

## 多穗柯黄酮 3-羟化酶基因的克隆与序列分析

尹峰<sup>1</sup>, 龙月红<sup>1</sup>, 冯若宣<sup>1</sup>, 林丽梅<sup>1</sup>, 黄剑<sup>2\*</sup>, 邢朝斌<sup>1\*</sup>

1. 华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210

2. 百色学院农业与食品工程学院, 广西 百色 533000

**摘要:** 目的 克隆多穗柯 *Lithocarpus polystachyus* 黄酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H) 基因, 了解其基因特征并初步探明其在各器官中的表达情况。方法 分别提取多穗柯叶片的总 RNA 及基因组 DNA, 根据转录组测序结果, 设计特异性引物, PCR 扩增得到多穗柯 F3H 基因的 cDNA 及 DNA 序列, 测序后进行生物信息学分析, 通过 qRT-PCR 法检测多穗柯 F3H 基因在不同器官中的表达情况。结果 多穗柯 F3H 基因 cDNA 全长 1 340 bp, 包含长 1 092 bp 的开放阅读框, 编码 363 个氨基酸的蛋白质, 定位于细胞质中。qRT-PCR 结果表明 F3H 基因在多穗柯各器官中均有表达, 但表达量具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结论 首次对多穗柯 F3H 基因进行了克隆和生物信息学分析, 证实 F3H 基因在多穗柯不同器官中表达量差异显著, 为多穗柯中黄酮类的次生代谢研究奠定了基础。

**关键词:** 多穗柯; 黄酮 3-羟化酶; 克隆; 生物信息; qRT-PCR; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)24-5085-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.005

## Cloning of flavanone 3-hydroxylase gene from *Lithocarpus polystachyus* and its sequence analysis

YIN Feng<sup>1</sup>, LONG Yue-hong<sup>1</sup>, FENG Ruo-xuan<sup>1</sup>, LIN Li-mei<sup>1</sup>, HUANG Jian<sup>2</sup>, XING Zhao-bin<sup>1</sup>

1. College of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

2. Agricultural and Food Engineering, Baise University, Baise 533000, China

**Abstract: Objective** To clone flavanone 3-hydroxylase (F3H) gene from *Lithocarpus polystachyus*, and to understand its gene characteristics and initially investigate its expression level in different organs. **Methods** The total RNA and genomic DNA from blade of *L. polystachyus* were extracted. Based on the result of RNA-seq, a pair of specific primers were designed. cDNA and DNA sequences of F3H gene from *L. polystachyus* were amplified by PCR, then bioinformation analysis was performed after sequencing. The expression level of F3H gene in different organs of *L. polystachyus* was detected by qRT-PCR. **Results** The full length of cDNA of F3H gene was 1 340 bp containing a 1 092 bp open reading frame that encoded 393 amino acids, and F3H was located in the cytoplasm. The result of qRT-PCR showed that F3H gene expressed in different organs of *L. polystachyus*, and the expression levels of F3H gene were significantly different in different organs ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The F3H gene of *L. polystachyus* was cloned and its bioinformation was analyzed for the first time, proving that the expression level of F3H gene in different organs of *L. polystachyus* was different. This finding lays a foundation for the studies on secondary metabolism of flavonoids in *L. polystachyus*.

**Key words:** *Lithocarpus polystachyus* Rehd; flavanone 3-hydroxylase; clone; bioinformation; qRT-PCR; expression analysis

多穗柯 *Lithocarpus polystachyus* Rehd, 别名甜茶, 属壳斗科石柯属植物<sup>[1]</sup>。以多穗柯叶为原料制作甜茶在我国民间具有悠久的历史, 其茶香浓郁、色泽鲜艳、回味持久、风味独特。目前其主要以野生状态分布于我国长江以南各省区, 其中江西、广

西、湖南、安徽等省区的资源尤为丰富, 广东、云南、四川、福建等省次之<sup>[1]</sup>。

多穗柯中有较高含量的根皮苷 (phloridzin)、三叶苷 (trilobatin) 等黄酮类化合物, 具有广泛的药用价值, 因而受到广泛关注。黄酮类化合物的生

