

# 苦荞二氢黄酮醇 4-还原酶的原核表达 与多克隆抗体制备

李 蒙, 陈芳霞, 吕 宁, 陈 鹏\*

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨陵 712100)

**摘 要:**苦荞二氢黄酮醇 4-还原酶(DFR)是花青素合成途径的关键酶。该研究以苦荞种子灌浆期 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法克隆苦荞 DFR 编码基因, 并将其连接到表达载体 pET47b 上, 转化获得苦荞 DFR 编码基因的大肠杆菌 BL21(DE3)工程菌, 通过 IPTG 诱导表达, 用 SDS-PAGE 分析表达产物, 用亲和层析方法纯化蛋白, 制备苦荞 DFR 多克隆抗体。RT-PCR 技术获得了苦荞 DFR 编码基因的开放阅读框, 重组表达载体经 PCR 和测序鉴定, 表明表达载体构建成功, SDS-PAGE 分析表达产物分别以可溶和不可溶的形式高效表达, 亲和层析纯化得到融合蛋白, Western blotting 显示, 制备的多克隆抗体能特异识别其对应的抗原, 天然的苦荞 DFR 蛋白在苦荞种子灌浆期中大量表达。苦荞 DFR 编码基因的原核表达与多克隆抗体的制备, 为进一步开展 DFR 编码基因功能的研究奠定了基础。

**关键词:**苦荞; 二氢黄酮醇 4-还原酶; 原核表达; 多克隆抗体

**中图分类号:** Q785      **文献标志码:** A

## Prokaryotic Expression of Tartary Buckwheat Dihydroflavonol 4-reductase and Preparation of Its Polyclonal Antibody

LI Meng, CHEN Fangxia, LÜ Ning, CHEN Peng\*

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) is a key enzyme in the biosynthesis of anthocyanins in tartary buckwheat. The DFR coding gene was amplified from the seed-filling period cDNA of tartary buckwheat by RT-PCR and ligated to the expression vector pET47b. The *E. coli* BL21 (DE3) carrying the DFR coding gene was obtained and induced by IPTG. The expression products were analyzed by SDS-PAGE, purified by affinity chromatograph and the high titer polyclonal antiserum raised against rabbit was obtained. The open reading frame of DFR coding gene was obtained by RT-PCR. As analyzed by PCR and DNA sequencing. The recombinant prokaryotic expression vector was constructed successfully. As analyzed by SDS-PAGE, the DFR had been high-efficiency expressed in *E. coli* in the form of soluble protein and inclusion bodies. Pure fusion protein was obtained by affinity chromatography. Western blotting analysis showed the raised antibody could specifically react with the antigen and native DFR existed in total protein of seed filling period of buckwheat. These results will be valuable for the further study on the biological function of DFR.

**Key words:** tartary buckwheat; DFR; prokaryotic expression; polyclonal antibody

苦荞 (*Fagopyrum tataricum*) 作为一种健康食品资源正风靡世界, 主要在于其含有高生物价的蛋

收稿日期: 2014-12-30; 修改稿收到日期: 2015-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171606)

作者简介: 李 蒙 (1988-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶学的研究。E-mail: limeng092188@126.com

\* 通信作者: 陈 鹏, 博士, 教授, 主要从事蛋白质与酶学的研究。E-mail: pengchen@nwsuaf.edu.cn

白质和丰富的维生素<sup>[1]</sup>,近年来的研究表明,黄酮类化合物是苦荞中重要的营养保健功能因子,芦丁、儿茶素、花青素作为主要黄酮类化合物,具有抗氧化<sup>[2]</sup>、抗癌<sup>[3-4]</sup>、降血脂<sup>[5]</sup>等一系列药理功效。

