

掌叶覆盆子 *RcF3H* 基因克隆及表达分析

应宇鑫^{1,2}, 陈俊宇², 姚玲窈², 许张婷², 俞振明², 开国银²

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江中医药大学 药学院/浙江省药食植物活性成分与健康国际科技合作基地/浙江省中药资源创新与转化中医药重点实验室, 浙江 杭州 311402)

摘要: 【目的】黄烷酮 3-羟化酶 (F3H) 是植物类黄酮合成的关键酶。研究掌叶覆盆子 *Rubus chingii* *RcF3H* 基因与类黄酮代谢的关系并分析其生物学功能, 可为进一步探究 *RcF3H* 在掌叶覆盆子类黄酮物质积累过程中的作用机制提供参考。

【方法】在掌叶覆盆子中克隆 *RcF3H* 基因, 并进行生物信息学分析, 包括理化性质、同源性比对、系统进化树和启动子顺式作用元件等。检测 *RcF3H* 基因在不同组织器官、果实生长时期以及在外源茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导下的表达水平。

【结果】2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-ODD) 家族基因 *RcF3H* 位于第一条染色体, 片段长度为 1 098 bp, 由 1 个外显子构成, 共编码了 365 个氨基酸。*RcF3H* 属于亲水性稳定蛋白, 亚细胞预测定位在细胞质上。*RcF3H* 蛋白的二、三级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成, 与插田泡 *Rubus coreanus* 及拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等双子叶植物的亲缘关系最近。*RcF3H* 基因启动子区域含有多个顺式作用元件, 功能集中于响应激素和应对胁迫等方面。*RcF3H* 基因在掌叶覆盆子果实中表达量较高, 有明显的组织特异性。*RcF3H* 基因表达变化与类黄酮物质在掌叶覆盆子果实中积累规律一致, 并在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理下表达量上升, 推测其是促进类黄酮合成的关键酶。【结论】*RcF3H* 响应外源 MeJA 刺激, 并可能作为掌叶覆盆子类黄酮生物合成的正向调节因子, 影响类黄酮的积累。图 8 表 2 参 28

关键词: 掌叶覆盆子; 黄烷酮 3-羟化酶; 基因克隆; 表达分析; 类黄酮

中图分类号: S567 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)00-0001-09

Cloning and Expression Analysis of *RcF3H* in *Rubus chingii*

YING Yuxin^{1,2}, CHEN Junyu², YAO Lingyao², XU Zhangting², YU Zhenming², KAI Guoyin²

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. School of Pharmacy/Zhejiang Provincial International Science & Technology Cooperation Base for Active Ingredients of Medicinal and Edible Plants and Health/Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Chinese Resource Innovation and Transformation, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Flavanone 3-hydroxylase (F3H) is a key enzyme in the synthesis of plant flavonoids. This study aims to investigate the relationship between *RcF3H* gene and flavonoid metabolism in *Rubus chingii* and analyze its biological function, so as to provide reference for further exploring the mechanism of *RcF3H* in the process of flavonoid accumulation in *R. chingii*. [Methods] *RcF3H* gene was cloned from *R. chingii*, and bioinformatics analysis was performed, including physicochemical properties, homology comparison, phylogenetic tree and promoter *cis*-acting elements. At the same time, this study detected the expression level of *RcF3H* gene in different tissues, fruit growth period and exogenous methyl jasmonate (MeJA) induction. [Results] *RcF3H* gene, belonging to the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily, was located on the first chromosome, and its fragment length was 1 098 bp. *RcF3H* gene consisted of 1 exon and encoded 365

收稿日期: 2024-04-29; 修回日期: 2024-07-25

基金项目: 浙江省农业(中药材新品种选育)新品种选育重大科技专项(2021C02074-3); 浙江省卫生创新领军人才计划项目; 国家青年岐黄学者项目

作者简介: 应宇鑫 (ORCID: 0009-0001-8065-2564), 从事药用植物组织培养、药效物质代谢合成分子调控研究。E-mail: yingyuxin0123@163.com. 通信作者: 开国银 (ORCID: 0000-0001-7586-9067), 教授, 博士, 从事药用植物种质资源创新利用、药效物质代谢合成分子调控和基因组学研究。E-mail: kaiguoyin@163.com

amino acids. RcF3H belonged to the hydrophilic stable protein. Subcellular localization predicted that the protein was located in the cytoplasm. The secondary and tertiary structure of RcF3H was mainly composed of α -helix and irregular curl, which had the closest genetic relationship with dicotyledons such as *Rubus coreanus* and *Arabidopsis thaliana*. Analysis of promoter *cis*-acting elements showed that the promoter region of *RcF3H* gene contained multiple *cis*-acting elements, and its function mainly focused on responding to hormones and stress. *RcF3H* gene was highly expressed in fruits, and had obvious tissue specificity. In addition, the expression of *RcF3H* gene in different ripening stages of fruits was consistent with the accumulation of flavonoids, and the expression increased under the treatment of $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA. These results suggested that *RcF3H* gene is the key enzyme to promoting flavonoid synthesis. [Conclusion] *RcF3H* gene responds to MeJA stimulation and may act as a positive regulator of flavonoid biosynthesis in *R. chingii*, affecting flavonoid accumulation. [Ch, 8 fig. 2 tab. 28 ref.]

