

红花花青素合成酶基因的克隆及表达分析

刘秀明^{1,2} 杨文婷^{1,2} 赵利旦^{1,2} 董园园¹ 姚娜¹ 王南¹ 官丽莉¹
李海燕^{1,2*} 李校堃^{1*}

¹吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 长春 130118;

²吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118)

摘要 根据红花转录物测序结果中得到的中间序列, 采用RT-PCR和RACE方法从红花花瓣中克隆到1个ANS基因的全长cDNA, 该基因全长序列1 226 bp, 具有完整的开放阅读框(ORF), 共1 050 bp, 编码349个氨基酸。生物信息学软件分析显示, 该基因编码的蛋白理论分子量约为82.27 kDa, 等电点为5.09, 序列里含有典型的加尾信号序列AATAA和Poly(A)。保守结构域预测表明, 该基因编码的蛋白具有典型的ANS蛋白功能结构域, 其保守结构域中含有铁离子及2-O-酮戊二酸结合位点。结合其他物种的ANS基因构建系统树表明, 红花ANS基因与其他物种氨基酸具有一定的同源性, 其中与芍药的亲缘关系最近。应用实时荧光定量PCR分析表明, ANS基因在红花的初花期和盛花期的表达量最高。

关键词 红花; 花青素合成酶; 黄酮生物合成; Real-time PCR

Cloning and Expression Analysis of Anthocyanidin Synthase in Safflower

Liu Xiuming^{1,2}, Yang Wenting^{1,2}, Zhao Lidan^{1,2}, Dong Yuanyuan¹, Yao Na¹, Wang Nan¹, Guan Lili¹,
Li Haiyan^{1,2*}, Li Xiaokun^{1,2*}

(¹Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; ²College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract In this study, the full-length cDNA sequence of anthocyanidin synthase (ANS) gene was cloned from flowers of *Carthamus tinctorius* L. (safflower) by RT-PCR and RACE techniques according to the sequences of transcriptome in safflower. The full-length cDNA of the ANS was 1 226 bp and included a whole open reading frame of 1 050 bp, encoding a polypeptide of 349 amino acids. The putative protein of the gene showed predicted molecular weight of 82.27 kDa with a theoretical pI of 5.09, and this gene contains typical AATAA tail signal sequence and Poly(A). The conserved structural domain analysis showed that it had the typical functional domains of ANS protein, containing 2-oxoglutarate and iron ion combination sites. Safflower ANS had high homology with other species according to the blasting and phylogenetic analysis, which indicated that safflower ANS was more related to ANS from *Paeonia lactiflora* Pall. Real-time PCR results indicated that relative expression of ANS gene was highest in early flowering period and blooming period.

Key words safflower; anthocyanidin synthase; flavonoid biosynthesis; Real-time PCR

收稿日期: 2014-01-24 接受日期: 2014-03-03

国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2011AA100606)、国家自然科学基金(批准号: 31101172、31201237)、吉林省科技厅中青年科技领军人才及优秀创新团队项目(批准号: 20111815)和教育部博士点基金(批准号: 20122223120002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0431-84533427, E-mail: hyl99@163.com; Tel: 0431-84533348, E-mail: xiaokunli@163.net

Received: January 24, 2014 Accepted: March 3, 2014

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.2011AA100606), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31101172, 31201237), the Program for Young Scientific and Technological Talents and Outstanding Innovation Team of Jilin Province (Grant No.20111815) and the Doctoral Fund of Ministry of Education (Grant No.20122223120002)

*Corresponding authors. Tel: +86-431-84533427, E-mail: hyl99@163.com; Tel: +86-431-84533348, E-mail: xiaokunli@163.net

网络出版时间: 2014-05-16 14:57 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0028.html>

红花(*Carthamus tinctorius* L.)属于菊科红花属植物,又名草红花、刺红花等,是我国传统中草药^[1-2],具有较强的抗旱及抗寒能力,不耐涝,在新疆的种植面积居全国第一^[3-4],是集食用、药用价值于一身的重要经济作物。红花具有活血化瘀、散瘀止痛的功效,在治疗痛经、闭经、跌打损伤等方面效果显著^[5]。研究表明,红花含有多种酚类化合物,包括木质素及黄酮类成分等^[6-7]。红花中含有红花黄色素和红花红色素两种色素,红花黄色素是从红花的花瓣中提取出的天然色素,为查耳酮类化合物。羟基红花黄色素A是红花黄色素的主要有效成分^[8],以其为主要活性成分的红花黄色素注射液已经被广泛地应用到脑血管病、冠心病及脉管炎等的治疗^[9]。

