

石榴果皮 DAHPS 基因的克隆与生物信息学分析

冯立娟¹, 尹燕雷¹, 杨雪梅¹, 武冲¹, 李英朋²

(1. 山东省果树研究所, 山东 泰安 271000; 2. 山东省聊城市冠县店子乡林业站, 山东 聊城 252525)

摘要:以‘泰山红’石榴果实为试材, 利用 RT-PCR 技术克隆石榴果皮 DAHPS 部分基因并对其进行生物信息学分析。结果表明: 获得 1 373 bp 的 DAHPS 基因 cDNA 片段编码 393 个氨基酸, 其氨基酸序列与甜橙(XP_006472576.1)、白梨(XP_009372963.1)、葡萄(NP_001268096.1)、苹果(XP_008386115.1)的相似性分别为 94%、93%、92%、92%; 预测蛋白质理论分子量约为 44 kDa, 等电点为 9.00, 具有 Cys-Ser-Ala-His 保守区和典型的 DAHP_synthe_2 超家族保守结构域, 为亲水性和跨膜蛋白, 不是分泌蛋白; 蛋白质二级结构主要由无规则卷曲(40.97%)、 α -螺旋(38.17%)、伸展链(12.47%)和 β -转角(8.40%)组成。GenBank 登录号为 KU198932。该研究结果为揭示石榴果实中没食子酸的代谢机理奠定了理论基础。

关键词:石榴; DAHPS 基因; 克隆; 序列分析; 没食子酸

中图分类号:S 665.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)13-0098-06

莽草酸途径(shikimate pathway)是连接糖代谢和次生代谢的主要桥梁。糖酵解途径产生的磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid, PEP)和磷酸戊糖途径产生的赤藓糖-4-磷酸(D-erythrose-4-phosphat, E4P)在 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成酶(3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid-7-phosphate synthase, DAHPS)催化下进入莽草酸途径, 经系列酶促反应, 最终形成芳香族氨基酸、维生素、木质素和酚类等物质^[1-2]。DAHPS 是莽草酸途径的入口酶, 也是该途径的关键调控酶, 其活性大小影响芳香族氨基酸及其次生代谢物的合成^[3]。DAHPS 有 2 种同工酶即 DS-Mn 和 DS-Co, 分别被 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 激活, 其活性受光照、营养条件和诱导子处理等因素的影响^[4]。DAHPS 基因在结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)^[5]、棒杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)^[6]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[7]和水稻(*Oryza sativa*)^[8]等物种中相继克隆出来, 其表达受紫外照射^[1]、温度^[2]、机械损伤^[9]和茉莉酸甲酯^[10]的诱导。

石榴(*Punica granatum* L.)果实富含可溶性酚类物

质, 具有诸多保健功能, 市场发展前景广阔。没食子酸是石榴果实中重要的酚类物质, 生物学效应广泛^[11]。莽草酸途径生成的 3-脱氢莽草酸代谢生成没食子酸^[12-13], DAHPS 也是没食子酸生物合成的关键酶。利用 RT-PCR 技术或基因组测序, 葡萄(*Vitis vinifera*)、苹果(*Malus domestica*)、白梨(*Pyrus x bretschneideri*)和甜橙(*Citrus sinensis*)等果树作物 DAHPS 基因的片段或全长已在 GenBank 上注册, 但石榴中 DAHPS 基因克隆及序列分析等方面的研究在国内外鲜见报道。‘泰山红’石榴是山东主栽品种之一, 果实富含酚类物质, 商品价值高, 保健功能强, 现以其果实为试材, 利用 RT-PCR 技术克隆 DAHPS 基因 cDNA 片段, 并进行生物信息学分析, 以期揭示石榴果实中没食子酸代谢的分子机理提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2015 年 6—11 月在山东省果树研究所进行。以‘泰山红’石榴果实为试材, 定植于山东省果树研究所石榴种质资源圃。该品种果实近圆球形或扁圆形, 艳红, 洁净美观, 果皮薄, 质脆, 籽粒鲜红色, 味甜微酸, 品质佳, 耐贮运。幼果期(果实直径 2~3 cm)采集石榴果实, 洗净擦干后, 削取果皮, 液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成 采用 RNA prep Pure Plant Kit 试剂盒(DP441, 北京天根生化

第一作者简介:冯立娟(1982-), 女, 博士, 助理研究员, 现主要从事果树遗传资源评价与选育等研究工作。E-mail: fenglj1230@126.com.

