

Nghiên cứu đặc điểm của gen chalcone isomerase phân lập từ cây sắn dây (*Pueraria montana* var. *lobata*)

Trần Thị Bích Ngọc¹, Nguyễn Tiến Dũng², Huỳnh Thị Thu Huệ^{3,4*}

¹Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng

³Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

⁴Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 16/8/2021; ngày chuyển phản biện 20/8/2021; ngày nhận phản biện 20/9/2021; ngày chấp nhận đăng 24/9/2021

Tóm tắt:

Chalcone isomerase (CHI) được biết là enzyme quan trọng tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các hoạt chất như flavonoid, isoflavonoid và anthocyanin. Enzyme này đã được nghiên cứu ở một số loài thực vật họ đậu, tuy nhiên ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào công bố về gen mã hóa CHI của cây sắn dây *Pueraria montana* var. *lobata* (*P. lobata*). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thông tin, đặc điểm về gen mã hóa CHI thông qua việc nhân gen bằng RT-PCR, giải trình tự nucleotide, so sánh phân tích đặc điểm vùng chức năng trên trình tự gen và amino acid. Kết quả giải trình tự gen CHI bằng phương pháp Sanger cho thấy, vùng CDS có chiều dài 672 bp mã hóa cho 224 amino acid. So sánh trình tự nucleotide và amino acid giữa gen CHI của *P. lobata* và gen tham chiếu cùng loài (D63577.1) cho thấy mức độ tương đồng là 99,7%. 2 thay đổi nucleotide trên gen CHI làm thay đổi amino acid nhưng không nằm trong vị trí hoạt động bảo thủ của enzyme. Các vị trí hoạt động là một số amino acid bảo thủ (như liên quan đến liên kết hydro hoặc trung tâm liên kết cơ chất) cũng hiện diện trong gen CHI của *P. lobata*. Sử dụng SWISS-MODEL xây dựng mô hình cấu trúc protein cho thấy, protein CHI của *P. lobata* tương thích gần nhất với protein này của *Medicago sativa* - đã được xác định cấu trúc, với các vùng cấu trúc xoắn α và phiến gấp β hoàn toàn tương đồng.

Từ khóa: chalcone isomerase, flavonoid, gen CHI, *P. lobata*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Sắn dây là cây thuốc nam được dùng để chữa bệnh trong y dược cổ truyền ở châu Á [1], với bộ phận sử dụng chính là rễ, có tác dụng chữa cảm sốt, say rượu, kiết lỵ cấp tính cùng những lợi ích tiềm năng trong chữa bệnh tiểu đường và tim mạch... [2-5]. Hiện nay, việc sử dụng *P. lobata* làm nguyên liệu thực phẩm, thực phẩm chức năng và trong mỹ phẩm khá phổ biến [6], do nó là một nguồn chất từ thực vật có tác dụng chống ôxy hóa, đường hóa protein và các hoạt động tái tạo da [7]. Các chất chuyển hóa thứ cấp được sử dụng để cải thiện sức khỏe con người như giảm mức cholesterol và ngăn ngừa một số bệnh ung thư [1]. Ngoài ra, Ahn và cs (2019) [8] còn quan tâm đến tác động phụ thuộc của genistein có trong rễ cây *P. lobata* lên sự kích hoạt mạng lưới nội chất và tác dụng chống tăng sinh qua con đường apoptosis chứ không phải mạng lưới nội chất trong tế bào ung thư vú MCF-7.

Gen CHI mã hóa enzyme CHI ở nhiều loài thực vật tham gia vào quá trình chuyển hóa theo con đường phenylpropanoid

để tạo ra flavonoid và isoflavonoid. Trong con đường tổng hợp đó, CHI (E.C.5.5.1.6) xúc tác sự tạo vòng của chalcone (4, 2', 4', 6'-tetrahydroxychalcone) và 6'-deoxychalcone (4, 2', 4'-trihydroxychalcone) để tạo thành (2S)-naringenin (5, 7, 4'-trihydroxyflavanone) và (2S)-5-deoxyflavanone (7, 4'-dihydroxyflavanone), đây là một bước quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp flavonoid [9].

