

• 药材与资源 •

灰毡毛忍冬 *CHS1* 基因克隆及功能分析

敖志杰¹, 张惊宇¹, 曾娟¹, 何佳蔚¹, 瞿美玲^{1,2}, 童巧珍^{1,2,3}, 周日宝^{1,2,3,4*}, 刘湘丹^{1,2,3,4*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
2. 湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点实验室, 湖南 长沙 410208
3. 湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室, 湖南 长沙 410208
4. 湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208

摘要: **目的** 探究灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* 中查耳酮合酶 *LmCHS1* 基因对黄酮类成分合成的作用。 **方法** 以灰毡毛忍冬叶的 cDNA 为模板, 利用 RT-PCR 技术克隆得到了 *LmCHS1* 基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列, 并对其基因序列进行生物信息学分析。通过农杆菌侵染的方式, 构建本氏烟草瞬时转化体系, 对 *LmCHS1* 编码蛋白进行亚细胞定位; 紫外分光光度法检测烟草叶片及灰毡毛忍冬样品中总黄酮含量; 构建原核表达载体, 诱导大肠杆菌得到重组蛋白; 利用 qRT-PCR 检测 *LmCHS1* 基因在灰毡毛忍冬花、茎和叶中的表达情况。 **结果** 克隆得到的基因长度为 1 182 bp, 共编码 393 个氨基酸, 分子式为 C₁₉₁₄H₃₀₇₀N₅₁₄O₅₆₃S₁₇, 理论等电点为 6.34, 属于亲水蛋白。亚细胞定位结果表明 *LmCHS1* 蛋白主要定位在细胞质, 与大部分物种中具催化黄酮前体合成功能的 CHS 蛋白的亚细胞定位一致。原核表达得到的重组蛋白, 大小为 43 000。总黄酮的含量测定结果显示过表达 *LmCHS1* 烟草叶片总黄酮含量高于空载组, 并具统计学差异。联合表达量和总黄酮含量结果分析发现, *LmCHS1* 表达量与总黄酮含量呈正相关。 **结论** *LmCHS1* 蛋白定位在细胞质中, 正向调控黄酮类物质的合成。

关键词: 灰毡毛忍冬; 查耳酮合酶; 原核表达; 总黄酮; 功能分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)17-6334-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.17.021

Cloning and functional analysis of *CHS1* gene from *Lonicera macranthoides*

AO Zhijie¹, ZHANG Jingyu¹, ZENG Juan¹, HE Jiawei¹, QU Meiling^{1,2}, TONG Qiaozhen^{1,2,3}, ZHOU Ribao^{1,2,3,4}, LIU Xiangdan^{1,2,3,4}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Key Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Hunan Large-scale Genuine Medicinal Materials, Changsha 410208, China
3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization Research in General Colleges and Universities of Hunan Province, Changsha 410208, China
4. Hunan Traditional Chinese Medicine Piece Standardization and Function Technology Research Center, Changsha, 410208, China

Abstract: Objective To investigate the function of chalcone synthase of *Lonicera macranthoides* (*LmCHS1*) gene in the flavonoid biosynthesis. **Methods** The open reading frame (ORF) sequence of *LmCHS1* was cloned from leaf cDNA using RT-PCR technology, followed by comprehensive bioinformatic analysis. The subcellular localization of the encoded protein was determined by constructing a transient transformation system in *Nicotiana benthamiana* via *Agrobacterium* infection. Total flavonoid content was quantified by ultraviolet spectrophotometry in both tobacco leaves and *L. macranthoides* samples. Prokaryotic expression vectors were constructed to obtain recombinant proteins through *Escherichia coli* induction. qRT-PCR was employed to detect the expression levels of *LmCHS1* gene in flowers, stems, and leaves of *L. macranthoides*. **Results** The cloned gene was 1 182 bp in length, encoding 393 amino acids,

收稿日期: 2025-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82373992); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-21); 湖南省中药材产业技术体系专项 (HARS-11); 2020 年湖南省一流专业建设点: 中药资源与开发; 湖南中医药大学重点学科中药学科 (校行发规字[2023]2 号)

作者简介: 敖志杰, 硕士研究生, 从事中药资源与质量研究。Tel: 13873572934 E-mail: PolygalaeAoZj@163.com

*通信作者: 刘湘丹, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源与质量研究。Tel: (0731)88458233 E-mail: paeonia@hnucm.edu.cn
周日宝, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源与质量研究。Tel: (0731)88458233 E-mail: 1057323510@126.com

with a molecular formula of $C_{1914}H_{3070}N_{514}O_{563}S_{17}$ and a theoretical isoelectric point of 6.34, which belongs to a hydrophilic protein.. Subcellular localization demonstrated cytoplasmic localization of LmCHS1 protein, consistent with that of most CHS proteins which catalyze the synthesis of flavonoid precursors in other species.. The recombinant protein obtained from prokaryotic expression was 43 000 in size. Flavonoid quantification showed significantly higher content in tobacco leaves overexpressing *LmCHS1* compared to empty vector controls, with statistical significance. The integrated analysis of qRT-PCR data and total flavonoid content measurements revealed a positive correlation between the expression level of *LmCHS1* and the total flavonoid content. **Conclusion** LmCHS1 protein is localized in the cytoplasm and positively regulates flavonoid biosynthesis.

Key words: *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.; chalcone synthase; prokaryotic expression; total flavonoid; functional analysis

忍冬科忍冬属植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. 是山银花的主要基原, 在湖南等地有着广泛的栽培面积。其干燥的花蕾及初开的花作为入药部位。山银花具有清热解毒、疏散风热之功效^[1], 使用历史悠久^[2]。现代药理学研究表明其具有抗炎^[3-4]、抑菌^[5-6]、抗氧化^[7-8]、保肝^[9-10]等功效, 其中黄酮类成分为发挥以上功效的主要物质基础^[11-12]。目前国内外对灰毡毛忍冬黄酮类成分的研究大多聚焦于分离提取以及药理活性方面, 少有对灰毡毛忍冬中黄酮类成分合成机制的关键基因及其合成途径的研究。

黄酮类成分的生物合成途径起始于苯丙氨酸, 属于苯丙烷类代谢途径的一个分支, 苯丙氨酸经过苯丙氨酸裂解酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 的催化下生成肉桂酸 (cinnamic acid), 在肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamate 4-hydroxylase, C4H) 的催化下生成对香豆酸, 再经 4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (4-coumaroyl-CoA ligase, 4CL) 催化生成对香豆酰辅酶 A (p-coumaroyl-CoA), 查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 再催化 1 分子对香豆酰辅酶 A 和 3 分子的丙二酰辅酶 A 生成柚皮素查耳酮 (naringenin chalcone), 再由查耳酮异构酶等酶的催化作用下生成各式各样的黄酮类成分^[13], 其中 CHS 在黄酮类成分合成途径中起关键作用^[14]。

大量研究工作者开展了药用植物 CHS 基因的克隆与功能研究, 如管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight^[15]、黄芪 *Astragalus membranaceus*

(Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao^[16]、多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua^[13]、红花 *Carthamus tinctorius* L.^[17]等。开展灰毡毛忍冬中黄酮类成分积累相关基因的功能研究, 可为阐明灰毡毛忍冬中黄酮类成分的合成机制、解释不同器官中黄酮类成分的含量差异提供研究依据。Tang 等^[18]研究表明灰毡毛忍冬中 MYB15 转录因子可结合并激活 4CL 的启动子, 以促进苯丙烷类代谢; 项目组^[19]通过分析灰毡毛忍冬花、茎及叶转录组及代谢组数据, 发现灰毡毛忍冬 *CHS1* 基因在叶中具有特异性高表达的特点, 进一步通过关联分析发现 *CHS1* 基因与黄酮类成分的积累密切相关; 曾娟等^[20]通过荧光定量 PCR 以及高效液相色谱法分析, 发现灰毡毛忍冬不同花期花、茎及叶中 *CHS*、*CHI* 基因的表达与木犀草苷含量存在相关性。目前尚未有灰毡毛忍冬查耳酮合酶具体的功能的研究报道。基于此, 本研究克隆灰毡毛忍冬 *CHS1* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 区, 对其进行生信分析、亚细胞定位、异源过表达、荧光定量分析以及重组蛋白表达等实验, 以解析灰毡毛忍冬 *CHS1* 基因的功能。

