林业科学研究 2014,27(1):120～127
Forest Research

文章编号:1001-1498(2014)01-0120-08

赤桉 *GAPDH* 家族基因的克隆及其序列分析

陈鸿鹏[1], 朱凤云[2], 吴志华[1], 谢耀坚[1*]

(1. 国家林业局桉树研究开发中心,广东 湛江 524022; 2. 黄淮学院生物工程系,河南 驻马店 463000)

关键词:赤桉;*GAPDH*;家族基因;克隆;序列分析

中图分类号:Q753;S722.3+3 **文献标识码**:A

Cloning and Sequence Analysis of *GAPDH* Family Genes from *Eucalyptus camaldulensis*

CHEN Hong-peng[1], *ZHU Feng-yun*[2], *WU Zhi-hua*[1], *XIE Yao-jian*[1]

(1. China Eucalypt Research Centre, Zhanjiang 524022, Guangdong, China;
2. Department of Agronomy-Forestry Science, Huanghuai University, Zhumadian 463000, He'nan, China)

Abstract: GAPDH is a typical structural protein in eukaryote organism, which plays an important role involved in the biosynthesis of cell composition and the expression of genetic information. In order to reveal the biological function of *GAPDH* in the growth and development of *Eucalyptus*, 3 genes were obtained and named as *EC-GAP*1, *EC-GAP*2 *and EC-GAP*3 by amplification with primers for *GAPDH* genes conserved regions and RACE method from the young leaf of *Eucalyptus camaldulensis*. The bioinformatics analysis suggested that the proteins encoded by corresponding genes owned the typical conserved domains of GAPDH and showed high homology with those of other plant species.

Key words: *Eucalyptus camaldulensis*; *GAPDH*; family genes; cloning; sequence analysis

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)是高等植物糖酵解和糖异生反应中的关键酶,是维持生命活动能量形成的最基本酶之一,它氧化甘油醛-3-磷酸生成1,3-二磷酸甘油酸,由此为糖酵解过程提供产生ATP的底物[1-4]。此外,由于该酶基因为管家基因,几乎在所有组织中都高水平表达,在同种细胞或组织中的蛋白质表达量较为恒定,故被广泛用作实时荧光定量PCR的内参基因[5-9]。近年来,随着研究的不断深入,发现GAPDH还参与胚胎的特化、细胞融合、微管结束、磷酸转移酶激活、DNA复制与修复等过程,并调控组蛋白基因的表达、调节端粒结构,具有核膜融合和微管成束的活性[10-14]。同时,GAPDH的mRNA和蛋白质水平会受到各种环境因素的影响,并具有不同的亚细胞定位以及多元化的生理功能[15-16]。

赤桉(*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.)是桃金娘科(Myrtaceae)桉树属(Eucalypts L' Hérit.)的一个树种,具有生长快,适应性强,喜光,耐高温、干旱、耐碱等特性,因此,在桉树的育种与栽培等领域有着广泛的应用[17-18]。GAPDH作为一种重要的代谢调节酶,对植物的生理代谢和抗逆性极为重要[19]。因此,为了了解*GAPDH*基因的特点对赤桉生长的影

收稿日期: 2013-07-02

基金项目: 湛江市科技计划项目(2013A03016);林业重大公益性行业专项(201104003);广东省自然科学基金项目(9145624536-4000003)

作者简介: 陈鸿鹏(1979—),男,博士,助理研究员. 研究方向:林业生物技术和植物资源应用. 电话:0759-3382163. E-mail:chenhogn-peng007@126.com

* 通讯作者:E-mail:xieyj@21cn.com

响,本研究采用 RACE 和 RT-PCR 方法克隆了赤桉中的 *GAPDH* 家族的 3 条基因,并利用生物信息学方法对这些基因进行了分析。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*植物材料*　本研究所用的赤桉幼苗栽种于国家林业局桉树研究开发中心国家南方种苗基地,将赤桉的嫩叶采摘后,立即于液氮中保存备用。

1.1.2　*主要试剂*　感受态细胞大肠杆菌 DH5α、dNTPs、DNase、DNA 凝胶回收试剂盒等购自 Ambio 公司;cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo 公司;Primestar 高保真酶购自 Takara 公司;100 bp plus DNA Ladder、DNase、Total RNA Purification System、5' RACE 以及 3' RACE 试剂盒等购自 Invitrogen 公司;pEASY-Blunt Simple 载体购自北京全式金公司;其它生化试剂和常规试剂如 DEPC、H_2O、Tris、EDTA、无水乙醇、EB、巯基乙醇等均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司[20]。

1.1.3　*生物信息学软件以及网上资源*　生物信息学软件为 Gendoc、Chromas、Vector NTI 11.0、GeneTree、Anthprot 5.0、VMD 1.8.5、MEGA 4.1、Clustal X 2.0 以及 Primer Premier 5.0 等,网上资源为 GenBank、SoftBerry、ExPASy-ProtParam tool 及 Swissmodel 等。

