

水芹类黄酮3'-羟化酶基因的克隆与表达特性分析

康美玲, 冯凯, 段希, 王柯文, 王枫, 熊爱生*

南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室, 江苏南京210095

摘要: 类黄酮3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)属于细胞色素P450家族(cytochrome P450, CYP450), 在植物主要成色物质花青素的合成中发挥重要作用。本实验以‘八卦洲水芹’以及紫色叶柄突变型水芹为实验材料, 利用RT-PCR方法, 从紫色叶柄突变型水芹的cDNA中克隆得到编码类黄酮3'-羟化酶的基因, 命名为*OjF3'H1*。序列分析显示, *OjF3'H1*基因全长1 575 bp, 共编码524个氨基酸。*OjF3'H1*蛋白相对分子质量为58 292.59, 理论等电点为6.77。系统进化分析显示, *OjF3'H1*蛋白具有高度保守性, 与同属伞形科的胡萝卜F3'H1进化关系最近。*OjF3'H1*编码的蛋白属于疏水蛋白, 无序化比例为5.53%, 空间结构主要由 α -螺旋和 β -折叠组成。实时定量PCR分析显示, *OjF3'H1*在不同品种水芹茎中相对表达量有明显差异, 紫色叶柄突变型水芹中*OjF3'H1*的表达量明显比‘八卦洲水芹’中高。

关键词: 水芹; 类黄酮3'-羟化酶基因; 克隆; 叶柄; 表达分析

次生代谢物质在植物生理调节、提高生存竞争能力等方面充当着重要的角色(鲁守平等2006)。目前, 植物花色苷物质代谢途径研究已较为成熟(Holton和Cornish 1995; 刘仕芸等2006; 宫硇等2011)。花色苷的生物合成主要由苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3'H)、类黄酮3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)和类黄酮3',5'-羟化酶(flavonoid 3',5'-hydroxylase, F3',5'H)、二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、花色苷合成酶(anthocyanin, ANS)和类黄酮3-O-葡萄糖基转移酶(flavonoid 3-O-glucosyltransferase, UFGT)催化完成(张学英等2004)。其中, F3'H蛋白具有催化多种依赖NADPH或NADH的底物氧化反应的功能, 它可将柚皮素(naringenin)和二氢槲皮醇(dihydrokaempferol, DHK)转化成圣草酚(eriodyctol)和二氢槲皮黄酮(dihydroquercetin, DHQ) (Graham和Peterson 1999; Werck-Reichhart和Feyereisen 2000; Schuler和Werck-Reichhart 2003; 乔小燕等2009)。Brugliera等(1999a)从矮牵牛(*Petunia hybrida*)中首次分离得到F3'H基因, 该基因被鉴定属于CYP75B2基因家族。目前, 已经从玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、紫茎泽兰(*Eupatorium adenophora*)、金鱼草(*Antirrhinum*

majus)、矢车菊(*Centaurea cyanus*)、葡萄(*Vitis vinifera*)和苹果(*Malus domestica*)等众多植物中分离和鉴定了F3'H基因(Schoenbohm等2000; Toda等2005; Soobrattee等2005; Han等2010)。之前关于花色苷代谢途径相关基因的研究表明, F3'H基因的表达量与植物花青素的积累有密切关系(胡可等2009)。F3'H催化 β -环单羟基化的类黄酮转变成二羟基化类黄酮, 这一转变可使植物抵御UV-B强烈照射所带来的伤害(Ryan等2002)。

水芹为伞形科水芹属水生宿根草本植物, 喜生于湿洼水沟中, 是我国的一种传统特色水生蔬菜。水芹作为一种具有独特功能价值的保健蔬菜, 质地鲜嫩, 清香爽口, 风味独特, 营养丰富, 以其嫩茎和叶柄供食用。水芹适应性较广, 全国各地均有分布, 以中国的东部和南部居多, 抗病虫害能力强, 产量高而稳, 主要在冬春蔬菜淡季采收上市, 既可鲜销又可加工, 是一种很好的天然无公害保健食品(李德明等2015)。紫色水芹是南京八卦洲野生型水芹的自发突变体, 其叶柄由于花青素积累而呈紫色(Feng等2017)。

收稿 2017-12-26 修订 2018-01-04

资助 国家大学生创新创业训练计划(201710307031)、国家自然科学基金(31272175)、教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0670)和江苏高校优势学科建设项目(PAPD)。

* 通讯作者(xionggaisheng@njau.edu.cn)。

与其他模式植物和园艺作物相比, 水芹分子生物学方面的报道相对较少, 水芹分子生物学相关研究相对滞后。本文从紫色叶柄突变型水芹的cDNA中克隆得到1个*OjF3'H1*基因, 对其进行了生物信息学分析, 并利用荧光定量PCR技术分析了*OjF3'H1*基因在‘八卦洲水芹’和紫色叶柄突变水芹中的表达特性, 为进一步研究水芹类黄酮代谢提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

本实验以水芹[*Oenanthe javanica* (Bl.) DC]的‘八卦洲水芹’(BWT)和紫色叶柄突变水芹(BM1)为植物材料, 于2017年2月下旬种植于南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室人工气候室, 生长条件为: 25°C光照12 h/20°C黑暗12 h, 光照强度300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。在水芹生长至抽薹后10和15 d时分别取样, 样品用液氮速冻后保存于-80°C冰箱, 用于总RNA的提取。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 α 保存于本实验室, pMD19-T质粒载体、*Ex Taq* DNA聚合酶、Prime Script RT reagent Kit等为大连TaKaRa公司产品。

