

研究报告

Research Report

“法兰地”草莓 *LDOX* 基因的克隆及其过表达与沉默载体的构建

陈瑞旭^{1,2} 彭丽桃^{1,2} 叶俊丽³ 杨书珍^{1,2*}

1 华中农业大学食品科技学院, 武汉, 430070; 2 食品环境学教育部重点实验室, 武汉, 430070; 3 华中农业大学园艺林学学院, 武汉, 430070

*通讯作者, yszhen@mail.hzau.edu.cn

摘要 花色素苷是草莓果实的主要呈色物质, 无色花色素双加氧酶(*LDOX*)是花色素苷合成途径中的关键酶。为探究 *LDOX* 基因在草莓花色素苷合成途径中的功能特性, 构建“法兰地”草莓 *LDOX* 基因的过表达与沉默载体。本试验用 RT-PCR 方法克隆出“法兰地”草莓 *LDOX* 基因的 CDS 序列(1 152 bp)及干扰片段(468 bp), 并成功用植物表达载体 pRI101-An-EGFP 及干扰载体 pK7GWIWG2(II)构建了过表达载体及沉默载体, 同时对 *LDOX* 基因序列进行了生物信息学分析。经农杆菌介导瞬时转化后, 可以观察到绿色荧光蛋白, 表明过表达载体及沉默载体已成功转染草莓果实。qPCR 验证表明, 相比对照果, *LDOX* 基因过表达的草莓果实基因表达量增加了 3.7 倍, 沉默果实下降了 70%, 表明 *LDOX* 基因过表达与沉默成功。本研究为进一步探究 *LDOX* 基因的功能特性提供指导。

关键词 草莓, 花色素苷, 过表达与沉默, *LDOX*

Cloning of the *LDOX* Gene of ‘Falandi’ Strawberry and Construction of Its Overexpression and Silencing Vector

Chen Ruixu¹ Peng Litao^{1,2} Ye JunLi³ Yang Shuzhen^{1,2*}

1 College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070; 2 Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan, 430070; 3 College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070

* Corresponding author, yszhen@mail.hzau.edu.cn

Abstract Anthocyanin is the main color substance of strawberry fruit, and leucoanthocyanidin dioxygenase (*LDOX*) is a key enzyme in anthocyanin synthesis pathway. In order to explore the effect of *LDOX* gene on the synthesis of anthocyanin in strawberry, the overexpression and silencing vector of the *LDOX* gene of ‘Falandi’ strawberry were constructed. This study successfully cloned the CDS sequence (1 152 bp) and interference fragment (468 bp) of *LDOX* gene in ‘Falandi’ strawberry, and successfully used the plant expression vector pRI101-An-EGFP and interference vector pK7GWIWG2(II) to construct overexpression vector and silencing

vector, and we also analyzed the bioinformatics of *LDOX* gene sequences. After *Agrobacterium*-mediated transient transformation, green fluorescent protein can be observed, indicating the overexpression vector and silencing vector have been successfully transfected into strawberry fruit. The results of qPCR validation shows, the expression of *LDOX* gene in overexpressed strawberries and silenced fruits increased by 3.7 times and decreased by 70% comparing to the control fruits, respectively, indicating the overexpression and silence of *LDOX* gene were successful. This study lays a foundation for further exploring the functional properties of *LDOX* gene.

Keywords Strawberry, Anthocyanin, Overexpression and silencing, *LDOX*

草莓(*Fragaria xananassa* Duch.)属蔷薇科草莓属多年生草本植物, 因其具有色泽艳丽、香气浓郁、酸甜适口和营养丰富等特点而深受人们的喜爱(Manganaris et al., 2014; Giampieri et al., 2015)。其中草莓含有丰富的花色苷类物质, 不仅使果实呈现艳丽的色泽, 同时也是果实中重要的抗氧化物质(Kalt et al., 1999)。

植物花色苷是由苯丙氨酸起始, 经苯丙烷代谢途径在系列酶的催化下合成的。其中, 无色花色苷双加氧酶(leucoanthocyanidin dioxygenase, *LDOX*)是花色苷生物合成途径末端的关键酶, 催化无色花色苷到有色花色苷的转变(Kayesh et al., 2013; Xu et al., 2014; 李小兰等, 2016)。Carbone 等(2009)在研究草莓不同发育时期 *LDOX* 的表达水平时, 发现 *LDOX* 在果实转红期表达量较低, 其后又逐渐增加。张晓楠(2013)的研究结果则稍有不同, *LDOX* 基因的表达量随草莓果实的成熟逐渐升高, 在小绿果期表达水平较低, 至全红期表达量达到最高, 其表达模式与草莓果实中花色苷的积累模式相符。这两个研究结果的差异可能是由于草莓品种的不同、生长环境的差别等因素造成的。由此表明, *LDOX* 基因在草莓花色苷的合成过程中扮演着重要作用。而在其它植物中, 也能发现这一点。Abrahams 等(2003)在研究拟南芥中的色素积累时, 发现 *LDOX* 是由 *TDS4* 基因编码的, 它对原花青素的合成及液泡发育至关重要。Rosati 等(1999)对比 *LDOX* 基因在美国连翘花萼、花瓣、花药中的表达量, 得出花药和花瓣中花色苷含量较少是由于缺少 *LDOX* 基因的表达所致。Shi 等(2015)用 RT-PCR 及 RACE 技术克隆出武当玉兰的 *LDOX* 基因, 检测发现 *LDOX* 的表达水平在红色花瓣中高于白色花瓣 26 倍之多。Nakamura 等(2006)通过 RNA 干扰的方法抑制蝴蝶草 *LDOX* 基因的表达, 培育出能够稳定遗传的白花植株。以上这些均说明, *LDOX* 基因作为植物花色苷合成通路末端的酶, 对花色苷的积累扮演着关键作用。因而, 验证 *LDOX* 基因的功能对研究草莓花色苷合成或色泽形成均有重要意义。

