

• 药材与资源 •

黄芩查耳酮异构酶基因的克隆和生物信息学分析

郭双双, 程 林, 杨利民*, 刘翠晶, 韩 梅

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要: **目的** 从黄芩愈伤组织中克隆查耳酮异构酶 (CHI) 基因, 并对其进行生物信息学分析。 **方法** 从黄芩愈伤组织中提取 RNA, 反转录为 cDNA, 设计特异性引物, 克隆得到黄芩查耳酮异构酶 (sbCHI) 基因。通过生物信息学对该基因蛋白的特征进行分析, 使用 MEGA5.1 构建 sbCHI 与相关物种查耳酮异构酶基因的系统进化树。 **结果** 获得 sbCHI 基因 (GeneBank 登录号 KP064512) 全长 648 bp, 含有 1 个完整的开放阅读框, 编码 215 个氨基酸。为不稳定亲水性蛋白, sbCHI 编码蛋白相对分子质量为 22 980, 等电点 (pI) 为 5.09, 不含信号肽, 无跨膜区, 具有 1 个查耳酮超级家族的保守结构域。二级结构中 α -螺旋 (alpha helix) 占 37.21%、 β -延伸 (β -extended) 占 23.25%、无规则卷曲 (random coil) 占 39.54%。同源性分析显示, sbCHI 基因与黄芩 (ADQ13184.1) 核苷酸序列相似性为 99.69%、氨基酸序列相似性为 99.07%, 仅在第 31、160 位不同。 **结论** 成功从黄芩愈伤组织中克隆得到 sbCHI, 为进一步鉴定 sbCHI 基因的功能及黄芩苷的合成生物学研究提供基础。

关键词: 黄芩愈伤组织; 查耳酮异构酶; 生物信息学分析; 黄芩苷; 克隆

中图分类号: R282.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)10-1506-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.10.019

Cloning and bioinformatic analysis of chalcone isomerase in *Scutellaria baicalensis*

GUO Shuang-shuang, CHENG Lin, YANG Li-min, LIU Cui-jing, HAN Mei

College of Traditional Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: **Objective** To clone chalcone isomerase (sbCHI) gene from the callus of *Scutellaria baicalensis* and to analyze its bioinformatics. **Methods** RNA was obtained from scutellariae callus, cDNA was reversely transcribed, specific primers were designed, and then CHI was cloned. The protein characteristics was analyzed using bioinformatics and the phylogenetic tree of CHI was constructed using MEGA5.1. **Results** The 648 bp sbCHI (accession number: KP064512) sequence was obtained, which has a complete open reading frame (ORF), encoding an unstable protein with 215 amino acids. The sbCHI encoding protein has isoelectric point (pI) of 5.09 and a calculated molecular weight about 22 980, without transmembrane regions and signal peptide has a conserved domain of chalcone-flavanone isomerase family. In the secondary structure, the percentage of alpha helix, β -extended, and random coil were 37.21%, 23.25%, and 39.54%, respectively. The homologous analysis indicates the nucleotide sequence 99.69% similarity and the amino acid sequence 99.07% similarity with *S. baicalensis* (ADQ13184.1), only in 31 and 160 were different. **Conclusion** The sbCHI in scutellariae callus is successfully cloned, which provides the foundation for further characterization sbCHI functionality and the synthetic biology research of baicalin.

Key words: callus of *Scutellaria baicalensis*; chalcone isomerase; bioinformatic analysis; baicalin; clone

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根, 作为传统中药材, 具有治疗炎症、呼吸道感染、失眠、腹泻、痢疾、高血压等作用^[1]。《中国药典》2010 年版规定以黄芩苷作为评价黄芩药材质量标准^[2]。研究发现黄芩苷具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗感染、抗 HIV、抗氧化及清除

氧自由基和治疗心血管疾病等作用^[3]。目前, 黄芩苷的生物合成途径与其关键酶基因表达之间的关系仍处于研究阶段。

查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI, EC5.5.1.6) 是第一个被认识的黄酮类化合物合成相关酶, 也是黄酮代谢途径中的关键酶之一。相关研

收稿日期: 2014-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31071292); 国家科技支撑计划项目 (2011BAI0301-02); 吉林省科技成果转化项目 (20125068)

作者简介: 郭双双 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药学和分子生物学。E-mail: 1530811226@qq.com

