

研究报告

Research Reports

葡萄乙醛脱氢酶 *VvALDH10A9* 基因的克隆、表达及酶活性分析

邢启凯, 燕继晔, 张 玮, 刘 梅, 富春元, 李兴红*

(北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

摘要 由葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae 真菌引起的葡萄溃疡病 Botryosphaeria dieback 是葡萄上的主要枝干病害,严重影响葡萄产量和品质。鉴定和分析参与葡萄与葡萄溃疡病菌互作的基因,有助于揭示和阐明葡萄抗溃疡病的信号通路。本研究根据葡萄溃疡病菌侵染后的葡萄转录组数据信息,利用逆转录聚合酶链式反应技术(RT-PCR)克隆了一个受葡萄溃疡病菌诱导上调表达的乙醛脱氢酶基因 *VvALDH10A9*(*Vitis vinifera* aldehyde dehydrogenase 10A9)。系统进化树分析表明,该基因编码的蛋白与拟南芥 AtALDH10A8 亲缘关系最近。利用实时荧光定量 PCR 分析 *VvALDH10A9* 的表达结果表明:*VvALDH10A9* 的表达具有组织特异性,在茎、叶和花中表达量最高,在根中表达量相对较低;葡萄溃疡病菌侵染后,*VvALDH10A9* 在葡萄抗病品种中表达变化不明显,而在葡萄感病品种中该基因显著上调表达。利用原核蛋白表达系统诱导合成的 *VvALDH10A9* 蛋白,经纯化后可降解乙醛,表明 *VvALDH10A9* 蛋白具有乙醛脱氢酶活性。

关键词 葡萄; 葡萄溃疡病; 乙醛脱氢酶; *VvALDH10A9*; 原核表达

中图分类号: S 436.631 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.05.005

Cloning, expression and enzyme activity analysis of an aldehyde dehydrogenase gene *VvALDH10A9* in grapevine

Xing Qikai, Yan Jiye, Zhang Wei, Liu Mei, Fu Chunyuan, Li Xinghong

(Institute of Plant and Environmental Protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract Botryosphaeria dieback caused by pathogens of the fungal family Botryosphaeriaceae is currently one of the most important trunk diseases in the world's primary grape production areas. This disease had seriously affected the grape yield and quality. Investigating the genes that play roles in grape-Botryosphaeriaceae interactions helps us understand the defense mechanism in grapevine. In this study, depending on the transcription analysis, an aldehyde dehydrogenase gene *VvALDH10A9* was cloned using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) based on the transcriptome information. Phylogenetic analysis of *VvALDH10A9* and other 37 characterized ALDH proteins revealed that *VvALDH10A9* was more closely related to AtALDH10A8. Quantitative real-time PCR assays showed that *VvALDH10A9* was preferentially expressed in leaf blades, stem and flower. Additionally, *VvALDH10A9* was rapidly induced by *Lasiodiplodia theobromae* CSS-01s in susceptible cultivar but not in resistant cultivar. Further analysis indicated that purified *VvALDH10A9* protein showed enzyme activities to acetaldehyde *in vitro*.

Key words grape; Botryosphaeria dieback; aldehyde dehydrogenase; *VvALDH10A9*; prokaryotic expression

葡萄 *Vitis vinifera* 不仅可以鲜食还可以酿酒、制干和制汁等,是全世界重要的水果之一,其产量和

收稿日期: 2016-10-31 修订日期: 2017-01-17

基金项目: 国家葡萄产业技术体系(CARS-30);北京市博士后工作经费;北京市农林科学院博士后基金

* 通信作者 E-mail: lixinghong1962@163.com

面积在世界水果中均位居前列^[1]。改革开放以来,中国葡萄产业迅速发展,截至 2013 年底,中国葡萄栽培面积已达 715.5 万 hm^2 ,葡萄总产量超 1 150 万 t (2014 年度葡萄产业技术发展报告)。葡萄病害是影响葡萄产量和品质的最重要因素之一,据统计,危害我国葡萄的病害有 40 余种^[2]。由葡萄座腔菌科真菌引起的葡萄溃疡病作为一种严重的枝干病害近几年才引起人们的重视,在世界上主要的葡萄栽培区域均有分布^[3-5]。在我国,李兴红研究组 2009 年首次发现并报道了由葡萄座腔菌引起的葡萄溃疡病,目前引起葡萄溃疡病的病原菌共分离到 5 种,分别是 *Botryosphaeria dothidea*、*Diplodia seriata*、*Lasiodiplodia theobromae*、*Neofusicoccum parvum*、*Lasiodiplodia pseudotheobromae* 和 *Neofusicoccum mangiferae*^[6-9]。通常认为,葡萄溃疡病主要通过自然孔口或修剪伤口侵入,感病植株出现枝枯、溃疡和果腐等现象,严重者发生根腐,致使整株枯死。葡萄溃疡病已成为中国葡萄生产的重大障碍^[6-7]。

