

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201703031

引文格式: 张华玲, 刘绪, 杨春贤, 等. 甘薯肉桂酸-4-羟化酶基因克隆及序列分析 [J]. 广西植物, 2018, 38(4):501-508

ZHANG HL, LIU X, YANG CX, et al. Molecular cloning and sequence analysis of acid-4-hydroxylase gene from sweet potato [J]. *Guihaia*, 2018, 38(4):501-508

甘薯肉桂酸-4-羟化酶基因克隆及序列分析

张华玲¹, 刘 绪^{1*}, 杨春贤², 黄元射³, 傅玉凡², 张启堂²

(1. 成都师范学院 化学与生命科学学院, 成都 611130; 2. 西南大学 生命科学学院, 重庆市甘薯工程技术研究中心, 重庆 400715; 3. 安顺学院 农学院, 贵州 安顺 561000)

摘 要: 肉桂酸-4-羟化酶(Cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H, EC 1.14.13.11)是苯丙烷途径中第二步反应酶,同时也是花色苷前体生物合成途径中关键酶。该研究根据植物 C4H 的同源序列设计引物,通过 RT-PCR 结合 RACE 的方法,在紫色甘薯中获得了与其相应的 C4H 基因,命名为 *IbC4H* (GenBank 登录号 GQ373157)。结果表明:(1)序列分析表明 *IbC4H* 长1 668 bp,编码 505 个氨基酸,该氨基酸序列与其 cDNA 序列与 *IbC4H* 蛋白与马铃薯 C4H 蛋白序列最为接近,与苹果、黑莓、大阿米芹、油菜一致性很高,均在 70% 以上。(2)二级结构预测表明 α -螺旋和无规则卷曲是 *IbC4H* 蛋白最大量的结构元件,而延伸链则散布于整个蛋白中。(3)三维结构建模预测,*IbC4H* 蛋白具备细胞色素 P450 氧和铁离子结合位点等典型的 C4H 结构。该研究结果为进一步了解花色苷生物合成途径中的作用奠定了基础,也为花青素生物合成分子机理和代谢调控提供了靶位点和理论参考。

关键词: 甘薯, 肉桂酸-4-羟化酶, 基因克隆, 序列分析

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)04-0501-08

Molecular cloning and sequence analysis of acid-4-hydroxylase gene from sweet potato

ZHANG Hualing¹, LIU Xu^{1*}, YANG Chunxian², HUANG Yuanshe³,
FU Yufan², ZHANG Qitang²

(1. College of Chemistry and Life Sciences, Chengdu Normal University, Chengdu 611130, China; 2. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing Sweet Potato Research Center, Chongqing 400715, China;
3. College of Agronomy, Anshun University, Anshun 561000, Guizhou, China)

Abstract: (Cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H, EC 1.14.13.11) is the second key enzyme involved in the biosynthetic pathway of phenylpropanoid and precursors of anthocyanin biosynthesis. Based on cDNA sequence conserved domain of C4H, a pair of primers were designed and used to amplify a fragment of *IbC4H* gene (GenBank accession: GQ373157)

收稿日期: 2017-07-24

基金项目: 贵州省科学技术厅三方联合科技基金 [黔科合 LH 字(2015)7687] [Supported by Three-Party Joint Fund Science and Technology for Department of Science and Technology in Guizhou Province (QKH LH-2015-7687)].

作者简介: 张华玲(1982-),女,四川泸州人,硕士研究生,讲师,主要从事作物遗传基因工程研究,(E-mail) zhanghualing2010@163.com。

*通信作者: 刘绪,硕士研究生,副教授,主要从事食品原料及加工技术研究,(E-mail)465685853@qq.com。

by RT-PCR from sweet potato using RT-PCR and RACE technique. A 1 668 bp full-length cDNA sequence was obtained. Analysis of *C4H* cDNA indicated that it encoded a peptide containing 505 amino acids and the sequence comparison with the *C4H* gene of potatoes, apples, blackberries, ammi majus and rapes showed that identity was all above 70%. The predicted secondary structure demonstrated that alpha helix and random coil were the most important structural conformation. However, extended chain distributed in the whole protein. The predicted tertiary structure demonstrated that IbC4H had binding sites of cytochrome P450 with oxygen and iron. The study will be helpful to understand more about the roles involved in anthocyanin biosynthesis at the molecular level and provides a candidate genes for metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis pathway in purple-fleshed sweetpotato.

