

陈景锋, 赵志常, 高爱平, 等. 芒果 *BCH* 基因的克隆与表达[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(22): 24–26, 31.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.006

# 芒果 *BCH* 基因的克隆与表达

陈景锋<sup>1</sup>, 赵志常<sup>2,3</sup>, 高爱平<sup>2,3</sup>, 黄建峰<sup>2,3</sup>, 罗睿雄<sup>2,3</sup>, 刘宽亮<sup>2,4</sup>, 张梦云<sup>2,5</sup>

(1. 海南省昌江黎族自治县良种繁育场, 海南昌江 572726;

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; 4. 海南大学农学院, 海南海口 570228; 5. 海南大学园艺园林学院, 海南海口 570228)

**摘要:**  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶(*BCH*)基因是催化玉米黄素合成的关键基因, 玉米黄素在植物光保护过程中发挥着重要的作用。采用 RACE 方法从黄色的金煌芒果的果皮中克隆得到了 1 个 *BCH* 基因, 该基因全长 cDNA 序列为 1 160 bp, 开放阅读框为 888 bp, 编码 295 个氨基酸, 分子质量为 32.97 ku, 分子等电点为 9.51。利用生物信息学在线分析软件对其组成成分、疏水性/亲水性、二级结构、功能结构域以及三级结构进行预测和分析。通过系统发育分析发现, 该基因编码的蛋白与温州蜜柑、柚子、大豆、草莓等具有较近的亲缘关系。对不同芒果品种的 *BCH* 基因的表达进行分析发现, 红色的贵妃品种中表达量较高, 而黄色的金煌品种中表达量较低。

**关键词:** 芒果;  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶(*BCH*)基因; 基因克隆; 基因表达分析; 亲缘关系

**中图分类号:** Q785; S667.701 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0024-03

$\beta$ -胡萝卜素羟化酶( $\beta$ -carotene hydroxylase, *BCH*)基因是催化玉米黄素合成的关键基因。目前, 已经报道了从拟南芥、甜橙、南丰蜜橘、甜椒等<sup>[1-5]</sup>植物中克隆到了该基因。由于 *BCH* 在类胡萝卜素生物合成中的关键作用, 已成为植物类胡萝卜素遗传工程改良中的主要目的基因。芒果类胡萝卜素生物合成途径中的 *BCH* 基因分离和鉴定研究国内外至今未见报道, *BCH* 在芒果类胡萝卜素生物合成途径中具体作用和功能目前还不清楚。本研究克隆并分析了芒果 *BCH* 基因, 为进一步研究 *BCH* 在芒果果实着色上的调控功能奠定分子基础, 对揭示 *BCH* 基因在芒果类胡萝卜素合成及果色形成中的作用具有重要理论意义, 为进一步创制高胡萝卜素含量新种质资源、开展芒果类胡萝卜素品质育种提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

分别用刀片切取桂七芒果完全成熟的绿果皮、金煌芒果完全成熟的黄色果皮、贵妃芒果完全成熟的红色果皮, 切碎放入采样袋中液氮速冻后, 立即放入 -80 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 芒果果皮总 RNA 提取** 采用植物 RNA 提取试剂盒提取芒果果皮总 RNA, 用 DNase 试剂盒进行基因组 DNA 消除, RNase-free 无菌水溶解, 采用 SMARTer™ RACE

Amplification Kit(Clontech)反转录合成 cDNA。

**1.2.2 PCR 扩增反应** 扩增条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 50 s, 50 °C 50 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。反应体系为 25  $\mu$ L, 其中含 10  $\times$  PCR buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L, 25 ng DNA 模板, 20  $\mu$ mol 引物, 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶, 5.0 mmol dNTPs。

### 1.3 *BCH* 基因全长 cDNA 序列的获得

以合成的 cDNA 为模板, 根据已知的 *BCH* 基因片段设计 cDNA 3'-RACE 和 5'-RACE 引物, 进行 3' 和 5' 端的扩增。将目的基因片段回收、连接、转化、鉴定及测序, 并根据得到的 cDNA 3' 端和 5' 末端的序列结果拼接 *BCH* 的全长 cDNA, 设计特异引物, 进行全长 cDNA 序列的扩增。

