

赵志常,张波,高爱平,等. 芒果 *UFGT* 基因的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):31-34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.007

芒果 *UFGT* 基因的克隆及表达分析

赵志常¹, 张波^{1,2}, 高爱平¹, 陈业渊¹, 黄建峰¹, 党志国¹, 罗睿雄¹

(1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室,海南儋州 571737;
2. 海南大学农学院,海南海口 570228)

摘要:花色苷的合成是红色芒果果实着色的主要代谢途径,类黄酮糖基转移酶(*UFGT*)是花色苷合成的最后一个酶,它可以不稳定的花色苷催化成花色苷。根据已经报道的 *UFGT* 基因的序列设计兼并引物,采用 3'RACE、5'RACE 方法,克隆得到芒果果实 *UFGT* 基因的全长 cDNA 序列。该基因开放阅读框为 1 392 bp,编码 463 个氨基酸,分子量为 51.15 ku。对基因组扩增得到 2 770 bp 长度的片段分析发现,该基因含有 2 个内含子,分别在 501 ~ 1 095 bp,1 548 ~ 2 330 bp。通过系统发育分析发现,该基因编码的蛋白与荔枝、山竹子等热带果树具有较近的亲缘关系。对不同芒果品种的 *UFGT* 基因表达进行分析发现,红色的芒果品种中表达量较高,黄色的芒果品种中表达量较低。

关键词:芒果;花色苷;*UFGT* 基因;基因克隆

中图分类号: S667.701;Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0031-03

芒果 (*Mangifera indica*) 是重要的热带、亚热带果树,其果实颜色多样^[1]。芒果果实富含类胡萝卜素、花色苷等物质,其中花色苷合成途径是红色芒果果实着色的主要代谢途径。类黄酮糖基转移酶(*UFGT*)是花色苷合成的最后一个酶,可以将不稳定的花色苷催化成花色苷。卢其能等^[1]、刘海峰等^[2] 分别从红巴梨果皮、马铃薯以及山葡萄中克隆了 *UFGT* 基因,并且作了表达分析,到目前为止,山竹子 (*Garcinia mangostana*)、草莓 (*Fragaria × ananassa*)、西洋梨 (*Pyrus communis*)、葡萄柚 (*Citrus × paradisi*)、荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 等果树中的 *UFGT* 基因得到了克隆^[3-6]。*UFGT* 是花色苷合成的关键基因。Ju 等发现,苹果果实发育过程中,*UFGT* 只在果实接近成熟的转色期表达,表达的强度与花色苷合成呈正相关^[7]。Boss 等对白皮葡萄、黑皮葡萄的不同组织进行表达分析发现,*UFGT* 基因只在有色的葡萄果皮中表达^[4]。本研究采用 RACE 方法从芒果的果实中克隆得到了一个 *UFGT* 基因,探讨该基因在芒果果实花色苷合成的作用机制及其对果实着色的影响,深入揭示该基因在芒果果实花色苷生物合成的分子机制,旨在为芒果果实着色提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以贵妃芒果的果实(取自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所的农业部芒果种质资源圃)为试材。大肠杆菌 DH5a 为本实验室保存,引物合成自英骏生物技术有限公

司,DEPC、IPTG、Tryptone、Yeast extract、Amp、X-Gal、pMD-19T 载体、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、T₄ DNA 连接酶、各种限制性内切酶均购于大连宝生物公司。

1.2 方 法

参照王家保等所述的方法^[5]提取芒果 DNA,用无菌的双蒸水溶解,采用核酸蛋白测定仪进行测定, -20 °C 保存备用。采用天根总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取芒果总 RNA,用 RNase-free 无菌水溶解,用大连宝生物公司的 DNase 试剂盒进行 DNA 去除,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和 DNA 是否去除干净,并用核酸蛋白测定仪对所得 RNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 及浓度进行测定,用 TaKaRa 公司的 3' 和 5' - RACE 试剂盒进行目的基因的 3'、5' 转录。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 50 s,50 °C 复性 50 s,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;72 °C 延伸 7 min;反应体系为 25 μL,其中含 10 × PCR buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL、25 ng/μL DNA 模板 2.0 μL、20 μmol 引物各 1.0 μL、2.5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL、5.0 mmol/L dNTPs 2.0 μL;反应体系在 eppendor PCR 仪上扩增,扩增反应结束后取 10 μL 进行扩增产物的电泳,采用 gelred 染色后在紫外凝胶成像仪上观察、拍照分析。

