

坛紫菜 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因 (*Phugp*) 的克隆及表达分析

於辰佳, 张晗晗, 徐燕, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UGPase)是红藻琼胶生物合成过程中的关键限速酶。以坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)转录组测序获得的 unigene 序列为基础, 采用 RACE 技术克隆获得了坛紫菜编码 UGPase 的基因序列: *Phugp*。序列分析结果表明: *Phugp* 基因序列全长 1734 bp, 包含一个 1530 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 510 个氨基酸, 相对分子质量为 56.190 ku, 等电点为 6.24, 具有 UGPase 特有的底物结合位点和红藻 UGPase 保守的 N 端和 C 端多肽结合位点。基因表达水平的定量分析结果表明: 在不同程度的高温和高光胁迫条件下, *Phugp* 基因的表达水平均极显著下调, 而在不同程度的失水胁迫条件下, *Phugp* 基因的表达则呈现为逐渐上调的趋势, 说明 *Phugp* 基因在坛紫菜遭受不同的胁迫条件时呈现为不同的表达模式, 并可能在应答失水胁迫中发挥着应激调节作用。

[关键词] 坛紫菜; UDP-葡萄糖焦磷酸化酶; 克隆; 表达水平定量分析

[中图分类号] S 917

Cloning and Expression Analysis of UDP-Glucose Pyrophosphorylase (UGPase) Gene from *Pyropia haitanensis*

YU Chenjia, ZHANG Hanhan, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian

(Fisheries College, Jimei university, Xiamen 361021, China)

Abstract: UDP-glucose pyrophosphorylase(UGPase), the key enzyme involved in agar biosynthesis of red algae. In this study, based on the unigene sequences obtained via whole transcriptome sequencing of *Pyropia haitanensis*, the full-length of *Phugp* gene was obtained by rapid amplification of cDNA ends(RACE). The full-length cDNA of *Phugp* gene comprised 1734 nucleotides and contained an open reading frame of 1530 bp, encoding a protein of 510 amino acid residues with the predicted molecular weight of 56.190 ku and theoretical isoelectric point of 6.24. The sequence of *PhUGPase* contains specific active sites of UGPase and conserved motifs of N-terminal and C-terminal in red algae UGPase. The expressions of the *Phugp* gene, as measured by real-time quantitative PCR, were significantly downregulated by high-temperature stress and high light stress, but upregulated by desiccation stress. These results suggested that the *Phugp* gene has different expression patterns in different stress and may play important roles in the response to desiccation stress.

Keywords: *Pyropia haitanensis*; UDP-glucose pyrophosphorylase; clone; real-time quantitative PCR

[收稿日期] 2017-03-28

[修回日期] 2017-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(41276177); 福建省自然科学基金项目(2014J07006)

[作者简介] 於辰佳(1990—), 女, 硕士生, 研究方向为坛紫菜遗传育种。通信作者: 谢潮添(1977—), 男, 教授, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn。

0 引言

海藻多糖是由不同的单糖基通过糖苷键(一般为 C1, 3-键和 C1, 4-键)相连形成的一类多组分的混合物,种类繁多,如褐藻中的硫酸化墨角藻多糖和红藻中的琼胶等^[1]。海藻多糖能够阻止细胞磷脂双分子膜由液晶态向固态转变,稳定蛋白质及核酸等高分子物质,从而增强植物细胞对脱水、干旱、高温、冷冻、高渗透压及有毒试剂等逆境条件的抵抗力,因而在大型海藻应对逆境胁迫中发挥着重要作用^[1-4]。

琼胶是红藻细胞壁的重要组成成分,UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UGPase)是红藻琼胶生物合成过程中的限速酶,控制着重要中间产物 UDP-半乳糖的合成^[5]。目前已在大型海藻龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)^[6-7]和麒麟菜(*Eucheuma denticulatum*)^[8]中通过克隆获得了编码 UGPase 的全长基因,李敏等^[6-7]的研究结果还表明低盐胁迫会促进 *Glugp* 基因表达水平上调,并促使龙须菜中琼胶含量增加。而在坛紫菜中,目前尚没有编码 UGPase 基因的相关报导。

