

管花肉苁蓉花中二氢黄酮醇4-还原酶的克隆、表达分析和酶活性鉴定

邱海玲^{1,2}, 王方明³, 高博闻⁴, 米苾雨^{1,2}, 张泽坤^{1,2}, 杜宇^{1,2}, 史社坡^{1,2},
屠鹏飞^{3*}, 王晓晖^{1,2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院中药现代研究中心, 北京 100029;
3. 北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 4. 包头医学院, 内蒙古 包头 014060)

摘要: 二氢黄酮醇4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 是花色苷生物合成途径的关键酶, 在植物花色调控中发挥重要作用。本研究通过管花肉苁蓉花转录组数据分析, 利用 RT-PCR 技术克隆出一条 *DFR* 基因并命名为 *CtDFR*, 其开放阅读框 (ORF) 长 1 263 bp, 编码 420 个氨基酸, 蛋白分子质量为 47.5 kDa。序列分析表明 *CtDFR* 具有 NADPH 结合域和底物特异性结合域。实时荧光定量 PCR 表明 *CtDFR* 在管花肉苁蓉的红、紫色花中高表达, 相对表达量分别是白色花的 4.04、19.37 倍。构建原核表达载体 pET-28a-*CtDFR*, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中, 成功表达 *CtDFR* 蛋白, 纯化得到可溶性重组蛋白。体外酶活性分析表明, 重组蛋白 *CtDFR* 能催化二氢山柰酚、二氢槲皮素、二氢杨梅素生成无色天竺葵素、无色矢车菊素、无色飞燕草素。亚细胞定位实验结果表明 *CtDFR* 主要定位于细胞质中。本研究结果表明 *CtDFR* 在管花肉苁蓉花色调控中起到重要作用, 为进一步探讨管花肉苁蓉花色形成及调控机制研究奠定了基础。

关键词: 管花肉苁蓉; 花色; 二氢黄酮醇4-还原酶; 表达分析; 酶活性分析; 亚细胞定位

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-1079-11

Cloning, expression analysis and enzyme activity verification of dihydroflavonol 4-reductase from *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight flower

QIU Hai-ling^{1,2}, WANG Fang-ming³, GAO Bo-wen⁴, MI Xin-yu^{1,2}, ZHANG Ze-kun^{1,2}, DU Yu^{1,2},
SHI She-po^{1,2}, TU Peng-fei^{3*}, WANG Xiao-hui^{1,2*}

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100191, China; 4. Baotou Medical College, Baotou 014060, China)

Abstract: Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) plays an essential role in the biosynthesis of anthocyanin and regulation of plant flower color. Based on the transcriptome data of *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight, a full-length cDNA sequence of *CtDFR* gene was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *CtDFR* contains an open reading frame (ORF) of 1 263 bp which encodes 420 amino acids with a predicted molecular weight of 47.5 kDa. The sequence analysis showed that *CtDFR* contains a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) binding domain and a specific substrate binding domain. The expression analysis

收稿日期: 2022-08-23; 修回日期: 2022-09-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773832).

*通讯作者 Tel: 86-10-64286180, E-mail: pengfeitu@163.com;

Tel: 15201166873, E-mail: wangxhui2014@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1008

indicated that *CtDFR* was highly expressed in red and purple flowers, and the relative expression levels were 4.04 and 19.37 times higher than those of white flowers, respectively. The recombinant *CtDFR* protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using vector pET-28a-*CtDFR* and was purified. *In vitro* enzyme activity analysis, *CtDFR* could reduce three types of dihydroflavonols including dihydrokaempferol, dihydroquercetin, and dihydromyricetin to leucopelargonidin, leucocyanidin and leucodelphinidin. Subcellular localization analysis showed that *CtDFR* was mainly localized in the cytoplasm. These results demonstrate that *CtDFR* plays an important role in regulation of flower color in *C. tubulosa* and make a valuable contribution for the further investigation on the regulation mechanism of *C. tubulosa* (Schenk) Wight flower color.

Key words: *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight; flower color; dihydroflavonol 4-reductase; expression analysis; enzyme activity analysis; subcellular localization

管花肉苁蓉 [*Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight] 为列当科肉苁蓉属植物, 是名贵中药肉苁蓉的基原植物之一^[1], 主要分布于新疆南疆的塔克拉玛干沙漠及周围地区, 在新疆和田区已形成大规模人工种植^[2]。管花肉苁蓉花期为4~5月, 颜色多为紫色至粉红色, 少数为白色^[3]。管花肉苁蓉拥有丰富的花色, 但未见其机制研究报道。花色与花瓣色素的种类、含量、分布及花瓣组织结构有关, 其中色素分为三大类: 类胡萝卜素、类黄酮和生物碱^[4]。类黄酮能产生淡黄色至蓝紫色, 颜色范围在3种色素中最为广泛, 因此被认为是十分重要的色素^[5]。花色素苷是类黄酮中一类重要的水溶性化合物, 能呈现出粉红色至蓝紫色^[6], 调控许多植物的花色, 如菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)^[7]、牡丹 [tree peony (*Paeonia suffruticosa*)]^[8]、非洲堇 (*Saintpaulia* cultivars)^[9]、紫罗兰 (*Matthiola incana*)^[10]、血红杜鹃 (*Rhododendron sanguineum* complex)^[11]等。管花肉苁蓉主要有3种花色: 白色、红色、紫色 (图1A), 丰富的花色可能与花色素苷的种类和含量有关。丰富的花色不仅可作观赏, 还对传粉昆虫有较大影响, 已有的研究表明, 管花肉苁蓉紫色花的昆虫访问频率最高^[12]。此外, 之前的研究结果表明, 药用植物花色与药材的品质可能相关, 如紫花苦玄参的苦玄参苷含量高于白花苦玄参^[13]; 白花类型甘草的甘草素、甘草苷、异甘草素含量高于深紫花类型甘草等^[14], 但关于管花肉苁蓉花色和品质的相关研究尚未见报道, 因此对管花肉苁蓉花中花色素苷合成基因进行生物学研究有利于阐明管花肉苁蓉花色形成机制, 为管花肉苁蓉的应用和管花肉苁蓉花色和品质之间的关系相关研究提供科学支撑。

花色素苷的生物合成途径起始于一般苯丙烷途径, 苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H) 和 4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (4-coumarate-coenzyme A ligase, 4CL) 的催化下反应生成 4-香豆酰辅酶 A^[15], 1分子的 4-香豆酰辅酶 A 与 3分

子的丙二酰辅酶 A 经查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 催化生成具有黄酮类化合物 C6-C3-C6 骨架的柚皮素查耳酮, 再通过查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮-3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H)、类黄酮 3'-羟化酶 (flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)、类黄酮 3'5'-羟化酶 (flavonoid 3'5'-hydroxylase, F3'5'H) 反应生成二氢黄酮醇, 再由二氢黄酮醇 4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 和花青素合成酶 (anthocyanidin synthase, ANS) 催化生成花青素, 花青素再通过一系列糖基化和甲基化反应最终生成花色素苷 (图1B)^[4]。