Đã có nhiều nghiên cứu về gen mã hóa CHI, một họ gồm 4 loại protein CHI, CHI loại I chuyên chalcone naringenin thành naringenin phổ biến trong giới thực vật [10, 11], trong khi CHI loại II điển hình được biết là “đặc hiệu” cho cây họ đậu [12]. Do đó, việc nghiên cứu đầy đủ các đặc tính của gen CHI được tiến hành trên nhiều loài thực vật như một số cây thuộc họ đậu, ngô, *Arabidopsis* và *Petunia hybrid*... [13-17]. Gần đây, gen CHI từ đậu tương cũng đã được nghiên cứu và biểu hiện tăng cường trong các cây đậu tương và thổ nhân sâm chuyển gen nhằm tăng cường hàm lượng daidzein và genistein hoặc flavonoid tổng số [18, 19]. Đối với cây *P. lobata*, một nhóm các sản phẩm phenol tự nhiên đã được nghiên cứu do có hàm lượng cao và tầm quan trọng của nó

*Tác giả liên hệ: Email: hueigr76@gmail.com

Characterisation of chalcone isomerase gene isolated from *Pueraria montana* var. *lobata* plant

Thi Bich Ngoc Tran¹,
Tien Dung Nguyen², Thi Thu Hue Huynh^{3, 4*}

¹Vietnam National University of Agriculture

²Regional Research and Development Institute

³Institute of Genome Research, VAST

⁴Graduate University of Science and Technology, VAST

Received 16 August 2021; accepted 24 September 2021

Abstract:

Chalcone isomerase (CHI) is well-known as an important enzyme in the biosynthetic pathways such as flavonoid, isoflavonoid, and anthocyanin biosynthesis. The enzyme was investigated in some kinds of plants in Fabaceae but no research was conducted about the *CHI* gene of *Pueraria montana* var. *lobata* (*P. lobata*) in Vietnam. In order to provide more information and characterisation of the gene, our study isolated the *CHI* gene by RT-PCR and Sanger sequencing. The sequence of the *CHI* gene was analysed with nucleotide and deduced amino acid sequences to find the main domains. A full-length CDS of *CHI* gene from *P. lobata* is 672 bp encoded 224 amino acids. By using bioinformatic tools to compare, the isolated gene shared 99.7% homology with the same species reference (code D63577.1). Two different nucleotides in the gene were altered the amino acids in the protein, but the differences have not happened in active sites. Additionally, the conserved amino acids related to active catalysis of a hydrogen bond network also appeared in the *P. lobata* *CHI* gene. SWISS-MODEL was used to build the complete protein modeling showing that *P. lobata* CHI protein was the most similar with CHI of *Medicago sativa* - was defined structure in which all alpha-helix and beta-helix were completely homologies.

Keywords: chalcone isomerase, *CHI* gene, flavonoid, *P. lobata*.

Classification number: 4.6

[20, 1]. Nghiên cứu của Korsangruang và cs (2010) [21] cho thấy, sự biểu hiện của CHI ở rễ cao nhất so với các bộ phận khác của cây. Ngoài ra, 2 nghiên cứu nhân dòng và biểu hiện của gen *CHI1* và *CHI2* phân lập từ *P. lobata*, trong đó, gen *CHI1* được đưa vào vector pET-3d đã được Terai và cs (1996) [22] biểu hiện thành công ở *E. coli*. Gen *CHI2* được xác định trình tự và đưa vào vector pDEST17 để biểu hiện ở *E. coli* [19]. Tuy nhiên, số lượng các nghiên cứu công bố về gen *CHI* của cây *P. lobata* trên thế giới vẫn còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nhân gen và xác định trình tự đoạn gen *CHI* ở cây sắn dây nhằm mục đích phân tích sự đa hình và đặc điểm vùng chức năng trên gen *CHI*, phục vụ nghiên cứu ứng dụng gen mã hóa enzyme CHI trong các nghiên cứu sau này.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Các mẫu củ cây sắn dây *P. lobata* 1 năm tuổi được thu thập tại huyện Phú Bình, tỉnh Thái Nguyên. Việc định danh về hình thái do Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật thực hiện và Viện Nghiên cứu Hệ gen định danh bằng chỉ thị phân tử (kết quả không đưa vào nghiên cứu này). Sau khi thu và làm sạch, mẫu được đưa vào dung dịch bảo quản RNA và lưu giữ trong -80°C.

