

- [5] Ducreux L J M, Morris W L, Hedley P E, et al. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of β -carotene and lutein[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 56(409): 81–89.
- [6] Maass D, Arango J, Wüst F, et al. Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels[J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6373.
- [7] Kim M J, Kim J K, Kim H J, et al. Genetic modification of the soybean to enhance the β -carotene content through seed-specific expression[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e48287.
- [8] Hurtado-Hernandez H, Smith P G. Inheritance of mature fruit color in *Capsicum annuum* L. [J]. Journal of Heredity, 1985, 76(3): 211–213.
- [9] Lefebvre V, Kuntz M, Camara B, et al. The capsanthin-capsorubin synthase gene; a candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 36(5): 785–789.
- [10] Popovsky S, Paran I. Molecular genetics of the y locus in pepper; its relation to capsanthin-capsorubin synthase and to fruit color[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101(1): 86–89.
- [11] Thorup T A, Tanyolac B, Livingstone K D, et al. Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae[J]. PNAS, 2000, 97(21): 11192–11197.
- [12] Huh J H, Kang B C, Nahm S H, et al. A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* spp.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102(4): 524–530.
- [13] Tian S L, Li L, Chai W G, et al. Effects of silencing key genes in the capsanthin biosynthetic pathway on fruit color of detached pepper fruits[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 314–325.
- [14] Kormos J, Kormos K. Die genetischen typen der carot-enoid-systeme der paprikafrucht[J]. Acta Bot Acad Sci Hung, 1960, 6: 305–319.
- [15] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): e45.
- [16] Marchler-Bauer A, Anderson J B, Chitsaz F, et al. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: D205–D210.
- [17] Tran D, Haven J, Qiu W G, et al. An update on carotenoid biosynthesis in algae: phylogenetic evidence for the existence of two classes of phytoene synthase[J]. Planta, 2009, 229(3): 723–729.
- [18] Busch M, Seuter A, Hain R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco[J]. Plant Physiology, 2002, 128(2): 439–453.
- [19] Just B J, Santos C A F, Fonseca M E N, et al. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114(4): 693–704.
- [20] Li F Q, Tsfadia O, Wurtzel E T. The phytoene synthase gene family in the grasses: subfunctionalization provides tissue-specific control of carotenogenesis[J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(3): 208–211.
- [21] Gallagher C E, Matthews P D, Li F Q, et al. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses [J]. Plant Physiology, 2004, 135(3): 1776–1783.
- [22] Li F Q, Tsfadia O, Wurtzel E T. The phytoene synthase gene family in the Grasses: subfunctionalization provides tissue-specific control of carotenogenesis [J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(3): 208–211.
- [23] Zhu C F, Yamamura S, Koiwa H, et al. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea* [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48(3): 277–285.
- [24] Ampomah-Dwamena C, Dejnopratt S, Lewis D, et al. Metabolic and gene expression analysis of apple (*Malus × domestica*) carotenogenesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(12): 4497–4511.
- [25] 朱海生, 李永平, 温庆放. 草莓八氢番茄红素合成酶基因的克隆及其表达特性[J]. 中国农业科学, 2011, 44(2): 349–357.
- [26] Kopsell D A, Kopsell D E. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(10): 499–507.
- [27] Cazzonelli C I, Pogson B J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 266–274.
- [28] Han Y J, Wang X H, Chen W C, et al. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans* [J]. Tree Genetics & Genomes, 2014, 10(2): 329–338.
- [29] Han Y J, Wu M, Cao L Y, et al. Characterization of OfWRKY3, a transcription factor that positively regulates the carotenoid cleavage dioxygenase gene *OfCCD4* in *Osmanthus fragrans* [J]. Plant Molecular Biology, 2016, 91(4): 485–496.

谭政委,鲁丹丹,李 磊,等. 红白忍冬花青素合酶编码基因 *rLjANS1* 的克隆、表达分析及其与花色苷积累的关系[J]. 江苏农业科学,2022,50(21):69–75.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.21.010

红白忍冬花青素合酶编码基因 *rLjANS1* 的克隆、表达分析及其与花色苷积累的关系

谭政委,鲁丹丹,李 磊,余永亮,许兰杰,董 薇,杨红旗,杨 青,李春明,安素妨,梁慧珍

(河南省农业科学院芝麻研究中心,河南郑州 450002)

摘要:花青素合成酶是植物花青素合成途径中的关键酶,为了探究花青素合成酶编码基因在红白忍冬花色苷合成中的作用,在分析忍冬、红白忍冬转录组数据的基础上,用逆转录 PCR(RT-PCR)技术从红白忍冬中分离得到 1 个编码花青素合成酶基因的全长 cDNA 序列,将其命名为 *rLjANS1*。测序结果表明,该基因的开放阅读框为 1 068 bp,编码 355 个氨基酸。生物信息学分析结果显示,*rLjANS1* 编码蛋白具有植物 ANS 特有的 2OG-Fe II_Oxy 氧化酶结构域,与蓝果忍冬、榴莲、雷公藤、三七等植物 ANS 蛋白序列的同源相似性较高,荧光定量 PCR 和花色苷含量相关性分析结果表明,*rLjANS1* 基因表达量与花色苷含量呈明显正相关,说明 *rLjANS1* 在红白忍冬花色苷代谢及色泽形成过程中具有重要作用。研究结果为深入研究红白忍冬色泽形成机制奠定了基础。

