

石斛兰 *dfr* 基因的克隆、序列分析及原核表达

潘丽晶*, 张妙彬, 范干群, 陈伟庭, 曹友培

(珠海市农业科学研究中心, 广东珠海 519070)

摘要: 二氢黄酮醇 4-还原酶 (DFR) 在不同花色形成中起着关键作用。利用 RT-PCR 方法从石斛兰中克隆出 *dfr* 基因, 并命名为 *Dendfr*。该序列全长 1 164 bp, 编码 352 个氨基酸。氨基酸序列分析发现, *Den DFR* 与 3 种兰科植物的 DFR 氨基酸序列同源性达 81% ~ 86%, 与其他非兰科植物的 DFR 氨基酸同源性在 56% ~ 72% 之间。在 *Den DFR* N-末端存在一个保守的 NADP 结合区, 序列中存在 26 个氨基酸组成的底物特异结合区, 其中 134 位氨基酸处存在特异的天冬酰胺 N 位点。将 *Dendfr* 的编码区克隆到 pQE30 载体中, 在大肠杆菌中高效表达了该蛋白, 为进一步研究石斛兰花色形成机制及花色改良基因工程打下基础。

关键词: 石斛兰; 花色; *dfr* 基因; 克隆; 序列分析; 原核表达

中图分类号: S 682.31; Q 78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2010) 01-0129-06

Cloning, Sequencing and Prokaryotic Expression of *dfr* from *Dendrobium*

PAN Li-jing*, ZHANG Miao-bin, FAN Gan-qun, CHEN Wei-ting, and CAO You-pei

(Zhuhai Agricultural Science Research Centre, Zhuhai, Guangdong 519070, China)

Abstract: Dihydroflavonol 4-Reductase (DFR) plays a key role in the formation of different floral color. By using RT-PCR method, a *dfr* gene was cloned from *Dendrobium* and designated as *Dendfr*. The *Dendfr* gene was 1 164 bp in length and encoded 352 amino acid residues. Amino acid sequence analysis revealed that *Den DFR* sequence share homologies of 81% - 86% with three species of orchid, and share homologies of 56% - 72% with the other species. *Den DFR* protein contains a reserved NADP domain at the N-terminal and a specific 26 amino acid region of substrate specificity with an asparagine (position 134). The encoding region of *Dendfr* was constructed into pQE30 vector and effectively expressed the protein in *E. coli*. These will be helpful for studying molecular mechanism of floral color formation and genetic improvement of the *Dendrobium*.

Key words: *Dendrobium*; flower color; *dfr* gene; cloning; sequence analysis; prokaryotic expression

二氢黄酮醇 4-还原酶 (DFR) 在不同花色形成中起着关键作用, 它是将二氢黄酮醇转变为花色素反应的第一个酶, 这一反应需要还原型辅酶 (NADPH)。由于不同物种的 DFR 对底物选择性不同, 所以合成不同的花色素, 呈现的花色各异。有些植物如矮牵牛的 DFR 缺乏还原底物 DHK 活性, 因而其花瓣缺少橙色; 相反, 大丁草 DFR 能够还原 DHK, 使花瓣产生橙色 (Elmaa et al, 1995)。

不同物种的 DFR 氨基酸序列在很多区域有较高的同源性, 例如: DFR 与 NADP 结合位点高度保守, 富含甘氨酸 G (Lacombe et al, 1997; Johnson et al, 1999); DFR 存在 26 个氨基酸组成的底物特异结合区, 其中第 134 位氨基酸可直接影响酶的底物特异性, 大多数物种在 134 位含有天冬酰胺 N 位点 (Beld et al, 1989; Johnson et al, 2001)。在矮牵牛的 DFR 序列中, 其底物特异区中的 134 位

收稿日期: 2009 - 05 - 11; 修回日期: 2009 - 10 - 10

基金项目: 广东省科技计划项目 (2006B20130004)

