

• 药材与资源 •

布渣叶查耳酮合酶基因全长 cDNA 克隆及其表达模式分析

岳春华, 张初梅, 林 爽, 黄奕辉, 李坤平*

广东药科大学药学院, 广东 广州 510006

摘 要: 目的 克隆布渣叶查耳酮合酶基因 (MpCHS) 全长 cDNA, 并对其在不同部位和不同生长阶段叶片中的表达模式进行分析。方法 以布渣叶叶片总 RNA 逆转录合成 cDNA 为模板, 根据其转录组数据设计特异引物序列, PCR 扩增 MpCHS 基因全长 cDNA, 经质粒连接、转化、扩增, 挑选阳性克隆测序、分析并构建原核表达载体。同时, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 对 MpCHS 基因的表达模式进行分析。结果 成功克隆得到 MpCHS 基因全长 cDNA (GenBank: KY472608)。生物信息学分析表明其开放阅读框为 1 176 bp, 编码含 391 个氨基酸的蛋白, 其相对分子质量为 42 700, 理论等电点 6.11, 具有 CHS 家族蛋白 3 个保守的功能活性位点 (165 C、304 H 和 337 N) 和特征多肽标签序列 RLMMYQQGCFAGGTVLR 和 GVLFGFGPGL。系统进化树分析发现 MpCHS 与可可、陆地棉等木本植物的亲缘关系比较近。RT-qPCR 结果表明, MpCHS 基因在不同部位均有表达, 在叶片中的表达量随着生长过程逐步降低。结论 首次克隆得到 MpCHS 基因, 并分析了 MpCHS 基因在布渣叶不同部位和不同生长阶段叶片中的表达模式, 为 MpCHS 基因的原核表达和功能验证奠定了基础, 也为进一步解析布渣叶黄酮类生物合成途径提供了参考。

关键词: 布渣叶; 查耳酮合酶; 基因克隆; 基因表达模式; 原核表达载体

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)17-4118-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.17.023

Cloning and expression pattern analysis of chalcone synthase gene in *Microcos paniculata*

YUE Chun-hua, ZHANG Chu-mei, LIN Shuang, HUANG Yi-hui, LI Kun-ping

School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To clone the full-length cDNA of MpCHS and analyze its expression pattern in different parts of *Microcos paniculata* and different growth periods of *M. paniculata* leaves. **Methods** Based on the transcriptome data of *M. paniculata*, we designed specific primers for MpCHS gene. The full-length cDNA of MpCHS was amplified by PCR and the positive clones were then sequenced, analyzed, and constructed prokaryotic expression vector. The bioinformatics analysis of MpCHS was also performed. Meanwhile, the mRNA expression of MpCHS was detected using real-time quantitative PCR. **Results** The relative molecular mass was 42 700, and its theoretical isoelectric point was 6.11, with three conserved functional active sites (165 C, 304 H, and 337 N) of the CHS family proteins and the tag sequence of RLMMYQQGCFAGGTVLR and GVLFGFGPGL. Phylogenetic tree analysis showed that MpCHS had close relationship with woody plants such as cocoa and upland cotton. We successfully cloned the full-length cDNA of MpCHS (GenBank: KY472608). It had an ORF of 1 176 bp which encoded a protein of 391 amino acid residues. RT-qPCR results showed that MpCHS was expressed in all parts of *M. paniculata* and its expression in leaves was gradually decreased along with its development. **Conclusion** MpCHS is cloned from *M. paniculate* for the first time, and the gene expression pattern of MpCHS in different parts of *M. paniculata* and different growth periods of *M. paniculata* leaves was analyzed. This study facilitates the further purification and functional validation of MpCHS protein and provides reference for further analysis of flavonoids biosynthesis pathway in *M. paniculata*.

