

地黄毛蕊花糖苷合酶基因的克隆、亚细胞定位与表达特性分析

李欣容¹, 智惊宇¹, 杨超飞¹, 李铭铭¹, 左鑫¹, 谢彩侠², 王丰青^{1*}

1. 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002

2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 克隆地黄 *Rehmannia glutinosa* 毛蕊花糖苷合酶基因 (RgAcS1), 分析其亚细胞定位和表达模式。方法 在地黄的转录组数据库中通过注释和比对, 获得地黄 RgAcS1 的 cDNA 序列, 利用聚合酶链式反应 (PCR) 方法进行分子克隆。构建绿色荧光蛋白 (GFP) 融合表达载体, 以农杆菌瞬时表达法观测 RgAcS1 的亚细胞定位。利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 RgAcS1 基因在地黄块根不同部位的表达模式。结果 获得地黄 1 个莽草酸-*O*-羟基肉桂酰基转移酶的全长编码序列, cDNA 长度为 1 659 bp, 包含 1 个 1 296 bp 的开放阅读框, 编码 431 个氨基酸残基, 蛋白质相对分子质量为 475 900, 具有莽草酸-*O*-羟基肉桂酰基转移酶的典型结构域, 命名为 RgAcS1。亚细胞定位结果显示 RgAcS1 主要分布在细胞质中, 在细胞核中也有分布。qRT-PCR 分析表明, RgAcS1 在地黄的周皮和根毛中表达量较高, 在木质部和韧皮部表达量较低。RgAcS1 基因在地黄品种北京 1 号、QH1 和 85-5 中非菊花心中表达量均高于菊花心中的表达量, 且差异达极显著水平。结论 获得地黄 RgAcS1 的 cDNA 序列, 明确了 RgAcS1 的亚细胞定位和时空表达模式, 为进一步研究 RgAcS1 基因在毛蕊花糖苷合成过程中的作用奠定基础。

关键词: 地黄; 毛蕊花糖苷合酶; 序列分析; 亚细胞定位; qRT-PCR

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4739-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.018

Cloning, subcellular location and expression analysis of an acteoside synthase gene from *Rehmannia glutinosa*

LI Xin-rong¹, ZHI Jing-yu¹, YANG Chao-fei¹, LI Ming-ming¹, ZUO Xin¹, XIE Cai-xia², WANG Feng-qing¹

1. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2. School of medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To clone the acteoside synthase gene (RgAcS1) from *Rehmannia glutinosa*, and analyze its subcellular localization and expression pattern. **Methods** The cDNA sequence of RgAcS1 was identified based on the annotation of the transcriptome data of *R. glutinosa*, and the RgAcS1 gene was cloned by polymerase chain reaction (PCR). Constructing the GFP fusion expression vector and observing the subcellular localization of RgAcS1 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The expression pattern of RgAcS1 in different parts of tuberous root of *R. glutinosa* was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** A full-length coding sequence of a shikimate-*O*-hydroxy cinnamoyl transferase from *R. glutinosa* was obtained and named RgAcS1. The length of the RgAcS1 cDNA was 1659 bp, including an open reading frame (ORF) of 1 296 bp, encoding 431 amino acid residues, the molecular weight of the protein was 475 900, and it has a typical domain of shikimic acid-*O*-hydroxy cinnamoyl transferase. The result of subcellular localization showed that RgAcS1 was mainly distributed in cytoplasm and also in nucleus. The qRT-PCR analysis showed that the expression levels of RgAcS1 were higher in the periderm and root hair of *R. glutinosa* tuberous root, but lower in the xylem and phloem. The expression levels of RgAcS1 were higher in non-radial striation than that in radial striation of BJ1, QH1 and 85-5. **Conclusion** In this study, we obtained the cDNA sequence of RgAcS1, and analyzed the subcellular location and expression patterns of RgAcS1, which will lay foundations for further study on roles of RgAcS1 gene in the synthesis of acteoside in *R. glutinosa*.

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch.; acteoside synthase; sequence analysis; subcellular localization; qRT-PCR

收稿日期: 2020-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872950); 国家自然科学基金资助项目 (81473299); 国家重点研发计划项目 (2017YFC1700705)

作者简介: 李欣容, 硕士研究生, 主要从事分子生药学研究。E-mail: 18838916933@163.com

*通信作者 王丰青, 博士, 副教授, 从事药用植物可持续利用与分子生药学研究。E-mail: fqwang@henau.edu.cn

地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 是河南省著名的“四大怀药”之一^[1], 其药用历史悠久, 药效明确, 是常用的大宗药材, 在中药处方中使用频率排在前 10 位^[2]。地黄含有丰富的苯乙醇苷、环烯醚萜苷、紫罗兰酮、酚酸、糖等多种化学成分, 对心脑血管系统、免疫系统、中枢系统、脏腑系统具有显著的药理作用^[3]。毛蕊花糖苷是地黄中含量较高的苯乙醇苷类成分, 也是《中国药典》2015 年版规定的 2 个指标性成分之一, 具有免疫调节、肾脏保护、抗氧化、抗高血压等多种生物学活性^[4], 在列当科、玄参科、胡麻科、马鞭草科、车前科等多种植物中均含有毛蕊花糖苷^[5]。地黄毛蕊花糖苷的含量易受产地、品种^[6]、采收时期^[7]等因素的影响。课题组前期的研究发现, 毛蕊花糖苷在地黄叶片中含量远高于块根, 而且不同年份地黄生长期叶片和块根毛蕊花糖苷含量波动也非常大^[7], 造成地黄质量稳定性差, 制约了地黄产业的发展。因此, 解析毛蕊花糖苷在地黄体内的生物合成分子调控机制将有助于地黄药材品质的安全、稳定、有效、可控。

