文章编号:1674-7054(2012)02-0109-07

葡萄莽草酸激酶基因(VvSK)的克隆与表达分析

张珍珍,肖慧琳,李小溪,潘秋红

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院 葡萄与葡萄酒研究中心 北京 100083)

摘 要: 以"赤霞珠"葡萄(*Vitis vinifera*) 果实为实验材料,采用电子克隆和分子克隆相结合的方法,克隆到莽 草酸激酶基因,命名为*VvSK。VvSK*的 cDNA 编码区全长 906 bp 编码 301 个氨基酸残基。预测该蛋白质相对 分子质量为 33.2×10³ 等电点为 8.6,*VvSK*的 DNA 全长 4 309 bp 包含 10 个外显子和 9 个内含子,定位于 7 号染色体上。*VvSK* 编码的蛋白与其他植物中同类酶在氨基酸水平上的同源性最高达 64.52%。系统进化树 分析显示 *VvSK* 与毛果杨 *SK* 基因亲缘关系较近。荧光实时定量 PCR 分析结果表明,*VvSK* 在葡萄果实、茎、叶 和叶柄组织中均有表达,在不同发育期果实的果皮、果肉和种子中相对表达量存在差异,与 UV-A 和 UV-B 照 射处理相比, UV-C 照射对 *VvSK* 基因表达的诱导效应较明显。

关键词:莽草酸激酶;基因克隆;组织表达;葡萄

中图分类号: Q7 文献标志码: A

莽草酸途径是芳香族氨基酸合成过程中的一段共同代谢途径,葡萄糖经糖酵解和磷酸戊糖途径分别 生成磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖-4-磷酸(E4P),两者在3-脱氧-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸 (DAHP)合成酶的催化下进入莽草酸途径,经过一系列酶促反应合成莽草酸,最终生成酪氨酸、色氨酸、苯 丙氨酸3种芳香族氨基酸。莽草酸途径只存在于高等植物、真菌和细菌中,据估计,绿色植物固定的碳约 有20% 经莽草酸代谢途径,最终形成芳香族氨基酸、维生素、木质素、酚类物质和芳香族类香气物质等^[1]。 这些物质有的可以作为信号分子参与植物发育的调节,有的赋予植物抗紫外线、抗虫害、抗伤害、抗离子 毒害等的能力,有的则是构成植物(如中草药)特有品质的要素或是花果特征香味的主要成分。

莽草酸激酶(Shikimate kinase) 是催化莽草酸途径中的第5步反应酶,需要 ATP 作为辅基,不可逆地 催化莽草酸转化为3-磷酸莽草酸。莽草酸激酶在一些微生物中研究得比较透彻,诸如大肠杆菌^[2]、菊欧 氏杆菌^[3]、构巢曲霉^[4] 酿酒酵母^[5],在高等植物中莽草酸激酶基因仅在高粱、菠菜、水稻、黑绿豆、豌豆^[6] 中被克隆。莽草酸激酶一般包括3个典型区域:核心域、帽子域和莽草酸结合域,其中帽子域和莽草酸结 合域负责催化时的构象变化^[7]。"赤霞珠"是我国主栽的红色酿酒葡萄品种,大多数红色酿酒葡萄品种的 酚类物质都占了其鲜质量的0.3%左右,在所有水果中含量最高。在葡萄酒酿造过程中,这些酚类物质通 过带皮浸渍发酵进入到葡萄酒中,它们不仅决定着葡萄酒酿造工艺的技术路线,还决定了葡萄酒(特别是 红葡萄酒)产品的涩、苦味的优劣和强弱,影响着葡萄酒的色泽、贮藏寿命及生物化学稳定性^[8-9]。此外, 大量研究还证实,葡萄多酚具有极强的抗氧化功能,能够有效地清除体内自由基,具有广泛的抗菌、抗病 毒、抗癌、抗发炎、抗血栓和心血管保护作用^[10-11]。酚类物质的生物合成代谢是莽草酸途径下游的一个 分支,迄今的研究只关注果实多酚生物合成途径(即苯丙烷代谢途径和类黄酮代谢途径),对底物供应链 上游的莽草酸途径尚未见报道。本研究以酿酒葡萄品种"赤霞珠"果实为实验材料,克隆了莽草酸激酶

收稿日期: 2012-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771490,30971980)

作者简介: 张珍珍(1984 -) ,女 新疆昌吉人,中国农业大学食品学院2009级博士生.

