

五味子 PLR 基因及其启动子的克隆与表达分析

李海燕¹, 刘久石², 魏如滨¹, 王 婷¹, 刘宇阳¹, 王熙昂¹, 李宏博^{1*}

1. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866

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 从五味子中克隆木脂素生物合成途径松脂醇-落叶松脂素还原酶(Pinoresinol-lariciresinol reductases, PLR)基因及其启动子序列, 并进行生物信息学与表达分析。方法 根据转录组 PLR 测序序列设计特异性引物, 克隆 ScPLR 并进行生物信息学分析; 采用 TAIL-PCR 对 ScPLR 启动子序列扩增, 并进行序列分析; 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析果实不同发育时期 ScPLR 的表达。结果 ScPLR 基因开放阅读框(ORF)全长 837 bp, 编码 278 个氨基酸; ScPLR 蛋白相对分子质量 31 419.85, 理论等电点 8.97; 具有跨膜结构, 无信号肽, 为稳定性疏水蛋白, 主要由 α -螺旋和无规卷曲构成; 亚细胞定位预测 ScPLR 主要定位于细胞质; 系统进化显示 ScPLR 与蓖麻 PLR 亲缘关系较近。克隆到 ScPLR 基因启动子长 994 bp, 具有 TATA-box、CAAT-box 基本元件、光调控、生长素响应、厌氧诱导、防御和应激反应的多种调控元件; qRT-PCR 结果显示 ScPLR 表达量呈现果实膨大期快速增加而进入着色期迅速降低的变化趋势。结论 获得了 ScPLR 基因及其启动子序列, ScPLR 果实着色期之前高水平表达的趋势和木脂素的动态变化相一致, 为进一步研究该基因功能及表达调控奠定了理论基础。

关键词: 五味子; ScPLR; 基因克隆; 启动子克隆; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4747-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.019

Cloning and expression analysis of PLR gene in *Schisandra chinensis*

LI Hai-yan¹, LIU Jiu-shi², WEI Ru-bin¹, WANG Ting¹, LIU Yu-yang¹, WANG Xi-ang¹, LI Hong-bo¹

1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

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

Abstract: Objective To obtain more information for further researches on mechanism of pinoresinol lariciresinol reductases (PLR) gene, which is the key enzyme gene involved with lignans synthesis in *Schisandra chinensis*, ScPLR gene and its promoter were cloned and analyzed, and the expression pattern of ScPLR gene at fruit development stages was also illustrated. **Methods** On the basis of PLR gene sequence obtained by transcriptome sequencing, specific primers were designed, the open reading frame (ORF) of ScPLR gene was then cloned, and the bioinformation of ScPLR gene was analyzed through online software. Meanwhile, the promoter of ScPLR gene was amplified by TAIL-PCR method and analyzed. The expression patterns of ScPLR from fruits at different development stages were analyzed preliminarily. **Results** The length of ScPLR gene ORF was 837 bp, which encoded 278 amino acids residues with molecular weight of 31419.85 and theoretical pI of 8.97; ScPLR consisted of a membrane structure, which was a hydrophobic stable protein without signal peptide, and mainly composed of α -helix and random curl; Subcellular localization prediction result showed that ScPLR protein is mainly located in cytoplasm; The results of phylogenetic analysis revealed that ScPLR is closest related to *Ricinus communis* PLR. The length of ScPLR gene promoter was 994 bp, which had regulatory elements including TATA-box, CAAT-box, also cis-regulatory elements related to light regulation, auxin response, anaerobic induction, defense and stress response, the presence of various cis-acting elements fully reflected the high efficiency and complexity of promoter regulation on gene expression at the transcriptional level. qRT-PCR results showed that ScPLR expression level displayed obvious up-regulation at fruit swelling stage, then down-regulation at fruit coloring period. **Conclusion** The ScPLR gene and its promoter were cloned and analyzed, the trend of high expression level of ScPLR before fruit coloring period was consistent with the

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 2018 年全国中药资源普查项目 (1102-01042918001)

作者简介: 李海燕 (1982—), 女, 博士, 讲师, 主要从事药用植物资源评价与利用研究。Tel: (024)88487143 E-mail: haiyanlisy@163.com

*通信作者 李宏博, 男, 讲师, 主要从事药用植物资源评价与利用研究。Tel: (024)88487143 E-mail: lhb@syau.edu.cn

dynamic change of lignans accumulation in *S. chinensis*, which will lay foundation for the further research on function and expression regulation of ScPLR gene in lignans biosynthesis pathway.