在花色素苷生物合成途径中, DFR 催化 3 种二氢黄酮醇: 二氢山柰酚 (dihydrokaempferol, DHK)、二氢槲皮素 (dihydroquercetin, DHQ)、二氢杨梅素 (dihydromyricetin, DHM), 生成相应的无色花青素: 无色天竺葵素、无色矢车菊素、无色飞燕草素, 在其他酶的催化下连续反应生成天竺葵苷、矢车菊苷、飞燕草苷 (图1B), 从而使植物表现出不同的花色, 因此在植物花色形成过程中起到重要作用。DFR 具有底物特异性, 催化 DHK 后最终生成的天竺葵苷使花色呈现为橙色/砖红色, 催化 DHQ 后最终生成的矢车菊苷使花色呈现为洋红色/红色, 催化 DHM 后最终生成的飞燕草苷使花色呈现为蓝色/紫色^[16], 若 DFR 不能催化相应底物则无法产生对应的花色, 如矮牵牛中 DFR 无法催化 DHK, 使得该物种缺乏天竺葵素, 不能产生橙色花^[17], DFR 催化活性和表达模式决定了花色素苷的种类和含量^[18]。本研究根据转录组测序结果从管花肉苁蓉花中克隆得到一条 *CtDFR* 基因, 并对其进行生物信息学分析、原核表达与纯化、酶活性分析、3 种颜色花中的表达分析、亚细胞定位分析, 初步探索 *CtDFR* 与管花肉苁蓉花色的关系, 为管花肉苁蓉花色调控机制研究奠定基础。

材料与方法

材料 管花肉苁蓉花于 2018 年 5 月采自新疆和田

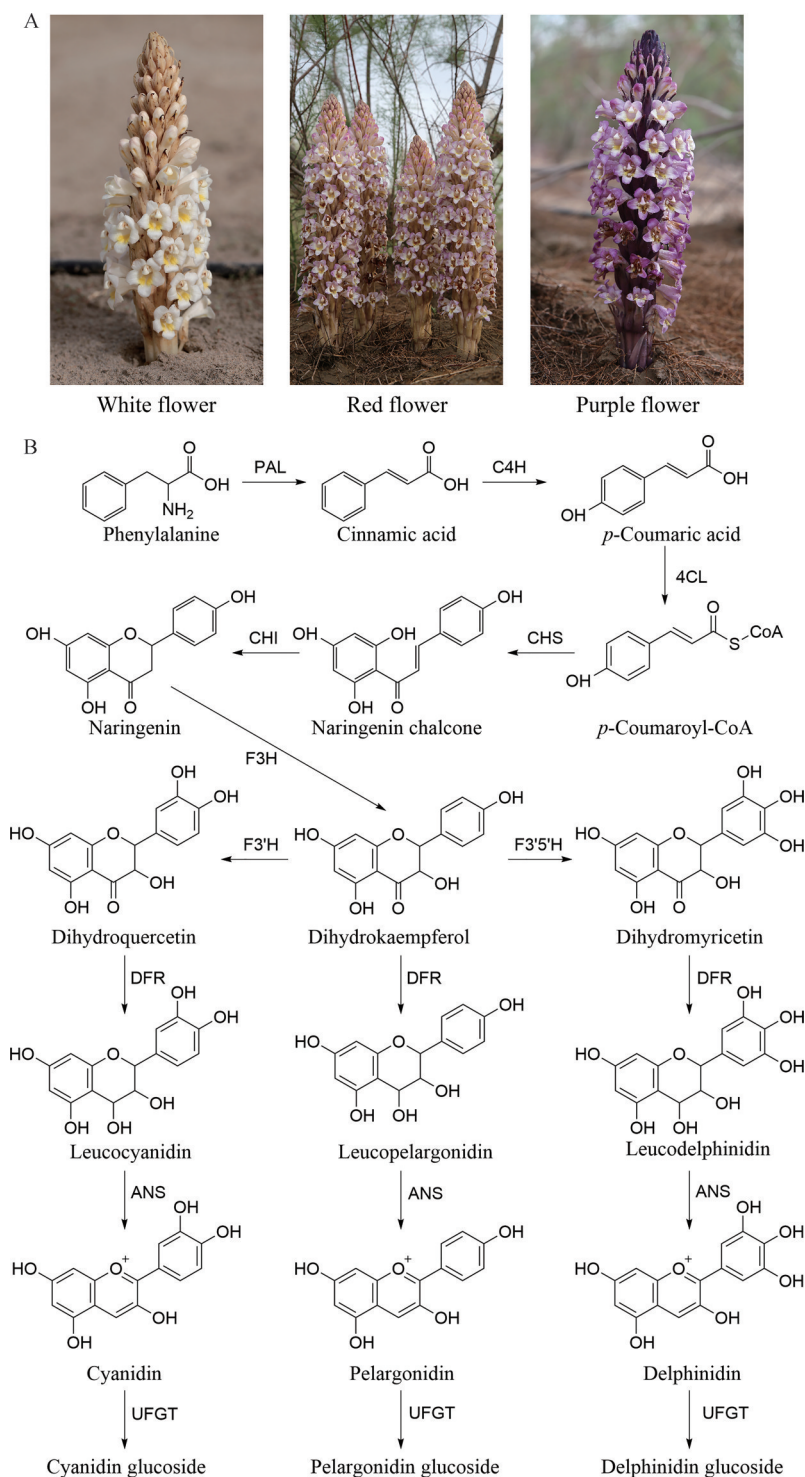


Figure 1 Flowers of *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight and anthocyanin biosynthetic pathway. A: White, red and purple flowers of *C. tubulosa* (Schenk) Wight; B: The biosynthetic pathway from phenylalanine to anthocyanin. PAL: Phenylalanine ammonia-lyase; C4H: Cinnamic acid 4-hydroxylase; 4CL: 4-Coumarate-coenzyme A ligase; CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; F3H: Flavanone 3-hydroxylase; F3'H: Flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H: Flavonoid 3'5'-Hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol 4-reductase; ANS: Anthocyanidin synthase; UFGT: UDPG-flavonoid glucosyltransferase

地区于田县, 选取生长健康、株高相近的管花肉苁蓉, 白色花、红色花、紫色花的植株各取3株, 由北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定为管花肉苁蓉, 经液氮速冻后

干冰保存运至北京。大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); *E. coli* BL21(DE3) (北京全式金生物科技股份有限公司); pET-28a、pCAM-

BIA1300-35S-GFP 载体 (武汉转导生物实验室有限公司); DHK (北京松原科创科技有限公司); DHQ (北京索莱宝科技有限公司); DHM (北京沿程科技有限公司); NADPH (上海吉至生化科技有限公司); 天竺葵素、矢车菊素、飞燕草素标准品 (上海源叶生物科技有限公司)。

