

芥菜型油菜类黄酮合成相关基因的克隆和序列分析

严明理, 刘忠松, 官春云, 陈社员, 刘显军, 袁谋志

(湖南农业大学油料作物研究所, 长沙 410128)

摘要: 【目的】分离和克隆芥菜型油菜类黄酮合成相关基因。【方法】采用同源克隆基因的方法, 参照拟南芥等植物控制类黄酮合成的基因保守序列设计引物, 对扩增片段进行测序并进行 BLAST 分析。【结果】有 13 对引物扩增的 17 个基因拷贝与参考基因序列相符, 这些克隆属于 13 个已知功能基因, 其中查尔酮合成酶基因有 3 个不同的基因拷贝, 花色素形成 (Production of anthocyanin pigment) 基因和查尔酮异构酶基因分别有 2 个不同的基因拷贝, 其余引物的扩增只获得一个拷贝。在 GenBank 数据库中进行检索表明, 所克隆的基因拷贝中的 DNA 结合/转录因子基因 (*TT2*、*TT8*、*TTG2*)、花色素形成基因 (*PAP*) 和黄烷酮-3-羟化酶基因 (*TT6*), 在芸薹属植物中未见报道。【结论】克隆芥菜型油菜类黄酮合成相关基因拷贝为阐明油菜种皮颜色形成的遗传调节奠定了基础。

关键词: 芥菜型油菜; 类黄酮; 基因

Cloning and Sequence Analysis of Flavonoid Biosynthesis Genes in *Brassica juncea*

YAN Ming-li, LIU Zhong-song, GUAN Chun-yun, CHEN She-yuan, LIU Xian-jun, YUAN Mou-zhi

(Rapeseed Research Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to isolate and clone the genes of flavonoid biosynthesis in *Brassica juncea*. 【Method】 Homology-based cloning strategy was used in this study. The primers were designed according to the sequences of homologous genes of the model plant *Arabidopsis thaliana*. The gene fragments were sequenced, and analyzed by BLAST. 【Result】 Seventeen gene copies were obtained by using 13 pairs of specific primers. These copies were shown to be homologous to 13 known *Arabidopsis thaliana* functional genes. The gene *CHS* (chalcone synthase) has three copies, while the genes *PAP* (production of anthocyanin pigment) and *CHI* (chalcone isomerase) each has two copies. No data was found in GenBank about the DNA binding/transcription factor genes (*TT2*, *TT8*, *TTG2*, *PAP*) and flavanone 3-hydroxylase (*TT6*) gene of *Brassica* through BLAST analysis. 【Conclusion】 The cloned copies of genes for flavonoid biosynthesis will provide further information on genetic regulation of seed coat color formation in *Brassica juncea*.

Key words: *Brassica juncea*; Flavonoid; Biosynthesis

0 引言

【研究意义】国内外大量研究表明, 在相同遗传背景下, 黄色种皮油菜 (简称黄籽油菜) 与黑色种皮油菜 (黑籽油菜) 相比具有种皮薄、含油量高、油中色素和杂质少、木质素含量低等优点^[1-3]。因此, 国内外都将黄籽油菜选育作为油菜育种的主攻方向。通过基因工程技术降低种皮色素含量, 从而培育黄籽

油菜是非常有前景的研究领域。在拟南芥中许多种皮颜色的突变与控制类黄酮合成基因有关, 因此研究芥菜型油菜中控制类黄酮合成的基因, 有利于揭示油菜种皮颜色形成的分子机理。【前人研究进展】由于在拟南芥、水稻等模式植物中已公布大量的基因序列, 因此根据已知基因序列利用序列的同源性在近缘物种中克隆相应基因已成为基因克隆的一种新手段^[4,5], 如在水稻^[6]、大豆^[7]、棉花^[8]、苧麻^[9]、甘蓝^[10]、柚^[11]、

收稿日期: 2006-11-08; 接受日期: 2007-01-15

基金项目: 国家自然科学基金 (30471098), 教育部重点科技项目 (204101), 湖南省教育厅重点项目 (03A017)

作者简介: 严明理 (1979-), 男, 湖南洞口人, 博士生, 研究方向为作物基因工程。Tel: 0731-4635290; Fax: 0731-4618778; E-mail: ymljack@126.com.
通讯作者刘忠松 (1963-), 男, 湖南常宁人, 教授, 博士, 研究方向为油菜分子育种。Tel: 07314617628; Fax: 0731-4618778; E-mail: zslu48@sohu.com

