

川乌头 F3'5'H 基因的 cDNA 克隆与表达分析

王翠丽^{1,2,3}, 吴丽芳^{2,3}, 王祥宁^{2,3}, 崔光芬^{2,3}, 贾文杰^{2,3}, 王继华^{2,3,*},
马璐琳^{2,3,*}

(¹华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; ²云南省农业科学院花卉研究所, 昆明 650205; ³云南省花卉育种重点实验室, 昆明 650205)

摘要: 利用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 从川乌头 (*Aconitum carmichaeli* Debx.) 花朵中克隆到 1 个类黄酮 - 3',5' - 羟基化酶基因的 cDNA 全长序列, 全长 1 720 bp, 包含 1 个编码 506 个氨基酸的开放阅读框, 命名为 *Ac-F3'5'H* (GenBank 登录号: JN635708)。序列分析表明 *Ac-F3'5'H* 编码的氨基酸序列中包含有已确定的保守基序, 包括 CYP 基序、I 螺旋区和血红素结合区等。氨基酸序列比对显示 *Ac-F3'5'H* 与其它物种的 *F3'5'H* 有很高的序列相似性。以川乌头 18S rRNA 基因 (FJ748878) 为内参, 通过半定量 RT-PCR 对 *Ac-F3'5'H* 的时空表达模式进行了分析, 结果显示 *Ac-F3'5'H* 随花朵发育, 表达量呈递增趋势, 并且在正在开放的花朵中达到最高, 而在根、茎、叶中不表达, 推测该基因可能在调节川乌头蓝色花朵形成中发挥作用。

关键词: 川乌头; 类黄酮 - 3',5' - 羟基化酶基因; 克隆; 基因表达

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2012) 07-1395-08

Cloning and Expression Pattern Analysis of Flavonoid-3',5'-hydroxylase Gene from *Aconitum carmichaeli*

WANG Cui-li^{1,2,3}, WU Li-fang^{2,3}, WANG Xiang-ning^{2,3}, CUI Guang-fen^{2,3}, JIA Wen-jie^{2,3}, WANG Ji-hua^{2,3,*}, and MA Lu-lin^{2,3,*}

(¹College of Horticulture & Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; ³Yunnan Flower Breeding Key Lab, Kunming 650205, China)

Abstract: A novel Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) gene, named *Ac-F3'5'H* (The accession number in GenBank: JN635708) was cloned from the flower of *Aconitum carmichaeli* Debx. using RT-PCR and RACE approaches. The cDNA sequence was 1 720 bp and included a whole open reading frame, which encoded 506 amino acids. Sequence alignment results showed that the *Ac-F3'5'H* had three known motifs such as "PPGP" motif, I-helix, and P450 haem-binding. The amino acid sequence of the *Ac-F3'5'H* has higher similarity with other F3'5'H. Using the 18S rRNA (FJ748878) transcripts as an internal control, semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the *Ac-F3'5'H* mRNA was highly transcribed in late phase of flowers development, which was concomitant with the appearance of anthocyanins in flower tissue. The transcript was abundant in the purple flowers but absent in leaves or

收稿日期: 2012-02-20; 修回日期: 2012-04-28

基金项目: 云南省应用基础研究计划项目 (2011FA019); 云南省花卉育种重点实验室开放基金项目 (FKL-201001)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangjih0505@sohu.com; malulin@sohu.com)

roots. This indicated that the *Ac-F3'5'H* might play a role in regulating the forming of blue flowers in *Aconitum carmichaeli* Debx.

Key words: *Aconitum carmichaeli* Debx.; flavonoid-3',5'-hydroxylase; cloning; gene expression

在观赏花卉中, 蓝色系列十分稀少, 培育蓝色花卉已成为近十多年来花卉育种中花色研究和改良的热点之一。

蓝色花形成的主要母体色素为飞燕草色素, 花瓣表皮液泡中飞燕草色素的存在与否是判断蓝色花出现的一个主要指标(Forkman, 1991; 杨少勇 等, 2003)。类黄酮-3',5'-羟基化酶(flavonoid-3',5'-hydroxylase, F3'5'H)是飞燕草色素合成过程中的关键酶, 因此被称为“蓝色基因”(Holton & Tanaka, 1994; Shimada et al., 1999)。通过导入外源 F3'5'H 基因提高飞燕草色素及其衍生物在花瓣中的含量, 为观赏植物产生新异的蓝色花提供了机会, 因此 F3'5'H 基因的分离和功能研究成为蓝色花分子育种的研究重点和热点之一。近年来已先后在矮牵牛(Holton et al., 1993)、大花草原龙胆(Nielsen & Podivinsky, 1997)、蔓长春花(Mori et al., 2004)、瓜叶菊(孟丽, 2006)、马鞭草(Togami et al., 2006)、蝴蝶兰(Wang et al., 2006)、万代兰(Ratanasut et al., 2011)、非洲紫罗兰(Sato et al., 2011)等多种植物中分离了 F3'5'H 基因, 并对其表达模式和功能进行了初步研究。有的已经用于育种(Fukui et al., 2003; Katsumoto et al., 2007), 目前已有通过转基因技术育成的蓝色康乃馨、月季等(Tanaka et al., 2010)。