Key words: *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.; ScPLR; gene cloning; promoter cloning; expression analysis

五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 为五味子科五味子属多年生落叶木质藤本植物, 主要分布于辽宁、吉林、黑龙江等地, 是我国温带针阔叶混交林和暖温带针叶阔叶林区域, 经历第四纪冰川时期后保留下来的第三纪古老植物种之一。其皮肉甘酸, 核中辛苦, 甘、酸、辛、苦、咸五味俱有, 故名“五味子”。五味子是临床常用中药, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效, 用于久嗽虚喘、梦遗滑精、遗尿尿频、久泻不止、自汗盗汗、津伤口渴、内热消渴、心悸失眠等症的治疗^[1-3]。五味子中含有木脂素类、萜类、多糖、挥发油类、类黄酮、有机酸类等多种活性成分, 目前国内外学者已从五味子中分离出 100 多种木脂素类化合物, 其中联苯环烯木脂素是其主要的生理活性成分, 现代药理研究表明其具有保肝护肝、抗肿瘤、抗 HIV、保护心血管、抗氧化、抗抑郁等作用, 在心血管疾病、肺病、抗疲劳及肿瘤辅助治疗等方面具有广阔的应用前景^[4-7]。

木脂素的生物合成包括苯丙烷途径合成其前体松柏醇、松柏醇进一步合成特异木脂素、木脂素糖基化形成木脂素糖苷 3 个阶段。PLR (Pinoresinol-lariciresinol reductase) 是木脂素生物合成的重要关键酶, 一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH) 的还原酶, 它催化松柏醇先后形成落叶松柏醇和开环异落叶松柏醇, 这些产物是合成各种木脂素的起始点, 如呋喃型、二芳基丁烷型、二苄基丁内酯型等, 导致木脂素结构和立体化学的多样性^[8-9]。目前已经从模式植物拟南芥或富含木脂素的植物中克隆得到 PLR 基因, 如连翘^[10-11]、亚麻^[12-13]、菰蓝^[14]、桃儿七^[15]、盾叶鬼臼^[16]等, 相关酶学研究表明^[10-22], 盾叶鬼臼和连翘 PLR 对松柏醇的底物亲和性接近, 而菰蓝 PLR1 对于松柏醇亲和性较低; 但对落叶松柏醇而言, 菰蓝 PLR1 的亲和性远高于盾叶鬼臼和连翘^[10,16]。对菰蓝 PLR 的研究还发现过表达 PLR 基因可以显著增加其落叶松树酯醇和开环异落叶松柏素二葡萄糖苷的含量, 反之可显著降低下游木脂素含量^[14]。植物次生代谢相关基因表达的调控主要体现在转录水平上, 而启动子在基因转录调控中占有核心地位, 决定基因的表达水平。目前对五味子 ScPLR 的相关研究还未见报

道, 本研究通过对五味子 ScPLR 基因及其启动子进行克隆及生物信息学分析, 并采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 对 ScPLR 在五味子果实不同发育时期的表达量进行分析, 明确五味子 ScPLR 基因及其启动子的序列特征和表达模式, 为进一步深入研究其基因功能和表达调控奠定理论基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

供试五味子采自沈阳农业大学五味子种质资源圃, 经沈阳农业大学朴钟云教授鉴定为五味子科五味子属五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.。采集五味子幼嫩叶片, 用去离子水冲洗干净, 滤纸吸干水分后放于液氮中, 带回实验室置于 -80 °C 超低温冰箱保存, 用于后续克隆及定量分析。五味子进入结果期时, 即花后 20 d, 每隔 30 天定期采摘五味子 4 个发育时期果实, 包括表型性状不同的 3 个品系 S1、S2、S3 的 4 个发育时期果实, 直至五味子完全成熟, 采摘后迅速放入液氮中, 带回实验室, 放入 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2 试剂

LB 培养基购自北京拜尔迪生物技术有限公司。凝胶回收试剂盒、反转录试剂盒、克隆载体 pMD19-T、感受态细胞、SuperReal PreMix Plus 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。所需引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

2 方法

2.1 ScPLR 基因克隆

采用 Trizol 法提取五味子 RNA, 并用 DNAase 去除 DNA 污染, 然后按照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书反转录为 cDNA。以 SMRT 转录组测序得到的全长 PLR 序列作为参考序列设计特异性引物, ScPLR F: 5'-ATGACGAAGCTGAGTGAGAGC-3'; ScPLR R: 5'-TCATAGATATCGCTTCAAATATTCT-3'。PCR 反应体系 25 μ L: 2 μ L dNTP (2.5 mmol/L), 上、下游引物各 1 μ L, 2.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer, 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), ddH₂O 17.3 μ L, 1 μ L 模板 cDNA。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环;

72 °C 延伸 10 min。用回收试剂盒纯化回收 PCR 产物，纯化后与 pMD18-T 载体过夜连接，然后转化 DH5 α 感受态，在含氨苄青霉素的 LB 培养基上培养，并进行蓝白斑筛选，将含有目的产物的阳性克隆测序。