小麦^[12]、玉米^[13]等植物中利用同源克隆, 分离得到许多有用基因或其片段。油菜和拟南芥同属十字花科, 基因序列相似性高, Parkin 等基于油菜和拟南芥序列的相似性, 把 1 000 多个甘蓝型油菜的 RFLP 位点定位到拟南芥基因组的同源位置^[14]。利用同源克隆在油菜类植物中克隆基因已有不少报道。赵志伟等^[15]参照拟南芥 *BAN* 基因的保守序列设计引物, 在甘蓝型油菜等十字花科植物中获得 *BAN* 基因拷贝; Li 等^[16]根据拟南芥、甘蓝和其他物种的 *DFR* 基因序列设计引物, 在白菜型油菜中克隆 *DFR* 基因; 忻雅等^[17]根据白菜的表达序列标签 (EST) 设计引物, 在油菜类植物中的获得相应片段; Bonnie 等^[18]根据 GenBank 拟南芥的 LMCO (laccase-like multicopper oxidase) 设计简并引物在甘蓝型油菜等 5 种植物中获得了 LMCO 基因拷贝。在拟南芥中, 许多种皮颜色突变是控制类黄酮合成基因突变所致, 已经发现 22 个基因 (*tt1*~*tt19*、*ttg1*、*ttg2* 和 *aha10*) 突变形成种皮透明突变体^[19]。这些基因一部分为结构基因, 编码参与类黄酮生物合成的酶; 一部分为调控基因, 编码控制类黄酮生物合成的转录因子; 还有一些基因编码色素转运积累有关的蛋白质。在油菜及其近缘种中, 已有一些与类黄酮合成相关的基因 (4-氢黄酮还原酶、查尔酮合成酶、漆酶、花色素合成酶、*BAN*、苯丙氨酸解氨酶等基因) 被克隆, 但不清楚它们与油菜种皮颜色之间的关系, 油菜种皮颜色形成的基因调控机制未见报道。【本研究切入点】芥菜型油菜成熟种子的种皮有黑色、棕褐色、黄色等之分, 与甘蓝型油菜不同, 芥菜型油菜种皮颜色遗传稳定, 黄籽对黑籽、褐籽表现为隐性, 受 1 或 2 对基因控制^[1,20], 是研究油菜种皮颜色的理想天然突变材料。但这些突变基因的本质是什么、突变的性状是由什么位点控制的, 目前尚不清楚。种皮颜色取决于种皮中的色素种类和含量^[21,22]。如芥菜型油菜黑色种皮中含有 3-OH 的黄烷醇类多酚, 而黄色种皮没有; 黑色种皮的黄酮醇类多酚 A 环主要为邻二酚羟基结构, 而黄色种皮的黄酮醇类多酚 A 环主要为单酚羟基^[23]。笔者按照 Debeaujon 等^[24]的方法, 利用香草醛对芥菜型油菜不同种皮颜色近等基因系的授粉后 25 d 种子种皮进行染色, 发现黑籽基因系的种皮很快被染成红色, 而黄籽近等基因系种皮不染色, 从而认为黑籽近等基因系的种皮含有 3, 4-二羟基黄烷酮和 4-羟基黄烷酮, 而黄籽种皮中没有这些物质。笔者利用四川黄籽作轮回亲本与紫叶芥进行杂交、回交, 培育出具有不同种皮颜色的近等基因系, 通过比

较这些近等基因系间在类黄酮合成有关基因上的差异, 试图阐明芥菜型油菜种皮颜色与类黄酮合成有关基因的关系。本文报道紫叶芥类黄酮合成有关部分基因同源克隆的初步结果。【拟解决的关键问题】根据拟南芥等植物控制类黄酮合成的基因保守区设计引物, 克隆芥菜型油菜类黄酮合成相关基因的同源序列。本研究共获得了类黄酮合成相关的 13 个基因的 17 个基因拷贝, 并与 GenBank 数据库中的序列进行了 BLAST 分析, 所克隆的基因拷贝将为克隆全长序列提供基础, 同时也可用于 Northern 杂交分析以探明芥菜型油菜黄籽形成的遗传基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以芥菜型油菜品种紫叶芥 S₆ 代自交系 (叶片紫色, 种子成熟时种皮为黑色) 为材料, 将种子浸泡过夜, 然后转入铺有滤纸的培养皿中, 待出芽后, 播入土中, 在人工气候箱中培养, 光周期 16 h/8 h, 温度 22°C/16°C。当幼苗长至 3 叶时, 取叶片提取总 DNA。

1.2 方法

1.2.1 油菜总 DNA 的分离 用 CTAB 法提取紫叶芥 S₆ 代自交系叶片总 DNA。

1.2.2 引物设计和合成 参照文献^[19,26-28]报道的拟南芥类黄酮合成的基因, 在拟南芥网站 TAIR (arabidopsis.org) 上查到其“LOCUS”, 然后在 GenBank 数据库查到该基因的序列。以该序列为参考, 在 NCBI 网站 (www.ncbi.nlm.gov) 通过 BLAST 找到基因的保守区, 用 Primer 5.0 设计引物, 每条引物的位置落在一个外显子中, 引物委托上海英杰生命技术有限公司 (Invitrogen Biotechnology CO., Ltd) 合成。首先针对每个基因设计一对引物, 用该引物扩增带测序后, 进行 BLAST 分析, BLAST 分析结果如与引物设计的参考基因相符, 就认为克隆到了目的基因拷贝, 称该对引物为有效引物; 如果不符, 再在参考基因另一位置设计引物, 直到所克隆的基因拷贝与引物设计的参考基因相符。本研究扩增用的有效引物及其序列见表 1。

