

甘林鑫,李厚华,李 果,等. 凤丹牡丹二氢黄酮醇-4-还原酶基因克隆及表达特性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(10):73-79.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.10.013

# 凤丹牡丹二氢黄酮醇-4-还原酶基因 克隆及表达特性分析

甘林鑫<sup>1</sup>, 李厚华<sup>1</sup>, 李 果<sup>2</sup>, 刘鹏远<sup>1</sup>, 韩美玲<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学,陕西杨凌 712100; 2. 莱布尼茨汉诺威大学,德国汉诺威)

**摘要:**以凤丹种皮为材料,克隆花青素生物合成中的关键基因 *DFR*,并进行功能验证。结果表明,凤丹 *DFR* 基因含有长度为 1 092 bp 的开放阅读框(ORF),共编码 364 个氨基酸。其中,凤丹 *DFR* 蛋白的相对分子量为 40 796.17 u,理论等电点(PI)为 5.76。实时荧光定量分析凤丹牡丹种子 4 个发育阶段的 *PoDFR* 基因表达水平,结果表明,在凤丹种子发育过程中,*PoDFR* 基因的表达水平先增加后减少,在 S2 时期达到最高。构建 *PoDFR* 基因的原核表达载体并在大肠杆菌中表达以获得 *PoDFR* 的原核表达蛋白。体外酶促反应和高效液相色谱法表明,*PoDFR* 蛋白可以催化二氢槲皮素合成无色花青素,通过与 PoANS 蛋白结合合成花青素,证明 *PoDFR* 基因具有相应的功能活性。

**关键词:**凤丹牡丹;*DFR* 基因;二氢槲皮素;花青素;表达特性;功能

**中图分类号:**S685.110.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)10-0073-07

凤丹牡丹,别称铜陵牡丹,栽培历史悠久,因其结实量大,栽培管理方便,已成为油用牡丹的主要品种<sup>[1]</sup>。然而,在实际生产榨油和使用过程中,由于成熟的牡丹种子外壳呈现黑色(图 1),压榨后的原油会出现有异味的黑色物质,降低了牡丹原油的品质,而脱壳又会降低出油量。因此,研究黑色物质合成的相关基因,可以为下一步在基因工程层面上改善凤丹牡丹的种壳特性提供理论依据<sup>[2]</sup>。研究发现,类黄酮物质是牡丹种壳中的主要色素成分,包含花青素类、黄酮类和原花青素类<sup>[3]</sup>,*DFR* 基因作为类黄酮合成途径中的关键基因,还未在凤丹牡丹中被克隆。*DFR* (dihydroflavonol 4-reductase, 二氢黄酮醇-4-还原酶)可以催化二氢黄酮醇合成无色的天竺葵素、飞燕草素或矢车菊素,再结合 ANS (anthocyanidin synthase) 催化合成有色花青素<sup>[4-6]</sup>。

为了解凤丹牡丹种皮中 *DFR* 基因的表达和调控,通过 RT-PCR 从凤丹牡丹种壳中克隆了类黄酮

合成途径的重要基因 *DFR*,并分析该基因的生物学信息。通过原核表达的方法获得该基因翻译的相应蛋白,再进行酶促反应,利用高效液相色谱法验证该基因的功能,分析了凤丹牡丹中类黄酮化合物代谢的分子机制。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 植物材料与菌株

本试验以凤丹牡丹种子为材料,于西北农林科技大学牡丹种质资源圃中分别采集白色期、变色期、褐色期、黑色期的凤丹种子(图 2),在液氮中快速冷冻后,将其储存在 -80 ℃ 冰箱中用于基因克隆及表达分析。

### 1.2 凤丹总 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 OMEGA Plant Total RNA 提取盒进行 RNA 提取,根据说明书操作。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用紫外分光光度计检测浓度。以每个时期总 RNA 为模板,使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser,先消除基因组 DNA 后,反转录合成 cDNA 第一链,置于 -80 ℃ 备用<sup>[7-8]</sup>。

### 1.3 基因克隆

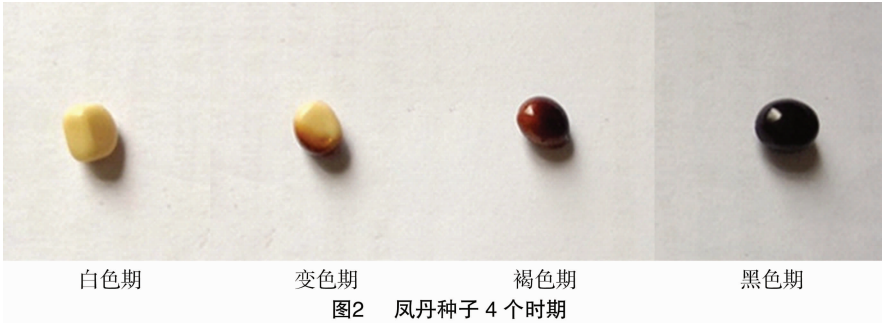
基于 NCBI 上其他植物的 *DFR* 基因序列,使用软件 Primer 5.0 设计引物(表 1)。以逆转录获得的 cDNA 为模板,用 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶高保真酶扩增靶基因全长,琼脂糖凝胶电泳检测反应结果。

