

• 农业生物技术 •

不同花色黄芩中 *dfr* 基因的克隆及时空表达分析

王疆然, 王玉芬, 王舒婷, 张芳娟, 牛颜冰, 王德富

山西农业大学 生命科学学院, 山西 晋中 030801

王疆然, 王玉芬, 王舒婷, 等. 不同花色黄芩中 *dfr* 基因的克隆及时空表达分析. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1312-1323.

Wang JR, Wang YF, Wang ST, et al. Cloning and temporal-spatial expression analysis of *dfr* gene from *Scutellaria baicalensis* with different colors. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1312-1323.

摘要: 二氢黄酮醇-4-还原酶 (Dihydroflavonol-4-reductase, Dfr) 是类黄酮生物合成途径中调控花青素和原花青素合成的关键酶。为探究 *dfr* 基因在同一生态环境下不同花色黄芩中的差异, 以白色、紫红色和紫色 3 种花色的黄芩花瓣 cDNA 为模板, 基于同源克隆和 RACE 技术从中克隆得到 3 个完整的 *dfr* 基因全长序列, 分别命名为 *Sbdfr1*、*Sbdfr2*、*Sbdfr3*, 并采用生物信息学软件对其相关结构进行分析。结果表明, 3 个 Dfr 蛋白均存在高度保守的 NADPH 结合位点和底物特异性结合位点。系统进化分析表明, 三者与已知粘毛黄芩 (GenBank 登录号: ACV49882.1) 聚为一簇, 亲缘关系最近; 关键结构域和 3D 模型分析发现 3 个 Dfr 蛋白表面催化活性区域均存在差异, 其独特的结构特性为研究 Dfr 底物特异性提供了有利条件。qRT-PCR 分析显示, *dfr* 在 3 种花色黄芩盛花期除根外的其他组织中均有不同程度的表达; 在花瓣发育进程中, *dfr* 基因在白花和紫花黄芩中的表达量均呈上升趋势, 在紫红花黄芩中的表达量先缓慢上升后下降, 之后再迅速上升至最大值。研究结果为进一步深入探究 Dfr 底物选择性的机理及功能提供一定的理论基础, 对阐明黄芩花色差异变化的分子机理具有重要的科学研究价值。

关键词: 黄芩, 二氢黄酮醇-4-还原酶, 基因克隆, 序列分析, 时空表达

Cloning and temporal-spatial expression analysis of *dfr* gene from *Scutellaria baicalensis* with different colors

Jiangran Wang, Yufen Wang, Shuting Wang, Fangjuan Zhang, Yanbing Niu, and Defu Wang

School of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

Abstract: Dihydroflavanol-4-reductase (Dfr) is a key enzyme that regulates the synthesis of anthocyanin and proanthocyanidin in the flavonoid biosynthesis pathway. To investigate the difference of *dfr* gene in *Scutellaria baicalensis* Georgi with different colors in the same ecological environment, three complete full-length sequences of *dfr* gene were cloned from the cDNA of *S. baicalensis* with white, purple-red and purple colors using homologous cloning and RACE techniques. The three genes were named *Sbdfr1*, *Sbdfr2* and *Sbdfr3*, respectively, and their corresponding structures were analyzed. The results showed that all three Dfr proteins have highly conserved NADPH binding sites and substrate-specific binding sites. Phylogenetic analysis showed

Received: July 29, 2020; **Accepted:** November 24, 2020

Supported by: China Agriculture Research System (No. CARS-21), Modern Agro-industry Technology Research System of Shanxi Province, China (No. 2020-05).

Corresponding author: Defu Wang. Tel: +86-354-6287205; E-mail: wanderful226@aliyun.com

现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. CARS-21), 山西省现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. 2020-05) 资助。

网络出版时间: 2021-01-06

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210104.1328.002.html>

that they are closely related to that of the known *S. viscidula* (ACV49882.1). Analysis of key structural domains and 3D models revealed differences in the catalytically active regions on the surface of all three Dfr proteins, and their unique structural characteristics may provide favorable conditions for studying the substrate specificity of different Dfr proteins. qRT-PCR analysis shows that *dfr* was expressed at different level in all tissues except the roots of *S. baicalensis* in full-bloom. During floral development, the expression level of *dfr* in white and purple-flowered *Scutellaria* showed an overall upward trend. In purple-red-flowered *Scutellaria*, the expression first slowly increased, followed by a decrease, and then rapidly increased to the maximum. This research provides a theoretical basis for further exploring the mechanism and function of Dfr substrate selectivity, and are of great scientific value for elucidating the molecular mechanism of floral color variation in *S. baicalensis*.

Keywords: *Scutellaria baicalensis*, dihydroflavonol-4-reductase, gene cloning, sequence analysis, temporal-spacial expression

类黄酮作为植物重要的次生代谢产物,在植物界广泛存在,主要包括二氢黄酮、异黄酮、黄酮、儿茶素、花青素和原花青素几大类^[1]。其参与植物多种生理生化反应,包括 UV-B 照射光保护、病原体防御、保护植物抵御低温等胁迫以及花色形成等^[2-3],同时在抗氧化、抗衰老、抗癌和心脑血管等疾病预防中发挥重要作用^[4-7]。

二氢黄酮醇-4-还原酶 (Dihydroflavonol-4-reductase, Dfr) 是控制花青素生物合成的关键酶之一,它不仅能引导类黄酮途径流向花青素合成方向^[8],更重要的是它在一定程度上决定着花青素的种类与含量。Dfr 在辅助因子 NADP (H) 的协助下催化二氢山奈酚 (Dihydrokaempferol, DHK)、二氢槲皮素 (Dihydroquercetin, DHQ) 和二氢杨梅素 (Dihydromyricetin, DHM) 生成相对应的无色的花青素 (无色天竺葵素、无色矢车菊素和无色飞燕草素),再经花青素合酶 (Anthocyanidin synthase, Ans) 和类黄酮 3-O-糖基转移酶 (Flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene, Uf3gt) 催化生成不同的花青素使植物组织或器官呈现出不同的颜色。目前,已从玉米 *Zea mays*^[9]、矮牵牛 *Petunia hybrida*^[10]、非洲菊 *Gerbera hybrida*^[11]、银杏 *Ginkgo biloba*^[12]、甘薯 *Ipomoea batatas*^[13]等多种植物中分离克隆出各种 *dfr* 基因。尽管研究表明,在许多植物中 Dfr 可以同时催化 3 种底物,但有的 Dfr 只能催化一种底物,具有一定的底物特异性,如矮牵牛和大花蕙兰不能产生基于天竺葵素的橙色花^[14]。因此,研究 Dfr 底物特异性机理对花色改良和育种具有重要意义。

