

# 百合查尔酮合成酶(*chs*) 基因的 cDNA 克隆与分析

杨 丽<sup>1</sup>, 刘雅莉<sup>2</sup>, 王跃进<sup>2</sup>

(1. 信阳农业高等专科学校, 河南 信阳 464000; 2. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 根据报道的查尔酮合成酶基因的保守序列, 设计了特异简并引物, 以东方百合 Sorbonne 盛开的花瓣总 RNA 为模板, 逆转录合成 cDNA 第一链, 用特异引物对此双链 cDNA 进行 PCR 扩增, 将扩增后的基因片段回收克隆后, 送至上海博亚生物公司测序, 目的序列长 873 bp, 与已发表的百合中 *CHS* 基因的同源性达到 91%, 说明克隆的片段属于查尔酮合成酶基因, GenBank 上登陆号为 DQ471950。

**关键词:** 百合; 查尔酮合成酶; cDNA; 克隆

**中图分类号:** S644.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)01-0124-03

## Cloning and Sequencing of Chalcone Synthase Gene cDNA in *Lilium*

YANG Li<sup>1</sup>, LIU Yali<sup>2</sup>, WANG Yuejin<sup>2</sup>

(1. Xinyang Agricultural College, Xinyang 464000, China; 2. College of Horticulture, Northwest Sci Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The specific primers synthesized according to conserved regions of reported *CHS* gene were used to acquire *CHS* cDNA by RT-PCR. A fragment of about 870 bp was obtained and the sequencing results showed that: the fragment length was 873 bp and its sequence was over 91% homology to other reported *CHS*. The Genbank accession number was DQ471950.

**Key words:** *Lilium*; *CHS*; cDNA; Gene cloning

植物花中的主要色素是类黄酮, 第一个类黄酮分子是由查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)催化一分子 4 香豆酰 CoA 与三分子丙二酸单酰辅酶 A 缩合形成查尔酮分子的形式<sup>[1]</sup>形成的。查尔酮分子异构化和功能基团的进一步取代都能导致黄酮、异黄酮和花色素苷的合成。这些化合物为自然界提供了颜色, 并且参与了多种生理过程, 包括防紫外线辐射、抗病、生长素运输、花粉的育性等<sup>[2]</sup>, 且在花中特异性表达<sup>[3]</sup>。CHS 表达量的增加或减少都可能导致植物花色的变异<sup>[4]</sup>, CHS 目前已成为植物基因工程研究中的热点。

关于通过抑制 *CHS* 基因的表达量来改变矮牵牛花色的研究比较深入, 但在百合中报道很少。长期以来百合的品种改良一直依赖于传统的遗传育种方法, 随着生物技术的不断发展, 分子育种已成为传

统育种的重要补充。RNA 干扰技术目前是转基因育种的研究热点, 本研究根据百合 *CHS* 基因的保守区设计特异引物, 对 *CHS* 进行克隆并测序, 进一步克隆该基因的启动子, 用以构建 RNAi 植物表达载体, 将其转入百合中进行品种改良, 并进一步探讨 *CHS* 在百合中的功能。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种及试验材料

东方百合索邦(*Lilium hybrid* Sorbonne) 组培苗和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 由农业部西北园艺种质资源与遗传改良重点开放实验室提供。

#### 1.2 主要试剂

有关的限制性内切酶、DL2000 Marker, 购自大连宝生物技术工程有限公司, 克隆载体 Pgenm-T

收稿日期: 2010-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371013)

作者简介: 杨 丽(1981-), 女, 河南邓州人, 讲师, 硕士, 主要从事园林植物育种研究。E-mail: sunnily000@126.com

easy 购于 promega 公司, LA-*Taq* 酶购自 MBI, ampicillin(Amp), X-gal/IPTG 为 Sigma 公司产品, 引物由上海生物工程有限公司合成。

1.3 RNA 的提取

参照郝福玲等<sup>[5]</sup>的方法提取和纯化百合总 RNA。

1.4 合成 cDNA 第一链

反转录锚定引物为 Oligo(dt) 16, 反转录反应体系为: 总 RNA 1.0μg, Oligo(dt) 16 6.3μmol/L, dNTPs 2.0μL(2.5mmol/L), RNasin 20U, 5× Buffer 4μL, M-MLV 200U, DEPC-H<sub>2</sub>O 补齐至体积 20μL。充分混匀后, 65℃水浴变性 5min, 迅速置冰上冷却 5min; 在反应液中加入 5× Buffer 4μL 轻轻混匀后 37℃水浴 2min; 在反应液中再加入需要体积的 M-MLV, 混匀, 37℃水浴 50min; 70℃水浴 15min 灭活反转录酶, 终止反应; -20℃保存备用。

