

# 山葡萄 C4H 基因的克隆表达及遗传转化分析<sup>①</sup>

陈 蒙, 刘海峰

延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002

**摘要:** 通过生物学技术来研究 C4H 基因在山葡萄着色过程中的作用, 进而揭示山葡萄果皮着色的分子机理; 利用 RT-PCR 技术克隆了山葡萄 C4H 基因的全长 cDNA 序列, 并对该蛋白进行生物信息学分析, 预测其功能; 利用实时荧光定量 PCR 检测 C4H 基因在山葡萄 8 个不同转色时期的表达量, 将克隆获得的山葡萄 C4H 基因完整的 ORF 连接到原核表达载体 pET28a 上, 转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3), 并通过不同浓度的 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 检测表达产物. 为了验证山葡萄 C4H 基因的功能, 构建了表达载体 pC C4H 并转化农杆菌 GV3101. 用菌液浸泡花序法对拟南芥进行遗传转化, 在含 50 mg/L Kan 的培养基上对 T<sub>0</sub> 代种子进行筛选. 克隆获得的山葡萄 C4H cDNA 全长 1 735 bp, 开放阅读框 1 518 bp, 编码 505 个氨基酸, 该基因表达产物分子质量为 57.70 KDa, 等电点值 9.06. C4H 基因在山葡萄果皮转色各个时期均存在表达; 该基因原核表达产物与预期大小一致, 表明原核表达成功, 拟南芥遗传转化先后得到 3 个阳性幼苗. 对移栽成活的 2 株抗性植株进行 PCR 检测为阳性, 2 株叶片颜色均变成紫红色; 经花色苷质量浓度的测定表明其质量浓度比对照组植株高出 3 倍. 在拟南芥中花色苷质量浓度虽然较低, 但还是能少量合成, 说明其花色苷生物合成途径是开通的, 只是积累的量较少.

**关键词:** 山葡萄; 克隆; C4H 基因; 原核表达; 遗传转化

**中图分类号:** Q75

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2019)10-0011-11

山葡萄(*Vitis amurensis*)为葡萄科葡萄属, 耐旱、抗低温, 是培育优良抗病菌、耐低温新品种葡萄稀有的种质资源<sup>[1-3]</sup>, 栽培范围最广泛的果树种类之一, 在当今果树生产中具有重要地位, 具有很高的经济价值. 山葡萄果皮颜色能够影响果实品质, 果皮的颜色主要受花色苷组成的影响.

花色苷(Anthocyanin)为类黄酮化合物, 具有水溶性, 是影响植物花、果实以及叶片颜色变化的重要成分. 通过研究表明, 果皮花色苷质量浓度的多少决定果皮颜色的深浅, 说明果皮色泽的差别与花色苷的质量浓度相关. 花色苷功能很多, 主要是使植物器官产生不同颜色, 另外花色苷对于种子传播、授粉、抵抗病原物侵染、防紫外线损伤等诸多方面都表现出明显作用<sup>[4-5]</sup>. 山葡萄因其含有很多可以作为天然色素的花色素苷, 可以清除自由基、抗氧化、抗突变和抗疲劳而备受关注. 因其栽培管理简单, 产量较高, 浆果易加工, 酿酒工艺较简单, 所以有非常好的市场前景. 葡萄酒的品质也受花色苷的影响, 在酿造葡萄酒的过程中, 多种花色苷与其他物质相互作用, 产生新的花色苷, 且在以后酿造过程中继续产生反应, 生成许多复杂的花色素苷衍生物<sup>[6]</sup>. 因此对山葡萄花色苷展开研究十分重要. 花色苷分布在植物的各个组织中, 使植物呈现出色彩斑斓的颜色<sup>[7-8]</sup>. 但由于花色苷稳定性影响因子多、降解机制复杂, 结构不稳定, 针对花色苷的降解机制及提升花色苷的稳定性进行研究极其重要.

山葡萄花色苷的生物合成是一个复杂的过程, 花色苷合成分为两个途径: 第一种途径是苯丙烷类代谢途径, 第二种途径是类黄酮途径, 其中需要很多酶参与, 如肉桂酸-4-羟化酶(C4H)是苯丙烷类代谢途径的关键酶, 也是植物中分布最广的主要 CYP450 之一, 在花色苷的形成过程中具有关键作用. 与其他

① 收稿日期: 2018-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260067); 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究规划项目(吉教科合字[2016]第 255 号).

作者简介: 陈 蒙(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事山葡萄分子生物学的研究.

通信作者: 刘海峰, 副教授, 博士.

CYP450 相比, C4H 的一个明显特点是在植株的各个组织中均具有很高活性. C4H 是第一个被鉴定的植物 CYP450 单加氧酶, 也是第一个被克隆和确定功能的植物 CYP450, 迄今许多植物的 C4H 基因已被分离<sup>[9]</sup>. 本次实验用山葡萄作为基本材料, 采用同源克隆的方法, 克隆 C4H 基因的 cDNA 片段, 得到全长序列. 并应用农杆菌介导拟南芥遗传转化方法将农杆菌菌液与植株的花序接触, 得到拟南芥转化体, 经检测初步验证了目的基因 C4H 的功能和活性. 利用生物学技术来研究 C4H 基因在山葡萄着色过程中的作用, 更准确地揭示山葡萄果皮着色的分子机理.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

山葡萄品种“双丰”(Vitis amurensis cv. Shuang Feng)采自延边大学农学院山葡萄种质资源圃. 在果实成熟期采摘, 采后立即置于液氮中冷冻,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 取果皮作为供试材料. 拟南芥(Arabidopsis thaliana)由延边大学提供.

实验所用大肠杆菌(Escherichia coli) DH5- $\alpha$ , pMD18-T 载体, 2xTaq Plus PCR MasterMix 产品购于天根生物有限公司; 反转录酶 SuperScript II 购于 Invitrogen 公司; 胶回收试剂盒购于 Promega 公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒购于天根公司; 限制性内切酶购于 Promega 公司, T4 连接酶、卡那霉素、羧苄青霉素、庆大霉素和 Silwet L-77 购于上海生工生物公司; 其他试剂为国产分析纯. 根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)为 GV3101, 表达载体为 pCAMBIA1301(延边大学农学院提供).

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

山葡萄果皮总 RNA 提取采用改良 CTAB 法<sup>[10]</sup>. 提取后用 1% 琼脂胶检测 RNA 完整性, 检测 RNA 浓度、纯度. 合格的 RNA 采用 SuperScript II 反转录酶合成 cDNA, 具体操作参照说明书.