RNA 提取与 cDNA 合成 利用 RNA 提取试剂盒 (Cat 17200, Norgen 公司) 提取管花肉苁蓉花的总 RNA, 通过 NanoDrop 2000C 仪检测 RNA 浓度并挑选 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.1 的 RNA 样品用于后续实验。使用逆转录酶试剂盒 (Cat R323-01, 诺唯赞公司) 将检测合格的总 RNA 反转录为 cDNA 第一条链, 实验操作按照说明书进行。

CtDFR 基因的克隆 根据管花肉苁蓉花二代转录组数据^[19]分析挖掘具有完整开放阅读框的 CtDFR, 利用 SnapGene 软件设计特异性引物 (表 1), 以管花肉苁蓉花 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增体系为: 2×Phanta Max Buffer 25 μ L, dNTP Mix (10 mmol·L⁻¹) 1 μ L, 引物 (10 μ mol·L⁻¹) 2 μ L, cDNA 2 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μ L, ddH₂O 17 μ L。反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 进行 25 个循环: 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 循环结束后 72 °C 反应延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 利用 DNA 纯化试剂盒 (Cat DC301-01, 诺唯赞公司) 进行胶回收, 以胶回收的 DNA 片段为模板再次进行 PCR 扩增, 产物胶回收后通过快速克隆试剂盒 (Cat C601-01, 诺唯赞公司) 将回收的 DNA 片段与 pCE2 TA/Blunt-Zero 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 37 °C 过夜培养后送北京六合华大基因科技有限公司测序。

生物信息学分析 采用在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白理化性质; 运用 Prot Scale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线工具分析蛋白亲水性/疏水性; 利用在线工具 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page

=npsa_sopma.html) 预测蛋白二级结构; 通过在线分析软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白三级结构; 采用在线软件 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 预测蛋白的跨膜结构; 运用软件 DNAMAN 将 CtDFR 与其他物种 DFR 氨基酸序列进行同源性比对; 利用 MEGA X 软件构建系统进化树, 采用邻接法 (Neighbor-joining), 以泊松校正法计算进化距离, bootstrap 重复次数为 1 000 次。

CtDFR 在 3 种颜色管花肉苁蓉花中的表达分析 根据 CtDFR 序列利用 DNAMAN 设计实时荧光定量引物, 以 F-box 为内参基因, 引物序列见表 1, 通过实时荧光定量 PCR 检测不同颜色的管花肉苁蓉花中的 CtDFR 相对表达量。利用 TransStart Green qPCR SuperMix (AQ101-02, 北京全式金生物技术股份有限公司) 以 SYBR Green 荧光染料法测定, 反应体系为: 2×TransStart Green qPCR SuperMix 5 μ L、上下游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.2 μ L、cDNA 模板 0.5 μ L、无核苷酸酶水 4.1 μ L, 采用两步法进行反应, 反应程序为: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火/延伸 30 s (每次循环后采集荧光), 40 个循环后, 95 °C 变性 10 s, 55~95 °C 做熔解曲线分析, 每个温度以每步 0.5 °C 上升, 每个温度停留 5 s。实验数据通过 Excel 进行分析, 以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 CtDFR 相对表达量, 利用 GraphPad Prism 8 进行显著性分析并绘制柱状图。

CtDFR 原核表达载体的构建及异源表达 根据 CtDFR 序列设计特异性引物, 并进行扩增, 将其构建到 pET-28a 载体, 测序后提取 pET28a-CtDFR 质粒, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 利用含卡那霉素 (50 μ g·mL⁻¹) 的 LB 培养基 37 °C、200 r·min⁻¹ 振荡培养使菌液 A_{600} 为 0.4~0.6, 加入终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 诱导蛋白, 16 °C、180 r·min⁻¹ 振荡培养 16 h 后收集菌体, 超声破碎 30 min, 破碎液离心后收集

Table 1 Primers sequences. The underlined sequences indicate the restriction enzyme sites. qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; CtDFR: *C. tubulosa* (Schenk) Wight dihydroflavonol 4-reductase

Primer role	Primer name	Primer sequence (5'-3')
Sequence amplification	CtDFR-F1	ATGTGCATGGA AACTACGGCC
	CtDFR-R1	TCACAATGTCCGAACGCAGC
	CtDFR-F2	CAGCAAATGGGGTCGCGGATCCATGTGCATGGA AACTACGGCC
	CtDFR-R2	GTGGTGGTGGTGGTGC TTCGAGT TCACAATGTCCGAACGCAGC
	CtDFR-F3	CACGGGGGACGAGCTCGG TACC ATGTGCATGGA AACTACG
	CtDFR-R3	CCATGTCGACTCTAGAGG ATCCCA ATGTCCGAACGCAGCC
qRT-PCR	CtDFR-F4	AATGGAGACGAGAAGGAACG
	CtDFR-R4	TTGAAGTCGGAAACACATCG
	CtF-box-F	CGTTTCTGTCTCTCCGTGAG
	CtF-box-R	CCCTGTTATCCTTCCAATGC

上清液,经0.45 μm 滤膜过滤后利用 Ni^{2+} 螯合树脂亲和色谱柱(Cat 17531901, Cytiva公司)进行蛋白纯化,首先用20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KPB缓冲液(pH 7.9,含500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑)洗脱除去杂蛋白,再用15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KPB缓冲液(pH 7.8,含500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑)洗脱CtDFR蛋白。通过超滤管(30 kDa, Millipore公司)离心浓缩蛋白并脱盐,将蛋白保存于20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KPB缓冲液(pH 8.0,含1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA)中,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱长期保存备用。

CtDFR酶活性分析 酶活性分析方法参考Liu等^[20]的方法并稍作改变,酶反应体系为:100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH 7.0)370 μL 、20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPH 50 μL 、CtDFR重组蛋白70 μL 、底物10 μL ,分别为DHK、DHQ、DHM(10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),于30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅反应30 min后加入500 μL 正丁醇:盐酸(95:5, v/v),于95 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴反应1 h后取正丁醇层,氮气流吹干后以100 μL 甲醇溶解。利用HPLC仪(日本岛津公司)检测产物,条件为PAK C18柱(4.6 $\text{mm}\times 250\text{ mm}$, 5 μm),柱温30 $^{\circ}\text{C}$,上样量为10 μL ,以0.1%甲酸水(A)和乙腈(B)作为流动相,洗脱梯度为:0 min, 10% B; 5 min, 10% B; 7.5 min, 20% B; 20 min, 60% B; 23 min, 90% B; 26 min, 90% B; 27 min, 10% B; 30 min, 10% B,流速为1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,在530 nm波长处检测。