1.2　研究方法

1.2.1　*赤桉叶片总 RNA 提取与 cDNA 转录*　将液氮保存的赤桉嫩叶迅速取出,在液氮中研磨成粉末状,参照 Invitrogen 公司提供的试剂盒进行总 RNA 的提取,电泳检测,之后用相应的试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA、5' RACE cDNA 和 3' RACE cDNA,保存于 −20 ℃备用[20]。

1.2.2　*GAP 基因保守区片段的克隆*　GAPDH 蛋白是一种在进化上比较保守的蛋白,尤其是功能性区域,通过对 NCBI 数据库中 GAPDH 蛋白的序列分析和比对,发现 GAPDH 蛋白最保守区的序列为:KIGINGFGRIGRLV、WYDNEWGYS,由此设计了如下引物进行保守区的扩增:

EC-GAP F1:5'-GATGTCGAGCTCGTCGCCGTCAACGA-3'

EC-GAP R1:5'-CACCTCTCCAGTCCTTCATCGA-3'

以赤桉嫩叶 cDNA 为模板,选用 EC-GAP F1& EC-GAP R1 引物进行 PCR 扩增。50 μL 的 PCR 反应体系为:0.5 μL Prime-star 聚合酶 (5 U · μL^{-1}),5.0 μL 10 × PCR buffer(with Mg^{2+}),4.0 μL dNTPs (各 2.5 mmol · L^{-1},2.0 μL cDNA,1.0 μL EC-GAP F1 (10 μmol · L^{-1}),1.0 μL EC-GAP R1 (10 μmol · L^{-1}),31.5 μL ddH_2O。PCR 扩增条件:98 ℃预变性 5 min;98 ℃变性 10 s,62 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,5 个循环;98 ℃变性 10 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,5 个循环;98 ℃变性 10 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,25 个循环;72 ℃继续延伸 5 min;4 ℃保温。反应结束后,对产物进行回收、克隆和测序[20]。

1.2.3　*GAP 基因 RACE 片段的克隆*　通过对获得的基因片段进行克隆测序,利用 Primer Premier 6.0 分别设计了 *EC-GAP* 基因的 5' RACE 和 3' RACE 引物(表 1),由上海博尚生物公司通过 PAGE 方式进行合成和纯化。

表 1　*EC-GAP* 基因的 RACE 特异引物

引物	基因	编号	序列
5' RACE	*EC-GAP* 1	5GSP 1	5'-GGTATGGGACCAAGTTGGTCTGGA-3'
		5GSP 2	5'-GACATTCTCCAAGAAGGCGTCTTCA-3'
	EC-GAP 2	5GSP 3	5'-GTGATGTGCTTTCTCGGCTGAGATGA-3'
		5GSP 4	5'-CCGCCTCCGACAGAGTTAAAGACA-3'
	EC-GAP 3	5GSP 5	5'-GTGAGGCAGTGAGGGATGAGATAACCT-3'
		5GSP 6	5'-GGATTCTGTCCAAGCAGAGATCCA-3'
3' RACE	*EC-GAP* 1	3GSP 1	5'-GATGTTGCTGTGCTTCTGGACAATGA-3'
		3GSP 2	5'-GAACGCAGCTGTGGCAACCATCA-3'
	EC-GAP 2	3GSP 3	5'-GAAGCCATCTATGACATCTGCCGAAGA-3'
		3GSP 4	5'-CAAACGGACTATCCAATTTGTTGA-3'
	EC-GAP 3	3GSP 5	5'-GTTATCTCATCCCTCACTGCCTCACTGA-3'
		3GSP 6	5'-CAAGGTGCAGAGAGCTGTGTGCA-3'

同理,以赤桉嫩叶5'RACE cDNA为模板,选用5'RACE引物与UPM为引物进行PCR扩增,反应体系同1.2.2节,用UPM& 5GSP 1/3/5代替EC-GAP F1& EC-GAP R1进行扩增。此后继续用5GSP 2/4/6做巢式PCR以提高产物纯度。

3'RACE反应与5'RACE类似,以3'RACE cDNA为模板,反应体系同1.2.2节,用AUAP、3GSP 1/3/5、3GSP 2/4/6分别代替UPM、5GSP 1/3/5、5GSP 2/4/6进行巢式PCR扩增。PCR扩增条件:98 ℃预变性5 min;98 ℃变性10 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,35个循环;72 ℃继续延伸5 min;4 ℃保温[20]。

对RACE产物分别进行回收、克隆和测序。

1.2.4 *EC-GAP*基因及蛋白质的序列特征分析 对*EC-GAP*基因保守片段、5'RACE产物和3'RACE产物进行测序,将相关的序列进行拼接和校对后,获得了*EC-GAP*基因的全长cDNA,通过网上资源和生物信息学软件对基因的ORF、功能及其他特性进行分析和预测。