川乌头(*Aconitum carmichaeli* Debx.)属毛茛科乌头属植物, 具有蓝色花色基因, 可用于花卉新品种的选育(瞿素萍 等, 2004)。

本试验中以云南野生的川乌头为材料, 克隆了 1 个 F3'5'H 全长基因, 并对其在花朵不同发育时期以及不同组织的表达模式进行了分析, 为进一步研究利用川乌头 F3'5'H 基因提供一定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

云南野生川乌头由云南省农业科学院花卉研究所提供, 种植于花卉研究所实验基地。于盛花期(花朵发育时期: 1, 没有显色的花蕾; 2, 带蓝色的花蕾; 3, 开裂的带蓝色的花; 4, 正在开放的花; 5, 完全开放的花)分别取其根、茎、叶及 5 个不同发育时期花朵, 在液氮中速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

试验所用的感受态细胞为 *TransI-T1*, 购自北京全式金生物技术有限公司。RNA 提取所用试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。Tris 碱、EDTA、DEPC、PCR 产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。*Taq* 酶、反转录酶、pMD^{18T} Vector 和 RACE 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

引物(表 1)由上海捷瑞生物技术有限公司合成。

1.2 *Ac-F3'5'H* 的 cDNA 全长克隆

RNA 的分离按照 Trizol 说明书进行。cDNA 第一链的合成程序按照 AMV 反转录酶说明书进行操作。

根据 GenBank 中已公布的其它物种 F3'5'H 基因的保守序列设计兼并引物 W-FH-F 和 W-FH-R, 以川乌头正在开放的花朵 cDNA 为模板克隆其 F3'5'H 基因同源片段。PCR 反应体系中各组分的浓度

参考 *Taq* 酶的说明书, 反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 50 ~ 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。目的条带回收按照北京全式金生物技术有限公司 DNA 回收试剂盒说明书进行, 连接按照 pMD^{18T} Vector 说明书进行。转化 Trans1-T1 感受态细胞, 筛选阳性克隆送交上海杰李生物技术有限公司测序。根据所获得目的基因片段核苷酸序列分别设计 3'端 RACE 引物 (3' outer 和 3' inner) 和 5'端 RACE 引物 (5' outer 和 5' inner), 按照 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 和 5'-Full RACE Kit 说明书进行操作。

根据 5'和 3'末端已知序列设计包括完整 ORF 框的特异引物 W1-FH-F 和 W1-FH-R。以正在开放的花朵总 RNA 的反转录产物为模板进行 PCR 扩增。对目的条带进行回收纯化与克隆载体连接后进行测序。对测序结果通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行比对分析, 并通过 DNAMAN 软件对该序列及其它物种中的 F3'5'H 基因 OFR 框氨基酸进行相似性分析。

表 1 引物列表
Table 1 Primers in this study

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence	目的基因或方法 Target genes or method
W-FH-F	CA (A/G) GA (T/C) ATGGT (A/T/C/G) TT (T/C) GC (A/T/C/G)	F3'5'H
W-FH-R	(A/T/C/G) CC (A/T/G) AT (A/T/C/G) GCCCA (A/T/G) AT (A/G) TT	
3' outer	AAGGAACATATGGCGACGAG	3' RACE
3' inner	ATCAGGTCATTGGCAGGAAC	
5' outer	AACTCGTTCGACTCCACACC	5' RACE
5' inner	CCCAGTCTTCAATGGCCTTA	
W1-FH-F	GCACCACCAATCACCATG	F3'5'H 全长 F3'5'H full-length
W1-FH-R	TTCCACAACAATTCTCCC	
W2-FH-F	TGAG TATGCTTCGGTTCT	RT-PCR
W2-FH-R	ATGCTGGTGTGTTGCTATG	
W-18S-F	TGAGAAACGGCTACCACA	内参 Internal control
W-18S-R	ACGCAATAGGACCGAAAT	

1.3 半定量 RT-PCR

提取材料总 RNA, 反转录成 cDNA 作为半定量 RT-PCR 模板, 以川乌头 18S rRNA 基因 (FJ748878) 作为内参进行 PCR。反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 28 个循环, 72 °C 延伸 10 min。根据琼脂糖电泳结果调整 RT-PCR 时所加模板量, 使内参产物亮度一致。再以调整好的各时期的 cDNA 为模板, 用 *Ac-F3'5'H* 的特异引物 W2-FH-F 和 W2-FH-R 进行 PCR 扩增。反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 28 个循环, 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统进行拍摄并分析其表达情况。

2 结果与分析

2.1 川乌头 *Ac-F3'5'H* cDNA 全长克隆

取 2 μL RNA 样品进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 检测到 RNA 条带清晰无拖尾, 说明 RNA 完整, 质量好。经紫外分光光度计检测, A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8 ~ 2.0 之间, 说明纯度较好。

根据矮牵牛、龙胆属 (*Gentiana*) 等其它物种已知 F3'5'H 基因高度保守的氨基酸序列设计简并引物 W-FH-F 和 W-FH-R, 从川乌头正在开放的花朵 cDNA 中, 克隆分离到了 861 bp 的同源片段 (图

