

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201605037

引文格式: 郑晟, 毛玉珊, 张腾国, 等. 柠条锦鸡儿 *F3H* 基因克隆及功能分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(6):723-733ZHENG S, MAO YS, ZHANG TG, et al. Cloning and expression analysis of *F3H* gene in *Caragana korshinskii* [J]. Guihaia, 2017, 37(6):723-733

柠条锦鸡儿 *F3H* 基因克隆及功能分析

郑 晟, 毛玉珊, 张腾国*, 聂亭亭

(西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070)

摘 要: 柠条锦鸡儿为豆科灌木,对各种环境胁迫具有较强的适应能力,类黄酮是天然的抗氧化剂,花青素属类黄酮化合物,逆境胁迫会影响植物体内花青素的合成,而黄烷酮 3-羟化酶 (*F3H*) 是花青素生物合成所必需的一种关键酶。该研究成功分离克隆了柠条锦鸡儿的 *F3H* 基因,命名为 *CkF3H*。*CkF3H* 基因的开放阅读框 (ORF) 为 1 095 bp,编码 364 个氨基酸,推测的蛋白质分子量为 41.3 kDa,理论等电点为 5.9。生物信息学分析发现,*CkF3H* 基因序列与其它植物 *F3H* 有较高的一致性,推测 *CkF3H* 蛋白与其它植物 *F3H* 蛋白具有相似的功能。利用染色体步移法克隆得到 *CkF3H* 起始密码子 ATG 上游 468 bp 的启动子序列,PlantCARE 软件分析表明,该序列具有启动子的基本元件 CAAT-box 和 TATA-box 以及多种与逆境胁迫相关的顺式调控元件。实时荧光定量 PCR 分析表明,*CkF3H* 在柠条的根、茎和叶中均有表达,没有组织特异性;*CkF3H* 的表达受低温、高盐、干旱和高温胁迫的诱导,并且在低温胁迫下,*CkF3H* 的表达还受到光周期的影响。综上所述,研究结果表明 *CkF3H* 基因在柠条锦鸡儿适应低温、高盐、干旱和高温胁迫的过程中发挥作用。

关键词: 柠条锦鸡儿, *CkF3H* 基因, 基因克隆, 表达分析, 非生物胁迫

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)06-0723-11

Cloning and expression analysis of *F3H* gene in *Caragana korshinskii*

ZHENG Sheng, MAO Yu-Shan, ZHANG Teng-Guo*, NIE Ting-Ting

(School of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: *Caragana korshinskii* is a kind of shrub belonging to the leguminosae category and it has characteristic of tolerance to stressful conditions. Flavonoids are natural antioxidants that include the groups of notable pigments such as anthocyanins. The adversity stress can influence the biosynthesis of anthocyanins in plants. Flavanone 3-Hydroxylase (*F3H*) is a key enzyme needed for the biosynthesis of anthocyanins. In this study, we successfully isolated, cloned *F3H* gene from *C. korshinskii*. The full length cDNA of *C. korshinskii F3H* gene (designated as *CkF3H*) had an open reading frame (ORF) of 1 095 bp encoding 364 amino acids with a calculated molecular mass of 41.3 kDa as well as an isoelectric point of 5.9. Comparative and bioinformatical analyses revealed that the cloned *CkF3H* from *C. korshinskii* has high identity with *F3H* from other plant species. The deduced *CkF3H* protein showed similarities with other available plant *F3H* proteins. The promoter of *CkF3H* gene was isolated by chromosomal walking and 468 bp sequence was obtained by sequencing. PlantCARE analysis of this sequence showed that the promoter contained some typical elements CAAT-box

收稿日期: 2016-06-30 修回日期: 2016-11-08

基金项目: 国家自然科学基金(31460099);西北师范大学青年教师科研能力提升计划项目(NWNU-LKQN-14-23) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31460099); Youth Teacher Scientific Capability Promoting Project of Northwest Normal University (NWNU-LKQN-14-23)]。

作者简介: 郑晟(1984-),男,甘肃兰州市人,博士,讲师,主要从事植物分子生物学研究,(E-mail) zhengsheng@nwnu.edu.cn。

*通信作者: 张腾国,博士,教授,主要从事抗逆生理及分子生物学研究,(E-mail) zhangtg@nwnu.edu.cn。

and TATA-box and kinds of Cis-acting elements involved in defence and stress responsiveness. RT-PCR analysis revealed that *CkF3H* was expressed in roots, stems, and leaves with almost no tissue specificity. The transcript level of *CkF3H* was increased in response to cold, high salt, drought and high temperature stress. The gene expression of *CkF3H* was influenced by photoperiod in response to cold stresses. The results suggested that *CkF3H* played an important role during cold, high salt, drought and high temperature stress in *C. korshinskii*.

Key words: *Caragana korshinskii*, *CkF3H* gene, gene cloning, expression analysis, abiotic stress

类黄酮(又称黄酮类物质)是一类广泛分布于高等植物中的多酚类次生代谢产物,是存在于植物中的天然色素(Shirley, 1996)。在植物适应特殊生境以及响应生物与非生物胁迫时,类黄酮发挥重要的作用。在植物体内,类黄酮主要以糖基衍生物的形式存在,是植物花、叶、果实和种子的主要显色物质,同时,类黄酮在植物体内也具有很重要的功能。类黄酮具有清除自由基和抗氧化的能力(Jovanovic et al, 1994),此外,类黄酮在人体中也具有多种生物活性,如抗氧化、抗病毒、血管舒张活性、抗癌和防衰老(Pietta, 2000; Heim et al, 2002)。

花青素(Anthocyanidin)为类黄酮化合物,是一种水溶性天然色素,广泛存于自然界的植物中(Sarma et al, 1997)。花青素生物合成途径是黄酮类代谢途径中的一个分支途径,苯丙氨酸是其生物合成的直接前体,经一系列酶促反应合成花青素。由苯丙氨酸合成花青素主要过程如下:苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(PAL)作用下脱去氨基,形成肉桂酸;在肉桂酸羟化酶(C4H)的作用下羟基化,形成4-香豆酸;在4-香豆酸 CoA 连接酶(4CL)的作用下,形成4-香豆酰 CoA;4-香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 在查尔酮合酶(CHS)的催化下合成查尔酮;由查尔酮异构酶(CHI)将其转变成4,5,7-三氢黄酮酮;4,5,7-三氢黄酮酮在黄酮酮3-羟化酶(F3H)的催化下形成二氢黄酮醇,这一阶段产生的二氢黄酮醇可在不同酶的作用下转化为花青素或其它类黄酮物质(二氢槲皮素和二氢杨梅黄酮等)(Holton & Cornish, 1995; Winkel-Shirley, 2001)。

黄酮酮3-羟化酶(flavanone 3 hydroxylase, F3H)基因最早由 Martin et al(1991)从金鱼草中分离得到。对矮牵牛的研究表明, F3H 是分子量为 42 kD 的单体蛋白,在这其中 His220、His278、Arg222 及 Ser290 氨基酸残基对酶活起到了关键作用(Lukacin & Britsch, 1997)。研究发现, *F3H* 基因在拟南芥、矮牵牛、玉米及苜蓿等多种植物中以单拷贝基因的形式存在,而在紫苏中存在 2~3 个拷贝(Gong et al,

