

延边苹果梨 *PyDFR* 基因的克隆及表达分析

杨宏霞, 曲柏宏, 刘振坤, 鹿艳新

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘 要:以延边苹果梨果实为试材,采用同源克隆及实时荧光定量 PCR 的试验方法,研究 *PyDFR* 基因在果实着色过程中的表达特性及其与花青苷积累的关系。结果表明:*PyDFR* 基因 cDNA 全长 1 039 bp,推断其含有 1 个 843 个核苷酸的开放阅读框(ORF),编码 281 个氨基酸,推导的蛋白分子量为 32 kDa,理论等电点 pI 为 6.32。同源性分析表明,*PyDFR* 基因与沙梨的(JQ749637.1)*DFR* 基因的同源性高达 99%;实时荧光定量 PCR 分析表明,*PyDFR* 基因受到光诱导表达量迅速上升,去袋后 1 d 即达到最大值,随后迅速下降,最终稳定在同一表达水平,与果实着色和花色苷含量测定的结果相对应,即 *PyDFR* 基因对果实花色苷积累有一定的促进作用。

关键词:苹果梨;DFR;基因克隆;序列分析;表达模式

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0099-05

苹果梨是吉林省特产,是北方寒温带地区的主栽梨品种之一,是抗寒、耐贮存的优良品种。随着果品市场经济的发展,对苹果梨品质的要求越来越高,尤其是外观品质,它不仅影响着苹果梨在市场上的竞争力,而且直接关系着果农的经济效益。因此,苹果梨能否充分着色对苹果梨的畅销以及产业发展至关重要。近年来,人们对果实色泽形成过程中起主要作用的花色苷,以及花色苷生物合成代谢途径的关键酶基因已有较深入的研究^[1-3]。

二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR)是花色素生物合成途径的关键酶。刘晓静等^[4]以‘国光’苹果及其红色芽变为试材研究发现,芽变果实中花色苷合成能力的提高与 DFR 活性升高有关。Murray 等^[5]指出在常春藤中,DFR 活性的缺乏是花色苷积累的限制性因素。王庆菊等^[6]对紫叶稠李叶片花色苷合成酶的动态研究也表明,DFR 活性与花色苷的含量相关,对花色苷的合成有启动作用。

目前,该课题组对影响延边苹果梨果实着色的外部因素及着色机理的研究取得了一定的成绩^[7-8]。孙百灵等^[9]克隆了苹果梨着色关键酶(*PAL*、*CHI*、*UFGT*)基因的片段,并用半定量 PCR 法对其表达特性进行了分析;

王旭等^[10]在基因组水平上克隆了苹果梨果实 *PAL* 基因的全长,并构建了 *PAL* 基因真核植物表达载体。该研究旨在对苹果梨 *DFR* 基因 cDNA 全长序列进行克隆,并对该基因及其表达产物进行生物信息学分析;同时运用荧光定量 RT-PCR 技术,检测与分析其在套袋与未套袋处理的不同取样时期的果实中的动态表达情况,旨在进一步利用生物技术和基因工程手段研究该基因在苹果梨着色方面的功能,对更准确的揭示苹果梨果实着色的分子机理具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试苹果梨于 2013 年采自吉林省龙井市延边华龙集团果树场绿色苹果梨示范基地。

1.2 试验方法

试验设 2 个处理(套袋与未套袋),样品的采样时间为:去袋前 1 d(8 月 31 日),去袋当天(9 月 1 日),去袋后 1 d(9 月 2 日),去袋后 3 d(9 月 4 日),去袋后 5 d(9 月 6 日),然后每 5 d 采 1 次,共采样 8 次。样品带回实验室后削取相同部位的果皮用锡箔纸包好,液氮速冻后放 -80℃ 超低温冰箱保存。

1.2.1 苹果梨果皮总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 采用改良的 CTAB 法^[9]和上海莱枫生物科技有限公司的小型 RNA 提取试剂盒提取果皮总 RNA,进行 RNA 质量和浓度检测后取 1 μg 的总 RNA 用于 cDNA 第一链的合成,合成方法参照大连宝生物公司的 RNA PCR Kit(AMV)Ver. 3.0 试剂盒说明书。

1.2.2 *PyDFR* 目的基因全长的获取 根据 GenBank

第一作者简介:杨宏霞(1989-),女,硕士研究生,研究方向为果树生理学。E-mail:hongxiayangss@163.com.

