

研究报告

Research Report

黄瓜 ζ -胡萝卜素脱氢酶基因克隆及表达分析

王柬人[✉], 李锡香[✉], 王海平[✉], 邱杨[✉], 宋江萍[✉], 张晓辉[✉], 沈镒[✉]

中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 农业部蔬菜作物基因资源与种质创制北京科学观测实验站, 北京, 100081

✉ 通讯作者: shendi@mail.caas.net.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 57 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0057

收稿日期: 2012 年 04 月 26 日

接受日期: 2012 年 05 月 08 日

发表日期: 2012 年 12 月 15 日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012 年第 10 卷第 5 期 520-527 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

王柬人等, 2012, 黄瓜 ζ -胡萝卜素脱氢酶基因克隆及表达分析, 分子植物育种(online) Vol.10 No.57 pp.1414-1421 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0057)

引用格式(英文):

Wang et al., 2012, Molecular Cloning and Expression Analysis of ζ -Carotene Desaturase Gene from *Cucumis sativus* L., Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.57 pp. 1414-1421 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0057)

摘要 以西双版纳黄瓜为试材, 从黄瓜果肉中克隆 ζ -胡萝卜素脱氢酶(ZDS)基因的 cDNA 序列, 命名为 *CsZds*。获得目的片段长度为 1 805 bp, 该序列具有完整的开放阅读框, 位于 31~1 761 bp, 编码 576 个氨基酸。序列比对分析结果显示, 该蛋白在氨基端变化十分明显, 中部较为保守, 存在一个特征序列。系统进化分析表明, 推测的 *CsZDS* 蛋白与南瓜中 ZDS 蛋白同源性最高, 达到 91.84%。利用实时荧光定量 PCR 技术分析结果显示, 随着果实成熟期的延长, 西双版纳黄瓜 *CsZds* 基因的表达量呈明显上升的趋势, 在转色期达到最大。在果实发育过程中, 西双版纳黄瓜 *CsZds* 基因的表达量高于普通黄瓜。

关键词 西双版纳黄瓜; ζ -胡萝卜素脱氢酶; 基因克隆; 表达

Molecular Cloning and Expression Analysis of ζ -Carotene Desaturase Gene from *Cucumis sativus* L.

Wang Jianren[✉], Li Xixiang[✉], Wang Haiping[✉], Qiu Yang[✉], Song Jiangping[✉], Zhang Xiaohui[✉], Shen Di[✉]

Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing Research Station of Vegetable Crop Gene Resource and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, Beijing, 100081, P.R. China

✉ Corresponding author, shendi@mail.caas.net.cn; ✉ Authors

Abstract A 1 805 bp target cDNA of ζ -Carotene desaturase (ZDS) was amplified and cloned from the fruit flesh of *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis*, and it was named as *CsZds*. The sequence had a full open reading frame located from 31 bp to 1 761 bp encoding for 576 amino acids. Sequence comparison analysis showed that ZDS protein presented clear variation at N-terminus, but it was highly conserved in the mid-section with one characteristic sequence. Phylogenetic analysis revealed that deduced *CsZDS* protein was closest to ZDS protein in pumpkin, with 91.84% similarity. Real-time PCR analysis indicated that with the expression of fruit development period, the expression level of *CsZds* gene in *xishuangbannanensis* showed significant increase, and reached the highest in color change stage. During the development of fruit maturation, the expression level of *CsZds* gene in *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* was higher than that in common cucumber (*C. sativus* L.).

Keywords *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis*; ζ -Carotene desaturase; Gene cloning; Expression

研究背景

西双版纳黄瓜是我国特有的黄瓜变种资源, 其果实形状为长圆形和近圆形, 单果重一般 2~3 kg, 老瓜果肉和胎座均为橙色, 胎座颜色最深, 果实颜色由内向外逐渐变浅, 与甜瓜相近(戚春章等, 1983)。分析表明, 18 份西双版纳黄瓜老瓜的平均 β -胡萝卜素含量为 106.58 mg/kg DW, 是普通栽培黄瓜的近百倍, β -胡萝卜素的大量积累是果肉色形成的主要原因(沈镒, 2009)。

类胡萝卜素是植物中的重要色素, 具有广泛的生物学功能。植物体中, 类胡萝卜素代谢可促进激素 ABA 的生物合成, 增强植物的多种抗逆反应(Fang et al., 2008; Schwartz et al., 2003); β -胡萝卜素是维生素 A 的前体物质, 维生素 A 的缺乏会导致人的皮肤变厚、干燥、发生皱纹, 增加患癌症、心脏病、眼疾等多种疾病的危险(Grune et al., 2010)。天然类胡萝卜素对于人体健康起着重要作用, 能够猝灭自由基, 延缓衰老, 增强抵抗力, 有防癌抗癌的功效

(Palozza et al., 2002; Müller et al., 2002)。近年来, 人们已从分子遗传和生理生化等方面对 β -胡萝卜素生物合成途径的酶进行鉴定, 并从分子水平对类胡萝卜素的主要生物合成途径进行了明确的阐述(Hirschberg, 2001; Fraser and Bramley, 2004; Romer and Fraser, 2005; DellaPenna and Pogson, 2006; Howitt and Pogson, 2006), 为研究西双版纳黄瓜类胡萝卜素积累提供了重要参考。

