



DOI:10.14188/j.ajsh.20260301001

大齿牛果藤中 *CHS* 基因家族鉴定与分析

王若彤, 杜瑞豪, 沈晓凤, 孙超, 罗红梅, 李滢*

(中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100193)

摘要: 藤茶基原植物大齿牛果藤(*Nekemias grossedentata*)富含黄酮类化合物, 查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)是黄酮合成途径的首个关键限速酶。基于基因组与转录组数据, 对其全基因组 *CHS* 基因家族进行系统鉴定和综合分析。结果显示, 共鉴定出 28 个 *CHS* 成员(*NgCHS*), 不均匀分布于 7 条染色体, 存在明显串联复制现象, 提示串联复制是 *NgCHS* 家族扩张的主要驱动力。进化分析将 *CHS* 分为 4 个亚组, *NgCHS2* 和 *NgCHS7* 与拟南芥 *AtCHS* 聚为一类, 推测为功能性 *CHS* 候选基因。保守基序与基因结构分析证实该家族高度保守。顺式作用元件分析表明, *NgCHS* 可能参与光响应、激素调控及非生物胁迫应答。组织表达谱分析筛选出幼叶高表达的 *NgCHS2* 和 *NgCHS7*; 酶活性检测表明, *NgCHS7* 可催化对香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 缩合生成产物柚皮素查尔酮, 具备典型查尔酮合酶功能。系统揭示了大齿牛果藤 *CHS* 基因家族的成员构成、进化特征及其酶催化功能, 为黄酮代谢调控机制解析及高黄酮含量藤茶的分子育种提供了基因资源和理论依据。

关键词: 藤茶; 大齿牛果藤; 查尔酮合酶; 基因家族分析; 黄酮合成途径

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2026)02-0167-12

Identification and analysis of the *CHS* gene family in *Nekemias grossedentata*

WANG Ruotong, DU Ruihao, SHEN Xiaofeng, SUN Chao, LUO Hongmei, LI Ying*

(State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: *Nekemias grossedentata*, the original plant of vine tea, is rich in flavonoids, in which chalcone synthase (CHS) acts as the first key rate-limiting enzyme in the biosynthetic pathway. Based on genome and transcriptome data, this study systematically identified and comprehensively analyzed the genome-wide *CHS* gene family for the first time. The results revealed a total of 28 *CHS* members (*NgCHS*), which were unevenly distributed across seven chromosomes, with evident tandem duplication events, suggesting that tandem duplication serves as the primary driving force for *NgCHS* family expansion. Phylogenetic analysis classified the *CHS* genes into four subgroups, with *NgCHS2* and *NgCHS7* clustering together with *AtCHS* from *Arabidopsis thaliana*, suggesting that they are candidate functional *CHS* genes. Conserved motif and gene structure analysis confirmed that the family was highly conserved. Cis-acting element analysis showed that *NgCHS* may be involved in light response, hormone regulation and abiotic stress response. Tissue expression profiling analysis revealed that *NgCHS2* and *NgCHS7* were highly expressed in young leaves, which is consistent with the results of phylogenetic analysis. Enzyme activity assay demonstrated that *NgCHS7* catalyzes the condensation of *p*-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA to produce naringenin chalcone, exhibiting typical chalcone synthase activity. This study systematically reveals, for the first time, the member composition, evolutionary characteristics, and enzy-

收稿日期: 2026-03-01 修回日期: 2026-04-03 接受日期: 2026-04-15

作者简介: 王若彤(2002-), 女, 硕士生, 研究方向为黄酮化合物的生物合成, E-mail: wangruotong@implad.ac.cn

* 通信作者: 李滢(1981-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为本草基因组学、生物信息学, E-mail: liying@implad.ac.cn

基金项目: 名贵中药资源可持续利用能力建设项目(2060302); 北京市自然科学基金(7254483)

引用格式: 王若彤, 杜瑞豪, 沈晓凤, 等. 大齿牛果藤中 *CHS* 基因家族鉴定与分析[J]. 生物资源, 2026, 48(2): 167-178.

Wang R T, Du R H, Shen X F, et al. Identification and analysis of the *CHS* gene family in *Nekemias grossedentata* [J]. Biotic Resources, 2026, 48(2): 167-178.

matic function of the *CHS* gene family in *N. grossedentata*. These findings provide key genetic resources and a theoretical basis for deciphering the regulatory mechanisms of flavonoid metabolism and for the molecular breeding of high-flavonoid vine tea.

Key words: vine tea; *Nekemias grossedentata*; chalcone synthase; gene family analysis; flavonoid biosynthesis pathway

0 引言

大齿牛果藤 (*Nekemias grossedentata* (Hand. - Mazz.) J. Wen & Z. L. Nie), 是葡萄科 (Vitaceae) 牛果藤属 (*Nekemias*) 植物, 其茎叶是制作藤茶的原料。因富含黄酮类化合物, 藤茶素有“黄酮之王”的美誉^[1], 具有清热解毒、止咳化痰、活血保肝、祛风除湿等功效^[2]。凭借其优秀的药用与食用价值, 藤茶自2013年起已被收录为新食品原料^[3]。大齿牛果藤富含黄酮类、酚类、甾体类、萜类、水溶性多糖等多种活性成分, 其中黄酮类化合物含量最高。目前已从其中分离出约30种黄酮类物质, 包括二氢杨梅素、槲皮素、杨梅素、橙皮苷和芹菜素等^[4], 其中二氢杨梅素含量最高, 是其药用功效的主要成分。

黄酮类化合物的合成途径简述如下: 葡萄糖首先经由莽草酸途径转化为苯丙氨酸, 然后在苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 的作用下转化为反式肉桂酸, 再经肉桂酸-4-羟化酶 (cinnamate 4-hydroxylase, C4H) 催化生成对香豆酸。随后, 对香豆酸在4-香豆酸辅酶A连接酶 (4-coumarate: CoA ligase, 4CL) 的作用下转化为对香豆酰辅酶A, 该物质在查尔酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 的催化下与3分子丙二酰辅酶A缩合生成柚皮素查尔酮, 再经查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 催化生成柚皮素^[5-6]。在大齿牛果藤中, 柚皮素进一步通过黄烷酮3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H) 和黄酮3', 5'-羟化酶 (flavonoid 3', 5'-hydroxylase, F3' 5'H) 转化为二氢杨梅素, 最后经由黄酮醇合成酶 (flavonol synthase, FLS) 生成杨梅素^[7]。CHS (EC 2.3.1.74) 属于Ⅲ型聚酮合酶家族, 是该家族首个被确认的成员, 是黄酮类化合物合成途径中的关键限速酶, 其基因家族成员组成与表达模式直接影响黄酮积累水平。此外, *CHS* 的表达受到多种因素的诱导, 包括可见光/紫外光、植物病原菌、植物激素、非生物胁迫和生物钟等^[8]。自1983年首个 *CHS* 基因在欧芹中被克隆发现^[9]以来, 多个物种中, 如百合、矮牵牛、紫花苜蓿、水稻和玉米等, *CHS* 已得到功能验证^[10]。截至2026年1月, UniProt数据库已累计收录超17万条含 *CHS* 核心结构域 (PF00195 和 PF02797) 的蛋白序列, 但经过具备功能表征支持的记录仅有22条。

