

研究报告 Original Papers

山葡萄 UDP-葡萄糖:类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因(3GT) cDNA 的克隆和分析

刘海峰^{1,2}, 杨成君¹, 于森¹, 王军^{1,*}¹东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040; ²延边大学农学院, 吉林龙井 133400

摘要: 用 RT-PCR 和 SMART RACE 技术克隆了山葡萄 3GT 基因的全长 cDNA 序列。GenBank 登录号为 FJ169463, 3GT cDNA 全长 1 477 bp, 包括开放阅读框 1 371 bp, 编码 456 个氨基酸, 该基因表达产物相对分子质量为 50.19 kDa, 等电点为 5.98, 是不稳定蛋白。该基因属于 UGT 超基因家族, 不包含信号肽。氨基酸序列与欧亚种葡萄 (AB047098)、美洲种葡萄 (EF630356) 和拟南芥 (AY072325) 等植物的 3GT 氨基酸序列的同源性系数分别为 98%、97% 和 59%。

关键词: 山葡萄; cDNA 克隆; UDP-葡萄糖:类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶

cDNA Cloning and Analysis of UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (3GT) in *Vitis amurensis*LIU Hai-Feng^{1,2}, YANG Cheng-Jun¹, YU Miao¹, WANG Jun^{1,*}¹Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China

Abstract: The full-length cDNA sequences of 3GT genes in *Vitis amurensis* were cloned by the techniques of RT-PCR and SMART RACE. The landing GenBank No. is FJ169463 and the full-length of 3GT cDNA is 1 477 bp with open reading frame of 1 371 bp, which encodes 456 amino acids. The product of 3GT gene expression is unstable protein with the molecular mass of 50.19 kDa, isoelectric point of 5.98. The 3GT gene belongs to the UGT supergene family, not containing a signal peptide. The amino sequence of 3GT in *Vitis amurensis* has the homology with 3GT of *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca* and *Arabidopsis thaliana*, and the likeness coefficient is 98%, 97% and 59% respectively.

Key words: *Vitis amurensis*; cDNA cloning; UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase

糖基转移酶(glycosyltransferase, GT; EC 2.4.x.y)催化糖基转移反应,将糖基从活化的供体分子转移到受体分子上,是生物体内的生物转化反应之一。葡萄花色苷生物合成的过程中,UDP-葡萄糖-类黄酮3-O-葡萄糖基转移酶(3GT)催化UDP-葡萄糖的糖基取代花色素的3-OH基团,催化不稳定的花色素糖苷化形成各种花色苷(Boss等1996; Castellarin等2007a, b),对花色素进行糖基化修饰,以增加其稳定性和水溶性。3GT表达具有品种和时间特异性,在自然条件下,3GT只在红色葡萄转色期后的果皮中表达,在白色品种和果肉中不表达,转色期为上调表达,随着果实的成熟,表达加强(Boss等1996; Kobayashi等2001; Castellarin等2007a, b)。因此认为葡萄花色苷生物合成中的关键酶是UDP-葡萄糖-类黄酮3-O-葡萄糖基转移酶。

山葡萄原产于我国东北和俄罗斯远东地区,是我国特有的种质资源,其浆果含有大量的花色苷。

目前有关山葡萄分子生物学的研究较少,有必要对其花色苷生物合成途径中的关键酶进行研究。众多的研究已从玉米、矮牵牛、金鱼草、葡萄等多种植物中分离鉴定了3GT,但山葡萄中的3GT的研究尚未见报道。本文采用RT-PCR和SMART RACE技术从山葡萄果皮克隆了3GT的cDNA全长序列,同时对序列进行了生物信息学分析,为进一步研究山葡萄中3GT的生物学功能建立基础。

材料与方法

山葡萄品种‘双丰’(*Vitis amurensis* Rupr. cv. Shuang Feng)采自中国农业科学院特产研究所国家

收稿 2009-05-15 修定 2009-06-12

资助 黑龙江省留学归国人员科学基金(LC08C07)。

* 通讯作者(E-mail: junwang1966@yahoo.com.cn; Tel: 0451-82191829)。

山葡萄种质资源圃。在果实成熟期采摘, 采后立即置于液氮中冷冻, -80°C 冰箱保存, 取果皮作为供试材料。实验所用大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5- α 、pMD18-T载体、胶回收试剂盒和 Ex Taq 聚合酶购于 TaKaRa; 反转录酶 SuperScript II 购于 Invitrogen 公司; RACE 试剂盒购于 Clontech 公司。其他试剂为国产分析纯, DNA 测序由上海生工生物公司完成。

