

红花查耳酮异构酶基因植物表达载体的构建及拟南芥转化

刘秀明^{1,2}, 李晓璇², 姚娜¹, 王立勇¹, 李晓薇^{1,2}, 董园园¹, 王南¹, 孟璐璐^{3*}, 李海燕^{1,2*}

1. 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, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

3. 吉林省科学技术厅, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 构建红花查耳酮异构酶 (CHI) 基因的植物表达载体并在拟南芥中进行超表达验证该基因的功能。方法 将已经分离的红花 CHI 基因作为目的基因, 在其两端引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点, 构建含有 35S 启动子的植物超表达载体 pBASTA-CHI, 通过 *Flora*-dip 法将其转化到拟南芥中, 并对转基因拟南芥 T2 代植株进行 PCR 和总黄酮量检测。结果 转基因拟南芥 T2 代植株的 PCR 检测, 红花 CHI 基因已经初步整合到拟南芥基因组中, 黄酮量检测表明, 转红花 CHI 基因的拟南芥比野生型拟南芥中的黄酮量有所提高, 最高提高到 2.3 倍。结论 成功构建了含有红花 CHI 基因的植物表达载体, 并在拟南芥中进行超表达, 获得了转基因拟南芥 T2 植株。

关键词: 红花; 查耳酮异构酶; 黄酮; 拟南芥; PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)18-3279-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.023

Construction of CHI gene expression vector of safflower and its transformation in *Arabidopsis thaliana*

LIU Xiu-ming^{1,2}, LI Xiao-xuan², YAO Na¹, WANG Li-yong¹, LI Xiao-wei^{1,2}, DONG Yuan-yuan¹,
WANG Nan¹, MENG Lu-lu³, LI Hai-yan^{1,2}

1. Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3 Science and Technology Department of Jilin Province, Changchun 130118, China

Abstract: Objective Plant expression vector of chalcone isomerase in safflower was built and its function was verified by over-expression of CHI in *Arabidopsis thaliana*. **Methods** CHI isolated from safflower in our previous study was introduced by *Bam*H I and *Eco*R I restriction sites and constructed into the over-expression vector pBASTA-CHI containing 35S promoter, transformed into *A. thaliana* by *Flora*-dip method. T2 plants of transgenic *A. thaliana* were detected by PCR and content of total flavones. **Results** Plant expression vector containing the safflower CHI gene was built and over expressed in *A. thaliana* successfully. T2 plants of transgenic *A. thaliana* were obtained. **Conclusion** PCR of transgenic T2 in *A. thaliana* is detected that CHI gene of safflower has been integrated into the *A. thaliana* genome, flavone content is determined in leaves, and the results show that the flavone in transgenic *A. thaliana* is higher than that in wild type, the highest strain increases by nearly 2.3 times.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; chalcone isomerase; flavone; *Arabidopsis thaliana* L.; PCR

红花 *Carthamus tinctorius* L., 菊科 (Compositae) 双子叶植物, 又名草红花、金红花, 是我国重要的传统中草药, 不仅可以用来药用, 还可用于食用、染料和油料等。黄酮类化合物是红花

中最主要的化学成分之一, 目前已经从红花中分离出多种黄酮化合物^[1-2], 其他多项研究也表明^[3-4], 红花中含有较高的黄酮量。红花的主要功效是活血化瘀, 因此, 具有活血通经、去瘀疗伤、宣毒透疹、

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863”) (2011AA100606); 国家自然科学基金资助 (31101172, 31501366); 吉林省科技厅 (20150623024TC-11)

作者简介: 刘秀明 (1981—), 女, 吉林人, 实验师, 研究方向为植物生物反应器。

Tel: (0431)84533428 Fax: (0431)84533347 E-mail: xiuming1211@163.com

*通信作者 李海燕 (1971—), 女, 吉林人, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物反应器。