1.2 总RNA的提取及cDNA合成

将所取的水芹样品利用RNA Simple Total RNA Kit提取总RNA (北京Tiangen公司), 并按照Prime Script RT reagent Kit说明书将提取的水芹总RNA反转录成cDNA。

1.3 水芹类黄酮3'-羟化酶基因克隆

根据本课题组的水芹转录组数据(Jiang等2015), 检索得到水芹*OjF3'H1*基因序列, 并设计一对克隆引物, *OjF3'H1*-F: 5'-ATGATTTCTGATACTCC-TCTTTTG-3'; *OjF3'H1*-R: 5'-AGCCCAGCAAGT-GTATAATGCTTAA-3'。以水芹的cDNA为模板利用以上引物进行PCR扩增。扩增的反应条件为: 94°C预变性5 min; 94°C变性30 s, 54°C退火30 s, 72°C延伸100 s, 共35个循环; 最后72°C延伸10 min。将反应所得产物用12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳分离并回收。回收产物连接到pMD19-T载体后转化到大肠杆菌DH5 α , 菌液检测后送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序鉴定。

1.4 序列分析

利用NCBI网站进行氨基酸序列分析以及保

守域预测, 通过DNAMAN 6.0软件进行氨基酸序列的亲水性和疏水性分析, 采用MEGA 5软件绘制系统进化树(Tamura等2011)。不同物种F3'H蛋白的氨基酸组成及理化性质分析均在ExPASy (<http://www.expasy.org>)上完成(Gasteiger等2003; Harrison和Bagajewicz 2015)。利用SWISS-MODEL (<http://swiss-model.expasy.org>)进行空间建模分析(Schwede等2003)。

1.5 基因表达特性分析

根据水芹*OjF3'H1*基因测序结果, 利用Primer Premier 6软件设计一对荧光定量PCR引物, 正向为5'-TTCATCCTTCAACTCCGCTCTCC-3', 反向为5'-AACTTCAAATCATTCCCCCTAA-3'。以水芹*PP2A*基因作为荧光定量数据处理的内参基因, 其正向引物为5'-TGGCTGACACAGTAATTCGAG-GTT-3', 反向引物为5'-CTGACGGAACAGACG-GACCAT-3' (Jiang等2014)。荧光定量PCR试验操作步骤按照大连TaKaRa公司的SYBR Premix *Ex Taq*试剂盒的操作说明在iQTM 5 Real-Time PCR System上进行, 数据处理采用iQTM 5 Software完成。*OjF3'H1*基因在不同品种水芹相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法(Schäffer等2001)。

2 实验结果

2.1 水芹*OjF3'H1*基因的克隆

提取正常生长的紫色叶柄突变型水芹植株的RNA, 并反转录成cDNA, 然后以此为模板, 利用*OjF3'H1*-F和*OjF3'H1*-R引物进行PCR扩增, 获得1 500 bp左右扩增片段。测序结果显示, 紫色叶柄突变型水芹的*OjF3'H1*基因全长为1 575 bp, 编码524个氨基酸(图1)。

2.2 水芹*OjF3'H1*蛋白的进化分析

水芹*OjF3'H1*蛋白在不同物种间的进化树结果显示, 水芹*OjF3'H1*与胡萝卜(*Daucus carota*)进化关系最近, 其次是山茶(*Camellia sinensis*)、苹果(*Malus domestica*)和葡萄(*Vitis vinifera*) (图2)。水芹的*OjF3'H1*蛋白与猕猴桃(*Actinidia chinensis*)进化关系最远。水芹的*OjF3'H1*蛋白与胡萝卜F3'H蛋白同属于伞形科分支。

