

药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及相关功能基因的研究进展

康亚兰¹, 裴瑾^{1*}, 蔡文龙², 刘薇¹, 罗静¹, 吴清华¹

1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137

2. 肯塔基大学药学院, 莱克星顿, 美国 肯塔基州 40503

摘要: 黄酮类化合物是广泛存在于药用植物中的一类化合物, 大多与糖类结合为苷存在。黄酮类成分具有调血脂、扩张冠脉、止血、镇咳、祛痰、降低血管脆性等药理作用, 备受研究者的关注。黄酮类化合物的生物合成途径的研究开始较早, 并取得了很大进展, 对黄酮类化合物生物合成步骤、催化各步反应的酶及其基因都有初步研究。对药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及功能基因的研究进展进行综述, 以期对黄酮类化合物进一步研究提供参考。

关键词: 药用植物; 黄酮类化合物; 代谢合成途径; 功能基因; 次生代谢产物

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)09-1336-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.09.026

Research progress on flavonoid metabolic synthesis pathway and related function genes in medicinal plants

KANG Ya-lan¹, PEI Jin¹, CAI Wen-long², LIU Wei¹, LUO Jing¹, WU Qing-hua¹

1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines of Ministry of Education, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. College of Pharmacy, University of Kentucky, KY 40503, USA

Key words: medicinal plants; flavonoids; metabolic synthesis pathway; functional genes; secondary metabolites

黄酮类化合物是广泛存在于药用植物中的一类化合物, 大多与糖类结合为苷存在, 多具有调血脂、扩张冠脉、止血、镇咳、祛痰、降低血管脆性等活性。银杏、红花、黄芩、陈皮等常用中药中都含有此类成分^[1]。此外, 黄酮类化合物具有多种多样的生物学功能, 如调节植物生长、保护植物免受紫外线的损伤以及作为植物抗毒素(phytoalexin)和活性氧清除剂等。目前药用植物黄酮类化合物的研究主要集中在提取工艺、成分分析及药理活性方面^[2]。随着分子生物学的迅速发展, 分子生物学也开始涉及到药用植物的研究, 中药有效成分研究越来越趋向于有效成分的合成及调控机制的研究。黄酮类化合物多种多样的生物活性备受研究者的关注, 因此黄酮类化合物的生物合成途径的研究开始较早, 并取得了较大进展。本文对药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及功能基因的研究进展进行综述, 以期

为黄酮类化合物进一步研究提供参考。

1 黄酮类化合物代谢合成途径

黄酮类化合物是一类由苯丙素起始的植物次生代谢产物, 其研究十分广泛。从结构上来说, 黄酮类化合物包括 2-苯基苯并吡喃类(2-phenylchromans)和 3-苯基苯并吡喃类(3-phenylchromans)。2-苯基苯并吡喃类即黄酮类(flavonoids), 包含黄烷酮(flavanones)、黄酮(flavones)、黄酮醇(flavonols)、黄烷醇(flavanol)以及花青素(anthocyanidins); 3-苯基苯并吡喃类即异黄酮类(isoflavonoids), 包含异黄酮素(isoflavones)、异黄烷类(isoflavans)以及紫檀素类(pterocarpanes)。

黄酮类化合物合成代谢途径中的相关基因可以分为 2 类: 一类是编码酶的结构基因, 另一类是调控基因。黄酮类化合物的合成途径见图 1。

查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)催

收稿日期: 2013-10-21

基金项目: 国家自然科学基金“国家基础科学人才培养基金项目”(J1310034)

