

李倩,盖江涛,白蓓蓓,等. 茄科植物中 HCT 基因家族的鉴定及进化和表达分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(19):65-68.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.19.015

茄科植物中 HCT 基因家族的鉴定及进化和表达分析

李倩^{1,2}, 盖江涛², 白蓓蓓², 叶秀旭², 王鹏²

(1. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江大庆 163000;

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实验室, 海南儋州 571737)

摘要:莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶(shikimic acid/quinic acid hydroxy cinnamyl transferase, 简称 HCT)是辣椒素苯丙烷代谢途径中关键的限速酶,其催化的产物对茄科植物具有重要的生理学意义。为了探清 HCT 在茄科植物基因组中的状况,重点考察了其在茄科植物基因组中的分布,并利用生物信息学分析的方法,对 HCT 基因进行全面的鉴定,共获得拟南芥、烟草、番茄和辣椒的 13 条基因序列。其次,构建了 HCT 在茄科植物中的系统发育树,并对其进行相关的结构、功能和表达的分析。结果揭示了茄科植物中 HCT 基因的亲缘关系;HCT 基因编码的蛋白结构域高度保守,该保守性体现在植物的结构和功能上。本研究为进一步研究茄科植物中的 HCT 基因的酶学及生理功能提供了基础。

关键词:茄科植物;莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶;HCT 基因;辣椒素;进化;表达

中图分类号: S641.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)19-0065-03

辣椒为茄科(Solanaceae)辣椒属(*Capsicum*)一年或有限多年生草本植物,是人们常食用的一种风味蔬菜。研究发现,辣椒的果实中含有丰富的维生素、矿物质以及一些微量元素,可以维持人体正常的生理活动,提高身体免疫力,增强人体机能。辣椒素(capsaicin)类物质是辣椒中辣味的物质基础,早在 1876 年,辣椒素就由 Thresh 分离出来并命名,Nelson 最先解析了辣椒素的结构,表明它是一种含香草酰胺的生物碱^[1],主要的物质是辣椒碱和二氢辣椒碱^[2]。辣椒素的生物合成是个复杂的途径,其间会涉及到多种酶和代谢物的参与,然而本质上,辣椒素主要由苯丙氨酸途径合成的香草基胺和由支链脂肪酸途径合成的 8-甲基-6-癸烯酰经辣椒素合成酶(CS)催化缩合而成^[3-4]。研究者在辣椒素的合成途径中,发掘到了 PAL、C4H、HCT、C3H、COMT、KAS、pAMT、ACL 和 FAT 等多个参与辣椒素生物合成的基因^[3],查阅相关文献发现,其中莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶(HCT)是在木质素生物合成路径中发现较晚的一种酶。

目前普遍认同的木质素生物合成途径大致可以分为 3 个步骤:(1)莽草酸途径,由植物光合作用同化产物到芳香氨基酸——苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的合成过程;(2)苯丙烷途径,苯丙氨酸到羟基肉桂酸及其辅酶 A 酯类;(3)木质素合成的特异途径,羟基肉桂酸辅酶酯类到合成木质素单体及其聚合物的过程^[5-7]。其中研究的重点大都是放在苯丙烷途径和木质素合成特异途径这 2 个阶段。

HCT 是控制木质素中的 H-单体和 G/S-单体相互转化

和聚合的关键酶,在苯丙烷 3-羟基化步骤上游和下游的苯丙氨酸途径中发挥着关键的双重调节作用^[8-9],其中 H-单体主要呈现在禾本科植物中,而 S-单体主要在被子植物中存在^[6]。Hoffmann 等从烟梗提取物中分离纯化出一种可以水解羟基肉桂酰基-CoA 酯的蛋白质,从它的序列分析结果揭示出该烟草基因属于一种植物酰基转移酶的基因家族,其成员也具有各种功能^[10]。最佳的酰基供体和酰基转移酶是香豆酰辅酶 A 和咖啡酰辅酶 A,该酶能够催化莽草酸和奎宁酸的合成,也催化其逆反应,从而对苯丙烷途径中的木质素合成了明确认识。

