

鹤望兰类黄酮3',5'-羟化酶基因*SrF3'5'H*的克隆及表达分析

黄敏玲^{1,2,3*} 樊荣辉^{1,2,3}

(¹福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; ²福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;

³福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要 采用RT-PCR和RACE方法从鹤望兰黄色花萼中克隆到类黄酮生物合成途径关键基因*SrF3'5'H*。该cDNA全长1 766 bp, 具有完整的开放阅读框(ORF), 共1 509个碱基, 编码503个氨基酸。氨基酸同源性分析表明, *SrF3'5'H*编码的氨基酸序列与已报道的其他植物的F3'5'H蛋白具有很高的同源性。系统进化树分析显示, 鹤望兰*SrF3'5'H*与非洲紫罗兰蛋白亲缘关系较近。应用半定量PCR分析表明, *SrF3'5'H*在始花期转录水平达到最高, 且在蓝色花瓣中表达最高, 在黄色花萼中几乎没有表达。

关键词 鹤望兰; 类黄酮3',5'-羟化酶; 类黄酮生物合成; 基因克隆

鹤望兰(*Strelitzia reginae* Banks)又称天堂鸟, 为旅人蕉科鹤望兰属多年生观赏植物, 原产南非, 现世界各地广为引种栽培。因其叶色青翠、花色艳丽、姿态奇特、花期长久, 是一种名贵观赏花卉, 素有“鲜切花之王”的美誉。目前, 鹤望兰属(*Strelitzia*)栽培品种共6个, 其花色多样性还有待进一步丰富。

花色是观赏花卉最重要的质量指标之一, 培育具有新型花色的新品种一直是花卉产业和观赏植物育种领域的研究热点之一^[1]。类黄酮是大多数花色形成的决定性色素群^[2], 其生物合成途径中的飞燕草色素苷是重要的蓝色花色成分, 类黄酮3',5'-羟化酶基因(*F3'5'H*)是合成飞燕草色素苷的关键酶基因。缺乏*F3'5'H*的植物, 如郁金香、玫瑰和香石竹等, 不能形成蓝色花, 因而*F3'5'H*又被称为“蓝色基因”^[3-5]。本研究首次克隆了*SrF3'5'H*全长基因, 并利用RT-PCR对*SrF3'5'H*基因的组织表达特异性及其在花发育过程中的表达进行了分析, 旨在为进一步研究鹤望兰*SrF3'5'H*的调控功能奠定分子基础, 为蓝色系花卉的花色形成分子机理研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以福建省农科院花卉研究中心种质资源圃栽培的鹤望兰(*Strelitzia reginae* Banks)品种为供试材料。取始花期蓝色花瓣, 立即用液氮冷冻并在-80 °C保存, 用于基因克隆; 取叶片、黄色花萼、蓝色花瓣,

液氮冷冻, -80 °C保存, 用于不同组织的表达分析; 取花蕾始期、花蕾中期、始花期、盛花期的整朵花, 迅速投入液氮中速冻后放入-80 °C冰箱保存, 用于花发育过程的基因表达分析。

大肠杆菌菌株DH5 α 由本实验室保存。RNA提取所用试剂、M-MLV反转录酶、pMD19-T vector和DNA回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit为Clontech公司产品; 引物合成及测序工作由上海生工生物工程服务有限公司完成。

1.2 *SrF3'5'H*基因cDNA全长的获得

总RNA的提取采用Trizol法。根据GenBank中检索到的F3'5'H保守氨基酸序列设计一对简并引物F3'5'H-F和F3'5'H-R(表1), 以RNA反转录产物cDNA第一链为模板进行PCR扩增。扩增条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 共35个循环; 最后72 °C延伸10 min。凝胶回收与预期片段大小一致(300 bp左右)的泳带, 连接克隆载体并转化感受态细胞, 通过蓝白斑筛选及PCR扩增鉴定阳性克隆后, 进行测序。

根据所得的cDNA中间序列, 分别设计特异性引

收稿日期: 2012-06-25 接受日期: 2012-07-30

福建省科技重大专项(No.2010NZ0003)、福建省农业科学院科技创新团队重点科研项目(No.CXTD2011-20)和福建省农业科学院青年人才创新基金(No.2011QC-15)资助项目

