

水母雪莲查尔酮合酶基因的克隆、表达及酶活分析

夏芳^{1,2}, 李厚华¹, 付春祥¹, 虞珍珍^{1,2}, 徐彦军³, 赵德修¹

1 中国科学院植物研究所, 北京 100093

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

3 中国农业大学理学院, 北京 100193

摘要: 从水母雪莲 *Saussurea medusa* Maxim. cDNA 文库中得到一段查尔酮合酶基因 (*SmCHS*) 片段, 然后通过 RT-PCR 得到完整的查尔酮合酶基因 cDNA。序列分析表明 *SmCHS* 全长 1 313 bp, 其开放阅读框为 1 170 bp, 编码 389 个氨基酸, 预测表达蛋白的分子量为 43 kDa。构建原核表达质粒 pET28a(+)-*SmCHS*, 重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 获得表达菌株。经 IPTG 诱导表达后, 对表达产物进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示, 表达的融合蛋白以部分可溶的形式存在。用 Ni-NTA 预装柱对融合蛋白进行亲和纯化, 对纯化蛋白进行酶活检测, 结果表明融合蛋白具有查尔酮合酶活性, 可催化底物 4-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。

关键词: 水母雪莲, 查尔酮合酶, 原核表达, 纯化, 酶活检测

Cloning, expression and characterization of chalcone synthase from *Saussurea medusa*

Fang Xia^{1,2}, Houhua Li¹, Chunxiang Fu¹, Zhenzhen Yu^{1,2}, Yanjun Xu³, and Dexiu Zhao¹

1 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: A fragment of chalcone synthase gene (*SmCHS*) was cloned from the cDNA library constructed in *Saussurea medusa*. The full-length cDNA sequence of *SmCHS* was obtained by RT-PCR. Sequence analysis showed that the full length of *SmCHS* was 1 313 bp, containing an open reading frame (1 170 bp) encoding 389 amino acids. The molecular weight of the protein was estimated to be 43 kDa. The prokaryotic expression plasmids pET28a(+)-*SmCHS* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for expression. SDS-PAGE indicated that the fusion protein was expressed partially in soluble form after induction by IPTG. The recombinant protein was collected and purified by Ni-NTA affinity column. The enzymatic activity assay of the purified recombinant protein showed that the fusion protein had chalcone synthase activity. It could catalyze the condensation of a 4-coumaroyl-CoA with three malonyl-CoAs to produce naringenin chalcone.

Received: August 25, 2010; **Accepted:** November 5, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30873452).

Corresponding author: Dexiu Zhao. Tel: +86-10-62836201; E-mail: zhaodx@ibcas.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 30873452) 资助。

Keywords: *Saussurea medusa*, chalcone synthase, prokaryotic expression, purification, enzymatic activity assay

水母雪莲 *Saussurea medusa* Maxim. 为多年生菊科风毛菊属草本植物, 分布于我国西藏、云南、四川等地, 是我国传统中药材, 已被列入中华人民共和国卫生部药品标准, 用于治疗炭疽、中风、风湿性关节炎和高原病等症^[1]。其化学成分已有研究报道, 包括类黄酮、萜类化合物和木脂素等^[2], 其中类黄酮是其主要药用成分^[3]。类黄酮化合物广泛存在于植物花瓣、叶片、果实、根茎中, 是许多中草药的有效成分, 具有多种生物学功能, 如防御病原体侵害、防止紫外线损伤、抑制生长素运输、植物化感作用、形成花色等^[4]。

查尔酮合酶 (Chalcone synthase, CHS, EC2.3.1.74) 是将苯丙烷类代谢途径引向类黄酮合成的第一个关键酶。CHS 能催化一分子 4-香豆酰辅酶 A 和三分子丙二酰辅酶 A 缩合生成柚皮素查尔酮, 柚皮素查尔酮可异构化为柚皮素, 为黄酮醇、黄烷酮、花青素糖苷及其他类黄酮物质的合成提供了保障。查尔酮合酶基因广泛存在于高等植物中, 目前已从裸子植物、被子植物中克隆到了大量的 CHS 基因, 并对它们的功能进行了研究和分类。

