

• 药材与资源 •

鱼腥草查耳酮合成酶 1 基因 cDNA 克隆、差异表达及其蛋白质序列分析

魏 麟¹, 伍贤进^{1*}, 刘胜贵¹, 唐玉莲¹, 贺安娜¹, 徐 杰^{1,3}, 吴成就^{1,2}

1. 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
2. 中南大学湘雅医学检验所, 湖南 长沙 410083
3. 四川农业大学农学院, 四川 成都 611130

摘要: 目的 克隆鱼腥草查耳酮合成酶 1 (CHS1) 基因并分析其蛋白质序列。方法 根据已经克隆的植物 CHS 基因的保守序列设计一对引物, 以鱼腥草总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 和 SON-PCR 的方法快速获得 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 1 188 bp 的序列, 序列分析表明, 该片段编码 395 个氨基酸, 与其他高等植物 CHS 基因氨基酸序列同源性在 62.3% 以上, 生物信息学分析表明, 该蛋白含有 CHS 家族的特征多肽序列“RLMMYQQGCFAGGTVLR”和“GVLFQFGPGL”, 不含信号肽序列。相对荧光定量 PCR 分析表明, CHS1 基因在花中的表达量最高, 其次是地上茎, 再次是地下茎, 叶片中表达量最低。结论 首次从鱼腥草中克隆了 CHS1 基因, 为有效利用该基因奠定了基础。

关键词: 鱼腥草; 查耳酮合成酶; 基因克隆; 序列分析; 荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)23-3372-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.021

Cloning and differential expression of chalcone synthase gene 1 in *Houttuynia cordata* and its protein sequence analysisWEI Lin¹, WU Xian-jin¹, LIU Sheng-gui¹, TANG Yu-lian¹, HE An-na¹, XU Jie^{1,3}, WU Cheng-jiu^{1,2}

1. 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
2. Xiangya Medical Laboratory, Central South University, Changsha 410083, China
3. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: Objective To clone and sequence the chalcone synthase1 (CHS1) gene from the leaves of *Houttuynia cordata*. **Methods** The cloning primers were designed on the basis of the conserved sequences of the cloned CHS gene in other plants. The total RNA was extracted from the leaves of *H. cordata*. The sequence of CHS gene was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and SON-PCR techniques, and then the gene was ligated with pMD18-T Simple vector. The positive clone was sequenced after the identification of clone by PCR. **Results** We cloned a fragment of 1 188 bp. The analysis of sequencing indicated that the fragment encoded 395 amino acids and shared the sequence homology of more than 62.3% with CHS gene sequences from other higher plants. Bioinformatic analysis indicated that the CHS amino acids had no signal peptide sequences, but possessed the CHS family's characteristic sequences, RLMMYQQGCFAGGTVLR and GVLFQFGPGL. Relative real-time PCR analysis indicated that CHS1 showed the highest transcript abundance in the flowers, moderate levels in the stems, lower levels in the rhizomes, and the lowest levels in the leaves. **Conclusion** It is the first report that a novel CHS gene is cloned from *H. cordata*, which lays a foundation for the effective use of CHS1 gene.

Key words: *Houttuynia cordata* Thunb.; chalcone synthase; gene clone; sequence analysis; real-time fluorescence quantitative PCR

收稿日期: 2013-03-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870230); 湖南省高校创新平台开放基金项目 (12K132); 湖南省科技计划重点项目 (2013FJ6090)

作者简介: 魏 麟 (1974—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为分子遗传学。Tel: (0745)2851037 E-mail: hhweilin@163.com

