

辣椒果实中 CaRIN 转录因子的克隆及其表达分析

胡宗利, 王燕, 王翊, 陈国平*

重庆大学生物工程学院, 重庆 400044

摘要: 根据BLAST获得的表达序列标签设计引物, 从辣椒中分离并鉴定了一个新型转录因子, 命名为CaRIN。与已知MADS-box蛋白对比表明, CaRIN分别与番茄LeMADS-RIN和矮牵牛FBP4有85%和77%的同源性, 并且具有典型的MADS-box类转录因子的特征区域。采用半定量RT-PCR进行特异性表达分析, 结果表明CaRIN在破色期和红熟期辣椒果实中大量表达, 而在绿熟期辣椒果实和其他辣椒器官中几乎不表达; 同时进行了DNA结合位点和系统发生等生物信息学分析, 这些结果都表明CaRIN可能参与辣椒果实成熟的调控。

关键词: 辣椒; CaRIN; MADS-box; 克隆; 半定量 RT-PCR

Cloning and Analysis of Expression of CaRIN Transcription Factor from Pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang) Fruit

HU Zong-Li, WANG Yan, WANG Yi, CHEN Guo-Ping*

College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

Abstract: Specific primers were designed based on the EST sequences which were obtained according to BLAST. A novel transcription factor CaRIN was isolated and characterized from the chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). Compared with known MADS-box proteins, CaRIN had 85% and 77% sequence homology with LeMADS-RIN from tomato and FBP4 from petunia, respectively, and contained typical structural characteristics of MADS-box transcription factors. Analysis of tissue-specific expression of CaRIN was performed by semi-quantitative RT-PCR. The result showed that CaRIN mRNA was existing mainly in breaker and red ripening fruits, but hardly detectable in mature green fruit and other organs of pepper. Bioinformatic analyses, such as DNA-binding residues and phylogenetic analysis, suggested that CaRIN were involved in regulating pepper fruit ripening.

Key words: pepper; CaRIN; MADS-box; cloning; semi-quantitative RT-PCR

采后的果蔬仍是一个活的有机体, 有活跃的生理代谢过程, 存在着果蔬成熟衰老所导致的自身耐贮性、抗病性下降等问题, 是果蔬采后损失的因素之一。果蔬成熟衰老是一个高度程序化调控的复杂的生物学过程, 涉及到一系列的生理和生化变化。根据果蔬的成熟衰老特性, 果蔬常分为呼吸跃变型和非跃变型两类。在呼吸跃变型果实的成熟过程中, 由于乙烯对成熟有调控作用, 所以对其研究较为深入, 已经分离了许多与乙烯生物合成和信号转导相关的基因, 对其成熟调控机制也有了一定的认识(Giovannoni 2001), 并建立了以拟南芥和番茄为代表的模式系统。然而, 除了乙烯以外, 发育过程也同样影响果实的成熟, 但迄今对植物中普遍存在的发育调控途径还知之甚少, 所以, 探讨跃变型和非跃变型果实共有的成熟调控机制就成了这一领域的研究热点之一。番茄 *rin* (*ripening-inhibitor*)

突变体的研究表明, 乙烯并非果实成熟调控的惟一关键因子, 果实成熟过程中还存在着许多调节因子, 但其调控机制仍不清楚(Vrebalov等2002)。

番茄 *rin* 突变体的乙烯生成受到抑制, 所以果实不能正常成熟, 同时还表现出萼片增大和花序决定功能丧失。Vrebalov等(2002)报道, *rin* 突变体之所以不能正常成熟, 是因为它的一个MADS-box转录因子的基因发生了突变, 通过定位克隆发现这是由于 *rin* 突变体基因组DNA缺失了约3 kb, 从而导致相邻两个同属于MADS-box基因家族的转录因子, 即 *LeMADS-MC* 和 *LeMADS-RIN* 的融合和功能

收稿 2009-08-11 修定 2009-10-20

资助 国家自然科学基金(30771463, 30871709)和重庆大学研究生创新团队建设项目(200909B1007)。

* 通讯作者(E-mail: chenguoping@cqu.edu.cn; Tel: 023-65112674)。

的失活, *LeMADS-MC* 突变导致萼片和花序决定功能丧失, 而 *LeMADS-RIN* 突变则导致果实不能正常成熟。现有的研究表明, *LeMADS-RIN* 基因具有调控果实成熟这一专一性, 而且是已知影响果实成熟的最早起作用的因子。