1.3 *UFGT* 基因全长 cDNA 和基因组 DNA 序列的获得

以贵妃芒果的果实总 RNA 作为模板,采用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 反转录合成第一链 cDNA,并参照该试剂盒的说明书进行 cDNA 3' 端和 5' 末端 cDNA 的扩增。根据 cDNA 片段的测序结果,分别设计 2 条上游引物,以接头为锚定引物进行半巢式 PCR 反应。将 3' 端和 5' 末端的 PCR 反应产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,确定所得到的片段大小是否与预测的片段大小一致。目的基因片段回收、连接、转化、鉴定及测序,并根据已知的片段和得到的 cDNA 3' 端和 5' 末端的序列结果拼接该基因的全长 cDNA。以上述 cDNA 和提取的基因组 DNA 为模板,设计特异引物,进行全长 cDNA 和基因组 DNA 序列扩增反应,PCR

收稿日期:2015-03-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471850);中南美洲热带作物种质资源收集与合作研究(编号:2011dfb31690);非营利性科研机构改革启动经费(编号:CATAS-PZS-201225、CATAS-TCGRI、1630032013003)。

通信作者简介:赵志常(1977—),男,副研究员,研究方向为热带果树遗传育种与分子生物学。E-mail:zhaozhichang2001@163.com。

反应体系 25 μL , 从中取 6 μL PCR 产物加入 0.2 mL PCR 管中, 加入 1 μL 6 \times Loading Buffer, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增的片段大小是否正确。确定 PCR 产物中含有所需大小的目的片段一致后, 对 PCR 产物进行普通琼脂糖凝胶电泳, 用手术刀在紫外灯下切下含有目的片段胶块, 再用 DNA 凝胶回收试剂盒 (Agarose Gel DNA Purification Kit, TaKaRa 公司) 进行目的片段回收, 参照试剂盒说明书上的步骤进行回收。取 5 μL 回收纯化后的目的 DNA 产物进行 1.2% 琼脂糖电泳检测, 以检验回收效果及大致含量, 根据回收产物片段大小及其有效浓度, 取适量回收纯化的产物与克隆载体 pMD19-T (TaKaRa 公司) 连接, 目的 DNA 与克隆载体的摩尔比控制在 3 : 1 左右。反应混合液包括 1 μL pMD19-T vector、4 μL 纯化后的 DNA、5 μL Ligation solution I, 混合均匀后在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温水浴过夜连接。

1.4 *UFGT* 基因氨基酸序列的结构特征和分子进化的分析

将所扩增得到的全长序列进行 NCBI 序列比对, 确定该基因是否为 *UFGT* 基因, 并进行其他物种 *UFGT* 基因的比对, 采用 DNAMAN 软件分析基因核苷酸和氨基酸的结构特征和同源性, 分析该基因所推定氨基酸序列, 进行多序列比较并构建系统树。

1.5 表达分析

分别提取不同芒果品种的 RNA, 反转为 cDNA 并采用 Primer 5.0 设计引物进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 分析采用内参引物 *actin*-F: 5'-AATGGAAGCTGGAATGCTCAAGGC-3' 和 *actin*-R: 5'-TGCCAGATCTTCTCCATGTCATCCCA-3'。目的基因扩增采用引物 *UFGT*-F: 5'-CAGCATAGCCCATATAGCACTC-3' 和 *UFGT*-R: 5'-CAATGGAGCCGATATAAACTAT-

3', PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 采用 Quantity One 软件进行数据分析, 作出相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *UFGT* 基因的获得

