

马铃薯花青素转录激活基因 *stwd40* 的克隆与表达分析

罗遵喜, 刘仕芸, 张树珍*, 杨本鹏, 蔡文伟

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘要: 根据 GenBank 中报道的茄属植物矮牵牛花青素 *wd40* 类转录激活基因 *an11* 及番茄 *wd40* 基因 113964R 的 mRNA 序列的保守区结构, 设计简并引物, 从紫色马铃薯皮中克隆了马铃薯 *wd40* 类转录激活基因的保守片段, 再利用 RACE 技术分别获得了该基因的 3'端和 5'端。序列分析表明, 该基因核苷酸序列为 1 292 bp, 具有完整的编码框, 推导其编码 362 个氨基酸, 命名为 *stwd40*。推测的氨基酸序列与 GenBank 数据库中大量物种的花青素转录激活蛋白 *wd40* 有较高的同源性, 其中与矮牵牛花青素转录调控基因 *an11* 的相似性达 86%。RT-PCR 表达分析显示 *stwd40* 在紫色马铃薯叶、茎、皮、肉及根中都有表达, 其中在茎中的表达量最高, 肉中表达量最低; 其在白色马铃薯的叶、皮和肉中也有表达, 推测该基因为组成型表达。

关键词: 马铃薯; 花青素转录激活基因; 克隆; RT-PCR

中图分类号: S 532 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 09-1317-06

Cloning and Expression Analysis of the Anthocyanin Transcriptional Activator Gene *stwd40* of *Solanum tuberosum*

LUO Zun-xi, LIU Shi-yun, ZHANG Shu-zhen*, YANG Ben-peng, and CAI Wen-wei

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Based on the conserved sequence of *Petunia hybrida* anthocyanin transcriptional activator gene *wd40* (*an11*) and tomato *wd40* mRNA (113964R) from GenBank, the conserved fragment of *stwd40* transcriptional activator gene was cloned from the purple potato coat. The 3'-end and 5'-end of this gene were amplified by using RACE technique separately. Sequence analysis showed that the nucleotide sequence of this gene is 1 292 bp, containing a complete open reading frame and encoding 326 amino acids. The *stwd40* amino acid sequence is similar to anthocyanin transcriptional activator protein *wd40* from large number of species, and the homology is 86% with the *Petunia hybrida* anthocyanin transcriptional regulatory gene *an11*. The results of RT-PCR expression analysis showed that *stwd40* expressed in leaves, stems, tuber skins, tuber fleshs and roots of purple potato and the leaves, tuber skins, tuber fleshs of white potato with different expression levels. It is suggested that the *stwd40* is constitutive expressed in potato.

Key words: potato; anthocyanin transcriptional activator gene; clone; RT-PCR

花青素 (anthocyanin) 属于类黄酮化合物, 自然状态下常与各种单糖形成花色苷, 具有抗氧化、抗突变、抗增生、抗癌等重要的生理功能 (Betti, 1985; 赵保路, 1999; Neill et al., 2002; 田云等, 2005; 赵艳和吴坤, 2006)。已有研究表明: 不同植物的花青素生物合成受两类基因共同控制: 一类是结构基因, 编码花青素生物合成途径所需的酶; 另一类是调节基因, 编码的转录因子调控结构

收稿日期: 2008-03-18; 修回日期: 2008-05-12

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangsz.2007@yahoo.com.cn)

基因的时空表达 (Holton & Cornish, 1995)。目前已分离和鉴定了三类花青素合成的转录因子: R2R3-MYB 蛋白、myc 家族的 bHLH 蛋白和 wd40 重复蛋白 (Ramsay & Glover, 2005)。至今已有多种 wd40 重复蛋白被鉴定, 它们都在转录水平上调控花青素的生物合成 (Carey et al., 2004)。

紫色马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 因其富含花青素而被营养学家称为健康食品。紫色马铃薯中花青素在不同组织中的积累模式和程度受花青素转录激活基因的表达而共同调控。因此, 分离克隆紫色马铃薯花色素生物合成的转录激活基因 *stwd40*, 并进一步鉴定其功能, 可为阐明马铃薯花色素生物合成和沉积机制提供理论依据, 为培育高含量花色素的马铃薯新品种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

紫色马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 2 号由云南省农业科学院经济作物研究所提供; ‘克新 19’ 为白皮白肉的马铃薯品种。

