

苹果梨果实 *CHI* 基因 cDNA 克隆及表达分析

孙百灵¹, 曲柏宏², 杨宏霞², 鹿艳新², 王雪², 曹丽^{2*}

(1. 围场满族蒙古族自治县职业技术教育中心, 河北承德 068451; 2. 延边大学农学院, 吉林延吉 133002)

摘要 以苹果梨果实为试验材料, 克隆得到 *CHI* 基因 cDNA 序列(片段), GenBank 登录号: JN120854, 其长度为 444 bp, 推断其编码 148 个氨基酸序列。生物信息学分析结果表明, 该氨基酸序列与其他植物 *CHI* 氨基酸序列的同源性在 90% 左右, 与砂梨 *CHI* 氨基酸序列聚类关系最近, 该 *CHI* 基因 cDNA 序列含有常用的限制性内切酶 *Bam*HI 的识别位点。半定量 RT-PCR 分析结果表明, 随着果实的成熟, 套袋果与未套袋果 *CHI* 基因的表达量都不断增加, 但套袋果在果实成熟期的表达量明显高于未套袋果。

关键词 苹果梨; 果实; 花青苷; *CHI*; 表达分析

中图分类号 S661.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)34-12043-03

Molecular Cloning and Expression Analysis of Chalcone Isomerase Gene from Pingguoli Fruit

SUN Bai-ling¹, QU Bai-hong², YANG Hong-xia², CAO Li^{2*} et al (1. Vocational and Technical Education of Weichang Man-Meng Nationality Autonomous County, Chengde, Hebei 068451; 2. Agricultural College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract Pingguoli fruit was used as material in the experiment, *CHI* gene cDNA sequence (fragment) was cloned, accession number: JN120854, partial sequence was 444 basepair, coding 148 amino acids. Bioinformatics analysis results show that *CHI* amino acid sequence homology is 90% with other plant, and *CHI* amino acid of the Pingguoli had closer relationship with Shali, there was a commonly used restriction enzyme site for *Bam*HI from *CHI* gene cDNA sequence. The semi-quantitative RT-PCR technique showed that as fruit mature, expression of *CHI* gene is increasing constantly about bagged fruit and not bagged fruit, but bagged fruit of expression obviously higher than not bagged fruit in the fruit mature.

Key words Pingguoli; Fruit; Anthocyanin; *CHI*; Expression analysis

果实的颜色主要取决于果实下表皮细胞中的叶绿素、类胡萝卜素、类黄酮以及花青素的含量。这几种色素在果实不同发育阶段含量不同, 红色品种从生长期过渡到成熟阶段, 果实的底色由绿变黄, 同时在底色的基础上着生红色或紫红色。底色的变化是由于叶绿素的分解和类胡萝卜素含量的增加, 而红色的产生是由于花青苷的合成^[1]。

花青苷是植物体内的一类次生代谢物质, 是苯丙氨酸代谢的产物, 目前对花青苷形成机制和影响因素已有详细的报道^[2-3], 甚至有人对花青苷生物合成的遗传和发育调控也进行了研究^[4-5]。花青苷在多种酶的催化作用下合成, 其中查尔酮异构酶(*CHI*)在花青苷合成途径中非常重要, 在 *CHI* 缺乏的玉米突变体中, 会出现查尔酮积累而使子粒呈古铜色。因此, 笔者对苹果梨果实 *CHI* 基因的 cDNA 克隆及表达分析进行研究, 从分子生物学角度探讨苹果梨果实着色的生理机制, 为进一步探明梨果实着色的分子机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料。采用延边华龙集团果树场绿色苹果梨示范基地的苹果梨果实, 取样后, 果皮用锡箔纸包好, 液氮速冻后, 保存在 -80 ℃ 冰箱中备用。

1.1.2 菌株和载体。大肠杆菌 DH5 α 为延边大学农学院生物技术实验室保存。pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara)。

