

# 不同酿酒葡萄品种白藜芦醇合酶基因的克隆和序列分析

宋长征, 张振文

(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以红葡萄品种“赤霞珠”、“品丽珠”、“黑比诺”和白葡萄品种“雷司令”为试材,采用改良 CTAB 法提取葡萄叶片组织中的 DNA,并扩增得到 4 个酿酒葡萄品种的白藜芦醇合酶基因部分片段。结果表明:红葡萄品种“赤霞珠”、“品丽珠”、“黑比诺”的扩增产物均为 1 419 bp,白葡萄品种“雷司令”扩增产物为 1 417 bp。通过序列多重比较分析,所得到的 4 个白藜芦醇基因片段与 Genbank 中河岸葡萄(AF128861)的该基因序列同源性较高(90%以上),外显子区同源性高于内含子;红色葡萄姊妹品种之间、红色葡萄不同品种之间、红色葡萄与白色葡萄品种之间的序列同源性依次递减。

**关键词:**酿酒葡萄;白藜芦醇;合酶基因;克隆;序列分析

**中图分类号:**S 663.1;Q 81 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)24-0140-05

白藜芦醇(Resveratrol 3,4',5-trihydroxystilbene,简称 Res)是一种只在生理条件下存在的芪二酚化合物(1,2-二苯乙烯,Stilbene),是植物为抵抗外界刺激而分泌的一种植物抗毒素<sup>[1]</sup>。它是在白藜芦醇合酶的催化作用下,以 1 分子 4-香豆酰辅酶 A 和 3 分子丙二酰辅酶 A 为底物合成的<sup>[1]</sup>,1940 年首次从毛叶藜芦的根部获得<sup>[2]</sup>。它具有许多医疗保健作用,如抗氧化、抗肿

瘤、抗血小板凝聚、抗细菌和真菌、防止人体低密度脂蛋白氧化等<sup>[1,3]</sup>,因此,Res 已成为科学家们高度重视的天然活性成分。研究表明,白藜芦醇合酶(Resveratrol synthase,简称 RS)是白藜芦醇合成途径中的关键酶,且是白藜芦醇生物合成中唯一必需的酶,它只存在于有白藜芦醇合成的植物中,大多数作物都缺乏白藜芦醇合酶基因<sup>[4]</sup>。不同植物或同种植物不同组织部位中白藜芦醇含量又有明显差异<sup>[5-6]</sup>。因此,对 RS 基因序列的深入研究有助于构建表达载体,培育转基因植物、微生物,为提高植物的抗性和人类的健康水平提供有效的途径<sup>[7-8]</sup>。该研究利用改良 CTAB 法提取葡萄叶片组织中的 DNA,根据文献<sup>[2]</sup>的序列(Genbank 登录号 AF128861)设计引物,并采用简单易行的 PCR 方法扩增得到 4 个酿酒葡萄品种的白藜芦醇合酶基因的部分片段序列,利用相关软件进行了不同酿酒葡萄品种白藜芦醇合酶基因序列的分析。

**第一作者简介:**宋长征(1989-),男,安徽宿州人,本科,研究方向为葡萄与葡萄酒工程。E-mail:sczl103@gmail.com。

**责任作者:**张振文(1960-),男,陕西铜川人,硕士,教授,博士生导师,现主要从事葡萄与葡萄酒研究工作。E-mail:zhangzhw60@nwsuaf.cn.com。

**基金项目:**国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-30-9)。

**收稿日期:**2011-09-15

## Research on Tissue Culture and Plant Regeneration of *Peperomia obtusifolia*

JI Chun-yan<sup>1</sup>, LI Rui-yi<sup>2</sup>, ZHANG Cai-li<sup>3</sup>, WANG Zhu<sup>1</sup>

(1. Institute of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, Heilongjiang 157012; 2. Institute of Horticultural, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 3. Qiqihar Gannan No. 2 Middle School, Gannan, Heilongjiang 162100)

**Abstract:** Taking the round leaf segments of pepper stems as test materials, the effect of 6-BA, NAA, IBA on pepper grass callus induction, adventitious bud differentiation and plantlet rooting were studied, to filter out the callus and shoot induction of differentiation and the best rooting medium. The results showed that MS+1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L for the conduct of callus induction, callus and adventitious buds optimal differentiation medium, 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+0.5% activated carbon were the best medium for *in vitro* rooting culture.

