

李先良,赵志常,高爱平,等. 芒果 *ANR* 基因的克隆及其表达分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):22–25.

doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2017.04.006

芒果 *ANR* 基因的克隆及其表达分析

李先良¹, 赵志常^{2,3}, 高爱平^{2,3}, 陈业渊^{2,3}, 黄建峰^{2,3}, 党志国^{2,3}, 罗睿雄^{2,3}

(1. 荆楚理工学院生物工程学院,湖北荆门 448000; 2. 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发实验室; 3. 国家热带果树品种改良中心,海南儋州 571737)

摘要:花青素还原酶(anthocyanidin reductase,简称 ANR)基因是植物产生原花青素的关键基因,对于研究原花青素的代谢有重要的作用。根据已经报道的 *ANR* 基因的序列设计兼并引物,采用 3'cDNA 末端快速扩增(3'RACE)、5'cDNA 末端快速扩增(5'RACE)方法,从芒果果实内克隆到 1 个 *ANR* 基因,其全长 cDNA 序列为 1 201 bp。该基因开放阅读框为 1 008 bp,编码 335 个氨基酸,等电点为 5.41,分子量为 36.33 ku。对基因组扩增得到了 1 810 bp 长度的片段,分析发现,该基因含有 5 个内含子,内含子位置分别为 130 ~ 646 bp、733 ~ 814 bp、1 017 ~ 1 080 bp、1 259 ~ 1 349 bp、1 563 ~ 1 651 bp。通过系统发育树分析发现,该基因编码的蛋白与可可、葡萄等果树具有较近的亲缘关系。对不同芒果品种中 *ANR* 基因的表达进行分析发现,该基因在绿色的桂七品种中表达量较高,而在红色的贵妃品种中表达量较低。

关键词:芒果;原花青素;花青素还原酶(*ANR*);基因克隆;表达分析

中图分类号:S667.701;Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2017)04–0022–04

原花青素是苯丙醇代谢途径产生的次生代谢产物,具有消除自由基、抗氧化、抗突变、抗肿瘤、调解免疫、防止体内过氧化等功能。原花青素的抗氧化性能比维生素 C 高 20 倍,比维生素 E 高 50 倍。此外,原花青素对于水果的口感,以及食草动物对牧草的进食量等都有一定的影响^[1–4]。花青素还原酶(anthocyanidin reductase,简称 ANR)是原花青素代谢途径中的关键酶,可催化花青素转化为表儿茶素(2,3–顺式黄烷 3–醇),进一步向液泡中转运并聚合成为原花青素。*ANR* 作

为花青素代谢途径上的负调控基因,其表达对花瓣、果实等组织的呈色有重要的影响^[5]。

目前,人们已经从拟南芥、银杏、苦荞麦、葡萄、苹果、草莓、百脉根、茶、苜蓿等多种植物中克隆出 *ANR* 基因^[6–11]。芒果是重要的热带、亚热带果树,其果实色彩多样,如绿色、黄色、浅黄色、红色、橙红色等^[12],其果实富含类胡萝卜素、花青素等物质。关于芒果果实的 *ANR* 基因研究未见报道,本研究采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)方法从芒果果实中克隆得到 1 个 *ANR* 基因,旨在深入探讨该基因在芒果果实花青素合成中的作用机制及对果实着色的影响,从而深入揭示该基因在芒果果实花色形成中的分子机制,为芒果果实着色提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以贵妃芒果的果实为试验材料,取自中国热带农业科学

收稿日期:2016–01–07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471850);农业部热带作物种质资源保护(编号:15RZZY–07);农业部“948”计划(编号:2011–G13);湖北省荆门市科技局项目(编号:110588)。

作者简介:李先良(1976—),男,湖北武汉人,博士,副教授,研究方向为园艺植物遗传改良和分子生物学。E-mail:libusher@sina.com。
通信作者:赵志常,博士,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。

[14] Franco–Rivera A, Benintende G., Cozzi J, et al. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina [J]. *Antonie vanleeu*, 2004, 86(1): 87–92.

[15] Seifinejad A, Salehijouzani G R, Hosseinzadeh A, et al. Characterization of Lepidoptera–active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strains collection [J]. *Biological Control*, 2008, 44(2): 216–226.

[16] 伍赠玲, 黄天培, 邱君志, 等. 一种改良的苏云金芽孢杆菌质粒 DNA 提取方法[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(2): 200–201.

[17] Ibarra J E, del Rincón M C, Ordúz S, et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5269–5274.

