

刘宽亮,赵志常,高爱平,等. 芒果 *C4H* 基因的克隆及其表达分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):8-12.

doi:10. 15889/j. issn. 1002-1302. 2017. 14. 003

芒果 *C4H* 基因的克隆及其表达分析

刘宽亮^{1,2}, 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. 海南大学农学院,海南海口 570228; 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,海南儋州 571737; 3. 国家热带果树品种改良中心,海南儋州 571737)

摘要:肉桂酸-4-羟化酶(*C4H*)是植物苯丙烷合成途径的关键酶之一,其蛋白质活性和转录丰度直接影响植物中黄酮类化合物和芳香族化合物的生物合成量。根据已经报道的 *C4H* 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 *C4H* 基因的全长 cDNA 序列为 1 680 bp。该基因开放阅读框为 1 518 bp,编码 505 个氨基酸,分子量为 58.08 ku。蛋白等电点为 9.52,分析发现该基因主要定位在线粒体中。通过软件预测得到 3 种三级蛋白结构图;通过系统发育分析发现,该基因编码的蛋白与橄榄、可可等植物具有较近的亲缘关系。对不同着色的芒果品种的 *C4H* 基因表达进行分析发现,红色的贵妃品种中表达量最高,而绿色的桂七品种中表达量最低。

关键词:芒果;*C4H* 基因;克隆;蛋白质;生物信息

中图分类号: S667. 701 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0008-04

肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate-4-hydroxylase,简称 *C4H*),别称反式肉桂酸-4-单氧化酶,是细胞色素单加氧酶 P450 超家族的成员之一^[1],该酶由 Russell 等首次从豌豆芽中发现^[2],它是苯丙素类化合物生物合成途径里继苯丙氨酸脱氨酶(phenylalanine ammonia-lyase,简称 PAL)之后的第 2 个关键调节酶,其作用是将苯丙氨酸途径的合成酶复合物固定在内质网上^[3];同时,在氧和磷酸烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,简称 NADP)存在下,将反式肉桂酸苯环的 4 位羟基化生成对-香豆酸^[4]。*C4H* 分布在微粒体中,能够原位利用 PAL 催化产生的苯乙烯酸。普遍认为,肉桂酸-4-羟化酶是苯丙素类物质代谢中一个调节点^[2]。由于肉桂酸-4-羟化酶基因在植物次生代谢中有这些重要的作用,因此被广泛关注。自上世纪 80 年代以来,肉桂酸-4-羟化酶的基因克隆逐渐成为一个研究热点。迄今,已有拟南芥、大豆、花生、杜仲等 50 多种植物的 *C4H* 基因被分离出来^[5-10]。与苯丙氨酸脱氨酶基因类似,肉桂酸-4-羟化酶基因的拷贝数在不同植物之间存在差异。如:苜蓿 *C4H* 基因有 2 个拷贝,豌豆的 *C4H* 基因只有 1 个拷贝,绿豆和长春花的 *C4H* 基因家族都有多个成员。这些不同植物种的 *C4H* 基因所编码的氨基酸序列相似性极高,同源性普遍在 85% 左右。但玉米和法国菜豆中的 2 个 *C4H* 酶蛋白氨基酸

序列例外,同源性只有 60%^[11]。*C4H* 基因在植物各组织中均具有很高的活性^[11-14],研究表明,*C4H* 的蛋白质活性和转录丰度直接影响植物中黄酮类化合物、木质素、芳香族类化合物的合成等多条代谢途径^[15-16]。芒果是重要的热带、亚热带果树,果实色彩多样,有绿色、黄色、浅黄色、红色、橙红色等。芒果果实富含类胡萝卜素、花色素苷等物质,其中花色素苷合成途径是红色芒果果实着色的一个主要的代谢途径。芒果果实 *C4H* 基因的研究工作未见报道,本研究采用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends,简称 RACE)从芒果的果实中克隆得到 1 个 *C4H* 基因,深入探讨该基因在芒果果实花色素苷合成的作用机制及其对果实着色的影响,借以深入揭示该基因在芒果果实花色素苷生物合成的分子机制,以期对芒果果实着色研究提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用芒果(品种有红色贵妃、黄色金煌、绿色桂七)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。引物委托上海英俊生物工程技术服务有限公司合成,其他药品如:异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside,简称为 IPTG)、酵母抽提物(yeast extract,简称 YE)、氨苄青霉素(ampicillin,简称为 Amp)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-吡喃半乳糖苷(简称为 X-Gal)、pMD-19T 载体及各种酶均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 芒果总 RNA 提取采用天根生化科技(北京)有限公司生产的总 RNA 提取试剂盒 用 RNase-free 无菌水溶解,并用宝生物工程(大连)有限公司的 DNase 试剂盒进行 DNA 去除,用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和 DNA 是否去除干净。