RNA Plant 购自 TIANGEN 公司, M-MLV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、凝胶回收试剂盒和 pMD-18T 载体购自 TaKaRa 公司。受体大肠杆菌 DH5 α 由本研究室保存。

1.2 RNA 的提取及逆转录反应

马铃薯根、茎、皮、叶以及块茎果肉总 RNA 的提取按照 TIANGEN 公司 RNA Plant Kit 的说明书进行。所提取的 RNA 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测无明显降解, OD_{260/280} 为 1.8 ~ 2.0, 然后进行下列逆转录反应: 2.5 μ L Oligo (dT), 5 μ L 总 RNA, 加 RNase free water 补足 15 μ L, 70 $^{\circ}$ C 热激 5 min, 冰浴冷却 2 min, 然后加入 5 μ L M-MLV Buffer, 1.5 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 1 μ L RNase inhibitor, 1 μ L M-MLV 逆转录酶 (200 U \cdot μ L⁻¹), 最后加入 RNase free water 补足 25 μ L, 轻轻混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min; 70 $^{\circ}$ C 加热 15 min 终止反应, 反转录产物保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 保守片段的克隆

根据 GenBank 核酸数据库中报道的茄属植物矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm) 花青素 wd40 类转录激活基因 *an11* 及番茄 (*Solanum lycopersicum*) *wd40* 基因 113964R 的 mRNA 序列, 通过 Premier 5 设计保守区引物 *stwd40* 1F: 5'-TGAATAYTGTGCTCCTTTGAC-3', *stwd40* 2R: 5'-CCAAGCAATAGCATTCA-CAC-3'。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 产物保存于 4 $^{\circ}$ C。

1.4 马铃薯 *stwd40* 基因 3' 端以及 5' 端的克隆

根据已克隆的马铃薯 *stwd40* 保守区域片段, 设计 3' RACE 上游引物 *stwd40* F1, 再结合 TaKaRa 公司 3-full RACE Core Set 试剂盒提供的 3' 末端锚定引物 (3' adaptor primer) 5'-CTGATCTAGAGGTAC-CGGATCC-3', 对马铃薯 *stwd40* 基因的 3' 末端进行 PCR 扩增。

然后根据所获得的 *stwd40* 保守片段核苷酸序列在 NCBI 上与其他植物花青素 wd40 重复蛋白进行比对, 寻找并设计 5' 上游保守区域简并引物 *stwd40* 5's, 根据保守片段设计下游引物 *stwd40* A1。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 产物保存于 4 $^{\circ}$ C。

引物序列: *stwd40* F1: 5'-TTGCGTCCGTTTCTGCTGATG-3'; *stwd40* 5's: 5'-TCACCAAACCCATA-AAGCAC-3'; *stwd40* A1: 5'-GAATGAAGTGGAGCCGAGAA-3'。

1.5 序列测定

将所有 PCR 产物凝胶电泳后回收目的片段, 与 PGM-18T 载体连接并转化 DH5 α , 重组子经质粒酶切鉴定后送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.6 RT-PCR 的表达分析

分别提取紫色马铃薯根、茎、皮、叶、果肉以及白色马铃薯的皮、叶、果肉总 RNA, 根据目的基因 *stwd40* 的非保守区设计引物, 以马铃薯组成型表达的 *GAPDH* 基因作为内参 (*GAPDH*-F: 5'-AT-GAAGGACTGGAGAGGTGG-3', *GAPDH*-R: 5'-GAAAATGCTTGACCTGCTGT-3'), 采用不同的循环, 进行 RT-PCR 表达分析。反应程序如下: 94 ℃ 3 min, 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 分别进行 25、28 和 30 个循环; 72 ℃ 5 min。其中在 28 个循环下扩增出来的条带看起来亮度一致, 将其确定为指数扩增期。

2 结果与分析

2.1 马铃薯花青素转录激活基因 *stwd40* 全长 cDNA 序列的克隆

以马铃薯紫皮 RNA 为模板, 以 *stwd40* 1F 和 *stwd40* 2R 为引物, 进行保守区域的 PCR 扩增 (图 1), 经测序其核苷酸序列大小为 430 bp, 同源比对结果显示, 其与番茄 (*Lycopersion esculentum*) *wd40* 基因同源性高达 94%, 与矮牵牛的相似性为 87%, 命名为 *stwd40-1*。