责任作者:尹燕雷(1976-), 男, 硕士, 副研究员, 现主要从事果树遗传资源评价与选育等研究工作。E-mail: yylei66@sina.com.

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2014YL022, ZR2015YL056); 山东省果树研究所所长基金资助项目(2013KY04)。

收稿日期:2016-02-15

有限公司)提取石榴果皮总 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,采用 Nanodrop 紫外分光光度计测其 OD_{260}/OD_{280} 值。以 RNA 溶液为模板, Oligo(dT)₁₈ 为引物,按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书反转录成 cDNA 第一链(K1622, Thermo Scientific)。

1.2.2 基因中间片段的克隆 根据已知物种同源序列的保守片段设计简并引物,进行 PCR 扩增。预计扩增片段大小为 1 000 bp,上游引物 DAHPS1: 5'-CARGGHG-GNGAYTGYGCNGA RAG-3'; 下游引物 DAHPS2: 5'-GAHCCDCCRAYGCAYTCHGTCAC-3'。PCR 反应体系总体积为 50 μ L: 2 \times Ex Taq buffer 25 μ L, dNTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 1 μ L, 上、下游引物各 1.5 μ L, cDNA 5 μ L, Ex Taq 酶 1.0 μ L, 灭菌蒸馏水 15 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将目的片段克隆至 pMD18-T 载体送上海生工测序,获得中间片段序列。

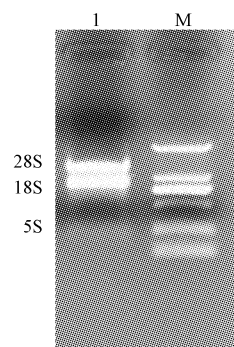
1.2.3 3' RACE 获得基因的 3'端序列 根据获得的中间片段序列设计 2 对特异引物,按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(634923, Clontech)获得该基因的 3'端序列。基因特异引物为 830-1: 5'-CTCAA-GACTCGTCCCTTCGATGCCA-3' 和 830-2: 5'-CCGG-GAGGGGTCCACCTAGAGATGA-3', 下游引物为 UPM 通用引物: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'。首先以 830-1 和 UPM 为引物进行第 1 轮扩增,以得到的 PCR 产物为模板,再以 830-2 和 UPM 为引物进行第 2 轮 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 50 μ L: 2 \times Ex Taq buffer 25 μ L, dNTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 1 μ L, 上、下游引物各 1.5 μ L, cDNA 5 μ L, Ex Taq 酶 1.0 μ L, 灭菌蒸馏水 15 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将目的片段克隆至 pMD18-T 载体上送上海生工测序,获得基因的 3'端序列。

1.2.4 DAHPS 基因的生物信息学分析 利用 DNAMAN 对中间片段和 3' RACE 序列进行拼接,进行多序列比对和系统进化树分析;利用 ORF finder 预测拼接序列的开放阅读框和编码的蛋白质序列;利用 NCBI 的 BLASTn 和 BLASTp 分析拼接序列核苷酸和氨基酸序列的相似性;利用 ExPasy ProtParam 分析该蛋白质的理化性质;利用 ProtScale 分析蛋白质的疏水性/亲水性;利用 TMHMM 分析蛋白质的跨膜结构;利用 SignalP 4.1 分析蛋白质的信号肽;利用 SOPMA 和 SWISS-Model 分别对蛋白质的二级结构和三级结构进行预测。

2 结果与分析

2.1 石榴果皮总 RNA 的提取

以天根 RNA prep Pure Plant Kit 试剂盒提取石榴果皮 RNA,紫外分光光度检测 OD_{260}/OD_{280} 值为 2.00。由图 1 可知,琼脂糖凝胶电泳检测 28S、18S 和 5S rRNA 条带清晰,表明提取的 RNA 纯度和完整性较好,没有蛋白质污染,符合 cDNA 合成的要求。



注: 1. PCR 扩增产物; M. DL 2 000 Marker。

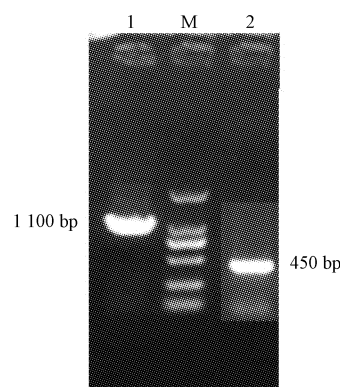
Note: 1. PCR amplification product; M. DL 2 000 Marker.