Phương pháp

Tách chiết RNA tổng số: RNA tổng số được tách chiết bằng phương pháp sử dụng Trizol và loại bỏ những tạp chất (lipit, protein, hợp chất thứ cấp...) bằng chloroform, kết tủa RNA bằng isopropanol lạnh. RNA tổng số được hòa tan trong nước đã được xử lý DEPC, sau đó xác định nồng độ RNA bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm [22].

Khuếch đại gen *CHI* bằng phương pháp RT-PCR: để chuẩn bị cho phản ứng RT-PCR, RNA tinh sạch được sử dụng làm khuôn để tổng hợp cDNA bằng cách sử dụng bộ KIT Revert Aid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher KIT). Sự khuếch đại gen *CHI* của *P. lobata* được thực hiện với 1 cặp mồi 5'-AAAGAGTGTTTGAGAATGGCG-3' và 5'-ATCACTTCCCTCAACTCAGAC-3', được thiết kế dựa vào trình tự tham chiếu trên NCBI (D63577.1). Tổng thể tích phản ứng RT-PCR là 25 µl bao gồm 1 U Tag Dream polymerase, 10X buffer Tag polymerase, 10 mM dNTPs, 10X cDNA template, 10 µM primer và nước tinh sạch. Chu kỳ nhiệt được thiết kế như sau: biến tính ở 94°C trong 3 phút; 30 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 58°C trong 30 phút, 72°C trong 45 giây), sau đó kéo dài 72°C trong 5 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 0,8% để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen với kích

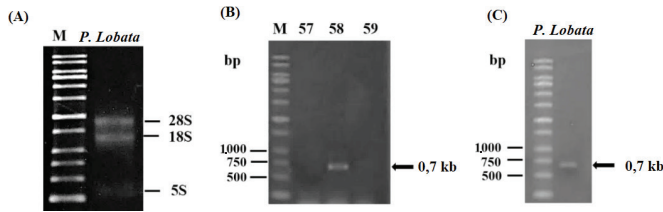
thuốc dự kiến 700 bp.

Giải trình tự DNA bằng phương pháp Sanger: trước khi xác định trình tự với bộ kit Big Dye Terminator (ABI Foster City, Mỹ) trên hệ thống Applied Biosystems™ 3500, các sản phẩm khuếch đại đã được tinh sạch bằng bộ kit OMEGA Biotek. Các trình tự nucleotide sau đó được phân tích, chỉnh sửa và so sánh bằng phần mềm BioEdit, BLAST. Protein được dự đoán nằm trong vùng bảo thủ và motif của từng trình tự amino acid được dự đoán bằng phần mềm của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) và phần mềm dự đoán motif (<https://www.genome.jp/tools/motif/>). Phần mềm SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) được sử dụng để xây dựng mô hình cấu trúc protein.

Kết quả và bàn luận

Khuếch đại gen CHI từ *P. lobata* bằng RT-PCR

RNA tổng số (hình 1A) sử dụng làm khuôn cho tổng hợp cDNA và khuếch đại gen *CHI* bằng RT-PCR thực hiện theo mô tả của Sambrook và Russell (2001) [23], 3 nhiệt độ gắn mỗi khác nhau đã được thực hiện. Cuối cùng, sản phẩm PCR được tinh sạch và điện di trên gel agarose 0,8% nhằm kiểm tra chất lượng và độ đặc hiệu (hình 1). RNA tổng số có chất lượng rõ, nét và đáp ứng yêu cầu cho tổng hợp cDNA (hình 1A).

