

人参查尔酮合成酶基因*PgCHS1*的克隆与表达分析

张变玲 黄雪梅 刘心怡 谢彪 黄合庆 张儒*

(湖南工程学院化学化工学院, 湘潭 411104)

摘要 该文探究了人参查尔酮合成酶(chalcone synthase, *CHS*)基因的表达模式与人参黄酮含量及抗胁迫之间的关系。作者从新鲜4年生人参根中提取总RNA, 反转录合成cDNA, 根据转录组测序结果, 利用PCR扩增克隆人参*CHS*基因的cDNA全长, 对其进行生物信息学分析, 采用荧光定量PCR(qRT-PCR)分析人参根、茎、叶和胁迫条件下发根中*CHS*基因的表达水平, 并测定其黄酮含量。克隆得到人参*CHS*, 命名为*PgCHS1*, 序列完整开放读码框(ORF)长度为1 182 bp, 编码393个氨基酸。分析表明, 该序列属于*CHS*家族基因, 其具有查尔酮合成酶催化中心4个高度保守的残基Cys¹⁶⁴、Phe²¹⁵、His³⁰³、Asn³³⁶和形成活性中心构象所必需的13个关键残基Pro¹³⁸、Gly¹⁶³、Gly¹⁶⁷、Leu²¹⁴、Asp²¹⁷、Gly²⁶²、Pro³⁰⁴、Gly³⁰⁵、Gly³⁰⁶、Gly³³⁵、Gly³⁷⁴、Pro³⁷⁵、Gly³⁷⁶。基因表达分析表明, *PgCHS1*基因在叶片中的表达量最高, 其次是茎、根和发根, 并且受SA和MeJA的诱导。人参黄酮含量与基因表达水平高度一致。结果提示, *PgCHS1*基因参与人参黄酮的生物合成, 从而保护人参免受外界的胁迫。

关键词 人参; 查尔酮合成酶; 基因表达; 黄酮; 生物合成

Cloning and Expression Analysis of Chalcone Synthase Gene *PgCHS1* in *Panax ginseng*

Zhang Bianling, Huang Xuemei, Liu Xinyi, Xie Biao, Huang Heqing, Zhang Ru*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, China)

Abstract To clone the chalcone synthase (*CHS*) gene and analyze the relationship of *CHS* expression profiles and flavonoids content, anti-stress in *Panax ginseng*, total RNA from fresh 4-years roots of *P. ginseng* was extracted and synthesized to cDNA. Primers were designed based on the *CHS* sequence of transcriptome of *P. ginseng*. The full open reading frame (ORF) of *CHS* gene was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and PCR products were sequenced. The sequence was analyzed by bioinformatics. The expression profiles of *CHS* gene were identified by qRT-PCR, and the content of the total flavonoids was assayed in the roots, stems, leaves and hairy roots of *P. ginseng*. The *CHS* gene was cloned and designated as *PgCHS1*. The full ORF of *PgCHS1* has 1 182 bp and encode 393 amino acids. The sequence analysis indicated that absolute conservation of Cys¹⁶⁴, Phe²¹⁵, His³⁰³ and Asn³³⁶ occur in *PgCHS1* sequence of the catalytic center. Moreover, *PgCHS1* protein

收稿日期: 2018-08-22 接受日期: 2018-10-29

国家自然科学基金(批准号: 81874332)、湖南省自然科学基金(批准号: 2017JJ3048、2016JJ2037)、湖南省教育厅基金(批准号: 16C0394)、中国博士后特别资助和面上基金(批准号: 2017T100601、2016M590746)以及国家大学生创新训练项目(批准号: 201811342007)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0731-58680393, E-mail: zhangru2002@126.com

Received: August 22, 2018 Accepted: October 29, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81874332), the Provincial Natural Science Foundation of Hunan (Grant No.2017JJ3048, 2016JJ2037), the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (Grant No.16C0394), China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2017T100601, 2016M590746), and the National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (Grant No.201811342007)

*Corresponding author. Tel: +86-731-58680393, E-mail: zhangru2002@126.com

网络出版时间: 2018-11-29 14:34:02

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181129.1433.012.html>

exhibits strong conservation of residues shaping the geometry of the active site (Pro¹³⁸, Gly¹⁶³, Gly¹⁶⁷, Leu²¹⁴, Asp²¹⁷, Gly²⁶², Pro³⁰⁴, Gly³⁰⁵, Gly³⁰⁶, Gly³³⁵, Gly³⁷⁴, Pro³⁷⁵ and Gly³⁷⁶). The *PgCHS1* gene expression level remained the highest in leaves, follow by stems, roots and hairy roots. Expression analysis of *PgCHS1* in elicitor treatments showed that salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA) obviously induced *PgCHS1* expression. Total flavonoids content of *P. ginseng* also enhanced in response to SA and MeJA, which correlated with increased *PgCHS1* expression. Induction of *PgCHS1* by SA and MeJA suggested its involvement in production of flavonoids, providing protection from environmental stresses.