### 1.4 *BCH* 基因生物信息学分析

根据 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 登录的 *BCH* 蛋白序列进行氨基酸序列的同源性分析, 用 DNAMAN 软件进行序列多重比对, 并绘制系统进化树推断其在进化过程中亲缘关系。采用 bioedit 软件对 *BCH* 蛋白中各个氨基酸的含量、亲水/疏水性进行了分析。WoLFPSORT(<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 软件进行定位预测, 采用 Swissmodel(<http://swissmodel.expasy.org/>) 蛋白的三级结构预测。

### 1.5 表达分析

分别提取桂七、金煌、贵妃芒果果皮的 RNA, 反转录为 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'-AATGG AACTGGAATGGTCAAGGC-3'; *actin*-R, 5'-TGCCAGATCT TCTCCATGTCATCCCA-3'。目的基因扩增采用的引物为: *BCH*-F, 5'-CAGCATAGCCCATATAGCACTC-3'; *BCH*-R, 5'-CAATGGAGCCGATATAAACTAT-3'。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, 作出相对表达量。

收稿日期: 2017-05-26

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31471850); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项(编号: 1630032017005, 1630032017004)。

作者简介: 陈景锋(1972—), 男, 海南昌江人, 农艺师, 主要从事芒果种植和推广。E-mail: 13976149268@163.com。

通信作者: 赵志常, 硕士, 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。

## 2 结果与分析

### 2.1 BCH 基因的获得

根据得到金煌芒果 *BCH* 基因的 3'端和 5'端序列信息进行拼接,最后得到 *BCH* 基因的全长 cDNA 序列。设计特异引

物,进行全长 cDNA 序列扩增,将电泳条带回收测序后得到 *BCH* 基因的 cDNA 全长序列,为 1160 bp,分析发现开放阅读框为 888 bp,编码 295 个氨基酸序列。通过 NCBI 上已经登录的拟南芥、柚子、大豆、葡萄的 *BCH* 蛋白序列进行了比对(图 1),发现克隆的基因为 *BCH* 基因。

