

枣果实黄烷酮-3-羟化酶基因(*F3H*)的克隆及生物信息学分析

师守国, 户婷婷

(运城学院 生命科学系, 山西 运城 044000)

摘 要:以枣果实为试材,采用同源克隆的方法,利用转录组测序结果设计 *F3H* 基因特异引物序列,成功克隆得到了枣果实 *F3H* 基因全长,对其进行了生物信息学分析,并对该基因含量变化与花色苷的关系进行了研究。结果表明:*F3H* 基因全长 1 336 bp,编码 367 个氨基酸残基。根据基因序列比对结果,枣果实 *F3H* 基因编码的氨基酸序列与龙眼(*Dimocarpus longan*)、橄榄(*Canarium album*)、荔枝(*Litchi chinensis*)及川桑(*Morus notabilis*)的一致性分别为 90%、90%、89%、89%。半定量 RT-PCR 法分析表明,该基因在枣果实的红熟期表达量最大,其次为枣果实的半红期,而枣果实的绿熟期表达量最低;该基因表达量变化与花色苷含量变化一致。

关键词:花色苷;克隆;半定量分析;生物信息学

中图分类号:S 665.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0089-05

花色苷是花色素与糖以糖苷键结合而成的一类类黄酮化合物,是植物的次级代谢产物,广泛存在于植物的花、果实、茎、叶和根器官的细胞液中,使其呈现从青到红各种不同颜色。

果皮的颜色是各类色素共同作用的结果,受类胡萝卜素、叶绿素、花青素、黄酮等物质含量的影响,目前关于枣类色素提取和稳定性研究的报道比较多,推测使枣果实果皮颜色发生变化的物质可能是花色苷及黄酮类物质。近年来,关于花色苷的合成机理是受到植物激素调控的研究,国内外已有诸多报道,但是具体的调控机制还不太清楚。随着生物技术及现代分析手段的进步和发展,以及在农业上的大量应用,今后应深入研究基因表达控制、激素和基因表达的关系等方面,进一步了解花色苷的合成机制,从而在实际中利用化学调控的方法来促进果实的着色。

花色苷生物合成途径起源于一般的苯基丙烷类代谢途径,花色苷的合成需要各种酶的参与,包括查尔酮异构酶(CHI)、黄烷酮-3-羟化酶(*F3H*)、二氢黄酮-4-还原

酶(DFR)、花青素合成酶(ANS)、花青素还原酶(ANR)、催化柚皮素形成-3-羟基黄烷酮。现以 3 个不同发育时期的枣为试材,提取花色苷 RNA,进行 RT-PCR 半定量分析在不同时期 *F3H* 基因的表达量,并与不同时期枣中花色苷含量进行比较,以期探讨黄烷酮-3-羟化酶在花色苷合成中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试枣果实于 8—10 月分 3 个阶段依次采集,分别为绿熟期(花后 70 d)的青枣、转色期(花后 90 d)的半青枣、成熟期(花后 120 d)的红枣,果实采摘后,液氮速冻,−40 °C 保存。

1.2 试验方法

RNA 提取和 RT-PCR 所需试验用品用 DEPC 水处理 4 h 以上,消除 RNAase,防止试验过程中 RNA 的降解,之后分别用高温高压蒸汽灭菌锅处理 121 °C 15 min 和干热 160 °C 灭菌 4 h,备用。RNA 的提取采取改良 CTAB 法,并进行完整性检测。基因克隆引物上游引物:5'-TTCACCATCCCATACCA 3';下游引物:5'-AT-TAACAAGCCGTCAAGC 3'。

将 3 种不同时期的枣分别研磨,并分别取研磨好的 3 g 枣浸泡于 15 mL 盐酸乙醇溶液中,放置于 4 °C 冰箱内静置 24 h。取静置好的提取液至于比色皿中,进行紫外分

第一作者简介:师守国(1973-),男,山西运城人,博士,副教授,现主要从事园艺植物遗传育种与分子生物学等研究工作。E-mail: shishouguo2009@163.com.

