

非洲菊查尔酮合酶基因的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达

谢修志, 陈兆平*, 王小菁

(华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要: 利用 RT-PCR 方法, 从非洲菊(*Gerbera hybrida*)花瓣的 cDNA 中克隆到了查尔酮合酶(Chalcone Synthase, CHS)基因 *CHS*, 进行了序列分析。结果表明, 克隆到的 *CHS* 基因全长为 1 197 bps, 编码一个由 398 个氨基酸残基组成的多肽, 与 Helariutta 等发表的非洲菊查尔酮合酶 *CHS1* 基因的 cDNA 序列的 *CHS* 基因同源性高达 99%。进一步将该基因克隆到表达载体 pET32a 上, 经 IPTG 诱导表达, 得到高效表达的融合蛋白。

关键词: 非洲菊; 查尔酮合酶; 序列分析; 基因表达

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)05-0431-04

Chalcone Synthase Gene Cloning in *Gerbera hybrida* and Expression in *E. coli*

XIE Xiu-zhi, CHEN Zhao-ping*, WANG Xiao-jing

(College of Life Science, South China Normal University, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Chalcone synthase (CHS) gene was cloned from the petals of *Gerbera hybrida* using RT-PCR method in our experiment. The sequence of the cDNA coding region was 1 197 bps, encoding a protein of 398 amino acids sharing 99% identical to *CHS1* cDNA reported by Helariutta. The gene was fused in expression vector pET32a and was efficiently expressed by transforming into *E. coli* BL21(DE3) with IPTG induction.

Key words: *Gerbera hybrida*; Chalcone synthase; Sequence analysis; Gene expression

花色是大自然赋予有花植物繁衍后代的重要特性, 在生产中也是花卉品质的重要指标。花色素苷是类黄酮生化合成的产物, 在花色形成中起最主要的作用^[1-3]。

查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)是类黄酮合成中的第一个特异性酶, 它催化丙二酰辅酶 A 的三个乙酸基和对羧基苯丙烯酰辅酶 A 的一个乙酸基缩合成苯基苯乙烯酮^[4-6]。在大多数的花中, *CHS* 的表达具有特异性, 受不同发育阶段的调控^[7,8]。外界环境因素如光、温度和植物激素都影响 *CHS* 的表达, 影响花的着色^[7,9-12]。在植物中, *CHS* 是一个多基因家族^[13,14]。

非洲菊(*Gerbera hybrida*)花朵硕大, 颜色丰富鲜艳, 是世界六大切花植物之一, 具有很好的经济价值。我们以非洲菊花瓣为材料, 采用 RT-PCR 技术克隆 *CHS1* 基因, 进行序列分析, 并使其在大肠杆菌中高效表达, 为进一步研究光、激素、温度等外界因素对 *CHS* 表达的影响及 *CHS* 对植物花色的影响奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料 黄色非洲菊(*Gerbera hybrida*)为华

收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2004-02-26

基金项目: 广东省自然科学基金(003062)资助

* 通讯作者 Corresponding author

南师范大学生命科学学院实验基地大棚种植, 日温 22–26℃, 夜温 15–18℃。2000 年 4 月采集刚开放的花, 液氮速冻, -70℃ 保存备用。

细菌菌株和质粒 大肠杆菌 XL-blue 为转化受体菌, 克隆载体为 pBluescript(KS), 原核表达载体为 pET32a(+), 大肠杆菌 BL21(DE3) 为表达受体菌。

试剂和酶 逆转录酶 (AMV) 为 GIBICO 产品; 限制性内切酶为 Takara 产品; Taq 酶、DNA 电泳凝胶回收试剂盒购自上海生工公司。

1.2 方法

总 RNA 的提取 取经液氮速冻的外轮舌状花在液氮中研磨成粉末, 按申能博彩公司的 Tribblue 说明书提取总 RNA, 紫外和电泳检测后, -70℃ 保存备用。

cDNA 合成与 PCR 扩增 以总 RNA 为模板, Oligo(dT) 为引物, 按照 GIBICO 公司逆转录酶说明书进行逆转录得到单链 cDNA。根据 Helariutta 等^[13]发表的非洲菊 (*Gerbera hybrida*) 查尔酮合酶 *CHS1* 基因的 cDNA 序列, 由上海生工生物技术有限公司合成引物 CHSF: TTGAATTCAGATAACAATGGCGTCCTCC 和 CHSR: CCGGATCCCAAACGTACATTCATTCCAACA。取 1 μl 逆转录物进行 PCR 扩增, 两端引物各为 100 pmol, 10 mmol/L dNTPs 2 μl, TaqDNA (5 U μl⁻¹) 聚合酶 1 μl, 加水至 100 μl。在 MJ 公司 PTC-100 型热循环仪上进行 PCR 扩增。反应条件: 预变性 94℃ 5 min 后, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 30 个循环, 72℃ 后延伸 120 s。扩增后电泳检测并用 DNA 电泳凝胶回收试剂盒回收扩增产物。

