



乔枫. 枸杞查耳酮异构酶 *LcCHI1* 基因的克隆与表达分析[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(04): 195-204.

QIAO Feng. Cloning and expression analysis of *Lycium chinense* chalcone isomerase *LcCHI1* gene[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(04): 195-204.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.04.17

枸杞查耳酮异构酶 *LcCHI1* 基因的克隆与表达分析

乔 枫

(青海师范大学 青藏高原药用动植物资源重点实验室/高原科学与可持续发展研究院, 西宁 810008)

摘 要 为探究枸杞查耳酮异构酶 *CHI1* 基因在不同组织中的表达模式和功能, 利用同源克隆的方法获得1个枸杞 (*Lycium chinense*) *LcCHI1* 基因 (Genbank No. OR026273), 通过生物信息学方法分析其理化性质、结构及进化关系, 利用荧光定量PCR (qRT-PCR) 技术对其组织表达的特异性进行分析, 并进行原核表达分析。结果表明: 1) 枸杞查耳酮异构酶 *LcCHI1* 基因的 cDNA 序列全长 695 bp, 开放阅读框为 633 bp, 编码 210 个氨基酸, 含有 1 个保守的 Chalcone_3 family 结构域。2) 氨基酸序列比对显示, *LcCHI1* 蛋白符合 Chalcone 蛋白结构特征且与其他物种 Chalcone 蛋白具有高度的相似性。聚类分析表明, *LcCHI1* 蛋白与茄科的 CHI 蛋白单独聚成一支。3) *LcCHI1* 在枸杞花、嫩叶与嫩枝中表达量较高, 在根中表达量较低。随着枸杞果实的发育, *LcCHI1* 表达呈先升高后降低趋势, 在变色果中表达量最高。4) 在原核表达载体中构建 *LcCHI1* 重组蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳分析在 63 ku 处出现表达蛋白。综上, *LcCHI1* 基因在枸杞花和变色果中表达较高, 并能进行原核蛋白表达, 研究结果为枸杞类黄酮合成途径中 *CHI* 基因的功能验证奠定基础。

关键词 枸杞; 查耳酮异构酶; 基因克隆; 基因表达; 原核表达

中图分类号 Q78

文章编号 1007-4333(2024)04-0195-10

文献标志码 A

Cloning and expression analysis of *Lycium chinense* chalcone isomerase *LcCHI1* gene

QIAO Feng

(Key Lab of Medicinal Animal and Plant Resources of Qinghai-Tibetan Plateau in Qinghai Province/Institute of Plateau Science and Sustainable Development, Qinghai Normal University, Xining 810008, China)

Abstract The expression patterns and functions of chalcone isomerase *CHI1* gene from different tissues in *Lycium chinense* were investigated in this study. *LcCHI1* gene (Genbank No. OR026273) was obtained using homologous cloning method. Its physicochemical properties, structure, and evolutionary relationships were analyzed using bioinformatics methods. The tissue expression specificity was analyzed using fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) technology and prokaryotic expression analysis was performed. The results showed that: 1) The *LcCHI1* gene had a total length of 695 bp, an open reading frame of 633 bp, encoding 210 amino acids and containing a conserved chalcone_3 family domains. 2) Multiple sequence alignment showed that the *LcCHI1* protein conformed to the structural characteristics of chalcone protein and had high similarity with other chalcone proteins. Cluster analysis showed that the *LcCHI1* protein and the CHI protein of the Solanaceae family aggregated into a single branch. 3) *LcCHI1* was highly expressed in the flowers, tender leaves, and tender branches of *L. chinense*, but low in the roots. With the

收稿日期: 2023-07-12

基金项目: 青海省共和县黄河龙羊峡库区林草生态修复综合治理中央财政支持国土绿化示范试点项目(科技支撑)(E6301000076033516); 中藏药材绿色高值化与标准化生产技术推广项目(2023-NK-P38)

第一作者: 乔枫(ORCID: 0000-0002-3122-1522), 教授, 主要从事植物生理和分子生物学研究, E-mail: qiaofnm@163.com

fruit development of *L. chinense*, the expression of *LcCHI1* showed a trend of first increasing and then decreasing, with the highest expression in color changing fruits. 4) The *LcCHI1* recombinant protein in the prokaryotic expression vector was constructed, and the expressed protein appeared at 63 ku through SDS-PAGE electrophoresis analysis. In summary, the *LcCHI1* gene was highly expressed in flowers and color changing fruits from *L. chinense*, and can undergo prokaryotic protein expression. The results laid the foundation for the functional verification of the *CHI* gene in the flavonoid synthesis pathway of *L. chinense*.

Keywords *Lycium chinense*; chalcone isomerase; gene cloning; gene expression; prokaryotic expression

类黄酮化合物作为一类重要的次生代谢产物,广泛存在于植物中。查耳酮异构酶(CHI)是类黄酮积累的第二个关键限速酶,参与催化查耳酮的立体特异性异构化,产生相应的黄烷酮^[1-2]。植物中关于CHI基因家族的研究有许多报导^[1-5]。例如,从15种代表性绿色植物包括小麦、水稻、拟南芥和玉米等植物中共鉴定了122个CHI基因,经系统发育、直向同源群(OG)分类和基因组结构分析,发现CHI家族的基因经基因复制后产生8个OGs的4种不同类型(I~IV型)^[1]。每株植物中CHI家族基因总数的差异主要归因于自然选择力的谱系特异性扩张。I型和II型蛋白都具有酶活性,能催化查耳酮的立体特异性异构化,以产生它们相应的黄烷酮^[3]。I型CHI广泛存在于维管植物中,并参与完全异构化生产(2S)-柚皮素(5,7,40-三羟基黄烷酮)和柚皮素查耳酮(4,20,40,60-四羟基查耳酮)^[4]。II型CHIs似乎是豆科植物特有的,主要负责异黄酮的产生^[5]。对拟南芥的研究发现III型CHIs参与脂肪酸代谢的脂肪酸结合蛋白(FAPs),这类蛋白定位于质体,可进一步细分为3个亚家族(FAP1、FAP2和FAP3)^[3]。对于IV型CHIs,先前的研究表明,它们可以作为增强子(激活剂),促进植物类黄酮的产生^[6-7]。所有CHIs起源于一个共同的祖先CHI,III型CHIs被认为是真正的CHIs的原型^[3,8]。对54个CHI蛋白序列进行分子系统进化分析^[9-10],拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, CHI)、玉米(*Zea mays*, CHI)、葡萄(*Vitis vinifera*, CHI)、橙子(*Citrus sinensis*, CHI)、大豆(*Glycine max*, CHI2)和百脉根(*Lotus japonicus*, CHI2)为I型CHI,大豆(CHI1B1)、百脉根(CHI)和苜蓿(*Medicago sativa*, CHI)等12个蛋白为II型CHI,拟南芥(FAP3)、大豆(CHI3)和蛇苔(*Conocephalum conicum*, CHI3b)等21个蛋白为III型CHI,钝鳞紫背苔(*Plagiochasma appendiculatum*, CHI3a)和蛇苔(CHI3a)等15个蛋白为IV型CHI。