**Key words:** *Peperomia obtusifolia*; caulis segment; tissue culture

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试酿酒葡萄品种“赤霞珠”、“品丽珠”、“黑比诺”和“雷司令”均来自于陕西杨凌西北农林科技大学葡萄酒学院葡萄教学标本区,2003年定植。PCR产物回收试剂盒、感受态大肠杆菌细胞及质粒由西安沃尔森生物技术有限公司提供,其它相关试剂均由西北农林科技大学植保学院分子实验室提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品采集 2010年10月19日上午采集供试葡萄品种幼嫩叶片,用冰盒带回实验室后置于 $-40^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.2 基因组总DNA的提取 取适量的PVP于预冷的研钵中,加入1g左右的葡萄幼嫩叶片,加适量液氮快速充分研磨成粉末。将粉末转入15 mL离心管中,加入5 mL  $65^{\circ}\text{C}$ 预热的CTAB提取液,充分混匀于 $65^{\circ}\text{C}$ 中保温40 min,加等体积的氯仿-异戊醇(24:1), $4^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心10 min,取上清液加等体积的氯仿-异戊醇(24:1), $4^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心10 min,取上清液加2.5倍体积 $-20^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇在 $-20^{\circ}\text{C}$ 静置1 h, $4^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心10 min,70%的乙醇洗涤DNA沉淀2次,将离心管置于通风橱内,风干后溶于1 mL TE, $4^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 PCR引物的设计与合成 按文献报道的序列(Genbank 登录号 AF128861)。用 primer premier 5 设计如下PCR扩增引物:P1:5'-TCCTAGCCATTGGCACAG-3'; P2:5'-AAACCGAATAATACTCCC-3'。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2.4 PCR扩增目的基因 在无菌0.2 mL PCR管中依次加入下列各组分:引物1(50 mol/L)1  $\mu\text{L}$ ,引物2(50 mol/L)1  $\mu\text{L}$ ,模板DNA(200 ng/ $\mu\text{L}$ )1  $\mu\text{L}$ ,PCR缓冲液2.5  $\mu\text{L}$ , $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu\text{L}$ ,10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu\text{L}$ ,Taq DNA 0.3  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 17.2  $\mu\text{L}$ ,总体积25  $\mu\text{L}$ 。充分混匀后,短暂离心后于PCR扩增仪上进行扩增反应。PCR扩增反应在PTC-200 thermo-cycle上进行,PCR反应程序为: $94^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, $94^{\circ}\text{C}$ 变性45 s, $55^{\circ}\text{C}$ 退火45 s, $72^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min,共35个循环。循环结束后, $72^{\circ}\text{C}$ 再延伸10 min, $4^{\circ}\text{C}$ 保存<sup>[1]</sup>。

1.2.5 测序 回收纯化后的PCR产物送交上海桑尼生物科技有限公司进行克隆和双向测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄基因组总DNA的提取

取用CTAB法提取的4个供试酿酒葡萄品种的葡萄基因组DNA,电泳结果表明,DNA呈单一条带,片段大小约为21 kb,无弥散现象,表明无RNA污染,稀释后可直接用于PCR扩增。

### 2.2 PCR扩增目的基因

以葡萄叶基因组DNA为模板进行PCR扩增,扩

增产物的电泳结果(图1)表明,泳道1、2、3、4的扩增产物均为单一DNA条带。片段大小与标准相对分子量中的1.5 kb条带接近,大小和文献报道的相符。PCR扩增产物的电泳条带单一、清晰,说明引物的设计、扩增条件、基因组DNA的质量较理想。

