

大花美人蕉查尔酮异构酶基因的 cDNA 克隆和序列分析

李军¹ 李洪清² 李美茹^{1,*}

¹中国科学院华南植物园, 广州 510650; ²华南师范大学生命科学院, 广州 510631

摘要 以高等植物查尔酮异构酶(CHI)基因的保守区域GKFVKFT、KFTAIGV、AVKWK GK及GPF EKFT、IIGKHGV设计简并引物和采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)以及温度非对称交互PCR(TAIL-PCR)方法, 从大花美人蕉花瓣组织中扩增查尔酮异构酶基因(CHI)的全长cDNA(678 bp), 编码226个氨基酸, 其氨基酸组成与其它已知的高等植物CHI基因具有很高的同源性, 与葡萄、草莓、丁香、柑桔、矮牵牛、洋葱及玉米的同源性分别为82%、79%、80%、80%、79%、81%和76%。

关键词 大花美人蕉; 查尔酮异构酶基因(CHI); 基因克隆

Cloning and Sequence Analysis of cDNA of Chalcone Isomerase Gene from *Canna generalis* Bailey

LI Jun¹, LI Hong-Qing², LI Mei-Ru^{1,*}

¹South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; ²College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract Degenerate primers were designed according to the conserved regions of chalcone isomerase (CHI) from higher plants, and were used to amplify the cDNA fragment of CHI gene from *Canna generalis* Bailey. The 3' and 5' end of CHI gene were obtained by 3' RACE and TAIL-PCR respectively. The results showed that the cDNA of CHI gene from *C. generalis* was 678 bp encoding 226 amino acids, and high homology to CHI from other higher plants.

Key words *Canna generalis* Bailey; CHI; gene clone

大花美人蕉(*Canna generalis* Bailey)是美人蕉科(Cannaceae)美人蕉属的多年生球根花卉。原产美洲热带和亚热带。我国各地广为栽培, 在园林中应用极为广泛。花色有乳白色、淡黄、桔红、粉红、大红、紫红和带斑点、条斑等, 开花盛期在八九月间, 在华南地区能四季开花。近年来, 以其抗污染、易栽培、叶绿花艳和花期长等优良特性已成为珠江三角洲地区的绿化常用花卉。大花美人蕉花瓣颜色艳丽, 含有丰富的类黄酮化合物(植中强 2005)。类黄酮是一类广泛存在于植物体内的次级代谢产物, 在改良花色、防紫外辐射和保健等有一定的作用。类黄酮的花色素苷的合成代谢以及与之相关的基因研究得较为深入, 且已用于改造花色的研究。查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)为类黄酮合成途径中的第2个关键性酶(颜华等 1997), 矮牵牛的CHI基因在番茄中表达后, 果实中黄酮醇含量显著提高(Muir等 2001)。目前, 已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Shirley等 1992)、菜豆(*Phaseolus*

vulgaris, Blyden等 1991)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*, McKhann和Hirsch 1994)、烟草(*Nicotiana tabacum*, Nishihara等 2005)、豌豆(*Pisum sativum*, Wood和Davies 1994)、玉米(*Zea mays*, Grotewold和Peterson 1994)中克隆了CHI基因, 并应用于转基因植物的研究。本文概述从大花美人蕉花瓣中克隆CHI基因cDNA序列的结果。

材料与amp;方法

以大花美人蕉(*Canna generalis* Bailey cv. 'Cleopatra')为试材, 取栽于植物园含苞欲放的红色花蕾花瓣制备RNA。RNA提取试剂盒购自QIAGEN公司, cDNA合成试剂盒购自TaKaRa公司, dNTPs、Taq DNA聚合酶购自北京鼎国生物

收稿 2005-12-13 修定 2006-03-24

资助 广东省自然科学基金(31267)。

*通讯作者(E-mail: limr@scbg.ac.cn, Tel: 020-37252590)。

公司, 引物合成委托北京赛百盛基因技术公司。

提取总 RNA 时, 称取 100 mg 花瓣, 按照 QIAGEN 公司 RNeasy Mini Kit 实验操作步骤进行 RNA 制备, 最终 RNA 溶于 50 μL DEPC 处理过的水中。