花青素(anthocyanidin)是一类重要的水溶性植物色素,属于黄酮类化合物,是植物体内重要的次生代谢产物^[10-11]。研究表明,花青素具有抗炎、抗辐射、增强免疫系统能力、抗辐射等多种功效^[12]。花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS; EC 1.14.11.19)是位于花色苷合成通路末端的酶,催化无色花色苷向花色素的转化^[13]。目前,关于花青素合成酶克隆的研究多集中在芜菁^[14]、拟南芥^[15]、葡萄^[16]、越橘^[17]、水稻^[18]、银杏^[19]等植物中,而在药用植物红花上还未见报道。本研究根据红花转录组测序结果,首次在红花中克隆了花青素合成酶基因,并对其进行生物信息学分析,研究其在不同开花时期的表达量,旨在为红花中花青素合成的分子机制研究奠定基础,同时也为红花黄酮化合物的代谢调控研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以红花吉红早熟品种为试验材料,种子购自新疆红花缘科技有限公司,种植于吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心试验田。采取红花花蕾期、初花期、盛花期、衰落期的花瓣用于表达分析,盛花期作为花青素合成酶基因克隆所用材料。剪取花瓣后,迅速放于液氮中,用锡箔纸包好后于-80 °C保存备用。

1.2 红花ANS基因中间片段的验证

取-80 °C中冻存的红花盛花期花瓣,按照RNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司,货号: RP3301)操作进行RNA提取,提取的RNA用核酸检测仪检测其纯度,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。RNA保存于-80 °C备用。按照反转录试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司,货号: RP6601)的操作说明,进行cDNA的反转录,反转录后的cDNA保存于-20 °C冰箱中备用。根据本实验室红花转录组测序结果中挑选的候选基因,设计特异性引物(表1),验证中间片段。扩增程序为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 30个循环; 72 °C延伸6 min。引物合成及测序工作由上海生工生物工程服务有限公司完成。

1.3 红花ANS基因全长cDNA克隆

根据验证的红花ANS基因中间片段,分别设计引物(表1)ctANS 2和ctANS 3,按照Race试剂盒(罗氏公司,货号: 3353621001)的说明书进行3' race和5' race克隆。根据3段序列拼接而得的cDNA全长,设

表1 用于红花ANS基因克隆的特异性引物

Table 1 The specific primers for cloning of the ANS gene of safflower

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	用途 Use
ctANS 1	F: AGG TAG GTT GGG AAG CAG GT R: TGA GCT GTT CGT TGA TGG AG	Cloning of the ANS fragment
ctANS 2	F: GTT TCC TGA GAT GAG TAG GAA G R: ACC GGC ATA TCA AAG AAT TC	Cloning of the 3' race of the ANS gene
ctANS 3	F: GTT GGG AAG CAG GTG TGG TTT C R: AAG ATC CCC AAC TTG TTG	Cloning of the 5' race of the ANS gene
ctANS 4	F: GAG AAA GGT AGA TGA TGG ATC R: GCT TAT GGG AAT ATA AGT GAC C	Cloning of cDNA of the ANS gene
ctANS 5	F: CAG CCC AAT CAA GCT TTT GC R: TGC CGG TGA AGG AGA AGA AA	Real-time PCR
18S	F: GAG AAA CGG CTA CCA CAT CCA A R: TCG TTT GAG CCC GGT ATT GTT A	Reference genes

计其全长扩增引物ctANS 4(表1), 获得目的基因全长cDNA。将扩增出全长片段的ANS基因的PCR产物在1%琼脂糖凝胶电泳上检测, 用胶回收试剂盒[爱思进生物技术(杭州)有限公司]回收目的片段, 将其连接到pEASY-T1 Simple载体(北京全式金生物技术有限公司, 货号: CT111-01)上, 进行蓝白斑筛选, 菌液PCR鉴定, 质粒酶切鉴定, 送上海生工生物工程服务有限公司进行测序。

