

黑果枸杞*LrANS*基因的克隆及表达分析

王联星^{1,2,3} 马得森^{1,2,3} 史国民^{2,3} 高思丹^{1,2,3} 郭佳磊^{1,2,3} 赵伟民¹ 李凤珍^{1,2} 何涛^{1,2,3*}

(¹青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016; ²青海省园林植物与观赏园艺重点实验室, 西宁 810016;

³省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016)

摘要 以黑果枸杞为材料, 利用同源克隆和 RACE 技术克隆了花青素合成相关基因 *LrANS* (GenBank 登录号为 MK713977)。序列分析表明, *LrANS* 基因 cDNA 全长为 1 527 bp, 包含 1 290 bp 的开放阅读框, 编码 429 个氨基酸; 亚细胞定位显示, *LrANS* 主要分布于细胞质及细胞膜上; 同源序列比对表明, *LrANS* 与烟草 *NtANS* 的氨基酸序列相似性较高, 达到 77.2%。RT-PCR 分析显示, *LrANS* 基因在根、茎、叶、花、青果、紫果和黑果中均有表达, 且在黑果中的表达显著高于其他组织; 在紫外胁迫下, *LrANS* 基因的表达显著下降。推测 *LrANS* 基因在花青素合成中发挥着重要作用。

关键词 黑果枸杞; 花青素; *LrANS* 基因; 紫外胁迫

Cloning and Expression Analysis of *LrANS* from *Lycium ruthenicum* Murr

WANG Lianxing^{1,2,3}, MA Desen^{1,2,3}, SHI Guomin^{2,3}, GAO Sidan^{1,2,3}, GUO Jiale^{1,2,3},

ZHAO Weimin¹, LI Fengzhen^{1,2}, HE Tao^{1,2,3*}

(¹School of Ecol-Environmental Engineering, Xining 810016, China; ²Key Laboratory of Landscape Plants of Qinghai Province, Xining 810016, China; ³State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract Taking the *Lycium ruthenicum* Murr as material, an anthocyanidin synthesis-related gene named *LrANS* (GenBank accession number MK713977) was cloned by homologous cloning and RACE methods. The sequence analysis showed that the length of *LrANS* gene was 1 527 bp, which contained a 1 290 bp ORF encoding 429 amino acids. Subcellular localization assays showed that the *LrANS* protein was localized in the cytoplasm and cytomembrane. Comparison of homology amino acid sequence indicated that *LrANS* had higher similarity with *Nicotiana tabacum* *ANS* (77.2%). The RT-PCR analysis showed that the *LrANS* gene was expressed in roots, stems, leaves, flowers, green fruits, purple fruits and black fruits, and the expression level in black fruits was significantly higher than other tissues. The *LrANS* gene expression was dramatically decreased under UV irradiation. It is speculated that the *LrANS* gene may play an important role in the anthocyanidin synthesis of *L. ruthenicum*.

Keywords *Lycium ruthenicum* Murr; anthocyanidin; *LrANS*; UV irradiation

花青素 (anthocyanidins) 又称花色素或花色苷, 属于黄酮类化合物, 是植物重要的次生代谢产物, 常与不同种类单糖结合形成糖苷累积于表皮细胞液泡中, 使植物的花、果实、种皮等器官呈现红色、紫色、深蓝色等颜色, 这在吸引昆虫传粉、防御紫外线辐

射、抵抗低温、防治病害等方面发挥着非常重要的生理功能^[1-2]。花青素合酶 (anthocyanidin synthase, *ANS*) 是花青素合成通路末端的关键酶, 依赖 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-ODDs) 及亚铁离子催化无色花青素向有色花青素转变^[3-4]。*ANS* 由一个小的基因

收稿日期: 2019-01-04 接受日期: 2019-07-08

国家自然科学基金项目 (批准号: 31660217) 资助的课题

*通讯作者: Tel: 0971-5315595, E-mail: hetaoxn@aliyun.com

Received: January 4, 2019

Accepted: July 8, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31660217)

*Corresponding author: Tel: +86-971-5315595, E-mail: hetaoxn@aliyun.com

网络出版时间: 2019-11-12 12:25:54

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1026.004.html>

家族编码,其开放阅读框普遍大于1 000 bp,基因序列含有1至2个内含子,启动子区具有基本启动子元件、转录因子结合元件和环境响应元件等^[5-6]。自1990年首个*ANS*基因从玉米中分离得到以来,已先后在山药(*Dioscorea opposita*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、荞麦(*Fagopyrum dibotrys*)、荔枝(*Litchi chinensis*)、菊花(*Dendranthema morifolium*)、鸡爪槭(*Acer palmatum*)等植物中克隆得到*ANS*基因^[7-9]。MYB、bHLH、WD40类转录因子可以调控*ANS*基因的表达,从而控制植物花青素积累影响到花瓣着色^[10-12]。*ANS*的表达产物可以积极响应植物激素的调节以帮助植物抵御逆境胁迫^[6]。

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr)属茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium* L.),是一种分布于我国西北地区的多棘刺灌木,其果实成熟后含有丰富的花青素,有植物界“花青素之王”的美称^[13]。目前,对黑果枸杞花青素及其合成相关基因还不是很清楚。为此,本研究以黑果枸杞为材料,通过RT-PCR,结合RACE技术克隆了其花青素合成酶基因*LrANS*,并研究该基因在不同组织中的表达;通过紫外胁迫处理,进一步研究该基因与环境的关系,为阐明黑果枸杞花青素的合成以及分子适应机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

