

冯立娟,焦其庆,尹燕雷,等. 石榴果皮 *DHQ/SDH* 基因的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):26-29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.008

石榴果皮 *DHQ/SDH* 基因的克隆及序列分析

冯立娟¹, 焦其庆¹, 尹燕雷¹, 李甲梁²

(1. 山东省果树研究所, 山东泰安 271000; 2. 枣庄市农业科学研究院, 山东枣庄 277300)

摘要:以泰山红石榴果实为试验材料,利用逆转录 PCR(RT-PCR)技术扩增出 980 bp 大小的中间片段,用 3'cDNA 末端快速扩增 PCR(RACE PCR)获得 *DHQ/SDH* 基因的 3'端,拼接后获得 1 585 bp 的 cDNA 片段。结果表明,该基因含有 1 265 bp 编码序列(CDS),编码 421 个氨基酸,其氨基酸序列与苹果(注册号:XP_008370537.1)、葡萄(注册号:XP_002270232.1)、白梨(注册号:XP_009335660.1)的同源性分别为 82%、84%、82%;蛋白质理论分子质量为 133 682.2 u,等电点为 5.01,含量最丰富的氨基酸是丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr),具有 DHQase I、SDH(AroE)2 个保守结构域,为亲水性蛋白;二级结构主要由无规则卷曲(31.12%)、 α -螺旋(30.17%)、伸展链(24.94%)和 β -转角(13.78%)组成;GenBank 登录号为 KU133479。

关键词:石榴;*DHQ/SDH* 基因;克隆;序列分析

中图分类号: S665.401;Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0026-04

石榴(*Punica granatum* L.)是一种重要的功能性水果,富含类黄酮、酚酸和鞣花单宁等可溶性酚类物质,市场发展前景广阔^[1]。没食子酸是石榴果实中重要的酚类物质,具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、抗炎抗菌^[4-5]等诸多功效,生物学效应广泛^[6]。莽草酸途径在植物次生代谢途径中起到中心作用,可为其他次生代谢途径提供底物。研究表明,没食子酸主要通过莽草酸途径生成的 3-脱氢莽草酸代谢生成^[7-8]。

脱氢奎尼酸脱氢酶(3-dehydroquinate dehydratase,简称 DHQ)、莽草酸脱氢酶(shikimate dehydrogenase,简称 SDH)分别催化莽草酸途径中的第 3、第 4 步反应,在大多数微生物中,DHQ、SDH 是单功能的,但是在植物中,DHQ、SDH 可以融合,形成具有 2 种功能的酶^[9]。3-脱氢奎尼酸脱氢酶(EC4.2.1.10)/莽草酸脱氢酶(EC1.1.1.25)双功能酶(bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydro-

genase,简称 DHQ/SDH)能催化 3-脱氢奎尼酸脱水生成 3-脱氢莽草酸,也能催化 3-脱氢莽草酸、莽草酸之间的可逆还原反应,是没食子酸代谢途径中的关键调控酶^[10]。编码 SDH 结构基因 *aroE* 的克隆、表达分析和功能鉴定在结核杆菌^[11-12]、谷氨酸棒杆菌^[13]中已有报道。*DHQ/SDH* 基因 cDNA 的片段或全长序列已在豌豆^[14]、烟草^[15]、番茄^[16]等植物中被克隆出来,通过全基因组测序推测苹果、葡萄、白梨、桃等果树 *DHQ/SDH* 基因的片段或全长已在 GenBank 上注册,但是关于石榴中 *DHQ/SDH* 基因的克隆及序列分析等方面的研究在国内外尚未见报道。因此,本研究以山东省主栽石榴品种泰山红为试验材料,利用逆转录 PCR(RT-PCR)技术克隆 *DHQ/SDH* 基因,对其进行生物信息学分析,从而为揭示石榴果实中没食子酸代谢的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2015 年 6—9 月在山东省果树研究所进行。以泰山红石榴果实为试验材料,将其定植于山东省果树研究所石榴种质资源圃。于幼果期(果实直径 2~3 cm)采集石榴果实,洗净擦干后,用削皮刀取果皮,在液氮中速冻后放入 -80 ℃ 冰箱保存备用。

