

文章编号:1674-7054(2010)01-0055-04

番木瓜 CYP79A2 基因片段的克隆与序列分析

李泽友^{1,3}, 沈文涛², 言 普², 李亚丽¹, 周 鹏^{1,2}

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101;

3. 海南医学院 药理学系, 海南 海口 571101)

摘 要: 苯丙氨酸氮羟化酶是植物中催化异硫氰酸苄酯(BITC)生物合成的第1个酶。笔者以番木瓜嫩叶总RNA反转录得到的cDNA为模板,依据拟南芥(NM-120608)和油菜(EU877074)的CYP79A2基因序列,并结合番木瓜的全基因组序列草图设计引物,进行PCR扩增,得到了大小为923 bp的基因片段,命名为CP-CYP79A2。生物信息学分析结果表明,其为番木瓜的CYP79A2基因片段。为进一步研究番木瓜BITC的生物合成调控打下了良好的基础。

关键词: 番木瓜; 异硫氰酸苄酯; 苯丙氨酸氮羟化酶; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S 667.9

文献标志码: A

番木瓜(*Carica papaya* L.),又名万寿果,《本草纲目拾遗》称之为“番蒜”,《现代实用中药》和《中华本草》称之为“番木瓜”。属于番木瓜科番木瓜属,药食两用,曾被世界卫生组织列为最有营养价值的十大水果之首,具有极高的营养保健和药用价值^[1]。近年来发现,番木瓜中含有丰富的防癌抗癌成分—异硫氰酸苄酯(Benzyl Isothiocyanate, BITC),其在成熟的番木瓜种子中含量很高,而果肉中含量很低^[2]。如果设法提高番木瓜果肉中BITC含量,其将成为人类非常好的防癌抗癌水果。对于BITC的生物合成,有学者研究了其在拟南芥和油菜中的途径(参见数据库 <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-2821> 及 <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5267>)。由苯丙氨酸经过苯丙氨酸氮羟化酶^[3]、苯乙醛肟单加氧酶、烷基硫代脲碳—硫裂解酶、硫代脲葡萄糖基转移酶基因、脱硫硫代葡萄糖苷磺酸基转移酶一步步催化生成苄基硫苷,最后遇芥子酶催化水解得到BITC,并克隆得到了其中的各相关酶基因。对于番木瓜,目前国内外还未见有BITC生物合成相关酶基因的报道。笔者采用RT-PCR方法首次从番木瓜中克隆了催化BITC生物合成的第1个酶——苯丙氨酸氮羟化酶CYP79A2的cDNA片段,并进行了初步的序列分析,为研究其时空表达量和进一步研究番木瓜BITC的代谢调控打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 供试的番木瓜嫩叶采自本实验室的试验基地,品种为苏鲁Ⅱ号。RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司, *E. coli* DH-5 α 为感受态大肠杆菌(由本实验室保存),克隆载体pMD-18T购自TakaRa公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒购自TIANGEN公司,PCR引物由上海生工公司合成, RNA PCR Kit购自TakaRa公司。

1.2 总RNA的提取 总RNA的提取使用Trizol试剂,具体操作按产品说明书进行。

1.3 引物设计与合成 根据GenBank中登录的拟南芥(NM-120608)和油菜(EU877074)的CYP79A2基因序列,结合番木瓜的全基因组序列草图^[4]设计2对引物。CYP79A2-F1: 5'-GTGGATTACACCGATAAT-

收稿日期: 2009-03-25

基金项目: 中央级事业单位基本科研业务费

作者简介: 李泽友(1973-),男,安徽金寨人,海南大学农学院2007级在职博士研究生。

通信作者: 周鹏(1963-),男,教授、研究员,博士研究生导师。E-mail: zhp6301@126.com

GG-3', CYP79A2-R1; 5'-CGGGTCTTGCCAGACTTTAG-3', CYP79A2-F2; 5'-GATTGCCCCGAGAAATCTTGA-3', CYP79A2-R2; 5'-GTGGTATCGCTTAGGGCAAC-3'。