收稿日期:2019-05-06

基金项目:公益性行业(林业)科研重大专项(编号:201404701);国家自然科学基金(编号:31570697)。

作者简介:甘林鑫(1994—),女,云南昆明人,硕士,主要从事园林植物分子生物学研究。E-mail:597807188@qq.com。

通信作者:李厚华,博士,教授,主要从事园林植物研究。E-mail:lihoushua73@163.com。



扩增条件为 98 ℃ 预变性 1 min;98 ℃ 变性 10 s, 58 ℃ 退火 5 s,72 ℃ 延伸 1 min(35 个循环);将反应在 72 ℃ 延伸 5 min,在 4 ℃ 下储存。在 1% 琼脂糖凝胶上检测扩增产物,纯化并回收目标条带,把回收产物连接到 pGEM - T 载体上,通过热击法转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,经蓝白斑筛选和菌落 PCR 验证后,将阳性菌液培养过夜,送至公司进行测序<sup>[9-11]</sup>。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
DFRf	ATGGAAGCAGTGACCGAGT
DFRr	TTAGATTGTATCATTAACATGG
nrDFRf	TCGCGGATCCGAATTCATGGAAGCAGTGACCGAGT
nrDFRr	GTGCGGCCGCAAGCTTTTAGATTGTATCATTAACAT
nrANSf	TCGCGGATCCGAATTATGCTGAATTCAGTAGCTCC
nrANSr	GTGCGGCCGCAAGCTTCAATTCTTAAACTCTTCTTGG
qDFRf	AACCTGCTGGAGTGACAT
qDFRr	GCTTCATTACCTGTGATTGG
qANSf	AGGAGAAGATCATACTCAAG
qANSr	TCAATTCTTAAACTCTTCT
qTUBf	TGAGCACCAAAGAAGTGACGAAC
qTUBr	CACACGCCTGAACATCTCCTGAA

1.4 生物信息学分析

使用 NCBI BLAST 进行氨基酸序列的同源分析,利用 ExPASyProtParam Tool(<http://web.expasy.org/protparam/>), HNN SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD, Swiss - Model Workplace(<http://swissmodel.expasy.org/>)和 TMGMM 2.0 等

软件进行蛋白质各级结构预测。编码蛋白的修饰位点检测在 KinasePhos (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>)中完成<sup>[12-15]</sup>。

1.5 *PoDFR* 基因的表达分析

用不同时期的种皮 cDNA 为模板,选用牡丹  $\beta$ -微管蛋白基因 *beta - Tubulin* (登录号: EF608942)为实时定量反应的参考基因<sup>[2]</sup>。采用 SYBR Green 法在 Applied Biosystems StepOne Plus 实时定量 PCR 仪上按照仪器说明进行试验。每个样品重复 3 次,并使用 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup> 方法进行数据分析<sup>[16]</sup>。

1.6 *PoDFR* 基因的原核表达分析

首先用 *EcoRI*、*Hind* III 双酶切线性化处理原核表达载体 pET - 28a<sup>[17]</sup>。基于载体切口两端的 15 bp 同源序列设计特异性引物 nrDFRf 和 nrDFRr (表 1)。使用 cDNA 作为模板,高保真酶扩增靶基因,并通过凝胶电泳检测回收产物和线性化载体,在重组酶的作用下进行连接。根据热激法连接产物转移至 DH5 $\alpha$  感受态细胞,并在过夜培养后挑斑用于 PCR 验证。将验证后的阳性细菌溶液送去测序以确保没有位点突变。在 37 ℃ 下培养合格的阳性细菌溶液过夜后,提取质粒并转移到大肠杆菌 BL21( DE3)感受态细胞中。在证实为正确且没有位点突变的重组载体菌液过夜培养后,将 LB 液体培养基稀释 50 倍并继续培养直至 *D*<sub>600 nm</sub> 约为 0.6。通过加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导外源基因的表达,并分别在 0、2、4、6、8 h 后收集细菌溶液,同时用 PET - 28a 载体作为对照。确定了最佳诱导时间后,IPTG 的终浓度分别设定为 0、0.2、0.4、0.6、

