

龙眼胚胎 F3H 基因的 cDNA 克隆及序列分析

章希娟^{1,3}, 许鸿川^{1,2}, 游向荣^{1,2}, 李燕^{1,2}, 陈清西^{1,3}, 陈伟^{1,2*}

(¹福建农林大学蛋白质组学研究中心, 福州 350002; ²福建农林大学生命科学学院, 福州 350002; ³福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

摘要: 采用 IEF/SDS-PAGE 双向电泳技术, 对 '立冬本' 龙眼合子胚发育不同时期的蛋白质进行分离, 通过 MALDI-TOF/TOF 鉴定到其中一个上调差异表达的蛋白为黄烷酮-3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H)。以 '立冬本' 龙眼胚胎 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 获得 F3H 基因 cDNA 1 404 bp 全长序列。序列分析表明, F3H 基因共编码 365 个氨基酸, 其 cDNA 序列与柑橘、苹果、棉花等 F3H 基因的同源性均高达 80% 以上, 该基因在 GenBank 中登录号为 EF468104。

关键词: 龙眼; 胚胎; 黄烷酮-3-羟化酶; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S 667.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 11-1581-06

Cloning and Sequence Analysis of F3H Gene cDNA from Longan Embryo

ZHANG Xi-juan^{1,3}, XU Hong-chuan^{1,2}, YOU Xiang-rong^{1,2}, LI Yan^{1,2}, CHEN Qing-xi^{1,3}, and CHEN Wei^{1,2*}

(¹Research Center for Proteomics, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ²College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ³College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The protein of 'Lidongben' longan zygotic embryos during different development stages were separated and compared by IEF/SDS-PAGE technique. Flavanone 3-hydroxylase was one of differential proteins identified by MALDI-TOF/TOF. Then F3H gene cDNA sequence was cloned from longan zygotic embryos using RT-PCR and RACE technique. A 1 404 bp full-length cDNA sequence was obtained. Analysis of F3H gene cDNA indicated that it encoded a peptide containing 365 amino acids. The nucleotide sequence comparison with the F3H gene of *Citrus sinensis*, *Gossypium hirsutum* and *Pinus cammuni* showed that identity was all higher than 80%. The sequence was accepted and released by GenBank (Accession number: EF468104).

Key words: longan; embryo; flavanone 3-hydroxylase; gene cloning; sequence analysis

从分子生物学角度看, 植物胚胎的分化发育过程是基因在机体内外因素协同作用下, 在时间和空间上顺序表达的过程。目前许多与胚胎发育相关的重要基因已被成功克隆分离。

LEC1 (*LEAFY COTYLEDON 1*) 基因是子叶特化以及胚胎成熟所必需的。胚胎发生早期, *LEC1* 是决定胚柄形成和子叶分化必须的。在胚胎发育后期, *LEC1* 是种子成熟中许多程序必需的, 包括干燥耐受性的获得和储藏物的积累 (Lotan et al., 1998)。 *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON 2*) 编码一个含 B3 区域 (植物特有的一种 DNA 结合基序) 的转录调控因子, 它控制胚发育的正确启动, 在胚发育早

收稿日期: 2008-08-12; 修回日期: 2008-10-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370999); 福建省自然科学基金项目 (C0410013)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: weichen909@163.com)

章希娟现工作单位为福建省农业科学院果树研究所。

期和后期均大量表达 (Stone et al, 2001)。STM (SHOOT MERISTEMLESS) (Long et al, 1996)、G蛋白的 γ -亚基 (Kaydamony et al, 2000)、PGA6 (Zuo et al, 2002)、热激蛋白基因 (HSPs) (Dong & Dunstan, 1996) 等和胚胎发育相关基因也已被分离克隆。龙眼的果核 (种子) 大小与胚胎发育状况直接相关, 胚胎早期或中途败育是小 (细) 核果形成的原因 (吕柳新等, 1985)。

在龙眼生产上, 果核大是影响品质的一个重要因素, 因此, 培育胚胎中途败育的焦 (小) 核优良品种, 在生产上有重要价值。荔枝已有许多大面积种植的焦 (小) 核生产品种, 而在龙眼中缺乏具有焦核性状的生产品种, 且传统的育种方法难以转移焦核性状, 因此开展龙眼胚胎蛋白质组和基因克隆的研究具有重要理论和生产意义。

