

斑地锦黄烷酮-3-羟化酶基因及启动子的克隆与分析

钟小菊^{1,2}, 吴晴阳¹, 张永康², 饶泽昌², 王飞², 黄胜和^{1*}

(1 江西中医药高等专科学校 医学基础部, 江西抚州 344000; 2 南昌大学 抚州医学院, 江西抚州 344000)

摘要: 该研究以斑地锦茎叶为材料, 利用同源克隆结合 RACE 和 Tail-PCR 法, 克隆了 1 个黄烷酮-3-羟化酶 (F3H) 基因, 命名为 *EmF3H* (GenBank 登录号为 MW767838), 其 ORF 区为 1 092 bp, 编码 364 个氨基酸。生物信息学分析显示, *EmF3H* 蛋白相对分子质量为 40.93 kD, 等电点为 5.47, 属于 2-酮戊二酸铁依赖的双加氧酶超家族, 其氨基酸序列与油桐的序列相似性为 85.5%, 在系统进化上为相对独立的一个分支。采用 Tail-PCR 法获得 1 604 bp 的 *EmF3H* 启动子序列, 分析发现其内含 TAAT-box、CAAT-box 等序列和 G-box 等光反应元件。qRT-PCR 结果表明, *EmF3H* 基因在不同生长期各组织中均有表达, 其中花期的根和果期的果实中表达水平最高。此结果为进一步研究 *EmF3H* 基因表达调控奠定了基础, 也为完善斑地锦鞣质生物合成途径提供了新思路。

关键词: 斑地锦; *F3H* 基因; 启动子; 克隆; qRT-PCR

中图分类号: Q785; Q786; Q949.95

文献标志码: A

Cloning and Analysis of Flavanone 3-hydroxylase Gene and Its Promoter from *Euphorbia maculata* L.

ZHONG Xiaoju^{1,2}, WU Qingyang¹, ZHANG Yongkang², RAO Zechang²,
WANG Fei², HUANG Shenghe^{1*}

(1 Department of Basic Medicine, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Jiangxi 344000, China; 2 Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou, Jiangxi 344000, China)

Abstract: In this study, a flavanone 3-hydroxylase (F3H) gene named *EmF3H* (GenBank: MW767838) was cloned from *Euphorbia maculata* with homologous cloning, RACE technology and Tail-PCR. The ORF of *EmF3H* is 1 092 bp, encoding 364 amino acids. Bioinformatics analysis showed that the theoretical molecular weight of *EmF3H* protein is 40.93 kD, theoretical pI is 5.47 and *EmF3H* protein belongs to 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase protein family. *EmF3H* protein is 85.5% similar to VvF3H (ARV78456.1) and located on the independent evolutionary node in phylogenetic tree. The 1 604 bp sequence of *EmF3H* promoter was cloned by Tail-PCR and included TAAT-box, CAAT-box, light responsive element and so on. The analysis of real-time quantitative PCR indicated that *EmF3H* gene was expressed among different tissues during different growth periods, with the strongest expression in the roots at the flowering stage and the fruits at fruiting stage. These results will provide a foundation for further research on gene expression regulation of *EmF3H* gene and improving the biosynthesis pathway of quercetin in *Euphorbia maculata*.

收稿日期: 2021-05-13; 修改稿收到日期: 2021-07-24

基金项目: 江西省抚州市指导性科技计划 (FKZ2020003)

作者简介: 钟小菊 (1988—), 女, 学士, 助理实验师, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: 37424809@qq.com

* 通信作者: 黄胜和, 博士, 副教授, 主要从事药用植物生物技术研究。E-mail: hsh712@163.com

Key words: *Euphorbia maculata* L.; *F3H* gene; promoter; cloning; qRT-PCR

斑地锦(*Euphorbia maculata* L.)是一年生大戟科(Euphorbiaceae)大戟属(*Euphorbia* L.)草本植物,分布于江西、新疆、河南和浙江等地区^[1],具有清热解毒、利湿退黄、凉血止血等功效,主治痢疾、泄泻、尿血、便血、疮疖痈肿、湿热黄疸等^[2]。斑地锦主要含有黄酮类、萜类、酚酸类和生物碱类等成分,其中槲皮素是主要药效成分之一^[3]。目前,斑地锦研究主要集中在成分分离、药用价值以及临床应用等方面^[4-5],分子生物学相关研究报道较少。

