

甘薯八氢番茄红素合成酶基因的克隆与功能验证

程洁¹, 赵腾飞¹, 廖志华^{1,2}, 杨春贤^{1,2,*}

¹西南大学生命科学学院, 重庆400715; ²重庆市甘薯工程技术研究中心, 重庆400715

摘要: 八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, psy)是植物体内类胡萝卜素合成途径中的第一个关键酶。本研究从甘薯高类胡萝卜素新品系渝薯11-10-97中克隆了PSY基因, 命名为***IbPSY***。序列分析显示该基因编码区为1 320 bp, 编码的蛋白质含有439个氨基酸, 分子量为49.110 kDa, 等电点(pI)为9.14。进化分析表明***IbPSY***与栀子的PSY亲缘关系最近。亚细胞定位结果显示, ***IbPSY***定位于植物细胞的叶绿体。在大肠杆菌PSY基因缺陷型菌株中表达***IbPSY***, 能够使缺陷型菌株合成类胡萝卜素; 在拟南芥中超表达***IbPSY***后, 拟南芥叶片中类胡萝卜素的含量明显提高; 表明获得的***IbPSY***具有八氢番茄红素合成酶基因的功能。

关键词: 甘薯; 八氢番茄红素合成酶; 基因克隆; 功能验证

类胡萝卜素是自然界中存在的一类重要的天然色素, 分子式为C₄₀H₅₆, 由8个类异戊二烯单位缩合而成的C₄₀的四萜类色素, 不仅可以保护叶绿素在强光的照射下脱色(Niyogi 1999), 还是植物激素脱落酸的合成前体(Hirschberg 2001)。类胡萝卜素存在 α 、 β 、 γ 三种异构体。 β -胡萝卜素是类胡萝卜素的一种, 在生物体内 β -胡萝卜素是合成维生素A的前体, 能提高人体的免疫力, 在抗癌方面也有重要的作用(Bartley和Scolnik 1995)。八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, PSY)是类胡萝卜素合成途径中的第一个关键酶, 能够催化2分子的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphat, GGPP)缩合形成无色的八氢番茄红素。八氢番茄红素再经过一系列的反应, 最后生成 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素(王玉萍等2006)。

PSY编码的蛋白质为全反式-异平基-二磷酸合成酶超家族, 含有底物结合域、底物-Mg²⁺结合位点、催化残基、活性部位残留域、2个天冬氨酸富集区域等6个保守结构域。其在真核生物与原核生物中发生的遗传突变很小(Marchler-Bauer等2009)。PSY包括两个家族: PSYI和PSYII, 目前研究发现在部分藻类生物中同时含有这两个家族, 而高等植物中只有PSYI家族, 包含PSY1、PSY2、PSY3三个同源基因(Busch等2002; Li等2009)。目前已经从多种植物中克隆出了编码PSY的基因, 如番茄、烟草、玉米、水稻等。在大多数的物种中, PSY基因的表达都是单一的, 只有少数物种如番茄、玉米、高粱中含有表达有差异的多个PSY基因。

我国栽培甘薯的历史悠久, 种植的面积和甘薯总产量都居于世界前列, 甘薯不仅是重要的粮食作物, 还是很好的家禽饲料和工业生产原料。

有研究表明, 某些品种的甘薯中所含的类胡萝卜素的含量高于胡萝卜。而橘色块根的甘薯品种中含有的 β -胡萝卜素则远高于其他肉色的甘薯品种(何川2004)。因此, 获得高类胡萝卜素含量的橘色品种中类胡萝卜素合成途径中关键酶基因PSY, 对于进一步研究该基因对类胡萝卜素生物合成途径的调控作用机制, 以及以该基因为调控靶点, 提高类胡萝卜素含量具有重要的意义。

材料与方法

1 材料

本实验所用的甘薯(*Ipomoea batatas* Lam)为重庆市甘薯工程技术研究中心保存的甘薯高类胡萝卜素新品系渝薯11-10-97。用于亚细胞定位的烟草为本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* Domin.), 用于遗传转化的拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)为本实验室保存的野生型拟南芥萌发的实生苗。

2 总RNA提取及第一链cDNA的获得

将甘薯的所有组织于液氮中研磨成粉, 利用天根生化科技有限公司的总RNA提取试剂盒(DP419)的说明书来提取甘薯总RNA, 用2%的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测所提取的RNA的完整性和纯度。最后用TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0反转录试剂盒反转出cDNA。

3 *IbPSY*基因的克隆与测序

根据甘薯转录组数据库中PSY基因的cDNA片

收稿 2017-02-15 修定 2017-03-30

资助 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(CSTC2015-SHMS-ZTZ80003和CSTC2015SHMS-ZTZ0128)和“863”计划(2011AA100607和2012AA101204)。