图 1 石榴果皮总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis result of total RNA of pomegranate peel

2.2 DAHPS 基因 cDNA 的克隆

由图 2 可知,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,在 1 000 bp 左右出现特异性条带,片段大小与预测值基本一致,经测序鉴定,该片段长 985 bp。3'端序列扩增得到约 450 bp 的片段,测序鉴定结果为 424 bp。将二者序列进行拼接,得到 1 条长度为 1 373 bp 的 cDNA 片段。由图 3 可知,该基因含有 1 180 bp 的 CDS 序列,编码 393 个氨基酸,编码的蛋白质具有 Cys-Ser-Ala-His 保守区和典型的 DAHP_synthe_2 超家族保守结构域(图 4)。



注: 1. 保守片段扩增产物; 2. 3' RACE 扩增产物; M. DL 2 000 Marker。

Note: 1. PCR amplification of conservative segment; 2. 3' RACE PCR amplification; M. DL 2 000 Marker.

图 2 石榴 DAHPS 基因的扩增

Fig. 2 Amplification products of DAHPS gene by PCR

```

1   TTC AAG GAG TTC AAT GCC AAC AAC ATC AGG GAC ACC TTC AGG ATC CTC CTC CAG ATG GGG
1   F   K   E   F   N   A   N   N   I   R   D   T   F   R   I   L   L   Q   M   G

61  GTG GTC CTC ATG ATC GGC GGG CAA ATG CCC GTT ATC AAG GTG GGA AGG ATG GCT GGT CAA
21  V   V   L   L   I   G   G   Q   M   P   V   I   K   V   G   R   M   A   G   R   Q

121 TTT GCG AAA CCG AGA TCA GAG CCG TTA GAG GAG AAG AAC GGT GTG AAG CTC CCC AGC TAC
41  F   A   K   P   R   S   E   P   L   E   G   E   K   N   G   V   K   L   P   S   Y

181 AGA GGT GAC AAT GTG AAC GGG AAT GCC TTC GAG GAG AAG TCC AGG ATC CCC GAC CCC CAG
61  R   G   D   N   V   N   G   N   A   F   E   E   K   S   R   I   P   D   P   Q

241 AGG ATG ATT CGG GCC TAC TGC CAG TCC GCT GCC ACC TTG AAT CTC TTG CGG GCT TTC GCC
81  R   M   I   R   A   Y   C   Q   S   A   A   T   L   N   L   L   R   A   F   A

301 ACC GGT GGT TAT GCT GCT ATC CAG AGG GTG ACA CAG TGG AAT TTG GAT TTC ACT GAG CAC
101 T   G   G   Y   A   A   I   Q   R   V   T   Q   W   N   L   D   F   T   E   H

361 AGT GAA CAG GGA GAC AGG TAC CGG GAG LTT GCT CAC AGG GTT GAC GAG GCC CTT GGG TTT
121 S   E   Q   D   R   Y   R   E   L   A   H   R   V   D   E   A   L   G   F

421 ATG ACT GCT GCT GGT CTC ACA GTG GAC CAT CCC ATA ATG CAA ACT ACT GAG TTC TGG ACT
141 M   T   A   A   G   L   T   V   D   H   P   I   M   Q   T   T   E   F   W   T

481 TCC CAT GAA TGC TTG CTT CTG CCC TAC GAG CAG GCA CTC ACT AGA ATG GAT TCG ACA TCA
161 S   H   E   C   L   L   L   P   Y   E   Q   A   L   T   R   M   D   S   T   S

541 GGC CTT TAC TAT GAC TGC TCG GCC CAC ATG CTC TGG GCT GGT GAG CGC ACC AGG CAA TTA