根据得到的 3' 端、5' 端序列信息进行拼接, 最后得到 *UFGT* 基因的全长 cDNA 序列。设计特异引物进行全长 cDNA 和基因组 DNA 序列扩增, 电泳结果如图 1 所示。将电泳条带回收测序后得到的 *UFGT* 基因的 cDNA 全长序列为 1 573 bp, 分析发现开放阅读框为 1 392 bp, 编码 463 个氨基酸序列 (图 2)。通过 NCBI 上已经登录的苹果、草莓、荔枝的 *UFGT* 蛋白序列进行比对 (图 3), 发现克隆的基因为 *UFGT* 基因。对基因组 DNA 扩增得到约 2 770 bp 的片段, 通过与 cDNA 序列比对发现, 该基因含有 2 个内含子, 分别位于 501 ~ 1 095 bp、1 548 ~ 2 330 bp 之间 (图 4)。

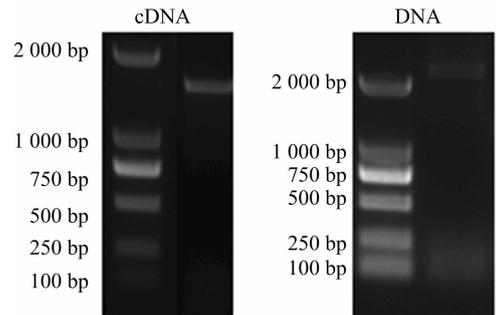


图1 *UFGT* 基因 cDNA 与基因组 DNA 电泳结果

```

1      MSQTTATVGS HVAIFAFPFA SHAAILLPVV HRLALSSPTT IFSFFTLHS NKTLSSTCKH
61     YLSLSNVRAF DLADGVPEGY LFTGKHQEDI ELFMSAGPVN LRKAVETAVA ETGKRVSCVV
121    SDAFLWFTAD IAKELDVAWV PCWTSQVNSL SAHVYTDLIR EKIGVEGIEE HLDENLDFIP
181    GMSKVRVRLD PEGVVFQNLQ SLFNSMLHQM GRKLPQADAV FLNCFEELDL TTTDDLKSKF
241    KKFLNVGPFT LLSTLPPAEV PDRNGCLSWL DGQKKAASVA YVSFGTAVKL PPAEVTIAIE
301    ALEADKVPFI WSLNENFQVD LPNGFKERTR SHGIVVPWAP QVDVLKHEAI GVFITHCGWD
361    SMLESIVGGV PMICRPFPGD HRLNGRMIES VVEVGVNVED GKFTKDLIR KLDLVLVRQEG
421    GEKMRKKIRK PKEDLLKAIG PKGSSVKNFR MLSEIVSKPK WVD

```

图2 *UFGT* 基因翻译成的蛋白序列

2.2 芒果 *UFGT* 基因的部分生物信息学分析

采用 DNAMAN 进行二级结构的预测, 发现芒果 *UFGT* 基因蛋白的二级结构主要以无规则卷曲和 β -折叠为主, 也具有少量的 α -螺旋结构 (图 5)。采用 bioedit 软件的 Kyte 和 Doolittle 算法对 *UFGT* 蛋白的亲水/疏水性 (正值表示疏水性, 负值表示亲水性) 进行分析, *UFGT* 蛋白所含的氨基酸主要介于 +1.3 ~ -3 之间 (图 6), 采用 DNAMAN 软件分析发现, 芒果 *UFGT* 蛋白与荔枝、山竹子等热带果树的蛋白序列聚为一类。草莓、苹果、桃、西洋梨、樱桃等温带果树可以聚为一类 (图 7)。

2.3 *UFGT* 基因的 RT-PCR 分析

分别提取不同着色程度的芒果果皮 RNA, 反转录为 cDNA, 通过上述 RT-PCR 分析的引物进行扩增, 对扩增结果进行分析发现: 该基因在红色果皮的贵妃的果实中表达较多, 绿色果皮中次之, 黄皮果皮中相对表达较少 (图 8), 初步推断 *UFGT* 基因可能与红色果实的花色素苷合成有密切关系, 而黄皮的芒果品种可能与类胡萝卜素合成有密切关系。

