

紫丁香查尔酮异构酶基因 *SoCHI* 的克隆及表达分析

王蕊^{1,2}, 李彦慧², 郑健^{1,①}

(1. 北京农学院园林学院 北京林果业生态环境功能提升协同创新中心, 北京 102206; 2. 河北农业大学园林与旅游学院, 河北 保定 071000)

摘要: 采用 RACE 技术从紫丁香 (*Syringa oblata* Lindl.) 花中克隆获得查尔酮异构酶基因 (*CHI*) 的 cDNA 全长序列, 命名为 *SoCHI*, 其编码的蛋白质为 SoCHI 蛋白。序列分析结果表明: *SoCHI* 基因的开放阅读框 (ORF) 长度为 684 bp, 编码 227 个氨基酸残基, 并且, 该基因全部由外显子构成, 无内含子。SoCHI 蛋白理论相对分子质量 24 988, 理论等电点 pI 5.53, 不稳定系数为 47.58, 平均亲水指数为 -0.096, 并包含 2 个氢键结合位点、2 个活性催化位点和 7 个底物结合位点; 在该蛋白质的二级结构中, α -螺旋、延伸链和无规则卷曲分别占该蛋白质氨基酸残基总数的 31.7%、20.3% 和 48.0%。同源性比对结果表明: 紫丁香与其他 9 种植物 CHI 蛋白的同源性很高 (均在 76% 以上), 与同科 [木犀科 (Oleaceae)] 植物桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour.) 和油橄榄 (*Olea europaea* Linn.) CHI 蛋白的同源性更高 (达 88%)。实时荧光定量 PCR 扩增结果表明: *SoCHI* 基因的相对表达量在紫丁香的嫩叶中最高, 在成熟叶中次之; 该基因的相对表达量在紫丁香花发育过程中先上升后下降, 并在花蕾期达到最高。研究结果显示: *SoCHI* 基因编码的氨基酸序列相对保守, 且其表达与紫丁香花呈色关系密切。

关键词: 紫丁香; 查尔酮异构酶基因; 基因克隆; 序列分析; 同源性分析; 表达特性

中图分类号: Q943.2; S685.26 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2018)03-0011-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.03.02

Cloning and expression analysis on chalcone isomerase gene *SoCHI* in *Syringa oblata* WANG Rui^{1,2}, LI Yanhui², ZHENG Jian^{1,①} (1. Beijing Collaborative Innovation Center for Eco-environmental Improvement with Forestry and Fruit Trees, College of Landscape Architecture, Beijing Agricultural University, Beijing 102206, China; 2. College of Landscape Architecture and Tourism, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2018, 27(3): 11-17

Abstract: Full-length sequence of cDNA of chalcone isomerase gene (*CHI*) was cloned from flower of *Syringa oblata* Lindl. by RACE technology, which was named as *SoCHI*, its encoding protein was SoCHI protein. The sequence analysis result shows that the length of open reading frame (ORF) of *SoCHI* gene is 684 bp, which encodes 227 amino acid residues, and this gene is formed with entirely exons and without intron. The theoretical relative molecular mass of SoCHI protein is 24 988, its theoretical isoelectric point is pI 5.53, instability coefficient is 47.58, and average hydrophilic index is -0.096, which contains two hydrogen bond binding sites, two active catalytic sites, and seven substrate binding sites. In secondary structure of this protein, α -helix, extended strand, and random coil account for 31.7%, 20.3%, and 48.0% of total number of amino acid residues of this protein, respectively. The homology comparison result shows that there is a high homology of CHI protein in *S. oblata* with that in other nine species (more than 76%), and a much higher homology with that in the same family (Oleaceae) species *Osmanthus fragrans* Lour. and *Olea europaea* Linn. (up to 88%). The result of real-time fluorescence quantitative PCR amplification indicates that the relative expression level of *SoCHI* gene is the highest in tender leaf of *S. oblata*, and the second in mature leaf. The relative expression level of this gene increases firstly and then decreases during flower development process of *S. oblata*, and reaches

收稿日期: 2017-10-11

基金项目: 国家林木种质资源共享服务平台建设与运行服务项目 (2005DKA21003); 城乡生态环境北京实验室建设项目 (PXM2015_014207_000014)

作者简介: 王蕊 (1991—), 女, 天津宁河人, 硕士研究生, 主要从事林木花卉种质资源及育种方面的研究工作。

①通信作者 E-mail: buazhengjian708@126.com

the highest at budding stage. It is suggested that the amino acid sequence encoded by *SoCHI* gene is relatively conserved, and there is a close relationship between its expression and flower coloration of *S. oblata*.