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国南方沿海广泛栽培的一种大型经济海藻,其产量占全国紫菜总产量的 70% 以上,经济效益显著^[9-10]。近年来,随着全球气候变暖,白露节气过后的持续高温回暖天气严重影响了福建、浙江沿海坛紫菜壳孢子的采苗和幼苗的附着生长,严重威胁着坛紫菜栽培业的健康发展^[11]。此外,坛紫菜叶状体自然生长于潮间带的中高潮区,该区的光强、温度、水分、盐度以及营养物质等环境因子每天都随潮汐变化而变化,从而对其生长产生剧烈影响^[12]。目前,坛紫菜已成为大型海藻逆境胁迫研究的代表性物种,研究坛紫菜逆境胁迫相关功能基因的克隆和表达分析将使人们更深入地了解坛紫菜对逆境胁迫的应答机制^[13-16],并可为坛紫菜抗逆新品种的选育提供理论依据。因此本研究的目的是要对坛紫菜中海藻多糖琼胶生物合成的关键限速酶 UGPase 的编码基因(*Phugp*)进行全长克隆,并采用实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)对 *Phugp* 基因在不同程度的高温、失水和高光胁迫条件下的表达特征进行定量分析,以分析其在坛紫菜胁迫应答中的作用,为坛紫菜逆境胁迫响应机制的研究提供基础资料。

1 材料方法

1.1 实验材料及胁迫处理

实验供试材料来自经人工杂交选育出的耐高温型品系 Z-61^[17],取自福建省坛紫菜种质资源库。Z-61 叶状体的正常培养温度为 21℃ 左右,光照强度为 50~60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照昼夜周期 12 h: 12 h,每隔 2 d 更换一次过滤的新鲜海水培养液。当叶状体培养至 15 cm 左右,选取生长旺盛期的健康藻体提取总 RNA,并逆转录成 cDNA 后用于 *Phugp* 基因的全长克隆。

高温胁迫处理:选取 1 组 (15±2) cm 的健康完整藻体置于 (29±0.5)℃ 的恒温光照培养箱中分别进行高温胁迫处理(其余培养条件同正常条件)0、3、6、12、24、48 h 后,分别提取其总 RNA,用于高温胁迫条件下基因表达水平的实时荧光定量 PCR(qPCR)分析^[18]。

失水胁迫处理:选取 1 组 (15±2) cm 的健康完整藻体用纱布轻压吸干藻体表面水分后,置于干燥纱布上,放置于 21℃,光照强度 50~60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的干燥箱内干燥失水。分别取失水率为 0%、15%、30%、45%、60%、75% 及 90% 的样品,和干燥失水(失水率为 90%)后再浸泡于新鲜海水中复水(培养 30 min)的样品,分别提取这些样品的总 RNA,用于失水胁迫条件下基因表达水平的实时荧光定量 PCR(qPCR)分析。失水率计算公式为:失水率(%)=(鲜重-失水后藻体重)/(鲜重-干重)×100%。

高光胁迫处理:选取 1 组 (15±2) cm 的健康完整藻体,在正常培养温度(21℃)下,分别置于光强为 50、200、500、1000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 下照射处理 1 h,以及 1000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 下照射处理 3、6 h,之后分别取样,提取其总 RNA,用于高光胁迫条件下基因表达水平的实时荧光定量 PCR(qPCR)分析^[19]。

1.2 引物及其序列

本研究中 *Phugp* 基因的克隆、验证、阳性菌落筛选及基因表达水平定量分析所采用的引物序列如表 1 所示, 由大连宝生物工程有限公司合成。

表 1 实验中所用引物的名称和序列
Tab.1 Primer names and sequence in this experiment

用途 Purpose	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence(5' – 3')
全长克隆 RACE	RUPM – 5'	CGAGGTGCCGAGACCACCATTTCAGC
	RNUP – 5'	GTTGTTGTGGCGGCTCATCTTCTCAG
	RUPM – 3'	AGGGGCTTCCTCAACCTGTATGG
	RNUP – 3'	GTCATTGAGGTGCACAACGACTCGAC
全长验证	HT – F	ACGCCGGCCCGTGTC
Head to toe	HT – R	CGCCATCAATGCCACGTG
荧光定量 PCR	qF	CACACTGCTCGCACAAGGAAA
qPCR	qR	CTCCAGGTACTGCTTGGGCAC
内参基因	UBCF	TCACAACGAGGATTTACCACC
Internal control	UBCR	GAGGAGCACCTTGGAAACG
阳性克隆筛选	RV – M	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
Validate of positive clone	M13 – F	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT

1.3 *Phugp* 基因的全长克隆及验证

根据坛紫菜转录组数据库中 unigene 基因的注释结果, 选取注释结果为 UDP – 葡萄糖焦磷酸化酶基因的 unigene 156718 作为 *Phugp* 基因全长克隆的核心序列。根据选取的核心序列设计 5' 和 3' RACE 扩增的特异性引物 (见表 1), 按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书进行 *Phugp* 基因的 5' 和 3' RACE 扩增。并对目的片段进行回收。随后以 cDNA 作为模板, 采用全长验证引物 (见表 1), 参照普通 PCR 体系进行全长基因克隆验证。

