

过表达 *CHI* 基因提高甘草毛状根中黄酮类化合物含量的研究

侯嘉铭¹, 尹彦超², 田少凯¹, 张智新¹, 杨林¹, 李文东^{3*}, 刘颖^{1*}

(1. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 102488; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部, 湖北 武汉 430000; 3. 北京市药品检验所, 北京 102206)

摘要: 查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI, EC5.5.1.6) 是甘草黄酮类有效成分生物合成途径中的第二个限速酶, 发挥重要的调控作用。本课题组在前期研究基础上, 筛选出黄酮高含量甘草特异对应的 *CHI* 基因型, 通过基因融合法构建了过表达 *CHI* 基因的植物二元表达载体, 并通过电转法将其转化到发根农杆菌 ACCC10060 中, 用于侵染甘草子叶和胚轴, 获得过表达 *CHI* 基因的甘草毛状根系, 利用 qRT-PCR 法测定各甘草毛状根系中 *CHI* 基因的拷贝数, 并利用 UPLC 法测定各甘草毛状根系中 4 种黄酮类化合物的含量。结果显示获得了拷贝数分别为 1 和 5 的过表达 *CHI* 基因甘草毛状根系, 且其总黄酮、甘草苷、甘草素和异甘草素的含量均显著高于野生型毛状根, 表明过表达 *CHI* 基因能显著提高甘草毛状根中黄酮类化合物的含量。本文为解析 *CHI* 基因的功能提供了理论依据, 筛选出 3 个过表达 *CHI* 基因甘草毛状根系用于后续扩大培养, 可为离体积累甘草黄酮类化合物奠定基础。

关键词: 甘草; 查尔酮异构酶; 过表达; 毛状根; UPLC; qRT-PCR

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)01-0319-09

Overexpressing of chalcone isomerase (*CHI*) gene enhances flavonoid accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots

HOU Jia-ming¹, YIN Yan-chao², TIAN Shao-kai¹, ZHANG Zhi-xin¹, YANG Lin¹,
LI Wen-dong^{3*}, LIU Ying^{1*}

(1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China;
3. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China)

Abstract: Chalcone isomerase (CHI) is the second rate-limiting enzyme involved in the biosynthetic pathway of flavonoids in *Glycyrrhiza uralensis*. Based on our previous studies, we selected the specific *CHI* haplotype (GenBank Accession No. KY115232) to maximize flavonoid accumulation. We constructed a plant binary expression vector for overexpression of this *CHI* gene by the gene fusion method and transfected the plasmid into *Agrobacterium tumefaciens* ACCC10060 by electroporation. The recombinant *A. tumefaciens* ACCC10060 subsequently was used to infect cotyledons and hypocotyls of *G. uralensis* to obtain transgenic hairy roots. A qRT-PCR method was used to determine the copy number of *CHI* and a UPLC method was used to assay the content of four flavonoids in different hairy root lines. The qRT-PCR results showed that the copy number of *CHI* in hairy roots was 1 or 5. UPLC results showed that the content of total flavonoids, liquiritin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin in transgenic hairy root samples was significantly higher than that in wild-type samples. This study demonstrates that overexpression of *CHI* significantly increases the content of flavonoids in hairy roots of *G. uralensis*. This work provides a theoretical basis for clarifying the function of *CHI*. Three transgenic hairy root lines of *G. uralensis* were isolated which can

收稿日期: 2020-06-11; 修回日期: 2020-08-03.

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

Tel: 86-10-52779628, E-mail: sxlwd76@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0951

be used to increase the accumulation of licorice flavonoids *in vitro*.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis*; chalcone isomerase; overexpression; hairy root; UPLC; qRT-PCR

甘草是我国最常用的大宗药材之一,《中华人民共和国药典》^[1]明确规定甘草药材的质量标准为三萜类化合物甘草酸的含量不低于2.0%、黄酮类化合物甘草苷的含量不低于0.5%。近年来,针对甘草药材有效成分生物合成途径的研究多集中于三萜生物合成途径。现代药理学研究表明,甘草黄酮类化合物具有重要的药理活性,是甘草发挥抗炎^[2]、抗病毒^[3]、抗癌^[4]等作用不可替代的成分。因此,甘草黄酮生物合成途径亦具有重要的研究价值。

甘草黄酮生物合成途径受到多个酶的调控,其中查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)是最早被认识的类黄酮物质合成相关酶^[5],也是甘草苷生物合成途径上的第二个限速酶。CHI可分为2种类型,I型CHI只能以查耳酮为底物,II型CHI既可以查耳酮为底物,也可以6'-脱氧查耳酮为底物^[6]。图1所示为甘草苷生物合成途径,CHI催化分子内环化反应,将双环查尔酮转化为三环(2S)-黄烷酮^[7]。开展CHI功能的相关

研究对于解析甘草苷生物合成的分子调控机制具有重要意义。

自1987年首次从法国豌豆(*Pisum sativum* L.)中克隆得到CHI基因以来^[8],已陆续从矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilmorin.)^[9]、菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)^[10]、玉米(*Zea mays* L.)^[11]、紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)^[12]、水母雪莲(*Saussurea medusa* Maxim.)^[13]等多种植物中克隆得到该基因。目前GenBank数据库中已注册了3 000多条植物CHI基因cDNA序列。CHI基因对于黄酮生物合成具有重要的调控作用,Muir等^[14]在番茄(*Lycopersicon esculentum* Miller.)中过表达CHI基因,使得番茄果皮中黄酮含量增加了76倍,果肉中黄酮醇含量增加了21倍。Kim等^[15]发现CHI基因缺失的大麦(*Hordeum vulgare* L.)和洋葱(*Allium cepa* L.)突变体中黄酮类化合物含量急剧下降。目前,甘草中CHI基因的报道相对较少,且主要集中于基因克隆和生物信息学分析^[16]。