在植物类黄酮代谢途径中,无色花青素是花青素、儿茶素以及原花色素的共同前体。二氢黄酮醇 4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)可将二氢黄酮醇还原为无色花青素,是调控植物体内类黄酮代谢物积累的关键功能基因和重要的限速酶之一,催化立体结构专一的三种黄酮醇(二氢山奈酚、二氢槲皮素和二氢杨梅素)生成花色素的前体物<sup>[6]</sup>,进而通过花色素合成酶(ANS)和类黄酮糖基转移酶(3-GT 或 5-GT)形成各种花青素苷<sup>[7]</sup>。由于它的重要性,研究发现不同物种的 DFR 对 3 种底物的偏爱性也存在差异,但 DFR 氨基酸序列在很多区域有较高的同源性,而且在植物的进化过程中 DFR 的功能没有变化<sup>[8]</sup>。研究酿酒葡萄 DFR 三维结构发现,底物特异性结合区域由 26 个氨基酸组成,其中任何一个氨基酸的突变都会改变酶对底物的特异性<sup>[6]</sup>,根据特异区 133 位氨基酸的不同,可分为 Asn 型、Asp 型和非 Asn/Asp 型<sup>[9]</sup>。

目前已基本探明类黄酮花青素的生物合成途径,由于 DFR 编码基因是花色改良和提高生物胁迫的关键基因之一,该基因已经在不同种得到分离,在拟南芥、大麦、金鱼草、葡萄、水稻、番茄中以单拷贝存在,毛果杨、非洲菊,苜蓿是以功能特性不同的多拷贝存在<sup>[10-11]</sup>。毛果杨 DFR 双基因转化的烟草中发现,DFR1 可以通过积累花青素而改变花的颜色,而 DFR2 只积累浓缩的丹宁(原花青素)<sup>[11]</sup>。因此,高等植物在适应环境的过程中,DFR 同工酶分别由不同的转录因子调控,在促进植物进化中起着关键作用<sup>[12]</sup>。植物 DFR 的过量表达都会提高黄酮的含量和生物的抗氧化能力<sup>[13-15]</sup>。

作为类黄酮代谢中关键酶,DFR 对植物体内花青素合成积累起到关键调节作用。李小华等<sup>[16]</sup>对不同苦荞品种间与花青素合成相关的 5 个酶表达差异的分析表明,DFR 编码基因的表达量与苦荞黄酮类化合物积累相关。目前,关于苦荞 DFR 的研究主要集中于转录水平<sup>[17]</sup>,而关于翻译后 DFR 蛋白质的研究未见报道。本文利用 RT-PCR 方法,克隆获得苦荞 DFR 编码基因,成功将它导入大肠杆菌中,在优化表达基础上分离纯化苦荞 DFR 重组蛋白,进行多克隆抗体的制备。为从翻译水平分析 DFR 的表达与苦荞黄酮类化合物累积的关系奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

苦荞品种榆 6-21(榆林农业学校提供),于大田种植,开花 3 d 后采集灌浆期样品,样品采集后立即分装,液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。原核表达载体 pET47b、大肠杆菌菌株 BL21(DE3)和 TOP10 均由本实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 苦荞总 RNA 的提取及 cDNA 合成** 苦荞种子灌浆期总 RNA 的提取参照陈鹏等<sup>[18]</sup>的方法进行,以提取所得总 RNA 为模板, Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物,按照 RevertAid First Strand cDNA Synthes Kit (Thermo Scientific 公司)操作说明书合成 cDNA。

**1.2.2 DFR 表达载体构建** 据 GenBank 中苦荞 DFR 编码基因(GU169468.1)mRNA 全长信息,针对其 ORF 设计了 1 对特异引物:上游引物 F<sub>1</sub>(5'-ACTGGCCGCGGGGGTTGCTGAGGGAGAGATCGTC-3',下划线为 Sac II 酶切位点),下游引物 R<sub>1</sub>(5'-ACACCGCTCGAGTCAATGGCCATTAC-CATTTACA-3',下划线为 Xho I 酶切位点),以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增条件:98 °C 预变性 1 min,98 °C 变性 10 s,59 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测、纯化(北京百泰克生物科技有限公司回收试剂盒)和双酶切,酶切产物经 T<sub>4</sub> DNA Ligase 连接到表达载体 pET47b 后,KCM 方法转化大肠杆菌 TOP10,阳性克隆菌经 PCR 和测序(北京奥科鼎盛公司)鉴定。

**1.2.3 序列比对与分析** 在 NCBI 数据库中 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行核苷酸序列比对。应用 DNAMAN 软件对推导的氨基酸进行多序列比对。利用 ExPASy 在线软件对其进行等电点及分子量预测(<http://www.expasy.org/>)。