槲皮素属于黄酮类化合物,其生物合成经由苯丙烷代谢途径,而黄烷酮-3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, *F3H*)是苯丙烷代谢途径的关键酶之一,催化柚皮素(naringenin)生成二氢山奈酚(dihydrokaempferol, DHK)。DHK 是合成黄酮醇和花青素的重要中间物质,阻断 *F3H* 基因的表达,可导致拟南芥植株体内黄酮及花色素等含量变低^[6]。目前, *F3H* 基因已在金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)^[7]、丹参(*Salvia miltiorrhiza*)^[8]和白芨(*Bletilla striata*)^[9]等多种植物^[10]中被克隆,但斑地锦 *F3H* 基因克隆还未见报道。该实验根据已知的植物 *F3H* 基因进行序列比对,在高度保守区设计简并引物,PCR 法结合 RACE 技术、热不对称 PCR(Tail-PCR)^[11]克隆斑地锦 *F3H* 基因及其启动子,利用 qRT-PCR 技术检测在苗期、花期和果期不同组织中的表达情况,为进一步研究斑地锦 *F3H* 基因表达调控和完善斑地锦槲皮素生物合成途径提供便利条件。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验植株采集于江西中医药高等专科学校实验田,经江西中医药高等专科学校药学系中药教研室鉴定为斑地锦(*Euphorbia maculata* L.)。分别采集苗期(未开花)、花期(开 3 朵以上的花且未结果)和果期(结 3 个以上的果)等的根、茎、叶以及果期的果实,样品采集后立即置-80℃冰箱备用。

1.2 主要试剂与仪器

植物总 RNA 提取试剂盒(Spin Column Plant Total RNA Purification Kit)、基因组 DNA 抽提试剂盒(Spin Column Plant Genomic DNA Purification Kit)、质粒 DNA 小量抽提试剂盒(SanPrep 柱式)、胶回收试剂盒(SanPrep Column DNA Gel Ex-

traction Kit)、引物合成、测序等,生工生物工程(上海)股份有限公司;反转录试剂盒(PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser)、荧光定量 PCR 试剂盒(PrimeScript RT Master Mix)等,宝日医生物技术(北京)有限公司;Pfu 酶(TransStart FastPfu DNA Polymerase)、Taq 酶、Marker (Trans2K[®] Plus II DNA Marker)、T-载体(pEASY-Blunt Simple Cloning Kit)等,北京全式金生物技术有限公司。该实验所用引物见表 1。

普通 PCR 仪(S1000[™] Thermal Cycler)、荧光定量 PCR 仪(CFX96 Real-Time)等,美国 Bio-Rad 公司;超微量分光光度计(NanoDrop One),美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 提取、cDNA 合成和 DNA 的提取

斑地锦总 RNA 提取、DNA 提取和 cDNA 合成均按试剂盒说明书进行。总 RNA 提取后经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,超微量分光光度计测定 RNA 浓度。

1.3.2 *F3H* 基因片段的获得 在 GenBank 中查找麻风树(*Jatropha curcas* L.)、非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)和乌桕(*Triadica sebifera*)等植物的 *F3H* 基因序列,比对找出高度保守区,Primer Premier5.0 软件设计简并引物 *F3H*-ZF 和 *F3H*-ZR,以引物 FZL-1 对总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,PCR 扩增斑地锦 *F3H* 基因保守序列。反应体系(25 μL):5×GC 缓冲液 5 μL, dNTPs 2 μL, *F3H*-ZF、*F3H*-ZR 各 2 μL, cDNA 模板 2 μL, Pfu 酶 0.3 μL, 灭菌超纯水 11.7 μL。反应程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环;72℃ 5 min。PCR 产物电泳后胶回收试剂盒回收,连 T-载体,转化大肠杆菌 DH5α 感受态,菌液 PCR 筛选阳性后送测序。