1.2.3 PCR 反应体系和扩增程序 优化的 PCR 反应体系总体积为 20 μl, 各成分如下: 10×PCR buffer (2.0 μl)、dNTP mix (10 mmol·L⁻¹ each, 0.3 μl)、10 mmol·L⁻¹ Forward Primer (1 μl)、10 mmol·L⁻¹ Reverse Primer (1 μl)、1 U Taq DNA 聚合酶、2.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂ (2 μl)、50 ng DNA 模板、无菌去离子水 (补足到

表 1 本研究所用引物及其序列

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	有效引物编号 Valid primer pairs	引物设计参考序列 GenBank accession No. used as reference for primer design	功能描述 Functional description	引物序列 Sequences of the primer pair (5'→3')
BjTT2	BjTT2-7	NM_122946	DNA 结合/转录因子 DNA binding / transcription factor	F:TDAAYARAGGWKCWTGGAC R:TTCTTDDATTCATTGTCTGTTCG
BjTT3	BjTT3-2	NM_123645	4-氢黄酮还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase	F:GTCAGAAAGAGACCGTNTGYGTNAC R:TCCATTCCTACTGTCGGYTTDAT
BjTT4	BjTT4-1	NM_121395	查尔酮合成酶 Chalcone synthase	F:CTTGACGGAAGGACGNARNCC R:CATCTTGGCTATTGGNACNGC
BjTT5	BjTT5-5	AF031921; NM_115370	查尔酮异构酶 Chalcone isomerase	F:CGTTTGAGAARTTYATYAARG R:GGAGAGAGCGAAGAGGATSG
BjTT6	BjTT6-6	NM_114983	黄酮醇 3-羟化酶 Flavanone 3-hydroxylase	F:TGATCTYACCTCGGACTC R:GTGGTCAYGYTCYTCTTTMG
BjTT8	BjTT8-8	NM_117050	DNA 结合/转录因子 DNA binding / transcription factor	F:TGGACWTAYAGTSTYTTCTGG R:CCYAGTTCMACHACRCCATC
BjTT10 ^[29]	BjTT10-4	NM_124184	漆酶 Laccase	F:GTAATAAACTCCGCACTGAA R:GGAAGAGCAAACGAAACA
BjTT18	BjTT18-3	AY228485	花色素合成酶 Anthocyanidin synthase	F:AGACGAAACCATCCGTGAGA R:ACAGCCCAAGAAATCCTTAC
BjTT19	BjTT19-2	NM_116486 AY299480	谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase	F:CAATGGCAGCTATCAAAGTT R:GAAATGTCTACTGAAGGATCT
BjTTG2	BjTTG2-7	NM_129282	转录因子 44 Transcription factor 44	F:TACGGACARAAGCAAGTTAAAGG R:TTATGTTTACCYTCRTAKGTGTG
BjBAN ^[27]	BjBAN-1	NM_104854	花色素还原酶 Anthocyanidin reductase	F:CAAATGTAGCGACCAGAAGC R:ATCTTCCATGTCCGCAACTCC
BjPAL	BjPAL-3	NM_115186	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase	F:AAAGCYACWGGTCCCAACG R:CGAGATKAGTCCCAAAGAGTT
BjPAP	BjPAP-8	NM_105310	花色素形成;DNA 结合/转录因子 Production of anthocyanin pigment; DNA binding / transcription factor	F:TTGAGGAAAGGTGCATGG R:TCCTAGAAGCTTATGAAG

F 和 R 分别代表正向和反向引物

F and R stands for the forward and the reverse primers, respectively

20 μ l)。以上试剂购自北京 TIANGEN 生物公司。

优化后的 PCR 反应扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 退火温度为: 引物 (T_m-5) $^{\circ}$ C 左右退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸时间以设计引物时预计产物的长度来定, 延伸时间为 1 000 bp \cdot min $^{-1}$, 循环 39 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延长 6 min。

1.2.4 PCR 产物的克隆、测序 将 PCR 产物用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) 进行切胶回收纯化后, 连接到 pMD18-T Vector (TaKaRa), 热激转化到大肠杆菌 DH5 α , 进行 Amp 抗性和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选。选白色菌落做菌落 PCR, 将检测结果为阳性的菌落进行 LB 液体培养, 强碱法提取质粒^[25]。以质粒为模板进行 PCR 检测。选取含阳性质粒的菌液

