

• 药材与资源 •

金荞麦花青素合酶基因的克隆及其表达与花青素量的相关性研究

卜星星, 雒晓鹏, 白悦辰, 李成磊, 陈 惠, 吴 琦*

四川农业大学生命科学学院, 四川 雅安 625014

摘要: 目的 获取金荞麦花青素合成途径关键酶花青素合成酶 (anthocyanins synthase, ANS) 基因的全长序列, 并进行序列分析; 对花期金荞麦 ANS 基因在各组织中表达水平与花青素量的相关性进行分析。方法 利用同源克隆技术获得 ANS 基因 cDNA 序列; 采用半定量 RT-PCR 对 ANS 表达量进行分析; 采用分光光度法测量花青素量。结果 金荞麦 ANS 基因 cDNA 包含一个 1 077 bp 的 ORF, 编码 358 个氨基酸, 命名为 *FdANS*。生物信息学分析表明, 该基因编码蛋白与其他植物 ANS 蛋白氨基酸序列同源率较高。*FdANS* 在花期金荞麦不同组织中的表达量分析表明, 其表达量花>叶>茎>根, 花青素量为花>叶>茎>根。结论 在金荞麦中首次获得 ANS 基因的 cDNA 序列, 编码蛋白具有 ANS 同源蛋白的典型特征。*FdANS* 基因在金荞麦根、茎、叶和花中的表达量与花青素量具有相关性。

关键词: 金荞麦; 花青素合酶; 基因克隆; cDNA 序列; 花青素

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)07-0985-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.017

Gene cloning of anthocyanin synthase in *Fagopyrum dibotrys* and correlation between its expression level and anthocyanin content

BU Xing-xing, LUO Xiao-peng, BAI Yue-chen, LI Cheng-lei, CHEN Hui, WU Qi

College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: Objective To obtain the full-length cDNA sequence of anthocyanins synthase (ANS) gene from *Fagopyrum dibotrys* (*FdANS*), and to analyze the expression of *FdANS* in each tissue and the total anthocyanin content during florescence of *F. dibotrys*. **Methods** The cDNA sequence of ANS gene was cloned by homology cloning from *F. dibotrys*. The expression of ANS was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The content of total anthocyanin was measured by spectrophotometry. **Results** The open reading frame (ORF) of *FdANS* was 1 077 bp and encoded a protein with 358 amino acids named *FdANS*. Bioinformatics analysis suggested that the amino acid sequence of *FdANS* had the higher homology with those in other plants. Both the gene expression *FdANS* in different tissues during florescence of *F. dibotrys* and the total anthocyanin content were in the order of flowers > leaves > stems > roots. **Conclusion** The cDNA sequence of *FdANS* is firstly obtained from *F. dibotrys* and its coding protein has the typical characteristic of ANS homologous protein. The gene expression of *FdANS* shows the correlation to the total anthocyanins content in the flowers, leaves, stems, and roots of *F. dibotrys*.

Key words: *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara; anthocyanin synthase; gene cloning; cDNA sequence; anthocyanin

金荞麦 *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara 是蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 *Fagopyrum* Mill. 多年生草本植物, 又名赤地利、金锁银开、天荞麦、荞麦、三七等, 原产于中国西南, 分布于陕西、江苏、四川及云南等省区^[1]。作为一种营养丰富并具有重要药用价值的资源植物^[2], 其性平、微凉、味苦, 酸涩, 具有清肺排痰、活血散瘀、健脾利湿之效,

主治肺脓疡、咽喉肿痛、菌痢、痛经等。金荞麦的块根活性提取物具有显著的抗癌, 以及消炎抗菌等重要的作用^[3-5]。而其中主要的抗癌活性成分为一类原花青素的缩合性鞣质混合物^[6]。目前, 由于人工栽培的金荞麦产量和品质的限制以及人们对其价值的重视, 大量的市场需求促进了对野生金荞麦的掠夺式采集, 致使金荞麦种源不断减

收稿日期: 2013-12-12

基金项目: 四川农业大学“211工程”双支计划 (00770106)