2 结果与分析

2.1 赤桉嫩叶总RNA的提取质量

取3 μL的RNA样品进行电泳检测,电泳结束后在凝胶成像系统中观察总RNA的提取质量。由图1看出:电泳条带清晰整齐,28S条带的亮度约为18S的2倍,具有较高的纯度和完整性,所提取的赤桉叶片总RNA效果较好,可用于后续的cDNA反转录试验。

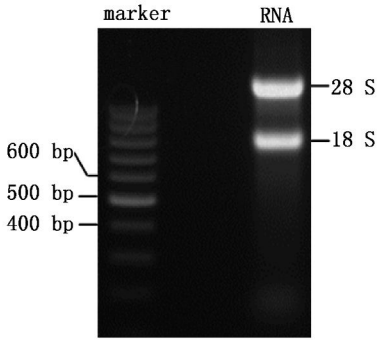


图1 总RNA的电泳检测结果

2.2 *EC-GAP*基因片段的分离

以反转录的cDNA为模板,使用EC-GAP F1& EC-GAP R1引物组合进行PCR扩增,得到1条约900 bp的片段。将此基因片段进行克隆和测序获得序列信息,经由Vector NTI 11.0和NCBI Blast上进行比对分析后,确认此序列片段是3种*GAP*基因的保守区部分片段,其中,2种长度一致,另外1种比前二者少了129 bp的编码区。电泳图中目的条带为1条主带,实际在主带下面还有一些微弱的条带出现,因此,经过克隆和测序后,会有3种*GAP*基因的序列信息(图2)。

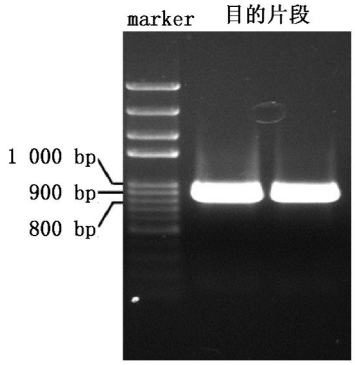
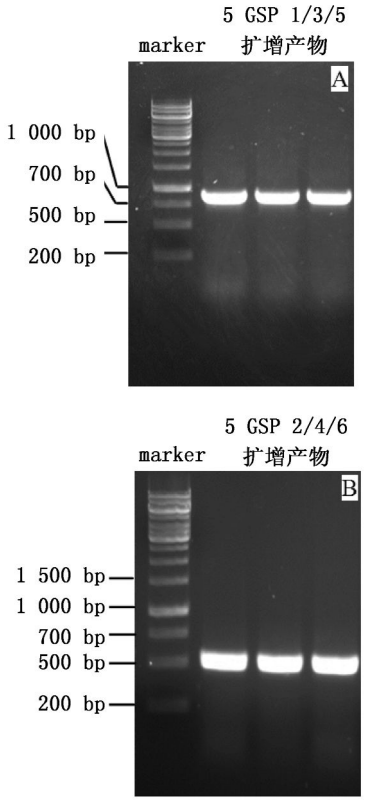


图2 *EC-GAP*基因保守片段的扩增结果

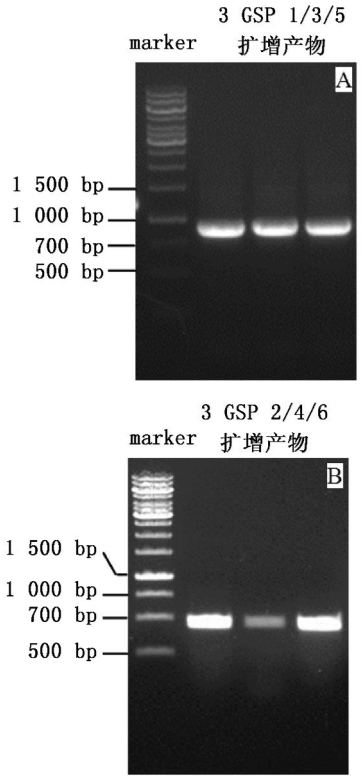
在以5'RACE cDNA为模板,5'RACE引物与UPM为引物进行2轮巢氏PCR扩增后,在1.2%的琼脂糖凝胶中进行电泳检测,获得大小分别为850、500 bp左右的清晰DNA条带(图3)。此外,3'RACE PCR扩增后,电泳也获得了830 bp和660 bp



