

鸡血藤查耳酮合成酶基因 *SsCHS1* 克隆及功能分析

谢月英, 姚李祥, 柯 芳, 林 泉, 余丽莹*, 秦双双*

广西壮族自治区药用植物园, 国家中医药传承创新中心, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室/广西中药资源普查与整理研究重点实验室, 广西 南宁 530023

摘要: 目的 克隆鸡血藤 *Spatholobus suberectus* 查耳酮合成酶基因 (chalcone synthase, CHS) *SsCHS1*, 开展生物信息学及基因功能研究, 以期解析其在黄酮生物合成中的作用。方法 以鸡血藤 cDNA 为模板, 借助 RT-PCR 技术克隆 *SsCHS1*, 对该基因的序列特征、蛋白结构与功能等开展系统的生物信息学解析。构建 *SsCHS1* 过表达载体, 遗传转化本氏烟草, 测定转基因植株中总黄酮含量及黄酮合成途径中关键酶基因的表达水平。结果 *SsCHS1* 基因全长 1 176 bp, 其编码蛋白由 391 个氨基酸组成, 理论相对分子质量为 42 825.35, 等电点为 6.10, 属于亲水性蛋白; 与豆科植物甘草、大豆等物种的 CHS 蛋白具有较高同源性。启动子分析表明, *SsCHS1* 富集了激素响应、光响应、胁迫响应及转录因子结合位点相关的多种顺式作用元件。功能分析显示, 过表达 *SsCHS1* 可显著促进转基因烟草中黄酮的积累, 并上调黄酮生物合成途径中关键酶基因的表达水平。结论 鸡血藤 *SsCHS1* 基因能够促进黄酮的生物合成, 该基因的发掘为深入解析鸡血藤活性成分的合成机制提供了重要的理论依据与候选基因。

关键词: 鸡血藤; *SsCHS1*; 基因克隆; 黄酮; 基因功能

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)18-7397-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.026

Cloning and functional characterization of chalcone synthase gene *SsCHS1* from *Spatholobus suberectus*

XIE Yueying, YAO Lixiang, KE Fang, LIN Quan, YU Liying, QIN Shuangshuang

Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement / Guangxi TCM Resources General Survey and Data Collection Key Laboratory, National Center for Traditional Chinese Medicine (TCM) Inheritance and Innovation, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China

Abstract: Objective To clone the chalcone synthase gene *SsCHS1* from *Spatholobus suberectus* and conduct bioinformatics and functional analyses, in order to elucidate its role in flavonoid biosynthesis. **Methods** Using cDNA from *S. suberectus* as a template, *SsCHS1* was cloned by RT-PCR. Systematic bioinformatics analyses were performed on the sequence characteristics, protein structure, and function of the gene. An *SsCHS1* overexpression vector was constructed and genetically transformed into *Nicotiana benthamiana*. The total flavonoid content and the expression levels of key enzyme genes in the flavonoid biosynthesis pathway in transgenic plants were determined. **Results** The full-length *SsCHS1* gene was 1 176 bp, encoding a protein consisting of 391 amino acids, with a theoretical relative molecular mass of 42 825.35, an isoelectric point of 6.10, and was characterized as a hydrophilic protein. It showed high homology with CHS proteins from leguminous plants such as *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycine max*. Promoter analysis revealed that *SsCHS1* contains multiple cis-acting elements associated with hormone response, light response, stress response, and transcription factor binding sites. Functional analysis demonstrated that overexpression of *SsCHS1* significantly promoted flavonoid accumulation in transgenic tobacco and upregulated the expression levels of key enzyme genes in the flavonoid biosynthesis pathway. **Conclusion** The *SsCHS1* gene from *S. suberectus* promotes flavonoid biosynthesis. The identification of this gene provides an important theoretical basis and a candidate gene for further elucidation of the biosynthetic mechanisms of active components in *S. suberectus*.

Key words: *Spatholobus suberectus* Dunn; *SsCHS1*; gene cloning; flavonoid; gene function

收稿日期: 2026-05-27

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2024YFC3506703); 广西中医药适宜技术开发与推广项目 (GZSY2025005); 广西自然科学基金项目 (2025GXNSFAA069354)

作者简介: 谢月英 (1978—), 女, 副研究员, 研究方向为中药资源。E-mail: 372020561@qq.com

*通信作者: 秦双双, 研究员, 硕士生导师, 从事中药资源相关研究。E-mail: qin_double@126.com

余丽莹, 研究员, 硕士生导师, 从事中药资源相关研究。E-mail: yuliyang@vip.sina.com

鸡血藤为豆科密花豆属植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎, 其主产区集中于中国南部(如广西、广东等省区), 在东南亚地区亦有分布。作为广西“桂十味”道地药材及常用中药材之一, 鸡血藤在古籍中被誉为“血分之圣药”, 具有活血补血、养血调经、舒筋活络等功效^[1]。它是花红片、金鸡胶囊、鸡血藤片等中成药的主要原料。在中医临床中, 鸡血藤还常用于骨癌、肝癌、胃癌等多种癌症伴随的贫血及血小板减少症的治疗。现代药理学研究表明, 黄酮类化合物是鸡血藤的主要活性成分^[2-4], 具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等作用^[5-7]。

在模式植物体系中, 黄酮类物质的生物合成主要依托苯丙烷代谢通路进行。该通路以苯丙氨酸为起始底物, 在苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H)与4-香豆酰基辅酶A连接酶(4-coumarate CoA ligase, 4CL)的协同催化下, 生成关键中间产物香豆酰辅酶A^[8]。随后, 查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)作为该通路的首个关键限速酶, 催化香豆酰辅酶A生成第1个具有C₁₅骨架的黄酮类前体物质——查耳酮^[9]。查耳酮进一步在查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)及二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)等多种酶的级联催化下生成无色花色素, 最终, 在花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)的催化下转化为花青素^[10]。