作者简介: 卜星星 (1987—), 男, 研究生, 硕士, 生物化学与分子生物学专业。E-mail: bxx0918@163.com

*通信作者 吴 琦 (1973—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: wuqiwwq@gmail.com

少,濒临灭绝。鉴于此,我国已将其列为国家二级保护植物^[7]。

花青素生物合成途径是类黄酮物质合成途径的一个分支。植物花青素合成是以苯丙氨酸为前体,经不同的羟基化、糖基化、甲基化或酰基修饰后形成花青素被转运到液泡中^[8]。花青素合成酶(anthocyanin synthase, ANS)是花青素合成通路末端的关键酶,催化以无色花青素到有色花青素的转变,即催化无色翠雀素、无色矢车菊色素和无色天竺葵色素生成翠雀素、矢车菊色素和花葵素^[9-11]。催化反应需要 2-酮戊二酸、铁、抗坏血酸和盐酸酸化,在 C-3 位羟基化无色花色素或直接形成 C-3 位酮基^[12]。目前,ANS 的 cDNA 序列已在拟南芥(AEI99590.1)等多种植物中得到克隆。各植物中 ANS 基因表达调控机制的差异,正是引起花青素量差异的主要原因。因此,了解克隆金荞麦花青素合酶(*FdANS*)基因表达与花青素量之间的关系,对进一步提高金荞麦的药用价值和促进其野生资源保护具有重要意义。

1 材料及主要试剂

2013 年 9 月中旬样品采集于雅安老板山,经四川农业大学植物学教研室袁明副教授鉴定为金荞麦 *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara。大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 由生物化学与分子生物学实验室保存。克隆载体 pMD19-T、胶回收试剂盒、DNA A-Tailing Kit、PrimSTART(日本 TaKaRa 公司),RNA 提取试剂植物 RNA_{out} 试剂盒(天泽基因公司),RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司),DNA 聚合酶、PCRMaster Mix(Bio Med 公司),T4 DNA 连接酶(北京天恩泽有限公司),其他化学药品均为进口或国产分析纯试剂。

2 方法

2.1 金荞麦总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

按照天泽基因公司“植物 RNA_{out} 试剂盒”说

明书,分别提取花期金荞麦根、茎、叶和花的总 RNA。利用 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas 公司)试剂盒以 Oligo-dT₁₈ 和 Random Hexamer Primer 为引物,进行 cDNA 的反转录,将合成的 cDNA 第一链保存于 -20 °C 冰箱中,备用。

2.2 *FdANS* 基因 cDNA 序列的克隆

参照甜荞 *FeANS* (HM149791.1) 基因 cDNA 全长序列,设计并合成一对特异性引物 *ANSf* 和 *ANSr* (表 1),以合成的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 体系: cDNA 1 μ L, PrimSTART 12.5 μ L, 特异性引物 *ANSf* 和 *ANSr* 各 1.25 μ L, ddH₂O 9 μ L, 共 25 μ L。PCR 条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 50 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。回收 PCR 产物加 A 后,与 pMD19-T Vector 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选 3 个菌落 PCR 检测为阳性的克隆子,送 Invitrogen 基因有限公司测序。

2.3 *FdANS* 基因核酸与蛋白序列分析

所得测序结果使用 NCBI 在线工具 BLAST 进行序列比对。采用 Expasy 网站 PROSITE 数据库进行结构域和生物学活性位点识别。采用 Clustalx1.81 软件进行植物 ANS 蛋白氨基酸序列的多重序列比对,采用 MEGA 4.1 软件经邻接法构建系统发育进化树,并以 Bootstrap 对进化树构建结果进行验证。采用 SOPMA (<http://pbil.ibcp.fr>) 对 *FdANS* 蛋白质二级结构进行预测;利用 Swiss-Model 在线同源建模软件进行蛋白质三级结构同源建模。采用 Expasy 网站在线工具 ProtParam 对 *FdANS* 蛋白进行理化性质分析。

2.4 花期 *FdANS* 的半定量 RT-PCR

设计一对特异引物 *ANSsmf* 和 *ANSsmr*,以荞麦持家基因组蛋白编码基因 H3 (*FdH3*, HM628903) 为内参(表 1),分别检测 *FdANS* 基因在金荞麦根、茎、叶、花中的表达量,PCR 产物用琼脂糖凝胶电