1997)。张华玲等(2010)克隆得到苦荞 *F3H* 基因,并对其进行序列分析。结果表明, *FtF3H* 基因长 1 369 bp, 编码 367 个氨基酸,与葡萄、牵牛 *F3H* 的同源性达到 80% 左右。预测的 FtF3H 蛋白具有铁离子结合位点及 2-酮戊二酸结合位点等典型结构。采用电子克隆法,获得了红花菜豆 *F3H* 基因的 cDNA 编码序列,并采用生物信息工具对红花菜豆 *F3H* 基因的性质进行研究。结果表明,红花菜豆 *F3H* 基因开放阅读框为 2 228 bp, 编码 375 个氨基酸,与大豆 *F3H* 基因同源性为 92% (Ma & Guo, 2014)。 *F3H* 基因在花青素合成及环境胁迫中发挥着重要作用。研究表明,阻断拟南芥 *F3H* 基因表达能导致黄酮及花色素水平下降(Wisman et al, 1998)。红砂在干旱和紫外线辐射胁迫中, *F3H* 基因的表达量显著上升,酶活性增强,植物花青素含量和抗氧化能力增强(Liu et al, 2013)。盐胁迫下, *F3H* 基因在茶和转基因烟草中的表达量及酶活性都显著增加(Mahajan & Yadav, 2014)。此外,枸杞 *F3H* 基因在转基因烟草中过表达能够增强其对干旱胁迫的耐受性(Song et al, 2016)。由此可见,当植物受到逆境胁迫时, F3H 促进花青素的积累,增强抗氧化能力,从而抵御逆境。目前已陆续从拟南芥、矮牵牛、玉米、甘蓝型油菜、苜蓿、苹果、康乃馨、银杏及苦荞等多种植物中克隆得到 *F3H* 基因,但在柠条锦鸡儿中未见报道。

柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii*)为豆科锦鸡儿属的灌木类植物,具有较为发达的根系。主要生长于内蒙古西部、陕西北部、宁夏及甘肃(河西走廊)等地区(李高等, 2013),生于半固定和固定沙地,是黄土高原植被建设的优良灌木植物。柠条锦鸡儿具有广泛的适应性和很强的抗逆性,能耐低温及酷热, also 具有很强的抗旱能力,是荒漠、荒漠草原地带的优质防风固沙的植物。另外,柠条锦鸡儿是优良的可再生生物能源,它枝叶繁茂,产草量高,茎叶营养丰富,是畜牧业优良的灌木饲料,还具有抗风、不怕埋没等特点(刘龙会等, 2012; 杨杞等,

2013)。近年来,关于柠条锦鸡儿的研究已受到人们越来越多的关注,选择柠条锦鸡儿为实验材料,为我们的研究提供了更多可能性。

本研究以柠条锦鸡儿为研究对象,从中克隆 *F3H* 基因,对 *F3H* 基因进行生物信息学分析,在不同的逆境处理下检测 *F3H* 基因 mRNA 转录水平的变化,分析其不同胁迫下的基因表达量,并克隆该基因的启动子,对其启动子的功能区进行分析,为研究 *F3H* 基因及花青素在逆境胁迫下的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与培养处理

以柠条锦鸡儿 (*Caragana korshinskii*) 为材料。于 1/2 MS 培养基中培养约 45 d 备用。培养条件: 25 ℃, 光周期 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度 $130 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

低温处理: 将柠条锦鸡儿放入 4 ℃ 培养箱中分别处理 0、12、24、36 和 48 h, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 处理时 0 h 开始先光照; 盐处理: 在 NaCl 浓度为 0、50、100、150 和 200 mmol · L⁻¹ 的培养液中分别处理柠条锦鸡儿植株 24 h; 干旱处理: 在 PEG6000 质量分数为 5%、10%、15% 和 20% 的培养液中分别处理柠条锦鸡儿植株 48 h; 高温处理: 将柠条锦鸡儿植株分别置于 25、30、35、38 和 40 ℃ 培养条件下培养 6 h。

本研究所用菌株为 *E. coli* DH5 α , 克隆载体为 pTG19-T。引物合成及测序服务均由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 柠条锦鸡儿总 RNA 提取及反转录 选取生长良好的柠条锦鸡儿植株, 按照 Trizol (上海生工生物公司) 说明书进行总 RNA 的提取。总 RNA 经过纯度检测后, 按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TakaRa) 试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。

1.2.2 RACE 方法克隆柠条锦鸡儿 *F3H* 基因 cDNA 全长 柠条锦鸡儿 *F3H* 基因中间保守片段克隆: 从 GenBank 中下载已克隆得到的植物 *F3H* 基因序列, 用 DNASTAR 软件 MegAlign 模块进行序列比对, 根据比对结果, 设计简并性引物 Primer 1 和 Primer 2, Primer 3 和 Primer 4 (表 1)。以反转录得到的柠条

锦鸡儿 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物凝胶回收, 连入 pTG19-T 载体, 4 ℃ 过夜连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 ℃ 过夜培养, 蓝白斑筛选后挑取白斑进行菌液 PCR 检测, 挑选阳性克隆, 送北京六合华大基因有限公司测序。

柠条锦鸡儿 *F3H* 基因 3'-RACE 克隆: 提取柠条总 RNA, 按照 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 (TakaRa) 试剂盒说明书进行反转录及 3'-RACE 扩增反应。以试剂盒中提供的两个特异性引物 3'-RACE D1 和 3'-RACE D2 (表 1) 为下游引物, 根据扩增得到的柠条锦鸡儿 *F3H* 中间片段序列, 设计 3'-RACE 扩增上游引物 3'-RACE U1 和 3'-RACE U2 (表 1)。以反转录得到的 cDNA 为模板, 3'-RACE U1, 3'-RACE D1 为引物进行第一次 PCR 扩增, 以一扩产物为模板, 3'-RACE U2, 3'-RACE D2 为引物进行第二次 PCR 扩增, 得到预期大小的片段, 切胶回收, 连接 pTG19-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆测序。

柠条锦鸡儿 *F3H* 基因的 5'-RACE 克隆: 提取柠条锦鸡儿总 RNA, 按照 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (TakaRa) 的说明书进行反转录及 5'-RACE 扩增反应。以试剂盒中提供的两个特异性引物 5'-RACE U1 和 5'-RACE U2 (表 1) 为上游引物, 根据扩增得到的柠条锦鸡儿 *F3H* 中间片段序列, 设计 5'-RACE 扩增下游引物 5'-RACE D1 和 5'-RACE D2 (表 1)。5'-RACE U1 和 5'-RACE D1 为引物进行一次 PCR 扩增, 再以一扩产物为模板, 以 5'-RACE U2 和 5'-RACE D2 为引物进行二次 PCR 扩增, 得到预期大小的片段, 切胶回收, 连接 pTG19-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆测序。

根据柠条锦鸡儿 *F3H* 基因 RACE 测序结果与之前得到的中间片段进行拼接, 得到全长基因, 设计引物扩增 *F3H* 基因的全长, 以验证得到的序列是否正确。PCR 产物纯化回收后, 连接载体, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 37 ℃ 过夜培养, 蓝白斑筛选阳性克隆, 送华大基因公司测序。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 以反转录得到的 cDNA 为模板, 以 ActinF, ActinR 为管家基因引物, F3H-DL U, F3H-DL D 为目的基因引物 (表 1), 对柠条锦鸡儿 *F3H* 基因的表达量进行分析。按照 SYBR Premix Ex TaqTM (TakaRa) 操作说明书于 25 μL 反应体系进行 PCR 扩增, 每个样品做 3 个平行重复, 每

