

龙眼花芽 ANS 基因的克隆与原核表达

游向荣^{1a,1b}, 许鸿川^{1b}, 梁文裕^{1b}, 陈清西^{1c}, 郑少泉², 陈伟^{1a,1b*}

(1. 福建农林大学, a. 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室; b. 生命科学学院; c. 园艺学院; 福州 350002; 2. 福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013)

摘要: 运用蛋白质组学比较龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)正常成花和成花逆转花芽的蛋白质组变化, 结果表明, ANS 蛋白(anthocyanidin synthase)在龙眼成花逆转花芽中下调表达。应用 RACE 方法克隆 ANS 蛋白的全长 cDNA, 长度为 1477 bp, 包括 1 个 1071 bp 的开放阅读框, 编码 357 bp 的氨基酸序列, GenBank 的登录号为 FJ479616(GI: 218202927)。将 ANS 在大肠杆菌中表达, 获得 1 个约 46 kD 的外源蛋白。这说明 ANS 蛋白在龙眼成花逆转过程中起作用。

关键词: 龙眼; 成花逆转; 差异蛋白; ANS; 克隆; 表达

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)03-0288-05

Cloning and Prokaryotic Expression of Longan ANS Gene

YOU Xiang-rong^{1a,1b}, XU Hong-chuan^{1b}, LIANG Wen-yu^{1b},

CHEN Qing-xi^{1c}, ZHENG Shao-quan², CHEN Wei^{1a,1b*}

(1a. Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops;

1b. College of Life Sciences; 1c. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University,

Fuzhou 350002, China; 2. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agriculture Science, Fuzhou 350013, China)

Abstract: The changes in proteome of normal flower and floral reversion buds in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) were studied by using Proteomics method. The results showed that ANS (anthocyanidin synthase) protein was found down-regulated expression in floral reversion buds. ANS cDNA was obtained (GenBank access number: FJ479616) by using RACE method, its full length was 1477 bp, with a 1071 bp open read frame. ANS gene was expressed in *E. coli*, and a 46 kD heterologous protein was obtained. It suggested that ANS protein play a role in floral reversion in longan.

Key words: Longan; Floral reversion; Differential protein; ANS; Clone; Expression

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)是我国南方重要果树,成花逆转是影响龙眼产量的主要因素之一。邱金淡等^[1]对石硖龙眼花芽分化的研究发现,龙眼的顶芽芽轴萌动时若发育成花序,芽轴伸长缓慢,基部的腋芽膨大、颜色变红,可判断已进入形态分化。若发育为新梢,则芽轴快速伸长、颜色变成浅红或紫红,羽状复叶的小叶展开、颜色变红,如果发生“冲梢”现象,芽轴伸长,但颜色多保持浅黄色,羽状复叶的小叶颜色一般保持黄色。高等植物的花、叶等颜色变红,主要与花青素的累积有关。花

青素产生颜色范围随细胞液的酸碱由红色到紫色转变^[2]。花青素经由类黄酮途径合成,花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)是位于花色素苷合成通路末端的酶,催化了无色花色素向花色素的转化^[3]。编码 ANS 的基因首先在紫苏(*Perilla frutescens*)中被克隆^[4]。本研究通过比较龙眼正常成花和成花逆转花芽蛋白质组的变化,发现 ANS 蛋白在龙眼成花逆转的花芽中下调表达,且 ANS 的表达量与花青素的累积密切相关。应用 RACE 方法克隆在龙眼成花逆转花芽中下调表达的 ANS

的 cDNA 全长,并在大肠杆菌中表达。本研究为龙眼正常成花和成花逆转花芽的细胞学变化提供了分子生物学的证据。

1 材料和方法

1.1 植物材料及主要试剂

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 品种为龙优 1 号,种植在福建省莆田市农科所果树分所龙眼品种园。选择 25 年生发育状态一致的植株 3 株,采集龙眼成花逆转花穗上的花芽(叶片已展开,没有红点);同时采集相同发育时期的龙眼正常成花花穗上的花芽(纯花穗,有红点)作为对照。-80℃ 保存备用。