Key words: *Microcos paniculata* Linn.; chalcone synthase; gene cloning; gene expression pattern; prokaryotic expression vector

收稿日期: 2018-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31300273); 广东省科技计划项目 (2015A030302082)

作者简介: 岳春华 (1982—), 女, 硕士, 讲师, 从事制药工程和药物植物资源方面的教学与研究。E-mail: yuechunhua2004@126.com

*通信作者 李坤平 (1978—), 男, 博士, 副教授, 从事中药制药和药用植物资源方面的教学与研究。

Tel: (020)39352118 E-mail: lkpchina@hotmail.com

布渣叶 *Microcos paniculata* Linn. 为灌木或小乔木, 药食两用其叶, 最早见于《生草药性备要》(~1711年), 现收载于国家新资源食品目录(2010年)和《中国药典》2015年版^[1]。药典记载布渣叶味微酸, 性凉, 具有消食化滞、清热利湿之功效。布渣叶的化学成分较为复杂, 主要有黄酮类、生物碱、三萜类、挥发油类、甾体类及有机酸类等次生代谢成分。课题组前期研究发现, 类黄酮是布渣叶的主要活性成分; 但迄今, 布渣叶黄酮的分离、活性筛选和制剂开发等研究较多^[2-4], 而有关其生物合成与代谢调控方面的研究鲜有报道。查耳酮合酶(chalcone synthase, CHS)是植物类黄酮代谢途径的第1个关键酶, 也是类黄酮合成途径中第1个被分离出的基因^[5], 其催化4-香豆酸-CoA和丙二酰-CoA缩合形成其骨架的A环和B环。CHS基因是一个较大的基因家族, 有比较保守的编码区^[6]。迄今为止, CHS基因已经从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi^[7]、苦荞 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn^[8]、百合 *Lilium* L.^[9]、小立碗藓 *Physcomitrella patens* L.^[10]、水飞蓟 *Silybum marianum* (L.) Gaertn.^[11]、金龙胆草 *Conyza blinii* Levl.^[12]和独一味 *Lamioophlomis rotata* (Benth.) Kudo^[13]等诸多药用植物中得到了克隆, 然而, 有关布渣叶中MpCHS克隆与表达模式的研究尚未见报道。本研究基于前期布渣叶转录组研究, 从功能注释为CHS的转录本中采用qRT-PCR方法克隆了MpCHS基因, 并对其进行了生物信息学分析、原核表达载体的构建和表达模式分析, 以期为深入研究MpCHS基因功能及其在布渣叶黄酮合成代谢途径中的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

样品采自广州番禺滴水岩自然保护区(23°03'29.65"N, 113°24'34.74"E), 经广东药科大学李坤平副教授鉴定为布渣叶 *Microcos paniculata* Linn. 采集后经液氮速冻, 于-80℃低温保存。植物总RNA提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒购自天根生物科技公司; TransScript II Reverse Transcriptase、ExTaq酶、XhoI和BglII限制性核酸内切酶、T4 DNA连接酶购自Takara公司; PCR引物由BGI公司合成。

1.2 RNA提取及cDNA合成

取约100 mg样品, 在液氮中研磨后用植物总RNA提取试剂盒提取总RNA, 用NanoDrop 2100

和1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的量和完整性后, 用TransScript II Reverse Transcriptase试剂盒反转录合成cDNA。所有样品均设置3个生物学重复。

1.3 MpCHS基因全长cDNA的PCR扩增

根据已获得的布渣叶转录组数据, 设计MpCHS基因的特异性引物如下: MpCHS-F: 5'-CCGCTCGAGATGGCTGCTTCAGTCGAGGAGT-3'; MpCHS-R: 5'-GAAGATCTTTAATTCGTGGGAATACTGTGTAGC-3', 下划线部分分别为XhoI和BglII限制性内切酶切位点。PCR反应体系为cDNA模板1 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各1 μL, 10×ExTaq buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, ExTaq酶0.25 μL, 加水至50 μL。PCR扩增反应程序: 98℃、5 min预变性, 循环内98℃、10 s变性, 从65℃每个循环降1℃退火, 72℃延伸2 min, 10个循环; 在55℃退火, 20个循环; 最后72℃延伸7 min后4℃保存。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测和试剂盒纯化。

1.4 MpCHS基因的克隆

用XhoI和BglII对上述PCR产物和pET-30a(+)进行双酶切, 回收酶切产物, 并按照纯化试剂盒说明书对酶切产物进行纯化, T4连接酶22℃连接30 min, 构建pET-30a(+)-MpCHS重组质粒。将pET-30a(+)-MpCHS重组质粒转化至*E. coli* DH5α感受态细胞, 挑选阳性克隆送BGI测序。