* 通讯作者(E-mail: yangchunxian@163.com)。

段设计引物,用之前反转的cDNA为模板进行PCR扩增。将反应得到的PCR产物连接T载体,由上海英骏公司测序。

4 分子进化树的构建与氨基酸序列的多重比对

从NCBI上下载多个物种的PSY蛋白的氨基酸序列[烟草: *Nicotiana tabacum* (ADK25054.1); 拟南芥: *Arabidopsis thaliana* (NP_001031895.1); 玉米: *Zea mays* (ACR36571.1); 番茄: *Solanum lycopersicum* (NP_001234671.1); 梔子: *Gardenia jasminoides* (AEF59491.1); 广藿香: *Pogostemon cablin* (AHJ90431.1); 柚子: *Citrus maxima* (ABY86652.1); 向日葵: *Helianthus annuus* (CAC27383.1); 草莓: *Fragaria x ananassa* (ACR61392.1); 辣椒: *Capsicum annuum* (P37272.1); 甜瓜 *Cucumis melo* (AEH03199.1); 日本水稻: *Oryza sativa Japonica Group* (BAG93381.1); 枸杞: *Lycium barbarum* (AAW88383.1); 柿子: *Diospyros kaki* (ACM44688.1); 猕猴桃: *Actinidia deliciosa* (ACO53104.1)],使用MEGA4.1软件进行进化树的分析,其他参数为默认值,自检举值1 000次。用Vector NTI suite 8.0进行氨基酸的多重序列比对。

5 亚细胞定位

将*IbPSY*的CDS连到pCAMBIA1300-GFP上构成重组质粒pCAMBIA1300-*IbPSY*-GFP。空的pCAMBIA1300-GFP作为实验对照,利用农杆菌侵染法,注射4周大的烟草叶片的背面。注射农杆菌后的烟草在弱光下培养2~3 d后,用激光共聚焦显微镜观察*IbPSY*融合GFP蛋白和对照的定位情况。

6 大肠杆菌功能互补

大肠杆菌能够产生合成类胡萝卜素的前体物质异戊二烯焦磷酸(isopentenylpyrophosphate, IPP)、二甲基丙烯焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)和法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)分子。pAC-BETA质粒包含噬夏孢欧文氏菌的*crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY*基因,能在大肠杆菌中合成 β -胡萝卜素。pAC-85b只含有*crtE*、*crtI*、*crtY*基因而缺少*PSY*的同源基因——*crtB*,不能合成 β -胡萝卜素,因此可以用于*PSY*的功能互补验证(Sherman等1989)。将*IbPSY*基因的CDS去掉质体转运肽后与pET28(a)相连,得到重组质粒pET28(a)-*IbPSY*-TP。将该重组质粒与pAC-85b共同转化大肠杆菌BL21(DE3)。筛选阳性克隆,用HPLC检测

共转有pET28(a)-*IbPSY*-TP与pAC-85b质粒的大肠杆菌中 β -胡萝卜素的含量。具体方法参考Qin等(2011)文献报道。

7 拟南芥的遗传转化及类胡萝卜素含量测定

将*IbPSY*的编码区连接至pHB载体上,构成重组质粒pHB-*IbPSY*,后将其转入农杆菌GV3101中,得到能够侵染拟南芥的工程菌。用蘸花法转化拟南芥(Clough和Bent 1998),用基因组PCR法检测T₁、T₂代转基因拟南芥。测定4周大小的T₂代拟南芥中类胡萝卜素的含量(Marr等1995)。

实验结果

1 *IbPSY*编码区长度的获得及序列分析

1.1 *IbPSY*编码区长度的获得

以反转录得到的甘薯高类胡萝卜素品系渝薯11-10-97的cDNA为模板进行PCR扩增,获得的*IbPSY*的编码区全长大小为1 320 bp,编码的蛋白质有439个氨基酸(图1),用ProtParam对*IbPSY*编码蛋白的氨基酸组成和理化性质进行预测,结果显示该蛋白的分子量为49.110 kDa,分子式为C₂₁₇₇H₃₄₆₆N₆₁₂O₆₄₁S₂₀,等电点(pI)为9.14;正电荷残基(Asp+Glu)有63个,负电荷残基(Arg+Lys)有50个;总的亲水性平均系数为-0.247,预测该蛋白为亲水性,用TargetP v1.1网站预测其含有1个47个氨基酸的质体转运肽。

1.2 *IbPSY*蛋白与其他植物*PSY*的氨基酸序列多重比对

选取烟草、拟南芥等模式植物以及与甘薯*PSY*蛋白同源性相近的植物进行氨基酸的序列比对分析(图2),*IbPSY*与其他物种的*PSY*氨基酸序列在中后部的保守性最高。*IbPSY*氨基酸序列与拟南芥、烟草、番茄、梔子和玉米的相似性分别为78.3%、87.6%、82.2%、87.9%和69.9%,一致性分别为78.3%、82.1%、72.8%、82.9%和63.8%。由此可见,从甘薯中获得的*PSY*基因所编码的蛋白质与梔子的*PSY*基因编码的蛋白质相似性最高。

