

# 荔枝 ANS 基因的克隆及其序列分析

赵志常<sup>1,2</sup>, 胡福初<sup>2</sup>, 黄建峰<sup>1</sup>, 胡桂兵<sup>2</sup>, 杨转英<sup>2</sup>, 肖靖<sup>2</sup>

(1. 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;

2. 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**以 3 个不同发育时期的‘糯米糍’荔枝果皮和幼嫩叶片为试材, 对其 ANS 基因进行了克隆及分析。结果表明:花青素合成酶 (Anthocyanidin synthase, ANS) 是花色素苷生化合成途径中的一个关键酶。利用同源克隆方法从荔枝果皮中克隆得到了 1 个 ANS 基因, 该基因开放阅读框的长度为 1 074 bp, 编码 357 个氨基酸。以基因组为模板, 扩增得到了 1 279 bp 的核苷酸序列与 cDNA 序列比对发现, 基因组序列中还有 1 个内含子, 位置在 504~708 bp 之间。通过系统发育分析发现, 该基因编码的蛋白与葡萄、可可豆、柑橘等聚为一类。

**关键词:**荔枝; ANS; 基因克隆; 序列分析

**中图分类号:**S 667.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0118-04

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 为无患子科 (Sapindaceae) 荔枝属 (*Litchi*) 果树, 原产我国热带、亚热带地区, 是我国岭南佳果, 因色、香、味皆美, 驰名中外, 有“果王”之称。荔枝作为我国一个主要的亚热带果树, 其资源丰富多样, 在我国华南和西南地区具有较多的分布, 分布于广东、海南、广西和福建的大部分地区, 台湾、云南、四川、贵州等省也有较多栽培品种的分布<sup>[1]</sup>。荔枝果肉产鲜时半透明凝胶状, 味香美营养丰富, 据分析, 每 100 mL 果汁中含有维生素 B 13.20~71.72 mg, 可溶性固形物 12.9%~21%, 为增进身体健康的营养品。据《本草纲目》记载, 荔枝可“止渴、益人颜色……, 通神、益智、健气 (补脑建身)、治痼疾、瘤赘……”等病<sup>[2]</sup>。荔枝果实色泽是荔枝果实品质的重要组成部分, 即便是风味极佳的品种, 也只有充分表现出其典型色泽时, 才具有较好吸引力和竞争力。花色素苷的含量在决定植物的花色、叶色、果色和其它经济器官的色泽及其营养品质方面起着重要作用, 而花色素苷合成过程是一个非常复杂的代谢过程, 花青素合成酶 (Anthocyanidin synthase, ANS) 是位于花色素苷合成通路末端的酶, 通过  $\text{Fe}^{2+}$  和 2-酮戊二酸离子将无色花青素氧化生成花青素苷<sup>[3]</sup>。在已经报道

的多种植物中, ANS 基因被认为由 1 个小基因家族所编码, 编码 ANS 的基因在紫苏 (*Perilla frutescens*)、山药 (*Dioscorea* spp.)、龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 等<sup>[4-5]</sup>植物中已经被克隆, 而对荔枝中的 ANS 基因未见报道。该研究以荔枝的果皮为材料, 对其 ANS 基因进行了克隆及分析, 希望能给荔枝果实着色的机理研究提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以 3 个不同发育时期的‘糯米糍’荔枝果皮和幼嫩的叶片为试验材料, 菌株 BL21、DH5a 为课题组实验室保存, 引物合成自上海生物工程技术服务有限公司, dNTP、DEPC、Amp、IPTG、X-Gal、*Taq* DNA 聚合酶、*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶、各种限制性内切酶、pMD-19T 载体均购置于大连宝生物公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 和 RNA 的提取 称取幼叶 2~3 g, 采用改良 CTAB 方法提取总 DNA<sup>[6]</sup>, 并根据所得到的 DNA 量加入 0.2~1.0 mL TE 溶解 DNA, -20℃ 保存备用。荔枝果皮 RNA 的提取采用改良的 Bugos 法<sup>[7]</sup>。RNA 的纯度分析和浓度测定: 取 1  $\mu\text{L}$  总 RNA 溶液用 DEPC 水稀释成不同浓度, 用紫外分光光度计检测其在 260、280、230 和 320 nm 下的吸收值, 并比较不同浓度的稀释样品在  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ ,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  的数值, 根据数值所在的范围, 确定 RNA 的纯度。总 RNA 样品浓度按下式计算:  $\text{RNA 浓度} = \text{OD}_{260} \times 40 \text{ ng}$ 。经过上述的检测总 RNA 样品用于下一步试验。

