

小桐子低温诱导查耳酮合酶基因的克隆及其表达分析

王海波^{1,2}, 邹竹荣¹, 龚明^{1*}

(1. 云南师范大学生命科学学院, 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 昆明 650500;
2. 曲靖师范学院生物资源与环境科学学院, 云南 曲靖 655011)

摘要: 为了解查耳酮合酶在小桐子(*Jatropha curcas*)抗冷性形成中的作用, 基于小桐子低温锻炼转录组和数字基因表达谱数据, 克隆了低温新诱导表达的小桐子查耳酮合酶基因(*JcCHS*), 并分析了该基因的表达特性和功能。结果表明, *JcCHS* 基因的 cDNA 全长为 1386 bp, 包含完整开放阅读框(ORF) 1170 bp, 编码 389 个氨基酸, *JcCHS* 的理论分子量为 42.2 kDa、等电点为 6.53, 与蓖麻 CHS 蛋白序列的相似性高达 93.6%, 具有 III 型聚酮合酶家族保守的查耳酮合酶 / 对苯乙烯合酶结构域。半定量 RT-PCR 分析表明, *JcCHS* 在小桐子各组织中都有表达, 其中根的表达量较高。*JcCHS* 基因的表达能在一定程度上提高重组酵母菌的低温抵抗能力, 这说明 *JcCHS* 基因可能参与了小桐子的抗低温响应。

关键词: 小桐子; 查耳酮合酶; 低温; 诱导; 表达; 基因克隆; 酵母

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.04.002

Cloning and Expression Analysis of Chilling-induced Chalcone Synthase Gene from *Jatropha curcas*

WANG Hai-bo^{1,2}, ZOU Zhu-rong¹, GONG Ming^{1*}

(1. School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology of Yunnan Province, Kunming 650500, China; 2. College of Biological Resource and Environmental Science, Qujing Normal University, Qujing 655011, China)

Abstract: In order to understand the function of chalcone synthase in cold resistance of *Jatropha curcas*, a chilling-induced chalcone synthase gene, named as *JcCHS*, was cloned from *J. curcas* based on data of transcriptome and digital gene expression profiling (DGE), and the expression patterns were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the full length of *JcCHS* cDNA was 1386 bp, with entire open reading frame (ORF) of 1170 bp encoding 389 amino acids. The theoretical molecular weight of *JcCHS* was 42.2 kDa with pI of 6.53. *JcCHS* protein shared 93.6% identity with CHS from *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), and belong to the type-III polyketide synthase family containing conserved domains of chalcone synthase/styrene synthase. The expression of *JcCHS* was detected in all tissues with the highest expression in root. In addition, the over-expression of *JcCHS* in yeast enhanced its resistance to low temperature. So, it was suggested that *JcCHS* gene would involve in the cold-resistance formation in *J. curcas*.

Key words: *Jatropha curcas*; Chalcone synthase; Low temperature; Induction; Expression; Gene clone; Yeast

收稿日期: 2014-10-29

接受日期: 2015-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260064, 31460059, 31460179); 云南省教育厅科研基金重大专项项目(ZD2010004)资助

作者简介: 王海波(1980~), 男, 博士研究生, 主要从事植物逆境生物学研究。E-mail: bocai0406@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: gongming63@163.com

小桐子(*Jatropha curcas*)为大戟科(Euphorbiaceae)落叶灌木或小乔木^[1],其种子含油量较高可生产生物柴油,耐干旱及贫瘠,可生长在边际土壤,不与粮食作物争地,已成为研究的热点^[2]。目前,小桐子已成为世界公认的、未来最有可能替代化石能源并具有巨大开发潜力的能源树种^[3],我国在近三个“五年”能源发展纲要中都把小桐子产业列为可再生能源中长期发展规划的重点。小桐子是原产于热带及亚热带地区的喜温植物,不耐寒,温度是影响小桐子地域分布的主要限制因素^[4-5]。随着小桐子栽培的北移和向高海拔山区的拓展,低温冷害使得小桐子的产量、分布和生存受到极大影响,严重制约小桐子产业的发展^[6]。因此,弄清小桐子低温冷害与抗冷性机理进而培育抗冷新品种已成为当今亟待解决的问题。

查尔酮合酶(Chalcone synthase, EC 2.3.1.74, CHS)是植物 III 型聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)的一个家族酶系,也是植物次生代谢途径中黄酮类物质(Flavonoids)合成的第一个限速酶,催化丙二酰单酰-CoA 与 4-香豆酰-CoA 的缩合反应,生成 C15 的柚皮素查耳酮(苯基苯乙烯酮),柚皮素查耳酮在苯基苯乙烯酮异构酶作用下生成黄烷酮类物质,再衍生出黄酮、异类黄酮、黄烷醇及黄酮醇等次生代谢物质,为花色苷类色素(Anthocyanins)和其他黄酮类物质合成提供了基础的碳架结构^[7]。另外,CHS 可能同时参与植物多种生理生化过程,如生长素运输、抗病、抗虫、损伤修复、花色形成、紫外线防御、根瘤形成等^[8]。自从欧芹(*Petroselinum crispum*)的 CHS 基因序列在 1983 年发布以来,目前许多植物的 CHS 基因被克隆,GenBank 中 CHS 基因及蛋白序列有 2000 余条;同时,至少有 10 余种植物,如高粱(*Sorghum bicolor*)^[9]、*Bromheadia finlaysoniana*^[10]、矮牵牛(*Petunia hybrida*)^[11]、金鱼草(*Antirrhinum majus*)^[12]的 CHS 基因已被用于转化研究。但是,有关小桐子查耳酮合酶基因的研究还未见报道。最近,我们通过高通量 RNA 测序获得了小桐子低温锻炼转录组和数字基因表达谱,并从中筛选到一些包括 CHS 在内的低温锻炼新诱导表达基因^[13-14]。在此基础上,本研究克隆了小桐子 CHS 基因的全长 cDNA,利用半定量 RT-PCR 分析 CHS 基因在低温锻炼下不同组织中的表达情况,并进行生物信息学分析及酵母背景下的功能初步验证,以期阐明小桐子抗冷性分子机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和处理