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 作为传统的药用植物,因其干燥根富含黄酮类化合物,具有泻火解毒、清热燥湿、延缓衰老和抗肿瘤等作用而被广泛种植^[15-18]。目前,对黄芩的研究大多集中在栽培繁育技术、种植模式、病虫害防控技术、有效成分 (黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷) 合成途径以及相关药理作用等方面,但对同一生长环境下同一品种出现黄芩花色的差异以及具体的着色机理还鲜有研究。

本研究采用 RT-PCR 技术和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术从 3 种花色的黄芩中克隆获得了 *dfr* 同源基因,通过生物信息学和 qRT-PCR 技术对 *dfr* 在 3 种花色黄芩中的蛋白结构及时空差异表达模式进行了分析,为该基因的表达和功能研究奠定了基础,为从分子角度解析黄芩花色差异明显变化提供了思路,为更多物种的花色改良及更深入探讨黄芩类黄酮合成途径中调控网络提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄芩的 3 种花色材料于 2019 年 6 月初至 7 月下旬采自山西省太谷县。分别取 4 个花发育时期的新鲜花瓣及盛花期各个部位的组织材料于液氮中速冻, -80 °C 保存备用 (图 1)。

1.2 RNA 的提取与反转录

样本总 RNA 的提取采用 Trizol 法,操作步骤参照说明书进行,琼脂糖变性凝胶电泳检测 RNA 质量,紫外分光光度计检测 RNA 浓度。合格后再

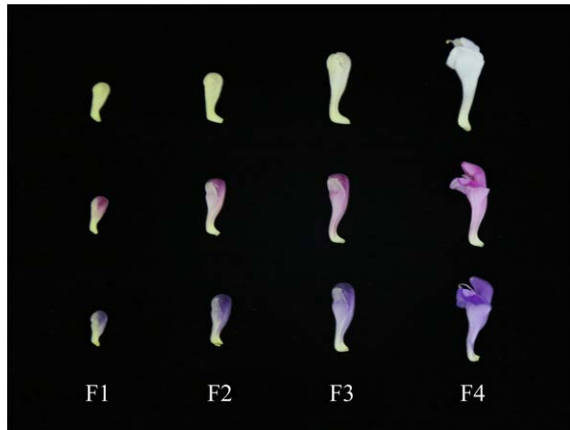


图 1 不同发育时期的黄芩花瓣

Fig. 1 *S. baicalensis* petals at different growing stages. From top to bottom: white, purple-red and purple flowers of *S. baicalensis*. F1: young-bud; F2: medium-bud flower; F3: pre-bloom flower; F4: full-blood flower.

参照 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书进行 cDNA 的第一链合成。

1.3 *Sbdfr* 基因全长克隆

根据 NCBI 上已发表的其他物种 *dfr* 基因的序

列, 通过 Primer Premier 5 软件在其保守区设计简并引物进行 PCR 扩增。25 μ L PCR 反应体系及反应程序为: ddH₂O 13.5 μ L、5 \times PCR 缓冲液 5 μ L、dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L、特异引物 F/R (10 μ mol/L) 1 μ L/1 μ L、*Taq* plus DNA polymerase (5U) 0.5 μ L、cDNA 2 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将目的片段与 TaKaRa 公司的 pMD18-T 进行连接、转化, 送至武汉金开瑞公司测序。获得基因的保守区序列。

依据所得基因的保守区序列, 设计 5'-RACE 和 3'-RACE 引物, 参照 SMARTer[®]RACE 5'/3'Kit 试剂盒 (TaKaRa) 说明进行 5'和 3'端扩增。进而得到 5'和 3'末端序列。利用 NCBI 中的 BLAST 工具对获得的保守区序列、5'和 3'末端序列测序结果进行检索比对, 再运用 DNASTAR 软件包中 SeqMan 软件对序列进行拼接。根据拼接结果设计特异引物进行 *Sbdfr* 基因全长 cDNA 扩增, 获得 *Sbdfr* 基因全长。扩增所用引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增所用引物

Table 1 Primers pairs for PCR amplification

Primers name	Primers sequences (5'-3')	Description
M ₁₃₋₄₇	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Universal primers
RV-M	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	
<i>Sbdfr</i> -5-1	TCCAGGTCCTCCAAGTGGTTTC	5'-RACE
<i>Sbdfr</i> -5-2	CAGTGTCCCTGCTGAGGTTGTG	
<i>Sbdfr</i> -3-1	AATCTTGGCTGAGAAAGCAGCA	3'-RACE
<i>Sbdfr</i> -3-2	CCCACCTAGCTTGATCACTGCA	
<i>dfr</i> -F	GAYCCYGAGAATGARGTRATHAA	Degenerate primer
<i>dfr</i> -R	TCYAVATGBACAWAYTGHCCCTTG	
Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCACGCAGAGT	UPM
Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
<i>qcdfr</i> -F	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG	Full length
<i>qcdfr</i> -R	TTCTTACTTTTGACACTAGAT	
<i>dfr</i> -RT-F	TCCAGCCACGACAGTATG	Real-time quantitative PCR
<i>dfr</i> -RT-R	GTGTCAACTTTGTGTCTGCT	
<i>Sb18SrRNA</i> -F	GGCTCCAGAAGAGCATCCAAT	
<i>Sb18SrRNA</i> -R	AGTTGTACGACCACTGGCAT	

1.4 生物信息学分析

使用 NCBI 中的 Blastn 工具对所得序列进行同源性分析。利用 ORF finder 在线软件查找开放阅读框及翻译获得目的基因编码的氨基酸序列。运用 ProtParam、PSORT II、SignalP 和 TMHMM 等在线工具分别分析蛋白的氨基酸序列、理论分子量及等电点 pI、亚细胞定位、信号肽和跨膜结构域等性质; ProtScale、NCBI Conserved Domains 软件分别分析蛋白亲疏水性和保守结构域; 运用软件 NetPhos 3.1 Server 和 NetOGlyc 4.0 Server 对蛋白进行磷酸化和糖基化位点预测。运用在线软件 SOPMA、Swiss-Model 分别进行相应的蛋白二级结构和三级结构的预测。氨基酸多序列比对采用 DNAMAN 软件进行。利用 MEGA 7 软件邻近结合法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建蛋白氨基酸序列的系统进化树, bootstrap 值为 1 000 次。

1.5 实时荧光定量 PCR 及数据分析

以 3 种花色黄芩花发育的 4 个时期的花瓣及盛花期的不同组织为材料分别提取 RNA, 进行反转录稀释后, 参照 SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 (TaKaRa) 进行实时荧光定量 PCR 反应。实时荧光定量 PCR 引物见表 1。20 μ L 反应体系为: cDNA 模板 2 μ L, 2 \times SYBR Premix Ex Taq[™] II 10 μ L, ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L,