黑果枸杞种子和组织采自柴达木盆地东沿都兰县境内诺木洪农场,其中青果为开花后15天、紫果为开花后22天、黑果为开花后30天。

选取培养60天的黑果枸杞种子苗,按照师生波等^[14]的方法进行紫外胁迫处理,分别于处理后1、3、6、9和12 h取叶片为材料。

1.2 实验方法

1.2.1 黑果枸杞*LrANS*基因的克隆 根据NCBI上已克隆的茄科植物*ANS*序列设计特异性引物(表1),以黑果枸杞叶片为材料,利用TaKaRa试剂盒提取总RNA,反转录合成cDNA为模板,利用Ex Taq酶进行PCR扩增反应获得*LrANS*基因的中间片段,将克隆获得的产物连接至pMD[®] 19-T载体上进行测序,经Blast序列比对确定为*LrANS*基因目标序列。再根据已得到序列设计3'-RACE和5'-RACE特异性引物,按照TaKaRa公司的SMARTer[®] RACE5'-/3'-Kit说明书进行3'和5'-RACE PCR扩增反应,扩增产物连接

至pMD[®] 19-T载体上进行测序,经NCBI序列比对确定为目标序列,根据3个片段拼接成的*LrANS*基因cDNA序列设计验证引物,并进行*LrANS*基因cDNA全长序列扩增验证。

1.2.2 黑果枸杞*LrANS*基因生物信息学分析 利用ORF Finder寻找开放阅读框;用NCBI中的Blast工具预测编码蛋白保守结构域;用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质理化性质;用SOPMA(<http://pbil.ibcp.fr>)和SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)对氨基酸的二三级结构进行预测;用Netphos3.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测蛋白磷酸化位点;用ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)预测蛋白亲/疏水性;用TMPred(https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)预测蛋白跨膜结构域;用SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽;用predictprotein(<https://www.predictprotein.org/>)预测亚细胞定位;用DNAMAN比对氨基酸序列;以MEGA 7.0构建系统发育进化树;用FoldIndex(<http://biportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>)进行蛋白无序化分析。

1.2.3 *LrANS*基因的亚细胞定位 利用Primer Premier 5在基因*LrANS*开放阅读框上游设计带有*Bsa*I和*Eco* 31I酶切识别位点的引物*LrANS*-F/*LrANS*-R及表达载体检测引物*ANS*1/*ANS*2。利用设计的表达载体构建引物对*LrANS*基因的CDS区进行扩增,并对PCR产物和pBWA(V)HS-GLosgfp载体进行双酶切;将酶切目标基因片段和表达载体片段用T4DNA连接酶连接,构建融合表达载体35S::*LrANS*-GFP。利用热击法转化大肠杆菌DH5 α ,鉴定出阳性克隆后扩大培养并提取重组质粒。通过液氮冻融法将重组质粒35S::*LrANS*-GFP转化至农杆菌GV3101,之后将用含有35S::*LrANS*-GFP质粒的农杆菌侵染本氏烟草叶片;培养48 h后,利用荧光共聚焦显微镜观察叶片中的荧光信号,并用含35S::*GFP*空载体的农杆菌作为对照组。

1.2.4 *LrANS*基因的表达分析 以黑果枸杞根、茎、叶、花、青果、紫果、黑果和紫外处理不同时间下的叶片为实验材料,提取总RNA,反转录cDNA为模板,利用实时荧光定量PCR技术,进行*LrANS*基因的表达分析;选用 β -Actin为内参基因,引物序列见表1。按照SYBR Premix Ex Taq II说明书进行RT-PCR,PCR

反应程序: 95 °C预变性3 min, 95 °C变性10 s, 60 °C退火30 s, 38个循环; 72 °C延伸10 min。实验设计了3组生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算*LrANS*在不同组织及紫外处理下样品中的表达量, 数据以SPSS软件进行统计分析。

2 结果

2.1 黑果枸杞*LrANS*基因的克隆

根据同源克隆的方法, 设计了上下游引物ANS-F和ANS-R, 以逆转录成第一链cDNA为模板分别进行扩增和测序(图1); 克隆得到保守片段约1 200 bp, 3'RACE片段约260 bp, 5'RACE片段约250 bp, 将保守片段与5'RACE片段、3'RACE片段拼接得到1条cDNA全长为1 527 bp的序列。经验证引物扩增最终获得了完整的黑果枸杞*LrANS*基因的cDNA序列, 其中包含长度为1 290 bp的开放阅读框(图2)及112 bp的5'-UTR

和125 bp的3'-UTR, 3'-UTR包含23 bp的polyA, 将其命名为*LrANS*(Genbank登录号为MK713977)。

2.2 黑果枸杞*LrANS*基因的生物信息学分析

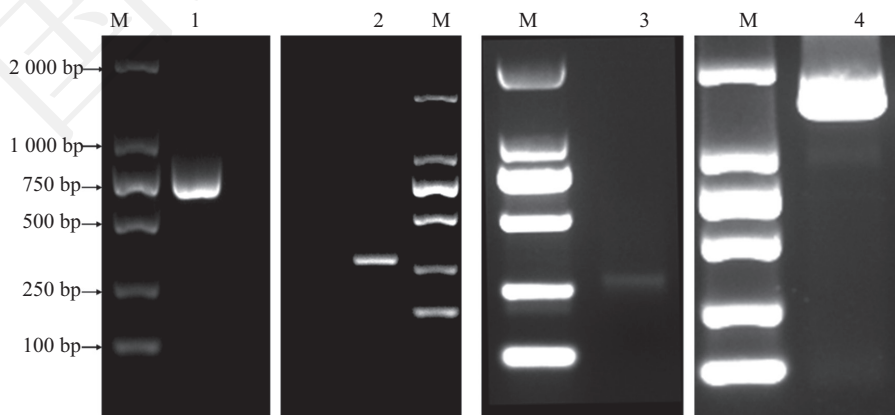
2.2.1 蛋白理化性质预测 蛋白理化性质分析结果显示, *LrANS*蛋白的分子式 $C_{2143}H_{3362}N_{576}O_{661}S_{14}$, 分子量为4.82 kDa, 理论等电点为5.31, 负电荷残基(Asp+Glu) 72个, 正电荷残基(Arg+Lys) 54个, 不稳定系数为43.83, 推测*LrANS*为不稳定酸性蛋白。

