



金胆草查尔酮合酶基因(*CHS*)的克隆及其在花期不同组织的表达量分析

刘珊^{1,2,3} 孙蓉¹ 唐自钟¹ 郑天润¹ 高静雷¹ 陈惠^{1*} 李成磊¹

1 四川农业大学生命科学与理学院, 雅安 625014; 2 攀枝花学院生物与化学工程学院, 攀枝花 617000; 3 干热河谷特色生物资源研发四川省高校重点实验室, 攀枝花 617000

*通讯作者, chen62hui@aliyun.com

摘 要 查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)是植物类黄酮化合物合成的第一关键酶。为了获得金胆草(*Conyza blinii* Lévl.)*CHS* 基因, 本研究采用快速扩增 cDNA 末端(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆得到了金胆草*CHS*基因的 DNA 和 cDNA 全长序列, 并进行生物信息学分析, 通过 RT-PCR 检测该基因在花期不同组织部位中的表达情况并检测对应部位的相对花青素含量。结果表明, 获得的*CHS*基因 DNA 全长 2 098 bp, 包括 2 个内含子; cDNA 全长为 1 692 bp, 含有完整开放阅读框(1 197 bp), 编码 399 个氨基酸, 包含查尔酮合酶的标志性序列, 命名为*CbCHS*(GenBank 登录号: KJ155749)。序列比对结果显示, 金胆草*CbCHS*基因与已报道的其它植物的 CHS 氨基酸序列具有很高相似性(最高为 95%)。半定量 RT-PCR 结果显示, 在叶和茎的表达量最高, 相对表达量分别达到 87.03 % 和 98.33 %, 表达量之间没有显著差异($P>0.05$); 在根中*CbCHS*基因表达量最少, 相对表达量仅为 9.43 %, 表达量与其余部位具有显著差异($P<0.05$)。花青素含量也以茎和叶中最高, 根中微量, 表明*CbCHS*基因与花青素的蓄积有一定相关性。本研究首次克隆了金胆草*CbCHS*基因的全长 DNA 及 cDNA 序列, 研究了其在花期不同组织器官中的表达量差异及与花青素的含量关系, 为进一步研究*CbCHS*基因对金胆草黄酮含量的影响及其调控机制提供了基础资料。

关键词 金胆草, 查尔酮合酶(CHS), 克隆, 生物信息学分析, 表达量分析

Cloning of Chalcone Synthase Gene (*CHS*) from *Conyza blinii* Lévl. and It's Expression Analysis in Different Tissues During Florescence

LIU Shan^{1,2,3} SUN Rong¹ TANG Zi-Zhong¹ ZHENG Tian-Run¹ GAO Jing-Lei¹ CHEN Hui^{1*}
LI Cheng-Lei¹

1 College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2 Department of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua 617000, China; 3 Key Laboratory of Dry-hot Valley Characteristic Bio-resources Development at University of Sichuan Province, Panzhihua 617000, China

* Corresponding author, chen62hui@aliyun.com

Abstract Chalcone synthase (CHS) is a pivot for the biosynthesis of flavonoid antimicrobial phytoalexins and anthocyanin pigments in plants. To clone *CHS* gene from *Conyza blinii* Lévl. and analyze its expression in different tissues during florescence, the full-length DNA cloned by RACE was 2 098 bp, including 2 introns (486 and 415 bp); the coding region of cDNA consisted of 1 692 nucleotides, and predicted to code a protein of 399 amino acids which included all the active sites of CHS, named *CbCHS* (GenBank accession No.

基金项目: 四川省科技创新苗子工程资助项目(No.2012ZZ046)和攀枝花学院校级科研项目(No.2012YB03)

收稿日期: 2013-12-04 接受日期: 2014-01-08

KJ155749). Bioinformatic analysis result showed that *CbCHS* amino acid sequence had a high homology with other opened *CHS* genes in plants (the highest value of 95%). The RT-PCR result showed that *CbCHS* was highly expressed in stems (87.03%) and leaves (98.33%), showed no significant difference between them ($P > 0.05$), while roots had the lowest expression (9.43%), and showed a significant difference with other tissues ($P < 0.05$). The anthocyanin content was the highest in stems and leaves, and the lowest in roots, which indicated that there was some relevance between the *CbCHS* expression and anthocyanins accumulation. The DNA and cDNA sequence of *CbCHS* gene were firstly obtained from *Conyza blinii* Lévl. with the research of relationship between the anthocyanin content and gene expression in different tissues of *Conyza blinii* Lévl.. The results of this study provide some technology basis for the key enzyme expression and regulation mechanism analysis in effective components biosynthesis pathway of *Conyza blinii* Lévl..

Keywords *Conyza blinii* Lévl., Chalcone synthase, Clone, Bioinformatic analysis, Expression analysis

0 引言

金龙胆草(*Conyza blinii* Lévl.)是一种菊科白酒草属植物,为两年生草本,单叶互生,分布于四川攀西地区、云南中南部及贵州海拔1 100~2 500 m的疏林地带,全株密被白色长柔毛和点状腺毛,是20世纪70年代四川省发掘的民间草药,具有清热化痰、止咳平喘、解毒利湿和凉血止血的功效,近年来的研究其具有一定的抗肿瘤活性(苏艳芳等, 2011)。金龙胆草已收录于《中国药典》(2010年版)及《四川省药品标准》,全草含黄酮、萜类、生物碱、皂苷及微量的挥发油等多种具有药用价值的次生代谢物(苏艳芳等, 2007; 徐丽萍等, 1998a; 徐丽萍等, 1998b; 苏艳芳等, 2001; 薛洪宝等, 2011; Yang et al., 1989),为金龙胆草新药研发提供了研究依据。研究代谢合成途径关键酶,为后续扩大提高植物次生代谢物产量提供基础基因工程技术支持。黄酮类化合物(flavonoid)是植物次生代谢的一大类化合物,具有防护紫外线损伤、抗病和促进种子传播及花粉管伸长等作用(Koes et al., 2005; Winkel-Shirleyb, 2002; Bogs et al., 2006)。查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)是植物Ⅲ型聚酮合成酶的一种,广泛存在于被子植物中,是植物类黄酮化合物合成的第一个关键酶,催化丙二酰辅酶A与对羟基苯丙烯酸酰辅酶A生成四羟基查尔酮(Han et al., 2006), 1983首先在欧芹(*Petroselinum crispum*)中分离得到(Kreuzaler et al., 1983),至今已在700多种植物上克隆到相应序列(Austin et al., 2003; 霍凤梅, 2010),但尚未见金龙胆草CHS基因(*CbCHS*)的相关报道。

