

夏海武,曹 慧,王效忠. 桑树白藜芦醇合酶基因全长克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):17-20.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.006

桑树白藜芦醇合酶基因全长克隆及序列分析

夏海武,曹 慧,王效忠

(山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室/潍坊学院,山东潍坊 261061)

摘要:根据已知的其他物种白藜芦醇合酶 cDNA 保守序列设计引物,用 RT-PCR 技术从桑葚中扩增获得白藜芦醇合酶基因部分 cDNA 序列,再用 RACE 技术获得其两端序列,并拼接得到完整的 1 442 bp 白藜芦醇合酶基因。经序列分析发现,桑树白藜芦醇合酶基因开放阅读框长 1 170 bp,编码 389 个氨基酸,氨基酸序列含有芪合酶家族特征信号区 GVLFGFGPGLT 和活性中心序列 GCFAGGTVLR;该基因与花生芪合酶基因的核苷酸序列同源性高达 82.82%,氨基酸序列的同源性高达 87.15%。

关键词:桑树;白藜芦醇合酶基因;RT-PCR;RACE 技术;序列分析

中图分类号: Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0017-04

桑葚为桑科落叶乔木桑树(*Morus alba* Linn.)的果实,聚花果,每年 4—6 月份成熟,不同生长环境、不同品种的果实之间存在差异。中国地大物博,桑葚资源丰富,全国各省份均有桑树的分布^[1-2]。桑葚含有丰富的营养物质,具有食用及中药材之用,早在 2 000 多年前,它就成为皇帝的御用药品之一。1993 年,国家卫生部把桑葚列为“既是食品又是药品”的农产品之一^[3]。现已证明桑葚具有 6 种防病保健功能,包括抗癌抗诱变、增强免疫力、保驾护航、驻颜抗衰老、促进造血细胞生长、降低血糖血脂等^[4],这些保健功能主要依赖于桑葚中含有的一种叫白藜芦醇的芪类物质,它具有抗氧化及消除自由基功效,有防癌、抗炎、预防心血管疾病、抗衰老等功能^[5-6]。白藜芦醇和其他芪类化合物均属于次生代谢物,其生物合成途径是苯丙氨酸-丙二酸,在白藜芦醇合成全过程中,白藜芦醇合酶(RS)是代谢途径中最后一个起作用的关键酶^[7],也是合成途径中唯一必需的合成酶,它催化 1 分子 4-香豆酰辅酶 A 和 3 分子丙二酰辅酶 A 反应合成白藜芦醇^[8]。

白藜芦醇合成的底物在植物体内广泛存在,白藜芦醇的合成及含量控制主要依赖于白藜芦醇合酶基因的表达状况^[9],但大多数植物不含白藜芦醇合酶或含量很低。目前,虽然发现含有白藜芦醇的植物已有 70 多种,但要从天然植物中提取到高丰度的白藜芦醇比较困难,并且提取成本较高。利用基因工程技术使更多的植物产生白藜芦醇或提高植物体内白藜芦醇的含量,满足人们医疗保健需求具有重要的现实意义。目前,已从松树、花生、葡萄、爬山虎、大黄等植物中分离到白藜芦醇合酶基因,但还没有从桑葚中克隆白藜芦醇合酶基因全长序列的报道。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 桑树接近成熟的果实,采自山东省潍坊市农业科学院。采后洗净,每 2 g 为 1 份,装于 5 mL 离心管中,液氮速冻,保存于 -80 ℃ 超低温冰箱中待用。

1.1.2 试剂盒、酶和试剂 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒,购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司;cDNA 第一链合成试剂盒,购于 Fermenta 公司;RACE 试剂盒,ClonTech 公司产品;pMD 18-T Vector Kit,Marker (DL2000)、T₄-DNA 连接酶、5.0 U/μL *Taq* DNA polymerase,购于 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司;其他试剂,分析纯,均为国产或进口。

1.1.3 试验用具与耗材的预处理 用于 RNA 提取的研钵、

收稿日期:2014-07-09

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2010CL022);山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室(潍坊学院)开放课题(编号:2012SWKF02)。

作者简介:夏海武(1958—),男,山东潍坊人,博士,教授,从事植物生物技术研究。E-mail:xianghaiwu206@163.com。

[15] Hu Y, Poh H M, Chua N H. The arabidopsis *ARGOS-LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth[J]. *Plant Journal*, 2006, 47(1):1-9.

