

# 八氢番茄红素脱氢酶(Pds)基因果实特异表达载体的构建

刘顺枝, 孙莉丽, 杨礼香, 王小兰\*  
(广州大学生命科学学院, 广东 广州 510006)

**摘 要:** 八氢番茄红素脱氢酶(Pds)是番茄红素合成的关键酶, 本研究通过 PCR 法获取 *pds* 基因和 E8 启动子序列, 将目的基因和 E8 启动子序列构建到植物表达载体 pMD1 中, 构建了含果实特异表达启动子的 *pds* 基因的植物表达载体。并采用 PCR、限制性内切酶酶切和序列测定分析法, 对重组质粒进行鉴定。结果表明: 番茄果实特异性表达 *pds* 的重组质粒构建成功; 通过农杆菌直接转化技术将其成功转入转化农杆菌 LBA4404、EHA105 中, 为下一步 *pds* 在番茄果实中特异表达奠定了基础。

**关键词:** 八氢番茄红素脱氢酶; 果实特异性启动子; 载体构建

## Construction of Phytoene Desaturase (Pds) Gene Expression Vector with Tomato Fruit Specific E8 Promoter

LIU Shun-zhi, SUN Li-li, YANG Li-xiang, WANG Xiao-lan\*  
(School of Biological Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Phytoene desaturase (Pds) is a key enzyme in the biosynthesis pathway of carotenoid. The target gene *pds* and the sequence of tomato fruit specific E8 promoter were amplified by PCR and then cloned into pMD1 vector, respectively. PCR, restriction enzyme map, and sequence analysis were used to identify the reconstructed plasmid. The experimental results confirmed the successful construction of a recombinant plasmid carrying *pds* gene and promoter E8. The recombinant plasmid successfully transformed *Atumefaciens* LBA4404 and EHA105. These investigations will provide references for further study of *pds* expression in tomato fruits.

**Key words:** phytoene desaturase; fruit specific promoter; vector construction

中图分类号: Q966; Q786

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0196-04

番茄红素是一种广泛存在于水果及蔬菜中的重要的一类胡萝卜素, 番茄的红颜色主要是因为番茄红素<sup>[1]</sup>的存在。八氢番茄红素脱氢酶(Pds)是影响类胡萝卜素合成的限速酶之一, Isaacson 等<sup>[2]</sup>和 Park 等<sup>[3]</sup>确认了在植物体内由无色八氢番茄红素转化番茄红素的整个脱氢过程是 Pds、 $\xi$ -胡萝卜素脱氢酶(Zds)和类胡萝卜素异构酶(CrtI) 3 个酶催化完成的结果。Pds 催化八氢番茄红素脱氢生成 9,9'-二顺式- $\xi$ -胡萝卜素, 再经由 Zds 和 CrtI 生成番茄红素<sup>[4]</sup>。在以类胡萝卜素为主要色素种类的植物如番茄、柑橘、黄花龙胆、金盏菊等花或果实中, *pds* 基因与八氢番茄红素合酶基因(*psy*)、*zds* 基因等相互作用, 在转录水平上调节花或成熟果实中类胡萝卜素的积累<sup>[5-6]</sup>。类胡萝卜素生物合成途径的阐明及其主要酶和基

因的分离为基因工程方法改变植物类胡萝卜素的含量和组成提供了可能。富含胡萝卜素的黄金稻米及胡萝卜素增加的玉米的出现是基因工程根据番茄红素的合成途径, 通过对水稻转入 *psy* 或 *crtI* 从而改良水稻胚乳颜色的成功典范<sup>[7-8]</sup>。理论上转入了 *psy* 或 *crtI* 的水稻因为番茄红素的产生其稻米颜色应该是红色的, 而非目前的黄色, 推测是因为如果仅仅转入 *psy* 基因而水稻自身的 Pds 或 Zds 表达太低, 导致有色的类胡萝卜素在水稻胚乳无法产生<sup>[9]</sup>。为此, Schaub 等<sup>[9]</sup>通过构建系列水稻胚乳特异启动子启动的 *pds* 表达系统, 在对水稻转基因后获得了颜色各异的稻米。因此推测, 利用果实特异表达启动子, 构建番茄 *pds* 系统进行番茄果实颜色的改良也是可行的。本研究在已经构建 *psy2* 基因的番茄果实特异性

