

铁皮石斛咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶基因的分离与表达分析

张 岗^{1,2}, 胡本祥¹, 张大为², 陈 伟¹, 郭顺星^{2*}

1. 陕西中医学院药学院/陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 西安 712046

2. 中国医学科学院-北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: **目的** 分离珍稀濒危药用植物铁皮石斛咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶 (caffeoyl CoA O-methyltransferase, CCoAOMT) 基因 (*DoOMT*) 并进行生物信息学和表达模式分析。 **方法** 采用 RT-PCR 和 RACE 技术获基因 cDNA 全长; 利用生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域和三维建模等分子特性; 用 DNASTAR 6.0 和 MEGA 4.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 借助实时定量 PCR 检测基因表达模式。 **结果** 分离到 *DoOMT* (GenBank 注册号 KF876839), cDNA 全长 1 005 bp, 编码一条由 239 个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量为 2.708×10^4 , 等电点 5.03; *DoOMT* 蛋白不含跨膜域和信号肽, 具有氧甲基转移酶 family 3、甲基转移酶的保守结构域(13~238、31~238)和 8 个保守基序; *DoOMT* 与植物 CCoAOMTs 蛋白一致性为 49.4%~78.7%, 所在分支隶属于 CCoAOMTs 分子进化的 1b 类群, 与单子叶植物香草亲缘关系最近; *DoOMT* 基因转录本在石斛根、茎、叶器官中为组成型表达, 茎中相对表达量较高, 为叶中的 4.562 倍, 根和叶中无显著差异。 **结论** 铁皮石斛咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶基因 *DoOMT* 的分子特征为进一步研究其在铁皮石斛次生代谢和生长发育过程中的作用奠定基础。

关键词: 铁皮石斛; 甲基转移酶; 基因克隆; 序列分析; 实时定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)08-0-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.

Isolation and expression analysis of caffeoyl CoA O-methyltransferase gene in *Dendrobium officinale*

ZHANG Gang^{1,2}, HU Ben-xiang¹, ZHANG Da-wei², CHEN Wei¹, GUO Shun-xing²

1. College of Pharmacy and Shaanxi Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Basis & New Drugs Research, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an, 712046, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To isolate the caffeoyl CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) gene (*DoOMT*) in a rare endangered medicinal orchid species *Dendrobium officinale*, and to carry out the bioinformatics and expression mode analysis. **Methods** RT-PCR and RACE technologies were used to obtain the full length cDNA of *DoOMT* gene. The characteristics of physiochemical properties, conserved domains, and three dimensional structure of the deduced DoOMT protein were determined using a series of bioinformatic tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using DNASTAR 6.0 and MEGA 4.0 softwares, respectively. Real time quantitative PCR was used for gene expression analysis. **Results** The full length cDNA of *DoOMT* was 1 005 bp in length and encoded a 239-aa protein with a molecular weight of 27 080 and an isoelectric point of 5.03; The deduced DoOMT protein, without transmembrane or signal peptide residues, contained the oxygen methyltransferase family 3, methyltransferase conserved domains (13—238, 31—238), and eight conserved signature sequences. DoOMT had high identities (49.4%—78.7%) with CCoAOMTs proteins from various plants; DoOMT belonged to the 1b subgroup of the CCoAOMT evolutionary tree, and was closely related to the monocot *Vanilla planifolia*. *DoOMT* transcripts were constitutively expressed in the leaves, stems, and roots. The transcription level of *DoOMT* was markedly higher than that of leaves with 4.562 fold, whereas the transcript amount showed no significant difference in leaves and roots. **Conclusion** Molecular characterization of *DoOMT* will be useful for further functional

收稿日期: 2013-12-2

基金项目: 国家自然科学基金资助(31070300, 31101608); 陕西省青年科技新星项目(2012KJXX-44); 陕西省教育厅专项科研项目(2013JK0829)

作者简介: 张 岗, 男, 博士, 副教授, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: zhanggang2006@gmail.com

