

• 药材与资源 •

金荞麦黄酮醇合酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

蒋洁, 白悦辰, 李成磊, 陈惠, 吴琦*

四川农业大学生命科学与理学院, 四川雅安 625014

摘要:目的 克隆金荞麦黄酮醇合酶(FdFLS)基因的编码序列, 并对该基因进行序列分析、原核表达及其活性研究。方法 采用同源克隆技术获得 FdFLS 基因 cDNA 序列, 并对其进行生物信息学分析; 构建 FdFLS 原核表达载体 pET-30b(+)-FdFLS, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达, 并测定目标蛋白的酶学活性。结果 FdFLS 基因开放阅读框(ORF)全长 1 008 bp, 编码 334 个氨基酸; FdFLS 基因在大肠杆菌中可表达出相对分子量约 4×10^4 的蛋白, 并具有将二氢槲皮素和二氢山奈酚转化为槲皮素和山奈酚的催化活性。结论 首次克隆到 FdFLS 基因, 并实现该基因在大肠杆菌中有活性的表达。

关键词: 金荞麦; 黄酮醇合酶; 基因克隆; 原核表达; 序列分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1974-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.020

Cloning of flavonol synthase gene from *Fagopyum dibotrys* and its expression in *Escherichia coli*

JIANG Jie, BAI Yue-chen, LI Cheng-lei, CHEN Hui, WU Qi

College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: **Objective** To clone the coding sequence of flavonol synthase gene from *Fagopyum dibotrys* (FdFLS) and to analyze its sequence, prokaryotic expression, and activity. **Methods** The cDNA sequence of FdFLS gene was obtained by homology cloning and analyzed by bioinformatic method; The FdFLS prokaryotic expression vector pET-30b(+)-FdFLS was established and induced to express in *Escherichia coli* BL21(DE3), as well as the enzymatic activity of the target protein was measured. **Results** The full length of open reading frame (ORF) of FdFLS gene was 1 008 bp that encoded a protein of 334 amino acids; The recombinant FdFLS protein had a relative molecular mass of 40 000. It also has a catalytic activity, which could make dihydroquercetin and dihydrokaempferol into quercetin and kaempferol, respectively. **Conclusion** The FdFLS gene is successfully cloned and reported for the first time, which has an active expression in *E. coli*.

Key words: *Fagopyum dibotrys* (D. Don) Hara; flavonol synthase; gene cloning; prokaryotic expression; sequence analysis

多年生草本植物金荞麦 *Fagopyum dibotrys* (D. Don) Hara 属双子叶蓼科(Polygonaceae)荞麦属 *Fagopyum* Mill, 又名野荞麦、荞麦当归等, 主要分布于我国西南地区、湖北及江苏等地^[1]。《本草纲目》中记载金荞麦, 性寒、味苦、酸涩。金荞麦块根入药能祛风利湿、清热解毒、止泻健脾、补肾润肺^[2], 其主要药用化学成分有黄酮类、甾类、萜类和苷类等^[3]。作为黄酮类化合物最具代表性之一的芦丁(槲皮素 3-O-芸香糖苷), 不仅在抗炎、抗癌和保护血管等方面起重要作用^[4], 还具有如抗 UV-B、抗氧化性和抗病性等生理功能^[5]。

黄酮醇中的槲皮素和山奈酚经类黄酮-3'-羟化酶(F3'H)和类黄酮-3', 5'-羟化酶(F3'5'H)在黄酮 B 环不同位置羟化而得到^[6]。黄酮醇合酶(FLS)则与 F3'5'H 和 F3'H 共同竞争二氢黄酮醇作为底物, 通过氧化反应形成槲皮素和山奈酚, 槲皮素和山奈酚进一步糖基化形成芦丁^[7-8]。FLS 基因首先发现于欧芹中并鉴定为 2-ODD 家族^[9]。随后, 又在不同的植物体中克隆得到了 FLS 的 cDNA。研究表明, FLS 是由多拷贝基因编码而且在不同植物中其拷贝数不同^[10-13]。