到目前为止, 仅从番茄和草莓等少数植物中分离和克隆了全长 *MADS-RIN* 基因, 而且只是在番茄中, 对 *MADS-RIN* 的功能进行了较深入的研究 (Zhu 等 2008; Yasuhiro 等 2008)。辣椒和番茄同属茄科类植物, 我们在研究辣椒果实成熟分子调控过程中, 分离和克隆到一个与番茄 *LeMADS-RIN* 基因高度同源的 *MADS-box* 蛋白基因, 命名为 *CaRIN* 基因 (GenBank 登录号为 DQ999998), 并进一步通过表达模式分析和生物信息学分析, 推测 *CaRIN* 可能参与

辣椒果实成熟的调控。

材料与amp;方法

辣椒品种为‘红辣椒’ (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang), 种植于本校 A 校区生物工程学院实验田。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 JM109 由本实验室保存。克隆载体 pMD18-T 为大连宝生物工程公司产品。

RNA 提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司; M-MLV 反转录酶为 Fermentas 公司产品; 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒为大连宝生物公司产品; T4 DNA 连接酶为 Promaga 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

所用引物见表 1, 由上海 Invitrogen 公司合成。

表 1 实验中用到的引物

Table 1 Primers used in this experiment

引物编号	引物序列	引物描述
R1	5'-CAAATAAGGTCAACTAAGACACAAC-3'	3' RACE 外侧引物
R2	5'-AAAGTTGGAAGAAGTGGTGTGCC-3'	3' RACE 内侧引物
R3	5'-CTATAGCCTATACACAATGGGTAGA-3'	<i>CaRIN</i> 全长 cDNA 上游引物
R4	5'-CTGCATAATTCCAAGTGTGGCTAG-3'	<i>CaRIN</i> 全长 cDNA 下游引物
WT 1	5'-GACTCTAGACGACATCGA(T)18-3'	反转录引物
WT 2	5'-GACTCTAGACGACATCGA-3'	通用引物
A1	5'-TTGGACTCTGGTGATGGTGTG-3'	辣椒肌动蛋白上游引物
A2	5'-AACATGGTTGAGCCACCACTG-3'	辣椒肌动蛋白下游引物
A3	5'-TATGGTGCCTTGAAGGAAC-3'	表达特异性分析上游引物
A4	5'-GGCACATTATCGTATCCGTA-3'	表达特异性分析下游引物

取开花期辣椒的根、茎、叶和花为材料。花期挂牌, 开花后不同天数采摘不同成熟度的辣椒果实: 绿熟期 (mature green, 辣椒果实呈青色, 体积不再长大, 但还没有变黄), 破色期 (breaker, 辣椒果实刚由青色变成黄色, 是辣椒成熟开始的标志), 红熟期 (red ripening, 辣椒果实完全变红, 果实完全成熟)。然后将上述试验材料加液氮研磨成细粉末状, 按照 RNA 提取试剂盒的步骤提取总 RNA, 并贮存于 -80 °C 冰箱中备用。

利用 *LeMADS-RIN* 的 DNA 序列对辣椒 EST 数据库 (www.tigr.org) 进行同源性搜索, 发现 TC4434 与 *LeMADS-RIN* 的序列同源性最高。而后根据 TC4434 序列设计 3' RACE 外侧引物 R1 和 3' RACE 内侧引物 R2。先以破色期的辣椒果实总 RNA (约 5 μg) 为模板, 以 WT1 为引物进行反转录以获得

cDNA 第一链。然后用引物对 R1/WT2 进行第一轮 PCR。以第 1 轮 PCR 产物稀释 50 倍为模板, 用引物 R2 和通用引物 WT2 进行第 2 次 PCR。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s、56 °C 复性 30 s、72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经电泳分离, 采用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒纯化, 连接到 pMD18-T 载体, 转化 JM109 大肠杆菌, 送样到上海 Invitrogen 公司测序。

为了得到辣椒 *CaRIN* 基因的全长片段, 分析以上 3' RACE 克隆片段和 TC4434 序列, 设计引物 R3 和 R4, 以上述所得 cDNA 第一条链为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94 °C 预变性 1 min; 94 °C 变性 10 s、53 °C 复性 30 s、72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖

凝胶电泳检测后,回收目的片段。连接到 pMD18-T 载体中,转化 JM109 大肠杆菌,送样到上海 Invitrogen 公司测序。

以辣椒肌动蛋白基因的组成型表达为参照,采用半定量 RT-PCR,研究目的基因在辣椒不同器官以及不同发育时期果实中的表达模式。以引物对 A1/A2 进行辣椒肌动蛋白基因的 PCR 扩增,以引物对 A3/A4 进行目的基因的 PCR 扩增,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, BioRad 凝胶成像系统拍照并分析。