2.3 不同物种F3'H蛋白氨基酸序列比对与氨基酸理化性质分析

利用NCBI对水芹*OjF3'H1*蛋白序列进行

```

1  atgatttctgatactcctcttttggttatctacacatcagttcttgatttcttctgtattgtttacttaacctagc
M I S D T P L L V I Y T S V L A F V L Y C L L N L R
79  accctcttcttaaccgtcaccgcagcccatatccactaccaccgggtcctaaaccatggcctgttataggaattg
T L F L N R H R S P Y P L P P G P K P W P V I G N L
157  ccccatctaggcaccatacctcaccactccttagcagccatggctcggacatattggaccacttttgaccctacggctc
P H L G T I P H H S L A A M A R T Y G P L L H L R L
235  gggttgggtcatgtggtgggtgcctcatccgcatgtgctgcacaattcttgaaccatgattcgaattctcc
G L V H V V V A S S A D V A A Q F L K T H D S K F S
313  aaccggccccgaatcgggtgccaacacattcgctataattatcaagatttggtttccgaccgtatggaccaagg
N R P P E S G A K H I A G A N Y Q D L V F A P Y G P R
391  tggcgcatgtaaggaaaattgttctctcatctttttccgtcaaggctcttgatgattttcccatgttcgaccg
W R M L R K I C S L H L F S V K A L D D F R H V R Q
469  gaggagttggtgactggctcgtggcttggctggagctgggaaaagaccagtacatttgggacaattattgaatata
E E V G V L V R G L A G A G K R P V H L G Q L L R I
547  tgtccacaaatgcactaggacgctgatgctaggcaagagagtgttcaactacgacagcagcacagggactcctgat
C A T N A L G R V M L G K R V F N Y D S S T G T P D
625  ccaaatgctgatgagtttaagacatgggtggtgagctcatgaccctcgtggagtttttaacattggtgattttatc
P N A D E F K D M V V E L M T L A G V F N I G D F R
703  cctgcccttgagtgccttgacttgcaagtggttgcgaaaaagatgaaaaacttcatttacgttttgattcgttcttg
P A L E C L D L Q G V A K K M K K L H L R F D S F L
781  aaccaaatcttggaggagcataaaatctctgacaaccaaggctgcgctgataagccaaaaaacgttgatttggat
N Q I L E E H K I S D N Q G C A D K P K N V D L L N
859  gaattgttatcgtgaaagatgttgatggtgaagatgggaagcttaatgatactgagattaaggctttgcttttgac
E L L S L K D V D G E D G K L N D T E I K A L L L N
937  ttatttacagctggaacagatacatcatctagcagtagagtggcgatagctgaggttcttcgcaaccggagatc
L F T A G T D T S S S T V E W A I A E V L R N P R V
1015  ttaaccgaaactcaaaaggaactagactctgttattgttcaaggccgctggtgacagagttggaccttcaacta
L T E T Q K E L D S V I G Q G R L V T E L D L P Q L
1093  ccttatctagcagcaattgtcaaagaagtgttccgacttcatccttcaactccgctctccctcccacggatggcatcc
P Y L A A I V K E V F R L H P S T P L S L P R M A S
1171  gagagctgtgaaattaacggatactcataaccagaagctccacacttctagtaaattgttgggcatagcccgtgat
E S C E I N G Y F I P E G S T L L V N V W A I A R D
1249  ccaaaaatgtgggatgatccattagtgttccgacctgaacgattttaccaggaggcgaagcctaattgttgatatt
P K M W D D P L V F R P E R F L P G G E K P N V D I
1327  agggggaatgattttgaagtataaccgttccgggctggacgaagaatttgtcaggtatgagcctaggccttcgcag
R G N D F E V I P F G A G R R I C A G M S L G L R M
1405  gtgcagctactaactgcaacattggttcatacatttgattggacattagcagatggacaagaggcagagaagataat
V Q L L T A T L V H T F D W T L A D G Q E A E K I N
1483  atggatgaagcttatggtctgactttgcaacggcggttcctttaatggtgcatcctaggcctaggcctagcccagcaa
M D E A Y G L T L Q R A V P L M V H P R P R L A Q Q
1561  gtgtataatgcttaa
V Y N A *

```

图1 水芹*OjF3'H1*基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列Fig.1 The nucleotide and putative amino acid sequences of *OjF3'H1* gene from *O. javanica*

*: 终止密码子。

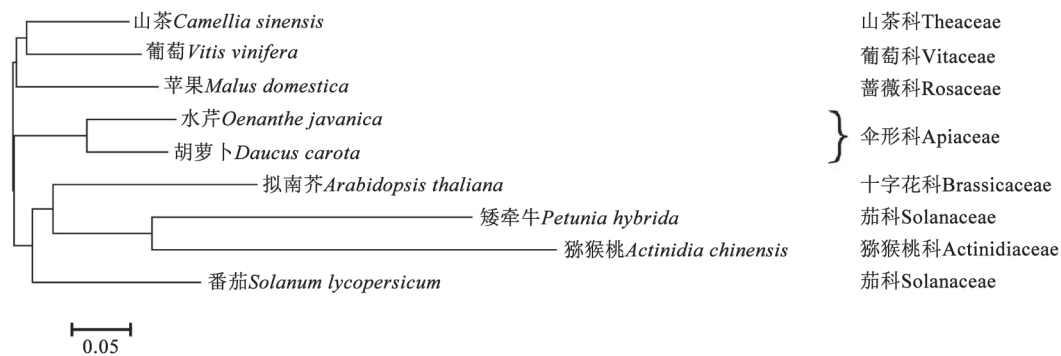


图2 水芹与其他物种F3'H蛋白的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of F3'H protein from *O. javanica* and other species

BLASTp检索, 结果表明, OjF3'H1蛋白具有一个典型的P450结构域(图3)。选取来源于胡萝卜、山茶、苹果、葡萄、拟南芥和山茶的F3'H蛋白, 进行氨基酸序列的多重比对。结果(图4)显示, 水芹的OjF3'H1蛋白序列第434~437位含有“GGEK”特异序列, N端含有典型的“LPPGP”序列。水芹与这5个物种的同源性达到了80.71%, F3'H1在植物中具有较高的保守性。

选取水芹、胡萝卜(登录号为AIT52346)、山茶(登录号为ASU87426)、葡萄(登录号为ALP48438)、苹果(登录号为ACR14869)、拟南芥(登录号为NP_196416)、番茄(登录号为NP_001289844)、矮牵牛(登录号为ABN42195)和猕猴桃(登录号为ADC34701)的F3'H蛋白进行氨基酸组成及理化性质分析(表1)。结果显示, 以上F3'H蛋白氨基酸数目均在506~524之间, 水芹与胡萝卜的氨基酸数目相等; 相对