目前, CHS在许多植物中被广泛研究, 如拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.^[11]、水稻 *Oryza sativa* L.^[12]、蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* L. var. *mongholicus* (Bge.) P. K. Hsiao^[13]、红花 *Carthamus tinctorius* L.^[14]等。在非洲菊 *Gerbera hybrida* L.花发育过程中, 有3个CHS基因表达, 其中CHS1参与调控花青素和黄烷酮等黄酮类化合物的生物合成^[15]。在灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.中, LmCHS1可正向调控黄酮类成分的积累, 其过表达能显著提高烟草叶片中总黄酮含量^[16]。目前, 关于鸡血藤查耳酮合成酶基因的具体功能尚未见报道。本研究基于课题组前期已获得的鸡血藤基因组^[17]和全长转录组^[18]数据, 成功克隆了SsCHS1, 并对其开展生物信息学分析、异源过表达及荧光定量测定等实验, 以期解析该基

因在黄酮生物合成中的功能, 为鸡血藤活性成分生物合成研究提供理论依据和候选基因。

1 材料

1.1 药材

本研究所用鸡血藤材料采自广西壮族自治区药用植物园科研基地, 经余丽莹研究员鉴定为豆科植物密花豆 *S. suberectus* Dunn。取其嫩茎经液氮速冻处理后, 置于-80℃冰箱中保存用于后续实验。

1.2 仪器与试剂

Nano Drop one 仪器(美国 Thermo Fisher 公司); A48141 基因扩增仪(美国 Eppendorf 公司); ZF-5 凝胶成像分析系统(美国 Thermo Fisher 公司); Vanquish 型超高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); TSQ Quantis Plus 串联质谱检测系统(美国 Thermo Fisher 公司); Thermo Sorvall ST16R 离心机(美国 Thermo Fisher 公司); Varioskan LUX 多功能微孔板酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司); Quant Studio3 型定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

RNA 提取试剂盒(货号 RC411, 南京 Vazyme 公司); 反转录试剂盒(货号 SR511, 北京金沙生物科技有限公司); 超快速克隆试剂盒(货号 C601, 南京 Vazyme 公司); 定量 PCR 检测试剂盒(货号 027E2232EA, 南京 Vazyme 公司); DNA 胶回收试剂盒(货号 DC301-01, 南京 Vazyme 公司); GV3101 农杆菌感受态(货号 AC1003M, 上海唯地生物技术有限公司); 植物黄酮试剂盒(货号 M0118A, 苏州梦犀生物医药科技有限公司)。

2 方法

2.1 引物设计

实验所需特异性引物采用 Primer 5.0 软件进行设计, 引物序列见表1。

2.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

鸡血藤总 RNA 提取采用 Vazyme 公司 RNA 提取试剂盒, RNA 检测完整性、浓度及纯度后, 通过反转录试剂盒合成 cDNA, 于-20℃保存备用。

2.3 SsCHS1 基因克隆

根据 SsCHS1 基因序列设计特异引物(表1), 以 cDNA 为模板通过 RT-PCR 扩增。反应体系: cDNA 2 μL, SsCHS1-F 1.5 μL, SsCHS1-R 1.5 μL, 2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 25 μL, ddH₂O 20 μL。PCR 程序设定为: 95℃预变性 3 min; 35 个循环(95℃变性 15 s, 55℃退火 15 s, 72℃延

表 1 引物及其用途

Table 1 Primers and their purposes in this study

引物名称	引物序列 (5'-3', 小写字体为侧翼重组序列)	用途
<i>SsCHS1-F</i>	ATGGTGACCGTGGAGGAAATCCGC	基因克隆
<i>SsCHS1-R</i>	ACCCTCCAAGGGAACGCTGTGCA	
<i>SsCHS1-F'</i>	aagagacaggatccgaattcATGGTGACCGTGGAGGAAATC	载体构建
<i>SsCHS1-R'</i>	acctccgaccggtgcactagtACCCTCCAAGGGAACGCTGTG	
<i>35S-F</i>	GACGCACAATCCCACTATCC	阳性鉴定
<i>Y-SsCHS1-R</i>	TCTCCTTCAGAAACTCCTCCGTCAG	
<i>Q-SsCHS1-F</i>	GCGTCATCCAAGCCGATTAC	表达量分析
<i>Q-SsCHS1-R</i>	GCACTTCAACCACCACTATGTC	
<i>NbPAL-F</i>	GACCTAATGGTGAGACCCTGAA	
<i>NbPAL-R</i>	AGAAAAGAGCGCGAGAATGTT	
<i>NbC4H-F</i>	CACTGGAAGAAACCCGAAGA	
<i>NbC4H-R</i>	CAACGCCAAACGGAAGATAT	
<i>Nb4CL-F</i>	ACTGGCGACATTGGGTTC	
<i>Nb4CL-R</i>	ACTTCTCCGGCTTGCTCATC	
<i>NbCHS-F</i>	CTAGTGGAGTGGACATGCCC	
<i>NbCHS-R</i>	CCTTAGCCAGTCGAGAACA	
<i>NbCHI-F</i>	CTGTCTTCTCTCGCCGCTAAATG	
<i>NbCHI-R</i>	GCCACCTTCTCTGAGTATTGCTTAC	
<i>NbF3H-F</i>	GCCAGACAAACCAGAAGGATG	
<i>NbF3H-R</i>	TCAGGCTGTGGACACTTTGG	
<i>NbDFR-F</i>	ATGTGGCAAAGATGGTCCG	
<i>NbDFR-R</i>	AAGGGAAGCAACTGTTTCTGTC	
<i>NbANS-F</i>	AGGACCTCAAGTACCGACGATTG	
<i>NbANS-R</i>	TTCAACTCTTGGTGGCATTCTCTC	
<i>NbEF1α-F</i>	AGAGGCCCTCAGACAAAC	内参基因
<i>NbEF1α-R</i>	TAGGTCCAAAGGTCACAA	