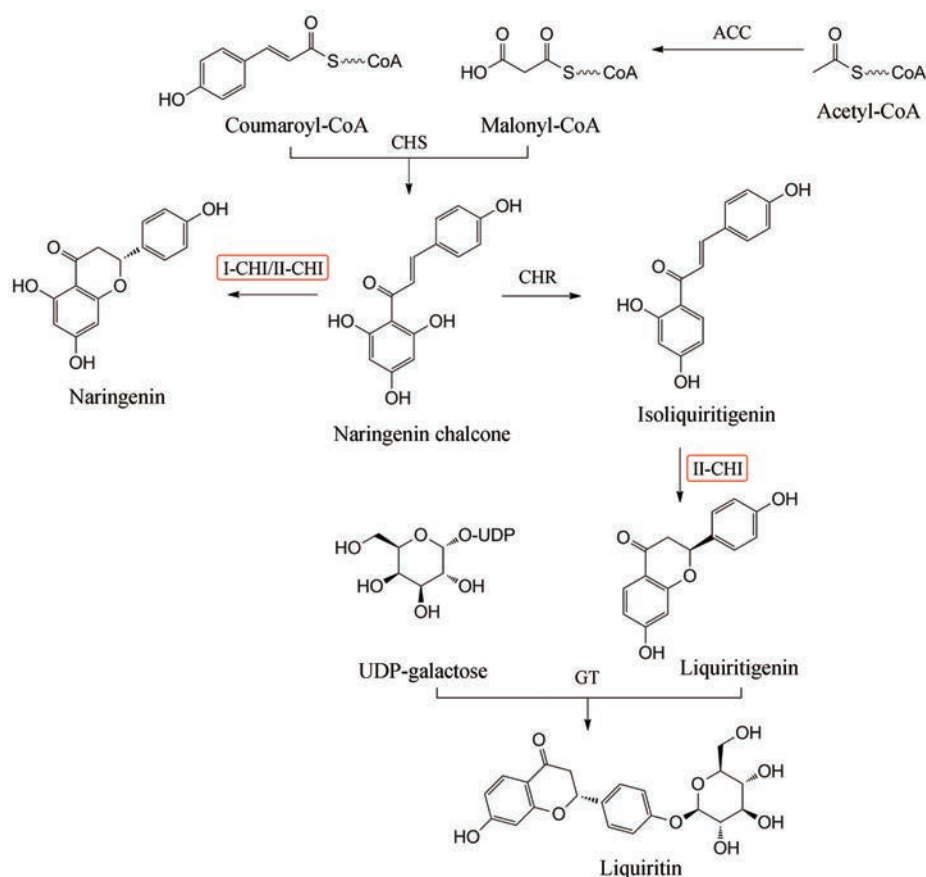


Figure 1 The biosynthetic pathway of flavonoids in licorice. ACC: Acetyl-CoA carboxylase, CHS: Chalcone synthase, CHI: Chalcone isomerase, CHR: Chalcone reductase, GT: Galactosyltransferase

毛状根是发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 侵染植物受伤部位而产生的一种病理表现。由于毛状根能合成植物的特征次生代谢产物, 因此毛状根培养技术在药用植物领域受到了较多关注。目前, 黄芩^[17]、丹参^[18]、西洋参^[19]等药用植物毛状根的研究均取得了较好的成就。近年来, 越来越多的学者通过毛状根聚焦植物基因的功能研究, 如: 在丹参毛状根中过表达 *SmMYB9b* 可使丹参酮含量增加 2.2 倍^[20]; 在桔梗毛状根中过表达 *HMGR* 可提高植物甾醇和三萜类化合物的积累^[21]; 利用 CRISPR/Cas9 定向敲除丹参 *SmCPS1* 基因可使丹参毛状根中的丹参酮, 尤其是隐丹参酮、丹参酮 IIA 和丹参酮 I 在纯合突变体中完全缺失^[22]。因此, 本文也将采用毛状根培养技术解析甘草 *CHI* 基因的功能, 为阐明甘草黄酮类化合物生物合成的分子调控机制奠定基础。

材料与方法

材料 健康饱满的甘草种子。

目标基因 本课题组前期开展了 *CHI* 基因多态性与甘草黄酮生物合成的相关性研究^[23], 确定了黄酮高含量甘草的特异 *CHI* 单倍型 (GenBank 注册号: KY115232), 将其保存于大肠杆菌中, 本文以此基因作为目标基因, 开展相关研究。

试剂与耗材 植物双元表达载体 pCAMBIA1305.1 购于北京华越洋生物科技有限公司; DNA Marker (BM2000、BM5000、BM15000)、高纯质粒小量快速提取试剂盒 (离心柱型) 均购于北京博迈德科技发展有限公司; 限制性内切酶 *Bgl* II、*Spe* I、*rTaq* DNA 聚合酶、dNTP mixture 等购于 TaKaRa 公司; Fast-Fusion 克隆试剂盒购于广州复能基因有限公司; 甘草素 (liquiritigenin)、异甘草素 (isoliquiritigenin)、甘草苷 (liquiritin)、异甘草苷 (isoliquiritin) 批号分别为 MUST-15021104、MUST-15042010、MUST-15082811、MUST-15031204, 纯度分

