

芜菁的类黄酮3'羟化酶基因克隆和UV-A诱导表达特性

许志茹*, 崔国新, 李春雷, 孙燕, 李玉花

东北林业大学生命科学学院, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 用UV-A处理‘津田’芜菁和‘赤丸’芜菁块根24 h后提取总RNA, 以RT-PCR方法分别克隆到*BrF3'H1*和*BrF3'H2*基因。*BrF3'H1*和*BrF3'H2*的开放读码框为1 536 bp, 均编码511个氨基酸。氨基酸序列分析显示, *BrF3'H1*和*BrF3'H2*与甘蓝型油菜F3'H的同源性达99%, 在第45~476的肽段含有细胞色素P450家族基因的结构域。*BrF3'H1*和*BrF3'H2*基因有高度同源性, 核苷酸序列的17个位点处有差异, 推导的氨基酸序列在5个位点处有差异。Northern杂交结果显示, UV-A可以诱导*BrF3'H1*表达, 基因的表达量与UV-A处理时间呈相关, UV-A不能诱导*BrF3'H2*基因表达。

关键词: 芜菁; 类黄酮3'羟化酶基因; 基因克隆; 序列分析; 基因表达

Cloning and UV-A Induced Expression Trait of Flavonoid 3'-Hydroxylase Gene in Turnip (*Brassica rapa* L.)

XU Zhi-Ru*, CUI Guo-Xin, LI Chun-Lei, SUN Yan, LI Yu-Hua

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: The roots of ‘Tsuda’ turnip (*Brassica rapa*) and ‘Yurugi Akamaru’ turnip were irradiated with UV-A light for 24 h. Total RNAs were isolated and then *BrF3'H1* and *BrF3'H2* genes were cloned by RT-PCR method. The open reading frame (ORF) of *BrF3'H1* and *BrF3'H2* genes contained 1 536 bp encoding proteins of 511 amino acids. Amino acid sequence analysis showed that *BrF3'H1* and *BrF3'H2* were 99% identified to F3'H of *Brassica napus*, and the cytochrome P450 domain was in the sequence from 45 to 476. *BrF3'H1* and *BrF3'H2* genes had high identity. The nucleotide sequence of *BrF3'H1* and *BrF3'H2* genes had 17 differences, as well as 5 differences in deduced amino acid sequence. The Northern blotting results showed that the expression of *BrF3'H1* could be induced by irradiation of UV-A, and the expression of the gene was correlated with light-exposure time. The expression of *BrF3'H2* gene could not be induced by irradiation of UV-A.

Key words: turnip; flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) gene; gene clone; sequence analysis; gene expression

植物花青素是黄酮类化合物, 决定花卉、果实和种子的颜色。花青素主要包括天竺葵色素、矢车菊色素、飞燕草色素、芍药色素、牵牛色素、锦葵色素及其衍生物(Holton和Cornish 1995), 积累在维管植物液泡中。类黄酮3'-羟化酶是花青素合成途径的关键酶, 属于细胞色素P450单加氧酶家族, 催化的反应需要NADPH和O₂的参与(Buchanan等2004)。4,5,7-三羟黄酮(naringenin)和二氢苝非醇(dihydrokaempferol)的B环3'位置在F3'H的催化下发生羟化反应, 生成圣草酚(eriodictyol)和二氢栎精(dihydroquercetin)。在花青素合成途径中, 二氢栎精在二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)和花色苷合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)等酶的催化下生成紫红色花青素(也称为矢车菊色素, cyanidin)。目前, 一些植物的

*F3'H*基因已得到克隆(Schoenbohm等2000; Toda等2002; Bogs等2006; Jeong等2006; Xu等2007)。花青素生物合成除了受催化酶影响外, 还与转录因子、光受体及光信号转导因子密切相关(万小荣和李铃2002; Quattrocchio等2006; Chatterjee等2006; Sheehan等2004), 蓝光和紫外光对花青素合成相关酶基因表达的调控也有所报道(Noh和Spalding 1998; Zhou等2007)。

