

查尔酮合酶基因的克隆、全序列分析及在大肠杆菌中的高效表达

邵 莉 李 毅* 潘爱华 陈章良

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

陈 敏

(鯨滨化学药业总公司 汕头 515000)

摘 要 类黄酮是植物中的一种重要的次级代谢产物,它与植物的花色形成有关。查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)是类黄酮合成途径中的一个关键酶,在植物体内,CHS 表达量的增加或减少都可能改变花的颜色。从矮牵牛(*Petunia hybrida*)花瓣的 cDNA 中克隆到了 CHS-A 基因,进行了全序列分析,并与国外已报道的 CHS-A 序列进行了同源性比较。结果表明,克隆的 CHS-A 基因长为 1170bp,编码一个由 389 个氨基酸组成的多肽,与国外已报道的 CHS-A 同源率高达 99%。此外,还在大肠杆菌中实现了 CHS-A 基因的高效表达。CHS-A 基因的成功克隆与表达为研究 CHS-A 基因对植物花色的影响打下了一个良好的基础。

关键词 CHS-A,矮牵牛,序列分析,表达

花色是开花植物的一个重要特性。花色的形成与植物中的一类重要的次级代谢产物——类黄酮有关。类黄酮可以在植物的不同部分合成,除了与花色形成有关外,还具有其它多种功能,如防止紫外线损伤,防御植物病原体侵害等等^[1]。

查尔酮合酶(Chalcone Synthase, CHS)是类黄酮合成中的一个关键酶,它催化丙二酰辅酶 A 的三个乙酸基和对羟苯丙烯酰辅酶 A 的一个乙酸基的缩合,产生柚配基查尔酮^[2]。在大多数植物中,CHS 的表达是花特异性的^[3],并且受不同发育阶段的调控^[4]。在特殊情况下,如紫外线照射或植物病原体侵害时,它也能在叶、茎等组织中被诱导表达^[5,6]。

在植物中,CHS 组成了一个多基因家族,这个家族有 8—10 个成员,位于 2 个不同的染色体上,其中 CHS-A 在花冠中表达量最大。我们从矮牵牛花瓣的 cDNA 中,采用 PCR 技术克隆得到了 CHS-A 基因,测定了全序列,并在大肠杆菌中实现了高效表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 DH5 α 为转化受体菌,克隆及亚克隆的载体为 pBluescript (KS),原核表达载体 pTrcB 质粒。

1.1.2 植物材料:矮牵牛(*Petunia hybrida*)由本实验室杨美珠老师提供。

1.1.3 试剂与酶:cDNA 合成试剂盒购自 Promega 公司,PCR 扩增试剂盒购自华美公司,DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司, α -³²P-dATP 为杜邦公司产品,限制酶和

* 联系作者

本文于 1994 年 2 月 2 日收到。

其它生化试剂购自 Biolabs 和 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取:矮牵牛的花蕾长到 2—3cm 即将开放时,将其采下,置于 -70°C ,取 3—4 个这样的花蕾在液氮中研磨成粉末状,采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿法提取 RNA^[9], -20°C 保存。

1.2.2 cDNA 第一链的合成:按照 Promega 公司 cDNA 合成试剂盒的说明书进行。以矮牵牛的 RNA 为模板,oligo(dT)为引物,在 AMV 逆转录酶的作用下,合成 cDNA 的第一条链, -20°C 保存。

1.2.3 采用 PCR 扩增 CHS-A 基因:参考已发表的矮牵牛 CHS-A 基因序列,采用本实验室的 ABI DNA 自动合成仪人工合成两段分别含有 26 个核苷酸的寡核苷酸作为引物,序列分别是:

5'端引物 5'CCGGATCCAAAAATGGTGACAGTCGA3'

3'端引物 5'CACTTAAGTAGCAACACTGTGGAGGAC3'

以合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR,反应条件为: 94°C 变性 40 秒, 55°C 退火 1 分 30 秒, 72°C 延伸 2 分钟,共 30 个循环。

1.2.4 PCR 产物的克隆:PCR 引物设计时两端加上了 BamHI 和 SalI 位点,因此,PCR 产物经纯化后用 BamHI 和 SalI 进行双酶切,然后克隆到 pBluescript(KS)的 BamHI 和 SalI 位点,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在选择培养基上挑取白色菌落,用煮沸法快速提取并做酶切鉴定。

