

## X射线辐照处理甘草样品中 *CHS* 基因多态性及其功能解析

田少凯<sup>1</sup>, 侯嘉铭<sup>1</sup>, 张智新<sup>1</sup>, 杨林<sup>1</sup>, 肖瑶<sup>2\*</sup>, 刘颖<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

**摘要:** 查尔酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 是催化甘草黄酮类化合物生物合成的第一个限速酶, 具有重要调控作用。本文以X射线辐照处理的黄酮高含量甘草以及未经辐照处理的黄酮低含量甘草为实验材料, 分析黄酮高/低含量组甘草的 *CHS* 基因多态性, 筛选其主流单倍型, 并解析其功能。6株样品共克隆得到109条长度均为1 170 bp的 *CHS* cDNA 序列, 存在220个变异位点 (错义突变位点116个), 可分为85种单倍型, 编码65种氨基酸序列类型, 存在96个变异位点。黄酮高含量组主流氨基酸序列类型为aa-20和aa-45, 低含量组主流氨基酸序列类型为aa-11, 结合靶点预测结果显示aa-20的383位点和aa-45的229位点位于结合位点区域, 与底物结合相关, 而aa-11的229位点和383位点均与底物结合无关, 因此推测CHS的229位点和383位点对其功能具有重要影响。本文对丰富的 *CHS* 基因型进行序列分析, 找到了影响其活性的重要位点, 为解析其功能奠定了基础, 也为进一步阐述甘草黄酮类化合物生物合成的分子调控机制提供了思路。

**关键词:** 甘草; 甘草黄酮; 辐照; 查尔酮合酶; 基因多态性

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)09-2207-09

## Analysis of *CHS* gene polymorphisms and function in X-ray irradiated *Glycyrrhiza uralensis*

TIAN Shao-kai<sup>1</sup>, HOU Jia-ming<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-xin<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>1</sup>, XIAO Yao<sup>2\*</sup>, LIU Ying<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**Abstract:** Chalcone synthase (CHS) is the rate-limiting enzyme involved in the biosynthetic pathway of flavonoids in *Glycyrrhiza uralensis*. It plays an important role in the regulation and control of flavonoids biosynthesis. In this study, X-ray irradiated *G. uralensis* samples with high or low content of flavonoids were studied. The *CHS* gene polymorphism in these samples were analyzed, the specific haplotypes were identified, and CHS function was parsed. 109 *CHS* cDNA sequences with a length of 1 170 bp were cloned, 220 variable sites (116 missense mutation sites) were found and 85 haplotypes were identified, which encoded 65 amino acid sequences with 96 variable sites. aa-20 and aa-45 were the most common amino acid sequences in samples with high flavonoid content, while aa-11 was the most sequence in samples with low flavonoid content. Molecular docking results showed that the mutation sites at 383 in aa-20 and 229 in aa-45 were related to substrate binding, while the mutation sites at 383 and 229 in aa-11 were not involved. Therefore, we speculate that the two mutation sites have significant influence on the function of CHS. We analyzed a large number of *CHS* cDNA sequences and identified the important functional sites, which will provide a basis for further functional studies. This paper will provide ideas for further research of the molecular regulation of the flavonoid biosynthetic pathway in *G. uralensis*.

收稿日期: 2020-03-20; 修回日期: 2020-04-13.

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

\*通讯作者 Tel: 86-10-53912163, E-mail: liuyliwd@bucm.edu.cn;

Tel: 86-10-53912136, E-mail: xiaoyao9510@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0362

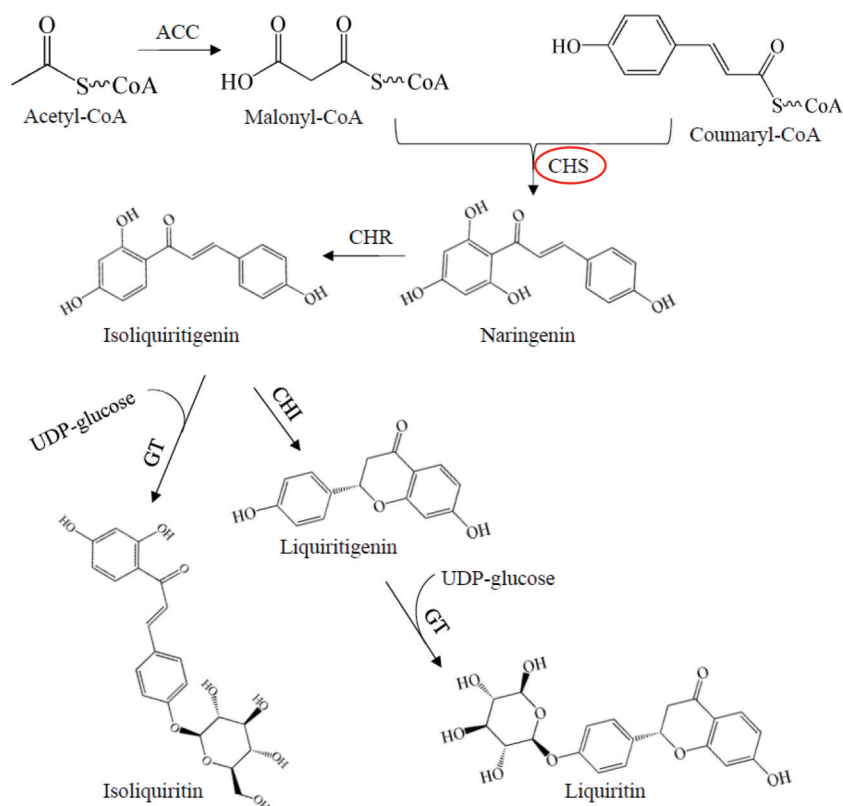
**Key words:** *Glycyrrhiza uralensis*; licorice flavonoids; X-ray; chalcone synthase; gene polymorphism