大齿牛果藤因其黄酮含量极高被誉为“黄酮之王”, 但其高黄酮含量的分子机制尚未明确, 限制了其种质资源的开发和利用。*CHS* 是黄酮类化合物生物合成途径的首个关键限速酶, 直接决定黄酮类化合物的积累水平。因此, 对大齿牛果藤 *CHS* 基因家族研究具有重要的科学价值与应用前景。虽然已有研究对大齿牛果藤中一个 *CHS* 基因进行了克隆^[11], 但仍缺乏全基因组水平的 *CHS* 基因家族系统分析。本研究基于大齿牛果藤基因组^[12]和转录组数据, 利用生物信息学的方法, 全面鉴定大齿牛果藤 *CHS* 基因家族成员, 并对家族各成员的理化性质、亚细胞定位、基因结构和系统进化等进行深入分析。此外, 结合转录组基因表达分析, 筛选并克隆了2条在幼叶中高表达的候选基因。本研究为后续的 *CHS* 基因功能验证奠定了基础, 并为揭示大齿牛果藤中高黄酮含量的分子机制研究和分子育种工作提供了理论参考。

1 材料和方法

1.1 NgCHS基因家族成员鉴定及理化性质分析

以拟南芥 *CHS* 基因的氨基酸序列为参考序列, 利用BLASTp工具将其与大齿牛果藤的氨基酸序列进行对比, 初步筛选出候选同源序列后, 再对获得的候选基因反向使用BLASTp。获得NgCHS基因成员, 再到Interpro和CDD数据库进行结构域预测。删除不包括 *CHS* 基因结构域的成员。通过ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线网址分析NgCHS蛋白理化性质, 包括编码氨基酸的数量、相对分子质量、理论等电点、不稳定指数、脂肪族指数和亲疏水性; 使用Euk-mPLoc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>) 预测NgCHS蛋白亚细胞定位^[14]。

1.2 NgCHS基因家族染色体定位和共线性分析

利用TBtools软件的Gene Location模块, 根据大齿牛果藤基因组注释文件信息, 分析NgCHS家族基因在染色体上的分布情况。在Phytozome植物基因组资源网站 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 下载拟南芥基因组 (版本号TAIR11)、葡萄T2T版本基因组^[15]。使用基因组的序列文件和注释文件, 利用TBtools中的One Step MCScanX模块

进行共线性预测,该分析自动调用blast计算同源基因对,比对阈值 $E < 1 \times 10^{-10}$,保留得分最高的5个比对结果。最小共线性区块包含基因对的数目设置为30。

1.3 NgCHS基因家族进化树构建

对拟南芥在基因组水平上搜集CHS基因家族成员,并根据文献报道确认拟南芥中已经被功能表征的CHS。使用mafft软件对两个物种的CHS蛋白序列进行多序列比对;使用trimal对多序列比对文件进行修剪,修剪参数-automated1;使用IQ-TREE评估最优模型,并构建最大似然树,bootstrap设置为1 000;利用ITOL在线网站(<https://itol.embl.de/>)对构建进化树进行可视化。

1.4 NgCHS基因家族保守基序及基因结构分析

使用MEME在线网站(<http://meme-suite.org/>)对NgCHS家族成员进行蛋白质保守基序分析。根据CHS基因注释文件中exon/intron坐标数据,利用TBtools软件的Visualize Gene Structure增强模块对基因结构、进化树和蛋白保守基序进行整体可视化^[16]。

1.5 NgCHS基因家族顺式作用元件分析

根据基因组注释文件,提取每个CHS基因ATG上游2 000 bp,利用PlantCARE在线分析工具,对NgCHS基因启动子区域的顺式作用元件分析,通过TBtools的软件PlantCARE result Classify模块对结果进行可视化^[17-18]。

1.6 NgCHS在不同组织中的表达分析

本研究通过搜集公共数据库中大齿牛果藤叶片转录组原始数据,选取标注了叶片生长阶段(幼叶和老叶)的数据^[19-20](SRR11196240-SRR11196244, SRR11211564, SRR11211565, SRR11211567, SRR11211569, SRR11211571-SRR11211574);同时,以大齿牛果藤叶芽作为实验材料,提取RNA并使用Illumina测序平台进行转录组测序。使用fastp对原始数据进行过滤,使用Hisat2比对过滤后的clean reads到大齿牛果藤基因组,根据mapping结果,使用StringTie对基因表达量TPM值进行计算。利用TBtools软件的HeatMap模块绘制CHS基因的表达量热图。对原始TPM数据分别进行按行与按列的标准化(Scale)处理,以直观展示同一CHS基因在不同样本中的表达差异,以及同一样品中各CHS基因家族成员的表达差异。

1.7 大齿牛果藤NgCHS基因克隆

选取大齿牛果藤的嫩芽组织,液氮冷冻后-80℃保存。采用多糖多酚植物总RNA提取试剂

盒(DP441)提取总RNA,经琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop验证完整性与纯度后,采用反转录试剂盒(全式金,AH311-02)合成cDNA,2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)(诺维赞,P515)进行基因扩增,Universal DNA Purification Kit(天根生化,DP214)进行胶回收,连接M5 HiPer pTOPO-Blunt Simple Vector载体(聚合美)后转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,涂布含氨苄青霉素的LB固体琼脂培养基筛选单菌落。经PCR验证阳性克隆后测序,比对确认NgCHS2和NgCHS7基因全长编码区序列。

1.8 NgCHS7蛋白纯化

将扩增出的NgCHS7基因片段用相应的限制性内切酶酶切后连接到pET32a载体中。将NgCHS7-pET32a的重组质粒和空pET32a质粒转化到大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中进行原核表达,挑选阳性克隆扩大培养,使用IPTG成功诱导出重组蛋白,收集菌液并进行破碎后保留上清液,之后使用BeyoGold™ His-tag Purification Resin(耐还原螯合型)进行蛋白纯化。纯化后的蛋白用SDS-PAGE电泳法进行分析^[21]。

1.9 NgCHS7功能鉴定分析

200 μL酶促反应体系包括100 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.5),50 μmol/L对香豆酰辅酶A,100 μmol/L丙二酰辅酶A和0.75 μg纯化的重组蛋白。空载pET32a表达的蛋白作为阴性对照。将上述反应体系置于35℃下孵育1 h,然后用等体积的乙酸乙酯萃取两次,使用氮吹仪将乙酸乙酯吹干后加入200 μL 80%甲醇溶解样品,使用0.22 μm滤膜过滤制备,样品转移至液相小瓶中用于检测分析^[22-23]。

使用超高效液相色谱仪对样品进行检测,具体液相条件为:色谱柱:Waters UPLC BEH C18 1.7 μm 2.1×100 mm;流动相:A相为色谱级甲醇,B相为0.1%甲酸水;流速:0.25 mL/min,柱温:25℃,检测波长:290 nm,进样量:5.0 μL。洗脱条件如下:2 min,5%A;2~3 min,40%A;3~12 min,50%A;12~13 min,95%A;13.5 min,5%A;16.5 min,5%A。

2 结果与分析

2.1 大齿牛果藤NgCHS基因的鉴定和编码蛋白理化性质分析

本研究首先基于大齿牛果藤基因组数据进行系统分析,通过blast同源比对和hmmscan结构阈搜索,共鉴定得到28个CHS基因(NgCHS1-28)。利

用 ProtParam 在线工具,对这 28 个 NgCHS 蛋白的理化性质进行全面预测,相关结果详见表 1。分析结果显示,28 个 *NgCHS* 基因的编码区(CDS)长度多数存在一致性特征,其编码的氨基酸数量介于 329~395 个之间,其中 *NgCHS19* 编码的氨基酸数量最多(395 个),*NgCHS11* 编码的氨基酸数量最少(329 个),呈现出一定的序列长度差异。蛋白质相对分子质量预测结果表明,其变动范围为 35,857.42 Da(*NgCHS11*)至 43,240.63 Da(*NgCHS1*)。理论等电点(pI)分析显示,所有 NgCHS 蛋白的 pI 值分布在 5.74~7.11,呈现出酸性为主、少数成员呈现中性或弱碱性:仅 *NgCHS13*、*NgCHS21* 及 *NgCHS27* 的 pI 值略高于 7.0,表现为弱碱性;其余 25 个蛋白的 pI 值均低于 7.0,属于酸性蛋白。不稳定指数分析结

