



## 生菜查尔酮异构酶基因克隆及体外酶活测定

徐朝阳<sup>1,2</sup>, 张苛苛<sup>3</sup>, 王晨晨<sup>1,2</sup>, 张彬<sup>2</sup>, 刘雪<sup>2</sup>, 唐金富<sup>3</sup>, 周军<sup>1</sup>, 刘敏<sup>1,\*</sup>, 李大勇<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>山东师范大学生命科学学院, 济南250014

<sup>2</sup>北京市农林科学院蔬菜研究所, 蔬菜种质改良北京市重点实验室, 北京100097

<sup>3</sup>中国中医科学院中药资源中心, 道地药材国家重点实验室, 北京100700

\*共同通信作者: 李大勇(lidayong@nercv.org)、刘敏(minliu@sdnu.edu.cn)

**摘要:** 查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)是植物黄酮类化合物合成的关键限速酶之一。生菜(*Lactuca sativa*)是全球性的叶用蔬菜, 含有丰富的黄酮类物质。本研究在生菜基因组中鉴定到一个编码查尔酮异构酶的基因*LsCHI*, 该基因编码235 aa的蛋白质, 具有典型的查尔酮异构酶活性残基位点。系统进化分析显示, *LsCHI*属于I型查尔酮异构酶。基因表达模式分析表明, *LsCHI*在生菜的地上部分表达量明显高于地下部分, 且在花序中表达量最高。构建原核表达载体pET28a-*LsCHI*并诱导表达, 纯化后获得*LsCHI*蛋白。体外酶活实验表明, *LsCHI*蛋白催化柚皮素查尔酮转化为柚皮素。本研究为进一步探讨查尔酮异构酶在生菜中的功能以及在黄酮类化合物生物合成中的作用提供一定基础。

**关键词:** 生菜; 查尔酮异构酶; 黄酮类化合物; 酶活鉴定

## Cloning and catalytic analysis of chalcone isomerase *in vitro* in lettuce (*Lactuca sativa*)

XU Zhaoyang<sup>1,2</sup>, ZHANG Keke<sup>3</sup>, WANG Chenchen<sup>1,2</sup>, ZHANG Bin<sup>2</sup>, LIU Xue<sup>2</sup>, TANG Jinfu<sup>3</sup>, ZHOU Jun<sup>1</sup>, LIU Min<sup>1,\*</sup>, LI Dayong<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

<sup>2</sup>Beijing Key Laboratory of Vegetable Germplasm Improvement, Vegetable Research Institute, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

<sup>3</sup>State Key Laboratory of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

\*Co-corresponding authors: Li DY (lidayong@nercv.org), Liu M (minliu@sdnu.edu.cn)

**Abstract:** Chalcone isomerase (CHI) is a key rate-limiting enzyme in flavonoids biosynthesis in plants. Lettuce (*Lactuca sativa*) is an important leafy vegetable worldwide, which contains abundant flavonoids. Here, a gene encoding chalcone isomerase was identified from lettuce, which was designated as *LsCHI*. *LsCHI* encodes a protein of 235 amino acids with a typical chalcone isomerase active residue site. Phylogenetic analysis shows that *LsCHI* belongs to the type I chalcone isomerase. Gene expression patterns analysis shows that *LsCHI* expression was significantly higher in the above-ground part of lettuce than in the underground part, with the highest expression in the inflorescence. The prokaryotic expression vector pE-

收稿 2023-03-23 修定 2023-10-03

资助 中央本级重大减支项目(2060302)、北京市财政局现代农业产业技术体系北京市设施蔬菜创新团队项目(BAIC01-2022-5)和北京市农业局北京市种质创新和新品种育种联合攻关项目(G20220628003-01)。

T28a-*LsCHI* was constructed and induced to express *LsCHI*. *LsCHI* protein was obtained after purification. *In vitro* enzymatic assay shows that *LsCHI* protein catalyzed the conversion of naringenin chalcone to naringenin. This study provides a basis for further study on the function of chalcone isomerase and its roles in the biosynthesis of flavonoids in lettuce.

**Key words:** lettuce; chalcone isomerase; flavonoids; enzymatic assay

生菜是叶用莴苣(*Lactuca sativa*)的俗称, 属菊科菊苣族莴苣属一年或二年生蔬菜。因为人们习惯生食叶片, 故而习惯称之为生菜。生菜原产地为地中海沿岸, 一般认为是由野生莴苣驯化而来(范双喜等2021; Wei等2021)。现如今生菜已是世界性蔬菜, 在全球有大规模种植, 我国生菜产量在2022年达到了1 432.31万t (<https://m.chinabgao.com/k/shengcai/65516.html>)。