关键词:红白忍冬;花青素合成酶;生物信息学分析;相关性分析

中图分类号:S567.7⁺90.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)21-0069-07

金银花为大宗中药材,来源于忍冬科植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb.)的花蕾或待初开的花。金银花中含有丰富的挥发油、黄酮类、有机酸类、三萜类和环烯醚萜类等化学成分,因其具有抗菌消炎、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老等功效,具有重要的临床药用价值^[1]。此外,金银花属于中华人民共和国国家卫生健康委员会公布的 110 种药食同源名录品种之一,其提取物已被广泛应用于香料、化妆品、食品饮料等领域^[2]。

红白忍冬 [*Lonicera japonica* Thunb. var. *chinensis* (Wats.) Bak.] 是一个忍冬自然变异的自变种,其幼枝呈紫黑色,幼叶带紫红色,花冠外面呈紫红色,里面呈白色。与忍冬相比,红白忍冬中绿

原酸、花色苷(anthocyanins)含量较高且挥发油种类更多^[3],香味更加浓郁,并且具有更强的抗寒性、耐旱性,花期长且开花时间比忍冬早,四季长青,因此也具有较高的观赏价值和茶饮价值。

花色苷是一类天然水溶性色素,广泛存在于植物的花、根、茎、叶及果实等多种组织中,使这些组织呈现红色、蓝色或粉色。花色苷在植物的生长发育和抗逆反应中都起着重要作用,主要包括抗氧化、抗紫外胁迫及吸引昆虫与食草动物前来传播花粉和种子等^[4]。此外,花色苷还具有抗炎、抗肿瘤、调节血脂等生物活性^[5-6],因此可见,作为一种天然存在的色素,花色苷在应用到食品添加剂方面具有良好的前景^[7]。花青素的生物合成涉及许多类黄酮生物合成的必需结构基因,包括苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate-4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸:辅酶 A 连接酶(4-coumarate:coenzyme A ligase, 4CL)、查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮-3-羟化酶(flavanone-3-hydroxylase, F3H)、二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol-4-reductase, DFR)、花青素合成酶[(anthocyanin synthase (ANS), 又称 leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX)]及 UDP 类黄酮葡萄糖基转移酶(UDP flavonoid

收稿日期:2022-05-25

基金项目:河南省科技攻关计划项目(编号:222102110379、222102110466);国家现代农业产业技术体系项目(编号:CARS-21);河南省农科院自主创新专项基金(编号:2022ZC64);河南省农科院新兴学科发展专项(编号:2021XK03、2022XK03);河南省中央引导地方科技发展专项自由探索类项目(编号:YDZX20214100001804);河南省科技基础条件专项资金(编号:2022ZXZYQ01)。

作者简介:谭政委(1983—),男,山东安丘人,博士,助理研究员,主要从事植物遗传育种及植物功能基因组学相关研究。E-mail:zhwtan@126.com。

通信作者:梁慧珍,博士,研究员,主要从事植物遗传育种研究。E-mail:lhzh66666@163.com。

glucosyltransferase, UFGT)^[8]。

ANS 作为花色苷合成途径中重要的关键酶之一,已从拟南芥^[9]、草莓^[10]、红薯^[11]、可可树^[12]、百脉根^[13]等多种植物中得到克隆,ANS 的功能特性及表达量影响了植物花色苷的种类和含量,如龙胆花中 ANS 基因突变可导致花色变白^[14],金钟连翘中 ANS 的表达量决定了花青素含量^[15]。Yuan 等研究发现,红白忍冬中的花色苷以矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷为主,并且 *DFR* 基因结构变异是导致忍冬中花色苷含量较低的重要因素之一^[3],但是目前关于 ANS 基因表达量是否与红白忍冬花色苷含量有关的研究未见报道。为了探究 ANS 基因在红白忍冬花色苷合成中的作用,本研究以红白忍冬为材料,通过转录组数据分析、RT-PCR 方法等,从红白忍冬中克隆得到 *rLjANS1* 基因 cDNA 序列全长,随后对该基因进行生物信息学分析,用 qRT-PCR 对其表达模式进行分析,并对其表达量与花色苷含量进行相关性分析,以期红白忍冬花色苷生物合成和 *rLjANS1* 基因功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用红白忍冬于 2017 年种植于河南农业科学院现代农业研究开发基地,经河南省农业科学院芝麻研究中心梁慧珍研究员鉴定为忍冬的变种红白忍冬,在自然条件下生长。于 2021 年 4—5 月在河南农业科学院现代农业研究开发基地采取其根、茎、叶和不同发育时期的花,红白忍冬花发育时期参照忍冬花期划分标准,分为幼蕾期、三青期、二白期、大白期、银花期、金花期。每份样品设置 3 个生物学重复,每个生物学重复分成 2 份,分别用于基因、花色苷的定量分析,先将样品在液氮中速冻,然后转移至超低温冰箱中保存备用。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取所用 Quick RNA Isolation Kit 试剂盒购自北京华越洋生物科技有限公司,反转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)、pMD19-T 和荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa TB Green® Premix ExTaq™ II)均购自宝生物工程(大连)有限公司,KOD FX 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司,DNA 凝胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司,*Escherichia coli* DH5α 感受态