1, A)。通过 3' RACE 与 5' RACE 分别克隆得到 734 bp (图 1, B) 和 491 bp (图 1, C) 的 F3'5'H 基因片段, 与预计大小相符, 这 3 段序列拼接后得到 1 个全长为 1 720 bp 的 cDNA 全长序列。根据拼接后的 cDNA 全长序列设计包括完整 ORF 的引物, 扩增出了长为 1 560 bp 的序列 (图 1, D), 该序列与拼接序列后的序列完全一致, ORF 编码 506 个氨基酸, 命名为 *Ac-F3'5'H* (GenBank 登录号: JN635708)。

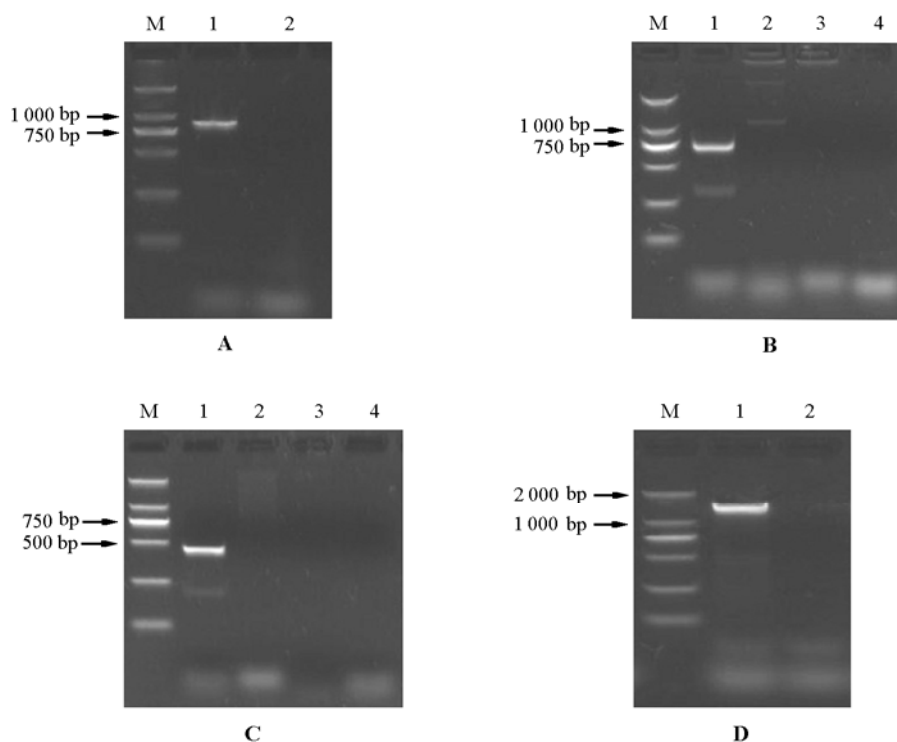


图 1 *Ac-F3'5'H* 中间序列的扩增和 RACE 的琼脂糖电泳检测

M: DL2000 marker; A: 1 为 PCR 产物, 2 为空白对照; B: 1 为 3'RACE 产物, 2 和 3 为单引物对照, 4 为空白对照;

C: 1 为 5'RACE 产物, 2 和 3 为单引物对照, 4 为空白对照; D: 1 为全长产物, 2 为空白对照。

Fig. 1 Amplification profiles of *Ac-F3'5'H* middle sequence and RACE products

M: DL2000 marker; A: 1: PCR products, 2: Blank control; B: 1: 3'RACE-products, 2 and 3: Single primer control,

4: Blank control; C: 1: 5'RACE-products, 2 and 3: Single primer control, 4: Blank control;

D: 1: *Ac-F3'5'H* gene, 2: Blank control.

利用 DNAMAN 软件对不同物种 F3'5'H 编码的氨基酸序列比对发现 *Ac-F3'5'H* 与已知序列有多处高度保守序列 (图 2)。序列分析表明 *Ac-F3'5'H* 编码的氨基酸序列中包含有已确定的保守基序, 包括细胞色素 P450 酶系 (CYP) 的基序 “PPGP” 序列 (Nielsen & Podivinsky, 1997), C 端血红素的结合区 (HBR) “FGAGRRICAG” 序列 (Bolwell et al., 1994)、I 螺旋区 “AGTDT” 高度保守序列 (Halkier, 1996) 和膜插入点的信号序列等。除了已知功能的基序外, 不同物种的 F3'5'H 还有很多高度保守的氨基酸区域, 进一步研究这些未知区域的功能, 将有助于全面了解 F3'5'H 基因在花色素代谢途径中的作用和分子机理 (孟丽, 2006)。

Ac-F3'5'H 与其它 F3'5'H 同源基因 cDNA 序列比对后具有高度的相似性 (图 3), 与翠雀、矮牵牛和风铃草的序列相似系数分别为 89%、71% 和 65%。序列相似性分析的结果初步说明分离得到了川乌头 F3'5'H 基因全长。