黄酮类化合物(flavonoids)是植物体内重要的次级代谢产物(Buer等2010), 该类化合物含有共轭双键, 具有一定还原性。植物受到胁迫(干旱、盐碱、高低温、细菌病毒侵害等)时, 体内活性氧会增加, 黄酮类化合物能够有效降低植物体内活性氧含量, 使其维持正常氧化还原状态(Buer和Muday 2004; Dixon和Paiva 1995; Taylor和Grotewold 2005)。因此黄酮类化合物在增强植物抗逆能力方面具有重要作用(于安东等2022)。此外, 黄酮类化合物也有药用价值, 如具有抗炎、抗氧化等功能(程兰等2022)。

4-香豆酰辅酶A (4-coumaroyl-CoA)和丙二酰辅酶A (malonyl-CoA)在查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)催化下缩合成柚皮素查尔酮(naringenin chalcone) (何梦媛等2022), 然后柚皮素查尔酮在查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)的催化下合成柚皮素(naringenin) (Ververidis等2007)。查尔酮异构酶根据功能可分为4种类型: I型、II型、III型和IV型(Ralston等2005)。其中, I型和II型具有查尔酮异构酶催化活性, III型和IV型不具有催化活性(Ngaki等2012)。I型只能把柚皮素查尔酮催化合成为柚皮素(Dixon等1988); II型不仅可以将柚皮素查尔酮催化为柚皮素, 还可以将异甘草素(isoliquiritigenin)催化为甘草素(liquiritigenin), 在植物中主要负责异黄酮的生成(Shimada等2003; Dixon等1988; Hahlbrock等1970)。III型又称为脂肪酸结合蛋白

(FAP), 只存在于叶绿体(Kaltenbach等2018; Gensheimer和Mushegian 2004)。IV型被称为*CHI-Like*, 可以通过与CHS互作来增强CHS活性(Ban等2018; Jiang等2015)。柚皮素下游酶丰富多样, 使得黄酮类化合物具有极高的多样性。在黄酮类化合物合成前期, CHI是黄酮类化合物合成的关键限速酶(Liu等2021), 研究CHI对于黄酮类化合物的合成乃至植物抗胁迫都具有重要意义。

本研究从生菜基因组中鉴定到一个编码查尔酮异构酶的基因*LsCHI*。以*LsCHI*为研究对象, 对其进行了生物信息学分析、表达分析、酶活性测定, 以为生菜黄酮类化合物的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试材料为生菜(*Lactuca sativa* L.)品种‘莴苣绿雅’, 本实验室编号为L46 (下文简称为L46)。种子购自京研益农(北京)种业科技有限公司。生菜材料在北京市农林科学院蔬菜研究所温室种植(温度25°C, 光照强度75  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )。

### 1.2 生物信息学分析

在拟南芥数据库(TAIR; <https://www.arabidopsis.org>)中下载CHI氨基酸序列(At3g55120.1)。通过Phytozome数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)BLASTp, 找到*LsCHI* (Lsat1 v5 gn 96622.1)氨基酸序列, 再通过同源比对得到其他物种中的同源序列。用桃(*Prunus persica* L.)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)、拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]、玉米(*Zea mays* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、葡萄(*Vitis vinifera* L.)中的CHI蛋白与生菜*LsCHI*进行序列比对。用MEGA 6通过neighbor-joining构建系统发育树(Tamura等2013)。

### 1.3 全长序列克隆及载体构建

通过Phytozome数据库BLASTp, 找到*LsCHI*编

码区序列(coding sequence, CDS)。用snappgene设计引物用于扩增CDS。PCR体系(总体积50  $\mu\text{L}$ )包括: 25  $\mu\text{L}$  2 $\times$ Mix、1  $\mu\text{L}$  cDNA、2.5  $\mu\text{L}$  Primer-F、2.5  $\mu\text{L}$  Primer-R、19  $\mu\text{L}$  双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)。PCR反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s、55 $^{\circ}\text{C}$  30 s、72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 34个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  7 min。

PCR产物进行电泳分析目的条带, 用FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit V21.1 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)回收目的条带。用*Bam*H I和*Sal* I酶切pET28a: 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切2 h, 并将*LsCHI*与酶切后的pET28a连接。连接体系: 2  $\mu\text{L}$  载体、3  $\mu\text{L}$  目的片段、5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ mix。在50 $^{\circ}\text{C}$ 下连接20 min。将重组的载体转化到大肠杆菌[*Escherichia coli* (Mig.) Cast. & Chalm.] Trans1-T1中, 在细菌培养箱37 $^{\circ}\text{C}$ 培养14 h后, 挑单菌落进行菌落PCR, 并测序。

#### 1.4 总RNA提取以及*LsCHI*在生菜不同组织中差异表达分析

使用VazymeRNA提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 提取L46散叶生菜的叶、茎、开花的花序、未开花的花序、根中的RNA, 然后用HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR试剂盒(诺唯赞生物科技股份有限公司)反转录获得cDNA。用NanoDrop超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific)鉴定RNA浓度与质量。反转录体系: 1  $\mu\text{g}$  RNA、1  $\mu\text{L}$  Enzyme Mix、4  $\mu\text{L}$  5 $\times$  All-in-one qRT supermix, 用RNase-free ddH<sub>2</sub>O补足至20  $\mu\text{L}$ 。