1.4 *Phugp* 基因的生物信息学分析

开放阅读框预测: ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>);
序列的同源性检测: NCBI Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>);
理化分析: ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>);
保守位点分析: InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>);
三级结构预测: SWISS – MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>);
氨基酸多重序列比对: Clustal X 软件^[20];
构建系统进化树: MEGA 6.06 软件^[21], 最大似然法 (Maximum Likelihood, ML)。

1.5 *Phugp* 基因在逆境胁迫下表达水平的 qPCR 分析

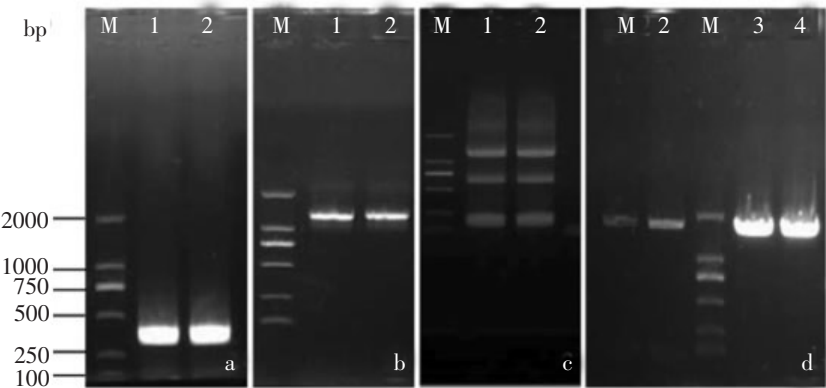
提取不同梯度不同胁迫处理方式的坛紫菜样品的总 RNA, 参照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (Takara) 说明书完成定量模板的合成。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 说明书配置定量 PCR 反应体系。反应在 ABI7300 型荧光定量 PCR 仪上进行, 每个处理梯度设置 3 个生物学重复和 2 个技术重复。

2 结果

2.1 坛紫菜 *Phugp* 基因的全长克隆、验证及序列分析

以坛紫菜 Unigene15618 序列作为核心序列, 设计特异性引物, 分别进行 *Phugp* 基因的 5' RACE 和 3' RACE 扩增及测序, 获得 1 条长度为 343 bp 的 5' – 末端序列 (见图 1a) 和 1 条长度为 604 bp 的 3'

- 末端序列（见图 1b）。根据 2 条末端序列与中间片段的重叠区进行序列拼接，得到 1 条长度为 1734 bp 的全长序列，经 blast 比对，确定其为坛紫菜的 *ugp* 基因，命名为 *Phugp*，其编码的蛋白质命名为 *PhUGPase*。进一步采用全长验证引物，分别以 cDNA（见图 1c）和 gDNA（见图 1d）为模板进行 *Phugp* 基因的全长验证，测序后发现 2 条扩增序列与拼接的 *Phugp* 基因序列完全一致。



说明：a—*Phugp* 基因的 5'-RACE 扩增产物；b—*Phugp* 基因的 3'-RACE 扩增产物；c—以 cDNA 为模板的 *Phugp* 基因全长扩增产物（箭头）；d—以 gDNA 为模板的 *Phugp* 基因全长扩增产物；M—DL 2000 PNA Marker。

Notes：a—5'-RACE products of *Phugp*；b—3'-RACE products of *Phugp*；c—Full-length amplification products of *Phugp* based on cDNA (arrow)；d—Full-length amplification products of *Phugp* based on gDNA；M—DL2000 DNA Marke.

图 1 坛紫菜 *Phugp* 基因的全长克隆及验证电泳图

Fig.1 Agarose electrophoresis of RACE and full-length amplification products of *Phugp* gene

通过 ORF Finder 软件分析发现，该基因序列含 197 ~ 1727 个碱基的完整开放阅读框（open reading frame, ORF），可编码包含 510 个氨基酸、相对分子质量为 56. 190 ku、等电点为 6. 24 的蛋白质。该蛋白质正电荷氨基酸（Arg + Lys）残基总数为 54，负电荷氨基酸（Asp + Glu）残基总数为 58，不稳定系数为 28. 74，脂肪系数为 92. 43，总平均疏水度为 -0. 170，表明 *PhUGPase* 比较不稳定，亲水性较强。通过 PredictProtein 程序预测 *PhUGPase* 的二级结构中构成螺旋（H）、片层（E）和环状（L）的氨基酸残基占总氨基酸比例分别为 29. 41%、22. 94% 和 47. 65%。利用在线软件 Swiss-Model 对 *PhUGPase* 氨基酸序列的三级结构进行预测，结果如图 2 所示。

2. 2 *PhUGPase* 的多重序列比对

本研究选取了脆江蓠（*Gracilaria chouae*）、麒麟菜（*E. denticulatum*）和落叶松（*Larix gmelinii*）的 UGPase 的氨基酸序列和 *PhUGPase* 进行多重序列比对分析，结果显示 *PhUGPase* 为典型的 UGPase，与其他 3 条序列高度相似，且具有 UGPase 特有的 N 端和 C 端保守的多肽结合区域和催化活性位点（见图 3）。

