



黄芩查尔酮合酶基因内含子在转基因烟草中 对 GUS 活性调控的初步研究

伍翀^{1,2}, 黄璐琦², 袁媛^{2*}, 张楠², 林淑芳²

(1. 武汉工业学院, 湖北 武汉 430023; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:通过对黄芩查耳酮合酶基因内含子区域分析,初步分析其功能。方法:设计特异引物克隆黄芩查耳酮合酶内含子,并通过生物信息学方法预测其顺式作用元件组成;将内含子插入植物表达载体 pCAMBIA 1301 中,转化烟草后观察 GUS 在各种非生物胁迫下的活性。结果:在查耳酮合酶内含子中预测了 7 种顺式元件;黑暗及高温条件下,GUS 活性先上升(3 h),后降低(9 h);10% PEG 处理条件下,GUS 活性上升;ABA 及 MeJA 对 GUS 的表达的调节作用不明显。结论:黄芩查耳酮合酶基因内含子可能参与了外界环境对黄芩有效成分的调控。

[关键词] 黄芩;查耳酮合酶;内含子;非生物胁迫

黄芩是一种常用的中药材,其主要活性成分为黄酮类化合物,包括黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等。查尔酮合酶基因是黄酮化合物生物合成途径的关键酶基因,其基因的表达水平与黄酮类化合物的积累密切相关。Pasold 等报道在拟南芥病害发生的过程中,*CHS* 基因的转录水平与黄酮含量均显著上升^[1],Kim 等报道紫外光刺激了大豆中黄酮醇的积累,与黄酮醇合酶的诱导表达有关^[2]。Jaakola 等报道了光照刺激可以促进 *CHS* 等黄酮生物合成途径上的关键酶基因,同时也诱导花青素、黄酮醇等化合物含量的提高^[3]。

药用植物的有效成分一般为次生代谢物,其表达水平是植物在发育调控下及各种生物或非生物诱发因子的诱导作用下,由其合成途径中的多个酶活性表达所决定,受诱发因子作用下的信号传递、转录因子活性、重要合成基因表达等多个环节的影响。其中转录因子与次生代谢物合成基因结合,激活其表达是次生代谢物合成途径启动前的重要分子事件,它不仅决定特定次生代谢物合成、积累量的多少,还决定次生代谢物合成的时间、空间分布以及对环境条件的响应。例如,玉米 *maysin* 的合成和积累量受到转录因子 *p1* 及结构基因 *c2* 和 *whp1* (*CHS* 的

编码基因)、*chi* (*CHI* 的编码基因)、*pr1* (病程相关蛋白基因)、*a1* (二氢黄酮醇-4-还原酶编码基因)及其他一些基因的控制^[4]。

本研究通过克隆黄芩查耳酮合酶基因的内含子序列,并结合影响有效成分积累的环境影响因子对内含子序列的功能进行初步分析,以期为进一步分析环境影响活性成分积累的机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 黄芩查耳酮合酶基因内含子序列的克隆 利用 CTAB 法提取黄芩总 DNA,根据 GeneBank 中黄芩查耳酮合酶基因序列 (AB008748) 设计引物:P1, 5'-AACATCAACCACCACTTCTCACTTCTC-3' 和 P2, 5'-GAGGGAGTTCCAGTCGGAGATGC-3'。以黄芩总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增反应,反应条件为:10 × PCR buffer 5 μL,10 pmol P1 引物 1 μL,10 pmol P2 引物 1 μL,Ex Taq 0.5 μL,DNA 1 μL。反应程序为 94 °C 预变性 5 min 后,94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 3 min,40 个循环后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,并送往北京华大基因公司进行测序。利用 CLUSTALW2 进行序列比对,确定查耳酮基因的内含子序列。

1.2 黄芩查耳酮合酶基因内含子序列的生物信息学分析 利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 软件对黄芩查耳酮合酶基因内含子序列的结构进行分析。

[稿件编号] 20101025007

[基金项目] 中国中医科学院自主选题 (ZZ2008062)