1.4 cDNA 克隆及序列分析 取番木瓜嫩叶总 RNA 反转录合成单链 cDNA, 条件为 42 ℃ 30 min, 99 ℃ 5 min, 5 ℃ 5 min, 以得到的 cDNA 链为模板, 用上述 2 对引物进行 PCR 扩增。PCR 的条件为 95 ℃ 预变性 2 min; 接着 95 ℃ 变性 30 s, 53 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 进行 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 $w = 1.0\%$ 琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的片段, 经回收纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH-5 α 大肠杆菌, 在含 AMP(100 mg · L⁻¹) 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 随机挑选经鉴定为阳性的菌株进行测序。

2 结果与分析

2.1 CYP79A2 基因片段的克隆及鉴定 扩增产物经 $w = 1.0\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 表明得到了 1 条约 1 200 bp 和 1 条约 950 bp 的 DNA 片段 (图 1)。用琼脂糖凝胶回收试剂盒分别回收、纯化后克隆, 均得到较多的阳性克隆菌落, 分别随机挑选 2 个进行 DNA 序列测定。

2.2 序列测定及分析 4 个阳性克隆的 DNA 测序结果两两一致, 均含有 923 bp 大小的相同碱基组成的 DNA 序列, 将其命名为 CP-CYP79A2。将该序列用 Vector NTI 软件与拟南芥 (NM-120608) 和油菜 (EU877074) CYP79A2 基因全序列比对发现, 与油菜 (EU877074) 的相似度 (similarity) 为 49%, 与拟南芥 (NM-120608) 的相似度为 35%, 但拟南芥和油菜之间的相似度仅为 54%。通过 tblastx 与 NCBI 中数据库比对发现, 番木瓜 CP-CYP79A2 与双色高粱中催化生氰葡萄糖苷合成的第 1 个酶——氮羟化酶基因的序列同源性最高, E 值为 $1e - 134$; 其次是与木薯的氮羟化酶基因的同源性高; 与拟南芥 (NM-120608) 比对的 E 值为 $8e - 100$; 与油菜 (EU877074) 比对的 E 值为 $2e - 88$ 。比对结果见表 1。

另外, 它们的氨基酸序列比对显示: 与番木瓜同位置的这段序列, 三者的一致性 (identity) 为 33%, 但同源度 (positive) 高达 92%。序列比对结果见图 2。

表 1 克隆片段 CP-CYP79A2 的核酸序列比对

同源基因登录号	高同源性物种	E 值
U32624	<i>Sorghum bicolor</i>	$1e - 134$
AF140613	<i>Manihot esculenta</i>	$2e - 132$
AY834391	<i>Manihot esculenta</i>	$4e - 132$
NM-120608	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$8e - 100$
EU877074	<i>Brassica rapa subsp. chinensis</i>	$2e - 88$

