

## • 药材与资源 •

## 红花黄酮醇合成酶基因片段的克隆及表达分析

杨文婷<sup>1,2</sup>, 刘秀明<sup>1,2#</sup>, 张雪萌<sup>2</sup>, 焦重达<sup>2</sup>, 万秋<sup>1</sup>, 姚娜<sup>1</sup>, 王南<sup>1</sup>, 李海燕<sup>1,2\*</sup>, 李校堃<sup>1\*</sup>

1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

**摘要:** 目的 克隆红花花瓣中的黄酮醇合成酶 (flavonol synthase, FLS) 基因并研究其在不同开花时期的表达量。方法 根据红花花瓣转录组测序结果挑选 FLS 基因的设计引物, 以红花花瓣总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 的方法扩增 FLS 基因片段并连接到 PEASY-T1 载体上, 阳性克隆经 PCR 检测后进行测序。结果 获得了 224 bp 的序列, 将获得的序列在 NCBI 上进行 Blast 比对, 该基因与其他物种的 FLS 基因具有较高的同源性。结论 克隆了红花 FLS 基因中间片段, 根据 FLS 基因片段设计引物, 对红花不同品种不同开花时期进行荧光定量 PCR 分析, 红花 FLS 基因在吉红油姊妹系的盛花期表达量最高。

**关键词:** 红花; 黄酮醇合成酶; 基因克隆; RT-PCR; 同源性

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)02-0250-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.019

Cloning and expression analysis of flavonols synthetase gene from *Carthamus tinctorius*

YANG Wen-ting<sup>1,2</sup>, LIU Xiu-ming<sup>1,2</sup>, ZHANG Xue-meng<sup>2</sup>, JIAO Zhong-da<sup>2</sup>, WAN Qiu<sup>1</sup>, YAO Na<sup>1</sup>, WANG Nan<sup>1</sup>, LI Hai-yan<sup>1,2</sup>, LI Xiao-kun<sup>1</sup>

1. Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

**Abstract: Objective** To clone the flavonol synthase (FLS) gene from *Carthamus tinctorius* (safflower) pigments and study its expression in different blossom periods. **Methods** Primers were designed according to FLS which was selected from transcriptome sequencing results of safflower petal. Taking total RNA of safflower petal as template, FLS genes were amplified by RT-PCR and connected to PEASY-T1 carrier, and positive cloning was detected by PCR and then sequenced. **Results** Sequencing results showed that at 224 bp sequence was acquired, to which the Blast comparison was carried out on NCBI. The gene had the higher homology compared with the FLS from other species. **Conclusion** The fragment of FLS gene is cloned from safflower, and PCR primers of safflower are designed based on FLS gene for real-time PCR in different blossom of periods different varieties in safflower. The results show that the expression of safflower FLS genes in the full bloom of auspicious red oil sisters line is the highest.

**Key words:** *Carthamus tinctorius* L. (safflower); flavonols synthetase; gene cloning; real-time PCR; homology

黄酮类化合物 (flavonoid) 是一类来自于丙二酰辅酶 A 和苯丙氨酸的次生代谢物, 泛指 15 个碳原子的多元酚类化合物, 其骨架可用 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 表示<sup>[1]</sup>。黄酮醇是黄酮类化合物的重要成分之一, 黄酮醇合成酶 (flavonol synthase, FLS) 是黄酮醇合成的直接相关酶, 在黄酮类化合物合成途径中, FLS

催化二氢黄酮醇转化为黄酮醇, 黄酮醇是花粉管生长过程中钴颜料及花颜色必不可少的调控因子<sup>[2-3]</sup>。黄酮醇类物质的积累在整个花药形成过程中, 从花粉发育的单细胞阶段, 一直持续到形成成熟的花粉的雌蕊<sup>[4]</sup>。FLS 基因作为苯丙氨酸代谢过程中的关键基因之一, 调控着色素合成、防御反应、植物育

收稿日期: 2014-05-21

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) (2011AA100606); 国家自然科学基金资助项目 (31101172, 31201237); 吉林省科技厅中青年科技领军人才及优秀创新团队项目 (20111815); 教育部博士点基金 (20122223120002)

作者简介: 杨文婷 (1990—), 女, 吉林人, 硕士研究生, 研究方向为植物生物反应器。

\*通信作者 李海燕 (1971—), 女, 吉林人, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物反应器。Tel: (0431)84533427 Fax: (0431)84533347 E-mail: hyl99@163.com

