

## 研究报告 Original Papers

## 用 SON-PCR 快速获得长鞭红景天 CHS 基因全长及其序列分析

肖燕, 杨足君\*, 李光蓉, 任正隆

电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054

**摘要:** 采用单侧寡核苷酸嵌套 PCR (SON-PCR) 方法, 从长鞭红景天中扩增得到查尔酮合成酶基因(chalcone synthase, CHS), 命名为 *Rhchs*, 其序列全长为 2 443 bp, 包括 682 bp 的启动子区、957 bp 的开放阅读框和 3' UTR 区。预测序列编码 381 个氨基酸, 其氨基酸组成与其他已知的高等植物的查尔酮合成酶具有很高的同源性, 与葡萄、山茶花、杜鹃和牵牛的同源性分别为 87%、87%、86% 和 85%。且大部分氨基酸序列保守。序列分析表明, 在启动子区域也找到了 TATA-box、W-box、G-box like 等顺式作用元件。

**关键词:** 长鞭红景天; SON-PCR; 查尔酮合成酶基因(*CHS*); 基因克隆; 序列分析

SON-PCR Fast Cloning and Sequence Analysis of CHS Gene from *Rhodiola fastigiata* (Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu

XIAO Yan, YANG Zu-Jun\*, LI Guang-Rong, REN Zheng-Long

School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China

**Abstract:** A new complete DNA sequence of *chalcone synthase* (*CHS*) gene, which was specially expressed in *Rhodiola sachalinensis*, was cloned by single oligonucleotide nested PCR (SON-PCR). The gene, named *Rhchs*, contained a length of 2 443 bp including a promoter region of 682 bp, an ORF of 957 bp and 3' UTR area. CHS protein predicted from *Rhchs* showed 87%, 87%, 86%, 85% identities with CHS of *Vitrus vinifera*, *Camellia sinensis*, *Rhododendron simsii*, *Petunia hybrida* and retained most of the conserved residues. Some putative *cis* elements characteristic of the *CHS* gene such as TATA-box, W-box, G-box were found at the promoter region of *Rhchs*.

**Key words:** *Rhodiola fastigiata*; SON-PCR; *chalcone synthase* (*CHS*); gene clone; sequence analysis

红景天的主要药用化学成分为红景天苷和黄酮类等化合物。查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)是类黄酮合成途径的限速酶, 参与类黄酮的合成, 催化丙二酰辅酶 A 的 3 个乙酸基和对羟基苯丙稀酰辅酶 A 的一个乙酸基的缩合, 产生 4,5,7-三羟黄烷酮查尔酮(Stich 等 1992)。类黄酮广泛存在于植物体内的次生代谢产物, 在改良花色、防紫外辐射和保健中有一定的作用(李军等 2006)。它还是植物中主要花色素, 在植物的多种功能中起作用。查尔酮合成酶可在花中特异性表达, 其表达量的改变可能会致植物花色的变异(韩颖颖等 2004)。采用抑制 CHS 基因的表达量来改变矮牵牛花色的研究已比较深入(绍莉等 1996), 但是以药用植物为对象来研究 CHS 的报道较少。鉴于此, 本文根据 CHS 基因的保守区设计特异引物, 从红景天中克隆得到保守序列, 进而用单侧寡核苷酸嵌套 PCR (single oligonucleotide nested-PCR,

SON-PCR) 扩增 CHS 基因的全序列。以获得的红景天 CHS 保守序列为基础, 设计 3 条 3' 端嵌套引物和 3 条 5' 端嵌套引物对两侧序列进行 SON-PCR 扩增, 从而获得全序列。

## 材料与方法

长鞭红景天 [*Rhodiola fastigiata* (Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu] 采集于四川康定县海拔 3 000 m 的山地。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室保存。红景天基因组 DNA 提取用 CTAB 法(赵为等 2006)。

根据已报道 CHS 基因的保守核苷酸序列合成

收稿 2007-08-28 修订 2007-11-15

资助 国家自然科学基金(30671288)和教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0810)。