利用实时荧光定量仪(Hoffmann-La Roche, 瑞士)检测生菜根、茎、叶、未开花的花序、开花的花序中*LsCHI*的表达量。选取生菜*Actin*基因为内参基因(Su等2020)。*LsCHI*引物序列(5'→3')为: qRT-LSCHI-F, TCTTCACAACCTCTTCCATCG; qRT-LsCHI-R, AACACCATACCTTCCGATCAC。*actin*引物序列(5'→3')为: qRT-LsACT-F, CTGGTGTGATGGTAGGTATGG; qRT-LsACT-R, CTCGTTGTAGAAAGTGTGATGC。实时荧光定量PCR(quantitative real-time-PCR, qPCR)体系: 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$  PerfectStart Green qPCR Super Mix、0.4  $\mu\text{L}$  Primer-F、0.4  $\mu\text{L}$  Primer-R、1  $\mu\text{L}$  cDNA、8.2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  5 s、60 $^{\circ}\text{C}$  15 s、

72 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 40个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$  5 s、60 $^{\circ}\text{C}$  60 s; 50 $^{\circ}\text{C}$  30 s。qPCR结束后, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析生菜不同组织中*LsCHI*表达量。

#### 1.5 异源表达

测序成功后, 从大肠杆菌Trans-T1中根据质粒提取试剂盒说明书提取重组载体pET28a-*CHI*, 并将它转化到大肠杆菌BL21 (DE3)中。挑单菌落进行PCR, 将阳性菌接种于含50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素的300 mL LB液体培养基中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的细菌培养箱中培养12~16 h。培养至OD值为0.6~0.8时, 加入300  $\mu\text{L}$  800  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG), 在16 $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的细菌培养箱中, 诱导16 h。用离心机4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 400 $\times$ g离心收集菌体。在浓度为50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的反应缓冲液(体积分数为10%的甘油、2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二硫苏糖醇, pH7.5)中, 利用超声破碎仪破碎5 min。常温离心20 min (离心力设为12 000 $\times$ g), 弃沉淀。用0.45  $\mu\text{m}$ 过滤器过滤上清, 然后对上清进行纯化。以未经诱导的菌液和未经纯化的蛋白提取物做对照, 进行聚丙烯酰胺(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)电泳, 剩余蛋白在缓冲液中于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

#### 1.6 体外酶活测定

在常温25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行酶活性检测: 加入2.5  $\mu\text{g}$  *LsCHI*于250  $\mu\text{L}$  反应缓冲液中, 孵育1 min; 然后马上加入浓度为40  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的柚皮素查尔酮作为底物, 控制酶催化反应的时间为1 min (Zhao等2021)。反应时间结束后, 加入500  $\mu\text{L}$  乙酸乙酯结束反应; 再用40  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异甘草素作为底物, 反应10min, 之后加入500  $\mu\text{L}$  乙酸乙酯终止反应。再将样品抽提2次, 氮吹去除溶剂, 之后加入300  $\mu\text{L}$  甲醇重新溶解样品。用0.22  $\mu\text{m}$ 的过滤器过滤后, 加入含有内插管的液相小瓶, 利用超高效液相色谱仪检测样品中的组分; 用ACQUITYUPLC BEH C18色谱柱(2.1 $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 流动相为A: 体积分数为0.1%甲酸:水; B: 体积分数为0.1%甲酸:乙腈。洗脱条件: 0~5 min, 10%~15% B; 5~16 min, 15%~95% B; 16 min~19 min, 95%~10% B; 19~21.2 min, 10% B。流速: 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。设置柱温为40 $^{\circ}\text{C}$ , 进样量为2  $\mu\text{L}$ 。柚皮素查尔酮紫外最大吸收波长为

254 nm, 因此, 以柚皮素查尔酮为底物时紫外吸收波长设为254 nm; 异甘草素紫外最大吸收波长为288 nm, 以异甘草素为底物时, 紫外吸收波长设为288 nm。通过 Q-TOF-MS (Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry, 四极杆飞行时间质谱仪) 对LsCHI进行定性分析, Waters Xevo G2-S Q-TOF-MS质谱使用负离子检测, 运用电喷雾离子化源方法(ESI); 扫描范围 $m/z$ 为50~1 500, 扫描时间0.2 s, 锥孔电压40 V, 离子源温度100°C。

## 2 实验结果

### 2.1 生菜LsCHI及其编码蛋白的特征

为了鉴定并克隆生菜CHI基因, 本研究以拟南芥CHI (AT3G55120.1)氨基酸序列为模板, 检索生菜的参考基因组(Jiang等2021), 得到与它同源性最高的序列Lsat1 v5 gn 96622.1。该基因编码235个氨基酸, 分子质量为25.20 kDa, 等电点为4.74。用该基因编码蛋白的氨基酸序列与桃(*Prunus persica*)、向日葵(*Helianthus annuus*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)、葡萄(*Vitis vinifera*)等物种的CHI蛋白氨基酸序列进行比对(图1), 发现这些CHI蛋白具有较

