

一个新的茶树黄酮醇合酶基因的克隆和表达分析

谢素霞, 张媛, 郭凯琳, 王磊, 袁红雨*

信阳师范学院生命科学学院, 河南信阳 464000

摘要: *Cs-COR113* (GenBank 登录号: FE942098) 为一受冷诱导的茶树黄酮醇合酶基因的 cDNA 片段, 采用 RACE 技术克隆了这一基因的全长 cDNA, 命名为 *CsFLS* (GenBank 登录号: FJ577509)。 *CsFLS* cDNA 序列全长为 1 303 bp, 5'-UTR 和 3'-UTR 分别长 91 bp 和 175 bp, 包含一个编码 336 个氨基酸的完整开放阅读框。序列分析显示, *CsFLS* 与烟草、矮牵牛、欧芹、拟南芥的黄酮醇合酶的同源性分别为 74%、75%、75% 和 63%, 含有 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶家族 2 个保守的基序, 以及与黄酮醇合酶正确折叠有关的 2 个保守的甘氨酸残基。 *CsFLS* 的表达受低温诱导, 但不受 ABA 诱导。

关键词: 茶树; 黄酮醇合酶; 基因表达

Cloning and Expression Analysis of a Flavonol Synthase Gene from *Camellia sinensis*

XIE Su-Xia, ZHANG Yuan, GUO Kai-Lin, WANG Lei, YUAN Hong-Yu*

Faculty of Life Sciences, Xinyang Normal College, Xinyang, Henan 464000, China

Abstract: *Cs-COR113* is the cDNA fragment of a cold-induced flavonol synthase (FLS) gene of tea (*Camellia sinensis* L.). The full-length cDNA, which was cloned using RACE (rapid amplification of cDNA ends) strategy (designated as *CsFLS*, GenBank accession number: FJ577509), was 1 303 bp in length with a 91-bp 5'-UTR and a 175-bp 3'-UTR, containing an open reading frame of 336 amino acids. *CsFLS* protein had homology to other flavonol synthase from *Nicotiana tabacum*, *Petunia hybrida*, *Petroselinum crispum*, and *Arabidopsis thaliana*, showing 74%, 75%, 75%, and 63% in amino acid identity, respectively. *CsFLS* contained two conserved motifs of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases and two glycine residues required for proper folding of the FLS polypeptide. The expression of *CsFLS* was induced by low temperature, but not by ABA.

Key words: *Camellia sinensis* L.; flavonol synthase; gene expression

黄酮类化合物(flavonoid)是一类来自于丙二酰辅酶A和苯丙氨酸的次生代谢物, 广泛存在于植物界。黄酮醇是最为古老, 分布最广泛的一类黄酮类化合物, 它们甚至在藓类和蕨类植物中也存在(Stafford 1991)。在黄酮类化合物合成途径中, 黄酮醇合成酶(flavonol synthase, FLS)催化二氢黄酮醇转化为黄酮醇。FLS 以及黄酮类化合物合成途径中的黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)和花色苷合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)均属于 2-酮戊二酸依赖型的双加氧酶(2-oxoglutarate-dependent dioxygenase)家族, 它们的编码基因都是由一个祖先基因进化而来(Pelletier 等 1997)。F3H的作用是将黄烷酮转化为二氢黄酮醇, 二氢黄酮醇可以由FLS转化为黄酮醇, 在其被还原为无色花色苷(leucoanthocyanidin)后, 由ANS的催化而转化为花色苷。

植物体合成的黄酮类化合物具有多种生物学

功能。例如, 促进花朵着色吸引传粉者, 抵御病原菌侵染, 在植物和微生物互作中参与信号传递, 保护植物体免受紫外线的辐射等(Owens 等 2008)。在植物抗逆反应中尤为重要, 它可以屏蔽有害辐射、结合植物毒素、通过控制生长素的运输调节植物多种逆境的反应(Winkel-Shirley 2002)。黄酮醇对人体还具有保健作用以及抗氧化、抗感染、抗增殖和抑制血管增生的功能。