1.1.3 酶和生化试剂。EX *Taq* 酶、普通 *Taq* 酶、反转录酶

(M-MLV)、dNTPs、凝胶回收试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara), 引物由北京英骏生物技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 套袋处理及取样时期。套袋种类选择单面蜡质的洛川双层纸袋。套袋时期为盛花后 4~5 周。在采前 18 d 进行解袋处理(双层袋, 先除去外层纸袋, 3~5 d 后除去内层袋)。分别在果实膨大期、着色期(前期、中期、后期)、成熟期取样, 未套袋的作为对照(CK)。

1.2.2 苹果梨果皮总 RNA 的提取及 cDNA 合成。采用改良的 CTAB 法提取果皮总 RNA, 该方法分别参考 Zeng 等^[6]、王西成等^[7]、Bekesiova 等^[8]和 Porebski 等^[9]的核酸提取方法改进而成。将 RNA 溶于 30 μ l 的 DEPC-H₂O 中, 在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳检测总 RNA 的完整性, 电压为 5 V/cm, 并用紫外分光光度计测定总 RNA 的 A₂₆₀、A₂₈₀, 其余置于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

用宝生物工程(大连)有限公司(Takara) M-MLV(RNase H⁻)反转录酶合成 cDNA 第一链, 以 Oligo(dT)₁₈ 为反转录引物, 起始 RNA 为 3 μ l 总 RNA。

1.2.3 苹果梨果实 *CHI* 基因的 RT-PCR 扩增。对 NCBI 上已登录的西洋梨和砂梨栽培品种的 *CHI* 核苷酸进行多序列比对, 利用 Oligo 6 软件设计一对特异引物, 对苹果梨果实 *CHI* 基因进行 RT-PCR 扩增, 引物序列: 上游引物 5'-ATG-GCTCCACCACCATCGCTCGCT3'; 下游引物 5'-CGGTGG-GAAGTTTTGATCTTTGAA3'。

PCR 反应体系: 25 μ l 总反应体积中含模板第一链 cDNA 1 μ l, 上下游引物各 1 μ l (20 μ mol/L), dNTP Mixture 1.5 μ l (2.5 mmol/L), MgCl₂ 1.5 μ l (25 mmol/L), Ex *Taq* DNA 聚合酶 0.2

基金项目 国家自然科学基金项目(30860169); 国家自然科学基金项目(31160389)。

作者简介 孙百灵(1985-), 女, 吉林榆树人, 讲师, 硕士, 从事苹果梨果实着色机理研究。* 通讯作者, 副教授, 从事园艺植物植物栽培及育种研究。

收稿日期 2014-10-24

μl(5 U/μl),10×Buffer 2.5 μl,其余用重蒸馏水补充。

PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,59 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察特异扩增片段。

1.2.4 PCR 产物纯化回收及测序。参照 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 说明书进行 PCR 产物纯化回收,于克隆载体 pMD18-T 连接,连接产物转化 DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选及 PCR 鉴定阳性克隆后,送北京英骏生物技术有限公司测序。

1.2.5 生物信息学分析。同源性分析:借助 DNA Star 软件,对所得序列与 Genbank 上有关序列进行同源性分析,挑选典型物种序列进行多序列比对,Gene doc 生成比对结果,并利用该软件对比对结果构建系统发育树,进行系统发育分析。利用 DNA Star 软件确定 *CHI* 基因序列的酶切位点。

1.2.6 苹果梨 *CHI* 基因的半定量 RT-PCR 分析。18SrRNA 进行 RT-PCR 可以被扩增出来,且经常用作内参基因^[10],反转录后根据 18SrRNA 基因的表达量确定不同处理 cDNA 模板的相对含量,根据 18SrRNA 基因的扩增量,调整各处理样品的 cDNA 模板的绝对含量一致。对西洋梨和砂梨栽培品种的 18SrRNA 核苷酸进行多序列比对,设计一对特异引物,引物序列为:上游引物 5'GACTGTGAACTGCGAATGGCTCA3';下游引物 5'ACTATCCTACCATCGAAAGTTGAT3'。