伸 1.5 min); 72 °C 终延伸 5 min。PCR 产物经切胶回收纯化后, 与 5×TA/Blunt-Zero Cloning Mix 载体连接, 再通过热激法导入大肠杆菌 DH5 α ^[16]。阳性克隆经菌液 PCR 鉴定目标条带大小正确后, 送至测序, 序列经 DNAMAN 软件与鸡血藤基因组及全长转录组中 *SsCHS1* 序列进行比对分析, 确认为 *SsCHS1* 基因。

2.4 *SsCHS1* 生物信息学分析

运用多种工具对 *SsCHS1* 基因及其编码蛋白进行系统分析: 使用 DNAMAN 软件完成基因序列比对与基础分析; Expasy 在线工具 (http://www.expasy.org/resources/compute_pi-mw) 分析蛋白理化性质; NCBI CDD 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测保守结构域; 采用 MEGA 11.0 软件构建系统进化树。

参与系统进化分析的物种及其 NCBI 序列号为 *Glycine max* (L.) Merr. (NP_001358312.1)、甘草 *Glycyrrhiza uralensi* Fisch. (QDG03194.1)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (NP_001267879.1)、甜橙 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (NP_001306986.1)、莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. (NP_001305084.1)、花毛茛 *Ranunculus asiaticus* L. (AYV99476.1)、茶 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (NP_001413603.1)、番茄 *Solanum lycopersicum* L. (NP_001234033.2)、皂皮树 *Quillaja saponaria* Molina (KAJ7971790.1)、过江藤 *Phylla nodiflora* (L.) Greene (WOX58875.1)、续随子 *Euphorbia lathyris* L. (XP_065866925.1)、陆地棉 *Gossypium hirsutum* L. (XP_016668064.1)、椰子 *Cocos nucifera* L. (KAG1331623.1)、罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex A. M. Lu & Zhi Y.

Zhang (ADF57184.1)、灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. (USJ75249.1)、加州马兜铃 *Aristolochia californica* Torr. (XP_068665217.1) 和旋刺草 *Genlisea aurea* A. St.-Hil. (EPS72180.1)。

通过 SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 预测 *SsCHS1* 蛋白二级结构; Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 构建其三级结构模型。从鸡血藤基因组序列中提取 *SsCHS1* 起始密码子上游 2 000 bp 作为启动子序列, 使用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件预测分析。

2.5 *SsCHS1* 过表达载体构建

提取“2.3”项获得的阳性菌株质粒, 以该质粒为模板进行扩增, 引物、反应体系及程序如“2.3”项。将 PCR 产物切胶回收, 获得具有载体同源臂的 *SsCHS1*。使用限制性内切酶 *Eco* RI 和 *Spe* I 对载体 pC131-YFP 进行双酶切, 纯化回收酶切片段后, 使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒, 将酶切载体产物和 *SsCHS1* 扩增产物进行同源重组连接, 转化至大肠杆菌感受态细胞, 经 PCR 确定为阳性克隆后测序完成序列验证。

2.6 农杆菌转化

从测序正确的大肠杆菌菌液中提取重组质粒。取 1 μ L 质粒加入 50 μ L 农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰水浴 10 min, 液氮速冻 5 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 冰水浴 5 min。加入 500 μ L 不含抗生素的 LB 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 2 h 进行菌体复苏。取 100 μ L 菌液均匀涂布于含 50 mg/L 利福平的 LB 固体平板上, 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 72 h。挑取单菌落接种于含抗生素的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养用于后续实验。

2.7 遗传转化本氏烟草

参照已报道的叶盘转化法^[18], 将目的基因转入本氏烟草, 随后在含 20 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 培养基上筛选并获得成功生长的抗性芽。通过 PCR (引物见表 1) 筛选阳性植株 (T0)。待阳性植株长大且根系发育充分后, 移栽至温室大棚进行常规培养。收获 T1 代种子后, 先经含 20 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 培养基筛选, 再通过 PCR 确定阳性植株。选取长势良好的阳性植株移栽至盆中种植, 取生长

至 8 周龄的转基因与野生型 (WT) 本氏烟草植株, 每个样品设置 3 次生物学重复。采集的组织样本迅速投入液氮中固定, 随后于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中保存, 用于后续总黄酮含量测定及基因表达水平的差异分析。

2.8 总黄酮含量测定

将样品烘干至恒定质量, 粉碎后过 40 目筛, 按植物黄酮试剂盒操作方式进行提取, 在多功能微孔板酶标仪上进行检测^[18]。

2.9 RT-qPCR 分析

利用超快速克隆试剂盒分别提取野生型与 *SsCHS1* 转基因烟草植株总 RNA, 并采用逆转录试剂盒将其反转录为 cDNA。以该 cDNA 为模板, 采用 qPCR SYBR Green 预混液, 按 20 μ L 反应体系进行 RT-qPCR 检测, 所用引物序列见表 1。以 *NbEF1 α* 基因作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算野生型及转基因植株中 *SsCHS1*、*NbPAL*、*NbC4H*、*Nb4CL*、*NbCHS*、*NbCHI*、*NbF3H*、*NbDFR*、*NbANS* 基因的相对表达量。

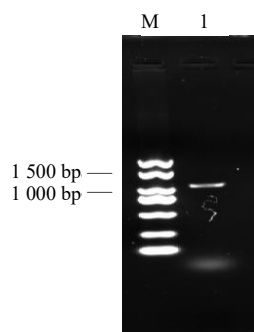
2.10 统计分析

数据整理与作图借助 Microsoft Excel 2019 完成。采用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 并基于 Tukey 法进行多重比较, 以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 表示差异显著性水平。

3 结果与分析

3.1 *SsCHS1* 基因克隆和序列分析

对 PCR 扩增产物开展琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示目标条带的迁移位置与目的基因预期长度相符 (图 1)。切胶纯化特异性条带后进行测序, 将所得序列与目的基因编码序列用 DNAMAN 软件



M-Maker; 1-目的基因条带。

M-Maker; 1-target gene band.

