

网络出版时间:2015-11-05

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1359.S.20151105.0922.018.html>

青稞 *CHS* 基因的克隆及原核表达分析

方建,牟利,李鹏,张鹏飞,刘新春,袁金娥,冯宗云

(四川农业大学农学院植物遗传育种学系大麦青稞研究中心,四川成都 611130)

摘要: 为进一步研究查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)在黄酮化合物代谢过程中的作用,以青稞 94-19-1 为材料,通过同源克隆技术分离 *CHS* 基因,并对分离得到的 *CHS* 基因进行生物信息学分析及原核表达。结果表明,从青稞 94-19-1 中克隆得到的 *CHS* 基因编码区长为 1 197 bp,编码 398 个氨基酸。生物信息学分析表明,该基因编码的蛋白质分子量为 43.479 kDa,预测等电点(pI)为 5.92,是酸性蛋白;该酶蛋白体外红细胞中的半衰期为 30 h,不稳定系数(II)大于 40,属于不稳定蛋白;平均亲水指数为 -0.090,是亲水性的蛋白。SDS-PAGE 检测结果表明,将该基因克隆到表达载体 pET-32a 上,并在大肠杆菌 BL21 中表达,可得到 64 kDa 左右的融合蛋白,在 IPTG 诱导浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,最佳诱导时间为 3 h。

关键词: 青稞;查尔酮合酶;同源克隆;原核表达

中图分类号:S512.3;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2015)11-1528-07

Cloning and Prokaryotic Expression Analysis of *CHS* Gene in Hulless Barley

FANG Jian, MOU Li, LI Peng, ZHANG Kunfei, LIU Xinchun, YUAN Jin'e, FENG Zongyun

(Barley & Hulless Barley Research Centre, Department of Plant Genetics and Breeding,

College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: In order to research the role of chalcone synthase gene in flavonoids metabolic pathway, Qingke "94-19-1" was used as the material for homologous cloning in this study to clone *CHS* gene which was then studied by bioinformatics analysis and prokaryotic expression. A sequence of open reading frame (ORF) with 1 197 bp encoding 398 amino acids was obtained. Sequence analysis showed that the enzyme HvCHS was an unstable, hydrophobic and acid protein with the molecular weight of 43.479 kDa, instable coefficient of 40.10 (>40), the half-life of 30 h, the average hydrophilic coefficient of -0.090 and theoretical pI of 5.92. Prokaryotic expression of pET-32a-HvCHS, which was formed from the expressive vector pET-32a linked with the encoding sequence of *HvCHS* gene, was carried out in *E. coli* BL21. The fusion protein with 64 kDa was expressed including the protein encoded by the gene *HvCHS* and the tag protein of expressive vector pET-32a. The optimal conditions for prokaryotic expression were $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for IPTG concentration and 3 h for expression time.

Key words: Hulless barley; Chalcone synthase; Homologous cloning; Prokaryotic expression

青稞 (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* hook. f.) 也叫裸大麦,是我国青藏高原地区重要的种质资源^[1]。在粮食作物中,青稞属于“三高两

低”(高蛋白、高纤维、高维生素、低脂肪和低糖)作物,其结构组成满足现代健康饮食的要求,是谷类作物中的佳品^[2]。此外,青稞更富含功能活性成

收稿日期:2015-07-13

修回日期:2015-09-21

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-05)

第一作者 E-mail: 306084103@qq.com

通讯作者:冯宗云(E-mail: zyfeng49@126.com)

分,如黄酮类化合物、 γ -氨基丁酸、多酚类化合物、麦角类化合物、生育三烯醇、B 族维生素以及 β -葡聚糖等^[3-4],被认为是防治人类慢性病的功能食品作物^[5],其保健和医疗作用一直是大麦工作者研究的重点。黄酮类化合物是一种重要的次生代谢产物,对植物的生理生化作用、抗病抗逆性及开花繁育等具有重要的调节功能^[6-9],对人体也有抗癌防癌、预防心血管疾病、增强免疫功能及降低血糖等保健药理功效^[10-11]。