基金项目:运城学院博士启动经费资助项目(YQ-2014021)。

收稿日期:2016-02-14

光度分析。直接测定花色苷含量 $C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = (A \times MW \times DF \times 1\,000) / (\epsilon \times 1)$ 。式中, A 为吸光值, MW 为分子量, DF 为稀释倍数, ϵ 为消光系数。

2 结果与分析

2.1 枣果实 3 个不同发育阶段 RNA 纯度检测

由图 1 可以看出, 28S 和 18S 核糖体 RNA 条带非常亮而浓, 28S 密度大约是 18S 的 2 倍; 5S 条带由低分子量的 RNA (tRNA 和 5S 核糖体 RNA 等) 组成, 在 28S 和 18S 核糖体带之间一般可以看到一片弥散的 EB 染色物质, 可能是由 mRNA 和其它异型 RNA 组成。样品的 $OD_{260}/OD_{280} = 2.04$, 证明所提取的总 RNA 纯度较高, 可进行下一步的试验。

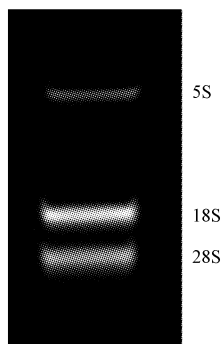
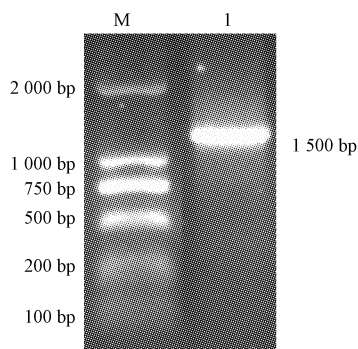


图 1 枣果实总 RNA 提取电泳结果

Fig. 1 Total RNA electrophoresis results in jujube fruit

2.2 枣果实的 *F3H* 基因的 cDNA 扩增结果

如图 2 所示, *F3H* 基因 cDNA PCR 扩增出 1 条约 1 500 bp 的条带, 初步判断为目标片段, 且纯度和特异性较好。回收扩增产物, 然后连接载体、转化, 获得的重质粒经 PCR 鉴定, 选择鉴定为阳性的菌株进行测序, 基因长度为 1 336 bp。其序列如下。



注: M. Marker; 1. *F3H* 基因。

Note: M. Marker; 1. *F3H* gene.

图 2 枣果实 *F3H* 基因 cDNA 的 PCR 产物

Fig. 2 *F3H* gene cDNA of PCR products in jujube fruit

TTCACCATCCATAACCATTAACCCCAACAA
TTCTCGCTTTACAAATCTTTCCCATACACCAATCC
GCACGTAATTAATTTCCCTCTCAACCAATCTCATTT
AAGAGAGAGGAAAACTGTTGTACATTCTCGCC
GACCAATAGAATGGCTCCATCTACTCTGACCGCA
CTAGCTGACGAGAAGACCTTCAGGCTACCTTCG
TTCGCGACGAAGATGAGCGCCCAAGGTTGCCTA
CAACCACTTCAGCAACGAAATCCCGATCATCTCGC
TAGCCGGAATCGATGAGGTGACGGCCGGAGGG
CAGAGATTTGCAAGAAGATCGTCGAGGCCTGTGA
GGATTGGGGTATTTTCCAGGTCTGTCGATCATGGT
GTCGATGCCGCTCTCATCTCCGACATGACTCGCC
TCGCTCGCGAATTCTTCGCTTTGCCTCCAGAAGAA
AAGCTCCGGTTCGACATGACCGGTGGCAAAAAGG
GCGGTTTCATCGTTTCCAGCCATTACAAAGGAGA
AGCAGTGCAAGATTGGCGTGAGATTGTGACCTAC
TTTTTCATACCCACTTCGGACAAGGGATTACTCCA
GGTGGCCGACAAAGCCAGAGGGCTGGAGAGCTG
TGACAGAGCAGTACAGTGAGAAGCTGATGGGAT
TGGCTTGCAAGCTGTTGGAGGTTTATCAGAAGC
CATGGGGCTAGAGAAGGAGGCTTTGACAAAGGC
TTGCGTGATATGGACCAGAAAGTGGTGGTGAA
CTTCTACCCGAAATGTCCACAACCAGACCTCACTC
TTGGTCTCAAACGCCACACCGACCCTGGCACCATT
ACCCTTCTTCTCCAGGACCAGGTTGGTGGGCTCC
AGGCGACTAGAGATGATGGCAAGACATGGATCA
CCGTTCAACCTGTTGAAGGAGCTTTTGTGGTCAA
TCTTGGTGATCATGGTCATTTTCTGAGCAACGGA
AGGTTCAAGAACGCAGATCATCAAGCAGTGGTGA
ACTCGAACCACAGCCGATTGTCCATAGCTACATT
CCAGAACCACAGCACCAGAAGCTACTGTATATCCA
CTTGCTATCAGAGAGGGAGAGAAGGCGATTCTAG
ATGAGCCCATTACATTTTCAGAGATGTACAGGAG
GAAAATGAGCAAAGATCTTGAGCTTGCCAGGCTC
AAAAAGCTGGCCAAGGAAAAGCAACTGGAGGAT
TTCGAGAAGGCCAAACTGGAAGCCAAATCCATTG
ACCAGATTCTTGCTTAAGGCTCGACCTTCTCAGC
CCATCCATCTTGTTTTATGCGTTTTATGCTTAAC
ATTATCGTCGTATCTTGTCTTTTGCCTTTGGAGC
TTGACGGCTTGTTAAT