1.2.2 PCR 反应程序 94 °C 预变性 4 min;95 °C 变性 50 s,

收稿日期:2016-03-22

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项目(编号:15RZZY-07);农业部“948”项目(编号:2011-G13);非营利性科研机构改革启动经费(编号:CATAS PZS-201225,CATAS-TCGRI 1630032013003)。

作者简介:刘宽亮(1991—),男,河南信阳人,硕士研究生,主要从事热带果树分子生物学研究。E-mail:976540380@qq.com。

通信作者:赵志常,博士,副研究员,主要从事热带果树遗传育种与分子生物学研究,E-mail:zhaozhichang2001@163.com;陈业渊,博士,研究员,主要从事热带果树资源研究,E-mail:chenyy1962@126.com。

50 ℃ 复性 50 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 7 min; 反应体系为 25 μL, 其中含 10 × PCR buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL, 25 ng DNA 模板, 20 μmol 引物, 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶, 5.0 mmol dNTPs; 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 *C4H* 基因全长 cDNA 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、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。根据测得的片段和得到的 cDNA 3' 端、5' 末端的序列结果拼接该基因的全长 cDNA。以 cDNA 为模板, 设计特异引物, 进行全长 cDNA 序列扩增反应。

1.4 *C4H* 基因氨基酸序列的结构特征和分子进化的分析

将测得的全长 cDNA 序列进行 NCBI 序列比对, 确定该全长序列是否为 *C4H* 基因, 并进行其他物种 *C4H* 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; 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 的扩增。RT-PCR 分析采用的内参引物序列为: *actin* - F 5' - AATGGAAGTGAATG

GTCAAGGC - 3', *actin* - R 5' - TGCCAGATCTTCTCCATGTCA TCCCA - 3'; 目的基因扩增采用的引物为: *C4H* - F, 5' - CAGCATAGCCTAGCACATACTC - 3', *C4H* - R 5' - CAATG GAGCATATACGAACTAT - 3', PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 并采用 Quantity One 软件进行数据分析, 计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *C4H* 基因的获得

根据 RACE 扩增结果进行拼接最后得到 *C4H* 基因的全长 cDNA 序列, 电泳收测序后全长序列为 1 680 bp, 分析发现, 开放阅读框为 1 518 bp, 编码 505 个氨基酸序列 (图 1)。通过 NCBI 上已经登录的水稻、大豆、橄榄、可可的 *C4H* 蛋白序列进行比对 (图 2) 发现, 克隆的基因为 *C4H* 基因。

