

山葡萄中类黄酮3'-羟化酶基因(*F3'H*) cDNA的克隆和分析

刘海峰^{1,2}, 杨成君¹, 赵权¹, 李波¹, 王军^{1,*}

¹东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040; ²延边大学农学院, 吉林龙井 133400

摘要: 用 RT-PCR 和 SMART RACE 技术克隆了山葡萄 *F3'H* 基因的全长 cDNA 序列。其 GenBank 登陆号为 FJ645766, *F3'H* cDNA 全长 1 844 bp, 包括开放阅读框 1 530 bp, 编码 509 个氨基酸, 该基因表达产物相对分子质量为 56.14 kDa, 等电点为 8.24, 是不稳定蛋白。该基因属于 P450 超基因家族, 不包含信号肽。氨基酸序列与欧亚种葡萄(AJ8803537)、矢车菊(FJ753550)、金鱼草(DQ272592)、大豆(AB061212)和玉米(EU966228)等植物的 *F3'H* 氨基酸序列的同源性系数分别为 98%、77%、72%、74% 和 57%。

关键词: 山葡萄; cDNA 克隆; 类黄酮 3'-羟化酶

cDNA Cloning and Analysis of Flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) in *Vitis amurensis* Rupr.

LIU Hai-Feng^{1,2}, YANG Cheng-Jun¹, ZHAO Quan¹, LI Bo¹, WANG Jun^{1,*}

¹Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Agricultural College, Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China

Abstract: The full-length cDNA sequences of *F3'H* genes in *Vitis amurensis* were cloned by the technique of RT-PCR and SMART RACE. The landing Genbank No. is FJ645766 and the full-length of *F3'H* cDNA is 1 844 bp with open reading frame of 1 530 bp, which encodes 509 amino acids. The deduced amino acid of *F3'H* gene was unstable protein with the molecular mass of 56.14 kDa and isoelectric point of 8.24. The *F3'H* gene belongs to the P450 supergene family, without a signal peptide. The amino acid sequence of *F3'H* in *Vitis amurensis* had the homology with *F3'H* of *Vitis vinifera* (AJ8803537), *Centaurea cyanus* (FJ753550), *Antirrhinum majus* (DQ272592), *Glycine max* (AB061212) and *Zea mays* (EU966228), and the homology coefficient was 98%, 77%, 72%, 74% and 57% respectively.

Key words: *Vitis amurensis*; cDNA cloning; flavonoid 3'-hydroxylase

类黄酮 3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, *F3'H*)属于细胞色素 P450 单加氧酶, 具有催化多种依赖 NADPH 或 NADH 的底物氧化反应的功能 (Buchanan 等 2004)。在葡萄花色苷的合成过程中, 类黄酮 3'-羟化酶分别将 4',5,7- 三羟基黄酮(naringenin)和二氢茨非醇(dihydrokaempferol)转化成圣草酚(eriodyctyol)和二氢槲皮素(dihydroquercetin)后形成不同的花色苷。类黄酮 3'-羟化酶和类黄酮 3'5'-羟化酶(flavonoid 3'5'-hydroxylase, *F3'5'H*)之间比例也可能控制葡萄果皮中花色苷的组成和果皮颜色(Jeong等2006; Castellarin等2007), 类黄酮 3'-羟化酶是葡萄花色苷生物合成中的关键酶之一。

山葡萄原产于我国东北和俄罗斯远东地区, 是我国特有的种质资源, 其浆果含有大量的花色苷。目前有关山葡萄分子生物学的研究较少, 有必要对

其花色苷生物合成途径中的关键酶进行研究。众多的研究已分别从玉米、矢车菊、金鱼草、葡萄等多种植物中分离鉴定了 *F3'H*, 但山葡萄中的 *F3'H* 的研究尚未见报道。本文采用 RT-PCR 和 SMART RACE 技术从山葡萄果皮克隆了 *F3'H* 的 cDNA 全长序列, 同时对序列进行了生物信息学分析, 为将来研究 *F3'H* 表达调控方式与花青素在果皮中特异性合成和积累的关系, 从而在分子水平上阐明山葡萄花青素高含量的原因和机制建立基础。

材料与方法

山葡萄品种 '双丰' (*Vitis amurensis* Rupr. cv.