Key words: *Syringa oblata* Lindl.; chalcone isomerase gene; gene cloning; sequence analysis; homology analysis; expression characteristics

黄酮类化合物是一类重要的植物次生代谢产物,在植物花色形成过程中具有重要作用。查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)在黄酮类化合物的合成过程中起关键作用,能够催化查尔酮异构化为 4,5,7-三羟基黄酮(naringenin),并在其他酶的催化作用下形成不同的黄酮类化合物^[1]。1967 年, Moustafa 等^[2]首先从大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 中纯化获得第 1 个 CHI 蛋白;20 年后, Mehdy 等^[3]首次从菜豆 (*Phaseolus vulgaris* Linn.) 中克隆获得 *CHI* 基因的 cDNA 序列;随后,研究人员从玉米 (*Zea mays* Linn.)^[4]、碧冬茄 [*Petunia hybrida* (J. D. Hook.) Vilm.]^[5]、银杏 (*Ginkgo biloba* Linn.)^[6]、番薯 [*Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.]^[7] 和金鱼草 (*Antirrhinum majus* Linn.)^[8] 等植物中均克隆到 *CHI* 基因。近年来,通过基因工程技术调控 *CHI* 基因表达、改变植物花色的研究屡见报道^[9-11],对于观花植物花色育种具有重要意义。

紫丁香 (*Syringa oblata* Lindl.) 又名华北紫丁香,隶属于木犀科 (Oleaceae) 丁香属 (*Syringa* Linn.), 为落叶灌木。紫丁香适应性强,耐寒、耐旱、耐瘠薄,病虫害较少,并具有花序硕大、开花繁茂及花色和花香独特等特点,是一种极具观赏价值的园林植物;该种可孤植、对植或片植,常作为公园、庭园和街头绿地的观花灌木广泛应用于中国北方园林绿化。目前,关于紫丁香的研究主要集中在花期^[12]、繁育技术^[13] 和抗逆生理^[14] 等方面,而关于其花色的研究尚处于起步阶段,仅见关于紫丁香花色素生物合成相关基因^[15] 的研究报道以及肉桂酸 4-羟化酶基因 (*SoC4H*) 时空表达模式^[16] 的研究报道。实际上,紫丁香花拥有从浅粉色到紫色再到深紫色等多种颜色,然而关于其花呈色的分子机制尚未清楚,阻碍了紫丁香花色育种研究进展。

为了探明紫丁香花色形成的分子机制,作者采用 RACE 技术从紫丁香花中克隆获得 *CHI* 基因的 cDNA 全长序列,对该基因编码蛋白质的理化性质、氨基酸序列同源性以及结构和功能进行了分析,并采用实时

荧光定量 PCR 技术对该基因在紫丁香不同器官和花期的表达特性进行了研究,以期明确紫丁香花色形成的分子机制,为利用基因工程技术培育紫丁香新品种提供理论基础和备选基因。

1 材料和方法

1.1 材料

在北京农学院林木种质资源圃内选择生长健壮且无病虫害的紫丁香植株,采集叶片和花,置于 -80 °C 冰箱中保存,分别用于总 DNA 和总 RNA 的提取;在该种质资源圃中随机选择 3 株生长健壮且无病虫害的紫丁香植株,在东、南、西、北 4 个方向分别采集嫩枝、嫩叶、成熟叶、花和根,并在花芽期、花蕾期、初花期、盛花期和末花期采集样株的花,单株样品混匀后置于 -80 °C 冰箱中保存,分别用于不同器官和花期紫丁香 *CHI* 基因的表达特性分析。

实验使用的 RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒、2×*EasyTaq*[®] PCR SuperMix、质粒提取试剂盒、pEASY-T 载体和大肠杆菌菌株 DH5α 感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司,切胶回收试剂盒和 SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus) 购自宝生物工程(大连)有限公司,3'RACE 和 5'RACE 试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;引物合成及测序工作均由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.2 方法

1.2.1 紫丁香 *CHI* 基因的克隆 参照李荣华等^[17] 的改良 CTAB 法提取紫丁香叶片的总 DNA。

使用 RNA 提取试剂盒,按照说明书操作流程提取紫丁香花的总 RNA;按照 RNA 反转录试剂盒说明书上的操作流程将提取的总 RNA 进行反转录,获得 cDNA 第 1 条链。使用 BLASTn 软件 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),将 Zheng 等^[15] 测序获得的紫丁香 *CHI* 基因序列与 NCBI 数据库中其他植物的 *CHI* 基因序列进行比对,确定 *CHI* 基因的保守区;