图 1 *SsCHS1* 基因扩增产物的凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of *SsCHS1* amplification products

比对,二者呈现 100%的同源性,证实该克隆片段为目标基因。该序列包含 *SsCHS1* 基因完整的编码区,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA;*SsCHS1* 基因长度为 1 176 bp,核苷酸含量分别为 A(20.58%, 242)、T(17.35%, 204)、C(29.85%, 351)、G(32.22%, 379)。

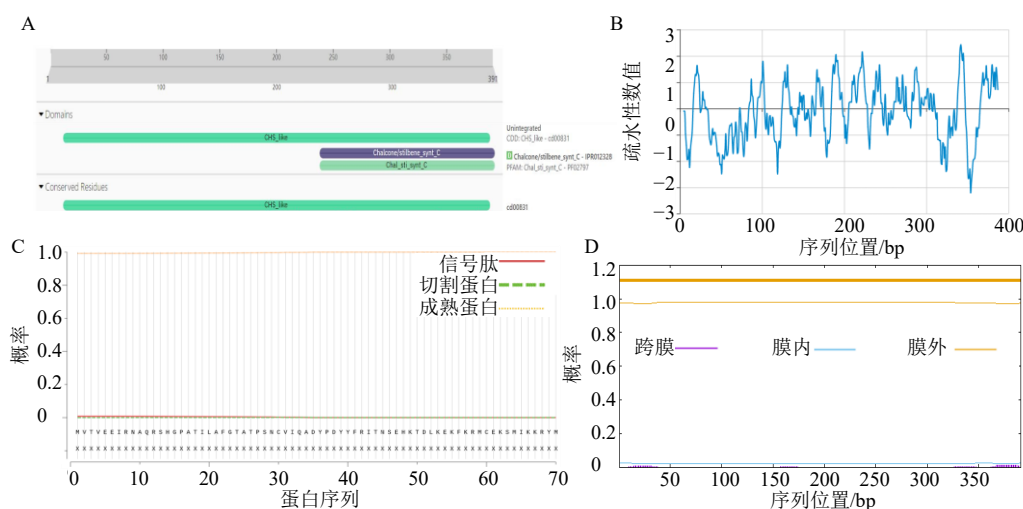
3.2 *SsCHS1* 蛋白理化性质

对 *SsCHS1* 编码蛋白进行生物信息学分析:保守结构域预测显示其具有典型的 CHS 家族结构域(第 16~384 位氨基酸)(图 2-A);理化性质分析表明该蛋白由 391 个氨基酸组成,相对分子质量 42 825.35,等电点 6.10;疏水性分析显示 GRAVY

值为-0.110,为亲水性蛋白(图 2-B);信号肽预测未检测到信号肽,提示为非分泌型蛋白(图 2-C);跨膜结构预测未发现跨膜区域(图 2-D)。

3.3 *SsCHS1* 蛋白二级和三级结构预测分析

SsCHS1 蛋白二级结构结果表明,无规则卷曲为其主要组成部分,占比达 44.76% (175 aa),其次为 α 螺旋,占 41.43% (162 aa),延伸链占比较少,为 13.81% (54 aa)(图 3-A)。*SsCHS1* 蛋白三维结构模型显示,该蛋白空间构象呈现高度结构化特征,其主体构象主要由无规则卷曲、 α 螺旋及延伸链共同组装而成(图 3-B),该三维结构特征与二级结构分析结果一致。



A-结构域分析; B-疏水性分析; C-信号肽预测; D-跨膜结构域预测。

A-structural domain analysis; B-hydrophobicity analysis; C-signal peptide prediction; D-transmembrane structural domain prediction.

图 2 *SsCHS1* 蛋白结构分析

Fig. 2 Structural analysis of *SsCHS1* protein

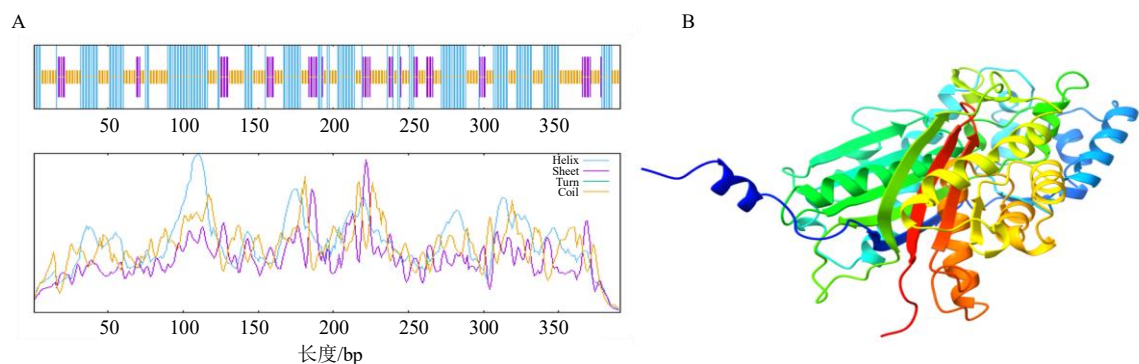


图 3 *SsCHS1* 蛋白二级结构 (A) 和三级结构 (B) 预测

Fig. 3 Prediction of secondary (A) and tertiary (B) structures of *SsCHS1* protein

