

草莓 ζ -胡萝卜素脱氢酶基因 *ZDS* 的克隆及特征分析

李永平¹, 朱海生^{1*}, 温庆放^{1*}, 花秀凤², 林 琿¹

(1. 福建省农业科学院作物研究所蔬菜研究中心, 福州 350013; 2. 福州市蔬菜科学研究所, 福州 350012)

摘要: 用 RT-PCR 和 RACE 技术从草莓(*Fragaria ananassa* Duchesne)果实中克隆到 ζ -胡萝卜素脱氢酶基因 *ZDS*, 命名为 *FaZDS*, 其 cDNA 全长 2148 bp, 具有 1 个 1710 bp 的完整开放阅读框(ORF), 编码 569 个氨基酸。序列分析表明, *FaZDS* 编码的氨基酸序列与其它植物的 *ZDS* 蛋白有很高的相似性。系统进化树分析表明, 草莓与苹果的 *ZDS* 蛋白亲缘关系较近。原核表达结果表明 *FaZDS* 基因在大肠杆菌中能高效表达。用半定量 RT-PCR 技术进行组织表达模式分析表明, *FaZDS* 基因在草莓的花、叶片和果实中均有表达, 表达量为花 > 红果 > 粉红果 > 白果 > 青果 > 叶。

关键词: 草莓; ζ -胡萝卜素脱氢酶; *FaZDS* 基因; 基因克隆

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)06-0670-05

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2010.06.013

Cloning and Characteristics of ζ -carotene Desaturase Gene in *Fragaria ananassa* Duchesne

LI Yong-ping¹, ZHU Hai-sheng^{1*}, WEN Qing-fang^{1*}, HUA Xiu-Feng², LIN Hui

(1. Vegetable Research Center, Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

2. Fuzhou Vegetable Institute, Fuzhou 350012, China)

Abstract: ζ -carotene Desaturase (*ZDS*) is one of the rate-limiting enzymes in the carotenoids biosynthetic pathway. The *ZDS* gene named as *FaZDS* was cloned from strawberry (*Fragaria ananassa* Duchesne) fruit using RT-PCR and RACE techniques. The results showed that the length of *FaZDS* cDNA was 2148 bp with an open reading frame of 1710 bp, which encoded a polypeptide of 569 amino acids. Homology analysis showed that the deduced *ZDS* protein was highly homologous to those from other species. Phylogenetic analysis also indicated that *ZDS* in strawberry was close to apple. Prokaryotic expression showed that recombinant *FaZDS* had highly expression in *E. coli* BL21. The *FaZDS* could express in flower, fruit and leaf by semi-quantitative RT-PCR analysis, with the order as flower > red fruit > pink fruit > white fruit > green fruit > leaf.

Key words: *Fragaria ananassa* Duchesne; ζ -carotene Desaturase; *FaZDS*; Gene cloning

草莓(*Fragaria ananassa* Duchesne)为蔷薇科(Rosaceae)草莓属多年生草本植物,是经济价值较高的保健水果。高等植物中,类胡萝卜素积累在花和果实的色素母细胞中,使花和果实呈亮黄色、橙

色或红色^[1]。类胡萝卜素除了是维生素 A 的前体外,在猝灭自由基、增强人体免疫力、预防心血管疾病和防癌抗癌等方面起着重要的作用^[2]。了解植物类胡萝卜素积累的特点与代谢的生理机制,对于

收稿日期: 2010-03-23

接受日期: 2010-05-19

基金项目: 福建省科技重大专项(2008NZ0002); 国家科技支撑项目(2007BAD07B03); 福建省自然科学基金项目(2010J0111); 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2010R1028-5); 福建省农业科学院博士科研启动基金项目(BS04); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设基金项目(STIFY06)资助

作者简介: 李永平, 硕士, 助理研究员, 主要从事蔬菜育种与生物技术研究工作, email: lyp_lily@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: zhs0246@163.com; fjvrc@163.com

