

矮牵牛 *F3'*, *5'H* 全长 cDNA 的克隆及花特异启动子介导表达载体的构建

王琳, 向太和*

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要:通过 RT-PCR 从蓝色矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 花瓣中克隆类黄酮-3',5'-羟化酶基因 (*F3'*, *5'H*) 全长 cDNA (GenBank 登记号 EF371021)。生物信息学分析表明克隆的 *F3'*, *5'H* 基因与 GenBank 登记号 D14588、Z22545 和 DQ352142 等的 *F3'*, *5'H* 基因序列高度一致; 其编码的氨基酸序列与 GenBank 登记号 BAA03438.1 (矮牵牛)、BAC10997.1 (银杯草) 和 AAV85470.1 (马铃薯) 的高度同源, 同源率分别为 99%、88% 和 87%。利用 pBIN19、pBluescript SK(+) 和 pMD18-PchsA 质粒成功构建了花特异性启动子 PchsA 驱动的 *F3'*, *5'H* 基因的表达载体 pBIN19-PchsA-*F3'*, *5'H*, 并导入到野生型发根农杆菌 K599 中。利用 K599 诱导菊花生根, 不定根的诱导率可达 30.7%。这为利用转基因技术创造蓝色花卉提供了重要的基础。

关键词:矮牵牛; 类黄酮-3',5'-羟化酶基因; 克隆; 花特异性启动子; 表达载体

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)04-0358-07

Cloning of Flavonoid-3', 5'-hydroxylase gene (*F3'*, *5'H*) of *Petunia hybrida* and Construction of a Novel Vector Expression *F3'*, *5'H* Driven by Flower-specific Promoter

WANG Lin, XIANG Tai-he*

(College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: The full-length cDNA of flavonoid-3',5'-hydroxylase gene (*F3'*, *5'H*) was cloned by RT-PCR from blue color pedal of *Petunia hybrida* (GenBank Accession EF371021). Bioinformatics analysis showed that the gene sequence was highly consistent with previously reported *F3'*, *5'H* genes, such as GenBank Accession D14588, Z22545, and DQ352142. The encoded amino acid sequence was highly homology with that of GenBank Accession BAA03438.1 (*Petunia hybrida*), BAC10997.1 (*Nierembergia* sp. NBI7) and AV85470.1 (*Solanum tuberosum*) at 99%, 88% and 87%, respectively. A novel vector pBIN19-PchsA-*F3'*, *5'H* was constructed from plasmids of pBIN19, pBluescript SK(+) and pMD18-PchsA, which was driven by flower-specific promoter of chalcone synthase A gene (*PchsA*). Furthermore, the vector was successfully transformed into the wild-type *Agrobacterium rhizogenes* K599. The hairy roots of *Dendranthema morifolium* were induced by K599 harboring pBIN19-PchsA-*F3'*, *5'H* with the frequency of 30.7%. The results provided an important foundation for blue flower breeding by gene engineering technique.

Key words: *Petunia hybrida*; Flavonoid-3',5'-hydroxylase gene; Clone; Flower-specific promoter; Expression vector

收稿日期: 2007-09-08 接受日期: 2008-01-04

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y3080184, Y304083); 杭州市科技创新基金项目(20070232H07); 杭州市“131”人才基金项目资助

* 通讯作者 Corresponding author

花色是花卉最重要的观赏性状之一,令人遗憾的是,许多名贵的花卉如兰花(*Cattleya hybrida*)、菊花(*Dendranthema morifolium*)、百合(*Lilium brownii* var. *viridulum*)、玫瑰(*Rosa rugosa*)和郁金香(*Tulipa gesneriana*)等都缺少蓝色花系^[1]。蓝色花是花瓣中 3',5'羟基花青素(飞燕草色素及其衍生物)的相对含量较高,而类黄酮 3',5'羟基化酶(flavonoid-3',5'-hydroxylase, F3',5'H)是合成这类色素的关键酶,其基因——类黄酮 3',5'羟基化酶基因(F3',5'H)被称为“蓝色基因”。在花青素的合成代谢中,类黄酮 3',5'羟基化酶催化黄酮和黄酮醇 B 环 3'和 5'位置上形成羟基,促使蓝色色素合成前体的生成。而蓝色花青素-飞燕草色素合成^[2-3]是因为 B 环羟基数目增多而形成。大多数蓝色花卉花瓣中存在类黄酮 3',5'羟基化酶基因,而缺乏蓝色品系的花卉该基因的缺失^[4],如兰花、菊花、百合、玫瑰和郁金香等。因此,导入外源 F3',5'H 基因成为通过基因工程手段创造蓝色花卉的一条途径。