送上海英杰生命技术有限公司测序。

1.2.5 序列分析 测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 分析, 以 E 值 $\leq 1e-20$ ^[30] 为标准判断与拟南芥等植物已经公布的基因序列的符合度。如果 E 值符合, 认为在芥菜型油菜中克隆到该基因拷贝。比较所克隆的基因拷贝与拟南芥和油菜近缘种已公布的基因编码区, 推断所克隆基因拷贝的外显子序列在基因拷贝中的位置。

2 结果与分析

2.1 芥菜型油菜类黄酮合成相关基因拷贝的生物信息学分析

在用所设计的 57 对引物扩增紫叶芥总 DNA 时,

17 对引物不能扩增出带, 约占总引物的 30%, 有 27 对引物 (约占总引物的 47%) 能扩增出带, 这些带测序后进行 BLAST 分析, 结果与目的基因不符, 但与拟南芥或油菜近缘种中的一些序列有相似性, 这些引物在芥菜型油菜 DNA 上有结合位点, 但不在目的基因区段。只有 13 对引物 (约占总引物的 23%) 扩增出 17 条带, 测序和 BLAST 分析表明 17 个克隆的基

因拷贝中与拟南芥的同源基因序列比较 E 值小于 $1e-20$ 的基因拷贝有 15 个 (表 2), 另 2 个基因拷贝与拟南芥的同源基因序列比较 E 值大于 $1e-20$, 它们是引物 BJT5-5 扩增的 2 个基因拷贝, 其中大小为 422 bp 的基因拷贝与拟南芥 NM_115370 序列相比 E 值为 $7e-15$, 大小为 203 bp 的基因拷贝与拟南芥 NM_115370 序列相比 E 值为 $1e-11$ 。

表 2 克隆的基因拷贝与拟南芥相应基因序列的比较

Table 2 The BLAST analysis between the gene copy from *B.juncea* and the corresponding sequences of *Arabidopsis thaliana* in NCBI

引物编号 Primer No.	芥菜型油菜测序基因拷贝 名称 Fragment name	The sequenced gene copy of <i>B. juncea</i> 大小 Size (bp)	拟南芥基因登陆号 <i>A. thaliana</i> accession No. in GenBank	E 值 E-value
BjTT2-7	BJZTT2-447	447	NM_122946	5e-47
BjTT3-2	BJZTT3-466	466	NM_123645	7e-52
	BJZTT4-679	679	NM_121396	1e-63
BjTT4-1	BJZTT4-573	573	NM_121396	7e-65
	BJZTT4-487	487	NM_121396	2e-80
BjTT5-5	BJZTT5-422	422	NM_115370	7e-15
	BJZTT5-203	203	NM_115370	1e-11
BjTT6-6	BJZTT6-504	504	NM_114983	1e-66
BjTT8-8	BJZTT8-1206	1206	NM_117050	7e-33
BjTT10-4	BJZTT10-536	536	NM_129597	2e-89
BjTT18-3	BJZTT18-1080	1080	NM_118417	1e-148
BjTT19-2	BJZTT19-835	835	NM_116486	3e-133
BjTTG2-7	BJZTTG2-763	763	NM_129282	6e-100
BjBAN-1	BJZBAN-779	779	NM_104854	4e-55
BjPAL-3	BJZPAL-825	825	NM_115186	1e-172
BjPAP-8	BJZPAP-595	595	NM_105310	3e-27
	BJZPAP-683	683	NM_105310	1e-48

把所克隆的基因拷贝与在 NCBI 已发布的芸薹属植物相应基因序列进行比较, 结果表明所克隆的基因拷贝与芸薹属植物相应基因的相似性均高于与拟南芥相应基因的相似性, E 值小于 $1e-78$ (表 3)。说明亲缘关系越近, 同源基因序列相似程度就高。

这 17 个克隆基因拷贝与参考基因序列相比 E 值 $\leq 1e-20$, 说明它们属于类黄酮合成有关基因。用 DNAMAN 分析同一引物克隆多个基因拷贝的相似性, BjTT4-1 引物在芥菜型油菜基因组中克隆出 3 个大小不同的片段, 它们的大小分别为 679 bp (BJZTT4-679)、573 bp (BJZTT4-573) 和 487 bp (BJZTT4-487), BJZTT4-679 片段与 BJZTT4-573 片段的相似性为 85%, BJZTT4-679 片段与 BJZTT4-487 片段相似性为 86%, BJZTT4-573 片段与