拟南芥	MAAGLST..IVNTLKELNRSFSAN....HPISTAVFPPLSRN....G...FRRRKILTVCFVVEERKQSSFMDCDNKPESTTSSEILMT..SFLIKTA	86
柚子	MAAGL...AAIVPKFCLLTTLKQSSLLTTKPAIYAPLGHGFFNGKNNRKLNSFTVCFVLEEKQSTCIETFTEEEE..EESGTCTST.AARVAEKI	96
大豆	MAAGLS...AAITMKELLRFHQPLP...KPIPTTLFESPLRIFHHT...ASPIQNFSTFTVCFVLMQDPKQGTQMEICQCEPP..PSPPQCVLS..QKLAEKI	91
芒果	MAAGLS...AAIVPKESGFHTPH....LETKTAIECK.....G.HRRRTSSTVCFVLEEKQCATQINFTTEANDFTSKDIDICVPATMAEKI	82
葡萄	MAAGLSASLNSMSCLRGNSFTATGPSSVISLSSFLTFVTHLKGN....TFPLQRRSLKVLQMLEKEIDEG..ITIEDCSPE.....SS..NRASERI	86
Consensus	ma g vc	
拟南芥	ERKRSRFTYLLAAAMSSSGITSMWAVVYRFQWQMGGEVPLSEMGTFALSVAAGVMEFWARWAHRAALWHSLWMMHESHHPREGFEINDVFAT	186
柚子	ARRRSRFTYLLAAAMSSSGITSMWAVVYRFQWQMGGEVPLSEMGTFALSVAAGVMEFWARWAHRAALWHSLWMMHESHHPREGFEINDVFAT	196
大豆	ARRRSRFTYLLAAAMSSSGITSMWAVVYRFQWQMGGEVPLSEMGTFALSVAAGVMEFWARWAHRAALWHSLWMMHESHHPREGFEINDVFAT	191
芒果	ARRRSRFTYLLAAAMSSSGITSMWAVVYRFQWQMGGEVPLSEMGTFALSVAAGVMEFWARWAHRAALWHSLWMMHESHHPREGFEINDVFAT	182
葡萄	ARRRSRFTYLLAAAMSSSGITSMWAVVYRFQWQMGGEVPLSEMGTFALSVAAGVMEFWARWAHRAALWHSLWMMHESHHPREGFEINDVFAT	186
Consensus	k e tyl aa mss gitsma avyrr wqn gg e gtfalsvgaavgmefwarwah alwh slw mheshh preg felndvfai	
拟南芥	INAVPAITLLSYGFFHKLVPGLCFAGLGTIVFGMAYMFVHDGLVHRRFPVGPPIANVPYIRRVASAHQLHHSKRGVPYGLFGPRGVEEVGCEELE	286
柚子	INAVPAITLLSYGFFHKLVPGLCFAGLGTIVFGMAYMFVHDGLVHRRFPVGPPIANVPYIRRVASAHQLHHSKRGVPYGLFGPRGVEEVGCEELE	296
大豆	INAVPAITLLSYGFFHKLVPGLCFAGLGTIVFGMAYMFVHDGLVHRRFPVGPPIANVPYIRRVASAHQLHHSKRGVPYGLFGPRGVEEVGCEELE	291
芒果	INAVPAITLLSYGFFHKLVPGLCFAGLGTIVFGMAYMFVHDGLVHRRFPVGPPIANVPYIRRVASAHQLHHSKRGVPYGLFGPRGVEEVGCEELE	282
葡萄	INAVPAITLLSYGFFHKLVPGLCFAGLGTIVFGMAYMFVHDGLVHRRFPVGPPIANVPYIRRVASAHQLHHSKRGVPYGLFGPRGVEEVGCEELE	286
Consensus	navpai ll g kglvpglcfaglglt fgmaymfvhdglvh rfpvgpia vpy r r va ahqlhh kf gpyglf gp e eev g eele	
拟南芥	KEISRRIILYNGKSGST	302
柚子	KEISRRIILYNGKSGST	311
大豆	KEISRRIILYNGKSGST	307
芒果	KEISRRIILYNGKSGST	295
葡萄	KEISRRIILYNGKSGST	299
Consensus	kei r	

图1 几种 *BCH* 蛋白的序列比对

### 2.2 部分生物信息学分析

采用 bioedit 软件对芒果 *BCH* 蛋白中各个氨基酸的含量进行分析,结果发现,该蛋白丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)和缬氨酸(Val)的含量较高(图 2),用 NCBI 上的 CDD(conserved domain database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)数据库分析其氨基酸序列中可能有的蛋白功能结构域,结果表明该蛋白有 1 个典型的 FA-hydroxylase superfamily(脂肪酸羟化酶超家族)保守结构域(图 3)。对其蛋白二级结构进行预测,发现芒果 *BCH* 蛋白的二级结构以无规则卷曲和  $\beta$ -折叠为主,也具有少量的  $\alpha$ -螺旋结构(图 4)。采用 bioedit 软件的 Kyte 和 Doolittle 算法对 *BCH* 蛋白的亲水性/疏水性(正值表示疏水性,负值表示亲水性)进行分析,*BCH* 蛋白所含的氨基酸主要介于 2.4 ~ -2.3

之间(图 5),采用 WoLFPSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)软件对 *BCH* 蛋白进行定位预测,发现该基因定位在叶绿体中,采用 Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>)在线软件对蛋白的三级结构进行预测,推导出该蛋白可能的三级结构构型(图 6)。采用 DNAMAN 软件进行亲缘关系聚类分析发现,芒果 *BCH* 蛋白与温州蜜柑、柚子、大豆等植物的蛋白序列聚为一类(图 7)。