责任作者:曲柏宏(1963-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事园艺植物栽培与生理等研究工作。E-mail:bhqu@ybu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160389)。

收稿日期:2014-09-11

上已经登录的蔷薇科的 *DFR* 基因序列的保守序列,利用 Oligo6 软件设计了 1 对苹果梨 *DFR* 基因的引物:上游引物 D1:5'-ATGGGATC (C/A)GAGTC(C/T)GAATC-3';下游引物 D2:5'-TTAACC (T/A/G)ACTTTGACATC-3'。反应体系 25 μ L 包括:10 \times Ex Taq buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture 1.5 μ L(2.5 mmol/L each),模板第 1 链 cDNA 1 μ L,上下游引物各 1 μ L(20 μ mol/L),Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L(5 U/ μ L),其余用重蒸馏水补充。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,54.6 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共进行 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶中检测,按照胶回收试剂盒(Takara)说明书回收产物,连入 PMD-18T 载体后,将其转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,筛选阳性克隆,菌液 PCR 验证后送至上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.3 *PyDFR* 基因的表达分析 利用获得的 *PyDFR* 基因全长序列设计荧光定量引物:*PyDFR*-F:5'-CACATCCTCAGCAGGA-ACTGTGAAC-3',*PyDFR*-R:5'-CACATCCTCAGCAGGA-ACTGTGAAC-3'。根据宝生物工程(大连)有限公司(Takara)的 SYBER[®] Green I 试剂盒说明书进行配制反应体系:SYBER[®] Premix Ex Taq[™] I 10 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,ROX Reference Dye II 0.5 μ L,模板 cDNA 1 μ L,灭菌 ddH₂O 7.5 μ L,总体积 20 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,40 个循环。反应结束后作溶解曲线分析。以 Actin^[11] 为内参,数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[12] 计算。

1.3 项目测定

1.3.1 果皮总叶绿素含量的测定 称取 0.2 g 果皮于 20 mL 丙酮乙醇混合液中在黑暗条件下浸提,待果皮变白后取出,用分光光度计测定即可。按 Arnon^[13] 公式计算总叶绿素的含量。

1.3.2 果皮花色苷含量测定 参照 Pirie 等^[14] 及王惠聪等^[15] 的方法(略做改动),将足够的果皮切碎充分混合,取 0.5 g 鲜样放入 10 mL 1% HCl 甲醇溶液中,室温黑暗浸提 2 h。用分光光度计测定提取液在 553 nm 和 600 nm 处的吸光值,二者之差即为花色苷的相对含量。差值每增加 0.01 定义为一个单位 U,3~5 次重复。

2 结果与分析

2.1 *PyDFR* 基因的克隆及序列分析

以延边苹果梨果皮 cDNA 为模板进行 RT-PCR,获得了预期大小的单一条带。将该片段连接到 pMD18-T 载体后测序,结果显示该基因 cDNA 全长为 1 039 bp,命名为 *PyDFR*,GenBank 登录号为 KM58889。推测其含有一个最大的编码 281 个氨基酸的 ORF,(A+T)含量

为 53.02%,(C+G)含量为 46.98%。*PyDFR* 推导的蛋白分子量为 32 kDa,理论等电点 pI 为 6.32。蛋白质亲水性和疏水性分析表明,该蛋白为细胞膜外的亲水性蛋白,结构元件以 α -螺旋和无规则卷曲为主,散布于整个蛋白质中。登录 NCBI,对其进行 Blastn,发现该序列与 GenBank 中已登录的蔷薇科植物的 *DFR* 基因高度同源,其中与沙梨(JQ749637.1)*DFR* 基因的核酸序列的同源性最高,达到 99%;与山楂(AY786995.1)和苹果(AF117268.1)的同源性分别达到了 98%与 97%。