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列	引物用途	预扩增长度 / bp
<i>ANSf</i>	5'-TTCCATTACGTCTTCGAGAGTTGAG-3'	<i>FdANS</i> cDNA 扩增	1 300
<i>ANSr</i>	5'-CCAATCACGCCTCTCTTATTCCTTT-3'		
<i>ANSsmf</i>	5'-GGAAGATTACTTTTTTACCTTGCTACC-3'	<i>FdANS</i> 半定量 RT-PCR 引物	500
<i>ANSsmr</i>	5'-GAATGCTTTGGCGGCTCACAGA		
<i>H3-semf</i>	5'-GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG-3'	<i>H3</i> 半定量 RT-PCR 引物	200
<i>H3-semr</i>	5'-CCAACAAGGTATGCCTCAGC-3'		

泳检测, 每条特定电泳条带的光密度通过 Quantity One 软件扫描获得, 以 *FdANS* 光密度值与内参基因 *FdH3* 的光密度值的比值来表示 *FdANS* 基因在根、茎、叶、花中的表达量。

2.5 花期金荞麦花青素的提取及定量测定

采用 Ronchi 等^[13]和 Park 等^[14]的方法略作改动, 提取金荞麦花期各组织中的花青素。分别取金荞麦花期与提 RNA 相同部位的根、茎、叶、花的样品研磨加入 1 mL 1% 盐酸的甲醇溶液 25 ℃ 过夜, 随后在提取液中加入 2/3 体积的双蒸水和 1 体积的氯仿, 13 000 r/min 离心 3 min 后取上清, 最后用紫外分光光度计测定 530 nm 和 657 nm 处的吸光度值。计算花青素的量 (花青素 = $[(A_{530} - 0.33 \times A_{657}) \times \text{鲜质量}]$)。实验结果为 3 次独立测定的平均值。

2.6 数据的分析和处理

采用 IBM SPSS Statistics 20 统计软件对金荞麦 *FdANS* 基因的表达量与其对应样本花青素的量进行相关性分析。

3 结果与分析

3.1 金荞麦总 RNA 的提取

提取的金荞麦总 RNA 电泳结果显示, 28 S 及 18 S rRNA 2 条主带清晰可见, 见图 1。二者条带亮度比大致符合 2:1, 且不含有 DNA 及蛋白质杂带, 可用于 RT-PCR 制备 cDNA 第一链。

3.2 *FdANS* 基因 cDNA 序列的克隆

以合成的 cDNA 第一链为模板, PCR 扩增出一条大小约为 1 300 bp 的特异条带, 见图 2。测序结果表明该片段为 1 284 bp, 经 Blast 比对显示其中包含了 1 077 bp 的 OFR 序列, 与 Genbank 中甜荞 *FeANS* (HM149791.1) 和部分苦荞 (HQ003254.1) 相似度最高, 分别为 93% 和 99%, 与其他植物 ANS 的相似度为 74%~85%。

