

國立臺灣大學生農學院森林環境暨資源學系

碩士論文

School of Forestry and Resource Conservation

College of Bio-Resources and Agriculture

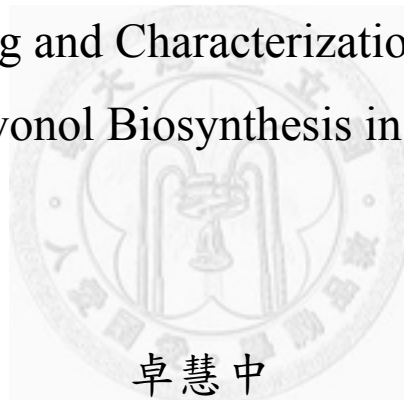
National Taiwan University

Master Thesis

參與相思樹黃酮醇生合成之酵素基因選殖與特性分析

Molecular Cloning and Characterization of the Enzymes

Involved in Flavonol Biosynthesis in *Acacia confusa*



卓慧中

Hwei-Choong Toh

指導教授：曲芳華 博士

Advisor: Fang-Hua Chu, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

誌謝

從 2009 年 8 月到 2011 年 12 月，雖然只是我人生之中短短的一段歲月，但卻非常珍貴、非常重要。在這兩年來，仿如展開了一段意義非凡的旅程，過程中歷經許多歡笑與艱辛，還有許多人的幫助和關心，我真的獲得很多學習。

不僅於碩士生涯，乃至未來的生命中，那位我最感恩的人，就是我親愛的指導老師--曲芳華老師。非常感謝老師不但在論文上細心指導我，也在在修正和指導我在學習上的態度，現在回想起來，那都是多麼重要的學習啊！但願我的老師未來能夠指導更多想要學習的學生。此外，也要非常感謝張上鎮老師、王升陽老師、何政坤老師以及簡慶德老師在論文上悉心的指點與建議，令我的論文能更趨完整。

除了敬愛的老師們，實驗室的諸位學長、學姐、同學以及學弟妹，都是我非常感謝的人。宜儒學姐、彥良學長、月德學姐，謝謝您們一直以來對我的指點與照顧，沒有您們，我的實驗肯定只會一團糟。莉婷也很關照我，覺得你很棒，非常的具有大將之風。兩位學妹和學弟，冠鳳、起祥和力仁，都非常乖巧，也幫我很多忙，跟你們相處非常開心。真的很喜歡大家，也衷心地祝福大家，心中所有美麗美好的願望都能夠早日實現。

最後，最想要感謝的就是我永遠的心靈導師以及親愛的父親、母親。沒有您們，我不會是現在的我，沒有您們，我就無法擁有這麼多寶貴的學習。在此，願我所有可敬可愛的師友親人恩人，現在乃至未來，生命都能夠越來越圓滿、越來越快樂。

祝福大家！

目錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
目錄.....	iii
圖目錄.....	vi
表目錄.....	ix
摘要.....	x
Abstract.....	xi
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	3
2.1 黃酮類化合物.....	3
2.1.1 黃酮類化合物之簡介.....	3
2.1.2 黃酮類化合物在植物中的分佈.....	4
2.1.3 黃酮類化合物之功能.....	4
2.1.4 黃酮類化合物之生合成途徑.....	5
2.2 黃酮類生合成途徑之相關生合成酶.....	9
2.2.1 黃酮類之相關生合成酶簡介.....	9
2.2.2 黃酮類於細胞組織之表現情形.....	9
2.2.3 蛋白質立體結構.....	11
2.2.4 黃酮醇途徑之相關生合成酶研究.....	11
2.2.4.1 查爾酮合成酶 Chalcone synthase.....	11
2.2.4.2 查爾酮異合酶 Chalcone isomerase.....	13
2.2.4.3 黃酮醇合成酶 Flavonol synthase.....	14
2.3 相思樹.....	16

2.3.1 相思樹之簡介.....	16
2.3.2 相思屬植物之二次代謝物活性研究.....	17
2.3.3 相思樹之黃酮類化合物成分與活性分析.....	18
叁、材料與方法.....	22
3.1 試驗試材.....	22
3.1.1 植物試材.....	22
3.1.2 載體之選用.....	22
3.1.3 菌株之選用.....	23
3.1.4 常用培養基與溶劑配方.....	23
3.2 實驗方法.....	25
3.2.1 相思樹 <i>CHS</i> , <i>CHI</i> , <i>FLS</i> 基因之選殖.....	25
3.2.2 譜系分析.....	26
3.2.2.1 AcCHS.....	26
3.2.2.2 AcCHI.....	27
3.2.2.3 AcFLS.....	27
3.2.3 AcFLS 蛋白質質體的建構.....	28
3.2.4 重組蛋白質表現.....	29
3.2.5 聚丙烯醯胺膠體電泳.....	30
3.2.6 西方墨點試驗.....	31
3.2.7 蛋白質酵素純化.....	31
3.2.8 AcFLS 酵素活性反應.....	32
3.2.9 化合物 HPLC 定性分析.....	32
3.2.10 相思樹創傷處理.....	33
3.2.11 反轉錄聚合酶連鎖反應.....	33
肆、試驗結果.....	34
4.1 <i>AcCHS</i> , <i>AcCHI</i> , <i>AcFLS</i> 基因序列分析.....	34

4.1.1 核苷酸序列.....	34
4.1.2 胺基酸序列.....	38
4.2 演化樹分析.....	41
4.2.1 查爾酮合成酶.....	41
4.2.2 查爾酮異合酶.....	44
4.2.3 黃酮醇合成酶.....	47
4.3 蛋白質結構預測.....	50
4.4 重組蛋白表現.....	54
4.5 蛋白質反應與產物定性.....	55
4.6 <i>AcCHS</i> 、 <i>AcCHI</i> 、 <i>AcFLS</i> 在相思樹不同組織之轉錄表現.....	59
4.7 <i>AcCHS</i> 、 <i>AcCHI</i> 、 <i>AcFLS</i> 在相思樹葉片創傷處理之轉錄表現.....	60
伍、討論.....	62
5.1 <i>AcCHS</i> 、 <i>AcCHI</i> 、 <i>AcFLS</i> 之功能性保守序列.....	62
5.2 <i>AcCHS</i> 、 <i>AcCHI</i> 、 <i>AcFLS</i> 之親緣關係分析.....	64
5.3 <i>AcCHS</i> 、 <i>AcCHI</i> 、 <i>AcFLS</i> 之蛋白質結構分析.....	66
5.4 <i>AcCHS</i> 、 <i>AcCHI</i> 、 <i>AcFLS</i> 於相思樹不同組織的表現.....	71
5.5 <i>AcCHS</i> 、 <i>AcCHI</i> 、 <i>AcFLS</i> 於相思樹葉片創傷處理之反應.....	71
5.6 <i>AcFLS</i> 之雙重功能.....	72
陸、結論.....	75
柒、參考文獻.....	76
捌、附錄.....	88
附錄 引子序列表.....	88

圖目錄

- 圖 1. 類苯丙醇合成途徑以及黃酮類生合成途徑(Austin and Noel, 2003)°.....7
Fig. 1. Phenylpropanoid biosynthetic pathway and flavonoids biosynthetic pathway (Austin and Noel, 2003).
- 圖 2 黃酮類化合物在細胞內之分佈 (Lepiniec *et al.*, 2006)°10
Fig. 2. Intracellular distribution of seed flavonoids (Lepiniec *et al.*, 2006).
- 圖 3. 豆科植物中的黃酮醇生合成途徑(Shimada *et al.*, 2003)°.....14
Fig. 3. The flavonoids pathway in leguminous plants (Shimada *et al.*, 2003) .
- 圖 4. 黃酮類化合物之基本化學結構°.....21
Fig. 4. Basic chemical structures of flavonoids.
- 圖 5. 相思樹、荔枝及葡萄之查爾酮合成酶核苷酸序列分析比對°.....35
Fig. 5. Nucleic acid sequence alignment of CHSs between *A. confusa*, *L. chinensis* and *V. vinifera*.
- 圖 6. 相思樹、金花茶和歐洲甜櫻桃之查爾酮異合酶核苷酸序列分析比對°.....36
Fig. 6. Nucleic acid sequence alignment of CHIs between *A. confusa*, *C. nitidissima* and *P. avium*.
- 圖 7. 相思樹、葡萄與茶樹之黃酮醇合成酶核苷酸序列分析比對°.....37
Fig. 7. Nucleic acid sequence alignment of FLSs between *A. confusa*, *V. vinifera* and *C. sinensis*.
- 圖 8. 相思樹、荔枝及葡萄之查爾酮合成酶胺基酸序列分析比對°..... 39
Fig. 8. Amino acid sequence alignment of CHSs between *A. confusa*, *L. chinensis* and *V. vinifera*.
- 圖 9. 相思樹、金花茶和歐洲甜櫻桃之查爾酮異合酶胺基酸序列分析比對°.....39

Fig. 9. Amino acid sequence alignment of CHIs between *A. confusa*, *C. nitidissima* and *P. avium*.

圖 10. 相思樹、葡萄與茶樹之黃酮醇合成酶胺基酸序列分析比對。.....40

Fig. 10. Amino acid sequence alignment of FLSs between *A. confusa*, *V. vinifera* and *C. sinensis*.

圖 11. CHS 超級家族的胺基酸序列之演化樹圖。.....42

Fig. 11. Phylogenetic tree based on amino acid sequences of CHS-superfamily enzymes.

圖 12. Type I CHIs 與 Type II CHIs 之演化樹圖。.....44

Fig. 12. Phylogenetic tree based on amino acid sequences of Type I CHIs and Type II CHIs.

圖 13. AcCHI 與 Type I CHI、Type II CHI 之胺基酸序列比對。.....46

Fig. 13. Amino acid sequence alignment between AcCHI, Type I CHIs and Type II CHIs.

圖 14. 黃酮類生合成途徑之 2-ODD 超級家族的演化樹圖。.....48

Fig. 14. Phylogenetic tree based on amino acid sequences of 2-ODD superfamily enzymes involved in the flavonoids biosynthetic pathway.

圖 15. AcCHS 之預測蛋白質立體模型。.....52

Fig. 15. Structural analysis of AcCHS protein.

圖 16. AcCHI 與 AcFLS 之預測蛋白質立體模型。.....53

Fig. 16. Structural analysis of AcCHI and AcFLS proteins.

圖 17. AcCHS 與 AcFLS 之 SDS-PAGE 以及 Western blot 結果分析圖。.....55

Fig. 17. SDS-PAGE and Western blot analysis of AcCHS and AcFLS.

圖 18. 以 HPLC 檢測 AcFLS 催化基質二氫楊梅素之酵素反應分析。.....56

Fig. 18. HPLC analysis of dihydromyricetin reaction products with AcFLS.

圖 19. 以 HPLC 檢測 AcFLS 催化基質二氫槲皮素之酵素反應分析。.....57

Fig. 19. HPLC analysis of dihydroquercetin reaction products with AcFLS.	
圖 20. 以 HPLC 檢測 AcFLS 催化基質柚皮素之酵素反應分析。	58
Fig. 20. HPLC analysis of narigenin reaction products with AcFLS.	
圖 21. <i>AcCHS</i> 、 <i>AcCHI</i> 和 <i>AcFLS</i> 於不同組織之 RT-PCR 結果。	60
Fig. 21. RT-PCR analysis of <i>AcCHS</i> , <i>AcCHI</i> and <i>AcFLS</i> gene expressions in various parts of <i>A. confusa</i> .	
圖 22. <i>AcCHS</i> 、 <i>AcCHI</i> 和 <i>AcFLS</i> 創傷處理反應之 RT-PCR 結果。	61
Fig. 22. RT-PCR analysis of <i>AcCHS</i> , <i>AcCHI</i> and <i>AcFLS</i> gene expressions after wounding treatment.	
圖 23. CHS 蛋白質二聚體及單體結構。	67
Fig. 23. Protein structures of CHS dimer and monomer.	
圖 24. <i>AcCHI</i> 蛋白質構型，氫鍵網活性區以及 Tyr ₁₀₆ 穩定水分子的機制。	68
Fig. 24. Structure of <i>AcCHI</i> protein, active site hydrogen bond network and the mechanism of water molecule stabilized by Try ₁₀₆ .	
圖 25. <i>AcFLS</i> 的蛋白質結構與活性區。	70
Fig. 25. Protein structure and active site of <i>AcFLS</i> .	
圖 26. 2-ODDs 的基本反應機制 (Turnbull <i>et al.</i> , 2004)。	73
Fig. 26. General reaction mechanism of 2-ODDs (Turnbull <i>et al.</i> , 2004).	
圖 27. 相思樹黃酮醇化合物生合成途徑。	74
Fig. 27. Flavonols biosynthetic pathway in <i>A. confusa</i> .	

表目錄

表 1. 黃酮類生合成酶之名稱(Austin and Noel, 2003)。.....	8
Table 1. The list of the enzymes involved in flavonoids biosynthetic pathway (Austin and Noel, 2003) .	
表 2. SDS-PAGE 膠片配方。.....	30
Table 2. Chemical components of SDS-PAGE gel.	
表 3. AcCHS 以及其他植物 CHS 超級家族胺基酸序列相似度比對表。.....	43
Table 3. Amino acid sequence similarity between AcCHS and other CHS-superfamilies.	
表 4. CHS 超級家族六個基因分群之相似度平均值。.....	43
Table 4. Similarity average of the six classes of CHS-superfamily genes.	
表 5. AcCHI 以及其他植物的 CHI 胺基酸序列相似度比對表。.....	45
Table 5. Amino acid Sequence similarity between AcCHI and other CHIs.	
表 6. Type I CHI 與 Type II CHI 之相似度平均值。.....	45
Table 6. Similarity average of Type I CHI and Type II CHI.	
表 7. AcFLS 以及 2-ODD 超基因家族之胺基酸序列相似度比對表。.....	49
Table 7. Amino acid Sequence similarity between AcFLS and other 2-ODD superfamilies.	
表 8. 2-ODD 超基因家族四個分群之相似度平均值。.....	49
Table 8. Similarity average of the four classes of 2-ODD superfamily genes.	
表 9. AcFLS 與 AtFLS1~6 以及 VvFLS1~5 之胺基酸序列相似度比對表。.....	50
Table 9. Amino acid Sequence similarity between AcFLS, AtFLS 1~6, and VvFLS 1~5.	
表 10. AcFLS 的基質轉換率。.....	59
Table 10. Substrates transformation rate of AcFLS.	

摘要

臺灣相思樹 (*Acacia confusa*) 之葉、花、枝條、樹皮與心材含有豐富的黃酮類化合物，並且具有良好的抗氧化活性，這些黃酮類主要為黃酮醇化合物。本研究中，以聚合酶鏈鎖反應及 cDNA 末端快速擴增法，由相思樹葉片獲得查爾酮合成酶 (*AcCHS*)、查爾酮異合酶 (*AcCHI*) 以及黃酮醇合成酶 (*AcFLS*) 基因全長，此三基因之核酸序列轉譯區長度分別為 1170 bp、720 bp 以及 996 bp，對應產生 43 kDa、26 kDa 和 38 kDa 的蛋白質。以鄰近連接演化樹分析法 (Neighbor-joining) 分析親緣關係，發現 *AcCHS*、*AcCHI* 以及 *AcFLS* 分別被歸類於 CHS 超級基因家族中的 CHS、非豆科專屬的 Type I CHI 以及 2-ODD 超級家族中的 FLS。經過反轉錄聚合酶連鎖反應檢測，發現相思樹小苗 *AcCHS*、*AcCHI* 以及 *AcFLS* 的表現在葉組織最佳；而成齡相思樹之 *AcCHS*、*AcCHI* 以及 *AcFLS* 在花的表現最為明顯。此外，為了鑑定 *AcFLS* 之活性，本研究以高效液相層析儀檢測此蛋白質體外反應之產物。首先將 *AcFLS* 建構在 His-tag 系統之表現載體 pET-21a (+)，並轉型至大腸桿菌中進行大量蛋白質表現，經過不同的基質檢測結果，*AcFLS* 可將二氫楊梅素、二氫槲皮素以及柚皮素分別轉化成楊梅素、槲皮素以及山奈醇。本研究為相思樹首篇有關於黃酮醇生合成途徑之報告，對未來的研究將可提供有用的參考價值。

【關鍵詞】 相思樹、生合成、黃酮類、黃酮醇、山奈醇、楊梅素、槲皮素

Abstract

The flavonoids are abundant in the leaves, flowers, branches, bark and heart wood of *Acacia confusa*, which possesses a remarkable antioxidant activities. The major class of compounds of the flavonoids is flavonols. In this study, polymerase chain reaction (PCR) and rapid amplification of cDNA end (RACE) were used to obtain full sequence of *AcCHS*, *AcCHI*, and *AcFLS*, which have 1170 bp, 720 bp and 996 bp coding region respectively. The molecular weights (M_w) of these three enzymes are 43 kDa, 26 kDa and 38 kDa, respectively. *AcCHS* belongs to the CHS group of the chalcone synthase superfamily; *AcCHI* belongs to the non-legume Type I CHI; *AcFLS* belongs to the FLS group of 2-ODD superfamily. In the reverse transcription-PCR (RT-PCR) test for the expression of *AcCHS*, *AcCHI*, and *AcFLS*, these three genes showed the best expression in the leave of the seedling, and in the flower of the mature tree. To characterize the corresponding enzyme of *AcFLS in vitro*, *AcFLS* is constructed into vector pET-21a (+) of histidine tag (His-tag) fusion protein system, and expressed in *Escherichia coli* for *AcFLS* recombinant protein. In the enzyme activity analysis, we found that *AcFLS* could transform dihydromyricetin, dihydroquercetin and naringenin into flavonol myricetin, quercetin and kaempferol, respectively. This is the first study of flavonols biosynthesis pathway in *A. confusa*, and the result might provide a useful reference for the future studies.

【Key words】 *Acacia confusa*, biosynthesis, flavonoids, flavonols, kaempferol , myricetin, quercetin

壹、前言

黃酮類化合物是植物重要的二次代謝物，目前已超過 10,000 種，且尚有新的化合物陸續被鑑定出來 (Tahara, 2007)。豆科植物 (Leguminosae) 中所含黃酮類化合物之分歧度比其他物種的來得高，因為除了普遍皆有的黃酮類，約 95% 的異黃酮類發現於豆科植物 (Hegnauer and Gpayer-Barkmeijer, 1993)。相思樹 (*Acacia confusa*) 所屬的豆科相思樹屬 (*Acacia*)，全球約 1,350 種，據分析顯示此屬植物之枝、葉、樹皮及心材皆含有豐富的酚類化合物。由於相思樹屬種類繁多，更增高了此屬黃酮類化合物的歧異度 (Seigler, 2003)。

從天然物中尋找有生物活性的成分並加以開發，已成為現今醫藥界的研究主流，相思樹屬植物之黃酮類化合物活性相當具有探索與開發的潛力 (王升陽等, 2003; Seigler, 2003); 同時，如今是基因體學-蛋白質體學-植物代謝體學三方結合的時代 (Winkel-Shirley, 2001)，由此更顯現出相思樹屬黃酮類化合物之生合成途徑具高度探討與研究的重要性。然而就目前而言，相思樹屬植物在這方面的研究實屬匱乏。雖在近年來，Suzuki 等人 (2010) 將相思樹屬中之直幹相思樹 (*A. mangium*) 之次級木質部與枝條建立了表現序列標幟 (Expressed Sequence Tags, ESTs)，然而他們著重於討論細胞生長、莖頂分生組織發育等相關課題，並未發現或分析黃酮類生合成途徑之相關基因序列。

臺灣本土樹種相思樹，具生長迅速以及耐候耐旱等特性，在臺灣低海拔地區普遍可見其高大樹影。相思樹富含酚類化合物，可為傳統藥用 (劉崇瑞, 1960; 邱年永和張光雄, 1986)，其二次代謝物因而受到關注。目前相思樹屬植物陸續有二次代謝物與活性分析的報告出現 (Adedapo *et al.*, 2008; Chatti *et al.*, 2009; Dongmo *et al.*, 2007; Grace *et al.*, 2009; Kalavani and Mathew, 2010; Kusano *et al.*, 2011; Manriquez-Torres *et al.*, 2007; Mattana *et al.*, 2010; Rifai *et al.*, 2010; Solomon-Wisdom and Shittu, 2010; Todkar *et al.*, 2010)，尤其在相思樹的各部位組

織如葉、花、枝條、樹皮與心材的二次代謝物成分分析與活性分析皆已建立起有系統的資料庫。相思樹的二次代謝物產物，證實具優異的抗氧化活性，除了樹皮，其他再生性部位（葉、花、枝條）以及心材之二次代謝物產物皆具有豐富的黃酮類化合物，並且是主要的抗氧化活性來源(Hsieh and Chang, 2010; Tung *et al.*, 2009a; Tung *et al.*, 2009b; Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008a)。而這些具抗氧活性極佳的黃酮類，多以黃酮醇化合物(Flavonols)為主，其中包括山奈醇(Kaempferol)、槲皮素(Quercetin)、楊梅素(Myricetin)以及存積在心材、結構特別的 Melanoxetin (Hsieh and Chang, 2010; Tung *et al.*, 2009a; Tung *et al.*, 2009b; Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008a)。

黃酮醇在植物當中扮演許多重要的角色，諸如防禦紫外線傷害、調控生長激素(Auxin)的運輸、調控花色以及與微生物之間的分子訊息傳遞等(Bohm *et al.*, 1998; Harborne and Williams, 2000)；此外黃酮醇在醫藥方面還具多方用途，如抗氧化劑(Antioxidant)、抗癌細胞增生(Antiproliferative)、抗血管生成(Antiangiogenic)以及具神經藥理學特性(Neuropharmacological properties)等功能(Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Kim and Lee, 2007)。由於黃酮醇化合物擁有如此眾多之重要功效，因此希望通過基因工程來改變細胞之代謝途徑，藉以調控黃酮醇增產的研究相繼出現(Owens *et al.*, 2008)。

綜上所述，相思樹之黃酮類生合成途徑是極具深入研究價值。然而在相思樹屬植物目前僅滯留於二次代謝物的成分與活性分析，尚未開始探討其中的生合成機制。因此，本研究主要的目的為建立相思樹之黃酮醇生合成途徑，繼而藉此為相思樹屬植物發起黃酮類生合成途徑研究之開端。本研究主要以選殖查爾酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)、查爾酮異合酶(Chalcone isomerase, CHI)以及黃酮醇生合成酶(Flavonol synthase, FLS)基因來建構相思樹之黃酮醇生合成途徑，其中將探討CHS、CHI以及FLS之親緣關係以及建立蛋白質立體結構，並進一步鑑定FLS之功能。

貳、文獻回顧

2.1 黃酮類化合物

2.1.1 黃酮類化合物之簡介

植物黃酮類的探究最早可追溯到 1664 年 Robert Boyle 所研究的酸與鹼對植物色素影響 (Winkel-Shirley, 2001)，至今到了 21 世紀，已有龐大的資料顯示黃酮類的結構、化學活性以及生合成途徑等。在高等植物當中，這些化合物依結構主要可分為 6 大組，包括：查爾酮 (Chalcone)，黃酮 (Flavones)，黃酮醇 (Flavonols)，黃烷雙醇 (Flavandiols)，花青素 (Anthocyanins)，原花青素 (Proanthocyanidins) 以及第七組為較特殊的橙酮 (Aurones)。有些植物也會製造一些特別的黃酮類，如在豆科及少數非豆科植物當中才有的異黃酮類；而高粱 (*Sorghum bicolor*)，玉米 (*Zea mays*) 以及大岩桐 (*Sinningia cardinalis*) 則是少數已知能生合成 3-Deoxyanthocyanins(其聚合物為鞣紅, Phlobaphenes) 的物種 (Winkel-Shirley, 2001)。植物的黃酮類生合成途徑主要受到光照的影響，在一個與葡萄 (*Vitis vinifera cv. Merlot*) 果實有關的實驗中顯示，受到光照的葡萄果實所測出 Quercetin、Myricetin 和 Kaempferol 糖苷化合物的含量比沒有受光照的莓果高出十倍以上 (Spayd *et al.*, 2002)。近年來，越來越多研究把焦點投注在以分子遺傳學的角度來探討黃酮類生合成途徑。由觀察花與種子的色素變化，許多研究找出了對黃酮類生合成造成影響的突變體。而玉米、金魚草 (*Antirrhinum majus*) 和牽牛花 (*Petuni x hybrida*) 更是建立此研究領域的首要模式物種，並由此發現了多種黃酮類的結構與調控基因 (Holton and Cornish, 1995; Mol *et al.*, 1998)。而阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 則是近十幾年來在調控分析以及次細胞組織層面來探討黃酮類生合成途徑 (Winkel-Shirley, 2001)。透過模式物種阿拉伯芥之突變株研究，人們已發現黃酮

類相關生合成酶在避免植物受到紫外線傷害的運作以及生長激素 (Auxin) 的運輸調控機制扮演著重要的角色 (Besseau *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2000)。

2.1.2 黃酮類化合物在植物中的分佈

黃酮類化合物是植物二次代謝物中主要的族群之一，通常以醣苷的形式存在植物體中，除了在蔬果之中，種子、核果、穀類、香辛料、藥用植物、紅酒、茶以及啤酒等均含有黃酮類化合物 (Harborne, 1988; Namiki, 1990)。最常見於蔬果中的黃酮類為黃酮醇化合物，而黃酮醇中的 Quercetin 和 Keampferol 亦富含於茶及紅酒當中 (Volikakis *et al.*, 2005)，Apigennin 及 Luteolin 則常見於穀類及芳香植物；異黃酮類常見於豆類及目宿芽、葵花子等；黃烷醇類 (其聚合物為縮合單寧，或稱原花青素) 在植物中廣泛分佈，尤其以茶葉的含量最多 (Yamamoto *et al.*, 1997)。另外，原花青素則常見於水果如葡萄、黑醋栗以及高粱、大麥等穀類 (Franke *et al.*, 1994)；而花青素是構成水果蔬菜以及落葉樹種秋天葉片之深紅色、藍色及紫色的主要來源，在某些品種的青豆 (*Pisum spp.*) 中具有紅色或紫色的豆莢，其中的色素主要亦來自花青素 (Terahara *et al.*, 2000)。

2.1.3 黃酮類化合物之功能

花青素和黃酮醇使植物的花、果、種子及葉片展示出美麗的顏色，為植物的繁衍而吸引傳粉者及傳播種子的昆蟲或動物；而早期在蘚苔類植物中便已發現黃酮、黃烷醇以及黃酮醇跟植物與微生物之間的訊息傳導以及防禦紫外線有關 (Stafford, 1991)。

黃酮類在植物生理功能方面扮演很重要的角色，包括：植物與微生物之間的訊息傳導、調控某些物種的雄性繁殖能力、抵禦微生物 (細菌、真菌、病毒) 和

植食者以及保護植物免於紫外線傷害等。另外黃酮類也在某些植食性昆蟲中擁有特別的功能，例如某些蝴蝶只會在某種特有醣苷黃酮醇累積的葉片上產卵，還有一些蝴蝶會將有吸收紫外線功能的黃酮類積存在它們的翅膀；而攝取的黃酮類含量與種類也會影響到它們的配偶選擇性 (Haribal and Renwick, 1996)。

由於黃酮類在光合作用中可作為光傳遞的催化劑，或是調節細胞之離子通道控制磷酸化的過程，因此是一種光受器 (Photoreceptors)；黃酮類還可捕捉活性氧 (Reactive oxygen species, ROS)，降低光合作用在光電子傳遞時產生的氧化壓力，因此又是一種抗氧化劑 (Pietta, 2000)。此外，眾多研究指出黃酮類具有多種生物活性，對動物的健康有許多益處，例如富含異黃酮類的豆類食物具有抗癌之功效，蔬果之中的黃酮醇化合物以有助於清除自由基，有助於預防癌症 (Winkel-Shirley, 2001)。黃酮類的生物活性還包括抗過敏性 (Antiallergenic)、抗病毒性 (Antiviral)、抗發炎力 (Antiinflammatory) 及有助血管擴張 (Vasodilating actions) 等 (Winkel-Shirley, 2001)。

而目前由於醫藥方面的研發新藥風潮，黃酮類最令人感興趣的地方在於它們具有降低自由基形成和清除自由基的功能 (Pietta, 2000)。人類體內如果產生過多的自由基，可能會對人體產生激烈的傷害，因此人們在飲食中的黃酮類攝取相當重要。Halliwell 與 Gutteridge 在 1999 年的報告指出，抗氧化劑的抗氧化機制主要包括抑制酵素或螯合催化自由基生成之金屬離子、直接捕捉活性氧及調控體內抗氧化防禦系統，而黃酮類化合物正好符合以上三點 (Brown *et al.*, 1998; Halliwell and Gutteridge, 1999; Korkina and Afanašev, 1997; Pietta, 2000)。

2.1.4 黃酮類化合物之生合成途徑

黃酮類化合物種類繁多，它的多樣性是透過黃酮類生合成途徑中的眾多生合成酶催化而成，其中主要包括了羥基化 (Hydroxylation)、鄰甲基化 (*O*-Methylation)、醣苷化 (Glycosylation)、醞化 (Acylation)、異戊烯化 (Prenylation) 以及共軛

(Conjugation) 等作用 (Austin and Noel, 2003)。黃酮類的基本骨架由 15 個碳分子 C 排列成 C6-C3-C6，依序標示成 A, C, B 環 (圖 1)。然後依 A、B 及 C 環上的氧化程度與取代基之差異而分成查爾酮、橙酮、黃酮、黃烷酮、兒茶素、異黃酮、黃酮醇、二氫黃酮醇、雙黃酮、原花青素以及花青素 (Harborne, 1988)。黃酮類化合物之前驅物來自類苯丙醇合成途徑 (Phenylpropanoid biosynthetic pathway) 的產物 *p*-Coumaroyl-CoA 以及來自脂肪酸生合成途徑 (Fatty acid pathway) 的 Malonyl-CoA，經由 Chalcone synthase (CHS) 的調控而產生黃酮類途徑中的第一個產物為 Chalcone (圖 1)。Chalcone 接著經過 Chalcone isomerase (CHI) 的異構化作用改變其立體結構，即產生黃烷酮 (Flavanone)，並由此處進入黃酮類化合物的主要四大分歧：1. 黃烷酮經 Isoflavone synthase (IFS) 調控 2, 3 位置芳香族羥基的重新排列，生合成異黃酮 (Isoflavones)；2. 經 Flavone synthase I/II (FSI/II) 調控使 C2-C3 形成雙鍵，成為黃酮 (Flavones)；3. 經 Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) 調控使 C3 的羰基氧化還原為羥基，產生 Flavan-4-ols，即聚合鞣紅 (Phlobaphenes) 之前驅物 4. 經 Flavanone 3-hydroxylase (F3H) 調控在 C-3 位置上接羥基，則產生二氫黃酮醇 (Dihydroflavonols)。而由二氫黃酮醇進入另兩大分歧：二氫黃酮醇經 Flavonol synthase (FLS) 作用使 C2-C3 形成雙鍵，生合成黃酮醇 (Flavonols)；若經 DFR 作用使 C4 的羰基氧化還原為羥基，則產生 Flavan-3,4-diols (Leucoanthocyanidin，無色花色素)，即花青素及原花青素之前驅物 (Austin and Noel, 2003) (圖 1) (表 1)。

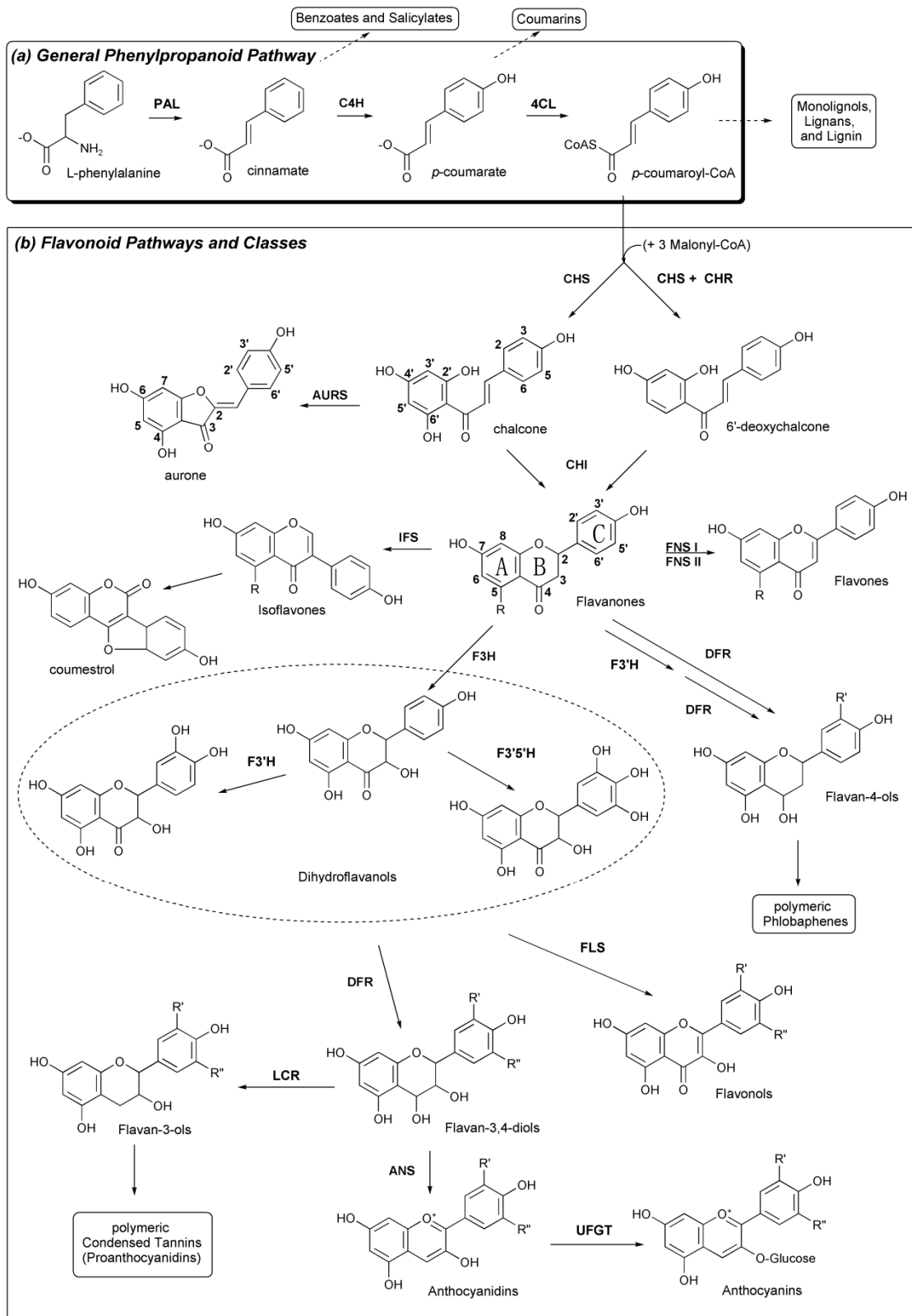


圖 1. (a) 類苯丙醇合成途徑。(b) 黃酮類生合成途徑。生合成酶之全名列於表 1 (Austin and Noel, 2003)。

Fig. 1. Phenylpropanoid biosynthetic pathway and flavonoids biosynthetic pathway (Austin and Noel, 2003).

