

李 娟,曹芳芳,权 哲,等. 山葡萄黄烷酮 3-羟化酶 *VamF3H* 基因及其克隆[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):36-40.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.010

# 山葡萄黄烷酮 3-羟化酶 *VamF3H* 基因及其克隆

李 娟,曹芳芳,权 哲,刘海峰

(延边大学农学院,吉林延吉 133000)

**摘要:**采用 RT-PCR 与 RACE 技术相结合的方法,从山葡萄果皮中克隆到黄烷酮 3-羟化酶(F3H)基因的 cDNA 全长序列。该基因全长 1 398 bp,包含 1 092 bp 的完整开放阅读框,编码 363 个氨基酸,相对分子质量为 40.81 ku,等电点(PI)值为 5.37。二级结构预测表明,随机卷曲是 *VamF3H* 蛋白最大量的结构元件,不具有信号肽,属于不稳定亲水蛋白。氨基酸序列与欧亚种葡萄(FQ389950)、圆叶葡萄(KF040970)、美国蔓藤(JX087441)等的 F3H 类基因同源性较高,相似性分别为 99%、99%、96%。

**关键词:**山葡萄;cDNA 克隆;黄烷酮 3-羟化酶

**中图分类号:**S663.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0036-05

黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)是花色素合成途径中的结构基因,是花青素生物合成途径中的关键酶<sup>[1]</sup>。F3H 属于依赖 2-酮戊二酸的双加氧酶,反应需要 2-酮戊二酸、分子氧、铁、抗坏血酸<sup>[2]</sup>。其作用为催化柚皮素 C3 位羟基化,生成二氢山奈酚(dihydrokaempferol, DHK),而 DHK 是黄酮和异黄酮合成的重要中间产物;因此, F3H 调控着黄酮与花青素苷产物的合成,是整个黄酮类化合物代谢途径的中枢位点<sup>[3]</sup>。有报道指出 F3H 与花青苷合成关系密

切<sup>[4]</sup>,然而此方面的研究尚较少。Holton 等发现 F3H 对黄烷酮、儿茶酸、原花青素、花青素代谢影响较大,是该代谢途径的关键酶<sup>[3]</sup>。Lepiniec 等研究证实,由 F3H 和 F3'H 催化生成的黄烷酮醇在 DFR 的催化作用下能够合成无色花青素<sup>[5]</sup>。F3H 的活性最初在紫罗兰花中被检测到<sup>[6]</sup>。Martin 等利用鉴别筛选与基因图谱技术首次从金鱼草中分离克隆到 *F3H* 基因<sup>[7]</sup>。研究表明, *F3H* 基因在矮牵牛等植物中是独立表达的,而大多数情况下, F3H 与其上游的 *CHS*、*CHI* 基因,以及下游的 *DFR* 基因协同表达<sup>[8]</sup>。在大多数物种中, *F3H* 基因仅以单拷贝形式存在<sup>[9-11]</sup>。

山葡萄别称野葡萄,最初发现于我国东北和俄罗斯远东地区,在我国主要分布于吉林省长白山、黑龙江省完达山、小兴安岭、辽宁省北部等地<sup>[12]</sup>。山葡萄是我国重要的野生果树资源,具有极强的抗寒性,是东北地区酿造葡萄酒的主要原料<sup>[13]</sup>,其浆果含有大量花色苷。目前,分子生物技术已广泛

收稿日期:2015-04-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260067)。

作者简介:李 娟(1989—),女,吉林长春人,硕士研究生,主要从事山葡萄基因克隆及 cDNA 文库构建的研究。E-mail:lijuanyanda@163.com。

通信作者:刘海峰,博士,副教授,主要从事山葡萄分子生物学研究。E-mail:shiyanshiqixiang@163.com。

in wheat are pleiotropic or closely linked[J]. Theoretical and Applied Genetics,2011,122(1):239-249.

[8] Herrera - Foessel S A, Singh R P, Huerta - Espino J, et al. *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics,2012,124(8):1475-1486.

[9] Li Z F, Lan C X, He Z H, et al. Overview and application of QTL for adult plant resistance to leaf rust and powdery mildew in wheat[J]. Crop Science,2014,54(5):1907-1925.

[10] 袁军海,刘太国,陈万权. 中国 47 个小麦新品种(系)苗期抗叶锈基因推导[J]. 中国农业科学,2007,40(9):1925-1935.

[11] Zhao X L, Zheng T C, Xia X C, et al. Molecular mapping of leaf rust resistance gene *LrZH84* in Chinese wheat line Zhou 8425B[J]. Theoretical and Applied Genetics,2008,117(7):1069-1075.