*通讯作者。Tel: 0591-87586106, E-mail: pudang12@yahoo.com.cn

物F3'5'H-3'GSP2和F3'5'H-5'GSP1(表1),按照Race试剂盒SMART™ RACE cDNA Amplification Kit说明书进行cDNA末端快速扩增。扩增采用Touchdown PCR程序,凝胶回收、产物克隆及序列测定如上所述。

根据由中间序列和末端序列拼接而得的cDNA全长序列,设计一对特异性引物SrF3'5'H-F和SrF3'5'H-R(表1),验证已获得的序列。

1.3 生物信息学分析

用BLAST对克隆序列进行同源检索后,确认为花色相关基因的同源序列;用ORF finder寻找最大开放阅读框(ORF);用BioXM对克隆序列进行氨基酸组成、等电点分析;通过软件DNAMAN和Bioedit进行氨基酸序列比对;利用MEGA软件进行系统进化

树的构建。

1.4 半定量PCR检测基因的表达

通过半定量PCR检测*SrF3'5'H*基因在黄色花萼、蓝色花瓣、叶片、花蕾始期、花蕾中期、始花期、盛花期的特异性表达。根据*SrF3'5'H*全长序列,按照半定量PCR设计原则设计一对特异性引物P1和P2(表1),获得的扩增片段为198 bp。以鹤望兰18s rRNA(GenBank accession number AF069229.1)为内参,设计其特异引物18s-F和18s-R(表1),获得的扩增片段为250 bp,进行半定量PCR分析。

PCR的扩增条件为:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环。PCR产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表1 鹤望兰*SrF3'5'H*基因克隆及表达分析所用引物

Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of *SrF3'5'H* gene in *Strelitzia reginae* Banks

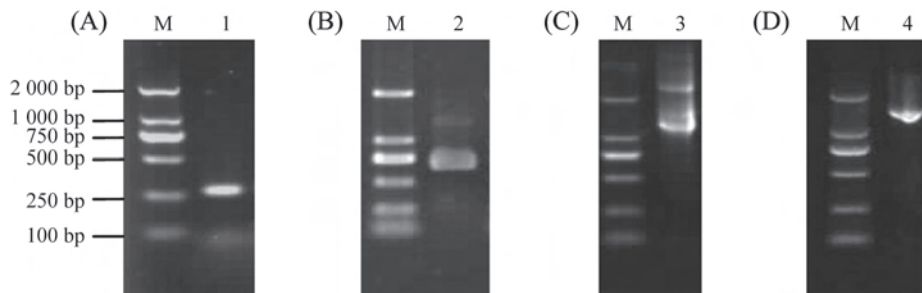
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	作用 Function
F3'5'H-F	TAC (C/T)T(G/C) CAA GCC AT(A/T/C) TGC AA	For the conserved fragment
F3'5'H-R	CCC (G/C)GC (A/G)CA (A/T)AT CCT CC	
F3'5'H-3'GSP2	CAA CCT CCC TCG CAT CTC CA	3'RACE
F3'5'H-5'GSP1	GGG AGG TTG AGA GGA GTG GAA GGG TG	5'RACE
SrF3'5'H-F	ATG GCG ACA ATC TTC CTA CGT G	For the cDNA of ORF
SrF3'5'H-R	TTA GTA GAC GTT GGG TGC CAG TC	
P1	CAA CCT CCC TCG CAT CTC CA	For the expression of <i>SrF3'5'H</i>
P2	ATG ATC TCG AAG TCA TTC CCA C	
18s-F	CTG AGA AAC GGC TAC CAC AT	For the internal control
18s-R	ACC CAA GGT CCA ACT ACG AG	

2 结果

2.1 *SrF3'5'H*全长cDNA克隆及序列分析

*SrF3'5'H*的中间序列:根据F3'5'H蛋白保守序

列设计一对简并引物F3'5'H-F和F3'5'H-R,以鹤望兰蓝色花瓣总RNA反转录的cDNA第一链为模板,PCR扩增获得一个长为289 bp的cDNA片段(图1A)。