\* 通讯作者(E-mail: yangzujun@uestc.edu.cn; Tel: 028-83206556)。

1对简并引物 CHSF 和 CHSR, 其序列为(R=A/G, W=A/T, S=G/C, Y=C/T, K=G/T, H=A/C/T) CHSF: 5' CCKTCHYTGGAYGCNMGRRCARGAC 3'; CHSR: 5' GGBCCRAANCCRAANARMAC-ACC 3'。通过降落式 PCR 方法对供试材料 DNA 进行扩增。其扩增程序: 94 °C 预变性 4 min; 其后 94 °C 1 min, 65 °C 1 min, 每经过一个循环温度降低 1 °C, 72 °C 2 min, 10 个循环; 然后 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。反应体系总体积 25  $\mu\text{L}$ , 其中含 1 U Taq DNA 聚合酶(上海申能博彩公司)、1 $\times$ PCR 缓冲液、1.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP、65 ng 引物和 50~100 ng 模板(长鞭红景天 DNA)。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 于凝胶成像系统下照相。

根据扩增得到的保守区序列设计并合成了 3 条 5' 端嵌套引物为, P1: 5' GAGCTTGGTGAGCTGGTAATC 3'、P2: 5' GAGTGATCTTGGATT-TAGGCTG 3'、P3: 5' TGGGACTTCTACTACA-ACCATG 3'; 和 3 条 3' 端嵌套引物为, P4: 5' AGGAGAAGCTGAAAGCTACGAG 3'、P5: 5' TAACATGTTCGAGCGCTTGT 3'、P6: 5' GA-GAACAACTGGCTACGTT 3'。PCR 扩增条件: 50  $\mu\text{L}$  反应体系中, dNTP 为 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 引物为 1  $\mu\text{mol}$ , 第 1 轮 PCR 中以红景天基因组 DNA 100 ng 作为模板, 在以后的两轮循环中, 取上轮扩增产物 1  $\mu\text{L}$  作为反应底物, dNTP 为 0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 酶为 2 U。SON-PCR 程序为在第 1 阶段 PCR (单链延伸)中, 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 1.5 min, 72 °C 2.5 min, 经 5 个循环后, 进入一个错配产生双链扩增阶段; 94 °C 30 s, 29 °C 3 min, 错配 3 min 至 72 °C; 72 °C 2.5 min, 经 1 个循环后; 进入一个新的扩增循环阶段: 94 °C 10 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2.5 min, 60 个循环(第二轮和第三轮反应为 30 个循环), 终延伸阶段 72 °C 7 min。

PCR 扩增产物经 DNA 胶回收试剂盒(上海申能博彩公司)进行回收。并将回收产物连接到载体 pMD18T (TaKaRa 公司), 再将连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 后涂布于含 IPTG、X-gal、Amp 的 LB 固体培养基上培养过夜后进行蓝白斑筛选。随机挑选 15 个的白色单菌落接种到含

Amp 的 LB 液体培养基里震荡培养。然后提取质粒直接电泳, 并用质粒 DNA 作模板用目标引物 CHSF、CHSR 及通用引物 M13F、M13R 进行 PCR 扩增鉴定, 筛选的阳性克隆送交上海英骏生物公司进行测序。最后将克隆测序得到的核苷序列送 NCBI GenBank 登录。

## 实验结果

### 1 CHS 基因的 PCR 扩增

以红景天 DNA 为模板, 用简并引物 CHSR、CHSF 进行 PCR 扩增得到一条约 800 bp 条带(图 1), 测序结果与预期目标片段相符。登录 NCBI GenBank, 序列号为 EF070214。

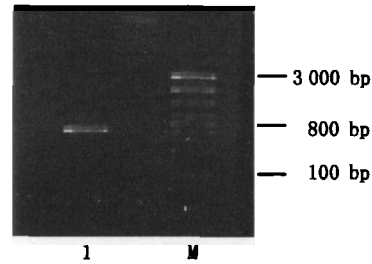


图 1 长鞭红景天 CHS 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR product of CHS gene in *R. fastigiata*  
M: DL3000 分子量; 1: 长鞭红景天 PCR 产物。

### 2 CHS 基因 5' 端的扩增

根据扩增片段设计引物 P1、P2、P3 进行 5' 端的扩增, 在第 1 轮 PCR 后, 扩增片段产生弥散现象, 第 2 轮 PCR 后出现了带, 但不明显; 第 3 轮扩增主带十分明显, 片段大小约 700 bp (图 2), 测序结果得到片段长度为 682 bp, 在 NCBI