1.4 生物学信息分析

将测得的全长序列利用DNAMAN软件进行核苷酸序列编辑和氨基酸序列的推导, 使用DNA-Star软件寻找最大开放阅读框(ORF), 在NCBI网站上进行BLAST搜索同源性序列, 利用clustalW1.83软件构建系统发育树, ProtParam软件(<http://web.expasy.org/>)分析编码蛋白的氨基酸序列的组成、相对分子质量及等电点等理化性质。

1.5 Real-time PCR 分析

分别取-80 °C冻存的花蕾期、初花期、盛花期和衰落期的花瓣, 提取RNA, 反转录cDNA用于qRT-

PCR(quantitative real time-PCR)分析。实验按照试剂盒说明书操作(宝生物工程(大连)有限公司, 货号: RR420A)进行, 定量PCR反应体系为: SYBR Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)(2×)10 μL; 上下游引物(表1)各0.4 μL; ROX Reference Dye II(50×); DNA模板 2 μL; ddH₂O 6.8 μL。反应条件为: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性3 s, 65 °C退火30 s, 40个循环。

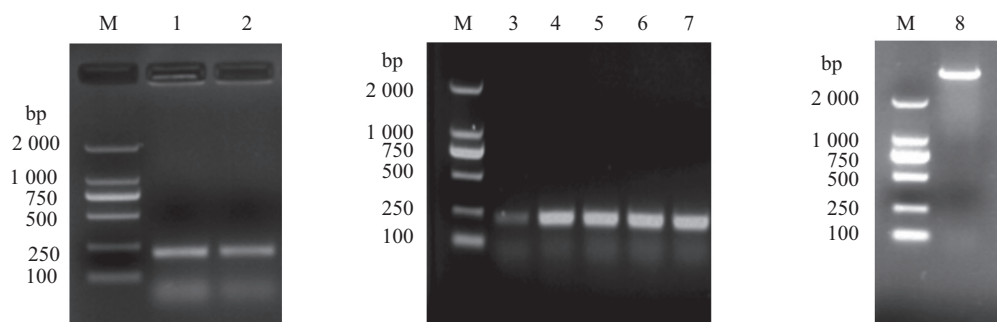
2 结果

2.1 红花ANS基因中间片段的验证

根据红花花瓣转录组测序得到的中间片段, 设计一对引物ctANS1-F和ctANS1-R, 以吉红早熟盛花期花瓣的cDNA为模板, 进行RT-PCR扩增, 获得221 bp的中间片段(图1A), 经过胶回收连接到克隆载体pEASY-T1上, 进一步通过菌液PCR(图1B)和EcoR I、Hind III酶切鉴定(图1C), 测序结果正确。

2.2 红花ANS基因全长cDNA克隆及序列分析

根据ANS基因221 bp的中间片段, 设计一对引物ctANS 2-F和ctANS 2-R, 按照Race试剂盒的说明

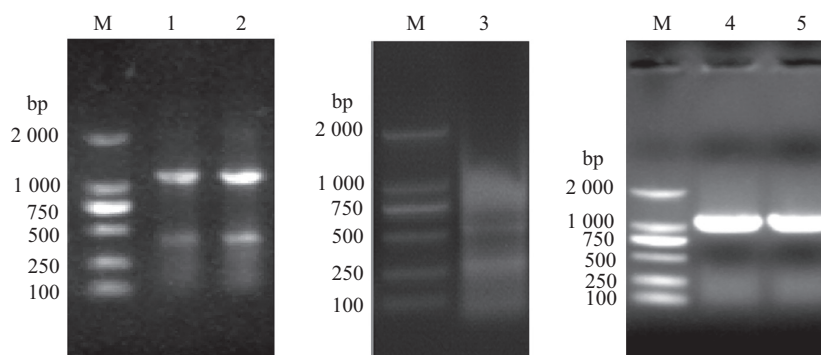


1、2: RT-PCR结果; 3~7: 菌液PCR; 8: 酶切图谱; M: DNA marker。

1,2: results of the RT-PCR; 3~7: PCR of bacterium; 8: results of the restriction; M: DNA marker.

图1 ANS基因中间片段的验证

Fig.1 Agarose gel electrophoresis from ANS fragment



M: DNA标准分子量DL2000; 1、2: 3' race; 3: 5' race; 4、5: 全长cDNA。

M: DNA marker DL2000; 1,2: 3' race; 3: 5' race; 4,5: cDNA.