A:5 GSP 1/3/5扩增产物;B:5 GSP 2/4/6扩增产物

图3 5'RACE扩增凝胶电泳图

左右的产物条带(图 4)。



A:3 GSP 1/3/5 扩增产物;B:3 GSP 2/4/6 扩增产物

图 4　3’RACE 扩增凝胶电泳图

2.3　生物信息学分析

2.3.1　*EC-GAP* 基因的全长 cDNA 序列特征分析

将 5’RACE 和 3’RACE 各片段序列与保守区部分片段进行拼接后,获得了 3 条 *EC-GAP* 基因的全长 cDNA,并通过生物软件 Vector NTI 11.0 将测序结果分析,得出 3 条 *EC-GAP* 基因的序列特征(表 2),其中,*EC-GAP* 1 与 *EC-GAP* 3 的编码区长度相同,而 *EC-GAP* 2 同另外 2 条基因相比,少了一段 129 bp 的编码序列(图 5)。

表 2　*EC-GAP* 家族基因的 cDNA 序列特征

基因	全长 cDNA / bp	5’非编码区/ bp	编码框 /bp	3’非编码区/ bp	编码氨基酸/ aa
EC-GAP 1	1 427	58	1 011	355	337
EC-GAP 2	1 124	24	882	215	294
EC-GAP 3	1 488	191	1 353	283	337

2.3.2　*EC-GAP* 基因的蛋白质序列分析

应用 Vector NTI 11.0 将 3 条 *EC-GAP* 基因的 ORF 翻译成相应的蛋白质序列,并与其它不同植物的 GAPDH 蛋白进行比对分析(图 5)发现:赤桉的 3 个 EC-GAPDH 蛋白与其他物种的 GAPDH 蛋白同源性较高,高达 95% 以上,由此可推测,这些基因是 *GAP* 家族基因的成员,GAPDH 蛋白质序列是高度保守的。本研究中获得的 3 个 EC-GAPDH 蛋白之间相似性较高,其中,EC-GAPDH 1 与 EC-GAPDH3 的长度相同,EC-GAPDH 2 同另外 2 条基因相比,少了一段 43aa 的蛋白质序列。EC-GAPDH 2 与 EC-GAPDH 3 的序列相似性较高,很可能为同一家族成员经过不同进化后出现了差异,并行使不同的功能。

