

中華大學生物資訊學系系統開發專題報告

胡蘿蔔花青素苷的穩定可能與 SCPL 基因替代性剪接有關

The stability of carrot anthocyanin may be related to alternative splicing of SCPL gene

專題組員:張芬菱、張秀璟、潘宛謙、蔡王禎

專題編號:106003

指導老師:張慧玫老師

1. 摘要

本專題是研究關於胡蘿蔔顏色主要來自 SCPL 的基因，SCPL 基因藉由乙醯化可穩定胡蘿蔔花青素，其抗氧化劑和抗炎特性相關的潛在健康益處。我們利用 PCR 發現市售橘紅色胡蘿蔔和論文(Curaba et al, 2020)在 Exon 3 有 700 鹼基插入不同，由插入延長的 Exon2 胺基酸造成。

2. 簡介

(一)物種介紹

胡蘿蔔是繖形科胡蘿蔔屬二年生植物，有白、黃、橙、橙紅、青、紫、黑等不同顏色。

(二)花青素介紹

花青素，是一種水溶性的植物色素。加入糖基修飾以醣苷鍵結合之後即為花色苷。

(三)似絲胺酸羧胺基轉移酶

簡稱 SCPL，醯基轉移酶可使用 1-0-β-葡萄糖酯作為供體，促進醯基轉移反應，與植物兒茶素、花青素相關。

(四)乙醯化

乙醯化是指將乙醯官能基加入到有機化合物中的化學反應。

3. 專題進行方式



(圖一) 整體流程圖

4. 研究方法及步驟

(一)實驗藥品

CTAB、β-mercaptoethanol、Rnase A、Phenolchloroform...等所使用的藥品均為試藥級或以上等級藥品。

(二)CTAB 植物基因體 DNA 萃取

將胡蘿蔔的根、莖、葉經過磨碎之後採取 0.5cc 加入 1.5cc 試管中加入 500 μl CTAB 緩衝液後震盪。CTAB 緩衝液的成分為 0.2M Tris-HCl(pH7.5)、50mM EDTA(pH8.0)、2M NaCl、2%(w/v)CTAB。將樣本放置水浴槽 65°C 約 15 分鐘，不時要搖晃混和。結束後加入 500 μl 的苯酚氯仿混和，用 10000rpm 離心 3 分鐘後抽取上清液放入

1.5cc 的新試管，新試管加入 500  $\mu$ l，95%酒精至滿管，放入 -20  $^{\circ}$ C 沉澱 1hr。沉澱離心將酒精倒掉，以 70~75%酒精清洗、離心再將酒精倒掉。自然烘乾後回溶在 2 mL TE 溶液。放入 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱保存。CTAB 溶液活性只能維持 2-3 天，為使 CTAB 能更有效率保護 DNA，建議實驗當天泡製溶液。

CTAB	PVP	$\beta$ -me
0.5ml	0.02g	2.5uL
5ml	0.2g	25uL

(表一) CTAB 泡製比例

### (三)植物基因體 DNA 純化

加入 2  $\lambda$  10mg/mL RNase A 放入水浴槽 60  $^{\circ}$ C, 30 min 為去除樣本的蛋白質，加入等體積的苯氯仿混合後離心 13000 rpm 1 min，重複至中間層變透明為止。離心後以 95%酒精-20  $^{\circ}$ C 靜置沉澱 1 hr。之後離心 13000 rpm 1 min 將酒精倒掉，以 70~75%酒精洗淨離心後再倒掉酒精。自然烘乾後回溶 200  $\lambda$  TE。在進行跑膠確認是否純淨。

