

## 苦参查尔酮异构酶的基因克隆与表达分析 \*

易雨琪, 韩荣春<sup>△</sup>, 俞年军, 顾晓, 苏蝶, 童小慧, 许菲, 王丽萍

(安徽中医药大学, 安徽省中医药科学院中药资源保护与开发研究所, 安徽 合肥 230012)

**摘要:** 目的 为明晰苦参查尔酮异构酶(*sfCHI*)的结构基因信息及其在苦参黄酮类化合物生源路径中的表达调控机理。**方法** 本实验以苦参为研究对象, 基于其转录组学数据, 克隆 *sfCHI* 基因并针对该 cDNA 序列展开生物信息学分析, 采用半定量 PCR 方法检测安徽产苦参不同组织中 *sfCHI* 基因表达情况。**结果** 结果显示苦参 *sfCHI* 基因的 cDNA 序列长度为 1 265 bp, 含有 630 bp 的开放式阅读框(ORF), 编码 209 个氨基酸; 序列分析表明 *sfCHI* 与狭叶羽扇豆查尔酮异构酶基因相似性最高, 达 89.95%; 进化树分析该基因与大豆、野大豆等植物的亲缘关系较近; 半定量 PCR 结果显示 *sfCHI* 基因在苦参根中表达量最低, 在叶、叶柄与茎中的表达未见明显差异。**结论** 本研究通过对苦参查尔酮异构酶的基因克隆与不同组织间的表达分析, 初步明确了该基因的序列信息与理化特征, 这对进一步研究苦参黄酮类物质生物合成机制将起到积极的推动作用。

**关键词:** 苦参; 查尔酮异构酶; 基因克隆; 半定量 PCR

**中图分类号:** Q943.2; S567.239    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1000-2723(2019)03-0022-06

**DOI:** 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.03.004

## Cloning and Expression Analysis of Chalcone Isomerase from *Sophora flavescens*

YI Yuqi, HAN Rongchun, YU Nianjun, GU Xiao, SU Die, TONG Xiaohui, XU Fei, WANG Liping

(Anhui University of Chinese Medicine & Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection  
and Development, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**ABSTRACT: Objective** In order to clarify the structural gene information of *Sophora flavescens* chalcone isomerase (*sfCHI*) and its expression pattern among distinct organs. **Methods** This experiment took advantage of *S. flavescens* deep transcriptomic data to clone *sfCHI* gene and conducted bioinformatics analysis on the cDNA sequence. Semi-quantitative PCR was used to detect the expression of *sfCHI* gene in different organs of *S. flavescens*. **Results** The results showed that the cDNA sequence of *S. flavescens* CHI gene was 1 265 bp in length and contained a 630 bp open reading frame (ORF) encoding 209 amino acids. Sequence analysis showed that the similarity between *sfCHI* and *Lupinus angustifolius* CHI gene was the highest, up to 89.95%. Phylogenetic tree resulted from 16 selected CHI genes showed that *sfCHI* and other related genes from Leguminosae were in the same group. Semi-quantitative PCR results showed that *sfCHI* gene expression in the root of *S. flavescens* is the lowest, while expression in leaves, petioles and stems did not show obvious difference. **Conclusion** In this study, the sequence information and physicochemical characteristics of the gene were firstly clarified by gene cloning of the chalcone isomerase gene and the expression analysis of different tissues, which will promote the study of biosynthetic mechanism of flavonoids in *S. flavescens*.

**KEY WORDS:** *Sophora flavescens*; chalcone isomerase; gene cloning; semi-quantitative PCR

---

收稿日期: 2019-04-18

\* 基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2017YFC1701602); 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目(gxyq2017016); 安徽省重点研究与开发计划项目(1804b06020356); 安徽中医药大学自然重点项目(2017zrzd011, 2019zrzd02)

第一作者简介: 易雨琪(1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药用植物次生代谢产物生物合成路径研究。