本研究采用RACE技术首次克隆得到了

*CbCHS*的cDNA全长序列,利用DNAMAN、BLAST和MEGA等生物信息学手段对其开放阅读框、同源性及系统进化树进行分析,并进行半定量RT-PCR分析基因在花期的组织表达特异性,旨在为下一步构建金龙胆草植物表达载体,研究该基因的表达调控机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金龙胆草(*Conyza blinii* Lévl.)采自四川省米易县,经四川农业大学生命科学与理学院丁春邦教授鉴定为菊科白酒草属(*Conyza*)植物金龙胆草,以花期全株植物为材料。

柱式植物RNAout试剂盒、固相RNase清除剂、DNA纯化回收试剂盒、Taq DNA聚合酶和dNTPs均购自天恩泽基因科技有限公司, PrimeScript® RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)、SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit、克隆载体pMD®19-T Simple Vector均购自大连TaKaRa(宝生物)公司,核酸纯化试剂盒购自美国OMEGA BIO-TEK公司,氨苄青霉素购自四川农业大学学校医务室,大肠杆菌(*Escherich coli*)菌株DH5α由本实验室保存,其它生化试剂均为分析纯。PCR引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成, DNA测序交由上海英俊公司完成。

1.2 方法

1.2.1 金龙胆草各部位总RNA的提取

按照柱式植物RNAout试剂盒说明书提取开花期同一新鲜植株花、叶、茎和根的总RNA,经2%

琼脂糖凝胶电泳检测RNA后保存于-70℃。

1.2.2 cDNA第一链的合成

以1.2.1提取的花、叶、茎和根总RNA为模板，根据PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒说明书进行，产物保存在-20℃。

1.2.3 特异性引物设计

根据GenBank上已登录的其它植物*CHS*同源基因的核苷酸保守序列设计一对引物CHSA和CHSB扩增*CHS*基因的部分片段，根据测序所获得的片段序列设计巢式PCR 3'端引物CHS3'-10及CHS3'-256和5'端引物CHS5'-94及CHS5'-201；根据获得的全长cDNA序列，按照半定量引物设计原则，设计*CHS*基因的半定量引物CHSBf和CHSBr以及本实验室已有的内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde- 3- phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)的半定量引物(表1)，进行RT-PCR扩增。

1.2.4 CbCHS全长基因的克隆及序列分析

核心片段扩增以叶的cDNA为模板，25 μLP-CR反应体系含上下游引物(10 μmol/L)CHSA和CHSB各2 μL，dNTP(2.5 mol/L each) 3 μL，MgCl₂ (25 mol/L)1.5 μL，10×*Taq* Reaction Buffer各2.5 μL，

模板cDNA(30 ng/μL) 1 μL和*Taq* DNA聚合酶(2.5 U/μL)0.5 μL，补ddH₂O至25 μL。PCR反应程序为：94℃预变性5 min，94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸1 min，30个循环，72℃延伸10 min。参照SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit说明书进行*CHS*基因的RACE扩增。1.5%的琼脂糖凝胶上电泳鉴定扩增产物。

PCR产物经回收、纯化，与pMD19-T载体连接。产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，经氨苄抗性的琼脂平板筛选，挑取阳性克隆送测序。测序结果利用DNAMAN6.0软件进行保守区、3'RACE和5'RACE扩增序列的拼接，采用Blast程序进行同源性搜索及MEGA5.05软件的邻位相连法(Neighbor-joining)构建系统进化树分析，使用蛋白质分析软件Protparam对所编码的氨基酸性质进行分析。

1.2.5 半定量RT-PCR

根据1.2.3设计的半定量PCR引物，以已获得的金龙胆草*GAPDH*基因中的一段146 bp的序列作内参基因(GenBank登录号：KF027475)，对金龙胆草*CHS*基因进行半定量RT-PCR，反应体系为15 μL总体积中Premix *Taq*®Version2.0 7.5 μL，CHSBf和CHSBr(10 μmol/L)各0.5 μL，GAPDHS和GAPDHX(引物浓度均为10 μmol/L)各0.5 μL，模板cDNA (30

表1 基因克隆及半定量RT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequence used in gene cloning and semi-quantitative RT-PCR

