

doi:10.7668/hbxb.2014.S1.002

芒果 *ANS* 基因的克隆及其序列分析

赵志常, 陈业渊, 高爱平, 黄建峰, 党志国, 罗睿雄, 张波

(中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点开发实验室, 海南 儋州 571737)

摘要: 为了研究芒果果实中 *ANS* 基因的功能。利用同源克隆方法从芒果果实中克隆得到了一个 *ANS* 基因, 该基因的 cDNA 长度为 1 252 bp, 开放阅读框的长度为 1 056 bp, 编码 351 个氨基酸。通过系统发育分析, 发现该基因编码的蛋白与荔枝、葡萄、可可豆、桑树等聚在一类。通过序列对比分析表明, 已经成功得到芒果 *ANS* 基因, 并对其生物信息进行了分析, 为下一步芒果 *ANS* 基因的功能研究打下了基础。

关键词: 芒果; *ANS*; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q78; S667.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)增刊-0006-04

Cloning and Sequence Analysis of *ANS* Gene from Mango

ZHAO Zhi-chang, CHEN Ye-yuan, GAO Ai-ping, HUANG Jian-feng,
DANG Zhi-guo, LUO Rui-xiong, ZHANG Bo

(Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Danzhou 571737, China)

Abstract: In order to study the function of *ANS* gene in mango fruit, a *ANS* gene was cloned from litchi pericarp by homologous cloning method. The open reading frame was 1 056 bp, and encoding 351 amino acids. The 1 252 bp length fragment was amplified from genome and analysis. It was found that the gene encoding for the protein had close relationship with mountain grape, cocoa, mulberry, and other fruit trees through phylogenetic analysis.

Key words: Mango; *ANS*; Gene cloning; Sequence analysis

芒果 (*Mangifera indica* Linn) 为漆树科 (Anacardiaceae) 芒果属热带常绿果树, 原产印度及马来西亚等地区。芒果在印度栽培历史最久, 产量最多, 占世界产量的 80%。现世界有 70 多个国家生产芒果, 90% 集中在亚洲的印度、巴基斯坦、孟加拉、缅甸、马来西亚等国; 在非洲的东部和西部, 坦桑尼亚、扎伊尔, 美洲的巴西、墨西哥, 美国的佛罗里达州和夏威夷州等均有栽培。我国的台湾, 广东、广西、海南和福建南部, 云南南部、东南部、西南部以及四川攀枝花地区均有芒果种植^[1]。芒果营养价值丰富, 果肉含维生素 C 0.564 ~ 1.375 mg/g, 有的可高达 189 mg/g; 含糖量 14% ~ 16%; 种子中含蛋白质 5.6%; 脂肪 16.1%; 碳水化合物 69.3%, 其中含有的维生素 A 的前体胡萝卜素成分特别高, 是所有水果中少见的。

芒果果实味道甜美, 以其独特风味的深受大家

的欢迎。芒果果实具有理气、止咳、健脾、益胃、止呕等功效。成熟的芒果在医药上可作缓泻剂和利尿剂, 种子则可作杀虫剂和收敛剂。芒果具有降低胆固醇的作用, 常食芒果有利于防治心血管疾病, 对皮肤润泽也有一定的作用, 是女士们的美容佳果。研究人员对芒果中的多酚进行了分析发现, 女性多食芒果, 有预防乳腺癌的作用, 特别是其中的生物活性成分丹宁的作用^[2]。研究表明, 芒果中的多酚可以打破细胞分裂周期, 这可能是芒果预防或抑制癌细胞的一种机制。

芒果果实色泽丰富, 具有绿色、黄色、橙色、黄绿色、黄色中带红晕和红色等色泽表现。芒果果实着色主要参与了类胡萝卜素和花色苷代谢, 而花色苷的含量在决定植物的花色、叶色、果色和其他经济器官的色泽及其营养品质方面起着重要作用。花色苷合成过程是一个非常复杂的代谢过程, 花青素合成

收稿日期: 2014-10-12

基金项目: 非营利性科研机构改革启动经费 (CATAS, PZS-201225; CATAS-TCGRI, 1630032013003); 国家自然科学基金资助项目 (31471850)

作者简介: 赵志常 (1977-), 男, 山东烟台人, 副研究员, 博士, 主要从事热带果树遗传育种与分子生物学研究。

酶(Anthocyanidin synthase, ANS)是位于花色苷合成通路末端的酶,通过 Fe^{2+} 和2-酮戊二酸离子将无色花青素氧化生成花青素苷^[3]。在已经报道的多种植物中,ANS基因被认为由一个小基因家族所编码,编码ANS的基因已在紫苏(*Perilla frutescens*)、山药(*Dioscorea* spp.)、荔枝(*Litchi chinensis*)龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)等^[4-5]植物中克隆到,而对芒果中的ANS基因未见报道。本研究以芒果的果实为材料对其ANS基因进行了克隆及其分析,希望能给芒果果实着色的机理研究提供一定的参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