植物黄酮类化合物是由苯丙烷代谢途径合成的,其基本骨架 $C_6-C_3-C_6$ 中的两个 C_6 来自两个不同的代谢途径,即苯丙烷代谢途径和丙二酸途径^[12]。1 分子 4-香豆酰 CoA 与 3 分子丙二酸途径生成的体丙二酰-CoA 在查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)的作用下合成 1 分子 15 个碳架结构的查尔酮^[13]。CHS 是一种聚酮合成酶,具有很强的底物专一性,为黄酮类化合物提供 15 个 $C_6-C_3-C_6$ 基本骨架,是黄酮类化合物的直接前体,也是黄酮类化合物的第一个关键的限速酶。Reimold 等^[14]在荷兰芹中分离出第一个 *CHS* 基因。此后,更多植物的 *CHS* 基因以荷兰芹 *CHS* 基因为探针被克隆出来。大部分植物的 *CHS* 基因编码区保守性很强,长约 1 200 bp,编码 400 个左右的氨基酸。一般 *CHS* 基因都具有两个外显子和一个内含子(金鱼草^[15]除外),其中,外显子在科属间的同源性 70% 以上,能够提供较多的进化信息,可用于不同科属间的进化和发育研究^[16]。*CHS* 基因在同一植物中的表达位置受不同发育时期的影响。在有些植物的早期发育阶段,查尔酮合酶会出现在其叶片组织^[17],而在其成熟植株的表达主要集中在花组织^[18]。此外,*CHS* 基因在不同植物同一器官中的表达部位也不相同。Mahroug 等^[19]用原位杂交技术发现长春花中该基因在花瓣上表皮内表达,但在有些植物中该基因却在花药中表达^[20]。

查尔酮合酶广泛分布在植物界,且在植物的生长和适应环境活动中起着重要作用,近年来也成为分子生物学与植物生理学的研究热点之一^[12-13]。但迄今,有关青稞中 *CHS* 基因的克隆研究尚未见报道。鉴于此,本研究以实验室前期测定的高黄酮含量青稞品种“94-19-1”为材料^[21],拟通过同源克隆技术分离 *CHS* 基因,并对分离得到的 *CHS* 基因进行生物信息学分析及原核表达,以期为进一步研究青稞黄酮合成的分子调控

机制和作用机理打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

青稞品系“94-19-1”,由甘肃省甘南藏族自治州农科所馈赠,种植于四川农业大学农学院国家大麦青稞产业技术体系成都综合试验站崇州羊马实验基地。

1.1.2 试剂

固相 RNase 清除剂购自北京天恩泽基因工程有限公司; cDNA 第一链合成试剂盒购自 Thermo 公司; 蛋白胨和酵母提取物购自 Oxoid 公司; DH5 α 感受态细胞、克隆载体 pMD19-T Simple Vector、BL21(DE3)感受态细胞、DNA 纯化回收试剂盒、 $2 \times Taq$ PCR Master Mix、DL2000 DNA marker、 $6 \times$ Loading Buffer 及 GoldViewTM 核酸染料购自天根生化科技有限公司(北京); 广谱蛋白 marker 和 Super DNA marker 购自北京康为世纪生物科技有限公司; *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司; pET-32a(+)质粒由本实验室保存; 其余常规化学试剂均为分析纯; 引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 的合成

以青稞三叶一心期的叶片为材料,用 Trizol 法提取总 RNA,然后用 Thermo 公司提供的反转录试剂盒将 RNA 反转录得到相应的 cDNA,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 *CHS* 基因的同源克隆

根据 GenBank 中已公布的大麦 *CHS* 基因(X58339.1),在 ORF 两侧分别设计扩增 *CHS* 基因的上下游引物 CHS-F 和 CHS-R(表 1)。以青稞叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。反应体系 ($30\text{ }\mu\text{L}$): cDNA $1\text{ }\mu\text{L}$, 上下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1\text{ }\mu\text{L}$, $2 \times Taq$ PCR Master Mix $15\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $12\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。