1.5 MpCHS基因的生物信息学分析^[14]

MpCHS基因编码的蛋白质使用在线工具ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测其相对分子质量与理论等电点(PI), 使用InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 进行蛋白的保守结构域预测, 使用SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html) 进行蛋白质二级结构分析, 使用SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维同源建模, SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析蛋白质信号肽, 采用WoLFPSORT <http://www.genscript.com/wolf-psort.html> 软件进行蛋白亚细胞定位预测, 使用TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜区预测。将MpCHS基因的ORF区编码的氨基酸序列提交到NCBI, 用BLASTP搜索相似氨基酸序列(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 从结果中选取与MpCHS相似性较高的其他植物蛋

白序列, 用 MEGA 6 软件构建的 Neighbor-joint 系统进化树。

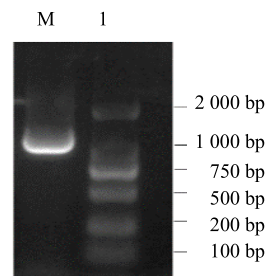
1.6 MpCHS 基因表达模式分析

采用 RT-qPCR 法测定 MpCHS 基因表达量。根据 MpCHS 基因的 cDNA 序列, 采用 Primer5 软件设计 RT-qPCR 引物 F: 5'-TGGAGGAAGG-AAAGAGCA-3' 和 R: 5'-AAGCCAAACAACA-AATCAAC-3', 以 Tubulin 为内参, 内参基因引物 F: 5'-TACAGCAACCACGACAG-3' 和 R: 5'-CAC-AAGAATCGTTGAGCC-3'。以 10 μ L 反应体系为基准, 包括 5 μ L SYBR Premix Ex Taq, 正、反向引物各 0.2 μ L (10 μ mol/L), cDNA 模板 4.6 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C、30 s 预变性; 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、20 s, 40 个循环, 数据采集; 65 $^{\circ}$ C、15 s; 60~95 $^{\circ}$ C 进行熔解曲线分析。每个反应重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 MpCHS 基因表达量。

2 结果与分析

2.1 布渣叶 MpCHS 基因全长 cDNA 序列

根据候选的 Unigene 序列, 设计特异引物, 进行 MpCHS 基因全长 cDNA 序列扩增, 得到了 1 000 bp 左右的条带(图 1)。进行测序后所得到的 MpCHS 基因的 cDNA 开放阅读框为 1 176 bp, 编码 391 个



M-Marker 1-MpCHS 基因 PCR 扩增产物
M-Marker 1-PCR product of MpCHS gene

图 1 PCR 扩增 MpCHS 基因

Fig. 1 PCR amplification of MpCHS gene

氨基酸序列(图 2); 此序列信息已经提交到 NCBI Genbank, 登陆号为 KY472608。

2.2 布渣叶 MpCHS 基因的部分生物信息学分析

ProtParam 预测 MpCHS 蛋白的分子式为 $C_{1900}H_{3040}N_{508}O_{566}S_{22}$, 相对分子质量为 42 761.42, 理论等电点 pI 为 6.11, 总带负电残基 (Asp+Glu) 为 47, 总带正电残基 (Arg+Lys) 为 43; 运用 BioEdit 软件中的 Kyte 和 Doolittle 两种算法对 MpCHS 蛋白所含的氨基酸亲水性和疏水性分析发现, 其亲水性和疏水性介于 +1.6~-2.8。

