

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

雒晓鹏, 白悦辰, 高 飞, 李成磊, 陈 惠, 吴 琦*

四川农业大学生命科学与理学院, 四川 雅安 625014

摘 要: 目的 获取金荞麦总黄酮合成途径的关键酶查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)基因的全长序列, 并进行序列分析; 对花期金荞麦 CHI 基因在各组织中的表达与总黄酮量进行分析。方法 利用同源克隆技术获得金荞麦查尔酮异构酶基因(FdCHI)的 cDNA 序列; 采用半定量 RT-PCR 对 CHI 表达量进行分析, 并采用 AlCl_3 法测量总黄酮量。结果 金荞麦 FdCHI 基因 cDNA 包含一个 750 bp 的 ORF, 编码 249 个氨基酸, 命名为 FdCHI。生物信息学分析表明该编码蛋白与其他植物 CHI 氨基酸序列同源率较高。FdCHI 在花期金荞麦不同组织中的表达量分析表明, 其表达量花>根>叶>茎, 总黄酮量为花>叶>茎>根。结论 在金荞麦中首次获得 CHI 基因的 cDNA 序列, 编码蛋白具有 CHI 同源蛋白的典型特征。FdCHI 基因在金荞麦茎、叶和花中的表达量与总黄酮量具有相关性, 但在根中表达量与总黄酮量相关性较小。

关键词: 金荞麦; 查尔酮异构酶; 基因克隆; 表达水平; 总黄酮

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)11-1481-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.023

Gene cloning and expression level of chalcone isomerase during florescence and content of flavonoids in *Fagopyrum dibotrys*

LUO Xiao-peng, BAI Yue-chen, GAO Fei, LI Cheng-lei, CHEN Hui, WU Qi

College of Life and Basic Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: Objective To clone and analyze the full-length cDNA of chalcone isomerase (CHI) gene from *Fagopyrum dibotrys* (FdCHI). To analyze the expression of CHI and the total flavonoids content during florescence of *F. dibotrys*. **Methods** The cDNA sequence of CHI was cloned by homology cloning from *F. dibotrys*. The expression of CHI was analyzed in the different tissues during florescence by semi-quantitative RT-PCR. The content of total flavonoids was measured by AlCl_3 method. **Results** The open reading frame (ORF) of FdCHI was 750 bp and encoded a protein with 249 amino acids. Bioinformantion analysis suggested that the amino acid sequence of FdCHI had the high homology with those in other plants. Gene expression analysis showed that FdCHI was highly expressed in the flowers, followed by the roots and leaves, while lower in the stems. The content of total flavonoids was the highest in the flowers then the leaves and stems, and the lowest was in the roots. **Conclusion** The cDNA sequence of FdCHI is firstly obtained from *F. dibotrys* and its coding protein has the typical characteristic of CHI homologous protein. The gene expression of FdCHI shows the same to the total flavonoids content in the stems, leaves, and flowers, but different in the roots of *F. dibotrys*.

Key words: *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara; chalcone isomerase; gene cloning; expression level; total flavonoids

金荞麦 *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara 是蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 *Fagopyrum* Mill. 多年生草本植物, 广泛分布于南亚各国, 我国主要分布在西南地区^[1-2]。《本草纲目》中记载金荞麦性寒、味酸苦, 具有清热解毒、祛风利湿的功效。现代医学研究表明, 金荞麦块根提取物具有抑制肿瘤细胞和消炎抗菌等作用^[2]。更重要的是金荞麦含有丰富的黄酮类化合物, 如原矢车菊素、槲皮素等成分, 具有调脂降糖和镇咳

祛痰等多种药理作用^[3-4]。金荞麦还是一种药用与饲料用兼备的资源植物, 除其块根能入药, 子粒具有独特的营养价值和保健功能外, 茎叶也是高产优质的牧草资源^[5]。随着对金荞麦价值的不断认识, 需求量也大大增加, 过度的采挖已使野生金荞麦资源急剧减少, 我国已将其列为国家二级保护植物。