0.8、1.0 mmol/L, 以确定最佳诱导浓度并收集诱导菌液。吸取上清液进行 SDS - PAGE 电泳。考马斯亮蓝染色后, 再脱色并拍照保存<sup>[18-19]</sup>。

### 1.7 原核表达蛋白酶促反应

通过获得的最佳诱导方法诱导重组蛋白, 并使用溶菌酶法提取蛋白质。诱导后, 4 ℃ 收集菌液, 4 000 r/min 离心 5 min, 去除上清液, 用 Buffer (100 mmol/L Tris - HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 μg/mL 的溶菌酶, pH 值 8.0) 重悬, 室温条件下孵育 15 min, 超声 15 ~ 20 s, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液<sup>[20]</sup>。根据 DFR 蛋白的特性, 使用二氢槲皮素作为反应的底物, 选择粗提蛋白作为催化剂进行酶促反应, 并设定对照组 PET - 28a 诱导提取蛋白。将单独 DFR 原核表达蛋白催化、DFR 和 ANS 原核表达蛋白联合催化设置为 2 个试验组。反应条件为 30 ℃、30 min, 结束后保存于 4 ℃。

### 1.8 高效液相色谱法检测

通过日立 L - 2000 高效液相色谱仪检测酶促反应物, 检测器为 L - 2455 型二极管阵列检测器, 检测波长为 200 ~ 700 nm, C<sub>18</sub> 柱 (Hitachi, Japan, 250 nm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 40 ℃, 进样量为

10 μL, 流速为 0.5 mL/min。流动相参数 A: 0.04% 甲酸水溶液, B: 乙腈 (色谱级)。采用梯度洗脱, 洗脱程序为 0 ~ 40 min, A 为 0 ~ 95%, B 为 5% ~ 100%; 40 ~ 60 min, A 为 0, B 为 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PoDFR* 基因的序列与分析

以凤丹牡丹的 cDNA 为模板, 通过 RT - PCR 扩增 *PoDFR* 基因全长, 获得 1 000 bp 的基因序列 (图 3)。它包含 1 个完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 共有 1 095 个碱基编码 364 个氨基酸残基 (图 4)。

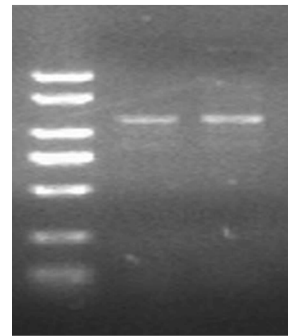


图3 凤丹 *DFR* 基因扩增产物

```

1      ATGGAAGCAGTGACCGAGTGCGATGCTGAAACCGTGTGTGTACCGGCGCGGCGGGGTTCT
1      M E A V T E C D A E T V C V T G A A G F
61     ATCGGTTTCATGGCTTGTCATGCGACTTCTGGAACATGGCTACGTCGTCGAGCCACAGTG
21     I G S W L V M R L L E H G Y V V R A T V
121    CGGGATCCAGAGAATATGAGGAAGGTGAAGCATTGTTGGATTGGCCAAAAGCGGATACC
41     R D P E N M R K V K H L L D L P K A D T
181    CATTGACCCTGTGGAAGCGGACCTTTTGGTGGATGGAAGCTTTGATGAAGCCATTAA
61     H L T L W K A D L L V D G S F D E A I K
241    GGATGCACCGGAGTTTCCATGTTGCCACACCCATGGATTTFAGTCCAAGGACCTTGAG
81     G C T G V F H V A T P M D F F E S K D P E
301    AATGAAGTGATAAAGCCAACAATAGATGGAATGTTAAGCATCATGAGAGCATGTGCCAAG
101    N E V I K P T I D G M L S I M Y I C S A C A K
361    GCTAAACTGTGCGGAGAGTCGTTTTACGTCATCTGCAGAACATTAAACGTTCAACAG
121    A K T T V R R V V F T S S A G T I N V Q Q
421    CATCAACAGTCGGTGTATGATGAAACCTGCTGGAGTGACATGGAGTTTATTCAGACTAAA
141    H Q Q S V Y D E T C W S D M E F I Q T K
481    AAGATGACTGGATGGATGTTATTCGTGTCCAAGATCCTGGCTGGGCAAGCTGCATGGA
161    K M T G W M Y F V S K I L A G Q A A W K
541    TTTGCTAAAGAACAGTATTGACTTCATCAGTATCATACCAACTCTAGTAGTGGGTCCT
181    F A K E N S I D F I S I I P T L V V G P
601    TTTCTCATGCCATCCATGCCACCTAGTCTTGTAACTGCACTTTCTCCAATCACAGGTAAT
201    F L M P S M P P S L V T A L S P I T G N
661    GAAGCTCATTATTCAATTATAAAGCAAGGTCAATTCGTGCACTTGGATGACCTTTGCACT
221    E A H Y S I I K Q G Q F V H L D D L C T
721    GCTCATATATACTTATTCGAGCACCACAAAGTAGAGGTCGCTACATTTGTTCTCCTACAT
241    A H I Y L F E H P K V E G R Y I C S S H
781    GATGCTACCATTTCTCAGCCTTGCAAAAATGCTTAGAGAAAAATATCCTGAGTATAATGTC
261    D A T I L S L A K M L R E K Y P E Y N V
841    CCTACAGAATTCAAAGACGTGGATGAGACTTGAAGAGTGTCTCTTTCTCTTCAAAAAG
281    P T E F K D V D E S L K S V S F S S K K
901    TTAATGGACTCTGGGTTGAATCAAGTACAACCTTAGAGGACATGTTTGTGCGAGCTATT
301    L M D S G F E F K Y N L E D M F V G A I
961    GAAACATGCAGAGAAAAGGGATTGCTTCCACTTCCTGTGGAAGAAACCATTTTTTAGGA
321    E T C R E K G L L P L P V E K N H F L G
1021   GCTATTGAAACATGCCGAGGAAAGGGATTGCTTCCACTTCCCATGGAAGAAACCATGTT
341    A I E T C R G K G L L P L P M E R N H V
1081   AATGACACAATCTAA
361    N D T I *
```