根据该基因的保守区序列设计引物 SoCHI-1F 和 SoCHI-1R (引物序列分别为 5'-TTGGAACCTACACCGATGCT-3' 和 5'-AACACCGTGCTTGCCAATTA-3'), 以 cDNA 第 1 条链为模板进行扩增反应, 获得紫丁香 *CHI* 基因 cDNA 序列的中间片段; 设计 3'RACE 引物 SoCHI-2F 和 SoCHI-3F (引物序列分别为 5'-CCAGAATCCGGGAATGCAGTTATATAG-3' 和 5'-CGGAAGCACTGCTGCAGTCTATAATTGGC-3'), 以 cDNA 第 1 条链为模板, 使用 3'RACE 试剂盒进行扩增反应, 获得紫丁香 *CHI* 基因 cDNA 序列的 3' 端片段; 设计 5'RACE 引物 SoCHI-2R 和 SoCHI-3R (引物序列分别为 5'-GGAAAGTTTCGTTCTTGAAGACC-3' 和 5'-CTCCAAGAAGTTTCAATTGCTTTAGAC-3'), 以 cDNA 第 1 条链为模板, 使用 5'RACE 试剂盒进行扩增反应, 获得紫丁香 *CHI* 基因 cDNA 序列的 5' 端片段。扩增产物经电泳检测、胶回收、连接载体、转化大肠杆菌、检测阳性克隆和测序后, 使用 DNAMAN 7.0 软件将扩增获得的紫丁香 *CHI* 基因 cDNA 序列的中间片段、3' 端片段和 5' 端片段进行拼接, 获得紫丁香 *CHI* 基因的 cDNA 全长序列。

设计能够扩增出紫丁香 *CHI* 基因的完整开放阅读框(ORF)的引物 SoCHI-4F 和 SoCHI-4R (引物序列分别为 5'-ATGTCTTTGTCGCCGACCGT-3' 和 5'-TCAATTTGGCACGGTGGCCT-3'), 分别以 cDNA 第 1 条链和总 DNA 为模板进行扩增反应, 扩增体系总体积 20.0 μL , 包括 cDNA 第 1 条链或总 DNA 1.0 μL , 上游引物和下游引物各 0.4 μL , $2\times\text{EasyTaq}^{\circledR}$ PCR SuperMix 10.0 μL , ddH₂O 8.2 μL 。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 30 个循环反应; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物经电泳检测、胶回收、连接载体、转化大肠杆菌和检测阳性克隆后进行测序。

1.2.2 紫丁香 *CHI* 基因序列分析及编码蛋白质特性分析 使用 DNAMAN 7.0 软件寻找紫丁香 *CHI* 基因 cDNA 序列的开放阅读框, 预测该基因编码蛋白质的氨基酸序列; 使用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站中的 BLASTp 软件对该基因编码蛋白质的氨基酸序列进行保守域预测, 并与 NCBI 网站 UniProt 数据库中其他植物 CHI 蛋白的氨基酸序列进行同源性比对; 使用 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 网站中的 Compute PI/MW tool 工具对该基因编码蛋白质的理论相对分子质量和理论等电点进行分析; 同时,