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence

基因 Gene	引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	注释 Note
<i>CkF3H</i>	Primer1	5'-CTCGCCGGAATCGA(A/C)GA(T/G)T-3'	中间片段 Intermediate fragment
	Primer2	5'-GTTGAGGGCATTTTGG(G/A)TAG(A/T)(A/T)A-3'	中间片段 Intermediate fragment
	Primer3	5'-ACCCAATCAGGGAGAGAGACTAC-3'	中间片段 Intermediate fragment
	Primer4	5'-GGTGCTGG(A/G)TT(C/T)TGGAATGTG-3'	中间片段 Intermediate fragment
	3'-RACE U1	5'-AATGCCCCCAACCTGACCTC-3'	3'-RACE
	3'-RACE D1	5'-TACCGTCGTTCCACTAGAGATTT-3'	3'-RACE
	3'-RACE U2	5'-CTTCAGGCTACTAGGGACAATGGT-3'	3'-RACE
	3'-RACE D2	5'-CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3'	3'-RACE
	5'-RACE U1	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGG-3'	5'-RACE
	5'-RACE D1	5'-GGCTTGTCTGCCCACCTTGACT-3'	5'-RACE
	5'-RACE U2	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	5'-RACE
	5'-RACE D2	5'-AAACGGGTCATGTCGGAATG-3'	5'-RACE
	Primer P1	5'-GCGAAACGGGTCATGTCGGAATG-3'	启动子克隆 Promoter clone
	Primer P2	5'-CTCTGCGGCCATGGACCTCGTC-3'	启动子克隆 Promoter clone
	Primer P3	5'-CGTCCGAACGAAGCTGGAGTCA-3'	启动子克隆 Promoter clone
	F3H-DL U	5'-AAAATGCCCCCAACCTGACCT-3'	定量 PCR Quantitative PCR
	F3H-DL D	5'-GTAGCCTGAAGGCCACCCACTT-3'	定量 PCR Quantitative PCR
<i>Actin</i>	Actin F	5'-TCAGGCTGTCCTTTCCCTTTATGC-3'	定量 PCR Quantitative PCR
	Actin R	5'-CCACGCTCGGTCAAGATTTTCATT-3'	定量 PCR Quantitative PCR

一种胁迫处理做 3 次生物学重复。

反应体系如下:SYBR Premix Ex Taq™ 12.5 μL, F3H-DL U、F3H-DL D 或 ActinF、ActinR (10 μmol·L⁻¹)各 1 μL,cDNA 2 μL,ddH₂O 8.5 μL。扩增程序:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 20 s,40 个循环;55~95℃ 每 30 s 渐进升高 0.5℃,81 个循环。扩增结束后,采用 2^{-△△Ct} 法分析数据,确定基因的相对表达量。

1.2.4 克隆柠条锦鸡儿 *F3H* 基因启动子 选取生长良好的柠条锦鸡儿植株,用 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0(TakaRa)试剂盒提取其幼嫩叶片中的基因组 DNA,根据已知的柠条锦鸡儿 *F3H* 基因全长序列设计特异性引物,按照 Genome Walking Kit(TakaRa)试剂盒克隆 *CkF3H* 基因的启动子序列。根据染色体步移的测序结果及 *CkF3H* 基因的全长序列设计一对基因特异性引物,以基因组 DNA 为模板,按照 Premix Ex Taq DNA Polymerase(Taka-

Ra)说明书进行 PCR 扩增,进一步验证启动子克隆的正确性。

1.2.5 柠条锦鸡儿 *F3H* 基因的生物信息学分析 用 DNASTar 软件的 Protean 模块对柠条锦鸡儿 *F3H* 基因进行氨基酸组成分和蛋白基本特征分析,用 Clustal 方法构建以氨基酸序列为基础的系统进化树;用在线工具 SOPMA 预测柠条锦鸡儿 F3H 蛋白的二级结构;根据生物信息学软件 TopPred (<http://services.cbib.u-bordeaux2.fr/pise/Toppred.html>)、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)、SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) 在线分析柠条锦鸡儿 F3H 蛋白的亲水/疏水性以及跨膜结构域。用在线分析软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析柠条锦鸡儿 *F3H* 基因启动子序列,根据启动子序列中所含的功能元件预测启动子的功能。

2 结果与分析

2.1 *CkF3H* 基因的克隆

利用已经克隆报道的植物 *F3H* 基因序列,通过分析在其保守区设计两对简并引物,从柠条锦鸡儿叶片中提取总 RNA,并以其反转录的 cDNA 为模

板,扩增得到 500 bp 和 400 bp 左右的两条单一条带(图 1:A)。将这两个基因片段经测序后拼接得到一条长度为 760 bp 的中间片段。再通过 3'-RACE 和 5'-RACE 分别扩增得到 530 bp 与 400 bp 大小的基因片段(图 1:B, C),经过测序后发现,与前面扩增得到的中间片段核苷酸序列有完全一致的重叠部分,说明以上克隆得到的片段均属于同一条基因。

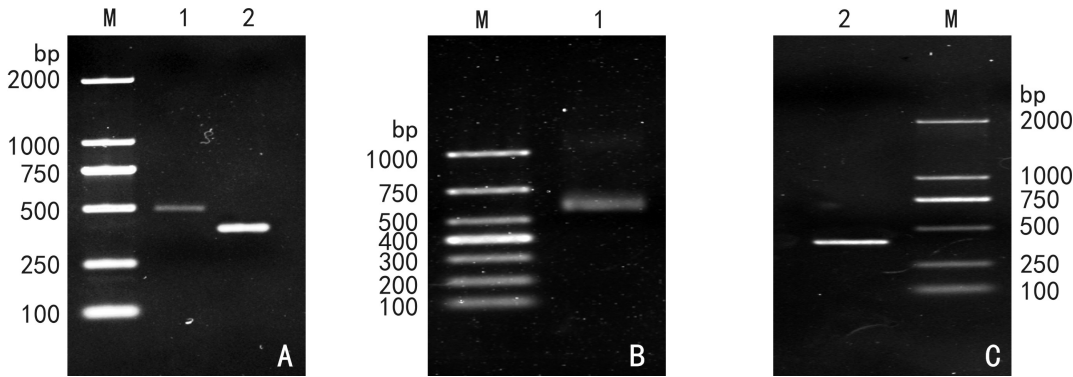


图 1 *CkF3H* 基因的克隆 M. 分子量标准; A: 1、2. *CkF3H* 基因片段; B: 1. 3'-RACE 扩增; C: 2. 5'-RACE 扩增。

Fig. 1 Cloning of *CkF3H* gene in *Caragana korshinskii* M. Molecular Marker; A: 1, 2. Amplification of *CkF3H* fragment; B: 1. Amplification result of 3'-RACE; C: 2. Amplification result of 5'-RACE.

