

甜荞查尔酮合酶基因 *Chs* 的克隆及序列分析

李成磊, 张晓伟, 吴琦*, 赵海霞, 陈惠, 邵继荣

(四川农业大学 生命科学与理学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 利用 RT-PCR 技术从甜荞中克隆得到查耳酮合酶(CHS)的 cDNA 开放阅读框(ORF)序列, 命名为 *FeChs*, NCBI 登录号为 GU172166.1。该序列长 1 179 bp, 编码 392 个氨基酸, 与其它植物 *CHS* 基因的同源性为 78%~92%, 其推导的氨基酸序列含有 CHS 高度保守的活性位点及 CHS 的标签序列 GFGPG。

关键词: 甜荞; 查耳酮合成酶基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2011)03-0383-05

Cloning and sequence analysis of chalcone synthase gene *Chs* from *Fagopyrum esculentum*

LI Cheng-Lei, ZHANG Xiao-Wei, WU Qi*, ZHAO Hai-Xia, CHEN Hui, SHAO Ji-Rong

(College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The cDNA ORF sequence of chalcone synthase gene(*FeChs*) was amplified by RT-PCR from *Fagopyrum esculentum*. Its accession number is GU172166.1 on GenBank. The analysis indicated the cDNA sequence was 1 179 bp, encoding 392 amino acids and had a homology 78%—92% with other plants' *CHS* genes. The deduced amino acids sequence of *FeChs* contained the highly conserved catalytic active sites, and the typical Tag sequence of CHS with GFGPG.

Key words: *Fagopyrum esculentum*; chalcone synthase gene; cloning; sequence analysis

甜荞(*Fagopyrum esculentum*)又称普通荞麦, 属蓼科荞麦属双子叶植物, 是我国荞麦的主要栽培品种之一。甜荞是一年生草本, 具有生育期短, 抗逆性强, 极耐寒瘠, 栽培简单等生产优势, 当年可多次播种多次收获, 是中国古代重要的粮食作物和救荒作物之一。甜荞的籽粒不仅含有丰富的营养元素, 还含有黄酮类化合物。黄酮类化合物广泛存在于自然界, 属植物次级代谢产物, 在植物紫外防护、花的显色、种间相互作用和防御反应中都扮演着重要角色(Stefan等, 2005)。黄酮类化合物具有降低血浆胆固醇和甘油三酯的水平、预防动脉粥样硬化(李传

勋等, 2005), 抗炎和提高机体免疫力的作用(吴晓等, 1998; 胡芝华等, 2009), 有很高的营养价值和药用价值。随着我国荞麦科研和产业开发的发展, 荞麦在农业生产中的地位正在由“救灾补种”作物转变为农民脱贫致富的经济小作物。

植物体内的黄酮类化合物源自于苯丙氨酸代谢途径。查尔酮合酶是苯丙氨酸代谢分枝途径中的一个关键酶。苯丙氨酸经过三步酶促反应生成香豆酰-CoA, 再由查尔酮合酶催化 1 分子香豆酰-CoA 和 3 分子丙二酸单酰-CoA 缩合生成柚配基查尔酮, 在此基础上经其它酶的催化合成植物黄酮类化合物(张

收稿日期: 2010-09-07 修回日期: 2011-01-27

基金项目: 四川省科技攻关项目(2006Z08-012)[Supported by the Key Technologies R & D Program of Sichuan Province(2006Z08-012)]

作者简介: 李成磊(1983-), 男, 四川雅安市人, 博士研究生, 研究方向为植物基因工程, (E-mail)lichenglei1998@yahoo. cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: wuqiwwq@yahoo. cn)

萍等,2008)。目前,*Chs* 的研究报告大都集中在其对花卉花色的影响这一领域(胡可等,2009;邵莉等,1996;冯慧等,2007),而对植物体内黄酮类化合物合成的影响鲜有报道。对传统的甜荞进行改造,以增强植株体内黄酮类化合物的合成和积累,则其利用价值将大大提升。对关键酶基因的克隆是这些研究工作的基础和重点。本研究以甜荞为材料,对 *FeChs* 的 cDNA 进行克隆,为今后进一步的研究提供资料。