灭菌超纯水 6 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 42 个循环。样品均进行 3 次生物学重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值法分析 *dfr* 基因在 3 种花色黄芩不同发育阶段和不同组织中的表达情况。基于 SPSS22.0 软件中的 ANOVA 法和 Duncan's 法进行单因素方差和显著性差异分析。利用 GraphPad Prism 7.0 软件进行图形分析。

2 结果与分析

2.1 *Sbdfr* 基因的克隆

以白花、紫红花和紫花黄芩花瓣 cDNA 为模板, 利用简并引物进行保守序列的扩增, 分别获得 392 bp、389 bp 和 391 bp 的目的片段。进而通过 RACE 技术扩增 5'端及 3'端基因组序列, 分别获得 531 bp、532 bp、540 bp 的 5'端目的片段和 708 bp、700 bp、707 bp 的 3'端目的片段。利用 SeqMan 软件对测序结果进行拼接。获得 3 种花色黄芩的全长序列。测序结果显示 3 个目的基因片段大小分别为 1 436 bp、1 441 bp 和 1 452 bp, 将克隆所得白花黄芩 *dfr* 基因序列命名为 *Sbdfr1* (GenBank 登录号为 MW148159)、紫红花黄芩命名为 *Sbdfr2* (GenBank 登录号为 MW148160)、紫花黄芩命名为 *Sbdfr3* (GenBank 登录号为 MW148161)。结果均符合预期的片段长度 (图 2)。

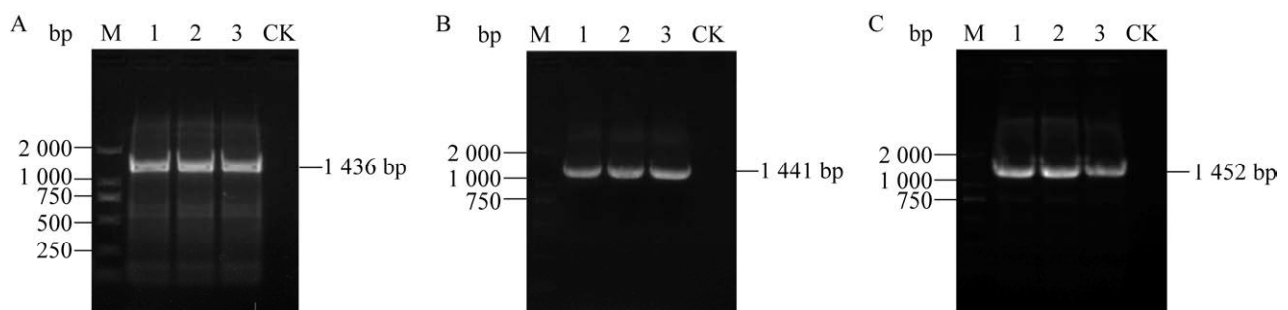


图 2 *Sbdfr* 基因的克隆

Fig. 2 Cloning of *Sbdfr* gene. PCR product of (A) *Sbdfr1*. (B) *Sbdfr2*. (C) *Sbdfr3*. M: DL 2 000[™] DNA marker; 1–3: cDNA amplification; CK: control.

2.2 序列分析

经 Blast 比对发现, 白花、紫红花和紫花黄芩的 3 个序列与已知粘毛黄芩 *dfr* 基因 (GenBank 登录号: FJ605512.1) 有较高的相似性, 分别为 99.48%、99.61%、99.87%。利用 ORF finder, ProtParam 在线工具对 3 个 *dfr* 核苷酸序列进行分析表明 (表 2), 3 个基因都包括 1 167 bp 的 ORF, 共编码 388 个氨基酸。3 个 Dfr 蛋白的理化性质较为相近。其中 *Sbdfr2* 分子量最大为 40.47 kDa。*Sbdfr2* 理论等电点最大为 5.29, 在组成 Dfr 蛋白的氨基酸中, 含量最丰富的均是苏氨酸 (Thr), 其次是谷氨酸 (Glu)。不稳定系数均小于 40, 推测蛋白均比较稳定。总平均疏水值 (GRAVY) 均为负, 为亲水性蛋白。

2.3 黄芩 Dfr 蛋白结构分析

利用在线工具 NCBI Conserved Domains 进行结构域分析 (图 3), 发现 3 个 *Sbdfr* 基因编码的 Dfr 蛋白 (白花黄芩: *SbDfr1*; 紫红花黄芩: *SbDfr2*; 紫花黄芩: *SbDfr3*) 都具有两个 NADB-Rossmann super family 的保守结构域, 即 NADPH 结合结构域和底物特异性结合结构域。疏水性预测分析结果表明, 在 *SbDfr1* 的氨基酸序列中, 第 198 位氨基酸疏水性最强, Score 值为 2.389, 第 355 位氨基酸亲水性最强, Score 值为 -2.900, 且亲水氨基酸多于疏水氨基酸, 总体平均疏水值为 -0.257, 推测该蛋白为亲水性蛋白。对 *SbDfr2* 和 *SbDfr3* 进行疏水性分析, 发现均为亲水性蛋白。信号肽预测显示, 3 个 Dfr 均没有信号肽, 为非分泌性蛋白。

表 2 不同花色黄芩的 Dfr 的理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of Dfr of *S. baicalensis* with different colors

Physical and chemical properties	<i>Sbdfr1</i>	<i>Sbdfr2</i>	<i>Sbdfr3</i>
Number of amino acids	388	388	388
Molecular weight	43 426.66	43 474.75	43 340.48
Theoretical pI	5.22	5.29	5.22
Formula	C ₁₉₃₆ H ₃₀₃₅ N ₅₀₁ O ₅₈₉ S ₂₁	C ₁₉₄₁ H ₃₀₃₉ N ₅₀₁ O ₅₈₈ S ₂₁	C ₁₉₂₇ H ₃₀₂₅ N ₅₀₁ O ₅₉₁ S ₂₁
Instability index	33.48	34.07	35.52
Total number of negatively charged residues	51	51	51
Total number of positively charged residues	34	35	34
Grand average of hydropathicity	-0.257	-0.261	-0.278