表 1. 黃酮類生合成酶之名稱 (Austin and Noel, 2003)

Table 1. The list of the enzymes involved in flavonoids biosynthetic pathway (Austin and Noel, 2003) .

Abbreviation	Enzymes
<i>General Phenylpropanoid Pathway</i>	
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase
4CL	4-Coumarate:CoA ligase
<i>Flavonoid Pathways and Classes</i>	
CHS	Chalcone synthase
CHI	Chalcone isomerase
AURS	Aureusidin synthase
IFS	Isoflavone synthase
ANS (LDOX)	Anthocyanidin synthase (Leucoanthocyanidin reductase)
FNS I	Flavone synthase I
FNS II	Flavone synthase II
F3H	(2S)-Flavanone 3-hydroxylase
DFR	Dihydroflavonol 4-reductase
F3'H	Flavonoid 3'-hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid 3'5'-hydroxylase
FLS	Flavonol synthase
LCR	Leucoanthocyanidin reductase
UFGT	UDP flavonoid glucosyl transferase

2.2 黃酮類生合成途徑之相關生合成酶

2.2.1 黃酮類之相關生合成酶簡介

黃酮類生合成途徑之研究，由於歷時長久，因而此途徑的建構也已相當完整 (Harborne and Williams, 2000)。這些參與黃酮類生合成途徑中的蛋白質酶，一般上可歸納成三大種類：1. Oxoglutarate-dependent dioxygenases (F3H, FLS, FSI, ANS)；2. NADPH-dependent reductases (DFR, LCR)；3. Cytochrome P450 hydroxylases (F3'H, F3'5'H, FSII, IFS) (Dixon and Steele, 1999)。而途徑的第一與第二個調控酶，即 CHS 與 CHI 則擁有各自的演化族群，其中特別是 CHI，其序列與立體結構對植物而言是相當特殊的。CHS 屬於 Type III Polyketide synthase superfamily (Type III PKS superfamily)，而這個家族的成員通常使用相似的反應機制以及相似或相關的基質來產生種類繁多的二次代謝物 (Winkel-Shirley, 2001)。

2.2.2 黃酮類於細胞組織之表現情形

近年來隨著技術的發展，黃酮類化合物以及其生合成酶在細胞中的分佈與定位已漸漸明瞭。黃酮類化合物通常會累積在不同的細胞區室內 (Cellular compartment)，如液胞是最常見於用來累積花青素、醣苷黃酮醇、以及原花青素的間隔；另外，聚合鞣紅及甲基化黃酮醇則常積累於細胞壁 (Grotewold, 2005; Yazaki, 2005)。如圖 2 所示大豆中的異黃酮類、阿拉伯芥未成熟種子中的黃酮醇與原花青素 [利用不同的染色方法可以偵測到這兩種黃酮類在後球型-心型期胚 (Late globular-heart stage) 中的分布狀況]，多數積累在液胞中；另外使玉米粒呈現深紅色的聚合鞣紅以及使阿拉伯芥種子呈現褐色的氧化原花青素則累積於細胞壁 (Lepiniec *et al.*, 2006)。

黃酮類生合成途徑中的相關蛋白質酶，通常會與代謝物聚集成稱為代謝區室

(Metabolons) 的複合體，而基質將直接在複合體中的活性區輾轉移動，即複合體中的蛋白質酶各自可利用上一個蛋白質酶所合成的產物作為基質，好幾個生合成步驟在一個複合體中完成。例如在阿拉伯芥中，CHS、CHI、F3H、以及 DFR 共同定位於內質網 ER (Endoplasmic reticulum) 的外膜 (膜面朝向細胞質)；與膜結合的 Cytochrome P450 家族蛋白質，諸如 F3'H (Saslowsky and Winkel-Shirley, 2001)，C4H (Achnine *et al.*, 2004) 以及 IFS (Liu and Dixon, 2001) 則聚成複合體鍵結在 ER 的外膜上。另外尚有研究指出，Flavan-3-ol 生合成途徑中所涉及的蛋白質酶會形成複合體(除 LCR 尚未確定以外)，並鍵結在 ER 或液胞外膜(膜面朝向細胞質)上 (Jørgensen *et al.*, 2005; Marks and Esch, 2003)。

蛋白質酶形成複合體的可能理由有三點：1. 有不同的分支途徑(Branch points)來競爭同樣的基質；2. 中間產物通常具有毒性與高活性；3. 這些化合物的總體濃度相當低。再者，這些途徑通常都必須對內在與外在的訊號產生迅速的反應，以改變終產物的種類或含量 (Winkel-Shirley, 2001)，所以選擇在一個多功能的蛋白質場所製造所需產物，既省時又省力，而且能夠確保基質充足以及保障細胞體的安全。

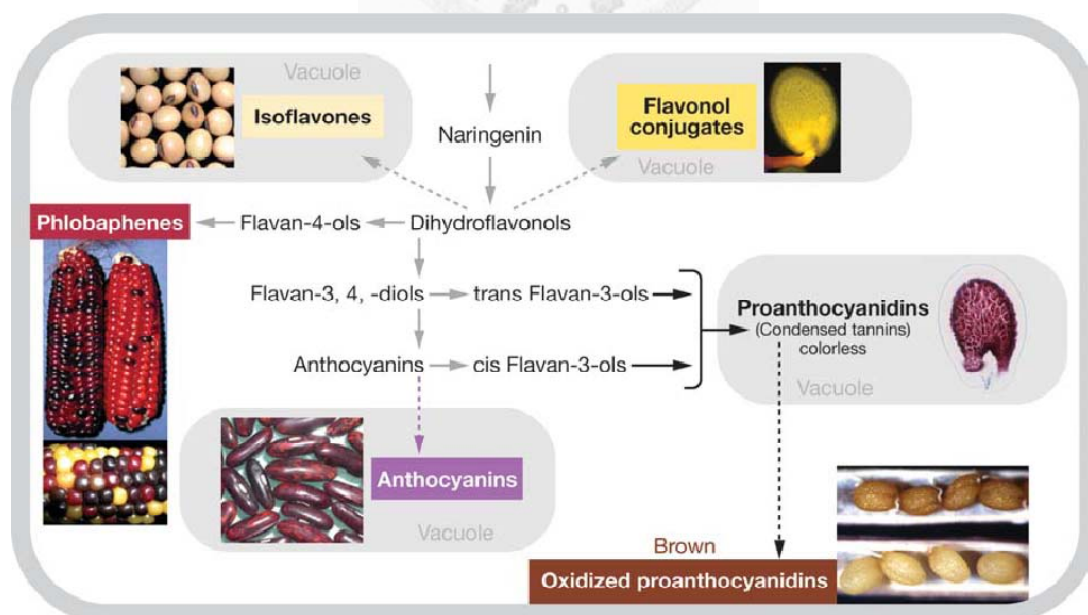


圖 2. 黃酮類化合物在細胞內之分佈 (Lepiniec *et al.*, 2006)。

Fig. 3. Intracellular distribution of seed flavonoids (Lepiniec *et al.*, 2006).

2.2.3 蛋白質立體結構

在蛋白質立體結構的研究方面，由於模式物種豆科的紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 之 CHS 和 CHI 的蛋白質立體結構在 Joseph Neol 以及 Richard Dixon 的研究團隊中有著突破性的發展，使黃酮類生合成途徑的立體運作層面得到更進一步的了解 (Ferrer *et al.*, 1999; Jez *et al.*, 2000)。1999 年 Ferrer 等人 (即屬 Neol & Dixon 的研究團隊) 首度發表來自苜蓿 CHS 的晶體結構，以立體呈現了蛋白質活性區的構造以及一連串複雜的環化作用 (Cyclization)、脫羧基作用 (Decarboxylation) 和縮合作用 (Condensation)，並且示出了基質與產物類似物 (Naringenin) 在蛋白質活性區的立體位置。此外，尚有 Saslowsky 等人 (2000) 於阿拉伯芥 CHS 之立體結構，提出了其他不同以往的觀點，來探討某些突變可能通過哪些方式來影響蛋白質活性，不僅是停留在活性區受到干擾，而是更進一步的發現突變的胺基酸使蛋白質變得不穩定，或是使兩個蛋白質單體在進行二聚作用 (Dimerization) 時受到干擾。另外在 CHI 的立體結構中，由於其晶體結構的完成而得以揭開 CHI 如何辨識基質 Chalcone (產自 CHS) 及 6'-Deoxychalcone (產自 CHS 及 Chalcone reductase, CHR)，以及如何催化 Chalcone 的立體專一性的環化作用。這些結構亦有助於推測某些胺基酸分子，是為豆科植物以及其他物種的 CHI 決定基質專一性的關鍵 (Jez *et al.*, 2000; Winkel-Shirley, 2001)。

2.2.4 三個黃酮醇途徑之相關生合成酶研究

2.2.4.1 查爾酮合成酶 (Chalcone synthase)

黃酮類化合物在植物當中有著重要的防禦性功能，因此許多研究對於植物在面對逆境時的防禦機制相當感興趣；而黃酮類生合成途徑上的第一個生合成酶

CHS 的表現與調控顯得相當重要，便成爲一個主要的研究對象。

在豆科植物當中，常藉逆境實驗以觀察 CHS 之 mRNA 或蛋白質表現量面對逆境時的反應，包括施予植株萃取自真菌的刺激物、物理創傷、微生物感染（例如真菌、細菌或根瘤菌）以及曝露於 UV-B 射線等（Daniel *et al.*, 1990; Grab *et al.*, 1985; Haberer *et al.*, 1989; Junghans *et al.*, 1993; Ryder *et al.*, 1987）。例如大豆的根部受到真菌感染時，會在 1~2 小時內大量表現 CHS，同時也伴隨著植物內毒素（Phytoalexin）的產生（Habereder *et al.*, 1989）。此外，在多篇研究報告當中，皆發現 CHS 有基因多形性（Polymorphism），通常具有六個或以上的 CHS，其具有專一性的表現部位，並且在應對不同的外在刺激時，這六個 CHS 有不同的反應速率以及表現時間（即動能 kinetic 的不同）。這表示植物在演化過程當中，爲了更有效率地面對各種不同的壓力，使 CHS 有了基因多形性，雖然序列相似，但面對不同的逆境時它們的功能卻有所不同（Junghans *et al.*, 1993; Jeon *et al.*, 1996; Ryder *et al.*, 1987）。

另外，由於黃酮類化合物的成分對於葡萄與紅酒的顏色與口感有相當大的影響，因此 CHS 在葡萄中也有相當多的研究報告。其中，Tian 等人（2006）由葡萄幼苗中選殖出一個全長 1225 bp 的 CHS cDNA，並且製作了 CHS 蛋白質（43 kDa）的抗體。這種抗體可以免疫辨認的方式捕捉粗蛋白質（Crude protein）中的 CHS，直接偵測出 CHS 蛋白質在各組織部位的表現情況。除此之外，利用免疫金電子顯微鏡技術（Immunogold Electron Microscopy Technique）觀察 CHS 在發育中的葡萄表皮細胞的分佈狀況時，發現 CHS 主要結合在粗內質網膜上以及細胞質中，而鮮少部分顯示於細胞壁。除此之外，還發現兩個分布地點，其一是在質體（Plastid）——發生於整個發育期；另一是在液胞（Vacuole）——發生於後發育期。由此故也可以推測 CHS 的分佈模式與黃酮類化合物在葡萄中的代謝情況有關（Tian, 2008）。

2.2.4.2 查爾酮異合酶 (Chalcone Isomerase)

CHI 是黃酮類生合成途徑中的第二個蛋白質酶，在豆科植物的研究中也有以 CHI 的表現觀察植物抗逆境之反應，諸如在面對抗真菌刺激物、創傷以及感染實驗等，CHI 皆會產生大量表現 (Mehdy and Lamb, 1986; Mehdy and Lamb, 1987)。

據 Hegnauer and Gpayer-Barkmeijer (1993) 的報告，約 95% 的異黃酮類在豆科植物中被發現，而其中的 60% 是 5-Deoxyflavonoids。一般而言，CHS 所產生的 6'-Hydroxychalcone (即 Chalcone) 為黃酮類化合物產物之前驅物；而 CHS 與 PKR (Polyketide reductase, eg. CHR) 所產生的 6'-Deoxychalcone 則為異黃酮類化合物產物之前驅物 (即 5-Deoxyflavonoids) (Tropft *et al.*, 1995)。後來的研究發現，在高等植物中 CHI 可被分為兩類，一者是非豆科 Type I CHI，另一者為豆科專屬的 Type II CHI。兩者之間的不同在於，Type I CHI 只接受 6'-Hydroxychalcone 為基質，產生成 5-Hydroxyflavanone，進行黃酮類化合物的生成；而 Type II CHI 則可接受 6'-Hydroxychalcone 以及 6'-Deoxychalcone 為基質，並分別產生 5-Hydroxyflavanone 以及 5-Deoxyflavanone，進行異黃酮類化合物的生成 (圖 3) (Shimada *et al.*, 2003)。

目前 CHI 基因僅發現於高等植物中，其構造具相當高的獨特性。CHI (屬於 Type II CHI，來自豆科苜蓿) 的第一個蛋白質晶體結構是由 Jez 等人 (2000) 建構的，由 Protein Data Bank (PDB) 以及 PSI-BLAST 中搜尋，他們發現 CHI 與其他蛋白質並沒有同源的折疊構造，也沒有其他同源的蛋白質序列。另外，Shimada 等人 (2003) 從豆科百脈根 (*Lotus japonicus*) 中選殖出 3 個 Type II CHI 以及一個 Type I CHI，發現各物種之間的 Type I CHI 胺基酸序列相似度 (>70%) 比同一物種內的 Type I、Type II CHI 的胺基酸序列相似度 (~50%) 來的高，這也顯示了隨著豆科植物之演化，Type II CHI 亦進行高度的演化。

在實際運用方面，CHS 和 CHI 基因也被應用於提高黃酮類化合物產量，諸如體外 (*in vitro*) 生合成，將此二基因分別或共同與載體結合，把建構好的質體轉入大腸桿菌或酵母菌中誘導蛋白質表現，外加黃酮類前驅物以產生大量的

(2S)-flavanones (Miyahisa *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2005)。此外，近年來亦有利用農桿菌誘導甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 產生毛狀根，將甘草之 CHI 轉殖入毛狀根後，再施與 CHI 之刺激物 (¹PEG8000-YE)，亦能顯著提升黃酮類化合物之產量 (Zhang *et al.*, 2009)。注 1、PEG8000: Polyethylene glycol (molecular weight 8000); YE: Yeast extract

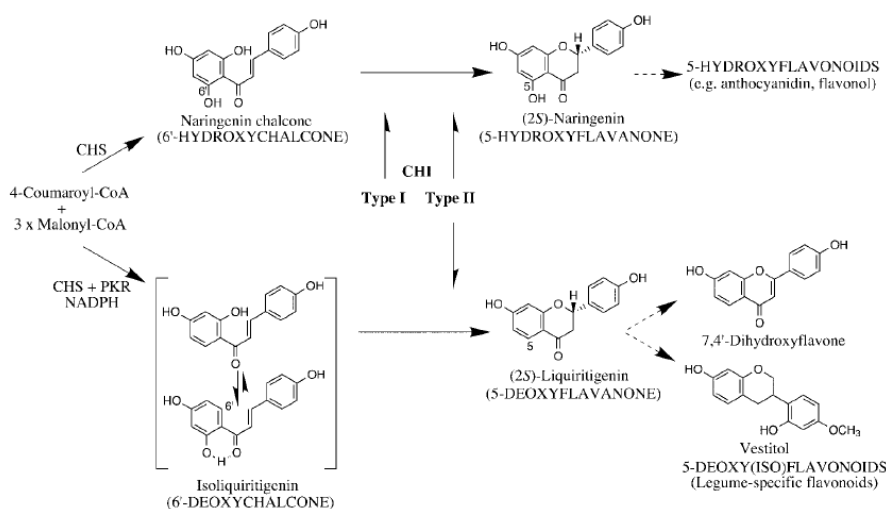


圖 3. 豆科植物中的黃酮醇合成途徑 (Shimada *et al.*, 2003)。

Fig. 3. The flavonoids pathway in leguminous plants (Shimada *et al.*, 2003).

2.2.4.3 黃酮醇合成酶 (Flavonol synthase)

FLS 可以將二羥黃酮醇 (Dihydroflavonols) 氧化成黃酮醇，前人的報告顯示 FLS 是一個 2-Oxoglutarate-/Fe(II)-dioxygenase，它需要氧分子、 Fe^{2+} 、2-Oxoglutarate 以及抗壞血酸 (Ascorbate) 才能有完全的活性反應 (Britsch *et al.*, 1981)。

黃酮醇化合物基本結構為 Myricetin、Quercetin 以及 Kaempferol，還有出現機率較少的 Isorhamnetin，主要由 FLS 調控生合而成，在植物當中扮演著組成花色以及防禦 UV-B 射線之傷害等重要功能。在豆科植物大豆的兩篇有關 FLS 的報告中，其中一篇認為 FLS 與調控花色有關，FLS 的點突變會造成花色由紫色變成紅紫色

(Takahashi *et al.*, 2007); 另一篇報告中，則發現植株受到 UV-B 射線的刺激時，會累積 Kaempferol 以作防禦，其中主要原因為 *F3H* 與 *FLS* 被 UV-B 射線誘發之故 (Kim *et al.*, 2008)。

在某些植物當中，都發現有好幾個具有組織專一性 *FLS* 冗餘基因 (Redundant gene)，然而通常只有其中一些具調控功能。如 Fujita 等人 (2006) 從分離出葡萄的 5 個 *VvFLS* 基因 (1~5)，這 5 個基因在花以及花芽都有表現，而 *VvFLS2*、4、5 則也在葡萄果皮中表現，但只有 *VvFLS4* 能夠影響黃酮醇的表現量；從阿拉伯芥分離出六個 *AtFLS* 基因 (1~6)，雖然它們的表現有組織專一性，但經過驗證，只有兩個具有催化活性 (*AtFLS1*, 3)，能夠影響植株的黃酮類產量 (Owens, 2008)。

此外，人們還發現黃酮類生合成途徑在調控機制上的特殊之處。黃酮醇與花青素雖然共同享有相同的上游生合成途徑，但是植物當中調控黃酮醇以及花青素的機制是不相同的，例如花青素會受高溫影響而大減，而黃酮醇幾乎不受影響 (Spayd *et al.*, 2002)。其實在 *FLS* 調控黃酮醇的產生時，會面對許多使用相同基質 (即 Dihydroflavonols) 的競爭對手，例如會在 B 環上接羥基的 *F3'H* 以及 *F3'5'H*，或 *DFR*，將途徑導向花青素及原花青素的產生 (Davies *et al.*, 2003)。而 *ANS* 在體外實驗當中則證實具有將二氫黃酮醇催化成黃酮醇的功能，被視為產生黃酮醇的另一可能的替代途徑。此因，這些蛋白質酶應如何共同合作調控，而能夠使整個黃酮類的代謝途徑達到平衡，還需要相當多的研究。其中，經由操控 *FLS* 以及 *ANS* 來改變黃酮類的生合成，並藉此來觀察黃酮類的生合成途徑的調控機制，可能還會發現許多意想不到的結果 (Reddy *et al.*, 2007; Schijlen *et al.*, 2006; Wellmann *et al.*, 2006)。

2.3 相思樹

2.3.1 相思樹之簡介

相思樹 (*Acacia confusa*) 屬於豆科 (Leguminosae) 相思樹屬 (*Acacia*)。此屬全球約 1,350 種，主要分布於熱帶與亞熱帶地區或氣候半乾燥與乾燥之地，其涵蓋範圍甚廣，包括非、美、澳三洲以及中亞、東南亞等地，單於澳洲即有 1,000 餘種。而屬於臺灣的兩種相思屬本土樹種，即相思樹及藤相思樹 (*Acacia intsia*) (劉崇瑞，1960；Seigler, 2003)。相思樹主要分布於海拔 100~600 公尺之平地及丘陵地區，別稱相思仔、香絲樹或臺灣柳，原產於恆春半島 (劉崇瑞，1960)。相思屬植物常為二回羽狀複葉，但相思樹僅於幼年具有二回羽狀複葉，成長時則由葉柄特化成假複葉。其假葉互生，革質，披針形略鐮刀狀彎曲，全緣，平滑，長 6~12 cm，寬 5~8 mm，平行脈 5~7 條。頭狀花序腋出，金黃色，總梗長 5~10 mm；花莖 5~8 mm，花瓣 4 片，基部合生；雄蕊多數，挺出花外；花柱較雄蕊長。莢果平薄，兩端截行，長 4~9 cm，內藏種子 5~8 粒。種子扁平，光滑 (劉崇瑞，1960；陳正和，2002)。相思屬喬木植物之中，一些木材性質緻密堅韌者，如相思樹、茶兒 (*Acacia catechu*)、金合歡 (*Acacia farnesiana*)、合歡 (*Albizia julibrissin*)、大葉合歡 (*Albizia lebbek*) 等，常供做家具或農具之用。相思樹樹幹質地堅硬、材質細、紋理直，用途甚廣，據「臺灣木本植物圖誌」記載：「大者供製枕木、抗木及農具，小者用於薪炭」。相思炭在早期有相思仔炭之稱，以品質良好，具耐燒、發熱量高質之特性稱著。在水土保持方面，因具生長迅速、不擇土質、耐候性、耐旱性良好等特色，使相思樹成為臺灣早期大量種植的防風林樹種。相思樹亦常作為行道樹或茶園、咖啡園之庇蔭樹，且根部具有固氮良好的根瘤，能夠改善貧瘠的土質 (劉崇瑞，1960)。相思屬植物中，一些樹皮或心材富含丹寧如相思樹、黑栲 (*Acacia decurrens*)、金龜樹 (*Pithecollobium dulce*) 等，常可製成染料 (劉崇瑞，1960；王松永，1983；陳正和，2002)。相思樹因其富含之酚類化合物，具多種傳統用途：樹皮含大量丹

寧，可製天然染料及單寧膠；樹皮及心材所含之聚酚類化合物，經萃取可製成天然防腐藥劑；樹皮亦含鞣質，能治跌打以及毒蛇咬傷等。此外，一些相思屬植物葉，有的可作飼料如金龜樹、可作食用如合歡；而相思樹之葉則可用作傳統藥用，具有行血、散瘀之功效（劉崇瑞，1960；邱年永和張光雄，1986）。

2.3.2 相思屬植物之二次代謝物活性研究

Seigler(2003)曾歸納指出相思屬植物的枝葉、樹皮及心材含有豐富的酚類化合物，如黃酮類化合物及單寧等，然而過去人們對此屬植物之毒性不甚了解且此屬植物不易辨認，所以對其抽出物成分和活性之研究甚少。而近代，可作為藥物、毒物、芳香劑和工業材料等之自然產物越來越受到重視，從天然物中尋找有生物活性的成分並加以研究與開發，已成為現今醫藥界的研究主流之一（王升陽等，2003；Seigler, 2003）。因此，近幾年來有關相思屬二次代謝抽出物之活性研究為數不少，其中包括 *Acacia pennata*、*A. burkittii*、*A. acuminata*、*A. mearnsii*、*A. concinna*、*A. nilotica*、*A. aroma*、*A. salicina*、*A. karroo* 及 *A. cochliacantha* 等。而當中含有黃酮類化合物之抽出物，通常被證實具有抗氧化活性、抗菌活性、抗發炎等能力（Adedapo *et al.*, 2008; Chatti *et al.*, 2009; Dongmo *et al.*, 2007; Grace *et al.*, 2009; Kalaivani and Mathew, 2010; Kusano *et al.*, 2011; Manriquez-Torres *et al.*, 2007; Mattana *et al.*, 2010; Rifai *et al.*, 2010; Solomon-Wisdom and Shittu, 2010; Todkar *et al.*, 2010）。在抗菌活性方面，*A. cochliacantha* 的地上部、*A. concinna* 的莢果及 *A. nilotica* 的葉片抽出物皆具抗菌活性，抽出物成分均含黃酮類化合物（Manriquez-Torres *et al.*, 2007; Solomon-Wisdom and Shittu, 2010; Todkar *et al.*, 2010）。而 *A. aroma* 之黃酮類萃取物則能有效抑制金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 生長（Mattana *et al.*, 2010）。在抗發炎反應方面，*A. pennata* 葉片之黃酮類抽出物，證實具抗發炎之能力，能抑制發炎反應相關之環氧化酶 COX-1 及 COX-2 的活性（Dongmo *et al.*, 2007）；*A. karroo* 莖幹之抽出物亦具抗發炎與鎮痛作用，

然未分析其成分 (Adedapo *et al.*, 2008)。在抑制癌細胞方面，*A. pennata* 的葉抽出物證實為 Hh/GLI 抑制因子 (Hh/GLI inhibitors)，對人類胰臟癌細胞 (PANC1) 及前列腺癌細胞 (DU145) 具選擇性細胞毒性 (Selective cytotoxic)，但不損害正常細胞 (Rifai *et al.*, 2010)，而其中一個成分為黃酮醇 Quercetin 化合物；*A. burkittii* 及 *A. acuminata* 的心材抽出物中，則分析出無色花色素 (Leucoanthocyanidin) 對 L1210 鼠淋巴瘤細胞 (Mouse lymphoma) 具細胞毒性 (Grace *et al.*, 2009)。另外，*A. nilotica* 的葉富含多酚與黃酮類化合物之抽出物，具良好的 DPPH 自由基清除能力 (Kalaivani and Mathew, 2010)，而 *A. salicina* 之黃酮類萃取物則證實具抗氧化活性、抗菌活性、抗基因毒性 (Antigenotoxic) 及具細胞毒性 (Chatti *et al.*, 2009) 等性質。

2.3.3 相思樹之黃酮類化合物成分與活性分析

早期關於相思樹抽出物成分分析與活性成分之探討不多，曾有 Lee 等人 (2000) 於相思樹之葉分離出 7 種黃酮類化合物，並對 Myricetin 的 5 種化合物 (Myricetin 3-*O*- (2"-*O*-galloyl) - α -rhamnopyranoside 7-methyl ether、Myricetin 3-*O*- (3"-*O*-galloyl) - α -rhamnopyranoside 7-methyl ether、Myricetin 3-*O*- (2"-*O*-galloyl) - α -rhamnopyranoside、Myricetin 3-*O*- (3"-*O*-galloyl) - α -rhamnopyranoside 及 Myricetin 3-*O*- (2",3"-di-*O*-galloyl) - α -rhamnopyranoside) 進行生物活性試驗，發現 Flavonol galloylglycoside 類化合物對豐年蝦卵 (*Artemia salina*) 的孵化具強力的抑制效果 (Lee *et al.*, 2006)。

近年來，針對相思樹各組織之抽出物進行成分分析，如心材、樹皮、枝條、花及葉，並進行有系統之抗氧化活性評估，成果斐然。其中經由對抽出物進行清除自由基 (DPPH assay)、超氧自由基 (Nitroblue Tetrazolium assay, NBT assay)、抑制脂質過氧化 (Inhibition of lipid peroxidation) 等實驗，已發現相思樹之心材、樹皮、枝條、花及葉組織抽出物具有極佳之抗氧化能力，其中黃酮類化合物為主

要的抗氧化活性來源 (Hsieh and Chang, 2010; Tung *et al.*, 2009a; Tung *et al.*, 2009b; Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008a)。

