

## 滇龙胆环烯醚萜氧化酶基因及启动子的克隆与生物信息学分析

张晓东<sup>1</sup>, 李彩霞<sup>1</sup>, 赵青蓉<sup>1</sup>, 王元忠<sup>2\*</sup>

1. 玉溪师范学院化学生物与环境学院, 云南 玉溪 653100

2. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南 昆明 650223

**摘要:** **目的** 从滇龙胆叶片中克隆单萜合成关键酶环烯醚萜氧化酶 (GrIDO) 基因及其启动子序列, 并进行序列分析。**方法** 根据滇龙胆转录组 GrIDO 基因序列设计基因特异性引物, 使用 RT-PCR 方法克隆 GrIDO 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列, 基于在线软件对 GrIDO 基因序列进行生物信息学分析。同时, 根据 GrIDO 基因 ORF 序列, 设计特异性引物, 采用 PCR 法对该基因启动子序列进行扩增, 并进行序列分析。**结果** GrIDO 基因 (GenBank 登录号 KP722034) ORF 全长 1 557 bp, 编码 518 个氨基酸; GrIDO 蛋白相对分子质量 58 920, 理论等电点 8.40, 属于细胞色素 P450 超家族成员, 可能定位于叶绿体; 无信号肽, 为亲水不稳定蛋白, 主要由  $\alpha$ -螺旋 (51.07%) 和环 (42.69%) 构成; GrIDO 蛋白与长春花 CrIDO 蛋白具有较高的相似性 (85.83%), 且亲缘关系较近。GrIDO 基因启动子 (GenBank 登录号 KT428570) 长 720 bp, 具有 TATA-box 和 CAAT-box, 还具有参与脱落酸和茉莉酸甲酯应答的顺式作用元件、光应答元件和 MYB 结合位点。**结论** GrIDO 基因表达受多种因素调控。克隆了 GrIDO 基因 ORF 及其启动子, 为 GrIDO 基因的功能验证奠定基础。

**关键词:** 滇龙胆; 环烯醚萜氧化酶; 基因和启动子克隆; 生物信息学分析; 开放阅读框

**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)18-4386-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.025

## Cloning and bioinformatics analysis of iridoid oxidase gene in *Gentiana rigescens*

ZHANG Xiao-dong<sup>1</sup>, LI Cai-xia<sup>1</sup>, ZHAO Qing-rong<sup>1</sup>, WANG Yuan-zhong<sup>2</sup>

1. College of Chemistry Biology and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China

2. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China

**Abstract: Objective** To obtain the key enzyme gene involving in the monoterpenoid biosynthesis pathway, an iridoid oxidase gene (GrIDO) and its promoter were cloned from the leaves of *Gentiana rigescens*, and its bioinformatics analysis were also performed. **Methods** The gene specific primers were designed according to the GrIDO gene of transcriptome in *G. rigescens*. The open reading frame (ORF) of GrIDO gene was cloned by RT-PCR method. The bioinformation of GrIDO gene was analyzed by online softwares. Meanwhile, the gene specific primers were designed according to the cloned GrIDO gene, and the promoter of GrIDO gene was amplified by PCR method. Its sequence analysis was also performed. **Results** The length of GrIDO gene ORF (GenBank accession number KP722034) was 1 557 bp, which encoded a protein with 518 amino acids. Its relative molecular weight was 58 920 with the theoretical isoelectric point of 8.40. GrIDO was the member of cytochrome P450 superfamily and may localize in chloroplast. GrIDO was a hydrophilic stable protein without signal peptide and composed of mainly  $\alpha$ -helix (51.07%) and loops (42.69%). GrIDO protein had a high similarity with CrIDO of *Catharanthus roseus* (85.83%) and their genetic relationship was close. The cloned GrIDO promoter had a length of 720 bp (GenBank accession number KT428570), which possessed cis-regulatory elements TATA-box and CAAT-box, and had cis-acting elements involved in the abscisic acid and MeJA responsiveness, part of a light responsive element and MYB transcription factor binding site. **Conclusion** The expression of GrIDO gene were regulated by multifactors. The GrIDO gene and its promoter were cloned from *G. rigescens*. This study will lay foundations for the functional research of GrIDO gene in monoterpenoid biosynthesis pathway.