[通信作者] *袁媛,主要从事分子生药学研究, Tel: (010) 64014411-2956, E-mail: yyuan0732@gmail.com

1.3 植物表达载体的构建 根据黄芩查尔酮合酶基因内含子序列设计引物:P1,5'-CCATGGCTGCAG-CAGTGTACATAAT-3'和 P2,5'-AGATCTCTGCAG-CAGTGTACATAAT-3'。以黄芩总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增反应,反应条件为:10 × PCR buffer 5 μL,10 pmol P1 引物 1 μL,10 pmol P2 引物 1 μL,Ex Taq 0.5 μL,DNA 1 μL。反应程序为 94 °C 预变性 5 min 后,94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 1 min,40 个循环后 72 °C 延伸 10 min。在 T4 DNA 连接酶的作用下将 PCR 产物与 T-easy 载体连接,连接产物转化至 *E. coli* DH5α 感受态中,中间载体命名为 pIT。利用 *Nco*I 和 *Bgl*III 同时酶切 pIT 和 pCAMBIA1301,分别回收 100 bp 和 10 000 bp 片段,在 T4 DNA 连接酶的作用下将回收片段进行连接,连接产物命名为 pI1301。质粒的提取、酶切、DNA 片段制备、连接及转化均参照文献[5]进行。

1.4 烟草的转化和再生 将 pI1301 转入根癌农杆菌 LBA4404 中,采用叶盘法^[6]用含有 pI1301 的根癌农杆菌转化烟草。筛选转化苗的培养基为 MS 添加 200 mg · L⁻¹潮霉素,500 mg · L⁻¹羧苄霉素,1.0 mg · L⁻¹6-BA,0.2 mg · L⁻¹NAA;诱导生根培养基为 MS。

1.5 再生烟草植株的 PCR 检测 用 SDS 法从 T₀,T₁ 代烟草叶片中提取总 DNA^[7],PCR 检测所用引物为:GUS1,5'-GGTGGAAAGCGCGTTACAAG-3',GUS2,5'-GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA-3'。反应条件为:94 °C 变性 30 s,61 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环后,72 °C 保温 5 min。Hpt1,5'-ATTGACGCTTAGACA ACT -3',Hpt2,5'-AGAGGCG-TTTTGGGTATT -3',反应条件为 94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,30 个循环后,72 °C 保温 5 min。

1.6 非生物胁迫诱导 将 T₁代转基因烟草滤纸上萌发,长出子叶后加入含有 200 mg · L⁻¹潮霉素的蒸馏水筛选至长出真叶。挑选生长健壮、长势一致的幼苗进行非生物胁迫诱导,诱导条件分别为:10%,20%,30% PEG 分别处理 24,48,72 h;40 °C 处理 3,6,9 h;黑暗条件下处理 3,6,9 h;100 mmol · L⁻¹ ABA 处理 3,6,9 h;100 mmol · L⁻¹ MJ 处理 3,6,9 h。

1.7 GUS 活性的定量测定 取 100 mg 植物材料,加 400 μL GUS 蛋白提取缓冲液在 Eppendorf 管中研

磨成匀浆。离心后吸取 10 μL 上清液,加底物 4-methylumbelliferone-β-D-glucuronide 混匀,37 °C 保温 30 min 后终止反应,用 UARIAN 型荧光分光光度计测定 E365/455 荧光值^[8]。总蛋白含量按 Bradford^[12]的方法测定。GUS 活性以 MU 的纳摩尔数与总蛋白含量及时间的比值 μmol · g⁻¹ · min⁻¹表示。

2 结果与分析

2.1 查尔酮内含子序列的克隆与生物信息学分析 以黄芩总 DNA 为模版,利用引物 P1 和 P2 进行 PCR 反应,获得黄芩查尔酮合酶基因,测序结果表明该基因大小为 1 272 bp,利用 DNAMAN 软件对所获得序列与黄芩 cDNA 序列对比结果表明该基因由 2 个外显子和 1 个内含子组成,其中内含子 99 bp,具有 GT...AG 内含子结构特征。根据内含子序列设计验证引物 P3:5'-CTCCTCCATTCCATTCCATTC-CATACA-3'。利用 P1 和 P3 引物进行 PCR 反应,进行 PCR 反应,结果表明所获得内含子序列是可靠的。将内含子序列提交 GeneBank 数据库,注册号为 EU814894(图 1)。



图 1 黄芩查尔酮合酶 cDNA 与基因组序列比对

分别利用 SoftBerry 和 PlantCARE 软件对内含子序列的结构进行分析,在 NSITE 数据库中共寻找到 7 种调控元件及其相应的转录因子,在 PlantCARE 数据库中共寻找到 2 个调控元件(表 1),其中糊粉层核蛋白, BPC1, DEF/GLO 与器官发育有关,糊粉层核蛋白和 ABF-2 与激素信号有关,DEF/GLO, ABF-2 和 TCCC-motif 与外界刺激有关。

