

· 资源与鉴定 ·

## 光果甘草 *CHS* 基因的克隆与多态性分析

高智强, 胡婷, 张晓冬, 尹彦超, 吴晨华, 周姗, 马永生, 刘颖\*  
(北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488)

**[摘要]** 目的:克隆光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* 查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)基因并分析其基因多态性。方法:通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)从光果甘草主根中扩增得到 *CHS* cDNA 序列,测序并运用生物信息学软件对测序结果进行分析。结果:克隆得到19条长度为1 175 bp的光果甘草 *CHS* cDNA 序列,测序结果显示其一致性99.10%,存在81个变异位点,可分为17种单倍型;氨基酸序列分析显示,这19条cDNA序列共编码14种氨基酸序列类型,一致性99.34%,存在25个变异位点。生物信息学分析表明光果甘草 *CHS* cDNA 序列编码蛋白为稳定性亲水蛋白,平均相对分子量42.6 kDa,等电点5.75~6.21,不含信号肽,无跨膜区,保守结构域包含1个查尔酮合酶超家族结构域,二级结构以 $\alpha$ 螺旋和无规卷曲为主。同源性分析显示,光果甘草 *CHS* cDNA 序列与乌拉尔甘草 *G. uralensis* 以及胀果甘草 *G. inflata* 在进化关系上最近,与小立碗藓 *Physcomitrella patens* 在进化关系上最远。结论:成功克隆并得到了光果甘草 *CHS* cDNA 序列,且这些序列编码区具有丰富的多态性。

**[关键词]** 光果甘草; 查尔酮合酶; 克隆; 生物信息学; 小立碗藓; 乌拉尔甘草; 胀果甘草

**[中图分类号]** R282;F124.5;R931;Q785;Q343.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0032-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20180910

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180214.1625.024.html>

**[网络出版时间]** 2018-02-15 14:57

## Molecular Cloning and Polymorphism Analysis of Chalcone Synthase cDNA in *Glycyrrhiza glabra*

GAO Zhi-qiang, HU Ting, ZHANG Xiao-dong, YIN Yan-chao, WU Chen-hua, ZHOU Shan,  
MA Yong-sheng, LIU Ying\*  
(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**[Abstract]** **Objective:** To clone the cDNA sequence of chalcone synthase (CHS) in *Glycyrrhiza glabra* and analyse its genetic polymorphism. **Method:** The cDNA sequence of *CHS* was cloned from root of *G. glabra* by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), then sequenced and analysed by bioinformatics software. **Result:** A total of 19 cDNA sequences of *CHS* with the full length of 1 175 bp were obtained from *G. glabra* samples, these 19 sequences with eighty-one polymorphic sites can be divided into 17 haplotypes, the similarity of which was 99.10%. Amino acid sequence analysis indicated that these 19 cDNA sequences encoded 14 amino acid sequences, the similarity of which was 99.34%, and 25 variable sites were determined. Bioinformatics analysis has shown that CHS was a stable hydrophilic protein, its average relative molecular weight was 42.6 kDa and isoelectric point was 5.75-6.21, it contained no signal peptides or transmembrane domains and had a conserved domain of chalcone synthase superfamily, its secondary structure mainly constituted of  $\alpha$ -helix and random coil. The homologue analysis showed that *CHS* cDNA sequence of *G. glabra* had the closest relationship

**[收稿日期]** 20171002(004)

**[基金项目]** 北京中医药大学杰出青年人才项目(2016JYBXJQ002)

**[第一作者]** 高智强,在读硕士,从事药用植物功能基因与分子生药学研究,E-mail:gaozhiqiangdc@163.com

**[通信作者]** \*刘颖,副研究员,从事药用植物功能基因与分子生药学研究,Tel:010-84738646,E-mail:liuyliwd@sina.com

to *G. uralensis* and *G. inflata*, and the furthest relationship to *Physcomitrella patens*. **Conclusion:** In this study, *CHS* cDNA sequence is successfully cloned from *G. glabra* samples and it shows abundant polymorphism.

**[Key words]** *Glycyrrhiza glabra*; chalcone synthase; cloning; bioinformatics; *Physcomitrella patens*; *G. uralensis*; *G. inflata*

光果甘草是中药材甘草的 3 种基原植物之一。2015 年版《中国药典》规定<sup>[1]</sup>, 甘草药材的检测指标为三萜类化合物甘草酸质量分数不低于 2.0%, 黄酮类化合物甘草苷质量分数不低于 0.5%。现代药理学研究表明, 甘草苷具有抗炎<sup>[2-3]</sup>、解痉<sup>[4]</sup>、抗癌<sup>[5]</sup>、抗抑郁<sup>[6]</sup>等药理活性。因此, 甘草苷作为甘草的指标性成分之一, 对于保证甘草的药效具有重要意义。

