

· 中药资源研究 ·

黄琼林

青天葵查尔酮合成酶基因的克隆及序列分析

黄琼林¹, 曾湘达^{2,3}, 卓一南^{2,3}, 何瑞^{2,3}, 詹若挺^{2,3} (1. 广东医科大学, 广东 湛江 524023; 2. 广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心, 广东 广州 510006; 3. 岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 克隆青天葵黄酮类药效成分生物合成途径第一步关键酶——查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)的编码基因, 并分析其序列特征及编码蛋白的功能。方法 在前期青天葵转录组测序获得的 CHS 基因序列片段的基础上, 采用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)从青天葵叶片中获取编码 CHS 的 cDNA 全长并克隆其编码区; 利用生物信息学方法对其编码蛋白进行同源性比对和功能分析。结果 克隆获得的青天葵 CHS 基因编码区长度为 1173 bp, 编码 391 个氨基酸。编码蛋白的氨基酸序列预测显示, 青天葵 CHS 蛋白为酸性、亲水性蛋白, 分子量约为 96.9 kDa; 不含有信号肽、转运肽和跨膜结构域, 很可能定位于细胞质中; 具有查尔酮合成酶保守功能域, 归属于查尔酮合成酶超家族, 与文心兰等同科植物 CHS 蛋白的同源性可达 87%。结论 成功克隆得到青天葵查尔酮合成酶基因, 为后续的基因功能鉴定和生物合成调控奠定了基础。

关键词: 查尔酮合成酶; 青天葵; 克隆; 序列分析

中图分类号: R34; R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2018)02-

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2018.02.

Cloning and sequence analysis of CHS gene from endangered *Nervilia fordii*

Huang Qionglin¹, Zeng Xiangda^{2,3}, Zhuo Yinan^{2,3}, He Rui^{2,3}, Zhan Ruoting^{2,3}

1. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China;

2. Research Center of Chinese Medicinal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

3. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To clone the encoding gene of chalcone synthase that the first-step key enzyme regulating the flavones biosynthesis from endangered herbaceous *Nervilia fordii*, and analyze its sequence feature and function of coding protein. Methods Based on the CHS sequence fragment acquired from previous transcriptome sequencing, the full-length cDNA and coding region of CHS was cloned from *N. fordii* leaves using reverse transcriptional PCR and rapid amplification of cDNA ends technologies, and then the polygenetic alignment and function analysis of the encoding protein were performed by bioinformatics approaches. Results The length of CHS gene cloned from *N. fordii* was 1173 bp, which encoded 391 amino acids. Sequence analysis and prediction revealed that NfCHS protein with a molecular weight of 96.9 kDa was acidic and hydrophilic, with none signal peptide, transit peptide and transmembrane region, which demonstrated the protein probably located in cytoplasm. NfCHS protein contained a

收稿日期: 2017-10-12

作者简介: 黄琼林, 男, 博士, 讲师, 主要从事生物医药研究。Email: perfectqql@163.com. 通信作者: 何瑞, 女, 博士, 研究员。Email: ruihe@gzucm.edu.cn.

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(2015A030310519); 广东省普通高校创新团队项目(2016KYYTD02)

研究方向: 中药资源可持续利用研究。

黄云峰

chalcone synthase conserved function domain and was cataloged into chalcone synthase superfamily, shared an identity of 87% with the CHSs from Orchidaceae species such as *Oncidium*. Conclusion A CHS encoding gene was successfully cloned from *N. fordii*, which provided firm foundation for its functional identification of flavones biosynthesis regulation in the plant.