2.2 *PyDFR* 基因氨基酸序列分析与系统进化树的构建

登陆 NCBI,对 *PyDFR* 基因编码氨基酸序列进行 Blastp 多序列比对,下载代表性植物序列并用 MegAlign 程序对其进行相似性分析,由图 1 可知,*PyDFR* 基因与已登录的其它植物 *DFR* 基因所编码的氨基酸序列相似性较高,均在 85%左右。其中与同为梨属的沙梨相似性最高,达到 99%,与西洋梨、苹果等的相似性也均达到 90%以上,进一步说明已成功地克隆出 *PyDFR* 基因序列。

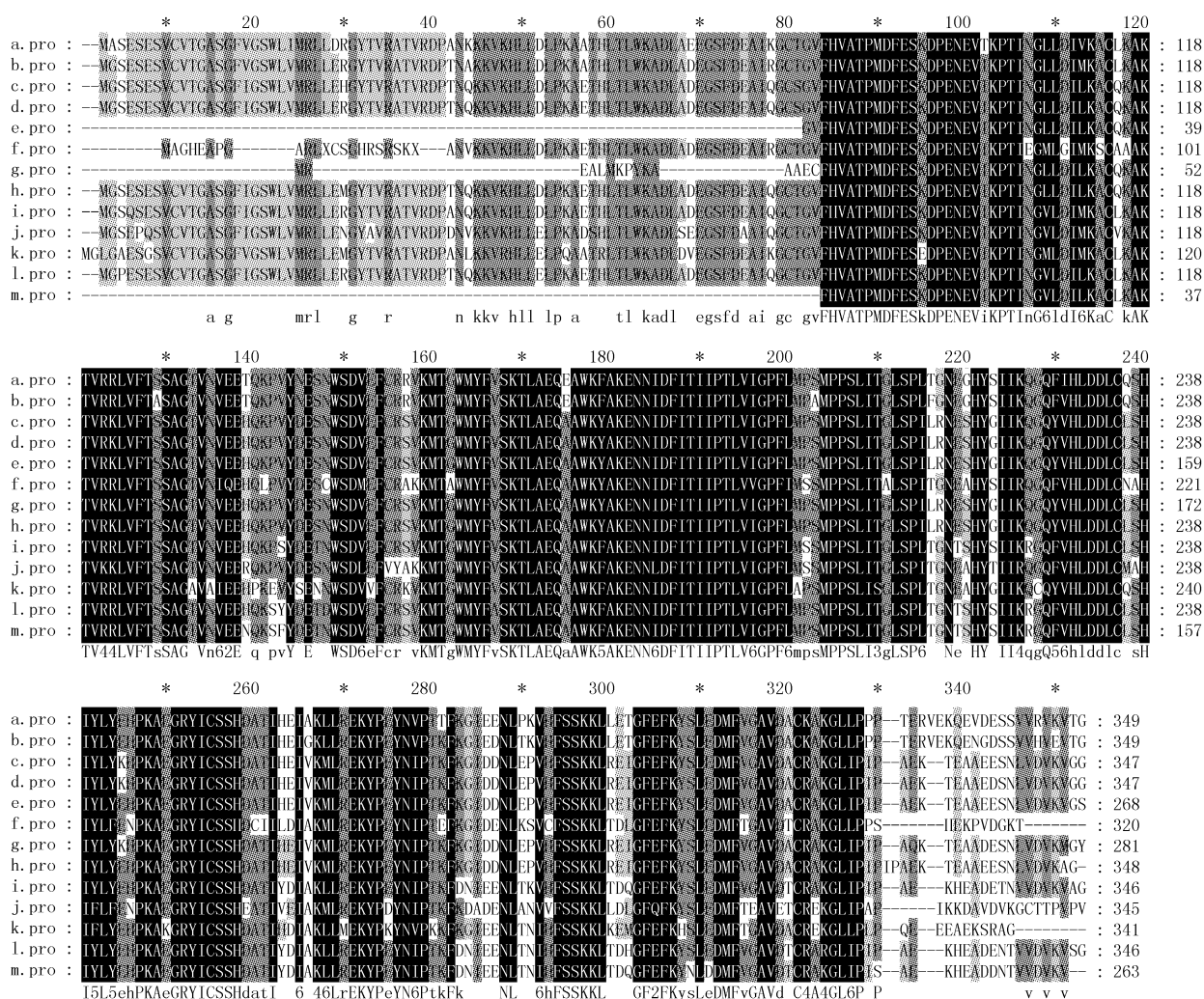
利用 MEGA 6 软件,对 *PyDFR* 编码的氨基酸序列及从 GenBank 中获得的其它植物 *DFR* 基因的氨基酸序列进行系统进化分析。从图 2 可以看出,*PyDFR* 基因的氨基酸序列与沙梨 *DFR* 基因的氨基酸序列聚成一类,说明苹果梨 *DFR* 基因与沙梨在进化上亲缘关系最近;*PyDFR* 基因的氨基酸序列与苹果、西洋梨、山楂的 *DFR* 基因的氨基酸序列虽然没有单独聚成一类,但它们处于一个亚类,说明 *PyDFR* 基因与其亲缘关系较近;可可和葡萄的 *DFR* 基因的氨基酸序列单独聚成一类,说明 *PyDFR* 基因与可可和葡萄的 *DFR* 基因的亲缘关系较远。