‘立冬本’是福建晚熟良种, 果大, 果核发育正常, 适合作为本研究的试材。本研究通过对‘立冬本’胚胎不同发育时期蛋白质的分离, 并克隆胚胎发育相关的差异蛋白基因, 分析其功能与胚胎发育的关系, 从分子水平上揭示龙眼胚胎发育与分化的本质, 为最终实现胚胎发育的基因调控奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于 2006—2007 年进行。试材龙眼‘立冬本’采自福建省农科院果树研究所。分别选取生长发育结果正常、树龄一致、同时开花的植株各 3 株, 于谢花后 31 d 和 38 d 采集正常幼果, 剥离胚胎, 用液氮速冻, -70°C 保存备用。

1.2 双向凝胶电泳

龙眼胚胎总蛋白的提取、蛋白质含量测定及双向电泳参照李燕等 (2006) 和陈伟等 (2001) 的方法。

1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 的克隆

采用酚—SDS 法提取龙眼胚胎总 RNA, 按 Fermentas 公司 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis 试剂盒的方法合成 cDNA 第一链, 并以此为模板, 进行特异性扩增。

参照已发表的柑橘、苹果、梨等 *F3H* 基因的 cDNA 序列设计两条特异性引物 P1: 5'-CAAGACTGCGGTGAAA TAGTGAC-3', P2: 5'-CTTTGCTCA TCTTCCTCTGTAC-3' 用于 RT-PCR 扩增。

PCR 扩增条件为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 40 s, 72°C 40 s, 35 个循环扩增; 4°C 保存。

根据 RT-PCR 扩增产物的测序结果设计 3 RACE 顺式引物 F3H-3R: 5'-CCATTATTTGACAAACGGAAGG-3' 和 5 RACE 反式引物 F3H-5R: 5'-CTGGCTTGTCGGGCCACCTTGA-3'。

参照 Clontech 公司的 SMARTTM RACE cDNA Amplification 试剂盒进行。3 RACE 的扩增条件为: 94°C 5 min; 94°C 45 s, 58°C 45 s, 72°C 1 min, 35 个循环扩增; 4°C 保存。5 RACE 的扩增条件为: 94°C 30 s, 72°C 3 min, 5 个循环; 94°C 30 s, 70°C 30 s, 72°C 3 min, 5 个循环; 94°C 30 s, 68°C 30 s, 72°C 3 min, 25 个循环; 4°C 保存。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳后, 回收纯化连接到 pGEM-T vector, 转化, 挑取阳性克隆子, PCR 检测后送至 Invitrogen 公司测序。测序结果利用 BLAST 进行碱基序列和氨基酸序列的同源性分析。

1.4 RT-PCR 分析

对龙眼胚胎花后 31 d 和 38 d 两个时期的总 RNA 进行定量, 用 cDNA 第一链合成试剂盒进行逆转录, 合成 cDNA 第一链。在等量 RNA (cDNA) 的条件下, 用引物 P1、P2 通过 RT-PCR 进行龙眼胚胎 *F3H* 基因不同发育时期的表达研究。PCR 扩增条件为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 40 s, 72°C 40 s, 25 个循环扩增。

2 结果与分析

2.1 龙眼胚胎蛋白质的双向电泳分析

采用窄范围 pH 4~7 的线性 IPG 干胶条分离 ‘立冬本’ 龙眼胚胎发育不同时期的蛋白质, 结果表明其胚胎不同发育时期的蛋白质组存在差异, 分离到胚胎发育相关蛋白 18 个。

选择谢花后 38 d 胚胎一个上调表达的蛋白 (如图 1 所示), 通过 MALDI-TOF-TOF-MS 分析和 Mascot 查询, 确定该差异蛋白为 flavanone 3-hydroxylase (黄烷酮-3-羟化酶, *F3H*)。