根据该保守区域片段, 利用 3'RACE 上游引物 *stwd40* F1, 进行 3'RACE 扩增 (图 2), DNA 序列测定表明该 3'RACE 产物大小为 659 bp, 含有 14 个 PolyA 尾。比对发现其与番茄 *wd40* 基因 113964R 同源性高达 92%, 命名为 *stwd40-2*。

再根据 *stwd40-1* 序列在 NCBI 上与其他植物花青素 *wd40* 重复蛋白进行比对, 寻找并设计 5' 上游保守区域引物 *stwd40* 5's, 结合保守片段所设计的下游引物 *stwd40* A1, 进行 5' 端 PCR 扩增 (图 3), 经测序该 5' 端核苷酸序列大小为 507 bp。

Blastn 比对结果显示, 该片段核苷酸序列与番茄 *wd40* 基因 113964R 同源性高达 94%, 与矮牵牛相似性为 87%, 且包含起始密码子 ATG, 命名为 *stwd40-3*。

最后将克隆到的 cDNA 片段的 *stwd40-1* 与 3' 末端的核苷酸序列 *stwd40-2* 及 5' 端序列 *stwd40-3* 进行拼接, 获得了紫色马铃薯花青素转录激活基因 *stwd40* 1 292 bp 的全长 cDNA。

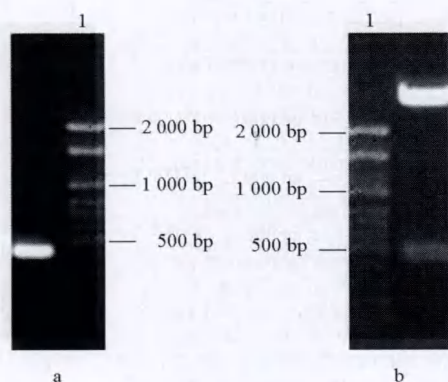


图 1 *stwd40* 保守区域的克隆及酶切鉴定

1. Marker 2000; a. PCR 扩增; b. 重组质粒酶切鉴定。

Fig. 1 The RT-PCR results of conserved region of *stwd40* and its identification for *Bam*H I / *Hind* III

1. Marker 2000; a. The PCR production of *stwd40*;

b. Recombinant plasmid identified

by restriction enzyme digestion.

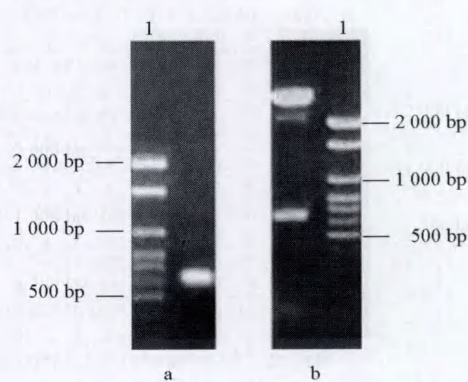


图 2 *stwd40* 3' 端的克隆及酶切鉴定

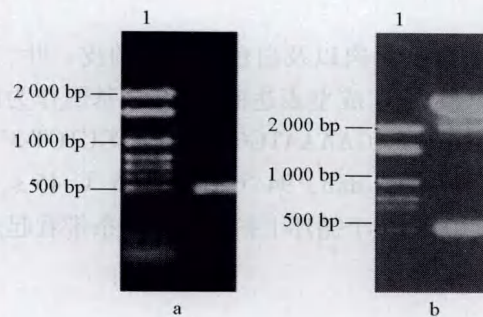
1. Marker 2000; a. 3'RACE 扩增产物; b. 重组质粒酶切鉴定。

Fig. 2 The RT-PCR results of 3'RACE and its identification for *Bam*H I / *Hind* III

1. Marker 2000; a. The 3'RACE production of *stwd40*;

b. Recombinant plasmid identified

by restriction enzyme digestion.

图 3 *stwd40* 5'端的克隆及酶切鉴定

1. Marker 2 000; a. 5'端 PCR 扩增; b. 重组质粒酶切鉴定。

Fig. 3 The RT-PCR results of 5' encoding cDNA fragment and its identification for *Bam*H I / *Hind* III1. Marker 2 000; a. The 5' encoding cDNA fragment of *stwd40*;

b. Recombinant plasmid identified by restriction enzyme digestion.