2.3 *PyDFR* 基因的表达分析

2.3.1 苹果梨果实去袋后总叶绿素和花色苷含量测定

从图 3A 可以看出,套袋果实的叶绿素含量低于未套袋果实,虽然去袋后叶绿素含量逐渐增加,但始终低于未套袋果实。说明套袋明显的抑制了苹果梨果实叶绿素的合成。从图 3B 可以看出,苹果梨果实去袋前花色苷含量处于较低水平,且低于未套袋果实。去袋后花色苷含量迅速增加,去袋后第 1 天表现最为突出,增加量最高,随后增加量逐渐减少,最终处于稳定水平。

2.3.2 实时荧光定量 RT-PCR 果皮总 RNA 提取 采用上海莱枫生物科技有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒提取苹果梨果皮总 RNA,电泳检测结果显示条带清晰明亮,28S 为 18S 条带亮度的 2 倍且紫外分光光度计检测显示 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间,说明所提 RNA 基本没有降解,结构较为完整,满足后续定量试验所需的基本要求。



注:a.月季(AHF58604.1);b.野草莓(XP_004291858.1);c.西洋梨(AAO39818.1);d.山楂(AAX16491.1);e.沙梨(ADP09380.1);f.葡萄(NP_001268144.1);g.苹果梨;h.苹果(AAO39816.1);i.甜樱桃(AHL45016.1);j.可可(XP_007017586.1);k.草莓(AAU12363.1);l.碧桃(XP_007222317.1);m.李子(AHZ30596.1)。

Note:a. *Rosa chinensis* (AHF58604.1); b. *Fragaria vesca* (XP_004291858.1); c. *Pyrus communis* (AAO39818.1); d. *Crataegus monogyna* (AAX16491.1); e. *Pyrus pyrifolia* (ADP09380.1); f. *Vitis vinifera* (NP_001268144.1); g. Pingguoli; h. *Malus domestica* (AAO39816.1); i. *Prunus avium* (AHL45016.1); j. *Theobroma cacao* (XP_007017586.1); k. *Fragaria × ananassa* (AAU12363.1); l. *Prunus persica* (XP_007222317.1); m. *Prunus domestica* (AHZ30596.1)。

图1 苹果梨和其它植物 DFR 的氨基酸序列比对分析

Fig.1 The amino acids sequence alignment of DFR between Pingguoli fruit and other plants

