

## 显齿蛇葡萄查耳酮合成酶基因 cDNA 克隆及蛋白质序列分析

付明, 魏麟, 余娟, 余小林

怀化学院 生命科学系, 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南 怀化 418008

**摘要:** 目的 对显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* 查耳酮合成酶 (CHS) 基因进行克隆及序列分析。方法 根据已经克隆的植物基因的保守序列设计一对引物, 以显齿蛇葡萄总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 的方法扩增 CHS 基因序列并连接到 pMD18-T Simple 载体上, 阳性克隆经 PCR 检测后进行测序。结果 得到一段 1 173 bp 的序列, 序列分析表明, 该片段编码 390 个氨基酸, 与其他高等植物 CHS 基因氨基酸序列同源性在 67.9% 以上。结论 首次从显齿蛇葡萄中克隆了 CHS 基因, 为有效利用该基因奠定了基础。

**关键词:** 显齿蛇葡萄; 查耳酮合成酶; 基因克隆; 序列分析; 保守序列

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)01-0085-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.016

## cDNA cloning and protein sequence analysis of chalcone synthase gene in leaves of *Ampelopsis grossedentata*

FU Ming, WEI Lin, YU Juan, YU Xiao-lin

Key Laboratory of Xiangxi Medicinal Plant and Ethnobotany of Hunan Higher Education, Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua 418008, China

**Abstract: Objective** To clone and analyze the chalcone synthase (CHS) gene sequence from the leaves of *Ampelopsis grossedentata*. **Methods** A pair of primers were designed on the basis of the conserved sequences of the cloned plant CHS gene. Using total RNA in the leaves of *A. grossedentata* as template, the sequence of CHS gene was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and then the gene was ligated with pMD18-T Simple vector. The positive clone was sequenced after the identification of clone by PCR. **Results** A fragment of 1 173 bp was cloned. The sequence analysis indicated that the fragment encoded 390 amino acids and shared sequence homology of more than 67.9% with CHS gene sequences from other higher plants. **Conclusion** It is the first report that a novel CHS gene is cloned from the leaves of *A. grossedentata*. This work lays a foundation for the effective application of CHS gene.

**Key words:** *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang; chalcone synthase; gene clone; sequence analysis; conserved sequence

显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang 系葡萄科蛇葡萄属的一种野生藤本植物, 为粤蛇葡萄 *A. cantoniensis* (Hook. Et Arn.) planch. 的变种。主要分布于湖南、湖北、广东、广西、江西、福建、云南、贵州等省区<sup>[1-3]</sup>。其味甘、淡、性凉, 具有清热解毒、祛风湿等功效, 用于治疗感冒发热、咽喉肿痛、黄疸型肝炎、疮疗等症, 已有数百年历史<sup>[2-4]</sup>。显齿蛇葡萄具有调节人体免疫功能、抗氧化、降低血糖、调血脂、保肝护肝、抗

血栓、抗病毒等作用, 对因烟酒过度、油腻过多等引起的咽喉炎、消化功能障碍等病症功效独特<sup>[5]</sup>。此外还有止咳祛痰、阻断艾滋病病毒感染等多种药理活性<sup>[6]</sup>。民间将其幼嫩茎叶经类似茶叶加工的方法制成“保健茶”, 可日常冲泡饮用, 清凉解渴, 是典型的药食两用植物, 其应用和开发价值引起了广大学者的关注。研究表明, 其有效成分主要是次生代谢产物黄酮及挥发油<sup>[2-14]</sup>, 其中黄酮的质量分数高达 45.52%<sup>[15-17]</sup>。植物体内通过莽草酸途径 (shikimic

收稿日期: 2012-09-03

基金项目: 湖南省“十二五”植物学重点建设学科资助 (2010212); 湖南省高校科技创新团队支持计划资助 (2010212); 怀化学院民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室资助项目 (SYSXM200902)

作者简介: 付明 (1966—), 女, 湖北荆门人, 副教授, 主要从事植物生物化学研究。E-mail: fm6988@163.com

网络出版时间: 2012-12-25 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121218.1013.002.html>

acid pathway) 和苯丙氨酸代谢途径 (phenylalanine metabolic pathway) 生成查耳酮, 再转化为黄酮类化合物。查耳酮合成酶 (chalconesynthase, CHS) 是黄酮类化合物生物合成的关键酶。近年来, 挥发油和黄酮类物质合成酶基因的克隆、分离、表达和调控成为研究热点。