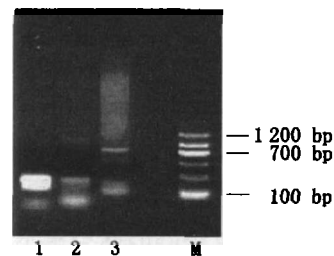


图 2 长鞭红景天 CHS 基因的 5' 端 SON-PCR 扩增

Fig.2 SON-PCR product of 5' end of CHS gene in *R. fastigiata*  
M: DL1200 分子量; 1: 第 1 轮 SON-PCR 扩增产物; 2: 第 2 轮 SON-PCR 扩增产物; 3: 第 3 轮 SON-PCR 扩增产物。

上进行比对证实为 CHS 基因的 5' 端序列。

### 3 CHS 基因 3' 端的扩增

根据扩增片段设计引物 P4、P5、P6 进行 3' 端的扩增, 经 3 轮扩增同样得到一条约 700 bp 的片段, 片段回收克隆后用 M13 检测, 结果如图 3, 测序结果片段长 702 bp, 证实为 CHS 基因的 3' 端序列。将实验结果 1 得到的 CHS 基因的 DNA 片段及其 3' 端和 5' 端进行拼接, 最终得到红景天 CHS 基因的全长。

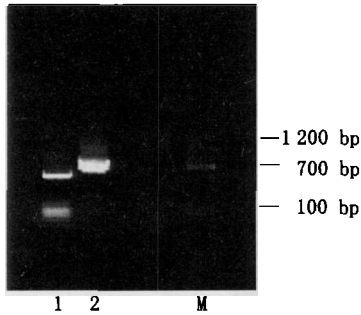


图 3 M13 和特异引物对挑选菌落的鉴定

Fig.3 Identification of product by M13 and specific primers  
M: DL1200 分子量; 1: 特异引物扩增; 2: M13 扩增。

### 4 红景天 CHS 基因 DNA 全序列分析

将测序得到的所有片段拼接以后, 结果如图 4 显示, 红景天 CHS 基因(*Rhchs*)全长为 2 443 bp, 包括开放阅读框 957 bp (539~1 495 bp), 共编码 318 个氨基酸。在启动子区域找到了部分顺式作用元件。W-box 位于 86 和 280 bp 处, TATA-box 位于 173 bp 处, G-box like 位于 449 bp 处。将 *Rhchs* 与 NCBI 基因库中登录的葡萄、山茶花等物种的序列进行氨基酸序列比对, 结果(图 5)发现红景天与其他含有此基因的各类物种同源性较高。本文获得的红景天序列与葡萄(*Vitnus vinifera*)和山茶花(*Camellia sinensis*)的同源性最高, 均为 87%, 与杜鹃(*Rhododendron simsii*)、牵牛(*Petunia x hybrida*)的同源性也分别高达 86%、85%。据此可以推测获得的基因为 CHS 基因。苜蓿 CHS 的晶体结构分析研究表明, CHS 的活性位点为 Cys<sup>164</sup>、Phe<sup>215</sup>、His<sup>303</sup>、Asn<sup>336</sup> (图 4 中带 \* 方框标记处), 在红景天的 CHS 氨基酸序列中都已找到, 分别位于 *Rhchs* 氨基酸的第 124、175、263 和 296 位。