3 结论与讨论

本研究成功从芒果果实中分离得到了 1 个全长 *UFGT* 基因, 该基因的 cDNA 的开放阅读框为 1 392 bp, 编码 463 个氨基酸, 对基因组分析发现, 该基因含有 2 个内含子, 荔枝的 *UFGT* 基因含有 1 个内含子。通过在线软件对 cDNA 和蛋白序列分析证实了该序列是植物 *UFGT* 基因的一员, 也发现其所推导的氨基酸序列含有 UDPGT、COG1819、MGT 等保守结构域^[8]。芒果 *UFGT* 基因与所选其他物种 *UFGT* 基因序列相比较发现, 无论在全长 cDNA 序列上还是其编码氨基酸序列上都具有较高的保守结构域。同时, 通过与其他部分物种的氨基酸序列构建系统发生树发现, 芒果 *UFGT* 基因编码的蛋白与荔枝、山竹子等热带果树可以聚为一类, 草莓、苹果、桃、西洋梨、樱桃等温带果树可以聚为一类。付海辉等采用 MEGA 4.1 软件对部分植物的 *UFGT* 基因分析发现, 草莓、葡萄、苹果等可以聚为一类^[9], 本研究的结果与其具有一致性。付海辉等预测, 部分植物的 *UFGT* 基因可能亚细胞定位于液

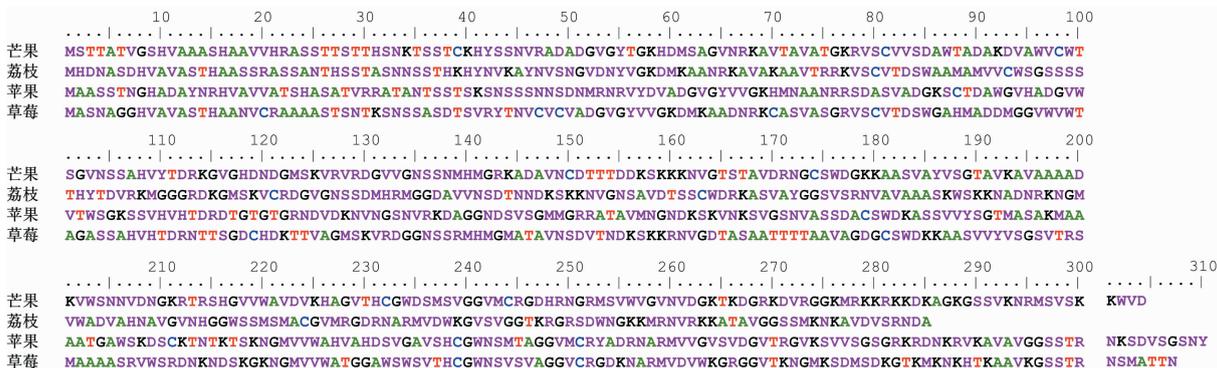


图3 几种 UFGT 蛋白的序列比对



图4 UFGT 基因组的结构
绿框为内含子序列

泡或叶绿体中,在液泡中催化不稳定的花色苷转化为稳定的花色苷,从而使花色苷在液泡中大量积累^[9]。芒果 *UFGT* 基因是芒果花色苷合成代谢途径中的关键基因,它对芒果果皮红色形成具有重要的作用。