Tel: (0431)84532885 Fax: (0431)84533347 E-mail: hyl99@163.com

孟璐璐 (1978—), 女, 吉林人, 副研究员, 研究方向为中药学。Tel: (0431)88935899 E-mail: 172561690@qq.com

抗氧化、抗癌等功效,在治疗痛经、闭经、跌打损伤等方面效果显著^[5]。

查耳酮异构酶 (CHI) 是第一个被认识的黄酮类化合物生物合成相关酶,是黄酮化合物合成途径中的第 2 个关键酶^[6],催化分子内的环化反应,以单体的形式普遍存在于大多数植物中,不同植物的 CHI 相对分子质量差别较大。其蛋白的三维折叠结构在植物中具有唯一性,已被作为一种植物特有的基因标记^[7]。CHI 基因最早是于 1987 年从法国豌豆中分离得到^[8],目前,CHI 基因已经从多种植物中分离并鉴定。Qin 等^[9]从葫芦巴的叶片中克隆了一个 CHI 基因,转基因拟南芥突变体的结果显示,在突变体中的黄酮醇苷表达高于野生型。相关研究^[10-13]也表明,CHI 基因在黄酮化合物合成代谢途径中具有重要的调节作用,且 CHI 基因的超表达可以提高植物中的黄酮量,本研究以本课题组已经分离的红花 CHI 基因作为目的基因,构建植物超表达载体,将其转化到拟南芥中并进行黄酮检测,初步验证红花查耳酮异构酶基因的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

材料经笔者鉴定为野生型哥伦比亚拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L., 植物表达载体 pBASTA 由实验室保存。

1.2 化学试剂

质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自爱思进生物技术 (杭州) 有限公司; 植物基因组提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; LA 酶、限制性内切酶等购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、pEASY-T1 Simple Cloning Kit (货号: CT111-01) 克隆载体购自北京全式金生物技术有限公司; 琼脂糖购自 Sigma 公司; 胰蛋白胨、酵母提取物购自 OXOID 公司; 乙醇、氯仿、NaCl、其他试剂均为分析纯。

1.3 红花 CHI 基因植物表达载体的构建

将本课题组前期克隆正确的 CHI 基因,设计特异性引物 Chir: 5'-AATAGGATCCCGGAAGTGCA-ATTACCAT-3' 和 Chif: 5'-AATAGAATTCCTCGTG-AAACTCCTGTTTTCT-3', 并在其 5' 端分别加入酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I, 连接到 pEASY-T1 载体上,将验证成功的连接 CHI 基因的 pEASY-T1 载体和 pBASTA 载体 (图 1) 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切,建立 50 μ L 酶切体系,酶切反应体系如下: DNA 1 μ g, *Bam*H I 2 μ L, *Eco*R I 2 μ L, 缓冲液 6 μ L,

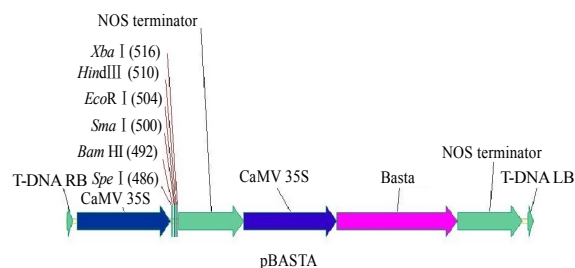


图 1 pBASTA 载体结构示意图

Fig. 1 Structure of pBASTA vector

Rnase Free H₂O 补齐,总反应体系为 50 μ L。经过 4 h 酶切后,获得的酶切产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,利用胶回收试剂盒切胶回收含有红花 CHI 目的基因片段和 pBASTA 载体。将获得的 CHI 目的基因片段和 pBASTA 载体用 T4 DNA Ligase 酶连接过夜。过夜连接后,将连接产物转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞。即将连接产物冰浴 20~30 min; 42 $^{\circ}$ C 热激 30 s,立即置于冰上 2 min; 加 250 μ L 灭菌的 LB 液体培养基,200 r/min, 37 $^{\circ}$ C, 1 h; 取 8 μ L, 500 mmol/L IPTG, 40 μ L, 20 mg/mL X-gal 混合,均匀地涂于 LB 平板上,在 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min; 取 100 μ L 菌液,用涂布棒均匀涂于平板上,过夜培养。次日,挑取白斑至 10 mL LB 液体培养基的试管中,200 r/min, 37 $^{\circ}$ C, 8 h。提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定。