引物 Primer	序列(5'~3') Sequence	用途 Purpose
CHSA	ATGTACCAACAAGGGTGTGTTTGCTGGG	保守区上游引物 Upstream primer of conserved region
CHSB	AACATGTCCAGTGCTTGTGT	保守区下游引物 Downstream primer of conserved region
CHS3'-10	CTTCGTCTAGCCAAAGACCTTGCCTTGCCGAGAAC	3'RACE第一轮引物 The first round primer of 3' RACE
CHS3'-256	GCTATTGATGGACACTTGAGGGAAGTTGGGC	3'RACE第二轮引物 The second round primer of 3' RACE
CHS5'-94	CGTGACCGCAGTAATCTCGGAGCAAACAAC	5'RACE第一轮引物 The first round primer of 5' RACE
CHS5'-201	CCGCTCAGTCGTCAAGTCAGGGTCAGAAC	5'RACE第二轮引物 The second round primer of 5' RACE
CHSBf	CTGACCCTGACTTGACGACTGA	<i>CbCHS</i> 半定量引物
CHSBr	CGAACCCAAAGAGAACACCC	Semi-quantitative primer of <i>CbCHS</i>
GAPDHS	ACTACCAACTGCCTTGCTCC	<i>GAPDH</i> 半定量引物
GAPDHX	GCTCTTCCACCTCTCCAGTC	Semi-quantitative primer of <i>GAPDH</i>

ng/μL)0.5 μL, ddH₂O 4.5 μL。PCR 反应参数:94 ℃预变性 2 min, 94 ℃变性 15 s, 55.9 ℃退火 15 s, 72 ℃延伸 30 s, 30 个循环, 72 ℃延伸 5 min。PCR 结果用 2% 琼脂糖凝胶检测。利用 Quantity one(version 4.6.2)软件分析, 并进行高斯建模(Gauss-model)计算光密度值, 各基因表达量用相对光密度值 ROD (optical density of *CbCHS*/ optical density of *GAPDH*)表示(3 次重复取平均值)。实验数据用 Excel2010 处理分析, 并使用 *t*-检验对样本间差异性进行显著性检测(置信区间为 95%)。本研究中柱状图值为平均值, 误差线为相对标准偏差。

1.2.6 花青素含量的测定

花青素相对含量测定方法参照 Chu 等(2013)并适当优化, 取 1.0 g 新鲜样品用液氮快速研磨为粉状后放入 5 mL 1%(V/V)HCl 甲醇溶液室温轻柔震荡浸提 18 h 后于 16 800×*g* 离心 15 min, 取 2.5 mL 上清, 用等体积去离子水和 1.5 mL 氯仿在离心管中混匀以除去叶绿素, 然后在 8 600×*g* 下离心 5 min。上清以 1% HCl 甲醇溶液作为空白, 用分光光度计测定提取液在 530 和 657 nm 处的吸光值, 并用公式 $Q_{\text{Anthocyanins}} = (A_{530} - 0.25 \times A_{657}) \times M^{-1}$ 计算花青素的相对含量, 其中 *Q* 为计算的花青素相对含量, *A*₅₃₀ 和 *A*₆₅₇ 表示样品溶液的吸光值, *M* 代表植物样品的取样量(g)。设 3 次取样重复。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量分析

提取叶、茎、花、根中总 RNA, 电泳结果显示, 28S 和 18S 清晰可辨, 完整性好、无降解, 两条带亮度比大致符合 2:1, 紫外分光光度分析 *A*₂₆₀/*A*₂₈₀ 为 1.8~2.0, 表明总 RNA 可用于后续实验。

2.2 金龙胆草 *CHS* 基因 DNA 序列和 cDNA ORF 序列的克隆

RT-PCR 从金龙胆草中扩增出一条约 500 bp 的条带, 与预测一致。以此条带的回收测序结果进行金龙胆草 cDNA 全长克隆的引物设计。经 3'-RACE 扩增得到一条包含终止密码 TAA、3'-TUR 和 Poly A 结构的片段, 同方法获得包含起始密码子 ATG、5'-TUR 的 5'端序列。对 3 个片段进行全长拼接, 获得 1 692 bp 的 cDNA 序列(图 1A), 命名为 *CbCHS*(GenBank 登录号: KJ155749), 其 CDS 区为 1 197 bp, 包

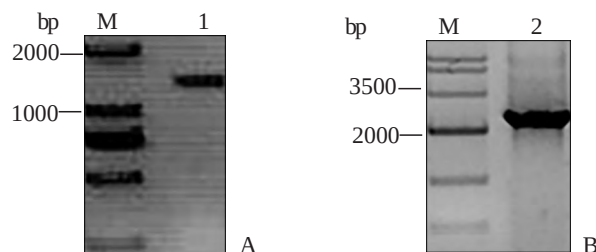


图 1 *CbCHS* 基因 cDNA(A)和 DNA(B)全长克隆电泳

Figure 1 Amplification results of cDNA(A) and DNA(B) sequences of *CbCHS*

1: *CbCHS* 基因 cDNA 全长扩增结果; 2: *CbCHS* 基因 DNA 全长扩增结果; M: 分子量标准

1: cDNA ORF RT-PCR of *CbCHS* gene; 2: DNA sequence amplification of *CbCHS* gene; M: DNA marker

含 1 个由 ATG 至 TAA 的完整 ORF。对金龙胆草基因组 DNA 进行扩增, 得到一条长度为 2 098 bp 的核苷酸序列(图 1B), 将 DNA 序列提交 <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html> 网站进行内含子预测, 预测结果显示该序列全长 2 098 bp 可能含有 2 个内含子, 3 个外显子。经过 NCBI 进行 DNA 序列与 cDNA 序列比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>), 结果与 DNA 预测结果一致, 第 63 位半胱氨酸密码子内第 1 位和第 2 位碱基之间含有 1 个 486 bp 大小的内含子(188~673 bp), 第 294 位甘氨酸密码子内第 1 位和第 2 位碱基之间含有 1 个 415 bp 的内含子(1 367~1 781 bp), 核苷酸序列符合 GT-AG 剪切规则(图 2)。