1.2.3 PCR 产物的克隆与测序

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,对目的片段进行切胶回收,并将回收产物与克隆载体 pMD19-T Simple Vector 连接,然后转化

DH5 α 感受态细胞。使用氨苄青霉素(Amp)及菌落 PCR 筛选阳性克隆,并送六合华大基因科技股份有限公司(北京)测序。

1.2.4 生物信息学分析

利用 NCBI 数据库中 BLAST 工具进行多序列比对;利用 DNAMAN 6.0 进行蛋白质翻译及同源序列比对;利用 ProtParam 软件对蛋白质理化性质进行预测;利用 SOPMA 软件对蛋白质二级结构进行预测;利用 NetNGlyc 和 NetPhos 2.0 软件对蛋白质的 N-糖基化和 N-磷酸化进行预测;利用 3D LigandSite server 对蛋白质三级结构进行预测;利用 ORF Finder 对基因编码区进行预测;利用 MEGA 5.0 构建系统进化树。

1.2.5 融合表达载体的构建

根据克隆得到的 *CHS* 基因编码区序列,利用 Primer 5.0 软件设计表达引物 HvCHSpp-F 和 HvCHSpp-R (表 1)。用引物 HvCHSpp-F/HvCHSpp-R 对 1.2.1 中反转录得到的 cDNA 进行 PCR 扩增,扩增条件及程序同 1.2.2。目的片段和 pET-32a(+)质粒分别进行双酶切。反应体系(40 μ L):10 \times Buffer 4 μ L,上下游表达引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各 1 μ L,目的片段或 pET-32a(+)质粒 20 μ L, ddH₂O 14 μ L。反应条件:37 $^{\circ}$ C 15 min,65 $^{\circ}$ C 15 min,12 $^{\circ}$ C 终止反应。将酶切产物进行电泳分析,回收纯化后,使用 T4 DNA 连接酶进行连接反应,将连接后的产物转化到 DH5 α 感受态细胞。经菌落 PCR 筛选和双酶切鉴定后,将构建的质粒命名为 pET-32a-HvCHS。其表达产物中含有 Trx,His 和 S 标签。

1.2.6 原核表达

将质粒 pET-32a-HvCHS 和空白载体 pET-32a 分别转化宿主菌 BL21(DE3),挑取阳性单克隆,接种至 10 mL 含有 Amp 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜。次日,将培养物按 1:50 的比例接种至 150 mL 含 Amp 的新鲜 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD₆₀₀ = 0.6~0.8 时,加入终浓度为 1.0 mmol \cdot L⁻¹ 的 IPTG 诱导表达 *n* h,其中 *n* 分别代表 0、1、2、3、4 和 5,即每诱导 1 h 取 1 次样,以确定最佳诱导时间。同时设立空载体诱导及未诱导作为对照。诱导后各取样 2 mL,12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 1 min,收集菌体。100 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液溶解沉淀,煮沸 10 min,12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,取上清,通过 SDS-PAGE 来检测融合蛋白的表达情况。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Information of primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度 Length of product/bp
CHS-F	CTCACATTTGTCTCGCAGCAC	1 351
CHS-R	CAAACCACGCACGGTAGAAT	
HvCHSpp-F	G <u>GAATTC</u> ATGGCGCGCAGATGAC	1 213
HvCHSpp-R	CCCAAGCTTTCACGCGGTGGCGCCGG	

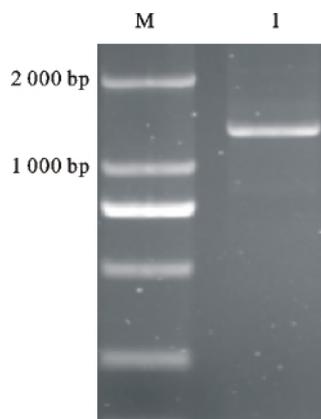
下划线处分别表示 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切位点