使用 GOR4 和 Swiss-Model 软件分别对该基因编码蛋白质的二级和三级结构进行预测分析。

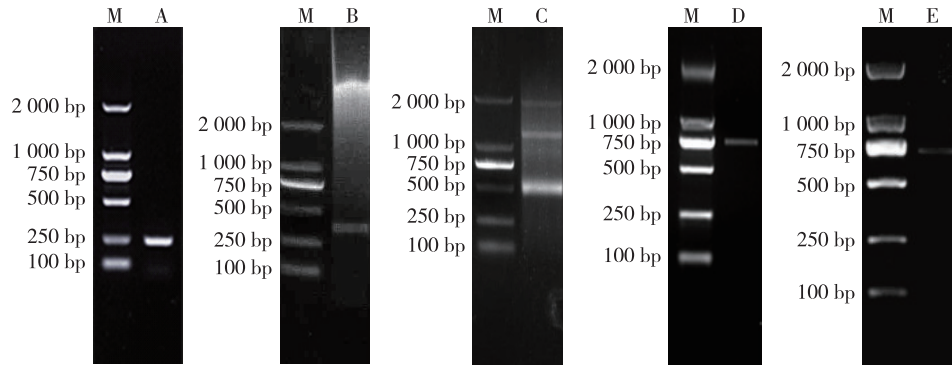
1.2.3 紫丁香 *CHI* 基因的表达特性分析 参照苑笑阳等^[18]的方法, 以 *SoActin7* 为内参基因, 采用实时荧光定量 PCR 技术对紫丁香嫩枝、嫩叶、成熟叶、花和根以及花芽期、花蕾期、初花期、盛花期和末花期花中 *CHI* 基因的相对表达量进行检测, 每个单株视为 1 个重复, 共 3 个重复。使用的荧光定量 PCR 扩增引物为 SoCHI-5F 和 SoCHI-5R (引物序列分别为 5'-CACCGTGCTTGCCAATTATAGA-3' 和 5'-GAATCCGGGAATGCAGTTATAGA-3'), 内参基因扩增引物为 *SoActin-7F* 和 *SoActin-7R* (引物序列分别为 5'-TGGAATGTGCTGAGAGATGC-3' 和 5'-TGCTGACCGTATGAGCAAAG-3')。使用 Bio-Rad iQTM 5 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)进行扩增反应, 扩增体系总体积 25.0 μL , 包括 cDNA 模板 1.0 μL , 上游引物和下游引物各 1.0 μL , SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 12.5 μL , ddH₂O 9.5 μL 。根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算紫丁香 *CHI* 基因在不同器官和花期的相对表达量。

2 结果和分析

2.1 紫丁香 *CHI* 基因 cDNA 和 gDNA 的全长序列分析

扩增结果表明: 以紫丁香花中 cDNA 第 1 条链为模板扩增获得的紫丁香 *CHI* 基因 cDNA 序列的中间片段长度为 247 bp (图 1-A), 通过与 NCBI 数据中的数据进行了比对, 该片段编码的蛋白质与多种植物 *CHI* 基因编码的蛋白质的同源性达 90% 以上; 根据同源特异片段序列分别设计 3'RACE 和 5'RACE 特异引物进行扩增, 分别获得紫丁香 *CHI* 基因 cDNA 序列的 3' 端片段 (图 1-B) 和 5' 端片段 (图 1-C), 序列长度分别约为 270 和 460 bp; 将上述 3 个片段测序后进行拼接, 获得紫丁香 *CHI* 基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *SoCHI*。根据 *SoCHI* 基因 3' 端片段和 5' 端片段的序列设计引物, 分别以紫丁香 cDNA 第 1 条链和总 DNA 为模板, 扩增获得该基因 cDNA (图 1-D) 和 gDNA (图 1-E) 的全长序列, 经比对, *SoCHI* 基因的 cDNA 序列与拼接后得到的 cDNA 序列一致, 并且, 该基因无内含子, 全部由外显子构成。

分析结果 (图 2) 表明: *SoCHI* 基因的开放阅读框



M: DNA marker; A: 中间片段 Intermediate fragment; B: 3'端片段 3' terminal fragment; C: 5'端片段 5' terminal fragment; D: cDNA 全长序列 Full-length sequence of cDNA; E: gDNA 全长序列 Full-length sequence of gDNA.

图 1 紫丁香 *SoCHI* 基因的扩增结果
Fig. 1 Amplification result of *SoCHI* gene in *Syringa oblata* Lindl.

```

1 ATGTCCTTTGTCGCCGACCGTGACGCAGCTCCAAGTCGGTTCCTACTTGTTCGGGGTGGTGCAGCCTCCAGGCTCCACCAATTCCTTA
  M S L S P T V T Q L Q V G S Y L F P A V V Q P P G S T N S L
91 TTCTCGGAGGCGCAGGTCCGAGGGGTTGTCAGATCGACGCAAGTTCATCAAGTTCACGGCGATCGGGGTACTTGAAGATAACGCC
  F L G G A G P R G L Q I D G K F I K F T A I G V Y L E D N A
181 GTTCGTCGCTCGCATTAAAGTGAAAGGGAAGAGCGCAGAGGAGTTGGCGGATCCGTCGAGTTCTTCAACGACATCGTTACAGGTCGCC
  V P S L A F K W K G K S A E E L A D S V E F F N D I V T G P
271 TTCAAAAAATTCACACGAGTGACAATGATTTTGCCTTAACGGTCCACAATACTCAGAGAAGGTAGCCGAGAAGTGGCTGCTCATTGG
  F K K F T R V T M I L P L T G P Q Y S E K V A E N C V A H W
361 AAAGCAATGGAACCTACACCGATGCTGAGTCTAAAGCAATTGAAAAGTCTTGGAGGTCTTCAAGAACGAAACTTCCCACCCGGTTCC
  K A I G T Y T D A E S K A I E K F L E V F K N E T F P P G S
451 TCCATCTTTTCACTCAATCACCCTGGATCATTGACGATCAGTTTCTCAAAAGGTGATCCGATTCCTCCAGAATCCGGGAATGCA
  S I L F T Q S P L G S L T I S F S K G D S D S F P E S G N A
541 GTTATAGAGAACAACAACACTATCGGAAGCAGTGTGCAGTCTATAATTGGCAAGCACGGTGTTCCTCCCTGAAGCTAAACAGAGTTAGCT
  V I E N K Q L S E A V L Q S I I G K H G V S P E A K Q S L A
631 GCAAGACTATCGGAGTCTTCAAGAATCCGAGAAGGCCACCGTGCCAAATTGA
  A R L S E F F K E S E K A T V P N *
    
```