△通信作者: 韩荣春, E-mail: hanr@ahcm.edu.cn

苦参始载于《神农本草经》<sup>[1]</sup>:“味极苦,性寒”,为豆科植物苦参(*Sophora flavescens* Ait.)的干燥根,主产于我国河北河南地区;有清热燥湿、杀虫解毒、利水消肿之功,用于皮肤瘙痒、黄疸、热痢及湿疹等症<sup>[2]</sup>。苦参主要含有黄酮类、黄酮醇类、生物碱类和三萜类等多种化学成分。其中黄酮类主要包括大豆昔元、柚皮素、苦参酮、异苦参酮等;生物碱类成分主要是喹诺里西啶类,少数为双哌啶类成分,其主要包括苦参碱、氧化苦参碱、羟基苦参碱等<sup>[3-5]</sup>。现代药理药效学研究表明,苦参具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗肝损伤和抑制中枢等药理活性,其药理活性成分主要包括生物碱及黄酮类化合物<sup>[6-9]</sup>。

查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)是黄酮类物质生物合成过程中的关键酶<sup>[10-12]</sup>。该酶首先发现于植物中,可将查尔酮环化为黄烷酮类物质。随后在真菌、黏菌和变形菌基因组中均发现了查尔酮的同源基因,该类生物体中因缺乏相关的催化底物,故认为CHI无法发挥作用<sup>[13]</sup>。目前最新研究报道显示,啤酒花中无催化活性的CHI蛋白对其黄酮类化合物的生物合成起重要的促进作用<sup>[14]</sup>。查尔酮异构酶的基因克隆及表达分析在草莓果实<sup>[15]</sup>、杭菊<sup>[16]</sup>、紫丁香<sup>[17]</sup>等植物中已有报道。有鉴于CHI在生物界分布的特点及其可不依赖于直接催化作用而影响特定次生代谢产物合成与积累的性质,通过对sfCHI的研究可以为苦参黄酮与花青素类物质生物合成研究提供资料,同时也为系统研究CHI进化与分子机理积累素材。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 苦参植物采自安徽中医药大学种质资源圃,经俞年军教授鉴定为豆科植物苦参(*Sophora flavescens* Ait.)。选择二年生苦参植株,自来水洗净后以75%乙醇消毒,再用无菌水冲洗3次后,在Kimwiper无尘纸上吸干水分备用。选取苦参新鲜植株,分为根、茎、叶和叶柄4个部位,将新鲜组织及时用液氮在研钵中研磨成细粉后保存在-80℃冰箱,用于提取苦参不同部位的总RNA。

## 1.2 方法

**1.2.1 总RNA提取及cDNA的合成** 选用Trizol试剂盒(Life Technologies,美国)提取苦参不同部位冻存粉末中的总RNA后,以ScanDrop 200型核酸分析仪(Jena,德国)对核酸进行检测以保证OD<sub>260/280</sub>>1.80,

OD<sub>260/230</sub>>1.80。所有样品的总RNA各使用1 000 ng,以FastQuant RT试剂盒(天根,北京)完成RNA的反转录,得到第一链cDNA。

**1.2.2 引物设计及sfCHI序列信息验证** 基于本课题组前期研究结果,通过Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)程序将苦参转录本Unigenes<sup>[18]</sup>在NCBI nr蛋白质数据库中进行检索,推送检索得到的序列信息至UniProt数据库<sup>[19]</sup>以注释sfCHI的同源序列。用Primer-BLAST程序在线设计引物进行特异PCR反应。本实验引物及质粒测序服务均由生工生物工程上海股份有限公司提供,各引物信息见表1。

表1 苦参sfCHI基因克隆与PCR实验所用引物信息

功能	引物名	序列
ORF扩增及半定量	sfCHI_F	5'-ATGGCTGATGAAGTTGTATTG-3'
PCR检测	sfCHI_R	5'-TCACTTGGACAATTCAAGCT-3'
管家基因	β-actin_F	5'-CGGTGCCCATTTATGAAGGC-3'
	β-actin_R	5'-ACCGGGAACATACTGGACC-3'