AAACTCAGCATTATATGTTTCAACAATCAACACCGAAGCAACCAAGCAAACCCACAAAGAGCACCAGCCAAAGCCAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTCTTAACA
AAACAATGGCACCAGCGAAAACCTCTCACATATCTGGCACAGGAAAAGACCCCTTGACTCCAGCTTCGTTTCGGGACGAGACGAGCGCCCAAAAGTTGCTTACAACACGTTCT
M A P A K T L T Y L A Q E K T L D S S F V R D E D E R P K V A Y N Q F
AGCAATGAGATCCCGTCATTTCTCTCACCGGAATCGACGAGGTCCATGGCCGACAGAGCAGAGATTGCAACAAGATCGTGGAGGCATGCGAGAAGCTGGGGTATCTTCCA
S N E I P V I S L T G I D E V H G R R A E I C N K I V E A C E N W G I F Q
GGTCGTTGACCATGGTGTGACCAAAACCTCATTTCCGACATGACCCGTTTCGCCAAACAGTTCTTCGATTGCCCCCTGAAGAGAAGCTTCGCTTTGACATGTCCGGTG
V V D H G V D Q N L I S D M T R F A K Q F F D L P P E E K L R F D M S G
GCAAAAAGGGTGGTTTTATTGTCTCTAGCCATCTCCAAGGAGAATCGGTGAAGGATTGGAGAGAGATAGTGACGTATTTTCATACCCAATCAGGGAGAGAGACTACTCA
G K K G G F I V S S H L Q G E S V K D W R E I V T Y F S Y P I R E R D Y S
AGGTGGCCAGACAAGCCAGAAGGGTGGAAAGGGGTAACGGAGCAATACAGCGAGAAGCTGATGGGTTTGGCATGCAAGCTGTTGGAGGTGTTGTGCGAGGCTATGGGGTT
R W P D K P E G W K G V T E Q Y S E K L M G L A C K L L E V L S E A M G L
AGAGAAGGAGGCTCTTACAAGGCATGTGTTGATATGGATCAGAAGGTTGTGATCAATTATTACCCAAAATGCCCAACCTGACCTCACTCTTGGGCTGAAGCGACACA
E K E A L T K A C A C V D M D Q K V V I N Y Y P K C P Q P D L T L G L K R H
CTGACCCCTGGCACCATCACTCTGCTGCTTCAGGACCAAGTGGGTGGCCTTCAGGCTACTAGGGACAATGGTAATACGTGGATCACCCTTCAGCCAGTGGAGGTGCTTTTC
T D P G T I T L L L Q D Q V G G L Q A T R D N G N T W I T V Q P V E G A F
GTTGTTAATCTTGAGACCATGGTCACTATCTGAGTAATGGGAGGTTCAAAAATGCTGATCACCAGCAGTGGTCAACTCAAACCTACAGCCGTTTGTCCATAGCTACGTT
V V N L G D H G H Y L S N G R F K N A D H Q A V V N S N Y S R L S I A T F
CCAAAACCCAGCACCAGATGCAACTGTGTACCCTTTGAAGGTTAGAGAGGGAGAGAACTGTGCTGGAGGAACCAATCACTTTTGAGAAATGTATAGGAGGAAGATGA
Q N P A P D A T V Y P L K V R E G E K P V L E E P I T F A E M Y R R K M
GCAAGGACCTTGAGATTGCTAGGATGAAGAAGCAGGCTAGGGAAGAAAGAAATTTGAGGGACTTGGAGAGGCAAACTTGAGGCCAAGCCTTTGAATGAGATTCTTGCTTAG
S K D L E I A R M K K Q A R E K E L R D L E K A K L E A K P L N E I L A *
AATTTAATTTAGAGATCATTGCTCCCTCATCTTTGTGTTTTTTTTTTGTTAAAGCCAAAGCATGTGTTGTCTTTTCGTTGAATATTTATATTGGTCTTTGTCTCCTCGTG
GTCGTGGAGATGTACACGATGCATTTGCTTATGTCTCAGGATCCAACGAGGACTCTGTAAGCCATATCATCATCATCATAAATAATACAATTATGAATCCTTAAAGAAAA
AAAAAAA

图 2 *CkF3H* 基因 cDNA 序列及预测氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *CkF3H* gene

将扩增得到的中间片段以及 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增得到的片段序列进行拼接,得到了一条全长 1 437 bp 的基因序列(图 2),包含一个 1 095 bp 的开放阅读框(ORF),编码 364 个氨基酸。起始密码

子 ATG 前面有一段 115 bp 的 5'非翻译区(5'UTR),终止密码子 TAG 后面有一段 227 bp 的 3'非翻译区(3'UTR),包含 15 bp 的 polyA。为了进一步确定以上拼接序列的正确性,我们用特异引物对全长序列

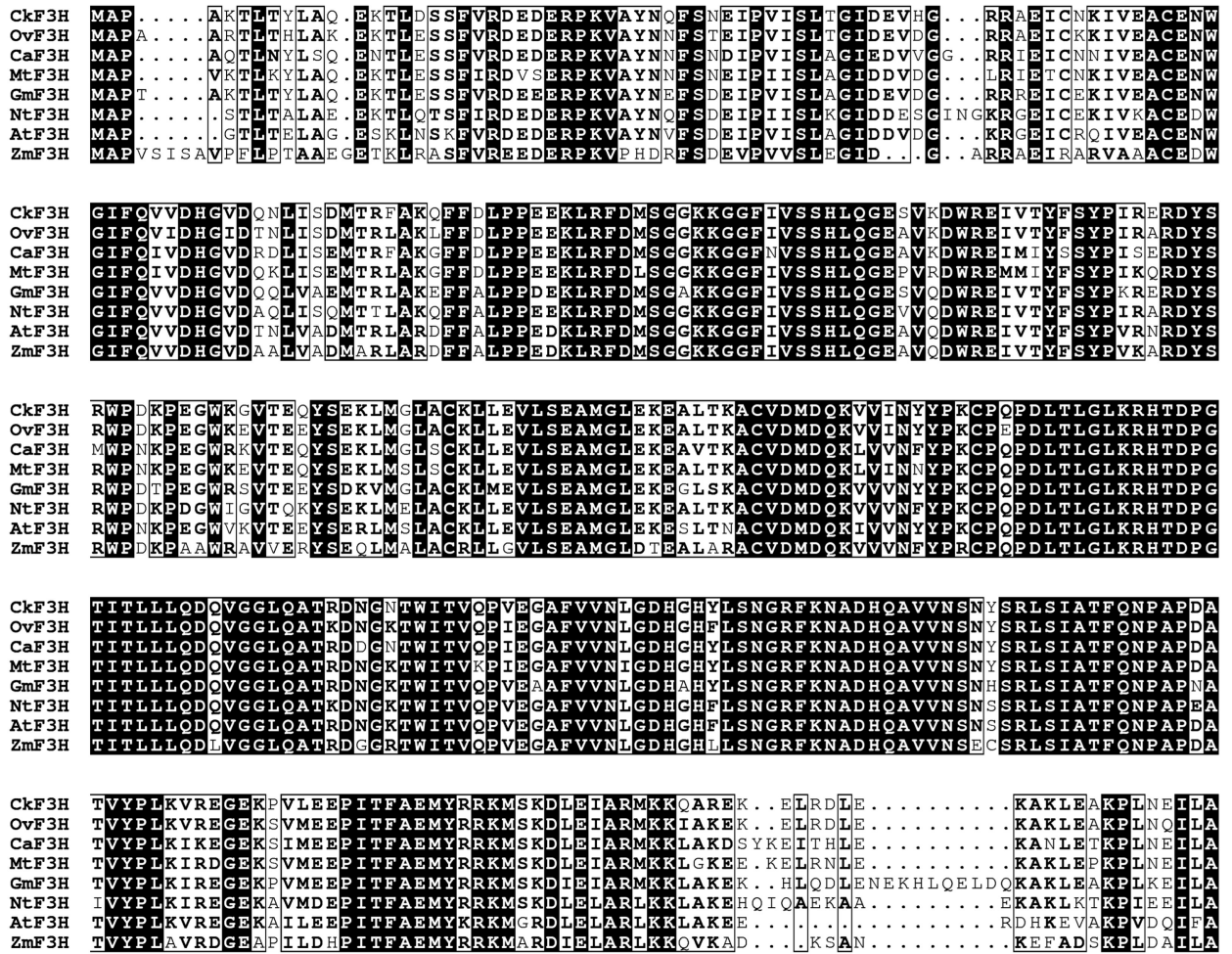


图 3 CkF3H 与其它植物 F3H 氨基酸序列比对
Fig. 3 Alignment of the CkF3H with F3H from other plant species

进行了扩增克隆,经比对与拼接序列的核苷酸组成完全相同。

与 GenBank 数据库中的序列进行比对,该片段与其它物种 *F3H* 基因的序列相似性为 73%~89%,由此可以确定获得的该序列片段属于柠条锦鸡儿中的 *F3H* 基因,我们命名为 *CkF3H*。

2.2 CkF3H 预测氨基酸序列与其他植物氨基酸序列比对分析

根据得到的 *CkF3H* 基因全长序列,利用 Vised11 软件推导其氨基酸序列(图 2)。通过 SOPMA 对柠条锦鸡儿 *F3H* 预测蛋白的二级结构进行预测,结果显示:其蛋白包含 37.09%的 α -螺旋(Alpha helix)、22.8%的延伸链(Extended strand)、11.26%的 β -转角(Beta turn)和 28.85%的无规则卷曲(Random coil)。

