

• 药材与资源 •

颠茄 AbCYP80F1 基因的克隆与功能分析

付 维, 郑 涛, 姜育松, 康 健, 张明生, 苟光前, 强 玮*

贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 山地生态与农业生物工程协同创新中心, 贵州 贵阳 550025

摘要:目的 克隆颠茄 AbCYP80F1 基因和启动子序列, 分析启动子上与调控信号和转录因子相关的调控元件, 研究 AbCYP80F1 基因超表达对颠茄发根中东莨菪碱积累的影响。方法 以莨菪 CYP80F1 为探针, 在颠茄转录组中进行 Blastn 检索获得同源的 unigene。采用 RACE 技术克隆 AbCYP80F1 全长, 热不对称 PCR 技术克隆启动子序列, 发根农杆菌浸染法获得超表达 AbCYP80F1 基因的颠茄发根, 对培养的发根中东莨菪碱含量进行 HPLC 分析。结果 克隆得到 1 675 bp 的全长 AbCYP80F1 基因, 其编码蛋白与铃铛子的 CYP80F1 亲缘关系最近。基因上游 2 000 bp 启动子上包含的顺式作用元件涉及光、无氧、生长素、茉莉酸、赤霉素和低温信号响应, 同时包含有 MYB、AP2/ERF、WRKY 和 bHLH 转录因子的识别位点。超表达 AbCYP80F1 基因使颠茄发根中东莨菪碱含量平均提高了 1.8 倍。结论 AbCYP80F1 是颠茄须根特异性表达的合成途径基因, 超表达能提高终产物东莨菪碱含量, AbCYP80F1 可能受到 WRKY 和 bHLH 转录因子的调控。

关键词: 颠茄; AbCYP80F1; 东莨菪碱; 启动子分析; RACE 技术

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4291-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.025

Cloning and functional analysis of AbCYP80F1 gene in *Atropa belladonna*

FU Wei, ZHENG Tao, JIANG Yu-song, Kang Jian, ZHANG Ming-sheng, GOU Guang-qian, QIANG Wei

Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Collaborative Innovation Center for Mountain Ecology & Agro-Bioengineering (CICMEAB), College of Life Sciences/Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To clone AbCYP80F1 gene and its promoter, analyze the *Cis*-acting elements related to control signals and transcription factors in AbCYP80F1 gene promoter and study the effect of AbCYP80F1 overexpression on scopolamine accumulation in *Atropa belladonna*. **Methods** CYP80F1cDNA from *Hyoscyamus niger* was used as query sequence to do blastn search in *A. belladonna* transcriptome database to retrieve homologous unigenes. Full-length of AbCYP80F1 cDNA and gene promoter were acquired by RACE and hiTAIL-PCR, respectively. *Agrobacterium rhizogenes*-dipping method was adopted to induce AbCYP80F1-overexpressed *A. belladonna* hairy roots, and scopolamine content in hairy roots was detected by HPLC. **Results** A full-length of 1 675 bp of AbCYP80F1 gene was obtained and the deduced protein had a closed homology with CYP80F1 from *Anisodus luridus*. A length of 2 000 bp promoter contained *Cis*-acting elements related to light, anaerobic induction, auxin, MeJA, gibberellins and low temperature, as well as recognition sites of transcription factor of MYB, AP2/ERF, WRKY and bHLH. Overexpression of AbCYP80F1 gene increased the scopolamine content in hairy roots of *A. belladonna* by an average of 1.8 times. **Conclusion** AbCYP80F1 is a secondary root-specific gene in scopolamine biosynthetic pathway and its overexpression can enhance scopolamine accumulation. Expression of AbCYP80F1 may be regulated by WRKY and bHLH transcription factors.

Key words: *Atropa belladonna* L.; AbCYP80F1; scopolamine; promoter analysis; RACE

托品烷类生物碱 (tropane alkaloids, TAs) 是一 阿托品 (atropine)、东莨菪碱 (scopolamine)、颠茄
类植物来源的天然药物, 包括莨菪碱 (hyoscyamine), 碱 (belladonin) 和山莨菪 (anisodamine) 等。由于具

收稿日期: 2020-01-09

基金项目: 贵州省生物学一流学科建设项目 (GNYL [2017] 009); 国家重点研发计划课题 (2016YFC0502604); 贵州省科技计划重大专项课题 (黔科合平台人才 [2017] 5411-06); 贵州省科技创新人才团队建设专项资金 (黔科合平台人才 [2016] 5624); 贵州省中药材现代产业技术体系建设项目 (GZCYTX-02); 贵州大学引进人才科研项目 (贵大人基合字 [2017] 58)

作者简介: 付 维 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物代谢与分子生物学。E-mail: 15722112741@163.com

***通信作者** 强 玮 (1988—), 男, 副教授, 主要研究方向为药用植物代谢工程与合成生物学。E-mail: qiangwei880311@126.com

有显著的抗胆碱活性,在临床上作为抗胆碱药物广泛应用于镇痛、麻醉、抗晕动、戒毒脱瘾、改善微循环和治疗帕金森病等^[1],尤其是其中的东莨菪碱药效最好且副作用低,市场上需求巨大。工业合成东莨菪碱成本高昂和易造成环境污染,所以目前市场上东莨菪碱供应主要依靠从资源植物中提取,包括颠茄属 *Atropa* L.、曼陀罗属 *Datura* L.、天仙子属 *Hyoscyamus* L.、澳洲毒茄属 *Duboisia* R. Br. 和山莨菪属 *Anisodus* Link et Otto 等若干物种,而颠茄 *Atropa belladonna* L. 是《中国药典》2015 年版收录的法定栽培药源。阐明颠茄中东莨菪碱生物合成的分子机制并利用代谢工程或合成生物学手段提高其合成效率是相关产业的追求目标。