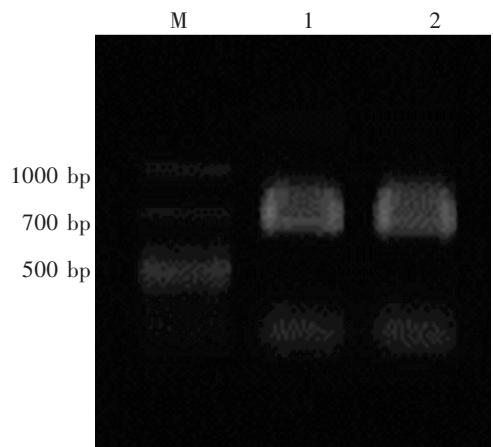
将sfCHI的PCR扩增产物在1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳分离后,在紫外光下将条带自凝胶中切出。使用Promega琼脂糖凝胶DNA纯化试剂盒回收DNA后,使用pGM-T Fast克隆试剂盒(天根,北京)将sfCHI与载体连接。使用热休克方法将含有外源基因的质粒转化入大肠杆菌DH5α后,37℃震荡培养过夜。通过Invitrogen质粒提取试剂盒回收质粒后进行测序。

**1.2.3 生物信息学分析** 选择具有代表性的同源序列与sfCHI进行比较分析,采用MEGA X<sup>[20]</sup>软件的邻位相连法参数构建其系统进化树。同时针对sfCHI所编码的氨基酸序列进行理化特征分析(<http://web.expasy.org/protparam>)以及三维结构的预测(<http://www.reading.bioinf>)。

**1.2.4 苦参sfCHI不同组织间表达的半定量PCR分析** 作为参照,以苦参的β-actin作为管家基因。使用表1的β-actin\_F、β-actin\_R、sfCHI\_F与sfCHI\_R引物对苦参根、茎、叶片、叶柄共4个部位进行PCR扩增。结合前期实验的转录组数据,分别考察β-actin在苦参不同器官及不同采集时间的表达稳定性<sup>[18]</sup>;设置PCR不同循环次数,分析sfCHI的电泳条带亮度和器官间表达差异,优化反应条件。

## 2 结果与分析

2.1 苦参 *sfCHI* 的基因克隆 基于苦参转录组学数据, 使用 *sfCHI* 引物对扩增茎和叶 cDNA, 以 7  $\mu$ L 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 电泳结果如图 1 所示, 扩增产物长度与预期一致。经凝胶回收、质粒转化与大肠杆菌培养、质粒提取与测序组装后, 使用 NCBI BLAST 进行同源基因检索, 发现 *sfCHI* 与豆科狭叶羽扇豆 (*Lupinus angustifolius*) CHI 序列一致性为 89.95%, 与月季 CHI (*Rosa chinensis*) 相似度为 78.47%。*sfCHI* 基因长度为 630 bp, 编码氨基酸 209 个。该基因在 DDBJ 的登录序列号为 LC495308。*sfCHI* 基因的 cDNA 核酸及氨基酸序列见图 2。



注:M:DL 1000;1:苦参茎;2:苦参叶

图 1 苦参 CHI 基因 PCR 扩增结果



图 2 苦参 CHI 基因 cDNA 及氨基酸序列

2.2 苦参 CHI 基因所编码蛋白质预测 采用瑞士生物信息研究所 ProtParam 软件对 *sfCHI* 蛋白质的理化性质进行解析预测: 其蛋白质分子式为 C<sub>1062</sub>H<sub>1661</sub>N<sub>259</sub>O<sub>326</sub>S<sub>2</sub>, 由 20 种共 209 个氨基酸构成; *sfCHI* 的原子总数为 3 310, 分子量为 23 337.53; 推算其不稳定系数为 34.04, 属稳定型蛋白质; 其预估半衰期在哺乳动物网状红细胞(体外)内为 30 h、酵

母菌(体内)超过 20 h、大肠杆菌(体内)超过 10 h; 脂肪质指数为 94.69。使用英国雷丁大学的蛋白质结构与功能预测服务器 (IntFOLD ver5.0)<sup>[21-22]</sup> 对 *sfCHI* 进行三维结构预测, 蛋白质模板选择 PDB 数据库的 4dokA、4doiA 和 1eyqA (见图 3); 结果显示 *sfCHI* 的 3D 结构预测 P 值为 2.92E-9, 提示该结构预测的可信度较强。