2.3 生物信息学分析

2.3.1 *F3H* 基因的氨基酸序列 由图 3 可以看出, *F3H* 基因翻译的蛋白由 363 个氨基酸组成。

```

144 atg gct cca tet act ctg acc gca cta gct gac gag aag acc ett
    M A P S T L T A L A D E K T L
189 cag gct acc ttc gtt cgc gac gaa gat gag cgc cca aag gtt gcc
    Q A T F V R D E D E R P K V A
234 tac aac cac ttc agc aac gaa atc ccg atc atc tcg cta gcc gga
    Y N H F S N E I P I I S L A G
279 atc gat gag gtc gac ggc cgg agg gca gag att tgc aag aag atc
    I D E V D G R R A E I C K K I
324 gtc gag gcc tgt gag gat tgg ggt att ttc cag gtc gtc gat cat
    V E A C E D W G I F Q V V D H
369 ggt gtc gat gcc gct ctc atc tcc gac atg act cgc ctc gct cgc
    G V D A A L I S D M T R L A R
414 gaa ttc ttc gct ttg cct cca gaa gaa aag ctc cgg ttc gac atg
    E F F A L P P E E K L R F D M
459 acc ggt ggc aaa aag ggc ggt ttc atc gtt tcc agc cat tta caa
    T G G K K G G F I V S S H L Q
504 gga gaa gca gtg caa gat tgg cgt gag att gtg acc tac ttt tca
    G E A V Q D W R E I V T Y F S
549 tac cca ctt cgg aca agg gat tac tcc agg tgg ccg gac aag cca
    Y P L R T R D Y S R W P D K P
594 gag ggc tgg aga gct gtg aca gag cag tac agt gag aag ctg atg
    E G W R A V T E Q Y S E K L M
639 gga ttg gct tgc aag ctg ttg gag gtt tta tca gaa gcc atg ggg
    G L A C K L L E V L S E A M G
684 cta gag aag gag gct ttg aca aag gct tgc gtg gat atg gac cag
    L E K E A L T K A C V D M D Q
729 aaa gtg gtg gtg aac ttc tac ccg aaa tgt cca caa cca gac ctc
    K V V V N F Y P K C P Q P D L
774 act ctt ggt ctc aaa cgc cac acc gac cct ggc acc att acc ctt
    T L G L K R H T D P G T I T L
819 ctt ctc cag gac cag gtt ggt ggg ctc cag gcg act aga gat gat
    L L Q D Q V G G L Q A T R D D
864 ggc aag aca tgg atc acc gtt caa cct gtt gaa gga gct ttt gtg
    G K T W I T V Q P V E G A F V
909 gtc aat ctt ggt gat cat ggt cat ttt ctg agc aac gga agg ttc
    V N L G D H G H F L S N G R F
954 aag aac gca gat cat caa gca gtg gtg aac tcg aac cac agc cga
    K N A D H Q A V V N S N H S R
999 ttg tcc ata gct aca ttc cag aac cca gca cca gaa gct act gta
    L S I A T F Q N P A P E A T V
1 044 tat cca ctt gct atc aga gag gga gag aag gcg att cta gat gag
    Y P L A I R E G E K A I L D E
1 089 ccc att aca ttt tca gag atg tac agg agg aaa atg agc aaa gat
    P I T F S E M Y R R K M S K D
1 134 ctt gag ctt gcc agg ctc aaa aag ctg gcc aag gaa aag caa ctg
    L E L A R L K K L A K E K Q L
1 179 gag gat ttc gag aag gcc aaa ctg gaa gcc aaa tcc att gac cag
    E D F E K A K L E A K S I D Q
1 224 att ctt gct taa l 235
    I L A *