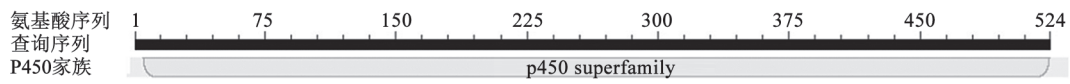


图3 水芹OjF3'H1氨基酸序列保守域预测

Fig.3 Prediction of conserved domain of amino acid sequences of OjF3'H1 from *O. javanica*

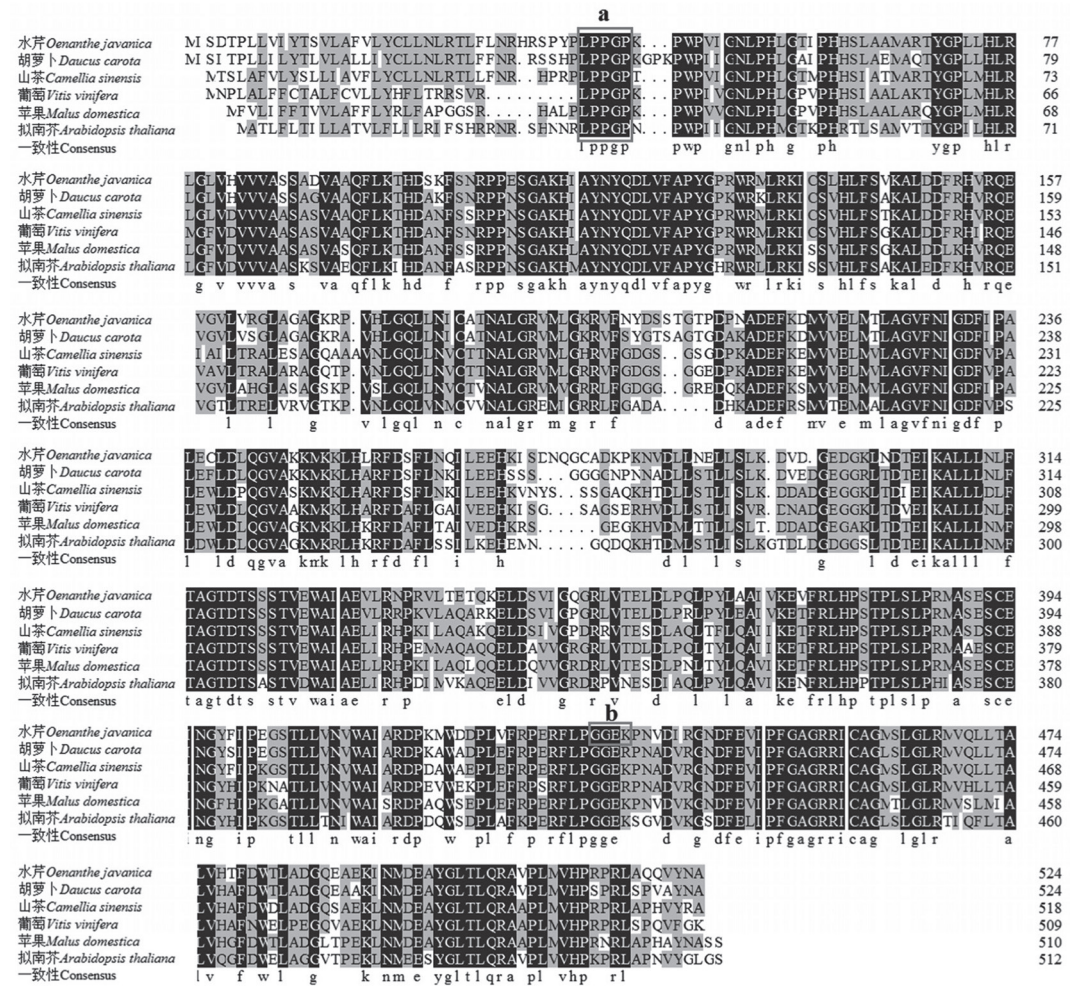


图4 水芹与其他物种F3'H氨基酸序列的多重比对

Fig.4 The multiple sequence alignment of F3'H from *O. javanica* and other species

a: 膜的锚定位点; b: F3'H特征序列。

表1 水芹及其他物种F3'H氨基酸组成及理化性质比较

Table 1 Comparison on compositions of amino acids and physical and chemical property of F3'H protein from *O. javanica* and other species

植物	登录号	氨基酸数目/个	相对分子量/Da	理论等电点	碱性氨基酸/%	酸性氨基酸/%	芳香族氨基酸/%	脂肪族氨基酸/%	总平均疏水性
水芹(<i>O. javanica</i>)	-	524	58 292.59	6.77	13.6	10.9	7.4	40.1	-0.039
拟南芥(<i>A. thaliana</i>)	NP_196416	513	56 786.57	7.83	14.4	10.6	7.5	40.2	-0.089
葡萄(<i>V. vinifera</i>)	ALP48438	509	56 117.00	8.17	13.9	10.0	7.7	42.3	0.005
胡萝卜(<i>D. carota</i>)	AIT52346	524	57 134.28	8.92	13.8	9.6	7.2	43.5	0.034
山茶(<i>C. sinensis</i>)	ASU87426	518	57 043.87	6.82	13.6	10.4	7.7	41.1	-0.006
番茄(<i>S. lycopersicum</i>)	NP_001289844	514	57 446.88	8.49	13.3	10.3	8.5	39.3	-0.030
矮牵牛(<i>P. hybrida</i>)	ABN42195	506	56 518.20	9.15	14.0	10.0	7.8	38.9	-0.050
苹果(<i>M. domestica</i>)	ACR14869	511	56 181.00	8.60	13.9	10.0	7.9	41.6	-0.023
猕猴桃(<i>A. chinensis</i>)	ADC34701	511	57 928.10	7.18	14.8	12.6	8.8	31.8	-0.188