近年来,已从多种植物中克隆到CHI基因^[11-14],并对基因的结构及功能进行验证,探究基因表达与类黄酮、花青素积累的关系^[12-16]。从金花茶(*Camellia nitidissima*)鉴定了7个CHI基因,并将其分为3个亚科,其中CnCHI4可能在金花茶类黄酮生物合成途径中发挥重要作用^[15],CnCHI4过表达显著增加了烟草和烟草中黄酮类化合物的产生。葱(*Allium fistulosum*)中查耳酮异构酶AfCHIL基因的表达与花青素的积累密切相关,并且AfCHIL和AfCHS的表达高度同步^[16]。从海南龙血树(*Dracaena cambodiana*)中鉴定出11个CHI家族基因,其中DcCHI1和DcCHI4可能参与类黄酮的产生^[17]。从蛇床草(*Ophiorrhiza japonica*)中分离出一个编码CHI的基因OjCHI,OjCHI的表达不仅与花青素在不同组织中的积累模式相匹配,而且在花的发育阶段也与花青素的积累模式匹配,这表明OjCHI在花青素生物合成中的潜在作用^[18]。从柑橘(*Citrus reticulata*)中鉴定出一种IV型CHI(命名为CitCHIL1),它增强柑橘黄烷酮和黄酮的积累,这导致底物有效流入查耳酮合酶(CHS),并提高CHS的催化效率^[19]。把矮牵牛(*Petunia hybrida*)中的CHI基因导入番茄中,转基因番茄的果皮黄酮醇增加了78倍^[20]。将水母雪莲(*Saussurea medusa*)查耳酮异构酶CHI过表达整合到雪莲(*S. involucrata*)基因组中,结果显示转基因毛状根系比野生型毛状根生长更快,产生更高水平的芹菜素和总黄酮,证实了CHI在总黄酮和芹菜素合成中发挥的关键作用^[21]。

枸杞(*Lycium chinense*)为茄科(Solanaceae)枸杞属植物,主要分布于青海、甘肃、宁夏、内蒙古和新疆等西北地区^[22]。枸杞的食用部位主要为果实,枸杞果实中富含多种营养成分,如多糖、类胡萝卜素类、酰胺类、有机酸类、多酚和类黄酮等^[23-25]。研究表明不同类黄酮化合物含量具有显著性差异,类黄酮化合物在植物组织呈色、逆境响应以及人类健

康饮食方面具有广泛的功能^[26-28]。Zhao等^[29]利用Illumina HiSeq 2000测序平台构建了枸杞的转录组,其中类黄酮合成前期的苯丙烷生物合成相关基因在红色果实、叶和花中高度表达。Qiao等^[25]分析枸杞果实发育过程中类黄酮含量和类黄酮代谢基因的变化,结果显示类黄酮含量随果实发育而增加,在发育后期较高。转录组学分析表明,花青素途径、黄酮醇途径、黄酮生物合成和苯丙素合成途径是参与类黄酮代谢的主要途径,*PAL1*和*CHS2*基因对类黄酮积累具有关键作用^[25]。Guan等^[30]克隆了枸杞 *CHI* 基因 (*LcCHI*, GenBank accession No. KJ619381),该基因在枸杞果实中表达量最大;随着枸杞果实的成熟,*LcCHI*表达和总黄酮含量逐渐增加;同时外施水杨酸(SA)处理果实,*LcCHI*基因的表达和枸杞中总黄酮含量也可上调^[30],表明*LcCHI*基因调控总黄酮的积累。本研究以枸杞为试验材料,克隆1个枸杞类黄酮异构酶*LcCHI1*基因并进行生物信息学分析,研究在枸杞不同组织和果实发育期*LcCHI1*基因表达变化,在大肠杆菌载体上构建枸杞*LcCHI1*原核表达载体,以期在枸杞*LcCHI1*基因功能验证奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以枸杞品种‘蒙杞1号’为材料,采自青海柴达木盆地诺木洪农场(36°23′26.84" N, 94°26′49.04" E,海拔2 860 m)。枸杞组织器官包括嫩叶、嫩茎、老叶、老茎、花、果柄、根和不同发育期的果实。枸杞果实从开花受精到果实成熟约需35 d,按照果实发育期将果实分为7种^[31],分别为:花后5~6 d为初果、花后10~11 d为青果,花后15~16 d为绿果,花后20~21 d为变色果,花后25~26 d为黄熟果,花后30~31 d为红初果,花后34~35 d为红熟果。枸杞组织样品和果实样品用于后续基因表达和克隆研究。

1.2 枸杞总RNA的提取及cDNA的合成

枸杞不同组织器官和不同发育期果实中总RNA采用Trizol reagent提取试剂盒(Invitrogen, Cat. No: 15596-026,上海博耀生物科技有限公司)进行提取,通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计(GE)检测RNA浓度、纯度和完整性。利用AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Cat.

No: 6210B)进行cDNA第一链的扩增,置于-20℃冰箱保存,用于后续荧光定量PCR反应。

1.3 *LcCHI1* 基因的克隆与测序

基于枸杞转录组序列信息,设计特异引物组合WF/WR用于*LcCHI1*的克隆(表1)。以枸杞红熟果RNA为模版,合成cDNA第一链。选用表1中引物组合WF/WR,以cDNA第一链为模板进行PCR扩增,扩增体系50 μL,包括:cDNA 2.0 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各1.0 μL,10×PCR Buffer 5 μL,dNTP(10 mmol/L) 1.0 μL,LA Taq聚合酶(5 U/μL, TaKaRa)0.4 μL,ddH₂O补足至50 μL。PCR反应条件为:94℃预变性3 min;94℃变性1 min,55~58℃退火1 min;72℃延伸2 min,35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶回收、纯化、连接、转化、菌液PCR鉴定、酶切鉴定和测序后获得*LcCHI1* cDNA序列。选取4个克隆进行测序,由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.4 基因序列的生物信息学分析

在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站进行Blast分析,并通过软件ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行ORF的查找和核苷酸的翻译;应用ExPASy(<http://www.expasy.org>)提供的相关软件,综合预测分析编码蛋白的基本性质、结构特点和亚细胞定位;用DNAassist进行多序列比对,利用Mega 7.0软件的Clustal X(1.83)对枸杞*CHI1*基因编码氨基酸序列进行多重序列比对,再使用邻接法(NJ)构建系统发育树。