双向电泳 IPG 胶条购自 GE 公司。RevertAid™ Furst Strand cDNA Synthesis 试剂盒购自 Fermentas 公司,SMART™ RACE cDNA Amplification 试剂盒购自 Clontech 公司,大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 BL21, pMD18-T vector, T4 DNA 连接酶,各种限制性内切酶, *Taq* DNA 聚合酶, dNTPs, X-gal, IPTG 均购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司(中国大连)。其余试剂为国产分析纯。PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, DNA 测序由上海英骏生物有限公司完成。

1.2 双向电泳及凝胶分析

龙眼花芽总蛋白提取、双向凝胶电泳、图像分析及差异蛋白的分析鉴定和含量测定均参考陈伟等^[5]的方法。

1.3 总 RNA 提取和 *ANS* 克隆

龙眼花芽总 RNA 以 SDS 法提取^[6], 采用 RevertAid™ Furst Strand cDNA Synthesis 试剂盒合成 cDNA 第一链,以反转录模版直接进行 PCR 反应。

以 MALDI-TOF/TOF/MS 分析鉴定的 *ANS* 蛋白氨基酸序列为主要参照,运用 BLAST 程序对 GenBank 进行搜索,选取与龙眼亲缘关系较近植物的 *ANS* 核酸序列进行比对分析并设计保守区特异性引物,上游引物 (P1) 为: 5'-GAAGTATGCCAATGACCAGG-3', 下游引物 (P2) 为: 5'-ACAGCCCATGAAATCCTCAC-3'。PCR 扩增条件为: 95℃ 变性 5 min, 95℃ 1 min, 50℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 5 min。

PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳回收, 连接到

pMD18-T 载体上, 热激转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选。选取白色菌落进行液体培养, PCR 检测阳性克隆子, 送上海英骏生物技术公司测序。

根据保守区扩增产物的测序结果设计 3' RACE 特异性引物: 5'-ATTGGAGACACCATTGG-AATCCTAAG-3' 和 5' RACE 特异性引物: 5'-TCGCTCGTCACCTCTATGTAATCTTT-3', 采用 SMART™ RACE cDNA Amplification 试剂盒进行 3'端和 5'端的 RACE 反应。将 3'端和 5'端的 RACE 反应产物分别回收, 连接 pMD18-T 载体, 转化测序。

1.4 *ANS* 在花芽中的表达

根据 5' RACE、3' RACE 及中间序列测序结果拼接而成的 *ANS* cDNA, 设计扩增全长 cDNA 的引物: AP1 为 5'-ATGGTGACTTCTGTGGCTCCAAGG-G-3'; AP2 为 5'-AGCAATAAGGAGCGAAGAATAAG-AG-3', 分别以分光光度法定量的龙眼正常成花逆转花芽总 RNA 反转录的 cDNA 为模版, 以龙眼 β -*actin* 基因作为内参, 先以 62℃ 退火温度进行 5 个循环, 再以 55℃ 退火温度进行 28 个循环的 RT-PCR 扩增。

1.5 *ANS* 在 *E. coli* 中诱导表达

ANS cDNA 全长扩增引物添加保护碱基和 *Bam*H I 及 *Xho*I 酶切位点, 重新设计表达载体构建引物: TP1 为 5'-GCGGGATCCATGGTGACTTCTGTGGCTCCAAGGG-3'; TP2 为 5'-CGGCTCGAGAGCAATAAGGAGCGAAGAATAAGAG-3', 进行 PCR 扩增。纯化的 PCR 产物和 pET-28a 载体以 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切, 回收酶切产物, 连接目的基因与载体片段, 转化 DH5α 感受态细胞, Kan 抗性筛选阳性克隆, 提取质粒酶切鉴定, 鉴定正确的质粒转化 BL21 感受态细胞, 以终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 *ANS* 的表达。SDS-PAGE 电泳分析。

2 结果和分析

2.1 龙眼成花逆转不同时期蛋白质的双向电泳分析

采用窄范围 pH 4~7 的线性 IPG 干胶条对龙眼正常成花和成花逆转花芽蛋白质进行 IEF-SDS-PAGE 分离, 共找到差异表达的蛋白点 59 个, 其中 27 个蛋白在龙眼成花逆转花芽上调表达, 32 个蛋

白下调表达。应用 MALDI-TOF-TOF/MS 分析和 Mascot 查询鉴定差异表达的蛋白,共获得 42 个蛋白的信息,其中明显下调表达的蛋白点 24 确定为 ANS 蛋白(图 1)。