Key words: *Rubus chingii*; flavanone 3-hydroxylase; gene cloning; expression analysis; flavonoids

类黄酮物质参与植物多种生理活动, 不仅能为植物生长发育提供帮助, 同时还在植物抵抗逆境胁迫方面发挥作用^[1]。黄酮 3-羟化酶 (F3H) 作为类黄酮代谢途径上游的关键酶之一, 负责催化形成二氢黄酮醇, 之后经过花青素和黄酮醇合成途径形成各种类黄酮衍生物^[2]。F3H 在基因及蛋白结构上高度保守, 其底物特异性较强, 需要在 2-氧化戊二酸盐、分子氧、亚铁 (Fe^{2+}) 和抗坏血酸盐的辅助下发挥作用, 所以在分类上也被归为 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-ODD) 家族^[3-4]。目前, 在草莓 *Fragaria vesca*、红花 *Carthamus tinctorius*、拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、茶叶 *Camellia sinensis*、黄花红砂 *Reaumuria trigyna*、独行菜 *Lepidium apetalum* 和铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 等植物中相继报道了关于类黄酮合成关键酶基因 *F3H* 的调控研究^[5-11]。在功能上, *F3H* 基因对植物的颜色着色有重要作用。苹果 *Malus domestica* *MdLUX* 和 *MdPCL-like* 通过其启动子区域 DNA 低甲基化以及激活 *MdF3H*, 促进果皮中花青素合成^[12]。在草莓中, RNAi 介导的 *F3H* 基因沉默导致花青素及黄酮醇显著降低, 产生无色的草莓果实^[5]。此外, *F3H* 基因表达受到多种植物激素的正调控, 其转录水平的增加也能提高植物对非生物和生物胁迫的耐受能力^[13]。番茄 *Solanum lycopersicum* *SIF3HL* 能在低温胁迫中刺激转基因烟草 *Nicotiana tabacum* 合成类黄酮物质, 使烟草耐冷性提高^[14]。*CtF3H* 在不同表型和化学型的红花中作用不同, 在茉莉酸甲酯 (MeJA) 刺激下, *CtF3H* 在花橙黄色型红花中高表达, 并与醌式查尔酮和黄酮醇的积累有关, 但在花白色型红花中低表达且不影响黄酮醇的积累^[6]。

掌叶覆盆子 *Rubus chingii* 是中国特色的药食同源植物, 也是浙江省新“浙八味”之一, 具有补肝益肾、固精缩尿等功效^[15]。相关研究表明掌叶覆盆子富含 20 多种黄酮类活性成分, 具有抗菌抗炎等多种药理活性^[16-17]。然而掌叶覆盆子类黄酮生物合成及转录调控机制尚不清晰。本研究克隆得到 1 个掌叶覆盆子类黄酮生物合成途径关键酶基因 *RcF3H* 的全长序列, 并对其进行生物信息学分析, 同时利用转录组和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术分析 *RcF3H* 基因在不同组织、果实发育期以及 MeJA 刺激下的表达特征, 为后期解析 *RcF3H* 对掌叶覆盆子类黄酮代谢的调控机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料和处理

掌叶覆盆子植物材料来自杭州市富阳环山掌叶覆盆子种植基地 (29.93°N, 119.95°E)。4 个发育阶段 (青果、青转黄果、黄果、红果) 的掌叶覆盆子果实于 2022 年 4—5 月陆续采收。

激素 MeJA 处理实验: 于 2022 年 4 月, 选择生长状态良好的 1 年生掌叶覆盆子植株, 使用 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MeJA 溶液喷施叶片的正、反两面做胁迫处理 (MJ), 以清水为对照组 (ck)。每 2 d 喷施 1 次, 处理 7 d 后, 采集每组植株从上往下的第 2 张叶片作为样本。以上实验材料各 3 个重复, 液氮速冻处理后放于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

使用 FastPure® Universal Plant Total RNA Isolation Kit 提取试剂盒 (RC411), 提取掌叶覆盆子植物样本总 RNA。使用分光光度计 (NanoDrop 2000) 检测提取掌叶覆盆子总 RNA 浓度。使用 Evo M-MLV 反转

录试剂盒 II (AG11711) 反转录合成掌叶覆盆子 cDNA。总 RNA 和 cDNA 分别放入 -80 和 -20 °C 低温冰箱保存备用。

1.3 *RcF3H* 基因克隆

根据掌叶覆盆子基因组文件^[18]得到 *RcF3H* 基因的参考序列。使用 Primer Premier 6.0 设计 *RcF3H* 基因的扩增引物 (表 1)。引物合成由浙江尚亚生物技术有限公司完成。PCR 扩增体系: ddH₂O 9.5 μL, 上下游引物各 1 μL (10 μmol·L⁻¹), 掌叶覆盆子 cDNA 模板 1 μL, 12.5 μL PrimeSTAR Max premix (R045A)。PCR 扩增程序: 94 °C 3 min; 98 °C 10 s, 58 °C 15 s, 72 °C 70 s, 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保温。反应结束后将 PCR 扩增产物使用琼脂糖凝胶电泳检测并使用产物纯化试剂盒 (DC301) 回收。最后将 *RcF3H* 基因片段连接到 pMD19-T 载体上 (D102A), 热激法转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态, 挑取阳性单克隆进行菌液 PCR 鉴定, 由浙江尚亚生物技术有限公司测序分析。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
β-actin-F	ATCCACGAGACTACATACAACTCC	内参基因
β-actin-R	CTGTCTGCAATACCAGGGAAC	
<i>RcF3H</i> -F	ATGGCTCTACACCTACTAC	序列扩增
<i>RcF3H</i> -R	AGCAAAAATACCATCCACTT	
<i>RcF3H</i> -qPCR-F	CAAAGTGGCCTACAACCAATTC	荧光定量
<i>RcF3H</i> -qPCR-R	CCTCGACAATCTTCTTGCAAATC	