WoLFPSORT 软件预测 MpCHS 蛋白定位于

```

1 ATGGCTGCTTCAGTCGAGGAGTTTCAGAAAGGCCCAAGAGCCAGGGTCCAGCCACCGTCTCGCCATTGGCACCGCC
1 M A A S V E E F R K A Q R A Q G P A T V L A I G T A
79 ACGCCTTCCAACCTGCGTTTCCAGGCCGACTATCCTGACTACTCTCCGTATCACCACAGCGAGCAGATGACTGAG
27 T P S N C V S Q A D Y P D Y Y F R I T N S E H M T E
157 CTCAAAGAGAAATTTAAGCGGATGTGCGACAATCAATGATCAAGAAACGTTACATGTACCTGACCGAGGAAATCTTG
53 L K E K F K R M C D K S M I K K R Y M Y L T E E I L
235 ATGGAATTCACCAATGTGCGCTTACATGGCTCCGTCTCTCGACGACGGCAAGACATGGTGGTGGTGGAGTTCCA
79 M E N P N M C A Y M A P S L D A R Q D M V V E V P
313 AAGCTGGGAAAGAGCGCAACAAAGGCCATCAAGAAATGGGGACAGCCAAATCTAAGATCACCCACCTTGTTC
105 K L G K E A A T K A I K E W G Q P K S K I T H L V F
391 TGCACTACCTCTGGTGTAGACATGCCCGGTGCAGACTACCAACTTACCAAGCTCTTGGGACTGAGACCTCCGTCAG
131 C T T S G V D M P G A D Y Q L T K L L G L R P S V K
469 AGGCTCATGTATGACAGCAAGGCTGCTTTGCTGGCGGAACCGTGCTCCGTCTCGCCAAGGACTTGGCCGAGAACAA
157 R L M M Y Q Q G C F A G G T V L R L A K D L A E N N
547 AAGGGCGCTCGTGTCTCGTGGTGTGTTCCGAGATCACAGCCGTCACCTTCCGCGGACCTTCTGATACGCACTTGGAC
183 K G A R V L V V C S E I T A V T F R G P S D T H L D
625 TCCCTGGTAGGCCAAGCACTTTTCGGTGTATGGCGCTGCAGCTATCATCGTAGGTGCAGACCTGATACCAAAATCGAA
209 S L V G Q A L F G D G A A I I V G A D P D T K I E
703 CGCCCACTTTCCAGCTTGTATCAGCAGCTCAGACGATCTTGCCAGACTCAGATGGAGCCATTGACGGACATTTACGG
235 R P L F Q L V S A A Q T I L P D S D G A I D G H L R
781 GAAGTGGGGCTCACTTTCCACTTGTGAAAGATGTACCGGGACTAATCTCAAAGAACGTAGAGAAAAGCTTGGTCGAA
261 E V G L T F H L L K D V P G L I S K N V E K S L V E
859 GCATTACCCCAATTGGCATTAGCGACTGGAATTCATATTCTGGATCGCTACCCCGGTGGCCCTGCAATTCTGGAC
287 A F T P I G I S D W N S I F W I A H P G G P A I L D
937 CAAGTGAAGCCAAATTTGGGCTTAAAGAGGAGAAATGAGGGCGACCGAGCATGTGCTGAGTGAGTATGGAACATG
313 Q V E A K L G L K E E K M R A T R H V L S E Y G N M
1015 TCAAGTGCATGTGTGTTTATCTTGGATGAGATGAGAAAGAAATCATTGGAGGAAGGAAAGAGCACCACCGGTGAA
339 S S A C V L F I L D E M R K K S L E E G K S T T G E
1093 GGCTTGAATGGGTGTCCTTTTCGATTGCGGGCGGGCTCACGGTTGAACTGTGTGTACACAGTATCCACAG
365 G L E W G V L F G F G P G L T V E T V V L H S I P T
1171 AATTAA
391 N *

```

图 2 布渣叶 MpCHS 基因 cDNA 编码区序列及氨基酸序列

Fig. 2 cDNA coding sequence and amino acid sequence of MpCHS gene

细胞质中; TMHMM 2.0 预测 MpCHS 蛋白不存在跨膜区域,属于非跨膜蛋白; SOPMA 软件预测 MpCHS 蛋白二级结构中 α -螺旋 (alpha helix) 占的比重比较大,为 40.4%; 延伸链 (extended strand) 为 17.9%, β -转角 (bete turn) 所占比重比较少,为 10.2%, 无规卷曲 (random coil) 为 31.5%。SignalP4.1Server 分析显示 MpCHS 蛋白没有信号肽。

利用 InterPro Scan 对 MpCHS 蛋白进行结构域预测,结果发现 MpCHS 蛋白具有 CHS 家族蛋白 3 个保守的功能活性位点 (165 C, 304 H 和 337 N) 和特征多肽标签序列 RLMMYQQGCFAGGTVLR 及 GVLFGFGPGL。

