

# 猕猴桃 *GalUR* 表达与抗坏血酸积累的关系

李明军, 刘 军, 梁 东, 郭春苗, 马锋旺\*

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

**摘 要:** 通过 RT-PCR 从美味猕猴桃 (*Actinidia deliciosa*) 果实中克隆了 D-半乳糖醛酸还原酶 (*GalUR*) 全长 cDNA 序列, 并分析其序列特征, 进行原核表达, 制备特异抗体, 分析其 mRNA 及蛋白表达水平与果实发育过程及不同组织中抗坏血酸 (AsA) 合成和积累的关系。结果表明: 克隆的 *GalUR* cDNA (GenBank 登录号为 GU339035) 包含的最大开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 990 bp, 编码 329 个氨基酸残基, 预测分子量为 37 kD, 与报道的草莓等其他植物 *GalUR* 具有较高的相似性。构建的 pET-32a (+)-*GalUR* 载体在大肠杆菌 BL21 (*E. coli* BL21) 中异源表达后, 获得了主要以包涵体存在约 58 kD 的融合蛋白 GalUR-His (His 约 21 kD)。以该蛋白制备抗体, 与重组蛋白的 Western 杂交表明该抗体能与 *GalUR* 蛋白发生特异反应。对猕猴桃可溶性蛋白杂交显示, 猕猴桃体内 *GalUR* 蛋白的分子量约 37 kD。在猕猴桃不同组织和发育过程中, *GalUR* 表达水平与 AsA 含量表现为高度一致, 但前期饲喂发现, 与 L-半乳糖相比, D-半乳糖醛酸并不能有效促进猕猴桃 AsA 的合成。这些结果表明以单体形式存在的 *GalUR* 与猕猴桃 AsA 合成有着密切关系, 但它可能并不是猕猴桃 AsA 积累的主要调控环节。

**关键词:** 猕猴桃; D-半乳糖醛酸还原酶; 原核表达; Western 杂交; 维生素 C

**中图分类号:** S 663.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 09-1641-09

## The Relationship Between *GalUR* Expression and Ascorbate Accumulation in Kiwifruit

LI Ming-jun, LIU Jun, LIANG Dong, GUO Chun-miao, and MA Feng-wang\*

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** In present study, D-galacturonate reductase (*GalUR*) cDNA were cloned from young fruit of *Actinidia deliciosa* 'Qinmei', expressed it in *E. coli*, and prepared the specific antibody, then we analyzed the relationship between its transcript level and AsA level during fruit development and among different tissues of kiwifruit. The results showed that cDNA of *GalUR* from young fruit of kiwi had an 990 bp open reading frame (ORF) and encoded a protein of 329 amino acid residues with a putative molecular mass of 37 kD. Its accession No. in GenBank is GU339035. Both of its cDNA and amino acid sequence showed high similarity with *GalUR* genes reported in other plants, e.g. strawberry. After it was heterologously expressed in *E. coli*, the fusion protein GalUR-His (His is about 21 kD) was about 58 kD, and existed mainly as inclusion body. Western blotting showed that the antibody prepared in rabbit reacted specifically with protein extracted from kiwifruit tissues, and the size of *GalUR* protein in kiwifruit was

收稿日期: 2011-05-06; 修回日期: 2011-09-07

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20090204110009); 国家自然科学基金项目 (30871700)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fwm64@sina.com)

also about 37 kD. Although *GalUR* expression levels had a good consistency with AsA content during fruit development and among different tissues of kiwi, the ratio of AsA produced from D-galacturonate was much lower than that from L-galactose by feeding experiment. These results suggest that *GalUR* in kiwifruit, as a monomer protein, has a good correlation with AsA content, but it is not a main controlling point in regulating AsA accumulation in kiwifruit.

**Key words:** kiwifruit; D-galacturonate reductase; prokaryotic expression; Western blotting; vitamin C

抗坏血酸 (L-ascorbic acid, AsA) 是生物体内重要的抗氧化剂和许多酶的辅因子, 在植物生长发育及其对逆境的抗性中起着重要作用 (Davey et al., 2000)。植物 AsA 含量受其自身生物合成能力的高度调控, 目前已证实 L-半乳糖途径为植物体 AsA 合成的主要途径 (Wheeler et al., 1998; Hancock & Viola, 2005; Linster et al., 2007), 同时与细胞壁多糖裂解相关的 D-半乳糖途径等支路途径也相继被提出 (Aguis et al., 2003; Hancock & Viola, 2005)。