Key words: sweet potato, cinnamic acid-4-hydroxylase, gene cloning, sequence analysis

甘薯,学名(*Ipomoea batatas*),是旋花科(Convolvulaceae)甘薯属(*Ipomoea*)中的一个栽培种,具有蔓生习性的一年生(温带)或多年生(热带)草本、双子叶植物(Woolfe, 2008)。甘薯薯肉色泽鲜艳,种类繁多,其中一类为紫色甘薯,富含花色素苷。花色素苷理化性质稳定,具有抗氧化活性、预防肿瘤和癌症等多种生理功能,在食品着色、医药保健、化妆品方面有着较大的应用潜力(肖素荣和李京东,2009)。

肉桂酸-4-羟化酶(*C4H*, EC1.14.13.111)是苯丙烷途径的第2个关键酶,同时也是花色素苷前体生物合成途径中的关键酶(陈鸿翰等,2013)。*C4H*催化反式肉桂酸的反应形成4-N基肉桂酸,也是第一个氧化反应。肉桂酸-4-羟化酶在细胞中含量的多少,直接影响多条代谢支路。苯丙烷途径的核心关键酶形成一个复合物,而*C4H*在苯丙烷途径(位于胞质中)与电子传递反应(位于膜上)之间起到重要作用(陈安和,2006)。*C4H*的克隆及代谢研究在白木香(梁良等,2014)、青稞(罗小娇等,2014)、油菜(陈安和,2006)、烟草(Annette et al, 2007)、马铃薯(Boddu et al, 2004)、苦荞(陈鸿翰等,2013)和菘蓝(胡永胜等,2015)等物种已有报道,但未见甘薯中克隆。为了进一步揭示花色素苷合成的分子机制,丰富花色素苷生物合成途径中的相关酶体系基因,本研究以紫色甘薯为材料,采用RT-PCR和RACE技术克隆甘薯*C4H*基因,命名为*IbC4H*(GenBank登录号:GQ373157),并进行生物信息分析,旨在为构建植物表达载体、转化做准备,从而为利用分子育种方法提高花色素苷的含量提供有益信息。

1 材料与方法

1.1 材料

该实验材料由西南大学甘薯工程研究中心提供,富含花色素的紫色甘薯新品种‘渝紫263’(张启堂等,2004)。选取幼嫩部分叶片,经液氮速冻处理后保存在-80℃冰箱中备用。

1.2 甘薯中*C4H*的获得

‘渝紫263’的RNA根据RNA提取试剂盒(北京天根)上的说明书进行提取,按照RNA PCR(AMV) Ver. 3.0(TaKaRa公司)的使用说明进行反转录获得cDNA链,-20℃保存。NCBI在线查找马铃薯、拟南芥、藿香、茶树、燕麦、喜树、芸香等植物的*C4H*全长cDNA的编码区序列(coding sequence, CDS),利用Vector NTI Suite 8.0对*C4H*核苷酸序列进行多重比对,选取其合适的保守位点进行核心引物设计,进而设计3′端、5′端及全长的引物。由上海英骏生物技术有限公司合成引物,引物序列如表1所示。引物设计方法以及序列的扩增方法及扩增条件参照苦荞黄烷酮3-羟化酶基因*F3H*的克隆及序列分析文章(张华玲等,2010)进行,PCR检测后由Invitrogen公司测序。

以‘渝紫263’叶片的cDNA为模板,以*C4H*-f、*C4H*-r核心引物进行PCR核心片段的扩增。*C4H*核心片段扩增条件作出修改,预变性时间为5 min,退火温度设为50~60℃,54.5℃退火45 s,30个循环。将PCR产物回收纯化,克隆至载体中,制作大肠杆菌DH5α感受态细胞,将连接产物转入,鉴定菌落并测序。接着进行3′和5′RACE扩增,

3' RACE 的二次扩增循环次数改为 30 个循环;5' RACE 条件做一定修改,退火阶段 72 °C 延伸 1 min,34 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min 进行 5' RACE 的二次扩增。最后以全长引物 C4H-fl-f、C4H-fl-r 为引物,cDNA 第一链为模板进行 PCR 反应,94 °C 预变性 10 min;94 °C 变性 45 s,64.5 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 10 min,34 个循环扩增全长序列。

表 1 引物序列及名称和说明

Table 1 Name and interpretation of primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物说明 Primer interpretation
C4H-f	5'-AACAA(G/A)GT(G/C/T)GT(G/C)CAGCAG(C/T)A-3'	核心上游引物 Core forward primer
C4H-r	5'-GACCA(C/T)A(G/A)(A/T)GTTGT(T/C)TC AATTGC-3'	核心下游引物 Core reverse primer
C4H-3'-1-f	5'-GGGAGAGATCAATGAG-GATAATGTCC-3'	3'端一扩引物 3' RACE inner primer
C4H-3'-2-f	5'-CATAGATCACATTCTT-GAAGCC CAGC-3'	3'端二扩引物 3' RACE outer primer
C4H-5'-1-r	5'-GTACATCATGAGCTG-CAAGCGCGC-3'	5'端一扩引物 5' RACE inner primer
C4H-5'-2-r	5'-CCGCTCCGGATTCTTCT-TCACC-3'	5'端二扩引物 5' RACE outer primer
C4H-fl-f	5'-AATCCCTCTGATTATC-CCACCTACC-3'	全长上游引物 Full length forward primer
C4H-fl-r	5'-GCTTCATGACAATGG-TAGAGTGCTTC-3'	全长下游引物 Full length reverse primer