接下來，將逐一介紹相思樹心材、葉、花、枝條之黃酮類二次代謝物成分與活性分析。

Chang 等人 (2001) 曾比較相思樹樹皮與心材之抽出物之抗氧化活性，發現除了在清除超氧自由基之效果中心材較佳於樹皮外，兩者均有強力的抗氧化作用。樹皮主要的抗氧化性抽出物成分為羥基苯甲酸類化合物，而心材抽出物則以黃酮類為主。相思樹心材抽出物當中，以 7,8,3',4'-Tetrahydroxyflavanone (Melanoxetin)、7,8,3',4'-Tetrahydroxy-3-methoxyflavone (Transilutin) 以及 3,4,2',3',4'-Pentahydroxy-trans-chalcone (Okanin) 為主要的黃酮類化合物以及主要的抗氧化物。而 Melanoxetin 更在抗發炎活性實驗當中，證實其具有抑制 LPS (Lipopolysaccharide)、誘導 RAW264.7 巨噬細胞之一氧化氮合成酶 (iNOS, Inducible nitric oxide synthase) 以及還氧合成酶-2 (COX-2, Cyclooxygenase-2) mRNA 表現之能力，由此可見心材抽出物的抗氧化活性的優異潛力 (Wu *et al.*, 2008b)。

DPPH 自由基清除能力及超氧自由基抑制作用的實驗顯示，相思樹葉抽出物的黃酮類化合物具優異的抗氧化效果，黃酮類的部分包括 1 個黃酮 (Flavones) Luteolin，以及 8 個黃酮醇 (Flavonols)：Myricetin 3-O- (2''-O-galloyl) - α -rhamnopyranoside 7-methyl ether、Myricetin 3-O- (3''-O-galloyl) - α -rhamnopyranoside、Myricetin 3-O- (3''-O-galloyl) - α -rhamnopyranoside 7-methyl ether、Myricetin-3-glucopyranoside、Myricetin-3-rhamnopyranoside、Myricetin 3-O- (2''-O-galloyl) - α -rhamnopyranoside、Quercetin-3-rhamnopyranoside 及 Europetin-3-rhamnopyranoside。除了 Luteolin 外，其他黃酮醇化合物清除 DPPH 自由基之能力皆較著名的抗氧化劑兒茶素為佳 (Tung *et al.*, 2009b)。

相思花萃取物成分當中，黃酮類化合物含量越高，則抗氧化能力越強。其中分離出的 6 個黃酮類化合物均為黃酮醇化合物，即 Myricitrin、Quercitrin、Europetin-3rhamnoside、Kaempferol-3rhamnoside、Rhamnetin-3-glucoside 以及

Rhamnetin-3-rhamnoside。此類化合物具有良好的 DPPH 自由基、超氧自由基清除能力以及還原力，唯獨抑制脂質過氧化的能力除外。但經過水解之後，此類化合物主要還原成為 Myricetin、Europetin、Quercetin 及 Keampferol，於抑制脂質過氧化方面便超勝於它們的糖苷化合物 (Wu *et al.*, 2008a)。

相思樹粗枝條 (直徑 4~5 cm) 以及細枝條 (直徑 0.3~0.5 cm) 抽出物當中，分別分離出 1 個及 5 個黃酮類化合物，包括粗枝條的 Quercetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside 以及細枝條的 Myricetin-3-*O*- β -glucopyranoside、Myricetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside、Quercetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside、Myricetin-3-*O*-(2''-*O*-galloyl)- α -rhamnopyranoside 及 Luteolin。分析亦顯示粗枝條與細枝之抽出物，分別以原花青素及黃酮類糖苷化合物為主。此類黃酮類糖苷化合物在抑制黃嘌呤氧化酶之活性表現良好，且經酸水解之後，主要還原成 Myricetin 以及少量 Quercetin，其抗氧化能力更優於酸水解之前 (Hsieh and Chang, 2010)。

綜上所述，不難發現黃酮醇化合物在相思樹中是極常見的黃酮類。而相思樹心材的黃酮類化合物更是與一般的黃酮類不同，一般黃酮類 A 環羥基多數接於 C5 及 C7 的位置，而相思樹心材黃酮類卻多是接在 C7 及 C8 的位置 (Melanoxetin 或 Transilitin)。此外，相思樹葉子之熱水抽出物亦具有良好的清除 DPPH 自由基之效果及總抗氧化能力。而在相思花與花茶之熱水抽出物抗氧化活性比較當中，證實相思花之抗氧化能力及還原力皆與洋甘菊相當，並且優於茉莉；而相思花之清除超氧自由基的能力則優於洋甘菊及茉莉。由此可見，相思樹之葉與花具有開發為保健茶葉與花茶的潛能 (Tung *et al.*, 2009b; Wu *et al.*, 2008a)。

實際上，黃酮醇有三種最常見的化合物，即 Myricetin、Quercetin 以及 Kaempferol (圖 1)，其生物活性的差異主要取決於它們 B 環上的羥基 (Winkel-Shirley, 2002)。吳志鴻 (2004) 對黃酮類化合物之抗氧化能力與其結構的關係進行分析，以清除 DPPH 自由基能力作為評估，將 A、B、C 環之影響力歸納出三點：首先為黃酮類化合物中 B 環之羥基數影響最大，至少兩個或以上抗氧化能力才會好。其

次為 C 環 C3 位置上之羥基，若無則效果會變差。最後，A 環之影響較小。此外，若 C2-C3 為不飽和雙鍵以及³C4 具羰基，則能提高抗氧化能力。綜上所述，黃酮類中以黃酮醇之抗氧化能力最好。更進一步在黃酮醇化合物之中比較抗氧化活性，則 A 環-鄰位取代雙羥基 (Melanoxetin, Transitilin) > A 環-間位取代雙羥基 (Myricetin, Quercetin) ; B 環-三羥基 (Myricetin) ≥ B 環-雙羥基 (Quercetin) > B 環-單羥基 (Kaempferol) (吳志鴻，2004)。

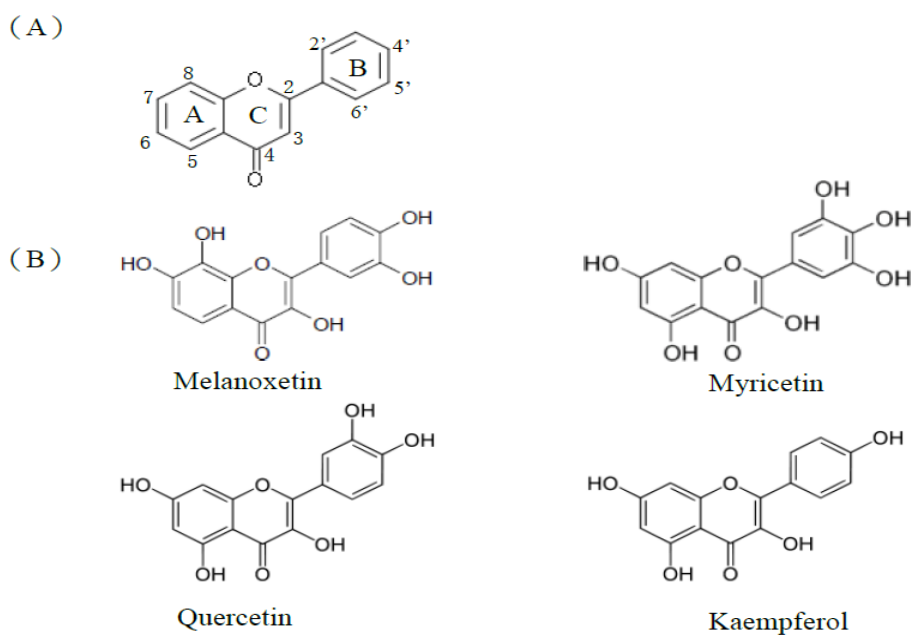


圖 4. 黃酮類化合物之基本化學結構。(A) 黃酮類化合物之基本骨架。(B) 四種相思樹常見之黃酮醇化合物。

Fig. 4. Basic chemical structures of flavonoids.

參、材料與方法

3.1 試驗試材

3.1.1 植物試材

本試驗所採用的相思樹主要來自三個地區。2010年5月20日，採集地點位於國立政治大學山上校區，近道藩樓，步道旁，指南溪畔。相思樹為30年生，樹形高大，主要收集葉、花以及枝條。2011年1月27日，相思樹位於國立臺灣大學森林環境暨資源學系系館旁，林產館門前。相思樹為30年生，樹形高大，主要採集樹皮和木質部。另外，五年生的相思樹小苗來自國立中興大學蕙蓀林場實驗林苗圃，以及1.5年生的相思樹小苗則是2009年10月於本實驗室播種生長所得，相思樹種子來自本系鹿兒陽老師實驗室。所有試材在採集之後，盡速將各不同組織分裝於50毫升離心管，分別有葉、花、細枝條、樹皮及邊材，先以液態氮冷凍，再儲存於-80°C冰箱備用。

3.1.2 載體之選用

1 · pGEM®-T Easy Vector

此載體由 Promega 生技公司出產，全長 3015 bp。

2 · pET-21a (+) Vector

此載體由 Novagen 生技公司出產，全長 5443 bp。

3.1.3 菌株之選用

1 · *Escherichia coli* DH5α

DH5α 品系可大量表現質體 (Plasmid)。用於基因的選殖與構築。

2 · *Escherichia coli* BL21 (DE3)

BL21 品系可大量表現重組蛋白 (Recombinant protein)。用於 AcFLS 蛋白質的大量表現。

3.1.4 常用培養基與溶劑配方

6X DNA/RNA tracking dye

0.25%(w/v) Bromophenol blue, 15%(w/v) Ficoll(type 400 溶於 TAE buffer)

0.5X TAE

20 mM Tris-acetate, 0.5 mM EDTA, pH 8.0

10X MOPS

0.2M 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), 80 mM NaOAc, 20 mL/L

EDTA (pH8.0)

SOC medium

1.6%(w/v) Tryptone, 1%(w/v) Yeast extract, 0.5%(w/v) NaCl, 10 mM MgCl₂,

10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 7.0

Luria-Bertani (LB) broth

1% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) Yeast extract, 1% (w/v) NaCl, pH 7.0

LB plates

LB broth, 1.5% (w/v) Bacto agar

抗生素 Ampicillin

Ampicillin 50 mg/l

5X Protein loading dye

0.25 M Tris-HCl, 50 mM DTT, 10 mM EDTA, 10% SDS, 50% Glycerol, 0.05%
Bromophenol blue, pH 6.8

10X TG-SDS

25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 20% (v/v) Methanol, 0.05% SDS

4X SDS loading buffer

250 mM Tris-HCl (pH 6.8) , 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerol, 10% (v/v)
2-Mercaptoethanol, 0.04% (w/v) Bromophenol blue

Colloidal Coomassie

17% Ammonium sulphate(w/v) , 34%(v/v) Methanol, 3%(v/v) Phosphoric acid,
0.1% (w/v) Coomassie G-250

Destaining solution

50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Acetic acid

TBS buffer

20 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 500 mM NaCl

Blocking buffer

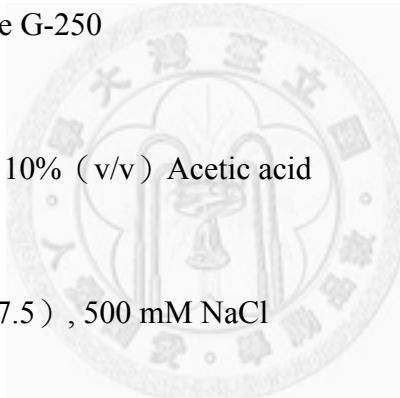
20 mM TBS, 5% (w/v) Non-fat milk powder, 0.05% (v/v) Tween-20

10X PBS

1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄, pH 7.3

PBST buffer

1X PBS, 0.05% Tween-20



3.2 實驗方法

3.2.1 相思樹 *CHS*, *CHI*, *FLS* 基因之選殖

於 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 之基因資料庫中，分別挑選出六種植物之查爾酮合成酶基因序列 [*Camellia sinensis* (BAA05641), *Populus trichocarpa* (XP_002303821), *Citrus unshiu* (ACQ41890), *Vitis vinifera* (BAB84112), *Rhododendron simsii* (CAC88858), *Citrus sinensis* (BAA81664)]，五種植物之查爾酮異合酶基因序列 [*Pyrus communis* (ABQ08639), *Elaeagnus umbellata* (AAC16013), *Camellia sinensis* (AAZ17563), *Gossypium hirsutum* (ABM64798), *Citrus sinensis* (BAA36552)]，以及三種植物之黃酮醇生合成酶基因序列 [*Camellia sinensis* (ACH99109), *Populus trichocarpa* (XP_00233483), *Vitis vinifera* (XP_002277152)]，以 EMBL Nucleotide Sequence Database (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>) 之 ClustalW2 程式進行比對，為三個目標基因各設計一對退化性引子。

從相思樹葉片中抽取總量 RNA，利用反轉錄酶 SuperScript™ III Reverse Transcriptase 轉成 cDNA 後，進行 PCR 反應，PCR 條件為 94°C 1 m，30 個循環的 94°C 30 s、42°C 40 s、72°C 1 m 以及 72°C 10 m，最後產物暫存於 4°C。PCR 產物以 1.2% 洋菜膠、進行 100 V 的電泳分析，再用 GeneMark 的 DNA clean/Extraction Kit (Cat.# DP034) 純化出 DNA 片段，與 Promega 公司的 pGEM-T Easy 載體以 T4 DNA ligase (Cat.# M1801) 於 4°C 接合 16 h。接著，將載體轉型至大腸桿菌 DH5 α ，於 IPTG/x-gal/ampicillin 培養基上進行篩選，再利用 GeneMark 的 Plasmid Miniprep Purification Kit (Cat.# DP01) 抽取質體，最後以 Promega 的 *EcoRI* 進行酵素切割。兩個小時的酵素切割之後，經電泳分析初步選出結合成功的質體，經基因定序分析結果，分別獲得部分之相思樹查爾酮合成酶、查爾酮異合酶、黃酮醇生合成酶基因之 DNA 片段。

此時，在已獲序列上進一步設計 3'端與 5'端的專一性引子 (Gene-specific primer)，分別經由 BD SMRAT™ RACE cDNA amplification kit (Cat.# 634914) 以及 Invitrogen 的 5'RACE system for rapid amplification of cDNA ends (Cat.# 18374-058)，得到 5'端和 3'端序列。透過 NCBI 當中的 Blast two sequence 整合序列，自序列的頭尾設計一對引子，用 PCR 增幅，將 PCR 產物與 pGEM-T Easy 載體進行結合，篩選質體進行定序確認。最後，將獲得的三個基因分別命名為 *AcCHS*、*AcCHI* 以及 *AcFLS*。

3.2.2 譜系分析

3.2.2.1 *AcCHS*

首先於 NCBI 基因資料庫搜尋其他物種的 CHS 超級家族基因 (Chalcone synthase superfamily gene) 胺基酸序列，接著運用 ClustalW2 程式將 *AcCHS* 與 19 個胺基酸序列做比對與譜系分析，並以鄰近連接分析法 (Neighbor-joining analysis) 製作譜系分析圖，最後在樹狀圖繪製軟體 (Tree view program) 中加以繪製。其中以鄰近連接演化樹分析法，重複計算 1000 次作演化樹分析。CHS 超級家族基因包括 Chalcone synthase (CHS)，Stilbene synthase (STS)，Bibenzyl synthase (BBS)，Benzophenone synthase (BPS)，Acridone synthase (ACS) 以及 Valerophenone synthase (VPS) 六個分群，並列出所使用之序列如下 (參考 Yamazaki *et al.*, 2001)：

CHS：紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) (AAB41559)，大豆 (*Glycine max*) (AAB01004)，豌豆 (*Pisum sativum*) (BAA01512)，葡萄 (*Vitis vinifera*) (BAA31259)，荔枝 (*Litchi chinensis*) (ADB44077)，山茶 (*Camellia japonica*) (BAI66465)，棉花 (*Gossypium hirsutum*) (ACH56521)，柑橘 (*Citrus unshiu*) (CQ41890)，灰楊樹 (*Populus trichocarpa*) (XP_002303821)；STS：羊蹄甲 (*Bauhinia variegata*) (ABF59517)，花生 (*Arachis hypogaea*) (BAA78617)，葡萄 (*Vitis vinifera*) (ABV82966)，河岸

葡萄 (*Vitis riparia*) (AAF00586); BBS : *Bromheadia finlaysoniana* (CAA10514), 蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis sp. 'pSPORT1'*) (CAA56277); BPS : 艷果金絲桃 (*Hypericum androsaemum*) (AAL79808), 金絲桃 (*Hypericum perforatum*) (ABP49616); ACS : 芸香 (*Ruta graveolens*) (CAC14058); VPS : *Humus lupus* (ACD69659)。

3.2.2.2 AcCHI

CHI 可分為 Type I CHI 和 Type II CHI 兩種，所使用之胺基酸序列如下 (參考 Shimada *et al.*, 2003) :

Type I CHI : 阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) (P41088), 橙 (*Citrus sinensis*) (BAA36552), 康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*) (Q43754), 小葉胡積子 (*Elaeagnus umbellata*) (O65333), 紫花牽牛 (*Ipomoea purpurea*) (O22604), 矮牽牛 (*Petunia x hybrida_A*) (AAF60296), *Petunia x hybrida_B* (P11651), 白蘿蔔 (*Raphanus sativus*) (O22651), 葡萄 (*Vitis vinifera*) (P51117), 玉米 (*Zea mays*) (Q08704), 百脈根 (*Lotus japonicus 2*) (BAC53984); Type II CHI : 紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) (P28012), 葛 (*Pueraria lobata*) (Q43056), 四季豆 (*Phaseolus vulgaris*) (P14298), 豌豆 (*Pisum sativum*) (P41089), *Lotus japonicus 1* (BAC53983), *Lotus japonicus 3* (BAC54038)。譜系分析方法比照 3.2.2.1。

3.2.2.3 AcFLS

2-ODD 超級家族基因可分為 FLS (Flavonol synthase), AS (Anthocyanidin synthase), F3H (Flavonone 3-hydroxylase), 以及 FSI (Flavone synthase I) 四個分群 (參考 Ferreyra *et al.*, 2010)。所使用之胺基酸序列如下 :

FLS: 馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) (ACN81826), 茶樹 (*Camellia sinensis*) (ABA54917), *Ricinus communis* (XP_002522207), *Allium cepa* (AAO63023),

金光菊 (*Rudbeckia hirta*) (ABN79672), 煙草 (*Nicotiana tabacum*) (ABE28017), 葡萄 (*Vitis vinifera*) (BAE75806), 銀杏 (*Ginkgo biloba*) (AAS21058); AS: 洋桔梗 (*Eustoma grandiflorum*) (BAJ08932), 彩葉草 (*Solenostemon scutellarioides*) (ABP57081), 可可 (*Theobroma cacao*) (ADD51355), 甘藍 (*Brassica oleracea var. capitata*) (AAO73440), 紫羅蘭 (*Matthiola incana*) (AAB82287); F3H: 馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) (AAM48289), 蘋果 (*Malus x domestica*) (AAX89397), 阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) (CAD37988), 大豆 (*Glycine max*) (AAU06217), 荷蘭芹 (*Petroselinum crispum*) (AAP57394), 稻 (*Oryza sativa Japonica*) (AAL58118); FSI: *Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata* (XP_002871353), *Arabidopsis thaliana* (CAP09035)。另外探討 AcFLS 與 *Arabidopsis thaliana* 的 AtFLSs 家族及 *Vitis vinifera* 的 VvFLSs 家族之間的關係, 所使用之胺基酸序列如下:

AtFLS1 (NP_196481), AtFLS2 (ACB88828), AtFLS3 (NP_201164), AtFLS4 (NP_680463), AtFLS5 (ANP_001190266), AtFLS6 (NP_680388), VvFLS1 (BAE75806), VvFLS2 (BAE75807), VvFLS3 (BAE75809), VvFLS4 (BAE75808), VvFLS5 (BAE75810), *Petunia x hybrida* (CAA80264), *Nicotiana tabacum* (ABE28017)。譜系分析方法比照 3.2.2.1。

3.2.3 AcFLS 蛋白質質體的建構

首先, 在 *AcCHS*、*AcFLS* 基因 5' 和 3' 端皆設計帶有 *NdeI* 和 *XhoI* 切位的引子, 並以具有校正功能的 *pfu* 酵素進行 PCR 反應。反應條件為 1 m /94°C, 28 個循環的 30 s /94°C、40 s /67°C、1 m /72°C, 以及最後 72°C 10 m, PCR 產物經電泳分析後, 純化出的 *AcCHS*、*AcFLS* 片段兩末端補加上 Adenin 鹼基, 然後與 pGEM-T Easy 載體黏合, 經篩選後將質體送定序確認。接著將夾帶目標基因的質體與 pET-21a (+) 載體, 於 37°C 以 Promega 公司的酵素 *NdeI* 和 *XhoI* 分別切割 16 以及 3 hr 後純化 DNA 片段, 再以 Promega 公司的 T4 DNA ligase 於 4°C 進行結合反應 16 hr。將 *AcCHS*、

AcFLS 片段與 pET-21a (+) 結合的質體轉型至大腸桿菌 DH5 α ,定序確認後，分別命名為 pET-CHS 以及 pET-FLS。最後將此二質體轉型至大腸桿菌 BL21，大量表現 AcCHS、AcFLS 蛋白質。

3.2.4 重組蛋白質表現

本實驗選用 Histidine tag (His-tag) 蛋白質融合系統，目標基因 *AcCHS*、*AcFLS* 則構築於此系統的載體 pET-21a (+)。將已建構好的質體分別轉型至大腸桿菌 BL21，並測試最适蛋白質誘導溫度以及誘導子 IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 濃度。抗生素為 Ampicillin 100 ppm，每次測試 5 mL 菌。菌液先於 37°C，225 rpm 培養 16 hr 之後，在 37°C 及 20°C 兩個不同的溫度下，加入濃度分別為 0.1 mM，0.4 mM 及 1 mM 的 IPTG，然後分別於 3hr 及 20 hr 後收取並離心。在大量表現蛋白質實驗中，首先將 0.5 μ l 質體轉型至 5 mL 大腸桿菌 BL21 (DE3) 中，抗生素為 Ampicillin 100 ppm，37°C 225 rpm 過夜培養。隔天將 4mL 菌液加入 500 mL 的 LB medium，37°C 225 rpm 培養至 O.D 600 0.4~0.7。

3.2.5 聚丙烯醯胺膠體電泳

利用聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) (表 2) 可分析蛋白質大小，判定目標蛋白質。首先，取出破菌後的蛋白質上清液 20 μ l，加入 5 μ l 的 5X Protein loading dye 混合均勻，煮沸 10 分鐘後，立即插冰上 5 分鐘。接著以 12000 rpm 高速離心 5 分鐘，即可將蛋白質樣品注入 12% 的 Polyacrylamide 膠片進行電泳分析。電泳電壓變化為 100 V 進行 20 分鐘，再提高電壓至 180 V 進行 1 小時。電泳結束後，將膠片取出浸染於 Coomassie Blue 250 染劑 5 分鐘，再以退染劑 Destain buffer 退色兩小時，最後於水中浸置隔夜，即可獲得蛋白質條帶清晰的膠片。

表 2. SDS-PAGE 膠片配方。

Table 2. Chemical components of SDS-PAGE gel.

Component	Separating gel	Stacking gel
37% Acrylamide mix	4.0 ml	0.33 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	-
1.0 M Tris (pH 6.8)	-	0.25 ml
dH ₂ O	3.3 ml	1.4 ml
10% SDS	0.1 ml	0.02 ml
10% Ammonium persulphate	0.1 ml	0.02 ml
TEMED	0.004 ml	0.002 ml

3.2.6 西方墨點試驗

透過西方墨點試驗(Western blots)，我們可以更進一步確認目標蛋白質的所在。蛋白質上清液經 SDS-PAGE 蛋白質膠體電泳分析後，將所獲得的膠片轉印到 PVDF 膜。PVDF 膜在轉印前需浸泡於甲醇(Methanol) 10 秒。轉印系統使用 Bio-rad mini trans-blot electrophoretic transfer system，組裝畢，以 100 V 0.35 A 轉印一小時。接著將 PVDF 膜依序處理：一級抗體(First antibody) 1 hr, PBST 5 min 兩次，二級抗體(AP-conjugated secondary antibody) 30 min，PBST 5 min 兩次。最後加入 BCIP/NBT 溶液(SIGMA FAST™ BCIT®/NBT, Cat.# B5655-25TAB)，輕微搖晃至呈色，以二次水沖洗數次終止呈色反應，再自然風乾後加以護貝保存。

3.2.7 蛋白質酵素純化

誘導蛋白質大量表現反應結束後，取 250 mL 的菌液，以 8500 rpm 離菌，棄菌液收集菌塊。加入 15 mL 20 mM Imidazole sodium phosphate buffer (0.02 M Na₂HPO₄, 0.02 M NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl)，破菌方法為超音波震盪 50 秒，停止一分鐘，如此循環 20 次。之後 8500 rpm 離心 20 min，將上清液使用 0.45 μm filter 過濾，利用 Ni Sepharose 6 Fast Flow 純化，AcCHS、AcFLS 蛋白質主要於 100 mM Imidazole sodium phosphate buffer 流洗下來。在使用 Amicon Ultra 濃縮後，AcCHS、AcFLS 分別以 Sodium phosphate buffer 以及 Replacing buffer [0.1 M NaH₂PO₄ (pH 6.8), 10% glycerol] 置換三次，最後得到可溶部蛋白質溶液 250 μl，濃度為 2.5 μg/μl。以上實驗，皆於 4°C 操作。

3.2.8 AcFLS 酵素活性反應

AcFLS 之活性反應參考自 Ferreyra *et al.* (2010)，反應總體積為 250 μL 。每 100 μL 的反應含 10 mM α -Ketoglutaric acid (Disodium salt)，10 mM Ascorbic acid，0.25 mM Ferrous sulfate，100 mM NaH_2PO_4 (pH 6.8) 以及 0.1 mM 的基質 (Dihydromyricetin, Dihydroquercetin, Naringenin)。此三種黃酮類基質被溶解於 80% HPLC 級的甲醇，製備成濃度 1 mM。以 100 mM Sodium acetate, pH 5.5 製備硫酸亞鐵，當中含 10 mM Ascorbic acid 以防止 Fe^{2+} 之氧化。反應溶液當中的其他藥劑，將溶於 100 mM Sodium acetate, pH 5.5。FLS 蛋白質之每個試驗的反應量為 75 μg 。

3.2.9 化合物 HPLC 定性分析

本實驗中蛋白質活性反應放置於開口小玻璃瓶中，反應條件為 25°C 60 min。反應結束後，加入兩倍體積的乙酸乙酯，即 500 μL ，震盪 1 min，離心 13500 g 5 分鐘，取 250 μL 之有機層。然後再以 500 μL 乙酸乙酯和剩下的 250 μL 有機層再次萃取，並與最初取出來的 250 μL 萃出液混合，再以氮氣吹乾。吹乾後以 50 μL methanol 回溶，然後高效液相層析儀 (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Agilent Technologies 1200 Series) 做定性分析，使用管柱為逆向管柱 Phenomenex Luna 5 μ C18 (250 x 4.60 mm)，注射體積為 10 μL 。化合物是以流速 (Flow rate) 為 1 mL/min 的梯度沖提來分離，其雙移動相 (Binary mobile phase) 條件為：溶劑 A 為甲醇，溶劑 B 為 dH_2O (0~5 min, 20% A:80% B; 5~30 min, 20% A:80% B; 30~50min, 100% A:0% B)。其初始之吸收光偵測波長為 280 nm，至 20 min 後改為 368 nm。二氫楊梅素 (Dihydromyricetin)、二氫槲皮素 (Dihydroquercetin)、柚皮素 (Naringenin)、楊梅素、槲皮素以及山奈醇之標準品皆購自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。

3.2.10 相思樹創傷處理

本試驗中選取五年生相思樹，於基部枝條上的葉片，由葉尖測量一公分，以剪刀垂直剪一刀。取樣時間點為 0，6，12 及 24 小時，每次收取 4 片成熟葉。另外於 0，6，12，18 及 24 小時收取同一植株上層枝條上的未傷葉作為對照組，每次收取 2 片成熟葉。取得樣品後立刻加入液態氮，並收藏於-80°C 冰箱。

3.2.11 反轉錄聚合酶連鎖反應

爲了探討 *AcCHS*，*AcCHI*，*AcFLS* 在相思樹不同組織的 mRNA 表現量差異，以及葉片創傷處理後的反應模式，本實驗針對相思樹成樹之葉、花、細枝、樹皮及木質部五個部位，相思樹小苗之葉、莖、根三個部位，以及創傷處理之葉片做了反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR) 檢測。並於此三個基因的 3' 端非轉譯區 (3' Untranslated Region, 3'UTR) 各設計一對 RT-PCR 專用引子。參考 Chang 等人 (1993) 所提出的 RNA 抽取技術，抽取個不同組織之 RNA。在合成 cDNA 時，定量了 1 μg 的 RNA，並使用 Invitrogen 的 SuperScript III Reverse Transcriptase (Cat.# 18064-022) 進行反轉錄。接著取 7.5 μl 的 2X PCR Master Mix (Genemark, Cat.# RP02)，定量 0.4 μg cDNA、forward 與 reverse 引子各 0.3 μM (最終濃度)，最後加入 MQ-H₂O 至總體積為 15 μl ，進行 RT-PCR。PCR 條件為 94°C 1 m，25 個循環的 94°C 30 s、42°C 40 s、72°C 30 s，72°C 10 m，最後產物暫存於 4°C。PCR 產物以 2% 的洋菜膠體進行電泳分析。