181 G   L   Y   Y   D   C   S   A   H   M   L   W   A   G   E   R   T   R   Q   L

601 GAT GGG GCG CAT GTT GAG TTC TTA AGA GGA GTT GCT AAC CCT CTT GGG ATT AAG GTG AGT
201 D   G   G   A   H   F   L   R   G   G   A   N   P   L   G   I   K   V   S

661 GAT AAG ATG AAC CCA GGT GAG CTA GTT AAG CTC ATT GAG ATT TTG AAC CCT CAG AAC AAG
221 D   K   M   N   P   G   E   L   V   K   L   I   E   I   L   N   P   Q   N   K

721 CCC GGG AGG ATC ACA ATA ATT ACA AGA ATG GGA GCT GAG AAC ATG AGA GTG AAG CTC CCC
421 P   G   R   I   T   I   I   T   R   M   G   A   E   N   M   R   V   K   L   P

781 CAT CTC ATT AGG GCT GTT CGC AGG GCA GGG CAG ATT GTC ACA TGG GTC AGC GAT CCT ATG
261 H   L   I   R   A   V   R   R   A   G   Q   I   V   T   W   V   S   D   P   M

841 CAT GGC AAC ACC ATT AAG GCT CCA TGT GGT CTC AAG ACT CGT CCC TTC GAT GCC ATC AGA
281 H   G   N   T   I   K   A   P   C   G   L   K   T   R   P   F   D   A   I   R

901 GCT GAA GTG AGA GCG TTC TTC GAC GTG CAT GAT CAA GAA GGC TCC AAC CCG GGA GGG GTC
301 A   E   V   R   A   F   F   T   D   V   H   D   Q   E   S   N   P   G   G   V

961 CAC CTA GAG ATG ACG GGA CAG AAC GTG ACG GAG TGC ATC GGT GGG TCC CGC ACG GTG ACG
321 H   L   E   M   T   G   Q   N   V   T   E   C   I   G   G   S   R   T   V   T

1 021 TTC GAT GAC CTG AGG TGG CGC TAC CAC ACC CAC TGC GAC CCC AGG CTC AAC GCC TCG CAG
341 F   D   D   L   S   S   R   Y   H   T   H   C   D   P   R   L   N   A   S   Q

1 081 TCG CTC GAA CTA GCC TTC ATC ATC GCG GAG CGC CTC AGG AAG CGG AGG ATC AGA TCC CAG
361 S   L   E   L   A   F   I   I   A   E   R   L   R   K   R   R   I   R   S   Q

1 141 AGC CCT CTC TCT TCT TCA CCT TCT CCT TCA TTG GGG CTC TGA AAT TAA ATA TAA ATT GTT
381 S   P   L   S   P   S   P   S   L   G   L   *

1 201 CTT TTT TAA AAC AAA AAT CAA GAA GAT TTG GGA CTT TAT TAT TCA GTG GAT GTA TTA GTA

1 261 TTG CAC TTT TGG TTA ATT CAT GTT CAT GCA ATG TAT TTT GTG TAT ACC CGA GTG AAA GTG

1 321 ATG GTT TGG AAG GAG AAA TGA GGA ATA AAG AGA AAA CAA GGA GAA TTC ATT CAA AAA AAA

1 381 AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

```

注:TGA为终止密码子,方框部分为保守区。

Note:TGA was termination codon, boxed text was conserved.

图3 石榴 DAHPS 基因 cDNA 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence and putative amino acid sequence of DAHPS gene cDNA of pomegranate