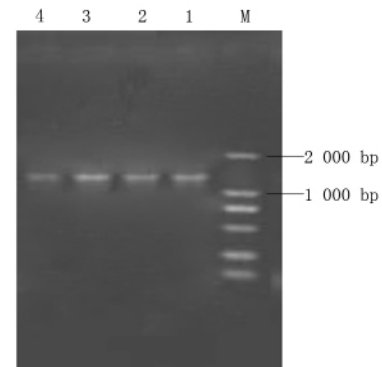


图1 扩增产物的电泳结果

注:M:marker;1:“品丽珠”;2:“黑比诺”;3:“赤霞珠”;4:“雷司令”。

Fig.1 Electrophoresis result of Amplification product

Note:M:marker;1:‘Cabernet Franc’;2:‘Pinot Noir’;

3:‘Cabernet Sauvignon’;4:‘Riesling’.

### 2.3 序列分析

2.3.1 扩增产物序列分析 由图2可知,红色供试葡萄品种“赤霞珠”、“品丽珠”、“黑比诺”的扩增产物为1 419 bp,白色葡萄品种“雷司令”扩增产物为1 417 bp,差异的2 bp来源于内含子区。与Genbank中所提供序列(登录号 AF128861)比较分析,确定产物中的2个外显子部分序列及中间的一个内含子序列。

2.3.2 序列多重比较分析 用生物信息学软件DNA MAN完成对扩增产物序列多重比较分析。结果表明,“雷司令”品种与河岸葡萄(AF128861)的序列同源性达到91.58%，“黑比诺”与AF128861同源性为97.40%，“赤霞珠”与AF128861的同源性高达97.96%，“品丽珠”与AF128861同源性为98.18%；“赤霞珠”与“品丽珠”同源性为98.95%，它们与“黑比诺”的同源性达到98.78%。图3为利用DNAMAN绘制的各个酿酒葡萄品种的系统进化树。单独对各个品种扩增产物中外显子的部分序列和内含子部分进行了多重分析(图4)。4个葡萄品种白藜芦醇合酶基因外显子的部分序列均为1 063 bp。“赤霞珠”、“品丽珠”、“黑比诺”3个品种该基因内含子均为356 bp，“雷司令”为354 bp。结果显示不同品种的外显子部分同源性高于95%，而内含子部分同源性最小值为86%，外显子同源性明显高于内含子。利用DNASTAR将外显子部分翻译成氨基酸序列,并进一步对不同葡萄品种间白藜芦醇合酶部分氨基酸序列进行多重比较分析(图5)。在外显子的1 063 bp中,有70个碱基位点在这4个酿酒葡萄品种中产生差异,其中11个导致相应氨基