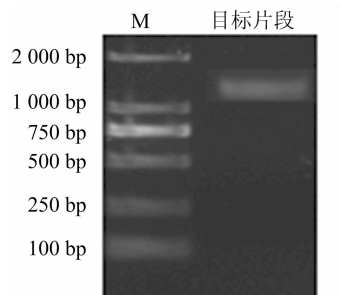


图1 *C4H* 基因 cDNA 电泳结果

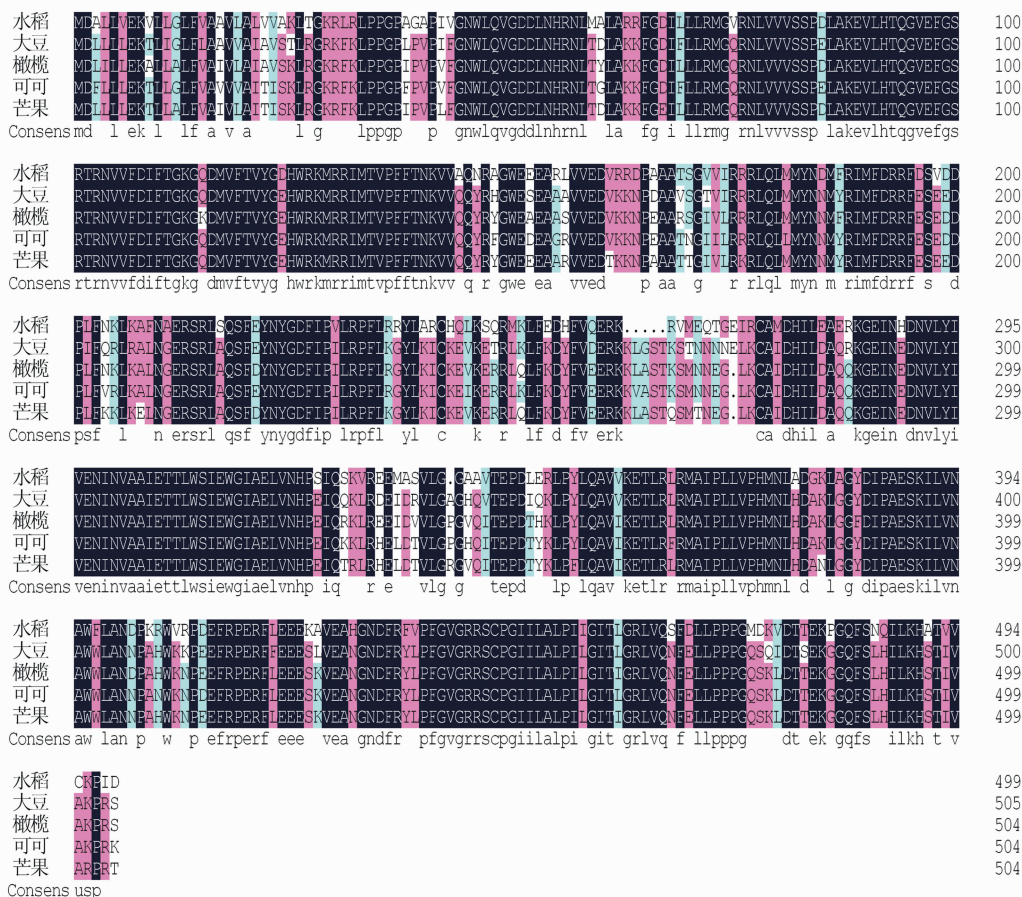


图2 几种 *C4H* 蛋白的序列比对

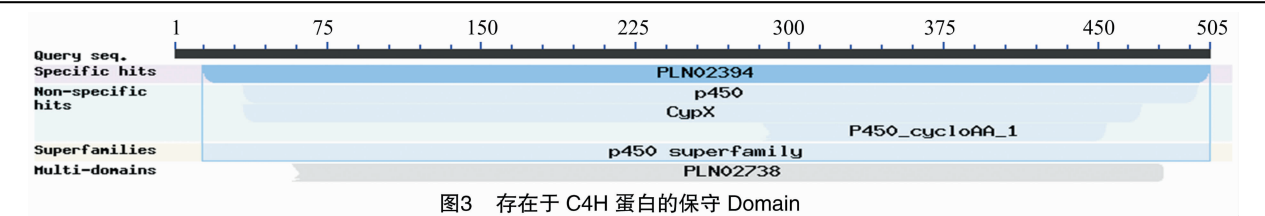


图3 存在于 C4H 蛋白的保守 Domain

2.2 芒果 C4H 基因的部分生物信息学分析

利用 NCBI 的 Blast 进行保守区查找,获得序列的保守 Domain(CD)。结果表明,C4H 有 PLN02394(trans - cinnamate 4 - monooxygenase)、p450(cytochrome P450)、CypX(secondary metabolites biosynthesis,transport and catabolism)P450_cycloAA_1(cyclodipeptide synthase - associated)、PLN02738(carotene beta - ring hydroxylase)等结合域。对其蛋白二级结构进行预测发现,芒果 C4H 蛋白的二级结构主要以蛋白二级结构元件以 α - 螺旋结构和无规则卷曲为主,也具有少量的 β - 折叠结构(图 4)。采用 Bioedit 软件的 Kyte 和 Doolittle 算法对 C4H 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,C4H 蛋白所含氨基酸的值主要介于 -2.2 ~