1.3 生物信息学分析

EditSeq 软件序列分析与拼接后,将甘薯 C4H 的核苷酸序列和氨基酸序列在 NCBI 中 BLAST 比对,接着利用 Vector NTI 8.0 软件进行甘薯 C4H 及其他植物 C4H 的氨基酸序列进行多重比对,分析相似性。从 GenBank 中查找得到 10 个植物物种的 C4H 蛋白氨基酸序列,根据 Neighbor-joining 方法(MEGA7)将 IbC4H 与它们构建系统进化树,bootstrap 检验重复次数为 1 000 次,从而分析得到不同物种中的 C4H 基因之间的分子进化关系(Kumar et al, 2001)。ProtScale 进行甘薯 C4H 基因编码蛋白的氨基酸序列疏水性预测,在 GOR 和 Target P 上进行二级结构分析和亚细胞定位分析,

IbC4H 结构的三维建模利用 SWISSMODEL 在线程序进行,利用 ViewerLite 4.2 软件进行编辑,得到甘薯 C4H 三级结构模型。

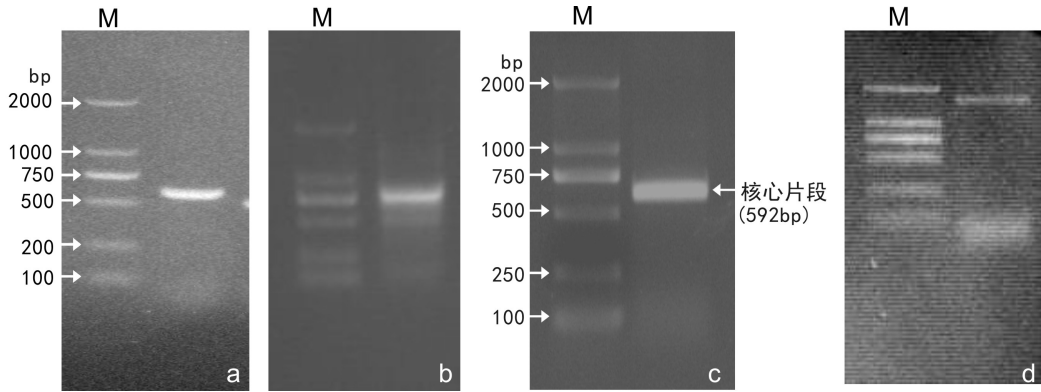
甘薯 C4H 生物信息学分析参照张华玲等(2010)的苦荞黄烷酮 3-羟化酶基因 *F3H* 的克隆及序列分析方法进行。

2 结果与分析

2.1 甘薯 C4H 的编码序列的获得及生物信息学分析

以紫薯叶片反转得到 cDNA,采用简并引物对其扩增获得长为 524 bp 的甘薯 C4H 基因核心片段,并通过 NCBI 进行 BLAST 比对,比对结果显示该序列与来源于马铃薯(EU391448)等的 cDNA 序列同源性高达 80%,表明已成功扩增 IbC4H 核心片段。根据 IbC4H 核心片段序列信息,设计 5' RACE 引物和 3' RACE 分别扩增得到 534 bp 左右的 5'端和 743 bp 左右的 3'端,用 Edit Seq 软件进行序列分析,将核心片段、3'端和 5'端拼接获得全长 1 668 bp,包括 65 bp 5'端 UTR、1 518 bp 编码区、85 bp 的 3'端 UTR 和 14 bp 的 polyA 尾巴(图 1)。根据该序列设计引物,扩增 cDNA 全长序列并进行 BLAST 比对。比对结果显示与藿香(*Agastache rugosa*, GenBank AY616436.1)和爬山虎(*Parthenocissus henryana*, DQ211885.1)相似性均为 81%;与火炬松(*Pinus taeda*, AY764841.1)相似性为 80%;与银合欢(*Leucaena leucocephala*, GU183363.1)和黑莓(*Rubus occidentalis*)为 79%;与插田泡(*R. coreanus*, GenBank EU123533.1)和苹果梨(*Malus × domestica*, GenBank DQ075002.1)为 78%;长春花(*Catharanthus roseus* GenBank Z32563.1)77%;与油菜(*Brassica napus*, GenBank DQ485129.1),芜菁(*B. rapa*, GenBank AB300317.1),大阿米芹(*Ammi majus*, GenBank AY219918.1)和香芹(*Petroselinum crispum*, GenBank L38898.1)均为 76%。

利用 DNAMAN 软件进行分析,从图 2 可以看出,IbC4H 的 cDNA 序列含有 66~1 583 bp 的开放阅读框以及 85 bp 的 3'非编码区和 65 bp 的 5'非编码区。IbC4H 终止密码子为 TAA,共编码 505 个氨基酸,符合有效翻译的基因全长 cDNA 特征。



注: M. DNA 分子标记; a. 保守区; b. 3'-RACE; c. 5'-RACE; d. 全长 cDNA。

Note: M. DNA Marker; a. PCR product of the core fragment of *IbC4H*; b. PCR product of 3'-RACE; c. PCR product of 5'-RACE; d. PCR product of the full-length cDNA.