[12] 李 星,李在峰,李亚宁,等. 小麦品系西农 1163-4 抗叶锈病基因的遗传分析和分子作图[J]. 中国农业科学,2010,43(12):2397-2402.

[13] Zhou Y, Xia X, He Z, et al. Fine mapping of leaf rust resistance gene *LrZH84* using expressed sequence tag and sequence-tagged site markers, and allelism with other genes on wheat chromosome 1B

[J]. Phytopathology,2013,103(2):169-174.

[14] Long D L, Kolmer J A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*[J]. Phytopathology,1989,79:525-529.

[15] Roelfs A P, Singh R P, Saari E E. Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management[M]. Mexico: CIMMYT,1992.

[16] Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, et al. Location of  $\beta$ -amylase sequences in wheat and its relatives[J]. Theoretical and Applied Genetics,1988,75(2):286-290.

[17] Li Z F, Xia X C, He Z H, et al. Seedling and slow rusting resistance to leaf rust in Chinese wheat cultivars[J]. Plant Disease,2010,94(1):45-53.

[18] Luig N H, McIntosh R A. Location and linkage of genes on wheat chromosome 2D[J]. Canadian Journal of Genetics and Cytology,1968,10,99-105.

[19] He Z H, Rajaram S, Xin Z Y, et al. A History of wheat breeding in China[M]. Mexico: CIMMYT,2001.

[20] 吴立人,杨华安,袁文焕,等. 1985—1990 年我国小麦条锈菌生理专化研究[J]. 植物病理学报,1993,23(3):79-84.

应用于葡萄遗传育种的各个领域,加速了葡萄遗传学图谱、基因的克隆表达、新基因的分离鉴定等研究的进展<sup>[14]</sup>。*F3H* 基因已在玉米、矮牵牛花、水母雪莲等很多植物中克隆得到并且定性<sup>[15]</sup>。在拟南芥、茄子、苜蓿、葡萄、苹果、柑橘、梨、康乃馨、翠菊、日本牵牛等植物中均克隆到了 *F3H* 基因,但未见山葡萄中 *F3H* 基因的相关报道。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术相结合的方法克隆 *F3H* 基因,获得全长序列,并进行生物信息学分析,旨在为阐明山葡萄花色苷的生物合成及调控奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试山葡萄品种为双丰 (*Vitis amurensis* Shuang Feng), 采自国家山葡萄种质资源圃。采摘无病虫害、饱满的成熟果粒,立即置于液氮中冷冻,并于 -80 °C 冰箱保存,取其果皮作为供试材料。

1.1.2 菌株、酶、生化试剂 Tris-HCl、CTAB、EDTA、无水 LiCl、 $\beta$ -巯基乙醇、DEPC 水、AMP、IPTG、X-gal 均为 AITiresco 分装试剂;大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、pMD19-T 载体、*Taq* 酶、Marker DL 2 000 均购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;反转录酶 SuPerscriptII 购自 invitrogen 公司;SMARTTM RACE 试剂盒购自 Clontech 公司;其他试剂均为国产分析纯。引物由英俊生物技术有限公司合成,DNA 测序由上海生工生物公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 登录 NCBI 网站,根据 GenBank 中已登陆的 *F3H* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列,通过多序列比对确定其共有的保守区,利用 Primer 6.0 软件设计 1 对特异引物用来扩增目的片段。上游引物 F1: 5'-TGTCTGGTG-GCAAGAAAGGC-3';下游引物 F2: 5'-CGAGGGTGAGGTCT-GGCTGT-3'。

以该引物扩增出的序列设计 5'RACE 和 3'RACE 引物,分别为: F3H-a: 5'-AGCGTCCTTGCCAAATCCA-3'; F3H-s: 5'-CGTTTCCAGCCATCTTCA-3'。

1.2.2 山葡萄果皮总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 采用改良的 CTAB<sup>[16]</sup> 法提取山葡萄果皮中的总 RNA。采用紫外分光光度计测定其 230、260、280 nm 处的吸光度及总 RNA 浓度,用 1% TAE 检测 RNA 的完整性。

按照 Invitrogen 公司的 SuperScript II 反转录酶试剂盒说明书,以 Oligo(dT)20 为引物、总 RNA 为模板进行逆转录反应,合成 cDNA 的第 1 条链。