李校堃 (1964—), 男, 吉林人, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物反应器。

Tel: (0431)84533348 Fax: (0431)84533347 E-mail: xiaokunli@163.net

#共同第一作者

性等。因此, FLS 基因在黄酮类成分合成过程中具有重要的调节作用<sup>[5-6]</sup>。红花 *Carthamus tinctorius* L. 为菊科红花属, 又名红花草, 一年或二年生草本科植物。其作为重要的菊科植物, 是中国传统中药材之一, 是一种集药用、油用、工业用于一身的植物资源<sup>[7]</sup>。现代医学中, 其活血化瘀功效已被广泛应用。红花花瓣中存在大量色素成分, 其中的黄色素作为主要的黄酮类物质代表, 是红花主要有效成分之一<sup>[8]</sup>。本研究根据红花转录物组中得到的序列, 采用 RT-PCR 法克隆红花中 FLS 基因片段, 并进行荧光定量表达分析, 为进一步研究该基因在红花中的表达调控机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

样品经笔者鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L. 品种, 购自新疆红花缘科技有限公司, 分别为吉红早熟、吉红油姊妹系、吉红 1 号、吉红 2 号。在吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程中心基地种植, 4 月末进行播种, 于开花时期, 采集不同品种、不同开花时期的花瓣于液氮速冻, 放入 -80 °C 冰箱中冻存备用。

### 1.2 酶及化学试剂

内切酶、DNA 相对分子质量标准 DL-2000、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、荧光定量试剂盒 (货号 RR420A) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; PCR 回收试剂盒、胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自爱思进生物技术 (杭州) 有限公司; 大肠杆菌 Trans-T1 菌种购自北京全式金生物技术有限公司; RT-PCR 反转录试剂盒购自北京百泰克生物技术公司。

### 1.3 引物设计与合成

将红花转录物组中挑选的 Unigene 与 Genbank 中的多种 FLS 基因进行序列对比, 选择同源性较高的基因定为候选基因, 设计引物进行中间片段验证。根据引物设计原则, Primer 5.0 生物软件设计一对引物 P1: 5'-GGGGCATCTTTCAAGTGGTA-3'; P2: 5'-AGAAGGTGGCCAAACCCTAT-3'。用于扩增 FLS 基因片段, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

### 1.4 红花花瓣中总 RNA 提取和检测

将 -80 °C 冷冻保存的红花花瓣取出, 按照试剂盒说明书, 提取红花花瓣中的 RNA, 使用 NanoDrop 1 000 核酸检测仪, 根据吸光度 (*A*) 值鉴定所提 RNA 的纯度 (若  $A_{260}/A_{280}$  的值在 1.8~2.0, 则说明 RNA

无污染) 及浓度; 并依照测定出的 RNA 产量来计算下一步实验中合成 cDNA 第一链所需模板的用量。

### 1.5 FLS 基因的克隆

cDNA 第一链合成按照试剂盒说明书进行。以反转录后 cDNA 为模版, 克隆 FLS 基因, PCR 反应体系: 在 200 μL PCR 管中加入下列组分, ExTaq 0.5 μL、10×ExTaq 缓冲液 5 μL、dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL、P1 (10 μmol/L) 0.5 μL、P2 (10 μmol/L) 0.5 μL、cDNA 模版 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 38.75 μL, 总体积为 50 μL。PCR 反应: 94 °C 预变性 6 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析系统检测, 目的片段回收和纯化按照胶回收试剂盒说明书进行。

### 1.6 阳性克隆的筛选与鉴定

将回收目的片段与 PEASY-T1 载体按照物质的量比 4:1 混合, 将反应物混合均匀, 室温反应 5 min。将连接产物加入到 50 μL 感受态大肠杆菌细胞中, 冰浴 30 min; 42 °C 热激 40 s; 冰浴 5 min。加入 250 μL LB 液体培养, 轻轻混匀, 37 °C 摇床, 180 r/min, 摇菌 2 h。将菌液加入含有卡那、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal) 和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养。次日挑选白色单菌落, 经 PCR 检测后提取重组质粒, 酶切验证正确后, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