#### 1.2.2 山葡萄 C4H 基因的克隆

在 NCBI 网站中, 下载 GenBank 中与山葡萄近缘植物的 C4H 基因的基因序列, 使用多序列比对方法找到保守区域, 利用 Primer6.0 设计各特异引物. 引物序列如下:

C4H-s: 5'-ATCCACCGCCACAACCAT-3'; C4H-a: 5'-AGTTTCCCATCTTCATCTTT-3', 在上海生工生物公司合成. 利用 C4H 基因引物进行 PCR 扩增来获得目的基因片段. PCR 反应采用 25  $\mu\text{L}$  体系, 其中含 ddH<sub>2</sub>O, 10.5  $\mu\text{L}$ ; 2xTaq Plus PCR MasterMix, 12.5  $\mu\text{L}$ ; 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ; 模板 cDNA, 1  $\mu\text{L}$ . 扩增程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 32 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min. 对目的基因片段进行胶回收(参照试剂盒说明书操作), 连接 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5- $\alpha$  感受态细胞, 蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆测序.

#### 1.2.3 山葡萄 C4H 基因 cDNA 序列及其编码蛋白氨基酸的序列分析

测序后得到一个全长序列, 并利用生物信息学软件进行序列分析, 用到的软件如表 1.

#### 1.2.4 山葡萄果皮不同着色时期 C4H 的表达分析

遵循实时荧光定量引物设计要求设计 qRT-PCR 引物, 并保证引物特异性, 引物序列如下: qC4H-F: 5'-TGGCTTGCTAACGACTC-3'; qC4H-R: 5'-CAATGGTGGAAATGCTTC-3', 由上海生工生物公司合成. 分别以 8 个时期的山葡萄果皮 RNA 反转录的 cDNA 为模版, 以 ACTIN 基因为内参基因进行 qRT-PCR 分析. 根据 TIANGEN 实时荧光定量说明书, 反应体系: 2 $\times$ SuperReal Premix Plus 10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  的正反向引物各 0.6  $\mu\text{L}$ , cDNA 模版 1  $\mu\text{L}$ , 50 $\times$ POX Reference Dye 0.4  $\mu\text{L}$ , RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补至总体积为 20  $\mu\text{L}$ ; 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 15 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 32 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  延伸 32 s, 循环 40 次. 每个样品设置 3 个重复. 数据应用 MxPro 软件处理.

#### 1.2.5 原核表达载体的构建和表达

根据已克隆出的山葡萄 C4H 的 ORF 序列, 设计含有酶切位点的特异扩增引物: F: 5'-CGGAATTC-CTAACGGCAGTGCAGCTTGC-3'(含 EcoRI 酶切位点); R: 5'-TCCCGGGTCAAGCTTCTATTGGC-CTTGCCACAAT-3'(含 SmaI 酶切位点), 以山葡萄 C4H 全长 cDNA 为模版, 利用设计的引物 PCR 扩增山葡萄 C4H 序列, 扩增程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,

35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min. 将含有酶切位点的山葡萄 C4H 与 pET-28a 原核表达载体进行双酶切, 回收目的基因片段和原核表达载体大片段, 并按一定体系用 T4-DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 转化到感受态细胞, 涂布于 100 mg/L 卡那霉素抗性固体 LB 培养基上, 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h, 挑取单克隆进行 PCR 和双酶切鉴定. 构建重组表达载体 pET28a-VAmC4H, 经不同浓度的 IPTG 诱导 8 h, 用 SDS-PAGE(15%)检测目的蛋白的表达情况, 以未诱导的重组表达载体为对照.

表 1 生物信息学分析网上软件

软 件	网 址	分 析 内 容
DNASar		ORF 分析及氨基酸序列推导
NCBI BlastP	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp</a>	蛋白质氨基酸相似性比对
ProtParam	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>	蛋白质的分子质量、等电点及基本性质
Signalp3.0Server	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/Signalp">http://www.cbs.dtu.dk/services/Signalp</a>	信号肽分析
ProtScale	<a href="http://web.expasy.org/protscale/">http://web.expasy.org/protscale/</a>	疏水性分析
ExPASy	<a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html</a>	二级结构预测
TMHMM	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0</a>	跨膜结构域
Mitoprot	<a href="http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html">http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html</a>	
TargetP1.1	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a>	
SubLoc v1.0	<a href="http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm">http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm</a>	细胞定位分析
GeneDoc		氨基酸多序列比对
MEGA5.0		系统进化树构建

### 1.2.6 真核表达载体的构建与转化

在目的基因 C4H 的 cDNA 两端加上 EcoRI 和 SmaI 酶切位点, 引物分别为正向: 5'-CGGAATTCATGGATCCCATACTCATAGAGAAAGCTCTGT-3'; 反向: 5'-TCCCGGGTCAAGCTTCTATTGGCCTTGCCACAAT-3', 用上述两种酶对目的基因 C4H 进行双酶切, 将其与 pCAMBIA1301 双酶切产物用 T4 连接酶在 16 °C 下过夜连接, 进行表达载体构建; 将连接产物转化至感受态中, 进行阳性克隆筛选, 提取表面载体 pC C4H, 应用冻融转化法转入到 GV3101 农杆菌中, 以目的基因序列为引物(C4H-s: 5'-ATCCACCGCCACAACCAT-3'; C4H-a: 5'-AGTTTCCCATCTTCATCTTT-3')进行 PCR 验证(目的基因序列为 1, 735 bp, GeneBank 序列号 MH045992), 测序后证实 GV3101 农杆菌与目的基因 pC C4H 的表达载体构建成功, 命名为 GV3101/pC C4H.

## 1.3 拟南芥的遗传转化及筛选

### 1.3.1 拟南芥的遗传转化

将拟南芥种子春化处理, 进行播种. 除去长出的第一个花序, 促进更多的花序能够萌发, 花序在此萌发时, 进行转化; 转化液为 B5 培养基的维生素, 0.044 μmol/L 的 BA, 1/2 MS 培养基的无机盐, 50 μL/L 的 Silwet L-77, 5%(W/V)的蔗糖; 取 GV3101/pCC4H 菌液 300 mL, 8 000 r/min 离心 10 min, 去上清; 加入 500 mL 转化液, 重悬沉淀, 浸染拟南芥的花序, 浸泡约 2 min, 连续 3 次; 约 4 周能够收获种子.

