

茶树类黄酮 3',5'-羟化酶在大肠杆菌的表达和优化

陈啸天¹, 高丽萍¹, 赵磊², 刘亚军¹, 王云生^{1,2*}, 夏涛^{2*}

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学教育部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 儿茶素是茶叶主要特征和功能成分之一, 其中 B 环三羟基儿茶素约占儿茶素总量的 65% 以上。类黄酮 3',5'-羟化酶是类黄酮合成中 B 环 5'羟基化的唯一酶系, 与 B 环三羟基儿茶素合成积累密切相关。采用 RACE 技术, 克隆了茶树类黄酮 3',5'-羟化酶基因的 1 944 bp 的全长序列, 开放阅读框区域为 55~1 587 bp, 编码 510 个氨基酸, 推测其分子量为 57.1 kDa, 等电点为 9.06。该基因重组至 pET-32a(+) 表达载体上, 在大肠杆菌 Rosetta 中进行原核表达; 优化了原核表达中温度诱导条件; 利用钴离子吸附柱纯化了目的蛋白。该研究为开展 F3'5'H 酶的反应动力学、酶的器官组织定位等研究奠定了基础。

关键词: 茶树; 类黄酮 3',5'-羟化酶; RACE; 原核表达

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0707-07

Expression and optimization of flavonoid 3', 5'hydroxylase of tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] in *Escherichia coli*

CHEN Xiao-tian¹, GAO Li-ping¹, ZHAO Lei², LIU Ya-jun¹, WANG Yun-sheng^{1,2*}, XIA Tao^{2*}

(1. School of Biology Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Key Lab of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Catechins are the most prominent characteristic and functional compounds of tea, of which, the type of B ring 3', 4' 5'-hydroxy catechins account for 65% of the total content. Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H) is a key enzyme for flavonoid synthesis in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). The cDNA sequence of F3'5'H gene was cloned by rapid amplification of cDNA ends(RACE), and its full length was 1 944 bp with ORF (open reading frame) beginning from 55 nt to 1 587 nt, encoding 510 amino acids. Bioinformatics analysis results showed that the deduced protein molecular weight and theoretical isoelectric point were 57.1 kDa and 9.06, separately. The gene was cloned into the expression vector pET32a (+) for expression in prokaryotic cells. The SDS-PAGE results showed that the flavonoid 3', 5' hydroxylase protein was expressed in *Escherichia coli* rosetta. The temperature for protein expression was optimized, and the induced protein was purified by Cobalt ion purification column. This research will lay a foundation for the enzymatic kinetics and histochemical localization of flavonoid 3', 5' hydroxylase.

Key words: *Camellia sinensis*; flavonoid 3', 5'hydroxylase; RACE; prokaryotic expression

由于类黄酮(flavonoid)显著生物学功能和广阔医学应用前景, 其生物合成代谢及调控备受人们关注^[1-3]。在植物体中广泛存在类黄酮类型主要包括: 花青素(anthocyanidin)、原花青素(proanthocyanidin, PA)、黄酮醇(flavonol)和儿茶素(catechins), 其中主体成分为儿茶素。不同植物、同一植物不同器官积

累的茶类黄酮主体成分有所不同。如 Chapple 等^[4]发现在拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh]中, 类黄酮主要为花青素、黄酮醇和 PA。其中, 营养器官中主要积累花青素和黄酮醇, 种胚中也存在黄酮醇, 而种皮中主要积累原花青素。茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]中类黄酮主体成分为儿茶素

收稿日期: 2012-04-05

基金项目: 国家自然科学基金(30972401, 31170647, 31170282 和 31000314)共同资助。

作者简介: 陈啸天, 男, 硕士研究生。E-mail: cxt86@163.com

* 通讯作者: 王云生, 男, 副教授。E-mail: wang_li09213@sina.com

夏涛, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: xiatao62@126.com

(catechins), 约占类黄酮总量的 70%^[5]。从结构上看, 儿茶素为黄烷-3-醇(flavan-3-ols)化合物, 主要由儿茶素 [(+)-catechin, C]、没食子儿茶素 [(+)-gallocatechin, GC]、表儿茶素[(-)-epicatechin, EC]、表没食子儿茶素[(-)-epigallocatechin, EGC]、表儿茶素没食子酸酯[(-)-epicatechin-3-gallate, ECG]、表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG]等 6 种所组成^[6]。按照 B 环羟基化的数目可以将儿茶素分为 B 环 3' 4'-二羟基儿茶素(包括 C、EC 和 ECG)和 B 环 3' 4' 5'-三羟基儿茶素(包括 GC、EGC 和 EGCG)。本课题组多年儿茶素测定数据显示, 茶树体内 B 环三羟基儿茶素含量明显高于二羟基儿茶素, 约占儿茶素总量的 65%以上^[7-10]。