供试小桐子(*Jatropha curcas*)种子取自云南省楚雄州元谋县野生型品种。参照李忠光等^[15]的方法,选取饱满的种子用 1.5% CuSO₄ 消毒 20 min,无菌水漂洗 5 次,于 26℃ 的恒温培养箱中吸涨 24 h,将吸涨的种子在无菌水中漂洗 3 次,播于垫有 5 层无菌水湿润滤纸的白磁盘(24 cm × 16 cm)中,于相对湿度(RH)为 75%、昼/夜为 26℃/20℃、16 h/8 h 光周期的恒温培养箱中萌发 5 d。将发芽的种子播于消毒的培养土中,并置于同样条件恒温培养箱中生长 15 d 至第二片真叶展开,每天用无菌水润湿培养土。将小桐子幼苗置于相对湿度 75%,在 12℃、16 h/8 h 光周期的低温培养箱中进行低温锻炼,分别取低温锻炼 12 h、24 h、48 h 的第二片真叶,以正常培养的为对照,液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱中用于 RNA 的提取。

1.2 菌株和主要试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) Trans1-T1 (DH5α) 及酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) INVSc1 菌株由本实验室保存;TransZol Up、DNase I、TransStart Taq DNA 聚合酶、氨苄青霉素(Amp)、X-gal、IPTG、2 × Easy Taq PCR SuperMix (+dye)、TransScript Two-Step RT-PCR SuperMix、EasyPure Quick Gel Extraction Kit、EasyPure Plasmid MiniPrep Kit、pEASY-T1 Cloning Kit、pEASY-E1 Expression Kit、Trans 2 k Plus II DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;BamH I、Xho I 限制性内切酶购自大连宝生物公司;引物(表 1)合成和 DNA 测序由深圳华大基因有限公司完成。

表 1 引物

Table 1 Primers tested

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
JcCHS_1	F: CCTGGTCTAACTCTGG R: GGGTACACTCGGGTCTG
18S rRNA	F: AGAAACGGCTACCACATC R: CCAAGTCCAACACTACGAG
JcCHS_2	F: ACCACCTACGGTCTAAGCCTCC R: AATCCTCAAACCTGCCATCAAG

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

取小桐子叶片 0.2 g,按照 TransZol 试剂盒说

明书提取总 RNA, 经过 DNase I 消化基因组 DNA, 得到纯化的总 RNA。取 3 μg 总 RNA, 以 Anchored Oligo(dT)18 为反转录引物, 利用 TransScript Two-Step RT-PCR SuperMix 反转录合成第一链 cDNA, 于 -20°C 保存。

1.4 半定量 RT-PCR 分析

以合成的第一链 cDNA 为模板, 以 18S rRNA 为内参, 用 JcCHS_1 引物进行 RT-PCR 扩增。18S rRNA 的扩增条件为: 94°C 5 min \rightarrow [94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min] $_{26}$ \rightarrow 72°C 10 min; JcCHS 基因的扩增条件为: 94°C 5 min \rightarrow [94°C 30 s, 49.6°C 30 s, 72°C 1 min] $_{28}$ \rightarrow 72°C 10 min。反应完毕后取 5 μL 采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.5 JcCHS 基因全长 cDNA 的克隆

基于前期高通量测序获得的小桐子低温锻炼转录组和数字基因表达谱数据^[13-14], 从中鉴定出小桐子低温诱导表达的 CHS 基因 Unigene914_JC-CK_1A (登录号: GAHK01013462)。该基因序列长度为 1480 bp, 包含完整 ORF 编码框 (1170 bp), 以此序列设计引物 JcCHS_2 (表 1) 用于 JcCHS 基因的全长 cDNA 扩增。

以低温锻炼 24 h 的小桐子叶片总 RNA 的反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94°C 5 min \rightarrow [94°C 30 s, 56.3°C 30 s, 72°C 1.5 min] $_{35}$ \rightarrow 72°C 10 min。扩增完成后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 回收目的片段条带 (1386 bp), 连接克隆载体 pEASY-T1, 并转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞, 过夜生长, 进行蓝白斑筛选。挑取白斑克隆, 进行菌落 PCR 鉴定, 重组质粒命名为 pEASY-T1-JcCHS, 过夜摇菌提取质粒, 送深圳华大基因公司利用 pEASY-T1 质粒上的 M13 正反向通用引物进行双向测序。

1.6 JcCHS 基因的生物信息学分析

将测序正确的 JcCHS 基因 cDNA 序列利用 BioEdit 软件翻译成氨基酸序列, 利用在线工具 ProtParam 计算蛋白质的理论分子量、等电点等基本参数。利用 Spidey 软件进行克隆 cDNA 序列与其对应基因组序列 (小桐子基因组数据库 <http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>) 比对以确定基因内含子与外显子的结构。利用 WolfSport 在线软件对

蛋白质进行亚细胞定位预测, 并利用 SignalP3.0 Server 分析蛋白质信号肽序列, 接着利用在线工具 TMHMM 与 Proscale 检测其跨膜结构与亲水/疏水特性。利用 Prosite 与 NCBI CDD 工具进行结构域与功能元件的鉴定。从 GeneBank 下载其它植物物种的 CHS 氨基酸序列, 利用 ClustalX 进行序列相似性比对, 然后用 MEGA4.0 软件通过邻接法 (NJ) 构建系统进化树, 并采用泊松法进行检验。利用 Phyre2 进行蛋白质三维结构的同源建模, 利用 VMD 软件显示其三维空间结构, 并结合 Ramachandram 图验证模型的准确性。

1.7 JcCHS 的酵母表达载体构建、转化及功能验证

质粒 pEASY-T1-JcCHS 和酵母表达载体 pYES2 经 BamH I 与 Xho I 双酶切, 回收 JcCHS 片段与 pYES2 的酶切大片段, 用 T4 DNA 连接酶于 22°C 连接 5 h, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂 LB + Amp 平板, 过夜生长, 经菌落 PCR 验证的阳性克隆命名为 pYES2-JcCHS。提取重组酵母表达质粒 pYES2-JcCHS, 转化酿酒酵母野生型菌株 INVSc1, 命名为 INVSc1-pYES2-JcCHS; 对照空载体 pYES2 质粒也转化 INVSc1, 命名为 INVSc1-pYES2; 通过酵母菌落 PCR 验证以确定阳性克隆。