3.1 之间(图 5),采用 WoLFPSORT(<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)软件对 C4H 蛋白进行定位预测发现,该基因定位在线粒体中,采用 Swissmodel(<http://swissmodel.expasy.org/>)在线软件对蛋白的三级结构进行预测,推导出该蛋白有 3 种结构构型(图 6)。采用 DNAMAN 软件分析发现,芒果 C4H 蛋白与橄榄、可可等植物具有较近的亲缘关系(图 7)。

2.3 C4H 基因的 RT-PCR 分析

对不同着色品种的芒果果皮进行 RT-PCR 分析结果发现,该基因在红色果皮贵妃的果实中表达较多,黄色果皮金煌的果实中次之,而绿色果皮桂七的果实中相对表达较少(图 8),初步推断 C4H 基因可能与红色果实的花色素苷合成有密切的关系。

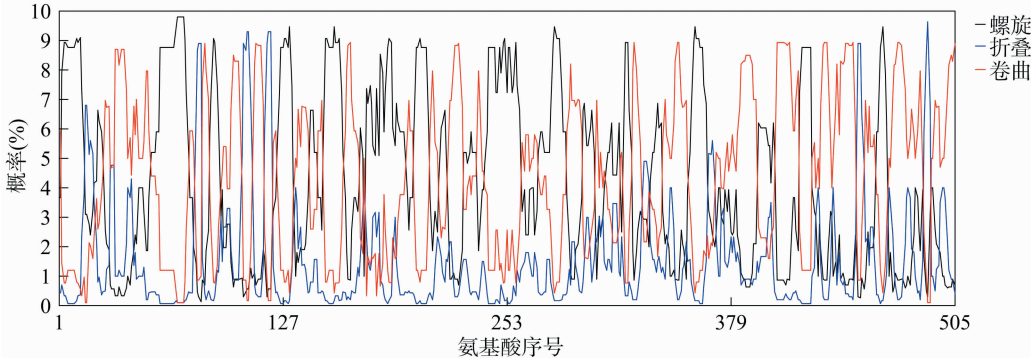


图4 C4H 蛋白的二级结构预测结果

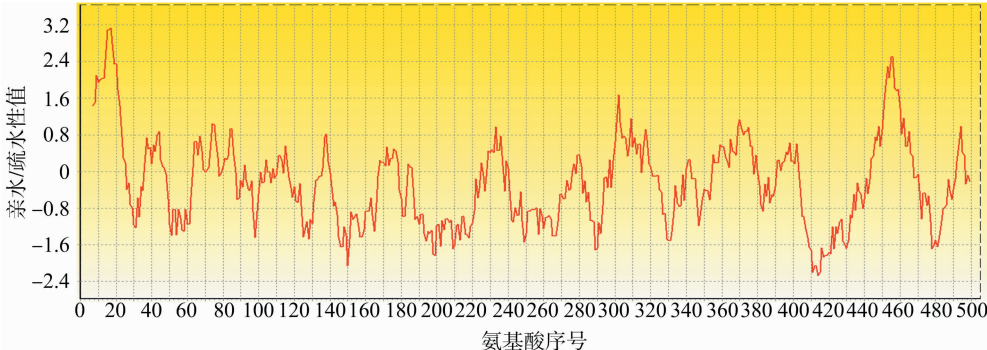


图5 C4H 蛋白疏水区的分布

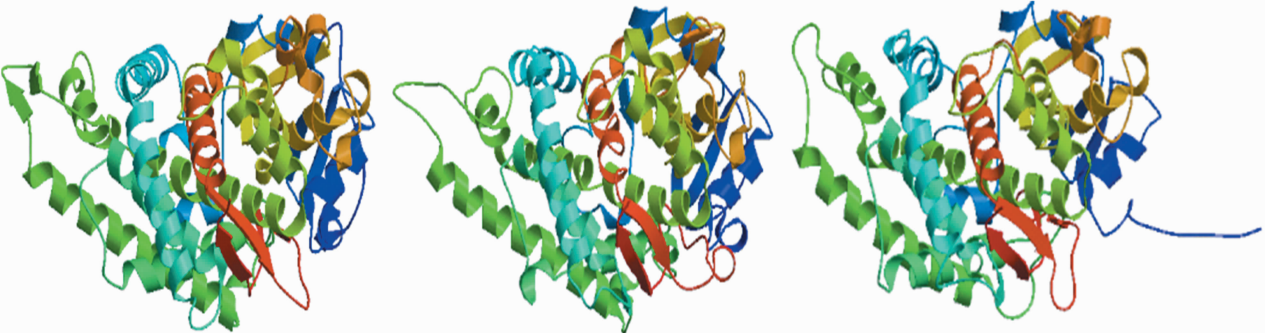


图6 C4H 基因编码蛋白的三级结构

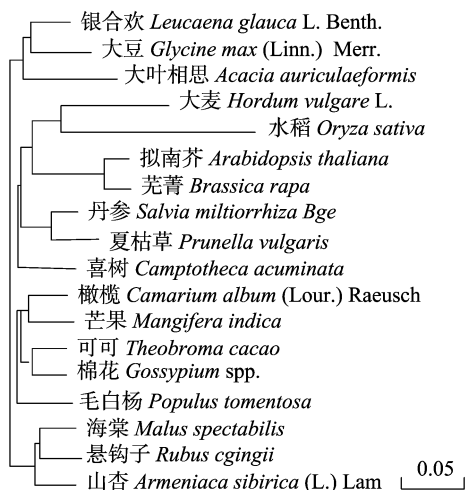


图7 部分植物的 C4H 蛋白序列的系统发育关系

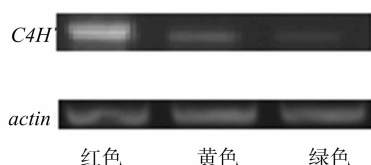


图8 C4H 基因在不同颜色芒果果实中的表达

3 讨论