收稿日期: 2009-10-14

基金项目: 广州市科技计划项目(2008J1-C251-2); 广州市属高校科技计划项目(08C030)

作者简介: 刘顺枝(1968—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为果蔬采后生理及分子生物学。E-mail: liusz@gzhu.edu.cn

\* 通信作者: 王小兰(1973—), 女, 教授, 博士, 研究方向为植物遗传学。E-mail: wx11972@gzhu.edu.cn

启动子植物表达载体的基础上,进一步构建 *pds* 基因的番茄果实特异性启动子植物表达载体,转化根瘤农杆菌,以期为进一步转化番茄,获得表达 *Pds* 且番茄红素含量提高的番茄奠定良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

番茄(*Lycopersicon esculentum* cv.)“华丰”品种种子由广州市蔬菜研究所邱漫宇副研究员惠赠。

大肠杆菌 *E. coli* DH5  $\alpha$ 、农杆菌 *LBA4404*、*EHA105* 和植物表达载体 *pMD1*(由载体 *pBI121* 改造而来,图1)由中国科学院华南植物园张美副研究员提供。克隆载体质粒 *pMDT-18 Simple Vector*、*PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2*、*Taq DNA* 聚合酶、*T4 DNA* 连接酶、限制性内切酶 *TaKaRa* 公司; *Trizol* 试剂 *Invitrogen* 公司; *DNA* 纯化回收试剂盒及其他相关试剂购自上海生物工程技术有限公司。

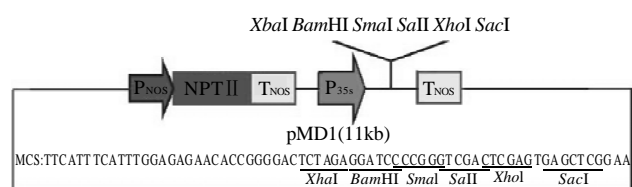


图1 *pMD1* 构建载体图

Fig.1 Construction map of *pMD1* vector

### 1.2 方法

#### 1.2.1 番茄 *E8* 启动子与重组质粒 *pMD1* 的连接

##### 1.2.1.1 番茄 *E8* 启动子的引物设计

根据周晓红等<sup>[10]</sup>报道的樱桃小番茄(*Lycopersicon esculentum*)的果实特异性 *E8* 启动子序列(Genbank ID AF515784),用生物软件 *DNAStar* 设计2条 *PCR* 引物,分别为 *E8F*: 5'GCAAGCTTAGGAATTTACGA AATCG3'引入 *HindIII* 酶切位点; *E8R*: 5'CGGGATC CTCTTTTGCACGTGTAATGAT3'引入 *BamH I* 酶切位点。

##### 1.2.1.2 *PCR* 扩增番茄 *E8* 启动子

采用 *CTAB* 法<sup>[11]</sup>提取番茄基因组 *DNA*,并以此为模板进行 *PCR* 扩增。反应产物通过电泳检测并切胶回收。

##### 1.2.1.3 *E8*启动子与克隆载体*pMDT-18 Simple Vector*的连接

将 *pMDT-18* 载体与回收的 *E8* 片段 16℃反应过夜,连接产物转化 *E. coli* DH5  $\alpha$  感受态细胞,涂布在含氨苄青霉素(*Amp*)的 *LB* 固体培养基平板上,培养 14~16h,