Keywords: Chalcone synthase; *Nervilia fordii*; cloning; sequence analysis

青天葵是“十大广药”之一，来源于兰科芋兰属毛唇芋兰 *Nervilia fordii*(Hance) Schltr. 干燥全草或叶片，具有清肺止咳、健脾消积、镇静止痛、清热解毒、散瘀消肿等功效，对肺结核咳嗽咯血、支气管炎、小儿疳积、小儿肺炎等疾病有着显著的临床疗效^[1-2]。由于自身生长条件苛刻和人为过度采挖，青天葵药材资源已经濒临灭绝，早在 20 多年前就被列为稀有濒危物种^[3]。化学研究^[4-7]表明，黄酮类成分是青天葵发挥药效的主要物质基础之一。调控黄酮类生物合成途径关键酶基因的表达，增加黄酮类有效成分的积累、促进优质高产青天葵品种的选育，是缓解当前青天葵资源严重匮乏现状的可考虑途径之一。

植物黄酮化合物的生物合成途径已基本阐明，起始底物为 1 分子的香豆酰酶和 3 分子的丙二酰辅酶，在查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)的作用下生成查尔酮，再由查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)合成黄烷酮，随后黄烷酮作为主要的中间产物催化生成黄酮、黄酮醇、花青素等各类黄酮类化合物^[8-9]。因此，CHS 被认为是植物黄酮类生物合成途径的第一步关键限速酶。CHS 基因表达及其基因工程不仅调控植物黄酮类化合物的合成与积累，还参与到调控植物育性、花色、调节生长素运输和防御抗逆等生理生化过程密切相关^[10]。目前，CHS 基因已从红花^[11]、白芨^[12]、决明^[13]和化州柚^[14]等多种药用植物中克隆获得。

本研究应用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术从青天葵叶片中克隆 CHS 基因，命名为 NfCHS，并通过生物信息学分析基因及其编码蛋白的序列特征和功能，以期后续利用该基因调控青天葵黄酮类药效成分的生物合成，进而实现高质优产的青天葵品种选育研究奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 植物材料 青天葵植株从广西壮族自治区南宁市

马山县移栽至广州中医药大学岭南中药资源教育部重点实验室栽培，经广西中医药研究院中药资源研究所黄云峰副研究员鉴定为兰科芋兰属植物毛唇芋兰 *Nervilia fordii*(Hance) Schltr.。

1.2 试剂 RNAiso Plus 植物总 RNA 提取试剂、PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser(Prefect Real Time)、SMARTer® RACE 5'/3' Kit、PCR 试剂、DNA markers，大连宝生物有限公司；GZgene GEL/PCR Extraction Kit，美国 Biomiga 公司；pGEM-T 克隆载体，美国普洛梅格生物有限公司。

2 方法

2.1 RNA 提取与 cDNA 合成 利用 RNAiso Plus 提取青天葵植物的总 RNA，采用 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser(Prefect Real Time) 制备用于扩增核心片段和编码区的 cDNA，采用 SMARTer® RACE 5'/3' Kit 合成用于 RACE 扩增的 cDNA。

2.2 引物设计 在前期研究^[15-16]中，作者从青天葵转录组测序数据中注释获得 1 条查尔酮合成酶基因片段，命名为 Unigene 25541。根据 Unigene 25541 序列，设计本研究所用的特异性引物(表 1)，由广州华大基因科技有限公司合成。

表 1 青天葵 CHS 基因克隆所用的引物

Table 1 Primers used for NfCHS cloning		
引物	序列(5'-3')	长度/bp
SMARTer II A Oligo*	AAGCACTGCTATCAACGCAGTACGCGGG	30
UPM Long*	CTTATACGACTCACTATAGGGAAGCAAGCACTGGTATCAACGCAGACT	49
UPM short*	CTAATACGACTCACTATAGGGC	22
CHSc-F	GAGCAGCTTCTACCAACAACCCAT	25
CHSc-R	CGGTGACGCTGGACCAATCCAAA	25
CHS5-1	GCTGAGCTGCTAGTCAGCCCGAGTA	26
CHS5-2	CTCGCTGTCAGAAAATGAGAT	22
CHS3-1	GGAGCAAAGGCTGGGCTGAAACAG	26
CHS3-2	GAAGTTGTGGGCTTCTAGACAT	22
CHS0-F	CTTCCGCCATCCCTAGCCTTGAAT	25
CHS0-R	ATCGCGTTAAAGACGACACTGCGG	25