Keywords *Panax ginseng*; chalcone synthase; gene expression; flavonoid; biosynthesis

人参(*Panax ginseng* C.A. Meyer)为我国名贵中药材, 其含有皂苷、黄酮和多糖等活性成分, 由于这些活性成分具有抗肿瘤、抗衰老、抗氧化和增强免疫力等功能, 许多活性成分已广泛应用于临床^[1-2]。目前, 国内外对人参活性成分的研究主要集中在人参皂苷和人参多糖的分离及药理功能方面的研究, 对人参黄酮的研究甚少^[3-4]。然而, 黄酮类化合物广泛存在于植物中, 它在植物的生长、发育及抗菌防病等方面起着重要作用; 在抗氧化、抗癌和抗肿瘤等方面也有显著效果^[5]。我们前期的研究亦发现, 人参黄酮具有明显的抗氧化作用^[6]。但人参中黄酮含量低, 但人参中黄酮含量低, 通过调控人参黄酮生物合成代谢关键酶基因, 可以提黄酮含量和人参的药用价值。

查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)属于III型聚酮合成酶(polyketide synthase, PKS), 它能催化3分子的丙二酰辅酶A(malonyl-CoA)和1分子的4-香豆酰辅酶A(4-coumaroyl-CoA)合成第一个具有黄酮类化合物骨架的查尔酮, 然后进一步衍生成种类多样的黄酮类化合物, 在此合成途径中, CHS是第一个限速的关键酶^[7-8]。近年来, 植物中黄酮类化合物生物合成代谢关键酶基因的克隆、表达和功能研究已引起了广泛的关注^[9]。为了利用基因工程途径提高人参黄酮的含量, 本研究基于前期转录组测序数据, 克隆人参CHS基因, 对其进行生物信息学分析并检测其在不同组织中的特异性表达, 为利用CHS基因调控人参黄酮的生物合成与积累奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

4年生新鲜人参(*P. ginseng* C.A. Meyer)根采自吉林抚松县; 新鲜人参根经发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)A4诱导、筛选后获得人参发根, *E. coli* DH5 α 于本实验室保存。

1.2 试剂及仪器

RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit购自Fermentas公司; 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、Taq酶、连接酶、DNA Marker和pEASY-T1 Cloning Kit均购自北京全式金生物技术有限公司; SYBR[®] Premix Ex TaqTM II购自TaKaRa生物工程有限公司; TRIzol试剂盒购自Invitrogen公司; 山柰素对照品购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

LC-6A高效液相色谱仪购自日本岛津; T100 PCR仪、CFX Connect荧光定量PCR仪、SmartSpec Plus分光光度计、电泳仪和ChemiDoc MP全能型凝胶成像分析系统购自美国Biorad; Eppendorf 5418型高速离心机购自德国。

1.3 RNA提取与cDNA合成

参照TRIzol试剂盒说明书, 取适量4年生新鲜人参根、茎、叶和发根于预冷的研钵内, 加入适量液氮, 充分研磨成粉末。取40 mg研磨的粉末置于1.5 mL离心管中, 加入1 mL TRIzol试剂和40 μ L β -巯基乙醇, 重悬沉淀, 室温孵育5~10 min; 加入0.2 mL氯仿, 振荡15 s, 室温孵育10~15 min; 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g离心15 min, 收集上层水相于1.5 mL离心管中, 弃沉淀; 加入0.4 mL 3 mol/L醋酸铵(pH5.2)和0.6 mL异丙醇, 轻柔振荡混匀, 室温孵育5~10 min(RNA沉淀)。4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g离心10 min, 弃上清; 加入1 mL 75%乙醇并振荡; 4 $^{\circ}$ C、7 500 \times g离心5 min, 弃上清, 重复该步骤; 室温干燥10 min, 加入20 μ L DEPC水溶解, -80 $^{\circ}$ C保存; 琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。以oligo(dT)₁₈为引物, 参照RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit说明书反转录合成cDNA。将合成的cDNA于-20 $^{\circ}$ C保存, 备用。

1.4 人参CHS基因克隆及生物信息学分析

根据前期人参转录组测序结果^[10], 采用Primer

Premier 5.0软件设CHS基因PCR扩增引物如下。CHS-F: 5'-ATG GTG TCC GTA GAG GAA ATC CG-3'; CHS-R: 5'-TCA GTG AGT AAT AGT AGC AGG CA-3'。引物由擎科新业生物技术有限公司合成。PCR扩增条件为: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 50 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 最后72 °C延伸10 min。将PCR产物胶回收后连接至pEASY-T1载体上, 转化大肠杆菌DH5 α 。将重组质粒送擎科新业生物技术有限公司测序。利用NCBI网站的BLAST程序与GenBank的dbEST数据库和蛋白数据库进行序列比对。采用ExPASy对PgCHS1蛋白质保守结构域进行分析预测; 利用Swiss-Model在线同源建模软件进行蛋白质三级结构同源建模, 并使用MEGA5.05软件以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)进行系统发育分析, 分析1 000次以检测系统发育树中分支的置信水平。