*通信作者 杨利民 (1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为中药资源生态与药材质量调控研究。E-mail: ylmh777@126.com

究证明,黄芩毛状根中CHI基因的表达量与黄酮(黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素)生物量呈正相关^[4]。1987年研究者利用抗体技术首次从法国豌豆中分离出CHI基因^[5]。随后从矮牵牛 *Petunia hybrida* Vilm.、菜豆 *Phaseolus vulgaris* Linn.、玉米 *Zea mays* Linn.等^[6-8]大多数维管植物中克隆分离得到。CHI催化分子内反应,使双环的柚皮苷查耳酮异构化形成有生物学活性的三环 2S-二羟基黄烷酮。根据反应底物的不同将CHI基因分为2种类型^[9],一类CHI基因仅能催化6'-羟基查耳酮转化为5-羟基黄烷酮,存在于非豆科植物;另一类CHI基因存在于豆科植物中能催化6'-羟基查耳酮和6'-脱氧查耳酮转化为相应的5-羟基黄烷酮和5-脱氧黄烷酮。研究发现有些细菌和真菌中也发现CHI基因的存在^[10],将其划分为第3类。

本实验对黄芩苷生物合成途径中的CHI基因(sbCHI)进行克隆与生物信息学分析,旨在从基因水平上研究黄芩苷生物合成途径的调控机制,实现黄芩苷合成基因的高效表达,增加药效成分量。为深入研究CHI家族蛋白的酶学特性和黄酮类生物合成的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 愈伤组织,由吉林农业大学中药材学院植物研究室提供。经吉林农业大学韩梅教授鉴定。于超净工作台中将愈伤组织放于自封袋中于-80℃保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

EASYspin Plus Plant RNA Kit、2×Taq PCR MasterMix 购自北京艾德莱生物科技有限公司,高纯质粒小量制备试剂盒、DNA连接试剂盒、多功能DNA纯化回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,M-Mulv 第一链 cDNA 购自上海生工生物工程有限公司,LB培养基、DH5α感受态细胞购自大连宝生物工程有限公司。MDF-382E超低温冰箱(日本SANYO),HC-2518R高速冷冻离心机,PCR扩增仪(Mastercycler nexus),凝胶成像系统[GIS-2010,天能科技(上海)有限公司],制冰机(SIM-F140,SANYO),电泳仪(DYY-8C型,北京六一电泳厂)。

1.3 方法

1.3.1 总RNA提取和cDNA合成 取小块黄芩愈伤组织于液氮中速冻,研钵研成细粉状,按

EASYspin Plus Plant RNA Kit 使用说明,提取黄芩愈伤组织总RNA。利用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。利用M-Mulv 第一链 cDNA 试剂盒以Oliga-dT为引物,合成黄芩愈伤组织cDNA链。

反应体系(12 μL)为总RNA模板10 μL,RNase Free H₂O 1 μL,5 μg/μL Oliga 1 μL。反应条件为65℃水浴5 min后,立即放于冰上冷却30 s,然后离心3~5 s。5倍反应缓冲液4 μL,20 U/μL RNase Inhibitor 1 μL,10 mmol/L dNTP Mix 2 μL,20 U/μL M-Mulv RT 1 μL。反应条件为42℃水浴90 min,70℃变性10 min,放于冰上5 min。逆转录DNA于-20℃保存。

1.3.2 sbCHI基因的扩增及测序 根据GenBank上已报道的黄芩CHI基因cDNA(HQ153041.1)序列,使用软件Primer Primer5.0设计引物,上游引物为sbCHI-F:5'-ATGGGTTTTTCAGGTTTGGC-3',下游引物为sbCHI-R:5'-TCACTTCCCAGCAGGTTTTTCAC-3'。以黄芩的cDNA为模板,按照以下体系对sbCHI基因进行扩增:cDNA 1.0 μL,2×Taq酶9 μL,10 μmol/L上下游引物各0.8 μL,ddH₂O 8.4 μL,终体积为20.0 μL。反应程序为94℃预变性3 min;然后进行35个循环:94℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸1 min;循环结束后72℃延伸10 min,4℃保温。0.8%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,对扩增所得的目的片段进行切胶回收。

将纯化回收的目的片段与pGEM-T easy载体连接,再转化到DH5α感受态细胞中,涂布在氨苄青霉素(Amp)、5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-半乳糖(X-gal)和异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)的LB平板上进行培养,随机挑取12个白色单克隆菌落PCR扩增和电泳检测后选择阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

