

白蓓蓓,荆永琳,蔡秉宇,等. 芒果 *MinSPP* 基因的克隆及表达载体构建[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):103-107.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.022

芒果 *MinSPP* 基因的克隆及表达载体构建

白蓓蓓^{1,2}, 荆永琳^{1,2}, 蔡秉宇^{1,2}, 蓝丽¹, 李倩², 赵志常², 陈业渊²

(1. 海南大学热带作物学院, 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, 海南海口 571101)

摘要:磷酸蔗糖磷酸酶(sucrose phosphate phosphatase)是合成蔗糖的关键酶,为了研究其在芒果果实中蔗糖合成的作用机制,从芒果果肉中克隆得到1个与蔗糖合成相关的基因,将其命名为*MinSPP*,其cDNA全长序列为1 561 bp,开放阅读框为1 275 bp,编码424个氨基酸,蛋白质分子量为48.46 ku,等电点为5.34,对*MinSPP*基因编码的蛋白进行系统发育分析,发现其与克莱门柚具有较近的亲缘关系。采用qRT-PCR对该基因在后熟处理的贵妃芒果肉中的表达量进行分析,结果显示从青熟期到成熟期芒果果肉中该基因表达量逐渐上升,从成熟期到完熟期芒果果肉表达量逐渐降低,其中成熟期芒果果肉中表达量较高。本研究深入了解了芒果蔗糖合成的分子机制,进一步构建了pBI121-*MinSPP*过表达载体,为*MinSPP*的功能鉴定奠定了理论基础。

关键词:芒果;*MinSPP*基因;分子机制;蔗糖合成;甜度;克隆;表达载体构建

中图分类号: S667.701 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0103-05

在高等植物中蔗糖是光合作用的产物,在植物的生长、发育、储存、信号转导等方面具有运输糖的核心作用^[1-2]。蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase,简称SPS)和磷酸蔗糖磷酸酶(sucrose phosphate phosphatase,简称SPP)是蔗糖合

成中的关键酶^[3],且2种酶都已定位于光合作用和储存细胞的胞质溶胶中^[4-6]。蔗糖合成途径是以二磷酸尿苷葡萄糖(UDP-Glc)和6-磷酸果糖(F6P)为底物,蔗糖磷酸合成酶(SPS)催化生成6-磷酸蔗糖(S6P),6-磷酸蔗糖(S6P)在磷酸蔗糖磷酸酶(SPP)催化下水解形成蔗糖和磷酸根离子^[7-8]。其中SPS的催化反应是可逆的,在最后一步中SPP的催化反应是不可逆的,而SPS和SPP又是以复合物的形式存在的,所以认为SPS和SPP共同催化蔗糖合成反应是不可逆的^[9-10]。

磷酸蔗糖磷酸酶(SPP)既是催化蔗糖合成途径的最后一步,也是光合碳同化途径中的最后一个酶^[11-12],与SPS相比有关SPP的研究报道相对比较少。相关研究表明,在植物体内SPS和SPP是以复合体的形式存在的,SPP催化生成

收稿日期:2018-07-20

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:白蓓蓓(1992—),女,河南郑州人,硕士研究生,研究方向为分子生物学,E-mail:1967785775@qq.com;荆永琳(1992—),女,海南海口人,硕士研究生,研究方向为分子生物学,E-mail:jingyonglin1019@qq.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。

[6] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. Virus Genes, 2012, 44(2): 167-175.

[7] 刘艳成, 芦婷, 刘丹丹, 等. 2010—2014年猪流行性腹泻病毒S基因遗传进化分析[J]. 动物医学进展, 2015(8): 28-34.

[8] 王飞, 陈小芬, 苏丹萍, 等. 2014—2015年我国部分省份猪流行性腹泻病毒S基因的遗传变异分析[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(9): 1484-1488.

[9] 乔涵, 李辉, 赵丽, 等. 猪流行性腹泻病毒河南流行株S基因的克隆与遗传进化分析[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(5): 781-786.

[10] Fan B C, Jiao D, Zhao X N, et al. Characterization of Chinese porcine epidemic diarrhea virus with novel insertions and deletions in genome[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44209.

[11] Lin C M, Saif L J, Marthaler D, et al. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains[J]. Virus Research, 2016, 226(SI): 20-39.

