

芜菁二氢黄酮醇 4 - 还原酶基因的克隆与功能鉴定

许志茹, 刘 通, 崔国新, 李春雷, 马 静, 李玉花*

(东北林业大学生命科学学院, 林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘 要: 二氢黄酮醇 4 - 还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 是花青素生物合成晚期阶段的关键酶, 属于 NAD/NADP 依赖型还原酶家族, 催化从二氢黄酮醇转变成无色花色素苷的反应。利用 UV-A 处理 ‘津田’ 芜菁 (‘Tsuda’ turnip) 和 ‘赤丸’ 芜菁 (‘Yurugi Akamaru’ turnip) 块根 24 h 后提取总 RNA, 通过 RT-PCR 方法分别克隆了 ‘津田’ 芜菁 *BrDFR1* 和 ‘赤丸’ 芜菁 *BrDFR2* 基因。*BrDFR1* 和 *BrDFR2* 的开放读码框分别为 1 158 bp 和 999 bp, 分别编码 385 和 332 个氨基酸。氨基酸序列分析显示, *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 与大白菜 DFR 具有高度同源性, 从第 8 到第 302 位氨基酸的肽段具有 FR_SDR_e 结构域。*BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因组全长序列均含有 5 个位置与序列完全相同的内含子。Southern 杂交结果显示, ‘津田’ 芜菁 *BrDFR1* 和 ‘赤丸’ 芜菁 *BrDFR2* 基因均为单一拷贝。UV-A 可以诱导 *BrDFR1* 基因表达, 对 *BrDFR2* 基因表达的诱导效果不明显。*BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因在大肠杆菌细胞中可以表达并纯化出分子量约为 42.8 kD 的 *BrDFR1* 蛋白和 37.5 kD 的 *BrDFR2* 蛋白。过量表达 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的烟草花色加深。芜菁 DFR 基因的 RNAi 载体遗传转化烟草后, 转基因植株的花色变浅。这些工作将为阐明依光型和非依光型花青素生物合成机理奠定研究基础。

关键词: 芜菁; 二氢黄酮醇 4 - 还原酶基因; 基因克隆; 遗传转化; 功能鉴定

中图分类号: S 631.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 04-0687-14

Cloning and Function Identification of Dihydroflavonol 4-reductase Genes in Turnip

XU Zhi-ru, LIU Tong, CUI Guo-xin, LI Chun-lei, MA Jing, and LI Yu-hua*

(College of Life Sciences, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) is the critical catalyze enzyme in the later stage of anthocyanins biosynthesis, which belongs to a large redox enzyme superfamily that shares a Rossmann-fold NAD(P)H/NAD(P)(+) binding (NADB) domain. DFR catalyzes the reaction from dihydroflavonol to unstable leucoanthocyanidin. The roots of ‘Tsuda’ turnip and ‘Yurugi Akamaru’ turnip were irradiated with UV-A light for 24 h. Total RNA was isolated, and then *BrDFR1* and *BrDFR2* genes were cloned by RT-PCR method. The open reading frame (ORF) of *BrDFR1* and *BrDFR2* genes contained 1 158 bp and 999 bp encoding proteins of 385 and 332 amino acids respectively. Amino acid sequence

收稿日期: 2013 - 12 - 26; 修回日期: 2014 - 03 - 06

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (DL10CA03); 国家自然科学基金项目 (J1210053)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xuzhiru2003@126.com; lyhshen@126.com)

analysis showed that BrDFR1 and BrDFR2 have high homology with DFR of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*. The FR_SDR_e domain was in the amino acid sequence from 8 to 302 of BrDFR1 and BrDFR2. The whole genome sequences of *BrDFR1* and *BrDFR2* had five introns with the same location and sequence. Southern blotting result showed that the copy of *BrDFR1* and *BrDFR2* in 'Tsuda' turnip and 'Yurugi Akamaru' turnip genome is only one. Northern blotting result indicated that the expression of *BrDFR1* could be induced by irradiation of UV-A, and the expression of the gene was correlated with light-exposure time. The induction of UV-A irradiation on the expression of *BrDFR2* gene was indistinctively. The 42.8 kD and 37.5 kD proteins of BrDFR1 and BrDFR2 were successfully purified after *BrDFR1* and *BrDFR2* genes expressed in *E.coli* cell, respectively. The color of the flowers from *BrDFR1* and *BrDFR2* over-expressed tobacco plants was darker than that of wild type. The transgenic plants with light-colored flowers were obtained after the RNAi vector containing the *DFR* gene fragment of turnip was introduced. The present study will establish the experiment foundation for preliminarily clarifying the mechanism of light-dependent and light-independent anthocyanin biosynthesis.

Key words: turnip; dihydroflavonol 4-reductase gene; gene clone; genetic transformation; function identification

花青素是植物重要的次生代谢产物, 在花色和果色的形成、防御紫外线损伤和植物病原体侵害等方面发挥重要作用 (Tanak et al., 2008; 张龙 等, 2008)。目前, 很多植物花青素合成的代谢途径及相关基因的表达特性已经明确 (Forkmann, 1991; Niu et al., 2010), 但其合成的调控机理还在探索中。

花青素的生物合成受一系列酶催化, 二氢黄酮醇 4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 是二氢黄酮醇转变成无色花色苷一系列反应中的第 1 个催化酶, 可以催化二氢槲皮黄酮 (DHQ)、二氢槲皮醇 (DHK) 和二氢杨梅黄酮 (DHM) 分别生成无色花青素、无色花葵素和无色翠雀素。在此基础上进而形成红色花青素糖苷、砖红色花葵素糖苷和蓝紫色翠雀素糖苷, 使花和果实呈现不同的颜色 (Shimada et al., 2005)。目前已经从多种植物中克隆了 *DFR* 并研究了其表达特性 (Shimada et al., 2004, 2007; Shih et al., 2008; 胡可 等, 2009)。例如, 百脉根 (*Lotus japonicus*) 中 *DFR* 家族有 5 个成员, 在积累原花色苷 PA 的组织中 *DFR2* 特异表达; 机械损伤可以诱导 *DFR1*、*DFR2* 和 *DFR3* 表达; 转录因子 MYB、bHLH 和 WDR 复合物只能激活 *DFR2* 启动子表达 (Yoshida et al., 2010)。水母雪莲花的 *SmDFR* 只能还原 DHQ 和 DHK; *SmDFR* 基因在花中表达量最高, 在叶片和根中低量表达 (Li et al., 2012a)。

不同植物 *DFR* 的功能研究也取得了一定进展。过量表达蕹菜苜蓿 *MtDFR1*、大白菜 *DFR_{Bra}*、毛果杨 *P_{tr}DFR1* 基因的烟草花中大量积累了花青素, 花色加深 (Xie et al., 2004; Lee et al., 2008; Huang et al., 2012)。蓝眼菊 (*Osteospermum hybrida*) 的 *DFR* 不能催化 DHK, 体内类黄酮 3',5'羟化酶 (*F3'5'H*) 的存在可以形成飞燕草花色苷, 使花呈青蓝色; 蓝眼菊表达非洲菊 *DFR* 基因 (能够催化 DHK)、同时自身的 *F3'5'H* 基因沉默后, 花中积累了大量花葵素糖苷, 呈微红色 (Seitz et al., 2007)。蓝色花夏堇的内源 *F3'H* 和 *F3'5'H* 基因被敲除后, 增加了花葵素含量, 开灰粉色花。这些植株中如果再表达玫瑰的 *DFR* 基因, 则可提高花葵素含量, 产生深粉色花。利用天竺葵 *DFR* 代替玫瑰 *DFR* 基因, 也可以增加花葵素含量, 使花瓣粉色加深。将这两种 *DFR* 基因导入开紫罗兰色花夏堇中, 也可增加花葵素含量, 从而获得粉色花 (Nakamura et al., 2010)。

花青素合成及 *DFR* 基因的表达还需要转录因子调控 (Ramsay & Glover, 2005; 韩科厅 等, 2012; Schaart et al., 2013; Tereshchenko et al., 2013)。拟南芥中 MYB 的低量表达降低了 *DFR* 基因的表