1.5 人参发根胁迫处理及PgCHS1基因qRT-PCR分析

分别在液体培养的人参发根中加入MeJA(100 μ mol/L)、SA(200 μ mol/L)、ABA(20 μ mol/L)、NaCl(50 mmol/L)或者放置4 °C进行冷处理, 和对照液体培养瓶放入摇床中, 25 °C或4 °C(冷处理), 110 r/min暗培养; 分别在不同时间点取出发根, 用于RNA和黄酮提取。PgCHS基因上游引物F为: 5'-CAC CTC CAC AAC CAC CA-3', 下游引物R为: 5'-CAC CTC CAC AAC CAC CA-3'; 以 β -actin为内参基因, 其上游引物F为: 5'-TGC CCC AGA AGA GCA CCC TGT-3', 下游引物R为: 5'-AGC ATA CAG GGA AAG ATC GGC TTG A-3'。qRT-PCR反应体系为: 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM II 12.5 μ L、cDNA 0.5 μ L、引物F(10 μ mol/L) 0.5 μ L、引物R(10 μ mol/L) 0.5 μ L、ddH₂O 11 μ L。qRT-PCR运行程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 40 s, 60 °C 30 s, 40个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。样品重复3次。以 β -actin为内参, 采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法^[11]分析PgCHS1基因在人参不同组织及发根中的表达水平。

1.6 人参黄酮的提取和含量测定

取新鲜人参根、茎、叶和胁迫处理前后的发根, 以自来水除去外表杂质, 自然风干后于60 °C烘箱烘干3 h, 粉碎、过20目筛。称取1.0 g干粉, 加入40 mL 75%乙醇, 65 °C回流提取2 h, 过滤, 收集滤液, 滤渣重复上述操作3次, 合并滤液。减压浓缩后用水饱和

正丁醇萃取, 挥发除去正丁醇。再以聚酰胺树脂吸附人参黄酮, 用2倍柱体积蒸馏水洗脱。再以80%乙醇洗脱至无信号, 分别收集80%乙醇洗脱液, 减压浓缩, 真空干燥, 得到精制的人参总黄酮。参考文献[6]的方法以山柰素为对照品测定人参总黄酮含量。

1.7 数据分析

所有实验均重复3次, 实验结果表示为平均值 \pm 标准偏差, 采用Origin作图, 显著性差异分析用SPSS 16软件进行。P<0.05为具有显著性差异, P<0.01为具有极显著性差异。

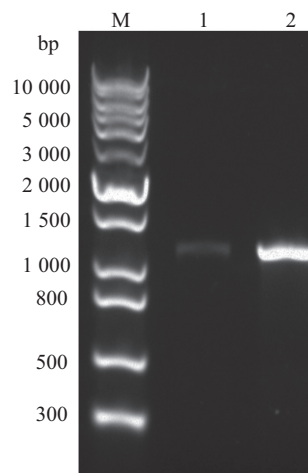
2 结果

2.1 RNA提取及PgCHS1基因克隆

以新鲜的4年生人参根为材料提取总RNA, 经电泳检测显示提取的RNA完整性好。以总RNA反转录所得到的第一链cDNA为模板PCR扩增后, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示出与理论推测值(1 182 bp)一致的DNA条带(图1)。胶回收纯化该片段, 连接至pEASY-T1载体上, 转化E. coli DH5 α 。从转化的平板上挑取阳性克隆, 提取质粒进行PCR扩增。经检测, 片段大小约为1 182 bp, 与片段的理论大小一致。

2.2 CHS基因测序及生物信息学分析

阳性质粒经PCR检测后, 再对重组质粒进行测序。ORF Finder分析后发现, 序列完整的ORF长度为1 182 bp, 预测其编码393个氨基酸(图2)。Blastp比对结果显示, 该序列属于CHS基因家族, 命名为PgCHS1(P. ginseng chalcone synthase 1)。查尔酮合



1、2: PCR产物; M: DNA marker。

1,2: PCR products; M: DNA marker.