1.2.5 DNA 序列分析:在全长 cDNA 片段上选择合适的限制酶位点进行亚克隆,并分别对这些亚克隆进行序列分析。

双链 DNA 测序方法为先将超螺旋质粒 DNA 在 0.2mol/L NaOH 中变性 15 分钟,再以 0.4 倍体积的 5mol/L NH_4AC 中和,乙醇沉淀。然后变性的质粒和测序引物一起退火。根据产品说明书中所给程序进行序列测定。

1.2.6 CHS-A 在大肠杆菌中的表达:CHS-A 基因克隆到表达载体 pTrcB 的 BamHI 和 KpnI 两个酶切位点之间得到质粒 pTrcB-CHS,选取阳性克隆于 2ml LB 中 37°C 培养过夜,次日加入 2ml 新的 LB, 37°C 继续培养 2 小时,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 诱导 4 小时,1.5ml 菌液离心后,菌体加 200 μl 缓冲液(50mmol/L Tris-HCl,pH7.9,50mmol/L 葡萄糖,1mmol/L EDTA),煮沸 2 分钟,挑出沉淀,上清加等体积 $2\times$ 蛋白提取缓冲液,做 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

2 结果和讨论

2.1 CHS-A 基因的扩增、克隆和鉴定

采用矮牵牛特定发育阶段的花瓣作为材料,提取 RNA,以 oligo(dT)作为引物合成第一链 cDNA,再以该第一链 cDNA 为模板,用 CHS-A 基因的 5'端和 3'端引物进行 PCR 合成 1.2kb 左右的 DNA 片段(图 1)。扩增的产物克隆入 pBluescript(KS)的 BamHI 和 SalI 位点之间,对其中的一个克隆 pBchs-2 进行酶切分析(图 2),发现酶切结果与国外报道的结果完全一致,从而初步证实我们克隆得到 JCHS-A 基因。

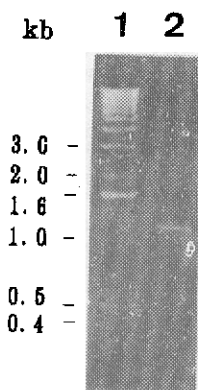


图 1 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

1. 1kb DNA ladder,
2. PCR product

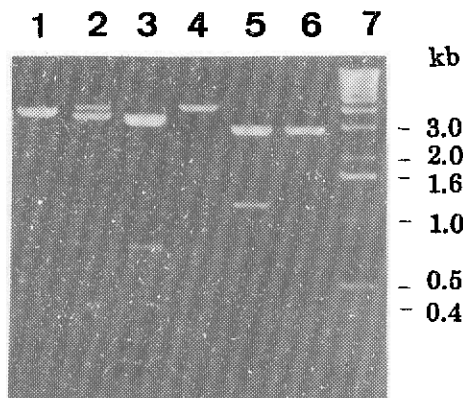


图 2 pSLC-2 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of restriction sites of pBchs-2

1. Stu I, 2. Xho I, 3. Nco I + Eco R I, 4. Nco I, 5. Bam HI + Sal I
6. pBluescript + Bam HI + Sal I, 7. 1kb DNA ladder

2.2 CHS-A 基因的全序列测定

通过对 3 个重组质粒及其亚克隆插入片段的核苷酸序列分析, 表明得到了完整的 CHS-A 基因(图 3)。此基因全长 1170bp, 编码 389 个氨基酸, 与国外报道的结果相比, 其核苷酸序列及推测的氨基酸序列的同源率均达到 99% 以上。

2.3 CHS-A 在大肠杆菌中的表达

CHS-A 基因克隆到表达载体 pTrcB 中, 经 IPTG 诱导后在大肠杆菌中实现了高效表达(图 4)。

花卉业在国际市场上一直是长盛不衰的, 在我国, 近年来花卉市场也正在悄然兴起。对于很多观赏花卉来说, 花的颜色是决定其观赏价值的一个重要因素。很多年以来, 人们一直是通过人工育种的方法筛选花色的突变种。1988 年 J. N. M. Mol 等首次将反义 CHS 基因转入矮牵牛, 发现外源的反义 CHS 基因可以改变矮牵牛的花色^[10]。

我们成功地从矮牵牛的花瓣中克隆得到了 CHS-A 基因, 并在大肠杆菌中得到高效表达。为了进一步研究外源 CHS 基因对花色的影响, 我们已将 CHS-A 基因分别正向、反向克隆入中间载体 pE3, 并转化矮牵牛, 得到愈伤组织。同时, 为了研究外