*通信作者 郭顺星, 男, 博士, 研究员, 主要从事药用植物菌根生物学研究。Tel/Fax: 86-10-62829619 E-mail: sxguo1986@163.com

determination of the gene involving in the secondary metabolism along with growth and development in *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*; methyltransferase; gene cloning; sequence analysis; real time quantitative PCR

氧甲基转移酶 (*O*-methyltransferase, OMT) 以 *S*-腺苷-*L*-甲硫氨酸 (*S*-adenosylmethionine, SAM) 为甲基供体, 催化类黄酮、生物碱、植保素或木质素前体等化合物的甲基化反应, 在植物细胞生理代谢中起重要作用^[1]。底物特异性和氨基酸序列特征将植物 OMTs 分为两大类型。II 型 OMTs 主要包括咖啡酸氧甲基转移酶 (Caffeic acid OMT, COMT), 相对分子质量较大, 无需金属离子激活即可催化木质素前体咖啡醛或 5-羟基松柏醛等物质的甲基化^[2]。咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶 (Caffeoyl-CoA OMT, CCoAOMT) 则属于 I 型, 相对分子质量较小, 需要 Mg^{2+} 激活, 以咖啡酰辅酶 A 为底物, 将 SAM 上的甲基转移到木质素单体的苯环碳 3 位置上, 形成阿魏酰辅酶 A, 是木质素合成途径中的关键酶^[2]。CCoAOMTs 蛋白的氨基酸序列具有八个保守基序, 其中 A、B 和 C 为植物 OMTs 所共有, 而 D、E、F、G 和 H 5 个基序为 CCoAOMTs 特有的标签序列^[2]。

植物 CCoAOMTs 通常以多基因家族成员形式存在, 以满足植物各种生理需求。大量研究已经证实 CCoAOMTs 基因对植物细胞木质素合成至关重要。CCoAOMTs 基因参与愈创木基 (G) 和紫丁香基 (S) 木质素的生物合成, 抑制 CCoAOMTs 基因表达会使拟南芥和苜蓿木质素含量普遍降低^[3-4]。对烟草 CCoAOMT 和 COMT 基因沉默分析发现, 单独抑制前者的转基因株系木质素下降幅度显著大于抑制后者, 两个基因同时被下调导致木质素含量急剧降低, 说明二者的协同效应^[5]。关于香草 *Vanilla planifolia* CCoAOMT 的最新研究证据表明, *Vp-OMT4* 和 *Vp-OMT5* 基因原核表达产物最适底物为 3'-五羟黄酮, 而非咖啡酰辅酶 A 或咖啡酸等, 暗示 CCoAOMTs 基因在植物细胞苯丙烷类代谢中的新机制^[6]。同时, CCoAOMTs 基因在植物抵御生物、非生物胁迫过程中也起重要作用。西瓜^[7]、拟南芥^[8]和龙眼^[9] CCoAOMTs 分别调控植物对干旱、高盐或低温等逆境胁迫的生理适应。在番茄-青枯雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 亲和互作体系中, 病菌侵染导致宿主 CCoAOMT 基因表达量降低, 说明该基因参与植物对病原菌固有的防御反应^[10]。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生草本植物, 药用部位为新鲜或干燥茎, 具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳、明目强身等作用, 是石斛属药用植物中最为珍稀名贵的种^[11]。石斛属植物主要含有多糖、芪类、酚类、木质素类等活性成分, 具有重要的药理作用^[12]。前期, 本课题组利用 SSH 技术富集菌根真菌侵染铁皮石斛根的差异表达基因^[13], 分离得到一条 447 bp 的 EST, BLASTx 分析显示其与香草 *Vp-OMT4* (GenBank 注册号 ADZ76153) 相似性较高 (73%)。鉴于 CCoAOMTs 基因在植物细胞生理代谢中的重要作用, 该差异基因可能在铁皮石斛生长发育中起作用。本研究利用 RACE 技术从铁皮石斛分离到一个 CCoAOMT 基因 cDNA 全长 *DoOMT*, 并进行生物信息学及表达模式分析, 为进一步揭示其在铁皮石斛次生代谢以及生长发育过程中的生物学功能提供依据。

1 材料

野生铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo 采自云南西双版纳, 取石斛根、茎、叶组织样品, 液氮速冻后置 $-80^{\circ}C$ 保存备用。