```

图3 枣果实 *F3H* 基因翻译的氨基酸序列

Fig. 3 Amino acid sequence of jujube fruit
F3H gene translation

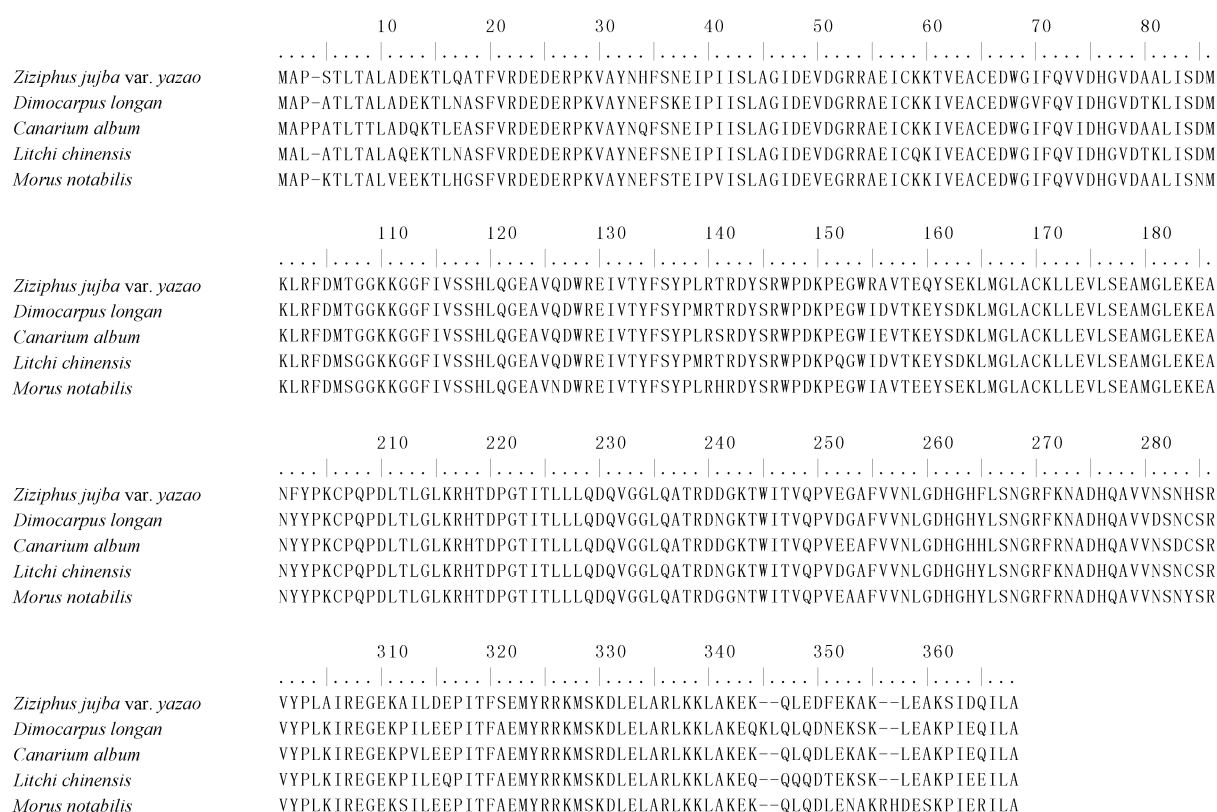
2.3.2 氨基酸序列的组成和理化性质分析 应用 EX-PASy 工具包中 Prot Param(<http://web.expasy.org/protparam/>)在线分析 *F3H* 的 cDNA 序列及编码的氨基酸序列的组成和理化性质^[1]。基因共编码 363 个氨基酸,分子量(MW)为 40 825.6 Da,等电点为 5.45,分子式为 $C_{1817}H_{2877}N_{495}O_{547}S_{13}$ 。蛋白质不稳定系数为 37.26。亮氨酸和丙氨酸的含量最高,分别为 9.9%和 8.8%。脂溶性系数(Aliphatic index)为 86.01,总平均亲水性为 -0.377。