在前人关于植物毛蕊花糖苷合成途径的研究基础上, 课题组进一步推导出毛蕊花糖苷是由咖啡酰基辅酶 A 和羟基酪醇苷在莽草酸-*O*-羟基肉桂酰基转移酶 (shikimate *O*-hydroxy cinnamoyl transferase, HCT) 和 UDP-糖基转移酶 (UGT) 作用下经缩合、糖苷化修饰而来^[8]。HCT 属于酰基辅酶 A 依赖的 BAHD 超家族, 已经鉴定出来一些 BAHD 的家族成员在药用植物次生代谢产物的形成中发挥重要的作用, 如长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. 生物碱长春花碱^[9]、罂粟 *Papaver somniferum* L. 生物碱吗啡^[10]、花青素^[11]、迷迭香酸^[12]等。本研究从地黄毛状根中鉴定出一个响应水杨酸诱导的 HCT 基因, 推测其可能参与毛蕊花糖苷的生物合成, 并将其重新命名为“RgAcS1”。本研究对鉴定出的与毛蕊花糖苷生物合成相关的关键酶基因 RgAcS1 进行系统的鉴定与分析, 为进一步揭示毛蕊花糖苷的分子合成机制提供参考。

1 材料与试剂

1.1 材料

怀地黄品种 85-5、北京 1 号和 QH1, 种植于温县武德镇河南农业大学中药材良种繁育基地, 经河南农业大学王丰青副教授鉴定为地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.。地黄出苗后 120 d 左右, 随机选取生长良好的 85-5 3 株, 分离其膨

大块根的周皮、韧皮部、木质部、根毛; 挑选生长良好的 85-5、北京 1 号和 QH1 植株, 每个品种随机选取 3 株, 分离其块根的菊花心和非菊花心部位, 于液氮中速冻保存。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 检测试剂盒、高保真 DNA 聚合酶、DNA Marker 等均购买于 TaKaRa 公司; 乙酰丁香酮和 MS 粉购于 Sigma-Aldrich 公司; pBWA(V)HS-RgAcS1-GLosgfp 融合表达载体由武汉伯远生物构建; 农杆菌 LBA4404 感受态细胞购于上海维地生物; 琼脂糖和胶回收试剂盒、购于天根生化科技 (北京) 有限公司; 酵母提取物和胰蛋白胨购于 Thermo Fisher Scientific 公司。

2 方法

2.1 RNA 的提取和反转录

取液氮保存的地黄样品放入预冷的研钵中, 加液氮迅速研磨成粉, 每个样品取约 0.1 g, 用 TaKaRa 公司的 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 提取。反转录利用反转录试剂盒 6210A 型, 反应体系为总 RNA 1 μg , 1 μL PrimeScript II 反转录酶 (200 U/ μL), 1 μL oligo dT 引物 (50 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL dNTP, 0.5 μL RNase 抑制剂 (40 U/ μL), 加无 RNA 酶的去离子水补足体积为 20 μL 。反应的程序为 65 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 、60 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min。

2.2 基因克隆

根据已经发表的其它植物的 HCT 基因的序列特征, 对课题组已有的地黄转录组 Unigene 集进行基因功能注释, 获取注释为 HCT 基因的序列, 根据基因的表达模式, 筛选可能参与地黄毛蕊花糖苷合成的 HCT 基因, 命名为 RgAcS1。根据获得的地黄 RgAcS1 cDNA 序列设计特异引物 5'-ATGAA-GATCGACGTTAAGGACTC-3' 和 5'-TCAAATG-TCATAAAGCAACTTCTCG-3', 扩增包含完整编码区的 cDNA 片段, 并进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定 PCR 产物, 随后对 PCR 产物胶回收纯化后送测序公司测序, 确定基因的正确序列。

PCR 反应体系为 25 μL : 0.25 μL PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶 (2.5 U/ μL), 5 μL 5 $\times$ PrimeSTAR[®] 缓冲液 (Mg^{2+} plus), 2 μL dNTP 混合物, 0.5 μL 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 0.5 μL 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL 模板 cDNA, 添加 16.25 μL 的 ddH₂O。反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、

2 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 无穷。

2.3 亚细胞定位

根据 RgAcS1 基因的编码区序列设计特异引物进行 PCR 扩增, 利用酶切连接法构建 pBWA(V)HS-RgAcS1-GLosgfp 融合表达载体。将测序正确的质粒转入农杆菌 LBA4404 中, LB 液体培养基摇菌, 用添加乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 的 MS 液体培养基重悬菌体, 分别侵染本生烟草 *Nicotiana benthamiana* Domin 叶片和普通烟草 *Nicotiana tabacum* L. 原生质体, 48 h 后于 Olympus 激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白。