基于 FLS 在黄酮类化合物生物合成中所起的重

收稿日期: 2013-02-23

作者简介: 蒋洁(1991—), 女, 生物工程专业学生。E-mail: jiangjiejj@yahoo.cn

*通信作者 吴琦 E-mail: wuqiwwq@yahoo.cn

要作用,本实验采用同源克隆方法克隆了金荞麦黄酮醇合酶(FdFLS)基因的全长cDNA编码序列,并实现其在大肠杆菌中有活性的表达。这将有助于对金荞麦黄酮类物质生物合成途径分子基础的深入了解。

1 材料与试剂

金荞麦 *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara 于2012年10月采自四川雅安老板山,大肠杆菌 DH5 α 、原核表达载体 pET-30b (+) 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 由本实验室保存。RNA 提取试剂植物 RNA_{out} 试剂盒购自天泽基因工程有限公司;逆转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司; pMD 20-T Simple Vector 克隆载体、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶均购自大连宝生物公司(Takara);其他化学药品为进口或国产分析纯试剂。

2 方法

2.1 FdFLS 基因 cDNA 完整开放阅读框(ORF)序列的克隆

采用植物 RNA_{out} 试剂盒提取金荞麦新鲜花期总 RNA。然后以其为模板,多聚胸腺嘧啶(Oligo-dT)为引物,通过 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒制备 cDNA 第一链。采用同源克隆的方法,参照苦荞 FtFLS (ID JF274262) 基因序列设计一对引物 FdFLSf: 5'-ATGGAGGTA GAGAGAGTGCAAGCTATT-3', FdFLSr: 5'-TTACT GGGGTAGTTTGTGAGCTTGCA-3'。以金荞麦总 cDNA 为模板,进行 PCR。PCR 反应体系总体积为 50 μ L,含 cDNA 模板 2.5 μ L、10 mmol/L 引物各 4 μ L、dNTP Mix 4 μ L、5 $\times$ Buffer 10 μ L、高保真酶(PrimeSTAR HS Polymerase) 0.5 μ L 和无菌去离子水 25 μ L。反应参数:94 $^{\circ}$ C 50 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。产物经琼脂糖凝胶电泳回收,按照 DNA A-Tailing Kit 试剂盒说明书对 PCR 产物进行加 A,然后克隆到 pMD 20-T Simple Vector,筛选阳性克隆送英骏公司测序。

2.2 FdFLS 生物信息学分析

采用 NCBI 在线工具 Blast 和 DNAMAN 对 FdFLS 核苷酸序列和蛋白质序列的同源性进行分析,氨基酸序列二级结构采用 SOMPA 进行预测,采用 Swiss-Model 建立蛋白质三级结构,Swiss-Pdb Viewer 4.0 软件进行图像处理,采用 MEGA4.1 经邻接法构建系统发育进化树。

2.3 FdFLS 在大肠杆菌中的表达

根据 FdFLS 基因序列和原核表达载体

pET-30b (+) 多克隆位点序列,设计一对引物:Ff 5'-TCCATATGGAGGTAGAGAGAGTGAAGCT-3' (含 Nde I 酶切位点),Fr 5'-CCAAGCTTCTGGG GTAGTTTGTGAGCTT-3' (含 Hind III 酶切位点)。以 FdFLS cDNA 为模板进行 PCR,扩增产物经 Nde I 和 Hind III 酶切后,连接到 pET-30b (+) 载体并转化大肠杆菌,重组质粒经鉴定后命名为 pET-30b (+)-FdFLS。重组质粒 pET-30b (+)-FdFLS 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取阳性克隆单菌落接种到 LB 液体培养基中(卡那霉素 50 mg/L),37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。按 2% 的接种量接种到 50 mL LB 液体培养基中(卡那霉素 50 mg/L),37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A_{600} 达到 0.6,加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1 mmol/L,25 $^{\circ}$ C 诱导 8 h。收集诱导 0、1、2、4、6、8 h 菌液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2.4 FdFLS 活性测定