*通信作者 伍贤进, 博士, 教授, 主要从事药用植物学与分子生物学研究。Tel: 13607459358 E-mail: hhwxianjin@163.com

鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb., 又称蕺菜、折耳根等, 是三白草科蕺菜属多年生草本植物, 广泛分布于我国长江流域以南各省。鱼腥草是传统中草药, 具有抗菌^[1]、抗炎^[2]、抗病毒^[3]、抗癌^[4]、抗氧化^[5]、抗过敏^[6]等功效, 广泛应用于治疗炎症和感染性疾病^[7-8]。研究表明, 鱼腥草有效药用成分主要是次生代谢产物黄酮及挥发油^[9]。植物体内黄酮生物合成首先是通过莽草酸途径 (shikimic acid pathway) 和苯丙氨酸代谢途径 (phenylalanine metabolism pathway) 生成查耳酮, 再转化为黄酮类化合物。查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 是黄酮类化合物生物合成的重要关键酶。近年来, 药用植物中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。鉴于鱼腥草 CHS 基因还未见报道, 本研究拟应用 RT-PCR 及改进 SON-PCR 的方法克隆 CHS 基因 cDNA 片段, 由于 CHS 几乎在所有植物中都以多基因家族存在^[10], 故将此克隆片段命名为 CHS1 基因, 并对其序列进行生物信息学分析及检测其在不同组织器官中的特异性表达, 为有效利用该基因及合理开发鱼腥草的药用价值奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鱼腥草样品经中央民族大学龙春林教授鉴定, 种植于怀化学院鱼腥草种植园, 采集鱼腥草新鲜地下茎、地上茎、叶片、花等样品, 洗净后, 经乙醇擦拭及焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理, 立即放入液氮中保存, 带回实验室, 于-80℃冰箱保存备用。

RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、Taq 酶、克隆载体 pMD 18-T Vector、质粒提取试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒、菌种 JM109、DNA 相对分子质量标记, T4 DNA 连接酶、荧光定量试剂盒 SYBR Prime ScriptTM RT-PCR Kit 及电泳类试剂等, 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 鱼腥草地下茎、地上茎、叶片及花 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℃保存备用。

1.2.2 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℃保存备用。

1.2.3 鱼腥草 CHS1 片段的获得 参照文献报道^[11], 合成一对简并引物 CHS-F 和 CHS-R。CHS-F:

5'-CCKTCHYTGGAYGCNMGRCARGAC-3'; CHS-R: 5'-GGBCCRAANCCRAANARMACACC-3'。(K=G/T, H=A/C/T, Y=C/T, N=A/C/G/T/U, M=A/C, R=A/G), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 扩增条件: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 50 min, 55℃退火 50 s, 72℃延伸 50 min, 35 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。

1.2.4 改进的 SON-PCR 法扩增鱼腥草 CHS1 侧翼序列 根据扩增得到的基因片段设计并合成了 2 条 5'嵌套引物 P1、P2 和 2 条 3'嵌套引物 P3、P4。P1: 5'-CGACGCCGGAGGTAGTGCAGA-3'; P2: 5'-GCGCGGCGGTGATTAGTTGGA-3'; P3: 5'-CAAAGAACATCGAGAAGAGCC-3'; P4: 5'-CTAGTGCCAAGGAGGGGAAGA-3'。

PCR 扩增条件: 第 1 轮 PCR 反应以鱼腥草 cDNA 50 ng 作为模板, 反应体系总体积 50 μL。扩增条件为 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 56℃退火 1 min, 72℃延伸 1.5 min, 5 个循环; 然后进入 1 个错配产生双链扩增阶段: 94℃变性 30 s, 29℃3 min, 以 0.5℃/s 升至 72℃, 72℃1 min, 经过 1 个循环后进入下一个新的循环: 94℃变性 10 s, 56℃退火 1 min, 72℃延伸 1.5 min, 60 个循环; 最后 72℃延伸 5 min。第 2 轮 PCR 反应以第 1 轮 PCR 产物的 1/10 为模板。第 2 轮 PCR 扩增反应条件: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 45 s, 55℃退火 45 min, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72℃延伸 5 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, 然后由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 搜索, 确定为同源序列后, 应用 DNASTAR 软件包、Contig1 等软件进行拼接和分析。得到全长后, 从起始密码子设计一对包含 ATG 的上游引物 F(5'-ATGGTGATCGCTGCTGGTGCT-3') 和包含有 TGA 的下游引物 R(5'-TCAGAGAGGAACGCTGAGCAA-3'), 采用“1.2.3”项的方法进行 PCR 扩增, 回收特异条带, 克隆测序, 确保克隆出的是正确的基因序列。应用 BioEdit 软件分析, 并用 Mega 4 软件对不同物种的 CHS 基因进行 UPMAG 聚类分析。