### 1.7 FLS 基因的生物信息学分析

将测序正确的 FLS 基因在 NCBI 上进行 Blast 比对, 并与其他几种植物的 FLS 进行同源性分析比较。

### 1.8 不同开花时期 FLS 基因的表达分析

以红花 4 个品种吉红早熟、吉红油姊妹系、吉红 1 号和吉红 2 号为研究对象, 分析 FLS 基因在花蕾期、初花期、盛花期和衰落期的表达量。提取不同品种、不同开花时期花瓣的 RNA, 严格计算 RNA 量, 反转录成 cDNA。以 18 S 作为内参, 根据 FLS 基因设计荧光定量 PCR 引物, FLSF: 3'-ACCATAGCCAAG-CCTGCAAA-5', FLSR: 3'-TGAAACAAGTGGTCC-ACCCAC-5'。按下列组成配制 PCR 反应液: SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2×) 12.5 μL; FLSF (10 μmol/L) 0.5 μL; FLSR (10 μmol/L) 0.5 μL; cDNA 模版 2 μL; dH<sub>2</sub>O (灭菌蒸馏水) 9.5 μL。采用 2 步法, 样本和内参分别设 3 个重复, ROX 作为校正荧光, 18 S RNA 为内参。2 步法 PCR 扩增标准程序如下: 预变性 95 °C、30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。

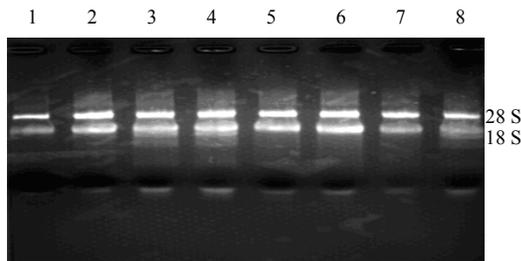
2 结果与分析

2.1 红花总 RNA 的提取及检测

从吉红早熟花瓣中提取总 RNA, 经过凝胶电泳检测结果, 显示 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带清晰 (图 1), 前者亮度约是后者的 2 倍, 说明所提取的 RNA 完整性较好; 经核酸蛋白检测仪测得  $A_{260}/A_{280}=1.96$ ,  $A_{260}/A_{230}=2.04$ , 表明 RNA 纯度较高, 可用于 RT-PCR 扩增。

2.2 RT-PCR 扩增

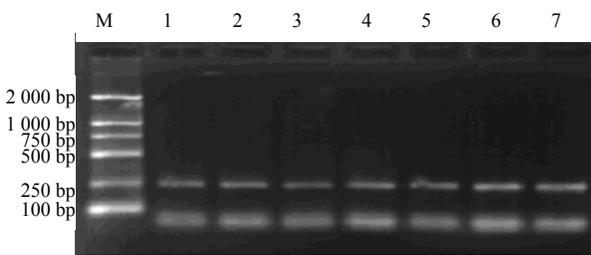
以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板, 用 FLS 基因引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。扩增产物经检测发现在 200 bp 左右处有一条亮带 (图 2), 且上下无杂带, 与推测的目的片段的大小一致, 有待进一步鉴定。



1~8-RNA 样品  
1—8-RNA samples

图 1 红花花瓣总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA from safflower petals



M-Marker 1~7-FLS 基因  
M-Marker 1—7-FLS gene

图 2 红花 FLS 基因中间片段的 RT-PCR 电泳图

Fig. 2 RT-PCR electrophoresis of middle fragment in safflower FLS gene

2.3 阳性克隆的鉴定

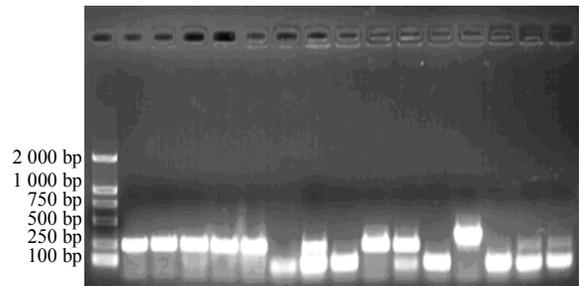
将目的片段在紫外下进行切胶回收, 回收纯化的片段连接到 PEASY-T1 克隆载体上, 转化 *E. coli* DH5a, 从转化的平板上随机挑取 15 个克隆进行菌液 PCR 鉴定 (图 3), 结果有 9 个菌种显示目的条带, 然后从这些克隆中选取 7 个菌液, 提取质粒进行酶切鉴定, 酶切后的小片段与目的片段大小基本