达 (Gonzalez et al., 2008)。矮牵牛转录因子基因 *DPL* 和 *PHZ* 的过量表达增强了矮牵牛花和叶中 *DFR* 等基因的表达 (Albert et al., 2011)。油菜的转录因子 BnTT16s 可以调控花青素合成途径中 *DFR* 等基因的表达 (Chen et al., 2013)。另外, 花和果实中花青素的生物合成与光照密切相关 (Chatterjee et al., 2006; 孟祥春 等, 2007)。紫外线也可以调节植物中花青素的合成 (Guo et al., 2008; Kim et al., 2008; Xie et al., 2011)。综上所述, 花青素的生物合成主要取决于催化酶和调控因子基因的表达, 同时还涉及特定的光信号传导途径。

芜菁 (*Brassica campestris* L. ssp. *rapifera* Metzg.) 别名蔓菁, 十字花科芸薹属芜菁亚种。‘津田’芜菁 (‘Tsuda’ turnip) 块根着色属于依光型, 受光一侧合成花青素糖苷, 呈紫红色, 背阴一侧无花青素合成, 呈白色。‘赤丸’芜菁 (‘Yurugi Akamaru’ turnip) 块根着色属于非依光型, 无论有光与否块根均呈红色。本研究中克隆了这两种芜菁的 *DFR* 基因全长 cDNA 序列, 并确定了 *DFR* 基因的拷贝数、基因组序列的内含子数及 *DFR* 基因的表达特性; 在大肠杆菌细胞中表达并纯化了两种芜菁的 *DFR* 蛋白; 遗传转化烟草后鉴定了‘津田’芜菁和‘赤丸’芜菁 *DFR* 基因的功能。这些工作将为探讨非依光型和依光型花青素合成机理, 通过转基因手段人为控制花卉和果实着色奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2012 年于东北林业大学生命科学学院温室种植‘津田’和‘赤丸’芜菁, 使其块根始终在土中避光生长。块根膨大 60 d 后, 利用波长为 352 nm 的 UV-A (光照强度为 $13.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 处理块根 0、6、12、18、24 和 48 h。

1.2 引物序列与试剂

在 Database 数据库中查找已经登录的 *DFR* 基因, 选取拟南芥的基因序列设计 RT-PCR 引物。引物序列 F: 5'-TAATGGTAGCTCACAAAGAGAC-3', R: 5'-TCGGGTTCAATTTCTAAGCA-3'。Southern 和 Northern 杂交探针合成的引物序列 F: 5'-ATGGGATTTAACTTCAAGTATAGTCTCG-3', R: 5'-CCC TGGTTCGGTCTTCTTAC-3'。构建原核表达载体的引物序列为: F1: 5'-CCATATGATAATGGTAGC TCACAAAGAGAC-3', R1: 5'-GCCGCTCGGGTTCAATTTCTAAG-3'; F2: 5'-GGAATTCATATGATA ATGGTAGCTCACA-3', R2: 5'-TAAAAGTTGCGGCCGCTCGGGT-3'。

根据 Gateway 试剂盒的要求设计引物。过量表达载体的引物序列为: F1: 5'-AAAAAGCAGGC TTAATGGTAGCTCACAAAGAGAC-3', R1: 5'-AGAAAGCTGGGTTTCGGGTTCAATTTCTAAGCA-3'; F2: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3', R2: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAA GCTGGGT-3'。在 GenBank 中查找烟草 *DFR* mRNA 序列 (No. EF421430.1), Blast 比对芜菁 *DFR* 基因与此基因的同源性, 选择同源性较高的区域作为干涉区段 (353 bp) 并设计引物; 序列为: F1: 5'-AAAAAGCAGGCTATCAGGATTCATCGGTTCA-3', R1: 5'-AGAAAGCTGGGTTTCCAGCAGAC GAAGTAAA-3'; F2 和 R2 引物序列与过量表达的 F2 和 R2 序列相同, 即为 attB 接头引物。

相关试剂: PowerScriptTM Reverse Transcriptase 购自 Clontech 公司; 分子杂交部分试剂购自 Roche 和 GE 公司; 原核表达蛋白纯化柱 HisTrapTM HP 购自 GE 公司; Gateway 试剂盒购于 Invitrogen 公司; LA Taq DNA 聚合酶及 DNA Marker 购自宝生物(大连)工程有限公司; dNTP 和内切酶购自 TOYOBO 公司; 大肠杆菌感受态细胞、pBS-T 载体、质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒购自北京天根生化有限公司。

1.3 *DFR* 全长 cDNA 的克隆及序列分析

提取 UV-A 处理 24 h 的‘津田’和‘赤丸’芜菁块根皮总 RNA 进行 RT-PCR 反应。PCR 纯化产物连接转化后经抗性及蓝白斑筛选获得单克隆。培养白色菌斑并提取质粒, PCR 验证。测序。在 NCBI 数据库中比对测定的两种芜菁 *DFR* 全长 cDNA 序列并查找开放阅读框(ORF)。利用 BioEdit 软件比较两种芜菁 *DFR* 的异同。进行 *DFR* 蛋白的多序列比较, 绘制分子进化树。利用 ExPASy Proteomics tools 预测 *DFR* 蛋白的信号肽、分子量、等电点、稳定性、氨基酸组成和二级结构。

1.4 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因组序列内含子的确定

利用两种芜菁块根皮总 DNA 和 RT-PCR 引物扩增 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 的基因组全长序列。PCR 产物回收、连接、转化并提取质粒。质粒 PCR 验证正确后测序。比对基因组序列和 cDNA 序列, 确定内含子及其数量。

1.5 分子杂交鉴定 *DFR* 基因的拷贝数及表达特性

提取‘津田’芜菁和‘赤丸’芜菁块根皮总 DNA。用地高辛标记探针。通过 Southern 杂交检测两种芜菁中 *DFR* 基因的拷贝数。重复 1 次。提取 UV-A 处理 0、6、12、18、24 和 48 h 的芜菁块根皮总 RNA。通过 Northern 杂交检测两种芜菁中 *DFR* 基因的表达特性(许志茹和李玉花, 2006)。重复 2 次。

1.6 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的原核诱导表达

通过两次 PCR 反应将含有 *Nde* I 和 *Not* I 酶切位点的引物序列加到两种芜菁 *DFR* 基因的两侧。利用 *Nde* I 和 *Not* I 酶切 PCR 纯化产物和载体 pET-14b。目的片段回收后连接并转化 DH5 α 感受态细胞。提取质粒, PCR、酶切及测序验证。利用正确的质粒转化大肠杆菌 BL21, PCR 验证。利用 1 mmol · L⁻¹ 的 IPTG 诱导目的蛋白表达, SDS-PAGE 电泳检测诱导结果。大量诱导后利用 HisTrapTMHP (GE Healthcare) HIS 标签亲和层析柱纯化 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 蛋白, 电泳检测。

1.7 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因遗传转化烟草及功能验证

1.7.1 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因过量表达载体和 RNAi 载体的构建

通过 PCR 反应在 *BrDFR1*、*BrDFR2* 的 cDNA 序列和干涉片段的两侧引入 attB 位点。PCR 产物纯化后进行 BP 反应。反应产物转化、提取质粒并进行 PCR 检测、测序鉴定。选取正确的 entry 克隆进行 LR 反应。反应产物转化、提取质粒并进行 PCR 检测和酶切鉴定。正确的质粒即为过量表达载体和 RNAi 载体。通过电转法将构建的载体转入农杆菌 EHA105 中。挑取菌斑培养后提取质粒并进行 PCR 检测, 即可获得含有过量表达载体和 RNAi 载体的农杆菌菌株。

1.7.2 农杆菌介导法遗传转化烟草

将烟草无菌苗叶片剪成小块(带有较粗叶脉)。叶盘在 OD₆₀₀ = 0.2 ~ 0.3 的农杆菌菌液中侵染 2 min 后置于无菌滤纸上吸干多余菌液, 接种于 MS 培养基上, 28 °C 黑暗条件共培养 2 d。用含 400 mg · L⁻¹ 头孢霉素的无菌水冲洗共培养后的外植体 3 ~ 5 次, 吸干水分后转到脱菌培养基(MS + BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + Cef 400 mg · L⁻¹) 上, 25 °C 培养 2 ~ 3 周。当外植体长出良好的愈伤组织后转入分化筛选培养基(MS + BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + Cef 400 mg · L⁻¹ + Hyg 20 mg · L⁻¹) 中。待不定芽长到 1 cm 以上时, 切割不定芽接种到生根培养基(1/2MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹ + Cef 400 mg · L⁻¹ + Hyg 20 mg · L⁻¹) 中诱导生根。