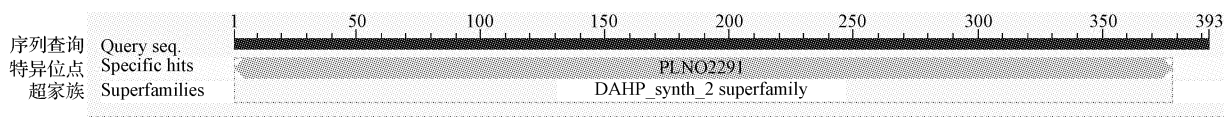


图4 DAHPS 蛋白的保守结构域

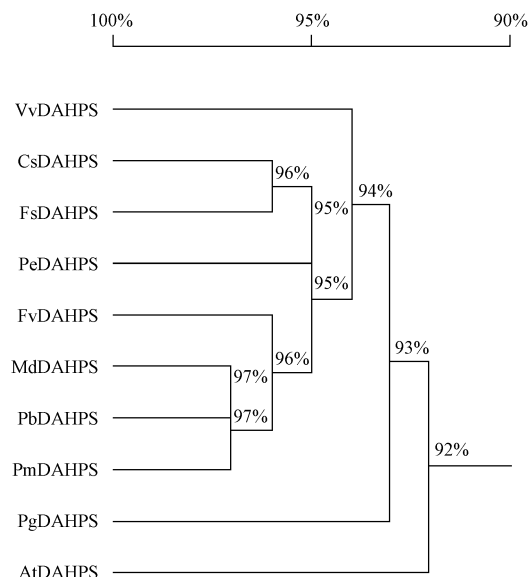
Fig. 4 Putative conserved domains of DAHPS protein

2.3 DAHPS 基因的进化分析

BLAST 分析表明,该基因片段的核苷酸序列与葡萄、白梨、苹果、野草莓(*Fragaria vesca* subsp. *Vesca*)等

植物的相似性达到了 80% 以上。将推导的氨基酸序列与其它植物 DAHPS 蛋白的氨基酸序列进行比较并构建系统进化树,结果表明,PgDAHPS 蛋白与甜橙、白梨、苹

果、葡萄、野草莓、拟南芥、果梅(*Prunus mume*)、欧洲山毛榉(*Fagus sylvatica*)、胡杨(*Populus euphratica*)的相似性都在92%以上(图5),表明克隆到的片段为石榴果皮DAHPS基因,GenBank登录号为KU198932。



注: PgNADHPS: 石榴; VvNADHPS: 葡萄 NP_001268096.1; MdNADHPS: 苹果 XP_008386115.1; PbDAHPS: 白梨 XP_009372963.1; CsDAHPS: 甜橙 XP_006472576.1; AtDAHPS: 拟南芥 NP_173657.1; FvDAHPS: 野草莓 XP_004299659.1; PmDAHPS: 果梅 XP_008219329.1; FsDAHPS: 欧洲山毛榉 ABA54865.1; PeDAHPS: 胡杨 XP_011003033.1。

Note: PgNADHPS: *Punica granatum*; VvNADHPS: *Vitis vinifera* NP_001268096.1; MdNADHPS: *Malus domestica* XP_008386115.1; PbDAHPS: *Pyrus bretschneideri* XP_009372963.1; CsDAHPS: *Citrus sinensis* XP_006472576.1; AtDAHPS: *Arabidopsis thaliana* NP_173657.1; FvDAHPS: *Fragaria vesca* XP_004299659.1; PmDAHPS: *Prunus mume* XP_008219329.1; FsDAHPS: *Fagus sylvatica* ABA54865.1; PeDAHPS: *Populus euphratica* XP_011003033.1.

图5 DAHPS基因系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis based on the deduced amino acid sequences of DAHPS genes

2.4 石榴果皮DAHPS基因的生物信息学分析

2.4.1 理化性质分析 利用ExPASy Proteomics Server提供的在线工具ProtParam对DAHPS基因编码蛋白的理化性质进行预测,推测该蛋白的分子式为 $C_{1927}H_{3074}N_{572}O_{568}S_{20}$,相对分子质量约为44 kDa,等电点pI为9.00,带正电荷(Asp+Glu)氨基酸数为48个,负电荷(Arg+Lys)氨基酸数为42个。该蛋白的不稳定系数为42.54。

2.4.2 疏水性/亲水性的预测与分析 利用在线分析软件ProtScale的Kyte andDoolittle算法对DAHPS基因进行疏水/亲水性分析,DAHPS蛋白存在明显的疏水区和亲水区,其中第19位最高,为2.478,第125位最低,为-2.833,表明该蛋白为亲水性蛋白(图6)。

2.4.3 跨膜结构和信号肽的预测与分析 用在线工具TMHMM对石榴DAHPS蛋白进行跨膜结构分析,由图7可知,DAHPS蛋白存在1个跨膜区域,从第13位氨基酸开始,到第32位氨基酸结束,第1~12位氨基酸在膜内,33~393位氨基酸在膜外。这说明,DAHPS蛋白是跨膜蛋白。利用SignalP 4.1在线软件对DAHPS蛋白的信号肽进行分析,结果表明,该蛋白不存在疏水性的信号肽,不是分泌蛋白(图8)。