醛是一类生物体内常见的生物分子,根据来源方式,可将其分为内源醛和外源醛。内源醛主要来自氨基酸、碳水化合物、维生素和脂类等物质的新陈代谢^[10-11]。外源醛主要是指逆境环境胁迫过程中膜的过氧化反应产生的醛类^[10-11]。由于其自身羰基基团的亲电特性,这些代谢过程产生的醛很容易与细胞内的亲和物质发生作用,对生物体造成一些严重的遗传毒害^[12]。因此,醛的选择性代谢对机体功能至关重要。醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenases, ALDHs)是一类通过氧化各种内源性和外源性等多种醛的酶类,在烟酰胺辅酶(NAD(P)⁺)的协助下,不可逆地将醛氧化形成相对应的羧酸,从而达到解毒的目的^[13-14],该类蛋白质都含谷氨酸、半胱氨酸活性位点^[15]。

到目前为止,在所有生物体中共发现超过 550 个不同的 ALDH 基因,根据蛋白质序列差异可分成 22 个醛脱氢酶家族^[16-17],而植物中的醛脱氢酶分布于 14 个家族,并且其中的 7 个家族(ALDH11、ALDH12、ALDH19、ALDH21、ALDH22、ALDH23 和 ALDH24)为植物所特有^[18]。张玉成等^[19]从酿酒葡萄基因组中共筛选到 23 个醛脱氢酶基因,并将其分成 10 个家族,证实一些 *VvALDH* 基因在寄主葡萄和病原菌的互作以及果实的发育等过程中起着重要的作用。本研究前期以 *L. theobromae* 菌株 CSS-01s、

葡萄‘夏黑’(高感)为研究对象,采用 RNA-seq 技术对 CSS-01s 诱导后的‘夏黑’枝干进行转录组分析,通过差异表达基因的筛选与注释,从转录组水平上分析感病葡萄对葡萄溃疡病菌防御反应以及早期病程相关基因的表达,发现乙醛脱氢酶 *VvALDH10A9* 基因在诱导后的样品中高表达。因此,本试验通过对 *VvALDH10A9* 基因克隆、原核表达并测定其酶活,初步验证 *VvALDH10A9* 蛋白的功能,旨在为揭示 *VvALDH10A9* 基因在葡萄溃疡病菌侵染过程中的作用机理奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料:大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 和 BL21 购自北京金全生物技术有限公司,根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 EHA105 及野生型 *L. theobromae* 菌株 CSS-01s 均由本实验室保存。一年生‘梅鹿辄’(Merlot)和‘品丽珠’(Cabernet Franc)绿枝条由山西省农业科学院果树研究所提供。

供试试剂:各种限制性内切酶、LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 SYBR Premix Ex TaqTM 购自宝生物工程(大连)有限公司。反转录酶 SuperScript[®] III 购自 Invitrogen 公司。DNA 胶回收试剂盒购于 Qiagen。抗生素以及异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海生工生物工程有限公司。其他常规化学药品均为分析纯。

1.2 同源与进化分析

利用 NCBI 数据库分别下载拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (NP_565094.1)、二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* (XP_003574495.1)、衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001699134.1)、大麦 *Hordeum vulgare* (BAB62846.1)、苜蓿 *Medicago truncatula* (XP_003608928.1)、水稻 *Oryza sativa* (NP_001061833.1)、毛杨 *Populus trichocarpa* (XP_002322147.2)、高粱 *Sorghum bicolor* (AGZ15751.1)、节节麦 *Aegilops tauschii* (EMT10403.1)、团藻 *Volvox carteri* (XP_002947147.1)、玉米 *Zea mays* (NP_001157804.1)、华东葡萄 *Vitis pseudoreticulata* (AAZ79355.1)和酿酒葡萄 *Vitis vinifera* (XP_002283132.1、XP_002263479.1、XP_002274863.1、CBI16844.3、CBI32134.3、XP_002273358.1、XP_002285866.1、XP_002273730.2、XP_002285466.1、XP_002265514.1、XP_

002265402. 1、XP_002265354. 1、XP_002266390. 1、XP_002266616. 1、XP_002266379. 1、XP_002278093. 1、XP_002272544. 1、XP_002281984. 1、XP_002285286. 1、XP_002279374. 1、XP_002273569. 1、XP_002282355. 1、XP_002273256. 1 和 XP_002277743. 1) 乙醛脱氢酶蛋白全长序列与 *VvALDH10A9* 进行比对, 得到其同源结构域, 运用 ClustalX 进行比对, 利用 MEGA6 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树。

1.3 葡萄组织 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

取一年生葡萄‘夏黑’开花期的茎、叶、花, 以及组培苗的根, 液氮冻存, 放于 -80°C 冰箱中备用, 用于基因组织特异性表达分析。参考 úrbez-Torres 等^[20]和 Yan 等^[6]测定葡萄溃疡病菌致病力的方法, 选用 *L. theobromae* 菌株 CSS-01 接种一年生葡萄‘梅鹿桠’和‘品丽珠’绿枝条, 于 0、2、4、6 和 12 h, 取葡萄枝条表皮, 液氮冻存后于 -80°C 冰箱中保存, 用于分析基因的诱导表达。采用 TRIzol 法 (Qiagen) 提取各组组织样品总 RNA, 经 DNase I 消化处理后, 采用 SuperScript[®] III 反转录酶 (Invitrogen) 反转录得到第一链 cDNA, -20°C 保存, 用于基因克隆与荧光定量分析。