挑选单菌落的一部分直接进行菌落 *PCR* 扩增,初步判断是否有外源片段插入,将重组子阳性克隆菌单菌落经 37℃摇床过夜扩大培养,选取两个阳性克隆进行测序鉴定,将含有目的片段的重组质粒记作 *pTE8*。

#### 1.2.1.4 *E8* 启动子和 *pMD1* 载体的连接、筛选及鉴定

将构建好的 *pTE8* 和 *pMD1* 质粒分别通过 *HindIII* 和 *BamH I* 双酶切后,切胶回收 *pMD1* 质粒大片段和 *E8* 启动子片段,通过 *T4 DNA* 连接酶 16℃连接过夜。将质粒转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5  $\alpha$  感受态菌株中,对卡那霉素(*Kan*)抗性克隆用引物 *E8F* 和 *E8R* 进行 *PCR* 扩增,将能够扩增出 1100bp 片段的克隆再经 37℃摇床过夜扩大培养,提取质粒,分别用 *Hind III* 和 *BamH I* 双酶切鉴定,连接正确的重组质粒命名为 *pMDE8*。

#### 1.2.2 *pds* 基因和质粒 *pMDE8* 重组载体的构建

##### 1.2.2.1 *pds* 基因的引物设计

根据已发表的番茄 *pds* 基因序列 X71023<sup>[12]</sup>,用生物软件 *DNAStar* 设计了该基因的上下游引物(由上海生物工程技术有限公司合成,分别命名为 *pdsF*、*pdsR*),分别引入 *BamH I* 和 *Sma I* 限制性酶切位点,引物序列如下:

*pdsF*: 5'TGT GGATCC ATG CCT CAA ATT GGA CTT GT-3'

*pdsR*: 5'ATA CCCGGG AAC TAC GCT TGC TTC GCA CA-3'。

##### 1.2.2.2 *RT-PCR* 扩增目的基因 *pds*

总 *RNA* 的提取采用 *Trizol* 试剂盒法<sup>[13]</sup>。由于最初提取的番茄幼苗总 *RNA* 进行扩增时,没有得到扩增产物,考虑到基因表达的时空性,因此,提取番茄果实总 *RNA* 进行后续实验。提取的番茄果实总 *RNA* 于 -20℃沉淀 3h,1.5% 的琼脂糖凝胶甲醛变性电泳检测质量。利用 *Takara* 试剂盒(*PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2*),采用王小兰等<sup>[14]</sup>的方法进行 *RT-PCR* 反应,反应产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并切胶回收。

##### 1.2.2.3 *pds* 基因和 *pMDE8* 的连接、筛选及鉴定

回收后的 *pds* 基因和 *pMDE8* 质粒分别用 *BamH I* 和 *Sma I* 双酶切过夜,电泳检测 *pMDE8* 质粒是否完全酶切,将完全酶切后的线性化 *pMDE8* 与酶切后的 *pds* 基因片段通过 *T4 DNA* 连接酶 16℃连接过夜。将连接产物转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5  $\alpha$  菌株中,挑取 *Kan* 抗性克隆用引物 *pdsF* 和 *pdsR* 先进行以菌落为模板的 *PCR* 筛选,将能够扩增出约 1.8kb 大小目的片段的克隆进行菌落扩大培养,并提取质粒进行 *BamH I* 和 *Sma I* 双酶切验证。将验证成功的重组质粒送上海生物工程技术有限公司进行序列测定,连接正确的重

组质粒命名为 pMEPDS。

### 1.2.3 重组质粒 pMEPDS 转化农杆菌

从大肠杆菌 *E. coli* DH5  $\alpha$  菌株中提取 pMD1、pMEPDS 质粒, 采用冻融法将其转化入根瘤农杆菌中, 挑取抗 Kan 和 Gent 的克隆, 以提取的质粒为模板进行 PCR 验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 E8 启动子与重组表达载体 pMD 的构建

