

# 红花*CHS*基因的过表达提高了拟南芥黄酮含量

刘秀明<sup>1,2</sup> 陆皖行<sup>1</sup> 李佳<sup>2</sup> 杜卫红<sup>2</sup> 姚娜<sup>1</sup> 董园园<sup>1</sup> 孟璐璐<sup>3\*</sup> 李海燕<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 长春 130118;

<sup>2</sup>吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; <sup>3</sup>吉林省科学技术厅, 长春 130118)

**摘要** 该研究旨在获得红花查尔酮合酶(chalcone synthase, *CHS*)基因全长片段, 并在拟南芥中进行过表达, 初步验证该基因的功能根据红花转录物测序结果中获得的中间序列, 采用RT-PCR和cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)方法从红花花瓣中克隆到1个*CHS*基因的全长cDNA, 命名为*CtCHS1*, 全长序列1 360 bp。生物信息学分析表明, 该基因具有完整的开放阅读框(open reading frame, ORF), 共1 113 bp, 编码370个氨基酸。亚细胞定位预测结果显示, 该基因编码的蛋白质定位于细胞质。结合其他物种的*CHS*基因构建系统树表明, *CtCHS1*具有高度保守性, 其与水母雪莲的亲缘关系最近。荧光定量PCR(Real-time PCR)分析表明, *CtCHS1*基因在吉红油姊妹系的衰落期和吉红一号的盛花期表达量最高。该研究成功构建了含有*CtCHS1*基因的植物表达载体, 并在拟南芥中进行过表达, 获得了高黄酮含量的转基因拟南芥T2株系。结果表明, 过表达红花*CHS*基因可以提高拟南芥中的黄酮含量, 为后续该基因的功能验证奠定基础。

**关键词** 红花; 查尔酮合酶; 黄酮; Real-time PCR; 拟南芥

## Over-Expression of Chalcone Synthase of Safflower Increases Flavonoid Content in *Arabidopsis thaliana*

Liu Xiuming<sup>1,2</sup>, Lu Wanhang<sup>1</sup>, Li Jia<sup>2</sup>, Du Weihong<sup>2</sup>, Yao Na<sup>1</sup>, Dong Yuanyuan<sup>1</sup>, Meng Lulu<sup>3\*</sup>, Li Haiyan<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University,

Changchun 130118, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

<sup>3</sup>Science and Technology Department of Jilin Province, Changchun 130118, China)

**Abstract** The object of this study is to isolate the cDNA of *CHS* of safflower and overexpress it in *Arabidopsis thaliana* to verify its function briefly. In this study, the full-length cDNA sequence of chalcone synthase (*CHS*) gene named *CtCHS1* was cloned from flowers of *Carthamus tinctorius* L. (safflower) by RT-PCR and RACE techniques according to the sequences of transcriptome in safflower. The full-length cDNA of *CtCHS1* was 1 360 bp and included a whole open reading frame of 1 113 bp, encoding a polypeptide with 370 amino acids. Subcellular localization prediction showed that *CtCHS1* may locate in the cytoplasm. Safflower *CHS* gene is highly conservative according to the blasting and phylogenetic analysis. Real-time PCR results indicated that relative expression of *CHS* gene was highest in fade of JIHONGYOU var. and early flowering period of JIHONGYIHAO

收稿日期: 2016-11-16 接受日期: 2016-12-26

国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2011AA100606)、国家自然科学基金(批准号: 31101172、31501366)和吉林省科技厅(批准号20150623024TC-11)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0431-88935899, E-mail: 172561690@qq.com; Tel: 0431-84532885, E-mail: hyl99@163.com

Received: November 16, 2016 Accepted: December 26, 2016

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.2011AA100606), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31101172, 31201237) and Science and Technology Department of Jilin Province (Grant No.20150623024TC-11)

\*Corresponding authors. Tel: +86-431-88935899, E-mail: 172561690@qq.com; Tel: +86-431-84532885, E-mail: hyl99@163.com

网络出版时间: 2017-01-16 17:28:01 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170116.1728.002.html>

var.. Plant expression vector of *CtCHS1* was constructed and transformed into *A. thaliana* genome. The T3 plants were obtained and the flavonoids content in transgenic *A. thaliana* is higher than that in wild type. This results showed that over-expression of *CtCHS1* could improve the flavonoids content and lay a foundation for the functional verification of *CtCHS1* flavone content is determined in leaves,

**Keywords** safflower; chalcone synthase; flavonoid; Real-time PCR; *Arabidopsis thaliana*

红花(*Carthamus tinctorius* L.), 又名草红花, 因其具有重要的药用和经济价值而被广泛种植, 红花干燥的管状花可以作为药用, 种子中含有丰富的脂肪酸可供人们食用<sup>[1-2]</sup>。红花黄色素(safflower yellow, SY)是红花的水溶性成分, 是红花的主要活性成分, 属于黄酮类化合物。研究表明, 红花黄色素具有扩张血管、改善心肌缺血、抑制血小板聚集和血栓形成、修复血管内皮组织损伤、抗氧化等多种药理作用<sup>[3-4]</sup>, 被广泛应用于冠心病、高血压、缺血性中风、糖尿病并发症等疾病的治疗<sup>[5-7]</sup>。