甘草苷的生物合成受多种酶的共同调控, 其中查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)是其生物合成途径中的第一个关键限速酶<sup>[7]</sup>, 其以三分子丙二酰辅酶 A(malonyl-CoA)和一分子 4-香豆酰辅酶 A(4-coumaroyl-CoA)为底物, 催化生成第 1 个具有 C6-C3-C6 基本骨架的黄酮类化合物——柚皮素查尔酮, 该产物可进一步衍化, 生成各类黄酮化合物<sup>[8]</sup>。因此, CHS 对于调控甘草中黄酮类化合物的生物合成及积累水平具有重要的影响。

2015 年版《中国药典》规定中药材甘草有 3 个基原, 即乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis*, 光果甘草 *G. glabra* 和胀果甘草 *G. inflata*。根据本课题组前期对全国四大药材市场所售甘草药材的调查研究显示<sup>[9]</sup>, 光果甘草在市场上的流通份额约 30%, 其供应量和需求量均较高。因此, 对光果甘草中 *CHS* 基因开展相关研究对保证光果甘草中黄酮类化合物的含量及市售甘草药材的质量具有重要意义。鉴于 *CHS* 基因在黄酮类代谢途径中的重要地位, 诸多科学家开展了 *CHS* 基因克隆及功能验证的相关研究。自 1983 年 Reimold 等<sup>[10]</sup>从荷兰芹 *Petroselinum hortense* 中克隆得到了第 1 条 *CHS* 基因序列以来, 到目前为止已从多种单子叶、双子叶和裸子植物中克隆得到了该基因序列, 涉及的植物包括高粱 *Sorghum bicolor*<sup>[11]</sup>, 玉米 *Zea mays*<sup>[12]</sup>, 白苇兰 *Bromheadia finlaysoniana*<sup>[13]</sup>, 紫花苜蓿 *Medicago sativa*<sup>[14]</sup> 和小苍兰 *Freesia hybrida*<sup>[15]</sup> 等。目前, *CHS* 基因仅在胀果甘草愈伤组织中被成功克隆<sup>[16]</sup>, 而光果甘草中 *CHS* 基因的克隆及多态性尚未见诸报道。本实验以光果甘草为研究对象, 利用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术克隆得到光果甘草 *CHS* cDNA 序列, 并对其进行生物信息学分析, 为进一步

研究光果甘草黄酮类代谢途径的分子机制、获取优质的光果甘草种质资源奠定分子基础。

## 1 材料

1-13 微型离心机(美国 Sigma 公司), DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂), Epoch 型全波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), BG-gds AUTO510 型凝胶成像系统(上海培清科技有限公司), TC-3000 型 RT-PCR 扩增仪(英国 Techne 公司), LRH-250 型生化培养箱(上海一恒科技有限公司)。

ESPY spin 植物 RNA 快速提取试剂盒, 逆转录试剂盒, 琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒, DNA marker (BM2000), M-MLV 逆转录酶, pMD-19T 载体和大肠埃希氏菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞(北京博迈德科技发展有限公司); LA *Taq* DNA 聚合酶, 寡聚胸腺嘧啶引物(Oligo dT), 6  $\times$  DNA 上样缓冲液(loading buffer), LB 培养基所需药品和氨苄青霉素(北京冠星宇科技有限公司); 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

种源地分别为新疆维吾尔自治区和田(E 79°55'14", N 37°06'52"), 新疆维吾尔自治区布尔津县(E 86°52'39", N 47°43'31"), 内蒙古自治区鄂托克前旗(E 107°28'19", N 38°10'51")和新疆维吾尔自治区 184 团(E 86°20'16", N 46°17'94")的野生甘草种子, 在北京中医药大学望京校区药园栽培 2 年后各取 1 株, 编号分别为 G1, G2, G3 和 G4, 经北京中医药大学刘颖副教授鉴定为豆科植物光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* 的根。

## 2 方法

**2.1 光果甘草总 RNA 提取及 RT-PCR 分析** 取光果甘草主根迅速加入液氮研磨成粉末, 严格按照植物 RNA 提取试剂盒使用说明书提取样品总 RNA, 利用酶标仪检测其吸光度 *A* 比值  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ , 计算质量浓度, 利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 以 RNA 为模板, Oligo dT 为引物, 按照逆转录试剂盒操作步骤完成逆转录。

**2.2 光果甘草 *CHS* 基因的 PCR 扩增** 根据文献[16]中已报道的胀果甘草 *CHS* 基因序列(EU706287), 利用 Primer 5.0 软件设计引物扩增光果甘草 *CHS* 基因编码区, 引物序列为上游引物 5'-