2.4 蛋白序列分析

用 NCBI 在线分析软件 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 进行开放阅读框预测分析, 蛋白质一级结构用在线软件 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行分析, 亚细胞定位用在线软件 ProtComp (<http://www.softberry.com>) 进行预测, 氨基酸多序列比对用在线软件 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 和序列编辑软件 GeneDoc 进行分析。用 MEGA 7.0 构建系统进化树。

2.5 基因表达量检测

取地黄块根不同部位样品, 用“2.1”项的方法提取总 RNA, 反转录后进行基因表达量检测。在 BIO-RAD IQ5 定量仪 (上海伯乐公司) 上进行 qRT-PCR, 采用宝生物的 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒。根据地黄 RgAcS1 基因的编码序列设计特异引物 5'-TGGGAGCTTATCGGTTGCTA-3' 和 5'-CAGGGGAAACAGGGTGAAAA-3' (扩增片段大小为 167 bp), 以 RgTIP41 为内参基因, 引物序列为 5'-TGGCTCAGAGTTGATGGAGTG-3' 和 5'-TCTCCAGCAGCTTCTCTCGGA-3' (扩增片段大小为 74 bp)。

PCR 扩增体系: 12.5 μL SYBR[®] Premix Ex 酶, 正、反向引物各 1 μL (10 μmol/L), cDNA 模板 2 μL, 去离子水 8.5 μL, 总体积为 25 μL。PCR 反应程序为 95 °C、30 s; 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 RgAcS1 基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 地黄 RgAcS1 基因的克隆

在课题组已有地黄转录组数据库中, 有 49 个转录本注释为莽草酸-*O*-羟基肉桂酰基转移酶基

因, 其中编号为 Unigene19512 的转录本在水杨酸处理后 3、9、12、24 h 的毛状根中表达量分别比未处理对照提高 2.7、3.5、2.6、1.6 倍^[8], 与水杨酸促进地黄毛蕊花糖苷的积累呈正相关。利用 ORF Finder 预测其具有完整的开放阅读框, 编码序列为 1 293 bp, 5'-非编码序列 (UTR) 和 3'-UTR 分别有 175 bp 和 188 bp, 推测其编码的蛋白质序列有 431 aa, 命名为 RgAcS1。根据编码区设计基因特异引物进行 PCR 扩增, 获得 1 条 1 296 bp 的条带 (图 1), 连接到克隆载体上测序, 结果与原序列完全一致。

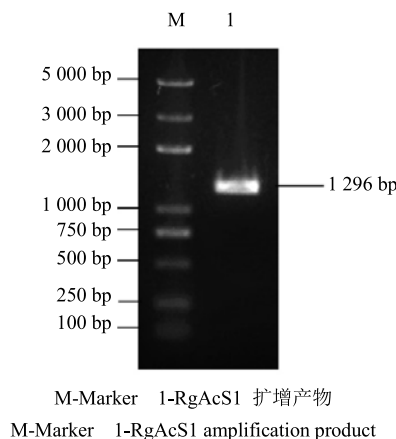


图 1 地黄 RgAcS1 基因的 PCR 扩增产物检测
Fig. 1 Detection of amplification product of RgAcS1 gene with *R. glutinosa* cDNA template by PCR

