

多穗柯查耳酮异构酶基因的克隆与序列分析

林丽梅¹, 龙月红¹, 冯若宣¹, 尹峰¹, 黄剑^{2*}, 邢朝斌^{1*}

1. 华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210

2. 百色学院农业与食品工程学院, 广西 百色 533000

摘要: 目的 克隆多穗柯的查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)基因, 并了解其表达情况。方法 根据转录组测序结果, 利用 PCR 扩增技术获取多穗柯 CHI 基因的 cDNA 全长, 并对其生物信息学分析, 采用 qRT-PCR 法检测 CHI 基因在多穗柯不同器官的表达量。结果 多穗柯 CHI 基因的 cDNA 全长为 772 bp, 开放阅读框长为 696 bp, 编码 231 个氨基酸的蛋白。该蛋白不存在跨膜区域, 定位于细胞质中。多穗柯 CHI 基因在不同部位均有表达, 叶片的表达量最高, 是根部最低量的 9.75 倍。结论 首次克隆获得多穗柯的 CHI 基因, 明确该基因属于 CHI II 型。且多穗柯 CHI 基因在各器官中的表达量具有显著差异。

关键词: 多穗柯; 查耳酮异构酶; 克隆; qRT-PCR; 生物信息学分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)24-5080-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.004

Cloning and bioinformatic analysis of chalcone isomerase gene in *Lithocarpus polystachyus*

LIN Li-mei¹, LONG Yue-hong¹, FENG Ruo-xuan¹, YIN Feng¹, HUANG Jian², XING Zhao-bin¹

1. College of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

2. College of Agricultural and Food Engineering, Baise University, Baise 533000, China

Abstract: **Objective** To understand the chalcone isomerase (CHI) gene expression by cloning it in *Lithocarpus polystachyus*. **Methods** A full-length cDNA of CHI gene from *Lithocarpus polystachyus* (*Lpr-CHI*) was obtained by PCR cloning technique according transcriptomics sequences information, which bioinformatics analysis was carried out. The expression of CHI gene in different organs of *Lithocarpus polystachyus* was detected by qRT-PCR. **Results** *Lpr-CHI* was 772 bp in full length with an open reading frame (ORF) of 696 bp, which encoded a protein with 231 amino acids. The protein did not contain a transmembrane domain and is localized in the cytoplasm. *Lpr-CHI* gene expression was found in different parts, and reached the highest in leaf, which was 9.75 times of the least gene expression in root. **Conclusion** *Lpr-CHI* was obtained for the first time, and it was clear that the gene belongs to CHI type II. And the expression of *Lpr-CHI* in each organ was significantly different.

Key words: *Lithocarpus polystachyus* Rehd; chalcone isomerase; clone; qRT-PCR; bioinformatic analysis

多穗柯 *Lithocarpus polystachyus* Rehd, 别名甜茶(通称)、胖桐(广东)、甘茶(贵州)、甜叶子树(云南)、多穗石柯等, 属于壳斗科石柯属常绿乔木。目前研究已知多穗柯中含有 20 余种黄酮类化合物, 多种甾醇类和三萜类化合物^[1]。其中, 黄酮类化合物具有抗癌、防癌、抑菌、抗病毒的作用; 还能够改善心血管系统, 可用于治疗糖尿病及其并发症;

能增强机体的非特异性免疫功能和体液免疫功能^[2]。多穗柯中的黄酮类成分以互为异构体的根皮苷与三叶苷为主^[3]。

查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)作为黄酮类化合物合成的关键酶, 除了植物中存在, 真菌和细菌中也含有^[4]。1987 年, 法国研究者首次从豌豆中利用抗体技术分离出 CHI^[5], 开创了 CHI

收稿日期: 2017-09-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31760221); 华北理工大学培育基金资助项目(SP201508)

作者简介: 林丽梅(1996—), 女, 研究方向为生物信息在药用植物中的应用。

*通信作者 邢朝斌(1975—), 男, 教授, 研究方向为分子生物学。Tel: (0315)3725859 Fax: (0315)3726341 E-mail: xzbheuu@126.com
黄剑(1979—), 男, 高级工程师, 研究方向为药用植物学。E-mail: huang_gxlky@163.com