本研究从蓝色矮牵牛(*Petunia hybrida*)花瓣中克隆到类黄酮-3',5'-羟基化酶基因(F3',5'H)全长 cDNA,构建了花特异启动子 PchsA 驱动下的 F3',5'H 基因的表达载体,并转入到野生型的发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) K599 中,利用发根农杆菌 K599 介导成功地将目的基因导入菊花细胞中,高效诱导出不定根,为通过基因工程手段培育蓝色花卉提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

蓝色花色矮牵牛品种为 QL01(杭州市苗圃花卉公司培育),自然条件下生长。菌种 XL1-Blue MRF'、野生型发根农杆菌 K599、质粒 pBIN19 和 pBluscript SK(+)(简称为 pBS)均由本实验室保存,含花特异启动子 PchsA 的质粒 pMD18-PchsA 由本实验室克隆和构建^[5]。

1.2 RT-PCR

按照前文^[6]的方法提取矮牵牛蓝色花瓣总 RNA。利用 RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司产品)合成 cDNA 第 1 条链。根据 Holton 等的序列^[7]和 GenBank 登记号为 Z22545 的序列,设计 1 对特异性引物 F3',5'H-P1:5'-ttcggccatatacgtttcc-3',F3',5'H-P2:5'-ataaaaggcggacaacaa-3',引物由上海生工公司合成。以 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩

增。反应条件为:94℃ 5 min,94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 90 s,72℃ 10 min,共 30 个循环。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳 1.5 h (5 V cm⁻¹),溴化乙锭(EtBr)染色,用美国 Bio/Rad 凝胶成像系统观察并拍照记录。

1.3 PCR 产物的克隆和测序

PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳后,用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工公司产品)提取和纯化。纯化后的 DNA 连接到测序载体 pMD18-T (日本 TaKaRa 公司产品)。采用冻融法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含 Amp(氨苄青霉素)的筛选培养基中筛选阳性克隆,其质粒用 EcoR I 和 Sal I 双酶切电泳鉴定正确后,质粒 DNA 送交上海华诺生物技术有限公司,用 ABI377 型 DNA 测序仪和 M13 正反向通用引物测定序列。

1.4 序列的分析

与国际核酸数据库联网,对测定的序列进行 Blast 和 ORF Finder 分析。

1.5 转基因表达载体 pBIN19-PchsA-F3'5'H 的构建

转基因表达载体 pBIN19-PchsA-F3'5'H 的构建分 3 步进行。第一步,质粒 pMD18-PchsA 经 Hind III + Xba I 酶切后回收含 PchsA 基因的目的片段,与质粒 pBS 经 Hind III + Xba I 酶切后的载体片段连接得到重组质粒 pBS-PchsA。第二步,质粒 pMD18-F3'5'H 经 EcoR I + Sal I 酶切后回收含 F3',5'H 基因的目的片段,与质粒 pBIN19 经 EcoR I + Sal I 酶切后的载体片段连接得到重组质粒 pBIN19-F3'5'H。第三步,质粒 pBS-PchsA 经 Kpn I + Xba I 酶切后回收含 PchsA 的目的片段,与质粒 pBIN19-F3'5'H 经 Kpn I + Xba I 酶切后回收的载体片段连接得到重组质粒 pBIN19-PchsA-F3'5'H。构建过程中质粒 DNA 小量提取、酶切、片段回收均参照试剂盒(上海生工公司产品)说明书进行。

1.6 转基因表达载体 pBIN19-PchsA-F3'5'H 导入野生型发根农杆菌 K599

用冻融法将 pBIN19-PchsA-F3'5'H 导入野生型发根农杆菌 K599,即在 100 μ L K599 感受态细胞中加入约 0.1 μ g 纯化质粒 DNA,混匀后在冰上放置 10 min,置于液氮速冻 5 min,立即用 28℃ 水浴热激 5 min,加入 500 μ L Luria-Bertani 液体培养基(简称为 LB)液体培养基,在 28℃ 缓慢振荡培养 2 h。取 100 μ L 菌液分别涂布于 LB + Km(卡那霉素)