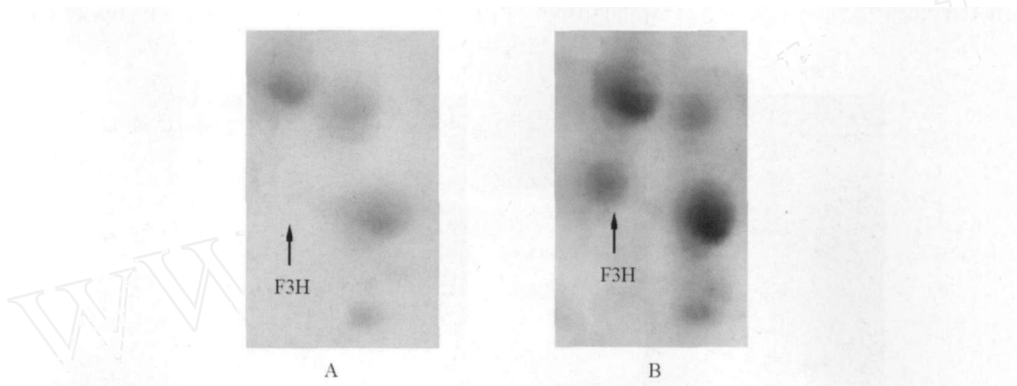


图 1 龙眼胚胎发育不同时期差异蛋白 *F3H* 差异表达图谱

A: 花后 31 d; B: 花后 38 d

Fig. 1 Differentially expressed protein *F3H* in longan embryo during different development stages

A: 31 days after anthesis; B: 38 days after anthesis

2.2 龙眼胚胎 *F3H* 基因 cDNA 的 RT-PCR 扩增

以 cDNA 第一链为模板, 利用一对特异性引物 P1、P2 进行 PCR 扩增, 获得了一个大约 600 bp 的特异产物 (图 2)。

对该片段进行回收纯化, 经连接、转化、筛选阳性克隆、重组质粒的 PCR 鉴定、测序, 得到一个 616 bp 的 cDNA 序列。

经 BLAST 分析, 此序列为 *F3H* cDNA 的同源片段。

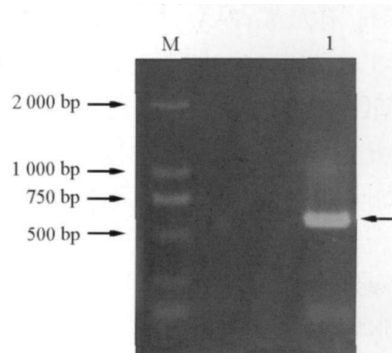


图 2 龙眼胚胎 *F3H* 基因 cDNA 保守区 RT-PCR 扩增结果

M: TaKaRa DL 2000 marker; 1: *F3H* 特异片段电泳检测结果。

Fig. 2 RT-PCR amplified product of *F3H* gene conserved sequence in longan embryo

M: TaKaRa DL 2000 marker; 1: Electrophoresis of *F3H* gene fragment

2.3 龙眼胚胎 F3H 基因 cDNA 3 RACE和 5 RACE扩增

根据 RT-PCR的测序结果设计 3 RACE和 5 RACE的特异性引物, 3 RACE试验与 5 RACE试验扩增信号很强, 均在首轮扩增便获得了清晰的特异性条带, 大小也与预期的相符 (图 3)。

经连接、转化、筛选阳性克隆、重组质粒 PCR 性鉴定、测序, 3 RACE试验获得一个大小为 500 bp的 cDNA片段。

该片段有 202 bp与 RT-PCR的测序结果重叠, 出现的第一个终止密码子为 TAG, 3端包含一个 187 bp的 UTR结构和多聚腺苷 (polyA) 尾。