鉴于显齿蛇葡萄 CHS 基因还未见报道, 本研究拟应用 RT-PCR 的方法克隆显齿蛇葡萄 CHS 基因片段, 并对其序列进行生物信息学分析, 为有效利用该基因及合理开发显齿蛇葡萄奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang 完整植株样品采集于湖南省八面山国家级自然保护区。由怀化学院伍贤进教授鉴定后摘取新鲜叶片用乙醇擦拭及焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水漂洗后, 立即放入液氮中保存, 回实验室后于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

克隆载体 pMD18-T Vector, TakaRa LA Taq 酶, M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒, Trizol 试剂, Gel Extraction Kit 试剂盒, 质粒提取试剂盒, DNA Marker, T4 DNA Ligase; 其他试剂均为分析纯。菌种 JM109 由本实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计与合成** 应用 Oligo 6 软件, 对比已报道的葡萄 CHS 基因的核苷酸序列 (X75969、EF192464、XM002276910), 进行引物设计。上游引物 F: 5'-ATGGTGTTCAGTTGCGGAAAT-3'; 下游引物 R: 5'-TCAGTGAGCCGCTGGTGCAG-3' 由生物工程 (上海) 有限公司合成。

**1.2.2 总 RNA 的提取** 叶片总 RNA 提取方法按照 Trizol 试剂说明书进行, 提取后进行电泳检测和纯度及浓度测定; 并于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.3 cDNA 链合成** 根据试剂盒说明书进行, 反转录产物分离纯化后置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.4 PCR 扩增** 在  $30\text{ }\mu\text{L}$  反应体系中, 加入反转录产物  $4\text{ }\mu\text{L}$ , PCR 缓冲液 ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus,  $2.5\text{ mmol/L}$ )  $15\text{ }\mu\text{L}$ , dNTP mixture ( $2.5\text{ mmol/L}$ )  $3\text{ }\mu\text{L}$ , F 和 R 引物 (均为  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ ) 各  $0.7\text{ }\mu\text{L}$ , TakaRa LA TaqDNA 聚合酶 ( $5\text{ U}/\mu\text{L}$ )  $0.3\text{ }\mu\text{L}$ , 加去离子水至  $30\text{ }\mu\text{L}$ , 混匀后扩增。反应条件为: 预变性  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ min}$ ,  $30$  个循环 ( $94\text{ }^{\circ}\text{C}$   $1\text{ min}$ ,  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $45\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $90\text{ s}$ ), 后延伸  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\text{ min}$ 。

**1.2.5 扩增片段的克隆、测序和序列分析** 对 PCR 产物进行回收, 连接载体 pMD 18-T Vector, 并转化 JM109 感受态细胞, 通过蓝白筛选后, 挑选白色菌落过夜培养, 提取质粒, PCR 方法鉴定重组子, 然后测序 (由上海生工生物工程公司完成)。采用 DNASTar 软件包分析与处理序列, 在 NCBI 网站上 Blast 比对及 BioEdit 软件分析, 并用 Mega 4 软件进行 UPMAG 聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取及检测

以显齿蛇葡萄叶片为材料提取的总 RNA, 经过琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带清晰 (图 1), 说明所提取的 RNA 完整性较好; 经核酸蛋白检测仪测得  $A_{260}/A_{280}$  平均值为 1.98, 表明 RNA 纯度较高。

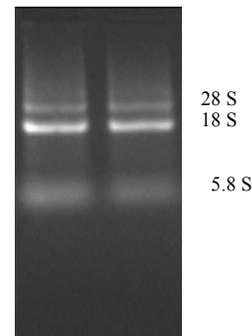
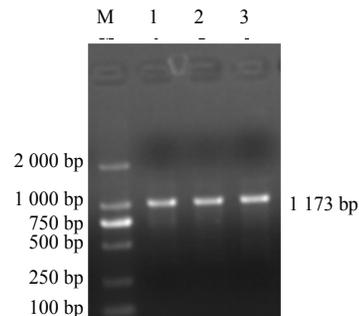


图 1 显齿蛇葡萄总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA from leaves of *A. grossedentata*

### 2.2 PCR 扩增

以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板, 用引物 F 和 R 进行 PCR 扩增。扩增产物经检测发现约在  $1\text{ }170\text{ bp}$  处有一条亮带 (图 2), 且上下



M-Marker 1~3 为显齿蛇葡萄 CHS 基因 PCR 扩增产物  
M-Marker 1—3-PCR amplification of CHG gene in leaves of *A. grossedentata*

图 2 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR product

无杂带，与推测的目的片段的大小一致。

### 2.3 阳性克隆的鉴定

将回收纯化的目的片段连接到 pMD18-T Simple 克隆载体上，转化 JM109，随机挑取阳性克隆，培养后提取质粒进行 PCR 扩增，经检测片段大小约为 1 173 bp (图 3)，与前面 PCR 结果一致，可进行测序。