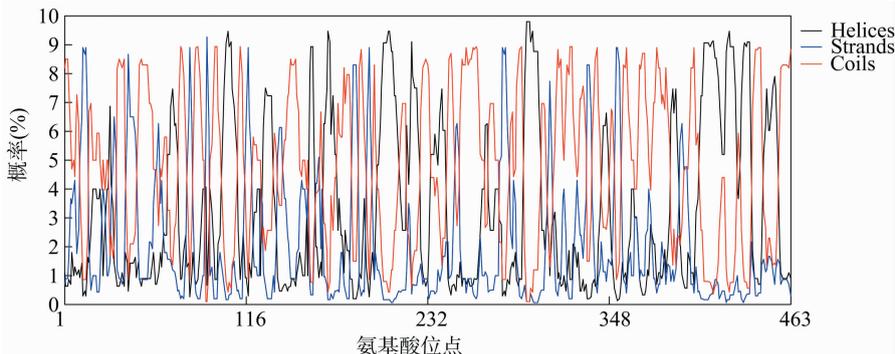


图5 UFGT 蛋白的二级结构预测结果

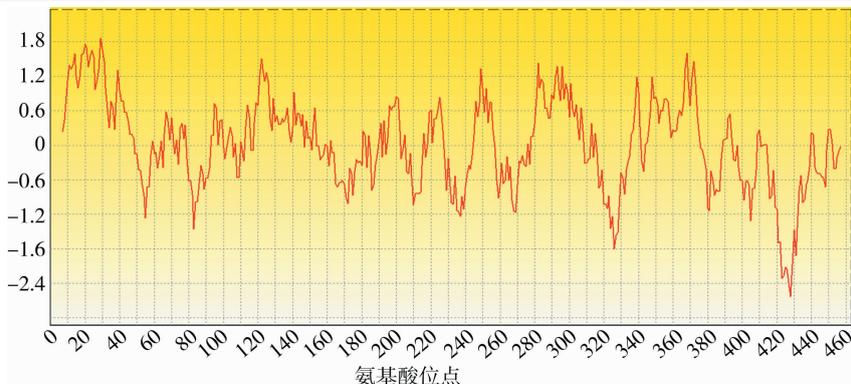


图6 UFGT 蛋白疏水区的分布

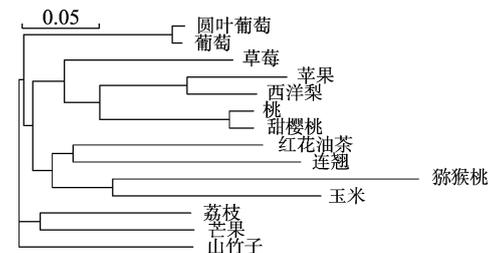


图7 部分基因的 UFGT 蛋白序列的系统发育关系

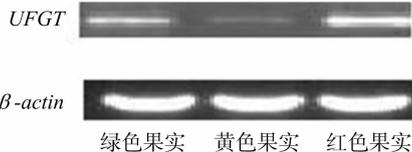


图8 UFGT 基因在不同颜色芒果果实中的表达

参考文献:

[1] 卢其能, 杨清, 沈春修. 马铃薯类黄酮-3-O-葡萄糖基化酶基因的克隆与表达分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(4): 11-16.

[2] 刘海峰, 杨成君, 于森, 等. 山葡萄 UDP-葡萄糖:类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因(3GT) cDNA 的克隆和分析[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(8): 748-752.

[3] Palapol Y, Ketsa S, Kui L W, et al. A MYB transcription factor regulates anthocyanin biosynthesis in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit during ripening[J]. Planta, 2009, 229(6): 1323-1334.

[4] Boss P K, Davies C, Robinson S P. Expression of anthocyanin biosyn-

刘 星,胡金凤,王希东,等. 西瓜食酸菌 CusB 蛋白的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):34-37.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.008

西瓜食酸菌 CusB 蛋白的生物信息学分析

刘 星¹, 胡金凤², 王希东¹, 刘 君²

(1. 新疆农业大学农学院, 新疆乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农业大学林学与园艺学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:为了解西瓜食酸菌耐药结节细胞分化(RND)家族外排转运体中膜融合蛋白 CusB 生物信息学信息,利用相关软件对西瓜食酸菌和其他革兰氏阴性细菌的 CusB 蛋白进行理化性质分析,同时对西瓜食酸菌 CusB 蛋白的疏水性、跨膜结构域、磷酸化位点、信号肽及分泌蛋白亚细胞定位、蛋白质二级结构进行预测。结果表明:西瓜食酸菌 CusB 蛋白理化性质及进化树分析结果与大肠杆菌较为接近,梨火疫病菌、荧光假单胞菌与其他 5 种细菌遗传距离较远,预测西瓜食酸菌 CusB 蛋白有 1 个区域疏水性较高,存在 1 个近 N 端的跨膜结构域,且还有多个磷酸化位点,前 1~36 个氨基酸残基组成了信号肽,分泌蛋白位于周质空间,二级结构含有较多的 α-螺旋、无规则卷曲。对 CusB 蛋白进行生物信息学分析,既丰富了信息学信息,又有助于在其分子水平的研究,同时也为西瓜食酸菌的抗铜性机理研究提供了依据。