果表明,28 个 NgCHS 蛋白的不稳定指数介于 33.39~55.43,其中 *NgCHS5*、*NgCHS8*、*NgCHS14* 及 *NgCHS21* 的不稳定指数大于 40(最高值为 55.43),为不稳定蛋白;剩余 24 个成员的不稳定指数均低于 40,为稳定蛋白,表明多数 NgCHS 蛋白具有稳定的结构特征。经过 Euk-mPLoc2.0 在线工具分析 NgCHS 的亚细胞定位,预测结果显示,多数的 NgCHS 定位在细胞质中,*NgCHS7*、*NgCHS8* 和 *NgCHS9* 定位在叶绿体和细胞质中,详见表 1。

2.2 大齿牛果藤 *NgCHS* 基因染色体定位及共线性分析

利用 TBtools 软件 Gene Location 模块构建大齿牛果藤 *NgCHS* 基因详细的染色体位置图(图 1)。结果显示,28 个 *NgCHS* 基因分布在 7 条染色体上,

表 1 大齿牛果藤 *NgCHS* 蛋白理化性质及亚细胞定位
Tab. 1 Physicochemical properties and subcellular localization of *NgCHS* protein in *N. grossedentata*

基因 id	CDS 长度/bp	氨基酸数量	理论等电点	相对分子质量/Da	不稳定指数	脂肪族指数	亲疏水性	亚细胞定位
<i>NgCHS1</i>	1 185	394	5.97	43 240.63	39.13	91.35	-0.189	细胞质
<i>NgCHS2</i>	1 170	389	6.04	42 606.19	38.23	89.95	-0.135	细胞质
<i>NgCHS3</i>	1 179	392	6.77	42 986.68	39.45	96.05	-0.025	细胞质
<i>NgCHS4</i>	1 179	392	6.53	42 853.48	39.16	94.57	-0.036	细胞质
<i>NgCHS5</i>	1 179	392	6.11	42 930.51	41.26	94.85	-0.050	细胞质
<i>NgCHS6</i>	1 179	392	6.33	42 825.41	35.78	96.58	-0.012	细胞质
<i>NgCHS7</i>	1 182	393	6.10	42 755.44	33.39	96.03	-0.021	叶绿体、细胞质
<i>NgCHS8</i>	1 179	392	6.41	43 212.08	55.43	91.33	-0.138	叶绿体、细胞质
<i>NgCHS9</i>	1 173	390	5.74	42 917.91	34.77	94.49	0.053	叶绿体、细胞质
<i>NgCHS10</i>	1 179	392	6.34	42 782.36	37.41	95.08	-0.031	细胞质
<i>NgCHS11</i>	990	329	5.94	35 857.42	38.94	99.60	0.019	细胞质
<i>NgCHS12</i>	1 179	392	6.77	42 826.46	37.86	94.31	-0.046	细胞质
<i>NgCHS13</i>	1 179	392	7.11	42 952.62	36.56	94.54	-0.054	细胞质
<i>NgCHS14</i>	1 179	392	6.53	42 909.55	40.16	95.82	-0.035	细胞质
<i>NgCHS15</i>	1 179	392	6.34	42 782.36	37.41	95.08	-0.031	细胞质
<i>NgCHS16</i>	1 179	392	6.77	42 779.39	39.40	96.07	-0.026	细胞质
<i>NgCHS17</i>	1 179	392	6.52	42 853.36	39.61	94.82	-0.074	细胞质
<i>NgCHS18</i>	1 188	395	6.33	43 029.61	39.51	96.35	-0.010	细胞质
<i>NgCHS19</i>	1 188	395	6.18	43 072.64	39.32	95.11	-0.03	细胞质
<i>NgCHS20</i>	1 179	392	6.33	42 726.19	37.79	95.08	-0.039	细胞质
<i>NgCHS21</i>	1 032	343	7.07	37 478.28	40.90	96.18	-0.037	细胞质
<i>NgCHS22</i>	1 179	392	6.57	42 833.35	38.31	94.08	-0.060	细胞质
<i>NgCHS23</i>	1 179	392	6.39	42 905.42	39.55	94.08	-0.068	细胞质
<i>NgCHS24</i>	1 188	395	6.57	43 152.73	38.41	93.37	-0.058	细胞质
<i>NgCHS25</i>	1 179	392	6.77	42 868.44	37.28	93.83	-0.068	细胞质
<i>NgCHS26</i>	1 179	392	6.77	42 838.41	37.28	94.08	-0.062	细胞质
<i>NgCHS27</i>	1 179	392	7.11	42 866.51	37.06	94.34	-0.062	细胞质
<i>NgCHS28</i>	1 179	392	6.76	42 810.36	39.51	95.08	-0.053	细胞质

