

大花胡麻草环烯醚萜合酶基因的克隆与表达分析

李玉萍¹, 邓梅¹, 飞亚宏², 李彩霞^{1*}, 张晓东^{1*}

1. 玉溪师范学院化学生物与环境学院, 云南 玉溪 653100

2. 玉溪飞熊农业开发有限公司, 云南 玉溪 653100

摘要: 目的 克隆大花胡麻草环烯醚萜合酶基因 (CgIS), 并进行表达分析。方法 以大花胡麻草根、茎、叶转录组中唯一的 CgIS 基因序列为基础, 采用 RT-PCR 技术从大花胡麻草幼叶克隆 CgIS 基因, 并进行组织特异性表达分析。结果 大花胡麻草 CgIS 基因 (GenBank 登录号 MH794270) 全长 1 185 bp, 编码 394 个氨基酸; CgIS 蛋白相对分子质量 44 670, 理论 pI 为 6.17; 该蛋白属于孕酮 5 β -还原酶 (P5 β -R) 家族成员, 可能定位于细胞质; 该蛋白无信号肽, 为亲水稳定蛋白, 主要由 α -螺旋 (40.61%) 和无规则卷曲 (46.70%) 构成; 该蛋白具有 SDR (短链脱氢酶/还原酶) 和 P5 β R 蛋白保守结构域; CgIS 蛋白与芝麻 SiIS 蛋白亲缘关系最近; CgIS 基因主要在叶中表达。结论 克隆了 CgIS 基因, 并对其进行了表达分析, 为进一步研究该基因的功能和环烯醚萜类的生物合成途径奠定基础。

关键词: 大花胡麻草; 环烯醚萜合酶; 基因克隆; 表达分析; RT-PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0741-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.026

Cloning and expression analysis of iridoid synthase gene in *Centranthera grandiflora*

LI Yu-ping¹, DENG Mei¹, FEI Ya-hong², LI Cai-xia¹, ZHANG Xiao-dong¹

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

2. Yuxi Flyingbear Agricultural Development Co., Ltd., Yuxi 653100, China

Abstract: Objective To clone the CgIS gene encoding iridoid synthase from *Centranthera grandiflora* and conduct its expression analysis. **Methods** Based on the sole sequence of CgIS gene in root, stem and leaf transcriptome of *C. grandiflora*, a CgIS gene was cloned from young leaves of *C. grandiflora* by RT-PCR technique, and its tissue-specific expressions were also performed. **Results** The CgIS gene (GenBank accession number: MH794270) had a length of 1 185 bp coding for 394 amino acids, and the relative molecular weight of CgIS protein was 44 670 with its theoretical pI of 6.17. CgIS protein belonged to the member of P5 β R (progesterone 5 β -reductase) family, and might localize in cytoplasm. CgIS protein was a hydrophilic stable protein without signal peptide, and composed of mainly α -helix (40.61%) and coil (46.70%). The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase) and P5 β R conserved domains were existed in CgIS protein. CgIS protein was close to SiIS protein of *Sesamum indicum*. CgIS gene was primarily expressed in leaves. **Conclusion** The CgIS gene is cloned, and its expressions are also analyzed, which will pave a way for further studies on function of CgIS gene and biosynthetic pathway of iridoids.

Key words: *Centranthera grandiflora* Benth.; iridoid synthase; gene cloning; expression analysis; RT-PCR

大花胡麻草 *Centranthera grandiflora* Benth., 又名蚕豆灵芝、野蚕豆根、化血丹、金猫头、小红药、灵芝草等, 为玄参科胡麻草属植物, 在国内主要分布于云南、贵州、广西等地, 在国外主要分布于印

度、缅甸、越南等地^[1-2]。大花胡麻草的药用部位为根, 具有活血调经、散瘀止痛、凝血、抗菌、抗癌的作用, 主要用于治疗闭经、痛经、崩漏、跌打损伤、风湿骨痛、外伤出血、心脑血管疾病等^[1,3-5]。

收稿日期: 2019-03-03

基金项目: 云南省高校基础研究联合专项 (2017FH001-024); 国家级大学生创新性项目 (201811390007); 云南省科技计划项目 (2016FD113)

