

• 药材与资源 •

管花肉苁蓉花中查耳酮合酶的基因克隆、功能鉴定与表达分析

邱海玲^{1,2}, 王方明³, 米芯雨², 张泽坤², 杜宇², 史社坡¹, 王晓晖^{1*}, 屠鹏飞^{3*}

1. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 102488

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

3. 北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

摘要: **目的** 研究管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* 花中查耳酮合酶 (chalcone synthase) CtCHS 蛋白的功能和 *CtCHS* 基因在白、红、紫 3 种颜色花中的表达模式。 **方法** 利用 RT-PCR 克隆 *CtCHS* 基因并进行生物信息学分析。将 pET-28a-CtCHS 质粒转入大肠杆菌通过 IPTG 诱导蛋白表达。将 CtCHS 重组蛋白与底物 4-香豆酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 孵育并利用 HPLC 和 MS 检测产物。将 pCambia1300-35S-GFP-CtCHS 质粒转入拟南芥原生质体观察 CtCHS 蛋白亚细胞定位。利用 qRT-PCR 检测 *CtCHS* 基因在 3 种颜色管花肉苁蓉花中的表达模式。 **结果** 克隆出 1 条 *CtCHS* 基因, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度为 1173 bp, 编码 390 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 42 800, 具有查耳酮合酶保守的催化残基 Cys164、His303、Asn336。利用大肠杆菌外源表达 CtCHS 蛋白并纯化获得重组蛋白。CtCHS 蛋白能够催化 4-香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 生成柚皮素查耳酮。CtCHS 蛋白主要定位于细胞质。*CtCHS* 基因在紫、红色花中高表达, 相对表达量分别为白色花中的 8.44、3.21 倍。 **结论** 从管花肉苁蓉花中克隆出 1 条 *CtCHS* 基因并外源表达蛋白, CtCHS 蛋白具有查耳酮合酶功能, *CtCHS* 基因在颜色更深的花中表达量更高, 表明 *CtCHS* 基因可能调控管花肉苁蓉花色, 为进一步研究管花肉苁蓉花色调控机制奠定基础。

关键词: 管花肉苁蓉; 查耳酮合酶; 酶活性分析; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7797-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.022

Cloning, functional identification and expression analysis of chalcone synthase from *Cistanche tubulosa*QIU Hai-ling^{1,2}, WANG Fang-ming³, MI Xin-yu², ZHANG Ze-kun², DU Yu², SHI She-po¹, WANG Xiao-hui¹, TU Peng-fei³

1. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

3. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Objective To study the function of chalcone synthase from *Guanhuaroucongong* (*Cistanche tubulosa*) and the expression pattern of *CtCHS* gene in white, red and purple flowers. **Methods** The *CtCHS* gene was cloned by RT-PCR and bioinformatics analysis was carried out. The pET-28a-CtCHS plasmid was transferred into the *Escherichia coli* to induce protein expression by IPTG. The CtCHS recombinant protein was incubated with the substrates *p*-coumaroyl CoA and malonyl CoA, and the products were detected by HPLC and MS. The pCambia1300-35S-GFP-CtCHS plasmid was transferred into the protoplast of *Arabidopsis thaliana* to observe the subcellular localization of the CtCHS protein. The expression pattern of *CtCHS* gene in the flowers of *C. tubulosa* with three colors was detected by qRT-PCR. **Results** A *CtCHS* gene was cloned. The length of the open reading frame (ORF) was 1173 bp, encoding 390 amino acids, and the molecular weight of the protein was 42 800.

收稿日期: 2023-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773832)

作者简介: 邱海玲 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药植物分子生物学与生物合成。E-mail: hailingqiuhy@126.com

*通信作者: 王晓晖 (1981—), 女, 副研究员, 研究方向为中药植物分子生物学与生物合成。E-mail: wangxhui2014@163.com

屠鹏飞 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药活性成分与中药复方。E-mail: pengfeitu@163.com

CtCHS contained the catalytic residues Cys164, His303, Asn336, which were conserved in chalcone synthase. The CtCHS protein was expressed in *E. coli* and purified to obtain the recombinant protein. CtCHS protein could catalyze *p*-coumaroyl CoA and malonyl CoA to produce naringenin chalcone. CtCHS protein was mainly localized in the cytoplasm. *CtCHS* gene was highly expressed in purple and red flowers, and the relative expression levels were 8.44 and 3.21 times higher than that in white flowers, respectively. **Conclusion** A *CtCHS* gene was cloned from the flower of *C. tubulosa* and protein was expressed. CtCHS protein has chalcone synthase function, and the expression of *CtCHS* gene is higher in darker flowers, indicating that *CtCHS* gene may regulate the flower color of *C. tubulosa*, which lays a foundation for further research on the regulation mechanism of the flower color of *C. tubulosa*.