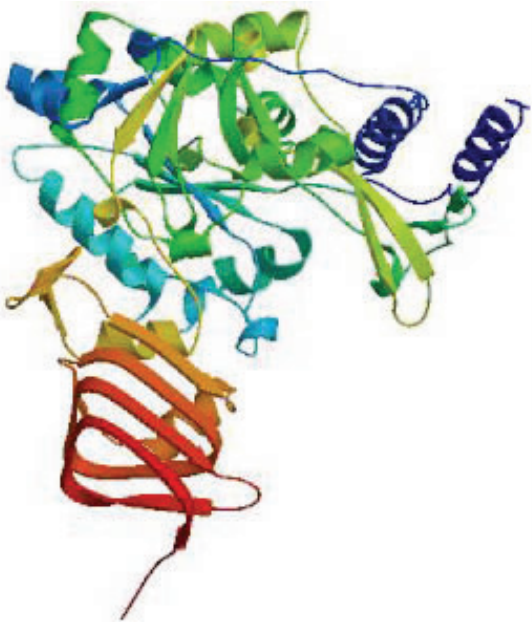
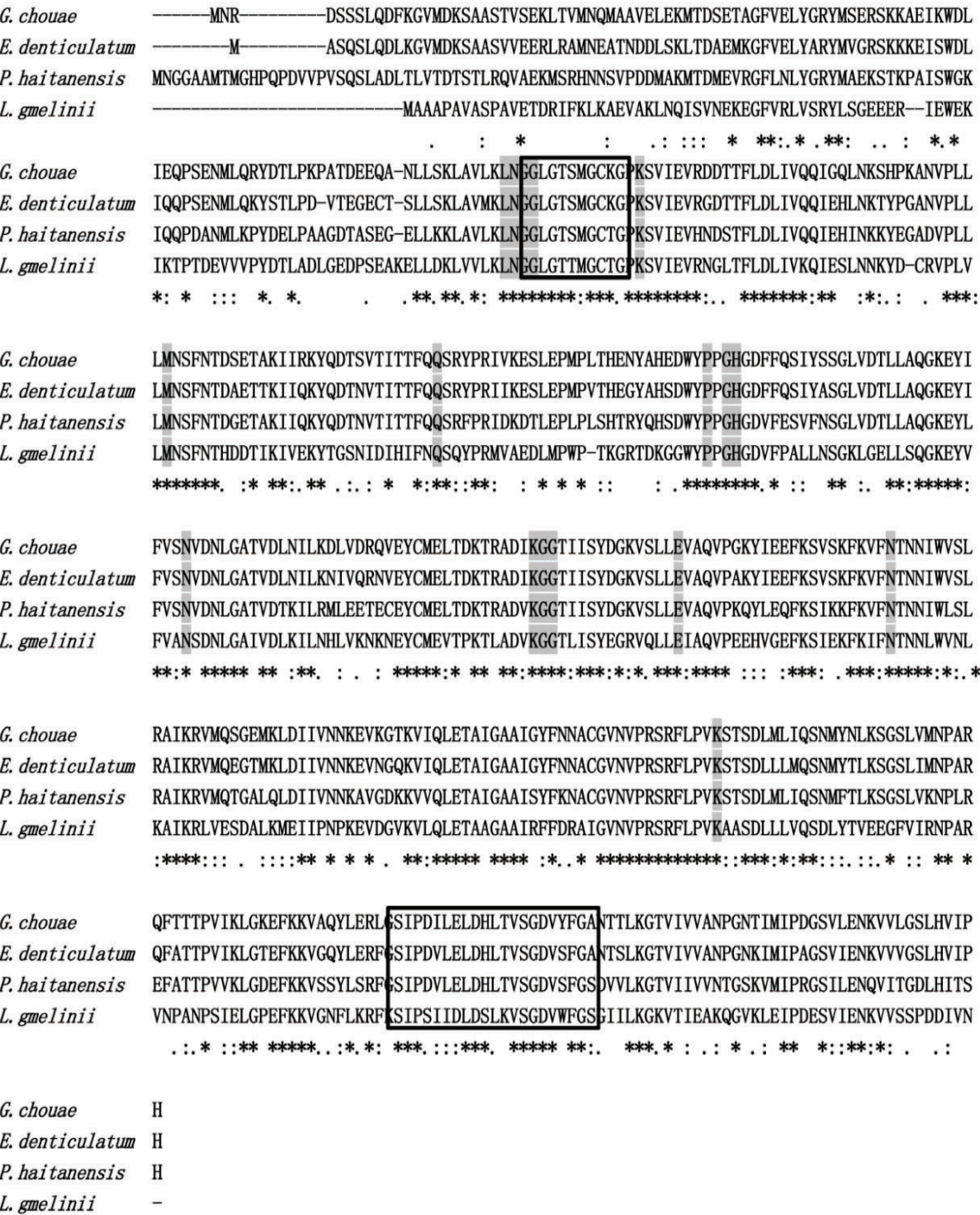