通信作者: 潘秋红(1966 –),女,广东饶平人,博士,教授,博士生导师. E-mail: panqh@ cau. edu. cn; Tel: 010 – 62736191.

SK 基因,并对其进行了生物信息分析,研究了该基因在不同组织、不同发育时期和响应紫外处理的表达变化,旨在为进一步探究葡萄果实莽草酸途径的调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验材料取自河北省怀来县中法葡萄酒庄园,于 2009 年分别在盛花后 3,7 9,11,13,17 周采集红色葡萄品种"赤霞珠"(*Vitis vinifera* L. Cabernet Sauvignon)果实,采样时间均在上午 10:00 左右, 根据实验需要 随机采集果实样品,用湿纱布包裹果穗,放进泡沫箱中 2 h内运回实验室。挑选发育期一 致、大小均匀、无机械损伤、无病虫害的果粒,经去离子水洗净晾干。分别选取花后 3,7,11 周的"赤霞珠" 果实约 750 粒用于紫外处理,将花后 7~17 周的"赤霞珠"果实晾干后再将果皮、果肉和种子剥离,分别用 液氮速冻,-80 ℃保存,用于不同发育期基因的表达分析。于盛花期后 9 周采集"赤霞珠"葡萄的果实、叶 子、幼茎以及叶柄,经去离子水洗净晾干后,立即用液氮速冻,-80 ℃保存,用于基因克隆和不同部位基因 的表达分析。

1.2 紫外(UV)照射处理 分别将花后 3 7 ,11 周的"赤霞珠"葡萄果实样品分为 24 份,每份约 30 粒果, 其中 1 份作为对照(不经 UV 处理),其余的分别平铺于同样规格的暗箱中。这些暗箱分别装有 UV→ 灯 (20 W,波长范围 320 ~ 400 nm,发光光谱能量主要集中在 365 nm 处),UV→B 灯(20 W,波长范围 280 ~ 320 nm,发光光谱能量主要集中在 305 nm 处)和 UV→C 灯(20 W,波长范围 200 ~ 275 nm,发光光谱能量主要集 中在 254 nm 处)。暗箱中的葡萄果实与正上方灯管的距离大约 50 cm。打开紫外灯,让葡萄果实分别接 受 19 min 的照射,使之累计照射剂量达到 1 800 J•m⁻²。照射达到相应剂量后立即将果实样品取出,放 在 25 ℃、相对湿度 70%的暗室中,分别暗放置 1 2 4 8 ,12 20 h 后(花后 3 周样品只放置 12 h), - 80 ℃ 液氮冷冻保存备用。

1.3 电子克隆 根据同源基因序列的保守性,分别以拟南芥和水稻的 SK 核苷酸序列为模板,以 BLAST 检索程序检索 PlantGDB 中的 Vitis vinifera ESTs(http://www.plantgdb.org/cgi-bin/blast/PlantGDBblast)数 据库并拼接(PUT) EST 序列 结果发现,在每个比对拼接得到的 cDNA 结果中,得分最高的序列均为同一条拼接 cDNA 序列 因此,将该拼接 cDNA 序列假定为葡萄 SK 的核苷酸序列。

1.4 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 葡萄果实总 RNA 的提取参考本实验室改进的 CTAB 法^[12]进行 用 DNase I 和 BBI 公司 EZ – 10 柱式小量抽提 RNA 纯化试剂盒处理 RNA 提取液除去 DNA 利用核酸 凝胶电泳检测 RNA 的完整性及质量后 取 5 μ L 的 RNA 用逆转录试剂盒(Promega) 合成 cDNA , – 80 ℃下 保存。

