

大豆查尔酮还原酶基因 *GmCHR* 的克隆与植物表达载体构建

刘江,陈沛,邢光南,赵团结,李艳,盖钧铭

(南京农业大学大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏南京210095)

摘要:黄酮类化合物在植物中参与过滤紫外线、固氮和花色形成等过程,异黄酮对人体有抗氧化、预防乳腺癌等保健作用。查尔酮还原酶(chalcone reductase,CHR)是植物中参与黄酮类化合物代谢的重要酶。克隆大豆查尔酮还原酶基因并构建植物表达载体,有助于进一步研究其功能和异黄酮的代谢过程。采用RT-PCR方法,从栽培大豆(*Glycine max*)南农1138-2中,克隆得到了第14号染色体上的一个编码大豆查尔酮还原酶(chalcone reductase,CHR)的基因,命名为*GmCHR*。该基因含有948 bp长的编码区序列(Coding DNA Sequence,CDS),编码315个氨基酸。预测其蛋白质分子量为35.5 kDa,等电点为6.32。与其他豆科植物中的查尔酮还原酶相比,*GmCHR*蛋白序列与葛藤(*Puerariae montana*)CHR的相似性最高,达94%。组织表达分析表明,在自然生长条件下*GmCHR*在叶中的表达量最大;其次是种子;在花和茎中相同;在根中的表达量最小。利用Gateway方法获得植物过表达载体pMDC83-*GmCHR*,经检测表明过表达载体已成功转化农杆菌EHA105,为今后进一步了解*GmCHR*在大豆异黄酮代谢过程中的功能提供材料基础。

关键词:大豆;异黄酮;查尔酮还原酶;基因表达

中图分类号:S565.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9841(2013)02-0139-04

Cloning of the Soybean Chalcone Reductase Gene *GmCHR* and Construction of Its Plant Expression Vector

LIU Jiang, CHEN Pei, XING Guang-nan, ZHAO Tuan-jie, LI Yan, GAI Jun-yi

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/MOA Key Laboratory for Biology and Genetic Improvement of Soybean(General)/National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: Flavonoids are involved in UV filtration, symbiotic nitrogen fixation and floral pigmentation in plants. Isoflavones have potential effects on human health, such as antioxidant activity, preventing breast cancer and other cancers. Chalcone reductase (CHR) is an important enzyme involved in flavonoid biosynthesis. Cloning of soybean chalcone reductase and construction of its plant expression vector would help study its function and the phenylpropanoid pathway. A gene encoding CHR on chromosome 14 was cloned from the cultivated soybean (*Glycine max*) cultivar Nannong 1138-2 using RT-PCR, and was designated as *GmCHR*. This gene contains a coding DNA sequence (CDS) of 948 bp, and the corresponding protein consists of 315 amino acids. The protein is estimated to have a molecular weight of 35.5 kDa and isoelectric point of 6.32. Comparing with the amino acid sequence of CHR from other legume species, *GmCHR* has a highest similarity of 94% with the CHR from *Puerariae montana*. The mRNA abundance of *GmCHR* was the highest in leaves, followed by seeds, flowers, stems and roots under normal growth conditions. A plant over-expression vector of pMDC83-*GmCHR* was constructed by Gateway technology, and was transferred into *Agrobacterium* EHA105, which would provide the opportunity to study the function of *GmCHR* in soybean flavonoid biosynthesis.

Key words: Soybean; Isoflavone; Chalcone reductase; Gene expression

大豆[*Glycine max*(L.)Merr.]起源于我国,是世界上重要的粮食和油料作物之一。黄酮类化合物是大豆中重要的多酚类次级代谢产物。对植物而言,黄酮类化合物作为色素吸引昆虫传播花粉和种子,并且具有清除紫外线对植物造成的DNA突变和抵御病原菌等作用^[1-3]。对人类健康而言,异