甘草为豆科甘草属多年生草本植物,其始载于《神农本草经》,在我国具有两千多年的药用历史,素有“国老药”、“十方九草”之美誉。2015版《中华人民共和国药典》规定,药用植物甘草的检测指标为黄酮类化合物甘草苷和三萜类化合物甘草酸<sup>[1]</sup>。黄酮类化合物是甘草中一类重要的活性成分,是其发挥抗炎<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4,5]</sup>、抗糖尿病<sup>[6]</sup>等药理作用不可替代的成分。甘草中最主要的黄酮类化合物包括:甘草苷 (liquiritin)、异甘草苷 (isoliquiritin)、甘草素 (liquiritigenin) 和异甘草素 (isoliquiritigenin),其生物合成途径如图1所示:3分子丙二酰辅酶A和1分子香豆酰辅酶A在查尔酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 催化下生成柚皮素查尔酮 (naringenin),继而在查尔酮还原酶 (chalcone reductase, CHR) 催化下生成异甘草素;异甘草素和UDP-葡萄糖可被糖基转移酶 (glycosyl transferase, GT) 催化生成异甘草苷;同时异甘草素也可被查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 催化生成甘草素;而甘草素可在GT催化下获得糖基,生成甘草苷。CHS是该途径的第一个限速酶,在黄酮类化合物生物合成中发挥

着重要调控作用。

自1983年报道荷兰芹 (*Petroselinum crispum*)<sup>[7]</sup>的CHS基因以来,已从丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)<sup>[8]</sup>、丁香 (*Syringa oblata*)<sup>[9]</sup>、葡萄 (*Vitis vinifera*)<sup>[10]</sup>、紫茉莉 (*Mirabilis himalaca*)<sup>[11]</sup>等近百种植物中克隆得到该基因。目前,GenBank上注册了13 000余条植物CHS基因,包括DNA 7 500余条,mRNA 5 500余条。CHS基因属于多基因家族,结构保守,多数CHS基因由一个内含子和两个外显子组成,其家族成员在黄酮生物合成途径的多个环节发挥作用<sup>[12]</sup>,可被多种因子调控<sup>[13]</sup>。研究表明,在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中过表达CHS基因可提高黄酮类化合物含量,而沉默CHS基因则使黄酮类化合物含量降低<sup>[14]</sup>。青蒿 (*Artemisia annua*) 中CHS基因表达量上调时,黄酮类化合物含量显著提高<sup>[15]</sup>。

植物在长期进化的过程中,由于自然突变的作用,遗传基因会发生不同程度的变异,形成基因多态性,其中功能基因的多态性对于调控产物的合成具有显著影响。就药材而言,药效物质的含量高低是评价其质量的决定性因素,因此功能基因的多态性同样是导致其质量差异



**Figure 1** Biosynthetic pathway of liquiritin. ACC: Acetyl-CoA carboxylase; CHS: Chalcone synthase; CHR: Chalcone reductase; CHI: Chalcone isomerase; GT: Glycosyltransferase

的分子基础。本课题组前期研究发现甘草三萜生物合成途径中 $\beta$ -香树酯醇合酶( $\beta$ -amyrin synthase,  $\beta$ -AS)<sup>[16]</sup>、鲨烯合酶(squalene synthase, SQS)<sup>[17]</sup>、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGR)<sup>[18]</sup>的基因多态性会明确影响甘草酸的含量。因此,推测甘草苷等黄酮类化合物的生物合成也受到功能基因多态性的影响。

辐照诱变技术由于具有突变率高、育种周期短等优点,近年来已成为获得药用植物新种质资源的有效途径之一<sup>[19]</sup>。Gao等<sup>[20]</sup>对空间飞行后的甘草进行分子标记,发现其基因组多态性的变化会影响次生代谢产物的积累。本课题组前期利用X射线辐照处理乌拉尔甘草种子,栽培一年后进行HPLC含量测定,结果显示辐照组三萜类和黄酮类成分含量均显著高于空白对照组<sup>[21]</sup>。因此,本文仍采用X射线辐照处理甘草样品,丰富其基因多样性,寻找CHS的功能位点,并深入解析CHS基因多态性影响甘草黄酮类化合物生物合成的分子机制。