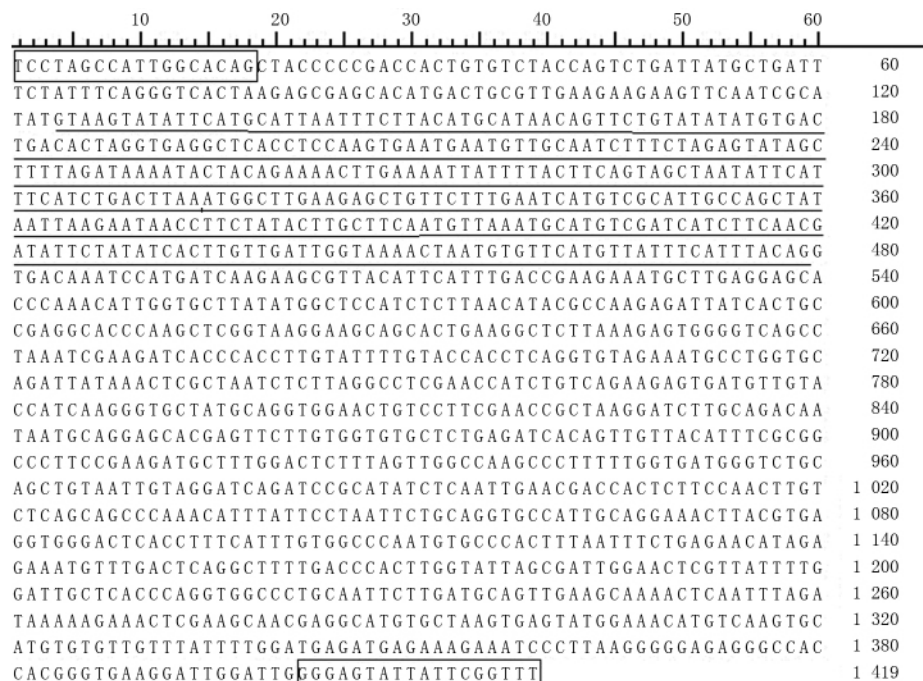


图2 “品丽珠”扩增产物序列

注:下划线为内含子区,两侧为部分外显子区,其中方框内为引物。

Fig. 2 Amplification product sequence of cabernet franc

Note: Underlined for the intron, two sides for part of the exons, and in the boxes for the PCR primers, respectively.

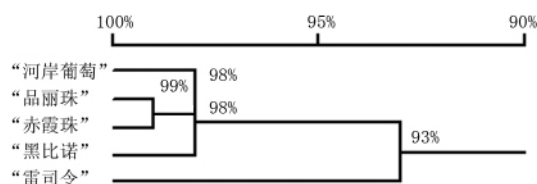


图3 扩增产物全序列同源性分析

Fig. 3 Sequence homology analysis of amplification product

酸位点的氨基酸不同。由图5可知,各品种间氨基酸同源性在98%以上,白葡萄品种“雷司令”与其它品种间的差异最大。

### 3 结论与讨论

该试验以4个酿酒葡萄品种为材料,分别得到白藜芦醇基因片段。结果表明,该试验中所扩增产物与Genbank上人所测序列同源性较高,且氨基酸同源性在98%以上,说明产物是白藜芦醇合酶基因的片段。系统进化树分析表明,“赤霞珠”与其姊妹品种“品丽珠”亲缘关系较近;红葡萄品种“赤霞珠”、“品丽珠”、“黑比诺”间亲缘关系较近,而与白葡萄品种“雷司令”亲缘关系较远,试验结果与事实相符。

若采用RT-PCR方法,得到的RS cDNA与RS DNA相比,剪掉了内含子,被认为能更准确表达目的基因。但在过去很长时间内被认为是不发生作用的内含子,现已发现也编码蛋白质,在基因的表达调控中起重要作用<sup>[1]</sup>。对外显子和内含子单独进行多重比

较分析可知,内含子片段较短,长度约为外显子部分的1/3,但差异性大于外显子;通过在线Blast检索,找到已测得的圆叶葡萄(*Vitis rotundifolia* Michx., EF108325.1)、华东葡萄(*Vitis pseudoreticulata*, FJ830330.1)、“佳丽酿”(FJ851183.1)、“汤姆森无核”(Thompson seedless, FJ851185.1)白藜芦醇合酶基因序列,分析发现外显子区长度均为1 063 bp,而内含子长度差异较大(圆叶葡萄346 bp,华东葡萄355 bp,“佳丽酿”357 bp,“汤姆森无核”359 bp),推测内含子的差异可能在编码蛋白质及对基因表达调控中产生影响。

不同来源的基因结构存在一定的差异,其合成Res的能力也不同,所以,通过对RS基因的克隆测序进而进行氨基酸序列的分析,有助于研究不同植物或不同葡萄品种体内合成Res能力的差异与Res的氨基酸序列的关系,从而对RS基因的转基因研究产生指导性意义。

相比对试验环境及操作人员要求较高的RT-PCR方法,该试验利用改良CTAB法提取葡萄叶片组织中的DNA,根据NCBI上登录号AF128861的基因序列直接设计引物,用简单易行的PCR方法扩增得到RS DNA,得到内含子与外显子序列,无需高质量的RNA,适宜应用于相关基因的克隆和测序分析。

将产物序列在线Blast检索,结果显示序列与白藜芦醇合酶基因序列和已测序的芪合成酶(Stilbene synthase,简称STS)基因序列同源性均在90%以上。