作者简介: 康亚兰(1989—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药资源学。

*通信作者 裴瑾(1970—), 女, 教授, 从事中药品质评价与资源研究。E-mail: peixjin@163.com

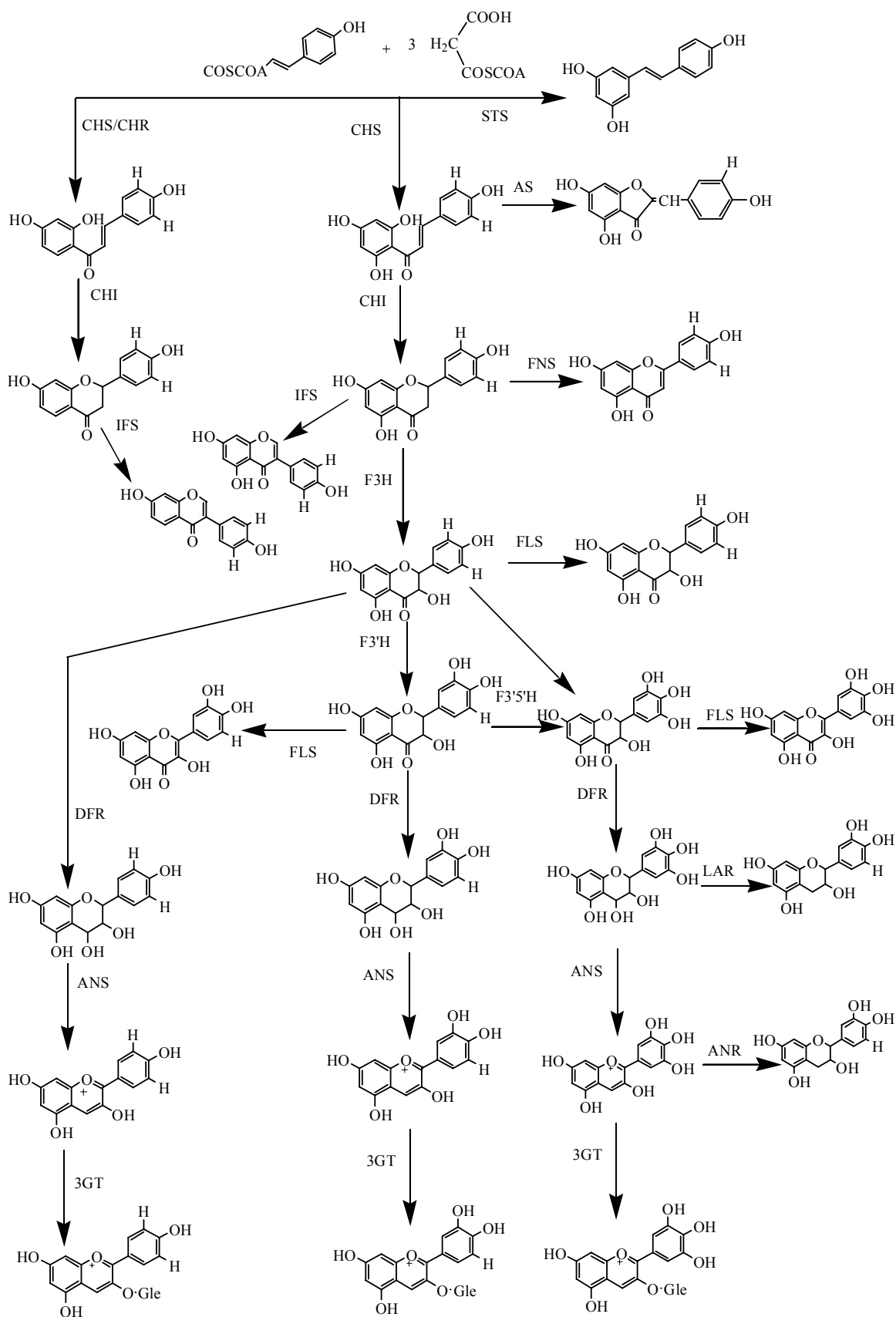


图1 黄酮类化合物代谢合成途径

Fig. 1 Metabolic synthesis pathway of flavonoids

化该途径的第1步。查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)催化分子内的环化反应。异黄酮合成酶(isoflavone synthase, IFS)催化CHI催化合成的(2S)-黄烷酮(5, 7, 4'-三羟基查耳酮)或(2S)-5-脱氧黄烷酮(7, 4'-二羟基查耳酮)的B环从C-2位转移到C-3位,进而通过异黄酮脱水酶使杂环C-2, 3位形成双键。黄烷酮3-羟化酶(flavanone 3- β -hydroxylase, F3H)将CHI催化合成的(2S)-黄烷酮或(2S)-5-脱氧黄烷酮的C-3位羟基化,生成二氢黄酮醇。黄酮醇合成酶(flavonol synthase, FLS)催化黄酮结构中的C-3位羟基化,从而形成各种黄酮醇类物质。二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)是花青素(anthocyanidins)和鞣质(phlobaphenes)合成途径中的关键酶,是一个重要的分支点^[3]。