图3 苦参 CHI 蛋白三维结构预测结果

### 2.3 苦参 CHI 基因同源性及进化分析 对包括 sfCHI

在内的 5 种植物的 CHI 氨基酸序列进行同源分析，序列多重比对使用 ESPript ver3.0 软件。结果提示，该组植物查尔酮异构酶间存在较高的相似性(见图 4)。将 sfCHI 的核酸序列通过 NCBI BLASTx 进行检索(E 值设置为 1e-10)，在蛋白质数据库中共检索到 576 条结果；其中与 sfCHI 序列一致性最低的为可可树 (*Theobroma cacao*, 25.95%)；最高的为狭叶羽扇豆 (*Lupinus angustifolius*, 89.95%)。以包含 sfCHI 编码蛋白在内的 16 种不同植物 CHI 氨基酸序列为模板，采用 MEGA X 软件创建 CHI 系统进化树(见图 5)，以邻位相连(Neighbor-joining)为统计方法，替代模型使用泊松分布，辅以配对删除法对缺失数据进行处理。结果显示，4 种豆科植物的遗传距离较近，而拟南芥、水稻等模式植物的遗传距离相对较远；这与传统分类学结论相一致。

sfCHI	-----MADEVVLVDEIPYPSKYTTTKPLSLLGHGITDMEIHFLQVKFYSIGIYLDPEIVGHLQQWKGKSA
laCHI	MNLISVADEVVLVDEIPYPSKYTTTKPLSLLGHGITDMEIHFLQVKFYSIGIYLDPEIVGHLQQWKGKSA
gmCHI	-----MATEEVLVDEITYPSKITTTKPLSLLGHGITDMEIHFIHVVKFYSIGIYLEPEVVGHLEQFKGISA
meCHI	-----MGSEVVVMDEVPPPSQITTSKPLSLLGQGITDIEIHFLQIKFTAIGVYIDTEVVGHLQQWKGKPG
vvCHI	-----MVMVDEIPFPPQITTAKPLCLLGYGITDIEIHFLQIKFTAIGVYLEPEIVGHLQWPWKGRSG
Consensus	V VDE P TT KPL LLG GITD EIHFD KF IG Y E VGHL KG
sfCHI	KELEEKDDFFDALIAAPVEKAIRLVIKEIKGAQYGVQIE TAVRDRLAADDKYEEEEEEALEKIVEFFQS
laCHI	KELEENDGFFDSVIFAPVEKVVRLVVIKEIKGAQYGVQIESAVRDRLAADDKYEEEEEEALEKIVEFFQS
gmCHI	KELEENDEFFNALISAPVEKFIRLVIKEIKGAQYGVQIE TAVRDRLAADDKYEEEEEEALEKIVEFFQS
meCHI	NQLAEDDDFFDALIAAPVEKFIRVVIKEIKGSQYGVQLES A VRDRLAADDKYEEEEEEALEKIVEFFQS
vvCHI	KELAENDDFEALISAPGEKFLRIVVIKEIKGSQYGVQLES A VRDRLAADDKYEEEEEEALEKIVEFFQS
Consensus	L E D FF I AP EK R VVIKEIKG QYGVQ E AVRDRLAAD KYEEEEEEALEK EF QS
sfCHI	KYFKKNSAITYHFPANSPTAEIVVSLEGKEDSKFVVENGNVETIKRWYLGGTGAVSPSTISSLATNLSA
laCHI	KYFKKHSVITYHFSADSTTAEIVVSLEGKEDSKFVVENANVETIKRWYLGGSRAVSPSTISSLASTLST
gmCHI	KYFKKHSVITYHFPTNSATAEIVVSLEGKEDSKYVIEANVVEAVKRWYLGGSSAVSSSTIRSLASTFSQ
meCHI	KYFKKD SVITYHFPVSPAAEIAFSTGGKEEAKMKVENEKNVVEMIKKWYLGGTRGVATTISFLANNLSA
vvCHI	KYFKKD SIIHFHPATCTAEIVFATEGKEESKITVENEAVKRWYLGGTRGVSPTTISALANTLAT
Consensus	KYFKK S IT HF AEI GKE K EN NVVE KRWYLGG VS TI LA
sfCHI	ELSK
laCHI	ELSK
gmCHI	ELSK
meCHI	HLSK
vvCHI	ELSK
Consensus	LSK