[18] Wu Y, Gao M, Dai S, et al. Investigation of the *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* and the biological activities of *Bt* isolates from the soil of China [J]. *Biological Control*, 2009, 47(3): 335–339.

[19] Patel K, Bhansali F, Chaudhary A, et al. A new enrichment method for isolation of *Bacillus thuringiensis* from diverse sample types [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 170(1): 58–66.

[20] Yu X, Zheng A, Zhu J, et al. Characterization of vegetative insecticidal protein *vip* genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China [J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 752–757.

[21] Liu J, Song F, Zhang J, et al. Identification of *vip3A*–type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *vip3A*–type gene [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(4): 432–438.

院热带作物品种资源研究所的农业部芒果种质资源圃。大肠杆菌 DH5a, 为笔者所在实验室保存。引物由上海英骏生物工程有限公司合成。焦碳酸二乙酯 (DEPC)、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、胰蛋白酶、酵母提取物、氨苄青霉素 (Amp)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-Gal)、载体 pMD19-T、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶, 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 芒果 DNA 提取 参照王家保等方法^[13] 提取芒果 DNA, 用无菌双蒸水溶解, 通过核酸蛋白测定仪进行纯度检测后于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 芒果总 RNA 提取 采用天根生化科技 (北京) 有限公司的总 RNA 提取试剂盒, 从芒果果肉中提取总 RNA, 用 RNase-free 无菌水溶解, 用宝生物工程 (大连) 有限公司的 DNase 试剂盒去除 DNA, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和纯度, 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, 然后用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 反转录合成第 1 链 cDNA。

1.2.3 PCR 反应 PCR 反应程序: 94 °C 4 min; 95 °C 50 s, 50 °C 50 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。25 μ L 反应体系: 2.5 μ L 10 × PCR buffer (含 Mg^{2+})、25 ng DNA 模板、20 μ mol 引物、1.0 U *Taq* DNA 聚合酶、5.0 mmol dNTPs。反应体系在 Eppendorf PCR 仪上扩增后取 10 μ L 上样电泳, 采用 GelRed 染色后在紫外凝胶成像仪上观察、拍照分析。

1.2.4 ANR 基因全长 cDNA 和基因组 DNA 序列的获得 以上述反转录第 1 链 cDNA 为模板, 参照该试剂盒的说明书进行 cDNA 3'端、5'端 cDNA 的扩增。根据扩增 cDNA 末端片段的测序结果, 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、5'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。对目的基因片段回收、连接、转化、鉴定及测序, 并根据已知片段和得到的 cDNA 3'端、5'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 序列的扩增反应。PCR 反应体系 25 μ L, 从中取 6 μ L PCR 产物, 加入 0.2 mL PCR 管中, 加入 1 μ L 6 × Loading Buffer, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以确定扩增片段大小是否正确。在确定扩增片段大小正确后对 PCR 产物进行普通琼脂糖凝胶电泳, 用 DNA 凝胶回收试剂盒 (Agarose Gel DNA Purification Kit, TaKaRa) 回收胶块中的目的片段, 回收方法具体操作参照试剂盒说明书上的步骤进行。取 5 μ L 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, 并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) 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 μ L pMD19-T 载体、4 μ L 纯化后的 DNA、5 μ L 连接液 (Ligation Solution) I, 混合均匀后在 16 °C 下恒温水浴过夜连接。

1.2.5 ANR 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得序列在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站上进行序列比对, 确定该基因是否为 ANR 基因, 并进行其他物种 ANR 基因的比对, 采用 DNAMAN 软件分析基因核苷酸、氨基酸的结构特征和同源性, 并分析该基因所对应的氨基酸序列, 进行多序列比较并构建系统树。

1.2.6 表达分析 分别提取不同芒果品种的 RNA, 反转录为 cDNA, 并采用 Primer 5.0 设计引物进行逆转录 PCR (RT-PCR) 的扩增。RT-PCR 分析采用的内参引物序列: *actin*-F, 5'-AATGGAAGTGAATGGTCAAGGC-3'; *actin*-R, 5'-TGCCAGATCTTCTCCATGTCATCCCA-3'。目的基因扩增采用的引物: ANR-F, 5'-GCCAGCATACCATGCACTCATA-3'; ANR-R, 5'-ATACAATGGAGCAACGTAAGTAT-3'。将 PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 并采用 Quantity One 软件进行数据分析, 得出相对表达量。