注：带*号引物为试剂盒自带，其他为自行设计。

2.3 NfCHS 基因的核心片段扩增 以 CHSc-F/CHSc-

R 为引物扩增 NfCHS 基因核心片段。反应体系总体积为 80 μL , 其中包括 10 $\times$ Ex Taq Buffer 8 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs Mixture 6 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上游引物 2 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下游引物 2 μL , 5U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Ex Taq DNA 聚合酶 1 μL , cDNA 4 μL , 余下体积用无菌水补足。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认与预期大小相符后, 采用 GZgene GEL/PCR Extraction Kit 纯化回收, 并取 20 μL 送至广州华大基因科技有限公司双向测序。

2.4 NfCHS 基因的 RCAE 扩增 采用巢式 PCR 进行 NfCHS 的 RACE 扩增。分别以 UPM Long/CHS5-1、CHS3-1/UPM Long 为引物进行 5' 端、3' 端 RACE 扩增的第 1 轮 PCR, 反应体系和扩增程序同核心片段的扩增。分别以相应的第 1 轮 PCR 扩增产物为模板, 以 UPM short/CHS5-2、CHS3-2/UPM short 为引物, 进行 5' 端、3' 端 RACE 扩增的第二轮 PCR, 反应体系同核心片段的扩增, 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。第二轮 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认与预期大小相符后, 采用 GZgene GEL/PCR Extraction Kit 纯化回收。RACE-PCR 产物通过 T-A 克隆至 pGEM-T 载体, 热击转化至 E.coli Top10, 以经 PCR 检测的阳性菌液用载体通用引物测序。

2.5 cDNA 全序列的拼接及编码区的克隆 利用美国国立生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information NCBI) 的 “Blast 2 Sequence” 功能以及 DNAMAN 软件, 将上述获得的 NfCHS 基因的核心片段、5' 端和 3' 端序列进行比对拼接, 获得 cDNA 全长序列。用 Omega 2.0 软件分析其编码区, 并翻译成氨基酸序列。将获得的氨基酸序列进行 BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索, 初步确认获得的蛋白是否相应基因的编码蛋白及其完整性。

根据 cDNA 序列设计扩增 NfCHS 基因编码区的特异性引物 CHSO-F/CHSO-R, PCR 克隆 NfCHS 基因编码区。反应体系同核心片段的扩增, 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。PCR 产物回收纯化后克隆至 pGEM-T 载体, 筛选阳性克隆进行测序。

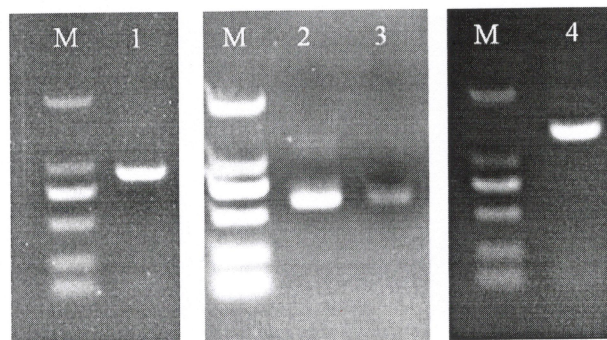
2.6 NfCHS 基因及其编码蛋白的序列分析和功能预测 采用 ProtParam 在线工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析目的基因编码蛋白的氨基酸组成、分

子量等理化性质; 应用 ProtScale 在线工具 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 预测蛋白质的亲水性/疏水性; 蛋白质的二、三级结构预测分别通过 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 Swiss-prot (<https://swissmodel.expasy.org/>) 完成; 采用 iPSORT 运算法则对蛋白进行亚细胞定位预测 (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>)。应用 TMHMM Server v. 2.0 软件对蛋白进行跨膜结构域在线预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。利用 NCBI 的 BLASTP 程序对氨基酸序列进行同源检索和功能域在线预测, 并采用 DNAMAN 软件进行多重比对。