1.5 引物设计及 cDNA 克隆 根据上述得到的假定葡萄 *SK*核苷酸序列 ,用 Primer 5.0 引物设计软件在 序列两端设计、合成特异性引物 ,其中正向引物: 5′-ATGGAGGCCAAAATTGCGCT-3′;反向引物: 5′-TTAT-GTTGCAATGTCCATG-3′。 PCR 反应体系为 25 μ L ,包括 *Taq* PCR MasterMix 12.5 μ L ,ddH₂O 10.5 μ L ,cD-NA 1 μ L ,上下引物(20 μ mol·L⁻¹) 各1 μ L。 PCR 反应程序: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s ,54 °C 复 性 30 s ,72 °C 延伸 1 min 循环 35 次 ,最后 72 °C 延伸 10 min。 PCR 产物经琼脂糖电泳分离 ,回收目的片 段 ,并用柱式胶回收试剂盒(北京天根公司生产) 纯化 将该片段连接到 pMD18-T 载体(日本 ,TaKaRa 生 物公司生产)中 ,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 ,在含氨苄(Amp) 琼脂糖平板上筛选白色菌落 ,在得到 的大量克隆片断中 ,挑取阳性克隆片断。用柱式胶回收试剂盒(北京天根生物公司生产) ,送往北京诺赛 公司进行序列测定。

1.6 *VvSK* 基因序列分析 应用 DNAMAN 软件对 *SK* 基因序列进行同源性和进化树分析。在 NCBI 基因组数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/)中对其定位,并获得其全长 DNA 序列信息。

1.7 VvSK 基因在不同组织中和不同发育时期的表达分析 分别提取"赤霞珠"果实(整个果实)、叶、幼 茎和叶柄的总 RNA、不同发育阶段果实的果皮、果肉和种子的总 RNA 以及紫外处理的果实(去籽)的总 RNA 反转录成 cDNA 第一链做模板。用组成型表达 VvUbiquitin (TC32075,TIGR database) 基因作内标, 调整 cDNA 用量和循环数,使内标基因与 VvSK 目标基因的表达效率一致,以调整后的 cDNA 模板量进行

VvSK 基因的扩增。根据 VvSK 的全长基因序列设计 Real-Time PCR,正向引物 5′-CCAGCTTCCTGAGTTCT-GTG-3′;反向引物 5′-TTCCTGGACGGAGAACAGT-3′ 扩增产物大小为 107 bp。 VvUbiquitin 基因:正向引物 5'-GTGGTATATTGAGCCATCCTT-3';反向引物 5'-AACCTCCAATCCAGTCATCTAC-3', 扩增产物大小为 182 bp。采用美国应用生物系统公司(ABI)的7300 Real-Time PCR 仪进行分析。PCR 反应体系 10 μL 其中: 5 μL SYBR[®] Premix Ex Taq^{TM} β.2 μL ROX Reference Dye (50 ×) (TaKaRa, 日本) 4.5 μL ddH₂O 1/6 μL cDNA, 1/3 μL 正反引物混合液 (10 μmol・L⁻¹)。PCR 反应程序: 95 °C 变性 30 s; 94 ℃变性 10 s 60 ℃ 复性延伸 31 s 循环 40 次。

在这部分实验中,每个样品提取2份RNA,每份RNA进行2个重复的PCR分析。即实验结果中呈现 的每个数据点来自 3 ~ 4 个数值的平均值(去除过高或过低的异常值),采用 SPSS 分析软件计算标准 偏差。

1.8 基因表达相对定量分析计算 基因在葡萄植株不同部位和不同发育期的相对表达量采用 2^{-acr}法 计算^[13] 即以 VvUbiquitin 作为内参将目的基因的 C_T 值标准化 , $\Delta C_T = (C_{T, lakased} - C_{T, VeUbquitin})$,计算 VvSK 基因相对于 VvUbiquitin 基因的表达量($2^{-\Delta CT}$)。而对于 3 种 UV 处理对基因相对表达量的影响,采用 2^{-AACT}法 即先计算 VvSK 基因相对于 VvUbiquitin 基因的表达量 然后将未经 UV 处理的对照样品的表达量 归一化,计算出各种 UV 处理样品基因的相对表达量($2^{-(\Delta CT \& D I I - \Delta CT \boxtimes D I I)}$)。

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取 提取葡萄果实总 RNA 并除去 DNA 后 经过核酸凝胶电泳检测发现 28S 和 18S rRNA 条带完整 28S 条带的亮度约为 18S 条带的 2 倍 表明所获得的 RNA 完整性良好 未发生降解。紫外分光 光度计分析显示 OD₂₆₀ / OD₂₈₀ = 1.91 , OD₂₆₀ / OD₂₃₀ = 2.42 , 均大于理论上要求的 OD₂₆₀ / OD₂₈₀ > 1.8 , OD₂₆₀ / OD₂₀₀ > 2.3 表明纯化后的 RNA 未受蛋白质和多糖的污染, RNA 质量较高, 能满足后续反转录实验 的要求。

