

番木瓜酪氨酸氨基转移酶基因 *CpTAT* 的分离与分析

申艳红, 陈永萍, 杨菲颖, 鲁娜

福建农林大学园艺学院 福建福州 350002
园艺植物遗传育种研究所

摘要 番木瓜酪氨酸氨基转移酶(Tyrosine aminotransferase, TAT)是维生素 E 合成途径中的一个关键酶。在已有番木瓜果实成熟差异基因片段序列的基础上, 采用 RACE 技术克隆了 TAT 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *CpTAT*。该基因全长包含 5'非编码区 98 bp, 3'非编码区 232 bp, 开放性阅读框 1 266 bp, 编码 421 个氨基酸。序列分析表明, 该基因为香草转氨酶超家族成员, 催化活性位点为第 253 位的赖氨酸, 编码蛋白与毛果杨、野草莓、桃、拟南芥和水稻的 TAT 蛋白同源性分别为 83.69%、81.09%、80.76%、78.87%、54.67%。荧光定量分析表明, *CpTAT* 基因在根中的表达量最高, 在茎和果实中的表达较低, 在叶中的表达量最低。与对照相比, 外源乙烯处理能诱导番木瓜果实中 *CpTAT* 基因表达量升高, 而 1-MCP 处理则抑制了该基因表达, 在果实衰老期表达量升高, 该基因可能在番木瓜果实成熟衰老中起作用。

关键词 番木瓜; 酪氨酸氨基转移酶; 基因克隆; RACE; 维生素 E

中图分类号 S668.2

文献标识码 A

Isolation and Analysis of Tyrosine Aminotransferase (TAT) Gene in Papaya

SHEN Yanhong, CHEN Yongping, YANG Feiying, LU Na

College of Horticulture / Institute of Genetics & Breeding in Horticultural Plants,
Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract Tyrosine aminotransferase (TAT) is one of the most important key enzymes in the vitamin E biosynthesis pathway. The full-length cDNA of TAT was isolated from papaya fruit using RACE-PCR and designated as *CpTAT*. The primers were designed according to a fruit ripening polymorphic fragment which was obtained from cDNA-AFLP analysis. The *CpTAT* cDNA sequence contains 5'-UTR of 98 bp, 3'-UTR of 232 bp, and ORF of 1 266 bp. Sequencing analysis showed that the gene was a member of the aspartate aminotransferase superfamily, which encoding 421 amino acids and having an active site of Lys253. The amino acid sequence was 83.69%, 81.09%, 80.76%, 78.87%, and 54.67% identity with TAT from *Populus trichocarpa*, strawberry, peach, *Arabidopsis*, and rice. Real-time PCR analysis revealed that the order of relative expression level of the *CpTAT* gene in different papaya organs was root, stem, fruit, and leaf. In addition, the *CpTAT* expression was induced by ethylene, inhibited by 1-MCP, and increased in aging period, indicating that *CpTAT* may be involved in the fruit senescence in papaya.

Key words *Carica papaya*; Tyrosine aminotransferase; Gene clone; RACE; Vitamin E

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2016.06.015

番木瓜(*Carica papaya* L.)是热带、亚热带地区常见果树。番木瓜营养成分多样, 除了含有比鲜橙更丰富的维生素 C 外, 还含有丰富的维生素 E^[1-2]。维生素 E 是具有抗氧化活性的生育酚和生育三烯酚的总称, 其中 α -生育酚的活性最高^[3]。由于酚基的存在, 维生素 E 极易被过氧化物氧化, 是一种较强的脂溶性抗氧化剂。医学证明, 维生素 E 与生殖系统、中枢神经系统、心血管系统和肌肉系统的正常代谢密切相关, 是治疗冠心病、动脉粥样硬