以贵妃芒果的不同发育时期的果实为试材,大肠杆菌BL21、DH5 α 为本试验保存,引物合成自上海生物工程技术有限公司,dNTP、DEPC、Amp、IPTG、X-Gal、*Taq* DNA聚合酶、 T_4 DNA连接酶、各种限制性内切酶、pMD-19T载体均购置于大连宝生物公司。

1.2 芒果总RNA的提取

芒果果实RNA的提取参照杜中军等^[6]。将提取的总RNA沉淀溶解于20~50 μL 的DEPC水中,迅速放入到-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。总RNA的完整性评价:取5 μL 总RNA在1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。RNA的纯度分析和浓度测定:取1 μL 总RNA溶液用DEPC水稀释至100 μL ,置于紫外核酸蛋白检测仪上测定其在260,280,320 nm的光吸收值并计算260nm/280nm比值。当 $\text{OD}_{260/280}$ 的比值介于1.80~2.00时,总RNA样品浓度按下列公式计算:RNA浓度 = $\text{OD}_{260} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 100$ 。经过上述的检测总RNA样品用于下一步试验。

1.3 ANS基因全长cDNA序列的获得

以贵妃芒果的果实总RNA作为模板,采用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)反转录合成第一链cDNA,并参照该试剂盒的说明书进行cDNA 3'端和5'末端cDNA的扩增。根据cDNA片段的测序结果,分别设计2条上游引物,以接头为锚定引物进行半巢式PCR反应。将3'端和5'末端的PCR反应产物,用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,确定所得到的片段大小是否与预测的片段大小一致。目的基因片段回收、连接、转化、鉴定及测序,并根据已知的片段和得到的cDNA 3'端和5'末端的序列结果拼接该基因的全长cDNA。以上述cDNA和提取的基因组DNA为模板,设计特异引物,进行全长cDNA的扩增反应,PCR反应体系25 μL ,从中取6 μL PCR产物加入0.2 μL PCR管中,加入

1 μL 的6 \times Loading Buffer,用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,扩增的片段大小是否正确。在得到确定PCR产物中含有所需大小的目的片段一致后,对PCR产物进行普通琼脂糖凝胶电泳,用手术刀在紫外灯下切下含有目的片段胶块,再用DNA凝胶回收试剂盒(Agarose Gel DNA Purification Kit, TaKaRa)进行目的片段的回收,回收方法具体的操作过程参照试剂盒说明书上的步骤进行。取5 μL 回收纯化后的目的DNA产物进行1.2%琼脂糖电泳检测,以检验回收效果及大致含量。并连根据回收产物片段大小及其有效浓度,取适量回收纯化的产物与克隆载体pMD19-T(TaKaRa)连接,目的DNA与克隆载体的摩尔比控制在3:1左右。反应混合液包括1 μL pMD19-T vector、4 μL 纯化后的DNA、5 μL Ligation solution I,混合均匀后在16 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温水浴过夜连接。

1.4 ANS基因全长cDNA及其氨基酸序列的结构特征和分子进化的分析

将所得中间目的片段cDNA序列在线Blast分析,确认目的基因,并根据扩增得到的全长得序列进行NCBI序列比对,确定该基因是否ANS基因,采用DNAMAN软件分析基因核苷酸和氨基酸的结构特征和同源性;并分析该基因所推定氨基酸序列进行多序列比较并构建系统树。

2 结果与分析

2.1 ANS基因的获得

根据NCBI已经登录的ANS基因的序列,设计兼并引物,扩增目的片段,采用巢式PCR扩增策略,扩增ANS基因的3'端和5'端核苷酸序列,根据得到的3'端和5'端序列信息进行拼接,最后得到了ANS基因的全长cDNA序列。设计特异引物进行全长cDNA序列的扩增。PCR反应体系20 μL ,含2 μL 10 \times PCR Buffer、1.6 μL 2.5 mmol/L dNTP、1 μL 20 mmol/L引物1、1 μL 20 mmol/L引物2、0.4 μL 2.5 U/ μL *Taq* 酶、2 μL 模板DNA、12 μL ddH₂O。反应扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸100 s,30个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸3 min。最后得到ANS基因的cDNA全长序列为1 252 bp,分析发现开放阅读框为1 056 bp,编码351个氨基酸序列(图1,2)。

2.2 ANS基因的氨基酸序列的分子进化的分析

根据NCBI上已经登录的部分物种的ANS蛋白的序列,选取葡萄(*Vitis vinifera*)、荔枝(*litchi chinensis*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的蛋白序列进行

