

红花查尔酮合成酶基因的克隆、生物信息学分析及表达

康亚兰, 裴瑾*, 刘薇, 罗静, 刘维, 陈翠平

成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 四川 成都 610075

摘要: 目的 克隆红花查尔酮合成酶基因(chalcone synthase, *CHS*), 运用生物信息学分析 *CHS*, 比较花期中每天 *CHS* 的表达, 为红花有效成分合成及调控机制研究提供基础。方法 从新鲜红花花冠中提取 RNA, 反转录为 cDNA, 设计特异性引物, 克隆获得 *CHS*。通过生物信息学对该基因蛋白的特征进行分析, 使用 MEGA5.1 构建 *CHS* 与相关物种 *CHS* 的系统进化树, 利用 real-time PCR 分析花期中每天红花 *CHS* 的表达量, 并进行分析和比较。结果 克隆获得的红花 *CHS*, 序列全长为 1 149 bp, 具有 1 041 bp 的完整开放阅读框, 编码 346 个氨基酸。将该蛋白通过 NCBI 上的 Blastp 比对发现, 该蛋白属于 *CHS* 家族, 比对结果显示红花 *CHS* 与 100 余种 NCBI 上登录的植物有相似性, 其中与水飞蓟、翠菊、菊花、红凤菜的相似性分别达 95%、95%、94%、94%。将相似性在 90% 以上的物种用 MEGA5.1 构建进化树, 结果显示红花 *CHS* 与水飞蓟 *CHS* 亲缘关系最近。通过 ProtParam 预测红花 *CHS* 蛋白分子式为 $C_{1678}H_{2693}N_{451}O_{493}S_{20}$, 相对分子质量为 37 700, 等电点为 6.10, 负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu)为 42, 正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys)为 38。基因表达分析结果表明红花 *CHS* 在花期中第 3 天的相对表达量最高, 远远高于花期其余时间。结论 成功克隆、分析并表达了红花 *CHS*, 为红花有效成分合成及调控机制研究提供基础。

关键词: 红花; 查尔酮合成酶基因; 基因克隆; 生物信息学分析; 基因表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)16-2385-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.020

Cloning, bioinformatic analysis, and expression of chalcone synthase gene in *Carthamus tinctorius*

KANG Ya-lan, PEI Jin, LIU Wei, LUO Jing, LIU Wei, CHEN Cui-ping

State Key Laboratory Breeding Base of the Research and Development for Traditional Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective To clone the chalcone synthase (*CHS*) gene in *Carthamus tinctorius*, to analyze the bioinformation of *CHS*, to compare the expression of *CHS* during the florescence, and to provide the foundation for composition and regulation mechanism of the active ingredients in *C. tinctorius*. **Methods** RNA was obtained from fresh safflower corolla, cDNA was reversely transcribed, specific primers were designed, and then *CHS* was cloned. The protein characteristics was analyzed using bioinformatics, the phylogenetic tree of *CHS* was constructed using MEGA5.1, the expression of *CHS* during the florescence was analyzed using real time-PCR. **Results** The 1 149 bp *CHS* sequence in *C. tinctorius* was obtained, which has a 1 041 bp ORF, encoding 346 amino acids. This protein belongs to the *CHS* family according to Blastp in NCBI. The *CHS* in safflower was similar to that in above 100 plants, and the similarities to *Silybum marianum*, *Callistephus chinensis*, *Chrysanthemum x morifolium*, and *Gynura bicolor* were respectively reaching 95%, 95%, 94%, and 94%. It has the closest relationship to *S. marianum* according to the phylogenetic tree using MEGA5.1. The *CHS* formula was $C_{1678}H_{2693}N_{451}O_{493}S_{20}$ and the molecular weight was 37 700, with the isoelectric point of 6.10. The number of negatively charged amino acid residues (Asp + Glu) was 42, and the number of positively charged amino acid residues (Arg + Lys) was 38. The gene expression analysis showed that the highest expression of *CHS* in safflower was on day 3 of florescence, much higher than that on the other days. **Conclusion** The *CHS* in safflower is successfully cloned, analyzed, and expressed, which provides the foundation for composite and regulation mechanism of the active ingredients in *C. tinctorius*.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; chalcone synthase gene; gene cloning; bioinformation analysis; gene expression

红花来源于菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 为活血化瘀要药, 红花作为一种多用途的综合资源植物, 红花色素是天然食用色素, 红花种子所含的油可作食用油, 年用量一直保持在

收稿日期: 2014-01-13

基金项目: 四川省教育厅重点项目“红花有效成分累积与其合成途径中相关功能基因的关联性分析”(14ZA0074)