“河岸葡萄”	...GTAAGTATATTTCATGCAATTAATTCTTACATGCATAACAGTTCTGTATATATGTGACTGA...CACTAGGTG	69
“品丽珠”	...GTAAGTATATTTCATGCAATTAATTCTTACATGCATAACAGTTCTGTATATATGTGACTGA...CACTAGGTG	69
“黑比诺”	...GTAAGTATATTTCATGCAATTAATTCTTACATGCATAACAGTTCTGTATATATGTGACTGA...CACTAGGTG	69
“赤霞珠”	...GTAAGTATATTTCATGCAATTAATTCTTACATGCATAACAGTTCTGTATATATGTGACTGA...CACTAGGTG	69
“雷司令”	GTAAGTATATATTTCATGCAATTAATTCTTACATGCATAACAGTTCTGTATATATACGAGTGTGCTATTAAAGTG	74
Consensus	gtaagtatatatttcacgcaatatttctttacatgcataacagttctgtatatatgtgactga cactaggtg	
“河岸葡萄”	AAGTTCACCTCCAAGTGAATGAAGTTGCAACTTTCTTAGAGTATAGCTTTTAGATAAAATCTACAGAAAACCTT	144
“品丽珠”	AGGCTCACCTCCAAGTGAATGAAGTTGCAACTTTCTTAGAGTATAGCTTTTAGATAAAATCTACAGAAAACCTT	144
“黑比诺”	AGGCTCACCTCCAAGTGAATGAAGTTGCAACTTTCTTAGAGTATAGCTTTTAGATAAAATCTACAGAAAACCTT	144
“赤霞珠”	AGGCTCACCTCCAAGTGAATGAAGTTGCAACTTTCTTAGAGTATAGCTTTTAGATAAAATCTACAGAAAACCTT	144
“雷司令”	AGGGTACCTCCAAGTGAATGAAGTTGCAACTTTCTTAGAGTATAGCTTTTAGATAAAATCTACAGAAAACCTT	146
Consensus	aggctcacctccaagtgaatgaatggttgcaactctttctagagtatagcttttagataaaaactacacagaaaactt	
“河岸葡萄”	GAAATATATTTTACTTCAGTAACTAATATTCTTTCATCTGACTGTAATGGCTTGAAGAGCTGTCTTTTGAATCA	219
“品丽珠”	GAAATATATTTTACTTCAGTAACTAATATTCTTTCATCTGACTGTAATGGCTTGAAGAGCTGTCTTTTGAATCA	219
“黑比诺”	GAAATATATTTTACTTCAGTAACTAATATTCTTTCATCTGACTGTAATGGCTTGAAGAGCTGTCTTTTGAATCA	219
“赤霞珠”	GAAATATATTTTACTTCAGTAACTAATATTCTTTCATCTGACTGTAATGGCTTGAAGAGCTGTCTTTTGAATCA	219
“雷司令”	GAAATATATTTTACTTCAGTAACTAATATTCTTTCATCTGACTGTAATGGCTTGAAGAGCTGTCTTTTGAATCA	221
Consensus	gaaatatttttacttcagtaactaatatttcattctctgactgtaatggcttgaagagctgtcttttgaatca	
“河岸葡萄”	TGTCGCATTGCCAGCTGTAATTAAGAAATAACCTTTTATACITGCTTCAATGTTAAATGCATGTCAATCATCTTCA	294
“品丽珠”	TGTCGCATTGCCAGCTGTAATTAAGAAATAACCTTTTATACITGCTTCAATGTTAAATGCATGTCAATCATCTTCA	294
“黑比诺”	TGTCGCATTGCCAGCTGTAATTAAGAAATAACCTTTTATACITGCTTCAATGTTAAATGCATGTCAATCATCTTCA	294
“赤霞珠”	TGTCGCATTGCCAGCTGTAATTAAGAAATAACCTTTTATACITGCTTCAATGTTAAATGCATGTCAATCATCTTCA	294
“雷司令”	TGTCGCATTGCCAGCTGTAATTAAGAAATAACCTTTTATACITGCTTCAATGTTAAATGCATGTCAATCATCTTCA	296
Consensus	tgtcgcattgccagctataattaagaataaccttttatacttgcttcaatgttaaatgcattgcatcatcttca	
“河岸葡萄”	ACCATATCTATATCACTTGTGATTGGTAAACAAATGTGTTTCATGTTATTTCAATTACAG	356
“品丽珠”	ACCATATCTATATCACTTGTGATTGGTAAACAAATGTGTTTCATGTTATTTCAATTACAG	356
“黑比诺”	ACCATATCTATATCACTTGTGATTGGTAAACAAATGTGTTTCATGTTATTTCAATTACAG	356
“赤霞珠”	ACCATATCTATATCACTTGTGATTGGTAAACAAATGTGTTTCATGTTATTTCAATTACAG	356
“雷司令”	ACCATATCTATATCACTTGTGATTGGTAAACAAATGTGTTTCATGTTATTTCAATTACAG...	356
Consensus	acgatattctatatacattgttgattggtaaaactaatgtgttcattgttatttcatttacag	354