作者简介: 李玉萍 (1997—), 女, 本科, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: 2640855358@qq.com

*通信作者 李彩霞, 博士, 讲师, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: licaixia1112@126.com

张晓东, 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

目前,关于大花胡麻草的研究较少,且主要集中于化学成分的分离鉴定和初步药理作用。1984 年,梁钜忠等人首次从大花胡麻草中分离鉴定到杜鹃红素和甘露醇两种化合物^[6]。2012 年,廖立平等^[1]采用硅胶柱色谱法首次从大花胡麻草乙醇提取物中分离得到 9 个环烯醚萜苷化合物,分别为桃叶珊瑚苷、玉叶金花苷、8-表番木鳖碱、8-表番木鳖酸、玉叶金花酸、梓醇、栀子新苷甲酯、京尼平苷酸、6-O-methylaucubin。大花胡麻草主要药效成分为环烯醚萜类化合物、苯乙醇苷类化合物、杜鹃红素类化合物^[2]。要使用合成生物学手段生产大花胡麻草的主要药效成分,必须弄清主要药效成分的生物合成途径及其调控机制。

裂环烯醚萜类化合物属于单萜,在植物中其生物合成途径可分为 3 个阶段:第 1 阶段为前体形成阶段,包括质体 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径和胞质中甲羟戊酸(MVA)途径,生成 IPP 和 DMAPP^[7];第 2 阶段为碳骨架结构形成阶段,起始于香叶基焦磷酸,止于裂环番木鳖苷的合成^[8-10];第 3 阶段为萜类化合物的结构后修饰阶段^[10]。环烯醚萜合酶(iridoid synthase, EC 1.3.1.99,在已报道文献中简称为 IS/IDS/ISY)是裂环烯醚萜类途径中的第 2 阶段第 5 个催化酶,也是形成环烯醚萜类核心碳骨架的酶,在辅因子还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)存在下,它能催化链状的 8-氧香叶醛(8-oxogeranial)或 10-氧香叶醛(10-oxogeranial)生成开环的琉蚁二醛(iridodial)和闭环的荆芥醇(nepetalactol)^[8,11-12]。目前,环烯醚萜合酶基因(IS)已从长春花^[13]、油橄榄^[14]、金鱼草^[15]、假荆芥^[11]、倒伏荆芥^[11]和滇龙胆^[16]等许多植物中分离得到。IS 基因的表达具有组织特异性,并被非生物因素诱导。在长春花悬浮培养细胞和植株中,茉莉酸甲酯能够分别使长春花 IS(CrIS)基因表达上调 35 倍和 2 倍^[9]。在油橄榄 IS(OeIS)基因在果实中表达量最高,其次是叶,在花中仅有微量表达,而在根中不表达^[14]。在川西獐牙菜 IS(SmIS)基因中,SmIS1 和 SmIS2 主要在叶中表达,其次是茎^[17]。在金鱼草中,AmIS 基因仅在叶中表达,在花和根中不表达^[15]。

总之,目前国内外对 CrIS 基因研究较多,尚未对大花胡麻草 IS(CgIS)基因进行克隆和表达分析。本研究根据大花胡麻草转录组中仅有的 1 条 CgIS 基因序列,设计引物,通过 RT-PCR 技术成功从大花胡

麻草叶片中扩增到 CgIS 基因,并进行序列分析和组织表达特异性分析,以期对 CgIS 基因功能研究及通过合成生物学生产环烯醚萜类成分奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大花胡麻草植株栽培于玉溪飞熊农业开发有限公司玉山城基地,由云南省农业科学院药用植物研究所金航研究员鉴定为 *Centranthera grandiflora* Benth. RNA 提取所用材料为大花胡麻草幼叶,基因表达分析使用的材料为大田栽培大花胡麻草的根、茎、叶和花,采样日期为 2018 年 11 月 3 日。