1.4 表达分析

依据 *VvALDH10A9* 序列设计特异性引物 (正向引物 Primer F: 5'-AGAGGTGTGA ACGTGTGTCA-3' 和反向引物 Primer R: 5'-TACCAGC-CCCATGGTTCATT-3'), 以 *VvEF1 α* (正向引物为 5'-GCGGGCAAGAGATACCTCAA-3'; 反向引物为 5'-TCAATCTGTCTAG GAAAGGAAG-3') 作为内参基因, 进行荧光定量 PCR 分析。采用 SYBR Green I 荧光染料法, 反应体系参照 TaKaRa 说明书。反应体系为: 反转录产物 0.5 μL , 引物 (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 3.5 μL , 2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 7 μL , ROX Reference Dye II 0.3 μL , 加水至总体积 14 μL 。PCR 仪为 ABI 7500。根据溶解曲线以及凝胶电泳确定 PCR 产物是否特异。每个反应得到相应的 *Ct* 值。每个样品进行 3 个平行反应, 取平均值后, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法算出基因的相对表达水平。

1.5 原核表达载体的构建与鉴定

选用 pET-32a 为表达载体, 根据 *VvALDH10A9* 测序得到的序列分析其含有的酶切位点, 在片段 5' 端和 3' 端分别加入 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切位点, 合成一对特异性引物。引物序列如下: 正向引物: 5'-

TA GGATCCATCCCCGTCATCAATC-3' (下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点), 反向引物: 5'-TA CCCGGGCAGCTTTGAAGGAGAC-3' (下划线部分为 *Sma* I 酶切位点)。以合成的 cDNA 链为模板进行 PCR 扩增。反应体系为 25 μL , 其中模板 1 μL 、上下游引物 (50 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL 、2.5 mmol/L dNTPs 1 μL 、LA Taq 0.2 μL 、10 $\times$ LA buffer 2.5 μL 、灭菌水补足 25 μL 。反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min 30 s, 32 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳验证后, 在紫外灯下切胶进行回收。回收产物经 *Bam*H I 和 *Sma* I 双酶切后, 与 pET-32a 连接, 连接反应总体积 10 μL , 其中目的基因 5.5 μL 、载体 3 μL 、T4 ligase buffer 1 μL 和 T4 ligase 0.5 μL , 于 16°C 连接过夜。

将连接产物转化到 BL21(DE3) 中, 涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37°C 过夜培养。挑取单克隆菌落摇培, 取菌液进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳验证判断菌体是否含有重组质粒。重组质粒委托北京博迈德基因技术有限公司进行测序。

1.6 重组蛋白诱导表达及纯化

1.6.1 蛋白诱导表达

取 1 mL 菌液转接至 100 mL LB (含 100 mg/L Amp) 液体培养基中, 37°C 180 r/min 摇培至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6; 取 1 mL 菌液加入 100 μL IPTG 至其终浓度为 0.1 mmol/L, 16°C 120 r/min 诱导过夜, 取 1 mL 诱导后的菌液, 于 4°C 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 缓冲液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH=7.4) 冲洗 1 次, 加 10 mL PDT (PBS, 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L DTT, pH=7.4) 将菌体悬浮, 超声波裂解细胞 (功率 250 W, 工作时间 10 s, 间隔 10 s, 工作 10 次)。 4°C 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 沉淀用 10 mL PDT 悬浮。取上清及沉淀, 与诱导前后总蛋白样品一起进行 SDS-PAGE 电泳。

1.6.2 诱导蛋白的纯化

取 1 mL 混匀的 Ni-NTA 琼脂糖加入至 Bio-Rad 层析柱中, 加入 3 倍体积的 Binding buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 0.3 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH=8.0) 洗涤 5 次; 缓缓加入待纯化的上清蛋白, 4°C 孵育 30 min; 加入 3 倍体积的 Wash buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 0.3 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪

唑,pH=8.0)洗涤3次;最后用0.5 mL的Elution buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 0.3 mol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑,pH=8.0)洗脱蛋白。

1.7 重组乙醛脱氢酶活性测定

参考刘峰等^[24]提供的乙醛脱氢酶活性测定方法。将10 μg 纯化蛋白加入到含1.5 mmol/L NAD (Sigma), 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 8.5)的反应液中,用ddH₂O定容至100 μL;加入20 μg 乙醛,用酶联仪(GE Versamax)测定460 nm处的吸光度,每隔20 s测定1次,持续2 min。以pET-32a空载体诱导表达的蛋白作为对照。