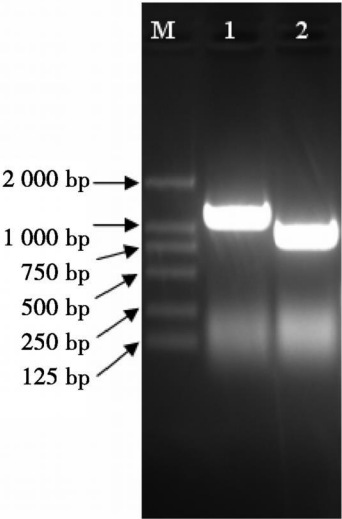


图 1 RT-PCR 产物
M: DNA Marker DL2000;
1: CYP79A2 - 1 引物对的带;
2: CYP79A2 - 2 引物对的带

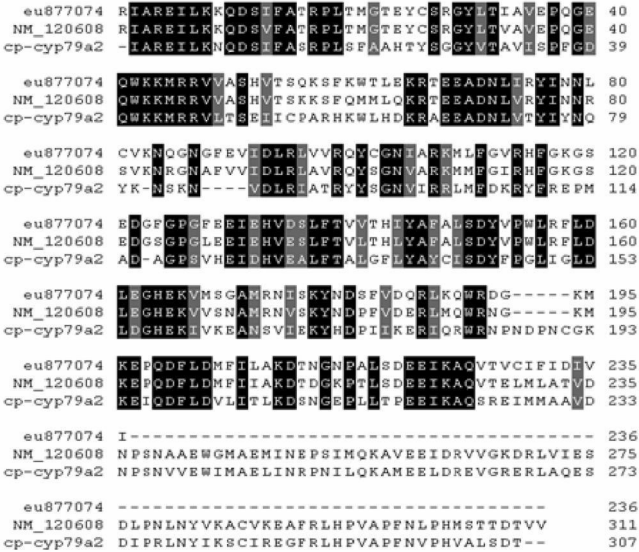


图 2 番木瓜、拟南芥和油菜 CYP79A2 编码氨基酸的序列比对
(EU877074、NM-120608、CP-CYP79A2 依次为油菜、
拟南芥和番木瓜 CYP79A2 基因编码的氨基酸)

用 Tmpred 服务器 (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED-form.html>) 跨膜结构分析表明,番木瓜有段含 26 个氨基酸的跨膜区域出现,拟南芥和油菜在同位置序列也有段含 23 个氨基酸的跨膜区域出现,且三者非常相似,见图 3~5。用 BioEdit 软件中 Kyte&Doolittle 方法进行蛋白的疏水性分析,结果三者在同位置序列也都有段含约 60 个氨基酸的较高的疏水性区域,见图 6~8。信号肽的预测分析采用 Technical university of Denmark 提供的预测服务器 SignalP3.0 预测,发现三者均无信号肽出现 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);糖基化位点分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/>) 发现三者均无糖基化位点。表明 CP-CYP79A2 基因编码的蛋白与拟南芥和油菜 CYP79A2 基因编码的蛋白结构相似,提示三者具有相似的功能。