1.2.3 PCR 扩增目的基因片段 以山葡萄 cDNA 第 1 链为模板,用引物 F1、F2 进行 PCR 扩增。50  $\mu$ L 反应体系包括: 2.0  $\mu$ L cDNA、5.0  $\mu$ L 10 $\times$  Ex *Taq* Buffer (Me<sup>2+</sup> free)、0.4  $\mu$ L Ex *Taq* (5 U/ $\mu$ L)、36.6  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、F1 和 F2 引物各 1.0  $\mu$ L。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min, 于 4 °C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并回收纯化目的片段。

1.2.4 5'RACE 和 3'RACE 法获得基因片段 参照 SMARTTM RACE 试剂盒说明书,以逆转录分别合成的 5'-RACE-

Ready-cDNA 和 3'-RACE-Ready-cDNA 为模板,以 F3H-a、F3H-s 分别同 UPM 为引物,进行 5'RACE、3'RACE 扩增以获得 5'端片段、3'端片段。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min, 于 4 °C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测以确定条带。

1.2.5 目的片段的回收和连接 按照胶回收试剂盒说明书对 PCR 产物的 DNA 片段进行回收、连接、转化。将回收的 DNA 片段与 pMD-18 载体连接,于 16 °C 连接 3 h。反应体系为 pMD-18 载体 0.5  $\mu$ L、DNA 片段 4.5  $\mu$ L、Solution I 5.0  $\mu$ L。

1.2.6 转化 将 DH5 $\alpha$  感受态细胞解冻后,取 50  $\mu$ L 加入 10  $\mu$ L 连接产物,冰浴 30 min; 取出后热激 90 s,并置于冰上 2~3 min; 加入预热的 LB 液体培养基 300  $\mu$ L,于 37 °C、190 r/min 培养 1 h; 取适量菌液涂布于含有 AMP、X-Gal、IPTG 的 LB 固体培养基平板上,于 37 °C 培养箱中倒置培养过夜。次日,挑白色单克隆置于 37 °C 摇床中,200 r/min 培养 12 h。随后进行菌液 PCR 检测,将成功克隆的菌样测序。

### 1.3 *VamF3H* 基因序列及其编码蛋白质的生物信息学分析

利用 DNASTAR 软件查找 *VamF3H* 基因的开放阅读框 (ORF) 并推导其氨基酸序列; 利用 NCBI 的 BLAST 程序检索数据库,对 *VamF3H* 基因全长 cDNA 序列及其氨基酸序列进行比对分析; 利用 ProtParam 在线软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析 *VamF3H* 基因编码蛋白质的理化性质; 运用 ProtScale 在线软件 (<http://ca.expasy.org/tools/protscale.html>)、TMHMM 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)、SignalP 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 对所编码蛋白质的亲水性、疏水性、跨膜结构域、信号肽进行分析; 通过 ExPASy 中的 HNN 工具分析其蛋白质序列的二级结构; 采用 GeneDoc 软件进行多序列比对,并采用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树。

## 2 结果与分析

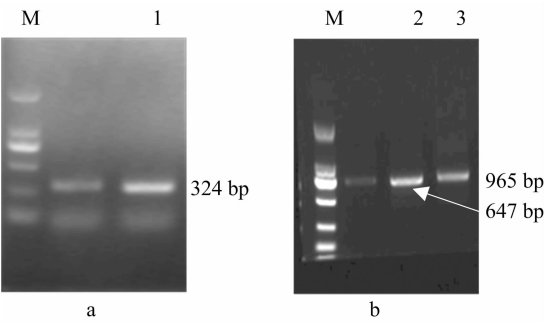
### 2.1 山葡萄 *VamF3H* 基因 cDNA 全长的克隆及序列分析

以山葡萄果皮总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,用特异引物 F1 和 F2 扩增出 1 条 324 bp 的预期片段 (图 1-a)。经 Blastn 分析发现,该序列与其他物种 *F3H* 基因高度同源,与欧亚种葡萄 (FQ389950) 的同源性高达 99%,初步确认其为山葡萄 *F3H* 基因的核心序列。根据所得中间段序列设计末端扩增的特异引物 F3H-a 和 F3H-s,经 RACE 扩增、产物克隆、测序后,分别得到长度为 965 bp 的 3'末端和 647 bp 的 5'末端 (图 1-b)。将 RT-PCR 和 RACE 扩增片段进行序列拼接得到 *VamF3H* 基因 cDNA 全长序列,最终获得 1 条长为 1 398 bp 的 cDNA 全长序列,经 Blastn 比对发现,该 cDNA 序列与其他物种的 *F3H* 基因同源。