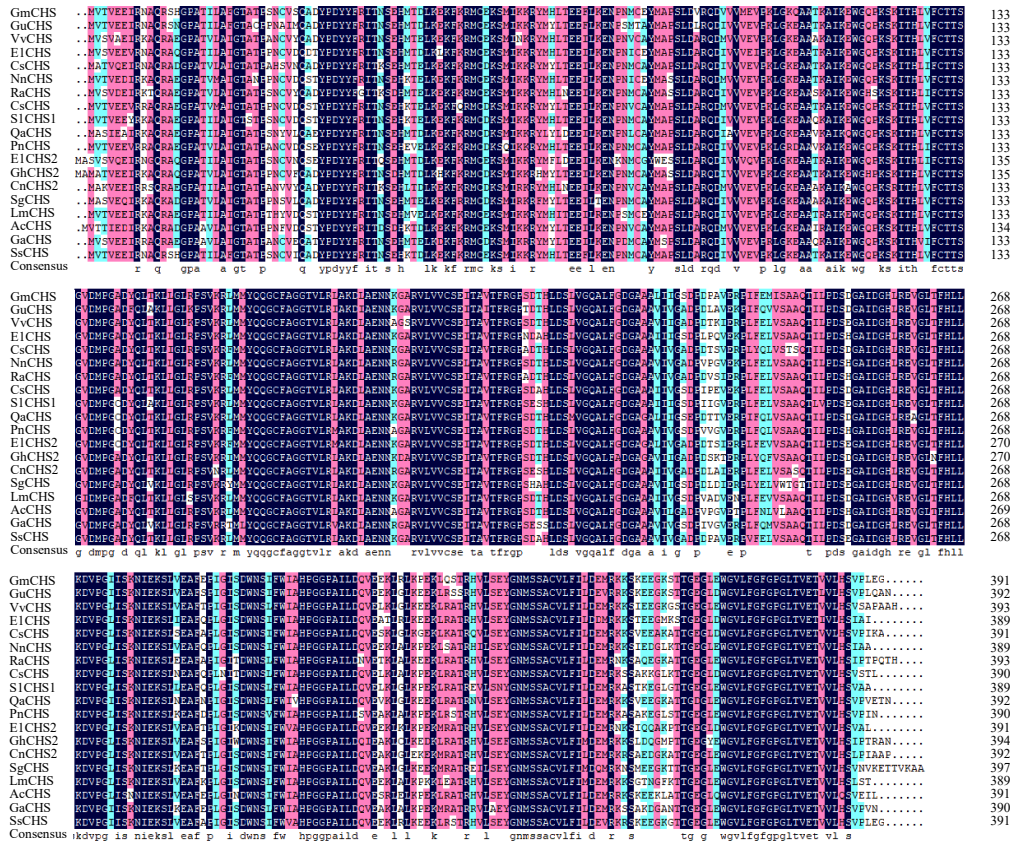
3.4 *SsCHS1* 系统发育分析

利用 NCBI 数据库对鸡血藤 *SsCHS1* 氨基酸序列进行同源比对分析。结果显示,选取的大豆

(Gm)、甘草(Gu)、葡萄(Vv)、甜橙(Cs)、莲(Nn)、花毛茛(Ra)、茶(Cs)、番茄(Sl)、皂皮树(Qs)、过江藤(Pn)、续随子(EI)、陆地棉(Gh)、椰子

(Cn)、罗汉果 (Sg)、灰毡毛忍冬 (Lm)、加州马兜铃 (Ac) 和旋刺草 (Ga) 17 个物种的 CHS 蛋白氨基酸序列与 SsCHS1 氨基酸序列的同源性超过 60%。所有序列均具有高度保守的 CHS 特征序列 (WGVLFQFGPGLT)，鸡血藤 SsCHS1 编码的氨基

酸序列与来自大豆、甘草、皂皮树、陆地棉、续随子等物种的 CHS 蛋白具有高度相似性 (>90%) (图 4)。随后利用最大似然法构建系统发育树进行进化分析, 结果表明鸡血藤与甘草、大豆聚在同一分支, 与皂皮树在系统发育树中处于较近的分支 (图 5)。



黑色、红色和浅蓝色分别代表 100%、75%和 50%的同源性。

Black, red, and light blue represent 100%, 75%, and 50% homology, respectively.

图 4 SsCHS1 与其他物种 CHS 蛋白的序列比对

Fig. 4 Multisequence alignment of SsCHS1 and CHS proteins from other species

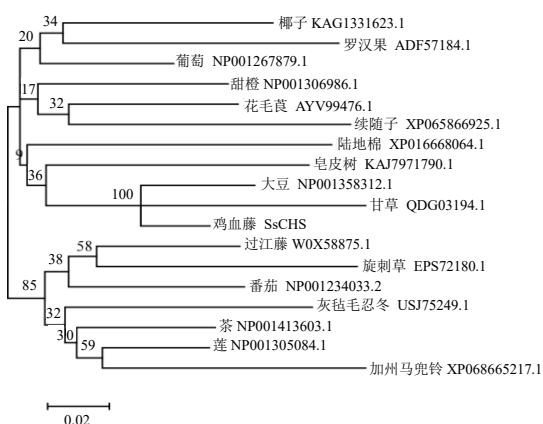


图 5 SsCHS1 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of SsCHS1

3.5 SsCHS1 启动子序列分析

对 *SsCHS1* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的启动子区域开展顺式作用元件分析。结果显示, 该启动子序列除核心元件 CAAT-box、TATA-box 外, 还含有 GT1-motif、G-box、Box4、GATA-motif、G-Box、TCA-motif、I-box、GA-motif 等 16 个光响应元件。此外, 还有转录因子结合位点 (MYC、Myb、MYB-like sequence)、胁迫响应元件 (TC-rich repeats 和 ARE) 及激素响应元件 (ABRE) (图 6)。

3.6 SsCHS1 调控本氏烟草黄酮积累研究

本研究构建了 pC131-*SsCHS1* 过表达载体, 通过农杆菌介导的遗传转化方法将其转入本氏烟草, 以解析 *SsCHS1* 对黄酮合成的调控作用。转化后经