## 材料与方法

**植物材料** 经X射线辐照处理的乌拉尔甘草种子,在北京中医药大学药草园栽培一年,利用HPLC检测样品中4种黄酮类化合物的含量,挑选含量最高的3株X射线辐照处理样品和含量最低的3株空白对照样品作为本实验的植物材料,样品信息见表1。

**试剂** ESPY spin植物RNA快速提取试剂盒、Oligo dT、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒、M-MLV(Rnase H<sup>-</sup>)、大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞等均购于北京博迈德基因技术有限公司;引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;氨苄青霉素(ampicillin, Amp)和LB培养基所需药品均购于北京冠星宇科技有限公司;pMD-19T载体、LA Taq DNA聚合酶等购于TaKaRa公司。

**仪器** 1-13000型离心机(Sigma公司);TC-3000 PCR扩增仪(英国Techne公司);DYY-6C电泳仪(北京市六一仪器厂);H6-1微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂);酶标仪(美国Biotek Epoch公司);恒温金

属浴(德国Eppendorf公司);恒温震荡培养箱(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司);凝胶成像系统(Gene Genius公司);LRH-250生化培养箱(上海一恒科技有限公司)。

**甘草总RNA提取及逆转录** 取6份甘草主根于液氮中研磨至粉末,使用ESPY spin植物RNA快速提取试剂盒提取总RNA,采用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,使用酶标仪测定OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>以确定RNA纯度和浓度。以所提RNA为模板,Oligo dT为引物,使用M-MLV(Rnase H<sup>-</sup>)逆转录试剂盒反转录生成cDNA。

**甘草CHS基因的PCR扩增** 根据GenBank上已注册的胀果甘草CHS序列(EU706287),运用软件Primer Premier 5.0设计引物序列如下:

F: 5'-CAATGGTGAGCGTAGCTGAAATTC-3'

R: 5'-CAATCATATAGCCACACTGTGCAG-3'

以cDNA为模板,25  $\mu$ L PCR扩增体系包括:1  $\mu$ L cDNA、18.25  $\mu$ L H<sub>2</sub>O、0.5  $\mu$ L上游引物F(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)、0.5  $\mu$ L下游引物R(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)、2.0  $\mu$ L dNTP、2.5  $\mu$ L 10 $\times$  Buffer、0.25  $\mu$ L LA Taq酶。PCR扩增程序:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 15 s,56  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 90 s(30个循环);72  $^{\circ}$ C 10 min;4  $^{\circ}$ C保存。

**CHS基因片段胶回收、连接、转化及测序** 采用北京博迈德基因技术有限公司的琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒,严格按照操作说明回收目的条带。将回收产物与pMD-19T载体于16  $^{\circ}$ C金属浴中连接12 h,连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,37  $^{\circ}$ C、180 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>复苏45 min后涂布于含50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> Amp的LB平板上,37  $^{\circ}$ C倒置培养过夜,挑取单克隆,接种于LB液体培养基(含50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> Amp),37  $^{\circ}$ C、220 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>培养过夜。以菌液为模板进行PCR,阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。对所有序列进行重复测序,同时结合碱基质量峰图,最大限度降低因测序误差造成的基因多态性误差。

**序列分析及同源建模** 使用软件DNAMAN 6.0.3.99比对全部CHS cDNA序列;使用软件Editseq 7.1.0进行序列翻译;利用在线软件Swiss-model进行

**Table 1** Information of six *Glycyrrhiza uralensis* samples

Groups	No.	Level of X-ray/Gy	Content/mg $\cdot$ g <sup>-1</sup>			
			Liquiritin	Isoliquiritin	Liquiritigenin	Isoliquiritigenin
Blank control group with low flavonoids contents	1	0	0.040 9	0.105 0	0.016 6	0.036 7
	2	0	0.038 6	0.050 9	0.040 7	0.026 9
	3	0	0.796 9	0.115 3	0.141 1	0.048 0
X-ray irradiated group with high flavonoids contents	1	50	11.120 1	1.504 7	0.552 8	0.084 9
	2	50	11.764 9	1.889 7	0.603 6	0.146 7
	3	5	15.550 2	2.221 3	0.582 1	0.055 3

同源模建; 利用 SAVES 服务器分析评价同源模建蛋白; 以丙二酰辅酶 A 和香豆酰辅酶 A 为底物, 采用 Discovery Studio 2.5 预测模建蛋白结合位点。