在 20 世纪 60 年代就发现甲基-D-半乳糖醛酸是 AsA 合成的有效前体物, 提出在植物体内存在经 D-半乳糖醛酸 (D-galacturonic acid, D-GalUA) 合成 AsA 的途径 (Loewus & Kelly, 1961; Loewus, 1963)。Aguis 等 (2003) 从草莓果实中克隆到了 D-半乳糖醛酸还原酶 (D-galacturonate reductase, *GalUR*) 基因, 其在草莓 (Aguis et al., 2003) 和葡萄 (Cruz-Rus et al., 2010) 果实成熟期间表达量与 AsA 积累量呈明显的相关性, 且该基因在拟南芥中的过量表达引起 AsA 含量增加了 2~3 倍 (Aguis et al., 2003); 张伟玉等 (2008) 也发现, 番茄果实中的 *GalUR* mRNA 水平与 AsA 含量呈正相关, 草莓的该基因在番茄中的过量表达也能增加 AsA 含量。*GalUR* 作为催化 D-GalUA 还原生成 L-半乳糖酸 (L-galactonic acid) 的酶, 是 D-半乳糖醛酸途径的重要依据及调控位点 (Aguis et al., 2003), 但对于该基因在其它植物 AsA 积累中的生理作用尚无深入研究。

猕猴桃是中国原产果树, 果实 AsA 含量高于大多数水果, 有“维生素 C 之王”的美称。研究发现猕猴桃果实中的 AsA 主要形成于果实生长发育早期 (侯长明 等, 2009)。Bulley 等 (2009) 已对猕猴桃 AsA 合成途径相关基因的表达与果实发育过程中 AsA 积累的关系作了系统研究, 发现在猕猴桃果实中 3 个 *GalUR* 同源基因的表达均与 AsA 的积累存在明显的相关性, 但是否存在 D-半乳糖醛酸途径和 *GalUR* 与猕猴桃 AsA 积累的关系尚不明确。本试验中以美味猕猴桃果实为试材, 克隆了与草莓 *GalUR* 同源性最高的 *GalUR1* 全长序列, 进行了原核表达, 制备了多克隆抗体, 探索了其表达与猕猴桃 AsA 积累的关系, 为进一步认识 *GalUR* 的功能及猕猴桃高 AsA 含量机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

植物材料为美味猕猴桃 ‘秦美’ (*Actinidia deliciosa* ‘Qinmei’) 品种。

为研究猕猴桃 *GalUR* 在不同组织中的表达特性, 在花后 30 d 取幼果、成熟叶片、幼叶、叶柄、果柄及结果枝的韧皮部, 液氮速冻后, 存于 -70 °C 冰箱, 用于基因表达分析和 AsA 含量测定。

为研究猕猴桃 AsA 合成能力, 于 2008 年在花后 30、75 和 125 d ( $\pm 2$  d) 取果实, 并在 30 d 采取成熟叶片。样品采集后立即带回实验室进行前体物饲喂试验。

### 1.2 猕猴桃 *GalUR* 基因的 cDNA 克隆及生物信息学分析

幼果总 RNA 提取采用 Chang 等 (1993) 的 CTAB-LiCl 法, 反转录合成 cDNA。在 GenBank 中

BLAST 与草莓 *GalUR* (AY663110) 基因同源的猕猴桃 EST 序列, 进行拼接, 获得含 *GalUR* 开放阅读框的 cDNA 序列, 根据此序列合成引物 (GalURs: 5'-TCCCTGAAAAATGGAAATTA-3', GalURa: 5'-AAATCACAAAATGAAACGT-3') 进行 PCR 扩增, PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 热激转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 得到的重组子送至上海生工生物工程技术有限公司测序。

根据所测得的核苷酸序列, 利用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 分析核苷酸和氨基酸的相似性; 利用 DNASTar 软件进行多重比较及进化分析; 采用 ExPASy 的 ProtParam Tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 分析理化性质; 通过 ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>) 系统中的软件在线预测其基序 (motif) 位点; 用 Signal P3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行蛋白质序列中信号肽的预测分析。

### 1.3 原核表达载体的构建及其表达分析

以重组质粒 pMD18-GalUR 为模板, 以 5'-ATGGATCCATGGAAATTAGGACCCACCA-3' (下划线为引入酶切位点 *Bam* H I) 与 5'-AAATCACAAAATGAAACGTCGACGC-3' (下划线为引入酶切位点 *Sal* I) 为引物进行 PCR 扩增, 回收目的片段, 双酶切后与载体 pET-32a (+) 连接, 转入 *E. coli* BL21 感受态细胞, 获得重组质粒 pET-32a (+)-*GalUR*, 经鉴定后的转化菌液用于下列的诱导试验。

pET-32a(+)-*GalUR* 菌液分别加入 IPTG, 使终浓度分别为 0、0.01、0.05、0.1、0.3 和 0.5 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , 在 37  $^{\circ}$ C 条件下诱导表达, 在不同时间 (0、1、2、3、4、5、6、7 和 8 h) 分别取样。离心获得的菌体经 10% 菌液体积的 1  $\times$  SDS 上样 buffer 处理后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 以检测 *GalUR* 重组蛋白的最适表达条件。