高的保守性; 将该序列命名为LsCHI (*Lactuca sativa* chalcone isomerase)。和其他物种CHI蛋白类似, LsCHI的氨基酸序列中也具有CHI的一些可能的活性位点, 如: Leu-64、Thr-50、Gly-39、Arg-38、Phe-31、Val-87、Tyr-108、Cys-116、Lys-136 (图1)。

为了进一步分析LsCHI与其他物种中CHI的进化关系, 对生菜CHI氨基酸序列和来自其他物种的25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(图2), 发现26个CHI氨基酸序列有4个类型(I-IV型) (Yin等2019)。LsCHI被归为I型, 推测它具有催化柚皮素查尔酮为柚皮素的功能。

### 2.2 LsCHI在生菜不同组织中的表达模式

为了对LsCHI在生菜不同组织中的表达模式进行分析, 选取定植1个月生菜L46的根、茎、叶以及开花后花序和未开花花序, 提取RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳观察到清晰的28S、18S条带(图3-A), 结果说明RNA质量合格。然后将RNA反转录为单链cDNA作为荧光实时定量PCR的模板。

查尔酮异构酶是黄酮类化合物合成的关键限速酶。为进一步探究它的功能, 我们通过实时荧光定量PCR, 分析生菜L46根、茎、叶、花序等组织中LsCHI的表达量(图3-B), 发现LsCHI在开花的花

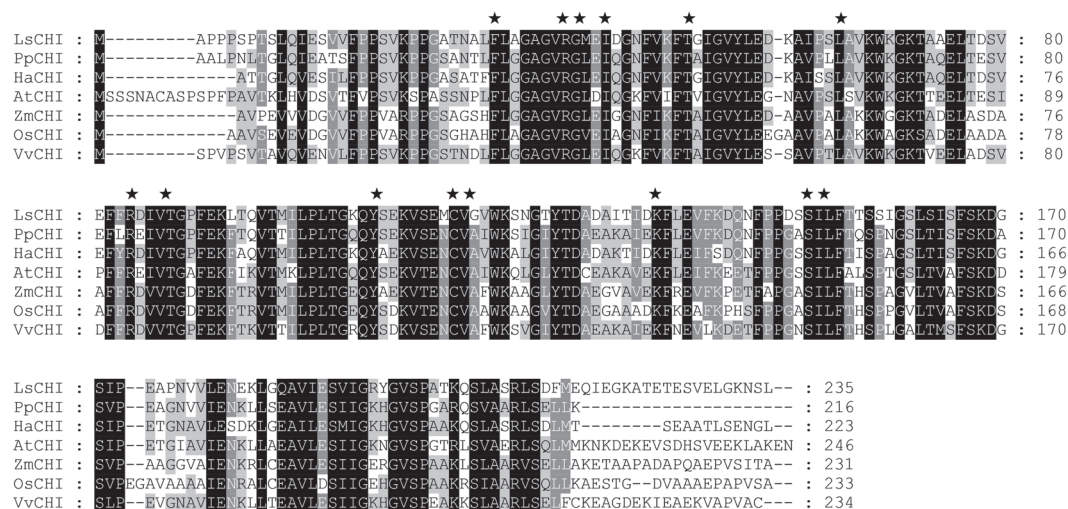


图1 LsCHI与其他物种CHI蛋白氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of LsCHI and CHIs from other species

活性位点的残基用“★”标识。Ls: *Lactuca sativa*, 生菜; At: *Arabidopsis thaliana*, 拟南芥; Zm: *Zea mays*, 玉米; Pp: *Prunus persica*, 桃; Ha: *Helianthus annuus*, 向日葵; Os: *Oryza sativa*, 水稻; Vv: *Vitis vinifera*, 葡萄。