1 材料

1.1 植物

带花、叶的茎枝样本采自湖南隆回, 经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* Hand. -Mazz.。根据项目组前期的分类标准^[21], 将灰毡毛忍冬花蕾分为 7 个花期, 见图 1; 用自封袋分装不同花期花及茎、叶, 液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱保存, 用于后续实验。



图 1 灰毡毛忍冬不同花期花、茎及叶样品

Fig. 1 Samples of flowers, stems and leaves of *Lonicera Macranthoides* at different flowering stages

1.2 主要试剂与仪器

Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（货号 BSC65S1），购自杭州博日科技股份有限公司；TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix（货号 AT311），购自北京全式金生物科技有限公司；2×Taq Master Mix（Dye）（货号 CW0682），购自康为世纪科技有限公司；芦丁对照品（货号 JOT-10229），购自成都普菲德对照品科技有限公司，pCAMBIA1300 及 pet-28a 载体由本实验室保存。

JY-96G 型 PCR 扩增仪（北京君意东方电泳设备有限公司），CFX96 型实时荧光 PCR 扩增仪（美国伯乐公司），激光共聚焦显微镜（德国蔡司公司），T2602 型双光束紫外可见分光光度计（上海佑科仪器仪表有限公司）。

2 方法

2.1 RNA 提取与 cDNA 合成

分别取灰毡毛忍冬的花、茎及叶适量，于研钵中加入液氮研磨，使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（Biospin）提取总 RNA^[22]，使用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 逆转录得到灰毡毛忍冬花、茎、叶 cDNA，

具体操作见使用说明书，得到的 cDNA 保存于 -20 ℃ 冰箱中。

2.2 基因克隆与序列分析

根据项目组前期的转录组测序结果，选择注释为 CHS1 的 Unigene 片段（TRINITY_DN46824_c0_g1），设计特异引物 CHS1-F 及 CHS1-R，见表 1。以“2.1”项下的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，总反应体系为 25 μL：2×Taq MasterMix(Dye) 12.5 μL，ddH₂O 9.5 μL，CHS1-F 1 μL，CHS1-R 1 μL，cDNA 1 μL。PCR 反应程序：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 变性 30 s，58 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 1 min 30 s，循环 40 次；最后 72 ℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测，使用试剂盒回收目的条带。产物连接至 pEASY®-T1 克隆载体，热激转化至大肠杆菌 Trelief™5α 感受态细胞中，转入目的片段的大肠杆菌涂布于含有涂布于含有 Amp、IPTG、X-gal 的平板培养基上，37 ℃ 倒置培养 12 h。挑选单独白色菌落进行 PCR 检测，将阳性菌液过夜培养后送至生工生物工程（上海）股份有限公司测序。测序结果用 DNAMAN 软件与 CHS1 的 CDS 序列进行序列比对。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

引物名称	引物序列 (5'-3')	用途
CHS1-F	ATGGGGAGCGTTACTGTAGAGGAAATCA	ORF 区克隆
CHS1-R	TTATATGGAAGCAGGGACACTGTGAAGC	
1300-CHS1-F	CGGGGCGGTACCCGGGATCCAATGGGGAGCGTTACTGTAGAGGAAATCA	亚细胞定位
1300-CHS1-R	CGCCGGGCCCTCTAGAGGATCCTTATATGGAAGCAGGGACACTGTGAAGC	
pet-28a-CHS1-F	AGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGGGAGCGTTACTGTAGAGGAAATCA	重组蛋白制备
pet-28a-CHS1-R	CGGAGCTCGAATTCGGATCCTTATATGGAAGCAGGGACACTGTGAAGC	
Q-CHS1-S	GACATGGTGGTGGTTGAAGTA	实时荧光定量 PCR
Q-CHS1-A	GAGGTGGGTGATCTTGGATTT	
18S-S	CTTCGGGATCGGAGTAATGA	内参基因
18S-A	GCGGAGTCCTAGAAGCAACA	

2.3 LmCHS1 生物信息学分析

NCBI 在线查找灰毡毛忍冬 CHS1 基因全长 ORF 阅读框，通过在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测其蛋白理化性质，包括编码蛋白的相对分子质量、分子式、不稳定系数及等电点等；采用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 软件预测蛋白亲/疏水性；WOLF

PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测蛋白质亚细胞定位；SignalP 4.1 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 进行信号肽预测；TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 分析蛋白质跨膜结构；NCBI 网站 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 在线分析蛋白质结构域；

SWISS-MODEL 软件 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测其三级结构; 将氨基酸序列上传 NCBI 数据库中进行 Blast 比对, 筛选出同源性相对较高的物种, 导入 DNAMAN 软件进行氨基酸多重序列比对分析; 利用 MEGA X 以邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树。

2.4 重组质粒构建

根据 *LmCHS1* 基因的开放阅读窗序列以及 pCAMBIA1300-EGFP 载体及 pet-28a 载体序列, 选择 BamHI 为酶切位点, 分别设计同源臂引物 1300-CHS1-F、1300-CHS1-R、pet-28a-CHS1-F 及 pet-28a-CHS1-R, 见表 1。经 PCR 扩增得到 *LmCHS1* 基因带有 pCAMBIA1300-EGFP 载体、pet-28a 载体同源臂的基因序列, 经凝胶电泳后, 回收目的条带, 使用限制性核酸内切酶 BamHI 对 pCAMBIA1300-EGFP 载体及 pet-28a 载体分别进行酶切, 得到线性化载体, 根据 In-Fusion®HD Cloning Kit, 采用 10 μ L 的连接体系 (2 μ L, 5 $\times$ In-Fusion HD Enzyme Premix, 5 μ L 线性化载体, 2 μ L 目的片段胶回收产物, 1 μ L ddH₂O), 50 $^{\circ}$ C 反应 50 min 后置于冰上, 然后向离心管中加入 100 μ L 5 α 感受态细胞, 冰浴 30 min, 立即 42 $^{\circ}$ C 热激 30 s, 再冰上孵育 2 min, 向离心管中加入 500 μ L 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、500 r/min 摇菌 1 h 复苏菌体, 4 000 r/min 离心 1 min, 弃去部分上清, 剩余菌液吹打混匀后涂布于 LB 固体培养基 (100 mg/L Kan) 中, 37 $^{\circ}$ C 下倒置培养过夜, 挑选单独菌落进行 PCR 检测, 将阳性菌送检测序, 将测序结果正确的菌扩大培养后使用质粒提取试剂盒提取重组质粒 pCAMBIA1300-EGFP-*LmCHS1* 及 Pet-28a-*LmCHS1* 备用。

2.5 烟草瞬时转化体系构建

使用重组质粒 pCAMBIA1300-EGFP-*LmCHS1* 及其空载质粒转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 向感受态细胞中加入适量质粒, 移液枪轻轻吹打混匀, 依次冰水浴中静置 5 min, 液氮速冻 5 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴中静置 5 min, 冰水浴中静置 5 min, 随后向菌液中加入 800 μ L 无抗 YEB 培养基, 28 $^{\circ}$ C、500 r/min 振荡培养 3 h 复苏菌体, 6 000 r/min 离心 1 min, 弃去部分上清, 剩余菌液吹打混匀后涂布于带有卡那霉素及利福平抗性的 YEB 培养基 (50 mg/L 卡那霉素, 20 mg/L 利福平) 中, 28 $^{\circ}$ C 下倒置培养 48~60 h, 挑选单独菌落进行 PCR 检测, 对阳性农杆菌扩大培养, 5 000 r/min、