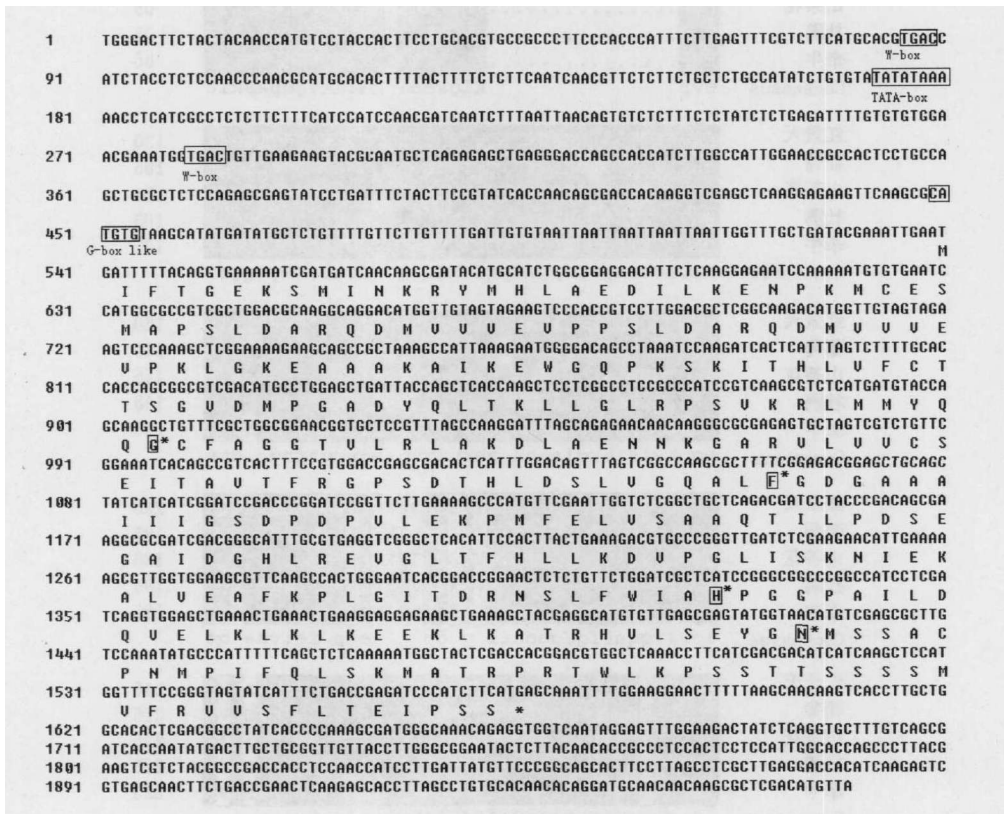


图 4 红景天 *Rhchs* 基因全序列

Fig.4 Full length of *Rhchs* in *R. fastigiata*

位于带 \* 方框内的氨基酸分别为 4 个 CHS 活性位点。

根据图5比对可以看出, 红景天CHS的氨基酸序列与葡萄、山茶花、杜鹃、牵牛的CHS大部分保守, 但却多出PSLDARQDMVVVEVP(位于44~58处)一类氨基酸。这部分氨基酸的验证工作正在进行中。

### 讨 论

自1983年第一个荷兰芹的CHS基因序列发表以后, 迄今, 已从多种双子叶, 单子叶和裸子植物中克隆到CHS基因(廖靖军等2000)。苜蓿CHS的晶体结构分析表明, 其活性位点为Cys<sup>164</sup>、Phe<sup>215</sup>、His<sup>303</sup>、Asn<sup>336</sup>。采用根据CHS基因的保守区设计的特异引物对红景天进行降落式PCR扩增, 得到一个大小为860 bp的目的片段, 序列

分析比较表明, 本文通过引物CHSF和CHSR扩增得到的CHS基因片段, 其起始端位于其他物种外显子II 5'端的70~80个氨基酸左右。并且找出4个活性位点, 分别位于Rhchs氨基酸序列124位的Cys<sup>164</sup>、175位的Phe<sup>215</sup>、263位的His<sup>303</sup>、296位的Asn<sup>336</sup>(图4)。

从CHS在各个物种中的序列比和聚类分析得知, CHS基因是一个较大的基因家族, 其编码区比较保守(杨俊波等2002), 本文获得的长鞭红景天与已报道的所有物种的CHS的同源性较高。由于SON-PCR方法是用DNA扩增全序列, 并没有去除内含子, 所以根据红景天比其他植物多出的氨基酸部分(即44~58部分的氨基酸)序列可以推测: 它有可能是红景天CHS的内含子, 也可能