分别挑取重组酵母 INVSc1-pYES2-JcCHS 及对照 INVSc1-pYES2 单菌落, 接种于 15 mL YPD 培养基中, 30°C 振荡过夜培养。加入 YPD 培养基至菌液 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6, 取 20 mL 菌液于 $7155\times\text{g}$ 离心 1 min, 弃上清液, 用 20 mL YPG 诱导培养基重悬菌体, 30°C 诱导表达 24~36 h 至 OD₆₀₀>2.0。取诱导表达菌液 2 mL 至 60 mL YPG 诱导培养基中, 使菌液 OD₆₀₀ 为 0.2, 分别在正常 (30°C) 与低温 (18°C) 下继续振荡培养, 每 3 h 间隔取样, 测定样品的 OD₆₀₀ 值。以时间为横坐标, OD₆₀₀ 为纵坐标, 绘制酵母菌的生长曲线, 比较重组酵母菌与对照酵母菌在正常和低温条件下的生长差异。

2 结果和分析

2.1 JcCHS 基因的表达

采用半定量 RT-PCR, 以 18S rRNA 为内参, 分析了小桐子 JcCHS 基因在低温锻炼和组织中的表达情况。由图 1 可以看出, JcCHS 基因的表达呈现组织特异性, 叶中基本不表达, 根和茎有表达且

接近。*JcCHS* 基因在低温锻炼的不同组织中表现出不同的表达变化,在低温锻炼 12 h 的叶中,与对照一样几乎没有表达,但随低温锻炼时间的延长表达逐渐增加,24 h 达到最高;随后表达量逐渐下降,到 48 h 已很弱。在低温锻炼的茎中,*JcCHS* 基因的表达量与对照基本相当。在低温锻炼 12 h 的根中,*JcCHS* 基因的表达与对照接近,但随锻炼时间的延长逐渐上调,24 h 达到最高,之后又逐渐下降,到 48 h 已低于对照。因此,*JcCHS* 是小桐子叶片特异性的低温新诱导表达基因,与我们前期基于小桐子叶组织的低温转录组和数字基因表达谱分析数据^[14]相符。

2.2 *JcCHS* 基因全长 cDNA 的克隆

由图 1 以及前期获得的数字基因表达谱数

据^[14]可以看出,本研究克隆的小桐子 *JcCHS* 基因属于叶片特异性的低温诱导型基因。以小桐子在 12℃ 低温锻炼 24 h 的叶片提取总 RNA,反转录成 cDNA 为模板,扩增 *JcCHS* 基因的全长 cDNA。结果表明,扩增产物约为 1.4 kb,与预期大小一致(图 2: A)。将目的条带切胶回收后与 T/A 克隆载体 pEASY-T1 连接,转化大肠杆菌,并经菌落 PCR 鉴定(图 2: B),阳性重组克隆命名为 pEASY-T1-*JcCHS*,接菌提取其质粒 DNA (图 2: C),并以 M13 通用引物进行测序。

2.3 *JcCHS* 基因的生物信息学分析

经测序分析,克隆的 *JcCHS* 基因全长 cDNA 序列为 1386 bp,已提交至 NCBI GenBank (登录号: KJ670149.1)。BioEdit 软件分析表明其包含完整的

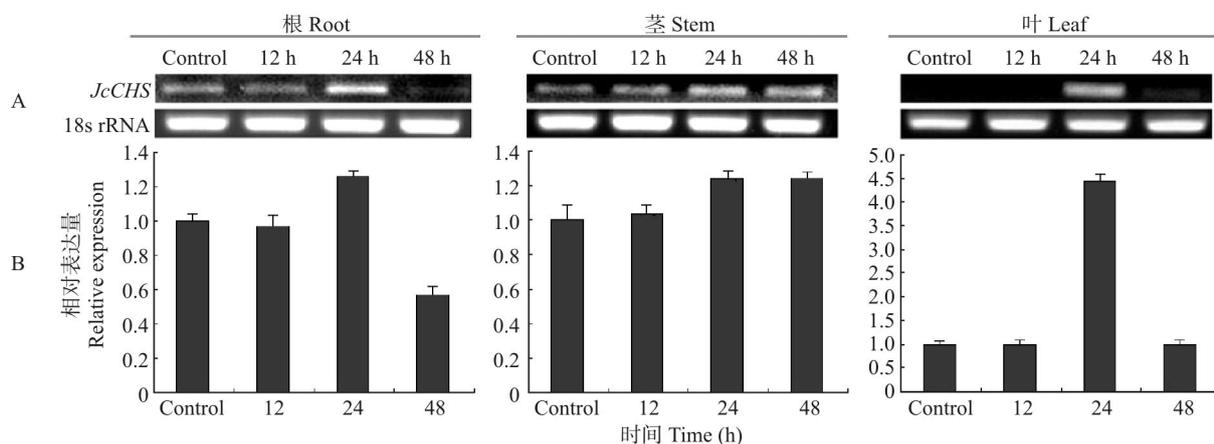


图 1 小桐子 *JcCHS* 基因在不同组织和低温锻炼下的表达

Fig. 1 Expression of *JcCHS* from *Jatropha curcas* in different tissues under low temperature