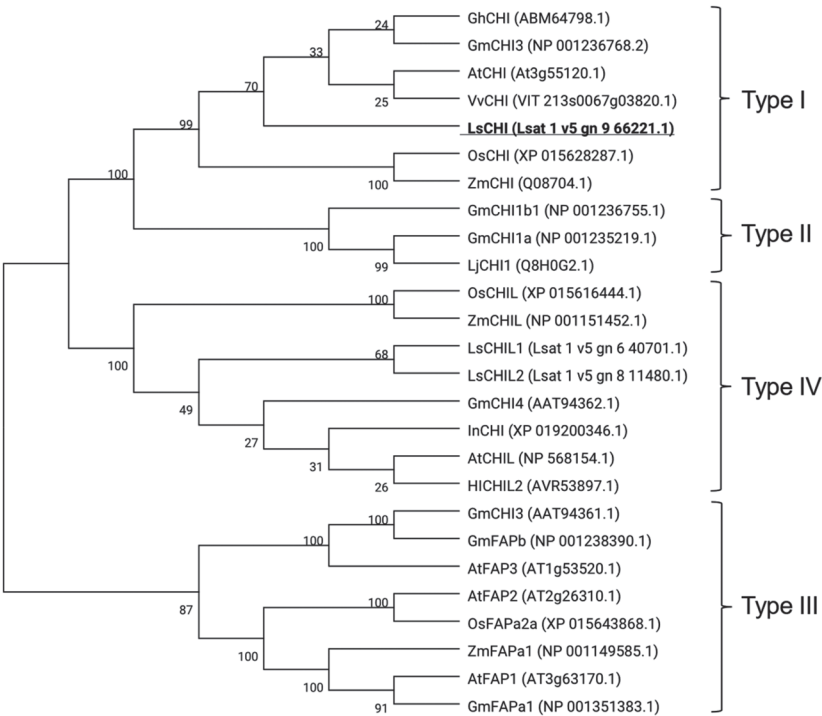


图2 CHI蛋白系统发育树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of CHI proteins

生菜CHI用粗体加下划线标识。At: 拟南芥; Gm: 大豆; Gh: 陆地棉; Vv: 葡萄; Ls: 生菜; Os: 水稻; Zm: 玉米; Lj: 光叶百脉根; In: 牵牛; Hl: 啤酒花。

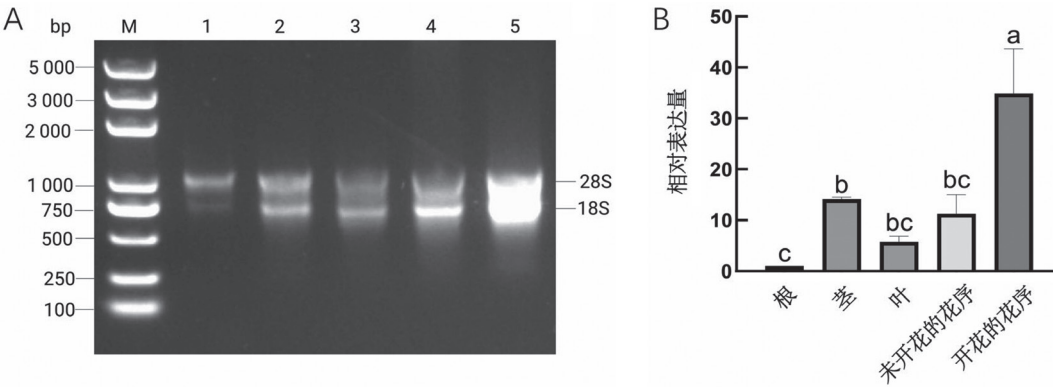


图3 *LsCHI*基因在生菜不同组织中的表达分析  
Fig. 3 Expression analysis of *LsCHI* gene in different tissues of *L. sativa*

A: 生菜不同组织的RNA检测; M: DNA marker; 1: 根; 2: 茎; 3: 叶; 4: 开花的花序; 5: 未开花的花序。B: *LsCHI*基因在生菜不同组织中的表达分析。

序中的表达量最高, 未开花的花序、茎中偏高, 叶中*LsCHI*表达量偏低, 根中*CHI*表达量最低。

2.3 *LsCHI*蛋白的表达和纯化

为了进一步检测*LsCHI*的活性, 我们在体外诱

导表达和纯化LsCHI蛋白, 诱导后的总蛋白以及纯化后蛋白进行SDS-PAGE分析, 结果显示诱导后的总蛋白相比诱导前在25.2 kDa处的蛋白量明显增加, 并且纯化后的蛋白条带也在25.2 kDa附近出现(图4), 说明LsCHI蛋白被成功表达和纯化。

2.4 LsCHI体外酶活鉴定

为了检测LsCHI的活性, 我们利用高效液相色谱仪对LsCHI蛋白的反应产物进行检测。本实验用柚皮素查尔酮与异甘草素分别作为反应底物, 加入纯化后的LsCHI蛋白进行酶反应, 随后用高效液相色谱仪对反应后的组分进行了检测。结果显示, LsCHI可以在1 min内将柚皮素查尔酮催化为柚皮素, 但在对照实验中, 只有少量柚皮素查尔酮发生自发转化; 而当以异甘草素为反应底物时, LsCHI不能催化异甘草素转化为甘草素(图5-A)。前人研究表明异甘草素只能被II型CHI催化(Winkel-Shirley 2001)。利用Q-TOF-MS (四级杆飞行时

间质谱)对反应样品产物的具体化学物质进行分析, 发现产物峰图与柚皮素标品一致(图5-B)。体外酶活实验检测结果表明, LsCHI在体外能够催化柚皮素查尔酮转化为柚皮素, 但不能催化异甘草素转化为甘草素。因此, 它属于I型查尔酮异构酶, 并具有正常的酶活性。