1.7.3 转基因植株的分子及表型鉴定

提取转基因烟草幼苗和野生型叶片总 DNA，利用 RT-PCR 引物进行 PCR 检测。通过 Southern 杂交鉴定 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 在烟草基因组中的整合情况。提取转基因植株和野生型花瓣总 RNA 进行 Northern 杂交，检测转基因植株中芜菁 *DFR* 的表达。观察转基因烟草植株花色的变化。

2 结果与分析

2.1 ‘津田’和‘赤丸’芜菁 *DFR* 全长 cDNA 的克隆

提取芜菁总 RNA 后进行 RT-PCR 反应，结果如图 1 所示。‘津田’和‘赤丸’芜菁的扩增产物在 1 200 bp 附近，分子量大小与预期结果吻合。RT-PCR 产物经纯化、连接、转化并提取质粒。质粒 PCR 鉴定后测序。

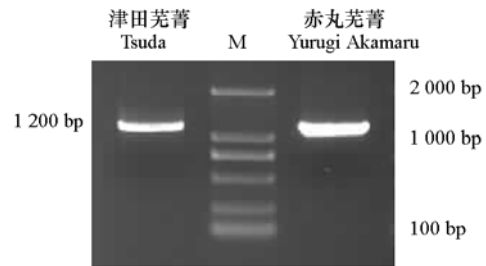


图 1 ‘津田’芜菁和‘赤丸’芜菁 *DFR* 基因的 RT-PCR 结果
Fig.1 RT-PCR result of *DFR* genes in ‘Tsuda’ and ‘Yurugi Akamaru’ turnip

2.2 ‘津田’和‘赤丸’芜菁 *DFR* 核苷酸序列及推断的氨基酸序列分析

‘津田’芜菁 *BrDFR1* 和‘赤丸’芜菁 *BrDFR2* 的登录号为 EU402418 和 EU402419，与大白菜 [*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson] *DFR* mRNA 序列的同源性达 100%和 99%。*BrDFR1* 的 1 158 bp 编码序列含有完整的 ORF(图 2)；*BrDFR1* 和 *BrDFR2* 仅在第 979 位核苷酸上存在差异，*BrDFR1* 为 G，而 *BrDFR2* 在此位置上缺失了 1 个核苷酸，从而导致移码突变。因此，*BrDFR2* 基因 999 bp 的编码序列包含完整的 ORF。

1 taatggtagctcacaagagaccggtgtgctgtaaccggcgcatcaggattcatcggttcatggctcgtgatgcggtactggaactggt
 M V A H K E T V C V T G A S G F I G S W L V M R L L E R G
90 tactttgtccgtgccactgttcgcatcctggaatttgaagaaagtcaacatcttcttgatttgcacaacgcaagacgcaactcact
 Y F V R A T V R D P G N L K K V Q H L L D L P N A K T Q L T
180 ttatggaagccgatttctgacgaaggaagctacgatgacgccataaacggatgacgacggcgtttccacatagctactcccatggat
 L W K A D L S D E G S Y D D A I N G C D G V F H I A T P M D
270 tttgaatctaaggatcccagaaacgaagtataaaacacagtgatggagtggtgggataatgaaagcatgtgataaggcaagacc
 F E S K D P E N E V I K P T V N G V L G I M K A C D K A K T
360 gtacgaagaattgtttacttctctgctggaacggttaatgttgaggaaaccagaaaaatgtctatgatgaaacatgtagtgat
 V R R I V F T S S A G T V N V E E H Q K N V Y D E N D W S D
453 cttgactttatcatgtccaagaagatgacaggatggatgtattcatgtcgaaaacgttagccgagaaagcagctgggattacgcaag
 L D F I M S K K M T G W M Y F M S K T L A E K A A W D Y A K
540 gaaaaaggaatagatttcattagtattatccgacattgggtgatcggtccattataacaacatctatgccgctagcctcataccg
 E K G I D F I S I I P T L V I G P F I T T S M P P S L I T A
630 ctctctctatcactcgtaacgagcacattactccatcataagacaaggacagatgtgacacttgacacttatgcaatgctcatata
 L S P I T R N E A H Y S I I R Q G Q Y V H L D D L C N A H I
720 ttctgtacgaacaagctggtgccaaggacgttatgtttgttctctcacgatgacgacgattcttactatctccgagtttctcaggcaa
 F L Y E Q A G A K G R Y V C S S H D A T I L T I S E F L R Q
810 aaatatccagaatataacgtgccttcaacgtttgaaggagtggatgagaatctaaagacattatgttcagttccaagaagctgattgat
 K Y P E Y N V P S T F E G V D E N L K S I M F S S K K L I D
900 atgggatttaacttcaagtagtctcaggatattggttggaaatcgattgagacatgctcgaaggggtttctccctgtcacttta
 M G F N F K Y S L E D M L V E S I E T C R Q K G F L P V T L
990 cgggaacatttgaatctgaggacaagttccgggcagtgatgacaataaggagattaaaaacggatctgcaggtttaaactgatggtatg
 P E H L K S E D K V P G S D D N K E I K N G S A G L T D G M
1 080 gtagcttgaagaagaccgaaccaggatggccggcgagaagccgatagtcacatgctggcacagcagatctgtgcttagaattgaac
 V A C K K T E P G M A G E K A D S H M S A Q Q I C A *
1 170 ccga

图 2 *BrDFR1* 基因全长 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

阴影序列为 Northern 杂交探针序列，下划线序列为 RT-PCR 引物序列。

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *BrDFR1* cDNA

The shadow sequences are probe of Northern blotting, and the underlined sequences are the primer of RT-PCR.

BrDFR1 和 BrDFR2 蛋白存在明显差异。BrDFR1 编码 385 个氨基酸；BrDFR2 编码 332 个氨基酸，前 326 个氨基酸与大白菜 DFR 的相似性为 100%。BrDFR1 和 BrDFR2 序列在第 327 个氨基酸之前是完全相同的。