收稿 2009-09-23 修定 2009-11-09

资助 黑龙江省留学归国人员科学基金(LC08C07)。

* 通讯作者(E-mail: junwang1966@yahoo.com.cn; Tel: 0451-82191829)。

‘Shuang Feng’)采自中国农业科学院特产研究所国家山葡萄种质资源圃。在果实成熟期采摘,采后立即置于液氮中冷冻,于 -80°C 冰箱中保存,取果皮为材料。实验所用大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5- α 、pMD18-T载体、胶回收试剂盒和 Ex Taq 聚合酶购于 TaKaRa 公司;反转录酶 SuperScript II 购于 Invitrogen 公司; RACE 试剂盒购于 Clontech 公司。其它试剂为国产分析纯, DNA 测序由上海生工生物公司完成。

山葡萄果皮总 RNA 提取采用改良的 CTAB 法 (Li 等 2006)。根据 GenBank 中已报道的 *F3'H* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列,通过多序列比对确定其共有的保守区,利用 Primer 5.0 设计一对简并引物 VAmF3'Hs: 5' CT(C/T)TT(C/A)Tg(C/T)gT(T/G)CTCCT(C/T)TACC 3', VAmF3'Ha: 5' CA(C/T)(C/T)gTCg(A/g)CA(T/C)TA(T/A)CCTT 3'。采用 SuperScript II 反转录酶合成 cDNA,利用简并引物进行 PCR,扩增目的基因片段。PCR 反应采用 50 μL 体系,其中含 0.4 μL Taq DNA 聚合酶、 $1\times$ Taq 缓冲液、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP、60 ng 引物和 150~200 ng 模板 cDNA。扩增程序为 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, 57°C 1 min, 72°C 2 min, 35 个循环;最后 72°C 延伸 7 min。对目的基因片段进行纯化,连接 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5- α 感受态细胞,蓝白斑筛选,挑取阳性克隆测序。

用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 方法进行 RACE cDNA 扩增。根据保守区测序结果,设计基因特异引物 GSP₁ (3'-RACE 引物) (5' gCCAT ATCCgACAggAggAggTTg 3') 和 GSP₂ (5'-RACE 引物) (5' gggCgTTggTAgTACACAgTTCA 3'), 两引物之间有重叠。除 5'-RACE 和 3'-RACE 退火温度分别为 63°C 、 65°C 外,反应体系、扩增程序、回收和转化方法同前。测序后应用 Vector NTI Suite 9.0 软件去除载体序列,将 5' RACE 和 3' RACE 测序结果拼接获得 cDNA 全长。

应用 DNASTar 软件对获得的 *F3'H* 全长 cDNA 序列进行开放阅读框(ORF)分析并将其推导为相应的氨基酸序列。蛋白质氨基酸相似性比对在 NCBI 的 BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp>) 中分析;不同植物 *F3'H* 基因氨基酸序列的多序列比较应用 ClustalW 1.82 (<http://www.ch.embnet.org/soft->

ware/ClustalW.html) 进行分析;蛋白质的分子量、等电点及基本性质用 ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测;信号肽分析利用 SignalP 3.0 Server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/Signalp>),疏水性分析和二级结构预测分别在网站(<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)和 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html) 进行。

结果与讨论

1 RT-PCR 合成山葡萄 *F3'H* 基因保守区的 cDNA

改良的 CTAB 法提取山葡萄果皮中的总 RNA, RNA 质量较高。以总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,用 *F3'H* 简并引物 VAmF3'Hs 和 VAmF3'Ha 进行 PCR 扩增,获得了约 810 bp 的特异片段,与预期片段大小相近。产物经连接转化,筛选测序后获得保守序列片段,用 NCBI/BLAST 程序进行同源搜索,结果与欧亚种葡萄(*Vitis vinifera*) *F3'H* 的相似性为 98%。因此初步认定该片段为山葡萄 *F3'H* 基因的片段。