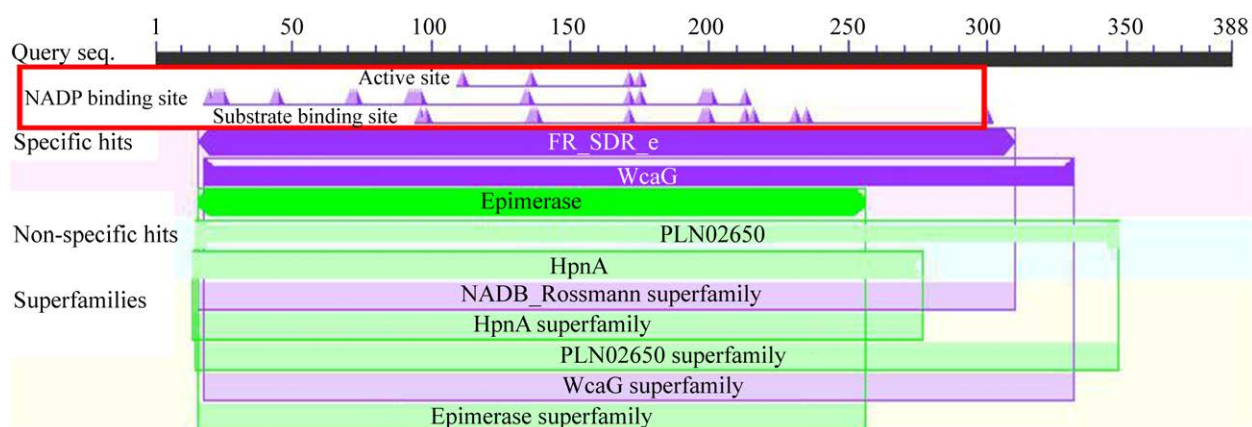


图 3 白花黄芩 Dfr 蛋白的保守结构域预测

Fig. 3 Prediction of the conserved domain of Dfr protein in white *Scutellaria*. The NADPH binding domain and substrate specific binding domain are marked by red frame.

推测 3 个基因在进行蛋白合成时,在核糖体上起始合成后不经蛋白转运直接在细胞质中催化合成。跨膜结构预测结果表明,3 个蛋白均无跨膜结构。亚细胞定位的分析显示,预测 3 个蛋白可能分布在细胞质 (55.6%)、线粒体 (33.3%) 和分泌的囊泡 (11.1%) 中。

Dfr 蛋白的磷酸化和糖基化位点预测结果显示 (图 4),SbDfr1 蛋白中有 16 个丝氨酸 (Ser)、17 个 Thr、5 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点和 12 个 O 糖基化位点;SbDfr2 中有 16 个 Ser、19 个 Thr、5 个 Tyr 磷酸化位点和 11 个 O 糖基化位点;SbDfr3 中有 18 个 Ser、18 个 Thr、5 个 Tyr 磷酸化位点和 16 个 O 糖基化位点。

通过在线工具 SOPMA 对 *dfr* 基因编码的蛋白质进行二级结构预测及氨基酸序列分析,发现三者结构相似,均由 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链和 β -折叠结构元件构成。其中 SbDfr1、SbDfr2、SbDfr3 结构中, α -螺旋 (Helix) 比例分别为 36.60%、38.66%、36.60%,延伸链 (Strand) 比例分别为 13.66%、12.37%、12.89%, β -折叠 (Turn) 比例分别为 6.44%、6.44%、6.96% 和无规则卷曲 (Coil) 比例分别为 43.30%、42.53%、43.56%。进一步分析发现,三者的催化残基位点有所差异,

其中 SbDfr1 和 SbDfr3 在第 136、138、171 和 175 位氨基酸处存在发挥催化作用的位点,而 SbDfr2 在第 136、160、164、171 和 175 位氨基酸处存在催化位点。

为进一步明确 Dfr 蛋白发挥催化活性的关键结构域,基于 PDB 数据库中的葡萄属 Dfr 蛋白 (PDB 登录号: 3bxx.1.A) 三维结构模型进行 Dfr 蛋白关键结构域的 3-D 模型的预测 (图 5),利用 phyre2 和 pymol 软件对 Dfr 氨基酸序列进行分析,3 个 Dfr 预测结构显示,与模板结构相似度分别为 69.42%、69.94% 和 69.85%,包含 6 个 β -转角: β 1 (15–19 位 aa)、 β 2 (38–45 位 aa)、 β 3 (88–92 位 aa)、 β 4 (130–140 位 aa)、 β 5 (192–197 位 aa)、 β 6 (257–260 位 aa);两对 α -螺旋: α 1 (24–35 位 aa)、 α 2 (98–125 位 aa)、 α 3 (170–188 位 aa)、 α 4 (239–251 位 aa)。其中 6 个 β -转角和两对 α -螺旋形成了 Rossmann 折叠区,是辅酶 NADP⁺ 和 Dfr 底物特异性结合位点区。本研究发现,在第 121 位点, SbDfr1 是亮氨酸,为疏水氨基酸, SbDfr2 和 SbDfr3 是丝氨酸,属亲水氨基酸;在第 164 位点, SbDfr2 是赖氨酸, SbDfr1 和 SbDfr3 是天冬氨酸。这两个差异位点均处在 Rossmann 折叠结构中,其位点差异可能导致 Dfr 选择性催化底物。基于

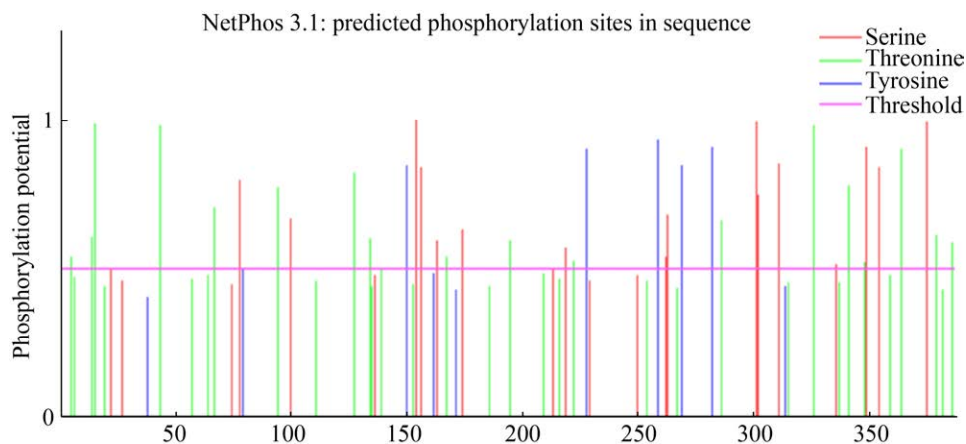


图 4 白花黄芩 Dfr 蛋白的磷酸化位点预测

Fig. 4 Prediction of phosphorylation site of Dfr protein in white *Scutellaria*. The Ser, Thr, Tyr and Thr phosphorylation site are indicated with red, green, blue and pink lines respectively.