化、贫血、肝病和癌症等的辅助药物^[4]。同时, 维生素 E 还可改善动物肉质, 提高动物免疫力^[5]。在植物中, 维生素 E 参与清除光合器官中的自由基, 保护脂类双层膜免受脂肪氧化酶的攻击, 保护光合器官和维持生物膜的完整性^[6-7]。酪氨酸氨基转移酶(Tyrosine aminotransferase, TAT)是维生素 E 合成途径中的一个关键酶, 提高该酶的表达可相应地提高维生素 E 含量^[8]。酪氨酸在 TAT 的催化下形成 4-羟苯丙酮酸(4-HPP), 4-HPP 在 4-羟苯丙酮酸

收稿日期 2016-01-05

修回日期 2016-04-25

基金项目 福建农林大学园艺学院青年学术骨干培养基金项目(No. FAFU2012YYPY05); 福建省自然科学基金项目(No. 2010J05048)。

作者简介 申艳红(1978年—), 女, 副教授, 博士; 研究方向: 园艺植物遗传育种; E-mail: papayacrazy@aliyun.com。

双加氧酶(HPPD)催化下生成尿黑酸, 生成了维生素 E 的亲水性头部^[9]。2012 年, Riewe 等人发现, 在拟南芥中敲除 TAT 基因大大降低了维生素 E 含量, 进而证明了 TAT 在拟南芥维生素 E 合成中的关键作用^[10]。

目前, 已经从许多植物中分离克隆了 TAT 基因, 如大豆^[11]、拟南芥^[12]、黄芩^[13]、丹参^[14]、紫苏^[15-16]等, 而关于番木瓜酪氨酸氨基转移酶基因克隆及其功能的研究目前还没有报道。本研究采用 RACE 技术克隆了番木瓜 TAT 基因全长序列, 对其进行生物信息学分析和转录差异表达分析, 旨在为进一步研究该基因功能, 并利用其进行基因工程提高维生素 E 含量改良果实品质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 番木瓜供试品种 ‘大白 8 号’ 采自福建闽侯木瓜园。将大小均匀、成熟期一致的绿熟期番木瓜果实进行以下处理: (1) 乙烯利处理, 将果实浸泡在 0.5 g/L 乙烯利水溶液中 3 min, 自然晾干, 装箱密封 2 h; (2) 1-甲基环丙烯(1-MCP)处理, 将果实置于 1 μL/L 1-MCP 气体中 18 h; (3) 对照, 将果实在清水中浸泡 3 min, 自然晾干, 装箱密封 2 h。将处理后的果实分别放在 25 °C 房间储藏, 于处理后 6、12、24 h 以及 3、6 d 取样。将果肉切成小块立即投入液氮中, -80 °C 保存备用。采集番木瓜幼嫩的根、茎和完全伸展的叶片, 投入液氮速冻后-80 °C 保存备用。

1.1.2 试剂与菌株 *ExTaq*、pMD18-T、T₄ DNA 连接酶载体购自 TaKaRa 公司; Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 购自 BD Biosciences Clontech 公司; 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司; SYBR ExScript™ RT-PCR 购自 TaKaRa 公司; 引物由上海博尚生物技术有限公司合成。*E.coli* DH5α 菌株由本实验室培养并保存。1-MCP 安喜布购自台湾利统股份有限公司, 其余为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 番木瓜 *CpTAT* 基因的克隆 采用改良热硼

酸小量法提取番木瓜果肉总 RNA^[17], 参照 Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 说明书, 以总 RNA 为模板合成双链 cDNA。根据本实验室已获得的番木瓜果实成熟差异基因片段序列(图 1)设计 RACE 特异引物^[18]。用 3'RACE 特异引物 TAT3-1、TAT3-2 与 3'端接头引物 TY-DOWN 组成半巢式扩增引物对, 扩增基因的 3'端。用 5'RACE 特异引物 TAT5-1、TAT5-2 与 5'端接头引物 TY-UP 扩增基因的 5'端。采用 25 μL PCR 反应体系: ddH₂O 18.3 μL, 10×Buffer 2.5 μL, dNTPs 2.0 μL, 特异引物与接头引物各 0.5 μL, 模板 1.0 μL, *ExTaq* 酶 0.2 μL。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。经两轮扩增后的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将目的条带割胶、回收, 连接 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 *E.coli* DH5α 感受态细胞, 挑取阳性克隆送到上海博尚生物技术有限公司测序。将测序获得的 3'端和 5'端序列拼接, 翻译的氨基酸序列与 NCBI 数据库中的同源序列进行比较, 确定基因的编码区, 设计开放性阅读框(Open Reading Frame, ORF)的上、下游引物 TAT-U 和 TAT-D。然后以 cDNA 为模板, 扩增该基因的 ORF 序列, 并测序验证。