BJZTT4-487 片段相似性为 86%, 利用 DNAMAN 对这 3 个片段与 NM_121396 进行序列比较分析, 结果表明, NM_121396 与这 3 个片段的比较序列位置为 141-512, 说明这 3 个片段为芥菜型油菜基因组中 *CHS* 的 3 个不同的基因拷贝。这 3 个基因拷贝 BLAST 分析后, E 值小于 $1e-20$ 的序列多于 50 条, 在亲缘关系比较远的物种中都有高的相似性, 说明查尔酮合成酶基因在不同的物种中保守程度特别高; BjTT5-5 引物在芥菜型油菜基因组中克隆出 2 个大小不同的片段, 它们的大小分别为 422 bp 和 203 bp, 相似性为 79%, 这 2 个片段与萝卜 AF031921 序列相比 E 值分别为 $1e-22$ 和 $6e-57$ (表 4), 小于 $1e-20$, 认为这 2 个片段为芥菜型油菜查尔酮异构酶基因拷贝, 利用 DNAMAN 对这 2 个片段和 AF031921 进行序列比较分

表 3 克隆的基因拷贝与芸薹属植物相应基因的比较

Table 3 BLAST analysis between gene copy cloned from *B. juncea* and the corresponding *Brassica* sequences in NCBI

基因拷贝	芸薹属植物	登陆号	E 值
Gene copy	<i>Brassica</i> species	GenBank accession No.	E-value
BJZTT3-466	白菜型油菜 <i>B. rapa</i>	AY953249	4e-139
	埃塞俄比亚芥 <i>B. carinata</i>	AY093619	2e-107
	甘蓝 <i>B. oleracea</i>	AY228487	1e-80
BJZTT4-679	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	AF076335	1e-91
	白菜型油菜 <i>B. rapa</i>	AF229398	5e-88
BJZTT4-573	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	AF076336	6e-87
	白菜型油菜 <i>B. rapa</i>	AF229398	1e-78
BJZTT4-487	白菜型油菜 <i>B. rapa</i>	AF229398	0.0
	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	AF229393	0.0
	甘蓝 <i>B. oleracea</i>	AF229396	0.0
BJZTT10-536	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	AY645921	0.0
BJZTT18-1080	甘蓝 <i>B. oleracea</i>	AY228485	0.0
BJZTT19-835	芥菜型油菜 <i>B. juncea</i>	AY299480	0.0
	白菜型油菜 <i>B. rapa</i>	AY567976	2e-171
BJZBAN-779	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	AF320985	0.0
BJZPAL-825	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	AY795078	0.0

析, 结果表明, AF031921 与这 2 个片段的比较序列位置为 287~489, 说明这 2 个片段为芥菜型油菜基因组中 *CHI* 的 2 个不同的基因拷贝; B_jZPAP-8 引物在芥菜型油菜基因组中克隆的 2 个大小不同的片段, 它们的大小分别为 683 和 595 bp, 相似性为 57%, 利用 DNAMAN 对这 2 个片段和 NM_105310 进行序列比较, 结果表明, NM_105310 与这 2 个片段的比较序列位置为 117-341, 说明这 2 个片段为芥菜型油菜基因组中 *PAP* 的 2 个不同的基因拷贝。其他基因暂时只克隆出 1 个基因拷贝。

在 GenBank 数据库中进行检索发现, 笔者所克隆的基因拷贝除谷胱甘肽 S-转移酶基因 (*TT19*) 外, 其他基因拷贝在芥菜型油菜都是首次克隆。尽管 4-氢黄酮还原酶基因 (*TT3*)、查尔酮合成酶基因 (*TT4*)、查尔酮异构酶基因 (*TT5*)、漆酶基因 (*TT10*)、花色素合成酶基因 (*TT18*)、花色素还原酶基因 (*BAN*)、苯丙氨酸解氨酶基因 (*PAL*) 在其他芸薹属植物中已有报道, 但 DNA 结合/转录因子基因 (*TT2*、*TT8*、*TTG2*)、花色素形成基因 (*PAP*) 和黄烷酮-3-羟化酶基因 *TT6* 除在拟南芥中报道外, 在其他芸薹属近缘植物中未见报道。

表 4 克隆的基因拷贝与芸薹属以外植物相应基因序列的比较

Table 4 BLAST analysis between gene copy from *B. juncea* and the corresponding sequences of *Cruciferae* species except *Brassica* and *A. thaliana* in NCBI

