

## 紫茎泽兰类黄酮 3'-羟化酶基因的克隆、序列分析和原核表达

黄文坤<sup>1,2</sup>, 程红梅<sup>3</sup>, 郭建英<sup>1</sup>, 高必达<sup>2</sup>, 万方浩<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094; <sup>2</sup> 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 长沙 410128; <sup>3</sup> 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

**摘要:** 用基因特异引物对紫茎泽兰 *F3'H* 基因进行 PCR 扩增、T-A 克隆及测序, 采用 DNAMAN 5.0 和 MEGA 3.0 等生物信息学软件进行序列分析, 并对 *F3'H* 基因的组织表达特性及原核表达产物进行了分析。结果表明紫茎泽兰 *F3'H* 基因 cDNA 全长为 1722 bp (GeneBank 登录号 EF137714), 编码 570 个氨基酸, 与翠菊、大豆和非洲菊 *F3'H* 基因的氨基酸序列同源性分别为 64.4%、57.3% 和 54.5%。Southern 杂交表明该基因为单拷贝。Northern 杂交表明 *F3'H* 基因在紫茎泽兰叶中表达量最高, 且其表达受泽兰酮诱导。SDS-PAGE 电泳表明 *F3'H* 基因经 IPTG 诱导后在大肠杆菌中能表达 56.8 kDa 的目的蛋白。

**关键词:** 类黄酮 3'-羟化酶; 紫茎泽兰; 入侵植物; 基因克隆; 原核表达

## Cloning, Sequence Analysis and Expression in *Escherichia coli* of Flavonoid 3'-hydroxylase Gene of *Eupatorium adenophorum* Sprengel

HUANG Wen-Kun<sup>1,2</sup>, CHENG Hong-Mei<sup>3</sup>, GUO Jian-Ying<sup>1</sup>, GAO Bi-Da<sup>2</sup>, WAN Fang-Hao<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; <sup>2</sup> College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; <sup>3</sup> Institute of Biotechnology Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** The *F3'H* gene of *Eupatorium adenophorum* was amplified using particular primers, cloned by T-A method and sequenced. The nucleotide and amino acid sequences among different species were compared and analyzed with DNAMAN 5.0, MEGA 3.0 softwares. Our results showed that the complete nucleotide sequence of *F3'H* gene of *Eupatorium adenophorum* contained 1722 base pairs from which deduced 570 amino acids (GenBank accession No. EF137714). The homology rates of amino acid sequences of *F3'H* gene between *Eupatorium adenophorum* and *Callistephus chinensis*, *Glycine max* and *Gerbera hybrida* were 64.4%, 57.3%, 54.5% respectively. Southern blot analysis showed that there was only one copy of *F3'H* in *Eupatorium adenophorum*. Northern blot analysis showed that the highest expression level of *F3'H* was detected in the leaf and the expression of *F3'H* was induced by the allelochemical 9-oxo-agerphorona. SDS-PAGE analysis of IPTG induced recombinant *Escherichia coli* showed that a predicted 56.8 kDa fusion protein was expressed in the culture.

**Key words:** flavonoid 3'-hydroxylase; *Eupatorium adenophorum*; invasive species; gene cloning; prokaryotic expression

类黄酮 3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)属于细胞色素 P450 单加氧酶(CYP450s), 具有催化多种依赖 NADPH 或 NADH 的底物氧化反应的功能(Graham 和 Peterson 1999; Werck-Reichhart 和 Feyereisen 2000; Schuler 和 Werck-Reichhart 2003)。<sup>14</sup>C 标记的查尔酮(chalcone)示踪实验表明, *F3'H* 基因分别将 4', 5, 7-三羟基黄酮(naringenin)和二氢茛非醇(dihydrokaempferol, DHK)转化成圣草酚(eriodictyol)和二氢栎精

(dihydroquercetin, DHQ)后形成不同的花色素苷, 因而植物表现出不同的花色(Doostdar 等 1995); 它可通过黄烷酮类物质参与乙酸-丙二酸途径(acetic-malonic acid pathway), 保护植物免受动物、植物和病原微生物等的侵害(Shin 等 2000;