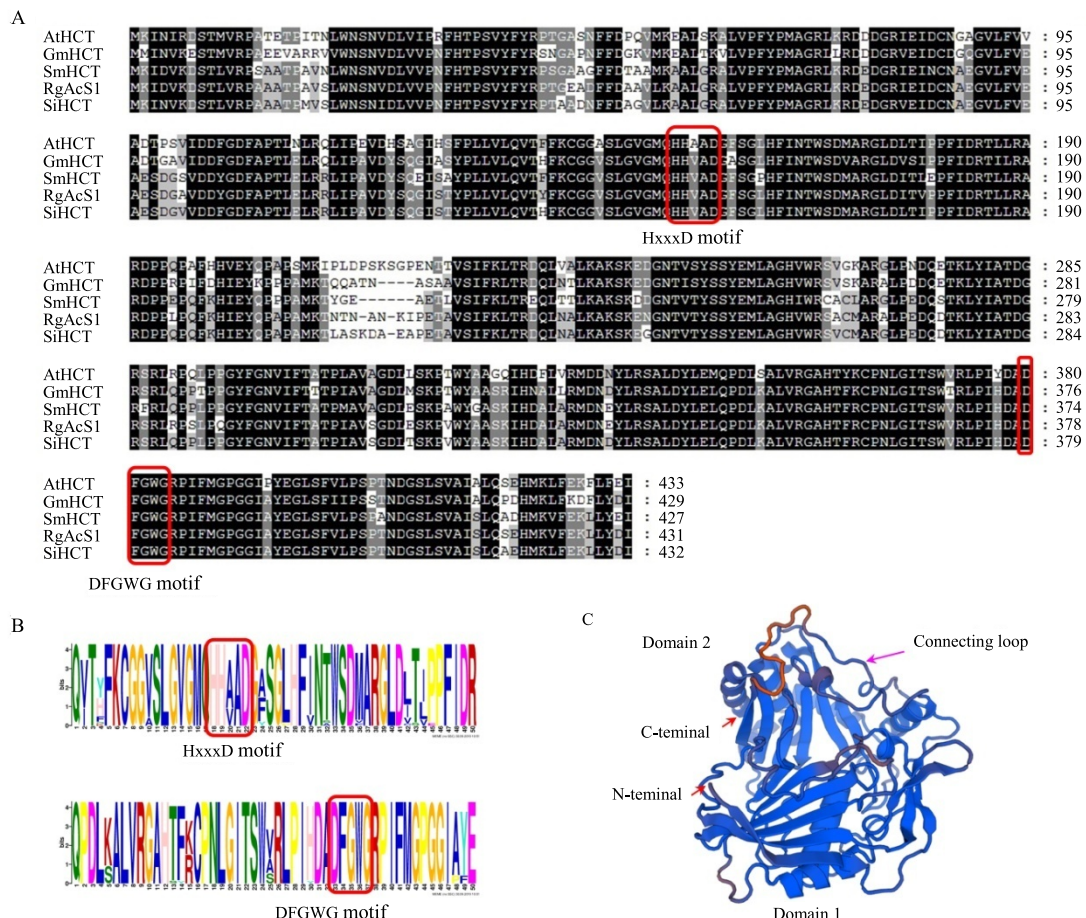
3.2 地黄 RgAcS1 基因的序列分析

用在线工具 ExPASy 分析地黄 RgAcS1 蛋白的理化性质, 结果发现 RgAcS1 的相对分子质量 (MW) 为 47 590, 理论等电点 (pI) 为 5.83。RgAcS1 蛋白带负电荷残基 (Asp+Glu) 为 49, 带正电荷残基 (Arg+Lys) 为 42, 不稳定指数为 38.23, 为稳定蛋白, GRAVY 为 -0.109, 为亲水性蛋白。以 RgAcS1 的氨基酸序列在 NCBI 上进行结构域搜索, 发现其包含一个 ω -羟基棕榈酸酯-*O*-阿魏酰转移酶 (ω -hydroxypalmitate-*O*-feruloyl transferase) 的结构域, 与来自芝麻 *Sesamum indicum* L. 的莽草酸邻羟基肉桂酰转移酶 (shikimate-*O*-hydroxycinnamoyl transferase) 序列一致性高达 92.36%。

为了分析地黄 RgAcS1 序列与其它已经报道的同源蛋白的序列相似性, 从 NCBI 下载了芝麻 SiHCT、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. AtHCT、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge SmHCT 和大豆 *Glycine max* (L.) Merr. GmHCT 的氨基酸序

列, 进行多序列联配, 结果 (图 2-A) 表明, 地黄 RgAcS1 与这些 HCT 蛋白的序列相似性很高, 序列一致性在 77.96%~92.36%, 特别是在植物 HCT 保守的 HxxxD 和 DFGWG 2 个 motif, 在不同的蛋白间高度保守。进而又下载了与 RgAcS1 序列相似性较高的其它 22 个物种的同源蛋白序列, 利用 MEME 在线软件 (<http://meme-suite.org/>) 对这 25 个蛋白的氨基酸序列进行保守的基序 (motif) 挖掘, 发现 (图 2-B) HxxxD 基序和 DFGWG

基序分别包含在 2 个不同的长 50 aa 的基序内, 而且序列高度一致, 说明 HxxxD 基序和 DFGWG 基序在这些蛋白发挥转移酶活性时非常重要。用在线软件 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 对 RgAcS1 的蛋白进行三维结构预测, 建模模板为彩叶草 *Coleus blumei* Benth. HCT^[13], 发现 (图 2-C) RgAcS1 由 18 个 β 折叠和 17 个 α 螺旋组成, 2 个大的 domain 由 1 个连接环 (Connecting loop) 连接。



A-RgAcS1 与其同源蛋白的多序列联配 B-RgAcS1 结构域的发掘 C-RgAcS1 的三维结构模型 At-拟南芥 Gm-大豆 Sm-丹参 Si-芝麻 Rg-地黄
A-alignment of RgAcS1 amino acid sequence of *R. glutinosa* and other plants B-screening the domain of RgAcS1 C-ribbon Model of RgAcS1 crystal
structure At-*Arabidopsis thaliana* L. Gm-*Glycine max* (L.) Merr. Sm-*Salvia miltiorrhiza* Bunge Si-*Sesamum indicum* L. Rg-*Rehmannia
glutinosa* Libosch.