细胞由河南省农业科学院芝麻研究中心保存,引物合成和基因测序委托河南尚亚生物技术有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成 按照北京华越洋生物科技有限公司的试剂盒说明书提取样品的总 RNA,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对提取的总 RNA 的质量和完整性进行检测,用 NanoDrop 2000 分光光度计对总 RNA 进行定量,参照试剂盒说明书将总 RNA 反转录为第 1 链 cDNA。

1.3.2 *rLjANS1* 基因 cDNA 全长序列的克隆 根据笔者所在研究室构建的红白忍冬转录组数据库注释信息,筛选注释为“leucoanthocyanidin dioxygenase/anthocyanidin synthase”并有完整读码框的转录本,提取转录本的核酸序列,用 Primer Premier 5 软件目的基因引物,上游引物序列为 5'-ATGGTGACCACGATGTCCTCAAG-3',下游引物序列为 5'-TCATTTCTTCTCAAGAGCTTCTT-3'。以提取得到的不同花期的 cDNA 为模板,用 KOD 酶进行 PCR 扩增,得到基因全长 cDNA 序列,PCR 反应程序:95 ℃ 3 min;98 ℃ 10 s,58 ℃ 30 s,68 ℃ 60 s,30 个循环;68 ℃ 10 min。反应结束后,对 PCR 产物进行电泳并切取目的片段,回收后与 pMD19-T 载体连接,并用连接后的载体转化 DH5α 感受态细胞,通过 PCR 筛选阳性克隆,将菌液送往河南尚亚生物技术公司测序。

1.3.3 *rLjANS1* 蛋白的生物信息学分析 *rLjANS1* 蛋白的氨基酸组成、分子量、理论等电点及稳定性参数的分析通过在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)完成;通过美国国家生物信息中心(NCBI)在线查找软件 ORF finder 查找 *rLjANS1* 的开放阅读框(ORF);通过 NCBI 的 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对 *rLjANS1* 蛋白的保守结构域进行预测分析;使用在线工具 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)对 *rLjANS1* 蛋白的二级结构进行预测分析;通过 SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)完成 *rLjANS1* 蛋白的三级结构分析;分别用 SignalP-5.0 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)和 PSORT (<https://www.genscript.com/psort.html>)完成信号肽的预测和亚细胞定位分

析;用 DNAMAN 6.0 软件对 rLjANS1 蛋白及其同源蛋白的氨基酸序列进行多重比对;通过 MEGA 7.0 软件中的 Neighbor - Joining 构建 rLjANS1 蛋白的系统进化树,并通过 Bootstrap 方法对进化树进行检测,Bootstrap 值设置为 100。

1.3.4 *rLjANS1* 基因的表达模式分析 通过荧光定量 PCR 技术检测 *rLjANS1* 基因在不同组织部位及不同发育时期花中的表达量,用 Premier5 设计 *rLjANS1* 基因的荧光定量 PCR 引物,上游引物序列为 5' - CCCTCAACTGCCAACAAT - 3',下游引物序列为 5' - ATCACCCCCCTCCAT - 3';内标参比基因为 *Ct60S* 基因,上游引物序列为 5' - CATCCATTATCCAACAATC - 3',下游引物序列为 5' - AAGAGTAATCAGTCTCCA - 3'。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,40 个循环。通过熔解曲线分析目的基因 PCR 扩增的特异性,反应程序:从 55 ℃ 到 94 ℃,升温速度为 0.1 ℃/s。每个荧光定量 PCR 反应重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 相对定量法对基因进行表达水平的分析。

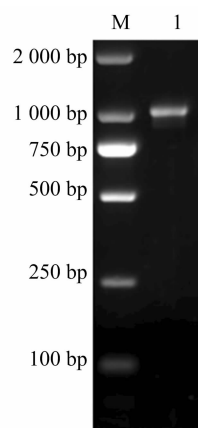
1.3.5 花色苷含量的测定及相关性分析 用 Wrolstad 等的 pH 示差法对花色苷含量进行定量分析^[16],称取 0.5 g 用液氮研磨的样品,加入 5 mL 提取液,混匀后于 4 ℃ 避光保存过夜,4 ℃ 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,分别检测样品在 pH 值为 1.0、4.5 时 520、700 nm 处的吸光度,用如下公式计算花色苷含量:花色苷含量 ($\mu\text{g/g}$) = $(D/\varepsilon L) \times Mm \times DF \times V/m \times 1\,000$ 。式中: $D = (D_{520\text{ nm}} - D_{700\text{ nm}})_{\text{pH}1.0} - (D_{520\text{ nm}} - D_{700\text{ nm}})_{\text{pH}4.5}$; ε 为矢车菊 - 3 - 葡萄糖苷消光系数(26 900); L 为比色皿光程(1 cm); Mm 为矢车菊 - 3 - 葡萄糖苷分子量(449.2); DF 为稀释因子; V 为最终体积(mL); m 为样品鲜质量(mg)。用 Excel 对 *rLjANS1* 基因的表达量与其对应样本花色苷含量进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 *rLjANS1* 基因的克隆