JN635708	MLSTR....ELVAAAIIFFIARLFVRFLLCSKQARKLPPGPKGWPVVGALPLLSMPHVAPAKMSRQYGPVIVYLKLGSCGMVASTPDS	85
AAX51796	MSISL....FLAGAAILFFVTHLLL...SPTTRTRKLPPEPKGWPVVGALPLGNMHPVALANLSRRYGPVIVYLKLGSRGMVASTPDS	81
BAC97831	MAIVD....FLAAFLIFILFQKLIQTLLFRRTYRRKLPPEPKGWPVVGALPYLGTMPHTSLAYMAKKYGPVIMYLKVGNTNMVASTPDA	84
BAA03438	.MMLLT...ELGAATSIFLIAHIIISTLISKTTGRHLPPGPERGWPVIGALPLLGAMPHVSLAKMAKKYGAIMYLKVGTCGMAVASTPDA	85
BAC10997	MMQLST...ELATAAIIIFLLAHILIS...KTSGRRLPPGPERGWPVIGALPLLDMPHVSLAKMAKKYGPIMYLKVGTCGMAVASTPHA	82
BAF93855	MAILVT...DFVVAIIIFLITRFLVRS.LFKKPTRLPPEPKGWPVVGALPLLGAMPHVALAKLAKKYGPIMHLKMGTCMDMVASTPES	85
AAB17562	MAVGNVLL.HIARSLMLFFHVQKLVQYLWMSRRRHLPPGPIGWVVLGALPLLGTMPHVALANMAKKYGPVIMYLKVGSCGLAVASTPEA	89
BAA03439	MAVGNVLL.HIAASLMLFFHVQKLVQYLWMSRRRHLPPGPIGWVVLGALPLLGTMPHVALANMAKKYGPVIMYLKVGSCGLAVASTPEA	89
BAA03440	MSIDISTLFYELVAAISLYLATYSFTRFLFKPSHHHLPPGPIGWVVLGALPLLGTMPHVSLADMAVKYGPIMYLKLGSKGTVASNPKA	90
JN635708	ARTFLKTLDLNFSNRPTDAGATHIAYNSQDMVFADYGRWKLRLKLSLHMLGSKAIEDWARVRRDEVGYMVKAMYESSCVGE..VVVVP	173
AAX51796	ARAFLLKTDLNFNSNRPTDAGATHIAYNSQDMVFADYGRWKLRLKLSLHMLGSKAIEDWARVRRDEVGYMVKAIYESSCAGE..AVHVP	169
BAC97831	ARAFLLKTLDLNFSNRPNAGATHLAYGAQDMVFAHYGPKWKLRLKLSLHMLGKALEDNANVRISLGHMLETMYESSKKGE..AVVVA	172
BAA03438	AKAFLLKTLDLNFSNRPNAGATHLAYNAQDMVFAHYGPRWKLRLKLSLHMLGKALENANVRANLGHMLKSMDSMSREGQ..RVVVA	173
BAC10997	AKAFLLKTLDLNFSNRPNAGATHFAYNAQDMVFAHYGPRWKLRLKLSLHMLGKALEDNANVRANLGHMLKSMMLDSREGQ..RVVIA	170
BAF93855	ARAFLLKTLDLNFSNRPNAGASHLAYGAQDLVFAKYGRWKLRLKLSLHMLGKALDDWANVRVTELGHM LKAMCASRCGE..PVVIA	173
AAB17562	AKAFLLKTLDMNFSNRPNAGATHLAYNAQDMVFADYGRWKLRLKLSNIHILGKALQGWEEVRKKELGMYLYAMAESGRHQG..PVVVS	177
BAA03439	AKAFLLKTLDMNFSNRPNAGATHLAYNAQDMVFADYGRWKLRLKLSNIHILGKALQGWEEVRKKELGMYLYAMAESGRHQG..PVVVS	177
BAA03440	ARAFLLKTHDANFSNRPIDGPTTYLAYNAQDMVFAHYGPKWKLRLKLSLHMLGKALEDNWAHVKVSVEGHMLKEMEQSSKSPVFPVVP	180
JN635708	DMLVFAMANMLGQVILSRRVFVTK.....GVESNEFKEMVIDLMTSAGLNFVGDYFIPSIAMMDLQGIIVRGMKRLHKKFDALLDKKL	254
AAX51796	DMLVFAMANMLGQVILSRRVFVTK.....GVESNEFKEMVIELMTSAGLNFVGDYFIPSIAMMDLQGIIVRGMKRLHKKFDALLDKKL	250
BAC97831	EMLTYAMANMIGQVILSRRVFVTK.....GSDSNFKDMVVELMTSAGLNFVGDYFIPSIAMMDLQGIIEGGMKRLHKKFDVLLTKLL	253
BAA03438	EMLTFAMANMIGQVILSKRVFVVK.....GVEVNEFKDMVELMTIAGYFNIIGDFIPCLAWMDLQGIIEKRMKRLHKKFDALLTKMF	254
BAC10997	DMLTFAMANMIGQVILSKRVFVVK.....GVEVNEFKDMVELMTVAGYFNIIGDYIPCLAWMDLQGIIEGGMKILHKKFDVLLTKMF	251
BAF93855	EMLTYAMANMIGQVILSRRVFVTK.....GTESNEFKDMVVELMTSAGYFNIIGDFIPSIAMMDLQGIIEGGMKLLHKKFDVLLTKMF	254
AAB17562	EMLTYAMANMIGQVILSKRVFVGSQ.....GSESNEFKDMVELMTVAGYFNIIGDFIPSIAMMDLQGIIEGGMKRLHKKFDALLTRLL	258
BAA03439	EMLTYAMANMIGQVILSKRVFVGSQ.....GSESNEFKDMVELMTVAGYFNIIGDFIPSIAMMDLQGIIEGGMKRLHKKFDALLTRLL	258