[12] Wang D, Fang L, Xiao S. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. Virus Research, 2016, 226: 7-13.

[13] Sun D, Wang X, Shan W, et al. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2016, 78(3): 355-363.

[14] Chang S H, Bae J L, Kang T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus[J]. Molecules and Cells, 2002, 14(2): 295-299.

[15] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1): 161-163.

[16] Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines[J]. Clinical and Experimental Vaccine Research, 2015, 4(2): 166-176.

[17] Li W T, Li H, Liu Y B, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(8): 1350-1353.

[18] 周兵强, 吴志明, 闫若潜, 等. 2012—2014年河南省猪流行性腹泻病毒M基因和ORF3基因的遗传变异分析[J]. 中国兽医学报, 2014(12): 1236-1243.

6-磷酸蔗糖(S6P)的同时二磷酸尿苷葡萄糖(UDP-Glc)存在时也能催化脱磷反应,且 SPP 的活性远大于 SPS,SPP 可能在蔗糖合成过程中起重要的作用^[13-15]。到目前为止,人们对芒果 SPP 基因的研究尚未见报道。由于 SPP 基因在蔗糖合成通路中有着举足轻重的作用,影响可溶性糖的含量,本研究从芒果的果肉中克隆得到了 1 个 *MinSPP* 基因,并对该基因进行生物信息学分析以及对该基因的功能进行研究,为芒果果肉蔗糖合成的作用机制及该基因对果肉甜度的影响提供理论依据,为揭示该基因在芒果果肉蔗糖合成的分子机制提供了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用试材均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儋州芒果种质圃,以贵妃芒为试材。使用的试剂有 TaKaRa PrimerSTAR[®] Max DNA Polymerase、*rTa*q 酶、克隆载体 pEASY[®]-Blunt、大肠杆菌 Trans-T1 感受

态、农杆菌 GV3101 等。

1.2 试验方法

1.2.1 芒果果肉总 RNA 的提取及 cDNA 的反转录 芒果果肉总 RNA 的提取参照天根生化科技(北京)有限公司生产的 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒进行相关的操作,用于普通 PCR 的 cDNA 合成方法详见北京全式金生物技术有限公司 TransScript[®]-Uni One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书。

1.2.2 *MinSPP* 基因的克隆 根据前期已经拼接得到的 *MinSPP* 基因的全长序列,设计上下游特异性引物扩增 *MinSPP* 基因(表 1)。PCR 反应体系:1 μL cDNA 模板、上下游引物(10 pmol/μL)各 0.5 μL、10 μL TaKaRa PrimerSTAR[®] Max DNA 聚合酶和 8 μL ddH₂O。PCR 反应程序:98 ℃ 预变性 5 s;98 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 8 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。连接 pEASY-Blunt 载体,转化到 Trans-T1 大肠杆菌感受态细胞中,挑取阳性菌液送广州天一辉远基因科技有限公司测序。

表 1 克隆引物序列

引物名称	引物序列
<i>MinSPP</i> -F	5'-CGGGGGACGAGCTCGGTACCATGGATCGTCTCAATGTTCTGC-3'
<i>MinSPP</i> -R	5'-ACCATGGTGTCTGACTCTAGACTAGAGAACCCAGGTAGTTTGTCT-3'

注:方框内为酶切位点。

1.2.3 *MinSPP* 基因的生物信息学分析 利用美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称 NCBI)上的 ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找 *MinSPP* 基因的开放阅读框,并推测其氨基酸序列;运用 ExPASy ProtParam 软件(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)分析 *MinSPP* 蛋白理化性质;使用 ProtScale(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)软件分析氨基酸的疏水性与亲水性;使用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/Interactive>)在线软件预测并构建 *MinSPP* 蛋白的三级结构模型;利用 NCBI 上的 BLASTP(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)搜索 *MinSPP* 蛋白的同源序列;使用 NCBI 中的 Conserved domains(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析 *MinSPP* 蛋白序列的保守结构域;利用 MEGA 7.0 软件进行同源序列比对并构建系统进化树。