利用UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS(美国Thermo Fisher公司)进一步检测产物,液相条件为Waters ACQUITY UPLC BEH Sheild RP18色谱柱(3.0 $\text{mm}\times 100\text{ mm}$, 1.7 μm),柱温40 $^{\circ}\text{C}$,标准品上样量为4 μL ,酶反应产物上样量为7 μL ,以0.1%甲酸水(A)和乙腈(B)作为流动相,洗脱梯度为:0 min, 10% B; 5 min, 10% B; 7.5 min, 20% B; 20 min, 60% B; 24 min, 100% B; 29 min, 100% B; 30 min, 10% B; 35 min, 10% B,流速为0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。质谱条件为电喷雾离子源,以氮气为载气,鞘气压力3.5 MPa,辅助气压力1.0 MPa,喷雾压力3 500 V,毛细管温度350 $^{\circ}\text{C}$,辅助气加热温度200 $^{\circ}\text{C}$,正负离子模式,扫描离子范围 m/z 为100~1 500, Full MS分辨率为35 000, dd-MS²分辨率为17 500, (N)CE/stepped nce设置为35, 60。

亚细胞定位 亚细胞定位的方法参考Shi等^[21]的方法并稍作改变,根据CtDFR序列设计带有酶切位点Kpn I、BamH I的引物,PCR扩增相应目的片段,利用内切酶Kpn I、BamH I酶切pCAMBIA1300-35S-GFP质粒,利用无缝克隆试剂盒(Cat C115-01, 诺唯赞公司)连接目的片段与载体,转入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,挑选单克隆菌株测序,测序正确后提取质粒。将pCAMBIA1300-35S-GFP-CtDFR、pCAMBIA1300-35S-

GFP质粒分别转化拟南芥原生质体,弱光下培养8~10 h,在激光共聚焦显微镜(FV1200,日本Olympus公司)下观察pCAMBIA1300-35S-GFP-CtDFR的亚细胞定位。

统计学分析 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用GraphPad Prism 8进行统计学分析,两组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

结果与分析

1 管花肉苕蓉CtDFR基因的克隆

通过分析管花肉苕蓉花转录组数据筛选出8条注释为“dihydroflavonol 4-reductase”的序列,通过NCBI的BLAST比对发现仅有一条序列具有DFR基因的全长。以管花肉苕蓉花cDNA为模板,PCR扩增得到约1 300 bp片段(图2)。将PCR产物胶回收后连接至pCE2 TA/Blunt-Zero载体,测序结果与转录组分析相符,将该基因命名为CtDFR,序列长度为1 263 bp,编码420个氨基酸。

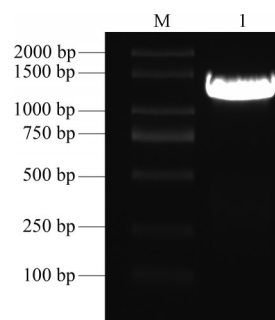


Figure 2 PCR amplification of CtDFR. M: DNA marker; 1: CtDFR

2 CtDFR的生物信息学分析

2.1 CtDFR理化性质与跨膜域分析 采用在线软件ProtParam分析CtDFR编码蛋白的理化性质:CtDFR编码420个氨基酸,分子式为 $\text{C}_{2102}\text{H}_{3280}\text{N}_{562}\text{O}_{644}\text{S}_{23}$,相对分子质量为47 465.93;理论等电点为5.35;不稳定系数II为34.55,属于稳定蛋白;总平均亲水性(GRAVY)为-0.467,属于亲水蛋白。进一步运用Prot Scale在线工具分析蛋白亲水性/疏水性,分析结果显示CtDFR亲水性/疏水性最大值为2.411(197),最小值为-3.000(344),CtDFR基因编码的氨基酸肽链中亲水性氨基酸残基数量多于疏水性氨基酸残基,属于亲水性蛋白。采用在线软件TMHMM预测蛋白的跨膜结构,CtDFR包含两个跨膜结构域。

2.2 CtDFR蛋白二级结构与三级结构的预测 利用在线工具SOPMA预测蛋白二级结构,结果显示,

CtDFR 蛋白的二级结构包含 37.14% 的 α -螺旋、43.33% 的随机卷曲、13.33% 的延伸链和 6.19% 的 β -折叠 (图 3A), 说明 α -螺旋是 CtDFR 蛋白的大量二级结构元件, 随机卷曲也在蛋白中占较大比例, 延伸链和 β -折叠散布于整个蛋白。通过在线分析软件 SWISS-MODEL 预测蛋白三级结构, 以葡萄 DFR 的晶体结构为模板, 预测 CtDFR 蛋白三维结构, 结果如图 3B 所示, 管花肉苁蓉 CtDFR 与葡萄 DFR 一致性为 70.73%。

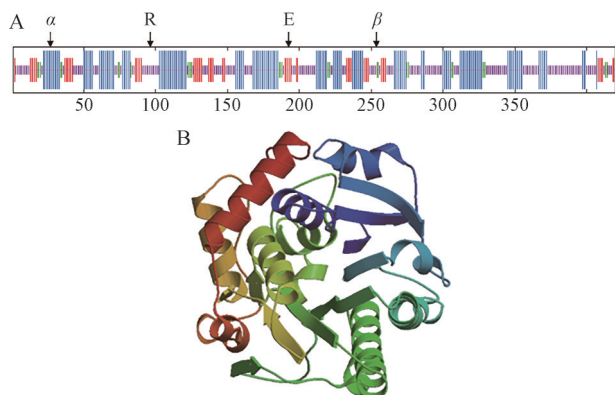


Figure 3 Predicted secondary structure and three-dimensional structure of CtDFR protein. A: Predicted secondary structure of CtDFR protein with SOPMA. α : α -Helix; β : β -Turn; E: Extended strand; R: Random coil; B: The deduced three-dimensional structure of CtDFR protein with SWISS-MODEL

2.3 序列比对及系统进化树分析 运用软件 DNAMAN 将 CtDFR 与其他物种 DFR 氨基酸序列进行同源性比对, 结果如图 4A 所示, CtDFR 氨基酸序列与沟酸浆 (*Erythranthe lewisii*, AHJ80979.1)、独脚金 (*Striga asiatica*, GER27969.1)、石猴花 (*Diplacus aurantiacus*, ACA04005.1)、紫苏 (*Perilla frutescens*, BAA19658.1)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*, AWX67418.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NP_199094.1) 中 DFR 的氨基酸序列相似度较高, 依次为 67.08%、66.88%、65.21%、62.50%、61.67%、47.50%, 多序列比对表明, CtDFR 与其他物种的 DFR 蛋白都具有高度保守的 NADPH 结合位点 (VTGASGFIGSGSWIVMRLLEGRY) 和底物特异性结合域 (TLDVEEHQKPVYVETDWSE-IDFIYSK), 其中 140 位氨基酸 (Asp) 和 151 位氨基酸 (Glu) 为底物特异性结合位点, 根据 140 位氨基酸的类型, CtDFR 被分类为天门冬氨酸型 DFR。