2.3 MpCHS 的三级结构预测

利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 同源建模服务器,以水稻 CHS (*Oryza sativa* CHS, PDB ID: 4YJY) 蛋白质三维结构作为模版,预测 MpCHS 蛋白的空间结构如图 3 所示; 序列同源性为 85.82%, 覆盖度为 99%。

2.4 MpCHS 的氨基酸序列多重对比及进化树构建

选取可可 *Theobroma cacao* L. (EOY02978.1)、

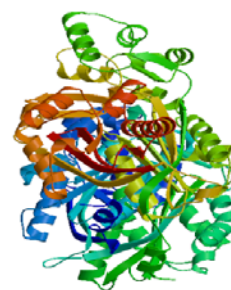
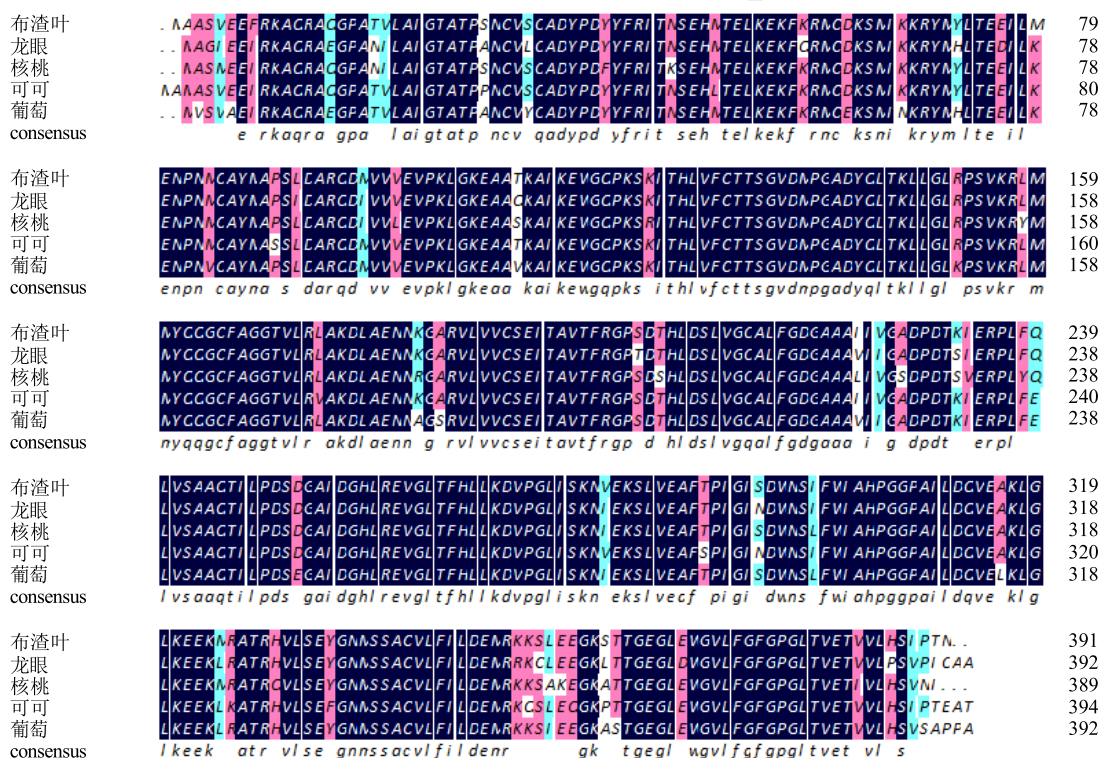


图 3 MpCHS 蛋白三维结构预测

Fig. 3 Prediction of 3D structure of MpCHS protein

葡萄 *Vitis vinifera* L.(BAA31259.1)、核桃 *Juglans regia* L. (XP_018822043.1) 和龙眼 *Dimocarpus longan* Lour (AEO36981.1) 等 CHS 蛋白与 MpCHS 进行多序列对比,结果如图 4 所示。将 MpCHS 蛋白 NCBI 中进行 Blastp 分析,发现 MpCHS 与可可 (EOY02978.1) 的相似性最高,达到了 96%; 与红果檉木 *Dysoxylum binectariferum* (Roxb.) Hook. f. ex Bedd. (AMR58953.1)、银白杨 (*Populus alba* L., ABD24222.1)、胡杨 *Populus euphratica* Oliv Voy Emp Othoman (XP_011006130.1) 的同源蛋白相似性也