芜菁别名小蔓菁, 十字花科芸苔属芜菁亚种。需光型的‘津田’芜菁(‘Tsuda’ turnip)块根中花青素

收稿 2008-07-05 修订 2008-08-26

资助 国家自然科学基金(30700560)和国家自然科学基金重点项目(30730078)。

* E-mail: xuzhiru2003@126.com; Tel: 0451-82191783

合成时需要光, 受光部分呈紫红色, 背光部分呈白色。非需光型的‘赤丸’芜菁(‘Yurugi Akamaru’ turnip)块根中花青素合成时无论受光与否都呈红色, 块根在黑暗条件下即可着色。本文以‘津田’芜菁和‘赤丸’芜菁为试材, 通过RT-PCR方法克隆了两者的*F3'H*基因。以基因片段合成探针, 并用Northern杂交技术检测了UV-A照射条件下两品种芜菁中*F3'H*基因表达情况, 以期分离需光型和非需光型花青素关键催化酶基因和研究需光型和非需光型花青素生物合成的机制建立基础。

材料与方法

温室种植的芜菁(*Brassica rapa* L.)品种‘津田’和‘赤丸’在土中避光生长的块根开始膨大时用锡纸遮蔽整个栽培钵, 进一步避光。块根膨大2个月后, 裸放在波长352 nm的UV-A光(光照强度为 $13.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下处理0、6、12、18、24和48 h。

在Database数据库中查找登录的*F3'H*基因, 选取十字花科植物的基因序列设计RT-PCR引物。引物序列为: F, 5' CCACCACTATGACTAATCTT-TACC 3'; R, 5' TAAGTTAGGTTTAAGCCGACCC 3'。探针合成的引物序列: F, 5' CAGGCTCCATC-CACCAACA 3'; R, 5' GTAAGTGAATCGTCCGTA-ACCC 3'。

LA-Taq DNA聚合酶及DNA Marker等购自宝生物工程(大连)有限公司; pBS-T载体购自北京TIANGEN生化科技有限公司; PowerScript™ Reverse Transcriptase 购自Clontech公司; Northern杂交部分试剂购自Roche公司。

按许志茹和李玉花(2006)文中方法提取UV-A处理24 h的‘津田’芜菁和‘赤丸’芜菁块根皮总RNA。用Clontech公司的PowerScript反转录酶和程序进行反转录。以反转录产物为模板, 利用RT-PCR引物和LA-Taq DNA聚合酶进行*F3'H*全长cDNA的克隆。回收纯化PCR产物, 与T载体连接后转化大肠杆菌感受态细胞Top 10, 经Amp⁺抗性及蓝白斑筛选, 随机挑取转化平板上的白色菌斑液体悬浮培养后提取重组质粒。重组质粒经PCR鉴定后由上海生工生物工程技术有限公司测序。

将测得的两品种芜菁的*F3'H*全长cDNA序列与NCBI数据库中推测的氨基酸序列进行Blast比

对。用开放阅读框(open reading frame, ORF)程序查找序列的ORF, 软件Clustalw 1.8.1进行多序列比较和分子进化树的绘制。以BioEdit软件比较‘津田’芜菁和‘赤丸’芜菁*F3'H*基因的异同。用SignalP 3.0预测蛋白的信号肽。用软件ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)预测蛋白的分子量、等电点、稳定性和氨基酸组成。用ScanProsite软件查找蛋白质的标签序列。用Blast P和HNN (Hierarchical Neural Network)程序预测蛋白保守区和二级结构。

Northern杂交时, 提取经UV-A处理0、6、12、18、24和48 h的芜菁块根皮总RNA。用地高辛标记出探针。通过Northern杂交技术检测两种芜菁中*F3'H*基因的表达情况(许志茹和李玉花2006)。Northern杂交重复3次。