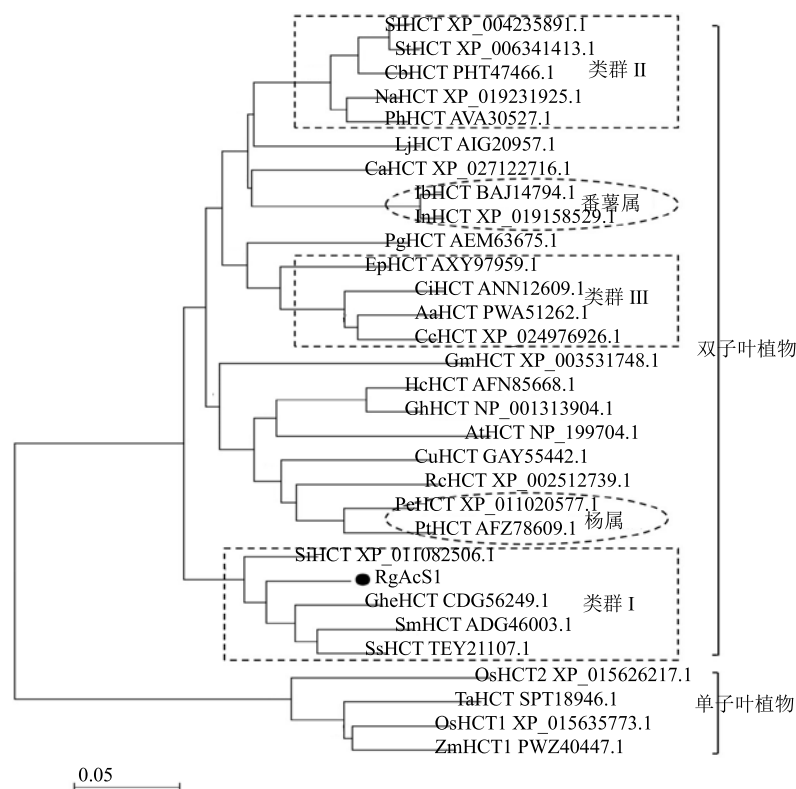
图 2 RgAcS1 的序列特征

Fig. 2 Sequence characteristics of RgAcS1

3.3 地黄 RgAcS1 氨基酸序列的系统进化分析

为了分析地黄 RgAcS1 与其他植物同源蛋白的亲缘关系, 又下载了水稻 *Oryza sativa* L.、玉米 *Zea mays* L. 和小麦 *Triticum aestivum* L. 的 HCT 序列, 对 31 条氨基酸序列进行进化分析, 构建系统进化树, 结果 (图 3) 表明, 31 个蛋白明显分为 2 个类

群, 水稻、玉米和小麦 3 个物种均为单子叶植物, 它们的 4 个 HCT 蛋白聚在一起, 其余 27 个蛋白均来源于双子叶植物, 聚为一个大的类群。地黄 RgAcS1 与来源于胡麻科芝麻 SiHCT 和来源于 3 个唇形科植物红鼠尾草 *Salvia splendens* Sellow ex Wied-Neuw.、欧活血丹 *Glechoma hederacea* L. 和丹



At-拟南芥 Gm-大豆 Sm-丹参 Si-芝麻 Rg-地黄 Hc-大麻槿 Gh-陆地棉 Cu-温州蜜柑 Rc-蓖麻 Pe-胡杨 Pt-毛白杨 Ss-红鼠尾草 Ghe-欧活血丹 Pg-桔梗 Ep-紫锥菊 Ci-菊苣 Aa-黄花蒿 Cc-刺苞菜蓟 Lj-金银花 Ib-甘薯 In-裂叶牵牛 Ca-小粒咖啡 SI-番茄 St-马铃薯 Cb-辣椒 Na-野生烟草 Ph-矮牵牛 Os-水稻 Zm-玉米 Ta-小麦
At-*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Gm-*Glycine max* (L.) Merr. Sm-*Salvia miltiorrhiza* Bunge Si-*Sesamum indicum* L. Rg-*Rehmannia glutinosa* Libosch. Hc-*Hibiscus cannabinus* L. Gh-*Gossypium hirsutum* L. Cu-*Citrus unshiu* Marc. Rc-*Ricinus communis* L. Pe-*Populus euphratica* Oliv. Pt-*Populus tomentosa* Carr. Ss-*Salvia splendens* Sellow ex Wied-Neuw. Ghe-*Glechoma hederacea* L. Pg-*Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. Ep-*Echinacea purpurea* (Linn.) Moench Ci-*Cichorium intybus* L. Aa-*Artemisia annua* L. Cc-*Cynara cardunculus* L. Lj-*Lonicera japonica* Thunb. Ib-*Ipomoea batatas* (L.) Lam. In-*Ipomoea nil* (L.) Choisy Ca-*Coffea arabica* L. SI-*Solanum lycopersicum* L. St-*Solanum tuberosum* L. Cb-*Capsicum baccatum* L. Na-*Nicotiana attenuata* (Graham) Hook. Ph-*Petunia hybrid* (J. D. Hooker) Vilmorin Os-*Oryza sativa* L. Zm-*Zea mays* L. Ta-*Triticum aestivum* L.