3 结果与分析

3.1 NfCHS 基因的克隆及序列分析 NfCHS 基因核心片段的 PCR 扩增获得约 900 bp 产物, RACE 巢式 PCR 扩增分别获得 5' 端、3' 端各约 600 bp 产物 (图 1)。将核心片段、3' 端和 5' 端 RACE 产物测得序列进行拼接, 获得 NfCHS 的 cDNA 全长, 共 1587 bp。Omega2.0 软件分析结果表明, 该序列包含 5' 端 147 bp 非编码区, 1173 bp 的开放阅读框 (open reading fragment, ORF) 和 3' 端 237 bp 非编码区, 最后以 poly A 结尾。

采用根据获得的 cDNA 序列全长设计的 CHSO-F/CHSO-R 进行 NfCHS 基因编码区 PCR 扩增, 获得约 1200 bp 产物, 与上述预期 ORF 大小相一致 (图 1)。测序得到 1191 bp 插入序列, 根据编码区阳性重组子测序结果, 修正拼接序列 ORF 中错误的核苷酸位点, 获得长度为 1173bp 的 NfCHS 基因编码区全长及其氨基酸序列, 见图 2。



M. DL2000 Marker, 条带依上至下的大小分别为 2000、1000、750、500、200、100 bp; 1. 核心片段 PCR 产物; 2. 5' RACE 第 2 轮 PCR 产物; 3. 3' RACE 第 2 轮 PCR 产物; 4. 编码区扩增 PCR 产物

图 1 NfCHS 基因克隆 PCR 电泳图

Figure 1 Electrophoretogram for gene cloning of NfCHS gene

1	ATGCGCTAGCC TTGAAT	CCAT	CAAGAAGACG	ACGCCGAAG	CAGAGGCGCT	CGCCTCCATC
61	TTGGCAATCG	GCAGGGCAAA	TCTGAACAC	TTCAATGAAC	AGAGGGATT	CCCTGATTTT
121	TACTCCGGG	TCACAAATAG	CGAACACTTG	GTCACCTCA	AGAAAAAT	CCAACGCATC
181	TGTGATAAGA	CAGAAATAG	AAAGGCGCAT	TTTGTTTGGA	ACGAGGAGCT	TCTCAACAAG
241	AAOCCATGCC	TTGCGACATT	CATGGGCAAC	TCTCTTAATG	TGAGGCAAGA	GGTGCTATA
301	AAAGTGATAC	CTAAGCTGGG	GGCGGAGGCT	GGCACTAAGG	CAATTCAGAA	GTGGGGCCAA
361	CCCAAGCTCT	GCATCAOCCA	TCTCATTTTC	TGCACACGA	GGGCACTGGA	TTGCCAGGG
421	GCTGACTACC	AGCTCAOCCA	ACTTCTTGGC	CTCAACTCAA	ACGTGCAACG	CGTCATGCTT
481	TACACAGAGG	GTGTTTTCG	AGGTGAACAC	ACGCTCCGGC	TAGCCAAATG	CCTTGCTGAG
541	AGCCGCGAGG	GTGACGCTGT	TCTTGTGCTC	TGGCTGAAA	CCACCACCGT	GCTATTTCCG
601	GCGCGCTCTG	AGGAACACCA	AGACGACCTT	ATCACCCAGG	CTTTATTTGC	TGATGTTGCC
661	ATGCGACTTA	TAATAGTGGC	CGACCCAGAT	GAGGAGCCCA	ATGAGCGAGC	TAGTTTGTGT
721	ATTGCGCTCA	CATCTCAAGT	CTTATTGCGG	GACTCAGCCG	GTGCTATTGG	AGGTCATGTT
781	AGCGAGGGAG	GCCTTATAGC	CACACTCCAT	AGAGATGTGC	CACAGATTGT	TAATAGTAAT
841	ATTGAAAGAT	GTTTGGAAAA	GGCATTACG	CCACTTGSTA	TTTCAGATTG	GAATCTATC
901	TTTGGGTGC	CACACCCAGG	AGGTCGAGCC	ATTCTAGACC	AAGTGAGGGA	AAGGTTGGGG
961	CTGAACACAG	AGAAGTTGTG	GGCTCTTASA	CATGTGCTTG	CAGAGTATGG	TAATATGTCC
1021	AGTGTCTTG	TTTATTTTGC	CCTCTCTAGA	ATGCGCAAAA	GGTCTAAGAA	AGAAAGAAAA
1081	GCTACAACTG	GTGAGGCGCT	CGAGTGGGGT	GTTCCTTTTG	GATTGTGCTC	AGGCGTCACC
1141	GTGAAACCG	TTGTCTCTCG	CAGTGTGCTT	CTTTAA		