2 cDNA 全长序列克隆及生物信息学分析

参照 RACE 试剂盒说明,以逆转录分别合成的 5'-RACE-Ready-cDNA 和 3'-RACE-Ready-cDNA 为模板, GSP 与 UPM 为引物,分别进行 5' RACE 和 3' RACE 扩增, GSP₁ 与 UPM 为引物扩增得到约 1 314 bp 的条带, GSP₂ 与 UPM 为引物扩增得到约 556 bp 的条带。将 5' RACE 和 3' RACE 测序结果应用 Vector NTI Suite 9.0 软件去除载体序列后拼接获得 cDNA 全长。应用 DNASTar 和 ProtParam 程序对获得的新基因全长 cDNA 序列进行开放阅读框分析,并将其推导为相应的氨基酸序列。结果显示,该基因全长 1 844 bp,包括开放阅读框 1 530 bp、86 bp 5' 非转译区(5' UTR)和 199 bp 的 3' 非转译区(3' UTR),起始密码子 ATG 位于 87~89 bp,终止密码子 TAG 位于 1 614~1 616 bp。基因的开放阅读框编码 509 个氨基酸,分子量为 56.14 kDa,等电点为 8.24。负电荷残基(Asp+Glu)数为 51 个,正电荷残基(Arg+Lys)数为 54 个。不稳定系数为 35.43,为不稳定蛋白质。将该基因命名为“VAmF3'H”, GenBank 登录号为 FJ645766。

在蛋白保守区数据库(conserved domain database, CDD),用 NCBI 的 BlastP 对山葡萄 VAmF3'H

进行蛋白保守区预测,结果表明与该基因匹配的蛋白保守区为细胞色素P450超基因家族,从第29个氨基酸到第473个氨基酸,共匹配445个氨基酸。

用推导的氨基酸序列与蛋白质数据库进行同源性比较,其氨基酸序列与欧亚种葡萄(AJ880

3537)、矢车菊(FJ753550)、金鱼草(DQ272592)、大豆(AB061212)和玉米(EU966228)等植物的F3'H氨基酸序列的同源性系数分别为98%、77%、72%、74%和57%。多序列比对结果见图1。