为了分析不同温度下 *GalUR*-His 蛋白的可溶性, 分别在 14、21、28、37 和 42  $^{\circ}$ C, 0.1 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  IPTG 条件下诱导表达 5 h, 收集菌体, 加入菌液体积 10% 的 Lysis buffer (50 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  Tris-Cl (pH 8.0)、2 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  EDTA  $\cdot$  Na $_2$ 、1 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  DTT、200 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  NaCl、10% 甘油和 0.5% Triton X-100) 重悬菌体, 加入溶菌酶 (终浓度为 1 mg  $\cdot$  mL $^{-1}$ ) 后, 冰上静置 30 min, 用超声破碎仪进行破碎, 离心后分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。

### 1.4 重组蛋白的纯化

收集 0.1 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  IPTG、28  $^{\circ}$ C 条件下诱导 5 h 的菌体, 用 Lysis buffer 重悬, 超声破碎后收集上清液, 经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后, 利用 AKTA 纯化系统通过 HisTrap 10 mL chelating HP 柱对目的蛋白进行镍离子亲和层析纯化。纯化目的重组蛋白利用 SDS-PAGE 检测纯化蛋白大小, -70  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.5 多克隆抗体制备、Western blot 检测及其不同组织蛋白的表达

0.1 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$  IPTG, 28  $^{\circ}$ C 下诱导 5 h 后, 收集重组菌液的包涵体, 利用 1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  盐酸胍反复洗涤以去除杂蛋白; 然后溶于 1 mL 9 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  尿素溶液 (含 0.1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  DTT) 并进行 SDS-PAGE 电泳; 电泳结束后凝胶在预冷的 0.25 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  KCl 溶液中显色 5 min, 蛋白条带呈现乳白色, 准确切下 *GalUR*-His 蛋白条带, 液氮中研碎即可作为抗原免疫家兔。每周免疫 1 次, 共 5 次。首次免疫时将抗原与完全弗氏佐剂 (CFA) 等体积混合乳化后在家兔背、腹部皮下多点注射, 之后 4 次将抗原与不完全弗氏佐剂 (IFA) 等体积充分混合乳化后进行注射。在第 5 次免疫后的第 7 天, 对免疫兔进行颈动脉取血, 血样 4  $^{\circ}$ C 静置过夜, 5 000  $\times$  g 离心 10 min, 分离血清, -70  $^{\circ}$ C 保存备用。

猕猴桃不同组织总蛋白的提取依据丁坤善等 (2005) 的方法加以改进。用 Bradford 法进行蛋白质定量 (Bradford, 1975)。

Western blot 试验中的封闭液、TBS 和 TTBS 洗涤液按《精编分子生物学实验指南》(第四版)

(奥斯伯 等, 2005) 配制。将纯化的重组蛋白 GalUR-His、猕猴桃不同组织蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后转膜, 在含 5% 脱脂奶粉的封闭液中过夜, 以 1:2 000 稀释的 GalUR-His 重组蛋白免疫兔抗血清为一抗, 以 1:2 000 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体为二抗, 用 NBT/BCIP 显色试剂盒显色, 进行 Western blot 分析。

### 1.6 *GalUR* 的定量表达分析

提取总 RNA 后, 利用 Primescript™ RT reagent Kit (TaKaRa) 反转录, 实时荧光定量 PCR 分析 *GalUR* 在不同组织中的表达水平。PCR 仪为 BIORAD 公司 IQ5 型, 反应试剂为 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa)。循环以 *Actin* 为内参基因, 不同样品得到的数据经内参基因均一化处理后, 通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算出待测基因相对表达量。*GalUR* 引物为 5'-GATGCCGGACCTGGAAACT-3' (正义) 和 5'-ACTTGATGATGCCGAGATGG-3' (反义), *Actin* 引物为 5'-GCTTACAGAGGCACCACTCAACC-3' (正义) 和 5'-CCGGAATCCAGCACAAATACCAG-3' (反义)。

### 1.7 AsA 和 DHA 含量的测定

参考 Kampfenkel 等 (1995) 的  $Fe^{3+}$  还原法。

### 1.8 AsA 合成前体饲喂

参考 Hancock 等 (2003) 的方法。猕猴桃果肉 (1 cm × 1 cm × 0.5 cm) 或叶片 (1 cm × 1 cm) 用蒸馏水冲洗干净后, 放入含有 400 mmol · L<sup>-1</sup> 甘露醇, 5 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol · L<sup>-1</sup> KCl, 1 mmol · L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 和 1 mmol · L<sup>-1</sup> CaSO<sub>4</sub> pH 5.5 的 20 mmol · L<sup>-1</sup> MES 缓冲液中 (样品完全浸没为好), 在 100 r · min<sup>-1</sup>、27 °C 的摇床中预培养 1 h 后, 加入 L-半乳糖酸-1,4-内酯 (L-galactono-1,4-lactone, L-GL, AsA 直接前体物)、L-半乳糖 (L-galactose, L-Gal, L-半乳糖途径前体物, 脱氢生成 L-GL)、D-GalUA 和 D-葡萄糖醛酸 (D-glucuronic acid, D-GluA, D-GalUA 前体物), 使其浓度为 5 mmol · L<sup>-1</sup>, 以加相同浓度的蔗糖为对照。培养 24 h 后, 缓冲液冲洗, 液氮速冻终止反应, 存于 -70 °C 冰箱用于 AsA 含量的测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因片段的 PCR 扩增及序列分析

