

大豆异黄酮生物合成串联基因簇及其表达载体的构建

夏循礼, 杨广笑, 何光源

(华中科技大学中英 HUST- RRes 基因工程和基因组学联合实验室, 湖北 武汉 430074)

摘要:植物异黄酮是一种重要的次级代谢产物,在植物的生理活动以及人类健康方面具有重要作用。植物异黄酮生物合成途径有三个调控酶:查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS),查尔酮异构酶(Chalcone Isomerase, CHI)和异黄酮合酶(Isoflavone synthase, IFS)。以大豆为材料,利用 RT-PCR 方法克隆到查尔酮合酶基因(*CHS*),查尔酮异构酶基因(*CHI II*)和异黄酮合酶基因(*IFS*)的 cDNA (Genebank 登记号分别为 EU526827, EU526829, EU526830)经过 NCBI 在线 Blast 比对,相似度均在 98% 以上,确认克隆的目标基因是正确的;将这三种基因顺序连接,构建成串联基因簇 *CHS- CHI II - IFS* (命名为 *rIFS*),并且构建了 *rIFS* 的原核表达载体,进行了初步的表达研究。为进一步研究植物异黄酮的生物合成以及进行异黄酮生物工程奠定了基础。

关键词:大豆异黄酮;生物合成;串联基因簇;表达载体

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)01-0007-04

Design of Tandem Genes Cluster and Expression Vectors for Soybean Isoflavone Biosynthesis

XIA Xun-li, YANG Guang-xiao, HE Guang-yuan

(China-UK HUST- RRes Genetics Engineering and Genomics Joint Laboratory, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China)

Abstract: Plant isoflavones is a sort of important secondary metabolites with signification in plant physiological function and healthiness for human being. There are three regulating enzymes in plant isoflavones biosynthesis pathway: Chalcone synthase (CHS), Chalcone isomerase (CHI) and Isoflavone synthase (IFS). In this article, we cloned the cDNAs of *CHS*, *CHI II*, and *IFS* using RT-PCR method; then assembled these three genes to make a tandem genes cluster-*CHS- CHI II - IFS* (we named it as *rIFS*); finally we constructed the *E. coli*. expression vector of pET-*rIFS* and researched its expression. All these made the groundwork for further research on soybean isoflavone biosynthesis and isoflavone engineering.

Key words: Soybean isoflavones; Biosynthesis; Tandem genes cluster; Expression vector

植物异黄酮(Isoflavone)是属于类黄酮(Flavonoid)化合物的一类植物次生代谢产物,主要分布在豆科蝶形花亚科、桑科、蔷薇科、苋科、卫矛科、大戟科、藜科、金莲子科、以及单子叶植物鸢尾科等植物中^[1]。异黄酮的基本骨架为 C₆-C₃-C₆,与动物雌激素 17-雌二醇的结构相似,是一类植物雌激素。研究表明异黄酮具有保护心脏、抗癌、内分泌系统疾病防治,以及抗氧化、保肝、抗菌和抗炎等药理作用,大豆异黄酮还是应用广泛的具有保健功能的活性物质^[1-2]。因此开展异黄酮代谢工程研究对提高豆类等含异黄酮成分作物的异黄酮水平、赋予不含异黄

酮成分特定植物合成异黄酮能力和生物工程方法生产异黄酮,改善食品品质、增强植物抗病能力、预防疾病发生和治疗相关疾病等具有重要意义。

异黄酮的生物合成源自植物体内氨基酸苯丙氨酸和酪氨酸的代谢产物香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A,经过查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)和异黄酮合酶(Isoflavone synthase, IFS)的依次催化最终合成异黄酮^[3-5]。其中 CHI 有两种主要类型 CHI I 和 CHI II,CHI I 存在于豆科和非豆科植物中,只能催化柚皮素查尔酮为柚皮素,CHI II 仅仅存在于豆科植物