[16] Kim G T, Tsukaya H, Uchimiya H. The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(15):2381-2391.

[17] Kim J H, Choi D S, Kende H. The *AtGRF* family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2003, 36(1):94-104.

[18] Szecsi J, Joly C, Bordji K, et al. *BIGPETALp*, a *bHLH* transcription

factor is involved in the control of *Arabidopsis* petal size[J]. *EMBO Journal*, 2006, 25(16):3912-3920.

[19] Deprost D, Yao L, Sormani R, et al. The arabidopsis *TOR* kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation[J]. *EMBO Reports*, 2007, 8(9):864-870.

[20] Feng G, Qin Z, Yan J, et al. Arabidopsis *ORGAN SIZE RELATED1* regulates organ growth and final organ size in orchestration with *ARGOS* and *ARL*[J]. *New Phytologist*, 2011, 191(3):635-646.

[21] Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)[J]. *Science*, 2006, 313(5793):1596-1604.

药匙、镊子、50 mL 离心管、试剂瓶等器具,用 0.1% 焦炭酸二乙酯处理过夜;无 RNA 酶的专用枪头、PCR 管、1.5 mL 离心管等耗材,经 1.1 MPa、121 ℃ 高压灭菌 30 min 或在干燥箱中 60 ℃ 烘干,备用。

1.2 试验方法

1.2.1 桑葚总 RNA 的提取与检测

1.2.1.1 桑葚总 RNA 的提取 迅速从 -80 ℃ 冰箱中取出桑葚 2 g,置于用液氮预冷的研钵中,加入 PVPP 0.2 g,研磨成细粉末,在研磨时不断加入液氮以不让组织解冻;在 50 mL 离心管中,加入经 65 ℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液 20 mL 和 β -巯基乙醇 400 μ L,倒入研磨好的桑葚细粉末,充分振荡混匀,65 ℃ 水浴 30 min;取出,冷却至室温,加入等体积的氯仿-异戊醇(体积比 49:1),混匀,于 4 ℃、20 000 g 离心 20 min;将上层水相移至另 1 支离心管中,加入 1/4 体积 10 mol/L 氯化锂,混匀,4 ℃ 冰箱沉淀过夜;4 ℃、20 000 g 离心 20 min,弃上清,用 2 mol/L 氯化锂洗涤沉淀 1 次,4 ℃、20 000 g 离心 10 min,取沉淀;用 2 mL 无 RNase 的 ddH₂O 溶解沉淀,转入 4 个 1.5 mL 离心管中,加等体积的氯仿-异戊醇(体积比 49:1)颠倒混匀,于 4 ℃、20 000 g 离心 20 min;将上层水相移至新的离心管中,加入 1/10 体积 3 mol/L、pH 值为 5.2 的乙酸钠和 2 倍体积的无水乙醇,置于 -20 ℃ 冰箱 1 h 以沉淀 RNA;4 ℃、20 000 g 离心 15 min,弃上清,沉淀用 75% 乙醇漂洗 2 次,真空抽干 5 min;加入 100 μ L 无 RNase 的 ddH₂O 充分溶解,放 -20 ℃ 冰箱保存。

1.2.1.2 电泳检测 将电泳槽、制胶板、梳子等用 DNA-RNA Away 处理,晾干,用 1×TAE 电泳缓冲液配制 1.0% 琼脂糖凝胶;待凝固,点入 3 μ L 提取的 RNA 样品,在预冷的 1×TAE 电泳缓冲液中,100 V 电压条件下电泳 20 min 左右;观察凝胶成像仪上 RNA 条带的清晰度和完整性,拍照。

1.2.2 桑葚芪合酶保守区 cDNA 的克隆

1.2.2.1 引物设计 根据 GenBank 中葡萄和花生白藜芦醇合酶基因的核苷酸序列,分别设计桑葚白藜芦醇合酶基因保守区的上、下游引物。上游引物(BP1)为:5'-GGCCAGC-CAATGTCTAAGATCAC-3',下游引物(BP2)为:5'-CTGCG-GAGGACAACAGTTTCAAC-3',由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2.2.2 桑葚白藜芦醇合酶保守区 cDNA 的 RT-PCR 扩增