2 方法

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, China) 操作说明制备各样品总 RNA, NanoDropTM 2000 分光光度计 (Thermo Fisher, USA) 分析 RNA 质量、纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测完整性。按照 M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega, USA) 操作说明, 逆转录合成 cDNA 第一链, $-20^{\circ}C$ 保存备用。

2.2 5'RACE 和 RT-PCR 验证

根据原始 EST 序列, 设计 2 条 5'-RACE 引物: DoOMT-R1 5'-GCCCCATTTTTATTGGCGACAC-3'; DoOMT-R2 5'-ATCCATTCCAGTTCAAACGAC G-3', 按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Japan) 说明书, 分别与 Nested Universal Primer A (NUP) 引物组合进行 2 次巢式 5'-RACE。两次 PCR 反应体系均为 25 μ L, 包括 10 \times Advantage[®] 2 PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μ L, DoOMT-R1 或 DoOMT-R2 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 10 \times NUP 0.5 μ L, 5'-RACE ready

cDNA (第一次 PCR 模板) 或第一次 PCR 产物 (第二次 PCR 模板) 各 1.0 μ L, 50 \times Advantage[®] 2 Polymerase Mix (5 U/L) 0.5 μ L, ddH₂O 19.5 μ L。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, TianGen 胶回收试剂盒 (TianGen, 中国) 纯化目的条带, 连接至 pMD18-T vector (Takara, 中国), 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞, 随机挑选 3 个克隆送上海生工测序。所获 cDNA 序列与原 EST 拼接, 设计跨开放阅读框 (open reading frame, ORF) 引物 DoOMT-S1: 5'-CTCCCTATCTCGAAATGGA-CG-3', DoOMT-AS1 5'-CACACAGAACATAGCA-ATACAGCA-3', 进行全长基因 RT-PCR 验证。

2.3 序列分析

使用一系列网络在线工具进行 *DoOMT* 基因核酸及编码蛋白的生物信息学序列分析。利用 NCBI 的 BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析 cDNA 序列; 用 ExPASy Proteomics Server 的 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan/>) 和 PROSITE SCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html) 分析 *DoOMT* 蛋白质的结构域和基元; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 分析蛋白质理化性质和二级结构; 采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三维建模分析; SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 预测蛋白质信号肽和跨膜区域; PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) 进行蛋白质亚细胞定位分析。采用 DNASTAR 6.0 进行氨基酸序列比对分析; 借助 MEGA 4.0 构建系统进化树。

2.4 实时定量 PCR 分析

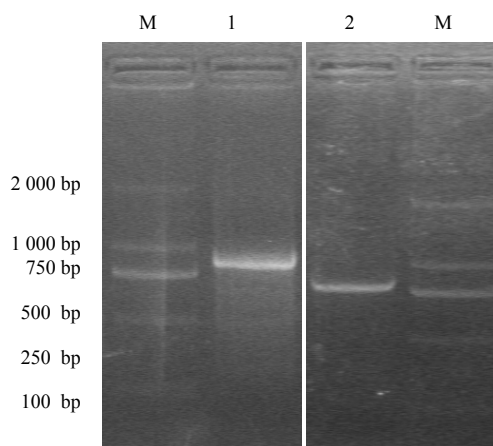
分别用 2 μ g 根、茎、叶样品总 RNA 反转录合成 cDNA, *DoEF1 α* 作为内参基因^[14], qPCR 分析 *DoOMT* 基因的组织表达模式。qPCR 引物 DoOMT-S2 5'-CATTCATCAAGGAAGCAGGAGT-3' 和 DoOMT-AS2 5'-CCAAAGGGTGTGTCAT AG-CAT-3' 的扩增产物长 215 bp。用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, USA)

进行 qPCR。反应体系 25 μ L 包括 2 \times SYBR[®] Premix *Ex Taq*[™] Master Mix (Takara, China) 12.5 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, ROX 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 9 μ L。每个反应重复 3 次, 包括不加模板的对照, 实验重复 3 次。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 40 个循环, 反应结束绘制熔解曲线。根据 ABI PRISM 7500 SDS 软件 (Applied Biosystems, USA) 生成的循环阈值 (Cycle threshold, CT), 用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法^[15] 计算相对表达量。