1.2.4 qRT-PCR 分析 *MinSPP* 基因相对表达量 利用 Bio-Rad 公司 CFX96 实时定量 PCR 仪进行试验及数据分析。荧光定量所用酶为 TransStart[®] Tip Green qPCR SuperMix,反应体系:1 μL 模板,上下游引物(10 pmol/μL)各 0.3 μL,5 μL SuperMix,3.4 μL ddH₂O,样品设 3 次重复。反应程序:95 ℃ 预变性 7 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环;60 ℃ 30 s,20 ℃ 停止。溶解曲线在 60~95 ℃ 下进行数据采集。*MinActin* 内参基因和 *MinSPP* 基因荧光定量引物见表 2。

1.2.5 *MinSPP* 基因表达载体的构建 将构建好的 pEasyBlunt-*MinSPP* 克隆载体和表达载体 pBI121 分别提取质粒,使用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xba* I 进行双酶切。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,分别将目的基因和酶切后的载体条带

表 2 荧光定量引物序列	
引物名称	引物序列(5'→3')
<i>MinActin</i> -F	ACCACCACTGCTGAACGGG
<i>MinActin</i> -R	CCGATGACTGATGGCTGGAA
<i>MinSPP</i> -F	ATGGTATGGGATGATGAG
<i>MinSPP</i> -R	TTCTGACTGAGGAACAAG

同源重组,反应体系为:2 μL In-fusion 同源重组酶,2 μL 载体,5 μL 目的片段,ddH₂O 补齐至 10 μL。然后 50 ℃ 反应 20 min,并迅速转至冰上。转化到 Trans-T1 大肠杆菌感受态细胞中,挑取阳性菌液扩繁提质粒后进行双酶切检测,最后转化 GV3101 农杆菌感受态,筛选阳性菌液,将菌液与 50% 甘油按照体积 1:1 混合,于-80 ℃ 保存。

2 结果与分析

2.1 贵妃芒果果肉总 RNA 的提取

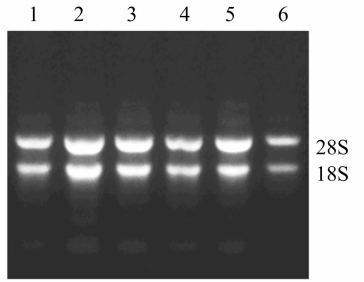
本研究提取贵妃芒果果肉总 RNA,用核酸蛋白仪测定其浓度为 800~1 000 ng/μL,纯度 *D*_{260 nm}/*D*_{280 nm} 的比值为 1.8~2.0,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,有 2 条清晰完整的条带(图 1)。

2.2 *MinSPP* 基因全长的克隆

以贵妃芒果青熟期果肉 cDNA 为模板,以 ORF 两侧设计引物克隆得到 *MinSPP* 基因全长。利用 ORF Finder 分析得到基因 CDS 区为 1 275 bp,编码 424 个氨基酸,蛋白质分子质量为 48.46 ku,等电点为 5.34。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测得到目的片段约 1 300 bp(图 2),与预期结果一致。