植物体中类黄酮物质合成途径的主要步骤已基本探明, 其中与类黄酮 B 环羟基化有关的酶主要有 2 类: 类黄酮 3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H) 和 类 黄 酮 3',5'-羟 化 酶 (flavonoid 3',5'-hydroxylase, F3'5'H)^[11]。它们都属于细胞色素 P450 酶家族(CYP)的单加氧酶, 是广泛存在于生物界的一大类位于膜上的血红素蛋白^[12]。其中, F3'5'H 酶能够在 NADPH 和 O₂ 存在的情况下催化类黄酮 B 环 5'-位或 3'5'-位发生羟基化反应, 是已知的催化 B 环 5'-羟基化反应的唯一酶系。

目前, NCBI 上已公布的 F3'5'H 基因至少有 58

条, 涉及至少 38 个物种。其中大量的研究多集中在 F3'5'H 基因在观赏花卉的花色改变的研究, 已在矮牵牛^[13-15]、龙胆科植物^[16-17]、长春花属植物^[18]、蝴蝶草属植物^[19-20]、风铃草属植物^[21]、菊科植物^[11]、樱草属植物^[22]、番茄^[23]等植物中分离到了可以编码具有酶活性的 F3'5'H 基因。虽然茶树中的 F3'5'H 基因已有报道, 但对其功能的验证、酶学性质、酶蛋白细胞定位等尚不清晰。作者在克隆茶树 F3'5'H 基因和结构域生物信息学预测的基础上, 利用大肠杆菌原核表达体系, 对茶树 F3'5'H 基因在大肠杆菌中的表达进行了优化, 以期分离纯化 F3'5'H 酶蛋白, 为 F3'5'H 酶的反应动力学研究、酶蛋白的器官组织细胞的特异性分布研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

用于试验的茶树品种为舒茶早(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. var. *sinensis* cultivar Shuchazao), 鲜叶采自安徽农业大学教学科研基地, 样品采集后迅速用液氮进行冷冻处理, 然后保存在 -80℃冰箱中备用。

1.2 菌株、质粒及主要试剂

原核表达载体 pET32a(+)和表达菌株 *E.coli* Rosetta 为本实验室保存。其它药品均为国产分析纯。

表 1 CsF3'5'H 基因 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR analysis of CsF3'5'H gene

名称 Name	目的 Purpose	引物序列 Primer sequences	大小/bp Size
FH3outer	3'RACE	ACGGCTACAAGAATCCGACCTA	22
FH3inner	3'RACE	TAGAATGGGGATTGTGCTTGTTG	23
FH5outer	5'RACE	GCTTGGGCAGCGACTCTGGGAAGAT	25
FH5inner	5'RACE	CAGCAGCGAATAAGTTCAAGAGTAG	25
FH-S	End-to-end PCR/ Genome PCR	AACCAGGTAGTGCTTTGCTTGCT	23
FH-A	End-to-end PCR/ Genome PCR	TTAAGCAGCATAAGCAATTTGGAGG	24
FH-EcoR V	<i>E.coli</i> expression	TTT <u>GATATC</u> ATGGCCCTAGACACGGTCTTCCTGC* ¹	34
FH-EcoR I	<i>E. coli</i> expression	CCG <u>GAATTC</u> TTAAGCAGCATAAGCAATTTGGAGGCAAC* ²	37

注: *¹下划线处为 *EcoR* V 位点, *²下划线处为 *EcoR* I 位点。

Note: bases in sequence 1 with underline represent site of *EcoR* V, and bases in sequence 2 with underline represent site of *EcoR* I.

1.3 茶树 F3'5'H 基因的克隆

以茶树鲜叶提取的 Total RNA, 提取根据 TaKaRa 公司 RNAiso-mate for Plant Tissue 试剂盒和 RNAiso Plus 试剂盒的说明书操作。cDNA 一链合成根据 Clontech 公司 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Ki 说明书操作。

根据 GenBank 数据库中登陆的茶树 EST 序列筛选 F3'5'H 基因信息 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 获得编号为 GO255029.1 序列, 针对序列设计 RACE 引物: FH3outer、FH3inner、FH5outer、FH5inner 以及 end-to-end PCR 引物: FH-S、FH-A(见表 1)。采用 Touchdown PCR 和 Nested PCR 的方法,

3'RACE 和 5'RACE 分别使用对应模板扩增末端序列, 并回收测序。

合成的 cDNA 一链为模板, 按照 Fermentas 公司 First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作。通过如下程序使用 TaKaRa 公司 Premix PrimeSTAR™HS 酶扩增目的基因: 98℃预变性 3 min; 98℃变性 15 s, 55℃复性 15 s, 72℃延伸 90 s, 共计 30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。目的条带经胶回收纯化后, 连接到 pMD18-T 载体, 由上海英骏生物技术有限公司完成测序。