**1.2.4 重组蛋白的表达** KCM 方法将测序正确的重组表达载体 pET47b-DFR 转化大肠杆菌 BL21(DE3),挑取阳性克隆单菌落接种到 Kana(50 μg/mL)的 LB 培养基中,37 °C 培养至 OD<sub>600</sub> 值达 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37 °C 诱导 3 h,收集 1.5 mL 菌体,加入 1×SDS-PAGE 上样缓冲液悬浮菌体,沸水保温 10 min 后进行 SDS-PAGE。

**1.2.5 重组蛋白的可溶性分析** 参照文献<sup>[19]</sup>的方法优化表达条件,鉴定的重组表达单菌落接种到

Kana(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养至  $\text{OD}_{600}$  值达 0.6~0.8 时,分别加入 IPTG 至终浓度为 0.15 mmol/L、0.25 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L,置于 22  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$  和 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床中震荡培养,每 4 h、8 h 和 12 h 取样,用 SDS-PAGE 检测重组蛋白表达情况,参照文献[20]进行可溶性分析,收集剩余菌体后加入超声裂解缓冲液(pH 7.5,20 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L NaCl),超声破碎,12 000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min 后,上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析。

**1.2.6 钴离子螯合层析纯化目的蛋白** 收集诱导菌体超声破碎后,12 000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min,上清与等体积的 2 $\times$  PBS(pH 7.5,0.1 mmol 磷酸二氢钠,0.6 mol/L NaCl)混合,缓慢上样经 1 $\times$  PBS 平衡的 Talon resin 柱上,先 1 $\times$  PBS 洗脱杂蛋白,然后用含 20 mmol/L 咪唑<sup>[21]</sup>的 PBS 再次洗脱杂蛋白,最后用含 150 mmol/L 咪唑的 PBS 洗脱目标蛋白。目标蛋白经 pH 7.5 的透析液(20 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L NaCl)透析后,再通过 PEG-6000 浓缩,电泳检测,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.7 重组蛋白抗体的制备** 将浓缩后的蛋白与 2 $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液混合,100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min,进行电泳,将凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。灭菌水洗涤后,切取目的条带置于研钵中,加入液氮充分研磨成粉末状。加入 1 mL 1 $\times$  PBS(pH 7.5)充分溶解<sup>[22]</sup>、混匀后,将制备好的抗原与等体积弗氏完全佐剂(Sigma)充分乳化后,皮下多点注射免疫 2 只大耳朵雄兔,每只兔抗原剂量 1 mg<sup>[23]</sup>,初次免疫后 2 周,抗原与弗氏不完全佐剂(Sigma)等体积充分混匀,免疫剂量减至 500  $\mu\text{g}$ ,皮下多点注射。之后每隔 2 周加强免疫 1 次,剂量如二免。3 次加强免疫后测抗血清效价,当达到满意值后,兔心脏穿刺取血,所取血液 37  $^{\circ}\text{C}$  静置 1 h,之后室温静置至抗血清析出,收集血清,即得到 DFR 的多克隆抗体,-20  $^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

**1.2.8 抗体的 Western blotting 检测** 取 1 g 灌浆期的苦荞种子,参考李玉萍等<sup>[20]</sup>加入 2 mL 可溶蛋白提取液(pH 7.5,10 mmol/L Tris-HCl,25 mmol/L NaCl),研钵中充分研磨、混匀后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,10 000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min,上清即为种子总蛋白,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。参考文献[24]方法 Western blotting 分析,苦荞总蛋白和原核表达蛋白经 SDS-PAGE 分离后转移至 0.15  $\mu\text{m}$  的 NC 膜上,50 mA 电流下转移 1 h,辣根过氧化酶(HRP)标记的山羊

抗兔 IgG 为二抗(1:1 000,北京博奥森生物科技有限公司)进行蛋白质印迹分析,印迹信号采用化学发光显色试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)进行显色,并利用化学发光成像仪(ChemiDocXRS System,Bio-Rad)记录结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 苦荞 DFR 编码基因片段的扩增

用设计的引物进行 DFR 编码基因 PCR 扩增,扩增产物通过 1%(W/V)琼脂糖凝胶电泳检测,显示一条 1 026 bp 的特异性扩增片段(图 1),与预期大小一致。测序结果表明,本研究扩增获得的苦荞二氢黄酮醇 4-还原酶基因全长 1 026 bp,编码 341 个氨基酸,利用在线软件预测该蛋白分子量为 38.53 kD,等电点为 5.78,重组蛋白分子量为 39.65 kD,等电点为 6.21。