2.2.2 磷酸化位点与亲/疏水性分析 磷酸化位点分析如图3所示, *LrANS*含有多个磷酸化位点, 丝氨酸磷酸化位点最多, 多个位点预测值在0.9以上, 表明其有可能受磷酸化作用调控。此外, 亲/疏水性预测结果显示, *LrANS*的GRAVY值为-0.613, 表明其属于亲水性蛋白。

2.2.3 跨膜结构域分析 跨膜结构预测结果显示, *LrANS*蛋白在239-257位氨基酸处存在一个由外向

表1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

引物名称 Primer name	前引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	后引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
5'RACE	TGC TGC CAT AGC CTT GGA CAT T	CTT GGA CAT TGC CAG AGG TTT G
3'RACE	AAG TCT TCA AGA AGG ACG ATC AGG A	TCA GGA TAT TGC TGC TGA AGA ATC T
ORF	ATG GTG AGT GCA GTT GTT CC	CTA TTT AGA TTC TTC AGC AG
Confirm	ATT CAT ACA AAG ATG GTG AGT GCA G	CGT ACT ATC TAA ATA GAG CAA CGC
β-Actin	CAA TCG GGT ATT TCA AGG TCA AG	GAG CAG TGT TTC CCA GCA TTG
RT-ANS	TCC ATT GTG TTT TCC CCG	TGC CTC CAA CTT CCT TCT CTA
LrANS	CAG TGG TCT CAC AAC ATG GTG AGT GCA GTT GTT CC	CAG TGG TCT CAT ACA TTT AGA TTC TTC AGC AA
ANS	ATG GTG AGT GCA GTT GTT CC	ACA TTT AGA TTC TTC AGC AA



M: Marker DL2000; 1: 保守片段; 2: 3'-RACE; 3: 5'-RACE; 4: 全长验证。
M: Marker DL2000; 1: conserved region; 2: product of 3'-RACE; 3: product of 5'-RACE; 4: confirmation of full-length cDNA.