1 材料与方 法

1.1 材料与主要试剂

供试甜荞种子购自四川阿坝农户,栽培于四川农业大学生物系试验农场。

RNA 提取试剂植物 RNAout 试剂盒购自天泽基因工程有限公司;逆转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司;质粒 DNA 小量提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司;rTaqDNA 聚合酶、克隆载体 pMD19-T 购自 Takara 公司。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机,Thermo ELECTRON CORPORATION;MyCyclerTMPCR 仪,BIO-RAD;DYY-III-68 型稳压稳流电泳仪,北京市六一仪器厂;凝胶成像系统,BIO-RAD;DNP-9272 型电热恒温培养箱,上海精宏试验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 甜荞花总 RNA 提取及甜荞 *Chs* 基因 cDNA ORF 序列的克隆 采用植物 RNAout 试剂盒提取甜荞新鲜花总 RNA,电泳检测。在 200 μ L Ep 管中加入甜荞花总 RNA 4 μ L,Oligo-dT (0.5 μ g/ μ L) 1 μ L,H₂O 7 μ L,混匀后,70 $^{\circ}$ C 变性 5 min,立即置于冰上 1~2 min。向上述离心管中加入 5 \times reaction buffer 4 μ L,RiboLockTM Ribonuclease Inhibitor 1 μ L,10 mmol/L dNTP mix 2 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 5 min 除去可能的 RNA 酶污染。将 1 μ L RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase 加入上述 Ep 管,反应总体积 20 μ L。42 $^{\circ}$ C 60 min;70 $^{\circ}$ C 下 10 min 灭活反转录酶,得到 cDNA 第一链。以甜荞 *Chs* 的 DNA 序列为依据,设计特异引物 Chsf (5'-CAATGGCACCGACGGT-3')、Chsr (5'-GCGCCTAGGGATAATCAGTT-3'),扩增甜荞 *Chs* 的

cDNA。以引物 Chsf 和 Chsr 进行 PCR 扩增,PCR 反应参数:94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性;(94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s) 30 cycles;72 $^{\circ}$ C 8 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后连接至 pMD 19-T 进行克隆,筛选出阳性克隆后送北京诺赛基因组研究中心进行测序。

1.3.2 生物信息学分析 借助 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在线工具 BLAST 和生物信息学软件 DNAMAN 进行甜荞 *FeChs* 核苷酸序列和蛋白质序列的同源性分析,利用 Clustal X1.81 进行多序列比对后构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 甜荞花总 RNA 的提取

提取的甜荞花总 RNA 经 2% 琼脂糖电泳结果见图 1,28S rRNA、18S rRNA 和 5.8S rRNA 条带清晰可见,28 s 与 18 s 的亮度比例接近于 2:1,表明提取的 RNA 质量较高,可用于 RT-PCR。

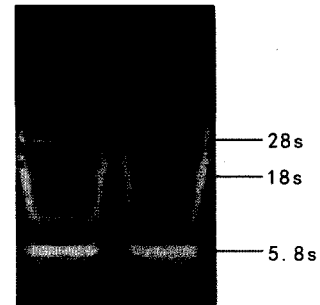


图 1 甜荞总 RNA

Fig. 1 Total RNA extracted from flower of *F. esculentum*

2.2 甜荞 *FeChs* cDNA 序列的克隆

以甜荞新鲜花总 RNA 反转录得到的 cDNA 第一链为模板,用特异引物 Chsf 和 Chsr 进行 PCR 扩增得到约 1 200 bp 的特异性条带(图 2)。

2.3 甜荞 *FeChs* 基因序列分析

甜荞 *CHS* 基因 cDNA 扩增产物测序结果经拼接后得到了长为 1 179 bp 的核苷酸序列。该 cDNA 序列包含一个完整的开放阅读框,编码 392 个氨基酸(图 3),将该序列命名为 *FeChs*,提交 GenBank,登录号为 GU172166.1。