查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)黄酮化合物合成代谢途径中的关键酶, 也是黄酮化合物生物合成途径中的第一个限速酶<sup>[8]</sup>, 即催化三分子丙二酰-CoA与对香豆酰-CoA发生缩合反应, 中间产物经过分子内环化反应生成柚皮素查尔酮。*CHS*为多基因家族, 在黄酮、类黄酮、槲皮素、花青苷、槲皮素及其他次生代谢物质的合成中都起到非常重要的作用。*CHS*普遍存在于自然界中, 在低等植物和高等植物中均已克隆出*CHS*基因。*CHS*最早是由Kreuzaler等<sup>[9]</sup>首先从欧芹悬浮细胞培养液抽提物中检测到了其体外酶活性。目前, *CHS*基因已经在玉米<sup>[10]</sup>、荷花<sup>[11]</sup>、葡萄<sup>[12]</sup>、水飞蓟<sup>[13]</sup>等多种植物中被克隆, 而关于红花查尔酮合酶基因的克隆及表达分析还未见报道。本研究根据红花转录组测序结果, 在红花中克隆了一个查尔酮合酶基因的全长cDNA, 对其进行生物信息学分析, 研究其在不同开花时期的表达量, 并构建植物表达载体在拟南芥中进行过表达, 研究转基因植株的黄酮含量变化, 旨在为进一步研究红花黄酮化合物的代谢调控研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

红花品种: 吉红油姊妹系(JIHONGYOU var., JHYZMX)和吉红一号(JIHONGYIHAO var., JHYH)。种植于吉林农业大学生物反应器与药物开发教育

部工程研究中心试验田, 于花期采取花蕾期、初花期、盛花期、衰落期的花瓣, 迅速放于液氮中, 用锡箔纸包好后于-80 °C保存, 备用。野生型哥伦比亚拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.), 植物表达载体pBASTA载体由实验室保存。

### 1.2 试剂和仪器

质粒提取试剂盒和DNA胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。植物基因组提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。LA酶、限制性内切酶等购自宝生物工程(大连)有限公司。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞、pEASY-T1 Simple Cloning Kit(货号: CT111-01)克隆载体购自北京全式金生物技术有限公司。琼脂糖购自Sigma公司。胰蛋白酶、酵母提取物购自OXOID公司。

实验使用仪器包括, 高速冷冻离心机、电热恒温培养箱、全自动高压蒸汽灭菌锅、梯度PCR仪、凝胶成像仪、荧光定量PCR仪、电泳仪。

### 1.3 红花*CtCHS1*基因中间片段的验证

通过对红花花瓣转录组的测序结果分析, 找到红花黄酮化合物合成代谢途径中查尔酮合酶基因的候选基因, 将获得的基因设计特异性引物F16567: 5'-GAA CTC GCT CTT CTG GAT CG-3'和R16567: 5'-TCG TGT TGA GCC CAT CTG TA-3'。提取红花盛花期的花瓣总RNA, 反转录成cDNA, 以反转录的cDNA为模板进行RT-PCR验证。扩增程序为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 30个循环; 72 °C延伸6 min。引物合成及测序工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

### 1.4 红花*CtCHS1*基因全长cDNA的克隆

根据获得的红花*CHS*基因中间片段, 分别设计3' race和5' race引物*CHS1*和*CHS2*(表1), 按照race试剂盒(罗氏公司, 货号: 3353621001)的说明书进行3' race和5' race克隆。根据3段序列拼接而得的cDNA全长, 设计其全长扩增引物*CtCHS3*(表1), 获得目的基因全长cDNA。将扩增出全长片段的*CHS*基因的PCR产物在1%琼脂糖凝胶电泳上检测, 用胶回收试

试剂盒[爱思进生物技术(杭州)有限公司]回收目的片段, 将其连接到pEASY-T1 Simple载体(北京全式金生物技术有限公司, 货号: CT111-01)上, 进行蓝白斑筛选, 菌液PCR鉴定, 质粒酶切鉴定, 送于生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.5 生物信息学分析

将测得的全长序列利用DNAMAN软件进行核苷酸序列编辑和氨基酸序列的推导, 使用DNASTAR软件寻找最大开放阅读框(open reading frame, ORF), 在NCBI网站上进行Blast搜索同源性序列, 利用ClustalW 1.83软件构建系统发育树, 利用在线WOLFP SORT软件进行亚细胞定位预测。

### 1.6 Real-time PCR分析

分别取-80 °C冻存的花蕾期、初花期、盛花期和衰落期的花瓣, 提取RNA, 反转录cDNA用于Real-

time PCR分析。试验按照试剂盒说明书操作[宝生物工程(大连)有限公司, 货号: RR420A]进行, 在荧光定量PCR仪(型号: MX3000P, 美国Strangene)上上样操作。荧光定量PCR反应体系为: 2×SYBR Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)10 μL, 上下游引物(表2)各0.4 μL, 50×ROX Reference Dye II, DNA模板2 μL, ddH<sub>2</sub>O 6.8 μL。反应条件为: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性30 s, 65 °C退火30 s, 40个循环。