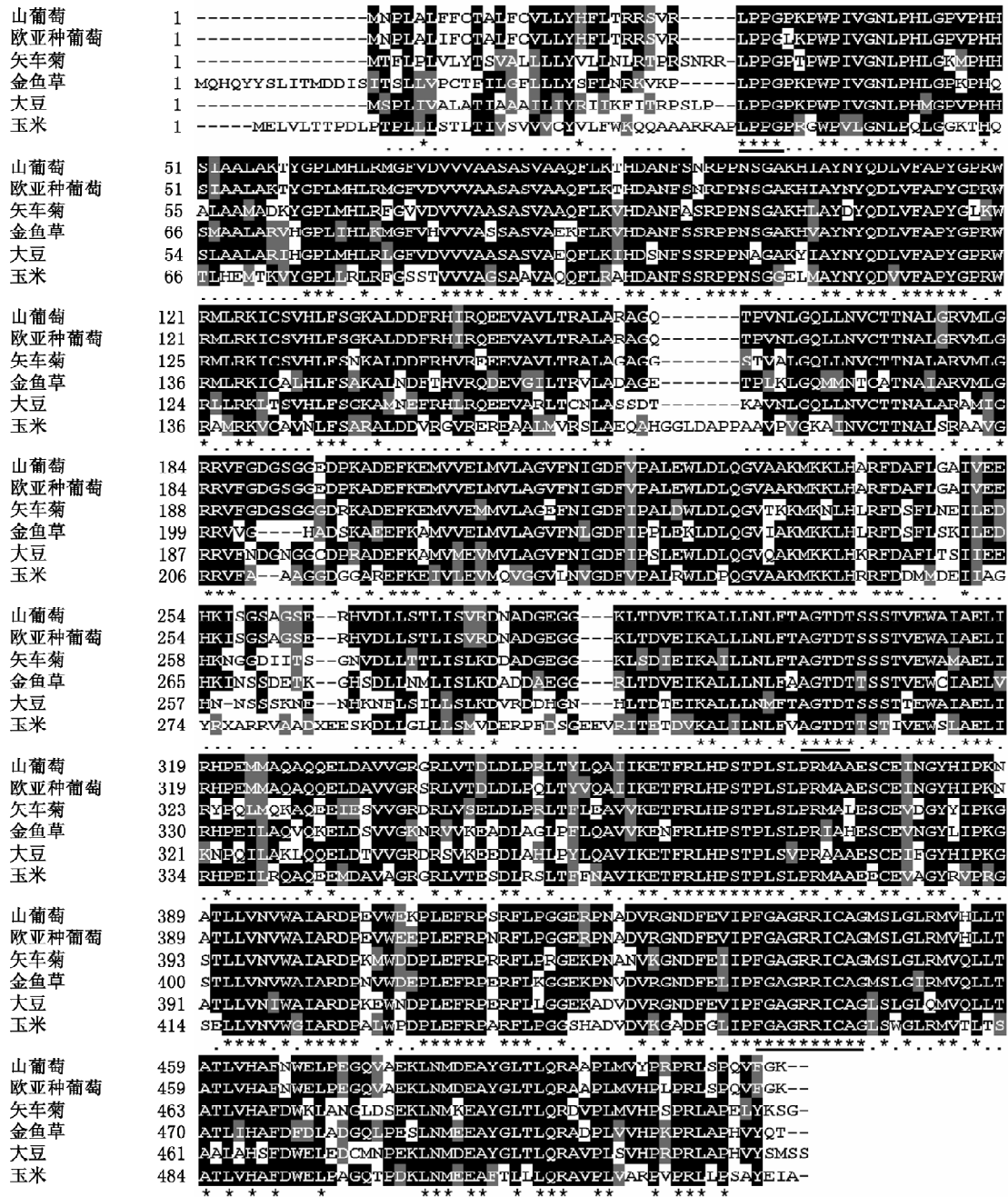


图1 F3'H氨基酸序列的多序列比对

Fig.1 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of F3'H

F3'H蛋白的GenBank登录号如下: 山葡萄(FJ645766)、欧亚种葡萄(AJ8803537)、矢车菊(FJ753550)、金鱼草(DQ272592)、大豆(AB061212)和玉米(EU966228)。下划线为F3'H保守域。

起始于第28位的“LPPGP”序列是细胞色素P450的主要保守域,是F3'H在微粒体膜上最佳定位的枢纽,连接膜的锚定位点和酶蛋白的球体部分,在不同的物种中高度保守(Yamazaki等1993; Murakami等1994)。起始于第301位的“AGTDT”序列也是高度保守序列,该序列与底物的选择和结合有关,被认为促使形成氧分子的结合域(Chapple 1998; Kraus和Kutchan 1995)。起始于437位的“FGAGRRICAG”是细胞色素酶类所必需的C端血

红素结合区,这段序列受半胱氨酸的调节,以其为中心,左右各氨基酸围绕半胱氨酸形成特定结构(Chapple 1998),在不同的物种中也是非常保守。

用MEGA 4软件对该基因及其它植物的F3'H氨基酸序列进行多序列比对,绘制分子进化树的结果(图2)表明, *VAmF3'H* 基因与欧亚种葡萄、山竹、翠蝶花的F3'H基因在进化关系上较近,与玉米、高粱、洋葱、油草等亲源关系较远。

