

网络出版时间:2015-06-10 08:40

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.07.020

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150610.0840.020.html

红花查尔酮异构酶基因全长 cDNA 的 克隆及表达分析

刘秀明^{a,b}, 杨文婷^{a,b}, 张雪萌^b, 焦重达^b, 姚娜^a,
杨美英^b, 官丽莉^a, 李海燕^{a,b}, 李校堃^a

(吉林农业大学 a 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, b 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

[摘要] 【目的】克隆红花(*Carthamus tinctorius* L.)黄酮合成途径中的关键酶查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)基因的全长序列, 研究其组织表达特异性, 为红花代谢调控研究提供参考。【方法】利用 RT-PCR 技术克隆 CHI 基因的 cDNA 全长, 并对其全长基因进行生物信息学分析; 构建系统发育树, 研究其与相似序列的同源性; 利用实时荧光定量 PCR 方法, 分析 CHI 基因在红花不同开花时期的表达量。【结果】CHI 基因全长 1 161 bp, 开放阅读框长 654 bp, 编码 217 个氨基酸, 理论分子质量约为 23.14 ku, 等电点为 5.67, 序列含有典型的加尾信号序列 AATAA 和 Poly(A)。系统发育树表明, 该基因与其他物种 CHI 基因具有较高的同源性, 其中与青木香的同源性最高, 达到 82%。实时荧光定量 PCR 结果表明, CHI 基因在红花花蕾期的表达量最高。【结论】克隆得到了红花 CHI 基因, 其在红花花蕾期的表达量最高。

[关键词] 红花; 查尔酮异构酶; cDNA 克隆; real-time PCR

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)07-0201-06

Cloning and expression of Chalcone isomerase gene cDNA of *Carthamus tinctorius*

LIU Xiu-ming^{a,b}, YANG Wen-ting^{a,b}, ZHANG Xue-meng^b, JIAO Zhong-da^b,
YAO Na^a, YANG Mei-ying^b, GUAN Li-li^a, LI Hai-yan^{a,b}, LI Xiao-kun^a

(a Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development,

b College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】This study cloned full-length of Chalcone isomerase (CHI) gene in flavonoids biosynthesis from *Carthamus tinctorius* and investigated tissue expression specificity to provide reference for the research of *Carthamus tinctorius* metabolic regulation. 【Method】The full-length cDNA of CHI gene from *Carthamus tinctorius* was cloned using RT-PCR and analyzed using the bioinformatics methods. Phylogenetic tree was constructed for studying homology with similar sequences and the expression at different flowering periods was analyzed by real-time PCR. 【Result】The full-length cDNA of CHI gene was 1 161 bp with an opening reading frame (ORF) of 654 bp encoding 217 amino acids. The putative protein of CHI gene had a molecular weight of 23.14 ku and a theoretical pI of 5.67, containing typical AATAA tail signal sequence and Poly(A). Genealogical tree showed that CHI gene had high homology with other species and

[收稿日期] 2014-01-10

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863)项目(2011AA100606); 国家自然科学基金项目(31101172, 31201237); 吉林省科技厅中青年科技领军人才及优秀创新团队项目(20111815); 教育部博士点基金项目(20122223120002)

[作者简介] 刘秀明(1981—), 女, 吉林松原人, 实验师, 主要从事植物生物反应器研究。E-mail: xiuming1211@163.com

[通信作者] 李海燕(1971—), 女, 吉林舒兰人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物抗逆与生物反应器研究。E-mail: hyl199@163.com

the highest value was 82% with *Saussurea medusa*. Real-time PCR results indicated that relative expression of *CHI* gene was highest in bud stage. 【Conclusion】 *CHI* gene was cloned successfully from *Carthamus tinctorius* flower, which had highest expression in *Carthamus tinctorius* bud stage.