收稿 2007-05-11 修定 2007-08-28

资助 国家“973”计划(2002CB111400)。

\* 通讯作者(E-mail: wanfangh@public3.bta.net.cn; Tel/Fax: 010-68975297)。

Olofsdotter 等 1995; 徐正浩等 2004)。

紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum*)是一种恶性外来入侵杂草,近几年来,在我国西南地区广泛蔓延,严重影响我国的农业、林业和畜牧业生产以及生物多样性的安全(万方浩等 2005)。随着生物检测方法的不断完善和外来生物入侵机制研究的深入,紫茎泽兰的化感物质(allelochemicals)已经得到有效的分离和鉴定,主要有酚类(如类黄酮)、萜类(如泽兰酮)和生物碱类等(闫乾胜等 2006; Yang 等 2006),对与化感物质相关基因的克隆和功能基因的定位尚未见报道。为了探索 *F3'H* 基因在紫茎泽兰次生代谢中的作用,本文克隆了紫茎泽兰 *F3'H* (*CYP75B*)基因,经 Southern 杂交和 Northern 杂交分析确定了该基因的拷贝数,并对该基因的组织表达特性作了初步研究。

## 材料与方 法

从云南省景洪市、贵州省贵阳市、重庆市巴南区采集的紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum* Sprengel)种子在中国农业科学院温室中繁殖,出苗 2 个月后取幼嫩的组织(嫩叶、幼根、茎尖)用液氮速冻后立即提取 RNA。

采用 Invitrogen GeneRacer™ kit 进行 *F3'H* 基因的 5'RACE、3'RACE 及全长 cDNA 克隆。实验所用大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室提供,克隆载体 pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 生物技术公司,原核表达载体 pET32a 与 *E. coli* BL21 (DE3)由中国农业科学院植物保护研究所张杰先生惠赠。泽兰酮由本实验室杨国庆先生提供。

引物由上海生工生物技术公司合成,序列为:GSP5, 5'-GGGAGAGTGGTGT-TGAAGGGTGGAGTC-3'; GSP3, 5'-ACAGTGGAAATGGGCAATAGCGGAA-3'; FSP5, 5'-CGCGAGCTCAAATGACCATACTAAC-CCTACTGC-3'; FSP3, 5'-GCCGTCGAC-CAACCATCTTAACAACCTTTCG-3'。

用苯酚法提取总 RNA 为模板,以 Oligo(dT) 为引物,按照 Invitrogen 试剂盒说明书进行反转录得到单链 cDNA 后,分别用 GSP3、GSP5 基因特异引物进行 3'RACE 与 5'RACE。序列拼接后,在

完整编码区的全长引物 FSP5 和 FSP3 的 5' 端分别加上 *Sac*I 和 *Sal*I 酶切位点,进行完整编码区的 cDNA 片段扩增。反应程序为:94 5 min; 94 1 min, 55 1 min, 72 2 min, 35 个循环; 72 10 min。扩增的完整编码区片段用 *Sac*I 和 *Sal*I 酶切后转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑选阳性克隆进行 PCR 鉴定和酶切鉴定后测序。用 ABI377 型自动测序仪测序。用 DNAMAN 5.0 和 MEGA 3.0 进行 DNA 序列拼接、分析和氨基酸序列比对。

采用改进的 CTAB 法提取分别来自云南、贵州、重庆等地区的紫茎泽兰基因组总 DNA (黄文坤等 2006)。总 DNA 经 *Eco*RI 限制性内切酶酶切后,用琼脂糖凝胶电泳分离后转移至 Hybond-N<sup>+</sup> 尼龙膜(Amersham)上。用王东兰等(2005)克隆的紫茎泽兰 644 bp 片段作探针,然后用 Random Primer Labelling Kit (TaKaRa)和 a-<sup>32</sup>P-dCTP 进行探针标记,按分子克隆实验指南中介绍的方法进行杂交(Sambrook 和 Russell 2001)。