黄酮具有抗氧化、调节心血管系统、抗癌、防癌等作用,对人体保健有多种功效,故而愈来愈受到人类的高度关注^[4]。

查尔酮还原酶(chalcone reductase,CHR)是植物中参与黄酮、异黄酮代谢的重要酶,它与查尔酮合成酶CHS共同作用,催化香豆辅酶A(coumaroyl-

收稿日期:2013-01-18

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973计划”(2009CB1184,2011CB1093);国家自然科学基金(31071442);江苏省优势学科建设工程专项和国家重点实验室自主课题;国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-04);农业部大豆生物学与遗传育种创新团队。

第一作者简介:刘江(1986-),男,硕士,主要从事大豆分子育种与基因工程研究。E-mail:scottmrl@163.com。

通讯作者:李艳(1975-),女,教授,主要从事大豆遗传育种及基因组学研究。E-mail:yanli1@njau.edu.cn。

盖钧铭(1936-),男,教授,中国工程院院士,主要从事大豆种质资源、遗传育种及数量遗传研究。E-mail:sir@njau.edu.cn。

CoA),生成异草苜素(6'-脱氧查尔酮)。查尔酮和脱氧查尔酮是形成多种黄酮和异黄酮的前体。异草苜素在查尔酮异构酶(CHI)和异黄酮合酶(IFS)催化下生成大豆苜元(Daidzein)^[4]。Roland 等^[5]从大豆栽培品种 Harosoy63 中首次分离出查尔酮还原酶,并证明其与查尔酮合成酶协同作用催化香豆辅酶 A 生成异甘草素。Liu^[6]通过与紫花苜蓿(*Medicago sativa*)查尔酮还原酶同源的大豆 EST 序列设计引物,从大豆品种 Dianfeng-1 中克隆到一段查尔酮还原酶的全长 cDNA(EU921437.1),半定量检测显示该基因在大豆的根、茎、叶、胚和花中均有表达,且在花中优势表达。

本研究将 Liu^[6]已报道的查尔酮还原酶基因 cDNA 序列与已发表的大豆品种 Williams82 的全基因组序列进行比对,发现该基因位于第 2 号染色体上,但同时第 14 号染色体上存在一条同源序列。并根据这段第 14 号染色体上的查尔酮还原酶基因序列设计特异性引物,克隆了该基因的全长 cDNA(*GmCHR*),并进行生物信息学分析和组织表达分析。利用 Gateway 技术构建 *GmCHR* 的植物过表达载体,为今后通过大豆遗传转化进一步了解 *GmCHR* 在大豆异黄酮代谢过程中的功能提供材料基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

栽培大豆南农 1138-2,由南京农业大学国家大豆改良中心种质资源研究室提供。大豆材料于 2011 年 6 月在南京农业大学江浦实验基地种植,常规田间管理。出苗后 10 d 取叶片、茎和根;盛花期取花;盛花期后 20 d 取豆荚,剥离出种子。取样后,即刻用液氮速冻,置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 cDNA 第一链的合成

用 QIAGEN TRIZOL 试剂盒提取自然生长状态下栽培大豆南农 1138-2 根、茎、叶片、花、种子的总 RNA。用 TaKaRa 生物公司的 cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,合成 cDNA。

1.3 GmCHR 基因的克隆

首先,在大豆数据库(<http://soybase.org/>)中,将 NCBI 所登录的大豆查尔酮还原酶基因序列(序列号:EU921437.1)与大豆全基因组进行 BLAST 比对,发现该基因位于第 2 号染色体上,同时第 14 号染色体上存在一条同源序列。针对第 14 号染色体上的查尔酮还原酶同源基因,用 Primer5 设计了一对特异引物,用于 RT-PCR 克隆该基因。上游引物 *GmCHR*-F: 5' TTTGAGAGTTAGAATGGCTGC 3',下游引物 *GmCHR*-R:5' CGTAAAATGAAACAAGAGGTAAA 3'。扩增程序:95℃ 预变性 5 min,94℃ 40 s,54.5℃ 30s,72℃ 1.5 min,30 个循环,72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,然后用 Bio-Rad 凝