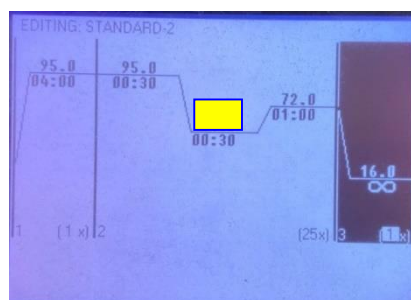
### (四)設計引子

由序列比對結果中找尋可能區域，在從中找出適合的序列片段做為設計 Primer，我們利用 NCBI Primer designing tool 去搜尋。

### (五)聚合酶連鎖反應 (PCR)

取出 10  $\mu$ L Genomic DNA ( $\mu$ g/  $\mu$ L) 被當作模板，在 90  $^{\circ}$ C 去二級結構 5 分鐘。PCR 連鎖反應將以 100  $\mu$ L 在 PCR

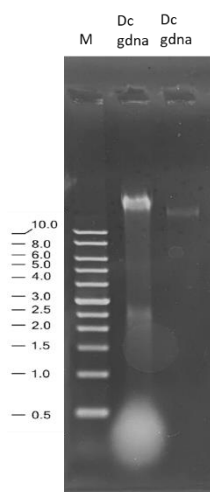
反應，100 mM 引子對各 2.5  $\mu$ L、2.5  $\mu$ L 的 5 $\times$  PCR Master Mix、25  $\mu$ L UvddH20 處理過的水。PCR 連鎖反應程式設定如下：以 95 $^{\circ}$ C 作用 4 分鐘模板單股化，再以 47 $^{\circ}$ C 作用 30 秒、72 $^{\circ}$ C 作用 1 分鐘，這三個溫度進行 25 個循環，經最後延長步驟才反應完全。所得擴大大子 (Amplicon)，以 1.0% 洋菜膠作電泳分析，以 NCBI BLAST program 作進一步序列分析。



(圖二)PCR 溫度程序設定格子部分的溫度，依各 primer 特性，合適溫度會有所不同。

## 5. 主要成果

### (一)genomic DNA 品質檢測結果



胡蘿蔔的全基因體約 5Mb, 用 0.8%洋菜膠和 1Kb 的 ladder 跑膠，結果 DNA 的 band 帶會在 10Kb 位置上。依照跑膠結果分為未純化和已純化，確認有無降解斷裂。結果無降解。

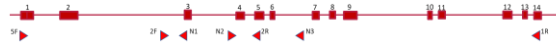
(圖三)gdna 電泳圖

## (二) 引子設計結果

我們利用兩序列去做交叉比對，確定引子可用度，不太會造成 Self complementarity。

5F	TTCGTGTTTTGGCAGAGCAT	論文提供
1R	TGATTTGGACCCGAGCCTAA	論文提供
2F	ATGACGGAAATCTTTCAAAGGC	論文提供
2R	TAATCCAGAGTAAGAGTCTCCAC	論文提供
N1	GTCCATGAATTGAGATTTCTG	本文設計
N2	GGTGAGAATCAATTTACAGA	本文設計
N3	CCTTCTCAGGTAATCTCTA	本文設計