山葡萄果皮总 RNA 提取采用改良的 CTAB 法 (Li 等 2006)。根据 GenBank 中已报道的 3GT 基因的核苷酸序列和氨基酸序列, 通过多序列比对确定其共有的保守区, 利用 Primer 5.0 设计一对简并引物 VAm3GTs: 5' AC(g/A)CA(T/C)TC(A/T)TT(T/g)gg-(T/C)TTg 3', VAm3GTa: 5' CT(C/T)AT(T/g)AgCCC-(A/C)CT(C/T)TTTgT 3'。采用 SuperScript II 反转录酶合成 cDNA, 利用简并引物进行 PCR, 扩增目的基因片段。PCR 反应采用 50 μL 体系, 其中含 0.4 μL Taq DNA 聚合酶、 $1\times$ Taq 缓冲液、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP、60 ng 引物和 150~200 ng 模板 cDNA。扩增程序为 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, 53°C 1 min, 72°C 2 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 7 min。对目的基因片段进行纯化, 连接 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5- α 感受态细胞, 蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆测序。

用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 方法进行 RACE cDNA 扩增。根据保守区测序结果, 设计基因特异引物 GSP₁ (3'-RACE 引物): 5' TAgCTTTggCACCGTCACgACACC 3' 和 GSP₂ (5'-RACE 引物): 5' ATggAACCACCATTCcGTACCCTCTg 3', 两引物之间有重叠。除 5'-RACE 和 3'-RACE 退火温度均为 65°C 外, 反应体系, 扩增程序, 回收和转化方法同前。测序后应用 Vector NTI Suite 9.0 软件去除载体序列, 将 5'-RACE 和 3'-RACE 测序结果拼接获得 cDNA 全长。

应用 DNASTar 软件对获得的 3GT 全长 cDNA 序列进行开放阅读框(ORF)分析并将其推导为相应的氨基酸序列。蛋白质氨基酸相似性比对在 NCBI 的 BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp>) 中分析; 不同植物 GT 基因氨基酸序列的多序列比较应用 ClustalW 1.82 (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) 进行分析; 蛋白质的分子量、等电点及基本性质用 ProtParam (<http://au.expasy>

<http://tools.protparam.html>) 预测; 信号肽分析利用 SignalP 3.0 Server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Signalp>), 疏水性分析和二级结构预测分别在 (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 和 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html) 网站进行。

结果与讨论

1 RT-PCR 合成山葡萄 3GT 基因保守区的 cDNA

用改良的 CTAB 法提取山葡萄果皮中的总 RNA, RNA 质量较高。以总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板, 用 3GT 简并引物 VAm3GTs 和 VAm3GTa 进行 PCR 扩增, 获得了约 850 bp 的特异片段(图 1), 与预期片段大小相近。产物经连接转化和筛选测序后获得保守序列片段, 用 NCBI/BLAST 程序进行同源搜索, 结果与欧亚种葡萄(*Vitis vinifera*) 和美洲种葡萄(*Vitis labrusca*) 3GT 的相似性均为 98%。因此初步认定该片段为山葡萄 GT 基因的片段。

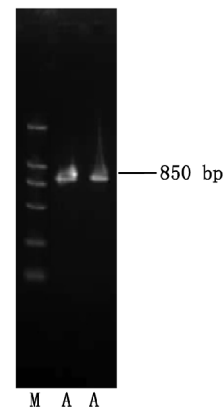


图1 山葡萄 3GT 基因的 cDNA 片段克隆
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of cDNA fragment of *Vitis amurensis* 3GT gene
M: DL2000; A: PCR 产物。

2 cDNA 全长序列克隆及生物信息学分析

参照 RACE 试剂盒说明, 以逆转录分别合成的 5'-RACE-Ready-cDNA 和 3'-RACE-Ready-cDNA 为模板, GSP 与 UPM 为引物, 分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增, 结果如图 2 所示。以 3'-RACE-Ready-cDNA 为模板, GSP₁ 与 UPM 为引物扩增得到约 800 bp 的条带。以 5'-RACE-Ready-cDNA 为模板, GSP₂

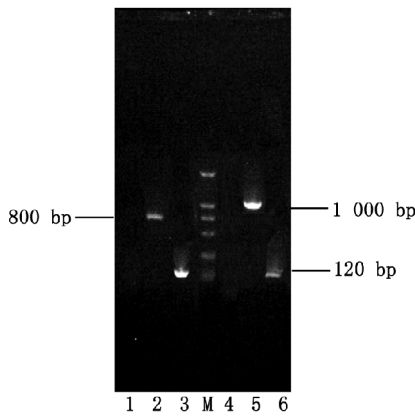


图2 3GT的 5'-RACE和 3'-RACE 扩增产物

Fig.2 The 5'-RACE and 3'-RACE product of 3GT cDNA

M: DL2000; 1: 3'-RACE 阴性对照; 2: 3'-RACE 产物; 3: 3'-RACE 阳性对照; 4: 5'-RACE 阴性对照; 5: 5'-RACE 产物; 6: 5'-RACE 阳性对照。