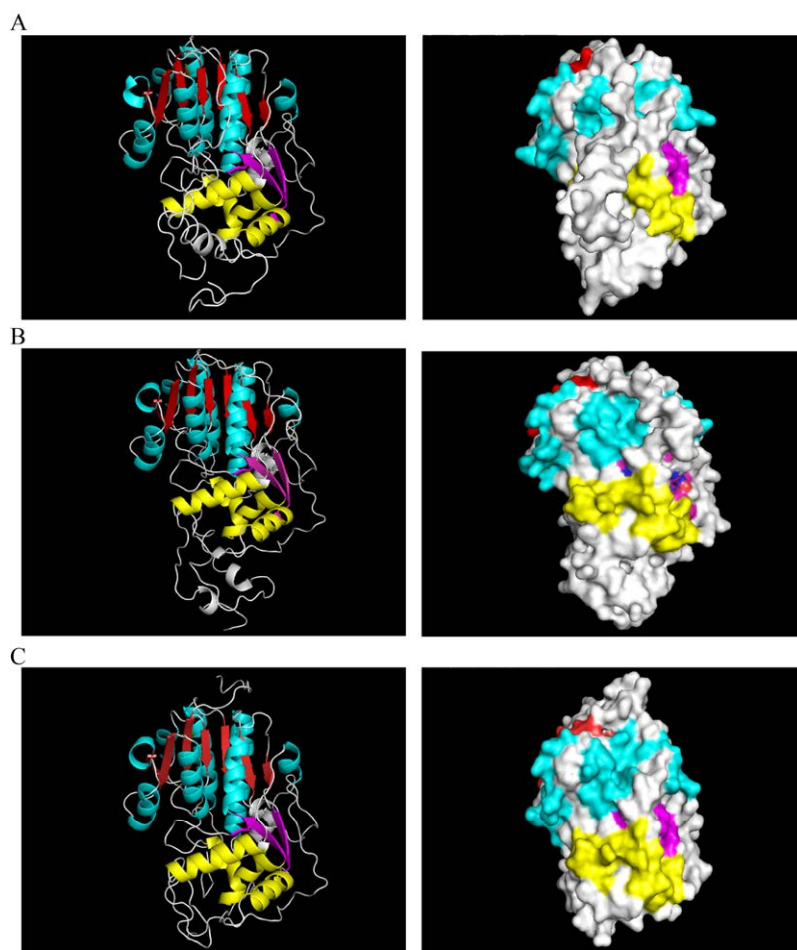


图5 黄芩 Dfr 蛋白关键结构域的 3-D 模型构建

Fig. 5 Construction of 3-D model of key domain of Dfr protein in *S. baicalensis*. The same secondary structure in the same area is marked with the same color. Different color regions in the protein structure on the right correspond to the corresponding secondary structure in the left picture. Construction of 3D model of (A) SbDfr1 protein key domain. (B) SbDfr2 protein key domain. (C) SbDfr3 protein key domain.

其关键结构域的 3D 模型分析, 发现其表面催化活性蛋白区域有所差异, 该结构区域碱基的突变可能会影响催化底物的改变。

2.4 Dfr 的序列比对和系统进化分析

利用 DNAMAN 软件将克隆所得的 3 个 Dfr 蛋白与其他物种蛋白氨基酸序列进行多重比对分析, 分析结果显示 3 个 Dfr 氨基酸序列都具有高度保守的功能区域和非常高的同源性。白花、紫红花与紫花黄芩 *dfr* 基因编码的蛋白的同源性分别为 99.48% 和 99.23% (图 6)。在其 N 端第 18–38 位的

氨基酸之间存在高度保守的 NADPH 结合位点“VTGASGFISWLVMLRLQHG”。

为明确 3 种花色黄芩的进化与起源关系, 将所得的核酸序列进行 BlastX 分析, 而后利用 MEGA5.2 软件将其与具有同源性的其他植物构建氨基酸序列系统进化树 (图 7)。结果显示, 所选植物的 Dfr 分成两大分支, 克隆得到的 3 个 Dfr 蛋白 SbDfr1、SbDfr2 和 SbDfr3 与已知粘毛黄芩 (GenBank 登录号 ACV49882.1) 亲缘关系最近, 与同为唇形科的丹参、植物钓钟柳等聚为一大簇,

亲缘关系较近。与茄科的马铃薯、矮牵牛及辣椒等亲缘关系相对较远。

2.5 *Sbdfr* mRNA 表达分析

以黄芩紫花 F1 时期 *Sbdfr1* 表达量为基准, 研究了 *dfr* 在不同花色黄芩中不同发育时期 mRNA 的表达情况 (图 8A)。结果显示, 在白花黄芩花期发育过程中, *Sbdfr1* 的表达量从 F1 至 F3 期呈缓慢上升趋势, 后期迅速增加, F4 期表达

量达到最大值, 极显著高于其他时期和其他花色 ($P < 0.01$); 在紫红花黄芩花期发育过程中, *Sbdfr2* 在花蕾开始着色的 F1 期的表达量最高, 显著高于 *Sbdfr1* 和 *Sbdfr3* ($P < 0.05$), 花瓣完全盛开时期, 其表达量最低; 在紫花黄芩花期发育过程中, *Sbdfr3* 的表达量在 F1 至 F3 期整体保持极缓慢上升趋势, 在 F4 期时显著上升, 表达量是 F3 期的 3 倍。