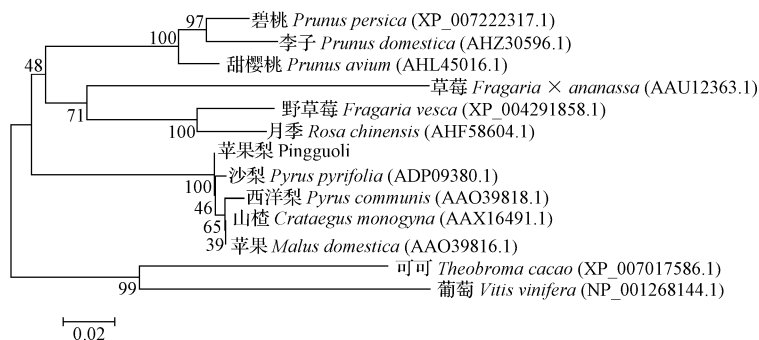


图2 苹果梨和其它植物 DFR 氨基酸序列的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of amino acid sequences of DFR between Pingguoli and other plants

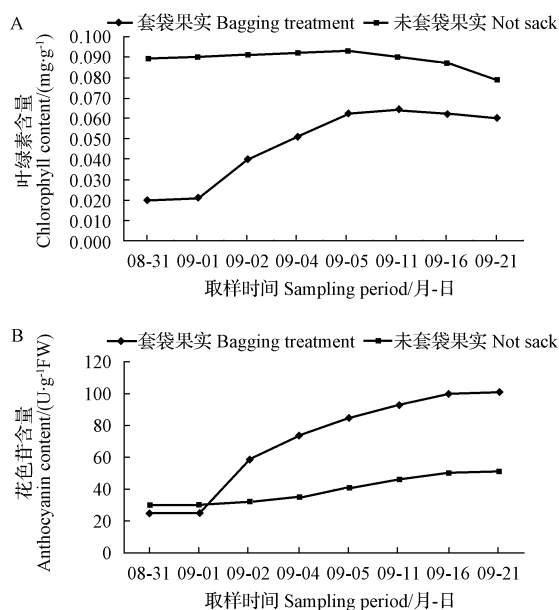


图3 苹果梨果实去袋后总叶绿素和花色苷含量变化

Fig. 3 Change of chlorophyll and anthocyanin content in Pongguoli fruits after debagging

2.3.3 引物扩增特异性检测结果 通过常规 PCR 检测引物特异性,可以看到各个泳道都分离得到单一条带且大小与预期一致,且未见明显的引物二聚体条带。回收特异条带测序,结果显示引物扩增的目的条带是属于 *PyDFR* 基因和内参基因的特异序列,表明引物特异性强,可用于下一步的定量检测。

2.3.4 *PyDFR* 实时荧光定量表达结果分析 通过实时荧光定量 RT-PCR 技术研究了 *PyDFR* 基因在套袋与未套袋处理的不同取样时期的果实中的表达规律。从图 4 可以看出, *PyDFR* 基因的表达量在套袋与未套袋的果实中表现出明显的差别,即套袋果实去袋后 *PyDFR* 基因的表达量明显高于未套袋果实; *PyDFR* 基因在去袋前(8月31日)和去袋当天(9月1日)的表达量稳定维持在较低水平,且低于未套袋果(对照);去袋后第1天(9月2日)表达量即达到了最大值,约为对照的2.5倍;

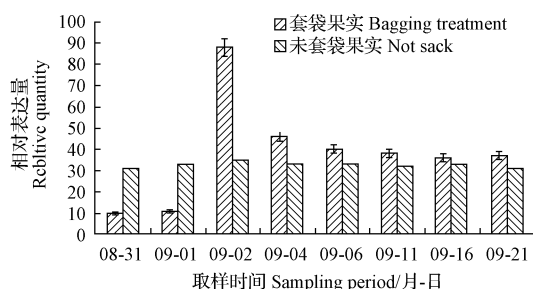
图4 苹果梨果皮 *DFR* 基因荧光定量表达模式图

Fig. 4 The fluorescence quantitative expression pattern of *DFR* in Pingguoli

随后呈迅速下降趋势,在去袋后第3天(9月4日)的表达量相比第1天下降了52.3%,约为对照的1.4倍;可以看出去袋后3~5 d 表达量在呈下降的趋势;最终稳定在同一表达水平上,约为对照的1.1倍左右。