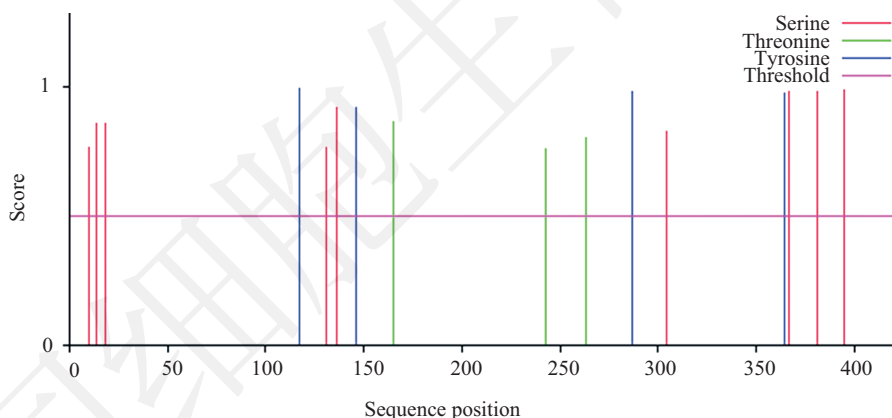
图1 黑果枸杞*LrANS*基因的扩增

Fig.1 Amplification of *LrANS* gene in *Lycium ruthenicum*


```

1  ATGGTGAGTGCAGTTGTTCCAAACCCCTTCAAGAGTTGAAAGCTTGGCTAAAAGTGAATC
1  M V S A V P T P S R V E S L A K S G I
61  CAGGCCATTCTTAAAGATGTGTGAGGCCACAAGAAGATTAAATGGAATGGGAACATC
21  Q A T P K E Y V R P Q E E L N G M G N I
121  TTGGAGGAAGAGAAGAGGAGGACCTCAAGTACCGACGATAGATCTTAAACAAATCGAC
41  F E E E K K G G P Q V P T I D L K Q I D
181  TCAGAGACAAATGAAATTCGCGAGAGATGCCACCAAGAGTTGAAGAAAGCAGCCATGGAA
61  S E D N E I R E R C H Q E L K K A A M E
241  TGGGGTGTGATGCACCTCGTAAACCATGGTATATCGGATGAGCTAATGTATGCTGTGAAG
81  W G V M H L V N H G I S D E L I D R V K
301  GTTGCCGGAGGTACCTTCITTGATTTACCTGTTGAAGAAAAGGAGAAGTATGCTAATGAT
101  V A G G T F F D L P V E E K E K Y A N D
361  CAAACCTCTGGCAATGTCCAGGCTATGGCAGCAAGCTAGCAAAATAGTGCTTCTGGTCAG
121  Q T S G N V Q G Y G S K L A N S A S G Q
421  CTGGAGTGGGAGGATTACTTCTTCATTGTGTTTTCCCGAGGACCAAGCAGACTTGGCC
141  L E W E D Y F F H C V F P E D K H D L A
481  ATCTGGCCTAAAACCCCTACCGACTACATTCAGCAACAAGTGAATATGCCAAGCAGATA
161  I W P K T P T D Y I P A T S E Y A K Q I
541  AGGAACCTAGCAACAAGATTTTATGCTGTGCTTCTATTTGGACTGGGACTGGAAGAAGGA
181  R N L A T K I L A V L S I G L G L E E G
601  AGACTAGAGAAGGAAGTTGGAGGCTGGAAGACCTGTTGCTTCAATGAAGATTAACTAC
201  R L E K E V G G M E D L L L Q M K I N Y
661  TACCTTAATGCCCCCAACGAACTAGCATTGGCGTGAAGCTCATACTGATGTGAGT
221  Y P K C P Q P E L A L G V E A H T D V S
721  GCACGTACTTTCATCTCCACAATATGGTGCCCGCTTGCAACTCTTCTATGAAGGGAAG
241  A L T F I L H N M V P G L Q L F Y E G K
781  TGGGTAACTGCAAGTGTGTGCTAATTCATAATCATGCACATTGGGGATACCCCTGAA
261  W V T A K C V P N S I I M H I G D T L E
841  ATCTTAAGCAATGGAAAGTACAAGAGTATTCTTACAGAGGGGTTGTGAACAAAGAGAAA
281  I L S N G K Y K S I L H R G V V N K E K
901  GTAAGGATTCATGGGCGATTTCTGTGAGCCGCAAGGATAAGATCATCTTAAGCCC
301  V R I S W A I F C E P P K D K I I L K P
961  CTACCTGAATGTGACCGACGCTGATCCACCTCGATTCCACCTCGCACCTTTCGACAG
321  L P E T V T D A D P P R F P P R T F A Q
1021  CATATGGCGCAGGAGCTGTTCAAGAAGGATGATCAGATGCTGCTGACCAAGATATAT
341  H M A H E L F K K D D H D A A D H K V Y
1081  AAGAAGGATTATCAGGATTCGTCTACTGAACAGAAAGTCTTCAAGAAGGACGATCAGGAT
361  K K D Y Q D S A T E Q K V F K K D D Q D
1141  TCTGCTGTTAAACAGAAAGCCGTCAACAAGGACATCAGGATTCTGCTCTGAACAGAAA
381  S A G K Q K A V N K D N Q D S A P E Q K
1201  GCCGTCAAAAGGATGAACAGGATGCCGTGCTGAGCACAAAGCTTTCGAGAACGACAAI
401  A V K K D E Q D A A A E H K V F E N D N
1261  CAGGATATGCTGCTGAAGATCTAAATAG
421  Q D I A A E E S K *

```

图2 黑果枸杞*LrANS*的编码序列全长及氨基酸序列Fig.2 Coding sequence and deduced amino acid sequence of *LrANS*图3 *LrANS*磷酸化位点分析Fig.3 Phosphorylation site prediction analysis of *LrANS*

内的跨膜螺旋, 加权平均分为722大于模型设定500, 推测其实以一个跨膜蛋白。同时, SignalIP预测结果显示, *LrANS*没有信号肽, 属于非分泌性蛋白。

2.2.4 蛋白无序化分析和二三级蛋白结构预测
利用FoldIndex程序对*LrANS*蛋白进行无序化预测分析。图4结果显示, 该蛋白整个氨基酸序列中有3个无序化区域, 包含196个氨基酸, 无序化比例为45.69%。为进一步分析*LrANS*蛋白的结构, 通过SPOMA软件分析*LrANS*蛋白二级结构, 得出 α 螺旋(alpha helix)占37.53%, β 转角(beta turn)占5.59%, 无

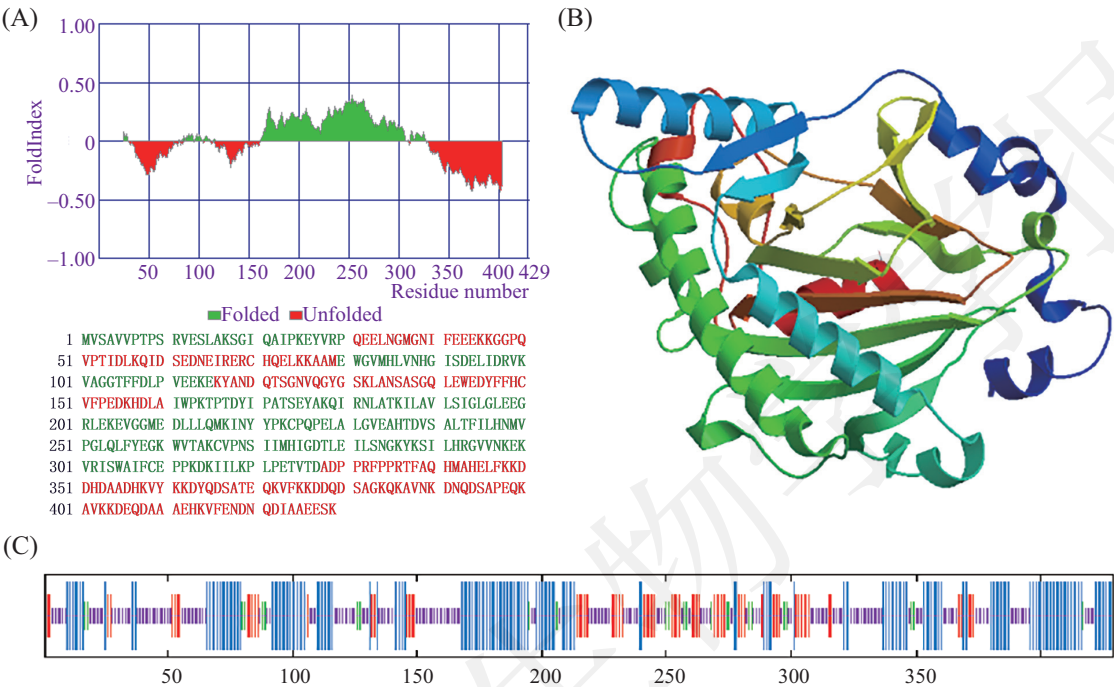
规则卷曲(random coil)占40.56%, 延伸链(extended strand)占16.32%。利用SWISS-MODEL对其三级结构的预测中发现*LrANS*蛋白属于PLN03178蛋白超家族。