1.5 *LcCHI*基因在不同组织和果实发育期的表达检测

以枸杞 *Actin* 基因为内参,设计保守引物 *Actin* F和 *Actin* R(表1)。根据*LcCHI1*基因序列设计荧光定量分析引物,预期扩增片段长度为138 bp。采用TaKaRa (Cat. No: RR820A)公司SYBR® Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)试剂盒程序进行实时荧光定量PCR反应。反应在iQ5(BIO-RAD)荧光定量PCR仪上进行,反应体系20 μL: 2×SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa)10 μL,cDNA模板2.0 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL,50×ROX Reference Dye 0.4 μL,ddH₂O 6.8 μL,每个反应3个重复。PCR扩增程序为:95℃预变性

30 s; 95 ℃变性 5 s, 60 ℃延伸 31 s; 40 个循环, 反应结束后确认 Real-Time PCR 扩增曲线和融解曲线, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量^[32]。

1.6 *LcCHI1* 基因的原核表达与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

将 *LcCHI1* 全长基因序列, 根据其 CDS 序列, 设计 *LcCHI1* 基因的上下游引物, 并在基因 5'端加入全长 attB1/2 片段, 通过 PCR 克隆获得用于 gateway 体外同源重组的目的基因片段, 引物序列如表 1 所示, 连接到原核表达载体上。

重组质粒经 PCR 扩增和酶切鉴定, 筛选阳性克隆, 选取 3~4 个阳性克隆质粒送至上海生物工程公司测序, 比对序列后正确的重组质粒即为目的基因的原核表达载体。

将目的基因的原核表达重组载体转化至表达感受态细胞 BL21(DE3) 中, 经 LB 液体培养、Amp 抗性筛选, 培养至 OD 值为 0.4~0.8, 加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导, 在 16、28 和 37 ℃摇床中振荡培养, 收集菌体后进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳。

表 1 枸杞基因引物及其序列
Table 1 Primers and sequences of genes in *L. chinense*

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物长度/bp Product length	用途 Usage
<i>LcCHI1</i>	F: AGTCCACTCTCAAACCTCTCCAAGT R: GGTCTTCCTCTATAGGCTAAATGC	138	<i>CHI</i> 基因荧光定量 PCR
<i>Actin</i>	F: CCATCTACGA GGGTTACGCTTTG R: AGTCAAGAGCACATAGGCAAGC	95	参比基因荧光定量 PCR
<i>LcCHI1</i>	WF: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTCATGGGAAAGAATGAAGTGATGG WR: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG TCTTATTTAGACATTTTCAGCAGAAAGGTTG	695	<i>CHI</i> 基因全长 cDNA 克隆

2 结果与分析

2.1 *LcCHI1* 基因的克隆与序列分析

以枸杞红熟果 RNA 为模板, 采用表 1 中 *LcCHI1* 基因 WF/WR 引物组合进行反转录 PCR (RT-PCR) 扩增 cDNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测的结果见图 1。将 PCR 产物回收、测序, 得到枸杞 *LcCHI1* 基因的全长 cDNA 序列, 以及相对应的氨基酸序列(图 2)。*LcCHI1* 基因 cDNA 序列为 695 bp, 包含读码框 633 bp(编码 210 个氨基酸)、起始密码子 ATG 上游序列 48 bp 和终止密码子 TAA 下游序列 14 bp。

2.2 *LcCHI1* 基因序列 Blast 对比

采用 DNAssist 法将枸杞 CHI 蛋白同源序列进行比对(图 3), 枸杞 CHI 蛋白与黑果枸杞(*L. ruthenicum*)CHI 相似性达 97.13%, 与绒毛状烟草(*Nicotiana tomentosiformis*)CHI 相似性达 90.91%, 与茄(*Solanum melongena*)的相似性达 90.48%。*LcCHI1* 蛋白序列与茄科植物 CHI 比对相似性达

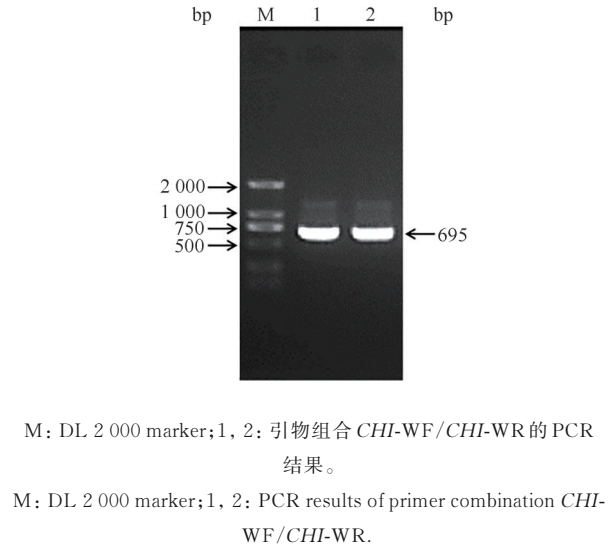


图 1 枸杞 *CHI1* cDNA 的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification results of *CHI1* cDNA in *L. chinense*

90% 以上, 进一步验证了枸杞 *CHI* 基因克隆的准确性。通过在线 ProtParam 分析, 推测的 *LcCHI1* 蛋白

```

-48 GAGCAATGCTTTTTATAATGCCAATTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGGAAAGATGAAGTATGGTGGATGAAATCCCTTTTCTCCGAGTTG
      M G K N E V M V D E I P F P S E F
52 ATGATGAATACTAAGCCTTTACCTTTGATGGGTACGGAATAACTGACATAGAGATACACTTTCTCCAAATTAATTCAGTGAATTGGAGTTTACTTG
      M N T K P L P L M G H G I T D I E I H F L Q I K F T A I G V Y L
151 GACCCAGAAATTGTGCTCATTTGCAGCAGTGAAGGGCAAAACAGGAGCTAGCTAACTGAAATGATGAATTCTTTGAAGCAATTGTTAATGCTCCA
      D P E I V S H L Q Q W K G K T G A E L T E N D E F F E A I V N A P
250 GTGGATAAGTCTTGAAGAGTAGTAGTATTAAGAGATCAAGGTTACAGATATGGGTGACAGTAGAGAGCCCATACGCGATCGTTTAGCAGAAGTC
      V D K F L R V V V I K E I K G S Q Y G V Q L E S A I R D R L A E V
349 GATAAATATGAAGAAGAGGAAGAAGCACTCGAAAAAATGTTGAATTTTCCAGTCTAAGTATTTCAAGAAAGACTGTGTAATAACATATTTCTTC
      D K Y E E E E E E A L E K I V E F F Q S K Y F K K D S V I T Y S F
448 CCAGCTACTTCTGCGACTGCAAGATTTCATCCACCATAGAAGTAAGGAAGACTCAGAAATTGAAGTGACAAATGCAAAATGTTGTAGAGATGATTAA
      P A T S A T A K I S S T I E G K E D S E I E V T N A N V V E M I K
557 AAATGGTACTTAGGTGAAGCAGGGAGTGTACCTACAACATATTTCTTCTTGGCCAAACCTTTCTGCTGAAATGTCTAAATAGACCCAGCTTTG
      K W Y L G G S R G V S P T T I S S L A N N L S A E M S K
616 TT

```

ATG: 起始密码子; TAA: 终止密码子。氨基酸中兰色区域序列表示 β -折叠, 玫红色区域序列表示 α -螺旋。

ATG: Starting codon; TAA: Terminating codon. Representation of blue sequence in amino acids β -Fold, represented by a rose red sequence α -Spiral.