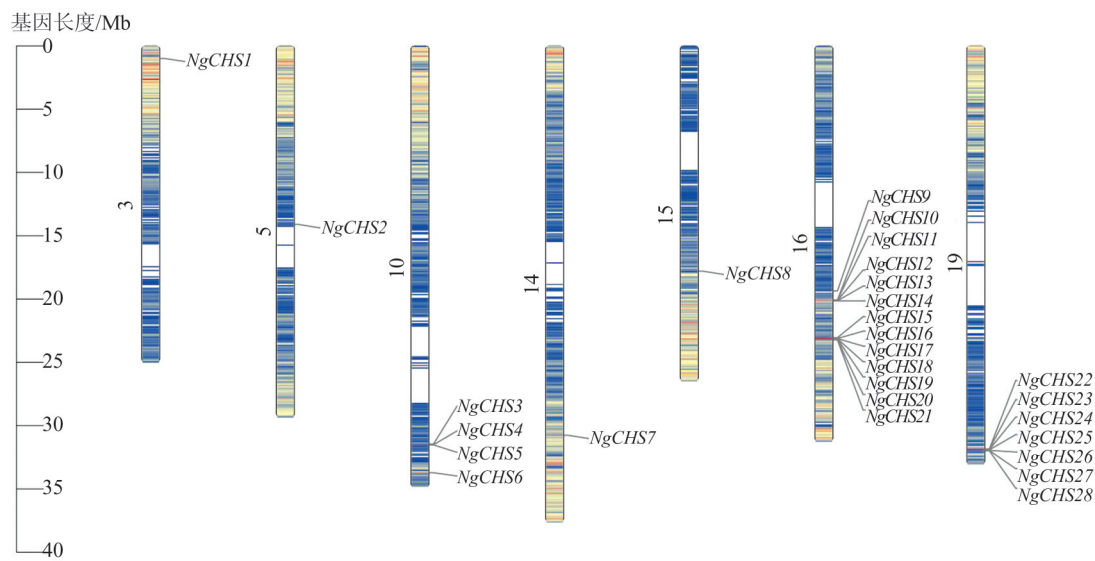


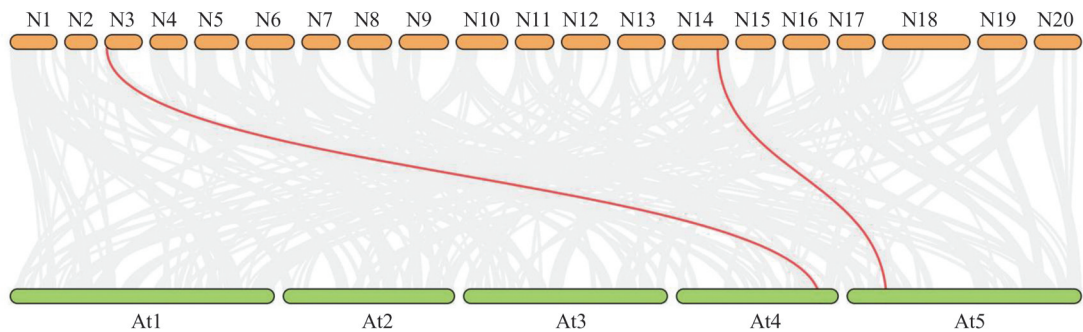
图1 大齿牛果藤 *NgCHS* 基因在染色体中的定位

Figure 1 Mapping of *NgCHS* gene in chromosome of *N. grossedentata*

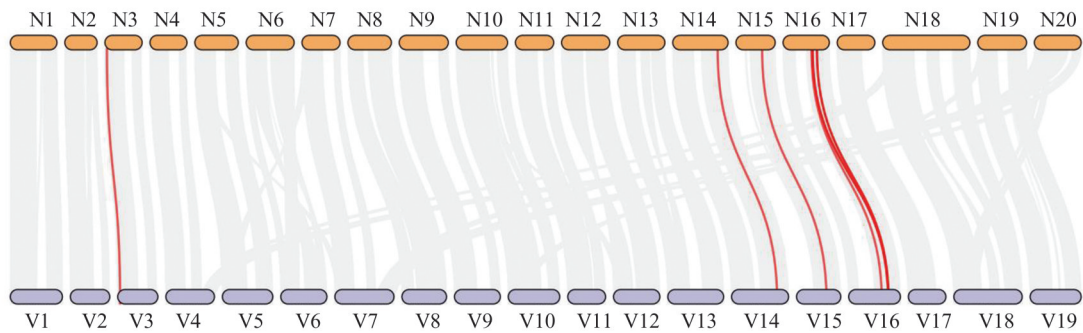
呈现不均匀分布。其中,16号染色体上数量最多,有13个 *NgCHS* 基因;其次为19和10号染色体,分别有7和4个基因;3、5、14和15号染色体上各有1个基因。进一步分析发现,位于10号、16号和19号染色体上的 *NgCHS* 基因呈现簇状分布,表现为明显的串联复制 (tandem duplication) 现象。

利用 TBtools 软件 MCSanX 模块对大齿牛果

藤分别与葡萄、拟南芥之间进行共线性分析,查找 *CHS* 基因家族成员是否位于共线性区块上(图2)。通过比较不同物种间的共线性关系,能够明确大齿牛果藤 *CHS* 基因所在染色体区域在进化过程中的保守性,从而为进一步的功能研究提供线索。共线性分析结果显示,大齿牛果藤与拟南芥之间有2对共线性基因对,分别是 *NgCHS1* vs. *AT4G34850* 和



(a) 大齿牛果藤 *NgCHS* 基因与拟南芥共线性分析



(b) 大齿牛果藤 *NgCHS* 基因与葡萄共线性分析

图2 大齿牛果藤 *NgCHS* 基因与拟南芥和葡萄共线性分析

Figure 2 Collinearity analysis of *NgCHS* gene with *Arabidopsis thaliana* and *Vitis vinifera*

NgCHS7 vs. AT5G13930;与葡萄之间有8对共线性基因对,分别是 NgCHS1 vs. Vitis03g00125、NgCHS7 vs. Vitis14g01784、NgCHS8 vs. Vitis15g00777、NgCHS9 vs. Vitis16g00940、NgCHS11 vs. Vitis16g01227、NgCHS13 vs. Vitis16g01219、NgCHS16 vs. Vitis16g01246 和 NgCHS18 vs. Vitis16g01252。

2.3 大齿牛果藤 NgCHS 基因进化树分析

为明确 NgCHS 蛋白的进化关系,本研究基于大齿牛果藤和拟南芥的 CHS 家族构建系统进化树(图3)。拟南芥全基因组共有4个 CHS 家族成员,

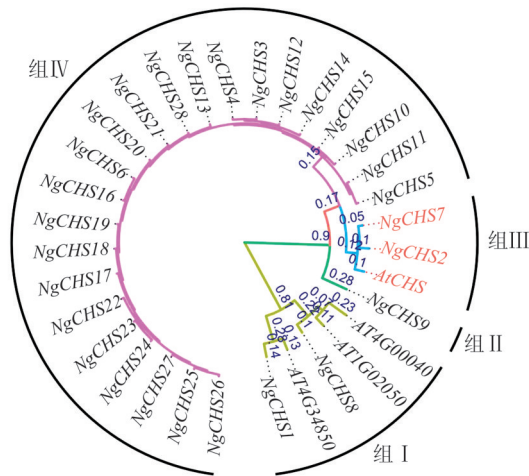


图3 大齿牛果藤与拟南芥CHS进化分析

Figure 3 Phylogenetic analysis of NgCHS and AtCHS

其中仅 AtCHS(AT5G13930, XP_002271371)为功能性 CHS。系统发育分析表明,大齿牛果藤和拟南芥 CHS 家族蛋白可分4个亚组:组 I 包含5个成员,组 II 包含1个成员,组 III 包含3个成员,组 IV 包含23个成员。其中,组 III 中包含来自大齿牛果藤 NgCHS2、NgCHS7 和来自拟南芥 AtCHS,共3个成员,表明 NgCHS2 和 NgCHS7 可能与拟南芥中已被功能表征的 CHS 具有相同的进化起源。进化树分支上的数值表示该分支对应节点上的蛋白序列之间的进化距离(仅标注大于0.03的分支),进一步支持了上述分组结构的可靠性。

2.4 大齿牛果藤 NgCHS 基因结构和编码蛋白保守基序分析

为探究 NgCHS 基因家族成员的基因结构特征和编码蛋白的功能,本研究对大齿牛果藤 NgCHS 基因的外显子和内含子组成,以及基因编码蛋白的保守基序(Motif)进行了系统分析(图4)。研究发现,大多数植物的 CHS 基因含有一个位置保守的内含子,本研究结果与之高度一致,绝大多数大齿牛果

藤 NgCHS 基因均含2个外显子和1个内含子,展现了该基因家族结构的保守性。值得注意的是,NgCHS11 缺失内含子,而 NgCHS9 和 NgCHS7 的内含子序列长度最短,呈现出独特的结构变异特征。保守基序分析共鉴定出10个基序(Motif 1~10)。综合进化分析发现,大齿牛果藤 NgCHS 基序组成模式与进化分组高度相关,同亚组内的成员具有高度相似的保守基序组成模式。进一步分析发现, Motif 1、2、4、6 和 10 为所有 NgCHS 共有的核心保守基序;而 Motif 7 仅特异性存在于组 III 和组 IV 中。据此推测,这些共有基序可能对 CHS 的基本功能至关重要,而特异性基序可能赋予了不同亚组 CHS 独特的生物学功能。本分析为后续揭示基因结构与蛋白功能之间的关联提供了重要依据。

2.5 大齿牛果藤 NgCHS 基因启动子区顺式作用元件分析

本研究对28个 NgCHS 基因上游2 000 bp 的启动子区域进行顺式作用元件分析(图5)。在这28个 NgCHS 基因的启动子中,除了真核生物基因转录基本元件(TATA-box、CAAT-box)外,依据功能可将其他元件划分为4大类:光响应元件(包括 Box II、chs-CMA1a、chs-CMA2a、GA-motif、Gap-box、GA-TA-motif、GTGGC-motif、I-box、LAMP-element、TCCC-motif、TCT-motif、ATC-motif、AE-box、ATCT-motif、ACE、G-Box、3-AF1 binding site、Sp1、MRE)、激素响应元件(包括 GT1-motif、TGACG-motif、TATC-box、GARE-motif、P-box、TGA-box、TGA-element、AuxRR-core、AuxRE、TCA-element、ABRE)、非生物胁迫响应元件(包括 LTR、WUN-motif、TC-rich repeats、MBS、ARE、GC-motif)以及生长发育响应元件(包括 GCN4-motif、AACA-motif)。其中,光响应元件213个,激素响应元件共206个,非生物胁迫响应元件115个,发育相关元件8个。大齿牛果藤 NgCHS 基因家族的28个成员均含有光响应元件,表明光信号可能是调控 NgCHS 家族基因表达的重要环境因子,在光响应元件中,G-box 元件数量最多,达到111个,占比52.11%; TCT-motif 元件次之,有16个,占比7.51%;最少的是 GTGGC-motif 和 ATC-motif 元件,均有1个,占比0.47%。激素响应元件中, ABRE 元件数量最多,有103个,占比50.00%; GT1-motif 和 TGACG-motif 元件次之,分别有30和26个,占比14.56%和12.62%;最少的是 TGA-box 元件,仅含有1个,占比0.49%。非生物胁迫响应元件中, ARE 元件数量最多,达40个,占比34.78%;