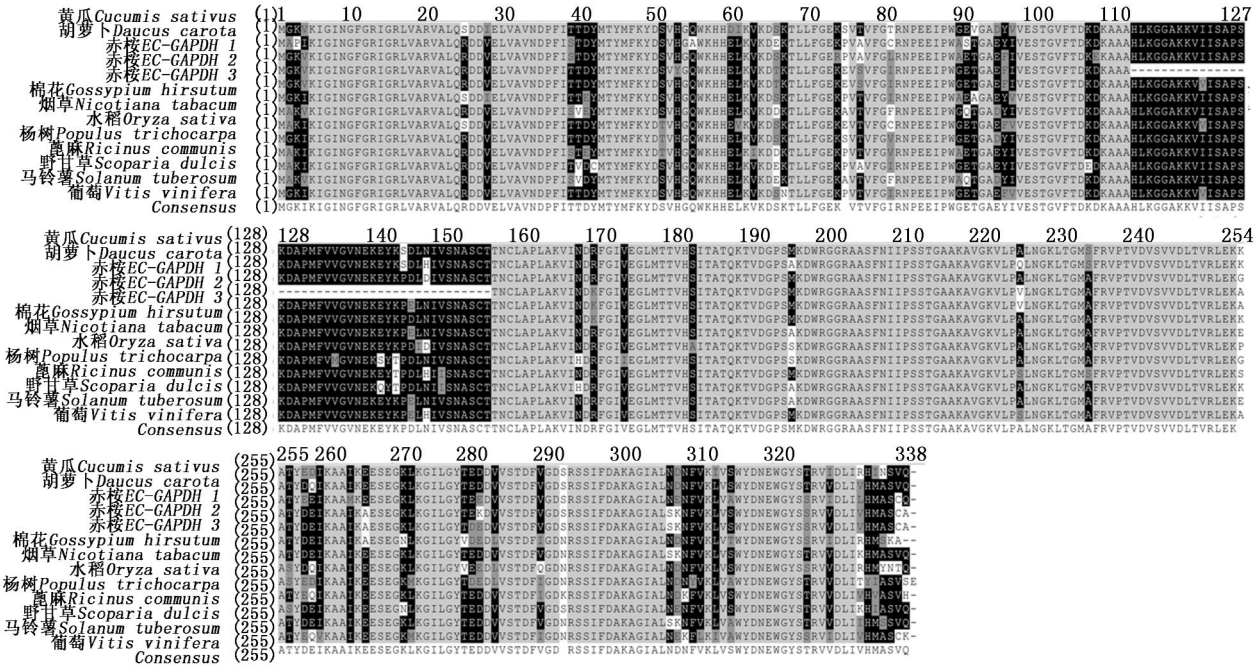


图 5　多种植物 GAPDH 的蛋白质序列比对分析

2.3.3 分子系统进化聚类分析 为探讨 EC-GAPDH 与其他植物 GAPDH 的亲缘进化关系,应用 Clustal X 2.0 和 MEGA4.1 软件的相邻连接法(Neighbour Joining,NJ)对该基因编码的蛋白质与烟草(*Nicotiana tabacum* Linn.)、葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)、杨树(*Populus* Linn.)、水稻(*Oryza sativa* Linn.)、棉花(*Gossypium hirsutum* Linn.)等物种的 GAPDH 蛋白质序列构建系统进化树。从整体上看,GAPDH 是一种在进化上非常保守的蛋白,EC-GAPDH 2 和 EC-GAPDH 3 聚为一个分支,之后再同 EC-GAPDH 1 聚在一起。同时,3 个 EC-GAPDH 同葡萄的 GAPDH 亲缘关系较近,能够聚合成一个分支。EC-GAPDH 1 位于系统进化树的前端,处于较原始的地位;EC-GAPDH 2 位于系统进化树的最后面,处于最进化的地位,这与其缺失一段功能区有一定的关系。

2.3.4 EC-GAPDH 的理化特征 利用 Antheprot 5.0 软件和 ExPASy-ProtParam tool 网站数据库对 3 个 EC-GAPDH 蛋白质序列进行理化性质的分析和预测,疏水标度值的正值为亲水性,负值为疏水性。从表 3 可看出:三者之间的蛋白质理化性质基本相似,差异很小,都属于疏水性蛋白,其中,EC-GAPDH 2 的稳定性低于另外二者。

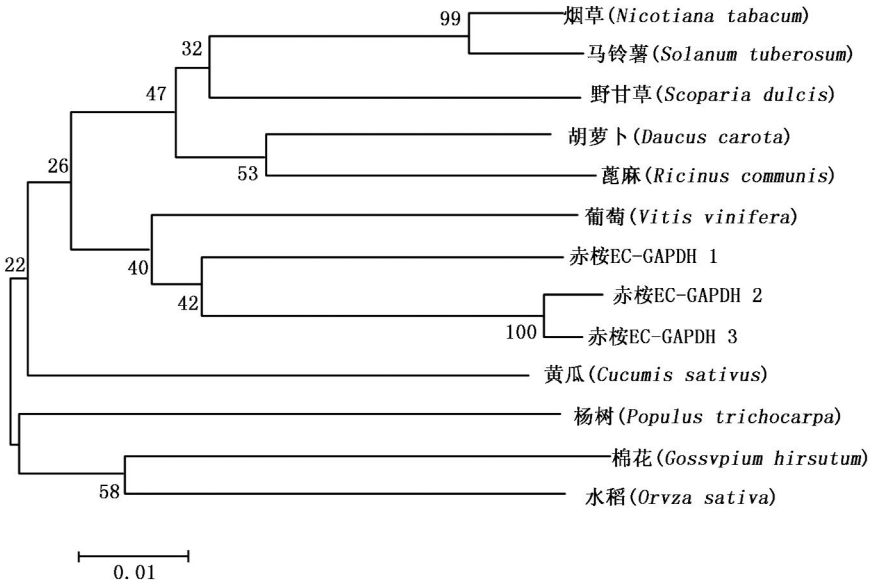


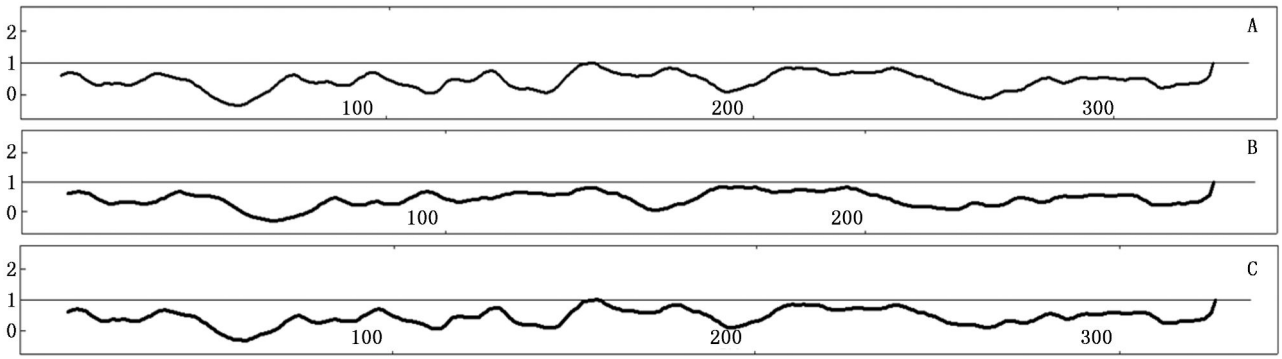
图6 基于 NJ 算法构建的多种植物的 GAPDH 的系统进化树

大量的原核和真核生物的 GAPDH 蛋白同源性很高,序列结构比较相似。从图 7 可看出:3 个 EC-GAPDH 蛋白都没有跨膜结构域,这说明 EC-GAPDH 不是膜结合蛋白,是一种分布在细胞中多个细胞器的功能蛋白。