图4 凤丹 *PoDFR* 基因 cDNA 序列及其编码氨基酸序列

2.2 *PoDFR* 基因的生物信息学分析

用 Blast 比较凤丹牡丹的 *DFR* 基因序列与 NCBI 中其他植物的 *DFR* 基因序列,结果表明,凤丹牡丹 *DFR* 基因与芍药 *DFR* 基因( GenBank 登录号: JQ070804.1)、枫香 *DFR* 基因( GenBank 登录号: JX944785.1)、圆叶葡萄 *DFR* 基因( GenBank 登录号: KC460268.1)的同源性分别为 97%、83%、80%,与胡杨 *DFR* 基因( GenBank 登录号: XM011009150.1)、欧洲草莓 *DFR* 基因( GenBank 登录号: KC894052.1)、杂交月季 *DFR* 基因( GenBank 登录号: AY780885.1)等的同源性也在 70% 以上。凤丹 *PoDFR* 蛋白相对分子质量为 40 796.17 u,通过 Expsasy Protparam 在线预测 *PoDFR* 蛋白氨基酸成分及比例如表 2 所示。

表 2 *PoDFR* 氨基酸成分

氨基酸	数量	比例(%)	氨基酸	数量	比例(%)
Ala(A)	24	6.6	Leu(L)	32	8.8
Arg(R)	12	3.3	Lys(K)	26	7.1
Asn(N)	10	2.7	Met(M)	15	4.1
Asp(D)	21	5.8	Phe(F)	18	4.9
Cys(C)	9	2.5	Pro(P)	18	4.9
Gln(Q)	8	2.2	Ser(S)	24	6.6
Glu(E)	26	7.1	Thr(T)	24	6.6
Gly(G)	21	5.8	Trp(W)	5	1.4
His(H)	12	3.3	Tyr(Y)	9	2.5
Ile(I)	21	5.8	Val(V)	29	8.0

利用 CELLO v.2.5 在线软件预测 *PoDFR* 蛋白在真核生物中的亚细胞定位,发现它在细胞质中具有最高的定位概率,可靠性为 4.063。其理化性质详见表 3。

表 3 *PoDFR* 理化性质

项目	<i>PoDFR</i> 蛋白
理论等电点	5.76
负电荷残基( Asp + Glu )	47
正电荷残基( Arg + Lys )	38
消光系数	41 410
哺乳动物体内半衰期	30 h
不稳定系数	34.26( stable )
脂溶指数	86.48
总平均疏水性	-0.077

HNN 用于预测凤丹 *PoDFR* 的二级结构。结果表明,*PoDFR* 由 35.44% 的  $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -helices), 17.86% 的延伸链(extended strands)和 46.79% 的无规则卷曲(random coils)组成。*PoDFR* 蛋白的三级结构预测如图 5 所示。分析了 *PoDFR* 蛋白的保守结构域(图 6),*PoDFR* 蛋白具有典型的 PLN02650 结构特征,其是 *DFR* 蛋白的特定位点,因此推测该蛋白是 *DFR*。