5 RACE试验得到一个大小 571 bp的 cDNA片段, 在序列的 5端包含一个 119 bp的 UTR结构。

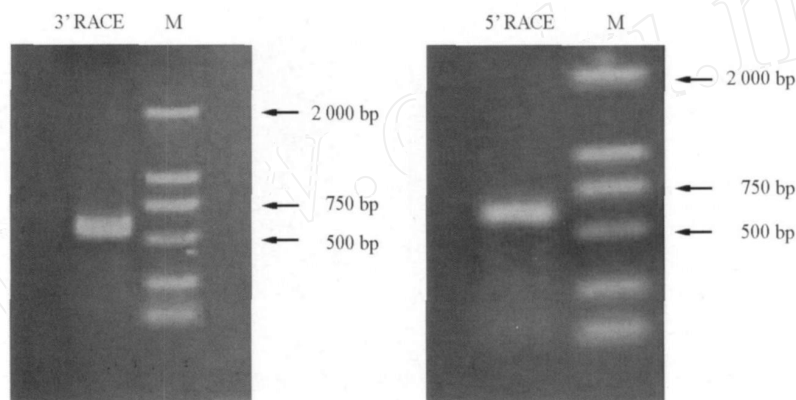


图 3 龙眼胚胎 F3H 基因 3 RACE和 5 RACE的 PCR扩增产物

M: TaKaRa DL 2000 marker

Fig. 3 3 RACE PCR and 5 RACE amplified product of F3H gene in longan embryo

M: TaKaRa DL 2000 marker

2.4 龙眼胚胎 F3H 基因 cDNA 全长序列分析

根据 RT-PCR与 RACE试验的结果, 将所获得的 3个 cDNA片段拼接, 得到龙眼胚胎 F3H cDNA的全长序列。该序列全长 1 404 bp, 已登录 GenBank, 登录号为: EF468104 (GI 134039063)。

利用 DNAMAN软件进行分析, 该 cDNA序列包含一个完整开放阅读框 (120 ~ 1 217), 编码 365个氨基酸, 在 3 poly (A)⁺区之前 15 bp有一 AATAAA加尾信号, 这些都符合有效翻译的基因全长 cDNA的特征。该基因含有 119 bp的 5非编码区和 187 bp的 3非编码区。

经 BLAST分析, 龙眼胚胎 F3H基因 cDNA序列与许多植物的 F3H基因具有很高的同源性。与棉花 F3H的同源性达 84%, 与柑橘 F3H的同源性达 82%, 与草莓 F3H的相似系数达 83%, 与梨的 F3H相似系数达 79%, 与苹果 F3H的同源性达 80%, 证实本试验所得到的 cDNA确实为龙眼胚胎的 F3H cDNA。

对其氨基酸序列进行分析发现, 龙眼 F3H的氨基酸序列与棉花 F3H同源性最高, 达 90.76%, 与葡萄、柑橘、草莓、梨和苹果的同源性分别为 89.04%、88.49%、86.10%、83.88%和 82.83% (图 4)。

2.5 龙眼胚胎 F3H 基因在不同发育时期的表达

RT-PCR分析检测结果如图 5所示, 龙眼胚胎 F3H基因在花后 31 d和 38 d两个时期都有表达, 龙眼胚胎 F3H基因在花后 38 d的表达量大于花后 31 d的表达量。这一结果和 F3H蛋白的上调表达是一致的。