2.3 *CbCHS* 基因编码蛋白质的同源性分析

全长 cDNA 经 Blast 比对结果显示, *CbCHS* 基因与 NCBI 提供的 *CHS* 的基因序列之间(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)的同源性较高, 其中与同为菊科植物的兰菊(*Callistephus chinensis*)的 *CHS* 基因(Z67988.1)相似性最高为 95 %; 在列出的前 100 条序列中, *CbCHS* 基因与其它 *CHS* 基因的同源性都在 75 % 以上。ORF 推断的氨基酸序列(GenBank 登录号: KJ155749)与 15 种植物来源的 *CHS* 氨基酸序列比对结果显示, *CbCHS* 基因与兰菊的同源序列(P48385.2)的相似性同样也是最高, 达到 98 %。系统进化关系分析结果(图 3)表明, *CbCHS* 蛋白质与菊科植物兰菊、红凤菜(*Gynura bicolor*)、菊花(*Chrysanthemum x morifolium*)、黑心菊(*Rudbeckia hirta*)、紫茎泽兰(*Ageratina adenophora*)同源序列的亲缘关系最近, 与单子叶植物玉米(*Zea*

1 **ATG**GCTTCCTCAATCGATATTGCGGCTATCAGAGAAGCCAGCGGGCACAAGGTCCAGCTACCATTTCTGCGATTGGCACTGCAACCCCG
1 M A S S I D I A A I R E A Q R A Q G P A T I L A I G T A T P
9 TCTAATTGTGTCTATCAAGCTGATTATCTGATTACTATTTTCGCATCTACTAAAGCGAACACATGGTTGATCTCAAAGAAAAATTCAAG
31 S N C V Y Q A D Y P D Y Y F R I T K S E H M V D L K E K F K
181 CGCATGTgtacgtatattaactcttactatatacatatacatctttattatgttttcacaaattggcacaagttaaacctagtgggta
61 R M
agcatcatgttttgcagaaaagatatcggtttgaaacctctctaggttaaacatttttaggtgtagccaaagtcggaagggtcagcagaataacctgttttagaccacacagatct
gaataaaaaagactcgacatctccaataaacctgaacaaggaaaaaacacattcatttaccggttttaatttggcacaagtgacattaaatgcaagacgttcactatgttcataat
cataattgttaattgtcctaaagttttatacagaaactatttagtttagcatgtatcatcattgaaatattttagaactcaataaacaattgtttgtactttatatagtggtgac
atgaagtattatcaataactaataagggtcttgtattgttacatgcataaataatgcag
674 GCGACAAATCTATGATAAGAAAGCGATACATGCACCTCACAGAAGAATATCTAAAAGAGAACCCCAACCTTTGCGAGTACATG
63 C D K S M I R K R Y M H L T E E Y L K E N P N L C E Y M
764 GCTCCATCACTCGATGCACGTCAAGATGTCGTGGTCTGTTGGAAGTCCCAAGCTCGGCAAGAAGCCGCAACCAAGCCATTAAAGAACGG
91 A P S L D A R Q D V V V V E V P K L G K E A A T K A I K E R
865 GGCAACCCAAATCGAAGTACCCATCTCATCTTCTGCACTACATCCGGGTCGACATGCCTGGTGTGATTACAGCTCACCAGCCTT
121 G Q P K S K I T H L I F C T T S G V D M P G A D Y Q L T K L
944 CTCGGCCTTCGCCATCTGTCAAACGCTTCATGATGTACCAACAAGGGTGTGTTTGTGGGGTACGGTCTTCGTCTAGCCAAAGACCTT
151 L G L R P S V K R F M M Y Q Q G C F A G G T V L R L A K D L
1034 GCCGAGAACAAAGGGTGTCTGTTCTTGTGTTTGTCTCGAGATTACTGCGGTACGCTTTCTGTCGCTTAATGATCTCATCTTGAC
181 A E N N K G A R V L V G V C S E I T A V T F R G P N D T H L D
1124 TCATTTGTGGGTCAAGCTTTGTTGGGGATGGGCGCTGCACTGTAGGTTCTGACCTGACTTGACGACTGAGCGGCCCTTGT
211 S L V G Q A L F G D G A A A V I V G S D P D L T T E R P L F
1214 GAGATGATCTCTGACGTCAAACGATCTTGCCGATTCCGAGGGAGCTATTGATGGACACTTGAGGGAAGTTGGGCTTACATTTTCATCTC
241 E M I S A A Q T I L P D S E G A I D G H L R E V G L T F H L
1304 CTTAAAGATGTCCTGGGTGATCTCAAAGAATATAGAGAAGGCATTGGTACAAGCCTTTTCTCCATTAGgtattgaaaatcgcaaatcatccat
gcactatgattt
271 L K D V P G L I S K N I E K A L V Q A F S P L
cttttagttaaagacacacaacaaatattactgaatctttagttttatgtacatttctaaaaatcatggacaaaatcatgtattttttatcttttaggtttacctttttaaaa
aagtttgaagaataataaaatttggctttgtctacaataaacattattgtataaaaaaaaggcaaataggtaaaacttacctttatcattatcttatgtacatgtat
aaagtaacacttctatgacttttataagtaacttatatattcctaacaattttataaagacaatttttttgcatagtgtgagagatagttactgttagttt
1734 tctatgataattagtagtaatacactctctctatatatatatttcagGTATAACTGACTGGAACCTCG
294 G I T D W N S
1801 ATCTTTTGGATCGCGCATCCAGGAGGTCCAGCGATACTGGACCAGGTGGAGCTCAAGCTCGGTCTCAAGGAAGAGAAAATGAGAGCCACA
301 I F W I A H P G G P A I L D Q V E L K L G L K E E K M R A T
1891 CGACATGTGCTTGGTGTAGTATGGGAACATGTCCAGTGCTTGTGTGTTGTTTCATCATTGATGAGATGAGGAGGAAGTCGGCCGAGGATGGC
331 R H V L G E Y G N M S S A C V L F I I D E M R R K S A E D G
1981 GCTGCGACCACCGGTGAAGGTTTAGATTGGGGTGTCTCTTTGGGTTCCGTTCTGGTTTGACAGTGGAGACAGTGGTCTTCATAGCCTC
361 A A T T G E G L D W G V L F G F G P G L T V E T V V L H S L
1171 CCAACCACGATGGCGATTGCGACA**TAA**
391 P T T M A I A T *