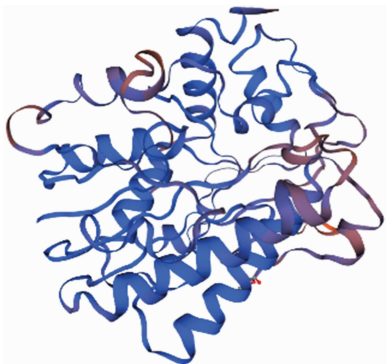


图5 凤丹 *PoDFR* 蛋白结构预测

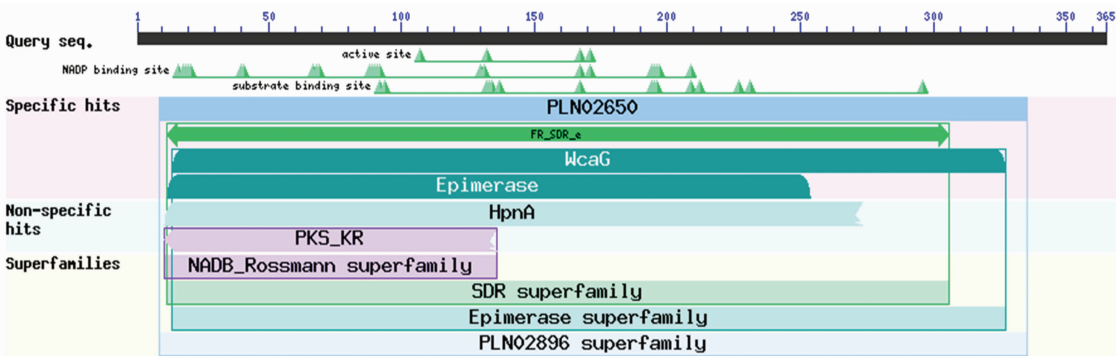


图6 *PoDFR* 蛋白保守结构域

由激酶 Phos 预测 *PoDFR* 的蛋白磷酸化位点含有 2 个丝氨酸磷酸化位点(分别位于 297、304 氨基酸)和 3 个苏氨酸磷酸化位点(分别位于 39、123、322 氨基酸)和 1 个酪氨酸磷酸化位点(255 氨基

酸)(图 7)。

2.3 *PoDFR* 基因表达分析

根据 *DFR* 基因序列,使用特异引物,通过实时定量方法(real-time PCR)对凤丹种壳发育过程中



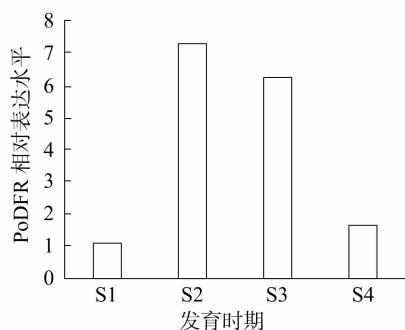
Locations (AA)	Phosphorylated Sites	HMM Bit Score	E-value	Catalytic Kinases	Predictive Models	
					HMMs	Logo
39	VVRA <b>T</b> VRDP	0.1	4.7	PKC	HMM	
123	AKAK <b>T</b> VRRV	4.0	0.46	PKC	HMM	
255	VEGR <b>Y</b> ICSS	-1.2	9.9	EGFR	HMM	
297	SVSF <b>S</b> SKKL	-3.2	28	cdc2	HMM	
304	KLMD <b>S</b> GFEP	-4.1	27	ATM	HMM	
322	GAIE <b>T</b> CREK	-2.0	15	PKC	HMM	

图7 PoDFR 蛋白磷酸化位点分析

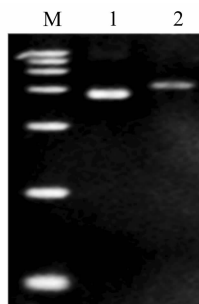
*DFR* 基因的表达量进行分析。结果(图 8)显示,*DFR* 基因在 S2 时期达到最高表达水平,是 S1 时期的 7.31 倍;S2 时期后,*DFR* 基因的表达量逐渐降低。