Key words: *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight; chalcone synthase; enzyme activity analysis; subcellular localization; expression analysis

管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight 为列当科肉苁蓉属植物, 自然分布于新疆南疆^[1], 在新疆和田地区大面积人工栽培^[2]。管花肉苁蓉具有极高的药用价值, 其肉质茎为《中国药典》2020 年版收载药材肉苁蓉的来源之一^[3]。针对管花肉苁蓉肉质茎的研究日益增多, 但是对其花的生物学研究相对较少。管花肉苁蓉花期 4~5 月^[4], 主要具有白、红、紫 3 种花色。管花肉苁蓉具有丰富的花色, 但是其花色调控机制未见报道。花色与花瓣组织结构、色素的种类、含量与分布有关, 受环境因子和遗传因素调控^[5]。植物花中的色素主要包括黄酮类化合物、类胡萝卜素和甜菜碱 3 大类^[6], 其中黄酮类化合物作为苯丙烷类的二级代谢产物在植物中广泛存在, 能够展现出淡黄色至蓝色, 具有最广泛的颜色范围^[7]。黄酮类化合物的种类与含量影响许多植物的花色, 如芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的 3 个品种中, 黄金轮中主要含有查耳酮使花显现为黄色, 玉楼红星中主要含有黄酮、黄酮醇使花显现为白色, 红艳争辉中主要含有有色的花色素苷使花呈现为紫红色^[8]。花色是许多观赏植物的重要特征, 也是吸引传粉昆虫的关键因素^[9], 研究表明传粉昆虫访问频率最高的为深紫色肉苁蓉植株^[10]。对管花肉苁蓉花中黄酮类化合物合成基因进行生物学研究有利于阐明管花肉苁蓉花色调控机制, 为利用基因工程技术改良花色提供理论依据, 促进其形成更丰富的花色, 增加观赏性, 扩大应用范围。

黄酮类化合物的生物合成途径起始于苯丙烷途径, 苯丙氨酸首先在苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 作用下转化为肉桂酸, 肉桂酸经肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H) 和 4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (4-coumarate-coenzyme A ligase, 4CL) 催化反应生成 4-香豆酰辅酶 A^[11]。1 分子的 4-香豆酰辅酶 A 与 3 分子的丙二

酰辅酶 A 经查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 催化生成柚皮素查耳酮, 柚皮素查耳酮具有黄酮类化合物的基本骨架, 在查耳酮异构酶、黄烷酮-3-羟化酶、二氢黄酮醇 4-还原酶等作用下生成多种黄酮类化合物如异黄酮、黄酮醇、花青素等^[12]。CHS 作为黄酮类化合物生物合成途径的关键酶, 调控植物中黄酮类化合物的含量, 对植物花色也有重要调控作用^[13]。如日本龙胆 *Gentiana scabra* Bunge CHS 转录后基因沉默能抑制花色素苷的生物合成并使花冠裂片特异性白化^[14], 毛花猕猴桃 *Actinidia eriantha* Benth. CHS 基因沉默降低花瓣中花色素苷含量且使红色花瓣颜色变淡^[15]。因此, 本研究从管花肉苁蓉花中克隆得到 1 条 *CtCHS* 基因, 并对其信息进行生物信息学分析、原核表达与纯化、酶活性分析、亚细胞定位分析及 3 种颜色花中的表达分析, 探究 CtCHS 蛋白的功能和 *CtCHS* 基因的表达模式, 初步探索 CtCHS 与管花肉苁蓉花色的关系, 为管花肉苁蓉花色调控机制研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

管花肉苁蓉花于 2018 年 5 月采自新疆和田地区于田县, 采样时遵循随机原则, 选取生理状态良好、株高一致的管花肉苁蓉。白、红、紫 3 种花色的管花肉苁蓉各取 3 株, 经北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定为管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) Wight, 经液氮速冻后干冰保存运至北京。大肠杆菌 DH5 α 化学感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 化学感受态细胞购自北京全式金生物科技股份有限公司; pET-28a、pCambia1300-35S-GFP 载体购自武汉转导生物实验室有限公司。丙二酰辅酶 A 购自 Sigma 公司, 4-香豆酰辅酶 A、柚皮素查耳酮购自上海源叶生物科技有限公司, 柚皮素购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 仪器

Nanodrop 2000C 分光光度计 (Thermo Fisher 公司, 美国); 梯度 PCR 仪 (Eppendorf 公司, 德国); CFX 96 荧光定量 PCR 仪、UVP 凝胶成像仪、凝胶电泳仪、蛋白电泳仪 (BioRad 公司, 美国); EnSpire 酶标仪 (PerkinElmer 公司, 美国); 恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); DHZ-D 型大容量全温振荡器 (太仓市实验设备厂); THZ-82A 型水浴恒温振荡器 (江苏科析仪器有限公司); AIRTECH 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 高压蒸汽灭菌锅 (TOMY 公司, 日本); Milli Q 纯水仪 (Millipore, 美国); LC-20A 高效液相色谱仪 (Shimadzu 公司, 日本); UPLC-Q-Exactive-Orbitrap 高分辨质谱 (Thermo Fisher 公司, 美国); FV1200 激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司, 日本)。

2 实验方法

2.1 RNA 提取与 cDNA 合成

管花肉苁蓉花经液氮研磨后通过 RNA 提取试剂盒 (Norgen, Cat 17200) 提取总 RNA, 通过 NanoDrop 2000C 检测 RNA 浓度和质量, 挑选 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.1 的 RNA 样品用于逆转录合