1.3.3 sbCHI基因生物信息学分析 将所测定的sbCHI基因序列在NCBI上通过Blast搜索蛋白质和核苷酸数据库,并由DNAMAN软件翻译成氨基酸序列,使用ORF Finder查找开放阅读框(ORF)。生物信息学分析主要采用一些网上在线软件进行分析,如采用Interpro(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterPro-Scan/>)进行结构域比对,ExPASy在线服务器的Compute PI/Mw(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测相对分子质量与理论等电点,TargetP1.1 server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)进行信号肽分析,SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)

org/) 进行二级结构分析和结构域的三维同源建模。用 DNAMAN 软件对序列进行多重比对, 用 ClustalW 软件与其他植物的 CHI 氨基酸序列进行比较, 用 MEGA 5.1 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1 000 次。

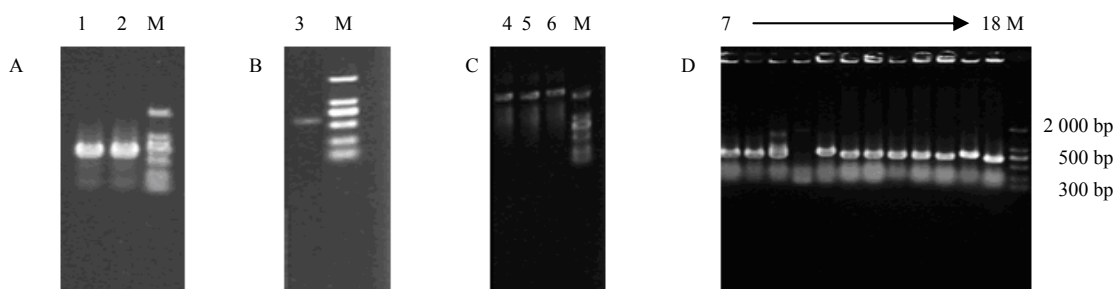
2 结果与分析

2.1 sbCHI 基因的克隆

对黄芩愈伤组织的总 RNA 进行浓度和纯度检测, 得到的 RNA 质量浓度为 115 ng/μL、 A_{260}/A_{280} 的值为 1.817, 表明所提取的总 RNA 完整性和纯度较好, 可用于下一步实验。根据 Genbank 中已公布的黄芩 CHI 基因的 CDS 设计引物, 以黄芩愈伤组

织 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增得到一条长为 648 bp 的序列 (图 1-A), 为区别于 Genbank 中的 1 条黄芩 CHI 基因, 将所扩增基因命名为 sbCHI, 并将核酸序列提交到 NCBI 中的 GenBank 数据库, 登陆序列号为 KP064512。

将 PCR 产物进行纯化回收, 回收结果见图 1-B, 连接到 pGEM-T easy 载体上。将于 4 °C 条件下连接过夜的 CHI/pGEM-T easy 载体转化到 DH5α 感受态细胞中, 涂布到 LB 平板培养基上培养, 对随机挑取的 12 个单克隆菌落进行菌落 PCR (图 1-D)。挑取 3 株有阳性克隆的菌落进行测序, 同时提取这 3 株菌落的重组质粒 (图 1-C)。



A-sbCHI 基因的扩增 B-sbCHI 基因纯化回收的检查结果 C-重组质粒 pGEM-T easy-sbCHI 的电泳检测 D-重组质粒 pGEM-T easy-sbCHI 的阳性克隆检测结果; 1~3、7~18-sbCHI 基因条带 4~6-pGEM-T easy-sbCHI 条带 M-Marker
A-ORF amplification of sbCHIGene B-detection of recover purified sbCHIGene C-gel detection of pGEM-T easy-sbCHI D-detection of positive clones of pGEM-T easy-sbCHI 1—3, 7—18-sbCHI 4—6-pGEM-T easy-sbCHI M-Marker

图 1 sbCHI 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of sbCHI

2.2 理化性质分析

利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 预测 sbCHI 基因编码蛋白的理化性质。CHI 编码的蛋白由 215 个氨基酸组成 (图 2), 分子式为 $C_{1037}H_{1634}N_{258}O_{321}S_4$, 总原子数为 3 254。相对分子质量为 22 980, 理论等电点 5.09, 带负电基 (Asp+Glu) 为 26, 带正电基 (Arg+Lys) 为 21。不稳定指数为 47.93, 表明该蛋白不稳定。脂溶指数 (aliphatic index) 为 85.30。总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.034, 通常根据 GRAVY 值范围在 -2~2, 正值表明此蛋白为疏水性蛋白, 负值表明此蛋白为亲水性蛋白, 故 sbCHI 基因编码蛋白为亲水性蛋白。