各种植物体内的黄酮类化合物合成基因是紫外线(UV-B)应答基因。Ubi 等(2006)的研究表明, 查耳酮合酶、F3H、二氢黄酮醇 4-还原酶、ANS 和 UDP-葡萄糖:类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶基因受

收稿 2009-08-20 修定 2009-10-14

资助 国家自然科学基金(30570137)和河南省高等学校新世纪优秀人才支持计划(2005HANCET-14)。

* 通讯作者(E-mail: hongyu_yuan@263.net; Tel: 0376-6392267)。

UV-B 诱导。UV-B 辐射可使苹果树体内的苯丙氨酸氨解酶和查耳酮异构酶的活性增强 10~20 倍。我们曾在研究茶树的冷适应时用抑制差减杂交从茶树的幼叶中成功分离到一个受低温诱导的 *FLS* 基因的 cDNA 片段, 命名为 *Cs-COR113* (GenBank 登录号: FE942098) (Wang 等 2009)。本文根据该 cDNA 片段的碱基序列设计引物, 以低温处理的茶树幼叶 SMART cDNA 文库为模板, 采用 RACE 技术分离得到了 *FLS* 基因的全长 cDNA, 并采用 Real-time PCR 技术研究了低温和 ABA 及 UV-B 对这一基因表达的影响。

材料与方 法

以两年生茶树 (*Camellia sinensis* L.) 栽培品种 ‘信阳大叶’ 营养钵扦插苗为实验材料。处理有 (1) 预培养: 处理前茶树幼苗先在温度为 23~25 °C、光照强度为 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和光照时间为 12 h·d⁻¹ 条件下生长 7 d。(2) 低温处理: 预培养的幼苗在光照培养箱中, 温度降至 4~5 °C, 持续光照, 光照强度保持不变。分别于低温 4~5 °C 处理 2、7、15、24、48 和 72 h 后取充分展开的第 4 片叶用于实验分析。以不进行低温处理的相同叶位叶片做对照。(3) ABA 处理: 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 溶液喷施茶树幼苗, 温度和光照同上, 分别于处理后 2、7、15、24、48 和 72 h 取充分展开的第 4 片叶用于实验分析, 以喷洒蒸馏水 7 h 后的茶树幼苗叶片作对照。(4) UV-B 处理: 茶树幼苗用强度为 0.2 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ 的 UV-B 处理, 同时用强度为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 白光做背景, 于处理后 3、7、15 和 24 h 取充分展开的叶片用于实验分析。以白光处理 7 h 的叶片作对照。

用 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) 从冷处理 24 h 的茶树叶中提取总 RNA。取 2 μL 总 RNA, 按照 Clontech 公司 SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit 的操作程序构建 5'-ready RACE cDNA 文库和 3'-ready RACE cDNA 文库。

根据 *Cs-COR113* 的核苷酸序列设计一对特异性引物 GPS1 (5'-ACAACCTGCAATCACCACAA-3') 和 GPS2 (5'-CCCAACTCTCTGCAAATTCC-3')。以 5'-ready RACE cDNA 文库为模板, 利用 5' 通用引物和 GPS2 扩增该基因 cDNA 的 5' 末端。PCR 条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 75 °C 1 min,

30 个循环。

以 3'-ready RACE cDNA 文库为模板, 采用 3' 通用引物和 GPS1 扩增该基因 cDNA 的 3' 末端。PCR 条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 75 °C 2 min, 30 个循环。

根据拼接出的序列, 在起始密码子附近和 3' 非翻译区设计一对特异性引物 GPS3 (5'-CAATGGAGTTGGAGAGGGTG-3') 和 GPS4 (5'-CGAGTGAGTGAAGAAGGCTC-3'), 以 SMARTTMRACE cDNA 为模板扩增 *CsFLS* 基因的 ORF。PCR 条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 75 °C 2 min, 30 个循环。