成 cDNA。使用 M-MLV 逆转录酶 (Promega, M170B) 将检测合格的总 RNA 反转录为 cDNA, 实验操作均按照说明书进行。

2.2 CtCHS 基因的克隆

根据本课题组的管花肉苁蓉花转录组数据^[16]筛选出 1 条具有完整开放阅读框的 *CtCHS*, 利用 SnapGene 软件根据基因序列设计特异性引物 (表 1)。以管花肉苁蓉花 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增体系为 2×Phanta Max Buffer 25 μL, dNTP Mix (10 mmol/L) 1 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, cDNA 2 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL, ddH₂O 17 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 25 个循环; 72 °C 反应延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 利用 DNA 纯化试剂盒 (诺维赞, Cat DC301-01) 进行胶回收, 再通过快速克隆试剂盒 (诺维赞, Cat C601-01) 将回收的 DNA 片段与 pCE2 TA/Blunt-Zero 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 37 °C 过夜培养后挑选单克隆菌株划线送公司测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物作用	引物名称	引物序列 (5'→3')
序列扩增	CtCHS-F1	ATGATGACCGTCGAGGAGATTC
	CtCHS-R1	TTAGTTGATCGGCACACTATGCA
	CtCHS-F2	CAGCAAATGGGGTCGCGGATCCATGATGACCGTCGAGGAGATTC
	CtCHS-R2	GTGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGTTAGTTGATCGGCACACTATGCA
	CtCHS-F3	CACGGGGGACGAGCTCGGTACCATGATGACCGTCGAGGAG
	CtCHS-R3	CCATGTCGACTCTAGAGGATCCGTTGATCGGCACACTATG
qRT-PCR	CtCHS-F4	GGAGATTCGTAGGGCTCAAC
	CtCHS-R4	CAGGATTTCTTCAGTTAGGTG
	CtF-box-F	CGTTTCTGTCTCTCCGTGAG
	CtF-box-R	CCCTGTTATCCTTCCAATGC

2.3 生物信息学分析

通过 ProtParam 在线软件分析蛋白理化性质; 利用 Prot Scale 在线工具分析蛋白亲水性/疏水性; 运用在线工具 SOPMA 预测蛋白二级结构; 利用在线分析软件 SWISS-MODEL 预测蛋白三级结构; 采用在线软件 TMHMM 预测蛋白的跨膜结构; 运用 DNAMAN 软件将 *CtCHS* 与其他物种 CHS 氨基酸序列进行同源性比对; 利用 MEGA-X 软件构建系统进化树, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ), 通过泊松校正法计算进化距离, Bootstrap 重复次数为 1000 次。

2.4 CtCHS 原核表达与纯化

根据 *CtCHS* 序列设计带有酶切位点 *Bam*HI、*Xho*I 的引物, PCR 扩增相应目的片段。利用内切酶 *Bam*HI、*Xho*I 酶切 pET-28a 载体和目的片段, 通过 5 min Universal Ligation Mix (诺维赞, Cat C311-01) 连接目的片段与载体, 转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 挑选单克隆菌株测序, 测序正确后提取质粒。将测序验证后的 pET-28a-*CtCHS* 质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 参考丁宁等^[17]的方法以异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 低温诱导蛋白表达并通过 Ni²⁺亲和色谱柱 (Cytiva, Cat 17531901) 纯化蛋白,

经超滤管 (Millipore, 30 000) 离心浓缩蛋白并脱盐后保存于 20 mmol/L KPB 缓冲液 (pH 8.0, 含 1 mmol/L EDTA) 中, 置于 -80 °C 冰箱长期保存备用。

2.5 CtCHS 酶活性分析

CtCHS 酶反应体系: 100 mmol/L KPB (pH 7.5) 468 μ L、1 mmol/L 丙二酰辅酶 A 10 μ L、5 mmol/L 4-香豆酰辅酶 A 2 μ L, CtCHS 重组蛋白 20 μ L, 于 37 °C 水浴反应 12 h 后 800 μ L 醋酸乙酯萃取 3 次, 氮气流吹干后溶于 100 μ L 甲醇。利用高效液相色谱仪检测产物, 条件为 Ultimate LP-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 柱温 30 °C, 上样量为 10 μ L, 以水 (A) 和乙腈 (B) 作为流动相, 洗脱梯度: 0~10 min, 30% B; 10~20 min, 30%~60% B; 20~25 min, 60%~70% B; 25~30 min, 70%~80% B; 30~35 min, 80%~100% B; 35~40 min, 100% B; 40~46 min, 100%~30% B。体积流量为 1 mL/min, 在 290 nm 波长处检测。

利用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 进一步检测, 液相条件为 Waters Acquity UPLC BEH Shield RP₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 3.0 mm, 1.7 μ m), 柱温 40 °C, 柚皮素查耳酮和柚皮素对照品上样量为 4 μ L, 酶反应产物上样量为 7 μ L, 以水 (A)-乙腈 (B) 作为流动相, 洗脱梯度: 0~5 min, 30% B; 5~15 min, 30%~60% B; 15~20 min, 60%~100% B; 20~25 min, 100% B; 25~31 min, 100%~30% B。体积流量为 0.3 mL/min。质谱条件为电喷雾离子源, 以氮气为载气, 鞘气压力 3.5 MPa, 辅助气压力 1.0 MPa, 喷雾压力 3500 V, 毛细管温度 350 °C, 辅助气加热温度 200 °C, 正负离子模式, 扫描离子范围 m/z 为 100~1500, Full MS 分辨率为 35 000, dd-MS² 分辨率为 17 500, (N) CE/stepped nce 设置为 35、60。

