

当归查耳酮异构酶基因家族的鉴定和功能验证

李朝会^{1,2}, 李勒松^{1,2}, 张金金^{1,2}, 梁艳丽¹, 杨生超^{1,2}, 栗孟飞³, 赵 艳^{1,2*}

1. 云南农业大学 西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心/云南省药用植物生物学重点实验室/农学与生物科技学院, 云南 昆明 650201
2. 云南特色植物提取实验室, 云南 昆明 650106
3. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070

摘要: **目的** 鉴定当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 基因家族成员, 对其进行生物信息学分析、筛选候选基因并进行体外酶活实验, 为进一步研究当归查耳酮异构酶在黄酮类化合物生物合成中的作用机制提供理论依据。 **方法** 依据当归基因组数据, 鉴定 *AsCHI* 基因家族成员, 进行蛋白理化性质分析、二级结构预测、基因结构、启动子顺式作用元件以及系统进化分析, 通过大肠杆菌异源表达和体外酶活验证基因功能, 利用反转录实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 分析其表达特征。 **结果** 在当归基因组中共鉴定到 5 个 *AsCHIs*, 编码 219~321 个氨基酸, 相对分子质量在 24 000~36 000, 理论等电点为 4.75~9.11, 二级结构以无规则卷曲和 α -螺旋为主。启动子分析显示 *AsCHIs* 基因含有丰富的光响应元件、激素响应元件及非生物胁迫响应元件; 系统进化分析将 *AsCHI1* 归类为 I 型 CHI, *AsCHI2* 为 IV 型 CHI; *AsCHI3*~5 属于 III 型 CHI。体外酶活实验表明 *AsCHI1* 能够催化柚皮素查耳酮生成柚皮素; RT-qPCR 结果显示 *AsCHI1* 和 *AsCHI2* 主要在当归的茎和叶中表达。 **结论** 鉴定了 5 个 *AsCHIs* 家族成员, 成功克隆了 *AsCHI1* 和 *AsCHI2*, 通过体外酶活实验验证了 *AsCHI1* 具有查耳酮异构酶活性。

关键词: 当归; 查耳酮异构酶; 黄酮类化合物; RT-qPCR; 茎; 叶

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)18-6750-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.18.024

Identification and functional verification of chalcone isomerase gene family in *Angelica sinensis*

LI Chaohui^{1,2}, LI Lesong^{1,2}, ZHANG Jinjin^{1,2}, LIANG Yanli¹, YANG Shengchao^{1,2}, LI Mengfei³, ZHAO Yan^{1,2}

1. Yunnan Agricultural University, National-Local Joint Engineering Research Center on Gemplasm Innovation & Utilization of Chinese Medicinal Materials in Southwest China, Key Laboratory of Medicinal Plant Biology, College of Agronomy and Biotechnology, Kunming 650201, China
2. Yunnan Characteristic Plant Extraction Laboratory, Kunming 650106, China
3. Agronomy College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To systematically identify members of chalcone isomerase (CHI) gene family in Danggui (*Angelica sinensis*) and elucidate their roles in flavonoid biosynthesis. **Methods** Genome-wide screening was performed using the *A. sinensis* reference genome. Physicochemical parameters, secondary structures, gene structure, promoter cis-elements, and phylogenetic relationships of the identified *AsCHIs* were analyzed. Candidate genes were cloned, heterologously expressed in *Escherichia coli*, and assayed for *in-vitro* enzymatic activity. Expression profiles were quantified by RT-qPCR. **Results** Five *AsCHI* genes encoding 219—321 amino acids (Mw 24 000—36 000; pI 4.75—9.11) were identified. Their predicted secondary structures are dominated by α -helices and random coils. Promoter regions showed abundant light-, hormone- and stress-responsive elements. Phylogenetic analysis classified *AsCHI1* in the type-I CHI clade, *AsCHI2* in type-IV, and *AsCHI3*-5 in type-III. Recombinant *AsCHI1* catalyzed the conversion of

收稿日期: 2025-03-06

基金项目: 云南省科技计划项目 (202502AS100012, 202304B1090009); 云南特色植物提取实验室自主研究项目基金 (2022YKZY001); 云南省兴滇英才支持计划“青年人才”项目 (XDYC-QNRC-2022-0219)

作者简介: 李朝会, 女, 研究方向为药用植物学。E-mail: 341115752@qq.com

*通讯作者: 赵艳, 教授, 博士生导师, 研究方向为药用植物学。E-mail: zhaoyankm@126.com

naringenin chalcone to naringenin *in vitro*, confirming CHI activity. Transcript analysis revealed that *AsCHI1* and *AsCHI2* are predominantly expressed in stems and leaves. **Conclusion** Five members of the *AsCHI* family were identified, with *AsCHI1* and *AsCHI2* successfully cloned. *In vitro* enzyme activity assays confirmed that *AsCHI1* possesses chalcone isomerase activity.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; chalcone isomerase; flavonoids; RT-qPCR; stems; leaves

黄酮类化合物是一类广泛存在于植物界的多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗癌等多种生物活性,在植物的生长发育、抵御病虫害、适应逆境环境以及与微生物的共生等生理过程中发挥着重要作用^[1-3]。黄酮类化合物的合成起始于苯丙烷代谢途径,苯丙氨酸通过苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸 4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate: CoA ligase, 4CL)这 3 个关键酶的催化下生成对香豆酰辅酶 A (*p*-coumaroyl CoA),查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)将对香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 缩合形成柚皮素查耳酮,查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)可进一步催化柚皮素查耳酮转化为柚皮素,再以柚皮素为分支点,由相应的酶催化形成异黄酮、黄酮醇和黄烷酮等不同的黄酮类成分^[4-5]。

CHI 参与植物黄酮类化合物的生物合成途径,主要催化柚皮素查耳酮生成柚皮素,且该酶催化查耳酮的分子内环化和立体定向环化是黄酮类化合物合成的关键步骤^[6]。虽然这个环化反应可以在植物体内自发产生,但是 CHI 的存在会使反应的催化速率提高 10⁷ 倍^[7]。由于其重要的功能,大多数学者对 CHI 进行了研究。早期的研究主要集中在模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.^[8]和一些经济作物如大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.^[9]、玉米 *Zea mays* L.^[10]、番茄 *Solanum lycopersicum* L.^[11]等物种中,这些研究揭示了 CHI 基因的结构特征、表达调控机制以及在植物生理过程中的功能。基于查耳酮异构酶的重要作用,对 CHI 基因的研究逐渐深入到更多植物中。如在一些药用植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.^[12]、红花 *Carthamus tinctorius* L.^[13]、白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg^[14]、黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi^[15]、枸杞 *Lycium chinense* Mill.^[16]、菘蓝 *Isatis indigotica* L.^[17]、灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.^[18]等物种中,CHI 基因的鉴定为这些植物中黄酮类药用成分的生物合成提供了重要的分子基础。然而,尽管已有诸多研究揭示了 CHI 基因在不同植物中的功