笔者所在课题组前期构建了忍冬、红白忍冬 S4 期的转录组,通过关键词“leucoanthocyanidin dioxygenase/anthocyanidin synthase”和 KEGG 编号“K05277”对转录组注释文件进行搜索,发现有 1 条序列 Cluster - 20471. 73376 注释为 anthocyanidin synthase,并且红白忍冬中 FPKM 值(354.02 ± 136.65)显著高于忍冬(0.91 ± 0.59)。为了对该基

因进行深入研究,笔者根据该注释基因序列设计引物并进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测。结果如图 1 所示,目的基因片段长度约 1 100 bp,与预测大小一致。测序结果表明,该基因 cDNA 序列长 1 068 bp,并且测序结果与转录组测序结果一致,具有完整的读码框,编码 355 个氨基酸(图 2)。通过 NCBI 保守结构域预测分析,发现该基因编码蛋白具有 ANS 蛋白典型的保守结构域 2OG - Fe II _Oxy 氧化酶结构域(图 3),因此将该基因命名为 *rLjANS1*。



M—DNA Marker DL2000; 1—cDNA 扩增产物

图1 *rLjANS1* 基因 PCR 扩增结果

2.2 *rLjANS1* 生物信息学分析

2.2.1 蛋白的理化性状、亚型胞定位、跨膜区域预测 通过 Prot Param 对 *rLjANS1* 蛋白进行分析,其分子式为 $\text{C}_{1807}\text{H}_{2863}\text{N}_{475}\text{O}_{541}\text{S}_{15}$,包含 5 701 个原子,相对分子量为 40.38 ku,理论等电点为 5.47。氨基酸组成及比例的分析结果表明,该蛋白中 Glu 数量最多,占 11.8%,Trp 数量最少,占 1.4%。带正电荷氨基酸残基、带负电荷氨基酸残基数分别是 45、56 个,脂肪系数为 88.17,亲水性指数为 -0.420,不稳定指数为 54.85,半衰期为 30 h,对以上数据的初步分析发现,*rLjANS1* 蛋白为不稳定的亲水性蛋白。通过 PSORT 对 *rLjANS1* 蛋白的亚细胞定位分析发现,该蛋白定位于细胞质中,用 SignalP 5.0 对其信号肽进行分析发现,*rLjANS1* 蛋白无信号肽,为非分泌蛋白;用 TMHMM 2.0 预测发现,该蛋白无跨膜区域,属于非膜蛋白。

2.2.2 *rLjANS1* 蛋白的空间结构分析 用 SOPMA 对 *rLjANS1* 的二级结构进行在线预测,统计结果显示,*rLjANS1* 蛋白的 4 种主要二级结构主要由无规则卷曲、 α - 螺旋、延伸链和 β - 折叠组成,其中无规

```
1  ATGGTGACCACGATGTCTCTCAAGAGTTGAAAGCCTGGCCAGTAGTGGGATCTTGTGTCATCCCAAAAGAGTACATC
1  M V T T M S S R V E S L A S S G I L S I P K E Y I
76  CGACCCAAAGAAGAACTACATAGTATTGGCAACATATTGAGGAAGAGATGAAAGAAGAAGGCCCTCAACTGCCA
26  R P K E E L T S I G N I F E E E M K E E G P Q L P
151  ACAATTGACTTAAAGATATCGAGTCTGAAGATAAAGAAGTGCCTGAAAAATGTCGCGAGGCTCTGAAAAAGGCC
51  T I D L K D I E S E D K E V R E K C R E A L K K A
226  GCGATGGAGTGGGGGGTGATGCACATAGTGAACCATGGGATATCGACTGAGCTAATGGACCGGGTTAGGGTTACT
76  A M E W G V M H I V N H G I S T E L M D R V R V T
301  GGTACGGCCTTTTGTACCCAGCCGTGGAGGAGAAGTATGCTAATGATCAAGCTAGTGGCAAGATTCAA
101  G Q A F F D Q P V E E K E K Y A N D Q A S G K I Q
376  GGGTATGGGAGTAAGCTTGCTAATAATGCTTGGCGGCAGCTCGAGTGGGAGGATTATTTCTTTACCTTGCCCTAC
126  G Y G S K L A N N A C G Q L E W E D Y F F H L A Y
451  CCTGAGGACAAGAGGGATCTATCTATTGGCCCAAGACACCAAGTATTACATCCAGCAACAAGTGAAGTACGCG
151  P E D K R D L S I W P K T P S D Y I P A T S E Y A
526  AAAGAATAACGAGGCTAGCAACCAAGATCTTCCGTCCTGTCCTAGGCTTGGGACTCGAAGAAGACAGGCTA
176  K E L R L A T K I L S V L S L G L E D R L
601  GAAAAAGAAGTCGGAGGCATAGAAGAGCTTTTACTTCAAATGAAATCAATTATTATCCCAATGCCGCAACCA
201  E K E V G G I E E L L L Q M K I N Y Y P K C P Q P
676  GAGCTAGCCCTGGGAGTGAAGCCACACTGACGTAAGCGCGCTCACCTTCATACTCCACAACATGGTCCCAGGG
226  E L A L G V E A H T D V S A L T F I L H N M V P G
751  CTCAGCTGTTCTACAACGACAAGTGGGTGACGGCCAAGTGCCTGCCCAACTCCATTGTATGCACATTGGTGAC
251  L Q L F Y N D K W V T A K C V P N S I V M H I G D
826  ACCATTGAGATTTTGAAGTAAAGTACAAGAGCATTCTTACCGGGGACTTGTCAATAAAGAGAGGGTTCTGA
276  T I E I L S N G K Y K S I L H R G L V N K E R V R
901  ATCTCTTGGGCTGTTTTTGTGAGCCTCCTAAGGAGAAAATCATCTCAAGCCGCTCTCGGAGACTACGCTCTGAG
301  I S W A V F C E P P K E K I I L K P L S E T T S E
976  GCTGAGCCTCCATTTTCCGCGGCACATTTTCTCAGCATATTGAGCACAAGCTGTTGAGGAGTGCACAGAA
326  A E P P L F P P R T F S Q H I E H K L F R R C Q E
1051GCTCTTGAGAAGAATGA
351  A L E K K *
```