本试验从草莓花色苷合成方向出发, 通过农杆菌介导的基因过量表达技术及沉默技术, 过表达与沉默合成途径中的关键酶基因 *LDOX*, 同时借助绿色增强荧光蛋白标记基因(*EGFP*)和 qRT-PCR 进行筛选检测。为进一步探究 *LDOX* 基因在草莓花色苷合成代谢中的作用提供依据。

1 结果与分析

1.1 *LDOX* 基因序列与干扰片段的克隆

以 RT-PCR 的方法扩增出相应的目的片段。EB 染色电泳显示，目的条带的大小符合预估的目的产物大小。经测序验证，*LDOX* 基因的 CDS 序列与干扰序列大小分别为 1 152 bp、468 bp，与电泳结果一致(图 1)。

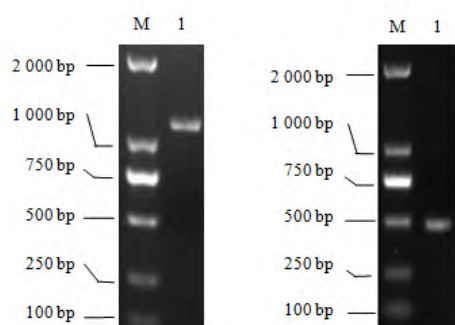


图 1 *LDOX* 目的片段的扩增

注: A: *LDOX* 基因 CDS 序列的扩增; M: DL2000 DNA marker; 1: *LDOX* 基因 CDS 全长序列; B: *LDOX* 基因 RNAi 片段的扩增; M: DL2000 DNA marker; 1: *LDOX* 基因干扰片段

Figure 1 The PCR amplification of target fragment

Note: A: Amplification of CDS sequence of *LDOX* gene; M: DL2000 DNA marker; 1: The full CDS sequence of gene *LDOX*; B: Amplification of RNAi fragment of *LDOX* gene; M: DL2000 DNA marker; 1: The interference fragment of *LDOX* gene

1.2 *LDOX* 基因的生物信息学分析

根据测序得到的“法兰地”草莓 *LDOX* 基因编码的氨基酸序列，对其蛋白结构及理化性状进行分析。可以得出，*LDOX* 氨基酸序列编码 383 个氨基酸，相对分子量约为 42.86 kD，等电点 PI 约为 5.48。对 *LDOX* 蛋白质的二级结构进行预测，发现 *LDOX* 的蛋白质二级结构含有 40.99%的 α 螺旋(alpha helix)、18.02%的延伸链(extended strand)、9.66%的 β 转角(beta turn)、31.33%的无规则卷曲(random coil)。预测 *LDOX* 基因编码氨基酸的三维结构(图 2)，也可以看出这两个蛋白均含有大量的 α 螺旋和无规卷曲，少量的延伸链结构，少量的 β 转角。



图 2 *LDOX* 蛋白的三维结构预测

Figure 2 Three-dimensional structure prediction of *LDOX*

1.3 LDOX 过表达载体的构建

对连接了 *OeLDOX* 基因的 T 载体 T-OeLDOX 与表达载体 pRI101-An-EGFP 用限制酶 *Sal* I 和 *Eco*R I 进行双酶切, 分别回收相应的小片段及大片段, 小片段即为带有相应酶切位点的目的片段, 大片段为切开后的线性载体(图 3A)。将回收到的目的基因片段与酶切好的表达载体 pRI101-An-EGFP 连接构成重组载体 pRI-OeLDOX, 转化大肠杆菌 DH5 α , 抽提质粒, 同时作双酶切与 PCR 验证, 双酶切反应切出 1 152 bp 左右条带, PCR 反应亦能扩增出目的条带, 表明过表达载体构建成功(图 3B)。