以草莓 *GalUR* 为模板, 对猕猴桃 EST 库进行 BLAST, 对其高度相似的 EST 序列进行拼接, 获得包含完全开放阅读框的 cDNA 序列, 以该序列设计引物, 以美味猕猴桃幼果 cDNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增得到一个约 1 000 bp 的片段, 回收纯化该片段与 pMD18-T 载体相连, 测序发现, 其与电子克隆序列相似性高达 99.2% (不同点可能与基因型有关)。该克隆的 cDNA 全长为 1 028 bp, 含有 990 bp 的完整开放阅读框, 编码 329 个氨基酸。在 GenBank 中 BLAST 发现与报道的草莓 (AY663110.1)、葡萄 (DQ843600.1) 等植物 *GalUR* 全长 cDNA 同源性分别为 71% 和 75%, 与登录猕猴桃 *GalUR2* 的同源性为 79%。说明克隆到的 cDNA 是目的基因, 在 GenBank 中登录号为 GU339035.1, 氨基酸登录号为 ADB85571.1, 命名为 *AdGalUR1*。

经预测发现, *AdGalUR1* 编码氨基酸理论等电点为 6.02, 分子量为 37 kD。经多重比较分析, *AdGalUR1* 编码氨基酸与其它植物上报道的 *GalUR* 存在高度的相似性 (图 1)。其氨基酸与草莓 (AY663110.1)、葡萄 (ABI26713.1)、蓖麻 (XP\_002520209) 的 *GalUR* 同源性分别为 62.9%、66.6% 和 51.7%, 与猕猴桃 *GalUR2* (ADB85574.1) 的部分氨基酸的同源性为 68.1%。该氨基酸序列中都

含有 4 个糖醛酸还原酶家族的 motif, 其中第 1 和第 3 个 motif 为糖醛酸还原酶家族的标识性 motif, 在不同的物种间存在高度的保守性 (图 1)。



图 1 不同植物 *GalUR* 基因编码氨基酸的多重比较分析

黑线区为预测的 4 个美味猕猴桃 *AdGalUR1* 糖醛酸还原酶 motif. ADB85571 为 *AdGalUR1*, ADB85574 为美味猕猴桃 *GalUR2* 的部分氨基酸序列; ABI26713 为葡萄 *GalUR*; AAT76306 为草莓 *GalUR*; XP\_002520209 为推断的蓖麻 *GalUR*。

Fig. 1 The multiple comparison of amino acid sequences of *GalUR* from various plant species

The regions marked with black lines are 4 predicted motifs of Aldo/keto reductase. ADB85571: *AdGalUR1*; ADB85574: *A. deliciosa GalUR2* partly;

ABI26713: *Vitis vinifera GalUR*; AAT76306: *Fragaria × ananassa GalUR*;

XP\_002520209: Putative *Ricinus communis GalUR*.

## 2.2 *AdGalUR1* 原核表达及融合蛋白的诱导表达

将原核表达载体 pET/*AdGalUR1* 转入 *E. coli* BL21, 在不同浓度的 IPTG 及温度诱导蛋白表达, 于不同时间取样。SDS-PAGE 电泳结果表明, 经 IPTG 诱导后, 获得了约 58 kD 的重组蛋白 (图 2), 且该重组蛋白在 28 °C、0.01 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 下诱导培养 4 h 表达量最高。可溶性分析表明, 该融合蛋白主要以包涵体的形式存在, 只有少量的可溶性蛋白, 且温度的变化无明显差异。SDS-PAGE 电泳检测经 AKTA 纯化系统纯化的融合蛋白 His-*AdGalUR1*, 其大小约为 58 kD (图 2)。

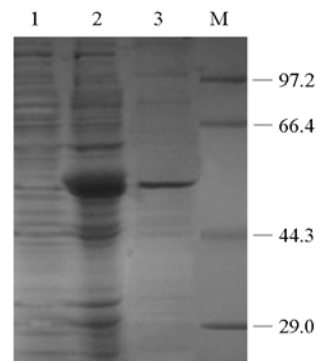


图 2 pET/*AdGalUR* 表达产物的纯化检测

1、2 分别为转化 pET/*AdGalUR* 未诱导和诱导的总蛋白; 3: 纯化的目的蛋白; M: 蛋白分子标准。

Fig. 2 Detection of purified products of the expressed products pET/*AdGalUR*

1, 2: Total proteins of *E. coli* BL21 transformed by pET/*AdGalUR* uninduced or induced, respectively; 3: Purified target fusion protein; M: Protein molecular weight standard.