2.3 sbCHI 基因编码蛋白二级结构分析、结构域预测及三维建模

采用 SWISS-MODEL 进行 sbCHI 的编码蛋白二级结构分析和结构域预测。sbCHI 编码蛋白的二级结构中, α -螺旋 (alpha helix) 占 37.21%、 β -延伸

(β -extended) 占 23.25%、无规卷曲 (random coil) 占 39.54%。蛋白质的空间结构决定了其功能作用, α -螺旋主要对蛋白质骨架起稳定作用, 而无规则卷曲结构决定了蛋白质尤其是酶的功能部位常常位于这种构象区域, 通过对蛋白质二级与三级结构预测和分析, 有助于理解蛋白质功能与结构的关系^[11]。

InterProScan 的结构域预测结果 (图 3) 表明, sbCHI 基因编码蛋白在 5~215 位, 包含一个查耳酮超级家族结构域。如图 4 所示, 三维同源模型以 4doi.1.A 蛋白为模板, 序列同源性为 50%, 用于建立该模型的氨基酸残基范围为 6~214 位, 从图 2 中可以看出, sbCHI 基因预测的编码蛋白二级结构与三级结构预测结果相符合。

2.4 sbCHI 基因编码蛋白信号肽、亚细胞定位、跨膜区预测分析

通过 Signal P4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对蛋白信号肽预测, 如图 5, S 值表示每

```

1 M S A S P S V T K V L V E S I E F S P A A K P P G S S N T L
1 ATGCTGCTTCGCCATCCGTCACCAAGTCCTAGTCGAATCCATCGAGTTCTCGCCGCCGCAAAGCCGCCGGGATCCTCCAACACCTTA
31 L L G G A G V R G M E I Q G N F V K F T A I G V Y L E D S A
91 TTACTCGCGCGCCCGGGGTGAGAGGAATGGAGATCCAGGGGAACCTCGTGAAGTTCACGGCGATCGGTGTTTACTTGGAAGACAGCGCC
61 V P S L A V N W K G K T A E E L T E S D D F F R E I V S G P
181 GTTCGCTCTCTCGCGTTAACTGGAAGGGCAAGACCGCCGAGGAGTTGACGGAGTCAGACGACTTTTCAGGGAAAATCGTGCTGCTGCTCT
91 F E K F T K V T M I L P L T G K Q Y S E K V A E N C V A Y W
271 TTCGAGAAAATTCACCAAGGTGACGATGATTCTGCCATTGACGGGAAGCAATACTCGGAGAAAAGTTGCAGAGAATCGGTTGCGTACTGG
121 K A V G K T D A E S E A I D K F L Q V F K D E T F A P G A
361 AAAGCCGTAGGGAATACACGGATGCTGAATCGGAAGCAATCGACAAGTTTCTCCAAGTGTCAAGGACGAAACGTTGCGCGCTGGAGCT
151 S I L F T Q S P A G S L T I S F S K D G S I P E Q G K A V I
451 TCCATCCTCTTACCCAAATCGCCGCCGCTCCTTGACGATTAGCTTCTCGAAAGACGGATCGATTCCAGAGCAAGGGAAGGCAGTAATA
181 E N K Q L S E A V L E S I I G K H G V S P S A K Q S L A A R
541 GAGAACAAACAGCTGTCGGAGGCAGTGCTGGAGTCGATCATCGGAAAGCATGGTGTCGCCGTCGGCGAAGCAGAGTTTGCGGCAAGA
211 L S E L F *
631 CTATCGGAGTTGTTTAA