图2 *LcCHI1* 基因的 cDNA 全长序列及对应的氨基酸序列

Fig. 2 The full length sequence and corresponding amino acid sequence of cDNA in *LcCHI1*

绒毛状烟草	1	MKNEVMDEFPFSQFMINTKPLSLMGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVTHLQWKGKTGAELTENDDFEATVNPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	AVR
小叶烟草	1	MAKNEVMDEFPFSQFMINTKPLSLMGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVTHLQWKGKTGTETLVNDDFEATVNPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	AVR
枸杞	1	MKNEVMDEIPPFSEFMNTKPLPLMGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVSHLQWKGKTGAELTENDDFEATVNPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SAIR
黑果枸杞	1	MKNAVMDEIPPFSEFMNTKPLPLMGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVSHLQWKGKTGAELTENDDFEATVNPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SAIR
潘那利番茄	1	MVKNEMVDEIPFSPQFMVNNKPLPLMGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVTHLQWKGKTGAELTENDDFEATVNPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SAIR
马铃薯	1	MVKNEMVDEIPFSPQFMVNNKPLPLMGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVTHLQWKGKTGEELTENDDFEATVNPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SAIR
风铃辣椒	1	MKNEVMDEIPPFSEFMNTKPLPLMGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVTHLQWKGKTGAELTENDDFEATVNPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SAIR
辣椒	1	MKNEVMDEIPPFSEFMNTKPLPLMGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVTHLQWKGKTGAELTENDDFEATVNPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SAIR
毛花连蕊茶	1	MGSEMVMDEIPFPQNTT-TKPLSLGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDSEIVGHQWKGKTGKDLAEDDDFEALISAPVEKFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SAVR
越橘	1	MGSAMVMDEIPPFETTT-TKPLSLGGYITDIEHFLQIKFTAIGVLDSEIVGHQWKGKSGKDLAEDDDFDLISAPVEKFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	STVR
芒果	1	MSAELVMDEIPFPQKIT-TKPLNLGHGITDIEHFLQIKFTAIGVDFPFISSHQWKGAGSSLAEDDDFEALISAPVEKFLRVVIKEIKGQYGVQLES	SAVR
油橄榄	1	MSTEVVMDEVFPSLGTIT-VKPLSVFGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVTHLQWKGKTGKDLAEDDDFEALIRAPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SAVR
毛果杨	1	MGTENVMDEIPFPQIAIATKPLSLGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVGHQWKGKPGNELAEDDDFEALISAPVEKFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SVVR
莲	1	MSTETVMDEIPFPETTT-TKPLSLGHGITDIEHFLQIKFTAIGVLDPEIVSHLQWKGKSGNELAKNDDFFNLISAPVDFLRVVIKEIKGSQYGVQLES	SAVR
绒毛状烟草	111	DRLAEVDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFATGKEDSETEVNANVVMKKWYLGGRGVSPITISLANNLSAE	SN 210
小叶烟草	111	DRLAEVDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFATGKEDSETEVNANVVMKKWYLGGRGVSPITISLANNLSAE	SK 210
枸杞	111	DRLAEVDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISSTIEGKEDSETEVNANVVMKKWYLGGRGVSPITISLANNLSAE	SK 210
黑果枸杞	111	DRLAEVDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISSTIEGKEDSETEVNANVVMKKWYLGGRGVSPITISLANNLSAE	S 209
潘那利番茄	111	DRLAEVDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFATGKEDSETEVNANVVMKKWYLGGRGVSPITISLANNLSAE	SK 210
马铃薯	111	DRLAEVDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISCTIEGKEDSETEVNANVVMKKWYLGGRGVSPITISLANNLSAE	SK 210
风铃辣椒	111	DRLAEVDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFATGKEDSETEVNANVVMKKWYLGGRGVSPITISLANNLSAE	SK 210
辣椒	111	DRLAEVDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFATGKEDSETEVNANVVMKKWYLGGRGVSPITISLANNLSAE	SK 210
毛花连蕊茶	110	DRLAADDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFAIEGKESKQVINTVEMKKWYLGGRVSPITISLANNLSAE	SK 210
越橘	110	DRLAADDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFAIEGKESKQVINTVEMKKWYLGGRVSPITISLANNLSAE	S 209
芒果	110	DRLAADDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFAIEGKESKQVINTVEMKKWYLGGRVSPITISLANNLSAE	SK 209
油橄榄	110	DRLAADDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFAIEGKESKQVINTVEMKKWYLGGRVSPITISLANNLSAE	SK 209
毛果杨	111	DRLAADDKYEDEEEALEKIVEFFQSKYFKKSVITYSPFATSGIAKISFAIEGKESKQVINTVEMKKWYLGGRVSPITISLANNLSAE	S 209
莲	110	DRLAEVDKYEDEEEALEKIQFQSKYFKKSAITYSPFATSGIAKISFVTEGKEBAKQVINTVEMKKWYLGGRVSPITISLANNLSAE	SK 208

绒毛状烟草 (*Nicotiana tomentosiformis*, XP_009627241.1); 小叶烟草 (*Nicotiana attenuata*, XP_019260692.1); 枸杞 (*Lycium chinense*, OR026271); 黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum*, AHH86093.1); 潘那利番茄 (*Solanum pennellii*, XP_015074627.1); 马铃薯 (*Solanum tuberosum*, XP_006365329.1); 风铃辣椒 (*Capsicum baccatum*, PHT48540.1); 辣椒 (*Capsicum annuum*, PHT82080.1); 毛花连蕊茶 (*Camellia fraterna*, AUT30534.1); 越橘 (*Vaccinium corymbosum*, AYC35388.1); 芒果 (*Mangifera indica*, XP_044461587.1); 油橄榄 (*Olea europaea*, XP_022867362.1); 毛果杨 (*Populus trichocarpa*, XP_002325926.1); 莲 (*Nelumbo nucifera*, ARQ79444.1)。

图3 枸杞 CHI 蛋白与其他植物蛋白的比对

Fig.3 Comparison of *L. chinense* CHI protein with other plant proteins

质等电点 (pI) 为 4.88, 为酸性蛋白; 相对分子质量为 24 734; 不稳定指数为 43.77, 属于不稳定蛋白; 亲水性的平均值为 -0.230, 是亲水性蛋白。LcCHI1 蛋白结构域分析结果显示 LcCHI1 蛋白在