与 UPM 为引物扩增得到约 1 000 bp 的条带。阳性对照反应用 GSP₁ 和 GSP₂ 为引物分别扩增, 得到与预期大小相同的约 120 bp 的条带。阴性对照单引物扩增, 没有条带产生。

上述产物经回收后, 连接克隆载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌, 蓝白斑筛选, 随机挑取单菌落进行菌液 PCR, 鉴定为阳性克隆的送公司测序。将 5'-RACE 和 3'-RACE 测序结果应用 Vector NTI Suite 9.0 软件去除载体序列后拼接获得 cDNA 全长。应用 DNASTar 和 Protparam 程序对获得的新基因全长 cDNA 序列进行开放阅读框分析, 并将其推导为相应的氨基酸序列。结果显示, 该基因全长 1 477 bp, 包括开放阅读框 1 371 bp, 24 bp 5' 非转译区(5' UTR), 52 bp 的 3' 非转译区(3' UTR), 起始密码子

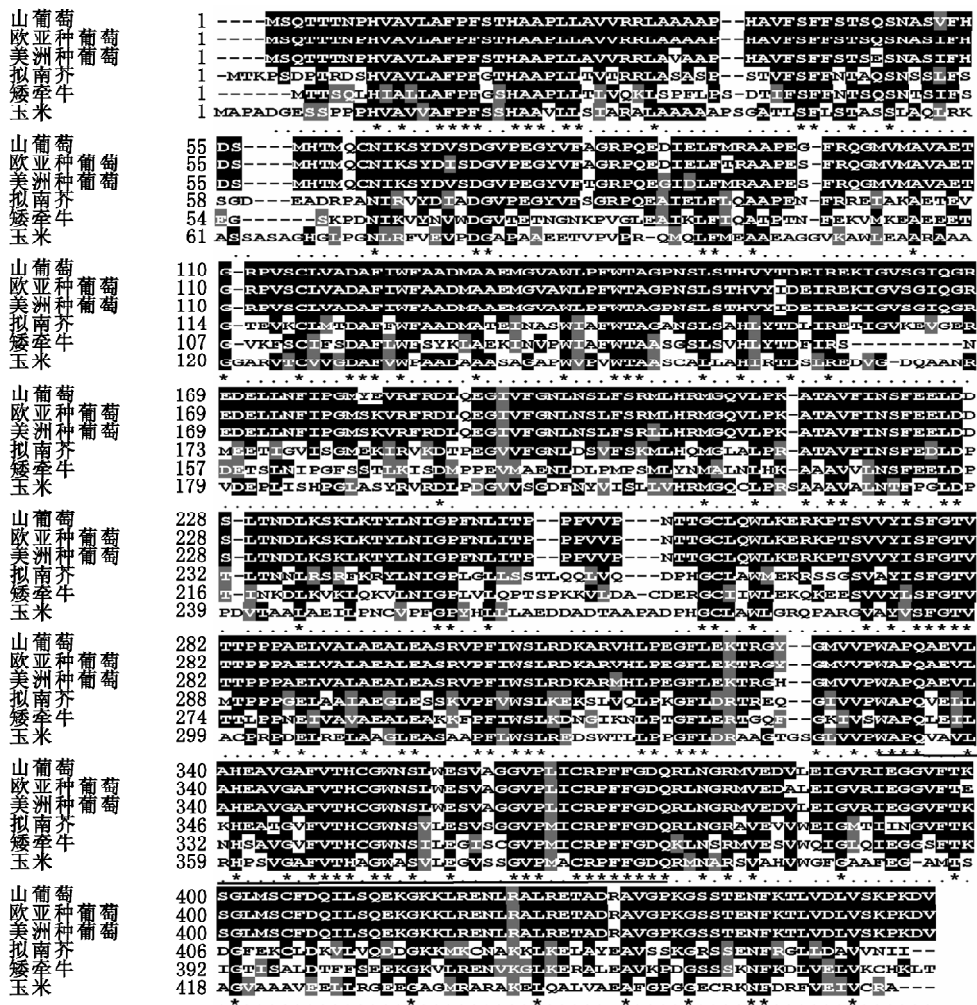


图3 3GTs 氨基酸序列的多序列比对

Fig.3 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of 3GTs

下划线为 3GTs 保守域。

ATG 位于 25~27 bp, 终止密码子 TAG 位于 1 393~1 395 bp。基因的开放阅读框编码 456 个氨基酸, 分子量为 50.19 kDa, 等电点为 5.98。负电荷残基 (Asp+Glu) 数为 49 个, 正电荷残基 (Arg+Lys) 数为 43 个。不稳定系数为 40.48, 为不稳定蛋白质。将该基因命名为 *VAm3GT*, GenBank 登录号为 FJ169463。