1.2.2 生物信息学分析 用 DNAMAN 软件进行引物设计、基因片段的拼接和蛋白质翻译; 用 ProtParam 预测编码蛋白的分子式、氨基酸组成、相对分子质量和等电点等理化性质 (<http://web.expasy.org/protparam/>); 用 SignalP 3.0 Server 进行信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 用 NCBI 网站的 CDD (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html) 进行氨基酸序列结构域分析; 用 MEGA 4.0 构建分子进化树。

1.2.3 番木瓜 *CpTAT* 基因在不同器官以及不同处理果实中的表达分析 提取番木瓜的根、茎、叶、果肉的 RNA, 分别取 1 μg 逆转录为 cDNA。在 *CpTAT* 基因 3'端非保守区设计引物 qTAT-U 和 qTAT-D, 以番木瓜 *Actin* 基因为内参^[19], 用 Bio-RAD 进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系为 20 μL: SYBR Premix *ExTaq*™ 10.0 μL, 上、下游引物各

```

1    TAATACACTG AAGCACTCAT CAGACATCTG TTGTGATAGG ATAAAGGAAA TCCCATGCAT
61   CAGTTGTCCC CACAAACCAG AGGGATCTAT GGCTGTGATG GTGAAACTAA ATCTTTCCTT
121  ATTGGATGAT ATAAGTGATG ACATTGACTT TTGTTTCAAG CTGGCGAAAG AGGAATCTGT
181  GATTATTCTT CCAGGAACTG CGGTGGGGTT AAAAGATTGG CTTCG

```

图1 番木瓜果实成熟差异基因片段序列
Fig. 1 The sequence of a papaya fruit ripening polymorphic fragment

表1 本研究所用引物及其序列
Table 1 PCR primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')	引物用途	引物名称	引物序列(5'-3')	引物用途
TAT3-1	GCATCAGTTGTCCCCACAAAC	3' RACE	TAT-U	ATGGAGAACGGGAGAAGAGTACTC	ORF扩增
TAT3-2	CATTGACTTTTGTTCACAGCTGGC	3' RACE	TAT-D	GTCATTCTTAC TGAGGATG CTTGG	ORF扩增
TY-DOWN	AGTGGTATCAACGCAGAGTACTTT	3' RACE	qTAT-U	AGGCTGGGAGGTTGATTTGGATG	荧光定量
TAT5-1	CACAGATTCCTCTTTTCGCCAGC	5' RACE	qTAT-D	CTCGTCGGCAATTACAAGGATTCC	荧光定量
TAT5-2	GTTTGTGGGG ACAACTGATGC	5' RACE	CpActin-U	TCCAAGGGTGACTATGATGAGTC	内参基因
TY-UP	TATCAACGCAGAGTACGCGG	5' RACE	CpActin-D	CAACAGATGATGAGAGGCAAGG	内参基因

0.5 μL, cDNA 1.0 μL, 双蒸水 8.0 μL。扩增程序为：95 °C 预变性 3 min；95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 39 个循环。每个样品 3 次重复，采用 2^{-ΔΔCT} 法分析数据。以根为对照，分析 *CpTAT* 基因在不同组织器官中的相对表达；以清水处理后 6 h 的果肉为对照，分析该基因在不同处理果实中的相对表达。用 SPSS 进行邓肯氏多重比较，Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 番木瓜 *CpTAT* 基因 cDNA 全长的获得