基于代谢工程高效获取植物药用活性成分首先依赖于对其生物合成途径的阐明和关键酶基因的功能研究。颠茄中东莨菪碱生物合成已逐渐清楚,其起始于鸟氨酸或精氨酸的脱羧,然后经多步反应生成带托品环结构的托品醇,托品醇与来源于苯丙氨酸转氨和还原的产物苯乳酸缩合生成海螺碱^[1-2]。CYP80F1 催化东莨菪碱合成的倒数第 3 步反应,它催化海螺碱进行分子内重排生成莨菪醛^[3],莨菪醛再经过假定的醇脱氢酶(ADH)和莨菪碱 6 β -羟化酶(H6H)催化最终生成东莨菪碱。这个代谢合成途径在颠茄中限定于根部,途径中已被克隆的精氨酸脱羧酶(ADC)基因、N-甲基腐胺转移酶(PMT)基因和 H6H 基因均具有须根表达特异性^[4-5]。CYP80F1 也叫海螺碱变位酶/单加氧酶,属于细胞色素 P450 家族。CYP80F1 基因最初是从莨菪 *Hyoscyamus niger* L. 根中被克隆鉴定的^[3],之后在另外 2 种 TAs 资源植物铃铛子 *Anisodus luridu* Link et Otto^[6]和软木树 *Duboisia myoporoides* R. Br.^[7]中被分离,这是仅有的 3 个 CYP80F1 基因被克隆的物种。对 CYP80F1 功能分析的报道不多,铃铛子的 CYP80F1 表达量受 UV-B 的诱导;在不同树龄的软木树中 CYP80F1 表达量与托品烷生物碱含量正相关^[7]。最近有研究表明,通过提高莨菪中氧气的高效转运与利用,可以提高 CYP80F1 的酶活性,进而促进托品烷生物碱的合成^[8]。目前颠茄中 CYP80F1 基因还未见克隆,其表达水平高低在东莨菪碱合成中的作用没有得到有效的评价,植物次生代谢物的合成往往受到生物和非生物环境因子的影响,通过信号转导最终由转录因子介导对合成途径基因的表达水平进行调控。这种调控作用是基于转

录因子与启动子上的调控元件互作来完成的,所以对途径基因启动子元件的分析有助于解析代谢调控机制。利用这种方法在青蒿和长春花等中药中成功鉴定了多种正调控的转录因子,如青蒿中根据途径基因启动上的 RAV1AAT 元件鉴定出了 2 个调控青蒿素合成的正调控因子 ERF1 和 ERF2^[9];根据 W-box 元件,分别从日本黄连、青蒿和长春花等药用植物中鉴定出了调控次生代谢的 WRKY 转录因子^[10-12]。颠茄中还没有鉴定出调控东莨菪碱合成的转录因子。本研究从颠茄转录组中分离克隆 CYP80F1 基因的全长,并进行详细的生物信息学分析,进而采用热不对称 PCR 法克隆其启动子序列,从顺式作用元件分析其可能受到的环境信号和转录因子的调控,最后将该基因在颠茄发根中进行超表达,探明其表达水平的提高对东莨菪碱合成的影响,为阐明颠茄中托品烷生物碱合成的代谢调控奠定基础。

1 材料

样品采集于陕西安康种植基地,由西南大学廖志华教授提供,经西南大学生命科学学院吴能表教授鉴定为颠茄 *Atropa belladonna* L. 的种子,繁育并保存于贵州大学植物生理生化与分子生物学实验室,材料的采集与处理方法与本实验室前期的报道一致^[5]。对照品东莨菪碱(批号 PHR1470)购自 Sigma 公司,质量分数 $\geq 98\%$ 。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

将颠茄须根用清水洗净,擦干多余水分,按 RNAsimple Total RNA Kit 说明书提取总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。按照 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa 公司)试剂盒说明书反转录获得第一链互补链 DNA (cDNA),用于基因片段克隆和 3'RACE。按照 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 和 BD AdvantageTM 2 PCR Kit (CLONTECH)试剂盒说明书反转录获得 cDNA,用于 5'RACE。

2.2 AbCYP80F1 基因的克隆

用莨菪 HnCYP80F1 基因序列(登录号 ABD39696)在颠茄转录组资源库中(<http://medicinalplantgenomics.msu.edu/>)进行 blastn 检索,获得 3 条相似性大于 90% 的 unigene 序列。根据这 3 条序列,设计核心片段引物、5'RACE 巢式引物和 3'RACE 巢式引物(表 1),以相应的 cDNA 为模板

表 1 基因和启动子克隆以及载体构建所用到的引物

Table 1 Primers designed for gene cloning, promoter cloning and vector construction

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃
F-CYP80F1	CCCATCCCAAATAGTTG	55
R-CYP80F1	GTGATGATAATAACAGAGAAC	
R-CYP80F1-5-1	GACACATGAGGCTTGTTACC	62
R-CYP80F1-5-2	GACACATGAGGCTTGTTACC	
F-CYP80F1-3-1	TACAAAGGCCAAGACTTTGAG	54
F-CYP80F1-3-2	GAAGAAGAATTTGTGCTGGAC	
LAD1-1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)N(G/C/A)NNNGGAA	65~55 梯度
LAD1-2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)N(G/C/T)NNNGGTT	65~55 梯度
LAD1-3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)(G/C/A)N(G/C/A)NNNCCAA	65~55 梯度
LAD1-4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)(G/A/T)N(G/C/T)NNNCGGT	65~55 梯度
AC1	ACGATGGACTCCAGAG	60~50 梯度
R-CYP80F1-W1-1	AAGCCGTATGGACATGAGGTC	65~55 梯度
R-CYP80F1-W1-2	GACACATGAGGCTTGTTACC	60~50 梯度
R-CYP80F1-W2-1	CCTCATCTAAACAATACTCTCCAAC	65~55 梯度
R-CYP80F1-W2-2	TCAGGTCGGCGCTTGAAATGAG	60~50 梯度
R-CYP80F1-W3-1	GGCGCACATAAAGTCAAGAGTAG	65~55 梯度
R-CYP80F1-W3-2	CAGGAGAAGTTTCTAGTTCCGTC	60~50 梯度
F-CYP80F1-PHB	CCGGGATCCatgaatattgaaacacaaagtga	52
R-CYP80F1-PHB	CCGGAGCTCtctctaactattatgacttct	