图2 红花ANS基因的全长克隆

Fig.2 Isolation of the cDNA of ANS gene in Safflower



图3 红花ANS氨基酸序列与蓖麻同源性分析

Fig.3 Homology analysis of ANS in Safflower and *Ricinus communis*

```

1   CTATATAACCACACACACACTCATATGTATATATGTATGTATAAAAAAACATAAT
61  AGAGAAAAGGTAGATGATGGATCCAAAGGGAATATATGTTGGGGGTTCACTCCCGGTTCT
      M M D P K G I Y V G G S L P V P
121 AGTGTAAGAATTGGCTAAGGAATCGCCGAGAGAGGTTCCACCACGATATATACGTCCA
      S V Q E L A K E S P R E V P P R Y I R P
181 GATCAAGATGCTCCAGTCATATCATCGTTGTCTCAAGTACCATAAATCAATATGGAGTAT
      D Q D A P V I S S L S Q V P I I N M E Y
241 TTATCGTCAAAAAGCTCCGAGCTAGAGAAACTACACCTTGCTTGTAAGATTGGGGTTTT
      L S S K S S E L E K L H L A C K D W G F
301 TTCCAGTTGATAAATCATGGGGTGAGTTGTTGTTGATGGAGAAAGTAAAGCAAGAAACA
      F Q L I N H G V S C S L M E K V K Q E T
361 CAAGAATCTTTGATATGCCGGTGAAGGAGAAGAAAAATATTGGCAACAAGTTGGGGAT
      Q E F F D M P V K E K K K Y W Q Q V G D
421 CTTGAAGGATTTGGGCAAGCATTGTTGTGTCGGATGAGCAAAAAGCTTGATTGGGCTGAC
      L E G F G Q A F V V S D E Q K L D W A D
481 ATGTTTTACTTGGTACCCTTCTACTCATCTCAGGAAACCACACCTGCTTCCAACCTA
      M F Y L V T L P T H L R K P H L L P N L
541 CCTCTCCATTCAGAGATACCCTAGAAGAATACTCGACAGAAGTAAAGAAGCGGCTTAA
      P L P F R D T L E E Y S T E V K K A A L
601 AAAACCTAGTGTTCATTGCAAAAAGCTTAAATATGGAGGTTGAGGAGATGAAGGAATTG
      K T L V F I A K A L N M E V E E M K E L
661 TTAAAGATGGAATCAAGCAATGAGAATGAATTATATCCACCATGTCCACAACCTGAA
      F K D G I Q A M R M N Y Y P P C P Q P E
721 CAAGTCATTGGTCTACCCCTCACTCAGATGCTGTTGGGATCACTTTTCTTCCAACCT
      Q V I G L T P H S D A V G I T F L L Q L
781 AATCAGGTAGAAGGCTACAGATTAATAAAGGATGGAATGTGGATACAGTAAACCCTT
      N Q V E G L Q I K K D G M W I P V K P L
841 CATGATGCTTTCATTGTTAATATCGGGGACATCTTGAGAGATTGTAACAAATGGAGTATAT
      H D A F I V N I G D I L E I V T N G V Y
901 AAAAGCATTGAGCATCGGCAACTATAAACTCCGAGAAGAAGAGGCTATCAATAGCCACA
      K S I E H R A T I N S E K K R L S I A T