1.3.3 *F3H* 基因 ORF 区的获得 根据保守序列测序结果设计正向特异引物 *F3H*-XF, 根据反转录引物 FZL-1 设计反向引物 *F3H*-3R, 进行 3'-RACE。反应体系(25 μL):5×GC 缓冲液 5 μL, dNTPs 2 μL, *F3H*-XF、*F3H*-3R 各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, Pfu 酶 0.3 μL, 灭菌超纯水 14.7 μL。反应程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环;72℃ 5 min。PCR 产物电泳后胶回收测序。

根据保守序列测序结果设计特异引物 *F3H*-

表 1 实验所使用的引物

Table 1 List of primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	引物用途 Primer purpose
<i>F3H</i> -ZF	GGCAAGAAAGGYGGMTTYATYGT	保守序列克隆 Conserved sequence clone
<i>F3H</i> -ZR	TCMGCATTCTTGAACCTYCCATT	
FZL-1	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA 合成 cDNA synthesis
<i>F3H</i> -XF	CTGTTGAGGGTGCCTTTGTTGT	3'-RACE
<i>F3H</i> -3R	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
<i>F3H</i> -SR1	ACCTGGTCCTGCAGCAACAGGGTAATGGTAC	Tail-PCR
<i>F3H</i> -SR2	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCGGTAGAAATTGACCACCACTTCTGGTC	
<i>F3H</i> -SR3	TCGCTGTAGGCCTCGGTCACTGGAATCCAC	
<i>F3H</i> -SR4	TAGAGCTCATGAACATGCTCGGTAAGAGG	
<i>F3H</i> -SR5	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCGGGTCAAAGTAGGAAGTTTACGTACTGAATG	
<i>F3H</i> -SR6	CGAATCAATCTTAAAACTTAGCAAGAAAACG	
ADF1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNGGAA	
ADF2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNGGTT	
ADF3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNNCCAA	
ADF4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNBNNGCGT	
ADF0	ACGATGGACTCCAGAG	
<i>F3H</i> -CF	CAATGGCTCCTACTACACTTAC	ORF 区克隆 ORF clone
<i>F3H</i> -CR	CCCAGATCAAGAACATTAAGAC	
<i>F3H</i> -PF	TTGGCACTGTCAACTCCTAC	启动子克隆 Promoter clone
<i>F3H</i> -PR	CATTTGCCAATGCGGTAAGT	
<i>F3H</i> -qF	AAGCAGTGGTGAATCCAAC	qRT-PCR
<i>F3H</i> -qR	CCAGCTCTAAATCCTTGCTCATC	
<i>UBQ</i> -qF	ATAACCTCGAGGTCGAGTC	
<i>UBQ</i> -qR	TGGAGAGTGGACTCCTTCTG	

SR1、*F3H*-SR2、*F3H*-SR3, 与随机引物 ADF1/ADF2/ADF3/ADF4, 以及引物 ADF0 进行 Tail-PCR 扩增 *F3H* 基因 5'端。Tail-PCR 第一轮 PCR, 反应体系 (25 μL): 10×缓冲液 2.5 μL, dNTPs 2 μL, ADF1 (/ ADF2/ADF3/ADF4) 2 μL, *F3H*-SR1 1 μL, 基因组 DNA 模板 1 μL, Taq 酶 0.3 μL, 灭菌超纯水 16.2 μL。第二轮 PCR 反应体系 (25 μL): 10×缓冲液 2.5 μL, dNTPs 2 μL, ADF0、*F3H*-SR2 各 1 μL, 稀释 100 倍的第一轮 PCR 产物 1 μL, Taq 酶 0.3 μL, 灭菌超纯水 17.2 μL。第三轮 PCR 反应体系 (25 μL): 10×缓冲液 2.5 μL, dNTPs 2 μL, ADF0、*F3H*-SR3 各 1 μL, 稀释 100 倍的第二轮 PCR 产物 1 μL, Taq 酶 0.3 μL, 灭菌超纯水 17.2 μL。Tail-PCR 反应程序见文献[11]。根据第二轮和第三轮 PCR 产物电泳结果选择长度合适的条带