ζ -胡萝卜素脱氢酶(ζ -Carotene desaturase, ZDS)是类胡萝卜素生物合成途径中的重要去饱和酶之一。它催化 ζ -胡萝卜素发生两次脱氢反应, 首先生成途径中的第一个有色分子—链孢红素, 然后经过进一步催化作用转化成番茄红素, 番茄红素是类胡萝卜素代谢途径的分歧点。目前已从胡萝卜、草莓、文心兰、甜橙、玉米等多种植物中克隆到 *Zds* 基因, 在甜瓜属中对该基因的分离和鉴定尚未见报道。

本研究以西双版纳黄瓜为试材, 克隆其果肉中 *CsZds* 基因进行相关序列分析, 并研究该基因在转录水平的表达调控, 旨在为探索西双版纳黄瓜果实类胡萝卜素积累的分子机制奠定基础, 同时也为黄瓜营养品质的改良提供科学依据。

1 结果分析

1.1 *CsZds* 基因 cDNA 序列的克隆

以 *ZdsF/ZdsR* 为引物进行 PCR 特异扩增, 获得约 1.8 kb 的特异产物(图 1)。对该片段进行回收纯化, 连接到 *pEASY-T1* 载体上, 筛选阳性重组子测序鉴定, 该克隆片段长 1 805 bp, 为 *CsZds* 目标片段。

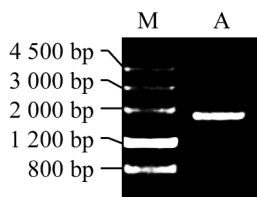


图 1 *CsZds* 基因的 PCR 扩增及检测结果

注: M: 天根 marker III; A: cDNA 扩增产物

Figure 1 The PCR amplification and detection results of *CsZds* gene

Note: M: TIANGEN marker III; A: cDNA amplification product

1.2 *CsZds* 基因的序列分析

核苷酸测序结果显示, 所得片段具有完整的开放阅读框, 位于 31~1 761 bp, 编码 576 个氨基酸(图 2)。推测蛋白质的相对分子式为 $C_{2879}H_{4520}N_{766}O_{837}S_{23}$, 原子数为 9 025, 相对分子质量为 63 993.5, 理论等

电点为 6.77, 不稳定系数为 40.11, 属于不稳定蛋白。

采用 ProtScale 对 *CsZDS* 蛋白质的疏水性进行分析(图 3), 整体来看, 亲水性氨基酸和疏水性氨基酸在整个蛋白质中的分布均匀, 无明显的疏水区。TMHMM Server 2.0 也并未预测到跨膜结构, 推测该酶在黄瓜中可能不是膜结合蛋白。

导肽引导新合成的肽链进入细胞器, 对于了解蛋白质的亚细胞定位与作用机制有一定意义, 应用 TargetP 1.1 Server 预测 *CsZDS* 氨基酸序列导肽(表 1), 结果表明, 该序列含有叶绿体转运肽。

蛋白质的多肽链通过折叠、螺旋、和卷曲形成比较稳定的空间结构, 依据 Geourjon 和 Deléage (1995) 的方法, 用 SOPMA 预测 *CsZDS* 氨基酸多肽链的二级结构(图 4), 发现无规则卷曲最多, 为 42.19%, 分布较为均匀; 其次是 α -螺旋, 为 37.85%, 主要集中在中部, 延伸链为 14.93%, β -转角最少, 为 5.03%, 这 4 个二级结构构成 *CsZDS* 蛋白的基本结构。

对推测的 *CsZDS* 氨基酸序列进行 CDD (conserved domain database)搜索, 32~569 位氨基酸区域与 ζ -胡萝卜素脱氢酶蛋白域(PLN02487)高度同源, 表明 *CsZds* 基因是 ζ -胡萝卜素脱氢酶, 而且 76~142 位含有 NADB-Rossmann superfamily 保守结构域, 说明该酶可能与 NADP(H)等辅助因子相互作用(图 5)。

1.3 *CsZDS* 同源性分析和系统发育树构建

通过 SWISSPORT 数据库检索 ZDS 在不同植物中的蛋白序列, 发现该蛋白在自然界广泛存在, ZDS 催化合成类胡萝卜素是不同物种共同拥有的生物途径。将检索到的南瓜、水仙、番茄等 28 种植物的 ZDS 氨基酸序列及 *CsZDS* 推导的氨基酸序列利用 MEGA4.0 软件构建系统进化树(图 6), ZDS 蛋白分为两大类群, 系属于单子叶植物和双子叶植物, 同一科属物种的 ZDS 蛋白位于系统进化树的相同分支上, 亲缘关系越近, 相似系数越高, ZDS 蛋白的进化与植物进化基本一致。推导的 *CsZDS* 氨基酸序列与同属葫芦科的南瓜序列进化关系最为相近, 与小麦、玉米、文心兰等进化关系相对较远。

利用 DNAMAN 软件对黄瓜、南瓜、向日葵、胡萝卜、甜橙、草莓、番茄、拟南芥、玉米等 9 个物不同物种中 ZDS 蛋白的同源性较高, 仅在氨基端和羧基端的氨基酸呈现多样性的变化, 氨基端的变化较为明显(图 7)。 *CsZDS* 氨基酸序列中存在 ζ -胡萝卜