收稿日期: 2017-09-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760221); 华北理工大学培育基金 (SP201508); 华北理工大学大学生创新创业训练计划 (X2017185)

作者简介: 尹峰 (1996—), 男, 研究方向为生物信息在药用植物中的应用。

\*通信作者 邢朝斌 (1975—), 男, 教授, 研究方向为分子生物学。Tel: (0315)3725859 Fax: (0315)3726341 E-mail: xzbheuu@126.com

黄剑 (1979—), 男, 高级工程师, 研究方向为药用植物学。E-mail: huang\_gxky@163.com

物合成途径也成为目前研究的热点,已有的研究表明,植物体内黄酮类的生物合成依赖苯丙烷合成途径<sup>[2]</sup>。首先由乙酰辅酶 A 合成丙二酸单酰辅酶 A,再由莽草酸途径获得的苯丙氨酸合成对-香豆酰辅酶 A,在一系列还原酶催化下将对-香豆酰辅酶 A 还原成对-二氢香豆酰辅酶 A,对-二氢香豆酰辅酶 A 最终与 3 分子丙二酸单酰辅酶 A 在查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)的催化下生成根皮素,根皮素在糖基转移酶的作用下进一步合成根皮苷<sup>[3-4]</sup>。作为黄酮类生物合成过程中的关键酶,多穗柯黄酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)一直是黄酮类生物合成研究的重点,在植物黄酮类化合物合成途径中,F3H 能催化黄烷酮生成二氢黄酮醇,F3H 常与查耳酮异构酶(chalcone isomerase)、CHS 等共同作用合成各类黄酮类化合物。自研究者从金鱼草中分离到 F3H 基因后,葡萄柚和矮牵牛<sup>[5]</sup>、红巴梨<sup>[6]</sup>、鹤望兰<sup>[7]</sup>等物种中的 F3H 基因先后得到克隆,而多穗柯中该基因的研究未见报道。本实验对多穗柯 F3H 基因进行克隆,并对其进行生物信息学分析及表达量分析,以期对黄酮类化合物生物合成研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试多穗柯叶片、叶柄、茎、根均采自广西巴马瑶族自治县,经华北理工大学生命科学学院邢朝斌教授鉴定为多穗柯 *Lithocarpus polystachyus* Rehd,清水洗净后用滤纸充分吸去水分后于-80℃保存,作为多穗柯总 RNA 及基因组 DNA 提取的材料。

ProFlex™ PCR 仪(Life Technologies); 3K15 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);电子天平(上海亚荣仪器厂);Azure c200 凝胶成像系统(美国 Azure Biosystems 公司);JY1000C 通用型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

植物总 RNA 提取试剂盒、DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒均购于天根生物技术有限公司,RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit 购于 Thermo Fisher 公司,KOD FX、KOD Buffer 及 2 mM dNTP 均购自 TOYOBO 公司,LA Taq DNA 聚合酶、10×LA Taq Buffer、2.5 mmol/L dNTP、ddH<sub>2</sub>O 购于大连宝生物工程有限公司,IPTG、X-gal 均购于北京拜尔迪生物技术有限公司,其余试剂均为国产分析纯。引物委托英潍捷基(上海)公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取及多穗柯 F3H 基因 cDNA 的