植物黄酮由苯丙烷类代谢途径合成, 该途径起始于苯丙氨酸解氨酶催化 *L*-Phe 脱氨, 并在多种酶

收稿日期: 2013-02-27

作者简介: 雒晓鹏 (1991—), 男, 生物科学专业学生。E-mail: luoxiaopenglxp@163.com

*通信作者 吴 琦 E-mail: wuqiwig@yahoo.cn

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.1113.001.html>

参与下逐步经环化、异构、修饰和糖基化等步骤,形成种类繁多的黄酮类化合物^[6]。查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI; EC 5.5.1.6)催化黄酮母环成环之后的第一个异构反应,是将1分子的查尔酮异构为1分子的黄烷酮^[7]。植物中,CHI与查尔酮合酶(CHS)一同控制着进入黄酮合成的代谢流^[8],是黄酮生物合成量的瓶颈和关键节点^[9]。目前,CHI的cDNA序列已在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.、大豆 *Glycine max* (L.) Merr.、银杏 *Ginkgo biloba* L.、番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill. (*Solanum lycopersicum* L.) 和葡萄 *Vitis vinifera* L. 等多种植物中得到克隆^[10],各植物中CHI酶学特征和表达调控机制间的差异,正是引起黄酮类物质种类和质量分数差异的主要原因。降低CHI的活性就会导致植物中查尔酮大量积累,总黄酮量显著降低^[11-12]。因此,了解克隆金荞麦查尔酮异构酶(FdCHI)基因表达与黄酮调控之间的关系,对进一步提高金荞麦的药用价值和促进其野生资源保护具有重要意义。

1 材料及主要试剂

2012年10月中旬样品采集于雅安老板山,经四川农业大学植物学教研室袁明副教授鉴定为金荞麦 *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara。大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 由生物化学与分子生物学实验室保存。RNA提取试剂植物 RNA_{out} 试剂盒(天泽基因公司)、RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司)、DNA 聚合酶、PCR Master Mix (Bio Med 公司)、T4 DNA 连接酶,其他化学药品均为进口或国产分析纯试剂。

2 方法

2.1 金荞麦总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

按照天泽基因公司“植物 RNA_{out} 试剂盒”说明书,分别提取花期金荞麦根、茎、叶和花的总 RNA。利用 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司)试剂盒以 Oligo-dT 和 Random Hexamer Primer 为引物,进行 cDNA 的反转录,将合成的 cDNA 第一链保存于-20℃冰箱中,备用。

2.2 FdCHI 基因 cDNA 序列的克隆

参照苦荞 FdCHI 基因 cDNA 全长序列,设计并合成一对特异性引物 CHIf 和 CHIr,以合成的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,回收 PCR 片段,T 载体克隆,选择3个菌落 PCR 检测为阳性的克隆子,送 Invitrogen 基因有限公司测序。

2.3 FdCHI 基因核酸与蛋白序列分析

所得测序结果使用 NCBI 在线工具 BLAST 进行序列比对。采用 Expasy 网站 PROSITE 数据库进行结构域和生物学活性位点识别。采用 Clustalx1.81 软件进行植物 CHI 蛋白氨基酸序列的多重序列比对,采用 MEGA 4.1 软件经邻接法构建系统发育进化树,并以 Bootstrap 对进化树构建结果进行验证。采用 SOPMA (<http://pbil.ibcp.fr>) 对 FdCHI 蛋白质二级结构进行预测;利用 Swiss-Model 在线同源建模软件进行蛋白质三级结构同源建模。采用 Expasy 网站在线工具 ProtParam 对 FdCHI 蛋白进行理化性质分析。

2.4 花期 FdCHI 的半定量 RT-PCR

设计一对特异引物 CHIsmf 和 CHIsmr,以金荞麦持家基因组蛋白编码基因 H3 为内参(表1),对花期 FdCHI 基因进行半定量 RT-PCR,PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测,利用软件 Quantity one (version 4.6.2) 分析,计算光密度值。

表1 引物序列及用途

Table 1 Primer sequences and application

引物名称	引物序列	引物用途
CHIf	5'-CACAGACACTACATTCACCTACCGACA-3'	FdCHI cDNA
CHIr	5'-AAATGCCAAATCACATTGAATCATTC-3'	扩增
CHIsmf	5'-TCCATAGCCATTGAGGATTCGTCT-3'	FdCHI 半定量
CHIsmr	5'-CGTTTTCAATCACAGCAACATCAGC-3'	PCR 引物
H3-semf	5'-GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG-3'	H3 半定量 PCR
H3-semr	5'-CCAACAAGGTATGCCTCAGC-3'	引物