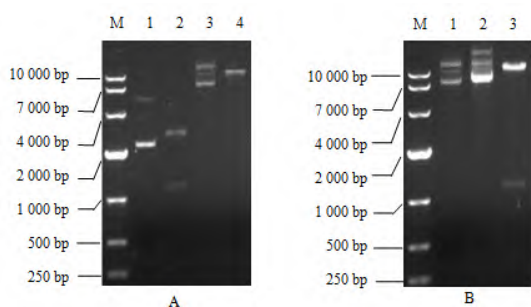


图 3 载体与重组载体的双酶切反应

注: A: T-OeLDOX 与 pRI101-An-EGFP 的双酶切反应; M: DL10000 DNA marker; 1: T-OeLDOX 重组载体; 2: T-OeLDOX 重组载体双酶切; 3: pRI101-An-EGFP; 4: pRI101-An-EGFP 双酶切; B: pRI-OeLDOX 重组载体的双酶切验证; M: DL10000 DNA marker; 1: pRI101-An-EGFP; 2: pRI-OeLDOX 重组载体; 3: pRI-OeLDOX 重组载体双酶切

Figure 3 The double digestion of the vector and recombinant vector

Note: A: Double enzyme digestion reaction between T-OeLDOX and pRI101-An-EGFP; M: DL10000 DNA marker; 1: The recombinant vector of T-OeLDOX; 2: The double digestion of recombinant vector of T-OeLDOX; 3: pRI101-An-EGFP; 4: The double digestion of pRI101-An-EGFP; B: Identification of pRI-OeLDOX recombinant vectors by double enzymatic digestion; M: DL10000 DNA marker; 1: pRI101-An-EGFP; 2: The recombinant vector of pRI-OeLDOX; 3: The double digestion of recombinant vector pRI-OeLDOX

1.4 LDOX 干扰载体的构建

将扩增好的目的片段与 T-Vector pMDTM19 连接, 抽提 T-LDOXi 重组载体, 用内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 作双酶切反应, 回收相应的小片段, 同时双酶切 pENTR 1A, 回收大片段。因 pENTR 1A 上存在 3 个 *Bam*H I 酶切位点及 1 个 *Xho* I 酶切位点, 因而在双酶切后共切割出 4 个 DNA 片段, 其中两个片段的大小均为 700 bp 左右, 因而在电泳图中重叠, 另有 1 个 90 bp 左右片段在电泳图中未显示(图 4A; 图 4B)。在目的基因连接上 pENTR 1A 后, 转化大肠杆菌抽提质粒作双酶切验证, 酶切反应表明连接成功(图 4C)。而后进行 LR 反应, 即可将目的基因与表达载体 pK7GWIWG2D(II)连接构成 pK7-LDOXi 重组载体。因自杀基因 *ccdB* 可抑制 DH5 α 的生长, 而干扰片段在 LR 反应中重组置换了 *ccdB*, 因而重组载体可成功转化 DH5 α 并在壮观霉素抗性板上生长。在进行酶切验证时, 考虑到重组载体与原载体中均含有多个 *Bam*H I 位点, 同时重组载体中含有 3 个 *Xho* I 位点, 而原载体仅含有 1 个 *Xho* I 位点, 故选择 *Xho* I 进行单酶切验证更为合理。经 *Xho* I 酶切, 重组载体切出 3 个 DNA 片段, 原载体切出唯一的线性片段, 电泳结果符合预期(图 4D)。PCR 检测也能扩增出相应的基因片段, 证明载体构建成功。

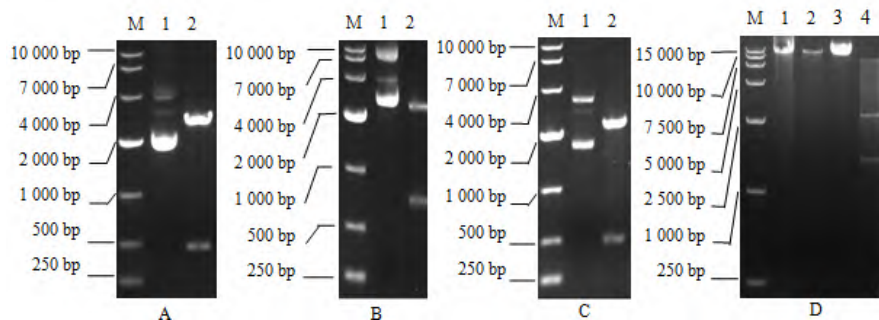


图 4 载体的双酶切反应与重组载体的双酶切验证

注: A: T-LDOXi 重组载体的双酶切反应; M: DL10000 DNA marker; 1: T-LDOXi 重组载体; 2: T-LDOXi 重组载体双酶切; B: pENTR 1A 的双酶切反应; M: DL10000 DNA marker; 1: pENTR 1A; 2: pENTR 1A 双酶切; C: pET-LDOXi 的双酶切验证; M: DL10000 DNA marker; 1: pET-LDOXi 重组载体; 2: pET-LDOXi 重组载体双酶切; D: pK7-LDOXi 重组载体的单酶切验证; M: DL15000 DNA marker; 1: pK7GWIWG2D(II); 2: pK7GWIWG2D(II)单酶切; 3: pK7-LDOXi 重组载体; 4: pK7-LDOXi 重组载体单酶切