### 1.3.2 转化体的筛选

1/2 MS 固体培养基中加入 50 mg/L Kan, 将经春化处理的转化的拟南芥种子用 0.1%氯化汞消毒处理后, 按每板 300 粒种子接种于 1/2 MS 固体培养基上(含 50 mg/L Kan); 适宜条件下, 光照培养箱中培养, 观察其生长状况; 筛选具有抗性的生长正常的植株用于后续实验.

## 1.4 拟南芥 RNA 的提取及 PCR 检测

### 1.4.1 拟南芥基因组 RNA 的提取

具体操作方法见参考文献<sup>[11]</sup>.

### 1.4.2 cDNA 的制备及 PCR 检测

拟南芥总 RNA 提取后用 1% 琼脂胶检测 RNA 的完整性, 检测 RNA 的浓度、纯度. 合格的 RNA 采用 SuperScript II 反转录酶合成 cDNA, 具体操作参照说明书. 以拟南芥 cDNA 为模版, 目的基因序列为引物, PCR 反应采用 25  $\mu\text{L}$  体系, 其中含 ddH<sub>2</sub>O, 10.5  $\mu\text{L}$ ; 2xTaq Plus PCR MasterMix, 12.5  $\mu\text{L}$ ; 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ; 模板 cDNA, 1  $\mu\text{L}$ . 扩增程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 32 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min.

### 1.5 测定拟南芥中花色苷的质量浓度

用直径为 1 cm 的打孔器随机取 3 块叶片, 放入 1.5 mL 的 0.1% 的盐酸甲醇溶液中于黑暗 -20  $^{\circ}\text{C}$  提取 24 h, 5 000 r/min 离心 5min, 取上清于 535nm 处测定其吸光值<sup>[12]</sup>, 紫外可见分光光度计为 Ultrospe 3000 (Amersham Pharmacia Biotch), 用公式  $A_{535} = A_{535} - 0.25A_{657}$  来校正花色苷的质量浓度<sup>[13-14]</sup>.

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR 合成山葡萄 C4H 基因 cDNA 全长序列

采用改良的 CTAB 法<sup>[10]</sup> 提取成熟期葡萄果皮中的总 RNA, 将其反转录合成 cDNA 模板, 用 C4H 基因引物 C4H-s 和 C4H-a 进行 PCR 扩增, 获得了目的特异条带, 约 1 735 bp 左右, 与预期片段大小相近(图 1). 产物经连接转化、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(XM\_002266202) 同源性达到 99%, 初步认定该序列为山葡萄 C4H 基因的核苷酸序列.

### 2.2 cDNA 全长序列生物信息学分析

#### 2.2.1 基因编码蛋白质理化性状分析

运用 DNASTAR 软件对山葡萄 C4H 基因进行开放阅读框分析, 结果表明, 该基因开放阅读框

1 518 bp. 利用 ProParam 软件推测基因的开放阅读框编码 505 个氨基酸, 分子质量为 57.70 KDa, 等电点值 9.06. 在构成山葡萄 C4H 蛋白的 20 种氨基酸里面亮氨酸(Leu)的量最多, 为 11.7%; 半胱氨酸(Cys)的量最少, 为 0.8%. 正电荷残基(Arg+Lys)个数是 69, 负电荷残基(Asp+Glu)个数是 61, 不稳定性系数是 46.97, 脂溶系数是 100.16, 说明山葡萄 C4H 蛋白为稳定蛋白质. 将该基因命名为 VAmC4H, GenBank 登录号为 MH045992.

#### 2.2.2 VAmC4H 蛋白保守区预测

对 VAmC4H 蛋白保守区进行预测, 具有 P450 超级家族结构域, 属于 C4H 家族蛋白. 其特征序列为 FGVGRRSCPG, 位于该蛋白的 440-449 氨基酸位置(图 2).

#### 2.2.3 VAmC4H 蛋白的细胞定位

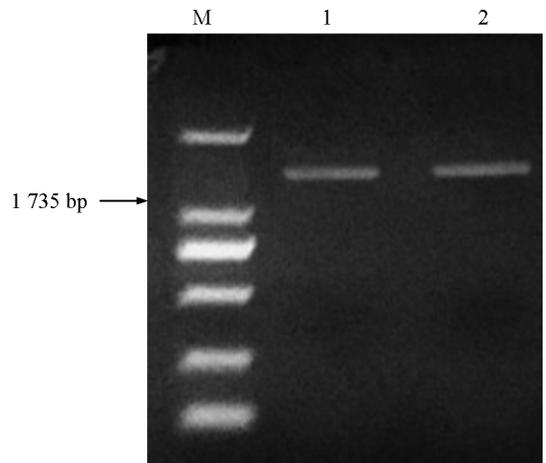
使用 TargetP 1.1 软件对 VAmC4H 蛋白序列进行细胞定位分析, 分析结果显示蛋白在线粒体中可能性是 0.012, 在分泌途径中存在的可能性是 0.983. 可靠级别为 1, 见表 2.

表 2 VAmC4H 蛋白 TargetP 1.1 定位分析结果

名称	长度	线粒体	分泌路径	其他	定位	可靠级别
VAmC4H	505	0.012	0.983	0.083	S	1

#### 2.2.4 VAmC4H 编码蛋白质的同源性

使用 NCBI 的工具 BlastP 对获得的山葡萄 C4H 基因的氨基酸序列做同源性比对. 比对结果表明, 山葡萄 C4H 基因同欧亚种葡萄(XM\_002266202)、爬山虎(ABA59555)等 C4H 基因的同源性相近, 相似性分别为 99%, 97%. 运用多重序列比对软件, 将山葡萄 VAmC4H 及其他植物 C4H 基因编码的氨基酸序列



M: DL 2 000 Marker; 1, 2: PCR 产物.

图 1 山葡萄 VAmC4H 的 PCR 扩增

比对分析, 结果如图 3.