3 讨论

花色苷合成过程中,二氢黄酮醇转变成花色苷的反应非常复杂, *DFR* 是这一转变中起作用的第一个酶,失去 *DFR* 活性的突变体产生象牙色或者白色。 *DFR* 基因是 O'Reilly 等^[16] 采用转座子标签法首先从玉米和金鱼草中分离出来的。后来从许多其它物种(如小麦、金荞麦等)中相继克隆出来^[17-18]。该研究通过 RT-PCR 技术从延安苹果梨果皮中成功克隆得到 *PyDFR* 基因,其 cDNA 全长 1 039 bp。多序列比对结果表明, *PyDFR* 与沙梨(JQ749637.1)的 *DFR* 基因的同源性高达 99%,同源性最高。系统进化分析表明, *PyDFR* 蛋白与蔷薇科植物的 *DFR* 蛋白的亲缘关系都比较近,特别是与沙梨的亲缘关系最近,山楂、西洋梨、苹果次之。综合结果表明, *PyDFR* 基因是梨属 *DFR* 基因家族中的同源基因。

该研究测定了套袋与未套袋处理的不同取样时期的苹果梨果皮中总叶绿素和花色苷的含量,结果发现套袋明显抑制了叶绿素和花色苷的合成,去袋后花色苷含量大量增加,果实色泽也迅速发生了变化。荧光定量 RT-PCR 分析了 *PyDFR* 基因在套袋与未套袋处理的不同取样时期的果实中的表达模式,结果发现,套袋果实去袋前 *PyDFR* 基因的表达量明显低于未套袋果实,原因可能是套袋抑制 *DFR* 基因的表达,从而影响果实中花色苷的合成。 *PyDFR* 基因在去袋前表达量极低,去袋后立即上升后又迅速下降,最终稳定在同一表达水平,且高于对照,此结果与相应的果实花色苷含量的测定的结果一致,即 *PyDFR* 基因大量表达的同时花色苷含量也大量的增加。这与黄春辉等^[19] 研究中 *DFR* 基因的研究结果相似,推测 *PyDFR* 基因可能是光诱导基因,一定的光强刺激可以使其表达量大大增加^[20],且能在一定程度上促进果实中还原性糖的合成,从而使花色苷含量增加^[21]。另外, Honda 等^[22] 从苹果果皮中分离出 *DFR*、*ANS* 等 5 个结构基因,发现这些基因在果实发育过程中的表达强度与花色苷的积累量呈正相关关系。 Niu 等^[23] 从成熟‘荸荠’杨梅果实中克隆得到 *DFR*、*ANS* 等基因,并检测它们在杨梅的不同品种、不同组织和发育阶段的表达水平,结果表明其表达量与花色苷含量呈显著正相关。综上所述, *PyDFR* 基因参与调控苹果梨果皮花色苷的合成。

该研究通过同源克隆方法成功获得了苹果梨 *PyDFR* 基因的 cDNA 全长序列,分析了该基因的序列特征,并对其在套袋与未套袋处理的不同取样时期的果实中的表达模式进行了初步分析,推测苹果梨花色苷

的合成与 *PyDFR* 基因的表达情况有关,但其是否能准确的影响苹果梨的果实色泽仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 高华君,王少敏,王江勇.套袋对苹果果皮花青苷合成及着色的影响[J].果树学报,2006(5):750-755.
- [2] 王龙,李鸿雁,杨健,等.‘红香酥’梨果皮色素变化规律及套袋对其形成的影响[J].果树学报,2012(3):333-337,523.
- [3] 张茜,杨健,王龙,等.红皮梨着色与花青苷合成研究进展[J].果树学报,2012(4):668-675.
- [4] 刘晓静,冯宝春,冯守千,等.‘国光’苹果及其红色芽变花青苷合成与相关酶活性的研究[J].园艺学报,2009,36(9):1249-1254.
- [5] Murray J R, Hackett W P. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L[J]. Plant Physiology, 1991, 97(1): 343-351.
- [6] 王庆菊,李晓磊,王磊,等.紫叶稠李叶片花色苷及其合成相关酶动态[J].林业科学,2008,44(3):45-49.
- [7] 杨林先,李伟,曲柏宏.不同时期解袋对苹果梨果实着色的影响[J].河南农业科学,2010(1):106-107.
- [8] 李伟,李正洙,曲柏宏.不同套袋期对苹果梨果皮色素含量的影响[J].湖南农业科学,2010(15):34-35.
- [9] 孙百灵,曲柏宏,李伟,等.苹果梨果实着色相关酶基因片段克隆及表达分析[J].吉林农业大学学报,2012,34(4):423-427,442.
- [10] 王旭,曲柏宏,刘振坤.延边苹果梨苯丙氨酸解氨酶基因克隆及植物表达载体的构建[J].北方园艺,2013(7):106-112.
- [11] 田义轲,李节法,王彩虹,等.梨茎尖中 *PpKO* 基因表达量的实时荧光定量 PCR 分析[J].华北农学报,2012,27(3):62-66.
- [12] Lloyd A M, Walbot V, Davis R W. Arabidopsis and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1[J]. Science, 1992, 258