2.2 ScPLR 基因启动子克隆

利用 Primer 5.0 在其 5' 端设计 3 个反向的巢式引物 ScPLR-R1、ScPLR-R2 和 ScPLR-R3 (表 1)，采用高保真酶 Prime STAR Max DNA Polymerase (Takara) 进行 3 轮 PCR 扩增。PCR 反应体系 25 μ L: 1 μ L 基因组 DNA, AD 上游引物 0.5 μ L, R1 或 R2 或 R3 1 μ L, Tap 酶混合反应液 12.5 μ L, 10 μ L ddH₂O。PCR 反应条件: (93 °C、1 min $\rightarrow$ 95 °C、1 min) $\times$ 1 $\rightarrow$ (94 °C、30 s $\rightarrow$ 62 °C、1 min $\rightarrow$ 72 °C、2 min) $\times$ 1 $\rightarrow$ (94 °C、30 s $\rightarrow$ 25 °C、1 min $\rightarrow$ 72 °C、2 min; 94 °C、30 s $\rightarrow$ 62 °C、1 min $\rightarrow$ 72 °C、2 min) $\times$ 1 $\rightarrow$ (94 °C、30 s $\rightarrow$ 62 °C、1 min $\rightarrow$ 72 °C、2 min; 94 °C、30 s $\rightarrow$ 44 °C、1 min $\rightarrow$ 72 °C、2 min) $\times$ 15; 72 °C、5 min。3 轮 PCR 产物经纯化后，将其连接到 pMD19-T 载体上，转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，涂平板后，37 °C 培养 12~16 h，挑取白斑，摇床培养后提取质粒，PCR 验证后测序。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物用途	引物名称	引物序列 (5' $\rightarrow$ 3')
接头引物	AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
	AP2	ACTATAGGGCAGCGTGTT
PLR 基因启动子克隆	ScPLR-R1	GTGTGGGGATCCCTGCTTCTTC
	ScPLR-R2	TTCAATGGCTCTCTTACCCTTCTC
	ScPLR-R3	CGATCCAGGGTGATTGCATGCTTC
qRT-PCR 扩增	ScPLR-F	CAGCAGACGATCCACGGACATT
	ScPLR-R	CCTCGGCATCCCTTCCATAGA
内参基因 Reference gene	GAPDH-F	CGGTGCTGAGTATGTCGTGGAGT
	GAPDH-R	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

2.3 生物信息学分析

利用 NCBI 中的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 在线分析开放阅读框; 采用 ExPASy 工具包中的 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 ScPLR CDS 序列及其编码的氨基酸的组成及理化性质; SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析 ScPLR 蛋白信号肽; ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 预测 ScPLR 蛋白亲水性;

TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析 ScPLR 蛋白的跨膜结构域; ScPLR 蛋白二级结构和三级结构由 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 和 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) 在线完成。SoftBerry ProtComp9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 和 WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 进行亚细胞定位预测; 利用 Mega7.0 软件构建五味子 ScPLR 和其他物种 PLR 的系统进化树; 利用 NCBI 的 Blast 软件将克隆的启动子序列进行序列比对, 确定是否为五味子 PLR 基因的启动子序列, 并确定起始转录位点, 并采用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子顺式作用元件分析, 明确转录起始位点上游的所包括的顺式作用元件的类型、来源、数目、位置及其功能。

2.4 五味子 ScPLR 的 qRT-PCR 表达分析

参照 EASYspin Plus plant RNA kit 试剂盒说明书提取五味子不同发育时期果实的总 RNA, 用反转录试剂盒 PrimeScriptTMRT reagent Kit with gDNA Eraser 合成 cDNA。采用 GAPDH 作为 qRT-PCR 的内参基因, 测定 PLR 的相对表达量。内参基因的引物序列、扩增所用引物序列见表 1。PCR 反应体系为 20 μ L: 2 $\times$ TB Green Premix Ex Taq II 10 μ L, 上、下游引物各 0.8 μ L, 模板 2 μ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye I 0.4 μ L, 用超纯水补至终体积 20 μ L。PCR 反应在 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪上运行。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 30 s; 定量分析 (95 °C、5 s $\rightarrow$ 60 °C、30 s) $\times$ 40; 融解曲线: (95 °C、5 s $\rightarrow$ 60 °C、60 s) $\times$ 1; 降温 50 °C、30 s。实验结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法对数据进行分析。

3 结果与分析

3.1 ScPLR 克隆及序列分析

基因序列分析表明, ScPLR 基因 cDNA 全长 937 bp, 利用 NCBI 的 ORF Finder 进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 查找, 发现该序列含有完整的全长为 837 bp 的 ORF, 共编码 278 个氨基酸 (图 1)。