5'RACE 第二轮 PCR 扩增出一条特异条带，见图 2 中的 1 泳道，将目的条带割胶回收、转化、测序，获得长度为 1 125 bp 的片段，与已知差异片段

有一个长 105 bp 的重叠区，可知为 *TAT* 基因的 5' 端。3' RACE 第二轮 PCR 扩增出一条约为 400 bp 的条带，见图 2 中的 2 泳道，测序后获得长 407 bp 的序列，与差异片段序列重叠 125 bp，是 *TAT* 基因的 3' 端。将 3'RACE 和 5'RACE 所测得的序列与已知差异片段序列拼接，获得长 1 596 bp 的 cDNA 序列，包含 5' 非编码区 98 bp, 3' 非编码区 232 bp, 开放性阅读框 1 266 bp。然后根据该序列设计 ORF 的上、下游引物，以 cDNA 为模板扩增，最终获得 *TAT* 基因 ORF 序列，见图 2 中的 3 泳道。将此序列与该基因的 3'-UTR 和 5'-UTR 拼接，获得了番木瓜 *TAT* 基因全长 cDNA 的序列，将其命名为 *CpTAT*，Genbank 登录号为 KU253441。

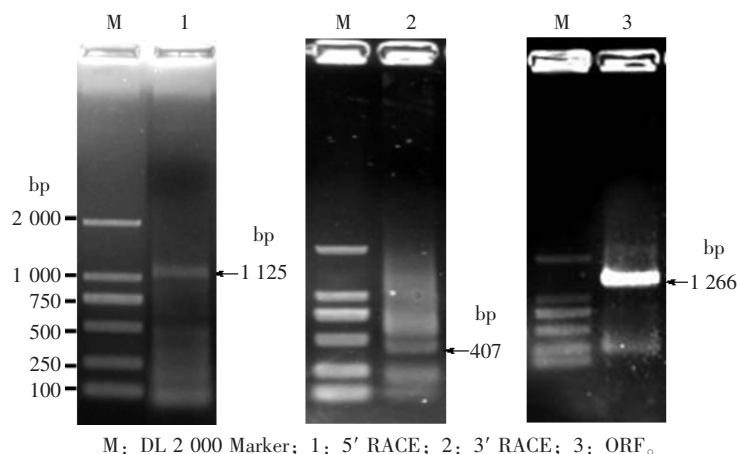


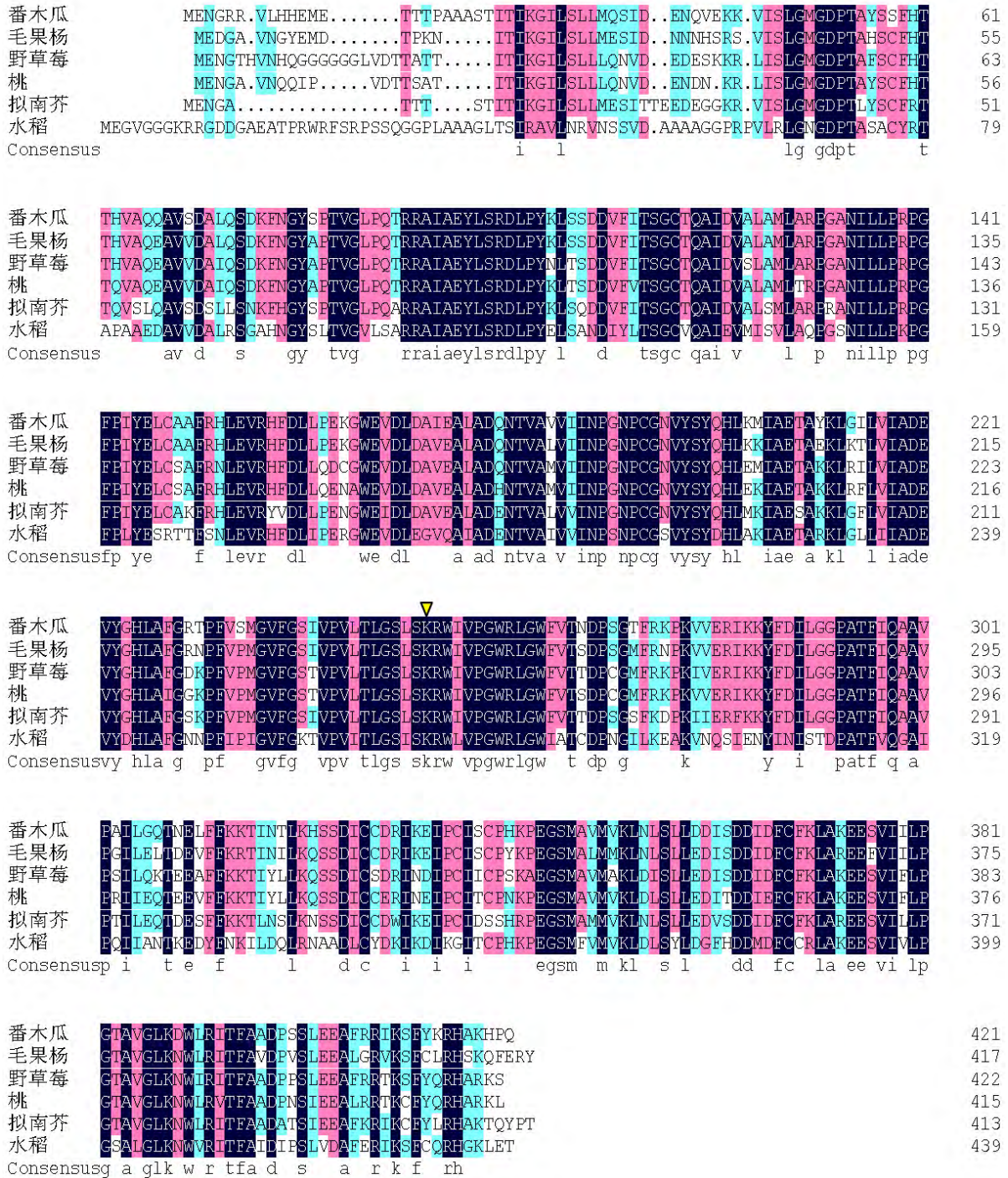
图2 *CpTAT* 基因的克隆