3 结果与分析

3.1 *DoOMT* 基因克隆和全长验证

经过 2 次巢式 5'-RACE 反应, 扩增产生长度为 850 bp 的目标条带 (图 1), 克隆、测序获得 807 bp 的序列, 拼接分析获得了一条 1 005 bp 的 cDNA。BLASTx 分析表明其与 GenBank 中已注册的多种植物咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶基因有很高的相似性 (52%~79%), 因此将其定名为 *DoOMT*, 提交 GenBank 获得注册号 KF876839。*DoOMT* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长 720 bp, 5'-UTR 长 68 bp, 3'-UTR 长 186 bp, 具有真核生物 mRNA 加尾信号 "AATAA" 以及 polyA 尾巴, 起始密码子附近碱基序列 GAAATGG (即 A/GNNATGG)。使用 DoOMT-S1/AS1 引物, RT-PCR 扩增产生单一条带 (图 1), 克隆、测序获得 814 bp 的序列包含完整 ORF, 与拼接序列一致, 进而验证已成功获得 *DoOMT* 基因全长。



1-5'-RACE 产物 2-全长基因 M-Marker
1-5'-RACE product 2-Full length gene M-Marker

图 1 铁皮石斛 *DoOMT* 基因全长 cDNA 克隆
Fig. 1 Cloning of full length cDNA of *DoOMT* gene in *D. officinale*

3.2 DoOMT 基因的编码蛋白理化特性分析

Protparam 预测 DoOMT 基因编码蛋白分子式 $C_{1223}H_{1966}N_{314}O_{362}S_7$ ，等电点 5.03，相对分子质量为 2.708×10^4 ，介于植物 CCoAOMTs 相对分子质量 $2.6 \times 10^4 \sim 2.9 \times 10^4$ [2]；DoOMT 蛋白带负电残基 (Asp+Glu) 为 39，带正电残基 (Arg+Lys) 为 28。该蛋白不稳定系数为 40.48，脂肪系数为 113.01，亲水性系数为 -0.020。SOPMA 分析 DoOMT 蛋白的二级结构主要由 α 螺旋 (alpha helix, 44.77%)，少量 β 转角 (β turn, 7.95%)，延伸链 (extended strand, 17.99%) 和随机卷曲 (random coil, 29.29%)。

3.3 DoOMT 蛋白结构域、定位和跨膜区分析

InterProScan 分析显示 (图 2)，DoOMT 基因编码蛋白含有保守的氧甲基转移酶家族 3 结构域 (13~238) 和甲基转移酶结构域 (31~238)。DoOMT 蛋白包括 5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (7~10、100~103、144~147、160~163、219~222) 和 3 个 N-豆蔻酰化位点 (79~84、175~180、231~236)，这些基元可能对蛋白结构和功能有重要作用。SignalP 4.0 分析

DoOMT 蛋白不含信号肽，TMpred 分析蛋白具有 1 个跨膜区 (76~93)。PSORT 预测 DoOMT 蛋白定位于细胞质可能性较高为 65%，定位在线粒体基质和叶绿体内囊体膜的可能性均为 10%。