基因研究的先河。此后各国研究者陆续对矮牵牛 *Petunia hyorida* Vilm.^[6]、喜马拉雅紫茉莉 *Mirabilis himalaica* (Edgew.) Heim.^[7]、桑树 *Morus alba* Linn.^[8]、玉米 *Zea mays* Linn.^[9]等植物的 CHI 基因进行研究。但是,关于多穗柯 CHI 基因尚未见报道。本研究根据多穗柯转录组测序结果,通过 PCR 扩增得到多穗柯 CHI 基因的 cDNA 及 DNA 全长序列,进而对其进行生物学信息分析,为多穗柯 CHI 基因の利用和其他基因的表达分析提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

样本为采自广西壮族自治区巴马瑶族自治县的多穗柯的叶片、叶柄、茎和根,经华北理工大学生命科学学院邢朝斌教授鉴定为壳斗科石柯属植物多穗柯 *Lithocarpus polystachyus* Rehd. 用清水将多穗柯的叶片、叶柄、茎和根的杂质洗净,滤纸吸干水后作为提取多穗柯总 RNA 和 DNA 的材料。

RevertAidTM First strand cDNA synthesis Kit (Thermo Fisher 公司);琼脂糖 (Sigma-Aldrich 公司);IPTG、X-gal、氨苄青霉素 (北京拜尔迪生物技术有限公司);新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pGM-T 质粒、大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞 (北京天根生化科技有限公司);其他试剂均为国产分析纯。引物由 Thermo Fisher 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 多穗柯总 RNA 提取与 cDNA 的合成 分别称取 0.1 g 多穗柯根、茎、叶柄、叶片洗净后冻存,按照 RNA prep pure 植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,超微量核酸测定仪测定纯度和浓度,将最后得到的总 RNA 冻存于 -70 °C 备用。取 11 μL 总 RNA,以 Oligo (dT)₁₈ 为引物,按照 RevertAidTM First strand cDNA synthesis Kit 的说明书进行逆转录反应,将转录得到的 cDNA 冻存于 -70 °C 备用。

1.2.2 多穗柯总 DNA 提取 称取 0.1 g 多穗柯叶片洗净后,按照新型植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取总 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,超微量核酸测定仪测定纯度和浓度,将最后得到的总 DNA 冻存于 -70 °C 备用。

1.2.3 多穗柯 CHI 基因 cDNA 及 DNA 序列的克隆 根据本实验室多穗柯转录组测序结果^[3],利用

Primer 5.0 软件设计一对特异性引物,上游引物 CHIS: 5'-CACTCTCACTAGTCAGCACTCTC-3',下游引物 CHIX: 5'-TCTCCACTTATTCCTTTCCCTCC-3'。以逆转录得到的 cDNA 为模板 PCR 扩增多穗柯 CHI 基因的核酸序列。反应体系为 50 μL,其中引物 CHIS、引物 CHIX 和模板 cDNA 各 1.0 μL, LA Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 10×LA Buffer (含 15 mmol/L MgCl₂) 5.0 μL, dNTP 8.0 μL, ddH₂O 补至 50.0 μL。反应条件为预变性 98 °C, 60 s; 变性 95 °C, 40 s; 退火 53 °C, 30 s; 延伸 72 °C, 60 s。40 个循环后 72 °C 补延伸 600 s。

根据多穗柯 cDNA 序列,应用 Primer 5.0 软件设计一对 PCR 扩增 DNA 序列的引物。上游引物 CHIDS1: 5'-GCACTCTCACACTTACAGAGCA-3'; 下游引物 CHIX: 5'-TCTCCACTTATTCCTTTCCCTCC-3'。以提取的 DNA 为模板,PCR 反应体系如下: DNA 1 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、KOD Fx 1 μL、KOD Buffer 25 μL、2 mmol/L dNTP 10 μL,用 ddH₂O 补至 50 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 180 s, 95 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 360 s。40 个循环后 72 °C 补延伸 600 s。