序列始端 ATG 和末端 TAA 分别为编码区启动密码子和终止密码子；方框中序列分别为引物 CHSO-F、CHSO-R 的部分序列。

图 2 NfCHS 基因编码区核苷酸和氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide and encoded amino acid sequence of NfCHS coding region

3.2 NfCHS 基因核苷酸及其编码氨基酸序列的理化性质分析 NfCHS 基因编码区包含 1173 个碱基，其中鸟嘌呤(Guanosine, G)和胞嘧啶(cytosine, C)所占的比率为 50.3%，编码 391 个氨基酸。编码蛋白的分子量为 96.9 kDa，等电点为 5.02，说明其为酸性蛋白质。在氨基酸组成上，含量较为丰富的是甘氨酸(Glycine)和丙氨酸(Alanine)，并且不含有带正、负电荷残基。蛋白质不稳定指数为 45.99，说明其属于不稳定蛋白质。

3.3 编码蛋白的结构分析 如图 3 所示，NfCHS 蛋白二级结构由 α -螺旋、不规则盘绕、延伸链和 β -转角等元件组成，它们所占的比例分别是 35.55%、20.72%、9.97%和 33.76%，提示 NfCHS 蛋白是以 α -螺旋和 β -转角为主要元件的混合结构型蛋白。

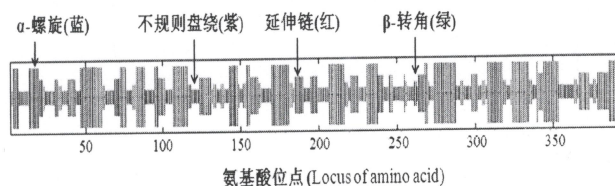


图 3 NfCHS 蛋白二级结构预测

Figure 3 Prediction for secondary structure of NfCHS protein

为了进一步了解 NfCHS 蛋白的空间排列，采用 Swiss-Model 在线工具分析该蛋白的三级结构。如图 4 所示，NfCHS 蛋白三级结构元件组成与二级结构预测基本一致，以 α -螺旋和 β -转角所占的比例最多，其次是不规则盘绕，延伸链则最少。