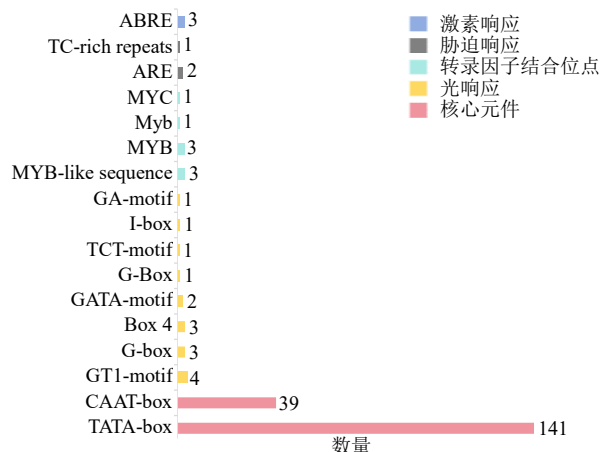
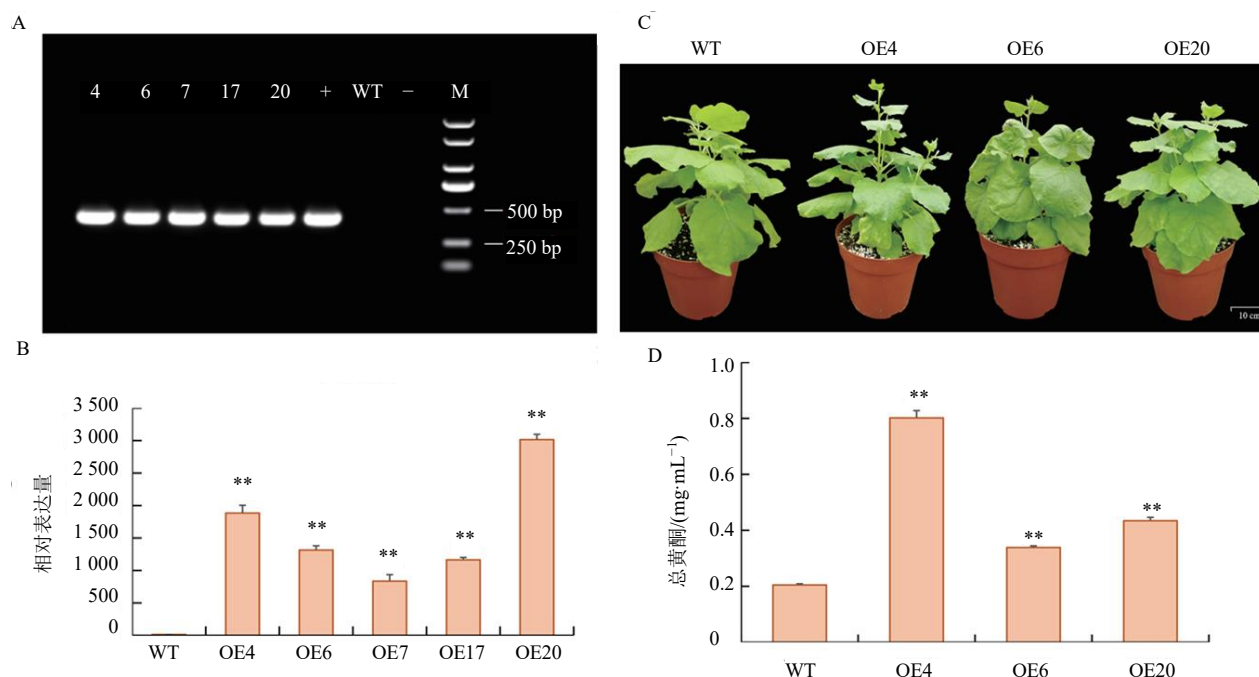


图 6 *SsCHS1* 启动子序列中的顺式作用元件分析
Fig. 6 Analysis of cis-acting elements of *SsCHS1* promoter sequence



A-过表达植株 PCR 鉴定，4、6、7、17、20-过表达株系，“+”-阳性对照，WT-野生型，“-”-阴性对照；B-荧光定量 PCR 测定 *SsCHS1* 相对表达量；C-野生型及转基因植株形态；D-野生型及转基因株系总黄酮含量；与 WT 比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，下同。
A-PCR identification of overexpression plants, 4~20 overexpression lines, + positive control, WT wild type, - control; B-RT-qPCR determination; C-Morphology of wild type and transgenic plants; D-Total flavonoid content of wild type and transgenic lines, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs WT group, same as below.

图 7 本氏烟草中过表达 *SsCHS1*
Fig. 7 *SsCHS1* overexpression in *N. benthamiana*

3.7 黄酮生物合成途径关键酶基因表达分析

选取黄酮生物合成途径上 8 个关键酶基因进行 RT-qPCR 分析，结果表明在不同过表达株系中，相同基因的表达水平不相同。与野生型相比，*NbDFR* 在 OE20 转基因植株中的表达水平未出现明显变化，而在 OE4 和 OE6 株系中上调表达。*NbANS* 在 OE4 和

PCR 鉴定，共获得 OE4、OE6、OE7、OE17 和 OE205 个阳性株系（图 7-A）。通过 RT-qPCR 测定转基因与 WT 型本氏烟草中 *SsCHS1* 的表达水平，结果显示，转基因株系（OE4、OE6、OE7、OE17 和 OE20）中 *SsCHS1* 的表达量约为野生型的 834~3014 倍（图 7-B）。从中选取表达量较高的 3 个株系 OE4、OE6 和 OE20，进一步研究 *SsCHS1* 对黄酮合成的影响（图 7-C）。对野生型及 3 个转基因株系的总黄酮含量测定表明，过表达 *SsCHS1* 能显著提高本氏烟草中总黄酮的积累。与 WT 相比，转基因株系 OE4、OE6 和 OE20 中总黄酮含量分别提高了 291.82%、65.49% 和 112.31%（图 7-D）。

OE20 株系中表达水平显著上调，而在 OE6 转基因植株中表达水平显著下调。除上述 *NbDFR* 和 *NbANS* 基因在某个株系中表达变化趋势不一致外，其他 6 个基因在 3 个转基因株系中表达水平平均显著升高，其中 OE6 转基因植株中 *NbPAL*、*NbCHS*、*NbF3H* 最大上调分别达 5.8、8.7、7.4 倍（图 8）。