能,但对于当归这一具有重要经济和药用价值的植物中 CHI 的研究却相对较少。

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 为伞形科(Apiaceae)多年生草本植物,是我国常用的大宗药材,以根部入药。在我国的种植区主要分布于甘肃、云南、四川、青海等地^[19-20]。传统多用于血虚血瘀证,素有“十方九归”之称^[21]。当代研究表明,当归根具有多种治疗性化学活性成分,包括酚酸类、黄酮类、香豆素类、苯胺类、挥发油、生物碱等活性物质,具有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效^[22-25]。黄酮类化合物是当归中的一类重要活性成分,然而对于当归黄酮类化合物的合成机制尚不清楚。CHI 是黄酮类生物合成途径的关键限速酶,研究 CHI 对于当归黄酮类化合物的合成乃至植物抗胁迫都具有重要意义。

本研究通过基因组数据对当归中的 CHI 基因家族进行了鉴定,并通过原核表达和体外酶活性测定进行验证。此外,通过反转录实时荧光定量 PCR 技术(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)对 *AsCHI1* 和 *AsCHI2* 的组织表达模式进行了分析,为进一步研究当归查耳酮异构酶的功能及其在黄酮类化合物生物合成中的分子机制提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

本实验材料采自云南省丽江市玉龙纳西族自治县太安乡(北纬 26°45'28", 东经 100°2'58", 海拔 2 977.63 m)种植基地,由昆明植物研究所杨文光研究员鉴定为伞形科当归属植物当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels。采集一年生当归根茎叶后置于液氮中速冻,−80 °C 保存备用。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; cDNA 反转录试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、2×Phanta Max Master Mix 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,无缝克隆酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司;大肠杆菌 DH5α 感受

态购买于生工生物工程（上海）股份有限公司，BL21（DE3）感受态购自北京全式金生物技术有限公司，酵母提取粉和胰蛋白胨购自安琪酵母股份有限公司，琼脂粉、卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷、SDS-PAGE 彩色凝胶制备试剂盒、三羟甲基氨基甲烷（Tris）和咪唑购自昆明傲雪商贸有限公司；柚皮素查耳酮（批号 DY0196-0020）、柚皮素（批号 DY0100-0020）对照品（质量分数 $\geq 98\%$ ）购自成都乐天医药科技有限公司，引物合成、测序由北京擎科生物科技股份有限公司昆明分公司完成。

2 方法

2.1 生物信息学分析

通过 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 CHI 基因的隐马尔科夫模型（PF02431），使用 TBtools 软件筛选符合模型的所有当归 CHI 蛋白序列；以拟南芥 CHI 蛋白家族成员序列为种子序列，利用 Blastp 对当归基因组数据进行筛选。将以上 2 种方法得到的结果进行合并，得到候选 *AsCHIs* 家族成员序列，命名为 *AsCHI1*~*AsCHI5*。

利用 Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测蛋白质理化性质，利用 SOMPA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 预测蛋白质二级结构；通过 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 对蛋白质的跨膜结构进行预测，并利用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 对亚细胞定位进行预测。通过 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>)

在线软件分析 *AsCHIs* 基因家族的保守基序，利用 NCBI 中的 BatchCD Search 工具分析 *AsCHIs* 基因家族的保守结构域，并通过 TBtools 处理生成可视化图形。内含子与外显子结构由 TBtools 的 Visualize Gene Structuer 工具进行分析。利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站分析启动子顺式作用元件。系统发育树由 MEGA-X 软件通过邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建，并通过 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对。

2.2 当归总 RNA 提取及 cDNA 的合成

称取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存的当归根、茎、叶组织样品，置于研钵中用液氮冷冻研磨，参照 RNA 提取试剂盒的步骤提取 RNA。利用仪器 NanoDrop 2000 检测 RNA 浓度和纯度，并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。提取完成后，用反转录试剂盒将不同组织部位反转录成 cDNA，并放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3 当归 *AsCHI1* 与 *AsCHI2* 基因克隆

利用 SnapGene 设计带有 pET-28a 同源臂的特异性引物（表 1），以当归 cDNA 作为模板，利用高保真酶（ $2\times$ Phanta Max Master Mix）对基因序列进行扩增。反应体系：cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$ ，前引物 F、后引物 R 各 $2\text{ }\mu\text{L}$ ，酶 $25\text{ }\mu\text{L}$ ，超纯水补足 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 3 min ； $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 15 s ， $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 15 s ， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 1 min ，35 循环； $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5 min ， $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增的目的基因经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测，并用凝胶成像仪观察结果，最后将对应条带的目的基因进行胶回收。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')	用途
<i>AsCHI1</i> -F	cagcaaatgggtcgcggatccATGTCTCCTTCCGTTACGGAAT	基因克隆
<i>AsCHI1</i> -R	cagtgggtggtggtggtgCTATACCTGCGTTTCTACTTGAGTTG	
<i>AsCHI2</i> -F	cagcaaatgggtcgcggatccATGGGGACTGAAGTGGTGAT	实时荧光定量
<i>AsCHI2</i> -R	cagtgggtggtggtggtgTCATGGACTGGGGGATGGG	
<i>q-AsCHI1</i> -F	CAAAATTTTCCTCCGGGCTCC	
<i>q-AsCHI1</i> -R	CTTACCGCCAAACTGTGCTT	
<i>q-AsCHI2</i> -F	AAGAAGCTGCCCTCGATCAA	内参基因
<i>q-AsCHI2</i> -R	GAAATGGTGGTGGGTGAGAC	
<i>EEF1G</i> -F	GTCCCAGCAGCCAAAAAGTC	
<i>EEF1G</i> -R	TCTGCCTTGGGCAATTCCTT	

2.4 原核表达载体构建

将 pET-28a 表达载体用限制性内切酶 *Bam*H I 进行单酶切, 并通过柱纯化试剂盒获得线性化载体, 将目的基因与线性化载体在无缝克隆酶的催化下进行重组连接, PCR 程序为 50 °C、50 min。反应完成后将重组产物转化到大肠杆菌感受态 DH5 α 中, 涂布至含有 100 mg/L 卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上培养 12~14 h, 挑取单菌落进行 PCR 验证, 并验证为阳性的菌落置于含卡那霉素的 LB 液体培养基过夜培养, 提取质粒、测序。最终根据测序结果确定目的基因与载体是否连接成功。