别为 99.07%、98%、98.5%、99.99%, 均购于成都曼思特生物科技有限公司。

仪器 TC-3000 PCR 扩增仪 (英国 Techne 公司); 1-13000 型离心机 (美国 Sigma 公司); DYY-8 型稳压稳流电泳仪 (上海琪特分析仪器有限公司); BG-gds AUTO510 型凝胶成像系统 (上海培清科技有限公司); Gene PulserMXcell 电穿孔仪 (美国 BIO-RAD 公司); LRH-250 生化培养箱 (上海一恒科技有限公司)。

过表达甘草 *CHI* 基因植物双元表达载体的构建 图 2 为过表达甘草 *CHI* 基因植物双元表达载体的构建策略。将含甘草特异 *CHI* 基因的大肠杆菌工程菌进行活化并提取质粒。按照 Fusion 重组酶引物设计原理设计引物 CHIF 和 CHIR (表 1), 并进行 PCR 扩增, 50 μ L 反应体系如下: cDNA 2.0 μ L、10 \times Buffer 5.0 μ L、dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 5.0 μ L、CHIF (5 μ mol·L⁻¹) 与 CHIR (5 μ mol·L⁻¹) 各 2.0 μ L、*rTaq* 酶 1.0 μ L、RNase-free Water 33.0 μ L, 反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 对 PCR 产物进行胶回收纯化。采用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Spe* I 对 pCAMBIA1305.1 进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C, 5 h, 50 μ L 酶切体系如下: *Bgl* II (10 U· μ L⁻¹) 与 *Spe* I (10 U· μ L⁻¹) 各 2.5 μ L、10 \times H Buffer 5.0 μ L、载体 DNA 30.0 μ L、ddH₂O 10.0 μ L, 将载体大片段胶回收纯化。利用 Fast-Fusion 克隆试剂盒, 在 25 $^{\circ}$ C 将载体大片段与 PCR 产物连接 30 min, 10 μ L 连接体系如下: PCR 产物 2.0 μ L、载体片段 5.0 μ L、Fast-Fusion Clonase 1.0 μ L、10 \times Clonase Buffer 1.0 μ L、dd H₂O 1.0 μ L。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆并进行 PCR 验证及测序验证 (由上海生工生物工程有 限公司完成), 将验证正确的质粒命名为 pCA-*CHI*。

转甘草 *CHI* 基因发根农杆菌工程菌的构建 采用电转法 (C: 25 μ F, PC: 200 Ω , U: 2 400 V) 将重组质粒 pCA-*CHI* 导入发根农杆菌 ACCC10060 感受态细胞。采用含卡那霉素 (50 mg·L⁻¹) 的 YEB 平板筛选阳性克隆。

Table 1 Primers used in this study. a: Primers for the verification of recombinant *A. rhizogenes*; b: Primers for the verification of *CHI* in hairy roots; c: Primers for qRT-PCR

Gene	Purpose	Code	Sequence (5'-3')
<i>CHI</i>	a	CHIF	CTCTTGACCATGGTAGATCTATGGCGGGAGCAGCACCAGTA
		CHIR	TTGATCGGGTACAGACTAGTTCAGTTTCCGTTTCCAAT
<i>rolC</i>	a, b	RF	CATATATGCCAAATTTACACTAG
		RR	GTTAACAACACTAGGAAACAGG
<i>CHI</i>	b	HF	CTCTTGACCATGGTAGATCTATGGCGGGAGCAGCACCAGTA
		HR	CGCAGCGAGTTGTTGATTCCGC
<i>CHI</i>	c	IF	GCTGTTTGGCTGAAAGATTACC
		IR	CTTCCAGTCCTTCCCGTAGT
<i>Actin</i>	c	AF	CAAAAGGATGCCTATGTGGG
		AR	CAGGAGCAACACGCAATTC

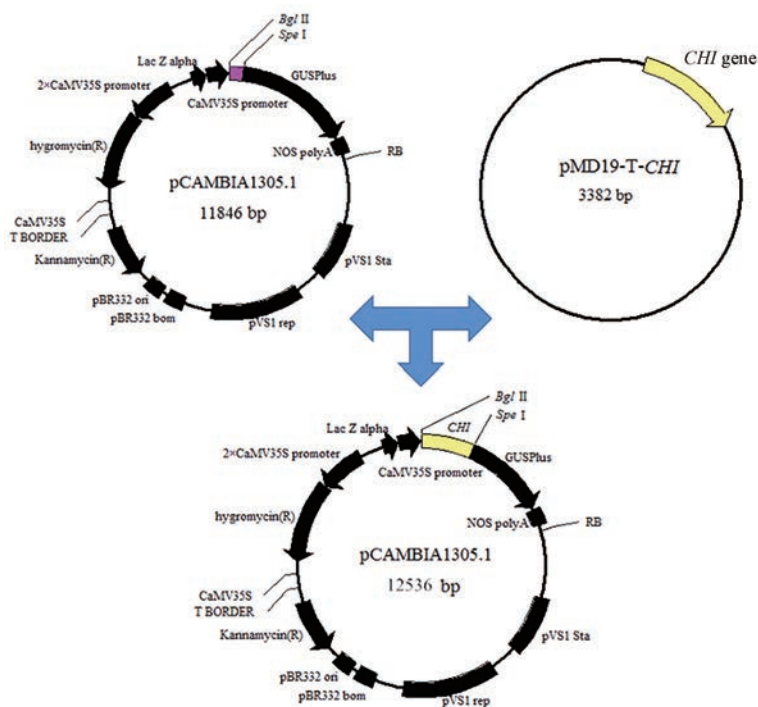


Figure 2 The construction of the recombinant plant expression vector pCA-*CHI*

设计引物HF、HR (表1) 对工程菌中的 *CHI* 进行PCR验证, PCR条件如“过表达甘草 *CHI* 基因植物二元表达载体的构建”项下所示。设计引物RF、RR (表1) 对发根农杆菌 *rolC* 基因进行PCR验证, PCR反应程序如下: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 10 min。将PCR产物送上海生工生物工程有限公司进行测序。