Fig. 2 Cloning of *CpTAT* gene from papaya

2.2 *CpTAT* 基因序列的生物信息学分析

将番木瓜 *CpTAT* 基因的 cDNA 序列翻译成氨基酸序列，编码 421 个氨基酸。ProtParam 分析可知，蛋白质分子式为 C₂₁₀₄H₃₃₁₈N₅₅₆O₆₀₀S₁₇，等电点为 6.86，分子量约为 46.54 ku。用 SignalP 3.0 Server 进行信号肽预测，发现没有信号肽序列，不是分泌蛋白。用 NCBI 网站的 CDD 进行氨基酸序列结构域分析，该基因属于香草转氨酶超家族成员，催化活性位点为第 253 位的赖氨酸(图 3)。其理论推导

的半衰期为 30 h，不稳定参数为 37.69，属于稳定蛋白。番木瓜 *TAT* 氨基酸序列与毛果杨、野草莓、桃、拟南芥、水稻的 *TAT* 氨基酸序列有很高的同源性，分别为 83.69%、81.09%、80.76%、78.87%、54.67%(图 3)，说明这个基因比较保守，可推测它们具有相同或相似的功能。系统进化树显示，番木瓜 *TAT* 与拟南芥、芥菜等十字花科植物 *TAT* 蛋白表现出最小的进化距离，与单子叶植物水稻 *TAT* 蛋白进化距离最远(图 4)。



黄色倒三角标注的氨基酸为催化活性位点。
 The catalytic sites was marked by yellow triangle.