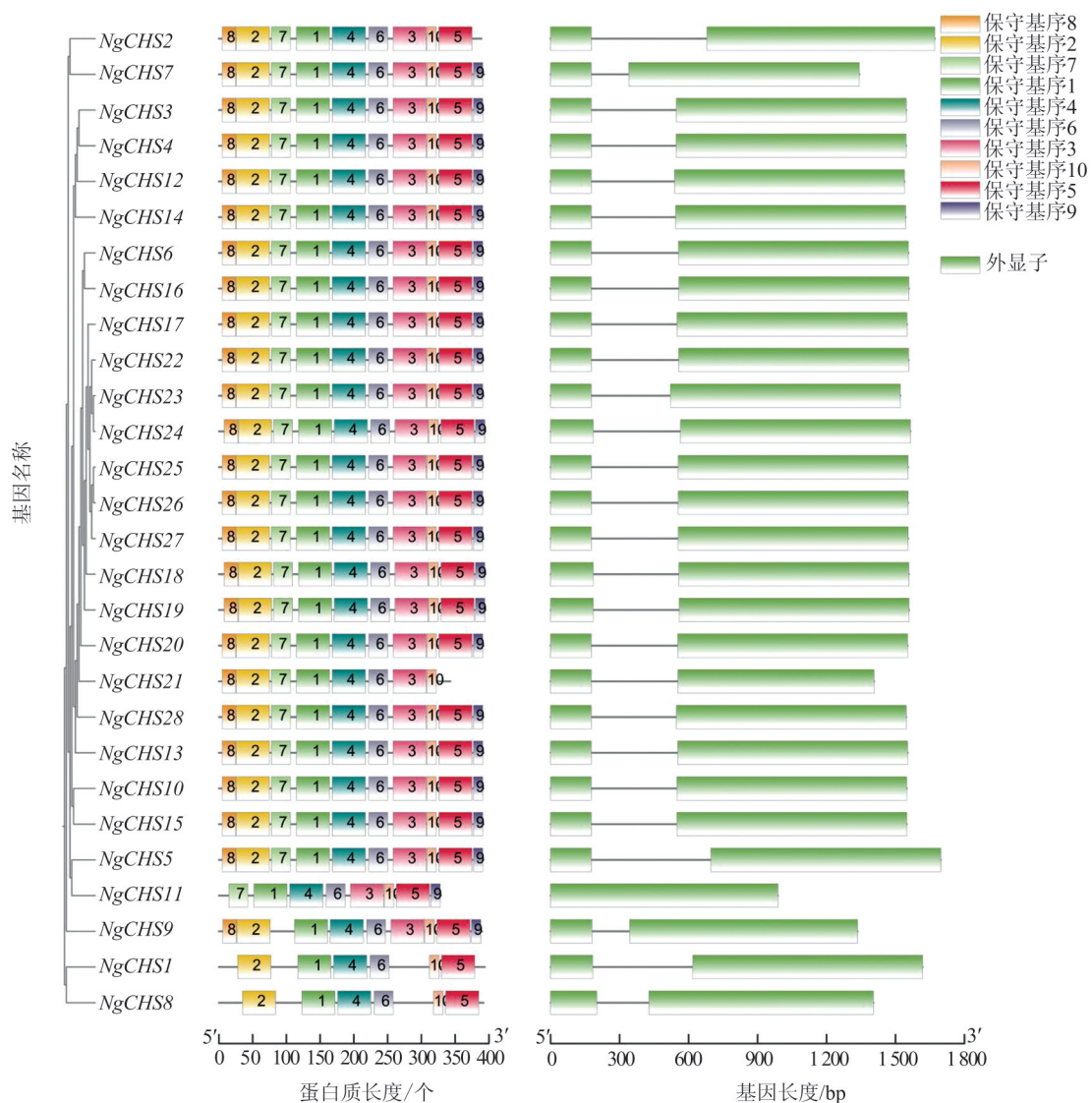


图4 *NgCHS*家族的蛋白质保守基序和基因结构分析

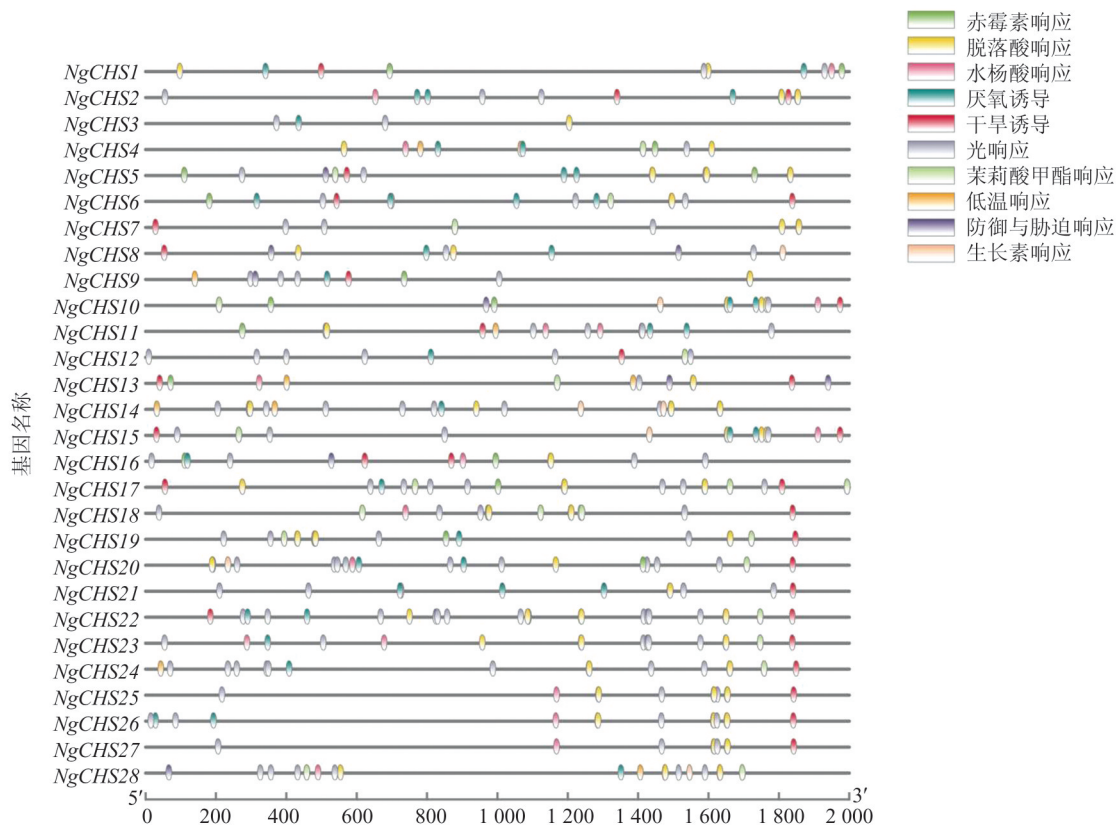
Figure 4 Conserved protein motifs and gene structure analysis of *NgCHS* family