肆、試驗結果

4.1 *AcCHS*、*AcCHI*、*AcFLS* 基因序列分析

4.1.1 核苷酸序列

從相思樹葉片取得總量 RNA，經由 NCBI 基因資料庫分別搜尋分析木本植物之查爾酮合成酶、查爾酮異合酶以及黃酮醇合成酶序列，並設計退化性引子對，藉由聚合酶鏈鎖反應及 cDNA 末端快速擴增法，獲得相思樹的查爾酮合成酶 (*AcCHS*: JN812063)、查爾酮異合酶 (*AcCHI*: JN812061) 以及黃酮醇合成酶 (*AcFLS*: JN812062)。其中 *CHS* 核苷酸序列全長為 1610 bp，其中轉譯區為 1170 bp，對應合成 389 個胺基酸的蛋白質，5'端非轉譯區為 109 bp，3'端非轉譯區 331 為 bp；*CHI* 核苷酸序列全長為 991 bp 轉譯區為 720 bp，對應產生 239 個胺基酸的蛋白質，5'端非轉譯區為 96 bp，3'端非轉譯區為 175 bp；*FLS* 核苷酸序列全長則為 1368 bp 轉譯區為 996 bp，對應產生 331 個胺基酸的蛋白質，5'端非轉譯區為 60 bp，3'端非轉譯區為 312 bp。接著，使用 NCBI 之中的 blastx 功能，將 *AcCHS*、*AcCHI* 與 *AcFLS* 序列與其他物種的基因進行比對，發現 *AcCHS* 與無患子科的荔枝 (*Litchi chinensis*) 和葡萄科的葡萄 (*Vitis vinifera*) 相似度最為相近，兩者皆為 78% (圖 5)；*AcCHI* 與山茶科金花茶 (*Camellia nitidissima*) 之 *CnCHI* 最為相近，次為薔薇科歐洲甜櫻桃 (*Prunus avium*) 之 *PaCHI*，*AcCHI* 與此兩者之相似度分別為 71% 和 69% (圖 6)；而 *AcFLS* 與葡萄之 *VvFLS* 最為相近，次為茶樹之 *CsFLS*，*AcFLS* 與此兩者之相似度分別為 73% 和 71% (圖 7)。

```

VvCHS : ATGGTGGTCACTTGGCAGAAATTAAGAAAGGCCACAGAGGCTGAGGGTCCCGCCACGGTTCCTGGCTTTGGCACGGCCACTCCGGC : 83
LcCHS : ATGGCAACCAATTGGACAAATCAGGAAGGCCACAGAGGCGGAGGTCCTGGCCACCGTACTGGCCATGGCACGGCCACTCCCTTC : 83
AcCHS : ATGGTCACTCCGACGACATCGCAAGGCCACCGCTCCGTTGGCCCGCGCCACGATTCCTGGCTTTGGCACGGCCACCCCTTC : 83

VvCHS : CAACTGCGTCTACCAGGGCAGCTACCCGGATTACTACTTCCGGATCACCAACCGTAGGACATGACCGACTTCAAGGAGAAGT : 166
LcCHS : CAACTGCGTTCATCAGGCTGATACCCCTGACTATTACTTCCGGATCACCAAGTGGAGACATGACCGAGCTCAAGGAGAAGT : 166
AcCHS : TAACTGCGTCTCCAGAGCTGATACCCCGACTACTACTTCCGGATCAGTCAAGGAGGAGACATGACCGGATCTCAAGGAGAAT : 166

VvCHS : TCCAGCCATGTGTGAAAAATCCATGATAAACAAACGCTACATGCACCTCACTGAAAGAAATCTCAAGGAGAACCCTAACCTC : 249
LcCHS : TCCAGCCATGTGTGACAAATCTATGATAAAGAGCGTTACATGCATCTTACCGGAAACATTTCTGAGGAGAACCCTAACCTG : 249
AcCHS : TCCAGCCATGTGTGAAAAATCTATGATAAAGAGCGTTACATGCATCTTACCGGAAACATTTCTGAGGAGAACCCTAACCTG : 249

VvCHS : TGTGGCTACATGGGCGCCCTCTCTTTGATGCGCGTCAAGACATGGTGGTGGTGGAGGTACCAAGCTTGGCAAGGAAAGTGGCTCT : 332
LcCHS : TGTGGCTACATGGGCGCCCTCTCTTTGATGCGCGTCAAGACATGGTGGTGGTGGAGGTACCAAGCTTGGCAAGGAAAGTGGCA : 332
AcCHS : TGTGGCTACATGGGCGCCCTCTCTTTGATGCGCGTCAAGACATGGTGGTGGTGGAGGTACCAAGCTTGGCAAGGAAAGTGGCTCT : 332

VvCHS : CAAGGCCATCAAGGAATGGGGCCACCCCAAATCCAAGATCACCCACTTGTCTTCTGCACCACCTCCGGCGTTGACATGCCCG : 415
LcCHS : GAAGGCCATCAAGGATGGGGCCACCCCAAATCCAAGATCACCCACTTGTCTTCTGTACACCTCCGGCTGACATGCCCTG : 415
AcCHS : CAAGGCCATCAAGGATGGGGCCACCCCAAATCCAAGATCACCCACTTGTCTTCTGTACACCTCCGGCTGACATGCCCTG : 415

VvCHS : GTGCTGACTATCAACTCACCAAGCTCTCGGCTCTCAACCCCTCGTCAAGAGCCTGATGATGTACCAACAGGGTGTGCTTGGCT : 498
LcCHS : GCGCTGACTACCAAGCTCACCAAGCTCTCGGCTCTCAACCCCTCGTCAAGAGCCTGATGATGTACCAACAGGGTGTGCTTGGCT : 498
AcCHS : GAGCCGATTAACAACCTCACCAAGCTCTCGGCTCTCAACCCCTCGTCAAGAGCCTGATGATGTACCAACAGGGTGTGCTTGGCT : 498

VvCHS : GGGGGACCGTCCCTCCGCTTGGCAAGGATCTGGCGAGAACAAAGCCGGCTCTCGTGTTCGTCTGTCTGCAATCAC : 581
LcCHS : GGGGGACCGTCCCTCCGCTTGGCAAGGATCTGGCGAGAACAAAGGGTGCACGTGTTCGTCTGTCTGCAATCAC : 581
AcCHS : GGGGGACCGTCCCTCCGCTTGGCAAGGATCTGGCGAGAACAAAGGGTGCACGTGTTCGTCTGTCTGCAATCAC : 581

VvCHS : AGCGTCACTTTCCGAGGCGCCCTCTGACACCCACTTGGACTCCCTCGTGGGTCAGGCCTTTTCGGTGAAGGTCAGCTGCCG : 664
LcCHS : AGCGTCACTTTTCGAGGCGCCCTCTGACACCCACTTGGACTCCCTCGTGGGTCAGGCCTTTTCGGTGAAGGTCAGCTGCCG : 664
AcCHS : TGCCTCACTTTCCGAGGCGCCCTCTGACACCCACTTGGACTCCCTCGTGGGTCAGGCCTTTTCGGTGAAGGTCAGCTGCCG : 664

VvCHS : TTATCATTTGGCGGACCCGGATACAAAATTGAAACGCCCTCTTTCGAGCTCGTCTCCGGCAAGACCATCCTCCCTGAC : 747
LcCHS : TCATTCATTTGGCGGACCCGGATACAAAATTGAAACGCCCTCTTTCGAGCTCGTCTCCGGCAAGACCATCCTCCCTGAC : 747
AcCHS : TGATCATTTGGCGGACCCGGATACAAAATTGAAACGCCCTCTTTCGAGCTCGTCTCCGGCAAGACCATCCTCCCTGAC : 747

VvCHS : TCCGATGGGACATGAGGGACACTTCCCGAAGTGGGCTCACCTTTCATTTACTGAAAGACGTCCTCCGGGTGATTTCCAA : 830
LcCHS : TCCGATGGGACATGAGGGACACTTCCCGAAGTGGGCTCACCTTTCATTTACTGAAAGACGTCCTCCGGGTGATTTCCAA : 830
AcCHS : TCCGATGGGACATGAGGGACACTTCCCGAAGTGGGCTCACCTTTCATTTACTGAAAGACGTCCTCCGGGTGATTTCCAA : 830

VvCHS : GAACATGAAAGAGCTTGGTGGAGCCTTCACTCCGATAGGCATCACCGAATGGAAATCCCTTGTCTGATCGCTCACCCCG : 913
LcCHS : GAACATGAAAGAGCTTGGTGGAGCCTTCACTCCGATAGGCATCACCGAATGGAAATCCCTTGTCTGATCGCTCACCCCG : 913
AcCHS : GAACATGAAAGAGCTTGGTGGAGCCTTCACTCCGATAGGCATCACCGAATGGAAATCCCTTGTCTGATCGCTCACCCCG : 913

VvCHS : GCGGCCAGCAATTTAGACCAGGTGACTTAAAGCTGGCTCTCAAGGAAGAGAACTCAGACCACTCCGCCAGTTCTGAGC : 996
LcCHS : GTGCCCGCCGATTTAGACCAGGTGACTTAAAGCTGGCTCTCAAGGAAGAGAACTCAGACCACTCCGCCAGTTCTGAGC : 996
AcCHS : GTGGTCCGCCATTTAGACCAGGTGACTTAAAGCTGGCTCTCAAGGAAGAGAACTCAGACCACTCCGCCAGTTCTGAGC : 996

VvCHS : GACTATGGGAACATGTCAGTGCATGGGTGTTTATCTCTCGACGAAATGAGGAATAAGTCAATGGAAGAGGAAAGCCAG : 1079
LcCHS : GACTATGGTAACATGTCAGTGCATGGGTGTTTATCTCTGGATGAGATGAGGAGGAAGTCTCTCAAGGAAGGAAAGCCAG : 1079
AcCHS : GACTATGGGAACATGTCAGTGCATGGGTGTTTATCTCTCGACGAAATGAGGAATAAGTCAATGGAAGAGGAAAGCCAG : 1079

VvCHS : CACAGGGAAGGGTGGATGGGGCGTACTGTTGGATTCGGCACCGGCTCACGGTGGAGACTGTTGCTTTGCACAGTGTGT : 1162
LcCHS : AACGGGGAAGGACTGACTGGGGGCTTCTTTGGATTCGGCACCGGCTCACGGTGGAGACTGTTGCTTTGCACAGTGTGT : 1162
AcCHS : CACGGGGAAGGGTGGATGGGGCGTACTGTTGGATTCGGCACCGGCTCACGGTGGAGACTGTTGCTTTGCACAGTGTGT : 1162

VvCHS : CCCACCCCGCTCACTGA : 1182
LcCHS : CTATTCAGGAACTCACTGA : 1182
AcCHS : CCGTGTG----- : 1170

```

圖 5. 相思樹、荔枝以及葡萄之查爾酮合成酶核苷酸序列分析比對。

Fig. 5. Nucleic acid sequence alignment of CHSs between *A. confusa*, *L. chinensis* and *V. vinifera*.

三個相同之保守性核苷酸以黑色為底，兩個相同則以灰色為底。荔枝與葡萄之 *CHS* 分別為 *LcCHS* (GU288820) 以及 *VvCHS* (AB015872)。

```

PaCHI : ATGGCTGCACTACCAAAATCC-----CACCCCACTTCAGATCGAG-GCGACGTCGTTTCCACCCTCAGTCAAACCCCGGGCTC : 77
CnCHI : ATGTCCTCCATCACAGTCAAGTCCCGTCACCCAAGTCCAGATCGAGAGCCACGTT-TTCCCTCCGACTGTGAAACCTCCCGGCAC : 83
AcCHI : ATG---GCACCCCGCTCTGT-----CACCCCGCTTCAACTCGAGAGCCCTTGTAG-TTTCCTCCGACCGTGAAGCCCGAGGATC : 74

PaCHI : ACCCAACACTCTCTTTCCTCGGCGGGCCGGGGTGGAGGCTGGAGATTCAGGGCAACTTCCTGAAAGTTCACGGGCATTGGCGT : 161
CnCHI : GTCCAAAGCCCTTCTTCCTCGGCGGGCCGGGGAGAGAGCTTTGGAAATCCAGGGCAAGTTCCTCAAGTTCACGGGCATCGGAGT : 167
AcCHI : CAACAAGAGCTTCTTCCTTGGCGGAGCCGGGGAGAGAGCCCTCCATATCCAGGCAAACTTCCTGAAAGTTCACGGGCATCGGAGT : 158

PaCHI : GTACTTGGAGGAGAAAGGCCCTGCCCTGCTCGCCCTAAAGTGGAAAGGCCAAGACCGCCAGGAGCTGACGGACTCCCGTGGAGTT : 245
CnCHI : GTACCTCGAGAGATGGCCCTCCCGTGGCTCGCCCTAAAGTGGAAAGGCCAAGACTGCAGAGGAGCTGACGGACTCCCGTGGAGTT : 251
AcCHI : ATACCTCGAGGATGATGCCCTTCCGGCGCTCGCCCTAAAGTGGAAAGGCCAAGACCGCCAGGAGCTTACGGAACTCCCGTGGAGTT : 242

PaCHI : CTTACAGAGATGTTTACGGTCCATTTGAGAAATTCACACAGGTGACAAAGGATCTGCCACTTACCGGCCAGCAATATCGGGA : 329
CnCHI : TTTACAGGATATGTTTCCGGTCCCTTTGAGAAATTCACACAGGTGACTATGATCTGCCATTAACGGGTCCACAAATATCAGA : 335
AcCHI : TTTACAGAAATGTTTACGGTGGATTTGAGAAATTCACACAGGTGACAAAGGATCTGCCATTAACCTGGCAGCAATATCAGA : 326

PaCHI : GAAGGTTTCCGACAAATGCGTTGGCATTGGGAAATCAATCGGAATTTACACTGATGCAGAGCCAAAGGCCATTGCAAGTTCCCT : 413
CnCHI : GAAGGTTTACGAAATGTTGTTGGCTATTGGGAAAGCAGTTGGAACTTACTGATGCAGAGGCCAAAGGCCATTGCAAGTTTAT : 419
AcCHI : GAAGTATTCGAAATGTTGTTGGCATTGGGAAAGCTCTGGGATTTACACAGAGGCAGAGGAAAGGCATTTGCAAGTTTCT : 410

PaCHI : TGAGGCTTCAAGGATCAAACTTCCCTCCGGCGCTCGATCCTTTTTCACACAATCCCCAAAGGATCATTAACGATTTGCTT : 497
CnCHI : CGAGGCTTCAAGGATGAAAGTTTCCCTCCCGGCTGTTCTTATCTTTTACCCCAATCCCTTGGATCATTAACGATTTGCTT : 503
AcCHI : TTCAGCTTCAAGGATCAAACTTCCCTCCAGGCTCCTCGATCCTTTCACACTCAATCCCTTAAAGGATCTTCAACGATTACTTT : 494

PaCHI : CTCCAAAGATGCTTCCCTACCGAAGCTGGGAGCTGGGTGATCGAAACAAACTGCTTTCCGAGGCAGTTCCTGAGTCCATCAT : 581
CnCHI : CTCCAAAGAGCGCTTCCCTACCTGAGCTGGGACTGTGGTGATAGACAACAAACAAATTCACAGAGCAGTGTGGAGTCCATCAT : 587
AcCHI : CTCCAAAGATGGTTCCTTACCTGAACTGGGAAATGGGTGATAGAAACAAGTACTTTCCAGAGGCAGTGTGGAGTCCATTA : 578

PaCHI : CGGAAAGCACGGCGTTTCTCTCTGGAGCAAGCAGAGTGTAGCTGGCGAGTTATCTGAAATTGTTGAACTCAGTTCTCAI----- : 660
CnCHI : CGGCAAGCACGGCGTTTCCCTCAGCGCAAGAGAGCTTGGCAGCGAGATGTTGAGAAATTGTTGAACTCAGTTCTCAI----- : 661
AcCHI : TGGCAAGCACGGCGTTTCCCTCAGCGCAAGAGAGTGTGGCGGTTAGATTTCATGACTTGTTCATCTTCTCAAAATGGCTT : 662

PaCHI : -----ATGAGGCCGG-AAAATGGGAAATTGGAA--AACCCAGCTTAG : 699
CnCHI : -----GGCAGCCGAG-ACACCTGCTGCTGCTGAAATP----- : 693
AcCHI : AGCACTTTATCTTAGCCACAGGCCACAGAGGTTGAAATGCTCTCATCACTCAATTTGA : 720

```

圖 6. 相思樹、金花茶和歐洲甜櫻桃之查爾酮異合酶核苷酸序列分析比對。

Fig. 6. Nucleic acid sequence alignment of CHIs between *A. confusa*, *C. nitidissima* and *P. avium*.

三個相同之保守性核苷酸以黑色為底，兩個相同則以灰色為底。歐洲甜櫻桃與金花茶之 *CHI* 分別為 *PaCHI* (GU990525) 以及 *CnCHI* (HQ269805)。

```

csFLS : ATGGAGGTAGAGAGTGCAGCCCTGTCCTGTAACCT---CTCCATGAGCTCCCTGCAGAAATTTATCCGACCCGCTCCACGA : 80
vvFLS : ATGGAGGTAGAGAGTGCAGCCCTGTCCTGTCCTGATCTCAATGAGCTTCCGCGCAATTCATCCGACCCAGCCCATGA : 83
acFLS : ATGGAGGTGAPAGAGTGCAGTGCCTGTCCTGTCGCT--ATGAAACGAGCTTCCCTACTCACTTTATCCGACCCAGCCCATGA : 80

csFLS : GCAACCGGAGAAACCAAGGCTATGGAAGGCTCACCGTCCCGCTGATCTCCCTCTCTCAACCAACAGATGTTGGTGGTCCATG : 163
vvFLS : GCGGCCGGAGAAATCCAAAGCCCTGGAAGGGCTGAGCGTCCCGCTGATCTCCCTTAGGGGAGTCTCAGGATGTTTTGGTGAAGG : 166
acFLS : ACGGCCGGAGAAATACCAAGCCCTGGAAGGGCTGAGAGTCCCGCTCATCTCACTGCTCTCTCTCATGACCTTTTGGTGAAGC : 163

csFLS : CATATACAAAGGCTTGTAGTGAATGGGGATTTTTCTCTCAACCGGATCAAGGCTTCGAGCCCTCCTTGATCCGACCGCTAAAT : 246
vvFLS : AATCTACAAAGGCTTGTAGGAGTGGGGATTTTTCTCTCTCAAGATCAAGGCTTATCTCCAGGCTTGATGCAAAAGTTCAG : 249
acFLS : AATATCCGAGGCTGCTGAGTGGGGGTTCTTCTCATCAACGATCAAGCAATATCCGACCTTGATTCGCCCTTACAA : 246

csFLS : GAGGTTGGGAGGAGTTCTTTACCTCCACAGAGGAGAAAGAGAGCTATGCCAAATGATCCTTCAAGTGGGAGTTTGAAGG : 329
vvFLS : GAGGTTGGGATAGAATTTCTTTAAGCAGCCACAGGAGGAGAGGAGAGTATGCCAAATGATCCTTCAACTGGTAAAGTTGAAGG : 332
acFLS : GAGGTTGGGACCAATTTCTTCTCTCTCCACAGAGGAGAGGATATAGCAAAATGACCCCTCAAGCAGAGCTTTGAAGG : 329

csFLS : GTATGCAACGAGATGACTAATAATTTTATGATGAGAAAGTTGAGTGGATTGATTATATTTTACCTCATGCACCCCTCCTAAGA : 412
vvFLS : GTATGCAACGAGATGACTAAGAACTTTGATGAGAAAGTTGAGTGGATTGATTATATTTTTCATCTCATGCTCCCTCCCTCTA : 415
acFLS : GTACGGCACGAGATGACCAAGAACTTCGATGAGAAAGTTGAGTGGATGATTACTTCTTCACTGATATCTCCCTCCCTCCA : 412

csFLS : ACCTCAATCTTGCATCTGGCCCTAAGAACCCCTTCTTCAACAGGGCAGTGACAGAGGATACAAATGTGGAAATATATGAGTAC : 495
vvFLS : ATGTTAACTTCAAGATCTGGCCCTAAGAACCCCTTCTTCAACAGGGGAGTGACAGAGGATACAAACAGGAACTTCTAATAAGTA : 498
acFLS : ACGTCAATTTGATATCTGGCCCAAGAACCCCTTCTTCAACAGGGGAGTGACAGAGGATACAAACAGGAACTTGTGAGGTTA : 495

csFLS : ACCAACAACCTTATTTGTACTTCTTCAAGGGACTTGGTTGGATGGGAAGGTTTGTGCTTCTTTGGGTTGGTATGAAAT : 578
vvFLS : ACAGATACCGTACTGGGACTTCTTCAAGGGCCTCGGTTGGAAAGGAAAGGCTTGAATACACAGTGGGTTGGTATGAAAT : 581
acFLS : ACAGAACCGTCTGGGCTTCTTCCGAAAGGCTTGGTTGGAGAGGAAAGCACTGAATAGCACCTTGGGCTGATGAAATGAT : 578

csFLS : TGAATTTGAAATGAAATCAACATGTAACCCATGCCACACACCTCAGTCCGCCCTGGAGTTGAACCTCACACGACATGT : 661
vvFLS : TGAATTTGAAATGAAATCAACATGTAACCCATGCCACACACCTCAGTCCGCCCTGGAGTTGAACCTCACACGACATGT : 664
acFLS : AGAAATGAAATGAAATCAACATGTAACCCATGCCACACACCTCAGTCCGCCCTGGAGTTGAACCTCACACGACATGT : 661

csFLS : CTGCTCTACTTTACTTGTCCCAATGACGTTCCCGGCTCTCAAGTTTGGAAAGACGCTAATTTGGGTTGCTGTCAATTACTTG : 744
vvFLS : CCGCCCTCACCTTACTGTTCCCAATGATGTTCCCGGCTTCAAGTTTGGAAAGACGCTAATTTGGGTTGCGGTCGATTACTTG : 747
acFLS : CAGCCCTCACCTTACTGTTCCGAAAGATGTTCCCGGCTTCAAGTTTGGCCGCAAGTCACTGGGTTGCGGTCGATTAATCCA : 744

csFLS : CCAAAATCACTCTCGTCCATGTTGGTATCAACTTGAGGTACTAAGCAATGGTAAGTACAAGAGTGTCTTTCACAGGACTTT : 827
vvFLS : CCAAAATGCCCTCTTTGTCCTGTTGGTATCAAAATGAGGTTGCTGAGCAATGGCAAGTACAAGAGTGTCTTTCACAGGACTAC : 830
acFLS : CAAAACACCTCTCTCGTCCATATTTGGGATCAGCTTGAGGTTGCTAAGTAAATGGCAAGTACAAGAGTGTCTTTCACAGGACTTT : 827

csFLS : GGTGAACAAAGAAAGGACAAATGATCTTTGGGCTGTGTTTCTTGTGCTTCTCATGAAAGCAATGATGGACCTCTTCCAGAGC : 910
vvFLS : AGTGAACAAAGAAAGGACAAATGATCTTTGGGCTGTGTTTGTGCTTCTCATGAAAGCAATGATGGACCTCTTCCAGAGC : 913
acFLS : GGTGAACAAAGAAAGGACAAATGATCTTTGGGCTGTGTTTGTGCTTCTCATGAAAGCAATGATGGACCTCTTCCAGAGC : 910

csFLS : TCAATGATGAGAAACCCAGCPAAATTTCAACAAAACATAATGCTGAGTACCGTCAATCGCAAATTCATAAGATTCCACAA : 993
vvFLS : TGTGTGATGAAACCCAGCTTTCAACAAAACCTTTGCTGAGTACCGTCAATCGCAAATTCATAAGATTCCACAA : 996
acFLS : TGTGTAAACCAAGGAGCCCTCCCAATTTTCAACAAAACCTTTGCTGAGTACCGTCAATCGCAAATTCATAAGATTCCACAG : 993

csFLS : TAA : 996
vvFLS : TAA : 999
acFLS : TCA : 996

```

圖 7. 相思樹、葡萄與茶樹之黃酮醇合成酶核苷酸序列分析比對。

Fig. 7. Nucleic acid sequence alignment of FLSs between *A. confusa*, *V. vinifera* and *C. sinensis*.

三個相同之保守性核苷酸以黑色為底，兩個相同則以灰色為底。茶樹與葡萄之 FLS 分別為 *CsFLS* (EF205150)、*VvFLS* (AB213566)。

4.1.2 胺基酸序列

接著經由胺基酸序列比對發現 AcCHS 與葡萄 VvCHS (BAA31259)、荔枝 LcCHS (ADB44077) 之相似度分別為 89%及 88%，AcCHI 與金花茶 CnCHI (ADZ28513)、歐洲甜櫻桃 PaCHI (ADZ54781) 之相似度分別為 71%及 70%，而 AcFLS 與葡萄 VvFLS (BAE75810)、茶樹 CsFLS (ABM88786) 之相似度則分別為 74%和 73%的相似度。AcCHS 包含基質 *p*-Coumaroyl-CoA 及 Malonyl-CoA 結合有關的活性區 Catalytic triad (Cys₁₆₄-His₃₀₃-Asn₃₃₆)，以及其他 13 個 Coenzyme A binding 的保守性胺基酸 (Lys₅₅, Arg₅₈, Lys₆₂, Leu₂₀₆, Asp₂₀₇, Val₂₁₀, Leu₂₁₄, Leu₂₆₇, Lys₂₆₉, Pro₂₇₂, Gly₂₇₃, Gly₃₀₅, Ala₃₀₈) (圖 8)。AcCHI 具有由 13 個保守性胺基酸組成的 (2S) -naringenin binding cleft (Arg₃₇, Gly₃₈, Leu₃₉, Phe₄₈, Thr₄₉, Ile₅₁, Leu₁₀₂, Try₁₀₆, Lys₁₁₀, Val₁₁₁, Asn₁₁₄, Ser₁₉₁, Ile₁₉₂)，以及氫鍵網活性區 (Active site hydrogen bond network) -Thr₄₉, Ala₅₀, Met₉₈, Tyr₁₀₆, Phe₁₅₃ (圖 9)。AcFLS 則具與基質結合之胺基酸- Tyr₁₂₈, Phe₁₃₀, Lys₁₉₈, Phe₂₈₉ 以及 Val₂₉₁，與鐵離子結合相關之胺基酸-HxDx_nH motif，與 2-OG 結合相關之 RxS motif，以及其他四個 2-ODDs 保守性胺基酸 (Gly₆₄, His₇₁, Pro₂₀₃, Gly₂₅₇) (圖 10)。

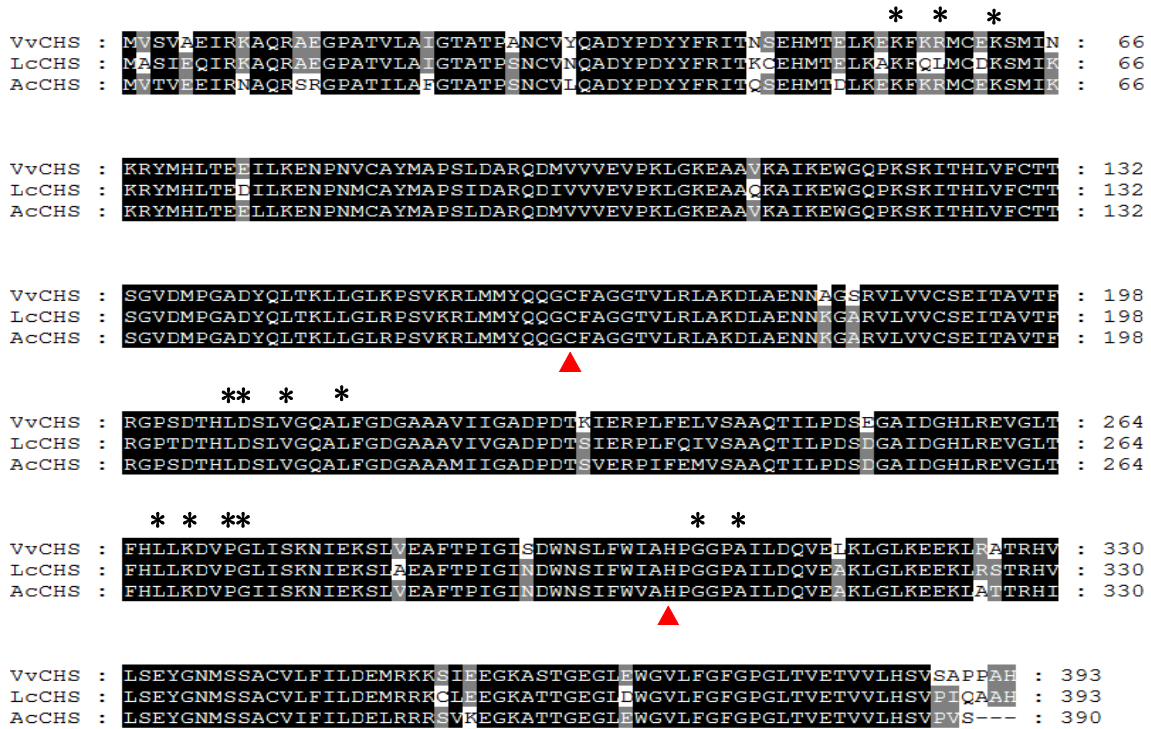


圖 8. 相思樹、荔枝及葡萄之查爾酮合成酶胺基酸序列分析比對。

Fig. 8. Amino acid sequence alignment of CHSs between *A. confusa*, *L. chinensis* and *V. vinifera*.

三個相同之保守性核苷酸以黑色為底，兩個相同則以灰色為底。Catalytic triad 以三角形於序列底部標示，與基質 Coenzyme A 結合相關的保守性胺基酸則以星號標示。

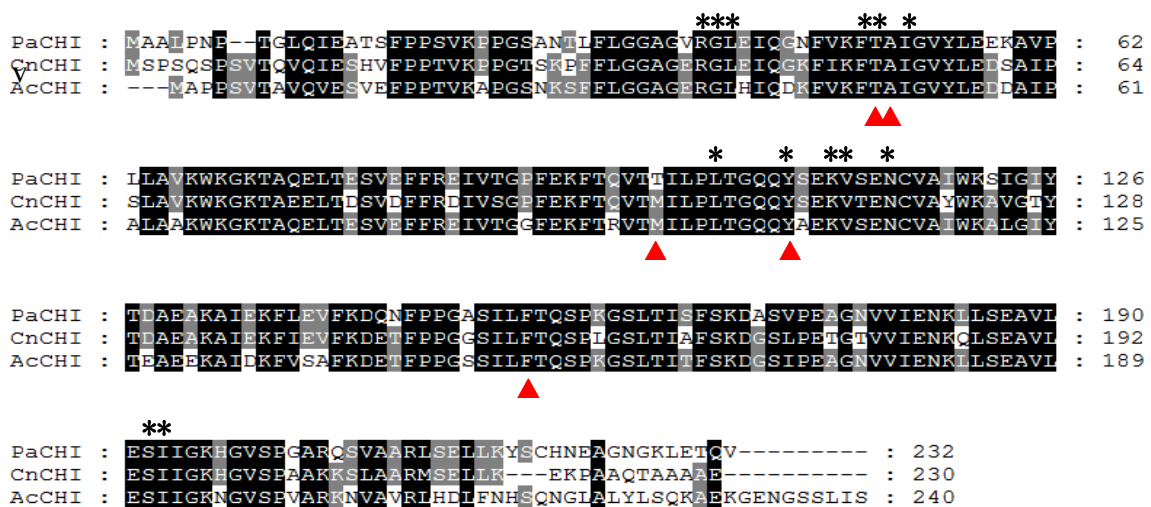


圖 9. 相思樹、歐洲甜櫻桃和金花茶之查爾酮異合酶胺基酸序列分析比對。

Fig. 9. Amino acid sequence alignment of CHIs between *A. confusa*, *C. nitidissima* and *P. avium*.

三個相同之保守性核苷酸以黑色為底，兩個相同則以灰色為底。(2S)-naringenin binding cleft 以星號標示，氫鍵網活性區 (Active site hydrogen bond network) 則以三角形於序列底部標示。

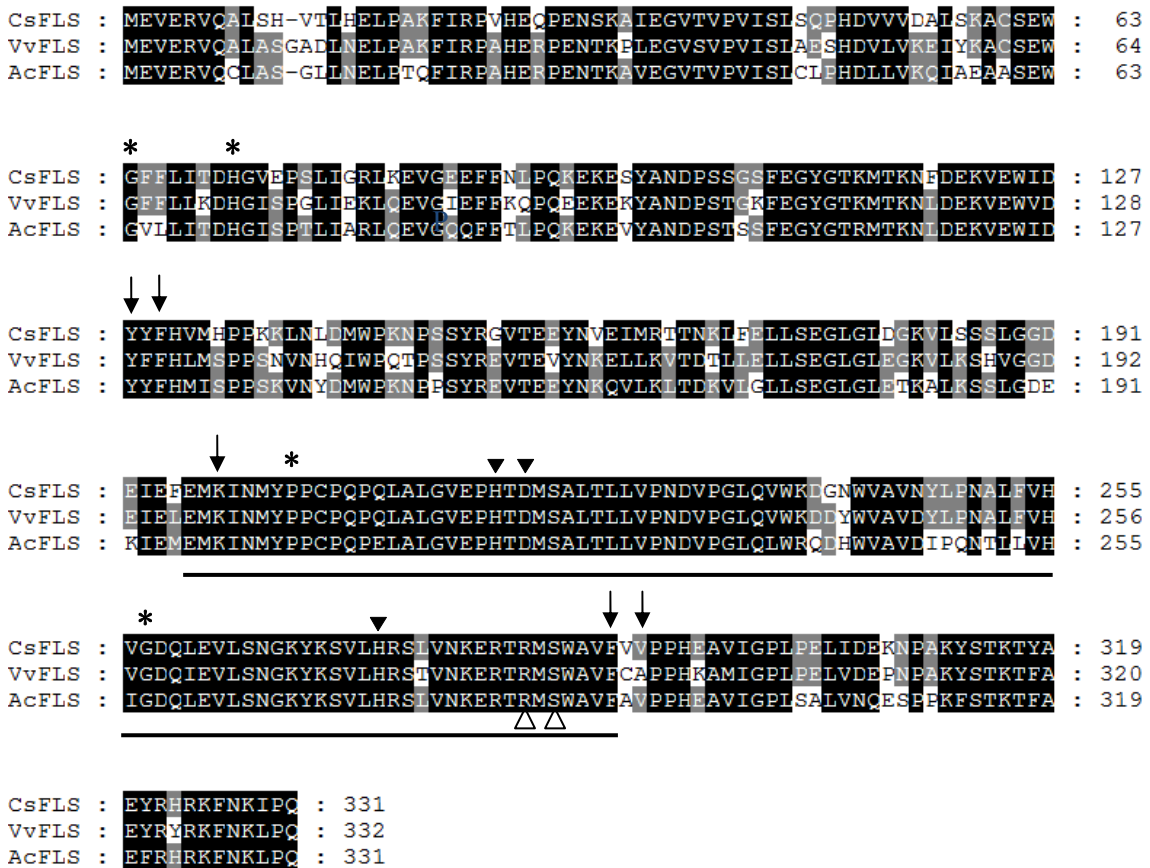


圖 10. 相思樹、葡萄與茶樹之黃酮醇合成酶胺基酸序列分析比對。

Fig. 10. Amino acid sequence alignment of FLSs between *A. confusa*, *V. vinifera* and *C. sinensis*.