基因拷贝	物种	登陆号	E 值
Gene copy	Species	Accession No.	E-value
BJZTT4-679	莴笋 <i>Lactuca sativa</i>	AY249896	5e-91
	芥菜 <i>Capsella rubella</i>	AF112106	1e-85
BJZTT4-573	芥菜 <i>Capsella bursa-pastoris</i>	AY612785	1e-88
	萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	AF031922	2e-84
BJZTT4-487	白芥 <i>Sinapis alba</i>	X16437	6e-84
	<i>Arabis pauciflora</i>	AF112102	6e-84
	<i>Arabis drummondii</i>	AY612784	4e-79
BJZTT5-422	莴笋 <i>Lactuca sativa</i>	AY249896	5e-152
	水蒜芥 <i>Sisymbrium irio</i>	AF144541	7e-108
BJZTT5-203	萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	AF031921	1e-22
	琴叶鼠耳芥 <i>Arabidopsis lyrata</i>	AJ582854	8e-18
BJZTT10-536	萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	AF031921	6e-57
	琴叶鼠耳芥 <i>Arabidopsis lyrata</i>	AJ582854	2e-16
BJZTT18-1080	<i>Arabis procurrens</i>	AY645910	2e-89
BJAPAL-825	萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	AB087206	2e-165
	紫罗兰 <i>Matthiola incana</i>	AF026058	4e-108
BJZTT18-1080	甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	AB023786	1e-40
	萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	AB087212	0.0

2.2 芥菜型油菜类黄酮合成相关基因拷贝的外显子区域分析

用所克隆的基因拷贝与已发表的相应基因编码区进行比较, 以推断所克隆序列的外显子区域。结果(表 5)表明所有引物都位于外显子区域, 与引物设计时的位置相符。

3 讨论

利用已报道的基因序列尤其是近缘种基因序列进行同源基因克隆是基因克隆的一条重要途径。在本研究中, 4-氢黄酮还原酶基因、查尔酮合成酶基因、苯丙氨酸解氨酶基因在很多物种中已被克隆, 因此在芥菜型油菜克隆这些基因只要设计 1~2 对引物就可以克隆到这些基因的拷贝。但值得指出的是, 在同一物种中, 尤其是多倍体中, 具有相同保守区的不同功能的基因很多, 根据保守区设计引物, 所克隆的基因可能是具有相同保守区的其他基因。如笔者在根据拟南芥 *TT12* 基因 (antiporter/transporter) 克隆芥菜型油菜同源基因时, 克隆到 2 个片段 (结果未列出), BLAST

表 5 克隆的基因拷贝的外显子序列分析

Table 5 Analysis of exon sequence in cloned genes

基因拷贝 Gene copy	参考基因登陆号 Accession No. of the reference gene	基因拷贝的外显子区域 Exon region in gene copy
BJZTT2-447	NM_122946;	1-98; 186-316; 391-447
BJZTT3-466	NM_123645; AY953249; AY093619; AY228487	1-110; 182-360; 437-466
BJZTT4-679	NM_121396; AF076336; AF229398	1-126; 554-679
BJZTT4-573	NM_121396; AF076336; AF229398	1-140; 272-572
BJZTT4-487	NM_121396; AF229398; AF229393; AF229396	1-487
BJZTT5-422	NM_115370; AF031921; AJ582854	1-106; 351-422
BJZTT5-203	NM_115370; AF031921; AJ582854	1-203
BJZTT6-504	NM_114983	1-170; 330-504
BJZTT8-1206	NM_117050	1-45; 150-396; 794-896; 1153-1206
BJZTT10-536	NM_129597; AY645921	1-536
BJZTT18-1080	NM_118417; AY228485	1-324; 670-1080
BJZTT19-835	NM_116486; AY299480; AY567976	3-152; 261-307; 383-827
BJZTTG2-763	NM_129282	1-465; 530-763
BJZBAN-779	NM_104854; AF320985	1-48; 124-327; 409-567; 645-779
BJZPAL-825	NM_115186; AY795078	1-825
BJZPAP-683	NM_105310	1-101; 560-683
BJZPAP-595	NM_105310	1-113; 459-595

分析表明这 2 个片段为 antiporter/transporter 基因拷贝, 但不是 TT12 基因拷贝, 因此为了克隆目的基因还需要设计更多引物来扩增, 或选择更多的阳性菌落测序, 看克隆的片段与目的基因序列是否相符。

本研究拟克隆的基因在模式植物拟南芥中都只有 1 个拷贝^[31]。但芥菜型油菜是由白菜型油菜 (*Brassica rapa*) 和黑芥 (*B. nigra*) 天然杂交、加倍形成的异源四倍体, 含有 A 和 B 染色体组, 理论上每个同源基因应该有 2 个或更多拷贝^[32]。笔者所克隆的基因目前大多 (13 个中的 10 个) 只获得 1 个基因拷贝, 说明已进行的克隆还不完全, 所克隆的还只是一部分同源基因。芸薹属植物含 A 染色体组的物种研究多, 在 NCBI 上公布的芸薹属植物基因序列多来自含 A 染色体组的植物。韩国 Brassica Genomics Team 在 NCBI 公布了含 A 染色体组的白菜 (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) 的许多序列。笔者所克隆的序列经 BLAST 分析后, 大部分能找到芸薹属中含 A 染色体组物种的相似序列, 但本研究利用简并引物所克隆的基因拷贝到底来自 A 染色体组还是 B 染色体组, 还需要进一步研究。