过表达 *CHI* 基因甘草毛状根的诱导及培养 对甘草种子进行表面灭菌, 接种于MS培养基, 4 500 lx光照培养7~10 d可获得无菌苗。在无菌条件下将其胚轴及子叶切下, 浸泡于“转甘草 *CHI* 基因发根农杆菌工程菌的构建”项下构建的发根农杆菌工程菌菌液 (OD₆₀₀ 为0.5左右) 中20~30 min, 然后转接于6,7-V固体培养基, 黑暗条件下共培养2~3 d。采用500 mg·L⁻¹ 头孢噻肟钠 (cefotaxime sodium, Cef) 水溶液浸泡共培养的外植体材料5 min, 转接至含500 mg·L⁻¹ Cef的6,7-V固体培养基上, 诱导生根。野生型毛状根的诱导则采用活化后的发根农杆菌 ACCC10060 浸泡, 其他条件均相同。每7天转接继代除菌, 并逐步降低Cef的浓度, 直至除净。提取各甘草毛状根系DNA进行PCR及测序验证, 将验证正确的毛状根系转接至6,7-V液体培养基中, 25 °C、110 r·min⁻¹ 条件下震荡培养。

转基因甘草毛状根中外源 *CHI* 基因拷贝数的测定 提取毛状根DNA, 以 *Actin* 基因为内标基因, 根据 *CHI* (GenBank注册号: KY115232) 和 *Actin* (GenBank

注册号: EU190972.1) 序列信息, 设计qRT-PCR特异性引物IF、IR和AF、AR (表1)。qRT-PCR反应程序为95 °C 2 min; 95 °C 20 s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35个循环; 72 °C 5 min。根据本课题组前期建立的拷贝数测定方法^[24], 分析各转基因甘草毛状根样品中 *CHI* 基因的拷贝数。

UPLC法测定甘草毛状根中黄酮类成分含量 在无菌条件下称取过表达 *CHI* 基因甘草毛状根5个样品 (I6、I7、I20、I41、I80) 及野生型甘草毛状根样品 (K15) 各2.0 g, 每个样品4个重复, 传代于6,7-V液体培养基中, 置于25 °C、110 r·min⁻¹ 条件下培养20 d。将液体培养的毛状根洗净、60 °C烘干至恒重、打粉、过60目筛。精密称定各甘草毛状根样品粉末0.1 g, 置于50 mL量瓶中, 加入50% 甲醇水溶液定容, 密塞, 超声 (频率50 kHz, 功率250 W) 提取30 min, 放冷, 用50% 甲醇水溶液补至刻度线。采用0.45 μm微孔滤膜对超声提取后的溶液进行过滤处理, 取续滤液作为UPLC分析的样品, 采用本课题组前期已建立的UPLC方法对毛状根中4种黄酮类化合物进行含量测定^[25]。采用ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 以乙腈 (A)-0.05% 磷酸溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 洗脱程序见表2; 柱温为40 °C、流速为0.3 mL·min⁻¹、进样量为1 μL; 在波长276 nm检测甘草素、甘草苷, 360 nm检测异甘草苷, 370 nm检测异甘草素。

Table 2 UPLC gradient elution procedure

Time/min	Acetonitrile (A)/%	0.05% Phosphoric acid (B)/%
0	14	86
1.36	23	77
3.26	30	70
4.08	34	66
4.76	36	64
5.71	42	58
6.53	51	49
9	51	49
9.5	14	86
12	14	86

结果与分析

1 植物双元表达载体 pCA-*CHI* 和工程菌的构建

图3显示了重组质粒 pCA-*CHI* 及重组发根农杆菌工程菌的 PCR 验证结果, 条带 1~3 为重组质粒中扩增得到的 690 bp 片段, 与 *CHI* 序列长度一致, 测序结果表明此片段与 *CHI* (GenBank 注册号: KY115232) 具有 100% 的一致性; 条带 7~9 为重组工程菌中扩增得到的 580 bp 片段, 与发根农杆菌 *rolC* 基因长度一致, 测序结果表明此序列与发根农杆菌 *rolC* 基因 (GenBank 注册号: DQ 160187.1) 有 99% 的一致性; 条带 4~6 为重组工程菌中扩增得到的 1 030 bp 片段, 通过 Editseq 分析, 此片段包含 690 bp 和 340 bp 两个片段, 通过 DNAMAN 分析, 690 bp 片段与 *CHI* (GenBank 注册号: KY115232) 具有 100% 的一致性, 而 340 bp 片段与 *GUS* 基因有 100% 的一致性 (GenBank 注册号: KT 985054.1), 从而表明 *CHI* 基因确为外源电转转入而非自身携带。以上结果表明成功构建了含 *CHI* 基因的发根农杆菌工程菌。