## 2.4 原核表达分析

2.4.1 重组载体 pET - PoDFR 原核表达载体 pET - 28 的双切线性化处理 a 质粒,如图 9 所示,由



S1~S4 分别表示白色期、变色期、褐色期、黑色期  
图8 凤丹种壳发育过程中 *DFR* 基因的相对表达水平



1—pET-28a 质粒;  
2—pET-28a 双酶切结果  
图9 pET-28a 质粒双酶切



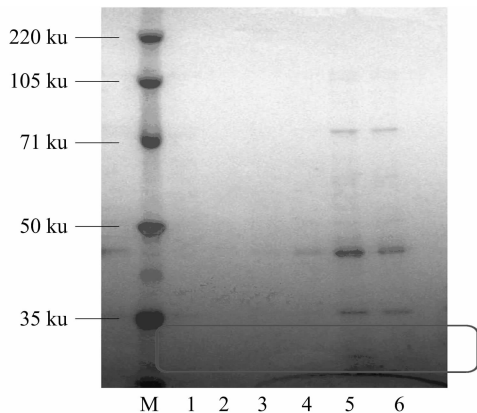
图10 重组质粒 pET-PoDFR PCR 验证

2.4.2 重组蛋白的诱导表达 诱导重组表达载体表达具有约 45 000 u 的相对分子量的特定蛋白质条带。PoDFR 蛋白大小为 40 796.17 u,加上原核表达载体 pET - 28a 表达的约 3 400 u 的融合标签,与预期相符合(图 11、图 12)。此外,诱导约 6 h 后, PoDFR 的表达水平最高。外源蛋白的表达水平明显高于载体 pET - 28a 本身的表达水平,从中可以得出,这是诱导的最佳时间。而 PoDFR 表达量在 0.2 mmol/L IPTG 浓度诱导下外源蛋白表达量最高,结果表明这是最佳诱导浓度。

## 2.5 酶促反应

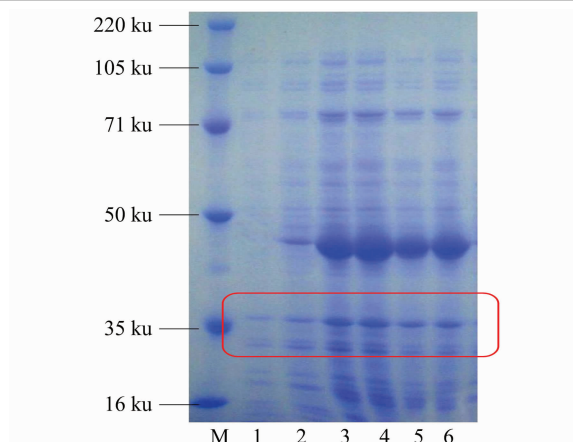
使用在前一步骤中获得的最佳条件诱导外源 PoDFR 在大肠杆菌中的表达,底物是二氢槲皮素。

于各种形式,在载体被消化之前,存在多个电泳条带,并且消化后的载体和预期的大小基本相同。如图 10、图 11 所示,有一个阳性转化体存在于重组载体 pET - PoDFR 中。在验证阳性转化体被摇动过夜并进行测序后,与第一次测序结果相比没有发现突变位点,因此表明成功构建了原核表达载体。



M—marker; 1—空载体 pET-28a 诱导结果; 2~6—1 mmol/L IPTG 诱导 0、2、4、6、8 h 后表达结果

图11 pET-PoDFR 蛋白不同时间诱导表达结果

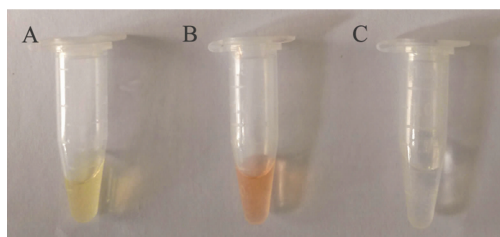


M—marker; 1—空载体 pET-28a 诱导结果; 2~6—IPTG 浓度分别为 1、0.8、0.6、0.4、0.2 mmol/L, 诱导 6 h 后表达结果

图12 pET-PoDFR 蛋白不同 IPTG 浓度诱导表达结果

在 NADPH 和粗蛋白提取物的作用下, 仅用 PoDFR 蛋白的催化进行酶促反应, 二氢槲皮素的颜色变暗; PoANS 蛋白质结合起来催化, 颜色迅速变红 (图 13), 可以发现 B 管反应的颜色明显比 A 管中 PoDFR 单独反应的颜色更红。PoANS 的催化底物为无色花青素, 可初步推断二氢槲皮素在 PoDFR 蛋白的催化下合成了无色花青素。对照组空载体 pET-28 蛋白质提取物与二氢槲皮素反应, 没有任何颜色变化。