10 min 离心, 弃去培养基收集菌体, 加入侵染液 (1/2 MS+1%蔗糖+10 mmol/L 2-(*n*-吗啡啉)乙磺酸+0.015% Silwett77+0.05 mmol/L MgCl₂+200 μ mol/L 肌酐, pH 5.7~5.8) 重悬菌体, 至 A_{600} 值为 0.5~0.6, 使用无菌注射器向烟草叶背面注射农杆菌侵染液适量, 暗培养 48 h, 构建烟草瞬时转化体系。撕取烟草叶部分下表皮, 制作装片, 用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 进行细胞核染色, 使用激光共聚焦显微镜观察荧光情况探究相关基因的亚细胞定位; 另部分用于总黄酮含量测定的烟草叶片不需做特殊处理, 备用。

2.6 重组蛋白表达

使用重组质粒 pet-28a-*LmCHS1* 及其空载转化 BL21 感受态细胞, 具体转化方法同“2.4”项下转化, 结束后, 将菌液涂布于卡那霉素 (100 mg/L) 抗性的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 下倒置培养过夜, 挑选单独菌落进行 PCR 检测, 将阳性菌接种于 1 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、500 r/min 过夜培养, 次日取 500 μ L 加入 5 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、500 r/min 扩大培养至 600 nm 处吸光度 (A_{600}) 值为 0.5~0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 或不加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (对照), 37 $^{\circ}$ C、500 r/min 诱导培养 4 h, 或 16 $^{\circ}$ C、500 r/min 诱导培养 18 h。

取 1.5 mL 菌液, 12 000 r/min, 1 min 弃去培养基, 收集菌体。随后的操作均在冰上操作, 加入 400 μ L PBS, 加入溶菌酶至 1 mg/mL。使用超声破碎仪裂解细菌, 13 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 分离上清及沉淀, 沉淀中加入 400 μ L PBS 重悬, 沉淀及上清中加入 SDS-PAGE 上样缓冲液, 混匀, 100 $^{\circ}$ C 金属浴 6 min, 冷却后上样, 150 V, 1 h 凝胶电泳后, 使用考马斯亮蓝染色, 用清水洗去背景后, 拍摄凝胶图像。

2.7 总黄酮含量测定

称取 5.8 mg 芦丁, 加入 95%乙醇溶解, 并定容至 25 mL 量瓶中, 配制成 0.232 mg/mL 对照品溶液, 把对照品溶液稀释为 0、4.64、9.28、13.92、18.56、23.2、27.84 μ g/mL, 在 410 nm 处测定 A 值, 并绘制标准曲线。取“2.5”项下侵染过的烟草叶片 0.5 g, 平行 3 份, 未侵染的烟草叶片作为对照; 液氮中研磨后加入 60%乙醇 3 mL, 混匀, 静置 10 min 后超声 30 min (800 W、40 kHz), 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清至 5 mL 量瓶中, 加入 10% 氯化铝溶液 200 μ L 并用 60%乙醇定容, 室温放置 30 min

后检测。以芦丁为对照品,得到的标准曲线为 $Y=0.0253X+0.0007$ ($R^2=0.9993$), X 代表浓度, Y 代表吸光度 (A) 值。灰毡毛忍冬样品总黄酮的测定方法中,选用 25 mL 量瓶定容,加入 10%氯化铝溶液 1 mL,其余步骤与以上方法一致。

2.8 荧光定量

分析 *LmCHS1* 基因在灰毡毛忍冬不同花期花、茎、叶中的表达情况,根据 *LmCHS1* 基因的 ORF 区序列,利用 PrimerQuest Tool 在线软件 (<https://sg.idtdna.com/pages/tools/primerquest>) 设计荧光引物,以 18S RNA 为内参基因^[23],引物序列见表 1。确定荧光引物具有特异性后,在荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量分析,每个样品平行 3 份检测,qRT-PCR 反应体系为 20 μ L: 荧光染料 10 μ L, ddH₂O 8.2 μ L, 正向引物 0.4 μ L, 反向引物 0.4 μ L, cDNA 1 μ L。qRT-PCR 反应程序 50 $^{\circ}$ C、2 min, 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s。2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 *LmCHS1* 基因的克隆及生物信息学分析

3.1.1 *LmCHS1* 基因的克隆 以灰毡毛忍冬 cDNA 为模板,经 PCR 扩增后得到约为 1 200 bp 的单一一条带(图 2),与预测的大小一致,连接 T1 载体测序后,使用 DNAMAN 将测序结果与 Unigene 模板相匹配,得出产物大小为 1 182 bp,共编码 393 个氨基酸,将序列进行命名并上传至 NCBI 数据库,得到基因登入号为(PQ663718)。

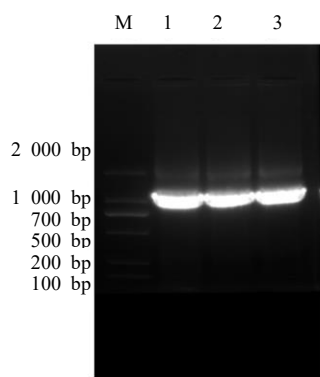
3.1.2 *LmCHS1* 基因序列分析 根据 ORF-Finder 分析,所克隆的基因片段为 1 个完整的 CDS 序列,中

间不含任何终止密码子,其长度为 1 182 bp。

3.1.3 *LmCHS1* 蛋白基本理化性质分析 使用 ExPASy ProtParam 分析发现,*LmCHS1* 编码蛋白相对分子质量为 42 835.56,分子式为 C₁₉₁₄H₃₀₇₀N₅₁₄O₅₆₃S₁₇,理论等电点为 6.34,不稳定系数为 38.18。ProtScale 在线预测 *LmCHS1* 蛋白亲/疏水性结果表明,亲水/疏水氨基酸的分布整体上亲水性大于疏水性,平均亲水性为-0.055,属于亲水蛋白。通过 WOLF PSORT 预测分析,*LmCHS1* 编码蛋白主要定位于细胞质中。由 SignalP 4.1 Server 分析可知,*LmCHS1* 基因的 ORF 区中不存在信号肽序列,为非分泌型蛋白。TMHMM 2.0 分析 *LmCHS1* 编码蛋白的跨膜结构结果表明,*LmCHS1* 编码的氨基酸全在膜外,不具备跨膜结构。

3.1.4 *LmCHS1* 蛋白结构域和二级、三级结构预测 使用 NCBI 网站 CD-Search 对结构域分析,见图 3-A,*LmCHS1* 属于 type III polyketide synthases 家族,具有 CHS-like 保守域(19~386)及 BH0617 保守域(18~387),BH0617 保守域被推测为是柚皮素查耳酮合酶的保守域,包含 3 个活性位点(169、308、341)满足 Cys-His-Asn 三元催化位点,属于“真 CHS”^[24],具有催化查耳酮合成的潜力。其编码的氨基酸序列具有查耳酮合酶高度保守的特征序列 RLMMYQQ-GCFAGGTVLR 和 GVLFGFGPGL^[25]。SOPMA 软件分析其二级结构,见图 3-B,结果表明其二级结构中 α 折叠(alpha helix)占 39.69%, β 折叠(beta helix)占 5.09%,延伸链(extent strand)占 14.25%,无规则卷曲(random coil)占 40.97%。Swiss model 预测得到 *LmCHS1* 蛋白的三级结构,见图 3-C,与水稻中的 III 型聚酮合酶的晶体结构有 84.32% 的相似性。