2 药用植物黄酮类化合物代谢合成途径中的相关功能基因

功能基因是DNA上编码蛋白质或RNA等具有特定功能产物的遗传信息的基本单位。功能基因包括能够转录成相应mRNA并编码蛋白的编码区和起调控作用的非编码区,在编码区上游有一小段核苷酸序列被称为启动子,是RNA聚合酶的结合位点,是转录的起始点,相应的在编码区下游有一小段核苷酸序列被称为终止子,是转录的终止点。功能基因的研究就是在了解基因结构的基础上,确定基因的功能,主要包括开放阅读框的确定、基因时空表达的调节机制以及表达产物的功能分析^[4]。

黄酮类化合物代谢合成途径中的切入酶是CHS和IFS,其中,更准确地说IFS应该是2-羟基异黄酮合成酶(2-hydroxyisoflavanone synthase),是一种能催化芳基转移反应使黄酮类化合物转化成异黄酮类化合物的细胞色素P450。基本碳骨架通过羟基化、糖基化、甲基化、酰化和异戊烯化的取代形成了结构多样的(异)黄酮。在某些情况下,通过聚合形成了花青素和鞣质。催化这些取代反应的酶包括CHI、F3H、FLS以及DFR^[5]。

2.1 CHS 基因

CHS是黄酮类化合物合成途径中的第1个关键酶,也是药用植物中研究较多的一个基因。它催化该途径的第1步,即将3分子的丙二酰辅酶A(malonyl-CoA)和1分子的4-香豆酰辅酶A(4-coumaroyl-CoA)结合形成第1个具有C₁₃架的黄酮类化合物——查尔酮,该产物进一步衍生转化

形成了各类黄酮类化合物^[6]。CHS基因表达除了参与植物的生长发育,也参与了植物抵抗外来压力,如UV、细菌或真菌感染等^[7]。CHS在植物中广泛存在,第1个植物CHS基因序列是1983年在荷兰芹中发现的。到目前为止,GenBank数据库中已经有4000多条植物CHS的核苷酸序列。

钟德馨等^[8]从决明*Cassia tora* Linn.的新鲜子叶中提取基因组DNA作为模板,利用一对特异引物进行PCR扩增,然后克隆测序得到决明CHS基因全长。测序结果表明,决明CHS基因全长为1766 bp,含有2个外显子和1个内含子。将其提交GenBank,登录号为JX676773。决明CHS基因的内含子位于188~765 bp,长度为578 bp,内含子的剪切符合GU-AG规律,含有多个酶切位点和顺式调控元件,可能与决明CHS基因的表达调控有关。CHS基因内含子具有多态性,可能是由不同植物存在多样性的生活史与生活环境影响导致的。决明CHS基因外显子2较为保守,编码几乎所有CHS的功能位点。

文海涛等^[9]以广东道地药材化橘红基源化州柚*Citrus grandis* Tomentosa为研究材料,采用RT-PCR技术克隆获得了CHS基因,并对其进行了序列分析。结果表明化州柚CHS基因编码区全长1176 bp,编码391个氨基酸残基,与同样来源于柑橘属的CHS基因序列同源性高于98%,与其他科植物CHS基因同源性也达到70%以上,且化州柚CHS基因编码的氨基酸序列具有CHS家族的全部4个保守序列。