表 1 CsZDS 导肽预测

Table 1 Predicted leading peptide and cleavage site for CsZDS

名称	氨基酸数	叶绿体导肽	线粒体靶向肽	分泌信号肽	其他	位点	可信率
Name	Len	cTP	mTP	SP	Other	Loc	RC
序列	576	0.788	0.095	0.049	0.077	C	2
Sequence							
截止值			0.000	0.000	0.000		
Cutoff							

```

ATCCATTCCCTTTGTTCTTCATTITACCAATTATGGCTTCTGGGATTCTTTTTCTCCTGTTTCTCTCTGGGAAGCATGCCAACTGTGCGC : 1
      M A S G I L F S P V S F S G K H A N C R : 1
GATTTTAGACTTCTGCTCGTCATTCTGTTGGTTCTTCTAAAGAGTCAAAGTTTTTGGTTAAATCCTCTTTGGACAAAGATGTTTCTGTAT : 91
D F R L P A R H S L L V L L K S Q K F L V K S S L D K D V S D : 21
ATGAGTGTTAATGCTCCCAAGGATTTTCCCTGAACTGAGCGATATCGAGGCCAAATGAAAAGTTGCCATTATTGGAGCTGGG : 181
M S V N A P K G L F P P E P E R Y R G P K L K V A I I G A G : 51
CTTGCTGGGATGTCGACCGCTGTGAGCTTTTGGATCAAGCCATGAGGTTGATATATATGAATCAAGGACCTTCATTGGTGGGAAAAGTG : 271
L A G M S T A V E L L D Q G H E V D I Y E S R T F I G G K V : 81
GGATCATTGTTGATAAACGTGGAAACCATAATTGAAATGGGGCTGCATGATTTTTTGGTTGTTACAACAATCTTTTTCGTTTAAATGAAA : 361
G S F V D K R G N H I E M G L H V F F G C Y N N L F R L M K : 111
AAGGTTGGCGCAGAGAAAACTACTTGTGAAGGATCATACTCATACTGTTGTAACAAGGGAGGTGAAATGGGAACTTGATTTCCGC : 451
K V G A E K N L L V K D H T H T F V N K G G E I G E L D F R : 141
TTTCCGGTTGGAGCTCCCATACATGGAATCAAGCTTTCTTGACCACAAATCAGCTTGGGACTTATGATAAAGCAAGAAATGCGTTGGCT : 541
F P V G A P I H G I Q A F L T T N Q L G T Y D K A R N A L A : 171
CTTGCTTAAAGTCCAGTTGTTAAGGCTCTGTTGATCCAGATGCTGCAATGAAGGATATCGAAACTGGATACTATAAGTTTTTCAGAG : 631
L A L S P V V K A L V D P D A A M K D I R N L D S I S F S E : 201
TGGTCTTGTCTAAAGGTGGCACACGTGCCAGCATCCAGAGAATGTGGGACCCAGTTGCCTATGCTCTTGGATTATTGATTGTGACAAC : 721
W F L S K G G T R A S I Q R M W D P V A Y A L G F I D C D N : 231
ATCAGTGCCCGCTGATGCTTACTATCTTCTCGTTGTTGCTACTAAAACCGAGGCTTCTTTATTACGCATGCTGAAAGGTTCTCCGGAT : 811
I S A R C M L T I F S L F A T K T E A S L L R M L K G S P D : 261
GTTTTTTAAGCGGGCCATAAAGAAGTATATCAGGACAGAGGGGGCAGATTCCATCTAAGGTGGGGATGCAGGGAGGTACTTTATGAC : 901
V F L S G P I K K Y I T D R G G R F H L R W G C R E V L Y D : 291
AAATTCAGAGATGGAGAGACTTATATTGCAAGGACTGGCAATGTCTAAGGCCACAAATAAGAAAATTGTGAAAGCTGATGCTTATGTAGCA : 991
K F A D G E T Y I A G L A M S K A T N K K I V K A D A Y V A : 321
GCATGTGATGCTCCCTGGAATAAAAGGTTGATCCATCACAATGGAGAGAATGGGAGTTCTTTGACAATATTTATAAGCTAATAGGAGTT : 1081
A C D V P G I K R L I P S Q W R E W E F F D N I Y K L I G V : 351
CCTGTGTGTCACCGTCCAACCTTCGGTACAATGGATGGGTGACAGAATTGCAAGATCTAGAACGTTTCGAGGCAGTTAAGGCAAGCATGGGG : 1171
P V V T V Q L W Y N G W V T E L Q D L E R S R Q L R Q A V G : 381
TTGGATAATCTCCTTTACTCCAGACAGCAGATTCTCATGCTTTGCAAGATCTAGCACTAACGCTCTCCCGAGGATTATTACATTGAAGGA : 1261
L D N L L Y T P D A D F S C F A D L A L T S P E D Y Y I E G : 411
CAGGGATCATTGCTTCAATGTGCTCCTCAGCCCGGGATCCTTACATGCCATTGCTAAATGATGAGATTATAGCAAGAGTTGCAAGACAG : 1351
Q G S L L Q C V L T P G D P Y M P L L N D E I I A R V A R Q : 441
GTCTTGGATTATTCCCATCATCACAAGGTTTAGAAGTAATATGGTCATCTGTGGTCAAGATTGGGCAGTCTCTATATCGCGAGGCACCC : 1441
V L D L F P S S Q G L E V I W S S V V K I G Q S L Y R E A P : 471
GGCAAAGATCCCTTTCCGACCAGATCAGAAAACCCCGATTAAAACTTCTTCTGCTGGGTCATACACAAAACAGGATTACATAGATAGC : 1531
G K D P F R P D Q K T P I K N F F L A G S Y T K Q D Y I D S : 501
ATGGAAGGAGCAACGTTGTCAAGGAGGCAAACTTCTGCATATATCTGTGATTCTGGTGAAGAAATGATGATGCTAAGAGAGAAGATTGGT : 1621
M E G A T L S G R Q T S A Y I C D S G E E L M M L R E K I G : 531
GACATTGAATCTGAAACTGCCAAATCGAGTGATGAGCTAAGCCTAGTTTATGCCATGAGGATTCACTTTTTATGATGTAACACAGAGGCA : 1711
D I E S E T A K S S D E L S L V * : 561
    
```