进行胶回收测序。

将所获得的 *F3H* 保守序列、5'端序列和 3'端序列用 DNASTar 软件拼接, 结合 GenBank 中的 blast 结果, 获得 ORF 区序列, 设计特异引物 *F3H*-CF、*F3H*-CR, 用 Pfu 酶进行 PCR 扩增并送测序。

1.3.4 生物信息学分析 *F3H* 蛋白的理化性质预测采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>), NCBI 的 conserved domain database(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测蛋白保守结构域。TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)进行跨膜结构域预测, Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)进行结构域三维建模^[12], NCBI 中的 Distance tree

of results(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行系统进化树分析。

1.3.5 *F3H* 基因不同生长期组织表达差异分析

根据 *F3H* 基因 ORF 区序列设计荧光定量 PCR 引物 *F3H*-qF、*F3H*-qR, 分别提取斑地锦苗期、花期和果期的根、茎、叶以及果实的总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计检测后, 反转录试剂盒合成 cDNA, 以 *UBQ* 为内参基因^[13], 进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系 (20 μ L): 2 $\times$ TB Green Premix Ex Taq(TliRNaseH Plus)10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 灭菌水 7.2 μ L; 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 每个反应体系重复 3 次。利用 Excel 分析处理实验结果。

1.3.6 *F3H* 基因启动子序列的获得与分析 根据 5' 端序列设计特异引物 *F3H*-SR4、*F3H*-SR5、*F3H*-SR6, 以基因组 DNA 为模板, 采用 Tail-PCR 进行染色体步移, 扩增 *EmF3H* 基因的启动子, 反应体系和反应程序与 1.3.3 相同。根据 Tail-PCR 产物测序结果设计特异引物 *F3H*-PF、*F3H*-PR, 用 Pfu 酶进行 PCR 扩增并送测序。序列分别用 Plantcare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>)分析序列特征。

2 结果与分析

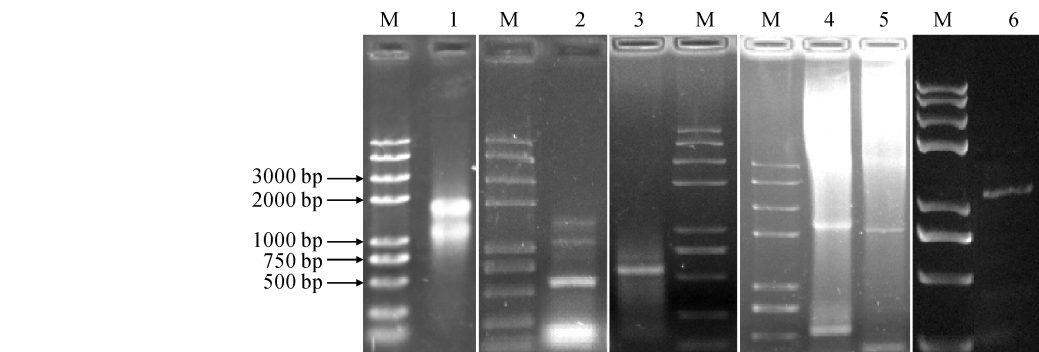
2.1 斑地锦 *F3H* 基因的克隆

试剂盒提取斑地锦总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检

测质量良好(图 1)。由图 1 可知, 同源克隆法设计简并引物 *F3H*-ZF 和 *F3H*-ZR, PCR 获得预期 510 bp 左右的斑地锦 *F3H* 基因保守序列, 3'-RACE 法得到约 530 bp 的 3' 端序列; Tail-PCR 进行染色体步移, 第三轮产物比第二轮产物小 120 bp 左右, 将第三轮产物测序获得保守序列上游约 2 000 bp, 其中包含基因 5' 端序列; 将保守序列、3' 端序列、5' 端序列用 DNASTAR 软件进行组装, 根据组装结果设计特异引物 *F3H*-CF 和 *F3H*-CR 扩增 ORF 区。测序结果显示, 斑地锦 *F3H* 基因 ORF 区包含 1 092 bp, 编码 364 个氨基酸, 其中氨基酸序列与油桐(*Vernicia fordii*)、乌柏(*Triadica sebifera*)的序列相似性高达 85.5%、85.4%。将此基因命名为 *EmF3H*, GenBank 登录号为 MW767838。