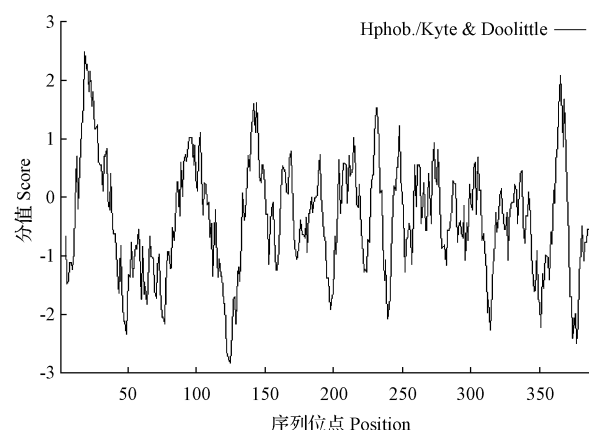


图6 DAHPS蛋白疏水性/亲水性预测

Fig. 6 Prediction of hydrophilicity/hydrophobicity of DAHPS protein

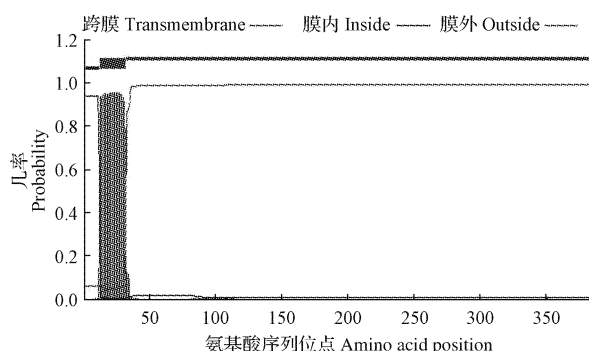


图7 DAHPS蛋白跨膜结构预测

Fig. 7 Prediction of transmembrane region of DAHPS

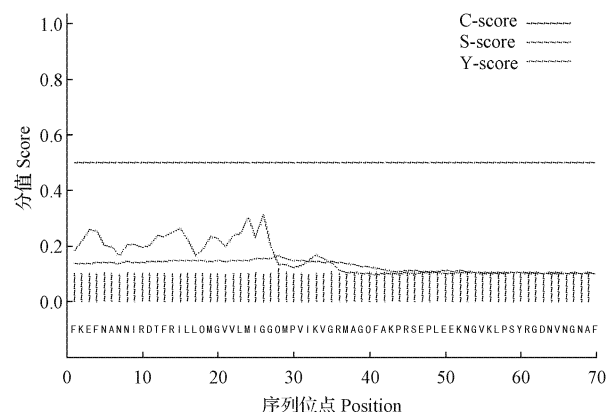
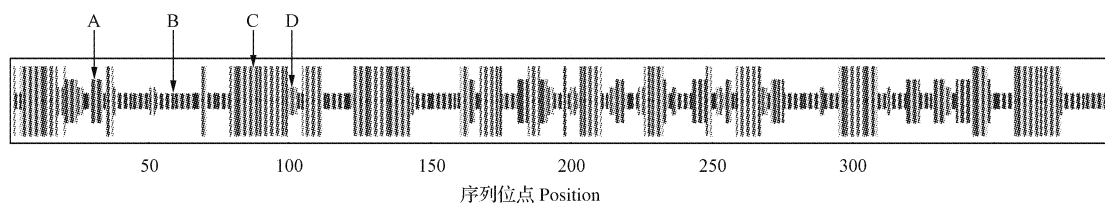


图8 DAHPS蛋白信号肽预测

Fig. 8 Prediction of signal peptides of DAHPS

2.4.4 二级结构的预测与分析 利用 SOPMA 软件预测石榴 *DAHPS* 基因编码蛋白二级结构,由图 9 可知,共有 161 个氨基酸参与形成无规则卷曲(random coil),占总氨基酸的 40.97%,有 150 个氨基酸参与形成 α -螺旋(alpha helix),占总氨基酸的 38.17%,有 49 个氨基酸参与形成延伸链(extended strand),占总氨基酸的

12.47%,有 33 个氨基酸参与形成 β -转角(beta turn),占总氨基酸的 8.40%。这说明 *DAHPS* 蛋白的二级结构中含有丰富的 α -螺旋和无规则卷曲。使用在线程序 SWISS-Model 的自动模式对该蛋白的三级结构进行预测分析,得到该蛋白的三级结构(图 10)。



注:A. 延伸链; B. 无规则卷曲; C. α -螺旋; D. β -转角。

Note: A. Extended strand; B. Random coil; C. Alpha helix; D. Beta turn.