961 TTTGTAAGCCGAATGTGGATGGGGATTCGGACCTGCACCTAGCCTCATCCTCTCGAG
      F V S P N V D G D F G P A P S L I T L E
1 021 ACACCAGCAAGATTTACTAGGTATCTGTGTTGATTCTTGAAAACTTGTTTTCGAGG
      T P A R F T R V S V V D F L K N L F S R
1 081 GAACCTAAAGGAAAAACTATAATCGACCAATATCGTATAATGATGTAATGAACCTAGA
      E L K G K T I I D Q Y R I *
1 141 TCTGGTCACTTATATCCATAAGCTACTTTTATTAATTATGCGAATCATAAATTCATA
1 201 ATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

起始密码子和终止密码子用方框表示, 阴影处是功能结构域。

The translation start codon and the stop codon are boxed, and the functional domain are shadowed.

图4 红花ANS基因cDNA的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.4 The complete cDNA sequence of Safflower ANS and its predicted amino acid sequence

书进行3' race扩增, 得到了1 171 bp的3'端序列(图2A)。设计一对引物ctANS 3-F和ctANS 3-R按照Race试剂盒的说明书进行5' race扩增, 得到了516 bp

的5'端序列(图2B)。通过拼接获得全长1 226 bp的片段。应用已设计的引物ctANS 4-F和ctANS 4-R, 以吉红早熟盛花期花瓣的cDNA为模板, 通过PCR扩增

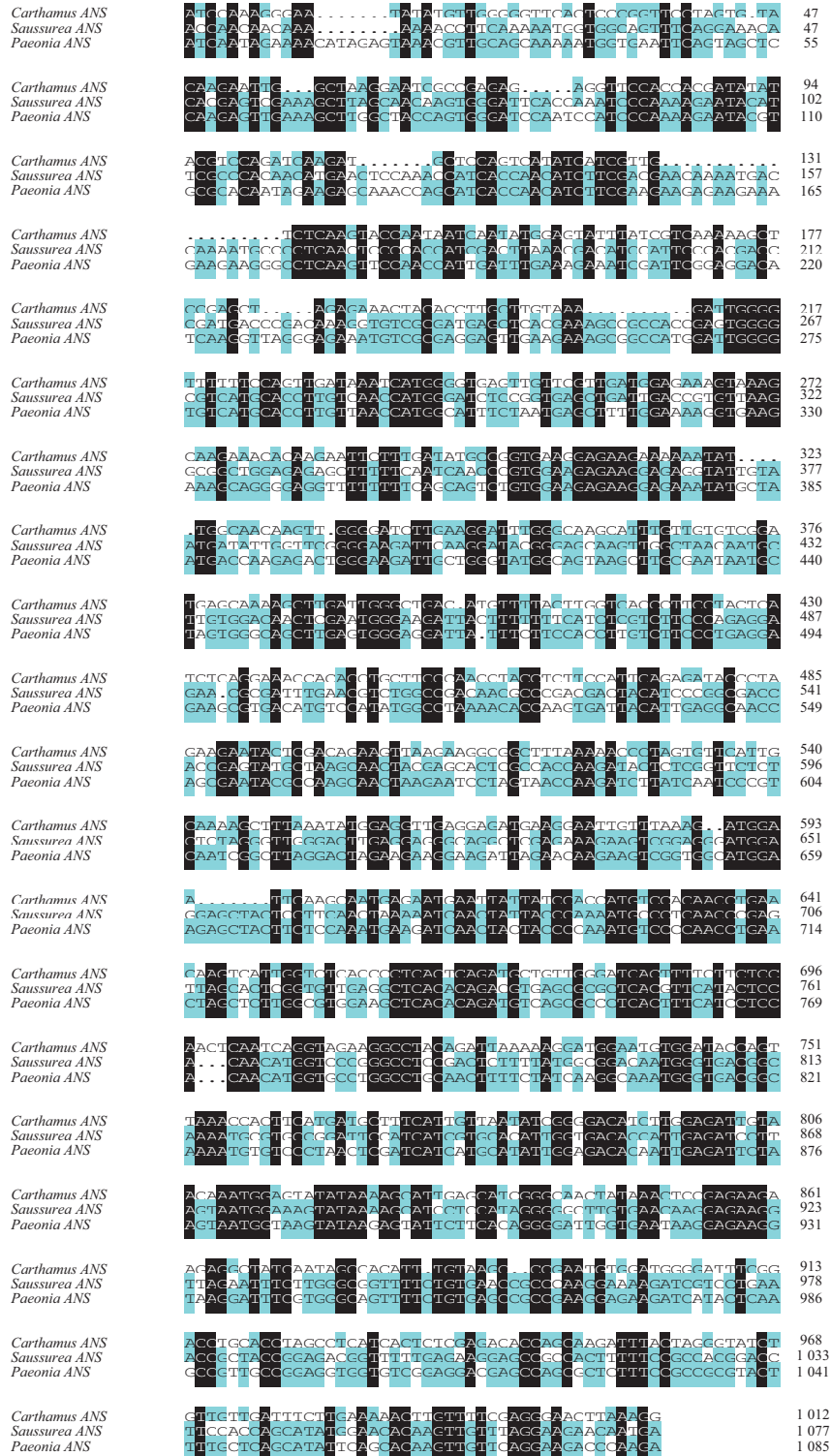


图5 红花ANS序列同源性分析

Fig.5 Homology analysis of ANS in safflower

和测序, 获得长约1 104 bp的片段(图2C)。将其在NCBI 上进行序列比对分析, 发现该基因与蓖麻假定的ANS 蛋白(XM_002519717.1)的同源性达到72%(图3)。序列 分析表明, 红花ANS基因的开放阅读框长度为1 050 bp, 编码349个氨基酸(图4), 5'非翻译区长为72 bp, 3'非

翻译区长为104 bp。序列里含有典型的加尾信号 序列AATAA和Poly(A)。根据在线分析软件([http:// web.expasy.org/](http://web.expasy.org/)), 推导的蛋白质理论分子量约为 82.27 kDa, 等电点(pI)为5.09。具有典型的ANS蛋白 的保守结构域: 2OG-Fe(II) oxygenase功能结构域(第

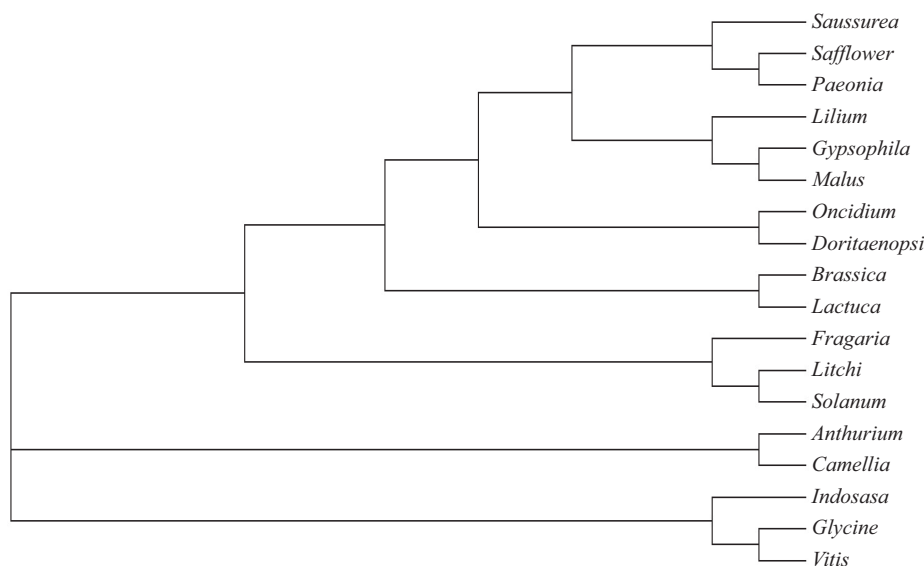
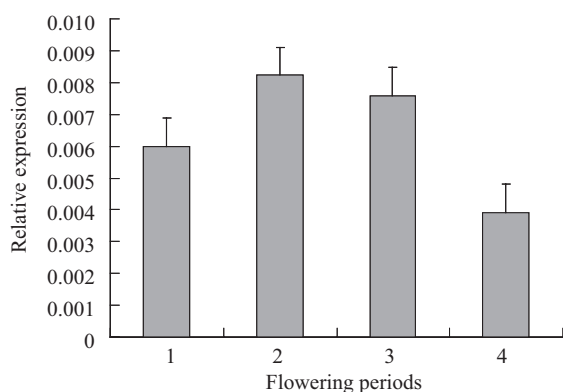


图6 红花ANS与其他17个植物ANS蛋白的系统进化分析

Fig.6 Phylogenetic analysis of ANS in safflower with 17 other plant ANSs



1: 花蕾期; 2: 初花期; 3: 盛花期; 4: 衰落期。

1: bud period; 2: early flowering period; 3: blooming period; 4: late flowering period.

图7 红花花发育过程中ANS的表达

Fig.7 Expression of ANS in different periods of safflower floral development

200~300个氨基酸处)。

2.3 红花ANS基因的同源性及系统树分析