### 2.3 多克隆抗体的 Western 杂交鉴定及其不同组织蛋白的表达

采用切胶法, 利用包涵体 His-AdGalUR1 免疫成年家兔, 制备多克隆抗体。以制备的多克隆抗血清为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体为二抗, 对重组 His-AdGalUR1 融合蛋白进行 Western 杂交, 结果表明在约 58 kD 处有特异性条带, 说明制备的抗血清与 AdGalUR1 识别反应良好。

如图 3 所示, 对猕猴桃不同组织中 AdGalUR 蛋白的 Western 杂交发现, 在预测的 AdGalUR 蛋白质分子量处有 1 条特异条带, 大小约为 37 kD, 表明制备的多克隆抗体能够识别猕猴桃体内的抗原。根据 Western 杂交分析显示, 在成熟叶片中, AdGalUR1 蛋白的表达量最高, 其次是叶柄和幼叶; 在成熟果中表达量最低, 幼果与韧皮部的 AdGalUR1 蛋白表达量没有明显差异, 都比较弱。

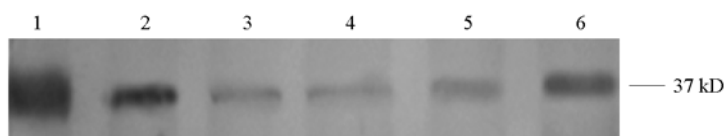


图 3 猕猴桃不同组织 AdGalUR1 基因表达的融合蛋白的 Western blot 分析

1. 成熟叶; 2. 幼叶; 3. 幼果; 4. 成熟果; 5. 韧皮部; 6. 叶柄。

Fig. 3 Western blot analysis among different tissues in kiwifruit

1. Mature leaf; 2. Young leaf; 3. Young fruit; 4. Mature fruit;  
5. Phloem; 6. Leaf petiole.

### 2.4 在猕猴桃果实发育过程及其不同组织中 AdGalUR1 mRNA 相对表达量及其 AsA 含量的变化

由图 4, A 可看出, 在猕猴桃果实的生长发育过程中, AdGalUR1 mRNA 相对表达水平在花后开始显著的增加, 在花后 30 d 达到最高峰, 之后开始显著的下降, 花后 45 d 果实的表达量略高于 0 d; 之后下降幅度明显减少, 在花后 75 d 降到至成熟基本无明显变化。

猕猴桃不同组织间 AdGalUR1 基因的相对表达量变化趋势相似其蛋白, 在成熟叶中的转录水平最高, 是表达量最低果柄中的 15.5 倍, 但与叶柄的差异不显著, 按表达量从高到底依次是成熟叶、幼果、成熟果、韧皮部、幼叶和果柄 (图 4, B)。

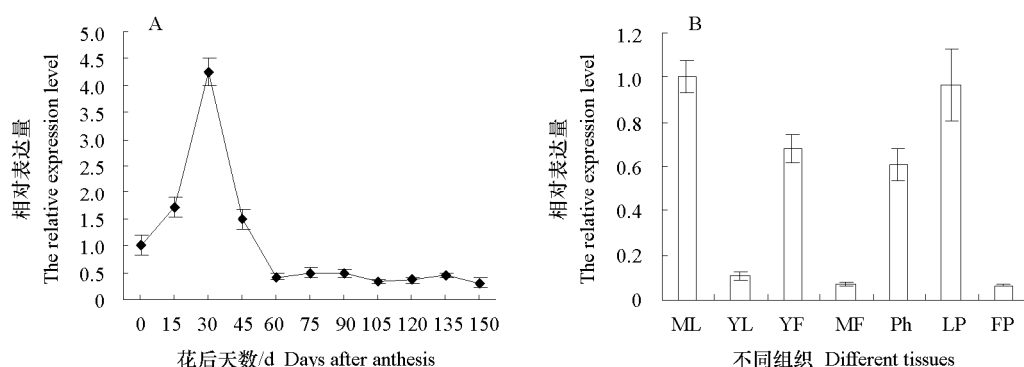


图 4 猕猴桃果实生长发育过程中 (A) 及其不同组织中 (B) AdGalUR1 基因 mRNA 相对表达量的变化

ML: 成熟叶; YL: 幼叶; YF: 幼果; MF: 成熟果; Ph: 韧皮部; LP: 叶柄; FP: 果柄。

Fig. 4 Changes of the mRNA relative expression level of AdGalUR1 during development of kiwi fruits (A) as well as among different tissues (B)

ML: Mature leaf; YL: Young leaf; YF: Young fruit; MF: Mature fruit;  
Ph: Phloem; LP: Leaf petiole; FP: Fruit petiole.