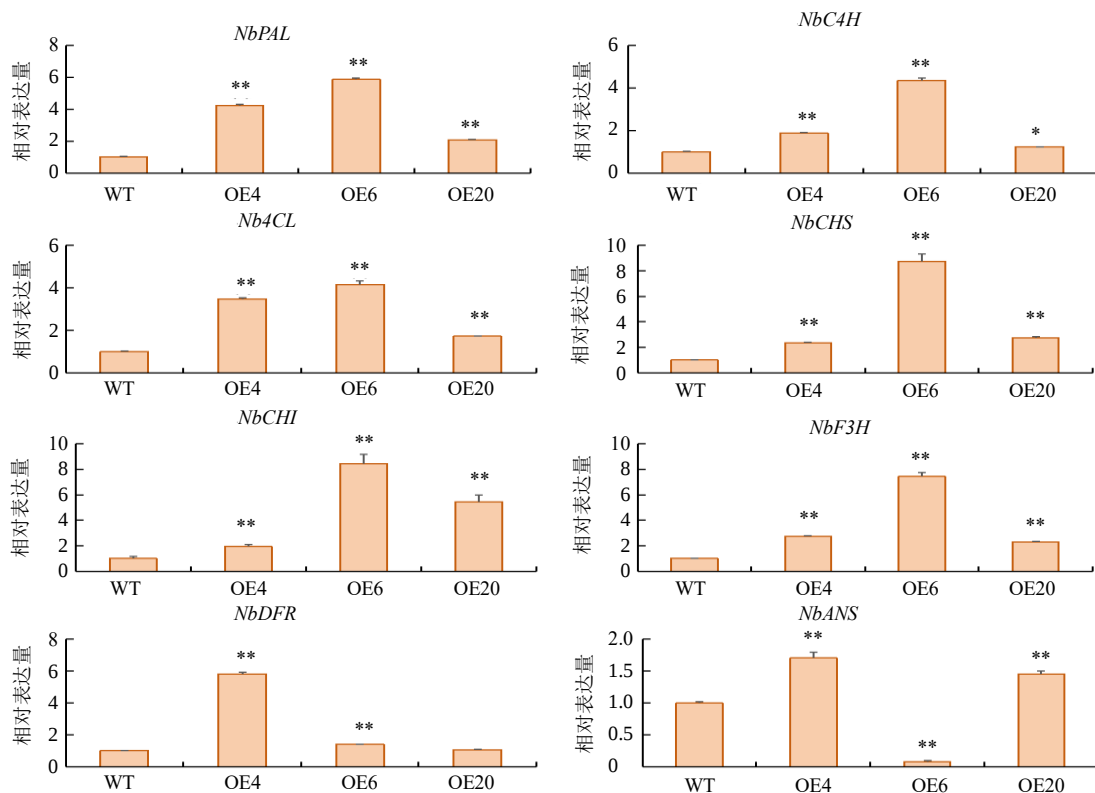


图 8 黄酮生物合成途径关键酶基因表达分析

Fig. 8 Analysis of gene expression of key enzymes in flavonoid biosynthesis pathway

4 讨论

CHS 基因家族广泛存在于植物中,通常由多个基因组成,其数量在不同植物中差异巨大。在玉米在玉米 *Zea mays* L.、大豆和小立碗藓 *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. 基因组中分别鉴定出 14 个、14 个及 17 个 *CHS* 基因^[19-21]。*CHS* 作为黄酮类化合物生物合成途径中的第 1 个限速酶,其活性的高低直接决定了碳流进入该分支的强度,并深刻影响着下游众多衍生物的种类和丰度^[22-23]。但并不是所有的 *CHS* 家族基因都具有活性,拟南芥中有 4 个 *CHS* 基因,但只有一个 *CHS* 基因发挥功能^[24]。课题组前期从鸡血藤基因组及全长转录组中共鉴定出 3 个 *CHS* 基因,本研究选择在药用部位表达量较高的 *SsCHS1*^[9],以鸡血藤 cDNA 为模板克隆得到 *SsCHS1*,并通过在模式植物本氏烟草中进行过表达,结果表明 *SsCHS1* 能够激活本氏烟草黄酮生物合成途径,促进黄酮的积累。

生物信息学的分析结果显示,*SsCHS1* 编码的蛋白拥有查耳酮合酶特征结构域 (CHS-like 结构域),这与已报道的 *CHS* 酶核心特征一致^[25-27]。系统进化树分析进一步揭示鸡血藤 *SsCHS1* 蛋白与大

豆、甘草的 *CHS* 聚类在一个分支上,其可能在催化特性或代谢流向上与这些已知功能蛋白具有相似性。此外,*SsCHS1* 启动子中含有脱落酸响应元件及多种光响应元件 (GT1-motif、Box 4、G-Box 等),表明该基因在鸡血藤中的表达可能受激素和光信号的调控。在拟南芥中,紫外线和光敏色素信号通路的相互协同作用能调节 *CHS* 的表达^[28]。研究表明,芒果 *Mangifera indica* L. 中查耳酮合酶家族基因 *MiCHS4*、*MiCHS16* 和 *MiCHS17* 等对光处理有显著响应,其表达水平受光信号调控,从而可能参与调节芒果对光照条件的适应反应^[29]。

CHS 是黄酮生物合成途径的关键限速酶,紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britton 中 *CHS* 基因的高表达能促进紫苏叶中黄酮类化合物的积累^[30]。研究发现在本氏烟草中过表达薰衣草查耳酮合酶基因 *LaCHS*, *CHS* 下游的 *NbDFR* 基因表达水平显著上调^[26]。本研究中, *SsCHS1* 的过表达不仅促进了黄酮的积累,还显著上调了黄酮合成途径中多个上下游关键酶基因的表达水平。具体而言,位于 *CHS* 上游的 *NbPAL*、*NbC4H*、*Nb4CL*,以及位于其下游的 *NbCHI*、*NbF3H* 等基因的表达水平均显著高于对