```

图 2 sbCHI 基因的 cDNA 和编码氨基酸

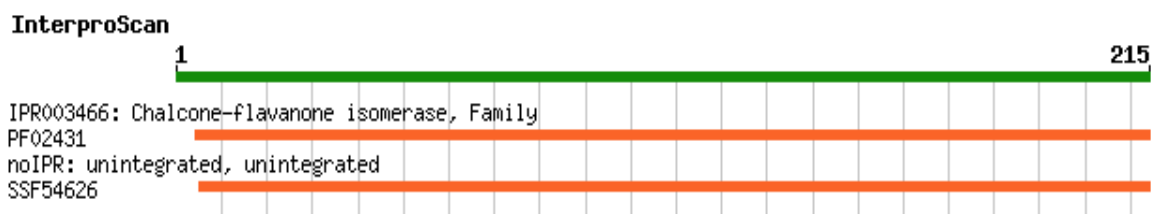
Fig. 2 cDNA of sbCHI and its deduced amino acid sequence of *S. icalensis*

图 3 InterProScan 在线软件预测 sbCHI 基因编码蛋白的保守结构域

Fig. 3 Conserved domain prediction of sbCHI encoding protein using InterProScan

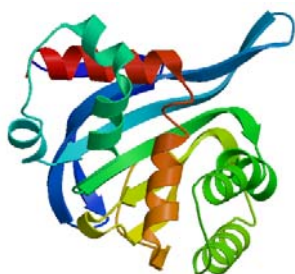


图 4 sbCHI 编码蛋白三维结构的预测

Fig. 4 Deduced 3D structure of sbCHI coding protein

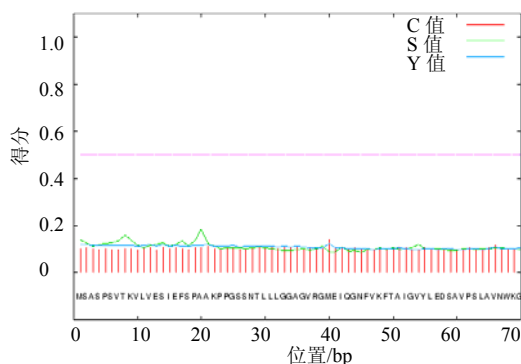


图 5 蛋白信号肽预测图

Fig. 5 Prediction of protein signal peptide

个氨基酸对应 1 个 S 值, 图表中有一个曲线显示 S 值的变化趋势, 信号肽区域的 S 值较高。C 值是剪切位点值。每个氨基酸会有一个 C 值, 在剪切位点处 C 值是最高的。Y 值是 Y-max 综合考虑 S 值和 C 值的一个参数, 其比单独考虑 C 值要更精确。因为在一条系列中 C 值可能不止有一个较高的位点, 但是剪切位点只有一个, 此时的剪切位点就由 Y-max 值来推测的, 为 S 值是陡峭的位置和具有高 C 值的位点。当 C 值最大, S 值陡峭, Y 值最高峰时, 就可以预测为信号肽的切位点。分析可知该蛋白没有信号肽。利用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测可知 sbCHI 编码蛋白跨膜螺旋数为 0, 结果见图 6, 可知此蛋白无跨膜区。TargetP 1.1 Server 在线工具分析结果显示, 此蛋白定位于叶绿体中的值为 0.634、定位于线粒体中的值为 0.030、定位于其他位置中的值为 0.275, 因此 sbCHI 基因编码蛋白最可能定位于叶绿体中。且分泌通道信号肽 (SP) 得分为 0.337, 而只有当 SP 值接近 1 时预测可能有信号肽, 这与利用 Signal P4.1 进行信号肽预测结果一致。