## 结果与讨论

### 1 甘草 *CHS* 基因的 PCR 扩增及测序结果

如图 2 所示, PCR 扩增获得了长度约为 1 200 bp 的特异性条带, 测序结果显示所得片段长度为 1 175 bp, 包含长度为 1 170 bp 的完整开放阅读框, 编码 1 条由 389 个氨基酸残基组成的多肽链。BLAST 分析发现该片段与乌拉尔甘草 *CHS* 基因序列 (KY810370) 一致性为 99%, 表明 *CHS* 基因序列克隆成功。6 份甘草样品共克隆得到 109 条 *CHS* 基因 cDNA 序列, DNAMAN 比对分析确定了 85 种单倍型, 共编码 65 种氨基酸序列类型, 在 GenBank 中对所有序列进行注册, 列于表 2 中。其中, 红色标出的单倍型仅存在于 X 射线辐照处理后的黄酮高含量组中 (38 种), 未采用红色标记的单倍型仅存在于空白组中 (47 种)。黄酮高含量组的 38 种单倍型一致性为 98.84%, 其中单倍型 28 占比最高 (15.09%), 其次为单倍型 63 (9.43%), 为该组的主流单倍型; 空白对照组的 47 种单倍型一致性为 99.35%, 单倍型 12 占比最高 (10.71%), 为该组的主流单倍型。65 种氨基酸序列中, 黄酮高含量组具有 23 种, 序列一致性为 99.43%, 其中 aa-20 占比最高 (43.40%), 其次为 aa-45 (16.98%), 是该组的主流 *CHS* 氨基酸序列类型; 空白对照组具有 42 种, 序列一致性为 99.32%, 其中 aa-11 占比最高 (16.08%), 是该组的主流 *CHS* 氨基酸序列类型。

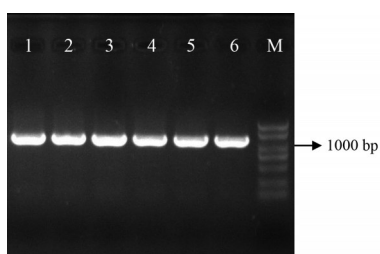


Figure 2 *CHS* cloning result. M: Marker, 1–6: Samples

### 2 甘草 *CHS* cDNA 序列及 *CHS* 氨基酸序列变异位点分析

85 种 *CHS* cDNA 单倍型共存在 220 个变异位点, 其中错义突变位点为 116 个, 统计结果如表 3 所示。65 种 *CHS* 氨基酸序列共存在 96 个变异位点, 统计结果如表 4 所示。在 X 射线辐照处理黄酮高含量组的全部氨基酸序列中, 193 位点的 V/I 变异频率为 35.85%; 229 位点的 I/V 变异频率为 37.74%; 383 位点的 I/V 变异频率为 100%。在空白对照组的全部氨基酸序列中, 193 位

点的 V/I 变异频率为 4.84%; 229 位点的 I/V 变异频率为 4.84%; 383 位点的 I/V 变异频率为 24.20%。黄酮高含量组样品在这 3 个位点的变异频率均显著高于空白对照组样品, 故推测这 3 个位点的突变与黄酮的积累水平相关。

### 3 *CHS* 单倍型聚类结果

85 种甘草 *CHS* 单倍型聚类分析结果如图 3 所示。整体而言, 黄酮高含量组和空白对照组甘草样品 *CHS* cDNA 序列区分度良好, 表明辐照处理后黄酮高含量组和空白对照组间 *CHS* 序列差异明显。

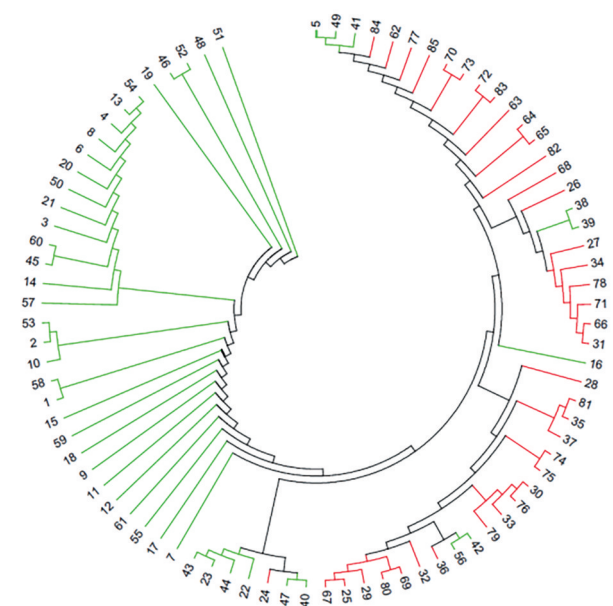


Figure 3 Clusters of 85 *CHS* cDNA sequences cloned from 6 *G. uralensis* samples. Red: X-ray irradiated samples; Green: Black control samples