2.3.3 *F3H* 基因的 cDNA 序列同源性分析 将枣 *F3H* 氨基酸运用 BioEdi 进行同源性分析,由图 4 可知,枣 *F3H* 编码的氨基酸序列与龙眼(*Dimocarpus longan*)、橄榄(*Canarium album*)、荔枝(*Litchi chinensis*)及川桑(*Morus notabilis*)的一致性分别为 90%、90%、89%、89%。

2.3.4 蛋白质的亲水性/疏水性分析 蛋白质的亲水性/疏水性的测定是蛋白质的结构预测和功能域划分的一个重要和必要的过程^[2]。应用 ExPASy 工具包中的 ProtScale 进行蛋白质的亲水性/疏水性分析。从图 5 可以看出,根据氨基酸分值与亲水性成反比,分值越高疏水性越强的规律,在分析结果中疏水性氨基酸残基的数量要多于亲水性氨基酸残基,疏水性氨基酸如亮氨酸出现了 33 次,丙氨酸出现了 29 次和缬氨酸出现了 26 次。从氨基酸的类型来看,非极性氨基酸出现的亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸及甘氨酸都占有极大的比重,分别为 9.0%、7.9%、7.1%、6.3%。然而,极性氨基酸所占的比重则较小,根据极性和非极性氨基酸所占的比重也能推测氨基酸的疏水性要大于亲水性,所以枣果实的 *F3H* 蛋白为疏水性蛋白。

2.3.5 RT-PCR 半定量 *F3H* 基因表达结果分析 由图 6 可知,内参基因扩增出的预期条带,在各样本中表达均一,表明 RT-PCR 体系符合表达分析的要求;*F3H* 基因在枣的 3 种不同时期均有表达,但其表达量略有不同,绿熟期的青枣表达量最低,其次是转色期的半红枣,而成熟期的红枣表达量最多。

2.3.6 花色苷含量的测定及含量变化分析 如图 7 所示,绿熟期(花后 14 d),转色期(花后 23 d)和成熟期(花后 28 d)青枣果实提取液在 520 nm 时的吸光值分别为 0.981 6、3.458 9 和 3.584 9,吸光度与花色苷含量成正比,所以调控枣果实花色苷合成的基因在枣的不同时期表达量不同,且绿熟期的表达量最少,其次为半红期,表达量最大的是红熟期。



注: *Dimocarpus longan*(龙眼)、*Canarium album*(橄榄)、*Litchi chinensis*(荔枝)及 *Morus notabilis*(川桑)。

图4 枣果实 F3H 氨基酸同源性分析

Fig. 4 F3H amino acid homology analysis in jujube fruit

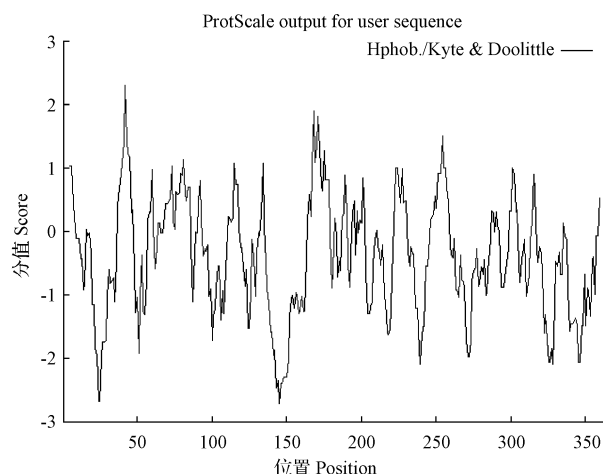


图5 蛋白质亲水性/疏水性的分析

Fig. 5 The analysis of hydrophilic/hydrophobic protein

3 讨论

该试验利用 RT-PCR 法对枣果实的 *F3H* 基因进行扩增,并对其进行测序,获得 *F3H* 基因的全长后,对其进行了生物信息学分析。序列的同源性分析发现,枣果实的基因序列与龙眼(*Dimocarpus longan*)、橄榄(*Canarium album*)、荔枝(*Litchi chinensis*)及川桑(*Morus nota-*