Figure 4 The double digestion of the vector and recombinant vector

Note: A: Double enzymatic digestion of T-LDOXi recombinant vector; M: DL10000 DNA marker; 1: The recombinant vector of T-LDOXi; 2: The double digestion of recombinant vector T-LDOXi; B: Double enzyme digestion of pENTR 1A; M: DL10000 DNA marker; 1: pENTR 1A; 2: The double digestion of pENTR 1A; C: Double enzyme digestion of pET-LDOXi; M: DL10000 DNA marker; 1: The recombinant vector of pET-LDOXi; 2: The double digestion of recombinant vector pET-LDOXi; D: Identification of pK7-LDOXi recombinant vector by single enzyme digestion; M: DL15000 DNA marker; 1: pK7GWIWG2D(II); 2: The single digestion of pK7GWIWG2D(II); 3: The recombinant vector of pK7-LDOXi; 4: The single digestion of recombinant vector pK7-LDOXi

1.5 EGFP 检测

通过体式荧光显微镜观察, 可以在转染 *LDOX* 过表达与沉默载体的草莓的组织中检测到绿色荧光蛋白, 证明目的基因已通过农杆菌介导的方式转染进入草莓果实组织中。转染 *LDOX* 过表达与沉默载体的草莓果实与空白对照果实的荧光成像, 转染成功的草莓组织可以在显微镜下观察到明亮的绿色, 而阴性对照则无法观察到相应的现象, 由此筛选出可用的样本进而用于下一步的研究(图 5)。

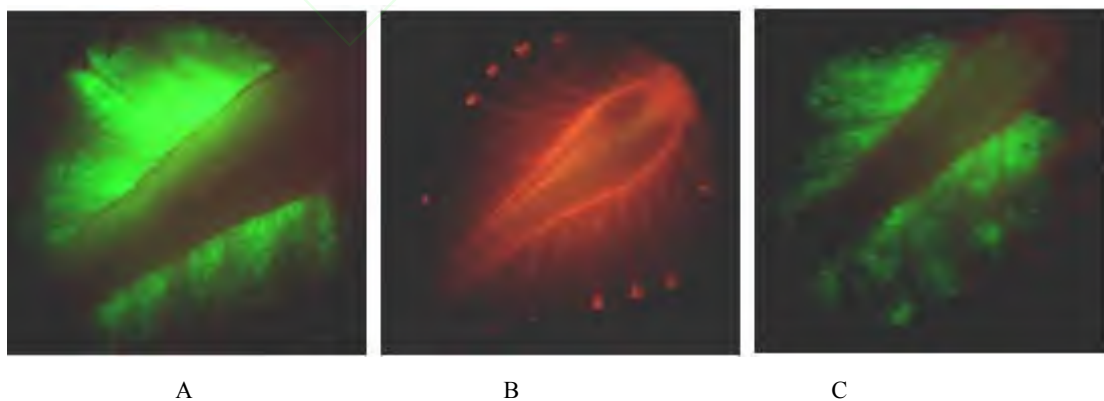


图 5 草莓果实的 *EGFP* 观察

注: A: 转染 *LDOX* 过表达载体的草莓果实; B: 阴性对照; C: 转染 *LDOX* 沉默载体的草莓果实

Figure 5 Observation of *EGFP* in strawberries

Note: A: Strawberry fruit transfected by *LDOX* overexpression vector; B: Negative control; C: Strawberry fruit transfected by *LDOX* silencing vector

1.6 荧光定量 PCR 验证

对转染 *LDOX* 过表达及沉默载体的草莓果实以及空白对照果实进行 qPCR 验证发现, *LDOX* 基因的表达到在转染沉默载体的果实中降低了 70%, 在转染过表达载体的果实中增加了 3.7 倍, 表明沉默转染与过表达转染成功, 采收的果实可用于进一步的研究。

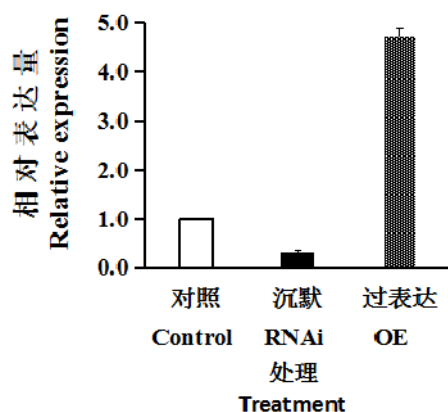


图 6 *LDOX* 基因的荧光定量 PCR 验证

Figure 6 The qPCR verification of gene *LDOX*

2 讨论

基因沉默与基因过表达是分子生物学领域常用的两种研究手段, 通过正、负两面的对比, 检验某一基因的功能特性。本试验中克隆了“法兰地”草莓的 *LDOX* 基因, 并成功构建了草莓果实花色素苷合成的关键基因 *LDOX* 的沉默与过表达载体, 为进一步验证其对花色素苷代谢的影响提供依据。