(5089):1773-1775.

- [13] Arnon D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts; polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* L[J]. Plant Physiol, 1949, 24(1): 1-15.
- [14] Pirie A, Mullins M G. Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic Acid[J]. Plant Physiology, 1976, 58(4): 468-472.
- [15] 王惠聪,黄旭明,胡桂兵,等.荔枝果皮花青苷合成与相关酶的关系研究[J].中国农业科学,2004,37(12):2028-2032.
- [16] O'Reilly C, Shepherd N S, Pereira A, et al. Molecular cloning of the *al* locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mul*[J]. EMBO J, 1985, 4(4): 877-882.
- [17] 杨国华,赵学强,李滨,等.蓝粒小麦花青素生物合成途径中的二氢黄酮-4-还原酶基因的分子克隆[J].植物学报,2003,45(11):1329-1338.
- [18] 刘光德,雷兴华,祝钦泷,等.金荞麦二氢黄酮醇-4-还原酶基因(*Fd-DFR1*)的克隆及序列分析[J].中国农业科学,2009,42(1):55-63.
- [19] 黄春辉,葛翠莲,张晓慧,等.‘红阳’猕猴桃突变体果实花青苷合成相关结构基因的表达分析[J].果树学报,2014,31(2):169-174.
- [20] 姜卫兵,徐莉莉,翁忙玲,等.环境因子及外源化学物质对植物花色素苷的影响[J].生态环境,2009,18(4):1546-1552.
- [21] 张茜,杨健,王龙,等.‘红太阳’梨花青苷与可溶性糖的相关性分析及外源糖的增色作用研究[J].果树学报,2013(2):248-253.
- [22] Honda C, Kotoda N, Wada M, et al. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40(8): 955-962.
- [23] Niu S S, Xu C J, Zhang W S, et al. Coordinated regulation of anthocyanin biosynthesis in Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit by a R2R3 MYB transcription factor[J]. Planta, 2010, 231: 887-899.

Molecular Cloning and Expression Analysis on *PyDFR* Gene of Pingguoli in Yanbian

YANG Hong-xia, QU Bai-hong, LIU Zhen-kun, LU Yan-xin
(College of Agronomy, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract: Taking the Pingguoli in Yanbian as material, the relationship between the expression and the accumulation of anthocyanin during the pigmentation of Pingguoli was analyzed by the homology cloning technology, and the real-time fluorescent quantitative PCR technique. The results showed that, the full-length cDNA of *PyDFR* included 1 039 basepair and opened reading frame encompassed 843 bp encoding a polypeptide of 281 amino acids residues with a calculated molecular weight(MV) of 32 kDa and isoelectric point theory(pI) of 6.32. The homology analysis revealed that this cDNA and *Pyrus pyrifolia* (JQ749637.1) was 99%. Real-time fluorescent quantitative RT-PCR results indicated the expression level of *PyDFR* were markedly enhanced in the sunlit side, and reached a maximum value at 1 day after debagging, then started decline rapidly, but finally expressed stably in the same level. The color code and anthocyanins content produced results essentially in agreement with these figures. In addition that had a certain role in promoting the accumulation of fruit anthocyanin.

Keywords: Pingguoli; Dihydroflavonol 4-reductase; gene cloning; sequence analysis; expression patterns