2.2 马铃薯花青素转录激活基因 *stwd40* 的序列分析

经序列分析, *stwd40* 基因核苷酸序列大小为 1 292 bp, 开放阅读框分析显示, 其读码框为 66 ~ 1 154 bp, 推导其编码 362 个氨基酸。结果如图 4 所示。

```

1   TCACCAAAACCCATAAAGCACAAACATACATAACTTCAATTTTACTTCAATTAATCTCTACTAAAA
66   ATGGAGAATTCAAGTCAAGAATCGCATCTCGATCTGAAAATTCGGTTACATATGACTCCTCTTACCCGATC
    M E N S S Q E S H L R S E N S V T Y D S S Y P I
138  TACGCTATGGCTTTTTCATCATTCACTTCTTCCCTCACAAACCGCCGCTCGACTTGCCGTCGGAAGCTTT
    Y A M A F S S F T S S L T N R R R R L A V G S F
210  ATCGAAGAGTTCACAATCGTGCCGATATTCTGTCTTCGATGAAGATACCCCTAACCCCTTAAGCCTCTTCGG
    I E E F N N R A D I L S F D E D T L T L K P L P
282  AATCTCTCTTTGAACACCCCTTATCCGCCTACGAAGCTCATGTTCCATCCTAATCCTTCTGCTTCTCAAG
    N L S F E H P Y P P T K L M F H P N P S A S L K
354  ACTAATGATATTCTTGGCCCTTCCGGTGACTACTCCGCTCTCTGGGATGTTACTGATATTCTTATTGAACCA
    T N D I L A P S G D Y L R L W D V T D T S I E P
426  CTITTCCTCTCAGTAACAATAAACTAGTGAATATTGTGCCCTTTGACGCTCTTTTGATTGGAATGAAGTG
    L F T L S N N K T S E Y C A P L T S F D W N E V
498  GAGCCGAGAAGAATTGGTACTTCTAGTATAGACACTACTTGACCATCTGGGATGTTGAAAAAGGAGTTTG
    E P R R I G T S S I D T T C T I W D V E K G V V
570  GAAACCCAATTGATAGCCCATGACAAAGAGGTTTACGATATAGCTTGGGGTGAAGCTGGAGTTTTCGCTCC
    E T Q L I A H D K E V Y D I A W G E A G V F A S
642  GTTTCCTGCTGATGGATCAGTTAGGATTTTGTATTGAGGGATAAGGAACATTCAACGATTATTATGAGAGC
    V S A D G S V R I F D L R D K E H S T I I Y E S
714  CCGAAACCGGATACTCATTGTTGAGGCTGGCTTGAACAAGCAAGATTGAGATACATGGCTACTATATTG
    P K P D T P L L R L A W N K Q D L R Y M A T I L
786  ATGGATAGCAACAAGATAGTGATTTAGATATTAGGTCTCCAGCAATGCCTGTGGCAGAACTGGACAGGCAT
    M D S N K I V I L D I R S P A M P V A E L D R H
858  CAGGCGAGTGTGAATGCTATTGCTTGGGGGCACCGCAGACGTGATACATATTAGTTCTGGTGGGGATGAGC
    Q A S V N A I A W G H R R R V D I L V L V G M T
930  GACAGGCGCTCATTTGGGAGTTGCCAACTAATGCAGGGCCGAATCGGATTGATCCCATGTCAGTCAACTCCG
    D R R S F G S C Q L M Q G R I G L I P C Q S T P
1 002 CTGGAGCTGCGATTAATCAAATTGGGTGCTGACATGGGTGATGATGGTCTGCTCCTAGTGGTGGCAGCGGT
    L E L R L I K L G A D M G D D G P A P S G G S G
1 074 GCCGGTCTAAATCGAGGAGGTCGACTAAGCTGTTTCTGCTCCTCATGTTTTTGGTTTCGTCAGTTAGTTTT
    A G P K S R R S T K L F L L M F L V S S V S F
1 146 TATCCTTGATGAGAACTCCATTTTATAATTCTGCATGTAAGTTTATAGTTAATGGTGATCACTTTTGGTAT
    Y P *
1 218 TTGGCTTGAACCTATTATCAAGTATACTATCATTTTTCGGATTATAATTTTCGAATTTTGCTAAAAAAA
1 290 AAAAAAGGATCCGTACCTTAGATCAG
  
```

图 4 马铃薯 *stwd40* 基因编码的阅读框及对应的核酸和氨基酸序列单下划线部分为 *wd40* 结构域; 双下划线部分为起始密码子和终止密码子。Fig. 4 The ORF and the deduced amino acid sequence of *stwd40* geneThe single underlined fragments were *wd40* domain;

The double underlined fragments were the initiation codon and termination codon.