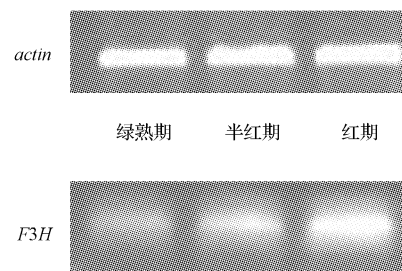


图6 *F3H* 基因不同时期的表达

Fig. 6 *F3H* gene expression in different periods

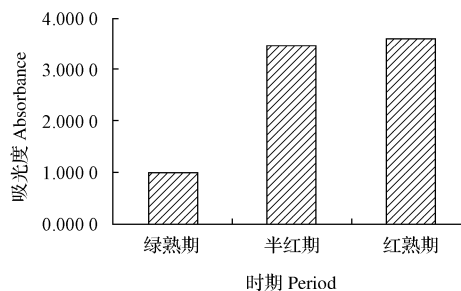


图7 不同时期枣花色苷的吸光度

Fig. 7 Absorbance of jujube anthocyanins in different periods

bilis)的同源性都很高,进而利用开放阅读框导出其氨基酸序列,利用 ExPASy 软件对该序列进行分析,得到了其氨基酸的理化性质及其氨基酸序列的组成,并对该蛋白质的亲水性/疏水性做了分析。

关于试验的优化和改进包括以下 3 个方面。一是关于枣果实 RNA 的提取方法优化,枣果实中含有蛋白质,所以在提取 RNA 过程中,可采用氯仿反复抽提,以降低蛋白质杂质残留^[3]。此外,加入氯仿后一定要剧烈震荡混匀,最好采用涡旋振荡的方法;可更好去除蛋白质残留。二是关于 PCR 反应体系的摸索,根据经验,PCR 时如产物的特异性不高,即电泳检测时有非特异性条带,可在标准体系的基础上升高退火温度;模板为 DNA 时应增加预变性时间,在对未知基因进行克隆时,应适当增加反应的延伸时间,以应对基因内部可能存在的内含子序列。为增加反应的特异性可尝试采用 Touch

down PCR,可取得良好的试验结果。此外,如果 PCR 反应中使用高保真酶,也应适当延长反应时间。三是关于分子试验试剂及操作,对于分子生物学试验的药品要注意分装,避免由于污染而造成整瓶的浪费;而且类似于 T 载体和 Taq 酶等不能反复冻融的试剂也提前做好分装工作;PCR 反应、感受态细胞制备、转化等操作均要在冰上进行,不可置于室温下,容易损坏试剂^[4]。

参考文献

- [1] 李倩,柳俊,谢从华,等. 彩色马铃薯块茎形成和贮藏过程中花色苷变化及抗氧化活性分析[J]. 园艺学报,2013,40(7):1309-1317.
- [2] 阮美颖,万红建,叶青静,等. 番茄查尔酮合成酶基因的鉴定及生物信息学分析[J]. 分子植物育种,2013,11(3):379-384.
- [3] 张琼,王红清,冷平,等. 草莓果实发育过程中花色苷和黄酮醇类物质的形成机制[J]. 园艺学报,2008,35(12):1735-1741.
- [4] 梁明伟,刘海峰,陆雪莹,等. 棕色棉类黄酮-3'-羟化酶基因(F3'H)的克隆及色素合成途径中相关基因表达特性研究[J]. 农业生物技术学报,2011,19(5):808-814.

Cloning and Bioinformatics Analysis of the Jujube Fruit Flavonoid-3-hydroxylase Gene(*F3H*)

SHI Shouguo, HU Tingting

(Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi 044000)

Abstract: Taking jujube fruit as material, adopting the homologous cloning method, based on transcriptome sequencing results, the jujube fruit *F3H* full-length gene was cloned. The bio-information analysis and the *F3H* influence on anthocyanins were studied. The results showed that the *F3H* gene was 1 336 bp, encoding 367 amino acid residues. According to the results of gene sequence alignment, sequence of amino acids of *F3H* gene had the consistency of 90%, 90%, 89% and 90% compared with *Dimocarpus longan*, *Canarium album*, *Litchi chinensi* and *Morus notabilis*, respectively. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the gene expression in jujube fruit red ripe period was the most, followed by a half red jujube fruit, and jujube fruit green ripe stage expression quantity was minimum; extracting anthocyanins in jujube during different periods, the change of anthocyanins content in jujube, was consistent with gene expression quantity.

Keywords: anthocyanins; clone; semi-quantitative analysis; bioinformatics