1.4 *RcF3H* 基因生物信息学分析

使用 Gene Structure Display Server 网站分析 *RcF3H* 基因结构, 并使用 IBS 2.0 作图。使用 ExPasy ProtParam tool 网站预测掌叶覆盆子 *RcF3H* 蛋白的分子量、等电点等基本理化性质; 通过 Plant-mPLoc 网站预测 *RcF3H* 蛋白的亚细胞定位情况。使用 ExPasy ProtScale 网站分析掌叶覆盆子 *RcF3H* 蛋白亲疏水性; 使用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 中的 CD-Search 分析 *RcF3H* 蛋白的保守结构域。

使用 SOPMA 网站预测 *RcF3H* 蛋白的二级结构, 利用 Swiss-Model 网站预测 *RcF3H* 蛋白的三维结构。从 NCBI 数据库的 Protein Blast 中下载与 *RcF3H* 有较高同源性的蔷薇科 Rosaceae 植物的 F3H 蛋白序列, 使用 DNAMAN 软件进行多序列比对; 使用 MEGA 7 软件将拟南芥、水稻 *Oryza sativa* 等单、双子叶其他科属植物的 F3H 蛋白序列采用邻接法 (neighbor-joining) 构建系统发育树 (bootstrap 值设置为 1 000, 其余参数默认), 并利用 ChiPlot 作图。使用 PlantCARE 网站获得 *RcF3H* 基因前 2 000 bp 的启动子序列, 检索得到顺式作用元件^[19-20]。

1.5 *RcF3H* 基因组织表达特异性分析

参考掌叶覆盆子的组织转录组数据^[18], 分析不同组织下 *RcF3H* 基因相对表达量, 并使用 TBtools 软件绘制热图。

1.6 *RcF3H* 基因实时荧光定量 PCR 分析

以反转录合成的掌叶覆盆子 cDNA 为材料, 使用 Primer Premier 6.0 设计 *RcF3H* 基因的 RT-qPCR 引物 (表 1)。引物由浙江尚亚生物技术有限公司合成。RT-qPCR 反应方法参照文献 [21], 使用 iTaq™ universal SYBR® Green supermix (1725121) 以及荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500) 完成。RT-qPCR 反应体系: iTaq™ universal SYBR® Green supermix 5 μL, 上、下游引物各 0.5 μL (10 mmol·L⁻¹), cDNA 模板 1 μL (50 mg·L⁻¹), ddH₂O 3 μL。RT-qPCR 反应程序: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。结果以掌叶覆盆子 β-actin 为内参基因, 采用 2^{-ΔΔCt} 法^[22] 计算 *RcF3H* 基因相对表达量。

1.7 数据分析与处理

数据使用 Excel 2021 进行统计分析。使用 SPSS 26 进行单向方差分析以及 *t* 检验, 使用 GraphPad Prism 8 作图。

2 结果与分析

2.1 *RcF3H* 基因的克隆

以反转录合成的掌叶覆盆子 cDNA 为模板, 成功扩增得到目的基因片段 (图 1A)。对基因片段进行

切胶回收，连接转化至 DH5 α 感受态，12 h 后对阳性单克隆菌液进行 PCR 验证并测序分析。结果显示：目的片段长度为 1 098 bp，将其命名为 *RcF3H*。*RcF3H* 基因定位于第 1 条染色体，由 1 个外显子构成，共编码了 365 个氨基酸 (图 2)。

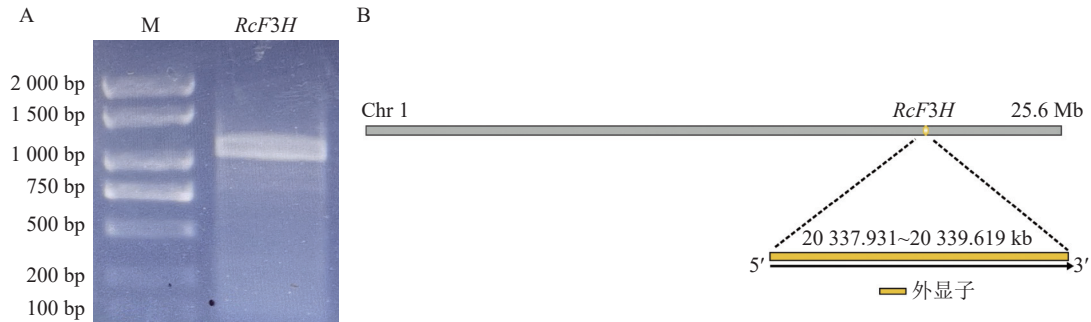


图 1 掌叶覆盆子 *RcF3H* 基因克隆 (A)、基因结构与染色体定位 (B)