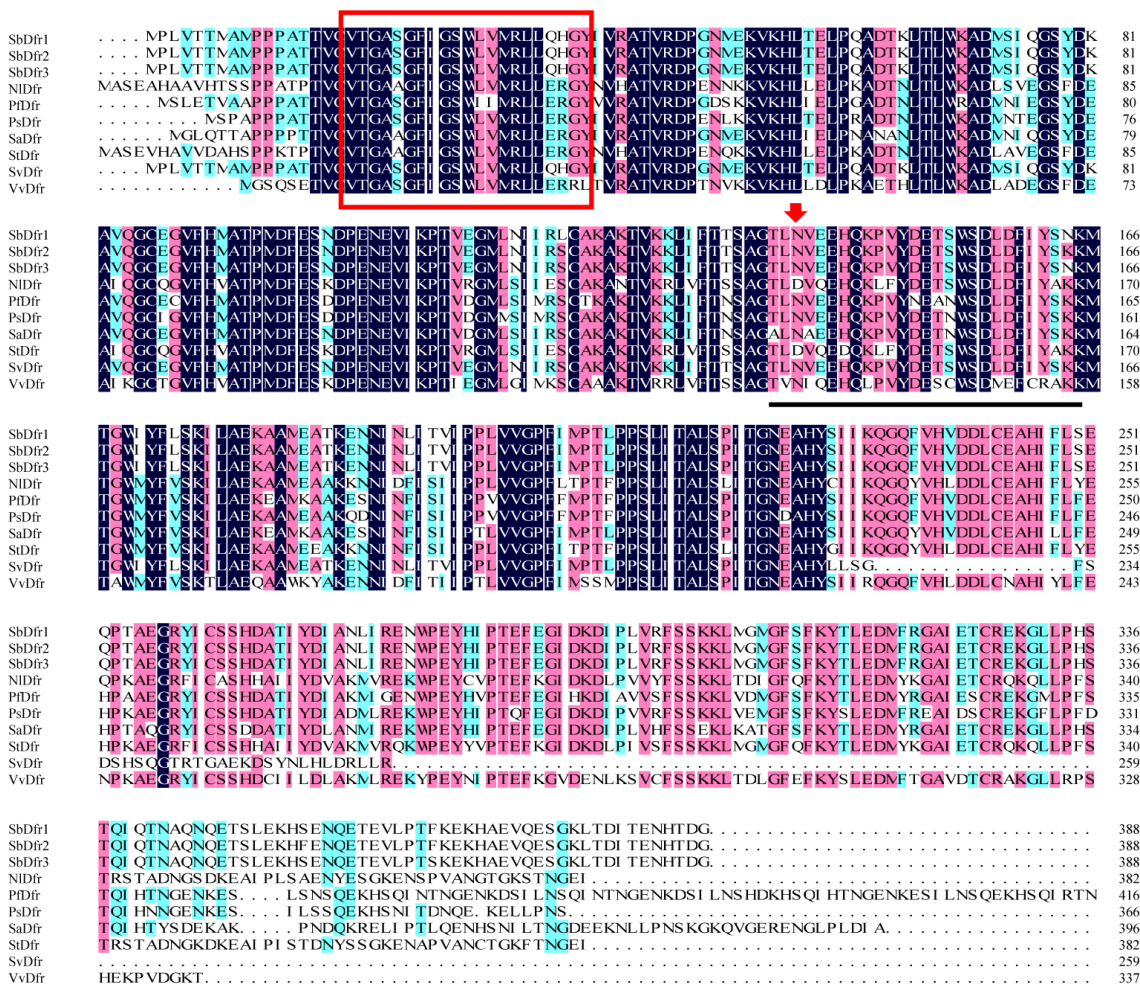


图 6 *SbDfr* 与不同物种 *Dfr* 蛋白的氨基酸序列对比

Fig. 6 Amino acid sequence alignment between *SbDfr* and *Dfr* proteins from different species. NADP highly conserved binding regions are marked with red square, and substrate specific binding regions are marked with black line. The red arrow indicates the amino acid site that determines the specificity of the enzyme substrate. *NIDfr*: *Nicotiana langsdorffii* Dfr, ACS12835.1; *PIDfr*: *Perilla frutescens* Dfr, BAA19658.1; *PsDfr*: *Plectranthus scutellarioid* Dfr, ABP57077.1; *SaDfr*: *Striga asiatica*, GER27969.1; *StDfr*: *Solanum tuberosum* Dfr, AFQ98276.1; *SvDfr*: *Scutellaria viscidula* Dfr, ACV49882.1; *VvDfr*: *Vitis vinifera* Dfr, CAA53578.1.

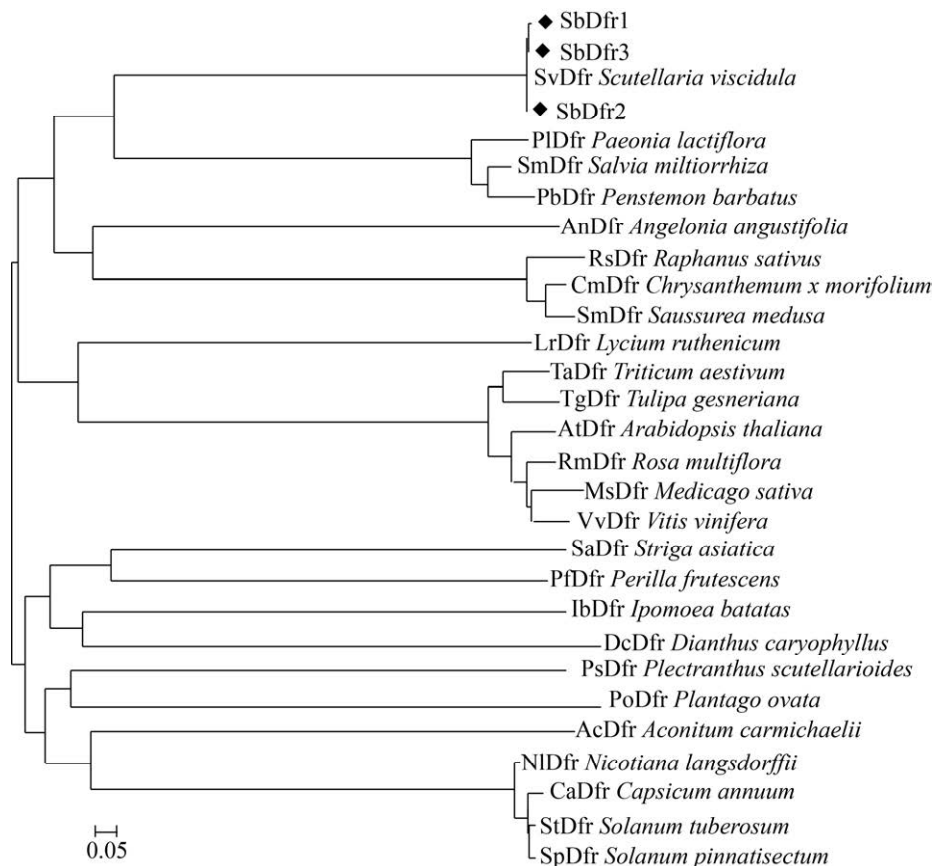


图 7 基于氨基酸序列构建 Dfr 系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of Dfr constructed based on amino acid sequences. PIDfr: *Paeonia lactiflora* Dfr, QIC54081.1; NIDfr: *Nicotiana langsdorffii* Dfr, ACS12835.1; SmDfr: *Salvia miltiorrhiza* Dfr, AWX67418.1; PbDfr: *Penstemon barbatus* Dfr, AIY51701.1; AaDfr: *Angelonia angustifolia* Dfr, AHM27144.1; RsDfr: *Raphanus sativus* Dfr, AGU42192.1; CmDfr: *Chrysanthemum x morifolium* Dfr, ABK88310.2; SmDfr: *Saussurea medusa* Dfr, ABQ97018.1; LrDfr: *Lycium ruthenicum* Dfr, ATB56299.1; TaDfr: *Triticum aestivum* Dfr, AAO53552.1; TgDfr: *Tulipa gesneriana* Dfr, BAH98155.1; AtDfr: *Arabidopsis thaliana* Dfr, NP_199094.1; RmDfr: *Rosa multiflora* Dfr, AJT55524.1; MsDfr: *Medicago sativa* Dfr, AEI59122.1; IbDfr: *Ipomoea batatas* Dfr, AEQ92209.1; DcDfr: *Dianthus caryophyllus* Dfr, CAA91924.1; PoDfr: *Plantago ovate* Dfr, AMR60823.1; AcDfr: *Aconitum carmichaelii* Dfr, AMR60823.1; SpDfr: *Solanum pinnatisectum* Dfr, AAX63400.1; CaDfr: *Capsicum annuum* Dfr, ACN60404.1.