2.2 CHI 基因

CHI是黄酮类化合物代谢途径中的第2个关键酶。它催化分子内的环化反应,将CHS催化合成的查耳酮(4, 2', 4', 6'-四羟基查耳酮)或6'-脱氧查耳酮(4, 2', 4'-三羟基查耳酮)的C-2'位羟基失氢与 β 位断裂的碳碳双键形成“-O-”,从而分别形成分子内环化的(2S)-黄烷酮或(2S)-5-脱氧黄烷酮^[10]。一般将CHI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^[11]。第1个CHI基因是1987年Mehdy等^[12]利用抗体技术从法国豌豆中分离出来的,到目前为止,GeneBank数据库中已经有1400多条植物CHI的核苷酸序列。

刘春霞等^[13]采用RT-PCR和RACE技术,获得了灯盏花*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz.

CHI cDNA 全序列, GenBank 登录号为 GU208823.1, 序列全长 996 bp, 开放阅读框为 594 bp, 编码 197 个氨基酸, 3-Race 有一个多聚腺苷酸加尾信号。应用软件预测该基因编码蛋白质相对分子质量约为 2.16×10^4 , 理论等电点为 4.78。该基因编码的蛋白无跨膜结构域, 其二级结构的主要构件为 α -螺旋和随机卷曲。对其三级结构进行了建模, 表明其结构与苜蓿 CHI 的三级结构相似。同时根据灯盏花 CHI N 端序列变化的特征, 提出了灯盏乙素的合成可能与 CHI 在细胞亚结构的定位及其与合成代谢相关酶形成复合酶的特异性有关。

刘长英等^[14]采用同源克隆法和抑制 PCR 法克隆桑树 *Morus alba* L. 查耳酮异构酶基因(*MaCHI*)全序列。该基因的基因组序列全长 2 402 bp, 包含 2 112 bp 长的开放阅读框和 290 bp 长的 3'UTR 序列, 开放阅读框由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 该基因编码 219 个氨基酸。预测 *MaCHI* 编码蛋白质的相对分子质量为 2.38×10^4 , 理论等电点为 5.29。采用 RT-PCR 法分析 *MaCHI* 在不同组织中的表达水平, 在叶片和果中的表达量较高, 在根中表达量较低。构建 pET-28a (+)-*MaCHI* 原核表达重组质粒, 并在大肠杆菌中诱导表达。

2.3 IFS 基因

IFS 是异黄酮合成途径的关键酶, 其催化 CHI 合成的 (2*S*)-黄烷酮或 (2*S*)-5-脱氧黄烷酮的 B 环从 C-2 位转移到 C-3 位, 进而通过异黄酮脱水酶使杂环 C-2, 3 位形成双键^[15]。到目前为止, GeneBank 数据库中收录了 50 多条 IFS 的核苷酸序列。

张丹凤^[16]用还原型谷胱甘肽处理蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) P. K. Hsiao 根部, 诱导 IFS 基因表达, 提取总 RNA。采用同源克隆方法, 首先利用 RT-PCR 技术得到了 673 bp 的序列; 再通过 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE) 技术获得长度为 1 995 bp 的 IFS 基因, 并命名为 *MHIFS*。MHIFS 包含一个完整的开放阅读框 (1 578 bp), 编码 525 个氨基酸, 推导肽链的相对分子质量约为 6.0×10^4 。经同源查找, 通过相关的生物信息学分析, 在核苷酸水平上, 蒙古黄芪 IFS 基因全长 cDNA 序列与大豆、鹰嘴豆、豌豆、刺甘草异黄酮合成酶基因分别有 82%、84%、82%、83% 的相似性; 在氨基酸水平上, 蒙古黄芪 IFS 与大豆、鹰嘴豆、豌豆、刺甘草 IFS 的氨基酸序列分别有 80%、83%、79%、83% 的同源性和 88%、