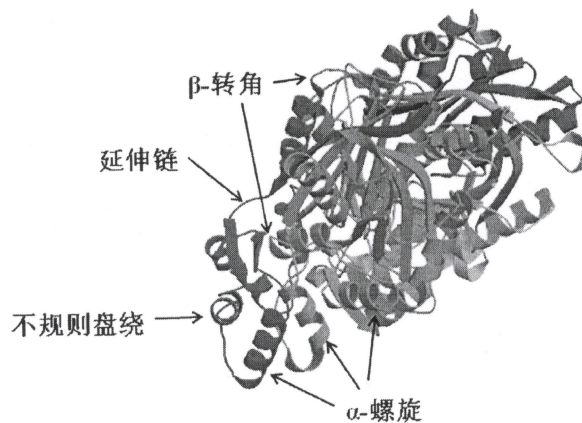


图 4 NfCHS 蛋白三级结构预测

Figure 4 Prediction for tertiary structure of NfCHS protein

3.4 编码蛋白的亲/疏水性分析 采用 ProtScale 软件在线分析 NfCHS 蛋白的亲/疏水性，结果发现，多肽链第 20 位的异亮氨酸和第 188 位的亮氨酸具有最高的分值 1.956，这两个位点疏水性最强；位于第 356 位的赖氨酸显现最低分值 -3.711，此处亲水性最强。多肽链整体表现为亲水性，且没有出现明显的疏水区域，表明其为亲水性/水溶性蛋白质。

3.5 编码蛋白的保守功能域分析 保守功能域搜索结果如图 5 所示，NfCHS 蛋白含有“chalcone and stilbene synthase”特异性保守功能域以及“chalcone synthase”、“chalcone and stilbene synthase N-terminal”两个非特异性保守功能域，并具有丙二酰辅酶 A 结合位点等功能位点，最终被归属于查尔酮合成酶超家族，说明 NfCHS 蛋白为查尔酮合成酶家族成员，推测其具有查尔酮合成酶的功能。

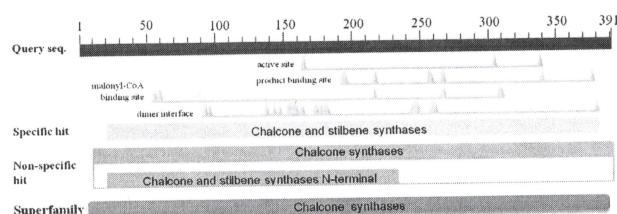


图 5 NfCHS 蛋白的保守功能域分析

Figure 5 Conserved domain of NfCHS protein

3.6 编码蛋白的信号肽、转运肽和跨膜结构分析 亚

细胞定位分析显示, NfCHS 蛋白不包含信号肽、转运肽和目标肽结构, 表明其为非分泌性蛋白。跨膜结构预测如图 6 所示, NfCHS 蛋白各氨基酸位于细胞膜外的概率均高于位于细胞膜内和存在跨膜结构的概率, 表明 NfCHS 蛋白不包含跨膜域, 整条多肽链均处于细胞膜外。

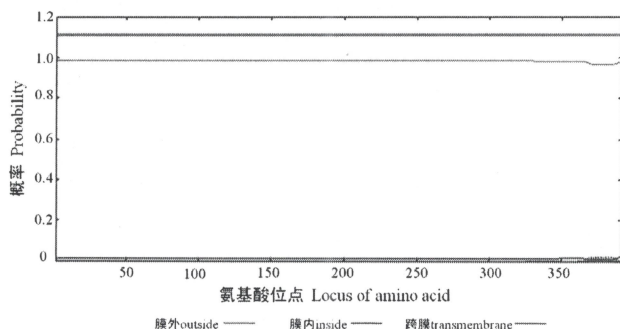
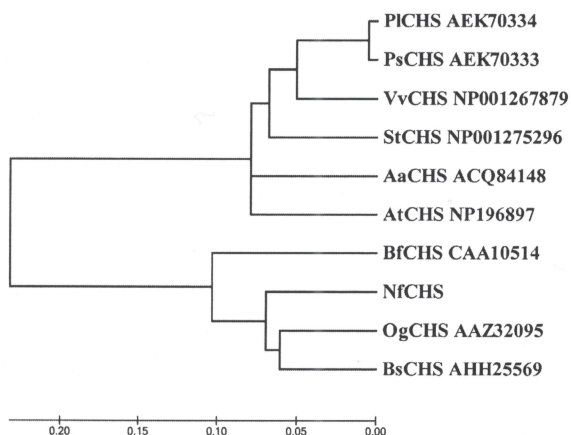