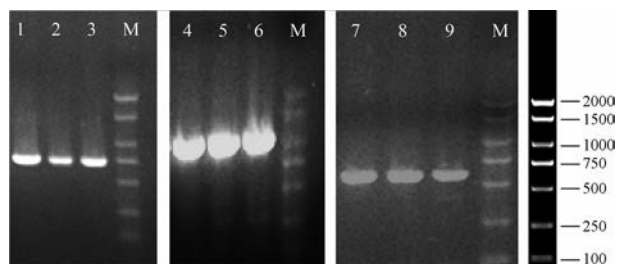


Figure 3 The verification of the recombinant plant expression vector pCA-*CHI* and the recombinant *A. rhizogenes* containing *CHI* gene. M is DNA marker, No. 1-3 shows the *CHI* in pCA-*CHI*, No. 4-6 shows the *CHI* together with *GUS* in the recombinant *A. rhizogenes*, and No. 7-9 shows the *rolC* in the recombinant *A. rhizogenes*

2 过表达甘草 *CHI* 基因毛状根的诱导及培养

图4a~4f是侵染后10、20和40天的野生型甘草毛状根和转 *CHI* 基因甘草毛状根的生长情况, 均长势良

好。图4g为转基因毛状根中 *CHI* 基因的 PCR 验证结果, 获得了长度约为 1 000 bp 的条带, 测序结果表明片段长度为 1 030 bp, 其中 690 bp 片段与 *CHI* (GenBank 注册号: KY115232) 具有 100% 的一致性, 340 bp 片段与 *GUS* 基因有 99% 的一致性 (GenBank 注册号: KT 985054.1)。图4h为转基因毛状根中 *rolC* 基因的 PCR 验证结果, 获得了长度约 600 bp 的条带, 测序结果表明片段长度为 580 bp, 与发根农杆菌 *rolC* 基因 (GenBank 注册号: DQ 160187.1) 具有 99% 的一致性。以上结果证明已成功获得转 *CHI* 基因甘草毛状根。

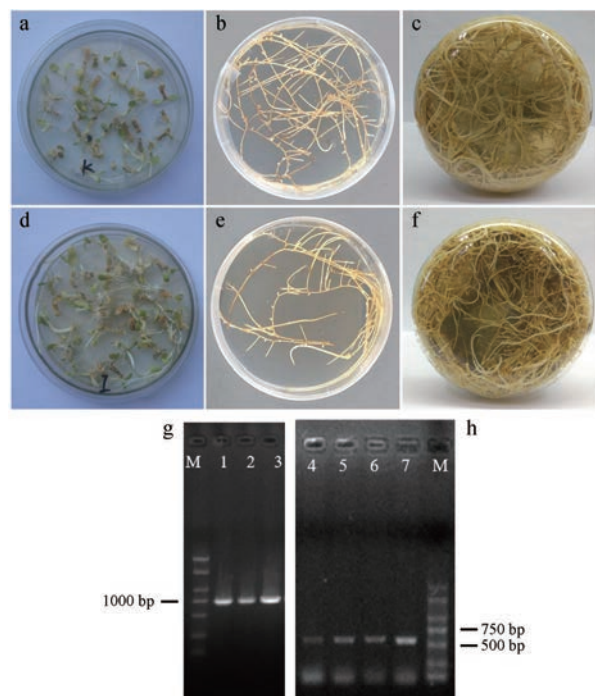


Figure 4 The transgenic hairy roots overexpressing *CHI* and the wild hairy roots of *G. uralensis*. a-c: 10, 20, and 40 d old wild type hairy roots culturing on the solid 6,7-V medium, respectively. d-f: 10, 20, and 40 d old transgenic hairy roots overexpressing *CHI* culturing on the solid 6,7-V medium, respectively. g: PCR verification results of the *CHI* in the transgenic hairy roots. h: PCR verification results of the *rolC* in the transgenic hairy root samples (No. 4-6) and the wild type hairy root sample (No. 7)

3 过表达 *CHI* 基因甘草毛状根外源基因拷贝数的测定

Actin 基因的 qRT-PCR 标准曲线为: $Y = -3.133X + 38.17$ ($R^2 = 0.9992$); *CHI* 基因的 qRT-PCR 标准曲线为: $Y = -3.250X + 40.44$ ($R^2 = 0.9988$)。 *CHI* 基因的拷贝数计算结果列于表3, 各毛状根系中 *CHI* 的拷贝数分别为 1、1、1、5 和 1。

4 甘草毛状根中 4 种黄酮类化合物的含量分析

UPLC 标准曲线、线性范围、定量限 (LOQ)、检测

Table 3 Copy number of *CHI* in different transgenic hairy root lines detected by qRT-PCR

Samples	Average <i>Y</i> value of <i>CHI</i>	Average <i>Y</i> value of <i>Actin</i>	Ratio	Copy number of <i>CHI</i>
I6	76 879.436	73 329.241	1.048	1
I7	47 635.635	60 314.119	0.790	1
I20	11 701.600	28 909.009	0.405	1
I41	91 315.221	17 365.946	5.258	5
I80	29 554.895	25 552.715	1.157	1

限 (LOD) 和峰面积相对标准偏差 (RSD) 值列于表 4 中。UPLC 色谱图如图 5 所示, 甘草苷、异甘草苷、甘草素和异甘草素的保留时间分别为 2.447、3.705、4.377 和 6.378 min。图 6 为 5 个过表达 *CHI* 基因甘草毛状根系 (I6、I7、I20、I41、I80) 及野生型甘草毛状根系 (K15) 中总黄酮、甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素的含量分析柱状图, 结果显示: 5 个转 *CHI* 甘草毛状根系中总黄

Table 4 The UPLC standard curves, linearity range, LOQ, LOD, and RSD of peak area