将上述 cDNA 和 DNA 的 PCR 扩增产物分别用 2% 琼脂糖凝胶电泳验证后,按 DNA 回收试剂盒说明书进行回收。再将回收产物克隆到 pGM-T vector 克隆载体上,转化大肠杆菌 TOP10,最后挑选 3 个转化成功的菌株交北京睿博兴科生物技术有限公司测序。

1.2.4 多穗柯 CHI 基因的表达量分析 参照文献方法^[10]以多穗柯 GAPDH 基因为内参基因,扩增的上游引物 DSKGS: 5'-CCTTCCGTGTTCTACCCCCAA-3',下游引物 DSKGX: 5'-TAGCCCAAGATGCCCTTCAGT-3'。用该引物扩增,预期得到 1 条长为 133 bp 的条带。

根据“1.2.3”项中已克隆得到的多穗柯 CHI 基因序列,设计一对预期扩增 229 bp 的特异性引物 DSKCHIS: 5'-ATGGTCCTAGCAGCGTCTCTT-3'和 DSKCHIX: 5'-TCAACTCCTCCGCACTCTTTC-3'。以“1.2.1”项中获得的各样本的 cDNA 为模板,利用上述引物进行 qRT-PCR 反应。反应体系如下: 引物对 DSKGS-DSKGX 和 DSKCHIS-DSKCHIX 各 0.6 μL, cDNA 1 μL, mix (SYBR) 5 μL, ROX 0.2 μL, ddH₂O 补至 10.0 μL。反应条件: 95 °C、30 s; 58 °C、30 s; 40 个循环,每个样本重复 3 次。表达量计算参照文献方法^[11]进行。

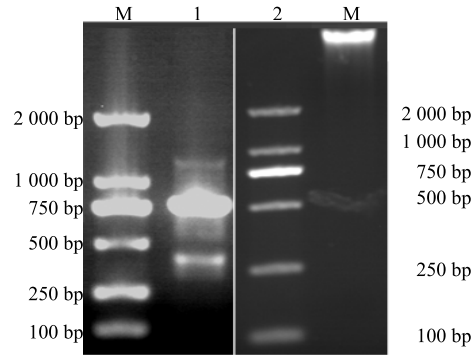
1.2.5 多穗柯 CHI 基因的生物信息学分析 通过 ExPASy 在线服务器的 Translate Tool 将多穗柯 CHI 基因 cDNA 全长序列翻译成氨基酸序列并查找其开放阅读框 (ORF); 预测蛋白质的基本理化性质使用 ProtParam; 在 SOPMA 中对其进行蛋白质二级结构分析; 蛋白质功能结构域分析在 PROSITE 中进行; 通过 TargetP 1.1 Server 在线服务器进行蛋白的亚细胞定位; 使用 SignalP 3.0 Server 预测其信号肽; TMHMM Server v.2.0 进行跨膜结构域预测; 使用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-Joining (邻位相连法, NJ) 法构建系统发育树。使用 SWISS-MODEL 进行蛋白质的三维结构预测。

2 结果与分析

2.1 多穗柯 CHI 基因克隆及序列分析

以多穗柯 cDNA 为模板, 利用特异性引物 CHIS 和 CHIX 进行 PCR 扩增获得一条长为 750 bp 左右的条带 (图 1), 其大小与预期一致。经测序长条带为 772 bp。BLAST 比对的结果表明, 该片段包含一个长为 696 bp 完整的 ORF, 其 5'端非编码区长 42 bp, 3'端非编码区长 36 bp, 终止密码子为 TGA, 共编码 231 个氨基酸。

以多穗柯 DNA 为模板, 使用引物 CHIDS1 和



M-Marker 1-cDNA 的 PCR 扩增产物 2-DNA 的 PCR 扩增产物
M-Marker 1-cDNA of the PCR amplification products 2-DNA of the PCR amplification products