胶成像系统进行检测和记录。将 PCR 产物回收后与 T-vector 连接,转化大肠杆菌感受态细胞,筛选阳性克隆送 Invitrogen 公司进行测序。

1.4 生物信息学分析

GmCHR 编码的氨基酸序列、蛋白质分子量、等电点由软件 BioXM2.6 分析。通过 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl 分析其蛋白二级结构。通过网站 [Http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/](http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/),对 *GmCHR* 蛋白进行信号肽预测。将 *GmCHR* 编码的蛋白序列利用 ClustalX2 与 NCBI 上登录的其他豆科植物中的查尔酮还原酶进行比对,包括紫花苜蓿(*Medicago sativa*)^[7]、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、黄芪(*Astragalus mongholicus*)^[8]、百脉根(*Lotus corniculatus japonicus*)^[9]、甘草(*Glycyrrhizae Puerariae*)和葛藤(*Puerariae montana*)等,并利用 MEGA 绘制进化树。

1.5 组织表达分析

以合成的 cDNA 为模板进行荧光定量分析。以大豆 *Tublin* 基因(Genebank accession No. AY907703)为内参。*Tublin* 引物:上游引物 *Tu*-RT-F 为 5' CGGC-TACCACATCCAAGGAA 3',下游引物 *Tu*-RT-R 为 5' GCTGGAATTACCGCGGCT 3'。*GmCHR* 引物:上游引物 *GmCHR*-RT-F 为 5' GGGATAATAGTGACTGCGT 3',下游引物 *GmCHR*-RT-R 为 5' ATGTCACA CCTT-GTTCGT 3'。PCR 程序为 95℃ 15min,95℃ 10 s,60℃ 30 s,40 个循环。每个组织做 3 次重复。

1.6 植物过表达载体的构建

依据 Invitrogen 公司 Gateway BP Clonase II Enzyme Mix 和 Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 试剂盒构建植物过表达载体^[10-11],设计含有 attB 位点的特异性引物一对。

上游引物 *GmCHR*-attB1-F(小写字母表示 attB1 位点):

5' ggggacaagtgtgtacaaaaagcaggetcc TTTGAGAGT-TAGAATGGCTGC 3',

下游引物 *GmCHR*-attB2-R(小写字母表示 attB2 位点):

5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggt CGTAAAAT-GAAACAAGAGGTAAA3'

将克隆出的 *GmCHR* 基因 PCR 产物连接到入门载体(entry clone)中得到 pDONR221-*GmCHR*。进而将目的基因置换进入表达载体(destination vector)中,得到植物过表达载体 pMDC83-*GmCHR*。将构建好的植物过表达载体利用冻融法转化农杆菌菌株 EHA105 中。

2 结果与分析

2.1 GmCHR 基因的克隆

以栽培大豆南农 1138-2 叶片的 mRNA 为模板,

通过 RT-PCR 方法克隆获得 *GmCHR* 的特异性产物(图1)。克隆测序结果表明,得到含 948 bp 的 *GmCHR* 基因全长 CDS,其核苷酸序列与大豆数据库(<http://phytozome.net/soybean>)公布的大豆品种 Williams 82 中第 14 号染色体上的 *GmCHR* 等位基因 Glyma14g00870 的序列一致。

2.2 *GmCHR* 序列的生物信息学分析

所克隆的 *GmCHR* 编码区序列(CDS)长 948 bp,编码 315 个氨基酸,蛋白质分子量为 35.5 kDa,等电点为 6.32。二级结构预测显示,查尔酮还原酶有 40.38% Alpha 螺旋、14.10% 衍生链、4.17% Beta 转角和 41.35% 无规则卷曲,没有预测到信号肽。

将 *GmCHR* 编码的蛋白序列与与其他豆科植物中的查尔酮还原酶进行比对,结果显示,大豆 *GmCHR* 蛋白序列与葛藤(*Puerariae montana*, AAM12529.1)、甘草(*Glycyrrhizaepuerariae*, BAA13114.1)、百脉根(*Lotuscorniculatus japonicus*, BAF44219.1)、黄芪(*Astragalus*