Figure 1 Gene cloning (A) and gene structure and chromosome localization (B) of *RcF3H* genes in *R. chingii*

```

1 ATG GCT CCT ACA CCT ACT ACT CTG ACC GCC ATA GCG GGG GAG AAG ACT CTT CAA CAG AGC TTC GTC CGC GAC GAA GAC GAG CGC CCC AAA
  M A P T P T T L T A I A G E K T L Q Q S F V R D E D E R P K
91 GTG GCC TAC AAC CAA TTC AGC AAC GAA ATC CCA ATC ATT TCG CTC TCC GGC ATC GAC GAG GTC GAA GGC CGT CGT GCA GAG ATT TGC AAG
  V A Y N Q F S N E I P I S L S G I D E V E G R R A E I C K
181 AAG ATT GTC GAG GCC TGC GAG GAC TGG GGC GTT TTC CAG ATT GTT GAT CAT GGC GTC GAC ACC AAG CTC ATA TCC GAA ATG ACT CGT CTC
  K I V E A C E D W G V F Q I V D H G V D T K L I S E M T R L
271 GCT AGA GAC TTC TTC GCT TTG CCA CCG GAG GAA AAG CTC CGG TTT GAT ATG TCC GGT GGC AAA AAG GGC GGC TTC ATT GTC TCC AGC CAT
  A R D F F A L P P E E K L R F D M S G G K K G G F I V S S H
361 TTA CAG GGA GAG GCG GTG CAA GAT TGG CGA GAG ATT GTG ACC TAC TTC TCA TAC CCG GTT CGC CAC CGG GAC TAC TCG AGG TGG CCC GAC
  L Q G E A V Q D W R E I V T Y F S Y P V R H R D Y S R W P D
451 AAG CCG GAG GGG TGG AGG GCG GTG ACG CAG CAG TAC AGT GAC GAG CTG ATG GGT TTG GCA TGC AAG CTG TTG GAA GTT TTA TCA GAG GCC
  K P E G W R A V T Q Q Y S D E L M G L A C K L L E V L S E A
541 ATG GGT TTA GAG AAG GAG GCA TTG ACG AAG GCA TGT GTG GAC ATG GAC CAA AAG GTT GTG GTC AAT TTC TAC CCG AAA TGC CCC CAA CCC
  M G L E K E A L T K A C V D M D Q K V V V N F Y P K C P Q P
631 GAC CTC ACT CTC GGA CTC AAG CGC CAC ACG GAT CCG GGT ACC ATT ACC CTT TTG CTT CAA GAC CAG GTT GGT GGT CTC CAA GCC ACT AGA
  D L T L G L K R H T D P G T I T L L L Q D Q V G G L Q A T R
721 GAT GGT GGA AAG ACG TGG ATC ACC GTT CAA CCT GTG GAA GGA GCT TTT GTG GTC AAC CTT GGA GAT CAT GGA CAT TTT CTG AGC AAC GGG
  D G G K T W I T V Q P V E G A F V V N L G D H G H F L S N G
811 AGA TTC AAG AAC GCC GAT CAC CAG GCA GTG AAC TCG AAC CAC AGC AGG CTG TCC ATA GCC ACA TTC CAG AAC CCT GCA CAG GAG GCC
  R F K N A D H Q A V V N S N H S R L S I A T F Q N P A Q E A
901 ATA GTA TAC CCA CTC AAG GTG AGG GAG GGA GAG AAA CCC ATT TTG GAG GAG CCA ATC ACC TAC ACT GAG ATG TAC AAG AAG AAG ATG AGC
  I V Y P L K V R E G E K P I L E E P I T Y T E M Y K K M S
991 AAG GAC CTT GAG CTT GCC AGG CTG AAG AAG CTT GCC AAG GAA CAG CAA CTT GAG GAC TCA GAG AAG ACC AAA CTT GAG GTC AAG CAA GTG
  K D L E L A R L K K L A K E Q Q L E D S E K T K L E V K Q V
1081 GAT GGT ATT TTT GCT TGA
      D G I F A

```

图 2 掌叶覆盆子 *RcF3H* 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide sequence and its encoded amino acid sequence of *RcF3H* genes in *R. chingii*

2.2 *RcF3H* 蛋白理化性质、亚细胞定位、亲疏水性预测和蛋白结构域分析

RcF3H 蛋白分子式为 $C_{1831}H_{2900}N_{498}O_{553}S_{13}$ ，相对分子量为 65.16 kDa；理论等电点为 5.64；脂防系数为 83.32；不稳定系数为 38.22，属于稳定蛋白。亚细胞定位预测表明：该蛋白定位在细胞质上。

蛋白亲疏水性分析表明：*RcF3H* 蛋白属于亲水性蛋白；蛋白平均亲水指数为 -0.448，大部分区域表现出亲水性，最大疏水分值 (-2.756) 位于肽链第 145 位氨基酸，最大亲水分值 (2.022) 位于肽链第 44 位氨基酸 (图 3)。

蛋白结构域分析发现：*RcF3H* 蛋白属于 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶家族，拥有 2OG-Fe II₀xy 区域以及 PLN02515 和 Pcb C 等 2 个保守结构域 (图 4)。

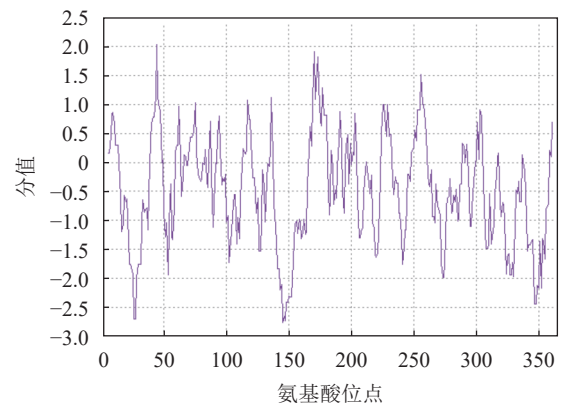


图 3 掌叶覆盆子 *RcF3H* 蛋白的亲/疏水性预测
Figure 3 Hydrophilic/hydrophobic prediction of *RcF3H* genes in *R. chingii*