拟南芥中有几个已知控制类黄酮合成的基因如 *TT1*、*TT12*、*TT16*、*TTG1* 等, 在其他植物中很少研究, 难以在 GenBank/DBJ/EMBL 数据库中找到其保守区。笔者正在按照 Rose 等^[33]的方法设计引物, 试图

克隆这些基因。

本研究所克隆的基因拷贝为分析芥菜型油菜黄籽、黑籽近等基因系控制类黄酮合成基因的表达差异 (Northern 杂交分析和 RT-PCR 分析) 提供了探针和引物, 为分离克隆油菜类黄酮合成基因全长序列和阐明控制芥菜型油菜种皮颜色性状的基因及其作用位点奠定了基础。

4 结论

以芥菜型油菜紫叶芥为材料, 利用同源克隆技术获得了 17 个控制类黄酮合成相关基因拷贝, 在 GenBank 数据库中进行检索表明, 这些基因拷贝 (*TT2*、*TT8*、*TTG2*、*PAP*、*TT6*) 除在拟南芥中报道外, 在芸薹属植物中未见报道。这些基因拷贝的获得为研究油菜种皮颜色形成分子机理奠定了基础。

致谢: 本研究在湖南农业大学作物基因工程湖南省重点实验室完成, 得到陈信波教授、熊兴华博士的指导和帮助, 在此表示衷心感谢。

References

- [1] 刘后利. 油菜遗传育种学. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 139-149.

- Liu H L. *Rapeseed Genetics and Breeding*. Beijing: China Agricultural University Press, 2000: 139-149. (in Chinese)
- [2] Rahman M H, Jeoersbo M, Poulsen M H. Development of yellow-seeded *Brassica napus* of double low quality. *Plant Breeding*, 2001, 120: 473-478.
- [3] Somers D J, Rakow G, Prabhu V K, Friesen K R D. Identification of a major gene and RAPD markers for yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *Genome*, 2001, 44: 1077-1082.
- [4] Winkel-Shirley B. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology*, 2001, 12: 1399-1404.
- [5] Fourmann M, Barret P, Froger N, Baron C, Charlot F, Delowrme R, Brunel D. From *Arabidopsis thaliana* to *Brassica napus*: development of amplified consensus genetic markers (ACGM) for construction of a gene map. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105: 1196-1206.
- [6] 刘继海, 程在全, 杨明挚, 吴成军, 王玲仙, 孙一丁, 黄兴奇. 云南 3 种野生稻中抗病基因同源序列的克隆及序列分析. *中国农业科学*, 2003, 36: 273-280.
- Liu J H, Cheng Z Q, Yang M Z, Wu C J, Wang L X, Sun Y D, Huang X Q. Cloning and sequence analysis of disease resistance gene analogues from three wild rice species in Yunnan. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36: 273-280. (in Chinese)
- [7] 杨秀红, 陈庆山, 杨庆凯, 李文滨. 大豆 NBS 类抗病相关基因的克隆与序列分析. *高技术通讯*, 2005, 15: 71-78.
- Yang X H, Chen Q S, Yang Q K, Li W B. Isolation and sequence analysis of a full-length NBS class of resistance gene homology from soybean. *High Technology Letters*, 2005, 15: 71-78. (in Chinese)
- [8] Humphries J A, Walker A R, Timmis J N, Orford S J. Two WD-repeat genes from cotton are functional homologues of the *Arabidopsis thaliana* TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (*TTG1*) gene. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57: 67-81.
- [9] 陈建荣, 张学文, 郭清泉. 分离克隆苧麻 CCoAOMT 基因部分序列. *作物学报*, 2006, 32: 787-790.
- Chen J R, Zhang X W, Guo Q Q. Clone of partial sequence of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase gene in ramie. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32: 787-790. (in Chinese)
- [10] 曹必好, 雷建军, 夏 勇, 宋洪元, 陈国菊, Xiang C B, David J. 结球甘蓝 NBS-LRR 类 R 基因同源序列的分离. *中国农业科学*, 2004, 37: 1081-1084.
- Cao B H, Lei J J, Xia Y, Song H Y, Chen G J, Xiang C B, David J. Isolation of resistant gene analog of NBS-LRR from cabbage. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 1081-1084. (in Chinese)
- [11] 黄代青, 王 平, 吕 柳. 柚 cDNA 中 NBS-LRR 类 R 基因同源序列的分离. *中国农业科学*, 2004, 37: 1580-1584.
- Huang D Q, Wang P, Lü L. Isolation of NBS-LRR class resistance gene analogs from stigma cDNA of pomelo (*Citrus grandis* cv. *Guanxi*). *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 1580-1584. (in Chinese)
- [12] 王海燕, 杨文香, 刘大群. 小麦 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与鉴定. *中国农业科学*, 2006, 39(8): 1558-1564.
- Wang H Y, Yang W X, Liu D Q. Isolation and characterization of NBS-LRR resistance gene homology sequences from wheat. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(8): 1558-1564. (in Chinese)
- [13] 高 伟, 陈 晓, 库丽霞, 任永哲, 常胜合, 王铁固, 陈彦惠. 玉米类 LFY 基因的克隆及其在不同光周期条件下的表达. *作物学报*, 2006, 32: 1256-1260.
- Gao W, Chen X, Ku L X, Ren Y Z, Chang S H, Wang T G, Chen Y H. Cloning and expression analysis of maize LFY-like gene. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32: 1256-1260. (in Chinese)
- [14] Parkin I A, Gulden S M, Sharpe A G, Lukens L, Trick M, Osborn T C, Lydiate D J. Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2005, 171: 765-781.
- [15] 赵志伟, 曾凡亚, 赵 云, 王茂林. 甘蓝型油菜 BAN 同源基因拷贝克隆与序列分析. *中国油料作物学报*, 2001, 23: 7-10.
- Zhao Z W, Zeng F Y, Zhao Y, Wang M L. Cloning and sequence analysis of homologous fragment of BAN from *Brassica napus*. *Chinese Journal of Oil Crop Science*, 2001, 23: 7-10. (in Chinese)
- [16] Li Y T, Li J N, Chai Y R, Yang C G, Lei B. Cloning and sequence analysis of a *DFR* gene from *Brassica campestris* L var. *oleifera* DC. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3: 485-492.
- [17] 忻 雅, 崔海瑞, 张明龙, 林容杓, 崔水莲. 白菜的 EST 标记及其对油菜的通用性. *遗传*, 2005, 27: 410-416.
- Xin Y, Cui H R, Zhang M L, Lin Y P, Chui S L. Development of EST (Expressed Sequence Tags) marker in Chinese cabbage and its transferability to rapeseed. *Hereditas* (Beijing), 2005, 27: 410-416. (in Chinese)
- [18] McCaig B C, Meagher R B, Dean J F D. Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2005, 221: 619-636.
- [19] Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 405-430.
- [20] Negi M S, Devic M, Delseny M, Lakshmikumaran M. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Theoretical and*