调控植物类胡萝卜素的生物合成途径,改善园艺植物的食用品质和观赏品质具有重要的意义^[3]。

ζ -胡萝卜素脱氢酶(ζ -carotene desaturase, *ZDS*)是植物类胡萝卜素生物合成过程中去饱和的重要酶之一,它催化 ζ -胡萝卜素转化成链孢红素,进而转化成番茄红素^[4-5]。有研究表明 *ZDS* 具有限制酶作用,从而限制相应类胡萝卜素的合成^[6]。草莓类胡萝卜素生物合成途径中的 *ZDS* 基因的分离和鉴定研究至今未见报道。本文从草莓中克隆了 *ZDS* 基因并分析了其 cDNA 全长序列,为研究 ζ -胡萝卜素脱氢酶的调控功能奠定分子基础,为草莓育种和利用基因工程改善草莓品质提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试植物为草莓(*Fragaria ananassa* Duchesne)丰香品种,采自福建省农业科学院作物研究所实验基地。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的克隆

采用 Trizol 法提取草莓果实 RNA,参照王关林^[7]方法加入 2-BE,以除去 RNA 中的多糖,提高纯度。按大连宝生物有限公司的 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的方法合成 cDNA 第一链,逆转录引物 AP 序列为 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)₁₇-3'。

根据 GenBank 中的 *ZDS* 基因序列设计 1 对保守区简并引物,上游 P1:5'-TTGGATCAAGGCCAT-GAGGTGGAT-3',下游 P2:5'-CCAGGIACATCACA-IGCTGCIAC-3'。PCR 扩增程序为:94℃ 3 min,94℃ 30 s,56℃ 40 s,72℃ 30 s,35 个循环;于 4℃ 下保存。

根据草莓 *ZDS* 基因(*FaZDS*)保守区测序结果,设计 3'端顺式引物 P3:5'-AGGCTACCAATAAG-CAAAC-3',与通用引物 AUAP 配对进行 PCR 扩增,AUAP 序列为:5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'。PCR 扩增程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,54℃ 40 s,72℃ 40 s,35 个循环;于 4℃ 下保存。

根据 *FaZDS* 测序结果,设计 2 个 5'端反式引物,分别为 P4:5'-CGACTGGACTCAATGCAAGA-3'和 P5:5'-CGAAAATCAAGTTCGCCAAT-3'。以 P4 为引物合成 cDNA 第一链,cDNA 第一链加同聚物尾,进行 cDNA 第二链的合成,产物用于 PCR 扩增。P5 与通用引物 AUAP 配对进行 PCR 扩增。

PCR 扩增程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,56℃ 40 s,72℃ 40 s,35 个循环;于 4℃ 下保存。

根据获得的 *FaZDS* 的 cDNA 全长,设计开放阅读框(ORF)引物 P6 和 P7,克隆其 ORF,验证已获得的序列,引物的序列分为 P6:5'-ATGGCTTCTT-GGGTGCTCTTACC-3',P7:5'-GCTTCTTGGGTGC-TCTTACC-3'。PCR 扩增程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,55℃ 90 s,72℃ 40 s,35 个循环;于 4℃ 下保存。

以上 PCR 扩增体系 25 μ L,包含 25 ng 模板 cDNA 1 μ L,0.4 μ mol/L 引物 1 μ L,0.15 mmol/L dNTP 5 μ L,1 U *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L,1.5 mmol/L $MgCl_2$ 的 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,加入灭菌的超纯水至 25 μ L。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖电泳检测后,回收纯化连接到 pMD18-T 载体上转化,挑取阳性克隆子,PCR 检测后送至测序,获得 *FaZDS* 基因全长序列后利用生物信息学数据库和互联网上的软件进行分析。

1.3 表达载体构建及表达

设计 1 对特异引物用于 *FaZDS* 基因完整开放阅读框的扩增,分别在 5'和 3'引入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点,PCR 扩增产物经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,回收 *FaZDS* 基因片段。原核表达载体 pET-32a(+)质粒用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,回收载体片段。将 *FaZDS* 基因片段和 pET-32a(+)的载体片段在 T4 连接酶的作用下 16℃ 连接过夜,连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α ,涂在含有 Amp 的 LB 平板上,挑取单菌落分别以 PCR、酶切和测序进行验证,将鉴定为阳性的重组表达质粒 pET-zds 转化表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)进行原核表达,经 SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝 R-250 染色检测蛋白表达情况。

1.4 *FaZDS* 基因的表达

分别从草莓的叶、花、绿果、白果、粉红果和红果中提取总 RNA 并定量,合成 cDNA 第一链后运用半定量 RT-PCR 检测 *FaZDS* 的表达量,以草莓 18S rRNA 为内参。*FaZDS* 引物为 P8:5'-ATGGCTTCTTGGGTGCTCTTACC-3', P9:5'-GATAAAACCTTCCCCCTTGTCAAT-3';18S rRNA 引物为 18SQF:5'-GTAGTCATATGCTTGTCT-3',18SQR:5'-GAATGATGCGTCGCCAGCACAAAGG-3'。PCR 扩增程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s,28 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂

糖凝胶电泳,用 UVP 公司的 GDS8000 凝胶成像系统拍照并对 PCR 条带进行密度扫描分析。

2 结果和分析

2.1 FaZDS 基因的克隆

根据 GenBank 中 ZDS 基因序列设计 1 对简并引物 P1、P2,以草莓果肉总 RNA 逆转录的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增,获得 1 个约 800 bp 的特异产物(图 1)。对该片段进行回收纯化,经连

接、转化、筛选阳性克隆、重组质粒 PCR 鉴定、测序,得到 1 个近 797 bp 的 cDNA 片断,其与番木瓜 (*Carica papaya*) (DQ666829.1)、大豆 (*Glycine max*) (AK245534.1)、辣椒(*Capsicum frutescens*)(X89897.1) 的 ZDS 基因同源性分别达 85%、83% 和 82%,其推导的氨基酸序列与苹果(*Malus pumila*)(AAQ04224.1)、柑橘(*Citrus reticulata*)(BAB68552.1)、柚(*C. maxima*) (ACE79169.1)等的同源性分别为 92%、91%、90%。BLAST 分析认为它是草莓 ZDS 的保守序列。

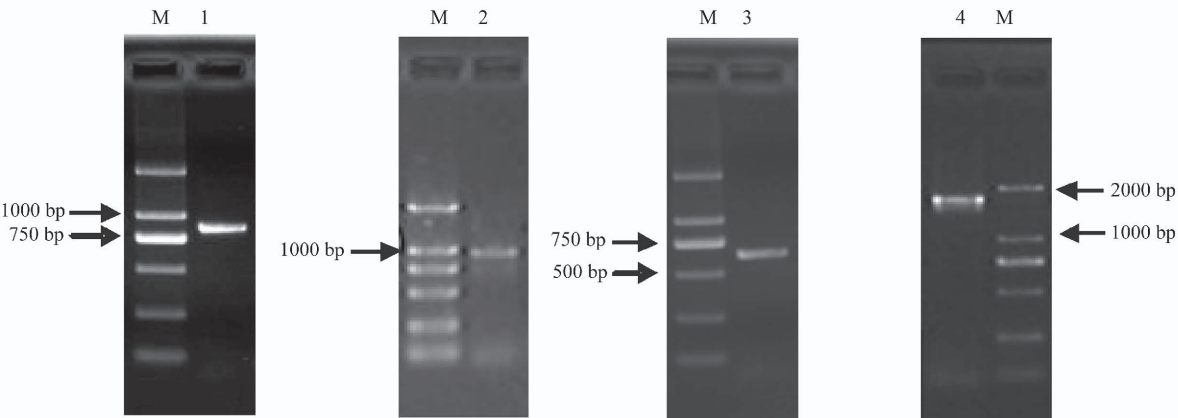


图 1 FaZDS 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of FaZDS
M. TaKaRa DL 2000 marker; 1. 保守区 Conserved region; 2. 3'RACE; 3. 5'RACE; 4. 开放阅读框 ORF.

根据草莓 ZDS 保守区序列,对 3'端 RACE 进行 PCR 扩增,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增出约 1000 bp 的特异条带(图 1)。测序结果表明该序列长 793 bp,与保守区有 61 bp 的重叠区段,在 NCBI 上 BLAST 检索,其与苹果 (AF429984)、梅 (*Prunus mume*) (AB253630.1)、杏 (*P. armeniaca*) (AY822066.1)等的同源性分别为 87%、88%、89%。推导其编码的氨基酸序列与苹果(AAQ04224.1)、番木瓜 (ABG72806.1)、胡萝卜 (*Daucus carota*) (2121278A)等的同源性分别为 92%、86%、87%。终止密码子后的 3' 端非编码区长度为 242 bp,包含 1 个由 17 个腺苷酸组成的 poly(A)。