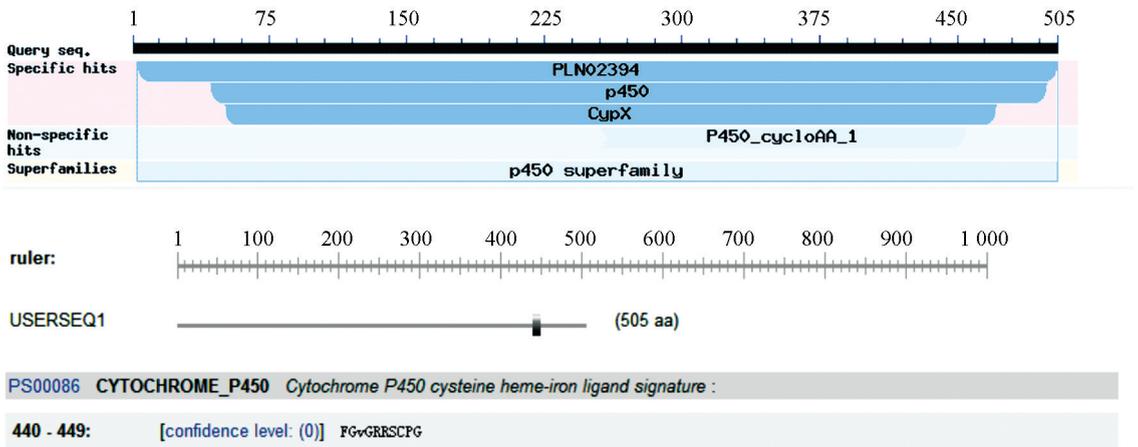


图 2 VAmC4H 基因编码蛋白的功能结构域分析

*Vitis amurensis* (MH045992) 山葡萄  
*Vitis vinifera* (XP\_002266238) 欧亚种葡萄  
*Camellia sinensis* (ASU87407.1) 茶  
*Canarium album* (FJ821504.1) 橄榄  
*Sorghum bicolor* (XM\_002458638.2) 高粱  
*Juglans regia* (XM\_018973017) 核桃  
*Theobroma cacao* (XP\_007011365.2) 可可  
*Pyrusx bretschneideri* (AHB52741.1) 梨  
*Nelumbo nucifera* (XP\_010253045.1) 莲  
*Populus tomentosa* (KU573531.1) 老白杨  
*Parthenocissus henryana* (ABA59555.1) 爬山虎  
*Ipomosa nil* (XP\_019167083.1) 牵牛花  
*Morus notabilis* (XP\_010094425.1) 桑树  
*Prunus avium* (GU990522.1) 甜樱桃  
*Camptotheca acuminata* (ANR76395.1) 喜树  
*Tulipa fosteriana* (KM507835.1) 郁金香  
*Sesamum indicum* (KP070829.1) 芝麻  
 Consensus

```

FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQKFL 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQKFL 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKI 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKL 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQKFL 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKI 477
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQKFL 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKL 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKI 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRMVQNFEIIPFEGQKFL 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKV 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKI 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKL 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKI 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQKFL 479
FGVGRRSCPGIILALEFILGIIIGRLVQNFEIIPFEGQSKL 479
fgvgrrrscpgiilalp l i g qnfel pp qq k
    
```

*Vitis amurensis* (MH045992) 山葡萄  
*Vitis vinifera* (XP\_002266238) 欧亚种葡萄  
*Camellia sinensis* (ASU87407.1) 茶  
*Canarium album* (FJ821504.1) 橄榄  
*Sorghum bicolor* (XM\_002458638.2) 高粱  
*Juglans regia* (XM\_018973017) 核桃  
*Theobroma cacao* (XP\_007011365.2) 可可  
*Pyrusx bretschneideri* (AHB52741.1) 梨  
*Nelumbo nucifera* (XP\_010253045.1) 莲  
*Populus tomentosa* (KU573531.1) 老白杨  
*Parthenocissus henryana* (ABA59555.1) 爬山虎  
*Ipomosa nil* (XP\_019167083.1) 牵牛花  
*Morus notabilis* (XP\_010094425.1) 桑树  
*Prunus avium* (GU990522.1) 甜樱桃  
*Camptotheca acuminata* (ANR76395.1) 喜树  
*Tulipa fosteriana* (KM507835.1) 郁金香  
*Sesamum indicum* (KP070829.1) 芝麻  
 Consensus

```

DTIHKGGQFSLIILKHSITVAKRPIEA..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVAKRPIEA..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVWKPRSF..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVFSQDHF..... 506
DTIHKGGQFSLIILKHSITVCKPRTF..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVWKPRSF..... 503
DTIHKGGQFSLIILKHSITVAKRPIEA..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVAKRPIEA..... 504
DTIHKGGQFSLIILKHSITVAKRPIEA..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVAKRPIEA..... 517
DTIHKGGQFSLIILKHSITVAKRPIEA..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVWKPRTF..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVWKPRSV..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVWKPIRS..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVAKRPIEA..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVAKRPIEA..... 505
DTIHKGGQFSLIILKHSITVWKPRSF..... 505
dt kggqfsl il hs v
    
```

下划线为 VAmC4H 保守域

图 3 VAmC4H 氨基酸序列的多序列比对

### 2.2.5 VAmC4H 编码蛋白质的进化分析

为了对 VAmC4H 和其他物种的 C4H 基因做深入的研究,在多重比对的基础上,使用分子生物学软件 MEGA 5.0,对 VAmC4H 基因及其他物种 C4H 基因的氨基酸序列构建系统发生进化树.分析结果如图 4, VAmC4H 基因同欧亚种葡萄同源性最近,同可可、莲等植物的同源性较低.