针对目的序列的 ORF 设计 1 组特异引物: FH-EcoR V、FH-EcoR I (见表 1)。以茶树鲜叶提取的 RNA 合成的 cDNA 一链为模板, 通过如下程序使用高保真 DNA 聚合酶扩增目的基因: 98℃预变性 3 min; 98℃变性 15 s, 55℃复性 15 s, 72℃延伸 70 s, 共计 30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。目的条带经胶回收纯化后, 连接到 pMD18-T 载体, 由上海英骏生物技术有限公司完成测序。

1.4 茶树 *F3'5'H* 序列比对及进化树分析

核苷酸及氨基酸序列分析采用 Blast 2.0、DNAMAN 6.0 和 Mega 5.05 等软件来完成。

1.5 *CsF3'5'H* 基因的原核表达及优化

1.5.1 原核表达 筛选测序验证正确的重组质粒和表达载体 pET-32a(+)同时使用内切酶 *EcoR* V 和 *EcoR* I 进行双酶切、连接, 新质粒 pET-F35H 转化大肠杆菌 *rosetta*(DE3)。挑取阳性克隆菌落于含氨基青霉素(50 μg·mL⁻¹)的 LB 液体培养基中, 37℃震荡培养过夜后按 1:50 (V/V) 转入新的培养基中继续培养, 待菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时, 加入 IPTG (异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷, Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside) 至终浓度为 1 mmol·L⁻¹, 诱导 5 h 后取样, SDS-PAGE 检测重组蛋白。

1.5.2 最佳诱导温度和时间 将过夜培养的菌液按 1:50 (V/V) 转入新的培养基中继续培养, 待菌液 OD₆₀₀ 为 0.5 左右时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol·L⁻¹, 分别置于 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃和 40℃摇床中 150 r·min⁻¹ 震荡培养, 1~5 h 后取样用于 SDS-PAGE 分析。

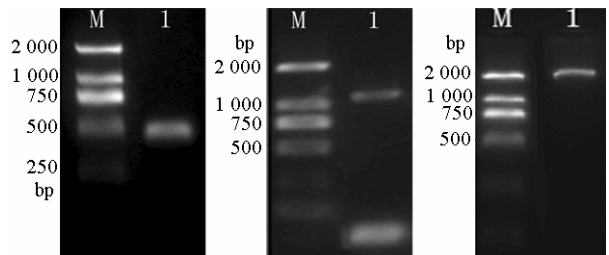
1.5.3 目的蛋白纯化 选择最适诱导温度、最适转速重新诱导目的蛋白表达, 将菌液离心, 收集菌体, 用含 300 mmol·L⁻¹ NaCl 的 0.2 mol·L⁻¹ (pH7.0) 的 PBS 缓冲液重悬菌体, 于冰上超声破碎, 12 000 r·min⁻¹ 4℃离心 10 min, 收集上清液, 沉淀用 6 mol·L⁻¹ 尿素溶液过夜处理。重组蛋白利用钴离子亲

和树脂 (Merck Drugs & Biotechnology) 纯化, SDS-PAGE 检测纯化后的蛋白纯度。

2 结果与分析

2.1 茶树 *F3'5'H* 基因的全长克隆

经 3'RACE 后, 琼脂糖凝胶电泳得到到 500 bp 左右的产物, 测序发现得到了 541 bp 的片段, 再根据这段序列设计 5'RACE 引物, PCR 获得了大约 1 200 bp 的产物测序后拼接就得到了约 1 944 bp 的全长序列。ORF 框区域为 55~1 587 bp, 编码 510 个氨基酸。



A: 3'RACE 扩增; B: 5'RACE 扩增; C: End-to-end PCR; M: DNA 标准分子量; 1: PCR 产物

A: Result of 3'RACE-PCR; B: Result of 5'RACE-PCR; C: Result of End-to-end PCR; M: DNA molecular weight markers; 1: PCR product