作者简介: 康亚兰(1989—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药用植物资源。Tel: 15982120550 E-mail: wonderingkk@sina.com

*通信作者 裴瑾(1970—), 女, 教授, 研究方向为中药品质与资源开发。Tel: 13880369322 E-mail: peixin@163.com

5 000 吨以上^[1]。红花花冠含黄酮、生物碱等成分，其中黄酮类成分红花黄色素 (safflower yellow, SY) 是红花中研究最多、最主要的有效成分。黄酮类化合物是广泛存在于药用植物中的一类化合物，大都与糖类结合为苷结构存在，多具有调血脂、扩张冠脉、止血、镇咳、祛痰、减低血管脆性等作用。此外，黄酮类化合物具有多种多样的生物学功能，如调节植物生长、保护植物免受紫外线的损伤，以及作为植物抗毒素 (phytoalexin) 和活性氧清除剂等^[2]。黄酮类成分多种多样的药理功能和生物活性备受研究者的关注。

查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 是黄酮类化合物合成途径中的第 1 个关键酶，也就是红花有效成分红花黄色素合成途径中的第 1 个关键酶。它催化该途径的第 1 步，即将 3 分子的丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA) 和 1 分子的 4-香豆酰辅酶 A (4-coumaroyl-CoA) 结合形成第 1 个具有 C₁₃ 架的黄酮类化合物——查尔酮，该产物进一步衍生转化构成了各类黄酮类化合物^[3]。CHS 在植物中广泛存在，第 1 个植物 CHS 基因序列是 1983 年在荷兰芹中发现的。到目前为止，GenBank 数据库中已经有 4 000 多条植物 CHS 的核苷酸序列。

红花花冠为红花的药用部位，红花黄色素主要存在于红花花冠中，其量远远大于根、茎、叶等其他部位^[4]。因此，本研究设计特异性引物，从红花新鲜花冠中克隆获得 CHS。通过生物信息学对该基因蛋白的特征进行分析，使用 MEGA5.1 构建 CHS 与相关物种 CHS 的系统进化树，利用 real time-PCR 分析花期中每天红花 CHS 基因的表达量，并进行分析和比较。

1 材料

新鲜红花花冠采于成都中医药大学药用植物园，由裴瑾教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L.，花期每天早上 8 点采摘，清洁后吸干水分直接用于 RNA 提取。

cDNA 反转录试剂盒、Thunderbird Sybr qPCR Mix 购于 TOYOBO 公司，植物总 RNA 提取试剂盒购于 Omega 公司，Trizol 总 RNA 提取试剂购于天根公司，2×Taq PCR MasterMix 购于 Biomed 公司，多功能 DNA 纯化回收试剂盒购于 BioTeke 公司。

2 方法

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 Trizol 总 RNA 提取试剂和植物总 RNA 提

取试剂盒提取样品总 RNA，筛选 RNA 提取方法。利用紫外分光光度仪测定总 RNA 的 A₂₆₀ 和 A₂₈₀。选择 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8~2.0，凝胶电泳检测为 3 条带的总 RNA 进行反转录，反转录反应按 cDNA 合成试剂盒说明书进行。

2.2 CHS 克隆与测序

根据文献报道^[5]红花 CHS 序列使用软件 Primer Primer 5.0、在线软件 <http://bioinfo.ut.ee/primer-3-0.4.0/>、<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer> 设计引物，见表 1。以 cDNA 为模板，使用 2×Taq PCR MasterMix 分别进行 PCR 扩增，扩增体系 20 μL：2×Taq PCR MasterMix 10 μL；正向引物 1 μL，反向引物 1 μL，cDNA 模板 5 μL，dd H₂O 3 μL。考察扩增条件（退火温度以 50~65 °C 梯度考察）：94 °C，3 min；30 循环（94 °C，30 s；50~65 °C，30 s；72 °C，10 min）；72 °C，5 min。PCR 结果凝胶电泳检测，多功能 DNA 纯化回收试剂盒 (BioTeke) 纯化回收 PCR 产物，由北京梓熙生物科技有限公司测序。

表 1 引物设计
Table 1 Primers design

编号	引物序列(3'—5')
引物 1	正向: CTTACCAACATCCATCG
	反向: CGGGTTTGAGTAGTAATTATGA
引物 2	正向: ATGGCATCCTTAACCGATATT
	反向: TTAAGCGGCAATGGGGGT
引物 3	正向: ACCAACATCCATCGGTGT
	反向: CGGGTTTGAGTAGTAATTATGA
引物 4	正向: GTGTCCTCGTGGTTTGCT
	反向: CTGACTTCCTCCTCTTCTACT