1.3 *IbPSY*分子进化树的构建

选取不同物种的*PSY*蛋白序列,用MEGA 4.1进行分子进化树分析,基于Neighbor-Joining的原理构建系统进化树(图3)。结果表明:双子叶植物纲的番茄、广藿香、梔子、甘薯、枸杞等聚为一支;烟草、拟南芥、枸杞、辣椒、草莓、甜瓜等

```

M S S A L L W V V S P S S E L S N G T G I F Y S
1 ATGTCTAGTGCCCTTGCTGTGGGTTGTTTCGCCCTCGTCTGAGCTATCGAATGGCACTGGAATCTTTTATTCA
V R E G I R I V D S S R F L G R N R S L V F K G
73 GTGAGGGAGGGAATCCGGATTGTGGATTCGTCGAGGTTTCCTTGGCAGGAACAGGAGTTTGGTGTCAAAGGC
R A K K G K K Q R C T L A S F N A D S R Y L C S
145 AGGGCTAAGAAGGTAAGAAACAAGGTGCACCTTGGCATCTTCAATGCAGACTCGAGGTATCTTTGCTCG
G G S S L K N G G K S S V L S N A V V S P A G E
217 GGAGGGTCGAGCTTGAAGAATGGAGGAAATCCTCCGTGCTTCAAAATGCGGTGGTTAGTCCAGCCGGGAA
M A M S S E Q K V Y D V V L K Q A A L V N R R L
289 ATGGCGATGTCATCTGAGCAAAGGTGTACGATGTAGTGTGAAGCAGGCTGCTTTGGTGAATAGGAGGTTG
R S I D N L E V K P D I V L P G D L G V L S E A
361 AGATCCATAGATAATTTGGAGGTGAAGCCGGATATAGTCCTTCCGGGCGATTGGGCGTGTGAGTGAAGCT
Y D R C G E V C A E Y A K T F Y L G T M L M T P
433 TATGATCGATGCGGTGAAGTATGTGCAGAGTATGCTAAGACGTTTTATTTGGGAACCATGCTAATGACACCT
E R R R A I W A I Y V W C R R T D E L V D G P N
505 GAGAGAAGAAGAGCTATCTGGGCGATATATGTGTGGTGTAGGAGAAGTGTGAGCTCGTTGATGGGCGTAAT
A S H I T P T A L D R W E A R L E D V F R G R P
577 GCATCGCATATAACTCCAACGCCCTGGATAGATGGGAGGCTCGGCTGGAAGACGTATTGAGAGGGCGCCCG
F D M L D A A L S D T V S R F P V D I Q P F R D
649 TTTGATGCTCGACGCTGCACTATCAGATACAGTATCCAGGTTTCCAGTTGATATTCAGCCCTTAGGGAT
M I E G M R M D L W K S R Y D N F D E L Y L Y C
721 ATGATTGAAGGAATGCGAATGGACCTCTGGAAGTCGAGATACGATAACTTTGATGAGCTATATCTGTACTGT
Y Y V A G T V G L M S V P V M G I A P E S K A T
793 TATTACGTTGCTGGTACAGTTGGTTTGTGAGTGTCCCGGTTATGGGCATTGCGCCGAATCAAAGGCAACT
T E S V Y N A A L A L G I A N Q L T N I L R D V
865 ACAGAGAGTGTCTATAATGCCGCTTTGGCTTTAGGCATCGCAAATCAACTAACCAACATTCTCAGAGACGTA
G E D A R R G R V Y L P Q D E L A Q A G L S D E
937 GGCGAGGATGCTAGACGGGGGAGGGTCTATTTACCTCAAGATGAATTAGCCCAAGCGGGACTTTCTGATGAG
D I Y A G K V T D K W R N F M K K Q I K R A R K
1009 GATATATACGCTGGAAGTTACTGATAAGTGGAGGAACTTCATGAAGAAGCAAATCAAGAGAGCAAGGAAG
F F D E A E R G V T E L S S A S R W P V W A S L
1081 TTCTTCGACGAGGCTGAGAGAGGCGTGACTGAACTTAGCTCCGCTAGTCGATGGCCAGTGTGGGCGTCGCTG
L L Y R K I L D E I E A N D Y N N F T R R A Y V
1153 CTGTTGATCGCAAGATACTGGACGAGATCGAAGCCAACGACTACAACAATTCACAAGGAGAGCCTATGTA
S K P K K L L A L P I A Y A K A V I R P S T T A
1225 AGCAAGCCAAAGAACTGCTTGCATTGCCTATTGCATATGCAAAAGCTGTGATTGACCATCAACAACCTGCT
S P L A K A G *
1297 TCCCCTTGCAAAAGCTGGATAA

```

图1 *IbPSY*的CDS序列及其编码的氨基酸序列Fig.1 The CDS sequence of *IbPSY* and its predicted amino acid sequence