**Key words:** *Gentiana rigescens* Franch.; iridoid oxidase; gene and promoter cloning; bioinformatics analysis; open reading frame

滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl. 为 Pseudonanthe (Gled.) Gaudin (SP) 植物, 富含环烯  
云南省道地药材, 为龙胆科龙胆属龙胆草组 Sect. 萜类成分, 具有较好的保肝、抗炎、解热、抗病

收稿日期: 2018-01-17

基金项目: 云南省教育厅重点项目 (2015Z171); 云南省大学生创新项目 (201511390006); 云南省自然科学基金重点项目 (2017FA049)

作者简介: 张晓东 (1980—), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物代谢基因工程研究。E-mail: zxd95@126.com

\*通信作者 王元忠, 男, 副研究员, 主要从事药用植物资源评价与利用研究。E-mail: boletus@126.com

毒等药理作用<sup>[1-3]</sup>。近年来,由于制药方面需求量迅速增加,导致其野生资源遭到大肆采挖,现已被列为国家三级重点保护植物<sup>[4]</sup>。滇龙胆的主要药效成分为龙胆苦苷,目前由于龙胆苦苷生物合成途径知识的片段化,导致其无法通过生物技术途径来生产<sup>[5-6]</sup>。

在龙胆苦苷生物合成途径中, iridotrial 和 7-deoxyloganetic acid 是重要的中间产物<sup>[6-8]</sup>。在长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中, 环烯醚萜氧化酶 (iridoid oxidase, CrIDO, EC 1.6) 是一个多功能的 P450 酶, 能够催化 疏 蚁 二 醛 (cis-trans-iridodial) 和 荆 芥 内 酯 (cis-trans- nepetalactol) 首先生成 iridotrial, 然后再生成 7-deoxyloganetic acid, 该反应需要 NADPH 的参与; 在反应的溶液中, 双环的荆芥内酯是首选的底物, 但是单环的顺、反疏蚁二醛和双环的顺、反荆芥内酯可以自由地相互转换, 导致使用这些底物很难获得该酶精确的催化参数<sup>[6]</sup>。目前, 环烯醚萜氧化酶基因 IDO 已从长春花<sup>[6,9]</sup>、萝芙木 *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baill.<sup>[9]</sup>、蓝星花 *Amsonia hubrichtii* (blue star)<sup>[9]</sup>、小蔓长春花 *Vinca minor* L.<sup>[9]</sup>、蟾蜍树 *Tabernaemontana elegans* (Stapf.)<sup>[9]</sup>、金鸡纳树 *Cinchona calisaya* Wedd.<sup>[9]</sup>、野生油橄榄 *Olea europaea* var. *syvestris* (Lour.) Raersch、臭马比木 *Nothapodytes nimmoniana* (Graham) 等许多植物中分离, 但仅有长春花中的 CrIDO 功能被解析。IDO 基因表达也具有组织特异性。在长春花悬浮培养细胞中, CrIDO 基因能够被茉莉酸甲酯 (MeJA) 和转录因子 ORCA2 诱导表达, 不能被 ORCA3 诱导; 在长春花幼苗中, MeJA 处理 24 h 后, CrIDO 基因上调表达<sup>[6]</sup>。

目前, 由于基因组杂合性高、多年生特性和重要性状遗传信息缺乏, 导致其基因组资源缺乏<sup>[10]</sup>。为探究滇龙胆龙胆苦苷的生物合成途径及其调控机制, 本研究根据本课题组 2013 年 5 月获得的滇龙胆转录组 GrIDO 基因序列<sup>[2]</sup>, 设计基因特异性引物, 通过 RT-PCR 技术克隆获得 GrIDO 基因, 然后根据所克隆的 GrIDO 基因序列设计引物, 通过 PCR 技术克隆获得该基因的启动子序列, 进行生物信息学分析, 为该基因功能研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

滇龙胆采自玉溪师范学院分子生物系实验室的无菌组培苗, 由云南省农业科学院金航研究员鉴定为滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl.。使用滇龙胆无菌苗幼叶进行基因克隆和启动子克隆, 采样日期为 2014 年 5 月 17 日。

### 1.2 方法

**1.2.1 叶片总 RNA 提取及 GrIDO 基因克隆** 按照张晓东等<sup>[11]</sup>的方法使用植物多糖组织提取试剂 (Takara) 提取滇龙胆幼叶总 RNA, 然后反转录成 cDNA。根据滇龙胆 GrIDO 基因序列, 设计一对特异引物 GrIDOEcoRI-F 和 GrIDOXhoI-R (表 1)。采用高保真酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara 公司) 进行扩增, PCR 产物经电泳分离后, 割胶回收, 将其连接到 pMD19-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞 (全氏金), 涂平板后, 37 °C 培养过夜。然后挑取白斑, 摇床培养后提取质粒, 经单双酶切鉴定正确后进行测序, 获得重组质粒 pMD19-GrIDO。