图4 内含子同源性多重比较分析

Fig. 4 Homology multiple comparison analysis of introns

“河岸葡萄”	LAIGTATPDHCVYQSDYADYFFRVTKSEHMTALKKKFNRIKDKSMIKKRYIHLTEEMLEHPNIGAYMAPSLNIR	75
“品丽珠”	LAIGTATPDHCVYQSDYADYFFRVTKSEHMTALKKKFNRIKDKSMIKKRYIHLTEEMLEHPNIGAYMAPSLNIR	75
“黑比诺”	LAIGTATPDHCVYQSDYADYFFRVTKSEHMTALKKKFNRIKDKSMIKKRYIHLTEEMLEHPNIGAYMAPSLNIR	75
“赤霞珠”	LAIGTATPDHCVYQSDYADYFFRVTKSEHMTALKKKFNRIKDKSMIKKRYIHLTEEMLEHPNIGAYMAPSLNIR	75
“雷司令”	LAIGTATPDHCVYQSDYADYFFRVTKSEHMTALKKKFNRIKDKSMIKKRYIHLTEEMLEHPNIGAYMAPSLNIR	75
Consensus	laigtatpdhcvyqsdadyffrvtksehmtalkkkfnricdksmikkr yihlteemleehpnigaymapslnir	
“河岸葡萄”	CEIITAEVPLKGKEAALKALKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLEESVRRVRLYHQGCYAGGT	150
“品丽珠”	CEIITAEVPLKGKEAALKALKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLEESVRRVRLYHQGCYAGGT	150
“黑比诺”	CEIITAEVPLKGKEAALKALKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLEESVRRVRLYHQGCYAGGT	150
“赤霞珠”	CEIITAEVPLKGKEAALKALKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLANLLGLEESVRRVRLYHQGCYAGGT	150
“雷司令”	CEIITAEVPLKGKEAALKALKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVEMPGADYKLSNLLGLEESVRRVRLYHQGCYAGGT	150
Consensus	qeitaevpklgkeaalalkewgqpkskithlvfcttsgvempgadyk lanllglepsvrrvrl yhqgc yaggt	
“河岸葡萄”	VLRTAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPSEDALDSL VGQALFGDGSAAVIVGSDPDISIERPLFQLVSAAG	225
“品丽珠”	VLRTAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPSEDALDSL VGQALFGDGSAAVIVGSDPDISIERPLFQLVSAAG	225
“黑比诺”	VLRTAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPSEDALDSL VGQALFGDGSAAVIVGSDPDISIERPLFQLVSAAG	225
“赤霞珠”	VLRTAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPSEDALDSL VGQALFGDGSAAVIVGSDPDISIERPLFQLVSAAG	225
“雷司令”	VLRTAKDLAENNAGARVLVVCSEITVVTFRGPSEDALDSL VGQALFGDGSAAVIVGSDPDISIERPLFQLVSAAG	225
Consensus	vlrtakdlaennagarlvlvcseitvvtfrgpsedal dslvgqal fgdgsaavivgsdpdisierplfqlvsaag	
“河岸葡萄”	TFIPNSAGA IAGNLREVGLTFHLWPNVPTLISENIEKCLTCAFDPLGISDWNLSLFWIAHPGGPAILD AVEAKLNL	300
“品丽珠”	TFIPNSAGA IAGNLREVGLTFHLWPNVPTLISENIEKCLTCAFDPLGISDWNLSLFWIAHPGGPAILD AVEAKLNL	300
“黑比诺”	TFIPNSAGA IAGNLREVGLTFHLWPNVPTLISENIEKCLTCAFDPLGISDWNLSLFWIAHPGGPAILD AVEAKLNL	300
“赤霞珠”	TFIPNSAGA IAGNLREVGLTFHLWPNVPTLISENIEKCLTCAFDPLGISDWNLSLFWIAHPGGPAILD AVEAKLNL	300
“雷司令”	TFIPNSAGA IAGNLREVGLTFHLWPNVPTLISENIEKCLTCAFDPLGISDWNLSLFWIAHPGGPAILD AVEAKLNL	300
Consensus	tfipsaga iagnlrevgltfhlw pnvptliseniekcltcafdplgisdw nslfwiahpggpaildaveaklnl	
“河岸葡萄”	DKKKLEATRHVLS EYGNMSSACVLF ILDEMRKKS LKGERATTG EGLDWGVLF	353
“品丽珠”	DKKKLEATRHVLS EYGNMSSACVLF ILDEMRKKS LKGERATTG EGLDWGVLF	353
“黑比诺”	DKKKLEATRHVLS EYGNMSSACVLF ILDEMRKKS LKGERATTG EGLDWGVLF	353
“赤霞珠”	DKKKLEATRHVLS EYGNMSSACVLF ILDEMRKKS LKGERATTG EGLDWGVLF	353
“雷司令”	DKKKLEATRHVLS EYGNMSSACVLF ILDEMRKKS LKGERATTG EGLDWGVLF	353
Consensus	dkkkleatrhlvls eygnmssacvlfildemrkkslkgerattgegl dwgvlf	