3.1.5 *LmCHS1* 蛋白同源性比对及系统进化树分析 将 *LmCHS1* 蛋白序列进行 NCBI-Blast 分析,结果显示,灰毡毛忍冬 CHS1 蛋白序列与忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、蓝果忍冬 *L. caerulea* L.、南鼠刺 *Escallonia herrerae* L.、莲 *Nelumbo nucifera* L. 及君迁子 *Diospyros lotus* L. 中 CHS 蛋白序列的同源性较高,均大于 95%,但与本物种另外一条 CHS (MZ004924) 氨基酸序列差异较大,在 DNAMAN 软件中输入上述物种 CHS 蛋白、*LmCHS* 及 *LmCHS1* 蛋白序列进行序列比对,总相似度达到 88.62%,见图 4。通过 MEGA X 软件,对蛋白序列

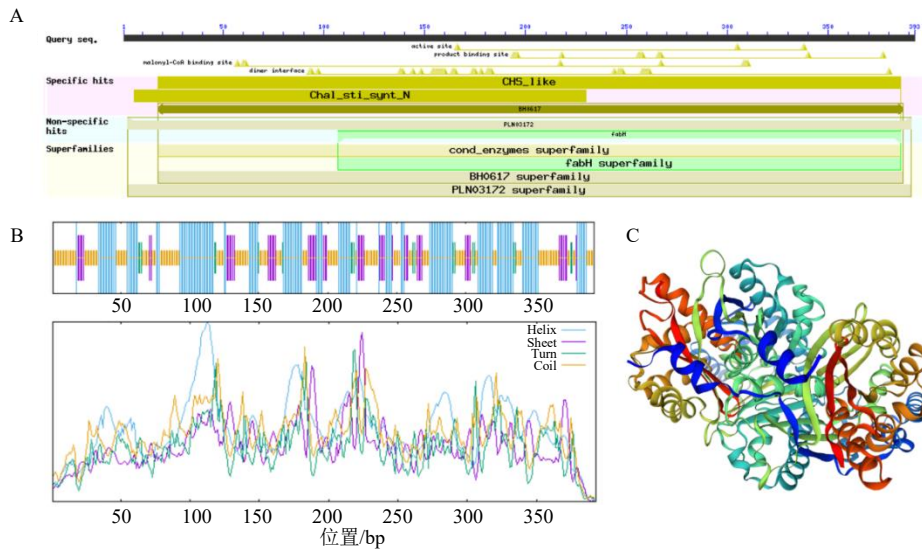


M-Marker; 1、2、3-*LmCHS1* 的 ORF 区片段。

M-Marker; 1, 2, 3-ORF frame of *LmCHS1*.

图 2 *LmCHS1* 基因 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *LmCHS1* gene



A-LmCHS1 蛋白结构域; B-LmCHS1 蛋白二级结构; C-LmCHS1 蛋白三级结构。

A- domain prediction of LmCHS1 protein; B-secondary structure of LmCHS1 protein; C- tertiary structure of LmCHS1 protein.

图 3 LmCHS1 蛋白结构域、蛋白二级结构及蛋白三级结构预测

Fig. 3 Domain prediction, secondary structure and tertiary structure of LmCHS protein

LmCHS1	MGSVTVEEIRKAQRAQGPATVLAIGTATPANCYQADYPDFYFRITKSEHKAELKEKFKRMC.....E	63
LmCHS	..MVTVEEIRKAQRAEGPATILAIGTATPTHYVDOSTYDPYFRITNSEHMLKEKFKRMC.....E	61
LiCHS	MGSVTVEEIRKAQRAQGPATVLAIGTATPANCYQADYPDFYFRITKSEHKAELKEKFKRMC.....E	63
LCCHS	..MVTVEEIRKAQRAQGPATVLAIGTATPANCYQADYPDFYFRITNSEHMLKEKFKRMC.....E	61
EhCHS	..MASVEEIRKAQRAQGPATVLAIGTATPNCIYQADYDPYFRITDSEHMLKEKFKRMCSSPPSSSSSSFTSLQHFSSE	83
NnCHS	..MVTVEEIRKAQRAQGPATVLAIGTATPANCYQADYDPYFRITNSEHMLKEKFKRMC.....E	61
DICHS	MAPKSVVEEIRKAQRAQGPATVLAIGTATPNCYQADYDPYFRITNSDHTELKEKFKRMC.....E	63
Consensus	vee r agra gpat aigtatp q ypd yfrit s h elkekfkrmc e	
LmCHS1	KSMIRKRYMHLNEEILKENEGICEYMAPSLDARQDMVVVEVFKLGKEAATKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSQVDMPGADYQLTK	148
LmCHS	KSMIRKRYMHLNEEILKENPSMCEYMAPSLDARQDIVVVEVFKLGKEAATKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSQVDMPGADYQLTK	146
LiCHS	KSMIRKRYMHLNEEILKENPSMCEYMAPSLDARQDMVVVEVFKLGKEAATKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSQVDMPGADYQLTK	148
LCCHS	KSMIRKRYMHLNEEILKECFDMCAYMAPSLDARQDIVVVEVFKLGKEAATKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSQVDMPGADYQLTK	146
EhCHS	KSMIRKRYMHLNEEILKENPNMCAYMAPSLDARQDMVVVEVFKLGKEAATKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSQVDMPGADYQLTK	168
NnCHS	KSMIRKRYMHLNEEILKENPNMCAYMAPSLDARQDMVVVEVFKLGKEAATKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSQVDMPGADYQLTK	146
DICHS	KSMIRKRYMHLNEEILKENPNMCAYMAPSLDARQDMVVVEVFKLGKEAATKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSQVDMPGADYQLTK	148
Consensus	ksmi krymh ee l e p c ymapsldarqd vvve pklgkeaa aikewgqpskithlvfcttsq dmpgad qltk	
LmCHS1	LLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNAGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSLVGQALFGDGAAAVIIGADPPTS	233
LmCHS	LLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNAGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSLVGQALFGDGAAAVIIGADPPTS	231
LiCHS	LLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNAGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSLVGQALFGDGAAAVIIGADPPTS	233
LCCHS	LLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNAGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSLVGQALFGDGAAAVIIGADPPTS	231
EhCHS	LLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNAGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSLVGQALFGDGAAAVIIGADPPTS	253
NnCHS	LLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNAGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSLVGQALFGDGAAAVIIGADPPTS	231
DICHS	LLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNAGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSLVGQALFGDGAAAVIIGADPPTS	233
Consensus	llgl psvkr mmyqqgcfaggtvlr lakdlaenn garvlvvcseitavtfrgpsdthldslvgqalfgdgaaa i g dp	
LmCHS1	VERPLFQVSAAQTILPDSGGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISKNIEKSLKEAFPIGTDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIK	318
LmCHS	VENPLFEVVSAAQTILPDSGGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISKNIEKSLVEAFKFLGSDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIK	316
LiCHS	VERPLFELVSAAQTILPDSGGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISKNIEKSLKEAFPIGTDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIK	318
LCCHS	VERPLFELVSAAQTILPDSGGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISKNIEKSLKEAFPIGTDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIK	316
EhCHS	IERPLFQVSAAQTILPDSGGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISKNIEKSLVEAFPIGSDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIK	338
NnCHS	IERPLFQVSAAQTILPDSGGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISKNIEKSLVEAFPIGSDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIK	316
DICHS	TERPLFELVSAAQTILPDSGGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISKNIEKSLVEAFPIGSDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIK	318
Consensus	e pif vsaaqtildps gaidgh revglthllkdvpggliskni ksl eaf p g dwns fwiahpggpaildqe k	
LmCHS1	LGLKEEKLRLPTRLHVLSEYGNMSSACVLFILDELRRKKSIEEGKATTGDLGWLGVLFPGPGPLTVETVVLHSPAST..	393
LmCHS	LALMPKLEATRLHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRKKSITNGFKTTGDLGWLGVLFPGPGPLTVETVVLHSPAST..	389
LiCHS	LGLKEEKLRLPTRLHVLSEYGNMSSACVLFILDELRRKKSIEEGKATTGDLGWLGVLFPGPGPLTVETVVLHSPAST..	393
LCCHS	LGLKEEKLRLPTRLHVLSEYGNMSSACVLFILDELRRKKSIEEGKATTGDLGWLGVLFPGPGPLTVETVVLHSPAST..	391
EhCHS	LGLKEEKLRLPTRLHVLSEYGNMSSACVLFILDELRRKKSIEEGKATTGDLGWLGVLFPGPGPLTVETVVLHSPAST..	415
NnCHS	LGLKEEKLRLPTRLHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRKKSIEEGKATTGDLGWLGVLFPGPGPLTVETVVLHSPAST..	393
DICHS	LGLKEEKLRLPTRLHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRKKSIEEGKATTGDLGWLGVLFPGPGPLTVETVVLHSPAST..	393
Consensus	l lk kl tr lseygnmssacvlfil derkks g ttg glewglvlfpgpgpltvetvvlhs	