由图 5 可看出，在猕猴桃不同组织中，成熟叶中的总 AsA 和 AsA 含量明显高于其它组织，其总 AsA 含量是幼果的 1.5 倍；幼果中的总 AsA 和 AsA 含量均高于幼叶。

表示 AsA 氧化还原程度的 AsA/DHA (DHA 含量 = 总 AsA 含量 - AsA 含量)比值叶片显著高于果实，幼叶与成熟叶之间没有明显差别（数据略）。

果柄的总 AsA、AsA 和 DHA 含量高于叶柄、韧皮部，其中叶柄最低，但三者的 AsA 氧化程度差异不大（数据略）。

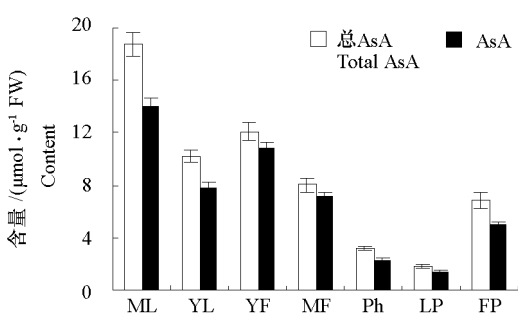


图 5 猕猴桃不同组织中 AsA 含量的变化  
ML: 成熟叶; YL: 幼叶; YF: 幼果; MF: 成熟果; Ph: 韧皮部; LP: 叶柄; FP: 果柄。

Fig. 5 Changes of AsA level among different tissues of kiwi  
ML: Mature leaf; YL: Young leaf; YF: Young fruit; MF: Mature fruit; Ph: Phloem; LP: Leaf petiole; FP: Fruit petiole.

### 2.5 D - 半乳糖醛酸 (D-GalUA) 离体饲喂对猕猴桃果实 AsA 含量的影响

为了分析猕猴桃经 D - 半乳糖醛酸途径合成 AsA 的能力，参与该途径前体物 D-GluA 和 D-GalUA、及 L - 半乳糖途径前体物 L-Gal 和植物 AsA 合成的最后一步前体物 L-GL 分别用于饲喂果肉组织及成熟叶片。从表 1 可看出，与对照相比，L-GL 和 L-Gal 能引起猕猴桃果肉总 AsA 含量的显著上升。在不同发育时期，花后 30 d 幼果中总 AsA 增加幅度增大，分别为 68.9%和 61.9%。成熟果的增加幅度最低，二者均不足 20%。但 D-GluA 饲喂无显著的影响，D-GalUA 饲喂仅使花后 30 d 幼果总 AsA 含量增加了 10%左右。对于叶片来说，L-Gal 和 L-GL 饲喂也引起总 AsA 含量的显著增加，与对照相比增加幅度均在 1 倍以上，而 D-GluA 和 D-GalUA 对 AsA 含量的影响幅度较小。这些结果表明 L - 半乳糖途径是猕猴桃果实 AsA 合成的主要途径，而经 D-GluA 合成 AsA 的能力很弱。

表 1 不同前体物饲喂美味猕猴桃花后不同发育阶段的果肉及成熟叶片对其总 AsA 含量的影响  
Table 1 Effects of possible precursors for AsA biosynthesis on total AsA content in mature leaves and flesh of fruits at different developmental stages / (μmol · g<sup>-1</sup> FW)

前体物 Precursor	30 d	75 d	125 d	成熟叶 Mature leaf
对照 Control	7.98 ± 0.16d	4.52 ± 0.36b	4.19 ± 0.28b	4.33 ± 0.18c
L-GL	13.48 ± 0.23a	6.17 ± 0.48a	4.93 ± 0.22a	8.72 ± 0.49a
L-Gal	12.92 ± 0.32a	5.86 ± 0.47a	4.96 ± 0.24a	8.63 ± 0.67a
D-GalUA	8.95 ± 0.51bc	4.82 ± 0.38b	4.26 ± 0.30b	4.95 ± 0.36b
D-GluA	8.25 ± 0.27c	4.70 ± 0.22b	4.24 ± 0.18b	4.63 ± 0.44bc

注:  $n = 4$ ，同列数据后不同的字母表示显著水平  $P < 0.05$ 。  
Note: The data are means of 4 replicates ± SD. Different letters within the same column indicate significant difference at  $P < 0.05$  by Duncan's test.

### 3 讨论

GalUR 是催化 D - 半乳糖醛酸还原生成 L - 半乳糖酸的酶(L - 半乳糖酸再经 L-GL 合成 AsA)。该基因于 2003 年第一次在草莓中得以鉴定，是糖醛酸途径合成 AsA 的重要依据。本试验中从猕猴桃果实中克隆的 *AdGalUR1* 基因 cDNA 序列含 990 bp 的完整 ORF，与草莓 (AY663110.1) (Aguis et al., 2003)，葡萄 (DQ843600.1) (Cruz-Rus et al., 2010) 报道的 *GalUR* 基因 cDNA 相似性均在 70% 以上，与其编码氨基酸的相似性均在 60% 以上。*AdGalUR1* 编码 329 个氨基酸残基，与其它物种同源基因的大小相一致。该编码氨基酸具有 GalUR 的基本特性 (Aguis et al., 2003)，即包含了 4 个糖醛酸还原酶基因家族的 motif 及其 NADP 结合位点，不存在信号肽和跨膜区，为胞质性蛋白。