提取与反转录总 RNA 时, 用 TRIzol Regent (Invitrogen) 从冷处理不同时间的叶片中提取总 RNA。进行反转录时, 取总 RNA 2 μL , Oligo (dT)₁₈ 引物 1 μL , 加水至 6 μL , 于 70 °C 中保温 10 min, 冰浴中 2 min, 然后在该溶液中依次加入 4 μL 5 \times M-MLV 缓冲液, 0.5 μL dNTP (各 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 0.5 μL M-MLV (RNase H), 加水至 20 μL , 于 42 °C 下保温 1 h。70 °C 中保温 15 min, 冰上冷却。

计算 PCR 扩增效率时, 分别取 3 μL 来自于不同样品的 cDNA, 进行 4 次 5 倍梯度稀释 (1、1:5、1:25、1:125 和 1:625), 每个浓度各取 1 μL cDNA 作实时荧光定量 PCR 分别扩增 α -tubulin 和 *CsFLS* 基因, 每个浓度做 3 管。在扩增过程中, ABI PRISM 7300 Real-Time PCR 仪 (Applied Biosystems) 自动读出 Ct 值, 并以模板浓度的对数为横坐标, Ct 值为纵坐标, 绘制出标准曲线, PCR 仪自动计算出曲线的斜率, 然后根据公式 $E=10^{[-1/\text{slope}]}$ 计算出扩增效率。通过优化实验, 使每一 cDNA 样品内参基因和目标基因的扩增效率趋于一致。

根据优化实验的结果, 取 1 μL cDNA, 10 μL SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (TOYOBO), 每种引物大约 5 pmol, 加水至 20 μL 。每一反应设 3 个重复。反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 58 °C 15 s, 75 °C 30 min, 共 40 个循环。设定程序, 使扩增结束后 PCR 仪自动运行绘制融解曲线 (95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s) 以决定是否发生了特异性扩增。实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 (Livak 和 Schmittgen 2001)。

结果与讨论

1 *CsFLS* 基因的克隆与序列分析

根据所得到的 *FLS* cDNA 片段的序列设计上游引物和下游引物。用下游引物和 SMART cDNA 的 5' 通用引物扩增 cDNA 的 5' 末端; 用上游引物和 3' 通用引物扩增 cDNA 的 3' 末端。5'-RACE 和 3'-RACE 分别得到 380 bp 和 1 200 bp 的扩增产物的测序表明, 它们分别是所克隆基因的 5' 端和 3' 端。BLAST 分析结果显示所克隆的 2 个 cDNA 片段为 *FLS* 的 2 个末端序列。

将上述序列拼接得到 1 303 bp 的 *FLS* 全长 cDNA 序列。进行 ORF 搜索的结果显示该序列包含一个完整的 ORF, 编码一条由 336 个氨基酸残基组成的多肽链。ORF 起始密码子上游第 3 位核苷酸为 A, 第 4 位为 G, 是一个典型的 Kozak 结构。拼接 cDNA 的 5'-UTR 和 3'-UTR 的长度分别为 91 bp 和 175 bp, 并且在 polyA 多聚核苷酸结构上游有一段多聚腺苷酸加尾信号序列(TAAAA)。根据已经获得的完整 cDNA 序列, 在起始密码子附近和 3' 非翻译区分别设计引物(GSP3 和 GSP4), 以上述 SMART cDNA 为模板扩增得到 1 046 bp 长的 cDNA 片段(图 1), 含有一个与拼接序列相同的 ORF。