进行基因的片段扩增和巢式 RACE 扩增, 扩展片段胶回收后连接 pMD19-T vector, 然后转化大肠杆菌, 取阳性克隆送测序。将这 3 段序列在 Vector NTI 8.0 软件中进行重叠分析, 根据拼接得到的电子全长序列设计验证引物, 用高保真酶进行 PCR 扩增和测序验证。

2.3 AbCYP80F1 的生物信息学分析

在 InforMax 软件包的 Vector NTI Suite 8.0 软件中进行 ORF 查找和推导假定的氨基酸序列, 在 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam 中进行编码蛋白的理化性质分析, 在 NCBI 的 CCD 数据库和 EMBL 的 InterPro 中分析保守结构域。用 TMHMM 2.0 进行跨膜域分析, SignalP 5.0 Server 进行信号肽分析, PSORT Prediction 和 SoftBerry 提供的在线工具 ProtComp 9.0 进行亚细胞定位分析。应用 BLAST 程序检索相似蛋白, 用 Clustal W 对氨基酸序列进行多重比对, 并用 MEGA NJ 法 (Bootstrap 1000) 构建系统树。

2.4 AbCYP80F1 启动子的克隆与元件分析

根据 Liu 等^[13]报道的方法, 设计染色体步移的巢式引物 R-CYP80F1-W1-1 和 R-CYP80F1-W1-2, 以 CTAB 法提取的颠茄根 DNA 为模板, 采用热不

对称 PCR 技术 (TAIL-PCR) 进行染色体步移, 扩增 AbCYP80F1 的启动子。第 1 次步移仅获得了 559 bp 的启动子序列, 为使启动子长度达到 2 000 bp 以上, 再按同样的方法进行 2 次步移。将 3 次步移获得的序列在 Vector NTI 8.0 软件中进行重叠分析, 拼接得到完整的启动子, 经高保真酶扩增和测序验证后, 用于后续顺式作用元件分析。在植物启动子顺式作用调控原件数据库 Plant Cis-Acting Regulatory Element (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) 中对获得的启动子序列进行分析, 整理重要的顺式作用元件。

2.5 AbCYP80F1 转基因发根的获得

2.5.1 超表达载体构建 根据 Ab CYP80F1 基因序列, 在 AbCYP80F1 基因编码区设计 1 对全长引物 F-CYP80F-PHB 和 R-CYP80F-PHB, 分别在 2 条引物 5'端引入 BamH I 和 SacI 酶切位点, 亚克隆入植物超表达载体 pHB。将获得的载体 pHB-AbCYP80F1 用冻融法转入发根农杆菌 C58C1 获得工程菌。

2.5.2 转基因发根的诱导 取上述工程菌在 YEP+Rif 40 mg/L+Kan 50 mg/L 的液体培养基中,按 28 °C 和 200 r/min 的条件进行 2 次连续的活化培养,当二活菌液 A_{600} 值为 0.4 左右时,室温下 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,菌体沉淀用 50 mL 未加抗生素的 MS 液体培养基悬浮,加入 AS 至终浓度为 100 μ mol/L,继续活化 30 min 后可用于转化。颠茄叶片剪成叶盘并适当用针扎一些伤口,转入菌液中浸泡约 8~10 min。吸干多余菌液,将叶片接种在 MS+AS (100 μ mol/L) 固体培养基上, (25 $\pm$ 1.0) °C 恒温暗培养 48 h。然后背面朝上接种到 MS+400 mg/L Cef+20 mg/L Kan 的固体除菌筛选培养基上继续培养,每 5 天换 1 次新鲜培养基。约一周后长出发根,剪下 3~5 cm 长发根接种到 MS+200 mg/L Cef 固体除菌培养基上培养。除菌彻底后提取发根 DNA 对转入的基因进行 PCR 检测。按上述方法获得空载体 pHB 转基因的发根作为对照。

2.5.3 发根的培养 转基因和对照颠茄发根在 MS 固体培养基上进行 2 次继代活化,第一次继代 7~10 d 后,剪取新长出的嫩白色且多分支的发根进行第 2 次继代,约 5~7 d 后,发根根尖生理状态和长势基本一致,剪取 3 根 3~4 cm 长的根尖接种于 50 mL MS 液体培养基中,110 r/min,25 °C 摇床暗培养 28 d。

2.6 生物碱提取与 HPLC 检测

2.6.1 东莨菪碱 HPLC 检测条件 参照 Qiang 等^[14]的方法:岛津 LC-60A 高效液相色谱仪(泵:LC-6AD、柱温箱:CTO-10AS vp、控制器:SPD-20A),色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ 110A 液相色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),流动相为乙腈-乙酸铵缓冲液(20 mmol/L 乙酸铵,0.1%甲酸,pH=4.0)(11:89),体积流量 1 mL/min,柱温箱 40 °C,检测波长 226 nm,进样量 20 μ L。色谱图见图 1。