BAA03440	EMLTYAMANMIGRIILSRPFVITSKLSSASASVSEFYQYVMEMLRMAGLNFVGDYFIPSIAMMDLQGIIEGGMKRVIQKFFVLLNKMI	270
JN635708	KEHMATRDERKEKPDLLDVLMDNRDNKSEQERLTDNLIKALLNLF SAGTDTSSSTIEWALTEMIKNRSLKRAHAEMDQVIGRNRRLLE	344
AAX51796	REHTATRSEKRGKPDLLDVLMDNRDNKSEQERLTDNLIKALLNLF SAGTDTSSSTIEWALTEMIKNRSLFRRHAEMDQVIGRNRRLLE	342
BAC97831	EEHKQSSSKRRKPKDLDVLANRDN.SEGERLTTTNIKALLNLF SAGTDTSSSTIEWALSEMLRNPSILKRAQEMDQVIGRNRRLVE	340
BAA03438	DEHKATTYERKGPDPFLDVMENGDN.SEGERLSTTNIKALLNLF TAGTDTSSSALEWALAEMLKNPAILKKAQEMDQVIGRNRRLLE	343
BAC10997	DEHKTTTHEREGKSDFLDMVMANRDN.SEGERLSTTNIKALLNLF TAGTDTSSSVIEWALTEMLKNPAILKKAQVEMDQVIGRNRRLLE	340
BAF93855	KEHRATSHERRKGAADFLDVLLEECDN.TNGEKLSTTNIKAVLLNLF TAGTDTSSSTIEWALTEMIKNPTILKKAQEMDRVIGRDRRLLE	343
AAB17562	EEHTASAHERKGPSDFLDFVVANRDN.SEGERLHTVNIKALLNMF TAGTDTSSSVIEWALAEMLKNPAILKKAQEMDQVIGRDRRPLE	347
BAA03439	EEHTASAHERKGPSDFLDFVANGDN.SEGERLQTVNIKALLNMF TAGTDTSSSVIEWALAEMLKNPAILLRRQAEMDQVIGRDRRPLE	347
BAA03440	KEHTESAHDRKDNPDFLILMAATQENTEGIQNLVNVKALLDLF TAGTDTSSSVIEWALAEMLNHROILNRAHEEMDQVIGRNRRLLEQ	360
JN635708	SDIPKLPYLQAIKETFRRKHPSTPLNLRVAIEPEIDGGYIPKGTLSVNIWAIGRDQVWENLEFNDRPFIIGKMAKIDPRGNDFEL	434
AAX51796	SDIPKLPYLQAVCKETFRRKHPSTPLNLRVAIEPEVEGGYHHPKGTLSVNIWAIGRDQVWENLEFNDRPFIIGKMAKIDPRGNNSFL	430
BAC97831	SDISRLPYLQAIKETFRRKHPSTPLNLRVAIEAEVNGYIPKGTLSVNIWAIGRDQVWENLEFNDRPFIISGKNARIDPRGNDFEL	432
BAA03438	SDIPNLPYLRAIKETFRRKHPSTPLNLRVAIEPEIDGGYIPKNTLSVNIWAIGRDQVWENLEFNDRPFIISGRNSKIDPRGNDFEL	433
BAC10997	SDISNLPYLRAIKETFRRKHPSTPLNLRVAIEPEIDGGYIPKNTLSVNIWAIGRDQVWENLEFNDRPFIISGKYAKIDPRGNDFEL	430
BAF93855	SDISSLPYLQAIKETFRRKHPSTPLNLRVAIQAEVGGYIPKNTLSVNIWAIGRDQVWENLEFNDRPFIISENGKINPRGNDFEL	433
AAB17562	ADISKLPYLQAIKETAFRKHPSTPLNLRVAISQAQAEVNGHYIPKGTLSVNIWAIGRDQVWENLEFNDRPFIISGRNSKIDPRGNDFEL	437
BAA03439	ADISKLPYLQAIKETAFRKHPSTPLNLRVAISQAQAEVNGHYIPKGTLSVNIWAIGRDQVWENLEFNDRPFIISGRNSKIDPRGNDFEL	437
BAA03440	SDIPNLPYFQAIKETFRRKHPSTPLNLRVAIEAEVDFHPIKNTLSVNIWAIGRDQVWENLEFNDRPFIISSEKHAIDPRGNDFEL	450
JN635708	IPFGAGRRICAGTRMGIVLVEYILGTLVHAFEWKMP.DGETLSMDEAFGLALQKAVPLAAMVTPRLPPSAMV	505
AAX51796	IPFGAGRRICAGTRMGIVLVEYILGTLVHAFEWKLR.DGEMLNMEETFGIALQKAVPLAAMVTPRLPPSAMV	501
BAC97831	IPFGAGRRICAGTRMGILLVEYILGTLVHAFEDWNLPPSVTELNMEESFGIALQKAVPLSALVTPRLPINAMV	504
BAA03438	IPFGAGRRICAGTRMGIVMVEYILGTLVHAFEDWKLPSVEIELNMEAFGLALQKAVPLEAMVTPRLQLDVMV	505
BAC10997	IPFGAGRRICAGTRMGIVMVEYILGTLVHAFEDWKLPSDVEIELNMEVFGALQKAVPLEAMVTPRLPLNVVA	502
BAF93855	IPFGAGRRICAGTRMGIVMVEYILGTLVHAFEDWKLPSVTELNMEESFGIALQKAVPLSALVSPRLASNAVA	505
AAB17562	IPFGAGRRICAGTRMGILLVEYILGTLVHAFEDWELPSSVEIELNMEPFGALQKAVPLAAMVTPRLPLHINC	509
BAA03439	IPFGAGRRICAGTRMGILLVEYILGTLVHAFEDWELPSSVEIELNMEPFGALQKAVPLAAMVTPRLPLHINC	509
BAA03440	IPFGAGRRICAGTRMGIVMVEYILGTLVHAFEDWKLPSVTELNMEESFGIALQKAVPLSALVTPRLPPSSVT	522