收稿日期:2008-09-18

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)前期专项资助项目(2005CCA1900)。

作者简介:夏循礼(1969-),男,博士研究生,研究方向为药用植物的分子生物学与生物技术研究。E-mail:xiaxunli@126.com。

通讯作者:何光源,教授,博士生导师。E-mail:hegy@mail.hust.edu.cn。

中,可以分别催化柚皮素查尔酮和异甘草素为柚皮素和甘草素,CHI II 与异黄酮的生物合成有一致性^[6]。

根据文献资料,检索 NCBI 数据库,参考已经发表的 *CHS*,*CHI II* 以及 *IFS* 序列数据^[6-8],利用 RT-PCR 方法克隆出查尔酮合酶基因(*CHS*),查尔酮异构酶基因(*CHI II*)和异黄酮合酶基因(*IFS*)的 cDNA 片段;并且将这三种基因的 cDNA 顺序连接,构建成串联基因簇 *CHS-CHI II-IFS*(命名为 *rIFS*);最后构建了 *rIFS* 的原核表达载体 pET-*rIFS*,并进行了初步的表达研究。为进一步研究植物异黄酮的生物合成以及进行异黄酮生物工程奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

用大豆(*Glycine max*)为材料温室培养 7 d 后,取下胚轴提取总 RNA 进行试验。

试剂: T4 DNA Polymerase, dNTP Mixture, Pyrobest DNA Polymerase, Ribonuclease Inhibitor, *Sal I*, *EcoR I*, *Cpo I*, *Not I*, Ligation Mix 等为 TaKaRa(大连)产品,ReverTra Ace(MMLV Reverse Transcriptase RNaseH-), RNase Inhibitor, dTTP, dATP 等为 TOYOBO 产品, RNAlant 植物 RNA 提取试剂为 TIANGEN,引物合成及测序(AuGCT)由北京奥科生物技术有限责任公司提供。

1.2 方法

1.2.1 方案设计 为了构建异黄酮生物合成途径代谢酶的串联基因簇及其表达载体,借鉴陆云华等提出的一种通用高效的复杂载体构建的新方法的思路^[9],设计如下方案:首先在选择的原核表达载体 pET-22b 质粒的 *Not I* 限制性内切酶酶切位点上游引入 *Cpo I* 限制性内切酶酶切位点,然后将这三个基因按 *CHS-CHI II-IFS* 顺序连接的要求设计适当的引物(在每对引物的 5' 端添加特定的“接头”)扩增出 *CHS*、*CHI II*、*IFS* 基因的 cDNA,最后按 *Cpo I-CHS-CHI II-IFS-Not I* 顺序连接起来,然后转化到进行酶切位点改造的原核表达载体 pET-22b(+) 质粒中,构建成 pET-*rIFS* 载体(见图 1)。

1.2.2 质粒 pET-22b 引入 *Cpo I* 限制性内切酶酶切位点 质粒 pET-22b 运用 *EcoR I* 和 *Sal I* 位点引入 *Cpo I* 位点,引物设计如下:

EcoR I-Cpo I-f: 5'-GGAATTCGGTCCGATGGCATTTCGGTCCGTAAC-3'; *Sal I*-r: 5'-TGAGT-

ET-*rIFS* 载体,以及
引物接头设计示意图
genes cluster, pET-*rIFS*
IFS's adapters designed

CGACTCACTTATGAGATTGAGGGTCAC-3'。

经过序列分析,从大豆中扩增出的一段 700bp 的 DNA 片段不含 *EcoR I* 和 *Sal I* 酶切位点,因此选用该片段,通过设计如上所列的引物扩增出一段“工具”DNA 片段;然后对这条“工具”DNA 片段进行 *Sal I* 和 *EcoR I* 限制酶双酶切,同时对 pET-22b 质粒也进行 *Sal I* 和 *EcoR I* 限制酶双酶切;最后连接酶切后的 pET-22b 质粒与酶切后的“工具”DNA 片段。这样 *Cpo I* 酶切位点就被引入进 pET-22b 质粒,质粒改造成功。

将引入了 *Cpo I* 酶切位点的 pET22b 质粒用 *Cpo I* 和 *Not I* 限制酶在同一反应体系(*Cpo I* 和 *Not I* 各 1 μL, 10 × H Buffer 4 μL, BSA 2 μL, TritonX-100 2 μL, pET22b 质粒 4 μL, 补充水至 20 μL) 于 25℃ 和 37℃ 分别酶切 2 h, 长片段 DNA 产物(pET22b 质粒酶切产物)回收备用。