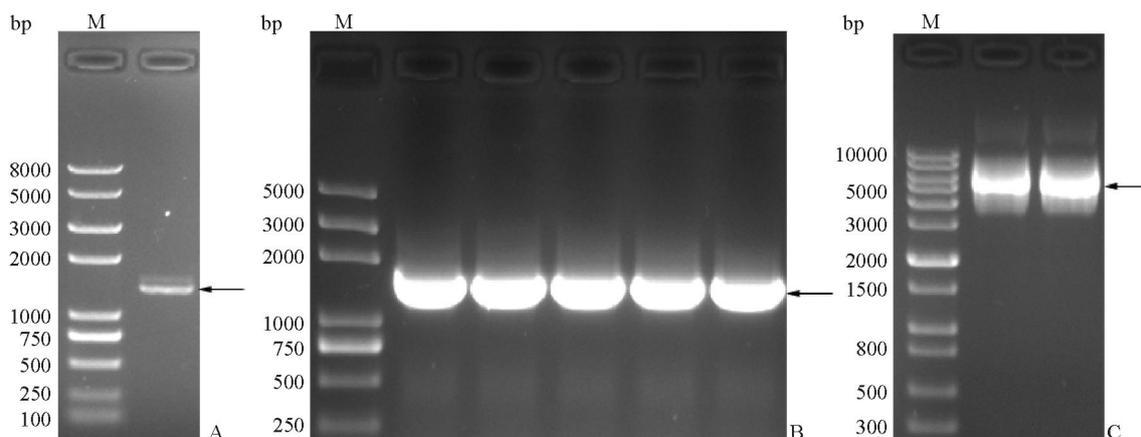


图 2 小桐子 *JcCHS* 基因的 cDNA 克隆。A: PCR 扩增; B: 菌落 PCR 鉴定; C: 重组质粒 pEASY-T1-*JcCHS*; M: 2000 bp DNA Marker。

Fig. 2 Clone of *JcCHS* cDNA from *Jatropha curcas*. A: PCR amplification; B: PCR identification of colony; C: Recombine plasmid pEASY-T1-*JcCHS*; M: 2000 bp DNA Marker.

开放阅读框 1170 bp, 编码 389 个氨基酸。通过在线 BLAST 检索, *JcCHS* 编码区序列在小桐子基因组数据库(<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>)中匹配的基因组序列包含 2 个外显子与 1 个内含子, 其中 5' 端外显子较短, 而 3' 端外显子较长。ProtParam 在线软件分析表明, *JcCHS* 蛋白的理论分子量为 42.4 kDa、等电点为 6.53, 氨基酸组成以亮氨酸 Leu (11.1%)、Ile (5.1%)、Ala (8.0%)、Val (8.7%) 等非极性氨基酸为主(占 32.9%), 而酸性氨基酸与碱性氨基酸分别占 12.1% 与 11.6%。预测分析表明该蛋白质没有信号肽、疏水区域及跨膜区, 说明该蛋白质可能属于可溶性胞质蛋白, 这与 WolfSport 软件预测该蛋白质主要定位在细胞质中相吻合。

通过 ClustalW 软件将推导的小桐子 *JcCHS* 蛋白序列与 NCBI 中其它植物的 CHS 氨基酸序列进行比对(图 3: A), 结果表明, 不同植物 CHS 蛋白序列的同源性很高(超过 87%)。其中 N 端(第 1~90 位)和近 C 段(第 320~370 位)区域内差异较大, 而中间部位与 C 末端约 20 个氨基酸残基(含 Motif I-IV)则非常保守。通过 Prosite 与 CDD 工具预测, 小桐子 *JcCHS* 蛋白有 1 个典型查耳酮合酶家族的特征多肽序列(Motif I: 156RLMMYQQGCFAGGTVLR172), 符合 R-[LIVMFYS]-x-[LIVM]-x-[QHG]-x-G-C-[FYNA]-[GAPV]-G-[GAC]-[STAVK]-x-[LIVMF]-[RAL]的查耳酮/二苯乙烯合酶活性位点标签序列, 核心催化氨基酸残基为 164 位的 Cys (图 3: A); 而 NCBI CDD 预测显示其活性催化中心还包括 303 位的 His、336 位的 Asn 以及 215 位的 Phe (图 3: B), 构成查耳酮合酶所特有的保守催化活性中心 Cys¹⁶⁴-His³⁰³-Asn³³⁶, 通过调控活性中心腔内的空间大小决定起始底物的种类和聚酮链的长度。Phe²¹⁵ 位于活性中心口袋的入口处, 调控底物和中间产物的进出, 同时有利于丙二酸单酰 CoA 的脱羧。另外, CDD 预测还显示, *JcCHS* 催化的产物结合位点(Motif III)由分布于第 192~375 位的 11 个氨基酸残基(Glu¹⁹²、Ile¹⁹³、Thr¹⁹⁴、Gly²¹¹、Ile²⁵⁴、Asp²⁵⁵、Gly²⁵⁶、Thr²⁶⁴、Phe²⁶⁵、Ser³³⁸、Pro³⁷⁵)组成, 丙二酰-CoA 结合位点由分布于第 55~308 位的 8 个氨基酸残基(Lys⁵⁵、Arg⁵⁸、Met⁵⁹、Phe²¹⁵、Phe²⁶⁵、Gly³⁰⁶、Pro³⁰⁷、Ala³⁰⁸)组成。

进一步通过 MEGA 软件将用 ClustalW 分析得到的植物 CHS 序列比对结果, 以邻近法构建其系统进化树(图 4)。结果表明, 小桐子 *JcCHS* 与

同属大戟科的蓖麻(*Ricinus communis*) CHS (XP_002518132.1)的进化关系最近, 序列同源性达到 93.6%。

CHS 是一种同型二聚体蛋白质, 每个单体的相对分子量为 $4.2 \times 10^4 \sim 4.5 \times 10^4$ [16], 同样具有催化活性。利用 Phyre2 在线分析工具采用同源建模方法对小桐子 *JcCHS* 蛋白的三级结构进行预测, 依据模板调整待预测蛋白序列主链原子位置生成预测蛋白的三级结构模型(图 5: A), 最后依据能量最小化原理使侧链基团处于能量最小的位置。预测信息显示, *JcCHS* 预测模型与同源模板序列同源性为 87.74%。由于 CHS 是一种同型二聚体蛋白质, 因此预测结果是其亚基结构。

采用软件 VMD 分析表明, 小桐子 *JcCHS* 蛋白具有典型的 CHS 家族蛋白三维结构域: 分别由 4 条和 5 条 β -折叠各组成两个平面, 构成 CHS 的催化空袋区域, 在空袋内有交叉成 V 字型的两条 α -螺旋填充, 而在两个平面的外侧各由两条 α -螺旋维系空袋结构。查耳酮合酶典型活性中心 Cys¹⁶⁴-His³⁰³-Asn³³⁶ 位于 V 字型 α -螺旋的交叉处, 而作为决定催化底物种类的 Phe²¹⁵ 就位于空袋的入口处(图 5: A)。Ramachandram 能量图显示, 该预测结构的 94.6% 氨基酸残基处于能量稳定区域, 说明预测的小桐子 *JcCHS* 蛋白质三维结构是可信的(图 5: B)。