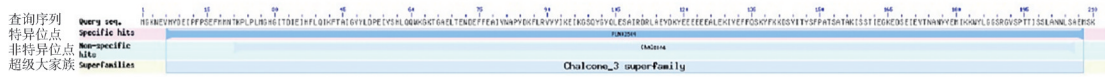


图4 LcCHI1蛋白的保守结构域

Fig. 4 Predicted conserved domain of LcCHI1 protein

6~188位点属于Chalcone_3 family(图4),在植物的生长发育以及抵御胁迫等方面起着重要的作用,参与植物类黄酮化合物合成代谢。在SOMPA软件中对CHI基因编码的蛋白质进行二级结构分析,该蛋白含 α -螺旋97个,占总氨基酸的百分比为44.09%;含 β -折叠46个,占总氨基酸的百分比为20.91%; β -转角14个,占总氨基酸的百分比为6.36%;含无规则卷曲63个,占总氨基酸的百分比为28.64%。SWISS-MODEL中预测的枸杞CHI蛋白的三级结构如图5所示,含有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规则卷曲。

2.3 分子系统进化树的构建

将LcCHI1的氨基酸和其他20种植物CHI的氨基酸序列通过MEGA 7.0的NJ法构建系统进化树(图6),进行500次boot straping检验。本研究枸杞CHI1蛋白(Genbank No. OR026273)与烟草(N.

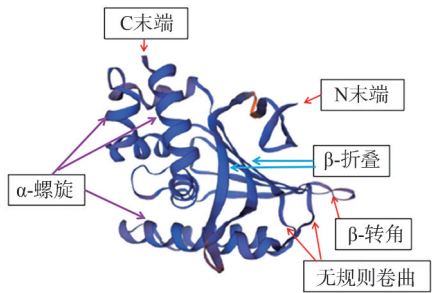


图5 LcCHI1蛋白质的三级结构

Fig. 5 Tertiary structure of LcCHI1 protein

attenuata)、智利番茄(*S. chilense*)、野生番茄(*S. pennellii*)、宁夏枸杞(*L. chinense*, Genbank No. AIC33515.1)和黑果枸杞(*L. ruthenicum*)等的CHI蛋白序列聚为一分支,茄科植物聚在同一分支。其他山茶科、蔷薇科、禾本科和豆科的CHI蛋白各自独立聚为分支(图6)。

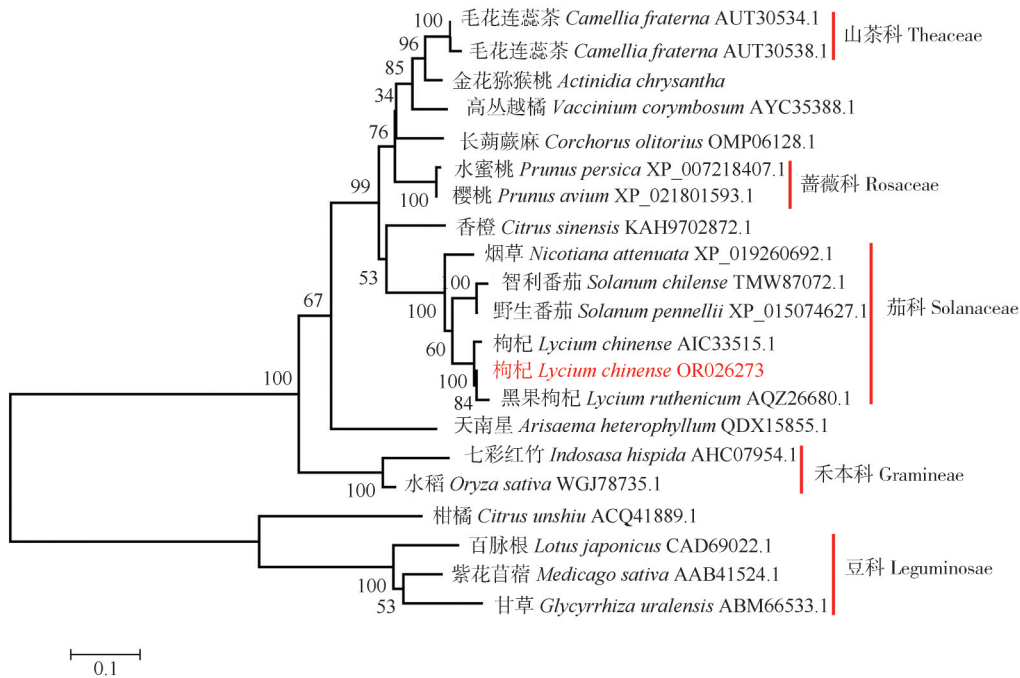


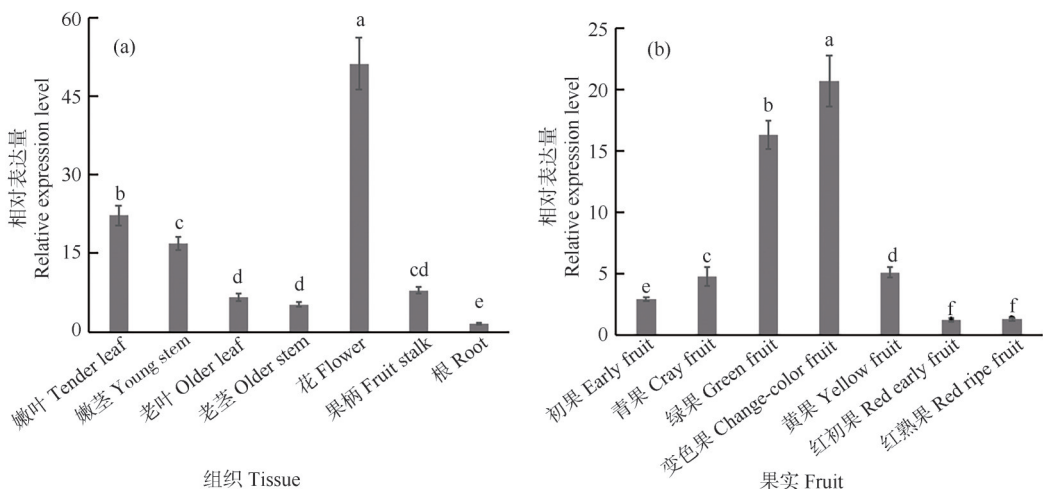
图6 21种植物CHI蛋白系统进化树

Fig. 6 CHI protein evolution tree from 21 plants

2.4 枸杞不同组织和果实 *LcCHI1* 相对表达量的变化

不同组织中 *LcCHI1* 相对表达量变化见图 7 (a), *LcCHI1* 的相对表达量在花中最高,其次是在嫩叶、嫩茎中表达较高,在根中表达量最低。其中花、嫩叶中 *LcCHI1* 表达量分别是根的 14.4 倍和 11.0

倍($P<0.05$)。枸杞果实发育中 *LcCHI1* 相对表达量变化见图 7(b),随着枸杞果实的发育, *LcCHI1* 相对表达量呈先增加后降低趋势,在变色果中表达量最高,其次在绿果中表达较高,在红初果和红熟果中表达量最低。其中变色果中 *LcCHI1* 表达量分别是红初果、红熟果的 17.6 倍和 16.4 倍($P<0.05$)。



(a)枸杞不同组织中 *LcCHI1* 基因的相对表达量。(b)枸杞不同果实 *LcCHI1* 基因的相对表达量。不同小写字母表示在 $\alpha = 0.05$ 水平上差异显著。

(a)The relative expression level of *LcCHI1* gene in different tissues of *L. chinense*. (b)The relative expression level of *LcCHI1* gene in different fruits of *L. chinense*. Different lowercase letters indicate significant differences at $\alpha = 0.05$ level.