2 *CsFLS* 基因编码产物的同源性比较与聚类分析

经同源性比对表明, *CsFLS* 编码产物与烟草、矮牵牛、欧芹、拟南芥的 *FLS* 的同源性分别为

74%、75%、75% 和 63%, 与茶树已克隆的 *FLS* 基因的编码产物的同源性为 51%, 因此推定茶树 *FLS* 基因家族一个新成员的全长 cDNA 已经得到。类黄酮合成途径中的 *FLS*、*F3H* 和 *ANS* 都是 2- 酮戊二酸依赖性双加氧酶家族的成员, 均含有 H-X-D 和 R-X-S 两个保守的基序, 它们分别是 Fe²⁺ 和 2- 酮戊二酸的结合位点。另外, 柑橘的 *FLS* 突变分析结果证实 2 个保守的甘氨酸残基是 *FLS* 多肽链正确折叠所必需的。*CsFLS* 也含有 H-X-D 和 R-X-S 基序以及 2 个保守的甘氨酸残基(图 2)。

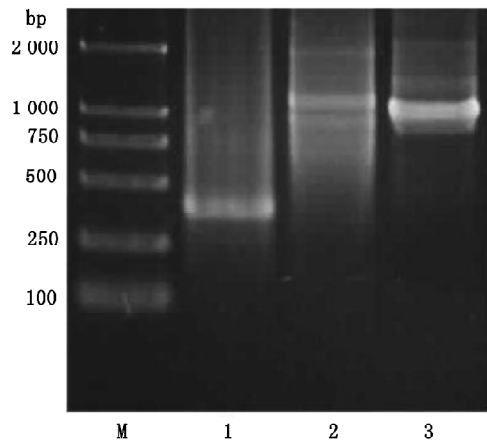


图 1 *CsFLS* cDNA 的扩增

Fig.1 Amplification of *CsFLS* cDNA sequence
M: DL2000 DNA marker; 1: *CsFLS* 基因的 5' RACE 产物; 2: *CsFLS* 基因的 3' RACE 产物; 3: GSP3 和 GSP4 扩增结果。

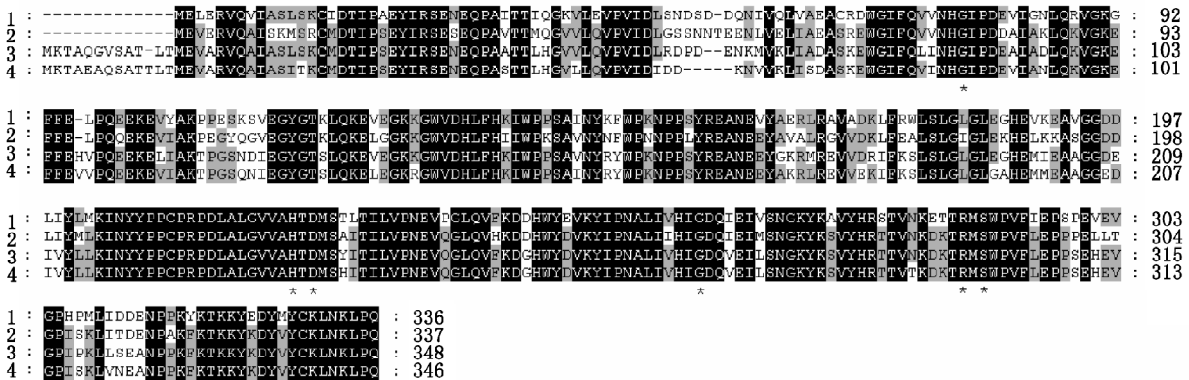


图 2 *CsFLS* 与其他物种 *FLS* 编码产物的同源性比对

Fig.2 Alignment of the predicted amino acid sequences of *CsFLS* and other *FLS*s

黑色表示在所有的序列中都相同的氨基酸残基; 灰色表示在多数序列中相同的氨基酸残基; 星号表示 6 个严格保守的氨基酸残基。1: 茶树(*Camellia sinensis*) (FJ577509); 2: 欧芹(*Petroselinum crispum*) (AAP57395); 3: 矮牵牛(*Petunia hybrida*) (Q07512); 4: 烟草(*Nicotiana tabacum*) (ABE28017)。