表 1 GrIDO 基因及其启动子克隆的引物序列

Table 1 Primers for GrIDO gene and its promoter cloning

| 基因          | 引物名称         | 引物序列 (5'→3')                   | T <sub>m</sub> /°C |
|-------------|--------------|--------------------------------|--------------------|
| GrIDO 基因    | GrIDOEcoRI-F | GGATCCATGCTTGGCAGCAATAAATCCTC  | 55                 |
|             | GrIDOXhoI-R  | CTCGAGTCATAGAGATGTTGGAATAGCACG |                    |
| GrIDO 基因启动子 | GrIDO-sp3    | GAATTGAGGAGTGTGTTCAAGGC        | 57                 |
|             | GrIDO-sp2    | TTAGCAGGAGAAGAAGGCCTGC         | 60                 |
|             | GrIDO-sp1    | GTGGTCTCCTTTTGAAGCTCCAG        | 59                 |

**1.2.2 叶片基因组 DNA 的提取及 GrIDO 基因启动子克隆** 按照植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Takara) 说明书提取滇龙胆叶片 DNA。根据“1.2.1”项中克隆到的滇龙胆 GrIDO 基因序列, 设计基因特异引物 GrIDO-sp1、GrIDO-sp2 和 GrIDO-sp3 (表

1)。采用高保真酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara) 进行 3 轮 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 总体积为 50  $\mu$ L, 具体成分: 基因组 DNA 2  $\mu$ L, MAX DNA Polymerase 25  $\mu$ L, AP1 或 AP2 或 AP3 1  $\mu$ L, GrIDO-sp1 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L。反应条件:

(98 °C、10 s→25 °C、1 min→72 °C、1 min) ×5→(98 °C、10 s→59 °C、15 s→72 °C、1 min; 98 °C、10 s→59 °C、15 s→72 °C、1 min; 98 °C、10 s→44 °C、15 s→72 °C、1 min) ×15; 72 °C、10 min。第 2 轮 PCR 总体系为 50 μL, 具体成分: 第 1 轮 PCR 产物 1 μL, MAX DNA Polymerase 25 μL, AP1 或 AP2 或 AP3 1 μL, GrIDO-sp2 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 22 μL。反应条件: (98 °C、10 s→60 °C、15 s→72 °C、1 min; 98 °C、10 s→60 °C、15 s→72 °C、1 min; 98 °C、10 s→44 °C、15 s→72 °C、1 min) ×15; 72 °C 10 min。第 3 轮 PCR 总体系为 50 μL, 具体成分: 第 2 轮 PCR 产物 1 μL, Max DNA Polymerase 25 μL, AP1 或 AP2 或 AP3 1 μL, GrIDO-sp3 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 22 μL。反应条件为 (98 °C、10 s→57 °C、15 s→72 °C、1 min; 98 °C、10 s→57 °C、15 s→72 °C、1 min; 98 °C、10 s→44 °C、15 s→72 °C、1 min) ×15; 72 °C、10 min。第 3 轮 PCR 产物经电泳分离后, 割胶回收, 将其连接到 pMD19-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞 (全氏金), 涂平板后, 37 °C 培养过夜。然后挑取白斑, 摇床培养后提取质粒, 经 PCR 检测正确后进行测序, 获得重组质粒 pMD19-pGrIDO。

**1.2.3 GrIDO 基因的生物信息学分析** 使用 NCBI 网站上的 BLAST 程序进行序列比对, 应用 Genetyx 进行翻译, 使用 DNAMAN 9 进行多序列比对; 使用 Clustal X2.1 进行比对, 然后使用 MEGA7.0 软件内置的 NJ 法构建系统进化树, 设置 Bootstrap = 1 000; 利用在线数据库 ([http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01\\_11.html](http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_11.html)) 进行稀有密码子分析。使用 ExPASy ProtParam 软件进行蛋白的理化性质分析; 使用 ExPASy SignalP 4.0 Server 进行信号肽分析; 使用 ChloroP 服务器 v1.1 进行叶绿体转运肽预测; 使用 Interpro 软件进行保守结构域预测; 使用 ProtScale 软件进行疏水性分析; 使用 PredictProtein 对二级结构进行预测; 使用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 对三级结构进行预测; 利用 Expasy 中的 TMHMM 工具预测蛋白的跨膜螺旋区; 利用在线工具 WOLF PSORT 预测蛋白的亚细胞定位情况。