*AdGalUR1* 在大肠杆菌中异源表达, 能诱导表达出与预测大小相似的蛋白质。这些结果表明所克隆的 cDNA 即为猕猴桃的 *AdGalUR1* 基因全长 cDNA 序列。对植物可溶性总蛋白进行 Western 杂交发现, 在猕猴桃内 GalUR 蛋白的大小约为 37 kD, 与原核表达和预测的大小相一致。这说明 *AdGalUR* 编码蛋白在猕猴桃中以单体的形式存在。同时, 如图 1 所示, 不同物种间 *GalUR* 基因却存在较大的变异, 这可能与它的功能有关。草莓基因组中存在 3 种同源的糖醛酸还原酶基因, 但只有 AY663110 具有 GalUR 活性, 参与了草莓 AsA 的合成 (Aguis et al., 2003)。在猕猴桃基因组中也存在 3 种与 *GalUR* 高度同源基因, 本试验中克隆的 *AdGalUR1* 与草莓和葡萄中证实的 *GalUR* 同源性最高(图 1)。

生物合成是植物细胞 AsA 积累的主要原因 (Wheeler et al., 1998; Hancock & Viola, 2005; An et al., 2007), 猕猴桃果实中 AsA 含量也主要依赖于生物合成 (Bulley et al., 2009; 侯长明 等, 2009)。除主要的 L - 半乳糖途径外, 研究发现 D - 半乳糖醛酸途径可能是草莓 (Aguis et al., 2003) 和葡萄 (Cruz-Rus et al., 2010) 等植物果实 AsA 合成的主要途径。在猕猴桃叶片、果实及输导组织均能检测到 *GalUR* mRNA 及蛋白的表达, 且 D-GalUA 饲喂猕猴桃幼果和成熟叶片能引起 AsA 含量的明显增加, 这表明在猕猴桃体内可能存在经 D - 半乳糖醛酸途径合成 AsA 的能力。有趣的是: 在高 AsA 含量的猕猴桃幼果中有较高的 D-GalUA 转化生成 AsA 效率和 *GalUR* 表达, 且在猕猴桃果实发育过程及其不同组织中, *AdGalUR1* 的表达量与 AsA 含量也表现出高度的一致性。这似乎暗示着 *AdGalUR1* 可能对猕猴桃 AsA 含量起重要作用。但前体物饲喂发现, 相对于主要途径——L - 半乳糖途径中的关键前提物 L-Gal, 由 D-GalUA 生成 AsA 的效率很低。这表明猕猴桃果实和叶片主要通过 L - 半乳糖途径合成 AsA, 而不是 *GalUR* 参与的 D - 半乳糖醛酸途径。对苹果的研究中也发现, D - 半乳糖醛酸途径也不是苹果叶片 (Li et al., 2010) 和果实 (Li et al., 2008) AsA 合成的主要途径。然而, 在葡萄 (Cruz-Rus et al., 2010) 和草莓 (Aguis et al., 2003) 中仅 *GalUR* 表达与果实成熟期的 AsA 快速积累一致。这种不一致可能与不同的物种间 AsA 形成模式不同有关。

D - 半乳糖醛酸途径是单细胞藻 *Euglena gracilis* 中 AsA 的主要合成途径 (Ishikawa et al., 2008)。植物体内大部分 AsA 是由 D - 葡萄糖通过非倒位的 L - 半乳糖途径直接合成 (Wheeler et al., 1998; Hancock & Viola, 2005), 而 D - 半乳糖醛酸途径作为一种补救途径, 其 AsA 合成底物糖醛酸是细胞壁多糖降解物衍生而来的 (Di Matteo et al., 2010)。尽管如此, 在植物细胞中是它们直接转化成 AsA 还是激活了 AsA 其它合成途径和/或干扰了 AsA 的周转还没有得到证实。虽然 D - 半乳糖醛酸在植物细胞果胶主链中自然的发生, 但这种酯化只有当主链在高尔基体中形成后才能发生, 这就对在 AsA 生物合成中这种甲基酯化效率提出了质疑 (Hancock & Viola, 2005)。此外, 发现 D - 半乳糖醛酸、D - 葡萄糖醛酸、D - 甘露糖和 L - 半乳糖都是细胞壁多糖的合成前体, Davey 等 (1999) 认为细胞壁多糖的周转和 AsA 生物合成之间可能存在一定的结合点, *GalUR* 表达的改变可能通过改变多糖的周转影响 AsA 的积累。利用生化、分子和基因工程等技术进一步解释不同 AsA 生物合成途径之间及其与其它代谢之间的相互关系是必要的。

## References

- Agius F, Gonzlezolez-Lamonthe R, Caballero J L. 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology*, 21: 177 - 181.
- An H M, Fan W G, Chen L G, Asghar S, Liu Q L. 2007. Molecular characterisation and expression of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase and L-ascorbic acid accumulation during fruit development in *Rosa roxburghii*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82 (4): 627 - 635.
- Ausubel F M, Brent E, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. 2005. Short protocols in molecular biology. 4th. Ma Xue-jun, Shu Yue-long, trans. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 奥斯伯 F M, 布伦特 E, 金斯顿 R E, 穆尔 D D, 塞德曼 J G, 史密斯 J A, 斯特拉尔 K. 2005. 精编分子生物学实验指南. 4 版. 马学军,



舒跃龙, 译. 北京: 科学出版社.

