyruvate carboxylase; *Cs-ppc* genes; Light intensity; Transcription analysis

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC, EC 4.1.3.1)催化磷酸烯醇式丙酮酸的 β -羧化,产生草酰乙酸(OAA)和无机磷酸。植物中绝大多数 PEPC 是细胞质酶,截止目前,仅在水稻中发现一个定位于叶绿体的 PEPC 酶^[1]。在植物中,PEPC 由一个包含 3~6 个基因的小基因家族(*ppc*)编码。根据基因核苷酸序列的同源性,可将该家族大致分为植物亚型和细菌亚型两大类,而据植物型 PEPC 所发挥的生理作用又可将其分为 C_4 /CAM 型和 C_3 型。在 C_4 /CAM 型植物的光合细胞中 C_4 /CAM 型 PEPC 对 CO_2 气体进行高效固定,是卡尔文循环中的重要步骤^[2]。 C_3 型 PEPC 则在植物

基础代谢中发挥着重要作用:PEPC 可合成 OAA 补充 TCA 循环流失的 C 骨架^[3]从而发挥回补作用^[4],这可以调节植物代谢的 C/N 流^[5]。研究已表明植物中 *ppc* 基因的转录受光、细胞分裂素、N 素、盐胁迫、干旱、外源 ABA 等因素的调节^[6-9]。

黄瓜是喜光性蔬菜,对弱光比较敏感,而光强是影响黄瓜生长和品质的一个重要因素。米国全^[10]利用抑制差减技术筛选黄瓜幼苗弱光胁迫诱导表达基因,PEPC 是在筛选的 64 个 Unique ESTs 中的一个,并表明黄瓜幼苗中 *ppc* 基因的 mRNA 转录水平在弱光处理 4 h 时与强光相比是上升的,推测这可能与光强直接或间接的调控影响有关。本研究分析

收稿日期:2011-08-11

基金项目:“973”项目(2009CB11900);科技支撑项目(2009BADB8B02;2011BAD12B03);中央高校基本科研业务费专项资金项目(15050702);果类蔬菜产业技术体系北京市创新团队项目

作者简介:郭芳(1985-),女,河北人,硕士研究生,主要从事黄瓜生理与分子生物学研究。

通讯作者:任华中(1963-),男,山东人,教授,主要从事黄瓜遗传与栽培生理研究。

了黄瓜 *Cs-ppc* 基因的组织表达及叶片中不同 *ppc* 转录水平对光强的响应, 这为进一步研究 *ppc* 基因在适应光强调节中发挥的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以中国农业大学蔬菜系选育的黄瓜高代自交系 S1 为试材。

1.2 幼苗培育及光强处理

黄瓜种子催芽后, 播于营养钵中, 营养土为蛭石和草炭 (3:1)。

幼苗长至 60 d, 取根、茎、顶部功能叶、雌花、幼果 (3 d)、卷须, 液氮迅速冷冻, -80°C 保存备用。

黄瓜幼苗于光照培养箱中培养, 培养条件: 25°C 、13 h/18 $^{\circ}\text{C}$ 、11 h (昼/夜), $80 \sim 100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 弱光 (LL)。待其长至三叶一心时, 转移部分幼苗至人工气候室中进行 $600 \sim 800 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 强光 (HL) 处理。分别取对照 (光照培养箱 LL) 和处理后 (人工气候室 HL) 第 1、5、天光照 0.5、1.5、3、7、11 h 后的黄瓜幼苗功能叶 (取样时间点分别为 8:30、9:00、11:00、15:00、19:00) 用于测定 *ppc* 的表达量, 每个分析重复 3 次。

1.3 总 RNA 提取

利用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒 (Promega, USA) 提取各取样材料的总 RNA。

1.4 荧光定量 PCR 分析

利用高容量 cDNA 反转录试剂盒 (High Capacity cDNA Archive Kit, ABI, USA) 合成第一条链。cDNA 反转录: 混合 $2 \times \text{RT master mix}$: $2.0 \mu\text{L}$ $10 \times \text{RT buffer}$ $0.8 \mu\text{L}$ $25 \times \text{dNTP Mix}$ (10 mmol/L) $2.0 \mu\text{L}$ $10 \times \text{RT Random Primer}$ $1.0 \mu\text{L}$ MultiscribeTM Reverse