2.5 重组蛋白异源表达及纯化

将测序成功后的 pET-28a-*AsCHI1*、pET-28a-*AsCHI2* 质粒转化至表达菌 BL21 (DE3) 感受态中, 挑取阳性菌落接种至含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、220 r/min 培养 12~16 h, 随后转移到 500 mL LB 培养基中扩大培养, 待 A_{600} 值为 0.6 时, 加入终浓度 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导蛋白, 并于 16 °C、180 r/min 培养 12~16 h。然后于 4 °C、5 000 r/min 下离心收集菌体, 加入适量 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 重悬菌体, 采用高压低温细胞破碎仪 (广州聚能生物科技有限公司) 在压力 120 MPa、4 °C 条件下进行破菌 1~2 次; 结束后将破碎后的菌液在 4 °C、12 000 r/min 下离心 30 min, 最后取上清进行蛋白纯化。将蛋白上清液加到 Ni-NTA 琼脂糖亲和柱上, 先用 20 mmol/L 和 50 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白, 再用 200 mmol/L 浓度的咪唑洗脱目的蛋白并收集滤液, 然后用 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测蛋白是否表达, 确认蛋白表达后, 采用超滤管进行离心浓缩, 浓缩后的蛋白加入 20% 甘油后放于 -80 °C 冰箱保存备用。

2.6 体外酶活检测

在常温 25 °C 条件下进行酶活性检测, 加入 2.5 μ g *AsCHI* 于 200 μ L 反应缓冲液中, 然后马上加入浓度为 100 mmol/L 的柚皮素查耳酮作为底物, 控制酶催化反应的时间为 1 min。反应结束后, 加入 500 μ L 醋酸乙酯萃取 2 次, 放入通风橱使其挥发完全, 再加入 300 μ L 甲醇重新溶解样品。用 0.22 μ m 的过滤器过滤后, 加入含有内插管的液相小瓶。

2.7 HPLC 和 LC-MS 检测

2.7.1 HPLC 色谱条件 采用 Agilent 1290 液相色谱仪进行 HPLC 分析, 色谱柱选用飞诺美的

Kinetex[®] Biphenyl 100 Å (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 30 °C。流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~8 min, 13%~28% B; 8~12 min, 28%~35% B; 12~17 min, 35%~40% B; 17~20 min, 40%~42% B; 20~22 min, 42%~98% B; 22~26 min, 98% B。产物标准品进样量为 5 μ L; 样品进样量为 10 μ L, 紫外检测波长为 254 nm。

2.7.2 LC-MS 条件 采用 Agilent 1290 UPLC/6540 Q-TOF 液相 LC-MS 进行检测, 质谱条件: 离子源采用负离子模式, 扫描范围 m/z 100~1 000, 扫描方式: SRM。其余色谱检测条件与 HPLC 检测一致。

2.8 *AsCHI1* 与 *AsCHI2* 的组织表达分析

利用 RT-qPCR 研究当归不同组织部位的转录情况, 选取当归真核翻译延伸因子 1 γ (*EEF1G*) 作为内参基因^[26]。反应为 20 μ L 体系, 包括 10 μ L 的 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 上下游引物各 0.4 μ L, 模板 cDNA 1 μ L 和 8.2 μ L 的无酶水。反应程序: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C、10 s, 60 °C、30 s, 循环 40 次, 每次循环后采集荧光; 95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 95 °C、15 s 做熔解曲线分析。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算得到 *AsCHI1* 与 *AsCHI2* 基因在当归的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 *AsCHIs* 生物信息学分析

3.1.1 *AsCHIs* 基因家族鉴定、理化性质分析及二级结构预测 本研究从当归基因组鉴定出 5 个 *AsCHIs* 基因, 依次命名为 *AsCHI1*~*AsCHI5*。利用在线软件 Expasy-ProtParam 分析 5 个 *AsCHIs* 的蛋白理化性质, 结果如表 2 所示, *AsCHI1*、*AsCHI2*、*AsCHI3*、*AsCHI4* 和 *AsCHI5* 的氨基酸数分别为 242、219、275、321 和 319, 相对分子质量在 24 000~36 000, 等电点为 4.75~9.11, *AsCHI1* 的不稳定系数为 36.3 (<40), 属于稳定蛋白; *AsCHI2*、*AsCHI3*、*AsCHI4* 和 *AsCHI5* 的不稳定系数分别为 42.43、42.08、47.12 和 51.65, 均大于 40, 属于不稳定蛋白; *AsCHIs* 的亲水性范围在 -0.170~0.017, 亚细胞定位预测 *AsCHI1* 和 *AsCHI2* 位于叶绿体, *AsCHI3* 位于细胞膜, *AsCHI4* 和 *AsCHI5* 位于细胞核; *AsCHI1*~*AsCHI4* 无跨膜结构域, *AsCHI5* 有跨膜结构。利用 TMHMM-2.0 对 *AsCHIs* 蛋白的二级结构进行分析, 由表 3 可知, 无规则卷曲和 α -螺旋是 *AsCHIs* 蛋白的主要元件, 延伸链所占比例较低, 无 β -折叠。

表 2 *AsCHIs* 蛋白理化性质分析Table 2 Analysis of physicochemical properties of *AsCHIs* protein

名称	基因ID	氨基酸数量/aa	相对分子质量	等电点	不稳定系数	亲水系数	亚细胞定位	跨膜结构
<i>AsCHI1</i>	AS03G00525	242	26 067.79	6.66	36.43	-0.074	叶绿体	无跨膜结构
<i>AsCHI2</i>	AS01G00004	219	24 204.43	4.75	42.30	-0.103	叶绿体	无跨膜结构
<i>AsCHI3</i>	AS01G03012	275	29 746.19	8.73	42.08	0.017	细胞膜	无跨膜结构
<i>AsCHI4</i>	AS02G03530	321	35 314.55	9.11	47.12	-0.170	细胞核	无跨膜结构
<i>AsCHI5</i>	AS09G01830	319	36 213.59	7.96	51.65	-0.024	细胞核	有跨膜结构

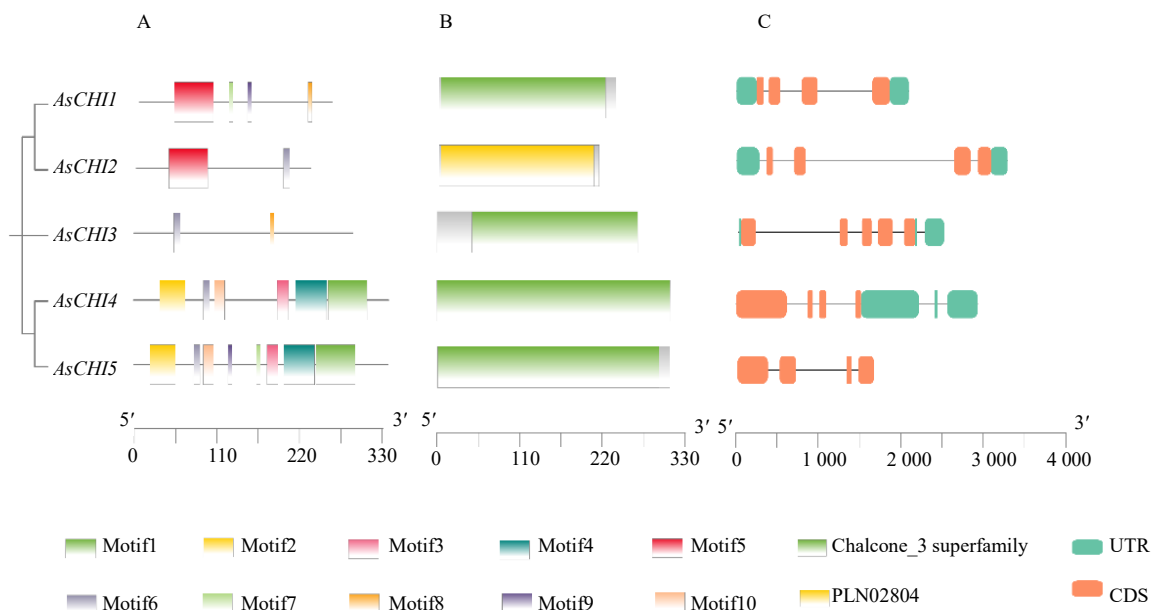
表 3 *AsCHIs* 蛋白质二级结构分析Table 3 Secondary structure analysis of *AsCHIs* proteins