2.5 花期金荞麦总黄酮的提取及定量测定

采用 Liu 等^[13]的方法略作改动提取金荞麦花期各组织总黄酮。采用 AlCl₃ 法^[14],建立芦丁标准曲线,测定总黄酮量。

3 结果与分析

3.1 金荞麦总 RNA 的提取

提取的金荞麦总 RNA 电泳结果显示,28S 及 18S rRNA 两条主带清晰可见,见图1。二者条带亮度比大致符合2:1,且不含有 DNA 及蛋白质杂带,可用于 RT-PCR 制备 cDNA 第一链。

3.2 FdCHI 基因 cDNA 序列的克隆

以合成的 cDNA 第一链为模板,PCR 扩增出一条大小约为 800 bp 的特异条带,见图2。测序结果经 Blast 比对显示,FdCHI 与 Genbank 中甜荞 FeCHI

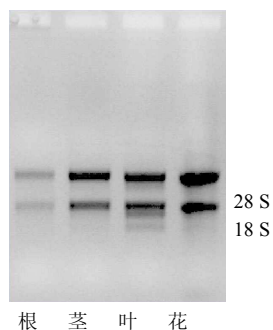


图 1 金荞麦总 RNA 的提取
Fig. 1 Total RNA extracted from *F. ditorys*

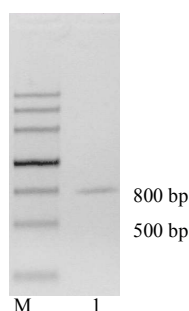


图 2 FdCHI 的克隆
Fig. 2 FdCHI cloning

(ADT63063) 和苦荞 FtCHI (AEF30419) 相似度最高, 分别为 97% 和 92%, 与其他植物 CHI 的相似度为 53%~66%。表明获得了编码 FdCHI 基因完整 ORF 的 cDNA 序列。

3.3 FdCHI 编码蛋白的序列分析

3.3.1 FdCHI 编码的氨基酸序列 利用 Dnaman 软件, 对 FdCHI 的 ORF 序列进行翻译, 其编码的氨基酸序列为 MASSITVSSIAIEDFVFPPSVRPPATDKSF FLGGAGVRGLTINGTFISFTAIGIYFEETAVASLAD KWKGKSATELTESVEFFRDVVTGQFEKFIQITML KPLTGAQYSEKVSENCVAIWKAIGIYSEAEKAIE KFTEIFKEQNFPPGTSILFKQCAPKSLRIAFIGKHD AIPEADVAVIENGPLSQSVLESIIIGKNGVSPAAKES LAVRLHELLNPAKVANGAEAEATKVANGAEAEV TKENGVEIKE (每个字母均对应相应氨基酸)。

3.3.2 FdCHI 的进化分析 20 种植物来源的 CHI 蛋白序列经 Clustalx 1.81 软件多序列比对后表明, 用于比对的序列相似性总体较高 (48.15%~87.11%), 且能够比较容易地鉴定出保守区域。比对结果经 MEGA 4.0 软件邻接 (Neighbour Joining, NJ) 法构建系统发育树, 结果见图 3。由图可知,

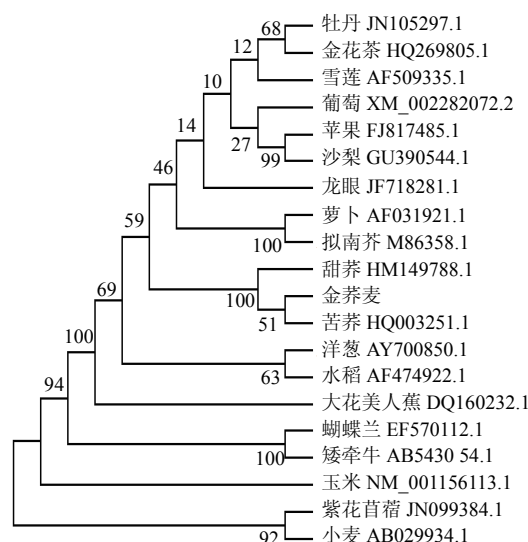


图 3 FdCHI 与其他植物来源 CHI 蛋白序列的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of FdCHI and other plants