图 2 不同物种 F3'5'H 氨基酸比对

JN635708: 川乌头; AAX51796: 翠雀; BAC97831: 蔓长春花; BAA03438: 矮牵牛; BAC10997: 赛亚麻; BAF93855: 三色堇; AAB17562: 大花草原龙胆; BAA03439: 草原龙胆; BAA03440: 风铃草。阴影部分为完全相同的氨基酸; 方框所示依次为细胞色素 P450 酶系 (CYP) “PPGP” 基序、I 螺旋区和 C 端血红素结合区; 下划线部分为风铃草 F3'5'H 氨基酸中特有的 9 个氨基酸特殊区段; 氨基酸所处位置在最右边显示。

Fig. 2 Sequence alignment of F3'5'H cDNAs from different species

JN635708: *Radix Aconiti*; AAX51796: *Delphinium*; BAC97831: Periwinkle; BAA03438: *Petunia*; BAC10997: Cupflowe; BAF93855: Pansy; AAB17562: *Lisianthus*; BAA03439: *Eustoma*; BAA03440: Canterbury bellst. Shaded regions show identical amino acid; Box indicates: “PPGP” moti, I-helix motif and haem-binding region of cytochrome P450 (CYP); Underlined region shows nine special amino acids of F3'5'H from canterbury bellst; The positions of amino acids are given on the right.

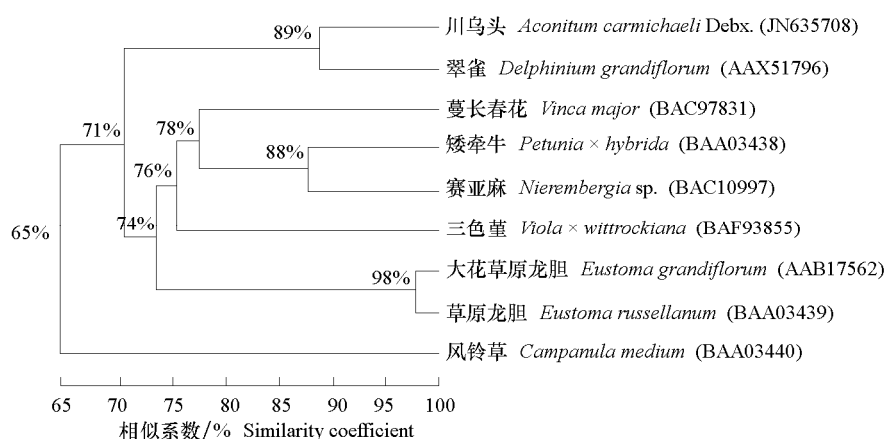


图 3 *Ac-F3'5'H*及其同源基因cDNA序列相似性分析

Fig. 3 Dendrogram based sequence similarity of F3'5'H cDNAs from different species

2.2 *Ac-F3'5'H* 基因的时空表达

半定量 RT-PCR 结果显示: *Ac-F3'5'H* 在花朵 5 个时期都有表达, 但表达趋势差异较大, 没有显色的花蕾期表达很微弱, 随着花瓣的发育, 表达量逐渐增加, 在正在开放的第 4 时期达到最高, 在完全开放的第 5 时期又迅速降低, 而在根、茎、叶中均不表达 (图 4), 说明 *Ac-F3'5'H* 是花器官特异性表达的基因。随着花朵的开放, *Ac-F3'5'H* RNA 在花朵发育后期高度反转录并伴随着花朵蓝色出现, 表明 *Ac-F3'5'H* 可能在调节川乌头蓝色花朵形成中发挥作用。类似的表达模式在大花草原龙胆 (Nielsen & Podivinsky, 1997)、蔓长春花 (Mori et al., 2004)、蝴蝶兰 (Wang et al., 2006)、赛亚麻 (Yukiko et al., 2006) 和万代兰 (Ratanasut et al., 2011) 的花朵中已经被报道。