反转录合成 cDNA 按照 TaKaRa 公司 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 实验操作步骤进行。在冰块中加入 2 μg 总 RNA、4 μL 反应缓冲液(5 \times)、1 μL dNTPs、1 μL RNA 酶抑制剂、2 μL Oligo dT18、1 μL 反转录酶 M-MLV (200 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 用 DEPC 处理过的水补足体积至 20 μL , 混匀后置于室温中 10 min, 后移至 42 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴槽内反应 1 h, 反应结束后置于冰中 2 min 中止反应。

RT-PCR 扩增 大花美人蕉 *CHI* 的 cDNA 片段时参考 *CHI* 氨基酸保守序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam02431>), 根据氨基酸保守序列 G K F V K F T、K F T A I G V、A V K W K G K 设计上游引物 P1: 5' GGNA(A/G)TT-(T/C)GTNAA(A/G)TT(T/C)AC 3', P2: 5' AA(A/G)-TT(T/C)ACNGCNAT(A/T/C)GGNGT 3', P3: 5' GCNGTNA(A/G)TGGAA(A/G)GGNAA 3'; 根据氨基酸保守序列 G P F E K F T、I I G K H G V 设计下游引物 P4: 5' GT(A/G)AA(T/C)TT(T/C)TC(A/G)-AANGGNCC 3', P5: 5' ACNCC(A/G)TG(T/C)-TTNCC(T/A/G)AT(T/A/G)AT 3'。经试验发现, 采用上游引物 P2、P3 及下游引物 P5 两对引物可以扩增出目的片段。

PCR 扩增按以下操作进行: 在每个 0.2 mL 离心管中加入 5 μL PCR 缓冲液(10 \times)、1 μL dNTPs (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL 引物 P2 或 P3 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL 引物 P5 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、2 μL cDNA 模板、0.5 μL Taq DNA 聚合酶(2 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)及 39.5 μL 无菌双蒸水, 于 94 $^{\circ}\text{C}$ 中变性 3 min, 然后按 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 进行 40 轮的循环反应, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 5 min。

大花美人蕉 *CHI* 基因 3' 端扩增时, 按照 TaKaRa cDNA PCR Library Kit 实验操作说明进行反转录。在冰块中将 1 μg 总 RNA、2 μL 反应缓冲液(5 \times)、0.5 μL dNTPs、0.5 μL RNA 酶抑制剂、1 μL Oligo dT-RA Primer、0.5 μL 反转录酶 M-MLV (200 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 用 DEPC 处理过的水补足体积至 10 μL , 混匀后按以下条件进行反转录反

应: 30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 80 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

根据上述已扩增的目的片段的序列设计以下对引物: P6, 5' GACGACCTCGCCGCAA-TTCTGA 3', P7, 5' GACTTCTTCAGAGATAT-CTTCAC 3'。PCR 扩增按以下操作进行: 在每个 0.2 mL 离心管中加入 5 μL PCR 缓冲液(10 \times)、5 μL dNTPs (2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)、0.8 μL 引物 P6 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、0.8 μL 引物 RA (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TaKaRa cDNA PCR Library Kit 提供)、2 μL MgSO₄ (25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL cDNA 模板、1 μL KOD-Plus (1 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 及 34.4 μL 无菌双蒸水, 于 94 $^{\circ}\text{C}$ 中变性 3 min, 然后按 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 条件进行 35 轮的循环反应, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 5 min。将反应产物稀释 50 倍, 然后取稀释后的产物 1 μL 作模板, 用引物 P7 和 RA 进行第 2 轮的 PCR 扩增, 扩增体系同上。