从 Genbank 中下载已经克隆得到的植物 *F3H* 基因序列,利用 ClustalX 2.1 软件对柠条锦鸡儿、红豆草、蒺藜苜蓿、大豆、鹰嘴豆、烟草、拟南芥、玉米 *F3H* 基因编码的氨基酸序列进行比对(图 3)。进一步分析发现,CkF3H 与红豆草 OvF3H 同源性最高,达到了 89.3%,与蒺藜苜蓿 MtF3H,大豆 GmF3H,鹰嘴豆 CaF3H,棉花 GhF3H,兔眼蓝莓 VaF3H,拟南芥 AtF3H 的同源性分别为 85.8%, 85.0%, 83.9%, 79.3%,78.1%,73.6%。同时,利用 MEGA 5.02 软件,对已报道的部分 *F3H* 蛋白进行了聚类分析,构建了 *F3H* 基因的系统进化树(图 4)。

2.3 CkF3H 基因启动子的克隆及分析

以柠条锦鸡儿中提取到的总 DNA 为模板,进行巢式 PCR 扩增,经过第 3 次 PCR 扩增后在 600 bp 处有一明显条带(图 5),回收后测序。结果表明,成

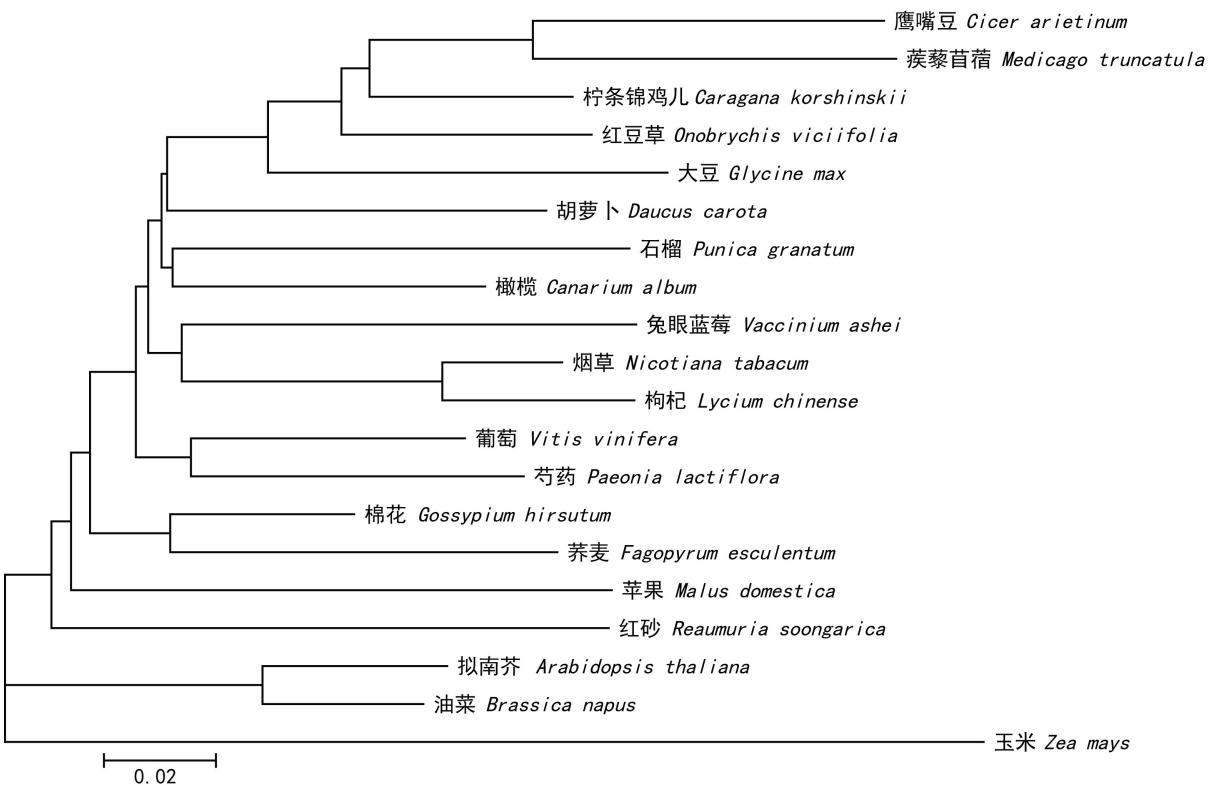


图 4 CkF3H 蛋白与其它植物 F3H 蛋白系统进化树分析 *F3H* 基因 GenBank 登录号:红豆草(HM204483)、鹰嘴豆(XM_004509301)、蒺藜苜蓿(XM_003629272)、大豆(FJ770474)、石榴(KF841617)、兔眼蓝莓(AB610765)、枸杞(KJ636468)、烟草(AB289450)、胡萝卜(AF184270)、葡萄(EF192467)、芍药(JQ070802)、橄榄(JF728820)、棉花(GU434116)、拟南芥(U33932)、油菜(DQ288239)、苹果(AF117270)、荞麦(HM149789)、红砂(JQ043380)、玉米(NM_001136803)。

Fig. 4 Phylogenetic tree of CkF3H protein and F3H proteins from other plant species *F3H* genes GenBank accession number: *Onobrychis viciifolia* (HM204483), *Cicer arietinum* (XM_004509301), *Medicago truncatula* (XM_003629272), *Glycine max* (FJ770474), *Punica granatum* (KF841617), *Vaccinium ashei* (AB610765), *Lycium chinense* (KJ636468), *Nicotiana tabacum* (AB289450), *Daucus carota* (AF184270), *Vitis vinifera* (EF192467), *Paeonia lactiflora* (JQ070802), *Canarium album* (JF728820), *Gossypium hirsutum* (GU434116), *Arabidopsis thaliana* (U33932), *Brassica napus* (DQ288239), *Malus domestica* (AF117270), *Fagopyrum esculentum* (HM149789), *Reaumuria soongarica* (JQ043380), *Zea mays* (NM_001136803).

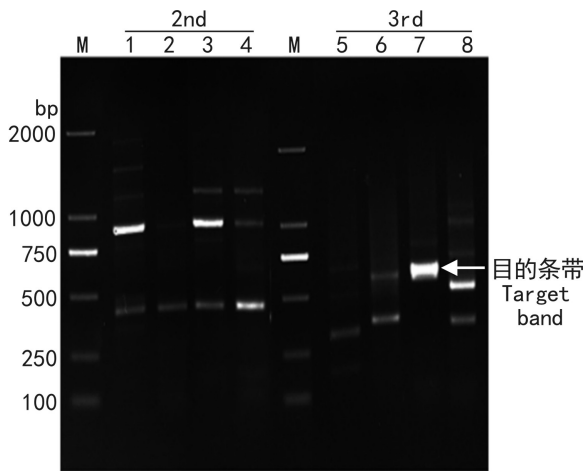


图 5 2nd 和 3rd 步移 PCR 产物电泳图

Fig. 5 Electrophoretic results of the 2nd and 3rd walking PCR

功克隆得到了 *CkF3H* 基因起始密码子 ATG 上游启动子序列 468 bp。采用 PlantCARE 软件进行基础启动子区及调控元件分析(图 6),发现该序列具有启动子基本元件 CAAT-box 和 TATA-box。三个高水平转录调控因子 5' UTR 嘧啶密集区 5UTR Py-rich stretch,分别位于-506 bp、-508 bp、-510 bp 处。一个与缺氧有道相关的元件 ARE,位于+178 bp 处。一个光反应元件 ATCT-motif、Box-I、Box-III、G-box、两个 Sp1,分别位于-36 bp、-261 bp、+382 bp、-257 bp、+229 bp 和 +302 bp。一个真菌诱导应答元件 Box-W1,位于+298 bp。两个分生组织特意表达调控元件 CCGTCC-box,分别位于+460 bp 和-603 bp。一个与 Me Ja 和 ABA 等激素响应相关的作用元件 CGTCA-motif,位于+422 bp 处。一个胚乳中特意表