50 mg L⁻¹ + Str(链霉素)50 mg L⁻¹ 固体培养基上, 28℃ 培养约 48 h 筛选抗性菌落。

根据花特异启动子 PchsA 序列(GenBank 登记号 EF199748)^[5]设计引物 PchsA-P1: 5'-ggaagcttttctgttcaaa-gctgatg-3', PchsA-P2: 5'-gctctagacgattttgcttgaaaaag-3'; 同时利用引物 F3'5'H-P1 和 F3'5'H-P2 对筛选获得的抗性转化子进行 PCR 扩增鉴定。PCR 扩增反应体系和反应条件同上。

1.7 菊花转基因不定根的诱导和鉴定

利用改良的叶盘法对菊花叶片外植体进行遗传转化, 即: 发根农杆菌 K599/pBIN19-PchsA-F3'5'H 于 LB+Km 50 mg L⁻¹ + Str 50 mg L⁻¹ 平板中划线 28℃ 活化后, 挑取单克隆于 LB+Km 50 mg L⁻¹ + Str 50 mg L⁻¹ 液体培养基中 28℃, 200 r min⁻¹ 过夜培养。取 1 mL 菌液移入 50 mL 的含 Km 50 mg L⁻¹ 和 Str 50 mg L⁻¹ 的 Murashige and Skoog Stock 液体培养基(简称为 MS)中, 28℃, 200 r min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5 左右, 离心管收集菌液并用 MS 液体培养基悬浮清洗 3 次。在无菌条件下侵染事先预培养于 MS + As(乙酰丁香酮) 25 mg L⁻¹ 3 d 带有伤口的菊花叶片 8 min, 转入 MS+As 25 mg L⁻¹ 固体培养基共培养 3 d 后, 经 MS+Cef(头孢霉素) 500 mg L⁻¹ 液体培养基清洗 3 次后转入 MS+NAA 0.5 mg L⁻¹+Km 50 mg L⁻¹+Cef 500 mg L⁻¹ 的筛选培养基中; 同时将未经侵染带有伤口的叶片转于相同的培养基中作为阴性对照。同前文的方法^[7]利用 3 对引物 PchsA-P1 和 PchsA-P2、F3'5'H-P1 和 F3'5'H-P2、virG-P1: 5'-ttatctgagtgaa-gtcgtctcagg-3'和 virG-P2: 5'-cgctgcctgagattaagtgtc-3' 对不定根的基因组 DNA 进行 PCR 扩增鉴定。

2 结果

2.1 F3', 5'H 基因的分离

经 RT-PCR 扩增, 获得片段大小约 1 800 bp 的 DNA 片段(图 1)。将此片段回收后与 pMD18-T 连接, 转化、筛选获得白色菌斑, 提取质粒, 分别进行 PCR 扩增和 *Sal* I + *Eco*R I 内切酶酶切鉴定, 经电泳分析显示为阳性克隆。

2.2 F3', 5'H 基因序列及分析

经过序列测定, RT-PCR 获得的 cDNA 片段长为 1 773 bp。通过 Blastn 比较, 本研究克隆的基因与矮牵牛中编码类黄酮-3', 5'-羟基化酶的 *Hf1* 和 *Hf2* 除去内含子后的片段相似性在 98% 以上, 而与

前人报道的矮牵牛 *F3', 5'H* 基因序列(GenBank 登记号: D14588、Z22545 和 DQ352142 等)高度一致, 仅在第 444、812、815、991 和 1001 位碱基上有差异, 说明 *F3', 5'H* 基因在矮牵牛的不同品种间是高度保守的。利用 ORF Finder 软件对该 cDNA 进行分析, 该 cDNA 的 28~1 548 bp 含有一个开放阅读框(open reading frame, ORF)和一个终止密码子, 编码 506 个氨基酸, 氨基酸序列与 GenBank 登记号 BAA03438.1 (矮牵牛)、BAC10997.1 (银杯草 *Nierembergia* sp. NB17) 和 AAV85470.1 (马铃薯 *Solanum tuberosum*) 的高度同源, 同源率分别为 99%、88% 和 87%。该氨基酸的第 35 位左右“LPPGP”序列是 CYP(细胞色素 P450)的基序, 连接膜的锚定位点和酶蛋白的球体部分, 在不同物种中是高度保守区^[8]; I 螺旋基序位于始于约第 190 位氨基酸的“AGTDT”高度保守序列, I 螺旋基序与底物的选择和结合有关, 被认为是促使形成氧分子的结合域^[9-10]。C 端血红素的结合区(HBR)“FGAGRRIC AG”在不同的物种中也是高度保守的, 血红素结合区是 CYP 酶类必需序列, 这段序列受半胱氨酸的调节, 以其为中心, 左右各氨基酸围绕半胱氨酸形成特定结构^[11](图 2, 其中引物序列用方框标出, 基序用黑底方框标出)。因此本研究克隆的 *F3', 5'H* 基因正确(该基因序列已被 GenBank 收录, 登记号: EF371021)。