2.2 VvSK 基因的克隆 PCR 产物经琼脂糖电泳分离 从图1 中可见1 条大 约900 bp 的片段, 与假定序列大小一致。序列测定结果显示其核苷酸序列与 假定的葡萄 SK 核苷酸序列有 100% 一致性 笔者将该基因命名为 VvSK (Vitis vinifera shikimate kinase),将其 cDNA 序列在 GenBank 上登录,登录号为 FJ604859。

2.3 VvSK 基因核苷酸序列分析 以"赤霞珠"葡萄果实 RNA 为模板 , 克隆 得到1条 cDNA 序列 测序结果表明,该序列包含1个 906 bp 的开放阅读框 (ORF) 编码 301 个氨基酸和 1 个终止密码子 TAA。DNAMAN 软件分析显 示 其推测的蛋白质等电点(pl)为8.6 相对分子质量为33190。利用 NCBI-



PCR 产物电泳分析

EST 数据库对 VvSK 基因进行电子表达谱分析 结果发现 ,VvSK 几乎在所有的 图 1 葡萄 VvSK 全长 cDNA 的 葡萄组织包括花、叶、根、果实、芽、茎和卷须中都有表达,而且在不同的发育 时期也有表达。

2.4 VvSK 同源性分析 VvSK 氨基酸的同源性分析表明,该基因的保守性较差, VvSK 与水稻、玉米、番茄 和拟南芥来源的 SK 的同源性仅为 64.52% 57.42% 57.38% A3.88% 。与所有 SK 相似 , VvSK 也包含 2 个高度保守的核酸结合酶的功能域,分别位于109~116 bp 和 176~181 bp(见图 2 中的实线红框) 图 2 中 Walker A 区域是与其他环状核酸的 β - 磷酸基团相结合, Walker B 区域则富含疏水残基^[14] 图中虚线 红框覆盖区域表示假定的莽草酸结合域(135~162 bp) 和帽子结构(21~225 bp)^[15]。

2.5 VvSK 基因 DNA 序列分析 利用 NCBI 葡萄基因组序列搜索比对,该 VvSK 基因位于葡萄的第7号 染色体上 得到的 DNA 序列全长 4 309 bp (图 3),包含了 10 个外显子,总长 906 bp 9 个内含子,总长 3 403 bp.

热带生物学报



实线红框对应与其他核苷酸结合酶识别的类似功能区域,虚线红框表示推测的莽草酸结合域和盖子域。



图 3 *WSK* 基因的 DNA 序列中内含子和外显子分布图 上方数字代表碱基的数量,下方数字表述核苷酸从 5′—3′的排序。

2.6 *VvSK*的进化树分析 根据葡萄 *VvSK* 基因编码的氨基酸序列与已知的 8 条有代表性的植物 *SK* 基因的氨基酸序列 利用 Vector NTI 10.0 分析得出它们的系统进化树(图4)。从图4 可以看出 *,VvSK* 基因与木本的毛果杨 *SK* 基因亲缘关系较近 ,单独聚成1 个亚类 而与其他植物 *SK* 亲缘关系较远。拟南芥 *SK* 基因与番茄 *SK* 基因单独聚成1 个亚类 在进化上亲缘关系较近; 水稻、高粱、玉米、小立碗藓和蓖麻子 *SK* 基因在1 个大类群中 ,说明它们在进化上的亲缘关系较近。笔者前期对葡萄果实莽草酸途径的入口酶 3 – 脱氧 – D – 阿拉伯糖型 – 庚酮糖酸 – 7 – 磷酸合成酶(3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate-7-Phosphate Synthease , DAHPS) 的 2 个同源基因 *VvDAHPS*-1 和 *VvDAHPS*-2 的进化树进行分析 ,结果也显示它们与毛 果杨的亲缘关系较近^[16] 这可能跟葡萄与毛果杨均属木本植物有关。





2.7 葡萄不同组织及不同发育阶段 VvSK 基因的表达分析 从图 5 可以看出, VvSK 基因在"赤霞珠"葡萄的果实、叶片、茎和叶柄中均有表达,在茎中的表达丰度相对较高,在果实和叶柄中的表达丰度相对较低,但表达量差异均不显著;该基因在不同发育期果实的果皮、果肉和种子中也有表达(图 5b),这些结果与生物信息学软件对该基因的电子表达谱预测相符。就果实而言,在发育的果皮和果肉中, VvSK 的相对