氨基酸同源性比对显示 (图 3)，BrDFR1 和 BrDFR2 与多种植物 DFR 的氨基酸序列有高度同源

津田芜菁 Tsuda	-----MVAHK-----ETVC	9
赤丸芜菁 Yurugi Akamaru	-----MVAHK-----ETVC	9
大白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	-----MVAHK-----ETVC	9
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	-----MVAHK-----ETVC	9
羽衣甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	-----MVAHK-----ETVC	9
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	-----MUSCK-----ETVC	9
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	-----MASEA-----VHAPSPFVAVETVC	19
烟草 <i>Nicotiana benthamiana</i>	-----MASEAHAAVHTSSSP-ATETVC	21
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	MKSSAYITLESARKQNNLGLPIFLVAFIFFFPGSFLRSMGSGS	47
菊花 <i>Chrysanthemum × morifolium</i>	-----MKEDS-----PATVC	10
津田芜菁 Tsuda	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	69
赤丸芜菁 Yurugi Akamaru	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	69
大白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	69
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	69
羽衣甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	69
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	69
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	79
烟草 <i>Nicotiana benthamiana</i>	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	81
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	107
菊花 <i>Chrysanthemum × morifolium</i>	VTGASGFIGSWLVMRLLEGGYFVRATVRDPEGNLKKVQHLHLLDLENAKTQTLTWKADLSDEG	70
津田芜菁 Tsuda	SYDDAINGCDGVFHIAETPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	129
赤丸芜菁 Yurugi Akamaru	SYDDAINGCDGVFHIAETPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	129
大白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	SYDDAINGCDGVFHIAETPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	129
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	SYDDAINGCDGVFHIAETPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	129
羽衣甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	SYDDAINGCDGVFHIAETPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	129
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	SYDDAINGCDGVFHIAETPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	129
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	SEDEALQGGCGVPHVATPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	139
烟草 <i>Nicotiana benthamiana</i>	SEDEALQGGCGVPHVATPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	141
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	SEDEALQGGCGVPHVATPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	167
菊花 <i>Chrysanthemum × morifolium</i>	SEDEALQGGCGVPHVATPMDPESKDPENEVIKPTVNGVGLGIMKACDKAKTVRRIVFTSSA	130
津田芜菁 Tsuda	GTUNVEEHQKNVYDENDDWSDDLDFIMSKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	189
赤丸芜菁 Yurugi Akamaru	GTUNVEEHQKNVYDENDDWSDDLDFIMSKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	189
大白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	GTUNVEEHQKNVYDENDDWSDDLDFIMSKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	189
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	GTUNVEEHQKNVYDENDDWSDDLDFIMSKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	189
羽衣甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	GTUNVEEHQKNVYDENDDWSDDLDFIMSKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	189
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	GTUNVEEHQKNVYDENDDWSDDLDFIMSKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	189
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	GTLDVCEQKQLFYDQTSMSDDLDFIYAKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	199
烟草 <i>Nicotiana benthamiana</i>	GTLDVCEQKQLFYDQTSMSDDLDFIYAKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	201
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	GTUNVEEHQKNVYDENDDWSDDLDFIMSKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	227
菊花 <i>Chrysanthemum × morifolium</i>	GTUNVQKCCVEVYDESHMSDDLDFIYAKKMTGWMYFMSKTLAEKAADYAKEKIDFISII	190
津田芜菁 Tsuda	PTLVIGPFFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	249
赤丸芜菁 Yurugi Akamaru	PTLVIGPFFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	249
大白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	PTLVIGPFFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	249
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	PTLVIGPFFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	249
羽衣甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	PTLVIGPFFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	249
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	PTLVIGPFFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	249
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	PFLVVGPFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	259
烟草 <i>Nicotiana benthamiana</i>	PFLVVGPFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	261
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	PFLVVGPFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	287
菊花 <i>Chrysanthemum × morifolium</i>	PFLVVGPFITTSMPPLSLITALSPITRNEAHYSIIROGOYVHLLDLCNAHIFLYEBOAAGAKG	250
津田芜菁 Tsuda	RYVCSHSDATILTISEFLRQKYPEYNVSTFEGVDENLKSIMFSSKKLIDMGFNFKYSLE	309
赤丸芜菁 Yurugi Akamaru	RYVCSHSDATILTISEFLRQKYPEYNVSTFEGVDENLKSIMFSSKKLIDMGFNFKYSLE	309
大白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	RYVCSHSDATILTISEFLRQKYPEYNVSTFEGVDENLKSIMFSSKKLIDMGFNFKYSLE	309
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	RYVCSHSDATILTISEFLRQKYPEYNVSTFEGVDENLKSIMFSSKKLIDMGFNFKYSLE	309
羽衣甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	RYVCSHSDATILTISEFLRQKYPEYNVSTFEGVDENLKSIMFSSKKLIDMGFNFKYSLE	309
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	RYVCSHSDATILTISEFLRQKYPEYNVSTFEGVDENLKSIMFSSKKLIDMGFNFKYSLE	309
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	RFICSSHHAALHYDVAKMVRKMPPEYVPTDFEFGKIDKDLFVVYFSSKKLIDMGFNFKYSLE	319
烟草 <i>Nicotiana benthamiana</i>	RFICSSHHAALHYDVAKMVRKMPPEYVPTDFEFGKIDKDLFVVYFSSKKLIDMGFNFKYSLE	321
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	RYVCSHSDATILTISEFLRQKYPEYNVSTFEGVDENLKSIMFSSKKLIDMGFNFKYSLE	347
菊花 <i>Chrysanthemum × morifolium</i>	RYVCSHSDATILTISEFLRQKYPEYNVSTFEGVDENLKSIMFSSKKLIDMGFNFKYSLE	310
津田芜菁 Tsuda	DMLVESIETCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	369
赤丸芜菁 Yurugi Akamaru	DMLVESIETCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	332
大白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	DMLVESIETCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	369
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	DMLVESIETCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	369
羽衣甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	DMLVESIETCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	369
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	DMLVESIETCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	366
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	EMFTEESIETCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	366
烟草 <i>Nicotiana benthamiana</i>	DMYKGAIDTCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	367
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	DMYKGAIDTCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	369
菊花 <i>Chrysanthemum × morifolium</i>	DMYKGAIDTCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	375
EMFTEESIETCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	-----VDGKT-----	375
菊花 <i>Chrysanthemum × morifolium</i>	EMFTEESIETCRQKGFLEVTLPFHLKSEDKVPGSDDNKEIKNGSAGLTDGMVACKRTEPEGM	358
津田芜菁 Tsuda	AGEKADSHMSAQCICA	385
赤丸芜菁 Yurugi Akamaru	-----	332
大白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	AGEKADSHMSAQCICA	385
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	AGEKADSHMSAQCICA	385
羽衣甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	VGERADSHMSAQCICA	385
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	TGERTDAFMTAQOMCA	382
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	VANHTEMLSNVE---	380
烟草 <i>Nicotiana benthamiana</i>	VANGTGKSTNGEI---	382
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	-----	375
菊花 <i>Chrysanthemum × morifolium</i>	VATHLAPLAKSILGE	374

图 3 芜菁 BrDFR1 和 BrDFR2 与其他植物 DFR 的氨基酸序列比较

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences of DFR among turnip and other plants

性, 与大白菜、芥菜 (*Brassica juncea*)、羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、矮牵牛 (*Petunia × hybrida*)、烟草 (*Nicotiana benthamiana*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、菊花 (*Chrysanthemum × morifolium*) DFR 的同源性在 70% ~ 100% 之间。

系统进化树显示 (进化树中的数值为进化树的校验值, 数值越大, 进化树可信度越高), BrDFR1 和 BrDFR2 与大白菜、芥菜和羽衣甘蓝的 DFR 在进化关系上较近, 与菊花、烟草和矮牵牛等植物的 DFR 在进化关系上较远 (图 4)。

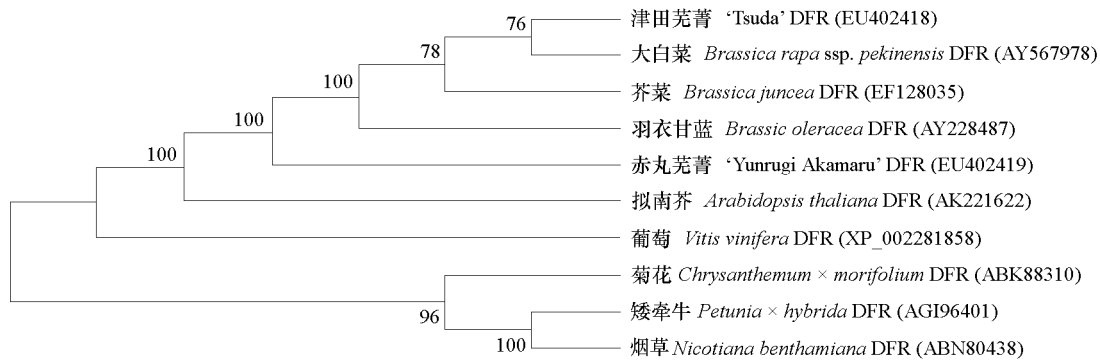


图 4 植物 DFR 蛋白的系统进化树
Fig. 4 Evolutionary tree of plant DFR

BrDFR1 和 BrDFR2 蛋白从第 8 到第 302 位氨基酸的肽段含有 FR_SDR_e 结构域。此结构域在类黄酮等次生代谢途径的依赖于 NADP 的还原反应中发挥作用; 结构域内分布着还原酶的活性位点、NADP 结合位点和底物结合位点 (图 5)。

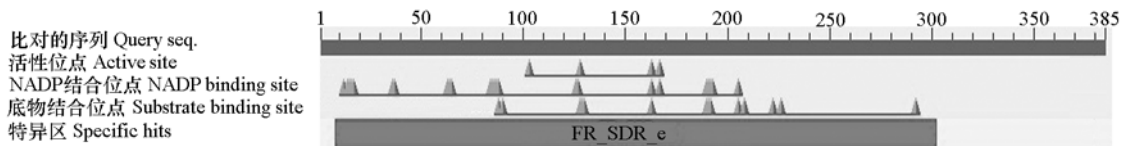


图 5 BrDFR1 的结构域
Fig. 5 The domain of BrDFR1

ProtParam 程序预测 BrDFR1 和 BrDFR2 的分子量分别为 42.8 kD 和 37.5 kD; 理论等电点分别是 5.54 和 5.80; 氨基酸组成中 Lys、Leu 分别占最大比例, 均高达 8.1%; 蛋白不稳定系数分别为 37.65 和 36.21, 属于稳定蛋白。SignalP 3.0 Server 检测结果显示 BrDFR1 和 BrDFR2 不含信号肽序列, 为非分泌蛋白。二级结构预测表明, BrDFR1 和 BrDFR2 中形成 α 螺旋的氨基酸分别占 54.55% 和 50.30%, 形成伸展序列的氨基酸分别占 32.99% 和 37.05%, 形成 β 转角的氨基酸分别占 7.27% 和 7.83%, 形成随意盘旋序列的氨基酸分别占 5.19% 和 4.82%, 两种蛋白中不含其他二级结构。