综上所述,基本证明该 923 bp 的序列是番木瓜中催化硫苷生物合成的苯丙氨酸氮羟化酶基因的序列。

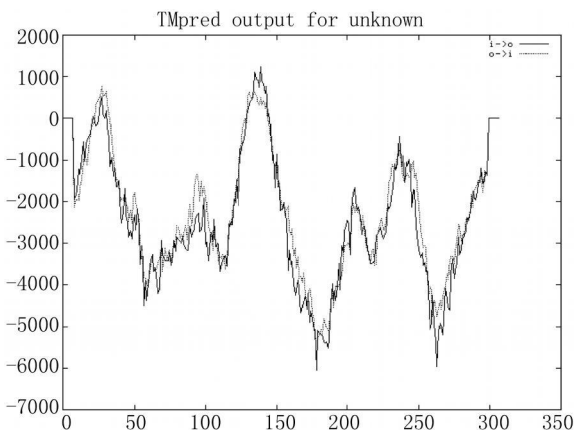


图 3 番木瓜 CP-CYP79A2 编码蛋白的跨膜区域

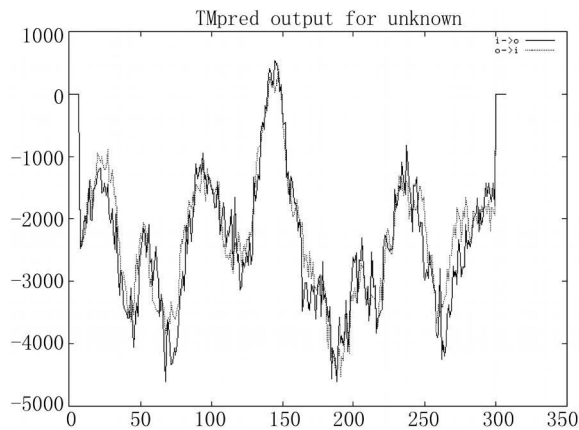


图 4 拟南芥 NM-120608 编码蛋白的跨膜区域

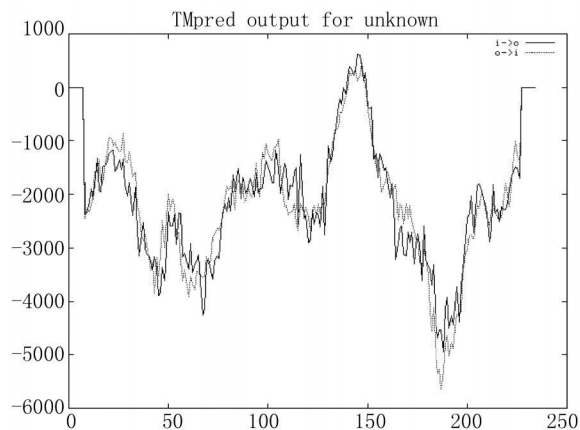


图 5 油菜 EU877074 编码蛋白的跨膜区域

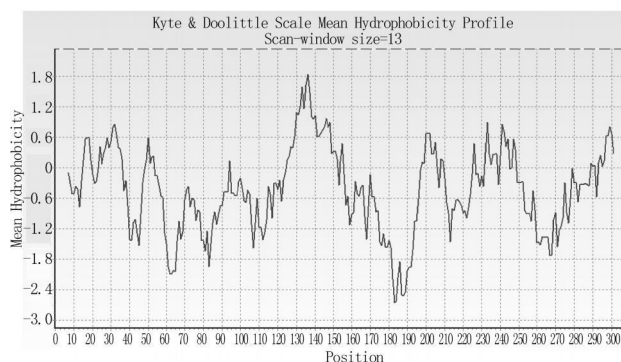


图 6 番木瓜 CP-CYP79A2 编码蛋白的疏水性区域

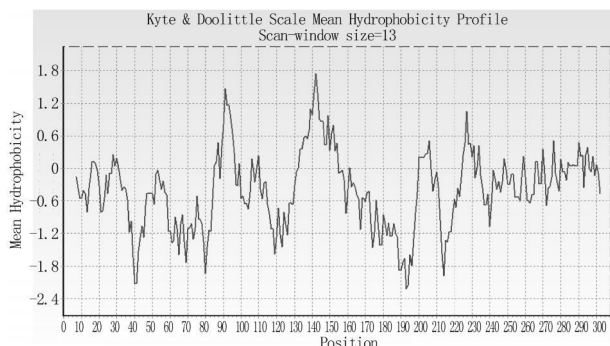


图 7 拟南芥 NM-120608 编码蛋白的疏水性区域

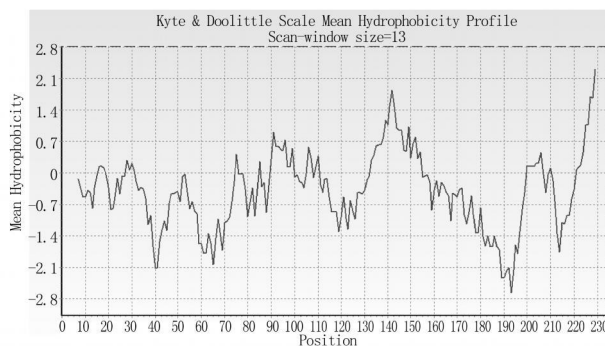


图 8 油菜 EU877074 编码蛋白的疏水性区域

3 讨论

番木瓜的 CYP79A2 基因是未知基因。设计引物时,由于 GenBank 中登录的 CYP79A2 的基因很少,只

有拟南芥(NM-120608)和油菜的(EU877074)的基因序列,还有一条 AF245302 基因(拟南芥的),但与 NM-120608 序列完全一致,保守序列不易找到。笔者起初设计多对引物均未扩出目的基因片段。后来将拟南芥(NM-120608)和油菜的(EU877074)的基因与番木瓜全基因组序列进行 BLAST 比对,在番木瓜全基因组序列上找到了与拟南芥(NM-120608)和油菜的(EU877074)的基因序列都最相似的片段 ABIM01023062.1(一致的碱基数目最多达 352 个;其他片段如 ABIM01023066.1、ABIM01019933.1、ABIM01019068.1、ABIM01021347.1 与拟南芥和油菜 CYP79A2 基因一致的碱基数目都比 ABIM01023062.1 少,只有 115 个或以下),故参考这段序列设计引物,再以番木瓜嫩叶总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,扩出 CP-CYP79A2。

经 Blast 比对,扩出的 CP-CYP79A2 这段序列与番木瓜全基因组上那段序列(ABIM01023062.1)的相似性为 99%,且 tblastx 比对结果显示其与双色高粱和木薯中的氮羟化酶基因同源性很高,说明扩出的番木瓜 CP-CYP79A2 所编码的也是氮羟化酶。通过对预测的 CP-CYP79A2 编码蛋白与拟南芥和油菜 CYP79A2 编码蛋白的结构域进行比较,发现三者结构相似。进一步证明了 CP-CYP79A2 是目的基因片段。考虑 CP-CYP79A2 与拟南芥和油菜的 CYP79A2 的相似度不高,推测可能是番木瓜科与十字花科科属差异所致。

本实验仅从番木瓜中克隆到催化 BITC 生物合成的第 1 个酶——苯丙氨酸氮羟化酶 CYP79A2 的中间片段,后续将克隆合成途径的其余 5 个酶基因并通过荧光定量研究其时空表达量与 BITC 含量的关系确定若是关键酶,则采用 3',5'-RACE 得到其基因全长,以便采用转基因技术提高抗癌活性成分 BITC 的含量。

CYP79A2 是催化硫代葡萄糖苷生物合成的第 1 个酶,在 GenBank 中登录的还很少。番木瓜 CYP79A2 基因片段的获得,不仅为 CYP79A2 增添了 1 位新成员,也为番木瓜 CYP79A2 基因的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 周鹏,彭明. 番木瓜种植管理与开发应用[M]. 北京:中国农业出版社. 2009.