**1.2.4 GrIDO 基因启动子的生物信息学分析** 使用启动子在线分析网站 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对所克

隆到的 GrIDO 基因启动子序列进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 滇龙胆 GrIDO 基因序列的克隆

以滇龙胆幼叶 cDNA 为模板, 使用基因特异性引物扩增出约 1 500 bp 片段 (图 1)。通过 TA 克隆获得重组质粒 pMD19-GrIDO, 酶切检测结果为双酶切获得两片段大小之和等于单酶切片段大小, 表明所克隆 GrIDO 基因已成功插入 T 载体。测序后, 将 GrIDO 基因序列上传 NCBI 网站, 获得 GenBank 登录号 KP722034。

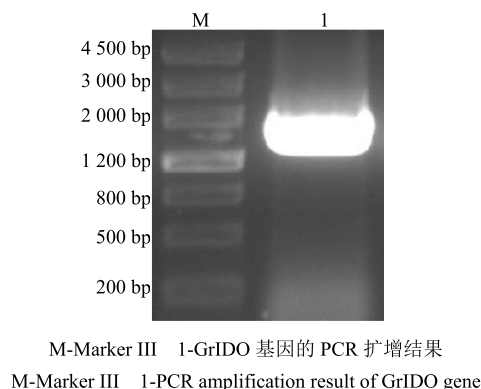


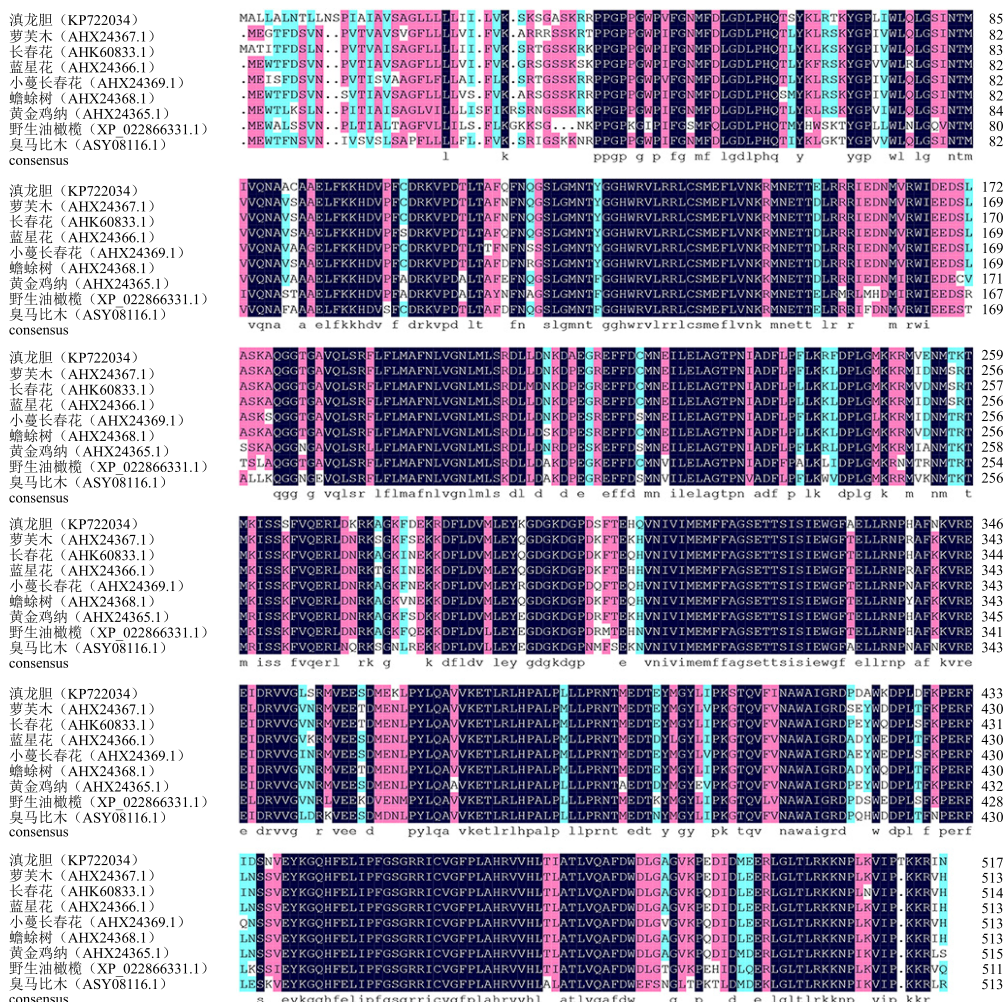
图 1 滇龙胆 GrIDO 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of GrIDO gene in *G. rigescens*