大花美人蕉 *CHI* 基因 5' 端扩增时, 根据上述方法已扩增到的目的片段设计以下 3 条引物: P8, 5' TCCAATGGGCAACGCAGTTCTCC 3', P9, 5' CCTCCACCTTCTCTGAGTACTGC 3', P10, 5' GACCGGTGAAGATATCTCTGAAG 3', PCR 扩增方法按照 TAIL-PCR 方法(Liu 等 1995)稍加改变进行, 随机引物采用 AD₂: 5' NGTCGA(G/C)(A/T)-GANA(A/T)GAA 3'。第 1 次 PCR 扩增体系: 5 μL 10 \times PCR 缓冲液、1 μL dNTPs (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)、1.5 μL 引物 P8 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、3.8 μL 引物 AD₂ (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、0.25 μL Taq DNA 聚合酶(2 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、10 ng DNA 模板、38 μL H₂O。第 2 次 PCR 扩增体系: 直接取第 1 次 PCR 扩增产物 1 μL 作为第 2 次 PCR 的模板, 加入 2 μL 引物 P9 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 其它成分与第 1 次扩增的相同。第 3 次 PCR 扩增体系: 取第 2 次扩增 PCR 产物 1 μL 稀释 50 倍, 然后从中取 2.5 μL 作为第 3 次 PCR 扩增的模板, 引物为 P10, 其它成分与第 1 次扩增的相同。3 次 PCR 扩增温度设置都按照 Liu 等(1995)的 TAIL-PCR 方法进行。

PCR 扩增产物的序列测定委托上海英俊生物技术公司, 测序结果通过国际生物技术信息中心网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)分析其基因同源性。大花美人蕉和其它植物 *CHI* 基因的氨基酸序列比较通过软件 DNAMAN 和 BioEdit 软件进行。

实验结果

1 大花美人蕉 *CHI* 基因 cDNA 片段的扩增

采用简并引物 P2 和 P5 进行 RT-PCR 扩增得到 1 条大约 450 bp 的条带, 进一步采用内侧锚定简并引物 P3 和 P5 扩增到 1 条约 400 bp 的 DNA 片段, 测序结果与预计的目的片段相似(图 1)。

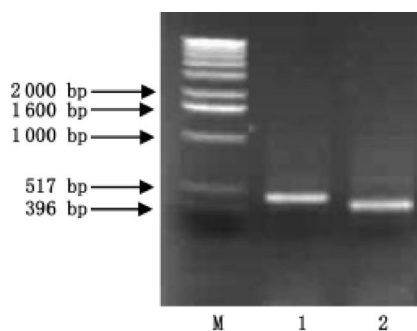


图 1 *CHI* 基因 cDNA 片段 RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR products of part of cDNA of *CHI* gene

M: 1 kb 分子量标准; 1: 引物 P2 和 P5 扩增产物; 2: 引物 P3 和 P5 扩增产物。

2 大花美人蕉 *CHI* 基因 3' 端的扩增

根据扩增片段的测序结果设计引物 P6 和 P7, 采用 3' RACE 的方法扩增 *CHI* 的 3' 端。经两轮扩增得到 1 条大于 500 bp 的 DNA 片段(图 2), 测序后证实为 *CHI* 基因的 3' 端序列。

3 大花美人蕉 *CHI* 基因 5' 端的扩增

根据扩增片段的测序结果设计引物 P8、P9 和 P10, 采用 TAIL-PCR 的方法, 以基因组 DNA 为模板, 经过 3 轮扩增得到 1 条约 760 bp 的 DNA 片段(图 3)。测序后通过国际生物技术信息中心网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析, 证实该序列含有 97 bp 的内含子序列, 该内含子与外显子连接位点符合 AG-GT 的规律, 而且该序列还含有 360 bp 的启动子序列, 去除内含子及启动子序列后得到 *CHI* 基因的 5' 端序列。