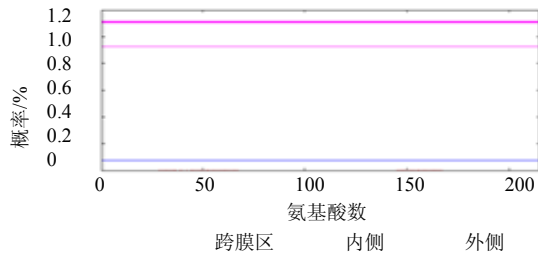


图 6 蛋白跨膜区预测图

Fig. 6 Prediction of protein transmembrane domain

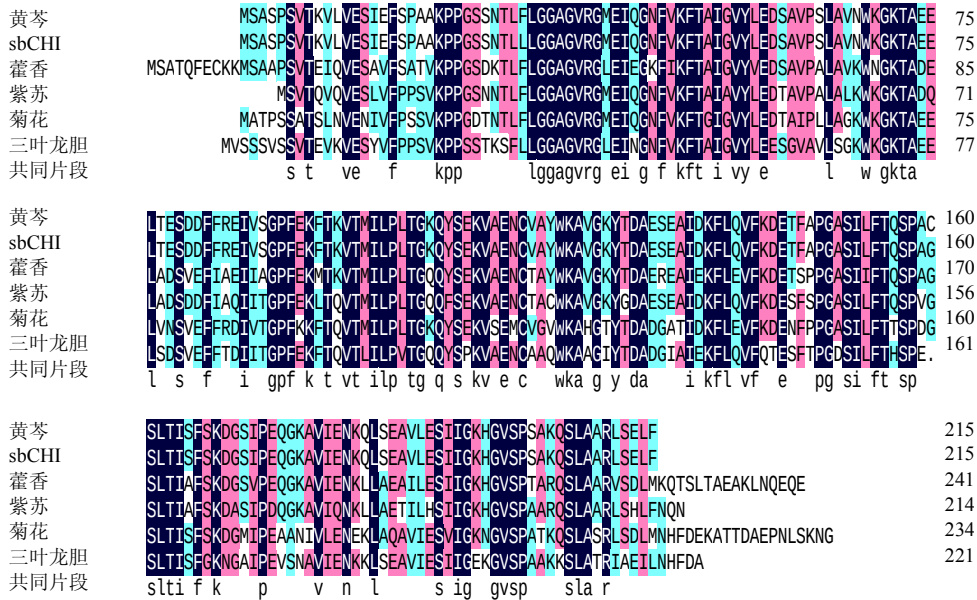


图 7 黄芩和其他植物的 CHI 编码氨基酸的序列分析

Fig. 7 Multiple alignment of putative amino acids sequence of sbCHI with those of cloned CHI in other plants

氨酸不同、160 位的甘氨酸和半胱氨酸不同。

为了分析 sbCHI 基因编码蛋白的进化情况, 从 GenBank 数据库中共选取了 17 个物种的 19 条 CHI 序列, 经过软件 Clustal W 比对并利用 MEG5.0 中的 neighbor-joining 方法^[12]。构建了植物、细菌不同生物 CHI 基因的进化树如图 8 所示, 这些序列分别聚类为单子叶植物、双子叶植物、双子叶植物唇形科、细菌门, 其中单子叶植物和双子叶植物同属于第一类、双子叶植物唇形科属于第二类、细菌门属于第三类。其中 sbCHI 基因与唇形科的霍香、紫苏聚类为一支, 与黄芩 (ADQ13184.1) 亲缘最近, 和同源性分析结果相同, 同属于第一类。这与实验预期相符, 在一定程度上说明克隆得到的 sbCHI 基因为黄芩 CHI 基因。

3 讨论

CHI 在黄芩苷形成的代谢途径中, 主要催化双环的柚皮苷查耳酮异构化形成有生物学活性的三环 2S-二羟基黄烷酮, 是关键酶之一。从 1987 年首次

2.5 sbCHI 编码蛋白的同源性及系统进化树分析

利用 DNAMAN 软件, 将 sbCHI 编码蛋白氨基酸序列与 GenBank 中已公布的菊花、霍香、三花龙胆、紫苏、黄芩进行序列比对 (图 7), 相似性分别为 64.24%、69.29%、64.86%、75.69%、99.07%。其中紫苏 CHI 基因和霍香 CHI 基因与 sbCHI 同属于唇形科较其他植物的氨基酸序列相似性高, sbCHI 基因与黄芩 (ADQ13184.1) 核苷酸相似性为 99.69%、氨基酸相似性为 99.07%, 仅在 31 位的亮氨酸和苯丙

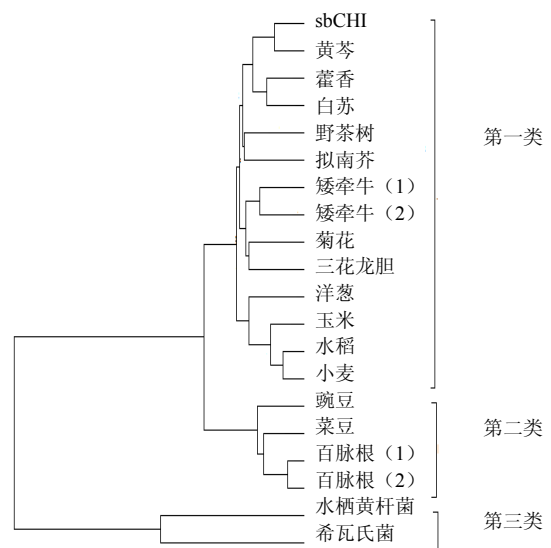


图 8 CHI 编码蛋白系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic tree of sbCHI and their related sequences