3 讨论

本研究在生菜中克隆并鉴定了一个编码查尔酮异构酶的基因*LsCHI*。系统发育分析表明LsCHI与已报道的I型查尔酮异构酶聚为一支, 随后的体外酶活性测定发现LsCHI只能催化柚皮素查尔酮转化为柚皮素, 不能将异甘草素催化为甘草素, 进一步表明LsCHI可能为I型查尔酮异构酶。I型查尔酮异构酶能够将柚皮素查尔酮催化为柚皮素, 是黄酮类化合物合成的关键酶之一。研究I型查尔酮异构酶对黄酮类化合物的合成具有重要意义。

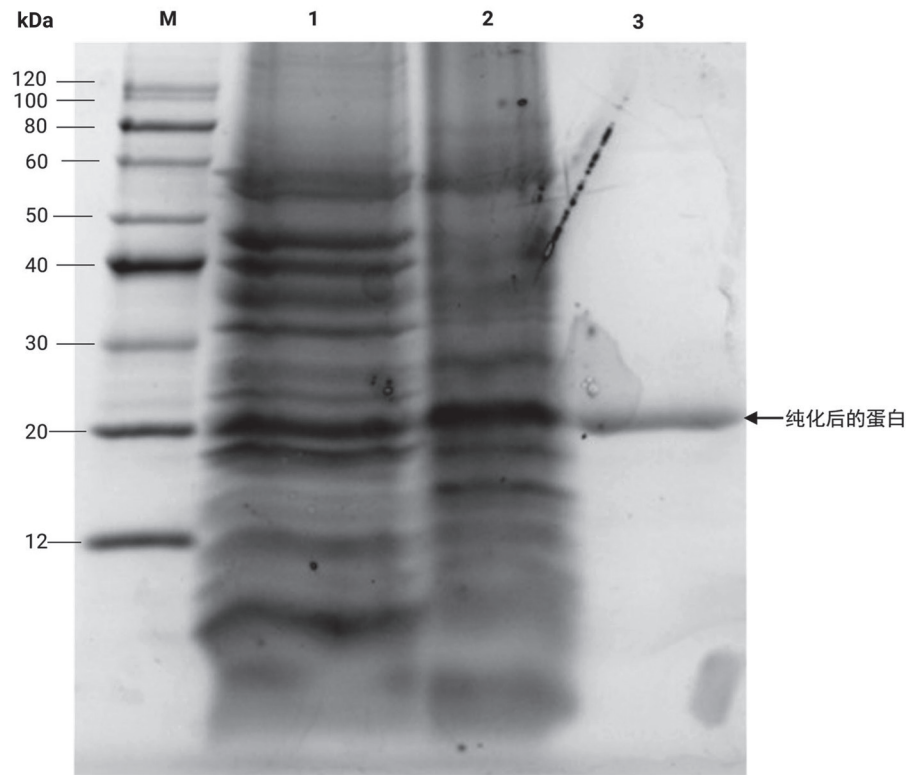


图4 LsCHI蛋白的表达和纯化

Fig. 4 The expression and purification of LsCHI protein

M: 蛋白分子质量标记; 1: 未加IPTG的蛋白; 2: 加入IPTG的蛋白; 3: 纯化后的蛋白。

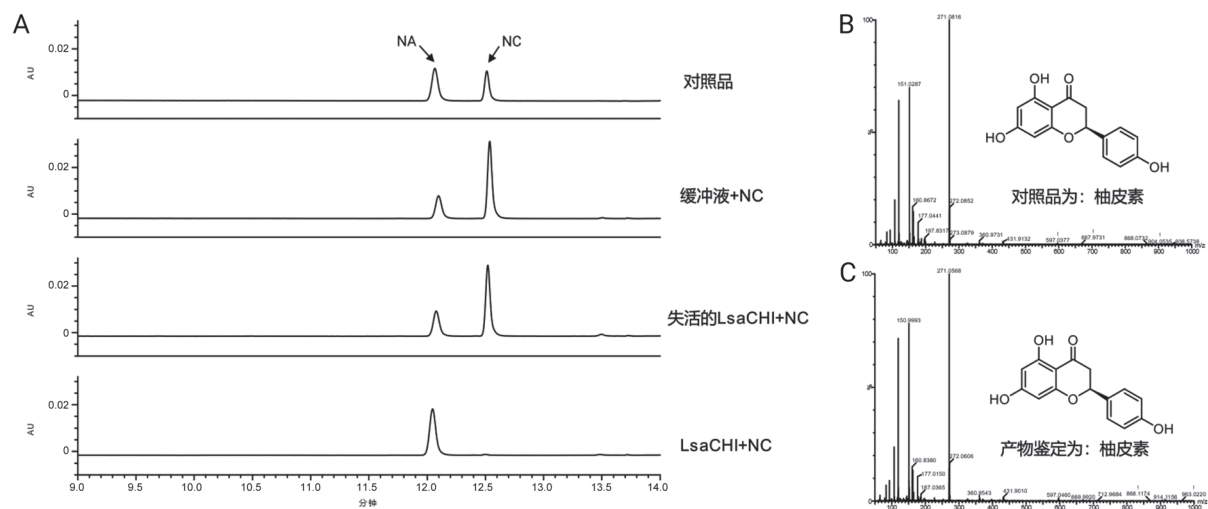


图5 LsCHI蛋白的LC-MS分析  
Fig. 5 LC-MS analysis of LsCHI protein

A: LsCHI蛋白催化柚皮素查尔酮(NC)为柚皮素(NA)的UPLC (超高效液相色谱)分析; B: 柚皮素对照品的Q-TOF-MS分析; C: LsCHI蛋白酶促产物的Q-TOF-MS分析。