(圖四)設計引子。黑色為順向引子，紅色為逆向引子。

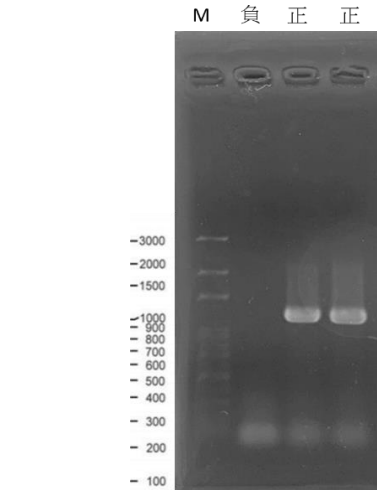


(圖五)全部引子位置圖

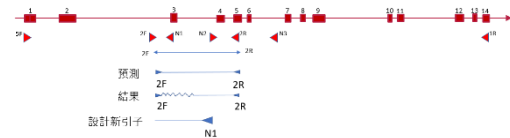
## (三) 引子跑膠結果分析

### (1) 2F-2R

加入 60ul 的 uvddH2O，再加入 20ul 5x PCR Master Mix，再加入 5ul 40mM 2R primer 及 5ul 40mM 2F primer，最後加入 10ul gdna 此步驟必須在冰上操作，再放入 PCR 機器運作。利用 1%洋菜膠和 100bp marker 去跑，band 帶長度大約 1200bp。送去明欣讀序。讀序結果主要針對 Exon3 到 Exon5，2F 顯示有雜訊，所以我們設計一個 N1 的引子去讀前方序列。經過序列比對，結果和#129 100% Exon 相同。



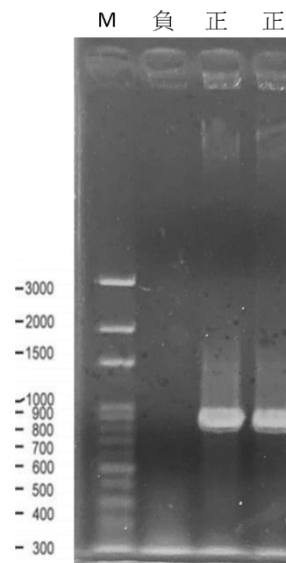
(圖六)2F-2R 引子跑膠電泳圖



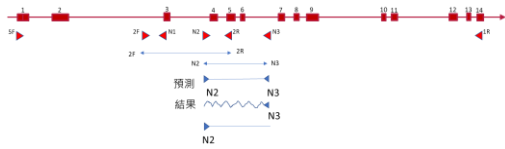
(圖七)2F-2R 引子結果示意圖

### (2) N2-N3

同前操作方式，引子換成 N2-N3。利用 1%洋菜膠和 100bp marker 去跑，band 帶長度大約 750bp。再送去明欣讀序。讀序結果主要針對 Exon3 到 Exon6，經過序列比對，結果和#129 100% Exon 相同。



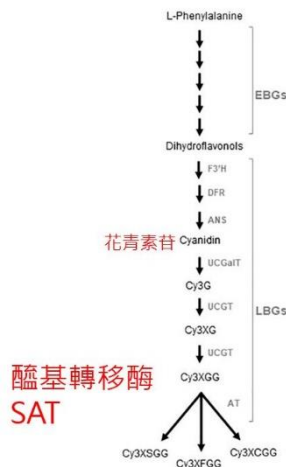
(圖八)N2-N3 引子跑膠電泳圖



(圖九) N2-N3 引子結果示意圖

## 6. 評估與展望

我們預期 SCPL 基因是胡蘿蔔的花青素苷醃化作用有相關性。結果發現花青素苷主要是 Cyanidin，加入半乳糖醃基化，變成 Cy3G 再加入木糖醃基化，變成 Cy3XG 再加入葡萄糖醃基化，變成 Cy3XGG。以上皆為未醃化花青素苷。Cy3XGG 有 3 種乙醃化模式(需要 SAT 催化)加入芥子鹼，形成 Cy3XSGG 加入阿魏酸酯，形成 Cy3XFGG 加入香豆醃基酯，形成 Cy3XCGG。



(圖十) 醃化路徑圖

根據論文(Curaba *et al*, 2020)表示胡蘿蔔 Cy3XGG 乙醃化有 3 個 SCPL，分別為 LOC108214128 (本文後簡稱#128) LOC108214129 (本文後簡稱#129) LOC108214130 (本文後簡稱#130) #129 為主要乙醃化負責基因。當#129 為正常版，花青素苷乙醃化，胡蘿蔔即為紫色。當#129 若為突變版，花青素苷未醃化，胡蘿蔔即為紅色。紅色胡蘿蔔#129 突變版，論文表明 Exon3 額外

插入 700bp 的替代剪接造成。但經過實驗發現我們與#129 在 Exon3 後面序列一模一樣，但我們在 Intron3 中有 55 字不同，但因時間因素前面序列尚未讀出，所以我們建立以下兩種假說。下面假說都需符合 Intron 剪接標準才算符合。