### 1.2.2 ANS 基因全长 cDNA 和基因组 DNA 序列的获

**第一作者简介:**赵志常 (1977-), 男, 山东烟台人, 博士, 副研究员, 现主要从事热带果树的遗传育种工作。

**责任作者:**胡桂兵 (1969-), 男, 江苏句容人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事果树遗传育种和果树生物技术等教学和科研工作。

**基金项目:**国家科技支撑计划资助项目 (2006BAD01A1705); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (nycytx-32); 国家自然科学基金资助项目 (30971985)。

**收稿日期:**2012-06-04

得 以不同着色时期的果皮总 RNA 作为模板,采用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 反转录合成第 1 链 cDNA,并参照该试剂盒的说明书进行 cDNA 3'端和 5'末端 cDNA 的扩增。根据 cDNA 片段的测序结果,分别设计 2 条上游引物,以接头为锚定引物进行半巢式 PCR 反应。将 3'端和 5'末端的 PCR 反应产物,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,确定所得到的片段大小是否与预测的片段大小一致。目的基因片段回收、连接、转化、鉴定及测序,并根据已知的片段和得到的 cDNA 3'端和 5'末端的序列结果拼接该基因的全长 cDNA。以上述 cDNA 和提取的基因组 DNA 为模板,设计特异引物,进行全长 cDNA 和基因组 DNA 的扩增反应,PCR 反应体系 20  $\mu$ L (10  $\times$  PCR buffer 2  $\mu$ L, dNTP (2.5 mM) 1.6  $\mu$ L, primer 1 (20 pmol/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, primer 2 (20 pmol/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, Taq 酶 (2.5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L, 模板 (5~100 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O (2.0  $\mu$ L), 反应扩增程序: 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 100 s, 共 30 个循环, 72℃ 3 min)。从中取 6  $\mu$ L PCR 产物加入 0.2  $\mu$ L PCR 管中,加入 1  $\mu$ L 的 6 $\times$  Loading buffer,用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测目的片段的大小是否与预测的结果一致。将得到的目的片段大小一致的 PCR 产物电泳回收,切下较亮的 PCR 产物,用凝胶回收试剂盒进行 PCR 产物的回收,回收产物加入 20~30  $\mu$ L 的双蒸水溶解,取部分产物在 1.2%~1.5% 的凝胶上电泳检测回收产物浓度,取 PCR 产物与 pMD19-T vector (TaKaRa) 按照 3:1 的摩尔浓度下进行连接,具体的操作过程参照 TaKaRa 公司的连接试剂盒。

1.2.3 ANS 基因全长 cDNA 及其氨基酸序列的结构特征和分子进化的分析 将所得中间目的片段 cDNA 序列在线 Blast 分析,确认目的基因,并根据扩增得到的全长序列进行 NCBI 序列比对,确定该基因是否 ANS 基因,采用 DNAMAN 软件分析目标基因的核苷酸序列,推导其氨基酸序列进行多序列比较并构建系统树,预测其同源性和结构特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 ANS 基因部分片段的获得

根据 NCBI 已经登录的 ANS 基因的序列,设计简并引物如下:上游引物 5'-AAGGAGAAGTATGCMAAT-GAYC-3';下游引物 5'-AARAGCTGCAGRCCVG-GRACCAT-3',采用上述的 cDNA 为模板,采用下述反应体系和程序扩增得到大约 500 bp 的片段(图 1),通过克隆测序发现该片段为 ANS 基因的一部分。

### 2.2 ANS 基因 3'RACE 和 5'RACE 的克隆

根据测序得到的目的片段的序列信息,在片段靠近 3'端分别设计 2 条上游引物 3'RACE Outer Primer 和 3'RACE Inner Primer,用于扩增该基因 3'端的未知核苷

