

黄瓜棉子糖合成酶基因克隆, 功能验证及其低温响应研究

睦晓蕾^{1,*}, 孟凡珍^{1,*}, 王虹云^{1,*}, 韦玉霞¹, 李瑞富¹, 王振雨¹, 胡丽萍¹,
王绍辉², 任华中¹, 张振贤^{1,**}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; ² 北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206)

棉子糖家族寡糖 (raffinose family oligosaccharides, RFOs) 是黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 韧皮部同化物质运输的主要形式, 且在抵御低温、干旱等非生物逆境胁迫中也具有重要作用。棉子糖合成酶 (Raffinose synthase, RS, EC2.4.1.82) 是调控蔗糖进入 RFOs 生物合成途径的关键酶。对黄瓜 RS 编码基因 (*CsRS*) 克隆, 时空表达, 功能验证和亚细胞定位, 以及 *CsRS* 对低温与外源脱落酸 (ABA) 的响应进行研究, 有助于揭示黄瓜棉子糖合成代谢的分子机理, 并为黄瓜糖代谢的调控及其产量和品质形成提供一定理论依据。

根据 GenBank 上 RS 基因序列, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 于黄瓜 ‘国农 25 号’ 中克隆 *CsRS* 基因全长序列, 并利用 Northern blot 和 RT-PCR 技术分析其时空表达; 通过构建 *CsRS* 过量表达、反义表达载体, 农杆菌侵染介导分别遗传转化烟草、黄瓜植株, 对其进行功能鉴定; 采用绿色荧光蛋白 (GFP) 标记技术, 对黄瓜 RS 进行亚细胞定位; 采用 RT-PCR 等方法研究低温胁迫、外源 ABA 对 *CsRS* 时空表达的调控作用, 同时利用高效液相色谱 (HPLC) 测定棉子糖、水苏糖等含量变化, 生化方法测定 RS 酶活性变化。

研究表明, 黄瓜棉子糖合成酶基因 *CsRS* (GenBank 登录号: DQ414725) 全长 2 552 bp, 开放读码框 2 355 bp, 编码 784 个氨基酸, 预测分子量 78.96 kD。 *CsRS* 在植株根、茎、叶、果实等器官中均有表达, 以叶器官中表达量最大; *CsRS:GFP* 在洋葱表皮细胞中的瞬时表达结果显示, RS 定位于细胞质、细胞膜及细胞核中。 *CsRS* 在烟草叶片中异源过量表达和在黄瓜叶片中同源反义表达后, 导致烟草中的 RS 酶活性和棉子糖含量上升, 而黄瓜中的 RS 酶活性和棉子糖含量下降, 证实了 *CsRS* 的功能。 *CsRS* 表达受外界低温及 ABA 的诱导。 12 °C/6 °C (昼/夜) 低温处理黄瓜植株后, *CsRS* 在叶片、果实、根和茎中迅速表达, *CsRS* mRNA 响应低温的速度为叶片 > 果实 > 根 > 茎, 同时 RS 酶活性及可溶性糖含量 (包括水苏糖、棉子糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、半乳糖), 特别是棉子糖、水苏糖含量也随之呈逐渐增加趋势。不同浓度外源 ABA 温育黄瓜叶圆片及果实圆片后, 对 *CsRS* 表达、RS 酶活性及可溶性糖含量的诱导作用类似于低温胁迫, ABA 诱导叶片和果实中 *CsRS* 最大表达量的浓度分别为 200 和 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 黄瓜; 棉子糖合成酶; 基因表达; 棉子糖; 低温; 脱落酸 (ABA)

中图分类号: S 642.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) S-2591-01

收稿日期: 2011-08-17

基金项目: 转基因专项 (2009ZX08009-064B, 2008ZX08009-003); 现代农业产业技术体系项目 (CARS-25-C-12)

* 有同等贡献作者

** 通信作者 (E-mail: suixiaolei@cau.edu.cn, zhangzx@cau.edu.cn; Tel: 010-62734371/1952/4373)