* E-mail: panlijing@msn.com

不存在 N 位点, 因而缺乏还原 DHK 活性 (Johnson et al, 2001)。

随着分子生物学的发展, 植物花色的形成及其相关基因的作用机理已得到广泛研究。然而, 不同植物 DFR 的结构及生化特征仍未得到透彻的阐明。Petit 等 (2007) 从葡萄 (*Vitis vinifera*) 中分离出 *dfr* 基因, 并将其在大肠杆菌中表达, 纯化其活性蛋白, 不仅检测了 DFR 的活性, 还获得了该酶与 DHQ 和辅酶 (NADP) 的两种结合物 (DFR-DHQ 和 DFR-NADP) 的三维结构图, 首次通过三维结构分析 DFR 的作用机理。

此外, *dfr* 基因是花色改良的关键基因之一。Meyer 等 (1987) 将玉米 *dfr* 基因导入矮牵牛 RC01 突变体后, DHK 被还原, 花变成淡砖红色, 生成矮牵牛的新花色系列。Aida 等 (2000a) 将反义 *dfr* 和反义 *chs* 导入蓝猪耳中, 花色更显蓝, 反义 *dfr* 比反义 *chs* 更能使花显蓝。其原因是反义 *dfr* 的导入使 *dfr* 基因钝化, 从而导致黄酮的积累, 使辅色作用增强 (Aida et al, 2000b)。

石斛兰 (*Dendrobium*) 又称石斛, 是兰科中的第二大属, 广泛分布于热带、亚热带地区, 是主要的切花品种之一。石斛兰的花色相对单一, 市场上备受欢迎的亮橙色、火红色和天蓝色在石斛兰中都不曾见。

长期以来, 育种家们渴望通过传统杂交手段获得新型的石斛兰花色品种, 然而, 由于对石斛兰花色的遗传研究较少, 研究者们对这些杂交后代的花色将如何改变无从知晓。同时石斛兰的育种周期长, 也限制了其新型花色品种的开发。近几年来, 尽管石斛兰的分子生物学相关研究已在加速, 但相比其他花卉, 仍比较落后。

石斛兰缺乏橙色与蓝色, 这与石斛兰花色形成过程中 DFR 的活性密切相关。本研究中从石斛兰中克隆出二氢黄酮醇 4-还原酶基因 (*dfr*), 并对其进行了全序列分析, 与其他已知的 *dfr* 基因作比较, 揭示了 DFR 可能的功能区。同时克隆了该基因的编码区, 构建表达载体, 并在大肠杆菌中高效表达, 为进一步研究石斛兰花色形成机制及改良花色的基因工程打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2008 年在珠海市农业科学研究中心实验室进行, 材料为本中心兰花资源圃栽培的石斛兰品种 'Geeting Fragrance'。将花蕾剪下, 迅速投入液氮中速冻后放入 -70 °C 冰箱保存。

1.2 总 RNA 的提取与 *dfr* 基因的克隆

取适量的花蕾于研钵中, 加入少量石英砂, 快速研磨成粉末, 加入 10 倍体积的裂解液 [50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)、20 mmol·L⁻¹ LiCl、2 mmol·L⁻¹ EDTA、1 mol·L⁻¹ NaCl; 1.5% SDS; 4% β-巯基乙醇], 涡旋 1 min, 静置 15 min。4 °C 8 500 ×g 离心 10 min; 取上清液, 加入 LiCl 至终浓度 2 mol·L⁻¹, 颠倒混匀后 -20 °C 放置 2 h。4 °C 15 000 ×g 离心 45 min, 弃上清液, 沉淀中加入 0.1~0.2 mol·L⁻¹ NaCl 溶解, 再加入等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提 2~3 次, 离心, 取上层水相; 加入 3 倍体积无水乙醇, -20 °C 放置 15 min, 离心, 收集沉淀; 将所得的沉淀用 75% 乙醇洗涤 1 次。待 RNA 沉淀略干, 加适量无 RNase 水溶解, -70 °C 储存备用。

参照 TaKaRa 公司的 RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。设计两个特异性引物: *dfr*1: 5'-AACTGGCGTTGAGGAGAGAGAA-3', *dfr*2: 5'-GCACTTAGAAAA TCAATAGGAC-3'。用 cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增。扩增产物经回收, 与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5, 提取质粒 T-dfr, 鉴定后送广州 Invitrogen 公司测序。质粒提取、酶切, DNA 片段回收、连接、转化等按分子克隆实验手册略加修改进行。