吻合, 将菌液送去测序 (图 4)。

2.4 FLS 基因的生物信息学分析

将测序结果与红花转录物组中挑选的序列进行比对, 测序结果正确。FLS 基因片段大小为 224 bp (图 5), 在 NCBI 上进行 Blast 分析, 红花与其他物种的 FLS 基因具有较高的同源性, 说明该片段确实为红花 FLS 基因的部分序列。将红花 FLS 基因与其他物种的该基因进行同源性比较分析, 构建系统树 (图 6), 可以看出, 红花的 FLS 与马铃薯和银杏的亲缘关系较近, 与拟南芥的亲缘关系较远。

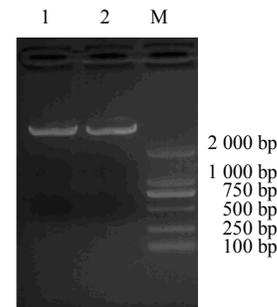
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



M-Marker 1~15-菌液  
M-Marker 1—15-bacterial liquids

图 3 红花 FLS 基因中间片段菌液 PCR 电泳图

Fig. 3 PCR electrophoresis of bacterial liquid in middle fragment of safflower FLS gene



M-Marker 1、2-酶切产物  
M-Marker 1, 2-enzyme digestion products

图 4 红花 FLS 基因中间片段酶切图

Fig. 4 Enzyme digestion of middle fragment in safflower FLS gene

```
GGGGCATCTTTCAAGTGGTAAACCATGGGATACC
AAGTGAAGCTCATAAGCAGGTTACAGAAAGTTGG
AAGAGAGTTCTTTGAGTTGCCACTAGAAGAGAA
GGAAACCATAGCCAAGCCTGCAAATATGAAAGA
TGGTATTGAAGGCTATGGAACAAAGCTTCAGAA
GGAGGTTGAAGGGAAGAAAGGGTGGGTGGACC
ACTTGTTTCATAGGGTTTGGCCACCT
```

图 5 红花 FLS 基因的中间片段序列

Fig. 5 Sequence of middle fragment in safflower FLS gene

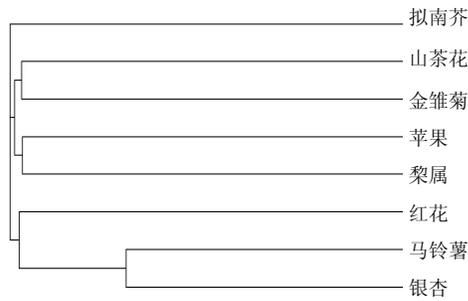


图 6 红花 FLS 基因片段的 Blast 结果

Fig. 6 Blast results of fragment in safflower FLS gene

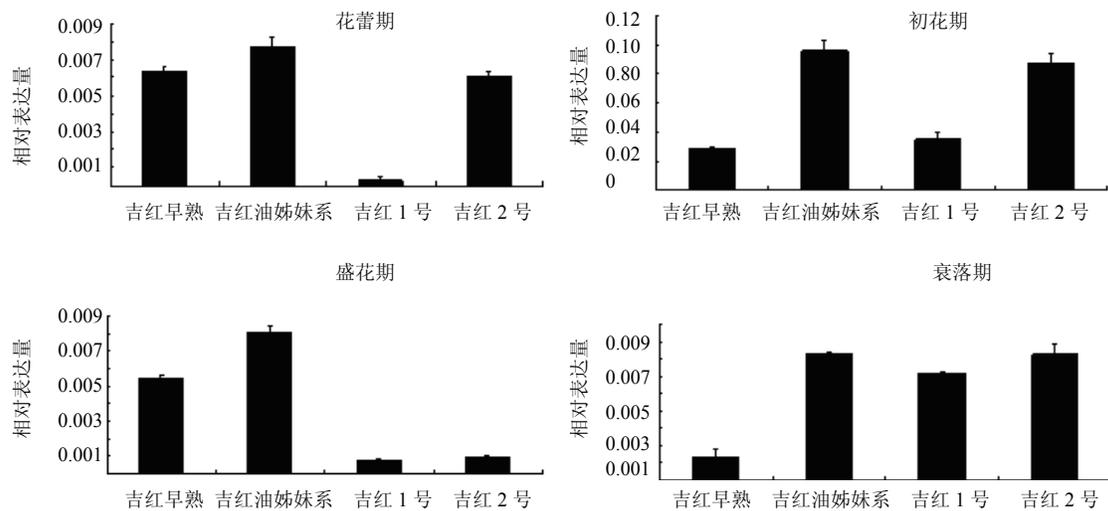


图 7 不同红花品种、不同开花时期的红花花瓣中 FLS 基因相对表达量

Fig. 7 Relative expression of safflower FLS gene in petal of safflower varieties in different blossom periods