### 2.2 GrIDO 基因的生物信息学分析

利用 DNAMAN 7 软件对 GrIDO 基因的 ORF 序列进行比对, 结果显示 GrIDO 基因 ORF 为 1 557 bp, 编码 518 个氨基酸。利用 BLASTp 程序对 GrIDO 氨基酸序列进行分析, 结果表明滇龙胆 GrIDO 与长春花 CrIDO 蛋白序列相似性最高 (85.83%), 与拟南芥 AtIDO (41.63%) 蛋白相似性较低。利用 DNAMAN 7 将 GrIDO 蛋白氨基酸序列与 NCBI 中相似性较高部分序列进行多序列比对分析, 结果表明 GrIDO 蛋白与已知蛋白序列保守性较高 (图 2)。利用 Mega 7.0 将 GrIDO 氨基酸序列与相似性较高的部分序列和文献已报道的部分序列进行系统发育分析, 结果显示滇龙胆 GrIDO 蛋白与长春花 CrIDO 亲缘关系较近 (图 3)。

使用 ExPASy ProtParam 对 GrIDO 蛋白进行分析, 结果表明 GrIDO 蛋白相对分子质量为 58 920, 理论等电点 (pI) 为 8.40, 分子式为 C<sub>2651</sub>H<sub>4202</sub>N<sub>718</sub>O<sub>745</sub>S<sub>27</sub>。不稳定指数为 42.34, 属于不稳定蛋白; 脂肪指数为 91.29, 总平均疏水性 (GRAVY) 为 -0.206, 为亲水蛋白。GrIDO 蛋白含有 20 种氨基酸, 其中亮

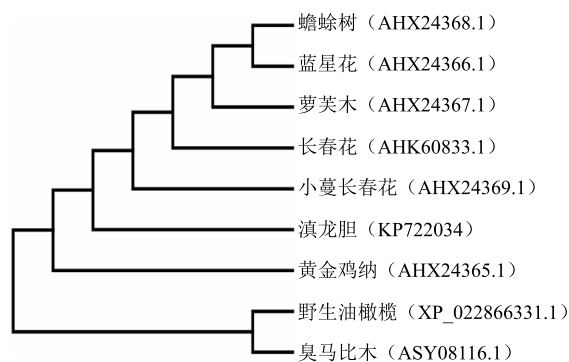


黑色-相似性等于 100%; 粉红色-75%≤相似性<100%; 浅蓝色-50%≤相似性<75%

Black-homology = 100%; pink-75% ≤ homology < 100%; light blue-50% ≤ homology < 75%

图 2 滇龙胆 GrIDO 蛋白与其他植物 IDO 蛋白的多序列比对结果

Fig. 2 Multiple sequence alignment of GrIDO protein in *G. rigescens* with IDO protein in other plants



数值代表从 1 000 次重复计算得到的 bootstrap 百分比值

Numbers represent the bootstrap percentage values calculated from

1 000 replications

图 3 滇龙胆 GrIDO 蛋白与植物中其他 IDO 蛋白的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of GrIDO protein in *G. rigescens* and IDO protein in other plants

氨酸含量最高, 为 12.20%; 其次是赖氨酸、甘氨酸和精氨酸, 分别为 6.80%、6.80%和 6.60%; 半胱氨酸含量最低, 为 1.00%。

利用 PredictProtein 软件对 GrIDO 蛋白进行二级结构分析, 结果表明该蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋 (H) 占 51.07%, 环 (L) 占 42.69%,  $\beta$ -折叠 (E) 占 6.24%。利用 Phyre 2 预测 GrIDO 蛋白的三级结构, 结果见图 4, 该模型以细胞色素 P450 酶 [d3czha1] 为模板, 在第 41~515 氨基酸处建模, 序列相似度为 25.00%, 可信度 100%; 结果同时也表明该蛋白主要由  $\alpha$ -螺旋和环构成 (图 4)。采用 InterPro 工具及相关文献预测 GrIDO 蛋白保守结构域, 结果表明 GrIDO 蛋白具有 1 个 P450 超家族结构域; GO 注释结果表明, 在生物过程中其参与氧化还原过程; 在分子功能方面, 其具有铁离子结合