2.6 CtCHS 蛋白亚细胞定位

根据 CtCHS 序列及无缝克隆原理设计带有酶切位点 *Kpn* I、*Bam*H I 的引物, PCR 扩增相应目的片段。利用限制性内切酶 *Kpn* I、*Bam*H I 酶切 pCambia1300-35S-GFP 质粒, 通过无缝克隆试剂盒 (诺维赞, Cat C115-01) 连接目的片段与载体, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选单克隆菌株测序, 测序正确的菌株提取质粒。利用 PEG4000 将 pCambia1300-35S-GFP-CtCHS、pCambia 1300-35S-GFP 质粒分别转化拟南芥原生质体, 弱光下培养 8~10 h, 在激光共聚焦显微镜下观察 CtCHS 蛋

白的亚细胞定位。

2.7 CtCHS 表达模式分析

根据 CtCHS 序列利用 DNAMAN 设计实时荧光定量引物, 以 F-box 为内参基因, 引物序列见表 1, 通过实时荧光定量 PCR 检测不同颜色的管花肉苁蓉花中的 CtCHS 相对表达量。利用 TransStart Green qPCR SuperMix (全式金, AQ101-02) 以 SYBR Green 荧光染料法测定, 反应体系: 2 $\times$ TransStart Green qPCR SuperMix 5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.2 μ L, cDNA 模板 0.5 μ L, 无核苷酸酶水 4.1 μ L, 采用两步法进行反应, 反应程序参考董先娟等^[18]的方法。每个样品包含 3 个生物学重复, 重复 3 次实验。实验数据通过 Excel 进行分析, 以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 CtCHS 相对表达量, 利用 GraphPad Prism 8 进行显著性分析并绘制柱状图。

3 结果与分析

3.1 CtCHS 基因的克隆

利用管花肉苁蓉花转录组数据筛选出 4 条注释为 “chalcone synthase” 的序列, 通过 NCBI 的 Blast 比对发现仅有一条序列具有 CHS 基因的全长且 FPKM 大于 10。根据该序列设计特异性引物, 以管花肉苁蓉花 cDNA 为模板, PCR 扩增得到约 1200 bp 片段 (图 1)。将 PCR 产物胶回收, 与 pCE2 TA/Blunt-Zero 载体连接, 测序结果与转录组分析相符, 将该基因命名为 CtCHS, 序列长度为 1173 bp, 编码 390 个氨基酸。

3.2 CtCHS 的生物信息学分析

3.2.1 CtCHS 理化性质与跨膜域分析 采用在线软件 ProtParam 分析 CtCHS 基因编码蛋白的理化性质, CtCHS 编码 390 个氨基酸, 分子式为

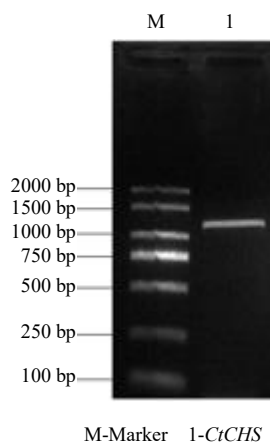


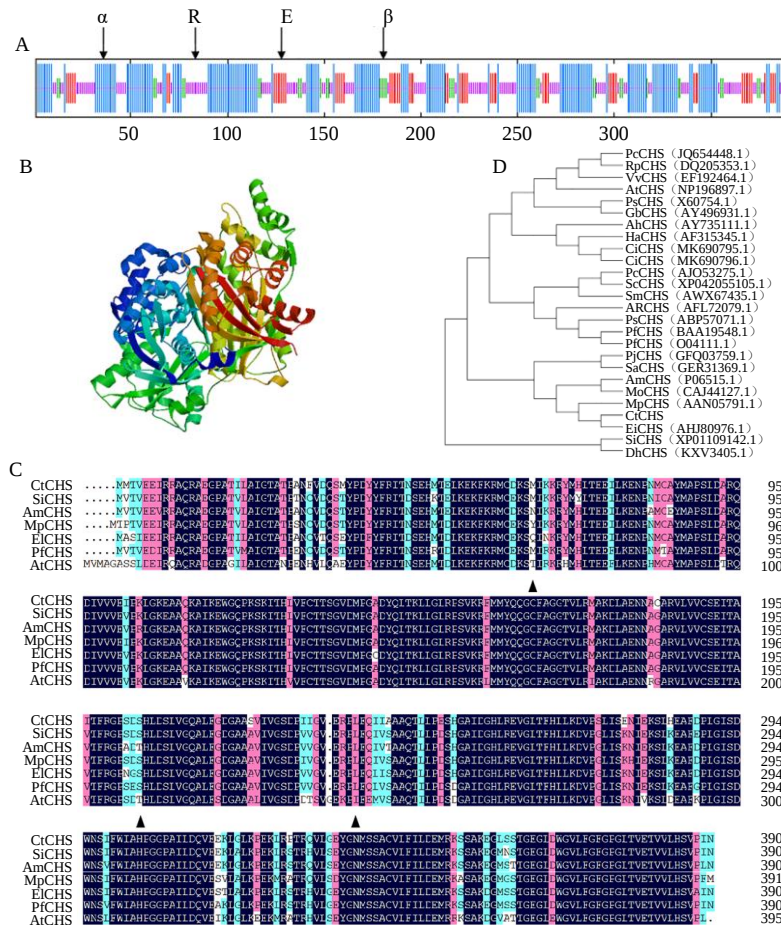
图 1 CtCHS 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of CtCHS gene