获得 根据天根公司总 RNA 提取试剂盒说明书提取多穗柯叶片、叶柄、茎及根 4 个部位的总 RNA,再根据 RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit 说明书,以总 RNA 为模板逆转录得到 cDNA。按宋菊等<sup>[8]</sup>的方法,根据转录组测序的结果,设计特异性扩增多穗柯 F3H 的引物,其中上游引物 F3HS2: 5'-GCCACTCATTCCATACACACCT-3',下游引物 F3HX: 5'-CTCATTGGTTCAGACACAAGGAT-3',以来自叶片的总 RNA 逆转录得到的 cDNA 为模板扩增多穗柯 F3H 基因的 cDNA,PCR 反应体系 50 μL 包括: cDNA 1 μL,上、下游引物各 1 μL,LA Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,10×LA Taq Buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTP 8 μL,剩余用 ddH<sub>2</sub>O 补足。PCR 条件:预变性 98℃,1 min;95℃变性 40 s;52℃退火 30 s;72℃延伸 2 min,共 40 个循环;最后 72℃补充延伸 10 min。PCR 产物以 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,按天根公司琼脂糖凝胶回收试剂盒回收,连接 pGM-T 质粒载体后,将重组质粒转入大肠杆菌 TOP-10 感受态细胞,将验证转化成功的 5 个菌株进行测序。

**1.2.2 基因组 DNA 的提取及多穗柯 F3H 基因 DNA 的克隆** 以多穗柯叶片为原料,按天根公司 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,以“1.2.1”项中相同引物扩增多穗柯 F3H 基因的 DNA 序列,PCR 反应体系: DNA 1 μL,上、下游引物各 1 μL,KOD FX DNA 聚合酶 1 μL,KOD Buffer 25 μL,2 mmol/L dNTP 10 μL,补 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。PCR 条件: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 1 min; 54℃退火 30 s; 72℃延伸 6 min,共 40 个循环;最后 72℃补充延伸 10 min。PCR 产物以 1.5%琼脂糖凝胶电泳后切下目的条带,按天根公司琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 DNA,将回收产物进行测序。

**1.2.3 多穗柯 F3H 基因的生物信息学分析** 参照邢朝斌等<sup>[9]</sup>的方法进行生物信息学分析。NCBI 的 ORF Finder 查找开放阅读框(ORF); ExPASy 在线服务器的 ProtParam 分析 F3H 蛋白的基本理化性质; Splign 进行内含子外显子分析; PROSITE 进行蛋白质功能结构域分析; TMHMM 工具对该蛋白的跨膜结构进行分析; SignalP 3.0 Server 预测蛋白信号肽; Psort 进行蛋白质亚细胞定位; SOPMA 软件分析蛋白质二级结构; SWISS-MODEL 预测蛋白质的三维结构; 使用 MEGA 6 构建系统发育树。

#### 1.2.4 多穗柯 F3H 基因在不同器官中的表达分析

以逆转录得到的叶片、叶柄、茎、根 4 个部位的 cDNA 为模板, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 其中 qRT-PCR 扩增 F3H 的上游引物 DSKF3HS: 5'-CACACTCGGACTCAAGCGTCAC-3', 下游引物 DSKF3HX: 5'-CCACAAAAGCTCCTTCAACAGG-3', 预计扩增 137 bp。以多穗柯 GAPDH 基因为内参基因, 参照文献设计 qRT-PCR 扩增引物<sup>[10]</sup>, 上游引物 DSKGS: 5'-CCTTCCGTGTTCTACCCCAA-3', 下游引物 DSKGX: 5'-TAGCCCAAGATGCCCTTCA-3', 预计扩增 133 bp, 进行 qRT-PCR 实验, 反应体系: cDNA 1  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.6  $\mu$ L, Mix (SYBR) 5  $\mu$ L, Rox 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 2.6  $\mu$ L; 反应条件: 95  $^{\circ}$ C、30 s; 58  $^{\circ}$ C、30 s, 共 40 个循环。每个样本重复 3 次, 表达量的计算按邢朝斌等<sup>[11]</sup>的方法进行。