图 6 NfCHS 蛋白的跨膜结构域预测

Figure 6 Transmembrane structure prediction of NfCHS protein

3.7 编码蛋白的系统进化同源比对分析 10 个植物来源 CHS 的系统进化关系如图 7 所示, NfCHS 与同为单子叶植物来源的文心兰、白及和兜兰 CHS 聚成一支, 而其他双子叶植物来源 CHS 聚成另外一个分支。系统进化分析表明 NfCHS 与单子叶植物 CHS 具有更近的亲缘关系, 与其来源植物的亲缘关系基本一致。



PICHs 芍药 (*Paeonia lactiflora*); PsCHs 牡丹 (*Paeonia suffruticosa*); VvCHs 葡萄 (*Vitis vinifera*); StCHs 土豆 (*Solanum tuberosum*); AaCHs 紫茎泽兰 (*Ageratina adenophora*); AtCHs 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*); BfCHs 白芨兰 (*Bromheadia finlaysoniana*); OgCHs 文心兰 (*Oncidium Gower Ramsey*); BsCHs 白及 (*Bletilla striata*)。

植物名后面为该物种 CHS 蛋白在 Genbank 数据库上序列登记号; 图下方的标尺表示基于氨基酸序列差异的遗传距离值。

图 7 10 个植物来源 CHS 的系统进化关系树

Figure 7 Polygenetic tree of CHS proteins from 10 plants

上述 10 个植物来源 CHS 的氨基酸序列同源比对发现, NfCHS 与其他植物来源的 CHS 蛋白具有较高的同源性, 其中与同为兰科的文心兰序列相似度最高, 达到 87%; 与芍药的相似度较低, 也达 64%, 说明不同植物来源 FLS 蛋白序列具有较高的保守性。

4 讨论

查尔酮合成酶是黄酮类化合物生物合成调控的重要靶点, 也是植物黄酮化合物代谢工程领域的研究热点。研究表明, 调控 CHS 基因的表达可以有效地提高黄酮类含量, 例如红花 CHS 基因的过表达可以提高转基因红花的喹啉查尔酮等化合物以及模式植物拟南芥的总黄酮含量^[17-18]。本研究在前期转录组测序获得的 CHS 基因片段基础上, 设计特异性 PCR 引物, 首次从青天葵叶片中克隆了 NfCHS 基因, 获得全长 1587 bp 的 cDNA 全长序列与 1173 bp 的编码区及其编码 391 个氨基酸的蛋白质序列。氨基酸序列分析显示 NfCHS 蛋白与文心兰等同科植物的相似性高达 87%, 其编码蛋白具有查尔酮合成酶的典型保守结构域及活性位点, 初步推断 NfCHS 基因即为青天葵的查尔酮合成酶基因, 编码具有植物查尔酮合成酶催化功能的活性蛋白质。

本研究对 NfCHS 蛋白质序列进行了生物信息学分析, 探讨其蛋白特征, 为后续 NfCHS 基因及其编码蛋白的功能鉴定和应用奠定了较好的基础。NfCHS 蛋白为位于细胞膜外的亲水性蛋白质, 说明其处于细胞质中, 经过细胞裂解和沉淀处理后分布于上清溶液中, 可以利用水性亲和柱进行富集。此外, NfCHS 蛋白不含有信号肽和转运肽等结构, 在原核生物如大肠杆菌中表达时, 可直接将编码区序列克隆至表达载体并转化至宿主菌中, 无须通过酶切或特定 PCR 引物扩增来去除这部分结构。这些蛋白特征可为 NfCHS 融合蛋白的纯化、功能鉴定、表达载体构建等后续实验提供理论指导。