1.3 序列分析

应用 DNAStar 软件对 DNA 序列进行读码框、核苷酸与氨基酸序列特征分析, 并将其编码的氨基

酸序列用 Blast 搜索引擎在 GenBank/EMBL 数据库中寻找同源序列。

同源性分析和多序列比较用 CLUSTAL W 软件 (Thompson et al, 1994) 进行。

序列特征分析参照文献 (Beld et al, 1989; Lacombe et al, 1997; Johnson et al, 1999; Johnson et al, 2001) 进行。

1.4 *dfr* 基因原核表达载体的构建

根据测序结果, 重新设计引物: *dfr*3: 5'-GGA TCCA TGGAGAA TGAGAA GAA G-3', *dfr*4: 5'-GG-TACCTCACTTAACAGCAATCTG-3'。

以 T-*dfr* 为模板进行 PCR 扩增, 扩增后的产物连入 pMD18-T 克隆载体, 连接产物转化 *E. coli* DH5, 经序列测定后, 以 *Bam*H 和 *Kpn* 酶切, 回收并纯化, 再连入 pQE30, 转化 *E. coli* DH5, 得到重组表达质粒。

重组质粒 pQE-*dfr* 经酶切鉴定后, 进一步用 pQE30 测序引物, 送广州 Invitrogen 公司进行测序鉴定。

1.5 DFR 在 *E. coli* 中的表达

分别将质粒 pQE30 与 pQE-*dfr* 转化 *E. coli* M15 [pREP4] 中, 37 °C 培养过夜。次日以 5% 转接于 LB 培养基中, 37 °C 培养 2 h 后, 取 3 mL 菌液, 测光吸收值 A_{600} ; 并收集菌体作为诱导表达前的对照, 其余菌液中加入 IPTG 至终浓度 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, IPTG 诱导 1~5 h 后, 分别收集菌体。表达产物用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 方法参照 QIA expressionist™ 操作说明进行。

2 结果与分析

2.1 *dfr* 基因的克隆与序列分析

2.1.1 *dfr* 基因的克隆

提取石斛兰花蕾总 RNA 后, 通过逆转录和 PCR 扩增, 进行琼脂糖凝胶电泳, 获得一条约为 1.2 kb 的特异条带, 条带大小与预期一致 (图 1), 将特异条带进行回收测序。

2.1.2 序列特征

dfr 序列全长 1 164 bp, 读码框全长 1 059 bp, 编码 352 个氨基酸, 预计分子量为 39.625 kD, 等电点为 5.88, GenBank 登录号为 FJ426271, 命名为 *Dendfr*。

用 Blast 分析发现, *Dendfr* 与 *Bromheadia* 'finlaysoniana' *dfr* 基因氨基酸同源性最高, 达 86%; 与兰属 (*Cymbidium hybrida*) 的 *dfr* 基因氨基酸同

源性为 83%, 与文心兰 (*Oncidium* 'Gower Ramsey') 的氨基酸同源性为 81%; Blast 分析还发现, 该基因的氨基酸序列与其他非兰科植物 *dfr* 基因的氨基酸同源性在 56%~72% 之间。

4 个兰科植物的 DFR 氨基酸序列进行比对结果见图 2, 其 N-末端存在一个保守的 NADP 结合区 "VTGASGYVGSWLVMKLLQKGY", 富含甘氨酸 G; 且都存在 26 个氨基酸组成的底物特异结合区 "TVNVEEMQAAVYDESSWSDLDFVNRV"; 在 134 位氨基酸处存在决定还原 DHK 活性的特异天冬酰胺 N 位点, 这两个结合区和一个位点在各物种的 DFR 中广泛存在且高度保守。

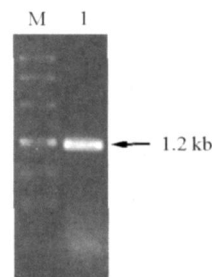


图 1 石斛兰 *dfr* 基因的 RT-PCR 产物

M: DNA marker;