C₁₉₀₈H₃₀₄₁N₅₁₁O₅₆₂S₂₂, 相对分子质量为 42 836.54, 理论等电点为 5.85, 不稳定系数 II 为 43.24 属于不稳定蛋白, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.052, 属于亲水性蛋白。进一步运用 Prot Scale 在线工具分析蛋白亲水性/疏水性, 分析结果显示 CtCHS 蛋白亲水性/疏水性最大值为 2.422 (342), 最小值为 -2.489 (119)。CtCHS 基因编码的氨基酸肽链中亲水性氨基酸残基数多于疏水性氨基酸残基, 属于亲水性蛋白。采用在线软件 TMHMM 预测蛋白的跨

膜结构, CtCHS 蛋白无跨膜结构域。

3.2.2 CtCHS 蛋白二级结构与三级结构的预测 运用在线工具 SOPMA 预测蛋白二级结构, 结果如图 2-A 所示, 44.87%的 α -螺旋、31.03%的随机卷曲、15.64%的延伸链和 8.46%的 β -折叠组成了 CtCHS 蛋白的二级结构。利用在线分析软件 SWISS-MODEL 预测蛋白三级结构, 以水稻 CHS1 的晶体结构为模板, 预测 CtCHS 蛋白三维结构, 结果如图 2-B 所示, 管花肉苁蓉 CtCHS 与水稻 CHS1 一致性为 83.55%。



A-CtCHS 蛋白二级结构预测 α - α -螺旋 β - β -折叠 E-延伸链 R-无规则卷曲 B-CtCHS 蛋白三级结构预测 C-CtCHS 与其他植物氨基酸序列比对, 黑色三角形表示保守催化残基 D-CtCHS 系统进化树

A-predicted secondary structure of CtCHS protein α - α -helix β - β -turn E-extended strand R-random coil B-deduced three-dimensional structure of CtCHS protein C-multiple sequence alignment of CtCHS and CHS from other plants. The residues that compose the active site are indicated with black triangles D-phylogenetic analysis of CtCHS

图 2 CtCHS 生物信息学分析
Fig. 2 Bioinformatic analysis of CtCHS

3.2.3 序列比对及系统进化树分析 运用 DNAMAN 软件将 CtCHS 与其他物种 CHS 氨基酸序列进行同源性比对, 结果如图 3-C 所示, CtCHS 氨基酸序列与芝麻 *Sesamum indicum* L. (XP_011091402.1)、金鱼草 *Antirrhinum majus* L. (P06515.1)、通泉草 *Mazus pumilus* (N. L. Burman)

Steenis (AAN05791.1)、沟酸浆 *Erythranthe lewisii* G. L. Nesom & N. S. Fraga (AHJ80976.1)、白苏 *Perilla frutescens* (L.) Britton (O04111.1)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (NP_196897.1) 中 CHS 的氨基酸序列高度相似, 相似度依次为 90.93%、90.68%、90.18%、89.42%、89.42%、81.61%。

此外,多序列比对还表明 CtCHS 具有保守催化残基 Cys164、His303、Asn336。为进一步了解管花肉苁蓉 CtCHS 在植物 CHS 家族中的进化位置,将 CtCHS 与其他植物的 CHS 蛋白利用 MEGA-X 软件构建系统进化树,结果如图 3-D 所示,管花肉苁蓉 CtCHS 与沟酸浆 *E. lewisii* (AHJ80976.1) EICHS 亲缘关系较接近。

3.3 CtCHS 原核表达与纯化

将 pET-28a-CtCHS 质粒转入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3),通过 IPTG 低温诱导蛋白表达。利用镍离子亲和色谱柱纯化蛋白,纯化蛋白经 10% SDS-PAGE 检测,结果如图 3 所示, CtCHS 蛋白条带出现在 40 000 附近,与 CtCHS 蛋白相对分子质量 42 800 相符。

