

苦荞类异黄酮还原酶基因(*FtIRL*)的克隆及序列分析

赵海霞, 李成磊, 白悦辰, 陈惠, 吴琦*
(四川农业大学生命科学与理学院, 四川雅安 625014)

摘要: 利用 RT-PCR 技术, 从苦荞(*Fagopyrum tataricum*)中克隆得到类异黄酮还原酶基因(*IRL*)的开放阅读框序列(ORF), 命名为 *FtIRL*。序列分析表明: *FtIRL* 含一个长 942bp 的 ORF, 编码 313 个氨基酸, 其氨基酸序列与金荞异黄酮还原酶 FcIFR (GenBank 登录号 ABV02071) 同源性最高, 达到 97%; 与其他植物 *IRL* 同源性为 44%~73%。生物信息学分析表明: *FtIRL* 推导的蛋白质含有典型的底物结合口袋和保守的 NADPH 结合位点, 符合短链脱氢酶家族的结构特征。构建基于氨基酸的系统发育树表明, 苦荞 FcIFR 虽然在氨基酸序列上与其他植物的异黄酮还原酶(IFR)有较高的同源性, 但其生物学功能可能更接近落叶松脂醇还原酶(PLR)。

关键词: 苦荞; 类异黄酮还原酶; 基因克隆; 序列分析

Cloning and Sequence Analysis of the Isoflavone Reductase-like (*FtIRL*) Gene from *Fagopyrum tataricum*

ZHAO Hai-xia, LI Cheng-lei, BAI Yue-chen, CHEN Hui, WU Qi*
(College of Life and Basic Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The cDNA sequence of isoflavone reductase-like gene *IRL* from *Fagopyrum tataricum* was amplified by RT-PCR. Sequencing showed that the ORF of *IRL* gene from *F. tataricum* (named as *FtIRL*) was 942bp, probably encoding a protein of 313 amino acids. Further analysis indicated that the deduced FcIFR protein had homology values of 97% with other plants' *IRL*s. *FtIRL* possessed two short-chain dehydrogenase/reductase conserved motifs: a substrate-binding pocket and a NADPH binding site. The phylogenetic tree constructed based on amino acid sequences indicated that, although the amino acid sequence of *IRL* gene from *F. tataricum* had high homology with that of isoflavone reductase (IFR) genes from other plants, its biological function might be more similar to that of pinorensinol lariciresinol reductase (PLR).

Key words: *Fagopyrum tataricum*; isoflavone reductase-like protein; gene cloning; sequence analysis

中图分类号: Q943.2; S517.032

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0210-05

苦荞(*Fagopyrum tataricum*)也称鞑靼荞麦, 属蓼科植物, 原产于我国及印度等地, 在我国主要分布在西南山区、云贵高原及陕西和山西等地。随着经济和社会的发展, 以及对苦荞营养价值和保健功能的深入研究, 对苦荞的利用和开发也越来越受到重视^[1]。祖国医学《本草纲目》记载, 苦荞性味苦、平寒, 有益气力、续精神、利耳目和降气宽肠健胃的作用。现代临床医学表明, 食用苦荞及其制品可显著降低人体血液中的胆固醇和血糖含量, 对高血压、冠心病和中风等病人都有辅助疗效作用, 对糖尿病有良好的治疗和缓解作用。这些作用都与苦荞中富含的黄酮类物质有关^[2]。

异黄酮还原酶(isoflavone reductase, IFR)、落叶

松脂醇还原酶(pinorensinol-lariciresinol reductases, PLR)和苯基香豆满苄醚还原酶(phenylcoumaran benzylic ether reductase, PCBER)是合成木质素(lignans)和异黄酮(isoflavone)等植物次生代谢产物的关键酶, 是具有 NADPH 依赖性的芳香族还原酶^[3], 属于同源性较高的短链脱氢酶家族(short-chain dehydrogenase/reductase, SDR)成员^[4]。由于对 IFR、PLR 和 PCBER 各成员生物学功能和反应机制的了解还比较有限, 学界将其统一称为类异黄酮还原酶(isoflavone reductase-like, IRL)^[5-6]。近年来的研究发现, IRL 参与了植物对生物和非生物胁迫的应答^[7], 与植物中多种抗毒素的合成密切相关, 例如紫花苜蓿(*Medicago sativa*)中 MsIFR 是合成美迪紫檀素

