

石榴花类黄酮 3'-羟化酶基因的克隆及序列分析

陶吉寒, 招雪晴, 苑兆和*, 尹燕雷, 冯立娟

(山东省果树研究所, 山东 泰安 271000)

摘要: 为研究花色苷生物合成途径中类黄酮 3'-羟化酶基因(*F3'H*)的序列信息, 以泰山红石榴花瓣为试材, 提取总 RNA 后反转录为 cDNA, 根据 GenBank 中登录的相关物种 *F3'H* 基因的保守序列设计兼并引物, 对反转录后的 cDNA 进行 PCR 扩增并测序。结果表明: 在石榴中克隆到了长度为 996 bp 的 *F3'H* 基因 cDNA 片段, 该基因编码 331 个氨基酸, 含有细胞色素 P450 保守域, 属于 CYP75B 亚家族。该序列在 GenBank 中的登录号为 KC430328。

关键词: 石榴; 类黄酮 3'-羟化酶基因; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S665.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)04-0121-04

Cloning and Sequence Analysis of Flavonoid 3'-Hydroxylase Gene in Pomegranate Flower

TAO Ji-han, ZHAO Xue-qing, YUAN Zhao-he*, YIN Yan-lei, FENG Li-juan

(Shandong Institute of Pomology, Taian 271000, China)

Abstract: The flower of pomegranate cultivar Taishanhong was used as experimental materials. Total RNA was extracted and reversely transcribed into cDNA. Degenerate primers were designed according to conserved sequences of flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) gene of some related species in GenBank database. PCR amplification was conducted and then the PCR product was sequenced. The result showed that a *F3'H* cDNA fragment was cloned from pomegranate flower with the sequence length of 996 bp, coding 331 amino acids. The *F3'H* in pomegranate contained cytochrome P450 conserved domains, belonging to CYP75B subfamily. The accession number for the gene in GenBank was KC430328.

Key words: pomegranate; flavonoid 3'-hydroxylase gene; gene cloning; sequence analysis

石榴(*Punica granatum* L.)在我国已有 2 000 多年的栽培历史, 不仅是人们喜爱的水果, 更是一种重要的园林绿化树种。石榴花色艳丽, 其花瓣有单瓣、复瓣、重瓣、台阁等不同花型和红、粉红、白、黄等不同花色^[1], 因其花期较长, 花量大, 具有极高的观赏价值。与月季、菊花、百合、蝴蝶兰、金鱼草等传统观赏植物的研究相比, 石榴的研究基础相对薄弱, 对石榴花色形成相关酶及基因的研究鲜见报道, 至今, 除报道了石榴中克隆到的二氢黄酮醇还原酶基因(*DFR*)^[2-3]、查尔酮合成酶基因(*CHS*)^[4]、花青素合成酶基因(*ANS*)^[4]等外, 未见有其他花色苷形成相

关基因的报道。

类黄酮 3'-羟化酶(*F3'H*)是花色苷生物合成途径的关键酶, 属于细胞色素 P450 单加氧酶家族, 催化的反应需要 NADPH 和 O₂ 的参加^[5-6]。*F3'H* 可将 4', 5, 7-三羟基黄酮和二氢槲皮醇 3' 位置羟基化, 转化成圣草酚和二氢槲精, 而这 2 种物质是合成花色素和原花色素的重要前体物质, 是花和种皮等器官呈色的重要物质^[7]。因此, 克隆了石榴花中 *F3'H* 基因并对其序列进行分析, 以期研究该基因的结构及其在花瓣着色过程中的作用机制奠定基础。

收稿日期: 2013-01-20

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2009DM010)

作者简介: 陶吉寒(1969-), 男, 山东成武人, 研究员, 硕士, 主要从事果树遗传资源与育种研究。E-mail: sdtjh_69@163.com *

通讯作者: 苑兆和(1963-), 男, 山东招远人, 研究员, 博士, 主要从事果树遗传资源与育种研究。

E-mail: zhyuan88@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 材料

于 5—6 月从山东省果树研究所石榴种质资源圃采集泰山红石榴盛花期花瓣,于液氮中速冻后放入 -80°C 冰箱保存备用。

1.2 试剂

cDNA 反转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒、T4 DNA 连接酶、pMD 18-T 载体、琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌 DH-5 α 大肠杆菌感受态购自 Transgene 公司,PCR 引物合成及测序工作委托 Invitrogen 公司(上海)进行。