将不同质量浓度(0.5、1、2、3、5、7、9、12、15 μ g/mL)的山柰酚和槲皮素溶于反应缓冲液中(含 111 mmol/L 乙酸钠,83 μ mol/L 2-酮戊二酸,42 μ mol/L 硫酸亚铁,2.5 mmol/L 维生素 C),使用紫外可见分光光度计(Shimadzu,日本)以 0.5 cm 的光径进行全波段扫描测得山柰酚和槲皮素的最佳特征吸收峰分别为 367 nm 和 365.5 nm^[14]。以山柰酚或槲皮素的不同质量浓度为横坐标,最佳特征吸收峰吸光度(A)值为纵坐标,建立标准曲线。FdFLS 活性测定反应体系如下:以 100 μ mol/L 二氢槲皮素或二氢山柰酚作为底物,50 μ L 粗酶液,111 mmol/L 乙酸钠,83 μ mol/L 2-酮戊二酸,42 μ mol/L 硫酸亚铁,2.5 mmol/L 维生素 C,总反应体系为 500 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 20 min。酶活力单位采用国际酶单位(IU),即以每分钟生成 1 μ mol 槲皮素或山柰酚的酶量为 1 个国际单位^[15]。

3 结果与分析

3.1 FdFLS cDNA 的克隆

提取的金荞麦花总 RNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示所得 RNA 质量较高,28S:18S 接近 2:1,无降解与总 DNA 污染。以金荞麦 cDNA 为模板,特异引物 FdFLSf 和 FdFLSr 进行 PCR 扩增,得到约 1 000 bp 的特异条带(图 1)。

3.2 FdFLS 序列分析

FdFLS 基因 cDNA 序列含 1 个 1 008 bp 的 ORF,编码 335 个氨基酸构成的蛋白质。经 Blast 分析表

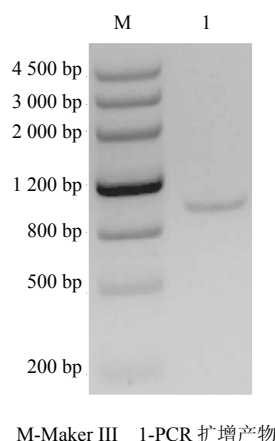
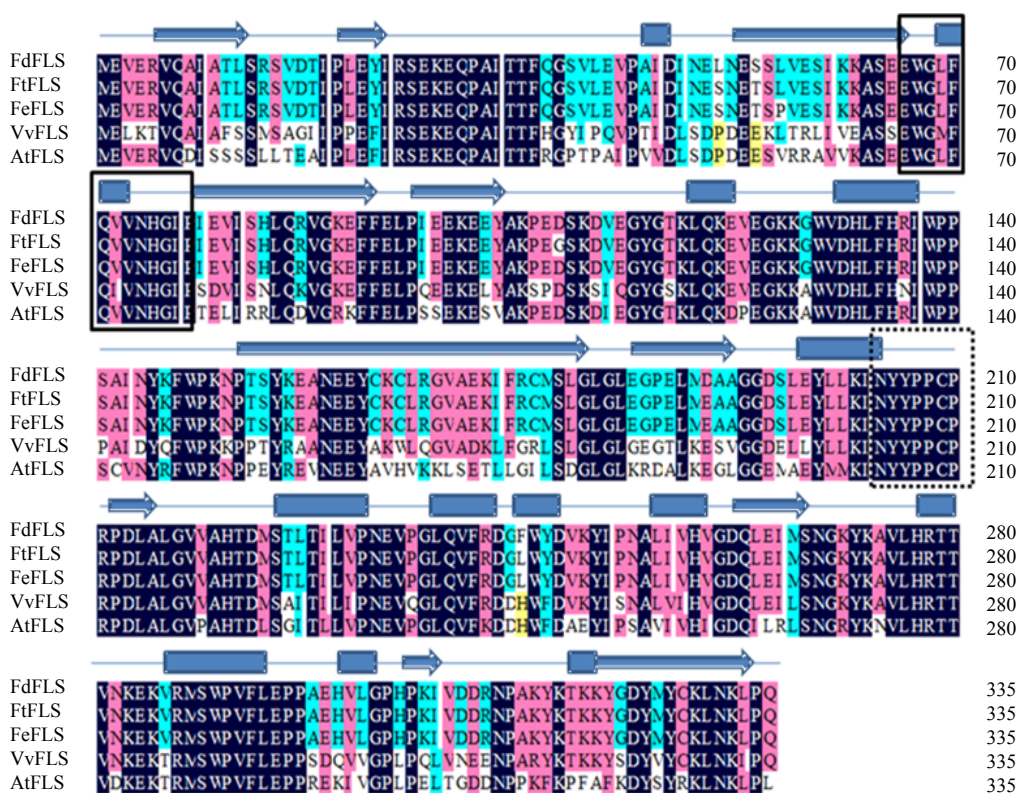