图 2 *PhUGPase* 的三级结构预测图

Fig.2 The three-dimensional structure of deduced UGP protein of *P.haitanensis*



说明:阴影部分为 UGPase 活性位点;黑色方框分别为 UGPase N 端和 C 端保守的多肽结合区域;“*”和“:”分别表示一致性和相似性的氨基酸残基。

Notes: Active sites are indicated with gray background;black boxes are nucleotide-binding loops of N-terminal and C-terminal; asterisks (*) and colons (:) indicate identical and similar amino acid residues, respectively.

图 3 *PhUGPase* 氨基酸序列的多重序列比对

Fig.3 Multi-alignment of amino acid sequence of *PhUGPase*

2.3 *PhUGPase* 的系统进化分析

为进一步了解 *PhUGPase* 的系统进化关系，选取 GenBank 数据库中公布的藻类和高等植物的 UGPase 的氨基酸序列，并整合本研究所克隆的 *Phugp* 基因所编码的氨基酸序列，通过 MEGA 6.06 软件采用最大似然法（maximum likelihood, ML）构建了系统进化树。结果（见图 4）显示：UGPase 的系统进化树分为明显的两支，藻类 UGPase 和高等植物 UGPase 分别聚为一支；*PhUGPase* 与高等植物 UGPase 亲缘关系较远，与红藻纲中的脆江蓼和麒麟菜聚为一小分支。由此结果进一步说明 *PhUGPase* 是典型的红藻 UGPase。