图2 *CbCHS* 基因DNA及其推导的氨基酸序列

Figure 2 *CbCHS* DNA and its deduced amino acid sequences

黑色方框:起始密码(ATG)和终止密码(TAA)。小写字母和下划线:内含子

Black box: The start codon(ATG) and the stop codon(TAA) . Lowercase and underline: The intron sequence

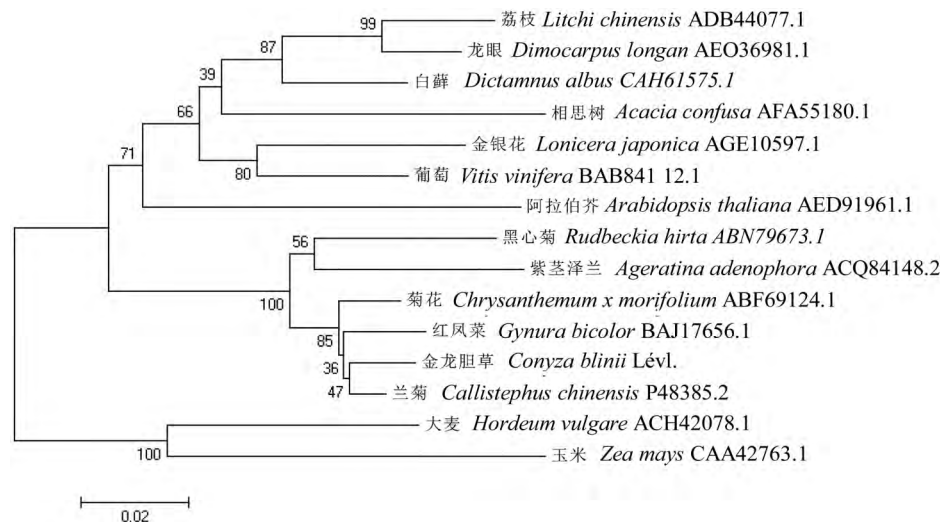


图3 *CHS* 蛋白质的分子进化分析

Figure 3 Molecular evolution analysis of *CHS*

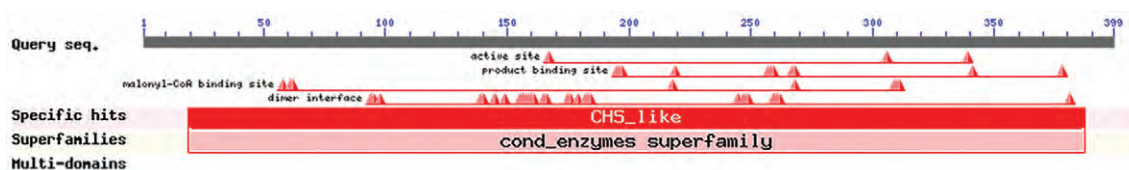


图4 CbCHS氨基酸序列的特征性保守区域

Figure 4 Characteristic conserved domain of amino acid sequence of CbCHS

三角形符号分别指出CbCHS蛋白保守结构域,即4-香豆酰-CoA结合位点、产物结合位点、丙二酰-CoA结合位点和Ⅲ型聚酮酶结合位点

The triangles indicate the conserved domains of CbCHS, including 4-coumaryl-CoA active site, product binding site, malonyl-CoA binding site and dimer interface

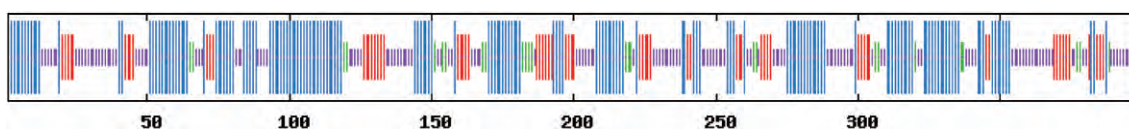


图5 CbCHS蛋白二级结构预测

Figure 5 CbCHS prediction of secondary structure

蓝色:α-螺旋;绿色:β-转角;红色:延伸链;紫色:不规则卷曲

Blue bars : α-helix; Green bars: β-turn; Red bars: Extended strand; Purple bars: Random coil

mays)、大麦(*Hordeum vulgare*)等同源序列亲缘关系最远。

GenBank工具预测显示,CbCHS基因编码蛋白质与已知的蛋白质结构功能数据库中其他物种的CHS基因编码蛋白质具有相似的结构功能域,其371~381 (GVLFQFGPGL)氨基酸残基处为查尔酮合酶的特征性多肽序列(Kim et al., 2002; Lanz et al., 1991)。CbCHS基因含有一个缩合酶超家族结构域(cond_enzymes superfamily),该家族都具有很强的结构相似性,参与脂肪酸的合成和降解,聚酮化合物的生产(Jez, 2000),分析结果显示,预测的CbCHS蛋白质N端和C端均含有一个典型查尔酮合酶家族所具有的硫醚酶无氨和β-酮合酶的保守区域(Chal_sti_synt),进一步证明CbCHS基因属于查尔酮合酶家族(图4)。