总 RNA 的提取采用苯酚法(王关林和方宏筠 2002)。从云南省临沧地区提取的紫茎泽兰根、茎、叶 RNA 经甲醛琼脂糖变性凝胶电泳后,转移至 Hybond-N<sup>+</sup> 尼龙膜(Amersham)上后进行 Northern 杂交。探针标记与 Northern 杂交按分子克隆实验指南方法(Sambrook 和 Russell 2001)进行。

为了检测泽兰酮诱导对紫茎泽兰 *F3'H* 基因表达的影响,将长势一致的紫茎泽兰幼苗置于含 2 mmol·L<sup>-1</sup> 泽兰酮的 Hoagland 营养液(pH 5.8)中分别培养 0、1、3、6、12、24 和 48 h 后提取叶片中的 RNA,进行 Northern 杂交。

将 *F3'H* 基因克隆到 pET32a 载体的 *Sac*I 与 *Sal*I 位点,转化 BL21(DE3)大肠杆菌,PCR 鉴定与酶切鉴定后得到重组克隆 pET-CYP75。将 pET-CYP75 单菌落接种到 3 mL 含有 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 LB 培养基中,于 37 下培养过夜。取 200  $\mu$ L 培养液,加到 20 mL 含 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 LB 培养基中,于 37 下继续培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6,加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的异丙基- $\beta$ -D- 硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup>,于 30 下诱导培养并分别在诱导 0、2、4、6、8 h 时取 1.5 mL 样品,离心收集菌体。菌体再悬浮于 100

$\mu\text{L}$  缓冲液( $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA,  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  葡萄糖, pH 8.0), 加等体积的 $2\times\text{SDS}$  凝胶加样缓冲液, 于 $100^\circ\text{C}$  水浴中煮沸 5 min, 按照郭尧君(2003)书中的方法进行 $10\%$  SDS-PAGE 电泳分析。

## 实验结果

### 1 紫茎泽兰 *F3'H* 基因的扩增

根据已知的紫茎泽兰 *CYP75* 基因中间片段(王东兰等2005)设计5'RACE特异引物GSP5和3'RACE特异引物 GSP3, 按照试剂盒说明进行PCR 扩增, 分别得到 5' 末端 1 075bp 和 3' 末端 753 bp cDNA 片段。根据所拼接的全长序列设计开放式阅读框全长引物 FSP5 和 FSP3, 参照 pET32a 上的多克隆位点, 在 2 条引物的 5' 端分别加上相应的酶切位点和 3 个保护性碱基。以总 RNA 的反转录产物扩增得到紫茎泽兰 *F3'H* 基因(GeneBank 登录号: EF137714)的编码区片段长度为 1 533 bp, 与预期片段大小相符。

### 2 重组克隆的酶切和序列分析

重组质粒 pET32a-CYP75 经 *SacI* 和 *SalI* 双酶切后, 在琼脂糖凝胶上表现为约 1 500 bp 的条带。序列分析显示, 已发表的紫茎泽兰 *CYP75* 基因片段与所克隆的 *F3'H* 基因同一片段的核苷酸同源率为 98.4%, 所得 *F3'H* 基因的编码区片段长度为 1 533 bp。该基因 cDNA 片段全长为 1 722 bp, 含 5' 非翻译区(37 bp)、编码区(1 533 bp)、3' 非翻译区(152 bp), 编码 570 个氨基酸, 理论分子量为 56.8 kDa。

### 3 原核表达及表达产物的 SDS-PAGE 分析

筛选正确连接的克隆并提取质粒, 用 *SacI* 与 *SalI* 酶切后回收目的片段, 用 T4 DNA 连接酶连接到 *SacI* 与 *SalI* 酶切过的 pET32a 载体中, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 将鉴定正确的克隆(命名为 pET32a-CYP75)用于诱导目的蛋白。以未转入 *F3'H* 基因的 pET32a 空载体转化 BL21(DE3), 诱导表达蛋白后作对照。提取诱导前后的细菌总蛋白, 取适量的样品经 SDS-PAGE 电泳。与未经诱导和空载体转化菌相比, IPTG 诱导的重组菌在 56.8 kDa 处有一条较浓的与目的蛋白分子量接近的带(图 1), 而未经诱导的重组菌却没有此带, 表