实时荧光定量PCR结果显示, *LsCHI*在开花的花序中的表达量最高, 未开花的花序、茎中次之, 叶中*LsCHI*表达量偏低, 根中*CHI*表达量最低。这些结果暗示查尔酮异构酶主要是在地上部分发挥作用。

在体外酶促实验中, 两个对照组(失活的Ls-CHI+NC和缓冲液+NC)都会出现一个比较低的查尔酮色谱峰, 这是因为柚皮素查尔酮会发生自我环化, 生成柚皮素。所以, 我们在进行体外酶促实验时, 参考Zhao等(2021)的实验严格控制反应时间在1 min, 这可以避免因时间过长导致柚皮素查尔酮自环化而无法测定LsCHI活性。*CHI*的功能是催化柚皮素查尔酮生成柚皮素, 生菜含有*CHI*, 因此推测生菜中含有柚皮素。

*CHI*是黄酮类化合物合成的关键基因, 对于黄酮类化合物的积累具有重要作用。*CHI*在植物的不同发育时期和不同组织中的表达是不同的。红花(*Carthamus tinctorius*)中*CHI*的表达会随着开花时长的增加而升高, 并在第4天达到高峰(Chen等2016)。本文研究了生菜L46不同组织中*CHI*表达量的差异, 推测随着时间增加花中*LsCHI*的表达量也会增加, 这与陈翠萍等(2016)的研究结果相似;

生菜地上部分*LsCHI*表达量明显高于地下部分, 这与隋娟娟等(2021)的研究结果相似, 说明黄酮类化合物主要是在地上部分合成。

生菜叶色是重要的农艺性状, 叶色变化有利于减少叶片的光合损伤以及老叶中营养元素的回流(Becker等2014)。叶色变化主要由叶片内叶绿素、类胡萝卜素、花青素等相对含量的改变引起。花青素属于黄酮类化合物, 是广泛存在于植物体内的天然色素(赵维萍等2022)。*CHI*是调控黄酮类化合物合成的关键酶之一。*CHI*沉默可使康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)花色变为黄色(Itoh等2002)。生菜喜阴凉环境, 不耐寒热, 土壤pH值以中性偏酸为适宜; 这导致生菜的种植环境受到极大限制。因此, 提高生菜的抗逆性, 使其适应环境变化是一个重要研究内容。本文为生菜黄酮类化合物的生物合成以及生菜叶色及抗逆方面的改良研究提供参考。

### 参考文献(References)

Ban Z, Qin H, Mitchell AJ, et al (2018). Nuncatalytic chalcone isomerase-fold proteins in *Humulus lupulus* are auxiliary components in prenylated flavonoid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 115 (22): E5223–E5232