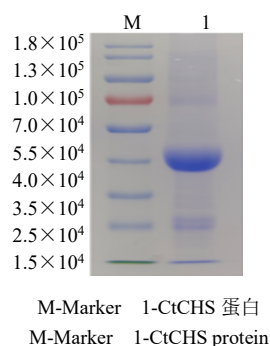
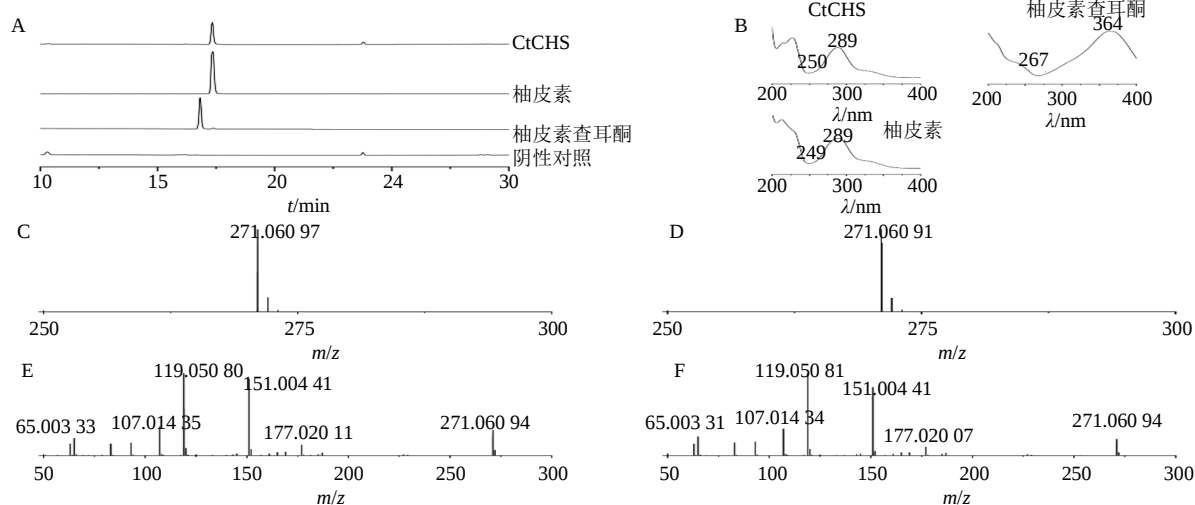


图 3 CtCHS 重组蛋白 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant CtCHS protein



A-CtCHS 酶反应产物、柚皮素、柚皮素查耳酮、阴性对照的色谱图 B-CtCHS 酶反应产物、柚皮素、柚皮素查耳酮的紫外吸收光谱图 C、D-CtCHS 酶反应产物、柚皮素一级质谱图 E、F-CtCHS 酶反应产物、柚皮素二级质谱图

A-chromatograms of products of CtCHS reaction, naringenin, naringenin chalcone and negative control B-ultraviolet absorption spectra of products of CtCHS reaction, naringenin and naringenin chalcone C, D-MS spectra of products of CtCHS reaction and naringenin E, F-MS² spectra of products of CtCHS reaction and naringenin

图 4 CtCHS 酶活性分析

Fig. 4 Enzyme activity analysis of CtCHS protein

3.4 CtCHS 酶活性分析

为了鉴定 CtCHS 的功能,将纯化的 CtCHS 蛋白与丙二酰辅酶 A、4-香豆酰辅酶 A 共同孵育反应并利用 HPLC 和 MS 检测产物。自然条件下柚皮素查耳酮在溶液中不稳定,容易环化为柚皮素,因此选择柚皮素查耳酮和柚皮素作为标准品对照。HPLC 检测结果如图 4-A、B 所示,酶反应产物与柚皮素标准品的保留时间相近,紫外吸收光谱中均在 289 nm 处有最大吸收,而与柚皮素查耳酮的保留时间、紫外吸收光谱均不同,而作为阴性对照的高温灭活 CtCHS 蛋白与底物孵育后的产物中无柚皮素查耳酮、柚皮素。进一步通过质谱检测,一级质谱(图 4-C、D)表明酶反应产物具有[M-H]⁻峰 m/z 271.060 97,而柚皮素具有[M-H]⁻峰 m/z 271.060 91。对比 MS² 图谱(图 5-E、F),CtCHS 酶反应产物与柚皮素均有 m/z 107、151、177 的特征碎片峰,与文献报道相符^[19],表明 CtCHS 具有查耳酮合酶活性,能将丙二酰辅酶 A 与 4-香豆酰辅酶 A 催化反应为柚皮素查耳酮。

3.5 亚细胞定位分析

为研究 CtCHS 蛋白在细胞中的作用位置,构建 pCambia1300-35S-GFP-CtCHS 质粒转化拟南芥原生质体观察其亚细胞定位。结果如图 5 所示,作为对照的 pCambia1300-35S-GFP 蛋白分布于细胞核

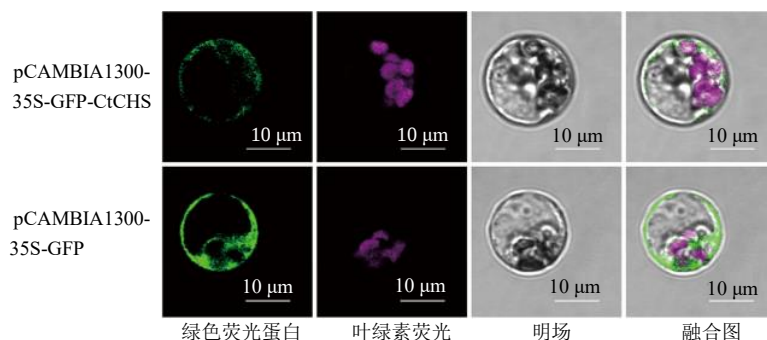


图 5 CtCHS 在拟南芥原生质体中的亚细胞定位分析

Fig. 5 Subcellular localization analysis of CtCHS protein in *A. thaliana* protoplast