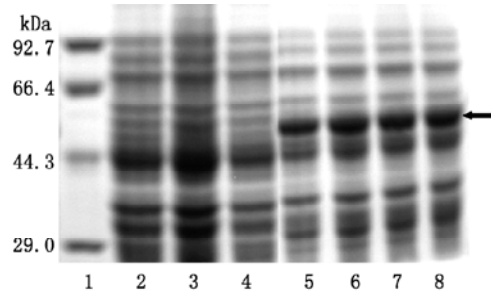


图 1 BL21(DE3)大肠杆菌诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳  
Fig.1 SDS-PAGE analysis of the microsomes of *E. coli*

BL21(DE3) induced by IPTG

1: 标准蛋白质分子量; 2、3: pET32a 空质粒 IPTG 诱导 0、8 h; 4~8: pET32a-CYP75 IPTG 诱导 0、2、4、6、8 h。箭头表示 *F3'H* 基因表达条带。

明外源蛋白在大肠杆菌中得到大量表达, 并且表达量随着时间的延长而增加。

### 4 Southern 杂交分析

采用 Southern 杂交分析 *F3'H* 基因在紫茎泽兰基因组中的拷贝数的初步结果表明, 该基因为单拷贝(*EcoRI* 在该基因中有一个切点, 酶切后形成 2 个片段) (图 2), 且不同地理区域的种群间拷贝数没有差异。

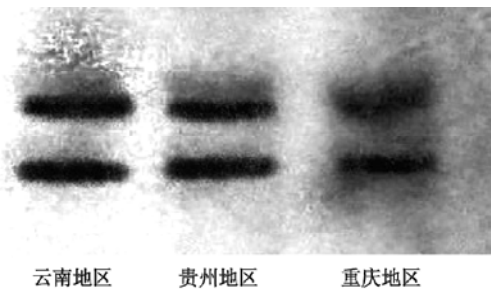


图 2 不同地区的紫茎泽兰基因组 DNA 的 Southern 杂交分析  
Fig.2 Southern blot analysis of genomic DNA of *Eupatorium adenophorum* with the *F3'H* fragment

### 5 *F3'H* 基因在植物组织中的表达特性分析

紫茎泽兰在北方温室中很难开花结籽, 为了研究紫茎泽兰 *F3'H* 基因的表达模式, 取从紫茎泽兰根、茎和叶中提取的 RNA, 以王东兰等(2005)已克隆的 *CYP75* 基因 644 bp 片段为探针进行 Northern 杂交的结果表明, 紫茎泽兰的根、茎和叶中均有 *F3'H* 基因产物, 在叶中的表达量最高, 根中最低(图 3)。

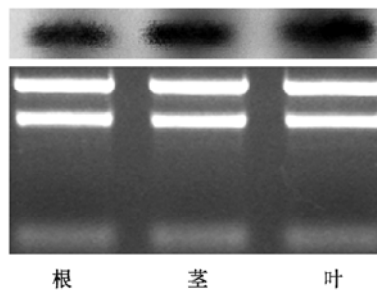


图3 紫茎泽兰不同组织中  $F3'H$  基因表达的 Northern 杂交分析

Fig.3 Northern blot analysis of  $F3'H$  gene in various organs of *Eupatorium adenophorum*

## 6 泽兰酮对 $F3'H$ 基因表达的诱导

泽兰酮是紫茎泽兰的主效化感物质之一,对白三叶、旱稻和紫花苜蓿等十种植物的种子萌发和幼苗生长具有不同程度的抑制作用(郑丽和冯玉龙 2005; Yang 等 2006)。图4的结果表明,泽兰酮对  $F3'H$  基因的表达有明显的诱导作用。经泽兰酮处理后的紫茎泽兰  $F3'H$  基因表达量在6 h后开始升高,24 h达到最高。据此推测  $F3'H$  基因可能在紫茎泽兰的防御反应或化感作用等次生代谢过程中起作用。