图2 rLjANS1 基因的核苷酸序列及其氨基酸序列

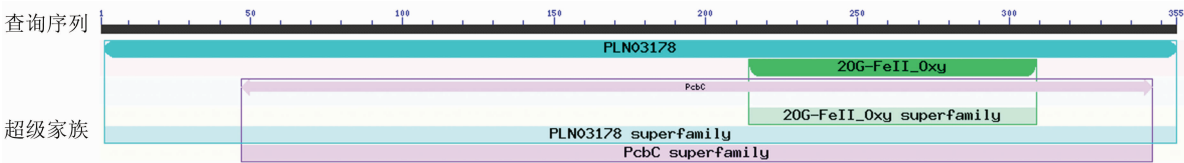


图3 rLjANS1蛋白保守结构域预测

则卷曲在 4 种二级结构中所占比例最高，为 40.85%， α -螺旋次之，占比为 35.21%，延伸链、 β -折叠的占比分别为 17.75%、6.20%（图 4）。用 SWISS-MODEL 对 rLjANS1 蛋白进行同源建模，得

到 rLjANS1 蛋白的三维空间模型（图 5）。通过 ExPASy structure assessment 程序评测推导可知，rLjANS1 蛋白模型得分为 0.93，可信度较高，与拟南芥中的 ANS（PDB:1GP4）的相似度为 79.60%。

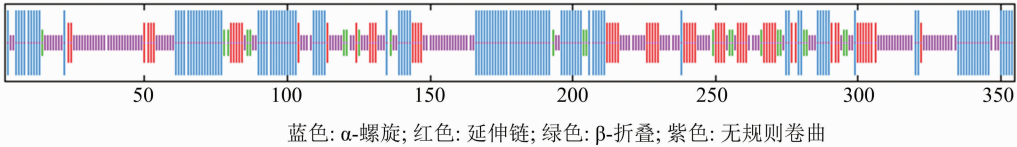


图4 rLjANS1 蛋白的二级结构

2.3 rLjANS1 蛋白序列比对和进化树分析

通过 DNAMAN 7.0 软件对 rLjANS1 蛋白与其他物种的 ANS 蛋白进行同源性分析，结果表明，该蛋白与蓝果忍冬（*Lonicera caerulea*, ALU09330.1）、榴莲（*Durio zibethinus*, XP_022732774.1）、雷公藤（*Tripterygium wilfordii*, XP_038687022.1）、三七（*Panax notoginseng*, QKV26469.1）等植物中同源 ANS 具有较高的同源性，同源性分别为 98.31%、86.36%、86.24%、83.94%，并具有植物 ANS 典型

的 2OG-Fe II_Oxy 氧化酶结构域，包含由第 236 位的组氨酸（His, H）、第 238 位的天冬氨酸（Asp, D）和第 290 位的组氨酸组成的亚铁离子结合位点（HxDxNH）及由第 300 位的精氨酸（Arg, R）、第 302 位的丝氨酸（Ser, S）构成的 2-酮戊二酸特异性结合位点（R_xS）（图 6）。

将拟南芥、榴莲、草莓、金荞麦、蓝果忍冬、苹果、水稻、垂穗商陆、紫苏、三七、菠菜、蓝猪耳、雷公藤、葡萄、玫瑰、小麦和苜蓿等 17 种不同物种的 ANS



图5 rLjANS1 蛋白三维结构的预测

蛋白序列与 rLjANS1 蛋白序列进行比对后构建进化树,结果表明,*rLjANS1* 与同为忍冬科的蓝果忍冬聚为一支,亲缘关系最近,与三七、雷公藤、榴莲、葡萄聚为一个分支,亲缘关系也较近(图7),推测这些物种中的 ANS 可能具有相似功能。

