

烟草黄酮醇合成酶基因的克隆及其序列分析

黄伟伟 杨曦 张常娥 方斌 马靛 常俊丽 杨广笑 何光源*

华中科技大学中英HUST-RRes基因工程和基因组学联合实验室, 武汉430074

摘要 根据已知的黄酮醇合成酶 cDNA 保守序列设计引物, 用 RT-PCR 技术从烟草叶片中扩增获得黄酮醇合成酶 cDNA 片段, 再用 RACE 方法得到其两端序列。根据获得的序列, 设计引物分离得到完整的 1 188 bp 的黄酮醇合成酶基因, 其开放阅读框编码 346 个氨基酸。序列分析显示, 烟草黄酮醇合成酶与高杯花、矮牵牛和马铃薯的同源性分别为 87%、86% 和 84%, 与其它物种中的同源性也在 80% 左右, 表明不同物种中黄酮醇合成酶基因具有高度同源性。此外, 在氨基酸水平上, 该酶与其它依赖于 2-酮戊二酸的双加氧酶及其相关酶也具有同源性。

关键词 烟草; 黄酮醇合成酶基因; RACE; 序列分析

Cloning and Sequence Analysis of Flavonol Synthase Gene from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

HUANG Wei-Wei, YANG Xi, ZHANG Chang-E, FANG Bin, MA Liang, CHANG Jun-Li, YANG Guang-Xiao, HE Guang-Yuan*
China-UK HUST-RRes Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Abstract According to the conserved cDNA sequence of flavonol synthase (*FLS*) gene, a pair of primers was designed, and *FLS* was cloned from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves using RT-PCR and RACE. The full length cDNA sequence was 1 188 bp and it included a open reading frame (ORF) which encoded 346 residues. Sequence analysis showed that homologies of *FLS* cDNA from tobacco with *Nierembergia caernlea*, *Petunia hybrida* and *Solanum tuberosum* were 87%, 86% and 84%, and which among the others were about 80%. The results indicated that *FLS* was highly stable in evolution of plants. On the other hand, it also had similarity with other 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases on amino acids level.

Key words tobacco (*Nicotiana tabacum* L.); flavonol synthase gene; RACE; sequence analysis

黄酮类化合物(flavonoids)是一类天然存在于植物中的多酚类次级代谢物, 至今已被分离鉴定出 6 000 多种(Harborne 和 Williams 2000)。它是最普遍的, 也是花卉之所以呈现各种颜色的一类花色素。其中, 花青素是黄酮类花色素中最重要的一种。但花青素需与共存于植物体内的辅色素一起方可呈现共色作用。在高等植物如烟草和矮牵牛中, 黄酮类化合物在果品着色、促进植物受精、花粉管生长(Napoli 等 1999)、抗紫外辐射、抵御病虫害、食品保健和医疗中都有作用(Middleton 等 2000)。

黄酮类化合物的生物合成一直是植物次生代谢基因工程中的一个重要研究课题, 其生物合成途径已比较清楚。黄酮醇是在黄酮醇合成酶(flavonol synthase, *FLS*)的催化下, 由二氢黄酮醇转变而成。Britsch 等(1981)用从欧芹细胞中提取的酶作用于二氢黄酮醇, 第 1 次体外检测到二氢黄酮醇转变为黄酮醇。随后在紫罗兰(Spribille 和 Forkman 1984)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)

(Forkman 等 1986)、石竹(Forkman 1991)花蕾提取物中也检测到 *FLS* 的活性。嗣后, Holton 等(1993)根据双加氧酶的保守序列设计简并引物, 用 PCR 的方法从矮牵牛中分离出 *FLS* 编码基因。之后人们又从其它物种中分离得到 *FLS* 基因, 如马铃薯(*Solanum tuberosum*) (Van Eldik 等 1997)、高杯花(*Nierembergia caernlea*)、月季、苹果和金鱼草(Schwinn 等 2006)等。

本文根据其它物种中 *FLS* 基因 cDNA 的保守序列设计引物, 采用 RT-PCR 和 RACE 的方法, 从烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 叶片中分离得到了 *FLS* 基因, 现报道如下。