Key words: *Carthamus tinctorius*; Chalcone isomerase; cDNA cloning; real-time PCR

红花(*Carthamus tinctorius* L.)属菊科,为一年生草本植物。红花具有活血通经,去瘀疗伤,宣毒透疹等功效,其主要有效成分为红花黄色素和红花红色素^[1]。红花黄色素为红花中多种水溶性查尔酮成分的混合物,是黄酮化合物中重要的一类,不但是很有价值的食用色素,而且具有活血通络、消炎镇痛等功效,在血管性疾病、高血压、糖尿病并发症等方面亦有重要疗效^[2]。查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI; EC5. 5. 1. 6)是植物黄酮化合物合成途径中的关键酶之一^[3-4],其在黄酮化合物合成中将查尔酮异构化生成槲皮素^[5]。因此,超表达查尔酮异构酶基因,可以提高红花黄酮化合物的含量,为大量生产红花黄色素提供了可能。目前,国内外关于查尔酮异构酶的研究报道较多,主要集中在葫芦巴^[6]、青木香属^[7]、苜蓿^[8]、水稻^[9]、柑橘^[10]、桑树^[11]、金花茶^[12]、水仙^[13]、花生^[14]等多种作物上,而有关红花中查尔酮异构酶基因的克隆及表达分析尚未见报道。本研究克隆获得了红花中的 *CHI* 基因,并对其进行生物信息学分析,以期为提高红花中黄酮化合物的含量及红花代谢调控研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 红花(*Carthamus tinctorius* L.)“吉红”早熟品种种子购自新疆红花缘科技有限公司。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂盒(RP3301)、反转

录试剂盒(RP6601)购自北京百泰克生物技术有限公司;克隆所用载体 pEASY-T1 Simple Cloning Kit (CT111-01)购自北京全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自爱思进生物技术有限公司;race 试剂盒购自罗氏公司;荧光定量试剂盒(RR420A)购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 红花花瓣 RNA 提取及第一链 cDNA 的合成 选取红花盛花期花瓣,迅速放于液氮中,用锡箔纸包好后于-80 ℃保存备用。RNA 提取按照试剂盒操作说明进行,提取的 RNA 用核酸检测仪检测其纯度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。RNA 于-80 ℃保存备用。按照反转录试剂盒的操作说明,进行 cDNA 的反转录,反转录后的 cDNA 保存于-20 ℃冰箱中备用。

1.2.2 *CHI* 基因的克隆 根据吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心实验室红花花瓣 454 测序结果中挑选的候选基因,设计特异性引物,验证 *CHI* 基因的中间片段。根据验证的 *CHI* 基因中间片段,以红花 cDNA 为模板,设计引物进行全长基因克隆,所用引物序列见表 1。PCR 反应体系为:cDNA 1 μL, dNTP Mixture 8 μL, 10× LA Buffer 5 μL, Primer F(10 μmol/L) 1 μL, Primer R(10 μmol/L) 1 μL, LA Taq 0. 5 μL, ddH₂O 33. 5 μL, 总体积 50 μL。PCR 反应程序为:95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。

表 1 用于红花 *CHI* 基因克隆的特异性引物
Table 1 Specific primers for cloning of *CHI* gene

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'→3')	用途 Usage
SfCHI 1	F: ACACCATTCTTCCCGATCAC R: GGGACCTATACCGATGCGA	<i>CHI</i> 基因中间片段验证 Clone of <i>CHI</i> fragment
SfCHI 2	F: GGAATCTGCATCGGTATAGGTC R: GATGGACTCCGTCCACTTCTAC	<i>CHI</i> 基因 3' race 克隆 Clone of <i>CHI</i> 3' race
SfCHI 3	F: CGTTAAGTGGAAGGGCAAAA R: TCGCAACGCACATTTTAGAC	<i>CHI</i> 基因 5' race 克隆 Clone of <i>CHI</i> 5' race
SfCHI 4	F: CGGAAGTGCAATTACCATG R: CTCGTGAAACTCCTGTTTCT	<i>CHI</i> 基因全长验证 cDNA of <i>CHI</i> gene
SfCHI 5	F: AAGATACTTGGCAATGGTTGCG R: CGGTATGCAACATGCCGAA	荧光定量引物 Primer of real-time
18S	F: GAGAAACGGCTACCACATCCAA R: TCGTTTGAGCCCGGTATTGTTA	扩增内参基因 Internal genes