1.2 方法

1.2.1 叶片总 RNA 提取及 CgIS 基因 ORF 的克隆按照植物 RNA 提取试剂盒 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (Takara 公司,大连)说明书提取大花胡麻草幼叶总 RNA;按照逆转录试剂盒 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara 公司,大连)说明书合成 cDNA。根据原核表达载体 pColdTM ProS2 DNA (Takara 公司,大连)多克隆酶切位点和大花胡麻草根、茎、叶转录组中唯一的 1 条 CgIS 基因序列 Cluster-13824.65961,设计一对特异引物 CgISBamHI-F: 5'-GGATCCATGT-ACACTGATACGATGAGCTG-3' (下划线为 BamHI 酶切位点), CgISHindIII-R: 5'-AAGCTTTTAAAG-GAATAAACTTATAAGCCCTC-3' (下划线为 HindIII 酶切位点,引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (2×Mix, Takara 公司,大连) 25 μL,模板 2 μL,正反向引物(10 μmol/L)各 1 μL,加 ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件为:98 °C 变性 10 s, 61 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 循环;72 °C 延伸 7 min。PCR 产物加 A 尾后,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,然后切胶,使用胶回收试剂盒(百泰克,北京)对目的片段进行回收,将其连接到 pMD19-T 载体 (Takara 公司,大连)。转化大肠杆菌 DH5α (Takara 公司,大连)后进行蓝白筛选,挑取白斑摇菌;使碱裂解法提取质粒,经酶切检测正确后,将 1 mL 菌液送公司进行 DNA 测序(上海生工,上海),从而获得正确的重组质粒 pMD19-CgIS。

1.2.2 CgIS 基因的生物信息学分析 使用 Genetyx Version 6.1.8 将核苷酸翻译成蛋白质,使用 NCBI 网站上的 BLASTp 程序进行序列比对,使用 DNAMAN Version 7 进行多序列比对;使用 MEGA

X Version 10.0.5 软件内置的 Clustal W 进行多序列比对, 然后使用 NJ 法构建系统发育树, 设置 bootstrap=1 000, cutoff=70%; 利用在线数据库 (http://molbiol. edu.ru/eng/scripts/01_11.html) 进行稀有密码子分析。使用 ChloroP 服务器 Version 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 进行叶绿体转运肽预测; 使用 Interpro 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 进行保守结构域预测; 使用 ProtScalee 软件 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 进行疏水性分析; 使用 SSpro 软件 (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) 对二级结构进行预测; 使用 SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) 进行同源建模分析; 利用 Expasy 中的 TMHMM Version 2.0 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白的跨膜螺旋区; 利用在线工具 WOLF PSORT 服务器 (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>)、ProtComp Version 9.0 服务器 (<http://www.softberry.com/>) 和 Predotar Version 1.3 软件 (<https://urgi.versailles.inra.fr/Tools/Predotar>) 预测蛋白的亚细胞定位情况。

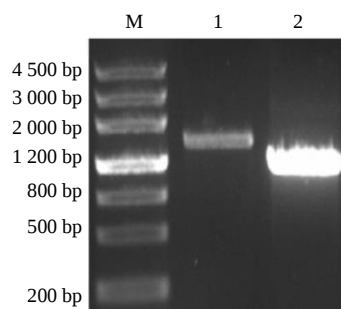
1.2.3 CgIS 基因的 qRT-PCR 分析 分别取 2 年生大花胡麻草的根、茎、叶和花, 每个器官取 3 个样品, 提取总 RNA。使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix (Takara 公司, 大连) 合成第 1 链 cDNA。以大花胡麻草转录组中 *CgUbi* 基因 (全称为 *CgUbiquitin*, 基因编号 Cluster-11710.57591, GenBank 号: MK256646) 作为内参设计引物 *CgUbi-F* (5'-AGAAGAAGGT CAAGCTCGCC-3') 和 *CgUbi-R* (5'-GCCACACTTACCGCAGTAG-T-3')。根据 *CgIS* 基因的 cDNA 序列设计特异性引物 *qCgIS-F* (5'-ATGATGAACAC GGTGAGCAC-3') 和 *qCgIS-R* (5'-TTAAACGCCTGGTTCTTCGC-3')。使用嵌合荧光检测试剂盒 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, Takara 公司, 大连) 进行 qRT-PCR, PCR 条件为 95 °C、15 s, 60 °C、15 s, 72 °C、20 s。反应在 LightCycler 480 II 荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司, 瑞士) 上进行扩增, 扩增曲线、溶解曲线、标准曲线由定量 PCR 仪软件自动生成。使用内参基因 (*CgUbi*) 表达校准后, 软件采用比较 C_t 值的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法自动计算出根、茎、叶和花中 *CgIS* 基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 大花胡麻草 CgIS 基因序列的克隆