将扩增得到的 *CHI* 基因的 cDNA 片段及其 3' 端和 5' 端进行拼接, 最终得到大花美人蕉 *CHI* 基因的全长 cDNA 序列。

4 大花美人蕉 *CHI* 基因与其它植物 *CHI* 基因的同源性比较

大花美人蕉 *CHI* 基因的 cDNA 序列拼接显示, 该基因由 678 个碱基组成, 编码 226 个氨基

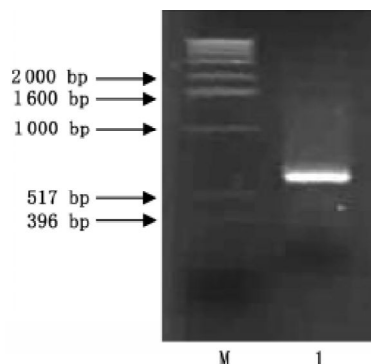


图 2 *CHI* 基因 cDNA 3' 端 RT-PCR 产物

Fig. 2 RT-PCR product of cDNA 3' end of *CHI* gene

M: 1 kb 分子量标准; 1: 引物 P7 和 RA 扩增产物。

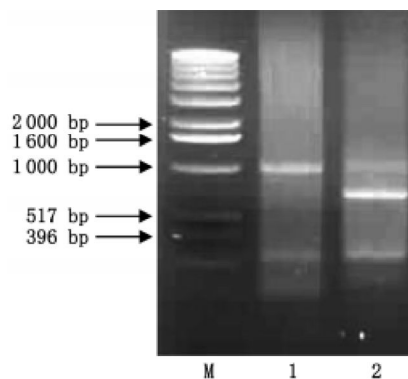


图 3 *CHI* 基因 DNA 5' 端 TAIL-PCR 产物

Fig. 3 TAIL-PCR products of DNA 5' end of *CHI* gene

M: 1 kb 分子量标准; 1: 引物 P9 和 AD₂ 扩增产物; 2: 引物 P10 和 AD₂ 扩增产物。

酸(图 4)。经国际联网查询, 该基因与葡萄(*Vitis vinifera*, 基因库中序号为 CAA53577)、草莓(*Fragaria x ananassa*, 基因库中序号为 BAE17121)、丁香(*Dianthus caryophyllus*, 基因库中序号为 CAA91931)、柑桔(*Citrus sinensis*, 基因库中序号为 BAA36552)、矮牵牛(*Petunia x hybrida*, 基因库中序号为 CAA68769)、洋葱(*Allium cepa*, 基因库中序号为 AAU11843)、玉米(*Zay mays*, 基因库中序号为 CAA80441)的 *CHI* 基因具有较高的同源性(图 5), 分别为 82%、79%、80%、80%、79%、81% 和 76%, 据此可以认定获得的基因为 *CHI*。