最少为 GC-motif 元件, 仅有 1 个, 占比 0.87%。在生长发育响应元件中, GCN4_motif 元件数量较多, 共 7 个, 占比 87.5%; AACAA-motif 元件有 1 个, 占比 12.5%。基于上述结果分析, *NgCHS* 基因可能参与大齿牛果藤的生长发育以及植物激素响应和非生物胁迫等多个生物学过程。

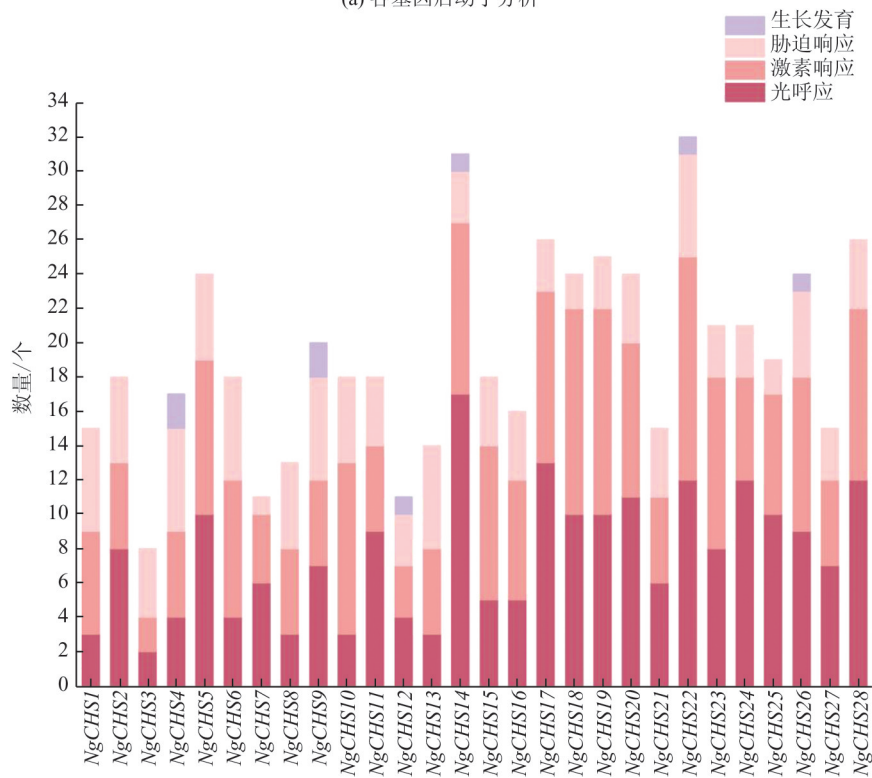
2.6 大齿牛果藤 *NgCHS* 基因在不同组织中的表达分析

化学检测结果显示, 黄酮类化合物在大齿牛果藤的幼嫩叶片中含量最高。因此, 本研究收集公共数据库中大齿牛果藤转录组数据, 包括不同生长阶段和不同色泽的幼叶和老叶, 并收集大齿牛果藤幼嫩叶芽进行转录组测序, 系统分析 *CHS* 基因家族成员的组织特异性表达模式(图 6)。结果表明, 多数 *NgCHS* 基因在芽和幼叶中呈现显著高表达特征, 表

明这些基因可能在幼叶代谢活动行使重要生物学功能, 以适应幼叶中特殊的生理需求。值得注意的是, *NgCHS2* 和 *NgCHS7* 在所有检测样本中的表达水平显著高于家族其他成员, 且两者在幼嫩组织中的表达量显著高于成熟组织, 其中, *NgCHS2* 在绿色幼叶中表达量最高, TPM 值高达 3 000 以上。整体来看, 大齿牛果藤 *NgCHS* 基因家族在不同组织中呈现显著的表达分化特征, 幼嫩组织是 *CHS* 基因家族多数成员的主要活跃表达场所, 这一结果与化学检测结果也高度吻合, 其中的 *NgCHS2* 和 *NgCHS7* 表现出较好的表达优势与特异性分布, 由于 *CHS* 基因是黄酮化合物合成中的关键限速酶, 这两个基因可能在幼嫩组织合成黄酮类化合物的过程中发挥了重要作用。



(a) 各基因启动子分析



(b) 各基因顺式作用元件统计

图5 *NgCHS* 基因启动子区顺式作用元件特征分析

Figure 5 Analysis of cis-acting elements in the promoter region of *NgCHS* gene

2.7 大齿牛果藤 *NgCHS* 基因克隆

以大齿牛果藤叶片 cDNA 为模板,经 PCR 扩增

后分别得到约为 1 200 bp 的单一一条带(图 7),与预测的大小一致,连接 pTOPO-Blunt 载体测序后,使用

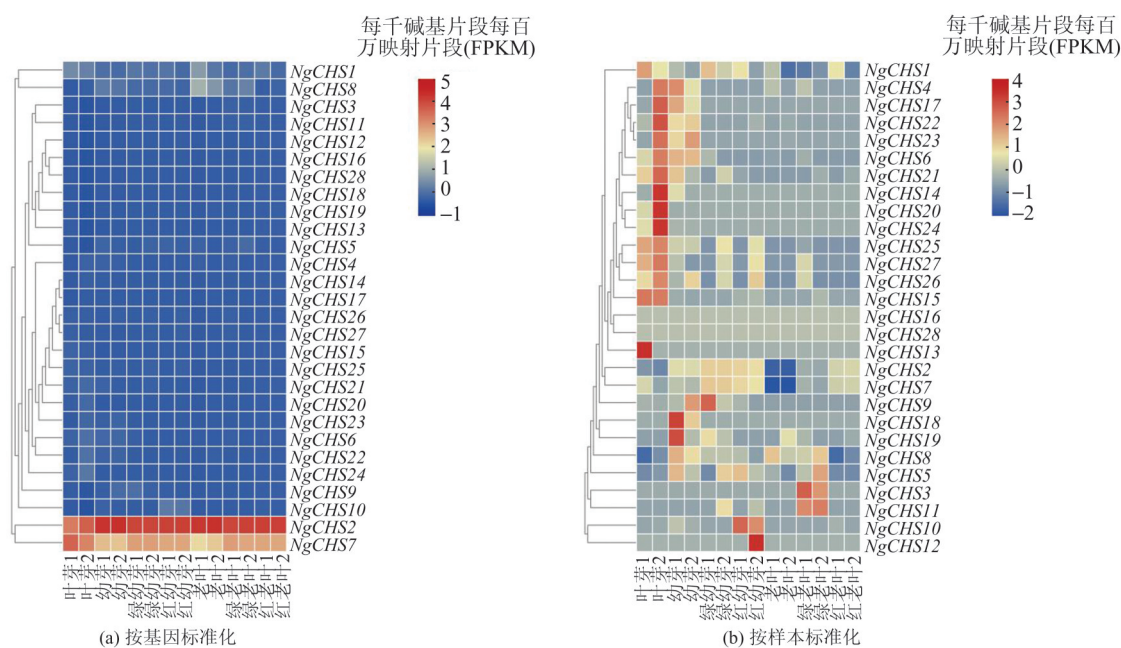


图6 大齿牛果藤CHS基因在芽、嫩叶和老叶中表达量分析

Figure 6 Expression analysis of CHS gene in bud, tender leaf and old leaf of *N. grossedentata*

SnapGene 软件将测序结果与参考序列进行比对, *NgCHS2* 大小为 1 170 bp, 共编码 389 个氨基酸; *NgCHS7* 大小为 1 182 bp, 共编码 393 个氨基酸。