图 2 CsZds 基因 cDNA 全长核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the complete cDNA of CsZds

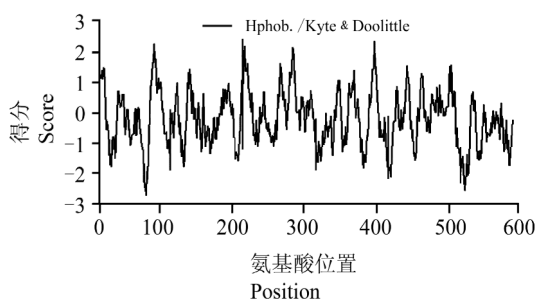


图 3 CsZDS 疏水性分析

Figure 3 Hydrophobicity analysis of CsZDS

素脱氢酶的特征序列, 该特征序列也存在于吡啶二硫核糖核苷酸氧化还原酶多肽中(黄彬城等, 2006)。

1.4 CsZds 相对定量表达分析

为了分析 CsZds 基因对西双版纳黄瓜果实成熟期 β-胡萝卜素积累的作用, 应用实时荧光定量 PCR 技术测定 CsZds 基因在西双版纳黄瓜不同组织器官及果实不同发育时期的表达量, 结果见图 8。从图中可以看出, 在西双版纳黄瓜的不同组织器官中, CsZds 基因均有表达, 花中表达量最高, 茎中最低, 而在叶

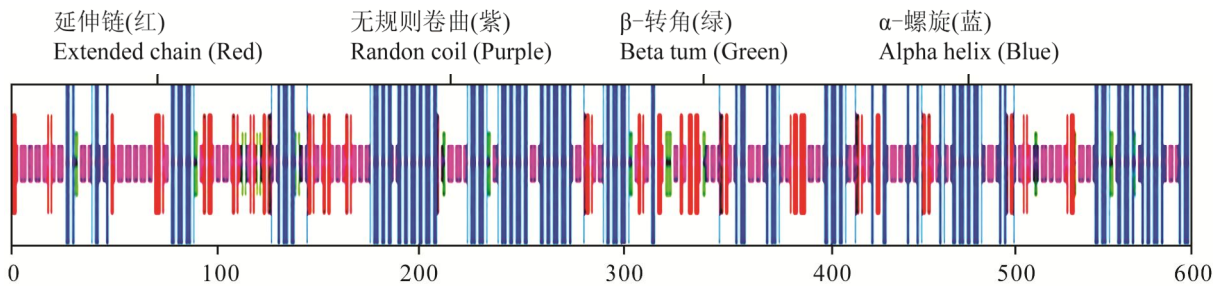


图 4 CsZDS 二级结构预测
Figure 4 Predicted secondary structure for CsZDS

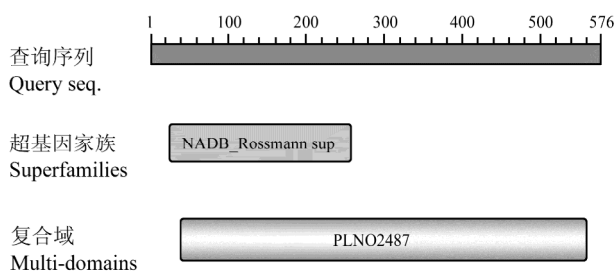


图 5 CsZds 基因 CDD 搜索结果
Figure 5 Search results of CsZds gene on CDD

片及果实不同发育时期的表达量介于花和茎之间。

比较西双版纳黄瓜和普通黄瓜果实不同发育时期 *CsZds* 基因表达量的变化趋势, 发现该基因在两份材料中均呈现随着生育期的延长表达量逐渐升高的趋势。西双版纳黄瓜果实授粉后 20 d 表达量显著低于其他时期, 授粉后 40 d 达到最大值, 而后逐渐下降。普通黄瓜果实 *CsZds* 基因在授粉后 40 d 之前表达量无明显差异, 之后表达量明显上升, 其上升的时期明显滞后于西双版纳黄瓜。从整体水平上看, 普通黄瓜 *CsZds* 基因的表达量低于西双版纳黄瓜。

2 讨论

Zds 基因是类胡萝卜素生物合成途径中的重要酶基因之一, 主要参与线状类胡萝卜素的生物合成, 催化 ζ -胡萝卜素向番茄红素的转化, 促进分支途径其他类胡萝卜素的合成。分析目前已克隆的多种植物 *Zds* 基因, cDNA 长度在 1.6~1.8 kb, 编码 558~588 个氨基酸, 肽链长度变化较小。对 *Zds* 基因的序列特征分析结果显示有以下特性: *Zds* 基因编码的蛋白质具有理论等电点在 6.43~8.71, 不稳定系数为 36.93~45.96, 含有 NADB-Rossmann super family 保守结构域, 表明该酶存在 NAD(H)结合位点, 以 NAD(H)作为电子受体或作为辅助因子。在本实验中, 对克隆的黄瓜 *CsZDS* 氨基酸序列特征分析结果表明, 该蛋白同样具有以上特性。多序列比对结果表明, 不

同物种中 *ZDS* 蛋白同源性很高, 仅在氨基端和羧基端的氨基酸呈现多样性的变化, 氨基端的变化更为明显, 这与氨基端多为转运肽有关, 因转运肽序列具有识别特异性, 不同物种间转运肽的同源性较低。