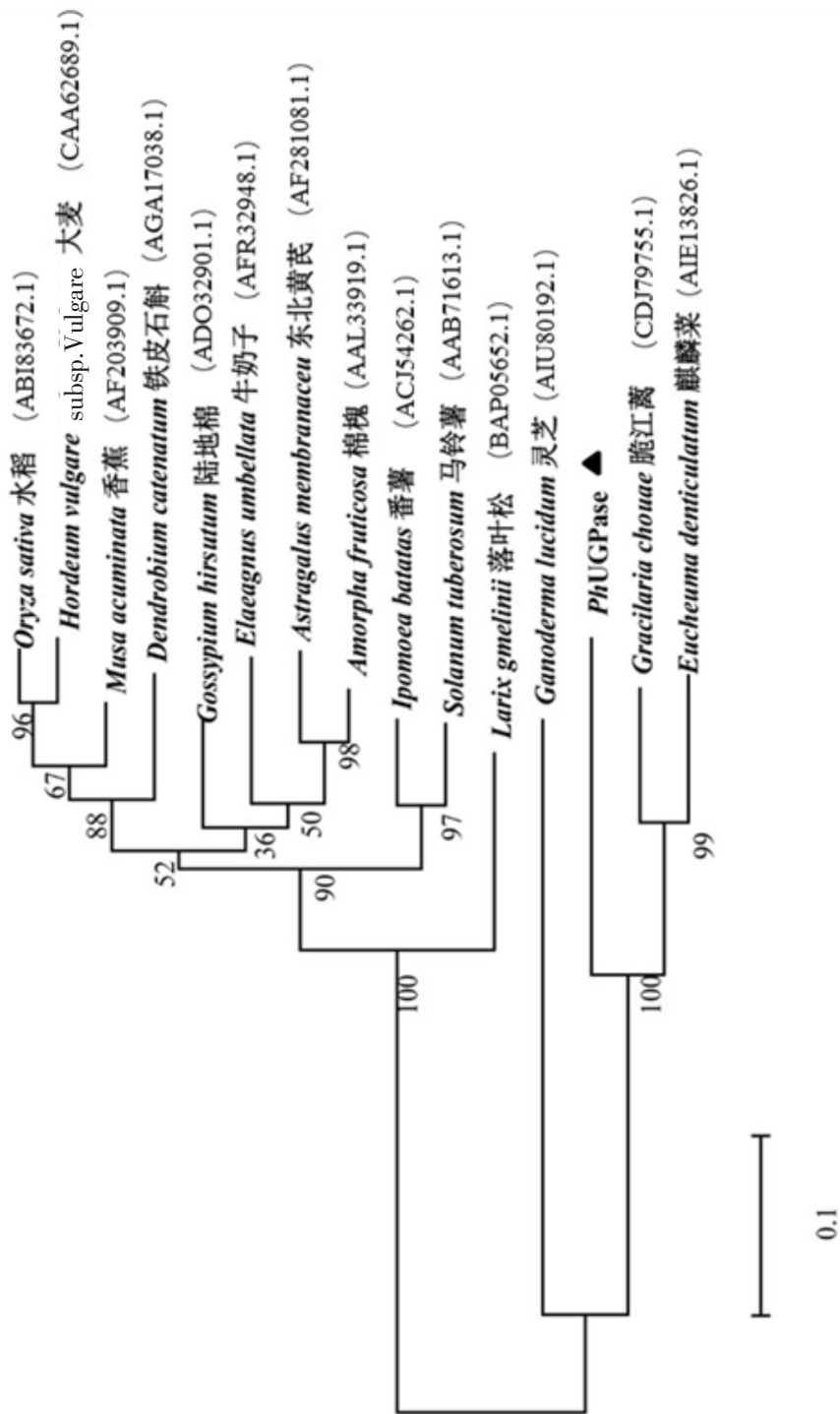
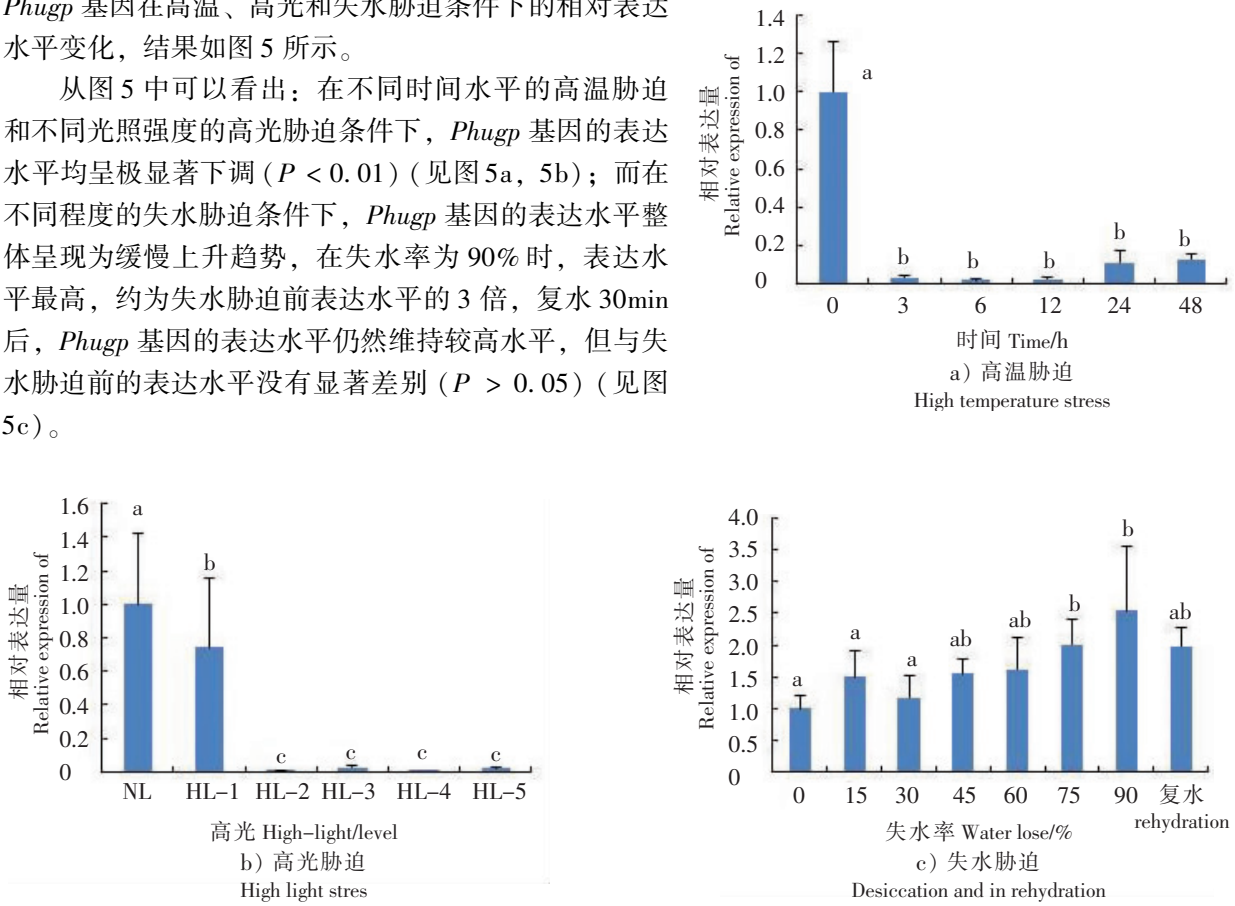