CAATGGTGAGCGTAGCTGAAATTC-3', 下游引物 5'-CAATCATATAGCCACACTGTGCAG-3'。PCR 扩增体系 (25  $\mu\text{L}$ ) 为 cDNA 2.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR 缓冲液 ( $\text{Mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2.0  $\mu\text{L}$ , 上游引物 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 体积 0.25  $\mu\text{L}$ , 下游引物 (浓度 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 体积 0.25  $\mu\text{L}$ , LA *Taq* 酶 0.25  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 17.25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s (30 个循环); 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

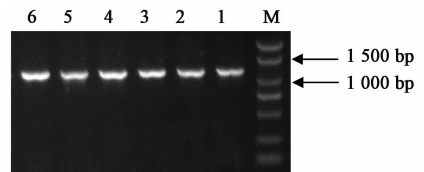
**2.3 PCR 产物的回收、连接、转化及测序** PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收, 于 16  $^{\circ}\text{C}$  与克隆载体 pMD-19T 连接 12 h, 转化至大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在含有 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  氨苄青霉素的 LB 选择培养基上培养, 随机挑取单菌落进行菌液 PCR 验证, 取检测为阳性的菌液进行测序。

**2.4 光果甘草 *CHS* 基因生物信息学分析** 利用 DNAMAN 6.0 软件对光果甘草 *CHS* cDNA 序列进行比对分析; 利用 EditSeq 7.10 软件将 cDNA 序列翻译成氨基酸序列并进行多态性分析; 翻译得到的氨基酸序列通过在线工具 ProtParam 分析其理化性质; 用 DNASTAR 7.0 及 SOPMA 构建和分析其二级结构; 用 Swiss-Model 构建三级结构; 用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的保守结构域数据库 (CDD) 预测保守结构域; 用 SignalP 4.1 Server 软件预测信号肽; 用 TMHMM Server 2.0 预测跨膜结构域, 利用 MEGA 5.0 对不同物种来源的 *CHS* cDNA 序列和对应氨基酸序列进行聚类分析。

### 3 结果

**3.1 光果甘草 *CHS* 基因的 PCR 扩增** 部分样品的 PCR 扩增结果见图 1, 获得了长度 1 200 bp 左右的片段, 与目的基因长度相符。测序结果显示, 从光果甘草样品中共克隆得到了 19 条长度为 1 175 bp 的 *CHS* cDNA 序列, 可分为 17 种单倍型 (单倍型 1 ~ 17), 编码长度为 389 的氨基酸序列, 可分为 14 种氨基酸序列类型 (AA1 ~ AA14), 在 GenBank 中对所得序列进行注册, 见表 1。结果发现单倍型 H2 占比 15.79%, 为光果甘草 *CHS* 基因序列的主流单倍型; 在所有氨基酸序列类型中, 氨基酸序列 AA2 占比 21.05%, 为光果甘草黄酮类代谢途径中发挥主要作用的主流 *CHS* 氨基酸序列类型。

**3.2 光果甘草 *CHS* 基因编码区序列的多态性分析** 利用 DNAMAN 6.0 软件对 19 条光果甘草 *CHS* 基因 cDNA 序列进行比对分析, 一致性可达 99.10%,



M. marker; 1 ~ 6. PCR 扩增产物

图 1 光果甘草 *CHS* 基因的 PCR 扩增分析

Fig. 1 PCR analysis of *CHS* gene in *Glycyrrhiza glabra*

表 1 *CHS* 基因的 GenBank 注册号及不同单倍型、氨基酸序列类型所占比例统计

Table 1 Proportion of different haplotypes and amino acid sequence type, GenBank registration number of *CHS* gene

<i>CHS</i> 单倍型	<i>CHS</i> 氨基酸序列类型	注册号	单倍型数目/条	单倍型占比/%
H1	AA1	MF964239	1	5.26
H2	AA2	MF964240	3	15.79
H9	AA2	MF964244	1	5.26
H3	AA3	MF964241	1	5.26
H4	AA3	KY748136	1	5.26
H5	AA4	MF964242	1	5.26
H6	AA5	KY748144	1	5.26
H7	AA5	KY748146	1	5.26
H8	AA6	MF964243	1	5.26
H10	AA7	MF964245	1	5.26
H11	AA8	MF964246	1	5.26
H12	AA9	MF964247	1	5.26
H13	AA10	MF964248	1	5.26
H14	AA11	MF964249	1	5.26
H15	AA12	MF964250	1	5.26
H16	AA13	MF964251	1	5.26
H17	AA14	MF964252	1	5.26

见表 2。结果发现 19 条序列共存在 81 个变异位点, 其中同义突变位点 48 个, 错义突变位点 33 个。

**3.3 光果甘草 *CHS* 氨基酸序列的多态性分析** 使用 EditSeq 7.10 软件将 19 条光果甘草 *CHS* cDNA 序列翻译成氨基酸, 发现其编码 389 个氨基酸残基, 经 DNAMAN 6.0 软件比对分析发现, 一致性 99.34%, 可分为 14 种氨基酸序列类型, 共存在 25 个变异位点, 见表 3。