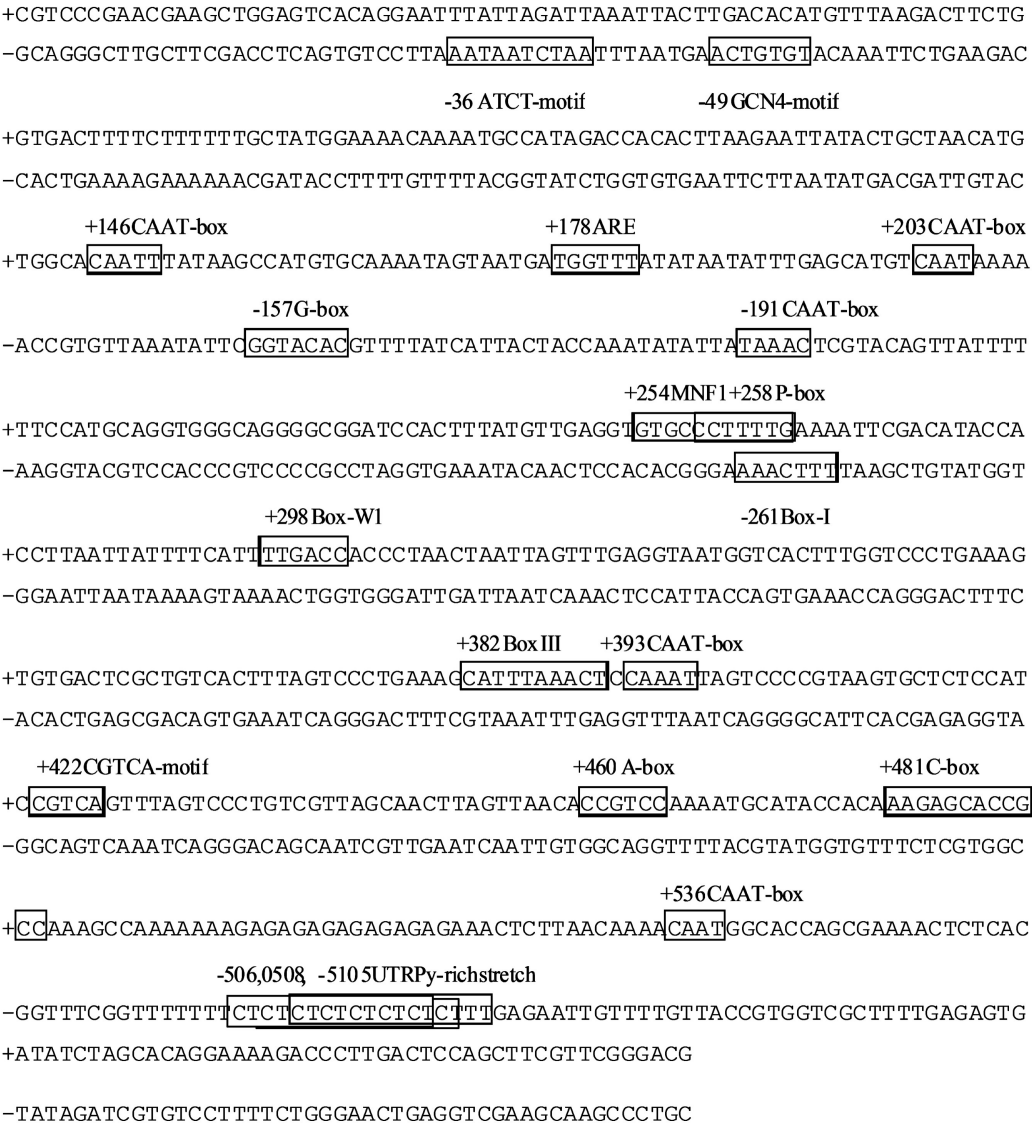


图 6 PlantCARE 分析 *CkF3H* 基因启动子序列的结果

Fig. 6 Nucleotide sequence of cloned *CkF3H* gene promoter by PlantCARE

达所需的正调控元件 GCN4-motif, 位于-49 bp 处。一个与高温胁迫相关的调控元件 HSE, 位于+263 bp 处。一个赤霉素应答元件 P-box, 位于+258 bp 处。一个激素敏感型顺式作用元件 TGA-element, 位于-438 bp 处。一个茉莉酸甲酯作用元件, 位于-422 bp 处。一个 WRKY 转录因子结合位点 W box, 位于+298 bp 处。此外, 通过软件分析还发现该启动子还具有 C-box, MNF1 等高效作用元件。

2.4 *CkF3H* 基因表达分析

以柠条锦鸡儿根、茎和叶中提取的 mRNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR, 分

析 *CkF3H* 基因在不同组织的表达。结果表明, *CkF3H* 基因在柠条锦鸡儿的根、茎、叶中均有表达, 没有组织特异性(图 7)在叶片中表达量最高, 其次是茎和根。

通过在 4 ℃ 低温处理我们发现, *CkF3H* 基因的表达受低温胁迫诱导。将柠条锦鸡儿植株在 4 ℃ 处理 12、24、36 和 48 h 后, *CkF3H* 基因转录水平与对照(0 h) 相比, 分别提高了 25.81、7.62、52.71 和 23.75 倍(图 8)。 *CkF3H* 基因的表达量呈现先上升后下降的趋势, 在 4 ℃ 处理 36 h 达到最大, 转录水平最高。

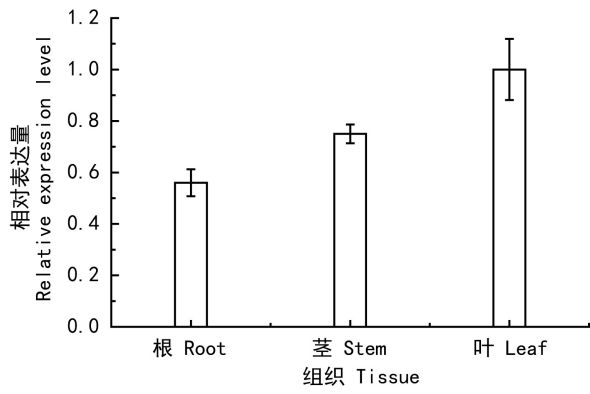


图 7 *CkF3H* 基因在不同组织中的表达
Fig. 7 Expression of *CkF3H* gene in different tissues

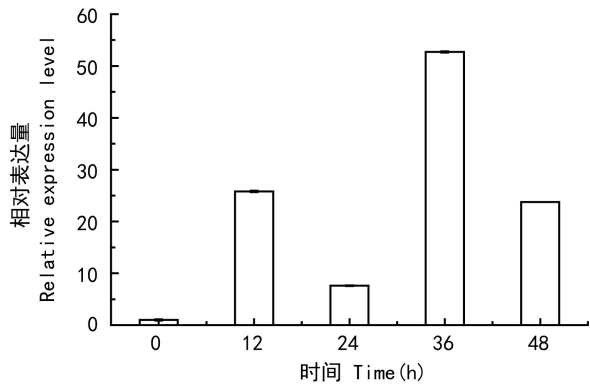


图 8 低温(4 °C)胁迫下 *CkF3H* 基因在柠条锦鸡儿中的表达
Fig. 8 Expression of *CkF3H* gene in *Caragana korshinskii* under cold (4 °C) treatment