V. vinifera

A. thaliana

O. sativa

L. esculentum

Consensus

78

77

80

70





表达量总体表现为先升后降的趋势,花后 13 周表达丰度最大。而在果实种子中, WSK 基因的相对表达 丰度除在花后9周较低外,其他时期差异并不明显;在转色前后(花后7~9周),果皮和果肉中该基因的 表达丰度几乎不变,但在种子中,表达量显著下降。



图 6 紫外照射对"赤霞珠"葡萄果实中 WSK 基因表达的影响

2.8 紫外照射对不同发育期葡萄果实 *VvSK* 基因表达的影响 从图 6 可以看出,葡萄果实中 *VvSK* 的表达受 UV-A 和 UV-B 的影响较小,与对照相比,在 UV 处理后的 12 h内,*VvSK* 的转录丰度呈起伏变化,变化

幅度在 50% 之内。UV-C 照射处理对花后 3 周和 11 周的果实中该基因表达的影响相对较大,花后 3 周的 果实经处理放置 4 h 后,其 *VvSK* 转录丰度为未处理果实的 2.5 倍,花后 11 周的果实经处理放置 8 h 后,其 转录丰度也约为对照的 2.2 倍,但随着处理后暗放置时间的延长,其表达量明显下降。

3 讨 论

通过对克隆到的葡萄 *VvSK* 基因的氨基酸序列进行生物信息学分析 ,发现其也包含 2 个高度保守的 核酸结合酶的功能域(与其他环状核酸的 β – 磷酸基因相结合的 Walker A 区域和富含疏水残基^[14] 的 Walker B 区域) ,因此 ,推测分离到的葡萄 *SK* 基因在葡萄中也具有相似的功能。荧光实时定量 PCR 分析 表明 ,*VvSK* 在葡萄果实、茎、叶和叶柄组织中均有表达 ,在不同发育期果实的果皮、果肉和种子中相对表达 量存在差异 ,葡萄莽草酸途径的其他酶 ,如 DAHPS^[16] 和 5 – 烯醇式丙酮酰莽草酸 – 3 – 磷酸合成酶(5– Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase , EPSPS)^[17] 的基因表达也呈现相似的器官或组织的普遍性 ,这 可能与莽草酸途径在植物代谢网络中的 "枢纽"作用有关 ,植物莽草酸途径的产物参与了植物形态建成、 发育调节、抗逆及特有品质构成等 ,因而决定了该途径在植物各部位的广泛分布。

利用荧光实时定量 PCR 分析紫外照射对不同发育期葡萄果实 *WsK* 基因表达的影响发现,与 UV-A 和 UV-B 照射处理相比,UV-C 照射对 *WsK* 基因表达的诱导效应较明显。这与葡萄果实中莽草酸途径的 入口酶 DAHPS 对紫外的响应明显不同,后者受 UV-A,UV-B 和 UV-C 诱导后转录丰度提高了 20~40 倍^[18] 这说明 UV 对莽草酸途径不同酶基因表达的影响存在较大差异。在水稻中发现有 3 个 *SK* 的同工 酶^[19] 但目前在葡萄中只获得了 1 个基因序列,是否还存在有其他的同工酶,这些同工酶对不同紫外诱导 的响应是否相似,还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] HERRMANN K M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds [J]. Plant Cell, 1995(7): 907-919.
- [2] MILLAR G, LEWENDON A, HUNTER M G, et al. The cloning and expression of the *aroL* gene fromEscherichia coli K12
 [J]. Biochem J, 1986, 237:427 437.
- [3] MINTON N P, WHITEHEAD P J, ATKINSON T, et al. Nucleotide sequence of an Erwinia chrysanthemi gene encoding shikimate kinase [J]. Nucl Acids Res , 1989, 17: 1769.
- [4] CHARLES I J, KEYTE J W, BRAMMAR W J, et al. The isolation and nucleotide sequence of the complex AROM locus of Aspergillus nidulans [J]. Nucl Acids Res, 1986, 14: 2201 – 2213.
- [5] DUNCAN K, EDWARDS R M, COGGINS J R. The pentafunctional arom enzyme of Saccharomyces cerevisiae is a mosaic of monofunctional domains [J]. Biochem J, 1987, 246:375 - 386.
- [6] MOUSDALE D M, COGGINS J R. Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L[J]. Planta, 1985, 163:241 249.
- [7] PEREIRA J H, OLIVEIRA J S, CANDURI F, et al. Structure of shikimate kinase from Mycobacterium tuberculosis reveals the binding of shikimic acid [J]. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr , 2004, 60: 2310 – 2319.
- [8] PELEG H, GACON K, SCHLICH P, et al. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimmers and trimers [J]. J Sci Food Agric, 1999, 79(8): 1123 – 1128.
- [9] VIDAL S, FRANCIS L, GUYOT S, et al. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidinss in wine-like medium [J]. J Sci Food Agric, 2003, 83(6):564 - 573.
- [10] SKERGET M, KOTNIK P, HADOLIN M, et al. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and antioxidant activities [J]. Food Chem, 2005, 89(2): 191-198.
- [11] RASMUSSEN S E, FREDERIKSEN H, KROGHOLM K S. Dietary proanthocyanidins: occurrence dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease [J]. Mol Nutr Food Res, 2005, 49:159 – 174.
- [12] HE F, FANG X X, HU M, et al. Preparation and biological application of antibodies against leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase from grape berry [J]. Vitis, 2009, 48:69-75.
- [13] BOGS J , DOWNEY M O , HARVEY J S , et al. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocya-

nidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves [J]. Plant Physiol , 2005 , 139 (2):652-663.

- [14] WALKER J E, SARASTE M, RUNSWICK M J, et al. Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and acommon nucleotide binding fold [J]. EMBO J, 1982(1): 945-951.
- [15] GU Y, RESHETNIKOVA L, LI Y, et al. Crystal structure of shikimate kinase from Mycobacterium tuberculosis reveals the dynamic role of the LID domain in catalysis [J]. J Mol Biol, 2002, 319:779 – 789.
- [16] ZHANG Z Z , LI X X , ZHU B Q , et al. Molecular characterization and expression analysis on two isogenes encoding 3-deoxyd-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in grapes [J]. Mol Biol Rep , 2011 , 38: 4739 – 4747.
- [17] 张珍珍,李小溪,问亚琴,等. 葡萄5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶基因的克隆及表达分析[G]//国际智能信息技术应用研究学会.2010年国际细胞生物学、生物学、生物工程会议论文集. [出版地不详]:美国 IEEE 出版 社 2010:561-566.
- [18] 初英娜,张珍珍,潘秋红.紫外照射对葡萄果实莽草酸途径相关基因表达的影响[J].植物生理学通讯 2010 46(9): 902-909.
- [19] KOJI K, TAKUYA K, MITSURU A, et al. Identification of three shikimate kinase genes in rice: characterization of their differential expression during panicle development and of the enzymatic activities of the encoded proteins [J]. Planta, 2005, 222:438-447.

Cloning and Expression Analysis of Gene Encoding Shikimate Kinase in Grapes

ZHANG Zhen-zhen , XIAO Hui-lin , LI Xiao-xi , PAN Qiu-hong

(Centre for Viticulture & Enology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: A shikimate kinase gene named *VvSK* was cloned from grape (*Vitis vinifera* L. Cabernet Sauvignon) berries by means of both *in silico* cloning and molecular cloning. The full-length cDNA of *VvSK* contains an open reading frame of 906 bp which encodes a polypeptide of 301 amino acid residues with a molecular mass of 33.2 kD and a pI value of 8.6. The *VvSK* gene from genomic DNA located on the 7th chromosome consists of 4 309 bp , with 10 exons and 9 introns. The sequence homology comparison revealed that the *VvSK* sequence exhibits a high homology (upto 64.52%) at amino acid level with other plant SK proteins from the GenBank. Phylogenetic analysis indicated that the *VvSK* has a close evolutionary relationship with *Populus trichocarpa* SK. The analysis of real-time PCR showed the transcriptional expression of *VvSK* was detected in all the tested tissues including fruit , stem , leaf and petiole. But some differences in transcript abundance were detected in the skin , pulp and seeds at the different fruit development stages. UV-C treatment induced higher expression of *VvSK* in the 3-week and the 11-week berries than other treatments (UV-A and UV-B) .

Key words: shikimate kinase (SK); cloning; gene expression; Vitis vinifera