在农杆菌转染草莓果实的预实验中, 我们对其转染条件进行了较为细致的探究, 最终确定农杆菌的 OD_{600} 在 0.6~0.8 之间较好, 并用 M404 培养基(含 20 g/L/蔗糖及 0.2 mol/L/乙酰丁香酮)悬浮菌体的方法。近年来有诸多相关的研究(Hoffmann et al., 2011; Aragüez et al., 2013; Medina-Puche et al., 2015)报道培养农杆菌的 OD_{600} 约为 0.8, 转染液采用 MS 培养基取得了较好的转染效果; 豆玉娟(2014)报道的农杆菌的 OD_{600} 约为 1.2 左右, 转染液则采用 MES 悬浊液。农杆菌的介导转化这一步是相当重要的, 它的成功与否直接影响基因过表达与沉默的效果。因而, 在预实验中优化农杆菌转染的条件, 尤其是控制好农杆菌的培养程度及转染悬浮液的浓度, 也是试验成功必不可少的一环。

β -半乳糖苷酶(*LacZ*)、氯霉素乙酰转移酶(*CAT*)、绿色荧光蛋白(*GFP*)、红色荧光蛋白(*RFP*)等是植物基因工程常用的报告基因(Koo et al., 2007)。本试验所用的报告基因 *EGFP* 是增强型的绿色荧光蛋白, 荧光强度大大高于 *GFP*, 更易于观察植物组织。近年来, *GFP* 用于分子标记已有诸多报道。周鹤莹等(2015)建立了森林草莓 ‘Hawaii 4’ 高效遗传转化系统, 借助 *GFP* 荧光筛选阳性植株。李玉生等(2013)通过农杆菌介导 *GFP* 基因转化苹果茎尖碎片获得了转基因植株。曾洁等(2014)利用 *GFP* 优化了农杆菌介导的瞬时转染与亚细胞定位的方法。

RNA 干扰载体的基本结构需要强启动子下游插入反向重复片段,形成 RNA 链的发夹结构是一种有效方法(Smith et al., 2000)。“酶切—连接”法、“零背景筛选”法、Gateway 技术是构建 RNA 干扰表达载体常用的方法(栗挺等, 2011)。本研究使用 Gateway 技术构建 *LDOX* 基因的 RNA 干扰载体, 操作简便、成功率高、克服了对原始载体和目的片段的限制, 干扰载体 *pK7GWIWG2D(II)* 含有 *EGFP*, 更易于进行阳性果实的筛选。

基于 *LDOX* 基因干扰及表达载体的构建, 可将转化得到的阳性草莓果实进行更进一步的研究, 如探究不同贮藏时期果实花色苷含量的变化, 花色苷代谢相关酶基因(合成, 转运, 褐变等)表达变化研究等, 进而揭露 *LDOX* 基因在花色苷代谢进程中的作用。

3 材料与方法

3.1 试验材料

试验材料为“法兰地”草莓果实, 采自湖北省武汉市农科院草莓采摘基地。果实采收后用蛋托安全运回实验室, 液氮处理后迅速储存于-80℃冰箱中。

3.2 引物设计

本实验室已完成“法兰地”草莓果实的转录组高通量测序, 参考转录组数据中 *LDOX* 序列设计引物。此序列在转录组中基因编号为 gene32347-v1.0-hybrid.v1.1, 全长 1 152 bp, 在 KEGG 及 NCBI 库中均注释为无色花色苷双加氧酶(leucoanthocyanidin dioxygenase)。我们将用于构建过表达载体及沉默载体的 *LDOX* 基因片段分别命名为 *OeLDOX* 和 *LDOXi*。在构建过表达载体时, 分别在 *LDOX* 基因上下游加上酶切位点 *Sal* I 和 *Eco*R I; 在构建干扰载体时, 分别在基因上下游加上酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I。为保证表达载体 *pRII01-An-EGFP* 上 *EGFP* 的表达, 在设计引物时去除序列的终止密码子。在进行荧光定量 PCR 反应时, 以 *GAPDH* (基因登录号: XM_004309993.2) 作内参基因, 分别设计 *LDOX* 与 *GAPDH* 的 qPCR 引物。引物合成和测序由上海生工公司合成。

表 1 *LDOX* 载体构建及荧光定量 PCR 验证所用引物序列

Table 1 Primer sequence for *LDOX* vector construction and qPCR Verification

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer	Primer sequence (5'-3')
<i>OeLDOX</i> -F	GTCGACATGGTGACTGCTGCATCCGT
<i>OeLDOX</i> -R	GAATTCATTAGTTGAGATGAGAGCAGCTTCT
<i>LDOXi</i> -F	GGATCCCACTGGCTTGGGATTAG
<i>LDOXi</i> -R	CTCGAGTGAACAGTTTGTGCTGGAT
<i>LDOX</i> -qPCR-F	GCTCGTCAACAAGGAGAAGG
<i>LDOX</i> -qPCR-R	TGTGCTGGATATGCTCGAAG
<i>GAPDH</i> -qPCR-F	CCCATGTTCTGTTGTTGGTGT
<i>GAPDH</i> -qPCR-R	AGTGCACGGTGGTCATAAGA