经 DNASTAR 软件分析发现,该 cDNA 包含 1 个 1 092 bp 的完整开放阅读框、214 bp 的 3'-非翻译区、92 bp 的 5'-非翻译区,推测其编码 363 个氨基酸。GenBank 登录号为 KP966099,将其命名为 *VamF3H*。

### 2.2 *VamF3H* 基因编码蛋白质的理化性状

利用 ProParam 软件在线预测分析 *VamF3H* 基因编码蛋



a—*VamF3H*基因中间片段检测结果；b—*VamF3H*基因3'RACE、5'RACE检测结果；M—DL 2 000；1—*F3H*的中间片段；2—3'RACE扩增产物；3—5'RACE扩增产物

图1 *VamF3H*基因 PCR 结果检测

白的理化性质,发现该蛋白由 363 个氨基酸组成,相对分子质量(MV)为 40.81 ku,等电点值为 5.37。组成 *VamF3H* 蛋白的 20 种氨基酸中亮氨酸(Leu)含量最高,达到 9.9%；半胱氨酸(Cys)、色氨酸(Trp)含量最少,仅为 1.4%。正电荷残基

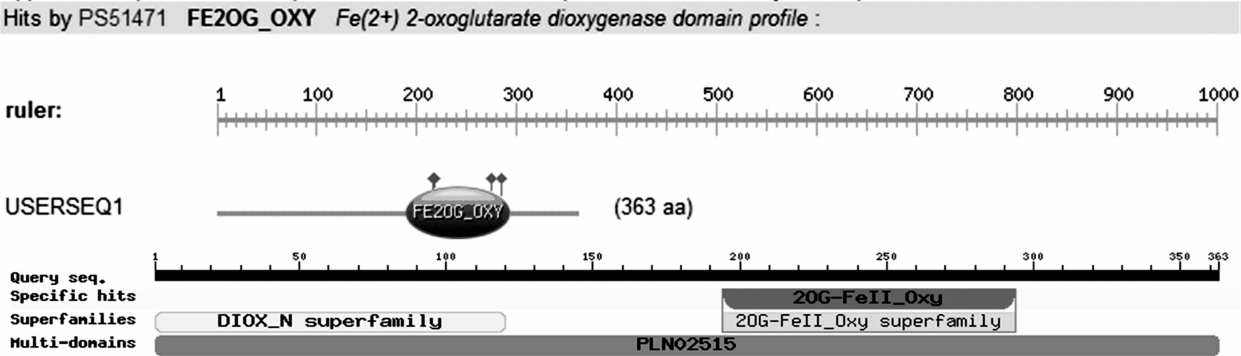


图2 *VamF3H*基因编码蛋白的功能结构域

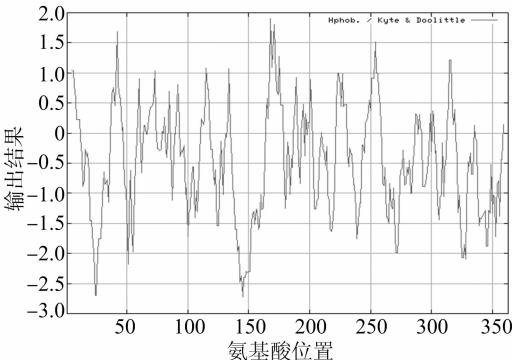


图3 *VamF3H*基因编码蛋白序列的亲水性分析

2.5 *VamF3H* 蛋白的跨膜结构域

根据 TMHMM、TMPred Server 网站分析,超过 500 分才被认为显著。可见 *VamF3H* 蛋白无跨膜螺旋,故可推测 *VamF3H* 不含有跨膜结构域。

2.6 *VamF3H* 蛋白的信号肽预测及二级结构

利用 SignalP 4.1 Server 软件对山葡萄 *VamF3H* 基因蛋白进行信号肽预测。结果表明,*VamF3H* 基因编码的蛋白不具有信号肽。

利用 HNN 软件在线预测 *VamF3H* 基因的二级结构(图 4)。该蛋白的二级结构由 48.48% 的无规卷曲(random

(Arg + Lys)数为 45 个,负电荷残基(Asp + Glu)数为 55 个,不稳定指数为 44.25,脂肪指数为 84.33,表明 *VamF3H* 基因蛋白属于不稳定蛋白质。

2.3 *VamF3H* 蛋白保守区预测

利用 NCBI 的 BlastP 程序,在蛋白保守区数据库预测山葡萄 *VamF3H* 基因的蛋白保守区。结果表明,*VamF3H* 具有 2-酮戊二酸的双加氧酶(2-ODD)结构域、非血红素双加氧酶结构域。*VamF3H* 具有特征性结构域 FE2OG\_OXY PS51471(图 2),属于双加氧酶家族。