1.2.3 引物设计与合成 根据 NCBI 上已经发表的相关 *CHS* 基因的序列设计引物,在其上游引物和下游引物的 5' 末端分别加上接头 GTC 和 TCGA,即:

chs-f: 5'-GTCATGGTGAGCGTAGCTGAGATCCG-3';

chs-r: 5'-TCGATCAGATGGCCACACTGCCGAG-3'。

根据 NCBI 上已经发表的相关 *CHI II* 基因的序列设计引物,在其上游引物和下游引物的 5' 末端分别加上接头 CGAT 和 AAAT,即:

chi II-f: 5'-CGATATGGCCACACCAGCATCCATC-3';

chi II-r: 5'-AAATCAGTTTTCAATGTTGGGATTGGC-3'。

根据 NCBI 上已经发表的相关 *IFS* 基因的序列设计引物,在其上游引物和下游引物的 5' 末端分别加上接头 TTT 和 GGCCA,即:

ifs-f: 5'-TTTATGTTGCTGGAACCTTGCACTT-3';

ifs-r: 5'-GGCCATTAAGAAAGGAGTTTAGATGCAACG-3'。

引物设计好后,由北京奥科生物技术有限责任

公司合成。

1.2.4 目的片段的 PCR 反应体系和条件 总 RNA 提取和单链 cDNA 模板的合成按照基本试验规程和试剂使用说明(具体步骤略)。

PCR 反应体系 Buffer (10 ×) 5 μL , dNTP (10 mmol · L⁻¹ each) 1 μL , Primer1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , Primer2 (10 μM) 2 μL , 模板 1 μL , Pyrobest DNA Polymerase (2.5 U · μL) 1 μL , 加 H₂O 至总体积 50 μL 。PCR 反应条件如下:

CHS 片段扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min。94℃, 1 min; 59℃, 1 min; 72℃, 1.5 min; 共进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 15 min。

CHI II 片段扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min。94℃, 1 min; 60℃, 1 min; 72℃, 1 min; 共进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 15 min。

IFS 片段扩增程序为: 94℃ 预变性 3 min。94℃, 1 min; 52℃, 1 min; 72℃, 2 min; 共进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 15 min。

目的片段的 PCR 产物分别进行凝胶回收。

1.2.5 *CHS*, *CHI II*, *IFS* 粘性末端的产生 *CHS*, *IFS* (凝胶回收产物) 分别按 DNA 片段 34.2 μL , dTTP (4mM) 5 μL , BSA Buffer 5 μL , T4 DNA Polymerase buffer 5 μL , T4 DNA Polymerase 0.8 μL 反应体系, 在 12℃ 反应 30 min, 产生设计需要的粘性末端。

CHI II (凝胶回收产物) 按 DNA 片段 34.2 μL , dATP (4mM) 5 μL , BSA Buffer 5 μL , T4 DNA Polymerase Buffer 5 μL , T4 DNA Polymerase 0.8 μL 反应体系, 在 12℃ 反应 30 min, 产生设计需要的粘性末端。

反应完成后, 以 DNA 纯化试剂盒进行 DNA 纯化, 置 -20℃ 保存备用。

1.2.6 *CHS*, *CHI II*, *IFS* 片段分别磷酸化 按 DNA 片段 12 μL , Buffer (10 ×) 2 μL , ATP (10 mmol · L⁻¹) 5 μL , T4 Polynucleotide Kinase 1 μL 反应体系, 37℃ 反应 1 h, 对 *CHS*, *CHI II*, *IFS* DNA 片段分别进行 5' 末端磷酸化处理。磷酸化产物用 DNA 回收试剂盒进行回收, 置 -20℃ 保存备用。

1.2.7 质粒载体与 *CHS*, *CHI II*, *IFS* 的连接转化 按 *CHS*, *CHI II*, *IFS* 产物各 1 μL , 酶切好的引入 *Cpo I* 酶切位点的 pET22b 载体 1 μL , Ligation Mix 4 μL 共 8 μL 反应体系, 16℃ 连接 2 h, 全部转移到 100 μL 的 DH_{5 α} 感受态细胞, 冰上放置 30 min, 42℃ 热击 90 s, 迅速放置到冰上 3 min, 加入 LB 培养基 200