1: 石斛兰 *dfr* 基因片段。

Fig. 1 RT-PCR product of *Dendfr*

M: DNA marker;

1: RT-PCR product of *Dendfr*

用 pQE30 测序引物进行测序鉴定, 结果表明, 插入片段与已经登录的序列完全一致, 而且正确插入到了表达载体的克隆位点。

将含 *dfr* 的重组表达质粒 pQE-*dfr* 转化 *E. coli* M15 [pREP4] 后, 经 IPTG 诱导可表达与理论预测值相符的 42 kD 蛋白, 并且诱导后 1 h 即可见诱导蛋白的产生, 诱导后 5 h 其表达量达到最大 (图 4)。

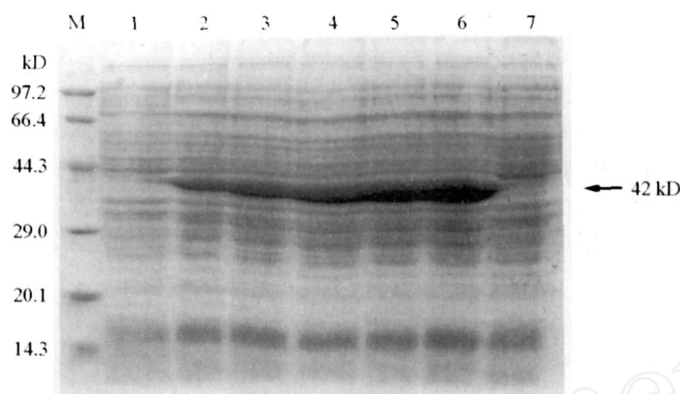


图 4 Den DFR 在 *E. coli* 中的表达

M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前; 2~6: 诱导后 1、2、3、4 和 5 h; 7: M15 [pREP4]。

Fig 4 Den DFR expressed in *E. coli* M15 [pREP4]

M: Standard protein marker; 1: Sample before IPTG induction;

2 - 6: Samples after IPTG induction 1, 2, 3, 4, 5 h; 7: M15 [pREP4].

3 讨论

目前有关兰花花色基因的报道相对较少, 对兰花花色形成的机制研究也比较薄弱。Liew 等 (1998) 用同源探针通过 PCR 方法从 *B. ram headia finlaysoniana* 的 cDNA 文库中分离得到 *dfr* 基因, Southern blot 分析表明, 在该兰花中 *dfr* 由单基因编码。Hieber 等 (2005) 从文心兰中分离到 3 个不同的 *dfr* 转录本。兰科植物大部分的 *dfr* 基因都是单拷贝, 多拷贝的 *dfr* 基因并不多见。本研究从石斛兰中成功克隆到的 *dfr* 基因也是单拷贝的。

在复杂的花色素合成过程中, 呈现不同颜色花色素的积累依赖于 DFR 的活性。Johnson 等 (1999) 将兰属 *dfr* 基因转入矮牵牛中, 发现兰属的 DFR 不能有效还原 DHK, 从而导致天竺葵色素的缺乏, 但兰属的 DFR 中存在 134 位的 N 特异氨基酸。文心兰的 DFR 中也存在 134 位的 N, 这就提示, 兰花的 DFR 底物特异性位点不是 134 位的 N 位点。Mudalige-Jayawickrama 等 (2005) 推测, 由于 F3 H 和 DFR 作用于相同的底物 DHK, 它们之间的竞争决定了 DHQ 和 DHK 的不同表达水平, 从而呈现不同的花色。本研究获得的 Den DFR 也存在 134 位的 N 特异氨基酸, 但石斛兰却缺乏橙色, 这似乎证实了以上的推测: F3 H 和 DFR 之间的竞争决定了 DHQ 和 DHK 的不同表达水平。