图5 氨基酸同源性多重比较分析

注:方框内为绝对保守的氨基酸半胱氨酸,横线部分为氨基酸保守结构域。

Fig. 5 Homology multiple comparison analysis of amino acids

Note: Conserved amino acids (Cysteine) is indicated by a box, underlined sequences are conserved motifs, respectively.

根据朱春燕等<sup>[1]</sup>和王西平等<sup>[9]</sup>的不同报道表明,RS 基因序列和 STS 基因序列均编码 392 个氨基酸。党尉<sup>[2]</sup>和王西平等<sup>[9]</sup>分别把 Genbank 中登录号 AB046373 对应的基因称作 RS 基因和 STS 基因。王征等<sup>[10]</sup>报道 Schoppner A 等从花生细胞悬浮培养液中得到了二苯乙烯合成酶(STS),分子量为 90 000 道尔顿,等电点为 4.8,而党尉等<sup>[2]</sup>在《白藜芦醇合酶的研究进展》中引用同一篇文献,说明的却是白藜芦醇合酶(RS)分子量为 90 000 道尔顿,等电点为 4.8~5.4。据 Schwekendiek A 等<sup>[11]</sup>报道,植物中存在的 STS 被划分为 2 类,一类是花生或葡萄中存在的以 4-香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 为底物合成 Res;另一类是以肉桂酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 为底物合成赤松素(pinosylvin),可见,对于花生或葡萄等相关植物来说,RS 和 STS 为同一种酶。Leckband G 等<sup>[12]</sup>也明确指出,STS 又被称为 RS。然而郭景南在对白藜芦醇的报道中将 RS 与 STS 列为白藜芦醇生物合成过程中不同的酶<sup>[13-14]</sup>;可见对同一种酶名称的不统一已经造成了对该合酶基因认识上的分歧,甚至重复的不必要的研究。在学术交流日益增进的今天,类似的问题应该尽快得到解决。