PCR 反应体系同 *CHI* 基因的 RT-PCR 扩增。

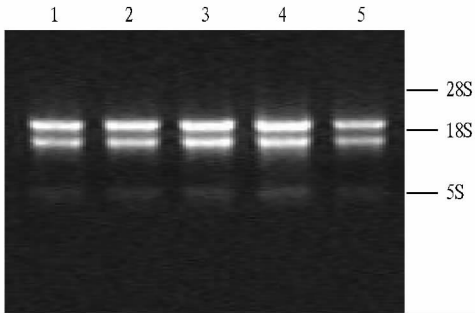
PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,54.8 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察特异扩增片段。

2 结果与分析

2.1 苹果梨果皮总 RNA 完整性检测 从图 1 可以看出,改良的 CTAB 法提取的苹果梨总 RNA 出现明显的 28 s、18 s、5 s 3 条带,带型规则整齐,且 28 s 的条带亮度是 18 s 的 2 倍,说明所提取 RNA 基本没有降解,结构较为完整。

2.2 苹果梨果皮总 RNA 的提取纯度 通过 A_{260} 与 A_{280} 的比值可以判断 RNA 的纯度,高质量 RNA 的 A_{260}/A_{280} 应在 1.8~2.0。改良的 CTAB 法提取 RNA 的 A_{260}/A_{280} 均介于 1.8~2.0 (表 1),说明所提取的总 RNA 纯度较高,浓度也较高,无蛋白质、DNA、多糖等物质的残留。

2.3 苹果梨 *CHI* 基因 cDNA 片段的克隆 由图 2 可知,将提取的苹果梨果皮总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板



注:1. 果实膨大期;2. 果实着色前期;3. 果实着色中期;4. 果实着色后期;5. 果实成熟期。

图 1 不同时期取样的套袋苹果梨果皮总 RNA 电泳图谱

表 1 改良 CTAB 法提取总 RNA 紫外分光光度计分析结果

取样时期	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
果实膨大期	0.078	0.041	1.897 6
果实着色前期	0.067	0.035	1.932 4
果实着色中期	0.062	0.032	1.961 8
果实着色后期	0.082	0.043	1.909 8
果实成熟期	0.059	0.031	1.871 4

进行 RT-PCR 反应,用 1.2% 的琼脂糖电泳检测 PCR 产物,发现扩增出一条 444 bp 的片段,与预测目的片段的大小一致。

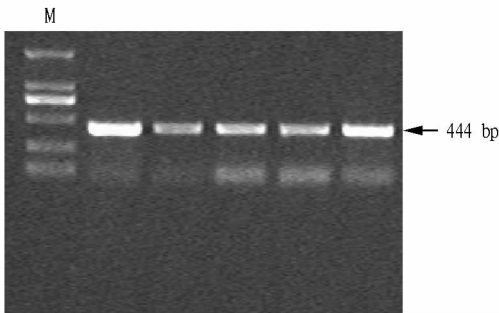
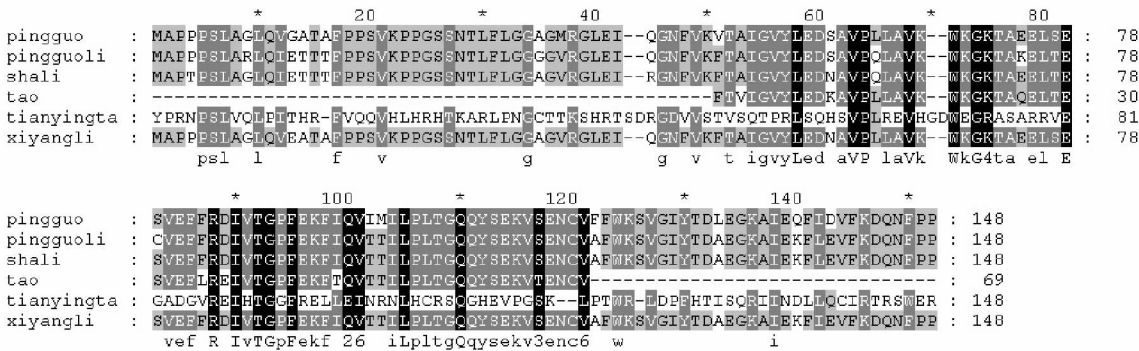