#### 2.1.1 E8 启动子片段的扩增

以 CTAB 法提取的番茄基因组 DNA 为模板, PCR 法扩增 E8 启动子片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到一条 1100bp 左右的电泳条带, 如图 2A 所示, 条带清晰特异。为使接下来的克隆继续进行, 首先将扩增得到的 E8 启动子与 T 载体进行连接, 经筛选、测序后证明, 扩增的序列与 Kato 等<sup>[9]</sup>报道的番茄果实特异性 E8 启动子序列完全一致, 说明启动子区在不同品种中是高度保守的。根据 E8 引物设计时加入的限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III, 将 E8 片段从重组 T 载体上切下来, 与同样经限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Hind*III 切除 35S 启动子的重组植物表达载体 pMD1 进行过夜连接, 经转化, 酶切鉴定, 如图 2B 所示, 重组阳性克隆经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 有一条 1100bp 左右的电泳条带, 与 E8 片段大小相同, 说明 E8 启动子区已经成功连接入植物表达载体中 pMD1, 命名为 pME8。

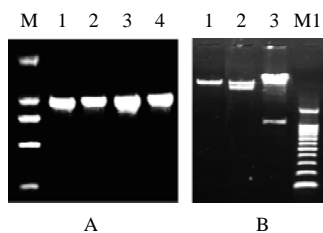


图2 番茄果实特异性 E8 启动子重组质粒鉴定图  
M. DNA 相对分子质量标准 2000(条带从上到下分别为: 2000、1000、750、500、250bp); M1. DNA 相对分子质量标准 100bp Ladder(条带从上到下分别为: 1500、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100bp); A.1~4. 果实特异性启动子 E8 PCR 扩增结果; B.泳道 1 为 pMD/*Hind*III; 泳道 2 为重组质粒 pME8; 泳道 3 为重组质粒 pME8/*Bam*HI+ *Hind*III。

图2 番茄果实特异性 E8 启动子重组质粒鉴定图

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid containing tomato fruit specific E8 promoter

#### 2.1.2 *pds* 基因的扩增及 pMEPDS 的构建

番茄果实总 RNA 在 1% 变性琼脂糖凝胶上电泳后如图 3A, 28S rRNA、18S rRNA 及 5S rRNA 等特异条带较清晰。分光光度计检测的  $A_{260nm}$  和  $A_{280nm}$  比值为 1.9, 表明所提取的总 RNA 可以用来进行下一步的实验。通

过 RT-PCR 扩增的 *pds* 基因片段大小约为 1800bp(图 3B), 与预期大小相符。将扩增的 *pds* 基因片段回收构建到 T 载体后, 将筛选到的阳性克隆测序, 经过 BLAST 程序比对测序结果显示序列正确。

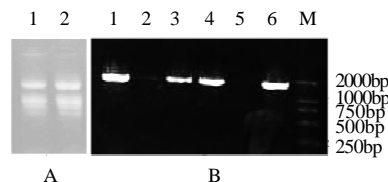


图3 番茄果实总 RNA 及 *pds* 基因扩增产物  
A.番茄果实总 RNA; B.RT-PCR 扩增 *pds* 的 cDNA 产物; 1~6. PCR 产物; M.DL2000 相对分子质量标准。

图3 番茄果实总 RNA 及 *pds* 基因扩增产物  
Fig.3 Agarose gel electrophoresis patterns of total RNA of tomato fruits and PCR products of *pds* gene

### 2.2 目的基因片段 *pds* 与表达载体 pMD 的连接

将 RT-PCR 扩增后得到的目的片段进行电泳、切胶回收, 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切, 然后将分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sma* I 完全酶切的 *pds* 目的基因片段与同样经 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切的 pME8 进行连接、转化, 分别用引物 *pds*F 和 *pds*R 及 E8 启动子的前后引物进行扩增鉴定。结果如图 4A 所示。