目前, 对于类胡萝卜素生物合成的研究主要集中在 3 个关键限速反应, 包括牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸的合成、八氢番茄红素的合成以及番茄红素的合成及代谢分解。*ZDS* 是番茄红素合成的重要限速酶, 对于类胡萝卜素的生物合成具有调控的作用。Yan 等(2011)对不同品种的番木瓜果肉中 *Pds*、*Zds* 基因的表达量进行测定, 发现番木瓜红色果肉和黄色果肉类胡萝卜素的积累差异与 *Pds*、*Zds* 的转录水平调控相关; Rodrigo 等(2004)对柑橘果实不同时期类胡萝卜素生物合成相关基因的表达研究发现, *Zds* 和 *Psy* 基因表达量上调明显, 促进线性类胡萝卜素的合成, 对柑橘果实颜色积累起重要的正调控作用; 在烟草中过量表达 *Zds* 基因, 使得烟草花中 β -胡萝卜素提高 49%, 叶片中 β -胡萝卜素含量提高 91% (Ji et al., 2009)。在本研究中, *CsZds* 基因在西双版纳黄瓜的花、叶片、茎、果实中均有表达, 花中表达量最高, 随着果实成熟期的延长, 西双版纳黄瓜 *CsZds* 基因的表达量呈明显上升的趋势, 在转色期达到最大, 在果实发育过程中, 其表达量明显高于普通黄瓜, 推测 *CsZds* 基因可能与黄瓜果实 β -胡萝卜素的积累及花的显色相关, 西双版纳黄瓜果实成熟过程中 β -胡萝卜素大量积累的分子机制还有待进一步深入研究。

3 材料与方法

3.1 试验材料

供试材料为西双版纳黄瓜(*Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis*) BN35 和普通黄瓜(*Cucumis sativus* L. var. *sativus*) JD7, 于 2010 年 8 月种植于中国农业科学院南口试验农场的日光温室中。

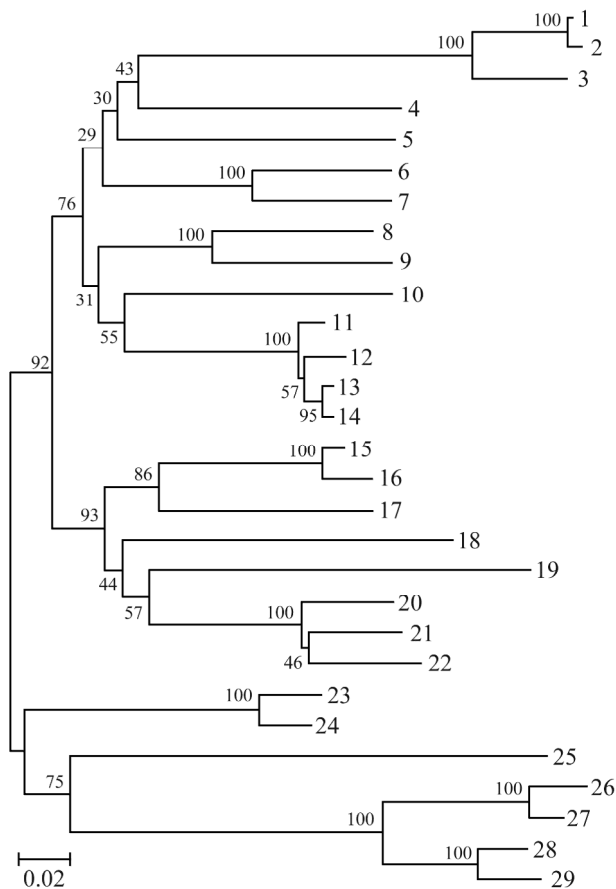


图 6 不同物种 ZDS 蛋白的系统进化树分析

注: 1: 甘蓝型油菜; 2: 大白菜; 3: 拟南芥; 4: 番木瓜; 5: 无花果; 6: 黄瓜; 7: 南瓜; 8: 草莓; 9: 苹果; 10: 麻风树; 11: 柚; 12: 葡萄柚; 13: 温州蜜柑; 14: 甜橙; 15: 向日葵; 16: 万寿菊; 17: 胡萝卜; 18: 黄龙胆; 19: 番薯; 20: 甜椒; 21: 烟草; 22: 番茄; 23: 黄水仙; 24: 中国水仙; 25: 文心兰; 26: 小麦; 27: 大麦; 28: 高粱; 29: 玉米; 树枝长度代表以邻接法估算出来的遗传距离, 树的分支程度根据 1 000 次重复的自展率

Figure 6 Phylogenetic analysis of ZDS protein in different species
Note: 1: *Brassica napus* [G3dr91]; 2: *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* [B9VUW3]; 3: *Arabidopsis thaliana* [Q38893]; 4: *Carica papaya* [C1KC69]; 5: *Ficus carica* [G9JNC6]; 6: *Cucumis sativus*; 7: *Cucubita moschata* [G1FQ09]; 8: *Fragaria ananassa* [C7T0M6]; 9: *Malus domestica* [Q5W5X6]; 10: *Jatropha curcas* [C7F6Z1]; 11: *Citrus maxima* [B3V5F5]; 12: *Citrus paradisi* [Q93Y81]; 13: *Citrus unshiu* [Q2PPX8]; 14: *Citrus sinensis* [Q8VXN4]; 15: *Helianthus annuus* [Q8H0Q6]; 16: *Tagetes erecta* [Q9FV46]; 17: *Daucus carota* subsp. *sativus* [Q2VEX8]; 18: *Gentiana lutea* [Q1XIT4]; 19: *Ipomoea* sp. *Kenyan* [D0FZ28]; 20: *Capsicum annuum* [Q9SMJ3]; 21: *Nicotiana tabacum* [F6N7C2]; 22: *Solanum lycopersicum* [Q202I0]; 23: *Narcissus pseudonarcissus* [O49901]; 24: *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [B2LS46]; 25: *Oncidium Gower Ramsey* [C3VEQ0]; 26: *Triticum aestivum* [F8SZ85]; 27: *Hordeum vulgare* var. *distichum* [F2DMF6]; 28: *Sorghum bicolor* [A9UKC6]; 29: *Zea mays* [B6UBK2]; The branch lengths are proportional to the genetic distances as estimated by the neighbor-joining method, this study employed 1 000 bootstrap replication