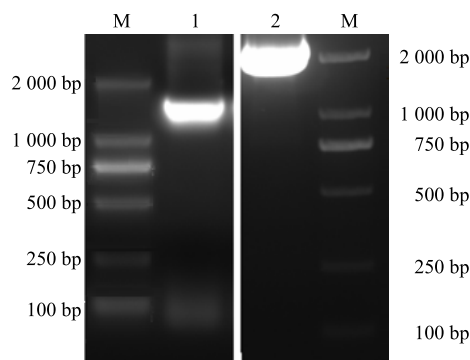
## 2 结果与分析

### 2.1 多穗柯 F3H 基因 cDNA 及 DNA 的克隆

以逆转录得到的 cDNA 为模板, 根据文献设计引物进行 PCR, 产物经电泳验证和测序, 得到 1 340 bp 的条带。以基因组 DNA 为模板, 相同引物扩增, PCR 产物经回收后测序, 得到 2 519 bp 的条带。测序结果经 NCBI 的 BLAST 比对后, 确定 PCR 产物分别为多穗柯 F3H 基因的 cDNA 和 DNA 序列 (图 1)。

### 2.2 多穗柯 F3H 基因的生物信息学分析

多穗柯 F3H 基因全长 1 340 bp, ORF 长 1 092 bp, 编码 363 个氨基酸。预测相对分子质量 40 677.44,



M-Marker 1-F3H 基因 cDNA 的扩增产物 2-F3H 基因 DNA 的扩增产物  
M-Marker 1-cDNA of the F3H gene amplification product 2-DNA of the F3H gene amplification product

图 1 多穗柯 F3H 基因的克隆

Fig. 1 Clone of F3H gene from *L. polystachyus*

理论等电点 (pI) 为 5.79, 在哺乳动物红细胞中的半衰期为 30 h, 不稳定指数为 42.46, 为不稳定蛋白。总平均亲水性指数为 -0.413, 表明该蛋白为亲水性蛋白。

NCBI 在线分析工具 Splign 查找多穗柯 F3H 基因内含子及外显子, 结果显示其有 3 个外显子, 分别位于 1~485 bp、1 475~1 903 bp、2 133~2 519 bp, 起始密码子为 ATG、终止密码子为 TGA, 5' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 长 125 bp, 3'UTR 长 81 bp (图 2)。



图 2 多穗柯 F3H 基因内含子、外显子分布示意图

Fig. 2 Distributing sketch map of introns and exons of F3H gene from *L. polystachyus*

PROSITE 分析显示在多穗柯 F3H 蛋白的 190~294 氨基酸具有典型的 2OG-FeII-Oxy 加氧酶结构域, 该结构域由 2-O-酮戊二酸和 Fe<sup>2+</sup> 依赖的加氧酶超家族 (2OG-FeII-Oxy superfamily) 组成, 分析还发现, 多穗柯 F3H 蛋白在 217、219、275 位氨基酸上都有 Fe<sup>2+</sup> 结合位点, 这些位点在已报道的其他物种的 F3H 蛋白中都存在, 而且位置相同或相近, 从而进一步证明多穗柯 F3H 蛋白属于 2OG-FeII-Oxy 超家族中的 F3H。TMHMM 预测该蛋白无跨膜区, SignalP 3.0 Server 预测多穗柯 F3H 蛋白无信号肽, Psort 预测多穗柯 F3H

定位于细胞质中, 表明该蛋白在核糖体中合成后很可能不经转运而直接定位于细胞质中发挥催化作用。

运用 SOPMA 软件分析多穗柯 F3H 蛋白的二级结构, 结果表明多穗柯 F3H 蛋白含有 130 个  $\alpha$  螺旋 (alpha helix), 占 35.81%, 83 个延伸链 (extended strand), 占 22.87%, 41 个  $\beta$  转角 (beta turn), 占 11.29%, 蛋白质的二级结构很大程度上决定了蛋白质的功能, 其中对蛋白质起稳定作用的是  $\alpha$  螺旋, 而随机卷曲决定了蛋白质的功能。SWISS-MODEL 预测多穗柯 F3H 蛋白的三维结构见图 3。