图 1 茶树 *F3'5'H* 基因的 RACE-PCR 电泳

Figure 1 Electrophoresis result of RACE-PCR of *F3'5'H* gene

2.2 *CsF3'5'H* 序列分析

利用 DNAMAN 软件分析其分子量 MW 为 57.1, 等电点 pI 为 9.06, ORF 框从第 55 位至第 1 587 位。

根据推测的 *CsF3'5'H* 氨基酸序列使用 Blast 工具 (<http://www.ncbi.nih.gov/blast/>) 在 NCBI 里检索, 发现最接近的序列为已公布的茶树 *F3'5'H* 基因, 一致性为 99%, 推测克隆获得的 *CsF3'5'H* 基因与已登陆的茶树 *F3'5'H* (GenBank accession [AY945842](#)) 是等位基因, 最接近的其他物种为仙客来 *F3'5'H* (GenBank accession [GQ891056](#)), 氨基酸一致性为 83%。与 [AY945842](#) 相比, *CsF3'5'H* 基因通过 RACE 技术获得了 3'UTR 区以及 5'UTR 区, 长度分别 345 bp 和 54 bp, 3'UTR 包含终止信号, 其后为 Poly(A) 序列。选取推测的 *CsF3'5'H* 氨基酸序列和其他已登录的 *F3'5'H* ([AY945842](#)、[DQ194358](#)、[GQ891056](#)、[AB517920](#)、[AJ880356](#)、[DQ786631](#)、[FJ645767](#)、[XM 002313968](#)、[XM 002313967](#)、[GU062184](#)、[AY275430](#)、[EU921266](#)、[Z22544](#))、*F3'H* ([FJ753548](#)、[DQ319866](#)、[HM153534](#)、[FJ216427](#)、

```

1 ACCAAAACACTCAACCAGGTAGTCTTGGCTTGGCCCTAGTTCAAACTATCCCGAAATGCGCCCTAGACAOGGTCTTCTGCTTGGTGAGCTCTCTTTTGAACCTCGTGCATCTCATCACT
1 M A L D T V F L L R E L S F A T L V I L I T
121 CAGATTTTCATGGCTCCATCTCTCACTAAACCCCTCGTATGCTCCCGCCCGCCCAACAGGGTTCGCACTCATTGGTGCCATTCCCAACTAGGTCCGATGCCACATGTTGCTCTAGCT
23 H I F M R S I L T K P L R M L P P G P T G L P L I G A I P H L G S M P H V A L A
241 AAAATGGCTAAAATATACGGACCCATAGTCTAAGCTCAAAATGGGCACTTGTGGGATGGTGGTTCGATCGACTCCAGACTCAGCTCGAGCCCTTTCTCAAAAACCTAGACTTGAATTTCTCA
63 K M A K I Y G P I V Y L K M G T C G M V V A S T P D S A R A F L K T L D L N F S
361 AACCGCCCACTAATGCCGGTCAACCCACTTAGCCCTAAGGTGCTCAGGACATGGTTTTTGCAGATTATGGACCTAGATGGAAGTTACTGAGGAACTAAGTAAGTTCAGCATGCTTGGT
103 N R P P N A G A T H L A Y G A Q D M V F A D Y G P R W K L L R K L S N L H M L G
481 GCAAGGCTCTTGAGAATTGGCTCAGGTCGATCCCTCAGCTTGGTCACATGTTAAAAGCTATGTACGATTGAGTTGTCGCGGTCAAGCAGCTGGTGAAGGAGATGTTGTGTAT
143 G K A L E N W A Q V R S S E L G H M L K A M Y D L S C R R E P V V V A B M L C Y
601 GCAATGCCAAATATGATCGGACAGTACTTAGCCGAGCAGTGTTTGAAAGCAAGGATCGGAGTCAAAAGGATCAAGGACATGGTGGAGCTCATGACCACCCGACGCTATTTT