1.3 方法

1.3.1 花瓣总 RNA 提取及反转录为 cDNA 采用改良 CTAB 法提取花瓣总 RNA。按照 cDNA 反转录试剂盒的操作将获得的 RNA 反转录成 cDNA。

1.3.2 引物设计 根据 GenBank 中登录的相关物种的序列,利用 DNAMAN 6.0 软件设计兼并引物。上游引物为: 5'-CGTNGAYGTBGTBGTBGC-SKCVTC-3', 下游引物为: 5'-GGGTCHCCDGC-WATGGCCCAHAYRTT-3'。

1.3.3 PCR 扩增 以获得的 cDNA 为模板,利用合成的兼并引物扩增目的片段。采用 25 μL 的反应体系进行 PCR 扩增,其中,灭菌蒸馏水 14.3 μL , dNTPs 2 μL , 10 \times PCR buffer 2.5 μL , 上游和下游引物各 2 μL , cDNA 2 μL , Taq 酶 0.2 μL 。反应条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

1.3.4 克隆与序列分析 将目的条带进行回收,连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH-5 α 感受态细胞。LB 平板筛选阳性克隆,经 PCR 鉴定后,进行测序。用 DNAMAN 6.0 软件分析获得的 DNA 序列,翻译出氨基酸序列后进行 BLASTP 比对。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 制备

获得 RNA 溶液经测量后,其 OD 值为 2.00。从图 1 可以看出,有清晰的 28S、18S 条带,表明提取的 RNA 没有蛋白质和 DNA 污染,可进行下一步反应。

2.2 PCR 扩增结果

以石榴花瓣 cDNA 为模板,以设计的兼并引物进行 PCR 扩增。经凝胶电泳后发现,条带与预计片段大小一致(图 2),测序后的 cDNA 片段为 996 bp。

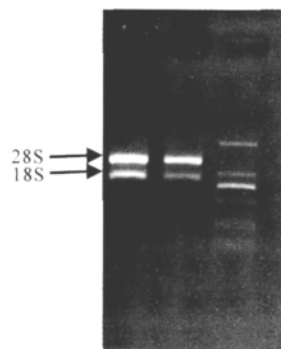


图 1 石榴花瓣总 RNA 电泳结果

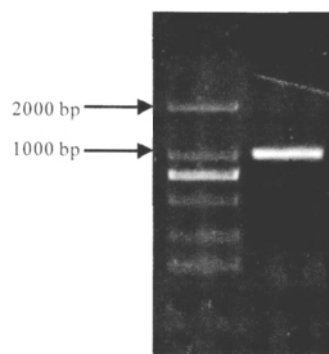


图 2 $F3'H$ 基因的 PCR 扩增效果

2.3 $F3'H$ 基因片段的序列分析结果

在 NCBI 数据库中,将 $F3'H$ 基因片段的核苷酸序列进行比对,结果发现,其与葡萄、莨菪、圆叶牵牛、甘薯、大丽花、山葡萄、万寿菊等的核苷酸序列相似性在 75% 以上。该基因片段共编码 331 个氨基酸(图 3)。将此氨基酸片段序列进行对比发现,其与葡萄、大丽花、番薯、杜鹃、万寿菊、毛果杨、苹果、紫罗兰等的同源性在 78% 以上。由此确定,本试验克隆到的片段为石榴花 $F3'H$ 基因,GenBank 登录号为 KC430328。

3 结论与讨论

$F3'H$ 是细胞色素加氧酶家族成员,NCBI CD (conserved domains) 搜索检测到石榴 $F3'H$ 含有细胞色素 P450 保守域,属于 CYP75B 亚家族。

$F3'H$ 最早在矮牵牛 *Petunia* 中分离得到的^[8]。后来在其他植物中也先后得到了 $F3'H$ 的同源基因^[9-10]。前人研究证明, $F3'H$ 在根、茎、叶、花中均有表达^[11-13]。 $F3'H$ 分别将 4', 5, 7-三羟基黄酮和二氢槲非醇转化成圣草酚和二氢柞精后形成不同的花色苷,使植物表现出不同的花色。通过 $F3'H$ 在矮牵牛花的异位表达发现,转 $F3'H$ 能提高 3'-二甲花青素含量^[14],表明 $F3'H$ 调控花色苷生物合成的代谢水平与强度,从而与其他基因共同协调决定