为进一步了解管花肉苁蓉 CtDFR 在植物 DFR 家族中的进化位置, 将 CtDFR 基因的核苷酸序列、CtDFR 蛋白的氨基酸序列与其他植物的 DFR 核苷酸序列和氨基酸序列利用 MEGA-X 软件构建系统进化树, 结果如图 4B、C 所示, 管花肉苁蓉 CtDFR 与 SmDFR、PfDFR

亲缘关系较接近。

3 CtDFR 在管花肉苁蓉不同颜色花中的表达量分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 CtDFR 在白、紫、红的管花肉苁蓉花中的表达量 (图 5), 结果表明, CtDFR 在紫色花中表达量最高, 红色花中次之, 在白色花中表达量最低。相比白色花, 紫色花中 CtDFR 表达量是其 19.37 倍, 红色花中 CtDFR 表达量是其 4.04 倍, 这些结果表明 CtDFR 表达量变化可能是造成管花肉苁蓉产生不同颜色的花的重要因素。

4 CtDFR 原核表达与酶活性分析

将 pET-28a-CtDFR 质粒转入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 通过 IPTG 低温诱导表达蛋白, 利用 Ni^{2+} 与组氨酸 (His) 的亲和力使用镍离子亲和色谱柱纯化蛋白, 纯化蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 结果如图 6A 所示, CtDFR 蛋白条带出现在 40~55 kDa 区域, 与 CtDFR 蛋白 47.5 kDa 分子质量相符。

DFR 能将 DHK、DHQ、DHM 还原成相应的无色花青素, 但无色花青素在溶液中不稳定, 因此在正丁醇:盐酸 (95:5) 中转化为有颜色的花青素进一步检测^[22]。为了鉴定 CtDFR 的活性, 以 DHK、DHQ、DHM 为底物进行酶活性分析, 结果表明, CtDFR 催化 3 种二氢黄酮醇反应的产物经过转化显示出不同的颜色 (图 6B)。进一步通过 HPLC 检测, 结果表明, 经过正丁醇/盐酸转化后, CtDFR 催化 DHK 的产物与天竺葵素标准品保留时间相近 (图 6C); CtDFR 催化 DHQ 的产物与矢车菊素标准品保留时间相近 (图 6D); CtDFR 催化 DHM 的产物与飞燕草素标准品保留时间相近 (图 6E)。初步表明, CtDFR 能催化 DHK、DHQ、DHM 生成无色天竺葵素、无色矢车菊素、无色飞燕草素并在酸醇中转化为天竺葵素、矢车菊素、飞燕草素。

利用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 进一步检测 CtDFR 催化 3 种二氢黄酮醇并经过转化的产物, CtDFR 催化 DHK 的产物分子离子峰为 m/z 271.059 20 (计算值为 271.060 10, 预测分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_5$); CtDFR 催化 DHQ 的产物分子离子峰为 m/z 287.054 41 (计算值为 287.055 01, 预测分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6$); CtDFR 催化 DHM 的产物分子离子峰为 m/z 303.049 07 (计算值为 303.049 93, 预测分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_7$)。同时, 利用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 检测天竺葵素、矢车菊素和飞燕草素标准品, 分子离子峰分别为 m/z 271.059 51、287.053 80、303.048 61, 与相应的以 DHK、DHQ、DHM 为底物的酶反应产物分子离子峰 m/z 相比差值均小于 5 ppm。对比 MS^2 图谱, CtDFR 催化 DHK 反应转化后的产物与天竺葵素标准品的 MS^2 图谱高度相似, 均有 m/z 271、121 特征碎片峰 (图 6F); CtDFR 催化 DHQ 反