图 4 基于氨基酸序列构建 UGPase 系统进化树
Fig.4 Phylogenetic tree constructed based on the amino acid sequences of UGPase

2.4 逆境胁迫下 *Phugp* 基因的表达定量分析

基因表达水平的定量分析是研究逆境胁迫下基因功能的前提, 本研究采用 qPCR 技术分析了 *Phugp* 基因在高温、高光和失水胁迫条件下的相对表达水平变化, 结果如图 5 所示。

从图 5 中可以看出: 在不同时间水平的高温胁迫和不同光照强度的高光胁迫条件下, *Phugp* 基因的表达水平均呈极显著下调 ($P < 0.01$) (见图 5a, 5b); 而在不同程度的失水胁迫条件下, *Phugp* 基因的表达水平整体呈现为缓慢上升趋势, 在失水率为 90% 时, 表达水平最高, 约为失水胁迫前表达水平的 3 倍, 复水 30min 后, *Phugp* 基因的表达水平仍然维持较高水平, 但与失水胁迫前的表达水平没有显著差别 ($P > 0.05$) (见图 5c)。



说明:不具有相同上标字母的数据间差异显著($P<0.05$)。

Note: Bar of each column with different small letters mean significant different ($P<0.05$).

图 5 不同胁迫条件下 *Phugp* 基因的相对表达水平

Fig.5 The relative expression levels of *Phugp* gene under different stress

3 讨论

UGPase 是海藻多糖琼胶生物合成的关键限速酶^[6-7], 它以 UTP 和葡萄糖-1-磷酸为底物催化合成 UDP-葡萄糖, 而后由半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (GALT) 催化 UDP-葡萄糖和半乳糖-1-磷酸合成 UDP-半乳糖, 使葡萄糖成功转化为能够直接参与琼胶合成的半乳糖^[22]。目前, 已在多种植物中成功克隆获得了编码 UGPase 的全长基因, 如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[23]、棉花 (*Gossypium hirsutum*)^[24]、水稻 (*Oryza sativa*)^[25]、大麦 (*Hordeum vulgare* subsp. *Vulgare*)^[26]等, 在红藻中也有相关研究, 如在龙须菜^[6-7,27], 麒麟菜^[8], 细江蓼 (*Gracilaria gracilis*)^[28] 中均已成功克隆了编码 UGPase 的全长基因。

已有研究结果认为红藻 UGPase 除应具备特有的底物结合位点外, 还应具有分别以 GGL-GTSMGCKG 和 GSIPI (V/I) LELDHLTVSGDVSG (A/S) 序列为特征的 N 端和 C 端的两个保守的多肽结合位点^[8]。本研究克隆获得的 *Phugp* 基因, 经多序列比对发现, *PhUGPase* 与其他物种的相似性较高, 具有 UGPase 特有的底物结合位点, 并且具有上述红藻 UGPase 的 N 端和 C 端两个保守多肽结合区域; 系统进化树分析结果表明 *PhUGPase* 与红藻的脆江蓼和麒麟菜聚为一支, 由此可以确定所克隆的 *Phugp* 基因是坛紫菜的 *ugp* 基因。

在已有文献中,关于 *ugp* 基因在逆境胁迫下表达水平变化的报导不多。Chang 等^[25]在龙须菜中的研究发现,在低盐胁迫下龙须菜琼胶合成相关基因 *Glugp* 的表达水平显著上调;叶冰莹等^[29]的研究发现甘蔗 (*Saccharum officinarum*) 叶片经蔗糖、光照、低温胁迫处理后, *ugp* 的表达水平也显著上调。本研究发现在不同程度的高温和高光胁迫条件下, *Phugp* 基因的表达水平都呈现出显著下调的趋势,说明 *Phugp* 基因在高温和高光胁迫条件下的表达受到了抑制,由此可能进一步抑制坛紫菜琼胶的合成,由此认为坛紫菜在高温应答和高光胁迫时可能通过抑制物质的代谢合成来减少逆境胁迫条件对机体的损伤;而在失水胁迫条件下, *Phugp* 基因的表达则呈现为逐渐上调的趋势,并在复水后迅速下调,复水后与失水胁迫前的表达水平没有显著差别,说明 *Phugp* 基因能积极响应失水胁迫,上调其表达水平,并由此可能上调琼胶的合成水平,以增强海藻细胞对失水逆境条件的抵抗力。

综上所述,坛紫菜在应答不同的逆境胁迫条件时, *Phugp* 基因会呈现出不同的表达模式,以响应不同的胁迫过程。

[参 考 文 献]