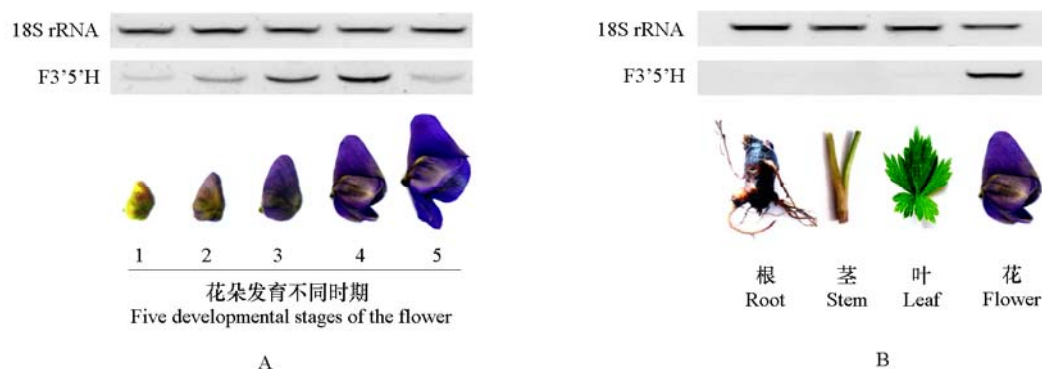


图 4 *Ac-F3'5'H* 基因 RT-PCR 表达分析

A. *Ac-F3'5'H* 在花朵不同发育时期表达结果; B. *Ac-F3'5'H* 在不同组织部位表达结果。

Fig. 4 RT-PCR analysis of *Ac-F3'5'H*

A. Expression pattern of *Ac-F3'5'H* in the five developmental stages of the flower;

B. Expression pattern of *Ac-F3'5'H* in petals, leaves, stems and roots.

3 讨论

3.1 F3'5'H 基因氨基酸序列分析

通过序列比对分析发现, 在所有已知的 F3'5'H 基因中 *Ac-F3'5'H* 与翠雀中的相似度最高 (相似

系数为 89%), 这可能与川乌头和翠雀都属于毛茛科, 进化关系较近有关。在一定程度上验证了一些研究者认为植物中的 F3'5'H 基因氨基酸序列可以作为植物分类的系统进化树, 并与恩格勒植物分类系统顺序是一致的结论(陈俊愉和程绪珂, 1989; 孟丽, 2006)。相对而言, *Ac-F3'5'H* 与风铃草 F3'5'H 基因的序列相似度不是很高(相似系数约为 65%), 有研究发现, 风铃草的 F3'5'H 基因在烟草中的表达可以促使烟草中积累高达 99% 的飞燕草色素, 明显高于矮牵牛、大花草原龙胆等, 推测引起此现象的原因可能与风铃草 F3'5'H 基因编码的氨基酸序列中 9 个特有的“SKLDSSASA”特殊区段(图 2)有关, 这个特殊区段可能会促使合成更多的蓝色色素(Okinaka et al., 2003), 但这个机理还不是很确定。然而不仅 *Ac-F3'5'H* 缺少这个特殊区段, 现已知的多种植物中的 F3'5'H 基因也都缺少这个特殊区段, 矮牵牛(Holton et al., 1993)、大花草原龙胆(Nielsen & Podivinsky, 1997)、蔓长春花(Mori et al., 2004)和赛亚麻(Yukiko et al., 2006)等中的 F3'5'H 基因通过遗传转化证明都在一定程度上促进了飞燕草色素的积累, 其中三色堇 F3'5'H 基因(Brugliera et al., 2004)是蓝色月季成功育出的关键因素之一(Katsumoto et al., 2007)。因此, 风铃草 F3'5'H 基因中 9 个氨基酸特殊区段是否真能促进更多的蓝色色素积累还有待进一步研究确证。川乌头 *Ac-F3'5'H* 与这些已经验证功能的同源基因有着极高的相似性, 可作为新的蓝色基因用于花色改良的研究。其功能的验证和在花色形成中的生化作用需进一步研究。

3.2 F3'5'H 基因表达模式的分析

不同物种 F3'5'H 基因在不同发育时期和不同组织的时空表达模式也有所差异。蓝色瓜叶菊 F3'5'H 基因在花朵第一阶段表达量最高, 其它阶段没有检测到其表达, 但在叶片中有表达, 而瓜叶菊叶背和叶柄基部存在蓝色着色点(孟丽, 2006)。细茎石斛 F3'5'H 基因在其花萼和花瓣的表达量远远低于花柱基部, 其花被呈现白色而花柱基部具有红紫色斑点(Whang et al., 2011)。*Ac-F3'5'H* 和大花草原龙胆(Nielsen & Podivinsky, 1997)、蔓长春花(Mori et al., 2004)、蝴蝶兰(Wang et al., 2006)、赛亚麻(Yukiko et al., 2006)、万代兰(Ratanasut et al., 2011)等的 F3'5'H 基因在其花朵中的表达结果显示都是正在开放的花朵中表达量最高, 在没有显色的花蕾和完全开放的花朵中不表达或者微弱表达。并且, *Ac-F3'5'H* 只在花朵部位特异表达。F3'5'H 基因表达上的差异可能是由于不同的物种本身合成飞燕草色素的调节基因存在一定的差异(Morita et al., 2006)所致。另外, 不同植物花朵的花形、着色程度以及发育时期等差异可能也会造成表达趋势存在差异。