### 2.3 *BCH* 基因的 RT-PCR 分析

分别提取桂七、金煌、贵妃这 3 种不同着色品种芒果果皮的 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,该基因在红色品种贵妃的果实中表达较多,绿色品种的桂七果皮中次之,而黄色品种的金煌果皮中相对表达较少(图 8),初步推断 *BCH* 基因可能与

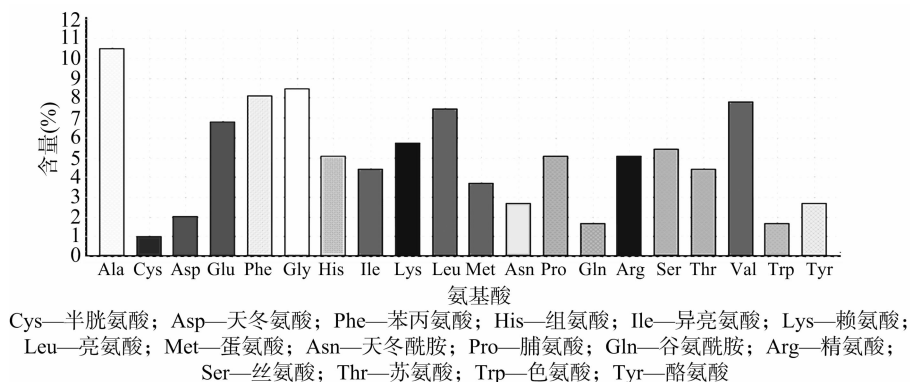


图2 *BCH* 蛋白序列中各氨基酸的含量



图3 存在于 *BCH* 蛋白的保守域

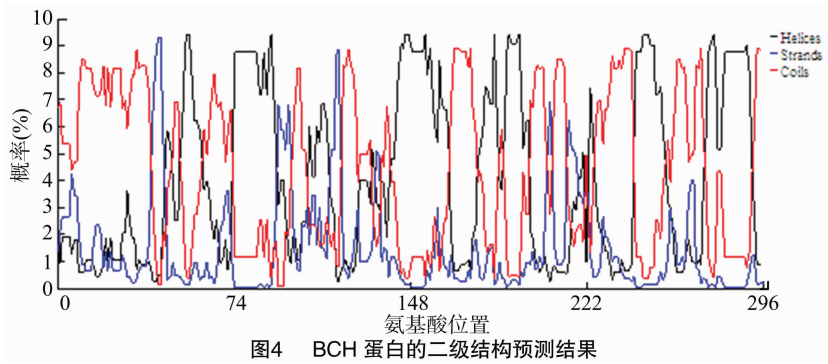


图4 BCH 蛋白的二级结构预测结果



图5 BCH 蛋白疏水区的分布

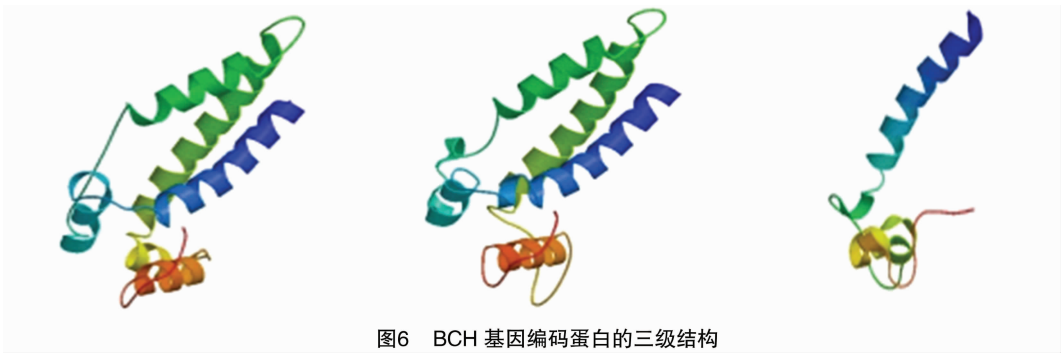


图6 BCH 基因编码蛋白的三级结构

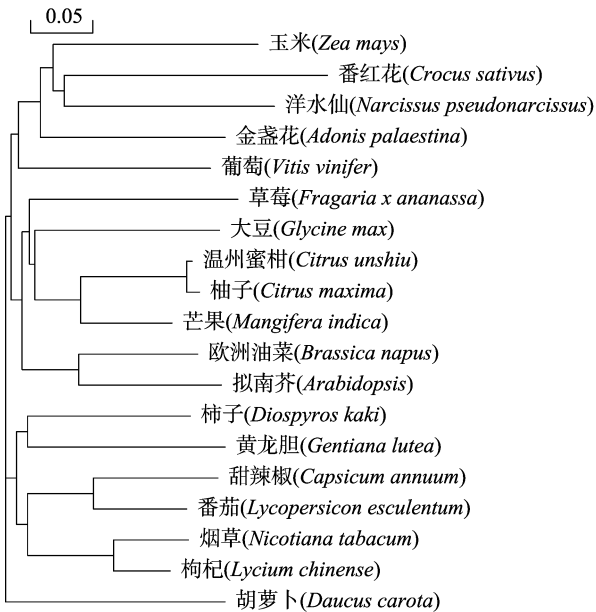


图7 部分基因的 BCH 蛋白序列的系统发育关系

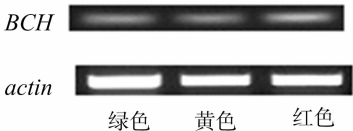


图8 BCH 基因在不同颜色芒果果实中的表达

红色品种的贵妃果实中的类胡萝卜素合成有密切的关系。

### 3 讨论

BCH 是玉米黄素生物合成的重要基因,基因编码蛋白的结构特征决定其基因的功能和性质。通过对几个物种的 BCH 蛋白的比对发现芒果 BCH 蛋白含有 BCH 蛋白家族相同的保守序列,即含有一个脂肪酸羟化酶超家族保守结构域,前人通过对拟南芥、玉米、水仙等研究发现,也含有相同的保守结构域,亚细胞定位发现该基因定位于叶绿体中<sup>[6]</sup>,这与本研究结果相一致。通过聚类分析表明,芒果 BCH 基因与柑橘类具有较近的亲缘关系。对其表达分析发现,红色的贵妃品种中表达量较高,而黄色的金煌品种中表达量较低。孙化雨

(下转第 31 页)

- Journal, 1998, 333: 233–242.
- [6] Ursic D, Sedbrook J C, Himmel K L, et al. The essential yeast TCP1 protein affects actin and microtubules [J]. Molecular Biology of the Cell, 1994, 5(10): 1065–1080.
- [7] Valpuesta J M, Martín – Benito J, Gómez – Puertas P, et al. Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT [J]. Febs Letters, 2002, 529(1): 11–16.
- [8] Yamada A, Sekiguchi M, Mimura T, et al. The role of plant CCT alpha in salt – and osmotic – stress tolerance [J]. Plant and Cell Physiology, 2002, 43(9): 1043–1048.
- [9] Baker S S, Wilhelm K S, Thomashow M F. The 5′ – region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis – acting elements that confer cold –, drought – and ABA – regulated gene – expression [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24(5): 701–713.
- [10] Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, et al. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene – product binds to the conserved MYB recognition sequence [J]. Plant Cell, 1993, 5(11): 1529–1539.
- [11] Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. Plant Cell, 2003, 15(1): 63–78.
- [12] Lopez T, Dalton K, Frydman J. The mechanism and function of group II chaperonins [J]. Journal of Molecular Biology, 2015, 427(18): 2919–2930.