图 1 *IbC4H* 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR electrophoresis products of *IbC4H*

IbC4H 氨基酸序列提交 <http://www.expasy.org> 预测,分子量 58.16 kD,等电点为 9.23,其中 95 个极性氨基酸和 190 个疏水性氨基酸残基。疏水性蛋白,亚细胞定位预测在细胞质。

2.2 不同植物的 C4H 氨基酸序列多重比对

利用 Vector NTI 8.0 软件对甘薯和其他植物的 C4H 氨基酸序列进行多重比对,并分析它们的相似性(图 3)。由图 3 可知,*IbC4H* 与马铃薯 C4H 序列相似性最高,与苹果、黑莓较为接近,而与大阿米芹、油菜差异稍微大些,但是一致性仍很高,均在 70% 以上,可见 C4H 编码区高度保守,从而进一步证明所克隆出的基因确实是甘薯 C4H 基因。分析由于这些植物生长过程需积累大量黄酮类化合物,而 C4H 是催化类黄酮前体肉桂酸合成的重要酶,推测其基因必须保持足够的遗传稳定性和演化趋向性。

2.3 C4H 分子系统发生树分析

将 *IbC4H* 与从 GenBank 中得到了黑莓 (*Rubus occidentalis*, GenBank FJ554629.1)、插田泡 (*R. coreanus*, GenBank EU123533.1)、苹果梨 (*Malus × domestica*, GenBank DQ075002.1)、长春花 (*Catharanthus roseus*, GenBank Z32563.1)、甘薯 (*Ipomoea batatas*, GenBank GQ373157.1)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*, GenBank: DQ341174.1)、大阿米芹

(*Ammi majus*, GenBank AY219918.1)、香芹 (*Petroselinum crispum*, GenBank L38898.1)、油菜 (*Brassica napus*, GenBank DQ485129.1) 和芜菁 (*B. rapa*, GenBank AB300317.1) 10 个植物物种的 C4H 蛋白序列,用 Neighbor-joining 方法 (MEGA7) 构建了系统进化树,用以分析不同物种中的 C4H 基因之间的进化关系(图 4),Bootstrap 检验的重复次数为 1 000 次。结果显示 *IbC4H* 与茄科马铃薯 C4H 蛋白相似性最高,进化树上遗传距离也最为接近,聚为一类。树莓、插田泡、苹果同为蔷薇科植物,所以聚为一大类,并且这类植物和长春花有相同的特点,即色泽鲜艳,富含花青素。*IbC4H* 位于花色素途径的上游,除了与合成黄酮类化合物进而合成花青素有关,还与合成木质素紧密相关,而木质素中一个重要的成分就是纤维素。因此,和富含纤维素的芹菜、芜荑,还有油菜、芜菁也有一定关联。其中芹菜、芜荑同为聚伞房花科,聚为一类;而油菜、芜菁同为十字花科,聚为一类。在进化树上不仅与所属科属类别亲缘关系相近,也和 BLAST 和多重比对结果相符。