图3 6种高等植物TAT基因氨基酸序列同源性比对分析

Fig. 3 Alignment of deduced amino acid sequences of six TAT genes from higher plants

2.3 CpTAT 基因的表达分析

采用 Real-time PCR 研究了 CpTAT 基因在番木瓜不同器官, 以及不同处理果实中的表达差异, 结果显示, 该基因在根、茎、叶和果实中均表达, 在根中的表达量最高, 在茎和果实中的表达较低, 在叶中的表达量最低, 达到显著水平(图 5)。与对照相比, 外源乙烯处理能诱导果实中 CpTAT 基因

表达量升高, 特别是在处理后 24 h 和 6 d 达到显著水平; 而 1-MCP 处理则抑制了该基因的表达, 在处理后的 3 d 和 6 d 表达差异达到显著水平。在果实处理后第 6 天, CpTAT 基因在乙烯处理中表达量最高, 对照中表达量较低, 而 1-MCP 处理中表达量最低, 达到显著水平(图 6)。

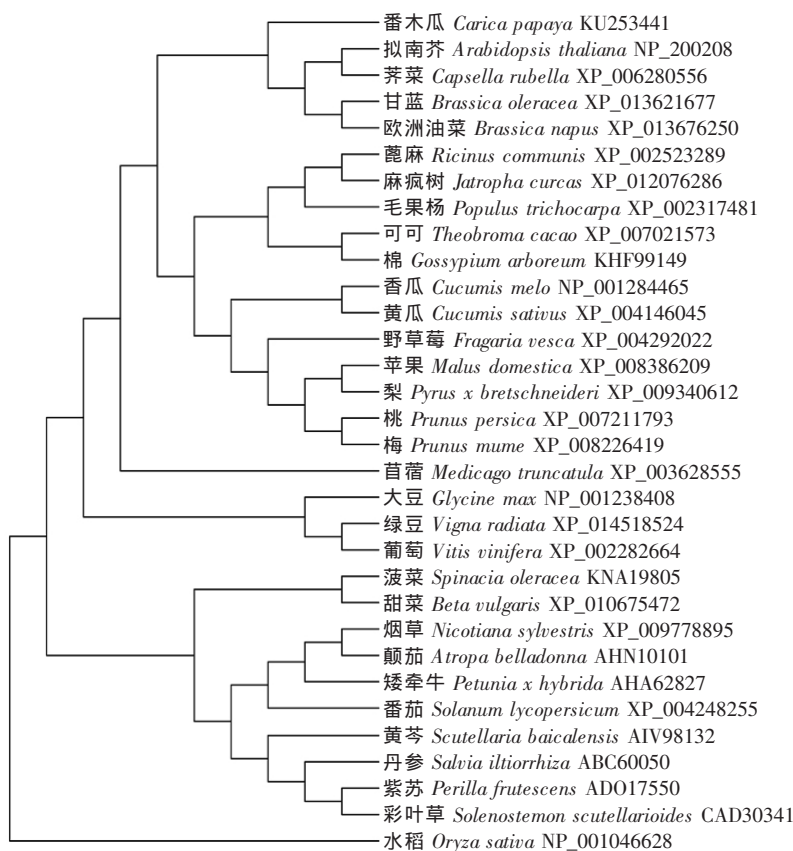
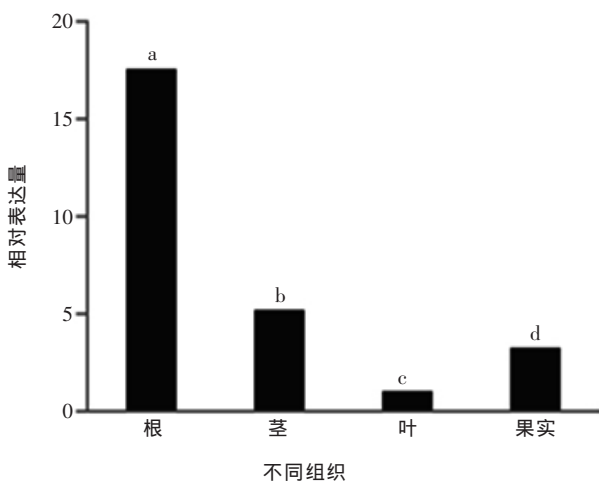
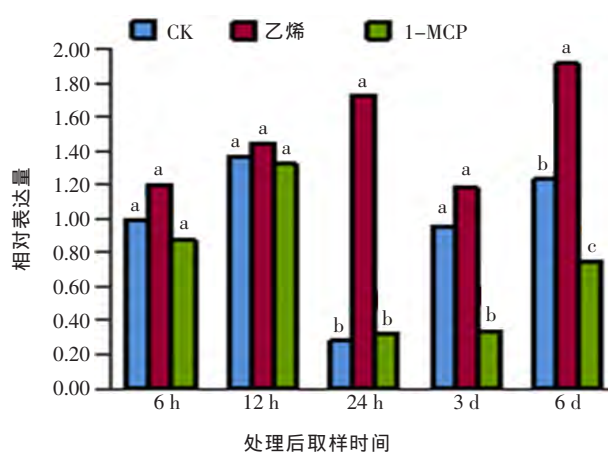