3.2 ScPLR 蛋白特征分析

ProtParam 分析预测 ScPLR 基因编码蛋白的相对分子质量约 31 419.85, 理论等电点 8.97, 正电荷残基 36 个, 负电荷残基 30 个, 总共 4 473 个原子,

```

1  ATGGAGGGAACGAAAGATAGGGTTTTGATTATAGGAGCAACAGGTTATTTGGGAAGAAGGTTTGTGAAGGCAAGCTTGGCTCTTGGCTAT
   M E G T K D R V L I I G A T G Y L G R R F V K A S L A L G Y
91  CCCACGTATCTTCTATACCGTCCGGAAGTCGCATCAGATGCCGAGAAAGTTCAGATGCTTATCGGATTCAAAATGCAAGGAGCCCATCTT
   P T Y L L Y R P E V A S D A E K V Q M L I G F K M Q G A H L
181 CTCGAAGGTTCACTTGGAGATCATGAGAGCATGGTTTCAGCACTAAAGCAGGTGGACGTGGTGTCTCAGCTGTGTGCAGGAAACCCACCTA
   L E G S L G D H E S M V S A L K Q V D V V V S A V A G N H L
271 AGACACGCCATTCTCGAACAGATCAAACCTCGTCAACGCCATTAAAGAAAGTTGGCACAATTAAGAGGTTTCATTCCTTCAGAGTTTGGGATG
   R H A I L E Q I K L V N A I K E V G T I K R F I P S E F G M
361 GATCCAGGCCGGATGAAGCATGCTATAGATCCTGGAGCGTATGTTTTTAAGGATAAACGTATTGTTTCGAGAAGCAATAGAGAAGGCAGGT
   D P G R M K H A I D P G A Y V F K D K R I V R E A I E K A G
451 ATCCCTTACACCTATATCTCTGCTAAGTCTGTGCTGGTACTTCTCTCTGCTCTGGCACAGATACTGAACTTCATGCCACCCAGAGAC
   I P Y T Y I S A N C C A G Y F L S A L A Q I L N F M P P R D
541 CATGTTCTTATCTACGGCGATGGCAGTAAGAAATGCATATGGGTGATGAGGATGATATAGGAATGTATACCTATGATGGCCATTAATGAT
   H V L I Y G D G S K K C I W V D E D D I G M Y T M M A I N D
631 CCTCGAACCTTGAACAAGAGTCTTTATTTGGGTCTCGCAGCAACATTTTGACACAGATTGAAGTTGTTCAATTATGGGAGAAGCTCATA
   P R T L N K S L Y L R P R S N I L T Q I E V V Q L W E K L I
721 GGGAAGGAATTGAAGAAACATTTGTTCTGAAGAAGAATGGCTTGTAATATGGCAAGATGGCTGCGCCTATGCAATCGGTGTAGCCCA
   G K E L K K T F V S E E E W L V I W A R W L R L C N R C S P
811 CTTTACCAAATTTCTATCGCGGTGA
   L L P N F L S R *

```

图 1 五味子 ScPLR 核苷酸序列及其氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequence of ScPLR

分子式为 $C_{1422}H_{2265}N_{381}O_{390}S_{15}$, 脂肪指数为 102.77, 不稳定指数为 32.25, ProtScale 分析显示 ScPLR 既有亲水峰也有疏水峰, 第 213 位氨基酸处具最高值 2.256, 在第 82 位氨基酸处具最低值 -2.022, 亲水性指数 (GRAVY) 的平均水平为 0.001, 疏水性氨基酸多于亲水性氨基酸, 均匀分布在肽链中, 由此推断该蛋白属于稳定性疏水蛋白 (图 2)。TMHMM 预测 ScPLR 蛋白 155~173 氨基酸处有 1 个跨膜结构。ScPLR 蛋白无信号肽序列, 是一种非分泌蛋白。SMART 结构域分析显示其含有结合 NAD-/NADP 结构域、NmrA 结构域及 Epimerase 结构域。

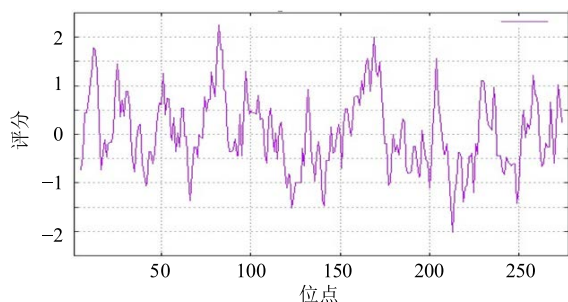


图 2 ScPLR 蛋白质亲水和疏水性分析

Fig. 2 Hydrophilic and hydrophobic analysis of ScPLR protein

利用 SOMPA 预测 ScPLR 蛋白质二级结构 (图 3), 其中 α -螺旋所占比例最大, 为 38.85%, 无规则卷曲为 34.89%, 延伸链为 18.35%, β -转角为 7.91%, 由此可见, ScPLR 为混合型蛋白, α -螺旋和无规卷曲是主要的结构元件。运用 Phyre2 数据库预测分析 ScPLR 蛋白质三级结构, 运用 Rasmol 软件分析 ScPLR 基因编码的蛋白质产物三级结构,