十字花科的萝卜和拟南芥进化关系较近, 单子叶洋葱和水稻构成一个分支, 表明它们进化关系比较近。金荞麦和苦荞同源关系最近, 与甜芥次之。

3.3.3 FdCHI 的生物信息学分析 SOPMA 预测表明, FdCHI 二级结构以 α -螺旋与无规则卷曲为主, 其中 α -螺旋为 46.59%, β -转角为 8.03%, 无规则卷曲为 27.31%, 延伸链为 18.07%。Swiss-Model 对 FdCHI 建模表明, 该蛋白为一个单体蛋白, 其中保守氨基酸 T⁴⁸、Y¹⁰⁶ 和 N¹¹³ 构成活性中心^[15], 表明 FdCHI 可能与拟南芥 CHI 有相似的催化机制。ProtParam 分析表明, FdCHI 蛋白分子式为 C₁₂₀₉H₁₉₀₇N₃₀₅O₃₇₁S₄, 相对分子质量为 2.678×10^4 , 理论 pI 值为 4.97。不稳定常数 II (instability index II) 为 30.58, 在酵母和大肠杆菌体内半衰期分别超过 20 h 和 10 h, 为稳定型蛋白。

3.4 花期 FdCHI 半定量 RT-PCR 与总黄酮的测定

3.4.1 FdCHI 的半定量 RT-PCR 花期金荞麦不同部位 FdCHI 的半定量 RT-PCR 结果见图 4。经 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 gene/optical density of H3) 表示。分析表明, FdCHI 基因在根、茎、叶和花中均有表达, 具有组织特异性。其中花中表达量最高, 相对表达量为 66.16%; 根和叶中相

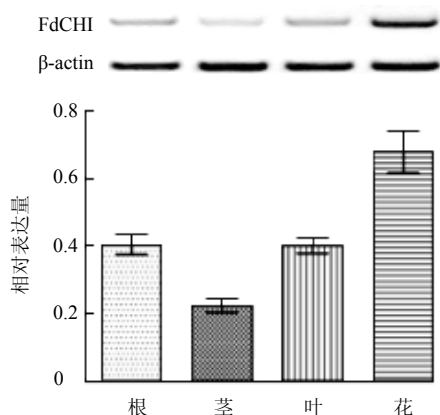


图4 花期 FdCHI 基因的半定量 RT-PCR 分析

Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR of FdCHI during florescence

对表达量分别为 41.7% 和 40.1%; 茎中表达量最低, 相对表达量仅为 23.2%。

3.4.2 总黄酮的测定 以芦丁质量浓度为横坐标 (X), 吸光度 (A) 值为纵坐标 (Y), 建立芦丁标准曲线, 回归方程为 $Y = 3.0148X + 0.0015$, $r = 0.9996$ 。金荞麦花期各个组织的黄酮量测定表明, 花中总黄酮量最高, 为 8.781%, 其次为叶和茎, 分别为 6.071% 和 1.851%, 根部的总黄酮量最低仅为 0.606%, 见图 5。可见, 总黄酮量与 CHI 的表达有一定的相关性, 但也具有差异。

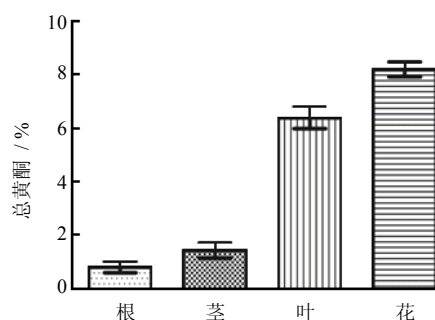


图5 花期金荞麦总黄酮的测定

Fig. 5 Determination of total flavonoids in *F. dibotrys* during florescence

4 讨论

本实验克隆所得 FdCHI 基因 cDNA 序列经测序及核酸、蛋白序列比对搜寻结果显示, FdCHI 蛋白序列与苦荞和甜荞相似度达 97% 和 92%。这说明金荞麦与苦荞的同源关系最近, 和甜荞次之, 与 Sharma 的观点一致^[16]。