图1 CHS基因PCR扩增结果

Fig.1 PCR products of CHS gene from cDNA

成酶家族具有特征多肽序列: R-[LIVMFYS]-x-[LIVM]-x-[QHG]-x-G-C-[FYNA]-[GAPV]-G-[GAC]-[STAVK]-x-[LIV MF]-[RAL], 其中C为最重要的活性位点^[12]。ExPASy在线分析发现, *PgCHS1*序列的156-172(RFmMyQqGCFAGGTvLR)处包含上述保守的氨基酸序列。氨基酸结构域分析发现, *PgCHS1*具有查尔酮合成酶催化中心4个高度保守的残基Cys¹⁶⁴、Phe²¹⁵、His³⁰³、Asn³³⁶(图2中方框部分)和形成活性中心构象所必需的13个关键残基Pro¹³⁸、Gly¹⁶³、Gly¹⁶⁷、Leu²¹⁴、Asp²¹⁷、Gly²⁶²、Pro³⁰⁴、Gly³⁰⁵、Gly³⁰⁶、Gly³³⁵、Gly³⁷⁴、Pro³⁷⁵、Gly³⁷⁶(图2中划线部分), 5个组成底物(对羟基苯丙烯酰辅酶A)结合口袋的位点Ser¹³³、Glu¹⁹²、Thr¹⁹⁴、Thr¹⁹⁷、Ser³³⁸(图2中划双线部分), 7个组成环化反应口袋的位点Thr¹³²、Met¹³⁷、Phe²¹⁵、Ile²⁵⁴、Gly²⁵⁶、Phe²⁶⁵和Pro³⁷⁵都是保守位点, 其中包含的Cys¹⁶⁴作为活性位点的亲核基团催化形成聚酮类化合物, 同时, His³⁰³和Asn³³⁶在丙二酰辅酶A脱羧过程中起到了重要的作用^[7,12-13]。分析发现, *PgCHS1*基因编码的蛋白蛋白不含信号肽序列, 属于非分泌蛋白, 位于细胞质。利用SWISS-MODEL对其三级结构进行预测, 结果见图3。

2.3 *PgCHS1*同源进化分析

为明确*PgCHS1*基因编码蛋白与其他植物CHS的进化关系, 选取NnCHS(荷花, XP010249317.1)、PbCHS(毛喉鞘蕊花, AHZ12855.1)、FtCHS(苦荞麦, ADU05554.1)、RpCHS1(掌叶大黄, ABB13607.1)、DcCHS1(胡萝卜, Q9ZS41)、CtCHS(蝶豆, BAF49290.1)、PaCHS(银白杨, ABD24225.1)、BpCHS(银色桦, CAA71904.1)、VvCHS(葡萄, AAB72091.1)、DaCHS(白藜, CAH61575.1)、AtCHS(拟南芥, CAI30418.1)、AhCHS(花生, AAO32821.1)、RhCHS(黄雏菊, ABN79673.1)、OsCHS(水稻, BAA19186.2)、ZmCHS(玉米, CAA42763.1)、IpCHS(圆叶牵牛, BAA20387.1)和*PgCHS1*(人参)等植物CHS蛋白进行序列比对, 并利用MEGA5软件构建进化树(图4)。结果发现, *PgCHS1*在进化上与荷花、葡萄等最为接近, 与花生和圆叶牵牛的进化关系最远。