## 讨 论

紫茎泽兰  $F3'H$  基因与其它植物  $F3'H$  基因在氨

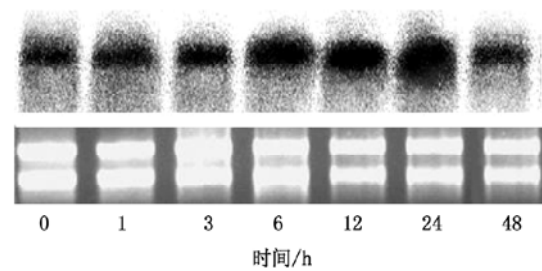


图4 泽兰酮对紫茎泽兰  $F3'H$  表达水平的诱导

Fig.4  $F3'H$  transcripts level in *Eupatorium adenophorum* induced by 9-oxo-agerphorona

基酸序列上有很高的同源性(表1),其中与翠菊 (*Callistephus chinensis* Linn)的相似性最高,大豆 (*Glycine max* L.)、非洲菊 (*Gebera hybrida* Hort)和万寿菊 (*Osteospermum hybrida* M.)次之。根据氨基酸序列的同源性,可将氨基酸序列同源性大于40%的归为同一个家族,氨基酸序列同源性超过55%的归为同一个亚族(Holton 等 1993; Tanaka 等 1996; Nielsen 和 Podivinsky 1997)。据此认为,紫茎泽兰  $F3'H$  基因可归为翠菊  $F3'H$  基因所在的 *CYP75B* 亚家族。

氨基酸序列比对显示,不同物种  $F3'H$  氨基酸序列的主要差异在于N端约30个氨基酸,这段序列含有疏水氨基酸残基,是膜插入点的信号序列

表1 16个物种  $F3'H$  基因氨基酸序列同源性

Table 1 Amino-acid sequences identity of  $F3'H$  between *Eupatorium adenophorum* and 15 organisms

物种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 紫茎泽兰	100															
2 翠菊	64.4	100														
3 大豆	57.3	44.0	100													
4 非洲菊	54.5	54.2	45.2	100												
5 万寿菊	36.2	35.6	30.3	37.5	100											
6 火葱	34.4	35.3	30.7	32.5	34.7	100										
7 葡萄	21.7	24.1	11.8	9.6	9.3	9.3	100									
8 牵牛花	10.8	11.8	10.8	10.8	39.0	18.9	10.8	100								
9 茛苳	10.5	10.8	11.1	10.5	39.9	18.3	10.2	89.2	100							
10 天竺葵	10.2	9.0	7.7	22.0	19.2	6.2	9.0	8.4	8.0	100						
11 高粱	9.9	6.5	9.0	11.1	10.8	10.2	5.6	7.7	9.6	7.1	100					
12 紫罗兰	9.0	12.7	9.3	9.3	24.1	10.5	11.5	43.0	43.7	8.0	7.4	100				
13 夏堇	9.3	10.5	9.0	12.1	28.2	18.3	10.2	26.0	26.0	9.9	8.7	13.9	100			
14 紫苏	6.5	6.8	6.5	6.2	7.1	6.8	6.5	8.4	9.3	9.3	10.2	7.1	6.2	100		
15 水稻	5.6	5.3	5.6	6.2	6.8	8.4	5.9	8.0	9.0	9.0	6.8	8.0	7.1	10.2	100	
16 龙胆	4.3	5.3	5.9	8.4	5.3	8.0	5.3	5.6	5.6	5.6	7.7	8.0	5.9	10.8	37.2	100