### 4 同源模建分析结果

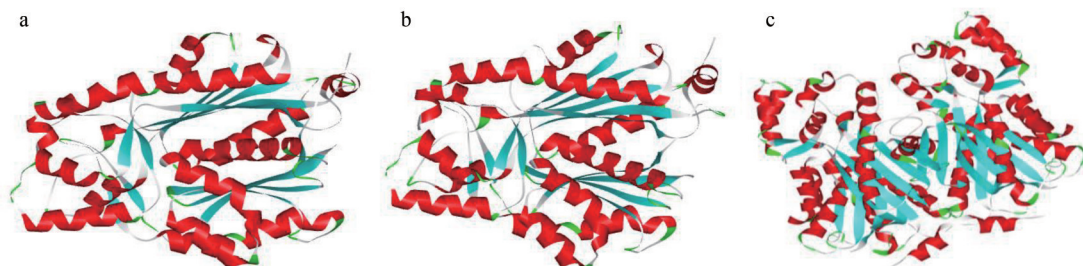
利用在线软件 Swiss-model 对黄酮高含量组的主流 *CHS* 氨基酸序列类型 aa-20、aa-45 及空白对照组的主流 *CHS* 氨基酸序列类型 aa-11 进行同源模建, 结果如图 4 所示。三条氨基酸序列共用一个模版 (PDB 数据库 ID: 1BI5)。利用 SAVES 服务器对同源模建蛋白进行评价分析, aa-11、aa-20、aa-45 三维模型的 Verify-3D 值分别为 89.85%、89.85%、91.26%; ERRAT 值分别为 98.6877、98.6877、98.1627; 拉氏图的最适残基量分别为 93.1%、93.1%、92.8%, 以上结果表明 aa-11、aa-20 及 aa-45 的模建蛋白均具有良好的空间结构和立体化学参数, 可用于后续分析。

### 5 结合位点预测结果

利用 Discovery Studio 2.5 预测模建蛋白的结合位点, 结果如图 5 所示, aa-20 的 383 位缬氨酸 (valine, V) 位于结合位点区域, 能够与香豆酰辅酶 A 结合, aa-45

**Table 2** GenBank accession number of 85 haplotypes and 65 amino acid sequences cloned from the 6 *G. uralensis* samples. Notes: Haplotypes marked by red only present in X-ray irradiated group

Haplotypes	Frequency of haplotypes/%	Amino acid sequences types	Frequency of amino acid sequence types/%	GenBank accession No.	Haplotypes	Frequency of haplotypes/%	Amino acid sequences types	Frequency of amino acid sequence types/%	GenBank accession No.
1	1.79	aa-1	1.79	MF979309	44	1.79	aa-26	1.79	MF979333
2	1.79	aa-2	1.79	MF979310	45	1.79	aa-27	1.79	MF979334
3	1.79	aa-3	1.79	MF979311	46	1.79	aa-28	1.79	MF979335
4	1.79	aa-4	1.79	MF979312	47	3.57	aa-29	3.57	MF979336
5	1.79	aa-5	1.79	MF979313	48	1.79	aa-30	1.79	MF979338
6	1.79	aa-6	1.79	MF979314	49	1.79	aa-31	1.79	MF979339
7	1.79	aa-7	1.79	MF979315	50	1.79	aa-32	1.79	MF979340
8	1.79	aa-8	1.79	MF979316	51	1.79	aa-33	1.79	MF979341
9	1.79	aa-9	1.79	MF979317	52	1.79	aa-34	1.79	MF979343
10	1.79	aa-10	1.79	MF979318	53	1.79	aa-35	1.79	MF979345
11	1.79	aa-11	16.08	MF979319	54	1.79	aa-36	1.79	MF979346
12	10.71			KY748116	55	1.79	aa-37	1.79	MF979347
13	1.79			MF979342	56	1.79	aa-38	1.79	MF979348
14	1.79			MF979344	57	1.79	aa-39	1.79	MF979349
15	1.79	aa-12	1.79	MF979320	58	1.79	aa-40	1.79	MF979350
16	1.79	aa-13	1.79	MF979321	59	1.79	aa-41	1.79	MF979351
17	1.79	aa-14	1.79	MF979322	60	1.79	aa-42	1.79	MF979352
18	1.79	aa-15	1.79	MF979323	61	1.79	aa-43	1.79	MF979353
19	1.79	aa-16	1.79	MF979324	62	1.89	aa-44	1.89	MF979354
20	1.79	aa-17	1.79	MF979325	63	9.43	aa-45	16.98	MF979356
21	1.79	aa-18	1.79	MF979326	64	5.66			MF979381
22	1.79	aa-19	3.58	KY810388	65	1.89			MF979382
23	1.79			MF979329	66	1.89	aa-46	1.89	MF979358
24	1.89	aa-20	43.40	MF979327	67	1.89	aa-47	1.89	MF979359
25	1.89			MF979355	68	1.89	aa-48	1.89	MF979360
26	1.89			MF979357	69	1.89	aa-49	1.89	MF979361
27	5.66			KY748118	70	1.89	aa-50	1.89	MF979362
28	15.09			KY748125	71	1.89	aa-51	1.89	MF979364
29	1.89			MF979363	72	1.89	aa-52	1.89	MF979365
30	1.89			MF979367	73	1.89	aa-53	1.89	MF979366
31	1.89			MF979373	74	1.89	aa-54	1.89	MF979368
32	1.89			MF979376	75	1.89	aa-55	1.89	MF979369
33	1.89			MF979378	76	1.89	aa-56	1.89	MF979370
34	1.89			MF979384	77	1.89	aa-57	1.89	MF979371
35	1.89			MF979386	78	3.77	aa-58	3.77	MF979372
36	1.89			MF979387	79	1.89	aa-59	1.89	MF979374
37	1.89			MF979388	80	1.89	aa-60	1.89	MF979375
38	1.79	aa-21	3.57	KY748156	81	1.89	aa-61	1.89	MF979377
39	1.79			MF979337	82	1.89	aa-62	1.89	MF979379
40	1.79	aa-22	1.79	MF979328	83	1.89	aa-63	1.89	MF979380
41	1.79	aa-23	1.79	MF979330	84	1.89	aa-64	1.89	MF979383
42	1.79	aa-24	1.79	MF979331	85	1.89	aa-65	1.89	MF979385
43	3.57	aa-25	3.57	MF979332					