HCT 在茄科植物辣椒的辣椒素生物合成通路中可催化对-香豆酰辅酶 A,使其形成 C3H 底物的同时将 C3H 的产物咖啡酰莽草酸/奎宁酸进一步催化生成咖啡酰辅酶 A。在木质素单体的合成通路中,不同的木质素单体形成的分水岭是 C3H/HCT,其决定了植物体内的碳源流向,是苯丙烷途径中的限速酶,也是控制木质素 H-单体与 G/S-单体的一个关键点,木质素不同单体间的比例差异对它的含量也会有所影响^[8]。木质素自身具有疏水的化学性质,在植物的生长发育过程中,既可以保持植物细胞内的水分,促进植物抵御干旱等不良生态环境,还可以提高植物抗病、抗击外来干扰,维持正常生长的能力。因此推论,对于植物中 HCT 基因的研究具有重要的生物学意义和功能。目前,已经从烟草^[10]、拟南芥^[11]、番茄^[12]、桉树^[13]、欧美杨^[14]中克隆出来 HCT 基因,然而,关于 HCT 基因在其他茄科植物中的克隆和鉴定,国内鲜有相关的系统生物信息学研究报道。

本研究以拟南芥、烟草和番茄中的 HCT 基因序列作为参考,以茄科植物中的辣椒作为研究对象,通过 BLAST 序列比对的方法获得这些植物 HCT 基因家族的全部序列,利用生物信息学分析方法中的系统发育分析、聚类分析等方法,来预测和分析茄科植物中的 HCT 基因的相关性质和功能,为后续 HCT 基因的研究和利用提供理论基础。

收稿日期:2018-07-03

基金项目:中国热带农业科学院基本科研业务专项(编号:1630032018023)。

作者简介:李倩(1994—),女,安徽池州人,硕士研究生,研究方向为植物基因组学。E-mail:a827680831@163.com。

通信作者:王鹏,博士,副研究员,主要从事植物天然产物生物技术、植物基因组学。E-mail:pwang521@163.com。

1 材料与方法

1.1 保守结构域鉴定

把 *HCT* 基因的蛋白序列作为 query 访问,输入 PfamA 数据库开始检索,获取相应的结构域信息^[15]。

1.2 数据库搜索

搜索拟南芥、烟草、番茄、辣椒的 *HCT* 基因组,各基因组数据从 Phytozome 中下载得到^[16]。通过搜索该蛋白质的模型数据库,再从结构域进行选择,获取 *HCT* 家族的序列信息。

1.3 序列比对与进化树构建

使用 probcons 比对之前已经搜索到的蛋白质序列,再利用 Phy ML 构建与之相对应的系统发育树,之后进行 1 000 次 bootstrap 分析^[17-18],最后采用 Figtree 来显示构建的进化树

结果。

1.4 相对表达量测定

根据番茄 *HCT* 基因的 CDs 序列设计引物,提取番茄样品的总 RNA,反转成 cDNA,筛选引物,之后做荧光定量测定相对表达量。

2 结果与分析

2.1 结构域鉴定

通过与 Pfam A 数据库匹配,从已知拟南芥的 *HCT* 基因的蛋白质序列中,鉴定得到了 1 个保守结构域,编号为 PF02458.11,显示该蛋白结构域高度保守,基本占据了整个蛋白质序列的 98%,存在很少的非保守序列区域(图 1)。



图1 *HCT* 蛋白结构域

2.2 含 PF02458.11 结构域的基因鉴定

为全面鉴定含有编号为 PF02458.11 的结构域的基因序列,选取了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和茄科植物中烟草 (*Nicotiana tabacum*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、辣椒 (*Capsicum annuum*) 为目标物种,通过 BLASTP 搜索目标物种基因组的蛋白质模型文件,在 BLAST 结果中筛选出 PF02458.11 结构域的序列,最终得到 13 个 *HCT* 家族成员(表 1)。

表 1 鉴定得到的 *HCT* 家族基因数目统计

物种	I	II	合计
拟南芥	0	1	1
烟草	2	2	4
番茄	1	1	2
辣椒	2	4	6
总计	5	8	13

为 2 条明显的独立分支(分别命名为 I 和 II),共有 13 条氨基酸序列,其中拟南芥 1 条、番茄 2 条、烟草 4 条、辣椒 6 条。烟草的 2 个 *HCT* 基因、番茄的 1 个 *HCT* 基因、辣椒的 2 个 *HCT* 基因聚为一支,说明这些基因的亲缘关系较近;烟草的 2 个 *HCT* 基因、番茄的 1 个 *HCT* 基因、辣椒的 4 个 *HCT* 基因、拟南芥的 1 个 *HCT* 基因聚为另一支,其中拟南芥单独分支,说明拟南芥与这些基因的亲缘关系较远(图 3)。