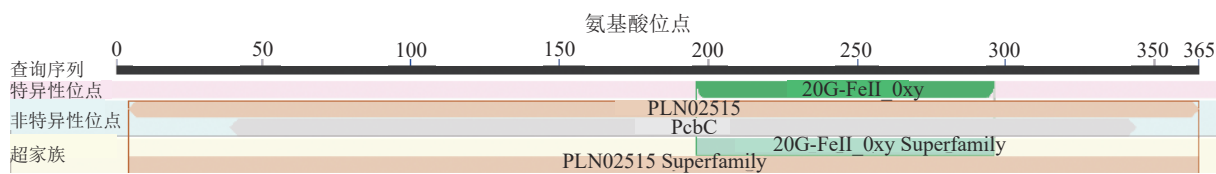


图 4 掌叶覆盆子 *RcF3H* 蛋白保守结构域预测

Figure 4 Protein conserved domain of *RcF3H* protein in *R. chingii*

2.3 *RcF3H* 蛋白二级和三级结构预测分析

RcF3H 蛋白的二级结构预测发现：该蛋白存在 α -螺旋、 β -折叠、直链延伸和无规则卷曲 4 种结构，其中以 α -螺旋和无规则卷曲占比最大，分别占 37.53% 和 38.63%，而直链延伸和 β -折叠分别占 18.36% 和 5.48% (图 5)。此外，以石榴 *Punica granatum* 蛋白 (编号：A0A218XVH5.1) 为模板，对 *RcF3H* 蛋白的三级结构进行建模。建模的三级结构覆盖率为 92.31%，序列一致性为 85.75%。该结果与二级结构预测结果一致。

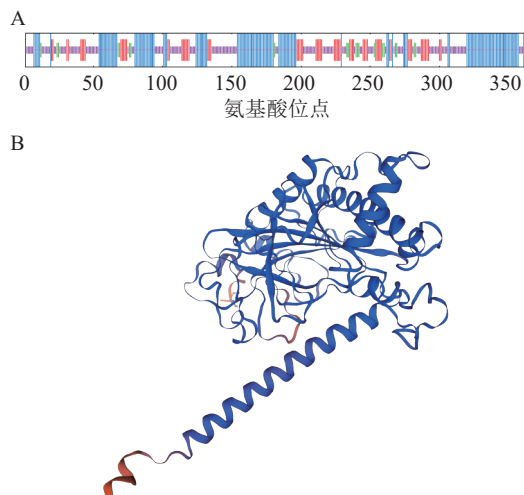


图 5 掌叶覆盆子 *RcF3H* 蛋白二级结构 (A) 与三级结构 (B) 预测

Figure 5 Protein secondary structure (A) and tertiary structure (B) of *RcF3H* protein in *R. chingii*

2.4 *RcF3H* 蛋白序列同源性比较和系统进化分析

多序列比对分析发现：蔷薇科 F3H 蛋白序列具有很高的相似度，其中 *RcF3H* 与插田泡 *Rubus coreanus*、草莓和玫瑰 *Rosa rugosa* 的相似性超过 95%，与樱桃李 *Prunus cerasifera*、欧洲甜樱桃 *Prunus avium* 和西洋梨 *Pyrus communis* 相似性接近 90% (图 6)。系统进化树分析发现：*RcF3H* 与蔷薇科插田泡蛋白 (编号：ABW74548.1) 的亲缘关系最密切。同科属的 F3H 蛋白在系统进化上处于同一分支。与单子叶植物相比，掌叶覆盆子 *RcF3H* 与双子叶植物关系更密切，属于同一亚组 (图 7)。以上结果说明掌叶覆盆子 *RcF3H* 蛋白在生物进化过程中较为保守。



图 6 掌叶覆盆子 *RcF3H* 蛋白序列与其他植物 F3H 蛋白的同源性比对

Figure 6 Homology comparison of *RcF3H* protein in *R. chingii* protein sequences with other plant F3H proteins

2.5 *RcF3H* 基因启动子顺式作用元件分析

RcF3H 基因启动子中具有大量相对保守的 CAAT-box 和 TATA-box。根据顺式作用元件功能的不同，可以将其分为植物生长发育、激素响应以及胁迫响应 3 个类别 (表 2)。*RcF3H* 基因启动子顺式作用元件有 2 个植物生长发育的顺式调控元件；在激素响应中茉莉酸响应元件数量最多，赤霉素和生长素次之。此外，*RcF3H* 基因在胁迫响应上包含有大多数响应光照元件以及少量应对厌氧、缺氧、防御和应激、低温以及干旱的顺式作用元件。以上结果表明：*RcF3H* 基因在辅助掌叶覆盆子响应激素和应对胁迫上发

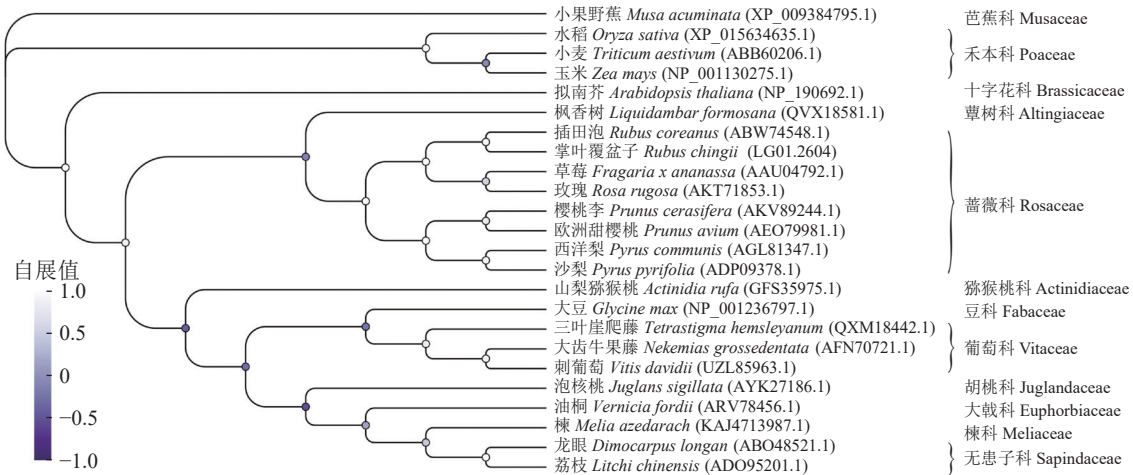


图7 掌叶覆盆子 RcF3H 与其他植物 F3H 蛋白的系统进化树

Figure 7 Phylogenetic tree of RcF3H protein in *R. chingii* with other plant F3H proteins