## 2.6 高效液相色谱分析



A—PoDFR; B—PoDFR 和 PoANS 联合反应;  
C—空载体 pET-28a

图13 PoDFR 酶促反应结果

将前一步获得的酶促反应物液体于 520 nm 波长下检测。结果显示, 在空载体 pET-28a 中没有检测到吸收峰 (图 14), PoDFR 和 PoANS 的联合反应物检测到吸收峰 (图 15), 结合酶促反应的结果表明, PoDFR 和 PoANS 联合催化出了花青素, 两者都具有催化反应性。而 ANS 催化合成花青素的反应底物是无色花青素, 证明了 *DFR* 基因能够将二氢槲皮素催化合成无色花青素。进一步说明了本试验克隆的 *DFR* 基因是与凤丹相对应的花青素催化合成的相关基因。

## 3 结论与讨论

在该研究中, 通过 RT-PCR 技术获得 *PoDFR* 基因序列。凤丹 *DFR* 基因的生物信息学分析表明,

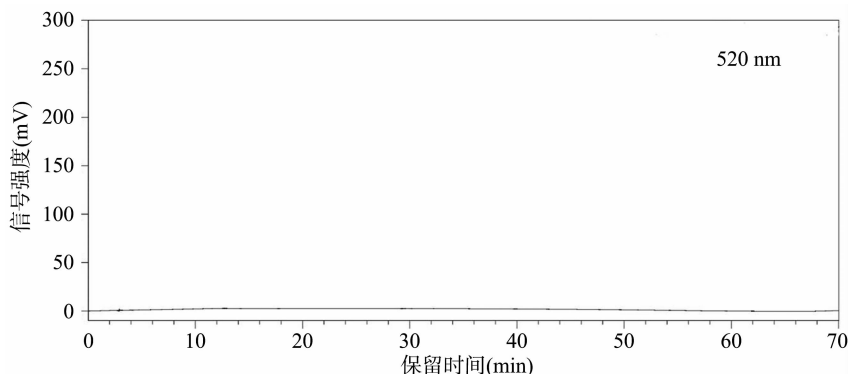


图14 空载体 pET-28a 高效液相色谱

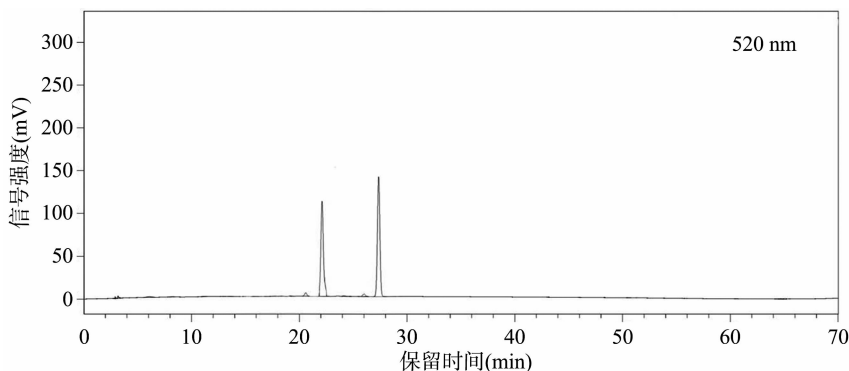


图15 PoDFR 和 PoANS 的联合反应物高效液相色谱

它与芍药 *DFR* 基因具有最高同源性,达到 97%,证明了芍药与牡丹有着十分接近的亲缘关系,*PoDFR* 蛋白也具有典型的 *DFR* 保守结构域。

*DFR* 基因表达量与花青素合成密切相关。本试验实时定量结果表明,*PoDFR* 基因的表达量在 S2 时期达到最高,然后表达水平逐渐下降。可能是在早期阶段,作为合成花青素的上游基因 *DFR* 蛋白,催化合成了大量的无色花青素,在后期,则需要 *ANS* 基因将无色花青素催化合成为花青素,*DFR* 基因不参与花青素合成的后期反应。

本研究成功构建了 pET - *PoDFR* 原核表达载体,IPTG 诱导了外源基因的原核表达蛋白。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳确定 6 h 为原核表达载体最佳的表达时间。结果表明,常用的 1 mmol/L IPTG 诱导浓度不适用于该原核表达载体,可能因为高浓度的 IPTG 抑制了大肠杆菌细胞的正常生长活性,此浓度不利于外源基因在质粒载体上的表达。在确定 0.2 mmol/L IPTG 作为原核表达载体的最佳浓度后,聚丙烯酰胺凝胶电泳还显示原核表达的蛋白与预测位置处的空载体明显不同。此外,它在大肠杆菌中表达的蛋白中占比较高,这也表明 IPTG 的诱导促进了插入质粒载体 pET - 28a 上的外源基因的表达。