图 1 多穗柯 CHI 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of CHI gene in *L. polystachyus*

CHIX 进行 PCR 扩增后, 测序获得一条长为 3 100 bp 左右的条带 (图 1)。经测序条带长度为 3 148 bp。将测序得到的 DNA 和 cDNA 序列放在 NCBI 分析软件中分析得到该序列含有 4 个外显子、3 个内含子 (图 2)。该基因在表达为成熟 mRNA 的过程中, 外显子与内含子的剪切位点 5'端为 GT, 3'端为 AG, 与 GT-AG 法则相符合。

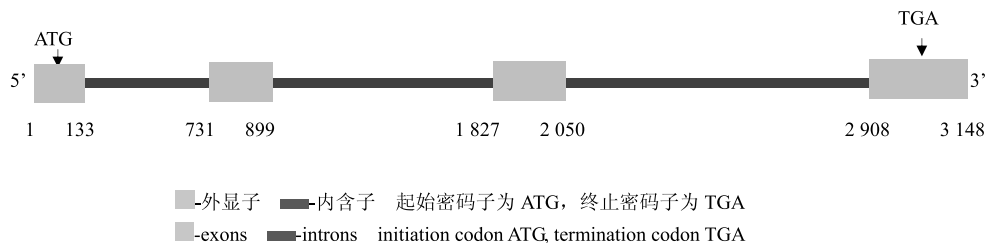


图 2 多穗柯 CHI 基因的外显子与内含子分布

Fig. 2 Distribution of exons and introns of CHI gene in *L. polystachyus*

2.2 多穗柯 CHI 基因的亚细胞定位及蛋白质分析

通过在线 ProtParam 分析, 其推测的蛋白质等电点 (pI) 为 5.12, 为酸性蛋白; 相对分子质量为 62 470; 在体外红细胞中的半衰期为 1.2 h, 不稳定指数为 46.86, 属于不稳定蛋白; 亲水性的平均值为 0.774, 是疏水性蛋白。

在 SOMPA 软件中对 CHI 基因编码的蛋白质进行二级结构分析得知该蛋白含 α 螺旋 93 个, 占 40.26%; 延伸链 50 条, 占 21.65%; β 转角 21 个, 占 9.09%; 无规则卷曲 67 个, 占 29.00%。PROSITE 程序预测该蛋白具有 1 个 ATP/GTP 结合位点 (氨基酸序列第 65 位, 下同), 1 个 cAMP 和 cGMP 蛋白

激酶磷酸化位点 (209), 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (72、171), 3 个 N-肉蔻酰化位点 (25、105、198), 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (20、109、157、219)。利用 NCBI Conserved Domain Search 进行保守域分析表明, 多穗柯 CHI 的保守区域为 12~214 氨基酸残基, 该蛋白属于查耳酮超体家族。SWISS-MODEL 中预测的多穗柯 CHI 蛋白三级结构见图 3。

通过 Blast 氨基酸序列对比, 发现多穗柯 CHI 蛋白与其他已知物种的 CHI 蛋白的同源性只达到 69%~81%。将本研究已得到的多穗柯 CHI 的蛋白序列与 NCBI 中已公布的同一亚纲下水蜜桃、黄麻、

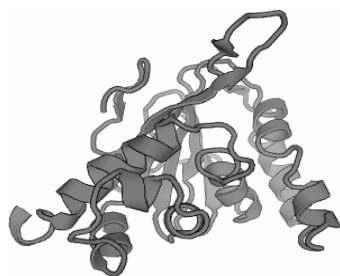


图 3 多穗柯 CHI 蛋白三级结构的预测结果

Fig. 3 Predictive results of tertiary structure of CHI protein in *L. polystachyus*

石榴 *Punica granatum* Linn.、牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.、金花茶 *Camellia nitidissima* C. W. Chi, 单子叶植物中黄胡萝卜 *Daucus carota* L. var. *sativa* DC.、小麦 *Triticum aestivum* L.、大花美人蕉 *Canna generalis* Bailey, 以及真菌和藻类的 CHI 蛋白序列构建系统进化树 (图 4)。结果发现, 多穗柯与双子叶植物水蜜桃、牡丹、石榴、黄麻相似性最高, 其次是单子叶植物黄胡萝卜、小麦、大花美人蕉, 与真菌类生物的相似性最低。