表2 掌叶覆盆子 *RcF3H* 基因启动子顺式作用元件分析

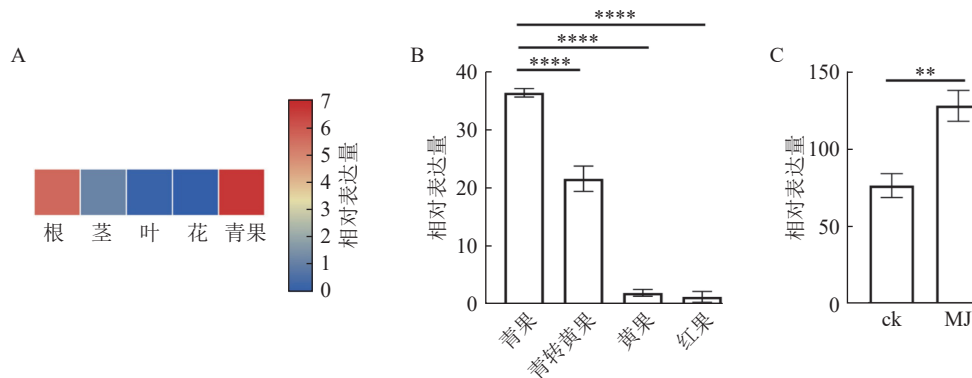
Table 2 Analysis of *cis*-regulatory elements of *RcF3H* promoter in *R. chingii*

类别	元件名称	数量	功能
植物生长发育	Circadian	1	参与昼夜节律控制的顺式调控元件
	O ₂ -site	2	玉米蛋白代谢调控的顺式调控元件
激素响应	AuxRE	1	生长素反应元件的一部分
	CGTCA-motif	1	参与茉莉酸反应性的顺式作用元件
	TGACG-motif	1	参与茉莉酸反应性的顺式作用元件
	MYC	6	激素响应元件
	P-box	1	赤霉素响应元件
	Myb	1	MYB识别位点
	MYB	1	MYB识别位点
	MYB-like sequence	1	MYB识别位点
	ARE	3	对厌氧诱导必要的顺式调节元件
	GC-motif	2	参与缺氧特异性诱导性的增强子元件
胁迫响应	LTR	1	参与低温反应的顺式元件
	MBS	1	MYB结合位点参与干旱诱导
	STRE	1	胁迫响应元件
	as-1	1	胁迫响应元件
	TC-rich repeats	1	参与防御和应激反应的顺式作用元件
	Box 4	2	参与光反应的保守DNA模块
	GATA-motif	1	光响应元件的一部分
	GT1-motif	3	光响应元件
	Sp1	1	光响应元件
W box	1	诱导子响应元件	

挥了重要作用，且可能受外界刺激后调控合成类黄酮物质。

2.6 *RcF3H* 基因表达模式分析

由图 8A 可知：*RcF3H* 基因在掌叶覆盆子的根、茎、叶和果实中表达；其中青果中的相对表达量最高，分别是根的 1.18 倍，茎的 5.05 倍，叶片的 46.00 倍。表明 *RcF3H* 可能与掌叶覆盆子果实的生长发育有关。进一步分析在果实发育成熟过程中 *RcF3H* 基因的相对表达量。由图 8B 可知：*RcF3H* 基因表达在青果期表达量最高，并在发育成熟过程表达量逐渐下降，该趋势与类黄酮质量分数变化一致^[23]。启动



****表示与青果相比差异极显著 ($P < 0.0001$); **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 8 掌叶覆盆子 *RcF3H* 不同组织 (A)、不同果实发育阶段 (B) 及 MeJA 诱导处理 (C) 的表达分析

Figure 8 Expression analysis of *RcF3H* in different tissues (A), different fruit development stages (B) and MeJA induction treatment (C) in *R. chingii*

子顺式作用元件分析发现：掌叶覆盆子 *RcF3H* 基因前 2 000 bp 启动子上存在响应 MeJA 的顺式作用元件 (表 2)。结合 RT-qPCR 技术发现：掌叶覆盆子 *RcF3H* 基因经过 MeJA 诱导处理后基因表达明显上升 (图 8C)。

3 讨论

本研究从掌叶覆盆子 cDNA 中克隆得到了完整的 *RcF3H* 基因序列，该基因由 1 条外显子构成，全长 1 098 bp，编码了 365 个氨基酸。蛋白序列比对后发现：掌叶覆盆子 *RcF3H* 蛋白与蔷薇科插田泡等 6 种植物 F3H 的同源关系较近。蛋白质是细胞的功能分子，基因功能的主要执行者。掌叶覆盆子 *RcF3H* 拥有 2OG-Fe(II)-Oxy 结构以及 2 个典型的 PLN02515 和 Pcb C 保守结构域，亚细胞定位预测该蛋白位于细胞质中。一些蛋白质需要转移至特定的位置后才能发挥作用，信号肽能引导新合成的蛋白质向分泌通路转移^[24]。*RcF3H* 蛋白为稳定的亲水性蛋白，蛋白二级和三级结构分析发现：*RcF3H* 主要以 α -螺旋和无规则卷曲缠绕形成。系统进化树分析发现：*RcF3H* 蛋白与单子叶植物亲缘关系较远，与双子叶植物亲缘关系较近且处于同一亚组，说明在进化过程中 *RcF3H* 基因较保守。