为进一步研究 *dfr* 基因在 3 种花色黄芩盛花期的组织特异性表达情况,以紫花黄芩茎部的 *dfr* 表达量为基准,通过实时荧光定量 PCR 技术进行了研究 (图 8B),发现 *dfr* 基因在 3 种花色黄芩地上部分的不同组织中均有不同丰度的表达,其中在各花色中花瓣的表达量最高,均极显著高于茎和叶 ($P < 0.01$)。其中紫花在叶中的表达量高于茎中的表达量,而白花和紫红花在叶中的表达低于茎中。

3 讨论

本研究通过 RACE 技术从白色、紫红色和紫色的黄芩花中成功克隆 *Sbdfr1*、*Sbdfr2* 和 *Sbdfr3* 的 cDNA 序列,将其 CDS 进行 Blast 比对,发现 3 个序列具有很高的相似性。在对其理化性质、亲疏水性、跨膜结构、亚细胞定位及结构预测中发现,3 个基因相似性较高,均为亲水性蛋白,都不具有信号肽,为非分泌性蛋白。亚细胞定位预测结果显示, Dfr 蛋白主要集中在细胞质中,符

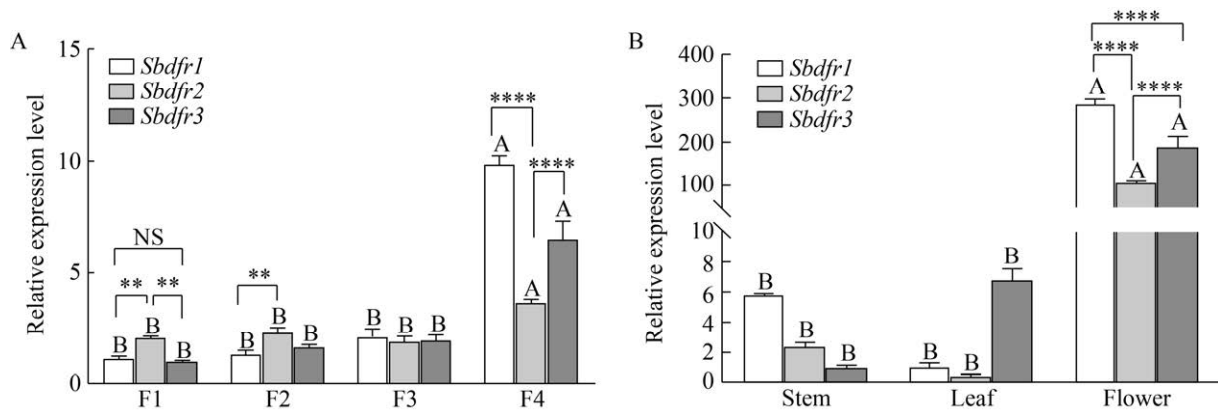


图 8 *dfr* 在白花、紫红花和紫花黄芩不同发育时期、不同组织的相对表达

Fig. 8 Relative expression of *dfr* in different development stages and tissues of white, purple-red and purple *S. baicalensis* petals. (A) Relative expression of *dfr* in different development stages. Histograms with different uppercases letters indicate extremely significant differences at different development stages of the same flower ($P < 0.01$). ****, ** and NS indicate that the expression of *dfr* in different colors *S. baicalensis* at same time had significant difference at the 0.01 level, significant difference at the 0.05 level and no difference at the 0.05 level, respectively. (B) Relative expression of *dfr* in different tissues. Histograms with different uppercases letters indicate extremely significant differences at different tissues of the same development stages ($P < 0.01$). **** indicate that the expression of *dfr* in different colors *S. baicalensis* at same tissues had significant difference at the 0.01 level.

合上述推断。最后阶段花色苷的形成需要经过一系列糖基化、磷酸化、甲基化等的修饰，在对 3 个蛋白的磷酸化位点和糖基化位点预测分析中，发现白花、紫红花和紫花的磷酸化位点和糖基化数目均不相同，推测这些差异可能是黄芩不同花瓣颜色中的 Dfr 催化底物不同所致。将 *Sbdfr1*、*Sbdfr2* 和 *Sbdfr3* 编码的序列与已登录的其他物种 Dfr 进行多重序列比对，发现都具有高度保守的 NADPH 结合位点和底物特异性位点。Johnson 等^[12]通过对非洲菊的研究表明，其底物的特异性则是由其第 134 位至 145 位间的氨基酸残基直接决定的。依据第 134 位的氨基酸残基种类将 Dfr 分为 3 类，第一类为天冬酰胺 (Asn, N) 型 Dfr，大多数植物的 Dfr 为此类型，其氨基酸残基为 Asn；第二类为天冬氨酸 (Asp, D) 型 Dfr，其氨基酸残基为 Asp，此类 Dfr 则不具有催化 DHK 的活性，如矮牵牛；第三类为非 Asn/Asp 型 Dfr，其氨基酸残基既不是 Asn 也不是 Asp。Chen 等^[19]对鳞毛蕨中决定底物特异性位点的精氨酸进行了研究验证，推测精氨酸 (Arg, R) 型 Dfr 是一种

新的功能性 Dfr。根据此特点，研究人员通过进行花色改良来提高其观赏价值。如 Chu 等^[20]将月季的 RcDfr 基因导入矮牵牛中，表现出与原色不同的颜色。本研究中 3 种花色黄芩的 SbDfr 均为 Asp 型，但却表现出不同的表型，推测可能是花青素合成途径中其他结构基因及转录因子调控 *dfr* 基因表达所致，或者是 Dfr 催化底物异构化所致。

Dfr 选择性地催化 3 种二氢黄酮醇 (DHK、DHQ、DHM) 形成相应的花色苷，显示出特定的底物偏好性。三种二氢黄酮醇在结构上仅在 B 环上的羟基数目不同，因此 Dfr 的底物特异性是由底物结合区域编码的蛋白和底物 B 环之间不同的相互作用引起的^[21-22]。Katsu 等^[23]对荞麦 FeDfr 研究发现，Dfr 的底物特异性不仅仅由决定底物特异性的区域中第 3 位氨基酸的类型决定，而且它的邻近残基也参与了底物口袋的形成，在决定底物偏好性方面起着重要的作用。因此，本研究基于其关键结构域进行了分析和 3D 模型的构建，发现其表面催化活性蛋白区域有所差异，推测其独特的结构是决定 Dfr 选择性催化底物的关键。