2.4 *VamF3H* 蛋白的亲水性

利用 ProtScale 程序分析山葡萄 *VamF3H* 基因氨基酸序列的亲水性及疏水性(图 3)。图中纵坐标为氨基酸标度值,横坐标为氨基酸序列位置。依据氨基酸分值越低亲水性越强、分值越高疏水性越强的规律,可明显看出疏水性最大值在第 168 位点,值为 1.900;最小值在第 145 位点,值为 -2.722。总平均亲水性指数为 -0.444,整体表现为亲水性。

coil)、32.78% 的  $\alpha$ -螺旋(alpha helix)、18.73% 的  $\beta$ -折叠(extended strand)组成。

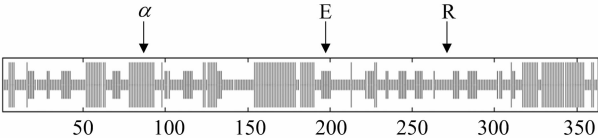


图4 *VamF3H*基因编码蛋白的二级结构预测

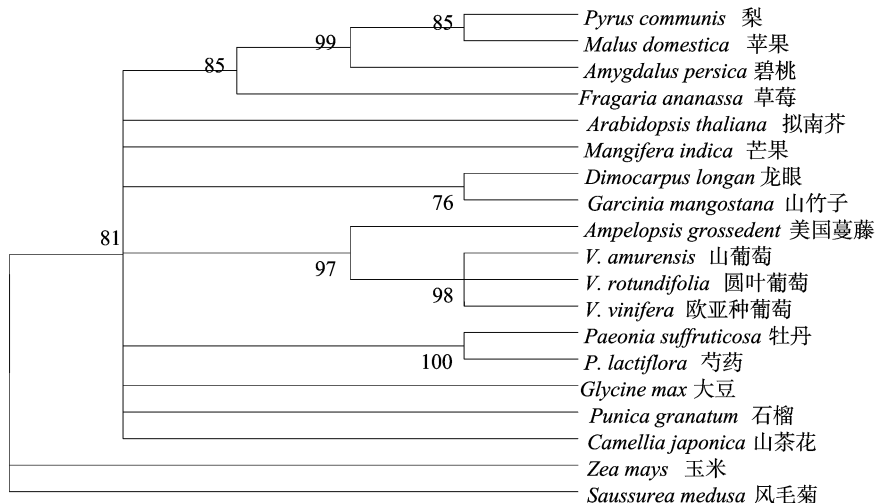
2.7 山葡萄 *VamF3H* 编码蛋白质的同源性及进化

登陆 NCBI 主页,利用 BlastP 在线软件将克隆得到的 *VamF3H* 基因编码氨基酸序列进行同源性搜索比较。结果表明,该基因与欧亚种葡萄(FQ389950)、圆叶葡萄(KF040970)、美洲种葡萄(JX087441)、桑树(KF438044)等的 *F3H* 类基因同源性较高,相似性分别为 99%、99%、96%、81%。利用 GeneDoc 软件对包括 *VamF3H* 在内 10 个物种的 *F3H* 基因编码的氨基酸序列进行多重比对分析(图 5),图中划线部分为保守结构域。

为进一步分析 *VamF3H* 与其他植物 *F3H* 之间的进化关系,在多重比对的基础上,利用 Mega 6.0 软件对该基因及其他植物 *F3H* 基因的氨基酸序列进行系统进化分析(图 6)。结果表明,山葡萄 *VamF3H* 基因与欧亚种葡萄、圆叶葡萄、美国蔓藤的同源性最高,与梨、风毛菊等亲缘关系较远。