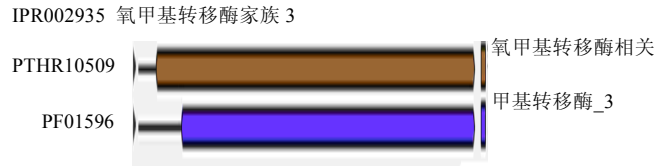
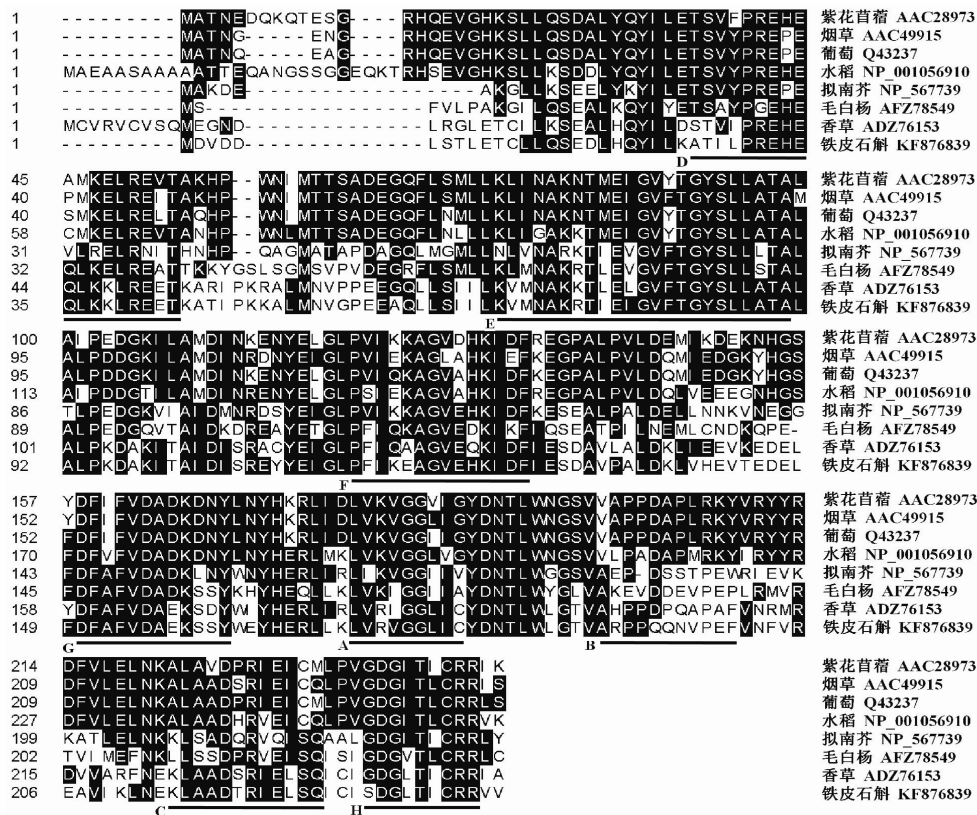


图 2 InterProScan 分析 DoOMT 蛋白的保守结构域
Fig. 2 InterProScan analysis of conserved domains of deduced DoOMT protein

3.4 DoOMT 与植物 CCoAOMT 蛋白的氨基酸序列比对分析

运用 DNASTar 6.0 中的 MegAlign 程序，对 DoOMT 基因编码蛋白与 7 种植物的 CCoAOMTs 蛋白进行多序列比对分析 (图 3)。结果表明，DoOMT 与香草 *Vanilla planifolia* VpOMT4 蛋白 (ADZ76153)



A、B 和 C 为植物甲基转移酶普遍存在的保守元件 D、E、F、G 和 H 为 CCoAOMTs 特有的标签序列
A, B and C are conserved elements in plant methyltransferase D, E, F, G and H are signatures of CCoAOMTs

图 3 DoOMT 与植物 CCoAOMTs 蛋白的多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of DoOMT and CCoAOMTs proteins from other plants

的一致性最高为 78.7%，与毛白杨 *Populus tomentosa* (AFZ78549)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (NP_567739)、水稻 *Oryza sativa* (NP_001056910)、烟草 *Nicotiana tabacum* (AAC49915)、紫花苜蓿 *Medicago sativa* (AAC28973) 和葡萄 *Vitis vinifera* (Q43237) 等植物 CCoAOMTs 蛋白的一致性分别为 53.6%、53%、51%、49.8%、49.8% 和 49.4%。DoOMT 蛋白包含植物甲基转移酶普遍存在的 A、B、C 保守基序以及 CCoAOMTs 特有的 5 个保守基序 (D、E、F、G 和 H)。其中，除 B 基序与其他植物 CCoAOMTs 差异较大，其余基序相对高度保守。