跨膜螺旋预测显示蛋白有跨膜结构, 这与跨膜结构分析结果相一致, 序列相似度为 56%, 三级结构预测结果与二级结构相符 (图 4)。

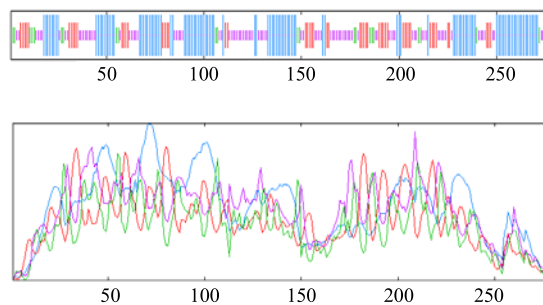


图 3 五味子 ScPLR 基因编码的蛋白质产物二级结构

Fig. 3 Secondary structure of ScPLR encoded protein

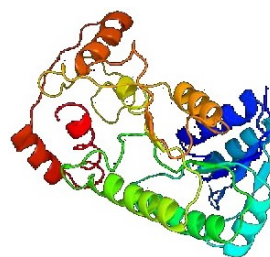


图 4 五味子 ScPLR 基因编码蛋白质产物的三级结构

Fig. 4 Tertiary structure of ScPLR encoded protein

3.3 ScPLR 蛋白的亚细胞定位

利用 SoftBerry ProtComp 9.0 在线对 ScPLR 蛋白进行亚细胞定位预测, 结果显示, ScPLR 蛋白定位在细胞质的相应预测数值最高, 为 8.68, 其次是叶绿体、液泡, 预测数值分别为 0.70、0.34。采用 WoLF PSORT 在线对 ScPLR 蛋白亚细胞定位进一步预测, ScPLR 蛋白同样主要定位于细胞质, 可能

为一细胞质蛋白。

3.4 ScPLR 系统发育树构建

使用 MEGA 7.0 的邻接法 (neighbour-joining, NJ) 构建五味子 ScPLR 蛋白、NCBI 数据库中有记载的 22 个 PLR 蛋白构建系统进化树 (图 5), 发现五味子 ScPLR 与蓖麻、海岸松、中华猕猴桃 PLR 的进化关系较近。

3.5 ScPLR 启动子克隆与生物信息学分析

运用改良的 CTAB 法提取无菌培养的五味子组培苗和幼嫩叶片基因组 DNA, 对比发现幼嫩叶片提取五味子植物基因组 DNA 纯度较高 (图 6), 因此克隆启动子选用幼嫩叶片基因组 DNA 做模板。经过 3 轮 TAIL-PCR 扩增, 成功获得约 994 bp 的启动子序列, 该片段 3' 端序列与五味子 PLR 基因的 5' 端序列完全重合。

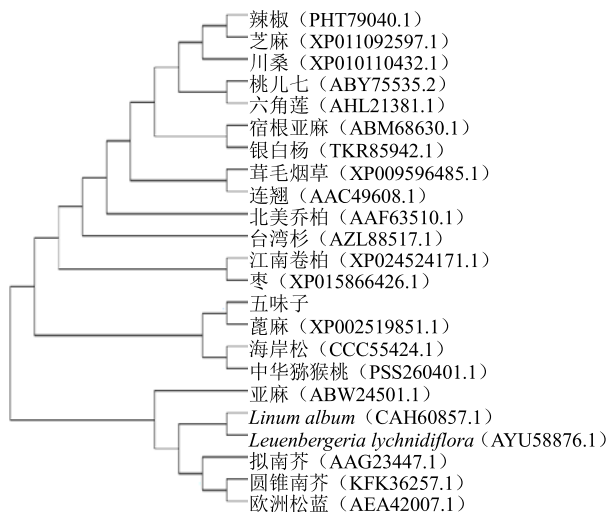


图 5 五味子与其他植物中 ScPLR 蛋白的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of ScPLR protein from *S. chinensis* and other plants

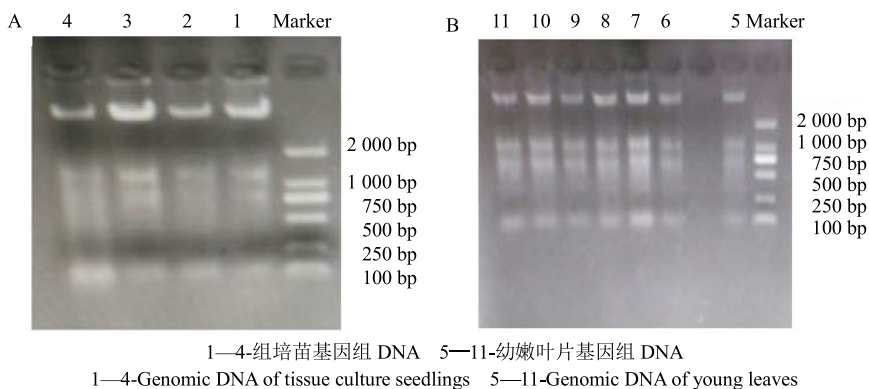


图 6 五味子植物组培苗 (A) 和幼嫩叶片 (B) 基因组 DNA

Fig. 6 Genomic DNA of tissue culture seedlings (A) and young leaves (B) of *S. chinensis*