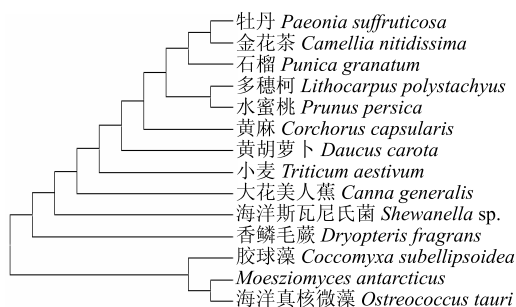


图 4 CHI 蛋白的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of CHI protein

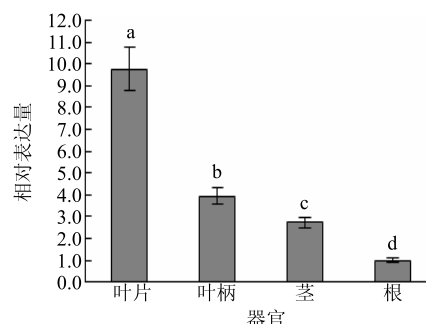
TargetP 1.1 Server 在线工具分析, 多穗柯 CHI 定位在细胞质基质中, 预测可靠性等级为 5, 而且 SignalP 3.0 Server 在线分析表明, 多穗柯 CHI 基因编码的蛋白质不存在信号肽。由此可知多穗柯 CHI 基因在游离核糖体上起始合成后, 蛋白很可能不进行转运, 而是继续保留在细胞质基质中。

用 TMHMM Server v.2.0 对多穗柯 CHI 氨基酸序列的跨膜结构域进行预测, 结果表明, CHI 整条肽链都位于细胞膜外, 说明多穗柯 CHI 基因编码的多肽不存在跨膜区, 结合上述转运肽的预测, 可以推断, 多穗柯 CHI 在细胞质基质中合成后, 很可能不经蛋白转运, 直接锚定于细胞质基质中的特定部位行使催化功能。ProtParam 分析结果显示该蛋白为

疏水性蛋白。结合跨膜结构域的预测结果, 可以推断, 多穗柯 CHI 基因编码的多肽不存在明显的疏水区域, 这与 CHI 不存在跨膜结构域的特征相吻合。

2.3 多穗柯不同器官中 CHI 基因的表达分析

CHI 基因在多穗柯的根、茎、叶柄和叶片器官中均有表达, 但是表达量具有显著差异。根部表达量最低, 茎的相对表达量为根部的 2.73 倍, 叶柄的相对表达量是根部的 3.94 倍, 而叶片中的相对表达量最高, 是根部 9.75 倍 (图 5)。



不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$)

图 5 多穗柯 CHI 蛋白在不同器官中的表达量分析

Fig. 5 Analysis of the expression of CHI protein in different organs of *L. polystachyus*

3 讨论

本研究克隆得到多穗柯 CHI 基因与已报道其他物种中的 CHI 基因相比, 编码区基本一致。编码区明显存在 4 个外显子、3 个内含子。在植物中 CHI 基因按照其作用底物不同分为 2 类, 即非豆科中能够将 6'-羟基查耳酮异构化成 5-羟基黄酮的 II 型和豆科中将 6'-脱氧查耳酮和 6'-羟基查耳酮都转化为 5-脱氧黄酮和 5-羟基黄酮的 II 型; CHI II 基因的典型结构是含有 4 个外显子和 3 个内含子^[12]。由此可推测多穗柯中的 CHI 基因属于 CHI II 基因。多穗柯 CHI 的定位分析结果与茶、豌豆^[13]、芍药^[14]等的定位分析结果相一致, 说明 CHI 蛋白是一种存在于细胞质基质的非分泌蛋白。多穗柯 CHI 的跨膜分析和疏水性预测结果显示, 无跨膜区, 不存在疏水区域, 番茄、洋葱^[13]、芍药^[14]等的 CHI 不存在跨膜区结构域的特征相符合。本研究还发现多穗柯 CHI 蛋白有多个磷酸化位点, 无糖基化位点, 与芍药相同。芍药 CHI 多肽链的第 20 个氨基酸残基具有一个典型的特异性蛋白激酶 PKC, 该位点发生磷酸化后可能会影响查耳酮异构酶的活性^[14]。多穗柯