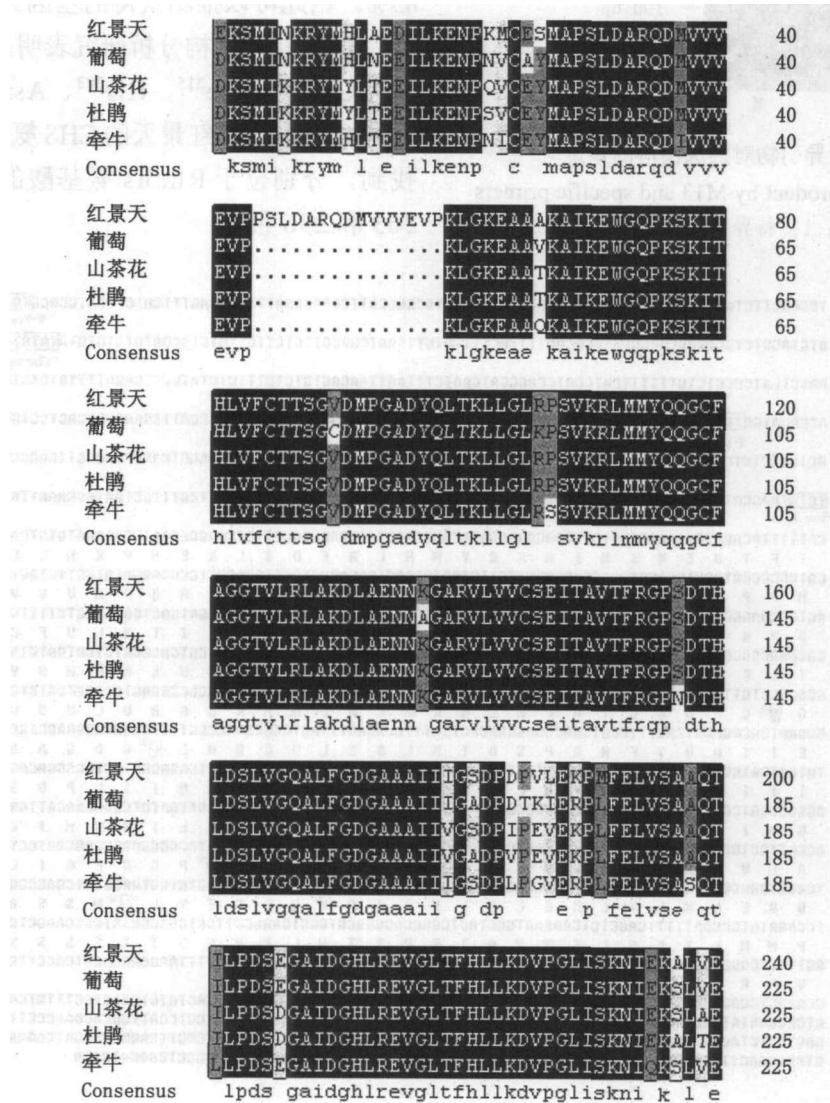


图5 红景天和其他植物CHS的氨基酸序列比较

Fig.5 Comparison on the amino acid sequences of CHS between *R. fastigiata* and other plants

是 CHS 基因家族中一个尚未发现的新成员。目前,进一步的鉴定工作正在进行中。

有关 CHS 的研究大多是从改变花卉的颜色这一角度出发的,而对其在药用价值中的研究报道则非常少。近年来,黄酮合成的分子机制及其调控已经成为研究的前沿和热点,如何在传统药学研究方法中融入现代分子生物学技术已成为人们关注的问题。本文中药用植物红景天中查尔酮合成酶(CHS)基因序列分析的结果,对以新的手段研究各种酶在药用植物中的机制和如何保护珍贵药用植物的资源是有一定的参考价值。

### 参考文献

- 韩颖颖, 明凤, 王敬文, 梁斌, 郭滨, 叶鸣明, 沈大棱(2004). 蝴蝶兰查尔酮合酶基因 cDNA 的克隆、鉴定及其原核表达. 复旦学报(自然科学版), 43 (2): 235~239
- 李军, 李洪清, 李美茹(2006). 大花美人蕉查尔酮异构酶基因的 cDNA 克隆和序列分析. 植物生理学通讯, 42 (3): 449~453
- 廖靖军, 安成才, 吴思, 陈章良(2000). 查尔酮合酶基因在植物防御反应中的调控作用. 北京大学学报(自然科学版), 36 (4): 565~575
- 绍莉, 李毅, 杨美珠, 宋云, 陈章良, 萧师辉(1996). 查尔酮合酶基因对转基因子午花色和育性的影响. 植物学报, 38 (7): 517~524
- 杨俊波, 田欣, 李德珠, 顾红雅, 杨世雄(2002). 石笔木 CHS 基因家族成员的分析. 云南植物研究, 24 (2): 209~214
- 赵为, 邓科君, 杨足君, 任正隆(2006). 景天科植物基因组 DNA 的高效提取方法. 安徽农业科学, 34 (22): 5804~5805
- Stich K, Eidenberger T, Wurst F (1992). Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3,4-diols using flower extracts of *Dianthus caryophyllus* L. (carntion). *Planta*, 187: 103~108