三個相同之保守性核苷酸以黑色為底，兩個相同則以灰色為底。2-ODD 超級基因家族之保守性區域以黑色底線標示，與鐵離子結合相關之胺基酸以黑色倒三角形於序列上方標示，與 2-Oxoglutarate 結合相關之胺基酸以空心正三角形於序列下方標示，2-ODDs 之保守性胺基酸以星號標示，與基質結合相關的氨基酸則以箭頭標示。

4.2 演化樹分析

4.2.1 查爾酮合成酶

Yamazaki 等人 (2001) 將 CHS 超級家族基因分成 CHS、STS (Stilbene synthase)、BBS (Bibenzyl synthase)、BPS (Benzophenone synthase)、ACS (Acridone synthase) 以及 VPS (Valerophenone synthase) 六個分群。爲了探討 AcCHS 基因在 CHS 超級家族中的分群形態，在此將 AcCHS 與其它 19 種植物進行胺基酸序列比對，並以鄰近連接演化樹 (Neighbor-joining analysis) 分析其間的親緣關係。分析結果顯示：AcCHS 隸屬於 CHS 的分群內，並與葡萄的 VvCHS 具有最親近的的相似度 (89%) 及親緣關係 (圖 11)。進一步將此 21 個 CHS 超級家族基因序列之間的相似度作列表分析，得 CHS 分群內的相似度在 81%~96% 之間 (平均為 87%)，其中 AcCHS 與豆科草本植物的相似度在 81%~84% 之間，而與其他非豆科的木本 (以及一個木質藤本) 的相似度則較高，在 84%~89% 之間 (表 3、表 4)，顯示雖然相思樹屬豆科，但 AcCHS 仍與木本植物的相似度較高，爲同一演化分群。此外，AcCHS 與 STS 以及 BBS 的相似度分別在 70%~74% 以及 61%~64% 之間，而 AcCHS 與 BPS、ACS 以及 VPS 的相似度分別別為 59%，72% 以及 77%。

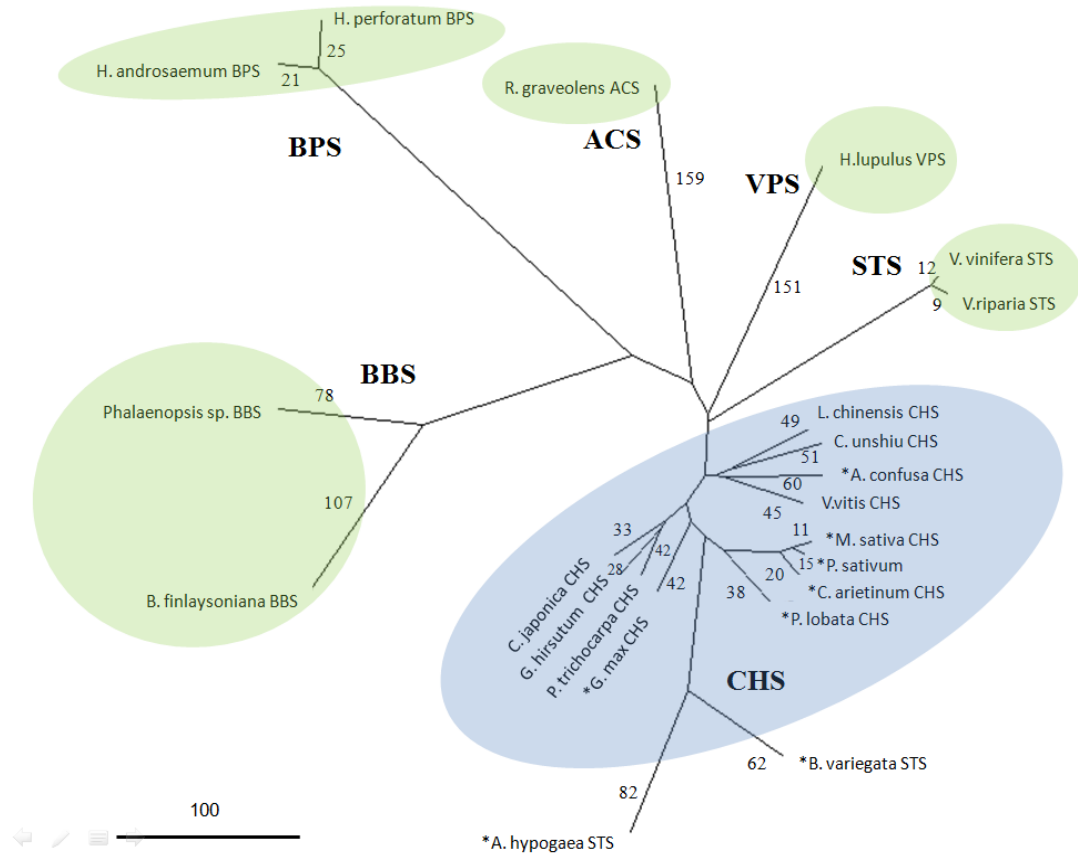


圖 11. CHS 超級家族的胺基酸序列演化樹圖。

Fig. 11. Phylogenetic tree based on amino acid sequences of CHS-superfamily enzymes. 以鄰近連接演化樹分析法，重複計算 (Bootstrap) 1000 次作演化樹分析。CHS: Chalcone synthase, STS: Stilbene synthase, BBS: Bibenzyl synthase, BPS: Benzophenone synthase, ACS: Acridone synthase, VPS: Valerophenone synthase。豆科植物學名以星號 (*) 標示。

表 3. AcCHS 以及其他植物 CHS 超級家族胺基酸序列相似度比對表。

Table 3. Amino acid sequence similarity between AcCHS and other CHS-superfamilies.

Ac: *A. confusa*, 1: *M. sativa*, 2: *G. max*, 3: *P. sativum*, 4: *P. lobata*, 5: *C. arientinum* 6: *V. vinifera*, 7: *L. chinensis*, 8: *C. japonica*, 9: *G. hirsutum*, 10: *C. unshiu* 11: *P. trichocarpa*, 12: *B. variegata*, 13: *A. hypogaea*, 14: *V. vinifera*, 15: *V. riparia*, 16: *B. finlaysonian*, 17: *P. sp. 'pSPORT1'*, 18: *H. androsaemum*, 19: *H. perforatum*, 20: *R. graveolens*, 21: *H. lupulus*

Identity Score (%)		CHS																													
		legume										non-legume										STS		BBS		BPS		ACS		VPS	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21									
CHS	Ac	81	84	81	83	81	89	88	85	86	87	84	74	70	74	74	61	64	59	59	72	77									
	1		88	97	91	96	84	81	86	87	82	86	79	76	70	71	61	63	57	56	70	72									
	2			87	91	87	87	86	90	89	87	88	80	77	75	75	61	63	58	57	71	72									
	3				90	95	84	81	85	86	82	86	79	76	70	71	61	63	57	56	70	72									
	4					91	85	83	87	86	86	86	79	78	72	72	61	64	57	57	69	72									
	5						83	80	87	87	82	86	78	76	70	71	61	64	56	56	69	71									
	6							89	89	90	88	88	75	72	76	76	60	64	60	59	73	76									
	7								86	86	90	83	73	71	76	76	59	63	58	59	73	76									
	8									93	87	92	78	74	74	74	60	62	59	59	71	74									
	9										86	93	78	75	74	74	60	63	60	59	71	74									
	10											85	75	73	76	76	60	64	60	60	74	75									
	11												77	74	74	74	60	62	58	57	70	73									
STS	12																85	66	67	56	60	65									
	13																	68	68	58	61	65									
	14																		97	57	60	69									
	15																			57	60	69									
BBS	16																				81	60									
	17																					53									
BPS	18																					55									
	19																					54									
ACS	20																					54									
																						65									

表 4. CHS 超級家族六個基因分群之相似度平均值。

Table 4. Similarity average of the six classes of CHS-superfamily genes.

	CHS	STS	BBS	BPS	ACS	VPS
CHS	87	75	62	58	71	74
STS		75	61	54	65	67
BBS			81	54	61	60
BPS				95	54	55
ACS					100	65
VPS						100

4.2.2 查爾酮異合酶

CHI 在植物中可分為兩類，其中 Type I CHI 僅以 6'-Hydroxychalcone 為基質，而草本豆科專屬的 Type II CHI 則可接受 6'-Deoxychalcone 及 6'-Hydroxychalcone 兩種基質 (Shimada *et al.*, 2003)。為探討 AcCHI 的分群形態，將 AcCHI 與其它 17 種植物 CHI 進行胺基酸序列比對，並以鄰近連接演化樹分析 AcCHI 與其它物種之間的親緣關係。分析結果顯示：AcCHI 隸屬於 type I CHIs 的分群內，並與豆科的百脈根 (*Lotus japonicus*) CHI 2 親緣關係最接近，兩者之胺基酸序列也是最相似的 (73%) (圖 12)。進一步將此 18 個 CHI 基因序列之間的相似度作列表分析，得 Type I CHI 之間的相似度在 53%~77%之間 (平均為 63 %)，而 Type II CHI 之間的相似度則於 61%~88%之間 (平均為 74 %)，而兩種類型之間的相似度平均低於 50% (表 5、表 6)。另外，AcCHI 與 Type I CHI 的相似度在 58%~73%之間，而與 Type II CHI 的相似度則於 42%~50%之間。

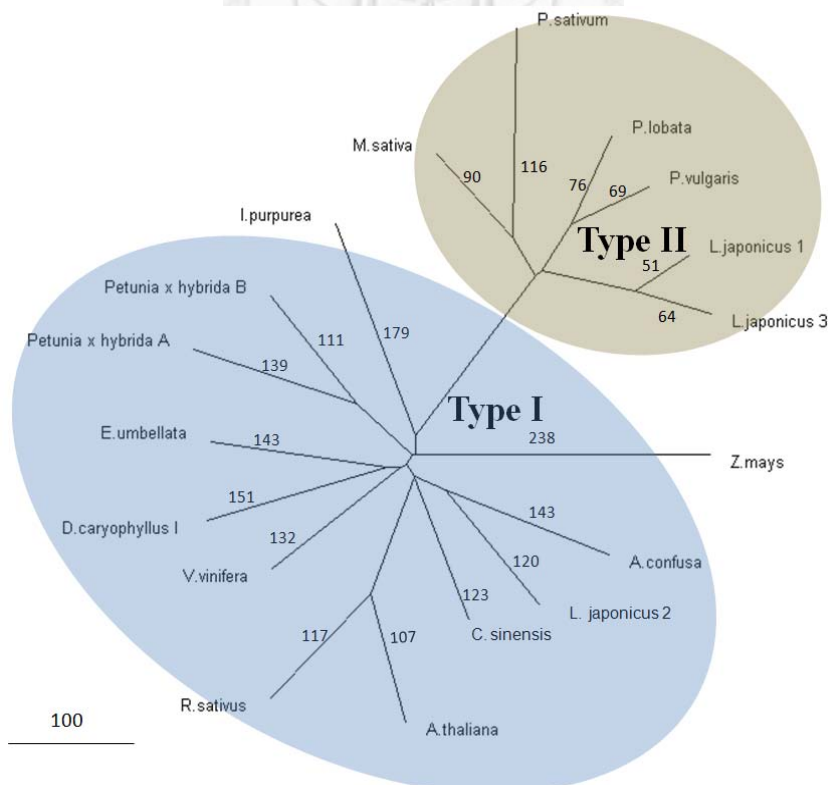


圖 12. AcCHI 與 type I CHIs 和 type II CHIs 演化樹圖。

Fig. 12. Phylogenetic tree based on amino acid sequences of Type I CHIs and Type II

CHIs.

表 5. AcCHI 以及其他植物的 CHI (Type I, Type II) 胺基酸序列相似度比對表。

Table 5. Amino acid Sequence similarity between AcCHI and other CHIs.

Ac: *A. confusa*, 1: *A. thaliana*, 2: *C. sinensis*, 3: *D. caryophyllus*, 4: *E. umbellate*, 5: *I. purpurea*, 6: *Petunia x hybrida_A*, 7: *Petunia x hybrida_B*, 8: *R. sativus*, 9: *V. vinifera*, 10: *Z. mays*, 11: *L. japonicus 2*, 12: *M. sativa*, 13: *P. lobata*, 14: *P. vulgaris*, 15: *P. sativum*, 16: *L. japonicus 1*, 17: *L. japonicus 3*

Identity	Type I CHI											Type II CHI						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Score (%)																		
Type	Ac	61	72	66	67	60	60	64	59	65	58	73	50	50	50	42	50	48
I	1		67	60	59	54	56	60	77	64	56	64	46	47	47	40	48	45
CHI	2			66	71	64	68	66	65	73	61	71	53	53	54	45	53	51
	3				70	65	62	65	59	70	59	65	54	53	52	46	52	51
	4					62	60	66	59	71	57	70	54	54	55	47	53	52
	5						58	66	53	65	56	67	52	53	55	46	52	50
	6							75	56	66	57	63	47	48	49	42	49	47
	7								58	69	57	64	52	53	53	46	52	50
	8									62	53	64	45	47	47	41	46	44
	9										61	71	52	52	53	45	50	49
	10											56	46	45	46	41	43	42
	11												51	53	52	43	51	49
Type	12													78	80	74	75	75
II	13														85	64	73	73
CHI	14															66	76	75
	15																61	63
	16																	88

表 6. Type I CHI 與 Type II CHI 之相似度平均值。

Table 6. Similarity average of Type I CHI and Type II CHI.

CHI	Type I	Type II
Type I	63.4	48.9
Type II		73.7

為了進一步檢驗 AcCHI 是否具備 Type I CHI 之特徵，於是另將 AcCHI 與阿拉伯芥(*A. thaliana*)和玉米(*Z. mays*)之 Type I CHI，以及其它三種豆科植物(*Phaseolus vulgaris*、*Pisum sativum* 和 *Lotus japonicas* (CHI 1)) 之 Type II CHI 進行胺基酸序列比對。由序列分析顯示(圖 13)，AcCHI 不但具有 Type I CHI 的保守性胺基酸(紅底標示)，而且依據 Shimada 等人(2003)所述的法則研判，其選擇基質之關鍵胺基酸為屬於 Type I CHI 的 Ser191 及 Ile192(底部以星號標示)，因此證實 AcCHI 為 Type I CHI。

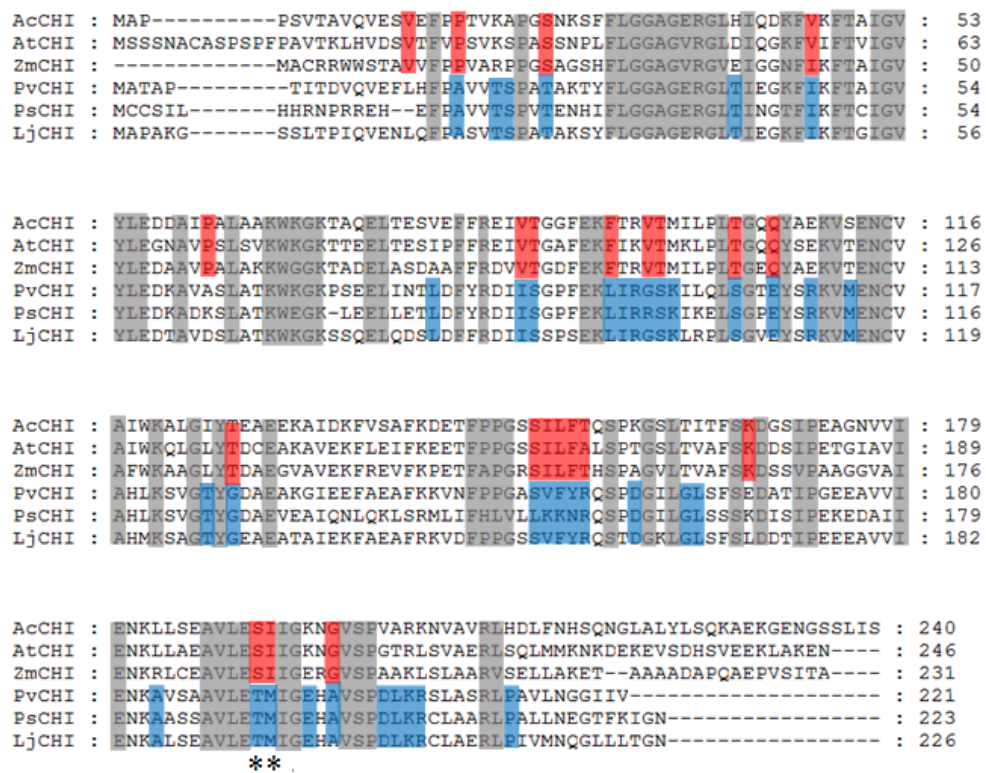


圖 13. *Acacia confusa* 之 CHI 與 Type I CHI [*A. thaliana* (P41088), *Z. mays* (Q08704)]、Type II CHI [*P. vulgaris* (P14298), *P. sativum* (P41089), *L. japonicas*(CHI 1) 1 (BAC53983)]之胺基酸序列比對。

Fig. 13. Amino acid sequence alignment between AcCHI, Type I CHIs and Type II CHIs. 其中 Type I CHI (紅色), Type II CHI (藍色) 以及兩個種類 CHI (灰色) 之保守性胺基酸以不同顏色標示 (Shimada *et al.*, 2003)。與選擇 6'-Deoxychalcone 或 6'-Hydroxychalcone 為基質之偏好性相關的胺基酸，其底部以星號標示。

4.2.3 黃酮醇合成酶

2-ODD 超級家族基因可分類為 *FLS* (Flavonol synthase), *AS* (Anthocyanidin synthase), *F3H* (Flavonone 3-hydroxylase), 以及 *FSI* (Flavone synthase I) 四個分群 (Ferreyra *et al.*, 2010)。為了探討 AcFLS 在 2-ODD 超級家族中的分群形態，將 AcFLS 與其它 20 個 2-ODD 超級家族進行胺基酸序列比對，並以鄰近連接演化樹分析 AcFLS 與其它物種之間的親緣關係。此外，前人研究中發現阿拉伯芥和葡萄各有 6 以及 5 個 FLS 族群，分別為 AtFLS1~6 以及 VvFLS1~5，在此亦探討 AcFLS 與它們之間的關係。分析結果顯示：(一) 由圖 14 (A) 的親緣關係圖可發現 AcFLS 基因坐落在 *FLS* 的分群內，並與葡萄 (*Vitis vinifera*) 的 FLS 親緣關係最相近，序列相似度也最高 (74%)。進一步將此 21 個 2-ODD 超級家族基因序列之間的相似度列表分析，得 FLS 之間的相似度在 47%~85% 之間 (平均為 58 %)，而 AcFLS 與其他 FLS 中的相似度則於 49%~74% 之間。此外，AcFLS 與 AS、F3H 以及 FSI 之相似度分別為 44%~45% 之間、28%~33% 之間以及 51% (表 7、表 8)。(二) 由圖 14 (B) 的親緣關係圖中可發現 AtFLS1~6 與 VvFLS1~4 各自形成一組群，而 AcFLS 與 VvFLS5 則另成一組群，由此顯示 AcFLS 與 VvFLS5 親緣關係最親近。此外，AcFLS 與 AtFLS 之相似度為 36%~51%，與 VvFLS 之相似度則高於 AtFLS 為 48%~74% (表 9)。

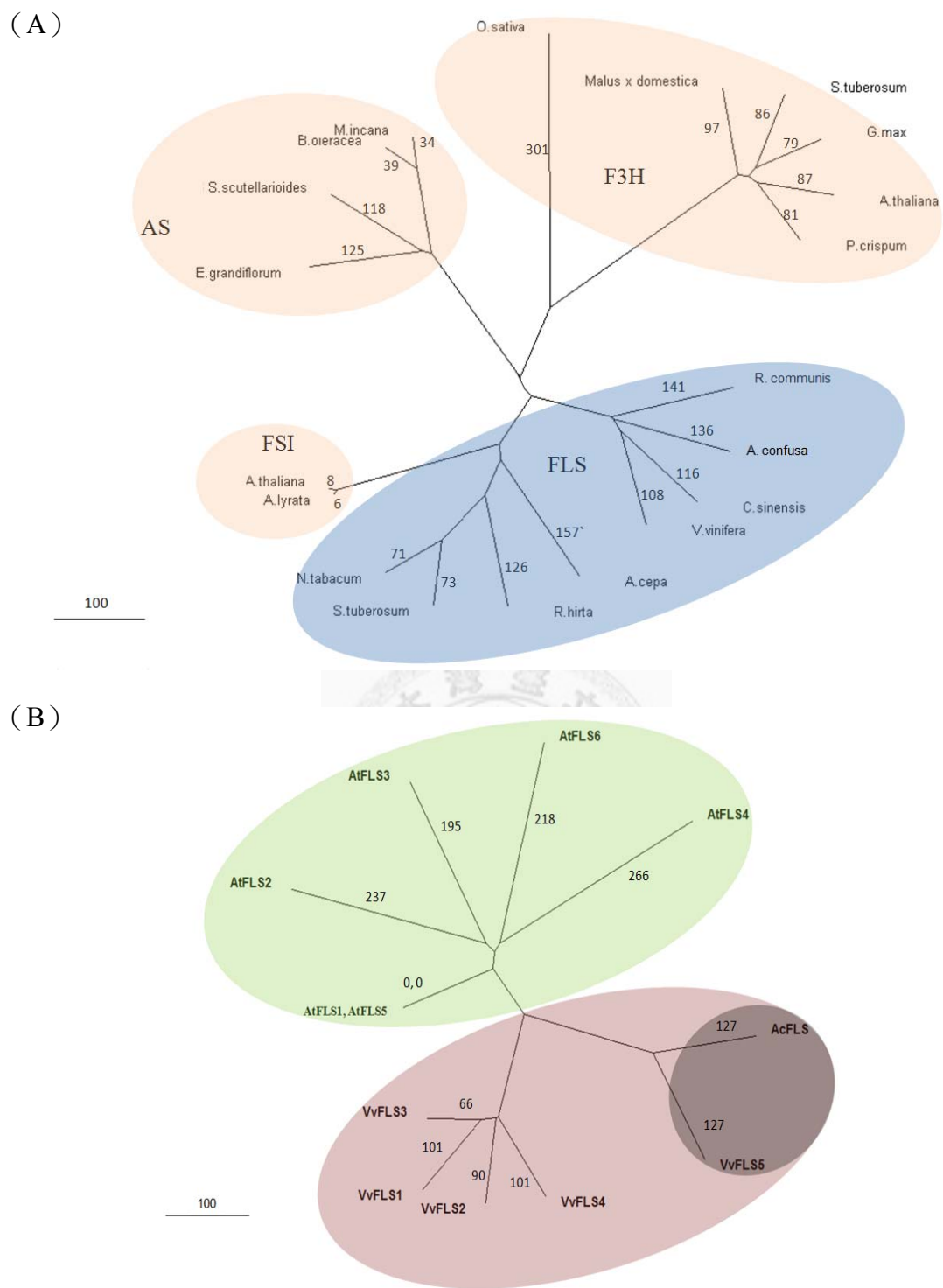


圖 14. AcFLS之演化樹圖分析。

Fig. 14. Phylogenetic analysis of AcFLS.

(A) AcFLS與黃酮類生合成途徑之2-ODD超級家族的演化樹圖。(B) AcFLS與AtFLS1~6以及VvFLS1~5之演化樹圖。FLS: Flavonol synthase, AS: Anthocyanidin synthase, F3H: Flavonone 3-hydroxylase, FSI: Flavone synthase I

表 7. AcFLS 以及 2-ODD 超基因家族之胺基酸序列相似度比對表。

Table 7. Amino acid Sequence similarity between AcFLS and other 2-ODD superfamilies.

Ac: *A. confusa*, 1-20: 1: *S. tuberosum*, 2: *C. sinensis*, 3: *R. communis*, 4: *A. cepa*, 5: *R. hirta*, 6: *N. tabacum*, 7: *V. vinifera*, 8: *E. grandiflorum*, 9: *S. scutellarioides*, 10: *B. oleracea*, 11: *M. incana*, 12: *S. tuberosum*, 13: *Malus x domestica*, 14: *A. thaliana*, 15: *G. max*, 16: *P. crispum*, 17: *O. sativa*, 18: *A. lyrata*, 19: *A. thaliana*

(a)

Identity Score (%)		FLS							AS				F3H					FSI		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
FLS	Ac	49	72	71	54	51	50	74	44	44	44	45	28	29	29	31	29	33	51	51
	1		49	48	66	46	85	51	37	41	37	39	26	27	25	26	27	33	63	63
	2			73	53	49	49	77	44	44	44	44	28	31	29	30	29	38	50	50
	3				51	51	48	73	43	44	44	44	27	29	28	30	29	38	50	50
	4					51	68	57	41	43	41	43	29	28	26	27	28	33	60	60
	5						47	50	44	44	43	45	29	31	27	31	29	34	46	46
	6							51	39	39	39	39	25	26	24	24	25	33	62	61
	7								44	45	45	44	30	31	29	31	30	37	51	51
	AS									75	73	74	27	28	27	27	26	29	41	41
											73	74	26	26	27	26	25	31	42	41
												92	25	26	26	27	25	31	41	41
													25	25	25	26	25	31	41	41
	F3H													80	81	83	79	31	30	29
															80	79	78	34	32	30
																82	83	32	30	28
																	80	33	30	30
																		36	31	31
																			35	34
	FSI																			98

表 8. 2-ODD 超基因家族四個分群之相似度平均值。

Table 8. Similarity average of the four classes of 2-ODD superfamily genes.

	FLS	AS	F3H	FSI
FLS	44.8	43	29	54
AS		77	32	41
F3H			65	31
FSI				98

表 9. AcFLS 與 AtFLS1~6 以及 VvFLS1~5 之胺基酸序列相似度比對表。

Table 9. Amino acid Sequence similarity between AcFLS, AtFLS 1~6, and VvFLS 1~5.

小框為 AcFLS 與 AtFLS1~6 以及 VvFLS1~5 之相似度平均值。Ac; *A. confusa*, At; *A. thaliana*, Vv; *V. vinifera*, PxH; *Petunia x hybrid*, Nt; *N. tabacum*

(b)

Identity	AtFLS						VvFLS					PxH	Zm
	Score	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	FLS
Ac	51	40	43	36	51	40	50	49	51	48	74	50	50
At	1	60	67	56	100	65	62	64	64	63	51	62	61
FLS	2		56	49	60	50	40	47	46	42	37	44	43
	3			51	67	56	47	50	49	50	42	51	52
	4				56	51	40	43	44	45	36	46	43
	5					65	62	64	64	63	51	62	61
	6						43	47	46	46	41	47	47
Vv	1							78	83	77	48	68	68
FLS	2								83	80	50	71	71
	3									81	53	73	71
	4										50	70	70
	5											53	51
PxHFLS													87

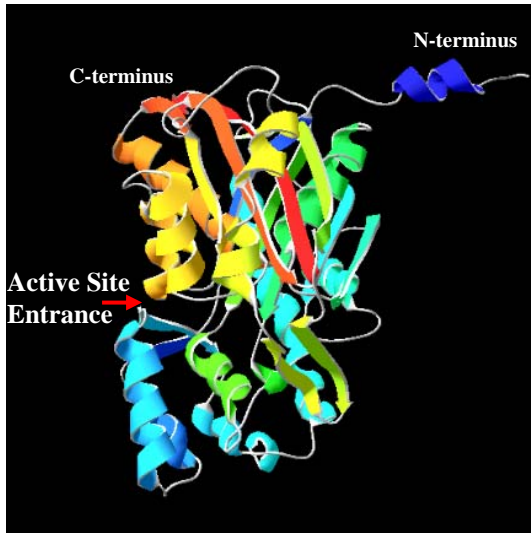
4.3 蛋白質結構預測

由 4.1.2 已知 AcCHS、AcCHI、AcFLS 的全長胺基酸序列分別為 389 aa、239 aa 以及 331 aa。在此利用 ExPASy Proteomics Server 預測此三基因之蛋白質分子量 (Molecular weight, M_w) 以及等電點 (Isoelectric point, pI)。所獲分子量由大到小依序排列為 CHS (43 kDa)、FLS (38 kDa) 以及 CHI (26 kDa)，而 CHS 之 pI 值為 6.18，FLS 和 CHI 則一樣為 5.74。另外，使用 SWISS protein structure prediction server 預測 AcCHS、AcCHI、AcFLS 之蛋白質立體結構，以所獲得的 PDB ID 到 PDB 資料庫 (RCSB protein data bank) 比對，搜尋各自構型相似的蛋白質。結果顯示，AcCHS 與紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 之 CHS (PDB ID: 1CML) 蛋白質結構相似，兩者胺基酸序列相似度為 81.5%；AcCHI 與紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 之 CHI (PDB ID: 1EYP) 相似，兩者序列相似度為 50.9%；而 AcFLS 則與阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 之 Anthocyanidin synthase 花青素合成酶 (PDB ID: 1GP5)

相似(Wilmouth *et al.*, 2002), 兩者序列相似度為 42.9%。三者序列相似度之 E-value 皆小於 1。

從立體結構中可看出, CHS 主要由 13 個 α -helices、12 個 β -sheets 以及許多連接線圈 (Connecting loops) 所組成; 而 CHI 主要由 8 個 α -helices、11 個 β -sheets 以及連接線圈組成; FLS 則由 11 個 α -helices、17 個 β -sheets 以及連接線圈所組成。在圖 15A1 及圖 16A1、B1 中, 蛋白質結構之顏色變化由紅、橙、黃、綠、藍至靛, 依序表示序列由 N 端至 C 端。於圖 15A1 可發現 AcCHS 具有一個基質 CoA 鍵結的活性區入口 (紅色箭頭所示), 由蛋白質的立體透視圖 (圖 15A2 及圖 16A2、B2) 則可預測基質 Malonyl-CoA 和產物 Chalcone (圖 15A2、A4 中以產物類似物——Naringenin 顯示其位置) 在蛋白質活性區域內鍵結之位置, 圖中以柱狀骨架 (全色) 標示反應基質或產物, 並以立體球形標示二價離子。AcCHS 與 Malonyl-CoA 鍵結的活性區, 主要胺基酸包括 Lys₅₅, Arg₅₈, Lys₆₂, Phe₂₆₅ 以及 Ala₃₀₈; 而與 Chalcone 鍵結的活性區, 則包括 Cys₁₆₄, Phe₂₁₅, Phe₂₆₅, His₃₀₃ 以及 Asn₃₃₆。另外, AcCHI 與產物 (2S)-Naringenin 反應之氫鍵網活性區, 主要胺基酸有 Thr₄₉, Ala₅₀, Met₉₈, Tyr₁₀₇ 以及 Phe₁₅₃。而在 AcFLS 的構型中, 包含了與基質 Dihydroquercetin 鍵結之胺基酸——Tyr₁₂₈, Phe₁₃₀, Lys₁₉₈, Phe₂₈₉ 以及 Val₂₉₁, 結合鐵離子之 HxDx_nH motif 以及結合了 2-OG 之 RxS motif。此外, 2-ODD 超級基因家族之保守性區域則示以黃色 (圖 16B2, B3)。

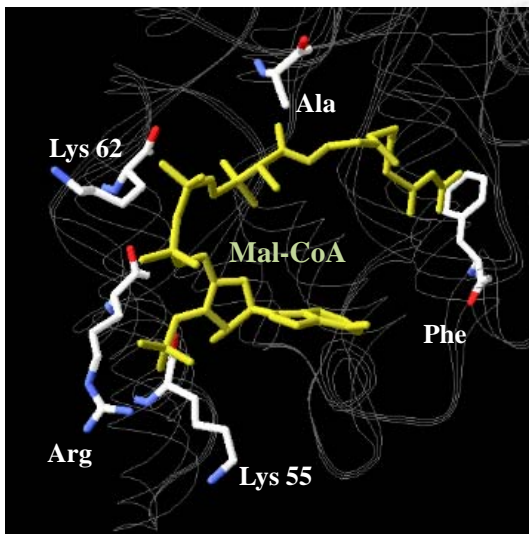
A1



A2



A3



A4

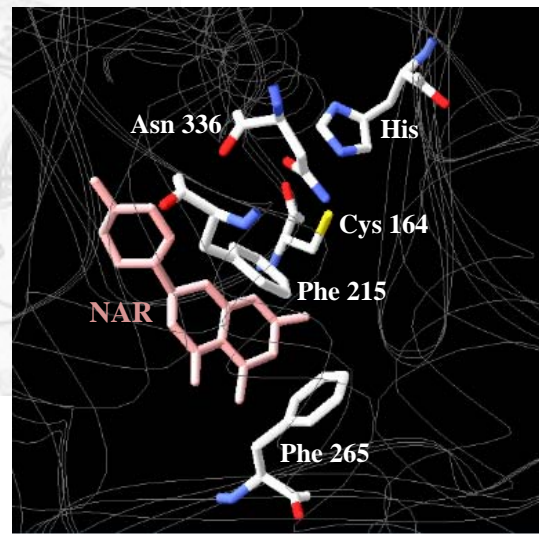


圖 15、AcCHS 之預測蛋白質立體模型。

Fig. 15. Homology model of AcCHS protein structure.