名称	α -螺旋/%	β -折叠/%	延伸链/%	无规则卷曲/%
<i>AsCHI1</i>	36.36	0	21.07	42.56
<i>AsCHI2</i>	39.73	0	21.92	38.36
<i>AsCHI3</i>	36.36	0	20.00	43.64
<i>AsCHI4</i>	28.66	0	15.26	56.07
<i>AsCHI5</i>	37.93	0	13.48	48.59

3.1.2 *AsCHIs* 基因结构与保守结构域分析 基因结构和保守结构域分析结果发现, *AsCHIs* 基因家族共有 10 个保守基序。其中, *AsCHI5* 有 8 个保守基序, 除了 motif 5 和 motif 8, 其他保守基序都存在, 其余的 *AsCHIs* 有 2~6 个数量不等的基序 (图 1-A); *AsCHI1*、*AsCHI3*、*AsCHI4*、*AsCHI5* 含有 Chalcone_3 superfamily 结构域, *AsCHI2* 含有 PLN02804 结构域 (图 1-B); *AsCHIs* 基因的外显

子数量为 0~3 个, *AsCHI1* 和 *AsCHI2* 有 2 个外显子, 且外显子分布于 2 端, *AsCHI3* 和 *AsCHI4* 有 3 个外显子, *AsCHI3* 的 N 端和 C 端均有外显子, 而 *AsCHI4* 仅在 C 端有外显子, N 端没有, *AsCHI5* 仅有内含子, 没有外显子结构 (图 1-C)。

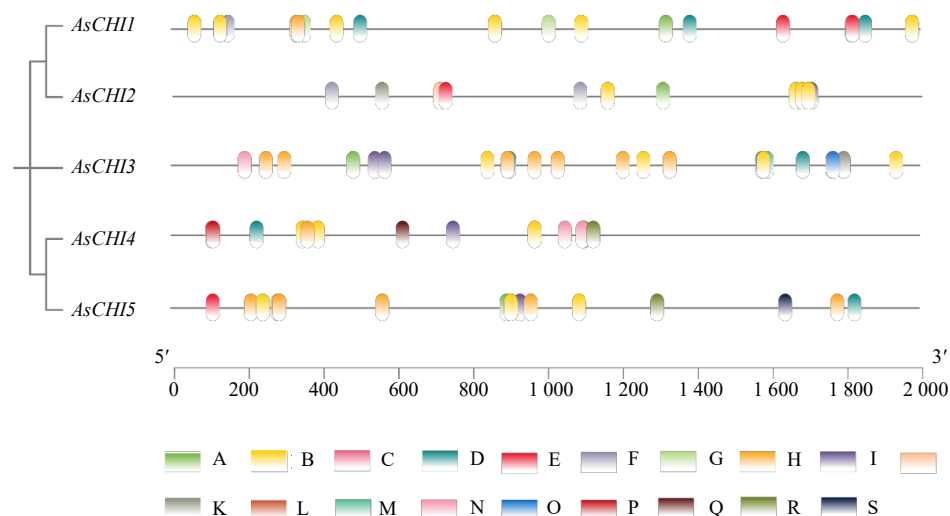
3.1.3 *AsCHIs* 基因启动子顺式作用元件分析 选取 *AsCHIs* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的启动子序列, 利用 PlantCARE 分析基因启动子序列中顺式作用元件的组成。结果如图 2 所示, *AsCHIs* 基因启动子含有丰富的光响应元件, 提示 *AsCHIs* 基因的表达可能与光信号传导密切相关。此外, 大多数 *AsCHIs* 启动子还含有脱落酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、低温响应元件以及厌氧诱导顺式作用元件。部分基因启动子还含有诱导子介导的最大激活元件、参与黄酮生物合成基因调控的 MYB 结合位点、与分生组织表达相关的顺式调控元件。总之,



A-基因结构; B-保守结构域; C-内含子与外显子结构。

A-gene structure; B-conserved domain; C-intron and exon structures.

图 1 *AsCHIs* 基因结构和保守结构域Fig. 1 Gene structure and conserved domains of *AsCHIs*



A-ATBP-1 结合位点; B-光反应元件; C-脱落酸响应元件; D-厌氧诱导顺式作用元件; E-参与 MeJA 反应的顺式调控元件; F-与分生组织表达相关的顺式调控元件; G-诱导子介导的最大激活元件; H-部分保守 DNA 模块参与光反应; I-低温响应的顺式作用元件; J-水杨酸响应元件; K-参与类黄酮生物合成基因调控的 MYB 结合位点; L-细胞周期调控顺式作用元件; M-参与防御和应激反应的顺式作用元件; N-玉米醇溶蛋白代谢调节顺式调节元件; O-MYBHv1 结合位点; P-参与缺氧特异性诱导的增强子样元件; Q-赤霉素响应元件; R-参与光反应的 MYB 结合位点; S-参与昼夜节律控制的顺式作用元件。

A-ATBP-1 binding site; B-Light-responsive element; C-Absciscic acid-responsive element; D-Anaerobic-responsive element; E-Methyl jasmonate-responsive element; F-Meristem expression-specific element; G-Elicitor-mediated activation element; H-Light-responsive conserved DNA module; I-Low-temperature-responsive element; J-Salicylic acid-responsive element; K-MYB binding site involved in flavonoid biosynthesis; L-Cell-cycle-regulatory cis-acting element; M-Defense- and stress-responsive element; N-Zein-metabolism regulation element; O-MYBHv1 binding site; P-Hypoxia-specific enhancer-like element; Q-Gibberellin-responsive element; R-MYB binding site involved in light responsiveness; S-Circadian rhythm cis-acting element.