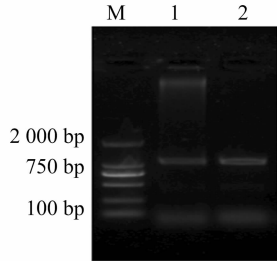
2.3 *MinSPP* 基因序列、同源性、结构域及进化树分析

根据 *SPP* 基因编码蛋白序列,在 NCBI 上利用 BLASTP 搜索并下载该蛋白的同源序列。选择与 *MinSPP* 同源性较高



1~6 为芒果不同发育阶段的果肉总 RNA

图1 贵妃芒果果肉总 RNA 的提取分析



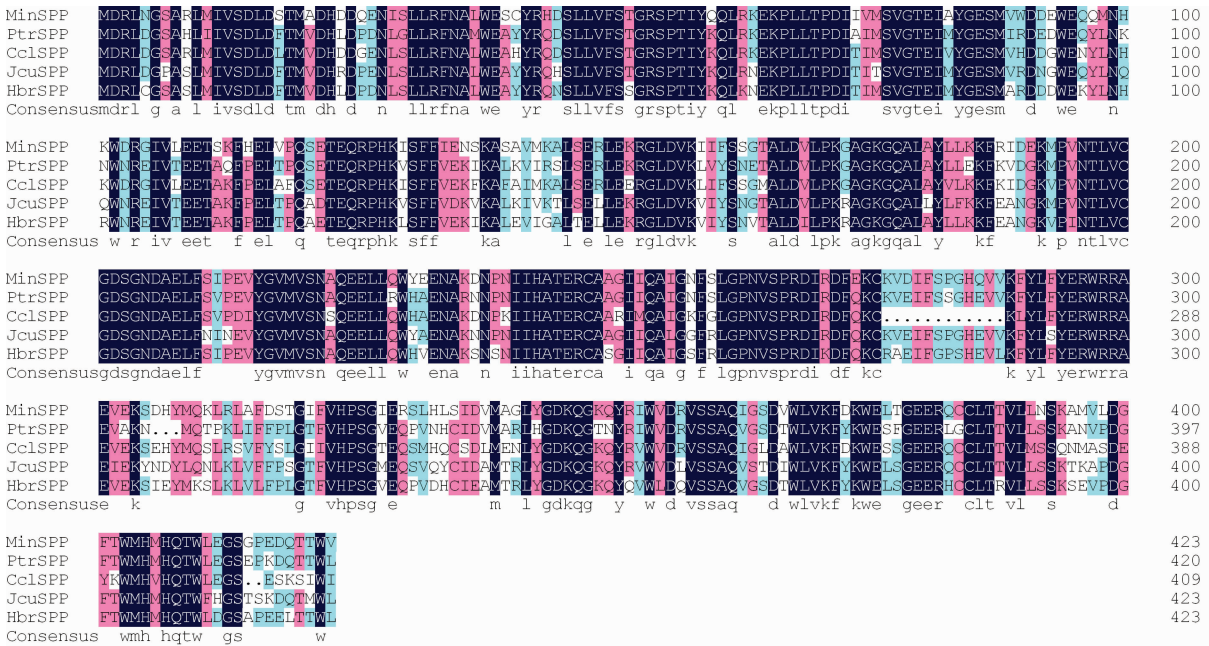
M—Marker DL2000; 1~2—MinSPP 基因全长序列

图2 芒果 MinSPP 基因全长序列电泳分析

的物种,分别为毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、克莱门柚 (*Citrus clementina*)、麻疯树 (*Jatropha curcas*) 和巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*),与芒果 MinSPP 蛋白序列同源性分别为 77%、77%、75%、73%,说明它们之间的亲缘关系很近(图3)。使用 NCBI 上的 Conserved domains 分析 MinSPP 蛋白结构域,结果显示 MinSPP 基因含有 PLN02382、SPP plant - cyano、S6PP、HAD_SPP、Cof 共 5 个结构域(图4)。采用 ProtParam Tool 软件对 MinSPP 蛋白的亲水/疏水性进行了分析(图5),其中 MinSPP 蛋白的亲水性平均系数的数值为 -0.350,说明该蛋白为亲水性蛋白。不稳定指数(Ⅱ)计算为 44.68,说明该蛋白质分类为不稳定。采用在线软件预测 MinSPP 蛋白的三级结构并构建该蛋白的三级结构模型(图6)。利用 MEGA 7.0 中 ClustX 多序列比对,邻位相连法构建系统发育树(图7),结果显示,芒果 SPP (*Mangifera indica* L.) 与克莱门柚 SPP (*Citrus clementina*) 在同一分支上,说明它们之间的蛋白亲缘关系较近。

2.4 芒果果肉在后熟处理中 MinSPP 表达量

利用 qRT - PCR 分析 MinSPP 在青熟期到完熟期(用乙烯催熟每间隔 24 h 取样)果肉的表达量变化,结果如图8所示。从柱状图中可以看出,MinSPP 基因在芒果后熟处理 5 d