1.2.3 PCR 产物的克隆与序列分析 将扩增出全长片段的 *CHI* 基因 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电

泳上检测,用胶回收试剂盒回收目的片段,将其连接到 pEASY-T1 Simple 载体上,进行蓝白斑筛选,菌液 PCR 鉴定和酶切鉴定后,送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

将测得的序列利用 DNAMAN 软件进行核苷酸序列编辑和氨基酸序列推导,在 NCBI 网站上通过 BLAST 搜索同源性序列,利用 clustalW1.83 软件构建系统发育树,用 ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/>) 分析编码蛋白氨基酸序列的组成、相对分子质量、等电点等理化性质^[15]。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析 分别提取红花花蕾期、初花期、盛花期和衰落期花瓣 RNA,反转录成 cDNA 用于实时荧光定量分析。定量 PCR 反应体系为:SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2×)10 μL,上、下游引物各 0.4 μL,ROX Reference Dye II (50×),DNA 模板 2 μL,ddH₂O 7.2 μL,总体积 20 μL。反应程序为:95℃预变性 30 s,95℃变性 3 s,62℃退火,40 个循环。

2 结果与分析

2.1 红花花瓣总 RNA 的提取

核酸检测仪检测发现,提取的红花花瓣 RNA 质量浓度均在 1 000 ng/μL 左右。1% 琼脂糖凝胶电泳检测发现,提取的红花 RNA 有 28S 和 18S 2 条

清晰带,且 28S 条带的亮度约为 18S 的 2 倍(图 1)。说明 RNA 提取完整,无降解,可以满足后续试验需要。

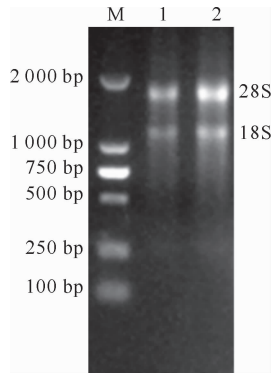


图 1 红花花瓣 RNA 的电泳结果

M. DL2000 Marker;1,2. 样品的 RNA

Fig.1 Total RNA agarose gel electrophoresis from safflower

M. DL2000 Marker;1,2. RNA

2.2 CHI 基因中间片段的获取及验证

根据红花花瓣 454 测序结果拼接比对,获得了 CHI 基因的中间片段序列,通过 RT-PCR 扩增出 209 bp 的中间片段(图 2A),经过胶回收后连接到克隆载体 pEASY-T1 Simple 上,进一步通过菌液 PCR(图 2B)和 EcoR I、Hand III 酶切鉴定(图 2C),证实测序结果正确。