横线表示预测的质体转运肽, *表示终止密码子。

聚为一大支。单子叶植物纲的日本水稻和玉米聚为一支。其中同为双子叶植物纲菊亚纲的栀子和甘薯的PSY蛋白同源性最高。

2 *IbPSY*蛋白的亚细胞定位分析

研究发现, 类胡萝卜素合成途径中的酶都是由核基因编码, 再定位于类胡萝卜素的合成场所叶绿体(DellaPenna和Pogson 2006)。用激光共聚焦显微镜观察烟草叶肉细胞, 图4-A和B是空质粒在白光和488 nm波长的激发光下的定位情况, 在本研究中作为对照。图4-C是烟草叶肉细胞在白光下的情况, 烟草叶肉细胞中的叶绿体在555 nm波长的激发光下的自发荧光为红色(图4-E), *IbPSY*编码的蛋白质将GFP蛋白转运到叶绿体中, 因此在488 nm波长的激发光下, 叶绿体会呈现出绿色荧

光(图4-D)。将两者重合之后可以发现, 叶绿体显示两种荧光的重合色为橘黄色(图4-F)。而转入空白质粒pCAMBIA1300-GFP的烟草细胞中, 细胞中各区域都有荧光, 没有特异的定位情况(图4-B)。由此可见, *IbPSY*编码的蛋白质是定位于叶绿体中, 这一结果与之前报道的其他物种的PSY蛋白定位情况一致。

3 *IbPSY*基因的功能验证及分析

3.1 在大肠杆菌中验证*IbPSY*的功能

为了验证*IbPSY*的功能, 我们在大肠杆菌中进行原核表达实验。大肠杆菌本身虽然不能合成类胡萝卜素, 但是它们自身可以合成类胡萝卜素的前体物质, 所以可以在大肠杆菌中构建 β -胡萝卜素的合成途径。我们将pET28(a)-*IbPSY-TP*与pAC-85b