分子量处于 $(5.6\sim 5.8)\times 10^4$ 之内,理论等电点在6.77~9.15之间;碱性氨基酸比例差异很小,介于13.3%和14.4%之间;酸性氨基酸比例为9.6%~12.6%;脂肪族氨基酸含量为31.8%~43.5%,明显高于芳香族氨基酸(7.2%~8.8%);平均疏水性为-0.089~0.034。

2.4 水芹OjF3'H1氨基酸亲疏水性以及无序化分析

蛋白亲水性疏水性分析结果显示,水芹OjF3'H1氨基酸位于第18位的缬氨酸疏水性最强,位于第299位的甘氨酸亲水性最强。从总体来看,水芹OjF3'H1属于疏水性蛋白(图5)。水芹OjF3'H1蛋白

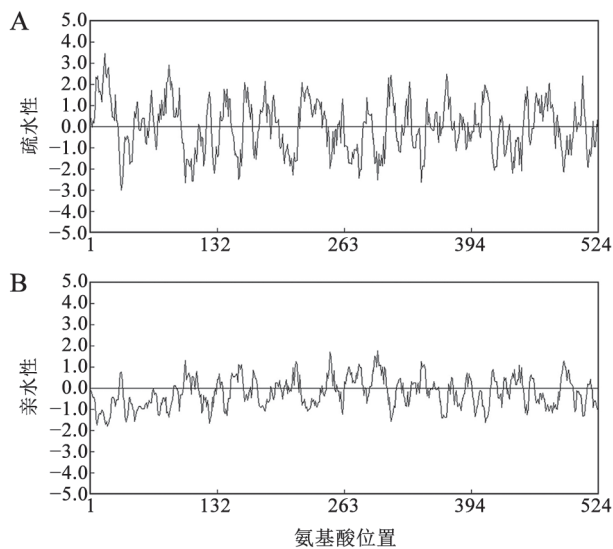


图5 水芹OjF3'H1蛋白氨基酸序列的疏水性(A)和亲水性(B)分析

Fig.5 Analysis of hydrophobicity (A) and hydrophilicity (B) of amino acid sequence of OjF3'H1 protein from *O. javanica*

序列折叠无序化分析显示,整个基因区段中有两个区域无序,共含有29个氨基酸,无序化比例为5.53% (图6)。

2.5 水芹OjF3'H1蛋白的三级结构预测及分析

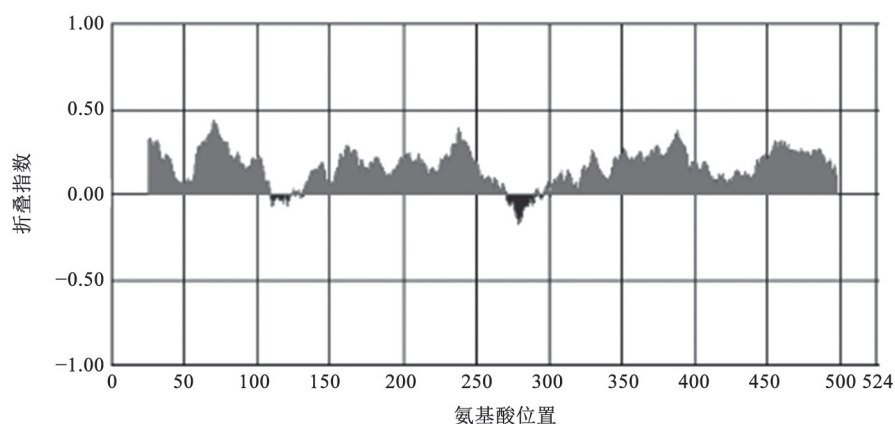
通过SWISS-MODEL对水芹OjF3'H1蛋白的三级结构进行了预测及分析,以PDB ID: 4I8V为模型对OjF3'H1蛋白序列进行同源建模。结果显示,水芹OjF3'H1蛋白结构主要由10个 α -螺旋和11个 β -折叠组成(图7)。

2.6 OjF3'H1基因在紫色和非紫色水芹茎不同生长时期的表达分析

利用qRT-PCR方法对‘八卦洲水芹’和紫色叶柄突变水芹茎中OjF3'H1基因的相对表达量进行分析。如图8所示,抽薹后生长10 d时,OjF3'H1基因在紫色突变型水芹(BM1)的相对表达量是野生型水芹(BWT)的11倍;抽薹后生长15 d时,OjF3'H1基因在紫色突变型水芹(BM1)的相对表达量是野生型水芹(BWT)的4倍。对于野生型水芹,生长15 d的OjF3'H1基因相对表达量比10 d的相对表达量有所上升。而对于紫色突变型水芹,生长15 d的OjF3'H1基因相对表达量比10 d的相对表达量低。