- Becker C, Klaering HP, Kroh LW, et al (2014). Cool-cultivated red leaf lettuce accumulates cyanidin-3-*O*-(6-*O*-malonyl)-glucoside and caffeoylmalic acid. *Food Chem*, 146: 404–411
- Buer CS, Imin N, Djordjevic MA (2010). Flavonoids: new roles for old molecules. *J Integr Plant Biol*, 52 (1): 98–111
- Buer CS, Muday GK (2004). The transparent *testa4* mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell*, 16 (5): 1191–1205
- Chen CP, Pei J, Wu YY, et al (2016). Cloning analysis and expression of chalcone isomerase gene in safflower and dynamic accumulation relationship of HSYA. *J Chin Med Mater*, (3): 499–503 (in Chinese with English abstract) [陈翠平, 裴瑾, 吴沂芸等(2016). 红花查尔酮异构酶基因的克隆分析表达及HSYA动态累积关系. *中药材*, (3): 499–503]
- Cheng L, Jiang W, Chen G, et al (2022). Research progress on the pharmacological effects of flavonoids on ulcerative colitis. *Guangdong Chem Ind*, (14): 19–20, 18 (in Chinese with English abstract) [程兰, 姜威, 陈刚等(2022). 黄酮类化合物对溃疡性结肠炎的药理作用研究进展. *广东化工*, (14): 19–20, 18]
- Dixon RA, Blyden ER, Robbins MP, et al (1988). Comparative biochemistry of chalcone isomerases. *Phytochemistry*, 27 (9): 2801–2808
- Dixon RA, Paiva NL (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7 (7): 1085–1097
- Fan SX, Liu CJ, Han YY, et al (2021). Development status and prospect of lettuce industry in Beijing. *Vegetables*, (S1): 12–17 (in Chinese) [范双喜, 刘超杰, 韩莹琰等(2021). 北京生菜产业发展现状及展望. *蔬菜*, (S1): 12–17]
- Gensheimer M, Mushegian A (2004). Chalcone isomerase family and fold: no longer unique to plants. *Protein Sci*, 13 (2): 540–544
- Hahlbrock K, Zilg H, Grisebach H (1970). Stereochemistry of the enzymatic cyclisation of 4,2',4'-trihydroxychalcone to 7,4'-dihydroxyflavanone by isomerases from mung bean seedlings. *Eur J Biochem*, 15 (1): 13–18
- He MY, Yao H, Li GZ, et al (2022). Identification and expression characteristics of CHS gene family in *Glycyrrhiza liquorice* and its relationship with glycyrrhiza chalconone A accumulation. *Plant Physiol J*, 58 (1): 141–154 (in Chinese with English abstract) [何梦媛, 姚华, 李国治等(2022). 甘草CHS基因家族鉴定、表达特性分析及其与甘草查尔酮A积累的关系研究. *植物生理学报*, 58 (1): 141–154]
- Itoh Y, Higeta D, Suzuki A, et al (2002). Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol*, 43 (5): 578–585
- Jiang M, Li Y, Chen H, et al (2021). Comparative and phylogenetic analysis of the complete chloroplast genome sequences of *Lactuca raddeana* and *Lactuca sativa*. *Mitochondrial DNA B*, 6 (4): 1498–1506
- Jiang W, Yin Q, Wu R, et al (2015). Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 66 (22): 7165–7179
- Kaltenbach M, Burke JR, Dindo M, et al (2018). Evolution of chalcone isomerase from a noncatalytic ancestor. *Nat Chem Biol*, 14 (6): 548–555
- Liu W, Feng Y, Yu S, et al (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. *Int J Mol Sci*, 22 (23): 12824
- Ngaki MN, Louie GV, Philippe RN, et al (2012). Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis. *Nature*, 485 (7399): 530–533
- Ralston L, Subramanian S, Matsuno M, et al (2005). Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. *Plant Physiol*, 137 (4): 1375–1388
- Shimada N, Aoki T, Sato S, et al (2003). 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*. *Plant Physiol*, 131 (3): 941–951
- Su W, Tao R, Liu W, et al (2020). Characterization of four polymorphic genes controlling red leaf colour in lettuce that have undergone disruptive selection since domestication. *Plant Biotechnol J*, 18 (2): 479–490
- Sui JJ, Qu CQ, Yang JX, et al (2021). Cloning of chalcone isomerase gene of toon and expression analysis in seedlings. *Mol Plant Breed*, (14): 4649–4656 (in Chinese with English abstract) [隋娟娟, 屈长青, 杨京霞等(2021). 香椿查尔酮异构酶基因的克隆及在幼苗中的表达分析. *分子植物育种*, (14): 4649–4656]
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30 (12): 2725–2729
- Taylor LP, Grotewold E (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol*, 8 (3): 317–323
- Ververidis F, Trantas E, Douglas C, et al (2007). Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol J*, 2 (10): 1214–1234
- Wei T, Treuren RV, Liu X, et al (2021). Whole-genome resequencing of 445 *Lactuca* accessions reveals the domestication history of cultivated lettuce. *Nat Genet*, 53 (5):

- 752–760
- Winkel-Shirley B (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, 126 (2): 485–493
- Yin YC, Zhang XD, Gao ZQ, et al (2019). The research progress of chalcone isomerase (CHI) in plants. *Mol Biotechnol*, 61 (1): 32–52
- Yu AD, Liu L, Long RC, et al (2022). Function and application of UDP-glycosyltransferase (UGT) in plants. *Plant Physiol J*, 58 (4): 631–642 (in Chinese with English abstract) [于安东, 刘琳, 龙瑞才等(2022). 植物UDP-糖基转移酶(UGT)的功能及应用前景. *植物生理学报*, 58 (4): 631–642]
- Zhao C, Liu X, Gong Q, et al (2021). Three AP2/ERF family members modulate flavonoid synthesis by regulating type IV chalcone isomerase in citrus. *Plant Biotechnol J*, 19 (4): 671–688
- Zhao WP, Ding ZJ, Wang FP, et al. (2022). Molecular characterization, prokaryotic expression and expression analysis of the ‘Chuju’ anthocyanin synthetase (CmANS) gene. *Plant Physiol J*, 58 (4): 677–686 (in Chinese with English abstract) [赵维萍, 丁子俊, 王方平等(2022). ‘滁菊’花青素合成酶(CmANS)基因的分子特征、原核表达与表达分析. *植物生理学报*, 58 (4): 677–686]