2 结果与分析

2.1 ANR 基因的获得

根据得到的 3'、5'端序列信息进行拼接, 最后得到 ANR 基因的全长 cDNA 序列。设计特异引物, 进行全长 cDNA、基因组 DNA 序列的扩增, 电泳结果如图 1 所示。将电泳条带回收测序后, 得到 ANR 基因的 cDNA 全长序列为 1 201 bp, 分析发现其开放阅读框为 1 008 bp, 编码 335 个氨基酸序列 (图 2), 其分子量为 36.33 ku, 等电点为 5.41。通过与 NCBI 上已经登录的苹果、草莓、荔枝的 ANR 蛋白序列进行比对, 发现克隆的基因为 ANR 基因 (图 3)。对基因组 DNA 扩增得到约 1 810 bp 的片段, 通过与 cDNA 序列比对, 发现该基因含有 5 个内含子, 碱基位置分别为 130 ~ 646 bp、733 ~ 814 bp、1 017 ~ 1 080 bp、1 259 ~ 1 349 bp、1 563 ~ 1 651 bp (图 4)。

2.2 芒果 ANR 基因的部分生物信息学分析

采用 DNAMAN 进行 ANR 蛋白二级结构的预测, 发现芒果 ANR 蛋白的二级结构元件主要以无规则卷曲、 β -折叠为主, 也具有少量的 α -螺旋结构 (图 5)。采用 BioEdit 软件的

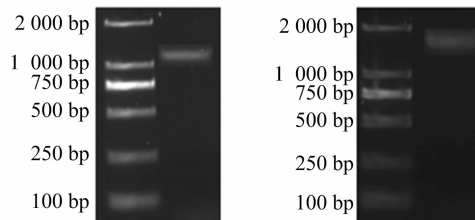


图1 ANR 基因 cDNA (左图) 与基因组 DNA (右图) 电泳结果

```

1      MSAQQTAKNT ACVVGGTGFV ASLLIKLLLQ KGYSVSTTVR DDPNQKISH LLSLQELGEL
61     KIFGADLTDE GSFDAPIAGS DIVFHVATPV NFASEDPEND MIKPAIQGVE NVLKACAKAK
121    TVKRVIILTSS AAAVTINNQD GTGLVMEKH WTDVEFLSSA KPPTWGYVPS KTLAERHAWK
181    FAQENNIDLI TIIPSLMAGP SLTPDIPSSL NLAMSLILGN EFLTNALKGM QMLSGSISIA
241    HVEDVCRAHI FLAEKESASG RYICCAVNTS VP ELAKFLQQ RYPQYKVPTD FGDFFSKPKL
301    LISSEKLISE GFSFKFGIEE IYDQTVEYFK AKGVL
  
```

左侧数字为氨基酸位点
图2 ANR 基因翻译成的蛋白序列

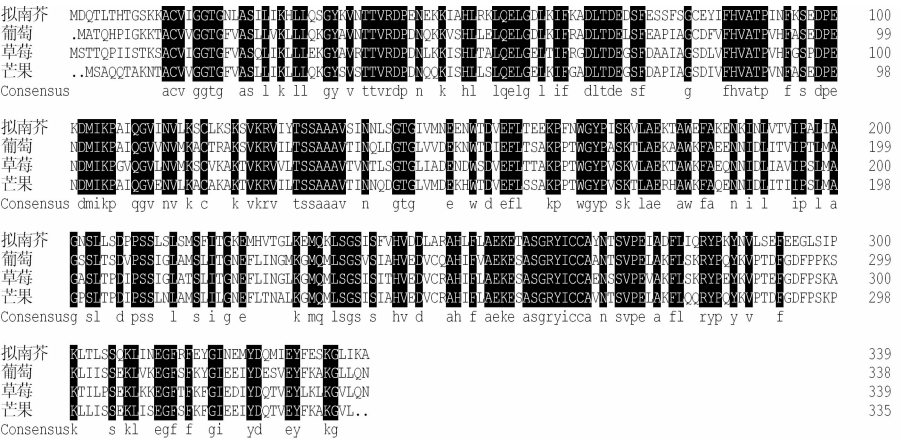


图3 几种ANR蛋白的序列对比结果



图4 ANR 基因组的结构(黑框为内含子序列)

Kyte、Doolittle 算法对 ANR 蛋白的亲水/疏水性值(正值表示疏水性,负值表示亲水性)进行分析表明,ANR 蛋白所含氨基酸的亲水/疏水性值主要介于 $-1.8 \sim 2.1$ 之间(图 6)。采用