植物中 CHI 的表达量与黄酮量密切相关:

Nishihara 等^[17]运用 RNAi 抑制烟草 CHI 的表达后发现花瓣中的黄酮类物质减少; 大麦和洋葱 CHI 基因缺失突变体的黄酮量急剧下降^[18]; 相反, 过量表达 CHI 或提高 CHI 酶的活性可以使植物中的黄酮量显著提高。在番茄中过表达 CHI 基因, 可使番茄果皮中黄酮量增加 76 倍^[19]; 在转基因烟草中 CHI 活性和总黄酮量正相关^[20]。本研究中, FdCHI 在金荞麦花、叶和茎的表达量与总黄酮量变化趋势一致, 表明这些组织中其表达可能与金荞麦总黄酮的合成和积累密切相关; 该基因在根中的表达量与总黄酮量变化趋势差异较大, 其原因可能与黄酮在金荞麦不同组织的转运相关^[6,21-22]。

近年来研究表明, 金荞麦籽粒含有丰富的生物类黄酮, 其质量分数接近苦荞, 且超过甜荞^[16], 可作为优质黄酮类物质的天然来源, 具有很高的经济价值^[23]。因此, 如能通过现代生物技术进一步提高黄酮类功效物质在金荞麦中的量, 将能够更深层次地挖掘金荞麦在保健品和功能食品方面的巨大潜力。

参考文献

- [1] 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] 刘光德, 李名扬, 祝钦泐, 等. 资源植物野生金荞麦的研究进展 [J]. 农业资源与环境科学, 2006, 22(10): 380-390.
- [3] 赵钢, 唐宇, 王安虎. 中国的荞麦资源及其药用价值 [J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(5): 39-40.
- [4] 吴清, 梁国鲁. 金荞麦野生资源的开发与利用 [J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(2): 27-28.
- [5] 唐华彬, 尹迪信, 罗红军, 等. 牧草作物金荞麦的引种比较试验 [J]. 贵州农业科学, 2007, 35(2): 51-53.
- [6] Grotewold E. *The Science of Flavonoids* [M]. Berlin: Springer, 2007.
- [7] 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.
- [8] Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 786-791.
- [9] 李琳玲, 程华, 许峰, 等. 植物查尔酮异构酶研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2008, 19(6): 935-937.
- [10] Joseph M J, Joseph P N. Reaction mechanism of chalcone isomerase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(2): 1361-1369.
- [11] Forkmann G, Dangelmayr B. Generic control of chalcone isomerase activity in flowers of *Dianthus caryophyllus* [J]. *Biochem Genet*, 1980, 18(5/6): 519-527.

- [12] Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene [J]. *Fed Eur Biochem Societ Lett*, 2005, 579(27): 6074-6078.
- [13] Liu B, Zhu Y. Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids [J]. *Food Eng*, 2007, 78(2): 584-587.
- [14] Kreft S, Štrukelj B, Gaberščik A, *et al.* Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: Comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method [J]. *Exp Bot*, 2002, 53(375): 1801-1804.
- [15] Jez J M, Bowman M E, Noel J P. Role of hydrogen bonds in the reaction mechanism of chalcone isomerase [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(16): 5168-5176.
- [16] Sharma T R. Species relationships in *Fagopyrum* revealed by PCR-based DNA fingerprinting [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(2): 306-312.
- [17] Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(27): 6074-6078.
- [18] Kim S, Jones R, YooK S, *et al.* Gold color in onions (*Allium cepa*): A natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon [J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272(4): 411-419.
- [19] Muir S R, Collins G J, Robinson S, *et al.* Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(5): 470-474.
- [20] 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(7/9): 455-461.
- [21] 赵坤霄, 吴红赤. 黄酮类化合物相关的转运蛋白研究现状 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(7): 486-488.
- [22] 鲁鑫焱, 蒋惠娣, 增 塑. 黄酮类化合物在 Caco-2 细胞模型上的转运和代谢研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(17): 1289-1292.
- [23] Van A J, Koes R E, Spelt C E, *et al.* Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes [J]. *EMBO J*, 1988, 7(5): 1257-1263.