### 2.2 重组表达载体的鉴定与表达

将构建好的重组载体进行 PCR 鉴定,琼脂糖电泳结果(图 2)显示 PCR 扩增的片段与预期大小一

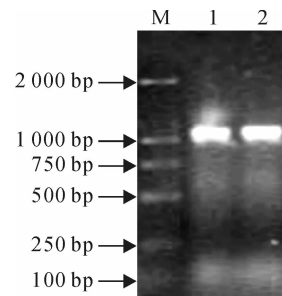


图 1 DFR 编码基因的 PCR 扩增  
M. DL2000;1,2. DFR 编码基因的 PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR amplification of the coding sequence of *DFR*

M. DL2000;1,2. PCR product of *DFR*

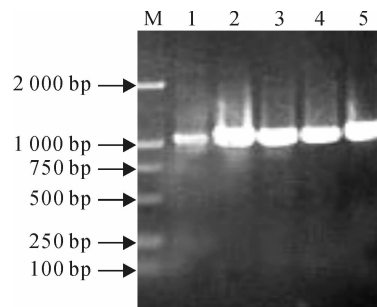


图 2 DFR 的质粒 PCR 扩增  
M. DL2000;1~5. DFR 的质粒 PCR 扩增  
Fig. 2 Screening of positive recombinant plasmid by plasmid PCR

M. DL2000;1-5. Plasmid PCR of five recombinant plasmids

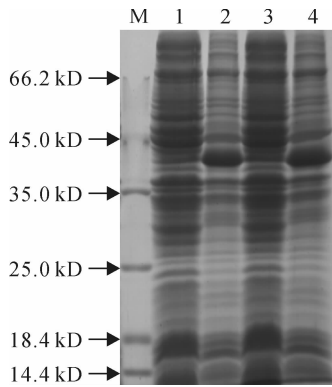


图 3 *DFR* 诱导表达的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 marker; 1, 3. 诱导前对照菌; 2, 4. 诱导表达菌体

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of *DFR*

M. Protein marker; 1, 3. Uninduced cells containing pET47b-*DFR*; 2, 4. Induced cells containing pET47b-*DFR*

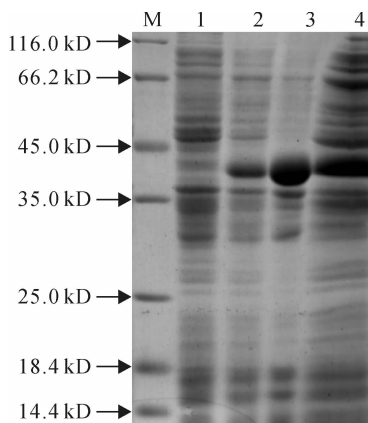


图 4 目的蛋白的可溶性表达分析

M. 蛋白 marker; 1. 未诱导的菌体蛋白; 2. 诱导的菌体蛋白;

3. 诱导菌株超声波裂解后的沉淀; 4. 诱导菌株超声波裂解后的上清

Fig. 4 The solubility analysis of recombinant

M. Protein marker; 1. Uninduced cells containing pET47b-*DFR*;

2. Induced cells containing pET47b-*DFR*; 3. Insoluble protein

from induced cell containing pET47b-*DFR*; 4. Soluble protein from induced cell containing pET47b-*DFR*

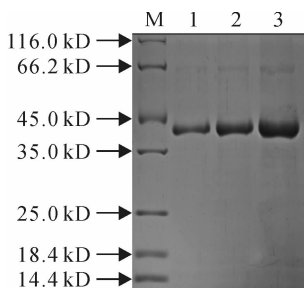


图 5 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 marker; 1~3. 纯化的目的蛋白

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified *DFR*

M. Protein marker; 1-3. Purified protein

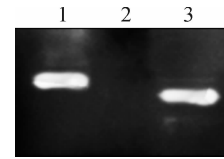


图 6 *DFR* 的 Western blotting 分析

1. 诱导后的目的蛋白; 2. 未重组表达载体的

菌体蛋白; 3. 苦荞种子灌浆期中总蛋白

Fig. 6 Western blotting analysis of *DFR*

1. Total protein from induced cell containing

pET47b-*DFR*; 2. Induced cells containing pET47b;