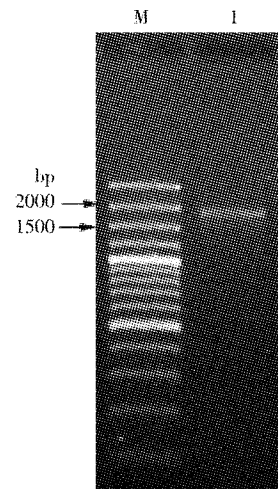


图 1 *F3', 5'H* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplified products of *F3', 5'H* gene

M. 100 bp DNA Ladder; 1. *F3', 5'H*

2.3 表达载体 pBIN19-PchsA-F3'5'H 的构建

质粒 pMD18-PchsA 经 *Hind* III + *Xba* I 酶切后回收含启动子 PchsA 的小片段, 与质粒 pBS 经

Hind III + *Xba* I 酶切后的大片段连接得到新质粒 pBS-PchsA。pBS-PchsA 经 *Sac* I + *Sal* I 双酶切得到约为 3 000 bp 和 350 bp 的两个片段,表明 pBS-PchsA 构建正确。质粒 pMD18-F3',5'H 经 *Eco*R I + *Sal* I 酶切后回收含 F3',5'H 基因的小片段,与质粒 pBIN19 经 *Eco*R I + *Sal* I 酶切后的大片段连接得到新质粒 pBIN19-F3',5'H。pBIN19-F3',5'H 经 *Hind* III + *Xba* I 双酶切得到约为 10 000 bp 和 1 800 bp