收稿日期:2015-11-17

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2014YL022、ZR2015YL056);山东省果树研究所所长基金(编号:2013KY04)。

作者简介:冯立娟(1982—),女,山东聊城人,博士,助理研究员,主要从事果树遗传资源与育种研究。E-mail:flj_19820227@163.com。
通信作者:尹燕雷,硕士,副研究员,主要从事果树遗传资源与育种研究。E-mail:yylei66@sina.com。

[7]唐耀平,刘 鹰,方显明. 山绿茶治疗老年单纯收缩期高血压 80 例分析[J]. 中医药学刊,2004,22(8):1502-1503.

[8]解军波,李 萍. 冬青属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2002,33(1):85-88.

[9]程齐来,李洪亮,彭金年. 山绿茶化学成分的研究[J]. 光谱实验室,2010,27(1):131-134.

[10]张 蕊,王秀花,章建红,等. 3 种冬青属种子休眠过程中的生理变化[J]. 浙江林学院学报,2010,27(4):524-528.

[11]徐本美,史晓华,孙涛涛,等. 大果冬青种子的休眠与萌发初探[J]. 种子,2002(3):1-2,5.

[12]何彦峰. 狭叶冬青种子休眠与萌发的研究[J]. 浙江林业科技,

2008,28(3):63-65.

[13]朱丽芳,史 俊,朱再标,等. 老鸦瓣芽茎组织培养初步研究[J]. 中草药,2014,45(4):563-568.

[14]王慧瑜,张晓申,赵海红,等. 大叶冬青组培快繁技术研究[J]. 农业科技通讯,2012(10):69-70.

[15]杨 灿,陈丽洁,黄小辉,等. 红果冬青组培快繁技术研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2014,34(4):356-359.

[16]李林轩,吴庆华,蔡锦源,等. 五指毛桃组织培养获得再生植株的研究[J]. 中草药,2014,45(17):2547-2551.

[17]叶祖云,阮少江,杨卓飞. 四倍体太子参种苗繁育技术体系的建立[J]. 中药材,2011,34(3):340-342.

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第 1 链的合成 采用 RNA Prep Pure Plant Kit[DP441, 天根生化科技(北京)有限公司]提取石榴果皮的总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 用 NanoDrop 紫外分光光度计测量吸光度, 计算 RNA 纯度, 即 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值。

以 RNA 溶液为模板, Oligo(dT)₁₈ 为引物, 根据 cDNA 第 1 链合成试剂盒说明书反转录成 cDNA 第 1 链(K1622, Thermo Scientific)。

1.2.2 基因中间片段的克隆 根据已知物种同源序列的保守片段设计兼并引物, 进行 PCR 扩增。预计扩增片段大小为 1 000 bp, 上游引物 DHQ/SDH 1; 5' - GCVATGGAGYTVG-GRGCTGATT - 3'; 下游引物 DHQ/SDH 2; 5' - GTTGTRTTB-GCRAGDAYCATVCC - 3'。50 μL PCR 反应体系: 25 μL 2 \times Ex Taq buffer, 1 μL dNTP (10 mmol/L), 各 1.5 μL 上、下游引物, 5 μL cDNA, 1.0 μL Ex Taq 酶, 15 μL 灭菌蒸馏水。反应步骤: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的片段克隆至 pMD18 - T 载体后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 获得中间片段序列。

1.2.3 3' cDNA 末端快速扩增 PCR (RACE PCR) 获得基因的 3' 端序列 根据获得的中间片段序列设计 2 对特异引物, 使用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (634923, Clontech) 试剂盒获得该基因的 3' 端序列。

基因特异引物: 3' DHQ/SDH1, 5' - TGGTAAACTGTTT-GTCGTCATGGGTGC - 3'; 3' DHQ/SDH2, 5' - GCCAATCGCA-CATATGACAAAGCCAAA - 3'。下游引物为通用引物 (UPM): 5' - CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT-GGTATCAACGCAGACT - 3'。首先用引物 3' DHQ/SDH1、UPM 进行第 1 轮扩增, 以得到的 PCR 产物为模板, 再用引物 3' DHQ/SDH2、UPM 进行第 2 轮 PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系: 25 μL 2 \times Ex Taq buffer, 1 μL dNTP (10 mmol/L), 各 1.5 μL 上、下游引物, 5 μL cDNA, 1.0 μL Ex Taq 酶, 15 μL 灭菌蒸馏水。反应步骤: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的片段克隆至 pMD18 - T 载体上, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 获得基因的 3' 端序列。