2.4 *PgCHS1*基因组织特异性表达分析

为了更清楚地了解*PgCHS1*基因在人参中的表达模式, 我们选用4年生人参的根、茎、叶和发根

```

1 M V S V E E I R K S Q R T E G P A T I L
1 ATGGTGTCGGTAGAGGAAATCCGAAAAATCCAGAGAACTGAGGGTCCGGCGACAATCTT
21 S I G T A T P S N C V Y Q A D Y P D Y Y
61 TCATTGGCACTGCTACCCCTTCAAATTCGCTACCAGGCGGATTATCCCGACTACTAC
41 F R I T N S E H K T D L K N K F K R M C
121 TTCGCATCACCAACGCGAACCAAGACTGACCTCAAGAACAAATCAAGCGAATGTGT
61 E K S M I R K R Y M H L T E E I L K E N
181 GAGAAATCCATGATCAGAAAGCGTTACATGCATTTAACAGAAAGAAATCTCAAAGAAAT
81 P N L C A Y E A P S L D A R Q D M V V V
241 CCAAACCTATGCGCGTACGAGGCACCTTCCTTGGACGCACGTCAGACATGGTGGTTGTG
101 E V P R L G K E A A S K A I K E W G L P
301 GAGGTGCCCGGCTCGGAAAGGAAAGCTGCTCCAAAGCCATCAAGAGTGGGGCCTACCC
121 K S K I T H L V F C T T S G V D M P G A
361 AAATCCAAAATAACCCACCTCGTTTTCTGCACCACCTCCGGCGTGCACATGCCCGGGCC
141 D Y Q L T K L L G L R P S V K R F M M Y
421 GACTATCAGCTCACCAAGCTCCTCGGCCCTCCGCCCTCCGTCAGAGGTTTCATGATGAC
161 Q Q G F A G G T V L R L A K D L A E N
481 CAGCAGGGCTGCTTCCCGCGGAAACCGTCTCCGTCCTGCCAAGGACCTCCCGGAGAAC
181 N A G A R V L V V C S E I T A V T F R G
541 AATGCCGGTGCACGTGTTCTAGTGGTCTGCTCGGAGATCCCGCGTCACTTTTCGTGGA
201 P S E S H L D S L V G Q A L F G D G A A
601 CCGTCCGAGTCCCACTGGATTCCTCTCGTGGGCCAGGCGCTTTTCGGTGATGGTGGCGG
221 A V I V G S D P D T S V E H P L F Q L V
661 GCGGTGATTGTGGGTGGATCCTGATACGTCCGTGGAGCACCCGCTCTTCCAACCTGTG
241 S A A Q T I L P D S D G A I D G H L R E
721 TCCGCGCCAGACTATACCTGCGGACTCGGACGGTGGCATTTGATGGACACTTGAGGGAA
261 M G L T F H L L K D V P G L I S K N V E
781 ATGGGCCAACTTTTCTACTAAAGGATGTGCCCGGATTTGATTCGAAGAAGCTAGAG
281 K S L K E V F G P I G I S D W N S L F W
841 AAATCCCTGAAGGAAGTTTTGGGCCAATAGGAATATCGGACTGGAACCTCTCTCTCTGG
301 I A H P G G P A I L D Q V E L K L A L K
901 ATAGCCCAACCCAGGTTGCCCGGCTATTCTGGATCAAGTGGAGCTTAAATTTGCCCTAAAG
321 E E K M R A T R H V L S E Y G N M S S A
961 GAGGAGAAAATGAGAGCGACCCGACACGTGTTGAGTGAATATGGGAATATGTCAGTGCA
341 C V L F I L D E M R K K S I E E G K A T
1021 TGTGTTTGTATTATTGGACGAAATGAGGAAGAAGTCCATTGAGGAAGGAAGGCAACT
361 T G D G L D W G V L F G F G P G L T V E
1081 ACTGGTATGGGCTGGATTGGGGTGTCTGCTTTGGGTTTGGGCGGGTCTGACCGTGGAA
381 T V V L H S V P A T I T H *
1141 ACCGTGGTGTGCATAGTGTGCCTGCTACTATTACTACTGA

```

查尔酮合成酶催化中心4个高度保守的残基(方框)、形成活性中心构象所必需的13个关键残基(划线)和5个组成底物结合口袋的位点(双线)。Four highly conserved residues (boxes) in the catalytic center of chalcone synthase, 13 key residues (lines) for the formation of active site conformation, and five sites (double lines) for formation the substrate binding pocket.

图2 *PgCHS1*基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleic acid sequence and speculated amino acid sequence of *PgCHS1* gene of *P. ginseng*



图3 PgCHS1蛋白三维结构预测图

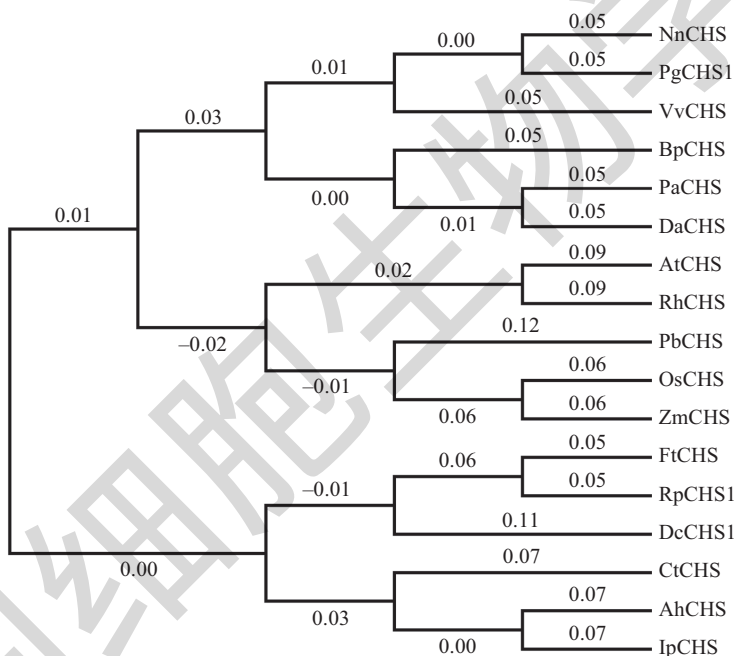
Fig.3 Three-dimensional model prediction of *PgCHS1* protein