μL , 在摇床 37℃ 下 250 r · min⁻¹ 培养 1 h, 取 100 μL 培养物涂布补加了安苄的 LB 平板, 置 37℃ 培养箱倒置培养 14 h, 筛选阳性菌株。

2 结果

2.1 *CHS*, *CHI II*, *IFS* 基因 cDNA 片段 PCR 克隆结果

图 2 是 *CHS*, *CHI II*, *IFS* 基因的 cDNA PCR 扩增产物的电泳图谱, 基因测序数据登记在 NCBI 数据库 (Genbank 登记号分别为 EU526827, EU526829, EU526830)。经过 NCBI 在线 Blast 比对分析, 相似度均在 98% 以上。

2.2 PCR 检测 pET-*rIFS* 结果

由于 *rIFS* 和引入 *Cpo I* 酶切位点的 pET22b 质粒连接后, *Cpo I* 和 *Not I* 限制性内切酶酶切位点消失, 并且为了防止载体上其他位置酶切位点的干扰, 采用 PCR 方法检测 *rIFS* 来筛选阳性质粒。结果如图 3。

2.3 pET-*rIFS* 表达结果

CHS 编码 389 个氨基酸, 蛋白质分子量约为 42.7 KDa; *CHI II* 编码 226 个氨基酸, 蛋白质分子量约为 24.9 KDa; *IFS* 编码 521 个氨基酸, 蛋白质分子量约为 57.4 KDa。以 IPTG 为诱导剂, 安苄青霉素为抗性物质进行 pET-*rIFS* 质粒的 LB 营养液培养, 作蛋白质表达 SDS-PAGE 检查, 结果如图 4。

M
=
Marker
er
III ,
the
sizes
are
4500
bp,
3000
bp,
2000
bp,
1200
bp,
800
bp,
500
bp,
and
200
bp
from
the
top
to
down
respectively
;
A :
chs
=
1170
bp,
B :
chi
=
681
bp,
C :
ifs
=
1566
bp
的 cDNA 扩增产物电泳图
PCR of *cDNA* of *CHS* and *IFS*

M
=
Marker
er
III ,
the
sizes

M
=
Protein
marker
,
the
sizes
are
94.
0KDa,
66.
2
KDa,
45.
0
KDa,
35.
0
KDa,
26.
0
KDa,
20.
0
KDa
and
14.
4
KDa
from
the
top
to
down
respectively
;
1,
2,
3,
4
are
samples
,
CHS
=
42.
7
KDa,
CHI
II
=
24.
9
KDa,
IFS