_: 底物结合位点 Substrate binding site; □: 氢键结合位点 Hydrogen bond binding site; ▲: 活性催化位点 Active catalytic site; *: 终止密码子 Stop condon.

图 2 紫丁香 *SoCHI* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列
Fig. 2 cDNA sequence of *SoCHI* gene in *Syringa oblata* Lindl. and its amino acid sequence encoded

(ORF)长度为 684 bp, 编码 227 个氨基酸残基, 编码的蛋白质为 SoCHI 蛋白。

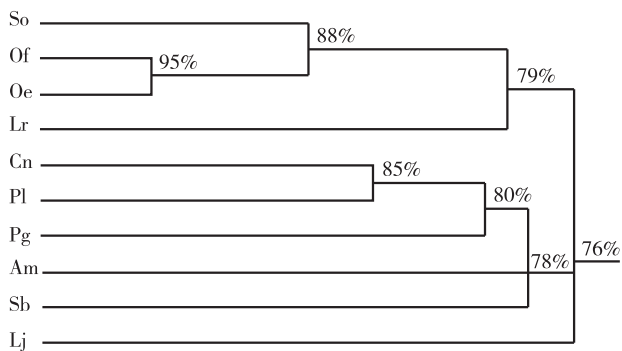
2.2 SoCHI 蛋白特性分析

2.2.1 理化性质分析 分析结果表明: SoCHI 蛋白的理论相对分子质量 24 988, 理论等电点 pI 5. 53; 其氨基酸序列包含 21 个带正电荷的氨基酸残基[精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)]和 24 个带负电荷的氨基酸

残基[天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)], 并且, 丝氨酸(Ser)、Lys、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)和亮氨酸(Leu)含量较高; SoCHI 蛋白的不稳定系数为 47. 58, 说明该蛋白质属于不稳定蛋白; 其平均亲水指数为 -0. 096, 说明该蛋白质为亲水性蛋白。

2.2.2 氨基酸序列同源性分析 将 SoCHI 蛋白的氨基酸序列与 NCBI 网站 UniProt 数据库中其他植物

CHI 蛋白的氨基酸序列进行比对,桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour.)、油橄榄 (*Olea europaea* Linn.)、黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.)、金花茶 (*Camellia nitidissima* Chi)、忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb.)、金鱼草、黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)、芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 和石榴 (*Punica granatum* Linn.) 9 种植物与紫丁香 CHI 蛋白的氨基酸序列相似性较高,同源性比对结果(图 3)表明:紫丁香与同科植物桂花(登录号为 ALL27265.1)和油橄榄(登录号为 AHI86005.1)CHI 蛋白的同源性最高,为 88%;其与黑果枸杞(登录号为 AHH86092.1)、金花茶(登录号为 ADZ28513.1)、忍冬(登录号为 AGE10599.1)、金鱼草(登录号为 BA032070.1)、黄芩(登录号为 AMW91737.1)、芍药(登录号为 AEK32592.1)和石榴(登录号为 AHZ97871.1)CHI 蛋白的同源性也较高,均在 76%以上。



So: 紫丁香 *Syringa oblata* Lindl.; Of: 桂花 *Osmanthus fragrans* Lour.; Oe: 油橄榄 *Olea europaea* Linn.; Lr: 黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr.; Cn: 金花茶 *Camellia nitidissima* Chi; Pl: 芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.; Pg: 石榴 *Punica granatum* Linn.; Am: 金鱼草 *Antirrhinum majus* Linn.; Sb: 黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi; Lj: 忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.