2.2.5 *LrANS*蛋白亚细胞定位分析 以含有35S::*LrANS*-GFP质粒的农杆菌侵染本氏烟草叶片, 培养48 h后, 利用荧光共聚焦显微镜观察叶片中的荧光信号, 并用含35S::GFP空载体的农杆菌作为对照组。与35S::GFP对照组相比, 含有目标基因的35S::*LrANS*-GFP融合蛋白, 绿色荧光信号主要集中

于细胞质(图5), 而对照组在烟草细胞质、细胞核中均有绿色荧光信号分布。定位结果与预测结果基本一致, *LrANS*主要定位于细胞质中, 推测其编码结构蛋白在细胞质的生理生化反应中发挥重要作用。

2.3 多序列比对及系统进化分析

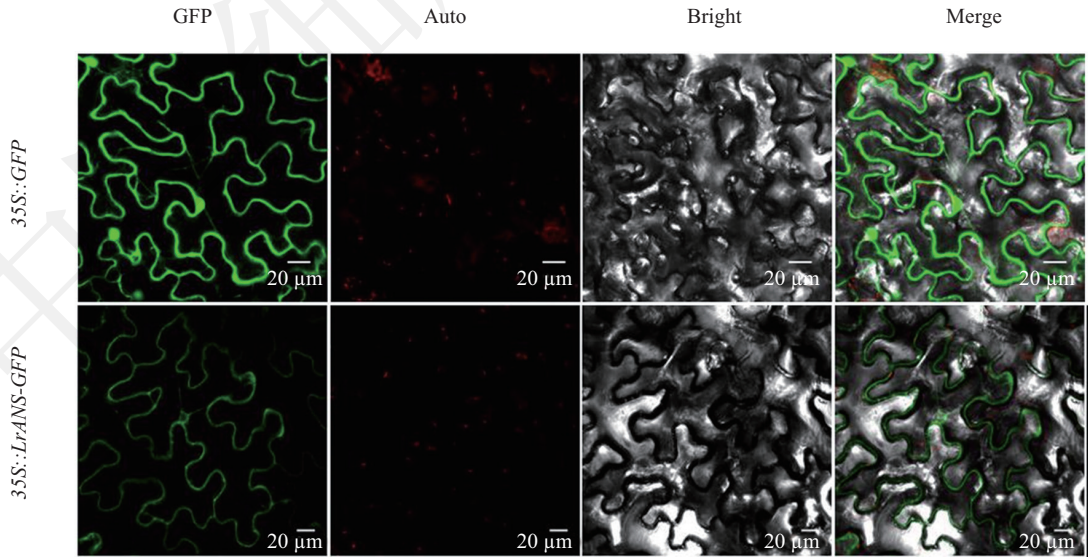
利用MEGA7.0对20种不同植物的ANS蛋白构建系统进化树(图6), 结果发现*LrANS*与烟草(MF445066.1)、马铃薯(NM_001287930.1)、茄子



A: *LrANS*折叠状态分析, 数值的正负表示蛋白的有序和无序状态; B: 三级结构预测; C: 二级结构预测, 蓝色: α 螺旋; 红色: 延伸链; 绿色: β 折叠; 紫色: 无规卷曲。
A: analysis of the folding state of *LrANS* from *L. ruthenicum*, positive and negative numbers represent ordered and nonordered protein, respectively; B: predicted 3-D structure; C: predicted secondary structure. blue: the alpha helix; red: the extended chain; green: the β -fold; purple: the random curl.

图4 黑果枸杞*LrANS*蛋白生物信息学分析

Fig.4 Bioinformatic analysis of *LrANS* protein in *L. ruthenicum*



A: 35S::GFP蛋白定位; B: 35S::LrANS-GFP融合蛋白定位。GFP: 绿色荧光; Auto: 叶绿体自发荧光。
A: localization of 35S::GFP protein; B: localization of 35S::LrANS-GFP fusion protein. GFP: green fluorescence; Auto: chloroplast autofluorescence.

图5 *LrANS*-GFP融合蛋白在烟草表皮细胞中的亚细胞定位

Fig.5 Subcellular localization of *LrANS*-GFP in the epidermal cells of *Nicotiana benthamiana*

(KT727966.1)等茄科植物进化关系较近,处于同一进化分支。通过DNAMAN6.0对黑果枸杞LrANS与其他进化关系较近的不同植物ANS氨基酸序列比对发现(图7),LrANS与烟草相似性最高,为77.2%。与马铃薯、茄子也均有较高的相似性。