(圖十一) Intron 剪接標準

### 假說(一)

我們胡蘿蔔是紅色原因，是否是因為在 Intron 2 有突變，造成延長的 Exon2 需符合下面兩條件：

- (1) 新5' donor site
  - (2) Exon2新增區域需要是3n 個鹼基
- 我們發現有兩個 5' donor site 特徵序列，一個為 gtaaga，另一個為 gtgtatc，但因第二個 gtgtac 未符合 3n 個鹼基所以可能造成後面 Exon 轉譯全部位移，會造成完全沒乙醃化。



(圖十二) Exon2 延長示意圖

### 假說(二)

我們胡蘿蔔是紅色原因是否是因為在 Intron 2 有突變造成，所以懷疑前面可能插入一個外顯子和兩個內含子，一個內含子剪接需 5' donor site 和 3' acceptor site 及中間 Branch site 但因 3' 剪接位點的關鍵序列只有一組，所以此假說不成立。



(圖十三) 插入一個新 Exon 示意圖

```

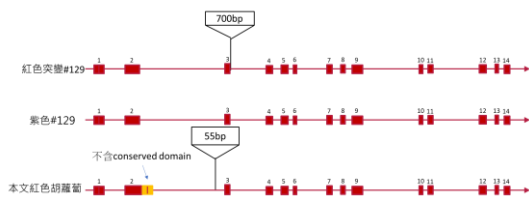
TCAGGAGGCCCTGGCTGTTCTTCCCTCTTTGGCCCTTCTTATGAAATGGATATGTACTCG
TATCACCTTACTCTGCCCCCTTCATTGTTATATGTACTGGCAAAGTTTTATATATTC
ATCAAGGCACAAACACTATCAAAATAGAAGTGTATGATGAGGCAGAAACGGAAATATG
ATGAAAAATATGACAAAATAAAAGAGAAAGAGAGGGT GGG GAGAACAGAGAGAAA
aaaaaaataaagaatttcagggggcctttggttattggttaaatgagtcggttaacgggaa
|
tcaaacctcaaaacataatggttggtttggattagccatttttggtatgaaatggg
accttatttccacttgatgggtaaatcatcttccacactccttgggatactcatctcc
ataccctcattctcattcccatctaccatccaaacaccccctcagtttggatgatgat
atgttagaacagatattgaaaaagattaaagcaggaattagcattgattgcaactctga
gaaaaactcgtatgaaatagaatgtagtataatggaagacagaataaaaattaaag
aatgtttgttttaaaaattatacatabttttatcatataagcttataaatagtattc
agccagctgaatggaacatctcgtggcagtagatggttaaatgtatataatgaaagaat
ggatcatctgaaacctcactcttggggtaattttcatctcaggtccacaatctcggac
cctgttaactgaaataaagttgcaaaatatactcggctcctcaggtttagttaaagtitt
aataccatgttagagccttagagaccacaaatttaaagttttgatatcatgttccagttaac
aattacagcaaaatcttggagagccactagatagacttaatat GGG ggcctcattg
atcatabcttttttttaacaccaaagtattttgtgaaagcttcatattccttaga
ttcactttgttctt TTAacattcagataaatattgttaaatctcttatattagtgata4
aaaga TTAaaTgaggaatTTTttaaaggTtTtggaaaaaattTaaagTtTaaatcccta
aatttttttttttttgcgaatcatcaattattttacTgaagTaaatggtaaa
aactgggtaagaaaattaaagttaccaaatctatttca TTA aaaaactcttaattt
aatccatgtattgtattag GTattagagtaactttgtcaccataattcatagattat
tacagatttccagctattcatta CTGacctcgggtattttggcagtcacattgataatgt
aaagtttaactgca GGT