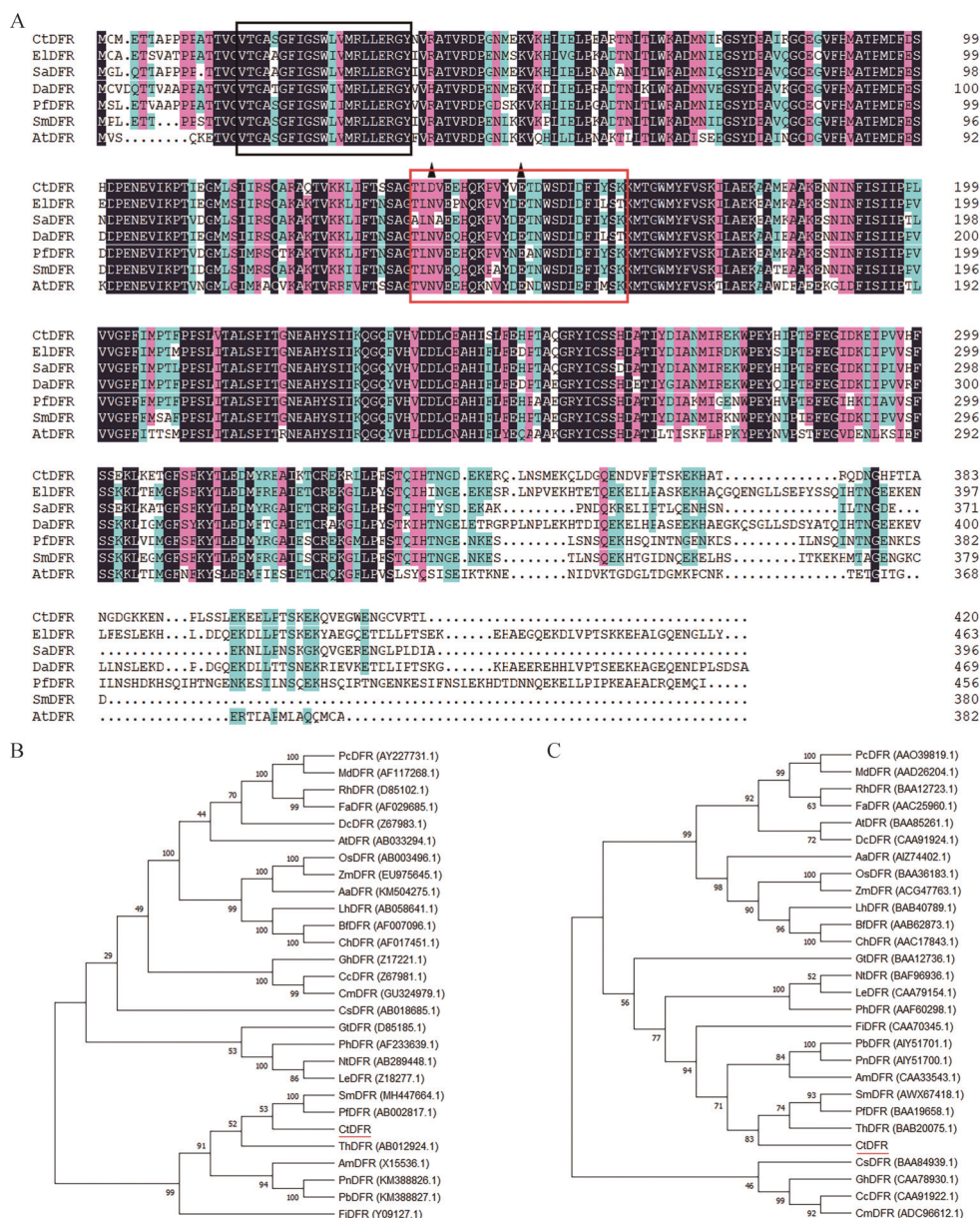


Figure 4 Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis of CtDFR. A: Multiple sequence alignment of CtDFR and DFR from other plants. The residues that compose the active site are indicated with black triangles. The NADPH-binding and substrate-binding domains of DFR are indicated by black box and red box, respectively. Ct: *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight; El: *Erythranthe lewisii*; Sa: *Striga asiatica*; Da: *Diplacus aurantiacus*; Pf: *Perilla frutescens*; Sm: *Salvia miltiorrhiza*; At: *Arabidopsis thaliana*; B: Phylogenetic analysis of CtDFR using nucleotide sequence; C: Phylogenetic analysis of CtDFR using amino acid sequence

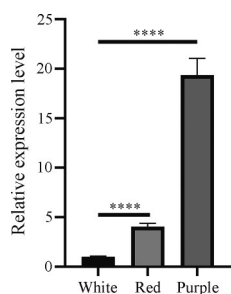


Figure 5 Relative expression level of *CtDFR* in flowers with different colors. Repeat 3 samples, each for 3 times. $\bar{x} \pm s$. **** $P < 0.0001$

应转化后的产物与矢车菊素标准品的 MS² 图谱高度相似, 均有 m/z 287、213、137 特征碎片峰 (图 6G); CtDFR 催化 DHM 反应转化后的产物与飞燕草素标准品的 MS² 图谱高度相似, 均有 m/z 303、257、229 特征碎片峰 (图 6H), 与文献^[23]报道一致, 表明 CtDFR 具有 DFR 活性, 能催化 DHK、DHQ、DHM 还原为无色天竺葵素、无色矢车菊素、无色飞燕草素。

5 CtDFR 亚细胞定位分析

为研究 CtDFR 的作用位置, 对其进行亚细胞定位

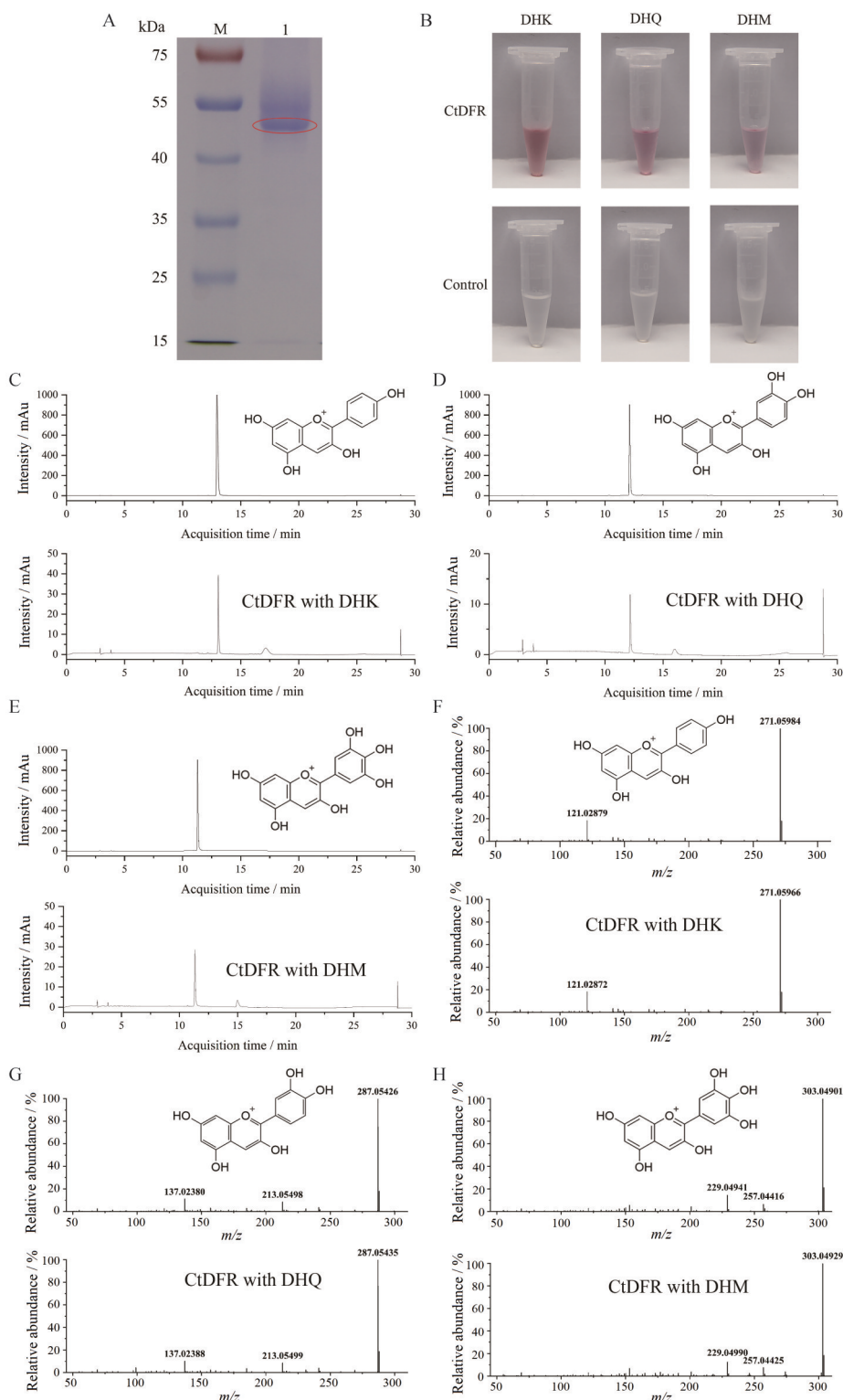


Figure 6 Prokaryotic expression and enzyme activity analysis of CtDFR protein. A: Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of recombinant CtDFR protein. M: Protein marker; 1: CtDFR protein; B: DFR activities of recombinant CtDFR using the dihydroflavonol substrates dihydrokaempferol (DHK), dihydroquercetin (DHQ), and dihydromyricetin (DHM). The unstable leucoanthocyanidins produced by DFR activity were chemically converted to stable anthocyanidins and showed different colors. The samples with denatured protein as control are colorless; C-E: High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of standards of pelargonidin (C), cyanidin (D), delphinidin (E) and CtDFR reaction products with different substrates DHK (C), DHQ (D), and DHM (E); F-H: The mass spectrometry (MS) analysis of standards of pelargonidin (F), cyanidin (G), delphinidin (H) and CtDFR reaction products with different substrates DHK (F), DHQ (G), and DHM (H)