2.4 黑果枸杞LrANS基因的表达分析

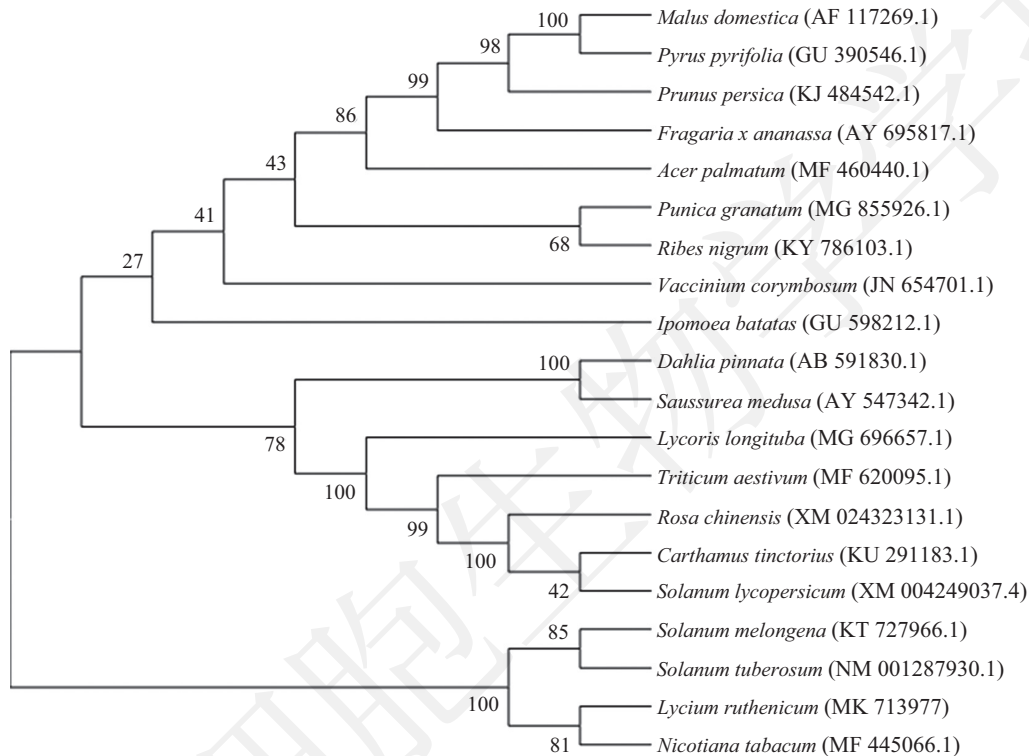
2.4.1 组织特异性表达分析

利用RT-PCR分析黑

果枸杞不同组织中LrANS基因的表达情况,图8结果显示,LrANS基因在检测的组织中均有表达,且黑果中的表达量显著高于其他组织;表达量由高到低依次为:黑果>紫果>绿果>花>叶>茎>根。这表明LrANS基因的表达水平随果实的发育程度不断增强。

2.4.2 紫外胁迫下的表达分析

紫外胁迫下,黑果

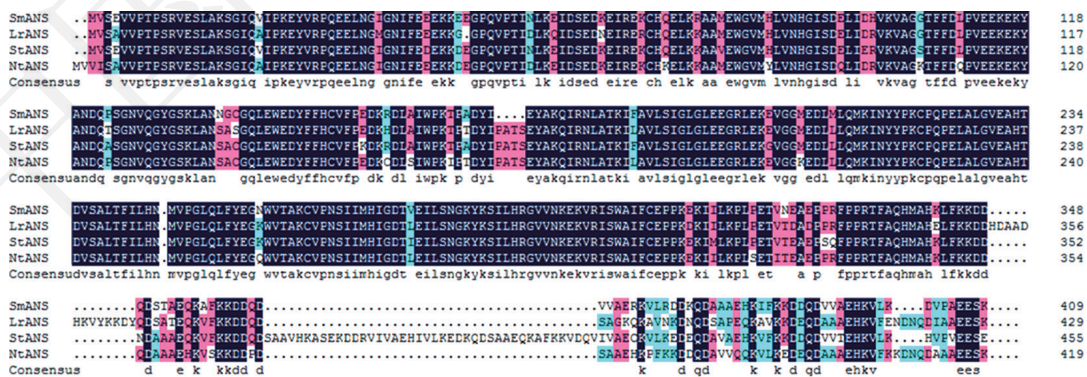


各节点处数字表示bootstrap值(重复1 000次)。

The numbers at each node represented the bootstrap values (with 1 000 replicates).

图6 ANS系统进化树分析

Fig.6 Phylogenetic tree of ANS

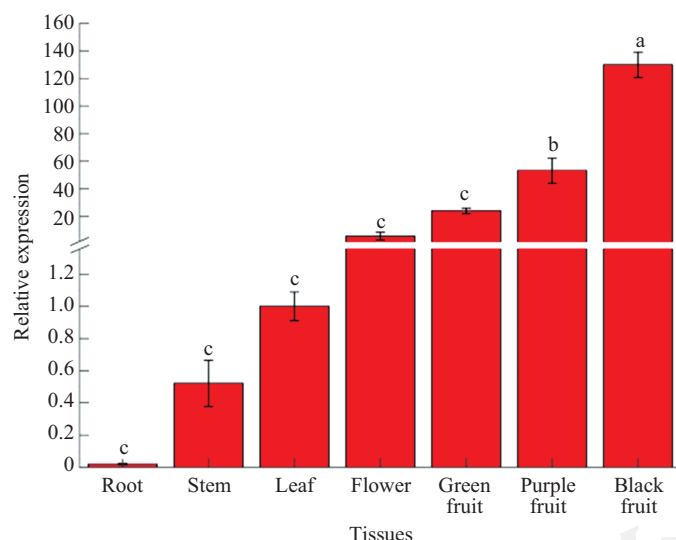


SmANS: 茄子(KT727966.1); LrANS: 黑果枸杞(MK713977); StANS: 马铃薯(NM_001287930.1); NtANS: 烟草(MF445066.1)。

SmANS: solanum melongena (KT727966.1); LrANS: lycium ruthenicum (MK713977); StANS: solanum tuberosum (NM_001287930.1); NtANS: nicotiana tabacum (MF445066.1)。