的两个片段,表明 pBIN19-F3',5'H 构建正确。质粒 pBS-PchsA 经 *Kpn* I + *Xba* I 酶切后回收含 PchsA 的小片段,与质粒 pBIN19-F3',5'H 经 *Kpn* I + *Xba* I 酶切后的大片段连接得到新质粒 pBIN19-PchsA-F3',5'H。pBIN19-PchsA-F3',5'H 经 *Hind* III 单酶切得到约为 10 000 bp 和 2 200 bp 小的两个片段,表明 pBIN19-PchsA-F3',5'H 构建正确(图3)。

```

1   [ttggccataatagcttttcc]ttagtcattgatgctacttactgagcttggcagcaact 60
                                     M M L L T E L G A A T
61  tcaatcttttctaatagcacacataatcatttcaactcttatttcaaaaactaccgcccgg 120
    S I F L I A H I I I S T L I S K T T G R
121 catctaccgcccggcccaagagggtggccggtgatcgagcacttccacttttaggagcc 180
    H [L P P G P] R G W P V I G A L P L L G A
181 atgccacatgtttccttagctaaaatggcaaaaaataggacaaatcatgtatctcaaa 240
    M P H V S L A K M A K K Y G A I M Y L K
241 gttagcaatgtggcatggcagttgcttaccctgatgctgtaaacattcttgaana 300
    V G T C G M A V A S T P D A A K A F L K
301 acactgatatacaacttcccaatgctccacctaatcgagggtgccactcacttagctat 360
    T L D I N F S N R P P N A G A T H L A Y
361 aatgctcaagacatggtttttgcacattatggaccacgatggaagtgtgtaaggaaat 420
    N A Q D M V F A H Y G P R W K L L R K L L
421 agcaacttgcataatgctaggggggaaagccttagagaattggcacaatgttcgtgcca 480
    S N L H M L G G K A L E N W A N V R A N
481 gagctagggcacatgctaaaatcaatgtccgatgatgctgagagggccagaggggtgtg 540
    E L G H M L K S M S D M S R E G Q R V V
541 gtggcggagatgttgacatttgccatggccaatgatgctggacaagtgatgctaaagaaa 600
    V A E M L T F A M A N M I G Q V M L S K
601 agagtattttagataaaaggtgttgaggtaaatgaatttaaggacatggtttagagatta 660
    R V F V D K G V E V N E F K D M V V E L
661 atgacaatagcagggtattttaacattgggtgattttatctctgttttagcttggatgat 720
    M T I A G Y F N I G D F I P C L A W M D
721 ttcaaggatagataaaaacgaatgaacgctttacataagaagtttgatgctttattgaca 780
    L Q G I E K R M K R L H K K F D A L L T
781 aagatgtttgatgaacacaaaagcaactactctttggacgtaagggaamccagattttctt 840
    K M F D E H K A T T F G R K G X P D F L
841 gatgtgttatgaaaaatgggacaattctgaaggagaagactcagtaacaacaacatc 900
    D V V M E N G D N S E G E R L S T T N I
901 aaagcacttttgetgaattgttccagctggtagcagcacttctcttagtgcaatagaa 960
    K A L L L N L F T [A G T D T] S S S A I E
961 tggccacttgcagaaatgatgaagaaccctaccattttgagaaaagcacaagcagaaatg 1020
    W A L A E M M K N P T I L R K A Q A E M
1021 gatcaagtatttgaagaataggcgtttactcgaatccgatateccaaatctcccttac 1080
    D Q V I G R N R R L L E S D I P N L P Y
1081 ctccgagcaatttgcagaacacatttcgaaaaacccctctacaccatnaaatcttct 1140
    L R A I C K E T F R K H P S T P L N L P
1141 aggatctcgaagcaaccatgcatgctgatggttattacatacaaaaaaacacatagcct 1200
    R I S N E P C I V D G Y Y I P K N T R L
1201 agtgttaacatattgggcaattggaagatcceaagtttgggaaaatccactagagttt 1260
    S V N I W A I G R D P Q V W E N P L E F
1261 aatccgaaagattcttgagtgaagaaactccaagattgatcctcagaggaacagatttt 1320
    N P E R F L S G R N S K I D P R G N D F
1321 gaattgatcaccatttggctgctggacgaagaatttggcaggaacaagaatgggaattgta 1380
    E L I P [F G A G R R I C A G] T R M G I V
1381 atggtagaatatatttagaactttggttcattcatttgattggaatataccaagtga 1440
    M V E Y I L G T L V H S F D W K L P S E
1441 gttattgagttgaatggaagaagctttggcttagctttagctgagaaagctgtccctct 1500
    V I E L N M E E A F G L A L Q K A V P L
1501 gaagctatggttactccaagttacaattggatgtttatgaccatagctatatatgtgt 1560
    E A M V T P R L Q L D V Y V P *
1561 attgtgctataattgcgcatgttggttgtagctagatattaaaaggagtacatga 1620
1621 agcgcattgcatgagtttaactgttagctccttaaattttaggtattttcaattaata 1680
1681 agttcttgggtgggtattttttagcaaattagctactatttttgcactttagaatt 1740
1741 tgttaagctgaat[ttgtgttccgacctttaa]

```

图2 F3',5'H 的 cDNA 序列和编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino sequences of F3',5'H from *Petunia hybrida*

2.4 转基因菊花不定根的诱导及其 PCR 鉴定

K599/pBIN19-PchsA-F3'5'H 用改良的叶盘法侵染菊花, 转入筛选培养基 7 d 后的菊花叶片伤口处

长出毛状的不定根(图 4), 诱导率达到 30.7% (37/120); 而未经发根农杆菌 K599/pBIN19-PchsA-F3'5'H 处理的叶片伤口处无不定根生成。

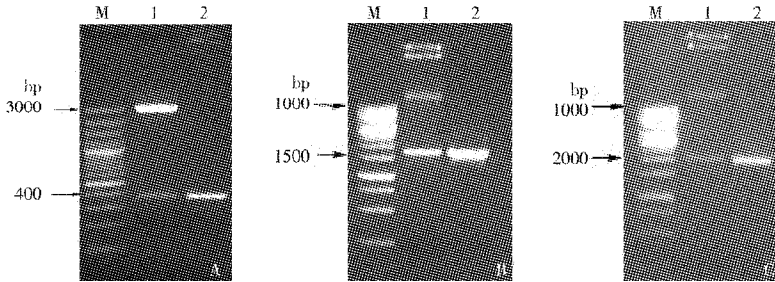


图 3 重组质粒的酶切及 PCR 扩增鉴定

Fig. 3 Digestion by restriction enzymes of recombinant plasmid and PCR identification

A: 质粒 pBS-PchsA 酶切 Digestion by *Sac* I + *Sal* I of pBS-PchsA; M. 100 bp DNA ladder; 1. 质粒 pBS-PchsA 用 *Sac* I + *Sal* I 酶切 pBS-PchsA digested by *Sac* I + *Sal* I; 2. 以质粒 pBS-PchsA 为模板的 PCR 扩增结果 PCR amplified result of pBS-PchsA.