- Bulley S M, Rassam M, Hoser D, Otto W, Schlünemann N, Wright M, MacRae E, Gleave A, Laing W. 2009. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *Journal of Experiment Botany*, 60: 765 – 778.
- Bradford M M. 1975. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.
- Chang S, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Report*, 11: 113 – 116.
- Cruz-Rus E, Botella M A, Valpuesta V, Gomez-Jimenez M C. 2010. Analysis of genes involved in L-ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries. *Journal of Plant Physiology*, 167: 739 – 748.
- Davey M W, Monatgu M V, Sanmatin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie I J J, Strain J J, Favell D, Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal Science of Food and Agriculture*, 80: 825 – 860.
- Davey M W, Gilot C, Persiau G, Ostergaard J, Han Y, Bauw G C, Van Montagu M C. 1999. Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture. *Plant Physiology*, 121: 535 – 543.
- Di Matteo A, Sacco A, Anacleria M, Pezzotti M, Delledonne M, Ferrarini A, Frusciante L, Barone A. 2010. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biology*, 10: 163.
- Ding Kun-shan, Zheng Cai-xia, Bao Ren-yan, Jiang Chun-ning. 2005. Improvement of two-dimensional gel electrophoresis of proteins from female cones of the female-sterile pinus *Tabulaeformis* Carr. *Chinese Bulletin of Botany*, 2: 190 – 197. (in Chinese)
- 丁坤善, 郑彩霞, 包仁艳, 姜春宁. 2005. 油松雌性不育系球果蛋白质双向电泳技术的建立. *植物学通报*, 2: 190 – 197.
- Hancock R D, McRae D, Haupt S, Viola R. 2003. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biology*, 3: 7.
- Hancock R D, Viola R. 2005. Biosynthesis and catabolism of L-ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 167 – 188.
- Hou Chang-ming, Li ming-jun, Ma Feng-wang, Liang Dong, Du Guo-rong. 2009. Changes of product accumulation and related enzyme activities in AsA metabolism during kiwifruit growth and development. *Acta Horticulturae Sinica*, 36: 1269 – 1276. (in Chinese)
- 侯长明, 李明军, 马锋旺, 梁东, 杜国荣. 2009. 猕猴桃果实发育过程中 AsA 代谢产物积累及相关酶活性的变化. *园艺学报*, 36: 1269 – 1276.
- Ishikawa T, Nishikawa H, Gao Y, Sawa Y, Shibata H, Yabuta Y, Maruta T, Shigeoka S. 2008. The pathway via D-galacturonate/L-galactonate is significant for ascorbate biosynthesis in *Euglena gracilis*: Identification and functional characterization of aldonolactonase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (45): 31133 – 31141.
- Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzè D. 1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 225: 165 – 167.
- Li M J, Ma F W, Zhang M, Pu F. 2008. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala.) . *Plant Science*, 174: 606 – 612.
- Li M, Ma F, Guo C, Liu J. 2010. Ascorbic acid formation and profiling of genes expressed in its synthesis and recycling in apple leaves of different ages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 216 – 224.
- Linster C L, Gomez T A, Christensen K C, Adler L N, Young B D, Brenner C, Clarke S G. 2007. *Arabidopsis* VTC2 encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *Journal of Biology Chemistry*, 26: 18879 – 18885.
- Loewus F A, Kelly S. 1961. Identity of L-ascorbic acid formed from D-glucose by the strawberry (*Fragaria*) . *Nature*, 191: 1059 – 1061.
- Loewus F A. 1963. Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry*, 2: 109 – 128.
- Wheeler G L, Mark A, Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393: 365 – 369.
- Zhang Wei-yu, Yang Jing-hui, Wang-Pruski G, Hodge M, Zhao Ya-ping, Liang Guo-lu. 2008. Cloning, construction and overexpression of *GalUR* for vitamin C. *Journal of Southwest University: Natural Science*, 2: 43 – 47. (in Chinese)
- 张伟玉, 杨静慧, Gefu Wang-Pruski, Mark Hodge, 赵亚萍, 梁国鲁. 2008. 不同转基因番茄 *GalUR* 的表达与 Vc 含量. *西南大学学报: 自然科学版*, 2: 43 – 47.