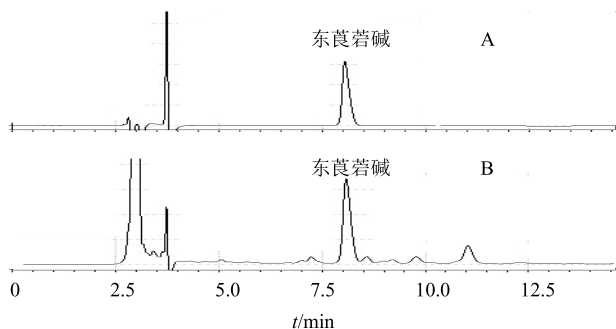


图 1 对照品 (A) 与供试品 (B) 溶液色谱图

Fig. 1 HPLC analysis of reference (A) and sample (B) of scopolamine

2.6.2 对照品溶液的制备 取对照品东莨菪碱适量,加甲醇配制成含 500 μ g/mL 东莨菪碱的对照品溶液。

2.6.3 供试品溶液的制备 发根洗净培养基,40 °C 烘干,研磨成粉,参照 Qiang 等^[14]提取托品烷生物碱用于东莨菪碱含量检测。200 mg 干粉加入 20 mL 甲醇超声振荡 40 min;滤过,用 10 mL 甲醇冲洗滤渣,一并回收;挥干甲醇,残留物溶于 10 mL 200 mmol/L 的 NH_4Cl (pH=9.8);过硅藻土 Extrelut-20[®] (Merck) 柱(20 cm $\times$ 1 cm);用 30 mL 氯仿饱和氨水洗柱;洗脱液 40 °C 烘干,残留物溶于 2 mL 生物碱存储缓冲液(17%乙腈,溶于 50 mmol/L KH_2PO_4 ,用磷酸调 pH 至 3.0);0.45 μ m Millipor 滤膜滤过。

2.6.4 标准曲线绘制 称取东莨菪碱对照品溶液配制成 500、250、100、50、25、10 μ g/mL 的梯度溶液。按“2.6.1”项条件测定并绘制标准曲线,线性回归方程为 $Y=4\,252.4X-750.04$, $R^2=0.999\,6$ 。

2.6.5 方法学考察 根据 Qiang 等^[14]方法,实验精密密度、稳定性、重复性试验结果均良好。

3 结果与分析

3.1 AbCYP80F1 基因的克隆与序列分析

用莨菪的 HnCYP80F1 蛋白序列在药用植物基因组学资源网站中的颠茄转录组数据库中进行 blastn 检索,筛选到 3 条序列相似性大于 89% 的 unigenes,分别对应于 HnCYP80F1 的上、中、下游 3 个区域,均被注释为 littorine mutase/monooxygenase,且在须根中表达丰度最高,地上部分没有表达,与其他 TAs 合成途径基因的表达模式一致(表 2)。分别在 aba_locus_125005 和 aba_locus_57443 上设计上游和下游引物,以颠茄根 cDNA 为模板,扩增出一条 1 376 bp 的片段,在此基础上用 RACE 技术分别获得了 176 bp 的 5'端片段和 297 bp 的 3'端片段,经拼接和高保真酶扩增验证后得到一条全长为 1 675 bp 的 cDNA 序列,该序列包含一段 1 527 bp 的编码框,预测编码 508 个氨基酸,另含有 37 bp 的 5'UTR 和 96 bp 的 3'UTR。将该基因命名为 AbCYP80F1,NCBI 登录号为 KF267456。

3.2 AbCYP80F1 基因编码蛋白的生物信息学分析

AbCYP80F1 蛋白预测由 508 个氨基酸组成,相对分子质量为 57 999,理论等电点 (pI) 为 7.69。blastp 分析表明 AbCYP80F1 与铃铛子 *A. luridus* Link et Otto 的 CYP80F1 (AGL76993) 序列一致性最高,达到 96.52%,其次为 *H. niger* L. 的 CYP80F1

表 2 3 条假定的 AbCYP80F1 基因 unigene 转录组数字表达丰度
Table 2 FPKM values of unigenes corresponding to AbCYP80F1 gene

序列 ID	注释	表达丰度						
		主根	须根	茎	叶	花	幼果	成熟果
aba_locus_125005_iso_1_len_396_ver_2	Littorine mutase/monooxygenase	1.52	8.42	0	0	0	0	0
aba_locus_61000_iso_1_len_287_ver_2	Littorine mutase/monooxygenase	1.92	7.95	0	0	0	0	0
aba_locus_57443_iso_1_len_489_ver_2	Littorine mutase/monooxygenase	1.09	7.31	0	0	0	0	0

(91.76%, ABD39696), 与软木树 (AQU12715) 的 CYP80F1 也有 86.31% 的一致性。氨基酸多重序列比对表明 AbCYP80F1 与其他物种的同源蛋白和近缘的 CYP 蛋白成员一样, 具有细胞色素 P450 蛋白特征性的 3 个结构区域: 螺旋 K 区、芳族区和血红素结合区 (图 2)。结构域预测发现 AbCYP80F1 的 40~483 位氨基酸残基区域属于典型的细胞色素 P450 蛋白 (Cyt-P450, IPR001128), 而 N 端 9~31 位氨基酸经 TMHMM 2.0 预测为一个跨膜螺旋结构, SignalP 5.0 Server 预测 AbCYP80F1 不具有信号肽, PSORT 预测其在内质网中的定位系数最高, 可能是一个内质网膜结合蛋白。