- Applied Genetics*, 2000, 101: 146-152.
- [21] Marles M A S, Gruber M Y. Histochemical characterization of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the Brassicaceae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84: 251-262.
- [22] Marles S M A, Gruber Y M, Scoles G J, Muir A D. Pigmentation in the developing seed coat and seedling leaves of *Brassica carinata* is controlled at the dihydroflavonol reductase locus. *Phytochemistry*, 2003, 62: 663-672.
- [23] 曾 鑫, 刘忠松, 龙 桑, 严明理. 芥菜型油菜黄黑种皮多酚差异的紫外-可见光谱研究. *作物学报*, 2007, 33: 476-481.
- Zeng K, Liu Z S, Long S, Yan M L. Uv-vis spectrum study on differences between polyphenols in the yellow and the black Seed-coats of *Brassica juncea*. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33: 476-481.
- [24] Debeaujon I, Leon K M, Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2000, 122: 403-413.
- [25] 拉萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W(黄培堂译). 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002: 27.
- Sambrook J, Russell D W (translated by Huang P T). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (3rd ed). Beijing: Science Press, 2002: 27. (in Chinese)
- [26] Debeaujon I, Nesi N, Perez P, Devic M, Grandjean O, Caboche M, Lepiniec L. Proanthocyanidin- accumulating cells in *Arabidopsis testa*: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell*, 2003, 15: 2514-2531.
- [27] Xie D Y, Sharma S B, Paiva N L, Ferreira D, Dixon R A. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science*, 2003, 299: 396-399.
- [28] Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A. *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 2004, 37: 104-114.
- [29] Pourcel L, Routaboul J M, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I. *TRANSPARENT TESTA 10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, 2005, 17: 2966-2980.
- [30] Li Y Y, Ma C Z, Fu T D, Yang G S, Tu J X, Chen Q F, Wang T W, Zhang X G, Li C Y. Construction of a molecular functional map of rapeseed (*Brassica napus* L.) using differentially expressed genes between hybrid and its parents. *Euphytica*, 2006, 152: 25-39.
- [31] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 2001, 126: 485-493.
- [32] Lotz T, Snowdon R, Horn R, Dewal G, Weisshaar B, Friedt W, Beicram H, caboche M, Chalhoub B. *Molecular Analysis of Arabidopsis thaliana Transparent Testa(tt) Genes in Brassica napus*. Proceedings 11th International Rapeseed Congress, Narayana Press, Copenhagen, Denmark, July 2003: 109-111.
- [33] Rose T M, Henikoff J G, Henikoff S. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 3763-3766.

(责任编辑 于 竞)