2.3 BrDFR1 和 BrDFR2 基因组序列的内含子

以两种芜菁基因组 DNA 为模板, 利用 RT-PCR 引物扩增了 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 全长基因组序列; 测序后获得了长度分别为 1 556 bp 和 1 555 bp 的序列。*BrDFR1* 和 *BrDFR2* 全长基因组序列均包含 5 个内含子和完整的 ORF, 内含子序列及位置完全相同。内含子序列符合真核生物内含子的典型边界序列 GT-AG 法则。图 6 为 *BrDFR1* 的全长基因组序列。

TAATGTAGCTCACAAAGAGACCGTGTGCGTAACCGGCGCATCAGGATTCATCGGTTTCATGGCTCGTGATGCGGCTACTGG
AACGTGGTTACTTTGTCCGTGCCACTGTTCCGCATCTGGTACATACTTACAAACTCGTTAATTTCTCCTAAGAGTAIGTTA
ATAAGTAACTACGAGTITTTCTCGGCCTGTAAGGAAATTTGAAGAAAGTGCAACATCTTCTTGATTTGCCAAACCGGAAG
ACGCAACTCACTTTATGGAAAGCCGATTATCTGACGAAGGAAGCTACGATGACGCCATAAACGGATGCGACGGCGTTTT
CCACATAGCTACTCCCATGGATTTGAATCTAAGGATCCCGAGGTGAATTATACTATGAACCTTTTTTATTACACATCAATC
CTACAAGATTTTGTTAAATGAGTTTGTGAATCAGAACGAAGTGATAAAACCAACAGTGAATGGAGTGTGGGGATAATG
AAAGCATGTGATAAGGCAAAGACCGTACGAAGAATTGTGTTTACTTCGTCGCTGGAACGGTTAATGTTGAGGAACACCA
GAAAAATGTCTATGATGAAAACGATTGGAGTGATCTTGACTTTATCATGTCCAAGAAGATGACAGGATGGGTATGATATTA
AGGATCATATATAAAAAATTAACCTGAGGTGATCTTCTCAAAGTAAATTAATGTTTTGATAAATGTTGGCAGATGATTTT
CATGTGCAAAACGTTAGCCGAGAAAGCAGCTTGGGATTACGCGAAGGAAAAAGGAATAGATTTTCATTAGTATTATCCCGA
CATTGGTGATCGGTCCATTATAACAACATCTATGCCGCTAGCCTCATTACCGGCTCTCTCTATCACTCGTGAGTGAGCC
TACTTTCTTATCCCTCTTTTTTTAACTAAGAGGTTAAATTTAAACTGTAAAAATGTTTTAGGTAACGAGGCACATTACTCC
ATCATAAGACAAGGACAGTATGTGCACTTGGACGACTTATGCAATGCTCATATATTCTGTACGAACAAGCTGGTGCCAAAG
GGACGTTATGTTTCTCTCACGATGCGACGATTCTACTATCTCCGAGTTTCTCAGGCAAAAATATCCAGAATATAACG
TGCTTCAACGTAAGATTTTATCAATACCGGTTAAGCTTGTTTGCATATTCAGTAAATTTTTTTCTGAATATGAACTCT
TTGGAACAGGTTTGAAGGAGTGGATGAGAATCTAAAGAGCATTATGTTTCAGTCCAAGAAGCTGATTGATATGGGATTTAA
CTTCAAGTATAGTCTCGAGGATATGTTGGTGAATCGATTGAGACATGTCGTCAAAAGGGTTTTCTCCCTGTCACTTTACC
GAACATTTGAAATCTGAGGACAAAGTTCCGGGCAGTGATGACAATAAGGAGATTAATAAACGGATCTGCAGGTTAACTGA
TGGTATGGTAGCTGTGAAGAAGACCGAACCGGATGGCCGGGAGAAAGCCGATAGTCACATGTCGGCACAGCAGATCT
GTGCTTAGAAATGAACCCGA

图 6 *BrDFR1* 的全长基因组序列

下划线序列为引物序列，斜体序列为起始密码子和终止密码子，阴影序列为内含子。

Fig. 6 The genome sequence of *BrDFR1*

The underlined sequences are the primers, the italic sequences are the initiation codon and the stop codon, the shadow sequences are introns.

2.4 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的拷贝数

提取两种芜菁块根皮总 DNA，酶切后进行 Southern 杂交。结果显示，‘津田’芜菁中，*Hind*III、*Eco*R I 和 *Eco*R V 酶切总 DNA 后均检测到 1 个杂交信号，*Xba* I 酶切总 DNA 后检测到 2 个杂交信号（图 7，A）。利用 *Xba* I 酶切其他的‘津田’芜菁株系总 DNA 后的杂交结果均可检测到 1 个杂交信号（数据未显示）。由此推测，第 1 次杂交中 *Xba* I 酶切后检测到的 2 个杂交信号可能是由于个体植株出现了单核苷酸多态性突变，在 *BrDFR1* 基因内形成了 *Xba* I 酶切位点造成的。

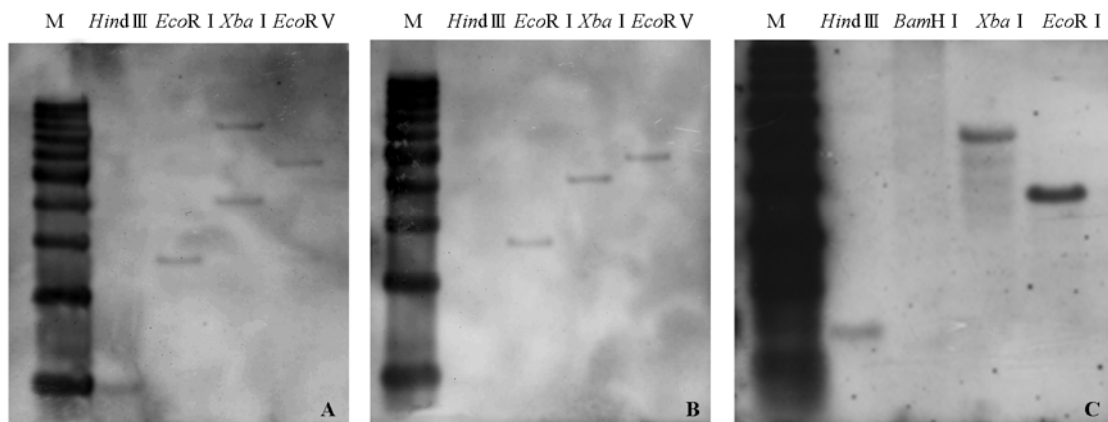


图 7 ‘津田’芜菁 (A) 和 ‘赤丸’芜菁 (B、C) Southern 杂交结果

Fig. 7 Southern result of ‘Tsuda’ turnip (A) and ‘Yurugi Akamaru’ turnip (B, C)

‘赤丸’芜菁中, *Xba* I、*Eco*R I 和 *Eco*R V 酶切总 DNA 后均检测到 1 个杂交信号, *Hind*III 酶切总 DNA 后未检测到杂交信号 (图 7, B)。在‘赤丸’芜菁的另一组试验中, 总 DNA 经 *Hind*III、*Eco*R I 和 *Xba* I 酶切后可以检测到 1 个杂交信号, 而 *Bam*H I 酶切总 DNA 后未检测到杂交信号 (图 7, C), 这可能是由于样品总 DNA 酶切不完全造成的。

综合以上杂交结果, 初步证实‘津田’芜菁和‘赤丸’芜菁中 *DFR* 基因均为单一拷贝。

2.5 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 的光诱导表达模式

UV-A 处理‘津田’和‘赤丸’芜菁块根 0 和 48 h 后检测 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因表达量的变化。未曾见光的块根皮中 *BrDFR1* 不表达; UV-A 处理 48 h 后 *BrDFR1* 的表达量增加。*BrDFR2* 基因在未见光和 UV-A 处理 48 h 后的块根皮中均表达 (图 8)。

为了确定 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的表达量与光处理时间长短的关系, 利用 UV-A 处理两种芜菁不同时间后进行 Northern 杂交。结果 (图 9) 显示, ‘津田’芜菁未见光的块根皮中 *BrDFR1* 基因不表达, UV-A 处理 6 h 后表达量明显增加并达到最高水平, *BrDFR1* 的表达量与 UV-A 光照时间存在相关关系。‘赤丸’芜菁未见光块根皮中 *BrDFR2* 基因表达, UV-A 处理后 *BrDFR2* 基因的表达量没有发生明显变化。由此可见, *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的 UV-A 诱导表达特性存在一定差异。