### 2.4 序列分析

将重组 pMD18-T Simple 质粒进行测序，得到一段长度为 1 173 bp 的序列，含一个完整的开放阅读

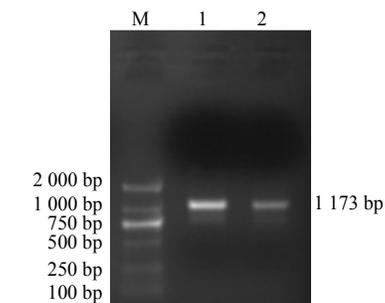
读框架(ORF)，共编码 390 个氨基酸(图 4)，BLAST 比对结果显示，该片段与其他近缘植物的 CHS 基因核苷酸序列的同源性在 90%以上，表明所克隆的 DNA 序列为显齿蛇葡萄的 CHS 基因序列。

### 2.5 显齿蛇葡萄 CHS 氨基酸序列基本特征的推导

利用 ExPASy 服务器在线软件对显齿蛇葡萄 CHS 进行理化性质分析，该蛋白编码一个含 390 个氨基酸残基的蛋白，分子式为 C<sub>1902</sub>H<sub>3044</sub>N<sub>512</sub>O<sub>566</sub>S<sub>20</sub>，其相对分子质量为 42 781.3，等电点预测为 6.18，为膜外蛋白。预测其二级结构，发现 α-螺旋占 44.62%，β-转角占 7.95%，无规卷曲占 30.77%，延伸链占 16.67%(图 5)。利用 SWISS-MODEL<sup>[18-20]</sup> 对其三级结构进行预测，结果见图 6。

### 2.6 显齿蛇葡萄 CHS 氨基酸序列的同源性及其亲缘关系分析

推导氨基酸序列比较结果表明，显齿蛇葡萄 CHS 与沙梨 (ADP09376.1)、桃 (AEJ88217)、西红柿 (NP001234033)、玉米 (NP001142246)、葛 (AFC87828)、虎杖 (AFD64563)、水仙 (AEN04070) 和圆叶牵牛 (AAB62587) CHS 分子的同源性分别