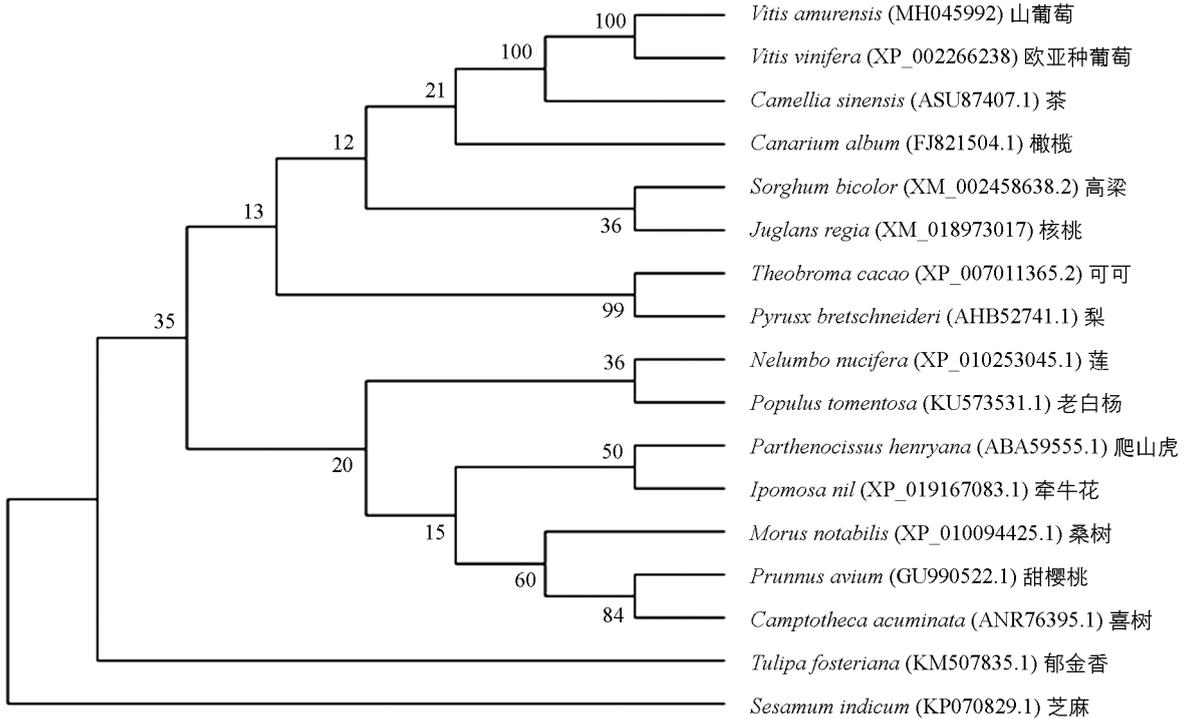
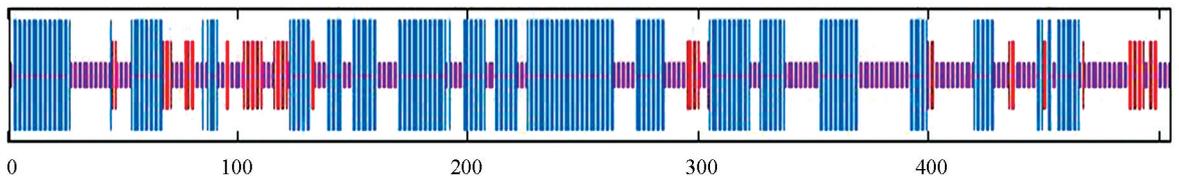


图 4 不同物种 C4H 类基因构建的分子进化树

### 2.2.6 VAmC4H 蛋白二级结构和三级结构预测

运用网上资源 HNN 推测 VAmC4H 的二级结构(图 5),结果表明该蛋白的二级结构是由 40.59% 的无规卷曲,48.32% 的  $\alpha$ -螺旋和 11.09% 的  $\beta$ -折叠构成.利用 SWISS-MODEL 预测 VAmC4H 的三级结构,见图 6.



蓝色:  $\alpha$ -螺旋; 紫色: 无规卷曲; 红色:  $\beta$ -折叠.

图 5 VAmC4H 蛋白二级结构预测图

### 2.3 VAmC4H 基因在山葡萄果皮不同转色时期的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 VAmC4H 基因在山葡萄果皮 8 个不同转色时期的表达量,结果表明 VAmC4H 在山葡萄果皮转色各个时期均存在表达, C4H 基因表达量在整个生长过程呈不规则变化,见图 7.

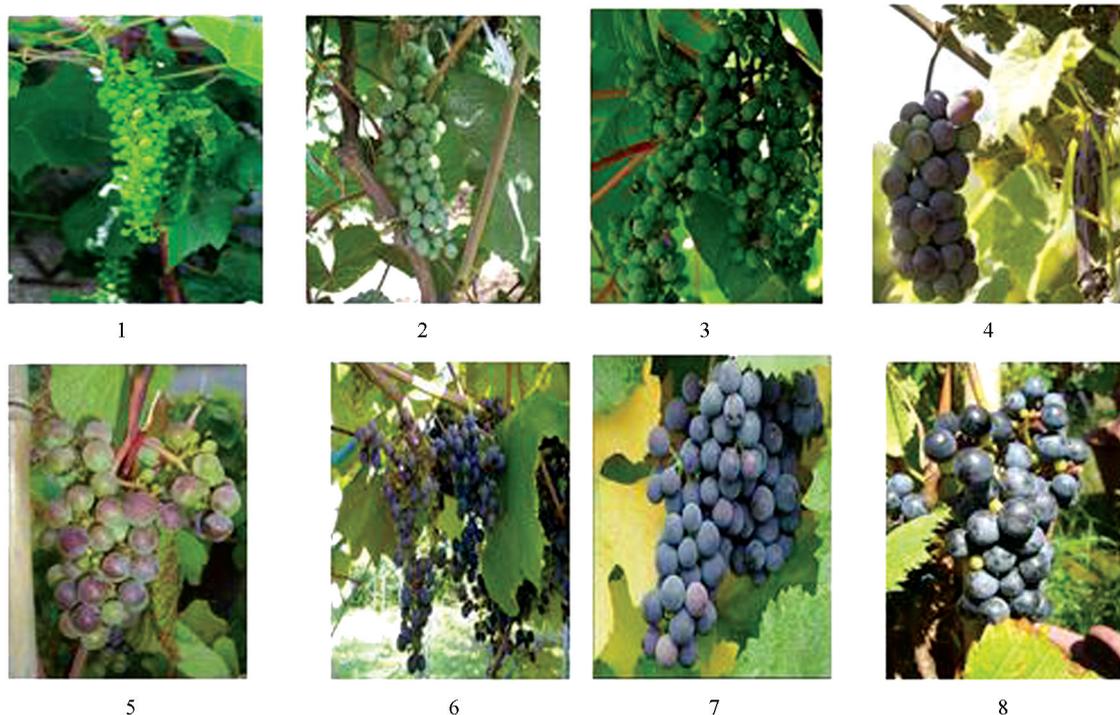
### 2.4 VAmC4H 编码产物的原核表达

将重组质粒 pET28a-VAmC4H 转化至感受态细胞 BL21 后,加入 IPTG 诱导菌体表达.在 28  $^{\circ}$ C 培养条件下对 IPTG 浓度进行筛选,分

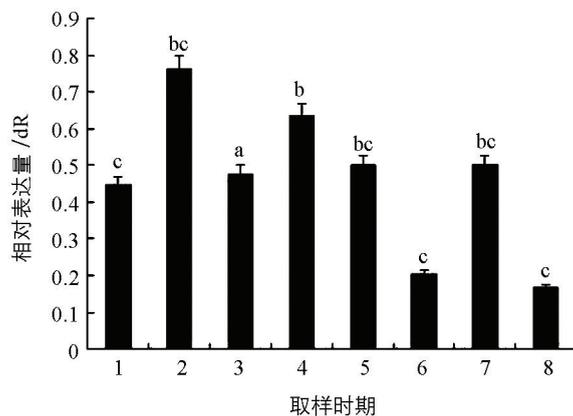


图 6 VAmC4H 蛋白三级结构预测图

别为 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L, 并进行 SDS-PAGE 电泳检测(图 8). 目的蛋白在上清中且 IPTG 诱导浓度为 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L(图 8a), 约 57.70 kDa 处有 1 条与预测重组 VAmC4H 蛋白相对分子质量大小一致的较高浓度的诱导表达带, 沉淀与对照组均未出现目的蛋白条带(图 8b). 表明 VAmC4H 基因在大肠杆菌中已成功表达.