FeChs 序列经 Blast 分析表明,其核苷酸序列与已报道的金荞麦(*Fagopyrum dibotrys*)*FdChs* 的同源

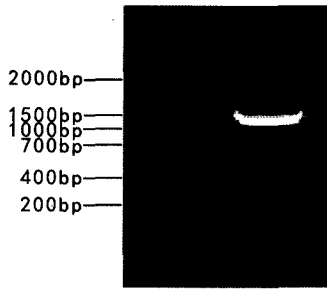


图 2 甜荞 *Chs* 基因的 RT-PCR

Fig. 2 RT-PCR product of *Chs* from *F. esculentum*

性达到 92%，与掌叶大黄(*Rheum palmatum*)、虎杖(*Polygonum cuspidatum*)、银白杨(*Populus alba*)等其它植物 *CHS* 基因序列同源性达 75% 以上。

用 DNAMAN 对 *FeChs* 推导的氨基酸基本性质进行预测。该氨基酸序列相对分子质量为 43 099.7，等电点为 5.86，二级结构中 α 螺旋占 40.05%，折叠片占 21.17%，无规则卷曲占 38.78%，在 366~388 位氨基酸处可能存在跨膜结构。用 SWISS-MODEL 对甜荞 *CHS* 三级结构进行预测，其结构如图 4。

将 *FeChs* 推导的氨基酸序列进行 BLASTP 分析，结果表明其与同为蓼科植物的金荞、苦荞 (*Fa-*

```

1 atggcaccgacggtccaggagatcaggaaggctcagaggccgagggtccggccaccgtctctgctatcggaacggccacaccgcccac
M A P T V Q E I R K A Q R A E G P A T V L A I G T A T P P N
91 tgcgtctaccaggccgactacccecgactactctcagggctaccaacacgaccacatgactgactgaaggagaaattcagacgcatg
C V Y Q A D Y P D Y Y F R V T N S D H M T D L K E K F R R M
181 tgcgacaatcacagattgagaagcgttacatgtacctaacaggagagattctcaaggaacacccaacatgtgcgagtacatggcgcca
C D K S Q I E K R Y M Y L T E E I L K E H P N M C E Y M A P
271 tctctagactcccgccaggacatggtcgtcaccgaggtccccaagctcggcaagaagctgccagaaggccatcaaggagtggggccag
S L D S R Q D M V V T E V P K L G K E A A Q K A I K E W G Q
361 cccaagtccaagatcaccacgtcatcgtctgcaccacctccggcgtcgacatgcccggagccgactaccagctcaccagctcctcggc
P K S K I T H V I V C T T S G V D M P G A D Y Q L T K L L G
451 cttegcccttcctgtaagcgttcatgatgtaccagcagggttgcctcggcggaggcaccgtctcgtatggccaaggaccttgccgag
L R P S V K R F M M Y Q Q G F A G G T V L R M A K D L A E
541 aacaaccggggagctcgtgtcctcgtcgtcgtcctccgagatcaccgcctgtcgttccggtggaccaccgacactcacttgactccatg
N N R G A R V L V V C S E I T A V C F R G P T D T H L D S M
631 gtggccagggccctcttcggggacggagccggagccgttatagtcggagctgaccccgatctctcagtgaggagaagccatcttcgaact
V G Q A L G D G A G A V I V G A D P D L S V E K P I F E L
721 gtctggacttcccagaccatcctccccgactccgaggcggccatcgacgggtcacctgcgcgaggtcgggctcaccttccaccttctcaag
V W T S Q T I L P D S E G A I D G H L R E V G L T F H L L K
811 gatgtccccggcctcatctccaagaacatcgagaagctcttaccgaggccttctcccctctaaacatcgccgactggaactccctctt
D V P G L I S K N I E K S L T E A F S P L N I A D W N S L F
901 tggatcggccaccggggggcccgctatcctcgcaccaggtcgggccaagctcggcctcaaggaggagaagctcaaggcaaccaggcag
W I A P G G P A I L D Q V E A K L G L K E E K L K A T R Q
991 gtctgaatgactacggaaacatgtccagtgcttgtgtttgttcatcttggatgagatgaggagaagctccctcgagaacggacacgcc
V L N D Y G M S S A C V L F I L D E M R K K S L E N G H A
1081accaccggagaggggttgattgggggtcttatttgcttcggaccggccttaccgtcgagaccgttgtgctacacagtggtgcccgta
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 V P V
1171 gctaactga
A N*