**Figure 4** The homology modeling results of aa-11, aa-20 and aa-45. a: aa-11; b: aa-20; c: aa-45

**Table 3** Variable sites of the 85 *CHS* haplotypes. Notes: "0" refers to synonymous mutation, "1" refers to missense mutation, mutation sites marked by red only present in X-ray irradiated group

Variable sites	Variation	Types	Variable sites	Variation	Types	Variable sites	Variation	Types	Variable sites	Variation	Types	Variable sites	Variation	Types
26	C/T	0	221	A/G	0	474	A/G	1	694	A/T	1	956	T/C	0
35	A/G	0	223	A/G	1	475	T/C	1		A/G	1	958	T/C	1
42	G/A	1	231	T/C	0	477	A/G	1	703	A/G	1	962	G/A	0
45	G/A	1	240	A/G	1	481	A/G	1	707	T/C	0	967	A/G	1
48	C/T	1	242	T/C	0	484	A/G	1	717	T/C	0	969	A/T	1
50	T/G	0	245	T/C	0	485	A/G	0		T/G	1	970	A/G	1
58	T/C	1	246	A/G	1	487	A/G	1	728	T/G	0	973	T/C	1
62	G/A	0	254	T/C	0	494	C/T	0	740	A/G	1	994	T/C	1
68	T/C	0	255	G/A	1	500	A/G	0	748	A/G	1	998	T/C	0
70	G/A	1	260	T/C	0	501	G/T	1	752	T/C	0	1003	A/G	1
71	C/T	0	261	A/G	1	507	A/G	1	759	G/A	1	1006	G/A	1
80	C/T	0	266	G/A	0	514	T/C	1	760	C/T	1	1010	T/C	0
83	A/G	0	269	T/C	0	520	T/C	1	767	T/C	0	1022	A/T	0
87	A/G	1	270	T/C	1	532	T/C	1	770	T/C	0	1027	T/C	1
88	A/G	1	272	T/C	0	536	G/A	0	776	T/G	0	1028	C/T	0
89	C/T	0	277	A/G	1	541	A/G	1	782	A/G	0	1029	C/T	0
90	T/C	1	278	C/T	0	542	C/T	0	796	T/C	1	1038	T/C	0
94	T/C	1	282	A/G	1	543	A/G	0	797	T/C	0	1042	A/G	1
100	A/G	1	286	A/G	1	555	C/T	1	800	T/C	0	1046	G/A	0
101	G/A	0	296	G/C	0	557	T/C	0	802	T/C	1	1047	A/G	1
105	A/G	1	299	C/T	0	565	T/C	1	803	T/C	0	1048	T/C	1
109	A/G	1	312	A/G	1	579	G/A	1	812	T/C	0	1058	A/G	0
118	T/C	1	319	G/A	1	580	T/C	1	824	T/A	0	1061	A/G	0
121	A/G	1	332	A/G	0	596	C/T	0	835	A/G	1	1063	C/T	1
126	A/G	0	336	A/G	1	599	T/C	0	837	A/G	1	1067	A/G	0
137	T/C	0	338	A/G	0	606	A/G	1	838	T/C	1	1070	T/C	0
145	A/C	0	345	A/G	1	608	T/A	0	839	T/C	0	1073	A/G	0
156	C/T	1	352	G/A	1	618	C/T	0	842	T/C	0	1075	T/C	1
160	A/G	1	359	A/G	0	620	G/A	0	850	T/C	1	1080	A/G	1
174	C/T	1	368	G/A	0	623	T/C	0	855	G/A	1	1094	G/A	0
177	A/G	1	373	T/C	1	628	T/C	1	856	A/G	1	1097	T/C	0
178	T/C	1	386	C/T	0	631	T/C	1	866	A/G	0	1107	G/T	1
180	T/C	1	390	T/C	1	638	A/G	0	867	C/T	1	1109	G/A	0
182	T/C	0	396	A/G	1	641	A/G	0	872	A/G	0	1121	T/C	0
185	T/C	0	398	T/C	0	642	T/C	0	874	G/A	1	1124	A/G	0
189	T/C	1	401	T/C	0	647	T/C	0	878	C/A	0	1127	T/G	0
191	T/C	0	404	T/A	0	665	A/G	0	886	A/G	1	1145	T/A	0
195	A/G	1	411	A/G	1	673	T/C	1	888	A/G	1	1149	A/G	1
201	A/T	1	419	C/T	0	678	T/C	1	895	T/C	1	1152	C/T	0
202	A/G	1	431	G/A	0	680	T/C	0	917	T/C	0	1162	T/-	1
204	C/A	1	452	T/C	0	686	A/G	0	923	G/A	0	1167	A/-	1
208	A/G	1	455	C/T	0	687	A/G	1		G/T	0	1168	T/A	1
	A/T	1	463	T/C	1	688	T/C	1	931	T/C	1	1169	A/T	1
209	T/C	0	465	A/G	1	692	T/A	0	949	A/G	1	1170	T/-	1
216	C/A	1	473	T/C	0		T/C	0	952	T/C	1	1175	G/A	1