**3.4 光果甘草 *CHS* cDNA 编码氨基酸序列的理化性质分析** 利用在线工具 ProParam 对 14 种氨基酸序列进行理化性质的分析, 见表 4。结果发现 14 种氨基酸序列均由 389 个氨基酸残基构成; 平均相对

表 2 17 种光果甘草 *CHS* 单倍型的变异位点统计

Table 2 Variable sites of 17 species of *CHS* haplotype in *Glycyrrhiza glabra*

变异位点/bp	变异	类型	变异位点/bp	变异	类型	变异位点/bp	变异	类型
33	A/G	1	342	A/G	1	713	A/G	1
34	A/G	1	366	G/A	1	726	T/G	0
42	A/G	0	384	C/T	0	768	T/C	0
54	C/T	0	399	T/C	0	798	T/C	0
66	T/C	1	402	T/A,T/G	0	812	T/C	1
68	G/A	1	429	A/G	0	822	T/A	0
69	C/T	0	449	T/C	1	830	A/G	1
78	C/T	0	463	A/G	1	840	T/C	0
81	A/G	0	464	A/G	1	876	C/A	0
87	C/T	0	471	T/C	1	889	T/C	1
99	G/A	0	472	A/G	1	921	G/A,G/T	0
106	T/G	1	483	A/G	0	960	G/A	0
135	T/C	0	492	C/T	0	963	T/C	0
145	A/G	1	495	T/C	0	996	T/C	1
176	T/C	1	509	T/C	1	998	A/G	1
183	T/C	0	535	G/A	0	1 008	T/C	0
190	A/G	1	541	A/G	1	1 012	T/C	1
202	C/A	0	567	T/C	0	1 026	C/T	0
219	A/G	0	577	G/A	1	1 036	T/C	0
252	C/T	0	594	T/C	0	1 056	A/G	0
257	A/G	1	606	T/A	0	1 065	A/G	0
264	A/G	0	616	C/T	0	1 078	A/G	1
268	T/C	1	618	G/A	0	1 092	G/A	0
276	C/T	0	660	T/C	0	1 095	T/C	1
294	G/C	1	684	A/G	1	1 097	A/G	1
330	G/A	0	685	A/G	1	1 098	A/G	0
336	A/G	0	690	T/C	0	1 107	G/A	0

注:类型 0. 此位点的变异导致同义突变;类型 1. 此位点的变异导致错义突变。

分子质量 42.6 kDa;等电点 5.75 ~ 6.21;总平均亲水性(GRAVY)均为负值,不稳定指数均 < 40,半衰期均为 30 h,表明光果甘草 *CHS* 为亲水性蛋白且结构稳定。

**3.5 光果甘草 *CHS* 的二、三级结构预测** 根据表 4 的统计结果,14 种光果甘草 *CHS* cDNA 序列编码氨基酸序列的性质较为接近,因此以占比最高的主流氨基酸序列 AA2 以及氨基酸理化性质与其他单倍型差异最大的 AA9 为目标序列,利用 ExPASy 分析其二级结构,见图 2。结果发现 AA2 序列中  $\alpha$  螺旋

表 3 14 种光果甘草 *CHS* 氨基酸序列类型的变异位点统计

Table 3 Statistics of variable sites of 14 species of *CHS* amino acid sequence in *Glycyrrhiza glabra*

变异位点	变异	变异位点	变异	变异位点	变异
12	G/R	150	P/L	277	R/K
23	D/G	155	E/K	297	P/S
36	D/Y	158	V/M	333	G/D
49	E/K	170	A/V	338	P/S
59	T/M	181	D/N	360	A/T
64	V/M	193	I/V	366	G/E
85	C/Y	229	V/I	383	I/V
90	F/S	238	G/E		
114	M/I	271	A/V		

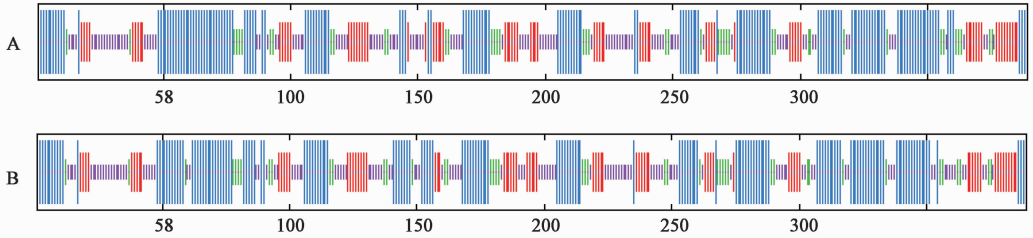
表 4 14 种光果甘草 *CHS* 氨基酸序列的理化性质

Table 4 Physicochemical properties of 14 species of *CHS* amino acid sequence in *Glycyrrhiza glabra*