3. Total protein of seed filling period of buckwheat

致,测序结果也证实 *DFR* 的原核表达载体构建成功。重组表达载体转化到表达菌 *BL21*(DE3),诱导后经 SDS-PAGE 分析,在 35~45 kD 之间有明显的诱导表达条带,其大小与预测的重组蛋白分子量大小相符(图 3),说明重组蛋白诱导表达成功。为了获得最大可溶性目的蛋白产量,获得 pET47b-*DFR* 表达菌株最佳诱导条件,诱导温度 22 °C、诱导时间 10 h、IPTG 浓度 0.15 mmol/L,SDS-PAGE 分析目的蛋白在大肠杆菌 *BL21*(DE3)中分别以上清与包涵体形式存在(图 4)。

### 2.3 重组蛋白的纯化与抗体制备

将含重组蛋白的上清经过钴离子螯合层析柱纯化后,SDS-PAGE 检测结果表明钴柱 Talon resin 实现了该重组蛋白的高效纯化(图 5)。为彻底除去目的蛋白中可能存在的微量杂蛋白,将纯化的目的蛋白 SDS-PAGE(20 cm×20 cm)电泳,考马斯亮蓝染色后切取目标条带,灭菌水洗涤后进行兔抗苦荞 *DFR* 多克隆抗体制备。

### 2.4 多克隆抗体的 Western blotting 检测

利用 Western blotting 检测制备抗体的特异性,结果显示原核表达的融合蛋白、苦荞种子灌浆期总蛋白与抗血清杂交显示单一条带,而未重组表达载体的菌体蛋白没有杂交出任何条带(图 6),说明该抗体具有较高的特异性,且在灌浆期的苦荞种子中含有大量的 *DFR* 蛋白。由于重组蛋白 *DFR* 含有组氨酸标签,Western blotting 中灌浆期苦荞种子杂交的蛋白条带较原核表达的蛋白分子量略小。

## 3 讨论

苦荞种子富含氨基酸均衡的蛋白质和高生物活性的黄酮类物质,是典型的药粮兼用作物。灌浆期是苦荞营养物质积累与合成的关键时期,研究该时期籽粒中各种营养物质积累及次生代谢相关基因的

表达规律对于提高苦荞的营养保健价值具有重要理论和应用价值<sup>[18]</sup>。二氢黄酮醇 4-还原酶是苦荞次生代谢途径中的关键酶和一个重要的调控位点,不但参与黄酮类化合物的累积<sup>[15,25]</sup>,而且参与显花植物雄性能育过程<sup>[26]</sup>。植物 DFR 与哺乳动物 3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶通过蛋白序列比对,发现它们由同一个祖先演化而来<sup>[27]</sup>,至今人们从多种植物分离并鉴定出 DFR 编码基因,研究结果显示,DFR 同源基因都具有一个典型的 NADP 结合位点和 26 个氨基酸组成的底物特异性结构域<sup>[28]</sup>。祝婷等<sup>[29]</sup>首次克隆了苦荞 DFR 编码基因,到目前关于其蛋白质相关的研究还未有报道,本研究从苦荞灌浆期种子中克隆得到 DFR 编码基因,利用 DNAMAN 软件分析,发现其具有 DFR 同源基因的典型特征和关键结构域,推测苦荞 DFR 编码基因编码蛋白具有催化活性,相关文献表明大肠杆菌和酵母中表达的 DFR 也都具有酶活和底物偏爱性<sup>[19,30-31]</sup>。由于目前对大肠杆菌的遗传背景和生理特性研究了解得比较清楚,无未知干扰蛋白的产生,为获得高纯度融合蛋白提供有力工具。因此,本研究通过构建 DFR 原核重组表达载体,转化大肠杆菌 BL21(DE3),实现了该基因的原核表达,但原核高效的表达系统,使部分蛋白

不能有效正确折叠形成了包涵体,通过优化表达条件,找到了获得大量可溶性蛋白的途径:首先菌体的活化过程,严格控制菌液 OD<sub>600</sub> 值达 0.6~0.8 进行诱导,诱导温度 22 °C、诱导时间 10 h、IPTG 浓度 0.15 mmol/L,使用固定化钴离子结合 HIS 标签纯化蛋白,适宜浓度咪唑洗脱,最终获得高纯度 DFR 融合蛋白,为深入研究苦荞 DFR 的反应动力学、催化特性奠定了基础。