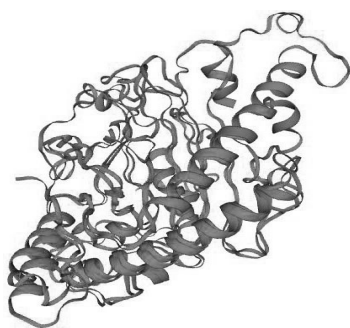


图 3 多穗柯 F3H 蛋白的三维结构

Fig. 3 Three-dimensional structure of F3H protein from *L. polystachyus*

对多穗柯 F3H 进行同源检索, 结果表明多穗柯 F3H 与龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. (ABO48521.1)、油桐 *Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy Shaw (ARV78456.1)、橄榄 *Canarium album* (Lour.) Rauesch. (AEO36935.1) 等 F3H 蛋白同源性较高 (均为 90%)。利用 MEGA 6 对包括多穗柯 F3H 在内的 9 种物种的 F3H 蛋白进行蛋白质系统进化分析, 结果表明, 多穗柯先与金花茶、猕猴桃等双子叶植物聚在一起, 再与玉米、洋葱等单子叶植物聚集, 最后与裸子植物银杏聚集, 这与传统的分类结果一致 (图 4)。

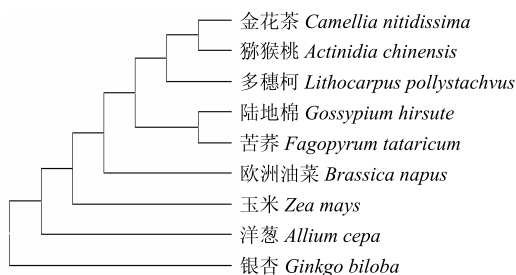


图 4 F3H 蛋白的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of F3H protein

### 2.3 多穗柯 F3H 基因在不同器官中的表达分析

qRT-PCR 的实验结果表明, 多穗柯 F3H 基因在叶片、叶柄、茎和根中均有表达, 但表达量差异显著 ( $P < 0.05$ )。其中叶片中表达量最高, 是最低表达部位根中的 6.759 3 倍, 其次是叶柄, 茎中也有少量表达, 根中表达量最低。结果见图 5。

### 3 讨论

本研究克隆了多穗柯 F3H 基因的 cDNA 序列, 全长 1 340 bp, 开放阅读框 1 092 bp, 编码 363 个氨基酸, 通过 BLAST 比对分析, 结果发现该基因与其他物种的 F3H 基因具有较高的相似性, 说明成功克隆了多穗柯 F3H 基因。二级结构预测发现该蛋白的二级结构以  $\alpha$  螺旋为主, 兼有少量的延伸链和  $\beta$

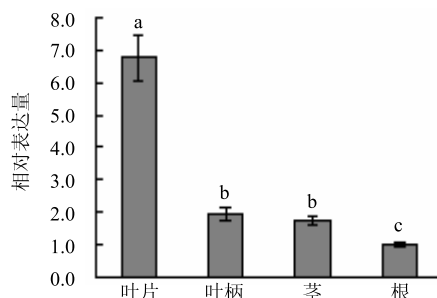
不同小写字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )Different lowercase letters represent significant differences ( $P < 0.05$ )