A1 為 AcCHS 之蛋白質立體結構，顏色變化由紅、橙、黃、綠、藍至靛，表示序列 N 端至 C 端。A2 為 AcCHS 之反應基質 Mal-CoA 以及產物類似物 NAR 的預測位置。A3、A4 為分別放大基質與產物類似物之預測鍵結位置。基質、產物類似物以及活性區胺基酸皆以柱狀骨架顯示。Mal-CoA: Malonyl-CoA (黃色)，Nar: Naringenin (粉紅色)。

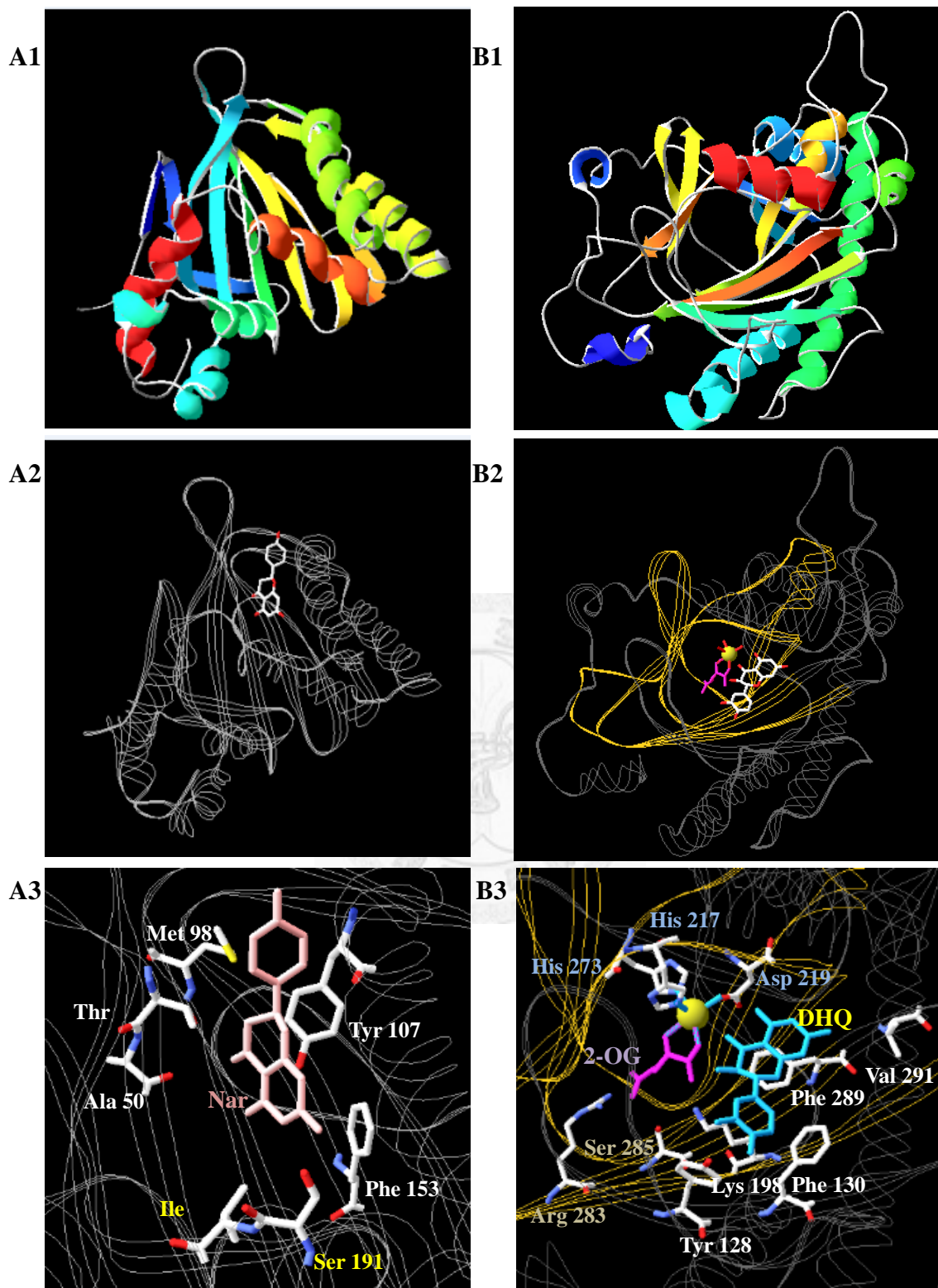


圖 16、AcCHI 與 AcFLS 之預測蛋白質立體模型。

Fig. 16. Homology model of AcCHI and AcFLS protein structure.

圖 16、(A1、B1) 蛋白質立體結構 (A2、B2) 分別為 AcCHI 之產物 Nar 以及 AcFLS 之基質 DHQ 的預測位置。(A3、B3) 為分別放大活性區之預測鍵結位置，其中相關基質、輔助分子 (2-OG) 以及活性區胺基酸皆以柱狀骨架顯示，而鐵離子則以黃色小球標示。Nar: Naringenin (粉紅色), DHQ: Dihydroquercetin (藍色), 2-OG: 2-Oxoglutarate (紫色)。

4.4 重組蛋白表現

本實驗使用 Histidine tag (His-tag) 蛋白質融合系統，將 *AcCHS* 以及 *AcFLS* 分別建構在表現載體 pET-21a (+)，然後轉型至大腸桿菌 (*E. coli* BL21) 進行大量蛋白質表現。利用蛋白質上的 Histidine tag 能與過渡金屬鎳 (Nickel, Ni) 結合之特性，進行蛋白質純化。由於各類蛋白質與鎳之間的結合有不同之緊密度，利用不同濃度之 Imidazole- 30 mM, 50 mM, 100 mM, 以及 250 mM, 可將蛋白質流洗出來。最後，將不同濃度 Imidazole 流洗下來的蛋白質進行聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 以及西方墨點試驗 (Western blot) 加以分析。先前已知 *AcCHS* 與 *AcFLS* 之蛋白質預測大小分別為 43 kDa 以及 38 kDa, 由圖 17 可見 Imidazole 濃度 100 mM 為兩個目標蛋白質之最佳流洗濃度。在大量表現蛋白質的條件測試中，分別檢測了 37°C 及 20°C 兩個不同的溫度下，並加入濃度分別為 0.1 mM, 0.4 mM 及 1 mM 的 IPTG, 然後分別於 3 hr 及 20 hr 後收取並離心。最後在這些試驗當中，測得 *AcCHS*、*AcFLS* 之溫度與時間最適條件皆為 20°C, 20 hr, 而 IPTG 之濃度則分別為 1 mM 以及 0.1 mM。經過大量表現獲得 *AcFLS* 之純化蛋白質後，接下來進入蛋白質定性實驗，進行活性反應。

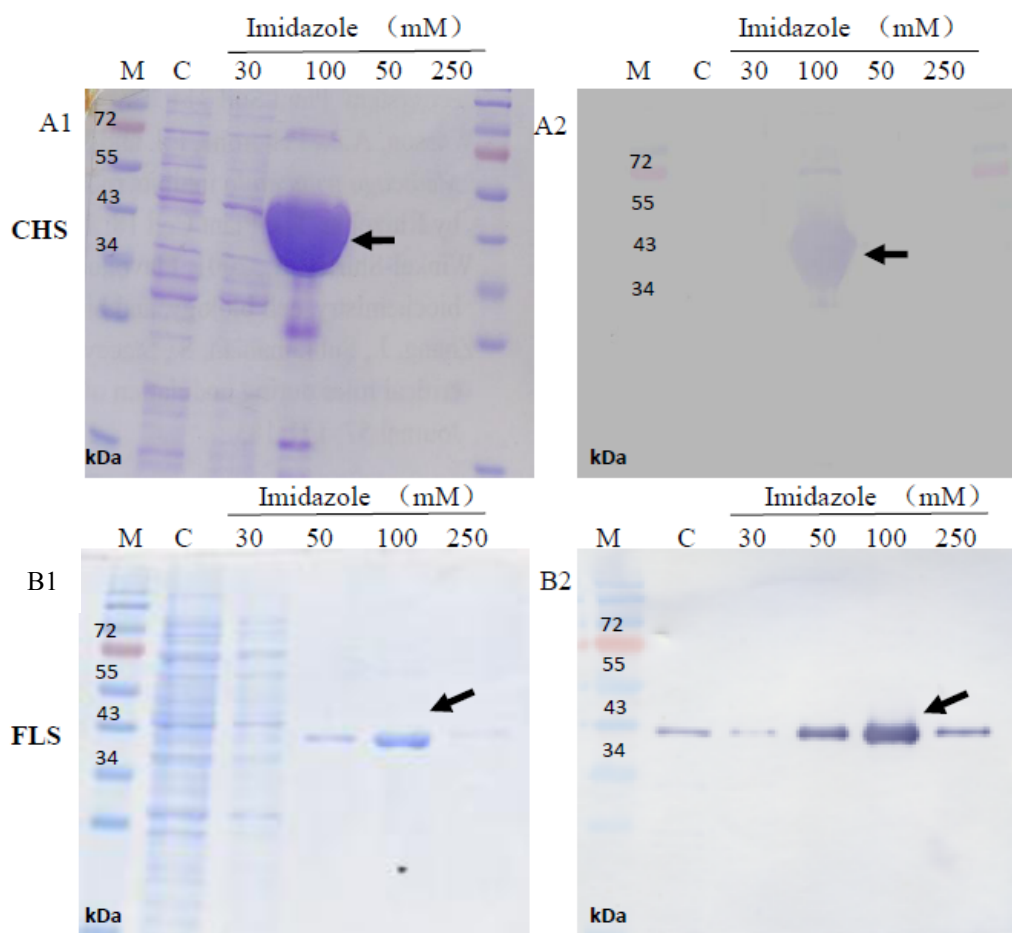


圖 17. AcCHS 與 AcFLS 之 SDS-PAGE 以及 Western blot 結果分析圖。

Fig. 17. SDS-PAGE and Western blot analysis of AcCHS and AcFLS.

(A1, B1) AcCHS 與 AcFLS 經不同濃度之 Imidazole 純化之聚丙烯醯胺膠體電泳分析圖。(A2, B2) 西方墨點試驗反應圖。箭頭所示為別為 AcCHS 以及 AcFLS 所在位置。M: Protein marker, C: Crude protein。

4.5 蛋白質反應與產物定性

AcFLS 經純化之後，每 250 ml 之菌液總共可獲 625 μg 的目標蛋白質，再分別施加基質二氫楊梅素、二氫檫皮素、柚皮素，於溫度 25 $^{\circ}\text{C}$ 體外反應 1 小時。反應總體積為 250 μl ，蛋白質用量為 75 μg 。控制組則以蛋白質之置換緩衝溶液 (Replacing buffer) 取代蛋白質。反應結束後，黃酮類之萃取物以 HPLC 做分析，其結果顯示 AcFLS 具備將此三種基質各自轉變成楊梅素(圖 18)、檫皮素(圖 19) 以及山奈醇之功能(圖 20)，並計算獲得基質轉換率分別為 68.9%，67.0%以及 72.8%。

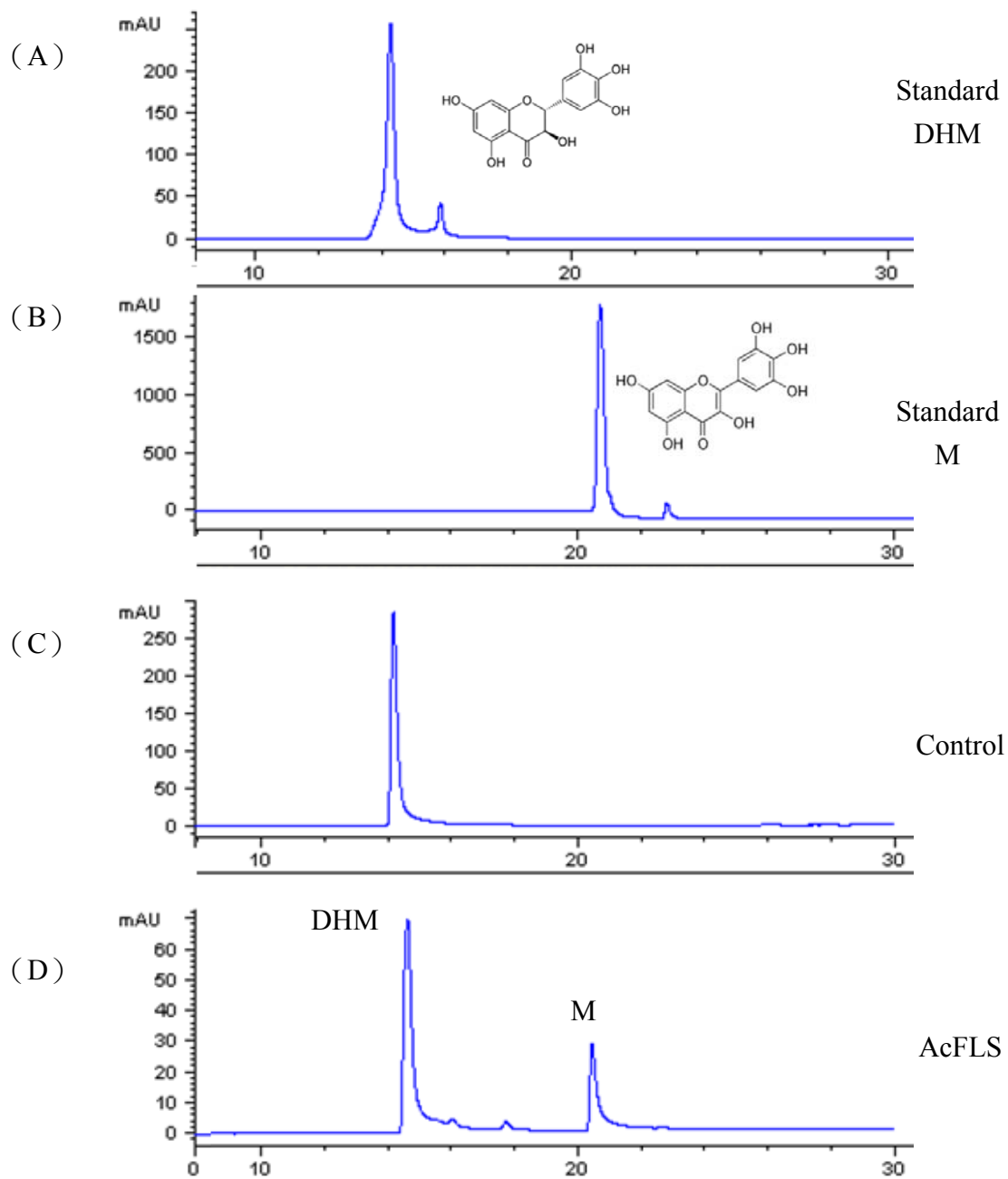


圖 18. 以 HPLC 檢測 AcFLS 催化基質二氫楊梅素之酵素反應分析。

Fig. 18. HPLC analysis of dihydromyricetin reaction product with AcFLS.

(A) DHM 標準品 (B) M 標準品 (C) 未加酵素之控制組 (D) 添加 AcFLS 之反應試驗，DHM 與 M 分別以波長 280 nm 以及 368 nm 偵測。DHM: Dihydromyricetin; M : Myricetin。

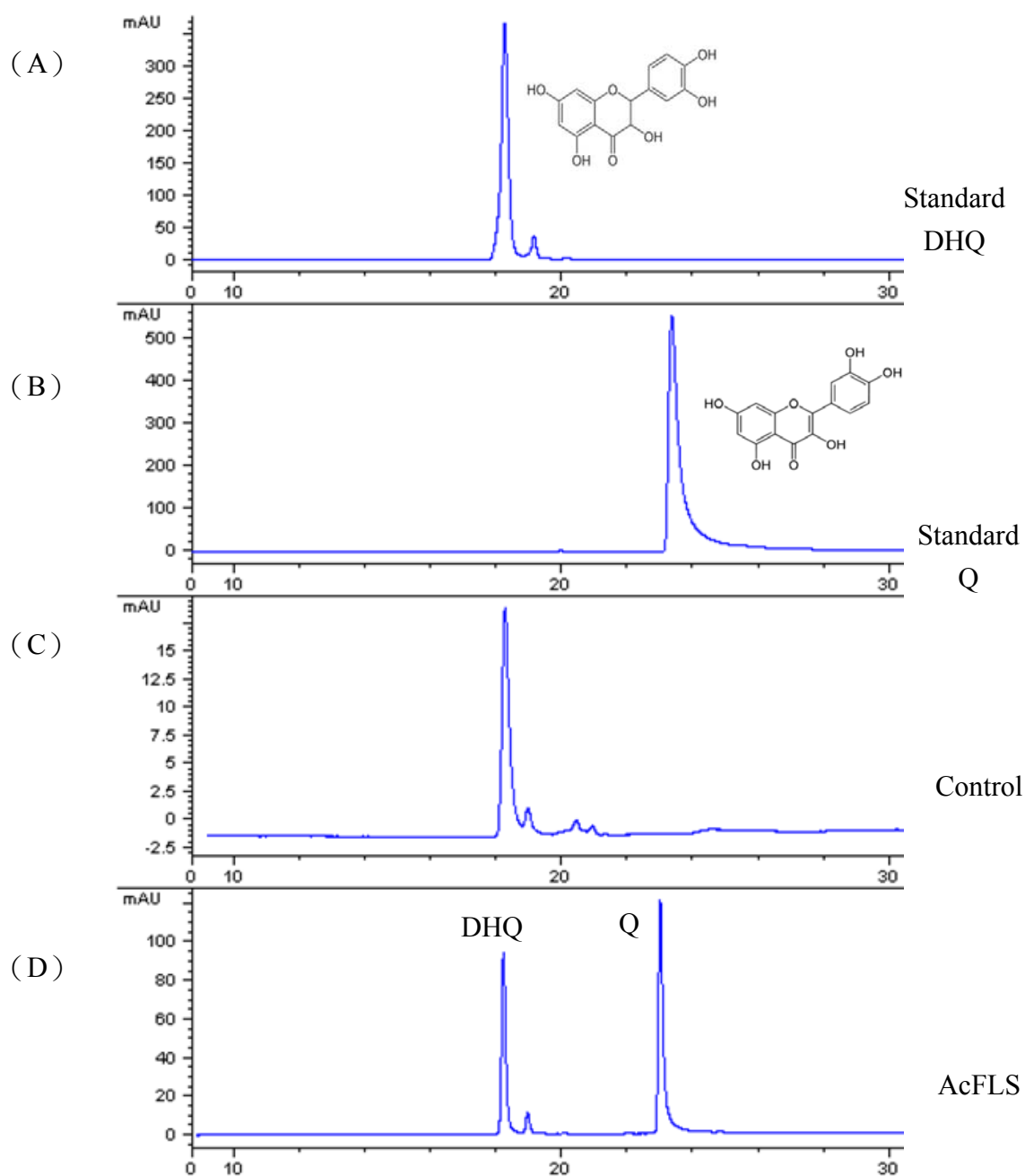


圖 19. 以 HPLC 檢測 AcFLS 催化基質二氫槲皮素之酵素反應分析。

Fig. 19. HPLC analysis of dihydroquercetin reaction product with AcFLS.

(A) DHQ 標準品 (B) Q 標準品 (C) 未加酵素之控制組 (D) 添加 AcFLS 之反應試驗, DHQ 與 Q 分別於波長 280 nm 及 368 nm 偵測。DHQ: Dihydroquercetin; Q : Quercetin。

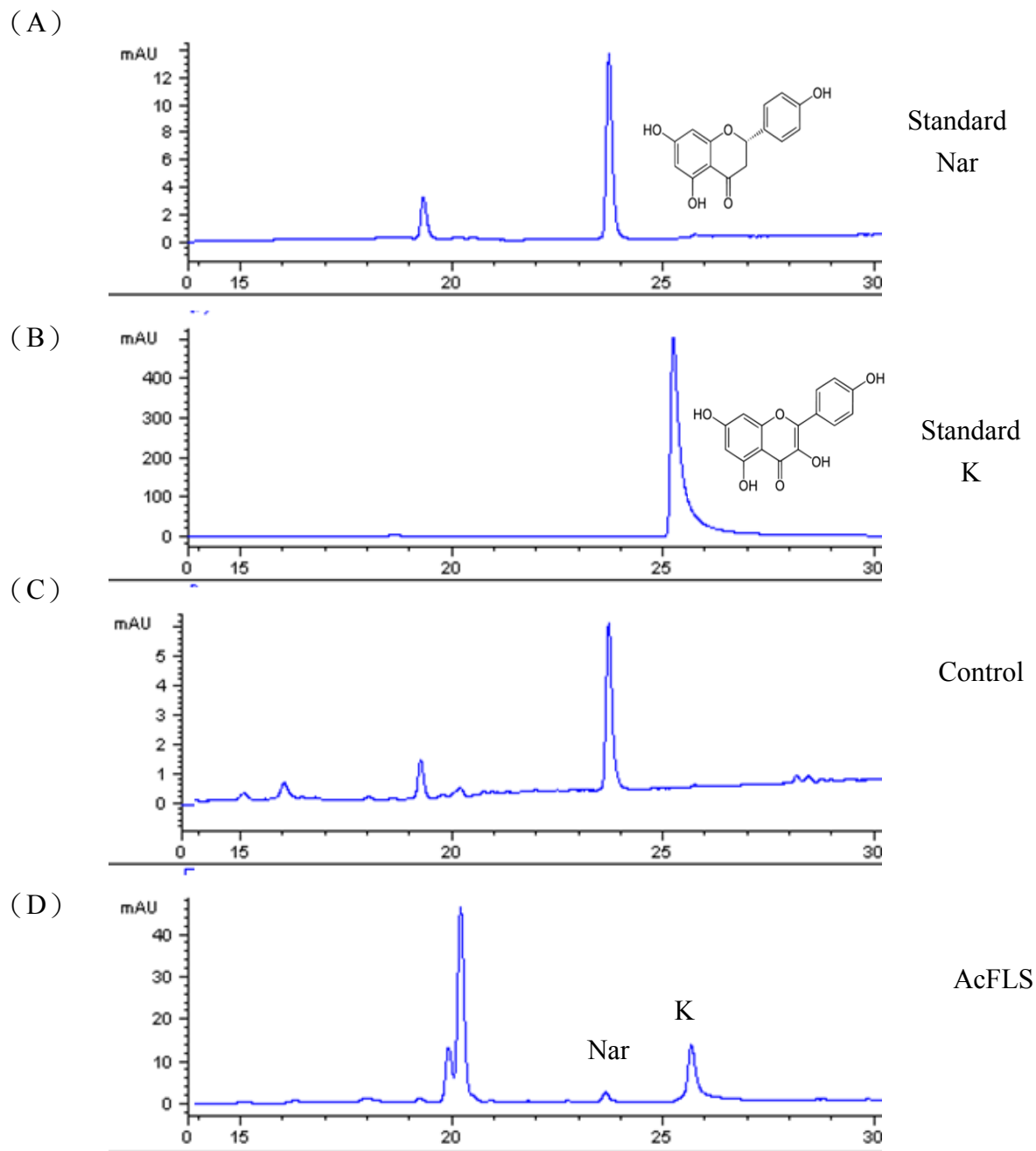


圖 20. 以 HPLC 檢測 AcFLS 催化基質柚皮素之酵素反應分析。

Fig. 20. HPLC analysis of naringenin reaction products with AcFLS.

(A) N 標準品 (B) K 標準品 (C) 未加酵素之控制組 (D) 添加 AcFLS 之反應試驗，Nar 與 K 皆於 368 nm 偵測。N：Naringenin; K: Kaempferol。

表 10、AcFLS 的基質轉換率。

Table 10. Substrates transformation rate of AcFLS.

Substrate	Blank	AcFLS	B-FlsS/B(%)
Naringenin	121.9	33.2	72.8
Dihydroquercetin	4960.7	1635.4	67.0
Dihydromyricetin	4709.6	1463.2	68.9

4.6 *AcCHS*、*AcCHI*、*AcFLS* 在相思樹不同組織之轉錄表現

將 *AcCHS*、*AcCHI*、*AcFLS* 此三個基因的 3'端非轉譯區 (3' Untranslated region, 3'UTR) 各設計一對 RT-PCR 專用引子，並從三十年生相思樹之葉、花、細枝、樹皮及邊材部五個部位，和 1.5 年生相思樹小苗之葉、莖、根三個部位抽取 RNA，然後做反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription-PCR, RT-PCR) 檢測。其中，以相思樹的連續性表現基因——*Actin*，作為內部控制組 (Internal control)。由 RT-PCR 分析結果，可發現相思樹小苗的葉組織，其 *AcCHS*、*AcCHI* 和 *AcFLS* 表現量較多於其他兩個部位 (圖 21A)。在相思樹成齡樹的花其 *AcCHS*、*AcCHI* 和 *AcFLS* 皆較為明顯的表現。而樹皮組織之 *AcCHI* 及 *AcFLS* 皆有次於花的表現反應 (圖 21B)。在同樣的增幅循環數之下，*AcCHS* 的表現量在所有的組織內普遍偏低。

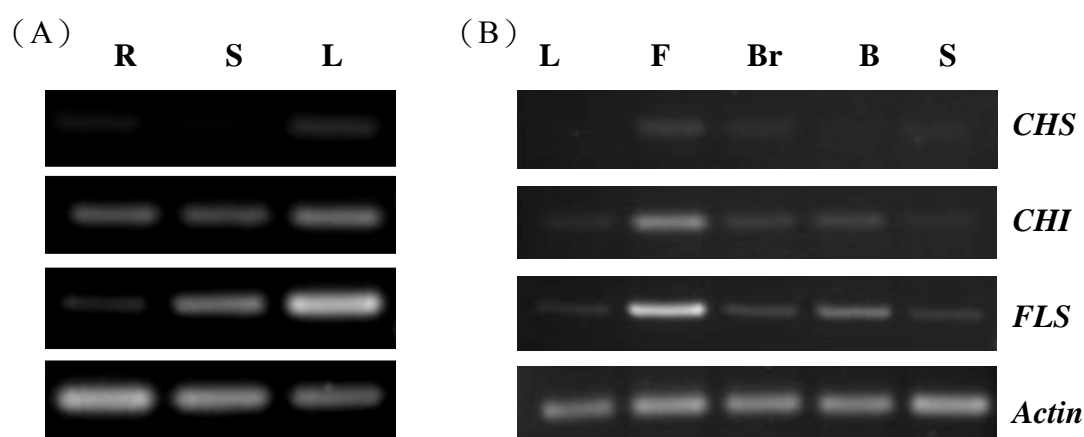


圖 21. *AcCHS*、*AcCHI* 和 *AcFLS* 於不同組織之 RT-PCR 結果。

Fig. 21. RT-PCR analysis of *AcCHS*, *AcCHI* and *AcFLS* gene expressions in different tissues (or organ) of *A. confusa*.

AcCHS、*AcCHI* 和 *AcFLS* 在 (A) 相思樹小苗不同組織以及 (B) 相思樹成齡樹不同組織 (或器官) 之 RT-PCR 試驗結果，以 *Actin* 基因作為內部控制組。R：根；S：莖；L：葉片；F：花；Br：枝條；B：樹皮；S：邊材

4.7 *AcCHS*、*AcCHI*、*AcFLS* 在相思樹葉片創傷處理之轉錄表現

本試驗採用五年生的相思樹葉片做創傷處理，並測試局部創傷反應 (Local wounding response) 之 *AcCHS*、*AcCHI* 和 *AcFLS* 表現量，並以相思樹的連續性表現基因 *Ubiquitin* 作為內部控制組。其中局部創傷反應測試時間點為 0、6、12、24 小時，而多重創傷反應則為 0、6、12、18、24 小時。由 RT-PCR 電泳膠體分析結果，得知在局部創傷反應中，*AcFLS* 於第 6 個小時的表現量達到高峰，到第 12 小時逐漸下降，至第 24 小時已恢復正常。而 *AcCHI* 也有類似的反應模式，但第 6 及 12 小時的表現兩差異不大，至第 24 小時已恢復正常。雖然此中 *AcCHS* 的表現量相當一致，但 *CHS* 的表現量較低，增幅的次數需增加至 31 個循環數，才可探測其表現情形 (圖 22)。另外在同一株創傷植株上取未傷葉做為對照組，其結果顯示 *AcFLS* 表現量並沒有起伏明顯的變化。

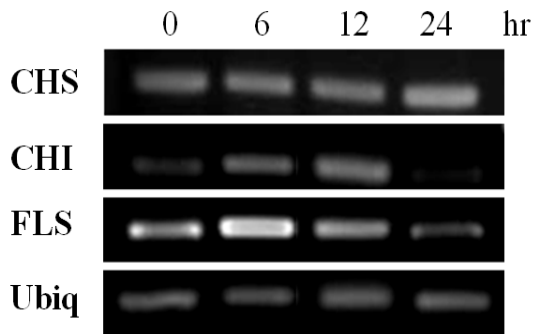


圖 22. *AcCHS*、*AcCHI* 和 *AcFLS* 於局部創傷反應以之 RT-PCR 試驗結果。以 *Ubiquitin* 基因作為內部控制組。

Fig. 22. RT-PCR analysis of *AcCHS*, *AcCHI* and *AcFLS* gene expressions after wounding treatment. *Ubiquitin* is used as internal control.