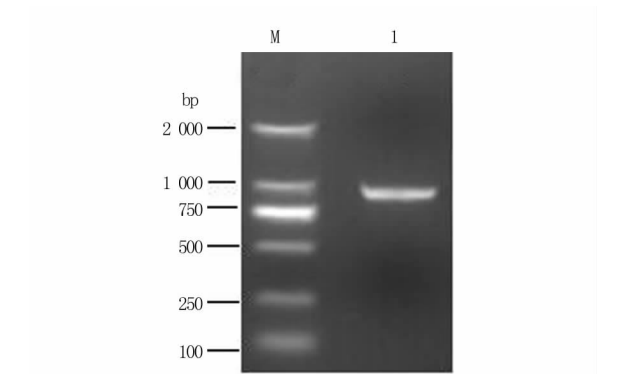


图1 *GmCHR* PCR 扩增产物
Fig.1 RT-PCR products of*GmCHR*

mongholicus, ABB00059.2)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*, XP_003618003.1)和紫花苜蓿(*Medicago sativa*, AAB41556.1)中的 CHR 相似性分别为 94%、87%、86%、86%、85% 和 85% (图2)。依据上述数据,绘制了蛋白序列的进化树(图3)。

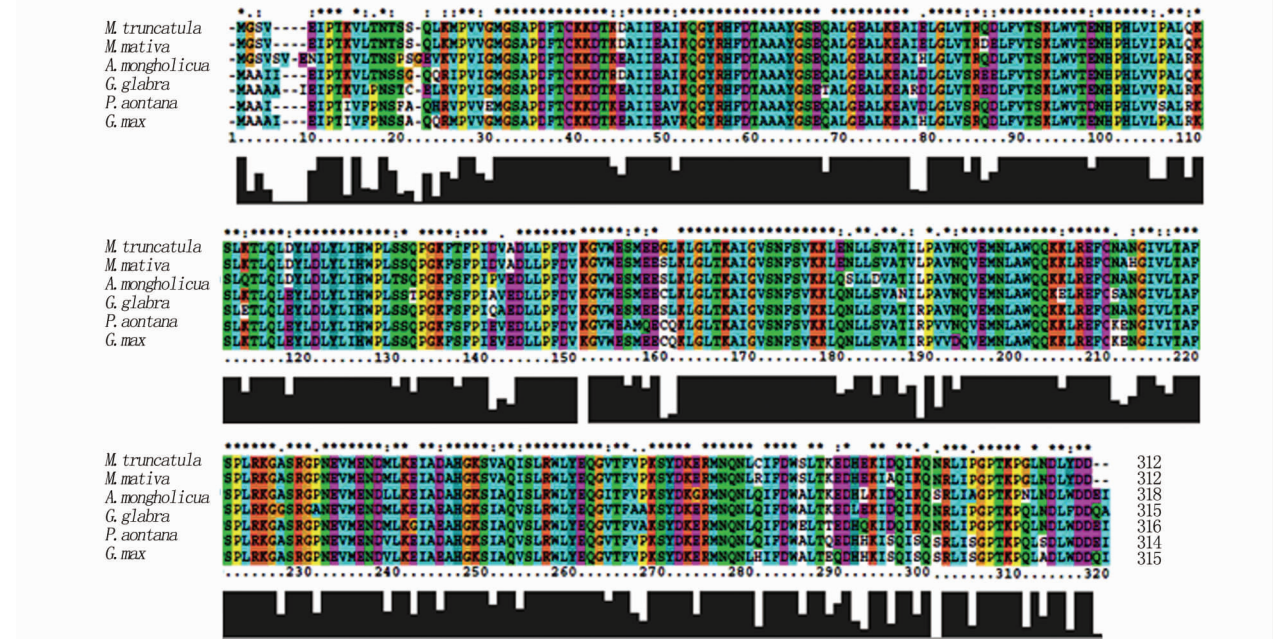


图2 *GmCHR* 与其他豆科 CHR 的氨基酸序列比对
Fig.2 Multiple alignments of *GmCHR* with the amino acid sequences of CHR from other legume species