图4 TAT分子系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic analysis of TAT



“a~d”表示 $p \leq 0.05$ 差异显著。
“a~d” means significant difference at $p \leq 0.05$ level.

图5 番木瓜 *CpTAT* 基因在不同组织的表达量分析
Fig. 5 Expression analysis of *CpTAT* gene in different tissues of papaya



“a、b、c”表示差异显著 $p \leq 0.05$ 。
“a、b、c” means significant difference at $p \leq 0.05$ level.

图6 *CpTAT* 基因在乙烯、1-MCP 处理番木瓜果实中的表达量分析
Fig. 6 Expression analysis of *CpTAT* gene in ethylene-treated or 1-MCP-treated papaya fruit

3 讨论与结论

植物在生长发育过程中会遇到各种各样的生物和非生物胁迫，如干旱、冻害、虫咬食和衰老等。在胁迫中，有氧自由基升高使脂质和叶绿体氧化，破坏细胞^[20]。维生素E可清除氧自由基和脂质过氧

化原子团以保护光合作用器和脂双层膜。当植物进入衰老期，活性氧自由基和脂类过氧化物自由基增加，同时也会伴随着 α -生育酚的增加，以保护细胞不受伤害^[21]。TAT 是维生素 E 合成关键酶^[8]，很多胁迫也诱导 TAT 基因表达量升高。例如，冠菌

素、茉莉酮酸甲酯、12-氧植物二烯酸或创伤均能诱导拟南芥的 *TAT* 基因表达量上升^[8,12]。在本研究中,外源乙烯诱导 *CpTAT* 基因表达量升高,而 1-MCP 则抑制该基因的表达,特别是在果实处理后第 6 天,该基因在乙烯处理中表达量最高,对照中较低,而 1-MCP 处理中最低,达到显著水平。番木瓜是典型的呼吸跃变型果实,外源乙烯促进果实成熟衰老,1-MCP 推迟衰老进程^[22-23]。果实处理后的第 6 天,乙烯利处理果实果皮全黄、果肉软化,进入全熟期,对照果实果皮半黄、果肉开始软化,为半熟期,而 1-MCP 处理果实果皮全绿,果肉硬,还处于绿熟期。*CpTAT* 基因的表达量在不同成熟期果实中表达差异显著,说明该基因与果实成熟有一定相关性,在番木瓜果实成熟衰老中起作用。