1.2.4 DHQ/SDH 基因的生物信息学分析 分别利用 NCBI 的 BLASTn、BLASTp 进行核苷酸、氨基酸序列相似性分析, 利用 DNAMAN 软件进行多序列比对, DHQ/SDH 基因编码蛋白的理化性质采用 ProtParam 预测, 疏水性/亲水性采用 ProtScale 进行预测, 利用 ExPASy 工具中的 SOPMA 软件编码蛋白的二级结构。

2 结果与分析

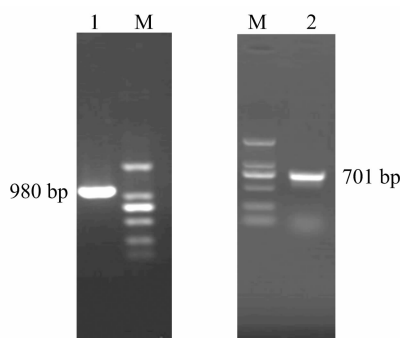
2.1 石榴果皮 DHQ/SDH 基因保守片段的克隆

用天根生化科技(北京)有限公司的 RNA Prep Pure Plant Kit 提取石榴果皮 RNA, 以反转录 cDNA 为模板, 利用设计的兼并引物 DHQ/SDH - 1、DHQ/SDH - 2 进行 PCR 扩增, 获得 980 bp 大小的 DHQ/SDH 基因的中间片段(图 1)。Blast 比对分析表明, 该片段与苹果 (*Malus domestica*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、白梨 (*Pyrus bretschneideri*)、梅花 (*Prunus mume*) 等植物的 DHQ/SDH 基因有较高的同源性, 确认为石榴 DHQ/SDH 基因保守序列。

era)、白梨 (*Pyrus bretschneideri*)、梅花 (*Prunus mume*) 等植物的 DHQ/SDH 基因有较高的同源性, 确认为石榴 DHQ/SDH 基因保守序列。

2.2 石榴果皮 DHQ/SDH 基因 3' 端序列的克隆

根据获得的保守序列设计 2 对特异引物, 3' RACE 扩增得到 701 bp 的片段(图 1)。根据测序结果将保守序列、3' 端片段拼接后得到 1 585 bp 的 cDNA 片段, 该基因含有 1 265 bp 的编码序列 (CDS), 编码 421 个氨基酸(图 2), 编码的蛋白具有 DHQase I、SDH (AroE) 2 个保守结构域(图 3)。BLAST 分析表明, 该基因片段的核苷酸序列与苹果、葡萄、白梨、桃 (*Prunus persica*) 和欧洲大叶杨 (*Populus trichocarpa*) 等植物的相似性达到了 80% 以上。



1—DHQ/SDH保守片段PCR扩增结果; 2—DHQ/SDH 3'RACE PCR扩增结果; M—DNA标准分子质量DL2000
图1 石榴 DHQ/SDH 基因扩增电泳结果

经比对, 该基因编码的氨基酸序列与苹果(注册号: XP_008370537.1)、葡萄(注册号: XP_002270232.1)、白梨(注册号: XP_009335660.1)、碧桃(注册号: XP_007207367.1)、梅花(注册号: XP_008246555.1)、胡杨 (*Populus euphratica*, 注册号: XP_011024056.1)、麻疯树 (*Jatropha curcas*, 注册号: XP_012089148.1)、可可 (*Theobroma cacao*, 注册号: XP_007030110.1) 和巨桉 (*Eucalyptus grandis*, 注册号: XP_010025117.1) 等物种的同源性在 80% 以上(图 4), 表明克隆到的片段为石榴果皮 DHQ/SDH 基因, GenBank 登录号为 KU133479。