本研究通过 RT-PCR 法克隆得到水母雪莲查尔酮合酶基因, 将其在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行诱导表达, 利用镍柱对融合蛋白进行了纯化, 并对纯化蛋白的酶活进行了检测, 为进一步研究水母雪莲查尔酮合酶蛋白的结构、催化机制及其的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒及细胞系

克隆载体 pMD19-T、宿主菌大肠杆菌 BL21(DE3)、质粒 pET28a(+) 由本实验室保存。水母雪莲 cDNA 文库由本实验室构建并保存。

1.1.2 主要试剂

各种限制性内切酶、高保真 EX-Taq 酶、T4

DNA 连接酶、T-easy 载体、RNA 提取试剂、反转录试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 胶回收试剂盒和蛋白 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司, IPTG 购自上海生工生物工程有限公司, His Gravitrap affinity columns 和 PD-10 columns 购自 GE 公司, 柚皮素和丙二酰辅酶 A 标准品购自 Sigma 公司, 4-香豆酰辅酶 A 参照文献合成^[5], 色谱纯甲醇购自 Merck 公司, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 水母雪莲 CHS 基因的克隆

根据 GenBank 中已发表的 CHS 基因保守的氨基酸序列, 用 DNAMAN 软件设计引物: CHS1: 5'-AA TGCGATGAATGAATGGGG-3'; CHS2: 5'-AAGCAA CCGTGTACATCAT-3'。

通过 PCR 筛选水母雪莲 cDNA 文库, 选取阳性单克隆测序, 得到 1 232 bp 的片段, 在 NCBI 上用 Blast 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜索比对后发现其为 CHS 基因片段, 5'端缺失约 100 多个碱基。根据 GenBank 中已公布的不同来源的 CHS cDNA 序列, 在开放阅读框上游根据保守性设计一段引物 CP₁, 再从已知片段中部设计一段引物 CP₂。CP₁: 5'-ATGGTGACCGTCGAGGAAGTCCG-3'; CP₂: 5'-CAACGCCACTAGTAGTGC-3'。

取 1 μL 反转录得到的 cDNA 为模板, 以 CP₁ 和 CP₂ 为引物进行 PCR 扩增: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收, 送上海生工生物工程有限公司测序。将此片段与 1 232 bp 的片段拼接, 根据拼接后的碱基序列, 在开放阅读框 3'端后面, 且 PolyA 尾巴前面设计一段引物: CP₃: 5'-GGCCACATCAAGA GATAGAGTAGG-3'。

取 1 μL cDNA 为模板, 以 CP₁、CP₃ 为引物进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 °C 变性 5 min; 随

后 94 °C 1 min; 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 进行 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.2 生物信息学分析

将测序得到的 cDNA 序列在 NCBI 上进行同源性比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 用 NCBI 上的 ORF finder 软件找出新基因的读码框, 用 CDD 软件包 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 分析 SmCHS 的保守结构域, 用 DNAMAN 软件进行序列比对分析和系统进化树的构建。

1.2.3 克隆载体 pMD19-T-SmCHS 的构建

将 SmCHS 基因 TA 克隆至 pMD19-T 载体上, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 将阳性转化子送上海生物工程技术有限公司测序。

1.2.4 表达载体 pET28a(+)-SmCHS 的构建

设计合成如下引物, 引物 SmCHS-Yf 和 SmCHS-Yr 的 5'端分别引入 EcoR I 和 Sal I 的识别位点: SmCHS-Yf: 5'-GGAATTCATGGTGACCGT CGAGGAAGTCCG-3'; SmCHS-Yr: 5'-GCGTCGA CGGCCACATCAAGAGATAGAGTAG-3'。

以质粒 pMD19-T-SmCHS 为模板, 用高保真 EX-Taq 酶进行 PCR 扩增, 将产物片段纯化、酶切、回收, 连接到表达载体 pET28a(+) 上, 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 经过卡那霉素抗性筛选, 挑选出单菌落扩大培养, 提取质粒, 进行酶切鉴定, 阳性质粒命名为 pET28a(+)-SmCHS, 并送上海生物工程技术有限公司测序。