应用SignalP 3.0 Server (www.cbs.dtu.dk/ser-

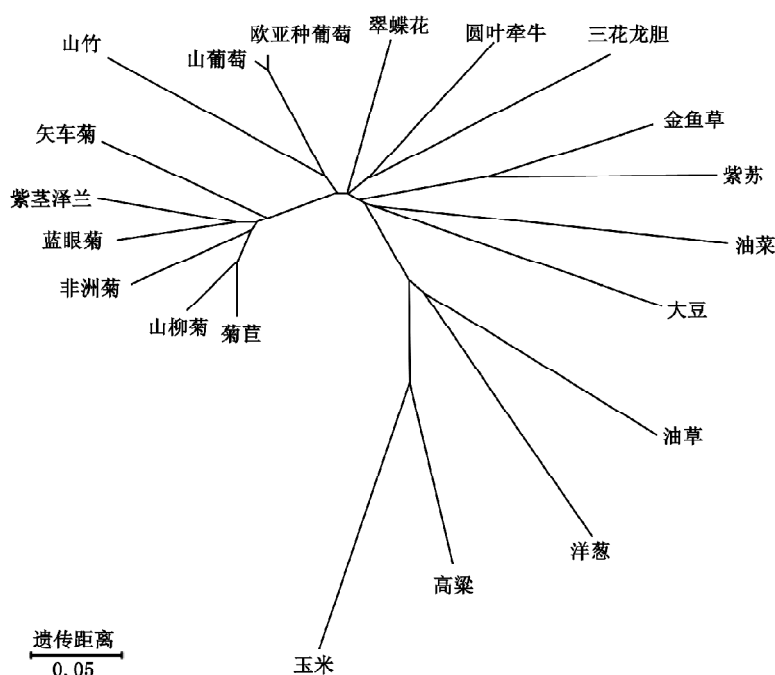


图2 *F3'H* 构建的分子进化树

Fig.2 Molecular phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of *F3'H*

F3'H蛋白的GenBank登陆号如下: 山葡萄(FJ645766)、欧亚种葡萄(AJ8803537)、翠蝶花(AB221082)、圆叶牵牛(EU032626)、三花龙胆(AB193313)、金鱼草(DQ272592)、紫苏(AB045593)、油菜(EU402420)、大豆(AB061212)、油草(AB480691)、洋葱(AY541035)、高粱(DQ787856)、玉米(EU966228)、菊苣(FJ753548)、山柳菊(DQ319866)、非洲菊(DQ218417)、蓝眼菊(DQ250711)、紫茎泽兰(EF137714)、矢车菊(FJ753550)和山竹(FJ197132)。

vices/SignalP)和隐马氏模型(hidden markov models)对山葡萄*VAmF3'H*进行信号肽预测的结果表明,该基因不具有信号肽。蛋白质疏水性分析结果表明,*VAmF3'H*疏水性最大值为2.722,最小值为-2.100,疏水性平均值为0.014,不具有明显的亲、疏水性。二级结构分析表明,*VAmF3'H*的二级结构主要以 α -螺旋和不规则盘绕为蛋白最大量的结构元件。

参考文献

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2004). 植物生物化学与分

子生物学. 瞿礼嘉, 顾红雅, 白书农, 赵进东, 陈章良主译. 北京: 科学出版社, 1057~1082

Castellarin SD, Matthews MA, Gaspero GD, Gambetta GA (2007). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227: 101~112

Chapple C (1998). Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 311~343

Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M (2006). Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',

- 5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci*, 170: 61~69
- Kraus PF, Kutchan TM (1995). Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminic synthase a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 2071~2075
- Li B, Wang B, Tang K, Liang Y, Wang J, Wei J (2006). A simple and convenient approach for isolating RNA from highly viscous plant tissue rich in polysaccharides. *Colloids Surf B Biointef*, 49: 101~105
- Murakami K, Mihara K, Omura T (1994). The transmembrane region of microsomal cytochrome P450 identified as the endoplasmic reticulum retention signal. *J Biochem*, 116: 164~175
- Yamazaki S, Sato K, Suhara K, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T (1993). Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s. *J Biochem*, 114: 652~657