2.3 组织表达结果分析

GmCHR 在自然生长状态下大豆的根、叶、茎、花和种子中均有表达,但表达量差异较大(图4)。*GmCHR* 在叶中的表达量最大,其次是种子,在花和茎中相似,在根中的表达量最小。

2.4 *GmCHR* 植物过表达载体的构建

为了验证 *GmCHR* 在大豆异黄酮合成过程的作用,利用 Gateway 技术建立植物过表达载体 pM-DC83-*GmCHR*(图5)。利用限制性内切酶 *Kpn* I 可以将载体酶切成 1 338 bp 和 10 758 bp 的 2 个片段(图6),表明载体构建成功。

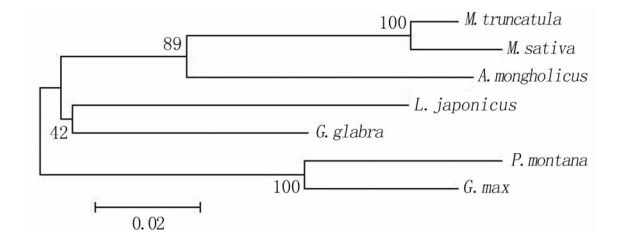


图3 豆科植物中 CHR 蛋白的进化树分析
Fig.3 The phylogenetic tree of CHR proteins in legume species

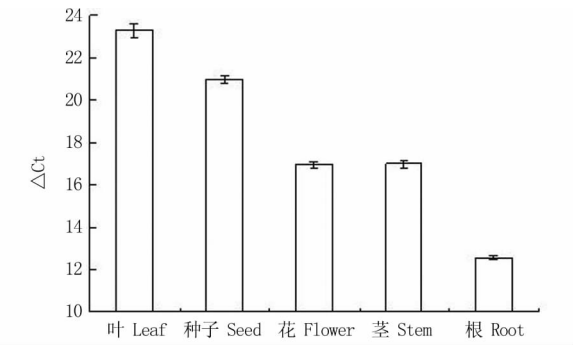


图4 *GmCHR* 组织表达分析(误差线为3次重复的标准误)

Fig.4 Tissue expression pattern of *GmCHR*(the error bar represents standard error of 3 replications)

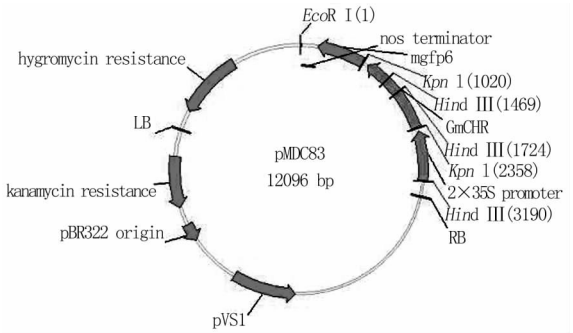


图5 植物过表达载体 pMDC83-*GmCHR*
Fig.5 The map of plasmid pMDC83-*GmCHR*

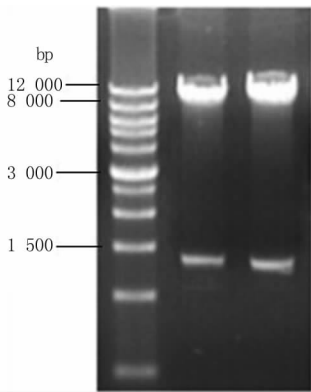


图6 限制性内切酶 *Kpn* I 酶切结果
Fig.6 *Kpn* I digestion

3 讨 论

本文从栽培大豆南农 1138-2 中克隆了位于第 14 号染色体上的查尔酮还原酶基因 *GmCHR*, 并对其编码的氨基酸序列进行了分析。*GmCHR* 的 CDS 区长 948 bp, 编码 315 个氨基酸, 预测其蛋白质分子量 35.5 kDa, 等电点 6.32。该基因在大豆品种 Williams 82 第 14 号染色体上的同源基因的基因组序列有 3 个外显子和 2 个内含子。蛋白质二级结构预测显示, 大豆查尔酮还原酶 *GmCHR* 有 40.38% Alpha 螺旋、14.10% 衍生链、4.17% Beta 转角和 41.35% 无规则卷曲, 未预测到信号肽。