图 2 *AsCHIs* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 2 Analysis of cis-acting elements of *AsCHIs* gene promoter

这些顺式元件的存在表明 *AsCHIs* 可能受到光、激素以及非生物胁迫的调节。

3.1.4 *AsCHIs* 系统进化分析 为了进一步分析 *AsCHIs* 与其他物种中 CHI 的进化关系,利用 MEGA-X 对当归 CHI 氨基酸序列和来自其他物种的 21 个 CHI 氨基酸序列进行序列比对,并通过邻接法构建系统发育树,发现 26 个 CHI 氨基酸序列分为 4 个类型(Type I~IV 型)(图 3)。其中 *AsCHI1* 被归为 Type I 型, *AsCHI2* 被归为 Type IV 型, *AsCHI3* 与 Type III 的 FAP3 亚家族归为一类、*AsCHI4* 和 *AsCHI5* 与 Type III 的 FAP2 聚为一支。前人研究报告, I 型和 II 型 CHI 具有 CHI 酶活性,因此推测 *AsCHI1* 具有催化柚皮素查耳酮为柚皮素的功能。

3.1.5 *AsCHIs* 氨基酸同源序列比对分析 由于 I 型 CHI 由 IV 型 CHI 进化而来^[27],为进一步分析 2 个亚家族的差异性,利用 DNAMAN 软件对 *AsCHI1*、*AsCHI2* 以及来自其他物种的 I 型和 IV 型 CHI 蛋白进行同源序列比对,用方框和箭头表示柚皮素残基的结合位点。由图 4 看出, *AsCHI1* 有 12 个保守的活性位点: R (38) G (39)、F (49) T (50)、I (52)、

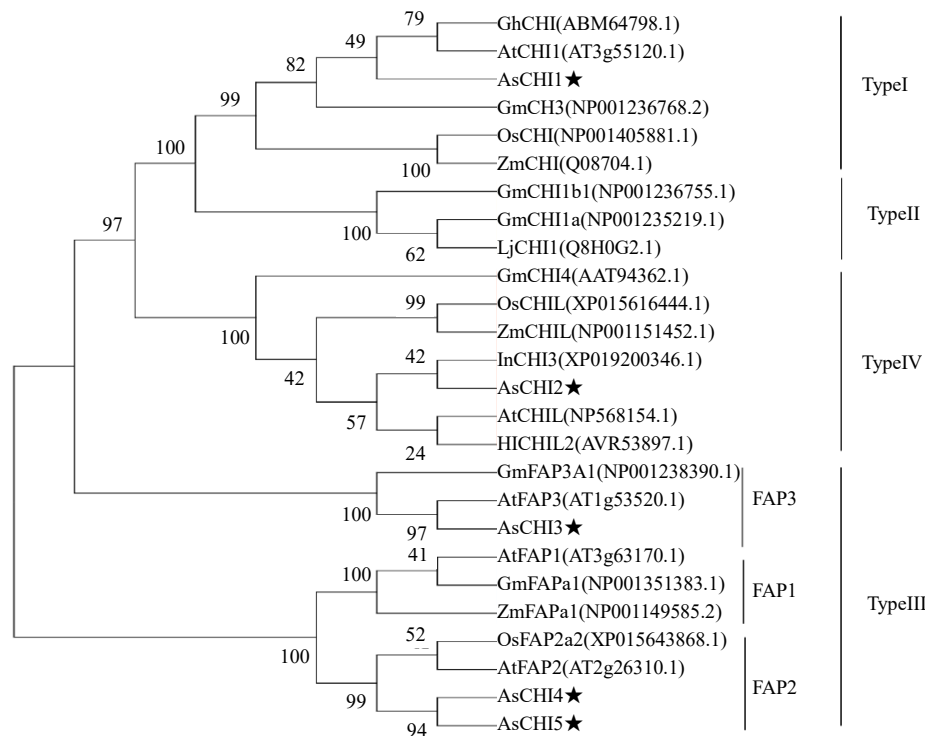
L (104)、Y (109)、K (112) V (113)、N (116) 和 S (195) I (196), 而 *AsCHI2* 与其他 IV 型 CHI 蛋白一样,缺乏与柚皮素残基的结合位点,进一步推测 *AsCHI1* 具有催化柚皮素查耳酮的活性,而 *AsCHI2* 则不具该活性。

3.2 当归不同组织总 RNA 提取及 cDNA 的合成

将当归不同组织中提取的 RNA 经过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果呈现 2 条清晰明亮的条带(图 5-A),且经过核酸蛋白检测仪测得 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0, RNA 质量较高。使用反转录试剂盒将当归不同部位的 RNA 反转录为第一链(cDNA),可用于全长扩增及 RT-qPCR 分析。

3.3 *AsCHI1* 和 *AsCHI2* 的克隆与原核表达载体的构建

为了进一步验证 *AsCHI1* 和 *AsCHI2* 是否具有查耳酮异构酶功能,通过原核异源表达进行功能验证。以当归 cDNA 为模板,通过设计的引物对 *AsCHI1* 与 *AsCHI2* 基因进行克隆,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 5-B 所示,目的条带符合预期结果。利用胶回收试剂盒对扩增产物进行回收,再将回收产物与线性化载体 pET-28a 进行重

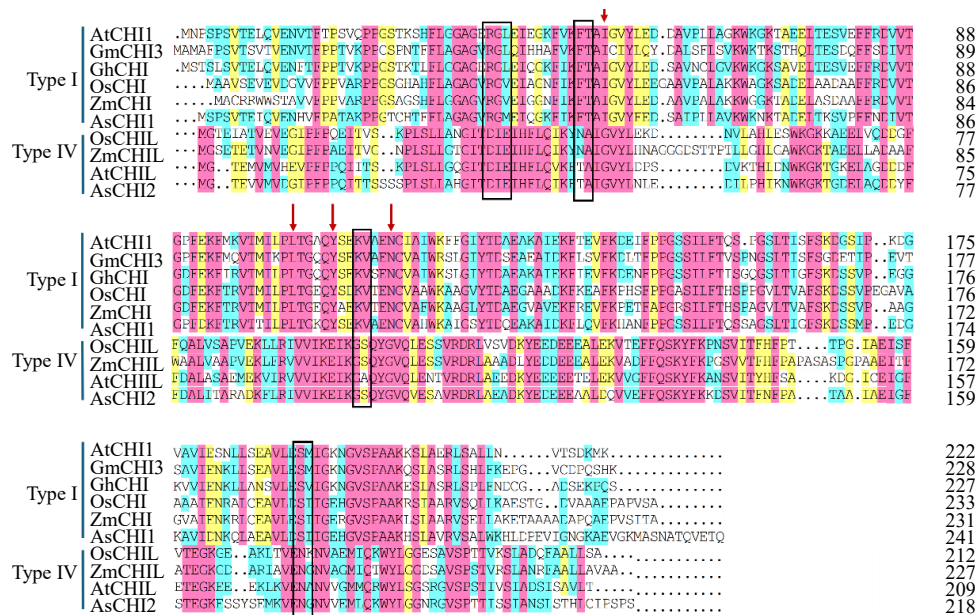


当归 CHI 家族成员用黑色五角星标注。Gh-陆地棉；At-拟南芥；Gm-大豆；Os-水稻；Zm-玉米；Lj-百脉根；In-牵牛花；HI-啤酒花。

The black stars represent members of the *A. sinensis* CHI family. Gh-*G. hirsutum*; At-*A. thaliana*; Gm-*G. max*; Os-*O. sativa*; Zm-*Z. mays*; Lj-*Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen; In-*Ipomoea nil* (L.) Roth; HI-*Humulus lupulus* L.