根据 FLS、F3H 和 ANS 的氨基酸序列, 采用 DNAMAN 软件和邻位法(NJ)构建进化树。图 3 表明, 来自不同物种的 FLS、F3H 和 ANS 首先分别聚类合并, 接着 FLS 和 ANS 聚合, 从进化关系上来说这两类 2- 酮戊二酸依赖性双加氧酶最近。FLS

和 ANS 最后与 F3H 聚合。系统进化分析显示, 从茶树中分离的 FLS 基因分为 2 组, 其中 2 个茶树 FLS 与蜜橘的 FLS 聚合为一组, 本文分离出的茶树 FLS 是与烟草、矮牵牛、欧芹、拟南芥的 FLS 聚类在一起。

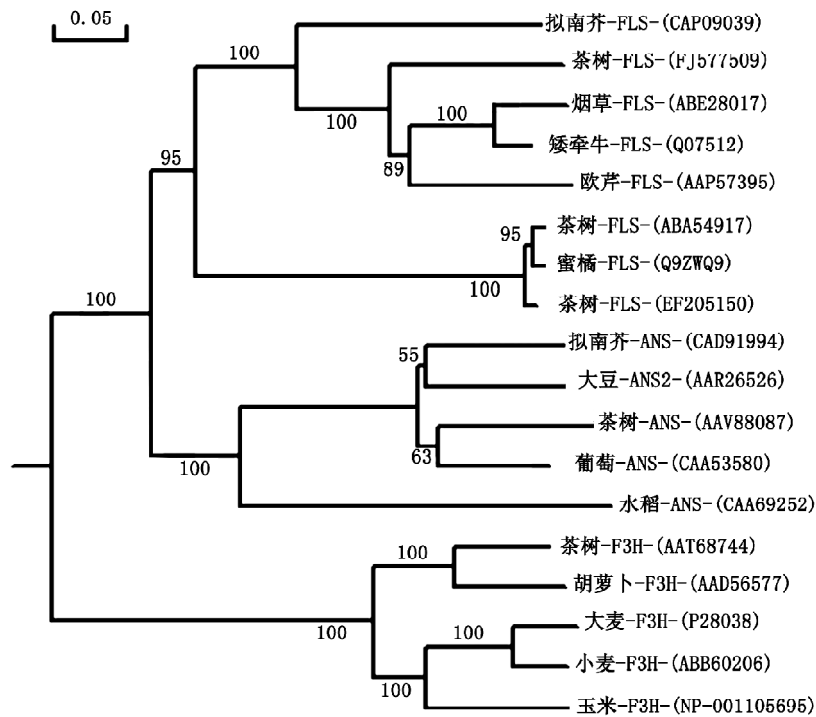


图 3 对黄酮类化合物特异性的 2- 酮戊二酸依赖的双加氧酶(包括 FLS、F3H 和 ANS)的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of 18 flavonoid-specific 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases, including FLS, F3H and ANS 节点显示的值为 Bootstrap 值(%), 括号内为 GenBank 登录号。

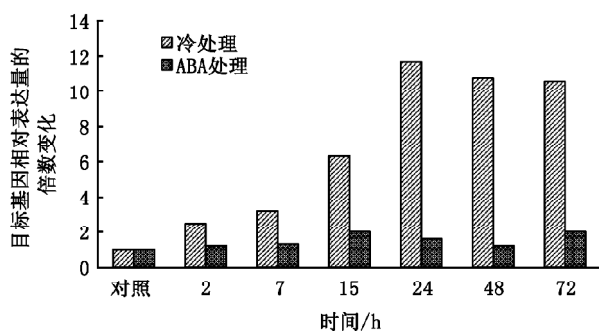
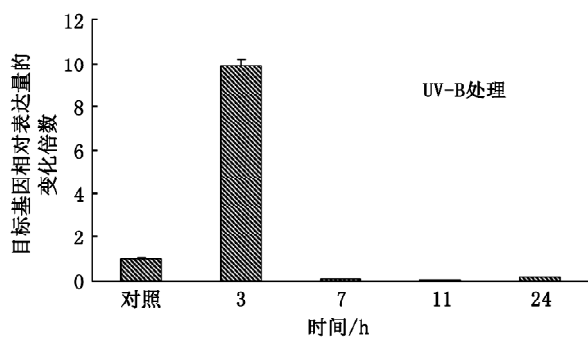
3 *CsFLS* 基因的表达分析