2 结果与分析

2.1 VvALDH10A9 的序列分析及进化分析

以VvALDH10A9为候选基因,设计特异性引

物,利用RT-PCR从葡萄‘品丽珠’茎组织中获得该基因全长ORF(open reading frame)片段,经测序比对,与NCBI公布的XM_002283654.4 (accession number)序列完全一致。该基因位于葡萄第17号染色体上,共有15个外显子(exon)和14个内含子(intron) (图1),cDNA开放阅读框为1 512 bp,碱基组成为A(25.3%)、T(27%)、C(27.5%)、G(20.2%)。编码含503个氨基酸的多肽,属于乙醛脱氢酶第10家族^[19],负电荷残基(Asp + Glu)有50个,正电荷残基(Arg + Lys)有60个(图2)。EditSeq软件分析结果显示,VvALDH10A9理论分子量为55 kD,理论等电点pI为5.5。系统进化树分析表明,该基因编码的蛋白与拟南芥AtALDH10A8 (NP_565094.1)蛋白的同源性较高、亲缘关系最近(图3),推测可能与该蛋白具有相似的功能。

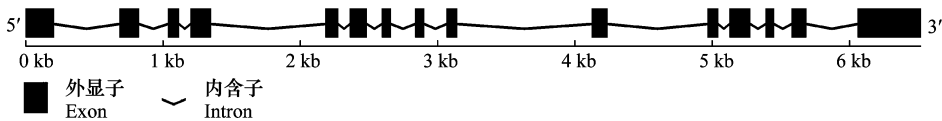


图1 VvALDH10A9 结构图

Fig.1 Gene structure of VvALDH10A9

1	ATGGAGACTAAAATACCATTGTCGGCAGCTCTTCATCGACGGCAAATGGGTTGAACCCATCACGAAGAGGCGCATC
1	M E T K I P C R Q L F I D G K W V E P I T K R R I
76	CCCGTCATCAATCCCGCACTGAGCAGACCATCGGCCTTATTCGGCGGCCACTGGTGAAGATGTGGAGCTTGCT
26	P V I N P A T E Q T I G L I P A A T G E D V E L A
151	GTGGATGCTGCCCGAAGAGCCTTTGCCAGGAATAAGGGGGCAGATTGGGGCTAAGGCCTGGTGCTTTCGTGCT
51	V D A A R R A F A R N K G A D W A K A P G A V R A
226	AAGTATTGCGTGCCATTGCTGCCAAGATAACAGAGAGAAAGACTGAATTGGCCAACTAGAGGCACCTTATTGT
76	K Y L R A I A A K I T E R K T E L A K L E A L D C
301	GGAAACCCCTGGATGAAGCAGCATGGGATATTGATGACGTTGCTTCTTTTGTAGTACTTTTCAGACCACGCT
101	G K P L D E A A W D I D D V A S C F E Y F A D H A
376	GAAGCTTTAGATGCACAGCAAAAGGCTCCTTTGCACTTCTATGGAGACATTAAAGTGTATATTCTTAAAGAG
126	E A L D A Q Q K A P L S L P M E T F K C H I L K E
451	CCCGTTGGTGTGTTGGATTACACCATGGAATTACCCACTACTGATGGCTACATGGAAAGTGGCTCGCC
151	P V G V V G L I T P W N Y P L L M A T W K V A P A
526	CTAGCTGCTGGTTGCACAGCAATACTAAAGCCATCTGAGTTGGCTTCTGTGACTTCTTTAGAGCTGGCTGATGTG
176	L A A G C T A I L K P S E L A S V T T G L E L A D V
601	TGTATAGAGTGGGCTCGCCACCTGGCGTCCTTAATATTCTGACTGGACTGGGCTCTGAAGCTGGTGCTCCATTG
201	C I E V G L P P G V L N I L T G L G S E A G A P L
676	TCATCTCATCCCGATTGTGACAAGATTGCATTTACTTGAAGCACTGTTACTGGGAGCAAGATCATGACAGCTGCA
226	S S H P H V D K I A F T G S T V T G S K I M T A A
751	GCTCAATTGGTGAAGCCTGTTTCATTGGAGCTTGGTGGAAAGAGTCCCATCTTGTGTTTGAGGATGTGACACCTT
251	A Q L V K P V S L E L G G K S P I L V F E D V D L
826	GACAAGCTGCTGAATGGACTGCCTTTGGTTGCTTTTGGACAAATGGCCAAATATGTAGTGCAACATCTCGTCTT
276	D K A A E W T A F G C F W T N G Q I C S A T S R L
901	CTTGTGCATGAAAGCATTGCAGCAGAATTTTGTAGACAAGCTTGTGAAATGGACTAAAATATCAAGATTTCAGAT
301	L V H E S I A A E F L D K L V K W T K N I K I S D
976	CCCTTTGAAGAAGGTTGTAGACTTGGTCCTGTTGTTAGTAGAGCAGTATGAGAAGATATTGAAGTTGGTTTCA
326	P F E E G C R L G P V V S R E Q Y E K I L K L V S
1051	ACAGCTAAGAGTGAGGGTGCACCAATATTGTGTGGTGGGGTCTGCCCCAGCATTTGAAGATGGGGTTCTACATT
351	T A K S E G A T I L C G G G R P Q H L K M G F Y I
1126	GAACCAACCATTATAAGTGATGTGACTACTTCCATGCAAATTTGGAGAGAGGAGTTTCGGGCTGTCTTTGT
376	E P T I I S D V T T S M Q I W R E E V F G P V L C
1201	GTTAAACATTAGCTCCGAAGATGAAGCATTGAACCTAGCAAAATGACACCCAGTATGGCTTACAGGTGCTGTA
401	V K T F S S E D E A I E L A N D T Q Y G L A G A V
1276	ATTTCAAATGATCTGGAGAGGTGTGAACGTGTGTCAAAGGCCCTTAATGCAGGGATGTATGGATCAACTGCTCA
426	I T S N D L E R C E R V S K A L N A G I V W I N C S
1351	CAGCCATGCTTCTGTCAAGCTCCATGGGGAGGAAACAGCGTAGTGGTTTGGGCGTGAATGGGCGCACGGGGA
451	Q P C F C Q A P W G G N K R S G F G E L G P R G
1426	CTTGATAATTACTTAAGTGTGAAGCAGGTCACTCAGTACCTCTCCAATGAACCATGGGGCTGGTACCAGTCTCCT
476	L D N Y L S V K Q V T Q Y L S N E P W G W Y Q S P
1501	TCAAAGCTGTGA
501	S K L *