V. amurensis:	MAFT--L-TALAGEKTIQSSFVRDEDERPKVAYNDFSNELPVISLGLDIEVGRDRDEICRKIVEACEDWGIF	: 70
V. vinifera:	MAFT--L-TALAGEKTIQSSFVRDEDERPKVAYNDFSNELPVISLGLDIEVGRDRDEICRKIVEACEDWGIF	: 71
V. ashei	MAH--L-TALAGEKTIQSSFVRDEDERPKVAYNDFSNELPVISLGLDIEVGRDRDEICRKIVEACEDWGIF	: 24
Paeonia suffruti:	MAH--L-TALAGEKTIQSSFVRDEDERPKVAYNDFSNELPVISLGLDIEVGRDRDEICRKIVEACEDWGIF	: 70
Ampelopsis grossedea:	MAFT--L-TALAGEKTIQSSFVRDEDERPKVAYNDFSNELPVISLGLDIEVGRDRDEICRKIVEACEDWGIF	: 71
G. hirsutum:	MAH--L-TALAGEKTIQSSFVRDEDERPKVAYNDFSNELPVISLGLDIEVGRDRDEICRKIVEACEDWGIF	: 70
Mangifera indica:	MAH--L-TALAGEKTIQSSFVRDEDERPKVAYNDFSNELPVISLGLDIEVGRDRDEICRKIVEACEDWGIF	: 70
P. lactiflo:	MAH--L-TALAGEKTIQSSFVRDEDERPKVAYNDFSNELPVISLGLDIEVGRDRDEICRKIVEACEDWGIF	: 71
Amygdalus persica:	MAH--L-TALAGEKTIQSSFVRDEDERPKVAYNDFSNELPVISLGLDIEVGRDRDEICRKIVEACEDWGIF	: 71
	map t lt ek l fvrddederpkvayn fs ip isl g d g r eic kiv aeedwg f	
V. amurensis:	QVVDHGVDANLISEMTRIAREFPALPPEEKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYPIRTRD	: 142
V. vinifera:	QVVDHGVDANLISEMTRIAREFPALPPEEKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYPIRTRD	: 143
V. ashei	QVVDHGVDANLISEMTRIAREFPALPPEEKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYPIRTRD	: 96
Paeonia suffruti:	QVVDHGVDANLISEMTRIAREFPALPPEEKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYPIRTRD	: 142
Ampelopsis grossedea:	QVVDHGVDANLISEMTRIAREFPALPPEEKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYPIRTRD	: 143
G. hirsutum:	QVVDHGVDANLISEMTRIAREFPALPPEEKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYPIRTRD	: 142
Mangifera indica:	QVVDHGVDANLISEMTRIAREFPALPPEEKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYPIRTRD	: 142
P. lactiflo:	QVVDHGVDANLISEMTRIAREFPALPPEEKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYPIRTRD	: 58
Amygdalus persica:	QVVDHGVDANLISEMTRIAREFPALPPEEKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYPIRTRD	: 143
	q hgv d l s Mtr lAREFPALPeeKLRPFDMSGGKGGFIVSSHLOGEAVQDWREIVTYFSYP6 RD	: 143
V. amurensis:	YSRWPDKPEGWRSVTQYSEKLMGLACKLLEVLSEAMLEKALTNACVDMQKVVVNFYPCFQPDLTGL	: 214
V. vinifera:	YSRWPDKPEGWRSVTQYSEKLMGLACKLLEVLSEAMLEKALTNACVDMQKVVVNFYPCFQPDLTGL	: 215
V. ashei	YSRWPDKPEGWRSVTQYSEKLMGLACKLLEVLSEAMLEKALTNACVDMQKVVVNFYPCFQPDLTGL	: 168
Paeonia suffruti:	YSRWPDKPEGWRSVTQYSEKLMGLACKLLEVLSEAMLEKALTNACVDMQKVVVNFYPCFQPDLTGL	: 214
Ampelopsis grossedea:	YSRWPDKPEGWRSVTQYSEKLMGLACKLLEVLSEAMLEKALTNACVDMQKVVVNFYPCFQPDLTGL	: 215
G. hirsutum:	YSRWPDKPEGWRSVTQYSEKLMGLACKLLEVLSEAMLEKALTNACVDMQKVVVNFYPCFQPDLTGL	: 214
Mangifera indica:	YSRWPDKPEGWRSVTQYSEKLMGLACKLLEVLSEAMLEKALTNACVDMQKVVVNFYPCFQPDLTGL	: 214
P. lactiflo:	YSRWPDKPEGWRSVTQYSEKLMGLACKLLEVLSEAMLEKALTNACVDMQKVVVNFYPCFQPDLTGL	: 130
Amygdalus persica:	YSRWPDKPEGWRSVTQYSEKLMGLACKLLEVLSEAMLEKALTNACVDMQKVVVNFYPCFQPDLTGL	: 215
	YSRWPDKPEGW VT YSEKLMGLACK6LeVLSEAM L k ALT ACVDMQKVV6N5YP CF2PdLTGL	: 215
V. amurensis:	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOATRDGCKTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	: 286
V. vinifera:	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOATRDGCKTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	: 287
V. ashei	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOATRDGCKTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	: 240
Paeonia suffruti:	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOATRDGCKTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	: 286
Ampelopsis grossedea:	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOATRDGCKTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	: 287
G. hirsutum:	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOATRDGCKTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	: 286
Mangifera indica:	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOATRDGCKTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	: 286
P. lactiflo:	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOATRDGCKTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	: 202
Amygdalus persica:	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOATRDGCKTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	: 287
	KRHTDPGTITILLQDQVGGLOAT4D GkTWITVQPVGAFVFNLDGHHGHLNNGFRFNKADHQAQVNSNSRL	
V. amurensis:	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEKAVLEGPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLKAKEC-LQ---DVEKAKL	: 353
V. vinifera:	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEKAVLEGPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLKAKEC-LQ---DVEKAKL	: 357
V. ashei	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEKAVLEGPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLKAKEC-LQ---DVEKAKL	: 307
Paeonia suffruti:	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEKAVLEGPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLKAKEC-LQ---DVEKAKL	: 349
Ampelopsis grossedea:	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEKAVLEGPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLKAKEC-LQ---DVEKAKL	: 351
G. hirsutum:	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEKAVLEGPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLKAKEC-LQ---DVEKAKL	: 353
Mangifera indica:	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEKAVLEGPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLKAKEC-LQ---DVEKAKL	: 269
P. lactiflo:	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEKAVLEGPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLKAKEC-LQ---DVEKAKL	: 354
Amygdalus persica:	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEKAVLEGPITFAEMYRRKMSKDLELARLKLKAKEC-LQ---DVEKAKL	: 351
	SIATFQNPAPPEATVYPLKIREGEK 66E PIT5 eMY4 KM3KD6EIA4LKK ak2q q Ek 1	
V. amurensis:	ESKPIDQILA	: 363
V. vinifera:	ESKPIDQILA	: 367
V. ashei	ESKPIDQILA	: 317
Paeonia suffruti:	ESKPIDQILA	: 359
Ampelopsis grossedea:	ESKPIDQILA	: 361
G. hirsutum:	ESKPIDQILA	: 363
Mangifera indica:	ESKPIDQILA	: 368
P. lactiflo:	ESKPIDQILA	: 279
Amygdalus persica:	ESKPIDQILA	: 364
	ESKPIDQILA	: 361