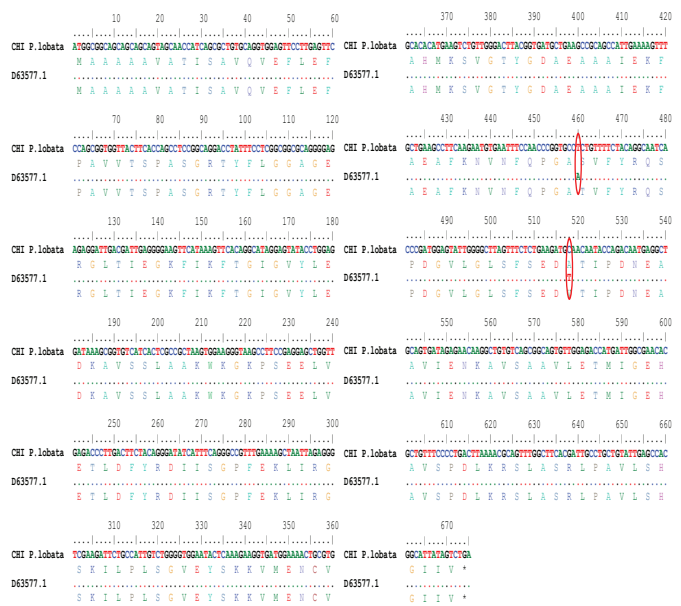


Hình 1. Hình ảnh điện di gen *CHI* của *P. lobata* trên gel agarose. M: marker 1 kb (InTron); (A) Kết quả của quá trình tách chiết RNA toàn phần; (B) Kết quả phản ứng RT-PCR gen *CHI* của *P. lobata* ở các nhiệt độ khác nhau (57, 58 và 59°C); (C) Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR.

Kết quả trong hình 1B cho thấy, sản phẩm PCR ở mẫu nghiên cứu thu được bằng DNA rõ ràng, với kích thước khoảng 0,7 kb phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết, xuất hiện ở nhiệt độ gắn mỗi tốt nhất 58° và không có ở nhiệt độ khác (57 hoặc 59°C). Ngoài ra, tất cả các đoạn môi còn dư lại đều được loại bỏ để tạo ra sản phẩm tinh sạch tốt và chất lượng cao, đảm bảo trình tự DNA có thể được xác định chính xác (hình 1C). Như vậy, gen *CHI* của *P. lobata* được khuếch đại thành công với kích thước đúng theo tính toán.

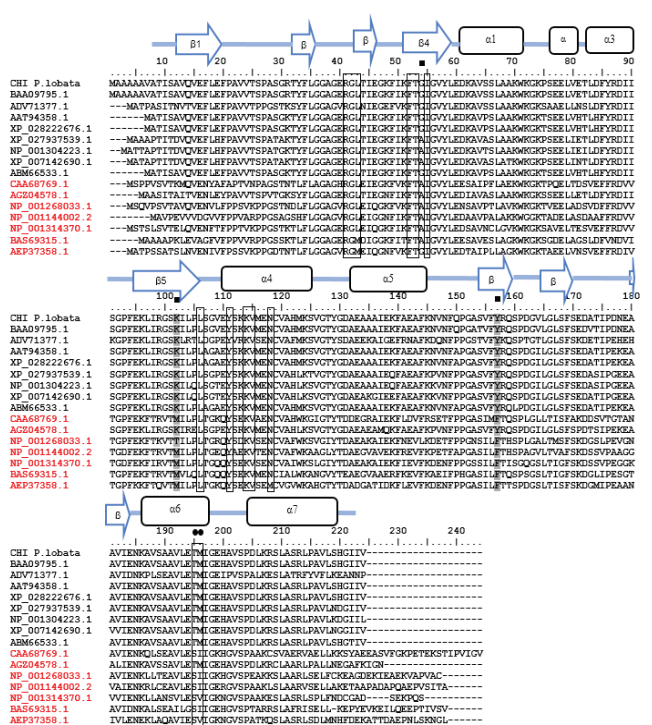
Phân tích trình tự nucleotide của gen *CHI* phân lập từ *P. lobata*

Kết quả giải trình tự DNA bằng phương pháp Sanger thể hiện đoạn gen phân lập được là ORF hoàn chỉnh mã hóa gen *CHI* của *P. lobata*. Trình tự này có kích thước 674 bp, mã hóa cho 224 amino acid. Với 99,7% là hệ số tương đồng giữa gen *CHI* của *P. lobata* và trình tự tham chiếu D63577.1 được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm BLAST, có 2 vị trí nucleotide sai khác dẫn đến sai khác 2 vị trí amino acid là T (460), C (518) (hình 2) được quan sát thấy ở gen *CHI* của *P. Lobata*, trong khi trên trình tự tham chiếu tương ứng là A (460) và T (518). Ở trình tự amino acid suy diễn, vị trí serin (154), alanine (173) trong gen *CHI* ở mẫu nghiên cứu và ở trình tự tham chiếu (D63577.1) tương ứng là threonine (154), valine (173). Những sự khác nhau này có thể cho thấy sự đa hình của gen *CHI* của *P. lobata* ở Việt Nam so với trình tự tham chiếu, do không làm thay đổi khung đọc cũng như số lượng amino acid ở protein suy diễn.