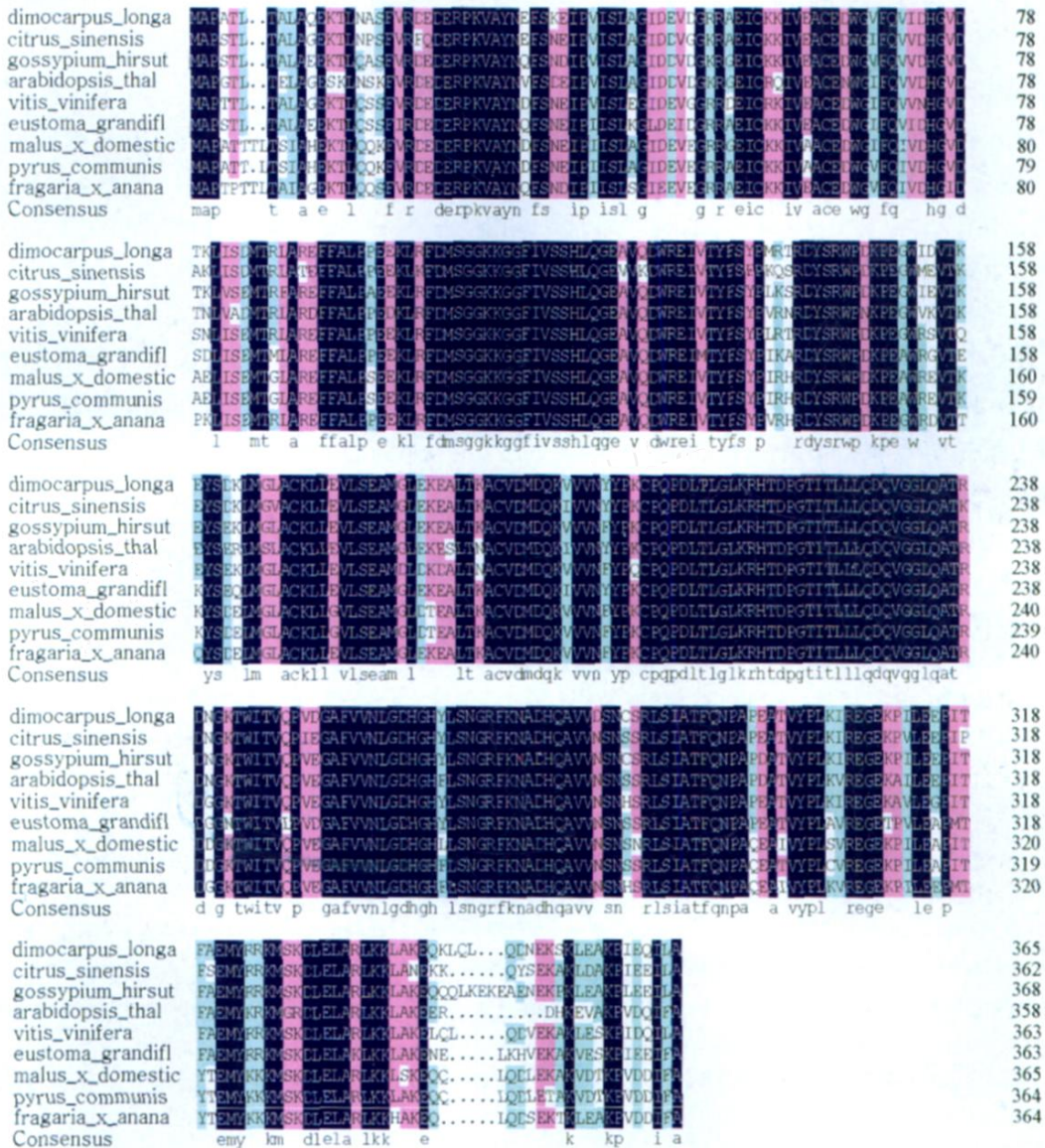


图 4 不同植物 F3H 氨基酸序列同源性比较

黑色表示氨基酸序列同源性为 100%，红色表示 80%~99%，蓝色表示 60%~79%。

Fig. 4 Alignment of predicted amino acid sequences of F3H from different plants

Black, red and blue show 100%, 80%~99%, 60%~79% identity respectively in amino acid sequences.

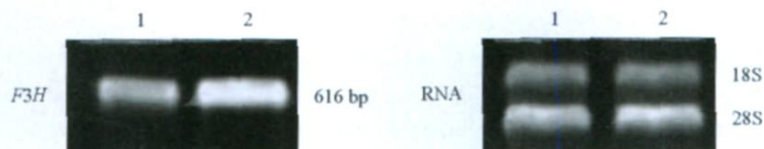


图 5 龙眼胚胎 F3H 基因不同发育时期的表达

1: 花后 31 d; 2: 花后 38 d。

Fig. 5 Expression of F3H in longan embryo in different development stages

1: 31 days after anthesis; 2: 38 days after anthesis.

3 讨论

黄烷酮 3-羟化酶 (F3H) 是黄酮类化合物合成途径中的一个关键酶。它催化 4, 5, 7-黄烷酮 C3 位的羟化, 属于依赖 2-酮戊二酸的双加氧酶家族。1991 年, F3H 基因的 cDNA 首次被 Martin 等 (1991) 从金鱼草中克隆出来。目前在拟南芥、矮牵牛、玉米、茄子、苜蓿、葡萄、苹果、柑橘、梨、康乃馨、翠菊、日本牵牛等植物中也都克隆到 F3H 基因。许多研究表明 F3H 在植物花粉发育和花粉管伸长中起重要作用 (Matthew et al, 1996; Nathalie et al, 2001; 张学英等, 2004), 还有报道认为黄酮类化合物参与信号传导过程 (邓晓军等, 2004)。但 F3H 和植物胚胎发育的关系尚未见报道。本研究结果提示的 F3H 上调表达可能与龙眼花后 31 d 之后的胚胎分化发育有关, 其花后 31 d 至 38 d 的胚胎急剧增加, 促进了胚胎黄酮类化合物的合成。推测黄酮类化合物的积累可能和龙眼胚胎的育性、胚胎分化发育进程中的信号传导有关, 并且可能是正常的胚胎发育所必需的。本研究的后续工作将 F3H 基因转化拟南芥, 验证其在植物胚胎中的生物学功能, 为分子水平上进行龙眼品质改良奠定基础。