根据软件 Antheprot 5.0 分析,在 3 个 EC-GAPDH 蛋白质序列中,都各自有 5 个明显的信号肽剪切位点(图 8),EC-GAPDH 1 和 EC-GAPDH 3 的都分别在 Ser182、Ala185、Ala215、Gly220、Cys336 位置上,其中,以 Ser182 位置可能性最大;EC-GAPDH 2 的分别在 Ser139、Ala142、Ala172、Gly177、Cys293 位置上,其中,以 Ser139 位置可能性最大;由此推测,目标蛋白被合成后,在这些信号肽的导向作用下,被运输到相关的细胞器中行使功能,而亚细胞定位预测结果(表 4)显示:EC-GAPDH 主要在细胞质中分布,这与其他物种该基因相关研究结论相符合。

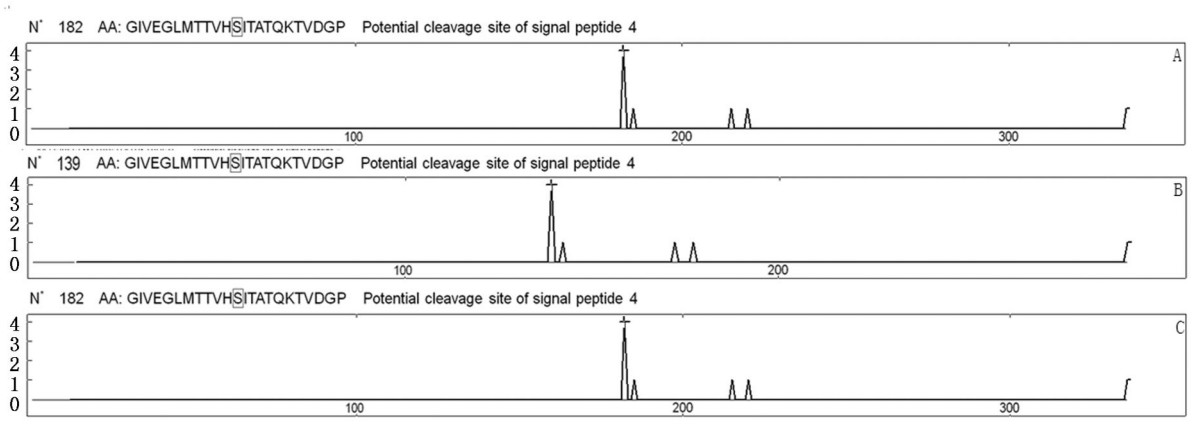
表 3 EC-GAPDH 蛋白的基本理化特征

蛋白序列	分子式	分子量	正电荷残基	负电荷残基	等电点	不稳定系数	亲疏水性
EC-GAPDH 1	$C_{1641}H_{2607}N_{437}O_{490}S_{12}$	36791.79Da	41	43	6.365	25.73	-0.079
EC-GAPDH 2	$C_{1440}H_{2286}N_{378}O_{427}S_{9}$	32123.68Da	37	36	8.155	18.36	-0.022
EC-GAPDH 3	$C_{1637}H_{2607}N_{433}O_{488}S_{11}$	36623.66Da	42	41	7.965	36.66	-0.042



A: EC-GAPDH 1; B: EC-GAPDH 2; C: EC-GAPDH 3

图 7　3 个 EC-GAPDH 跨膜结构域的分析



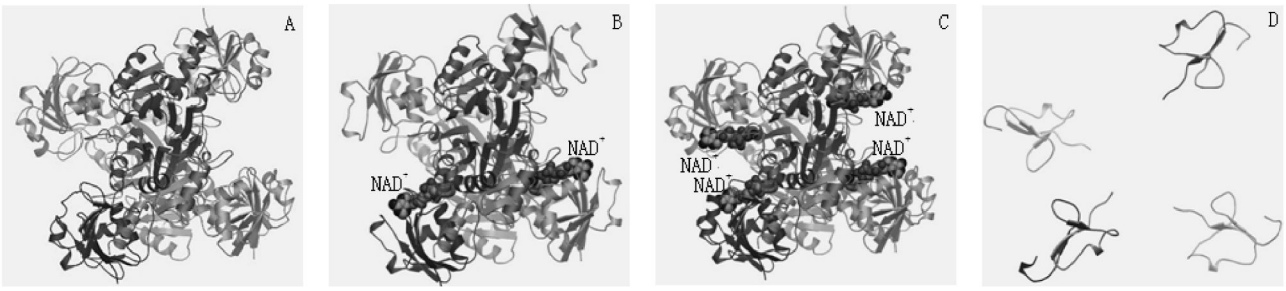
A: EC-GAPDH 1; B: EC-GAPDH 2; C: EC-GAPDH 3