(a) 山葡萄 8 个时期着色表现特征



不同小写字母表示不同时期在 0.05 水平上差异有统计学意义.

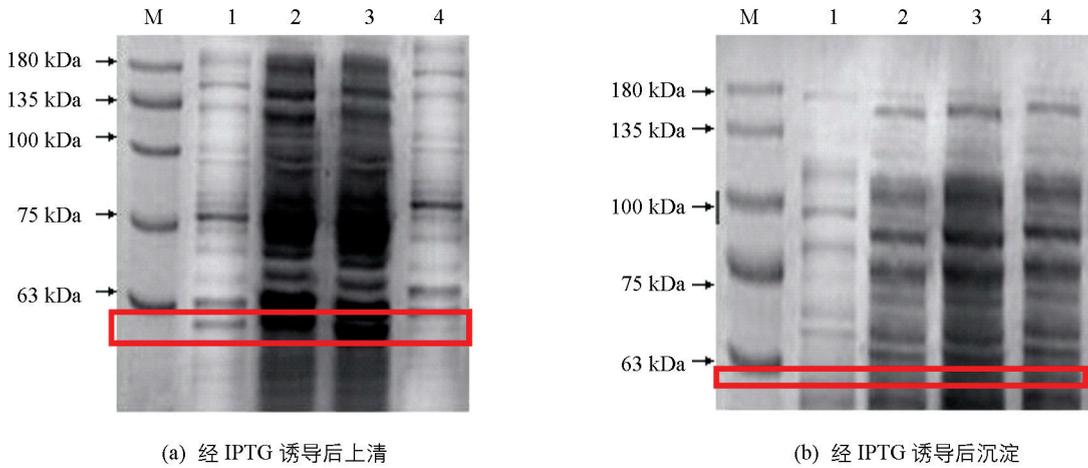
(b) VAmC4H 基因在 8 个时期的表达规律

1: 转色前第 II 个时期(花后 4 周); 2: 转色前(花后 6 周); 3: 转色 10%; 4: 转色 30%; 5: 转色 50%; 6: 转色 80%; 7: 转色 100%; 8: 完熟期.

图 7 VAmC4H 基因在 8 个时期的宏观微观分析

## 2.5 转化农杆菌

利用冻融热击法将 pC C4H 质粒转化至农杆菌 GV3101 中, 涂布于含有 Kan 的平板中进行筛选, 单菌落进行阳性 PCR 检测(图 9), 选阳性菌落接种转拟南芥花序. 收获成熟拟南芥种子, 春化后, 在 1/2 MS 培养基(含 50 mg/L Kan)上进行筛选, 得到 3 株阳性拟南芥幼苗.

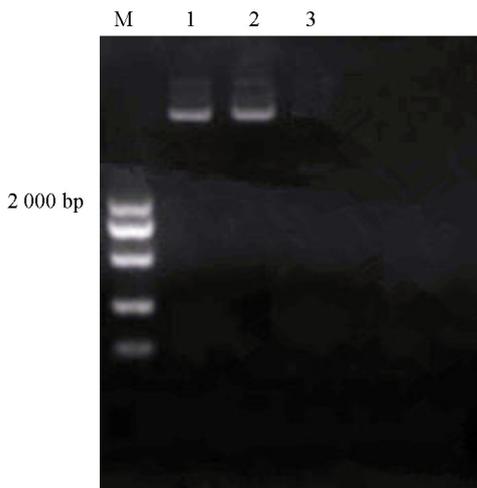


M: 分子质量标记; 1: 对照(未经 IPTG 诱导); 2: 0.8 mmol/L; 3: 1.0 mmol/L; 4: 1.2 mmol/L.

图 8 不同 IPTG 浓度诱导表达产物的 SDS-PAGE 检测

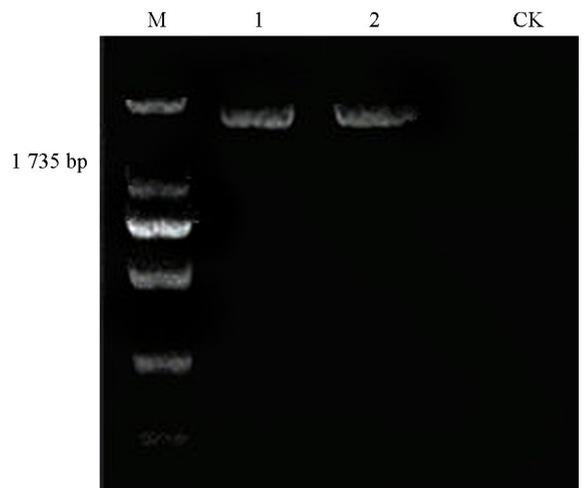
## 2.6 转基因植株 PCR 检测

对具有抗性的转基因植株 PCR 检测, 提取叶片中 RNA 进行反转录, 以其 cDNA 为模版、目的基因序列为引物, PCR 检测结果, 2 株抗性植株均为阳性, 扩增的目标条带约为 1 735 bp(图 10).



M: DNA 标记物; 1: pC C4H 转化大肠杆菌;  
2: pC C4H 转化农杆菌 GV3101; 3: 空菌株.

图 9 携带目的基因的 pC C4H 转化大肠杆菌和农杆菌的 PCR 检测



M: DNA 标记物; 1-2: 转基因植株;  
CK: 野生型植株对照.