3.3 目的基因的克隆与分析

抽提草莓果实的 RNA, 检测其质量良好后反转录为 cDNA, 并以 cDNA 为模板扩增目的基因片段。同时以 *Pfu* 酶及 *Taq* 酶扩增目的片段, 测序正确后将 *Taq* 酶扩增得到的片段连接 T 载体以便于下一步的连接反应。构建过表达载体时, *Pfu* 酶 PCR 条件: 95°C 3 min; 95°C 15 s, 58°C 15 s, 72°C 69 s, 30 cycles; 72°C 5 min; *Taq* 酶 PCR 条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 69 s, 30 cycles; 72°C 5 min。构建沉默载体时, 将其延伸时间调整为 28 s。 *Pfu* 酶 PCR 体系: 无菌水 11 μ L, 10 \times *Pfu* Buffer 4 μ L, 上下引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, dNTP 1.6 μ L, *Pfu* 酶 0.4 μ L。 *Taq* 酶 PCR 体系: 无菌水 13.3 μ L, 10 \times Ex *Taq* Buffer 2 μ L, 上下引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, dNTP 1.6 μ L, Ex *Taq* 0.1 μ L。扩增完成后回收相应的目的片段, 将回收片段送至生工公司测序, 并在 NPS 网站、ExpASy 网站、Phyre2 网站上对 LDOX 基因的生物信息学信息进行在线分析。

3.4 过表达及沉默载体的构建

过表达载体构建(“酶切—连接”法): 将成功测序的基因片段 *OeLDOX* 连接 T 载体构成 *T-OeLDOX* 重组载体, 热激法转入 DH5 α , 在氨苄青霉素抗性板上筛选阳性菌落并进行 PCR 验证, 抽提重组载体。用 *Sal* I 和 *Eco*R I 内切酶双酶切 *T-OeLDOX*, 回收小片段; 同时双酶切表达载体 *pRI101-An-EGFP*, 回收大片段。通过 T4 DNA 连接酶于 16°C 过夜连接目的片段与表达载体, 转化大肠杆菌, 利用卡那霉素筛选阳性克隆, 抽提质粒并作双酶切与 PCR 验证。

沉默载体构建(Gateway 技术): 将回收到的 *LDOXi* 片段连接 T 载体构成 *T-LDOXi* 重组载体, 转化大肠杆菌并进行菌落 PCR 验证。抽提质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 作双酶切反应回收小片段, 同时将入门载体 *pENTR 1A* 双酶切回收大片段, 用 T4 DNA 连接酶连接相应片段构成 *pET-LDOXi*, 转化大肠杆菌。抽提 *pET-LDOXi* 重组载体后与目的载体 *pK7GWIWG2D(II)* 进行 LR 反应, 转化 DH5 α , 于壮观霉素抗性板上筛选阳性菌落, 并进行 PCR 与酶切验证。

3.5 农杆菌的瞬时转染与 GFP 的显微观察

将构建好的过表达载体与干扰载体转化农杆菌 GV3101, 并将其菌液划线后挑取单菌落摇菌培养, LB 培养基中加入 50 mg/L 的卡那霉素(干扰载体换为壮观霉素)、25 mg/L 的利福平以及 50 mg/L 的庆大霉素, 180 r/min、28°C 振荡过夜培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8。后 5 000 r/min 离心 6 min, 弃去上清, 用 M404 培养基(含 20g/L 蔗糖及 0.2 mol/L 乙酰丁香酮)充分悬浮菌体。转染大绿果时期草莓果实时用 1 mL 无菌注射器由果蒂处注射处理好的农杆菌悬浮液, 注射菌液 10 d 后摘取草莓果实, 并于奥林巴斯体式荧光显微镜 SZX16 下观察 *EGFP*, 检验重组载体是否成功转染草莓果实。

3.6 qRT-PCR 验证基因表达量

从采收到的 *LDOX* 基因过表达、沉默及对照果实中提取总 RNA, 并反转录为 cDNA。以此为模板, 参

考 Takara 公司的 SYBR®premix Ex TaqTMII(Tli RNaseH Plus)说明进行两步法 qPCR 反应: Hold: 95°C, 30 s; 40 cycles: 95°C, 5 s; 60°C, 30 s。以草莓 *GAPDH* 基因为内参, 并以空白处理果实的基因表达量为对照, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *LDOX* 基因的相对表达量。