控制两性状的基因座进行初定位,进而进行精细定位与基因克隆,为大豆品质育种和高产育种提供更为可靠的信息。

参考文献

- [1] 刘章雄,邱丽娟,关荣霞,等. 美国大豆育种研究进展[J]. 大豆科学,2004,23(2):123-129. (Liu Z X, Qiu L J, Guan R X, et al. New advances in the study soybean breeding of U. S. A [J]. Soybean Science, 2004, 23(2): 123-129.)
 - [2] 梁慧珍,李卫东,王辉,等. 大豆粒形性状的遗传效应分析[J]. 遗传学报,2005,32(11):1190-1204. (Liang H Z, Li W D, Wang H, et al. Genetic effects on seed traits in soybean [J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(11): 1199-1204.)
 - [3] 武田和义,斋藤健一. 控制水稻籽粒大小的主效基因[J]. 育种学杂志,1980,30(3):280-282. (Wu T H Y, Zhai T J Y. Major gene controlling seed size in rice [J]. Breeding, 1980, 30(3): 280-282.)
 - [4] 石春海,朱军. 粳型杂交水稻稻米外观品质的籽粒和母体遗传效应分析[J]. 北京农业大学学报,1993,19(增刊):67-74. (Shi C H, Zhu J. Seed and maternal genetic effects on outlooking qualities of indica hybrid rice grains [J]. Journal of Beijing Agricultural University, 1993, 19(Suppl): 69-74.)
 - [5] Chang T T, Li C C. Genetics and breeding [M] // Luh. Rice: production and utilization. Westport, Connecticut AVI Press, 1980: 87-127.
 - [6] Mckenize K S, Rutger J N. Genetic analysis of amylase content, alkali spreading score and grain dimensions in rice [J]. Crop Science, 1983, 23(2): 306-313.
 - [7] 张名位,郭宝江,彭仲明. 粳型黑米粒形性状的遗传效应及其与矿质元素含量的遗传相关性[J]. 遗传学报,2002,29(8):688-695. (Zhang M W, Guo B J, Peng Z M. Genetic effects on grain shape traits of indica black pericarp rice and their genetic correlations with main mineral element contents in grains [J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29(8): 688-695.)
 - [8] 李玉玲,张泽民,许自成. 玉米籽粒性状的遗传效应分析[J]. 遗传,2000,22(3):133-136. (Li Y L, Zhang Z M, Xu Z C. Analysis of genetic effects on kernel traits in maize (*Zea mays* L.). Hereditas (Beijing), 2000, 22(3): 133-136.)
 - [9] 吴吉祥,王国建,朱军,等. 陆地棉籽粒性状直接效应和母体效应的遗传分析[J]. 作物学报,1997,21(6):658-664. (Wu J X, Wang G J, Zhu J, et al. Analysis of seed and maternal genetic effects on kernel traits in upland cotton [J]. Acta Agronomica Sinica, 1997, 21(6): 658-664.)
 - [10] 章元明,盖钧镒,张孟臣. 利用 $P_1 P_2 F_1$ 和 F_2 或 $F_{2:3}$ 世代联合的数量性状分离分析[J]. 西南农业大学学报,2000,22(1):6-9. (Zhang Y M, Gai J Y, Zhang M C. Jointly segregating analysis of $P_1 P_2 F_1$ and F_2 or $F_{2:3}$ families [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2000, 22(1): 6-9.)
 - [11] 盖钧镒,章元明,王建康. 植物数量性状遗传体系 [M]. 北京: 中国科学出版社,2003,169-223. (Gai J Y, Zhang Y M, Wang J K. Genetic system of quantitative traits in plants [M]. Beijing: Science Press, 2003, 169-223.)
 - [12] Zhang Y M, Gai J Y, Yang Y H. The EIM algorithm in the joint segregation analysis of quantitative traits [J]. Genetics Research, 2003, 81(2): 157-163.
 - [13] 高文瑞,陈晨,王红铃,等. 大豆籽粒大小的遗传及 SSR 标记分析[J]. 中国油料作物学报,2007,29(2):1-8. (Gao W R, Chen C, Wang H L, et al. Genetic basis analysis of soybean seed size and its related SSR marker screening [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007, 29(2): 1-8.)
 - [14] 宁海龙,李文霞,李文滨,等. 大豆籽粒重的遗传效应分析[J]. 中国油料作物学报,2005,27(2):69-71. (Ning H L, Li W X, Li W B, et al. Genetic effect analysis of seed weight in soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005, 27(2): 69-71.)
 - [15] 杨联松,白一松,许传万,等. 水稻粒形类型及其遗传的研究进展[J]. 安徽农业科学,2001,29(2):164-167. (Yang L S, Bai Y S, Xu C W, et al. Research progress of rice grain type and its inheritance [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2001, 29(2): 164-167.)
-
- (上接第 10 页)
- [3] Yu O, Jung W, Shi J, et al. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues [J]. Plant Physiology, 2000, 124, 781-793.
 - [4] Liu C J, Jack W B, Christopher L S, et al. Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in Arabidopsis [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences, 2002, 99(22): 14578-14583.
 - [5] Brenda W S. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. Plant Physiology, 2001, 126: 485-493.
 - [6] Ralston L, Subramanian S, Matsuno M, et al. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II Chalcone isomerases [J]. Plant Physiology, 2005, 137(4): 1375-1388.
 - [7] Akada S, Kung S D, Dube S K. Nucleotide sequence of a soybean chalcone synthase gene with a possible role in ultraviolet-B sensitivity, Gmchs 6 [J]. Plant Physiology, 1993, 102(2): 699-701.
 - [8] Jung W, Yu Q, Lau S M C, et al. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 208-212.
 - [9] 陆云华,马立新,蒋思婧. 一种通用高效的复杂载体构建的新方法[J]. 遗传,2006,28(2):212-218. (Lu Y H, Ma L X, Jiang S J. A universal high-throughput novel method of constructing the vectors [J]. Hereditas, 2006, 28(2): 212-218.)