1.2.6 相对荧光定量 PCR 表达分析 根据 CHS1 cDNA 全长序列,按照荧光定量 PCR 引物设计原则设计一对特异引物 P5: 5'-ACCGACACCCACCTA-GATAG-3'和 P6: 5'-GTTCCAGTCCGAGATGCCG-A-3',获得的扩增片段为 265 bp。参考本实验室已克隆的鱼腥草 18S rDNA 序列设计引物 18S-F: 5'-CCTCCGGCGTTGTTACTTTG-3'和 18S-R: 5'-C-CCGACTGTCCCTGTAATCA-3',以获得的 147 bp 的扩增片段为内参照,对 CHS1 表达进行分析。反应在 ABI 7 500 实时定量 PCR 仪上进行,反转录反应体系为:总 RNA 2 μ L (约 1 μ g), 5 $\times$ 缓冲液 4 μ L, 反转录酶 1 μ L, 随机引物 (100 μ mol/L) 1 μ L 及寡聚胸苷酸引物 (50 μ mol/L) 1 μ L, 加 ddH₂O (RNase free) 至总体积 20 μ L。荧光定量 PCR 扩增的反应体系为:模板 cDNA 2 μ L, 2 $\times$ SYBR Premix Ex TaqTM 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 均为 0.375 μ L, 50 $\times$ ROX Reference DyeII 0.4 μ L, 加 ddH₂O (RNase free) 至 20 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 共 35 个循环。每个试验重复 3 次,利用 ABI 7500 PCR 仪 Sequence Detection software 软件^[12]和 Excel 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及检测

以鱼腥草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 1.93,表明 RNA 纯度较高,可以用于下一步实验。

2.2 鱼腥草 CHS 片段的 PCR 扩增

以鱼腥草基因组 cDNA 为模板,用简并引物 CHS-F 和 CHS-R 进行 PCR 扩增得到一条约为 860

bp 的条带 (图 2),克隆测序。结果与预期目标片段相符,选择 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,确定其是 CHS 同源序列。

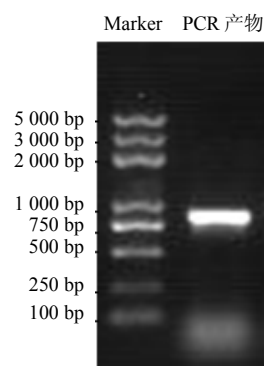


图 2 鱼腥草 CHS1 的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of CHS1 from *H. cordata*

2.3 鱼腥草 CHS1 5'与 3'端侧翼序列的扩增

根据得到的 CHS1 cDNA 片段设计引物 P1、P2,应用改进的 SON-PCR 方法对 CHS1 基因的 5'端进行扩增,经过 2 轮 PCR 扩增得到 1 条约为 500 bp 的 DNA 片段 (图 3),克隆、测序,结果得到片段长度为 496 bp,经 BLASTn 比对后确定其是 CHS1 基因的 5'端序列的一部分。同样,根据扩增片段设计引物 P3、P4 进行 3'端的扩增,经 2 轮扩增同样得到 1 条约 350 bp 的片段 (图 4)。克隆、测序,结果显示片段长 365 bp,在 NCBI 上进行比对证实为 CHS1 的 3'端序列。

2.4 鱼腥草 CHS1 基因验证及其 cDNA 全长克隆

为了保证得到的是正确的序列,用包含 ATG 的上游引物和包含有 TGA 的下游引物 F 和 R,以鱼

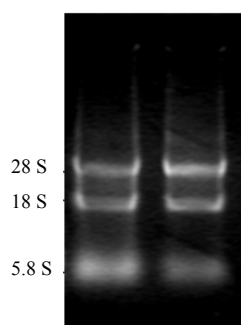
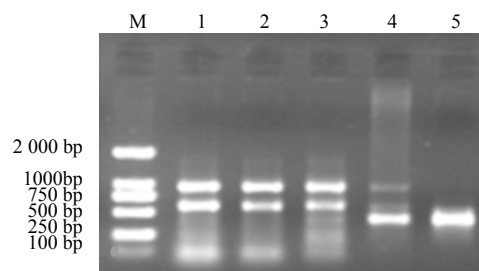


图 1 鱼腥草叶总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA from leaves of *H. cordata*



M-Marker; 泳道 1~3 为第 1 次 SON-PCR 产物,引物 P1; 泳道 4、5 为第 2 次 SON-PCR 产物,引物 P2

M-Marker Lanes 1-3: The first SON-PCR primary product (Primer P1); Lanes 4 and 5: The second product (Primer P2)