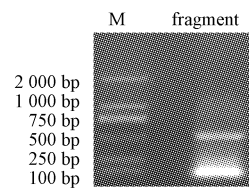


图 1 ANS 基因片段的电泳结果

酸序列,同时,在对于该基因的 5'端的未知序列的扩增采用了 5'RACE 方法,分别设计内侧引物(5'RACE Outer Primer)和外侧引物(5'RACE Inner Primer),引物序列分别为: 3' RACE Outer Primer: 5' TAACAGG-TAGGGGCTGAAAGCAATA 3'; 3'RACE Inner Primer: 5' ACCGAGAGCAAGTTCTGGTTGTGGG 3'; 5' RACE Outer Primer: 5' AGTTCTGGTTGTGGGCATTTTG-GAT 3'; 5'RACE Inner Primer: 5' CCTTCCTTCTTCTA-ATCCTAACCT 3'。

根据 RACE 试剂盒的操作说明书,经过 2 次 PCR 的产物分别回收,连接到 T 载体上克隆测序,对得到的 ANS 基因的 3'端和 5'端核苷酸序列进行拼接,并根据 DNAMAN 分析软件拼接 ANS 基因的包括非翻译区的全长的 cDNA 序列。通过 RACE 的方法,得到了 3'端的片段长度为 650 bp 左右(图 2 左),5'端的片段长度为 480 bp 左右(图 2 右)。

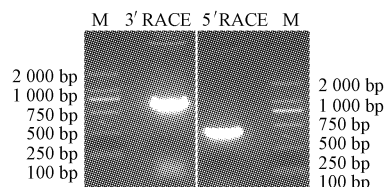


图 2 ANS 基因的 3'RACE 和 5'RACE 扩增的 PCR 产物的电泳结果

注:左图:3'RACE 结果;右图:5'RACE 结果;M 为 DNA marker。

Fig. 2 3'RACE and 5'RACE of ANS gene by electrophoresis

Note: Left: results of 3'RACE; Right: results of 5'RACE; M: DNA marker.

### 2.3 cDNA 和基因组 DNA 的扩增及氨基酸序列的推导

根据拼接的 ANS 基因全长的 cDNA 序列,采用 Primer Perimer 5.0 软件设计特异引物,进行 cDNA 和基因组 DNA 的扩增(图 3)。

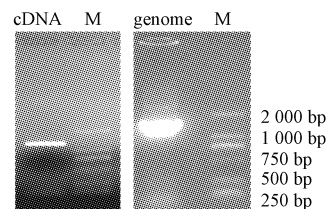


图 3 ANS 基因的 cDNA 和基因组的 PCR 产物的结果

注:左图:cDNA;右图:基因组 DNA;M 为 DNA marker。

Fig. 3 The cDNA and DNA of ANS gene by electrophoresis

Note: Left: cDNA; Right: gene group DNA; M: DNA marker.

通过分析发现,该基因的 cDNA 序列包含 1 074 bp 的开放阅读框,编码 357 个氨基酸序列(图 4)。

```

MTSVAPRVESLSSSGIQSPIKEYVRPEELTSIGNVFEEKKKDGDPQLPTIDLKEIDSEDQV
VREKCRQQLKQAATDWGVMHLVNHGISDELMDKVREVGQAFFDLPIEEKKHANDQAS
GNVQGYGSKLANNASQLEWEDYFFHLIYPEDKRDLSIWPKTPKDYIEVTSEYARQLRSL
ATKILSVLSLGLGLEGRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTF
ILHNMVPLQLFYEGKWITAKCPNSIIMHIGDTIEILSNGKYKSILHRGLVNKEKVRISWA
VFCEPPKEKILKPLSETVSETEPPLFPPTFQQHIQHKLFRTQDALLNKQV
    
```