图 3 RgAcS1 的分子进化系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of RgAcS1 and its homologous proteins from other plants

参的 HCT 蛋白聚在一起，同属唇形目，序列一致性高，序列相似性分别为 92.36%、89.1%、89.63%、88.86%，为类群 I。其他 HCT 蛋白的亲缘关系也与植物的亲缘关系具有较强的相关性，如来源于茄科的番茄 *Solanum lycopersicum* L.、马铃薯 *S. tuberosum* L.、辣椒 *Capsicum baccatum* L.、野生烟草 *N. attenuata* (Graham) Hook. 和矮牵牛 *Petunia hybrida* (J. D. Hooker) Vilmorin 的 HCT 蛋白同属于类群 II，来源于菊科的紫锥菊 *Echinacea purpurea* (Linn.) Moench、菊苣 *Cichorium intybus* L.、黄花蒿 *Artemisia annua* L. 和刺苞菜蓟 *Cynara cardunculus* L. HCT 蛋白属于类群 III，来源于番薯属的番薯 *Ipomoea batatas* (L.) Lam. 和裂叶牵牛 *I. nil* (L.) Choisy 与来源于杨属的毛白杨 *Populus tomentosa* Carr. 和胡杨 *P. euphratica* Oliv. 的

HCT 同源蛋白分别聚在一起。

3.4 RgAcS1 亚细胞定位分析

为了分析 RgAcS1 蛋白的亚细胞定位，先利用在线软件 WoLF PSORT II(<https://www.genscript.com/wolf-psort.html?src=leftbar>) 进行亚细胞定位预测，结果预测 RgAcS1 为细胞质蛋白。同时进行实验验证，将 RgAcS1 融合在 GFP 的 N 端，构建 pBWA(V)HS-AcS1-GLogsfp 融合表达载体。以农杆菌侵染法分别在烟草原生质体和烟草叶片中进行瞬时表达分析，用激光共聚焦显微镜观察荧光信号，结果（图 4）发现，无论在烟草原生质体中，还是在本生烟草表皮细胞中，绿色荧光信号主要存在于细胞质中，细胞核中也有荧光。结果显示 RgAcS1 主要在细胞质中发挥作用。

3.5 RgAcS1 基因的组织表达特性

毛蕊花糖苷在地黄块根的不同组织中含有较大差异, 分析了地黄 RgAcS1 在地黄块根周皮、韧皮部、木质部和根毛中的表达量, 结果(图 5)表明, RgAcS1 在根毛中表达量最高, 其次为周皮, 在木质部和韧皮部的表达量比较低, 表达量最低的为木质部。

地黄不同品种的菊花心部位与非菊花心部位含量也有明显差异, 分析了 RgAcS1 在地黄品种北京 1 号、QH1 和 85-5 菊花心和非菊花心部位的表达量, 结果(图 5)表明, 在 3 个品种非菊花心部位 RgAcS1 的表达量均明显高于菊花心部位, 北京 1 号和 QH1 菊花心和非菊花心部位 RgAcS1 的表达量均显著高于 85-5。