实时荧光定量 RT-PCR 分析表明, *CsFLS* 为一冷应答基因。低温处理 15 h 左右 *CsFLS* 转录本水平显著增加, 其在低温处理 24 h 前后的值最大, 此后 *CsFLS* 的转录本基本上保持稳定并持续到 72 h (图 4)。在玉米和拟南芥中, 冷诱导的花色素苷的合成与 PAL 和 CHS mRNA 的积累存在相关性 (Leyva 等 1995)。在本文中, *FLS* 基因的转录受低温诱导。这说明低温能够诱导类黄酮途径中多个基因的表达, 而不是只诱导与花青素合成有关的基因。

此外, 低温、干旱和高盐等非生物胁迫常导致细胞缺水, 许多冷应答基因也受干旱和高盐的诱导。ABA 调节植物体对这些胁迫的应答反应, 许多胁迫诱导的基因也是 ABA 应答基因。为了检验

这一认识, 我们进一步采用荧光定量 RT-PCR 进行分析, 结果(图 4)显示, *CsFLS* 并不受 ABA 诱导, 说明该基因可能受不同信号转导途径的调控。在茶树中, FLS 由多基因家族编码。不同家族成员表达的时空模式、对环境的应答反应以及表达产物的底物专一性有待进一步研究。

如图 5 所示, *CsFLS* 基因的表达受 UV-B 辐射的影响。黄酮醇具有保护植物体免受 UV-B 辐射损伤的功能。大豆 UV-B 抗性品种的黄酮醇水平比敏感品种高, 并且 UV-B 诱导的黄酮醇的积累与黄酮醇合酶基因的诱导表达具有相关性 (Kim 等 2008)。在我们的实验中, UV-B 处理的早期, *CsFLS* 受诱导表达, 而后受到抑制。*CsFLS* 对 UV-B 的应答模式与大豆黄酮醇合成途径中的 2 个关键基因 *GmF3H* 和 *GmFLS* (Kim 等 2008) 类似。

图4 低温和ABA对茶树幼叶 *CsFLS* 基因表达的影响Fig.4 Effects of low temperature and ABA on *CsFLS* expression of young tea leaves图5 UV-B对茶树幼叶 *CsFLS* 基因表达的影响Fig.5 Effect of UV-B on *CsFLS* expression of young tea leaves

参考文献

- Kim BG, Kim JH, Kim J, Lee C, Ahn JH (2008). Accumulation of flavonols in response to ultraviolet-B irradiation in soybean is related to induction of flavanone 3- β -Hydroxylase and flavonolsynthase. *Mol Cells*, 25: 247~252
- Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martinez-Zapater JM (1995). Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol*, 108: 39~46
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25: 402~408
- Owens DK, Alerding AB, Crosby KC, Bandara AB, Westwood JH, Winkel BSJ. (2008). Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 147: 1046~1061
- Pelletier MK, Murrell J, Shirley BW (1997). Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*: further evidence for differential regulation of "early" and "late" genes. *Plant Physiol*, 113: 1437~1445
- Stafford HA (1991). Flavonoid evolution: an enzyme approach. *Plant Physiol*, 96: 680~685
- Ubi BE, Honda C, Bessho H, Kondo S, Wada M, Kobayashi S, Moriguchi T (2006). Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature. *Plant Sci*, 170: 571~578
- Wang L, Li XW, Zhao Q, Jing SL, Yuan HY (2009). Identification of genes induced in response to low temperature treatment in tea leaves. *Plant Mol Biol*, 27: 257~265
- Winkel-Shirley B (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 218~223