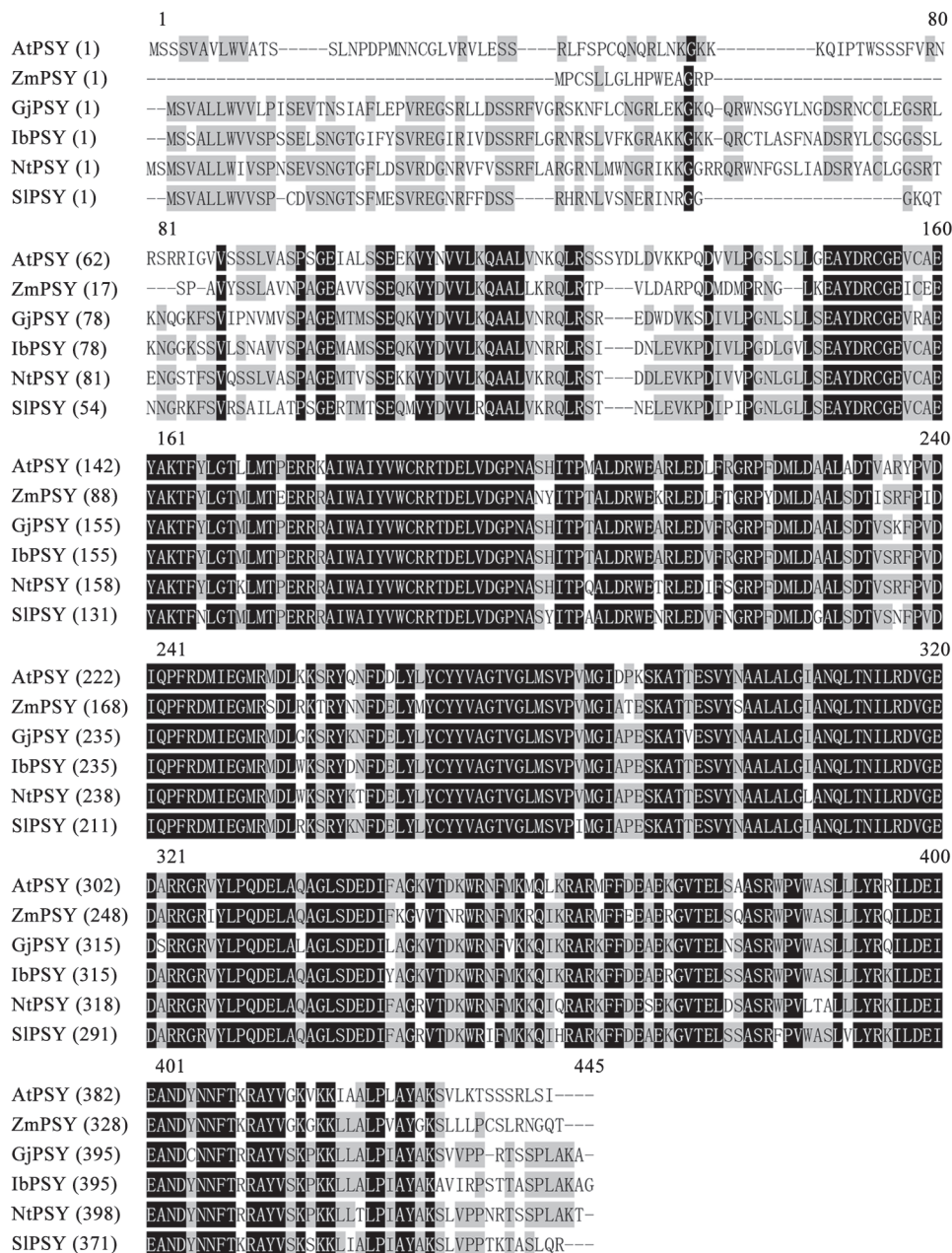


图2 不同植物PSY蛋白序列同源性比较

Fig.2 Alignment of PSY proteins from different plants

AtPSY、ZmPSY、GjPSY、NtPSY和SIPSY分别表示拟南芥、玉米、茄子、烟草和番茄的PSY蛋白。

共转大肠杆菌,重建 β -胡萝卜素合成途径的大肠杆菌呈现出黄色(图5-A),并进一步用HPLC检测共转的大肠杆菌中是否有 β -胡萝卜素的生成。结果如图5-B所示:1为 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 β -胡萝卜素的标准品,2为从共转有pET28(a)-*IbPSY-TP*和pAC-85b的大肠杆菌中提取的样品,3为从只含有pAC-85b的大肠杆菌中提取的样品。只含有pAC-85b质粒的大肠杆

菌的提取液中没有检测到 β -胡萝卜素,当pET28(a)-*IbPSY-TP*与pAC-85b共转大肠杆菌后,大肠杆菌的提取液中能检测到 β -胡萝卜素。因此*IbPSY*编码的酶具有八氢番茄红素酶的活性,可以弥补*crtB*的功能。

3.2 转*IbPSY*拟南芥中类胡萝卜素含量的测定

分别用PCR检测 T_2 代转基因拟南芥和作为阴

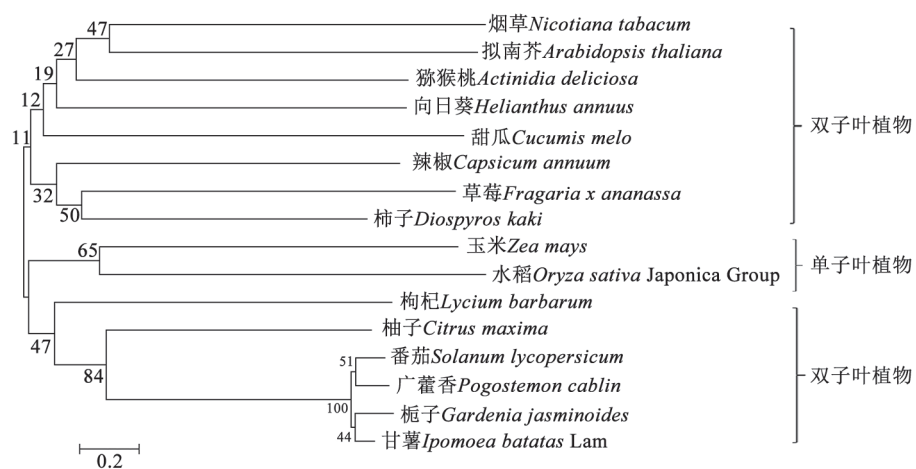


图3 利用不同植物的PSY蛋白序列构建系统进化树
Fig.3 The phylogenetic tree of PSY from different plant species