- [13] Yam A Y, Xia Y, Lin H T J, et al. Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies [J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2008(15): 1255–1262.
- [14] Liang X H, Shen W, Sun H, et al. TCP1 complex proteins interact with phosphorothioate oligonucleotides and can co – localize in oligonucleotide – induced nuclear bodies in mammalian cells [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(12): 7819–7832.
- [15] Wang S Q, Zhang W J, Yang K L, et al. Isolation and characterization of a novel *Dehalobacter* species strain TCP1 that reductively dechlorinates 2, 4, 6 – trichlorophenol [J]. Biodegradation, 2014, 25(2): 313–323.
- [16] Yaffe M B, Farr G W, Miklos D, et al. TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis [J]. Nature, 1992, 358: 245–248.
- [17] Vinh D B, Drubin D G. A yeast TCP – 1 – like protein is required for actin function *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(19): 9116–9120.
- [18] Frydman J, Nimmesgern E, Erdjument – Bromage H, et al. Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP – 1 and structurally related subunits [J]. EMBO J, 1992, 11(13): 4767–4778.
- [19] Spiess C, Meyer A S, Reissmann S, et al. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets [J]. Trends in Cell Biology, 2004, 14(11): 598–604.
- [20] Llorca O, Martín – Benito J, Grantham J, et al. The ‘sequential allosteric ring’ mechanism in the eukaryotic chaperonin – assisted folding of actin and tubulin [J]. EMBO Journal, 2001, 20(15): 3893–4323.
- [21] Wang W X, Vinocur B, Shoseyov O, et al. Role of plant heat – shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(5): 244–252.
- [22] Ben – Zvi A P, Goloubinoff P. Review: Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones [J]. Journal of Structural Biology, 2001, 135(2): 84–93.
- [23] Somer L, Shmulman O, Dror T, et al. The eukaryote chaperonin CCT is a cold shock protein in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Cell Stress & Chaperones, 2002, 7(1): 47–54.