本研究在已有番木瓜果实成熟差异基因片段序列的基础上,通过 RACE 技术成功克隆了维生素 E 合成关键酶基因 *CpTAT* 全长序列,为进一步利用该基因进行基因工程提高维生素 E 含量,改良果实品质奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] Aravind G, Debjit B, Duraivel S, *et al.* Traditional and medicinal uses of *Carica papaya*[J]. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2013, 1(1): 7-15.
- [2] Krishna K, Paridhavi M, Patel J A. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of papaya(*Carica papaya* Linn.)[J]. *Natural Product Radiance*, 2008, 7(4): 364-373.
- [3] Brigelius-Flohe R, Traber M G. Vitamin E: function and metabolism[J]. *The FASEB Journal*, 1999, 13(10): 1145-1155.
- [4] Traber M G, Sies H. Vitamin E in humans: demand and delivery[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1996, 16 (1): 321-347.
- [5] Rocheford T R, Wong J C, Egesel C O, *et al.* Enhancement of vitamin E levels in corn[J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2002, 21(sup3): 191S-198S.
- [6] Yamauchi R, Matsushita S. Light-induced lipid peroxidation in isolated chloroplasts and role of α -tocopherol[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1979, 43(10): 2157-2161.
- [7] Goffman F D, B?hme T. Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids(*Zea mays* L.)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(10): 4990-4994.
- [8] Sandorf I, Hollander-Czytko H. Jasmonate is involved in the induction of tyrosine aminotransferase and tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Planta*, 2002, 216(1): 173-179.
- [9] 郭新波, 唐岳立, 孙小芬, 等. 高等植物维生素 C 和维生素 E 代谢调控[J]. *植物生理学报*, 2011, 47(8): 731-744.
- [10] Riewe D, Koochi M, Lisee J, *et al.* A tyrosine aminotransferase involved in tocopherol synthesis in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2012, 5: 850-859.
- [11] 胡英考, 李晓晓, 李雅轩, 等. 大豆酪氨酸氨基转移酶基因的克隆与表达分析[J]. *西北植物学报*, 2010, 30(6): 1092-1098.
- [12] Lopukhina A, Dettenberg M, Weiler E W, *et al.* Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(4): 1678-1687.
- [13] Kim Y B, Uddina M, Kim Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of tyrosine aminotransferase and hydroxyphenylpyruvate reductase, and rosmarinic acid accumulation in *Scutellaria baicalensis*[J]. *Natural Product Communications*, 2014, 9(9): 1311-1314.
- [14] Huang B, Yi B, Duan Y, *et al.* Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen)in rosmarinic acid biosynthesis pathway[J]. *Molecular Biology Reports*, 2008, 35(4): 601-612.
- [15] 吕晓玲, 郝磊, 王芳, 等. 紫苏酪氨酸氨基转移酶基因片段的克隆及表达分析[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(24): 207-212.
- [16] Lu X, Hao L, Wang F, *et al.* Molecular cloning and overexpression of the tyrosine aminotransferase(TAT)gene leads to increased rosmarinic acid yield in *Perilla frutescens*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2013, 115(1): 69-83.
- [17] 申艳红, 陈晓静. 改良热硼酸小量法提取番木瓜果肉 RNA[J]. *中国南方果树*, 2009, 38(2): 7-9.
- [18] 申艳红, 陈晓静, 蔡雪玲, 等. 番木瓜半胱氨酸蛋白酶基因 *CpCP* 的分离及表达分析[J]. *园艺学报*, 2015, 42(9): 1789-1797.
- [19] 申艳红, 陈晓静, 何玮毅, 等. 番木瓜肌动蛋白 *CpActin* 基因的克隆及在果肉中的表达研究[J]. *果树学报*, 2010, 27(6): 859-862.
- [20] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373-399.
- [21] Spiteller G. The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death[J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 119(1): 5-18.
- [22] An J F, Paull R E. Storage temperature and ethylene influence on ripening of papaya fruit[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1990, 115(6): 949-953.
- [23] Fabi J P, Cordenusi B R, de Mattos Barreto G P, *et al.* Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(15): 6118-6123.

责任编辑: 赵军明