B: 质粒 pBIN19-F3'5'H 酶切 Digestion by *Hind* III + *Xba* I of pBIN19-F3'5'H; M. 1 kb DNA Ladder; 1. 质粒 pBIN19-F3'5'H 用 *Hind* III + *Xba* I 酶切 pBIN19-F3'5'H digested by *Hind* III + *Xba* I; 2. 以质粒 pBIN19-F3'5'H 为模板的 PCR 扩增结果 PCR amplified result of pBIN19-F3'5'H.

C: 质粒 pBIN19-PchsA-F3'5'H 酶切 Digestion by *Hind* III of pBIN19-PchsA-F3'5'H; M. 1 kb DNA Ladder; 1. 质粒 pBIN19-PchsA-F3'5'H 用 *Hind* III 酶切结果 pBIN19-PchsA-F3'5'H digested by *Hind* III; 2. 以质粒 pBIN19-PchsA-F3'5'H 为模板的 PCR 扩增结果 PCR amplified result of pBIN19-PchsA-F3'5'H.

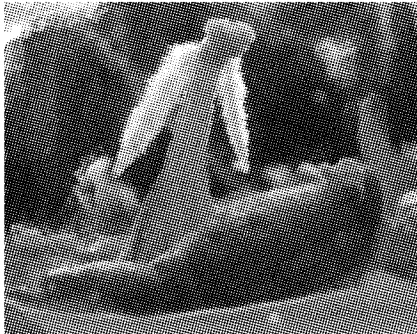


图 4 菊花叶片被发根农杆菌 K599 侵染后形成的不定根

Fig. 4 Hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* K599 from the leaf of *Dendranthema morifolium*

利用引物 PchsA-P1 和 PchsA-P2 以及 F3'5'H-P1 和 F3'5'H-P2 对 4 个不定根系和质粒 pBIN19-PchsA-F3'5'H 经 PCR 扩增, 获得了约为 350 bp 和

1 800 bp 的条带(图 5)。

此外, 根据发根农杆菌 *virG* 基因设计的引物 *virG*-P1 和 *virG*-P2 对 K599 自身携带的 Ri 质粒、质粒 pBIN19-PchsA-F3'5'H 和菊花转基因不定根基因组 DNA 进行扩增, 结果只有 K599 自身携带的 Ri 质粒扩增出了长度约 1 kb 条带(图 6), 因此, 排除了不定根中存在残留农杆菌污染的可能, 表明目的基因已经整合到不定根的基因组中, 即获得的不定根为转基因不定根。

3 讨论

目前从矮牵牛、洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)、长春花(*Catharanthus roseus*)、*Gerbera hybrids*、风铃草(*Campanula medium*)等植物中成功分离出编码类

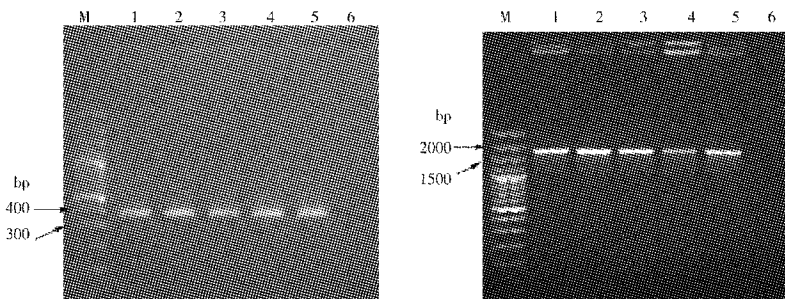


图 5 利用 *PchsA* 启动子(左)和 *F3'5'H*(右)基因引物对转基因不定根进行 PCR 扩增

Fig. 5 PCR results of DNA from transformed hairy root with primer pairs of *PchsA* promoter (left) and *F3'5'H* genes (right)

M. 100 bp DNA ladder; 1. pBIN19-PchsA-F3'5'H; 2~5. 转基因菊花根 Transformed root of *Dendranthema morifolium*; 6. 非转基因菊花根 Non-transformed root of *Dendranthema morifolium*.