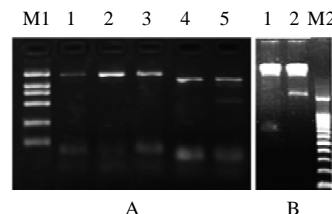


图4 pEPDS 的 PCR 鉴定图谱(A)及 pEPDS 的酶切鉴定图谱(B)  
A.1~3 泳道. 引物 *pds*F 和 *pds*R 的 PCR 扩增结果; 4~5 泳道. 引物 E8F 和 E8R 的 PCR 扩增结果; M1.DL2000 相对分子质量标准(条带从上到下分别为: 2000、1000、750、500、250、100bp); B.1 泳道. 质粒 pEPDS; 2 泳道. 质粒 pEPDS 经 *Bam*HI 和 *Sma* I 酶切后的结果; M2. DNA 相对分子质量标准 100bp Ladder(条带从上到下分别为: 1500、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100bp)。

图4 pEPDS 的 PCR 鉴定图谱(A)及 pEPDS 的酶切鉴定图谱(B)  
Fig.4 Identification of pEPDS by PCR and digestion with both *Bam*HI and *Sma*I

所挑选的克隆分别扩增出约 1.8kb 和 1.1kb 的产物; 进一步经 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切鉴定, 结果如图 4B 所示, 与未酶切的质粒(图 4B 中的 1 号点样孔)对比可知, 酶切的载体有两个片段, 说明载体 pME8 插入了外源片段。测序结果表明, 本实验插入的目的基因片段是一全长 1749bp, 包含一个 583AA 完整阅读框的 *pds* 基因, 证明目的片段 *pds* 与表达载体 pME8 连接成功, 命名为 pEPDS。将 pMD、pEPDS 质粒采用冻融法分别转化根

瘤农杆菌感受态细胞,挑取抗 Kan 和 Gent 的克隆提取质粒后进行 PCR 验证。保存 pMD 和 pEPDS 质粒成功转化的根瘤农杆菌 LBA4404 和 EHA105。

### 3 讨 论

番茄是我国重要的果菜之一。近年来,青枯病等病害卷土重来,生态环境的恶化以及城市工业化进程的加快,致使产区引种的番茄品种适应性与抗病性每况愈下。其中,青枯病是严重危害多种茄科植物的一种细菌性病害,国内外对蔬菜青枯病的防治作了大量的研究,但在抗病育种工作中,还存在着抗病性与产量、品质等优良性状的矛盾以及抗性丧失等问题。Pds 是植物类胡萝卜素生物合成途径中促进番茄红素合成的上游关键酶,从理论上讲,将该酶基因从植物体内克隆出来,构建超量表达载体,再转移到植物中去,通过基因工程的手段可以提高植物番茄红素的含量,增加植物产品的营养品质。本研究针对广州市农业蔬菜所获得的对青枯病产生较强的抗性但在番茄果实成熟后期颜色不转变这一现象,在已经构建果实特异启动子调控的番茄 *psy2* 基因表达载体的基础上,进一步构建果实特异表达启动子调节的 *pds* 基因的表达载体,以期利用基因克隆的手段,增加番茄果实中番茄红素的含量,改善番茄品质,为得到商品化的抗青枯病品种提供借鉴。