以大花胡麻草幼叶 cDNA 为模板, 使用特异性

引物扩增出约 1 200 bp 的片段 (图 1)。通过 TA 克隆获得重组质粒 pMD19-CgIS, 酶切检测结果表明双酶切获得的 2 片段大小之和等于单酶切片段大小, 与预期结果相符。



M-Marker III 1-阳性对照 *CgDLGT2* 基因的扩增结果 2-*CgIS* 基因的 PCR 扩增结果

M-Marker III 1-Positive control amplification result of *CgDLGT2* gene 2-PCR amplification result of *CgIS* gene

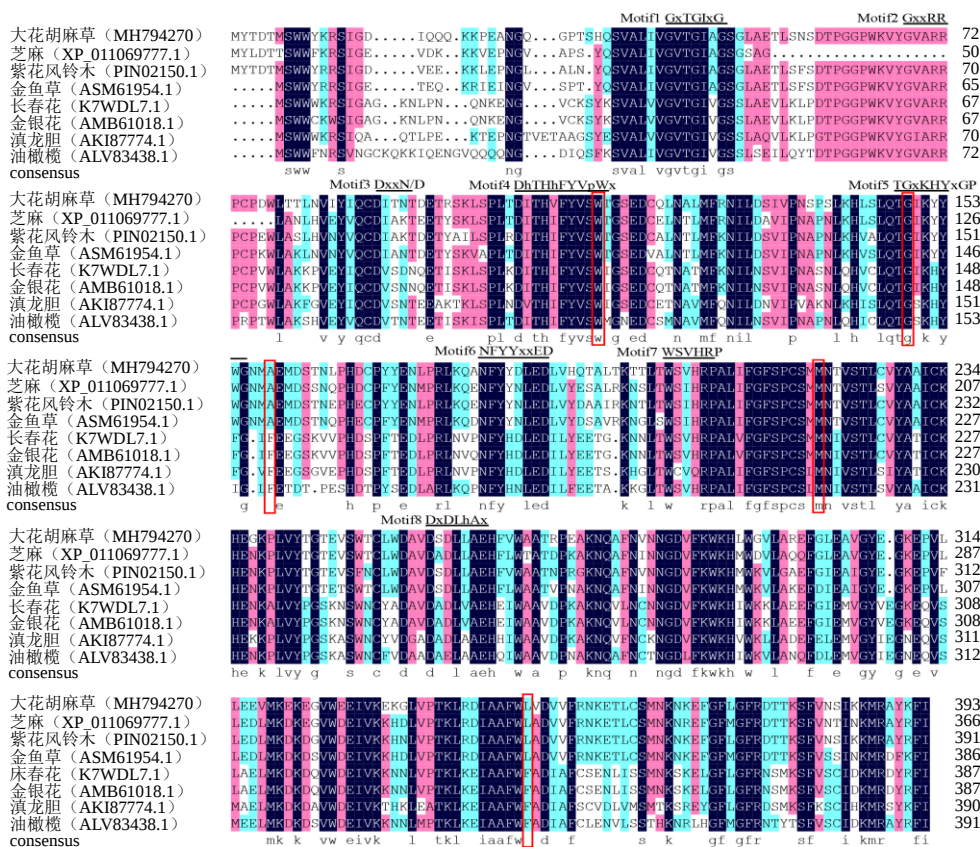
图 1 *CgIS* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of *CgIS* gene in *C. grandiflora*

2.2 CgIS 基因的生物信息学分析

利用 Genetyx 和 DNAMAN 软件对 *CgIS* 基因 cDNA 序列进行分析, 结果显示 *CgIS* 基因开放阅读框 (ORF) 全长 1 185 bp, 编码 394 个氨基酸。使用 NCBI 网站提供的 BankIt 软件将该序列上传至 GenBank 数据库, 获得登录号 MH794270。