图 4 LmCHS1 蛋白与多种植物 CHS 蛋白序列比较

Fig. 4 Sequence comparison of LmCHS protein with CHS proteins from various plants

相似度最高的前 16 个蛋白与 LmCHS1 使用 NJ 法构建进化树, 见图 5, 系统进化树聚为 5 个小类,

其中灰毡毛忍冬与忍冬以及蓝果忍冬的同源聚为一小类, 与南鼠刺属植物 (*Escallonia rubra*, *Escallonia*

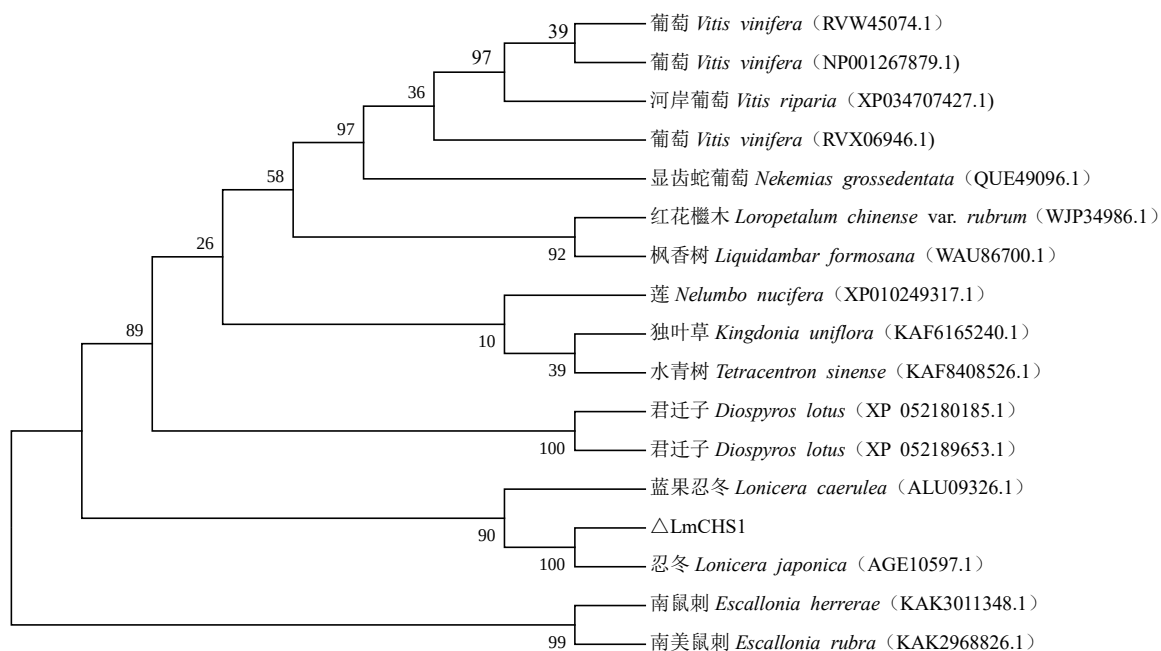


图 5 LmCHS1 蛋白与多种植物 CHS 蛋白系统进化树

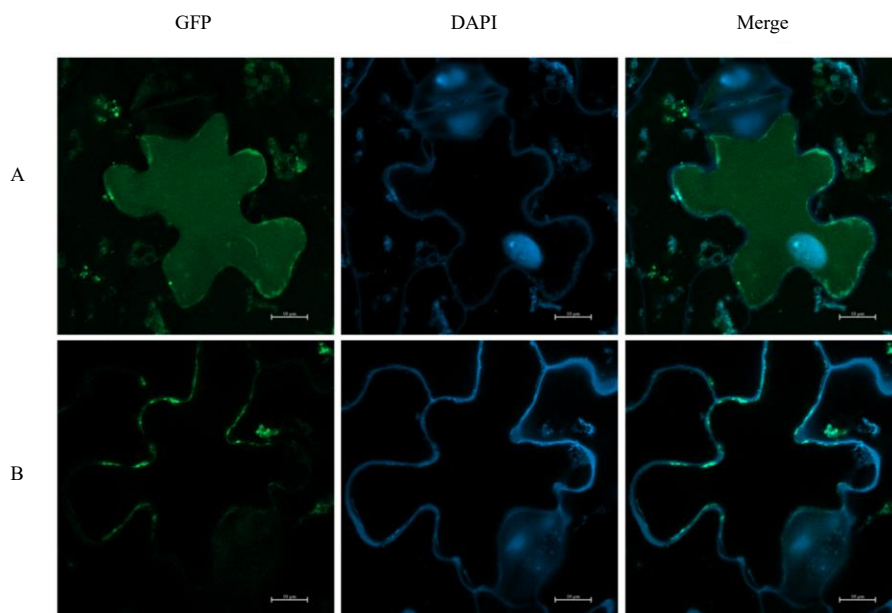
Fig. 5 Phylogenetic tree of LmCHS1 protein and CHS proteins from various plants

herreriae) 亲缘性较高; 与葡萄 *Vitis vinifera* L. 及其同属植物相隔最远, 亲缘性较低。

3.2 亚细胞定位分析

为了预测 LmCHS1 蛋白在灰毡毛忍冬中的亚

细胞定位情况, 利用烟草瞬时转化体系, 使用激光共聚焦显微镜对烟草叶片进行荧光成像, 见图 6。结果表明 LmCHS1 蛋白主要定位在细胞质, 与预测的结果一致。



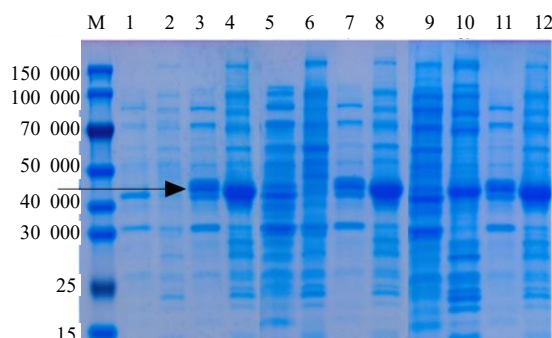
A-pCambia1300-EGFP 空载; B-pCambia1300-EGFP-LmCHS1 重组载体。
A-pCambia1300-EGFP empty vector; B-pCambia1300-EGFP-LmCHS1 recombinant vector.