利用系统进化树对 AbCYP80F1 与其他物种 CYP450 蛋白的亲缘关系进行分析, 见图 3。CYP80F1 属于细胞色素 P450 家族中的 CYP71 族, 选取该族的其他亚家族成员, 用 MEGA 5.0 软件中的 Neighbor-joining 方法构建系统进化树。AbCYP80F1 与茄科其他 3 个 TAs 资源植物的 CYP80F1s 共聚为一支 group I, 该分支成员均为东莨菪碱合成途径的 P450 酶, 其中 AbCYP80F1 与铃铛子的 CYP80F1 的亲缘关系最近; 另 2 个非东莨菪碱合成途径的 CYP80B 亚家族成员组成了另外一支 group II; 来源于 CYP75 和 CYP76 亚家族的其他成员则组成了亲缘关系稍远的第 3 个分支 group III。

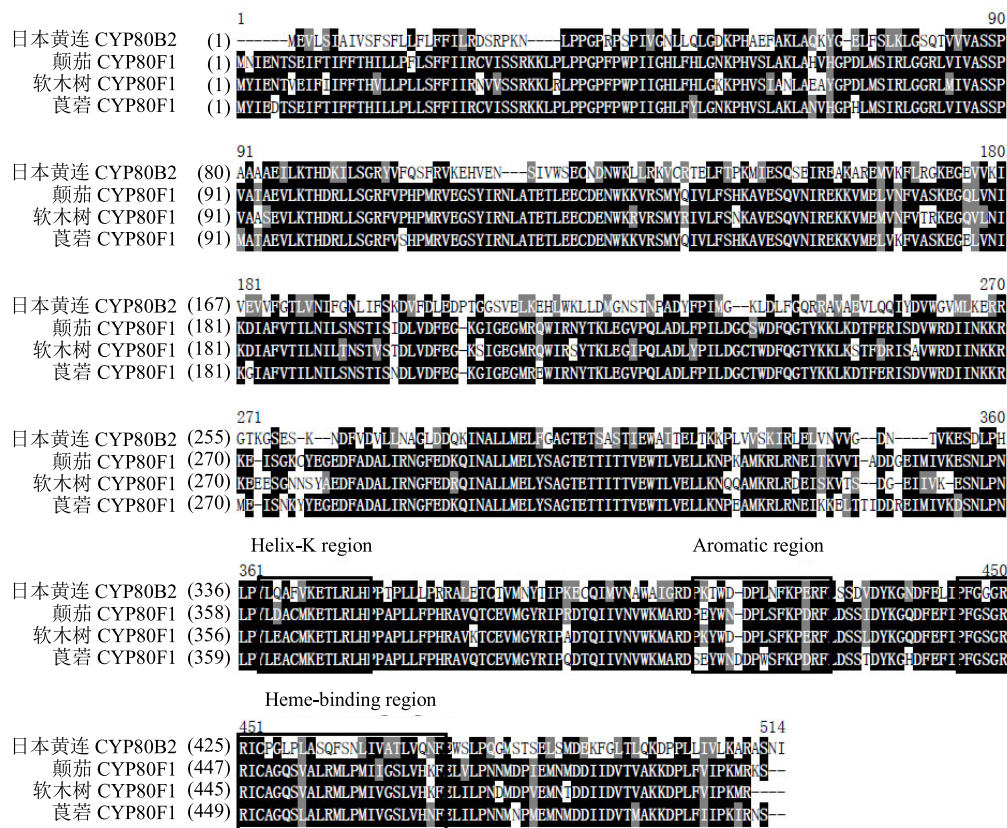


图 2 AbCYP80F1 与其他物种 CYP 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of AbCYP80F1 with other CYP protein sequences

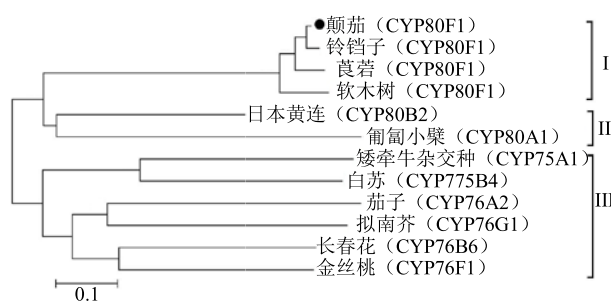


图3 AbCYP80F1 的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of AbCYP80F1 and related CYP proteins

3.3 AbCYP80F 基因启动子克隆与分析

采用热不对称 PCR (TAIL-PCR) 技术对 AbCYP80F1 基因进行 5'端染色体步移 (Genome Walking), 扩增 AbCYP80F1 基因启动子序列。3 轮 TAIL-PCR 分别获得了 559、421、2 544 bp 的侧翼片段, 经拼接后得到了一条 3 059 bp 的启动子序列, 选取转录起始位点上游 2 000 bp 进行顺式作用元件分析, 结果见图 4 和表 3。AbCYP80F1 基因启动子上游包含保守的 TATA-box (-35 区) 和 CAAT-box (-155 区), 除了这 2 个真核生物基因转录最基本的元件以外, 还包括一些信号响应元件和转录因子识别结合元件。涉及的信号包括光 (2 个 AE-box、3 个 Box 4、2 个 G-box、1 个 GT1-motif 和 1 个

TCT-motif)、无氧 (1 个 ARE)、生长素 (1 个 AuxRR-core)、茉莉酸 (1 个 CGTCA-motif)、赤霉素 (1 个 GARE-motif) 和低温 (3 个 LTR)。相关的顺式作用元件对应的转录因子有 MYB (1 个 MBS 和 1 个 Myb-binding site)、AP2/ERF (4 个 RAV1AAT)、WRKY (3 个 W-box), 尤其值得注意的是有 11 个 bHLH 转录因子识别的 E-box 元件。此外, 还有 1 个分生组织表达相关的 CAT-box 和 1 个光敏色素下调表达相关的 Unnamed-1 元件。