图 10 转基因拟南芥植株的 PCR 检测

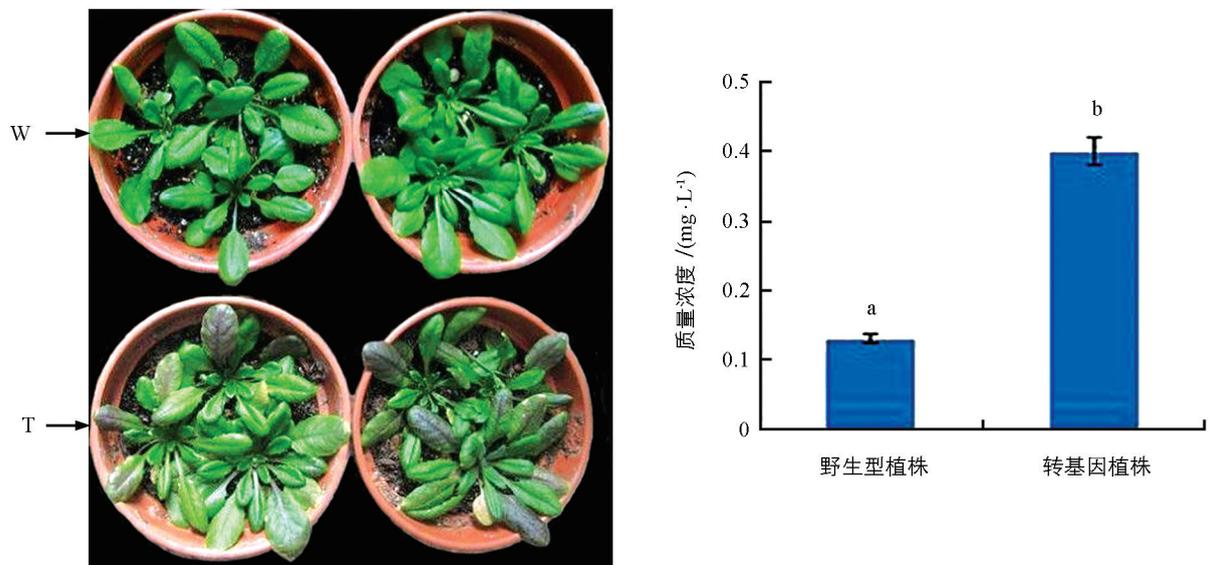
## 2.7 转基因植株表型和花色苷质量浓度

从 2 株阳性植株的表观颜色来看, 茎杆和叶片的颜色均发生了变化, 茎杆和叶片转变为浅紫红色. 对转化型和野生型拟南芥植株进行了花色苷质量浓度的粗测定, 前者质量浓度比对照野生型约高 3 倍(图 11).

## 3 讨论与结论

苯丙烷类代谢途径是植物体次生代谢中的一个通用途径, 在植物生长发育中具有重要作用<sup>[15]</sup>. 通常认为此途径参与一系列生物反应形成花色苷并由几种酶共同参与完成催化<sup>[16]</sup>. 肉桂酸-4-羟基化酶(C4H), 又称反式肉桂酸-4-单氧化酶, 催化肉桂酸羟化作用产生 4-香豆酸盐, 是苯丙烷途径中继 L-苯丙氨酸解氨酶(PAL)之后的第二个关键酶. 很多植物的 C4H 大多以基因家族形式存在. 迄今, 已有多种

植物的 *C4H* 基因被分离出来<sup>[17-19]</sup>. *C4H* 基因拷贝数在不同植物中呈现不同, 苜蓿有 2 个 *C4H* 基因, 豌豆(*Pisumsal sativum*) 只有 1 个拷贝, 长春花(*Catharanthus roseus*) 和绿豆的 *C4H* 是由多个拷贝组成的 1 个小的基因家族, 这些基因编码的氨基酸序列同源性普遍较高, 约 85%. 在山葡萄中 *C4H* 基因的存在及功能尚未被报道, 该基因拷贝数仍需进一步验证. 本实验借鉴前人方法与经验, 最初在山葡萄里克隆得到其 *C4H* 基因 cDNA 全长序列, 且命名为 VAmC4H. 用生物信息学软件进行多序列比对分析, 预测其蛋白的二级结构发现, 它由无规卷曲,  $\alpha$ -螺旋,  $\beta$ -折叠构成, 此结果与前人得出的葡萄、爬山虎等 *C4H* 蛋白二级结构结论相同, 表明 VAmC4H 和其他植物已分离 *C4H* 基因有极高同源性, 尤其是欧亚种葡萄, 并具有相同蛋白质保守活性位点. 该基因参与催化植物的次生代谢, 因此研究其生物学活性能够有效进行品种培育和植物遗传改良.



(a) 野生植株和转基因植株表型

(b) 野生植株和转基因植株的花色素苷质量浓度

W: 野生型植株; T: 转基因植株

图 11 野生型植株和转基因植株的表型和花色素苷质量浓度

VAmC4H 在山葡萄果皮转色各个时期时均存在表达量, 因此推测该基因可能在植物的生长发育过程中, 各时期都参与苯丙烷类代谢途径合成花色素苷. 本研究选取 *C4H* 基因家族共同保守区域进行表达检测, 可证明 *C4H* 基因家族在山葡萄果皮各转色时期具有普遍规律. BL21(DE3) 菌株是实验室应用最为广泛的表达菌株<sup>[20]</sup>, 很多外源基因都能够在该菌株中大量表达, VAmC4H 蛋白在上清中有较高浓度的诱导表达带, 表明 VAmC4H 基因在大肠杆菌中已成功表达. 在某些植物中, 该酶和 PAL 样常由于植物组织的损伤、光照或培养细胞的老化等因素而影响诱导活性<sup>[9,21]</sup>. 而在拟南芥中花色素苷质量浓度虽然较低, 但依然有少量合成, 证明该基因影响花色素苷生物合成途径, 但积累的量不多; 转基因拟南芥中的 *C4H* 基因过量表达, 能促使花色素苷的合成并快速积累, 进一步提高花色素苷合成的稳定性. 有学者认为 *C4H* 是一个调控酶, 在植物幼苗中以及正在经历主动木质化的组织中表达水平较高. 它的催化活性通常在受损的组织中增加, 通过乙烯处理可以增强该酶的活性<sup>[22]</sup>. 在光照和病菌感染后其活性也会增强<sup>[9,23]</sup>. 在生物合成途径中, *C4H* 基因起到了与各个分支反应相联系的纽带作用. *C4H* 参与次生代谢物质合成, 表现出时间和部位上的差异, 在植物生长代谢各个时期这个基因表达旺盛<sup>[24]</sup>. *C4H* 是苯丙烷类代谢途径的调控位点, 其活性的高低也是调节苯丙烷类代谢途径碳通量的最重要的因素, 因此, *C4H* 的结构-功能关系和酶活机理是近年来备受重视的研究热点<sup>[25]</sup>. 随着分子生物学的快速发展, 已初步揭示生物合成的大体轮廓, 并逐步应用到不同植物资源的研究中.