- [1] 洪泽淳,方晓弟,赵文红,等. 海藻多糖的研究进展 [J]. 农产品加工: 学刊, 2012(8): 93-97.
- [2] SCHEPETKIN I A, QUINN M T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential [J]. International Immunopharmacology, 2006, 6(6): 317-333.
- [3] LEUNG M, LIU C, KOON J C, et al. Polysaccharide biological response modifiers [J]. Immunology Letters, 2006, 105(2): 101-114.
- [4] PILLAI T G, NAIR C K K, JANARDHANAN K K. Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in southern parts of India, protects radiation induced damages both *in vitro* and *in vivo* [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2008, 26: 80-85.
- [5] GOULARD F, DIOUDS M, QUERE G, et al. Salinity effects on NDP-sugars, floridoside, starch, and carrageenan yield, and UDP-glucose-pyrophosphorylase and -epimerase activities of cultivated *Solieria chordalis* [J]. Plant Physiology, 2001, 158: 1387-1394.
- [6] 李敏. 龙须菜半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶基因的克隆和分析及其表达与琼胶合成的相关性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [7] 张杨. 龙须菜琼胶合成相关基因的克隆及其表达调控的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [8] CHI S, FENG Y J, LIU T. Molecular cloning, characterization, and comparison of UDP-glucose pyrophosphorylase from *Gracilaria chouae* and *Saccharina japonica* [J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 28(3): 1-9.
- [9] 李晓川. 我国紫菜产业发展, 标准状况及安全性评价 [J]. 中国渔业质量与标准, 2012, 1(3): 9-12.
- [10] XIE C T, CHEN C S, XU Y, et al. Construction of a genetic linkage map for *Porphyra haitanensis* (bangiales, rhodophyta) based on sequence-related amplified polymorphism and simple sequence repeat markers [J]. Journal of Phycology, 2010, 46(4): 780-787.
- [11] 张元, 谢潮添, 陈昌生, 等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应 [J]. 水产学报, 2011, 35(3): 379-386.
- [12] BLOUIN N A, BRODIE J A, GROSSMAN A C, et al. *Porphyra*: a marine crop shaped by stress [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(1): 29-37.
- [13] 仵燕青, 肖海东, 许凯, 等. 坛紫菜过氧化氢酶基因的克隆及表达特征 [J]. 水产学报, 2016, 40(10): 1576-1585.
- [14] 曲玲, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜细胞质型果糖 1, 6-二磷酸酶基因的克隆及表达分析 [J]. 应用海洋学学报, 2015, 34(3): 402-410.
- [15] 史健志, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜 6-磷酸海藻糖合成酶 (TPS) 家族基因的克隆及表达特征分析 [J]. 水产学报, 2015, 39(4): 485-495.
- [16] 陈玉婷, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜两种小分子热激蛋白 (sHSP) 基因的克隆及表达特征分析 [J]. 水产学报, 2015, 39(2): 182-192.
- [17] 陈昌生, 纪德华, 谢潮添, 等. 坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究 [J]. 海洋学报 (中文版), 2008, 30(5): 100-106.

- [18] 张晗晗, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜谷胱甘肽过氧化物酶基因的克隆及表达特征 [J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 791-799.
- [19] 陈陆丹, 许凯, 徐燕, 等. 坛紫菜应答高光强胁迫的生理指标分析 [J]. 应用海洋学学报, 2016, 35 (3): 399-404.
- [20] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [21] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [22] BARRETO M, JEDLICKI E, HOLMES D S. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 2902-2909.
- [23] MENG M, WILCZYNSKA M, KLECZKOWSKI L A. Molecular and kinetic characterization of two UDP-glucose pyrophosphorylases, products of distinct genes, from *Arabidopsis* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Proteins and Proteomics, 2008, 1784(6): 967-972.
- [24] WANG Q, ZHANG X, LI F, et al. Identification of a UDP-glucose pyrophosphorylase from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) involved in cellulose biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(7): 1303-1312.
- [25] ABE T, NIIYAMA H, SASAHARA T. Cloning of cDNA for UDP-glucose pyrophosphorylase and the expression of mRNA in rice endosperm [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105(2-3): 216-221.
- [26] ELLING L, KULA M R. Purification of UDP-glucose pyrophosphorylase from germinated barley (malt) [J]. Journal of Biotechnology, 1994, 34(2): 157-163.
- [27] CHANG L, SUI Z, FU F, et al. Relationship between gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase and agar yield in *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(6): 2435-2441.
- [28] LLUISMA A O, RAGAN M A. Characterization of the UDP-glucose pyrophosphorylase gene from the marine red alga *Gracilaria gracilis* [J]. Journal of Applied Phycology, 1998, 10(6): 581-588.
- [29] 叶冰莹, 叶世超, 薛婷, 等. 蔗糖, 光照和温度对甘蔗 UGPase 调控影响的研究 [J]. 福建师范大学学报 (自然科学版), 2013, 29(6): 120-124, 130.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)