材料与方法

烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 栽培于人工气候室

收稿 2006-07-11 修定 2006-11-16
资助 国家“973”项目(2002CB111302)子课题和自然科学基金(30370807)。
*通讯作者(E-mail: hegy@hust.edu.cn, Tel: 027-87792271)。

中,按常规管理。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株是我们实验室保存的。RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司,反转录酶购自Promega公司。Taq DNA聚合酶、DNA marker购自北京天为生物公司,凝胶回收试剂盒购自上海华舜公司,dNTP以及其它试剂均购自大连宝生物公司。

根据其它物种中*FLS* cDNA保守序列,设计出RT-PCR引物R1、R2,获得部分序列后,再根据这部分序列设计特异性引物,包括5' RACE中反转录引物5GSP1,3'和5' RACE PCR扩增特异性引物3GSP1、3GSP2和5GSP2。另外,还设计了3' RACE反转录引物3AUAP、接头引物3AAP,5' RACE的上游引物5AUAP、接头引物5AAP。根据3'和5' RACE的测序结果,设计引物F1、F2,扩增出*FLS*基因的全长。引物由北京奥科公司合成(表1)。

表1 *FLS*基因的引物序列Table 1 Primer sequences of *FLS* gene

引物名称	序列
R1	5' ATTTGTTCCATAAGATTGGCC 3'
R2	5' ATCCTTGTACTTCTTGGTCTTG 3'
3GSP1	5' CAGCAGGTGGTGAAGAAATA 3'
3GSP2	5' TGGAGTTGTGGCCCATACAG 3'
5GSP1	5' GCCTTGGACTTCATTTGGGAC 3'
5GSP2	5' TAACCCAAGCCCAAGTGATAAG 3'
3AUAP	5' CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-poly (T) 17 3'
3AAP	5' CTGATCTAGAGGTACCGGATCC 3'
5AUAP	5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC-poly (G) 10 3'
5AAP	5' GGCCACGCGTCGACTAGTAC 3'
F1	5' GCGTCTAGAATGAAAACAGCTCAAGCTCAG 3'
F2	5' CGCGAGCTCTCACTGAGGAAGCTTGTTAAG 3'

用烟草的叶片提取RNA, RNA提取按照Invitrogen公司Trizol试剂说明书进行,然后进行反转录。反转录反应体系为20 μ L: 包括9 μ L焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水、2 μ L 1.5 μ g \cdot μ L⁻¹烟草总RNA、1 μ L 10 pmol \cdot L⁻¹反转录引物、4 μ L 5 \times 反转录酶缓冲液、2 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP、1 μ L 40 U \cdot μ L⁻¹ RNase抑制剂和1 μ L 200 U \cdot μ L⁻¹反转录酶M-MLV。先将DEPC处理水、RNA和引物加入微量离心管中,于70 $^{\circ}$ C中放置5 min,使RNA打开二级结构,再在冰中放置5 min。然后依次加入反转录酶缓冲液、dNTP、RNase抑制剂和反转

录酶,于42 $^{\circ}$ C温浴中放2 h。

RT-PCR cDNA合成的反转录引物为3AUAP。RT-PCR扩增,其扩增体系为50 μ L: 5 μ L 10 \times PCR缓冲液,1 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP,3 μ L 25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂,10 pmol \cdot L⁻¹上下游引物各2 μ L, Taq DNA聚合酶2 U,以1 μ L反转录产物为模板,加双蒸水至50 μ L。反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性5 min,然后于94 $^{\circ}$ C中变性45 s,55 \sim 62 $^{\circ}$ C复性45 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,30个循环。

3' RACE cDNA合成的反转录引物为3AUAP。3' RACE扩增,以cDNA为模板直接进行第1轮PCR扩增,引物为3AUAP、3GSP1,然后再以第1轮PCR产物为模板进行巢式PCR,引物为AAP、3GSP2,PCR方法同前。