据郭景南等<sup>[13]</sup>的报道,在果实生长发育的各个阶段,美洲种、种间杂种 Res 的合成能力都高于欧亚种,酿酒品种高于鲜食品种,黑色果皮的圆叶葡萄比青铜色圆叶葡萄含量高。后续试验可将材料范围扩大,在用途上涉及酿酒葡萄(红葡萄品种、白葡萄品种)与鲜食葡萄,在原产地上涉及欧洲葡萄、美洲葡萄、中国野生葡萄,进行更加全面细致的分析,增加试验结果说服力。

## 参考文献

- [1] 朱春燕,雷建军,周浩,等.白藜芦醇合酶基因的克隆与植物表达载体的构建[J].南方医科大学学报,2008,28(11):2051-2053.
- [2] 党尉,尉亚辉,曹伟.白藜芦醇合酶的研究进展[J].植物学通报,2003,20(2):152-159.
- [3] 李华.葡萄酒工艺学[M].北京:科学出版社,2007.
- [4] Akiyama T, Shibuya M, Liu H M, et al. p-Coumaroyltriacyclic acid synthase, a new homologue of chalcone synthase, from *Hydrangea macrophylla* var. *Thunbergii*[J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 263(3):834-839.
- [5] 王光忠,李秋怡,干国平,等.17 种国产蒴藋属植物中白藜芦醇含量比较[J].时珍国医国药,2007,18(7):1679-1680.
- [6] 曹庸,张敏,于华忠,等.不同植物、同种植物不同组织部位中白藜芦醇含量变化研究[J].湖南林业科技,2003,30(4):32-34.
- [7] 郭春叶,刘林丽,龚月生,等.芪合酶基因的克隆及其酵母表达载体的构建[J].西北农业学报,2007,16(4):67-70.
- [8] 郭芝光,尉亚辉,刘蕾,等.白藜芦醇合酶基因的克隆及对毕赤酵母的转化[J].西北大学学报(自然科学版),2006,36(2):263-265.
- [9] 王西平,刘斌,王跃进.毛葡萄芪合酶基因的克隆及序列分析[J].西北植物学报,2007,27(8):1544-1549.
- [10] 王征,罗泽民,邓林伟.白藜芦醇的药理作用机理和合成途径[J].天然产物研究与开发,2003,15(2):178-181.
- [11] Schwekendiek A, Pfeffer C, Kindl H. Pine Stilbene Synthase cDNA, a Tool for Probing Environmental Stress[J]. FEBS, 1992, 301(1):41-44.
- [12] Leckband G, Lorz H. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance[J]. Theor Appl Genet, 1998, 96:1004-1012.
- [13] 郭景南,刘崇怀,潘兴,等.葡萄属植物白藜芦醇研究进展[J].果树学报,2002,19(3):199-204.
- [14] 张真,李胜,刘媛,等.生物技术在白藜芦醇研究中的应用[J].甘肃农业大学学报,2008,43(1):119-125.

## Cloning and Sequence Analysis of Resveratrol Synthase Gene from Different Wine Grape Varieties

SONG Chang-zheng, ZHANG Zhen-wen

(College of Enology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Red grape varieties ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Cabernet Franc’, ‘Pinot Noir’ and white grape variety ‘Riesling’ were used as test material, the DNA from leaf tissue with modified CTAB method were extracted, and get the resveratrol synthase part gene segments of four different wine grape varieties with PCR method. The results showed that amplification product of ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Cabernet Franc’, ‘Pinot Noir’ were all 1 419 bp, yet it was 1 417 bp as for the white grape variety ‘Riesling’. The gene sequences homology was quite high (above 90%) between the obtained four gene segments and the same gene of *Vitis riparia* (No. in Genbank: AF128861) according to the sequence multiple comparison analysis. Homology of the exons was higher than introns; when it came to red grape varieties of the same strain, red grape varieties of different strains, red grape varieties and white grape varieties, sequences homology declines successively.

**Key words:** wine grape; resveratrol; synthase gene; cloning; sequence analysis