3.5 DoOMT 编码蛋白三维建模

在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中，以蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中已提交的紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶 (PDB No.: 1SUI) A 链晶体分子^[16] 为模板，对 DoOMT 蛋白进行三维结构建模 (图 4)，结果显示 DoOMT 与该蛋白有 52.19% 的序列相似性，空间结构类似。



图 4 基于 SWISS-MODEL 的 DoOMT 蛋白三维建模
Fig. 4 Three-dimensional structure of deduced DoOMT protein using SWISS-MODEL

3.6 DoOMT 基因编码蛋白的系统进化树分析

为分析 DoOMT 基因编码蛋白的进化关系，从 GenBank 数据库中选取来自细菌、藻类和高等植物中具有代表性的 25 个物种的 31 条 CCoAOMT 蛋白序列，利用 MEGA 4.0 构建 DoOMT 蛋白的系统进化树。图 5 结果表明，以吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) CCoAOMT 蛋白 (AAF86386) 为外类群，所选 CCoAOMTs 被聚成 1a、1b 和 1c 三个分支，DoOMT 蛋白隶属于 1b 分支，与单子叶植物香草亲缘关系最近。

3.7 基因表达模式分析

分别提取石斛根、茎、叶等样品总 RNA，利用 qPCR 技术检测 DoOMT 的组织表达模式。图 6 结果

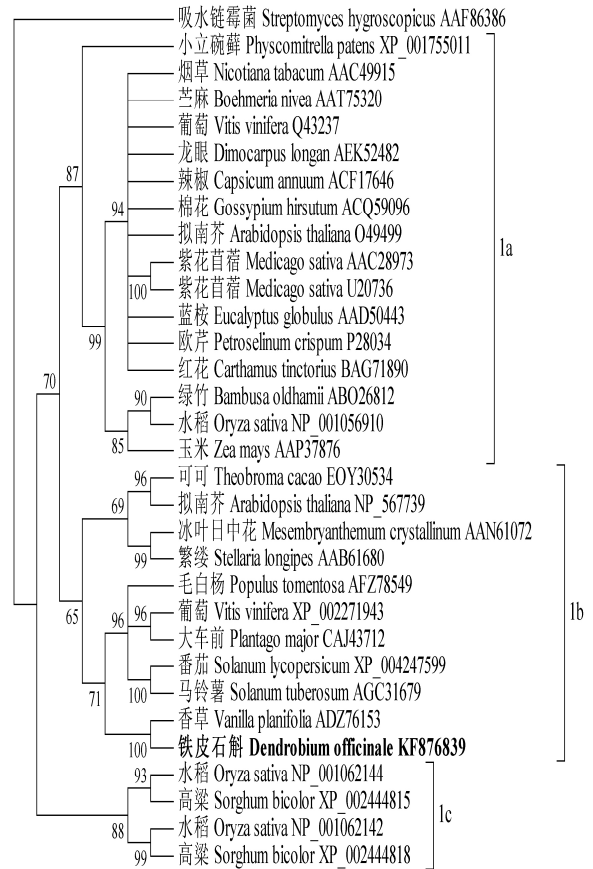


图 5 DoOMT 与不同物种 CCoAOMT 蛋白的进化树分析
Fig. 5 Phylogenetic tree of DoOMT with CCoAOMTs from other species

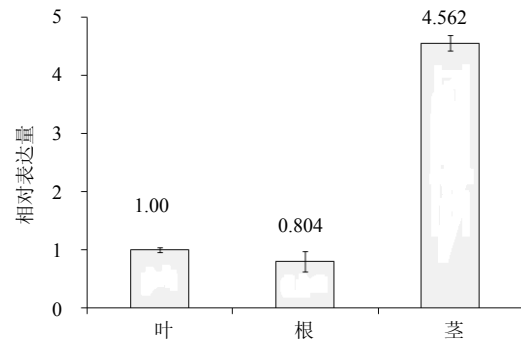


图 6 利用 qPCR 分析 DoOMT 基因的组织表达模式
Fig. 6 Tissue-specific expression pattern of DoOMT gene using qPCR analysis