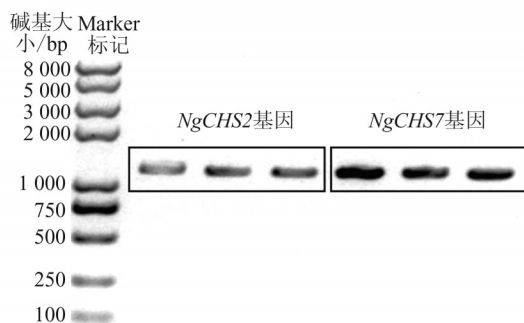


图7 大齿牛果藤NgCHS基因克隆

Figure 7 Cloning of *NgCHS* gene from *N. grossedentata*

2.8 NgCHS7蛋白纯化及功能鉴定分析

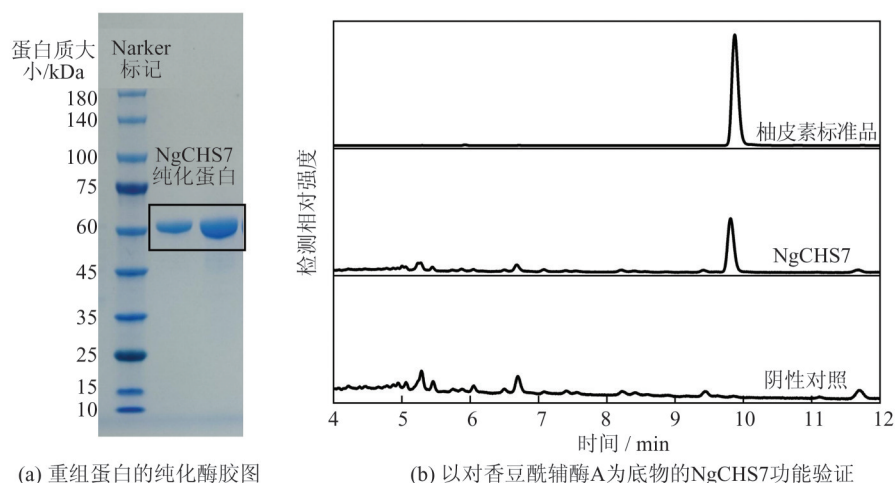
为探究鉴定得到的 *NgCHS* 是否具有活性, 根据进化树的分支关系, 选取与拟南芥的 *CHS* 同一分支的 *NgCHS7* 做后续功能研究, 因此, 构建了 *NgCHS7*-pET32a 重组载体, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 使用 IPTG 成功诱导出重组蛋白并进行纯化, 取适量纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 详见图 8(a) 所示。以对香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 为底物, 取适量纯化蛋白进行体外酶活分析, 由于产物柚皮素查尔酮容易发生环化反应转化为柚皮素^[13], 故选取柚皮素作为标准品, 同时, 为排除非特异性反应的干扰, 采用 pET32a 空载纯化后的蛋白

作为阴性对照, 其他实验条件均保持一致。在 UPLC 图谱中, 柚皮素标准品在 9.875 min 呈现特征性单峰, 且 *NgCHS7* 的酶促反应在 9.813 min 出现相应的单峰, 但是在阴性对照中未产生相应的特征峰。经过对比分析表明, 确定 *NgCHS7* 生成的产物是柚皮素, 结果如图 8(b) 所示。

3 讨论

黄酮类化合物不仅参与植物生长发育、抗逆应答等多种生理过程, 还因其独特的药理活性与营养价值, 成为药用植物资源开发的重要研究靶点。查尔酮合酶 (CHS) 作为黄酮类化合物生物合成途径中的首个关键限速酶, 催化对香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 缩合生成查尔酮, 而查尔酮作为黄酮类化合物的核心骨架前体, 其合成效率直接影响后续黄酮类化合物的种类与积累水平^[24]。本研究以富含黄酮类化合物的藤茶基原植物大齿牛果藤为研究对象, 通过对其 *NgCHS* 基因家族的全基因组鉴定、序列特征、进化关系、表达模式及核心成员功能验证等系统分析, 明确了 *NgCHS* 基因家族的扩张规律、保守特性及其酶的催化, 这些结果有助于解析大齿牛果藤黄酮类化合物高积累的分子机制, 也能为植物 *CHS* 基因家族的功能演化研究提供参考。

本研究在大齿牛果藤全基因组水平共鉴定到 28 个 *CHS* 基因家族成员 (*NgCHS*), 相较于其他已报道物种的 *CHS* 基因家族成员数目显著增多——在全基因组水平上, 拟南芥仅含 4 个 *CHS* 基因^[25], 葡



(a) 重组蛋白的纯化酶胶图

(b) 以对香豆酰辅酶A为底物的NgCHS7功能验证

图8 NgCHS7蛋白纯化及功能鉴定

Figure 8 Purification and functional identification of NgCHS7 protein

萄中有7个CHS基因,番茄中也仅鉴定出8个CHS基因^[17]。前人研究结果表明大齿牛果藤基和葡萄分化出来后,没有经历独立的全基因组复制事件^[19]。本文研究结果表明NgCHS在大齿牛果藤染色体上存在明显串联复制现象,表明基因串联复制是CHS家族扩张的主要驱动力。大齿牛果藤NgCHS基因家族成员的大量存在,为其黄酮类化合物的合成提供了潜在高效的基因资源,进而支撑其体内黄酮类化合物的高积累特性。基于上述研究结果,未来研究可进一步聚焦NgCHS基因与其他黄酮合成关键基因的互作机制,进一步揭示大齿牛果藤被称为“黄酮之王”的分子机制。例如已有研究报道MYB转录因子在植物黄酮类生物合成中发挥了核心调控作用,其中,Stracke等^[26]报道了拟南芥AtMYB11、AtMYB12和AtMYB111可以直接、特异性地激活黄酮合成途径的早期关键基因(PAL、CHS、CHI等),共同调控其合成;大豆(*Glycine max*)中GmMYB3a通过调控查尔酮合酶基因GmCHS7和GmCHS8,参与了异黄酮、类黄酮和苯丙氨酸的代谢^[27];玫瑰(*Rosa rugosa*)中的RrMYB12和RrMYB111可通过激活CHS和FLS基因表达,显著增强黄酮醇代谢通路^[28];这些研究均为探究大齿牛果藤MYB转录因子与NgCHS基因的互作关系提供了重要参考。

本研究对NgCHS基因结构与蛋白质保守基序的分析,为CHS家族在植物进化中的高度保守性提供了新证据。进化与共线性分析进一步揭示,NgCHS7与拟南芥AtCHS为直系同源基因,功能实验证实NgCHS7能够催化对香豆酰辅酶A生成柚皮素查尔酮,这表明其在进化过程中保留了典型的查尔酮合酶功能。考虑到大齿牛果藤是富含黄酮类化合物的药用植物,其体内黄酮合成代谢异常活跃,

推测NgCHS7相较于拟南芥AtCHS可能具有更高效的酶催化活性。因此,后续可进一步开展NgCHS7的酶活性质与催化机制研究,通过体外酶活实验、动力学参数测定等方法,系统分析其催化效率、底物特异性及最适反应条件,并与拟南芥等其他植物种已经报道的CHS进行精准对比,明确他们在酶活特性上的差异及分子机制,进而深入阐明NgCHS7在大齿牛果藤黄酮类化合物生物合成途径中的核心作用。同时,可将可能具有高效催化活性的NgCHS7作为核心分子标记,应用于大齿牛果藤分子辅助育种工作中,为筛选高黄酮含量的优良种质资源提供精准的分子工具,也为植物黄酮合成关键酶基因的功能挖掘与应用提供新的思路。