Compound	Standard curve	R^2	Linearity/ μg	LOD/ng	LOQ/ng	RSD of peak area/%
Liquiritin	$Y = 1.0 \times 10^7 X - 1.076 2 \times 10^4$	0.999 9	1.350 0 - 135.000 0	0.172 0	0.515 0	0.190 0
Isoliquiritin	$Y = 3.0 \times 10^6 X + 8.500 3 \times 10^2$	0.999 1	0.208 0 - 20.800 0	0.078 3	0.235 0	0.460 0
Liquiritigenin	$Y = 2.0 \times 10^6 X - 1.061 9 \times 10^3$	0.999 5	0.071 3 - 7.130 0	1.430 0	3.570 0	0.940 0
Isoliquiritigenin	$Y = 5.0 \times 10^7 X - 1.156 2 \times 10^2$	1	0.078 2 - 0.782 0	0.019 4	0.155 0	1.000 0

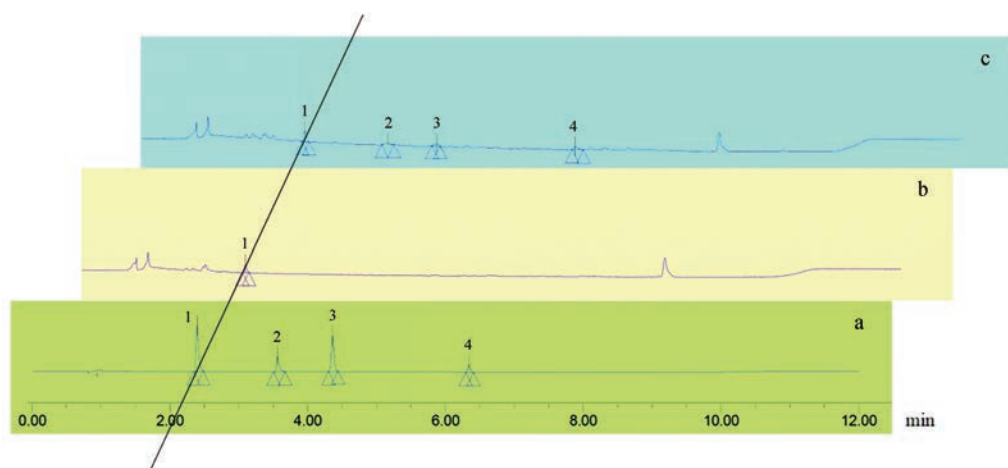


Figure 5 The UPLC chromatograms of reference substances (a), wild hairy root sample (b), and transgenic hairy root sample (c). Peak 1–4 represents liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin, respectively

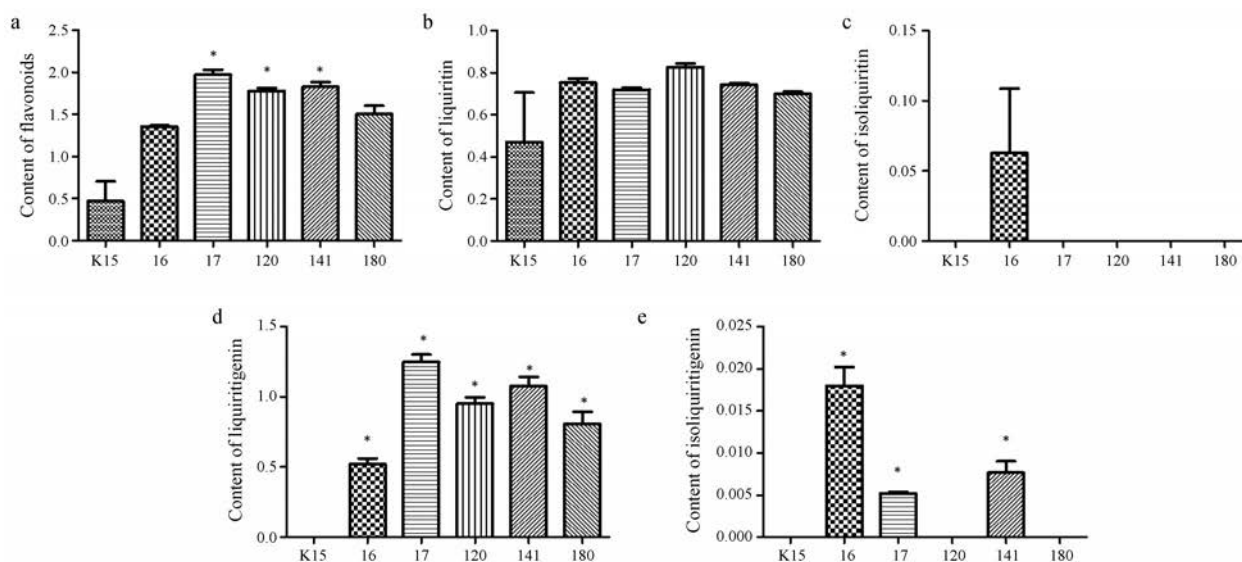


Figure 6 The contents of total flavonoids (a), liquiritin (b), isoliquiritin (c), liquiritigenin (d), and isoliquiritigenin (e) in different transgenic and wild type hairy root lines. *Y* axis shows the contents of flavonoids ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Paired *T* test was applied to calculate the content difference among samples. * $P < 0.05$ vs K15