本研究成功地从芒果果实中分离得到 1 个全长 *C4H* 基因,该基因 cDNA 的开放阅读框为 1 518 bp,编码 505 个氨基酸。通过在线软件对 cDNA 和蛋白序列分析证实该序列是植物 *C4H* 基因的一员。芒果 *C4H* 基因与所选其他物种 *C4H* 基因序列相比较发现,无论在全长 cDNA 序列上还是在其编码氨基酸序列上都具有较高保守的结构域细胞色素 P450。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 *C4H* 基因编码的蛋白与橄榄、可可、棉花等植物聚为一类。植物黄酮类物质的生物合成相关的蛋白一般定位于内质网外膜上,由一系列特定的黄酮合成相关酶组成的多酶复合体连续合成并转运到特定的亚细胞结构中^[17]。*C4H* 蛋白的 N-末端的膜锚定信号基(signal-anchor sequence),使其定位于内质网外膜上,参与苯丙烷类代谢途径中多酶复合体的亚细胞定位和内质网上电子链的化学传递^[18],进而进行黄酮类物质的生物合成。Baek 等在黑莓中发现,黄酮积累量与 *C4H* 表达量在果实发育的不同时期表现了同步增加或减少的变化趋势^[19]。本研究对芒果不同果实着色分析发现,红色的贵妃品种中表达量最高,而绿色的桂七品种中表达量最低,这与花色素苷的含量有一定的相关性。在大蒜中 *C4H* 的转录在根中最高,而在苯丙素类物质富集的茎中却很低。推测大蒜中苯丙素类物质可能在根部合成后转运到茎中^[20]。在逆境胁迫下,植物可通过调节一系列合成相关酶基因的转录水平从而影响其黄酮类和芳香族类的合成和积累^[8],其中就包括 *C4H*。Ryan 等在矮牵牛花中的研究发现,在 UV-B 胁迫处理下,*C4H* 等基因表达量的增加使得植物组织中总黄酮含量增加^[21]。Liu 等发现 K 离子缺乏诱导的菊花中 *C4H* 等基因的表达量减少,造成了该部位黄酮含量的降低^[22]。芒果 *C4H* 基因是芒果花色素苷合成代谢途径中的一个关键的基