The sequences underlined respectively represent the restriction sites of *Eco*R I and *Hind* III

2 结果与分析

2.1 青稞 *CHS* 基因的克隆

利用引物 CHS-F/CHS-R 对青稞 94-19-1 进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,在 1 000~1 500 bp 之间有一特异性条带(图 1),大小与实验预期基本相符。将目的片段回收、克隆并测序后,利用 DNAMAN 进行序列比对及拼接得到长度为 1 351 bp 的序列。NCBI 在线 BLASTn 表明,所得到的序列与 NCBI 已公布的大麦 *CHS* 基因序列(X58339.1) 同源性最高,达到 99%,因此推断本研究克隆得到的基因为青稞来源的 *CHS* 基因,暂命名为 *HvCHS*。经 ORF Finder 分析表明,该 *CHS* 基因编码区长为 1 197 bp,编码 398 个氨基酸。



M:DL2000;1:目的基因片段

M: DL2000; 1: The target fragment

图 1 青稞 *CHS* 基因 PCR 扩增产物电泳结果
Fig. 1 Result of electrophoretogram for *CHS* gene amplification

2.2 生物信息学分析

2.2.1 蛋白质理化性质分析

ProtParam 分析结果表明,本研究克隆得到

的 *CHS* 基因推导的蛋白质的分子式为 $C_{1918}H_{3059}N_{531}O_{572}S_{24}$, 分子量为 43.479 kDa; 预测等电点 (pI) 为 5.92, 是酸性蛋白; 体外红细胞中的半衰期为 30 h, 不稳定系数(II) 大于 40 (40.10), 属于不稳定蛋白; 平均亲水指数为 -0.090, 是亲水性的蛋白。

2.2.2 蛋白质结构预测

NetNGlyc 和 NetPhos 2.0 软件预测结果表明, 本研究克隆得到的 *CHS* 基因推导的蛋白质没有糖基化位点, 而有丰富的磷酸化位点, 包括 9 个丝氨酸(Ser)、6 个苏氨酸(Thr) 和 2 个酪氨酸(Tyr) 磷酸化活性位点, 具体为: Ser⁴⁹、Ser⁶⁶、Ser¹³⁶、Ser¹⁵⁶、Ser²⁰⁷、Ser²³⁴、Ser²⁵³、Ser³³⁵、Ser³⁵⁶、Thr⁶、Thr¹³⁵、Thr²⁰⁰、Thr²⁴⁸、Thr³³⁰、Thr³⁶³、Tyr³⁹、Tyr⁴³。SOPMA 软件分析结果表明, 本研究克隆得到的 *CHS* 基因推导的蛋白质的二级结构主要由 α -螺旋(41%)、无规则卷曲(12%) 及 β -转角(15%) 组成。利用 3D LigandSite server 软件, 以 alfalfa 的 *CHS* 蛋白的三级结构为模板, 对本研究克隆得到的 *CHS* 基因推导的蛋白质进行三级结构预测, 结果如图 2 所示。

2.2.3 系统进化树分析

在同源比对的序列基础上, 加入部分被子植物 *CHS* 蛋白序列, 利用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树(图 3), 发现 *CHS* 蛋白被聚类为 2 个独立的簇: 双子叶植物(I) 和单子叶植物(II)。其中, 本研究得到的 *CHS* 蛋白与大麦之间的亲缘关系最近, 其次与小麦、水稻、高粱及玉米等单子叶植物聚在一起, 最后与葡萄等双子叶植物聚在一起。进化树分析结果与 NCBI 中 BLASTn 结果基本一致。



图 2 青稞 *CHS* 蛋白三级结构及活性中心预测
Fig. 2 Prediction of protein tertiary structure and active centre of HvCHS protein