的229位缬氨酸位于结合位点区域,能够与丙二酰辅酶A结合,而aa-11的229位和383位的异亮氨酸(isoleucine, I)均与底物结合无关。以上结果与黄酮高/低含量组CHS氨基酸序列变异位点分析结果一致,进一步解释了229、383位点处的变异与黄酮积累水平相关。

## 6 讨论

甘草中发现的黄酮类化合物超过300余种,囊括

了花青素之外的所有黄酮小类<sup>[22]</sup>。近些年报道较多的黄酮类化合物是甘草苷、异甘草苷、甘草素和异甘草素,研究主要集中在药理活性方面,而对其次生代谢途径分子调控的研究较少。本文以甘草黄酮类生物合成途径入口酶CHS为研究对象,探讨其基因多态性对黄酮类化合物生物合成的影响作用。

*CHS*属于多基因家族,近年来,越来越多的*CHS*基因从大豆(*Glycine max*)<sup>[23]</sup>、桑树(*Morus atropur-*



*CHS* 基因和氨基酸序列的多态性, 发现氨基酸序列 142 位点和 336 位点突变对 *CHS* 功能影响较大。本课题组前期对自然生长的甘草 *CHS* 基因多态性进行了分析<sup>[31]</sup>, 发现 *CHS* 氨基酸序列 229 位点的变异会影响甘草苷的生物合成。相较于其他学者以及本课题组的前期研究, 在本研究中采用 X 射线辐照处理甘草种子, 栽培一年后作为实验材料, 这大大提高了甘草样品基因变异的频率, 丰富了 *CHS* 基因多样性, 在此基础上确定了黄酮高/低含量组共计 85 种 *CHS* 单倍型, 从丰富的单倍型中进一步筛选出黄酮高/低含量组对应的主流 *CHS* 单倍型及氨基酸序列, 并分析其功能, 深入挖掘酶的活性位点。根据氨基酸序列变异位点分析, 推测 193、229、383 位点的突变会影响 *CHS* 的功能, 进一步利用黄酮高/低含量组的主流氨基酸序列类型 aa-20、aa-45、aa-11 进行结合位点预测分析, 发现黄酮高含量组 aa-20 的 383 位点和 aa-45 的 229 位点均与底物结合有关, 而黄酮低含量组 aa-11 的 229 位点和 383 位点均不在位点结合域内, 与底物结合无关。因此证明除 229 位点的突变会对 *CHS* 功能产生较大影响之外, 383 位点变异同样会影响 *CHS* 的功能。本研究为解析甘草 *CHS* 基因的功能奠定了基础, 也为其他药用植物功能基因多态性研究提供了思路。