2.3 CHS 生物信息学分析

使用在线软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>，找出 CHS 的开放阅读框 (open reading frame, ORF)，并获得其编码蛋白质序列；使用在线软件 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>，将预测结果与 NCBI 中已登录的物种进行对比分析；使用软件 MEGA5.1 将预测结果与相似性达 90% 以上的物种 CHS 构建进化树；使用在线软件 <http://web.expasy.org/protparam/>，分析其编码蛋白质序列的一级结构。

2.4 红花花期 CHS 的表达

查阅文献报道^[5]，得到红花 CHS 的 real-time

PCR 引物序列和内参基因 25s 的 real-time PCR 引物序列。扩增体系 10 μ L: Thunderbird SYBR qPCR Mix 5 μ L, 正向引物 0.5 μ L, 反向引物 0.5 μ L; cDNA 模板 1 μ L, dd H₂O 3 μ L。考察引物扩增曲线、溶解曲线及标准曲线, 考察 real-time PCR 条件 (退火温度以 50~65 $^{\circ}$ C 梯度考察): 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 30 循环 (94 $^{\circ}$ C, 30 s; 50~65 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 10 min); 72 $^{\circ}$ C, 5 min。确定条件后测试花期 7 d 的红花 CHS 和 25s 的表达量, 并在 Bio-Rad CFX Manager 中分析得到相对表达量。

3 结果与分析

3.1 RNA 提取结果

Trizol 法提取所得 RNA 紫外分光光度法测定 A_{260} 和 A_{280} , A_{260}/A_{280} 为 2.0, 凝胶电泳检测可见清晰 3 条带, 可用于后续实验, 见图 1。由于红花花冠富含红花黄色素等黄酮类物质, 干扰 RNA 提取, 加大了 RNA 提取的难度。试剂盒的方法不能将红花 RNA 提取出来, 在使用 Trizol 法的过程中应注意以下几点: 离心 15 min, 保证漂浮于 Trizol 提取液中的红花花冠粉末沉淀; 分层后, 在吸取上清液时, 吸取 50% 水相, 尽可能避免吸收到中间层的蛋白, 以保证 RNA 的纯度; 异丙醇沉淀 RNA 过程中, 增加至 2 h, 尽可能多的使 RNA 沉淀; RNA 清洗过程中, 3 次用 300 μ L 75% 乙醇清洗, 保证色素被清洗干净。

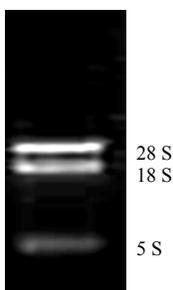


图 1 Trizol 法提取红花 RNA 凝胶电泳图
Fig. 1 Gel electrophoresis of safflower RNA extracted by Trizol

3.2 CHS 克隆及测序结果

引物 2 在扩增条件: 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 30 个循环 (94 $^{\circ}$ C, 30 s; 64.2 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 10 min); 72 $^{\circ}$ C, 5 min 下, 可以得到 1 000 bp 左右的产物, 见图 2。

3.3 CHS 生物信息学分析结果

测序分析表明, 红花 CHS 全长 1 149 bp, 包含一段 1 041 bp 的 ORF, 编码 346 个氨基酸组成的蛋

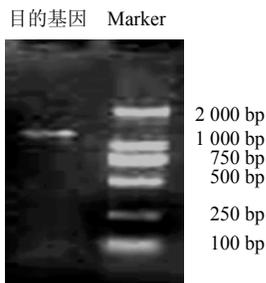


图 2 PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR products

白, 见图 3。将该蛋白通过 NCBI 上的 Blastp 比对发现, 该蛋白属于 CHS 家族。比对结果显示, 红花 CHS 与 100 余种 NCBI 上登录的植物有相似性, 其中与菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* (L.) Gaertn.、翠菊 *Callistephus chinensis* (L.) Nees、菊花 *Chrysanthemum x morifolium* Ramat.、红凤菜 *Gynura bicolor* (Willd.) DC.、黑心菊 *Rudbeckia hirta* L.、大丽花 *Dahlia pinnata* Cav. 的相似性分别达 95%、95%、94%、94%、93%、92%。将相似性达 90% 以上的比对结果用 MEGA5.1 构建进化树, 见图 4。通过 ProtParam 预测 CHS 蛋白分子式为 C₁₆₇₈H₂₆₉₃N₄₅₁O₄₉₃S₂₀, 相对分子质量为 37 700, 等电点为 6.10, 负电荷的氨基酸残基数 (Asp+Glu) 为 42, 正电荷的氨基酸残基数 (Arg+Lys) 为 38。