89%、87%、88% 的相似性。对其进行氨基酸保守区域分析, 结果表明其与其他豆科植物的 IFS 一样都含有 3 个保守区域。

2.4 F3H 基因

F3H 是黄酮类化合物代谢途径上的关键酶, 将 CHI 催化合成的 (2*S*)-黄烷酮或 (2*S*)-5-脱氧黄烷酮的 C-3 位羟基化, 生成二氢黄酮醇^[17]。F3H 基因是整个黄酮类化合物代谢途径的中枢位点, 调控着合成途径中的代谢流向。它催化生成二氢黄酮醇, 而二氢黄酮醇是黄酮类化合物生物合成中生成黄酮、花色苷和异黄酮等黄酮类化合物的重要中间产物。到目前为止, GeneBank 数据库中收录了 800 多条植物的 F3H 的核苷酸序列。

本课题组根据桑科植物 F3H 基因序列, 设计引物 PCR 克隆得到桑 *Morus alba* L. 的 F3H 基因, 将测序得到的 F3H 基因片段与 Genbank 所登录 F3H 基因的序列进行同源性比较, 发现同源性较高, 达 97% 左右, 认为该序列是 F3H 基因的片段。实验首次克隆并表达了 F3H 基因, 为桑叶的分子生物学研究提供了一定的依据^[18]。

雷桢^[19]通过 RACE 成功克隆了粘毛黄芩 *Scutellaria viscidula* Bunge. 类黄酮生物合成途径中 F3H, 命名为 SvF3H, 并登录到 Genbank, 获得了基因序列登录号 FJ432699。SvF3H 全长 1 317 bp, 包括 5'和 3'非翻译区、polyA 尾巴和一个编码 1 050 bp 的开放阅读框, 它编码 1 条 350 个氨基酸残基的 F3H 蛋白质, 预测分子式为 $C_{175}H_{273}N_{47}O_{52}S_{18}$, 相对分子质量为 3.382×10^4 , 等电点为 5.41。TargetP 分析结果显示 SvF3H 定位于细胞质基质, 且无转氨酶。ProtScale 预测 SvF3H 是疏水性蛋白质。通过 GOR 预测 SvF3H 的二级结构, 结果显示 SvF3H 含有 31.43% 的 α -螺旋、22.29% 的延伸链和 46.29% 的无规则卷曲。分析 SvF3H 蛋白的三级结构显示, SvF3H 亚基包含多个重要的功能结构域, 如 Fe^{2+} 结合位点和 2-酮戊二酸结合位点等。用 Neighbor-joining 方法构建了系统进化树, SvF3H 很清楚地和其他植物中的 F3H 合为一簇, 从分子水平上验证了所选植物的 F3H 可能起源于同一个祖先, 也反映出植物间的黄酮醇类化合物量的差异与植物间亲缘关系可能存在一定相关性。

2.5 FLS 基因

FLS 作为黄酮类化合物合成途径与儿茶素合成途径的桥梁, 在植物中高度保守^[20], 它催化黄酮类

结构中的 C-3 位羟基化, 从而形成各种黄酮醇类物质。Britsch 等^[21]用从欧芹细胞中提取的酶作用于二氢黄酮醇, 第 1 次体外检测到二氢黄酮醇转变为黄酮醇。到目前为止, GeneBank 数据库中收录了 100 多条植物的 *FLS* 的核苷酸序列。

乔中全等^[22]根据已知的其他物种黄酮醇合成酶 cDNA 保守序列设计引物, 用 RT-PCR 技术从金银花 *Lonicerae Flos* 叶片中扩增获得黄酮醇合成酶基因部分 cDNA 序列, 再用 RACE 技术获得其两端序列。序列拼接得到完整的 1 248 bp *FLS* 基因, 根据获得的序列, 设计引物扩增获得 1 001 bp 的开放阅读框, 编码 333 个氨基酸。序列分析显示, 金银花黄酮醇合成酶与烟草、马铃薯和桔梗的同源性分别为 86%、83%和 80%, 与其他物种的同源性也在 80%左右, 表明不同物种中 *FLS* 基因具有高度同源性。

李广平等^[23]克隆银杏 *Ginkgo biloba* L. *FLS* 基因启动子序列的基础上, 利用生物信息学方法, 分析了该基因的启动子结构。结果表明 *FLS* 基因启动子中包含了 3 个 MYB 转录因子结合位点和 9 个光信号应答位点, 为确立银杏 *FLS* 基因与 *CHI* 基因间的共调控关系及揭示 *FLS* 基因应答光信号的转录调控机制提供了分子基础。