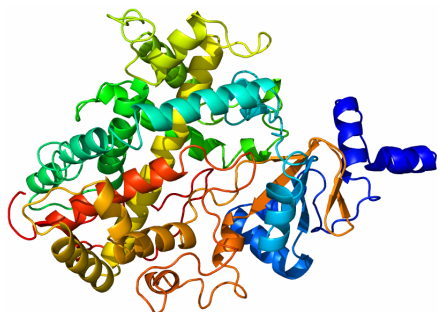


图 4 滇龙胆 GrIDO 蛋白的三维结构预测

Fig. 4 Prediction of three dimensional structure of GrIDO protein in *G. rigescens*

功能、氧化还原酶活性和血红素结合功能。

利用 ExPASy SignalP 4.0 Server 分析 GrIDO 蛋白, 未发现信号肽, 表明该蛋白为非分泌型蛋白。利用 TMHMM 2.0 软件预测 GrIDO 蛋白的跨膜螺旋区, 结果表明 GrIDO 蛋白为膜蛋白, 这与长春花中的 CrIDO 蛋白相一致<sup>[6]</sup>。GrIDO 蛋白的第 1~5 氨基酸位于膜内, 其跨膜螺旋位于第 6~30 氨基酸位置, 其余的部分位于膜外 (图 5), 这与使用 PredictProtein 软件预测结果一致。使用 ChloroP 在线软件对叶绿体转运肽进行预测, 结果表明 GrIDO 蛋白不含叶绿体转运肽。使用 WoLF PSORT 软件对 GrIDO 蛋白亚细胞定位进行预测, 结果表明其可能定位于叶绿体。对 GrIDO 基因进行稀有密码子分析, 结果表明 GrIDO 基因中稀有密码子占 2.90%, 且含有 1 个三联稀有密码子连续出现的情况, 因此可选用表达菌 BL21 或 Rosetta (DE3) 进行原核表达。

### 2.3 滇龙胆 GrIDO 基因启动子序列的克隆

以滇龙胆叶片 DNA 为模板, 使用基因特异性

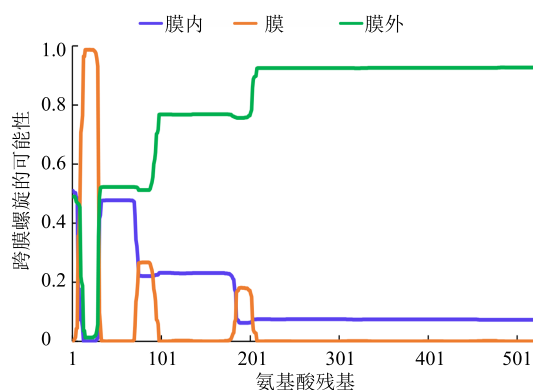


图 5 滇龙胆 GrIDO 蛋白 N 末端 1 个可能跨膜螺旋的检测  
Fig. 5 Detection of a putative transmembrane helix at the N-terminal of GrIDO protein in *G. rigescens*

引物分别进行 3 轮 PCR 扩增, 第 3 轮 PCR 扩增产物通过 TA 克隆获得重组质粒 pMD19-pGrIDO, 测序后, 上传 NCBI 数据库, 获得登录号 (GenBank 登录号 KT428570)。对获得的 GrIDO 启动子进行生物信息学分析, 结果表明该启动子不但在 -30 区域附件含有转录起始的核心启动子元件 TATA-box, 而且还含有启动子和增强子区域通用顺式作用元件 CAAT-box; 此外, 还具有 1 个高转录水平顺式作用元件、1 个参与脱落酸应答的顺式作用元件、5 个光应答元件、2 个参与茉莉酸甲酯应答的顺式调控元件、1 个热胁迫应答元件、1 个防御胁迫应答元件和 1 个 MYB 结合位点 (表 2)。