1.5 用简并引物扩增目的 cDNA 片段

根据 GenBank 上登陆的百合查尔酮合成酶基因的保守序列, 利用 Primer 5.0 结合人工方法设计 3 条简并引物, 序列如下: P1: 5′-3′ GCATCA CY-MASAGYGAGCATCTC; P2: 5′-3′ CGTACTC GCTCAGCACATGCC 反应体系为 25μL, cDNA 模板 2.0μL, 2 条引物各为 1.0μL, dNTPs 4.0μL(2.5mmol/L), *Taq* 酶 0.5μL(3U/μL), 10× Buffer 2.5μL, ddH<sub>2</sub>O 14.0μL 补齐至 25μL。在混好的样品中加入 10μL 石蜡油, 反应程序如下: 94℃预变性 10min; 然后 94℃变性 1min, 50℃退火 1min, 72℃延伸 1min, 35 个循环; 72℃延伸 10min, 4℃保存。

1.6 基因克隆

扩增产物电泳检测后用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的条带, 将回收产物与克隆载体 pGEM-T easy 连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 用蓝白斑筛选重组子, 挑取阳性克隆的单菌落 37℃培养 12h, 然后提取质粒, 用 *Eco*RI 酶切消化后电泳检测。

2 结果与分析

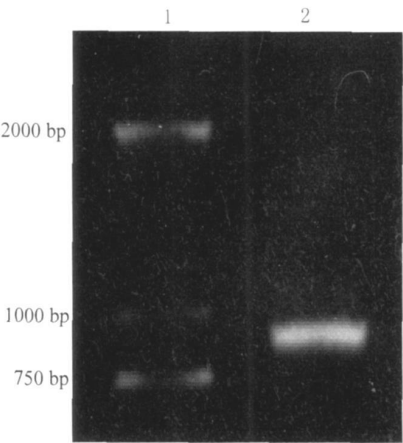
2.1 PCR 扩增及克隆

为获得 *CHS* 基因的 cDNA 序列, 根据 GenBank 上发表的百合查尔酮合成酶基因的保守序列设计简并引物, 通过 RT-PCR 扩增, 获得了目的片段, 大小约为 900bp(图 1), 与克隆载体连接后, 并经大肠杆菌进行克隆后酶切(图 2), 将阳性克隆的菌液送至上海博亚生物公司进行测序。

2.2 序列分析

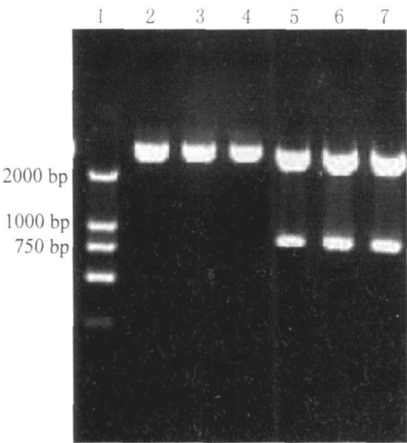
测序结果表明, 所得到的 cDNA 片段长 873bp,

命名为 *chs* 1。经 BLAST 分析, 与 GenBank 上报道的其他百合 *CHS* 的同源性达到 90% 以上, 与玉米等其他科植物的 *CHS* 核苷酸序列同源性达到 75% 以上(表 1)。初步说明 *chs* 1 是查尔酮合成酶基因, 将该序列提交 GenBank, 序列号为 DQ471950。



1. DL2000; 2. PCR 扩增产物

图 1 RT-PCR 扩增产物的凝胶电泳



1. DL2000; 2-4. CK; 5-7. 重组质粒 *Eco*RI 酶切

图 2 重组质粒 *Eco*RI 酶切鉴定

表 1 *chs* 1 cDNA 序列与已报道植物 *CHS* 基因的同源性比对

| 材料                                  | Gen Bank 序列号 | 同源性/ % |
|-------------------------------------|--------------|--------|
| 百合 <i>Lilium speciosum</i> Acapulco | AF169798     | 93     |
| 玉米 <i>Zea mays</i>                  | NM001148774  | 80     |
| 花烛 <i>A. thurium</i>                | DQ421809     | 78     |
| 芥蓝 <i>Brassica</i>                  | EF408921     | 77     |
| 小南芥 <i>Arabis</i>                   | AF112807     | 74     |