183 A M A N M I G Q V I L S R R V F E T K G S E S N E P K D M V V E L M T T A G Y F
721 AACATTCGAGATTTGATACCATGATTCGCTGGATGCACTTGCAGGAAATAGCGAGCTGCGATGMAAGGCTTCGACAAGAAGTTGATGTTGATAACAAAGATGATAGAGAACACAAG
223 N I G D F I P S I A W M D L Q G I E R G M K R L H K K F D V L I T K M I E E H K
841 GCTTCGGCTTATCAGCCAAAGCAAGCCAGATTTTCTTGATGTTTTCATGGCTCAGCAGGAAAATCTGGTGAAGAGAAGCTCAACAGCAGCAACATCAAGCCACTACTCTGAACTTA
263 A S A Y Q R K E T P D F L D V F M A Q Q E N P G E E K L N T T N I K A L L L N L
961 TTCACTGCTGGCACGACATCAACCCATAATAGAGTGGGGCTACCCGAAATGTTGAAAGCAACCCAAAATCTCAACCGACACCAAGCAGATGGATCGGGTCACTCGGTCGAAAC
303 F T A G T D T S S S I I E W A L A E M L K D P K I L N R A H D E M D R V I G R N
1081 CGACGGCTACAAGAATCCGACTACCCAACTCCATACTTACAGCCATTGCAAGAAACATTTCGAATGCACCCCTCAACTCCCTCAATCTTCCAGAGTCTCGCCCAAGCTTGC
343 R R L Q E S D L P K L P Y L Q A I C K E T F R M H P S T P L N L P R V S A Q A C
1201 CGAGTGAATGGTTATTACATCCAAAAAACAAGTACTGAGTCAACATTTGGCCATAGGCGAGACCCCTGATGTTGGGAAAGCCACCAAGCAGATGGATCGGATGATGTTTGGAGT
383 R V N G Y Y I P K N T R L S V N I W A I G R D P D V W E R P L E F I P D R F L S
1321 CGAAAAGATCCAAAGACTGATCCCGCTGGGAAGATTTTGAGCTGATCCATTGGAGCTGGAAGGAGGATCTGTCGCGGTACTAGAAATGGGATTTGCTTGTGAGTACATTTTGGCC
423 G K N A K T D P R G N D F B L I P F G A G R I C A G T R M G I V L V B Y I L G
1441 TCTTTGGTTCACTCTTTTGGATGGAAATGGCTGATGAGTGTAGCTGAACATGGATGAGAGTTTCGGACTGCTCTGCAGAAAGCTGGCTCTTTCGGCTATGTTGCTCTCTAGG
463 S L V H S F D W K L A D D G V E L N M D E S F G L A L Q K A V P L S A M V S P R
1561 TTGCTCCAAATGCTTATGCTGCTTAAAGCCCTACATAGCTTAAGATCATATATGAATAAAGATGATTTGCTTTGCTGCTTTTGTGTTTGGTGGAAATGCACATGGGAGCAAAAATAAA
503 L P P N A Y A A *
1681 AATAATTATAAAATATGGAAGTGCAAATGGGCTGTGCTCTAGAGCATAACTCTCATTACACTTTCATATCTTGTAAATATTTTATGCTTTCCACTAATGTAAATCTTCATATT
1801 CTCTTTTGTGCTCTCTACGTACATTTTGGAGTACACCCCTACACTATGTATCGATGTTGTGCTGTGTTTGTGGATTTCGATGCAGGCATCAAAATAAAATGCTTGAATAACA
1921 TGCTGTAGCCCCAAAAAATAAA

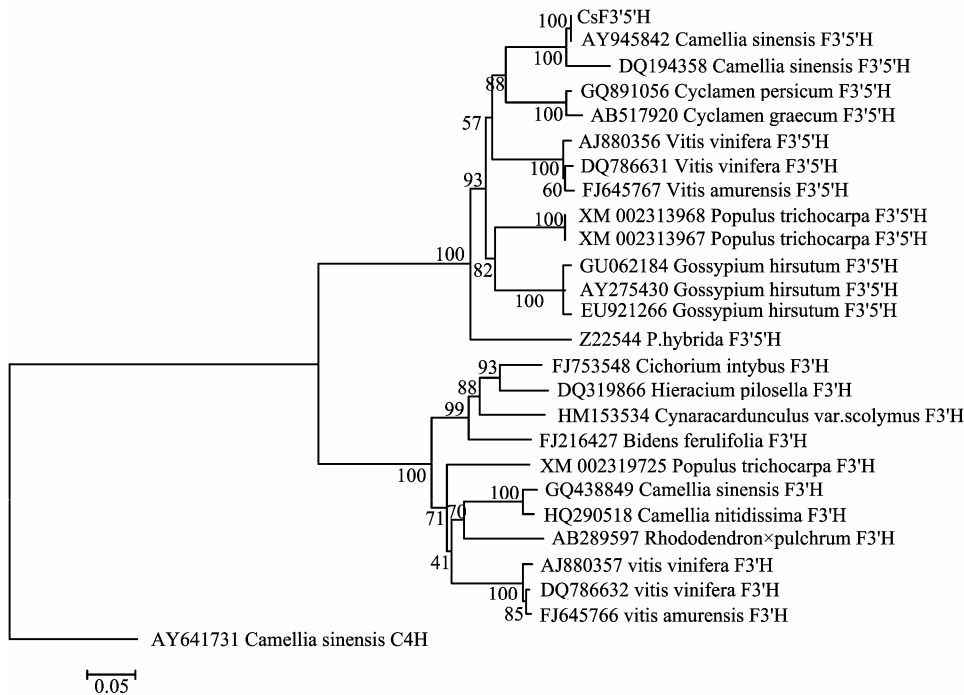
```