2.3 pET-32a-*HvCHS* 的原核表达

2.3.1 pET-32a-*HvCHS* 的双酶切鉴定

将获得的重组表达质粒进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 可得 1 200 bp 左右和 5 300 bp 左右的 2 个片段(图 4), 且大小与预期结果相符, 表明构建的表达载体 pET-32a-*HvCHS* 正确。

2.3.2 青稞 *CHS* 基因的原核表达

SDS-PAGE 检测分析结果(图 5、图 6)表明, 含有重组质粒 pET-32a-*HvCHS* 的表达菌株在 37 °C 下经 1.0 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导表达 1 h 后, 即可发现约 64 kDa 处出现目的条带, 且与预测结果相符(pET-32a 上的 Trx、His 和 S 标签蛋白为 18~20 kDa, 本研究得到的 *CHS* 基因编码的蛋白分子量约为 43.4 kDa); 诱导表达 3 h 后, 目的蛋白不再增加, 说明在 IPTG 诱导浓度为 1.0 mmol · L⁻¹ 时, 最佳诱导时间为 3 h。

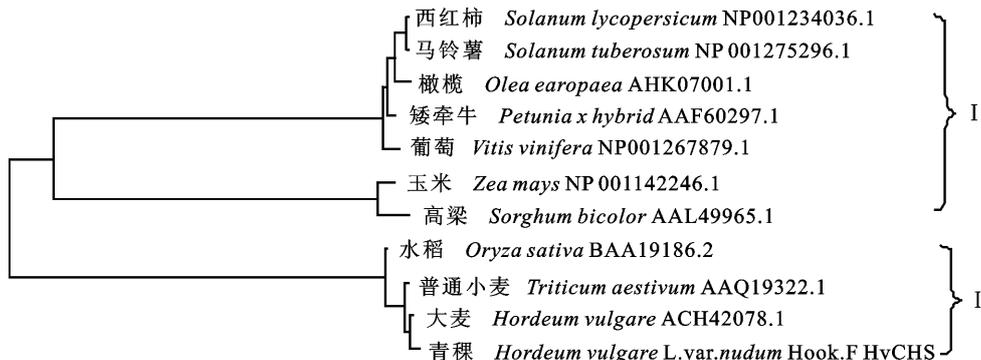
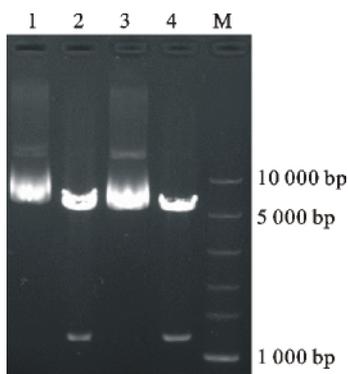


图 3 *CHS* 蛋白序列系统进化树分析
Fig. 3 Phylogenetic tree of *CHS* amino acid sequences

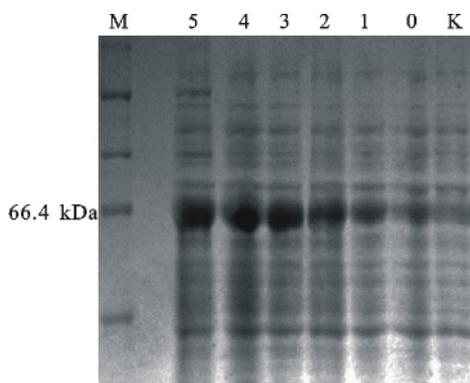


M: Super DNA marker; 1 和 3: pET-32a(+) 的双酶切产物; 2 和 4: pET-32a-*HvCHS* 的双酶切产物

M: Super DNA marker; 1 and 3: Product of double restriction digested pET-32a(+); 2 and 4: Product of double restriction digested pET-32a-*HvCHS*

图 4 pET-32a-*HvCHS* 表达体系的双酶切验证

Fig. 4 Identification of pET-32a-*HvCHS* expression system with double restriction digestion