5' RACE cDNA合成的反转录引物为5GSP1。反转录产物先用RNaseH分解RNA-DNA杂交体中的RNA链,然后再以0.2倍体积的10 mol \cdot L⁻¹乙酸铵和2.5倍体积的无水乙醇沉淀纯化,纯化后的cDNA用TdT酶和dCTP加尾。以加尾之后的cDNA为模板,5AUAP、5GSP1为引物进行5' RACE第1轮PCR扩增,然后以第1轮PCR的产物为模板,5AAP和5GSP2为引物进行巢式PCR,PCR方法同前。

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段,连接pMD18-T载体(大连宝生物公司),转化大肠杆菌DH5 α ,随机挑取4个阳性转化子作菌落PCR鉴定,测序由北京奥科公司完成。

用NCBI提供的程序进行序列拼接和开放阅读框(open reading frame, ORF)寻找,拼接后的序列进行BLAST相似性比较,用BioEdit 7.0进行序列比对分析。

实验结果

1 烟草*FLS*基因部分同源片段的克隆

根据矮牵牛(GenBank登录号Z22543)、马铃薯(GenBank登录号X92178)、高杯花(GenBank登录号AB078512)、月季(GenBank登录号AB038247)和苹果(GenBank登录号AY965343)*FLS*编码基因高度保守序列设计引物R1、R2,以烟草叶片总RNA的反转录产物为模板进行RT-PCR,电泳检测获得600 bp左右的特异行扩增条带(图1-a)。经测序后,证明为*FLS* cDNA片段。

2 烟草 *FLS* 基因 cDNA 序列末端的扩增

通过 3' RACE、5' RACE 分别获得长约 500 bp、600 bp 左右的 2 条特异性扩增条带(图 1-b、c), 分别对这 2 条带进行测序, BLAST 分析结果

显示其为 *FLS* 末端序列。采用 NCBI 的开放读码框寻找程序(ORF founder)确定该基因的 ORF。至此得到 1188 bp 的 *FLS* 基因 cDNA 全长序列, 向 GenBank 递交序列, 序列号为 DQ435530。

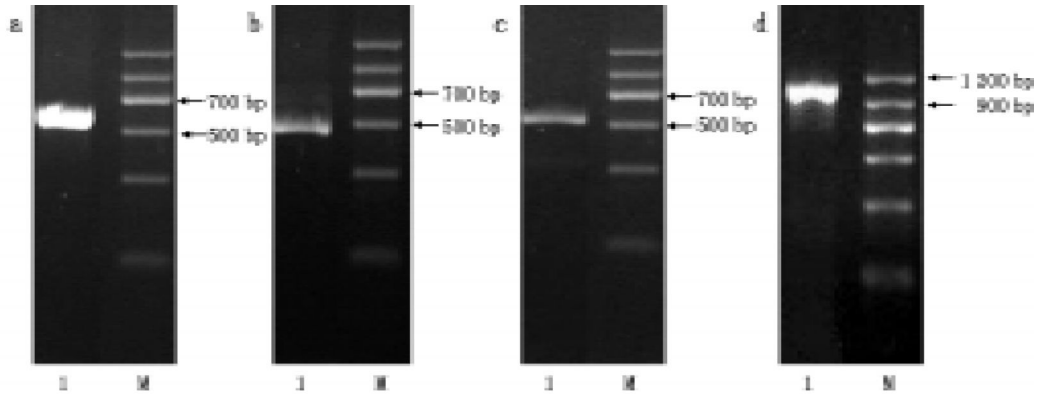


图1 琼脂糖电泳检测PCR产物

Fig.1 Agrose gel of electrophoresis of PCR product

1: PCR产物; M: DNA分子标记。a: RT-PCR获得的 *FLS* cDNA 片段; b: 3' RACE获得的 *FLS* cDNA 3' 端片段; c: 5' RACE获得的 *FLS* cDNA 5' 端片段; d: RT-PCR获得的 *FLS* cDNA 全长。