2.4 通过酵母表达初步验证小桐子 *JcCHS* 的功能

小桐子 *JcCHS* 基因经 *Bam*H I 与 *Xho* I 双酶切后连接到酵母表达质粒 pYES2 中, 获得重组酵母表达载体 pYES2-*JcCHS*。随后将其转化酵母菌 INVSc1, 利用 *JcCHS* 上下游引物进行酵母菌落 PCR 鉴定, 结果表明该重组酵母表达质粒已经成功转化酵母。

通过比较重组酵母菌 INVSc1-pYES2-*JcCHS* 与对照酵母菌 INVSc1-pYES2 的生长曲线(图 6), 在 30℃ (非胁迫)生长条件下, *JcCHS* 重组酵母菌与对照菌都没有出现显著的停滞期, 而是直接进入了对数生长期, 前期两者生长速度基本相同, 但培养 12~24 h 的 *JcCHS* 重组酵母菌表现出略微的生长优势(图 6: A)。在 18℃ 低温条件下, *JcCHS* 重组酵母菌与对照菌都表现出相同的生长趋势, 即在培养的前 3 h 出现略微的生长停滞, 之后到 24 h 内是快速的对数生长期, 30 h 后同时到达平台期, 但整个生长周期内 *JcCHS* 重组酵母菌的生长

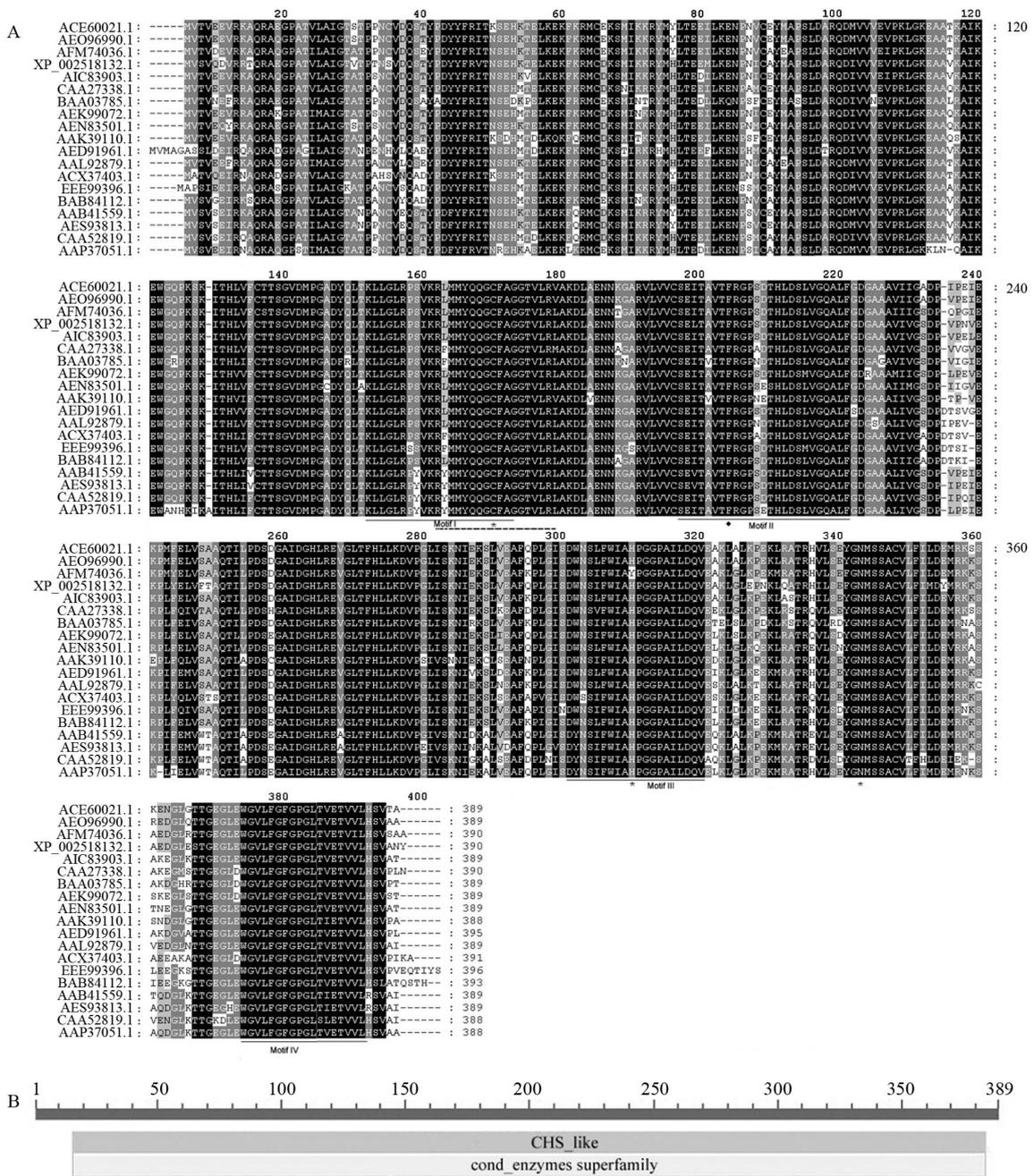


图3 小桐子 *JcCHS* 推导的氨基酸序列与其它植物 CHS 的多重序列比对(A)及其保守结构域(CDD)(B)预测。___: 查耳酮合酶及对苯乙烯合酶活性位点; ---: 查耳酮合酶家族的特征多肽序列; *: 构成活性中心的保守氨基酸残基; ◆: Phe215 的保守氨基酸残基; ACE60221.1: 黄蜀葵; AFM74036.1: 鸡爪槭; CAA27338.1: 金鱼草; AED91961.1: 拟南芥; AAL92879.1: 大麻; ACX37403.1: 柚子; BAA03785.1: 野胡萝卜; AEO96990.1: 棉花; AAK39110.1: 圆叶牵牛; AIC83903.1: 小桐子; AAP37051.1: 黄羽扇豆; AAB41559.1: 紫花苜蓿; AES93813.1: 蒺藜苜蓿; EEE99396.1: 毛果杨; XP_002518132.1: 蓖麻; AEK99072.1: 番茄; AEN83501.1: 马铃薯; CAA52819.1: 豇豆; BAB84112.1: 葡萄。