利用DNAMAN软件进行比对发现, 红花与芍药和水母雪莲花的同源性最高(图5)。从NCBI上搜索到其他17个物种的ANS序列, 利用clustalW1.83软件进行多重序列比对, 并构建系统发生树(图6)。结果表明, 红花ANS基因与芍药的亲缘关系最近, 在分类上与芍药和水母雪莲花聚为一类, 与百合、满天星和苹果的亲缘关系也较近。

2.4 红花ANS基因的表达分析

分别取花蕾期、初花期、盛花期和衰落期的花瓣, 提取RNA, 反转录成cDNA, 以18S rRNA作为内

参基因, 采用Real-time PCR的方法分析红花ANS基因在不同开花时期的表达量。结果见图7, 从相对表达量来看, 红花ANS基因在初花期的表达量最高, 其次为盛花期, 在衰落期表达量最低。

3 讨论

转录组(transcriptome)是指某一生理条件下, 细胞内所有转录产物的集合, 包括信使RNA、核糖体RNA、转运RNA及非编码RNA。转录组测序作为转录组学研究的新方法, 属于新一代测序技术(next-generation sequencing), 是利用深度测序技术进行转录组分析的技术^[20]。本研究根据红花花瓣转录组测序结果挑选出红花ANS基因的中间片段, PCR及测序结果证明该基因片段确实存在于红花花瓣中。根据得到的中间片段, 采用RACE技术, 成功获得红花ANS基因的全长cDNA。将该序列与其他物种的ANS基因进行同源性比对。结果发现, 红花ANS基因与其他物种的同源性不高, 仅与NCBI上蓖麻推定的蛋白同源性较高, 这与前人研究的ANS基因的同源性均较高的结果有所不同^[21-22]。但该基因编码的蛋白却具有典型的ANS蛋白的保守结构域, 因此, 红花ANS基因还需要通过进一步的功能验证。

本研究通过Real-time PCR技术研究红花ANS基因在红花不同开花时期的表达量, 结果表明, 红花ANS基因在初花期和盛花期的表达量均较高且差异不明显, 仅在衰落期表达量最低。因此, 可将红花的

初花期和盛花期作为该基因后续研究对象。

花青素合成酶(EC 1.14.11.19)是花青素合成途径中的关键酶基因,也是黄酮化合物合成途径中的重要末端限速酶。通过超表达或抑制该基因的表达将会对红花黄酮化合物含量产生重要变化,这为本课题组后期红花黄酮化合物的代谢调控研究奠定基础。本研究后续将通过转基因技术分别进行原核表达、真核表达及亚细胞定位等来进行功能验证,深入研究红花ANS基因在不同开花时期的表达情况及其与红花开花的关系,从而明确该基因在红花黄酮化合物合成中的作用。

参考文献 (References)

- 江磊,李刚,岳帅,刘虹,严兴初,覃瑞. 11个红花品种遗传多样性与亲缘关系的SRAP分析. 中国油料作物学报(Jiang Lei, Li Gang, Yue Shuai, Liu Hong, Yan Xingchu, Qin Rui. Analysis of genetic diversity and relationship of 11 *Carthamus tinctorius* L. varieties by SRAP. Chinese Journal of Oil Crop Sciences) 2013; 35(5): 546-50.
- Yu SY, Lee YJ, Kim JD, Kang SN, Lee SK, Jang JY, et al. Phenolic composition, antioxidant activity and anti-adipogenic effect of hot water extract from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. Nutrients 2013; 5: 4894-907.
- 李威,张曦,谭勇,周玲玉,王恒,陈文. 干旱胁迫对3个品种红花种子萌发的影响. 中国农学通报(Li Wei, Zhang Xi, Tan Yong, Zhou Lingyu, Wang Heng, Chen Wen. The effects of PEG stress on germination characteristics of 3 *Carthamus tinctorius* L. Chinese Agricultural Science Bulletin) 2013; 29(34): 207-11.