2.4 *rLjANS1* 基因表达模式的分析

用 qRT-PCR 对红白忍冬根、茎、叶及不同发育时期花组织(S1~S6)中 *rLjANS* 基因的表达情况进行定量分析,结果表明,*rLjANS1* 基因除了不在根中表达外,在其他所测组织中都有表达,在叶中的相对表达量最高;另外,在不同花发育时期,*rLjANS1* 基

rLjANS1	MVITMSS...RVESIASGILSLIKKEYIRKKEBELTSGNIFEEEMKEEGPCLPTIDLKDI...ESELKEVREKCREAKKAAMEW	79
LcANS	MVITMSS...RVESIASGILSLIKKEYIRKKEBELTSGNIFEEEMKEEGPCLPTIDLKDI...ESELKEVREKCREAKKAAMEW	79
DzANS	MVITSVAS...RVESIASGILSLIKKEYIRKKEBELTSGNIFEEEMKEEGPCLPTIDLKDI...ESELKEVREKCREAKKAAMEW	79
TwANS	MVITSEVTPRVESIASGILSLIKKEYIRKKEBELTSGNIFEEEMKEEGPCLPTIDLKDI...ESELKEVREKCREAKKAAMEW	80
PnANS	MVITSVAS...RVESIASGILSLIKKEYIRKKEBELTSGNIFEEEMKEEGPCLPTIDLKDI...ESELKEVREKCREAKKAAMEW	80
rLjANS1	GVMHIVNHGIS...ELMDRVVRVAGQAFEDQFEEKEKYANDCASGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHILAYFPEKRDLSI	159
LcANS	GVMHIVNHGIS...ELMDRVVRVAGQAFEDQFEEKEKYANDCASGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHILAYFPEKRDLSI	159
DzANS	GVMHIVNHGIS...ELMDRVVRVAGQAFEDQFEEKEKYANDCASGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHILAYFPEKRDLSI	159
TwANS	GVMHIVNHGIS...ELMDRVVRVAGQAFEDQFEEKEKYANDCASGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHILAYFPEKRDLSI	160
PnANS	GVMHIVNHGIS...ELMDRVVRVAGQAFEDQFEEKEKYANDCASGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHILAYFPEKRDLSI	160
rLjANS1	WPKTESDY...PATSEYAKELRGLATKILSVLSLGLGLEEDRLEKEVGGTEELLLQMKINYPKCPQPELALGVEAHTDVSA	239
LcANS	WPKTESDY...PATSEYAKELRGLATKILSVLSLGLGLEEDRLEKEVGGTEELLLQMKINYPKCPQPELALGVEAHTDVSA	239
DzANS	WPKTESDY...PATSEYAKELRGLATKILSVLSLGLGLEEDRLEKEVGGTEELLLQMKINYPKCPQPELALGVEAHTDVSA	239
TwANS	WPKTESDY...PATSEYAKELRGLATKILSVLSLGLGLEEDRLEKEVGGTEELLLQMKINYPKCPQPELALGVEAHTDVSA	240
PnANS	WPKTESDY...PATSEYAKELRGLATKILSVLSLGLGLEEDRLEKEVGGTEELLLQMKINYPKCPQPELALGVEAHTDVSA	240
rLjANS1	LTFTILHNMVPGIQLFYNDKWTAKCVNSITVMHIGDTIELISNGKYKSTILHRGVNKRFRVRSWAVFCEFPKEKTIILKPL	319
LcANS	LTFTILHNMVPGIQLFYNDKWTAKCVNSITVMHIGDTIELISNGKYKSTILHRGVNKRFRVRSWAVFCEFPKEKTIILKPL	319
DzANS	LTFTILHNMVPGIQLFYNDKWTAKCVNSITVMHIGDTIELISNGKYKSTILHRGVNKRFRVRSWAVFCEFPKEKTIILKPL	319
TwANS	LTFTILHNMVPGIQLFYNDKWTAKCVNSITVMHIGDTIELISNGKYKSTILHRGVNKRFRVRSWAVFCEFPKEKTIILKPL	320
PnANS	LTFTILHNMVPGIQLFYNDKWTAKCVNSITVMHIGDTIELISNGKYKSTILHRGVNKRFRVRSWAVFCEFPKEKTIILKPL	320
rLjANS1	SEITSEAEFEL...PPRTFEOHTEHKLFRRCBALEKK.....	355
LcANS	SEITSEAEFEL...PPRTFEOHTEHKLFRRCBALEKKSVLPN.....	360
DzANS	SEITSEAEFEL...PPRTFEOHTEHKLFRRCBALEKKSVLPN.....	354
TwANS	SEITSEAEFEL...PPRTFEOHTEHKLFRRCBALEKKSVLPN.....	357
PnANS	SEITSEAEFEL...PPRTFEOHTEHKLFRRCBALEKKSVLPN.....	400

LcANS—蓝果忍冬(*Lonicera caerulea*, ALU09330.1); DzANS—榴莲(*Durio zibethinus*, XP_022732774.1); TwANS—雷公藤(*Tripterygium wilfordii*, XP_038687022.1); PnANS—三七(*Panax notoginseng*, QKV26469.1); 红色方框—2OG-Fe II_Oxy 氧化酶结构; 圆点—亚铁离子结合位点; 正方形—2-酮戊二酸特异的结合位点

图6 红白忍冬和其他植物的 ANS 蛋白多序列比对

因的相对表达量都呈现先升高后下降的趋势,其中在 S4 期的相对表达量最高(图8)。

2.5 *rLjANS1* 基因表达与花色苷含量的相关性分析

红白忍冬不同组织部位及不同花发育时期的花色苷含量如图9所示。从检测结果看,在红白忍冬根中几乎检测不到花色苷,红白忍冬地上部分组织中都有花色苷积累,其中叶中的花色苷含量最高。随着花发育进程的推进,花色苷含量呈现先增加后降低的趋势,其中 S4 期的含量最高。