图 8　EC-GAPDH 的信号肽剪切位点的分析

表 4　EC-GAPDH 蛋白亚细胞定位预测结果

蛋白序列	存在位置	同源性预测	理论预测	神经预测	相似性预测	综合预测
EC-GAPDH 1	细胞质	6.30	0.00	2.12	5.80	9.85
EC-GAPDH 2	细胞质	3.20	0.00	1.84	5.92	9.95
EC-GAPDH 3	细胞质	3.10	0.00	2.72	5.90	9.97

经过 Swissmodel Server 和 VMD1.8.5 软件的分析,发现在 EC-GAPDH 经过多次折叠后,由 4 个亚基组合起来形成了具有活性催化功能的三维立体结构(图 9)[21]。由于 3 个 EC-GAPDH 的蛋白序列高度相似,所以他们的结构也十分相似。EC-GAPDH 的三维立体结构以 α-螺旋和 β-折叠为主,其中,NAD^+结合区有 1 个典型的 α/β 双层核苷酸折叠区—Rossmann 折叠区[22],这个结构由 9 个 β-折叠组成:β_A(3-8),β_B(27-33),β_C(58-60),β_D(65-67),β_E(70-75),β_F(92-95),β_G(116-119),β_H(128-130)以及 β_I(145-146),同时,这些 β 折叠之间由短螺旋和无规则卷曲连接起来。活性结构域由 8 个 β-折叠和 3 个长的 α-螺旋组成:β1(170-179),β2(207-210),β3(228-235),β4(241-249),β5(271-275),β6(290-293),β7(298-302)和 β8(305-314),α1(151-168),α2(256-266)以及 α3(317-336)。由于 EC-GAPDH 2 缺少了这段蛋白质序列,因此,在其三维立体结构中缺少了图 9 中 D 所示的结构;同时,由于 Lys146(第 146 个氨基酸残基(赖氨酸))和 Cys155 第 155 个氨基酸残基(半胱胺酸))是活性位点之一,因此,EC-GAPDH 2 可能缺失部分催化活性。此外,从图 9 还看出,EC-GAPDH 1 的 4 个亚基聚合后,不能结合 NAD^+,EC-GAPDH 2 只能结合 2 个 NAD^+,而 EC-GAPDH 3 能够正常的与 4 个 NAD^+结合,因此,推测这 3 个 EC-GAPDH 成员间具有不同的功能。



A：EC-GAPDH 1 四聚体；B：EC-GAPDH 2 四聚体；C：EC-GAPDH 3 四聚体；D：EC-GAPDH 2 四聚体缺少的结构

图9 EC-GAPDH 的三维立体结构图

3 结论与讨论

本研究利用 RACE 结合 RT-PCR 的方法从赤桉中得到3个 *EC-GAP* 基因的 cDNA 序列，同时，对其进行了多方面的生物信息学分析。结果发现：这3个 *EC-GAP* 基因的序列高度相似，但由于在序列上存在一定的差异性，因此，其亲缘进化关系以及三维结构也出现了差异。*EC-GAP* 2 和 *EC-GAP* 3 基因亲缘关系较近，而与 *EC-GAP* 1 基因的亲缘关系较远。同时，三维结构显示 EC-GAPDH 1 的4个亚基聚合后，没有 NAD^+ 的结合域，不能结合 NAD^+，而 EC-GAPDH 2 和 EC-GAPDH 3 分别能够结合2个和4个 NAD^+。作为高等植物糖酵解和糖异生反应中的关键酶，NAD^+ 对于 GAPDH 的磷酸化活性非常重要，因此，推测这3个 GAPDH 基因在赤桉的生长发育中可能具有不同的功能。此外，Nina 等[23]、Nakajima 等[24]发现，同 *EC-GAP* 3 基因相比，*EC-GAP* 2 基因缺失这段序列与细胞的正常生理活动相关，大量的 GAPDH 积累会导致细胞的死亡，由此推测 *EC-GAP* 2 基因和 *EC-GAP* 3 基因与调控赤桉生长发育过程中细胞死亡有一定的相关性。

当生物体受到不同的胁迫后，其体内的正常代谢途径会受到不同程度的影响，GAPDH 作为糖酵解途径中的一种关键酶，可以感知细胞内的非正常状态，将细胞质的“要求”携带到细胞核中，借此将细胞内代谢状态和基因表达耦合在一起[25-27]。因此，赤桉中的3个 *GAP* 基因也可能对其生长环境中遇到的胁迫进行一定的调节，从而保证植株的正常生长。本研究为揭示该基因在不同树种或无性系中的表达情况，分离纯化该蛋白及研究其功能等提供了重要的参考依据；同时为进一步成为荧光定量 PCR 的内参基因分析提供了材料，也为研究其他 *GAP* 基因奠定了基础。