Transcriptase $1.0 \mu\text{L}$ RNase Inhibitor $3.2 \mu\text{L}$ Nuclease-free H_2O , 总体积为 $10 \mu\text{L}$ 。将混合物置于冰上, 轻轻混合。加入 $10 \mu\text{L}$ RNA, 混合离心进行 PCR 程序为: 25°C , 10 min; 37°C , 120 min; 85°C , 5 min; 4°C , ∞ 。

荧光定量分析所用试剂盒为天根, 荧光定量仪器为 ABI 7500。荧光定量引物 *Cs-ppc1S*: TTT GCA ACC TTT ATA AGC TCC; *Cs-ppc1A*: GTG CCA CGT TAG TCA ACC AT, 扩增长度为 231 bp; *Cs-ppc2S*: TCC TGA ATC CGA GTA CCC AA; *Cs-ppc2S*: GAG GGT TGT CCC ATT ATT CG, 扩增长度为 139 bp; *Cs-ppc3S*: TTA TGG TTC TTT ATT ATG TGC TC; *Cs-ppc3A*: TGG TGC CTA TGT GAT CTC TAT, 扩增长度为 230 bp; *a-TubulinS*: ACG CTG TTG GTG GTG GTA C *a-TubulinA*: GAG AGG GGT AAA CAG TGA ATC, 扩增长度为 106 bp^[11]。

2 结果与分析

2.1 *Cs-ppc* 基因在不同组织部位表达量分析

由图 1 分析可知 *Cs-ppc1*、*Cs-ppc2* 和 *Cs-ppc3* 在黄瓜植株不同组织中均有表达, 但不同组织中表达量有一定差异。*Cs-ppc1* 基因在雌花中的表达量最高, 其次为根和茎, 而幼果中表达量最低 (图 1-A)。*Cs-ppc2* 基因在雌花中表达量最高, 而在其他部位的表达量比较低 (图 1-B)。*Cs-ppc3* 在卷须、根、幼果中的表达量均比较高, 茎和叶中的表达量较低 (图 1-C)。基因 *Cs-ppc2* 相对另两个基因表达水平的差异性最为明显: *Cs-ppc1* 和 *Cs-ppc3* 在各组织的表达差异在 3 倍和 1 倍左右, 而 *Cs-ppc2* 组织表达差异高达 40 倍。