3.2 黄瓜 RNA 提取及 cDNA 克隆

选取 BN35 转色期果实(授粉后 40 d), 将果肉切成薄片, 液氮速冻。采用 TransGen EasyPure™ Plant RNA Kit 试剂盒提取 RNA, 具体操作按照说明书进行, 所提取的 RNA 经过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行逆转录反应。逆转录试剂盒 SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT 购自 Invitrogen 公司, 以提取的总 RNA 为模板, 按照说明书逆转录为 cDNA。

以黄瓜全基因组数据库注释的 *Zds* 序列为参考, 在开放阅读框之外设计一对特异引物, *ZdsF*: 5'-ATCCATTCCTTTGTTCT-3'; *ZdsR*: 5'-CACTATGCCTCTGTGTTAC-3', 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 所用的酶购自 TransGen 公司, PCR 体系: 10×*TransStart Taq* Buffer 2.5 mL (含 20 mmol/L Mg^{2+}), 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, *TransStart™ Taq* DNA Polymerase 0.5 μL, 10 μmol/L 上游引物 0.5 μL, 10 μmol/L 下游引物 0.5 μL, cDNA 模板(20 ng/μL) 2 μL, 加 ddH₂O 补足到 25 μL。PCR 反应程序: 94℃, 5 min, 变性 94℃, 30 s; 退火 56℃, 30 s, 延伸 72℃, 2 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 冰箱保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 采用天根普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)按照说明进行回收, 回收产物连入 *pEASY-T1 Cloning Vector*, 转化 *TransI-T1* 感受态细胞, 连接载体和感受态均购自于 TransGen 公司。蓝白斑筛选阳性克隆, 经菌液 PCR 检测后, 将阳性重组子送到中国农业科学院作物科学研究所重大科学工程楼开放实验室测序。

3.3 *CsZds* 基因序列特征分析及系统进化树构建

采用 ExPASy 网站 ProtParam 程序分析编码氨基酸的组成、分子量、理论等电点等理化性质, TMH-MM Server 2.0 分析跨膜区, ProtScale 分析蛋白的亲水性、疏水性, TargetP 1.1 Server 预测蛋白的导肽, 蛋白质的二级结构通过 SOPMA 在线分析获得, CDD (conserved domain database) 进行氨基酸序列结构域分析, *CsZds* 基因开放阅读框的分析、相应编码氨基酸序列的推导和多重序列比对均采用 DNAMAN 软件完成, MEGA4.0 软件进行同源性分析, 并用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, 所用 *ZDS* 蛋白序列来自 SWISSPORT 数据库。