Fig. 3 Sequence alignments of deduced *JcCHS* of *Jatropha curcas* with those of other plants (A) and corresponding CDD prediction (B). ___: Active sites of chalcone synthase and styrene synthase; ---: Specific polypeptide of chalcone synthase family; *: Conserved amino acid residues of active center; ◆: Conserved Phe215; ACE60221.1: *Abelmoschus manihot*; AFM74036.1: *Acer palmatum*; CAA27338.1: *Antirrhinum majus*; AED91961.1: *Arabidopsis thaliana*; AAL92879.1: *Cannabis sativa*; ACX37403.1: *Citrus maxima*; BAA03785.1: *Daucus carota*; AEO96990.1: *Gossypium hirsutum*; AAK39110.1: *Ipomoea purpurea*; AIC83903.1: *Jatropha curcas*; AAP37051.1: *Lupinus luteus*; AAB41559.1: *Medicago sativa*; AES93813.1: *M. truncatula*; EEE99396.1: *Populus trichocarpa*; XP_002518132.1: *Ricinus communis*; AEK99072.1: *Lycopersicon esculentum*; AEN83501.1: *Solanum tuberosum*; CAA52819.1: *Vigna unguiculata*; BAB84112.1: *Vitis vinifera*.

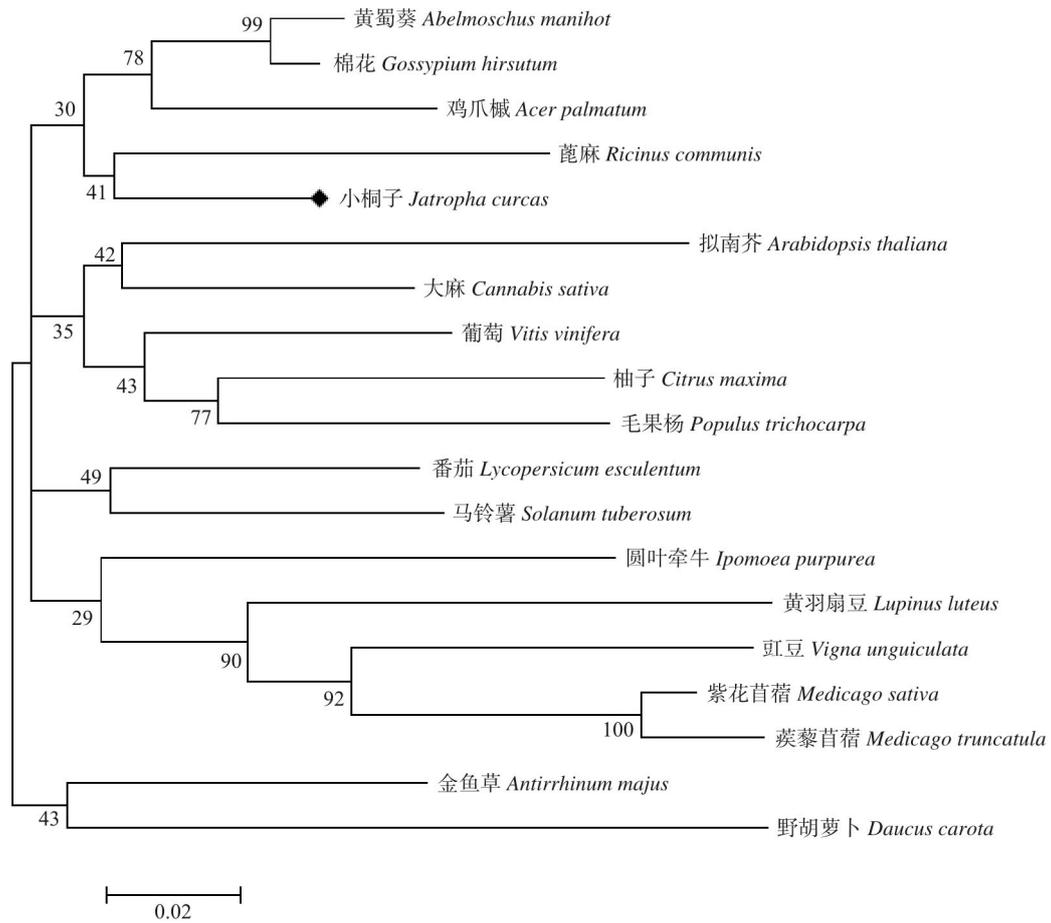


图 4 通过 ClustalW 序列比对和 MEGA4.0 邻接法构建的植物 CHS 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of CHS by ClustalW alignment and MEGA4.0 neighbor-joining method