M: 广谱蛋白 marker; 泳道 0、1、2、3、4 和 5 分别代表诱导时间为 0、1、2、3、4 和 5 h; 泳道 K 为空载体未诱导

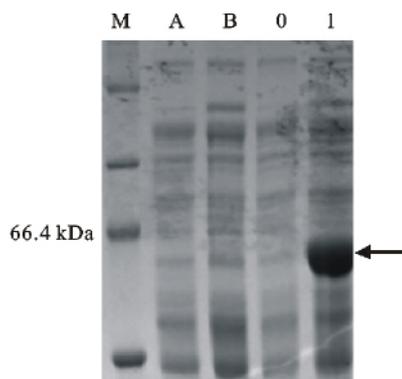
M: Protein marker; The line 0, 1, 2, 3, 4 and 5 were induced by IPTG for 0, 1, 2, 3, 4 and 5 h; The line K was pET-32a non-induced by IPTG

图 5 pET-32a-*HvCHS* 表达时间的优化

Fig. 5 Optimization of pET-32a-*HvCHS* expression time

3 讨论

CHS 基因在细菌、蕨类植物、裸子植物及被子植物中已有大量克隆研究,但在青稞中还未有报道。本研究通过同源克隆的方法获得了青稞 *CHS* 基因序列,与已知 *CHS* 基因序列比对分析发现,与大麦同源性最高^[22],编码的氨基酸仅有 2 个有所差异,与小麦的同源性也高达 96%^[23],与单子叶植物玉米^[24],双子叶植物葡萄^[25]、马铃薯^[26]等的同源性都在 65% 以上。此外,早有报道



M: 广谱蛋白 marker; A: 未诱导的空载体; B: IPTG 诱导后的空载体; 0: 未诱导的重组质粒; 1: IPTG 诱导后的重组质粒

M: Protein marker; A: pET-32a non-induced by IPTG; B: pET-32a induced by 1.0 mmol · L⁻¹ IPTG for 3 h; 0: pET-32a-*HvCHS* non-induced by IPTG; 1: pET-32a-*HvCHS* induced by 1.0 mmol · L⁻¹ IPTG for 3 h

图 6 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant protein

称该基因在植物不同科之间的同源性高达 70% ~ 90%^[27],说明 *CHS* 基因序列相当保守。进一步的系统进化树分析显示,青稞与单子叶植物的大麦、小麦的亲缘关系最近,相对双子叶植物如西红柿等关系较远,符合进化规律。

通过对植物 *CHS* 基因的改造,能使植株发生巨大变化。目前,一般有两种方法可以抑制 *CHS* 基因的活性:一种是通过反义 RNA 技术使目的基因的表达受到抑制,如洋桔梗转基因植株中花色变浅^[28];二是以共抑制技术方式向植物中转入外源目的基因,如烟草转基因植株原来粉色的花变成了白色^[29]。缺失 *CHS* 基因的矮牵牛突变体不仅不产生黄酮类化合物而且雄性不育,如果加入黄酮类物质,可使花粉管发育正常^[30]。*CHS* 基因导入植物最终还可以使植物的抗逆性得到提升,如转基因杨树对低温的敏感性会被降低^[31]。本研究克隆得到的 *CHS* 基因编码蛋白相对于大麦发生 2 个氨基酸的改变,这种改变对植株的影响还尚待研究,并且由于该研究材料为高黄酮含量,该改变还可能与黄酮化合物的代谢密切相关。

关于 *CHS* 基因的原核表达技术已相当成熟,在葡萄、大豆、蝴蝶兰、矮牵牛、葛根、非洲菊、树莓、香雪兰和红盖鳞毛蕨等多种植物中已有报道^[32],而在禾本科植物中鲜有研究。现有报道表明,IPTG 终浓度在 1.0 mmol · L⁻¹ 时,能得到