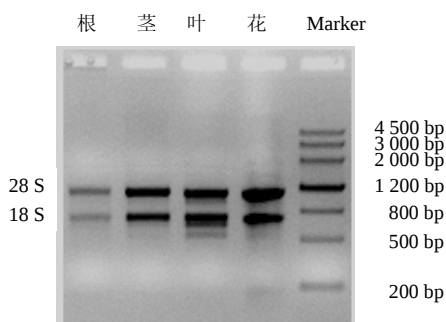


图 1 金荞麦总 RNA 的提取

Fig. 1 Total RNA extracted from *F. dibotrys*

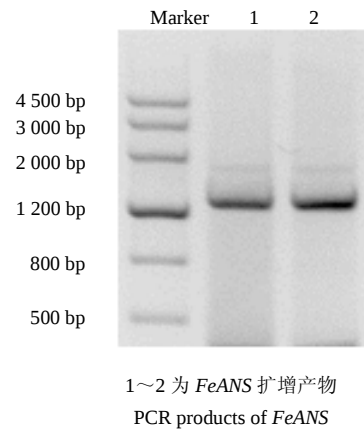


图 2 金荞麦 *FdANS* 基因的扩增

Fig. 2 Amplification of *FdANS* from *F. dibotrys*

3.3 *FdANS* 编码蛋白的序列分析

3.3.1 *FdANS* 编码的氨基酸序列 利用 Dnaman 软件, 对 *FdANS* 的 ORF 序列进行翻译, 其编码的氨基酸序列为“MVSITSSRVESLASSGIQSIKEYVRPEEELTSIGDVFEEEEKKEGPQVPTIDIKDIASDDKEVRKAIEELKKAATEWGVMLVNHGIPDELTRVKNAGATFFELPIEEKEKYANDQASGKIQGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHLAYPEDKRDLSVWPQTPSDYIPSTSEYAKELRSLATKIMSALSLALGLEEDRLEKEVGGIEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGQLFYEGKWVTAKCVPNSIIMHIGDTLTILSNGKYKSILHRGLVNKEKVRISWAVFCEPPKHSIILKPLPELVSESEPAEFPPRTFAQHIEYKLFRTQELQAAPASKE”。

3.3.2 *FdANS* 的进化分析 16 种植物来源的 ANS 蛋白序列经 Clustalx 1.81 软件多序列比对后表明, 用于比对的序列相似性总体较高 (48.15%~87.11%), 具有共同的保守区域。经 MEGA 4.0 软件邻接 (Neighbour Joining, NJ) 法构建系统发育树, 结果见图 3。由图可知, 十字花科的芥蓝 *Brassica alboglabra* L. H. Bailey 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 进化关系较近, 金荞麦和甜荞 *Fagopyrum esculentum* Moench 同源关系最近。

3.3.3 *FdANS* 的生物信息学分析 SOPMA 预测表明, *FdANS* 二级结构以 α -螺旋与无规则卷曲为主, 其中 α -螺旋为 40.22%, β -转角为 11.45%, 无规则卷曲为 30.73%, 延伸链为 17.60%。

Swiss-Model 对 *FdANS* 蛋白同源建模, 所得结果与已知结构和功能的拟南芥 ANS 蛋白的三级结构类似, ANS 有两个保守功能域, 其中一个具有异

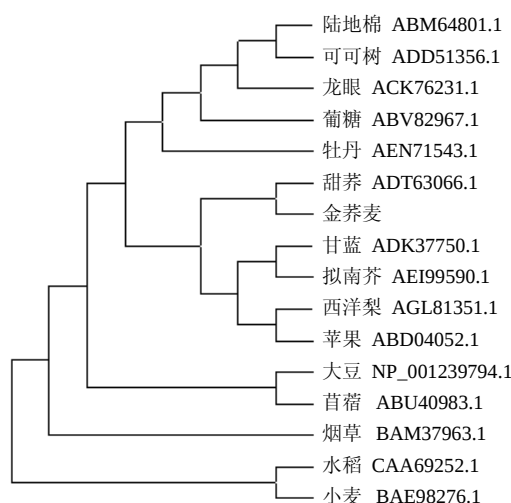


图3 金荞麦 *FdANS* 与其他植物来源 ANS 蛋白序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on protein sequences of *FdANS* from *F. ditorys* and ANS from other plants

青霉素 *N* 合成酶和双加氧作用；另一个是 2-酮戊二酸- Fe^{2+} -双加氧酶家族的保守结构域，行使双加氧作用。其中 Fe^{2+} 结合在 His²³²、His²⁸⁸ 和 Asp²³⁴ 上，2-酮戊二酸的 5-羧基与保守残基 Arg²⁹⁸ 形成静电作用^[15]。这些特征与其他植物 ANS 及双加氧酶家族的黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H) 和黄酮醇合成酶 (flavonol synthase, FLS) 的催化活性中心特征一致，表明 *FdANS* 属于典型的依赖 2-酮戊二酸双加氧酶家族，与在类黄酮合成途径中同属此家族的 F3H 和 FLS 具有保守的同源关系^[16]。ProtParam 分析表明，*FdANS* 蛋白分子式为 $\text{C}_{1810}\text{H}_{2856}\text{N}_{472}\text{O}_{547}\text{S}_9$ ，相对分子质量为 4.027×10^4 ，理论 PI 值为 5.38。不稳定常数 II (instability constant II) 为 53.74，在酵母和大肠杆菌体内半衰期分别超过 20 h 和 10 h，为典型不稳定型蛋白。