图5 山葡萄VamF3H与其他植物的F3H氨基酸多序列比对



*P. communis* (KC460396); *M. domestica* (NM\_001293954); *A. persica* (XM\_007202045); *F. ananassa* (XM\_004287766); *A. thaliana* (AAC68584); *M. indica* (KF929410); *D. longan* (ABO48521); *G. mangostana* (ACM62745); *A. grossedentata* (JX087441); *V. rotundifolia* (KF040970); *V. vinifera* (FQ389950); *P. suffruticosa* (KJ466966); *P. lactiflora* (JQ070802); *G. max* (NP\_001236797); *P. granatum* (AHZ97872); *C. japonica* (JN944581); *Z. mays* (NP\_001105695); *S. medusa* (AF509338)

图6 不同物种 F3H 类基因构建的分子进化树

### 3 结论与讨论

本研究利用同源克隆和 RACE 技术相结合的方法,从山葡萄果皮中克隆获得 F3H 的同源基因 VamF3H,并对其编码的蛋白质进行生物信息学分析。二级结构预测发现,该蛋白的二级结构以无规卷曲为主,其次为  $\alpha$ -螺旋,再次为  $\beta$ -折叠,无其他二级结构元件,此预测结果与已报道的草莓、葡萄、海棠 F3H 蛋白的二级结构一致<sup>[17]</sup>。保守结构域分析表明,该基因编码的蛋白具有典型 2-O-酮戊二酸和  $\text{Fe}^{2+}$ -依赖的双加氧酶家族(2OG-Fe II\_Oxy)的保守结构域,该结构域中含有与铁离子结合所需的组氨酸、天冬氨酸,以及与 2-O-酮戊二酸结合所需的精氨酸、丝氨酸保守位点,这些都是植物双加氧酶超家族基因的典型特征。系统进化分析显示,VamF3H 与同属的欧亚种葡萄 F3H 亲缘关系最近,而与蔷薇科的梨、菊科的风毛菊亲缘关系较远,可见 VamF3H 的进化具有明显的种属特性。