- 王果平,帕丽达,李晓瑾,石明辉,何震. 药用植物红花新疆产地适应性数值分析. 中国民族民间医药(Wang Guoping, Palida, Li Xiaojin, Shi Minghui, He Zhen. Suitable producing area of *Carthamus tinctorius* in XinJiang. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy) 2010; 23(2): 49-50.
- Zhou X, Tang L, Xu Y, Zhou G, Wang Z. Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. J Ethnopharmacol 2014; 1(151): 27-43.
- Kim EO, Lee KT, Choi SW. Chemical comparison of germinated and ungerminated-safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds. J Korean Soc Food Sci Nutr 2008; 37: 1162-7.
- Kim EO, Oh JH, Lee SK, Lee JY, Choi SW. Antioxidant properties and quantification of phenolic compounds from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. Food Sci 2007; 16: 71-7.
- Zang BX, Jin M, Si N, Zhang Y, Wu W, Piao YZ. Antagonistic effect of hydroxysaffor yellow A on the platelet activating factor receptor. Acta Pharm 2002; 37(9): 696-9.
- Li HX, Han SY, Wang XW, Ma X, Zhang K, Wang L, et al. Effect of the carthamins yellow from *Carthamus tinctorius* L. on hemorheological disorders of blood stasis in rats. Food Chem Toxicol 2009; 47(8): 1797-802.
- 元希武, 帅琴, 范丽, 曾其伟, 向仲怀, 何宁佳. 桑树花青素合成酶(ANS)基因的克隆及在2种果色桑树中的表达特征. 蚕业科学(Qi Xiwu, Shuai Qin, Fan Li, Zeng Qiwei, Xiang Zhonghuai, He Ningjia. Molecular cloning and expressional pattern of anthocyanidin synthase gene in two mulberry species with different fruit colors. Science of Sericulture) 2013; 39(1): 5-13.
- Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments. Annu Rev Plant Biol 2006; 57: 761-80.
- 蒋明, 陈孝赏, 李金枝. 紫菜薹花青素合成酶基因*BcANS*的克隆、表达与序列分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版)(Jiang Ming, Chen Xiaoshang, Li Jinzhi. Cloning, expression and sequence analysis of anthocyanidin synthase gene *BcANS* in *Brassica campestris* var. *purp urea*. Journal of Zhejiang University, Agric& Life Sci) 2011; 37(4): 393-8.