Hình 2. Sự sắp xếp theo cặp của gen *CHI* phân lập từ *P. lobata* trong nghiên cứu và gen tham chiếu trên NCBI (D63577.1). Các vòng tròn màu đỏ đại diện cho các nucleotide khác nhau tạo ra các amino acid khác nhau.

Trình tự amino acid suy diễn từ gen *CHI* của *P. lobata* được so sánh với trình tự của 8 loài trong họ *Fabaceae* và những loài khác đã được công bố trình tự CDS bằng cách sử dụng phần mềm BLAST và BioEdit (hình 3). Sau đó, các trình tự amino acid suy diễn được dự đoán những vị trí thuộc vùng bảo thủ bằng công cụ Conserved Domains của NCBI.



Hình 3. So sánh trình tự amino acid suy diễn từ gen CHI của *P. lobata* và protein CHI của các loài trong họ Fabaceae cùng các loài khác. BAA09795.1 (*P. lobata*), ADV71377.1 (*P. lobata*), AAT94358.1 (*Glycine max*), XP_028222676.1 (*G. soja*), XP_027937539.1 (*Vigna unguiculata*), NP_001304223.1 (*V. radiata*), XP_007142690.1 (*Phaseolus vulgaris*), ABM66533.1 (*Glycyrrhiza uralensis*), CAA68769.1 (*Petunia hybrida*), AGZ04578.1 (*Medicago sativa*), NP_001268033.1 (*Vitis vinifera*), NP_001144002.2 (*Zea mays*), NP_001314370.1 (*Gossypium hirsutum*), BAS69315.1 (*Lilium speciosum*), AEP37358.1 (*Chisy morifolium*) từ cơ sở dữ liệu NCBI; khoảng vùng chữ nhật hiển thị những amino acid liên kết (2S)-naringenin trong phức hợp CHI-(2S)-naringenin; các amino acid của trung tâm liên kết hydro được ghi nhận bằng các chấm màu đen; trình tự CHI của họ Fabaceae có tên màu đỏ, trình tự của các loài không thuộc họ Fabaceae có tên màu đen.

Khi phân tích các vùng chức năng liên quan trong cấu trúc của CHI nhận thấy, vai trò của các liên kết hydro là một yếu tố quan trọng với chức năng xúc tác của enzyme này [23], có nhiều amino acid bảo thủ đã được đề cập trong các công bố trước đây là các vị trí hoạt động trong CHI của Alfalfa, bao gồm vị trí hoạt động nằm trên chuỗi β 3a (Arg-36, Gly-37, Leu-38), β 3b (Phe-47, Thr-48, Ile-50), α 4 (Tyr-106, Lys-109, Val-110, Asn-113), Thr-190 và Met-191 [9]. Các vị trí amino acid quan trọng này đều có ở trình tự amino acid suy diễn của gen CHI trong nghiên cứu này tại các vị trí hoạt động nằm trên chuỗi β 3a (Arg-41, Gly-42, Leu-43), β 3b (Phe-52, Thr-53, Ile-55), α 4 (Tyr-111, Lys-114, Val-115, Asn-118), α 6 (Thr-195, Met-196) và những biến đổi amino acid trong trình tự của gen CHI trong nghiên cứu này đều không nằm ở những vị trí hoạt động (hình 3).

Đáng chú ý, tất cả các trình tự CHI loại II trong họ Fabaceae thường có Thr-190 và Met-191 ghi nhận tính bảo thủ cao cho phép enzyme tạo ra một liên kết không chỉ với naringenin-chalcone mà còn liên kết hiệu quả với 6'-deoxychalcone. 2 vị trí này của *P. lobata* cũng là Thr-195 và Met-196. Tuy nhiên, ở một số loài, việc thay thế chúng bằng các gốc Ser và Ile là để tăng liên kết với vòng trihydroxy của chất nền liên kết, có thể bị ảnh hưởng bởi liên kết 6'-deoxychalcone [12] (hình 3).