2.4 *IbC4H* 的蛋白结构分析

根据 *IbC4H* 的二级结构预测,在 *IbC4H* 多肽链中含有 44.55% 的 α -螺旋, 13.47% 的延伸链,和 41.98% 的无规则卷曲。纵观蛋白的整体结构, α -


```

1          acgcggggacttcaateccctctgattatcccacctaccttttttctactagcaactagcaagaaacc
66  ATGGATCTTCTCCTCTTAGAGAAGACCCTTCTTGGCCTCTTCTTGGCATTCTTGTGCGCATTGTTGTGTCCAAGTACCGGGCAAGAAG
   M D L L L L E K T L L G L F F A I L V A I V V S K L R G K K
156 TACAAGCTCCC GCCGGTCTCTCCCGGTGCCGGTGTTCGGAAGTGGCTCCAGGTCGGGGATGACCTGAACCACCGGAATCTCACCGAT
   Y K L P P G P L P V P V F G N W L Q V G D D L N H R N L T D
246 TACGCCAAGAAGTTCGGTGACATTTTCTTCTGAGGATGGGGCAGAGGAACCTGGTGGTGGTGTGTCGTCGCGGGAGCTAGCGAAGGAGGTT
   Y A K K F G D I F L L R M G Q R N L V V V S S P E L A K E V
336 CTCCACACGCAAGGGGTGGAGTTCGGGTCCCGAACCCGGAACGTGGTGTTCGATATCTTACCAGGAAAGGGCAGGACATGGTGTTCACC
   L H T Q G V E F G S R T R N V V F D I F T G K G Q D M V F T
426 GTCTACGGGACCCTGGCGGAAGATGCGGGGATCATGACGGTGCCTTCTTACCAACAAGTTGTGCAGCAGTACCGGGCAGGGGTGG
   V Y G D H W R K M R R I M T V P F F T N K V V Q Q Y R R G W
516 GAGGACGAGATCGGGTGGTGGTGGAGGAGTGAAGAAGAATCCGAGGGCGGCACCACCGGGATTGTTCTCCGCCCGCTTCAGCTC
   E D E I G L V V E E V K K N P E A A T T G I V L R R R L Q L
606 ATGATGTACAACAATCTGTTCAAGATTATGTTTGACCGGAGTTCGAGAGCGAGGAGGACCCCATGTTTAAAGAAGCTCAGAGCTTTGAAT
   M M Y N N L F R I M F D R R F E S E E D P M F K K L R A L N
696 GGTGAGAGGAGTAGGCTGGCACAGAGCTTGTATTACAATGTTGATTTCATCCCCATTTGAGGCCCTTCTCCGAGGCTACTTGAAG
   G E R S R L A Q S F D Y N Y G D F I P I L R P F L R G Y L K
786 ATCTGCAAGGAGTTAAGGAGAGGAGATTGCAGTATTCAAGGACCCTTGTGAGGAGAGAAAGAAGCTTCAAGCACAAAGGGCATG
   I C K E V K E R R L Q L F K D H F V E E R K K L S S T K G M
876 GACAACAACAGTCTGAAATGTCCATAGATCACATTCTTGAAGCCAGCAAAAGGGAGAGATCAATGAGGATAATGTCCTCTACATGTT
   D N N S L K C A I D H I L E A Q Q K G E I N E D N V L Y I V
966 GAGAACATTAATGTTGCTGCAATTGAAACAACCTGTGGTCGATCGAGTGGGGCATTGCAGAACTGGTTAAACAACCCGGGGATCCAAAAG
   E N I N V A A I E T T L W S I E W G I A E L V N N P G I Q K
1056 AAATTCGCGAAGAGATTGATGCAGTCTGGGACCGGGAGTTCAGCTAACCGAGCCAGACCCCAAACTTCCATACCTTCAGGCGGTG
   K L R E E I D A V L G P G V Q L T E P D T H K L P Y L Q A V
1146 ATCAAAGAAACACTTCGCTTAGAATGGCAATTCCTCTGTTAGTCCCCACATGAACCTCCACGACCCAAGCTTGAGGGTATGACATC
   I K E T L R L R M A I P L L V P H M N L H D A K L G G Y D I
1236 CCTGCAGAGAGCAAAATCTTGGTGAATGCTTGGTGGCTAGCTAACACCCTCGACCTGGAAGAACCCGGAGGAGTCCGCCAGAGAGG
   P A E S K I L V N A W W L A N N P S T W K N P E E F R P E R
1326 TTCTTTGAGAGGAGAAGCACGTCGAGGCGAATGGCAACGACTTCAGATTCTCCCGTTTGGCGTTGGCAGGAGGAGTCCCGGGGATC
   F F E E E K H V E A N G N D F R F L P F G V G R R S C P G I
1416 ATCTGGCCTTGCCAATCTCGGCATCGTGTGGGGCCTGGTTCAGAACTTGAACCTTGGCCCCCTCCAGGACTCCAAGTGGAC
   I L A L P I L G I V L G R L V Q N F E L L P P P G H S K V D
1506 ACCACAGAAAAGGTGGCCAGTTCAGTCTCCACATCTGAAGCACTTACCATTGTCATGAAGCCTAGGACTTTCTAAaacgtgtgatat
   T T E K G G Q F S L H I L K H S T I V M K P R T F *
1596 atgtaacctggtttaattcaagtttggttaagataatggacatgtacttttgcggccaaaaaaaaaaaaaa