对 *rLjANS1* 基因的相对表达量与其对应样本花色苷含量进行线性回归分析,得出相关系数为 0.97 ($P < 0.05$),其相关方程为 $y = 0.0086x + 0.1158$,说明 *rLjANS* 基因的表达水平与其对应的花色苷含量呈正相关关系。

3 讨论与结论

花青素合成酶是一个植物花青素生物合成代谢途径中的关键酶,是一个依赖亚铁离子、2-酮戊

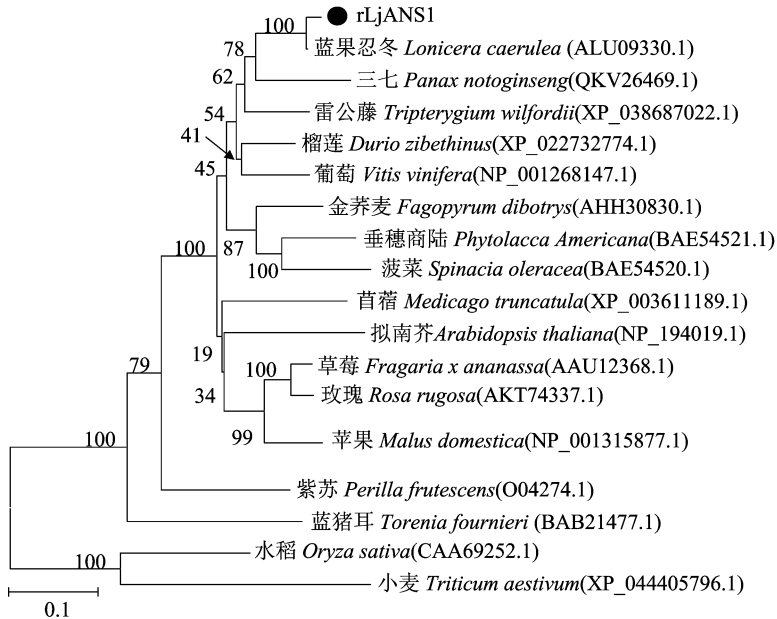


图7 rLjANS1 与其他植物 ANS 蛋白的系统进化分析

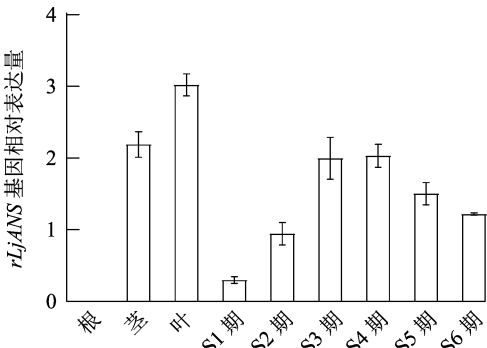


图8 rLjANS1 基因不同组织部位的相对表达量

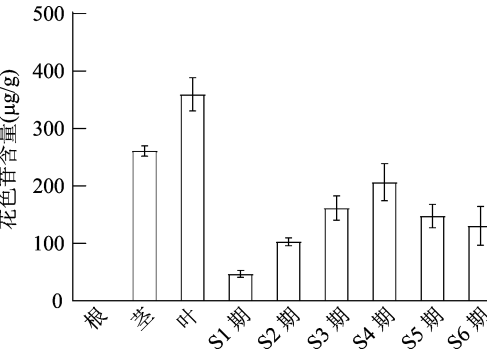


图9 不同组织部位的花色苷含量

hederacea)、草莓 (*Fragaria × ananassa*) 等植物中得到克隆,研究者已对其在色泽形成中的作用进行了相关研究^[15,17]。

本研究通过挖掘转录组数据,从红白忍冬中筛选并克隆得到 1 个 ANS 基因 *rLjANS1*,编码 355 个氨基酸,结构域分析表明,*rLjANS1* 蛋白具有 ANS 蛋白典型的保守结构域 2OG-Fe II_Oxy 氧化酶结构域,属于 2-OGD 蛋白超家族。生物信息学分析显示,*rLjANS1* 蛋白定位于细胞质,为水溶性蛋白,这与拟南芥、葡萄等物种已报道的 ANS 一致,也与花青素主要在细胞质中合成的结论^[9,18]一致。对 *rLjANS1* 进行二级结构预测发现,α-螺旋主要集中在蛋白的前中部和 C-末端,与草莓、葡萄的二级结构类似^[17-18]。多种序列比对结果显示,*rLjANS1* 与其他已知的 ANS 蛋白具有较高的同源性,并且从蛋白三级结构的模拟结果看出,*rLjANS1* 与已知结构功能的拟南芥 AtANS 空间结构非常相似,提示 *rLjANS1* 的功能与 AtANS 具有一定的相似性,这为进一步研究红白忍冬花色形成机制与 *rLjANS1* 催化功能提供了很好的借鉴。

黄酮类化合物与其他次生代谢物一样,其积累大多具有组织特性,参与这些代谢物合成的关键基因也具有组织表达特异性,这种特性已被广泛应用于基因组复杂或非模式植物的次生代谢产物合成途径关键基因的分离鉴定中^[19-20]。大量研究发现,ANS 的表达量与花色苷含量具有一定的相关性。