对 cDNA 第一链加同聚物尾合成第二链,用引物 P5 和 AUAP 对 5'RACE 进行 PCR 扩增,得到 1 个 695 bp 的 cDNA 片段(图 1),其与保守区 cDNA 有 239 bp 的重叠区,实际大小为 439 bp。在 NCBI 网站上 BLAST 检索,其与苹果 (AF429984)、蓖麻 (*Ricinus communis*) (XM002512193)、黄 龙 胆 (*Gentiana lutea*) (EF203258.1)等的同源性分别为 77%、86%、87%。推导其编码的氨基酸序列与苹

果(AAQ04224.1)、橙(*Citrus sinensis*)(CAC85667.1)、柚 (ACE79169.1)等的同源性分别为 83%、70%、70%。5'端包含 1 个 196 bp 的非编码区。

2.2 ORF 克隆及全序列分析

根据草莓 ZDS 保守区、5'端和 3'端的测序结果,拼接出全长 cDNA,用 ORF 引物 P6 和 P7 进行 PCR 扩增,目的片段符合预期(图 1)。将全长片段回收纯化,经连接、转化、筛选阳性克隆、重组质粒 PCR 鉴定、测序,测序结果和拼接序列一致,确证其为草莓 ZDS 基因序列,命名为 FaZDS。该 cDNA 全长 2148 bp,具有完整的开放阅读框(197 ~ 1906 碱基),共有 1710 个碱基,编码 569 个氨基酸,分子量为 62.738 kDa,理论等电点为 6.85。该 cDNA 序列已 登 录 GenBank,登 录 号 为 FJ795343 (GI: 256041891)。

将获得的 FaZDS 基因全长 cDNA 及其编码的氨基酸序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 同源性检索,结果表明,FaZDS 与苹果(AF429984.1)、番木瓜 (FJ812088.1)、麻疯树(*Jatropha curcas*)(GQ337075.1)、蓖麻(XM002512193)等的同源性分别为 86%、83%、

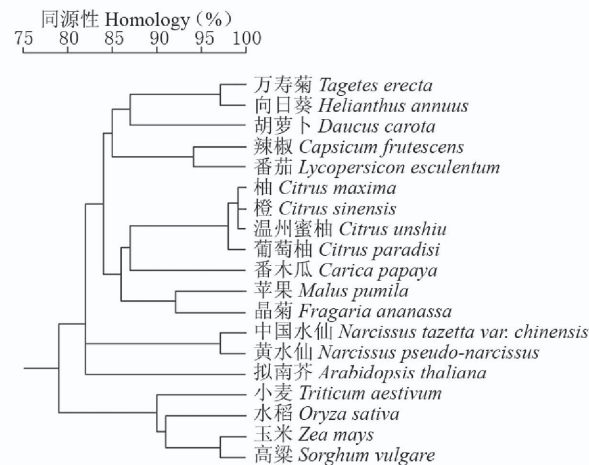


图 2 ZDS 蛋白的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of ZDS in different plants

83%、83%。推导的氨基酸序列与苹果(AAQ04225.1)、温州蜜柚 (*Citrus unshiu*) (BAB68552.1)、橙(CAC85667.1)、柚(ACE79169.1)等的同源性分别为 91%、86%、86%、86%。

利用 DNAMAN5.0 软件对草莓、苹果等 19 种植物 ZDS 基因的氨基酸序列进行多重比较表明,不同植物 ZDS 基因的氨基酸序列中部具有很高的保守性,氨基酸序列同源性高达 83.58%。19 种植物的 ZDS 蛋白系统进化分析表明(图 2),草莓和苹果的 ZDS 蛋白亲缘关系比较近,聚为一类;之后与番木瓜、橙、柚、温州蜜柑、葡萄柚等聚在一起,而与高粱、玉米和水稻等单子叶植物系统进化上相距最远。

2.3 原核表达载体 PET-ZDS 鉴定及表达

用 *Nde* I 和 *Xho* I 对原核表达载体 PET-ZDS 进行双酶切鉴定(图 3),获得约 1.7 kp 的片段,与预期大小一致,说明原核表达载体 PET-ZDS 构建成功。

经 SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色表明,用 1 mmol/L IPTG 诱导 8 h 后,携带重组质粒 PET-ZDS 的 *E. coli* 菌株中出现 1 条约 84 kDa 的蛋白条带,而携带空质粒 pET32a(+)的菌株中无相应蛋白条带。由于融合蛋白中 His 标签及质粒编码的氨基酸约为 21.0 kDa,因此所表达的蛋白条带大小与 ZDS 蛋白预测的 62.7 kDa 基本一致。