3 讨论

类黄酮3'-羟化酶F3'H属于细胞色素P450单加氧酶,在植物花色苷的生物合成及次生代谢中起着重要作用(Graham和Peterson 1999; Schuler和Werck-Reichhart 2003)。在花色苷合成途径中,F3'H是由二氢槲皮醇合成花色苷的第一个酶(侯



```

MISDTPLLVI YTSVLAFVLY CLLNLRTLFL NRHRSPYPLP PGPKPWPVIG
NPLHLGTIPH HSLAAMARTY GPLLHLRLGL VHVVVASSAD VAAQFLKTHD
SKFSNRPPES GAKHIAYNYQ DLVFAPYGPR WRMLRKICSL HLF SVKALDD
FRHVRQEEVG VLVRGLAGAG KRPVHLGQLL NICATNALGR VMLGKRVFNY
DSSTGTPDPN ADEFKDMVVE LMTLAGVFNI GDFIPALECL DLQGVAKKMK
KLHLRFDSFL NQILEEHKIS DNQGCADKPK NVDLLNELLS LKDVDGEDGK
LNDTEIKALL LNLFTAGTDT SSSTVEWAIA EVLRNPRVLT ETQKELDSVI
GQGRLVTELD LPQLPYLAAI VKEVFRHPS TPLSLPRMAS ESCEINGYFI
PEGSTLLVNV WAIARDPKMW DDPLVFRPER FLPGGEKPNV DIRGNDFEVI
PFGAGRRICA GMSLGLRMVQ LLTATLVHTF DWTLADGQEA EKINMDEAYG
LTLQRAVPLM VHPRPRLAQQ VYNA

```

图6 水芹OjF3'H1折叠状态分析

Fig.6 Analysis of the folding state of OjF3'H1 from *O. javanica*

下划线标注的为无序状态的氨基酸, 无下划线标注的为有序状态的氨基酸。

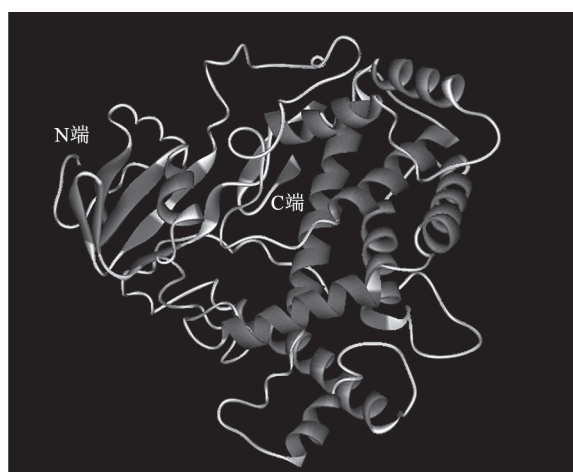
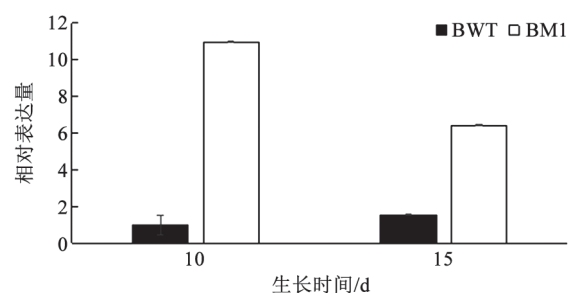


图7 水芹OjF3'H1蛋白的三级结构

Fig.7 Tertiary structure of OjF3'H1 protein from *O. javanica*

杰等2011; 王文丽等2017)。二氢槲皮醇在F3'H的催化下发生羟化反应生成二氢槲皮黄酮, 二氢槲

图8 *OjF3'H1*基因在水芹不同生长时期茎中的相对表达量Fig.8 The relative expression levels of *OjF3'H1* gene in the stems of *O. javanica* at various growth stages

BMT: '八卦洲水芹'; BM1: 紫色叶柄突变水芹。

皮黄酮在二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)和花色素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)的催化下生成矢车菊色素(cyanidin) (Saito等2013)。通过病毒介导的基因沉默使大豆中F3'H基因表达下调, 影响了大豆短茸毛的成色

(Nagamatsu等2009)。将紫茎泽兰*F3'H*基因遗传转化烟草后,烟草植株的苯丙氨酸解氨酶活性提高,从而增强了植物抵御外界侵害的能力(张松焕等2009)。*F3'H*基因突变型拟南芥(*transparent testa 7, tt7*)的种皮深褐色消失,变为白色(Brugliera等1999)。