1.4 工程农杆菌的制备与转化

将农杆菌 EHA105 在平板上划线,挑取农杆菌 EHA105 的单菌落,加入到 YEP 培养基中。加入 10 mg/L 的利福平,220 r/min, 28 $^{\circ}$ C 过夜培养。取 500 μ L 已经过夜培养的菌液加入到含有 10 mg/L 利福平的 50 mL YEP 培养基中,250 r/min, 28 $^{\circ}$ C, 6 h。将菌液放入离心管中,4 $^{\circ}$ C, 5 000 r/min, 5 min,离心后去上清收集菌体后,用 2 mL YEP 培养基吹打混匀,然后分装,5 000 r/min, 10 min,弃上清。将预先制备好的 CaCl₂ 溶液 (20 mmol/L) 冷藏,取 50 μ L 重悬菌体,加入甘油后分装到 1.5 mL 的 EP 管内,液氮中放入 2 min 后于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。提取“1.3”项中验证正确的质粒 1 μ L,加入到 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存的农杆菌感受态细胞中,冰浴 30 min。液氮冷冻 5 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴,热击 5 min。在离心管中加入 1 mL 不加抗生素的 YEP 液体培养基,混匀后放于摇床中,28 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 4 h。5 000 r/min, 离心 6 min。离心后加入 200 mL YEP 液体培养基进行重悬。将重悬后的菌体涂在含有 10 mg/L 利福平的 YEP 固体培养基中,28 $^{\circ}$ C 培

养 2~3 d。待长出菌落后,挑取单菌落,放于 10 mg/L 利福平的 YEP 液体培养基的试管中,过夜培养后,进行菌液 PCR 验证,将验证正确的菌液加入甘油,−80 °C 冰箱保存备用。

1.5 拟南芥的转化与检测

取保存在−80 °C 的农杆菌菌株,加入到 50 mL YEP 培养基中,28 °C 1 800 r/min 摇床上活化培养,6~8 h 后转入到 1 L 的三角瓶中培养。28 °C, 500 r/min 培养至菌液浓度达到 1.0~1.2 cfu/mL,用于侵染拟南芥。待侵染的拟南芥转化前一天浇足水,侵染前用剪刀处理掉拟南芥的花,籽粒荚,留下花蕾备用。准备好的农杆菌菌液加入 500 mL 渗透培养基,加入 Silwet L-77 25 μL,振荡混匀,用于转化。生长 14 d 左右,开始先采摘发黄的成熟荚,待整株植物干枯后把成熟植株根部剪断,放在报纸上阴干处理,收集所有种子。将收获的 T0 代拟南芥种子进行春化处理,播种到无菌土中,待拟南芥小苗长出 4 片真叶时,用 1% Basta 筛选剂进行喷洒,每隔 1 天喷 1 次,共 3 次,收获 T1 代种子保存备用。收获的 T1 代种子进行播种,待拟南芥小苗长出 4 片真叶时,用 1% Basta 筛选剂进行喷洒,1 周后将存活下来的 T2 代小苗进行移栽,利用植物基因组试剂盒对获得的小苗进行基因组提取,PCR 验证。

1.6 拟南芥黄酮的提取

将上述 PCR 验证正确的拟南芥株系进行黄酮的测定,黄酮的提取方法参照萨仁高娃等^[14]的方法,略有改进。

1.6.1 标准曲线的制作 精密称取芦丁对照品 100 mg,用 30%的乙醇溶液溶解定容至 100 mL 量瓶中,摇匀,配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的芦丁标准溶液。分别精密吸取芦丁标准溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,置于 10 mL 比色管中,用 30%乙醇补充至约 5 mL,加入 5%亚硝酸钠 0.3 mL,摇匀,放置 5 min,加入 10%硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 5 min 后再加入 4%氢氧化钠溶液 4 mL,摇匀,用 30%乙醇定容至刻度,摇匀,放置 10 min 后,在 300~400 nm 的波长进行扫描,波长设定:300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400 nm,11 个梯度,确定最佳波长。选择最佳吸收峰波长,并在此波长下作工作曲线和试样测定。

1.6.2 拟南芥黄酮粗提取液制备 原料清理、干燥、粉碎,过 40 目筛,备用。取 0.5 g 拟南芥叶片粉状物,加入 10 mL、65%乙醇,50 °C,超声波 600 W,