图 6 LmCHS1 蛋白的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of LmCHS1 protein

3.3 LmCHS1 重组蛋白表达

将 IPTG 诱导的细胞裂解液上清及其沉淀，及其对照（未加 IPTG），进行 SDS-PAGE 蛋白电泳，目的蛋白大小 43 000，见图 7，与预期相符。空载的上清和沉淀中未发现目的蛋白条带，未加 IPTG 诱导上清和沉淀中有少量的目的蛋白表达，0.5 mmol/L IPTG 诱导的上清和沉淀中均表达了目的蛋白，此外发现 37 °C 下诱导的上清和沉淀中表达的目的蛋白比 16 °C 诱导效果较好。



M-Marker; 1、2-0.5 mmol/L IPTG、37 °C 下诱导 4 h 空载菌上清及沉淀；3、4-0.5 mmol/L IPTG、37 °C 下诱导 4 h 重组菌上清及沉淀；5、6-0.5 mmol/L IPTG、37 °C 下诱导 4 h 重组菌的上清及沉淀；7、8-0.5 mmol/L IPTG、37 °C 下诱导 4 h 重组菌的上清及沉淀；9、10-0.5 mmol/L IPTG、16 °C 下诱导 18 h 重组菌的上清及沉淀；11、12-0.5 mmol/L IPTG、37 °C 下诱导 4 h 重组菌的上清及沉淀。

M-Marker; 1,2-4 h induced supernatant and precipitate of empty vector under 0.5 mmol/L IPTG and 37 °C; 3,4-4 h induced supernatant and precipitate of recombinant vector under 0.5 mmol/L IPTG and 37 °C; 5,6-4 h induced supernatant and precipitate of recombinant vector under 0 mmol/L IPTG and 37 °C; 7, 8-4 h induced supernatant and precipitate of recombinant vector under 0.5 mmol/L IPTG and 37 °C; 9,10-18h induced supernatant and precipitate of recombinant vector under 0.5 mmol/L IPTG and 16 °C ; 11,12-4h induced supernatant and precipitate of recombinant vector under 0.5 mmol/L IPTG and 37 °C.

图 7 不同诱导条件下的蛋白表达情况

Fig. 7 Protein expression in different induction conditions

3.4 烟草瞬时表达叶片中总黄酮含量的测定

烟草叶片中的总黄酮含量见图 8，可以发现与对照组相比，增加 *LmCHS1* 基因的外源表达可以提高烟草叶片中的总黄酮含量。

3.5 灰毡毛忍冬中不同花期花、茎及叶的 *LmCHS1* 基因表达及总黄酮含量情况

qRT-PCR 的结果可以看出 *LmCHS1* 基因的表达量在枯萎期中表达最低，故将其表达量归为 1，得到 *LmCHS1* 基因在其他部位的相对表达量，见图 9-A。结果发现 *LmCHS1* 基因在青绿色花蕾中表达

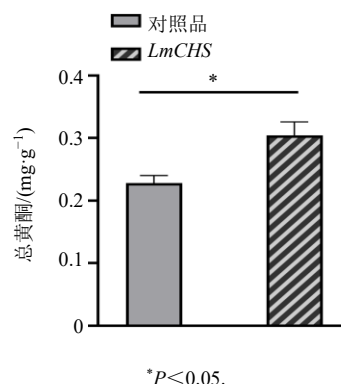


图 8 烟草叶片总黄酮含量 ($n=3$)

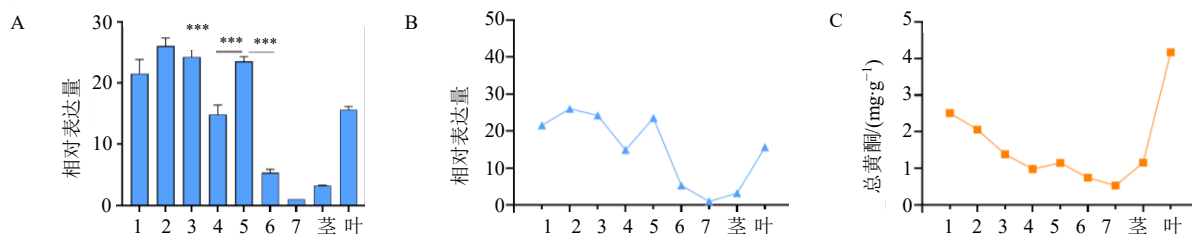
Fig. 8 Total flavonoid content in leaves of *Nicotiana benthamiana* ($n=3$)

量最高，随着花的发育，绿白色花蕾、白色花蕾中的表达量逐渐降低，但是在白色开花期有显著的回升，然而在黄色开花期和枯萎期中的表达量又显著下降，直至最低。*LmCHS1* 基因在叶中的表达量较茎中高。将灰毡毛忍冬不同花期花、茎及叶的 *LmCHS1* 基因相对表达量与总黄酮含量的变化趋势进行比较，分别见图 9-B、C，发现变化趋势有较大的相似性。

4 讨论

4.1 LmCHS 生物信息学分析

LmCHS1 蛋白二级结构分析发现，其无规则卷曲占比大达 40.97%，这往往能构成酶活性部位或者具有蛋白其他特殊功能的部位。蛋白预测的不稳定系数为 38.18，推测为稳定蛋白，PI 值为 6.34，并且其平均亲水指数小于 0，属于亲水性蛋白，表明其具备体外酶活性试验的先决条件。蛋白序列同源性比对发现，*LmCHS1* 编码蛋白的同源性除了与同属于忍冬科的植物很高以外，也表现出与其他较远科属有很高的匹配程度，如莲科莲属、柿科柿属、南鼠刺科南鼠刺属等，这一点也说明了查耳酮合酶基因在序列上的高度保守性，不过与同一物种中另外一条 *CHS* 基因存在较大差异，也体现了同源基因的进化多样性。其中 *LmCHS1* 与忍冬的 *CHS* 蛋白序列相似度最高，仅在第 232 处氨基酸存在差异，*LmCHS* 为 T 苏氨酸，*LjCHS* 为 K 赖氨酸。Wu 等^[26]发现忍冬 *LjFNSII-1.1* 与 *LjFNSII-2.1* 仅在第 242 处有一个位点的氨基酸取代，即谷氨酸取代为赖氨酸；进一步通过酶活性检测，发现赖氨酸取代后酶催化活性显著增强。基于此，推断 *LjCHS* 可能因 232 处赖氨酸的取代，导致其催化活性强于 *LmCHS1*，其与忍冬花蕾中黄酮类物质积累高于灰毡毛忍冬



A-灰毡毛忍冬不同部位中 *LmCHS1* 基因的相对表达量, *** $P < 0.001$; B-灰毡毛忍冬不同部位中 *LmCHS1* 基因的变化趋势图; C-灰毡毛忍冬不同花期花、茎及叶的总黄酮含量。1~7-花蕾初期、青绿色花蕾、绿白色花蕾、白色花蕾、白色开花期、黄色开花期、枯萎期。

A-relevant expression of *LmCHS1* gene in different tissues of *L. macranthoides*, *** $P < 0.001$; B-variation trends of *LmCHS1* gene in different tissues of *L. macranthoides*; C-total flavonoid content of *LmCHS1* gene in different tissues of *L. macranthoides*. 1~7-early bud stage, green bud stage, greenish-white bud stage, white bloom stage, yellow bloom stage, senescence stage.