1.2.5 重组质粒 pET28a(+)-SmCHS 在大肠杆菌中的诱导表达

挑取鉴定为阳性的单菌落接种至含卡那霉素(终浓度为 100 mg/L) 的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 取上述培养物以 1:100 的比例接种于新鲜的 LB 培养基 (Kan, 100 mg/L) 中, 培养至 OD 值约 0.6, 加入 1 mmol/L 的 IPTG, 28 °C 诱导表达, 取不同表达时段的样品进行 SDS-PAGE 分析, 确定最佳表达时间。离心收集经 IPTG 诱导最佳表达时

间表达的大肠杆菌, 将菌体沉淀重新悬浮于 1/25 体积的结合缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑) 中。超声破碎, 4 °C、14 000 r/min 离心 20 min, 分别收集上清和沉淀, 以诱导前菌体为对照, 12% SDS-PAGE 对表达蛋白的可溶性进行分析。

1.2.6 融合蛋白的纯化

用结合缓冲液平衡 Ni-NTA 预装柱, 上样后用洗涤缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑) 进行洗涤, 最后用洗脱缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L NaCl, 600 mmol/L 咪唑) 进行目的蛋白的洗脱。

1.2.7 融合蛋白的脱盐

用置换缓冲液 (含 10% 甘油的磷酸缓冲液) 冲洗 PD-10 柱, 加入纯化蛋白, 弃流出液, 然后加入置换缓冲液, 收集流出液, 进行 SDS-PAGE 分析。用分光光度计测定蛋白含量。

1.2.8 通过体外酶促反应进行 SmCHS 的酶活分析

体外酶促反应体系总体积 250 μ L, 其中含有 3.75 μ mol 的 4-香豆酰辅酶 A、14 μ mol 的丙二酰辅酶 A、0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 以及 2.0 μ g 纯化的 SmCHS。上述反应体系置于 30 °C 下 60 min 后, 加入 12.5 μ L 乙酸, 获得酶促反应产物。向酶促反应产物中加入 250 μ L 乙酸乙酯萃取, 吸取有机相, 12 000 r/min 离心 20 min。取上清液干燥后, 加入 250 μ L 50% (V/V) 的甲醇水溶液获得酶促反应产物提取物。由于酶促反应产物柚皮素查尔酮可自发异构化为柚皮素, 所以以柚皮素标准品作为对照。

用 Agilent 1100 HPLC/MSD Trap VL 鉴定上述获得的酶促反应产物。色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m, 柱温 30 °C, 进样量 20 μ L。流动相为水 (A) 和甲醇 (B), 流速为 1.0 mL/min, 洗脱程序: 30% B 3 min, 30%~80% B 17 min, 80% B 3 min。检测波长为 289 nm。质谱条件: 电喷雾 (ESI) 离子阱, 干燥气温度 350 °C,

雾化气压力 35 psi, 干燥气流速 8.00 L/min, 毛细管电压 3 500 V, 锥孔电压-30.9 V, 负离子模式下扫描质量范围 m/z 100~400。

2 结果

2.1 *SmCHS* 基因的克隆

以 cDNA 为模板, 以 CP₁、CP₂ 为引物进行 PCR 扩增, 经过琼脂糖凝胶电泳, 可以看出扩增出 400 bp 左右的片段 (图 1), 再将 PCR 产物测序, 测序结果为 406 bp, 经 GenBank 比对为 *CHS* 基因的上游序列。将此 406 bp 的片段与之前获得的 1 232 bp 的片段拼接, 得到一个长度为 1 313 bp 的 cDNA 序列。以 cDNA 为模板, CP₁、CP₃ 为引物进行扩增, 经电泳显示扩增出 1 200 bp 的片段 (图 2)。推测该基因编码的蛋白为水母雪莲查尔酮合酶, 将该基因命名为 *SmCHS* (GenBank Accession No. DQ350888)。

2.2 *SmCHS* 基因的生物信息学分析

对该基因进行生物信息学分析, 结果表明, *SmCHS* 基因的 ORF 含 1 170 bp 的核苷酸序列, 编码 389 个氨基酸, 理论分子量为 43 kDa。对编码区进行蛋白质功能域的分析后发现, *SmCHS* 属于缩合酶超家族 (Cond enzymes superfamily), 具有丙二酰辅酶 A 和产物结合位点 (图 3)。选择分别来自胡萝卜 *Daucus carota*、翅果铁刀木 *Senna alata*、观果金丝桃 *Hypericum androsaemum*、紫罗兰 *Matthiola*