讨 论

本文以 RT-PCR 及 TAIL-PCR 方法从大花美人

1	ATG GCT CAA GCC GGC GTT TCA TTG CCC AAG CTC GTC ATT GGT GAA	45
1	M A Q A G V S L P K L V I G E	15
46	GTC ACC TTC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG TCC ACC ACC ACC	90
16	V T F P P A A A P P G S S S S	30
91	CTC TTC CTC GCC GGC GCA GGT GAG CGA GGA TTG GAG ATC GAC CGA	135
31	L F L A C A G E R C L E I J R	45
136	CAG TTC GTT GTC TTC ACG GCC ATC GGC GTC TAC CTC GAG GAC TTG	180
46	Q F V V F T A I G V Y L E D L	60
181	CCC CTC TCG ACC CTT GCC CCC AAG TCG AAG CGA AAG ACC GCC GAC	225
61	A V S T L A P K W K G K T A D	75
226	GAC CTC GCC GGC AAT TCT GAC TTC TTC AGA GAT ATC TTC ACC GGT	270
76	D L A C N S D F F R D I F T G	90
271	CCT TTT GAG AAG TTC ACA CGG ATA ACG ATG GTG AAG CCG CTC AGC	315
91	P F E K F T R I T M V K P L S	105
316	CCC CAC CAC TAC TCA GAG AAC CTC CAG CAG AAC TCC CTT GCC CAT	360
106	G Q Q Y S E K V E E N C V A E	120
361	TGG AAG GCG GCC GGG ACC TAC ACC GAG GCG GAA GCC GCG GCA GTG	405
121	W K A A C T Y T E A E A A A V	135
406	GAG AAG TTC AAA GAG GCT TGC AAG AAC GAG ACC TTC CCT CCC GGC	450
136	E K F K E A C K N E T F P P G	150
451	ACT TCC AAT CTC TTC ACT CAT CAA CTT TCT CCT GCC TCC CTC ACT	495
151	T S T L F T H Q V S P A S L T	165
496	ATC ACA TTC TGG AGG GAG GGG TCA ATG CCC GAG ACA GGA AAC ACG	540
166	I T F W R E C S M P L T C N T	180
541	GTG ATA GAG AGC AAA GCT CTC ACC GAA GCA AAT CTG GAG TCC ATC	585
181	V I E S K A L S E A I L E S I	195
586	ATC CGA AAA CAC GCC GTA TCC CCC CCC GCA AAA ACC ACC CTC GCC	630
196	T G K H G V S P G A K R S V A	210
631	CAG AGG TTG TCG GAG ATA CTG CAG GAG GTT AAG TTG GAG GGC TCA	675
211	O R L S E I L E E V K L E C S	225
676	AAA TAGCTGTTGCCCTAATTATTTGGGGCAAGTGGTGTACTTCTTTCCGCCAAATGATGGTGAT	
226	K *	
TCACCAATCTCCCTTCCTTTGGCCGAATAAAAACCCCATTCCTCTTATTTTATAATACAAAAA		

图4 大花美人蕉 *CHI* 基因 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *CHI* cDNA from *C. generalis*
转录终止密码子处用“*”表示。

蕉中克隆全长的 *CHI* 基因, 其 cDNA 全长为 678 bp, 编码 226 个氨基酸, 在 GenBank 的登录号为 DQ160232。此基因的克隆为大花美人蕉花色形成、黄酮醇基因工程操作奠定了一定的基础。

本文中以 TAIL-PCR 方法扩增 cDNA 的 5' 端, 比 5' RACE 以及其它染色体步行 PCR 技术更加方便快捷, 此方法对模板的量和纯度要求不高, 而且其扩增的非特异性产物的比例也很低(彭玮欣等