- Holton TA, Cornish EC. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell 1995; 7(7): 1071-83.
- 许志茹, 李春雷, 崔国新, 孙燕, 李玉花. 芜菁花青素合成酶基因的克隆、序列分析及表达. 生物技术通讯(Xu Zhiru, Li Chunlei, Cui Guoxin, Sun Yan, Li Yuhua. Cloning, sequence analysis and expression of anthocyanidin synthase gene in turnip. Letters in Biotechnology) 2009; 20(1): 66-74.
- Pelletier MK, Murrell JR, Shirley BW. Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis* (further evidence for differential regulation of "early" and "late" genes). Plant Physiol 1997; 113(4): 1437-45.
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). Plant Mol Biol 1994; 24(5): 743-55.
- 李晓艳, 裴嘉博, 张志东, 吴林, 刘海广, 李海燕, 等. 越橘*VcANS*基因的克隆及表达分析. 西北农林科技大学学报(自然科学版)(Li Xiaoyan, Pei Jiabo, Zhang Zhidong, Wu Lin, Liu Haiguang, Li Haiyan, et al. Molecular cloning and expression analysis of *VcANS* gene in blueberry. Journal of Northwest A&F University, Nat Sci Ed) 2012; 40(6): 201-9.
- Reddy AM, Reddy VS, Scheffler BE, Wienand U, Reddy AR. Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. Metab Eng 2007; 9(1): 95-111.
- Xu F, Cheng H, Cai R, Li LL, Chang J, Zhu J, et al. Molecular cloning and function analysis of an anthocyanidin synthase gene from Ginkgo biloba, and its expression in abiotic stress responses. Mol Cells 2008; 26(6): 536-47.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet 2009; 10(1): 57-63.
- 王瑜, 崔金腾, 张克中, 贾月慧. 百合花青素苷合成酶基因片段的克隆及表达分析. 中国农学通报(Wang Yu, Cui Jinteng, Zhang Kezhong, Jia Yuehui. Molecular cloning and expression analysis of anthocyanidin synthase gene fragment in *Lilium*. Chinese Agricultural Science Bulletin) 2013; 29(10): 162-6.
- 缪军, 刘冰江, 杨妍妍, 霍雨猛, 张一卉, 霍凤梅, 等. 洋葱花青素合成酶基因的克隆和序列分析. 山东农业科学(Miao Jun, Liu Bingjiang, Yang Yanyan, Huo Yumeng, Zhang Yihui, Huo Fengmei. Cloning and sequence analysis of anthocyanidin synthase gene in onion. Shandong Agricultural Sciences) 2010; 1: 1-5.