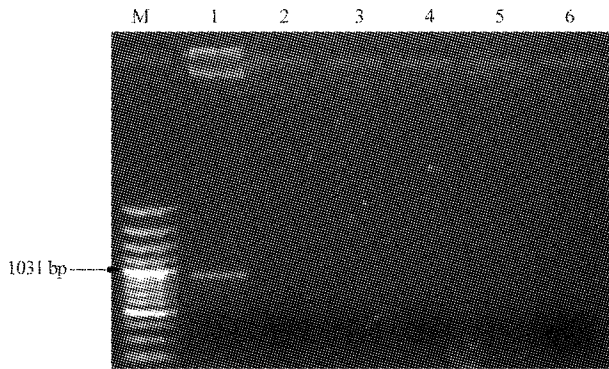


图6 利用 *virG* 基因引物对转基因不定根进行 PCR 扩增

Fig. 6 PCR results of hairy root DNA by primer pair from *virG* gene
M. 100 bp DNA ladder; 1. 野生型发根农杆菌 K599 Ri 质粒
Ri plasmid of wild-type *Agrobacterium rhizogenes* K599; 2. pBIN19-
PchsA-F3'5'H; 3 ~ 6. 菊花转基因根 Transformed roots of
Dendranthema morifolium.

黄酮 3',5'羟基化酶的基因^[8,12-18],并且在月季(*Rosa chinensis*)、玫瑰中已经成功培育了蓝紫色系列的花卉^[19-20]。此外,Florigene 和 Suntory 两家公司已利用转基因技术培育了蓝色康乃馨(*Dianthus caryophyllus*),并在澳大利亚和日本上市^[21]。我国北京林业大学戴思兰教授课题组也从蓝色的瓜叶菊(*Pericallis cruentia*)花瓣中分离出 *F3',5'H* 同源基因的 cDNA 全长序列^[22]。

然而目前的研究成果都是利用 CaMV 35S 启动子驱动 *F3',5'H* 基因在异源植物中表达,从而获得转基因蓝紫色系列花卉^[18,20-22],而组成型启动子 CaMV 35S 的应用有很多弊端,如基因的组成性表达会给植物带来很大负担,打破植物本身代谢的平衡,有时会产生 RNAi 干涉现象,严重时会造成植物死亡等^[23]。Annadana 等^[24]和 Outchkouro 等^[25]研究也表明利用 CaMV 35S 启动的基因在菊花叶和花中的表达效率很低。因此,寻找一个功能强大的花期特异性启动子已成为近年来花色基因工程的热点,*CHS* 基因(查尔酮合成酶基因)是植物体内参与色素代谢的第 1 个关键酶,对花的颜色形成具有很强的调节作用;而其中查尔酮合成酶基因家族的 *CHSA* 启动子是一种光依赖性并在花器官中特异表达的启动子^[26-27]。Annadana 等^[24]曾成功地实现了矮牵牛 *CHSA* 启动子驱动的 *GUS* 在菊花花中的高效表达,这为利用 *PchsA* 启动子驱动异源基因在菊花花中表达提供了很好的依据。在国内外花色研究工作中,对具有较大市场前景的菊花研究比较少,且菊花自身缺乏 *F3',5'H* 基因^[22]。本研究首先从蓝色矮牵牛花瓣中克隆出类黄酮-3',5'-羟基化酶

基因(*F3',5'H*)全长 cDNA,成功构建了花特异性启动子 *PchsA* 驱动的 *F3',5'H* 基因的表达载体,并利用野生型的发根农杆菌 K599 介导将 *F3',5'H* 基因转入至菊花细胞中,这为进一步通过基因工程技术创造蓝色菊花等提供了重要的前提基础,相关的植株再生工作正在进行之中。