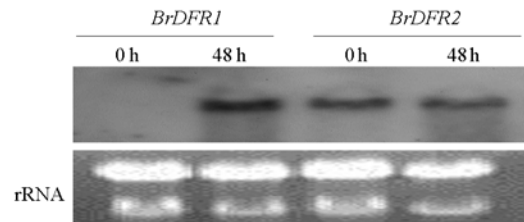


图 8 UV-A 处理 0 h 和 48 h 后 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 的表达
Fig. 8 Expression of *BrDFR1* and *BrDFR2* genes after exposed to UV-A for 0 h and 48 h

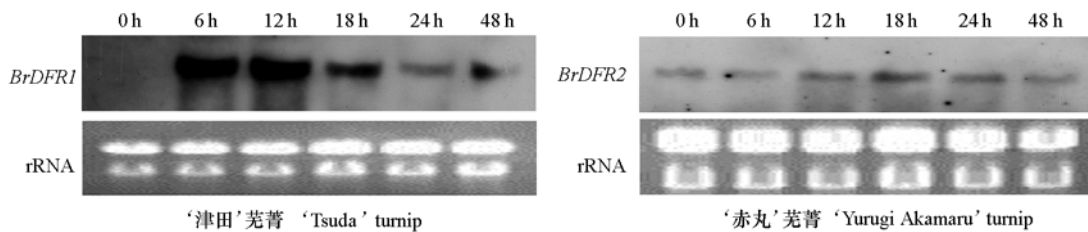


图 9 UV-A 处理不同时间 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 的表达
Fig. 9 Expression of *BrDFR1* and *BrDFR2* after exposed to UV-A for different time

2.6 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 蛋白的诱导表达及纯化

通过 PCR 可在 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因两侧加上酶切位点序列。利用 *Nde* I 和 *Not* I 酶切 PCR 纯化产物及载体 pET-14b。回收目的片段, 连接, 转化。挑取单菌落培养, 提取重组质粒。重组质粒的 PCR 验证反应能够扩增出 1 200 bp 左右的目的条带。酶切验证结果表明 (图 10), *BrDFR1*、*BrDFR2* 重组质粒酶切后均得到两条条带, 分别对应空载体的酶切产物和 *DFR* 基因的 PCR 产物。由此表明原核表达重组质粒构建成功。

鉴定后的重组质粒转化 BL21。挑取单菌落扩大培养后进行菌液 PCR 检测, 可以获得目的条带。验证后进行目的蛋白的小量诱导、大量诱导并纯化目的蛋白。SDS-PAGE 电泳检测结果如图 11 所示, 箭头指示条带为纯化的 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 蛋白, 由于融合蛋白携带 His 标签, 所以分子量比预期的分子量 (42.8 和 37.5 kD) 稍大。

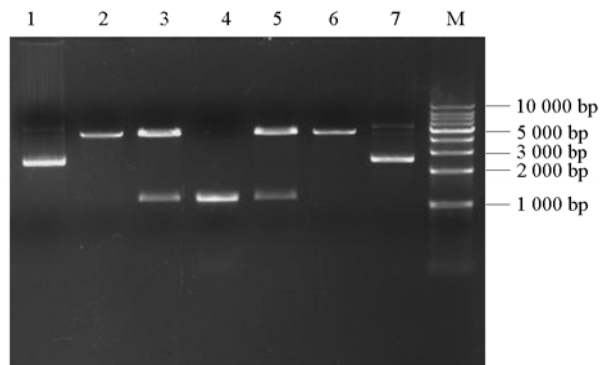


图 10 原核表达重组质粒的酶切鉴定

M: Marker; 1: *BrDFR1* 重组质粒; 2、6: pET-14b 酶切产物; 3: *BrDFR1* 重组质粒酶切产物; 4: PCR 产物;
5: *BrDFR2* 重组质粒酶切产物; 7: *BrDFR2* 重组质粒。

Fig. 10 The digestion result of the prokaryotic expression recombinant plasmids

M: Marker; 1: *BrDFR1* recombinant plasmid; 2, 6: Digested product of pET-14b; 3: Digested product of *BrDFR1* recombinant plasmid;
4: PCR product; 5: Digested product of *BrDFR2* recombinant plasmid; 7: *BrDFR2* recombinant plasmid.

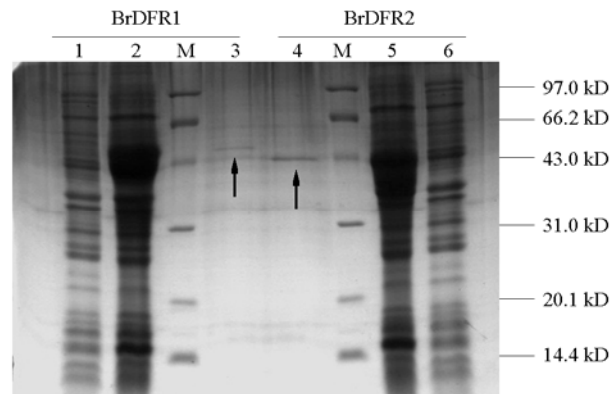


图 11 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 的诱导及纯化结果

M: Marker; 1、6: 诱导前样品; 2、5: 诱导后样品; 3、4: 纯化的蛋白。

Fig. 11 The result of induction and purification of *BrDFR1* and *BrDFR2*

M: Marker; 1, 6: Sample before induction; 2, 5: Sample after induction; 3, 4: Purified protein.

2.7 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因表达载体的构建及功能鉴定

BrDFR1 和 *BrDFR2* 的 cDNA 和基因片段经过 BP 反应和 LR 反应后获得重组质粒, 重组质粒 PCR 检测可以获得分子量与预期一致的片段。过量表达的 LR 重组质粒酶切验证结果(图 12)显示, *EcoR* I 酶切重组质粒可以获得 1 个 > 10 000 bp 的片段; *EcoR* V 酶切后, 空载体可以获得 > 10 000 bp、1 716 bp 和 187 bp 的片段, 重组质粒可以得到 > 10 000 bp、1 418 bp 和 187 bp 的片段; 阳性对照为 *DFR* 基因的 PCR 产物。酶切结果与预期相符, 过量表达载体 pH7DG2D-*BrDFR1* 及 pH7DG2D-*BrDFR2* 构建成功。

RNAi 的 LR 重组质粒酶切验证结果(图 13)显示, *EcoR* I 酶切空载体可以获得 > 10 000 bp 和 3 237 bp 的片段, 酶切重组质粒只产生 > 10 000 bp 的片段。*Hind*III 酶切空载体可以得到 > 10 000 bp 和 3 180 bp 的片段, 酶切重组质粒可以获得 > 10 000 bp 和 2 065 bp 的片段, 酶切结果与预期相符, RNAi 载体 pH7GWIWG2(I)-*DFR* 构建成功。

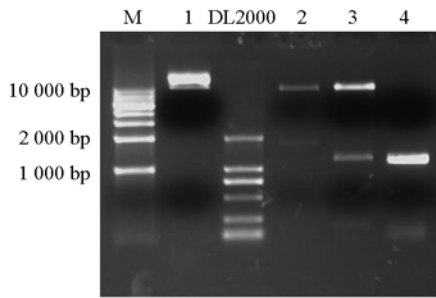


图 12 *BrDFR1* 过量表达载体的酶切结果

M: 1 kb marker; 1: 重组质粒的 *EcoR* I 酶切产物;
2: 载体的 *EcoR* V 酶切产物; 3: 重组质粒的
EcoR V 酶切产物; 4: PCR 产物。

Fig. 12 The digestion result of *BrDFR1* over-expression vector

M: 1 kb marker; 1: *EcoR* I digestion product of recombinant plasmid; 2: *EcoR* V digestion product of vector;
3: *EcoR* V digestion product of recombinant plasmid;
4: PCR product.

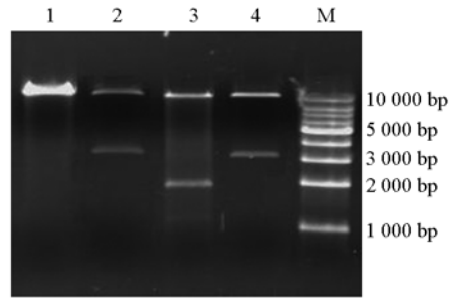


图 13 RNAi 载体的酶切结果

M: 1 kb marker; 1: 重组质粒的 *EcoR* I 酶切产物; 2: 载体的 *EcoR* I 酶切产物; 3: 重组质粒的 *Hind* III 酶切产物;
4: 载体的 *Hind* III 酶切产物。

Fig. 13 The digestion result of RNAi vector

M: 1 kb marker; 1: *EcoR* I digestion product of recombinant plasmid; 2: *EcoR* I digestion product of vector; 3: *Hind* III digestion product of recombinant plasmid;
4: *Hind* III digestion product of vector.