结果与讨论

1 芜菁*F3'H*全长cDNA的克隆

如图1所示, ‘津田’芜菁和‘赤丸’芜菁中扩增的cDNA产物在1500 bp附近, 分子量大小与预期结果吻合。

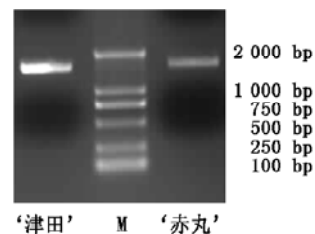


图1 芜菁*F3'H*基因的RT-PCR反应产物

Fig.1 The RT-PCR product of *F3'H* genes of turnip
M: DNA 分子量标记(DL2000)。

2 芜菁*F3'H*核苷酸序列和氨基酸序列分析

两类芜菁中RT-PCR产物测序后证实为*F3'H*基因全长cDNA序列。‘津田’芜菁*F3'H* cDNA (*BrF3'H1*)和‘赤丸’芜菁的*F3'H* cDNA (*BrF3'H2*)序列在GenBank中的登录号分别为EU402420和EU402421。Blast比对结果显示, *BrF3'H1*和*BrF3'H2*基因和甘蓝型油菜(*Brassica napus*) *F3'H* mRNA序列的同源性分别为99%和98%, *BrF3'H1*和*BrF3'H2*氨基酸序列由511个氨基酸组成, 含有完整的ORF(图2)。

```

1  ccaccactatgactaatctttaccctcacaatccttctccctactttcatattccttctcgttctcgttctatctcgcgccgcaataac
   M T N L Y L T I L L P T F I F L I V L V L S R R R N N
90  cgtctccctccaggtccaaccatggccatcatcggaacctccctcacatgggccctaaacccatcaaacactagccgcatgta
   R L P P G P N P W P I I G N L P H M G P K P H Q T L A A M V
180  accacatacggacctatcctccacctacggctagggttcgcccagcttgggttgcgacctcaaatccgtggccggaacagttcttga
   T T Y G P I L H L R L G F A D V V V A A S K S V A E Q F L K
270  gtctcatgaccctcctagccgaccacctaactccgagccaaacacatgcatataactatcaaatcttctcttgccttat
   V H D A N F A S R P P N S G A K H M A Y N Y Q D L V F A P Y
360  ggacaacgatggagaatggtgaggaagattagttctgttcattttttcagctaaagctcttgaagatttcaaacatggttcgacaggaa
   G Q R W R M L R K I S S V H L F S A K A L E D F K H V R Q E
450  gaggttgaacactcgtgcccagctagcgcgtgcaaacacgaacactgtaacctagccagttggttaaacatgtgctactcaacgcc
   E V G I L V R E L A R A N I K P V N L G Q L V N M C V L N A
540  ctggacgagatgatcggacggcactggtcggcggcggatcggatcacaaagcggaggagttcgtatcaatggttacagaaatgatg
   L G R E M I G R R L F G A D A D H K A E E F R S M V T E M M
630  gctctcggcagatattcaacatcggagatttctgcccacttgattggttagatttacaagcctcgtctgtaaaatgaaacgtcta
   A L A G V F N I G D F V P A L D C L D L Q G V A G K M K R L
720  cacaagaggttcgacgcttttctatcgtcgtatcttgaagaacacgaggcggatgaagaacgccaggatcaaaagcacacggacatgctt
   H K R F D A F L S S I L E E H E A M K N G Q D Q K H T D M L
810  agcactttaaactcgttaaggaactgatttggatggtgagggtggaacttaactgatacagagatcaaaagccttgcattgaaatg
   S T L I S L K G T D F D G E G G T L T D T E I K A L L N M
900  ttaaggttgaactgacaagcagcaagtaagcggactggccatagctgaattaatccgccaccggagataatgaaagccca
   F T A G T D T S A S T V D W A I A E L I R H P E I M R K A Q
990  gaagagcttgattccgctggtggacgtggaagccattaacgagtcggacctctcagcttccctaccctcaggcggttatcaagag
   E E L D S V V G R G R P I N E S D L S Q L P Y L Q A V I K E
1080  aatttcaggctccatcccaaacaccactctcgtttaccacacatcgcatcagagagctgtgagatcaacggctatcatatccccaaagga
   N F R L H P P T P L S L P H I A S E S C E I N G Y H I P K G
1170  tcaacccttttgacaacatattggccatagcccgtgaccggaccatggtccgaccgttaactgttcgaccggagagatttttacc
   S T L L T N I W A I A R D P D Q W S D P L T F R P E R F L P
1260  ggtggtgaaaagccggcgtggatgtgaaaggaaacgatttcgagcttataccggttcggagccggaggagaatctgcccgggttggat
   G G E K A G V D V K G N D F E L I P F G A G R R I C A G L S
1350  ttagggttacggacattcagttactgacggcagcgtgtgacggattgaaatgggaactggccggaggagttacgccggagaagctg
   L G L R T I Q L L T A T L V H G F E W E L A G G V T P E K L
1440  aacatggaggagacttatggattactctacaagacggttcctttggtgtgcatcctaagctaaggttggatagagctcttatgga
   N M E E T Y G I T L Q R A V P L V V H P K L R L D M S A Y C
1530  ctgggtcggcttaaacctaactta
   L G S A *
    
```