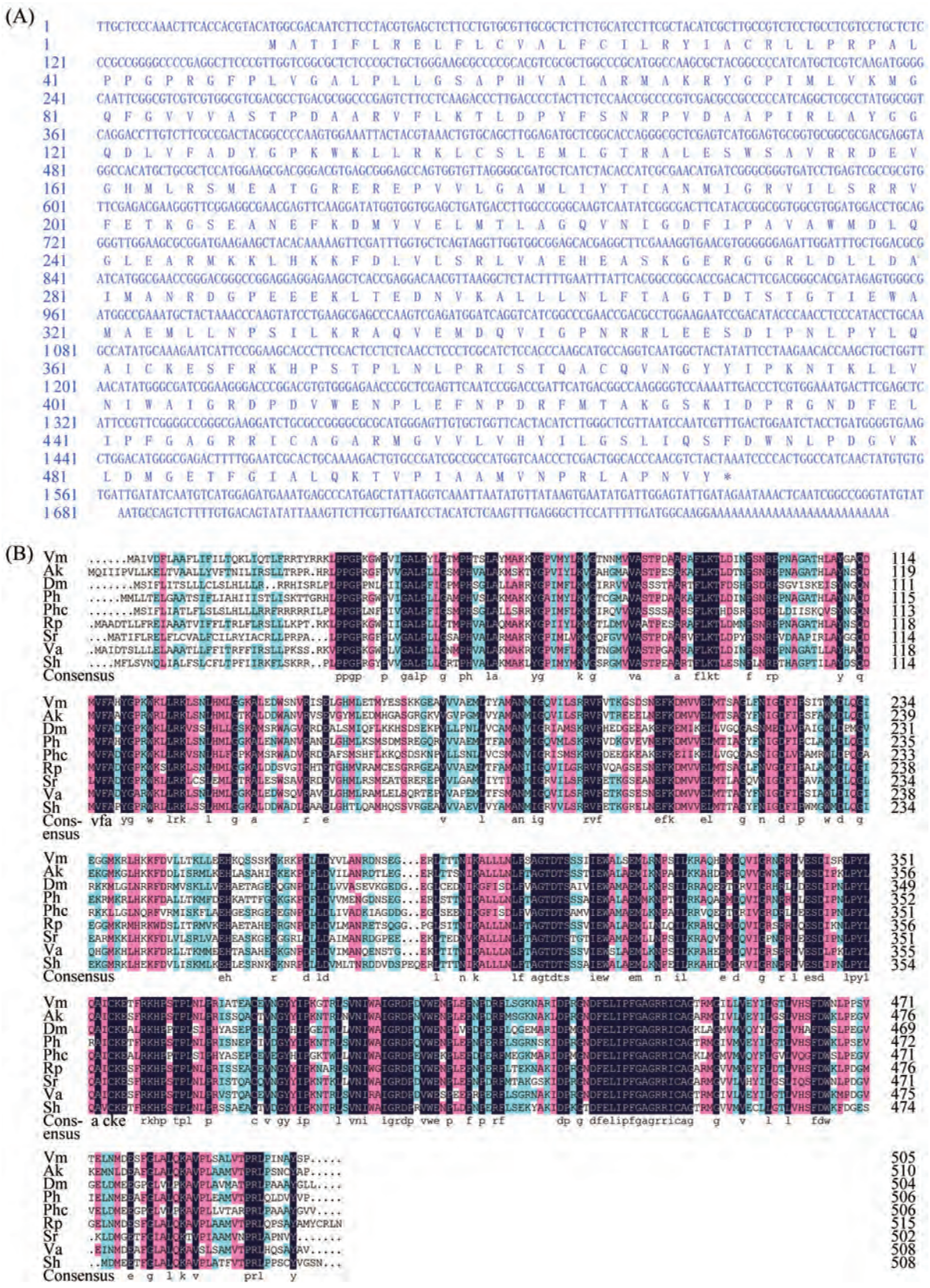


M: DNA标准分子量DL2 000; 1: *SrF3'5'H*核心片段扩增产物; 2: 3'RACE扩增产物; 3: 5'RACE扩增产物; 4: ORF扩增产物。

M: DNA marker DL2 000; 1: product of *SrF3'5'H* gene fragment; 2: product of 3'RACE; 3: product of 5'RACE; 4: product of ORF.