因,对芒果果皮红色的形成具有重要的作用。芒果果实的着色也受得了光照、温度等条件的影响,这些因素是否影响了 *C4H* 基因的表达,同时,对该基因功能的深入研究须要进一步进行转基因植物表达验证。

参考文献:

- [1] Barber M S, Mitchell H J. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants[J]. International Review of Cytology, 1997, 172(8): 243-293.
- [2] Russell D W, Conn E E. The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1967, 122(1): 256-258.
- [3] 李波,梁颖,柴友荣. 植物肉桂酰辅酶 A 还原酶(CCR)基因的研究进展[J]. 分子植物育种, 2006, 4(增刊 1): 55-65.
- [4] Mizutani M, Ward E, Dimaio J, et al. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding mung bean cytochrome P450 (P450C4H) possessing cinnamate 4-hydroxylase activity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 190(3): 875-880.
- [5] 王安娜,王婵娟,吴蕾,等. 大豆 *C4H* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(4): 12-16.
- [6] 杜红岩. 杜仲活性成分与药理研究的新进展[J]. 经济林研究, 2003, 21(2): 58-61.
- [7] 陈安和,李加纳,柴友荣,等. 羽衣甘蓝中一个突变型肉桂酸-4-羟化酶基因的克隆及分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 915-922.
- [8] 陈鸿翰,袁梦求,李双江,等. 苦荞肉桂酸羟化酶基因(*FtC4H*)的克隆及其 UV-B 胁迫下的组织表达[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(2): 137-147.
- [9] 李莉,赵越,马君兰. 苯丙氨酸代谢途径关键酶: PAL、C4H、4CL 研究新进展[J]. 生物信息学, 2007, 5(4): 187-189.
- [10] 罗小娇,刘新春,杨晓云,等. 青稞 *C4H* 基因的克隆及组织表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 589-596.
- [11] Fahrendorf T, Dixon R A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XVIII; molecular cloning and expression of the elicitor-inducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome P450[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993, 305(2): 509-515.
- [12] Mizutani M, Ward E, Dimaio J, et al. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding mung bean cytochrome P450 (P450C4H) possessing cinnamate 4-hydroxylase activity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 190(3): 875-880.
- [13] Teutsch H G, Hasenfratz M P, Lesot A, et al. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90(9): 4102-4106.
- [14] Millar D J, Long M, Donovan G, et al. Introduction of sense constructs of cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A24) in transgenic tomato plants shows opposite effects on flux into stem lignin and fruit flavonoids[J]. Phytochemistry, 2007, 68(11): 1497-1509.
- [15] Ryan K G, Swinny E E, Markham K R, et al. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves[J]. Phytochemistry, 2002, 59(1): 23-32.

刘 媛,张凤慧,赵宏宇,等. 组蛋白八聚体的装配及荧光标记检测体外组装核小体的效率[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):12-16.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.004

组蛋白八聚体的装配及荧光标记 检测体外组装核小体的效率

刘 媛,张凤慧,赵宏宇,蔡 禄

(内蒙古科技大学生命科学与技术学院,内蒙古包头 014010)

摘要:基于影响核小体定位的 DNA 序列 TA 10-bp 周期性和 R5Y5 序列模体,设计 6 条对组蛋白亲和性不同的 DNA 序列,将其克隆到重组质粒中,分别命名为 CS1~CS6。通过 PCR 扩增的方法,在引物上标记 Cy3 荧光信号分子,获得大量标有 Cy3 的目的序列;同时,从大肠杆菌中表达纯化出 H₂A、H₂B、H₃、H₄ 共 4 种组蛋白,经复性装配成组蛋白八聚体,利用盐透析法将目的 DNA 序列与组蛋白八聚体组装成核小体结构;经荧光信号检测,分析 6 条目的序列形成核小体的能力。结果发现,CS2、CS3 形成核小体的能力较强,该结果与 Trifonov EN 提出的核小体在该模体上的精确定位基本吻合,该试验方法的建立对核小体结构及相关表观遗传学领域的研究具有一定的意义。