### 3 讨论

龙胆苦苷是滇龙胆的主要药效成分, 属于裂环烯醚萜类化合物, 目前裂环烯醚萜类生物合成途径还不完全清楚<sup>[6,12]</sup>, 这大大阻碍了使用合成生物学手段进行有用次生代谢物的生产。本研究以笔者实验室前期建立的滇龙胆转录组数据库为基础, 从滇龙胆幼叶中克隆到 1 条 GrIDO 基因, 其编码蛋白与长春花 CrIDO 蛋白的同源性高达 85.83%; 在系统发育分析结果中二者亲缘关系较近, 且 GrIDO 蛋白具有 CYP450 结构域, 属于 E 类家族成员, 这些结果表明所克隆的基因的确为 IDO 基因。不同植物中的 IDO 蛋白大小也有差异。长春花中的 CrIDO 蛋白包含 515 个氨基酸, 而本研究中 GrIDO 蛋白为 518 个氨基酸, 比前者多 3 个氨基酸 (图 2), 这提示着滇龙胆中 GrIDO 蛋白与长春花 CrIDO 蛋白可能存在结构或功能上的差异。

在真核生物基因中, 启动子由核心启动子和上游启动子两部分组成, 是位于转录起始位点及其 5' 端上游近端 100~200 bp 的一组具有独立功能的 DNA 序列, 每个元件长度约为 7~20 bp, 是决定 RNA 聚合酶转录起始和转录频率的关键元件<sup>[13]</sup>。本研究所扩增到的滇龙胆 GrIDO 基因启动子片段大小为 720 bp, 不但具有核心启动子 TATA-box 和上游启动子 CAAT-box, 而且还具有 1 个高转录水平顺式作用元件、1 个参与脱落酸应答的顺式作用元件、5 个光应答元件、2 个参与茉莉酸甲酯应答的顺式调控元件、1 个热胁迫应答元件、1 个防御胁迫应答元件和 1 个 MYB 结合位点, 表明 GrIDO 基因的表达受光、脱落酸、茉莉酸甲酯、胁迫、MYB 转录因子等多种因素的调控, 这也提示着可以通过调控基因表达来提高龙胆苦苷含量。

表 2 滇龙胆 GrIDO 基因启动子功能预测 (除 CAAT-box 和 TATA-box 外)

Table 2 Functional prediction of GrIDO gene promoter in *G. rigescens* (except for CAAT-box and TATA-box)

| 位点名称                 | 物种                             | 位点  | 链 | 得分 | 序列          | 功能                                                                          |
|----------------------|--------------------------------|-----|---|----|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 5UTR Py-rich stretch | <i>Lycopersicon esculentum</i> | 346 | + | 9  | TTTCTTCTCT  | <i>cis</i> -acting element conferring high transcription levels             |
| ABRE                 | <i>Arabopsis thaliana</i>      | 216 | + | 7  | TACGGTC     | <i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness     |
| ARE                  | <i>Zea mays</i>                | 30  | + | 6  | TGGTTT      | <i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction |
| CAT-box              | <i>Arabopsis thaliana</i>      | 655 | + | 6  | GCCACT      | <i>cis</i> -acting regulatory element related to meristem expression        |
| CATT-motif           | <i>Zea mays</i>                | 568 | − | 6  | GCATTC      | part of a light responsive element                                          |
| CATTAT-motif         | <i>Avena sativa</i>            | 460 | − | 10 | GTCATTATCGG |                                                                             |
| CGTCA-motif          | <i>Hordeum vulgare</i>         | 675 | + | 5  | CGTCA       | <i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness   |
| GAG-motif            | <i>Arabopsis thaliana</i>      | 692 | + | 7  | AGAGAGT     | part of a light responsive element                                          |
| HSE                  | <i>Brassica oleracea</i>       | 497 | − | 9  | AAAAAATTTC  | <i>cis</i> -acting element involved in heat stress responsiveness           |
| I-box                | <i>Solanum tuberosum</i>       | 415 | − | 10 | TATTATCTAGA | part of a light responsive element                                          |
| I-box                | <i>Solanum tuberosum</i>       | 664 | − | 9  | TGATAATGT   | part of a light responsive element                                          |
| MBS                  | <i>Zea mays</i>                | 218 | + | 6  | CGGTCA      | MYB Binding Site                                                            |
| Skn-1_motif          | <i>Oryza sativa</i>            | 12  | − | 5  | GTCAT       | <i>cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression     |
| Skn-1_motif          | <i>Oryza sativa</i>            | 676 | + | 5  | GTCAT       | <i>cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression     |
| Skn-1_motif          | <i>Oryza sativa</i>            | 466 | − | 5  | GTCAT       | <i>cis</i> -acting regulatory element required for endosperm expression     |
| TC-rich repeats      | <i>Nicotiana tabacum</i>       | 72  | − | 9  | GTTTTCTTAC  | <i>cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness    |
| TGACG-motif          | <i>Hordeum vulgare</i>         | 675 | − | 5  | TGACG       | <i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness   |
| Unnamed_4            | <i>Petroselinum hortense</i>   | 618 | + | 4  | CTCC        |                                                                             |
| Unnamed_6            | <i>Zea mays</i>                | 427 | − | 10 | taTAAATATct |                                                                             |
| chs-CMA2a            | <i>Hordeum vulgare</i>         | 703 | − | 8  | GCAATTCC    | part of a light responsive element                                          |