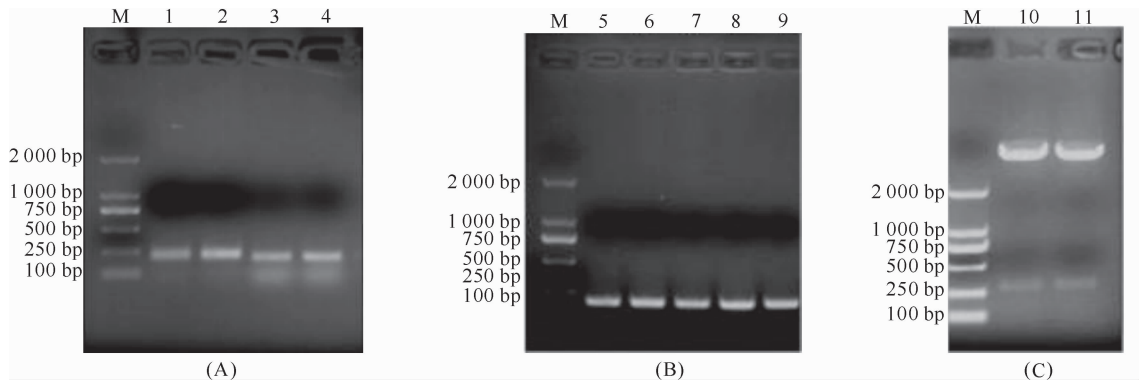


图 2 红花 CHI 基因中间片段的获取及鉴定

A. RT-PCR 扩增结果;B. 菌液 PCR 鉴定;C. 酶切鉴定;M. DL2000 Marker;1~4. RT-PCR;5~9. 菌液 PCR;10~11. 质粒酶切

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of CHI fragment

A. Results of RT-PCR;B. PCR of bacterium;C. Results of restriction;M. DL2000 Marker;

1—4. RT-PCR;5—9. PCR of bacterium;10—11. Restriction

2.3 CHI 基因 cDNA 克隆及序列分析

根据 CHI 基因 209 bp 的中间片段,以红花花瓣 cDNA 为模板,分别设计引物进行 3' race 和 5' race 克隆,扩增出 670 bp 的 3' 端序列和 636 bp 的 5' 端序列。将测序结果利用 DNAMAN 进行拼接,得到红花 CHI 基因的全长 cDNA 片段(图 3)。图 3

显示,CHI 基因全长 cDNA 长度为 1 161 bp。序列分析表明,该基因的开放阅读框长 654 bp,编码 217 个氨基酸(图 4),5' 非翻译区长度为 250 bp,3' 非翻译区长度为 257 bp,含有典型的加尾信号序列 AATAA 和 Poly(A)。该基因所编码的蛋白质理论分子质量约为 23.14 ku,等电点(pI)为 5.67。带负

电荷残基(Asp+Glu)共 23 个,总的带正电荷残基(Arg+Lys)共 20 个。将红花 *CHI* 基因在 NCBI 上进行序列比对分析,搜索到青木香(*Saussurea medusa*)、大丽花(*Dahlia pinnata*)、葡萄(*Vitis labrusca*)等 21 个物种的查尔酮异构酶基因,利用 clust-

alW1.83 软件进行多重序列比对,并构建系统发育树,结果(图 5)表明,红花查尔酮 *CHI* 基因与青木香的同源关系最近,达到 82%,与菊花和飞蓬的亲缘关系也较近,说明克隆得到的基因确为红花 *CHI* 基因。

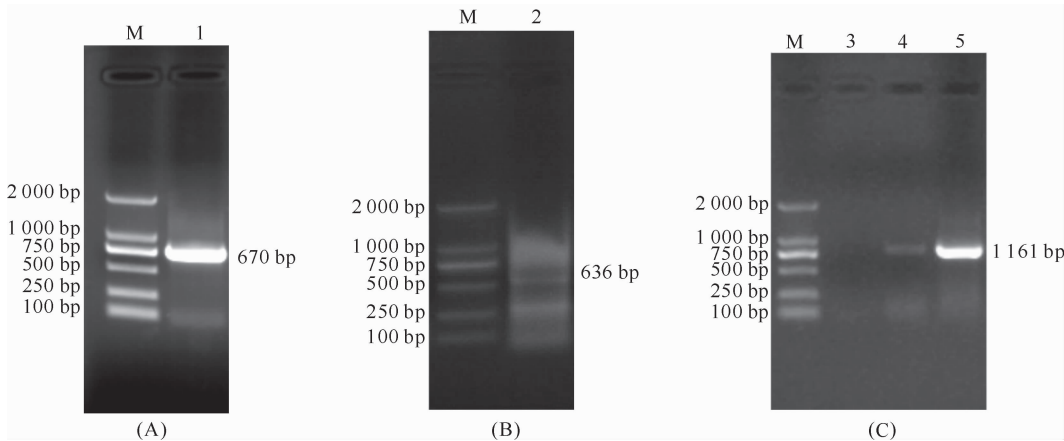


图 3 红花 *CHI* 基因全长序列的 cDNA 克隆
A. *CHI* 基因 3'端;B. *CHI* 基因 5'端;C. *CHI* 基因全长;M. DL2000 Marker;1. 3' race;2. 5' race;3~5. cDNA of *CHI*
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of cDNA of *CHI* gene
A. PCR product of *CHI* gene 3' race;B. PCR product of *CHI* gene 5' race;C. PCR product of *CHI* gene cDNA;
M. DL2000 Marker;1. 3' race;2. 5' race;3~5. cDNA of *CHI*