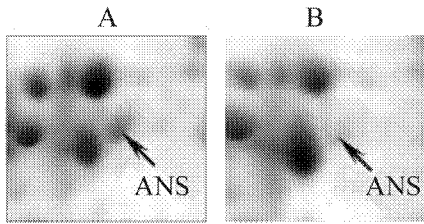


图 1 龙眼正常成花(A)与成花逆转(B)花芽 ANS 蛋白的差异表达
Fig. 1 Differential expression of ANS protein in longan normal flower (A) and floral reversion (B) buds

2.2 ANS 全长 cDNA 克隆

以逆转录合成的 cDNA 为模板,利用一对特异性引物 P1、P2 进行保守区 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳,可见 1 条约 550 bp 的条带(图 2),对该片段进行回收测序,得到一段 576 bp 的 cDNA,经 DNAMAN 和 BLAST 比对分析,该序列为 ANS cDNA 的同源片段。以带有 UPM 接头的 cDNA 为模板,利用 3' RACE 特异性引物 AP1 和 UPM 引物进行 3' RACE,获得 1 条约 500 bp 的条带,对该片段进行回收测序,得到一段 553 bp 的 cDNA 序列,该片段包含一个多聚腺苷(ployA)尾,并有 107 bp 与保守区测序结果重叠。

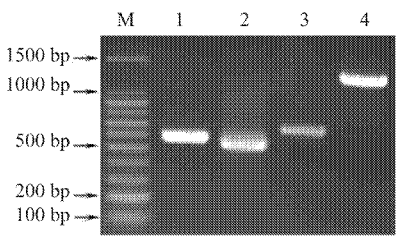


图 2 龙眼成花逆转花芽 ANS RT-PCR 扩增结果
Fig. 2 RT-PCR amplification product of ANS cDNA sequence in longan floral reversion buds

M:100 bp DNA Marker; 1:保守区 ANS conservative region; 2: 3' RACE 扩增 3' RACE amplification; 3: 5' RACE 扩增 5' RACE amplification; 4:全长 cDNA Full length cDNA.

以带有 UPM 接头的 cDNA 为模板,利用 5' RACE 特异性引物 AP2 和 UPM 引物进行 5' RACE,获得一个约 600 bp 的 DNA 条带,对该片段进行回收测序,得到一段 672 bp 的 cDNA 序列,该片段有 178 bp 与保守区测序结果重叠。

将 3 个片段进行拼接,获得 1477 bp 的 ANS 基因全长序列(图 3),该 cDNA 序列包含一个 1071 bp 的完整开放阅读框,在 GenBank 的登录号为 FJ479616 (GI: 218202927)。该开放阅读框编码一个具有 357 个氨基酸残基的蛋白,推测其分子量为 40.4 kDa;与双向凝胶电泳和 Mascot 查询结果一致。在 3' ploy (A)⁺ 区前 25 bp 处有一个 ATAATAA 加尾信号,该开放阅读框包含 189 bp 的 5'非编码区和 216 bp 的 3'非编码区。

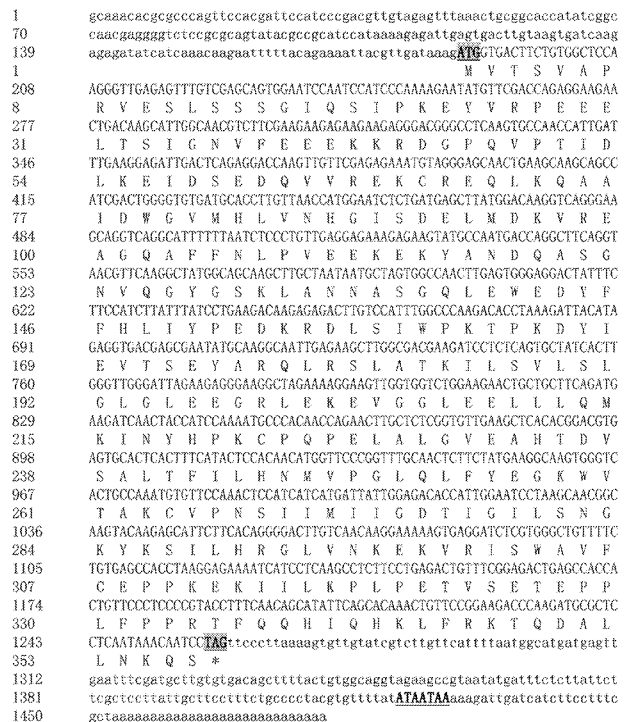


图 3 龙眼成花逆转花芽 ANS cDNA 的核苷酸序列(上行)及推导氨基酸序列(下行)