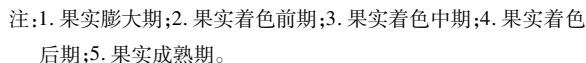
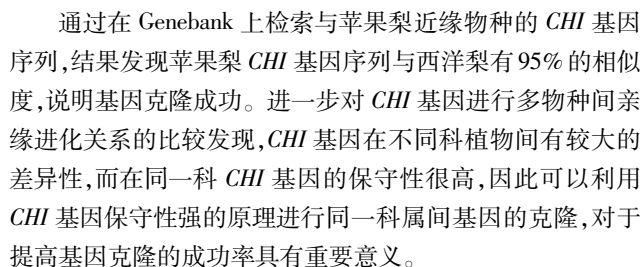
图 2 苹果梨 *CHI* 基因的 RT-PCR 扩增

2.4 苹果梨 *CHI* 基因多序列比对及其系统发育分析 苹果梨 *CHI* 基因片段 cDNA 序列经 Blast 比对,发现与大多数已登录的其他植物的 *CHI* 基因序列同源性在 90% 左右,其中与西洋梨有 95% 的相似度,说明已成功克隆出苹果梨 *CHI* 基因片段。将该片段 cDNA 对应的氨基酸序列在 NCBI 上运行 blastp,比对结果见图 3。由图 3 可知,它与多种植物的 *CHI* 氨基酸序列具有较高的同源性,特别是与砂梨、西洋梨的同源性分别达到 95%、93%。



2.6 苹果梨 *CHI* 基因的半定量 RT-PCR 分析

应用半定量 RT-PCR 研究了 *CHI* 在不同取样时期的苹果梨果皮中的表达,结果见图6。由图6可知,套袋果与未套袋果 *CHI* 基因在果实膨大期、着色期(前期、中期、后期)、成熟期均能检测到,随着果实的成熟,*CHI* 基因的表达量不断增加,但套袋果在果实成熟期的表达量明显高于未套袋果。

图6 不同取样时期套袋与未套袋果实 *CHI* 基因的表达

查尔酮异构酶是花青苷合成途径中至关重要的酶,其作用主要是催化查尔酮环的闭合,因此,该基因的克隆对于花青苷合成的研究非常重要。该研究首次从苹果梨果皮中克隆了 *CHI* 基因(片段),并通过半定量 RT-PCR 技术对该基因的表达进行了分析,结果表明,套袋果在果实成熟期的表达量明显高于未套袋果,这也是利用套袋技术来促进果实着色的原因,同时,也说明 *CHI* 基因是形成苹果梨红色果皮的关键基因之一。

- [1] 吕忠恕. 果树生理[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983:341-342.
- [2] REAY P E, FLETCHER R H, THOMAS V J, et al. Chlorophylls, carotenoids and anthocyanin concentrations in the skin of 'Gala' apples during maturation and the influence of foliar applications of nitrogen and magnesium m[J]. J Sci Food Agric, 1998, 76: 63-71.
- [3] LI Z, GEMMA H, IWAHORI S. Stimulation of 'Fuji' apple skin color by ethephon and phosphorus calcium mixed compounds in relation to flavonoid synthesis[J]. Scientia Horticulturae, 2002, 94(7): 193-199.
- [4] HONDA C, KOTODA N, WADA M, et al. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin[J]. National Institute of Fruit Tree Science, 2002, 40(8): 955-962.
- [5] BAN Y, HONDA C, HATSUYAMA Y, et al. Graduate School of Life and Environmental Sciences [J]. Plant Cell Physiol, 2007, 48(7): 58-70.
- [6] ZENG Y, YANG T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polycarbohydres [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2002, 20: 417.
- [7] 王西成, 乔玉山, 欧春青, 等. 三种梨果皮总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2010(2): 91-94.
- [8] BEKESIOVA I, NAP J P, MLYNAROVAL L, et al. Isolation high quality DNA and RNA from leaves of the Carnivorous plant *Drosera rotundifolia* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17: 269-277.
- [9] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R, et al. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for Plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8-15.
- [10] 宗成文. 葡萄花发育相关基因的克隆与表达特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.