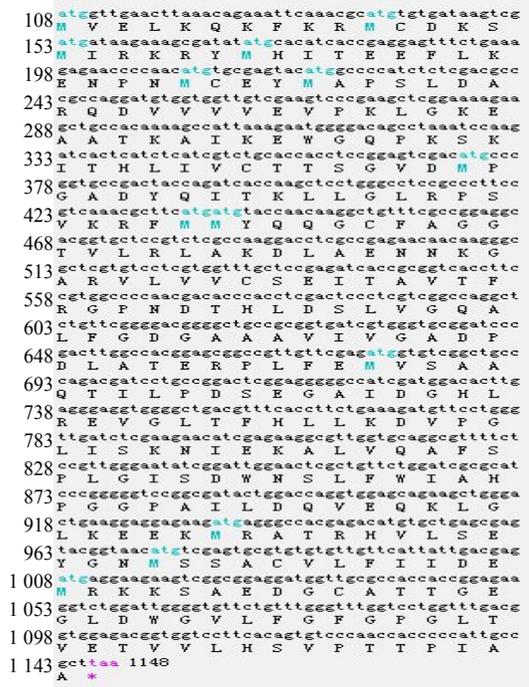


图 3 红花 CHS 编码的氨基酸序列

Fig. 3 Amino acid sequence encoded by safflower CHS

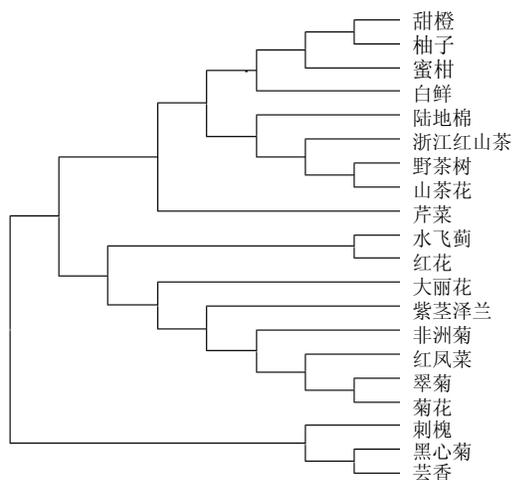


图 4 红花 CHS 与相关物种 CHS 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of CHS in *C. tinctorius* and other relative related species

表 2 25s 和 CHS 的 C_q 值及表达量

Table 2 C_q value and relative expression of 25s and CHS

目的基因	花期	相对表达量	相对表达量标准误差	平均 C _q 值	C _q 值标准误差
25s	第 1 天			25.55	0.098 68
25s	第 2 天			25.71	0.050 30
25s	第 3 天			28.34	0.038 63
25s	第 4 天			26.01	0.057 42
25s	第 5 天			27.62	0.078 96
25s	第 6 天			28.24	0.010 46
25s	第 7 天			29.11	0.079 35
CHS	第 1 天	0.278 17	0.015 20	25.61	0.038 26
CHS	第 2 天	1.098 70	0.091 33	23.44	0.130 44
CHS	第 3 天	2.801 89	0.138 37	24.61	0.073 15
CHS	第 4 天	0.125 01	0.009 29	27.44	0.110 53
CHS	第 5 天	0.823 35	0.073 97	25.93	0.113 57
CHS	第 6 天	1.123 37	0.026 80	26.05	0.039 37
CHS	第 7 天	0.852 23	0.060 98	27.42	0.100 37