转录调控对基因表达起着很大的作用，主要通过基因的启动子及其相关的顺式作用元件控制^[25]。对 *RcF3H* 启动子分析发现：其拥有茉莉酸、赤霉素和生长素等响应元件。*RcF3H* 基因在 MeJA 处理 7 d 后表达量上调了 1.68 倍。在拟南芥中，茉莉酸和脱落酸能够调控类黄酮生物合成中 *AtF3H* 的表达^[26]。MeJA 处理绿熟期的樱桃番茄 *S. lycopersicum* ‘Xin Taiyang’ 果实后，促进了类黄酮的积累，其类黄酮代谢途径中 *PAL1*、*C4H* 以及 *F3H* 等基因表达水平上调^[27]。掌叶覆盆子 *RcF3H* 启动子还存在逆境胁迫响应有关的作用元件。黄花红砂在受到 UV-B 和干旱胁迫后，其 *RsF3H* 酶活性增加，类黄酮生物合成产物积累增多^[28]。说明 *RcF3H* 基因可能在激素和逆境胁迫上发挥作用，调节类黄酮物质的合成来提高对环境适应性。

进一步探究掌叶覆盆子 *RcF3H* 表达与类黄酮的关系。*RcF3H* 在掌叶覆盆子的根、茎、叶和果实中表达且具有组织特异性。*RcF3H* 在青果中表达量最高，并在果实成熟过程中表达量逐渐下降，推测 *RcF3H* 可能与果实发育有关。随着掌叶覆盆子果实发育成熟，槲树苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷等各种黄酮化合物会逐渐减少^[23]，这与 *RcF3H* 表达变化趋势一致，推测 *RcF3H* 可能促进类黄酮的积累。一些研究报道了 MeJA 能促进类黄酮的生物合成^[26-27]。掌叶覆盆子 *RcF3H* 能响应外源 MeJA 的刺激，其表达量相较于对照组上升了 1.68 倍，而 MeJA 促进掌叶覆盆子类黄酮代谢未见报道。综上所述，掌叶覆盆子 *RcF3H* 在多个组织器官中发挥生物学功能，并能影响类黄酮的积累。此外，具体的生物学功能验证以及调控机制解析也有待进一步研究。

4 结论

本研究在掌叶覆盆子中鉴定克隆了 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶家族基因 *RcF3H*，该基因蛋白定位于

胞质,与双子叶植物同源性较高。该基因启动子上存在大量与激素和逆境响应相关的元件。*RcF3H*在多个器官中均有表达且具有组织特异性,并随果实成熟表达量逐渐下降。外源 MeJA 的刺激处理可提高 *RcF3H* 基因的表达。本研究初步解析了 *RcF3H* 在掌叶覆盆子类黄酮物质积累中的作用,为进一步研究其分子机制提供参考。

5 参考文献

- [1] MATHESIUS U. Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms [J/OL]. *Plants*, 2018, 7(2): 30[2024-04-05]. doi: [10.3390/plants7020030](https://doi.org/10.3390/plants7020030).
- [2] MA Gang, ZHANG Lancui, YAMAMOTO R, et al. Molecular characterization of a flavanone 3-hydroxylase gene from citrus fruit reveals its crucial roles in anthocyanin accumulation [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 233[2024-04-05]. doi: [10.1186/s12870-023-04173-3](https://doi.org/10.1186/s12870-023-04173-3).
- [3] AVNEESH K, BALJINDER S, KASHMIR S. Functional characterization of flavanone 3-hydroxylase gene from *Phyllanthus emblica* (L.) [J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 24(4): 453 – 460.
- [4] 段玥彤, 王鹏年, 张春宝, 等. 植物黄酮-3-羟化酶基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 27 – 33.
DUAN Yuetong, WANG Pengnian, ZHANG Chunbao, et al. Research progress in plant flavanone-3-hydroxylase gene [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(6): 27 – 33.
- [5] FEI Jiang, WANG Jiayi, JIA Haifeng, et al. RNAi-Mediated silencing of the flavanone 3-hydroxylase gene and its effect on flavonoid biosynthesis in strawberry fruit [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2013, 32(1): 182 – 190.
- [6] TU Yanhua, LIU Fei, GUO Dandan, et al. Molecular characterization of flavanone 3-hydroxylase gene and flavonoid accumulation in two chemotyped safflower lines in response to methyl jasmonate stimulation [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 132[2024-04-05]. doi: [10.1186/s12870-016-0813-5](https://doi.org/10.1186/s12870-016-0813-5).
- [7] BONG G K, JEONG H K, JIYOUNG K, et al. Accumulation of flavonols in response to ultraviolet-B irradiation in soybean is related to induction of flavanone 3-beta-hydroxylase and flavonol synthase [J]. *Molecules and Cells*, 2008, 25(2): 247 – 252.
- [8] SINGH K, RANI A, KUMAR S, et al. An early gene of the flavonoid pathway, flavanone 3-hydroxylase, exhibits a positive relationship with the concentration of catechins in tea (*Camellia sinensis*) [J]. *Tree Physiology*, 2008, 28(9): 1349 – 1356.
- [9] ZHANG Huirong, ZHAO Lixia, WANG Jia, et al. Cloning and functional analysis of two flavanone-3-hydroxylase genes from *Reaumuria trigyna* [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(5): 1221 – 1229.
- [10] 赵乐, 马利刚, 张金燕, 等. 独行菜 *LaF3H* 基因克隆、序列分析及原核表达[J]. 中草药, 2018, 49(23): 5626 – 5632.
ZHAO Le, MA Ligang, ZHANG Jinyan, et al. Cloning, sequence analysis, and prokaryotic expression of *LaF3H* gene from *Lepidium apetalum* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(23): 5626 – 5632.
- [11] SI Can, DONG Wei, da SILVA J A T, et al. Functional analysis of flavanone 3-hydroxylase (F3H) from *Dendrobium officinale*, which confers abiotic stress tolerance [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2023, 9(2): 356 – 364.
- [12] LI Wenfang, NING Gaixing, ZUO Cunwu, et al. MYB_SH[AL]QKY[RF] transcription factors *MdLUX* and *MdPCL-like* promote anthocyanin accumulation through DNA hypomethylation and *MdF3H* activation in apple [J]. *Tree Physiology*, 2020, 41(5): 836 – 848.
- [13] ALMUTH H, DINESHKUMAR K, CHHANA U, et al. Flavanone-3-hydroxylase plays an important role in the biosynthesis of spruce phenolic defenses against bark beetles and their fungal associates [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 208[2024-04-05]. doi: [10.3389/fpls.2019.00208](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00208).
- [14] MENG Chen, ZHANG Song, DENG Yongsheng, et al. Overexpression of a tomato flavanone 3-hydroxylase-like protein gene improves chilling tolerance in tobacco [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 96: 388 – 400.
- [15] SHENG Jiayun, WANG Siqi, LIU Kaohua, et al. *Rubus chingii* Hu: an overview of botany, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2020, 18(6): 401 – 416.
- [16] HE Beihui, DAI Linghao, JIN Li, et al. Bioactive components, pharmacological effects, and drug development of traditional herbal medicine *Rubus chingii* Hu (Fu-Pen-Zi) [J/OL]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 9: 1052504[2024-04-05]. doi: [10.3389/fpls.2019.00208](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00208).