MVTSVVRVRESLSSSGIQAIKPEYVVRPQELTSGNVFEEKKEEGPQVPTIDLKEIDAEDPV
VREKCREQLKKAAMDWGVMLHVNHGIPDELIERVKKAGEAFFELPLEEKEYANDQVSG
KIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLIFPEDKRDLSIWPKYPADYTVATSEYAKLLRGLAT
KIMAVLSIGLGLLEGRLEKEVGGIEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTFILH
NMVPLQLFYEGKWWTAKCVPNSIIMHIGDTIEILSNRKYKSILHRGLVNKEKVRISWAVF
CEPPKEKIVLKLPEVTVSETEPPLFPFRFTQQHIEHKLFRKAQKS

图1 ANS 基因翻译成的蛋白序列

Fig.1 Amino acid sequence of ANS gene

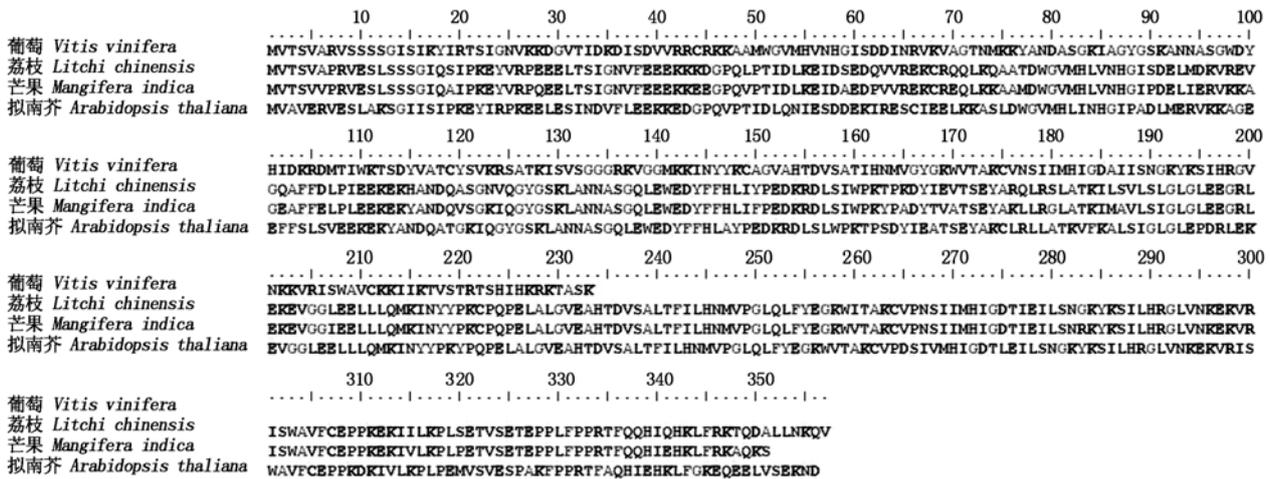


图2 几种 ANS 蛋白的序列比对

Fig.2 Sequence alignment of several ANS proteins

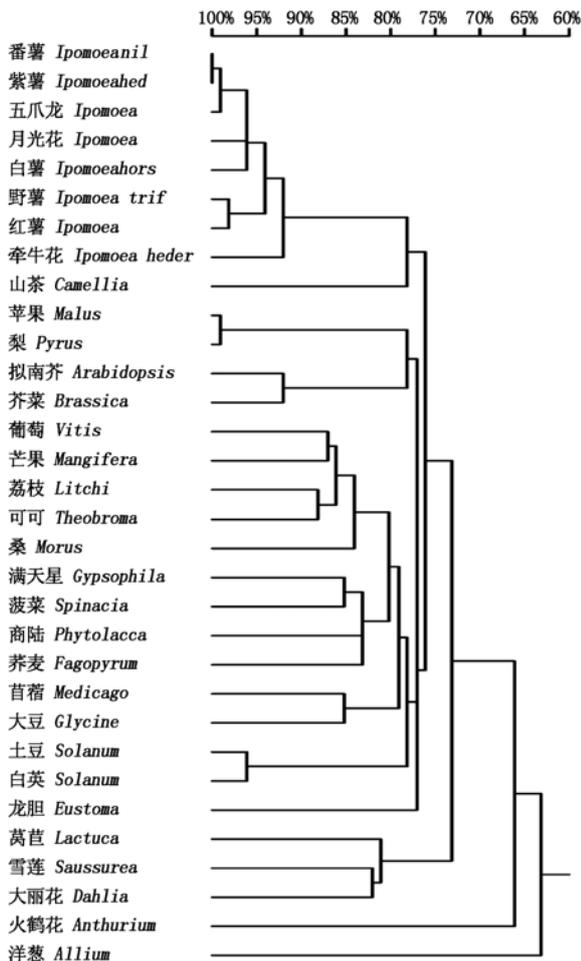


图3 部分基因的 ANS 蛋白序列的系统发育关系

Fig.3 Phylogenetic relationship of some ANS protein sequences

比对,结果表明,该蛋白为 ANS 蛋白序列(图2),含有 ANS 蛋白的结构域,推导的氨基酸序列含有 2-酮戊二酸-Fe²⁺-双加氧酶家族的保守结构域,其中包括与 2-酮戊二酸特异结合的精氨酸及与 Fe²⁺ 结合的保守组氨酸和天冬氨酸采用 DNAMAN 软件分析发现,芒果 ANS 蛋白与荔枝、葡萄、可可豆、桑树等可以聚在一类(图3)。

3 讨论

本研究成功地从芒果果实中分离得到了一个全长 ANS 基因,该基因的 cDNA 的开放阅读框为 1 056 bp,编码 351 个氨基酸。通过在线软件对 cDNA 和蛋白序列分析证实了该序列是植物 ANS 基因的一员,也发现其所推导的氨基酸序列含有 2-酮戊二酸-Fe²⁺-双加氧酶家族的保守结构域和 PcbC 功能域,而这些是双加氧酶催化活性中心具有的特征,而且该中心含有与 Fe²⁺ 结合所需的保守 His、Asp 及与 2-酮戊二酸特异结合的 Arg,这些都为植物双加氧酶家族基因保守结构域的典型特征,这些特征与双加氧酶家族的 F3H 及其他植物 ANS 和黄酮醇合成酶的催化活性中心特征具有一致^[4]。芒果 ANS 基因与所选其他物种 ANS 基因序列相比较发现,无论在全长 cDNA 序列上还是其编码氨基酸序列上都具有较高的保守的结构域。同时,通过与其他部分物种的氨基酸序列构建系统发生树发现,芒果 ANS 基因

编码的蛋白与荔枝、葡萄、可可等聚在一类。Lu 等^[7]认为,ANS 基因所编码氨基酸不能将被子植物和裸子植物、单双子叶植物及科间植物完全区分开,而在属和种的分类级别上可将植物完全区分。芒果 ANS 基因是芒果花色素苷合成代谢途径中的一个关键的基因,其对芒果果皮红色的形成具有重要的作用,而其对芒果果实着色的功能深入研究需要进一步的转基因植物表达的验证。

参考文献:

- [1] 许树培,陈业渊,高爱平. 海南芒果品种资源图谱(一) [M]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [2] 罗学兵. 芒果的营养价值、保健功能及食用方法[J]. 中国食物与营养,2011,17(7):77-79.
- [3] Xie D Y, Jackson L A, Cooper J D, *et al.* Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago truncatula* [J]. Plant Physiology, 2004, 134(3):979-994.
- [4] Rosati C, Cadic A, Duron M, *et al.* Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia × intermedia* reveals organ-specific expression during flower development [J]. Plant Science, 1999, 149(1):73-79.
- [5] Jaakola L, Määttä K, Pirttilä A M, *et al.* Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development [J]. Plant Physiology, 2002, 130(2):729-739.
- [6] 杜中军,徐兵强,黄俊生,等. 一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总 RNA 提取方法[J]. 植物生理学通讯,2005,41(2):202-204.
- [7] Lu Y, Rausher M D. Evolutionary rate variation in anthocyanin pathway genes [J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20(11):1844-1853.

欢迎订阅 2015 年《河南农业科学》

《河南农业科学》是河南省农业科学院主办的综合性农业科技期刊。多年来,深受省内外农业科技人员、农业院校师生等涉农读者的喜爱。本刊连续被评为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊、RCCSE 中国核心学术期刊(A-)和中国农业核心期刊。曾多次获得有关部门的奖励,被评为“全国优秀农业期刊”;连续荣获“河南省优秀科技期刊一等奖”、“河南省自然科学期刊综合质量检测一级期刊”,“河南省第一、二届自然科学二十佳期刊”。

栏目设置有:综述、作物栽培·遗传育种、农业资源与环境、植物保护、园艺·林学、畜牧·兽医、农产品加工·农业工程·农业信息技术。

本刊为月刊,国际标准 16 开本,160 页,彩色封面,每期定价 18.00 元,全年 216 元。各地邮局均可订阅,邮发代号:36-32。如错过订期,可直接与本刊编辑部联系订阅。

网址:<http://www.hnnykx.org.cn>

地址:郑州市花园路 116 号

E-mail:hnnykx@163.com

邮编:450002

电话:0371-65739041

传真:0371-65712747