2.4 CbCHS基因的蛋白结构分析

利用在线工具Protparam对基因编码蛋白质的理化性质进行预测,推测该蛋白质的分子式为 $C_{1930}H_{3091}N_{521}O_{574}S_2$,相对分子质量为43 451.1 D,等电点pI为6.03,带正电残基(Arg+Lys)为43,负电残基(Asp+Glu)为48。该蛋白的脂脂系数为91.93,亲水性系数为-0.048,不稳定系数为36.80,且在酵母(*Pichia pastoris*)和大肠杆菌体内半衰期分别超过

20和10 h,表明其为稳定型蛋白。用SOPMA预测CbCHS蛋白质二级结构,结果显示(图5),其以α-螺旋与无规则卷曲为主,其中α-螺旋为41.21%,β-转角为6.53%,无规则卷曲为35.68%,另有16.58%的氨基酸参与形成延伸连。使用在线软件SignalP 4.1对CbCHS蛋白进行信号肽模测,结果显示N端的C值、S值和Y值的计算结果均少于0.5,显示此蛋白无信号肽。WOLFPSPORT预测表明,CbCHS最可能定位在细胞质中(cytoplasm: 10.0,chloro-

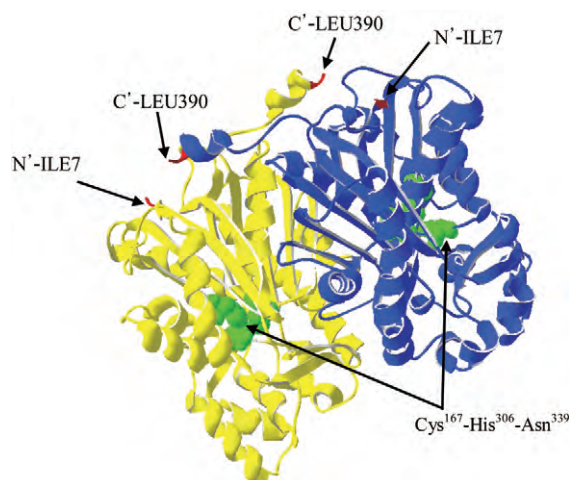


图6 CbCHS蛋白的三级结构预测模型

Figure 6 The deduced three-dimensional structure model of CbCHS by Swiss-model

plastP: 7.0, mitochondrial: 1.0)。使用 SWISS-MODELS 在线预测 CbCHS 蛋白质三级结构,采用自动建模模式(automated mode),用于建模的蛋白残基为第7~390位,以紫花苜蓿查尔酮合酶基因(1cgzA)作为模板构建同源模型(图6),实验分辨率为1.70Å,序列相似性为82.55%(Arnold et al., 2006)。与紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)查尔酮合酶相似,CbCHS 蛋白拥有两个亚基,活性位点位于单体内部,且含有一个位于活性位点腔顶部的 Cys¹⁶⁷-His³⁰⁶-Asn³³⁹三联体(Abe, Morita, 2010),与菊花等(张明珠, 2006)同科植物的查尔酮合酶基因结构相似。

2.5 花期金龙胆草不同组织部位 *CbCHS* 基因的半定量分析

花期金龙胆草花、叶、茎、根中 *CbCHS* 基因的半定量 RT-PCR 电泳检测结果如图7所示。结果表明,*CbCHS* 基因在花、叶、茎、根中均有表达(图8),具有组织特异性。其中在叶和茎的表达量最高,相对表达量分别达到87.03 %和98.33 %,表达量之间没有显著差异($P>0.05$);在根中 *CbCHS* 基因表达量最少,相对表达量仅为9.43 %,表达量与其余部位具有显著差异($P<0.05$)。花期各个组织的花青素含量测试结果(图8)表明,叶中的花青素相对含量最高,茎和花其次,根中最少,这一趋势与 *CHS* 的表达量有一定的相关性,但也有一定的差异,这可能与花青素的形成是受到多基因共同控制的机制有关(石少川等, 2011)。

3 讨论

查尔酮合酶是花青素合成途径中第一个关键酶,其催化生成的查尔酮是花青素代谢途径的各种色素的前体,它的活性直接影响下游反应,最终对黄酮类物质的产量产生重大影响(Shelagh et al.,

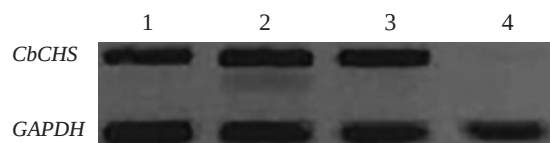


图7 *CbCHS* 在不同组织中的半定量PCR检测

Figure 7 Semi-quantitative PCR of *CbCHS* in different tissues

1: 花; 2: 叶; 3: 茎; 4: 根。内参基因: *GAPDH*; n=3; 下同

1: Flowers; 2: Leaves; 3: Stems; 4: Roots. Reference gene: *GAPDH*; n=3; The same below