### 1.7 红花*CtCHS1*基因植物表达载体的构建

根据获得的*CtCHS1*全长序列, 在其5'端分别加入酶切位点*Bam*H I和*Eco*R I, 连接到pEASY-T1载体上, 将pEASY-T1载体和pBASTA载体(图1)用*Bam*H I和*Eco*R I进行双酶切, 建立50 μL酶切体系, 酶切反应体系如下: 1 μg DNA、2 μL *Bam*H I、2 μL *Eco*R I、6 μL缓冲液, 无RNA酶水H<sub>2</sub>O补足, 总反应体系为

表1 用于红花*CHS*基因全长克隆的特异性引物

Table 1 The specific primers for cloning of the *CHS* gene of Safflower

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	用途 Use
CHS1	F: TAG CTT ATC GGG CTT CAG GC R: CGG GCC CGC CCG GGT GCG CG	Cloning of the 3' race of the <i>CHS</i> gene
CHS2	F: GAC ATG TTT CCG TAT TCG CT R: GTT GAG CCC ATC TGT AGC CG	Cloning of the 5' race of the <i>CHS</i> gene
CtCHS3	F: CCA ATT TTT CAA CCA TCA ACA C R: CAA CCC TAT TAC AAA TTT CCA TTG C	Cloning of cDNA of the <i>CHS</i> gene

表2 荧光定量PCR引物

Table 2 The primers for Real-time PCR

引物名称 Primer name	引物(5'→3') Primers (5'→3')
18SF	GAG AAA CGG CTA CCA CAT CCA A
18SR	TCG TTT GAG CCC GGT ATT GTT A
CHS-DLF	TTG GAC CAG GTC GAG GAA AAA
CHS-DLR	AAG ACA CAA GCG CTC GAC ATG

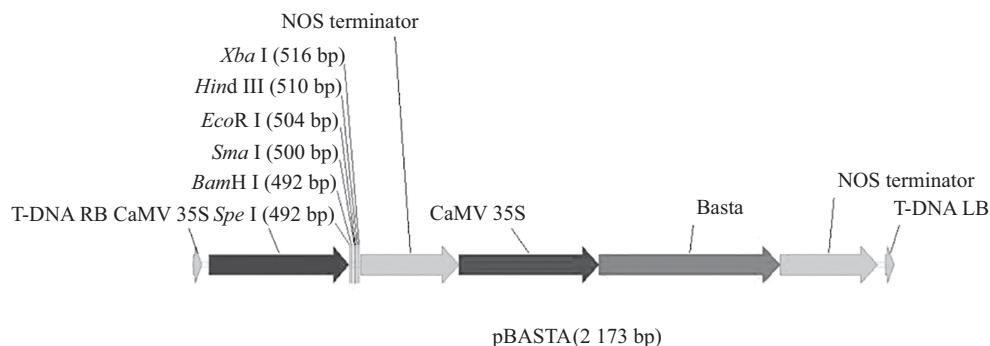


图1 pBASTA载体结构示意图

Fig.1 Structure of pBASTA vector

50  $\mu$ L。经过4 h酶切后,获得的酶切产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,利用胶回收试剂盒切胶回收含有红花*CtCHS1*目的基因片段和pBASTA载体。将获得的*CHS*目的基因片段和pBASTA载体用T4 DNA连接酶连接过夜。提取质粒进行PCR和酶切鉴定。

### 1.7 拟南芥的转化与检测

将冷冻保存的农杆菌菌株活化培养后用于侵染拟南芥。准备好的农杆菌菌液加入500 mL渗透培养基,加入Silwet L-77 25  $\mu$ L,振荡混匀,利用Floradip法侵染拟南芥。待侵染的拟南芥转化前1 d浇足水,侵染前用剪刀处理掉拟南芥的花和籽粒荚,留下花蕾备用。将拟南芥花器浸入农杆菌悬液,并轻轻搅动约10 s,并用保鲜袋将拟南芥植株包裹起来,保湿避光,并倒掉过多的水。待拟南芥生长14 d左右,开始采摘发黄的成熟荚,待整株植物干枯后把成熟植株根部剪断,放在报纸上阴干处理,收集所有种子。将收获的T0代拟南芥种子进行春化处理,播种到无菌土中,待拟南芥小苗长出4片真叶时,用1% Basta筛选剂进行喷洒,每隔1 d喷1次,共3次,收获T1代种子保存备用。收获的T1代种子进行播种,待拟南芥小苗长出4片真叶时,用1% Basta筛选剂进行喷洒,1周后将存活下来的T2代小苗进行移栽,利用植物基因组试剂盒对获得的小苗进行基因组提取,PCR验证阳性植株。

### 1.8 拟南芥黄酮含量的测定

将上述PCR验证正确的拟南芥株系进行黄酮的测定。拟南芥黄酮粗提取液制备:将拟南芥叶片清理、干燥、粉碎并过40目筛,取0.5 g加入10 mL 65%

乙醇,50  $^{\circ}$ C下超声波600 W震荡提取30 min。离心取上清液备用。在最佳吸收峰波长下,测定吸光度。以课题组前期制定的芦丁标准曲线为标准,计算转基因拟南芥的黄酮含量与野生型黄酮含量。