在以往的基因超表达研究中,普遍应用的植物启动子是能启动外源基因在植物细胞中有效表达的组成型强启动子 CaMV35S,但是这类启动子调控的基因表达既没有组织特异性,也不受发育时期的影响,而组织特异性表达启动子,不仅可以提高外源基因的表达量,而且能有目的地达到调节转基因植物果实的发育或种子的营养或改善其品质。本研究所采用的 E8 启动子是 Lincoln 等<sup>[15]</sup>于 1987 年发现的番茄果实特异性启动子,它是乙烯应答性基因的启动子,Deikman 等<sup>[16]</sup>通过实验证实 -409~-263bp 可控制 E8 基因在果实成熟过程中特异表达。因此,选择包含 -409~-263bp 在内的 1100bp 的 E8 启动子调控区进行基因表达的调控,理论上对于番茄品质的改良是可行的。事实上,已有的实验也证明 E8 启动子能引导目的基因在番茄等果实中高效定向表达,是一种新型的果实特异性启动子。Fraser 等<sup>[17]</sup>将 *Erwinia uredovora* 的八氢番茄红素合成酶 *CrtB* 基因导入番茄,在果实特异性启动子的调控下,发现果实中番茄红素较之对照提高了 1.8 倍;Krasnyanski 等<sup>[18]</sup>将 E8 启动子与报道基因 *uidA* 相连,导入番茄中,通过对植株果实和叶子中  $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶活性的分析,发现 E8 控制的 *uidA* 基因只在番茄果实中表达。这些早期的实验为今后作物中的类胡萝卜素品质改良提供了良好的典范。

### 参考文献:

- [1] 李京,惠伯棣,裴凌鹏. 番茄红素: 被关注的功能因子[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 461-464.
- [2] ISSAACSON T, RONEN G, ZAMIR D, et al. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of  $\beta$ -carotene and xanthophylls in plants[J]. Plant Cell, 2002, 14(2): 333-342.
- [3] PARK H, KERUNEN S S, CUTTRISS A J, et al. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation and photomorphogenesis[J]. Plant Cell, 2002, 14(2): 321-332.
- [4] 朱长甫,陈星,王英典. 植物类胡萝卜素生物合成及其相关基因在基因工程中的应用[J]. 植物生理及分子生物学学报, 2004, 30(6): 609-618.
- [5] SUN Zairen, CUNNINGHAM F X, GANTT E, et al. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A, 1998, 95(19): 11482-11488.
- [6] KATO M, IKOMA Y, MATSUMOTO H, et al. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit[J]. Plant Physiology, 2004, 134(2): 824-837.
- [7] PAINE J A, SHIPTON C A, CHAGGAR S, et al. Improving the nutritional value of golden rice through increased pro-vitamin A content [J]. Nature Biotechnology, 2005, 23: 482-487.
- [8] AIURU M, XU Yang, GUO Rong, et al. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(13): 3551-3562.
- [9] SCHAUB P, AL-BABILI S, DRAKE R, et al. Why is golden rice golden (yellow) instead of red[J]. Plant Physiology, 2005, 138(1): 441-450.
- [10] 周晓红,陈晓光,张晓东,等. 番茄果实特异性 E8 启动子的基因克隆与序列分析[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(1): 25-28.
- [11] BROWN S M, HOPKINS M S, MITCHELL S E. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats(SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor*(L.) Moench)[J]. Theoretical Applied Genetics, 1996, 93: 190-198.
- [12] MANN V, PECKER I, HIRSCHBERG J. Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (Pds) from tomato (*Lycopersicon esculentum*)[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 24: 429-434.
- [13] 王小兰. 水稻抗褐飞虱基因表达调控的分析和抗虫相关 cDNA 的克隆[D]. 武汉: 武汉大学, 2003.
- [14] 王小兰,刘顺枝,姚焱,等. 水稻 OsWNK 基因超量表达载体的构建及转化[J]. 广州大学学报, 2009, 8(4): 31-34.
- [15] LINCOLN J E, CORDES S, READ E, et al. Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1987, 84(9): 2793-2797.
- [16] DEIKMAN J, KLINE R, FISCHER R L. Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit specific promoter from tomato[J]. Plant Physiology, 1992, 100(2): 2013-2017.
- [17] FRASER P D, ROMER S, SHIPTON C A, et al. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit specific manner[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(2): 1092-1097.
- [18] KRASNYANSKI S F, SANDHU J, DOMIER L L, et al. Effect of an enhanced CaMV 35S promoter and a fruit-specific promoter on *uidA* gene expression in transgenic tomato plants[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-plant, 2001, 37: 427-433.