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 用粗体加下划线

In the nucleotide sequence, the start codon ATG and the stop codon TAA are in underlined bold face

图 2 茶树 F3'5'H 基因 cDNA 序列和推测的蛋白质序列

Figure 2 cDNA and deduced amino acid sequences of F3'5'H



F3'5'H(上半部分),F3'H(下半部分)在类黄酮生物途径中是十分紧密的 2 条序列, 树中数字表示自举值。CsF3'5'H 用红色字体表示

F3'5'H(top half), F3'H(lower portion), a less closely related sequence for a cytochrome P450 enzyme involved in flavonoid biosynthesis. The phylogenetic tree shows bootstrap values. CsF3'5'H has been shown in red

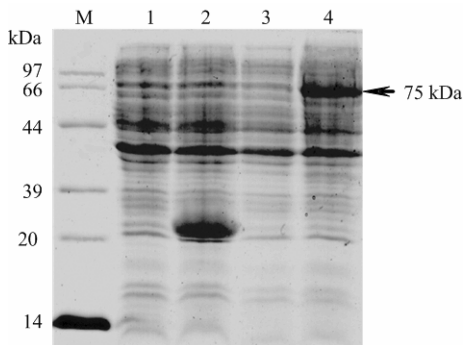
图 3 茶树 F3'5'H 基因的系统发生树分析

Figure 3 A phylogenetic tree inferred using Mega5.03 from the deduced amino acid sequences for F3'5'H, F3'H and C4H

XM 002319725、GQ438849、HQ290518、AB289597、AJ880357、DQ786632、FJ645766)及 C4H(AY641731 作为树根)氨基酸序列,使用 Mega 5.05 软件构建系统发生进化树。由于 *F3'H*、*F3'5'H* 在类黄酮生物途径中是十分紧密的 2 条基因序列,序列相似性较高,所以使用 NJ (Neighbor-Joining, 邻接法) 建立系统发生树,自举值为 1 000 次(图 3)。从进化树中可以明显的发现 *F3'5'H* 和 *F3'H* 形成了 2 个分支,*CsF3'5'H* 被归类到 *F3'5'H* 一支上。由氨基酸序列和系统发生树可以推测克隆的 *CsF3'5'H* 可能编码 *F3'5'H* 酶。

2.3 *CsF3'5'H* 在大肠杆菌中的表达、温度条件的优化及蛋白纯化

2.3.1 *CsF3'5'H* 原核表达 将重组质粒 pET-ANR 转化表达宿主菌,用 IPTG 诱导表达。提取诱导前后大肠杆菌的总蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后观察到在 75 kDa 左右有 1 条明显的外源蛋白条带(图 4),除去 18.5 kDa 大小的目的蛋白所带标签,pET-F35H 表达了与目的蛋白预测分子量 57 kDa 大小接近的蛋白。



M. 蛋白标准分子量; 1. pET32a(+)诱导前; 2. pET32a(+)诱导后; 3. pET-F35H 诱导前; 4. pET-F35H 诱导后
M. Protein molecular weight markers; 1. The negative control of pET32a(+); 2. The induced total protein of pET32a(+); 3. The positive control total protein of pET-F35H; 4. The induced total protein of pET-F35H

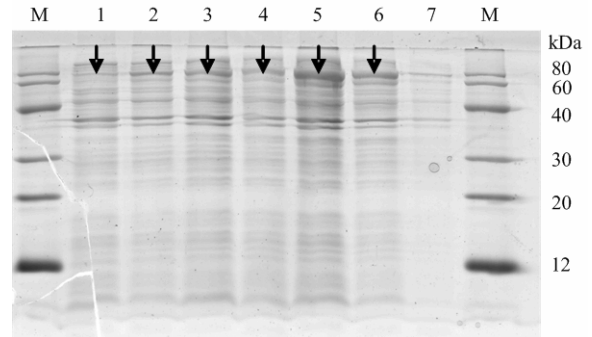
图 4 茶树 *F3'5'H* 融合蛋白 SDS-PAGE 图谱

Figure 4 SDS-PAGE of expressed *CsF3'5'H* fusion protein

2.3.2 最佳诱导温度和时间 从图 5 中可以看出,温度对茶树 *F3'5'H* 在大肠杆菌中的表达影响明显,用 BandScan 软件分析,在 30℃ 下目的蛋白产量最大,达到 43.8%。研究结果还显示,蛋白表达量也随着时间的增加而增加(图略)。

2.3.3 *CsF3'5'H* 融合蛋白的纯化 通过对原核表达最佳诱导条件的摸索,选择 30℃ 作为诱导温度,

诱导 5 h,重组蛋白经 6 mol·L⁻¹ 尿素破碎后,利用钴离子亲和树脂纯化,取样经 SDS-PAGE 进行检测,结果见图 6。用 BandScan 软件分析,纯化后的蛋白纯度接近 86.4%,说明茶树 *F3'5'H* 酶蛋白得到了较好纯化。