和细胞质中，而 pCambia1300-35S-GFP-CtCHS 融合蛋白则主要分布于细胞质，表明 CtCHS 蛋白可能在植物细胞的细胞质中发挥功能。

3.6 CtCHS 表达模式分析

利用 qRT-PCR 检测 CtCHS 在白、紫、红 3 种颜色管花肉苘蓉花中的相对表达量，结果如图 6 所示，CtCHS 在紫、红色花中表达量均显著高于白色花中表达量。相比白色花，紫色花中 CtCHS 表达量是其 8.44 倍，红色花中 CtCHS 表达量是其 3.21 倍，这些结果表明 CtCHS 表达量变化可能与管花肉苘蓉花色差异有关，表达量越高花色越深，表达量越低花色越浅。

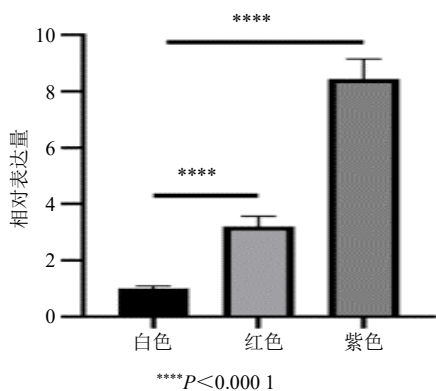


图 6 CtCHS 在不同颜色花中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of CtCHS in flowers with different colors

4 讨论

CHS 是黄酮类化合物生物合成途径的关键酶，在许多植物中都与花色调控有关，如石竹 *Dianthus chinensis* L.^[20]、碧冬茄 *Petunia × hybrida* Hort. ex Vilm.^[22] 的花色都受 CHS 的调控。管花肉苘蓉主要具有白、红、紫 3 种花色，但是尚未见其花色调控

机制的报道。本研究通过管花肉苘蓉花转录组数据分析利用 RT-PCR 克隆出 1 条 CtCHS 基因，并对其进行生物信息学分析，结果表明 CtCHS 与沟酸浆 (AHJ80976.1) EICH5 氨基酸序列相似度较高且有较近的亲缘关系。CHS 是一种 III 型聚酮合酶 (PKS III)，研究发现 CHS 具有保守的 Cys-His-Asn 催化三联体^[23]。本研究中，氨基酸序列比对分析表明 CtCHS 具有保守的催化残基 Cys164、His303、Asn336，表明 CtCHS 可能具有典型的查耳酮合酶功能。利用大肠杆菌原核表达 CtCHS 蛋白进行酶活性分析，以 HPLC 和 MS 检测，发现 CtCHS 蛋白能够催化 4-香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 生成柚皮素查耳酮。

CHS 在许多植物中参与黄酮类化合物的合成，但是不同物种中亚细胞定位不同。如红花 *Carthamus tinctorius* L. CtCHS^[24]、广东桑 *Morus atropurpurea* Roxb. MaCHS^[25]、紫茎泽兰 *Eupatorium adenophorum* Spreng. EaCHS^[26] 均定位于细胞质，而黄牡丹 *Paeonia delavayi* var. *lutea* (Delavay ex Franch.) Finet et Gagnep. PdCHS^[27]、茄子 *Solanum melongena* L. SmCHS^[28] 则定位于细胞质和细胞核，在葡萄 *Vitis vinifera* L. 中 VvCHS 定位于细胞质、细胞核和细胞壁^[29]。本研究中，利用 pCambia1300-35S-GFP-CtCHS 质粒转化拟南芥原生质体观察到 CtCHS 蛋白主要定位于细胞质中，可能在细胞质中催化生成柚皮素查耳酮促进黄酮类化合物的积累。

苯丙烷途径由 4-香豆酰辅酶 A 分支为黄酮类化合物合成途径和木脂素生物合成途径，CHS 催化 4-香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 生成柚皮素查耳酮启动黄酮类化合物的生物合成途径，是该途径的第一个关键酶^[30]。因此，高表达的 CHS 有利于植物积

累更高含量的黄酮类化合物从而产生颜色更深的花,如玉簪 *Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers 中紫花品种 CHS 表达量高于白花品种,将玉簪 *HpCHS* 转化烟草获得过表达植株,相比于野生型烟草,过表达烟草花瓣颜色更深,总花色苷含量更高^[31]。本研究中, *CtCHS* 基因的表达量高低与管花肉苘蓉花色深浅相关,在颜色较深的紫色花、红色花中高表达,在颜色浅的白色花中低表达, *CtCHS* 的表达差异可能是管花肉苘蓉具有不同花色的原因之一。