2.2 植物表达载体的构建与转基因烟草的获得 将内含子序列插入到植物表达载体 p1301 的 35S 启动子和 GUS 基因的中间,构建植物表达载体 pI1301(图 2)。利用根癌农杆菌 LBA4404 将植物表达载体 pI1301 和 p1301 分别整合到烟草的基因组

表1 内含子中的调控元件及其转录因子

调控元件	序列	位置/bp	转录因子/预测功能	正义(+)/反义(-)
Box 1	GCAGTG	94 — 89	糊粉层核蛋白	-
GA-4	AGAGAGGgA	18 — 10	BPC1	-
GA-5	AGAGAGgGA	18 — 10	BPC1	-
CArG2	ACaTAAATGG	67 — 58	DEF/GLO	-
ABI heptamer	TCTCAAA	16 — 22	ABF-2	+
TATA-box	TACAAAA	24 — 18, 61 — 54	核心启动子元件, 邻近 - 30 bp 处	-
TCCC-motif	TCTCCCT	7 — 13	光响应元件	+

中,对 T0, T1 代转基因烟草进行 PCR 检测。GUS, hpt 基因 PCR 检测结果表明 85.2% 的烟草为阳性植株(图 3)。

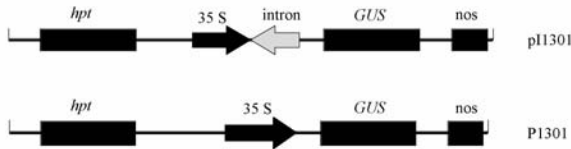
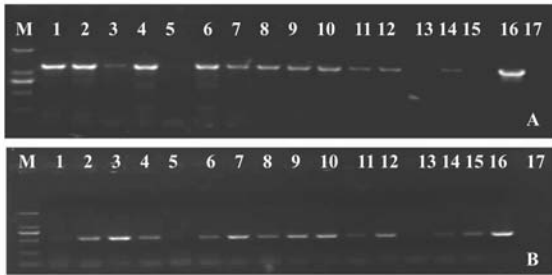


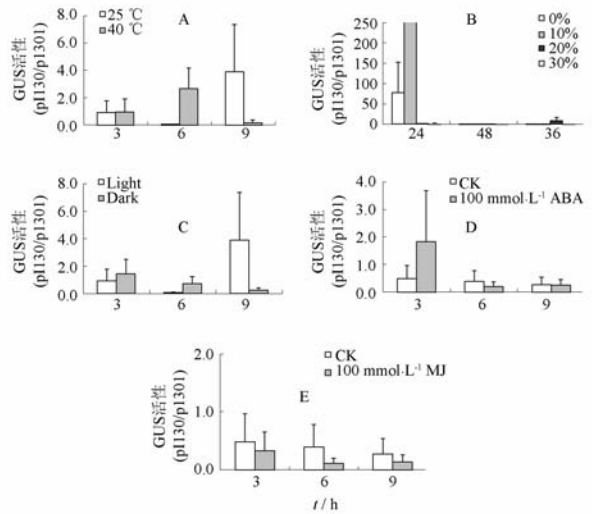
图2 植物表达载体 pI1301, pI301 图谱



A. GUS 基因片段 PCR 结果; B. hpt 基因片段 PCR 结果; M. 2 000 bp DNA marker; 1 ~ 15. 转基因烟草; 16. pI301; 17. 非转基因烟草。

图3 转基因植株 PCR 检测电泳

2.3 外界非生物刺激对查尔酮内含子调控基因表达的影响 选择 PCR 阳性植株进行非生物刺激诱导,每个转化子各 3 个株系。对诱导后转基因烟草中的 GUS 活性进行定量分析,结果表明 40 °C 和黑暗处理 6 h 后内含子序列促进 GUS 的活性,但处理 9 h 后则抑制 GUS 的活性。而 10% PEG 处理 24 h 后内含子序列促进 GUS 的活性,但其他 PEG 处理均抑制 GUS 的活性。ABA 和 MJ 处理对 GUS 的活性影响不显著(图 4)。