在滇龙胆中,不同组织器官中的龙胆苦苷含量差别较大,其中在根中含量最高<sup>[14]</sup>。转录组数据库分析结果表明,滇龙胆中至少存在 2 个 IDO 基因。因此,研究 GrIDO 基因的组织器官的表达特异性对于阐明其参与的龙胆苦苷生物合成途径具有重要意义。滇龙胆转录组数据分析结果表明,GrIDO 基因在叶中的表达量为根中表达量的 10.79 倍,因此推测 GrIDO 基因主要在叶中参与环烯醚萜类的生物合成。龙胆苦苷可能在叶片中合成后,

在转运子作用下,转运到根中进行累积<sup>[15]</sup>。下一步需要对该基因编码的蛋白进行酶活分析和基因表达分析及通过酵母单杂交技术分离调控该基因表达的转录因子,以阐明该基因在龙胆苦苷生物合成中的作用。

#### 参考文献

- [1] Wei L, Wei Z, Sohyun K, *et al.* Three new secoiridoid glycosides from the rhizomes and roots of *Gentiana scabra* and their anti-inflammatory activities [J]. *Nat*

- Prod Res*, 2015, 29(20): 1920-1927.
- [2] Zhang X D, Allan A C, Li C X, *et al.* De novo assembly and characterization of the transcriptome of the Chinese medicinal herb, *Gentiana rigescens* [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 11550-11573.
- [3] 董丽萍, 倪梁红, 赵志礼, 等. 龙胆属环烯醚萜类化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2116-2128.
- [4] 杨 雁, 邵爱娟, 金 航, 等. 云贵高原滇龙胆不同居群形态特征变异研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1604-1610.
- [5] 张晓东, 李彩霞, 王连春, 等. 滇龙胆 *GrSLS1* 基因的克隆和原核表达 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(7): 1311-1317.
- [6] Miettinen K, Dong L, Navrot N, *et al.* The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus* [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3606-3616.
- [7] Struwe L, Albert V A. *Gentianaceae-Systematics and Natural History* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- [8] Inouye H. *Pharmacognosy and Phytochemistry* [M]. Berlin: Springer, 1971.
- [9] Salim V, Wiens B, Masada-Atsumi S, *et al.* 7-deoxyloganetic acid synthase catalyzes a key 3 step oxidation to form 7-deoxyloganetic acid in *Catharanthus roseus* iridoid biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 2014, 101(9): 23-31.
- [10] Nakatsuka T, Yamada E, Saito M, *et al.* Construction of the first genetic linkage map of Japanese gentian (*Gentianaceae*) [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 672.
- [11] 张晓东, 李彩霞, 李泽君, 等. 滇龙胆 *GrCYP450-17* 基因的克隆、序列分析与原核表达 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2678-2683.
- [12] De Luca V, Salim V, Thamm A, *et al.* Making iridoids/secoiridoids and monoterpenoid indole alkaloids: Progress on pathway elucidation [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 19: 35-42.
- [13] 朱玉贤, 李 毅, 郑晓峰, 等. 现代分子生物学 [M]. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2013.
- [14] 杨美权, 张金渝, 沈 涛, 等. 不同栽培模式对滇龙胆中龙胆苦苷含量的影响 [J]. 江苏农业科学, 2011(1): 287-289.
- [15] 朱宏涛, 郑传伟, 赵 平, 等. 野生坚龙胆及其组培苗中龙胆苦苷的含量分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(3): 482-485.