图 1 FdFLS ORF 扩增琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of ORF amplification in FdFLS

明, FdFLS 核苷酸序列与苦荞和甜荞相似率最高均为 98%, 与拟南芥 (AM887658.1)、葡萄 (AB213565.1)、草莓 (DQ834905.1) 等的相似率在 75% 以上, 而与其他植物的相似率较低。表明成功获得 FdFLS ORF 序列。

FdFLS 蛋白分子式为 $C_{1734}H_{2696}N_{446}O_{501}S_{12}$, 理论相对分子质量为 3.819×10^4 , 等电点值为 5.70。二级结构预测结果表明, FdFLS 含 31.73% 的 α -螺旋, 18.56% 的 β -转角, 49.70% 的不规则卷曲。选取与金荞麦同属的苦荞麦 FtFLS、甜荞麦 FeFLS, 双子叶模式植物拟南芥 AtFLS 以及单子叶植物葡萄 VvFLS 进行基于 FdFLS 氨基酸序列的多重序列比对 (图 2), FdFLS 与其他 4 个 FLS 相比其氨基酸序列较为保守, 未在氨基酸序列的 C 端和 N 端发



直线-不规则卷曲 箭头- β 片层 矩形条带- α -螺旋 实线框-conserved domain A 虚线框-conserved domain B
Straight line-irregular curl Arrow-extended- β layer Rectangular strip- α -helix Solid box-conserved domain A Dashed box-conserved domain B

图 2 金荞麦 FdFLS 多重序列比对
Fig. 2 Sequence multi-alignment of FdFLS

现较大变异区域。同时, 作为 2-ODD 家族的 FdFLS 也含有保守区 A 和 B 2 个保守的功能区域。此外, His²²¹、Asp²²³ 和 His²⁷⁷ 是典型的 Fe²⁺ 离子结合位点, Arg²⁸⁷ 和 Ser²⁸⁹ 为 2-酮戊二酸结合位点。采用 Swiss-Model 对 FdFLS 蛋白质三维结构进行同源建

模, 以拟南芥花青素合酶结晶结构为模型建立三维结构, 两者相似度为 43%。

3.3 FdFLS 系统进化树的构建

采用 MEGA 5.0 软件构建基于植物 FLS 氨基酸序列的系统进化树 (图 3)。结果表明, 该进化树分

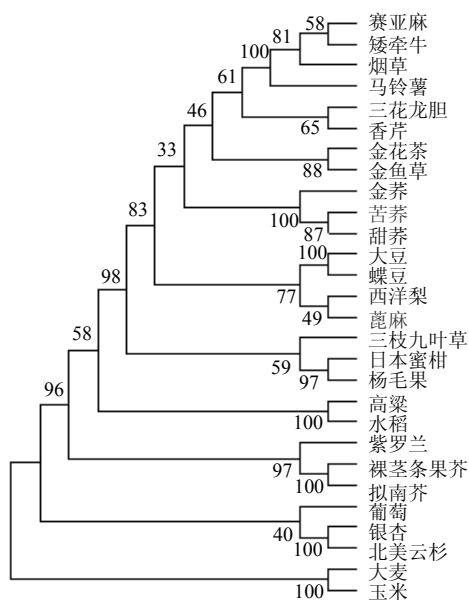


图 3 FdFLS 与其他植物 FLS 氨基酸序列的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of FdFLS and FLS of other amino acids