2.6 DFR 基因

DFR 是花青素和鞣质合成途径中的关键酶, 是一个重要的分支点^[24]。Reilly 等^[25]于 1985 年采用转座子标签法从玉米和金鱼草中首次分离出了 *DFR* 基因。到目前为止, GenBank 数据库中收录了 600 多条植物的 *DFR* 核苷酸序列。

樊云芳等^[26]根据已报道植物 *DFR* 基因 cDNA 序列的保守区域设计引物, 对宁夏枸杞 *Lycium barbarum* Linn. *DFR* 基因进行克隆及序列分析。结果表明, 宁夏枸杞 *DFR* 基因 cDNA 全长 1 140 bp, 有 1 个编码 1 116 bp 的开放阅读框, 编码 1 个长 372 个氨基酸的蛋白质; 氨基酸序列的聚类分析显示, 宁夏枸杞 *LbDFR* 与马铃薯、烟草、蕃茄等茄科植物的 *DFR* 亲缘关系较近, 其中与马铃薯 *DFR* 亲缘关系最近, 相似性为 92%; 通过编码蛋白的三级结构预测, 该蛋白为单体模式, 具有酶学的生物特征; 宁夏枸杞 *LbDFR* 在宁夏枸杞的根、茎、叶等组织中广泛表达, 为组成表达型基因。

潘丽晶等^[27]根据已报道的石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. *DFR* 基因序列设计引物, 从石斛中分

离了 *DFR* 基因。将该基因序列正向与反向连接到植物表达载体 pCambia1301 中, 并由组成型启动子 CaMV35S 驱动, 成功构建了 *DFR* 基因的正义和反义植物表达载体 pCSDN1 和 pCSDN2, 并导入根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, 以期利用转基因技术培育出石斛花色新品种。

3 结语与展望

迄今, 有关黄酮类化合物代谢合成途径及相关功能基因都已得到证实并进行了系统的研究, 从而使得黄酮类化合物代谢合成途径成为植物次级代谢中研究得最为深入的代谢系统之一。在药用植物中, 黄酮类化合物代谢合成途径及相关基因的研究处于起步阶段, 但也取得了较大的成果, 为药用植物黄酮类化合物合成途径及相关功能基因的深入研究奠定了基础。药用植物黄酮类化合物代谢合成途径中相关基因的研究方法主要是通过已有的相关基因序列, 设计特异性的引物, PCR 扩增得到序列, 再通过 RACE 法等得到全长序列, 并将测序结果进行生物信息学分析, 最后再将基因在植物中进行不同的表达, 以期得到有效成分累积及调控机制。常用在线软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>、<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/getorf>、<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html> 等, 可找出测序所得基因的开放阅读框, 并可获得其编码蛋白质序列; 在线软件 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 将预测蛋白序列结果与 NCBI 中已登录的物种进行对比分析; 软件 MEGA5.10 可构建进化树; 在线软件 <http://web.expasy.org/protparam/>、<http://psort.hgc.jp>、<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 等, 可分析其编码蛋白质序列的一级结构; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM> 可分析其编码蛋白质序列的二级结构。

目前国内药用植物的研究还是集中于化学成分研究, 分子生物学研究处于起步阶段, 今后可以将化学成分分析与基因表达分析结合起来, 研究药用植物有效成分的累积和调控机制。功能基因是后基因组时代植物基因组研究的最活跃、最核心的领域之一。它强调发展和应用整体 (基因组水平或系统水平) 实验方法分析基因组序列信息, 阐明基因功能。其基本策略从过去的单一基因或蛋白质上升到系统角度研究所有基因或蛋白质^[28]。在药用植物功能基因研究中, 与基因组研究相比, 最为活跃的研究领域是与活性成分形成关系最密切的生物合成相关基