3.4 超表达 AbCYP80F1 颠茄发根中的东莨菪碱含量分析

为了评价 AbCYP80F1 基因在颠茄东莨菪碱生物合成中的作用, 本研究将该基因在颠茄发根中进行了超表达, 选取了 5 个空载体转化发根对照和 10 个超表达发根系进行东莨菪碱含量比较, 结果见图 5。AbCYP80F1 基因超表达发根中东莨菪碱质量分数为 0.41~1.57 mg/g, 是对照的 1.6~5.9 倍。在平均水平上, 对照发根质量分数为 0.27 mg/g, 转基因发根为 0.75 mg/g, 平均提高了 1.8 倍。

4 讨论

东莨菪碱的高效合成是植物次生代谢的研究热点, 也是药源植物颠茄种质创新的目标, 利用植物代谢工程遗传改造合成途径基因是促进这一目标的基本手段。CYP80F1 (海螺碱变位酶/单加氧酶) 属

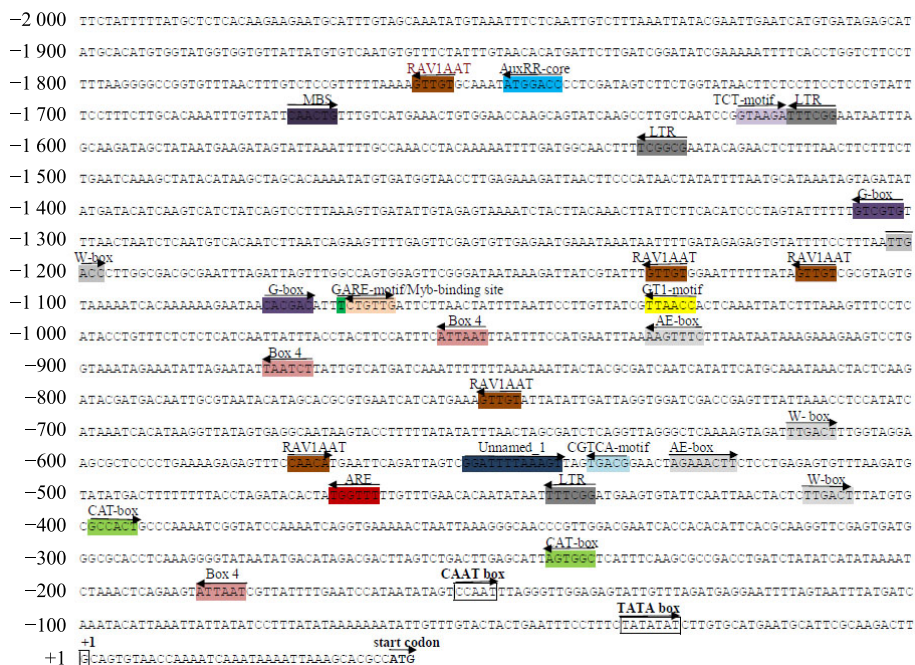


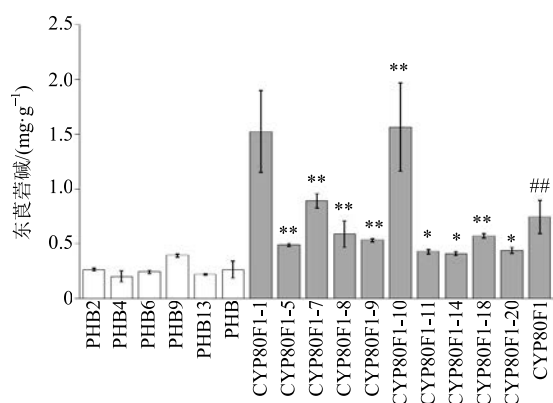
图4 AbCYP80F1 基因启动子中顺式作用元件

Fig. 4 Cis-acting elements contained in AbCYP80F1 promoter

表 3 AbCYP80F1 基因启动子中顺式作用元件

Table 3 *Cis*-acting elements contained in AbCYP80F1 promoter

元件名称	位置 (正链/反链)	序列	数量	功能
AE-box	-529 (+), -925 (-)	AGAAACTT	2	光响应模块的部分组件
ARE	-465 (-)	AAACCA	1	无氧诱导必需的顺式调控元件
AuxRR-core	-1 743 (-)	GGTCCAT	1	生长素响应有关的元件
Box 4	-181 (-), -952 (-), -1290 (-)	ATTAAT	3	光响应有关的一个保守 DNA 模块
CAT-box	-239 (-), -399 (+)	GCCACT	2	分生组织表达相关的顺式调控元件
CGTCA-motif	-525 (-)	CGTCA	1	茉莉酸响应有关的顺式调控元件
E-box	-371 (±), -791 (±), -1 675 (±), -1 814 (±), -1 847 (±), -1 985 (±), -1 897 (±), -1 903 (±), -1 915 (±), -1 944 (±), -1 970 (±)	CANNTG	11	bHLH 转录因子结合位点
G-box	-1 078 (+), -1 302 (-)	CACGAC	2	光响应元件
GARE-motif	-1 069 (+)	TCTGTTG	1	赤霉素反应元件
GT1-motif	-1 027 (-)	GGTTAA	1	光反应元件
LTR	-439 (-), -1 528 (-), -1 610 (-)	CCGAAA	3	低温响应有关的顺式作用元件
MBS	-1 675 (+)	CAACTG	1	干旱可诱导的 MYB 结合位点
Myb-binding site	-1 063 (-)	CAACAG	1	—
RAV1AAT	-575 (+), -1 063 (-), -1 129 (-), -1 248 (-)	CAACA	4	AP2-like 结构域识别位点
TCT-motif	-1 616 (-)	TCTTAC	1	光响应的一个元件
Unnamed_1	-554 (+)	GGATTTTAAAGT	1	光敏色素下调表达相关的顺式作用元件
W-box	-413 (+), -615 (+), -1 203 (+)	TTGACC TTGACT	3	WRKY 转录因子结合位点