Fig. 3 The nucleotide sequence (upper lines) and its deduced amino acid sequence (lower lines) of ANS cDNA

通过与 GenBank 上其他植物进行 BLAST 比较表明,龙眼与橙(*Citrus sinensis*)、玫瑰(*Rosa hybrid*)、桃(*Prunus persica*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、杨树(*Populus trichocarpa*)和大豆(*Glycine max*)的同源性分别达 74%、80%、81%、78%、80%、72%、70%,说明 ANS 基因在植物中具有较高的保守性(图 4)。

2.3 RT-PCR 分析 ANS 在花芽中的表达

以龙眼正常成花和成花逆转花芽总 RNA 为模板,以龙眼 β -actin 基因作为内参,对 ANS 进行 RT-PCR 分析。结果显示,ANS mRNA 在成花逆转的

花芽中下调表达(图 5),与 *ANS* 蛋白在正常成花和成花逆转花芽中的表达趋势一致。

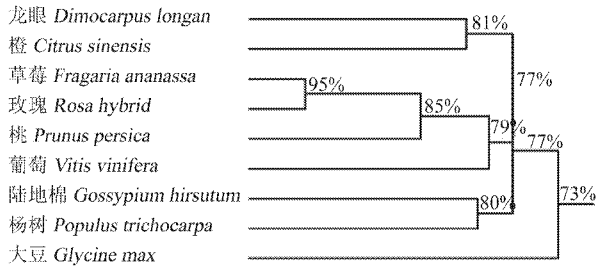


图 4 *ANS* 核苷酸序列同源树

Fig. 4 Homology tree of nucleotide sequences of *ANS*

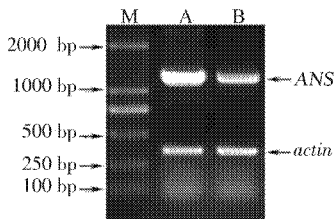


图 5 *ANS* 在龙眼正常成花和成花逆转花芽表达的 RT-PCR 分析

Fig. 5 RT-PCR analysis of *ANS* expressed in normal flowering and floral reversion longan buds

M: DL 2000 DNA Marker; A: 正常成花 Normal flower; B: 成花逆转 Floral reversion.

2.4 *ANS* 在 *E. coli* 中诱导表达

将 pET28a-*ANS* 阳性质粒转化到 BL21 感受态细胞中,并以 IPTG 诱导 *ANS* 的表达,12.5% SDS-PAGE 电泳结果见图 6,可见大量外源蛋白的表达。参照蛋白分子量,外源蛋白分子量约为 46 kD,符合预测的 *ANS* 蛋白分子量。表达的融合蛋白带有

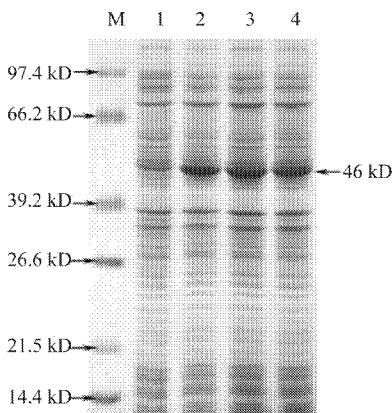


图 6 *ANS* 蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 6 SDS-PAGE map of *ANS* protein expressed in *E. coli*

M: 蛋白分子量标准 Protein marker; 1: IPTG 诱导的空质粒转化子 Negative transformant induced by IPTG; 2~4: IPTG 诱导的阳性质粒转化子 Positive transformant with pET28a-*ANS* induced by IPTG.