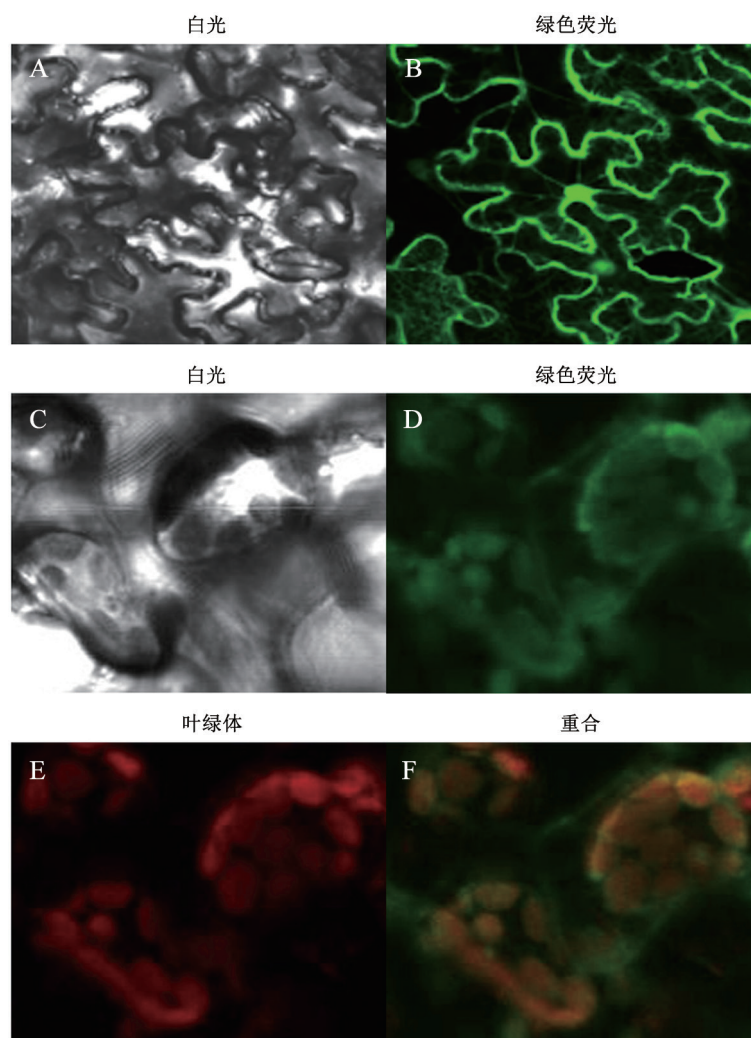
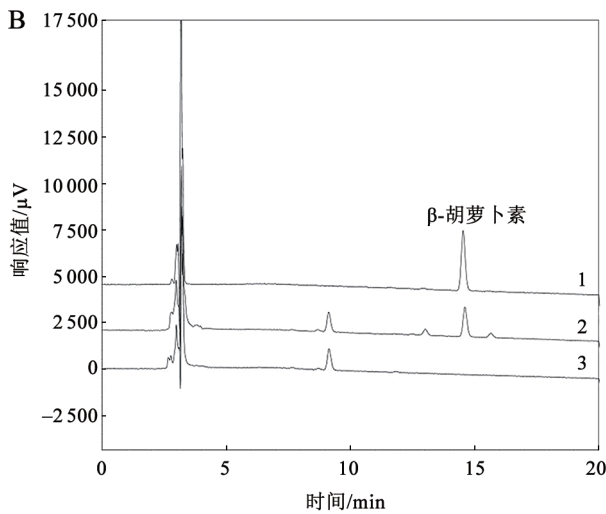
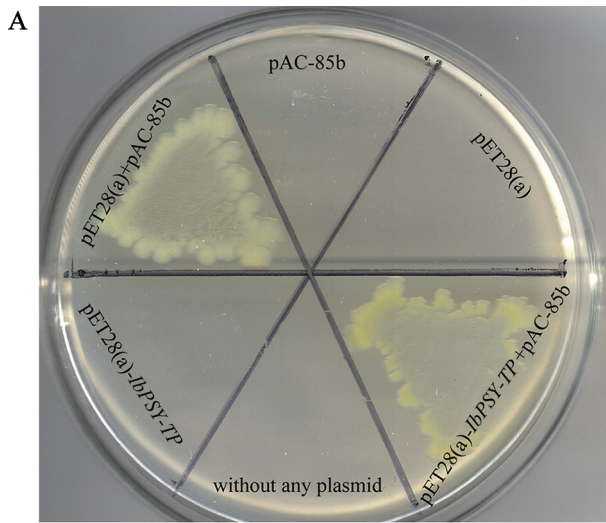


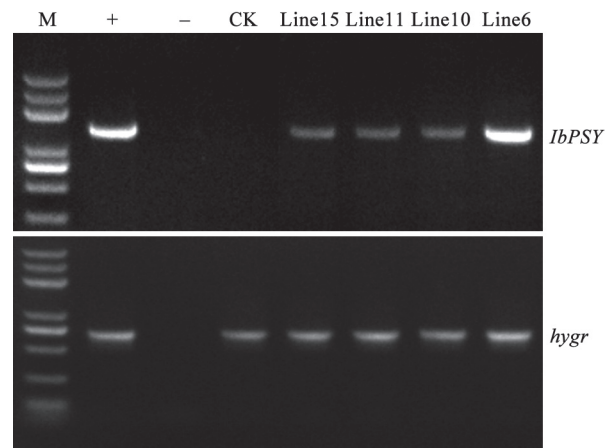
图4 IbPSY的亚细胞定位

Fig.4 The subcellular localization of IbPSY

A和B: 作为对照的GFP蛋白的亚细胞定位; C~F: IbPSY与GFP融合蛋白的亚细胞定位。

图5 *IbPSY*在大肠杆菌中的功能互补实验Fig.5 The functional complementation of *IbPSY* in *E. coli*

性对照(转有pHB质粒)的拟南芥,结果显示(图6),在T₂代拟南芥中能够同时检测到目的基因和潮霉素筛选基因,而在阴性对照中则只能检测到潮霉素筛选基因,因此所选取的拟南芥可用于类胡萝卜素的含量分析。分析超量表达*IbPSY*的拟南芥中类胡萝卜素的含量(图7),其中有3个独立转化的株系有了显著的提高($0.01 < P < 0.05$),有1个独立转化的株系有极显著的提高($P \leq 0.01$),阴性对照中拟南芥类胡萝卜素的含量为(0.261 ± 0.013) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,转基因拟南芥株系Line10、Line15、Line11、Line6中类胡萝卜素的含量分别为: (0.337 ± 0.04)、(0.305 ± 0.017)、(0.294 ± 0.028)和(0.299 ± 0.024) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,分别比阴性对照提高29%、16%、12%和14%。