PHB 系列代表空 pHB 载体转化的发根, CYP80F1 系列代表 AbCYP80F1 超表达的发根。PHB 和 CYP80F1 代表相应各系列发根的含量平均值
PHB series: hairy root culture with blank vector pHB. CYP80F1 series: AbCYP80F1-overexpressing hairy root lines. pHB and CYP80F1 represent the mean contents of corresponding hairy root lines

图 5 转 AbCYP80F1 基因颠茄发根中东莨菪碱含量

Fig. 5 Scopolamine content in hairy root cultures of *A. belladonna* overexpressing AbCYP80F1 gene

于细胞色素 P450 家族成员, 2006 年首次在莨菪根 EST 库中被鉴定出参与了东莨菪碱合成的倒数第三步反应。随后, 依次在铃铛子^[6]和软木树^[7]中鉴定到了同源基因。本研究以莨菪 HnCYP80F1 为探针,

在颠茄转录组数据库中 tblastn 得到了颠茄的 3 条同源 unigene 序列, 这 3 条序列都具有根特异性, 而且在须根中表达量远高于主根, 与颠茄中东莨菪碱合成部位和其他合成途径基因 (PMT 和 H6H) 表达模式相吻合^[6], 表明它们很可能是颠茄的 AbCYP80F1 基因。后经 RACE 技术得到了颠茄 AbCYP80F1 基因的全长, 也证明这 3 条 unigene 正是 AbCYP80F1 基因的上中下游 3 个片段。AbCYP80F1 蛋白与铃铛子的 CYP80F1 亲缘关系最近, 莨菪其次, 序列一致性分别达到了 96.52% 和 91.76%, 表明 CYP80F1 在东莨菪碱资源植物中是非常保守的途径基因, 暗示着具有相同的功能。

根一般认为是托品烷生物碱合成的主要部位, 尤其在常见的草本资源植物中, 如莨菪、曼陀罗和颠茄, 相关的合成途径基因 (PMT、TRI、CYP80F1 和 H6H) 都具有严格的须根特异性^[15]。即使近年来在几种新的 TAs 资源植物中 (南非醉茄 *Withania somnifera* Dunal、木本曼陀罗 *Datura arborea* L.) 和软木树等) 发现 PMT、TRI 和 H6H 基因在茎叶中也有表达, 且根不一定是表达量最高的部位^[7,14,16], 但是已克隆的 CYP80F1 基因均保持着根部绝对优势的表达, 如软木树中 DmPMT、DmTRI 和 DmH6H

基因在根茎叶中都有表达,且 DmH6H 基因在叶中丰度最高,但 DmCYP80F1 基因的表达仍主要限定在根部,其表达水平是叶的 40 多倍^[7]。本实验室在之前的研究中,已验证 AbCYP80F1 是须根特异性表达基因,与转录组数据一致,颠茄中东莨菪碱只在根中合成^[5]。

植物中 CYP450 家族蛋白一般都是膜锚定蛋白,大部分定位于内质网,或定位于线粒体和质体等细胞器^[17]。如水稻 CYP81A6 在水稻原生质体中定位于内质网^[18],参与对 2 种除草剂苯达松和甲磺隆的解毒,使水稻对除草剂产生抗性。AbCYP80F1 经预测在其 N 端存在一个跨膜结构域,预测为内质网膜结合蛋白的可能性最高,符合大多数 CYP450 蛋白的亚细胞定位,暗示莨菪醛的生成可能在内质网表面。目前,东莨菪碱合成的亚细胞场所一般认为是细胞质^[8],内质网上合成的莨菪醛可能进一步在胞质中被还原和环氧化生成东莨菪碱。

为了研究 AbCYP80F1 基因的转录调控情况,本研究克隆了该基因转录起始位点上游大于 3 000 bp 的启动子序列。启动子的长度一般没有具有的定义,按常规选取上游 2 000 bp 进行转录调控元件分析。转录元件的鉴定可以为探明基因可能受到的物理和化学调控信号提供有价值的线索。AbCYP80F1 启动子上含量最丰富的是光响应元件,各类元件共 10 个,其中一个涉及到光敏色素下调表达。AbCYP80F1 是根特异表达的蛋白,在根中参与东莨菪碱的合成,光照可能会抑制该基因的表达。CYP450 蛋白是需氧氧化酶,缺氧可能会诱导其表达,对应 AbCYP80F1 启动子上有一个无氧诱导元件。生长素一般抑制生物碱的合成,而且植物的生物量往往和生物碱的含量成反比^[19],AbCYP80F1 基因启动子包含一个生长素响应元件,可能也受到生长素的负调控。茉莉酸响应元件形式较多样,一个元件一般不足以保证启动子对茉莉酸产生响应^[20-21],颠茄中已证实托品烷生物碱合成不受甲基茉莉酸的调控^[22]。AbCYP80F1 启动子还包含一个赤霉素响应元件和低温响应元件,暗示可能受到的相关的信号调控。转录因子识别和结合元件能更直接的表明基因可能受哪些转录因子调控。MYB、AP2/ERF、WRKY 和 bHLH 是植物中常见的调控次生代谢的转录因子家族,AbCYP80F1 启动子中均包含有它们相应的顺式作用元件,可为筛选调控东莨菪碱合成的转录因子提供依据。尤其值得注意的是,

AbCYP80F1 启动子上有 11 个 E-box 元件,这是植物中第二大类转录因子 bHLH 的结合位点,暗示 bHLH 很可能参与了调控 AbCYP80F1 基因的表达。