图 3 AsCHIs 与其他物种的进化分析

Fig. 3 Evolutionary analysis of AsCHIs and other species

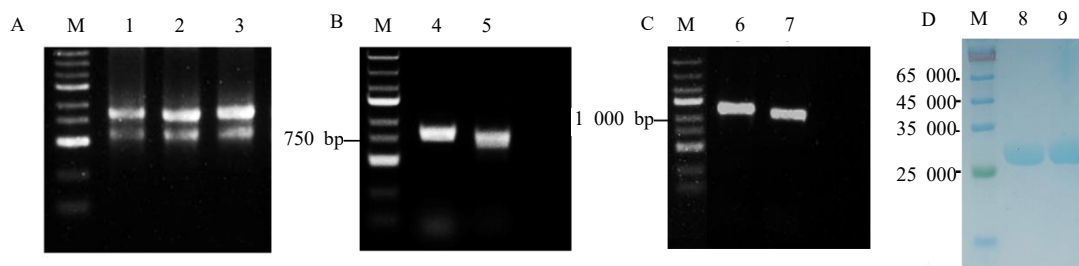


箭头和黑色框（相邻的氨基酸位点）表示与柚皮素残基的结合位点。

Arrows and black boxes indicate binding sites with naringin residues.

图 4 AsCHI1、AsCHI2 与其他物种的氨基酸序列比对

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of AsCHI1 and AsCHI2 with other species



A-当归不同组织 RNA 检测; B-*AsCHIs* 基因克隆; C-pET-28a-*AsCHIs* 菌液 PCR 检测; D-*AsCHIs* 蛋白的 SDS-PAGE 分析。M-Marker; 1-根; 2-茎; 3-叶; 4-*AsCHI1* 基因克隆; 5-*AsCHI2* 基因克隆; 6-pET-28a-*AsCHI1* 菌液验证; 7-pET-28a-*AsCHI2* 菌液验证; 8-*AsCHI1* 蛋白条带; 9-*AsCHI2* 蛋白条带。

A-RNA detection in different tissues of *A. sinensis*; B-Cloning of *AsCHIs* gene; C-pET-28a-*AsCHIs* bacterial liquid PCR detection; D-SDS-PAGE analysis of *AsCHIs* protein; M-Marker; 1-Roots; 2-Stems; 3-Leaves; 4-Cloning of *AsCHI1* gene; 5-Cloning of *AsCHI2* gene; 6-Validation of pET-28a-*AsCHI1* bacterial solution; 7-Validation of pET-28a-*AsCHI2* bacterial solution; 8-Purified *AsCHI1* protein; 9-Purified *AsCHI2* protein.

图 5 琼脂糖凝胶电泳检测以及 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis and SDS-PAGE analysis

组连接,检测结果如图 5-C,在 1 000 bp 附近有
条带,初步判断连接成功。对其提取质粒后进行
测序比对,测序结果无任何突变,可以进行蛋白
表达。

3.4 原核表达分析

将重组载体 pET-28a-*AsCHI1* 和 pET-28a-*AsCHI2*
转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态中,在 37 °C、220
r/min 条件下培养,当 A_{600} 约 0.6 时,加入终浓度为
0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导剂于 16 °C 下诱导 12~16 h
后进行蛋白纯化。将 200 mmol/L 咪唑洗脱后的蛋白
进行 SDS-PAGE 检测,结果显示在 27 000 左右出现
目标条带(图 5-D),表明重组蛋白表达成功。

3.5 体外酶活测定

本研究选用柚皮素查耳酮作为底物,在室温下
进行酶反应(图 6-A),产物使用高效液相色谱仪
进行检测。结果表明,在以柚皮素查耳酮为底物时,
AsCHI1 能够高效地把底物柚皮素查耳酮在 1 min
内完全催化为柚皮素,但 *AsCHI2* 和对照实验(失
活的蛋白)中,只有少量柚皮素查耳酮发生自发转
化(图 6-B)。利用 LC-MS 对反应样品产物进行定
性分析,产物分子离子峰在负离子模式下的 m/z 为
271.062 9(图 6-C),与柚皮素标准品的离子碎片
高度相似(图 6-D)。因此,*AsCHI1* 属于 I 型查耳
酮异构酶,并具有正常的酶活性。

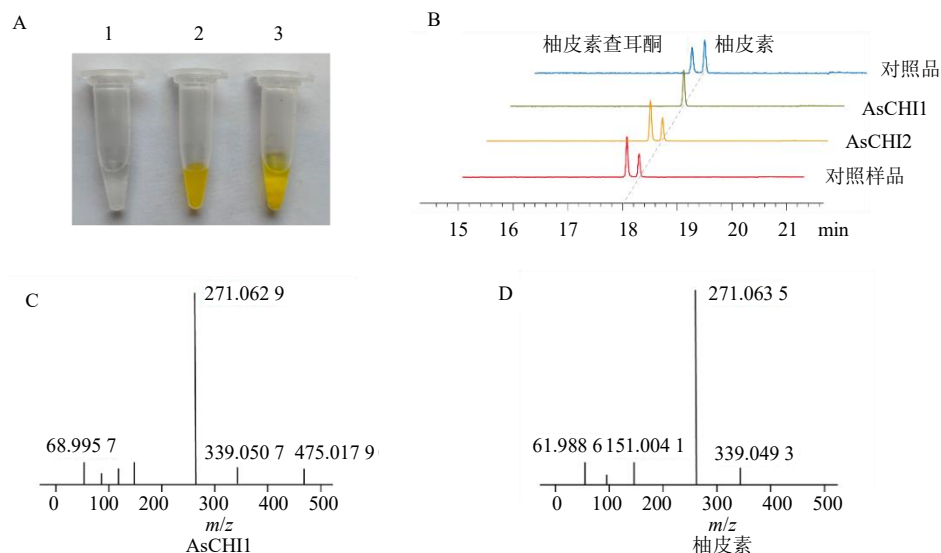
3.6 *AsCHI1* 与 *AsCHI2* 组织表达量分析

为了进一步分析 *AsCHI1* 和 *AsCHI2* 在当归不
同组织部位的转录情况,对当归根、茎、叶进行 RT-
qPCR 分析,结果如图 7 所示。*AsCHI1* 在茎和叶中
呈现高表达,且表达水平一致,而在根中表达量极

低(图 7-A); *AsCHI2* 在叶中表达量最高,其次是
茎,在根中没有表达(图 7-B)。结果表明当归的
AsCHI1 和 *AsCHI2* 主要在地上部位发挥作用。