氨基酸序列类型	分子式	相对分子质量/kDa	理论等电点	不稳定指数	总平均亲水性
AA1	C <sub>1912</sub> H <sub>3048</sub> N <sub>504</sub> O <sub>561</sub> S <sub>19</sub>	42.68	6.21	36.44	-0.076
AA2	C <sub>1910</sub> H <sub>3044</sub> N <sub>504</sub> O <sub>562</sub> S <sub>18</sub>	42.64	6.21	35.94	-0.083
AA3	C <sub>1911</sub> H <sub>3046</sub> N <sub>504</sub> O <sub>561</sub> S <sub>19</sub>	42.67	6.21	35.94	-0.076
AA4	C <sub>1904</sub> H <sub>3040</sub> N <sub>504</sub> O <sub>559</sub> S <sub>20</sub>	42.58	6.21	36.78	-0.060
AA5	C <sub>1913</sub> H <sub>3048</sub> N <sub>504</sub> O <sub>563</sub> S <sub>19</sub>	42.73	6.04	35.78	-0.084
AA6	C <sub>1904</sub> H <sub>3038</sub> N <sub>508</sub> O <sub>562</sub> S <sub>19</sub>	42.65	6.04	37.15	-0.091
AA7	C <sub>1904</sub> H <sub>3033</sub> N <sub>501</sub> O <sub>559</sub> S <sub>19</sub>	42.50	6.21	36.43	-0.058
AA8	C <sub>1907</sub> H <sub>3037</sub> N <sub>503</sub> O <sub>560</sub> S <sub>18</sub>	42.55	6.04	35.68	-0.055
AA9	C <sub>1908</sub> H <sub>3034</sub> N <sub>502</sub> O <sub>563</sub> S <sub>18</sub>	42.59	5.75	34.39	-0.077
AA10	C <sub>1910</sub> H <sub>3044</sub> N <sub>504</sub> O <sub>561</sub> S <sub>20</sub>	42.69	6.21	36.16	-0.083
AA11	C <sub>1912</sub> H <sub>3048</sub> N <sub>504</sub> O <sub>561</sub> S <sub>18</sub>	42.65	6.21	36.44	-0.070
AA12	C <sub>1908</sub> H <sub>3040</sub> N <sub>504</sub> O <sub>562</sub> S <sub>18</sub>	42.61	6.21	35.94	-0.089
AA13	C <sub>1913</sub> H <sub>3043</sub> N <sub>503</sub> O <sub>561</sub> S <sub>19</sub>	42.67	5.89	35.09	-0.079
AA14	C <sub>1912</sub> H <sub>3046</sub> N <sub>504</sub> O <sub>561</sub> S <sub>18</sub>	42.65	6.21	35.94	-0.085

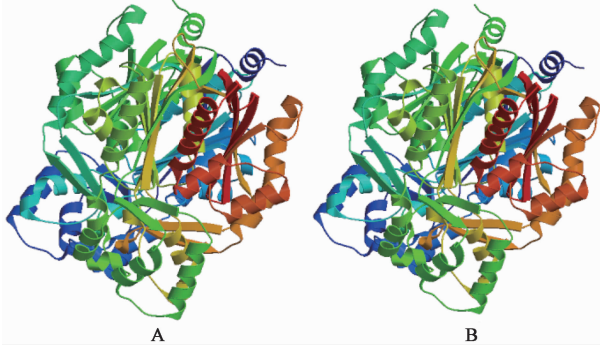
占 40.62%,  $\beta$  转角占 10.80%, 无规卷曲占 29.31%, 延长链占 19.28%; AA9 序列中  $\alpha$  螺旋占 40.10%,  $\beta$  转角占 11.06%, 无规卷曲占 30.33%, 延长链占 18.51%。说明光果甘草 *CHS* 二级结构以  $\alpha$  螺旋和无规卷曲为主。用在线软件 Swiss-Model 构建光果甘草 *CHS* 基因编码蛋白三级结构模型见图 3。结果发现 AA2 和 AA9 的三级结构相同,说明不同单倍型光果甘草 *CHS* 三级结构无明显差异。