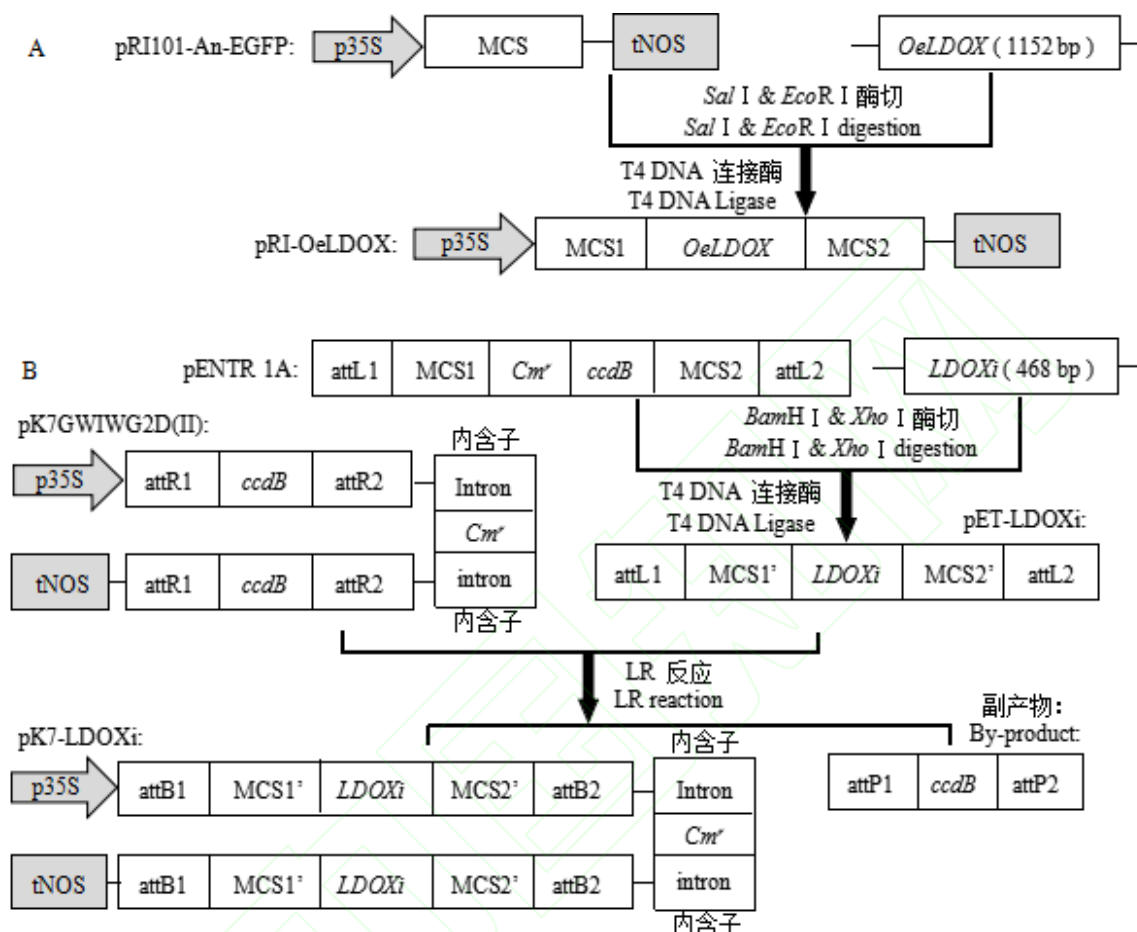


图 7 载体构建示意

注: A: 过表达载体构建; B: 干扰载体构建

Figure 7 The construction of overexpression vector and RNAi vector

Note: A: The construction of overexpression vector; B: The construction of RNAi vector

作者贡献

陈瑞旭是本研究的实验执行人, 并完成数据分析, 论文初稿的写作; 彭丽桃、叶俊丽参与实验设计, 试验结果分析; 杨书珍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

本研究由国家重点基础研究发展计划项目(4001-3111300901)资助。

参考文献

Abrahams S., Lee E., Walker A.R., Tanner G.J., Larkin P.J., and Ashton A.R., 2003, The Arabidopsis *TDS4* gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and

vacuole development, *Plant J.*, 35(5): 624-636

Aragüez I., Osorio S., Hoffmann T., Rambla J.L., Medinaescobar N., Granell A., Botella M.Á., Schwab W., and Valpuesta V., 2013, Eugenol production in achenes and receptacles of strawberry fruits is catalyzed by synthases exhibiting distinct kinetics, *Plant Physiol.*, 163(2): 946-958

Carbone F., Preuss A., Vos R.C.H.D., D'Amico E., Perrotta G., Bovy A.G., Martens S., and Rosati C., 2009, Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits, *Plant Cell Environ.*, 32(8): 1117-1131

Dou Y.J., 2014, Comparative analysis of expression and sequence of pigment-related genes in white-flesh mutant of 'Sachinoka' and its wild type, Thesis for M.S., Shenyang Agricultural University, Supervisor: Zhang Z.H., pp.42 (豆玉娟, 2014, '幸香'草莓白肉突变体与野生型花色素相关基因表达及序列分析, 硕士学位论文, 沈阳农业大学, 导师: 张志宏, pp.42)

Giampieri F., Forbes-Hernandez T.Y., Gasparri M., Alvarez-Suarez J.M., Afrin S., Bompadre S., Quiles J.L., Mezzettia B., and Battino M., 2015, Strawberry as a health promoter: an evidence based review, *Food Funct.*, 6(5): 1386-1398

Hamadziripi E., Muller M., Theron K.I., and Steyn W.J., 2012, Consumer preference for apple eating quality and taste in relation to canopy position, *Acta Horticulturae*, 1058(1058): 253-260

Hoffmann T., Kurtzer R., Skowranek K., Kießling P., Fridman E., and Pichersky E., and Schwaba W., 2011, Metabolic engineering in strawberry fruit uncovers a dormant biosynthetic pathway, *Metab. Eng.*, 13(5): 527-531