```

注: * 为终止密码。

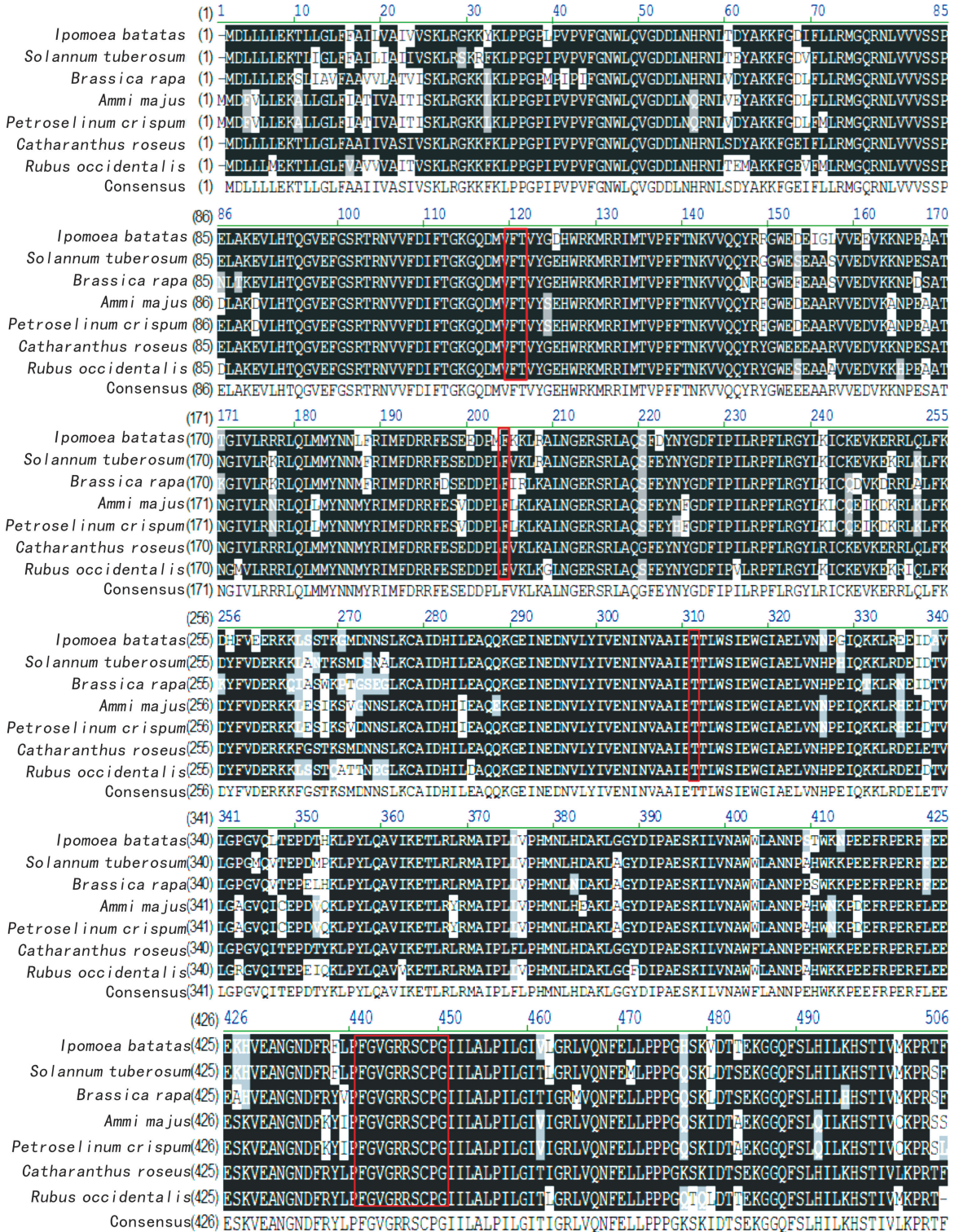
Note: * means the stop codon.

图 2 *IbC4H* 及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 *IbC4H* of sweet potato and its deduced amino acid sequence

螺旋和无规则卷曲是 *IbC4H* 蛋白大量的结构元件,而延伸链则散布于整个蛋白中(图 5)。用 TM-HMM Server 对甘薯基因 *C4H* 功能结构域分析,甘薯 *C4H* 肽链在细胞膜外,*IbC4H* 不存在跨膜结构域。用 ProtScale 进行甘薯 *C4H* 基因编码蛋白的氨基酸序列预测,整条多肽链表现为输水性,在 N 端和近 C 端有较为明显的输水区域。在 PROSITE 中

分别预测,*IbC4H* 含有细胞色素 P450 血红素半胱氨酸铁元素结合位点(440~449 位氨基酸残基)、N-糖基化位点(57~60 位、272~275 位氨基酸残基)、依赖于 CAMP-CGMP 蛋白激酶磷酸结合位点(262~265 位氨基酸残基)。此外,还含有蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、N-豆蔻酰化位点、酰胺化位点。三维结构建模预测,丙

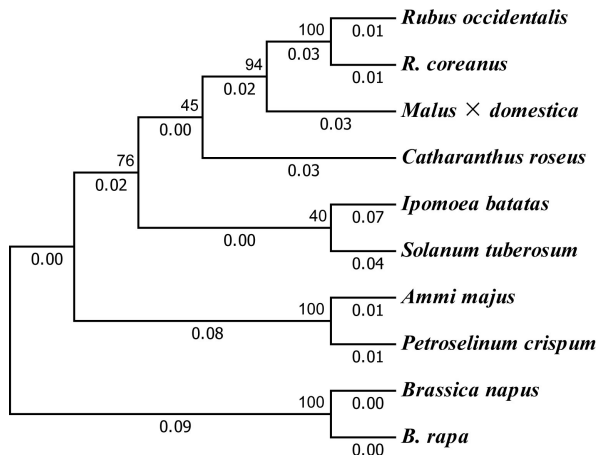


注：黑色背景和灰色背景分别表示一致氨基酸和保守氨基酸残基；黑色字体白色背景表示其他氨基酸残基；活性位点用红色框标注。

Note: Identical and conserved amino acid residues are denoted with black and gray backgrounds respectively; Other amino acid residues are denoted with white backgrounds; Active sites are denoted with red frames.