M-Marker 1~2 为 PCR 鉴定产物  
M-Marker 1-2-PCR identification products

图 3 阳性克隆的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of positive clones

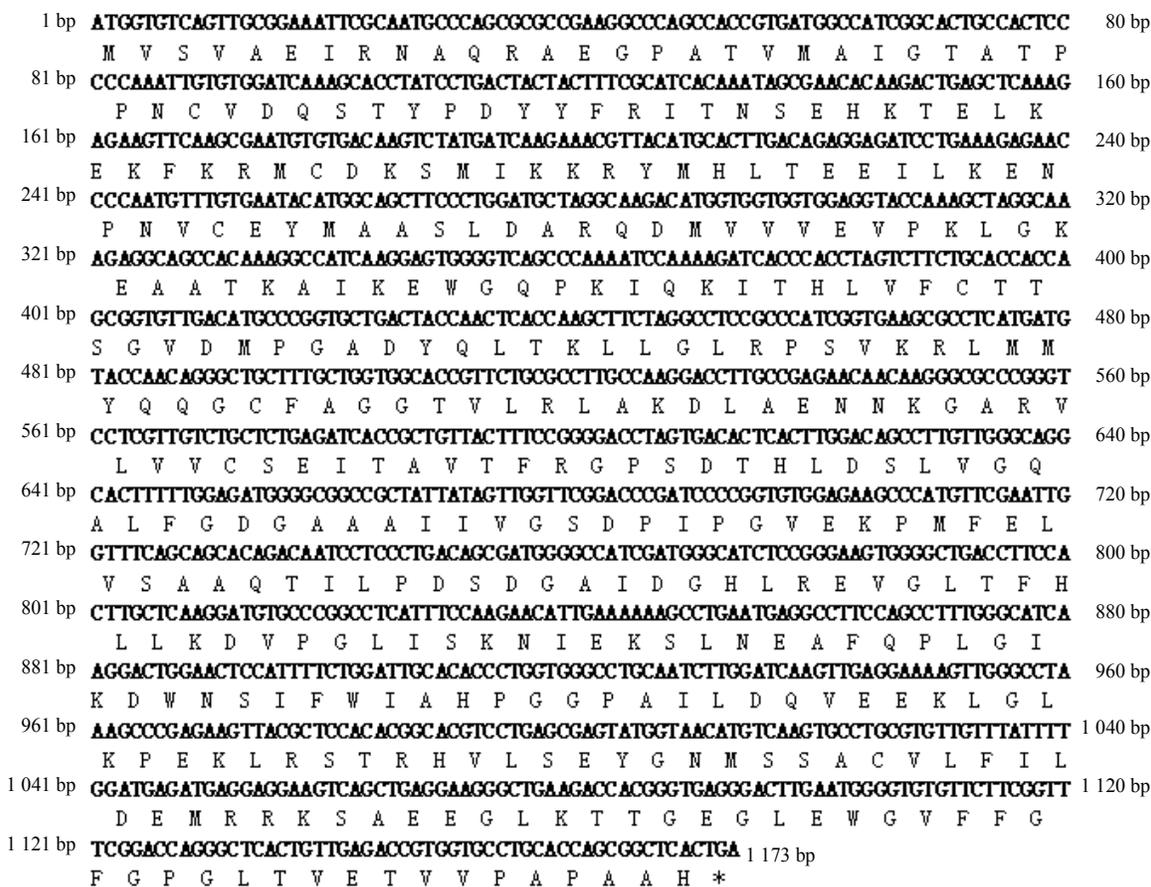


图 4 显齿蛇葡萄 CHS 基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of CHS gene from leaves of *A. grossedentata*

为 91.5%、90.5%、88.4%、83.1%、84.8%、81.8%、84.1%和 67.9%，表明 CHS 氨基酸序列具有较高的同源性，说明其在进化过程中，具有较高的保守性。将序列进行聚类分析，结果显示显齿蛇葡萄与沙梨、桃、西红柿的亲缘关系相对较近，而与圆叶牵牛亲缘关系相对较远（图 7）。

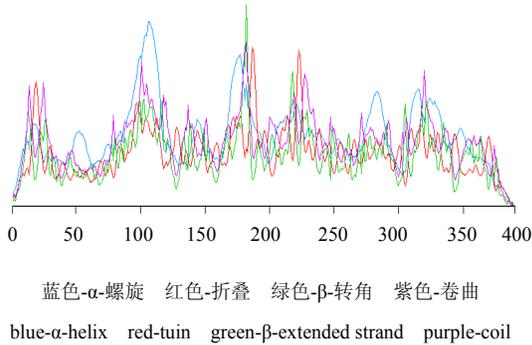


图 5 CHS 蛋白二级结构预测图

Fig. 5 Secondary structure prediction of CHS protein

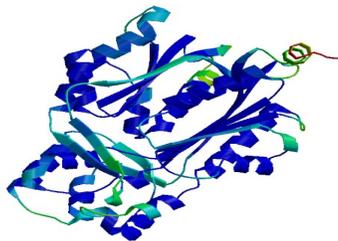


图 6 CHS 蛋白三级结构预测图

Fig. 6 Tertiary structure prediction of CHS protein

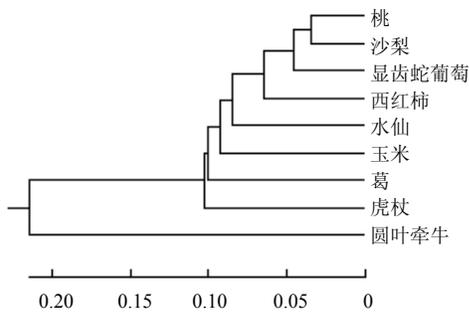


图 7 显齿蛇葡萄与其他植物的 CHS UPGMA 进化树  
Fig. 7 UPGMA dendrogram of CHS in *A. grossedentata* and other plants

### 3 讨论

CHS 在苯丙氨酸合成途径和异黄酮合成途径中发挥关键作用<sup>[21]</sup>，是黄酮类化合物合成途径的关键酶和限速酶。CHS 在植物中广泛存在，在很多生理生化活动中起着重要作用，是近年来植物生理生化和分子生物学研究的热点之一。作为黄酮类化合

物合成的关键酶和限速酶，其活性高低与量的多少决定着后续产物量的多少。随着植物黄酮类合成途径中相关酶的分离与鉴定，利用酶表达改变黄酮类物质的量是改变作物及中药品质的有效手段之一。

本研究利用 RT-PCR 技术首次克隆了显齿蛇葡萄 CHS 基因的全长 cDNA 序列。克隆的显齿蛇葡萄 CHS 基因的一个完整的 ORF，编码 390 个氨基酸。对推导的氨基酸序列的结构和功能进行生物信息学分析，发现显齿蛇葡萄 CHS 是 1 种膜外蛋白，没有信号肽序列，提示 CHS 在催化黄酮类代谢反应中产物合成的初始反应均在膜外进行。与其他植物的氨基酸序列进行比较，结果显示，显齿蛇葡萄 CHS 蛋白同其他植物 CHS 蛋白具有较高的相似性，说明 CHS 基因在进化过程中比较保守。这与其在植物生命活动过程中——黄酮类物质合成途径中所发挥的作用有关。

