

• 药材与资源 •

阳春砂 3 个萜类合酶基因启动子的克隆及其参与萜类调控的分析

赵海莹¹, 李 萌¹, 林晓静¹, 赵圆圆¹, 梁慧琳¹, 叶泽萍², 杨锦芬^{1*}

1. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室 (广州中医药大学), 国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510000

摘要: 目的 获得药用植物阳春砂 *Amomum villosum* 萜类合酶基因 AvBPPS (bornyl diphosphate synthase)、AvLIS (linalool synthase) 和 AvHUS (humulene synthase) 的启动子, 探究其顺式作用调控元件参与萜类合成的调控。方法 从阳春砂叶片基因组 DNA (genomic DNA, gDNA) 中分别克隆获得 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 的 gDNA 序列, 据此设计特异引物, 再通过 FPNI-PCR (fusion primer and nested integrated PCR, FPNI-PCR) 方法分别克隆其启动子并进行生物信息学分析, 结合转录组及对应萜类含量数据, 分析其较为关键的顺式作用调控元件与萜类调控的关系。结果 获得 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 的 gDNA 长度分别为 2374、2295、2362 bp, 均包含相应基因的完整编码区和 7 个外显子。进一步克隆获得 470、934、762 bp 的启动子。AvBPPS 启动子含有参与胚乳表达的顺式作用调控元件 GCN4-motif, 结合基因表达量的分析, 该顺式作用调控元件调控了 AvBPPS 在阳春砂药用部位种子中的特异表达, 进而影响了主要药效萜类成分龙脑、乙酸龙脑酯等在种子中的积累。AvLIS 和 AvHUS 启动子均含有参与茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 反应的顺式作用调控元件, 转录组和萜类含量的分析显示 AvLIS 响应高浓度 MeJA 的诱导, 而 AvHUS 没有表现出对 MeJA 的响应。结论 首次从药用植物阳春砂的启动子中发现了参与胚乳表达和 MeJA 反应的调控元件, 为深入探究萜类合成关键酶的种子表达特异性和对 MeJA 响应的机制提供了基础, 为萜类代谢的调控提供了操作元件。

关键词: 启动子; 阳春砂; 萜类合酶; 萜类化合物; 茉莉酸甲酯

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)04-1117-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.025

Cloning and bioinformatics analysis of promoters of three terpene synthase genes and their terpenoid regulation in *Amomum villosum*ZHAO Hai-ying¹, LI Meng¹, LIN Xiao-jing¹, ZHAO Yuan-yuan¹, LIANG Hui-lin¹, YE Ze-ping², YANG Jin-fen¹

1. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Joint Laboratory of National Engineering Research Center for Pharmaceuticals of Traditional Chinese Medicines, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To obtain the promoters of terpenoid synthase genes AvBPPS (bornyl diphosphate synthase), AvLIS (linalool synthase) and AvHUS (humulene synthase) of medicinal plants *Amomum villosum*, and investigate the regulation of *cis*-acting regulatory elements involved in terpenoid synthesis. **Methods** The gDNA of AvBPPS, AvLIS, and AvHUS were cloned from genomic DNA (gDNA) of leaves from *A. villosum*, and then specific primers were designed accordingly. The promoters were cloned by FPNI-PCR subsequently and bioinformatics analysis was performed. The relationship between key *cis*-acting regulatory elements and terpene regulation was analyzed by combining the transcriptome data and terpenoid contents. **Results** The gDNA lengths of AvBPPS, AvLIS and AvHUS were 2374 bp, 2295 bp and 2362 bp, respectively, and all contained complete coding regions of the corresponding genes and seven exons. The promoters of AvBPPS, AvLIS and AvHUS were cloned, respectively. The promoter of AvBPPS contained GCN4-motif, a *cis*-acting regulatory element involved in endosperm expression. Combined with the analysis of gene expression, it was speculated that this *cis*-acting regulatory element regulated the specific expression of AvBPPS in seeds, and

收稿日期: 2020-08-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81872954)

作者简介: 赵海莹 (1993—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药用植物次生代谢。Tel: 15625132812 E-mail: 965301844@qq.com

*通信作者: 杨锦芬 (1978—), 女, 研究员, 研究方向为药用植物萜类化合物生物合成与调控。Tel: (020)39358331 E-mail: yangjif@gzucm.edu.cn

then affected the accumulation of major terpenoids such as borneol and borneol acetate in seeds. Both AvLIS and AvHUS promoters contained *cis*-acting regulatory elements involved in methyl jasmonate (MeJA) reaction. Transcriptome and terpene content analysis showed that AvLIS responded to the induction of high-concentration-MeJA, while AvHUS showed no response to MeJA.