图4 人参与其他植物CHS系统进化树

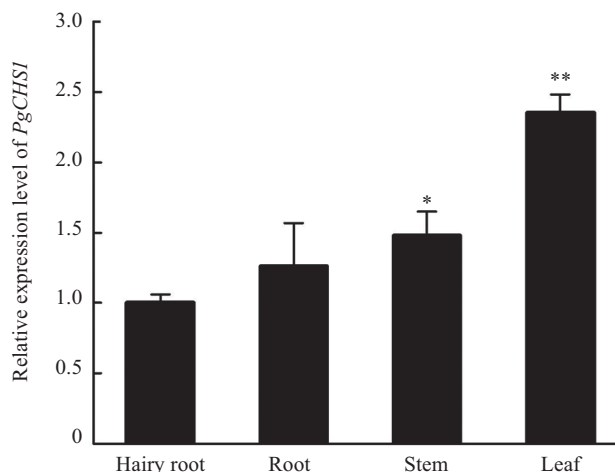
Fig.4 Phylogenetic tree of CHS for roots of *P. ginseng* and other plants

作为分析材料,以qRT-PCR进行分析。基因表达分析表明*PgCHS1*基因在叶片中的表达量最高,其次是茎、根和发根。与*PgCHS1*基因表达水平最低的发根相比,茎和叶与它组织的发根中的*PgCHS1*基因表达水平有显著差异($P<0.05$ 和 $P<0.01$)(图5)。叶是与外界环境接触面积最大的组织,在植物胁迫反应中非常重要,因而我们推测*PgCHS1*基因可能参与植物胁迫反应。

2.5 不同胁迫诱导下*PgCHS1*基因表达分析

图6为人参发根在不同处理条件下*PgCHS1*基

因表达分析结果。*PgCHS1*经SA处理后,其表达水平立即增加,在处理6 h达到对照水平5.08倍,随之在12 h和24 h分别下降至4.54倍和3.11倍。这表明,*PgCHS1*参与SA介导的防御性反应。MeJA诱导后,相对表达水平逐渐提高,24 h表达水平提高到了3.68倍。相比SA,MeJA对*PgCHS1*基因的诱导作用不甚明显。盐胁迫是许多防御反应相关基因表达的重要诱导因素,但是*PgCHS1*基因对ABA和NaCl没有产生明显的反应。对人参发根进行低温胁迫,发现*PgCHS1*基因的表达不受低温影响。

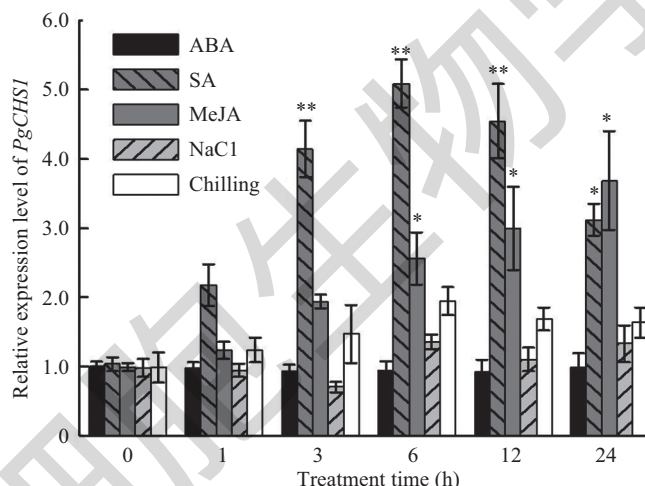


实验独立重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示。以发根中*PgCHS1*基因表达水平作为对照, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Each point represents the mean±S.D. of three experiments independent. The *PgCHS1* expression level of hairy root as control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 不同人参组织*PgCHS1*基因表达水平

Fig.5 *PgCHS1* gene expression levels in different tissues of *P. ginseng*



实验独立重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示。以处理0 h的发根中*PgCHS1*基因表达水平作为对照, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Each point represents the mean±S.D. of three experiments independent. The *PgCHS1* expression level of hairy root at 0 h after treatment as control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 不同胁迫处理条件下*PgCHS1*基因表达分析

Fig.6 Expression levels of *PgCHS1* in ginseng hairy roots after stress treatment