2.2 *EmF3H* 的生物信息学分析

用在线工具 Protparam 分析斑地锦 *F3H* 蛋白的理化性质, 等电点(pI)为 5.47, 相对分子质量为 40.93 KDa, 不稳定系数 47.89, 脂肪指数为 86.54, 平均亲水性为-0.371, 表明 *EmF3H* 为相对稳定的疏水性蛋白。保守结构域预测显示该蛋白属于 2-酮戊二酸铁依赖的双加氧酶(2-oxoglutarate/iron-dependent dioxygenase, 2-ODD)超家族, 与其他植物 *F3H* 的保守结构域相似。TMHMM 2.0 预测 *EmF3H* 不含跨膜区域。Phyre 三维建模结果见图 2, 以克拉维胺合成酶(Clavaminic synthase, PDB ID: d1gp6a)的晶体三维结构为模板建模, 三维模型覆盖率为 91%, 序列的一致性为 31%。利用 NCBI 在线 BLAST 工具将 *F3H* 与 GenBank 中其他植物 *F3H* 蛋白进行比对, 选择相似性最高的 17 种 *F3H*



M. Trans2K[®] Plus II; 1. 总 RNA; 2. 保守序列; 3. 3'-RACE; 4-5. 5'-Tail 第二、三轮产物; 6. ORF

图 1 *EmF3H* 基因的克隆

M. Trans2K[®] Plus II; 1. Total RNA; 2. Conserved sequence; 3. 3'-RACE; 4-5. The second and third round products of 5'-Tail-PCR; 6. ORF

Fig. 1 Cloning of *EmF3H*

蛋白,用 Distance tree of results 中的 Neighbor Joining 法构建系统进化树(图 3),不同物种来源的 F3H 蛋白在进化上归属不同的分支,类似于蔓花生、大花悬铃果的 F3H,EmF3H 也为相对独立的一个分支。

2.3 EmF3H 基因在不同生长期组织表达模式

分别提取斑地锦不同生长期(苗期、花期、果期)根、茎、叶、果的总 RNA,以 UBQ 为内参基因,进行 qRT-PCR 扩增。结果显示,EmF3H 在不同生长期各组织中均有表达,但表达量有显著差异,其中花期的根和果期的果实中表达量最高,其次为苗期的根和果期的根、茎,在各生长期的叶、苗期的茎和花期的茎内表达水平较低(图 4)。另外,在茎中随生长期