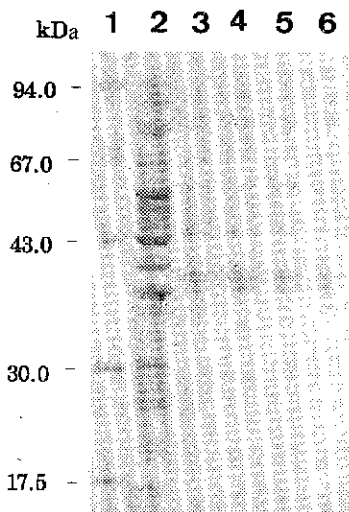


图 4 CHS-A 基因在大肠杆菌中表达的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE of the expressed CHS-A in *E. coli*
1. Protein molecular weight marker, 2. Control (Total proteins of *E. coli* with pTrcB), 3, 4, 5, 6. Total proteins of *E. coli* pTrcB-CHS (The recombinant CHS-A is indicated by the arrow)

源 CHS-A 基因究竟是什么水平影响花色的形成,我们还对 CHS 基因的翻译起始部位进行了突变,并已完成了植物转化的工作。目前正在培养用 CHS-A 基因转化的矮牵牛,研究正向、反向及突变的外源 CHS-A 基因对花色的影响。

```

      M   V   C   V   E   E   Y   R   K   A   Q   R   C
GGATCCA AAA ATG GTG ACA GTC GAG GAG TAT CGT AAG GCA CAA CGC TGT
      E   G   P   A   T   V   M   A   I   G   T   A   T   P   T   N
GAG GGT CCA GCC ACT GTC ATG GCC ATT GGA ACA GCC ACA CCT ACA AAC
      C   V   D   Q   S   A   T   Y   P   D   Y   T   Y   F   R   I   T   N
TGT GTT GAT CAA AGC ACT TAC CCT GAT TAT TTT CGT ATC ACT AAC
      S   E   H   K   T   D   L   K   E   K   F   K   R   M   C   S
AGT GAG CAC AAG AGT GAT CTT AAG GAG AAA TTT AAG CGC ATG TGT GAA
      K   S   M   I   K   A   R   Y   M   H   L   T   E   E   I   L
AAA TCA ATG ATT AAG AAA AGG TAC ATG CAC TTA ACA GAG AAA ATT TTG
      K   E   N   P   S   M   C   E   Y   M   A   P   S   L   D   A
AAA GAG AAT CCT AGT ATG TGT GAA TAC ATG GCA CCT TCT CTT GAT GCT
      R   Q   D   I   V   V   E   V   P   K   L   G   K   E   A
AGG CAA GAC ATA GTG GTG GTT GAA GTG CCC AAA CTT GGC AAA GAA GCA
      A   Q   K   A   I   K   E   W   G   Q   P   K   S   K   I   T
GCC CAA AAG GCT ATC AAG GAA TGG GGC CAG CCC AAG TCC AAA ATT ACC
      H   L   V   F   C   T   T   S   G   V   D   M   P   G   D
CAT TTG GTC TTT TGC ACA ACT ACT GGT GTG GAC ATG CCT GGC TGT GAC
      Y   Q   L   T   K   L   L   G   L   R   P   S   G   V   K   R   L
TAT CAA CTC ACT AAG CTA CTT GGG CTT CGT CCA TCG TGC AAG AGG CTC
      M   M   Y   Q   G   C   F   A   G   G   T   V   L   R   L
ATG ATG TAC CAA CAA GGT TGC TTT GCT GGT GGC ACG GTT CTT CGG TTA
      R   K   D   L   A   E   N   N   K   G   A   R   V   L   V   V
CGC AAG GAC TTG GCT GAA AAC AAC AAG GGC ACT CGA TCT CTT GTT GTT
      C   S   E   I   T   A   V   T   F   R   G   P   N   D   T   H
TGT TCA GAA ATC ACC GCG GTC ACC TTC CGT GGG CCA AAT GAT ACT CAT
      L   D   S   L   V   G   Q   A   L   F   G   D   G   A   G   A
TTG GAT AGT TTA GTT GGC CAA GCA CTT TTT GGT GAT GGC GCA GGC GCG
      I   I   I   G   S   D   P   I   P   G   V   E   R   P   L   F
ATC ATT ATA GGT TCT GAT CCA ATT CCA GGA GTC GAG AGG CCT TTG TTC
      E   L   V   S   A   A   Q   T   L   L   P   D   S   H   G   A
GAG CTC GTT TCA GCA GCC CAA ACT CTT CTT CCA GAT AGC CAT GGT GCT
      I   D   G   H   L   R   E   V   G   L   T   F   H   L   L   K
ATT GAT GGC CAT CTC CGT GAA GTT GGG CTT ACA TTC CAC TTA CTC AAA
      D   V   P   G   L   I   S   K   N   I   E   K   S   L   E   E
GAT GTT CET GGG CTG ATC TCA AAA AAC ATT GAG AAG AGC CTT GAG GAA
      A   F   K   P   L   G   S   D   W   N   S   L   F   W   I
GCA TTT AAA CCT TTG GGC ATT TCT GAT TGG AAC TCT CTA TTC TGG ATT
      A   H   P   G   G   P   A   I   L   D   Q   V   E   I   K   L
GCT CAT CCA GGT GGG CCT GCA ATT TTG GAC CAA GTT GAA ATA AAG TTG
      G   L   K   P   E   K   L   K   A   T   R   N   V   L   S   D
GGC CTA AAG CCC GAG AAA CTT AAG GCT ACA AGG AAT ATG TTA AGT GAC
      Y   G   N   M   S   S   A   C   V   L   F   I   L   D   E   M
TAT GGT AAC ATG TCA AGT GCT TGT GTA CTG TTT ATT TTG GAT GAA ATG
      R   K   A   S   A   K   E   G   L   G   T   G   E   G   L
AGA AAG GCC TCA GCC AAA GAA GGT TTA GGA ACT ACT GGT GAA GGG CTT
      E   W   G   V   T   F   G   F   G   P   G   L   T   V   S   T
GAG TGG GGT GTT CTT TTT GGA TTT GGG CCT GGG CTA ACA GTT GAG ACT
      V   V   L   H   S   V   A   T   *
GTT GTC CTC CAC AGT GTT GCT ACT TAA GT