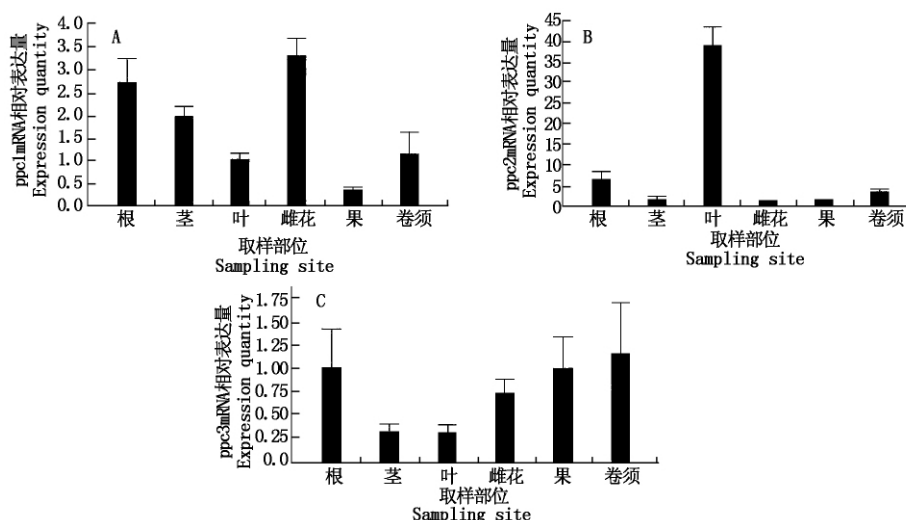


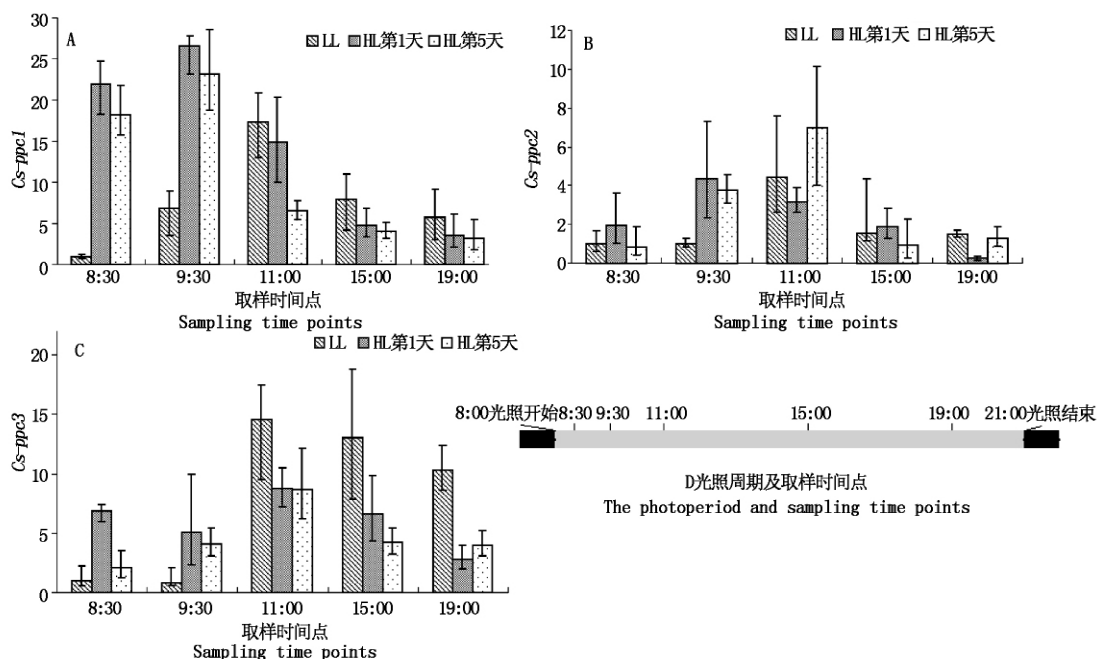
图 1 *Cs-ppc1*、*Cs-ppc2* 和 *Cs-ppc3* 在根、茎、叶、雌花、果和卷须中的相对表达量

Fig. 1 Expression quantity of *Cs-ppc1*, *Cs-ppc2* and *Cs-ppc3* in roots, stems, leaves, female flowers, fruits and tendrils

2.2 光强对 *Cs-ppc* 基因转录水平的影响

对同一光照周期内 5 个时间点黄瓜叶片 3 个 *ppc* 基因表达量的分析,发现 *Cs-ppc* 基因家族的转录水平存在一定的周期性:开始光照时表达量升高,达到最大值后又逐渐下降。不同光强处理对最大值及表达水平上升速度的影响存在差异。以弱光(LL)下 8:30 样品转录水平为参照,LL 处理时 *Cs-ppc1*、*Cs-ppc2* 和 *Cs-ppc3* 表达量最大值均发生在 11:00 左右(图 2-A、B、C),其中 *Cs-ppc1* 的最大值是

参照的 17 倍左右,而强光(HL)处理第 1 天和第 5 天最大值提前到 9:30 左右。*Cs-ppc2* 在 HL 处理第 1 天变化同 *Cs-ppc1*,但 HL 处理第 5 天时原来的周期性已恢复,最大值时间点又为 11:00 左右。*Cs-ppc3* 在 HL 处理下这种周期性变化不大。由此可知在 HL 对生物周期的影响中 *Cs-ppc1* 最为明显,在 HL 光照的 0.5 h 内表达量就上升到了较高的水平,且处理第 5 天时这种表达水平上升及周期变化仍存在。



A、B、C. 分别为基因 *Cs-ppc1*、*Cs-ppc2*、*Cs-ppc3* 在光照条件下 5 个时间点不同光强转录表达的分析; D. 光照周期及取样时间点。

A、B 和 C. The transcription level of *Cs-ppc1*, *Cs-ppc2*, *Cs-ppc3* at 5 time points under different light intensity respectively; D. The photoperiod and sampling time.