图2 *BrF3'H1* 基因全长 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *BrF3'H1* cDNA
 阴影部分为 Northern 杂交探针序列, 下划线部分为 RT-PCR 引物序列。

氨基酸同源性比对显示(图 3), *BrF3'H1* 和 *BrF3'H2* 与多种植物的 F3'H 蛋白有高度同源性, 与甘蓝型油菜 F3'H (ABC58722) 的同源性为 99%, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、矮牵牛(*Petunia × hybrida*)、大豆(*Glycine max*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)、高粱(*Sorghum bicolor*)和洋葱(*Allium cepa*) F3'H 的同源性在 88%~59% 之间。F3'H 氨基酸序列的系统树显示, 茺菁的 *BrF3'H1* 和 *BrF3'H2* 与甘蓝型油菜和拟南芥的 F3'H 的进化关系较近, 与高粱和洋葱等植物的 F3'H 较远(图 4)。

‘津田’茺菁和‘赤丸’茺菁 F3'H 的 Blast P 分析结果表明, 此蛋白质第 45~476 的肽段具有细胞色素 P450 家族基因的结构域。ProtParam 程序预测 *BrF3'H1* 和 *BrF3'H2* 属于稳定蛋白, 分子量分别是 56.59 和 56.78 kDa, 理论等电点是 7.01 和 7.31, 氨基酸组成中 Leu 占最大比例。SignalP 3.0 检测结果显示 *BrF3'H1* 和 *BrF3'H2* 的 N 端第 1~22 位氨基酸区段为信号肽序列。二级结构预测表明,

BrF3'H1 和 *BrF3'H2* 的 511 个氨基酸可以形成 α -螺旋、随意盘旋序列和伸展序列, 两种蛋白中不含其他二级结构。ScanProsite 分析显示, *BrF3'H1* 和 *BrF3'H2* 在 436~445 的氨基酸序列是 FGaGRRICAG, 符合标签序列 [FW]-[SGNH]-x-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-C-[LIVMFAP]-[GAD]。此基序也包含在 Blast P 程序查找出的蛋白结构域内。BioEdit 软件比对结果显示, *BrF3'H1* 和 *BrF3'H2* 基因的同源性为 98%, 核苷酸序列存在 17 个位点的差异, 推导的氨基酸序列存在 5 个位点的差异。

3 *BrF3'H1* 和 *BrF3'H2* 基因的 UV-A 诱导表达

为了研究 *BrF3'H1* 和 *BrF3'H2* 基因的表达与 UV-A 处理的关系, 用不同的光照时间处理两种茺菁, Northern 杂交结果显示(图 5), 未露于光下的‘津田’茺菁块根皮中 *BrF3'H1* 基因不表达, UV-A 处理 6 h 后 *BrF3'H1* 的表达量明显增加, 处理 24 h 后 *BrF3'H1* 基因的表达量最高, 显示 *BrF3'H1* 与 UV-A 光照时间有关系。UV-A 不诱导‘赤丸’茺菁的 *BrF3'H2* 基因表达。这表明, ‘津田’茺菁 *BrF3'H1*