LFLAGAGVRGMEIEGKFVKLTGIGLYLEDKAIPSLAVKWKGKTAELMDSVHFYSDIINGP
FEKLAEVAMIVPLVGMQHAETLSKMCVAIWKAEGTYTDADSATIAKYLEAFKDKQKFSPGS
SILYTTTPDGLVMVSFVKDGIPETPIVVLENKKLGHALFESVIGKNGVSPEAKQSLASRLA
DLMN

图 4 红花 *CHI* 基因编码的氨基酸序列
Fig. 4 Amino acid sequence of *CHI* gene of safflower

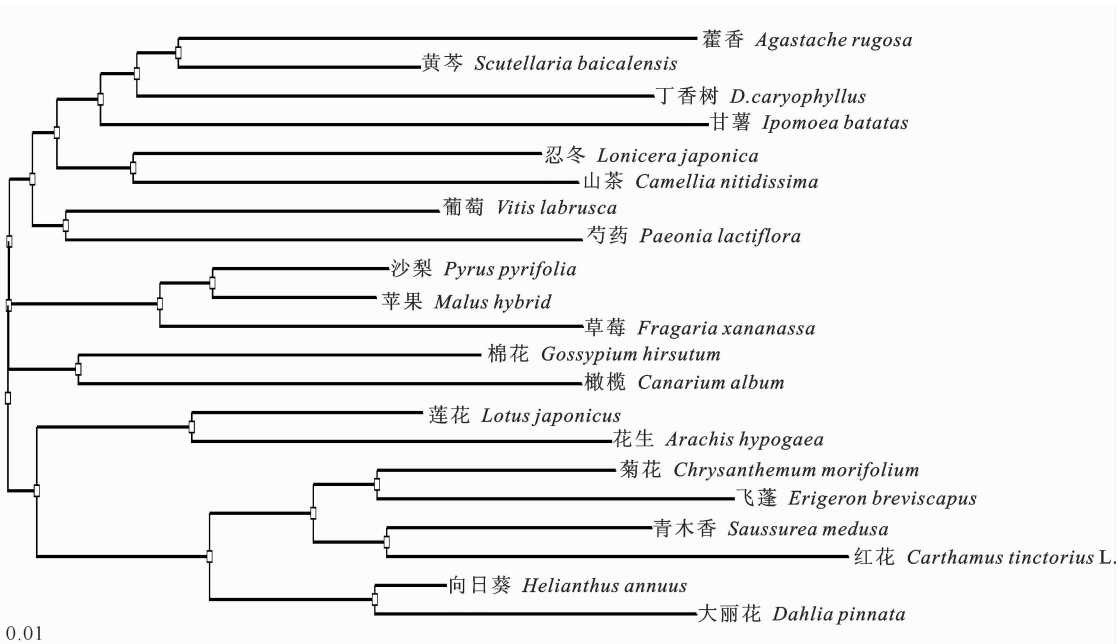


图 5 红花 *CHI* 基因与其他物种查尔酮异构酶基因的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of *CHI* genes of safflower and other species

2.4 *CHI* 基因在红花中的表达特征

采集红花不同开花时期的花瓣提取 RNA,反转录成 cDNA,以 18S 作为内参基因,采用实时荧光定量方法分析 *CHI* 基因在红花不同开花时期的表达量,结果见图 6。由图 6 可见,红花 *CHI* 基因在花蕾期的表达量最高;其次为衰落期,几乎是初花期表达量的 17 倍;表达量最低的是初花期。

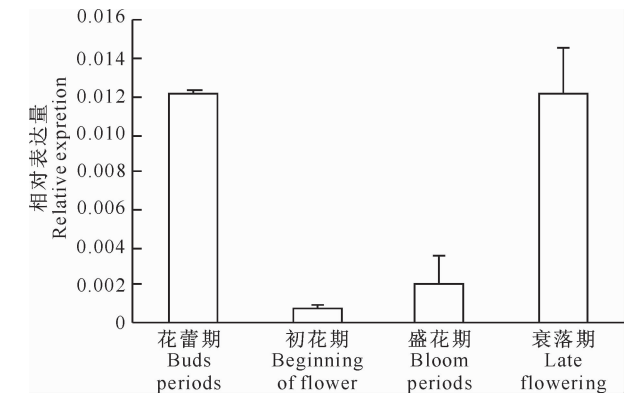


图 6 *CHI* 基因在红花不同开花时期的表达情况
Fig. 6 Expression levels of *CHI* gene at different flowering periods by real-time PCR