水芹是我国特色水生蔬菜,由于富含 α -蒎烯和香芹酚而具特殊的香味,又因为黄酮、甾醇类等物质的存在而具有抗肝炎、降血压、降血脂等保健功效。本文依据本课题水芹转录组数据(Feng等2017),从水芹中获取一个编码类黄酮3'-羟化酶的*OjF3'H1*基因。*OjF3'H1*氨基酸序列第434~437位含有“GGEK”序列,这是*F3'H*基因的特征序列;从第39位开始的“LPPGP”序列是细胞色素P450主要保守域,是*F3'H*在微粒体膜上的最佳定位枢纽,连接膜的锚定位点和酶蛋白的球体部分,在不同物种中高度保守(Yamazaki等1993; Murakami等1994; Zabala和Vodkin 2003)。系统进化分析显示,水芹*OjF3'H1*与同科植物胡萝卜具有最近的亲缘关系。*OjF3'H1*氨基酸序列属于P450超级家族,无序化程度不明显。综合水芹与其他物种氨基酸理化性质分析结果来看,同一科植物*F3'H1*蛋白氨基酸理化性质相近,同科植物的*F3'H*蛋白同源性也较高。紫色突变型水芹*OjF3'H1*基因的相对表达量在抽薹后15 d较抽薹后10 d有所下降,可能是前期合成较多的原因。Brugliera等(1999)的研究表明:*F3'H*的表达在花冠伸长时达到最高,从花朵开始开放到成熟时期转录水平开始降低。水芹中不同生长发育时期的*OjF3'H1*基因转录水平变化有待进一步研究验证。*OjF3'H1*基因在紫色突变型水芹(BM1)的相对表达量显著高于‘八卦洲水芹’(BWT)的相对表达量。有研究指出,*F3H1*、*F3'HI*等结构基因可能参与了紫色胡萝卜的花青素生物合成(Xu等2014)。推测*OjF3'H1*基因在水芹花青素合成中起重要作用。

本文通过序列对比、保守域预测、三级结构、亲/疏水性、进化分析等生物信息学手段对水芹*OjF3'H1*进行了分析,并利用荧光定量PCR检测了不同品种不同生长时期水芹茎中的*OjF3'H1*基因的相对表达量,验证了*OjF3'H1*基因在水芹花青素积累中的作用,为水芹黄酮类物质的合成等研究提供了重要的理论基础。

参考文献(References)

- Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton TA, et al (1999). Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*. *Plant J*, 19 (4): 441–451
- Feng K, Xu ZS, Que F, et al (2017). An R2R3-MYB transcription factor, *OjMYB1*, functions in anthocyanin biosynthesis in *Oenanthе javanica*. *Planta*, doi: 10.1007/s00425-017-2783-8
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 31 (13): 3784–3788
- Gong X, Xue J, Zhang XD (2011). Regulation genes in plant anthocyanin synthesis pathway. *Curr Biotech*, 1 (06): 381–390 (in Chinese with English abstract) [宫硇, 薛静, 张晓东(2011). 植物花青素合成途径中的调控基因研究进展. *生物技术进展*, 1 (06): 381–390]
- Graham SE, Peterson JA (1999). How similar are P450s and what can their differences teach us. *Arch Biochem Biophys*, 369 (1): 24–29
- Han YP, Vimolmangkang S, Soria-Guerra RE, et al (2010). Ectopic expression of apple *F3'H* genes contributes to anthocyanin accumulation in the *Arabidopsis tt7* mutant grown under Nitrogen stress. *Plant Physiol*, 2 (153): 806–820
- Harrison RG, Bagajewicz MJ (2015). Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol*, 1258: 403–408
- Holton TA, Cornish EC (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7 (7): 1071–1083
- Hou J, Tong L, Cui GX, et al (2011). Research advances of plant flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) gene. *Plant Physiol J*, 47 (07): 641–647 (in Chinese with English abstract) [侯杰, 佟玲, 崔国新等(2011). 植物类黄酮3'-羟化酶(*F3'H*)基因的研究进展. *植物生理学报*, 47 (07): 641–647]
- Hu K, Meng L, Han KT, et al (2009). Isolation and expression analysis of key genes involved in anthocyanin biosynthesis of *Cineraria*. *Acta Horti Sin*, 36 (7): 1013–1022 (in Chinese with English abstract) [胡可, 孟丽, 韩科厅等(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 (07): 1013–1022]
- Jiang Q, Wang F, Li MY, et al (2014). Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses in *Oenanthе javanica* (BI.) DC. *PLoS One*, 9 (3): e92262
- Jiang Q, Wang F, Tan HW, et al (2015). *De novo* transcriptome assembly, gene annotation, marker development, and miRNA potential target genes validation under abiotic stresses in *Oenanthе javanica*. *Mol Genet Genomics*, 290 (2): 671–683
- Li DM, Cai XL, Hu YP, et al (2015). Study on adaptability of