图2 VvALDH10A9 核酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence of VvALDH10A9 and its deduced amino acid sequence

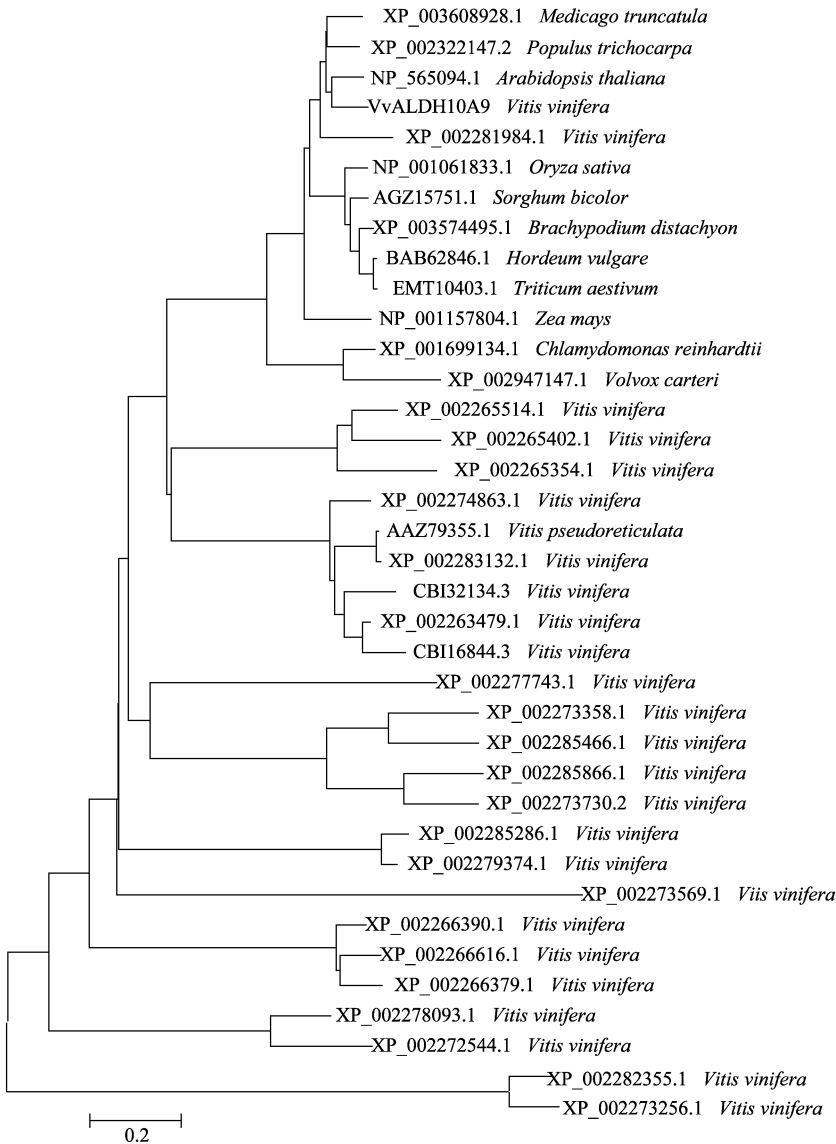


图 3 *VvALDH10A9* 与其他植物 ALDH 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *VvALDH10A9* and ALDHs from other plants

2.2 *VvALDH10A9* 的表达分析

为了研究 *VvALDH10A9* 基因在生物胁迫下的表达特征,利用 Real-time PCR 分析葡萄溃疡病菌 CSS-01 接种后该基因的表达模式,结果表明, *VvALDH10A9* 在抗病葡萄品种‘梅鹿辄’中的表达变化不明显,而在感病葡萄品种‘品丽珠’的表达量随着处理时间的延长而上升,并且在处理 6 h 时表达量迅速上升达到最大值,随后表达量又呈现下降趋势(图 4a),以上结果表明该基因对葡萄溃疡病菌表现出一定的适应性,表达受到精细调控。