伍、討論

5.1 AcCHS、AcCHI、AcFLS 之功能性保守序列。

CHS 屬於植物之 Type III PKS 超級基因家族，而 AcCHS 之序列具有此 PKS 的高保守性活性區胺基酸，即 Cys₁₆₄-His₃₀₃-Asn₃₃₆ (Catalytic triad)。根據前人研究顯示，其功能為催化基質 *p*-Coumaroyl-CoA 及 Malonyl-CoA 延長 (Elongation) 與環化作用 (Cyclization)。在這個過程當中，活性區之 Cys₁₆₄ 會以共價鍵的方式與中間產物結合，直到四聚酮中間產物 (Tetraketide intermediate) 形成後才分離 (Ferrer *et al.*, 1999)。此外 AcCHS 尚具有 13 個與 Coenzyme A 結合相關的保守性胺基酸，能與基質 Coenzyme A 結合，固定這些基質在活性區中的位置。

AcCHI 具有 CHI 氫鍵網活性區的主要特徵，其功能為環化基質 Chalcone 以產生 (2*S*)-Naringenin。水分子在這個過程中提供氫鍵，並於基質結合區下方形成一個氫鍵網，而反應基質則位於水分子中。根據 Jez 等人 (2000) 分析豆科苜蓿的 CHI (豆科專屬的 Type II CHI) 蛋白質結晶構造，認為氫鍵網活性區主要由 5 個胺基酸——Thr₄₈, Ala₄₉, Lys₉₇, Tyr₁₀₆, Tyr₁₅₂ 所組成，然而相思樹的 AcCHI 在同樣的序列位置上，只有 Thr₄₉, Ala₅₀ 和 Tyr₁₀₆ 是相同的，而 Lys₉₇ 和 Tyr₁₅₂ 分別為 Met₉₈ 和 Phe₁₅₃ 所取代，此外，經進一步的序列分析發現 AcCHI 之 Met₉₈ 和 Phe₁₅₃ 在 Type I CHI 中為保守性序列，因此推測 Met₉₈ 和 Phe₁₅₃ 可能為 Type I CHI 氫鍵網活性區的一個特徵，雖然實際機制仍需進一步驗證，但由此顯示 AcCHI 並非豆科專屬的 Type II CHI。另外，AcCHI 亦具有 13 個保守性胺基酸組成的 (2*S*)-Naringenin binding cleft，而這些保守性胺基酸當中包括了 Ser₁₉₁ 及 Ile₁₉₂，根據前人研究推測 Ser₁₉₁ 及 Ile₁₉₂ 可能是決定 Type I CHI 接受不同基質的關鍵因子，而 Type II CHI 在對應的位置上之關鍵因子則是 Thr₁₉₀ 及 Met₁₉₁ (Jez *et al.*, 2000)，由此亦可證實 AcCHI 為 Type I CHI 而不是 Type II CHI。

AcFLS 明顯具有三項 2-ODD (2-Oxoglutarate- and Fe (II) -dependent dioxygenases) 家族的特徵，其中包括與鐵離子之結合非常重要的 HxD_xnH motif，與 2-OG 結合相關之 RxS motif 以及其他四個與蛋白質構型正確折疊有關的 2-ODDs 保守性胺基酸——Gly₆₄、His₇₁、Pro₂₀₃、Gly₂₅₇ (Wellmann *et al.*, 2002)。此外，AcFLS 尚具有五個與基質 Dihydroflavonols 結合相關的胺基酸——Tyr₁₂₈、Phe₁₃₀、Lys₁₉₈、Phe₂₈₉ 以及 Val₂₉₁，與 Chua 等人 (2008) 於阿拉伯芥中驗證到的五個稍有不同，其中 Tyr₁₂₈ 和 Val₂₉₁ 等同的位置上分別被替代為 His 以及 Glu，而另三個則為相同。

透過由阿拉伯芥的 AtFLS 點突變試驗得知，若 HxD_xnH motif 中任何一個胺基酸受到改變，無論是由性質相同或不同的胺基酸替換，都會造成此蛋白質喪失活性。此外，若 RxS motif 中的 Arg 受到改變時，亦會造成活性喪失，但 Ser 替換成性質相同的 Thr 時，則可保留將近一半的活性 (Chua *et al.*, 2008)。另外，據前人在探討 2-ODD 的四個保守性胺基酸 (Gly₆₄, His₇₁, Pro₂₀₃, Gly₂₅₇) 的功能性時，證實 Gly 對蛋白質構型之正確摺疊具有相當大的影響力 (Lukačič and Britsch, 1997, Wellmann *et al.*, 2002)。同樣是在 Chua 等 (2008) 的研究中，他們發現五個與基質結合相關的胺基酸 (His₁₃₂, Phe₁₃₄, Lys₂₀₂, Phe₂₉₃, Glu₂₉₅) 中，除了 His 之外，其他四個若受到改變則會造成活性驟減或減半的結果。特別的是，當 His 換成 Phe 時活性不減反增；當換成 Tyr 時 (即與相思樹 AcFLS 相同)，則尚能保留 83% 的活性。此外，這組實驗發現當 Glu₂₉₅ 被替換為性質不同的 Leu 時，AtFLS 蛋白質活性將近喪失，驟減至原來的 7%，而在相思樹的 AcFLS 中此 Glu 位置上的胺基酸亦由性質不同的 Val 所取代，為了探討 AcFLS 之活性是否將如前人研究所示而近於喪失，本研究後續將藉由蛋白質結構，推測 AcFLS 的活性區中尚有其他胺基酸可以補足這個缺憾。

5.2 AcCHS、AcCHI、AcFLS 之親緣關係分析

查爾酮合成酶 (Chalcone synthase, CHS) 是調控黃酮類生合成途徑中的第一個合成酶，主要產物為查爾酮，屬於 CHS 超級家族基因。由演化樹圖分析中可發現，CHS 自成一組相似度很高的分群，而相思樹、葡萄和荔枝的 CHS 再獨立形成一個亞分群。由此可見，CHS 的演化分歧點首先出現於草本和木本（及木質藤本）之間，然後豆科草本再進一步演化出具豆科特色的 CHS。因此，AcCHS 與木本植物（荔枝）和木質藤本植物（葡萄）之 CHS 演化關係比起豆科草本更為親近。此外，無論是親緣樹圖或是相似度比對表，兩者皆顯示 CHS 與 STS 親緣關係最為相近。STS 和 CHS 的共同點為它們都可以將 3 個 Malonyl-CoA 的醋酸分子與 4-Coumaroyl-CoA 按次第一步一步地縮合成四聚酮中間產物；而兩者相異之處在於各自具有不同的環化系統，導致下游分別產生以 Chalcone 為前驅物的黃酮類化合物，及以 Stilbene 為前驅物的植物內毒素。一般上，STS 僅分佈於較少數的植物中；而 CHS 則廣泛地普遍存在於各種高等植物中 (Tropf *et al.*, 1995)。

查爾酮異合酶 (Chalcone Isomerase, CHI) 主要可分成兩類，在豆科植物中，Type II CHI 為單系群 (Monophyletic group)，Type I CHI 則為多系群 (Polyphyletic group) (Shimada *et al.*, 2003)。由親緣關係分析結果可發現，相思樹的 CHI 屬於 Type I CHI，並且和同樣為豆科的百脈根 (*L. japonicus*) 之 CHI 2 親緣關係最為相近，其次為芸香科的橙橘 (*C. sinensis*)，再來則是秋胡纒子 (*E. umbellate*) 以及康乃馨 (*D. caryophyllus*)。此外，透由蛋白質序列比對分析的結果，也顯示了 AcCHI 具有 Type I CHI 之特徵，其中包括了 Type I CHI 基質決定性的胺基酸 Ser191 及 Ile192。由 Shimada 等人 (2003) 的研究中，可歸納出以下兩點推論：1. Type II CHI 是 Type I CHI 的重複複製基因，並於豆科植物演化分歧之前便已出現。此二類型之間的相似度差異顯示 Type II CHI 在出現之後迅速演化；而兩者之保守型序列之間的極大差異可能是由大量的非同義鹼基替代 (Nonsynonymous substitution) 所造成。2. 隨著豆科植物的演化，Type II CHI 的原始形態逐漸變異加入了新的功能，

使豆科能產生豆科專屬的 5-Deoxy(iso)flavonoid，及其後續能產生對豆科植物具生態利益的植物內毒素和共生訊息分子 (Symbiotic signals)，最後形成如今可見之 Type II CHI。以百脈根為例，在此豆科植物所發現的兩種 CHI 類型中，CHI 1 和 3 為 Type II，而 CHI 2 為 Type I。經由序列比對，發現 CHI 2 的序列相似度比起 CHI 1 和 3，更加接近其他物種的 Type I CHI。在 AcCHI 和其他 CHI 的親緣關係演化分析中所亦應證了上述之 Type II CHI 迅速演化的部分。在相似度分析中 Type II CHI 之間的相似度 (74%) 比 Type I CHI 之間的相似度 (63%) 高了 10%，顯示豆科專屬的 Type II CHI 擁有相當高的演化程度；而兩種類型之間的相似度平均低於 50%，此結果與 Shimada 等人 (2003) 的研究結果一致。

黃酮類生合成途徑當中不少蛋白質屬於 2-Oxoglutarate 以及 Fe (II) 依賴性雙氧化酶超級家族 (2OG-Fe (II) dependent dioxygenases superfamily, 2-ODD superfamily)，FLS 是其中之一。由演化樹圖分析所示，在 FLS 自成一分群中，相思樹與大戟科蓖麻 (*Ricinus communis*)、山茶科茶樹 (*Camellia sinensis*) 和葡萄科葡萄進一步獨立形成一個亞分群，而另外四種草本植物 FLS 則形成另一亞分群。由此可推斷，FLS 的演化分歧點主要出現於草本與木本 (及木質藤本) 植物之間。此外，由序列平均相似度可發現，若跟 CHS 超級家族基因 (58%~73%) 比較，FLS 與其他 2-ODD 家族之間的平均相似度 (25%~55%) 顯得相當低。由此推斷這是因為 CHS 家族各能使用不同種類的基質，而在黃酮類生合成途徑中，FLS 等四個 2-ODD 成員則會使用同一種基質 (Naringenin)，並產生不同種類的黃酮類化合物。由於 2-ODD 成員之間相互具競爭關係，故需要比較高的基因歧異度，才能確保產生正確所需的產物。此外，2-ODD 家族之基因歧異度同時也增添了植物黃酮類化合物之多樣性。

本研究除了討論 AcFLS 與其他 2-ODD 成員的親緣關係，同時也針對 AcFLS 和 VvFLSs 以及 AtFLSs 的關係做一個探討。經由分析發現一個有趣的現象：AcFLS 與 VvFLS5 相似度很高，甚至高於 VvFLS5 和其他 VvFLSs 的序列相似度；透過親緣分析圖亦顯示 VvFLS5 和 AcFLS 獨立組成一個分群。在葡萄之 VvFLS 研究中，

Fujita 等人 (2006) 對 VvFLS5 與其他 VvFLSs 的低相似度感到興趣，此外經由一些逆境處理，他們發現 VvFLS4 是具有影響葡萄果皮黃酮醇含量的 FLS，但幾乎在所有情況下都有 VvFLS5 存在，並且有些時候其表現量會比 VvFLS4 高，所以作者認為有必要更進一步確認 VvFLS5 的功能。而本研究中已證實 AcFLS 是一個具有雙重功能的蛋白質，間接也證明了 VvFLS5 極可能是具有功能的 FLS。由此推測具功能的 FLS 有可能有兩種形態，而 AcFLS 所屬的形態與 VvFLS5 相似，在相思樹中可能扮演著跟 VvFLS5 類似的功能，例如當其他形態的 FLS 在某些逆境中降低了表現量而影響到黃酮類化合物的產生時，AcFLS 這類型的 FLS 依然能持續表現，以確保維持植物對黃酮類化合物的基本需求。這些推論皆有待進一步的蛋白質結構分析及其他方面的研究與探討。

5.3 AcCHS、AcCHI、AcFLS 之蛋白質結構分析

根據前人研究指出，CHS 是以同形二聚體 (Homodimer) 的形式行使功能，兩個單體相互對稱。每個單體各自獨立擁有兩個構造區域 (Structural domains)，其主要功能分別為縮合 p-Coumaroyl-和 3 個 Malonyl-CoA 分子形成四聚酮中間產物，以及將此中間產物轉變為 Chalcone。由於存在著化學機制複雜程度的問題，在活性區域中鮮少有具化學活性的胺基酸，而所有類似 CHS 的蛋白質中，其中有四個保守性胺基酸共為這些活性區的功能中心。此四胺基酸即為 Cys₁₆₄、Phe₂₁₅、His₃₀₃ 以及 Asn₃₃₆，其中 Cys₁₆₄ 明顯是為重要的親核劑 (Nucleophile)。當 Cys₁₆₄ 形成親和性硫醇陰離子時，His₃₀₃ 可作為通用鹼 (General base)，而 Phe₂₁₅，及 Asn₃₃₆ 則可能參與羧基化反應。總的來說，CHS 的活性區結構主要由這四個胺基酸分子交錯連接於三個活性腔 (Cavities) 所組成，此三腔室即為 CoA-binding tunnel、Coumaroyl-binding pocket 以及 Cyclization pocket。以上所述之活性區，除了 Met₁₃₇ 以外，所有涉及的活性區胺基酸幾乎都是屬於蛋白質單體 (Ferrer *et al.*, 1999)。

由構型上分析，Met₁₃₇ 會突入相鄰連接的另一個單體，成為那個單體的環化作用活性區之一部分（圖 23）（Ferrer *et al.*, 1999）。

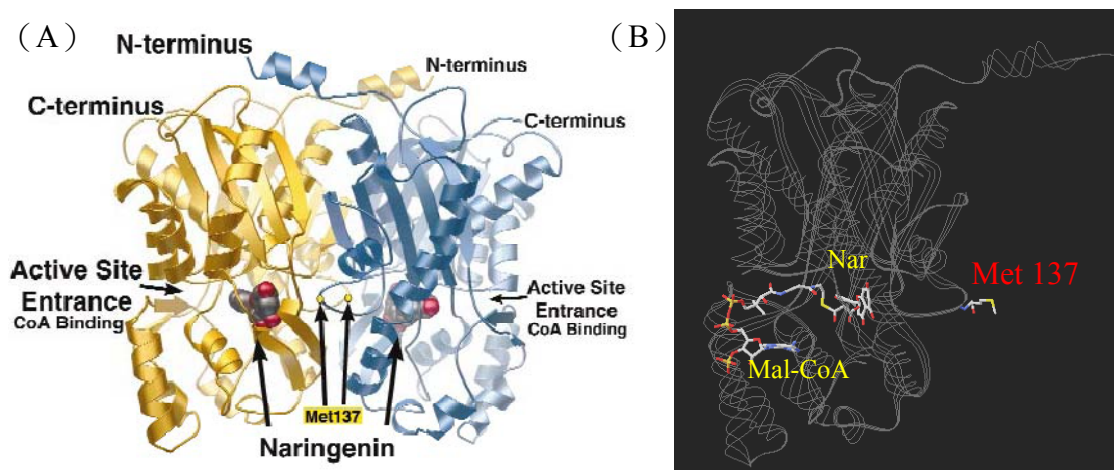


圖 23. CHS 蛋白質二聚體及單體結構。

Fig. 23. Protein structures of CHS dimer and monomer.

(A) 紫花苜蓿之 CHS 蛋白質二聚體（Ferrer *et al.*, 1999） (B) 相思樹之 AcCHS 蛋白質單體。Nar: Naringenin，Mal-CoA: Malonyl-CoA。

CHI 是一個擁有 220 個胺基酸的具功能性單體蛋白質（Monomer），Jez 等人（2000）從豆科紫花苜蓿中找到豆科專屬的 Type II CHI，並轉殖於 *E. coli* 大量表現，純化之後做了結晶分析。本實驗在相思樹中發現的是 Type I CHI，經蛋白質結構比對結果發現 AcCHI 與此 Type II CHI 相似，在結構上 CHI 總體像似一個倒花束（Upside-down bouquet），裡面是由 β -sheet 組成的開放式三明治折疊結構（ β -sandwich fold）。此外 Jez 等人（2000）亦發現 CHI 的活性區明顯的是在蛋白質表面，而此區域在不同物種之間具一定程度的保守性，皆由兩個 β -sheet 和兩個 α -helix 所組成，AcCHI 同樣擁有上述之結構（圖 24A）。雖然此二類型 CHI 之氫鍵網活性區的功能性胺基酸不盡相同，即在主要的五個胺基酸當中，其中兩個不一樣者為 Lys₉₇ 和 Tyr₁₅₂（Type II CHI），但同樣具有 Tyr₁₀₆（圖 24B）。根據前人研究指出，此胺基酸或可活化水分子，令水分子在環化作用中扮演酸（General acid）

的角色，並產生穩定中間產物的作用（圖 24C），故推斷 AcCHI 同樣能形成氫鍵網。

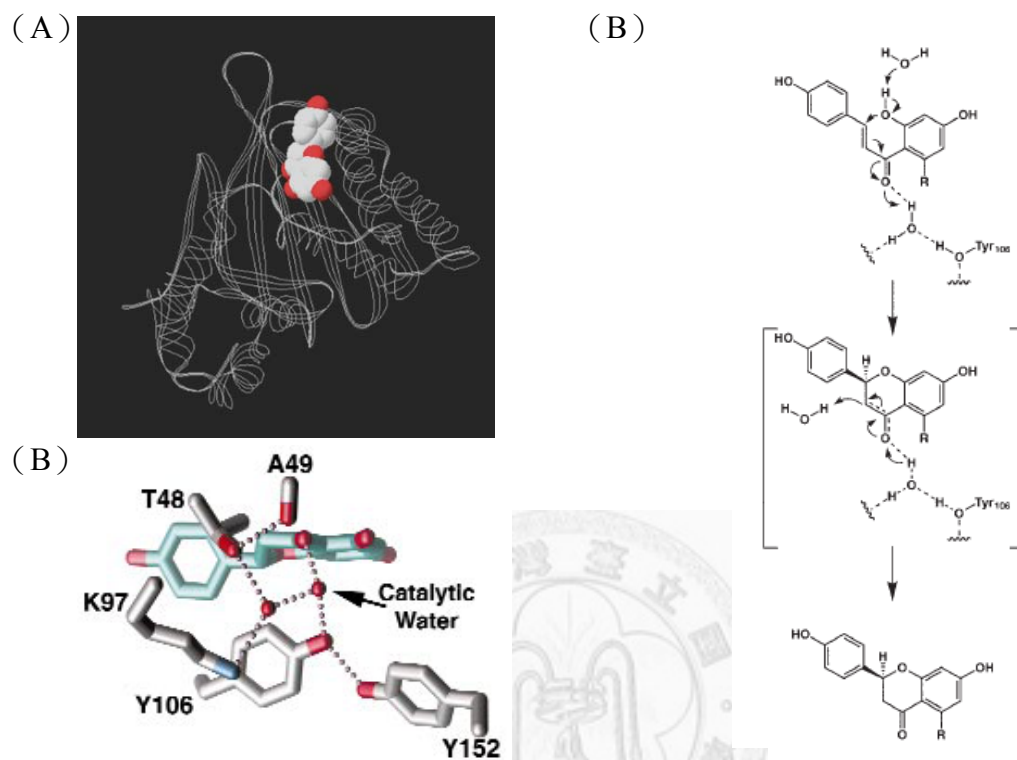


圖 24. (A) AcCHI 蛋白質構型，以球型顯示產物 Naringenin。(B) 紫花苜蓿之 CHI(Type II)的氫鍵網活性區(C)Tyr106 穩定水分子的機制(B, C: Jez *et al.*, 2000)。

Fig. 24. (A) Structure of AcCHI protein, (B) Active site hydrogen bond network and (C) the mechanism of water molecule stabilized by Try₁₀₆.

FLS 與 AS (Anthocyanidin synthase) 於 2-ODD 家族中不但序列相似，而且功能也很類似，經實驗證實，AS 在植物體外 (*In vitro*) 可以使用與 FLS 同樣的基質，並產生同樣的產物。Wilmouth 等人 (2002) 已解開了阿拉伯芥的 AtAS 蛋白質晶體結構，並對其之生合成機制有詳細的研究。由於 FLS 尚未有蛋白質晶體結構方面的研究，故於此藉由 AS 來探討 AcFLS 的蛋白質晶體結構。經過 FLS 蛋白質預測結構與 AS 的結構相疊合，發現 AcFLS 與 AS 大部分結構相似，而少部分未能疊合處則主要是在非活性區域 (圖 25A)，故推測不會影響 AcFLS 活性的探討。

FLS 的活性區域主要由 8 個 β strands 組成一個 β 蛋捲型 (β jellyroll)，此構造形成一個疏水性的腔室 (Hydrophobic cavity) (圖 25B)。在此活性區內，主要將針對 RxS motif 及基質 DHQ 結合相關的胺基酸提出兩點疑問，並做出探討(圖 25C)。首先 2-OG 結合之 RxS motif，關於為何在點突變試驗中 Ser 的突變只會造成蛋白質活性減低一半，此由蛋白質結構推斷，其可能原因為 Tyr₂₀₂ 亦可與 2-OG 產生鍵結，所以能彌補部分 Ser 突變缺失的功能 (圖 25D)。Wilmouth 等人 (2002) 在報告中雖未詳細探討此點，但於 AtAS 蛋白質結構中亦有將此鍵結標示出來。另外，如前已述 AcFLS 之基質 DHQ 結合的胺基酸中 Tyr₁₂₈ 和 Val₂₉₁ 於阿拉伯芥中分別為 His 及 Glu，經突變實驗證實 Tyr 會造成 FLS 活性稍有損減，而當 Glu 置換為疏水性側鏈的 Leu 則造成蛋白質九成以上的活性喪失。AcFLS 的 Val₂₉₁ 同為疏水性側鏈胺基酸，然而其依然具有轉化基質的活性，其中原因亦可由蛋白質結構圖推論。第一，Tyr 的側鏈上具有羥基，可以與 DHQ 之 C3' 及 C4' 上的羥基產生鍵結，其功能與 His 相似 (圖 25D)。此推論在 AtAS 中可得印證，原因為 AtAS 這個位置上的胺基酸便是 Tyr (Wilmouth *et al.*, 2002)。第二，AcFLS 之 Val₂₉₁ 雖然不能與 DHQ 產生鍵結，然而在 196 位置上的 Glu 側鏈羧基或許能與 DHQ 的 C7 羥基產生氫鍵鍵結 (3.30 Å 及 3.52 Å)，彌補了原本 Val 的不足，替代了 Val 位置上的 Glu 功能 (圖 25D、E)。由上兩點，推斷 AcFLS 依舊具有將基質轉化為產物之活性。最後，本研究亦希望透由分析 AcFLS 蛋白質結構，探討相思樹心材特殊黃酮醇類化合物由此蛋白質生合成的可能性。相思樹心材的黃酮類化合物與一般的黃酮類不同，一般黃酮類 A 環羥基多數接於 C5 及 C7 的位置，而相思樹心材黃酮類卻多是接在 C7 及 C8 的位置 (Melanoxetin 或 Transilitin)。本研究推論關鍵的胺基酸之一應是 Glu₁₉₆ (在阿拉伯芥中 AtFLS 相對位置上的胺基酸為 Met₂₁₀)，Glu₁₉₆ 除了可以跟 DHQ 的 C7 羥基產生氫鍵，亦應能與距離上更為相近的 C8 羥基產生氫鍵鍵結 (圖 25E)。本推測所採用的氫鍵形成之範圍為供應者與接受者之標準距離 (Donor-receptor distance) $\geq 3.5\text{\AA}$ (Baker and Hubbard, 1984)。

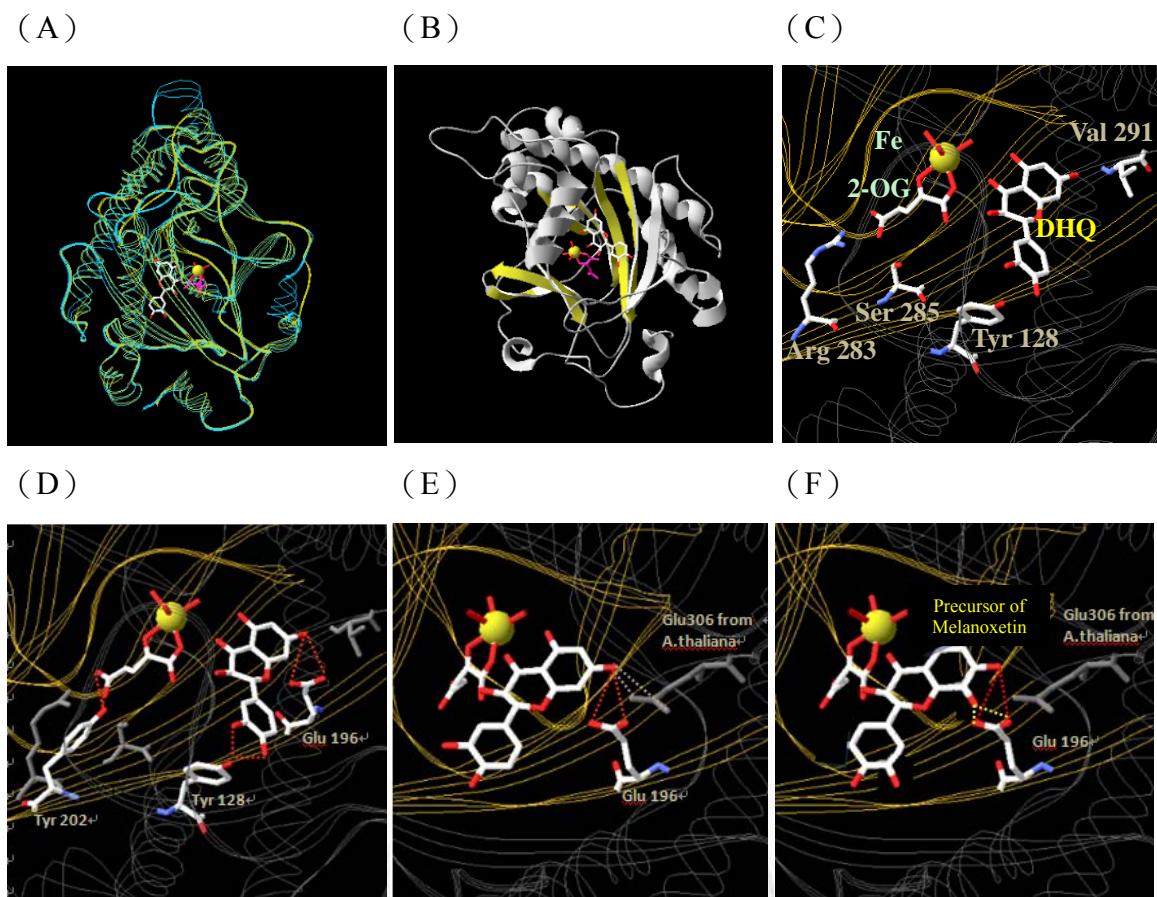


圖 25. AcFLS 的蛋白質結構與活性區。

Fig. 25. Protein structure and active site of AcFLS.