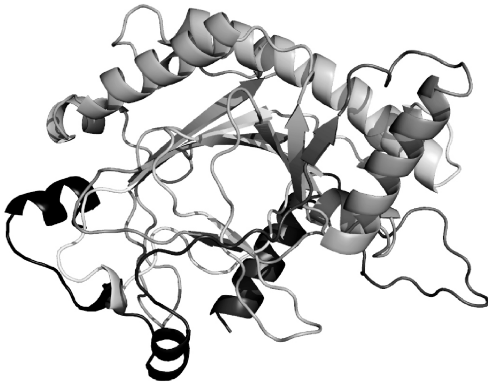


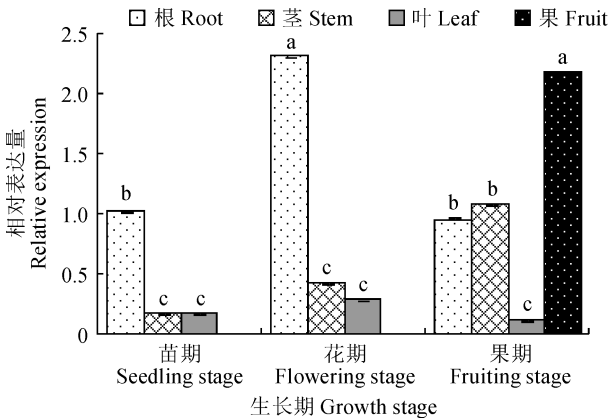
图 2 EmF3H 蛋白三维结构预测

Fig. 2 The deduced three-dimensional structure of EmF3H

表达有不断增强的趋势,在根内表达量先上调后下降。

2.4 EmF3H 基因启动子序列的获得与分析

以斑地锦基因组 DNA 为模板,Tail-PCR 法进行染色体步移(图 5),将第三轮约 2 000 bp 的 PCR 产物胶回收后连接 T-载体测序。根据测序结果设计特异引物 F3H-PF、F3H-PR,Pfu 酶进行 PCR 扩增并送测序,结果获得约 1 604 bp 的 EmF3H 启动



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

图 4 不同生长期不同组织中 EmF3H 的相对表达量
Different normal letters indicate significant difference at 0.05 level ($P<0.05$)

Fig. 4 The relative expression levels of EmF3H from different tissues in different growth stages

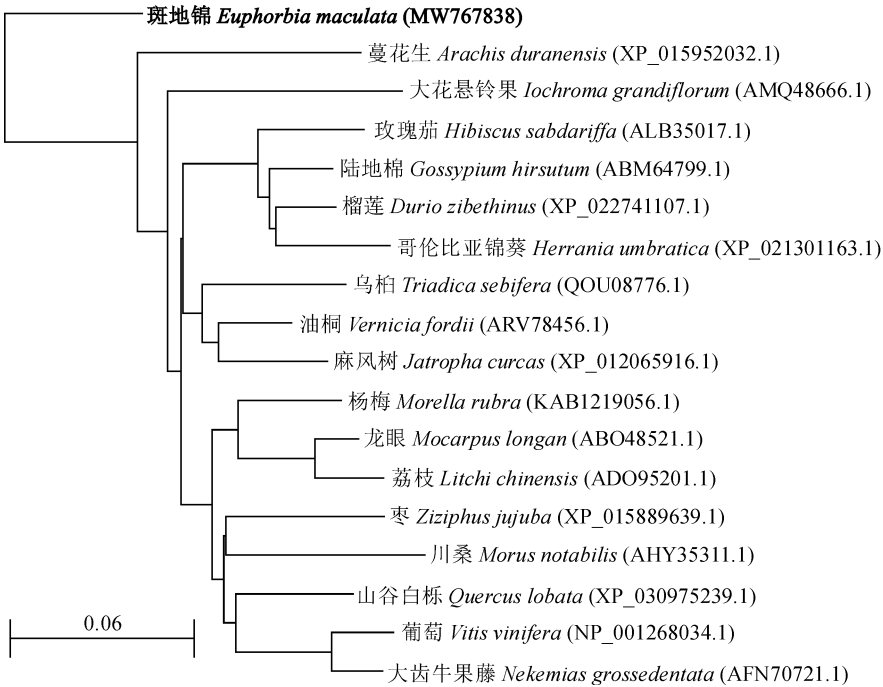
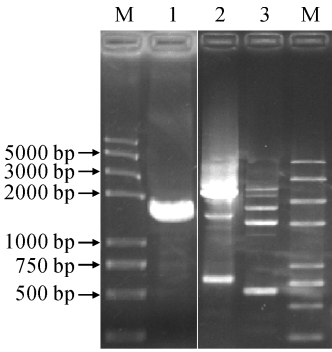


图 3 EmF3H 和其他 F3H 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of EmF3H protein and other plant F3H proteins



M. Trans2K[®] Plus II; 1. 启动子;
2-3. Tail-PCR 第二、三轮产物

图 5 EmF3H 基因启动子的克隆

M. Trans2K[®] Plus II; 1. EmF3H promoter;
2-3. The second and third rounds products
of Tail-PCR

Fig. 5 Cloning of EmF3H promoter

子序列,用 Plantcare 和 PLACE 分析显示内含 TA-TA-box、CAAT-box 等基本启动子序列,也含有 Box 4(ATTAAT)、G-Box(CACGTG)、GATA-motif(AAGATAAGATT)、AE-box(AGAAACAA)、I-box(TGATAATGT)、TCT-motif(TCTTAC)等光反应元件,LTR(CCGAAA)低温反应元件,TC-rich repeats(GTTTTCTTAC)应激反应元件,circadian(CAAAGATATC)昼夜节律调控元件和 ABRE(ABA 反应元件)、P-box(GAs 反应元件)、TGA-element(生长素反应元件)等激素反应元件。