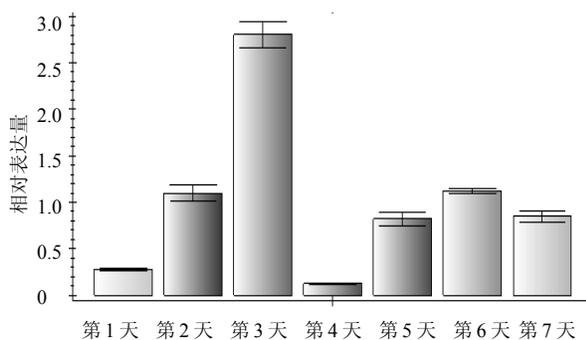


图 5 红花花期 CHS 相对表达量

Fig. 5 Relative expression of CHS in safflower during florescence

3.4 红花花期 CHS 表达结果

引物序列可用于 real-time PCR, 条件考察结果是 CHS 扩增条件: 95 °C, 2 min; 30 循环 (95 °C, 15 s; 61.4 °C, 20 s; 72 °C, 20 s), 内参基因 (25s) 扩增条件: 95 °C, 2 min; 30 循环 (95 °C, 5 s; 55 °C, 20 s; 72 °C, 20 s), 引物特异性良好。花期 7 d CHS 相对于 25s 的表达量分析结果见表 2 和图 5, 结果表明红花开花第 3 天表达量最高, 高达 2.8, 远远高于其余几天, 表达量第 2 的是开花第 6 天, 也仅仅 1.2。花期 7 d 中, 红花花色从淡黄色逐渐变成红色, 花冠数量逐渐增多, 大多在第 3、4 天持平。有文献报道^[5], 红花在花开第 3 天黄酮类成分羟基红花黄色素 A 量最高, 与基因表达结果相吻合。

4 讨论

研究克隆获得的红花 CHS, 序列全长为 1 149 bp, 具有 1 041 bp 的完整 ORF, 编码 346 个氨基酸。

将该蛋白通过 NCBI 上的 Blastp 比对发现, 该蛋白属于 CHS 家族。比对结果显示红花 CHS 与 100 余种 NCBI 上登录的植物有相似性, 其中与菊科植物水飞蓟、翠菊、菊花、红凤菜、黑心菊、大丽花的相似性分别达 95%、95%、94%、94%、93%、92%。将相似性在 90% 以上的物种用 MEGA5.1 构建进化树, 结果显示红花 CHS 与水飞蓟 CHS 亲缘关系最近, 经典植物分类学中红花和水飞蓟同属于菊科 (Compositae) 管状花亚科 (Carduoideae) 菜蓟族 (Cynareae)。通过 ProtParam 预测 CHS 蛋白分子式为 C₁₆₇₈H₂₆₉₃N₄₅₁O₄₉₃S₂₀, 相对分子质量为 37 700, 等电点为 6.10, 负电荷的氨基酸残基数 (Asp+Glu)

为42, 正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys)为38。花期7 d中, 红花花色从淡黄色逐渐变成红色, 花冠数量逐渐增多, 大多在第3、4天持平。基因表达分析结果表明红花 *CHS* 在花期第3天表达量最高, 远远高于其余几天。该研究成功设计了PCR引物并考察得到了相应的PCR扩增条件及real-time PCR条件, 克隆得到了1 149 bp的红花 *CHS* 基因, 并对该基因进行了生物信息学分析, 为红花 *CHS* 基因提供了更多更详尽的信息。在今后研究中, 可以同时结合化学成分研究, 找出基因表达与化学成分的关联性, 为有效成分合成及调控机制研究提供更多的信息。

随着分子生物学的迅速发展, 药用植物也开始涉及到分子生物学领域, 中药有效成分研究越来越趋向于有效成分的合成及调控机制的研究。在这些研究中, 最为活跃的研究领域是与活性成分形成关系最密切的生物合成相关基因克隆研究。由于临床上对天然药物的实际需求不断增加, 以及基因克隆与表达技术的进步, 近年来药用植物功能基因的克隆呈现快速增长的趋势^[7]。在药用植物中, 黄酮类化合物代谢合成途径及相关基因的研究处于起步阶段, 但也取得了较大的成果, 为药用植物黄酮类化合物合成途径及相关功能基因的深入研究奠定了基

础。通过生物合成途径的研究, 推动药用植物次生代谢工程的发展, 提高中药材的品质, 为中药的良种选育、规范化种植和质量控制提供技术支撑, 将是中药材品质研究的前沿和热点课题。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [2] 王青云. 中草药的有效成份探讨 [J]. 内蒙古中医药, 2010(13): 105-106.
- [3] Koes R E, Francesca Q, Joseph N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution [J]. *Bioessays*, 1994, 16: 123-132.
- [4] 郭美丽, 张芝玉, 张汉明, 等. 不同栽培居群红花各器官的组织构造和化学成分含量 [J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(7): 441-444.
- [5] Huang L L, Yang X, Sun P, *et al.* The first illumina-based *de novo* transcriptome sequencing and analysis of safflower flowers [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): 1-11.
- [6] 侯拥钺, 杨晓君, 王建华. 不同产地和采摘时间对红花有效成分的影响 [J]. 内蒙古中医药, 2009(9): 49-50.
- [7] Andy P, Brandle S, Kehr J, *et al.* Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser induced fluorescence detection [J]. *Transgenic Res*, 2000, 9: 243-260.