图6 检测转基因拟南芥中*IbPSY*和*hygR*基因Fig.6 Detection of *IbPSY* and *hygR* genes in transgenic*Arabidopsis thaliana*

M: DL2000 marker; +: 阳性对照; -: 空白对照; CK: 阴性对照(转空pHB质粒的拟南芥); Line15、Line11、Line10、Line6: 超表达*IbPSY*基因的拟南芥。

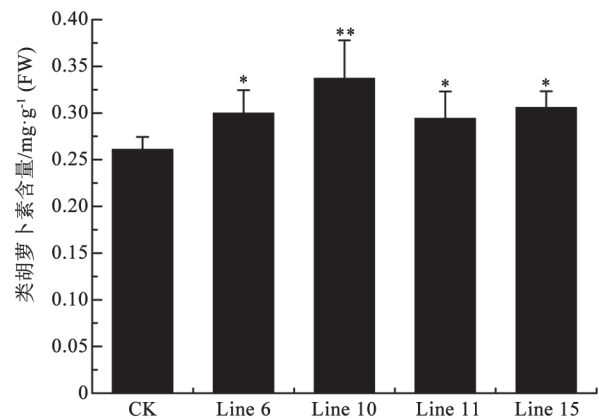


图7 转基因拟南芥中类胡萝卜素含量的测定

Fig.7 The contents of carotenoid in *Arabidopsis thaliana*

CK: 阴性对照(转pHB质粒的拟南芥); Line15、Line11、Line10、Line6: 超量表达*IbPSY*的拟南芥; *: $0.01 < P < 0.05$; **: $P \leq 0.01$ 。

讨 论

本研究从甘薯中克隆出了编码八氢番茄红素合成酶的*PSY*基因,其编码区的长度与椴子、玉米和烟草的*PSY*基因编码区的长度基本一致。将甘薯的*PSY*基因与已经报道的其他植物的*PSY*基因对比可以发现:大多数*PSY*基因编码的蛋白质的氨基酸序列长度在382~440个氨基酸之间,而甘薯的*PSY*基因编码的蛋白质含有439个氨基酸。对*PSY*

蛋白质的等电点pI分析表明, 甘薯PSY蛋白的等电点pI为9.14, 这与模式植物拟南芥PSY蛋白等电点大小相差不大(李宁等2015)。预测IbPSY蛋白显示其有一个长为47个氨基酸的质体转运肽, 亚细胞定位结果显示, IbPSY定位于叶绿体中, 这与其他已报道物种中的PSY定位情况一致。从生物信息学方面分析可知, 本研究得到的甘薯PSY基因具有与已报道的其他植物的PSY基因相似的结果。在之前的研究中发现IbPSY在甘薯品系渝薯11-10-97块根中的表达量最高, 分别比须根、成熟叶片、幼嫩叶片、成熟茎、幼嫩茎高618、88、22、898、648倍(Fu等2014)。对渝薯11-10-97品系的各个部位的 β -胡萝卜素含量分析显示, 成熟叶片中的 β -胡萝卜素含量远高于块根, 因此可以推测, β -胡萝卜素的合成在根中进行, 而后运往叶片中储存(Fu等2014)。

目前对类胡萝卜素的生物合成途径已较为清楚, 在类胡萝卜素的合成途径中, 由GGPP生成八氢番茄红素的这一步骤一直都是难以突破的瓶颈。大量的研究结果显示, 超表达PSY可以显著提高植物中类胡萝卜素的含量, 比如: 将细菌的八氢番茄红素合成酶基因(*crtB*)导入油菜中, 可以显著提高油菜中类胡萝卜素的含量(Shewmaker等1999)。在烟草中过量表达PSY1和PSY2基因, 则会导致烟草植株中八氢番茄红素的含量大量增加(Busc等2002)。在水稻中正义导入黄水仙的PSY基因能使水稻种子的内胚乳产生八氢番茄红素(Burkhardt等1997), 而第二代“黄金大米”的 β -胡萝卜素大幅高于第一代“黄金大米”, 其主要原因在于第二代“黄金大米”使用来源于玉米的PSY基因替代了来源于黄水仙的PSY基因, 导致 β -胡萝卜素含量大幅提高(Ye等2000; Paine等2005)。这提示来源于目标产物含量不同的物种的同一功能基因在催化同一生化反应时效率可能存在显著差异。在本研究中, 将甘薯的PSY基因在拟南芥中超量表达后, 拟南芥中的类胡萝卜素的含量与对照相比均有显著的提高。这表明, 超量表达PSY基因, 可能在一定程度上突破由GGPP生成八氢番茄红素这一瓶颈, 又或是会提高PSY基因下游的一些基因的表达量, 从而提高类胡萝卜素的含量。IbPSY基因的克隆和功能分析, 为今后研究如何提高甘薯中类胡萝卜素的含量奠定了基础, 也为今后类胡萝卜素的代谢工程提供候选基因。