图 3 CHS1 5'端的 SON-PCR 产物

Fig. 3 SON-PCR product of 5' end of CHS1

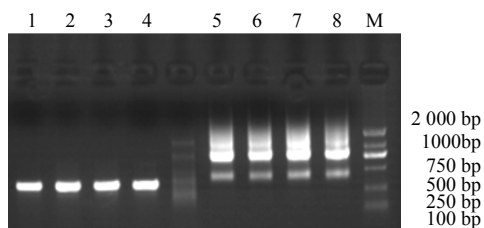


Fig. 4 SON-PCR product of 3' end of CHS1

图4 CHS1 3'端的 SON-PCR 产物

Fig. 4 SON-PCR product of 3' end of CHS1

1 ATGGTGATCGCTGCTGGTGTCTTCTTGGTTCGATGATGATCAGACAGGCTCAGAGAGCTGAT
 61 M V I A A G A S S F D E I R Q A Q R A D
 GGACGTGCAGGCATCTTGGCTATTGGCAAGGCTAACCGTGAGAACCATGTGCTTCAGCOG
 G R A G I L A I G T A N R E N H V L Q P
 121 GAGTATCCTGACTACTATTTCGCAACACAGTGAACACATGAOCGACCTCAAGCAG
 E Y P D Y Y F R N T N S E H M T D L K Q
 181 AAGTTCAAGCCCATGAGCGACAAGTGGACTATTTCGGAACGCCACATGCATCTGACGGAG
 K F K R M S D K S T I R K R H M H L T E
 241 GAATTCCTCAAGGAAAACCCACACATGTGGCTTACATGGTTCCTTCTTGGATGCTAGA
 E F L K E N P H M C A Y M V P S L D A R
 301 CAAGACTTGGTGGTGGTGGAGGTGCCAGGCTCGGCAAGGAGGGOOGGOCAGGOCATC
 Q D L V V V E V P R L G K E A A A K A I
 361 AAGGAGTGGGCGCAGCCAAATOCAAAATTACCACTCATCTTCTGCACTAOCCTOOGGC
 K E W G Q P K S K I T H L I F C T T S G
 421 GTGACATGCGCGGCGCGATTACAGCTCAOCAAAGCTCCTTGGGCTCCGCCCTGGGTC
 V D M P G A D Y Q L T K L L G L R P S V
 481 CGCCGCTTCATGCTCTACAGCAGGGCTGTTTCGAGGAGGCACAGTCTCCGCCCTGGGC
 R R F M L Y Q Q G C F A G G T V L R L A
 541 AAGGACCTTGGGAGAAACAATGTCGGGGCTGGCGTCTGCTGCTGTTTCAAGAACTCACT
 K D L A E N N V G A R V L V V C S E I T
 601 GCGTCAOCTTCCGCGGTCCCAOCCAGCAOCCACCTAGATAGCATGGTGGGCCAGGGOCTC
 A V I F R G P T D T H L D S M V G Q A L
 661 TTCGGGGATGGTGTGCGCAGTCATCATCGGTGCGGATCCAGACCCAGOCATCGAGCGG
 F G D G A A A V I I G A D P D P A I E R
 721 COCTTGTTCCAACTAATCAOCCGCGGCAAAOAGATTCTCCGCGACTCAGACGGGGOCATT
 P L F Q L I T A A Q T I L P D S D G A I
 781 GACGGTCACTTGGCGAGGTAGGCCTGACCTTCCACTGCTCAAGGACGTGCCAGGCOCTC
 D G H L R E V G L T F H L L K D V P G L
 841 ATCTCAAGAACATCGAGAGAGCCTGAGGAGGGGTTGACCCOCTCGGCATCTGGGAC
 I S K N I E K S L K E A F D P L G I S D
 901 TGGAACTOCATCTTCTGGATAGOGCATOCCGCGGGGCGGCCATATTAGACCAGGTGGAG
 W N S I F W I A H P G G P A I L D Q V E
 961 GCGAAGGTCGCGCTGAGGAGGAGAGCTGCGAGOCAGCAGAGAGGTGCTGAGGGATTAT
 A K V G L K E E K L R A S R E V L R D Y
 1021 GCAACATGTCCAGCGOCTGTGCTTGTTCACAAATGGACGTGATGAGGAAGGCTGOC
 G N H S S A C V L F T M D V M R K A S A
 1081 AAGGAGCGGAGAGCAOCCAGCGGAGGGCTGGACTGGGGTGTCATTTGGATTGGA
 K E G K S T T G E G L D W G V L F G F G
 1141 CCAGGTCCTACTGTGACACAGTCGCTCTGCTCAGCGTTCCTCTCTGA
 P G L T V D T V V L L S V P L *