Kalt W., Forney C.F., Martin A., and Prior R.L., 1999, Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 47(11): 4638-4644

Kayesh E., Shangguan L., Korir N.K., Sun X., Bilkish N., Zhang Y., Han J., Song C., Cheng Z., and Fang J., 2013, Fruit skin color and the role of anthocyanin, *Acta Physiol. Plant*, 35(10): 2879-2890

Koo J., Kim Y., Kim J., Yeom M., Lee I.C., and Nam H.G., 2007, A GUS/Luciferase fusion reporter for plant gene trapping and for assay of promoter activity with luciferin-dependent control of the reporter protein stability, *Plant Cell Physiol.*, 48(8): 1121-1131

Li X.L., Zhang M.S., and Lv H., 2016, Research progress in plant anthocyanin synthase ANS gene, *Zhiwu Shengli Xuebao (Journal of Plant Physiology)*, 52(6): 817-827 (李兰, 张明生, 吕亨, 2016, 植物花青素合成酶 ANS 基因的研究进展, *植物生理学报*, 52(6): 817-827)

Li Y.S., Wu Y.J., Cheng H.H., Chen L., Zhao Y.H., and Wu Y.Q., 2013, Transgenic plants from fragmented shoot

- tips of apple via agrobacterium-mediated transformation with *GFP* gene, *Guoshu Xuebao* (Journal of Fruit Science), 30(6): 909-913 (李玉生, 吴永杰, 程和禾, 陈龙, 赵艳华, 吴雅琴, 2013, 农杆菌介导 *GFP* 基因转化苹果茎尖碎片获得转基因植株, *果树学报*, 30(6): 909-913)
- Manganaris G.A., Goulas V., Vicente A.R., and Terry L.A., 2014, Berry antioxidants: small fruits providing large benefits, *J. Sci. Food Agric.*, 94(5): 825-833
- Medina-Puche L., Molina-Hidalgo F.J., Boersma M., Schuurink R.C., López-Vidriero I., and Solano R., 2015, An R2R3-MYB transcription factor regulates eugenol production in ripe strawberry fruit receptacles, *Plant Physiol.*, 168(2): 598-614
- Nakamura N., Masako F.M., Miyazaki K., Suzuki K., and Tanaka Y., 2006, RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia Hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression, *Plant Biotechnol.*, 23(1): 13-17
- Rosati C., Cadic A., Duron M., Ingouff M., and Simoneau P., 1999, Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia × intermedia*, reveals organ-specific expression during flower development, *Plant Sci.*, 149(1): 73-79
- Shi S.G., Li S.J., Kang Y.X., and Liu J.J., 2015, Molecular characterization and expression analyses of an anthocyanin synthase gene from *Magnolia sprengeri* pamp, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175(1): 477-488
- Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B., Stoutjesdijk P.A., Green A.G., and Waterhouse P.M., 2000, Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs, *Nature*, 407(6802): 319-320
- Su T., Liu A.L., and Chen X.B., 2011, Advances in constructing method for RNA-interference vector, *Hunan Nongye Kexue* (Hunan Agricultural Sciences), (19): 1-4 (粟挺, 刘爱玲, 陈信波, 2011, RNA 干扰载体构建方法的研究进展, *湖南农业科学*, (19): 1-4)
- Xu W., Peng H., Yang T., Whitaker B., Huang L., and Sun J., 2014, Effect of calcium on strawberry fruit flavonoid pathway gene expression and anthocyanin accumulation, *Plant Physiol. Biochem.*, 82(3): 289-298
- Zeng J., Huang F.Z., Li B.C., Liu M.X., and Huang X., 2014, An optimized method of agrobacterium tumefaciens-mediated GFP subcellular localization, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 33(1): 159-162 (曾洁, 黄凤智, 李本昌, 刘梦昕, 黄萱, 2014, 一种根癌农杆菌介导的 GFP 亚细胞定位的方法优化, *基因组学与应用生物学*, 33(1): 159-162)
- Zhang X.N., 2013, The regulation role of *ANS*, *ANR* and *LAR* gene in strawberry anthocyanin biosynthesis pathways, Thesis for M.S., Sichuan Agricultural University, Supervisor: Tang H.R., pp.28-29 (张晓楠, 2013, *ANS*, *ANR* 和 *LAR* 基因在草莓花青素代谢途径中的调控作用, 硕士学位论文, 四川农业大学, 导师: 汤

浩茹, pp.28-29)

Zhou H.Y., Zhang W., Zhang Q., Cao Q.Q., Shen Y.Y., Qin L., and Xing Y., 2015, Establishment of high-efficiency transformation of the woodland strawberry (*Fragaria vesca*, Hawaii 4), Beijing Nongxueyuan Xuebao (Journal of Beijing University of Agriculture), 30(1): 10-14 (周鹤莹, 张玮, 张卿, 曹庆芹, 沈元月, 秦岭, 邢宇, 2015, 森林草莓‘Hawaii 4’高效遗传转化系统的建立, 北京农学院学报, 30(1): 10-14)