**3.6 光果甘草 *CHS* 信号肽、保守结构及跨膜结构域预测** 图 2, 3 结果显示光果甘草中不同 *CHS* cDNA 序列编码氨基酸序列在二级结构及三级结构



A. AA2 二级结构; B. AA9 二级结构; 蓝色代表  $\alpha$  螺旋; 红色代表延长链; 绿色代表  $\beta$  转角; 橙色代表无规卷曲; 紫色代表无二级结构氨基酸  
图 2 光果甘草 CHS 的二级结构

Fig. 2 Secondary structure of CHS in *Glycyrrhiza glabra*



A. AA2 三级结构; B. AA9 三级结构

图 3 光果甘草 CHS 的三级结构

Fig. 3 Tertiary structure of CHS in *Glycyrrhiza glabra*

上均差异较小,因此在后续的信号肽、保守结构域及跨膜结构域预测中仅对主流单倍型 AA2 进行相关性分析。利用 SignalP 4.1 Server 软件进行信号肽预测,见图 4。结果原始剪切位点分值(C),信号肽剪切位点分值(S)和综合剪切位点分值(Y)较低,说明光果甘草 CHS 结构中不含信号肽。用 CDD 预测保守结构域,见图 5。结果显示光果甘草 CHS 包含 1 个查尔酮异构酶超家族结构域。用 TMHMM Server 2.0 进行跨膜结构域预测,见图 6。结果发现跨膜区和膜内部的概率极低,而紫色细线为膜外部,其概率接近 1,说明该蛋白存在于膜外且无跨膜区。

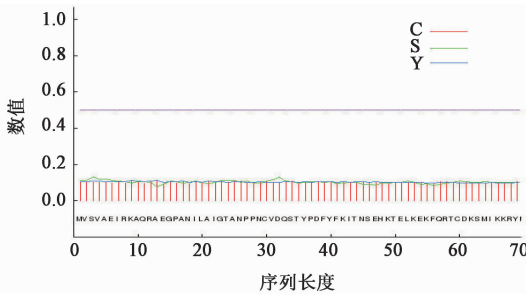


图 4 光果甘草 CHS 信号肽的预测

Fig. 4 Prediction of CHS signal peptides in *Glycyrrhiza glabra*

### 3.7 光果甘草 CHS cDNA 序列及氨基酸序列同源

性分析 从 GenBank 中筛选双子叶植物、单子叶植物、裸子植物、蕨类植物和苔藓类植物的 CHS cDNA 序列 12 条与本文获得的 17 条不重复的光果甘草 CHS cDNA 序列,利用 MEGA 5.0 构建进化树,聚类分析见图 7。获得的 17 种光果甘草 CHS 单倍型与胀果甘草及乌拉尔甘草的 2 种单倍型聚在 1 支,且与同科植物豇豆 *Vigna unguiculata*,大豆 *Glycine max* 等聚为一大支;单子叶植物水仙 *Narcissus tazetta* 和海南龙血树 *Dracaena cambodiana* 聚为 1 支;蕨类植物水蕨 *Ceratopteris thalictroides* 和香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* 聚为 1 支;裸子植物欧洲冷杉 *Abies alba* 和红松 *Pinus koraiensis* 聚为 1 支;苔藓类植物小立碗藓 *Physcomitrella patens* 单独聚为 1 支。整体而言,光果甘草 CHS cDNA 序列与乌拉尔甘草及胀果甘草在进化关系上最近,其次为同科植物豇豆和大豆,而与小立碗藓在进化关系上最远。

选择与 3.7 项下相同的物种,从 GenBank 中筛选物种对应的氨基酸序列 9 条,文献中得到的胀果甘草 CHS 氨基酸序列 1 条以及从 GenBank 中下载得到的乌拉尔甘草 CHS 氨基酸序列 2 条<sup>[16]</sup>,与本文获得的 14 条不同氨基酸序列一起构建进化树,聚类分析见图 8。本实验得到的 14 种 CHS 氨基酸序列类型与乌拉尔甘草及胀果甘草 CHS 氨基酸聚为 1 支,且与同科植物大豆、豇豆聚为一大支;水仙和海南龙血树 2 种单子叶植物聚为 1 支;欧洲冷杉和红松聚为 1 支;水蕨和香鳞毛蕨 2 种蕨类植物以及苔藓类植物小立碗藓分别单独聚为 1 支。整体而言,光果甘草 CHS 氨基酸序列与乌拉尔甘草以及胀果甘草在进化关系上最近,其次为同科植物大豆、豇豆,而与小立碗藓等苔藓植物在进化关系上最远,这与 CHS cDNA 序列聚类分析结果一致。