(A) AcFLS (黃色) 與 AS (藍色) (PDB ID: 1gp5) 的蛋白質結構疊合圖。

(B) AcFLS 之 β 蛋捲型厭水性的腔室 (黃色)。(C) RxS motif 及基質 DHQ 結合相關的胺基酸 (DHQ 結合相關的胺基酸只顯示 Try128 及 Val291)。(D) 活性區內其他可能的鍵結推測圖 (鍵結: 紅色虛線) (E) 以阿拉伯芥中 Glu (灰色柱狀骨架) 替代了 AcFLS 之 Val₂₁₉ 的位置, 此中以灰色虛線顯示其與 DHQ 的鍵結。(F) 以 Melanoxetin 之前驅物((-)-2,3-trans-3',4',7,8-Tetrahydroxydihydroflavonol) 替換 DHQ, Glu₁₉₆ 能與此基質之 C8 產生鍵結 (黃色虛線)。DHQ、2-OG 以及胺基酸皆以柱狀骨架顯示, 而鐵離子則以黃色小球標示。DHQ: Dihydroquercetin, 2-OG: 2-Oxoglutarate。

5.4 *AcCHS*、*AcCHI*、*AcFLS* 於相思樹不同組織的表現

本研究所檢測的 1.5 年生相思樹小苗三個部位——根、莖、葉，可相當明顯觀察到葉組織的 *AcCHS*、*AcCHI* 及 *AcFLS* 表現量最為明顯；而三十年生相思樹中的五個部位——葉、花、枝條、樹皮、邊材，則以花最為明顯。這個現象亦與阿拉伯芥相似，*CHS*、*CHI* 及 *FLS* 主要於花為最多，而在成熟葉的表現量則不及年輕的葉片 (Owens *et al.*, 2008)。此外在葡萄中 *FLS* 亦出現於葉、花、果皮等部位，並隨著不同時期而有所變化 (Fujita *et al.*, 2006)。在此，本試驗並未探討各時期的基因表現量變化。此外，由 RT-PCR 的結果可發現 *CHS*、*CHI* 及 *FLS* 的表現模式相當一致，此處可說明在黃酮類生合成途徑當中，此三個基因的表現息息相關。另外，黃酮醇化合物是相思樹主要的抗氧化活性來源之一，相對應於相思樹成樹的黃酮醇化合物主要出現於葉、花、細枝條以及心材，本研究發現 *AcFLS* 在所檢測的五個部位中皆有表現，包括了葉、花、細枝條、樹皮以及邊材。雖然前人研究顯示樹皮的抗氧化活性主要來源於羥基苯甲酸類化合物 (而非黃酮類化合物) (Tung *et al.*, 2009a)，但是樹皮中含有大量的單寧(黃酮醇聚合物)，因此在 RT-PCR 中顯示 *AcFLS* 出現於樹皮組織應為合理。本試驗採樣時所刮取的樹皮以及邊材，皆含些許形成層，因此相思樹心材的黃酮類化合物可能是由形成層以及邊材活細胞生成並儲存。而花之 *AcFLS* 表現量在成樹種為最高，極可能是與調控相思樹的深黃花色有密切關係。

5.5 *AcCHS*、*AcCHI*、*AcFLS* 於相思樹葉片創傷處理之反應

黃酮醇類化合物在植物當中扮演著調控花或果皮顏色，防禦 UV-B 射線、真菌及蟲害等重要功能。而在多篇報告中亦指出當植物遇到逆境時，例如不同的光照效果、施予刺激性的化學藥劑、或荷爾蒙如 ABA 等，會使 *CHS*、*CHI* 及 *FLS* 產生相對應的反應 (Owens *et al.*, 2008)。本研究中發現經創傷處理的成熟葉片，*AcCHI*

以及 *AcFLS* 明顯於第 6 小時有著最高的表現，之後此表現量逐漸降低至少能持續至第 12 小時。然而此中 *CHS* 之表現量並無顯著變化，這個結果與白雲杉 (*Picea glauca*) 中的創傷實驗大不相同 (Richard *et al.*, 2000)。該實驗顯示 *CHS* 在白雲杉針葉之局部創傷反應於 4 小時內產生最高表現量，而系統性創傷反應亦於八小時內產生最高峰，前者與後者的表現量逐漸降低並至少能維持一天以上。相反的，本實驗中的未傷葉對照組並沒有顯著的變化，推斷這個程度的創傷在相思樹中不會引起系統性反應，而且在正常狀態下相思樹葉片中已貯存著具抗真菌害蟲的黃酮類化合物，或許在不需刺激 *CHS* 表現的情況下，*CHI* 和 *FLS* 的反應便足以產生所需的防禦效果。另外，在白楊 (*Populus spp.*) 中 *FLS* 對創傷處理沒有反應 (Mellway *et al.*, 2009)。由此可知每個物種在面對逆境時皆會有各自不同的反應機制。

5.6 *AcFLS* 之雙重功能

根據前人研究發現相思樹中的黃酮醇類化合物主要有三種結構——Kaempferol、Quercetin 以及 Myricetin。在植物生理上黃酮類扮演了重要的角色，同時在醫藥學上此三種類型的黃酮醇各具不同的醫療效果和抗氧化活性 (Hsieh and Chang, 2010; Tung *et al.*, 2009a; Tung *et al.*, 2009b; Wu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008a)，因此無論在植物本身或是人類醫療方面，黃酮醇之生合成都具有高度的研究價值。本研究最主要的目的為鑑定與建立相思樹黃酮醇類生合成途徑，並經由一系列的實驗分析與驗證，於相思樹中鑑定出三個主要的黃酮醇類化合物生合成基因，*AcCHS*、*AcCHI* 以及具雙重功能的 *AcFLS*。根據前人的研究報告顯示，*FLS* 是一個 2-Oxoglutarate-/Fe(II)-dioxygenase，在其反應過程中 2-OG 能令氧分子置換鐵離子中心的水分子，同時 2-OG 會產生氧化脫羧作用，繼而產生琥珀酸 (Succinate)，二氧化碳以及一個氧化鐵中間產物 $[Fe(IV)=O \leftrightarrow Fe(III)-O]$ (圖 26)，此中間產物隨後將影響基質的羥基化作用或去飽和化作用 (Britsch *et al.*, 1981; Turnbull *et al.*, 2004)。*AcFLS* 便是具有羥基化作用以及去飽和化作用之雙重功能。

本研究透過植物體外酵素反應檢測，已證實 AcFLS 可將基質黃烷酮 (Naringenin) 以及二氫黃酮醇 (Dihydroquercetin 以及 Dihydromyricetin) 分別轉化為 Kaempferol, Quercetin 以及 Myricetin (圖 27)。這個結果與 *A. thaliana* 及 *C. unshiu* 中的研究相符，兩者皆指出 FLS 具有替代 F3H ((2S)-Flavanone 3-hydroxylase) 羥基化 C3 之功能 (Lukačín *et al.*, 2003; Prescott *et al.*, 2002)。根據目前進行過 FLS 雙重功能之植物體外酵素反應檢測的研究，*A. thaliana* 的 AtFLS 能夠將生合成 Kaempferol 以及 Quercetin (*A. thaliana* 中並未分離到 Myricetin)；而 *C. unshiu* 的 CuFLS 只有做單一產物檢測，即 Kaempferol。本研究為目前唯一做過 Myricetin 產物驗證的 FLS 體外酵素反應活性檢測。此外，從 HPLC 圖分析可獲得兩個發現：一、推測在滯留時間 (Retention time) 20.4 min 出現的訊號為 Dihydrokaempferol (圖 20)，由此證實了 AcFLS 具有可以將黃烷酮轉換為二氫黃酮醇，並更進一步轉換成黃酮醇的雙重功能 (圖 27)。二、由 HPLC 所偵測的基質面積推算的基質轉換率中發現，AcFLS 對此三個基質並沒有明顯的偏好性。

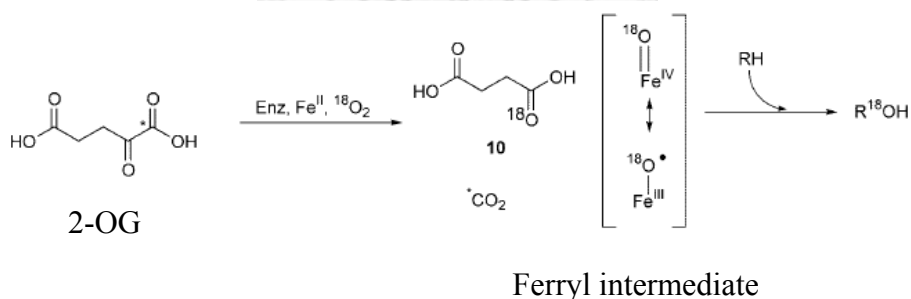


圖 26、2-ODDs 的基本反應機制，R 為基質 (Turnbull *et al.*, 2004)。

Fig. 26. General reaction mechanism of 2-ODDs, R is indicated as substrate (Turnbull *et al.*, 2004).

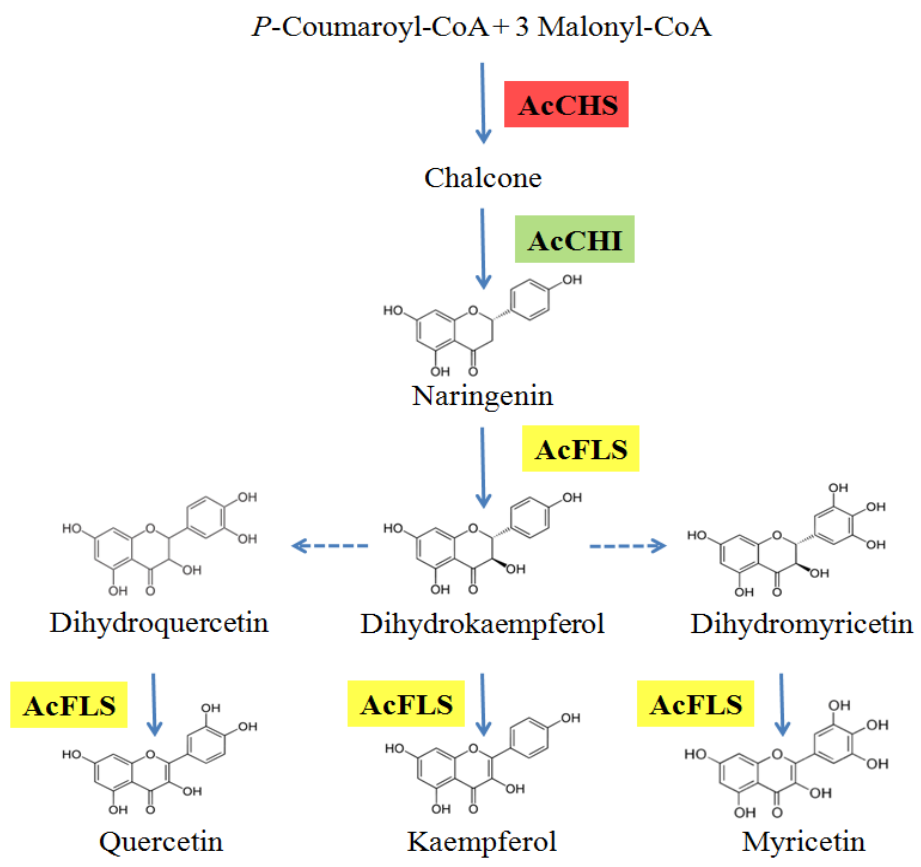


圖 27、相思樹黃酮醇化合物生合成途徑。虛線表示該途徑為其他酵素所調控。

Fig. 27. Flavonols biosynthetic pathway in *A. confusa*.

陸、結論

臺灣相思樹所含之黃酮類化合物，無論在醫療藥物、保健食品或者抗蟲抗菌等方面，皆富有極高的開發價值。本研究在相思樹中分離出三個與黃酮醇類化合物之生合成相關的基因，分別為 *AcCHS*、*AcCHI* 以及 *AcFLS*，透過蛋白質序列分析和親緣分析顯示，此三個基因分別屬於 *CHS*、*CHI* 和 *FLS* 基因。另外，酵素活性分析也更進一步證實了 *AcFLS* 是能夠生合成黃酮醇類的蛋白質。在相思樹不同部位的基因表現分析中，顯示 *AcCHS*、*AcCHI* 以及 *AcFLS* 在相思樹小苗的葉部和成樹的花部有著最顯著的表現量。在分子生物這條現代主要的研究道路上，本研究已為相思樹建立了基本的黃酮醇類化合物之生合成途徑。另外經由蛋白質結構分析，更進一步地了解 *AcCHS*、*AcCHI* 和 *AcFLS* 的活性區域與反應機制。有關相思樹的特殊黃酮醇類化合物的生合成途徑，或許亦可利用蛋白質晶體結構分析，尋獲正確的解答。此外，不僅生合成途徑的建立，尚結合相思樹二次代謝產物的成分分析，利用分子生物科技達到量產黃酮類化合物的需求，並合理地運用在人們的所需之處，這樣系統化的發展指日可待。植物中幾乎皆存在黃酮類生合成途徑，而黃酮醇類化合物於植物生理上扮演著抵抗逆境與防禦外敵傷害的重要角色；同時，在許多植物中 *CHS*、*CHI* 和 *FLS* 於逆境中皆能產生相對應的反應，只是在各物種之間的反應模式都不盡相同。因此未來若能以黃酮類生合成途徑為主，探討於相思樹中的防禦機制，相信能更進一步了解相思樹的生存模式或相關的生態意義。

柒、參考文獻

- 王升陽、徐麗芬、楊寧蓀 (2003) 傳統與科技結合—藥用與保健植物新發展。科學發展 364: 50-55。
- 王松永 (1983) 商用木材 林產工業叢書。中華民國林產事業協會。377 頁。
- 邱年永、張光雄 (1986) 原色臺灣藥用植物圖鑒。南天出版社。287 頁。
- 吳志鴻 (2004) 相思樹心材具抗氧化及抗發炎成分之分析與鑑定。國立台灣大學森林學研究所博士論文。191 pp。
- 陳正和 (2002) 台灣最普遍的森林喬木之一—相思樹。台灣林業 28(6): 59-61。
- 劉棠瑞 (1960) 台灣木本植物圖誌第一冊。國立台灣大學農業學院叢書，第 8 種；林學叢書，第 1 種，台北。484 頁。
- Achnine, L., E.B. Blancaflor, S. Rasmussen and R.A. Dixon (2004) Colocalization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16: 3098-3109.
- Adedapo, A.A., M.O. Sofidiya, P.J. Masika and A.J. Afolayan (2008) Anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous extract of *Acacia karroo* stem bark in experimental animals. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 103: 397-400.
- Austin, M.B. and J.P. Noel (2003) The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthase. *Natural Product Reports* 20: 79-110.
- Baker, E.N. and R.E. Hubbard (1984) Hydrogen bonding in globular proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 44: 97-139.
- Besseau, S., L. Hoffmann, P. Geoffroy, C. Lapierre, B. Pollet and M. Legrand (2007) Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant cell* 19: 148-162.

- Bohm H., H. Boeing, J. Hempel, B. Raab and A. Kroke (1998) Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft* 37: 147-163.
- Britsch, L., W. Heller and H. Grisebach (1981) Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Z. Naturforsch* 36c: 742-750.
- Brown, D.E., A.M. Rashotte, A.S. Murphy AS, J. Normanly, B.W. Tague, W.A. Peer, L. Taiz and G.K. Muday (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 524-535.
- Brown, J.E., H. Khodr, R.C. Hider and C.A. Rice-Evans (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal* 330: 1173-1178.
- Chang, S.T., J.H. Wu, S.Y. Wang, P.L. Kang, N.S. Yang and L.F. Shyur (2001) Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3420-3423.
- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.
- Chatti, I.B., I. Limem, J. Boubaker, I. Skandrani, S. Kilani, W. Bhourri, M. Ben Sghaier, A. Nefatti, H. Ben Mansour, K. Ghedira and L. Chekir-Ghedira (2009) Phytochemical, antibacterial, antiproliferative, and antioxidant potentials and DNA damage-protecting activity of *Acacia salicina* Extracts. *Journal of Medicinal Food* 12: 675-683.
- Chua, S.C., D. Biermann, K.S. Goo and T.S. Sim (2008) Elucidation of active site residues of *Arabidopsis thaliana* flavonol synthase provides a molecular platform for engineering flavonols. *Phytochemistry* 69: 66-75.
- Daniel, S., K. Tiemann, U. Wittkamp, W. Bless, W. Hinderer and W. Barz (1990)

- Elicitor-induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*. *Planta* 182: 270-278.
- Davies, K.M., K.E. Schwinn, S.C. Deroles, D.G. Manson, D.H. Lewis, S.J. Bloor and J.M. Bradley (2003) Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. *Euphytica* 131: 259-268.
- Dixon, R.A. and C.L. Steele (1999) Flavonoids and isoflavonoids: a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* 4: 394-400.
- Dongmo A.B., T. Miyamoto, K. Yoshikawa, S. Arihara and M.A. Lacaille-Dubois (2007) Flavonoids from *Acacia pennata* and their cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) inhibitory activities. *Planta Medica* 73: 1202-1207.
- Ferrer, J-L., J.M. Jez, M.E. Bowman, R.A. Dixon and J.P. Noel (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural & Molecular Biology* 6: 775-784.
- Ferreira, M.L.F., S. Rius, J. Emiliani, L. Pourcel, A. Feller, K. Morohashi, P. Casati and E. Grotewold (2010) Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase. *The Plant Journal* 62: 77-91.
- Franke, A.A., L.J. Custer, C.M. Cerna and K.K. Narala (1994) Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1905-1913.
- Fujita, A., N. Goto-Yamamoto, I. Aramaki and K. Hashizume (2006) Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70: 632-638.
- Grab, D., R. Loyal and J. Ebel (1985) Elicitor-induced phytoalexin synthesis in soybean cells: Changes in the activity of chalcone synthase mRNA and the total population

- of translatable mRNA. Archives of Biochemistry and Biophysics 243: 523-529.
- Grace, M.H., G.R. Wilson, F.E. Kandil, E. Dimitriadis and R.M. Coates (2009) Characteristic flavonoids from *Acacia burkittii* and *A. acuminata* heartwoods and their differential cytotoxicity to normal and leukemia cells. Natural Product Communications 4: 69-76.
- Grotewold, E. (2005) Plant metabolic diversity: a regulatory perspective. Trends in Plant Science 10: 57-62.
- Habereder, H., G. Schröder and E. Jürgen (1989) Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (*Glycine max* L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis. Planta 177: 58-65.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge (1999) Free radicals in biology and medicine. Oxford, New York. 620 pp.
- Harborne, J.B. and C.A. Williams (2000) Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55: 481-504.
- Harborne, J.B. (1988) The flavonoids: advances in research since 1980. Chapman and Hall, New York. 620 pp.
- Haribal, M. and J.A. Renwick (1996) Oviposition stimulants for the monarch butterfly: Flavonol glycosides from *Asclepias curassavica*. Phytochemistry 41: 139-144.
- Hegnauer, R. and R.J. Gpayer-Barkmeijer (1993) Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. Phytochemistry 34: 3-16.
- Holton, T.A. and E.C. Cornish (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell 7: 1071-1083.
- Hsieh, C.Y. and S.T. Chang (2010) Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of phenolic phytochemicals from *Acacia confusa* twigs and

- branches. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 58: 1578-1583.
- Jeon, J.H., H.S. Kim, K.H. Choi, Y.H. Joung, H. Joung and S.M. Byun (1996) Cloning and characterization of one member of the chalcone synthase gene family from *Solanum tuberosum* L.. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60: 1907-1910.
- Jez, J.M., M.E. Bowman, R.A. Dixon and J.P. Noel (2000) Structure and mechanism of chalcone isomerase: an evolutionarily unique enzyme in plants. *Nature Structural & Molecular Biology* 7: 786-791.
- Jørgensen, K., A.V. Rasmussen, M. Morant, A.H. Nielsen and N. Bjarnholt, M. Zagrobelny, S. Bak and B.L. Møller (2005) Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 280-291.
- Junghans, H., K. Dalkin and R.A. Dixon (1993) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 15. Characterization and expression patterns of members of a subset of the chalcone synthase multigene family. *Plant Molecular Biology* 221: 239-253.
- Kalaivani, T. and L. Mathew (2010) Free radical scavenging activity from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex Delile, an Indian medicinal tree. *Food and Chemical Toxicology* 48: 298-305.
- Kim, J.D., L. Liu, W. Guo and M. Meydani (2006) Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 17: 165-176.
- Kim, Y.H. and Y.J. Lee (2007) TRAIL apoptosis is enhanced by quercetin through Akt dephosphorylation. *Journal of Cellular Biochemistry* 100: 998-1009.
- Kim, B.G., J.H. Kim, J. Kim, C. Lee and J.H. Ahn (2008) Accumulation of flavonols in response to ultraviolet-B irradiation in soybean is related to induction of flavanone 3-beta-hydroxylase and flavonol synthase. *Molecules and Cells* 25: 247-252.

- Korkina, L.G. and I.B. Afanašev (1997) Antioxidant in disease mechanisms and therapy. Academic Press, San Diego. 707 pp.
- Kusano, R., S. Ogawa, Y. Matsuo, T. Tanaka, Y. Yazaki and I. Kouno (2011) alpha-Amylase and lipase inhibitory activity and structural characterization of *Acacia* bark proanthocyanidins. *Journal of Natural Products* 74: 119-128.
- Lee, B.H., S.M. Jeong, J.H. Lee, J.H. Kim, I.S. Yoon, J.H. Lee, S.H. Choi, S.M. Lee, C.G. Chang, H.C. Kim, Y. Han, H.D. Paik, Y. Kim and S.Y. Nah (2005) Quercetin inhibits the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-mediated ion current by interacting with pretransmembrane domain I. *Molecules and Cells* 20: 69-73.
- Lee, T.H., D.Z. Liu, F.L. Hsu, W.C. Wu and W.C. Hou (2006) Structure-activity relationships of five myricetin galloylglycosides from leaves of *Acacia confusa*. *Botanical studies* 47: 37-43.
- Lee, T.H., F. Qiu, G.R. Waller and C.H. Chou (2000) Three new flavonol galloylglycosides from leaves of *Acacia confusa*. *Journal of Natural Products* 63: 710-712.
- Lepiniec, L., I. Debeaujon, J.M. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi and M. Caboche (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 405-430.
- Lin, G.Z., Y.J. Lian, J.H. Ryu, M.K. Sung, J.S. Park, H.J. Park, B.K. Park, J.S. Shin, M.S. Lee and C.I. Cheon (2007) Expression and purification of His-tagged flavonol synthase of *Camellia sinensis* from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 55: 287-292.
- Liu, C.J. and R.A. Dixon (2001) Elicitor-induced association of isoflavone O-methyltransferase with endomembranes prevents the formation and 7-O-methylation of daidzein during isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. *Plant Cell* 13: 2643-2658.

- Lukačin, R. and L. Britsch (1997) Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase. *European Journal of Biochemistry* 249: 748-757.
- Lukačin, R., F. Wellmann, L. Britsch, S. Martens and U. Matern (2003) Flavonol synthase from *Citrus unshiu* is a bifunctional dioxygenase. *Phytochemistry* 62: 287-292.
- Manriquez-Torres, J.J., A. Zuniga-Estrada, M. Gonzalez-Ledesma and J.M. Torres-Valencia (2007) The antibacterial metabolites and proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. *Journal of the Mexican Chemical Society* 51: 228-231.
- Marks, M.D. and J. Esch (2003) Initiating inhibition, control of epidermal cell patterning in plants. *EMBO Reports* 4: 24-25
- Mattana, C.M., S.E. Satorres, A. Sosa, M. Fusco and L.E. Alcaráz (2010) Antibacterial activity of extracts of *Acacia aroma* against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 581-587.
- Mehdy, M.C. and C.J. Lamb (1986) Induction of chalcone isomerase gene expression in plant cells in response to fungal cell wall components. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 10D: 63-63.
- Mehdy, M.C. and C.J. Lamb (1987) Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection. *EMBO Journal* 6: 1527-1533.
- Mellway, R.D., L.T. Tran, M.B. Prouse, M.M. Campbell and C.P. Constabel (2009) The Wound-, pathogen-, and ultraviolet B-responsive MYB134 gene encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates proanthocyanidin synthesis in poplar. *Plant Physiology* 150: 924-941.
- Miyahisa, I., M. Kaneko, N. Funa, H. Kawasaki, H. Kojima, Y. Ohnishi and S. Horinouchi (2005) Efficient production of (2S)-flavanones by *Escherichia coli*

- containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 498-504.
- Mol, J., E. Grotewold and R. Koes (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3: 212-217.
- Murphy, A., W.A. Peer and L. Taiz (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 211: 315-324.
- Namiki, M. (1990) Antioxidant/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 29: 273-300.
- Owens, D.K., A.B. Alerding, K.C. Crosby, A.B. Bandara, J.H. Westwood and B.S.J. Winkel (2008) Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 147: 1046-1061.
- Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.
- Prescott, A.G., N.P.J. Stamford, G. Wheeler and J.L. Firmina (2002) *In vitro* properties of a recombinant flavonol synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 60: 589-593.
- Reddy, A.M., V.S. Reddy, B.E. Scheffler, U. Wienand and A.R. Reddy (2007) Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. *Metabolic Engineering* 9: 95-111.
- Richard, S., G. Lapointe, R. G. Rutledge and A. Séguin (2000) Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate. *Plant Cell Physiology* 41: 982-987.
- Rifai Y., M.A. Arai, T. Koyano, T. Kowithayakorn and M. Ishibashi (2010) Terpenoids and a flavonoid glycoside from *Acacia pennata* leaves as hedgehog/GLI-mediated transcriptional inhibitors. *Journal of Natural Products* 73: 995-997.

- Ryder, T.B., S.A. Hedrick, J.N. Bell, X.W. Liang, S.D. Clouse and C.J. Lamb (1987) Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Molecular and General Genetics* 210: 219-233.
- Saslowky, D. and B. Winkel-Shirley (2001) Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 27: 37-48.
- Saslowky, D.E., C.D. Dana and B. Winkel-Shirley (2000) An allelic series for the chalcone synthase locus in *Arabidopsis*. *Gene* 255: 127-138.
- Schijlen, E., C.H. Ric de Vos, H. Jonker, H. van den Broeck, J. Molthoff, A. van Tunen, S. Martens and A. Bovy (2006) Pathway engineering for healthy phytochemicals leading to the production of novel flavonoids in tomato fruit. *Plant Biotechnology Journal* 4: 433-444.
- Seigler, D.S. (2003) Phytochemistry of *Acacia*-sensu lato. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 845-873.
- Shimada, N., T. Aoki, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, S. Ayabe (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 Physiology* 131: 941-951.
- Solomon-Wisdom, G.O. and G.A. Shittu (2010) *In vitro* antimicrobial and phytochemical activities of *Acacia nilotica* leaf extract. *Journal of Medicinal Plants Research* 46: 1268-1277.
- Spayd, S.E., J.M. Tarara, D.L. Mee and J.C. Ferguson (2002) Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 171-182.
- Stafford, H.A. (1991) Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology* 96: 680-685.

- Suzuki, S., K. Suda, N. Sakurai, Y. Ogata, T. Hattori, H. Suzuki, D. Shibata and T. Umezawa (2010) Analysis of expressed sequence tags in developing secondary xylem and shoot of *Acacia mangium*. *The Journal of Wood Science* 57: 40-46.
- Tahara, S. (2007) A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71: 1387-1404.
- Takahashi, R., S.M. Githiri, K. Hatayama, E.G. Dubouzet, N. Shimada, T. Aoki, S. Ayabe, T. Iwashina, K. Toda and H. Matsumura (2007) A single-base deletion in soybean flavonol synthase gene is associated with magenta flower color. *Plant Molecular Biology* 63: 125-135.
- Terahara, N., T. Honda, M. Hayashi and K. Ishimaru (2000) New anthocyanins from purple pods of pea (*Pisum* spp.). *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 64: 2569-2574.
- Tian, L., S.B. Wan, Q.H. Pan, J.C. Zheng and W.D. Huang (2008) A novel plastid localization of chalcone synthase in developing grape berry. *Plant Science* 175: 431-436.
- Tian, L., W.F. Kong, Q.H. Pan, J.C. Zhan, P.F. Wen, J.Y. Chen, S.B. Wan and W.D. Huang (2006) Expression of the chalcone synthase gene from grape and preparation of an anti-CHS antibody. *Protein Expression and Purification* 50: 223-228.
- Todkar, S.S., V.V. Chavan, and A.S. Kulkarni (2010) Antimicrobial activity and screening of secondary metabolites from *Acacia concinna*. *Research Journal of Microbiology* 5: 974-979.
- Tropf, S., B. Kärcher, G. Schröder and J. Schröder (1995) Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthases (stilbene and chalcone synthase). *The Journal of Biological Chemistry* 270: 7922-7928.
- Turnbull, J.J., J. Nakajima, R.W. Welford, M. Yamazaki, K. Saito and C.J. Schofield (2004) Mechanistic studies on three 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases of

- flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase and flavanone 3beta-hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 1206-1216.
- Tung, Y.T., J.H. Wu, C.Y. Huang, Y.H. Kuo and S.T. Chang (2009a) Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. *Bioresource Technology* 100: 509-514.
- Tung, Y.T., J.H. Wu, C.Y. Hsieh, P.S. Chen and S.T. Chang (2009b) Free radical-scavenging phytochemicals of hot water extracts of *Acacia confusa* leaves detected by an on-line screening method. *Food Chemistry* 115: 1019-1024.
- Volikakis, G.J. and C.E. Efstathiou (2005) Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 551: 124-131.
- Wellmann, F., M. Griesser, W. Schwab, S. Martens, W. Eisenreich, U. Matern and R. Lukačič (2006) Anthocyanidin synthase from *Gerbera hybrida* catalyzes the conversion of (1)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin. *FEBS Letters* 580: 1642-1648.
- Wilmouth, R.C., J.J. Turnbull, R.W.D. Welford, I.J. Clifton, A.G. Prescott and C.J. Schofield (2002) Structure and Mechanism of Anthocyanidin Synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* 10: 93-103.
- Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126: 485-493.
- Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 218-223.
- Wu, J.H., Y.T. Tung, S.Y. Wang, L.F. Shyur, Y.H. Kuo and S.T. Chang (2005) Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5917-5921.
- Wu, J.H., C.Y. Huang, Y.T. Tung and S.T. Chang (2008a) Online RP-HPLC-DPPH

- screening method for detection of radical-scavenging phytochemicals from flowers of *Acacia confusa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 328-332.
- Wu, J.H., Y.T. Tung, S.C. Chien, S.Y. Wang, Y.H. Kuo, L.F. Shyur and S.T. Chang (2008b) Effect of phytochemicals from the heartwood of *Acacia confusa* on inflammatory mediator production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1567-1573.
- Yamamoto, T., L.K. Juneja, D.C. Chu and M. Kim (1997) Chemistry and application of green tea. CPC Press, New York. 160 pp.
- Yamazaki, Y., D.Y. Suh, W. Sitthithaworn, K. Ishiguro, Y. Kobayashi, M. Shibuya, Y. Ebizuka and U. Sankawa (2001) Diverse chalcone synthase superfamily enzymes from the most primitive vascular plant, *Psilotum nudum*. *Planta* 214: 15-84.
- Yan, Y.J., A. Kohli and M.A.G. Koffas (2005) Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5610-5613.
- Yazaki, K. (2005) Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 301-307.
- Zhang, H.C., J.M. Liu, H.Y. Lu and S.L. Gao (2009) Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. *Plant Cell Reports* 28: 1205-1213.

捌、附錄

附錄（一）引子序列表

1. 退化性引子序列

引子名稱	序列(5'-3')
dchsF	5' AAGGCCATMAARGAATGGGGYCAGCC 3'
dchiF	5' GGSAASTTCRTNAAGTTCACSGC 3'
dchiR	5' CTTTGCTKCDGGSGAAACACC 3'
dflsF	5' TGGCCYAACAACCCYYCTTCWTAC 3'
dflsR	5' TTGTACTIONRCCATTGCTHAGDAYCTC 3'

備註：Mixed bases: R(A,G);Y (C,T);M(A,C);K(G,T);S(C,G);W(A,T);H(A,C,T);B(C,G,T);V(A,C,G);D(A,G,T);N,X(A,C,G,T)

2. 3'端 RACE 引子序列

引子名稱	序列(5'-3')
3Rchs1	5' CTTCTCGGCCTCAGACCCTCCGTCAAG 3'
3Rchs2	5' GACTCACTCGTTGGTCAGGCCCTCTTC 3'
3Rchi1	5' CAGGCTCCTCGATTCTCTTCACTCAATC 3'
3Rchi2	5' GATGGATCCATACCTGAAGCTGGGAATG 3'
3Rfls1	5' GCTAGGGTTGGAGACGAAGGCACTGA 3'
3Rfls2	5' GTATCCGCCATGCCACAGCCAGAGCTA 3'

3. 5'端 RACE 引子序列

引子名稱	序列(5'-3')
5Rchs1	5' CTCCACCTGATCCAGAATC 3'
5Rchs2	5' CAGCAAGTGGAACGTGAGACCCACTTC 3'
5Rchs3	5' ACGGAAAGTGACGGCAGTGATCTC 3'
5Rchi3	5' GTCCGTAGTTCACCTCACATC 3'
5Rchi2	5' CTTTCTCAGCCTTCTGGCTAAG 3'
5Rchi1	5' CTCGACGGATTCCGTTAACTC 3'
5Rfls3	5' TAGCTCTGGCTGTGGGCATGGCGGATAC 3'
5Rfls2	5' CTGATCGCCAATATGGACGAGGAGGGT 3'
5Rfls1	5' CACCAAGCTTCTGTGCAGAAC 3'

4. 全長校正引子序列

引子名稱	序列(5'-3')
Hchs	5' GACATGGTCACCGTCGAGGAGATC 3'
Tchs	5' CATCATCACACGGGAACACTGTGCAAC 3'
Hchi	5' CTTTATCTCATCTCGTCGCTACAATGGC 3'
Tchi	5' TGAGAGTATCAAATCAGTGATGAGCCAT 3'
Hfls	5' CATAATGGAGGTTGAAAGAGTGCAGTGCTTG 3'
Tfls	5' TCACTGAGGAAGCTTATTGAATTTGCGGTG 3'

5. 蛋白質表現質體建構

引子序列

引子名稱	序列(5'-3')
pETflsF	5' GGAATTCATATGGAGGTTGAAAGAGTGCAGTGC 3'
pETflsR	5' CCGCTCGAGCTGAGGAAGCTTATTGAATTTGCG 3'

6. RT-PCR 引子序列

引子名稱	序列(5'-3')
RTchsF	5' GATCCTGTGATGTTGTGAAC 3'
RTchsR	5' GAGCAAGAGGAATATCATAAATCTC 3'
RTchiF	5' CTCAAATTAGCCTGTGTTCTC 3'
RTchiR	5' CAACAAGTCCGTAGTTCAC 3'
RTflsF	5' CGTCCATCTATATCTCCTCTTAC 3'
RTflsR	5' GAAAGAACATTGGAAGAGTACTTC 3'
3'acF	5' CATTGGCAGGTAGTCTGAGCTTGATTG 3'
3'acR	5' CATCACTCCTTTGCTACGAATAAGCTCTTG 3'
3'ubF	5' GATATCTAAGGAAATTGCCGTTTCATGTG 3'
3'ubR	5' CAACCACTGATAACTAATATCTAAGCAGAATAAC 3'

備註：ac=actin；ub=ubiquitin