收稿日期: 2011-07-04

作者简介: 赵海霞(1977—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为基因工程。E-mail: aasky8@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@yahoo.cn

(medicarpin)的关键酶^[8]。本研究以苦荞为材料,克隆编码苦荞 IRL 的 cDNA 序列,为进一步研究苦荞黄酮类化合物的合成表达调控与其抗逆生理提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苦荞:“西荞二号”购自四川西昌学院。

Taq DNA 聚合酶、质粒 DNA 小量提取试剂盒、胶回收试剂盒、克隆载体 pMD19-T 日本 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂植物 RNAout 试剂盒 天泽基因工程有限公司;逆转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 加拿大 Fermentas 公司;其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

苦荞花蕾总 RNA 提取所需器皿均按 RNA 操作常规方法处理。以植物 RNAout 试剂盒提取苦荞花蕾总 RNA,电泳检验其完整性并置于液氮中保存。

1.2.2 RT-PCR 制备 cDNA 第一链

依次向 200 μL PCR 管中加入苦荞花总 RNA 4 μL、引物 Oligo-dT (10 μmol/L) 1 μL、DEPC H₂O 7 μL,温和混匀后,70℃变性 5 min,立即置于冰上。向上述 PCR 管中加入 5 × Reaction Buffer 4 μL、RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor 1 μL、dNTP Mix (10 mmol/L) 2 μL,37℃反应 5 min 除去可能的 RNA 酶污染。上述 PCR 管中加入 1 μL RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase,反应总体积 20 μL。42℃反应 60 min;70℃条件下 10 min 灭活反转录酶,将合成的 cDNA 第一链保存于 -20℃冰箱备用。

1.2.3 苦荞 IRL 基因开放阅读框序列(ORF)的克隆

根据 NCBI 上已经发表的金荞(*Fagopyrum cymosum*)异黄酮还原酶基因序列(GenBank 登录号 EU116032)设计一对特异引物 IRL-f 和 IRL-r。上游引物 IRL-f 包含基因的起始密码 ATG,序列为:5'-GATGGCAAAGGGCAAGGTG-3'(下划线为起始密码);下游引物 IRL-r 位于基因的 3' ATR 区域,序列为:5'-GCTCGCTCAAGAAAGGGGT-3'。

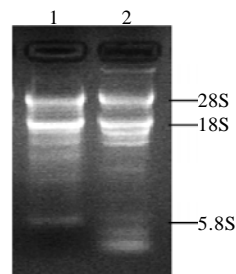
苦荞类异黄酮还原酶基因 cDNA 的 PCR 反应体系:ddH₂O 34 μL、10 × Buffer 5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 3 μL、dNTP mixture 3 μL、20 μmol/L 上下游引物各 1.5 μL、模板 cDNA 1 μL、Taq DNA 聚合酶 1 μL (5U/μL),总体积 50 μL。PCR 反应参数:94℃预变性 3 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 150 s,共 30 个循环;72℃保温 8 min。利用胶回收试剂盒回收 PCR 扩增片段并克隆到 pMD 19-T 载体,筛选阳性转化子送上海英骏生物技术公司测序。

1.2.4 苦荞 IRL 的生物信息学分析

测序结果采用 <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html> 和 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 进行序列比对分析。采用 <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/> 预测蛋白质二级结构, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 和 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> 预测信号肽序列和亚细胞定位。采用 SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)进行蛋白质结构三维建模。采用用软件 MEGA 4.0 构建系统发育树。

2 结果与分析

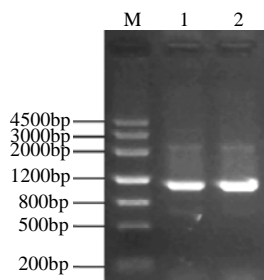
2.1 苦荞花总 RNA 的提取及其 IRL 基因 ORF 的扩增



1、2. 苦荞花总 RNA。

图 1 苦荞花总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Electrophoresis of total RNA extracted from *F. tataricum*