图 3 紫丁香及其他 9 种植物 CHI 蛋白氨基酸序列的同源性比对
Fig. 3 Homology comparison on amino acid sequences of CHI protein in *Syringa oblata* Lindl. and other nine species

2.2.3 结构及功能位点分析 对 SoCHI 蛋白二级结构的预测分析结果表明:在 SoCHI 蛋白的二级结构中, α -螺旋、延伸链和无规则卷曲分别包含 72、46 和 109 个氨基酸残基,各占氨基酸残基总数的 31.7%、20.3%和 48.0%。对 SoCHI 蛋白的三级结构进行建模(图 4),该蛋白质三级结构模型的 QMEAN 得分为 0.78,且该蛋白质的三级结构与拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] AtCHI 蛋白三级结构的相似性为 67.3%。

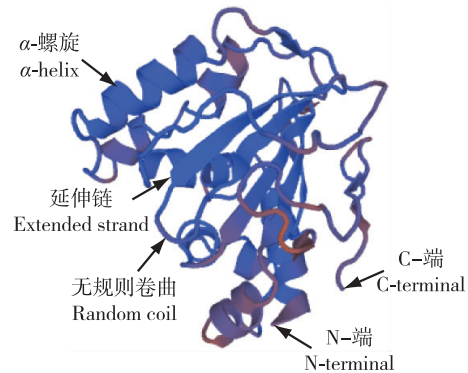
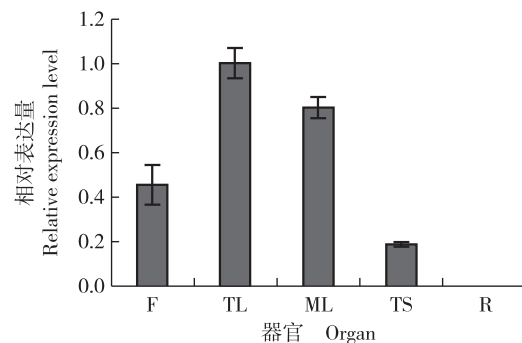


图 4 紫丁香 SoCHI 蛋白的三级结构
Fig. 4 Tertiary structure of SoCHI protein in *Syringa oblata* Lindl.

对 SoCHI 蛋白功能位点的分析结果(图 2)表明:该蛋白质含有 2 个保守的氢键结合位点、2 个活性催化位点和 7 个底物结合位点,氢键结合位点分别位于第 50 位的苏氨酸(Thr)和第 108 位的酪氨酸(Tyr)处;活性催化位点分别位于第 115 位的天冬酰胺(Asn)和第 208 位的 Ser 处,底物结合位点分别位于第 38 位的 Arg 处、第 39 位的 Gly 处、第 40 位的 Leu 处、第 49 位的苯丙氨酸(Phe)处、第 52 位的异亮氨酸(Ile)处、第 111 位的 Lys 处和第 112 位的缬氨酸(Val)处。这些位点均高度保守且相对位置保持不变。

2.3 SoCHI 基因在紫丁香不同器官和花期的表达特性分析

2.3.1 在不同器官的表达特性分析 研究结果(图 5)表明:SoCHI 基因在紫丁香的花、嫩叶、成熟叶、嫩

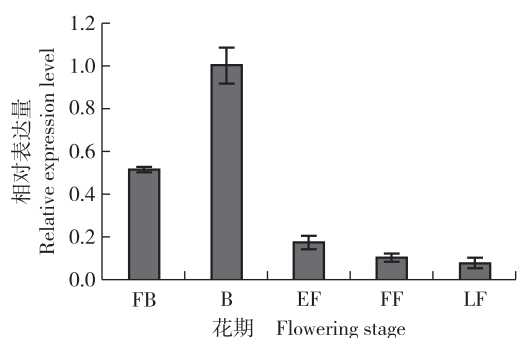


F: 花 Flower; TL: 嫩叶 Tender leaf; ML: 成熟叶 Mature leaf; TS: 嫩茎 Tender stem; R: 根 Root.

图 5 紫丁香不同器官中 SoCHI 基因的相对表达量
Fig. 5 Relative expression level of SoCHI gene in different organs of *Syringa oblata* Lindl.

枝和根中均有表达,但其相对表达量存在明显差异,表现为在嫩叶中最高,在成熟叶中次之,在花中也较高,在嫩茎中较少,在根中极低。

2.3.2 在不同花期的表达特性分析 研究结果(图6)表明:*SoCHI* 基因在紫丁香花芽期、花蕾期、初花期、盛花期和末花期均有表达,但其相对表达量存在明显差异,表现为在花蕾期最高,在花芽期次之,在初花期和盛花期较低,在末花期最低。



FB: 花芽期 Flower bud stage; B: 花蕾期 Budding stage; EF: 初花期 Early flowering stage; FF: 盛花期 Full flowering stage; LF: 末花期 Late flowering stage.