### 1.9 数据分析

将测得的转基因拟南芥和野生型拟南芥的黄酮含量作比较,分析转红花*CHS*基因对拟南芥黄酮含量的影响。利用SPSS 17.0软件进行差异显著性分析,用均值 $\pm$ 标准差来表示最终结果,*t*检验比较组间差异, $P < 0.05$ 为存在显著性差异。

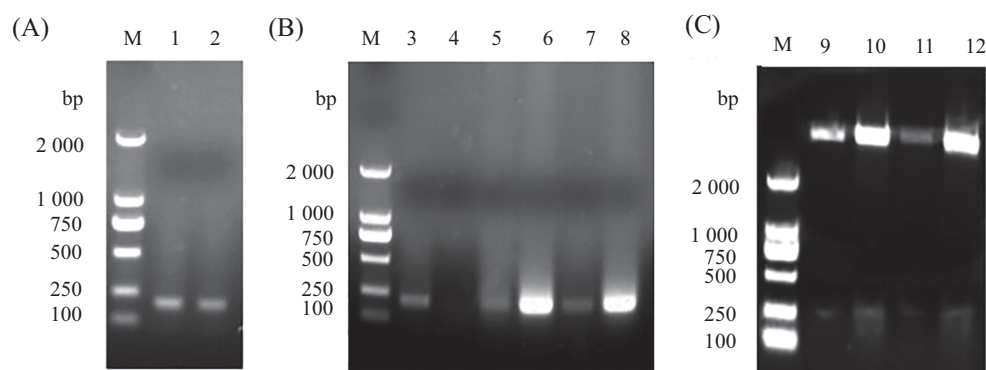
## 2 结果

### 2.1 红花*CtCHS1*基因中间片段的验证

根据红花花瓣转录组测序获得的序列Unigene 16567,设计一对引物F16567和R16567,以吉红一号盛花期花瓣的cDNA为模板,进行RT-PCR扩增,获得197 bp的中间片段(图2A),经过胶回收连接到克隆载体pEASY-T1上,进一步通过菌液PCR(图2B)和酶切鉴定(图2C),获得了与目的条带大小相同的片段,测序结果显示与原序列吻合。

### 2.2 红花*CtCHS1*基因全长cDNA克隆

根据*CtCHS1*基因的中间片段,以红花花瓣cDNA为模板,用CHS1F: 5'-TAG CTT ATC GGG CTT CAG GC-3'和CHS1R: 5'-CGG GCC CGC CCG GGT GCG CG-3'首先扩增出446 bp的3'端序列(图3A)以红花花瓣cDNA为模板,利用一对引物CHS2F: 5'-GAC ATG TTT CCG TAT TCG CT-3'和CHS2R: 5'-GTT GAG CCC ATC TGT AGC CG-3'扩增出1 031 bp的5'端序列(图3B)。将测序结果利用DNAMAN进行拼接,



A: RT-PCR扩增结果; B: 菌液PCR鉴定结果; C: 酶切图谱。M: DNA标准分子量DL 2000。

A: results of the RT-PCR; B: PCR of transformed bacterium; C: results of the restriction. M: DNA marker DL 2000.

图2 *CHS*基因中间片段的验证

Fig.2 Agarose gel electrophoresis from *CHS* fragment

得到红花*CHS*基因的全长cDNA片段长度为1 360 bp。对拼接得到的序列在ORF两侧设计一对引物CHS3F: 5'-CCA ATT TTT CAA CCA TCA ACA C-3'和CHS3R: 5'-CAA CCC TAT TAC AAA TTT CCA TTG C-3'进行全长片段验证, 获得了1 255 bp的序列(图3C)。

### 2.3 红花*CtCHS1*基因的生物信息学分析

将获得的红花*CtCHS1*基因在NCBI上进行比对, 发现其与水母雪莲(*Saussurea medusa*)的同源性最高, 达到97%。利用NCBI的ORF finder寻找最大开放阅读框, 红花*CtCHS1*基因的开放阅读框长度为1 113 bp, 编码370个氨基酸(图4), 5'非翻译区长度为117 bp, 3'非翻译区长度为130 bp, 序列里含有典型的加尾信号序列AATAA和Poly(A)。为进一步明确*CtCHS1*基因的生物学功能, 利用在线WOLFP SORT软件对*CtCHS1*编码蛋白质的亚细胞定位进行预测, 结果显示, 定位在细胞质的可能性最大为9.0; 定位于叶绿体的可能性为3.0; 定位于细胞核的可能性为1.0。