用 NCBI 的 BlastP, 在蛋白保守区数据库 (conserved domain database, CDD), 对山葡萄 *VAm3GT* 进行蛋白保守区预测, 结果表明与该基因匹配的蛋白保守区为 UGT 超基因家族, 从第 48 个氨基酸到第 435 个氨基酸, 共匹配 387 个氨基酸。

用推导的氨基酸序列与蛋白质数据库进行同源比较, 其氨基酸序列与欧亚种葡萄 (AB047098)、

美洲种葡萄 (EF630356)、拟南芥 (AY072325)、矮牵牛 (AB027454)、玉米 (X13501) 等植物的 *3GT* 氨基酸序列两两比对的相似性系数分别为 98%、97%、59%、51%、42%。多序列比对结果见图 3, 图中划线部分约 44 个氨基酸残基为糖基转移酶的保守域 PSPG (Yoshihara 等 2005), 该保守序列被认为是结合糖基供体的区域, 所以克隆到的基因应为 UDP-糖基转移酶基因。

用 MEGA 4 软件对该基因及其他植物的 *GT* 氨基酸序列进行多序列比对, 绘制分子进化树 (图 4) 的结果表明, *VAm3GT* 基因属于 *3GTs* 组, 区别于 *5GTs* 和 *7GTs* 组, 与欧亚种葡萄、拟南芥和苹果的 *3GT* 基因在进化关系上较近, 与紫苏、连翘、龙胆等亲源关系较远。

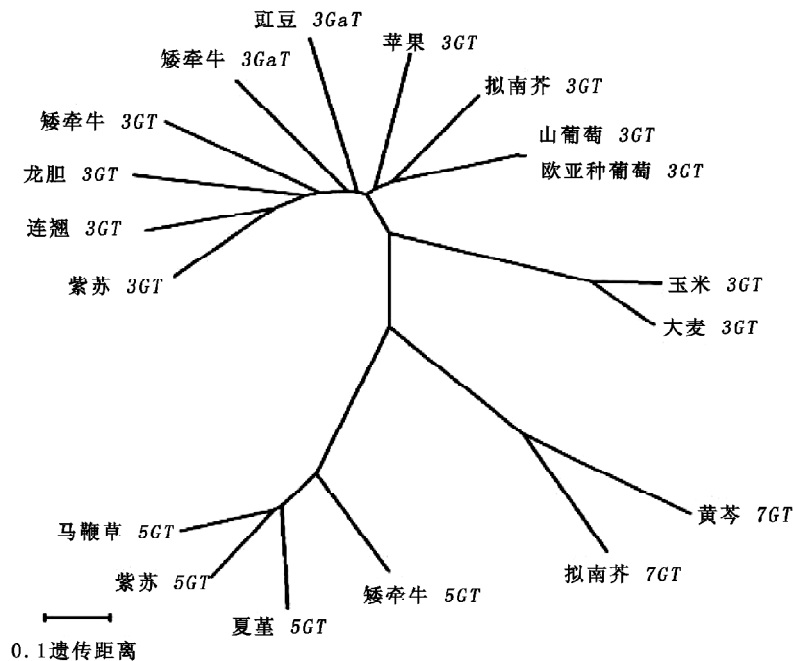


图 4 *3GTs*、*5GTs* 和其他糖基转移酶构建的分子进化树

Fig.4 Molecular phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of *3GTs*, *5GTs* and related glycosyltransferases

应用 SignalP 3.0 Server (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) 和隐马氏模型 (Hidden Markov Models) 对山葡萄 *VAm3GT* 进行信号肽预测的结果表明, 该基因不具有信号肽。蛋白质疏水性分析结果表明, *VAm3GT* 疏水性平均值为 -0.001, 不具有明显的亲、疏水性。二级结构分析表明, *VAm3GT* 的二级结构主要以 α -螺旋和不规则盘绕为蛋白最大量的结构元件。

参考文献

- Boss PK, Davies C, Robinson SP (1996). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol*, 111: 1059~1066
- Castellarin SD, Matthews MA, Gaspero GD, Gambetta GA (2007a). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227: 101~112
- Castellarin SD, Pfeiffer A, Silvilotti P, Degan M, Peterlunger E,

- Gaspero GD (2007b). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environ*, 30: 1381~1399
- Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, Yakushiji H, Goto N (2001). Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci*, 160: 543~550
- Li B, Wang BC, Tang K, Liang YL, Wang J, Wei JM (2006). A simple and convenient approach for isolating RNA from highly viscous plant tissue rich in polysaccharides. *Colloids Surf B Biointerf*, 49: 101~105
- Yoshihara N, Imayama T, Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, Tanaka Y, Ino I, Yabuya T (2005). cDNA cloning and characterization of UDP-glucose:anthocyanidin 3-*O*-glucosyltransferase in *Iris hollandica*. *Plant Sci*, 169: 496~501