图 7 枸杞不同组织和果实 *LcCHI1* 基因的相对表达量

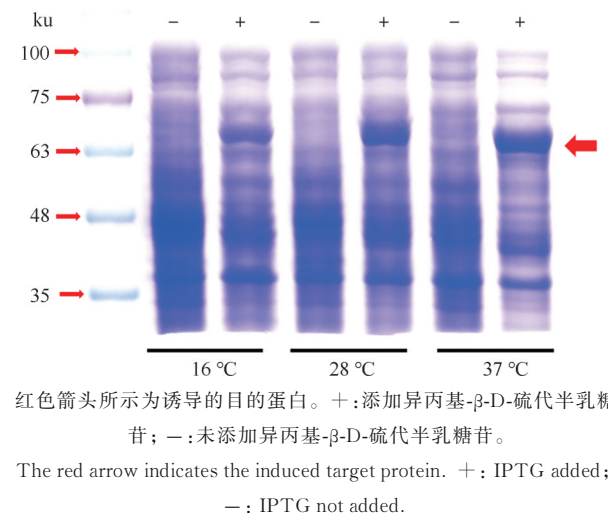
Fig. 7 Relative expression levels of *LcCHI1* gene in different tissues and fruit of *L. chinense*

2.5 *LcCHI1* 基因的原核表达

为了进一步验证 *LcCHI1* 基因是否能进行蛋白表达功能,将 *LcCHI1* 基因连入融合 MBP 标签蛋白的原核表达载体 pMAL-cRI-GWR 后,在 16、28 和 37 °C 这 3 个温度梯度下,加入 IPTG 后诱导 *LcCHI1* 蛋白的表达,结果见图 8。红色箭头所指位置为融合表达蛋白,分子量约 63 ku。随着培养温度的提高, *LcCHI1* 蛋白表达量逐渐增加。结果表明 *LcCHI1* 基因在原核表达载体中能被 IPTG 诱导表达。

3 讨论

类黄酮是植物体内重要的次生代谢产物之一,影响植物的花色^[33-34]、生理代谢^[35]和抗逆能力^[36]。类黄酮的合成代谢涉及多种酶,其中 CHI 是类黄酮合成的第二关键酶,在类黄酮的累积中起关键作用^[37,16]。目前已从多种植物中克隆到 *CHI* 基因。中华黄芪 (*Astragalus sinicus*) *AsiCHI* 基因编码 219 个



红色箭头所示为诱导的目的蛋白。+:添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷; -:未添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷。
The red arrow indicates the induced target protein. +: IPTG added; -: IPTG not added.

图 8 *LcCHI1* 重组蛋白的诱导表达

Fig. 8 Induced expression of *LcCHI1*

氨基酸^[38];紫丁香 (*Syringa oblata*) *SoCHI* 基因编码 227 个氨基酸残基^[39];多穗柯 (*Lithocarpus*

polystachyus) *CHI* 基因编码 231 个氨基酸^[40]; 甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 黑籽系 5B 中 *BnCHI-1* 编码 251 个氨基酸, 预测发现 *BnCHI-1* 蛋白存在查耳酮-黄烷酮异构酶结构域、底物 2S-柚皮苷的结合位点以及氢键网络氨基酸残基活性位点^[41]。本研究克隆得到 1 个枸杞 *CHI* 基因编码 220 个氨基酸残基, 预测具有 *CHI* 蛋白固有的保守序列, 其氨基酸序列与茄科植物的氨基酸序列相似性在 90% 以上。在系统进化树中与茄科植物在一个分支上, 但与豆科和山茶科亲缘关系较远。

已有研究表明 *CHI* 基因的表达具有特异性, 在不同物种、不同部位发育时期和不同部位的时空表达特异性均有所差异^[38-42]。*AsiCHI* 的过表达增强了转基因系中花青素的积累, *AsiCHI* 在叶片中的表达水平最高, 并且与花青素含量呈正相关^[38]。紫丁香 *SoCHI* 基因的相对表达量在嫩叶中最高, 在成熟叶中次之; 该基因的相对表达量在紫丁香花发育过程中先上升后下降, 并在花蕾期达到最高^[39]。多穗柯 *CHI* 基因在不同部位均有表达, 叶片的表达量最高, 是根部最低量的 9.75 倍^[40]。马缨杜鹃 (*Rhododendron delavayi*) *RdCHI1* 在开花过程中的表达水平先上升后下降, 在雌蕊中表达量最高, 在花瓣和根中相对较低^[43]。通过对不同发育阶段山茶花中 *CnCHIs* 的表达模式和总黄酮含量进行分析, 发现 *CnCHI4* 可能在山茶花类黄酮生物合成途径中发挥重要作用^[15]。*CnCHI4* 过表达显著增加了烟草和烟草中类黄酮的产生^[15]。*OsCHI* 基因在水稻的大多数组织中表达, 在节间中表达最多, 在抽穗前的圆锥花序中也有高水平表达, 但在圆锥花序出鞘后, 其表达显著下降^[44]。水稻含有 7 个 *CHI* 家族成员, *OsCHI3* 是 I 型 *CHI*, 其他 *OsCHI* 分为 III 型和 IV 型, 在大肠杆菌中表达了 *OsCHI1*、*OsCHI3*、*OsCHI6* 和 *OsCHI7* 蛋白, 并纯化了重组 *OsCHI* 蛋白^[45]。重组 *OsCHIs* 的蛋白酶活性测定表明, *OsCHI3* 催化柚皮素-查耳酮和异甘草素的异构化, 而其他重组 *OsCHI* 没有 *CHI* 蛋白酶活性, 显示 *OsCHI3* 是水稻中真正的 *CHI*^[45]。*OsCHI3* 的基因表达在紫外线 (UV) 胁迫下立即被诱导, 这表明它参与了水稻中类黄酮植物抗毒素 sakuranetin 的生物合成^[45]。本研究克隆了枸杞 *CHI* 基因的 cDNA 全长序列, 在各部位都检测到 *LcCHI1* 基因的表达, 在不同组织茎、叶、根、果实和花中都有表达, 其中在