图 5 多穗柯 F3H 基因在不同器官中的表达量

Fig. 5 Expression level of F3H gene of *L. polystachyus* in different organs

转角, 这一预测结果与已报道的石蒜<sup>[12]</sup>、金花茶<sup>[13]</sup> (无  $\beta$  转角) 等略有差别, 这可以解释为它们来源于不同物种, 存在一定的进化差异。F3H 在进化上比较保守, 在已报道的拟南芥<sup>[14]</sup>、矮牵牛<sup>[15]</sup>等物种中, 其保守结构域具有高度的同源性, F3H 属于 2-酮戊二酸的双加氧酶家族, 具有底物特异性, 含有  $\text{Fe}^{2+}$  结合所需的组氨酸、天冬氨酸保守位点, 这与本研究的结果相吻合, 亚细胞定位预测结果与石蒜<sup>[12]</sup>中 F3H 蛋白的细胞定位一致, 这都表明多穗柯 F3H 基因编码的蛋白质具有与其他物种 F3H 蛋白相同的催化作用。氨基酸序列比对结果表明, 多穗柯与龙眼 (ABO48521.1)、油桐 (ARV78456.1)、橄榄 (AEO36935.1) 等的 F3H 均有较高的一致性。通过系统进化树分析得出, 多穗柯 F3H 蛋白与双子叶植物的 F3H 蛋白聚为一支, 这与传统的分类方法相一致。利用实时定量 PCR 对多穗柯 F3H 基因在多穗柯各器官中的表达量进行分析, 结果表明, F3H 基因在叶片中表达量最高, 其次为叶柄、茎和根, 说明多穗柯 F3H 基因在各器官中的表达具有显著性差异, 这与石蒜<sup>[12]</sup>中 F3H 基因的在各器官中的表达略有差异, 推测可能是由于石蒜的黄酮类积累于花瓣, 而多穗柯的黄酮类积累于叶片所致。

药用植物的药用价值及其中药品质的高低很大程度上取决于其药用活性成分的高低。因此, 对多穗柯药用活性成分黄酮类的生物合成的研究, 对其中涉及的酶、调控因子等因素运用生物学方法进行分析, 以期实现对黄酮类生物合成的人为调控, 将对多穗柯药用价值的提高及进一步开发利用奠定基础。

## 参考文献

- [1] 何春年, 彭 勇, 肖 伟, 等. 多穗柯甜茶的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1253-1255.
- [2] Burbulis I E, Winkel-Shirley B. Interactions amongenzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12929-12934.
- [3] Dare A P, Tomes S, Cooney J M, *et al.* The role of enoylreductase genes in phloridzin biosynthesis in apple [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 72: 54-61.
- [4] Jugdé H, Nguy D, Moller I, *et al.* Isolation and characterization of a novel glycosyltransferase that converts phloretin to phlorizin, a potent antioxidant in apple [J]. *FEBS J*, 2008, 275(15): 3804-3814.
- [5] Pelt J L, Downes W A, Schoborg R V, *et al.* Flavanone 3-hydroxylase expression in *Citrus paradisi* and *Petunia hybrida* seedlings [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(2): 435-444.
- [6] 张大生, 崔丽洁, 王景明, 等. 红巴梨 F3H 基因的克隆及植物表达载体的构建 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(2): 65-68.
- [7] 樊荣辉, 黄敏玲, 钟淮钦, 等. 鹤望兰黄烷酮 3-羟化酶基因 *SrF3H* 的克隆及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2014, 12(1): 168-172.
- [8] 宋 菊, 黄 剑, 李志栋, 等. 多穗柯转录组分析及黄烷类化合物合成相关基因的挖掘 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 675-679.
- [9] 邢朝斌, 龙月红, 何 闪, 等. 刺五加法尼基焦磷酸合酶基因的克隆、生物信息学及表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1725-1730.
- [10] 邢朝斌, 龙月红, 李 明, 等. 刺五加亚精胺合成酶基因的克隆及内生真菌对其表达的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2260-2265.
- [11] 邢朝斌, 龙月红, 吴 鹏, 等. 刺五加环阿屯醇合酶基因的克隆及其表达分析 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1387-1392.
- [12] 黄春红, 高燕会, 朱玉球, 等. 石蒜黄烷酮 3-羟化酶基因 *LrF3H* 的克隆及表达分析 [J]. 园艺学报, 2013, 40(5): 960-970.
- [13] 周兴文, 殷恒福, 朱宇林, 等. 金花茶黄烷酮 3-羟化酶基因 *CnF3H* 的克隆及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(9): 2051-2057.
- [14] Owens D K, Crosby K C, Runac J, *et al.* Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3 beta-hydroxylase [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46(10): 822-843.
- [15] Britsh L, Ruhnau-Brich B, Forkmann G. Molecular clone, sequence analysis, and *in vitro* expression of 3 beta-hydroxylase from *Petunia hybrida* [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(8): 5380-5387.