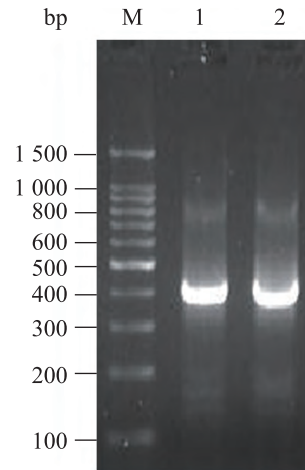


图 1 RT-PCR 扩增 *SmCHS* 上游片段 (CP₁-CP₂)

Fig. 1 5' sequence of *SmCHS* was obtained by RT-PCR. M: 100 bp DNA marker; 1,2: RT-PCR product of 5' sequence of *SmCHS*.

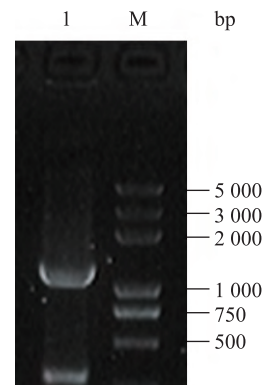


图 2 RT-PCR 扩增 *SmCHS* 全长 cDNA (CP₁-CP₃)

Fig. 2 Full-length cDNA of *SmCHS* was obtained by RT-PCR. 1: RT-PCR product of full-length cDNA of *SmCHS*; M: DL2000 plus marker.

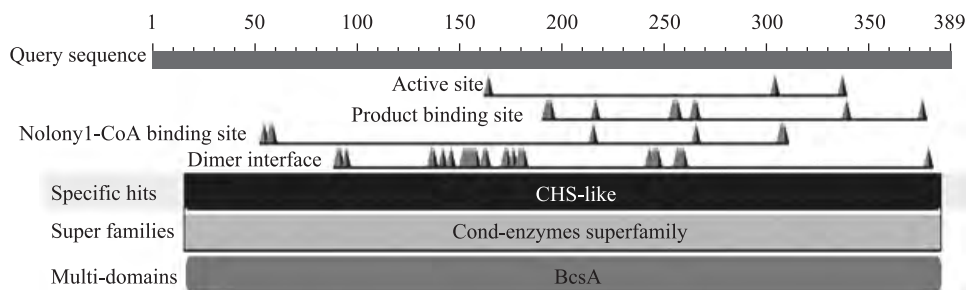


图 3 *SmCHS* 蛋白结构功能域的分析

Fig. 3 Architecture analysis of domains of *SmCHS*.

incana (GenBank Accession No.分别为 CAA07244、AAM00230、AAG30295、CAD20739) 的 CHS 蛋白进行氨基酸序列的多重比对, 结果显示, 该基因所编码的氨基酸序列与观果金丝桃的 CHS 相似性最高, 达 88.7%, 与其余 3 个物种的 CHS 相似性也都在 80% 以上, 说明 CHS 基因的编码区十分保守 (图 4)。根据 GenBank 中报道的其他物种的查尔酮合酶氨基酸序列, 利用 DNAMAN 软件构建 CHS 进化树。从系统进化树 (图 5) 可以看出, SmCHS 与大丽菊的查尔酮合酶在进化关系上较为相近, 而与大麦、小麦、水稻等单子叶植物的查尔酮合酶进化关系较远。

2.3 重组质粒 pET28a(+)-*SmCHS* 的构建

将 *SmCHS* 基因构建到携有 His 标签的原核表达载体 pET28a(+)上, 重组质粒 pET28a(+)-*SmCHS* 经过 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 结果如图 6 所示, 在 1 200 bp 左右有一条特异带, 证明 *SmCHS* 基因已经正确构建到载体中。

2.4 水母雪莲查尔酮合酶的诱导表达与纯化

将重组质粒 pET28a(+)-*SmCHS* 转化至 *E. coli* BL21, 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 结果表明所表达的融合蛋白分子量约为 43 kDa, 与预期分子量大小基本一致。为了确定最佳表达条件, 本实验进行了时相表达, 转化菌经过 1 mmol/L IPTG 诱导后, 0~6 h 内融合蛋白的表达呈递增趋势, 5 h 后融合蛋白的表达水平基本稳定, 不再上升 (图 7)。因此把最佳诱导表达时间选定在 5 h, 经鉴定, 表达的融合蛋白以可溶性形式存在, 用镍亲和层析柱进行纯化, 获得了纯化的融合蛋白 (图 8)。