花中表达量最高, 其次是在嫩叶、嫩茎中, 在根中表达量最低, 花中 *LcCHI1* 表达量是根的 14.4 倍。随着枸杞果实的发育, *LcCHI1* 相对表达量呈先增加后降低趋势, 在变色果中表达量最高, 其次在绿果中, 在红初果和红熟果中表达量最低。枸杞果实变色期呈现出橙色, 类黄酮途径代谢比较旺盛, 需要的 *LcCHI1* 的转录水平也比较高。本研究成功构建了 *LcCHI1* 重组表达载体, 并在大肠杆菌中表达了该蛋白, 为该基因表达调控机理的研究奠定了基础。

4 结 论

本研究以枸杞果实为材料, 克隆了枸杞查耳酮异构酶 *LcCHI1* 基因, 该基因开放阅读框为 633 bp, 编码 210 个氨基酸。*LcCHI1* 蛋白在 6~188 位点属于 Chalcone_3 family。分子系统进化树显示枸杞 *CHI* 蛋白序列与茄科植物 *CHI* 蛋白序列聚在同一分支。*LcCHI1* 相对表达量在枸杞花和变色果中最高, *LcCHI1* 基因在原核表达载体中能被 IPTG 诱导表达蛋白。该研究结果为枸杞类黄酮合成代谢机制提供理论基础。

参考文献 References

- [1] Wang J Y, Jiang Y F, Sun T, Zhang C H, Liu X H, Li Y S. Genome-wide classification and evolutionary analysis reveal diverged patterns of chalcone isomerase in plants [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 961
- [2] Park S H, Lee C W, Cho S M, Lee H, Park H, Lee J, Lee J H. Crystal structure and enzymatic properties of chalcone isomerase from the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica* Desv [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192415
- [3] Ngaki M N, Louie G V, Philippe R N, Manning G, Pojer F, Bowman M E, Li L, Larsen E, Wurtele E S, Noel J P. Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis [J]. *Nature*, 2012, 485(7399): 530-533
- [4] Shimada N, Aoki T, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Ayabe S I. 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 Physiology*, 2003, 131(3): 941-951
- [5] Ralston L, Subramanian S, Matsuno M, Yu O. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(4): 1375-1388
- [6] Jiang W B, Yin Q G, Wu R R, Zheng G S, Liu J Y, Dixon R A, Pang Y Z. Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(22): 7165-7179

- [7] Ban Z N, Qin H, Mitchell A J, Liu B X, Zhang F X, Weng J K, Dixon R A, Wang G D. Noncatalytic chalcone isomerase-fold proteins in *Humulus lupulus* are auxiliary components in prenylated flavonoid biosynthesis[J]. *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*, 2018, 115(22): E5223-E5232
- [8] Dastmalchi M, Dhaubhadel S. Soybean chalcone isomerase: Evolution of the fold, and the differential expression and localization of the gene family [J]. *Planta*, 2015, 241(2): 507-523
- [9] Cheng A X, Zhang X B, Han X J, Zhang Y Y, Gao S, Liu C J, Lou H X. Identification of chalcone isomerase in the basal land plants reveals an ancient evolution of enzymatic cyclization activity for synthesis of flavonoids[J]. *New Phytologist*, 2018, 217(2): 909-924
- [10] Ni R, Zhu T T, Zhang X S, Wang P Y, Sun C J, Qiao Y N, Lou H X, Cheng A X. Identification and evolutionary analysis of chalcone isomerase-fold proteins in ferns[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(1): 290-304
- [11] van Tunen A J, Koes R E, Spelt C E, van der Krol A R, Stuitje A R, Mol J N. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: Coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes[J]. *The EMBO Journal*, 1988, 7(5): 1257-1263
- [12] Lan X Z, Quan H, Xia X L, Yin W L, Zheng W L. Molecular cloning and transgenic characterization of the genes encoding chalcone synthase and chalcone isomerase from the Tibetan herbal plant *Mirabilis himalaica* [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2016, 63(3): 419-426
- [13] Shah F L A, Baharum S N, Goh H H, Leow T C, Ramzi A B, Oslan S N, Sabri S. Molecular cloning and in silico analysis of chalcone isomerase from *Polygonum minus* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2023, 50(6): 5283-5294
- [14] Keykha F, Bagheri A, Moshtaghi N, Bahrami A R, Sharifi A. RNAi-induced silencing in floral tissues of *Petunia hybrida* by agroinfiltration: A rapid assay for chalcone isomerase gene function analysis[J]. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 2016, 62(10): 26-31
- [15] Yu S H, Li J Y, Peng T, Ni S, Feng Y, Wang Q S, Wang M Y, Chu X, Fan Z Q, Li X L, Yin H F, Ge W C, Liu W X. Identification of chalcone isomerase family genes and roles of *CnCHI4* in flavonoid metabolism in *Camellia nitidissima* [J]. *Biomolecules*, 2022, 13(1): 41
- [16] Xu H H, Lan Y P, Xing J Y, Li Y, Liu L C, Wang Y Q. AfCHIL, a type IV chalcone isomerase, enhances the biosynthesis of naringenin in metabolic engineering[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 891066
- [17] Zhu J H, Zhao W, Li R S, Guo D, Li H L, Wang Y, Mei W L, Peng S Q. Identification and characterization of chalcone isomerase genes involved in flavonoid production in *Dracaena cambodiana* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 616396
- [18] Sun W, Shen H, Xu H, Tang X X, Tang M, Ju Z G, Yi Y. Chalcone isomerase a key enzyme for anthocyanin biosynthesis in *Ophiorrhiza japonica* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 865
- [19] Zhao C N, Liu X J, Gong Q, Cao J P, Shen W X, Yin X R, Grierson D, Zhang B, Xu C J, Li X, Chen K S, Sun C D. Three AP2/ERF family members modulate flavonoid synthesis by regulating type IV chalcone isomerase in citrus[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(4): 671-688
- [20] Muir S R, Collins G J, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric De Vos C H, van Tunen A J, Verhoeven M E. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(5): 470-474
- [21] Li F X, Jin Z P, Zhao D X, Cheng L Q, Fu C X, Ma F S. Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involucrata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(6): 553-560
- [22] Shi Z G, Wei F, Wan R, Li Y X, Wang Y J, An W, Qin K, Dai G L, Cao Y L, Chen X Y, Wang X Y, Yang L B. Comprehensive evaluation of nitrogen use efficiency of different *Lycium barbarum* L cultivars under nitrogen stress[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 295: 110807
- [23] Gong H G, Rehman F, Ma Y, Biao A, Zeng S H, Yang T S, Huang J G, Li Z, Wu D P, Wang Y. Germplasm resources and strategy for genetic breeding of *Lycium* species: A review [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 802936
- [24] Liu H, Cui B, Zhang Z. Mechanism of glycometabolism regulation by bioactive compounds from the fruits of *Lycium barbarum*: A review [J]. *Food Research International*, 2022, 159: 111408
- [25] Qiao F, Zhang K M, Zhou L Y, Qiu Q S, Chen Z N, Lu Y H, Wang L H, Geng G G, Xie H C. Analysis of flavonoid metabolism during fruit development of *Lycium chinense* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2022, 279: 153856
- [26] Ma Z F, Zhang H X, Teh S S, Wang C W, Zhang Y T, Hayford F, Wang L Y, Ma T, Dong Z H, Zhang Y, Zhu Y F. Goji berries as a potential natural antioxidant medicine: An insight into their molecular mechanisms of action [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019: 2437397
- [27] Oh M R, Jung S J, Chae S W, Park B H, Lee S O. *Lycium chinense* Miller fruit extract lowers liver enzyme levels in subjects with mild hepatic dysfunction: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *European Journal of Nutrition*, 2023, 62(3): 1415-1425
- [28] Wen C L, Liu C H, Li Y T, Xia T B, Zhang X H, Xue S T, Olatunji O J. Ameliorative potentials of the ethanolic extract from *Lycium chinense* leaf extract against diabetic cardiomyopathy. Insight into oxido-inflammatory and apoptosis modulation [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 154: 113583
- [29] Zhao S C, Tuan P A, Li X H, Kim Y B, Kim H, Park C G, Yang J L, Li C H, Park S U. Identification of phenylpropanoid biosynthetic genes and phenylpropanoid accumulation by transcriptome analysis of *Lycium chinense* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 802
- [30] Guan C F, Song X Y, Ji J, Li X Z, Jin C, Guan W Z, Li J, Wang G. Salicylic acid treatment enhances expression of chalcone isomerase gene and accumulation of corresponding flavonoids during fruit maturation of *Lycium chinense* [J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 239(5): 857-865
- [31] 赵建华. 枸杞果实发育期糖分及其糖代谢相关基因表达分析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2016
- Zhao J H. Study on sugar components and expression of sugar metabolizing genes in wolfberry (*Lycium* Lin) fruit development [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016 (in Chinese)
- [32] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [33] Zhu C Y, Peng C, Qiu D Y, Zeng J W. Metabolic profiling and transcriptional analysis of carotenoid accumulation in a red-fleshed mutant of pummelo (*Citrus grandis*) [J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4595
- [34] Li G, Michaelis D F, Huang J J, Serek M, Gehl C. New insights into the genetic manipulation of the *R2R3-MYB* and *CHI* gene families on anthocyanin pigmentation in *Petunia hybrida* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 203: 108000
- [35] Wang Y Y, Shi Y F, Li K Y, Yang D, Liu N N, Zhang L J, Zhao L,