图7 ANS蛋白多序列比对

Fig.7 Multiple sequence alignment of ANS

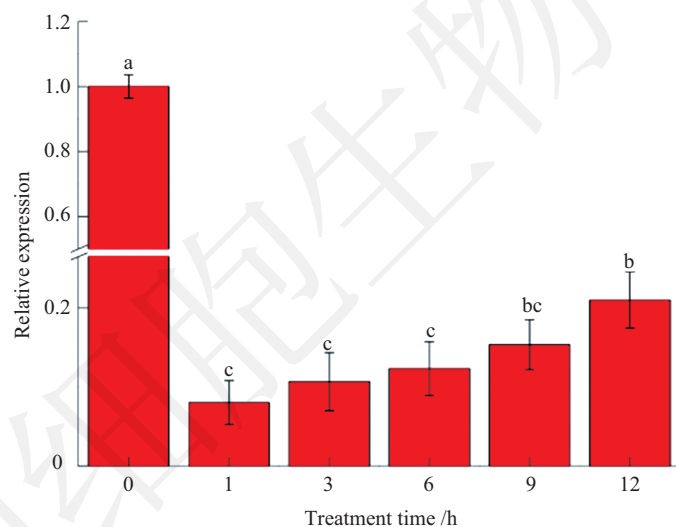


不同字母表示不同组织间的表达差异显著, $P < 0.05$ 。

Different letters represent significant difference among different tissues, $P < 0.05$.

图8 *LrANS*基因在不同组织间的表达情况

Fig.8 Relative expression level of *LrANS* gene in different tissues



不同字母表示同一处理不同时间的表达差异显著, $P < 0.05$ 。

Different letters represent significant different among difference time points within same treatment, $P < 0.05$.

图9 *LrANS*基因在紫外胁迫下的表达分析

Fig.9 Relative expression level of *LrANS* gene under UV irradiation

枸杞叶片中*LrANS*基因的表达量显著下降, 1 h时表达量最低, 为对照组的1/12, 其后表达量缓慢上升, 12 h恢复到对照组的1/5, 整体呈现先降低再缓慢上升的变化趋势(图9)。

3 讨论

*ANS*作为植物花青素合成的关键基因, 对植物生长发育至关重要, 其分子机制及功能研究受到了广泛的关注。我们从黑果枸杞中克隆了*LrANS*基

因, 序列分析表明, *LrANS*属于PLN03178超家族, 包含典型的2OG-Fe(II)结构域。系统进化树分析与氨基酸序列比对结果显示, 黑果枸杞*LrANS*蛋白与烟草、茄子、马铃薯等茄科植物的*ANS*蛋白处于同一进化分支, 其中又与烟草的相似性较高, 达到77.2%。已有研究证实, 马铃薯*StANS*、茄子*SmANS*及烟草*NtANS*基因参与了花青素的合成^[15-17]。因此, 推测黑果枸杞*LrANS*基因的功能与它们的相似, 也与花青素的合成有关。

植物ANS基因的表达具有组织特异性,王雪等^[18]发现, *RtLDOX2/(ANS)*在长叶红砂(*Reaumuria trigyna*)叶中特异性表达; Xu^[19]检测到银杏(*Ginkgo biloba*)GbANS在成熟果实中的表达量远远高于其他组织; Liu等^[20]测出甘薯(*Ipomoea batatas*)中IbANS基因在块根及周皮中表达量更高; 钟淮钦等^[21]发现, 鸡爪槭(*Acer palmatum*)叶片中ApANS表达量在展叶期最高。本研究发现, 黑果枸杞*LrANS*基因在所有组织中均有表达, 不具有组织特异性, 但在成熟果实中的表达量较高, 在根、茎、叶中的表达量较低。本实验室曾对黑果枸杞果实花青素含量的变化进行了研究, 发现随着果实的发育花青素的含量逐渐升高^[22]。在黑果枸杞果实的发育中, *LrANS*基因的表达与花青素含量的变化呈现了相同的变化趋势, 我们进一步推测*LrANS*基因与花青素的合成相关。

诸多证据表明, 植物ANS基因的表达受各种转录因子及环境胁迫诱导^[23-26]。为研究*LrANS*基因与紫外辐射的关系, 我们对黑果枸杞种子苗进行了紫外胁迫处理, 结果显示, *LrANS*基因的表达量显著下降。在花青素合成途径中, 一般由MYB转录因子、bHLH转录因子和WD40转录因子构成的蛋白复合体(MBW)直接调控包括ANS在内的结构基因的转录^[27]。本实验室研究发现, 黑果枸杞*LrTTG1*基因(WD40转录因子)的表达水平在紫外胁迫下也显著下降^[22]。根据以上结果推测, *LrANS*基因可能受到上游MBW复合体的调控, 在紫外胁迫下, WD40转录因子的下调导致下游结构基因*LrANS*的表达量下降, 这与周雯在甘蓝(*Brassica oleracea*)中的研究结果一致^[26]。但在黑果枸杞果实中, *LrANS*基因的表达与WD40转录因子以及紫外辐射的关系是否与种子苗一致, 目前仍然不清楚。

本研究克隆了黑果枸杞*LrANS*基因, 并对该基因在不同组织中及紫外胁迫下的表达模式进行了分析, 推测*LrANS*基因在调控花青素合成的同时也受到环境、激素、MBW复合体等的调控。该研究为进一步明确*LrANS*基因在黑果枸杞花青素合成中的分子调控机理奠定了理论基础。

参考文献 (References)