按照试剂盒说明书进行,50 μ L 反应体系为:10×PCR buffer (Mg^{2+} Plus) 5.0 μ L, cDNA 2.0 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTP 1.0 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA Polymerase 0.5 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保存。取 10 μ L 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶、1×TAE 电泳缓冲液、90 V 电压条件下电泳 30 min,其余产物用于回收。

1.2.2.3 目的片段的回收 从琼脂糖凝胶上切下目的片段条带称重,装入 1.5 mL 离心管中,按照北京鼎国昌盛生物技术有限公司的 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒说明书进行操作,得到纯化的 PCR 产物。

1.2.2.4 目的片段与载体的连接与转化 按 TaKaRa 公司的 pMD 18-T Vector Kit 说明书,将连接产物转化到大肠杆

菌 DH5 α 。大肠杆菌感受态细胞的制备及其转化采用 CaCl₂ 法。

1.2.2.5 重组质粒的 PCR 检测与测序 挑取白色菌斑置于加抗生素的 LB 培养基中,对菌液进行 PCR 检测,20 μ L 反应体系为:10×PCR buffer (Mg^{2+} Plus) 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 菌液 2.0 μ L, 上、下游引物各 1.0 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA Polymerase 0.3 μ L, 加无菌 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保存。取 10 μ L 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶、1×TAE 电泳缓冲液、90 V 电压条件下电泳 30 min,在凝胶成像仪上观察并拍照,并将扩增出目的条带的样品菌液送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.3 桑葚芪合酶 cDNA 全长的克隆

1.2.3.1 引物设计及合成 根据保守区 cDNA 的测序结果和 ClonTech 公司 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书要求,设计 3'RACE 上游引物(SP2)为:5'-CTATCT-TAACAAGAGTGTTCCTCCG-3'和 5'RACE 下游引物(SP1)为:5'-GCGGTATTCTCAGAGCAAACAATGAG-3',引物序列委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.3.2 第一链 cDNA 的合成 按照试剂盒操作说明书进行,5'RACE CDS 引物序列为:5'-(T)₂₅ VN-3', (N=A、C、G 或 T; V=A、G 或 C);3'RACE CDS 引物序列为:5'-AAGCAGTG-GTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀ VN-3';BD SmartII A oligo 序列:5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCCGG-3'。

1.2.3.3 cDNA 末端的快速扩增 3'RACE PCR 扩增体系:PCR-Grade Water 34.5 μ L, 10×BD Advantage 2 PCR buffer 5.0 μ L, 3'-RACE-Ready cDNA 2.5 μ L, UPM (10×) 5.0 μ L, 10 μ mol/L SP2 1.0 μ L, 10 μ mol/L dNTP Mix 1.0 μ L, 50×BD Advantage 2 Polymerase Mix 1.0 μ L。5'RACE PCR 扩增体系:PCR-Grade Water 34.5 μ L, 10×BD Advantage 2 PCR buffer 5.0 μ L, 5'-RACE-Ready cDNA 2.5 μ L, UPM (10×) 5.0 μ L, 10 μ mol/L SP1 1.0 μ L, 10 μ mol/L dNTP Mix 1.0 μ L, 50×BD Advantage 2 Polymerase Mix 1.0 μ L。其中,UPM 是通用引物混合物,其长序列为:5'-CTAATAC-GACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3',短序列为:5'-CTAATACGACTCACTATAGGG C-3'。PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min;4 ℃ 保存。取 10 μ L 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶、1×TAE 电泳缓冲液、90 V 电压条件下电泳 30 min,其余产物用于回收。回收的 PCR 产物,进行电泳、回收、连接、转化和蓝白斑筛选。

1.2.3.4 重组质粒的 PCR 检测 将白斑挑起,液体培养过夜,进行菌液 PCR 检测。20 μ L 反应体系为:10×PCR buffer (Mg^{2+} Plus) 2.0 μ L, 菌液 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, UPM (10×) 5.0 μ L, 10 μ mol/L SP (5'RACE 加 SP1, 3'RACE 加 SP2) 1.0 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA Polymerase 0.5 μ L, 加无菌 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保存。取 10 μ L 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶、1×TAE 电泳缓冲液、90 V 电压条件下电泳 30 min,将含重组质粒的阳性菌液送上海生工生物工程技术有限公司