M. DNA Marker III; 1、2.苦荞 IRL 基因 ORF 扩增产物。

图 2 苦荞 IRL 基因 ORF 的扩增

Fig.2 Electrophoresis of PCR amplified products of IRL ORF from *F. tataricum*

由图 1 苦荞花总 RNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳可知,28S RNA 和 18S RNA 的条带清晰可见,亮度比接近 2:1, RNA 完整性较好。以反转录后的 cDNA 为模板,使用引物 IRL-f 和 IRL-r 进行 PCR 扩增。由图 2 可知,扩增得到一条约 1.2 kb 的特异条带。

2.2 *FtIRL* 的序列分析

PCR 扩增产物经克隆并测序后,得到长度为 1081 bp 的核苷酸序列,包含引物设计位点 IRL-f 和 IRL-r,将该序列命名为 *FtIRL*。 <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>

小的结构域由C端约100个氨基酸残基构成,形成IRL蛋白的底物结合口袋。FtIFR蛋白具有SDR家族的典型特征,其N端和C端聚集在活性中心口袋周围,而其活性中心口袋较紫花苜蓿MsIFR狭窄且与FiPLR更为接近。在氨基酸组成上,FtIFR的活性中心有较大的可变性,由F₁₆₄、V₂₆₆和A₂₇₁构成,而FiPLR蛋白活性中心由F₁₆₄、V₂₆₈和L₂₇₁构成,其中F₁₆₄氨基酸残基在所有的IFR、IRL和PLR中高度保守。这在一定程度上解释了IRL、PLR和PCBER等SDR家族成员虽然在氨基酸序列上高度相似,但其生物学功能确各有差异的原因。

2.5 分子进化分析

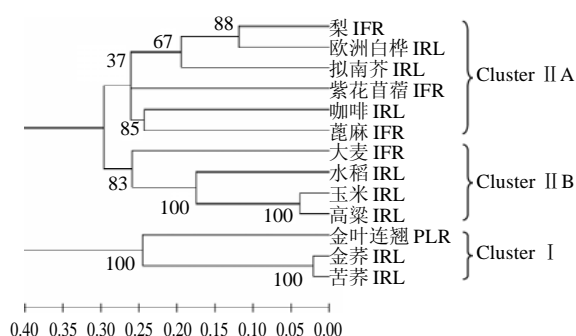


图6 不同植物IRL氨基酸序列的系统发育进化树

Fig.6 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of IRL protein in different plants

NCBI数据库中IFR相关的数据较少,在有花植物中主要有IFR、IRL和PLR三类酶蛋白基因共150多条相关序列。采用MEGA4.0软件^[11],通过邻接法构建基于有花植物中13个物种IRL相关氨基酸序列的系统发育树。由图6可知,同为蓼科植物的FtIFR与金荞F_cIFR同源关系最近,且和木犀科的金叶连翘PLR聚为一大类(Cluster I);其他植物的IFR和IRL聚为一大类,其中双子叶植物聚为Cluster II A,单子叶植物聚为Cluster II B。多数植物的IRL在进化上较为保守,符合植物分类规律。苦荞和金荞虽然在氨基酸序列上与其他植物的IFR相关基因有较高的同源性,但其生物学功能可能更接近PLR。

3 讨论

在中国、日本和韩国等亚洲国家,苦荞作为一种具有保健价值的粮食作物日益受到关注^[12]。黄酮类化合物的含量是衡量苦荞品质高低的标准之一。异黄酮类化合物主要分布于豆科植物中(Leguminosae)^[13],但苦荞中的黄酮类化合物是以芦丁为代表的黄酮醇类物质及其衍生物,目前还未见从苦荞中分离出异黄酮的报道。本研究以苦荞黄酮类化合物含量最高的花蕾为材料,采用

RT-PCR技术获得了FtIRL,但却未能从甜荞中获得与IRL类似的序列。通过序列分析,FtIRL与高黄酮含量的金荞愈伤组织中分离的F_cIFR在基因的长度和结构上同源性较高,表明二者编码的蛋白可能具有相似的生物学功能。蛋白质高级结构的分析结果和基于氨基酸序列的分子进化结果均进一步表明,FtIRL在结构和进化上更加接近PLR。