DNAMAN5 软件分析发现,芒果 ANR 蛋白与可可、葡萄等果树的蛋白序列聚为一类;草莓、苹果、西洋梨、柿和蓝莓等果树也可以聚为同一类(图 7)。

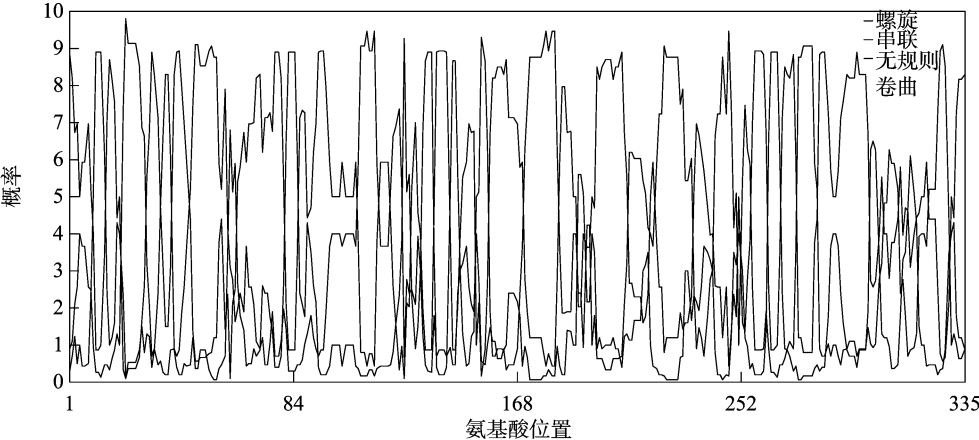


图5 ANR 蛋白的二级结构预测结果

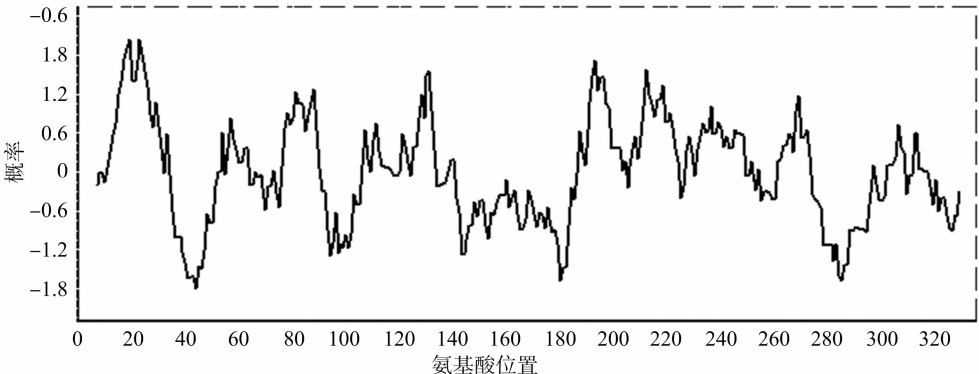


图6 ANR 蛋白疏水区的分布

2.3 ANR 基因的 RT-PCR 分析

分别提取不同着色程度芒果的果皮 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:该基因在绿色桂七品种的果实中表达量较多,在黄色果皮中次之,而在红色果皮贵妃中相对表达量较少(图 8),初步推断 ANR 基因可能与红色果实中原花色素等含