2.3 DHQ/SDH 基因的生物信息学分析

2.3.1 DHQ/SDH 基因编码蛋白的理化性质、疏/亲水性分析 利用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam 对 DHQ/SDH 基因编码蛋白的理化性质进行预测, 推测该蛋白的分子式为 C₄₉₇₀H₈₃₂₆N₁₆₁₆O₂₀₈₈S₂₉₈, 相对分子质量为 133 682.2 u, 等电点 (pI 值) 为 5.01, 含量最丰富的氨基酸是丙氨酸 (Ala)、半胱氨酸 (Cys)、甘氨酸 (Gly)、苏氨酸 (Thr), 带正电荷 (Asp + Glu)、负电荷 (Arg + Lys) 的氨基酸数均为 0。该蛋白的不稳定系数为 40.76, 脂肪系数为 30.82, 亲水性系数为 0.725。

利用在线分析软件 ProtScale 的 Kyte and Doolittle 算法对 DHQ/SDH 基因进行疏水/亲水性分析表明, DHQ/SDH 蛋白存在明显的疏水区、亲水区, 其中第 268 位氨基酸疏水/亲水值最高, 为 2.022, 第 300 位氨基酸最低, 为 -2.556, 为亲水性蛋白。

1	ATT	GAT	GTT	GAG	CTT	CAG	GTA	GCT	CAT	GAT	TTC	TAC	AAA	ACC	ATT	CAA	GGG	AAG	AAA	CCT
1	I	D	V	E	L	Q	V	A	H	D	F	Y	K	T	I	Q	G	K	K	P
61	GAA	AAG	GTC	AAA	ATA	ATT	GTG	TCT	TCA	CAC	AAC	TAT	CAG	NAT	ACT	CCA	TCT	CTT	GAG	GAA
21	E	K	V	K	I	V	S	S	S	N	N	Q	Q	N	T	P	S	L	E	E
121	ATT	GGC	AAT	CTC	GTG	GCA	AGA	ATA	CAG	GCT	ACT	GGA	GCT	GAT	ATT	GTG	AAG	GTT	GCA	ACA
41	I	G	N	L	V	A	R	I	C	T	G	A	D	I	V	K	V	A	A	T
181	ACT	GCC	GTA	GAT	ATC	ACT	GAC	TCT	GCA	CGT	ATA	TTC	CAA	GTT	CTT	GTG	CAT	TCT	CAA	GTC
61	T	A	V	D	I	T	D	S	A	R	I	F	Q	V	L	H	S	Q	Q	V
241	CCT	ATG	ATA	GGA	CTT	GTG	ATG	GGT	GAC	AGG	GGA	TTC	ATT	TCA	AGA	ATT	CTT	AGT	GCA	AAA
81	P	M	I	G	L	V	M	G	R	G	F	I	S	S	A	I	L	S	A	K
301	TTT	GGT	GGG	TTT	CTC	ACG	TTT	GGT	TCG	ATT	GAG	GCT	GGG	GTA	GTA	TCA	GCT	CCT	GGG	CAA
101	F	G	G	F	L	T	F	G	S	I	E	A	G	V	V	S	A	P	G	Q
361	CCA	AGT	ATA	AAA	GAT	TTG	TTG	GAT	TTA	TAC	AAT	TTC	AGA	CTG	CTA	GGG	CCT	GAT	ACC	AAA
121	P	S	I	K	D	L	L	L	T	N	F	N	R	L	G	C	F	D	T	K
421	GTG	CAT	GGT	GTT	ATT	GGG	AAT	CCT	ATT	GGA	CAC	AGC	AAA	AGT	CCT	CAT	CTC	TAC	AAT	CCC
141	V	H	G	V	I	G	N	P	I	G	H	S	K	S	P	H	L	Y	N	P
481	GCA	TTC	AAG	TCC	GTC	AAT	TTT	AAT	GGA	ATT	TAT	CTG	CCT	CTG	TTG	GTT	GAT	AAT	GTC	GCA
161	A	F	K	S	V	N	F	N	G	I	Y	L	P	L	L	V	D	N	V	A
541	AAT	TTT	CTC	AAG	ACT	TAC	TCA	TCT	PCT	GAT	TTT	GTT	GGA	TAC	AGT	TAT	ACG	ATT	CCT	CAC
181	N	F	K	T	Y	S	T	P	D	F	V	G	Y	S	Y	T	A	I	P	H
601	AAG	GAA	GCT	GGG	TTT	AAT	TGC	TGC	GAT	GAG	ATT	GAT	CCG	ATT	GCC	AAG	GAA	ATA	GGA	GCT