- [2] NAKAMURA Y, YOSHIMOTO M, MURATA Y, *et al.* Papaya Seed Represents a Rich Source of Biologically Active Isothiocyanate[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(11):4407-4413.
- [3] WITTSTOCK U, HALKIER B A. Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. Catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19):14659-14666.
- [4] MING R, HOU S, FENG Y, *et al.* The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus) [J]. Nature, 2008, 452(7190):991-996.

Cloning and Sequence Analysis of CYP79A2 Gene Fragment in Papaya

LI Ze-you^{1,3}, SHEN Wen-tao², YAN Pu², LI Ya-li¹, ZHOU Peng^{1,2}

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China;

2 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;

3 Hainan Medical College, Haikou 571101, China)

Abstract: L-phenylalanine N-hydroxylase is the first enzyme which catalyze the biosynthesis of benzylisothiocyanate (BITC) in plant. According to the sequences of CYP79A2 gene of *Arabidopsis thaliana* (NM120608) and *Brassica rapa* (EU877074) from GenBank and combining with the genome draft of the transgenic tropical fruit tree papaya, specific primers were designed and RT-PCR was used to amplify partial sequences of CYP79A2 gene from papaya young leaves. The sequence includes 923bp, which named CPCYP79A2. Bioinformatics analysis results showed that the frgment is the partial sequences of CYP79A2 gene of papaya. The data set a strong basis for the study of the biosynthetic regulation of BITC in papaya.

Key words: papaya; benzylisothiocyanate (BITC); L-phenylalanine N-hydroxylase; cloning; sequence analysis