通过在线软件 PlantProm 分析 ScPLR 基因起始密码子 ATG 上游序列, 预测显示该序列的转录起始位点 (transcription start site, TSS) 位于 ATG 上游 193 bp 处。利用 PlantCARE 对克隆获得的 ScPLR 启动子进行顺式作用元件预测分析 (表 2), 五味子 ScPLR 启动子序列中包含 5 个 TATA-box、11 个 CAAT-box 基本元件; 10 个光响应元件 (AE-box、G-box、GAG-motif、MNF1、Sp1、TCCC-motif), 这些光响应元件大多来源于玉米和拟南芥, 较少来源于菠菜; 1 个生长素响应元件 (TGA-element), 来源于甘蓝; 5 个厌氧诱导顺式调控元件 (ARE); 1 个参与防御和胁迫响应的顺式调控元件 (TC-rich repeats); 2 个参与抗旱诱发的 MYB 结合位点的作用元件 (MBS); 1 个来源于玉米的与蛋白代谢有关的作用元件 (O2-site); 3 个来源于稻的涉及胚乳表达的调控元件 (Skn-1_motif), 1 个高转录水平的 5UTR Py-rich stretch。以上分析表明, 五味子 ScPLR

基因的转录表达调控与多种因素有关, 该基因启动子很可能与组织特异性表达有关, 而且这些顺式作用元件能够响应外界环境的变化, 从而调控 ScPLR 基因的表达。

3.6 qRT-PCR 表达分析

为了明确 ScPLR 对五味子果实不同发育时期木脂素积累的作用, 本实验利用 qRT-PCR 技术, 研究分析了 ScPLR 在五味子不同发育时期果实中的表达水平 (图 7), 分析结果显示 ScPLR 表达量呈现先增加后降低的变化趋势, 花后 20 d 即果实发育初期表达量较低, 随着果实的迅速膨大, ScPLR 的表达量也随之大幅提高, 花后 50 d 达到整个发育时期的最高值, 而后进入果实着色期, 其表达量逐渐下降, ScPLR 果实着色期之前高水平表达的趋势和木脂素的动态变化相一致。不同品系五味子 ScPLR 表达量亦呈现先增加后降低的变化趋势 (图 8), 花后 50 d 达到最高值, 而后逐渐下降, 品系 S1 的 ScPLR

表 2 五味子 ScPLR 启动子顺式作用元件分析

Table 2 Prediction of Cis-acting elements of ScPLR gene promoter

元件名称	序列	数量	功能
5UTR Py-rich stretch	TTTCTCTCTCTCTC	1	转录增强
TATA-box	TATA/ATATAT/TATACA/TAATA	5	转录起始-核心启动子元件
CAAT-box	CAAAT/CAAT/CCAAT	11	启动子和增强子区调控元件
G-box	CACGAC	1	光响应元件
AE-box	AGAAACAT	1	光响应元件
GAG-motif	AGAGAGT, GGAGATG	3	光响应元件
MNF1	GTGCCC(A/T)(A/T)	1	光响应元件
Sp1	CC(G/A)CCC	2	光响应元件
TCCC-motif	TCTCCCT	2	光响应元件
ARE	TGGTTT	5	厌氧诱导的必须顺式调控元件
MBS	CAACTG	2	参与抗旱诱发的 MYB 结合位点
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	1	防御与胁迫响应元件
O2-site	GATGA(C/T)(A/G)TG(A/G)	1	玉米醇溶蛋白代谢调控
Skn-1_motif	GTCAT	3	胚乳特异表达
TGA-element	AACGAC	1	生长素响应元件
F-box	CTATTCTCATT	1	
AAGAA-motif	GAAAGAA	1	未知
TATCCAT/C-motif	TATCCAT	1	未知
Unnamed_1	CGTGG	1	
Unnamed_3	CGTGG	1	
Unnamed_4	CTCC	17	

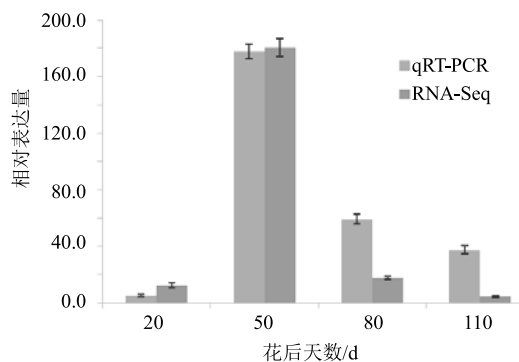


图 7 五味子果实不同发育时期 ScPLR qRT-PCR 表达分析
Fig. 7 qRT-PCR expression analysis of ScPLR at different development stages of *S. chinensis* fruits