2.3 *stwd40* 蛋白质的同源性分析及系统树构建

stwd40 基因推测所编码蛋白的同源性比对结果显示它具有典型的 wd40 结构域，位于第 78 ~ 273 位氨基酸；且与矮牵牛和苹果 (*Malus × domestica*) 的 wd40 蛋白间有较高的同源性，分别为 86% 和 80%。构建的系统进化树如图 5，可以看出其分子进化树分为两个分支。*stwd40* 基因与苹果的 *Ttg1* 基因和棉花 (*Gossypium hirsutum*) 的 *GhTTG3*、*GhTTG1* 基因聚为一类，其中与苹果 *Ttg1* 基因亲缘关系最近。

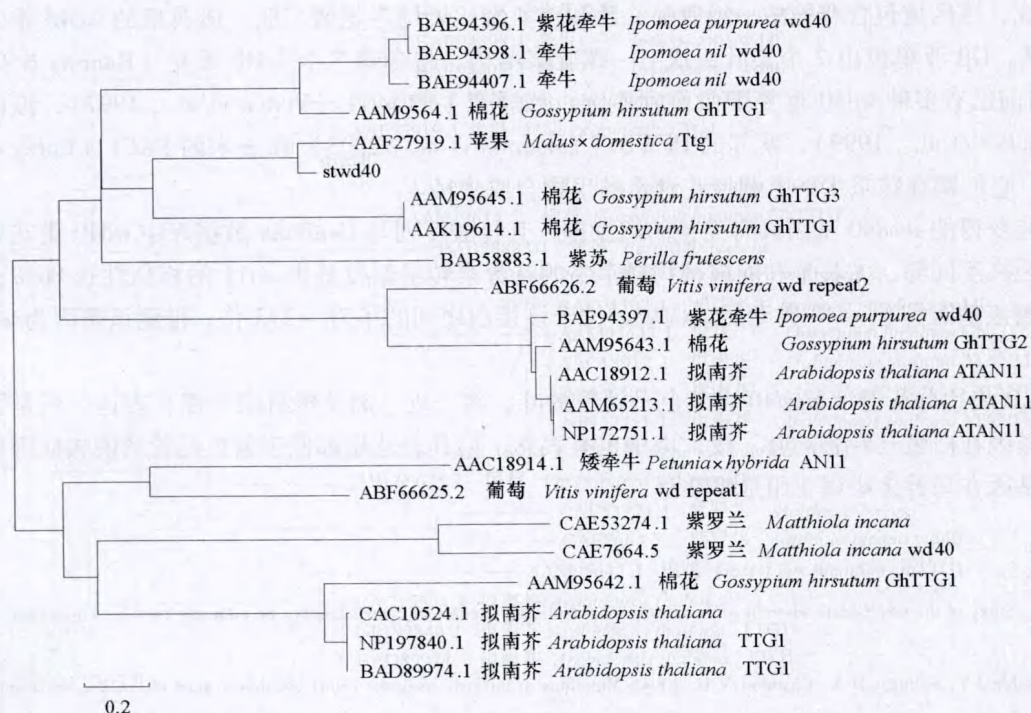


图 5 *stwd40* 的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *stwd40*

2.4 *stwd40* 在不同马铃薯品种不同组织部位的 RT-PCR 表达分析

在指数扩增期下 (28 个循环) 通过内参基因 *GAPDH* 的表达量调节 cDNA 模板加入量，进行 RT-PCR 分析 (图 6)。

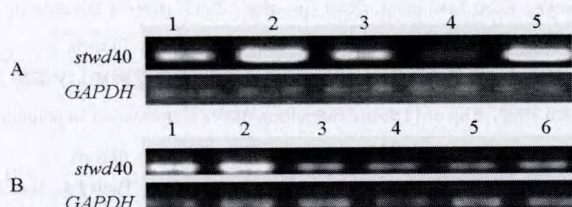


图 6 *stwd40* 基因在马铃薯不同组织部位的 RT-PCR 表达分析

A. 1 ~ 5 分别为：紫叶、紫茎、紫皮、紫肉、紫根；

B. 1 ~ 6 分别为：紫叶、紫皮、紫肉、白叶、白皮、白肉。

Fig. 6 RT-PCR expression analysis of *stwd40* in various tissue in potato

A. 1 ~ 5: Purple leaves, purple stems, purple tuber skins, purple tuber fleshs, purple roots;

B. 1 ~ 6: Purple leaves, purple tuber skins, purple tuber fleshs,

white leaves, white tuber skins, white tuber fleshs.