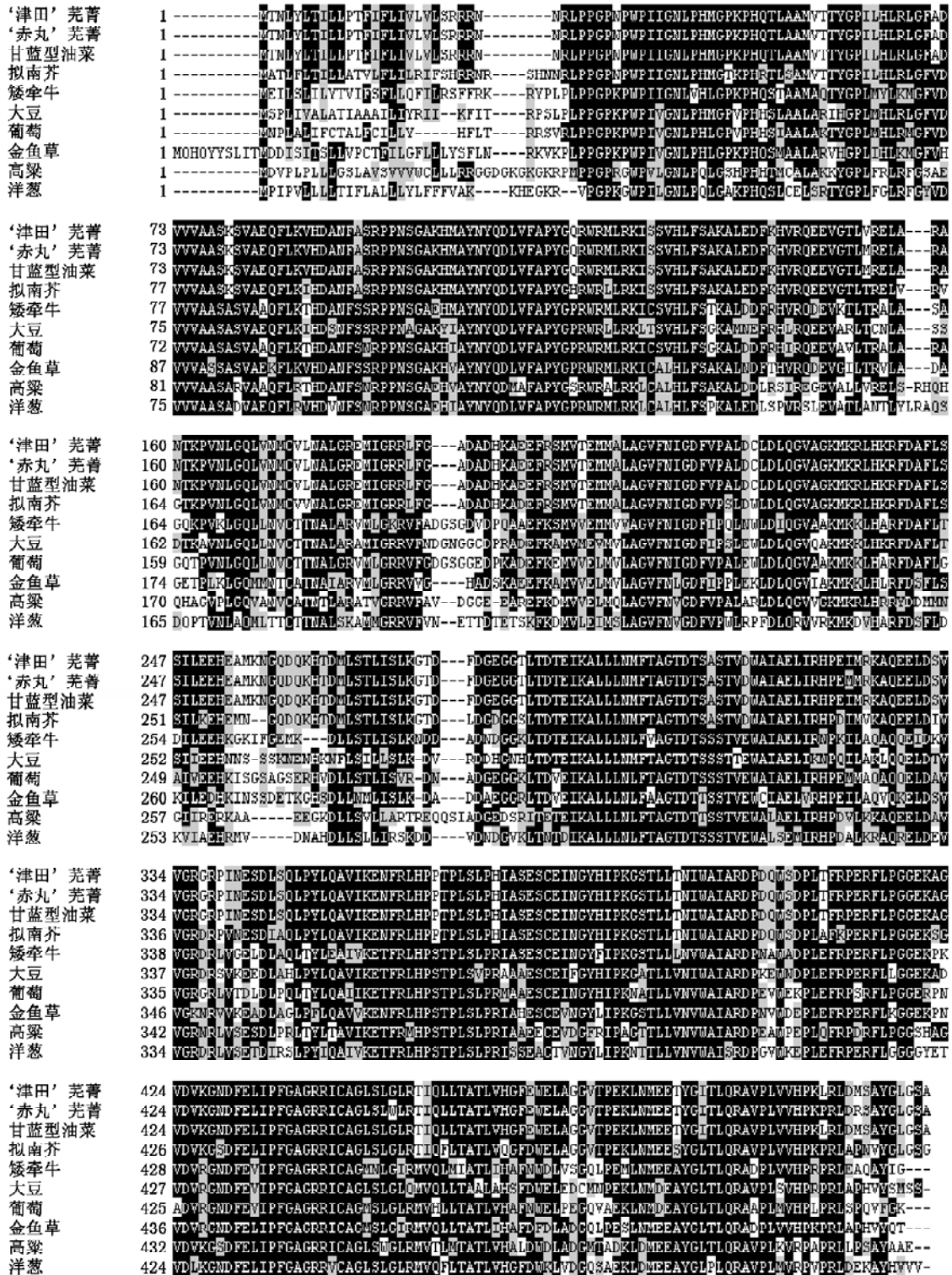


图3 芜菁 BrF3'H1 和 BrF3'H2 与其他植物 F3'H 的氨基酸序列比较

Fig.3 Comparison on amino acid sequences of F3'H among turnip and other plants

和‘赤丸’芜菁 *BrF3'H2* 基因的UV-A诱导表达特性不同。

F3'H是细胞色素加氧酶家族成员,在花青素生物合成途径中发挥重要作用(Seitz等2006)。我们

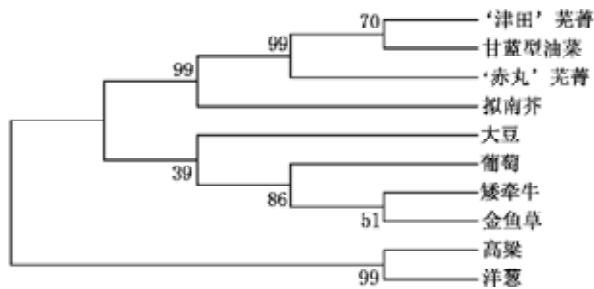


图4 植物F3'H蛋白的系统进化树
Fig.4 Evolutionary tree of plant F3'H

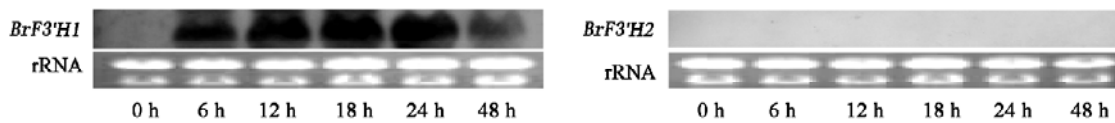


图5 UV-A处理不同时间BrF3'H1和BrF3'H2基因的表达
Fig.5 Expressions of BrF3'H1 and BrF3'H2 genes after exposed to UV-A with different times

参考文献

- 刘仕芸, 黄艳岚, 张树珍(2006). 植物花青素生物合成中的调控基因. 植物生理学通讯, 42 (4): 747~754
- 万小荣, 李玲(2002). 植物的MYB蛋白. 植物生理学通讯, 38 (2): 165~170
- 许志茹, 李玉花(2006). 利用cDNA微阵列分离津田芜菁花青素生物合成相关基因. 遗传, 28 (9): 1101~1106
- 闫海芳(2003). 光环境影响花青素合成途径中相关基因表达的机制[硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学, 14~20
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, 瞿礼嘉, 顾红雅, 白书农, 赵进东, 陈章良主译(2004). 植物生物化学与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1057~1082
- Bogs J, Ebadi A, McDavid D, Robinson SP (2006). Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. Plant Physiol, 140 (1): 279~291
- Chatterjee M, Sharma P, Khurana JP (2006). Cryptochrome 1 from *Brassica napus* is up-regulated by blue light and controls hypocotyl/stem growth and anthocyanin accumulation. Plant Physiol, 141 (1): 61~74
- Holton TA, Cornish EC (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell, 7 (7): 1071~1083
- 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 (1): 61~69