4 讨论

黄酮类化合物是植物重要的次生代谢产物,广
泛存在且具有药用价值,在植物生长发育、响应环
境胁迫以及花色改良等方面发挥着重要作用^[28-29]。
查耳酮异构酶是参与黄酮类生物合成途径的关键
限速酶,催化柚皮素查耳酮发生分子内环化。目前
CHI 在植物中已被广泛克隆,如马缨杜鹃
Rhododendron delavayi Franch.^[30]、生菜 *Lactuca sativa*
L.^[31]、苦荞 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.^[32]、银
杏 *Ginkgo biloba* L.^[33]、矮牵牛 *Petunia*× *hybrida*
(Hook.) Vilmorin.^[34]等。此外,在水稻 *Oryza sativa*
L.^[35]、桑树 *Morus alba* L.^[36]、陆地棉 *Gossypium*
hirsutum L.^[37]、巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd.
ex A. Juss.) Müll. Arg.^[38]等植物中也系统分析了 *CHI* 基
因家族。本研究对当归查耳酮异构酶 *CHI* 基因家族进
行了鉴定,获得了 5 个当归 *AsCHIs* 基因(表 2)。
AsCHIs 的启动子区中,存在着大量光响应顺式作用
元件以及多种激素响应元件和非生物胁迫响应元件
(图 2),暗示 *AsCHIs* 基因的表达可能与光信号传导
密切相关,还受到多重环境因素的调控。*CHI* 属于超
基因家族,在植物体内可分为 4 个亚组(I~IV 型),
I 型主要催化柚皮素查耳酮生成柚皮素^[39],II 型主要
存在于豆科植物中,不仅负责类黄酮的生成,还能
催化异甘草素生成甘草素^[40]。III 型为脂肪酸结合蛋
白,参与脂肪酸代谢过程^[41],IV 型 *CHI* 也被命名为
CHI-like,通过与 *CHS* 互作来增强 *CHS* 活性^[42-43]。

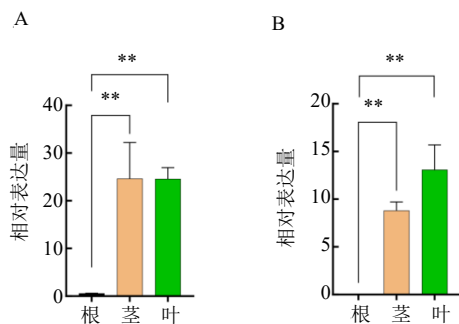


A-AsCHIs 蛋白的酶促反应过程, 1-AsCHI1 的酶促反应, 2-AsCHI2 的酶促反应, 3-失活蛋白的酶促反应(对照); B-AsCHIs 蛋白催化柚皮素查耳酮为柚皮素的 HPLC 分析; C-AsCHI1 蛋白酶促反应的 LC-MS 分析; D-柚皮素对照品的 LC-MS 分析。

A-Time-course of AsCHIs-mediated conversion: 1-AsCHI1, 2-AsCHI2, 3-heat-inactivated protein (control); B-HPLC profile of naringenin chalcone (substrate) converted to naringenin by AsCHIs; C-LC-MS spectrum of the AsCHI1 reaction product; D-LC-MS spectrum of naringenin standard.

图 6 AsCHIs 蛋白的酶促反应分析

Fig. 6 Enzymatic assay of AsCHIs proteins



A-AsCHI1 在当归不同组织部位的表达量; B-AsCHI2 在当归不同组织部位的表达量。**表示差异极显著, $P < 0.01$ 。

A-Expression levels of AsCHI1 in different tissues of *A. sinensis*; B-Expression levels of AsCHI2 in different tissues of *A. sinensis*.

**Indicates highly significant difference, $P < 0.01$.

图 7 AsCHI1 (A) 和 AsCHI2 (B) 表达量分析

Fig. 7 Expression profiles of AsCHI1 (A) and AsCHI2 (B)

本研究对 AsCHIs 基因家族进行了系统进化分析(图 3), 结果显示, AsCHI1 为 I 型 CHI, 是真正发挥黄酮类化合物合成功能的 CHI, 但其没有豆科植物专属的 II 型 CHI; AsCHI3~5 为 III 型 CHI, 表现出脂肪酸结合特性; 而 AsCHI2 与 IV 型 CHI 聚为一类, 推测该基因与 CHS 互作参与当归黄酮类化合物的生成。

查耳酮异构酶的系统进化分析表明, I 型和 II 型 CHI 由 IV 型演化而来^[27]。因此, 为进一步探究当归的 CHI 酶活性, 选择 AsCHI1 和 AsCHI2 进一步进行功能验证。在大肠杆菌中异源表达并做体外酶活检测, 结果显示, AsCHI1 可以将柚皮素查耳酮催化为柚皮素, 证实了 AsCHI1 为 I 型 CHI, 而 AsCHI2 对柚皮素查耳酮没有催化活性, 是典型的 CHI-like (IV 型 CHI), 缺乏柚皮素残基的结合位点(图 4)。有趣的是, 当 AsCHI1 蛋白与柚皮素查耳酮反应时, 黄色的柚皮素查耳酮迅速变为无色, 而 AsCHI2 和对照(高温灭活的 AsCHI)蛋白颜色则无明显变化(图 6-A), 表明 AsCHI1 加速了柚皮素查耳酮的环化。HPLC 检测中, AsCHI2 和对照结果出现了柚皮素产物的色谱峰(图 6-B), 是由于柚皮素查耳酮本身在溶液中不稳定, 容易发生自身环化而生成的柚皮素, 而 I 型和 II 型 CHI 酶的存在会加速反应。所以本实验将反应时间严格控制在 1 min, 检测 AsCHI 蛋白是否具有酶活性。

CHI 在植物的不同发育时期和不同组织中的表达具有差异性。如在红花的开花阶段, CHI 在花芽时期的表达水平最高^[13]; 在苜蓿和生菜中, CHI 主要在地上部位表达^[17, 31]。基于 I、II 和 IV 型 CHI 在黄酮类化合物积累中的重要作用, 因此, 本研究推

测I型成员 *AsCHI1* 和IV型成员 *AsCHI4* 参与当归黄酮类化合物的产生,并通过 RT-qPCR 分析当归不同组织部位中的表达量,结果发现 *AsCHI1* 和 *AsCHI2* 在茎、叶组织中高表达,而在根组织中表达量极低甚至检测不到,表明黄酮类化合物主要是在地上部分合成,与菘蓝^[17]、生菜^[31]等物种研究结果一致。而当归的药用部位为根部,且根部积累一定量的黄酮类成分,表明当归根部的黄酮类成分是在茎叶组织中合成后通过转运机制输送至根部。