植物中花青素的合成途径中受一系列关键酶催化及相关转录因子共同协作影响^[24], 如苯丙氨酸解氨酶 (Pal)、查尔酮异构酶 (Chi)、类黄酮-3'-羟基化酶 (F3'h)、类黄酮-3',5'-羟基化酶 (F3'-5'h) 花青素合酶 (Ans) 和糖基转移酶 (Ufgt) 等。其在植物不同组织的表达以及在不同花期的花瓣的表达模式, 与植物的颜色表型具有一致性。Meng 等^[25]研究证实 MYB 激活因子 WP1 能够与 bHLH 家族蛋白 MtTT8 和 MtWD40-1 互作形成复合体, 共同调节蒺藜苜蓿的花瓣颜色。Li 等^[26]发现 bHLH3 异常表达会导致桑葚果实色素成分差异。dfr 作为类黄酮花青素合成途径的一个决定性的关键酶基因, 对其在 3 种花色黄芩中的表达模式进行了研究。结果发现 *Sbdfr* 在黄芩地上部分各组织均有表达, 但表达丰度有所差异, 均在花瓣中最高, 其中 *Sbdfr3* 在叶中的表达量高于茎, *Sbdfr1* 和 *Sbdfr2* 则相反。推测该基因参与调控植物各组织的着色, 影响类黄酮途径中的代谢流向。在花瓣发育进程中, *Sbdfr* 在 3 种花色黄芩中基本都是在 F1 至 F3 时期呈缓慢上升趋势, 而后在 F4 时期表达量迅速增加, 且白花中 *dfr* 的表达量最高, 显著高于其他花色, 在紫花和紫红花黄芩花瓣中均检测到花色苷的大量积累, 而在白花黄芩中几乎检测不到, 推测可能白花在花瓣着色过程中, *dfr* 基因正常表达, 下游基因 *ans* 和 *ufgt* 表达异常所致。黄芩花色出现差异是由单基因 *dfr* 作用影响还是由多个基因叠加作用后的结果, 以及如何调控和协同作用, 还需进一步的深入研究。后续试验将从构建 3 种底物 (DHK、DHQ、DHM) 分子复合物和 SbDfr 对接模型和克隆花色苷合成途径中的其他关键酶基因及转录因子两方面着手, 为阐明黄芩花色差异和 Dfr 底物选择性分子机制奠定基础。

REFERENCES

- [1] Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(5): 236-242.
- [2] The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botan J Linnean Soc*, 2009, 161(2): 105-121.
- [3] 刘学铭, 肖更生, 陈卫东. 桑椹的研究与开发进展. *中草药*, 2001, 32(6): 569-571.
Liu XM, Xiao GS, Chen WD. Advances in research and development of mulberry. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2001, 32(6): 569-571 (in Chinese).
- [4] Mierziak J, Kostyn K, Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 2014, 19(10): 16240-16265.
- [5] Brunetti C, Di Ferdinando M, Fini A, et al. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(2): 3540-3555.
- [6] Grimes KL, Stuart CM, McCarthy JJ, et al. Enhancing the cancer cell growth inhibitory effects of table grape anthocyanins. *J Food Sci*, 2018, 83(9): 2369-2374.
- [7] 董杨, 季光, 曹爱丽, 等. 甜橙黄酮对人胃癌 AGS 细胞增殖和凋亡的作用及其机制研究. *中国中药杂志*, 2011, 36(6): 790-794.
Dong Y, Ji G, Cao AL, et al. Effects of sinensetin on proliferation and apoptosis of human gastric cancer AGS cells. *Chin J Tradit Chin Med*, 2011, 36(6): 790-794 (in Chinese).
- [8] Lim SH, You MK, Kim DH, et al. RNAi-mediated suppression of dihydroflavonol 4-reductase in tobacco allows fine-tuning of flower color and flux through the flavonoid biosynthetic pathway. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 109: 482-490.
- [9] Wu XL, Beecher GR, Holden JM, et al. Concentrations of anthocyanins in common foods in the united states and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(11): 4069-4075.
- [10] Jeong JC, Jang SW, Kim TH, et al. Mulberry fruit (*Morus fructus*) extracts induce human glioma cell death *in vitro* through ROS-dependent mitochondrial pathway and inhibits Glioma tumor growth *in vivo*. *Nutr Cancer*, 2010, 62(3): 402-412.
- [11] Johnson ET, Ryu S, Yi H, et al. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of

- dihydroflavonol 4-reductase. *Plant J*, 2001, 25(3): 325-333.
- [12] Cheng H, Li LL, Cheng SY, et al. Molecular cloning and characterization of three genes encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Ginkgo biloba* in Anthocyanin biosynthetic pathway. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e72017.
- [13] Wang HX, Fan WJ, Li H, et al. Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e78484.
- [14] Yoshida K, Iwasaka R, Shimada N, et al. Transcriptional control of the dihydroflavonol 4-reductase multigene family in *Lotus japonicus*. *J Plant Res*, 2010, 123(6): 801-805.
- [15] Shang XF, He XR, Hi XY, et al. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 279-313.
- [16] Zhang YY, Wang XY, Wang XR, et al. Protective effect of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi on cerebral ischemia injury. *J Ethnopharmacol*, 2006, 108(3): 355-360.
- [17] Baumann S, Fas SC, Giaisi M, et al. Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLC γ 1- and Ca²⁺-dependent apoptosis. *Blood*, 2008, 111(4): 2354-2363.
- [18] Parajuli P, Joshee N, Rimando AM, et al. *In vitro* antitumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta Med*, 2009, 75(1): 41-48.
- [19] Chen XF, Liu WL, Huang XY, et al. Arg-type dihydroflavonol 4-reductase genes from the fern *Dryopteris erythrosora* play important roles in the biosynthesis of anthocyanins. *PLoS ONE*, 2020, 15(5): e0232090.
- [20] Chu YX, Chen HR, Wu AZ, et al. Expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase genes in *Petunia hybrida*. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 5010-5021.
- [21] Zhang TJ, Zheng J, Yu ZC, et al. Functional characteristics of phenolic compounds accumulated in young leaves of two subtropical forest tree species of different successional stages. *Tree Physiol*, 2018, 38(10): 1486-1501.
- [22] Wang X, Li CF, Zhou C, et al. Molecular characterization of the C-glucosylation for puerarin biosynthesis in *Pueraria lobata*. *Plant J*, 2017, 90(3): 535-546.
- [23] Katsu K, Suzuki R, Tsuchiya W, et al. A new buckwheat dihydroflavonol 4-reductase (DFR), with a unique substrate binding structure, has altered substrate specificity. *BMC Plant Biol*, 2017, 17: 239.
- [24] Suzuki K, Suzuki T, Nakatsuka T, et al. RNA-seq-based evaluation of bicolor tepal pigmentation in Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). *BMC Genomics*, 2016, 17: 611.
- [25] Meng YY, Wang ZY, Wang YQ, et al. The MYB activator WHITE PETAL1 associates with MtTT8 and MtWD40-1 to regulate carotenoid-derived flower pigmentation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 2019, 31(11): 2751-2767.
- [26] Li H, Yang Z, Zeng QW, et al. Abnormal expression of *bHLH3* disrupts a flavonoid homeostasis network, causing differences in pigment composition among mulberry fruits. *Hortic Res*, 2020, 7: 83.

(本文责编 郝丽芳)