3 讨 论

CHI 基因是黄酮化合物合成途径中的关键酶^[16],其催化查尔酮异构化合成相应的黄酮^[17]。本研究通过 RT-PCR 技术克隆得到红花 *CHI* 基因的全长序列,且与其他物种 *CHI* 基因有较高的同源性。Park 等^[18]研究表明,利用发根系统使黄芩中 *CHI* 基因超表达可以提高黄酮化合物的含量。Qin 等^[6]克隆了葫芦巴 *CHI* 基因并在拟南芥突变体中表达,发现转化拟南芥植株的异黄酮含量比野生型拟南芥有较大提高。Zhang 等^[19]证实,*CHI* 基因在黄酮化合物合成过程中具有重要的作用,甘草 *CHI* 基因在甘草发根中过量表达可明显提高黄酮含量,这与 *CHI* 基因活性与转录水平的提高直接相关。Li 等^[7]的试验证实,超表达青木香 *CHI* 基因是提高黄酮化合物产量的一个有效方法。

CHI 基因存在组织表达特异性,不同组织部位表达不同。银杏^[17] *CHI* 基因主要在叶片中表达,促进黄酮化合物积累合成,这与银杏 *CHI* 基因启动子区域功能是相关的。而巨峰葡萄^[20] *CHI* 基因在幼叶和幼根中都有表达,且在根中的表达受温度诱导。本研究克隆的 *CHI* 基因在红花花蕾期表达量最高,表明在花蕾期黄酮化合物的含量可能最高,这为后期研究该基因的超表达提供了理论依据。

4 结 论

从红花中克隆得到了 *CHI* 基因的中间片段,进而获得其全长 cDNA 序列,通过对基因全长序列的生物信息学分析及比对发现,其序列中含有典型的加尾信号序列 AATAA 和 Poly(A),且与其他物种的 *CHI* 基因具有较高的同源性。Real-time PCR 结果表明,*CHI* 基因在红花花蕾期的表达量最高,说明该基因相关的黄酮化合物可能在花蕾期积累最多。

[参考文献]

[1] 王岩军.红花的组织培养及基因工程研究进展 [J]. 新疆农业科学,2008,45(S1):237-241.
Wang Y J. Advance of research on tissue culture and gene engineering of safflower [J]. Xinjiang Agricultural Sciences,2008, 45(S1):237-241. (in Chinese)

[2] 田 兰,吴桂荣,王 岩.红花黄色素研究进展 [J]. 西北药学杂志,2007,22(4):218-220.
Tian L, Wu G R, Wang Y. The progress of safflower yellow [J]. Northwest Pharmaceutical Journal,2007,22(4):218-220. (in Chinese)

[3] 雒晓鹏,白悦辰,高 飞,等.金荞麦查尔酮异构酶的基因克隆及其花期表达与黄酮量分析 [J]. 中草药,2013,44(11):1481-1485.
Luo X P, Bai Y C, Gao F, et al. Gene cloning and expression characterization of chalcone isomerase from *Fagopyrum dibotrys* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2013,44(11): 1481-1485. (in Chinese)

[4] 李 莉,孙 欣,马君兰,等.异黄酮合成代谢调控关键酶 CHS、CHI 的特性与研究前景 [J]. 大豆科学,2007,26(5): 762-765.
Li L, Sun X, Ma J L, et al. Progress on key enzymes CHS, CHI of isoflavones synthesize [J]. Soybean Science, 2007, 26(5): 762-765. (in Chinese)

[5] Yuan Y, Ma X H, Shi Y M, et al. Isolation and expression analysis of six putative structural genes involved in anthocyanin biosynthesis in *Tulipa fosteriana* [J]. Scientia Horticulturae, 2013,153:93-102.

[6] Qin J C, Zhu L, Gao M J. Cloning and functional characterization of a chalcone isomerase from *Trigonella foenum-graecum* L. [J]. Planta Med,2011,77(7):765-770.

[7] Li F, Jin Z, Qu W, et al. Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco [J]. Plant Physiol Biochem, 2006, 44(7/8/9): 455-461.