利用含有过量表达载体和 RNAi 载体的农杆菌 EHA105 侵染烟草叶盘。经过 3 ~ 4 周的选择培养，从叶片周围的愈伤组织分化出不定芽。将不定芽切割后诱导生根。提取野生型和转化植株叶片总 DNA 进行 PCR 检测。选取有扩增条带的转化植株进行 Southern 杂交检测（图 14）。2 ~ 8 号转基因烟草株系及质粒的杂交结果呈阳性，9 号转基因株系及野生型无杂交条带；由此表明，茺菁 *BrDFR1* 基因已经整合到部分烟草基因组中。转 *BrDFR2* 基因的烟草植株 Southern 杂交结果也可以检测到杂交条带。

温室培养转基因烟草植株，开花后观察植株的花色。转基因载体的一部分烟草的花色明显变浅；转过量表达载体的烟草花大部分颜色明显加深，一小部分没有变化（图 15）。

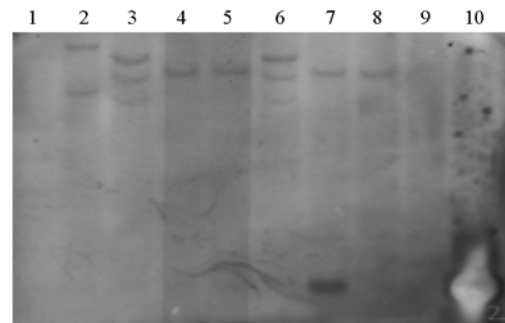


图 14 转 *BrDFR1* 烟草植株的 Southern 杂交结果

1: 野生型; 2~9: 转基因植株; 10: 质粒。

Fig. 14 The Southern result of transgenic tobacco plant of *BrDFR1* gene

1: Wild type; 2 - 9: Transgenic plant; 10: Plasmid.



野生型 Wild type

BrDFR1

BrDFR2

RNAi

图 15 转基因烟草植株

Fig. 15 The transgenic tobacco plants

提取花色发生变化的转基因烟草植株和野生型花瓣总 RNA，利用 *DFR* 探针进行 Northern 杂交。结果如图 16 所示，过量表达 *BrDFR1* 或 *BrDFR2* 的烟草植株中 *BrDFR1*、*BrDFR2* 基因表达，而野生型和 RNAi 植株中则无杂交条带。

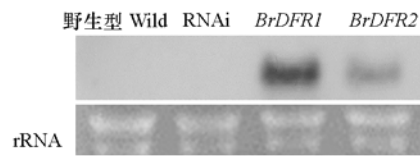


图 16 转基因烟草植株花的 Northern 杂交结果
Fig. 16 The Northern result of the flowers in transgenic tobacco plants

3 讨论

花青素的生物合成在多种植物中已有所研究 (葛翠莲 等, 2012; Rahimi et al., 2013)。自然界中植物花青素的生物合成与糖类的积累、光照和环境胁迫密切相关 (Li et al., 2012b; Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2013)。DFR 是花色素苷生物合成晚期阶段的关键酶，催化产生无色花色素苷，进而形成各种类型的花青素，使花、果实和种子等呈现不同颜色 (Shimada et al., 2005; Trabelsi et al., 2011)。目前，多种植物的 *DFR* 基因已被克隆 (潘丽晶 等, 2010)，利用 *DFR* 基因进行的遗传转化也可以使转基因植株的花色发生相应变化 (Huang et al., 2012; Kazama et al., 2013)。

本研究中以花青素合成依光型 ‘津田’ 芜菁和非依光型 ‘赤丸’ 芜菁为试材，通过 RT-PCR 方法克隆了 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因。Blast 比对表明，*BrDFR2* 基因的序列在 *BrDFR1* 基础上缺失了一个核苷酸，由此造成移码突变，致使 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 蛋白存在明显差异；*BrDFR1* 编码 385 个氨基酸，而 *BrDFR2* 仅编码 332 个氨基酸，*BrDFR1* 和 *BrDFR2* 蛋白分子量的差异通过 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的原核诱导表达和纯化得到了进一步验证。‘津田’ 芜菁和 ‘赤丸’ 芜菁中 *DFR* 基因均为单一拷贝，而大多数植物中存在 *DFR* 基因家族的不同成员，其功能也各不相同 (Shimada et al., 2005)。

另外，本研究中同时克隆了 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 的基因组全长序列，比对结果显示，这两个全长基因均含有 5 个内含子，内含子的序列及位置完全相同。表达特性研究表明，*BrDFR1* 基因的表达与 UV-A 光照时间存在相关关系，但是 UV-A 并未明显改变 *BrDFR2* 基因的表达量。‘赤丸’ 芜菁未见光块根皮中 *BrDFR2* 基因表达的现象与其块根合成花葵素糖苷不需光特性相符，即 ‘赤丸’ 芜菁在黑暗条件下就有 *BrDFR2* 表达，积累花葵素糖苷。由此可知，*BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的表达特性存在一定差异。

本研究中通过 Gateway 技术构建了 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的过量表达载体和 RNA 干扰载体，遗传转化烟草后，部分转基因植株的花色发生相应变化，出现颜色加深的深粉色花和颜色变浅的灰粉色花。此试验结果证明，从 ‘津田’ 和 ‘赤丸’ 芜菁中克隆的 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的编码产物具有二氢黄酮醇 4 - 还原酶功能，在烟草中的异位表达增加了花青素的积累，由此验证了 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因的生物学功能。

后期的研究工作可以在克隆的 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因核苷酸序列基础上设计引物分离这两个基因的启动子序列，确定相应的光诱导应答元件；通过酵母单杂交和双荧光素酶表达系统等技术手段进一步确定与 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因启动子相互作用的转录因子及与光诱导应答元件作用的蛋白质因子，从而进一步了解花青素合成依光和非依光途径的基本原理和涉及的光信号传导途径。因此，本研究克隆的 *BrDFR1* 和 *BrDFR2* 基因将为通过转基因技术培育花卉及果实新品种奠定试验基础，也可以为阐明依光型和非依光型花青素的合成机制奠定研究基础。