单位: %。

(图5)。起始于第32位左右的“PFGF”序列是 细胞色素P450酶系的基序,连接膜的锚定位点和

Soybean	SPLIVALATIAAAAILIYRIIKFI	TRPSLELPDGGKRWETV	41
Callistephus	TILPFIFYTCITALVLYVLLNLL	TRNENRLEPPGETPWETV	41
Eupatorium	TILTLLLLYTSISALAFYLLLNLR	TRHEKRLPPGPTPWETV	41
Gerbera	TEPLTLLLIGTCVTGLFLYVLLNRC	TRNENRLEPPGETPWETV	41
Consensus	l t y tr lppgp pwp v		
Soybean	GNLPHMGPVPHHSLAALARIHG	GPLMHLRLGFDVVAASA	81
Callistephus	GNLPHLGMIPHHSLAALAKY	GPLMHLRLGFDVVAASA	81
Eupatorium	GNLPHLGTVPHHSLAALATKY	GPLMHLRLGFDVVAASA	81
Gerbera	GNLPHLGTIPHHSLAAMAKKY	GPLMHLRLGFDVVAASA	81
Consensus	gnlph g phhslaa a gplmhlrlgfdvvaasa		
Soybean	SVAAQFLKIHDSNESSREENACAKY	IAYNYODLVEAPYGF	121
Callistephus	SVAAQFLKTHDANFASRPENS	GAKHIAYNYODLVEAPYGF	121
Eupatorium	SVASQFLKSHDANFASRPENS	GAKHIAYNYODLVEAPYGF	121
Gerbera	SVAAQFLKTHDANFADRPENS	GAKHIAYNYODLVEAPYGF	121
Consensus	sva qflk hd nf rppn gak iayny dlvfapygp		
Soybean	RWRMLRKLTSVHLFSGKAMNEFRHRC	EEVARTCNLASS	161
Callistephus	RWRMLRKLCSVHLFSTKALDDERHVR	EEVATLTRVLVHA	161
Eupatorium	RWRMLRKLCSVHLFSAKSLDDERHVR	EEVATLTRVLISA	161
Gerbera	RWRMLRKLCSVHLFSTKALDDERHVR	EEVATLARAIVGA	161
Consensus	rwr lrk svhlfs k frh r eeva l l		
Soybean	DTKAMNLGQLINVCTTNALARAMI	GRRVENDCN..GGCDE	199
Callistephus	GE SA VKLGQLINVCTTNALARVMI	GRRVEADGSEGRVDE	201
Eupatorium	GETTVKLGQLINVCTTNALARVLL	GRRVEGDCS..RDSDE	199
Gerbera	GKSPVKLGQLINVCTTNALARVMI	GRRVDSG.....DA	195
Consensus	v lgqlinvcttnalar grvrf g d		
Soybean	KADEFKDMVVELMELAGEFNIGDF	IELELDCLDLQGITRKM	239
Callistephus	KADEFKDMVVELMELAGEFNIGDF	IELELDCLDLQGITRKM	241
Eupatorium	KADEFKDMVVELMELAGEFNIGDF	IELELDCLDLQGITRKM	239
Gerbera	KADEFKDMVVELMELAGEFNIGDF	IELELDCLDLQGITRKM	235
Consensus	adefk mv e m lag fnigd fip l ldlqg km		
Soybean	KKLHKRFDAFLTSIEEBHNSSSKNEN	.....HKNFLSL	273
Callistephus	KKLHARFDKFLNTILDDH..KTEKGA	ARRHS.DLLTTLT	278