图 4 ANS 基因的蛋白序列结果

Fig. 4 The protein sequence of ANS gene

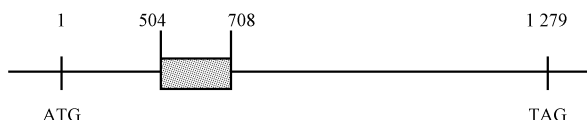


图 5 基因组 DNA 的结构图

Fig. 5 Structure diagram of ANS gene

根据 NCBI 上已经登录的 ANS 蛋白的序列,采用 DNAMAN 软件分析其系统发育关系,由图 6 可知,荔枝 ANS 蛋白与葡萄、可可豆、柑橘等聚为一类。

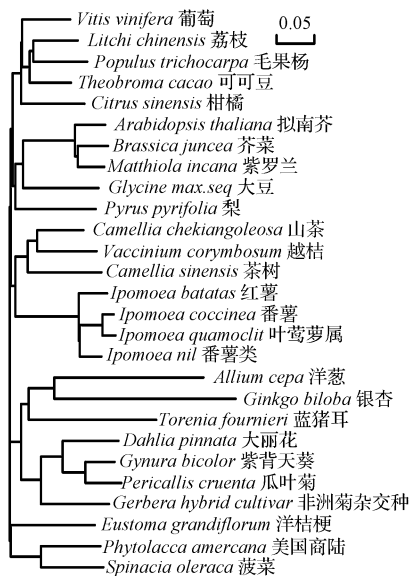


图 6 部分基因的 ANS 蛋白序列的系统发育关系

Fig. 6 Phylogenetic relationship of some ANS protein sequences

### 3 讨论

该研究成功地从荔枝果皮中分离得到了 1 个全长 ANS 基因,该基因的 cDNA 的开放阅读框为 1 074 bp,编码 357 个氨基酸,对基因组的序列与 cDNA 的序列对比发现,该基因在基因组中含有 1 个 200 bp 的内含子。根据测序的核苷酸序列和推导的氨基酸序列,在 NCBI 上 Blast 发现该序列为植物 ANS 基因家族的成员,氨基酸序列分析发现,该基因还有 2-酮戊二酸- $\text{Fe}^{2+}$ -双加氧酶家族的保守结构域结构,该结构还有与 2-酮戊二酸特异结合的 Arg 及与  $\text{Fe}^{2+}$  结合所需的 His、Asp,这些结构

由图 5 可知,基因组序列为 1 279 bp,包含 1 个内含子序列(504~708 bp)。

特征与其它植物 ANS 基因的双加氧酶家族的 F3H、ACC 氧化酶及黄酮醇合成酶的催化活性中心特征具有明显的一致性<sup>[4]</sup>。与其它物种的 ANS 基因序列比对分析发现,荔枝 ANS 基因无论在核苷酸序列还是在氨基酸序列上都具有该基因保守的结构域。同时,通过与其它部分物种的氨基酸序列构建系统发生树发现,荔枝 ANS 基因编码的蛋白与葡萄、柑橘、可可豆等聚在一类;而模式植物拟南芥与芥菜、紫罗兰、梨等聚在一类;山茶、茶树和越桔被聚集在一类。Lu 等<sup>[8]</sup>通过对 ANS 基因的进化分析认为,ANS 基因可以将植物在属和种的分类级别上把植物区分开来,而在单双子叶植物的科间及被子植物与裸子植物之间并不能完全区分。ANS 基因是荔枝花色素苷合成代谢途径中的一个关键的基因,它可以将无色的花色素催化成有色花色素,其对荔枝果皮红色的形成具有重要的作用,其在荔枝果实花色素苷的合成及果实着色的作用机理的研究,需进一步通过转基因植物的分析与验证。

### 参考文献

- [1] 李建国. 荔枝学[M]. 北京:中国农业出版社,2008:2-3.
- [2] 吴淑娟. 中国果树志·荔枝卷[M]. 北京:中国林业出版社,1998.
- [3] Xie D Y, Jackson L A, Cooper J D, et al. Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding Dihydroflavonol-4-Reductase from *Medicago truncatula* [J]. Plant Physiology, 2004, 134: 979-994.
- [4] Rosati C, Cadic A, Duron M, et al. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia × intermedia* reveals organ-specific expression during flower development [J]. Plant Science, 1999, 149: 73-79.
- [5] Jaakola L, Maatta K, Pirttila A M, et al. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development [J]. Plant Physiology, 2002, 130: 729-739.
- [6] 赵志常, 胡桂兵, 刘运春, 等. 番荔枝 DNA 的提取和 AFLP 体系的建立[J]. 北方园艺, 2009(10): 44-47.
- [7] Bugos R C, Chiang V L, Zhang X, et al. RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine[J]. Biotechniques, 1995, 19: 734-737.
- [8] Lu Y Q, Rausher M D. Evolutionary rate variation in anthocyanin pathway genes [J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20 (11): 1844-1853.