使用 Genetyx 软件将 *CgIS* 基因的核苷酸序列翻译成蛋白质, 然后使用 NCBI 数据库中的 BLASTp 程序对 *CgIS* 蛋白的氨基酸序列进行相似性分析, 结果表明 *CgIS* 蛋白具有短链脱氢酶/还原酶 (SDR) 超家族保守结构域和类 5βPR 保守结构域, 且 *CgIS* 蛋白与芝麻 IS (SiIS, 75.38%)、紫花风铃木 IS (HiIS, 82.23%)、金鱼草 IS (AmIS, 79.95%) 蛋白序列相似性较高, 与中华猕猴桃 IS (AcIS, 55.32%) 蛋白相似性较低。利用 DNAMAN 软件将 *CgIS* 蛋白氨基酸序列与从 BLASTp 结果中相似性较高的部分已知序列进行多序列比对分析, 结果显示 *CgIS* 蛋白与已知 IS 蛋白序列相似性很高, 都具有 8 个保守的 SDR 基序 (图 2) 和 P5βR 家族酶催化重要的氨基酸, 表明 *CgIS* 蛋白属于 P5βR 家族成员。利用 Mega X 将 *CgIS* 氨基酸序列与文献已报道的部分序列、BLASTp 结果中的相似性较高的部分序列进行系统发育分析, 结果显示 *CgIS* 蛋白与 SiIS、AmIS、HiIS 蛋白处于同一进化枝 (图 3), 表明它们亲缘关系较近。



黑色-相似性等于 100%; 粉红色-75%≤相似性<100%; 浅蓝色-50%≤相似性<75%; 保守氨基酸基序使用下划线标出; 催化重要的氨基酸使用红色框标出

Black-homology=100%; pink-75%≤homology<100%; light blue-50%≤homology<75%; Conserved amino acid motifs are underlined; catalytically important amino acids are indicated by red frame

图 2 CgIS 蛋白与其他植物 IS 蛋白的多序列比对结果

Fig. 2 Multiple sequence alignment of CgIS protein with ISs in other plants

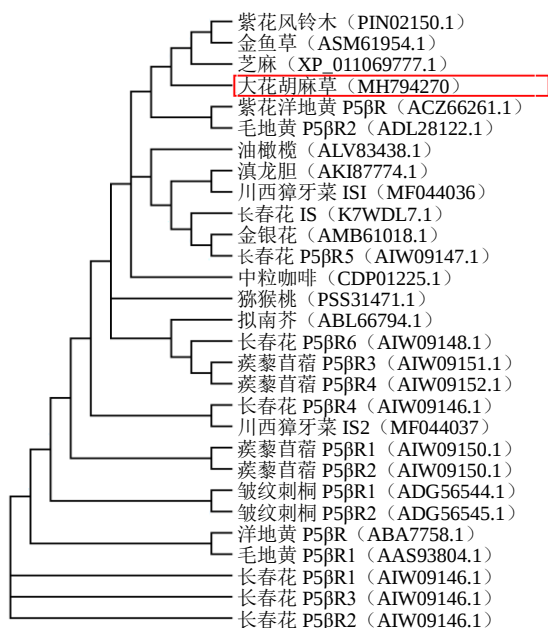
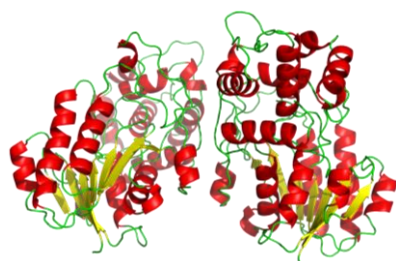


图 3 CgIS 蛋白与其他植物 IS 及 P5βR 蛋白的系统发育

Fig. 3 Phylogenetic tree of CgIS protein and ISs, P5βRs in some other plants

使用 ExPASy ProtParam 软件对 CgIS 蛋白进行理化性质分析, 结果表明 CgIS 蛋白单体相对分子质量为 446 700, 理论 pI 为 6.17; 带正电氨基酸残基 (Arg+Lys) 为 40 带负电氨基酸残基 (Asp+Glu) 为 44, 分子式为 $C_{2020}H_{3093}N_{523}O_{585}S_{19}$ 。不稳定指数为 31.67, 属于稳定蛋白; 脂肪指数为 80.38, 总平均疏水性 (GRAVY) 为 -0.260, 为亲水蛋白。CgIS 蛋白含有 20 种基本氨基酸, 其中亮氨酸含量最高, 为 9.1%; 其次是苏氨酸和缬氨酸, 分别为 7.9% 和 7.6%; 半胱氨酸和组氨酸含量最低, 均为 2.3%。