结果与讨论

1 *CaRIN* 全长 cDNA 的克隆和鉴定

根据 BLAST 分析可以看到,辣椒 EST 数据库中的 TC4434 序列与 *LeMADS-RIN* 基因(AF448522) 高度同源。再根据 TC4434 序列设计特异引物 R1、R2,用反转录引物 WT1 和通用 WT2,并用

3' RACE 技术,获得长度约为 300 bp 的 3' 末端序列。通过比较以上克隆片段和 TC4434 序列的重叠区域,推导出 *CaRIN* 的全长 cDNA 序列。而后设计特异引物 R3 和 R4,经 RT-PCR 获得 *CaRIN* (约 1 042 bp) 的完整序列,此序列与我们推导的 cDNA 序列一致。序列分析表明, *CaRIN* 完整的 cDNA 序列(GenBank 登录号为 DQ999998) 具有 1 042 bp, 其 5' 末端具有 74 bp 非翻译区, 3' 末端具有 236 bp 非翻译区。该 cDNA 包含 732 bp 开放阅读框, 编码了一个具有 243 个氨基酸的蛋白。该蛋白的预测分子量约 28 kDa, 等电点为 8.09。CaRIN 的预测氨基酸序列与不同植物的已知 MADS-box 蛋白进行同源性比较表明, CaRIN 分别与番茄的 *LeMADS-RIN* 和矮牵牛的 *FBP4* 具有 85% 和 77% 的同源性(图 1)。序列分析表明, CaRIN 也存在一些在所有 MADS-box 蛋白间高度保守的区域, 如 MADS 结构域和 K 结构域。



图 1 *CaRIN* 推导的氨基酸序列的同源性和保守结构域的分析

Fig. 1 Alignment and conserved domains analysis of the deduced amino acid sequence of *CaRIN* gene

2 DNA 结合位点预测与分析

MADS-box 是植物中常见的转录因子家族, 已有的报道认为所有的 MADS-box 蛋白都具有 MADS-box 结构域, 并且该结构域是结合 DNA 所必需的(Santelli 和 Richmond 2000), 但是这一区域的 DNA 结合位点尚不清楚。采用 BindN、DP-Bind 和 DISIS 运算法则, 对 *CaRIN* 中最有可能结合 DNA

的序列进行预测的结果表明, MADS-box 结构域中存在很多可能与 DNA 结合的氨基酸残基。另外, 一些存在于 MADS-box 结构域之外的氨基酸残基仍然可能起着结合 DNA 的作用, 而这些残基(Arg136-Lys142)属于 K 结构域(图 2), 由此可见 K 结构域的一些氨基酸残基也可能参与 *CaRIN* 与 DNA 的结合。

3 *CaRIN* 的系统发生分析

MADS-box 蛋白是一大类植物中推定转录因子的高度保守的基因家族, 在植物发育和信号转导过程中起作用(Messenguy 和 Dubois 2003; Ng 和 Yanofsky 2001)。而且从不同植物种类中分离得到的 MADS-box 基因的数目不断提高(Theissen 等 2000)。为了确定各种植物种类中不同 MADS-box 蛋白间的进化关系, 采用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> 所提供的资料, 编制出系统发生树, 并且所采用的氨基酸序列均存于 GenBank 数据库中(图 3)。

该系统发生树将 *CaRIN* 蛋白置于与 *LeMADS-RIN*、*LeMADS-rin* 和 *FBP4* 相同的进化枝中。该进化枝中的 *LeMADS-RIN* 是在果实成熟调控中起作用的 MADS-box 蛋白。如番茄中成熟抑制(*RIN*) 位点发生突变, 则番茄果实就不能成熟, 而且萼片变大。*CaRIN* 和 *LeMADS-RIN* 的序列高度同源表明 *CaRIN* 可能也参与果实成熟的调控。与番茄和辣椒相比, 矮牵牛果实为蒴果, 不是肉质型果实, 可以推测该类转录因子可能会对不同果实类型的成熟产生影响。

4 *CaRIN* 特异性表达分析

提取开花期辣椒的根、茎、叶、花以及不同成熟度的辣椒果实总 RNA, 以辣椒肌动蛋白基因的组成型表达为内参, 进行 *CaRIN* 基因的半定量 RT-PCR 分析的结果表明, *CaRIN* 在破色期的辣椒

果实和红熟期辣椒果实中大量表达, 而在绿熟期辣椒果实和其他辣椒器官中几乎不表达(图 4)。该基因的表达模式与 Hileman 等(2006)报道的 *LeMADS-RIN* 的表达模式一致, 由此可以推测 *CaRIN* 可能具有与 *LeMADS-RIN* 相似的功能。