PCR 产物的克隆及序列分析 设计 PCR 引物时两端加上了 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点, 因此, 将纯化的 PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切, 然后克隆到 pBluescript (KS) 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点, 转化大肠杆菌 XL-blue 感受态细胞, 在选择性培养基上蓝白斑筛选, 挑取阳性白色菌落进行 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序鉴定 (测序送往上海基康生物技术有限公司, 在 3700 型测序仪上完成)。

表达质粒的构建 根据测序结果和原核表达载体 pET32a(+), 的酶切位点设计引物 TTGGA TCCATGGCGTCCTCCGTTGACATG; TTGAA TTC GATGATAAAGTTTACGACGGCAACC, 将 *CHS* 基

因克隆到表达载体 pET32a(+), 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点, 转化大肠杆菌 DE3 感受态细胞, PCR 筛选阳性克隆, 酶切鉴定得到重组克隆 pET-CHS。

表达产物的诱导及 SDS-PAGE 胶分析 将 pET-CHS 单菌落接种到 3 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 于 37℃ 培养过夜, 取 500 μl 过夜培养液, 加到 50 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 于 37℃ 继续培养到 OD₆₀₀ 为 0.6, 加 1 mol/L 的 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 20℃ 低温诱导培养, 分别在诱导 2 h、4 h 和 6 h 时取 1.5 ml 样品, 离心收集菌体, 菌体再悬浮于 100 μl 缓冲液 (5 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH8.0, 50 mmol/L 葡萄糖), 加等体积的 2×SDS 凝胶加样缓冲液, 100℃ 煮沸 5 min, 做 12% 的 SDS-PAGE 胶分析。

2 结果和讨论

2.1 非洲菊总 RNA 的提取

紫外检测 A₂₆₀ 和 A₂₈₀, A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.9, 1% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色, 在紫外灯下显示, 28S rRNA 的亮度大约是 18S rRNA 的 2 倍, 说明提取的总 RNA 完整, 没有发生降解, 而且没有基因组 DNA 污染 (图 1), 可以用来进行 RT-PCR 扩增。

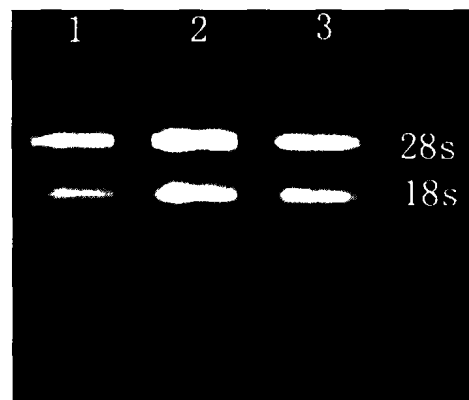


图 1 非洲菊总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of total RNA isolated from ray florets of *Gerbera hybrida*
1, 2, 3: 分别代表 3 个重复 Total RNA of three repetitions

2.2 cDNA 合成与 PCR 扩增

以非洲菊花的总 RNA 为模板, Oligo(dT) 为引物合成第一链 cDNA, 用 CHSF 和 CHSR 引物进行 PCR 扩增反应, 得到 1 200 bps 左右大小的片段 (图 2), 与预测的长度相符。

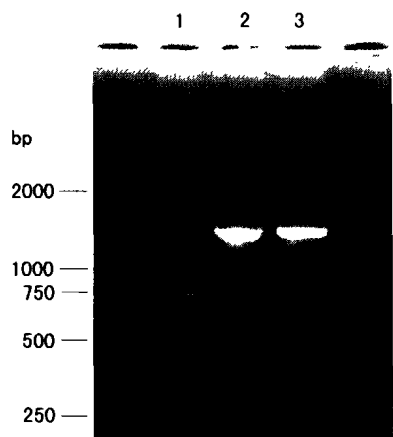


图 2 CHS 基因 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoretogram of PCR product of CHS