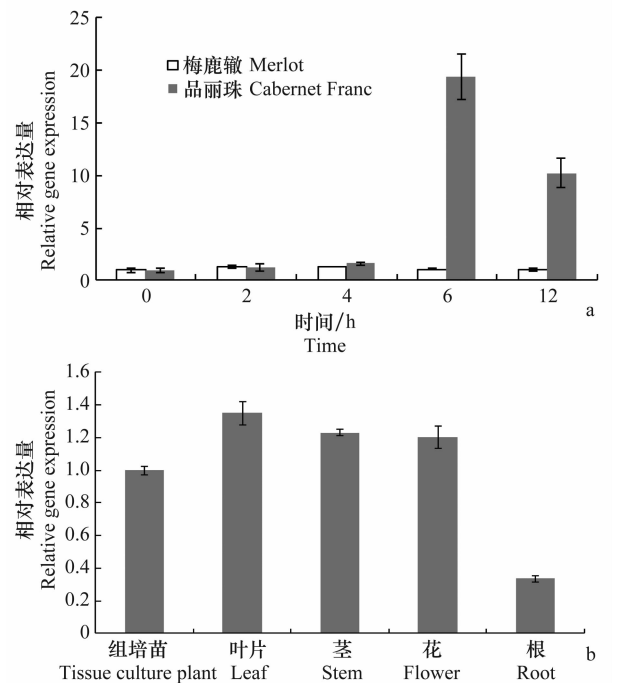
同时对该基因的组织表达特征进行了分析,结果显示, *VvALDH10A9* 在葡萄的各个组织中均有表达,在茎、叶和花中表达量最高,而在根中表达量

相对较低(图 4b)。

2.3 *VvALDH10A9* 的原核表达

当将基因全长序列构建至 pET-32a 时,未诱导出目的蛋白;随后将去除信号肽的 *VvALDH10A9* 基因序列(73 bp~1 509 bp)构建至 pET-32a 上,片段长度为 1 437 bp,编码 479 个氨基酸,经计算其分子量约为 51.7 kD,而 pET-32a 编码的蛋白为 20.1 kD,因此推定该融合蛋白分子量约为 71.8 kD。为了获得能够可溶性表达的目的蛋白,在 16℃,用终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 诱导过夜,诱导完成后进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果表明,超声波破碎后沉淀中无明显诱导条带,而上清液在 70 kD 处有一蛋白质条带,与重组质粒推测的表达蛋白大小相近(图

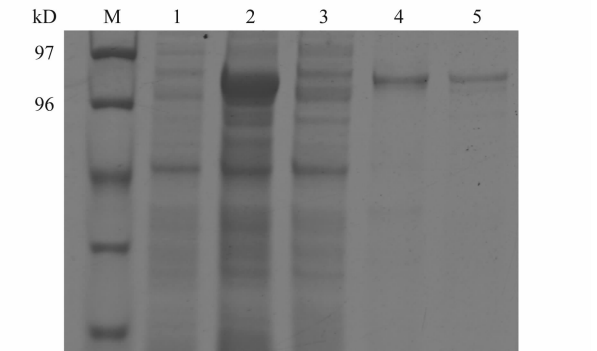
5)。为了进一步鉴定该蛋白,将诱导获得的粗蛋白用 Ni-NTA 进行亲和纯化,以 250 mmol/L 咪唑将蛋白洗脱,SDS-PAGE 电泳发现在 70 kD 左右有一条明显的蛋白质条带(图 5),其大小与推测的融合蛋白大小一致,测定浓度为 0.9 mg/mL。



a: 接种葡萄座腔菌后 *VvALDH10A9* 基因的表达分析; b: *VvALDH10A9* 组织表达特异性分析
a: Time-course transcription analysis of *VvALDH10A9* after inoculation with CSS-01s; b: Tissue expression analysis of *VvALDH10A9* by quantitative real-time PCR

图 4 *VvALDH10A9* 的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *VvALDH10A9* in grapevine



M: 蛋白质Marker; 1: 诱导前的重组质粒; 2: 诱导后的重组质粒; 3: 诱导后的沉淀蛋白; 4: 诱导后的上清液; 5: 纯化蛋白
M: Protein molecular weight marker; 1: Recombinant vector before IPTG induction; 2: Recombinant vector after IPTG induction; 3: Precipitation after IPTG induction; 4: Supernatant after IPTG induction; 5: Purified fusion protein

图 5 *VvALDH10A9* 基因重组蛋白在大肠杆菌的表达和纯化

Fig. 5 Expression and purification analysis of recombinant *VvALDH10A9*/pET32a protein in *Escherichia coli* BL21

2.4 纯化蛋白乙醛脱氢酶活性测定

为了确定 *VvALDH10A9* 蛋白是否编码一个有功能的乙醛脱氢酶蛋白,对纯化蛋白的体外活性进行测定。结果表明,在乙醛存在时,pET-32a 测定值基本没有发生变化,而 *ALDH10A9*/pET-32a 的测定值增加了 2.5 倍(图 6)。与此相反,对照 pET-32a 中仅检测到背景。由此推断,在 NAD⁺ 的辅助下, *VvALDH10A9* 蛋白可将底物乙醛分解,具有乙醛脱氢酶活性。