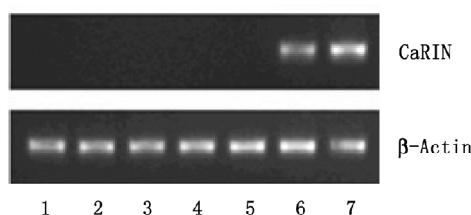


图 4 *CaRIN* 的半定量 RT-PCR 分析

Fig.4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *CaRIN* gene in different organs of peppers

1: 根; 2: 茎; 3: 叶; 4: 花; 5: 绿熟期果实; 6: 破色期果实; 7: 红熟期果实。

我们用 *CaRIN* 基因序列对番茄功能基因组数据库(Tomato Functional Genomics Database)进行 BLASTn 搜索的结果表明, 探针 1-1-8.2.16.2 对 *CaRIN* 显示出最大的序列同源性。从数据库得到的该基因的表达结果(图 5)可以看出, *CaRIN* 在破色期后高度表达, 这一结果与我们的半定量 RT-PCR 的结果一致。因此可以推断, *CaRIN* 可能控制着能够调控辣椒果实发育的成熟特异基因的表达。

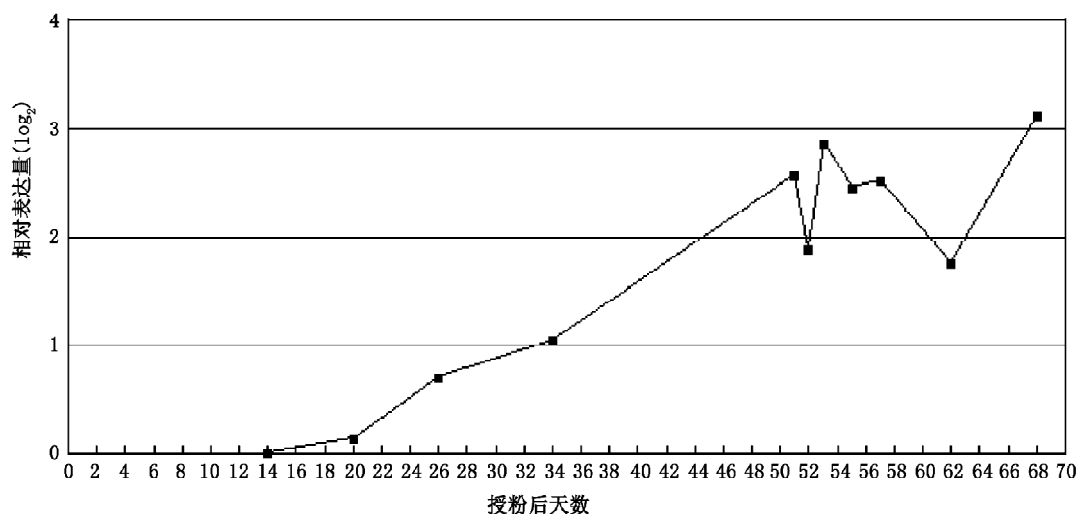


图 5 果实成熟过程中 *CaRIN* 的表达

Fig.5 Expression of *CaRIN* gene during fruit ripening
授粉后 39 d 进入绿熟期, 42 d 进入破色期, 50 d 进入红熟期。

参考文献

- Giovannoni J (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 725~749
- Hileman LC, Sundstrom JF, Litt A, Chen M, Shumba T, Irish VF (2006). Molecular and phylogenetic analyses of the MADS-box gene family in tomato. *Mol Biol Evol*, 23: 2245~2258
- Messenguy F, Dubois E (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene*, 316: 1~21
- Ng M, Yanofsky M (2001). Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat Rev Genet*, 2: 186~195
- Santelli E, Richmond TJ (2000). Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol*, 297: 437~449
- Theissen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, Munster T, Winter KU, Saedler H (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol*, 42: 115~149
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*Rin*) locus. *Science*, 296: 343~346
- Yasuhiro I, Mamiko K, Nao I, Kimiko Y, Junji K, Junichi Y, Hirotaka I, Takahiro I, Seiji H, Takafumi K (2008). DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the *rin* mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator *RIN*. *Plant J*, 55: 212~223
- Zhu HL, Zhu BZ, Li YC, Shao Y, Wang XG, Xie YH, Chen AJ, Luo JJ, Jia XY, Luo YB (2008). Expression and DNA binding activity of the tomato transcription factor *RIN* (ripening inhibitor). *Biosci Biotechnol Biochem*, 72: 250~252