提取 30 min。离心取上清液备用。在最佳吸收峰波长下测定吸光度。

2 结果与分析

2.1 红花 CHI 基因表达载体构建

将前期验证成功的连接 CHI 基因全长的 pEASY-T1 载体和 pBASTA 载体用 *Bam*HI 和 *Eco*R I 进行双酶切,酶切后的 CHI 片段基因见图 2,与目的条带 748 bp 大小吻合。对获得的大片段和小片段分别进行胶回收后,用 T4 连接酶连接,连接后的载体命名为 pBASTA-CHI,将其转化大肠杆菌,蓝白斑筛选后挑取 11 个单菌落进行 PCR 鉴定,其中有 7 个转化子显示 748 bp 的目的基因大小(图 3),说明连接转化成功。对鉴定正确的 7 个转化子提取质粒,进行酶切鉴定(图 4),将酶切鉴定正确的 3 个菌液送于测序,测序结果与 CHI 基因的序列吻合,说明红花 CHI 基因的植物表达载体已经构建成功。将酶切测序正确的植物表达载体 pBASTA-CHI 质粒,利用冻融法转化农杆菌 EHA105,转化后涂板,对挑取的 14 个单菌落进行农杆菌菌液 PCR 鉴定(图 5),其中有 9 条非常亮的目的条带出现,说明农杆菌转化成功,可以用于下一步的拟南芥转化。

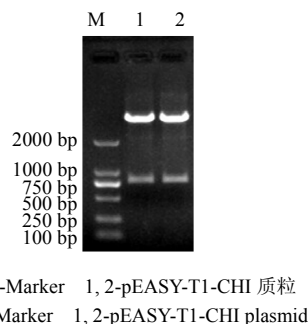


图 2 红花 CHI 基因的质粒酶切图谱

Fig. 2 Restriction of plasmid of safflower CHI gene

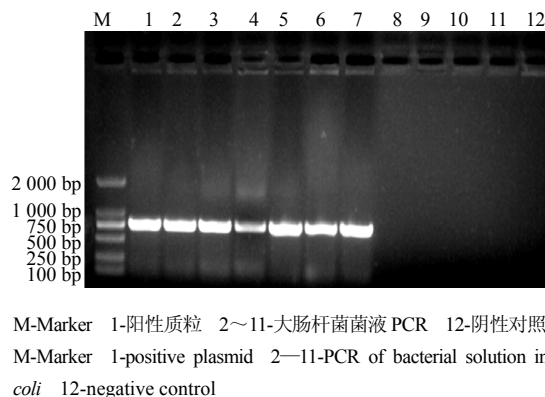


图 3 pBASTA-CHI 表达载体的大肠杆菌菌液 PCR 鉴定
Fig. 3 PCR identification of pBASTA-CHI expression vector in bacterial solution of *E. coli*

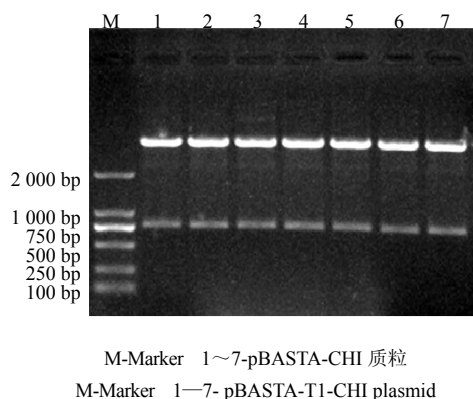


图 4 pBASTA-CHI 表达载体的质粒酶切鉴定

Fig. 4 Restriction identification of plasmid of pBASTA-CHI expression vector

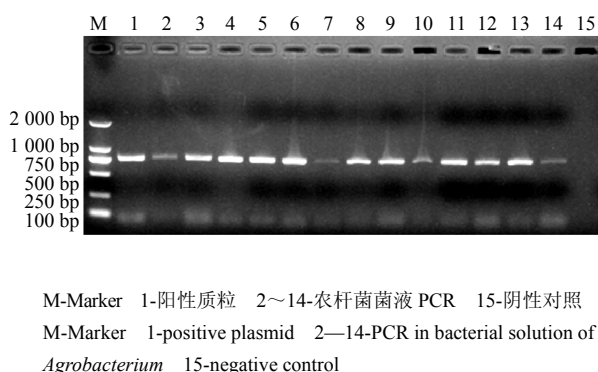


图 5 pBASTA-CHI 表达载体的农杆菌菌液 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of pBASTA-CHI expression vector in bacterial solution of *Agrobacterium*