2.5 水母雪莲查尔酮合酶的活性分析

在体外酶促反应中, 纯化的 SmCHS 可以催化一分子 4-香豆酰辅酶 A 和三分子丙二酰辅酶 A 缩合生成柚皮素查尔酮, 柚皮素查尔酮可自发异构化为柚皮素。SmCHS 的体外酶促反应产物 HPLC-MS 鉴定结果如图 9 所示, 柚皮素标准品保留时间为 15 min, 负离子模式下柚皮素标准品的 m/z 为 270.8

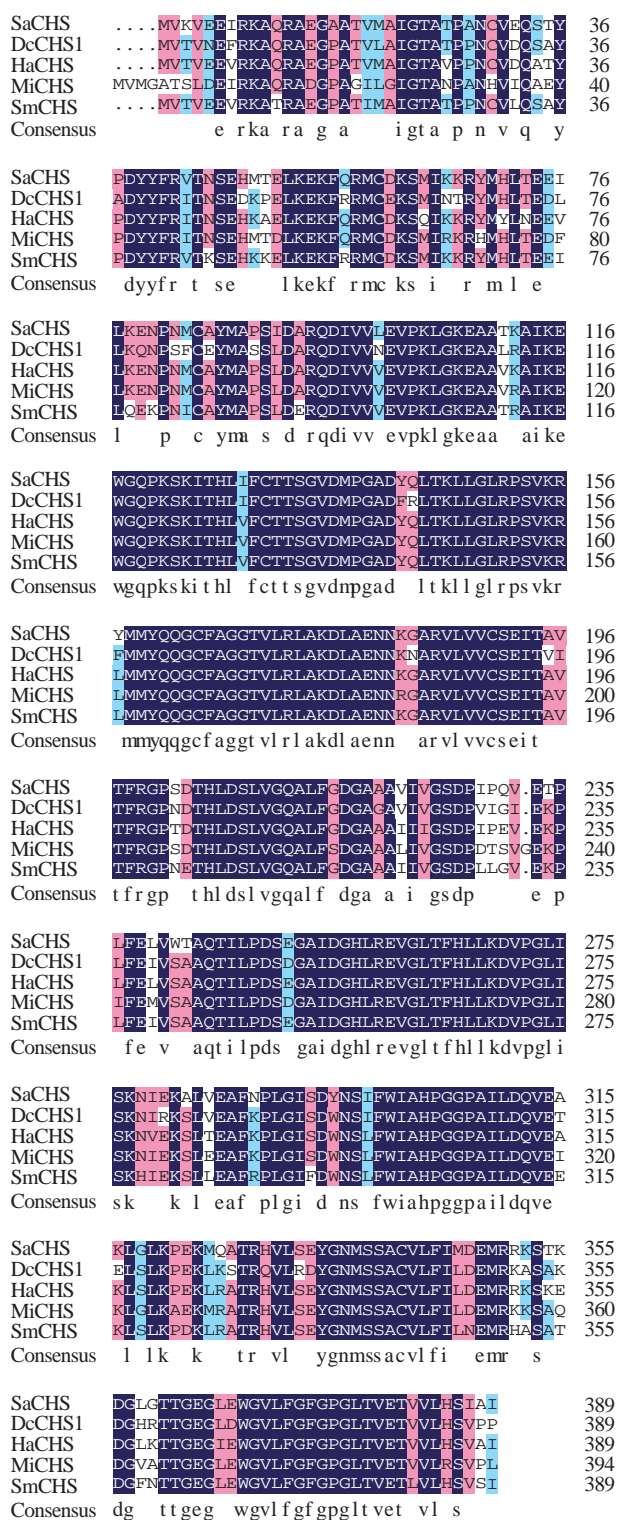


图 4 不同物种 CHS 基因氨基酸序列的同源性分析

Fig. 4 Homology analysis of the amino sequences of chalcone synthase among difference species.