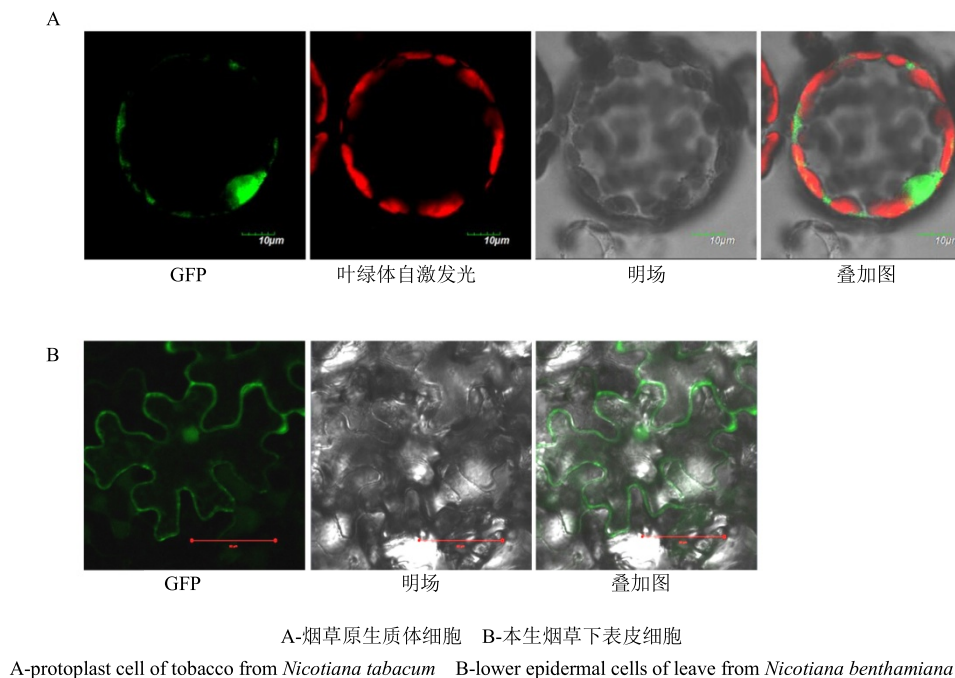


图 4 RgAcS1 的亚细胞定位荧光观察

Fig. 4 Sub-cellular localization of RgAcS1

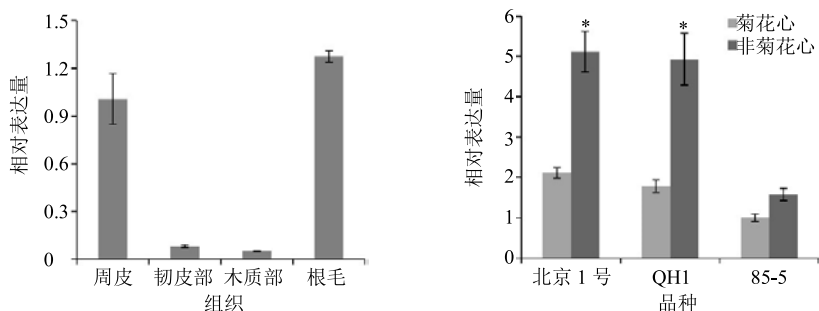


图 5 地黄 RgAcS1 的表达模式

Fig. 5 Expression levels of RgAcS1 in different tissues of *R. glutinosa* tuberous root

4 讨论

4.1 莽草酸-O-羟基肉桂酰基转移酶的结构和功能在植物中保守

莽草酸-O-羟基肉桂酰基转移酶(HCT)属于BAHD酰基转移酶大家族, 参与多种次生代谢产物的生物合成^[14], 通过遗传和生化手段已经证明了至少 46 种 BAHD 酰基转移酶的分子功能^[15]。第一个 HCT 基因最早从烟草 *N. tabacum* L. 中克隆出来^[16],

之后, 拟南芥、烟草和苜蓿 *Medicago sativa* L. 等植物 HCT 的分子功能逐渐得到解析^[17-18]。目前已经鉴定出来的几乎所有 HCT 均具有 HxxxD 和 DFGWG 两个保守的 motif, 其中 HxxxD 位于催化酶的中心部位附近, 对于乙酰基转移非常关键^[19], DFGWG 位于催化酶的羧基末端。定点突变实验结果表明, 删除或修饰其中一个 motif 或同时删除两个 motif, 均会导致酶催化活性的严重下降^[20,21]。本

研究筛选出1个与毛蕊花糖苷合成相关的基因, 推导的氨基酸序列具有HxxxD和DFGWG 2个保守的 motif, 属于HCT基因家族, 将其命名为RgAcS1。RgAcS1与芝麻莽草酸羟基肉桂酰转移酶SiHCT的序列同源性最高, 达92.36%。进化分析发现RgAcS1与同为唇形目的芝麻、红鼠尾草、欧活血丹和丹参HCT聚在一起, 符合物种的进化关系。

4.2 不同植物莽草酸-*O*-羟基肉桂酰基转移酶的亚细胞定位有差异

蛋白质的亚细胞定位与该蛋白质在细胞内的分子功能关系密切。细胞行使功能需要由特定空间分布的蛋白质与蛋白质之间的互作、修饰和含量的动态变化等的调控来实现^[22]。本研究通过构建GFP融合表达载体, 分别以烟草原生质体和本生烟草叶片为材料进行RgAcS1的亚细胞定位观测, 发现绿色荧光主要分布在细胞质中, 在细胞核部位也有分布。这与夏枯草 *Prunella vulgaris* L. PvRAS^[23]和丹参 SmHCT^[24]的亚细胞定位结果一致, 但与苔类植物粗裂地钱 *Marchantia paleacea* Bertol. MpHCT和钝鳞紫背苔 *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. & Lindenb. PaHCT的亚细胞定位结果有所不同, MpHCT和PaHCT融合GFP表达载体的荧光仅在细胞质中分布, 而截短的MpHCT-Tr和PaHCT-Tr融合GFP的荧光在细胞质中也有分布^[25]。RgAcS1的亚细胞定位结果为毛蕊花糖苷合成部位的分析提供了有价值的线索。

4.3 地黄 RgAcS1 的时空表达模式为毛蕊花糖苷的合成部位研究提供了线索

已有的研究结果表明^[26], 药用植物的次生代谢物含量随着基因表达量的不同而存在显著差异。如丹参酮主要积累于丹参的周皮中, 与丹参酮合成相关两个关键酶基因 SmCPS1 和 SmKSL1 也是在周皮中特异表达^[27]。丹参的酚酸类成分主要分布在丹参根的韧皮部和木质部, 与迷迭香酸生物合成相关的关键基因 SmRAS、SmC4H1 和 SmCYP98A78 在韧皮部和木质部表达量较高一致^[28]。课题组前期的研究发现, RgAcS1 (Unigene19512) 在地黄毛状根中能够响应水杨酸的诱导而上调表达, 与水杨酸促进毛蕊花糖苷的积累一致, 且在毛蕊花糖苷含量较高的地黄品种 QH 中具有较高的表达量^[8]。本研究发现, RgAcS1 的表达量在3个地黄品种北京1号、QH1和85-5的非菊花心部位显著高于菊花心部位, 这与毛蕊花糖苷在地黄的非菊花心部位含

量较高^[29]的现象一致。同时, 进一步分析显示地黄的根毛和周皮中 RgAcS1 的表达量远高于韧皮部和木质部, 推测在地黄块根的根毛和周皮中积累更多的毛蕊花糖苷。