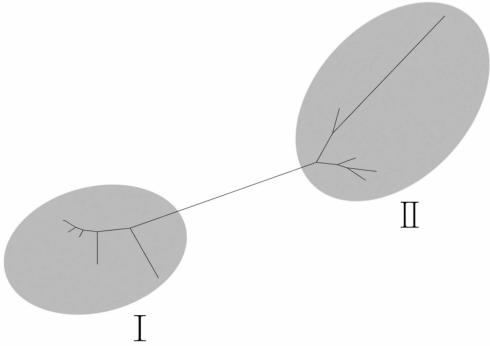


图2 *HCT* 基因家族无根进化树

2.3 进化树构建

为阐述植物中 *HCT* 家族各成员的进化关系,通过最大似然法构建了 *HCT* 家族进化树,结果(图 2)显示,此家族可分

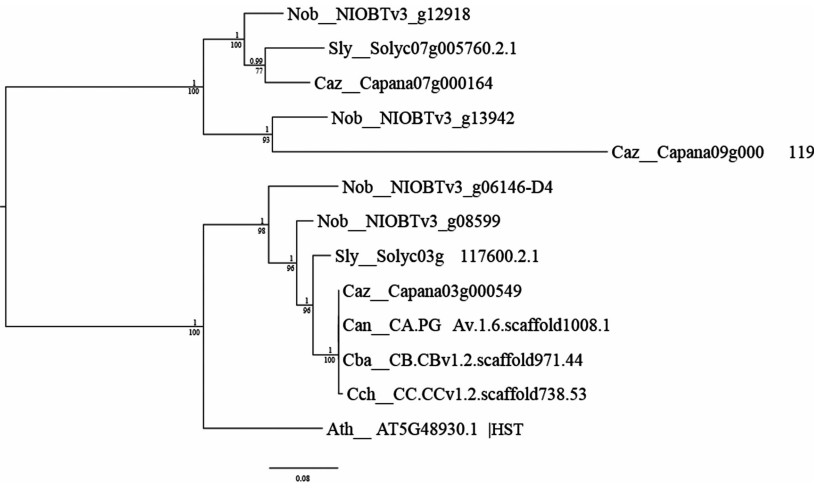


图3 *HCT* 基因家族系统发育树

2.4 HCT 基因相对表达量分析

通过建立热图来进行茄科植物中番茄的 *HCT* 基因相对表达量的差异分析。测定结果(图 4)表明,共有野生型和突变型 2 个基因型,包含 3 个发育时期:幼果期、转色期和成熟

期,整体来看它们在基因中的表达量较符合生长发育的规律。其中野生型内的 *Solyc07g043670.1.1*、*Solyc12g006330.1.1*、*Solyc09g014280.1.1* 基因和突变型内的 *Solyc09g092270.2.1* 基因在幼果期表达量低,在成熟期表达量高。