MinSPP—芒果 SPP; PtrSPP—毛果杨 SPP; CclSPP—克莱门柚 SPP; JcuSPP—麻疯树; HbrSPP—巴西橡胶树 SPP

图3 MinSPP 蛋白与其他 SPP 蛋白的序列比对

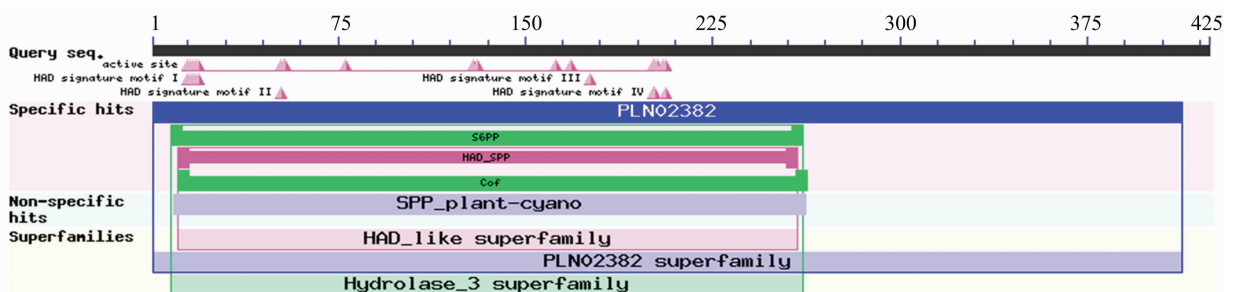


图4 MinSPP 蛋白结构域分析

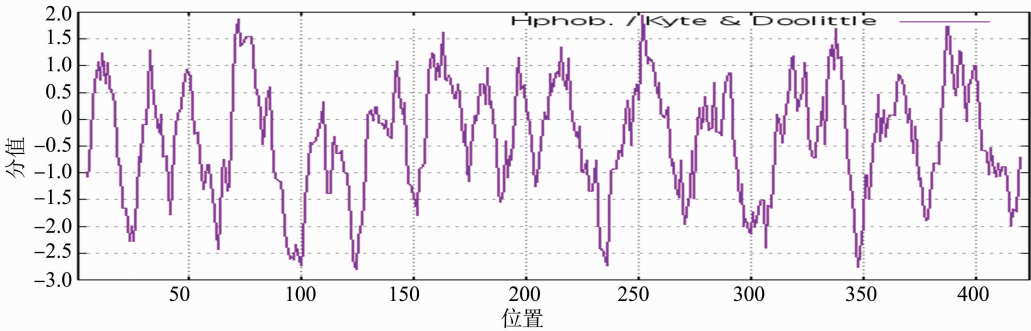


图5 MinSPP 蛋白疏水区的分布

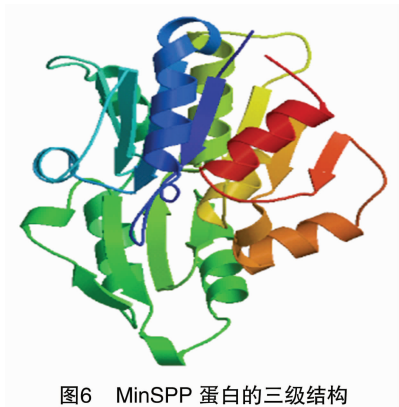


图6 MinSPP 蛋白的三级结构

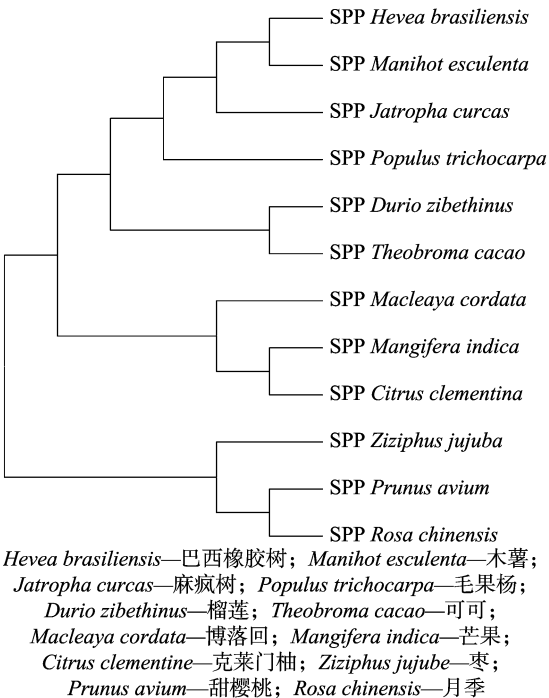


图7 MinSPP 及其他 SPP 类蛋白的进化树分析

的相对表达量最高,在之后的完熟过程中 *MinSPP* 基因的相对表达量逐渐降低。

2.5 *MinSPP* 基因表达载体的构建

使用 TaKaRa PrimerSTAR® Max DNA 聚合酶扩增基因全长,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测且用胶回收试剂盒回收目的条带,将 pBI121 空载体用 *Kpn* I 和 *Xba* I 进行双酶切,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测且用胶回收试剂盒回收目的条带,然后