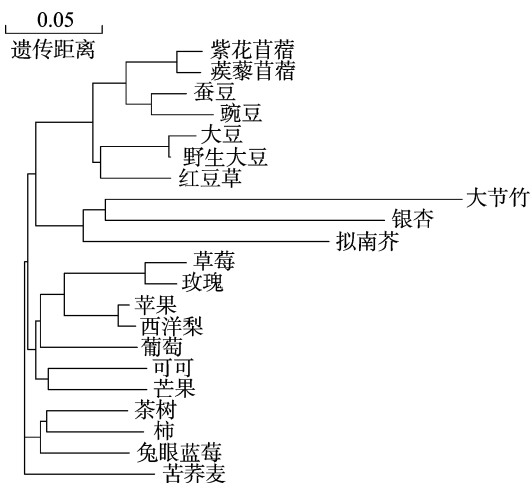


图7 部分基因的 ANR 蛋白序列的系统发育关系

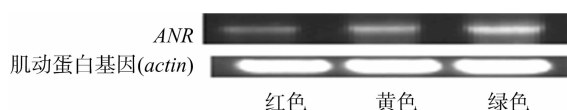


图8 ANR 基因在不同颜色芒果果实中的表达情况

量有一定的关系。

3 讨论

ANR 基因最初从拟南芥中克隆并命名^[14], ANR 基因对种皮色素积累有重要作用,是调节种皮色泽的负调控基因。该基因在拟南芥突变体的种皮内因积累花青素而显红色,但类黄酮含量与正常植株含量相差不多^[15-17]。通过体外重组 ANR 能将非手性花青素催化成 2,3-顺-(2R,3R)-黄烷-3-醇(如表儿茶素)、2,3-反-(2R,3R)-黄烷-3-醇(如内儿茶素)^[18]。Bogs 等对 ANR 基因在葡萄中的表达进行了研究,发现该基因在叶片、花、果实中均有表达,且随着叶片、花、果实的生长,原花色苷不断增加,在成熟的果实中 ANR 基因表达量较少,原花色苷也不再增加^[19]。本研究发现,该基因在绿色的桂七芒果品种中表达量较高,而在红色的贵妃品种中表达量较低,这与果皮中花色苷的含量呈现相反的趋势。葡萄 ANR 基因在转基因烟草中表达,表现为表达量较高的花瓣颜色减弱,花青素含量减少^[19]。因此推测,ANR 基因的表达在花青素和原花青素之间的转化中具有重要作用。芒果 ANR 基因是芒果原花色苷合成代谢途径中的关键基因之一,它对芒果果皮色泽的影响具有重要作用,而对芒果果实色泽功能的深入研究须要进一步通过转基因植物表达的验证。

参考文献:

- [1] Dixon R A, Xie D Y, Sharma S B. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? [J]. The New Phytologist, 2005, 165 (1): 9 - 28.
- [2] Bagchi D, Bagchi M, Stohs S J, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention [J]. Toxicology, 2000, 148 (2/3): 187 - 197.
- [3] Bagchi D, Garg A, Krohn R, et al. Oxygen free radical scavenging

abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro [J]. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 1997, 95 (2): 179 - 189.

- [4] 潘伟彬, 黄毅斌. 植物单宁及其对牧草品质的影响研究进展 III. 单宁对牧草品质和反刍动物养殖的影响 [J]. 热带农业科学, 2008, 28 (4): 86 - 92.
- [5] 王晨, 房经贵, 曹雪, 等. 葡萄中原花青素的代谢 [J]. 中国农学通报, 2009, 25 (9): 169 - 173.
- [6] Deluc L, Barrieu F, Marchive C, et al. Characterization of a grapevine R2R3 - MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway [J]. Plant Physiology, 2006, 140 (2): 499 - 511.
- [7] Liu Y, Shi Z, Maximova S, et al. Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase, and leucoanthocyanidin reductase [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13 (1): 202.
- [8] Shen G A, Pang Y, Wu W, et al. Isolation and characterization of a putative anthocyanidin reductase gene from *Ginkgo biloba* [J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163 (2): 224 - 227.
- [9] Ray H, Bock C, Georges F. Faba bean: Transcriptome analysis from etiolated seedling and developing seed coat of key cultivars for synthesis of proanthocyanidins, phytate, raffinose family oligosaccharides, vicine and convicine [J]. The Plant Genome, 2015, 8 (1): 346 - 348.
- [10] Ferraro K, Jin A L, Nguyen T D, et al. Characterization of proanthocyanidin metabolism in pea (*Pisum sativum*) seeds [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14 (1): 1 - 17.
- [11] Wang Z, Meng D, Wang A, et al. The methylation of the PcMYB10 promoter is associated with green - skinned sport in Max Red Bartlett pear [J]. Plant Physiology, 2013, 162 (2): 885 - 896.
- [12] Tada K, Minami H, Oka Y, et al. The mango: botany, production and uses [J]. Scientia Horticulturae, 1998, 73 (1): 63 - 65.
- [13] 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.
- [14] Devic M, Guilleminot J, Debeaujon I, et al. The BANYULS gene encodes a DFR - like protein and is a marker of early seed coat development [J]. The Plant Journal, 1999, 19 (4): 387 - 398.
- [15] Xie D, Sharma S, Dixon R. Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 422 (1): 91 - 102.
- [16] Albert S, Delseny M, Devic M. BANYULS, a novel negative regulator of flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat [J]. The Plant Journal, 1997, 11 (2): 289 - 299.
- [17] Lepiniec L, Debeaujon I J M, Baudry A, et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids [J]. Plant Biology, 2006, 57 (57): 405 - 430.
- [18] Xie D, Sharma S, Paiva N, et al. Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis [J]. Science, 2003, 299 (565): 396 - 399.
- [19] Bogs J, Downey M, Harvey J, et al. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves [J]. Plant Physiology, 2005, 139 (2): 652 - 663.