为了评价 AbCYP80F1 基因表达水平对颠茄东莨菪碱生物合成的影响,本研究获得了该基因超表达的发根。发根中东莨菪碱含量显著高于对照,最优克隆中含量达到了对照的 5.9 倍,平均提高了 1.8 倍,表明颠茄中 AbCYP80F1 是影响东莨菪碱合成的关键基因。不同物种中,相同的生物合成途径可能有不同的调控方式,如东莨菪碱上游合成途径基因 PMT 在白花曼陀罗和钝莨菪中过量可以促进下游托品烷生物碱合成^[23],而在颠茄中超表达却没有显著效果^[24]。CYP80F1 基因在莨菪中不是限制步骤,超表达不影响生物碱的积累^[3],在本研究中却能促进东莨菪碱的积累,表明 CYP80F1 基因在 2 种植物中有不同的调控方式。最近的报道,Kohnen 等^[7]研究了 6 周、3 月和 6 月大的软木树中生物碱积累与合成途径基因的表达情况,发现根中 CYP80F1 表达水平随树龄的增长稳步提高,与托品烷生物碱含量增长水平一致,说明两者有正相关关系。另外,莨菪中最新研究表明,CYP80F1 活性的提高也可促进下游托品烷生物碱的积累。CYP80F1 和 H6H 都是需氧氧化酶,超表达透明颤菌血红蛋白可以促进氧气的高效利用,进而提高 CYP80F1 和 H6H 的酶活性,最终提高 TAs 的含量^[8]。

本研究从颠茄中克隆到了全长的功能性 AbCYP80F1 基因,并用转基因方法证明其是东莨菪碱合成的关键基因,对阐明颠茄中托品烷生物碱合成的代谢调控有重要意义。另外,AbCYP80F1 启动子的分析表明 WRKY 和 bHLH 转录因子很可能参与调控该基因的表达,为筛选相应的转录因子奠定了基础。

参考文献

- [1] Qiu F, Yang C, Yuan L, *et al.* A phenylpyruvic acid reductase is required for biosynthesis of tropane alkaloids [J]. *Org Let*, 2018, 20(24): 7807-7810.
- [2] Qiu F, Zeng J, Wang J, *et al.* Functional genomics analysis reveals two novel genes required for littorine biosynthesis [J]. *New Phytol*, 2019, doi: 10.1111/nph. 16317.
- [3] Li R, Reed D W, Liu E, *et al.* Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome P450 involved in littorine rearrangement [J]. *Chem Biol (Camb)*, 2006, 13(5): 513-520.

- [4] 王中平, 秦白富, 强 玮, 等. 颠茄精氨酸脱羧酶基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2734-2740.
- [5] 强 玮, 王亚雄, 张 巧, 等. 颠茄托品烷生物碱合成途径基因表达分析与生物碱积累研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 52-58.
- [6] Qin B, Ma L, Wang Y, *et al.* Effects of acetylsalicylic acid and UV-B on gene expression and tropane alkaloid biosynthesis in hairy root cultures of *Anisodus luridus* [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2014, 117(3): 483-490.
- [7] Kohnen K L, Sezgin S, Spiteller M, *et al.* Localization and organization of scopolamine biosynthesis in *Duboisia myoporoides* R. Br [J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 59(1): 107-118.
- [8] Guo Z, Tan H, Lv Z, *et al.* Targeted expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* hairy roots [J]. *Sci Rep-UK*, 2018, 8(1): 17969.
- [9] Yu Z X, Li J X, Yang C Q, *et al.* The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 353-365.
- [10] Kato N, Dubouzet E, Kokabu Y, *et al.* Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(1): 8.
- [11] Ma D M, Pu G B, Lei C Y, *et al.* Isolation and characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4, 11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(12): 2146-2161.
- [12] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, *et al.* The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(4): 2081-2093.
- [13] Liu Y G, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. *Biotechniques*, 2007, 43(5): 649-656.
- [14] Qiang W, Xia K, Zhang Q, *et al.* Functional characterisation of a tropane-forming reductase gene from *Brugmansia arborea*, a woody plant species producing tropane alkaloids [J]. *Phytochemistry*, 2016, 127: 12-22.
- [15] 强 玮, 夏 科, 赵许朋, 等. 木本曼陀罗中一条新 TRI 基因克隆与酶活功能鉴定 [J]. 药学报, 2019, 54(3): 196-203.
- [16] Kushwaha A K, Sangwan N S, Trivedi P K, *et al.* Tropane forming tropinone reductase gene from *Withania somnifera* (Ashwagandha): Biochemical characteristics of the recombinant enzyme and novel physiological overtones of tissue-wide gene expression patterns [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74777.
- [17] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: A success story [J]. *Genome Biol*, 2001, 1(6): 1-9.
- [18] Lu H P, Hai P. Expression of cytochrome P450 CYP81A6 in rice: Tissue specificity, protein subcellular localization, and response to herbicide application [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(2): 113-122.
- [19] Xiao Y, Zhang L, Gao S, *et al.* The c4h, tat, hppr and hppd genes prompted engineering of rosmarinic acid biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29713.
- [20] van der Fits L, Memelink J. The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element [J]. *Plant J*, 2001, 25(1): 43-53.
- [21] Vom Endt D, Soares e S M, Kijne J W, *et al.* Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-Hook DNA-binding proteins [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(3): 1680-1689.
- [22] Suzuki K I, Yamada Y, Hashimoto T. Expression of *Atropa belladonna* putrescine N-methyltransferase gene in root pericycle [J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40(3): 289-297.
- [23] Moyano E, Jouhikainen K, Tammela, Päivi, *et al.* Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus* [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(381): 203-211.
- [24] Rothe G, Hachiya A, Yamada Y, *et al.* Alkaloids in plants and root cultures of *Atropa belladonna* overexpressing putrescine N-methyltransferase [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(390): 2065-2070.