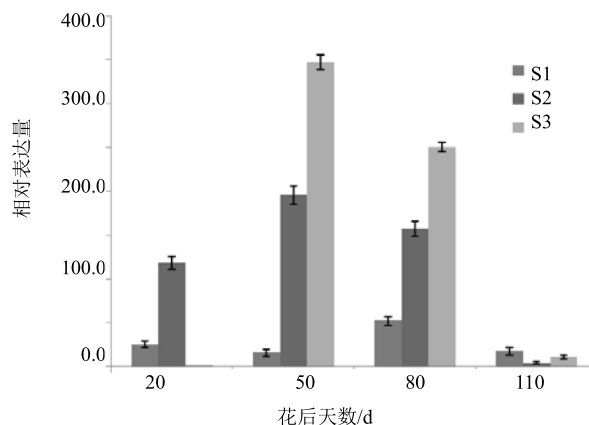


图 8 不同品系五味子果实 ScPLR qRT-PCR 表达分析
Fig. 8 qRT-PCR expression analysis of ScPLR in different strains of *S. chinensis* fruits

表达量各时期均较低, 品系 S3 的 ScPLR 花后 20 d 表达量非常低, 之后迅速增加, 花后 80 d 仍可维持相对较高的表达水平, 相关分析结果表明五味子 ScPLR 表达量与果实木脂素含量呈正相关关系。

4 讨论

PLR 是木脂素生物合成过程的关键酶^[11], 多数传统植物中的 PLR 不仅可以催化松脂醇生成落叶松脂素, 还能以落叶松脂素作为底物, 将其还原为开环异落叶松脂酚^[23], 因为这种连续催化能力, 所以被称为松脂醇-落叶松脂素还原酶。目前虽然在桃儿七、亚麻、连翘、菘蓝等少数植物中成功分离 PLR 并进行了相应的功能验证, 但 PLR 基因在五味子木脂素合成中的功能尚未明确, 为此, 本实验首次克隆了 ScPLR 的 cDNA 序列, 并对 ScPLR 蛋白进行了生物信息学分析, 发现 ScPLR 基因 ORF 全长 837 bp, 编码 278 个氨基酸, 为稳定性疏水蛋白, 亚细胞定位预测 ScPLR 主要定位于细胞质; 对 ScPLR 蛋白的二级和高级结构系统分析发现, α -螺旋和无规卷曲是其主要的结构元件, 且含有结合 NAD-/NADP 结构域、NmrA 结构域及 Epimerase 结构域, 这和已知的其他物种 PLR 蛋白结构特征具有一定相似性^[20]。通过比对发现, 系统发育分析 ScPLR 与蓖麻、海岸松、中华猕猴桃 PLR 亲缘关系较近, 但不同植物中的 PLR 蛋白大小有一定差异, 这意味着五味子中 ScPLR 蛋白与其他植物的 PLR

蛋白可能存在结构或功能上的差异,说明他们在进化上是高度保守的。前期研究发现^[20],PLR基因表现出时空和器官特异性的表达模式。五味子木脂素以果实的含量最高,课题组前期对五味子果实发育不同时期木脂素含量进行了检测,发现果实发育前期(幼果期、青果期)木脂素积累速率较快,果实着色之前其积累速率达到高峰,而后木脂素积累速率逐渐下降,其趋势与关键基因的表达是否一致,基于此本研究采用 qRT-PCR 对不同发育时期果实 ScPLR 相对表达量进行测定,结果显示 ScPLR 果实着色期之前高水平表达的趋势和木脂素的动态变化相一致,且与亚麻 LuPLR1 自其种子发育初期表达水平不断提高的研究结果一致^[20],这为进一步深入研究该基因在五味子木脂素生物合成中的功能及表达调控提供了理论依据。