Eupatorium	KKLHTRFDSFFENLILEEH..KSYGNSG	.....DLLSTLI	271
Gerbera	KKLHAKFDSFLNTILEEH..KTGAGD	GVASGKVDLLSTLI	273
Consensus	kklh fd f i h i		
Soybean	ILSL.KDVRDDHGNHITDTEIKALLN	MEAGTDTSSST	312
Callistephus	SLKD.VDAADDDEEGKLSDIEIKALLN	MEAGTDTSSSTV	318
Eupatorium	GLKD.DADADGEGVKLTDIEIKALLN	MEAGTDTSSSTV	310
Gerbera	SLKD.DA..DGEKLSDIEIKALLN	MEAGTDTSSSTI	310
Consensus	l d l d eikalln f agtdfssst		
Soybean	EWATAELIKNEQILAKLQCELETVVGR	DRSVKBEEDLAHLP	352
Callistephus	EWATAELIRHPELILKQAREEMDIVVGR	DRIVTELDLSRLT	358
Eupatorium	EWATAELIRHPELILKQACEEITVTVGR	DRIVTELDLNQLT	350
Gerbera	EWATAELIRNEQILNQARKEEMDIVVGR	DRIVTESDLGQLT	350
Consensus	ewa aeli p l e d vg dr v e dl l		
Soybean	YLQAVIKETFRLHPSTELSLPRMAA	ESCEVDGYIPKGSAT	392
Callistephus	FLQAVIKETFRLHPSTELSLPRMAE	ESCEVDGYIPKGSAT	398
Eupatorium	FLQAVIKETFRLHPSTELSLPRIS	SAACEVDGYIPKGSAT	390
Gerbera	FLQAVIKETFRLHPSTELSLPRMAE	ESCEVDGYIPKGSAT	390
Consensus	qa ketfrlhpstpls pr e ce gy ipkg t		
Soybean	LLVNVWAIARDPKEMNDLEEFREBER	ELLCGEKADVVRGN	432
Callistephus	LLVNVWAIARDPKMMTNLEEFRESRE	LEGGKEPDADIKGN	438
Eupatorium	LLVNVWAIARDPEMMTNLEEFRESRE	LEGGKENVDVRGN	430
Gerbera	LLVNVWAIARDPKIWADELEECETRE	LEGGKENVDIKGN	430
Consensus	llvn wai rdp w plef p rfl ggek d gn		
Soybean	DFEVIFPGAGRRICAGLSLGLQMVQL	ITAAIAHSPDWELE	472
Callistephus	DFEVIFPGAGRRICAGMSLGMVMVQL	ITATLVQTFDWELE	478
Eupatorium	DFEVIFPGAGRRICVGMTLGLRMVQL	ITATLVQTFDWELE	470
Gerbera	DFEVIFPGAGRRICVGMSLGLRMVQL	ITATLIHAFDWELE	470
Consensus	dfevipfgagrric g lg mvqll a l fdwel		
Soybean	DCMNPEKLNMEAYGLTLQRAVELSVH	PRPRLAPHVYSMS	512
Callistephus	NGLDPEKLNMEAYGLTLQRAEFLM	VHPRPRLSPHVYSR	518
Eupatorium	KGLEPEKLNMEAYGLTLQRAEQILV	HPRPRLAPGVYBSC	510
Gerbera	DGLNPKKLNMEAYGLTLQRAEFLV	HPRPRLAPHVYETTT	510
Consensus	p klnm eaygltlqra l vhp prl p vy		