分析(图7)。利用pCAMBIA1300-35S-GFP载体的绿色荧光标签观察CtDFR的亚细胞定位,结果表明,pCAMBIA1300-35S-GFP-CtDFR融合蛋白主要分布于细胞质,而作为对照的pCAMBIA1300-35S-GFP分布于细胞质和细胞核中,说明CtDFR主要定位于植物细胞的细胞质中。

讨论

DFR是花色苷生物合成途径的关键酶,近年来的研究表明,DFR与许多植物的花的颜色密切相关,如翠雀^[24]、马樱杜鹃^[25]、大豆^[26]的花色都受DFR的调控。管花肉苕蓉也具有不同花色,主要有白、红、紫3种花色,但尚未见其花色调控机制的报道,本研究通过管花肉苕蓉转录组数据分析利用RT-PCR首次从管花肉苕蓉中克隆出一条*CtDFR*的全长cDNA序列。与其他物种的DFR相似,CtDFR含有保守NADPH结合位点和底物特异性结合域,并与SmDFR、PfDFR氨基酸序列相似度较高并有较近的亲缘关系,这为进一步研究CtDFR的生物学功能奠定了基础。DFR催化二氢黄酮醇反应生成无色花青素,决定了花色苷的种类,但黄酮醇合酶(flavonol synthase, FLS)与DFR竞争底物二氢黄酮醇,FLS催化二氢黄酮醇反应生成黄酮醇,促使植物花色显现为白色^[27]。因此,高表达的DFR有利于植物产生更高含量的花色苷从而产生红色至蓝紫色的花,如飞燕草中花色苷积累量高的暗蓝色花变种、橘色花变种和红色花变种中的DFR基因表达水平高于花色苷积累量低的淡蓝色花变种和淡粉色花变种^[24]。本研究中,*CtDFR*基因在紫色花中表达量最高,其次是红色花,在白色花中表达量最低,颜色越深的花的*CtDFR*基因表达量越高,*CtDFR*基因表达量与管花肉苕蓉的花色形成密切相关。

DFR是一种NADPH依赖性氧化还原酶,含有1个NADPH保守结构域和1个底物特异性结合域,研究表

明^[28],矮牵牛和非洲菊中的DFR底物特异性结合域由132~157位的26个氨基酸组成,Asn134与Glu145是关键位点,而葡萄中的DFR由131~156位的26个氨基酸组成底物特异性结合域,第133位氨基酸为关键位点,由Asn突变为Asp后活性降低,但仍能催化DHK和DHQ生成相应的无色花青素^[22]。本研究中,CtDFR具有NADPH保守结构域(VTGASGFIGSGSWIVM-RLLERGY)和138~163位氨基酸组成的底物特异性结合域(TLDVEEHQKPVYVETDWSEIDFIYSK),对应非洲菊Asn134和Glu145的是Asp140和Glu151,分类为天门冬氨酸型DFR,与矮牵牛PhDFR一致。通过大肠杆菌原核表达获得CtDFR蛋白并检测其是否对3种二氢黄酮醇DHK、DHQ、DHM具有催化作用,结果表明CtDFR蛋白能催化DHK、DHQ、DHM生成相应的无色天竺葵素、无色矢车菊素、无色飞燕草素,并在酸醇中进一步反应生成天竺葵素、矢车菊素、飞燕草素。不同于矮牵牛PhDFR无法催化DHK导致的花色差异,管花肉苕蓉CtDFR能催化3种二氢黄酮醇,其花色差异可能是*CtDFR*基因表达量差异导致花色苷含量不同造成的。

不同物种DFR的细胞定位不同,红花(*Carthamus tinctorius*)中DFR蛋白CtCYP45082C1定位于细胞膜^[29],紫萼(*Hosta ventricosa*)HvDFR^[30]和金花茶(*Camellia nitidissima*)CnDFR^[31]定位于细胞核和细胞膜,茄子(*Solanum melongena*)SmDFR定位于细胞质和细胞核,石蒜(*Lycoris radiata*)LrDFR定位于细胞膜、细胞质、细胞核^[32]。本研究通过带有绿色荧光标签的pCAMBIA1300-35S-GFP质粒进行亚细胞定位实验,结果表明,CtDFR主要定位在细胞质中,与花色苷首先在细胞质中合成,之后转运至植物细胞的液泡中发挥功能相符^[33]。

以前的研究结果表明,药用植物花色可能与其体内的药效成分含量相关,如傣药肾茶的基原植物中紫

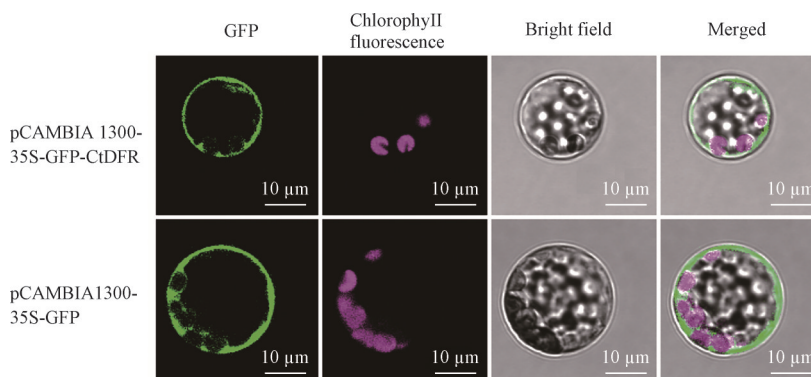


Figure 7 Subcellular localization of pCAMBIA1300-35S-GFP-CtDFR fusion proteins in *Arabidopsis thaliana* protoplast. Scale bar: 10 μ m. GFP: Green fluorescent protein

花肾茶的迷迭香酸和咖啡酸平均值含量均高于白花肾茶^[34]; 丹参基原植物中紫花丹参的隐丹参酮和丹参酮 II_A 含量高于白花丹参, 但白花丹参的丹酚酸 B 含量高于紫花丹参^[35]。因此, 肉苁蓉花色也很可能与药效成分含量密切相关, 但尚未见管花肉苁蓉中关于花色和肉苁蓉药效成分含量相关的报道。本研究初步探索了 CtDFR 与管花肉苁蓉花色的关系, 发现 CtDFR 蛋白对 DHK、DHQ、DHM 均有催化作用, CtDFR 基因在红、紫色花中高表达, 在白色花中低表达, CtDFR 表达差异导致花青素含量差异可能是管花肉苁蓉花色丰富的因素之一, 丰富了管花肉苁蓉花色调控机制, 有利于其花色形成机制的进一步研究, 为管花肉苁蓉形成丰富花色、扩大应用范围提供科学支撑, 也为肉苁蓉花色和药效成分的相关研究奠定基础。