Tạo mô hình cấu trúc protein 3 chiều của CHI *P. lobata*



Hình 4. Cấu trúc 3 chiều của gen CHI từ *P. lobata*. Hình chữ nhật thể hiện chuỗi xoắn alpha, mũi tên biểu thị chuỗi xoắn beta. Màu xanh lam đậm trên vùng trình tự cho biết độ tin cậy cao nhất, tiếp theo là màu xanh lam nhạt hơn và màu đỏ.

Như thể hiện trong hình 4, mô hình protein 3 chiều suy diễn từ trình tự gen CHI của *P. lobata* điển hình được xác định qua SWISS-MODEL. Chuỗi đơn của 224 amino acid được xử lý bằng phương pháp tinh thể học tia X, với độ đồng nhất của trình tự từng cặp là 80,93% và độ phân giải cao 2,4 Å với cấu trúc chalcone - flavonone isomerase 1 của *Medicago sativa* trong dữ liệu. Việc xây dựng protein được suy diễn dựa trên mô hình tương đồng cấu trúc và được đánh giá bằng cách sử dụng Global Model Quality Estimate (GMQE) giá trị từ 0 đến 1 và điểm Quaternary Structure Quality Estimate (QSQE) ở khoảng 0 (hoặc >-4) (bảng 1). Nói chung, điểm GMQE cao là 0,86 và với 0,96 độ bao phủ cho thấy, độ tin cậy và chính xác cao của kết quả mô hình hóa cấu trúc. Giá trị QMEAN (-0,2) được tính toán cho thấy, sự nhất quán tốt giữa cấu trúc mô hình và thực nghiệm có kích thước tương tự.

Bảng 1. Các thông số chất lượng mô hình hóa.

Mẫu	Độ tương đồng	Dạng chuỗi	Phương pháp	Độ bao phủ	GMQE	QMEAN	Mô tả
6cjo.1.A	80,93%	đơn	X-ray 2.4Å ^a	0,96	0,86	-0,2	Chalcone - flavonone isomerase 1. Cấu trúc tinh thể của Chalcone - flavonone isomerase từ <i>M. sativa</i> với đột biến G95S.

Qua phân tích so sánh trình tự nucleotide và amino acid của gen CHI đã phân lập cho thấy, đoạn gen có đầy đủ các vị trí hoạt động quan trọng cần có của CHI và với dự đoán cấu trúc 3 chiều nhận thấy, các vùng cấu trúc xoắn α và phiến gấp β hoàn toàn tương đồng với các vùng cấu trúc

đã được chỉ ra ở enzyme CHI1 của *M. sativa*. 2 sự thay đổi nucleotide trên trình tự gen làm thay đổi amino acid nhưng không nằm trong trung tâm hoạt động của enzyme. Tầm quan trọng và khả năng ứng dụng của các gen thuộc họ CHI đã được chứng minh trong nghiên cứu chuyển gen *GmCHI* vào cây thỏ nhàn sâm của Thi Nhu Trang Vu và cs (2018) [19] khi biểu hiện tăng cường nhờ promoter CaMV35S đã làm tăng sự tích lũy flavonoid ở cây chuyển gen lên 7 lần, hay nghiên cứu của Huu Quan Nguyen và cs (2020) [18] trên cây đậu tương chuyển gen *GmCHIIA* cho thấy, cây chuyển gen đã có hàm lượng daidzein và genistein tăng lên một cách đáng kể. Do đó, việc dự đoán này rất có ý nghĩa cho định hướng nghiên cứu ứng dụng gen CHI và enzyme CHI trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, gen CHI từ cây sắn dây đã được phân lập và xác định trình tự với chiều dài trên 700 bp, trong đó vùng CDS mã hóa cho 224 amino acid, có 2 vị trí sai khác về nucleotide và amino acid so với gen tham chiếu (D635771.1). Gen mã hóa CHI của *P. lobata* chứa các vùng chức năng chính và bảo thủ cao giúp duy trì cấu trúc và chức năng của nó tương tự như gen của nhiều loài trong họ và tương đồng cao với CHI1. Kết quả bước đầu phân tích đặc điểm gen CHI ở cây sắn dây của Việt Nam giúp định hướng trong nghiên cứu ứng dụng gen CHI và enzyme CHI trong các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] X. Wang, et al. (2019), "Identification of Three (Iso) flavonoid Glucosyltransferases from *Pueraria lobata*", *Front Plant Sci.*, **10**, DOI: 10.3389/fpls.2019.00028.