关键词:瓜类细菌性果斑病;西瓜食酸菌;RND 外排转运体;CusB 蛋白;生物信息学分析

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0034-04

瓜类细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是一种严重危害葫芦科植物的世界性种传细菌性病害,其病原菌为西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*)^[1]。自从 1965 年在美国首次发现西瓜食酸菌以来,世界多国已相继报道该病害的发生^[2]。目前在我国主要分布于新疆、内蒙古、山东、陕西、河北、福建、云南、吉林、海南、黑龙江、辽宁、台湾等 15 个省(市)的西甜瓜种植区^[3],该病害严重影响了葫芦科植物的产量和商品销量,是我国葫芦科作物产业的主要危害因子^[4]。

由于西瓜食酸菌属于革兰氏阴性菌,因此其细胞质膜由细胞外膜、周质空间、细胞内膜构成^[5],并且其细胞膜上存在着革兰氏阴性细菌特有的耐药结节细胞分化(RND)外排转运体^[6],该转运体由 3 个部分构成:外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)、内膜蛋白(inner membrane efflux proteins, IMP)、膜融合蛋白(membrane fusion proteins, MFP),主要负责细菌细胞内重金属离子、色素分子、糖类、抗生素等由胞内向胞外的转运^[7]。已有报道指出,大肠杆菌(*Escherichia coli*)中编码 CusB 蛋白的基因突变会导致铜离子、银离子无法正常

转运至胞外,最终导致大肠杆菌死亡^[8]。在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中 RND 外排转运体任一组分缺失都会影响外排转运体的正常工作^[9]。目前,在西瓜食酸菌中还未见关于 RND 外排转运体中膜融合蛋白的报道。本研究运用生物信息学分析的方法,对 *A. citrulli* 的膜融合蛋白基因 *cusB* 基因和 CusB 蛋白的理化性质、进化分析、疏水性、跨膜结构域、磷酸化、信号肽、分泌蛋白亚细胞定位和蛋白质二级、三级结构进行了预测分析,以期对瓜类细菌性果斑病菌的抗铜分子机理的研究奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 数据来源 本研究所用的西瓜食酸菌膜融合蛋白的氨基酸序列为笔者所在实验室测序获得的膜融合蛋白序列,在本试验中命名为 CusB。选择梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*, NC_005246)、茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*, NC_001399)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, NC_007779)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, NC_022361)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, NC_012674)、地毯草黄单胞菌柑橘致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, NC_005240)中编码膜融合蛋白的基因进行研究。

1.1.2 相关软件和在线工具 本研究中所用相关软件和在线工具主要有: ClustalX、MEGA4.0、ProtParam、DNAMAN、NETPHOBAC(www.cbs.dtu/)、SignalP、TargetP、TatP1.0、

thesis pathway genes in red and white grapes[J]. Plant Molecular Biology, 1996, 32(3):565-569.

[5]王家保,王令霞,刘志媛,等. 芒果 DNA 提取方法比较及 ISSR 反应体系的优化[J]. 生物技术, 2005, 15(5):37-41.

[6]赵志常,胡福初,胡桂兵,等. 荔枝类黄酮糖基转移酶(UFGT)基因的克隆及其原核表达研究[J]. 广西师范大学学报:自然科学版, 2011, 29(4):104-110.

[7]Ju Z G, Liu C L, Yuan Y B. Activities of chalcone synthase and UDP-

Gal:flavonoid-3-O-glycosyltransferase in relation to anthocyanin synthesis in apple[J]. Scientia Horticulturae, 1995, 63:175-185.

[8]Castellarin S D, Pfeiffer A, Sivillotti P A, et al. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit[J]. Plant Cell and Environment, 2007, 30(11):1381-1399.

[9]付海辉,辛培尧,许玉兰,等. 几种经济植物 UFGT 基因的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1):92-102.