- different *Oenanthe javanica* varieties in Hainan province. *J Changjiang Veg*, (22): 67–68 (in Chinese with English abstract) [李德明, 蔡兴来, 胡艳平等(2015). 海南不同水芹品种适应性研究. *长江蔬菜*, (22): 67–68]
- Liu SY, Huang YL, Zhang SZ (2006). Regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in plant. *Plant Physiol J*, 42 (04): 747–754 (in Chinese) [刘仕芸, 黄艳岚, 张树珍(2006). 植物花青素生物合成中的调控基因. *植物生理学通讯*, 42 (04): 747–754]
- Lu SP, Sui XX, Sun Q, et al (2006). Biological functions of secondary metabolism of medicinal plants and influences of ecological environment. *Nat Prod Res Dev*, 18 (06): 1027–1032 (in Chinese with English abstract) [鲁守平, 隋新霞, 孙群等(2006). 药用植物次生代谢的生物学作用及生态环境因子的影响. *天然产物研究与开发*, 18 (06): 1027–1032]
- Murakami K, Mihara K, Omura T (1994). The transmembrane region of microsomal cytochrome P450 identified as the endoplasmic reticulum retention signal. *J Biochem*, 116 (1): 164–175
- Nagamatsu A, Masuta C, Matsuura H, et al (2009). Down-regulation of flavonoid 3'-hydroxylase gene expression by virus-induced gene silencing in soybean reveals the presence of a threshold mRNA level associated with pigmentation in pubescence. *Plant Physiol J*, 166 (1): 32–39
- Qiao XY, Ma CL, Chen L (2009). Plant flavonoid biosynthesis pathway and regulation of its important genes. *Nat Prod Res Dev*, 21 (02): 354–360, 207 (in Chinese with English abstract) [乔小燕, 马春雷, 陈亮(2009). 植物类黄酮生物合成途径及重要基因的调控. *天然产物研究与开发*, 21 (02): 354–360, 207]
- Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, et al (2002). Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry*, 59 (1): 23–32
- Saito K, Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, et al (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: structural and genetic diversity. *Plant Physiol Biochem*, 72: 21–34
- Schäffer AA, Aravind L, Madden TL, et al (2001). Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res*, 29 (14): 2994–3005
- Schoenbohm C, Martens S, Eder C, et al (2000). Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. *Biol Chem*, 381 (8): 749–753
- Schuler MA, Werck-Reichhart D (2003). Functional genomics of P450s. *Annu Rev Plant Biol*, 54: 629–667
- Schwede T, Kopp J, Guex N, et al (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 31 (13): 3381–3385
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, et al (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat Res*, 579 (1-2): 200–213
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28 (10): 2731–2739
- Toda K, Akasaka M, Dubouzet EG, et al (2005). Structure of flavonoid 3'-hydroxylase gene for pubescence color in soybean. *Crop Sci*, 45 (6): 2212–2217
- Wang WL, Wu ZJ, Liu ZW, et al (2017). Cloning and expression analysis of the gene encoding flavonoid 3'-hydroxylase in tea plant (*Camellia sinensis*). *J Tea Sci*, 37 (01): 108–118 (in Chinese with English abstract) [王文丽, 吴致君, 刘志薇等(2017). 茶树类黄酮3'-羟化酶基因的克隆与表达特性分析. *茶叶科学*, 37 (01): 108–118]
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*, 1 (6): REVIEWS3003
- Xu ZS, Huang Y, Wang F, et al (2014). Transcript profiling of structural genes involved in cyanidin-based anthocyanin biosynthesis between purple and non-purple carrot (*Daucus carota* L.) cultivars reveals distinct patterns. *BMC Plant Biol*, 14: 262
- Yamazaki S, Sato K, Suhara K, et al (1993). Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s. *J Biochem*, 114 (5): 652–657
- Zabala G, Vodkin L (2003). Cloning of the pleiotropic *T* locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3'-hydroxylase. *Genetics*, 163 (1): 295–309
- Zhang SH, Li CQ, Guo HM, et al (2009). Effects of eupatorium adenophorum flavonoid 3'-hydroxylase over-expression on POD and PAL activity in transgenic tobacco. *J Agric Sci Tech China*, 11 (3): 98–101 (in Chinese with English abstract) [张松焕, 李春奇, 郭惠明等(2009). 过量表达紫茎泽兰类黄酮3'-羟化酶基因对转基因烟草 POD、PAL活性的影响. *中国农业科技导报*, 11 (3): 98–101]
- Zhang XY, Zhang SL, Luo J, et al (2004). Advances in research on fruit anthocyanin synthesis. *J Fruit Sci*, (05): 456–460 (in Chinese with English abstract) [张学英, 张上隆, 骆军等(2004). 果实花色苷合成研究进展. *果树学报*, (05): 456–460]

Cloning and expression analysis of flavonoid 3'-hydroxylase in *Oenanthe javanica*

KANG Mei-Ling, FENG Kai, DUAN Xi, WANG Ke-Wen, WANG Feng, XIONG Ai-Sheng*

State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), belongs to the family of cytochrome P450 monooxygenases (CYP450), plays important roles in anthocyanins biosynthesis in plant. In this study, 'Baguaizhou shuiqin' and the purple-petiole mutant *Oenanthe javanica* were used as plant materials. A gene encoding flavonoid 3'-hydroxylase was cloned from the cDNA of purple-petiole *O. javanica* by RT-PCR and designated as *OjF3'H1*. The *OjF3'H1* gene contained a full-length open reading frame of 1 575 bp, which encodes 524 amino acids. The relative molecular mass and theoretical isoelectric point of OjF3'H1 protein was 58 292.59 and 6.77, respectively. Sequence alignments and phylogenetic analysis indicated that OjF3'H1 was highly conserved and had the closest phylogenetic relationships with the F3'H protein from carrot. Quantitative real-time PCR analysis demonstrated that the relative expression levels of *OjF3'H1* gene in the stems of different *O. javanica* varieties were significantly different. The relative expression levels of *OjF3'H1* gene in purple *O. javanica* was higher than that in 'Baguaizhou shuiqin'.

Key words: *Oenanthe javanica*; flavonoid 3'-hydroxylase; clone; petiole; expression analysis

Received 2017-12-26 Accepted 2018-01-04

This work was supported by the National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (2017103070310), National Natural Science Foundation of China (31272175), the ministry of education in the new century excellent talents to support projects (NCET-11-0670), and Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions Project (PAPD).

*Corresponding author (xiongaisheng@njau.edu.cn).