A. 高温胁迫下转基因烟草 GUS 活性; B. 暗处理的转基因烟草 GUS 活性; C. PEG 处理下转基因烟草 GUS 活性; D. ABA 处理下转基因烟草 GUS 活性; E. MJ 处理下转基因烟草 GUS 活性。

图4 非生物刺激对转基因烟草中 GUS 活性的影响

3 讨论

黄芩查尔酮合酶基因内含子序列全长 99 bp, 具有典型的内含子结构特征 GT...AG。生物信息学分析结果表明内含子序列中含有 7 种调控元件, 分别与植物的器官发育、激素信号、氧化胁迫、次生代谢等多个途径有关。其中 box I (GCAGTG) 与 pyrimidine box (CCTTT) 作为复合体与赤霉素响应有关^[9]。BPC1 与调控胚珠发育同源异型基因表达相关^[10], 并在钙信号调控授粉过程中发挥重要作用^[11]。CArG2 是 CC-6-GG 型的调控元件, 也是 MADS 转录因子的保守结合元件, 其与花的发育有着密切的联系^[12]。DEF/GLO 转录因子被认为与 MADS 转录因子具有类似的功能^[13]。ABF 转录因子是一个 ABA 响应的基因家族, 其表达受到不同胁迫条件的诱导^[14]。TCCC-motif 与光反应有关。



内含子序列与植物功能基因的表达有着密切的联系, Callis 等^[15]报道了乙醇脱氢酶基因内含子可以增强乙醇脱氢酶基因在玉米细胞中的表达水平。Sieburth 等^[16]报道了拟南芥 MADS box 基因非翻译区对调控该基因的时空表达具有重要作用。水稻 EPSP 合酶第一内含子也增强外源基因的表达^[17]。

在本研究中, 黄芩查尔酮合酶基因内含子序列被插入到 35S 启动子和 GUS 基因的中间, 构建植物表达载体并转化烟草, 以整合 p1301 的转基因烟草作为对照。在不同外界非生物胁迫的刺激下, 转基因烟草中 GUS 酶的活性发生了显著的变化。结果表明在内含子序列的调控作用下较长时间 (>6 h) 的高温和黑暗处理均抑制了 GUS 的活性, 而 PEG 模拟水分胁迫 (10% PEG) 则促进了 GUS 的活性。陈顺钦等研究表明, 高温和黑暗均抑制了黄芩中黄芩苷等有效成分的积累, 而土壤缺水则对总黄酮有一定的促进作用^[18-19]。从以上结果可以推测出: 黑暗条件下, 光响应调控元件 TCCC-motif 可能参与抑制黄芩苷生物合成酶基因的表达, 从而导致黄芩苷含量的降低; 研究表明高温条件会促使 ABA 的生物合成, 并抑制 GAs 的活性^[20]。本研究中发现在黄芩查耳酮合酶基因的非编码区存在 ABA 响应元件 AB1 heptamer 及 GA 响应元件 box I。可以推测在高温环境下 ABA 和 GA 都参与调节黄芩查耳酮合酶的表达; 水分胁迫条件下, 同样会促使植物体内的 ABA 积累^[21]。本研究发现, 水分胁迫能促使 GUS 基因的表达, 说明水分胁迫下 ABA 也可能参与了黄芩查耳酮合酶的表达调控; ABA 处理后没有观察到 GUS 活性显著变化, 说明在正常环境下, ABA 对查耳酮合酶的表达的调节作用不明显。上述研究结果表明黄芩查尔酮合酶基因内含子可能参与了外界环境对黄芩有效成分的调控。

内含子影响基因表达的机制目前尚未完全清晰, 目前有以下几种情况: ①依赖于内含子的转录水平增强; ②mRNA 前体的剪切与其他加工环节的相互作用; ③剪切对 mRNA 代谢的影响; ④剪切后效应^[22]。黄芩查尔酮合酶内含子中预测的 7 种调控元件参与黄芩苷生物合成的过程尚还需要进一步分析。

[参考文献]

[1] Pasold S, Siegel I, Seidel C, et al. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana* root galls caused by the obligate biotrophic

pathogen *Plasmodiophora brassicae*[J]. Mol Plant Pathol, 2010, 11(4):545.