图1 鹤望兰*SrF3'5'H*基因的克隆

Fig.1 Isolation of *SrF3'5'H* gene in *Strelitzia reginae* Banks



Vm: 长春花; Ak: 金鱼草; Dm: 石斛兰; Ph: 矮牵牛; Phc: 蝴蝶兰; Rp: 杜鹃花; Sr: 鹤望兰; Va: 葡萄; Sh: 非洲紫罗兰。

Vm: *Vinca major*; Ak: *Antirrhinum kelloggii*; Dm: *Dendrobium moniliforme*; Ph: *Petunia hybrida*; Phc: *Phalaenopsis hybrid cultivar*; Rp: *Rhododendron x pulchrum*; Sr: *Strelitzia reginae* Banks; Va: *Vitis amurensis*; Sh: *Saintpaulia hybrid cultivar*。

图2 SrF3'5'H蛋白的氨基酸序列(A)和与其它F3'5'H蛋白的序列比对(B)

Fig.2 The amino acid sequence of SrF3'5'H(A) and the alignment of SrF3'5'H and other F3'5'H proteins(B)

经BLAST分析, 该片段编码的氨基酸序列与多种植物的F3'5'H蛋白高度同源, 其中与杜鹃花F3'5'H(GenBank accession number AB488486)同源性最高, 达78%, 认为所获得的序列是鹤望兰F3'5'H的中间序列。

*SrF3'5'H*的3'端和5'端序列: 根据所获得的鹤望兰*SrF3'5'H*中间序列设计3'RACE和5'RACE的特异性引物F3'5'H-3'GSP2和F3'5'H-5'GSP1, 经RACE-PCR扩增和产物克隆、测序后, 分别得到长度为642 bp的3'末端和1 132 bp的5'末端(图1B和图1C), 与中间区分别有232 bp和61 bp的重叠区段, 经BLAST检索认为它是鹤望兰*SrF3'5'H*的3'端和5'端序列。

*SrF3'5'H*的cDNA全长序列: 将上述3段序列根据重叠区域进行拼接得到*SrF3'5'H*基因全长, 共1 766 bp。该基因具有完整的开放阅读框, 共1 509个碱基(图1D), 编码503个氨基酸, 编码产物的分子

量为55.80 kDa, 理论等电点为8.96。该cDNA序列已登录GenBank, 登录号为JX144664。

2.2 *SrF3'5'H*编码氨基酸的同源性分析

利用NCBI Blastp, 将*SrF3'5'H*完整的开放阅读框推测的氨基酸序列与其他植物F3'5'H氨基酸序列进行同源性比较(图2)得知, 该序列与葡萄(ACN38269)、金鱼草(BAJ16329)、长春花(ACZ63206)、矮牵牛(ABN42195)、杜鹃花(BAH98133)、非洲紫罗兰(BAJ-23912)等序列的同源性分别达69%、68%、67%、65%、65%、63%。

在多重比对的基础上, 为进一步了解*SrF3'5'H*与其它植物F3'5'H之间的进化关系, 应用MEGA4软件对23个F3'5'H的氨基酸序列进行了系统进化树构建, 发现鹤望兰F3'5'H与非洲紫罗兰的F3'5'H蛋白亲缘关系比较近(图3)。