组氨酸标签,后期可以纯化制备抗体。经凝胶扫描测定,外源蛋白约占细菌蛋白总的 18.4%。

3 讨论

花青素合成酶作为花色素苷合成通路末端的酶,决定了花青素的累积^[1]。*ANS* 蛋白和 F3'H 一样,属于氧化戊二酸依赖性加氧酶(Oxoglutarate-dependent dioxygenases)家族,与在类黄酮合成途径中同属此家族的黄酮醇合成酶(flavonol synthase, FLS)具有保守的同源关系^[7]。Saito 等^[8]的研究表明,*ANS* 在红色紫苏的茎和叶中表达,但在绿色紫苏中缺乏,这与花青素的累积模式相符。Rosati 等^[7]从美国金钟连翘(*Forsythia intermedia*)中克隆了 *ANS* 基因,认为其花瓣中没有花色素苷是由于缺少 *ANS* 基因表达所致。Noriko 等^[9]应用 RNAi 技术抑制蓝花蝴蝶草(*Torenia hybrida*)的 *ANS* 基因,培养出稳定遗传的白花植株。Nakajima 等^[10]用 Northern Blot 方法证明 *ANS* 基因只在蝴蝶草的花芽中表达,在叶片和成熟的花中不表达。Nakatsuka 等^[11]认为 *ANS* 基因的突变是导致龙胆(*Gentiana manshurica*)花变为白色的重要原因。

本研究结果表明,龙眼正常成花的顶芽芽轴萌动时,芽轴颜色变红,*ANS* 正常表达;而发生成花逆转时,芽轴颜色保持浅黄色,*ANS* 下调表达。这与前人对龙眼正常成花和成花逆转花芽的观察结果一致^[1]。由于龙眼芽轴颜色和 *ANS* 的表达差异有关,因此龙眼成花逆转和 *ANS* 的下调表达可能有一定内在联系。另外有研究报道指出花色素苷可能作为一种抗氧化剂在植物的成花转变和花发育过程中起作用,Garzon 和 Wrolstad^[12]认为花青素能有效清除旱金莲(*Tropaeolum majus*)中的自由基。虽然有证据证明花青素在植物正常的成花过程中累积,但 *ANS* 在龙眼花芽中的下调表达是否在一定程度上和龙眼成花逆转有关,还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Qiu J D(邱金淡), Wu D Y(吴定尧), Zhang H L(张海岚). A study on flower differentiation of 'Shixia' longan (*Dimocarpus longana* Lour. cv. Shixia) [J] J S China Agri Univ(华南农业大学学报), 2001, 22(1): 27-30.(in Chinese)
- [2] Yoshida K, Kato Y T, Kameda K. Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured [J]. Plant Cell Physiol, 2003, 44(3): 262-268.
- [3] Wilmouth J, Turnbull R, Welford I, et al. Structure and mechanism

- of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Structure, 1999, 10(1): 93–103.
- [4] Yoshikazu T, Shinzo T, Takaaki K. Metabolic engineering to modify flower color [J]. Plant Cell Physiol, 1998, 39(11): 1119–1126.
- [5] Chen W(陈伟), Lü L X(吕柳新), Huang C M(黄春梅), et al. Studies on 'Wuyu' lichi specific proteins in the embryo development stages [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2001, 28(6): 504–508.(in Chinese)
- [6] Zhang X J(章希娟), Xu H C(许鸿川), You X R(游向荣), et al. Cloning and sequence analysis of *F3H* gene cDNA from longan embryo [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2008, 35(11): 1581–1586.(in Chinese)
- [7] Rosati C, Cadic A, Duron M, et al. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia intermedia* reveals organ-specific expression during flower development [J]. Plant Sci, 1999, 149: 73–79.
- [8] Saito K, Kobayashi M, Gong Z Z, et al. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: Molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens* [J]. Plant J, 1998, 17(2): 181–189.
- [9] Noriko N, Masako F M, Kiyoshi M, et al. RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression [J]. Plant Biotechn, 2006, 23(1): 13–17.
- [10] Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M, et al. cDNA cloning and gene expression of anthocyanidin synthase from *Torenia fournieri* [J]. Plant Biotechn, 2000, 17(4): 331–335.
- [11] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K. Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants [J]. Plant Sci, 2005, 169: 949–958.
- [12] Garzon G A, Wrolstad R E. Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) [J]. Phytochemistry, 2004, 65(15): 2219–2227.