测序。

2 结果与分析

2.1 桑葚总 RNA 的提取结果

由图 1 可见,提取的桑葚总 RNA 样品可以看到 3 条带,分别为 28S、18S 和 5S,其中 28S、18S 条带整齐清楚,且 28S 条带比 18S 条带更亮,5S 条带非常暗淡,这说明桑葚的总 RNA 完整性较好,没有出现降解。RT-PCR 扩增和 RACE 试验结果进一步证实,提取的桑葚总 RNA 质量较高、完整性好,能满足多数分子生物学试验要求。

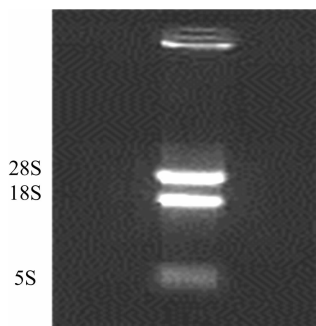


图1 桑葚总RNA的电泳检测图

2.2 桑葚白藜芦醇合酶保守区 cDNA 的 PCR 扩增与序列分析

将桑葚总 RNA 进行逆转录合成 cDNA 第一链,再以 cDNA 第一链为模板,以 BP1 和 BP2 为上、下游引物进行 PCR 扩增,得到 1 条 800 bp 左右的特异条带(图 2)。

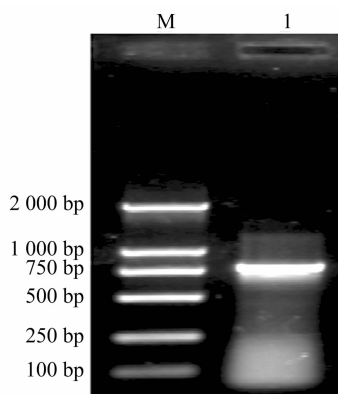


图2 桑葚白藜芦醇合酶基因保守区的 PCR 扩增电泳图

将该产物进行克隆、菌液 PCR 检测,将检测结果阳性的相应菌液送样测序,结果表明,该 PCR 产物的大小为 806 bp。由此推导出的氨基酸序列编码 268 个氨基酸,其中包含植物芪合酶的活性中心和家族特征信号区,该 PCR 产物是桑葚白藜芦醇合酶保守区 cDNA 片段。

2.3 桑葚白藜芦醇合酶 cDNA 的 RACE 与序列分析

在桑葚白藜芦醇合酶保守区 cDNA 内,各设计 1 条正向引物 SP2 和反向引物 SP1,采用 BD SMARTTM RACE 技术,分别进行 3'端和 5'端的 PCR 扩增,电泳检测结果表明,3'RACE 和 5'RACE 特异条带的大小均在 500 ~ 750 bp 之间(图 3、图 4)。将这 2 个特异片段进行克隆、菌液 PCR 检测,结果表明,3'RACE 和 5'RACE 样品电泳都有预计大小的特异条带。测

序结果表明,3'RACE 产物的大小为 635 bp,该序列与保守区有 361 bp 的重叠区,在第 481 ~ 485 bp 处存在加尾信号序列 AATAA,在序列的末端含有 19 个 A 的 poly(A) 尾巴;5'RACE 产物的大小为 585 bp,该序列与保守区有 232 bp 的重叠区。由此推断,这 2 个片段分别是桑葚白藜芦醇合酶 cDNA 的 3'端和 5'端。