照。说明 *CHS* 基因在黄酮生物合成调控中具有重要作用。

综上所述,本研究克隆了鸡血藤 *SsCHS1* 基因并开展了系统的生物信息学分析,构建了过表达载体 pC131-*SsCHS1*,通过遗传转化本氏烟草,发现过表达 *SsCHS1* 能够显著提高本氏烟草总黄酮含量,并上调黄酮生物合成途径中多个关键酶基因(*NbPAL*、*NbC4H*、*Nb4CL*、*NbCHS*、*NbCHI*、*NbF3H*)的表达水平。这些结果表明,*SsCHS1* 在黄酮生物合成中发挥正向调控作用,该基因的发掘为深入解析鸡血藤活性成分的合成机制提供了重要的理论依据与候选基因。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 209-210.
- [2] 秦双双, 朱艳霞, 韦坤华, 等. 鸡血藤的本草沿革与黄酮类成分及其药理学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2216-2223.
- [3] Chen H L, Yang J, Fu Y F, *et al.* Effect of total flavonoids of *Spatholobus suberectus* Dunn on PCV2 induced oxidative stress in RAW_{264.7} cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 244.
- [4] Pan Y H, Luo X M, Gong P Y. *Spatholobi caulis*: A systematic review of its traditional uses, chemical constituents, biological activities and clinical applications [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116854.
- [5] Liu X Y, Zhang Y B, Yang X W, *et al.* Anti-inflammatory activity of some characteristic constituents from the vine stems of *Spatholobus suberectus* [J]. *Molecules*, 2019, 24(20): 3750.
- [6] Chen S R, Wang A Q, Lin L G, *et al.* *In vitro* study on anti-hepatitis C virus activity of *Spatholobus suberectus* Dunn [J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1367.
- [7] Peng F, Meng C W, Zhou Q M, *et al.* Cytotoxic evaluation against breast cancer cells of isoliquiritigenin analogues from *Spatholobus suberectus* and their synthetic derivatives [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(1): 248-251.
- [8] Sunil L, Shetty N P. Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(5/6): 1783-1798.
- [9] 覃炜棋, 林泉, 梁莹, 等. 鸡血藤不同器官转录组分析与儿茶素生物合成基因研究 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(12): 3297-3306.
- [10] Liu H M, Liu Z J, Wu Y, *et al.* Regulatory mechanisms of anthocyanin biosynthesis in apple and pear [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8441.
- [11] Wang W K, Schaal B A, Chiou Y M, *et al.* Diverse selective modes among orthologs/paralogs of the *Chalcone synthase (Chs)* gene family of *Arabidopsis thaliana* and its relative *A. halleri* ssp. *gemmaifera* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, 44(2): 503-520.
- [12] Wang L X, Lam P Y, Lui A C W, *et al.* Flavonoids are indispensable for complete male fertility in rice [J]. *J Exp Bot*, 2020, 71(16): 4715-4728.
- [13] Yang M, Yin M Z, Chu S S, *et al.* Colour, chemical compounds, and antioxidant capacity of *Astragali Radix* based on untargeted metabolomics and targeted quantification [J]. *Phytochem Anal*, 2022, 33(4): 599-611.
- [14] Guo D D, Gao Y, Liu F, *et al.* Integrating molecular characterization and metabolites profile revealed CtCHI1's significant role in *Carthamus tinctorius* L. [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 376.
- [15] Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, *et al.* *Chalcone synthase*-like genes active during *Corolla* development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28(1): 47-60.
- [16] 敖志杰, 张惊宇, 曾娟, 等. 灰毡毛忍冬 *CHS1* 基因克隆及功能分析 [J]. 中草药, 2025, 56(17): 6334-6345.
- [17] Qin S S, Wu L Q, Wei K H, *et al.* A draft genome for *Spatholobus suberectus* [J]. *Sci Data*, 2019, 6(1): 113.
- [18] Qin S S, Wei G L, Lin Q, *et al.* Analysis of the *Spatholobus suberectus* full-length transcriptome identified an R2R3-MYB transcription factor-encoding gene *SsMYB158* that regulates flavonoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2024, 214: 108929.
- [19] Han Y H, Ding T, Su B, *et al.* Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the *Chalcone synthase* family in maize [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 161.
- [20] Anguraj Vadivel A K, Krysiak K, Tian G, *et al.* Genome-wide identification and localization of *Chalcone synthase* family in soybean (*Glycine max* L. Merr) [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 325.
- [21] Harshavardhan Koduri P K, Gordon G S, Barker E I, *et al.* Genome-wide analysis of the *Chalcone synthase* superfamily genes of *Physcomitrella patens* [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 72(3): 247-263.
- [22] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 485-493.
- [23] Dao T T H, Linthorst H J M, Verpoorte R. *Chalcone synthase* and its functions in plant resistance [J]. *Phytochem Rev*, 2011, 10(3): 397-412.

- [24] Saito K, Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, *et al.* The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 72: 21-34.
- [25] 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(8): 775-784.
- [26] 李鹏飞, 王爱凡, 黄佳慧, 等. 薰衣草花青素合成相关基因 *LaCHS* 的克隆与功能分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(5): 1048-1058.
- [27] 单丽伟, 汪勇, 王美玲, 等. 大豆类黄酮生物合成关键酶 *CHS* 基因的克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(11): 2164-2168.
- [28] Jenkins G I, Long J C, Wade H K, *et al.* UV and blue light signalling: Pathways regulating *Chalcone* synthase gene expression in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, 2001, 151(1): 121-131.
- [29] Hu H F, Shi B, Zhu W C, *et al.* Genome-wide identification, characterization and expression analysis of mango (*Mangifera indica* L.) *Chalcone* synthase (*CHS*) genes in response to light [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(10): 968.
- [30] Jiang T, Guo K Y, Liu L D, *et al.* Integrated transcriptomic and metabolomic data reveal the flavonoid biosynthesis metabolic pathway in *Perilla frutescens* (L.) leaves [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 16207.

[责任编辑 时圣明]