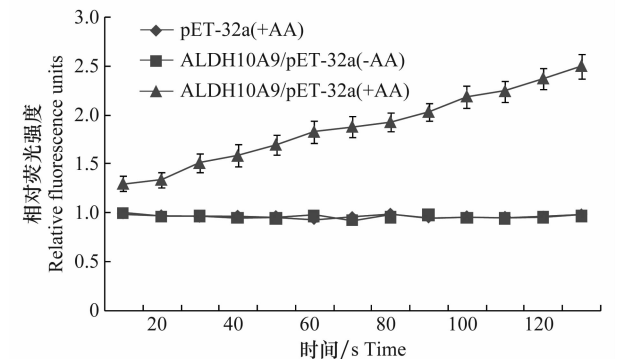


图 6 *VvALDH10A9* 重组蛋白体外酶活性测定

Fig. 6 Aldehyde dehydrogenase activity assay of purified recombinant *VvALDH10A9*/pET32a protein

3 讨论

醛脱氢酶是一类氧化各种内源性和外源性醛的酶类,在 NAD(P)⁺ 的协助下,将醛氧化形成相对应的羧酸,从而保护植物不被醛类毒害。近几年,关于 ALDHs 家族的研究已取得很大进展,然而,大多数的研究集中在植物的花器官发育过程,关于非生物胁迫过程中醛脱氢酶的研究也主要集中在拟南芥^[16]、水稻^[21]和玉米^[22]等模式植物,而葡萄中关于该家族成员与植物抗病的研究报道相对较少。依托转录组分析数据,本研究采用 RT-PCR 技术克隆到编码醛脱氢酶的 *VvALDH10A9* 基因。经测序发现,该基因片段为 1 512 bp,能编码含有 503 个氨基酸残基的蛋白。通过氨基酸序列比对发现, *VvALDH10A9* 蛋白与 *VvALDH10B1*、拟南芥 *AtALDH10A8* 蛋白亲缘关系最近(图 3),推测可能与该分支蛋白具有相似的功能。

研究发现,醛脱氢酶除了具有催化醛类的作用之外,在植物的生长发育和逆境响应中具有重要的生理功能。水稻 *OsALDH7* 基因受氧胁迫和非生物胁迫强烈诱导,对水稻种子的成熟和种子的活性至

关重要^[23]。玉米 *rf2a* 基因编码一个线粒体 *ALDH2B2* 基因,与玉米花粉发育有关,且在玉米功能性雄配子体产生过程中发挥重要作用^[24]。有研究指出,*ALDH3I1* 和 *ALDH7B4* 这两个基因分别被脱水、高盐和脱落酸(ABA)不同程度地在不同组织中特异激活,可显著提高拟南芥对上述胁迫的抵抗能力^[25]。玉米 *ZmALDH22A1* 基因在烟草中的过量表达可显著提高转基因植株对 ABA、盐、甘露醇和脱水等的抗胁迫能力^[26]。脱水、高盐、脱落酸和 UV 照射都可诱导念珠藻 *ALDH21A1* 基因的表达^[27]。为揭示醛脱氢酶 *VvALDH10A9* 基因的相关功能,对该基因的组织特异性表达情况进行了研究。试验结果显示,该基因在葡萄叶片、茎和花中的表达量比较高,在根中的表达量最低,推测其可能参与葡萄花的发育等生理过程。此外,醛脱氢酶基因在植物应对病原菌胁迫上也发挥着重要的作用^[18,28]。野生葡萄 *VpALDH2B4* 基因编码蛋白定位于细胞线粒体,并受到病原菌 *Erysiphe necator* 和 *Plasmopara viticola* 诱导表达。该基因在拟南芥中的过量表达可显著提高植株对病原菌 *Hyaloperonospora arabidopsidis* 和 *Golovinomyces cichoracearum* 的抵抗能力^[30]。本研究也发现,葡萄 *VvALDH10A9* 基因对葡萄溃疡病菌的侵染有应答,推测该基因在葡萄溃疡菌侵染初期发挥着一定的作用。*VvALDH10A9* 基因如何行使功能目前还不清楚,因此本研究进一步构建原核表达 *VvALDH10A9* 蛋白的载体,并诱导其在大肠杆菌中高量表达、纯化获得了 *VvALDH10A9* 原核表达蛋白。本试验选择表达的蛋白是去掉信号肽,因为真核生物蛋白在原核系统中表达时,信号肽的存在很容易导致原核表达蛋白的失败^[25]。本研究表达获得的纯化蛋白表现出乙醛脱氢酶活性,与此前关于这一酶类的报道相吻合,为其功能研究奠定了基础。但关于其具体生物学功能,有待于获得超表达和 RNAi 干扰转基因植株后做进一步分析。