### 2.4 红花*CtCHS1*基因的同源性及系统树分析

利用DNAMAN软件进行比对发现, 红花与水母

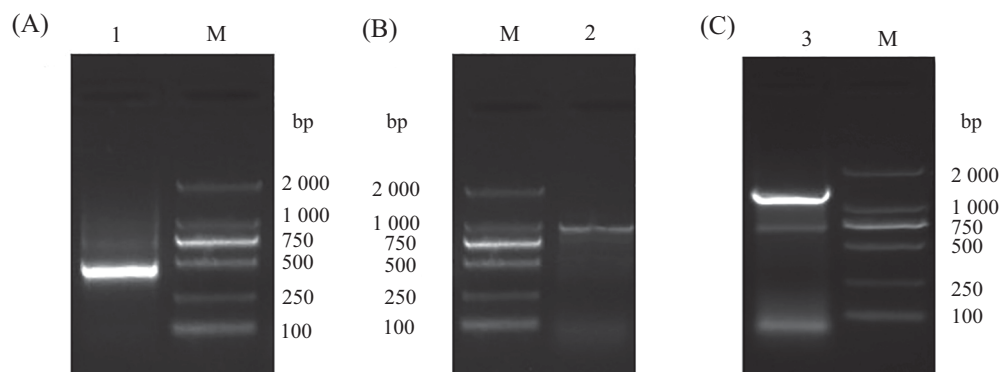
雪莲花的同源性最高。从NCBI上搜索到其他17个物种的*CHS*序列, 利用ClustalW 1.83软件进行多重序列比对, 并构建系统发生树(图5), 结果表明, 红花*CtCHS1*基因与水母雪莲花的亲缘关系最近, 在分类上与水母雪莲花和大丁草(*Gerbera hybrid cultivar*)聚为一类, 与烟草(*Nicotiana tabacum*)、野生马铃薯(*Solanum pinnatisectum*)、野牡丹(*Melastoma malabathricum*)的亲缘关系也较近。

### 2.5 红花*CtCHS1*基因的表达分析

分别取吉红油姊妹系和吉红一号红花花蕾期、初花期、盛花期和衰落期的花瓣, 提取RNA, 反转录成cDNA, 以18S rRNA作为内参基因, 采用Real-time PCR的方法分析红花*CtCHS1*基因在不同品种不同开花时期的表达量。结果如图6所示, 从相对表达量来看, *CtCHS1*在吉红油姊妹系的盛花期和衰落期表达量最高, 而在吉红一号的花蕾期和盛花期的表达量最高。

### 2.6 红花*CtCHS1*基因植物表达载体的构建

将前期验证成功的连接*CtCHS1*基因全长的pEASY-T1载体和pBASTA载体用*Bam*H I和*Eco*R I



A: 3' race; B: 5' race; C: cDNA全长。M: DNA标准分子量DL 2000。

A: 3' race; B: 5' race; C: cDNA. M: DNA marker DL 2000.

图3 红花*CHS*基因的全长克隆

Fig.3 Isolation of the cDNA of *CHS* gene in safflower

MAIGTATPPNCVLQSTYDPDYFRVTKSEHKKDLKEKFRRMCDKSMIKKRYMYLTEEILEE  
 KPNICAYMAPSLDERQDIVVVEVPKLGKEAATRAIKEWGPQKSKITHLVFC TTSGVDMPG  
 ADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLR LAKDLAENKNGARVLMVCSEITAVTF  
RGPDETHLDSL VGQALFGDGA AII VGS DPLLDVEKPLFEIVSAAQTILPDSEGAIDGHLRE  
VGLTFHLLKDV PGLISKHIEK SLLEAFRPLGIVDWNLSLFWIAHPGGPAILDQVEEKL SLKPD  
KLRATRHLVSEYGNMSSACVLFILNEMRHASATDGLNTTGEGLDWGV LFGFGPGLTVEL  
 VLHSVSI.

下划线: 活性位点。

Underline: active site.

图4 红花*CHS*基因cDNA编码氨基酸序列

Fig.4 The amino acid sequence of safflower *CHS* encoding

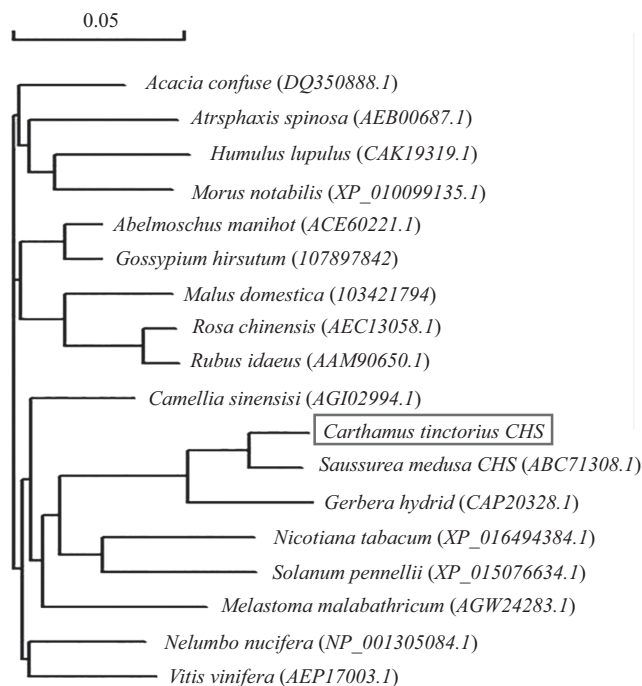
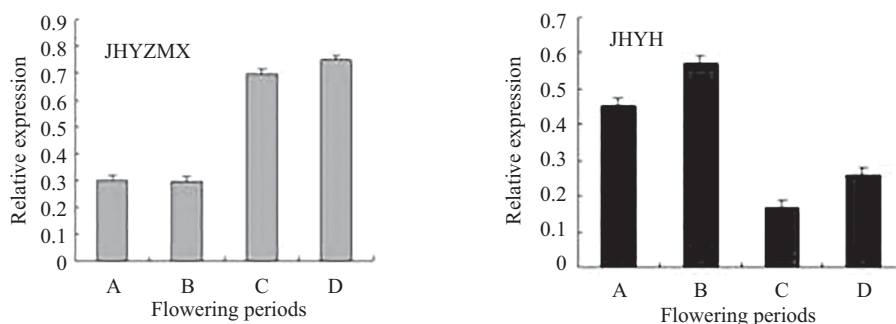