4 结论

本研究基于大齿牛果藤的全基因组共鉴定出28个CHS基因家族成员(NgCHS),这些基因不均匀分布于7条染色体上,且存在明显的串联复制现象。其编码蛋白质长度为329~395个氨基酸,且多数蛋白为定位于细胞质的酸性稳定蛋白。进化分析表明,CHS可以分为4个亚组,组Ⅲ中NgCHS2和NgCHS7与拟南芥中已经鉴定的CHS聚为一类,表明NgCHS2和NgCHS7可能为编码功能性CHS的候选基因。蛋白质保守基序和基因结构分析表明,NgCHS家族成员之间具有高度保守性。顺式作用元件分析表明,NgCHS家族成员可能参与光响应、激素调控、非生物胁迫等多种生物学过程。组织表达谱分析筛选得到两条在幼叶中高表达的基因:NgCHS2和NgCHS7,表达模式与进化预测结果相符,对NgCHS7进行功能验证,能催化对香豆酰辅酶A转化为柚皮素查尔酮,具有查尔酮合酶的功能。

本研究不仅为后续开展酶动力学分析、构建黄酮合成调控网络奠定了坚实基础,更能为大齿牛果藤的分子育种工作提供精准靶点,助力黄酮资源的高效开发利用,推动大齿牛果藤这一优质药用植物资源的深度挖掘与产业化应用。

参考文献

- [1] Wang Z Y, Cao Z R, Yue Z Y, et al. Research progress of dihydromyricetin in the treatment of diabetes mellitus [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1216907.
- [2] Zhang Q L, Zhao Y F, Zhang M Y, et al. Recent advances in research on vine tea, a potential and functional herbal tea with dihydromyricetin and myricetin as major bioactive compounds [J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2021, 11(5): 555-563.
- [3] Hou G Q, Xu C F, Cheng K X, et al. Metabolic mechanisms of dihydromyricetin and strategies for enhancing its bioavailability: a recent review [J]. *Food Chemistry*, 2025, 485: 144470.
- [4] Wu R R, Li X, Cao Y H, et al. China medicinal plants of the *Ampelopsis grossedentata*: a review of their botanical characteristics, use, phytochemistry, active pharmacological components, and toxicology [J]. *Molecules*, 2023, 28(20): 7145.
- [5] 王若彤, 沈晓凤, 严赵玖, 等. 黄酮类化合物合成生物体系构建的研究进展[J]. *中国医药生物技术*, 2024, 19(6): 569-576.
Wang R T, Shen X F, Yan Z J, et al. Advancements in constructing biological systems for flavonoid synthesis [J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2024, 19(6): 569-576.
- [6] 李玉凤, 庞晓慧, 罗红梅, 等. 忍冬属药用植物资源、活性成分及功能基因研究进展[J]. *生物资源*, 2025, 47(03): 213-221.
Li Y F, Pang X H, Luo H M, et al. Research progress on medicinal plant resources, active ingredients and functional genes of *Lonicera* [J]. *Biological resources*, 2025, 47(03): 213-221.
- [7] Xing M Y, Cao Y L, Ren C H, et al. Elucidation of myricetin biosynthesis in *Morella rubra* of the Myricaceae [J]. *The Plant Journal*, 2021, 108(2): 411-425.
- [8] Martin C R. Structure, function, and regulation of the chalcone synthase [M]//*International Review of Cytology*. Amsterdam: Elsevier, 1993: 233-284.
- [9] Reimold U, Kröger M, Kreuzaler F, et al. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme [J]. *The EMBO Journal*, 1983, 2(10): 1801-1805.
- [10] Tong Y J, Lyu Y B, Xu S, et al. Optimum chalcone synthase for flavonoid biosynthesis in microorganisms [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 41(8): 1194-1208.
- [11] 许明, 林世强, 倪冬昕, 等. 藤茶查尔酮合成酶基因 AgCHS1 的克隆及功能鉴定[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(24): 5091-5103.
Xu M, Lin S Q, Ni D X, et al. Cloning and function characterization of chalcone synthase gene *AgCHS1* in *Ampelopsis grossedentata* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(24): 5091-5103.
- [12] Yao Z, Feng Z, Wu F W, et al. The near-complete genome assembly of *Ampelopsis grossedentata* provides insights into its origin, evolution, and the regulation of flavonoid biosynthesis [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2025, 16: 1580779.
- [13] Lanz T, Tropf 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.
- [14] 刘俊, 程婷婷, 练从龙, 等. 杜仲查尔酮合成酶基因家族全基因组鉴定及其表达模式分析[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(18): 5130-5141.
Liu J, Cheng T T, Lian C L, et al. Genome-wide identification and expression pattern analysis of chalcone synthetase gene family in *Eucommia ulmoides* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2025, 50(18): 5130-5141.
- [15] Shi X Y, Cao S, Wang X, et al. The complete reference genome for grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetics and breeding [J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(5): uhad061.
- [16] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [17] 成永娟, 张明月, 曹雪璟, 等. 葡萄 *CHS* 基因家族鉴定与表达分析[J]. *果树学报*, 2023, 40(5): 861-874.
Cheng Y J, Zhang M Y, Cao X J, et al. Identification and expression analysis of *CHS* gene family in grape [J]. *Journal of Fruit Science*, 2023, 40(5): 861-874.
- [18] 陆业磊, 邓为, 王震, 等. 高粱 *SPL* 基因家族的鉴定及表达分析[J]. *生物资源*, 2020, 42(04): 444-453.
Lu Y L, Deng W, Wang Z, et al. Identification and expression analysis of *SPL* gene family in sorghum [J]. *Biological resources*, 2020, 42(04): 444-453.

- [19] Han D L, Na S Y, Hou Z W, et al. Pan-genome assembly of vine tea (*Nekemias grossedentata*) reveals structural variation in its dihydromyricetin biosynthesis diversity [J]. Horticulture Research, 2026, 13 (2) : uhaf307.
- [20] Li X H, Cao M H, Ma W B, et al. Annotation of genes involved in high level of dihydromyricetin production in vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) by transcriptome analysis [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20 (1): 131.
- [21] 兰泓,孔劭凡,李慎涛,等. 稀有密码子影响人RNaseH-Apaf1融合蛋白原核表达[J]. 氨基酸和生物资源, 2015,37(04):72-78.
Lan H, Kong S F, Li S T, et al. Rare codons affect the prokaryotic expression of human RNaseH-Apaf1 fusion protein[J]. Amino acids and biological resources, 2015, 37(04): 72-78.
- [22] 刘玥. 君子兰查尔酮合酶基因和查尔酮异构酶基因的克隆及功能验证[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
Liu Y. Molecular cloning and characterization of chalcone synthase and chalcone isomerase genes in *Clivia miniata*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021.
- [23] Hu M W, Fu J, Lu Y, et al. Functional characterization of key enzymes involved in the biosynthesis of distinctive flavonoids and stilbenoids in *Morus notabilis* [J]. Horticulture Research, 2025, 12(10): uhaf171.
- [24] 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]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(11): 5651.
- [25] 应宇鑫,许张婷,陈俊宇,等. 掌叶覆盆子查耳酮合酶基因家族鉴定及表达分析[J]. 中草药, 2024, 55 (22): 7799-7811.
Ying Y X, Xu Z T, Chen J Y, et al. Identification and expression profiles of chalcone synthase gene family in *Rubus chingii* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2024, 55(22): 7799-7811.
- [26] Stracke R, Ishihara H, Huep G, et al. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling[J]. The Plant Journal, 2007, 50(4): 660-677.
- [27] Xu Z B, Li J W, Song X, et al. Overexpression of the R2R3-MYB transcription factor GmMYB3a enhances isoflavone accumulation in soybean [J]. Physiologia Plantarum, 2025, 177(1): e70120.
- [28] Shi Y F, Lu T R, Lai S Y, et al. *Rosa rugosa* R2R3-MYB transcription factors RrMYB12 and RrMYB111 regulate the accumulation of flavonols and anthocyanins [J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1477278.