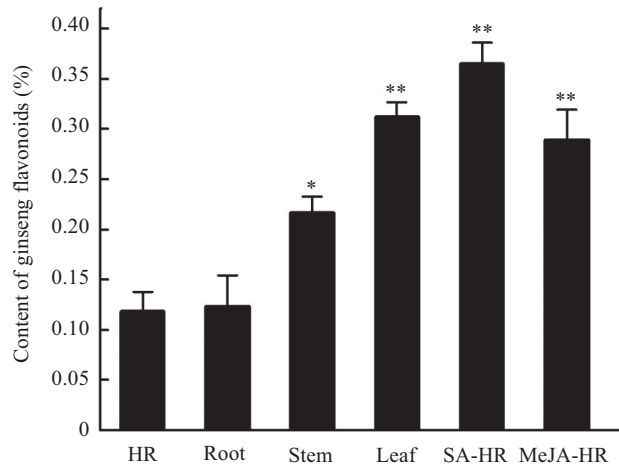
2.6 人参总黄酮的测定

以山柰素的含量为纵坐标(y), 山柰素进样量(μg)为横坐标(x), 绘制标准曲线, 得线性回归方程: $y = 4.713x + 0.801$ ($r = 0.999$)。结果表明, 山柰素进样量在0.122 4~0.816 μg 之间具有良好的线性关系。人参根、茎、叶和发根黄酮含量测定结果见图7。结果显示, 叶中黄酮含量最高, 为0.31%; 其次为茎和根, 分别为0.21%和0.12%; 发根中黄酮含量最低仅为0.11%。与发根中黄酮含量相比, 茎和叶中人参黄酮的含量有显著差异($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。这个差异反映了人参黄酮的含量具有较高的组织差异性。在人

参发根经SA和MeJA诱导6 h后, 人参黄酮含量分别达到0.37%和0.29%, 与对照相比, 分别增加了2.08倍和1.41倍, *PgCHS1*基因表达模式与人参黄酮的积累变化规律一致。基于上述qRT-PCR检测结果, 我们推测, *PgCHS1*基因表达与人参黄酮生物合成与积累密切相关。

3 讨论

黄酮类化合物起始于苯丙氨酸代谢途径和聚酮类化合物代谢通路, *CHS*在黄酮代谢途径中调控着黄酮类成分的生物合成与积累, 同时, *CHS*受各种



实验独立重复3次,数据以mean±S.D.形式表示。以未处理的发根中总黄酮含量作为对照, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Each point represents the mean±S.D. of three experiments independent. The total flavonoids content of hairy root (HR) as control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图7 不同人参组织总黄酮的测定

Fig.7 Determination of total flavonoids in different tissues of *P. ginseng*

外界环境的影响。植物在应激条件下,如紫外线照射、细菌或是真菌侵染,都会促进*CHS*基因的表达,激活植物体内苯丙氨酸通路,促进黄酮类化合物或其衍生物的积累,从而对植物进行保护^[7]。尽管黄酮类化合物在人参中含量很低,但是人参黄酮中含有较高的山奈酚及其苷类、槲皮素及其苷类等重要成分,其含量的高低影响人参药材品质。考虑到黄酮类化合物的药用价值和在植物生长、发育与环境适应等方面的重要作用,提高人参黄酮的生物合成与积累是研究人参的重要方向之一。

基于转录组测序结果,克隆得到人参*PgCHS1*基因cDNA全长。序列分析发现,其编码序列包含查尔酮合成酶家族特征的保守氨基酸序列RFmMy-QqGCFAGGTvLR、查尔酮合成酶催化中心的4个高度保守的残基(Cys、Phe、His和Asn)、形成活性中心构象所必需的13个关键残基、5个组成底物(对羟基苯丙烯酰辅酶A)结合口袋的位点、7个组成环化反应口袋的位点和催化形成聚酮类化合物的活性位点Cys¹⁶⁴,属于典型的查尔酮合成酶家族基因。

人参是多年生植物,生长周期通常为4~6年。为此,我们选择4年生人参作为实验材料,探讨*PgCHS1*基因表达模式与人参黄酮生物合成与积累的关系。基因表达模式分析发现,*PgCHS1*基因在人参根、茎、叶和发根中的表达水平与总黄酮变化趋势一致。大量研究发现,*CHS*基因表达与植物黄酮含量密切相关^[14-17]。在烟草中过量表达红花*CHS*基因

可以显著提高黄酮含量^[14]。在番茄中过表达*CHI*基因,可使番茄果皮中黄酮量增加76倍^[15]。在苹果树中*CHS*基因沉默后,黄酮类化合物的积累受阻导致植物生长激素的运输障碍,从而使植物生长异常^[16]。因而,通过过量表达*CHS*基因,可以提高黄酮含量和植物的抗逆性。将*CHS*和*CHI*基因导入到马铃薯的块茎中,这些基因的过量表达引起花青素苷等黄酮类化合物的含量大量提高,从而提高其抗氧化能力^[17]。基于黄酮类化合物的合成代谢途径,我们推断,*PgCHS1*在人参黄酮生物合成中亦扮演重要角色,是提高人参黄酮含量的重要工具酶。这些关键酶基因的表达水平决定人参黄酮的含量,同时也影响相关基因的表达,我们可以在这些基因的高水平表达条件下来挖掘生物合成代谢调控相关基因。因此,*PgCHS1*是研究人参黄酮生物合成途径及其调控的重要目标基因。