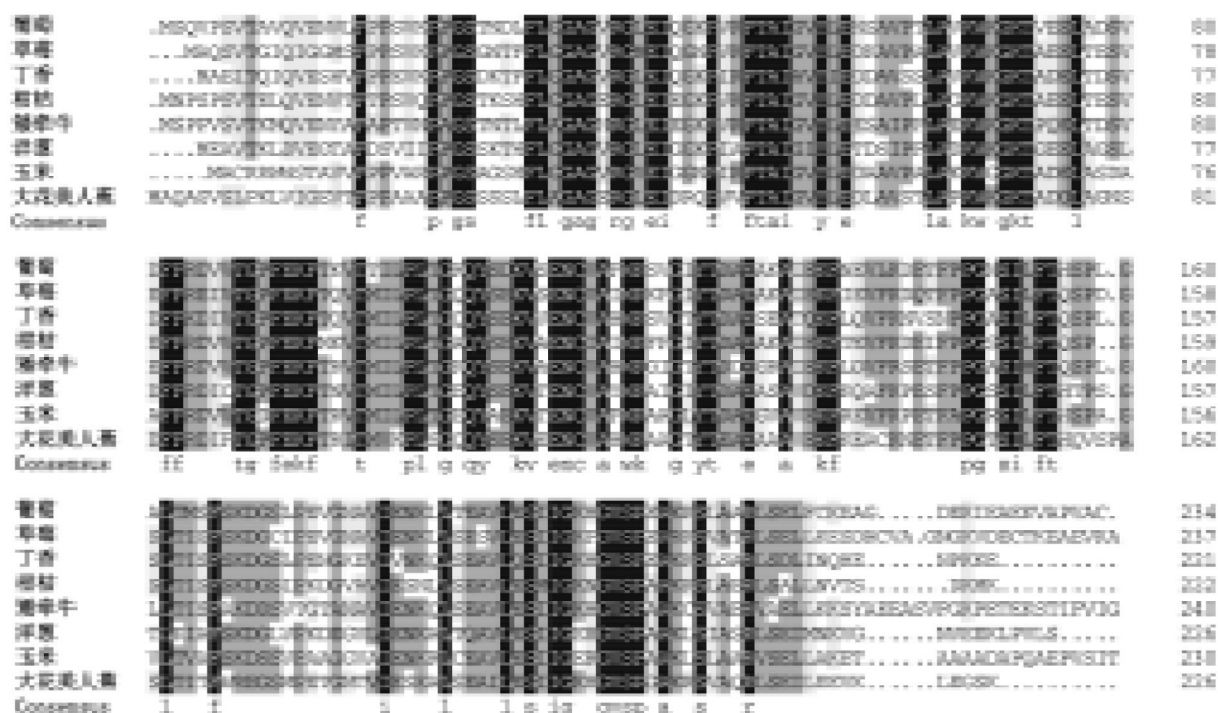


图5 大花美人蕉和其它植物CHI基因的氨基酸序列比较

Fig. 5 Comparison of the amino acid sequences of CHI gene between *C. generalis* and other plants

2001)。

从植物花色形成的角度研究 CHI 基因很有意义。CHI 是影响花色形成的一个重要的酶, 其表达与否及其表达量多少会直接影响花色。对此我们认为, 可将 CHI 基因转入植物中间载体后, 进行转基因植物的研究, 探讨外源或内源 CHI 基因对植物花色的影响。

另外, CHI 是类黄酮生物合成途径中的一种关键酶, 它调控类黄酮的生物合成。因此我们认为, 从提高植物抗性和保健功能探讨这一问题也有意义。

参考文献

- 李军, 李洪清, 吴萍, 李美茹 (2005). 转座子在观赏植物嵌合花色形成中的应用. 植物生理学通讯, 41 (4): 542~546
- 彭玮欣, 刘国庆, 马峙英 (2001). 用于染色体步行的PCR技术. 河北农业大学学报, 24 (3): 86~89
- 颜华, 宋云, 李翊云, 颜瑞茗, 李毅, 陈章良 (1997). 查尔酮异构酶基因的克隆序列分析及在大肠杆菌中的表达. 植物学报, 39 (11): 1030~1034
- 植中强 (2005). 美人蕉花红色素的提取工艺. 应用化工, 34 (1): 54~55
- Abe Y, Hoshino A, Iida S (1997). Appearance of flower variegation in the mutable speckled line of the Japanese morning glory is controlled by two genetic elements. Genes Genet Syst,

72: 56~62

- Blyden ER, Doerner PW, Lamb CJ, Dixon RA (1991). Sequence analysis of a chalcone isomerase cDNA of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Mol Biol, 16 (1): 167~169
- Grotewold E, Peterson T (1994). Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavanone isomerase. Mol Gen Genet, 242 (1): 1~8
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J, 8: 457~463
- McKhann HI, Hirsch AM (1994). Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.): highest transcript levels occur in young roots and root tips. Plant Mol Biol, 24 (5): 767~777
- Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric DVC, Van Tunen AJ, Verhoeyen ME (2001). Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. Nat Biotechnol 19: 470~474
- Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S (2005). Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. FEBS Lett, 579 (27): 6074~6078
- Shirley BW, Hanley S, Goodman HM (1992). Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. Plant Cell, 4 (3): 333~347
- Wood AJ, Davies E (1994). A cDNA encoding chalcone isomerase from aged pea epicotyls. Plant Physiol, 104 (4): 1465~1466