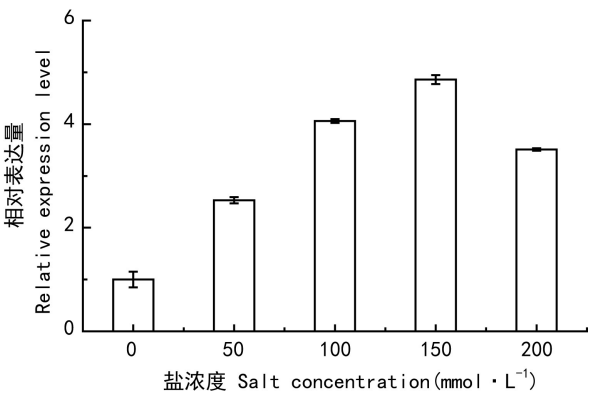


图 9 盐胁迫下 *CkF3H* 基因在柠条锦鸡儿中的表达
Fig. 9 Expression of *CkF3H* gene in *Caragana korshinskii* under salt treatment

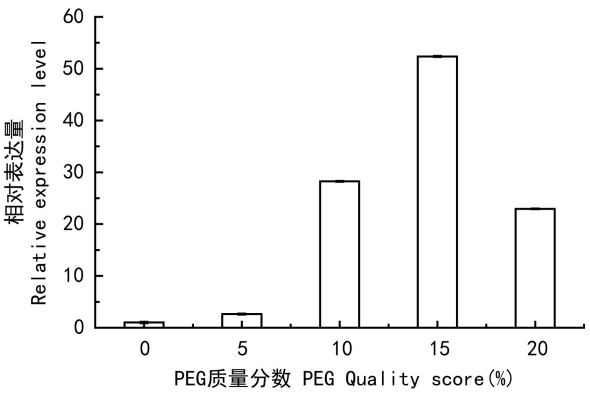


图 10 干旱胁迫下 *CkF3H* 基因在柠条锦鸡儿中的表达
Fig. 10 Expression of *CkF3H* gene in *Caragana korshinskii* under drought treatment

通过盐胁迫处理我们发现, *CkF3H* 基因的表达也受高浓度 NaCl 的诱导。当培养基中 NaCl 浓度为 50、100、150 和 200 mmol · L⁻¹ 时, *CkF3H* 基因的表达与对照相比, 分别提高了 2.53、4.06、4.86 和 3.51 倍, 其表达呈先上升后下降的趋势。当 NaCl 浓度为 150 mmol · L⁻¹ 时, *CkF3H* 基因的转录水平达到最大值, 表达最强 (图 9)。

通过模拟干旱胁迫我们发现, 培养基中添加 5%、10%、15% 和 20% 的 PEG6000 后, *CkF3H* 基因转录水平与对照相比, 分别提高了 2.62、28.25、52.35 和 22.94 倍, 其表达量也呈现先升高后下降的趋势, 在 PEG6000 质量分数为 15% 时达到最高 (图 10)。说明 *CkF3H* 基因在适应干旱胁迫的过程中发挥作用。

通过高温胁迫处理我们发现, *CkF3H* 基因转录水平的表达也受高温诱导。将柠条植株在 30、35、38 和 40 °C 的处理下, *CkF3H* 基因的转录水平与对照相比, 分别上升了 76.64、34.3、37.27 和 89.26 倍 (图 11), 在 40 °C 时, *CkF3H* 基因的转录水平达到最大。以上结果表明 *CkF3H* 基因对高温胁迫的诱导较为敏感。

3 讨论

黄酮类苯环上的羟基是具有抗氧化活性的关键基团, 对氧自由基有很强的清除作用 (郭春梅等, 2012; 陈季武等, 2002)。当植物处于逆境胁迫时, 它可将自身的氢供给脂类化合物的自由基, 抑制脂

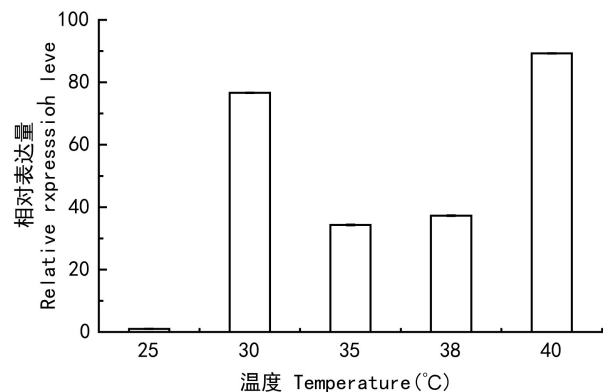


图 11 高温胁迫下 *CkF3H* 基因在柠条锦鸡儿中的表达

Fig. 11 Expression of *CkF3H* gene in *Caragana korshinskii* under high temperature treatment

类的进一步氧化,从而减少膜质损伤。黄烷酮 3-羟化酶(F3H)是重要的生物合成中间产物酶,参与黄酮醇、儿茶酚、花青素以及原花青素的生物合成(Prescott & John, 1996)。研究表明,生物胁迫与非生物胁迫能够诱导 *F3H* 基因的表达(Jeong et al, 2004)。在干旱、高盐、低温以及激素胁迫下,*F3H* 基因的表达均有上升(Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996)。许志茹等(2008)对茼蒿 *F3H* 在 UV-A 诱导下的表达量进行分析,发现 *F3H* 基因的表达量与 UV-A 处理的时间呈相关性。范敏等(2008)研究表明,马铃薯 *F3H* 基因的表达量在不同干旱胁迫下都有不同程度的增加,且叶中 *F3H* 基因受干旱诱导的时间比根中长,说明 *F3H* 基因参与了马铃薯的抗旱反应。

本研究从柠条锦鸡儿中克隆了 *CkF3H* 基因,并分析了在逆境胁迫下其转录水平表达量的变化:在低温、高盐以及干旱胁迫下,*CkF3H* 基因的表达量均呈现先升高后下降趋势,且均高于对照水平。由此可见,*CkF3H* 基因在柠条锦鸡儿抵御低温、高盐和干旱胁迫过程中发挥了重要作用。其中,在低温胁迫处理下,*CkF3H* 基因在 0、24、48 h 时表达较低,12、36 h 的表达量较高,可能受到光周期的影响(图 8);先前研究发现,在光处理条件下葡萄皮中 *F3H* 基因表达以及花青素含量均显著高于黑暗处理(Azuma et al, 2012),将苹果从暗处转移至光照条件下,其表皮中 *F3H* 基因表达显著上调(Feng et al, 2013)。因此,在低温胁迫下,*CkF3H* 基因表达可能受低温及光照共同影响。此外,对 *CkF3H* 基因启动

子区进行生物信息学分析发现:其启动子含有与光、ABA 及高温等胁迫诱导相关的顺势作用元件。*CkF3H* 基因在转录水平表达量的变化也表明了该基因受高温的诱导,且温度越高,表达量变化越明显。由于类黄酮在植物营养及生理方面具有重要作用,因此,了解类黄酮代谢途径是非常必要的。克隆分析编码此途径中关键酶的基因,是认识类黄酮生物合成调控机制的重要途径,也是进一步了解类黄酮生物学意义的基础。

参考文献:

- AZUMA A, YAKUSHIJI H, KOSHITA Y, et al, 2012. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions [J]. *Planta*, 236 (4): 1067–1080.
- CHEN JW, HU TX, ZHU DY, 2002. Study on structure-activity relationship of eleven natural flavonoids scavenging superoxide anion [J]. *Chin Pharm J*, 37(1): 57–58. [陈季武, 胡天喜, 朱大元, 2002. 11 种黄酮类化合物清除超氧阴离子的构效关系研究 [J]. *中国药学杂志*, 37(1): 57–58.]
- FAN M, JIN LP, HUANG SW, et al, 2008. Effects of drought on gene expressions of key enzymes in carotenoid and flavonoid biosynthesis in Potato [J]. *Acta Horti Sin*, 35(4): 535–542. [范敏, 金黎平, 黄三文, 等, 2008. 干旱胁迫对马铃薯类黄酮和类胡萝卜素合成关键酶基因表达的影响 [J]. *园艺学报*, 35 (4): 535–542.]
- FENG F, LI M, MA F, et al, 2013. Phenylpropanoid metabolites and expression of key genes involved in anthocyanin biosynthesis in the shaded peel of apple fruit in response to sun exposure [J]. *Plant Physiol Biochem*, 69: 54–61.
- GONG Z, YAMAZAKI M, SUGIYAMA M, et al, 1997. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens* [J]. *Plant Mol Biol*, 35(6): 915–927.
- GUO CM, LIU SQ, GUO YM, et al, 2012. Function-structure association of flavonoid phytochemicals on scavenging hydroxyl radical($\text{HO}\cdot$) [J]. *Nat Prod Res Dev*, 24(12): 1724–1728. [郭春梅, 刘淑清, 郭一萌, 等, 2012. 黄酮类化合物清除羟自由基($\text{HO}\cdot$)功能及其构效关系研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 24(12): 1724–1728.]
- HEIM KE, TAGLIAFERRO AR, BOBILYA DJ, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships [J]. *J Nutr Biochem*, 13(10): 572–584.
- HOLTON TA, CORNISH EC, 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 7(7): 1071–1083.
- JEONG ST, GOTO-YAMAMOTO N, KOBAYASHI S, et al, 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins [J]. *Plant Sci*, 167(2): 247–252.
- JOVANOVIC SV, STEENKEN S, TOSIC M, et al, 1994. Flavonoids as antioxidants [J]. *J Am Chem Soc*, 116(11).
- LI G, YANG Q, ZHANG Y, et al, 2013. Cloning and sequence analysis of the *CkC3H* gene from *Caragana korshinskii* Kom. and preliminary studies of its function [J]. *Chin Biotechnol*, 33(4):

- 61-67. [李高, 杨杞, 张烨, 等, 2013. 柠条锦鸡儿香豆酸-3-羟化酶基因克隆及其功能初步研究 [J]. 中国生物工程杂志, 33(4): 61-67.]
- LIU LH, SONG GU, GUO YJ, et al, 2012. Microsporogenesis and male gametophyte development of *Caragana korshinskii* Kom. [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 32(1): 81-84. [刘龙会, 古松, 郭亚娇, 等, 2012. 柠条锦鸡儿小孢子发生和雄配子体发育 [J]. 西北植物学报, 32(1): 81-84.]
- LIU M, LI X, LIU Y, et al, 2013. Regulation of flavanone 3-hydroxylase gene involved in the flavonoid biosynthesis pathway in response to UV-B radiation and drought stress in the desert plant, *Reaumuria soongorica* [J]. Plant Physiol Biochem, 73(6): 161-167.
- LUKACIN R, BRITSCH L, 1997. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase [J]. Eur J Biochem, 249(3): 748-757.
- MA G, GUO JP, 2014. In silico cloning and sequence analysis of *F3H* gene in *Phaseolus coccineus* [J]. Mod Food Sci Technol, 30(4): 6-9, 33.
- MAHAJAN M, YADAV SK, 2014. Overexpression of a tea flavanone 3-hydroxylase gene confers tolerance to salt stress and *Alternaria solani* in transgenic tobacco [J]. Plant Mol Biol, 85(6): 551-573.
- MARTIN C, PRESCOTT A, MACKAY S, et al, 1991. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus* [J]. Plant J, 1(1): 37-49.
- PIETTA PG, 2000. Flavonoids as antioxidants [J]. J Nat Prod, 63(7): 1035-1042.
- PRESCOTT AG, JOHN P, 1996. DIOXYGENASES: Molecular structure and role in plant metabolism [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 47(245-271).
- SARMA AD, SREELAKSHMI Y, SHARMA R, 1997. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation [J]. Phytochemistry, 45(4): 671-674.
- SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, 1996. Molecular responses to drought and cold stress [J]. Curr Opin Biotechnol, 7(2): 161-167.
- SHIRLEY BW, 1996. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway [J]. Trends Plant Sci, 1(11): 377-382.
- SONG XY, DIAO JJ, JI J, et al, 2016. Molecular cloning and identification of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Lycium chinense*, and its overexpression enhances drought stress in tobacco [J]. Plant Physiol Biochem, 98: 89-100.
- WINKEL-SHIRLEY B, 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. Plant Physiol, 126(2): 485-493.
- WISMAN E, HARTMANN U, SAGASSER M, et al, 1998. Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 95(21): 12432-12437.
- XU ZR, CUI GX, LI CL, et al, 2008. Cloning sequence analysis and expression of flavanone 3-hydroxylase gene in Turnip [J]. Mol Plant Breed, 6(4): 787-792. [许志茹, 崔国新, 李春雷, 等, 2008. 芜菁黄烷酮 3-羟化酶基因的克隆、序列分析及表达 [J]. 分子植物育种, 6(4): 787-792.]
- YANG Q, ZHANG T, WANG Y, et al, 2013. Construction of a suppression subtractive hybridization library of *Caragana korshinskii* Kom. under drought stress and cloning of *CkWRKY1* gene [J]. Sci Sil Sin, 49(7): 62-68. [杨杞, 张涛, 王颖, 等, 2013. 干旱胁迫下柠条锦鸡儿叶片 SSH 文库构建及 *CkWRKY1* 基因克隆 [J]. 林业科学, 49(7): 62-68.]
- ZHANG HL, HUANG YS, YANG CX, et al, 2010. Molecular cloning and sequences analysis of flavanone 3-hydroxylase gene from *Fagopyrum tataricum* [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 30(3): 447-452. [张华玲, 黄元射, 杨春贤, 等, 2010. 苦荞黄烷酮 3-羟化酶基因 *F3H* 的克隆及序列分析 [J]. 西北植物学报, 30(3): 447-452.]
- pests and diseases; a review [J]. J Henan Norm Univ (Nat Sci Ed), 43(2): 119-125. [张宝成, 白艳芬, 陈骥, 2015. 病虫害侵染对植物光合作用影响研究进展 [J]. 河南师范大学学报 (自然科学版), 43(2): 119-125.]
- ZHANG BC, BAI YF, WU L, 2016. Effect of climatic change on the breeding phenology of three kinds of herbaceous plants from Qinghai Lake [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med (1): 126-129. [张宝成, 白艳芬, 吴霖, 2016. 气候变化对青海湖三种草本植物繁殖物候的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医 (1): 126-129.]
- ZHANG HP, LI MD, 2016. Effects of water stress and rewetting on chlorophyll content in pea leaves [J]. Agric Res Arid Areas, 34(2): 177-181. [张红萍, 李明达, 2016. 水分胁迫后复水对豌豆叶片叶绿素含量的影响 [J]. 干旱地区农业研究, 34(2): 177-181.]
- ZHANG Z, XU L, ZHU XM, 2010. Effect on species diversity of plant communities caused by invasion of *Alternanthera philoxeroides* in different habitats [J]. Acta Pratac Sin, 25(10): 2056-2061. [张震, 徐丽, 朱晓敏, 2010. 喜旱莲子草对不同生境植物群落多样性的影响 [J]. 草业学报, 19(4): 10-15.]
- ZHU ZH, LIU JX, ZHENG W, 2005. Influences of resources availability and intraspecific competition on *Elymus nutans* growth and reproduction [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin [J], 25(10): 2056-2061. [朱志红, 刘建秀, 郑伟, 2005. 资源获得性和种内竞争对垂穗披碱草生长繁殖的影响 [J]. 西北植物学报, 25(10): 2056-2061.]

(上接第 706 页 Continue from page 706)