植物花色苷组成及颜色。

当前,花色苷的生物合成途径、相关基因的协同表达调控已成为花卉基因工程和果树遗传育种研究

的热点,改变花色的基因工程研究主要围绕 $F3'H$ 、 $F3'5'H$ 和 DFR 进行^[15],充分体现了 $F3'H$ 基因在花色修饰中的重要作用。

```

1   CGTCGACGTGGTGGTGGCCGCCTCCGCCTCCGTGGCCGCTCAGTTCTTGAAAATTCATGA
1   V D V V V A A S A S V A A Q F L K I H D
61  CGCGAATTTCTCCAGCCGGCCACCGAACTCCGGCGCCAAACATATCGCTTATAACTATCA
21  A N F S S R P P N S G A K H I A Y N Y Q
121 AGATCTGGTGTGTTGCGCCCTACGGCCCGCGGTGGCGCATGCTTCGGAAGATCAGCTCCGT
41  D L V F A P Y G P R W R M L R K I S S V
181 GCATCTCTTCTCCGCCAAGGCCTTGATGATTTTCAGACATGTTTCGACAGGAAGAGGTTGC
61  H L F S A K A L D D F R H V R Q E E V A
241 AATACTGACACGCGCTCTAGCGAGTGCAGGCAAAACACCAGTGAAATTAGGGCAATTACT
81  I L T R A L A S A G K T P V K L G Q L L
301 GAACGTGTGCACCACCAACGCCCTAGCGCGAGTGATGTTAGGGAGGAGAGTGTTCCGGCA
101 N V C T T N A L A R V M L G R R V F G D
361 CGGCGGCGATCCAAAGGCGGATGAGTTCAAGTCGATGGTGGTGGAGCTGATGGTGTGTTGGC
121 G G D P K A D E F K S M V V E L M V L A
421 CGGAGTATTCAACATCGGTGACTTCATCCCGCGCTTGATTGGCTTGACCTGCAAGGCGT
141 G V F N I G D F I P A L D W L D L Q G V
481 GGCAGGTAAGATGAAGAACTCCACGCGAGATTTGACGCGTTCCTGAACACCATTCTGGA
161 A G K M K K L H A R F D A F L N T I L E
541 AGAGCACAAAAACCAGCAACGGCGCAGGGGAGAATCACGTGGACTTGTTGAGCACGTTGAT
181 E H K T S N G A G E N H V D L L S T L I
601 TTCACTCAAAGATACTGATTTTGATGCTGATGGTGAAGGAGGGAAACTCACGGACACTGA
201 S L K D T D F D A D G E G G K L T D T E
661 AATCAAAGCTTTGCTATTGAACCTTGTTACAGCTGGAACGACACATCATCTAGCACAGT
221 I K A L L L N L F T A G T D T S S S T V
721 GGAATGGGCAATAGCAGAACTAATTCGCCATCCACAAATCATGAACCAAGCCCAAGAAGA
241 E W A I A E L I R H P Q I M N Q A Q E E
781 GCTGGACACCGTAGTGGGCGGAGACCGGCTTGTAACCGAATCGGACCTAACCCAACTACC
261 L D T V V G R D R L V T E S D L T Q L P
841 TTACCTCCAAGCCATTATCAAGGAGACCTTCAGGCTCCACCCATCAACCCCACTCTCTCT
281 Y L Q A I I K E T F R L H P S T P L S L
901 GCCACGAATGGCAGCGGAGAGCTGCGAGATCAACGGCTACCACATCCCCAAAGGATCGAC
301 P R M A A E S C E I N G Y H I P K G S T
961 CCTTTTGGTCAACGTGTGGGCCATAGCTCGTGACCC
321 L L V N V W A I A R D

```

图3 石榴 $F3'H$ 基因片段核苷酸及推测的氨基酸序列

本研究采用同源克隆方法克隆了石榴花中 $F3'H$ 基因,得到了 cDNA 片段,为进一步的研究工作奠定了理论基础。利用 RACE 技术获得该基因的 3'和 5'端,从而得到基因的 cDNA 全长将是后续研究的重点。

参考文献:

- [1] 汪小飞,周耘峰,黄埔,等.石榴品种数量分类研究[J].中国农业科学,2010,43(5):1093-1098.
- [2] 招雪晴,苑兆和,陶吉寒,等.粉花石榴二氢黄酮醇还原

酶基因 cDNA 片段的分离与鉴定[J].中国农学通报,2012,28(1):233-236.