## 参考文献:

- [1] 陈 蒙, 袁赫海, 杨铭慧, 等. 山葡萄类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因的表达分析 [J]. 河南农业科学, 2018, 47(11): 95-98.
- [2] 刘海峰, 王 军. 山葡萄谷胱甘肽 S-转移酶基因(VAmGST4)克隆及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(12): 1161-1166.
- [3] DONG C, ZHANG Z, REN J P, et al. Stress-Responsive Gene ICE1 from *Vitis amurens* Increases Cold Tolerance in Tobacco [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71: 212-217.
- [4] 刘海峰, 杨成君, 于 森, 等. 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 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(8): 748-752.
- [5] HARBORNE J B, WILLIAMS C A. Advances in Flavonoid Research since 1992 [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(6): 481-504.
- [6] 徐开生. 我国马铃薯加工业现状及发展对策 [J]. 农产品加工, 2007(9): 55-57.
- [7] 陈伊里, 屈冬玉. 马铃薯种薯生产与栽培技术-2009 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2009.
- [8] 钟巍然, 柴友荣, 张 凯, 等. 苯丙烷代谢途径中细胞色素 P450 的研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(13): 5285-5289.
- [9] 付 阳, 刘海峰, 李 娟, 等. 山葡萄总 RNA 提取方法的比较 [J]. 延边大学农学学报, 2013, 35(4): 298-301, 312.
- [10] 金美芳. 拟南芥总 RNA 的简便提取与效果分析 [J]. 福建师大福清分校学报, 2007(2): 16-18.
- [11] LI S S, STRID Å. Anthocyanin Accumulation and Changes in *CHS* and *PR-5* Gene Expression in *Arabidopsis Thaliana* after Removal of the Inflorescence Stem (decapitation) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(6): 521-525.
- [12] MANCINELLI A L, ROSSI F, MORONI A. Cryptochrome, Phytochrome, and Anthocyanin Production [J]. *Plant Physiology*, 1991, 96(4): 1079-1085.
- [13] 卢其能, 杨 清, 沈春修. 马铃薯 3GT 基因转化拟南芥引起花色苷大量积累 [J]. 浙江农业学报, 2009, 21(6): 544-548.
- [14] 蔺占兵, 马庆虎, 徐 洋. 木质素的生物合成及其分子调控 [J]. 自然科学进展, 2003, 13(5): 455-461.
- [15] 张 雪, 唐铭浩, 陈 蒙, 等. 山葡萄不同着色时期果皮转录组测序分析 [J]. 果树学报, 2017, 34(7): 781-789.
- [16] 王安娜. 大豆 *C4H* 基因克隆及生物信息学分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
- [17] MIZUTANI M, WARD E, DIMAIO J, et al. Molecular Cloning and Sequencing of a cDNA Encoding Mung Bean Cytochrome P450 (P450C4H) Possessing Cinnamate 4-Hydroxylase Activity [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 190(3): 875-880.
- [18] 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控 [J]. 植物生理学通讯, 1988, 24(3): 9-16.
- [19] 覃鸿妮, 谢钰珍, 薛高旭, 等. 牛胰腺 *DNase I* 基因的合成、表达及功能验证 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(6): 24-31.
- [20] OVERKAMP S, HEIN F, BARZ W. Cloning and Characterization of Eight Cytochrome P450 cDNAs from Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Cell Suspension Cultures [J]. *Plant Science*, 2000, 155(1): 101-108.
- [21] 吴 林, 李洪雷, 姜玉松, 等. 月季 *RhPR10.2* 基因克隆及生物学功能分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2018, 40(8): 8-15.
- [22] SMITH C G, RODGERS M W, ZIMMERLIN A, et al. Tissue and Subcellular Immunolocalisation of Enzymes of Lignin Synthesis in Differentiating and Wounded Hypocotyl Tissue of French Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) [J]. *Planta*, 1994, 192(2): 155-164.
- [23] 陈 肃. 白桦 *4CL* 与 *CCoAOMT* 基因表达分析及蛋白预测 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [24] KNOBLOCH K H, HAHLBROCK K. Isoenzymes of p-Coumarate: CoA Ligase from Cell Suspension Cultures of Glycine Max [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1975, 52(2): 311-320.
- [25] 姜 爽. *CCoAOMT* 和 *4CL*cDNA 的克隆及转基因紫穗槐的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.

## Cloning Expression and Genetic Transformation Analysis of *Vitis amurensis* *C4H* Gene

CHEN Meng, LIU Hai-feng

Agricultural College of Yanbian University, Yanji Jilin 133002, China

**Abstract:** [Objective] To study the effect of *C4H* gene in the staining process of *Vitis amurensis* via biological technology, thus revealing the molecular mechanism of staining on skin of this fruit. [Methods] Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCT) technology was used to clone the full length cDNA sequence of *V. amurensis C4H* gene and bioinformatic analysis was carried out of this protein to predict its function. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression level of *C4H* gene in 8 different color transition periods of *V. amurensis* and its complete ORF obtained via cloning was connected to the prokaryotic expression vector pET28a and transformed to *E. coli* BL21 (DE3). The expression was induced by IPTG of different concentrations and the expression product was detected by SDS-PAGE. In order to verify the function of *C4H*, the expression vector pCC4H was established and *Agrobacterium* GV3101 was transformed. Genetic transformation was carried out on *Arabidopsis* by soaking the inflorescences in liquid bacteria. T<sub>0</sub> generation seeds were screened out on the culture medium containing 50 mg/L Kan. [Results] The full length of *V. amurensis C4H* cDNA obtained via cloning was 1, 735 bp, and the open reading frame was 1, 518 bp, encoding 505 amino acids. The molecular volume (MV) of this gene expression product was 57.70 KDa and the value of isoelectric point was 9.06. *C4H* gene was expressed in every stage of skin color transformation of *V. amurensis*. The prokaryotic expression product of the gene was consistent with the expected size, indicating that the prokaryotic expression was successful. Three positive seedlings were obtained from the genetic transformation of *Arabidopsis*. PCR detection of the two resistant plants which survived after transplanting was positive and the leaves of both plants turned purple. In determination of anthocyanin, its content was 3 times higher than that of plants in the control group. [Conclusion] Although the content of anthocyanin in *Arabidopsis* is on a relatively low level, it still can be synthesized in a small amount, indicating that the biosynthetic pathway of its anthocyanin is open, though with a small accumulation amount.

**Key words:** *Vitis amurensis*; cloning; *C4H*; prokaryotic expression; genetic transformation

责任编辑 周仁惠