```

图 3 甜荞 *FeChs* cDNA ORF 序列和推导的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA ORF sequences of *FeChs* and its deduced amino acid sequences

阴影部位表示高度保守活性位点；划线部位为 *CHS* 标签序列 GFGPG。

Shaded areas denote the conserved active sites of *CHS*; The signature sequence is GFGPG is underlined.

gopyrum tataricum)、掌叶大黄、虎杖的同源性均在 90% 以上，与不同科植物如葡萄 (*Vitis vinifera*)、银白杨、大豆 (*Glycine max*) 等也具有较高的同源

性。利用 DNAMAN 软件将 *FeCHS* 推导的氨基酸序列与其它几种植物 *CHS* 的氨基酸序列进行多序列比对。分析表明，*FeChs* 编码的氨基酸序列含有

CHS 高度保守的活性位点 Cys¹⁶⁵、Phe²¹⁶、His³⁰⁴ 和 Asn³³⁷ (Ferrer 等, 1999; Shomura 等, 2005) 以及 CHS 的标签序列 GFGPG(图 3), 这些活性位点与苦荞、金荞等 CHS 活性位点比较相似, 表明甜荞 CHS 是 CHS 蛋白质家族中的一员。

2.4 分子进化分析

利用 Clustal X1.81 软件构建基于 CHS 氨基酸序列的系统发育树(图 5)。可以看出甜荞麦与同为蓼科的苦荞麦与金荞麦的同源关系最近, 并与掌叶大黄和虎杖构成一个分支, 表明与它们的同源关系较近, 而与其它植物的同源关系较远。