得到第一个 CHI 基因, 随后陆续从矮牵牛、藿香、紫苏、三花龙胆、黄芩等大多数植物中克隆获得 CHI 基因。除了在植物中发现 CHI 基因, 在一些细菌、真菌中也克隆出 CHI 基因。

植物黄酮类化合物在植物中的积累, 受 CHI 基因表达量的影响。通过荧光定量 PCR 对银杏叶片中 CHI 基因进行分析, 结果显示查耳酮异构酶的活性和查耳酮异构酶基因的表达量与叶片中的黄酮类化合物的积累相关^[13]; 利用酵母提取物和 PEG8000 处理甘草毛状根, 提高 CHI 基因的表达量, 结果甘草毛状根中的类黄酮化合物的量明显增加^[14]; 通过对黄芩毛状根中 CHI 基因进行过表达处理和基因沉默处理, 发现黄芩毛状根中黄酮类物质相应的增加和减少。这些研究在一定程度上说明了 CHI 基因的表达量与植物中黄酮类化合物呈正相关。

本实验首次以黄芩愈伤组织为材料, 克隆了 sbCHI 基因的全长 cDNA, 长度为 648 bp, 包含 1 个 ORF, 共编码 215 个氨基酸, 并对其进行生物信息学分析, 预测 CHI 相对分子质量大小和等电点分别为 22 980 和 5.09, 为不稳定的亲水性蛋白; 二级结构中以 α -螺旋、 β -延伸以及无规卷曲为主, 保守结构域属于查耳酮超级家族。通过同源性分析及系统进化树分析, 发现 sbCHI 基因与藿香、紫苏唇形科植物的亲缘较近, 氨基酸序列相似性最高仅有 75.69%, 说明物种间的差异比较大。类黄酮生物合成通过苯丙氨酸代谢途径, 是目前最为清楚的植物次生代谢产物合成途径。黄芩作为一种重要的药用植物, 黄芩苷是黄芩中量最高的类黄酮化合物。目前, 关于黄芩类黄酮代谢途径的上游基因均已克隆获得, 下游基因研究较少, 至于黄芩调节基因研究还未有报道。关于黄芩 CHI 基因在转录水平的变化已有研究报道, 为了更深入了解黄芩 CHI 基因, 应用生物信息学方法对 sbCHI 基因编码的蛋白进行序列比对、分析, 从而对其结构和功能进行推断和预测, 为该基因的功能研究提供科学依据。

参考文献

[1] Li H, Murch S J, Saxena P K. Thidiazuron-induced de

novo shoot organogenesis on seedlings, etiolated hypocotyls and stem segments of Huang-qin [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2000, 62(3): 169-173.

[2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[3] 杨娟, 傅军鹏. 黄芩活性成分及药效研究近况 [J]. *实用医药杂志*, 2004, 21(3): 271-273.

[4] Park N I, 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 Genom*, 2011, 11(3): 491-496.

[5] 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.

[6] Blyden E R, Doerner P W, Lamb C L, et al. Sequence analysis of a chalcone isomerase cDNA of *Phaseolus vulgaris* L. [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16(1): 167-169.

[7] Grotewold E, Peterson T. Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavonone isomerase [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 242(1): 1-8.

[8] Wood A J, Davies E. A cDNA encoding chalcone isomerase from aged pea epicotyls [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104(4): 1465-1466.

[9] Dixon R A, Richard Blyden E, Robbins M P, et al. Comparative biochemistry of chalcone isomerases [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(9): 2801-2808.

[10] Gensheimer M, Mushegian A. Chalcone isomerase family and fold: no longer unique to plants [J]. *Protein Sci*, 2004, 13(2): 540-544.

[11] Zhou X Y, Li J Y, Fan Z Q. Cloning and expression analysis of chalcone isomerase gene cDNA from *Camellia nitidissima* [J]. *Forest Res*, 2012, 25(1): 93-99.

[12] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23: 2947-2948.

[13] Cheng H, Li L L, Cheng S Y, et al. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (GbCHI) from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(1): 49-62.

[14] Zhang H C, Liu J M, Lu H Y, et al. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(8): 1205-1213.