3.4 *CsZds* 基因表达分析

分别提取西双版纳黄瓜(BN35) 6 个不同时期的

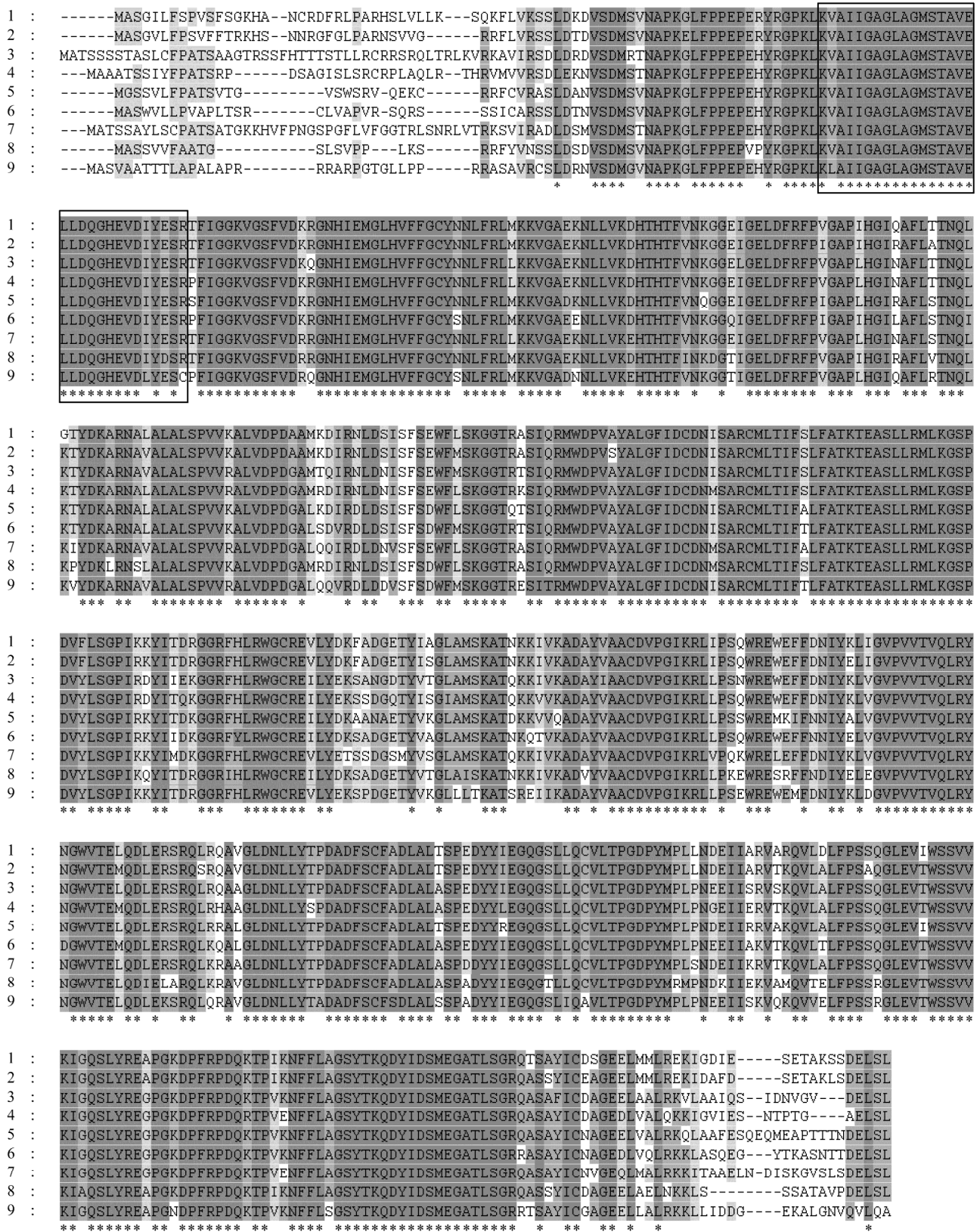


图 7 CsZDS 推测的氨基酸序列多重序列比对分析及 ZDS 的特征序列
注: 1: 黄瓜; 2: 南瓜; 3: 向日葵; 4: 胡萝卜; 5: 甜橙; 6: 草莓; 7: 番茄; 8: 拟南芥; 9: 玉米
Figure 7 Alignment of the predicted amino acid sequence of CsZDS and characteristic sequence of ZDS
Note: 1: *Cucumis sativus*; 2: *Cucurbita moschata*; 3: *Helianthus annuus*; 4: *Daucus carota*; 5: *Citrus sinensis*; 6: *Fragaria ananassa*; 7: *Solanum lycopersicum*; 8: *Arabidopsis thaliana*; 9: *Zea mays*

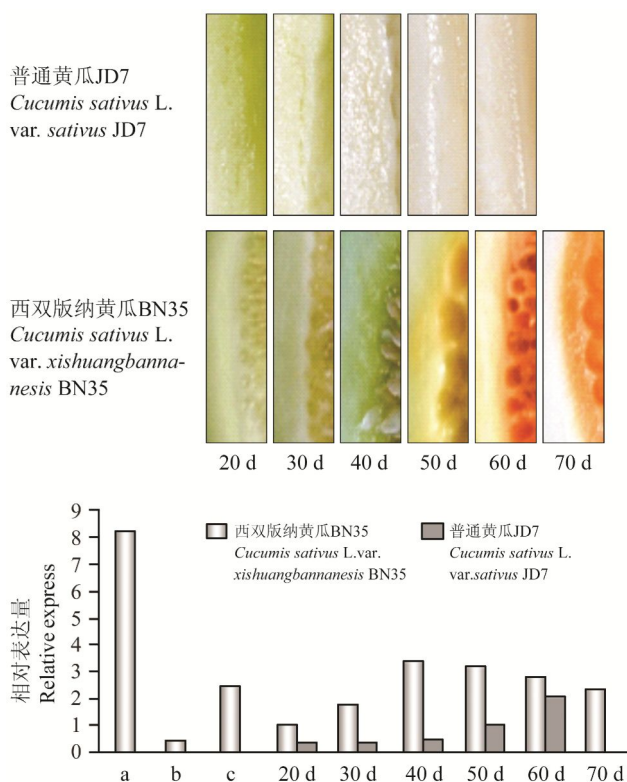


图 8 果实不同发育时期果肉色及 *CsZds* 基因相对表达量分析
注: a: 花; b: 茎; c: 叶

Figure 8 flesh color at different stages and real-time expression analysis of *CsZds* gene

Note: a: Flower; b: Stem; c: Leaf

果肉(授粉后 20 d, 30 d, 40 d, 50 d, 60 d 和 70 d)、结果盛期的花、叶、茎, 以及普通黄瓜(JD7) 5 个不同时期的果肉(授粉后 20 d, 30 d, 40 d, 50 d 和 60 d)总 RNA, 参照已克隆序列, 设计 *CsZds* 基因的实时荧光定量引物 qZdsF: 5'-AATGGATGGGTGACAGAA-3'; qZdsR: 5'-CCTCGGGAGACGTTAGTG-3', 内参基因 Actin 的特异性引物参照孙晓琦(2008)合成, ActinF: 5'-CCACGAACTACTTACAACCTCCATC-3'; ActinR: 5'-GGGCTGTGATTCCTTGCTC-3'。RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 反转录成 cDNA 第一链。荧光定量试剂盒购自于 TransGen 公司的 *TransStart*TM Green qPCR SuperMix, 反应体系为: 5 μ L RT 产物稀释液, 0.5 μ L 引物, 1 \times *TransStart*TM Green qPCR SuperMix, 1 \times Passive Reference Dye/PCR Enhancer, 终体积为 25 μ L, 3 次重复。在 ABI Step One 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 分析。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 以激活 *TransStart Taq* 热启动酶, 之后 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 40 次循环。目标基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