Petit 等 (2007) 首次对 DFR 的三维结构进行了详细描述, 进一步证实了其 NADP 结构域、底物特异结合位点的存在。Trabelsi 等 (2008) 进一步获得了 DFR - NADP - 杨梅酮和 DFR - NADP - 栎精两种结合物的晶体, 通过三维结构的展示, 证实黄酮醇可能抑制 DFR 的活性。DFR 三维结构的分析, 将有助于 DFR 作用机理的阐明。本研究将石斛兰 *dfr* 基因的编码区在大肠杆菌中进行了高效表达, 为 Den DFR 蛋白的分离纯化、活性检测、三维结构的探讨、石斛兰花色素的研究与遗传转化奠定了基础, 同时也为石斛兰新品种的改良提供了一条新途径。

References

- Aida R, Sanae K, Yoshikazu T, Shibata M. 2000a. Modification of flower color in *Ipomoea* by genetic transformation. *Plant Sci*, 153: 32 - 42.
- Aida R, Yoshida K, Kondo T, Kishimoto S, Shibata M. 2000b. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic *Ipomoea* plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Sci*, 160: 49 - 56.
- Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje A R, Gerats A GM. 1989. Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: Partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol Biol*, 13: 491 - 502.
- Elkmaa P, Helariutta Y, Griesbach R J, Kotilainen M, Seppanen P, Teeri T H. 1995. Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of the foreign gene. *Mol Gen Genet*, 248: 649 - 656.
- Hieber A D, Mudalige-Jayawickrama R G, Kuehnle A R. 2005. Color genes in the orchid *Oncidium Gower Ramsey*: Identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross. *Planta*, 223: 521 - 531.
- Johnson E T, Yi H, Shin B, Oh B J, Cheong H, Choi G. 1999. *Cymbidium hybrida* dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins. *Plant J*, 19: 81 - 85.
- Johnson E T, Ryu S, Yi H, Shin B, Cheong H, Choi G. 2001. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *Plant J*, 25: 325 - 333.
- Lacombe E, Hawkins S, Van Doorselaere J, Piquemal J, Goffner D, Poeydomege O, Boudet A M, Grima-Pettenati J. 1997. Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: Cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J*, 11: 429 - 441.
- Liew C F, Loh C S, Goh C J, Lin S H. 1998. The isolation, molecular characterization and expression of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in the orchid, *Bomarea finlaysoniana*. *Plant Sci*, 135: 161 - 169.
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H. 1987. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature*, 330: 677 - 678.
- Mudalige-Jayawickrama R G, Champagne M M, Hieber A D, Kuehnle A R. 2005. Cloning and characterization of two anthocyanin biosynthetic genes from *Dendrobium* orchid. *J Am Soc Hort Sci*, 130: 611 - 618.
- Petit P, Granier T, d Estaintot B L, Manigand C, Bathany K, Schmitter J M, Lauvergeat V, Hamdi S, Gallois B. 2007. Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis. *J Mol Biol*, 368: 1345 - 1357.
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673 - 4680.
- Trabelsi N, Petit P, Manigand C, Langlois d Estaintot B, Granier T, Chaudière J, Gallois B. 2008. Structural evidence for the inhibition of grape dihydroflavonol 4-reductase by flavonols. *Acta Cryst*, 64: 883 - 891.

征订

欢迎订阅 《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊，创刊于 1962 年，刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究简报、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息，适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊，被中国科学引文数据库 Chinese Science Citation Database 等多家重要数据库收录。《园艺学报》2005 年荣获第三届国家期刊奖，2008 年获中国科技信息所“中国精品科技期刊”称号及武汉大学中国科学评价研究中心“中国权威学术期刊”称号。2007 年《园艺学报》总被引频次 4213 次，影响因子 1.323。

《园艺学报》为月刊，每月 25 日出版。2010 年每期定价 40.00 元，全年 480.00 元。国内外公开发行，全国各地邮局办理订阅，国内邮发代号 82 - 471，国外发行由中国国际图书贸易总公司承办，代号 M448。漏订者可直接寄款至本编辑部订购。

编辑部地址：北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部；

邮政编码：100081；电 话：(010) 82109523。

E-mail: yuanyixuebao@126.com。网址：http://www.ahs.ac.cn