图5 红花CHS与其他17个植物CHSs的系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of CHS in safflower with 17 other plant CHSs



A: 花蕾期; B: 初花期; B: 盛花期; D: 衰落期。

A: bud period; B: early flowering period; C: blooming period; D: late flowering.

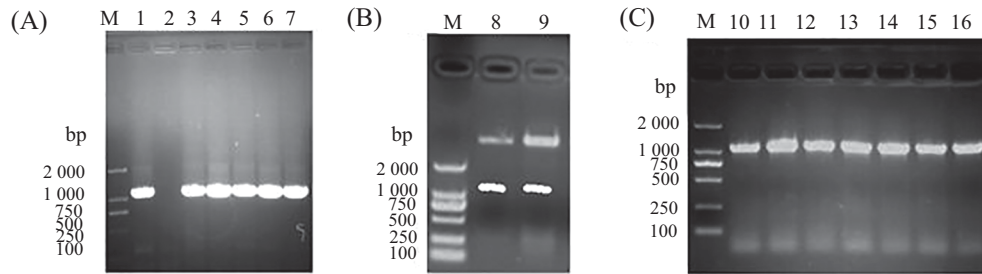
图6 *CtCHS1*基因红花不同开花时期的表达量Fig.6 Expression of *CtCHS1* in different periods of safflower floral development

进行双酶切, 对获得的大片段和小片段分别进行胶回收后, 用T4连接酶连接, 连接后的载体命名为pBASTA-CHS1。将其转化大肠杆菌, 蓝白斑筛选后挑取6个单菌落进行PCR鉴定, 其中, 有5个转化子显示1 200 bp的目的基因大小(图7A), 说明连接转化成功。对鉴定正确的2个转化子提取质粒, 进行酶切鉴定(图7B), 将酶切鉴定正确的2个菌液送去测序, 测序结果与*CtCHS1*基因的序列吻合, 说明红花*CtCHS1*基因的植物表达载体已经构建成功。将酶切测序正确的植物表达载体pBASTA-CHS1质粒, 利用冻融法转化农杆菌EHA105, 转化后涂板,

对挑取的7个单菌落进行农杆菌菌液PCR鉴定(图7C), 结果有非常亮的目的条带出现, 说明农杆菌转化成功, 可以用于下一步的拟南芥转化及功能鉴定。

## 2.7 转染*CtCHS1*基因拟南芥的PCR检测及黄酮含量测定

选择T2代拟南芥植株的叶片进行基因组DNA提取, 以基因组DNA为模板, 以特异性引物*CHS3F*和*CHS3R*进行PCR扩增, 对获得的14株拟南芥T2代植物进行PCR初步检测, 共检测出10株转基因阳性植株(图8), 结合Basta筛选, 初步说明, 红花*CHS*基因

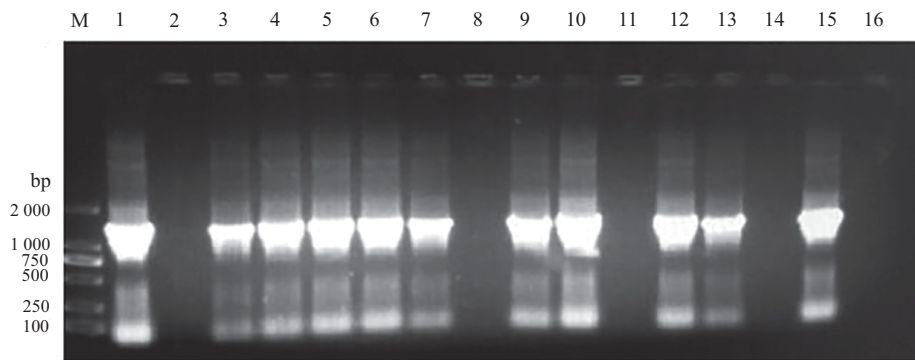


A: 转化大肠杆菌的菌液PCR产物电泳; B: 酶切鉴定产物电泳; C: 转化农杆菌菌液PCR产物电泳。M: DNA标准分子量DL 2000。

A: electrophoresis of PCR product of bacterial solution in *E. coli*; B: electrophoresis of results of the restriction product; C: electrophoresis of PCR product in *Agrobacterium*. M: DNA marker DL 2000.