3 讨论

苯丙烷代谢途径是植物重要的次生代谢途径之一,该途径以苯丙氨酸为底物,先后在苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、4-香豆酰-CoA 连接酶(4CL)、查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶

(CHI)、黄烷酮-3-羟化酶(F3H)、类黄酮-3'-羟化酶(F3'H)、黄酮醇合成酶(FLS)等一系列酶的催化作用下,合成黄酮类、木质素及花青素等多种次生代谢产物^[14-15],而 F3H 是其中的关键酶之一,催化柚皮素生成二氢山奈酚。F3H 的克隆与功能研究已有一些报道^[7-10],烟草中超表达枸杞 *LcF3H* 提高了黄烷-3-醇的含量和对干旱胁迫的耐受性^[16];转基因高粱胚轴中,*SbF3H* 将部分碳流转移到了 3-羟基黄酮的生产上^[17]。

该研究从斑地锦中克隆了一个 *F3H* 基因编码区及其启动子。蛋白质 EmF3H 与油桐 VfF3H、乌柏 TsF3H 的序列相似性分别为 85.5%、85.4%,初步证明 *EmF3H* 属于 *F3H* 基因家族,氨基酸序列聚类分析结果表明其为相对独立的一个分支,说明 EmF3H 在进化上有明显的种属特性。研究表明 *F3H* 基因在不同植物不同生长期和不同组织中表达水平有差异,柠条锦鸡儿 *CkF3H* 在根、茎和叶中均有表达,没有组织特异性^[18],而茶菊 *CmF3H* 在花中表达量最高,其次为茎、叶,根中表达量最低^[10]; *EmF3H* 在花期的根和果期的果实中表达量最高,随着植物的生长,表达量在茎中逐渐上升,在叶内一直较低,说明该基因表达在斑地锦中存在组织特异性,同时预示着 *F3H* 可能参与多种物质的生物合成,且在不同植物中功能侧重点不同,其具体功能有待于进一步挖掘。在 *EmF3H* 启动子序列内预测有 TAAT-box 等基本启动子序列和光反应元件、应激反应元件、激素反应元件等,表明 *EmF3H* 可能参与胁迫应答,但是否能够响应不同胁迫,进而影响槲皮素等黄酮类化合物的合成,还需进一步研究基因表达调控。因此,该研究结果丰富了 *F3H* 基因资源,也对探讨斑地锦苯丙烷类次生代谢途径(包括黄酮类化合物生物合成途径)奠定了一定的基础。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第十三卷第三分册[M]. 北京: 科学出版社, 1997.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-四部: 2015 年版 分辑号: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 127.

[3] 安惠霞, 李治建, 古丽娜·达吾提, 等. 地锦草的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2 866-2 868.

AN H X, LI Z J, GULINA D, et al. Research advance of the

Uighur medicine Dijincao[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 19(12): 2 866-2 868.

[4] WANG T T, ZHOU Z Q, WANG S, et al. Mechanisms of vasorelaxation induced by total flavonoids of *Euphorbia humifusa* in rat aorta[J]. Journal of Physiology and Pharmacology, 2017, 68(4): 619-628.

[5] 胡建新, 席晓甜, 王晓敏, 等. 地锦草调控 NF-κB/VEGF 信号通路抑制肿瘤血管生成的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,

2018, **24**(23): 165-170.

HU J X, XI X T, WANG X M, *et al.* Mechanism of humi-
fuse *Euphorbia* in regulating tumor angiogenesis by NF- κ B/
VEGF signal pathway[J]. *Chinese Journal of Experimental*
Traditional Medical Formulae, 2018, **24**(23): 165-170.