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,是一段位于结构基因 5'端上游区的 DNA 序列,能活化 RNA 聚合酶,使之与模板 DNA 准确地相结合并具有转录起始的特异性,在调控基因表达中具有重要的作用^[23-28]。本研究克隆的 ScPLR 基因启动子长 994 bp,且发现该启动子含有多种生物学顺式作用元件,推测 ScPLR 的转录水平可能受到多种因素的调控。ScPLR 基因启动子除含有核心启动子 TATA-box 和上游启动子 CAAT-box 基本元件外,还有多个光响应元件,另外还有生长素响应调控元件,暗示五味子中 ScPLR 的表达受光信号与激素的调节。厌氧诱导、防御和应激反应等多种调控元件的存在,暗示 ScPLR 可能提高植物对非生物胁迫的耐受能力,下一步需要通过 β -葡萄糖苷酸酶基因(β -glucuronidase gene, GUS)分析启动子缺失体与启动子功能的相关关系,通过凝胶阻滞法、染色质免疫共沉淀、酵母单杂交等技术鉴定各顺式作用元件及与其相互作用的转录因子,为进一步阐明 ScPLR 在五味子果实中的表达调控机制奠定理论基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] Bensky D, Gamble A, Kaptchuk T. *Chinese Herbal Medicine: Materia Medica* [M]. Seattle: Revised Edition Eastland Press, 1993.
- [4] Szopa A, Ekiert R, Ekiert H. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies [J]. *Phytochem Rev*, 2017, 16(2): 195-218.
- [5] Zhu L, Li B, Liu X, et al. Purification of six lignans from the stems of *Schisandra chinensis* by using high-speed countercurrent chromatography combined with preparative high-performance liquid chromatography [J]. *Food Chem*, 2015, 186(11): 146-152.
- [6] Jiang P, Lu Y, Chen D. Authentication of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera* in Chinese patent medicines [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 131(1): 263-271.
- [7] Piao J, Liu L, Wang S, et al. Magnetic separation coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for rapid separation and determination of lignans in *Schisandra chinensis* [J]. *J Separ Sci*, 2018, 41(9): 2056-2063.
- [8] Vanholme R, Demedts B, Morreel K, et al. Lignin biosynthesis and structure [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(3): 895-905.
- [9] Umezawa T. Diversity in lignan biosynthesis [J]. *Phytochem Rev*, 2003, 2(1): 371-390.
- [10] Takeshi K, Laurence B D, Norman G L. An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(11): 3875-3881.
- [11] Dinkova-Kostova A T, Gang D R, Davin L B. (+)-Pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*. Protein purification, cDNA cloning, heterologous expression and comparison to isoflavone reductase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(46): 29473-29482.
- [12] Corbin C, Drouet S, Mateljak I, et al. Functional characterization of the pinoresinol lariciresinol reductase-2 gene reveals its roles in yatein biosynthesis and fax defense response [J]. *Planta*, 2017, 246(4): 405-420.
- [13] Hano C, Martin I, Fliniaux O, et al. Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing fax (*Linum usitatissimum*) seeds [J]. *Planta*, 2006, 224(6): 1291-1301.
- [14] Xiao Y, Ji Q, Gao S, et al. Combined transcriptome and metabolite profiling reveals that Li PLR1 plays an important role in lariciresinol accumulation in *Isatis indigotica* [J]. *J Experimental Bot*, 2015, 66(20): 6259-6271.

- [15] Wankhede D P, Biswas D K, Rajkumar S, *et al.* Expressed sequence tags and molecular cloning and characterization of gene encoding pinoresinol/lariciresinol reductase from *Podophyllum hexandrum* [J]. *Protoplasma*, 2013, 250(5): 1239-1249.
- [16] Kuo H J, Wei Z Y, Lu P C, *et al.* Bioconversion of pinoresinol into matairesinol by use of recombinant *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(9): 2687-2692.
- [17] Wu Y L, Xing D W, Ma G L, *et al.* A variable loop involved in the substrate selectivity of pinoresinol/lariciresinol reductase from *Camellia sinensis* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 162(6): 1-9.
- [18] Zhao Q, Zeng Y, Yin Y, *et al.* Pinoresinol reductase 1 impacts lignin distribution during secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 112(4): 170-178.
- [19] Renouard S, Corbin C, Lopez T, *et al.* Absciscic acid regulates pinoresinol lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol accumulation in developing fax (*Linum usitatissimum* L.) seeds [J]. *Planta*, 2012, 235(1): 85-98.
- [20] Lucija M, Cyrielle C, Sullivan R, *et al.* Pinoresinol-lariciresinol reductases, key to the lignan synthesis in plants [J]. *Planta*, 2019, 249(3): 1695-1714.
- [21] Chiang N T, Ma L T, Lee Y R, *et al.* The gene expression and enzymatic activity of pinoresinol-lariciresinol reductase during wood formation in *Taiwania cryptomerioides* [J]. *Holzforschung*, 2018, 73(2): 197-208.
- [22] Tomoyuki N, Masaharu M, Shiro S, *et al.* Characterization of *Arabidopsis thaliana* pinoresinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis [J]. *Biological Chem*, 2008, 283(23): 15550-15557.
- [23] 曾晓玲, 赵昶灵, 文国松, 等. 启动子结构、功能预测和验证方法的研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(12): 3915-3925.
- [24] 张晓东, 李彩霞, 赵青蓉, 等. 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 [J]. *中草药*, 2018, 49(18): 4386-4392.
- [25] Dreos R, Ambrosini G, Périer R C, *et al.* The eukaryotic promoter database: expansion of EPD new and new promoter analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 92-96.
- [26] Leong S L, Ismail I, Taha R S, *et al.* The oil palm stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase (Des) promoter drives transient gene expression in tomato fruits and is affected by gibberellic acid [J]. *Plant Omics*, 2013, 6(6): 399-407.
- [27] 刘超, 王玲利, 吴 颀, 等. 枇杷叶片发育基因 EjGRF5 与启动子克隆及其在不同倍性枇杷中的表达 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(8): 1598-1606.
- [28] 谢德金, 叶友杰, 杨德明, 等. 巴戟天 MoDXR 基因及其启动子的克隆与分析 [J]. *药学报*, 2020, 55(2): 335-344.