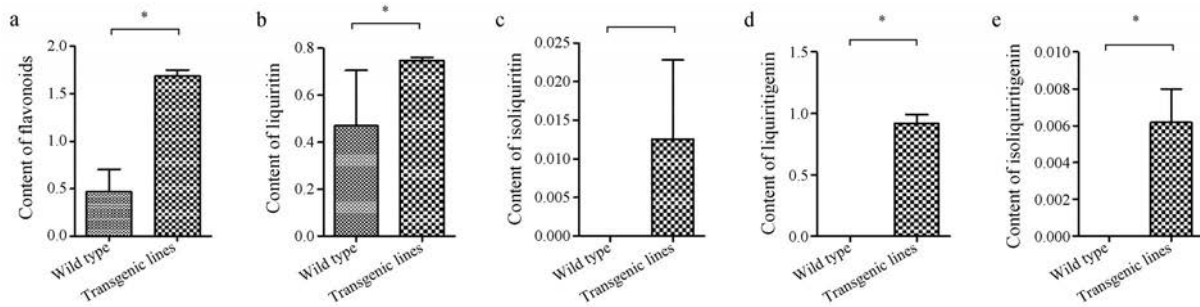


Figure 7 Difference in the contents of flavonoids ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) between wild type and transgenic hairy roots analyzed by Non-parametric test. Total flavonoids (a), liquiritin (b), isoliquiritin (c), liquiritigenin (d), and isoliquiritigenin (e). * $P < 0.05$ vs wild type

酮的含量均高于野生型毛状根, 其中样品 I7、I20、I41 与野生型毛状根具有显著性差异; 5 个转 *CHI* 甘草毛状根系中甘草素的含量均显著高于野生型毛状根; 在转 *CHI* 毛状根系 I6、I7、I41 中检测到异甘草素, 而其他根系中未检测到; 5 个转 *CHI* 甘草毛状根系中甘草苷的含量均高于野生型, 但无显著性差异; 仅在转 *CHI* 毛状根系 I6 中检测到异甘草苷。图 7 则直观展示了转 *CHI* 基因甘草毛状根与野生型甘草毛状根组间各黄酮类化合物含量的比较分析, 运用 SAS 9.4 软件对 2 组样品中各黄酮类化合物及总黄酮含量进行非参数检验, 结果表明转 *CHI* 甘草毛状根样品组的总黄酮、甘草苷、甘草素和异甘草素的含量均显著高于野生型毛状根样品。

讨论

功能基因对于药用植物次生代谢产物的积累具有重要的调控作用, 本课题组前期研究发现, 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (3-hydroxy-3methylglutary CoA reductase, HMGR)^[26] 以及鲨烯合酶 (squalene synthase, SQS)^[27] 的拷贝数多态性对甲羟戊酸代谢途径 (mevalonate pathway, MVA) 可产生明确的影响; 还发现过表达 β -AS 基因的甘草毛状根中甘草酸含量明显增加^[28]。因此, 有理由推测 *CHI* 作为甘草黄酮类化合物生物合成途径中的关键酶, 也势必会对黄酮类成分的积累发挥重要的调控作用。Zhou 等^[29] 将牡丹 *CHI* 基因导入烟草高效遗传转化体系后, 转基因烟草的总黄酮含量比野生型提高了 3 倍; Park 等^[30] 研究表明 *CHI* 基因过表达可增加黄芩毛状根中黄酮类有效成分的含量。因此, 对甘草 *CHI* 基因开展相关研究, 也将有助于解析甘草黄酮类化合物生物合成的分子调控机制。

本文通过农杆菌转化法成功构建了 5 个转甘草 *CHI* 基因的毛状根系, 对黄酮类化合物含量进行组间差异分析, 结果显示过表达 *CHI* 可有效增加毛状根中总黄酮、甘草苷、甘草素和异甘草素的含量。由于毛状

根是植物病理状态下产生的根器官, 与正常生长中的植物根系具有一定的差异, 并非所有的毛状根中均可产生植物特征性次生代谢产物, 因此本文在野生型毛状根中未检测到异甘草苷、甘草素和异甘草素。然而, 在转 *CHI* 基因的甘草毛状根系中, 如 I6 中检测到了全部 4 种黄酮化合物, I41 和 I7 中检测到了 3 种, 这表明过表达 *CHI* 基因有助于提高甘草黄酮类化合物的生物合成。就黄酮整体水平而言, 样品 I7、I20 和 I41 具有更为明显的优势, 可作为后期大规模培养的实验材料, 用于开展离体积累甘草黄酮类化合物的相关研究。然而, 转基因毛状根系中 *CHI* 的拷贝数与黄酮含量之间并无直接相关性, I7 和 I20 携带有单拷贝 *CHI*, I41 携带有 5 拷贝 *CHI*, 而它们在黄酮含量方面并无显著性差异, 这可能与基因的表达水平以及酶活水平均具有一定的相关性。

此外, 其他学者研究发现高蔗糖、高生长素的培养基配方^[31]、细胞提取物^[32]、真菌多糖^[33]、重金属离子^[34]、光和紫外线辐射^[35] 等因素对于毛状根的生长均会产生不同程度的影响。因此, 今后将陆续开展毛状根培养条件的优化研究, 以进一步增加转基因甘草毛状根中黄酮类化合物的含量, 为甘草毛状根的大规模培养和黄酮类化合物的离体积累奠定基础。

作者贡献: 侯嘉铭撰写了论文; 刘颖和李文东构思并设计了实验方案; 侯嘉铭、尹彦超和田少凯完成了实验; 张智新和杨林分析了相关实验数据; 所有作者均阅读并参与修改了这篇文章。

利益冲突: 本文作者均没有利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Part 1 Beijing: China Medical Science Press, 2015: 86-87.
- [2] Kim YW, Zhao RJ, Park SJ, et al. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-depen-