2.4 FaZDS 的组织表达

用半定量 RT-PCR 法对 *FaZDS* 基因的表达进行分析,结果表明草莓的叶、花、绿果、白果、粉红色和红果中均有 *FaZDS* 基因的表达(图 4),说明该基

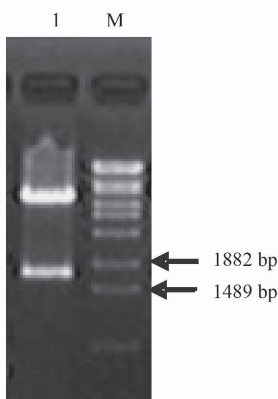


图 3 pET-ZDS 重组质粒 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmids digested by *Nde* I and *Xho* I

M. λ-EcoT14 I digest; 1. 质粒 pET-ZDS.

因为组成型表达,但表达量存在明显差异,花中的表达量最高,青果最低。果实不同发育阶段的表达量不同,随着果实的成熟,表达量相应增加,以红果的表达量最大。草莓 ZDS 基因的表达以花 > 红果 > 粉红色果 > 白果 > 青果 > 叶。

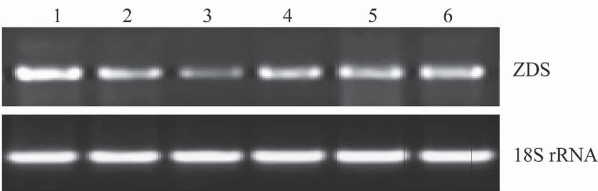


图 4 FaZDS 基因在不同器官中的表达

Fig. 4 Expression of *FaZDS* gene in different organs

1: 花 Flower; 2: 青果 Green fruit; 3: 叶 Leaf; 4: 白果 White fruit; 5: 粉红色果 Pink fruit; 6: 红果 Red fruit.

3 讨论

高等植物中,类胡萝卜素是在质体中通过类异戊二烯途径合成的^[8]。近年来,对类胡萝卜素合成的 3 个关键限速反应研究比较多,如牻牛儿苗基焦磷酸的合成、八氢番茄红素的合成以及八氢番茄红素的去饱和作用,包括相关的 4 种酶:牻牛儿苗基焦磷酸合成酶、八氢番茄红素合成酶、八氢番茄红素去饱和酶和 ζ-胡萝卜素脱氢酶(ZDS)^[9]。ZDS 催化 ζ-胡萝卜素生成整个类胡萝卜素合成途径中的第一个有色(淡黄色)分子——链孢红素,其进一步脱氢生成番茄红素^[10]。ZDS 是类胡萝卜素合成途径中的重要限速酶,对合成途径具有调控作用。2004 年 Rodrigo 等^[11]从成熟柑橘果实中克隆到 ZDS 的 cDNA 序列,且 ZDS 对柑橘果实中类胡萝卜素的积累起重要的正调控作用。

Jěřemy 等^[12]的研究也证实, 胡萝卜根中的番茄红素和叶黄素含量与 *ZDS* 基因的表达有直接关系, 认为 *ZDS* 是影响番茄红素积累的关键酶。

目前已从辣椒、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (GBAN U38550)、黄水仙 (*Narcissus pseudo-narcissus*) (GBAN AJ224683)、小麦 (*Triticum aestivum*)^[13] 和中国水仙 (*N. tazetta* var. *chinensis*)^[14] 等中分离出 *ZDS*, 其 cDNA 全长为 1.8 ~ 2.1 kb, 编码 558 ~ 574 个氨基酸。*ZDS* 的氨基酸序列中都有 1 个特征序列, 该特征序列也存在于吡啶二硫核苷酸氧化还原酶多肽中^[9]。本研究成功克隆了草莓 *ZDS* 基因的全长 cDNA, 约为 2148 bp, 具有完整的开放阅读框 (197 ~ 1906 bp), 共 1710 bp, 编码 569 个氨基酸。经 DNAMAN5.0 软件分析, 草莓 *ZDS* 与苹果的亲缘关系比较近。