1. DNA 分子量标准物 DL2000 marker;
2, 3. CHS 基因 PCR 产物 PCR product of CHS

2.3 PCR 产物的克隆及序列分析

将纯化的 PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切,然后克隆到 pBluescript(SK)的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点,转化大肠杆菌 XL-blue 感受态细胞,在选择性培养基上蓝白斑筛选,得到多个阳性克隆,我们对其中 3 个阳性克隆进行了酶切分析和序列测定分析,我们克隆到的 *CHS* 基因全长为 1 197 bp, 编码一个由 398 个氨基酸残基组成的多肽,与 Helariutta 等^[15]发表的非洲菊(*Gerbera hybrida*)查尔酮合酶 *CHS1* 基因的 cDNA 序列的 *CHS* 基因同源性高达 99%。

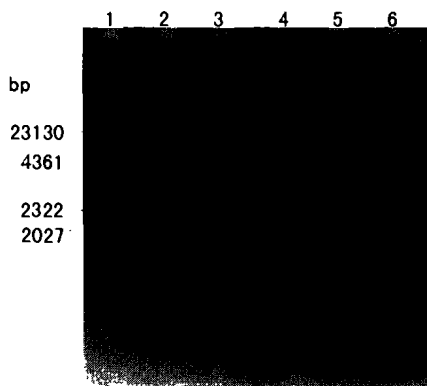


图 3 阳性克隆 pBluescript(SK)-CHS 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of CHS fragment in pBluescript(SK)-CHS

1. DNA 分子量标准物 λDNA/*Hind* III; 2. 质粒 pBluescript(SK)的 *Bam*H I/*Eco*R I 的双酶切产物 Plasmid pBluescript(SK) digested by *Bam*H I/*Eco*R I; 3, 4, 5. 质粒 pBluescript(SK)-CHS 的 *Bam*H I/*Eco*R I 的双酶切产物 Plasmid pBluescript(SK)-CHS digested by *Bam*H I/*Eco*R I; 6. *CHS* 基因的 PCR 扩增产物 PCR Product of *CHS* amplification

2.4 表达质粒的构建

将 *CHS* 基因克隆到表达载体 pET32a(+)

的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点,转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,得到许多阳性克隆,PCR、酶切鉴定阳性克隆,得到重组克隆 pET-CHS,最后选取 3 号重组克隆 pET-CHS 进行表达。

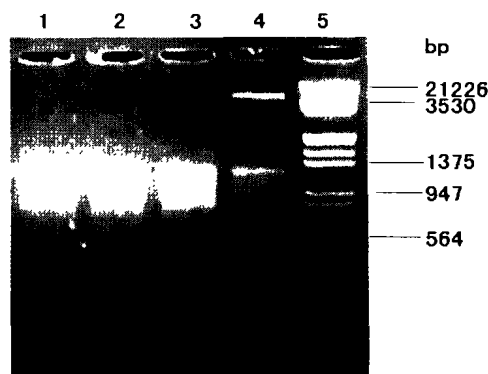


图 4 重组克隆 pET-CHS 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of CHS fragment in pET-CHS

1, 2, 3. PCR 扩增产物 PCR product; 4. 质粒 pBluescript(SK)-CHS 的 *Bam*H I/*Eco*R I 的双酶切产物 Plasmid pET-CHS digested by *Bam*H I/*Eco*R I; 5. DNA 分子量标准物 λDNA/*Eco*R I+*Hind* III

2.5 表达产物的检测

将含有空载体 PET32a(+)

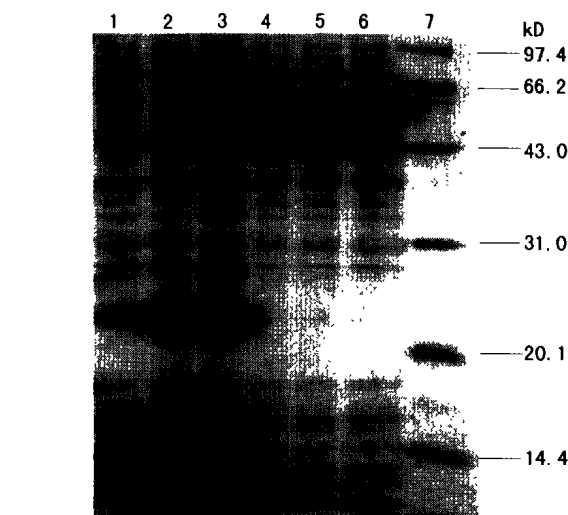


图 5 *CHS1* 基因在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE of the expressed *CHS1* in *E. coli*