3 讨论

查尔酮合成酶广泛存在于多种植物中, 它在植物的抗菌机制、抗胁迫、细胞的发育和分化、花色素的积累和外源基因的表达等过程中起着重要的作用<sup>[6]</sup>。目前为止, 在 GenBank 注册的与 *CHS* 有关的

核酸序列已经有 4000 多条,涉及的主要有豆科的大豆、苜蓿、碗豆,十字花科的拟南芥,禾本科的水稻、玉米,葡萄科的葡萄,碧冬茄属的矮牵牛等,*CHS*在模式植物拟南芥和矮牵牛中研究的比较透彻。矮牵牛的*CHS*基因家族有 12 个成员,试验证明其中只有 2 个成员(*CHSA*和*CHSJ*)能够在花中表达,尤其是在花瓣和花药中表达<sup>[67]</sup>。前人研究表明<sup>[8-11]</sup>,当*CHS*有多拷贝导入植物体内时,植株的内源*CHS*则局部或全部不能表达,从而形成白色花或图案变化十分丰富的彩瓣花。邵莉等<sup>[12]</sup>把*CHS*植物正义表达载体转化矮牵牛后,转基因植物的花色不但发生了明显的变异,其育性也受到了影响,不能产生正常花粉粒,成为雄性不育植株。近年来,双链 RNA 干扰技术(dsRNA)的发展为基因功能研究提供了更为有效的手段, RNAi 效率高、特异性强,可使 90% 以上转化植株的目的基因沉默<sup>[13]</sup>。因此,将百合*CHS*的 RNA 干扰载体通过农杆菌介导法转入百合,则有可能得到花色改良且雄性不育的转基因百合新品种。本试验以东方百合索邦的花瓣 cDNA 为模板,以人工合成的寡核苷酸引物克隆到*CHS*的 cDNA 序列,完成转基因上游工作的一部分,并为*CHS*启动子的克隆提供前提条件。

#### 参考文献:

- [1] 孟繁静. 植物花发育的分子生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 225-256.
- [2] Johzuka Hisatomi Y, Hoshino A, Mori A, et al. Characterization of the chalcone synthase genes expressed in flowers of the common and Japanese morningglories[J]. Genes Genet Syst, 1999, 74: 141-147.
- [3] Akira Nakatsuka, Yoko Izumi, Masumi Yamagishi. Spatial and temporal expression of chalcone synthase and dihydroflavono-4 reductase genes in the Asiatic hybrid lily[J]. Plant Science, 2003, 165: 759-767.
- [4] Elomaa P, Honkanen J, Puska P, et al. Agrobacterium mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrid* inhibits flower pigmentation[J]. Biotechnology, 1993, 11: 508-511.
- [5] 郝福玲, 刘雅莉, 王跃进. 百合花瓣总 RNA 提取方法的研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(6): 1143-1147.
- [6] Koes R E, Spelt C E, van den Elzen PGM, et al. Cloning and molecular characterization of chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*[J]. Gene, 1989, 81: 245.
- [7] Koes R E, van Blokland R, Quattrocchio F, et al. Chalcone synthase promoters in petunia are active in pigmented and unpigmented cell types[J]. Plant Cell, 1990, 2: 379.
- [8] Napoli C, Lemieux C, Jorensen R. Introduction of achimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans[J]. Plant Cell, 1990, 2: 279-289.
- [9] van der krol A R, Lenting R J, Veenstra J G, et al. An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation[J]. Nature, 1988, 333: 866-869.
- [10] Jorgensen R A. Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression states[J]. Science, 1995, 268: 686-691.
- [11] Van Blokland R, Vander, Geest N, Mol J N M, et al. Transgene mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover[J]. Plant, 1994, 6(6): 861-877.
- [12] 邵莉, 杨美珠, 陈章良, 等. 查尔酮合酶基因对转基因植物花色和育性的影响[J]. 植物学报, 1996, 38(7): 517-524.
- [13] Chuang C F, Meyerowitz E M. Specific and heritable genetic interference by double stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(9): 4985-4990.