```

(圖十四) 序列表示圖綠色螢光筆部分為 5' donor site, 藍色螢光筆部分為 branch site, 紅色螢光筆部分為 3' acceptor site, 粗體字為我們延長的部分。

結論: 我們認為我們顏色變化的因素是在 Exon2 的延長。表明 Exon2 額外插入 168bp 的替代剪接造成。在同一種紅色的胡蘿蔔可能是同一個基因不同位置的突變造成。

解決方式: 未來可抽 mRNA, 拿到 Exon2、Exon3 的基因皆可知道此假說是否成立。



(圖十五) 結論序列示意圖

## 5. 結語

經過了一年, 我們遇到了很多問題, 也和老師溝通了很多次, 到訂好主題我們也花了不少精力, 在實驗過程中也遇上了許多問題, 還好一件事一件事慢慢解決, 感覺很有成就感, 也感覺學到了很多東西。

## 6. 銘謝

特別感謝張慧玫老師給我們的指導, 一開始我們對於做實驗心有餘力而不足, 畢竟是需要耗盡時間與體力去和實驗抗爭。從大三下學期就開始不停的抽取胡蘿蔔的 dna, 希望能早點看到成果, 但抽到的結果都不盡理想, 試圖想放棄往這條路再繼續前進, 這就是所謂的撞牆期吧! 可是老師對我們非常有耐心, 每次的跑膠結果都會和我們說明狀況, 不對的地方也會提醒我們怎麼解救並繼續往下一個方向前進且讓實驗順利完成。在後段部分老師提供許多相關資料給我們, 並且於每個禮拜固定時間與老師 meeting 並且說明現況, 那段時間大家都辛苦了。

## 7. 參考文獻

- (1) Curaba J., Bostan H., Cavagnaro P.F., Senalik D., Mengist M.F., Zhao Y., Simon P.W., Iorizzo M. Identification of an SCPL Gene Controlling Anthocyanin Acylation in Carrot (*Daucus carota* L.) Root. *Front. Plant. Sci.* 2020;10:1770. doi: 10.3389/fpls.2019.01770.
- (2) Massimo Iorizzo, Julien Curaba, Marti Pottorff, Mario G. Ferruzzi, Philipp Simon, Pablo F. Cavagnaro Carrot Anthocyanins Genetics and Genomics: Status and Perspectives to Improve Its Application for the Food Colorant



- Industry Sci. 2020; 11(8): 906. doi: 10.3390/genes11080906
- (3) Fraser C. M., Rider L. W., Chapple C. (2005). An expression and bioinformatics analysis of the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiol.* 138 1136 - 1148. doi:10.1104/pp.104.057950
- (4) Muhammad Zulfiqar Ahmad, Penghui Li, Guangbiao She, Enhua Xia, Vagner A. Benedito, Xiao Chun Wan, and Jian Zhao. Genome-Wide Analysis of Serine Carboxypeptidase-Like Acyltransferase Gene Family for Evolution and Characterization of Enzymes Involved in the Biosynthesis of Galloylated Catechins in the Tea Plant (*Camellia sinensis*). *Sci.* 2020; 11: 848. doi:10.3389/fpls.2020.00848
- (5) Geng Meng, Sabine K. Clausen, and Søren K. Rasmussen. Transcriptome Analysis Reveals Candidate Genes Related to Anthocyanin Biosynthesis in Different Carrot Genotypes and Tissues. *Plants (Basel).* 2020 Mar; 9(3): 344. doi: 10.3390/plants9030344
- (6) 胡蘿蔔的維基百科 <https://zh.wikipedia.org/wiki/%E8%83%A1%E8%90%9D%E5%8D%9C>
- (7) 花青素的維基百科 <https://zh.wikipedia.org/wiki/%E8%8A%B1%E9%9D%92%E7%B4%A0>
- (8) 乙醯化維基百科 <https://zh.wikipedia.org/wiki/%E4%B9%99%E9%86%AF%E5%8C%96>