牡丹中的花青素主要是矢车菊素和芍药素,二氢槲皮素是这 2 种花青素的上游前体,因此,用二氢槲皮素作为原核表达 *PoDFR* 的催化反应底物。结果显示,*PoDFR* 原核表达的粗蛋白提物可以催化二氢槲皮素合成无色花青素,无色花青素不稳定,在自然条件下转化为红色花青素,而对照组空载体原核表达蛋白粗提物没有发生相应的颜色变化,证实获得的 *DFR* 基因具有相应的功能活性。同时,本研究还利用李果等获得的 *PoANS* 原核表达蛋白粗提物<sup>[21]</sup>与 *PoDFR* 蛋白联合催化,发现反应产物比 *PoDFR* 单独催化时更红。再用高效液相色谱法进行验证,在 520 nm 波长下,空载体没有检测到吸收峰,而 *PoANS* 与 *PoDFR* 联合催化的反应物检测到了吸收峰,这也进一步证明了 *DFR* 是凤丹牡丹花青素合成的相关基因。本研究旨在通过 RNAi 及病毒干扰技术干扰花青素合成途径的下游基因,调节花青素的合成与积累,为培育具有经济价值和观赏价值的凤丹新品种奠定一定的理论基础。

#### 参考文献:

[1]覃逸明,聂刘旺,黄雨清,等. 凤丹(*Paeonia ostii* T.) 自毒物质的

检测及其作用机制[J]. 生态学报,2009,29(3):1153-1161.

- [2]李育材. 中国油用牡丹工程的战略思考[J]. 中国工程科学, 2014,16(10):58-63.
- [3]魏新翠. 油用牡丹类黄酮合成酶基因的克隆及表达分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [4]姚红,周平,范雨昕,等. 中国水仙 *DFR* 基因启动子的克隆及功能[J]. 应用与环境生物学报,2019,25(4):993-998.
- [5]李亚丽,李欣,肖婕,等. 二氢黄酮醇-4-还原酶在花青素合成中的功能及调控研究进展[J]. 西北植物学报,2018,38(1):187-196.
- [6]梁立军,杨祎辰,王二欢,等. 植物花青素生物合成与调控研究进展[J]. 安徽农业科学,2018,46(21):18-24.
- [7]孟祥春,彭建宗,王小菁. 光和糖对非洲菊花色苷积累及 *CHS*、*DFR* 基因表达的影响[J]. 园艺学报,2007,34(1):227-230.
- [8]张波,赵志常,高爱平,等. 芒果二氢黄酮醇 4-还原酶(*DFR*) 基因的克隆及其表达分析[J]. 分子植物育种,2015,13(4):816-821.
- [9]焦淑珍,刘雅莉,娄倩,等. 葡萄风信子二氢黄酮醇 4-还原酶基因(*DFR*)的克隆与表达分析[J]. 农业生物技术学报,2014,22(5):529-540.
- [10]黄兴琳,陆俊杏,廖冰楠,等. 油用牡丹 *PsFAD6* 基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种,2017,15(12):4867-4871.
- [11]李方殷. 葡萄风信子花色形成关键基因 *DFR* 原核表达及功能验证[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2018.
- [12]Gollop, R. Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region[J]. Journal of Experimental Botany,2002,53(373):1397-1409.
- [13]Marco B, Stefan B, Andrew W, et al. SWISS - MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. Nucleic Acids Research,2014,42(W1):W252-W258.
- [14]Li H, Qiu J, Chen F, et al. Molecular characterization and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) gene in *Saussurea medusa* [J]. Molecular Biology Reports,2012,39(3):2991-2999.
- [15]周琳,王雁. 我国油用牡丹开发利用现状及产业化发展对策[J]. 世界林业研究,2014,27(1):68-71.
- [16]王亚杰,李厚华,付婉艺,等. 水母雪莲红色细胞系类黄酮含量和相关基因表达[J]. 生物工程学报,2014,30(8):1225-1234.
- [17]田振东. 羽衣甘蓝粉色叶相关基因 *DFR* 的克隆及表达载体构建[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2018.
- [18]Yu C S, Lin C J, Hwang J K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on *n*-peptide compositions[J]. Protein Science,2004,13(5):1402-1406.
- [19]袁玉辉,朱守晶,邹杰,等. 芥菜型油菜 *BjuA09DFR* 基因及其启动子的克隆与转化和表达[J]. 西北植物学报,2019,39(1):24-31.
- [20]许志茹,刘通,崔国新,等. 茺菁二氢黄酮醇 4-还原酶基因的克隆与功能鉴定[J]. 园艺学报,2014,41(4):687-700.
- [21]李果,李厚华,张延龙,等. 凤丹牡丹 *ANS*(*PoANS*) 基因克隆、特性及表达[J]. 东北林业大学学报,2016,44(7):64-69.