**作者贡献:** 刘颖和肖瑶设计并指导了本文全部实验及论文写作; 田少凯撰写了本论文并与侯嘉铭一起完成实验; 杨林和张智新参与了实验数据分析。

**利益冲突:** 本文作者均无利益冲突。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part 1 (中华人民共和国药典一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 87.
- [2] Yu XM, Bao YR, Meng XS, et al. Multi-pathway integrated adjustment mechanism of licorice flavonoids presenting anti-inflammatory activity [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18: 4956-4963.
- [3] Funakoshi-Tago M, Tanabe S, Tago K, et al. Licochalcone A potently inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced nuclear factor- $\kappa$ B activation through the direct inhibition of I $\kappa$ B kinase complex activation [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 76: 745-753.
- [4] Frattaruolo L, Carullo G, Brindisi M, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) leaf phytocomplexes: identification of licoflavone as a modulator of NF- $\kappa$ B/MAPK pathway [J]. *Antioxidants*, 2019, 8: 186.
- [5] Fu Y, Chen J, Li YJ, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice [J]. *Food Chem*, 2013, 141: 1063-1071.
- [6] Gosch C, Halbwirth H, Stich K. Phloridzin. Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71: 838-843.
- [7] 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: 1801-1805.
- [8] Deng YX, Li CL, Li HQ, et al. Identification and characterization of flavonoid biosynthetic enzyme genes in *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae) [J]. *Molecules*, 2018, 23: 1467.
- [9] Wang Y, Dou Y, Wang R, et al. Molecular characterization and functional analysis of chalcone synthase from *Syringa oblata* Lindl. in the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *Gene*, 2017, 635: 16-23.
- [10] Wang H, Wang W, Zhan J, et al. The accumulation and localization of chalcone synthase in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 106: 165-176.
- [11] Lan X, Quan H, Xia X, et al. Molecular cloning and transgenic characterization of the genes encoding chalcone synthase and chalcone isomerase from the Tibetan herbal plant *Mirabilis himalaical* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 63: 419-426.
- [12] Hu L, He H, Zhu C, et al. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the chalcone synthase gene family in rice [J]. *J Plant Res*, 2017, 130: 95-105.
- [13] Du F, Fan J, Wang T, et al. Identification of differentially expressed genes in flower, leaf and bulb scale of *Lilium oriental* hybrid 'Sorbonne' and putative control network for scent genes [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18: 899.
- [14] Chen LJ, Guo HM, Yi L, et al. Chalcone synthase EaCHS1 from *Eupatorium adenophorum* functions in salt stress tolerance in tobacco [J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34: 885-894.
- [15] Dilshad E, Zafar S, Ismail H, et al. Effect of rol genes on polyphenols biosynthesis in *Artemisia annua* and their effect on antioxidant and cytotoxic potential of the plant [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 179: 1456-1468.
- [16] Hu T, Liu ZZ, Tian SK, et al. Polymorphism of  $\beta$ -amyrin synthase gene ( $\beta$ -AS) influence the accumulation of triterpenes in licorice [J]. *S Afr J Bot*, 2019, 125: 310-320.
- [17] Liu Y, Zhang N, Wang XY, et al. Researches on influence of squalene synthase gene polymorphism on catalytic efficiency of its encode enzyme in *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 3777-3783.
- [18] Liu Y, Xu QX, Wang XY, et al. Analysis on correlation between 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene polymorphism of *Glycyrrhiza uralensis* and content of glycyrrhizic acid [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 3789-3792.
- [19] Jia C, Li A. Advances in studies on radiating mutation breeding of medicinal plants in China [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38: 633-636.

- [20] Gao WY, Li KF, Yan S, et al. Effects of space flight on DNA mutation and secondary metabolites of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) [J]. *Sci China C Life Sci*, 2009, 52: 977-981.
- [21] Hu T, Gao ZQ, Ma YS, et al. Effect of X-ray irradiation treatment on contents of triterpenoids and flavonoids in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2017, 23: 17-21.
- [22] Wang X, Zhang H, Chen L, et al. Licorice, a unique "guide drug" of traditional Chinese medicine: a review of its role in drug interactions [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150: 781-790.
- [23] Anguraj VAK, Krysiak K, Tian G, et al. Genome-wide identification and localization of chalcone synthase family in soybean (*Glycine max* [L] Merr) [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18: 325-325.
- [24] Wang CH, Zhi S, Liu CY, et al. Isolation and characterization of a novel chalcone synthase gene family from mulberry [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 115: 107-118.
- [25] Han YH, Ding T, Su B, et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the chalcone synthase family in maize [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 161.
- [26] Sun W, Meng XY, Liang LJ, et al. Molecular and biochemical analysis of chalcone synthase from freesia hybrid in flavonoid biosynthetic pathway [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0119054.
- [27] Pettinga DJ, Ou J, Patterson EL, et al. Increased chalcone synthase (CHS) expression is associated with dicamba resistance in *Kochia scoparia* [J]. *Pest Manag Sci*, 2018, 74: 2306-2315.
- [28] Hossain MZ, Ishiga Y, Yamanaka N, et al. Soybean leaves transcriptomic data dissects the phenylpropanoid pathway genes as a defence response against *Phakopsora pachyrhizi* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 132: 424-433.
- [29] Yin YC. Research of Over-expression *CHS* and *CHI* in Hairy Roots of Licorice (基于毛状根培养体系的甘草 *CHS* 及 *CHI* 基因功能研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.
- [30] Ghosh S, Mandi SS. SNP in chalcone synthase gene is associated with variation of 6-gingerol content in contrasting landraces of *Zingiber officinale* Roscoe [J]. *Gene*, 2015, 566: 184-188.
- [31] Zhang XD, Zhou S, Yin YC, et al. Analysis on the correlation between chalcone synthase gene polymorphism and content of liquiritin in licorice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 646-658.