3.4 花期金荞麦 *FdANS* 半定量 RT-PCR 与花青素的测定及其相关性分析

3.4.1 *FdANS* 的半定量 RT-PCR 花期金荞麦不同部位 *FdANS* 的半定量 RT-PCR 结果见图 4。经 Quantity one (version 4.6.2) 软件分析，并进行高斯建模 (Gauss-Model) 计算光密度值，各基因表达量用相对光密度值 ROD (relative optical density) 表示。分析表明，*FdANS* 基因在根、茎、叶和花中均有表达。其中花和叶中表达量最高，相对表达量分别为 92.12% 和 81.32%；根和茎中相对较低分别为 49.04%

和 52.06%。

3.4.2 花青素的测定 金荞麦花期各个组织的花青素的测定结果见图 5。由图可知，金荞麦的花中花青素量最高为 3.38 mg/g，其次为叶和茎，分别为 1.60、1.05 mg/g，根部花青素量最低为 0.9 mg/g。

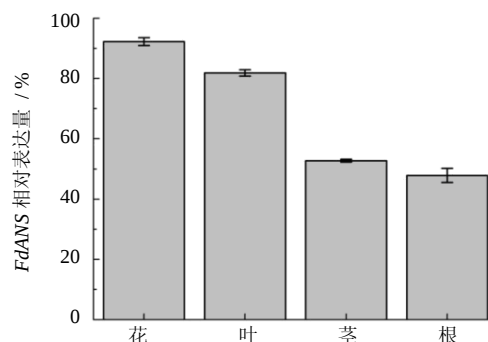


图4 花期金荞麦 *FdANS* 基因的半定量 RT-PCR 分析

Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *FdANS* from *F. ditorys* during florescence

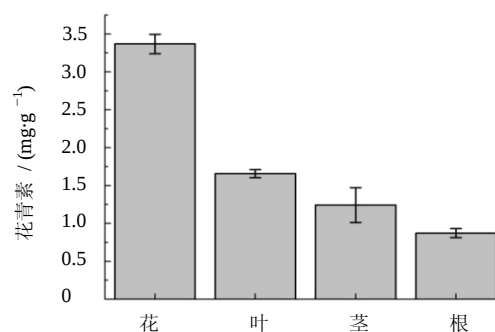


图5 花期金荞麦花青素的测定

Fig. 5 Determination of anthocyanin content from *F. ditorys* during florescence

3.4.3 金荞麦 *FdANS* 基因表达量与其对应样本花青素量的相关性分析 IBM SPSS Statistics 20 统计软件对花期金荞麦 *FdANS* 基因的表达量与其对应样本花青素量进行线性回归分析，得出相关系数为 0.875 ($P < 0.05$)，Durbin-Watson 现行检测值为 0.803 < 2 ，因此可认为金荞麦 *FdANS* 表达水平与其对应的花青素量呈正相关关系，其相关方程为 $Y = 0.009X - 0.270$ 。

4 讨论

本实验克隆所得 *FdANS* 基因 cDNA 序列经测序及核酸、蛋白序列比对搜寻结果显示，*FdANS* 核酸序列与实验室获得苦荞以及网上公布的甜荞相似度达 98% 和 93%。这说明金荞麦与苦荞的同源关系最近，和甜荞次之，与 Sharma 的观点一致^[17]。