表明，DoOMT 在 3 种组织中为组成型表达，但相对表达量存在差异。以叶为校正样本，DoOMT 在茎中表达量最高，为叶中的 4.562 倍，茎和叶中无差异。

4 讨论

CCoAOMTs 通过参与木质素合成代谢调控植物体生长发育、次生代谢、抗逆胁迫和抗病等多种生命活动过程。*CCoAOMTs* 基因系统性分析已在苜蓿^[3]、拟南芥^[4, 17]、杨树和葡萄^[18]中广为报道。在烟草^[5, 10]、棉花^[19]、水稻^[20]和绿竹^[21]等植物中也有相关分析。药用植物中仅有香草^[6, 22]和龙眼^[9]的研究报道。植物 *CCoAOMTs* 呈多基因家族, 拟南芥、烟草、棉花和水稻等已鉴定有 2、4、2 和 3 个成员, 香草中有 5 个, 其中 *Vp-OMT4* 和 *Vp-OMT5* 在细胞苯丙烷类代谢中发挥重要作用^[6, 22]。本研究利用 RACE 技术首次从珍稀濒危药用铁皮石斛分离到一个 *CCoAOMT* 基因, 起始密码子附近序列遵循 KOZAK 规则^[23]; 该基因编码蛋白具有氧甲基转移酶家族 3、甲基转移酶的保守结构域。*DoOMT* 与多种植物 *CCoAOMTs* 蛋白序列相似性较高, 含有 OMTs 和 *CCoAOMTs* 特有的 8 个保守基序, 其中 A、B、元件可能并非底物的特异结合位点, 而与甲基供体 SAM 的结合有关, 三者间距离的保守性可能与结合 SAM “口袋”结构的形成有关^[2]。*DoOMT* 蛋白三维结构和紫花苜蓿 *CCoAOMT A* 链晶体结构类似^[16], 与单子叶植物香草 *Vp-OMT4* 蛋白高度相似, 二者聚成的子分支隶属于植物 I 型 OMTs 系统进化树的 1b 分支。1a 分支的 *CCoAOMTs* 基因主要参与木质素合成^[3-4]; 1b 分支中的冰叶日中花^[24]、葡萄^[25]和香草^[6]等植物 *CCoAOMTs* 基因被证实同时参与木质素合成和类黄酮、花青素等次生代谢产物的修饰, 因此推测处于 1b 分支中的 *DoOMT* 基因可能执行类似的功能。

基因表达分析是研究基因功能的重要前提。植物 *CCoAOMTs* 基因的组织表达模式存在较大差异。不同植物或同一植物的不同器官, 木质素合成关键酶基因的表达部位和表达量都有差异。拟南芥 *CCoAOMT* 基因在幼苗的各个部位表达, 但不能在成熟植株的成熟叶脉处表达^[4]。棉花的 *GhCCoAOMT1* 和 *GhCCoAOMT2* 基因在根和茎中表达量较高, 在叶、子叶、花瓣、雄蕊和胚珠等部位表达量较低^[19]。龙眼 *DLCCoAOMT* 基因根和茎中表达量较高^[9]。本研究 qPCR 分析结果显示, *DoOMT* 基因为组成型表达, 在石斛茎中表达量显著高于根和叶中。铁皮石斛的药用部位是富含生物碱和多糖等有效成份的直立茎, *DoOMT* 基因在石斛茎中的高丰度表达特征, 暗示其很可能主要调节茎中木质

素的合成代谢, 以赋予植株一定的机械强度。高木质素含量的植物能在工业上能高效转化为生物质能源, 但在造纸或饲料业等方面严重影响生产。农艺性状优良的药用植物从基源上可为临床治疗提供高质量的中药材。众多药用植物的类黄酮、酚或酸类等活性成分是由苯丙烷类化合物衍生而来, 抑制苯丙烷类代谢途径中木质素合成关键酶基因可使代谢产物流向酚或酸类化合物, 已成为通过生物技术手段培育优良品种的新策略。抑制肉桂酰辅酶 A 还原酶基因的丹参转基因株系, 酚酸类物质的含量显著提高^[27]。本研究后续将利用 RNAi 或过量表达技术研究 *DoOMT* 基因在铁皮石斛次生代谢和生长发育中的生物学功能, 为通过遗传工程手段改良铁皮石斛种质奠定基础。