图5 鱼腥草 CHS1 基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 5 Nucleic acid sequence and speculated amino acid sequence of CHS1 gene fragment of *H. cordata*

白不含信号肽序列，属于非分泌蛋白，该蛋白具有 CHS 所特有的高度保守的催化活性中心 (Cys、His、Asn 和 Phe)，还具有查尔酮合酶家族的特征多肽序列：RLMMYQQGCFAGGTVLR 和 GVLFQFGPGL^[13-16]。预测其二级结构，发现 α -螺旋占 44.05%， β -转角占 7.34%，无规卷曲占 31.14%，延伸链占 17.47% (图 6)。利用 SWISS-MODEL^[17-20]对其三级结构进行预测，结果见图 7。

2.6 鱼腥草 CHS1 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，鱼腥草 CHS1

腥草 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，回收特异条带，克隆、测序。得到一段长度为 1 188 bp 的序列，含一个完整的开放阅读框架 (ORF)，共编码 395 个氨基酸 (图 5)。BLAST 比对结果表明所克隆的 DNA 序列为鱼腥草的 CHS1 基因序列。

2.5 鱼腥草 CHS1 推导氨基酸序列的基本特征

利用 ExPASy 服务器在线软件对鱼腥草 CHS1 进行理化性质分析，该蛋白编码一个含 395 个氨基酸残基的蛋白，分子式为 $C_{1920}H_{3067}N_{531}O_{566}S_{17}$ ，其相对分子质量为 43 190.7，等电点预测为 6.38。用 Signal P3.0 Server 检测，结果显示鱼腥草 CHS1 蛋

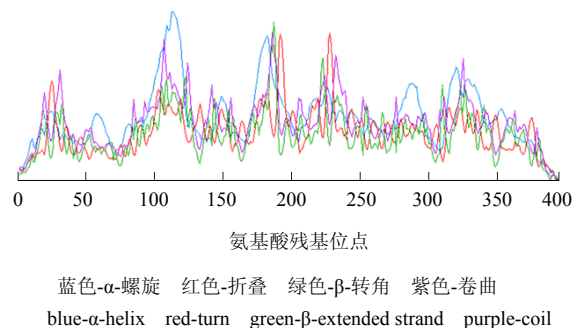


图6 CHS1 蛋白二级结构预测图

Fig. 6 Two-dimensional structure prediction of CHS1 protein

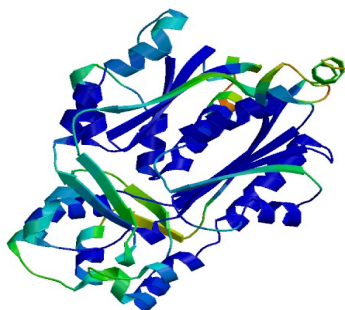


图7 CHS1 蛋白三级结构预测图

Fig. 7 Three-dimensional model prediction of CHS1 protein

与菊花 (ABF69124)、虎杖 (AFD64563)、水仙 (AEN04070)、黄秋葵 (ACE60221)、梨 (ADP09376.1)、番茄 (NP_001234033)、桃 (AEJ88217)、玉米 (NP_001142246)、葛 (AFC87828) 和圆叶牵牛 (AAB62587) 的 CHS 分子的相似性分别为 81.3%、81.2%、80.3%、80.2%、79.7%、79.2%、78.8%、78.7%、75.3% 和 62.3%，表明 CHS1 氨基酸序列同源性较高，说明其在进化过程中，具有一定的保守性。将序列进行聚类分析，结果显示鱼腥草与圆叶牵牛 (旋花科) 亲缘关系相对较远，与菊花 (菊科)、虎杖 (蓼科)、水仙 (石蒜科)、黄秋葵 (锦葵科) 的亲缘关系相对较近 (图 8)。