CHI 多肽链第 20 个氨基酸残基也是一个蛋白激酶 PKC 位点, 该位点是否是典型的特异性蛋白激酶 PKC 还需要进一步研究。

已有研究表明 CHI 基因的表达具有特异性, 在不同物种、不同部位发育时期和不同部位的时空表达特异性均有所差异^[15]。对多穗柯 CHI 基因的表达分析显示该基因的表达具有特异性, 与桑树 CHI 基因的表达相一致(叶片表达量最高, 根部最少)^[8], 但是与喜马拉雅紫茉莉 CHI 基因的表达不同(根>茎>叶)^[7]。推测 CHI 基因在不同部位的表达量可能与该部位类黄酮物质的种类有关, 也可能是与不同物种的不同部位的类黄酮物质总量有关。

本实验首次克隆了多穗柯 CHI 基因的 cDNA 序列全长, 对其生物信息学分析表明该基因编码的多肽链与其他物种的 CHI 蛋白同源性并不是很高, 但是多穗柯 CHI 蛋白还是具有 CHI 蛋白固有的保守序列和标志性位点。还发现 CHI 基因在不同物种中的相同部位的表达量具有明显差异。这为今后进一步通过 CHI 基因对多穗柯中黄酮类物质的合成进行调控研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 何春年, 彭 勇, 肖 伟, 等. 多穗柯甜茶的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1253-1255.
- [2] 李 楠, 刘 元, 侯滨滨. 黄酮类化合物的功能特性 [J]. 食品研究与开发, 2005, 26(6): 139-141.
- [3] 宋 菊, 黄 剑, 李志栋, 等. 多穗柯转录组分析及黄酮类化合物合成相关基因的挖掘 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 675-679.
- [4] Herles C, Braune A, Blaut M. First bacterial chalcone isomerase isolated from *Eubacterium ramulus* [J]. *Arch Microbiol*, 2004, 181(6): 428-434.
- [5] Mehdy M C, Lamb C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor wounding and infection [J]. *EMBO J*, 1987, 6(6): 1527-1533.
- [6] 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.
- [7] Lan X, Quan H, Xia X, *et al.* Molecular cloning and transgenic characterization of the genes encoding chalcone synthase and chalcone isomerase from the Tibetan herbal plant *Mirabilis himalaica* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 63(3): 419-426.
- [8] 刘长英, 赵爱春, 李 军, 等. 桑树查耳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.
- [9] Grotewold E, Peterson T. Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavonone isomerase [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 242(1): 1-8.
- [10] 邢朝斌, 龙月红, 吴 鹏, 等. 刺五加环阿屯醇合酶基因的克隆及其表达分析 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1387-1392.
- [11] 邢朝斌, 龙月红, 吴 鹏, 等. 刺五加皂苷合成关键酶基因表达的半定量 RT-PCR 分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(6): 691-696.
- [12] 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(3): 941-951.
- [13] 雷 桅, 邹 祥, 向 阳, 等. 植物查耳酮异构酶的生物信息学分析 [J]. 北方园艺, 2008, (2): 193-197.
- [14] 吴彦庆, 赵大球, 王 静, 等. 芍药查耳酮异构酶基因 (CHI) 克隆、密码子偏好性分析以及蛋白结构功能预测 [J]. 华北农学报, 2016, 31(2): 71-80.
- [15] 吴 冰, 祝钦珑, 郭余龙, 等. 查耳酮异构酶基因的分子特征及其在基因工程中的应用 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 175-181.