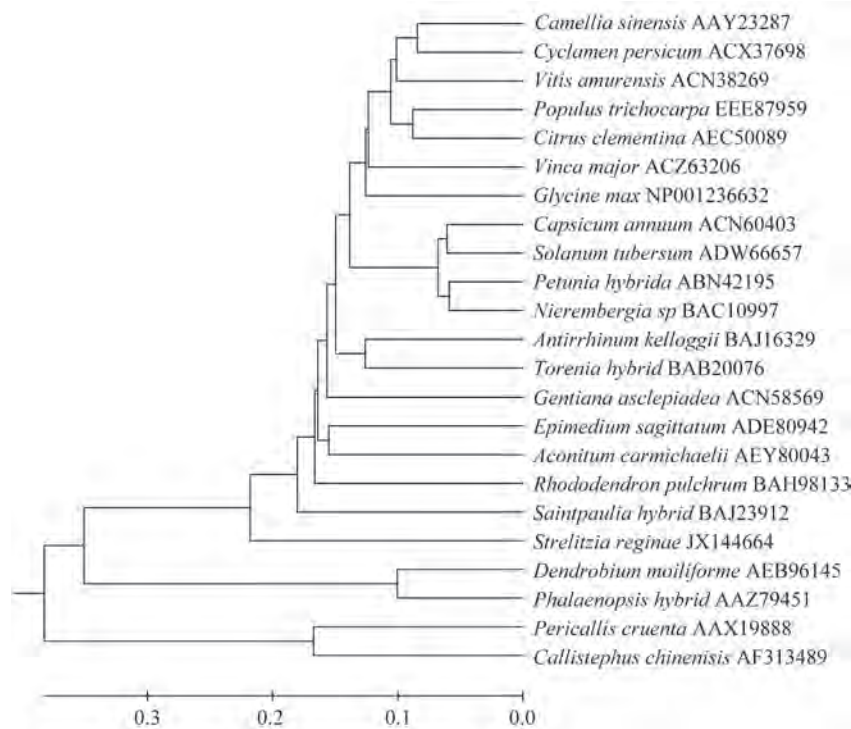


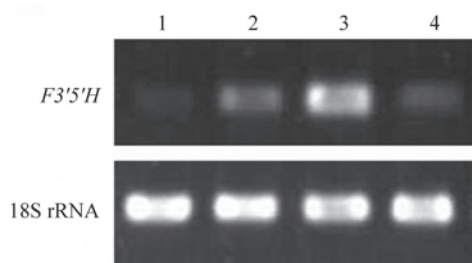
图3 鹤望兰*SrF3'5'H*与其它22种植物F3'5'H蛋白的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of *SrF3'5'H* in *Strelitzia reginae* Banks with 22 other plants F3'5'Hs

2.3 *SrF3'5'H*基因的表达分析

用半定量PCR技术检测*SrF3'5'H*在鹤望兰花发育阶段及不同组织上的表达分析。结果表明, *SrF3'5'H*在鹤望兰开花的花蕾期表达量逐渐增加, 到

始花期达到最高, 在盛花期呈减弱趋势(图4)。在不同组织中表达分析结果表明, *SrF3'5'H*在蓝色花瓣中表达量最高, 其次是叶片, 在黄色花萼中几乎没有表达(图5)。

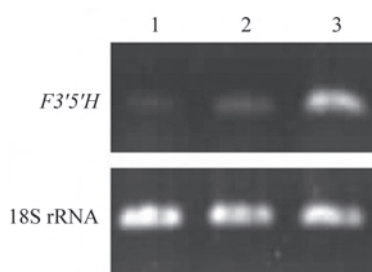


1: 花蕾前期; 2: 花蕾中期; 3: 始花期; 4: 盛花期。

1: bud early; 2: bud mid; 3: early flowering season; 4: bloom stage.

图4 鹤望兰花发育过程中*SrF3'5'H*的表达

Fig.4 Expression of *SrF3'5'H* in different growth periods of flowering from *Strelitzia reginae* Banks



1: 黄色萼片; 2: 叶片; 3: 蓝色花瓣。

1: yellow sepals; 2: leaf; 3: blue petals.

图5 *SrF3'5'H*在鹤望兰不同组织中的表达

Fig.5 Expression of *SrF3'5'H* in different tissues of *Strelitzia reginae* Banks

3 讨论

本研究通过RT-PCR和RACE方法成功克隆了*SrF3'5'H*基因全长, 该cDNA全长1 766 bp, 具有完整的开放阅读框, 共1 509个碱基, 编码503个氨基酸。多重比对结果表明, *SrF3'5'H*与葡萄(*ACN38269*)、金鱼草(*BAJ16329*)、长春花(*ACZ63206*)的*F3'5'H*均具有较高同源性, 分别达到69%、68%、67%。通过构建系统进化树发现, 鹤望兰*F3'5'H*与非洲紫罗兰*F3'5'H*蛋白聚为一支。

Wang等^[6]采用RT-PCR方法对*F3'5'H*在蝴蝶兰蓝色花瓣、叶片和根中的表达差异进行分析发现, *F3'5'H*仅在花瓣特异表达, 在叶片和根中没有表达; 并对*F3'5'H*在蝴蝶兰的花发育过程中的表达差异进行分析发现, *F3'5'H*在始花期表达量最高。Castellarin等^[7]报道, 葡萄*F3'5'H*基因在花瓣中大量表达, 在叶片中有微量表达。本实验通过半定量RT-PCR的方法对*SrF3'5'H*在鹤望兰不同组织及花发育过程

中的表达情况进行分析发现, *SrF3'5'H*在蓝色花瓣、黄色萼片、叶片均有表达, 但表达水平有明显差异, 其中在花色素大量积累的蓝色花瓣中表达量最高。这与葡萄中的研究结果相似^[7], 说明*SrF3'5'H*的表达与花青素的合成有关; 对鹤望兰花发育过程中的表达情况进行分析发现, *SrF3'5'H*在花蕾期开始表达, 到始花期表达量最高, 盛花期减弱, 这与蝴蝶兰中的研究结果^[6]相似, 推测*SrF3'5'H*可能在转录水平上对鹤望兰花色的形成起调控作用。