1, 2, 3. IPTG 诱导 2、4、6 h,含质粒 pET 的大肠杆菌所表达的总蛋白 Total proteins of *E. coli* with pET after IPTG induction for 2, 4, 6 hours; 4, 5, 6. IPTG 诱导 2、4、6 h,含质粒 pET-CHS 的大肠杆菌所表达的总蛋白 Total proteins of *E. coli* with pET-CHS after IPTG induction for 2, 4, 6 hours; 7. 蛋白质分子标准物 Protein molecular weight marker.

约为 65 kD, 与电泳图中显示的结果符合, 而且融合蛋白的表达量随着表达时间的增加而增加。

参考文献

- [1] Harborne J B. Nature, distribution and function of plant flavonoids [J]. *Prog Clin Biol Res*, 1986, 213:15-24.
- [2] Mol J, Cornish E, Mason J, et al. Novel coloured flowers [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10:198-201.
- [3] Winkel-Shirley B. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127:1399-1404.
- [4] Heller W, Hahlbrock K. Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1980, 200:617-619.
- [5] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7:1071-1083.
- [6] Stafford H A. *Flavonoid Metabolism* [M]. Boca Raton: CRC Press, 1990. 298.
- [7] Koes R E, Spelt C E, Reif H J, et al. Floral tissue of *Petunia hybrida* (V30) expresses only one member of the chalcone synthase multigene family [J]. *Nucl Acids Res*, 1986, 14:5229-5240.
- [8] Meer M I. *Control of Plant Gene Expression* [M]. London: CRC Press, 1993. 1-8.
- [9] Jackson D, Roberts K, Martin C. Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus* [J]. *Plant J*, 1992, 2:425-434.
- [10] Katz A, Weiss D. Light regulation of anthocyanin accumulation and chalcone synthase gene expression in *Petunia* flowers [J]. *Israel J Plant Sci*, 1999, 47:225-229.
- [11] Katz A, Weiss D. Photocontrol of *chs* gene expression in *Petunia* flowers [J]. *Physiol Plant*, 1998, 102:210-216.
- [12] Rabino I. Light, temperature and anthocyanin production [J]. *Plant Physiol*, 1986, 81:922-924.
- [13] Durbin M L, McCaig B, Clegg M T. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42:79-92.
- [14] Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, et al. Duplication and functional divergence in the chalcone synthase gene family of Asteraceae: evolution with substrate change and catalytic simplification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:9033-9038.
- [15] Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, et al. Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28:47-60.

欢迎订阅 2005 年《生态环境》

《生态环境》刊号:ISSN 1672-2175; CN 44-1565/X。原刊名为《土壤与环境》,是经国家科技部批准的正式学术期刊,向国内外公开发行人。被评选为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国自然科学核心期刊,广东省优秀期刊、广东省优秀科技期刊、全国优秀农业期刊(一等奖)、中国学术期刊(光盘版)规范优秀期刊;入选《中文核心期刊要目总览》(2004年最新版)、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库。主要刊登国内外环境科学、生态学及相关领域具有创新性的重要研究论文,以及对前沿问题和热点问题具有独到见解和理论建树的综述。适合从事环境科学、生态学、资源保护、农业科学、林业科学、土壤学、大气科学、水科学、地理学、地质学、地球科学、医学、社会科学、经济科学等领域的科技人员、学者、教师、学生、环境爱好者和各级管理者阅读。

本刊 2005 年为双月刊,大 16 开,每册正文 150 页,每册定价 16.00 元,全年定价 96 元(含邮资)。邮发代号 46-272。全国各地邮局均可订阅。如错过邮局订阅期限,可直接向编辑部订阅。

编辑部地址:510650 广州市天河区乐意居 广东省生态环境与土壤研究所《生态环境》编辑部

电话:(020)87024961 E-mail: editor@eco-environment.com

如通过银行汇款,请填写以下的有关项目:

开户银行:中国工商银行广州市沙河办事处

银行帐号:3602002709002419786

收款单位:广东省生态环境与土壤研究所