[8] Hur S, Newby Z E, Bruice T C. Transition state stabilization by general acid catalysis, water expulsion, and enzyme reorganization in *Medicago savita* chalcone isomerase [J]. Proc Natl Acad Sci,2004,101(9):2730-2735.

[9] Druka A,Kudrna D,Rostoks N,et al. Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): Physical,genetic and mutation mapping [J]. *Gene*,2003,302 (1/2):171-178.

[10] Wang Y,Li J,Xia R X. Expression of chalcone synthase and chalcone isomerase genes and accumulation of correspondi flavonoids during fruit maturation of Guoqing No. 4 satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marcow) [J]. *Scientia Horticulturæ*,2010,125:110-116.

[11] 刘长英,赵爱春,李 军,等. 桑树查尔酮异构酶基因的克隆与原核表达分析 [J]. *林业科学*,2013,49(2):39-45.
Liu C Y,Zhao A C,Li J,et al. Cloning and prokaryotic expression of chalcone isomerase gene from mulberry (*Morus alba*) [J]. *Scientia Silvæ Inicae*,2013,49(2):39-45. (in Chinese)

[12] 周兴文,李纪元,范正琪. 金花茶查尔酮异构酶基因全长克隆与表达的初步研究 [J]. *林业科学研究*,2012,25(1):93-99.
Zhou X W,Li J Y,Fan Z Q. Cloning and expression analysis of chalcone isomerase gene cDNA from *Camellianitidissima* [J]. *Forest Research*,2012,25(1):93-99. (in Chinese)

[13] 蔡雪玲,陈晓静,叶一江,等. 中国水仙查尔酮异构酶基因的克隆与表达分析 [J]. *热带作物学报*,2011,32(12):2287-2292.
Cai X L,Chen X J,Ye Y J,et al. Cloning and expression analysis of chalcone isomerase gene from *Narcissus tazetta* var. *Chinensis* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*,2011,32 (12):2287-2292. (in Chinese)

[14] 温世杰,邱金梅,刘海燕,等. 花生查尔酮异构酶基因的克隆及其序列分析 [J]. *热带作物学报*,2011,32(11):2084-2087.
Wen S J,Qiu J M,Liu H Y,et al. Cloning and sequence analysis of cDNA of chalcone isomerase gene from peanut (*Aras hypogaea* L.) [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*,2011, 32(11):2084-2087. (in Chinese)

[15] 吕娟娟,王进军,高新菊,等. 二斑叶螨乙酰辅酶 A 羧化酶基因全长 cDNA 克隆及其生物信息学分析 [J]. *中国农业科学*, 2013,46(8):1736-1744.
Lü J J,Wang J J,Gao X J,et al. Cloning and bioinformatics analysis of Acetyl-CoA carboxylase gene cDNA in *Tetranychus urticae* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*,2013,46 (8):1736-1744. (in Chinese)

[16] 颜 华,宋 云,李翊云,等. 查尔酮异构酶基因的克隆序列分析及在大肠杆菌中的表达 [J]. *植物学报*,1997,39(11):1030-1034.
Yan H,Song Y,Li Y Y,et al. Molecular cloning,sequencing of chalcone isomerasegene and its expression in *E. coli* [J]. *Acta Botanica Sinica*,1997,39(11):1030-1034. (in Chinese)

[17] Cheng H,Li L,Cheng S,et al. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (GbCHI) from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Cell Rep*,2011,30(1):49-62.

[18] Park N I,Xu H,Li X,et al. Enhancement of flavone levels through overexpression of chalcone isomerase in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Funct Integr Genomics*,2011,11(3):491-496.

[19] Zhang H C,Liu J M,Lu H Y,et al. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch bycombining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment [J]. *Plant Cell Rep*,2009,28 (8):1205-1213.

[20] 周 军,姚泉洪,彭日荷,等. 巨峰葡萄查尔酮异构酶基因克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*,2009,29(9):1723-1729.
Zhou J,Yao Q H,Peng R H,et al. Cloning and expression analysis of CHI of Kyoho grape by semi-quantity RT-PCR [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*,2009,29(9):1723-1729. (in Chinese)