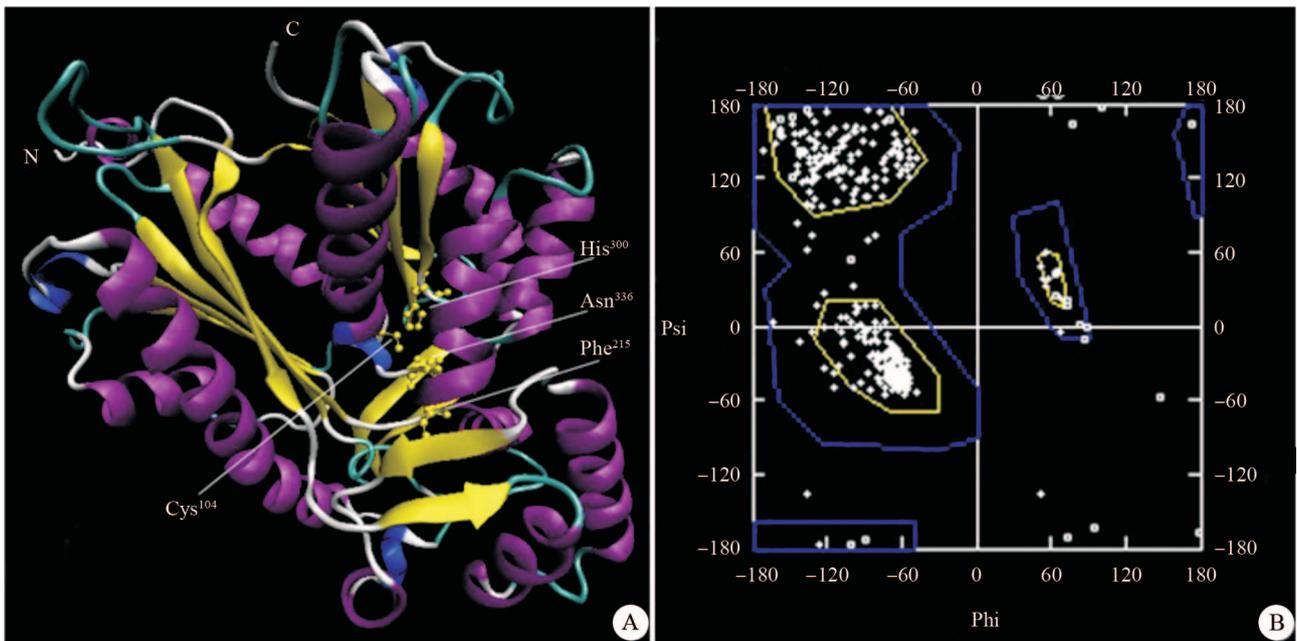


图 5 同源建模得到的小桐子 JcCHS 蛋白三维空间结构。A: 卡通模型; B: Ramachandram 能量图。

Fig. 5 3-D structure of JcCHS protein by homologous modeling. A: Cartoon model; B: Ramachandram plot.

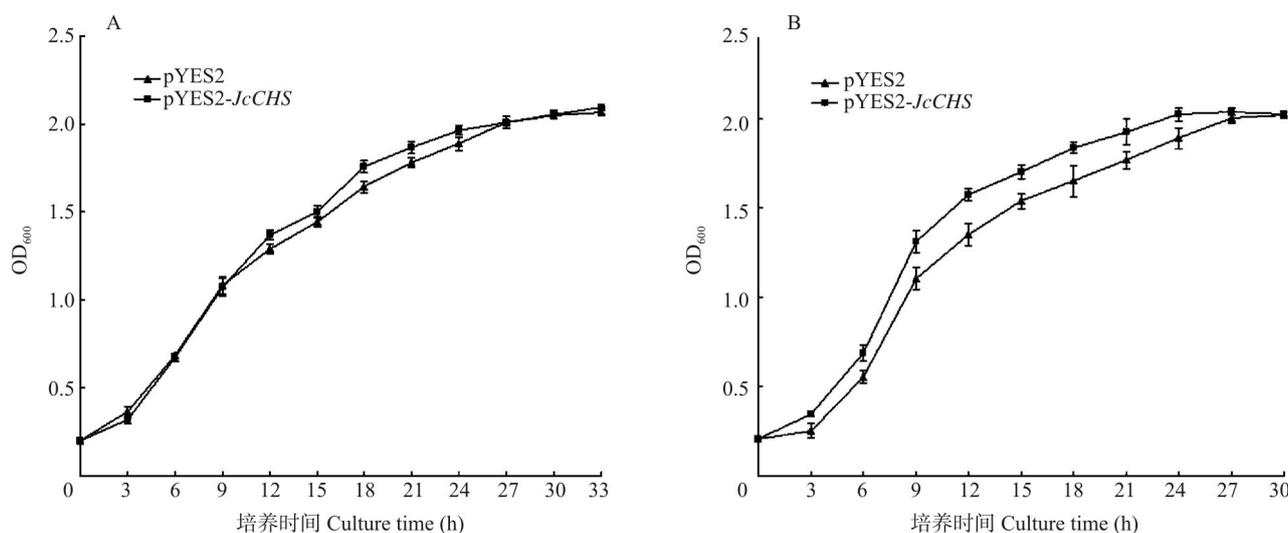


图6 重组酵母菌 INVSc1-pYES2-*JcCHS* 与酵母菌 INVSc1-pYES2 在 30°C (A)和 18°C下(B)的生长

Fig. 6 Growth of recombinant yeast strain INVSc1-pYES2-*JcCHS* and yeast strain INVSc1-pYES2 under 30°C (A) and 18°C (B)

速度都明显快于对照菌(图 6: B),尤其在培养 12 h 时, *JcCHS* 重组酵母菌的生长速度超过对照菌的 16.33%。这说明 *JcCHS* 是与抗冷性直接相关的基因,其在酵母中过量表达明显增强了酵母的低温抵抗能力。

3 讨论

查耳酮合酶(CHS)是从脂肪酸代谢途径中的一个酶进化而来的,且在进化过程中有多次功能转变^[17]。*CHS* 属于多基因家族,多数物种中各成员的同源性较高,个别种的 *CHS* 基因分属于不同的家族^[18]。*CHS* 基因数在不同物种间的差异较大,矮牵牛有 12 个 *CHS* 同源基因,大豆(*Glycine max*)至少有 8 个,水生三叶草(*Trifolium repens*)至少有 9 个,黑麦(*Secale cereale*)有 4 个,玉米(*Zea mays*)有 2 个,而金鱼草和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)只有 1 个。

查耳酮合酶基因的编码区十分保守,不同物种间 *CHS* 氨基酸序列的同源性都在 80% 以上(图 3: A)。其基因结构也十分保守,除金鱼草的 *CHS* 基因有 2 个内含子外,其它物种的 *CHS* 基因都只含有 1 个内含子,这与本研究克隆到的小桐子低温诱导型查耳酮合酶基因结构相同。研究表明, *CHS* 基因外显子 2 编码的氨基酸序列是 *CHS* 较为保守的部分,而且这个外显子的位置在已报道的序列中也均保守,都位于 Cys⁶⁵ 密码子内第 1 与第 2 碱基之间,编码氨基酸序列几乎包含所有 *CHS* 的功能