关键词:核小体;组蛋白;荧光标记;序列模体;体外组装;定位

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0012-05

表观遗传是后基因组时代的研究热点,其中核小体定位是重要的研究领域之一。它在真核生物细胞转录调控、DNA 复制和修复等过程中扮演着至关重要的角色^[1]。科学家们经过大量的试验研究发现,在所有对核小体定位有影响的因素中,DNA 序列扮演着关键的角色^[2]。近年来,有大量关于核小体定位的理论分析和预测,但大多没有进行直接的试验验证。体内试验易受到很多因素的干扰,因而体外重组核小体试验技术是研究核小体定位的有效手段之一。

影响核小体定位的 DNA 序列因素有 TA 10-bp 周期性、polyA、各种序列模体等^[3]。其中以以色列科学家 Trifonov 建立了多个理论模型,分析了线虫、人类等模式生物核小体定位特

征,提出 RRRRRYYYYY 模体可能是一种具有强核小体定位信号的序列,其中 R 是嘌呤,Y 是嘧啶^[4-5]。本试验主要考虑了 TA 10-bp 周期性和 R5Y5 序列模体,构造了 6 条对蛋白亲和力和不同的 DNA 序列,标记为 CS1~CS6,构建重组质粒,经过 PCR 扩增得到大量 CS 序列。同时,试验从含有组蛋白重组基因质粒的大肠杆菌中表达纯化出 4 种组蛋白,装配形成组蛋白八聚体。在体外将 DNA 序列与组蛋白八聚体在一定条件下进行组装形成核小体结构,建立了一种基于荧光标记检测核小体体外组装的试验方法,为后续研究奠定了基础。

之前试验采用 Biotin 标记方法检测核小体组装效率较为繁琐,6 条序列组装后还须经过核小体电泳、转膜条件、紫外交联、封闭、加抗体、洗膜、加抗体、暗室曝片等步骤^[6]。由于检测的信号需要多步转换,才能间接地反映核小体组装效率,而且难以量化,以至于结果存在较大误差。本研究在此基础上对核小体检测方法做了改进,试验的 DNA 直接进行荧光标记,组装后进行聚丙烯酰胺电泳检测,放入荧光化学凝胶成像系统中成像,根据荧光的强弱即可直观地判断大概结果,后期

收稿日期:2016-03-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:61072129、11547150);内蒙古自然科学基金(编号:2013MS0514)。

作者简介:刘 媛(1988—),女,内蒙古包头人,硕士,主要从事表观遗传学研究。E-mail:736745380@qq.com。

通信作者:蔡 禄,博士,教授,主要从事分子生物学和生物信息学研究。E-mail:nmcailu@163.com。

[16] Sewalt V J H, Ni W, Blount J W, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of *L*-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115(1): 41-50.

[17] Saslowsky D E, Warek U, Winkel B S. Nuclear localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(25): 23735-23740.

[18] Williams P A, Cosme J, Sridhar V, et al. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity [J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(1): 121-131.

[19] Baek M H, Chung B Y, Kim J H, et al. cDNA cloning and expression pattern of cinnamate-4-hydroxylase in the Korean

black raspberry[J]. *BMB Reports*, 2008, 41(7): 529-536.

[20] Tuan P A, Park N I, Li X, et al. Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in the phenylpropanoid biosynthesis pathway in garlic (*Allium sativum*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(20): 10911-10917.

[21] Ryan K G, Swinny E E, Markham K R, et al. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves[J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(1): 23-32.

[22] Liu W, Zhu D, Liu D, et al. Comparative metabolic activity related to flavonoid synthesis in leaves and flowers of *Chrysanthemum morifolium* in response to K deficiency [J]. *Plant and Soil*, 2010, 335(1/2): 325-337.