在前期转录组研究^[15]中, 作者曾分析青天葵查尔酮合成酶基因片段 Unigene 25541 在叶片和球茎中的相对表达量, 发现该基因在地下部分球茎的表达量高于地上器官叶片, 提示青天葵黄酮醇合成酶基因在青天葵不同器官能够广泛表达并趋向在地下部分高表达。由于青天葵植物材料产量极低的限制, 本研究未能采用实时荧光定量 PCR 探讨 NfCHS 基因的表达分布并验证上述转录组测序分析结果, 若后续条件允许, 应进一步明确 NfCHS 基因在青天葵不同组织中的表达特征, 为利用基因工程靶向调控青天

黄琼林

葵黄酮类成分的积累提供科学参考。

本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术成功克隆了青天葵黄酮类化合物生物合成途径的关键酶基因 *NfCHS*，并利用生物信息学分析其序列特征和蛋白功能，为进一步鉴定该基因在青天葵黄酮类成分合成中的功能奠定基础，旨在为后续通过基因工程手段提高青天葵药效成分积累，从而保护和改良青天葵的种质资源，促进濒危药材青天葵的可持续性利用提供科学参考。

参考文献:

- [1] 陈蔚文. 岭南本草(二)[M]. 广州: 广东科技出版社, 2011: 318-335.
- [2] 陈蔚文, 徐鸿华. 岭南道地药材研究[M]. 广州: 广东科技出版社, 2007: 326.
- [3] 文和群, 许兆然, Villa-Lobos J, 等. 中国南部石灰岩稀有濒危植物名录[J]. 广西植物, 1993, 13(2): 110-127.
- [4] 韦柳斌, 陈金幔, 周光雄. 青天葵大极性化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(1): 43-46, 59.
- [5] QIU L, JIAO Y, XIE J Z, et al. Five new flavonoid glycosides from *Nervilia fordii*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2013, 15(6): 589-599.
- [6] 焦扬, 邱莉, 谢集照, 等. 青天葵黄酮 F 的抗炎作用[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(2): 143-146.
- [7] 甄汉深, 周燕园, 袁叶飞, 等. 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3): 36-38.
- [8] PETRUSSA E, BRAIDOT E, ZANCANI M, et al. Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses[J]. International Journal of Molecular Science, 2013, 14(7): 14950-14973.
- [9] FALCONE FERREYRA M L, RIUS S P, CASATI P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological application [J]. Frontier Plant Science, 2012, 3: 222.
- [10] 张必弦, 朱延明, 来永才, 等. 植物查尔酮合酶(CHS)及其基因的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(20): 10376-10379.
- [11] 康亚兰, 裴瑾, 刘薇, 等. 红花查尔酮合酶基因的克隆、生物信息学分析及表达[J]. 中草药, 2014, 45(16): 2385-2389.
- [12] 田艾梅, 许忠民, 张恩慧. 白芨查尔酮合酶基因的克隆与分析[J]. 西北农业学报, 2014, 23(7): 91-95.
- [13] 钟德馨, 方袁梦梦, 郭壮浩, 等. 决明查尔酮合酶全长基因序列的克隆与分析[J]. 生物技术通报, 2013, (5): 99-104.
- [14] 文海涛, 赵红英, 肖凤霞, 等. 化州柚查尔酮合酶基因克隆与序列分析[J]. 生物学杂志, 2011, 28(1): 39-41.
- [15] Huang Q, Liang L, He R, et al. The first insight into transcriptome profile of herbaceous plant *Nervilia fordii* based on RNA-seq[J]. Plant Omics Journal, 2015, 8(6): 493-499.
- [16] 黄琼林, 何瑞, 詹若挺. 基于转录组测序的青天葵差异表达基因分析[J]. 中药新药与临床药理. 2017, 28(5): 687-691.
- [17] Guo D, Xue Y, Li D, et al. Overexpression of *CtCHS1* increases accumulation of quinochalcone in safflower[J]. Frontier Plant Science, 2017, 8: 1409.
- [18] 刘秀明, 陆皖行, 李佳, 等. 红花 CHS 基因的过表达提高了拟南芥黄酮含量[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(2): 182-190.

(编辑: 梁进权)