参考文献

- [1] 田东,冯建英,陈旭,等.世界葡萄产业生产及贸易形势分析[J].世界农业,2010(6):46-50.
- [2] 霍立强,张建发,王素娟.葡萄病害的发生及防治方法[J].现代农业科技,2011(1):21.
- [3] Bertsch C, Larignon P, Farine S, et al. The spread of grapevine trunk disease [J]. Science, 2009, 324(5928): 721.
- [4] Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, et al. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood [J]. Plant Pathology, 2013, 62(2): 243-265.
- [5] Phillips A J L, Alves A, Abdollahzadeh J, et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture [J]. Studies in Mycology, 2013, 76: 51-167.
- [6] Yan Jiye, Xie Yue, Yao Shengwei, et al. Characterization of *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of grapevine canker in China [J]. Australasian Plant Pathology, 2012, 41(4): 351-357.
- [7] Yan Jiye, Xie Yue, Zhang Wei, et al. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China [J]. Fungal Diversity, 2013, 61(1): 221-236.
- [8] Dissanayake A J, Zhang Wei, Li Xinghong, et al. First report of *Neofusicoccum mangiferae* associated with grapevine dieback in China [J]. Phytopathologia Mediterranea, 2015, 54(2): 414-419.
- [9] Dissanayake A J, Zhang Wei, Liu Mei, et al. *Lasiodiplodia theobromae* causes pedicel and peduncle discolouration of grapes in China [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2015, 10(1): 1-5.
- [10] Sophos N A, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update [J]. Chemico-Biological Interactions, 2003, 143: 5-22.
- [11] Sunkar R, Bartels D, Kirch H H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance [J]. The Plant Journal, 2003, 35(4): 452-464.
- [12] Lindahl R. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1992, 27(4/5): 283-335.
- [13] Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu L C, et al. Human aldehyde dehydrogenase gene family [J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 251(3): 549-557.
- [14] Vasiliou V, Bairoch A, Tipton K F, et al. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping [J]. Pharmacogenetics and Genomics, 1999, 9(4): 421-434.
- [15] Perozich J, Nicholas H, Wang Bicheng, et al. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family [J]. Protein Science, 1999, 8(1): 137-146.
- [16] Kirch H H, Bartels D, Wei Yanling, et al. The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis* [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(8): 371-377.
- [17] Vasiliou V, Nebert D W. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family [J]. Human Genomics, 2005, 2(2): 138-143.
- [18] 张玉成,牛姣,徐晓召,等.葡萄醛脱氢酶(ALDH2)基因进

化、表达及启动子功能的生物信息学分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(9): 169-180.

- [19] Zhang Yucheng, Mao Linyong, Wang Hua, et al. Genome-wide identification and analysis of grape aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily [J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e32153.
- [20] úrbez-Torres J R, Gubler W D. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California [J]. Plant Disease, 2009, 93(6): 584-592.
- [21] Gao Chenxi, Han Bin. Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in rice (*Oryza sativa*) [J]. Gene, 2009, 431(1): 86-94.
- [22] Liu Feng, Schnable P S. Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases [J]. Plant Physiology, 2002, 130(4): 1657-1674.
- [23] Shin J H, Kim S R, An G. Rice aldehyde dehydrogenase 7 is needed for seed maturation and viability [J]. Plant Physiology, 2009, 149(2): 905-915.
- [24] Liu Feng, Cui Xiangqin, Horner H T, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize [J]. The Plant Cell, 2001, 13(5): 1063-1078.
- [25] Kotchoni S O, Kuhns C, Ditzer A, et al. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana*

confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress [J]. Plant, Cell & Environment, 2006, 29(6): 1033-1048.

- [26] Huang Weizao, Ma Xinrong, Wang Qilin, et al. Significant improvement of stress tolerance in tobacco plants by overexpressing a stress-responsive aldehyde dehydrogenase gene from maize (*Zea mays*) [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 68(4/5): 451-463.
- [27] Chen Xinbo, Zeng Qin, Wood A J. The stress-responsive *Torturula ruralis* gene *ALDH21A1* describes a novel eukaryotic aldehyde dehydrogenase protein family [J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159(7): 677-684.
- [28] Kim N H, Hwang B K. Pepper aldehyde dehydrogenase CaALDH1 interacts with *Xanthomonas* effector AvrBsT and promotes effector-triggered cell death and defence responses [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(11): 3367-3380.
- [29] Wen Yinqiang, Wang Xiping, Xiao Shunyun, et al. Ectopic expression of *VpALDH2B4*, a novel aldehyde dehydrogenase gene from Chinese wild grapevine (*Vitis pseudoreticulata*), enhances resistance to mildew pathogens and salt stress in *Arabidopsis* [J]. Planta, 2012, 236(2): 525-539.

(责任编辑: 田 喆)

征订启事

欢迎订阅 2018 年《中国种业》

《中国种业》是由农业部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。

刊物目标定位:以行业导刊的面目出现,并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围:大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等,信息量大,技术实用。

读者对象:各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊,大 16 开,每期 20 元,全年 240 元。国内统一刊号:CN 11-4413/S,国际标准刊号:ISSN 1671-895X,全国各地邮局均可订阅,也可直接汇款至编辑部订阅,挂号需每期另加 3 元。

邮发代号:82-132 地址:(100081)北京市中关村南大街 12 号 中国种业编辑部

电话:010-82105796(编辑部) 010-82105795(广告发行部)

传真:010-82105796 网址:www.chinaseedqks.cn

E-mail:chinaseedqks@163.com

《中国种业》读者群 QQ:289113905

中国种业编辑部 QQ 群:115872093

微信公众号:中国种业编辑部