- Zhang X F, Liu Y J, Gao L P, Xia T, Wang P Q. Roles of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in the flavonoid pathway: A review of the functional diversity of F3H, FNS I, FLS, and LDOX/ANS[J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6745
- [36] Fu S D, Deng Y, Zou K, Zhang S F, Liu X D, Liang Y L. Flavonoids affect the endophytic bacterial community in *Ginkgo biloba* leaves with increasing altitude[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 982771
- [37] Yin Y C, Zhang X D, Gao Z Q, Hu T, Liu Y. The research progress of chalcone isomerase (CHI) in plants[J]. *Molecular Biotechnology*, 2019, 61(1): 32-52
- [38] Zhang X, Xu J, Si L L, Cao K, Wang Y G, Li H, Wang J H. Cloning, identification, and functional analysis of the chalcone isomerase gene from *Astragalus sinicus*[J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14(7): 1400
- [39] 王蕊, 李彦慧, 郑健. 紫丁香查尔酮异构酶基因 *SoCHI* 的克隆及表达分析[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(3): 11-17
- Wang R, Li Y H, Zheng J. Cloning and expression analysis on chalcone isomerase gene *SoCHI* in *Syringa oblata*[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2018, 27(3): 11-17 (in Chinese)
- [40] 林丽梅, 龙月红, 冯若宣, 尹峰, 黄剑, 邢朝斌. 多穗柯查耳酮异构酶基因的克隆与序列分析[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5080-5084
- Lin L M, Long Y H, Feng R X, Yin F, Huang J, Xing Z B. Cloning and bioinformatic analysis of chalcone isomerase gene in *Lithocarpus polystachyus*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 48(24): 5080-5084 (in Chinese)
- [41] 许本波, 谢伶俐, 李加纳, 柴友荣, 曾柳. 甘蓝型油菜 *BnCHI-1* 基因的克隆和表达特征分析[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(2): 142-149
- Xu B B, Xie L L, Li J N, Chai Y R, Zeng L. Cloning and characterization of *BnCHI-1* from *Brassica napus*[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2016, 38(2): 142-149 (in Chinese)
- [42] 李洋, 黄武略, 林福永, 罗超, 李新艺, 刘应丽, 朱佳鹏, 冯志熙, 黄美娟, 黄海泉. 滇水金凤 *CHI* 基因的克隆及表达分析[J]. 江西农业大学学报, 2020, 42(3): 468-474
- Li Y, Huang W L, Lin F Y, Luo C, Li X Y, Liu Y L, Zhu J P, Feng Z X, Huang M J, Huang H Q. Cloning and expression analysis of *CHI* genes in *Impatiens uliginosa* [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2020, 42(3): 468-474 (in Chinese)
- [43] 孙威, 孙世宇, 陈一然, 王聿晗, 张艳, 鞠志, 乙引. 马缨杜鹃查尔酮异构酶基因 *RdCHI1* 的克隆与功能解析[J]. 园艺学报, 2022, 49(11): 2407-2418
- Sun W, Sun S Y, Chen Y R, Wang Y H, Zhang Y, Ju Z G, Yi Y. Cloning and function analysis of chalcone isomerase gene *RdCHI1* in *Rhododendron delavayi*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49(11): 2407-2418 (in Chinese)
- [44] Hong L L, Qian Q, Tang D, Wang K J, Li M, Cheng Z K. A mutation in the rice chalcone isomerase gene causes the golden hull and internode 1 phenotype[J]. *Planta*, 2012, 236(1): 141-151
- [45] Park S I, Park H L, Bhoo S H, Lee S W, Cho M H. Biochemical and molecular characterization of the rice chalcone isomerase family [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(10): 2064

责任编辑:董金波



第一作者简介:乔枫,教授,硕士生导师。科技特派员,教育部学位中心博硕士学位论文盲审专家,全国本科学位论文抽查盲审专家。研究专业为生物化学与分子生物学。主要从事高原特色植物青稞和枸杞逆境生理代谢和分子机制研究、藏药植物药用成分的次生代谢和分子机制研究。近5年主持和主要参与科研项目15项,主持青海省科技厅项目2项、教育厅项目1项、中央财政专项子课题1项、省部级横向项目1项,参与国家自然科学基金项目1项、青海省科技厅项目2项、中央财政专项子课题2项、省部级横向项目5项。近5年发表论文40余篇,其中以第一作者和通讯作者发表SCI论文10篇、中文核心30篇。以第一作者在青海省科技厅登记成果10项。