- [3] 招雪晴,苑兆和,陶吉寒,等.红花石榴二氢黄酮醇还原酶(DFR)基因 cDNA 片段克隆及序列分析[J].山东农业科学,2012,44(2):1-4.
- [4] Ben-Simhon Z, Judeinstein S, Nadler-Hassar T, et al. A pomegranate (*Punica granatum* L.) WD40-repeat gene is a functional homologue of *Arabidopsis* TTG1 and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis during pomegranate fruit development[J]. Planta, 2011, 234: 865-881.

- [5] Graham S, Peterson J. How similar are P450s and what can their differences teach us[J]. Arch Biochem Biophys, 1999, 369: 24-29.
- [6] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: A success story[J]. Genome Biol, 2000 (1): 30031-30039.
- [7] Doostdar H, Shapiro J P, Niedz R, et al. A cytochrome-P450 mediated naringenin 3'-hydroxylase from sweet orange cell cultures[J]. Plant Cell Physiology, 1995, 36 (1): 69-77.
- [8] Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton T A, et al. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*[J]. The Plant Journal, 1999, 19: 441-451.
- [9] Seitz C, Eder C, Deiml B, et al. Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase in the Asteraceae family[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 61: 365-381.
- [10] Tanaka Y. Flower colour and cytochromes P450[J]. Phytochemistry Reviews, 2006, 5: 283-291.
- [11] Castellarin S D, Gaspero G D, Marconi R, et al. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organization, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyaniding-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin[J]. BMC Genomics, 2006, 7: 12.
- [12] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, et al. Heterologous expression of two gentian cytochrome P450 genes can modulate the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco plants[J]. Molecular Breeding, 2006, 17: 91-99.
- [13] Jeong S T, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, et al. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*) [J]. Plant Science, 2006, 170: 61-69.
- [14] Bogs J, Ebasia A, McDavid D, et al. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development[J]. Plant Physiol, 2006, 140(1): 279-291.
- [15] 侯杰, 佟玲, 崔国新, 等. 植物类黄酮 3'-羟化酶 (*F3'H*) 基因的研究进展[J]. 植物生理学报, 2011, 47 (7): 641-647.

(上接第 120 页) 和产量最高。密度处理对猫爪草化学成分含量的影响较大。低密度水平(M3)有利于各化学成分积累,与高密度水平(M1)相比,多糖和黄酮含量差异极显著,蛋白质和总糖含量差异不显著,且化学成分的含量比文献记载都要高^[5],这充分体现出道地产区药材的优越性。

本试验条件下,综合产量和化学成分含量因素,M1(45 万株/hm²)是最佳的栽培密度。更高密度水平对猫爪草产量和化学成分的影响有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 周立,张炜,许津. 猫爪草有效成分诱生肿瘤坏死因子的作用[J]. 中国医学科学院学报, 1995, 17(6): 456.
- [2] 张振凌,董呈明,房方. 重视和加快猫爪草的研究与开发[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(1): 25-26.
- [3] 张艳玲,孙万慧,胡孔峰,等. 猫爪草遗传多样性的ISSR分析[J]. 河南农业科学, 2010(9): 117-120.

- [4] 张艳玲,齐丹,吴月红,等. 密度处理对猫爪草果期光合蒸腾特性的影响[J]. 河南农业科学, 2008(12): 103-105.
- [5] 吴晓,徐佳,池玉梅,等. 猫爪草中总糖和多糖含量测定方法研究[J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(3): 169-171.
- [6] 池玉梅,于生,张明洁,等. 差示分光光度法测定猫爪草中总黄酮的含量[J]. 江苏中医药, 2007, 39(12): 56-58.
- [7] 查菲娜,宋晓,马冬云,等. 种植密度对不同穗型冬小麦氮素积累和分配及子粒蛋白质含量的影响[J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(1): 19-23.
- [8] 李洪. 不同密度处理下玉米单株根系体积的动态变化[J]. 山西农业科学, 2010, 38(9): 20-22.
- [9] 吴奇峰,董志新. 不同施肥及密度处理下大豆籽粒干物质积累动态及产量表现[J]. 江苏农业科学, 2011, 39 (3): 112-113.
- [10] 钟任强,冯世鑫. 摘除分枝对提高猫爪草产量的研究[J]. 时珍国药研究, 1998, 9(1): 28.