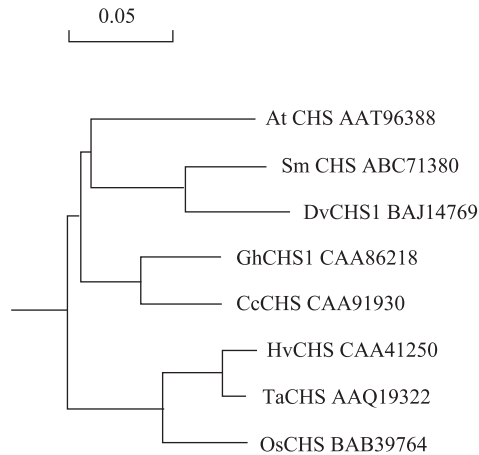


图5 不同来源查尔酮合酶的系统进化树

Fig. 5 A phylogenetic tree of various chalcone synthases.

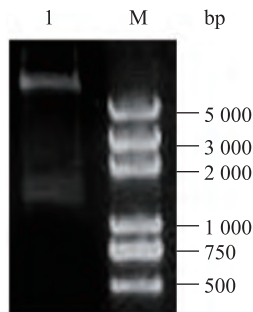


图6 重组质粒 pET28a(+)-SmCHS 的双酶切鉴定

Fig. 6 Enzymolysis identification of the recombinant plasmid pET28a(+)-SmCHS. 1: pET28a(+)-SmCHS digested with *EcoR* I and *Sal* I; M: DL2000 plus marker.

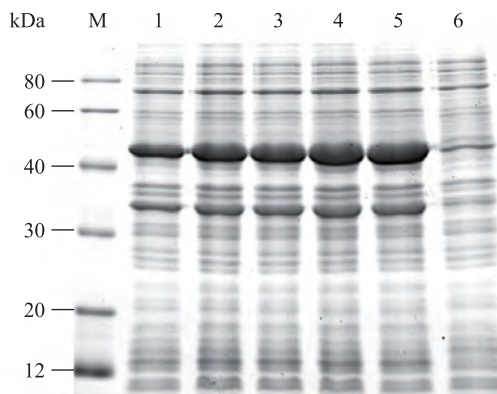


图7 SDS-PAGE 分析 pET28a(+)-SmCHS 不同时期的表达蛋白

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the expression product of BL21(DE3)/pET28a(+)-SmCHS. M: protein marker; 1-6: BL21(DE3)/pET28a(+)-SmCHS induced with 1 mmol/L IPTG for 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 0 h.

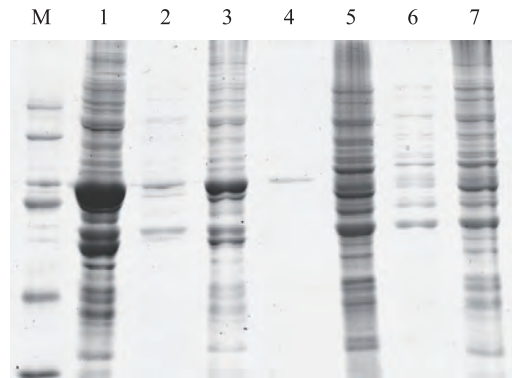


图8 SDS-PAGE 分析重组蛋白的纯化

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein. M: protein marker; 1: protein of BL21(DE3)/pET28a(+)-SmCHS after induced with IPTG; 2: induced recombinant BL21 supernatant; 3: induced recombinant BL21 precipitation; 4: purified recombinant protein; 5: uninduced protein of BL21(DE3)/pET28a(+)-SmCHS; 6: uninduced recombinant BL21 supernatant; 7: uninduced recombinant BL21 precipitation.