图 9 灰毡毛忍冬不同部位中 *CHS1* 基因表达及总黄酮含量情况 ($n = 3$)

Fig. 9 Expression of *CHS1* gene and total flavonoid content in different parts of *L. macranthoides* ($n = 3$)

花蕾的现象相一致^[27]。

4.2 亚细胞定位

植物 CHS 家族基因的亚细胞定位多样, 刘玥等^[28]发现大花君子兰 *Clivia miniata* (Lindl.) Verschaff. 中的 CHS 蛋白定位于细胞质及细胞核, 并且在体外验证了其催化活性; 邱海玲等^[15]通过实验证明管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* 中的 CHS 蛋白主要定位于细胞质, 并且具有查耳酮合酶的催化功能; 木薯 *Manihot esculenta* Crantz. CHS^[29]定位于细胞质中; 牡丹 *Paeonia delavayi* Franch. CHS^[30]定位于细胞质、细胞核中; 葡萄 CHS^[31]定位于细胞壁、细胞质、细胞核中。亚细胞定位结果表明 *LmCHS1* 编码蛋白定位在细胞质中, 靠近细胞膜边缘分布, 与预期定位于细胞质的结果相同。Liu 等^[32]发现前胡 *Peucedanum praeruptorum* Dunn. 中的 4CL1 定位在细胞质中, Nakanishi 等^[33]通过研究表明, 紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Siebold & Zucc. 中的 4CL3 和 4CL4 定位在细胞质中的过氧化物酶体中, 行使催化活性, Wu 等^[34]发现番薯 *Ipomoea batatas* (L.) Lam. 中的 CHI1 定位在细胞质中。由此可以发现 *LmCHS1* 编码蛋白与大部分催化黄酮合成的 CHS、4CL、CHI 蛋白定位一致。

4.3 蛋白功能研究

在烟草瞬时转化体系中, 项目组发现 *LmCHS1* 组的叶片总黄酮含量高于空载组, 过表达 *LmCHS1* 可以提高烟草叶片中总黄酮的含量, 说明查耳酮合酶作为黄酮类化合物合成途径的关键酶, 其表达量的增加会在一定程度上促进总黄酮的生成。

通过原核表达方式获取重组蛋白的方法已得

到广泛地应用, 目前报道了许多通过原核表达得到重组 CHS 蛋白, 并且在体外验证其酶活性的研究^[35-37]。几经尝试, 笔者并未在体外发现诱导的 *LmCHS1* 蛋白体外酶活性的阳性结果。为了蛋白正确地折叠, 得到水溶性蛋白, 研究者往往选择较低的 16 °C 对其进行诱导催化, 但在本研究中发现 37 °C 下诱导可获得大量的水溶性 *LmCHS1* 编码蛋白, 但可能由于诱导温度较高, 蛋白质合成速率过快, 从而导致蛋白空间折叠出现错误, 未能形成底物结合腔室, 导致酶与底物无法结合, 不能发生催化反应; 而 16 °C 诱导产生的水溶性蛋白含量较少, 难以纯化。在实践中, 研究者多采用不同浓度的磷酸钾溶液作为反应体系的缓冲溶液, 说明钾离子可能是 CHS 酶反应的辅助因子, 辅助递氢及电子转移。不同的酶有其专属的辅助因子以及最佳活性环境, 项目组后期会通过调整诱导温度及时间、缓冲溶液浓度、pH 以及反应温度等, 摸索 *LmCHS1* 编码蛋白的体外酶活验证的条件。

4.4 *LmCHS1* 表达量与总黄酮含量的相关性分析

荧光定量结果表明, *LmCHS1* 在前 3 个花期中的表达并无统计学意义上的差异, 在白色花蕾期中 *LmCHS1* 的表达量显著降低, 又在白色开花期中显著上升, 并且总黄酮的含量在白色花蕾期及白色开花期这 2 个花期中表现出相同趋势。随着花的进一步发育至凋谢, 黄色开花期及枯萎期中的 *LmCHS1* 的表达逐渐降低至最低, 花中总黄酮的含量也是如此, 总黄酮的含量变化与 *LmCHS1* 的表达量呈现出正相关性。

灰毡毛忍冬白色花蕾期与白色开花期的花冠

形态差异巨大,从闭合到开放。花器官发育属于植物生长发育的重要阶段,许多研究表明花冠展开受到复杂且精准的基因网络调控,其中 *MYB* 基因家族^[38-39]、*bHLH* 基因家族^[40-41]、*AP2-ERF* 基因家族^[42]对植物花发育的影响巨大,而被广泛研究。随着研究的深入,人们发现这些转录因子与许多次生代谢物积累,以及合成与代谢相关基因存在一定的联系。研究表明,MYB-bHLH-WDR 复合体对类黄酮合成途径起重要的调控作用^[43],Arlotta 等^[44]发现石榴 *Punica granatum* L. 中的 *MYB5* 及 *HLH* 与 *CHS* 的表达呈正相关,并且发现在烟草中共同表达 *MYB5* 及 *HLH*,对类黄酮物质合成中间体有显著的积累作用,推测其在类黄酮合成途径的上游对相关基因起转录激活作用;Jiang 等^[45]通过对草莓 *Fragaria* × *ananas* (Weston) Duchesne ex Rozier. 的转录及代谢组数据分析,发现 R2R3-FaMYB5 增强了参与类黄酮合成途径基因的表达以及代谢物的积累。Guan 等^[46]通过对忍冬的转录组及代谢组数据分析发现,白色开花期的花中 3 个 AP2-ERF 类基因的表达高于白色花蕾期,并且其表达与绿原酸及木犀草素的生物合成呈正相关;Wang 等^[47]通过对石蒜 *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. 的转录及代谢组数据分析中发现 *AP2-ERF* 基因在不同花发育阶段有明显的表达差异,并且 *AP2-ERF16* 基因在盛开期的花中表达显著上升,与花青素的表达呈正相关。综合来看,推测在灰毡毛忍冬花冠展开的过程中,白色开花期的花中的总黄酮含量以及 *LmCHS1* 基因的表达因为受到花发育相关转录因子直接或间接的影响,从而产生了总黄酮含量以及 *LmCHS1* 基因表达量突然回升的现象。

综上所述,本研究克隆了灰毡毛忍冬 *CHS1* 基因并对其进行了生物信息学分析,构建了 pCAMBIA1300-EGFP-LmCHS1 及 Pet-28a-LmCHS1 重组载体,利用大肠杆菌外源表达得到了 LmCHS1 编码蛋白,通过农杆菌侵染烟草的瞬时转化技术,对 LmCHS1 编码蛋白进行了亚细胞定位分析,表明 LmCHS1 编码蛋白定位于细胞质。对侵染烟草叶片总黄酮的含量测定,发现过表达 LmCHS1 可以提高烟草叶片总黄酮的含量,不同花期花中 LmCHS1 的荧光定量结果的趋势也与总黄酮的含量呈正相关性,以上结果表明 *LmCHS1* 基因能正向调控黄酮类成分的积累。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 32.
- [2] 刘艳萍,王云,贾哲,等. 基于颜色-特征成分关联分析及网络药理学的金银花质量标志物(Q-Marker)研究[J]. 中草药, 2024, 55(14): 4882-4896.
- [3] 白仲杰,任群利,俸婷婷,等. 基于炎症细胞模型的灰毡毛忍冬抗炎活性研究[J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(5): 35-39.
- [4] 王淑,张翠翠,郭凤丹,等. 基于 UPLC 多指标含量测定和指纹图谱的不同种质金银花药材质量评价研究[J]. 中草药, 2024, 55(3): 947-955.
- [5] 景炳年,魏磊,周雍,等. 山银花总三萜超声辅助提取工艺优化及其抗菌抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 174-181.
- [6] Shi Z L, Liu Z J, Liu C S, et al. Spectrum-effect relationships between chemical fingerprints and antibacterial effects of *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae* Flos base on UPLC and microcalorimetry [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 12.
- [7] 韩少凡,程满,王懿文,等. 灰毡毛忍冬乙醇提取物减缓 D-半乳糖致小鼠胚胎成纤维细胞氧化应激的效果[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2023, 49(1): 43-51.
- [8] Li Y K, Li W, Fu C M, et al. *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae* flos: A systematic review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology [J]. *Phytochem Rev*, 2020, 19(1): 1-61.
- [9] 汤瑾,刘文,苏松柏,等. 金银花、山银花不同提取物对小鼠化学性肝损伤的保护作用研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(16): 9-11.
- [10] 薛强,刘杨,李燕君,等. 灰毡毛忍冬对小鼠免疫调节及肝损伤保护作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(8): 601-606.
- [11] 李倩,陈燕,窦霞,等. 金银花、山银花、川银花化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(15): 67-72.
- [12] 张小娜,童杰,周衍晶,等. 忍冬属药材药效成分及药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1049-1054.
- [13] 潘萍萍,徐志浩,张怡雯,等. 多花黄精查耳酮合酶 PcCHS 的原核表达、亚细胞定位及表达分析[J]. 生物技术通报, 2024, 40(5): 280-289.
- [14] Lewis J A, Jacobo E P, Palmer N, et al. Structural and interactional analysis of the flavonoid pathway proteins: Chalcone synthase, chalcone isomerase and chalcone isomerase-like protein [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 5651.
- [15] 邱海玲,王方明,米芯雨,等. 管花肉苁蓉花中查耳酮