位点,包括活性位点、产物结合位点、丙二酰辅酶 A 结合位点和二聚体接口等,可以用作遗传分化和分子进化研究中的重要依据^[19]。

类黄酮化合物的多功能性决定了 *CHS* 基因家族成员的功能多样性,同时, *CHS* 同源基因的表达特性也存在差异。研究表明, *CHS* 多基因家族中的每个成员表达都可以被不同方式所调控。*CHS* 基因在植物不同发育时期的不同器官表达,如发育早期主要在叶片中表达,而到达生殖生长期则主要在花器官中表达;其还能在同一器官的不同部位表达,如长春花(*Catharanthus roseus*)的 *CHS* 基因在花器官的上皮部位表达,而有些植物则在花药中表达^[20]。目前,有研究认为 *CHS* 基因还受不同的光质诱导表达,这也与 *CHS* 基因的调控区域包含光受体顺式作用元件、MYB 识别元件及 ACGT 元件相吻合^[21]。另外,徐文燕等^[22]报道,低温有利于植物组织中黄酮类物质的积累以及 *CHS* 基因的诱导表达。我们获得的小桐子低温锻炼数字基因表达谱的分析结果也表明,低温锻炼下小桐子 *CHS* 基因(*JcCHS*)差异表达较为显著,而且为新诱导表达基因^[14]。本研究通过半定量 RT-PCR 分析了 *JcCHS* 在小桐子低温锻炼下不同组织中的表达,结果表明该基因表达呈现组织差异性且受低温诱导表达(图 1),尤其在对低温响应敏感的叶片中更加显著,这也与数字基因表达谱结果^[14]相一致。此外,该基因在酵母中过量表达能在一定程度上增强重组酵母菌的低温抵抗能力(图 6),也间接反映出它与小桐

子抗冷性的密切关系,因此可以用作后续对小桐子进行抗冷性遗传改良的主要候选基因。同时,对该基因的进一步研究将会深入揭示 *CHS* 及其催化的代谢产物(如黄酮类物质)在植物抗冷性形成中的作用机制。

参考文献

- [1] Zeng J M. Biomass energy plant with potential development: *Jatropha curcas* L. [J]. *J Yunnan For*, 2006, 27(2): 21–22.
曾觉民. 可大力发展的生物质能源植物——膏桐 [J]. *云南林业*, 2006, 27(2): 21–22.
- [2] Kumar G R K, Eswaran N, Johnson T S. Isolation of high-quality RNA from various tissues of *Jatropha curcas* for downstream applications [J]. *Anal Biochem*, 2011, 413(1): 63–65.
- [3] Lin J, Zhou X W, Tang K X, et al. A survey of the studies on the resources of *Jatropha curcas* L. [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2004, 12(3): 285–290.
林娟, 周选围, 唐克轩, 等. 麻疯树植物资源研究概况 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2004, 12(3): 285–290.
- [4] Johnson T S, Eswaran J N, Sujatha M. Molecular approaches to improvement of *Jatropha curcas* Linn. as a sustainable energy crop [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(9): 1573–1591.
- [5] Carels N. *Jatropha curcas*: A review [J]. *Adv Bot Res*, 2009, 50: 39–86.
- [6] Maes W H, Trabucco A, Achten W M J, et al. Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L. [J]. *Biomass Bioener*, 2009, 33(10): 1481–1485.
- [7] Martin C R. Structure, function, and regulation of the chalcone synthase [J]. *Int Rev Cytol*, 1993, 147(2): 233–284.
- [8] Coverly L C, Rausher M D. Analysis of a chalcone synthase mutant in *Ipomoea purpurea* reveals a novel function for flavonoids: Amelioration of heat stress [J]. *Mol Ecol*, 2003, 12(9): 1113–1124.
- [9] Lo C, Coolbaugh R C, Nicholson R L. Molecular characterization and in silico expression analysis of chalcone synthase gene family in *Sorghum bicolor* [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2002, 61(3): 179–188.
- [10] Liew C F, Goh C J, Loh C S, et al. Cloning and characterization of full-length cDNA clones encoding chalcone synthase from the orchid *Bromheadia finlaysoniana* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1998, 36(9): 647–655.
- [11] Holton T A, Brugllers F, Tanaka Y. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida* [J]. *Plant J*, 1993, 4(6): 1003–1010.
- [12] Sommer H, Saedler H. Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus* [J]. *Mol Gen Genet*, 1986, 202(3): 429–434.
- [13] Wang H B, Zou Z R, Wang S S, et al. Deep sequencing-based transcriptome analysis of the oil-bearing plant physic nut (*Jatropha curcas* L.) under cold treatments [J]. *J Plant Omics*, 2014, 7(3): 178–187.
- [14] Wang H B, Zou Z R, Wang S S, et al. Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcas* L. [J]. *PLoS One*, 2013(12): e82817.
- [15] Li Z G, Gong M. Effect of different chemical disinfectant on seed germination and seedling growth of *Jatropha curcas* L. [J]. *Seed*, 2010, 30(2): 4–7, 12.
李忠光, 龚明. 不同化学消毒剂对小桐子种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. *种子*, 2010, 30(2): 4–7, 12.
- [16] Austin M B, Noel J P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases [J]. *Nat Prod Rep*, 2003, 20(1): 79–110.
- [17] Tropf S, Kärcher B, Schröder G, et al. Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (stilbene and chalcone synthase): A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(14): 7922–7928.
- [18] Zhang M S. Cloning and sequence analysis of chalcone synthase gene from *Chrysanthemum × Morifolium* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2006: 7–10.
张明妹. 菊花查尔酮合酶基因的克隆与序列分析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2006: 7–10.
- [19] Durbin M L, McCaig B, Clegg M T. Molecular evolution of chalcone synthase multigene family in the morning glory genome [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(1): 79–92.
- [20] Mahroug S, Courdavault V, Thiersault M, et al. Epidermis is a pivotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs [J]. *Planta*, 2006, 223(6): 1191–1200.
- [21] Hartmann U, Sagasser M, Mehrrens F, et al. Differential combinatorial interactions of *cis*-acting elements recognized by R2R3-MYB, bZip, and bHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 57(2): 155–171.
- [22] Xu W Y, Gao W W, He C N. The influences of environmental factors on flavonoid biosynthesis [J]. *Word Sci Techn (Mod Trad Chin Med)*, 2006, 8(6): 68–72.
徐文燕, 高微微, 何春年. 环境因子对植物黄酮类化合物生物合成的影响 [J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2006, 8(6): 68–72.