图 6 不同花期紫丁香花中 *SoCHI* 基因的相对表达量
Fig. 6 Relative expression level of *SoCHI* gene in flower of *Syringa oblata* Lindl. at different flowering stages

3 讨论和结论

紫丁香是中国北方地区常见的乡土树种之一,亦是国内重要的木本花卉种类,花色和花香独特,被广泛用于园林绿化。本研究成功获得紫丁香查尔酮异构酶(CHI)完整的同源基因,命名为 *SoCHI*,该基因的开放阅读框(ORF)长度为 684 bp,编码 227 个氨基酸残基,编码的蛋白质为 *SoCHI* 蛋白。相关研究结果表明:*CHI* 基因为多基因家族,且基因的结构变异较大,如油橄榄的 *OeCHI* 基因及 *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen 的 *LjCHI1* 和 *LjCHI3* 基因均包含 4 个外显子和 3 个内含子^[19-20],大麦(*Hordeum vulgare* Linn.)的 *HvCHI* 基因包含 3 个外显子和 2 个内含子^[21],芸薹属(*Brassica* Linn.)植物的 *BrCHI-2*、*BoCHI-2* 和 *BnCHI-2* 基因均包含 6 个外显子和 5 个内含子^[22]。与上述植物 *CHI* 基因不同的是,紫丁香 *SoCHI* 基因无内含子。

蛋白质二级结构预测结果表明:无规则卷曲在 *SoCHI* 蛋白的二级结构中所占比例最大(48.0%),

α -螺旋次之(31.7%),延伸链最小(20.3%)。另外,*SoCHI* 蛋白的氨基酸序列具有保守的氢键结合位点、活性催化位点和底物结合位点,与油橄榄和金花茶等植物 *CHI* 蛋白的结构相似^[19,23],属于查尔酮合酶超家族。同源性比对结果表明:紫丁香 *SoCHI* 蛋白与蔷薇科(Rosaceae)、山茶科(Theaceae)、忍冬科(Caprifoliaceae)、茄科(Solanaceae)、唇形科(Lamiaceae)及芍药科(Paeoniaceae)植物 *CHI* 蛋白的氨基酸序列同源性略低于同科植物油橄榄和桂花的 *CHI* 蛋白,表明 *CHI* 蛋白的氨基酸序列在不同植物中相对保守。

本研究中,*SoCHI* 基因在紫丁香嫩叶中的相对表达量最高,其次为成熟叶,这可能是紫丁香嫩叶色素积累并呈现紫红色的重要原因。相关研究结果^[24-26]表明:查尔酮异构酶处于植物体内黄酮类化合物合成途径的上游,对黄酮类化合物等次生代谢产物的合成具有重要作用,并且,*CHI* 基因主要在生命活动较旺盛的器官中表达。

周兴文等^[23]的研究结果表明:*CHI* 基因在植物花呈色过程中起重要作用,且植物的花色苷含量随该基因表达量升高而升高。在紫丁香花发育过程中,*SoCHI* 基因的相对表达量呈先升高后降低的变化趋势,在花发育早期特别是花蕾期最高,这一研究结果与紫丁香花蕾期花蕾颜色浓于盛花期和末花期花冠裂片颜色的现象相吻合。另外,*CHI* 基因在金花茶^[23]和红掌(*Athurium andraeanum* Lind.)^[27]等植物花发育过程中也存在类似的表达模式。根据上述研究结果推测 *CHI* 基因的表达量在不同植物花发育前期明显升高有助于植物体内花色素的积累。

综上所述,*SoCHI* 基因无内含子,全部由外显子构成;*SoCHI* 蛋白属于不稳定蛋白和亲水性蛋白,其氨基酸序列相对保守;并且,*SoCHI* 基因的表达与紫丁香花呈色关系密切。

参考文献:

- [1] SASLOWSKY D E, DANA C D, WINKELSHIRLEY B. An allelic series for the chalcone synthase locus in *Arabidopsis* [J]. *Gene*, 2000, 255(2): 127-138.
- [2] MOUSTAFA E, WONG E. Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed [J]. *Phytochemistry*, 1967, 6(5): 625-632.
- [3] MEHDY M C, LAMB C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection [J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6(6): 1527-1533.