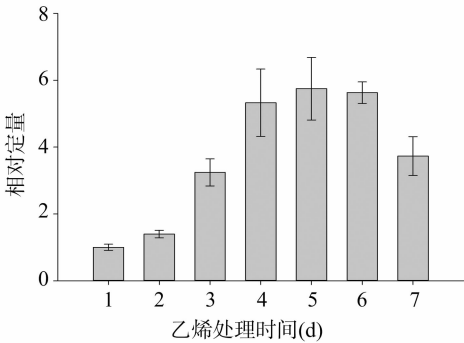


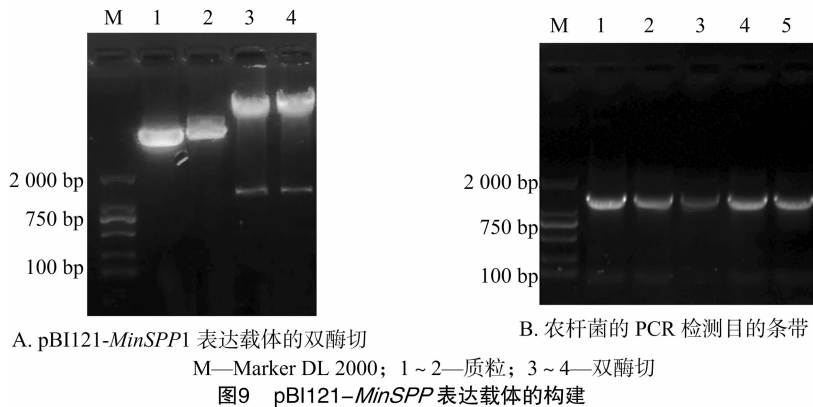
图8 *MinSPP* 基因在芒果果肉后熟处理不同时间的表达量

用无缝克隆的方法连接 2 个回收后的条带,构建表达载体 pBI121 - *MinSPP*,转化到 Trans - T1 大肠杆菌感受态细胞中,挑取阳性菌液进行扩繁,之后提取 pBI121 - *MinSPP* 重组质粒,再用 *Kpn* I 和 *Xba* I 进行双酶切验证,酶切目的基因片段为 1 300 bp (图 9 - A),与预期结果吻合,表明 pBI121 - *MinSPP* 重组质粒表达载体构建成功。pBI121 - *MinSPP* 转化到 GV3101 农杆菌,菌液 PCR 检测到目的基因已成功转化到农杆菌菌株(图 9 - B)。

3 讨论与结论

在植物蔗糖合成过程中 SPP 无处不在,不管是藻类植物、裸子植物、被子植物还是在细菌中,都发现 SPP 存在^[13,16-17],也有研究表明,水稻、小麦和玉米的叶片中 SPP 活性和 SPS 活性相当,它们都是以复合体的形式存在于植物中,因此 SPP 可能在蔗糖合成过程中发挥着重要的作用^[14,18-19]。从芒果青熟期到完熟期各生育时期的变化可以明显地看到 SPP 基因表达量的变化,说明在芒果果肉蔗糖合成过程中 SPP 也发挥着关键作用。而在芒果中 SPS 和 SPP 之间的关系需要进一步研究与讨论。

到目前为止,人们对于芒果中 SPP 基因研究甚少,本研究从芒果蔗糖合成途径中的关键基因 *MinSPP* 进行相关研究分析,发现在不同物种的同源序列比对中蛋白比对的一致性为 85.61%,说明它们之间的亲缘关系较近。从系统进化树中可以看出,芒果 *MinSPP* 基因与克莱门柚 *CclSPP* 基因在同一支上,说明它们之间的蛋白亲缘关系较近。荧光定量分析芒果后熟过程中 *MinSPP* 相对表达量水平变化,结果显示 *MinSPP* 在从青熟期到成熟期芒果果肉中的表达量逐渐上升的,从成熟期到完熟期芒果果肉中的表达量逐渐降低,其中成熟期芒果果肉中表达量较高。说明芒果在成熟期合成蔗糖含