本研究鉴定了 5 个 *AsCHIs* 家族成员,成功克隆了 *AsCHI1* 和 *AsCHI2*,通过体外酶活实验验证了 *AsCHI1* 具有查耳酮异构酶活性;荧光定量分析发现, *AsCHI1* 和 *AsCHI2* 主要在当归的茎和叶中表达。本研究结果为进一步探讨当归查耳酮异构酶的体内功能及其在黄酮类生物合成的分子机制提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(3): 218-223.
- [2] Buer C S, Imin N, Djordjevic M A. Flavonoids: New roles for old molecules [J]. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52(1): 98-111.
- [3] Ahuja I, Kissen R, Bones A M. Phytoalexins in defense against pathogens [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17(2): 73-90.
- [4] Yin Y C, Zhang X D, Gao Z Q, *et al.* The research progress of chalcone isomerase (CHI) in plants [J]. *Mol Biotechnol*, 2019, 61(1): 32-52.
- [5] 葛诗蓓, 张学宁, 韩文炎, 等. 植物类黄酮的生物合成及其抗逆作用机制研究进展 [J]. *园艺学报*, 2023, 50(1): 209-224.
- [6] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 485-493.
- [7] Bednar R A, Hadcock J R. Purification and characterization of chalcone isomerase from soybeans [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(20): 9582-9588.
- [8] Cain C C, Saslowsky D E, Walker R A, *et al.* Expression of chalcone synthase and chalcone isomerase proteins in Arabidopsis seedlings [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35(3): 377-381.
- [9] Boland M J, Wong E. Purification and kinetic properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean [J]. *Eur J Biochem*, 1975, 50(2): 383-389.
- [10] Grotewold E, Peterson T. Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavanone isomerase [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 242(1): 1-8.
- [11] Muir S R, Collins G J, Robinson S, *et al.* Overexpression of Petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(5): 470-474.
- [12] 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.
- [13] Liu X M, Ahmad N, Yang L Y, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of chalcone isomerase from *Carthamus tinctorius* [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 132.
- [14] 丁宁, 海燕, 王晓晖, 等. 白木香查耳酮异构酶基因的克隆鉴定与表达分析 [J]. *药学学报*, 2021, 56(2): 630-638.
- [15] 张甜, 程林, 杨林林, 等. 春季黄芩质量形成与生态因子和关键酶基因表达的关系 [J]. *吉林农业大学学报*, 2022, 44(5): 557-566.
- [16] 张凯敏, 耿贵工, 乔枫. 枸杞果实发育期酶活性、基因表达与类黄酮积累的相关性分析 [J]. *分子植物育种*, 2024, 22(22): 7515-7524.
- [17] 敖志杰, 张惊宇, 曾娟, 等. 灰毡毛忍冬 *CHS1* 基因克隆及功能分析 [J]. *中草药*, 2025, 56(17): 6334-6345.
- [18] 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.
- [19] 严辉, 段金廛, 宋秉生, 等. 我国当归药材生产现状与分析 [J]. *中国现代中药*, 2009, 11(4): 12-17.
- [20] 严辉, 张小波, 朱寿东, 等. 当归药材生产区划研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(17): 3139-3147.
- [21] Wei W L, Zeng R, Gu C M, *et al.* *Angelica sinensis* in China-A review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 190: 116-141.
- [22] 周桂生, 杨念云, 唐于平, 等. 当归地上部分的化学成分及其生物活性研究 [J]. *中国天然药物*, 2012, 10(4): 295-298.
- [23] 赵静, 夏晓培. 当归的化学成分及药理作用研究现状 [J]. *临床合理用药杂志*, 2020, 13(6): 172-174.
- [24] Gao Y, Mo S Y, Cao H K, *et al.* The efficacy and mechanism of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels root aqueous extract based on RNA sequencing and 16S rDNA sequencing in alleviating polycystic ovary syndrome [J]. *Phytomedicine*, 2023, 120: 155013.
- [25] Li M L, Li M, Wang L, *et al.* Apiaceae medicinal plants in China: A review of traditional uses, phytochemistry,

- bolting and flowering (BF), and BF control methods [J]. *Molecules*, 2023, 28(11): 4384.
- [26] 朋冬琴, 罗蜜蜜, 郭欣慰, 等. 当归实时荧光定量 PCR 内参基因筛选 [J]. *中草药*, 2024, 55(1): 269-278.
- [27] Kaltenbach M, Burke J R, Dindo M, *et al.* Publisher Correction: Evolution of chalcone isomerase from a noncatalytic ancestor [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(10): 988.
- [28] Zhang S, Zou J, Hao Z, *et al.* Identification and functional characterization of a new flavonoid glycosyltransferase from *Rheum palmatum* [J]. *Chin Herb Med*, 2024;17(2):307-314.
- [29] Willemse C M, Stander M A, de Villiers A. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1319: 127-140.
- [30] 王聿晗, 孙世宇, 鞠志刚, 等. 马缨杜鹃查耳酮异构酶 (RdCHI1) 重组蛋白的制备及功能验证 [J]. *福建农业学报*, 2023, 38(5): 574-582.
- [31] 徐朝阳, 张苛苛, 王晨晨, 等. 生菜查耳酮异构酶基因克隆及体外酶活测定 [J]. *植物生理学报*, 2023, 59(11): 2135-2143.
- [32] 侯伶俐, 杨雄榜, 董雪妮, 等. 逆境胁迫对苦荞花期总黄酮含量及关键酶基因表达的影响 [J]. *核农学报*, 2016, 30(1): 184-192.
- [33] 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.
- [34] Keykha F, Bagheri A, Moshtaghi N, *et al.* RNAi-induced silencing in floral tissues of *Petunia hybrida* by agroinfiltration: A rapid assay for chalcone isomerase gene function analysis [J]. *Cell Mol Biol*, 2016, 62(10): 26-31.
- [35] Park S I, Park H L, Bhoo S H, *et al.* Biochemical and molecular characterization of the rice chalcone isomerase family [J]. *Plants*, 2021, 10(10): 2064.
- [36] Chao N, Wang R F, Hou C, *et al.* Functional characterization of two chalcone isomerase (CHI) revealing their responsibility for anthocyanins accumulation in mulberry [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 161: 65-73.
- [37] 杨丹, 鲍军秀, 陈沛, 等. 棉花查耳酮异构酶基因家族的鉴定及表达分析 [J]. *华中农业大学学报*, 2023, 42(5): 94-104.
- [38] 吴倩倩, 夏玲, 于飞, 等. 巴西橡胶树查耳酮异构酶 HbCHI 基因家族的鉴定和基因功能初步验证 [J]. *热带作物学报*, 2025, 46(2): 247-255.
- [39] Dixon R A, Richard Blyden E, Robbins M P, *et al.* Comparative biochemistry of chalcone isomerases [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(9): 2801-2808.
- [40] Shimada N, Aoki T, Sato S, *et al.* 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.
- [41] Ngaki M N, Louie G V, Philippe R N, *et al.* Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis [J]. *Nature*, 2012, 485(7399): 530-533.
- [42] Ban Z N, Qin H, Mitchell A J, *et al.* Noncatalytic chalcone isomerase-fold proteins in *Humulus lupulus* are auxiliary components in prenylated flavonoid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(22): E5223-E5232.
- [43] Jiang W B, Yin Q G, Wu R R, *et al.* Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66(22): 7165-7179.

[责任编辑 时圣明]