二酸的双加氧酶,属于 2-氧戊二酸依赖性双加氧酶(2-OGD)超家族,可催化无色花青素(leucoanthocyanidin)转化为有色花色苷元,在植物色泽形成中起着重要作用^[14]。ANS 最早是从玉米突变体 A2 中克隆得到的,目前已从金钟连翘(*Forsythia intermedia*)、裂叶牵牛(*Ipomoea*

Aharoni 等发现,通过 RNAi 降低草莓 *ANS* 基因的表达量,会导致花青素含量降低,花冠也由粉红色变为白色^[21],Nakamura 等抑制植物蓝猪耳中 *ANS* 基因的表达后,发现植株中花青素含量显著降低^[22]。在本研究中,*rLjANSI* 基因在红白忍冬根、茎、叶和不同发育期花组织中的表达量与花青素含量呈明显的正相关,这与百脉根、紫娟茶叶等 *ANS* 的研究结果^[13,23]一致,表明这些组织中 *rLjANSI* 基因的表达可能与红白忍冬花色苷合成和积累密切相关。

目前 *ANS* 基因在园艺作物中的研究相对较多,但在红白忍冬中关于该基因表达量与花色苷积累关系的研究较少。本研究在分析转录组数据的基础上,克隆并对该基因的表达量和花色苷含量相关性进行研究,初步证明了 *rLjANSI* 基因表达与花色苷的正相关性,为 *rLjANS* 基因在红白忍冬中花色苷生物合成积累及遗传改良等方面的相关研究提供了参考。

参考文献:

- [1]Shang X F, Pan H, Li M X, et al. *Lonicera japonica* Thunb. : ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 138(1) : 1 – 21.
- [2]Seo O N, Kim G S, Park S, et al. Determination of polyphenol components of *Lonicera japonica* Thunb. using liquid chromatography – tandem mass spectrometry; contribution to the overall antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2012, 134(1) : 572 – 577.
- [3]Yuan Y, Yang J, Yu X D, et al. Anthocyanins from buds of *Lonicera japonica* Thunb. var. *chinensis* (Wats.) Bak. [J]. Food Research International, 2014, 62 : 812 – 818.
- [4]Ravindra P V, Narayan M S. Antioxidant activity of the anthocyanin from carrot (*Daucus carota*) callus culture [J]. International Journal of Food Sciences & Nutrition, 2003, 54(5) : 349 – 355.
- [5]Hansen A S, Marckmann P, Dragsted L O, et al. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2005, 59(3) : 449 – 455.
- [6]Xia X D, Ling W H, Ma J, et al. An anthocyanin – rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E – deficient mice [J]. The Journal of Nutrition and Disease, 2006, 136(8) : 2220 – 2225.
- [7]Downham A, Collins P. Colouring our foods in the last and next millennium [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2000, 35(1) : 5 – 22.
- [8]Shi M Z, Xie D Y. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana* [J]. Recent Patents on Biotechnology, 2014, 8(1) : 47 – 60.
- [9]Wilmouth R C, Turnbull J J, Welford R W, et al. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana* [J].

Structure, 2002, 10(1) : 93 – 103.

- [10]Mano H, Ogasawara F, Sato K, et al. Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple – fleshed sweet potato [J]. Plant Physiology, 2007, 143(3) : 1252 – 1268.
- [11]Xu F, Cheng H, Cai R, et al. Molecular cloning and function analysis of an anthocyanidin synthase gene from *Ginkgo biloba*, and its expression in abiotic stress responses [J]. Molecules and Cells, 2008, 26(6) : 536 – 547.
- [12]Liu Y, Shi Z, Maximova S, et al. Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase, and leucoanthocyanidin reductase [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1) : 202.
- [13]马 兰. 百脉根花青素合酶基因 (*LcANS*) 的克隆及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(7) : 2926 – 2933.
- [14]Nakajima J I, Tanaka Y, Yamazaki M, et al. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3 – glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(28) : 25797 – 25803.
- [15]Rosati C, Cadic A, Duron M, et al. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia × intermedia* reveals organ – specific expression during flower development [J]. Plant Science, 1999, 149(1) : 73 – 79.
- [16]Wrolstad R, Heatherbell D. Identification of anthocyanins and distribution of flavonoids in tamarillo fruit [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.] [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1974, 25(10) : 1221 – 1228.
- [17]Almeida J R M, D'Amico E, Preuss A, et al. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria × ananassa*) [J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 465(1) : 61 – 71.
- [18]Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, et al. Myb – related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis [J]. Planta, 2002, 215(6) : 924 – 933.
- [19]Zhao Q, Zhang Y, Wang G, et al. A specialized flavone biosynthetic pathway has evolved in the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* [J]. Science Advances, 2016, 2(4) : e1501780.
- [20]Pluskal T, Torrens – Spence M P, Fallon T R, et al. The biosynthetic origin of psychoactive kavalactones in kava [J]. Nature Plants, 2019, 5(8) : 867 – 878.
- [21]Aharoni A, De Vos C H R, Wein M, et al. The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco [J]. The Plant Journal, 2001, 28(3) : 319 – 332.
- [22]Nakamura N, Fukuchi – Mizutani M, Miyazaki K, et al. RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression [J]. Plant Biotechnology, 2006, 23(1) : 13 – 17.
- [23]邹 瑞, 王青芬, 杨自云, 等. 紫娟茶叶片中花青素合酶基因的克隆及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(3) : 1284 – 1288.