### 4 讨论

本课题组前期对市售甘草药材的调查研究<sup>[9]</sup>表明,市售甘草药材质量参差不齐,难以达到 2015

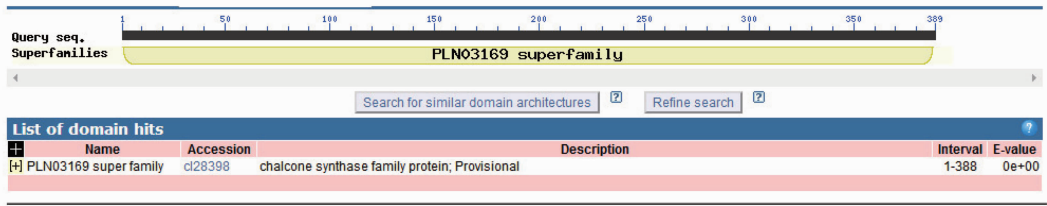


图 5 光果甘草 CHS 的保守结构域预测

Fig. 5 Prediction of CHS conserved domain in *Glycyrrhiza glabra*

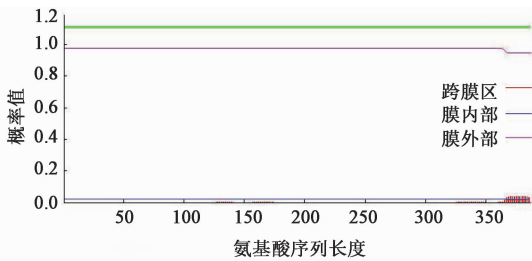


图 6 光果甘草 CHS 的跨膜结构域预测

Fig. 6 Prediction of CHS transmembrane domain in *Glycyrrhiza glabra*

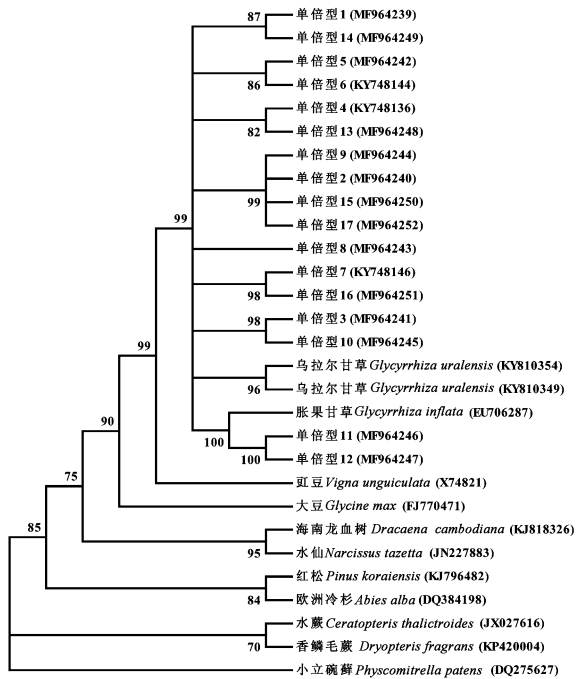


图 7 光果甘草 CHS cDNA 序列的聚类分析

Fig. 7 Cluster analysis of CHS cDNA sequences in *Glycyrrhiza glabra*

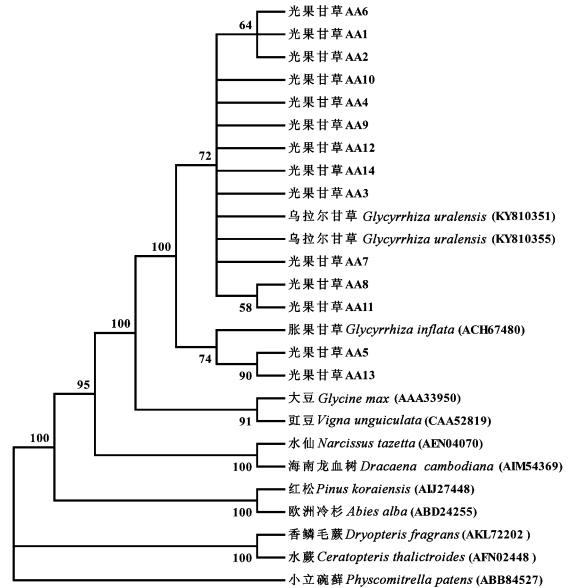


图 8 光果甘草 CHS 氨基酸序列的聚类分析

Fig. 8 Cluster analysis of CHS amino acid sequences in *Glycyrrhiza glabra*

了光果甘草基因库,增加了 CHS 基因的序列类型。

查尔酮合酶广泛存在于植物界,研究表明查尔酮合酶基因 CHS 表达量与植物体内黄酮类物质含量具有一定的相关性,Heredia 等<sup>[17]</sup>以成熟期的番茄为实验材料,通过沉默 CHS 基因的方法发现番茄果皮角质层中的异黄酮成分和 CHS 基因表达呈正相关关系;Wani 等<sup>[18]</sup>对扁担杆属植物 *Grewia asiatica* 的 2 个 *GaCHS* 基因研究发现,该植物的黄酮类化合物柚皮苷、槲皮素的积累量与 CHS 表达量水平呈良好正相关。因此,本课题组通过克隆和分析光果甘草 CHS 基因,可揭示该基因的多态性,为阐明光果甘草黄酮类成分代谢途径的分子机制、筛选优质光果甘草种质资源奠定基础。