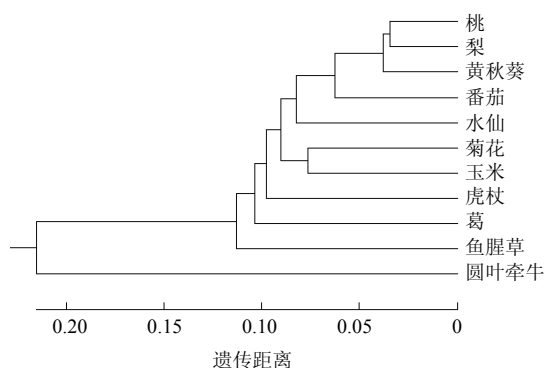


图8 鱼腥草与其他植物 CHS 的 UPGMA 进化树

Fig. 8 UPGMA dendrogram of CHS in *H. cordata* and other plants

2.7 鱼腥草 CHS1 的差异表达

分别以鱼腥草 18S rRNA 为内参照，采用荧光定量 PCR 的方法对鱼腥草不同组织中 CHS 基因的表达进行了检测，结果表明，CHS1 基因在花中的表达量最高，其次为地上茎，再次为地下茎，叶中最低。从相对表达量上来看，花中的表达水平几乎为地上茎中的 5.3 倍，地下茎中的 6.2 倍，而最低的叶中表达量仅为花中的 1/40~1/35 (图 9)，虽然在

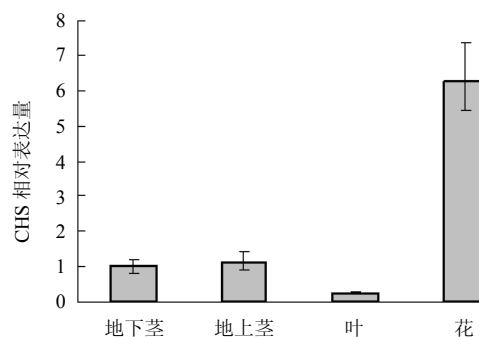


图9 鱼腥草不同组织中 CHS1 基因的相对表达量

Fig. 9 Relative expression amount of CHS1 in different tissues of *H. cordata*

各组织中均检测到了 CHS1 的转录本，但表达量的显著差异说明其表达具有一定的组织特异性。

3 讨论

比较 RACE 技术，应用改进的 SON-PCR 技术克隆已知基因片段的旁侧序列具有其自身的优势：操作简单，速度快，成本低，并可应用基因组 DNA 或 cDNA 为模板分别获得目的基因的 DNA 序列或 cDNA 序列。然而，目前应用 SON-PCR 技术进行研究的相关文献还较少，如邓洪渊等^[21]克隆 *Botrytis cinerea* 羟甲基戊二酰 CoA 还原酶基因，肖燕等^[22]克隆长鞭红景天 CHS 基因，刘毅等^[23]抗禾谷孢囊线虫基因 LRR 区、谢南南等^[24]克隆枣基因片段，以及林玲等^[25]克隆观赏桃 CHS 基因，在其他物种中尚未见报道。主要原因是由于 SON-PCR 技术出现较晚，尚未得到广泛应用；另外有可能是 SON-PCR 方法的假阳性较高的问题，但是这一问题容易解决，本实验采用设计嵌套引物，提高退火温度，比对测序结果；在所得到的 cDNA 全长基础上再设计引物，进行 RT-PCR 克隆，测序验证。实验结果表明，通过改进的 SON-PCR 技术获得了鱼腥草 CHS 基因 cDNA 全长，进一步证明了该技术克隆基因全长是快速可行，并为其广泛应用提供科学依据。

研究获得的鱼腥草 CHS1 基因含 1 个完整的开放阅读框 1 188 bp，编码 395 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，发现该基因编码的蛋白质具有 CHS 家族存在的所有功能位点和特征多肽序列^[13-16]。是 1 种膜外蛋白，没有信号肽序列，这提示鱼腥草 CHS1 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^[26]。同时鱼腥草 CHS1 基因表达存在一定的组织特异

性,在花中的表达量最高,结果与许多学者研究不同植物 CHS 基因差异表达的结果类似^[27-29],这可能与其在植物生命活动过程中所发挥的作用有关。

CHS 是类黄酮代谢途径中的第一个关键限速酶,本研究首次成功克隆了鱼腥草 CHS1 基因 cDNA 序列,为进一步研究该基因的功能及其在鱼腥草黄酮类物质形成中的作用及调控机制,以及为进一步构建过表达载体和遗传转化体系,实现黄酮类主要成分在植株及细胞中高效表达,培育高产黄酮类成分的鱼腥草植株的遗传改良和分子育种奠定理论基础。