- Noh B, Spalding EP (1998). Anion channels and the stimulation of anthocyanin accumulation by blue light in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiol, 116 (2): 503~509

实验室已有的工作表明, '津田' 芜菁块根皮中含有花青素, '赤丸' 芜菁块根皮中含有花葵素(闫海芳 2003)。前者花青素合成过程中需要F3'H催化二氢黄酮醇合成二氢栎精, 从而进一步形成紫红色的花青素(矢车菊色素)。后者的二氢黄酮醇直接在DFR的催化下生成无色天竹葵色素, 进而合成花葵素, 此过程不需要F3'H蛋白的催化(刘仕芸 2006)。
'赤丸' 芜菁中克隆的不受UV-A诱导的F3'H基因的功能尚需实验验证。

- Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J, Koes R (2006). PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. Plant Cell, 18 (5): 1274~1291
- Schoenbohm C, Martens S, Eder C, Forkmann G, Weissshaar B (2000). Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. Biol Chem, 381 (8): 749~753
- Seitz C, Eder C, Deiml B, Kellner S, Martens S, Forkmann G (2006). Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase in the Asteraceae family. Plant Mol Biol, 61 (3): 365~381
- Sheehan MJ, Farmer PR, Brutnell TP (2004). Structure and expression of maize phytochrome family homeologs. Genetics, 167 (3): 1395~1405
- Toda K, Yang D, Yamanaka N, Watanabe S, Harada K, Takahashi R (2002). A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color. Plant Mol Biol, 50 (2): 187~196
- Xu BB, Li JN, Zhang XK, Wang R, Xie LL, Chai YR (2007). Cloning and molecular characterization of a functional flavonoid 3'-hydroxylase gene from *Brassica napus*. J Plant Physiol, 164 (3): 350~363
- Zhou B, Li Y, Xu Z, Yan H, Homma S, Kawabata S (2007). Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). J Exp Bot, 58 (7): 1771~1781