2.2 红花 CHI 基因转化拟南芥的筛选及检测

选择 T2 代转基因拟南芥植株的叶片进行基因组 DNA 提取, 以基因组 DNA 为模板, 以特异性引物 CCHI3F: 5'-CGGAAGTGCAATTACCATG-3' 和 CCHI3R: 5'-CTCGTGAACTCCTGTTTCT-3' 进行 PCR 扩增, 首先对获得的 44 株拟南芥 T2 代植物进行 PCR 初步检测, 共检测出 37 株转基因阳性植物, 图 6 中列出了转基因拟南芥中检测到目的条带的部分 PCR 结果。从

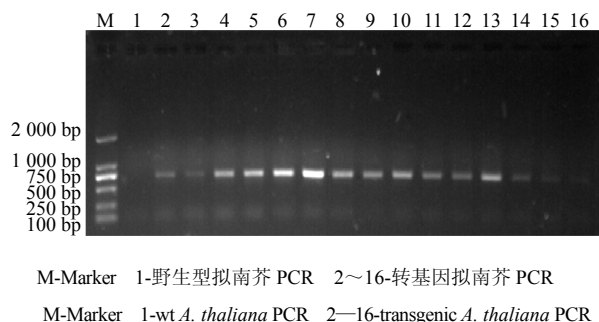


图 6 转 CHI 基因的 T2 代拟南芥的 PCR 检测

Fig. 6 PCR determination of T2 CHI transformants in *A. thaliana*

PCR 结果中发现, 转化率为 84.1%, 结合 Basta 筛选, 可以说明红花 CHI 基因已初步整合到拟南芥基因组中。

2.3 黄酮标准曲线的绘制

最终得到芦丁的质量浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL, 测量时再将溶液稀释 10 倍, 将其在 300~400 nm 的波长内进行扫描, 得到芦丁对照品在 340 nm 处的吸收峰最大, 因此, 将 340 nm 作为测定黄酮量的最佳波长。取芦丁对照品, 将配制 1、2、3、4、5 μg/mL 的对照品溶液在 340 nm 波长下进行测定, 绘制芦丁的吸光度-浓度的标准曲线, 对获得的实验数据进行回归分析, 得到芦丁标准溶液的浓度与吸光度的回归方程为 $Y=0.0136X+0.0614$, 回归系数 $R^2=0.9991$, 线性范围 1.0~5.0 μg/mL。

2.4 转红花 CHI 基因拟南芥的黄酮量检测

对获得的转 CHI 基因的拟南芥的部分株系提取黄酮, 以野生型拟南芥作为对照 (wt), 采用分光光度法测量拟南芥叶片中黄酮的吸光度, 根据标准曲线中的线性回归方程计算转红花 CHI 基因的黄酮含量。从图 7 可以看出, 转基因拟南芥中黄酮量比野生型拟南芥中的量有所提高, 最高的株系提高到 2.3 倍。

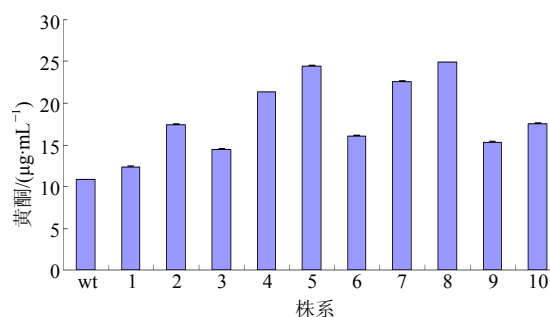


图 7 不同株系的黄酮量

Fig. 7 Flavone content of different strains

3 讨论

CHI 基因是黄酮化生物合成途径中的主要结构基因, 是黄酮化合物合成途径中的关键酶和限速酶, 研究表明, 植物中 CHI 的表达与黄酮的合成有一定的相关性, CHI 缺失突变可能会导致多种植物的黄酮生物合成途径受阻, 使黄酮和花色素量严重下降^[15-16], Nishihara 等^[17]应用 RNAi 技术抑制烟草 CHI 基因的表达后, 发现花瓣中的黄酮类物质减少而超表达则会使黄酮量提高^[18]。