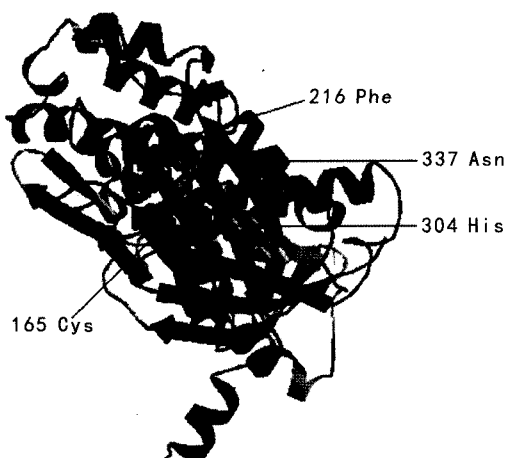


图 4 预测的甜荞 CHS 三级结构

Fig. 4 The predicted 3-D structure of CHS

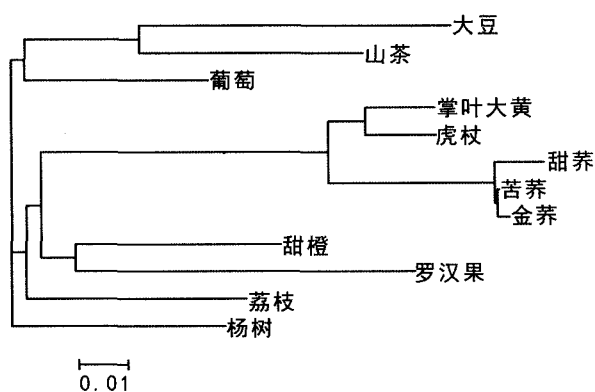


图 5 CHS 氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of CHS

3 讨论

黄酮类化合物是植物在长期进化过程中应对紫外辐射、高光强度、低温、干旱等不利生存因素而产

生的物质。黄酮类化合物的出现可能是植物进化选择的一个标准(Stefan 等, 2005)。CHS 作为黄酮类物质代谢途径的关键酶, 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 等, 2001)。胡可等(2009)对不同品种瓜叶菊(*Senecio cruentus*)的结构基因表达差异进行研究后发现, 白色花与有色花的差异主要体现在于 *Chs* 基因的是否表达。当 *Chs* 基因的表达被抑制后, 转基因瓜叶菊的花色会变为白色或出现不规则的白色条纹。国外一些学者对欧洲女贞(*Ligustrum vulgare*)的研究以及我国学者对玉米(*Zea mays*)和大豆等的研究发现适当的光照条件和强度可以提高植物组织中的黄酮类化合物的含量(Mas-similiano 等, 2004; Agati 等, 2002; 高炜等, 2004; 李卫东等, 2004; 曾明等, 1997), 低温有利于植物组织中的黄酮类物质的积累(徐文燕等, 2006)。进一步的研究表明 *Chs* 基因的转录水平受到光照条件的调节。Fritz 等(1983)发现紫外辐射可以诱导欧芹(*Petroselinum hortense*) *Chs* 的 mRNA 瞬时大量表达, Rhonda(1991)等的研究发现拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *Chs* 的基因表达水平与光照强度呈正相关。Leyva 等(1995)的研究表明低温以及较明显的温差可以诱导 *Chs* 的表达。此外, 有研究表明赤霉素可以降低 *Chs* 的活性, 进而抑制黄酮类物质的合成(程水源等, 2000)。

作为植物重要的次生代谢途径之一, 苯丙氨酸代谢途径的调控体系非常复杂, 不仅受本体基因的控制也受到外界条件的影响。基因工程的发展给人类带来一个改造生命的有力武器, 但是它也并非万能。有报道称当外源 *Chs* 基因导入本身含有 *Chs* 基因的植物时, 会因为 *Chs* 基因的高同源性会产生共抑制现象, 导致转基因植物的 *Chs* 局部或全部不表达(Vander Krol 等, 1990)。邵莉等(1996)对转基因矮牵牛(*Petunia hybrida*)研究发现, 转基因植株不仅花色发生明显变化, 其育性也发生变化, 出现雄性不育植株。赵万苓等(2006)利用农杆菌将 *Chs* 基因导入大岩桐(*Sinningia speciosa*), 发现转基因植株长势普遍稍低于野生植株, 转基因植株的抗性也降低了。所以在对传统甜荞进行改造时, 要充分考虑它的遗传效应和生理效应, 一方面可以通过基因工程技术增强植物体内 *Chs* 基因的表达, 另一方面可以探求增强 *Chs* 基因表达的外部条件, 在两者之间寻求一个平衡点, 以获得对甜荞最佳的改良和最

大的利益。当然,这些工作都是建立在在对苯丙烷类代谢途径的充分了解的基础上,所以对该途径的关键酶—CHS 的研究是一个好的起点也是一个重点。本研究首次从甜荞基因组中克隆出 CHS 的基因,并对克隆的基因序列和其氨基酸序列进行了生物信息学分析,为黄酮类化合物的研究补充了数据和资料。

参考文献:

- 吴晓,王龙火,黄晓平,等. 2009. 黄酮类化合物的抗癌机制[J]. 中国民族民间医药,18(22):1-2
- Agati G, Galardi C, Gravano E, et al. 2002. Flavonoid distribution in tissues of *Phillyrea latifolia* leaves as estimated by microspectrofluorometry and multispectral fluorescence microimaging[J]. *Photochem Photobiol*, 76(3):350-360
- Cheng SY(程水源), Gu MR(顾曼如), Shu HZ(束怀瑞). 2000. Advances in research on flavonoids in *Ginkgo biloba* leaf(银杏叶黄酮研究进展)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), 36(6):110-115
- Feng H(冯慧), Wang JH(王建红), Wang ML(王茂良), et al. 2007. Study on genetic transformation of chalcone synthase genes in *Petunia*(矮牵牛遗传转化查耳酮合酶基因的研究)[J]. *J Tianjin Agric Univ*(天津农学院学报), 14(2):9-12
- Ferrer JL, Jez JM, Bowman ME, et al. 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis[J]. *Nat Struct Biol*, 6(8):775-784
- Fritz K, Hermann R, Erich F, et al. 1983. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80(9):2 591-2 593
- Gao W(高炜), Youfei Z, Slusser JR, et al. 2004. Effects of supplementary ultraviolet-B irradiance on maize yield and qualities; a field experiment[J]. *Photochem Photobiol*, 80:127-131
- Hu K(胡可), Meng L(孟丽), Han KT(韩科厅), et al. 2009. Isolation and expression analysis of key genes involved in anthocyanin biosynthesis of *Cineraria*(瓜叶菊花青素合成关键结构基因的分离及表达分析)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 36(7):1 013-1 022
- Hu ZH(胡芝华), Qin P(钦佩). 1998. Anti-inflammatory activity of topically applied total flavonoids of *Spartina alterniflora* Loisel *in vivo*(互花米草总黄酮局部用药的抗炎作用)[J]. *J Plant Res Environ*(植物资源与环境), 7(2):6-11.
- Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, et al. 1995. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner[J]. *Plant Physiol*, 108:39-46
- Li CX(李传勋), Zhou Q(周琴), Gao GY(高广猷), et al. 2001. Effects of *Ginkgo biloba* leaf flavonoids on blood lipid level in high lipid rats(银杏叶黄酮对高血脂大鼠血脂水平的影响)[J]. *J Dalian Med Univ*(大连医科大学学报), 23(3):179-180
- Li WD(李卫东), Liang HZ(梁慧珍), Lu WG(卢为国), et al. 2004. Effects of eco-physiological factors on isoflavone contents in soybean seeds(大豆籽粒异黄酮含量与生态因子相关关系的研究)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 37(10):1 458-1 463
- Massimiliano T, Carlotta G, Patrizia P, et al. 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress[J]. *New Phytologist*, 163(3):547-561
- Rhonda L. Feinbaum Gisela S, Frederick MA. 1991. High intensity and blue light regulated expression of chimeric chalcone synthase genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants[J]. *Mol Gen Genet*, 226(3):449-456
- Shelagh RM, Geoff JC, Susan R, et al. 2001. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols[J]. *Nat Biotech*, 19:470-474
- Shao L(邵莉), Li Y(李毅), Yang MZ(杨美珠), et al. 1996. Gene expression of Chalcone Synthase-A(CHSA) in flower colour alterations and male sterility in transgenic *Petunia*(查尔酮合酶基因对转基因植物花色和育性的影响)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 38(7):517-524
- Shomura Y, Torayama I, Suh DY, et al. 2005. Crystal structure of stilbene synthase from *Arachis hypogaea*[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 60:803-806
- Stefan M, Axel M. 2005. Flavones and avone synthases[J]. *Phytochemistry*, 66:2 399-2 407
- Vander Krol AR, Mur LA, Beld M, et al. 1990. Flavonoid genes in *Petunia*; addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression[J]. *Plant Cell*, 2(4):291-299
- Xu WY(徐文燕), Gao WW(高微微), He CN(何春年). 2006. The influences of environmental factors on flavonoid biosynthesis(环境因子对植物黄酮类化合物生物合成的影响)[J]. *World Sci Tech-Modernization Trad Chin Med*(世界科学技术—中医药现代化), 8(6):68-72
- Zeng M(曾明), Zhang HM(张汉明), Zheng SQ(郑水庆), et al. 1997. Ontogenetic chemical changes of the active constituents in *Gegen*(*Pueraria lobata*)(野葛中活性成分的动态研究)[J]. *Academic J Second Military Med Univ*(第二军医大学学报), 18(2):150-152
- Zhang P(张萍), Chen GS(陈国神). 2008. Advances in studies on type III polyketide synthases from plants(植物 III 型聚酮合酶的研究进展)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), 39(2):309-313
- Zhao WL(赵万苓), Jiang SP(姜世平), Fu XS(付新生), et al. 2006. Introduction of Chalcone Synthase-A(CHSA) Gene into *Sninningia speciosa* via *Agrobacterium*-mediated transformation(利用农杆菌介导法将查尔酮合酶基因导入大岩桐)[J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种), 4(1):45-48