图7 *CHS*基因植物表达载体构建

Fig.7 Construction of plant expression vector of *CHS* in safflower

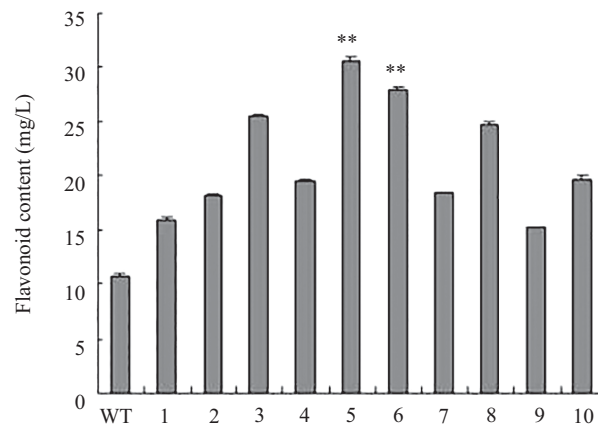


M: DNA标准分子量DL 2000; 1~15: 转基因拟南芥; 16: 野生型拟南芥。

M: DNA marker DL 2000; 1-15: transgenic *Arabidopsis*; 16: wild type of *arabidopsis*.

图8 转*CHS*基因的T2代拟南芥的PCR检测

Fig.8 PCR identification of T2 *CHS* transformants in *Arabidopsis*



WT: 野生型植株; 1~10: 转基因植株; \*\* $P < 0.01$ , 与野生型组比较。

WT: wild plants; 1-10: transgenic plants; repeat 3 times; \*\* $P < 0.01$  compared with WT group.

图9 不同转基因拟南芥株系的黄酮含量检测

Fig.9 Determination of flavonoids content of different transgenic *Arabidopsis* plants

已整合到拟南芥基因组中。

对PCR鉴定正确的阳性植株收取种子, 获得T3代纯合体, 对转基因株系提取黄酮, 以野生型(WT组)拟南芥作为对照, 采用分光光度法测量拟南芥叶

片中黄酮的吸光度, 根据标准曲线中的线性回归方程<sup>[14]</sup>, 计算转红花*CtCHS1*基因的黄酮含量。从图9可以看出, 转基因拟南芥中黄酮量比野生型拟南芥中的量有所提高, 最高的株系提高到2.8倍。

### 3 讨论

本研究根据转录组测序结果, 克隆了1条红花黄酮化合物合成途径的关键酶CHS基因的全长cNDA(*CtCHS1*), 为1 360 bp, 编码370个氨基酸, 经Blast比对, 与其他物种具有较高的同源性。研究表明, *CHS*基因编码区一般长约1.2 Kb, 编码约400个氨基酸, 本研究克隆的红花*CHS*基因与之基本相符<sup>[15-16]</sup>。

*CtCHS1*基因在不同品种、不同花期的表达量差异较大, 但表达量都相对较高。我们的结果表明, *CtCHS1*分别在吉红油姊妹系的衰落期和吉红一号的初花期表达量最高, 这与Wang等<sup>[17]</sup>在红花油茶中*CHS*基因家族的3个基因均在花蕾期的表达量最高不同。分析可能是因为*CHS*基因是多基因家族, 多个基因共同作用调控表达的结果, 同时, 品种的差异性也可能导致基因的表达量不同, 这将在后期的功能验证中进行深入研究。课题组在前期的基础研究中也做过不同品种的黄酮含量检测, 但是不同红花品种的黄酮含量变化趋势基本一致, 而红花*CHS*基因在品种间的表达量差异较明显, 可能是品种差异引起的, 这有待于后期通过红花转化来进一步验证该基因的功能。

本研究成功克隆了红花*CHS*基因, 它编码黄酮化合物合成途径中的重要限速酶。已有多项研究表明, 基因的过表达和干扰都会对植物黄酮含量产生很大的影响<sup>[18-20]</sup>。红花黄酮化合物具有重要的药理作用, 且已被做成药剂广泛应用在临床上。本研究构建含有红花*CHS*基因的植物表达载体, 并在拟南芥中进行超表达进行其功能的初步鉴定。结果显示, 转基因拟南芥中的黄酮含量比野生型拟南芥有较大提高, 说明红花*CHS*基因可能参与黄酮化合物的合成, 这将为通过基因工程手段提高红花黄酮含量提供理论依据, 为了进一步证明红花*CHS*基因在黄酮合成途径中的作用, 需要做进一步的亚细胞定位及红花的遗传转化, 从而明确该基因在红花黄酮化合物合成中的作用, 利用基因工程手段提高红花黄酮含量, 将会对我国红花的产业发展带来巨大的经济效益和前景。