[2] Kim B G, Kim J H, Kim J, et al. Accumulation of flavonols in response to ultraviolet-B irradiation in soybean is related to induction of flavanone 3-beta-hydroxylase and flavonol synthase[J]. Mol Cells, 2008, 25(2):247.

[3] Jaakola L, Maatta-Riihinen K, Karenlampi S, et al. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L) leaves[J]. Planta, 2004, 218(5):721.

[4] Cheong Y H, Chang H S, Gupta R, et al. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2002, 129(2):661.

[5] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[6] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. Science, 1985, 227:1229.

[7] Payne G, Ahl P, Moyer M, et al. Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(1):98.

[8] Blazquez M. Quantitative GUS activity assay in intact plant tissue [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2007(3):t4688.

[9] Guan L, Polidoros A N, Scandalios J G. Isolation, characterization and expression of the maize Cat2 catalase gene[J]. Plant Mol Biol, 1996, 30(5):913.

[10] Kooiker M, Airoidi C A, Losa A, et al. Basic pentacysteine1, a GA binding protein that induces conformational changes in the regulatory region of the homeotic *Arabidopsis* gene seedstick[J]. Plant Cell, 2005, 17(3):722.

[11] Rozwadowski K, Zhao R, Jackman L, et al. Characterization and immunolocalization of a cytosolic calcium-binding protein from *Brassica napus* and *Arabidopsis* pollen[J]. Plant Physiol, 1999, 120(3):787.

[12] Tilly J J, Allen D W, Jack T. The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene APETALA3 mediate diverse regulatory effects[J]. Development, 1998, 125(9):1647.

[13] Mouradov A, Hamdorf B, Teasdale R D, et al. A DEF/GLO-like MADS-box gene from a gymnosperm; *Pinus radiata* contains an ortholog of angiosperm B class floral homeotic genes[J]. Dev Genet, 1999, 25(3):245.

[14] Choi H, Hong J, Ha J, et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors[J]. J Biol Chem, 2000, 275(3):1723.

[15] Callis J, Fromm M, Walbot V. Introns increase gene expression in cultured maize cells[J]. Genes Dev, 1987, 1(10):1183.

[16] Sieburth L E, Meyerowitz E M. Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically[J]. Plant Cell, 1997, 9(3):355.

[17] 徐军望, 冯德江, 宋贵生, 等. 水稻 EPSP 合酶第一内含子增

- 强外源基因的表达[J]. 中国科学:C辑,2003,33(3):224.
- [18] 陈顺钦,袁媛,罗毓健,等. 光照对黄芩黄酮类活性成分积累及其相关基因表达的影响[J]. 中国中药杂志,2010,35(5):49.
- [19] 秦双双,陈顺钦,黄璐琦,等. 水分胁迫对黄芩内源激素与有效成分相关性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):99.
- [20] Toh S, Imamura A, Watanabe A, et al. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds[J]. Plant Physiol,2008,146(3):1368.
- [21] Wan X R, Li L. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene[J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,347(4):1030.
- [22] Le Hir H, Nott A, Moore M J. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression[J]. Trends Biochem Sci, 2003,28(4):215.

Preliminary functional analysis of intron in chalcone synthase gene from *Scutellaria baicalensis*

WU Chong^{1,2}, HUANG Luqi², YUAN Yuan^{2*}, ZHANG Nan², LIN Shufang²

(1. WuHan Polytechnic University, Wuhan, 430023, China;

2. Institute of Chinese Meteria Maddica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the function of the chalcone synthase gene introns in *Scutellaria baicalensis*, and clarify preliminarily their role in abiotic stress. **Method:** The *CHS* introns with specific primers were cloned and bioinformatic method was applied to predict the cis-elements in the intron of *CHS*. The introns were subcloned into binary vector, pCAMBIA-1301 before being transferred to tobacco. Then the activity of GUS of the transgenic tobacco seeds was analyzed. **Result:** Seven cis-elements were found in the introns. Under the dark and high temperature GUS expression rose at the first (3 h), but then declined (9 h). ABA and MeJA regulated insignificantly the GUS activity in normal temperature; treatment of 10% PEG induced GUS expression. **Conclusion:** *CHS* introns could be play a role in the regulation of *S. baicalensis* phenylpropanoid biosynthetic pathway.

[Key words] *Scutellaria baicalensis*; chalcone synthase; intron; abiotic stress

doi:10.4268/cjcmm20110329

[责任编辑 吕冬梅]