利用 SSpro 软件对 CgIS 蛋白进行二级结构分析, 结果表明该蛋白二级结构中 α -螺旋 (H) 占 40.61%, β 折叠 (E) 占 12.69%, 无规卷曲 (C) 占 46.70%。利用 Swiss-Model Workspace 使用自动模式预测 CgIS 蛋白的三级结构, 结果见图 4, 该模型以长春花环烯醚萜合酶 [5dcw.1.A] 为模板, 在第 33~394 氨基酸处建模, 三维模型覆盖率为 91.88%, 序列一致性为 65.93%。使用 InterPro 在线



红色- α -螺旋 黄色- β -折叠 绿色-环
red- α -helix yellow- β -fold green-loop

图 4 CgIS 蛋白同源二聚体的三维结构预测

Fig. 4 Prediction of three dimensional structure of CgIS homo-dimer

工具对 CgIS 蛋白进行分析和归类, 结果表明 CgIS 蛋白属于 NAD(P)-结合结构域超家族成员, 包含 NAD(P) 结合位点 (41G、42V、43T、44G、45I、46A、70A、71R、72R、88C、89D、90I、112V、113S、114W、147Q、148T、184Y、208P、209A、211I、218S、219M、220M、328E) 和活性位点 (151K、184Y)。

利用 SignalP 4.1 服务器分析 CgIS 蛋白, 未发现信号肽, 表明该蛋白为非分泌型蛋白。利用 TMHMM 软件预测 CgIS 蛋白的跨膜螺旋区, 结果表明 CgIS 蛋白不含跨膜螺旋区域 (图 5), 为非膜蛋白。使用 WoLF PSORT 软件进行亚细胞定位分析, 结果为 CgIS 蛋白在细胞质、内质网和叶绿体的定位系数分别为 10、2 和 1。使用 ProtComp 9.0 对 CgIS 蛋白进行亚细胞定位预测, 结果表明该蛋白定位于细胞质。使用 Predotar 软件对 CgIS 蛋白进行亚细胞定位预测, 结果表明该蛋白为非质体、内质网、线粒体定位。使用 ChloroP 1.1 Server 对 CgIS 蛋白的叶绿体转运肽进行预测, 结果表明 CgIS 蛋白无叶绿体转运肽。

对 CgIS 基因进行稀有密码子分析, 结果表明

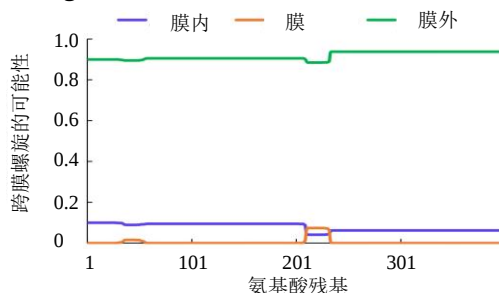


图 5 CgIS 蛋白可能跨膜螺旋的检测

Fig. 5 Detection of putative transmembrane helices of CgIS protein

CgIS 基因中稀有密码子仅占 1.78%, 且无二联或三联稀有密码子连续出现的情况, 因此可选用大肠杆菌表达菌 BL21 或 Rosetta (DE3) 进行原核表达。

2.3 CgIS 基因的组织表达分析

取两年生大花胡麻草的根、茎、叶和花, 通过 qRT-PCR 分析 CgIS 基因在不同组织中的表达情况。结果表明, CgIS 基因在叶中的表达量最高, 为根中的 103 倍; 其次是茎, 为根中的 6 倍; 该基因在花中不表达 (图 6)。

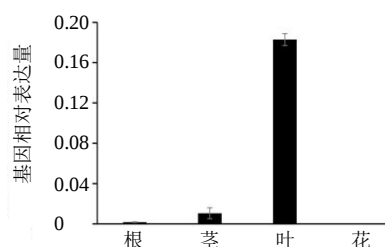


图 6 CgIS 基因在大花胡麻草根、茎、叶、花中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of CgIS gene in roots, stems, leaves and flowers