植物中 ANS 的表达量与花青素量密切相关：田

佶等^[18]研究表明,苹果属海棠的 *McANS* 基因的表达量与幼叶,功能叶中花青苷量变化规律呈现明显的一致性。Aharoni 等^[19]在草莓上通过抑制 *ANS* 基因的表达量,使花青素的积累明显减少,花冠由粉红色变为白色,表明该基因对从无色花青素到产生有色花青素的催化过程是植物红色形成的重要因素之一。Nakamura 等^[20]采用 RNAi 的方法抑制蓝猪耳中 *ANS* 基因的表达,结果转基因株系花青素的量大大减少,有一半植株的花朵的颜色变为白色,并且在温室中种植 3 年花色的遗传稳定。Rosati 等^[13]从美国金钟连翘中克隆得到了 *ANS* 基因和其启动子,并证明在连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的花瓣中无花色素苷是由于缺少 *ANS* 基因的表达所致。Nakatsuka 等^[21]发现, *ANS* 基因的突变是导致龙胆花变为白色的重要原因。本研究中, *FdANS* 在金荞麦花、叶、茎和根中的表达量与花青素变化趋势一致,表明这些组织中其表达可能与金荞麦花青素的合成和积累密切相关,这与 Wei 等^[22]的研究结果一致。

近年来研究表明,金荞麦籽粒中含有丰富的生物类黄酮,其质量分数接近苦荞,且超过甜荞^[17],可作为优质黄酮类物质的天然来源,具有很高的经济价值。因此,如能通过现代生物技术进一步提高金荞麦中黄酮类功效物质量,将能够进一步挖掘金荞麦在保健品和功能食品方面的巨大潜力。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 雒晓鹏, 白悦辰, 高飞, 等. 金荞麦查尔酮异构酶的基因克隆及其花期表达与黄酮量分析 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1481-1485.
- [3] 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.
- [4] Chan P K. 金荞麦体外抑制肿瘤细胞生长的研究 [J]. 中西医结合学报, 2003, 1(2): 128-131.
- [5] 林洪生. 金荞麦抗肿瘤研究进展 [J]. 中西医结合学报, 2004, 2(1): 72-74.
- [6] 盛华刚, 朱立俏, 林桂涛. 金荞麦的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2011, 26(2): 156-158.
- [7] 吴清, 梁国鲁. 金荞麦野生资源的开发与利用 [J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(2): 27-28.
- [8] 周惠, 文锦芬, 邓明华, 等. 植物花青素生物合成相关基因研究进展 [J]. 辣椒杂志, 2011(4): 1-7.
- [9] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1071-1083.
- [10] Saito K, Kobayashi M, Gong Z, et al. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red form of *Perilla frutescens* [J]. *Plant J*, 1999, 17(2): 181-189.
- [11] Nakajima J, Sato Y, Hoshino T, et al. Mechanistic study on the oxidation of anthocyanidin synthase by quantum mechanical calculation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(30): 21387-21398.
- [12] 张学英, 张上隆, 骆军, 等. 果实花色素苷合成研究进展 [J]. 果树学报, 2004, 21(5): 456-460.
- [13] Ronchi A, Farina G, Gozzo F, et al. Effects of a triazolic fungicide on maize plant metabolism: modifications of transcript abundance in resistance-related pathways [J]. *Plant Sci*, 1997, 130(1): 51-62.
- [14] Park N I, Li X, Suzuki T, et al. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes and anthocyanin accumulation in tartary buckwheat cultivars "Hokkai T8" and "Hokkai T10" [J]. *J Agr Food Chem*, 2011, 59(6): 2356-2361.
- [15] 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.
- [16] 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 Sci*, 1999, 149(1): 73-79.
- [17] Sharma T, Jana S. Species relationships in Fagopyrum revealed by PCR-based DNA fingerprinting [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(2/3): 306-312.
- [18] 田佶, 沈红香, 张杰, 等. 苹果属观赏海棠 *McANS* 基因克隆与不同叶色品种间表达差异分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(6): 939-948.
- [19] Aharoni A, De Vos C, Wein M, et al. The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco [J]. *Plant J*, 2001, 28(3): 319-332.
- [20] Nakamura N, Fukuchi M 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 Biotechnol*, 2006, 23(1): 13-17.
- [21] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, et al. Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants [J]. *Plant Sci*, 2005, 169(5): 949-958.
- [22] Wei Y Z, Hu F C, Hu G B, et al. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of *Litchi chinensis* Sonn [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19455.