201	K	E	A	G	F	N	C	D	E	I	D	P	I	A	K	E	I	G	A	T
661	ATT	AGT	TGC	ATG	ATC	AAG	AGA	CCT	GAT	GGG	AAT	CTA	ATG	GGC	TAC	AAT	GTT	GAC	TAT	CTT
221	I	S	C	M	I	K	R	P	D	G	N	L	M	G	Y	N	V	D	Y	L
721	GGA	GCC	ATT	GCA	GCT	ATC	GAG	GAA	GGG	CTT	AGA	GCA	TCA	AAT	GGT	GCA	AGC	CCC	GTA	TCT
241	G	A	I	A	G	I	E	G	G	L	R	A	S	N	G	A	P	P	V	S
781	GGT	TCT	CCC	TTG	GCT	GGT	AAA	CTG	TTT	GTC	GTC	ATG	GGT	GCT	GGT	GGT	GCT	GGA	AAA	GCA
261	G	S	P	L	A	G	K	L	F	V	V	M	G	A	G	G	A	G	K	A
841	CTT	GCT	TTT	GGT	GGA	AAA	GAA	AAG	GGA	GCA	AGA	GTC	GTA	GTT	GCC	AAT	CGC	ACA	TAT	GAC
281	L	A	F	G	G	K	E	K	G	A	R	V	V	V	A	N	R	T	Y	D
901	AAA	GCC	AAA	CAA	CTT	GCC	AAT	AAA	GTT	GGA	GGA	GAA	GCT	ATA	ACT	CTT	GCC	GAA	TTA	GAA
301	K	A	K	Q	L	A	N	K	V	G	G	E	A	I	T	L	A	E	L	E
961	AAT	TTC	CAT	CCA	GAA	GAT	GGG	ATG	ATT	CTA	GCA	AAT	ACT	ACA	TCT	GTT	GGA	ATG	AAA	CCA
321	N	F	H	P	E	D	G	M	I	L	A	N	T	T	S	V	G	M	K	P
1021	AAA	ATT	GAG	GAC	ACA	CCC	CTT	TCG	AAG	AAA	GCT	CTG	AAA	CAC	TAC	TCT	TTG	VTT	TTT	GAT
341	K	I	E	D	P	L	S	K	K	A	A	L	K	H	Y	S	L	V	F	D
1081	GCC	ATT	TAC	ACA	CCA	AAA	TTG	ACC	AGA	CTC	TTA	AGA	GAA	GCA	CAA	GAG	TCT	GGA	GCC	ACA
361	A	I	Y	T	P	K	L	T	R	L	L	R	E	A	Q	E	S	G	A	T
1141	ATT	GTT	TAT	G	ACA	GAA	ATG	TTC	ATT	AAC	CAA	Q	F	T	GTA	CAQ	TTT	GAA	AAG	TTC
381	I	V	Y	T	G	E	M	F	I	N	A	A	F	V	Q	F	E	K	F	S
1201	GGT	CTG	CCA	GCA	CCG	AAG	CAA	CTG	ATT	AGG	GAC	ACT	TTG	GCA	AGA	AAC	ACA	AAA	GAA	GGA
401	G	L	P	A	P	K	Q	L	I	R	D	T	L	A	R	N	T	K	E	G
1261	ATA	TAG	CTG	GTG	ACT	CTC	ACT	GCA	GCA	GCT	GAA	CCT	ATG	TTT	CTC	CAC	TAG	AGC	TAT	TTC
421	I	*																		
1321	ATT	TCA	ATT	CTA	AAA	TGT	GCC	ATG	ATC	AGC	TGT	TGC	ATT	ATT	CTG	TTG	AAA	ACA	ATA	TAA
1381	TTT	TCA	TTT	TTC	TTT	ATG	GAG	TGA	CTT	GTG	ATC	ATG	AAT	TTA	ACA	AGT	TGT	CAA	GCT	TGC
1441	CTT	ATG	CCG	TGT	ATA	GGC	AGC	CAC	AGA	TAA	CAG	ATT	ACG	GCA	GTT	TCA	CGA	GAG	AGG	ATT
1501	CAT	GTA	GCC	AAT	TCT	AAA	TTT	TTT	GGA	CAT	GCT	TTT	GCA	ATC	AAG	TTT	AGA	ATA	GGA	TGG
1561	GGT	CAT	TTG	TCT	CTC	TTT	TAT	TCA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA

TAG为终止密码子；左侧数字对应右侧的氨基酸、碱基位点；氨基酸采用缩写表示；“*”表示氨基酸序列终止

图2 石榴 DHQ/SDHcDNA 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列



数字表示氨基酸位置

图3 石榴 DHQ/SDH 基因编码蛋白的功能结构域

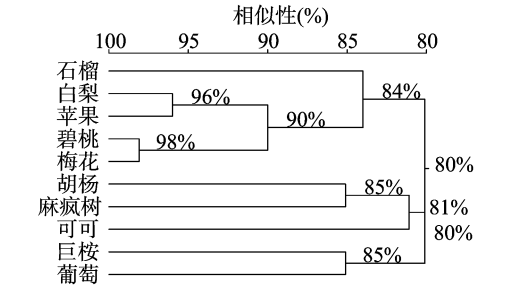


图4 不同植物 DHQ/SDH 基因氨基酸序列同源性比对

2.3.2 DHQ/SDH 基因编码蛋白的二级结构分析 利用 SOPMA 软件预测石榴 DHQ/SDH 基因编码蛋白二级结构表明,有 127 个氨基酸参与形成 α -螺旋(alpha helix),占总氨基酸数的 30.17%;有 58 个氨基酸参与形成 β -转角(beta turn),占总氨基酸数的 13.78%;有 105 个氨基酸参与形成延伸链(extended strand),占总氨基酸数的 24.94%;有 131 个氨基酸参与形成无规则卷曲(random coil),占总氨基酸数的 31.12%。结果表明,DHQ/SDH 基因编码蛋白的二级结构中含有丰富的 α -螺旋、无规则卷曲结构。

3 讨论与结论

DHQ/SDH 双功能酶的优点就是在莽草酸途径中通过限制中间物在竞争途径中的质量而提高代谢物流通的效率^[9]。苹果、白梨、葡萄等果树上 *DHQ/SDH* 基因序列主要通过全基因组测序预测得到,本研究首次利用 RT-PCR 技术从石榴果皮中分离得到 *DHQ/SDH* 基因 3'端 cDNA 序列,是国际上果树 *DHQ/SDH* 基因克隆的一大突破。

氨基酸序列分析表明,石榴 *DHQ/SDH* 基因与葡萄、苹果、白梨的同源性分别为 84%、82%、82%,推测石榴 *DHQ/SDH* 具有其他植物中 *DHQ/SDH* 的生物学功能,为进一步揭示 *DHQ/SDH* 的功能奠定了理论基础。*DHQ/SDH* 基因具有 DHQase I、SDH (AroE) 2 个保守结构域,DHQase I 具有 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain, 简称 TIM) 磷酸结合超家族保守结构域,莽草酸脱氢酶基因 *AroE* 蛋白具有 shikimate_dh_N、NADB_Rossmann 超家族保守结构域,这与 Han 等在异形水绵上的研究结果^[17] 一致。

拟南芥只有 1 种 *DHQ/SDH* 基因型^[18],烟草有 *NiDHQ/SDH1*、*NiDHQ/SDH2* 2 种基因型,二者中的任何 1 个受到 RNA 干扰 (RNAi) 的抑制,就能改变脱氢奎尼酸和莽草酸代谢途径的稳定水平^[15]。本研究从泰山红石榴果皮中分离得到 1 种 *DHQ/SDH* 基因型,是否还有其他类型 *DHQ/SDH* 基因存在还须继续选择不同石榴品种进行深入研究。