黑色表示氨基酸序列同源性为 100%, 粉红色表示 $\geq 75\%$, 蓝色代表 $\geq 50\%$

Black, pink and blue show 100%, $\geq 75\%$ and $\geq 50\%$ identity on amino sequences, respectively

图 4 MpCHS 和其他物种 CHS 氨基酸序列的同源性比较

Fig. 4 Homology comparison of amino acid sequence between MpCHS and other CHS protein

达到了 93%~95%。图 5 为 MpCHS 与其他植物 CHS 蛋白采用 MEGA 6.0 软件的 Neighbour-joining 法构建系统进化树。

2.5 MpCHS 基因原核表达载体的构建

用限制性内切酶 XhoI 与 BglII 分别对 MpCHS 基因的 PCR 纯化产物和 pET-30a (+) 质粒进行双酶切, T4 DNA 连接酶连接后转化 *E. coli* BL21

(DE3) 感受态细胞, Kan 抗性筛选后挑取阳性单克隆, 进行 PCR 菌检和双切酶鉴定, 结果显示有 1 000 bp 左右的目的条带 (图 6)。将酶切正确的单克隆送 BGI 测序, 测序结果与 Unigene 序列一致; 可以得知已成功构建 pET-30a(+)-MpCHS 重组体; 对于其诱导表达条件的优化以及 MpCHS 酶活性分析正在展开。

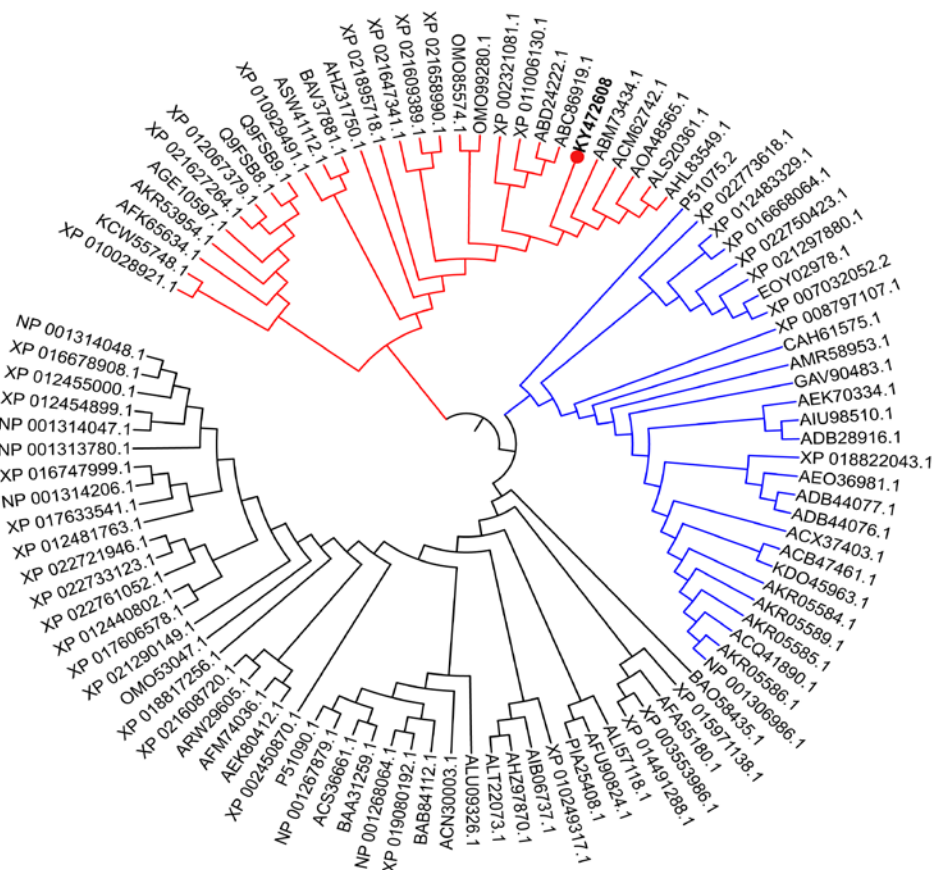
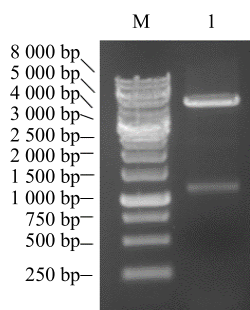