将大豆 *GmCHR* 蛋白序列与葛藤、甘草、百脉根、黄芪、蒺藜苜蓿和紫花苜蓿中的 CHR 同源序列进行

比对, 结果显示大豆 *GmCHR* 与以上几种豆科植物的 CHR 蛋白序列相似性分别为 94%、87%、86%、86%、85% 和 85%, 与葛藤的相似性最高。但本文克隆的 *GmCHR* 与 Liu^[6] 已报道的大豆查尔酮还原酶相似性仅为 87%, 且位于不同的染色体上, 说明大豆可能在进化过程中产生了来源不同的查尔酮还原酶基因。组织表达分析结果也支持这个假设, 本研究表明 *GmCHR* 在大豆叶中表达量最高, 其次为种子、花和茎, 在根中的表达量最低, 而 Liu^[6] 报道的基因在花中表达量最大, 因此推测本文所克隆的 *GmCHR* 基因和 Liu 克隆的基因可能是查尔酮还原酶家族的 2 个功能不同的基因。本文也构建了 *GmCHR* 基因的植物表达载体并成功转化农杆菌 EHA105, 为将 *GmCHR* 转入大豆进行功能研究提供了材料基础。

参考文献

[1] Lane G A, Sutherland O R W, Skipp R A. Isoflavonoids as insect feeding deterrents and antifungal components from root of *Lupinus angustifolius* [J]. Journal of Chemical Ecology, 1987, 13 (4): 771-783.

[2] Gutierrez-Gonzalez J J, Wu X L, Gillman J D, et al. Intricate environment-modulated genetic networks control isoflavone accumulation in soybean seeds[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10:105-121.

[3] Ferrer J L, Austin M B, Stewart Jr C, et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(3): 356-370.

[4] Wang X Q. Structure, function, and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis[J]. Functional & Integrative Genomics, 2011, 11:13-22.

[5] Welle R, Schroder G. Induced plant responses to pathogen attack analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean[J]. European Journal of Biochemistry, 1991, 196:423-430.

[6] Liu G Y. Isolation, sequence identification and tissue expression profile of tow novel soybean (*Glycine max*) genes-vestitone reductase and chalcone reductase [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36: 1991-1994.

[7] Sallaud C, El-Turk J, Bigarre L, et al. Nucleotide sequences of three chalcone reductase genes from alfalfa [J]. Plant Physiology, 1995, 108(2): 869-870.

[8] Xu R Y, Nan P, Pan H Y. Molecular cloning, characterization and expression of a chalcone reductase gene from *Astragalus membranaceus* Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39:2275-2283.

[9] Shimada N, Nakatsuka T, Nishihara M, et al. Isolation and characterization of a cDNA encoding polyketide reductase in *Lotus japonicus* [J]. Plant Biotechnology, 2006, 23:509-513.

[10] 郭姗姗, 张蒙, 单卫星. 基于 Gateway 技术的植物表达载体的构建 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2010, 38 (11): 161-172. (Guo S S, Zhang M, Shan W X. Construction of a Gateway technology-based plant expression vector [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat. Sci.), 2010, 38 (11): 161-172.)

[11] 陈其军, 安瑞, 周海梦, 等. 使用与 Gateway 技术兼容的 T 载体获得入门载体 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31 (10): 951-954. (Wang Q J, An R, Zhou H M, et al. Making entry clones using T vectors compatible with the Gateway cloning [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2004, 31 (10): 951-954.)