参考文献

- Bartley GE, Scolnik PA (1995). Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*, 7: 1027–1038
- Burkhardt PK, Beyer P, Wünn J, Klöti A, Armstrong GA, Schledz M, Lintig JV, Potrykus I (1997). Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J*, 11 (5): 1071–1078
- Busch M, Seuter A, Hain R (2002). Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol*, 128 (2): 439–453
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (6): 735–743
- DellaPenna D, Pogson BJ (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 711–738
- Fu Y, Ma L, Qiu F, Yang C, Hu C, Zhao Y, Lin Z, Chen M, Liao Z, Lan X (2014). A prenyltransferase gene confirmed to be a carotenogenic CRTE gene from sweetpotato. *J Genet Genomics*, 41 (11): 613–616
- He C (2004). Nutrition of sweet potato and its development and usage. *Chin Western Cereals Oils Tech*, 28 (5): 44–46 (in Chinese with English abstract) [何川(2004). 红薯的营养价值及开发利用. *西部粮油科技*, 28 (5): 44–46]
- Hirschberg J (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol*, 4: 210–218
- Li F, Tsfadia O, Wurtzel ET (2009). The phytoene synthase gene family in the grasses: subfunctionalization provides tissue-specific control of carotenogenesis. *Plant Signal Behav*, 4 (3): 208–211
- Li N, Wang BK, Yang SB, Tang YP, Wang Q, Yang T, Patiguli, Yu QH (2015). Bioinformatics analysis of PSY in 21 plant species. *Xinjiang Agric Sci*, 52 (12): 2157–2165 (in Chinese with English abstract) [李宁, 王柏柯, 杨生保, 唐亚萍, 王强, 杨涛, 帕提古丽, 余庆辉(2015). 21种植物八氢番茄红素合成酶的生物信息学分析. *新疆农业科学*, 52 (12): 2157–2165]
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, et al (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res*, 37: D205–D210
- Marr IL, Suryana N, Lukulay P, Marr MI (1995). Determination of chlorophyll a and b by simultaneous multi-component spectrophotometry. *Fresenius J Anal Chem*, 352 (5): 456–460
- Niyogi KK (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Biol*, 50: 333–359
- Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL, et al (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol*, 23 (4): 482–487
- Qin XQ, Coku A, Inoue K, Tian L (2011). Expression, subcellular localization, and *cis*-regulatory structure of duplicated phytoene synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Planta*, 234 (4): 737–748

- Sherman MM, Petersen LA, Poulter CD (1989). Isolation and characterization of isoprene mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 171 (7): 3619–3628
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999). Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J*, 20 (4): 401–412
- Wang YP, Liu QC, Zhai H (2006). Expression and regulation of genes related to plant carotenoid biosynthesis and their application in plant gene engineering. *Mol Plant Breeding*, 4 (1): 103–110 (in Chinese with English abstract) [王玉萍, 刘庆昌, 翟红(2006). 植物类胡萝卜素生物合成相关基因的表达调控及其在植物基因工程中的应用. *分子植物育种*, 4 (1): 103–110
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000). Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287 (5451): 303–305

Cloning and functional identification of phytoene synthase gene from sweetpotato

CHENG Jie¹, ZHAO Teng-Fei¹, LIAO Zhi-Hua^{1,2}, YANG Chun-Xian^{1,2,*}

¹School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; ²Chongqing Engineering Research Center for Sweetpotato, Chongqing 400715, China

Abstract: Phytoene synthase is the rate-limiting enzyme involved in the carotenoid biosynthetic pathway in plants. In this research, we cloned the phytoene synthase gene named *IbPSY* from a new sweetpotato variety named YUSHU 11-10-97. Sequence analysis showed that the coding region of *IbPSY* was 1 320 bp. The encoded protein contained 439 amino acids with a molecular weight of 49.110 kDa and an isoelectric point (pI) of 9.14. Phylogenetic analysis showed that *IbPSY* was closest to *PSY* in gardenia. Subcellular localization results showed that *IbPSY* was localized in chloroplasts. Expression of *IbPSY* resulted in the synthesis of carotenoid in *PSY* gene-deficient *Escherichia coli* strain. Finally, overexpression of *IbPSY* in *Arabidopsis thaliana* significantly increased the contents of carotenoids. The results showed that *IbPSY* has the function of the phytoene synthase.

Key words: sweetpotato; phytoene synthase; gene cloning; functional identification

Received 2017-02-15 Accepted 2017-03-30

This work was supported by Chongqing Science & Technology Projects (Grant Nos. CSTC2015SHMS-ZTZX80003 and CSTC2015SHMS-ZTZX0128), and National High-tech R&D Program of China (“863” Program) (Grant Nos. 2011AA100607 and 2012AA101204).

*Corresponding author (E-mail: yangchunxian@163.com).