图 2 不同光强处理下 *Cs-ppc* 基因相对表达量的比较

Fig. 2 Comparison of *Cs-ppc* gene's relative quantification under different light intensity treatment

相同时间点不同光强的分析发现 3 个基因的转录水平在光照开始 2 h 左右,HL 处理较 LL 时转录水平上升,而 3 h 后转录水平较 LL 时下降。*Cs-ppc1* 和 *Cs-ppc3* 在 11:00 前后的取样比较均为此趋势,*Cs-ppc2* 的趋势稍有不同:HL 处理第 1 天的影响中 *Cs-ppc2* 与 *Cs-ppc1*、*Cs-ppc3* 相似,但处理的第 5 天 *Cs-ppc2* 表达量的最大值时间点发生在 11:00 左右,且比 LL 此时的表达量要高。

不同光强下 3 个 *ppc* 基因转录水平的生物周期和同一时间点表达水平比较发现,*Cs-ppc1* 受光强的调节均最为明显。HL 使在 LL 生长的黄瓜幼苗 *Cs-ppc1* 的表达水平在光照 0.5 h 内急剧上升了近 20 倍,且这种影响能持续多天(第 5 天时上升约 17 倍),同时这种影响也改变了 *Cs-ppc1* 表达的周期性,使其表达量最高的时间点由 LL 条件下的 11:00 提前到了 9:30。另外在 HL 处理 3 h 后的取样中发

现处理后 *Cs-ppc1* 的表达量较 LL 时下降了。这说明光强是调节 *Cs-ppc1* 基因转录水平的一个重要因素。

3 讨论

本实验室通过研究,对基因结构、进化树、氨基酸序列相似性对比及蛋白结构位点的比较分析已得知 *Cs-ppc1* 和 *Cs-ppc2* 编码植物型 PEPC 酶,而 *Cs-ppc3* 编码细菌型 PEPC 酶。为进一步研究 *ppc* 基因在适应光强调节中发挥的作用。类族 A 了解黄瓜 *ppc* 小家族基因在各组织的转录水平及不同光强对叶片中该家族基因转录水平的影响,这为进一步分析基因的功能奠定了基础。

目前在 *C₃* 型模式植物拟南芥中克隆了 4 个 *ppc* 基因,对转录水平分析发现植物型 *Atppc1*、*Atppc2*、*Atppc3* 在各组织中均有表达, *Atppc1* 表达量在根部、

Atppc2 在叶片中、*Atppc3* 要根和角果中较高,而细菌型 *Atppc4* 主要在角果和花部位表达,根部也能检测到^[12]。水稻基因组中发现有 6 个 *ppc* 基因, *Osppc1*、*Osppc2a*、*Osppc2b*、*Osppc3* 和 *Osppc4* 为植物型, *Osppc-b* 为细菌型^[12],其中 *osppc4* 为叶肉细胞主要的 PEPC,是定位于叶绿体的植物型酶。同拟南芥相似,6 个基因虽具有组织表达具有差异性,但在水稻各检测组织中均有表达。在黄瓜中各个 *Cs-ppc* 在黄瓜各组织中的表达比较发现, *Cs-ppc2* 基因的转录在花瓣中最高,其次是根,其他组织中表达量很低。据此推断,无论拟南芥、水稻还是黄瓜,植物型和细菌型 *ppc* 基因虽具有表达水平上的差异,但其在各组织中均表达,故前人^[13] 依表达差异将 C_3 型 *ppc* 基因分为 *housekeeping* 和 *root-specific* 型不甚科学。虽然这些基因编码的酶催化相同的反应,但在不同部位的表达模式的差异表明他们具有不同的生理作用。本研究中 *Cs-ppc2* 在黄瓜各组织的转录水平差异最大,花瓣中的转录水平是其他组织的 40 倍以上,这表明 *Cs-ppc2* 基因在花瓣的生长发育过程中发挥着重要作用。