因克隆研究。由于临床上对天然药物的实际需求不断增加,以及基因克隆与表达技术的发展,近年来药用植物功能基因的克隆呈现快速增长的趋势^[29]。通过生物合成途径的研究,推动药用植物次生代谢工程的发展,提高中药材的品质,为中药的良种选育、规范化种植和质量控制提供技术支撑,将是中药材品质研究的前沿和热点课题。

参考文献

- [1] 王青云. 中草药的有效成份探讨 [J]. 内蒙古中医药, 2010(13): 105-106.
- [2] 赵娅敏, 马好文, 孟淑娟. 紫花苜蓿中黄酮类化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3245-3252.
- [3] Schijlen E G W M, de Vos C H R, van Tunen A J, et al. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2631-2648.
- [4] 周小龙, 郑云云, 董迎辉, 等. 海洋贝类功能基因的研究进展 [J]. 海洋科学, 2012, 36(12): 99-107.
- [5] Dixon R A, Pasinetti G M. Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(2): 453-457.
- [6] Koes R E, Francesca Q, Joseph N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution [J]. *Bioessays*, 1994, 16: 123-132.
- [7] 钟德馨, 方袁梦梦, 郭壮浩. 决明查尔酮合成酶全长基因序列的克隆与分析 [J]. 生物技术通报, 2013, 29(5): 99-104.
- [8] Pierre P, Thierry G, Bentrice I E, et al. Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-Reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis [J]. *J Mol Biol*, 2007, 368: 1345-1357.
- [9] 文海涛, 赵红英, 肖凤霞, 等. 化州柚查尔酮合成酶基因克隆与序列分析 [J]. 生物学杂志, 2011, 28(1): 39-41.
- [10] Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 786-791.
- [11] 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 japonicus* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 941-951.
- [12] Mehdy M C, Lamb C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor wounding and infection [J]. *EMBO J*, 1987, 6(6): 1527-1533.
- [13] 刘春霞, 王 玥, 崔明昆, 等. 灯盏花 CHI 的克隆及其生物信息学分析 [J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(6): 682-690.
- [14] 刘长英, 赵爱春, 李 军, 等. 桑树查尔酮异构酶基因的克隆与原核表达分析 [J]. 林业科学, 2013, 49(2): 39-45.
- [15] Jung W. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(2): 208-212.
- [16] 张丹凤. 蒙古黄芪异黄酮合成酶基因的克隆及序列分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2004.
- [17] Timothy A, Edwina C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1071-1083.
- [18] 刘 薇. 桑叶化学成分的动态变化与 PAL、F3H 基因的表达水平研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [19] 雷 桢. 黄芩苷生物合成途径中关键酶基因的克隆与序列分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- [20] Forkmann G, Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12(2): 155-160.
- [21] Britsch L, Heller W, Grisebach H. Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley [J]. *Zeitschrift Naturforsch*, 1981, 36: 742-750.
- [22] 乔中全, 何 钢, 王小明, 等. 金银花黄酮醇合成酶基因全长克隆及其序列分析 [J]. 生物技术通报, 2012, 28(4): 63-68.
- [23] 李广平, 张兴青, 曹福亮. 银杏 FLS 基因启动子克隆及序列分析 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(23): 77-80.
- [24] Cynthia A D, Jason B, Timothy B, et al. Arctic mustard flower color polymorphism controlled by petal-specific downregulation at the threshold of the anthocyanin biosynthetic pathway [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18230.
- [25] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1071-1083.
- [26] 樊云芳, 陈晓军, 李彦龙, 等. 宁夏枸杞 DFR 基因的克隆与序列分析 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(12): 2373-2379.
- [27] 潘丽晶, 范干群, 张妙彬, 等. 石斛兰 DFR 基因植物表达载体的构建 [J]. 生物技术通报, 2009, 25(8): 71-75.
- [28] 王景雪, 孙 毅, 徐培林, 等. 植物功能基因组研究进展 [J]. 生物技术通报, 2004, 20(1): 18-22.
- [29] Andy P, Brandle S, Kehr J, et al. Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser induced fluorescence detection [J]. *Transgenic Res*, 2000, 9: 243-260.