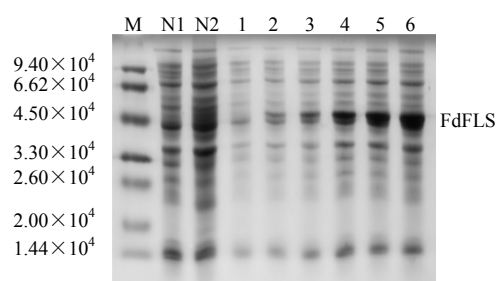
为 2 个主要的簇 I 和 II。簇 I 由不同的双子叶植物 FLS 组成，其中矮牵牛、香芹、金鱼草、苦荞、大豆等的 FLS 的生物学功能得到验证。同是来自蓼科荞麦属的 FtFLS、FeFLS 和 FdFLS 高度同源。簇 II 由模式植物拟南芥、裸茎条果芥、紫罗兰和部分单子叶植物以及少量裸子植物的 FLS 组成，FLS 在不同的植物中的同源性较低，进化模式也不确定，所以推测其在这些物种中有种属特异性存在。分析表明大多数双子叶植物的 FLS 在氨基酸序列上有较高的同源性，一些物种其复制和演变可能发生在双子叶植物进一步分化之前。

3.4 FdFLS 的诱导表达

将酶切鉴定和序列测定后的重组质粒 pET-30b (+)-FdFLS 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，经 IPTG 的诱导表达后进行 SDS-PAGE 分析。结果表明，重组质粒 pET-30b (+)-FdFLS 新生成了一条相对分子质量约 4.0×10^4 的新生条带，与理论相对分子质量一致；目的蛋白的表达量随诱导时间，逐渐增加(图 4)。

3.5 FdFLS 活性的测定

山柰酚的回归方程为 $A = 0.0274C$ (A 表示光吸收值， C 表示浓度， $\mu\text{g/mL}$)， $R^2 = 0.9968$ ；槲皮素的回归方程为 $A = 0.0300C$ ， $R^2 = 0.9976$ 。测定结果表明，FdFLS 以二氢山柰酚和二氢槲皮素为底物，其酶活力分别为 $6.86 \times 10^{-5} \text{ IU}/\mu\text{L}$ 和 $7.12 \times 10^{-5} \text{ IU}/\mu\text{L}$ 。



M-蛋白 Marker N1、N2-pET-30b (+) 空载体诱导前后
1~6-pET-30b (+)-FdFLS 经诱导 0、1、2、4、6 和 8 h
M-protein Marker N1 and N2-before and after induction of
pET-30b (+) zero loading vectors 1-6- 0, 1, 2, 4, 6, and 8 h after
pET-30b (+)-FdFLS induction

图 4 FdFLS 在大肠杆菌中的诱导表达

Fig. 4 Induced expression of FdFLS in *E. coli*

4 讨论

作为 2-ODD 家族的 FLS、黄烷酮-3-羟化酶 (F3H)、黄酮合酶 (FNS)、花青素合酶 (ANS)，此 4 个结构基因参与了黄酮类化合物的生物合成^[8]。通过与其他生物的 FLS 比较，FdFLS 具有典型的保守活性位点，且位于保守区 A 的 His⁷⁵ 具有边际效应^[16]，若位于保守区 B 的 Pro⁷⁵ 突变成 Ala 或 Gly 将引起酶活的降低^[17]。在其三维结构中 N 端第一个 α -螺旋的缺失可能会引起其活性的丢失，在拟南芥 AtFLS1-AtFLS6 中，此部位的突变或缺失将会造成表达产物的失活^[18]。可见，FdFLS 中所有的分子特征皆表明其为一可催化二氢黄酮醇生成黄酮醇的酶。