### 参考文献 (References)

- Guo DD, Liu F, Tu YH, He BX, Gao Y, Guo ML. Expression patterns of three *UGT* genes in different chemotype safflower lines and under MeJA stimulus revealed their potential role in flavonoid biosynthesis. *PLoS One* 2016; 11(7): e0158159.
- Zhou X, Tang L, Xu Y, Zhou G, Wang Z. Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol* 2014; 151(1): 27-43.
- Wang C, Zhang D, Li G. Neuroprotective effects of safflower yellow B on brain ischemic injury. *Exp Brain Res* 2007; 177(4): 533-9.
- Han SY, Li HX, Ma X, Zhang K, Ma ZZ, Tu PF. Protective effects of purified safflower extract on myocardial ischemia *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine* 2009; 16: 694-702.
- Li LJ, Li YM, Qiao BY, Jiang S, Li X, Du HM, *et al.* The value of safflower yellow injection for the treatment of acute cerebral infarction: A randomized controlled Trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; doi: 10.1155/2015/478793.
- Fan S, Lin N, Shan G, Zuo P, Cui L. Safflower yellow for acute ischemic stroke: A systematic review of randomized controlled trials. *Complement Ther Med* 2014; 22(2): 354-61.
- Li W, Liu J, He P, Ni Z, Hu Y, Xu H, *et al.* Hydroxysafflower yellow A protects methylglyoxal-induced injury in the cultured human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett* 2013; 9(549): 146-50.
- Wang H, Wang W, Zhan J, Yan A, Sun L, Zhang G, *et al.* The accumulation and localization of chalcone synthase in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiol Biochem* 2016; 106: 165-76.
- Reimold U, Kröger M, Kreuzaler F, Hahlbrock K. Coding and 3' noncoding nucleotide sequence of chalcone synthase messenger RNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme. *EMBO J* 1983; 2(10): 1801-5.
- Han Y, Ding T, Su B, Jiang H. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the chalcone synthase family in maize. *Int J Mol Sci* 2016; doi: 10.3390/ijms17020161.
- Dong C, Yu AQ, Wang ML, Zheng XW, Diao Y, Xie KQ, *et al.* Identification and characterization of chalcone synthase cDNAs (NnCHS) from *Nelumbo nucifera*. *Cell Mol Biol* 2016; 61(8): 112-7.
- Wang H, Wang W, Zhan J, Yan A, Sun L, Zhang G, *et al.* The accumulation and localization of chalcone synthase in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiol Biochem* 2016; 23(106): 165-76.
- Sanjari S, Shobbar ZS, Ebrahimi M, Hasanloo T, Sadat-Noori SA, Tirnaz S. Chalcone synthase genes from milk thistle (*Silybum marianum*): Isolation and expression analysis. *J Genet* 2015; 94(4): 611-7.
- 刘秀明, 李晓璇, 姚娜, 王立勇, 李晓薇, 董园园, 等. 红花查耳酮异构酶基因植物表达载体的构建及拟南芥转化. *中草药*(Liu Xiuming, Li Xiaoxuan, Yao Na, Wang Liyong, Li Xiaowei, Dong Yuanyuan, *et al.* Construction of CHI gene expression vector of safflower and its transformation in *Arabidopsis thaliana*, *Chinese Traditional and Herbal Drugs*) 2016; 47(18): 3279-83.
- 谭晓风, 张党权, 陈鸿鹏, 谢禄山, 王晓红, 石明旺, 等. 油茶查耳酮合酶和异构酶基因的cDNA克隆. *中南林业科技大学学报*(自然科学版)(Tan Xiaofeng, Zhang Dangquan, Chen Hongpeng, Xie Lushan, Wang Xiaohong, Shi Mingwang, *et al.* Cloning of cDNAs from chalcone synthase and chalcone isomerase of *camelliaoleifera*. *Journal of Central South University of Forestry & Technology, Natural Science*) 2007; 27(1): 9-13.



- 16 夏芳, 李厚华, 付春祥, 虞珍珍, 徐彦军, 赵德修. 水母雪莲查尔酮合酶基因的克隆、表达及酶活分析. 生物工程学报 (Xia Fang, Li Houhua, Fu Chunxiang, Yu Zhenzhen, Xu Yanjun, Zhao Dexiu. Cloning, expression and characterization of chalcone synthase from *Saussurea medusa*. Chinese Journal of Biotechnology) 2011; 27(9): 1363-70.
- 17 Wang ZW, Jiang C, Wen Q, Wang N, Tao YY, Xu LA. Deep sequencing of the camellia chekiangoleosa transcriptome revealed candidate genes for anthocyanin biosynthesis. Gene 2014; 538(1): 1-7.
- 18 Jiang W, Yin Q, Wu R, Zheng G, Liu J, Dixon RA, *et al.* Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. J Exp Bot 2015; 66(22): 7165-79.
- 19 Lijuan C, Huiming G, Yi L, Hongmei C. Chalcone synthase EaCHS1 from eupatorium adenophorum functions in salt stress tolerance in tobacco. Plant Cell Rep 2015; 34(5): 885-94.
- 20 Abdel-Lateif K, Vaissayre V, Gherbi H, Verries C, Meudec E, Perrine-Walker F, Cheynier V, *et al.* Silencing of the chalcone synthase gene in *Casuarina glauca* highlights the important role of flavonoids during nodulation. New Phytol 2013; 199(4): 1012-21.