在 C_4 植物如高粱、玉米有关光照调节 *ppc* 基因转录的研究中发现,光照能够调节 C_4 -*ppc* 基因的转录,如玉米 C_4 型 *ppc* 在光照开始后转录水平上调了 20 倍^[6]。而本研究表明, C_3 植物黄瓜叶片中的 *ppc* 基因的转录也受光照及光照强度的调节,尤其是 *ppc1*,其上调水平与玉米 C_4 型 *ppc* 相似。这说明光照不仅可以调节 C_4 型 *ppc* 基因的转录,也可以调节 C_3 植物的 *ppc* 基因。但马铃薯的研究中,光照对 *ppc* 亚型转录的影响较小^[14],且转录水平在光照条件下的周期性与本研究不一致:光照开始时 *ppc* 基因的转录水平最高,但日转录水平起伏不大。分析可能是由于试验方法的误差,基因探针对 *ppc* 基因的特异性不高,转录水平为两个或更多 *ppc* 基因的综合结果。

本研究表明光照强度可以调节 C_3 植物黄瓜 *ppc* 基因的转录水平,其中对 *Cs-ppc1* 的影响最为明显,在强光处理的 30 ~ 120 min 期间转录水平比弱光下上升超过 20 倍,同时也使光照条件下转录水平最高的时间点改变,从而影响了转录水平的生物周期。Offermann 等^[15] 认为弱光处理玉米的研究中,光照可以抑制 C_4 -*ppc* 基因启动子区域的乙酰化从而调节此基因的转录活性。据此我们推测黄瓜中存在一个可以调节 *Cs-ppc1* 转录活性的光强信号转导途径,将光强信号传递到 *ppc1* 基因的启动子区域或其转录因子从而调节基因转录水平。

参考文献:

- [1] Masumoto C, Miyazawa S I, Ohkawa H, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation [J]. PNAS 2010, 107(11): 5226 - 5231.
- [2] Izui K, Matsumura H, Furumoto T, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A new era of structural biology [J]. Annu Rev Plant Biol 2004, 55: 69 - 84.
- [3] Huppe H C, Turpin D H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. Annu Rev Plant Physiol [J]. Plant Mol Biol 1994, 45: 577 - 607.
- [4] Oliver E, Satish C, Richard W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function [J]. J Biol Chem 2002, 277(34): 30409 - 30412.
- [5] Scheible W R, Krapp A, Stitt M. Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves [J]. Plant Cell and Environ 2000, 23: 1155 - 1167.
- [6] Kurotani K, Hata S, Izui K. Light-regulated expression of the gene for C_4 -form phosphoenolpyruvate carboxylase in maize: destabilization of mRNA by okadaic acid [J]. Plant Cell Physiol 1999, 40(4): 423 - 430.
- [7] Suzuki I, Crutin C, Omata T, et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of nitrogen-responding expression of phosphoenolpyruvate carboxylase gene in maize [J]. Plant Physiol 1994, 105: 1223 - 29.
- [8] McElwain E F, Bohnert H J, Thomas J C. Light moderates the induction of phosphoenolpyruvate carboxylase by NaCl and abscisic acid in *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. Plant Physiol 1992, 99: 1261 - 64.
- [9] Sa' R, Flores A, Cejudo F J. Arabidopsis phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress [J]. Planta 2006, 223: 901 - 909.
- [10] 米国全. 黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 幼苗弱光耐受性的相关生理及分子机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2008.
- [11] Wan H J, Zhao Z G, Qian C T, et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber [J]. Analyt Biochem 2010, 399: 257 - 261.
- [12] Sa'nchez R, Cejudo F J. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from Arabidopsis and rice [J]. Plant Physiol 2003, 132: 949 - 957.
- [13] Chollet R, Vidal J H, O'Leary M. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 273 - 298.
- [14] Li X R, Wang L, Ruan Y L. Developmental and molecular physiological evidence for the role of Phosphoenolpyruvate carboxylase in rapid cotton fibre elongation [J]. J Experim Botany 2010, 6(1): 287 - 295.
- [15] Offermann S, Danker T, Dreymüller D, et al. Illumination is necessary and sufficient to induce histone acetylation independent of transcriptional activity at the C_4 -specific phosphoenolpyruvate carboxylase promoter in maize [J]. Plant Physiol 2006, 141: 1078 - 1088.