图5 不同物种来源的F3'H基因多序列比对图

Fig.5 Multiple alignments of F3'H from different organisms

Soybean : 大豆(*Glycine max*); Callistephus : 翠菊(*Callistephus chinensis*); Eupatorium : 紫茎泽兰(*Eupatorium adenophorum*); Gerbera : 非洲菊(*Gerbera hybrida*).

酶蛋白的球体部分,在不同物种中是高度保守区(Nielsen和Podivinsky 1997)。I螺旋基序始于约300位氨基酸的“AGTDT”高度保守序列,I螺旋基序与底物的选择和结合有关,也有人认为是促使形成氧分子的结合域(Kraus和Kutchen 1995)。C端血红素的结合区(HBR)“FGAGRRICXG”始于437位氨基酸在不同的物种中也是高度保守的,这段序列受半胱氨酸的调节,左右各氨基酸围绕半胱氨酸形成特定结构(Bolwell等1994)。除了已知功能的基序外,不同物种的*F3'H*基因可能有很多高度保守的氨基酸区域,值得深入探讨。

此外,自Brugliera等(1999)克隆矮牵牛*F3'H*基因并鉴定其功能以来,有关*F3'H*基因克隆和功能鉴定的报道越来越多,但主要集中在花色育种方面(Vern等2004;Christian等2006),而从*F3'H*基因序列的保守性研究其在植物次生代谢中的功能和地位的工作尚少,有待进一步研究。

#### 参考文献

- 黄文坤, 郭建英, 万方浩, 高必达, 谢丙炎(2006). 紫茎泽兰 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立. 武汉植物学研究, 24 (6): 498~504
- 郭尧君(2003). 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 123~145
- 万方浩, 郑小波, 郭建英(2005). 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 北京: 科学出版社
- 王东兰, 郭建英, 谢丙炎, 万方浩, 何龙飞(2005). CYP75 基因 cDNA 片段的克隆与鉴定. 植物保护, 21 (4): 65~69
- 王关林, 方宏筠(2002). 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 750~751
- 徐正浩, 何勇, 崔绍荣, 李迪, 赵明, 张旭, 余柳青(2004). 水稻化感物质的代谢途径及基因调控. 植物保护, 30 (1): 5~8
- 闫乾胜, 杨婕, 李华民, 曹焘程, 陈庆华, 文永奇, 何兰(2006). 入侵物种紫茎泽兰化学成分及生物活性研究进展. 北京师范大学学报(自然科学版), 42 (1): 70~73
- 郑丽, 冯玉龙(2005). 紫茎泽兰叶片化感作用对 10 种草本植物种子萌发和幼苗生长的影响. 生态学报, 25 (10): 2782~2786
- Bolwell GP, Bozak K, Zimmerlin A (1994). Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*, 37 (6): 1491~1506
- Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton TA, Mason JG (1999). Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*. *Plant J*, 19 (4): 441~451
- Christian S, Christian E, Bettina D, Sandra K, Stefan M, Gert F (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: 365~381
- Doostdar H, Shapiro JP, Niedz R, Burk MD, McCollum TG, McDonald RE, Mayer RT (1995). A cytochrome-P450 mediated naringenin 3'-hydroxylase from sweet orange cell cultures. *Plant Cell Physiol*, 36: 69~77
- Graham S, Peterson J (1999). How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch Biochem Biophys*, 369: 24~29
- Holton TA, Brugliera F, Lester DR, Tanaka Y, Hyland CD, Menting JGT, Lu CY, Farcy E, Stevenson TW, Cornish EC (1993). Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature*, 366: 276~279
- Kraus PFX, Kutchen TM (1995). Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase a C-phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 2071~2075
- Nielsen KM, Podivinsky E (1997). cDNA cloning and endogenous expression of a F3', 5'H from petals of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Plant Sci*, 129: 167~174
- Olofsdotter M, Navarez D, Moody K (1995). Allelopathic potential in rice (*Oryza sativa* L.) germplasm. *Annu Appl Biol*, 127: 543~560
- Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 549~552
- Schuler MA, Werck-Reichhart D (2003). Functional genomics of P450s. *Annu Rev Plant Biol*, 54: 629~667
- Shin DH, Kim KU, Sohn DS, Kang, SU, Kim HY, Lee IJ, Kim MY (2000). Regulation of gene expressing relaxed to allelopathy. In: Kim KU, Shin DH (eds). *Rice Allelopathy*. Taegu: Kyungpook National University, 109
- Tanaka Y, Yonekura K, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Fujiwara M, Ashikari T, Kusumi T (1996). Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell Physiol*, 37 (5): 711~716
- Vern EC, Jameson PE, Schwinn KE, Umaharan P, Davies KM (2004). Temporal and spatial expression of flavonoid biosynthetic genes in flowers of *Anthurium andraeanum*. *Physiol Plant*, 122: 297~304
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*, 1: 30031~30039
- Yang GQ, Wan FH, Liu WX, Zhang XW (2006). Physiological effects of allelochemicals from leachates of *Ageratina adenophora* (Spreng.) on rice seedlings. *Allelopathy*, 18 (2): 112~118