本实验成功构建了红花 CHI 基因的植物表达载体, 将其转化拟南芥并进行了初步检测, 结果发现,

转 CHI 基因的拟南芥株系比野生型拟南芥中的黄酮量确实有所提高,这与吴冰^[19]研究的彩叶草的查耳酮异构酶基因的功能研究相似,说明红花 CHI 基因可能参与拟南芥中黄酮的合成代谢,红花 CHI 基因可能在黄酮合成途径中起着重要作用。Qin 等^[9]克隆了葫芦巴 CHI 基因并在拟南芥突变体中表达,表达后的植株比野生型的异黄酮量有较大提高。Li 等^[20]从凤毛菊中克隆了一个 CHI 基因并在转基因烟草中进行表达,超表达 CHI 基因的转基因烟草中的黄酮含量是野生型烟草中的 5 倍,因此,在转基因植物中超表达 CHI 基因是提高黄酮量的一个有效方法。但本研究中提高的倍数不大,最高的株系黄酮量比野生型提高近 2 倍,原因可能是因为查耳酮异构酶位于黄酮合成途径的上游,而黄酮化合物的合成途径也较为复杂,参与合成的关键酶也比较多,因此提高的倍数不大。

本研究只利用拟南芥对红花 CHI 基因的功能进行了初步鉴定,超表达 CHI 基因的拟南芥比野生型拟南芥的黄酮量有所提高,证明了红花 CHI 基因可能参与黄酮化合物的合成,但为了弄清楚红花 CHI 基因在黄酮化合物合成途径中的作用,还需要做进一步的亚细胞定位及红花的遗传转化,本研究的开展,将为下一步其他关键酶基因的验证及红花新品种的选育奠定一定的基础。

参考文献

- [1] 范莉,赵海誉,濮润,等.红花的黄酮类化学成分研究[J].中国药学杂志,2011,46(5):333-337.
- [2] Yaginuma S, Shiraiishi T, Igarashi K. Developmental transition of the flavonoid contents in safflower leaves during stress-loaded cultivation [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(8): 1691-1698.
- [3] Lee J Y, Chang E J, Kim H J, *et al.* Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius* [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(3): 313-319.
- [4] 张纪宁.分光光度法测定新疆红花中总黄酮含量[J].长春师范学院学报:自然科学版,2009,28(2):47-50.
- [5] Zhou X, Tang L, Xu Y, *et al.* Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharm*, 2014, 151(1): 27-43.
- [6] Gensheimer M, Mushegian A. Chalcone isomerase family and fold: no longer unique to plants [J]. *Protein Sci*, 2004, 13(2): 540-554.
- [7] Mehdy M C, Lamb C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungale elicitor wounding and infection [J]. *EMBOJ*, 1988, 6: 1527-1533.
- [8] Shimada N, Aoki T, Sato S, *et al.* A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5-deoxy (iso) flavonoids in *Lotus japonicus* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131: 941-951.
- [9] Qin J C, Zhu L, Gao M J, *et al.* Cloning and functional characterization of a chalcone isomerase from *Trigonella foenum-graecum* L. [J]. *Planta Med*, 2011, 77(7): 765-770.
- [10] 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.
- [11] 曹玉婷,邱栋梁.鸳鸯茉莉查耳酮异构酶基因 (CHI) cDNA 的克隆与生物信息学分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(5): 475-481.
- [12] 耿慧,沈红香,姚允聪,等.苹果属观赏海棠 McCHI 基因的克隆及不同叶色品种间表达差异分析 [J]. 林业科学, 2010, 46(10): 42-49.
- [13] 康亚兰,裴瑾,刘薇,等.红花查耳酮合成酶基因的克隆、生物信息学分析及表达 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2385-2389.
- [14] 萨仁高娃,陈红梅.红花总黄酮提取工艺研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2010, 3(3): 57-58.
- [15] Kim S, Jones R, Yoo K 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.
- [16] van Tunen 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.
- [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] 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.
- [19] 吴冰.彩叶草的查耳酮异构酶 (CHI) 基因的遗传转化及其功能验证 [D]. 成都:西南大学, 2008.
- [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.