作者贡献

王秉人是本研究的实验设计和实验研究的执行人并完成数据分析, 论文初稿的写作; 李锡香、王海平、邱杨、宋江萍、张晓辉参与实验设计, 试验结果分析; 沈颖是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31071797)和农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目共同资助。

参考文献

- DellaPenna D., and Pogson B.J., 2006, Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 711-738 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301> PMID:16669779
- Fang J., Chai C., Qian Q., Li C., Tang J., Sun L., Huang Z., Guo X., Sun C., Liu M., Zhang Y., Lu Q., Wang Y., Lu C., Han B., Chen F., Cheng Z., and Chu C., 2008, Mutations of genes in synthesis of the carotenoid precursors of ABA lead to pre-harvest sprouting and photo-oxidation in rice, *Plant J.*, 54(2): 177-189 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03411.x> PMID:18208525 PMCid:2327239
- Fraser P.D., and Bramley P.M., 2004, The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids, *Prog. Lipid Res.*, 43(3): 228-265 <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002> PMID:15003396
- Geourjon C., and Deléage G., 1995, SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments, *Computer Applications in the Biosciences*, 11(6): 681-684
- Grune T., Lietz G., Palou A., Ross A.C., Stahl W., Tang G., Thurnham D., Yin S., and Biesalski H.K., 2010, β -Carotene is an important Vitamin A source for humans, *J. Nutr.*, 140(12S): 2268-2285 <http://dx.doi.org/10.3945/jn.109.119024> PMID:20980645 PMCid:3139236
- Hirschberg J., 2001, Carotenoid biosynthesis in flowering plants, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4(3): 210-218 [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00163-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00163-1)
- Howitt C.A., and Pogson B.J., 2006, Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues, *Plant Cell Environ.*, 29(3): 435-445 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01492.x> PMID:17080597
- Huang B.C., Ji J., Wang G., and Zheng Y.X., 2006, Advances of carotenoid in plants, *Tianjin Nongye Kexue (Tianjin Agricultural Sciences)*, 12(2): 13-17 (黄彬城, 季静, 王罡, 郑

- 阳霞, 2006, 植物类胡萝卜素的研究进展, 天津农业科学, 12(2): 13-17
- Ji J., Wang G., Wang J.H., and Wang P., 2009, Functional analysis of multiple carotenogenic genes from *Lycium barbarum* and *Gentiana lutea* L. for their effects on β -carotene production in transgenic tobacco, Biotechnol. Lett., 31(2): 305-312 <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-008-9861-8> PMID:18936881
- Müller K., Carpenter K.L.H., Challis I.R., Skepper J.N., and Arends M.J., 2002, Carotenoids induce apoptosis in the T-lymphoblast cell line Jurkat E6.1, Free Radic. Res., 36(7): 791-802 <http://dx.doi.org/10.1080/10715760290032539> PMID:12180130
- Palozza P., Serini S., Torsello A., Boninsegna A., Covacci V., Maggiano N., Ranelletti F.O., Wolf F.I., and Calviello G., 2002, Regulation of cell cycle progression and apoptosis by β -carotene in undifferentiated and differentiated HL-60 leukemia cells: Possible involvement of a redox mechanism, Int. J. Cancer., 97(5): 593-600 <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10094> PMID:11807783
- Qi C.Z., Yuan Z.Z., and Li Y.X., 1983, A new type of cucumber *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis*, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 10(4): 259-264 (戚成章, 袁珍珍, 李玉湘, 1983, 黄瓜新类型—西双版纳黄瓜, 园艺学报, 10(4): 259-264)
- Rodrigo M.J., Marcos J.F., and Zacarías L., 2004, Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation, J. Agric. Food Chem., 52(22): 6724-6731 <http://dx.doi.org/10.1021/jf049607f> PMID:15506808
- Romer S., and Fraser P.D., 2005, Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation, Planta, 221(3): 305-308 <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-005-1533-5> PMID:15834583
- Schwartz S.H., Qin X., and Zeevaart J.A.D., 2003, Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes, Plant Physiol., 131(4): 1591-1601 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.102.017921> PMID:12692318 PMID:1540303
- Shen D., 2009, Analysis of population genetic diversity in *Cucumis sativus* L. var. *xishuangbannanensis* and study on the QTL mapping of fruit flesh color in cucumber, Dissertation for Ph.D., Institute of Vegetables and Flowers CAAS, Supervisor: Fang Z.Y., pp.46-49 (沈镒, 2009, 西双版纳黄瓜群体遗传多样性分析及黄瓜果肉色QTL定位研究, 博士学位论文, 中国农业科学院研究生院, 导师: 方智远, pp.46-49)
- Sun X.Q., 2008, Studies of construction of overexpression vectors containing rubisCO activase gene (RCA) and genetic transformation, Thesis for M.S., College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Supervisor: Ai X.Z., pp.13-14 (孙晓琦, 2008, 黄瓜RubisCO活化酶基因(RCA)正义表达载体的构建及其遗传转化的研究, 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 艾希珍, pp.13-14)
- Yan P., Gao X.Z., Shen W.T., Zhou P., and Wang C., 2011, Cloning and expression analysis of phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase genes in *Carica papaya*, Mol. Biol. Rep., 38(2): 785-791 <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0167-2> PMID:20401696