# 生姜通过器官发生途径体外再生的研究

孙霞, 亓翠英, 秦燕

(莱芜职业技术学院 生物研究所, 山东 莱芜 271100)

**摘要:**以生姜茎尖为外植体,采用正交实验设计研究了不同激素组合和浓度的培养基对茎尖分化的影响。结果表明:茎尖经无菌处理,接种于 MS+KT 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 的培养基上,可使芽、根相继分化,形成的幼芽数平均为 3.5 个,继代培养历经 60 d 可产生大量的带根苗,为生姜通过器官发生途径体外再生扩繁种苗提供了有效方法。

**关键词:**生姜;器官发生途径;体外再生

**中图分类号:**S 632.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0121-03

生姜(*Zingiber officinale* Rosc.)是药食两用的重要经济作物,由于开花结籽困难,通常用地下茎繁殖,即以姜块作为种姜,致使生产成本提高。据统计,山东省 1 hm<sup>2</sup>姜田的姜平均产量为 50 t,而 1 hm<sup>2</sup>姜田仅需姜种就达 5.5 t,对姜农来说是庞大的生产投入。自 1977 年, Hosoke 等<sup>[1]</sup>首次报道了生姜离体培养成功后,后人做了一系列的生姜离体培养扩繁试验,用组织培养技术获得生姜再生植株作为种苗,既可以减少姜块的消耗,降低生产投入,又可以在有限的时间和空间内培育大量无菌苗。生姜的体外再生有 2 种途径:1 种是通过器官发生途径<sup>[2-4]</sup>,另 1 种是通过体细胞胚途径<sup>[5-7]</sup>。为建立莱芜大姜持续稳定的种苗培育体系,该试验以茎尖为外植

体,研究了不同激素组合和浓度的培养基对茎尖分化的影响,以期通过器官发生途径快速获得再生植株。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取健康、无病害伤口的莱芜大姜根状茎,放于塑料袋内,置 25℃培养箱内保湿催芽。待芽长至 2 cm 左右时,取已发芽的姜块,用肥皂水清洗表面的污物,流水冲洗 15 min。将芽用手术刀全部切下,剥去外层叶鞘,流水冲洗 1~2 h,然后拿到无菌室,剥取带有 1~2 个叶原基约 3~5 mm 左右大小作为外植体,先用 70%乙醇消毒 15 s,无菌水冲洗 1 遍,再置于 0.1%的升汞中杀菌 8 min,无菌水冲洗 3~4 遍,除去表面的化学物质后备用。

### 1.2 试验方法

以 MS 为基本培养基,用 2,4-D(0、1.0、1.5 mg/L), 6-BA(0、1.0、3.0 mg/L),KT(0、0.5、2.0 mg/L),NAA(0、0.1、1.0 mg/L)4 种激素,进行 4 因素 3 水平的交互正交

**第一作者简介:**孙霞(1974-),女,博士,副教授,现主要从事经济作物的育种研究工作。E-mail:lwzysx@126.com.

**基金项目:**山东省科学发展计划资助项目(2011GGA12019)。

**收稿日期:**2012-05-21

## Cloning and Aequnce Analysis of ANS Gene from *Litchi chinensis*

ZHAO Zhi-chang<sup>1,2</sup>, HU Fu-chu<sup>2</sup>, HUANG Jian-feng<sup>1</sup>, HU Gui-bing<sup>2</sup>, YANG Zhuan-ying<sup>2</sup>, XIAO Jing<sup>2</sup>

(1. Institute of Tropical Crops Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Danzhou, Hainan 571737; 2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

**Abstract:** Taking the peel and young leaves of *Litchi chinensis* 'Nuomici' at three different stages as material, its ANS gene was cloned and analyzed. The results showed that the anthocyanidin synthase (ANS) was a key enzyme in the anthocyanin biosynthesis. A ANS gene was cloned from litchi pericarp by homologous cloning method. The open reading frame was 1 074 bp, and encoding 357 amino acids. The 1 279 bp length fragment was amplified from genome and analysis, which contained five introns, respectively, in 504~708 bp. It was found that the gene encoding for the protein had close relationship with mountain grape (*Vitis vinifera*), cocoa (*Theobroma cacao*), citrus (*Citrus sinensis*), and other fruit trees through phylogenetic analysis.

**Key words:** *Litchi chinensis* Sonn.; ANS; gene cloning; sequence analysis