和衰落期，吉红油姊妹系 FLS 基因的表达量仍然最高，吉红 1 号与吉红 2 号在盛花期表达量最低。

### 3 讨论

FLS 基因是黄酮类化合物合成途径的关键酶之一，目前已经从苦荞麦<sup>[9]</sup>、金荞麦<sup>[10]</sup>、玉米<sup>[4]</sup>、烟草<sup>[11]</sup>、银杏<sup>[6]</sup>等多种植物中克隆出该基因并研究其功能。转录组学 (transcriptomics) 是一门在整体水平上研究细胞中基因转录情况及转录调控规律的学科，通过转录组测序，可以得到大量未知基因或研究领域感兴趣的基因。本研究在红花转录组测序结果的基础上，运用基因工程手段克隆了红花 FLS 基因片段，为红花在黄酮化合物代谢调控方面的深入研究提供理论依据。

近年来荧光定量 PCR 广泛应用于定量分析的研究中，渐渐有取代普通定量 PCR 的趋势，对目的基因进行表达分析。本研究对红花不同品种及不同开花时期的 FLS 基因相对表达量进行分析，结果表

### 2.5 不同开花时期 FLS 基因的表达分析

提取红花不同品种、不同开花时期花瓣的 RNA，反转录 cDNA，以 18 S 作为内参基因，采用荧光定量的方法分析 FLS 基因在红花不同开花时期的表达量，结果见图 7。从相对表达量来看在花蕾期，吉红油姊妹系品种的 FLS 基因表达量最高，是吉红 1 号的 9 倍以上，其次为吉红早熟品种，吉红 1 号的表达量最低。在初花期，吉红油姊妹系品种的 FLS 基因表达量最高，是吉红早熟的 3 倍以上，其次为吉红 2 号，吉红早熟表达量最低。在盛花期

明，同一开花时期不同品种表达量差异较大，红花 FLS 基因在吉红油姊妹系中的表达量最高，而在吉红一号的花蕾期中表达量最低，说明吉红油姊妹系是 FLS 基因研究的理想品种选择，这为后期红花 FLS 基因在红花中的代谢调控机制的研究奠定基础。

### 参考文献

- [1] 汪秋安, 周冰, 单杨, 等. 天然黄酮类化合物的抗氧化活性和提取技术研究进展 [J]. 化工生产与技术, 2004, 11(5): 29-32.
- [2] Zhou X W, Fan Z Q, Chen Y, et al. Functional analyses of a flavonol synthase-like gene from *Camellia nitidissima* reveal its roles in flavonoid metabolism during floral pigmentation [J]. *J Biosci*, 2013, 38(3): 593-604.
- [3] Tan J F, Wang M J, Tu L L, et al. The flavonoid pathway regulates the petal colors of cotton flower [J]. *PLoS One*, 2013, 12(8): e72364.
- [4] Maria L F F, Maria I C, Julia I Q, et al. Evolution and

- expression of tandem duplicated maize flavonol synthase genes [J]. *Front Plant Sci*, 2012, 25(3): 1-26.
- [5] Harborne J B, Christine A. Advances in flavonoid research since 1992 [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55: 481-504.
- [6] Xu F, Li L L, Zhang W W, *et al.* Isolation, characterization, and function analysis of a flavonol synthase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 2285-2296.
- [7] 官玲亮, 侯凯, 刘千, 等. 红花 ω 6 脂肪酸脱氢酶基因克隆及生物信息学分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35(4): 372-383.
- [8] Li H Y, Dong Y Y, Yang J, *et al.* De novo transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): 1-10.
- [9] Li X H, Kim Y, Kim Ye J, *et al.* Differential stress-response expression of two flavonol synthase genes and accumulation of flavonols in tartary buckwheat [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170(18): 1630-1636.
- [10] 蒋洁, 白悦辰, 李成磊, 等. 金荞麦黄酮醇合酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. *中草药*, 2013, 44(14): 1974-1978.
- [11] Monika M, Paramvir S A, Sudesh K Y. Post-transcriptional silencing of flavonol synthase mRNA in tobacco leads to fruits with arrested seed set [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28315.