本研究从 4 个光果甘草样品中克隆得到了 19 条 CHS 基因序列,通过序列比对和多态性分析,分为 17 种 CHS 单倍型,可翻译成 14 种氨基酸序列,其中 H2 为 CHS 基因主流单倍型,AA2 为主流 CHS 氨基酸序列类型。17 种 CHS 单倍型共存在 81 个变

年版《中国药典》的规定标准;光果甘草是市场流通的主流甘草药材之一,且光果甘草中甘草酸含量位居 3 种甘草前列,因此光果甘草的 CHS 基因多态性具有较高的研究价值。截止目前,在 GenBank 上注册的与 CHS 基因有关的核苷酸序列已有 2 万多条,但未见有关光果甘草的 CHS 基因报道,本研究丰富

异位点,其中同义突变位点 48 个,错义突变位点 33 个;14 种氨基酸序列类型共存在 25 个变异位点。生物信息学分析表明光果甘草 *CHS* cDNA 序列编码蛋白为稳定性亲水蛋白,平均相对分子质量为 42.6 kDa,等电点 5.75~6.21,不含信号肽,无跨膜区,保守结构域包含 1 个查尔酮合酶超家族结构域,二级结构以  $\alpha$  螺旋和无规卷曲为主,不同 *CHS* 氨基酸序列的三级结构具有较高的一致性。因此,光果甘草中不同 *CHS* cDNA 序列间的功能差异还有待进一步的实验验证。聚类分析结果表明 *CHS* 基因在种间同源性相对较低,光果甘草相对于豇豆和大豆 *CHS* cDNA 序列一致性仅 88.06%,因此给同源克隆造成了一定的难度,但胀果甘草 *CHS* cDNA 序列和光果甘草 *CHS* cDNA 序列一致性可达 96.26%,这也是本实验能成功克隆出光果甘草 *CHS* 基因的原因之一。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:86-87.

[2] Kwon H M, Choi Y J, Choi J S, et al. Blockade of cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression by licorice isoliquiritigenin through NF- $\kappa$ B signal disruption[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2007, 232(2):235-245.

[3] Kim Y W, ZHAO R J, Park S J, et al. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(1):165-173.

[4] Sato Y, HE J X, Nagai H, et al. Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of *Glycyrrhiza uralensis* roots, acts in the lower part of intestine[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(1):145-149.

[5] Lee C K, Son S H, Park K K, et al. Isoliquiritigenin inhibits tumor growth and protects the kidney and liver against chemotherapy-induced toxicity in a mouse xenograft model of colon carcinoma [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 106(3):444-451.

[6] ZHAO Z, WANG W, GUO H, et al. Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats[J]. *Behav Brain Res*, 2008, 194(1):108-113.

[7] Koes R E, Quattrocchio F, Joseph N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution [J]. *Bioessays*, 1994, 16(2):123-132.

[8] 钟德馨,方袁梦梦,郭壮浩,等. 决明查尔酮合酶全长基因序列的克隆与分析[J]. *生物技术通报*, 2013, 1(5):99-104.

[9] 杨瑞,李文东,马永生,等. 不同基原甘草的分子鉴定及市售甘草药材的质量评价[J]. *药学报*, 2017, 52(2):318-326.

[10] Reimold U, Kröger M, Kreuzaler F, et al. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme[J]. *EMBO J*, 1983, 2(10):1801-1805.

[11] Lo C, Coolbaugh R C, Nicholson R L. Molecular characterization and in silico expression analysis of a chalcone synthase gene family in *Sorghum bicolor* [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2002, 61(3):179-188.

[12] Franken P, Niesbach-Klößgen U, Weydemann U, et al. The duplicated chalcone synthase genes *C2* and *Whp* (*white pollen*) of *Zea mays* are independently regulated; evidence for translational control of *Whp* expression by the anthocyanin intensifying gene in [J]. *EMBO J*, 1991, 10(9):2605-2612.

[13] 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):647-656.

[14] Mckhamm H I, Hirsch A M. Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNA from alfalfa (*Medicago sativa* L.): highest transcript levels occur in young roots and root tips [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24(5):767-777.

[15] SUN W, MENG X, LIANG L, et al. Molecular and biochemical analysis of chalcone synthase from *Freesia hybrida* in flavonoid biosynthetic pathway [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0119054.

[16] 许恒飞. 胀果甘草细胞培养及查尔酮合酶基因的 cDNA 克隆[D]. 保定:河北大学,2008.

[17] Heredia A, Heredia-Guerrero J A, Dominguez E. *CHS* silencing suggests a negative cross-talk between wax and flavonoid pathways in tomato fruit cuticle [J]. *Plant Signal Behav*, 2015, 10(5):e1019979.

[18] Wani T A, Pandith S A, Gupta A P, et al. Molecular and functional characterization of two isoforms of chalcone synthase and their expression analysis in relation to flavonoid constituents in *Grewia asiatica* L. [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6):e0179155.

[责任编辑 刘德文]