3 烟草 *FLS* 基因 cDNA 全长的扩增及序列分析

根据已经获得的完整 cDNA 序列, 在起始密码子和终止密码子区分别设计引物 F1、F2, 参考 pBI121 载体上的多克隆位点, 并在 F1、F2 引物的 5' 端分别加上 *Xba*I、*Sac*I 酶切位点和保护碱基, 为后续在植物体中表达打下基础。以叶中总 RNA 的反转录产物为模板扩增得到 1.1 kb 左右的 ORF 片段(图 1-d)。测序结果表明, ORF 片段大小为 1 041 bp, 编码 346 个氨基酸残基的多肽。序列分析显示, 烟草与其它 13 个物种的已知 *FLS* cDNA 序列具有 80% 左右的同源性, 如与高杯花、矮牵牛、马铃薯和洋桔梗的序列相似性系数分别为 87%、86%、84%、77% 和 75%, 氨基酸的同源性则更高(图 2)。

讨 论

在所有的黄酮类化合物中, 黄酮醇是分布最为广泛的一类化合物。黄酮醇是黄烷酮的衍生物, 由 *FLS* 催化形成, *FLS* 是 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶(2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, 2-ODD) 家族中的一员, 黄酮类化合物合成途径中的二氢黄酮-3 β -羟基化酶(flavanone-3 β -hydroxylase, FHT)、花青素合成酶(anthocyanidin

synthase, ANS) 都是属于这个家族。2-ODD 需要氧分子作为辅助底物, Fe^{2+} 、2-酮戊二酸或者抗坏血酸盐作为辅助因子(Springob 等 2003), 其编码基因具有 19%~75% 的保守性, 正是由于这些保守性的差异, 因而 2-ODD 各自具有不同的生物活性。

烟草 *FLS* 与其它 13 个物种的 *FLS* 氨基酸具有 80% 左右的同源性, 其中有 93 个氨基酸残基是完全保守的。*FLS* 同源性较高的区域主要位于 C 末端(213~346 个氨基酸残基), 具有 85% 的同源性, 而 N 末端(1~123 个氨基酸残基) 同源性只有 60% 左右。

将 *FLS* 氨基酸序列与不同功能的 2-ODD [FHT、ANS、天仙子胺-6 β -羟基化酶] 及其相关酶[1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(ACC 氧化酶)、赤霉素 C20-氧化酶、脱乙酰氧基头孢菌素 C 合酶(DAOCs)、异青霉素 N 合成酶(IPNS)] 的氨基酸序列进行比较时见到, 有 3 个高度保守的氨基酸区域(图 2), 可能跟 2-ODD 的生物活性密切相关(Wellmann 等 2002), 这些酶可能由同一基因进化而来。

总之, *FLS* 基因在植物中非常保守, 在植物的花色和雄性不育中起作用(Forkmann 和 Martens 2001)。采用基因工程的手段反义或正义抑制 *FLS* 基因, 已经获得了转基因花卉(Nielsen 等 2002),

	1	21	41	60
FLS-Tab	MKTAQAQSATTLTMEVARVQAIASITKMDGTIPSEYIRSENEQASITTLRGVLLQVFEVD			
FLS-Con	MktagggSATtLTMeVArVqaiAs-----dtIP-SfiRsenEqPa-ct-hG-vl-wPvID			
	61	81	101	120
FLS-Tab	IDQNSVWELISDASKEWGIPOVIEHGIPDEVIAMLOKVGREFFEWWQEESEVIANKIPGS			
FLS-Con	l-e---vk-i-eAs-ewSiIQvVHGIp-evi--Lq-VGkeFFE-lPqeEKE--ak-p-s			
	121	141	161	180
FLS-Tab	QSIIEGYGTSIQWELDGKRGWVHLPFBRIWFPsAJINVKYWPKNPFSYREAMEEYAKGLREV			
FLS-Con	--ieGYET-Lqke-eGkkqWvDhlfPbkiWFPsainy-fWPknPpsVreanDeYak-lr-v			
	181	201	221	240
FLS-Tab	AEKIFKSLSLGDLGLEAHENMEAEAGGEEIVYLLKINIVYFPCPRFDLALGVVAHTDMSHITI			
FLS-Con	vdKlf--lSlglgle--elkea-Ggdd--yllKINIVYFPCPrPdIALGVVAHTDmS-iTi			
	241	261	281	300
FLS-Tab	LVPNEVQGLQVFKDDHWYDWSYIPNALIIHIGDQVEILSDGKYSVYBRTIVTKDKTRMS			
FLS-Con	LvPNeVqGLQvFKDdHWyDwSYiPnAlI-HIGDQ-eIlSDGkySvY-BRtIVmKdTrMS			
	301	321	346	
FLS-Tab	WPFVLEPPSEHEVGPVIRKLVSEKSPKPKFKKCYKQVYVYCKLMLLPQ			
FLS-Con	WPFVlePp-e--vGP-p-lv---appkfkKkykdYvYcklMLLPq			