参考文献：

[1] Yang Y, Kwon H B, Peng H P, *et al*. Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 1993, 101 (1): 209-216

[2] Yun M, Park C G, Kim J Y, *et al*. Structural Analysis of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from *Escherichia coli*: Direct Evidence of Substrate Binding and Cofactor-Induced Conformational Changes[J]. Biochemistry, 2000, 39: 10702-10710

[3] Bedhomme M, Adamo M, Marchand C H, *et al*. Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the model plant *Arabidopsis thaliana* is reversed by both glutaredoxins and thioredoxins *in vitro*[J]. Biochemistry Journal, 2012, 445 (3): 337-347

[4] 侯志军，张长生，金 辛. 貉 GAPDH 基因的克隆与序列分析[J]. 经济动物学报，2012, 16(1): 35-37

[5] Barber R D, Harmer D W, Coleman R A, *et al*. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues[J]. Physiology Genomics, 2005, 21: 389-395

[6] 朱 华，赵瑞强，吴耀生. 三七植物 GAPDH 基因克隆及序列分析[J]. 西北植物学报，2006, 26(7): 1316-1319

[7] 黄 科，李春峰，范晓东，等. 家蚕 GAPDH 基因的克隆及分析[J]. 西南大学学报：自然科学版，2008, 30(11): 68-73

[8] 陈欣虹，钱 琨，郁 川，等. 鸡内参基因 β-actin 方流和 GAPDH 实时定量 PCR 重组质粒标准品的构建术[J]. 中国家禽，2011, 33(10): 21-24

[9] 张 娟，唐红菊，王 晓，等. 内参基因 GAPDH 在 3T3-L1 脂肪细胞分化中的表达变化[J]. 中华内分泌代谢杂志，2012, 28(10): 849-854

[10] Berry M D, Boulton A A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis[J]. Journal of Neuroscience Research, 2000, 60 (2): 150-154

[11] Ishitani R, Sunaga K, Hirano A, *et al*. Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture[J]. Journal of Neurochemistry, 1996, 66 (3): 928-935

[12] Tanaka R, Mochizuki H, Suzuki A, *et al*. Induction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion[J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2002, 22: 280-288

[13] Bae B I, Hara M R, Cascio M B, *et al*. Mutant hunting in: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(9): 3405 – 3409

[14] Hara M R, Cascio M B, Sawa A. GAPDH as a sensor of No stress [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1762: 502 – 509

[15] Guo L, Devaiah S P, Narasimhan R, *et al*. Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D delta to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress[J]. Plant Cell, 2012, 24: 2200 – 2212

[16] Marco V, Mirko Z, Margherita F, *et al*. Nuclear Accumulation of Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Cadmium-Stressed *Arabidopsis* Roots[J]. Plant Physiology, 2013, 162:333 – 346

[17] 陆钊华, 徐建民, 白嘉雨,等. 细叶桉和赤桉种源间材性变异研究[J]. 林业科学研究, 2000, 13 (4): 370 – 376

[18] 林睦就. 高抗逆性速生桉树优树选择研究[J]. 湖南林业科技, 2005, 32 (6): 19 – 21

[19] Sirover M A. Subcellular dynamics of multifunctional protein regulation: mechanisms of GAPDH intracellular translocation [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2012, 113 (7): 2193 – 2200

[20] 朱凤云, 陈鸿鹏, 谭晓风, 等. 油茶脂氧合酶基因全长 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 中南林业科技大学学报:自然科学版, 2012, 32(10): 45 – 51, 57

[21] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models[J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 343 – 350

[22] Somnath M, Debajyoti D, Baisakhee S, *et al*. Crystal Structure of Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase 1 from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* MRSA252 Provides Novel Insights into Substrate Binding and Catalytic Mechanism[J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 401: 949 – 968

[23] Nina A B, Henner B, Bettina S, *et al*. NAD^+-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(11): 6149 – 6156

[24] Nakajima H, Amano W, Kubo T, *et al*. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregate formation participates in oxidative stress-induced cell death[J]. Journal Biological Chemistry, 2009, 284(49):34331 – 34341

[25] Arasimowicz M, Floryszak W J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses[J]. Plant Science, 2007, 172 (5): 876 – 887

[26] Zheng L, Roeder R G, Luo Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component[J]. Cell, 2003, 114: 255 – 266

[27] Dai R P, Yu F X, Goh S R, *et al*. Histone 2B (H2B) expression is confined to a proper NAD^+/NADH redox status[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283 (40): 26894 – 26901