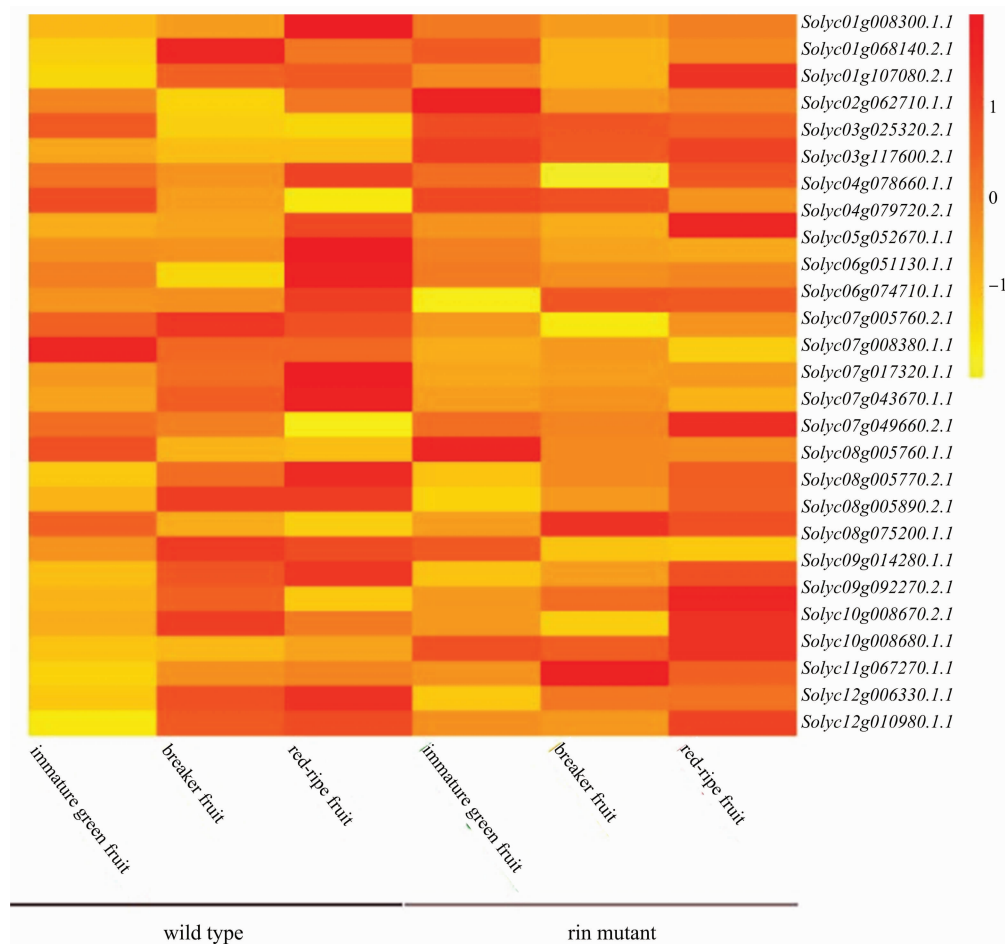


图4 *HCT* 基因在番茄中的表达量

3 讨论与结论

木质素的生物合成是植物体内碳素次级代谢的一个环节,*HCT* 是木质素合成途径中研究较晚的一种酶,同时在辣椒素苯丙氨酸合成通路的苯丙烷 C3 羟基化的代谢途径中充当关键酶和限速酶的重要角色,其代谢产物在植物生长发育的生命活动过程中肩负着不可或缺的作用,这些物质的相对含量也总是与 *HCT* 基因的活性保持着关联性,因而 *HCT* 基因对于植物的生命调控具有重大的生物学意义。

本研究对拟南芥、烟草、番茄和辣椒这 4 种植物的 13 条 *HCT* 基因家族蛋白构建系统发育分析,结果显示了茄科植物之间 *HCT* 基因的亲缘进化关系,还鉴定到另一个分支的 7 条序列与拟南芥的 *HCT* 基因分别在 2 个分支,亲缘关系较远,推测这些基因可能会在茄科植物中发挥重要的生理功能,同时随着研究的深入,不断增加的 *HCT* 基因完整序列将会构建出更加丰富的系统发育树。相对表达量的测定结果显示,本试验设定的参考对象番茄符合植物生长发育的规律,在幼果期表达量低,成熟期表达量高。

目前,人们对于苯丙烷代谢途径中的基因研究较多,虽有

一些关于植物中 *HCT* 基因的研究,但鲜有研究从茄科植物的 *HCT* 基因家族层面来分析它的系统进化,包括在辣椒素的相关合成通路中的生长调控影响,还有该基因的表达与辣椒辣味之间的联系,以及比较茄科植物中 *HCT* 基因的性质和功能等等一系列的问题亟待解决。因此本研究以茄科植物为研究对象,对它们的序列结构、性质、进化进行系统分析,为后续研究茄科植物中的 *HCT* 基因提供参考依据和理论基础,促进茄科植物在育种工作中的进一步发展。

参考文献:

- [1] Nelson E K. The constitution of capsaicin—The pungent principle of *Capsicum*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1919, 188 (2): 269.
- [2] Sarpras M, Gaur R, Sharma V, et al. Comparative analysis of fruit metabolites and pungency candidate genes expression between Bhut Jolokia and other *Capsicum* species [J]. PLoS One, 2016, 11 (12): e0167791.
- [3] 成善汉, 吴艳阁, 贺申魁. 辣椒素生物合成路径及调控基因研究的最新进展[J]. 分子植物育种, 2008, 6(2): 335–340.
- [4] Bennett D J, Kirby G W. Constitution and biosynthesis of capsaicin

曹 丁,李学优,咎继清,等. 鸡 α 干扰素真核表达载体的改造及在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 江苏农业科学,2019,47(19):68-71.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.19.016

鸡 α 干扰素真核表达载体的改造及在毕赤酵母中的分泌表达

曹 丁,李学优,咎继清,兰玲峰,甘祥武

(广州市微生物研究所,广东广州 510663)