本研究首次成功克隆了显齿蛇葡萄的 CHS 基因 cDNA 序列，将为进一步构建过表达载体和遗传转化体系，为实现黄酮类主要成分在植株及细胞中高效表达及其生物合成遗传改良提供基因资源和理论基础，并为开展显齿蛇葡萄及类似以黄酮为主要活性成分植物的遗传改良、提高药材品质具有十分重要的理论意义和实践价值。

### 参考文献

- [1] 刘建新, 周天达. 藤茶的生药学研究 [J]. 中草药, 1999, 30(6): 459-463.
- [2] 熊皓平, 何国庆, 杨伟丽, 等. 显齿蛇葡萄生化成分分析 [J]. 中国食品学报, 2004, 4(3): 68-71.
- [3] 熊皓平. 显齿蛇葡萄生化成分分析及抑菌作用的研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2002.
- [4] 易 诚. 显齿蛇葡萄研究进展 [J]. 经济林研究, 2004, 22(3): 51-56.
- [5] 林淑英. 显齿蛇葡萄中二氢杨梅素的提取纯化及抗氧化活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2004.
- [6] 董倩倩, 陈立峰. 二氢杨梅素药理研究进展 [J]. 中草药, 2005, 3(5): 295-298.
- [7] Zhang Y S, Yong W L, Xin H P. Review on *Ampelopsis grossedentata* [J]. *Tea Rep*, 2001(1): 19-20.
- [8] 罗祖友, 付晓芳, 吴谋成. 藤茶的研究进展 [J]. 食品科学, 2005, 26(8): 513-516.
- [9] 张友胜, 杨伟丽, 崔 春. 显齿蛇葡萄化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(5): 402-403.
- [10] 夏慧玲, 胡居吾, 熊 伟, 等. 显齿蛇葡萄中二氢杨梅素的提取纯化 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(32): 133-135.

- [11] 易海燕, 何桂霞, 欧阳文, 等. 大孔吸附树脂分离纯化藤茶黄酮的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 74-77.
- [12] 熊 璞, 姚茂君, 肖凯军. 藤茶中二氢杨梅素的提取工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2009, 25(8): 907-910.
- [13] 胡远艳. 藤茶中双氢杨梅树皮素的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 157-158.
- [14] 何桂霞, 杜方麓, 杨伟丽, 等. 藤茶总黄酮清除氧自由基与抗脂质过氧化作用 [J]. 中药材, 2003, 26(5): 338-340.
- [15] 覃洁萍, 许学健, 董明娇. 广西藤茶中黄酮类成份的提取工艺研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(3): 196-197.
- [16] Wang Y, Ying L, Sun D, *et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from *Ampelopsis grossedentata* stems: Process optimization and antioxidant activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(10): 6856-6870.
- [17] Wang Y, Bian X, Park J, *et al.* Physicochemical properties, *in vitro* antioxidant activities and inhibitory potential against  $\alpha$ -glucosidase of polysaccharides from *Ampelopsis grossedentata* leaves and stems [J]. *Molecules*, 2011, 16(9): 7762-7772.
- [18] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195-201.
- [19] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [20] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2714-2723.
- [21] 蒋 明, 曹家树. 查尔酮合成酶基因 [J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(4): 525-529.

## 《中草药》杂志最新佳绩

《中草药》杂志在2011年荣获**第二届中国出版政府奖**(国家新闻出版行业的最高奖)基础上,2012年又获丰收,《中草药》杂志喜获国家自然科学基金重点学术期刊专项资助,并荣获“2012中国最具国际影响力学术期刊”。

2012年版《中国科技期刊引证报告》(核心板)2012年12月7日发布:《中草药》杂志2011年核心总被引频次6480,名列我国科技期刊第14位,中医学与中药学类期刊**第1名**;核心影响因子**0.978**,基金论文比0.75,权威因子2270.20;综合评价总分84.9,位列中医学与中药学类期刊第1名。连续8年(2005—2012年)荣获“百种中国杰出学术期刊”。

中国知网(CNKI)《中国学术期刊影响因子年报》2012年12月26日发布:《中草药》杂志总被引频次16314,影响因子1.481,基金论文比0.80,WEB下载量41.32万次。

感谢广大读者、作者、审稿人、编委和各级领导对《中草药》杂志的关心和支持!