作者贡献: 邱海玲负责 CtDFR 基因克隆、生物信息学分析、表达分析、酶活性分析及论文初稿撰写; 高博闻负责 CtDFR 亚细胞定位分析; 王方明、米芯雨参与 CtDFR 生物信息学分析; 张泽坤、杜宇负责 RNA 的提取; 史社坡主要指导 CtDFR 的体外酶反应分析; 屠鹏飞、王晓晖负责论文思路设计、指导实验及论文撰写与修改。所有作者参与论文修改。

利益冲突: 无相关利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中国药典) [S]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2020.
- [2] Tu PF, Chen QL, Jiang Y, et al. Cultivation techniques of *Cistanche tubulosa* and its host *Tamarix* spp. [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2015, 17: 349-358.
- [3] Liu GK, Tu PF, Yang TX, et al. Processing in biology research of *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2015, 17: 399-405.
- [4] Zhao DQ, Tao J. Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 13.
- [5] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. Plant J, 2008, 54: 733-749.
- [6] Zhang Y, Butelli E, Martin C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants [J]. Curr Opin Plant Biol, 2014, 19: 81-90.
- [7] Lim SH, Park B, Kim DH, et al. Cloning and functional characterization of dihydroflavonol 4-reductase gene involved in anthocyanin biosynthesis of chrysanthemum [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 17.
- [8] Qi Y, Zhou L, Han LL, et al. PsbHLH1, a novel transcription factor involved in regulating anthocyanin biosynthesis in tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. Plant Physiol Biochem, 2020, 154: 396-408.
- [9] Tatsuzawa F, Hosokawa M. Flower colors and their anthocyanins in *Saintpaulia* cultivars (Gesneriaceae) [J]. Hort J, 2016, 85: 63-69.
- [10] Nuraini L, Ando Y, Kawai K, et al. Anthocyanin regulatory and structural genes associated with violet flower color of *Matthiola incana* [J]. Planta, 2020, 251: 61.
- [11] Ye LJ, Möller M, Luo YH, et al. Differential expressions of anthocyanin synthesis genes underlie flower color divergence in a sympatric *Rhododendron sanguineum* complex [J]. BMC Plant Biol, 2021, 21: 204.
- [12] Wang X. Study on Pollination Biology of *Cistanche deserticola* Y.C.Ma (肉苁蓉传粉生物学研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2011.
- [13] Xie YJ, He ZP, Li YY, et al. Analysis of the influence factors on the differential accumulation of picefltraenins I_A and I_B in *Picria fetterae* Lout. [J]. Crops (作物杂志), 2016, (3): 89-93.
- [14] Ma CY. Study on Breeding Basis and *HMGR* Gene Cloning of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (甘草品种选育基础及 *HMGR* 基因克隆研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2009.
- [15] Dong NQ, Lin HX. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions [J]. J Integr Plant Biol, 2021, 63: 180-209.
- [16] Tanaka Y, Brugliera F. Flower colour and cytochromes P450 [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013, 368: 14.
- [17] Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, et al. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene [J]. Nature, 1987, 330: 677-678.
- [18] Leonard E, Yan Y, Chemler J, et al. Characterization of dihydroflavonol 4-reductases for recombinant plant pigment biosynthesis applications [J]. Biocatal Biotransfor, 2008, 26: 243-251.
- [19] Li TZ, Wang JL, Liu X, et al. Selection and validation of appropriate reference genes for qRT-PCR analysis in *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight [J]. Plant Physiol J (植物生理学报), 2021, 57: 969-981.
- [20] Liu HL, Lou Q, Ma JR, et al. Cloning and functional characterization of dihydroflavonol 4-reductase gene involved in anthocyanidin biosynthesis of *Grape Hyacinth* [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 17.
- [21] Shi Y, Man JH, Jiang WY, et al. Cloning and subcellular location of the PnMYB1R1 gene from *Panax notoginseng* and expression analyses with different stressors [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1506-1515.
- [22] Petit P, Granier T, d'Estaintot B, et al. Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis [J]. J Mol Biol, 2007, 368: 1345-1357.
- [23] Xie S, Zhao T, Zhang ZW, et al. Reduction of dihydrokaempferol by *Vitis vinifera* dihydroflavonol 4-reductase to produce orange oclargonidin-type anthocyanins [J]. J Agric Food Chem,

- 2018, 66: 3524-3532.
- [24] Miyagawa N, Miyahara T, Okamoto M, et al. Dihydroflavonol 4-reductase activity is associated with the intensity of flower colors in delphinium [J]. *Plant Biotechnol*, 2015, 32: 249.
- [25] Sun W, Zhou NN, Wang YH, et al. Characterization and functional analysis of RdDFR1 regulation on flower color formation in *Rhododendron delavayi* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 169: 203-210.
- [26] Yan F, Di S, Rodas FR, et al. Allelic variation of soybean flower color gene W4 encoding dihydroflavonol 4-reductase 2 [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 12.
- [27] Luo P, Ning GG, Wang Z, et al. Disequilibrium of flavonol synthase and dihydroflavonol-4-reductase expression associated tightly to white vs. red color flower formation in plants [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 6: 12.
- [28] Johnson E, Ryu S, Yi H, et al. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase [J]. *Plant J*, 2001, 25: 325-333.
- [29] Ahmad N, Li T, Liu Y, et al. Molecular and biochemical rhythms in dihydroflavonol 4-reductase-mediated regulation of leucoanthocyanidin biosynthesis in *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 156: 16.
- [30] Qin SJ, Liu YT, Cui BQ, et al. Isolation and functional diversification of dihydroflavonol 4-reductase gene *HvDFR* from *Hosta ventricosa* indicate its role in driving anthocyanin accumulation [J]. *Plant Signal Behav*, 2022, 17: 9.
- [31] Jiang LN, Fan ZQ, Tong R, et al. Functional diversification of the dihydroflavonol 4-reductase from *Camellia nitidissima* Chi. in the control of polyphenol biosynthesis [J]. *Genes*, 2020, 11: 12.
- [32] Wang N, Shu XC, Zhang FJ, et al. Comparative transcriptome analysis identifies key regulatory genes involved in anthocyanin metabolism during flower development in *Lycoris radiata* [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 19.
- [33] Chanoca A, Kovinich N, Burkel B, et al. Anthocyanin vacuolar inclusions form by a microautophagy mechanism [J]. *Plant Cell*, 2015, 27: 2545-2559.
- [34] Yin WF. Study on Quality Standard of Shredded Herbs Ready for Decoction of *Clerodendranthus spicatus* (Thunb.) C. Y. Wu (肾茶饮片质量标准研究) [D]. Kunming: Yunnan University of Chinese Medicine, 2019.
- [35] Song ZQ. Genetic Diversity Study of *Salvia miltiorrhiza* Bge. (丹参种质资源的遗传多样性研究) [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2008.