CHS 融合蛋白。37 °C 条件下,在 IPTG 浓度为 1.0 mmol · L⁻¹ 时,牛天敏等^[33] 诱导 1、3 和 5 h 后经 SDS-PAGE 检测有特异性蛋白条带出现,蛋白在 3 h 蛋白表达量达到最大并不再增加;韩颖颖等^[34] 诱导 1 h 和 2 h 后经 SDS-PAGE 检测均得到特异性蛋白条带。本实验设定 IPTG 终浓度为 1.0 mmol · L⁻¹,采用 pET-32a 载体与 *CHS* 基因重组的原核表达技术,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中首次表达出了青稞 pET-32a-*HvCHS* 融合蛋白。通过对 *HvCHS* 蛋白原核表达诱导时间进行优化,发现 3 h 为最佳诱导时间,与牛天敏等^[33] 研究结果一致。蛋白表达最佳条件的确定,对进一步蛋白质的纯化及后续功能研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Liu X J (刘仙俊). The research on molecular biology of special germplasm resources in barley [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University (雅安:四川农业大学), 2011 (in Chinese with English abstract).
- [2] Wu K L (吴昆仑). A review of researches on shanlan upland rice in China [J]. *Crops (作物杂志)*, 2008(2): 15-17 (in Chinese with English abstract).
- [3] Baik B K, Ullrich S E. Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest [J]. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48(2): 233-242.
- [4] Li Y L, Long C L, Kato K, et al. Indigenous knowledge and traditional conservation of hullless barley (*Hordeum vulgare*) germplasm resources in the Tibetan communities of Shangri-la, Yunnan, SW China [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2011, 58(5): 645-655.
- [5] Qian J W, Jiang S P, Su W T, et al. Characteristics of oil from hullless barley (*Hordeum vulgare* L.) bran from Tibet [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2009, 86(12): 1175-1179.
- [6] Wasson A P, Pellerone F I, Mathesius U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(7): 1617-1629.
- [7] Kobayashi H, Naciri-Graven Y, Broughton W J, et al. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234 [J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(2): 335-347.
- [8] Barry K M, Davies N W, Mohammed C L. Effect of season and different fungi on phenolics in response to xylem wounding and inoculation in *Eucalyptus nitens* [J]. *Forest Pathology*, 2002, 32(3): 163-178.
- [9] Mol J, Grotewold E, Koes R. How genes paint flowers and seeds [J]. *Trends Plant Science*, 1998, 3: 212-217.
- [10] Elangovan V, Sekar N, Govindasamy S. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis [J]. *Cancer Letters*, 1994, 87(1): 107-113.
- [11] Cheng C G (陈春刚), Han F X (韩芬霞). Research and application of bio-flavonoids [J]. *Journal of Anhui Agricultural Science (安徽农业科学)*, 2006, 34(13): 2949-2951 (in Chinese with English abstract).
- [12] Deng X, Bashandy H, Ainasoja M, et al. Functional diversification of duplicated chalcone synthase genes in anthocyanin biosynthesis of *Gerbera hybrida* [J]. *New Phytologist*, 2014, 201(4): 1469-1483.
- [13] Han Y, Zhao W, Wang Z, et al. Molecular evolution and sequence divergence of plant chalcone synthase and chalcone synthase-like genes [J]. *Genetica*, 2014, 142(3): 215-225.
- [14] Reimold U, Kroeger M, Kreuzaler F. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase messenger RNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme [J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1983, 2(10): 1801-1806.
- [15] Sommer H, Saedler H. Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus* [J]. *Molecular General Genetics*, 1986, 202(3): 429-434.
- [16] Yang J B, Tian X, Li D Z, et al. Molecular composition and evolution of the chalcone synthase (*CHS*) gene family in five species of *Camellia* (Theaceae) [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(6): 659-666.
- [17] Koes R E, Spelt C E, Reif H J, et al. Floral tissue of *Petunia hybrida* (V30) expresses only one member of the chalcone synthase multigene family [J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(13): 5229-5239.
- [18] Knogge W, Schmelzer E, Weissenbeck G. The role of chalcone synthase in the regulation of flavonoid biosynthesis in developing oat primary leaves [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, 250(2): 364-372.
- [19] Mahroug S, Courdavault V, Thiersault M, et al. Epidermis is a pivotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs [J]. *Planta*, 2006, 223(6): 1191-1200.
- [20] Napoli C A, Fahy D, Wang H Y, et al. White anther: a petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(2): 615-622.
- [21] Yu C L (余春磊), Qi G C (齐国昌), Zhang K F (张鹏飞), et al. Studies on the accumulation of four major flavonoids after flowering in barley [J]. *Journal of Triticeae Crops (麦类作物学报)*, 2014, 34(2): 222-226 (in Chinese with English abstract).
- [22] Rohde W, Dörr S, Salamini F, et al. Structure of a chalcone synthase gene from *Hordeum vulgare* [J]. *Plant Molecular*