2001)。本研究所克隆的金龙胆草 *CbCHS* 基因的基因组序列分析显示其具有两个内含子,而迄今为止所克隆得到的 *CHS* 基因除金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)的 *AMCHS* 基因也含有两个内含子之外均只有1个内含子(王燕等, 2007),内含子的剪切机制在基因调控中具有重要意义,金龙胆草 *CHS* 基因的这一发现值得后续深入研究。氨基酸序列分析显示其与兰菊、红凤菜等菊科植物的 *CHS* 基因序列相似性达到90 %以上,其编码的蛋白质具有查尔酮合酶典型保守结构域和活性位点,初步断定 *CbCHS* 基因就是金龙胆草的 *CHS* 同源基因,编码具有活性的蛋白,具有普通查尔酮合酶的催化功能。植物 *CHS* 基因在不同组织器官有不同的表达模式,并在不同发育阶段和外界刺激条件下有所差异(Xu et al., 2007)。植物花中的 *CHS* 基因表达量相比较其他组织器官是最高的(Nakatsuka et al., 2005),而本研究结果表明,*CbCHS* 基因在金龙胆草花中的表达却低于茎和叶,且差异显著($P<0.05$),可能是由于 *CHS* 多基因家族在植物体中受不同的模式所调控, *CbCHS* 基因的表达可能受到其酶自身催化产物的反馈抑制作用(Dietrich-Szostak, Oleszek, 1999);同时,这一 *CbCHS* 基因花期表达模式与苦荞(*Fagopyrum tataricum*)花期 *FtCHS* 基因(吴琦等, 2010)和越桔(*Vaccinium* spp.)花期 *VcCHS* 基因(裴嘉博, 2012)等表达模式十分类似,由于植物中 *CHS* 基因属于多基因家族,受到发育阶段和外界刺激的诱导显示出不同的表达模式(Xu et al., 2007), *CbCHS* 基因的表达可能受到自身催化产物的反馈抑制,抑制了其在花中的表达,同时由于查尔酮合酶参与植物花色素的合成, *CHS* 表达量在白色花植物中表达较少(胡

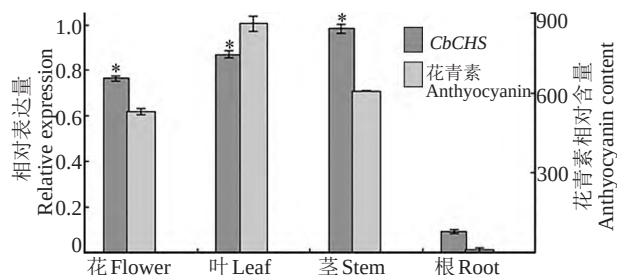


图8 *CbCHS* 基因在不同组织表达量与花青素含量的关系
Figure 8 The relationship between expression amount of *CbCHS* and anthocyanin content in different tissues

*: 同根中 *CbCHS* 表达量相比差异显著($P<0.05$);

*: Significantly different($P<0.05$) vs in root of *CbCHS* expression

可等, 2009; 梁明炜等, 2011), 与金龙胆草白色小花的特征符合。*CbCHS*可能涉及到一些新的尚未探明的调节机制, 有待今后对*CbCHS*基因在花期表达的时间进程做进一步研究。

4 结论

本研究首次克隆得到了金龙胆草*CbCHS*基因的全长DNA及cDNA序列, 并进行生物信息学分析探讨该基因的结构特点, 分析结果显示*CbCHS*的DNA序列含有2个内含子, 在氨基酸序列保持高度保守性的同时显示了金龙胆草与其它植物查尔酮合酶基因的不同之处。*CbCHS*基因在不同组织部位的表达量及花青素相对含量的差异的分析结果表明, *CbCHS*在茎中表达量最高, 花青素在叶中含量最多, 这可能是由于与类黄酮的代谢途径上查尔酮分子的异构化和功能集团的进一步取代有关。通过基因工程手段改造*CHS*基因的表达量, 可以改变黄酮类次生代谢物的产量, 提高植物利用价值, 增强抗性。从本研究对黄酮成分生成关键酶*CbCHS*基因克隆和表达量分析, 为今后金龙胆草次生代谢物合成过程中关键酶表达分析及调控机制的研究提供了基础资料。

参考文献

胡可, 孟丽, 韩科厅. 2009. 瓜叶菊花青素合成关键结构基因的分离及表达分析[J]. 园艺学报, 36 (7) : 1013-1022. (Hu K, Meng L, Han KT, et al. 2009. Isolation and expression analysis of key genes involved in anthocyanin in biosynthesis of *Cineraria* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 36 (7): 1013-1022.)

霍凤梅. 2010. 洋葱种质资源遗传多样性的SRAP分析与查尔酮合成酶基因的分子克隆与表达研究[D]. 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 杨建平, pp.25. (Huo F M. 2010. SRAP analysis of genetic diversity and the *CHS* gene cloning and its expression in onion (*Allium cepa* L.) [D]. Thesis for M.S., Shandong Agricultural University, Supervisor: Yang J P, pp.25.)

梁明炜, 刘海峰, 陆雪莹. 2011. 棕色棉类黄酮3'-羟化酶基因(*GhF3'H*)的克隆及色素合成途径中相关基因表达特性研究[J]. 农业生物技术学报, 19(5): 808-814. (Liang M W, Liu H F, Lu X Y, 2011. Cloning of flavonoid 3'-hydroxylase gene (*GhF3'H*) and expressional characteristics of several genes associated with pigment synthesis in brown cotton (*Gossypium*

hirsutum L.) fibers[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 19(5): 808-814.)

裴嘉博. 2012. 越橘查耳酮合酶基因的克隆及表达分析[D]. 硕士学位论文, 吉林农业大学, 导师: 李亚东, pp.32-33. (Pei J B. 2012. Molecular cloning and expression analysis of chalcone synthase gene in blueberry[D]. Thesis for M.S., Jilin Agricultural University, Supervisor: Li Y D, pp. 32-33.)

石少川, 高亦珂, 张秀梅, 等. 2011. 植物花青素生物合成相关基因的研究及应用[J]. 植物研究, 31(5): 633-640. (Shi S C, Gao Y K, Zhang X M, et al. 2011. Progress on plant genes involved in biosynthetic pathway of anthocyanins [J]. Bulletin of Botanical Research, 31(5): 633-640.)

苏艳芳, 陈磊, 罗洋, 等. 2007. 金龙胆草化学成分及其抗溃疡活性研究(I) [J]. 中草药, 38(3): 332-334. (Su Y F, Chen L, Luo Y, et al. 2007. Chemical constituents and their antiulcerogenic studies on whole herb of *Conyza blinii* (I) [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 38 (3): 332-334.)