图 5 MpCHS 基因和其他物种 CHS 基因的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of MpCHS and CHS genes from other species



M-Marker 1-XhoI 和 BglII 双酶切产物
M-Marker 1-double digestion results by XhoI and BglII

图 6 原核表达载体 pET30a-MpCHS 的双酶切鉴定

Fig. 6 Identification of prokaryotic expression vector pET30a-MpCHS with double digestion

2.6 MpCHS 基因表达分析

MpCHS 基因在布渣叶不同组织部位和不同生长阶段 (花期 6~8 月, 果期 8~9 月) 叶片中的相对表达量的 RT-qPCR 分析结果如图 7 所示, 从图中可以看出, MpCHS 基因在布渣叶不同组织均有表达, 以叶中表达量稍高, 果实中较低; 其中叶在花期和果期时, MpCHS 基因表达水平呈递减趋势。

3 讨论

在不同的植物物种中, 有一些关于 CHS 基因的不同功能的研究。据报道^[15-16], 它们涉及植物防御病原体和形成花色素。此外, CHS 基因在适应非生物胁迫如伤害, 低温、盐分和氮缺乏等方面起着

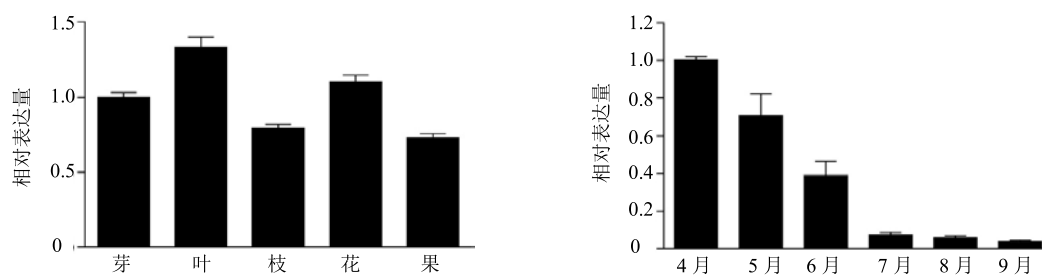


图 7 MpCHS 基因表达模式

Fig. 7 MpCHS gene expression pattern

重要作用。研究表明,植物暴露于低温时 CHS 的表达量明显提高^[17]。CHS 是植物类黄酮合成过程中第一个关键酶,其催化生成的查耳酮是类黄酮代谢途径的各种化合物的前体,其活性直接影响下游反应,最终对黄酮类物质的积累产生极大影响^[18]。此次实验从布渣叶中成功克隆出 MpCHS 基因的 cDNA 序列,长度为 1 382 bp,开放阅读框的大小为 1 176 bp,编码 391 个氨基酸;生物信息学分析结果显示,该基因具有典型的 CHS 蛋白保守结构域: N-末端结构域, C-末端结构域和 III 型聚酮合酶结构域,且 N-末端结构域含有 1 个活性位点 (active site),与硫解酶中的结构域相似。CHS 具有保守的半胱氨酸残基,位于蛋白质序列的中央部分,这对于 CHS 的催化活性是必需的,并且可能代表 4-香豆酰辅酶 A 基团的结合位点。MpCHS 基因在关键氨基酸序列保持高度保守性的同时显示了 MpCHS 蛋白与其他植物的查耳酮合酶序列也存在变异。同时,本实验利用 pET-30a 原核表达载体和 *E. coli* BL21 (DE3) 成功构建了 pET-30a(+)-MpCHS 重组体,为进一步的原核表达分析,诱导表达 MpCHS 蛋白,研究 MpCHS 酶学性质及体外酶活实验奠定了基础。