- Rizzolo A, Nani RC, Viscardi D, Bertolo G, Torreggiani D. Modification of glass transition temperature through carbohydrates addition and anthocyanin and soluble phenol stability of frozen blueberry juices. *J FOOD ENG* 2003; 56(2): 229-31.
- Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* 2006; 57(1): 761-80.
- Turnbull JJ, Sobey WJ, Aplin RT, Hassan A, Firmin JL, Schofield CJ, *et al.* Are anthocyanidins the immediate products of anthocyanidin synthase. *Cheminform* 2000; 32(14): 2473-4.
- Springob K, Nakajima JI, Yamazaki M. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep* 2003; 20(3): 288-3.
- 王冰, 王全逸, 印敬明. 野生马铃薯ANS同源基因的克隆与表达分析. 植物生理学(Wang Bing, Wang Quanyi, Yin Jingming. Molecular cloning and expression analysis of an ANS homologous gene from *Solanum cardophyllum*. *Plant Physiology Journal*) 2011; 47(11): 1103-8.
- 李小兰, 张明生, 吕享. 植物花青素合成酶ANS基因的研究进展植物生理学报(Li Xiaolan, Zhang Mingsheng, Lü Xiang. The research progress on plant anthocyanin synthetase ANS gene. *Plant Physiology Journal*) 2016; 52(6): 817-27.
- Mano H, Ogasawara F, Sato K, Higo H, Minobe Y. Isolation of aregulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physiol* 2007; 143(3): 1252-68.
- 赵志常, 胡福初, 黄建峰. 荔枝ANS基因的克隆及其序列分析. 北方园艺(Zhao Zhichang, Hu Fuchu, Huang Jianfeng. Cloning and sequence analysis of ANS gene from *Litchi chinensis*. *Northern Horticulture*) 2012; 36(19): 118-21.
- 唐杏姣, 韩科厅, 胡可, 孟丽, 戴思兰. 菊花*CmDFR*与*CmANS*基因启动子序列克隆与瞬时表达分析. 生物技术通报(Tang Xingjiao, Han Keting, Hu Ke, Meng Li, Dai Silan. Cloning and transient expression assay of *CmDFR* and *CmANS* promoters in anthocyanin pathway from *chrysanthemum*×*morifolium* *Biotechnology Bulletin*) 2012; (5): 81-8.
- Deluc L, Bogs J, Walker AR. The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiol* 2008; 147(4): 2041-53.
- 王璐. 瓜叶菊花青素苷合成分支途径的调控机制. 北京林业大学(硕士论文), 2015.
- 李宝燕. 烟草WD40蛋白TTG2对生长发育和抗病性的调控作用. 南京农业大学(博士论文), 2012.
- 姬孝忠. 黑果枸杞育苗繁殖技术. 中国野生植物资源(Ji Xiaozhong. Technique of Propagation and Grow Seedlings of *Lycium ruthenicum* Murr. *Chinese Wild Plant Resources*) 2015; 2: 75-7.
- 师生波, 韩发. 紫外光源及太阳UV-B辐射的模拟实验. 生物技术通报(Shi Shengbo, Han Fa. Light sources for ultraviolet research and simulation of solar ultraviolet B radiation *Biotechnology Bulletin*) 2006; S1: 161-6.
- Lim SH, Kim JK, Jong-Yeol Lee. Petal-specific activity of the promoter of an anthocyanidin synthase gene of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2013; 114(3): 373-83.
- Jiang M, Liu Y, Ren L. Molecular cloning and characterization of anthocyanin biosynthesis genes in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 2016; 38(7): 163.
- Fogelman E, Oren-Shamir M, Hirschberg J. Nutritional value of potato (*Solanum tuberosum*) in hot climates: anthocyanins, carotenoids, and steroidal glycoalkaloids. *Planta* 2019; 12: 1-13.

- 18 王雪. 珍稀泌盐植物长叶红砂RtLDOX2基因的克隆及功能分析. 内蒙古大学(硕士论文), 2018.
- 19 Xu F, Cheng H, Cai R, Li LL, Chang J, Zhu J, *et al.* Molecular cloning and function analysis of an anthocyanidin synthase gene from *Ginkgo biloba*, and its expression in abiotic stress responses. *Mol Cells* 2008; 26(6): 536-47.
- 20 Liu X, Chen M, Li M. The anthocyanidin synthase gene from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) Cloning, characterization and tissue expression analysis. *AFR J BIOTECHNOL* 2010; 925(25): 3748-52.
- 21 钟淮钦, 陈裕德, 林榕燕. 鸡爪槭叶片花青素合成酶基因*ApANS*的克隆与表达分析. 中国细胞生物学学报(*Zhong Huaiqin, Cheng Yude, Lin Rongyan. Cloning and expression analysis of anthocyanin synthetase gene ApANS in Acer palmatum. Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(12): 1573-82.
- 22 马得森, 王联星, 史国民. 黑果枸杞*LrTTG1*基因的克隆及表达分析. 西北植物学报(*Ma Deseng, Wang Lianxing, Shi Guoming. Cloning and expression analysis of LrTTG1 from Lycium ruthenicum murr. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*) 2018; 38(12): 2194-200.
- 23 Emiliani J, Grotewold E, Ferreyra MLF, Casati P. Flavonols protect Arabidopsis plants against UV-B deleterious effects. *Mol Plant* 2013; 6(4):1376-9.
- 24 Nakatsuka T, Yamada E, Saito M. Heterologous expression of gentian MYB1R transcription factors suppresses anthocyanin pigmentation in tobacco flowers. *Plant Cell Rep* 2013; 32(12): 1925-37.
- 25 Ben-Simhon Z, Judeinstein S, Trainin T, Harel-Beja R, Bar-Ya'akov I, Borochoy-Neori H, *et al.* A "White" anthocyanin-less pomegranate (*Punica granatum* L.) caused by an insertion in the coding region of the leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX; ANS) gene. *PLoS One* 2015; 10 (11): e014277.
- 26 周雯. 甘蓝TT8及WD40转录因子影响花青素合成及开花时间的研究. 西南大学(硕士论文), 2017.
- 27 Tanaka Y, Ohmiya A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19(2): 190-7.