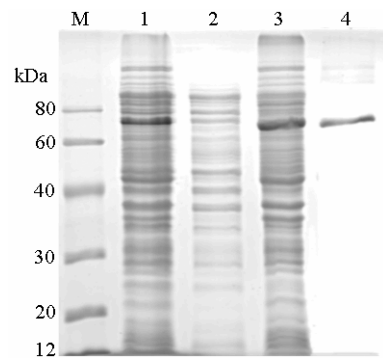


M. 蛋白分子量标准; 1. pET-F35H 诱导前; 2~7. pET-F35H 在 15~40℃ 条件下诱导后

M. Protein molecular weight markers; 1. The control; 2-7. The induced total protein of pET-F35H in the range of 15-40℃

图 5 不同诱导温度下表达 *CsF3'5'H* 融合蛋白的 SDS-PAGE

Figure 5 SDS-PAGE of expressed *CsF3'5'H* fusion protein with different induction temperatures



M. 蛋白分子量标准; 1. pET-F35H 诱导后; 2. pET-F35H 诱导后上清; 3. pET-F35H 诱导后沉淀; 4. pET-F35H 诱导沉淀破碎纯化

M. Protein molecular weight markers; 1. The induced total protein of pET-F35H; 2. The induced upper; 3. The induced precipitation; 4. Purified product

图 6 最佳表达条件下 *CsF3'5'H* 融合蛋白的 SDS-PAGE
Figure 6 SDS-PAGE of expressed *CsF3'5'H* fusion protein under the optimum expression temperature

3 讨论

P450 蛋白家族是植物中最庞大的家族,在植物体中有重要作用^[24],它广泛参与生物体重要物质的代谢作用,其催化作用可以改变物质的代谢途径或速率^[25]。P450 参与催化的反应十分广泛且复杂,

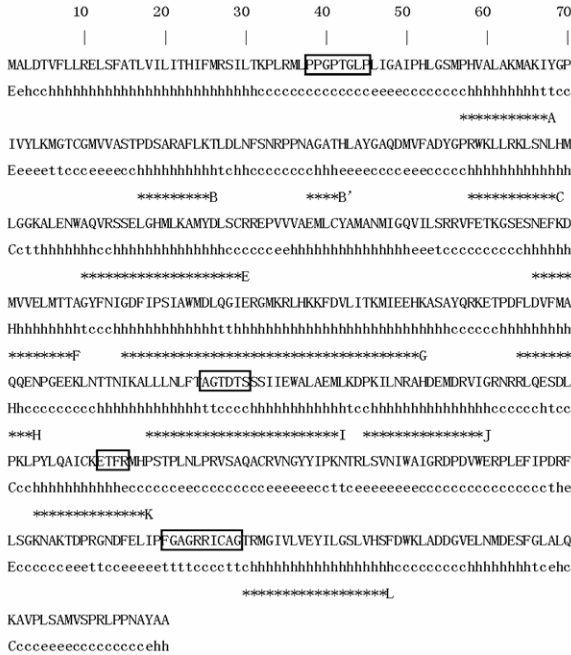
主要有脂肪碳的羟基化, 芳香碳的羟基化, 芳香碳的环氧化, 氮、氧、硫-脱烷基化和氧化作用, 芳胺的羟基化, 芳胺的水解作用, 氧化性脱氨和脱硫、脱卤和脱氢, 氧化性的碳碳键断裂及一些还原反应等^[26]。

比, 相似度均在 55%以上, 且与 AY945842 相似度在 98%以上, 所以 *CsF3'5'H* 属 CYP75A 家族, 与 AY945842 属等位基因。

本试验利用 RACE 技术, 克隆出了茶树 *F3'5'H* 基因, 并获得了其 ORF 框两翼 UTR 区序列。在推测该基因表达蛋白的分子量、等电点等的基础上, 通过优化大肠杆菌表达体系, 获得了能高效表达茶树 *F3'5'H* 酶的菌株。结果显示, 该重组菌株在 30 °C 下蛋白表达量最高。通过钴离子亲和树脂对目的蛋白进行初步纯化。BandScan 软件分析, 纯化后的蛋白纯度接近 86.4%, 可用于后续研究。该研究为开展 *F3'5'H* 酶的器官组织定位等研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Dixon R A, Paiva N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 1085.
- [2] Koes R E, Quattrocchio F, Mol J N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution[J]. *BioEssays*, 1994, 16: 123-132.
- [3] Wolfram S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health[J]. *J Am Coll Nutr*, 2007, 26: 373S-388S.
- [4] Chapple C C S, Shirley B W, Zook M, et al. Secondary metabolism in Arabidopsis[M]// Meyerowitz E M, Somerville C R. Arabidopsis NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 989-1030.
- [5] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 7-21 .
- [6] 夏涛, 高丽萍. 类黄酮及茶儿茶素生物合成途径及其调控研究进展[J]. *中国农业科学*, 2009, 42: 2899-2908.
- [7] Liu Y, Gao L, Xia T, et al Investigation of the site-specific accumulation of catechins in the tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) via vanillin-HCl staining[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 10371-10376.
- [8] Yang D, Liu Y, Sun M, et al. Differential gene expression in tea (*Camellia sinensis* L.) calli with different morphologies and catechin contents[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012 169: 163-175.
- [9] Wang Y, Gao L, Wang Z, et al. Light-induced expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthetic pathways in callus of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 133: 72-83.
- [10] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. *植物学报*, 2010, 45: 9.
- [11] Seitz C, Eder C, Deiml B, et al. Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase in the Asteraceae family[J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 61: 365-381.
- [12] de Vetten N, ter Horst J, van Schaik H P, et al. A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3',