3 讨论

环烯醚萜合酶 IS 属于短链脱氢酶/还原酶超家族的植物酶, 能够产生包括抗肿瘤药在内的具有各种药物活性的下游生物碱的环骨架, 因此备受研究者的关注^[18]。研究表明在植物中 IS 蛋白是环烯醚萜类生物合成途径中负责还原和碳骨架环化的关键酶^[18], 因此大花胡麻草中 CgIS 基因的表达情况能够直接影响环烯醚萜类的生物合成。从分子进化角度来看, IS 基因起源于 P5 β R 基因, 且在进化早期其编码蛋白就已具备 IS 酶的活性^[9]。本研究根据大花胡麻草根、茎、叶转录组数据中仅有的 1 条 CgIS 基因序列, 设计基因特异性引物, 克隆到 CgIS 基因, 并对其编码蛋白进行序列分析, 结果表明 CgIS 蛋白与 SiIS、CrIS、AmIS、HiIS 蛋白相似性分别为 75.38%、63.05%、81.40%和 82.65%, 并且具有 8 个保守的 SDR 基序和 P5 β R 家族酶催化重要的氨基酸 (图 2)^[9], 这表明 CgIS 蛋白属于 P5 β R 家族成员。系统发育分析结果表明大花胡麻草 CgIS 蛋白与芝麻 SiIS、金鱼草 AmIS、紫花风铃木 HiIS 蛋白亲缘关系较近 (图 3), 它们可能具有相同或相似的结构和功能。值得注意的是, 在多序列比对中发现, 芝麻 SiIS 蛋白比大花胡麻草等其他几种植物的 IS 蛋白在 N 端缺少 25 个氨基酸 (图 2), 这暗示

着大花胡麻草 CgIS 蛋白与芝麻 SiIS 蛋白在结构和功能上存在差异。本研究,使用 WoLF PSORT 软件、ProtComp 9.0 软件和 Predota 1.3 软件对 CgIS 蛋白亚细胞定位进行分析,结果表明 CgIS 蛋白为细胞质蛋白,这与长春花 CrIS 蛋白的定位于细胞质的结果一致^[9]。这些结果都表明本研究克隆到的基因为大花胡麻草 CgIS 基因。

在不同生物中,IS 基因的同源基因数目不同。在长春花和川西獐牙菜中,分别发现了 2 和 3 条 IS 基因^[9,17],其中 CrP5 β R4 和 CrP5 β R5 (CrIS)、SmIS1 和 SmIS2 均可能存在功能冗余。与油橄榄^[14]、金鱼草^[15]、滇龙胆^[16]和青叶胆^[19]相同,在大花胡麻草转录组中仅发现了 1 条 IS 基因,表明它在环烯醚萜合成中的起重要作用。在不同物种中,IS 蛋白的活性形式也不同。在长春花中,CrIS 蛋白的活性形式为同源二聚体^[13,20]。在本研究中,CgIS 蛋白三维模型预测结果表明,该蛋白的活性形式也为同源二聚体(图 4),当然这需要通过 Native-PAGE 或酵母双杂交实验进行进一步验证。

在长春花 CrIS 蛋白酶的活性中心,它仅保留了 SDR 酶家族活性中心的 Tyr178,并且 Ser349 和具有由非保守氨基酸组成的疏水支架决定底物的特异性^[18]。在 CgIS 蛋白中,也存在 SDR 家族保守结构域中的 Tyr,但其疏水支架与金鱼草 AmIS 和紫花风铃木 HiIS 相同,仅保留了 CrIS 蛋白中的 Ile145、Leu203、Met213,缺少 CrIS 蛋白中的 Ser349,这表明 IS 酶对支架的要求并不严格,在不同物种中其决定底物特异性的机制也存在差异。