有研究报道,CHS 过表达可增加下游黄酮类化合物的产生和类黄酮生物合成途径中相关基因的表达。对布渣叶 MpCHS 基因表达模式分析发现, MpCHS 基因在布渣叶不同组织中均有表达,以叶和花中表达量较高,这为药典规定的布渣叶的干燥叶作为入药部位提供了新的依据,同时也间接说明了叶中的黄酮类有效成分较其他部位高;而对于不同生长阶段叶片, MpCHS 基因的表达量以生长期最高,而在花期 (6~8 月) 和果期 (8~9 月) MpCHS 基因表达水平随着生长进程而逐步降低,与水飞蓟中 CHS 在开花初期表达量最高的报道一

致^[19]。布渣叶全年可采收,药典记载布渣叶的采收季节为夏、秋二季,这可能与叶中有效成分含量的积累有关。CHS 基因是植物类黄酮合成代谢途径关键基因之一,本研究对布渣叶黄酮类成分生物合成关键酶 MpCHS 基因克隆和表达量分析,为今后布渣叶次生代谢物合成过程中关键酶表达分析及调控机制的研究提供了参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 陈艳芬, 杨超燕, 李坤平, 等. 布渣叶总黄酮对大鼠急性心肌缺血的保护作用及其机制 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1003-1007.
- [3] 李坤平, 陈艳芬, 岳春华, 等. 布渣叶保护急性心肌缺血损伤有效部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3373-3376.
- [4] 刘昌乐, 林 爽, 何卓儒, 等. 一测多评法测定布渣叶总黄酮部位中 8 种黄酮苷成分 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1872-1877.
- [5] Kreuzaler F, Ragg H, Fautz E, *et al.* UV-Induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1983, 80(9): 2591.
- [6] Abe I, Morita H. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases [J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 41(37): 809-838.
- [7] 李果明, 雷 桅, 税晓容. 黄芩 CHS 基因的分子克隆、序列分析及其高效表达载体的构建 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(10): 2814-2818.
- [8] 吴 琦, 李成磊, 陈 惠, 等. 苦荞查耳酮合酶基因 CHS 的结构及花期不同组织表达量分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26 (12): 1151-1160.
- [9] 杨 丽, 刘雅莉, 王跃进, 等. 百合查耳酮合酶 (CHS) 基因的克隆与分析 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(5): 933-936.
- [10] Jiang C G, Schommer C K, Sun Y K, *et al.* Cloning and characterization of chalcone synthase from the moss,

- Physcomitrella patens* [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(23): 2531-2540.
- [11] 刘 珊, 孙 蓉, 唐自钟, 等. 金龙胆草查尔酮合酶基因 (CHS) 的克隆及其在花期不同组织的表达量分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(6): 703-711.
- [12] Hoda A S E, Salah K, Mahmoud M A M, *et al.* Silybin content and overexpression of chalcone synthase genes in *Silybum marianum* L. plants under abiotic elicitation [J]. *Plant Phys Biochem*, 2016, 108(2): 191-202.
- [13] Feng Q, Gui G G, Yang Z, *et al.* Molecular cloning and expression profiling of a chalcone synthase gene from *Lamiophlomis rotata* [J]. *Genet*, 2015, 94(2), 193-205.
- [14] 李坤平, 林 爽, 张初梅, 等. 布渣叶黄烷酮-2-羟化酶基因 cDNA 克隆及其生物信息学和表达分析 [J]. *中草药*, 2018, 49(1): 188-193.
- [15] 赵风治, 马钰婕, 韦 韬, 等. 花椰菜查尔酮合酶基因的克隆及功能分析 [J]. *南开大学学报: 自然科学版*, 2016, 49(4): 61-66.
- [16] Zhou B, Wang Y, Zhan Y, *et al.* Chalcone synthase family genes have redundant roles in anthocyanin biosynthesis and in response to blue/UV-A light in turnip (*Brassica rapa*; Brassicaceae) [J]. *Amer J Bot*, 2013, 100(12): 2458-2467.
- [17] 马立功, 张匀华, 孟庆林, 等. 向日葵查尔酮合酶 HaCHS 基因的克隆与逆境应答 [J]. *中国油料作物学报*, 2016, 38(1): 19-26.
- [18] Stefan M, Axel M. Flavones and flavone synthases [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(20): 2399-2407.
- [19] Sepideh S, Zahra S S, Mohsen E, *et al.* Chalcone synthase genes from milk thistle (*Silybum marianum*): isolation and expression analysis [J]. *J Genet*, 2015, 94(4): 611-617.