

# 欧李八氢番茄红素合成酶cDNA克隆、序列分析及在大肠杆菌中的功能表达

张建成, 王鹏飞, 杜俊杰\*, 刘 和\*, 薛晓芳, 穆晓鹏

(山西农业大学园艺学院, 山西太谷 030801)

克隆和分析欧李 [*Cerasus humilis* (Bge.) Sok.] 果实八氢番茄红素合成酶 (phytoene synthase, PSY) 基因, 并利用大肠杆菌异源表达体系对其功能进行研究, 以期阐明欧李果实中类胡萝卜素合成和积累的分子机制提供依据, 也为今后开展欧李果实类胡萝卜素代谢调控奠定基础。

‘欧李 4 号’成熟果实采自山西农业大学园艺研究所。采收后液氮速冻, -75℃保存备用。根据 GenBank 上已登录的植物 PSY 同源基因的保守序列设计简并引物, 通过 RT-PCR 扩增欧李 PSY cDNA 特异片段, 再利用 RACE 技术获得全长序列, 并对该序列进行生物信息学分析。构建欧李 PSY 基因原核表达载体 pET-*ChPSY*, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 诱导表达, 通过 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。将重组质粒 pET-*ChPSY* 转入可以合成和积累  $\beta$ -胡萝卜素的工程大肠杆菌诱导表达, 利用 HPLC 分析工程菌株中  $\beta$ -胡萝卜素含量的变化, 从而鉴定欧李果实 PSY 蛋白的功能特性。

获得的欧李 PSY cDNA 序列全长 1 559 bp (包括 polyA 尾上连续的 12 个碱基 A), 包含 1 194 bp 的完整开放读码框, 编码 398 个氨基酸, 5'端有 195 bp 的非编码区 (5'UTR), 3'端含 170 bp 的非编码序列, 因此将其命名为 *ChPSY*。核苷酸 Blast 比较发现, 该基因的 cDNA 序列与柑橘、番茄、拟南芥、草莓、梅等植物 *psy* 的同源性在 70.0% 以上。该序列完整的开放读码框推导的氨基酸序列与草莓、拟南芥、柑橘、番茄和向日葵等同源性分别为 92.3%、77.2%、75.7%、68.5% 和 68.0%。ChloroP 1.1 Server 预测发现, 欧李 PSY 蛋白 N 末端存在一段由第 1 ~ 55 位氨基酸组成的转运肽信号序列, 信号肽酶在 Arg<sup>55</sup> ~ Ser<sup>56</sup> 剪切前肽原产生 39.0 kD 的成熟欧李 PSY 蛋白。TmPred 分析表明, 成熟欧李 PSY 蛋白在 219 ~ 240 氨基酸处有 1 个跨膜区, 表明欧李 PSY 蛋白是一个 N 端向内, C 端向外的跨膜结合蛋白。

该基因在大肠杆菌中能够表达一条约 45.8 kD 的特异蛋白, 与预测的含有六联组氨酸标签的融合蛋白的分子量大小相吻合。将重组质粒 pET-*ChPSY* 转入可以合成和积累  $\beta$ -胡萝卜素的工程大肠杆菌诱导表达, 结果表明, 当欧李 *ChPSY* 在工程菌株中表达时, 工程菌株的表型由亮黄色转变为橙黄色, 而空白对照菌株的表型未发生变化。HPLC 分析表明, 欧李 *ChPSY* 表达的工程菌株中  $\beta$ -胡萝卜素含量较空白对照菌株中增加了 1.38 倍, 表明欧李 *ChPSY* 可编码一个具有催化活性的功能蛋白, 促进工程菌株中  $\beta$ -胡萝卜素的合成和积累。

**关键词:** 欧李; 八氢番茄红素合成酶; 基因; 克隆; 功能表达

**中图分类号:** S 662.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) S-2478-01

**收稿日期:** 2011-06-27

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20101403120006); 山西农业大学引进人才科研启动项目 (XB2010018); 山西农业大学大学生科技创新项目 (9-031)

\* 通信作者 (E-mail: dj738@163.com; liuhe818@yahoo.com.cn)