类胡萝卜素既是决定水果、蔬菜内在营养品质的重要指标, 也是影响果实外观品质和花卉观赏价值的重要因素^[3]。作为类胡萝卜素合成途径中的重要限速酶, ζ -胡萝卜素脱氢酶 (*ZDS*) 在果实显色和成熟中起着重要作用^[6,14-15]。Zhu 等^[16]研究了开花期龙胆的 *ZDS* 基因表达, 认为 *ZDS* 基因只在花和叶片中表达, 且全开的花中表达量最高, 因此它的转录控制着龙胆花中类胡萝卜素的积累。中国水仙中的 *NTZDS1* 基因的表达模式与龙胆 *ZDS* 的基本一致^[14]。番木瓜的果实、花、叶片中均可检测到 *ZDS* 基因的表达, 成熟果实的表达量比花和叶的高^[6]。本研究表明 *FaZDS* 基因在草莓花中的表达量最高, 其次是果, 叶最低, 推测 *FaZDS* 可能在草莓果实的类胡萝卜素积累和花的显色中起重要作用。类胡萝卜素在草莓不同器官中的含量及分布规律是否与 *FaZDS* 的表达相关, 探讨 *FaZDS* 基因在草莓类胡萝卜素合成中的功能还有待进一步研究, 为草莓品质改良研究奠定基础。

参考文献

- [1] Wang Y P (王玉萍), Liu Q C (刘庆昌), Zhai H (翟红). Expression and regulation of genes related to plant carotenoid biosynthesis and their application in plant gene engineering [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2006, 4(1): 103-110. (in Chinese)
- [2] Bartley G E, Scolnik P A. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health [J]. Plant Cell,

- 1995, 7: 1027-1038.
- [3] Tao J (陶俊), Zhang S L (张上隆). Metabolism of caroteneoid and its regulation in garden crop [J]. J Zhejiang Univ (Agri Life Sci) (浙江大学学报: 农业与生命科学版), 2003, 29(5): 585-590. (in Chinese)
- [4] Xu C J (徐昌杰), Zhang S L (张上隆). Carotenoid biosynthesis and its regulation in plant [J]. Plant Physiol Commun (植物生理学通讯), 2000, 36(1): 64-67. (in Chinese)
- [5] Tao J (陶俊), Zhang S L (张上隆), Xu C J (徐昌杰), et al. Gene and gene engineering of carotenoid biosynthesis [J]. Chin J Biotechn (生物工程学报), 2002, 18(3): 276-281. (in Chinese)
- [6] Gao X Z (高新征), Yan P (言普), Shen W T (沈文涛), et al. Temporal-spatial expressing analysis of *ZDS* gene of papaya by real-time QF-PCR [J]. Chin J Trop Crops (热带作物学报), 2009, 30(4): 510-514. (in Chinese)
- [7] Wang G L (王关林), Fang H J (方宏筠). Plant Gene Engineering [M]. Beijing: Science Press, 2002: 752. (in Chinese)
- [8] Lichtenthaler H K, Schwender J, Disch A, et al. Biosynthesis of isoprenoids in higher plants chloroplasts proceeds via a mevalonate independent pathway [J]. FEBS Let, 1997, 40(3): 271-274.
- [9] Huang B C (黄彬城), Ji J (季静), Wang G (王罡), et al. Advances of carotenoid in plants [J]. Tianjin Agri Sci (天津农业科学), 2006, 2 (2): 13-17. (in Chinese)
- [10] Breitenbach J, Sandmann G. (zeta)-Carotene *cis* isomers as products and sudstrates in the plant poly-*cis* carotenoid biosynthetic pathway to lycopene [J]. Planta, 2005, 220(5): 785-793.
- [11] Rodrigo M J, Marcos J F, Zacartas L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and rnaturation [J]. J Agri Food Chem, 2004, 52: 6724-6731.
- [12] Jěřemy C, Didier P, Renmin B, et al Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development [J]. J Exp Bot, 2008, 59(13): 3563-3573.
- [13] Cong L (丛玲), Liu L (刘璐), Wang C (汪成), et al. Isolation of cDNA eoding ζ -carotene desaturase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Biotechnology (生物技术), 2009, 19(2): 1-3. (in Chinese)
- [14] Chen D F (陈段芬), Peng Z H (彭镇华), Gao J (高健). Cloning and expression analysis of *ZDS* gene in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. For Res (林业科学研究), 2009, 22(1): 115-119. (in Chinese)
- [15] Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, et al. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit [J]. Plant Physiol, 2004, 34(2): 824-837.
- [16] Zhu C, Yamamura S, Koiwa H, et al. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea* [J]. Plant Mol Biol, 2002, 8(3): 277-285.