Wellmann 等^[19]研究表明，柑橘中 FLS 对二氢山柰酚 ($K_m 45 \mu\text{mol/L}$) 的底物亲和力大于二氢槲皮素 ($K_m 272 \mu\text{mol/L}$)；玉米中 ZmFLS1 则更趋向于二氢山柰酚 ($K_m 58 \mu\text{mol/L}$) 为底物而不是二氢槲皮素 ($K_m 151 \mu\text{mol/L}$)^[20]；而来自拟南芥的 AtFLS 却更加偏爱二氢山柰酚^[21]。本研究表明，FdFLS 对二氢槲皮素的催化活力略大于二氢山柰酚，表明金荞麦中芦丁的合成可能是通过二氢山柰酚经 F3'H 羟基化为二氢槲皮素，再由二氢槲皮素氧化为槲皮素，最后糖基化成芦丁。这一通路苦荞一致，但 FdFLS 对二氢黄酮醇的催化活性明显低于苦荞麦 FtFLS，故其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈晓峰, 顾振纶. 金荞麦抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(9): 715-718.
- [2] 陈洁梅, 顾振纶, 梁中琴, 等. 金荞麦 Fr4 抑瘤和拮抗

- 环磷酸胺毒性的作用 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 938-940.
- [3] 程友斌. 金荞麦的化学成分及抗炎药理研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2007.
- [4] Conesa C M, Ortega V V, Gascoón M J Y, *et al.* Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin and diosmin [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(17): 6791-6797.
- [5] Harborne J B, Williams C A. Advances in flavonoid research since 1992 [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(6): 481-504.
- [6] Holton T A, Brugliera F, Tanaka Y. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida* [J]. *Plant J*, 2002, 4(6): 1003-1010.
- [7] Kaltenbach M, Schroöder G, Schmelzer E, *et al.* Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants [J]. *Plant J*, 1999, 19(2): 183-193.
- [8] Turnbull J J, Nakajima J, Welford R W, *et al.* Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase and flavanone 3 β -hydroxylase [J]. *Plant J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1206-1216.
- [9] Britsch L, Heller W, Grisebach H. Conversion of flavanone to flavone, dihydro flavonol and flavonol with an enzyme system from cell culture of parsley [J]. *Z Naturforsch C*, 1981, 36(9/10): 742-750.
- [10] Pelletier M K, Burbulis I E, Winkel-Shirley B. Disruption of specific flavonoid genes enhances the accumulation of flavonoid enzymes and end-products in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 40(1): 45-54.
- [11] Preuss A, Stracke R, Weisshaar B, *et al.* *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional flavonol synthase [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(12): 1981-1986.
- [12] Ferreyra M L F, Rius S, Emiliani J, *et al.* Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase [J]. *Plant J*, 2010, 62(1): 77-91.
- [13] Kim B G, Joe E J, Ahn J H. Molecular characterization of flavonol synthase from poplar and its application to the synthesis of 3-O-methylkaempferol [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(4): 579-584.
- [14] Chua C S, Biermann D, Goo K S, *et al.* Elucidation of active site residues of *Arabidopsis thaliana* flavonol synthase provides a molecular platform for engineering flavonols [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(1): 66-75.
- [15] Prescott A G, John P. Dioxxygenases: molecular structure and role in plant metabolism [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47(1): 245-271.
- [16] Lukacin R, Britsch L. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 249(3): 748-757.
- [17] Wilmouth R C, Turnbull J J, Welford R W D, *et al.* Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Structure*, 2002, 10(1): 93-103.
- [18] Owens D K, Alerding A B, Crosby K C, *et al.* Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(3): 1046-1061.
- [19] Wellmann F, Lukacin R, Moriguchi T, *et al.* Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from *Citrus unshiu* [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(16): 4134-4142.
- [20] Ferreyra M L F, Rius S, Emiliani J, *et al.* Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase [J]. *Plant J*, 2010, 62(1): 77-91.
- [21] Owens D K, Alerding A B, Crosby K C, *et al.* Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(3): 1046-1061.