注：la, 狹叶羽扇豆；gm, 大豆；me, 木薯；vv, 葡萄

图4 不同植物 CHI 氨基酸序列多重比对

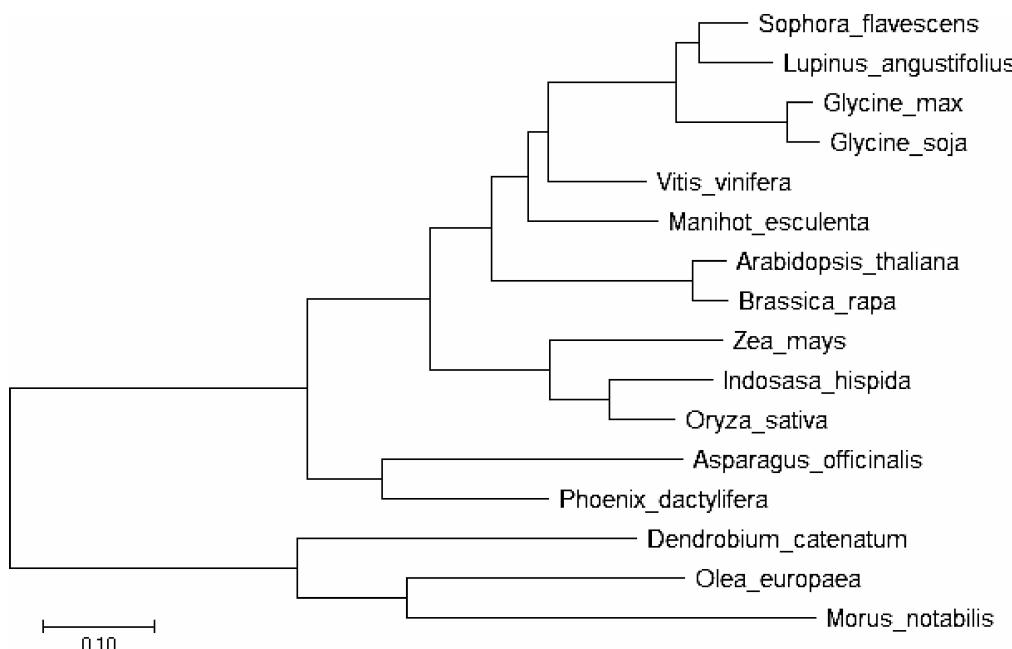


图5 苦参 CHI 系统进化树

**2.4 半定量表达分析** 将 PCR 退火温度设为 50℃, 每次循环延伸时间为 1min;  $\beta$ -actin 凝胶电泳图在 26 循环时可见明显条带且苦参不同采集月份的 PCR 扩增图谱在 4 种组织间无明显差异, 提示管家基因的表达较稳定。经预实验考察, 对 *sfCHI* 的半定量扩增循环次数分别定为 28、30。见图 6。

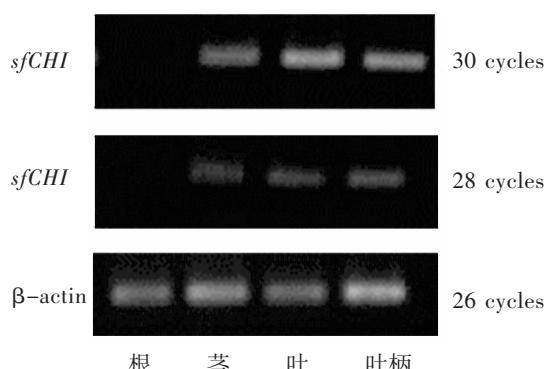


图6 苦参 CHI 基因在不同组织中的相对表达量

### 3 讨论

本实验通过分析苦参转录组数据<sup>[18]</sup>, 设计特异性引物对 *sfCHI* 进行克隆。经凝胶回收、载体连接与转化, 在质粒提取后进行测序, 确定了 *sfCHI* 序列的碱基数为 630 bp, 编码 209 个氨基酸。对 *sfCHI* 翻译的蛋白质进行测算, 发现其理化性质较为稳定, 在酵母等模式工程菌体内可存在较长时间, 适合进行原核或真核异源表达。将 *sfCHI* 在 NCBI 数据库中检索同源