苦荞和金荞中的黄酮类化合物的合成存在着不同的分支途径,随着各分支途径的代谢的强弱不同,相关基因的表达丰度存在一定差异。而苦荞中FtIRL可能与未直接参与异黄酮的合成过程,很可能作为SDR家族中的成员从而参与其他次生代谢产物的合成反应。近年来,随着对苦荞抗逆生理研究的深入,发现苦荞中黄酮类化合物含量的上升常常伴随着逆境的出现^[14-16],这在一定程度上反映了苦荞中黄酮类化合物的含量与FtIRL表达丰度之间的潜在关系。例如:水稻OsIRL在稻瘟病原菌(Magnaporthe grisea)和茉莉酸的诱导下,其表达量上升^[17];研究者从西柚中鉴定出IRL基因,该基因在紫外照射和真菌浸染时被诱导表达^[18];咖啡叶中CoIRL在真菌浸染和机械损伤的逆境下,表达量显著上升^[17]。

植物黄酮的生物合成,是由不同的基因所编码的酶控制并以代谢流的方式流向不同的支路,从而形成了种类多样、结构复杂的植物黄酮及其衍生物。FtIRL作为苦荞SDR中的IRL类基因,其生物学功能还不甚明晰,与苦荞中黄酮类化合物生物合成的关系以及对逆境的应答机制有待进一步研究。因此,对苦荞FtIRL的研究有助于进一步认识苯丙烷类代谢途径中不同基因的表达机制以及相应代谢产物的生理作用,从而获得更多与苦荞品质相关的功能基因,为高黄酮苦荞转基因育种提供实验素材。

参考文献:

- [1] 辛力,廖小军,胡小松.苦荞麦的营养价值、保健功能和加工工艺[J].农牧产品开发,1999,21(5):78-95.
- [2] 张宏志,管正学,刘湘元.荞麦资源在我国开发利用[J].资源科学,1996,18(4):38-44.
- [3] VASSAO D G, KIM S J, MILLHOLLAN J K, et al. A pinoresinol-laricresinol reductase homologue from the creosote bush catalyzes the efficient *in vitro* conversion of alcohol esters into the allylphenols chavicol[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 465(1): 209-218.
- [4] GANG D R, DINKOVA-KOSTOVA A T, DAVIN L B, et al. Phylogenetic links in plant defense system: lignans isoflavonoids and their reductases[J]. American Chemical Society, 1997, 658(1): 58-59.
- [5] KOEDUKA T, FRIDMAN E, GANG D R, et al. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(26): 10128-10133.
- [6] KAJIKAWA M, HIRAI N, HASHIMOTO T. A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids[J]. Plant Molecular Biology,

- 2009, 69(3): 287-298.
- [7] MARCOS B, FABIO E S, MIRIAN P M, et al. The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(11): 1699-1708.
- [8] PAIVA N L, EDWARDS R, SUN Y, et al. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 11. Molecular cloning and expression of alfalfa isoflavone reductase, a key enzyme of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(4): 653-667.
- [9] SAWANT S V, KIRAN K, SINGH P K, et al. Sequence architecture downstream of the initiator codon enhances gene expression and protein stability in plants[J]. Plant Physiology, 2001, 126(4): 1630-1636.
- [10] 郭铁英. 野生金荞麦类异黄酮还原酶基因(*IFR*)的克隆和功能的初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [11] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Brief Bioinform, 2004, 5(2): 150-163.
- [12] DIETRYCH-SZOSTAK D, OLESZEK W. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) grain [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(10): 4384-4387.
- [13] 尹朝玲. 异黄酮类化合物在植物界中的分布、药理及分析方法研究进展[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(3): 178-181.
- [14] SUZUKI T, HONDA Y, FUNATSUKI W, et al. Purification and characterization of flavonol 3-glycosidase, and its activity during the ripening in tartary buckwheat seeds[J]. Plant Science, 2002, 163(3): 417-423.
- [15] YAO Yin'an, XUAN Zuying, LI Yuan, et al. Effects of ultraviolet-B radiation on crop growth, development, yield and leaf pigment concentration of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) under field conditions [J]. European Journal of Agronomy, 2006, 25(3): 215-222.
- [16] 蔡娜, 淡荣, 陈鹏. 水分胁迫对苦荞幼苗黄酮类物质含量的影响[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4): 91-93.
- [17] KIM S T, CHO K S, KIM S G, et al. A rice isoflavone reductase-like gene, *OsIRL*, is induced by rice blast fungal elicitor[J]. Molecules and Cells, 2003, 16(2): 224-231.
- [18] LERS A, BURD S, LOMANIEC E, et al. The expression of a grapefruit gene encoding an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 36(6): 847-856.