- [4] GROTEWOLD E, PETERSON T. Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavanone isomerase [J]. *Molecular and General Genetics*, 1994, 242(1): 1-8.
- [5] VAN TUNEN A J, KOES R E, SPELT C E, et al. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes [J]. *The EMBO Journal*, 1988, 7(5): 1257-1263.
- [6] CHENG H, LI L, CHENG S, et al. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (*GbCHI*) from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(1): 49-62.
- [7] ZHANG Z, QIANG W, LIU X, et al. Molecular cloning and characterization of the chalcone isomerase gene from sweetpotato [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(65): 14443-14449.
- [8] FUJINO N, YAMAZAKI T, LI Y, et al. cDNA cloning and characterization of chalcone isomerase-fold proteins from snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) flowers [J]. *Plant Biotechnology*, 2014, 31(2): 105-114.
- [9] TAKAMURA T, TOMIHAMA T, MIYAJIMA I. Inheritance of yellow-flowered characteristic and yellow pigments in diploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) cultivars [J]. *Scientia Horticulturae*, 1995, 64(1/2): 55-63.
- [10] ITOH Y, HIGETA D, SUZUKI A, et al. Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*) [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43(5): 578-585.
- [11] NISHIHARA M, NAKATSUKA T, YAMAMURA S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(27): 6074-6078.
- [12] 徐雨晴, 陆佩玲, 于强. 气候变化对我国刺槐、紫丁香始花期的影响 [J]. *北京林业大学学报*, 2004, 26(6): 94-97.
- [13] 李广春, 孙丽萍. 紫丁香扦插育苗技术试验研究 [J]. *林业科技情报*, 2006, 38(3): 1.
- [14] 赵晓丽, 于艳, 孙文静, 等. SO₂胁迫对紫丁香和连翘叶片生理生化指标的影响 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2008, 43(6): 81-85.
- [15] ZHENG J, HU Z, GUAN X, et al. Transcriptome analysis of *Syringa oblata* Lindl. inflorescence identifies genes associated with pigment biosynthesis and scent metabolism [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142542.
- [16] 王蕊, 王羽, 李彦慧, 等. 华北紫丁香肉桂酸 4-羟化酶 (*SoC4H*) 基因的克隆及表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2016, 14(8): 2025-2030.
- [17] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法 [J]. *实验室研究与探索*, 2009, 28(9): 14-16.
- [18] 苑笑阳, 吴雪君, 聂力, 等. 芹菜品种‘六合黄心芹’ *AgCCoAOMT* 基因的克隆及表达特性分析 [J]. *植物资源与环境学报*, 2016, 25(3): 19-27.
- [19] 陈文拴, 黄乾明, 陈华萍, 等. 油橄榄查尔酮合酶与查尔酮异构酶基因全长的克隆及序列分析 [J]. *食品科学*, 2015, 36(9): 117-124.
- [20] SHIMADA N, AOKI T, SATO S, et al. A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5-deoxy (iso) flavonoids in *Lotus japonicus* [J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(3): 941-951.
- [21] DRUKA A, KUDRNA D, ROSTOKS N, et al. Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): physical, genetic and mutation mapping [J]. *Gene*, 2003, 302(1): 171-178.
- [22] 曹廷. 芸薹属查尔酮异构酶基因家族的克隆与功能鉴定 [D]. 重庆: 西南大学农学与生物科技学院, 2011: 33-34.
- [23] 周兴文, 李纪元, 范正琪. 金花茶查尔酮异构酶基因全长克隆与表达的初步研究 [J]. *林业科学研究*, 2012, 25(1): 93-99.
- [24] 张水明, 涂佳丽, 阿不都热扎克·依沙克, 等. 桂花查尔酮异构酶 *OjCHI* 基因的克隆与表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2016, 36(9): 1728-1734.
- [25] 刘长英, 赵爱春, 李军, 等. 桑树查尔酮异构酶基因的克隆与原核表达分析 [J]. *林业科学*, 2013, 49(2): 39-45.
- [26] 李静. 红肉脐橙和‘国庆四号’温州蜜柑中 *CHS* 和 *CHI* 基因的克隆与表达及其对类黄酮积累的调控机制 [D]. 武汉: 华中农业大学园艺林学学院, 2009: 32-33.
- [27] 杨哲, 刘克林, 彭佳佳, 等. 红掌查尔酮异构酶基因的克隆与表达分析 [J]. *园艺学报*, 2016, 43(7): 1402-1410.

(责任编辑: 佟金凤)