SA同JA及其衍生物是高等植物中一种重要的信号分子,在植物应对生物和非生物胁迫应答的信号转导中起重要的调控作用。SA是一种植物内源信号分子,在植物抗病信号转导中通过激活超敏反应(hypersensitive response, HR)和系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)反应而起着关键的调控作用^[18]。在SA、MeJA和ABA等胁迫处理中,*PgCHS1*基因主要受SA和MeJA诱导而上调表达;组织表达分析亦显示,*PgCHS1*基因主要在叶中表达;叶是植物与外界接触的最主要防御性组织。因而,

我们推测, *PgCHS1*基因在人参应对外界胁迫的防卫反应中起调控作用。为进一步研究*PgCHS1*基因的功能及其在人参黄酮类物质形成中的作用及调控机制, 实现黄酮类成分在人参植株、细胞或发根中高效表达, 培育遗传性状优良的人参种质资源奠定了理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules* 2007; 12(3): 607-21.
- 2 Kim HG, Jang SS, Lee JS, Kim HS, Son CG. *Panax ginseng* Meyer prevents radiation-induced liver injury via modulation of oxidative stress and apoptosis. *J Ginseng Res* 2017; 41(2): 159-68.
- 3 Jeong GT, Park DH, Ryu HW, Hwang B, Woo JC, Kim D, et al. Production of antioxidant compounds by culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer hairy roots: I. enhanced production of secondary metabolite in hairy root cultures by elicitation. *Appl Biochem Biotechnol* 2005; 121-124: 1147-57.
- 4 李清民, 王晓中, 周洪玉, 魏巍, 李绪文, 金永日. HPLC法测定人参叶中人参黄酮苷的质量分数. *吉林大学学报(理学版)*(Li Qingmin, Wang Xiaozhong, Zhou Hongyu, Wei Wei, Li Xuwen, Jin Yongri. Determination of panasenoside in leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer by HPLC. *Journal of Jilin University Science Edition*) 2010; 48(5): 865-7.
- 5 Iwashina T. Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biol Sci Space* 2003; 17(1): 24-44.
- 6 张儒, 张变玲, 赵勇, 谢涛, 李谷才, 罗志勇. 人参根中黄酮类化合物提取及其抗氧化性研究. *中成药*(Zhang Ru, Zhang Bianling, Zhao Yong, Xie Tao, Li Gucai, Luo Zhiyong. Extraction and antioxidant activity of flavonoids in the roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Chinese Traditional Patent Medicine*) 2012; 34(10): 1896-900.
- 7 Ferrer JL, Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol* 1999; 6(8): 775-84.
- 8 Awasthi P, Mahajan V, Jamwal VL, Kapoor N, Rasool S, Bedi YS, et al. Cloning and expression analysis of chalcone synthase gene from *Coleus forskohlii*. *J Genet* 2016; 95(3): 647-57.
- 9 Wang C, Zhi C, Liu F, Xu F, Zhao A, Wang X, et al. Isolation and characterization of a novel chalcone synthase gene family from mulberry. *Plant Physiol Biochem* 2017; 115: 107-18.
- 10 Xiu H, Nuruzzaman M, Guo X, Cao H, Huang J, Chen X, et al. Molecular cloning and expression analysis of eight *PgWRKY* genes in *Panax ginseng* responsive to salt and hormones. *Int J Mol Sci* 2016; 17(3): 319.
- 11 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6): 1101-8.
- 12 Han YY, Ming F, Wang W, Wang JW, Ye MM, Shen DL. Molecular evolution and functional specialization of chalcone synthase superfamily from *Phalaenopsis orchid*. *Genetica* 2006; 128(1/2/3): 429-38.
- 13 Lanz T, Tropf S, Marnier FJ, Schroder J, Schroder G. The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways. *J Biol Chem* 1991; 266(15): 9971-6.
- 14 刘秀明, 陆皖行, 李佳, 杜卫红, 姚娜, 董园园, 等. 红花CHS基因的过表达提高了拟南芥黄酮含量. *中国细胞生物学学报*(Liu Xiuming, Lu Wanxing, Li Jia, Du Weihong, Yao Na, Dong Yuyuan, et al. Over-expression of chalcone synthase of safflower increases flavonoid content in *Arabidopsis thaliana*. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(2): 182-90.
- 15 Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric De Vos CH, et al. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nat Biotechnol* 2001; 19(5): 470-4.
- 16 Dare AP, Tomes S, Jones M, McGhie TK, Stevenson DE, Johnson RA, et al. Phenotypic changes associated with RNA interference silencing of chalcone synthase in apple (*Malus x domestica*). *Plant J* 2013; 74(3): 398-410.
- 17 Lukaszewicz M, Matysiak-Kata I, Skala J, Fecka I, Cisowski W, Szopa J. Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content. *J Agric Food Chem* 2004; 52(6): 1526-33.
- 18 Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I. Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 1990; 250(4983): 1002-4.