- 合酶的基因克隆、功能鉴定与表达分析 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7797-7805.
- [16] Yang M, Yin M Z, Chu S S, *et al.* Colour, chemical compounds, and antioxidant capacity of *Astragali Radix* based on untargeted metabolomics and targeted quantification [J]. *Phytochem Anal*, 2022, 33(4): 599-611.
- [17] Guo D D, Gao Y, Liu F, *et al.* Integrating molecular characterization and metabolites profile revealed CtCHI1's significant role in *Carthamus tinctorius* L. [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 376.
- [18] Tang N, Cao Z, Yang C, *et al.* A R2R3-MYB transcriptional activator LmMYB15 regulates chlorogenic acid biosynthesis and phenylpropanoid metabolism in *Lonicera macranthoides* [J]. *Plant Sci*, 2021, 308: 110924.
- [19] 张惊宇, 龙雨青, 曾娟, 等. 基于代谢组学及转录组学研究灰毡毛忍冬不同品种黄酮类成分差异积累的转录调控机制 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(10): 2666-2679.
- [20] 曾娟, 龙雨青, 李灿, 等. 灰毡毛忍冬 CHI 和 CHS 基因的克隆及功能研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2419-2429.
- [21] 刘畅宇, 陈勋, 陈娅, 等. 不同品种灰毡毛忍冬 ACS3 基因克隆、表达及生物信息学分析 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2154-2164.
- [22] 刘湘丹, 徐玉琴, 王珊, 等. 适用于基因全长克隆的灰毡毛忍冬不同器官总 RNA 提取方法筛选 [J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(12): 60-63.
- [23] Zeng J, Long Y Q, Zhu J Y, *et al.* Accumulation differences of high-value ingredients in different phenotype *Lonicera macranthoides*: Insights from integrative metabolome and transcriptome analyses [J]. *Front Plant Sci*, 2025, 16: 1533263.
- [24] Jez J M, Ferrer J L, Bowman M E, *et al.* Structure and mechanism of Chalcone synthase-like polyketide synthases [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, 27(6): 393-398.
- [25] 林玲, 方健超, 陈观水, 等. 辣木查耳酮合成酶(CHS)基因的克隆及其序列分析 [J]. 福建农业学报, 2021, 36(5): 549-555.
- [26] Wu J, Wang X C, Liu Y, *et al.* Flavone synthases from *Lonicera Japonica* and *L. macranthoides* reveal differential flavone accumulation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19245.
- [27] 王莹, 郝江波, 陈佳佳, 等. 基于主要化学成分差异的金银花与山银花种质资源系统评价研究 [J]. 中南药学, 2020, 18(5): 825-831.
- [28] 刘玥, 李月庆, 孟祥宇, 等. 大花君子兰查耳酮合酶基因 CmCHS 的克隆及其功能验证 [J]. 园艺学报, 2021, 48(10): 1847-1858.
- [29] 安飞飞, 齐剑雄, 陈松笔, 等. 木薯查耳酮合酶 MeCHS 基因家族特征与表达分析 [J]. 热带作物学报, 2023, 44(12): 2384-2391.
- [30] Zou H Z, Han L L, Yuan M, *et al.* Sequence analysis and functional verification of the effects of three key structural genes, *PdTHC2'GT*, *PdCHS* and *PdCHI*, on the isosalipurposide synthesis pathway in *Paeonia delavayi* var. *lutea* [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5696.
- [31] Wang H L, Wang W, Zhan J C, *et al.* The accumulation and localization of Chalcone synthase in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 106: 165-176.
- [32] Liu T T, Yao R L, Zhao Y C, *et al.* Cloning, functional characterization and site-directed mutagenesis of 4-coumarate: Coenzyme A ligase (4CL) involved in coumarin biosynthesis in *Peucedanum praeruptorum* dunn [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 4.
- [33] Nakanishi K, Li H, Ichino T, *et al.* Peroxisomal 4-coumaroyl-CoA ligases participate in shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Plant Physiol*, 2024, 195(4): 2843-2859.
- [34] Wu Y Q, Jin X J, Wang L J, *et al.* Bioinformatics and expression analysis of CHI gene family in sweet potato [J]. *Plants*, 2025, 14(5): 752.
- [35] Huang J, Zhao X, Zhang Y, *et al.* Chalcone-synthase-encoding *RdCHS1* is involved in flavonoid biosynthesis in *Rhododendron delavayi* [J]. *Molecules*, 2024, 29(8): 1822.
- [36] Yahyaa M, Ali S, Davidovich-Rikanati R, *et al.* Characterization of three chalcone synthase-like genes from apple (*Malus x domestica* Borkh.) [J]. *Phytochemistry*, 2017, 140: 125-133.
- [37] Ni R, Niu M, Fu J, *et al.* Molecular and structural characterization of a promiscuous chalcone synthase from the fern species *Stenoloma chusanum* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2022, 64(10): 1935-1951.
- [38] Bhatt P A, Gurav T P, Kondhare K R, *et al.* MYB proteins: Versatile regulators of plant development, stress responses, and secondary metabolite biosynthetic pathways [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 288: 138588.
- [39] Chen Q C, Zhang X D, Fang Y X, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the R2R3-MYB transcription factor family revealed their potential roles in the flowering process in Longan (*Dimocarpus longan*) [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 820439.
- [40] Aslam M, Jakada B H, Fakher B, *et al.* Genome-wide study of pineapple (*Ananas comosus* L.) bHLH transcription factors indicates that cryptochrome-interacting bHLH2

- (AcCIB2) participates in flowering time regulation and abiotic stress response [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 735.
- [41] Zeng M Y, Zhu P K, Tang Y, *et al.* Genome-wide identification and role of the *bHLH* gene family in *Dendrocalamus latiflorus* flowering regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(19): 10837.
- [42] 杜朝金, 张汉尧, 罗心平, 等. 基因调控植物花器官发育的研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2024, 25(2): 151-61.
- [43] Xu W J, Dubos C, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(3): 176-185.
- [44] Arlotta C, Puglia G D, Genovese C, *et al.* MYB5-like and bHLH influence flavonoid composition in pomegranate [J]. *Plant Sci*, 2020, 298: 110563.
- [45] Jiang L Y, Yue M L, Liu Y Q, *et al.* A novel R2R3-MYB transcription factor FaMYB5 positively regulates anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in cultivated strawberries (*Fragaria × Ananassa*) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21(6): 1140-1158.
- [46] Guan R W, Guo F D, Guo R Q, *et al.* Integrated metabolic profiling and transcriptome analysis of *Lonicera japonica* flowers for chlorogenic acid, luteolin and endogenous hormone syntheses [J]. *Gene*, 2023, 888: 147739.
- [47] Wang Z, Song G W, Zhang F J, *et al.* Functional characterization of *AP2/ERF* transcription factors during flower development and anthocyanin biosynthesis related candidate genes in *Lycoris* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14464.

[责任编辑 时圣明]