基因 *stwd40* 在紫色马铃薯的不同组织部位中都有表达,其中以紫茎中的表达量为最高,紫肉中表达量最低(图6, A);且该基因在白色马铃薯的皮、叶和果肉中都表达,但表达量相对都低于紫色马铃薯的对应相同部位(图6, B),说明该基因在马铃薯中呈组成型表达。

3 讨论

wd40 重复蛋白最早发现于植物细胞质中,它具有 β 螺旋桨蛋白组结构,其核心区域由 40 个氨基酸残基组成,该区域包含甘氨酸—组氨酸二肽和色氨酸—天门冬氨酸二肽。最典型的 wd40 重复蛋白是 G β 亚基, G β 亚单位由 7 个桨叶组成 β -螺旋桨结构,包含着 7 个 wd40 重复(Ramsay & Glover, 2005)。目前已有多种 wd40 重复蛋白得到鉴定,如矮牵牛的 *an11* (Vetten et al., 1997)、拟南芥的 TTG1 (Walker et al., 1999)、紫苏的 PFWD (Yamazaki et al., 2003) 和玉米的 PAC1 (Carey et al., 2004) 等,它们都在转录水平上调控花青素的生物合成途径。

本研究获得的 *stwd40* 基因具有完整的阅读框,其核酸序列与 GenBank 数据库中 wd40 类花青素转录激活基因高度同源,尤其是和同属植物矮牵牛的花青素转录调控基因 *an11* 的相似性达 86%;蛋白质功能预测该基因具有 wd40 典型的结构域,位于该蛋白序列的第 78~273 位,推测该基因为 wd40 类基因。

RT-PCR 表达分析显示 *stwd40* 在紫色马铃薯的叶、茎、皮、肉及根组织中都有表达,只是强弱不一,且该基因在白色马铃薯的叶、皮、肉中也有表达,但其表达量都低于紫色马铃薯的相应部位,所以认为该基因在马铃薯中属于组成型表达。

References

- Betti V. 1985. Study of the mechanism whereby anthocyanosides potentiate the effect of catecholamines on coronary vessels. *Fitoterapia*, 4 (2): 67–72.
- Carey C C, Strahle J T, Selinger D A, Chandler V L. 2004. Mutations in the pale aleurone color1 regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar transparent testa glabral gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16 (2): 450–464.
- Holton T A, Cornish E C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7 (7): 1071–1083.
- Neill S O, Gould K S, Kilmartin P A, Mitchell K A, Markham K R. 2002. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant Cell & Environment*, 25 (4): 539–547.
- Ramsay N A, Glover B J. 2005. MYB bHLH WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Sci*, 10 (2): 63–70.
- Tian Yun, Lu Xiang-yang, Yi Ke, He Xiao-jie, Zhou Xiao-ming, Xiao Gui-qing. 2005. Recent advance in natural plant antioxidants. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 36 (3): 468–471. (in Chinese)
- 田云, 卢向阳, 易克, 何小解, 周晓明, 肖桂青. 2005. 天然植物抗氧化剂研究进展. *中草药*, 36 (3): 468–471.
- Vetten N D, Quattrocchio F, Mol J, Koes R. 1997. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals. *Genes Dev*, 11: 1422–1434.
- Walker A R, Davison P A, Bolognesi-Winfield A C, James C M, Srinivasan N, Blundell T L, Esch J J, Marks M D, Gray J C. 1999. The transparent testa glabral locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell*, 11: 1337–1350.
- Yamazaki M, Makita Y, Springob K, Saito K. 2003. Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochem Eng J*, 14: 191–197.
- Zhao Bao-lu. 1999. Oxygen free and natural antioxidants. Beijing: Science Press: 367–378. (in Chinese)
- 赵保路. 1999. 氧自由基和天然抗氧化剂. 北京: 科学出版社: 367–378.
- Zhao Yan, Wu Kun. 2006. Advances biological function on procyanidines. *Chinese Public Health*, 22 (1): 110–112. (in Chinese)
- 赵艳, 吴坤. 2006. 原花青素生物学作用研究进展. *中国公共卫生*, 22 (1): 110–112.