参考文献

- [1] Xu Q Y(徐清漪), Dai S L(戴思兰). Blue flower's molecular breeding [J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2004, 2(1): 93-99. (in Chinese)
- [2] Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T. Metabolic engineering to modify flower color [J]. Plant Cell Physiol, 1998, 39(11): 1119-1126.
- [3] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7(7): 1071-1083.
- [4] Meng L(孟丽), Dai S L(戴思兰). *F3',5'H* genes regulation and blue flowers formation [J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2004, 2(3): 413-420. (in Chinese)
- [5] Xu J M(徐纪明). Cloning and analyzing of three actin genes from *Cucumis sativus* L. and two flower-specific promoters from *Petunia hybrida* [D]. Hangzhou: Hangzhou Normal University, 2008: 1-6. (in Chinese)
- [6] Xu J M(徐纪明), Xiang T H(向太和). Cloning and characterization of three actin genes in gynocercous line cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. J Cell Biol(细胞生物学杂志), 2008, 30(1): 125-130. (in Chinese)
- [7] Xu J M(徐纪明), Xiang T H(向太和). Construction of a novel vector harboring green fluorescence protein gene (*gfp*) and high expression of *gfp* in transformed roots of *Petunia hybrida* [J]. Hereditas(遗传), 2008, 30(8): 1069-1074. (in Chinese)
- [8] Nielsen K, Podivinsky E. cDNA cloning and endogenous expression of a *F3',5'H* from petals of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) [J]. Plant Sci, 1997, 129(2): 167-174.
- [9] Halkier B A. Catalytic relationships and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes [J]. Phytochemistry, 1996, 43(1): 1-21.
- [10] Kraus P F X, Kutchen T M. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding beramunine synthase a C-phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 2071-2075.
- [11] Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. Plant cytochrome P450 [J]. Phytochemistry, 1994, 37(6): 1491-1506.
- [12] Holton T A, Brugliera F, Lester D R, et al. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour [J]. Nature, 1993, 366(6452): 276-279.
- [13] Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T. Metabolic engineering to modify flower color [J]. Plant Cell Physiol, 1998, 39(11): 1119-1126.
- [14] Kaltenbach 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]. *Plant J*, 1999, 19(2): 183–193.
- [15] Martens S, Forkmann G. Cloning and expressing of flavone synthase II from *Gerbera hybrids* [J]. *Plant J*, 1999, 20(5): 611–618.
- [16] Shimada Y, Ohbayashi M, Nakano-Shimada R, et al. Genetic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway with flavonoid-3',5'-hydroxylase: Specific switching of the pathway in *Petunia* [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(5): 456–462.
- [17] Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, et al. Expression of chimeric *P450* genes encoding flavonoid-3',5'-hydroxylase in transgenic tobacco and *Petunia* plants [J]. *FEBS Letters*, 1999, 461(3): 241–245.
- [18] Okinaka Y, Shimada Y, Nakano-Shimada R, et al. Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative *F3',5'H* cDNA from *Campanula medium* [J]. *Biosci Biotechn Biochem*, 2003, 67(1): 161–165.
- [19] Holton T A, Tanaka Y. Blue roses — A pigment of our imagination? [J] *Trend Biotechn*, 1994, 12(2): 371–378.
- [20] Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flower accumulating delphinidin [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(11): 1589–1600.
- [21] Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T. Metabolic engineering to modify flower color [J]. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(11): 1119–1126.
- [22] Meng L(孟丽), Dai S L(戴思兰). Cloning, sequencing and prokaryotic expression of *F3',5'H* cDNA from *Pericallis cruentia* (L.) Herit [J]. *Mol Plant Breed(分子植物育种)*, 2005, 3(6): 780–786. (in Chinese)
- [23] Zhang C X(张春晓), Wang W Q(王文祺), Jiang X N(蒋湘宁), et al. Review on plant gene promoters [J]. *Acta Gene Sin(遗传学报)*, 2004, 31(12): 1455–1464. (in Chinese)
- [24] Annadana S, Beekwider MJ, Kuijpers G, et al. Cloning of the chrysanthemum UEP1 promoter and comparative expression in leaves and ray and disc florets of *Dendranthema grandiflora* [J]. *Transgen Res*, 2002, 11(4): 437–445.
- [25] Outchkourov NS, Peters J, Jong J de, et al. The promoter-terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression level in plants. [J]. *Planta*, 2003, 216(6): 1003–1012.
- [26] Koes R E, Spelt C E, van den Elzen P J M, et al. Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30) [J]. *Gene*, 1989, 81(2): 245–257.
- [27] Zhang S Z(张树珍), Yang B P(杨本鹏), Liu F H(刘飞虎). Cloning and sequence analysis of a flower-specific expression promoter *PchsA* [J]. *J Agri Biotechn(农业生物技术学报)*, 2002, 10(2): 116–119. (in Chinese)