References

- Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*, 37 (6): 1491 - 1506.
- Brugliera F, Tanaka Y, Mason J. 2004. flavonoid-3',5'-hydroxylase gene sequences and uses therefore. Patent publication number: WO2004/020637.
- Chen Jun-yu, Cheng Xu-ke. 1989. *Scripture of flowers of China*. Shanghai: Shanghai Culture Publishing House: 111 - 554. (in Chinese)
- 陈俊愉, 程绪珂. 1989. *中国花经*. 上海: 上海文化出版社: 111 - 554.
- Forkman G. 1991. Flavonoids as flower pigments: The formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breeding*, 106 (1): 1 - 20.
- Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Iwashita T, Nomoto K. 2003. A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid-3',5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry*, 63: 15 - 23.
- Halkier B A. 1996. Catalytic relatedities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry*, 43 (1): 1 - 21.
- Holton T A, Brugliera F, Lester D R, Tanaka Y, Hyland C D, Menting J G T, Lu C Y, Farcy E, Stevenson T W, Cornish E C. 1993. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature*, 366: 276 - 279.
- Holton T A, Tanaka Y. 1994. Blue roses-a pigment of our imagination. *Trend in Biotechnology*, 12: 40 - 42.

- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiology*, 48 (11): 1589 - 1600.
- Meng Li. 2006. Isolation and expression pattern of key genes involved in blue flower formation [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 孟 丽. 2006. 蓝色花形成关键基因的分离及其表达分析 [博士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Mori S, Kobayashi H, Hoshi Y, Kondo M, Nakano M. 2004. Heterologous expression of the flavonoid-3',5'-hydroxylase gene of *vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports*, 22: 415 - 421.
- Morita Y, Saitoh M, Hoshino A, Nitasaka E, Iida S. 2006. Isolation of cDNA for R2R3-MYB, bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of c and ca mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiology*, 47 (4): 457 - 470.
- Nielsen K M, Podivinsky E. 1997. cDNA cloning and endogenous expression of a flavonoid-3',5'-hydroxylase from petals of *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*). *Plant Science*, 129: 167 - 174.
- Okinaka Y, Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Kiyokawa S, Kikuchi Y. 2003. Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative flavonoid-3',5'-hydroxylase cDNA from *campanula medium*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67 (1): 161 - 165.
- Qu Su-ping, Chen Wei, Qu Yun-hui, Li Shu-fa. 2004. Rapid propagation of *Aconitum carmichaeli* seedling by tissue culture. *Chinese Wild Plant Resources*, 23 (4): 22 - 26. (in Chinese)
- 瞿素萍, 陈 伟, 屈云慧, 李树发. 2004. 组织培养法快速繁殖川乌头种苗. *中国野生植物资源*, 23 (4): 22 - 26.
- Ratanasut K, Wongkhamprai B, Maknoi S. 2011. Expression of a CYP76AB1 correlates with the sequential white-blue-white colour transition of *Vanda coerulea* petals. *Biologia Plantarum*, 55 (2): 353 - 356.
- Sato M, Kawabe T, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. 2011. Tissue culture-induced flower-color changes in *Saintpaulia* caused by excision of the transposon inserted in the flavonoid-3', 5'-hydroxylase (F3'5'H) promoter. *Plant Cell Report*, 30: 929 - 939.
- Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Okinaka Y, Kiyokawa S, Kikuchi Y. 1999. Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3', 5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants. *FEBS Letters*, 461 (3): 241 - 245.
- Tanaka Y, Brugliera F, Kalc G, Senior M, Dyson B, Nakamura N, Katsumoto Y, Chandler S. 2010. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: Practical perspectives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74 (9): 1760 - 1796.
- Togami J, Tamura M, Ishiguro K, Hirose C, Okuhara H, Ueyama Y, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Suzuki K, Fukui Y, Kusumi T, Tanaka Y. 2006. Molecular characterization of the flavonoid biosynthesis of *Verbena hybrida* and functional analysis of *verbena* and *Clitoria ternatea* F3'5'H genes in transgenic verbena. *Plant Biotechnology*, 23: 5 - 11.
- Wang Jingwen, Ming Feng, Han Yingying, Shen Daleng. 2006. Flavonoid-3',5'-hydroxylase from *Phalaenopsis*: A novel member of cytochrome P450s, its cDNA cloning, endogenous expression and molecular modeling. *Biotechnology Letters*, 28: 327 - 334.
- Wang S S, Um W S, Song I J, Lim P O, Choi K, Park K W, Kang K W, Choi M S, Koo J C. 2011. Molecular analysis of anthocyanin biosynthetic genes and control of flower coloration by flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) in *Dendrobium moniliforme*. *Journal of Plant Biology*, 54 (3): 209 - 218.
- Yang Shao-yong, An Yin-ling, Fan Guo-sheng, Bi Wang-fu, Wang Sha-sheng. 2003. Pigmentation mechanisms of anthocyanins of blue flowers. *Journal of Beijing Forestry University*, 25 (5): 68 - 76. (in Chinese)
- 杨少勇, 安银岭, 樊国盛, 毕望富, 王沙生. 2003. 蓝色花植物花色素的着色机理. *北京林业大学学报*, 25 (5): 68 - 76.
- Yukiko U, Yukihisa K, Yuko F, Masako F M, Hideo O, Takaaki K, Takashi I, Yoshikazu T. 2006. Molecular characterization of the flavonoid biosynthetic pathway and flower color modification of *Nierembergia* sp. *Plant Biotechnology*, 23: 19 - 24.