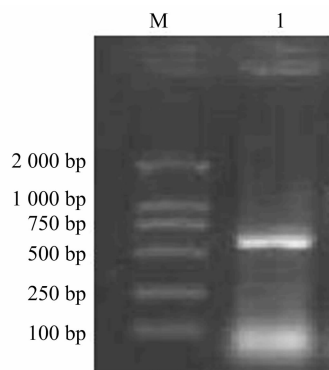


图3 桑葚白藜芦醇基因 3'RACE 的 PCR 扩增产物

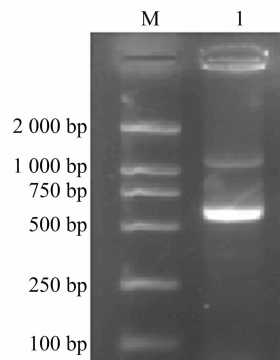


图4 桑葚白藜芦醇基因 5'RACE 的 PCR 扩增产物

2.4 桑葚白藜芦醇合酶 cDNA 全长的获得与序列分析

由图 5 可见,桑葚白藜芦醇合酶 cDNA 编码区长度为 1 170 bp,编码 389 个氨基酸,该氨基酸序列含有芪合酶的活性中心序列 GCFAGGTVLR 和家族特征信号区 GVLFGFG-PGLT;在起始密码子 ATG 上游有 11 bp 的 5'端非编码区,在终止密码子 TAA 下游有 259 bp 的 3'端非编码区序列,其中,在第 1286 ~ 1290 bp 为加尾信号 AATAA。

将桑葚与其他植物白藜芦醇合酶基因编码区核苷酸序列与氨基酸序列进行比较,结果(表 1)表明,桑葚白藜芦醇合酶与花生的同源性较高,核苷酸序列和氨基酸序列同源性最高分别达到 82.82% 和 87.15%,与葡萄的同源性在 60% 左右。这说明桑葚白藜芦醇合酶基因与以往克隆的白藜芦醇合酶基因有一定的进化距离。

3 结论

近年来,人们发现至少 21 科 31 属 72 种植物中存在白藜芦醇,日常生活中人们喜闻乐见的食物如葡萄、桑葚、花生、凤梨等含有白藜芦醇,许多常见的药用植物中也含有白藜芦醇,如决明、藜芦、何首乌、虎杖等。已有资料表明,不同类群植物中白藜芦醇的含量差异很大,且多数植物中白藜芦醇含量都很低。笔者用高效液相色谱法测得桑葚中白藜芦醇的鲜质量

图5 桑葚白藜芦醇合酶 cDNA 全长的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

表 1 桑葚与花生、葡萄白藜芦醇合酶基因编码区核苷酸和氨基酸序列同源性比较

植物名称	基因登录号	核苷酸序列 同源性(%)	氨基酸序列 同源性(%)
桑葚		100	100
花生	AB027606	80.68	85.60
花生	AF227963	81.37	85.09
花生	AY170347	81.20	84.83
花生	AY826726	80.94	86.38
花生	DQ124938	80.85	85.60
花生	L00952	82.82	87.15
葡萄	AB046373	60.77	66.07
葡萄	AB046374	60.69	66.33
葡萄	AB046375	60.45	65.82
葡萄	AF128861	60.22	66.84
葡萄	AF274281	64.55	65.05
葡萄	DQ366301	63.16	66.58
葡萄	DQ366302	64.29	65.56

- [1] 李冬香,陈清西. 桑葚功能成分及其开发利用研究进展[J]. 中国农学通报,2009,25(24):293-297.
- [2] 潘训海,刘新露,罗惠波,等. 桑葚果酒酵母的分离及筛选[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):249-251.
- [3] 吴祖芳,翁佩芳. 桑葚的营养组分与功能特性分析[J]. 中国食品学报,2005,5(3):102-107.
- [4] 黄勇,张林,赵卫国,等. 桑葚的化学成分及药理作用研究进展[J]. 广西蚕业,2006,43(3):15-19.
- [5] Jang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Science, 1997, 275(5297):218-220.
- [6] Chan M M. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(2):99-104.
- [7] Rolfs C H, Fritzemeier K H, Kindl H. Cultured cells of *Arachis hypogaea* susceptible to induction of stilbene synthase (resveratrol-forming)[J]. Plant Cell Reports, 1981, 1(2):83-85.
- [8] Lanz T, Schroder G, Schroder J. Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell-cultures of *Arachis hypogaea*[J]. Planta, 1990, 181(2):169-175.
- [9] Schwekendiek A, Pfeffer C, Kindl H. Pine stilbene synthase cDNA, a tool for probing environmental stress[J]. Federation of European Biochemical Societies Letters, 1992, 301(1):41-44.
- [10] 夏海武,吕柳新. 几种果实中白藜芦醇含量的研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(12):99-100, 131.