参考文献

- [1] Lam K C, Ibrahim R K, Behdad B, *et al.* Structure, function and evolution of plant O-methyltransferases [J]. *Genome*, 2007, 50: 1001-1013.
- [2] Joshi C P, Chiang V L. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 663-674.
- [3] Guo D, Chen F, Inoue K, *et al.* Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(1): 73-88.
- [4] Do C T, Pollet B, Thevenin J, *et al.* Both caffeoyl Coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2007, 226: 1117-1129.
- [5] 赵华燕, 张景昱, 刘惠荣, 等. 抑制 COMT 与 *CCoAOMT* 调控植物木质素的生物合成 [J]. *科学通报*, 2002, 47(8): 71-78.
- [6] Widiez T, Hartman T G, Dudai N, *et al.* Functional characterization of two new members of the caffeoyl CoA O-methyltransferase-like gene family from *Vanilla planifolia* reveals a new class of plastid-localized O-methyltransferases [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(6): 475-488.
- [7] Yoshimura K, Masuda A, Kuwano M, *et al.* Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C3 xerophyte (wild watermelon) under water deficits [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(2): 226-241.
- [8] Kim J K, Bamba T, Harada K, *et al.* Time-course

- metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(3): 415-424.
- [9] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶 (DLCCoAOMT) 基因的克隆和表达分析 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(1): 118-126.
- [10] Miao L, Shou S, Zhu Z, *et al.* Isolation of a novel tomato caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase gene following infection with the bacterium *Ralstonia solanacearum* [J]. *J Phytopathol*, 2008, 156(10): 588-596.
- [11] 曾淑华, 文国松, 徐绍忠, 等. 铁皮石斛磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 766-771.
- [12] 陈晓梅, 王春兰, 杨俊山, 等. 铁皮石斛化学成分及其分析的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(19): 1634-1640.
- [13] 李标, 唐坤, 张岗, 等. 菌根真菌诱导的铁皮石斛根差减 cDNA 文库构建 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(22): 1790-1795.
- [14] 张岗, 赵明明, 宋超, 等. 铁皮石斛促分裂原活化蛋白激酶基因 *DoMPK1* 的克隆及特征分析 [J]. 药学报, 2012, 47(12): 1703-1709.
- [15] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [16] Ferrer J, Zubieta C, Dixon R A, *et al.* Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137: 1009-1017.
- [17] Raes J, Rohde A, Christensen J H, *et al.* Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1051-1071.
- [18] Barakat A, Choi A, Yassin N B M, *et al.* Comparative genomics and evolutionary analyses of the O-methyltransferase gene family in *Populus* [J]. *Gene*, 2011, 479: 37-46.
- [19] 吕萌, 倪志勇, 王娟, 等. 棉花甲基化酶基因 COMT 和 CCoAOMT 的组织特异性表达分析 [J]. 核农学报, 2010, 24(4): 713-719.
- [20] 赵华燕, 沈庆喜, 吕世友, 等. 水稻咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因 (CCoAOMT) 表达特性分析 [J]. 科学通报, 2004, 49(14): 1390-1394.
- [21] 李雪平, 高志民, 彭镇华, 等. 绿竹咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因的克隆与分析 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(3): 587-592.
- [22] Li H M, Rotter D, Hartman T G, *et al.* Evolution of novel O-methyltransferases from the *Vanilla planifolia* caffeic acid O-methyltransferase [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 61: 537-552.
- [23] Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(20): 8125-8132.
- [24] Ibdah M, Zhang X H, Schmidt J, *et al.* A novel Mg²⁺-dependent O-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 43961-43972.
- [25] Lucker J, Martens S, Lund S T. Characterization of a *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon 3', 5'-O-methyltransferase showing strong preference for anthocyanins and glycosylated flavonols. *Phytochem*, 2010, 71: 1474-1484.
- [26] Wang Z J, Cui L J, Chen C, *et al.* Downregulation of cinnamoyl CoA reductase affects lignin and phenolic acids biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30(5): 1229-1236.