从以上核苷酸、氨基酸较高的相似系数可知,F3H 基因在进化上较为保守,因为 F3H 仅以单拷贝形式存在于大多数物种中,提示 F3H 基因可能在花青素生成中具有重要地位。单拷贝基因比多拷贝基因更易于调控,且 F3H 基因在进化上保守性很高,少数几个碱基的突变就可能造成基因失活,从而阻碍花青素的生成。目前,关于控制花青素生成的研究主要集中于控制花青素生成的结构酶,并通过转入结构酶的基因以获得结构酶的过量表达,从而增加花青素的生成,而关于调控结构酶的基因或调控因子的研究尚未见报道;因此,研究花色素调控基因比单纯研究结构酶更具有意义。

通过获得的 F3H 基因 cDNA 全长序列,可在以下方面做进一步研究。验证 F3H 基因在山葡萄中是否为单拷贝存在。F3H 基因在很多物种中均以单拷贝存在,而葡萄中的 F3H 则为 2 个拷贝<sup>[18-20]</sup>,因此推测 VamF3H 也同为 2 个拷贝。可使用 Southern Blot 技术验证 F3H 基因在山葡萄的果皮、果肉、根、茎、叶、种子等部位中是否为 2 个拷贝。将已有的 F3H 基因作为探针,与山葡萄基因组文库杂交,可获得 F3H 基因组 DNA 序列,以进行内含子组成、外显子组成、结构预测等分子生物学分析,为山葡萄花色素的研究提供分子生物学基础。

#### 参考文献:

- [1] 张 龙,李卫华,姜淑梅,等. 花色苷生物合成与分子调控研究进展[J]. 园艺学报,2008,35(6):909-916.
- [2] 张学英,张上隆,骆 军,等. 果实花色苷合成研究进展[J]. 果树学报,2004,21(5):456-460.
- [3] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. The Plant Cell,1995,7(7):1071-1083.
- [4] Zuker A, Tzfira T, Ben - Meir H, et al. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3 - hydroxylase gene[J]. Molecular Breeding,2002,9(1):33-41.
- [5] Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids[J]. Annual Review of Plant Biology,2006,

57:405-430.

- [6] Forkmann G, Heller W, Grisebach H. Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana*. Flavanone - 3 - hydroxylase and flavonoid - 3' - hydroxylase[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C - A Journal of Biosciences,1980,35(9/10):691-695.
- [7] Martin C, Prescott A, Mackay S, et al. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus* [J]. Plant Journal,1991,1(1):37-49.
- [8] Britsch L, Ruhnau - Brich B, Forkmann G. Molecular cloning, sequence analysis, and in vitro expression of flavanone 3 beta - hydroxylase from *Petunia hybrida* [J]. The Journal of Biological Chemistry,1992,267(8):5380-5387.
- [9] Deboog B, Albertsen M C, Taylor L P. Flavanone 3 -  $\beta$  - hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinate in Maize anthers[J]. Plant Journal,1995,7(5):703-713.
- [10] Charrier B, Coronado C, Kondorosi A, et al. Molecular characterization and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavanone - 3 - hydroxylase and dihydroflavonol - 4 - reductase encoding genes[J]. Plant Molecular Biology,1995,29(4):773-786.
- [11] Pelletier M K, Shirley B W. Analysis of flavanone 3 - hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase[J]. Plant Physiology,1996,111(1):339-345.
- [12] 葛玉香,沈育杰,李晓红,等. 山葡萄种质资源评价与利用研究现状[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2000(4):16-20.
- [13] 沈育杰,赵淑兰,杨义明,等. 我国山葡萄种质资源研究与利用现状[J]. 特产研究,2006,28(3):53-57.
- [14] 王 军. 生物技术与葡萄遗传育种[J]. 中国农业科学,2009,42(8):2862-2874.
- [15] Jin Z P, Grotewold E, Qu W Q, et al. Cloning and characterization of a flavanone 3 - hydroxylase gene from *Saussurea medusa* [J]. DNA Sequence,2005,16(2):121-129.
- [16] Daldoul S, Chenenanoui S, Mliki A, et al. Improvement of an RNA purification method for grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for cDNA library construction[J]. Acta Physiologiae Plantarum,2009,31(4):871-875.
- [17] Shen H X, Zhang J, Yao Y C, et al. Isolation and expression of *McF3H* gene in the leaves of crabapple[J]. Acta Physiologiae Plantarum,2012,34(4):1353-1361.
- [18] Sparvoli F, Martin C, Scienza A, et al. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. Plant Molecular Biology,1994,24(5):743-755.
- [19] Jeong S T, Goto - Yamamoto N, Kobayashi S, et al. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins [J]. Plant Science,2004,167(2):247-252.
- [20] Waters D L, Holton T A, Ablett E M, et al. cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin [J]. Functional & Integrative Genomics,2005,5(1):40-58.