真核生物次生代谢相关基因的表达调控包含转录水平和翻译水平等多个层次,目前关于 DFR 编码基因转录调控机制的研究在许多植物中都已经取得了突破,通过转录因子调控结构基因的表达,进而影响植物次生代谢物的合成和累积<sup>[12,32]</sup>。而探讨苦荞次生代谢物的累积与 DFR 表达的关系,从翻译水平入手更具现实意义,免疫学技术是研究蛋白质表达水平的有效方法,本研究通过原核表达获得大量的目的蛋白,通过亲和层析,得到高纯度目的蛋白作为抗原,免疫兔后获得 DFR 多克隆抗体,Western blotting 显示获得的抗体特异性好,背景低,可以为进一步开展 DFR 蛋白酶在不同苦荞品种、不同生长发育时期和不同组织内的蛋白表达谱以及蛋白定位等方向的研究提供有利工具。

#### 参考文献:

- [1] LI D(李 丹), DING X L(丁霄霖). Advance in the active components of buckwheat(2)—The structural property and physiological effects of buckwheat polyphenol[J]. *China Western Cereals & Oils Technology*(西部粮油科技), 2000, **25**(6):38—41(in Chinese).
- [2] WANG L, YANG X, QIN P, *et al.* Flavonoid composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, **49**:312—317.
- [3] GHASEMZADEH A, JAAFAR H, KARIMI E. Involvement of salicylic acid on antioxidant and anticancer properties, anthocyanin production and chalcone synthase activity in ginger(*Zingiber officinale* Roscoe) varieties[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, **13**(12):14 828—14 844.
- [4] HUI C, BIN Y, XIAOPING Y, *et al.* Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Nutrition and Cancer*, 2010, **62**(8):1 128—1 136.
- [5] DURENDIC BRENESEL M, POPOVIC T, PILIJA V, *et al.* Hypolipidemic and antioxidant effects of buckwheat leaf and flower mixture in hyperlipidemic rats[J]. *Bosnian Journal of Basis Medical Sciences*, 2013, **13**(2):100—108.
- [6] JOHNSON E T, RYU S, YI H, *et al.* Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase[J]. *Plant Journal*, 2001, **25**(3):325—333.
- [7] LI CH L(李春雷), CUI G X(崔国新), XU ZH R(许志茹), *et al.* Research advances on dihydroflavonol 4-reductase gene[J]. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯), 2009, **20**(03):442—445(in Chinese).
- [8] LIU M S, WANG F, DONG Y X, *et al.* Expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase genes involved in anthocyanin biosynthesis in purple grains of wheat[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, **47**(9):1 107—1 114.
- [9] PETIT P, GRANIER T, DESTAINTOT B L, *et al.* Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in *Flavonoid biosynthesis*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, **368**(5):1 345—1 357.
- [10] XIE D Y. Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago truncatula*[J]. *Plant Physiology*, 2004, **134**(3):979—994.
- [11] HUANG Y, GOU J, JIA Z, *et al.* Molecular cloning and characterization of two genes encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Populus trichocarpa*[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(2):e30 364.