总之,本研究从管花肉苘蓉花中克隆了一条 *CtCHS* 基因并对其进行生物信息学分析,利用大肠杆菌外源表达获得 CtCHS 重组蛋白,通过酶活性分析证明 CtCHS 蛋白能够催化 4-香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 生成柚皮素查耳酮,发现 *CtCHS* 基因在紫、红色花高表达,在白色花低表达。这些结果表明 *CtCHS* 基因可能调控管花肉苘蓉产生不同花色,有利于管花肉苘蓉花色调控机制的进一步研究,为后续研究 *CtCHS* 在管花肉苘蓉花色调控中的作用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 谢彩香,董梁,陈君,等. 管花肉苘蓉产地适宜性之再分析 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(12): 891-895.
- [2] 赵志信. 和田管花肉苘蓉产业现状及发展对策 [J]. 现代农业科技, 2019(9): 72-73.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 140.
- [4] 刘国库,屠鹏飞,杨太新,等. 管花肉苘蓉的生物学研究进展 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(4): 399-405.
- [5] Zhao D Q, Tao J. Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 261.
- [6] Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 761-780.
- [7] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 733-749.
- [8] Zhao D Q, Tao J, Han C X, et al. Flower color diversity revealed by differential expression of flavonoid biosynthetic genes and flavonoid accumulation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(12): 11263-11275.
- [9] van der Kooi C J, Dyer A G, Kevan P G, et al. Functional significance of the optical properties of flowers for visual signalling [J]. *Ann Bot*, 2019, 123(2): 263-276.
- [10] 王霞. 肉苘蓉传粉生物学研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.
- [11] Dong N Q, Lin H X. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions [J]. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63(1): 180-209.
- [12] Zhao C Y, Wang F, Lian Y H, et al. Biosynthesis of citrus flavonoids and their health effects [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(4): 566-583.
- [13] Wang Y, Dou Y, Wang R, et al. Molecular characterization and functional analysis of chalcone synthase from *Syringa oblata* Lindl. in the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *Gene*, 2017, 635: 16-23.
- [14] Ohta Y, Atsumi G, Yoshida C, et al. Post-transcriptional gene silencing of the chalcone synthase gene *CHS* causes Corolla lobe-specific whiting of Japanese gentian [J]. *Planta*, 2021, 255(1): 29.
- [15] Li Y K, Cui W, Qi X J, et al. Chalcone synthase-encoding *AeCHS* is involved in normal petal coloration in *Actinidia eriantha* [J]. *Genes*, 2019, 10(12): 949.
- [16] 李铁铮,王金铃,刘晓,等. 管花肉苘蓉实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择和验证 [J]. 植物生理学报, 2021, 57(4): 969-981.
- [17] 丁宁,海燕,王晓晖,等. 白木香查尔酮异构酶基因的克隆鉴定与表达分析 [J]. 药学报, 2021, 56(2): 630-638.
- [18] 董先娟,刘晓,张钟秀,等. 白木香 2 个小分子热激蛋白基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4054-4061.
- [19] 孙梦佳,王焕军,丁富娟,等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 和质量亏损过滤技术的三叶青黄酮类化合物定性分析 [J]. 质谱学报, 2020, 41(4): 359-367.
- [20] Liu J, Hao X L, He X Q. Characterization of three chalcone synthase-like genes in *Dianthus chinensis* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2021, 146(3): 483-492.
- [21] Ban Y, Morita Y, Ogawa M, et al. Inhibition of post-transcriptional gene silencing of chalcone synthase genes in petunia picotee petals by fluacrypyrim [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70(5): 1513-1523.
- [22] Sun W, Meng X Y, Liang L J, et al. Molecular and biochemical analysis of chalcone synthase from *Freesia hybrid* in flavonoid biosynthetic pathway [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119054.
- [23] Bisht R, Bhattacharyya A, Shrivastava A, et al. An overview of the medicinally important plant type III PKS derived polyketides [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 746908.
- [24] Guo D D, Xue Y R, Li D Q, et al. Overexpression of *CtCHS1* increases accumulation of quinochalcone in safflower [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1409.
- [25] Wang C H, Zhi S, Liu C Y, et al. Isolation and characterization

- of a novel chalcone synthase gene family from mulberry [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 115: 107-118.
- [26] Guo H M, Pei X X, Wan F H, *et al.* Molecular cloning of allelopathy related genes and their relation to HHO in *Eupatorium adenophorum* [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(7): 4651-4656.
- [27] Zou H Z, Han L L, Yuan M, *et al.* Sequence analysis and functional verification of the effects of three key structural genes, *PdTHC2'GT*, *PdCHS* and *PdCHI*, on the isosalipurposide synthesis pathway in *Paeonia delavayi* var. *lutea* [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5696.
- [28] Jiang M M, Liu Y, Ren L, *et al.* Molecular cloning and characterization of anthocyanin biosynthesis genes in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. *Acta Physiol Plant*, 2016, 38(7): 163.
- [29] Wang H L, Wang W, Zhan J C, *et al.* The accumulation and localization of chalcone synthase in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 106: 165-176.
- [30] Ma D W, Constabel C P. MYB repressors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2019, 24(3): 275-289.
- [31] Zhang J Y, Sui C H, Wang Y L, *et al.* Transcriptome-wide analysis reveals key degs in flower color regulation of *Hosta plantaginea* (Lam.) Aschers [J]. *Genes*, 2020, 11(1): 23.

[责任编辑 时圣明]