- [17] 李瑶晨, 范紫佩, 杨静, 等. 野生蔬菜功能性成分及其生物活性研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2022, **39**(4): 913 – 922.
LI Yaochen, FAN Zipei, YANG Jing, *et al.* Research progress on functional components and biological activities of wild edible vegetables [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, **39**(4): 913 – 922.
- [18] WANG Longji, LEI Ting, HAN Guomin, *et al.* The chromosome-scale reference genome of *Rubus chingii* Hu provides insight into the biosynthetic pathway of hydrolyzable tannins [J]. *The Plant Journal*, 2021, **107**(5): 1466 – 1477.
- [19] 卓娟, 侯丹, 林新春. 毛竹 *PhebHLH6* 基因克隆及表达分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2023, **40**(4): 731 – 737.
ZHUO Juan, HOU Dan, LIN Xinchun. Cloning and expression analysis of *PhebHLH6* gene from *Phyllostachys edulis* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2023, **40**(4): 731 – 737.
- [20] 尚林雪, 王群, 张国哲, 等. 紫薇 *LiCMB1* 基因的克隆及表达特性分析[J]. 浙江农林大学学报, 2023, **40**(2): 330 – 337.
SHANG Linxue, WANG Qun, ZHANG Guozhe, *et al.* Cloning and expression characteristics of *LiCMB1* gene in *Lagerstroemia indica* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2023, **40**(2): 330 – 337.
- [21] 郑飞雄, 陈俊宇, 江林琪, 等. 掌叶覆盆子 *4CL* 基因家族鉴定及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2024, **32**(2): 311 – 321.
ZHENG Feixiong, CHEN Junyu, JIANG Linqi, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of *4CL* gene family in *Rubus chingii* Hu [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2024, **32**(2): 311 – 321.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 – 408.
- [23] LI Xiaobai, JIANG Jingyong, CHEN Zhen, *et al.* Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of flavonoid biosynthesis during fruit maturation in *Rubus chingii* Hu [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, **12**: 706667[2024-04-05]. doi: [10.3389/fpls.2021.706667](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.706667).
- [24] 苏甜, 李子薇, 张新梅, 等. 黄瓜 *CsD27* 基因的克隆、生物信息学及表达分析[J/OL]. 分子植物育种, 2024-03-27[2024-04-05]. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240326.1103.004>.
SU Tian, LI Ziwei, ZHANG Xinmei, *et al.* The cDNA cloning, bioinformatics and expression analysis of *CsD27* gene in *Cucumis sativus* L. [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2024-03-27[2024-04-05]. <https://link.cnki.net/46.1068.S.20240326.1103.004>.
- [25] ZOU Cheng, SUN Kelian, MACKALUSO J D, *et al.* Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(36): 14992 – 14997.
- [26] LORETI E, POVERO G, NOVI G, *et al.* Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis* [J]. *The New Phytologist*, 2008, **179**(4): 1004 – 1016.
- [27] TAO Xiaoya, WU Qiong, LI Jiayin, *et al.* Exogenous methyl jasmonate regulates phenolic compounds biosynthesis during postharvest tomato ripening [J/OL]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, **184**: 111760[2024-04-05]. doi: [10.1016/j.postharvbio.2021.111760](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111760).
- [28] LIU Meiling, LI Xinrong, LIU Yubing, *et al.* Regulation of flavanone 3-hydroxylase gene involved in the flavonoid biosynthesis pathway in response to UV-B radiation and drought stress in the desert plant, *Reaumuria soongorica* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, **73**: 161 – 167.