References

- Chen Wei, L Ü Liu-xin, Huang Chun-mei, Zhou Jie, Liang Wen-yu. 2001. Studies on 'Wuye' litchi specific proteins in the embryo development stages. *Acta Horticulturae Sinica*, 28 (6): 504 - 508. (in Chinese)
- 陈伟, 吕柳新, 黄春梅, 周洁, 梁文裕. 2001. '乌叶'荔枝胚胎发育过程特异蛋白的变化. *园艺学报*, 28 (6): 504 - 508.
- Deng Xiao-jun, Chen Xiao-ya, Du Jia-wei. 2004. Plant volatiles and their metabolic engineering. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 30 (1): 11 - 18. (in Chinese)
- 邓晓军, 陈晓亚, 杜家纬. 2004. 植物挥发性物质及其代谢工程. *植物生理与分子生物学学报*, 30 (1): 11 - 18.
- Dong J Z, Dunstan D I. 1996. Characterization of three heat-shock protein genes and their developmental regulation during somatic embryogenesis in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta*, 200 (1): 85 - 91.
- Kaydamony C, Tewes A, Adler K. 2000. Molecular characterization of cDNAs encoding G protein alpha and beta subunits and study of their temporal and spatial expression patterns in *Nicotiana glauca* V. *Biochim Biophys Acta*, 1491 (1 - 3): 143 - 160.
- Li Yan, Cai Jian-xiu, Zheng Shao-quan, Chen Si-si, Chen Qing-xi, Chen Wei. 2006. Analysis of proteins during different embryo development stages of longan 'Red Seed'. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 27 (4): 64 - 68. (in Chinese)
- 李燕, 蔡建秀, 郑少泉, 陈思思, 陈清西, 陈伟. 2006. '红核子'龙眼胚胎发育不同时期的蛋白质组分析. *热带作物学报*, 27 (4): 64 - 68.
- Long J A, Moan E I, Medförd J I, Barton M K. 1996. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by *STM* gene in *Arabidopsis*. *Nature*, 379: 66 - 69.
- Lotan T, Ohto M, Matsudaira Y, West M A L, Lo R, Kwong R W, Yamagishi K, Fischer R L, Goldberg R B, Harada J J. 1998. *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93: 1195 - 1205.
- L Ü Liu-xin, Chen Rong-mu, Chen Jing-lu. 1985. Observation of litchi embryo in development process. *Subtropical Plant Communication*, (1): 1 - 5. (in Chinese)
- 吕柳新, 陈荣木, 陈景录. 1985. 荔枝胚胎发育过程的观察. *亚热带植物通讯*, (1): 1 - 5.
- Martin C, Prescott A, Mackay S. 1991. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J*, (1): 37 - 49.
- Matthew K, Pelletier, Brenda W, Shirley. 1996. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*, 111: 339 - 345.
- Nathalie N, Clarisse J, Isabelle D. 2001. The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *The Plant Cell*, 13: 2099 - 2114.
- Stone S L, Kwong L W, Yee K M. 2001. *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 11806 - 11811.
- Zhang Xue-ying, Zhang Shang-long, Luo Jun, Ye Zheng-wen, Li Shi-cheng. 2004. Advances in research on fruit anthocyanin synthesis. *Journal of Fruit Science*, 21 (5): 456 - 460. (in Chinese)
- 张学英, 张上隆, 骆军, 叶正文, 李世诚. 2004. 果实花色素苷合成研究进展. *果树学报*, 21 (5): 456 - 460.
- Zuo J, Niu Q W, Frugis G. 2002. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic in *Arabidopsis*. *Plant J*, 30 (3): 349 - 359.