苏艳芳, 刘建生, 果德安, 等. 2001. 金龙胆草黄酮类成分的研究[J]. 中草药, 32(6): 496-497. (Su Y F, Liu J S, Guo D A, et al. 2001. Seven flavonoids from aerial parts of *Conyza blinii* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 32(6): 496-497.)

苏艳芳, 颜世伦, 周立军. 2011. 金龙胆草总皂苷在制备抗肿瘤药物中的用途[P]. 中国专利: CN101933964A. (Su Y F, Yan S L, Zhou L J. 2011. The use of total saponins of *Conyza blinii* in preparation anti tumor drugs[P]. China Patent, CN101933964A.)

王燕, 许锋, 程水源. 2007. 植物查尔酮合成酶分子生物学研究进展[J]. 河南农业科学, 08: 5-9. (Wang Y, Xu F, Cheng S Y. 2007. The advances of chalcone synthase in plant [J]. Journal of He'nan Agricultural Sciences, 08: 5-9.)

吴琦, 李成磊, 陈惠, 等. 2010. 苦荞查尔酮合酶基因*CHS*的结构及花期不同组织表达量分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 26(12): 1151-1160. (Wu Q, Li C L, Chen H, et al. 2010. Molecular structure characterization of *Fagopyrum tataricum* chalcone synthase and its tissue-specific expression during florescence [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 26(12): 1151-1160.)

徐丽萍, 刘建生, 敏德, 等. 1998a. 金龙胆草的化学成分研究(I) [J]. 中国中药杂志, 23(5): 293-295. (Xu L P, Liu J S, Min D, et al. 1998. Studies on chemical constituents of *Conyza blinii* Lévl. [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 23(5): 293-295.)

徐丽萍, 刘建生, 敏德, 等. 1998b. 金龙胆草的化学成分研究(II) [J]. 中国中药杂志, 23(9): 552-253. (Xu L P, Liu J S,

- Min D, et al. 1998. Studies on chemical constituents of *Conyza blinii* Lévl.[J].China Journal of Chinese Materia Medica, 23(5): 552-253.)
- 薛洪宝, 常华兰, 许丽, 等. 2011.色谱法分析金龙胆草中低极性有效成分[J].辽宁中医药大学学报, 2011, 13(10): 157- 161. (Xue H B, Chang H L, Xu L, et al. 2011. Analysis low polarities active ingredients in *Conyza blinii* Lévl. by chromatography[J]. Journal of Liaoning University of TCM, 13(10): 157-161.)
- 张明姝. 2006.菊花查尔酮合酶基因的克隆与序列分析 [D].硕士学位论文,北京林业大学,导师: 戴思兰, pp.25-28.(Zhang M S. 2006. Cloning and sequence analysis of chalcone synthase gene from *Chrysanthemum × morifolium*[D].Thesis for M.S., Beijing Forestry University, Supervisor: Dai S L, pp.25-28.)
- Abe I, Morita H. 2010. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases[J]. Natural Product Reports, (27): 809-838.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. 2006.The SWISS-MODEL Workspace: A web- based environment for protein structure homology modeling[J]. Bioinformatics, (22):195-201.
- Austin M B, Noel J P. 2003.The chalcone synthase superfamily of type polyketide synthases[J]. Natural Product Reports, 20: 79-110.
- Bogs J, Ebadi A, Mcdavidd. 2006. Identification of the flavonoid hydroxy lases from grapevine and their regulation during fruit development[J]. Plant Physiology, 140(1): 279-291.
- Chu H, Jae C J, Kim W J, et al. 2013. Expression of the sweetpotato R2R3- type *IbMYB1a* gene induces anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*[J]. Physiologia Plantarum,148(2): 189-199.
- Dietrych- Szostak D, Oleszek W. 1999. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.)grain[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10): 4384-4387.
- Han Y Y, Ming F, Wang W. 2006. Molecular evolution and functional specialization of chalcone synthase superfamily from *Phalaenopsis orchid*[J]. Genetica, 128 (1-3): 429-438.
- Jez J M, Ferrer J L, Bowman M E, et al. 2000. Dissection of malonyl- coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase[J]. Biochemistry, 39(5): 890-902.
- Kim S H, Mizuno K, Fujimura T. 2002. Regulated expression of ADP glucose pyrophosphorylase and chalcone synthases during root development in sweet potato[J]. Plant Growth Rregulation, 38: 173-179.
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. 2005. Flavonoids: A colorful model for there gulationand evolution of biochemical pathways[J].Trends in Plant Science,10(5): 236-242.
- Kreuzaler F, Ragg H, Fautz E,1983. Uv-induction of chalcone stythase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hotense*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 80: 2591-2593.
- Lanz T, Tropf S, Marner F J. 1991. The role of cysteines in polyketide synthases[J]. Journal of Biological Chemistry, 266(15): 9971-9976.
- Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K. 2005. Temporal expression of flavonoid biosynthesis related genes regulates flower pigmentation in gentian plants[J].Plant Science, 168(5) : 1309-1318.
- Shelagh R M, Geoff J C, Susan R. et al. 2001. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols[J]. Nature Biotechnology, 19: 470-474.
- Winkel- Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress[J]. Current Opinion in Plant Biology, 5 (3): 218-223.
- Xu F, Cheng S Y, Cheng S H. 2007. Time course of expression of chalcone synthase gene in *Ginkgo biloba* [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 33(4): 309-317.
- Yang C R, He Z T, Li X C. 1989. Blinin, a neoclerodane diterpene from *Conyza blinii*[J]. Phytochemistry, 28(11): 3131-3134.

(责任编辑 马丽萍)