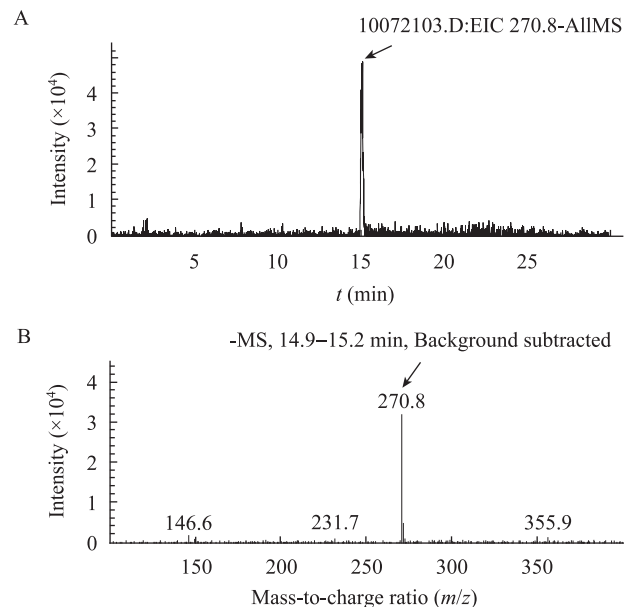


图9 SmCHS 的体外酶促反应产物 HPLC-MS 鉴定

Fig. 9 HPLC-MS identification of the product of enzymatic reaction *in vitro* catalyzed by SmCHS. (A) Extracted ion profiles of enzymatic reaction product (m/z 270.8). (B) Mass spectrum of enzymatic reaction product.

(图略); 纯化的 SmCHS 酶促反应产物的提取离子流图谱保留时间为 15 min 时有洗脱峰出现 (A 图箭头所示), 纯化的 SmCHS 酶促反应产物的 m/z 为 270.8 (B 图箭头所示); 阴性对照酶促反应产物提取离子流

图谱保留时间为 15 min 时没有洗脱峰, 质谱图保留时间为 15 min 时也没有 m/z 为 270.8 的离子出现 (图略)。产物的出峰时间和质谱图显示 4-香豆酰-CoA 和丙二酰-CoA 在体外被 SmCHS 催化生成了柚皮素查尔酮, 柚皮素查尔酮自发异构化为柚皮素, 表明克隆到的水母雪莲 CHS 基因是一个与柚皮素合成相关的基因。

3 讨论

查尔酮合酶 (Chalcone synthase, CHS) 是将苯丙烷类代谢途径引向类黄酮合成的第一个关键酶, 因此查尔酮合酶基因是进入类黄酮次生代谢的第一个关键酶基因。CHS 基因的沉默、超表达或者基因突变都将直接或间接影响到该过程, 从而对植物色素合成、抗病性、抗 UV 等方面产生一定影响^[6]。

本研究通过 RT-PCR 法克隆得到全长约 1 200 bp 的水母雪莲查尔酮合酶基因, 编码 389 个氨基酸, 这与已经登录的大部分常见物种的 CHS 大小基本一致, 如烟草, 矮牵牛, 胡桃, 大麻, 山茶, 葡萄的 CHS 都由 389 个氨基酸组成, 分子量为 43 kDa。对查尔酮合酶蛋白三维结构的研究表明, 它的亚基结合位点和酶活性位点紧密连接在一起, 二聚体酶的活性位点在三维结构中很可能相邻。然而, 尽管 CHS 的两个亚基的活性位点连接很紧密, 但单个亚基仍能独立催化整个缩合反应, 因而, 可认为 CHS 的亚基在查尔酮合成过程中起协同作用^[7]。对掌叶大黄 CHS 的研究发现, Gly256 决定底物选择性的起始, Thr197 位于隐藏的催化袋的入口处以控制聚酮化合物的长度, Ser338 的作用类似 Cys164——引导线性聚酮化合物中间产物进入催化袋进行下一步合成^[8]。

CHS 体外酶活性最早是在 1972 年由德国科学家 Kreuzaler 等从欧芹悬浮细胞培养液抽提物中检测到的^[9]。本实验采用 pET28a(+) 原核表达载体在大