图2 烟草FLS氨基酸序列与14种植物中FLS氨基酸保守序列比对

Fig. 2 Comparison of FLS polypeptide from tobacco with consensus sequence of FLS polypeptide from 14 varieties of plants

FLS-Tab 为烟草 FLS 氨基酸序列; FLS-Con 为 14 种植物中 FLS 氨基酸保守序列, 这 14 种植物为烟草、矮牵牛、马铃薯、高杯花、洋桔梗、欧芹、金鱼草、月季、苹果、葡萄、拟南芥、蜜桔、洋葱和银杏。FLS-Con 序列中大写字母表示完全保守, 小写字母表示高度保守; 划线部分与数据库中 64 种双加氧酶及其相关酶类的保守序列高度相似, 在这 64 种酶中除了上面的 14 种 FLS 以外, 还包括 18 种 FHT、3 种 ANS、5 种赤霉素 C20-氧化酶、1 种天仙子胺-6 β -羟基化酶、11 种 ACC 氧化酶、1 种 DAOCS、11 种 IPNS。

但尚未得到雄性不育系。一般来说, 雄性不育系是杂交育种的必要条件。所以本文结果对采用基因工程手段调控 FLS 基因的表达, 改变花色和获得雄性不育系等来说, 是有一定参考意义的。

参考文献

- Britsch L, Heller W, Grisebach H (1981). Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Z Naturforsch*, 36c: 742~750
- Forkmann G (1991). Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed*, 106: 1~26
- Forkmann G, de Vlaming P, Spribille R, Wiering H, Schramm AW (1986). Genetic and biochemical studies on the conversion of dihydroflavonols to flavonols in flowers of *Petunia hybrida*. *Z Naturforsch*, 41c: 179~186
- Forkmann G, Martens S (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr Opin Biotechnol*, 12: 155~160
- Harborne JB, Williams C (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem*, 55: 481~504
- Holton TA, Brugliera F, Tanaka Y (1993). Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant J*, 4: 1003~1010
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673~751
- Napoli CA, Fahy D, Wang HY, Taylor LP (1999). *White anther*: a petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complimented by a chalcone synthase transgene. *Plant Physiol*, 120: 615~622
- Nielsen K, Deroles SC, Markham KR, Bradley MJ, Podivinsky E, Manson D (2002). Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in *Lisianthus*. *Mol Breed*, 9: 217~229
- Schwinn K, Venail J, Shang Y, Mackay S, Alm V, Butelli E, Oyama R, Bailey P, Davies K, Martin C (2006). A small family of *MYB*-Regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell*, 18 (4): 831~851
- Spribille R, Forkmann G (1984). Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flower buds of *Matthiolum incana* R. Br. *Z Naturforsch*, 39c: 714~719
- Springob K, Nakajima JJ, Yamazaki M, Saito K (2003). Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep*, 20: 288~303
- Van Eldik GJ, Reijnen WH, Ruiters RK, Van Herpen MM, Scrauwen JA, Wullems GJ (1997). Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development, and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*. *Plant J*, 11: 105~113
- Wellmann F, Lukačič R, Moriguchi T, Britsch L, Schiltz E, Matern U (2002). Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from *Citrus unshiu*. *Eur J Biochem*, 269: 4134~4142