References

- Albert N W, Lewis D H, Zhang H, Schwinn K E, Jameson P E, Davies K M. 2011. Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. *Plant J*, 65 (5): 771 - 784.
- Chatterjee M, Sharma P, Khurana J P. 2006. Cryptochrome 1 from *Brassica napus* is up-regulated by blue light and controls hypocotyl/stem growth and anthocyanin accumulation. *Plant Physiol*, 141 (1): 61 - 74.
- Chen G, Deng W, Peng F, Truksa M, Singer S, Snyder C L, Mietkiewska E, Weselake R J. 2013. *Brassica napus* TT16 homologs with different genomic origins and expression levels encode proteins that regulate a broad range of endothelium-associated genes at the transcriptional level. *Plant J*, 74 (4): 663 - 677.
- Forkmann G. 1991. Flavonoids as flower pigments: The formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed*, 106 (1): 1 - 26.
- Ge Cui-lian, Huang Chun-hui, Xu Xiao-biao. 2012. Research on anthocyanins biosynthesis in fruit. *Acta Horticultrae Sinica*, 39 (9): 1655 - 1664. (in Chinese)
- 葛翠莲, 黄春辉, 徐小彪. 2012. 果实花青素生物合成研究进展. *园艺学报*, 39 (9): 1655 - 1664.
- Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, Lloyd A M. 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/BHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 53 (5): 814 - 827.
- Guo J, Han W, Wang M H. 2008. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis. *Afr J Biotechnol*, 7 (25): 4966 - 4972.
- Han Ke-ting, Zhao Li, Tang Xing-jiao, Hu Ke, Dai Si-lan. 2012. The relationship between the expression of key genes in anthocyanin biosynthesis and the color of *Chrysanthemum*. *Acta Horticultrae Sinica*, 39 (3): 516 - 524. (in Chinese)
- 韩科厅, 赵莉, 唐杏娇, 胡可, 戴思兰. 2012. 菊花花青素苷合成关键基因表达与花色表型的关系. *园艺学报*, 39 (3): 516 - 524.
- Hu Ke, Meng Li, Han Ke-ting, Sun Yi, Dai Si-lan. 2009. Isolation and expression analysis of key genes involved in anthocyanin biosynthesis of *Cineraria*. *Acta Horticultrae Sinica*, 36 (7): 1013 - 1022. (in Chinese)
- 胡可, 孟丽, 韩科厅, 孙翊, 戴思兰. 2009. 瓜叶菊花青素合成关键结构基因的分离及表达分析. *园艺学报*, 36 (7): 1013 - 1022.
- Huang Y, Gou J Q, Jia Z C, Yang L, Sun Y M, Xiao X Y, Song F, Luo K M. 2012. Molecular cloning and characterization of two genes encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Populus trichocarpa*. *PLoS One*, 7 (2): e30364.
- Kazama Y, Fujiwara M T, Takehisa H, Ohbu S, Ichida H, Hayashi Y, Abe T. 2013. Characterization of a heavy-ion induced white flower mutant of allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Rep*, 32 (1): 11 - 19.
- Kim B G, Kim J H, Kim J, Lee C, Ahn J H. 2008. Accumulation of flavonols in response to ultraviolet-B irradiation in soybean is related to induction of flavanone 3- β -hydroxylase and flavonol synthase. *Mol Cells*, 25 (2): 247 - 252.
- Lee W S, You J A, Chung H, Lee Y H, Baek N I, Yoo J S, Park Y D. 2008. Molecular cloning and biochemical analysis of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) from *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (Chinese cabbage) using a heterologous system. *J Plant Biol*, 51 (1): 42 - 47.
- Li H, Qiu J, Chen F, Lv X, Fu C, Zhao D, Hua X, Zhao Q. 2012a. Molecular characterization and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene in *Saussurea medusa*. *Mol Biol Rep*, 39 (3): 2991 - 2999.
- Li L, Ban Z J, Li X H, Wu M Y, Wang A L, Jiang Y Q, Jiang Y H. 2012b. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes and transcription factor PcMYB10 in pears (*Pyrus communis* L.). *PLoS One*, 7 (9): e46070.
- Meng Xiang-chun, Peng Jian-zong, Wang Xiao-jing. 2007. Anthocyanin accumulation and CHS, DFR gene expression regulated by light and sugar in *Gerbera hybrida* ray floret. *Acta Horticultrae Sinica*, 34 (1): 227 - 230. (in Chinese)
- 孟祥春, 彭建宗, 王小菁. 2007. 光和糖对非洲菊花色素苷积累及 CHS、DFR 基因表达的影响. *园艺学报*, 34 (1): 227 - 230.
- Nakamura N, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Ishiguro K, Suzuki K, Suzuki H, Okazaki K, Shibata D, Tanaka Y. 2010. Generation of pink flower varieties from blue *Torenia hybrida* by redirecting the flavonoid biosynthetic pathway from delphinidin to pelargonidin. *Plant Biotechnol*, 27 (5): 375 - 383.
- Niu S S, Xu C J, Zhang W S, Zhang B, Li X, Wang K L, Ferguson I B, Allan A C, Chen K S. 2010. Coordinated regulation of anthocyanin biosynthesis in Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit by a R2R3 MYB transcription factor. *Planta*, 231 (4): 887 - 899.
- Pan Li-jing, Zhang Miao-bin, Fan Gan-qun, Chen Wei-ting, Cao You-pei. 2010. Cloning, sequencing and prokaryotic expression of *dfrr* from

- Dendrobium*. Acta Horticultrae Sinica, 37 (1): 129 - 134. (in Chinese)
- 潘丽晶, 张妙彬, 范干群, 陈伟庭, 曹友培. 2010. 石斛兰 *dfr* 基因的克隆、序列分析及原核表达. 园艺学报, 37 (1): 129 - 134.
- Rahimi A R, Babaei S, Mashayekhi K, Rokhzadi A, Amini S. 2013. Anthocyanin content of coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves as affected by salicylic acid and nutrients application. IJB, 3 (2): 141 - 145.
- Ramsay N A, Glover B J. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. Trends Plant Sci, 10 (2): 63 - 70.
- Schaart J G, Dubos C, Romero De La Fuente I, van Houwelingen A M, de Vos R C, Jonker H H, Xu W, Routaboul J M, Lepiniec L, Bovy A G. 2013. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits. New Phytol, 197 (2): 454 - 467.
- Seitz C, Vitten M, Steinbach P, Hartl S, Hirsche J, Rathje W, Treutter D, Forkmann G. 2007. Redirection of anthocyanin synthesis in *Osteospermum hybrida* by a two-enzyme manipulation strategy. Phytochemistry, 68 (6): 824 - 833.
- Shih C H, Chu H, Tang L K, Wataru S, Masahiko M, Chu I K, Wang M, Lo C. 2008. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. Planta, 228 (6): 1043 - 1054.
- Shimada N, Sasaki R, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Aoki T, Ayabe S. 2005. A comprehensive analysis of six dihydroflavonol 4-reductases encoded by a gene cluster of the *Lotus japonicus* genome. J Exp Bot, 56 (419): 2573 - 2585.
- Shimada S, Otsuki H, Sakuta M. 2007. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in the Caryophyllales. J Exp Bot, 58 (5): 957 - 967.
- Shimada S, Takahashi K, Sato Y, Sakuta M. 2004. Dihydroflavonol 4-reductase cDNA from non-anthocyanin-producing species in the Caryophyllales. Plant Cell Physiol, 45 (9): 1290 - 1298.
- Tanak Y, Sasaki N, Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. Plant J, 54 (4): 733 - 749.
- Tereshchenko O Y, Arbutova V S, Khlestkina E K. 2013. Allelic state of the genes conferring purple pigmentation in different wheat organs predetermines transcriptional activity of the anthocyanin biosynthesis structural genes. J Cereal Sci, 57 (1): 10 - 13.
- Trabelsi N, d'Estaintot B L, Sigaud G, Gallois B, Chaudière J. 2011. Kinetic and binding equilibrium studies of dihydroflavonol 4-reductase from *Vitis vinifera* and its unusually strong substrate inhibition. J Biophys Chem, 2 (3): 332 - 344.
- Xie D, Jackson L A, Cooper J D, Ferreira D, Paiva N L. 2004. Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago truncatula*. Plant Physiol, 134 (3): 979 - 994.
- Xie R, Zheng L, He S, Zheng Y, Yi S, Deng L. 2011. Anthocyanin biosynthesis in fruit tree crops: Genes and their regulation. Afr J Biotechnol, 10 (86): 19890 - 19897.
- Xu Zhi-ru, Li Yu-hua. 2006. Screening the genes associated with anthocyanin biosynthesis in roots of 'Tsuda' turnip using cDNA microarray. Hereditas, 28 (9): 1101 - 1106. (in Chinese)
- 许志茹, 李玉花. 2006. 利用 cDNA 微阵列分离津田芜菁花青素生物合成相关基因. 遗传, 28 (9): 1101 - 1106.
- Yoshida K, Iwasaka R, Shimada N, Ayabe S, Aoki T, Sakuta M. 2010. Transcriptional control of the dihydroflavonol 4-reductase multigene family in *Lotus japonicus*. J Plant Res, 123 (6): 801 - 805.
- Zhang K M, Li Z, Li Y, Li Y H, Kong D Z, Wu R H. 2013. Carbohydrate accumulation may be the proximate trigger of anthocyanin biosynthesis under autumn conditions in *Begonia semperflorens*. Plant Biol (Stuttg), 15 (6): 991 - 1000.
- Zhang Long, Li Wei-hua, Jiang Shu-mei, Zhu Gen-fa, Wang Bi-qing, Li Hong-qing. 2008. Progress of molecular basis of biosynthesis and transcriptional regulation of anthocyanins. Acta Horticultrae Sinica, 35 (6): 909 - 916. (in Chinese)
- 张 龙, 李卫华, 姜淑梅, 朱根发, 王碧青, 李洪清. 2008. 花色苷生物合成与分子调控研究进展. 园艺学报, 35 (6): 909 - 916.
- Zhou Y, Guo D, Li J, Cheng J, Zhou H, Gu C, Gardiner S, Han Y P. 2013. Coordinated regulation of anthocyanin biosynthesis through photorespiration and temperature in peach (*Prunus persica* f. *atropurpurea*). Tree Genet Genomes, 9 (1): 265 - 278.