[2] K.H. Wong, et al. (2011), "Kudzu root: traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases", *J. Ethnopharmacol.*, **134**, pp.584-607.

[3] Z. Zhang, et al. (2013), "*Radix puerariae*: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use", *J. Clin. Pharmacol.*, **53**, pp.787-811.

[4] S.C. Mun, G.S. Mun (2015), "Dynamics of phytoestrogen, isoflavonoids, and its isolation from stems of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi growing in Democratic People's Republic of Korea", *J. Food Drug Anal.*, **23**, pp.538-544.

[5] X.Z. He, et al. (2011), "A genomic approach to isoflavone biosynthesis in kudzu (*Pueraria lobata*)", *Planta*, **233**, pp.843-855.

[6] W. Cherdshewasart, et al. (2008), "Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay", *J. Reprod. Dev.*, **54**, pp.63-67.

[7] D. Tungmunnithum, et al. (2020), "A promising view of Kudzu plant, *Pueraria montana* var. *lobata* (Willd.) sanjappa & pradeep: flavonoid phytochemical compounds, taxonomic data, traditional uses and potential biological activities for future cosmetic application", *Cosmetics*, **7**, DOI: 10.3390/cosmetics7010012.

[8] S.Y. Ahn, et al. (2019), "Dual effects of isoflavonoids from *Pueraria lobata* roots on estrogenic activity and anti-proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cells", *Bioorg. Chem.*, **83**, pp.135-144.

[9] J.M. Jez, et al. (2000), "Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase", *Nat. Struct. Biol.*, **7**, pp.786-791.

[10] L. Ralston, et al. (2005), "Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and II chalcone isomerases", *Plant Physiol.*, **137**, pp.1375-1388.

[11] N. Shimada, et al. (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 Physiol.*, **131**, pp.941-951.

[12] A.X. Cheng, et al. (2017), "Identification of chalcone isomerase in the basal land plants reveals an ancient evolution of enzymatic cyclization activity for synthesis of flavonoids", *New Phytol.*, **217**, pp.909-924.

[13] A.J. Van Tunen, et al. (1988), "Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes", *EMBO J.*, **7**, pp.1257-1263.

[14] E.R. Blyden, et al. (1991), "Sequence analysis of a chalcone isomerase cDNA of *Phaseolus vulgaris* L.", *Plant Mol. Biol.*, **16**, pp.167-169.

[15] E. Grotewold, T. Peterson (1994), "Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavanone isomerase", *Mol. Gen. Genet.*, **242**, pp.1-8.

[16] M. Dastmalchi, S. Dhaubhadel (2015), "Soybean chalcone isomerase: evolution of the fold, and the differential expression and localization of the gene family", *Planta*, **241**, pp.507-523.

[17] W. Jiang, et al. (2015), "Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*", *J. Exp. Bot.*, **66**, pp.7165-7179.

[18] Huu Quan Nguyen, et al. (2020), "Overexpressing *GmCHIIA* increases the isoflavone content of transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **56**, pp.842-850.

[19] Thi Nhu Trang Vu, et al. (2018), "Overexpression of the *Glycine max* chalcone isomerase (*GmCHI*) gene in transgenic *Talinum paniculatum* plants", *Turk J. of Bot.*, **42**, pp.551-558.

[20] W. Cherdshewasart, et al. (2007), "Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, pp.428-434.

[21] S. Korsanguang, et al. (2010), "Cloning of gene encoding chalcone isomerase (CHI) from *P. candollei* and expression of genes involved isoflavonoid biosynthesis pathway in seedling plants", *Planta Med.*, **76**, DOI: 1055/s-0030-1264316.

[22] Y. Terai, et al. (1996), "Cloning of chalcone-flavanone isomerase cDNA from *Pueraria lobata* and its overexpression in *Escherichia coli*", *Protein Expr. Purif.*, **8**, pp.183-190.

[23] J. Sambrook, D.W. Russell (2001), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.