```

图 3 CHS-A 基因全序列及其编码的氨基酸

Fig. 3 Nucleotide sequence of CHS-A gene and deduced amino acid sequence
(The sequence of the primers are underlined)

致谢:作者衷心感谢潘乃穰教授、萧师辉先生对本研究的关心和支持,梁晓文和李小华小姐在序列分析和论文打印过程中给予的大力帮助,汕头鮑滨化学药业总公司提供赞助,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Harborne J B *et al.* Plant Flavonoids in Biology and Medicine, 1986, pp15—24.
[2] Heller W *et al.* Arch Biochem Biophys, 1980, **200**, 617—619.
[3] Koes R E *et al.* Nucleic Acids Res, 1986, **14**, 5229—5239.
[4] Koes R E *et al.* Plant Mol Biol, 1989, **12**, 213—226.
[5] Kreuzaler F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1983, **80**, 2591—2593.
[6] Ryder T B *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984, **81**, 5724—5728.
[7] Bell J N *et al.* Mol Cell Biol, 1986, **6**, 1615—1623.
[8] Koes R E *et al.* Plant Mol Biol, 1987, **10**, 159—169.
[9] Chomczynski *et al.* Analytical Biochemistry, 1987, **162**, 156—159.
[10] Van der Krol A R *et al.* Nature, 1988, **333**, 866—869.

Molecular Cloning, Sequencing and Expression in *Escherichia coli* of Chalcone Synthase Gene

Shao Li Li Yi Pan Aihua Chen Zhangliang

(The National Laboratory of Protein Engineering and
Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Chen Min

(Tuobin Chemical and Pharmaceutical Corporation, Shantou 515000)

Abstract Flavonoids form a class of secondary metabolites which are abundant in all higher plants. They serve important function in flower pigmentation. Chalcone Synthase (CHS) is a key enzyme in the biosynthesis of all classes of flavonoids, therefore, variation of the expression of CHS might change the colour of flower. CHS-A gene was cloned from *Petunia hybrida*, which has 99% sequence homology with that has been cloned abroad. The sequence of the coding region is 1170bp, encodes a protein of 39kDa. CHS-A gene is also expressed high-efficiently in *E. coli*. All these work establishes a sound basis for the future research on the impact of CHS-A gene on flower pigmentation.

Key words CHS-A, *petunia hybrida*, sequence analysis, expression