量较高,推测芒果从青熟期到完熟期对合成蔗糖含量的变化是从上升到下降的趋势,从而可以印证在果实成熟过程中蔗糖的积累与 *SPP* 基因是有直接联系的。本研究进一步构建了 pBI121-*MinSPP* 重组过表达载体,对芒果蔗糖含量的功能变化还需要进一步在转基因植物中表达进行验证,为研究 *MinSPP* 基因在芒果后熟过程中的作用机制提供理论支撑。

参考文献:

- [1] 张明方,李志凌. 高等植物中与蔗糖代谢相关的酶[J]. 植物生理学通讯,2002,38(3):289-295.
- [2] 王晨,房经贵,王涛,等. 果树果实中的糖代谢[J]. 浙江农业学报,2009,21(5):529-534.
- [3] Cumino A, Curatti L, Giarrocco L, et al. Sucrose metabolism: *Anabaena* sucrose - phosphate synthase and sucrose - phosphate phosphatase define minimal functional domains shuffled during evolution[J]. FEBS Letters,2002,517(1/2/3):19-23.
- [4] Winter K, Foster J G, Edwards G E, et al. Intracellular localization of enzymes of carbon metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* exhibiting C_3 photosynthetic characteristics or performing crassulacean acid metabolism[J]. Plant Physiology,1982,69(2):300-307.
- [5] Echeverria E, Salerno G. Intracellular localization of sucrose - phosphate phosphate in photosynthetic cells of lettuce (*Lactuca sativa*) [J]. Physiologia Plantarum,2010,88(3):434-438.
- [6] Echeverria E. Intracellular localization of sucrose - phosphate phosphatase in storage cells [J]. Physiologia Plantarum, 2010, 95 (4):559-562.
- [7] 刘凌霄,沈法富,卢合全,等. 蔗糖代谢中蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 的研究进展[J]. 分子植物育种,2005,3(2):275-281.
- [8] 唐朝荣,肖小虎,方永军,等. 巴西橡胶树磷酸蔗糖磷酸化酶基因的克隆和表达模式分析[J]. 热带作物学报,2013,34(5):855-859.
- [9] Huber S C, Huber J L. Role and regulation sucrose - phosphate synthase in higher plants[J]. Annual Review Plant Biology,1996,47 (2):431-444.
- [10] 孙丽萍. 番茄果实蔗糖磷酸合成酶基因的克隆和番茄遗传转化体系的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2005.
- [11] 王计超. 蔗糖磷酸酶 (OsSPP1) 参与水稻磷信号调控功能研究 [D]. 金华:浙江师范大学,2016.
- [12] 徐志华. 大豆蔗糖代谢相关基因 *GmCInv1* 和 *GmSPP1* 的克隆及功能分析[D]. 南京:南京农业大学,2013.
- [13] Hawker J S, Smith G M. Occurrence of sucrose phosphatase in vascular and non - vascular plants [J]. Phytochemistry, 1984, 23 (2):245-249.
- [14] Lunn J E, Ashton A R, Hatch M D, et al. Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose - 6 (F) - phosphate phosphohydrolase from plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97 (23):12914-12919.
- [15] 肖小虎. 巴西橡胶树蔗糖代谢相关基因家族的克隆、结构进化 和表达分析[D]. 海口:海南大学,2013.
- [16] Page - Sharp M, Behm C A, Smith G D. Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial *Scytonema* species isolated from desert soils[J]. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects,1999,1472(3):519-528.
- [17] Porchia A C, Salerno G L. Sucrose biosynthesis in a prokaryotic organism: presence of two sucrose - phosphate synthases in *Anabaena* with remarkable differences compared with the plant enzymes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1996,93(24):13600-13604.
- [18] Salerno G L, Echeverria E, Pontis H G. Activation of sucrose - phosphate synthase by a protein factor/sucrose - phosphate phosphatase[J]. Cellular and Molecular Biology,1996,42(5):665-672.
- [19] Echeverria E, Salvucci M E, Gonzalez P, et al. Physical and kinetic evidence for an association between sucrose - phosphate synthase and sucrose - phosphate phosphatase [J]. Plant Physiology,1997, 115(1):223-227.