参考文献

- [1] Kim G S, Kim D H, Lim J J, *et al.* Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen salmonella within the RAW 264.7 macrophage [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(11): 2012-2017.
- [2] Kim D, Park D, Kyung J, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Houttuynia cordata* supercritical extract in carrageenan-air pouch inflammation model [J]. *Lab Anim Res*, 2012, 28(2): 137-140.
- [3] Chen X, Wang Z, Yang Z, *et al.* *Houttuynia cordata* blocks HSV infection through inhibition of NF- κ B activation [J]. *Antivir Res*, 2011, 92(2): 341-345.
- [4] Zhou N N, Tang J, Chen W D, *et al.* Houttuyninum, an active constituent of Chinese herbal medicine, inhibits phosphorylation of HER2/neu receptor tyrosine kinase and the tumor growth of HER2/neu-overexpressing cancer cells [J]. *Life Sci*, 2012, 90(19/20): 770-775.
- [5] Toda S. Antioxidative effects of polyphenols in leaves of *Houttuynia cordata* on protein fragmentation by copper-hydrogen peroxide *in vitro* [J]. *J Med Food*, 2005, 8(2): 266-268.
- [6] Lee J S, Kim I S, Kim J H, *et al.* Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(1): 34-40.
- [7] 刘冬梅. 鱼腥草注射液致不良反应及文献分析 [J]. 天津中医药, 2004, 21(5): 437-438.
- [8] 潘颖, 陈晨, 王乐, 等. 鱼腥草滴眼液治疗急性卡他性结膜炎的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 371-374.
- [9] 伍贤进. 鱼腥草种质资源与规范化栽培技术研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2011, 29-34.
- [10] Martin C R. Structure, function and regulation of the chalcone synthase [J]. *Int Rev Cytol*, 1993, 147: 233-284.
- [11] 王金玲, 瞿礼嘉, 陈军, 等. CHS 基因外显子 2 的进化规律及其用于植物分子系统学研究的可行性 [J]. 科学通报, 2000, 45(9): 942-949.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [13] Lanz T, Tropf S, Marner F J, *et al.* The role of cysteines in polyketide synthases [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(15): 9971-9976.
- [14] Ferrer J L, Jez J M, Bowman M E, *et al.* Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis [J]. *Nat Struct Biol*, 1999, 6: 775-784.
- [15] Schröder J, Raiber S, Berger T, *et al.* Plant polyketide synthases: A chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(23): 8417-8425.
- [16] Kim S H, Mizuno K, Fujimura T. Regulated expression of ADP glucose pyrophosphorylase and chalcone synthases during root development in sweet potato [J]. *Plant Growth Regul*, 2002, 38: 173-179.
- [17] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195-201.
- [18] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31: 3381-3385.
- [19] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2714-2723.
- [20] Kiefer F, Arnold K, Künzli M, *et al.* The SWISS-MODEL Repository and associated resources [J]. *Nucl Acids Res*, 2009, 37: 387-392.
- [21] 邓洪渊, 王闵霞, 孙雪文, 等. 一种改进的 SON-PCR 基因扩增方法 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 857-860.
- [22] 肖燕, 杨足君, 李光蓉, 等. 用 SON-PCR 快速获得长鞭红景天 CHS 基因全长及其序列分析 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 15-19.
- [23] 刘毅, 翟旭光, 吴芳, 等. SON-PCR 扩增抗禾谷孢囊线虫基因 LRR 区及序列分析 [J]. 农业生物技术学

- 报, 2006, 14(4): 565-568.
- [24] 谢南南, 乔 勇, 赵 锦, 等. 一种适合扩增枣基因片段侧翼序列的 SON-PCR 技术 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(4): 781-788.
- [25] 林 玲, 汤浩茹, 陈 清, 等. 观赏桃查尔酮合成酶基因的克隆及其序列分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39(3): 581-587.
- [26] 付 明, 魏 麟, 余 娟, 等. 显齿蛇葡萄 CHS 基因 cDNA 克隆及蛋白质序列分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 85-89.
- [27] Noda N, Kanno Y, Kato N, *et al.* Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) [J]. *Physiol Plant*, 2004, 122(2): 305-313.
- [28] Mudalige R G, Champagne M M, David H, *et al.* Cloning and characterization of two anthocyanin biosynthetic genes from *Dendrobium orchid* [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 2005, 130(4): 611-618.
- [29] 周 琳, 王 雁, 彭镇华. 牡丹查耳酮合酶基因 Ps-CHS1 的克隆及其组织特异性表达 [J]. 园艺学报, 2010, 37(8): 1295-1302.