黑框部分为基序, * 表示螺旋结构(以 A~L 编号)

The motif is in the black box. Helix structure is shown * (A-L)

图 7 *CsF3'5'H* 基序、螺旋结构分析

Figure 7 The motif and helix structure of *CsF3'5'H*

P450 蛋白家族的分类以及命名是基于氨基酸序列的相似性。对于新发现的 P450 家族蛋白, 其氨基酸序列的相似性与已知其他 P450 在 40%以下, 则该 P450 属一个新的 P450 家族; 在 40%以上, 则同属一个家族; 在 40%~55%之间, 则属同一家族的不同亚家族, 在 55%以上, 则属同一家族的同一亚家族。在 97%以上, 属等位基因。

通过对 *CsF3'5'H* 的氨基酸序列分析, 发现其具有 CYP 的保守结构(图 7)。在 N 端具有信号肽序列, 紧跟在信号肽序列之后的是一段富含脯氨酸区域, 具有保守的(P/I)PGPx(G/P)xP 序列; 在螺旋 I 区具有一个含有苏氨酸(T)的氧结合口袋区, 具有保守的(A/G)Gx(D/E)T(T/S)序列; 所有的 CYP 酶都是血红素蛋白, 所以在 C 端具有一个亚铁血红素结合区, 具有保守的 FxxGxxxCxG 序列, 其中的半胱氨酸(C)作为血红素铁的第 5 个配体是完全保守的^[27]。另外, 螺旋 K 区含完全保守的 ExxR 序列, 可能与核心结构的稳定有关^[25]。与已知的 *F3'5'H* 基因相

- 5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 778-783.
- [13] Holton T A, Brugliera F, Lester D R, et al. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour[J]. Nature, 1993, 366: 276-279.
- [14] Toguri T, Azunla M, Ohtani T. The cloning and characterization of a cDNA encoding a cytochrome P450 from the flowers of *Petunia hybrida*[J]. Plant Science, 1993, 94: 119-126.
- [15] Menting J, Scopes R K, Stevenson T W. Characterization of Flavonoid 3',5'-Hydroxylase in Microsomal Membrane Fraction of *Petunia hybrida* Flowers[J]. Plant Physiology, 1994, 106: 633-642.
- [16] Tanaka Y, Yonekura K, Fukuchi-Mizutani M, et al. Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*[J]. Plant and Cell Physiology, 1996, 37: 711-716.
- [17] Nielsen K M, Podivinsky E. cDNA cloning and endogenous expression of a flavonoid 3',5'-hydroxylase from petals of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)[J]. Plant Science, 1997, 129: 167-174.
- [18] Kalitenbach M, Schroder G, Schmelzer E, et al. Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants[J]. The Plant Journal, 1999, 19: 183-193.
- [19] Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y, et al. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation[J]. Plant Science, 2000, 153: 33-42.
- [20] Suzuki K, Xue H M, Tanaka Y, et al. Flower color modifications of *Torenia hybrida* by cosuppression of anthocyanin biosynthesis genes[J]. Molecular Breeding, 2000, 6: 239-246.
- [21] Okinaka Y, Shimada Y, Nakano-Shimada R, et al. Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNA from *Campanula medium*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67: 161-165.
- [22] Boase M R, Lewis D H, Davies K M, et al. Isolation and antisense suppression of flavonoid 3', 5'-hydroxylase modifies flower pigments and colour in cyclamen[J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 107.
- [23] Olsen K M, Hehn A, Jugde H, et al. Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3',5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*[J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 21.
- [24] Werck-Reichhart D, Ehlting J, Sauveplane V, et al. An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8.
- [25] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 101-131.
- [26] Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. Plant cytochrome P450[J]. Phytochemistry, 1994, 37: 1491-1506.
- [27] Chapple C. Molecular-Genetic Analysis of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 311-343.