(上接第 26 页)

等对毛竹的根、幼茎、叶片、叶鞘、节等部分的表达分析发现, *BCH* 基因主要在叶片中表达, 而根中表达量较少<sup>[7]</sup>; 对转基因拟南芥分析发现, 叶片中叶绿素、叶黄素、类胡萝卜素等含量升高, 表明在毛竹中 *BCH* 基因的过量表达促进了类胡萝卜素向玉米黄素转化, 使其含量增加, 抗胁迫能力增加<sup>[8–9]</sup>。本研究从金煌芒果果皮中克隆得到了 1 个 *BCH* 基因, 对该基因在芒果中的功能研究还须要进一步通过转基因验证其功能及在对芒果果实色泽形成的作用机理, 为深入理解芒果果实色泽形成多样性的原因提供理论依据, 并为生产中着色不良成因提供改善的技术支持。

#### 参考文献:

- [1] Tian L, Magallanes – Lundback M, Musetti V, et al. Functional analysis of beta – and epsilon – ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2003, 15(6): 1320–1332.
- [2] Sun Z R, Gannt E, Cunningham F X. Cloning and functional analysis of the  $\beta$  – carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(40): 24349–24352.
- [3] 徐昌杰, 陈昆松, 张上隆, 等. 甜橙  $\beta$  – 胡萝卜素羟化酶 cDNA 克隆及其瞬间反义表达 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(6): 593–597.
- [4] 冯唐锴, 李思光, 汪艳璐, 等. 南丰蜜橘  $\beta$  – 胡萝卜素羟化酶基因的克隆和序列分析 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 238–243.
- [5] Wolfrum L A, Dhindsa R S. Cloning and sequencing of the cDNA for cas17, a cold acclimation – specific gene of alfalfa [J]. Plant Physiology, 1993, 103(2): 667–668.
- [6] 赵大球, 曹春燕, 孔 芬, 等. 植物  $\beta$  – 胡萝卜素羟化酶的生物信息学分析 [J]. 生物技术通报, 2010(4): 116–121.
- [7] 孙化雨, 陈 颖, 赵韩生, 等. 毛竹  $\beta$  – 胡萝卜素羟化酶基因的分子特征及其功能 [J]. 林业科学, 2015, 51(10): 53–59.
- [8] Kim J, Smith J J, Tian L, et al. The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis* [J]. Plant & Cell Physiology, 2009, 50(3): 463–479.
- [9] Pons E, Alquézar B, Rodríguez A, et al. Metabolic engineering of  $\beta$  – carotene in orange fruit increases its *in vivo*, antioxidant properties [J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12(1): 17–27.