- dent iNOS and proinflammatory cytokines production [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154: 165-173.
- [3] Grienke U, Braun H, Seidel N, et al. Computer-guided approach to access the anti-influenza activity of licorice constituents [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77: 563-570.
- [4] Zhou Y, Ho WS. Combination of liquiritin, isoliquiritin and isoliquirigenin induce apoptotic cell death through upregulating p53 and p21 in the A549 nonsmall cell lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31: 298-304.
- [5] Boland MJ, Wong E. Purification and kinetic properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean [J]. *Eur J Biochem*, 1975, 50: 383-389.
- [6] Shimada N. 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 japonicas* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131: 941-951.
- [7] Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 786-791.
- [8] Mehdy MC, Lamb CJ. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection [J]. *EMBO J*, 1988, 86: 1527-1533.
- [9] Van TAJ, Koes RE, Spelt CE, et al. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes [J]. *EMBO J*, 1988, 7: 1257-1263.
- [10] Blyden ER, Doerner PW, Lamb CJ, et al. Sequence analysis of a chalcone isomerase cDNA of *Phaseolus vulgaris* L. [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16: 167-169.
- [11] Grotwold E, Peterson T. Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavanone isomerase [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 242: 1-8.
- [12] Mckhann HI, Hirsch AM. Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.): highest transcript levels occur in young roots and root tips [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24: 767-777.
- [13] Li F, Jin Z, Qu W, et al. Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44: 455-461.
- [14] Muir SR, Collins GJ, Robinson S, et al. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 470-474.
- [15] Kim S, Jones R, YooK S, et al. Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon [J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272: 411-419.
- [16] Li JH. Study on Flavonoid Prenyltransferases from *Glycyrrhiza uralensis* (乌拉尔甘草黄酮异戊烯基转移酶的研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2014
- [17] Elkin YN, Kulesh NI, Stepanova AY, et al. Methylated flavones of the hairy root culture *Scutellaria baicalensis* [J]. *J Plant Physiol*, 2018, 231: 277-280.
- [18] Wang XY, Cui HG, Huang LQ, et al. A full length cDNA of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase cloning and analysis of introduced gene expression in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 1251-1257.
- [19] Kochan E, Nowak A, Zakłós-Szyda M, et al. *Panax quinquefolium* L. ginsenosides from hairy root cultures and their clones exert cytotoxic, genotoxic and pro-apoptotic activity towards human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 [J]. *Molecules*, 2020, 25: E2262.
- [20] Zhang J, Zhou L, Zheng X, et al. Overexpression of SmMYB9b enhances tanshinone concentration in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Cell Rep*, 2017, 36: 1297-1309.
- [21] Kim YK, Kim JK, Kim YB, et al. Enhanced accumulation of phytosterol and triterpene in hairy root cultures of *Platycodon grandiflorum* by overexpression of *Panax ginseng* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 1928-1934.
- [22] Li B, Cui G, Shen G, et al. Targeted mutagenesis in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43320.
- [23] Zhang XD. Molecular Mechanism of Licorice Flavonoid Biosynthesis Based on *CHI* Gene Polymorphism (基于 *CHI* 基因多态性的甘草黄酮类化合物生物合成分子机制研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.
- [24] Yin YC, Hou JM, Tian SK, et al. Overexpressing chalcone synthase (*CHS*) gene enhanced flavonoids accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots [J]. *Bot Lett*, 2020, 167: 219-231.
- [25] Hu T, Gao ZQ, Yin YC, et al. Determination of seven flavonoids in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and *Glycyrrhiza glabra* L. by UPLC [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2019, 39: 763-771.
- [26] Liu Y, Xu QX, Xi PY, et al. Cloning and characterization of a cDNA coding 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase involved in glycyrrhizic acid biosynthesis in *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 773-779.
- [27] Liu Y, Zhang N, Wang XY, et al. Study on the effects of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch squalene synthase gene polymorphism on its enzyme catalytic efficiency [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2012, 37: 3777-3783.
- [28] Yin YC, Zhang XD, Gao ZQ, et al. Enhancing glycyrrhizic acid accumulation by over-expressing β -amyrin synthase gene (*GuBAS*) root-specifically in hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11: 192-199.
- [29] Zhou L, Wang Y, Ren L, et al. Overexpression of Ps-*CHI1*, a homologue of the chalcone isomerase gene from tree peony (*Paeonia suffruticosa*), reduces the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*,

- 2013, 116: 285-295.
- [30] Park NI, Xu H, Li X, et al. Enhancement of flavone levels through overexpression of chalcone isomerase in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Funct Integr Genomics*, 2011, 11: 491-496.
- [31] Gao Y, Wu CH, Piao XC, et al. Optimization of culture medium components and culture period for production of adventitious roots of *Echinacea pallida* (Nutt.) [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2018, 135: 299-307.
- [32] Jisha S, Gouri PR, Anith KN, et al. *Piriformospora indica* cell wall extract as the best elicitor for asiaticoside production in *Centella asiatica* (L.) Urban, evidenced by morphological, physiological and molecular analyses [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 125: 106-115.
- [33] Mercier L, Lafitte C, Borderies G, et al. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence [J]. *New Phytol*, 2010, 149: 43-51.
- [34] Zhou X, Yang Y. Differential expression of rice Nramp genes in response to pathogen infection, defense signal molecules and metal ions [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2004, 65: 235-243.
- [35] Logemann E, Wu SC, Schröder J, et al. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2010, 8: 865-876.