序列, 发现其与数种豆科植物的 CHI 相似性较高, 而与水稻等同源性较低。基于前期转录组学数据<sup>[18]</sup>关于苦参 CHI 的组织间表达情况, *sfCHI* 的 RPKM 值在根、茎、叶和叶柄中分别为 2、97.4、130.9 和 112.7; 采用半定量 PCR 法对 *sfCHI* 基因表达信息进行分析, 发现实测情况与生物信息学数据吻合度较高。通过本研究明确 *sfCHI* 序列信息、理化特征与基因表达信息, 将对进一步研究苦参黄酮类物质生物合成机制起到积极的推动作用。

### 参考文献:

- [1] 顾观光辑.神农本草经[M].杨鹏举校注.北京:学苑出版社,2007:143.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2015:202-203.
- [3] HE X, FANG J, HUANG L, et al. *Sophora flavescens* Ait.:Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 172:10-29.
- [4] 张翅,马悦,高慧敏,等.苦参化学成分研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(4):205-214.
- [5] KUROYANAGI M, ARAKAWA T, HIRAYAMA Y, et al. Antibacterial and antiandrogen flavonoids from *Sophora flavescens*[J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(12):1595-1599.
- [6] 张钟媛.苦参的化学成分和药理作用研究进展[J].云南中医中药杂志,2015,36(6):104-106.

- [7] YIM D, KIM M J, SHIN Y, et al. Inhibition of cytochrome P450 activities by *Sophora flavescens* extract and its prenylated flavonoids in human liver microsomes [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 2673769.
- [8] HILLERNS P I, WINK M. Binding of flavonoids from *Sophora flavescens* to the rat uterine estrogen receptor[J]. *Planta Med*, 2005, 71, (11): 1065–1068.
- [9] DENG X, SHEN C, MENG Q. Screening of herbal components for attenuating amiodarone-induced hepatotoxicity on gel-entrapped rat hepatocytes[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2014, 37(1): 100–106.
- [10] 周明, 沈勇根, 朱丽琴, 等. 植物黄酮化合物生物合成、积累及调控的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37 (18): 216–220.
- [11] JEZ J M, BOWMAN M E, DIXON R A, et al. Structure and mechanism of the evolutionary unique plant enzyme chalcone isomerase[J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 786–791.
- [12] YUAN Y, MA X, SHI Y, et al. Isolation and expression analysis of six putative structural genes involved in anthocyanin biosynthesis in *Tulipa fosteriana* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 153: 93–102.
- [13] GENSHEIMER M, MUSHEGIAN A. Chalcone isomerase family and fold: no longer unique to plants[J]. *Protein Sci*, 2004, 13(2): 540–544.
- [14] BAN Z, QIN H, MITCHELL A J, et al. Noncatalytic chalcone isomerase-fold proteins in *Humulus Lupulus* are auxiliary components in prenylated flavonoid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115 (22): E5223–E5232.
- [15] 蔡雯婷, 孙娟, 董文华, 等. 草莓果实在查尔酮异构酶基因克隆及表达分析[J]. 北京农学院学报, 2019, 34(4): 40–44.
- [16] 王蕊, 邹庆军, 郭巧生, 等. 杭菊 CHI 基因的克隆及原核表达[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(14): 3051–3021.
- [17] 王蕊, 李彦慧, 郑健. 紫丁香查尔酮异构酶基因 SoCHI 的克隆及表达分析[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(3): 11–17.
- [18] HAN R, TAKAHASHI H, NAKAMURA M, et al. Transcriptome analysis of nine tissues to discover genes involved in the biosynthesis of active ingredients in *Sophora flavescens* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38 (6): 876–883.
- [19] MAGRANE M, CONSORTIUM U. UniProt Knowledgebase:a hub of integrated protein data [J]. *Database (Oxford)*, 2011, 2011:bar009.
- [20] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol and Evol*, 2018, 35 (6): 1547–1549.
- [21] MCGUFFIN L J, ADIYAMAN R, MAGHRABI A H, et al. IntFOLD:an integrated web resource for high performance protein structure and function prediction [J]. *Nucl Acids Res*, 2019, 47(W1):W408–W413.
- [22] MCGUFFIN L J, SHUID A N, KEMPSTER R, et al. Accurate template-based modeling in CASP12 using the IntFOLD4 -TS, ModFOLD6, and ReFOLD methods [J]. *Proteins*, 2018, 86(S1):335–344.