本实验对可能参与毛蕊花糖苷生物合成的一个关键酶基因 RgAcS1 进行了克隆和分析, 为进一步研究 RgAcS1 在地黄毛蕊花糖苷合成中的分子功能奠定了基础。

参考文献

- [1] 温学森, 杨世林, 魏建和, 等. 地黄栽培历史及其品种考证 [J]. 中草药, 2002, 33(10): 84-87.
- [2] 黄璐琦, 李军德, 李哲, 等. 我国现代大中药产业链发展趋势及对策 [J]. 中国科技投资, 2010(5): 67-69.
- [3] 李红伟, 孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 218-228.
- [4] 郑帅, 杨敏. 毛蕊花糖苷治疗糖尿病肾病的研究进展 [J]. 医学综述, 2018, 24(16): 3232-3236.
- [5] 郑晓珂, 刘媛媛, 冯卫生, 等. 天然苯乙醇苷类化合物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(3): 230-234.
- [6] 柴茂, 董诚明, 江道会, 等. 不同品种怀地黄中梓醇和毛蕊花糖苷的高效液相色谱法测定 [J]. 中医学报, 2013, 28(5): 690-692.
- [7] 王丰青, 王丽娜, 智惊宇, 等. 不同品种地黄中毛蕊花糖苷的动态积累规律变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 78-83.
- [8] Wang F, Zhi J, Zhang Z, et al. Transcriptome analysis of salicylic acid treatment in *Rehmannia glutinosa* hairy roots using RNA-seq technique for identification of genes involved in acteoside biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 787-795.
- [9] St-Pierre B, Laflamme P, Alarco A M, et al. The terminal *O*-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer [J]. *Plant J*, 1998, 14(6): 703-713.
- [10] Grothe T, Lenz R, Kutchan T M. Molecular characterization of the salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(33): 30717-30723.
- [11] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. *Plant J*, 2010, 54(4): 733-749.
- [12] Ru M, Wang K, Bai Z, et al. A tyrosine aminotransferase involved in rosmarinic acid biosynthesis in *Prunella vulgaris* L. [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4892-4896.
- [13] Levsh O, Chiang Y C, Tung C F, et al. Dynamic

- conformational states dictate selectivity toward native substrate in a substrate-permissive acyltransferase [J]. *Biochemistry*, 2016, 55(45): 6314-6326.
- [14] Raes J, Rohde A, Christensen J H, *et al.* Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 133(3): 1051-1071.
- [15] John C D'Auria. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(3): 331-340.
- [16] Hoffmann L. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2002, 278(1): 95-103.
- [17] Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, *et al.* Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinatase hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(6): 1446-1465.
- [18] Tong Z, Li H, Zhang R, *et al.* Co-downregulation of the hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimate hydroxycinnamoyl transferase and coumarate 3-hydroxylase significantly increases cellulose content in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Plant Sci*, 2015, 239: 230-237.
- [19] Shaw W V. Chemical anatomy of antibiotic resistance: chloramphenicol acetyltransferase [J]. *Sci Prog*, 1992, 76(301/302): 565-580.
- [20] Suzuki H, Nakayama T, Nishino T. Proposed mechanism and functional amino acid residues of malonyl-CoA: anthocyanin 5-*o*-glucoside-6'-*O*-malonyl transferase from flowers of *Salvia splendens*, a member of the versatile plant acyltransferase family [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(6): 1764-1771.
- [21] Bayer B, Ma X, Stöckigt J. Acetyltransfer in natural product biosynthesis—functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(10): 2787-2795.
- [22] 邢浩然, 刘丽娟, 刘国振. 植物蛋白质的亚细胞定位研究进展 [J]. 华北农学报, 2006, 21(S2): 1-6.
- [23] Ru M, Wang K, Bai Z, *et al.* Molecular cloning and characterisation of two enzymes involved in the rosmarinic acid biosynthesis pathway of *Prunella vulgaris* L. [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 2017, 128(2): 381-390.
- [24] Di P, Zhang L, Chen J, *et al.* C-13 Tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(7): 1537-1542.
- [25] Wu Y, Zhao Y, Liu X, *et al.* Isolation and functional characterization of hydroxycinnamoyltransferases from the liverworts *Plagiochasma appendiculatum* and *Marchantia paleacea* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 129: 400-410.
- [26] Alagna F, Mariotti R, Panara F, *et al.* Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development [J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12(1): 162-169.
- [27] Xu Z, Peters R J, Weirather J, *et al.* Full-length transcriptome sequences and splice variants obtained by a combination of sequencing platforms applied to different root tissues of *Salvia miltiorrhiza*, and tanshinone biosynthesis [J]. *Plant J*, 2015, 82(6): 951-961.
- [28] Xu Z, Luo H, Ji A, *et al.* Global identification of the full-length transcripts and alternative splicing related to phenolic acid biosynthetic genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 100-109.
- [29] 谢彩侠, 李雅静, 张 苗, 等. 不同种质地黄块根菊花心与非菊花心部位有效成分特征分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 54-62.