摘要:旨在利用毕赤酵母密码子的偏好性和遗传简并性,将鸡 α 干扰素优化基因片段 *cIFN- α 2* 连入毕赤酵母表达载体 pPIC9k,再经重叠延伸 PCR 方法去除重组质粒的 5'端非翻译区多余的 8 个核苷酸 GGATCCAA,使其与毕赤酵母 AOX1(醇氧化酶)的 5'端非翻译区的序列完全一致,构建并筛选重组毕赤酵母,并进行摇瓶诱导表达试验。将表达产物用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行检测,并用微量病变抑制法检测其抗病毒效价。抗病毒活性检测结果显示,天然基因、优化基因、质粒 5'端非翻译区改造后的优化基因重组质粒表达产物的抗病毒效价分别为 10^5 、 10^6 、 1.5×10^6 U/mL。鸡 α 干扰素基因优化后的抗病毒效价提高了 10 倍,对质粒 5'端非翻译区进行进一步改造后,表达蛋白的抗病毒活性提高了 50%,从而为鸡 α 干扰素的工业化生产奠定了基础。

关键词:鸡 α 干扰素;真核表达;pPIC9k;分泌表达;抗病毒活性

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)19-0068-04

干扰素是一类能够诱导人及动物细胞产生多种广谱抗病毒蛋白的类激素蛋白,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等生物学活性,可有效解决禽类的疫病泛滥问题,并能够解决应用抗生素造成的菌群失调、出现耐药性菌株及药物的不良反应等问题^[1-2]。毕赤酵母是近年来发展起来的一种以甲醇为碳源的真核表达系统,酵母可对异源蛋白进行修饰,采用有信号肽

的质粒时,蛋白能被正确折叠和加工,然后被分泌到培养基中。毕赤酵母分泌蛋白除了具有与哺乳动物细胞表达蛋白许多相似的优点外,还具有操作简便、营养要求低、培养价格低廉、便于高密度发酵、高产分泌表达外源蛋白以及表达产物易于纯化等优点^[3-4]。因此,基于毕赤酵母的表达系统,可以有效地高表达重组鸡 α 干扰素。

鸡 α 干扰素作为禽类干扰素中的代表,其抗病毒作用较强。本研究为了解决天然鸡 α 干扰素基因表达量低下等问题,在其成熟肽序列的基础上,选用毕赤酵母偏好性密码子,人工合成其优化基因序列,并在基因序列前加入蛋白酶切割位点,使其表达蛋白具有天然的 N 端。此外,将连入的真核

收稿日期:2018-09-16

基金项目:广州市科技计划(编号:201610010087)。

作者简介:曹 丁(1986—),女,河南南阳人,硕士,高级工程师,主要从事生物农业工程方面的研究。E-mail:caoding218@163.com。

- [J]. Journal of the Chemical Society C Organic,1968,4:442-446.
- [5]王雪霞. HCT 基因的克隆及其鉴定[D]. 大连:大连工业大学,2009.
- [6]张士花. 不同 4CL 基因家族成员对植物苯丙烷衍生物代谢调控的研究[D]. 济南:山东师范大学,2011.
- [7]Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis[J]. Annual Review of Plant Biology,2003,54(1):519-546.
- [8]王雪霞,薛永常,赵文超. 木质素生物合成中 C3H/HCT 的研究进展[J]. 生命的化学,2008,28(5):650-653.
- [9]崔 雪,于月华,申丽婕,等. 海岛棉 *GbHCT* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 生物技术通报,2016,32(4):80-86.
- [10]Hoffmann L, Maury S, Martz F, et al. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism[J]. The Journal of Biological Chemistry,2003,278(1):95-103.
- [11]Niggeweg R, Michael A J, Martin C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid[J]. Nature Biotechnology,2004,22(6):746-754.
- [12]Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P A, et al. Flavonoid accumulation

- in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth[J]. Plant Cell,2007,19(1):148-162.
- [13]Harakava R. Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*[J]. Genetics & Molecular Biology,2005,28(3):601-607.
- [14]王雪霞,曹 方,薛永常. 杨树木质素合成酶 *hct* 基因的克隆及核苷酸序列分析[J]. 辽宁林业科技,2009(6):4-7.
- [15]Finn R D, Coghill P, Eberhardt R Y, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future[J]. Nucleic Acids Research,2016,44(1):D279-D285.
- [16]Goodstein D M, Shu S, Howson R, et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics[J]. Nucleic Acids Research,2012,40:1178-1186.
- [17]Do C B, Mahabhashyam M S, Brudno M, et al. ProbCons: probabilistic consistency-based multiple sequence alignment[J]. Genome Research,2005,15(2):330-340.
- [18]Guindon S, Delsuc F, Dufayard J F, et al. Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML[J]. Methods in Molecular Biology,2009,537:113-137.