图 9 *DAHPS* 蛋白二级结构预测

Fig. 9 Secondary structures predicting of *DAHPS* protein

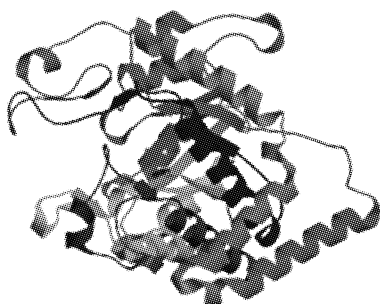


图 10 *DAHPS* 蛋白三级结构预测

Fig. 10 Tertiary structures predicting of *DAHPS* protein

3 讨论与结论

该研究首次利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆得到石榴果皮 *DAHPS* 基因 cDNA 片段,与其它植物已经报道的 *DAHPS* 基因相似性高,编码的蛋白具有金属结合位点 Cys-Ser-Ala-His,位于 186~189 位氨基酸,是 *DAHPS* 蛋白的保守区,这与 ZHANG 等^[14]在葡萄上的研究结果一致。

DAHPS 是莽草酸途径的第 1 个关键调控酶,存在于植物、细菌和微生物中。与植物 *DAHPS* 蛋白不同,微生物蛋白中存在双功能分支酸变位酶,如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等^[15]。该研究表明,石榴 *DAHPS* 基因氨基酸序列与甜橙、白梨、葡萄、苹果的相似性分别为 94%、93%、92% 和 92%,这为深入研究石榴 *DAHPS* 基因的生物学功能奠定了理论基础。目前,葡萄果实中已分离到 *VvDAHPS-1*、*VvDAHPS-2*、*VvDAHPS-3* 等 3 种 *DAHPS* 基因,其分子特性及表达分析方面的研究已有相关报道^[14,16],这为深入研究石榴 *DAHPS* 基因的分子结构与表达调控提供了理论依据。

目前,*DAHPS* 酶活性、结构与功能、基因克隆、表达分析方面的研究主要集中在微生物和模式植物上,木本植物尤其果树作物上较少,只在葡萄上有所涉及。该研究克隆得到石榴果皮中 *DAHPS* 基因部分 cDNA 片段,为进一步的研究工作奠定了理论基础。由于石榴果皮富含酚类、鞣质、糖、酸等物质,RNA 纯度不能满足 5'RACE 的需要,下一步将改进试验方案,克隆得到 *DAHPS* 基因全长 cDNA 序列。石榴中存在几种同工型的 *DAHPS* 基因,该基因的表达是否受温度、光照和机械损伤的诱导,该基因如何调控石榴发育期果实中没食子酸的代谢将是今后研究的重点。

参考文献

- [1] 初英娜,张珍珍,潘秋红. 紫外照射对葡萄果实莽草酸途径相关基因表达的影响[J]. 植物生理学通讯,2010,46(9):902-908.
- [2] 李小溪,问亚琴,李春兰,等. 低温对葡萄果实莽草酸途径入口酶及后分支酸途径关键酶基因表达的影响[J]. 热带作物学报,2011,2(3):250-255.
- [3] 王永. *DAHPS* 的酶活性测定方法、诱导表达及其性质研究[D]. 重庆:西南大学,2006.
- [4] MORI T, SAKURAI M, SAKUTA M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa* [J]. Plant Science, 2001, 160(2):355-360.
- [5] RIZZI C, FRAZZON J, ELY F, et al. DAHP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 40(1):23-30.
- [6] 张春花,赵智,张英姿,等. 北京棒杆菌 DAHP 合成酶 I 基因的克隆、序列分析及表达[J]. 微生物学报,2008,48(11):1466-1472.
- [7] TZIN V, GALILI G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants [J]. Molecular Plant, 2010, 3(6):956-972.
- [8] PAGOR R, SIKDAR M S I, MOON E S, et al. Characterization of a gene encoding 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from rice [J]. Journal of Biological Sciences, 2015, 15:33-39.