蓝色系的花卉因其色彩高雅、相对稀少而供不应求。然而, 一些观赏价值很高的花卉如蝴蝶兰、月季、郁金香、康乃馨等, 却缺少蓝色, 主要原因是由于没有*F3'5'H*的活性, 而鹤望兰具有其它花卉不常有的蓝色。迄今已从蝴蝶兰^[6]、葡萄^[7]、蓝目菊^[8]、草原龙胆^[9]、长春花^[10]等植物中克隆到*F3'5'H*基因。本实验成功分离了鹤望兰*SrF3'5'H*基因, 并对其组织表达特异性进行了分析, 为进一步研究*SrF3'5'H*的功能及其在鹤望兰黄色花形成中的作用及调控机制奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Mol J, Cornish E, Mason J, Koes R. Novel coloured flowers. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10(2): 198-201.
- 2 黄金霞, 王亮生, 李晓梅, 鲁迎青. 花色变异的分子基础与进化模式研究进展. *植物学通报*(Huang Jinxia, Wang Liangsheng, Li Xiaomei, Lu Yingqing. *Advances in molecular basis and evolution of floral color variation. Chinese Bulletin of Botany*) 2006; 23(4): 321-33.
- 3 Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* 2008; 54(4): 733-49.
- 4 Tanaka Y, Bruglira F, Kalc G, Senior M, Dyson B, Nakamura N, et al. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: Practical perspectives. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74(9): 1760-9.
- 5 徐清燊, 戴思兰. 蓝色花卉分子育种. *分子植物育种*(Xu Qingyu, Dai Silan. *Blue flowers' molecular breeding. Molecular Plant Breeding*) 2004; 2(1): 93-9.
- 6 Wang JW, Ming F, Han YY, Shen DL. Flavonoid-3',5'-hydroxylase from *Phalaenopsis*: A novel member of cytochrome P450s, its cDNA cloning, endogenous expression and molecular modeling. *Biotechnol Lett* 2006; 28: 327-34.
- 7 Castellarin SD, Gaspero GD, Marconi R, Nonis A, Peterlunger E, Paillard S, et al. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): Genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics* 2006; 7: 12.
- 8 Akkal S, Benayache F, Benayache S, Jay M. Flavonoids from

- Centaurea incana* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol* 1997; 25(4): 361-2.
- 9 Naonobu N, Yoshiaki K, Naoki K, Kohei K, Masahiko S. Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Physiol Plant* 2004; 122(3): 305-13.
- 10 Mori S, Kobayashi H, Hoshi Y, Kondo M, Nakano M. Heterologous expression of the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida*. *Plant Cell Rep* 2004; 22(6): 415-21.

Cloning and Expression Analysis of Flavonoid 3',5'-hydroxylase in *Strelitzia reginae* Banks

Huang Minling^{1,2,3*}, Fan Ronghui^{1,2,3}

¹*Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China;*

²*Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China;*

³*Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China)*

Abstract The *SrF3'5'H* gene cDNA sequence involved in flavonoid biosynthesis was cloned from the blue petals of *Strelitzia reginae* Banks using RT-PCR and RACE techniques. The cDNA sequence consists of 1 766 bp with an intact open reading frame of 1 509 bp, encoding a polypeptide of 503 amino acids. Homology analysis showed that the deduced *SrF3'5'H* protein was highly homologous to other F3'5'H proteins from different plants. Phylogenetic analysis indicated that *SrF3'5'H* was more related to F3'5'H of *Saintpaulia hybrid cultivar*. The semi-quantitative PCR analysis indicated that *SrF3'5'H* showed the highest transcript abundance in early flowering season and the transcript was abundant in the blue petals but little in yellow sepals.

Key words *Strelitzia reginae* Banks; flavonoid 3',5'-hydroxylase; flavonoid biosynthesis; gene cloning

Received: June 25, 2012 Accepted: July 30, 2012

This work was supported by the Science and Technology Major Project of Fujian Province (No.2010NZ0003), Technology Innovation by Fujian Academy of Agricultural Science (No.CXTD2011-20) and Young Talent Innovation Fund by Fujian Academy of Agricultural Science (No.2011QC-15)

*Corresponding author. Tel: 86-591-87586106, E-mail: pudang12@yahoo.com.cn