图 3 不同植物 C4H 氨基酸序列的多重比对结果

Fig. 3 Multiple alignments of amino acid sequences of C4H from different plants

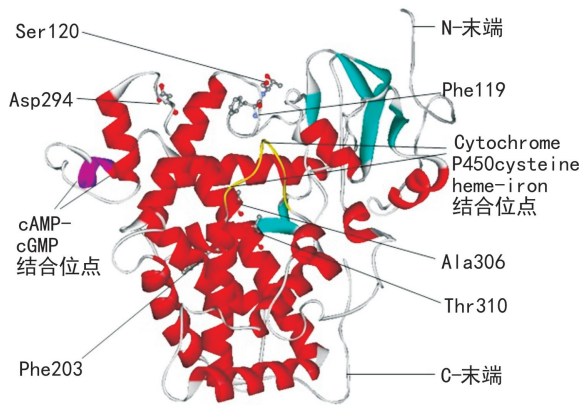


注: 节点上的数值为通过 bootstrap 检验次数的百分数 (重复1 000次)。

Note: Bootstrap values of the nodes represent the percentage drawn from bootstrap test (1 000 replications).

图 4 在 MEGA7 软件平台上用 neighbor-joining 方法构建 C4H 分子系统进化树

Fig. 4 A phylogenetic tree of C4H from different organisms constructed by neighbor-joining method on MEGA7



注: 用螺旋表示 α -螺旋; 用板状箭头表示 β -片层; 用绳状表示随机卷曲。

Note: The α -helix, β -pleated sheet and random coil are indicated by the helix, sheet and rope-shape, respectively.

图 5 *IbC4H* 编码蛋白的三维结构

Fig. 5 3-D structure of *IbC4H* encoding protein

氢键的连接,增加结构稳定性。丝氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸是酶的结合位点,该催化中心含有水分子、氧及铁元素结合位点,和其它关于人类细胞色素 P450 氧化及相关结构模型研究结果相一致 (Wilmouth et al, 2002; Stefaan et al, 2007; Linda et al, 1986)。

3 讨论

花色苷合成要经由苯基丙酸路径和类黄酮合成途径生成,除合成木质素、类黄酮物质,还合成香豆素、绿原酸等物质,作为植物的信号分子或拮抗物质。肉桂酸-4-羟化酶催化反式肉桂酸的反应形成 4-N 基肉桂酸,是苯丙烷途径的第 2 个关键酶,属于细胞色素单加氧酶超家族。苯丙烷途径的核心关键酶形成一个复合物, C4H 在苯丙烷途径 (位于胞质中) 与电子传递反应 (位于膜上) 之间起着重要作用 (梁良等, 2014; 陈安和, 2006)。Blount et al (2000) 的研究表明,转基因烟草中肉桂酸-4-羟化酶过量表达将导致绿原酸的含量的增加。目前已对拟南芥、水稻、油菜、青稞、大豆等多种植物 C4H 基因进行了分离和克隆, (Annette et al, 2007; Boddu et al, 2004; 罗小娇等, 2014; 王安娜等, 2010)。谭国飞等 (2014) 通过定量、半定量 PCR, 检测 C4H 基因在不同组织中的表达, 如鸭儿芹中基因与温度的响应表达, 为其生长环境的分析提供了重要依据; 利用实时荧光定量 PCR 分析青稞 C4H 在胚乳发育不同组织的表达情况, 对品种改良等有重要意义 (罗小娇等, 2014)。本研究成功克隆了紫色甘薯 C4H 基因, 同时进行了生物信息学分析, 为利用植物次生代谢途径中关键酶的“基因修饰”技术, 调节甘薯 C4H 的活性来增加色素的含量及黄酮类含量奠定了基础, 目前, 在甘薯中 C4H 的表达水平与黄酮和紫色色素积累量的关系有待进一步研究分析, 后期还将研究紫薯花色苷合成途径中其他关键基因, 分析其表达与花色苷总量的关系, 探究黄酮类化合物生物合成的分子调控网络, 从而对天然色素新品种的研发提供重要依据。

氨酸 306 位残基所在侧链, 苯丙氨酸 119 位残基及丝氨酸 120 残基, 天冬氨酸 294 位残基, 苏氨酸 310 位残基, 苯丙氨酸 203 位残基共同形成一个穴状的结构, 其中苏氨酸和天冬氨酸参与水分子的

参考文献:

- ANNETTE R, MICHAEL A, JOSEPH I, et al, 2007. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*) [J]. Biochim et Biophys Acta (BBA)-Proteins, 1774(11): 1422-1430.
- BLOUNT JW, KORTH KL, MASOUD SA, et al, 2000. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway [J]. Plant Physiol, 122:107-116.
- BODDU J, SVABEK C, SEKHON R, et al, 2004. Expression of a putative flavonoid 3-hydroxylase in sorghum mesocotyls synthesizing 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins [J]. Physiol Mol Plant Pathol, (65): 101-113.
- CHEN HH, YUAN MQ, LI SJ, et al, 2013. Cloning of cinnamate 4-hydroxylase Gene (*C4H*) from tartary buckwheat (*Fagopyrum tararicum*) and its tissue-specific expression under UV-B stress during seed germination [J]. Agric Biotechnol, 21(2): 137-147. [陈鸿翰, 袁梦求, 李双江, 等, 2013. 苦荞肉桂酸羟化酶基因(*FtC4H*)的克隆及其UV-B胁迫下的组织表达[J]. 农业生物技术学报, 21(2): 137-147.]
- CHEN AH, 2006. Cloning and comparative genomic study of *C4H* gene families of *Brassica napus* and its parental species [D]. Chongqing: Southwest University: 15-25. [陈安和, 2006. 甘蓝型油菜及其亲本物种 *C4H* 基因家族克隆及比较基因组学研究 [D]. 重庆: 西南大学: 15-25.]
- HU YS, ZHANG L, CHEN WS, 2015. Molecular cloning and expression analysis of cinnamic acid 4-hydroxylase gene from *Isatis indigotica* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 46(1): 101-106. [胡永胜, 张磊, 陈万生, 2015. 菘蓝中肉桂酸-4-羟化酶基因克隆与表达分析[J]. 中草药, 46(1): 101-106.]
- KUMAR TK, TAMURA K, JAKOBSEN IB, et al, 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 17:1244-1245.
- LIANG L, HAN XX, ZHANG Z, et al, 2014. Cloning and expression analysis of cinnamate 4-hydroxylase (*C4H*) reductase gene from *Aquilaria sinensis* [J]. Chin Mat Med, 39(10):1769-1771. [梁良, 韩晓敏, 张争, 等, 2014. 白木香肉桂酸-4-羟化酶(*C4H*)基因的克隆及表达分析[J]. 中国中药杂志, 39(10):1769-1771.]
- LIAO H, ZHOU JY, 2008. Molecular cloning and analysis of a chalcone synthase gene of *Cassia tora* [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 9:1728-1733. [廖海, 周嘉裕, 2008. 决明查尔酮合成酶基因的克隆及序列分析[J]. 西北植物学报, 9:1728-1733.]
- LINDA CQ, USHA RP, STEEVE TO, et al, 1986. Human cytochrome P-450 mRNA and gene: Part of a multigene family that contains Alu sequences in its Mrna [J]. Biochemistry, 83:6731-6735.
- LUO XJ, LIU XC, YANG XY, et al, 2014. Cloning and tissue expression analysis of Hv *C4H* gene in *Hullless barley* [J]. Plant Genet Resourc, 15(3): 589-596. [罗小娇, 刘新春, 杨晓云, 等, 2014. 青稞 *C4H* 基因的克隆及组织表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 15(3): 589-596.]
- MA J, SU L, YUAN M, et al, 2012. Cloning and expression analysis of *C4H* and *ANR* genes in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Nucl Agric Sci, 26(1): 43-48. [马敬, 苏磊, 袁美, 等, 2012. 花生 *C4H* 和 *ANR* 基因的克隆与表达研究[J]. 核农学报, 26(1): 43-48.]
- STEFAN S, JASON K, YANO, et al, 2007. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of Human P450 1A2 [J]. Biol Chem, 282(19): 14348-14355.
- TAN GF, WANG F, WANG GL, et al, 2014. Isolation and expression analysis of cinnamic acid 4-hydroxylase gene under different temperatures in *Cryptotaenia japonica* Hassk [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 34(7): 1298-1304. [谭国飞, 王枫, 王广龙, 等, 2014. 鸭儿芹肉桂酸 4-羟化酶基因的克隆与不同温度下的表达分析[J]. 西北植物学报, 34(7): 1298-1304.]
- WOOLFE JA, 2008. Sweet potato: An untapped food resource [M]. Cambridge: Cambridge University Press: 80-91.
- WANG AN, WANG CC, WU L, et al, 2010. Soybean *C4H* gene clone and bioinformatics analysis [J]. J NE Agric Univ, 41(4): 12-15. [王安娜, 王婵婵, 吴蕾, 等, 2010. 大豆 *C4H* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 东北农业大学学报, 41(4): 12-15.]
- WILMOUTH RC, RUPERT C, TURNBULL, et al, 2002. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Structure, 1(10): 93-103.
- XIAO SR, LI JD, 2009. The natural anthocyanins of purple sweet potato [J]. Chin Food Nutr, 6:29-31. [肖素荣, 李京东, 2009. 新型天然色素——紫甘薯色素[J]. 中国食物与营养, 6:29-31.]
- ZHANG QT, FU YF, YANG CX, et al, 2004. The new species of purple sweet potato [J]. Bull Agric Sci Technol, 6: 34. [张启堂, 付玉凡, 杨春贤, 等, 2004. 紫肉甘薯新品种——渝紫 263 [J]. 农业科技通讯, 6:34.]
- 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.]