- [9] DEVOTO A, ELLIS C, MAGUSIN A, et al. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound-and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence and hormone interactions[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58(4): 497-513.
- [10] YAN Y, STOLZ S, CHÉTELAT A, et al. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway[J]. The Plant Cell, 2007, 19(8): 2470-2483.
- [11] 冯立娟, 尹燕雷, 招雪晴, 等. 石榴没食子酸代谢与保健功能研究进展[J]. 果树学报, 2014, 31(4): 710-716.
- [12] WERNER R A, ROSSMANN A, SCHWARZ C, et al. Biosynthesis of gallic acid in *Rhus typhina*: discrimination between alternative pathways from natural oxygen isotope abundance[J]. Phytochemistry, 2004, 65: 2809-2813.
- [13] OSSIPOV V, SALMINENA J P, OSSIPOVA S, et al. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, 31: 3-16.
- [14] ZHANG Z Z, LI X X, ZHU B Q, et al. Molecular characterization and expression analysis on two isogenes encoding 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in grapes[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(7): 4739-4747.
- [15] TOHGE T, WATANABE M, HOEFGEN R, et al. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, (4): 62.
- [16] ZHANG Z Z, LI X X, CHU Y N, et al. Three types of ultraviolet irradiation differentially promote expression of shikimate pathway genes and production of anthocyanins in grape berries[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 57: 74-83.

Cloning and Bioinformatical Analysis of *DAHPS* Gene in Pomegranate Peel

FENG Lijuan¹, YIN Yanlei¹, YANG Xuemei¹, WU Chong¹, LI Yingpeng²

(1. Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000; 2. Dianzi Forestry Station of Guan County in Shandong Province, Liaocheng, Shandong 252525)

Abstract: Taking 'Taishanhong' pomegranate as test material, the *DAHPS* gene was cloned by using RT-PCR technology and the bioinformatical characteristics were analyzed. The results showed that the cDNA was 1 373 bp, and it encoded 393 amino acids. The similarities of pomegranate *DAHPS* gene compared with *Citrus sinensis* (XP_006472576.1), *Pyrus bretschneideri* (XP_009372963.1), *Vitis vinifera* (NP_001268096.1), *Malus domestica* (XP_008386115.1) were 94%, 93%, 92% and 92%, respectively. The theoretical molecular mass of *DAHPS* protein was 44 kDa, and isoelectric point was 9.00. It was hydrophilic and transmembrane protein, but not secreted, which had Cys-Ser-Ala-His and typical DAHP_synthe_2 superfamily conserved domain. The secondary structure of *DAHPS* protein was composed by random coil (40.97%), α -helix (38.17%), extended strand (12.47%) and β -turn (8.40%). The GenBank accession number was KU198932. The result established a theoretical foundation for revealing the metabolic mechanism of gallic acid in pomegranate fruit.

Keywords: pomegranate; *DAHPS* gene; cloning; sequence analysis; gallic acid

欢迎订阅《北方园艺》

《北方园艺》于1977年创刊,是面向国内外公开发行的以科学研究和技术普及相结合的园艺类综合性学术期刊。

主要栏目:试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、贮藏保鲜加工、食用菌、中草药、新品种选育、资源与环境、产业论坛、专题综述、经验交流、农业经纬,内容涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉等研究领域的新成果、新技术、新品种、新经验。

取得成绩:连续7次入选全国中文核心期刊、中国农业核心期刊、美国化学文摘社收录期刊;全国优秀农业期刊、中国北方优秀期刊、黑龙江省优秀期刊;2次入选“农家书屋”推荐目录;2015年获“期刊数字影响力100强”称号。

刊物信息:国内外公开发行,半月刊,每月15、30日出版,每册定价15.00元,全年360.00元。中国标准连续出版物号:CN23-1247/S;国际标准连续出版物号:ISSN 1001-0009,邮发代号14-150,国外代号:BM 5011。

网址:www.haasep.cn.

电话:0451-86674276

邮箱:bfiybjb@163.com

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路368号《北方园艺》编辑部