DHQ/SDH 的结构与功能研究主要在拟南芥、烟草等模式植物上,随着分子生物学技术的发展,不同植物 *DHQ/SDH* 基因的功能研究将不断深入。由于石榴果皮富含酚类、鞣质、糖、酸等物质,提取高纯度、完整的 RNA 难度较大,本试验目前提取的 RNA 纯度不能满足 5'RACE 的需要,下一步将改进试验方案,克隆得到 *DHQ/SDH* 基因全长 cDNA 序列。本研究比较不同石榴品种发育期果实中 *DHQ/SDH* 基因的表达与没食子酸含量的相关关系,为从分子水平揭示石榴果实没食子酸的代谢机制提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Zhao X E, Yuan Z H, Feng L J, et al. Cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in red and white pomegranate [J]. Journal of Plant Research, 2015, 128 (4): 687 - 696.
- [2] Schuck A G, Weisburg J H, Esan H, et al. Cytotoxic and proapoptotic activities of gallic acid to human oral cancer HSC - 2 cells [J]. Oxidants and Antioxidants in Medical Science, 2013, 2 (4): 265 - 274.
- [3] Qiu X B, Takemura G, Koshiji M, et al. Gallic acid induces vascular smooth muscle cell death via hydroxyl radical production [J]. Heart and Vessels, 2000, 15 (2): 90 - 99.
- [4] Zaidi - Yahiaoui R, Zaidi F, Bessai A A. Influence of gallic and tannic acids on enzymatic activity and growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi* bv. *chrysanthemi*) [J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7 (4): 482 - 486.

- [5] Khalil R S. Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26 (11): 2069 - 2079.
- [6] 冯立娟, 尹燕雷, 招雪晴, 等. 石榴没食子酸代谢与保健功能研究进展 [J]. 果树学报, 2014, 31 (4): 710 - 716.
- [7] Werner R A, Rossmann A, Schwarz C, et al. Biosynthesis of gallic acid in *Rhus typhina*; discrimination between alternative pathways from natural oxygen isotope abundance [J]. Phytochemistry, 2004, 65 (20): 2809 - 2813.
- [8] Ossipov V, Salminen J P, Ossipova S, et al. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, 31 (1): 3 - 16.
- [9] Singh S A, Christendat D. The DHQ - dehydroshikimate - SDH - shikimate - NADP (H) complex: insights into metabolite transfer in the shikimate pathway [J]. Crystal Growth & Design, 2007, 7 (11): 2153 - 2160.
- [10] Singh S A, Christendat D. Structure of arabidopsis dehydroquinase dehydratase - shikimate dehydrogenase and implications for metabolic channeling in the shikimate pathway [J]. Biochemistry, 2006, 45 (25): 7787 - 7796.
- [11] Magalhães M B, Pereira C P, Basso L A, et al. Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [J]. Protein Expression and Purification, 2002, 26 (1): 59 - 64.
- [12] Zhang X L, Zhang S B, Hao F, et al. Expression, purification and properties of shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38 (5): 624 - 631.
- [13] Kubota T, Tanaka Y, Hiraga K, et al. Characterization of shikimate dehydrogenase homologues of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97 (18): 8139 - 8149.
- [14] Deka R K, Anton I A, Dunbar B, et al. The characterisation of the shikimate pathway enzyme dehydroquinase from *Pisum sativum* [J]. FEBS Letters, 1994, 349 (3): 397 - 402.
- [15] Ding L, Hofius D, Hajirezaei M R, et al. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3 - dehydroquinase dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58 (8): 2053 - 2067.
- [16] Bischoff M, Schaller A, Bieri F, et al. Molecular characterization of tomato 3 - dehydroquinase dehydratase - shikimate: NADP oxidoreductase [J]. Plant Physiology, 2001, 125 (4): 1891 - 1900.
- [17] Han J W, Lee K P, Yoon M, et al. Cold stress regulation of a bifunctional 3 - dehydroquinase dehydratase/shikimate dehydrogenase (DHQ/SDH) - like gene in the freshwater green alga *Spirogyra varians* [J]. Botanica Marina, 2009, 52 (2): 178 - 185.
- [18] Tzin V, Galili G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants [J]. Molecular Plant, 2010, 3 (6): 956 - 972.