- Biology*, 1991, 16(6): 1103-1106.
- [23] Kawaura K, Mochida K, Enju A, *et al.* Assessment of adaptive evolution between wheat and rice as deduced from full-length common wheat cDNA sequence data and expression patterns [J]. *BioMed Central Genomics*, 2009, 10(1): 271.
- [24] Franken P, Niesbach-Klöggen U, Weydemann U, *et al.* The duplicated chalcone synthase genes *C2* and *Whp* (*white pollen*) of *Zea mays* are independently regulated; evidence for translational control of *Whp* expression by the anthocyanin intensifying gene *in* [J]. *The EMBO Journal*, 1991, 10(9): 2605.
- [25] Sparvoli F, Martin C, Scienza A, *et al.* Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 24(5): 743-755.
- [26] Jeon J H, Kim H S, Choi K H, *et al.* Cloning and characterization of one member of the chalcone synthase gene family from *Solanum tuberosum* L. [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60(11): 1907-1910.
- [27] Lanz T, Tropsch S, Marner F J, *et al.* The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, two key enzymes in different plant-specific pathways [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(15): 9971-9976.
- [28] Derolles S C, Bradley J M, Schwinn K E, *et al.* An antisense chalcone synthase cDNA leads to novel colour patterns in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) flowers [J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4(1): 59-66.
- [29] Wang C K, Chen P Y, Wang H M, *et al.* Cosuppression of tobacco chalcone synthase using *Petunia* chalcone synthase construct results in white flowers [J]. *Botanical Studies*, 2006, 47: 71-82.
- [30] Pollak P E, Vogt T, Mo Y, *et al.* Chalcone synthase and flavonol accumulation in stigmas and anthers of *Petunia hybrida* [J]. *Plant Physiology*, 1993, 102(3): 925-932.
- [31] Zhang D Q (张党权), Tan X F (谭晓风), Wang X H (王晓红). Gene characteristics and transgenic application of chalcone synthase and chalcone isomerase [J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology* (中南林业科技大学学报), 2007, 27(2): 87-91 (in Chinese with English abstract).
- [32] Chen J Y (陈俊毅), Chai Y R (柴友荣), Yao Y H (姚永宏). Protein expression technologies, structure, activity and evolution of chalcone synthase [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* (西南农业学报), 2012, 25(1): 328-336 (in Chinese with English abstract).
- [33] Niu T M (牛天敏), Ma H Q (马会勤), Cheng S W (陈尚武). Cloning and expression of chalcone synthase (CHS) of *Glycine max* L. and analysis of its metabolize produce in the extracts from *Saussurea* spp. [J]. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2007, 27(2): 58-63 (in Chinese with English abstract).
- [34] Han Y Y (韩颖颖), Ming F (明凤), Wang J W (王敬文), *et al.* The cloning and identification of chalcone synthase gene cDNA of *Phalaenopsis* and its expression in *E. coli* [J]. *Journal of Fudan University* (复旦学报), 2004, 43(2): 235-239 (in Chinese with English abstract).