[6] WISMAN E, HARTMANN U, SAGASSER M, *et al.*
Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis*
thaliana population generate phenylpropanoid biosynthesis
phenotypes[J]. *Proceedings of the National Academy of*
Sciences of the United States of America, 1998, **95** (21):
12 432-12 437.

[7] MARTIN C, PRESCOTT A, MACKAY S, *et al.* Control of
anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*
[J]. *The Plant Journal*, 1991, **1**(1): 37-49.

[8] DENG Y X, LI C L, LI H Q, *et al.* Identification and charac-
terization of flavonoid biosynthetic enzyme genes in *Salvia*
miltiorrhiza (Lamiaceae) [J]. *Molecules*, 2018, **23** (6):
1 467.

[9] 宋祥忠, 黄克江, 王瑞珩. 白芨(*Bletilla striata*)黄烷酮 3-羟
化酶基因的克隆和表达分析[J]. 分子植物育种, 2019, **17**
(14): 4 586-4 591.

SONG X Z, HUANG K J, WANG R H. Cloning and expres-
sion analysis of flavanone 3-hydroxylase gene in *Bletilla stria-*
ta [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, **17** (14): 4 586-
4 591.

[10] 曹世哲, 罗 昌, 陈东亮, 等. 茶菊品种‘14-C-1’的 *CmF3H*
基因及启动子克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2021, **41**
(1): 78-85.

CAO S Z, LUO C, CHEN D L, *et al.* Cloning and expres-
sion analysis of *CmF3H* from *Chrysanthemum morifolium*
‘14-C-1’ and isolation of its promoter[J]. *Acta Botanica Bo-*
reali-Occidentalia Sinica, 2021, **41**(1): 78-85.

[11] LIU Y G, CHEN Y L. High-efficiency thermal asymmetric
interlaced PCR for amplification of unknown flanking se-
quences [J]. *BioTechniques*, 2007, **43** (5): 649-650,
652,654.

[12] KELLEY L A, MEZULIS S, YATES C M, *et al.* The
Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analy-
sis[J]. *Nature Protocols*, 2015, **10**(6): 845-858.

[13] 宋美玲, 黄胜和, 陈祖杰, 等. 斑地锦 RT-qPCR 内参基因的筛
选[J/OL]. 广西植物, 2021: 1-11.

SONG M L, HUANG S H, CHEN Z J, *et al.* Screening of
reference genes for RT-qPCR in *Euphorbia maculate* [J/
OL]. *Guihaia*, 2021: 1-11.

[14] LI X H, PARK N I, XU H, *et al.* Differential expression of
flavonoid biosynthesis genes and accumulation of phenolic
compounds in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*)
[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010,
58(23): 12 176-12 181.

[15] 许 明, 伊恒杰, 郭佳鑫, 等. 藤茶黄烷酮 3-羟化酶基因
AgF3H 的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2020, **40**
(2): 185-192.

XU M, YI H J, GUO J X, *et al.* Cloning and expression
analysis of a flavanone 3-hydroxylase gene *AgF3H* from *Am-*
pelopsis grossedentata [J]. *Acta Botanica Boreali-Occiden-*
talia Sinica, 2020, **40**(2): 185-192.

[16] SONG X Y, DIAO J J, JI J, *et al.* Molecular cloning and
identification of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Lycium*
chinense, and its overexpression enhances drought stress in
tobacco[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 98:
89-100.

[17] WANG L X, LUI A C W, LAMP Y, *et al.* Transgenic ex-
pression of flavanone 3-hydroxylase redirects flavonoid bio-
synthesis and alleviates anthracnose susceptibility in *Sor-*
ghum [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, **18** (11):
2 170-2 172.

[18] 郑 晟, 毛玉珊, 张腾国, 等. 柠条锦鸡儿 *F3H* 基因克隆及
功能分析[J]. 广西植物, 2017, **37**(6): 723-733.

ZHENG S, MAO Y S, ZHANG T G, *et al.* Cloning and ex-
pression analysis of *F3H* gene in *Caragana korshinskii* [J].
Guihaia, 2017, **37**(6): 723-733.

(编辑:宋亚珍)