在同一植物的不同发育时期,IS 基因的组织特异性表达也不同^[21]。在大花胡麻草转录组中,CgIS 基因在根、茎和叶中的 FPKM (每一百万个片段中来自某一基因每一千碱基长度的片段数目)平均值分别为 297.73、2.63 和 7.14,表明在生长期该基因主要在叶中表达,其次是根,表达量最低的是茎。在本研究中,组织表达特异性分析结果表明在花期 CgIS 基因在叶中的表达量最高,其次是茎,再次是根(图 6),而在花中不表达。这些结果表明在生长期和花期,CgIS 基因都主要在叶中表达,在茎和根中仅有少量表达。在传统中药中,大花胡麻草用药部分为橙红色的根,因此推测大花胡麻草的环烯醚萜类物质首先是在叶中合成,然后通过茎转运到根部进行累积的。

本研究为 CgIS 基因功能的解析奠定基础。下

一步将对 CgIS 基因进行原核表达、蛋白纯化和酶活性分析,为大花胡麻草环烯醚萜类生物合成途径的阐明奠定基础。

参考文献

- [1] 廖立平,张紫佳,胡之璧,等.大花胡麻草环烯醚萜类化学成分研究[J].中草药,2012,43(12):2369-2371.
- [2] 廖立平.化血丹化学成分与活性研究[D].上海:上海中医药大学,2014.
- [3] 王真,王琼,闫俊岭,等.大花胡麻草的化学成分及其活性研究[A]//云南省药学会论文集[C].昆明:云南省药学会,2012.
- [4] 梁钜忠,张嘉硕,马孝本,等.大花胡麻草中化学成分的鉴定[J].中国中药杂志,1985,10(5):35.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,2009.
- [6] 梁钜忠,张嘉硕,马孝本,等.大花胡麻草(*Centranthera grandiflora*)中化学成分的鉴定[J].植物学报,1984,2(Z1):47.
- [7] Hua W, Zheng P, He Y, et al. An insight into the genes involved in secoiridoid biosynthesis in *Gentiana macrophylla* by RNA-seq[J]. *Mol Bio Rep*, 2014, 41(7): 4817-4825.
- [8] Miettinen K, Dong L, Navrot N, et al. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus* [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3606-3616.
- [9] Munkert J, Pollier J, Miettinen K, et al. Iridoid synthase activity is common among the plant progesterone 5 β -reductase family [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 136-152.
- [10] 黄璐琦,刘昌孝.分子生药学[M].第3版.北京:科学出版社,2015.
- [11] Sherden N H, Lichman B, Caputi L, et al. Identification of iridoid synthases from *Nepeta* species: Iridoid cyclization does not determine nepetalactone stereochemistry [J]. *Phytochemistry*, 2018, 145: 48-56.
- [12] Billingsley J M, DeNicola A B, Barber J S, et al. Engineering the biocatalytic selectivity of iridoid production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metab Eng*, 2017, 44: 117-125.
- [13] Geu-Flores F, Sherden N H, Courdavault V, et al. An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis [J]. *Nature*, 2012, 492(7427): 138-142.
- [14] Alagna F, Geu-Flores F, Kries H, et al. Identification and characterization of the iridoid synthase involved in oleuropein biosynthesis in olive (*Olea europaea*) fruits [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(11): 5542-5554.

- [15] Kries H, Kellner F, Kamileen M O, *et al.* Inverted stereocontrol of iridoid synthase in snapdragon [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(35): 14659-14667.
- [16] Zhang X, Allan A, Li C, *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.
- [17] Xiang B, Li X, Wang Y, *et al.* Cloning and characterization of two iridoid synthase homologs from *Swertia Mussotii* [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1387.
- [18] Lindner S, Geu-Flores F, Brase S, *et al.* Conversion of substrate analogs suggests a michael cyclization in iridoid biosynthesis [J]. *Chem Biol*, 2014, 21(11): 1452-1456.
- [19] Qin L, Zhu Y, Ding Z, *et al.* Structure of iridoid synthase in complex with NADP⁽⁺⁾/8-oxogeranial reveals the structural basis of its substrate specificity [J]. *J Struct Biol*, 2016, 194(2): 224-230.
- [20] 吴昕怡, 严 媛, 刘小莉. 基于高通量测序的青叶胆转录组研究 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 363-369.
- [21] Kries H, Caputi L, Stevenson C E M, *et al.* Structural determinants of reductive terpene cyclization in iridoid biosynthesis [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 12(1): 6-8.