- [12] YOSHIDA K, IWASAKA R, SHIMADA N, *et al.* Transcriptional control of the dihydroflavonol 4-reductase multigene family in *Lotus japonicus*[J]. *Journal of Plant Research*, 2010, **123**(6):801–805.
- [13] HAYASHI M, TAKAHASHI H, TAMURA K, *et al.* Enhanced dihydroflavonol-4-reductase activity and NAD homeostasis leading to cell death tolerance in transgenic rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(19):7 020–7 025.
- [14] KUMAR V, YADAV S K. Overexpression of CsDFR and CsANR enhanced flavonoids accumulation and antioxidant potential of roots in tobacco[J]. *Plant Root*, 2013, **7**:65–76.
- [15] KUMAR V, NADDA G, KUMAR S, *et al.* Transgenic tobacco overexpressing tea cDNA encoding dihydroflavonol 4-reductase and anthocyanidin reductase induces early flowering and provides biotic stress tolerance[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(6):e65 535.
- [16] LI X, THWE A A, PARK N I, *et al.* Accumulation of phenylpropanoids and correlated gene expression during the development of tartary buckwheat sprouts[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, **60**(22):5 629–5 635.
- [17] LI X, PARK N I, KIM Y B, *et al.* Accumulation of flavonoids and expression of flavonoid biosynthetic genes in tartary and rice-tartary buckwheat[J]. *Process Biochemistry*, 2012, **47**(12):2 306–2 310.
- [18] CHEN P(陈 鹏), JIA P(贾 鹏), WANG C(王 聪), *et al.* Construction and partial expressed sequence tags analysis of seed filling period full-length cDNA Library of tartary buckwheat(*Fagopyrum tartaricum*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2012, **20**(5):576–584(in Chinese).
- [19] WANG Y(王云生), XU Y J(许玉娇), HU X Q(胡晓婧), *et al.* Clone, expression and functional analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene of tea plant(*Camellia sinensis*)[J]. *Journal of Tea Science*(茶叶科学), 2013, **33**(3):193–201(in Chinese).
- [20] LI Y P(李玉萍), DENG D D(邓丹丹), ZHANG H N(张海纳), *et al.* Prokaryotic expression of truncated tartary buckwheat flavanone-3-hydroxylase and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(4):672–677(in Chinese).
- [21] ZHANG P, WEN P, WAN S, *et al.* Molecular cloning of dihydroflavonol 4-reductase gene from grape berry and preparation of an anti-DFR polyclonal antibody[J]. *Vitis*, 2008, **47**(3):141–145.
- [22] LI J H(李敬华), LIU M B(柳明波), MA Y(马 彦), *et al.* Gel purified recombinant protein as immunogen to generate polyclonal antibodies against human thyrotropin  $\beta$  subunit(hTSH $\beta$ )[J]. *Chinese Journal of Immunology*(中国免疫学杂志), 2010, **26**(5):428–431(in Chinese).
- [23] JIANG J(姜 静), SUN Q F(孙其飞), CHEN Y(陈 勇), *et al.* Preparation and characterization of polyclonal antibodies against high abundant proteins in human parotid saliva[J]. *Beijing Journal of Stomatology*(北京口腔医学), 2007, **15**(5):254–256(in Chinese).
- [24] CHEN J(陈 姣), ZHANG X B(张学宾), WANG L(王 磊), *et al.* Recombinant expression of TBW16 allergen in tartary buckwheat and preliminary analysis of its targeting binding protein[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2014, **34**(04):665–670(in Chinese).
- [25] WANG H, FAN W, LI H, *et al.* Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(11):e78 484.
- [26] TANG L K, CHU H, YIP W K, *et al.* An anther-specific dihydroflavonol 4-reductase-like gene(DRL1) is essential for male fertility in *Arabidopsis*[J]. *New Phytologist*, 2009, **181**(3):576–587.
- [27] BAKER M E, LUU-THE Y, SIMARD J, *et al.* A common ancestor for mammalian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and plant dihydroflavonol reductase[J]. *Biochem. Journal*, 1990, **269**(2):558–559.
- [28] LIU G D(刘光德), LEI X H(雷兴华), ZHU Q L(祝钦泷), *et al.* Cloning and sequence analysis of a DFR gene from *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2009, **42**(1):55–63(in Chinese).
- [29] ZHU T(祝 婷), LI CH L(李成磊), WU Q(吴 琦), *et al.* Cloning and sequence analysis of dihydroflavonol 4-reductase genes from tartary buckwheat and common buckwheat[J]. *Food Science*(食品科学), 2010, **31**(13):219–223(in Chinese).
- [30] LI H, QIU J, CHEN F, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase(DFR) gene in *Saussurea medusa*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(3):2 991–2 999.
- [31] TRABELSI N. Kinetic and binding equilibrium studies of dihydroflavonol 4-reductase from *Vitis vinifera* and its unusually strong substrate inhibition[J]. *Journal of Biophysical Chemistry*, 2011, **2**(3):332–344.
- [32] YOSHIDA K, IWASAKA R, KANEKO T, *et al.* Functional differentiation of *Lotus japonicus* TT2s, R2R3-MYB transcription factors comprising a multigene family[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2007, **49**(2):157–169.