肠杆菌中对 SmCHS 进行高效表达, 表达产物带有 6×His 标签, 为重组蛋白纯化提供了方便, 而且 6×His 标签分子量小, 生理条件下不带电荷, 因此基本不影响目的蛋白的结构和功能。采用亲和层析进行目的蛋白的纯化, 纯化蛋白的分子量为 43 kDa, 与 Liu 等、Ma 等分别利用不同的原核表达载体表达的观果金丝桃和虎杖的 CHS 分子量相同^[10-11]。通过 HPLC-MS 对 SmCHS 催化的体外酶促反应产物进行鉴定, 结果表明 SmCHS 具有查尔酮合酶的活性, 产物中生成了柚皮素查尔酮。Jiang 等利用放射薄层色谱法鉴定小立碗藓 CHS 的体外酶促反应产物, 发现除了生成主产物柚皮素查尔酮之外, 还生成了 2 种副产物, 即 4-香豆酰甘油酸内酯 (4-coumaroyl-triacetic acid lactone, CTAL) 和丙烯酮非环化产物 (Bis-noryangonin, BNY)^[12]。本实验没有发现副产物生成, 可能是由于副产物量太少, 无法检测出来。下一步可以对反应条件进行优化, 加入适量二硫苏糖醇, 提高产物的产率^[10]。查尔酮合酶的底物除了 4-香豆酰辅酶 A (4-coumaroyl-CoA) 外, 还可以是肉桂酰辅酶 A (Cinnamoyl-CoA) 或二氢香豆酰辅酶 A (Dihydro-p-coumaroyl-CoA)。对小立碗藓 CHS 的体外活性分析表明, 其将肉桂酰辅酶 A 或二氢香豆酰辅酶 A 转化为查尔酮的效率是以 4-香豆酰辅酶 A 为底物时的 50%~60%, 与野葛 CHS 显示出相同的底物偏好性^[12]。本实验下一步可以尝试分别以肉桂酰辅酶 A 或二氢香豆酰辅酶 A 为底物, 探讨 SmCHS 对不同底物的催化效率, 进而推测 SmCHS 的生理底物。

本研究通过对 SmCHS 进行原核表达, 对重组蛋白的酶活性、生物学功能进行了分析。由于 SmCHS 活性较高, 具有很好的应用价值。通过转基因技术, 在其他植物中过表达查尔酮合酶基因, 能增强转基因植物的抗病、抗紫外线能力, 同时也为调控类黄酮化合物的合成和培育更好的中药材奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Dawa Z, Bai Y, Zhou Y, et al. Chemical constituents of the whole plants of *Saussurea medusa*. *J Nat Med*, 2009, 63(3): 327–330.
- [2] Xie HH, Wang T, Matsuda H, et al. Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XV. Inhibitory effect on aldose reductase and structures of Saussureosides A and B from *Saussurea medusa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2005, 53(11): 1416–1422.
- [3] Liu CZ, Saxena PK. *Saussurea medusa* cell suspension cultures for flavonoid production. *Methods Mol Biol*, 2009, 547(1): 53–59.
- [4] Buer CS, Imin N, Djordjevic MA. Flavonoids: new roles for old molecules. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52(1): 98–111.
- [5] Beuerle T, Pichersky E. Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme a esters. *Anal Biochem*, 2002, 302(2): 305–312.
- [6] Jiang M, Cao JS. Chalcone synthase gene. *Chin J Cell Biol*, 2007, 29(4): 525–529.
蒋明, 曹家树. 查尔酮合成酶基因. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(4): 525–529.
- [7] Zhang DQ, Tan XF, Wang XH. Gene characteristics and transgenic application of chalcone synthase and chalcone isomerase. *J Central South Univ Forestry Technol*, 2007, 27(2): 87–91.
张党权, 谭晓凤, 王晓红. 查尔酮合酶与查尔酮异构酶基因特征及转基因应用. *中南林业科技大学学报*, 2007, 27(2): 87–91.
- [8] Abe I, Watanabe T, Morita H, et al. Engineered biosynthesis of plant polyketides: manipulation of chalcone synthase. *Org Lett*, 2006, 8(3): 499–502.
- [9] Kreuzaler F, Hahlbrock K. Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *FEBS Lett*, 1972, 28(1): 69–72.
- [10] Liu B, Falkenstein-Paul H, Schmidt W, et al. Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *Plant J*, 2003, 34(6): 847–855.
- [11] Ma LQ, Pang XB, Shen HY, et al. A novel type III polyketide synthase encoded by a three-intron gene from *Polygonum cuspidatum*. *Planta*, 2009, 229(3): 457–469.
- [12] Jiang CG, Schommer CK, Kim SY, et al. Cloning and characterization of chalcone synthase from the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry*, 2006, 67(23): 2531–2540.