Conclusion *Cis*-acting regulatory elements involved in endosperm expression and MeJA response were discovered from promoters of medicinal plants *A. villosum*, which provided a basis for in-depth exploration of seed expression specificity of key enzymes of terpene synthesis and the mechanism of response to MeJA, and provided operating elements for regulation of terpene metabolism.

Key words: promoter; *Amomum villosum* Lour.; terpene synthase; terpenoids; methyl jasmonate

萜类化合物是自然界存在的一类由异戊二烯为结构单元组成的化合物^[1], 包括含有 2 个异戊二烯单位的单萜类化合物, 如芳樟醇; 含有 3 个异戊二烯单位的倍半萜类化合物, 如青蒿素; 含有 4 个异戊二烯单位的二萜类化合物, 如紫杉醇; 以及含有 6 个异戊二烯单位的三萜类化合物, 如植物甾醇。萜类不仅对植物的生长发育、抗逆防御等具有重要作用, 还具有重要的药用价值, 如青蒿素是治疗疟疾的特效药^[2]; 紫杉醇是治疗多种癌症最有效的化疗剂之一^[3]等。阳春砂仁为姜科豆蔻属阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的干燥成熟果实, 是我国著名的“四大南药”之一, 具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎等功效^[4]。其挥发油中富含乙酸龙脑酯、樟脑、龙脑等单萜类成分^[5]。

植物细胞中萜类合酶以异戊二烯焦磷酸——香叶基焦磷酸 (geranyl diphosphate, GPP)、法呢基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP)、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 为底物, 合成大量结构功能多样的萜类化合物^[6]。按形成产物的不同, 可分为单萜合酶、倍半萜合酶、二萜合酶等。目前, 已有多种萜类合酶被报道, 如‘西伯利亚’百合 (*Lilium ‘Siberia’*) 中的 LoTPS1 催化底物 GPP 产生芳樟醇^[7]; 檀香树 *Santalum album* L. 中的 SaTPS2 催化 FPP 产生多种倍半萜化合物, 其主产物为 (*E*)- α -佛手柑^[8]。课题组从阳春砂中克隆并鉴定了多个萜类合酶, 如单萜合酶——蒎烯合酶 (pinene synthase, AvPS)、龙脑基二磷酸合酶 (bornyl diphosphate synthase, AvBPPS) 和芳樟醇合酶 (linalool synthase, AvLIS), 它们对应的主产物分别为蒎烯^[9]、龙脑基二磷酸^[9]和芳樟醇; 还有倍半萜合酶——葎草烯合酶 (humulene synthase, AvHUS) 催化 FPP 生成倍半萜石竹烯和葎草烯, 以葎草烯为主产物^[10]。其中 AvBPPS 除了以龙脑基二磷酸为主产物, 还生成茨烯、柠檬烯和月桂烯, 而龙脑基二磷酸是阳春砂主要药效物质乙酸龙脑酯、樟脑和龙脑的直接或间接前体。因此 AvBPPS 是阳

春砂萜类药效物质合成途径的关键酶^[9]。AvLIS 和 AvHUS 的主产物芳樟醇和葎草烯是香料以及医药和食品工业的重要原料。

启动子 (promoter) 是位于基因上游的一段提供 RNA 聚合酶识别并结合的 DNA 序列^[11]。启动子通常有 G-box、GCN4-motif、TATA-box、CGTCA-motif 等顺式作用调控元件^[12-13], 其能够在种子中特异表达, 也能够响应激素如 MeJA 或脱落酸等, 因而在植物种子萌发、衰老、抗逆反应等生物过程基因表达调控中发挥着重要的作用。如刺五加 *Eleutherococcus senticosus* L. mevalonate diphosphate decarboxylase (MDD) 的 2 个茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 顺式作用调控元件可根据 MeJA 的浓度来调控其皂苷类化合物的含量^[14]。萜类合酶基因启动子的表达调控会影响植物萜类产物的合成, 克隆并分析药用植物次生代谢相关功能基因的启动子, 对深入了解药用植物的萜类合成机制有重要的意义。课题组已从阳春砂中克隆了 AvPS 的启动子, 并验证了其活性^[15]。本实验在前期研究的基础上, 克隆阳春砂的 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 的基因组 DNA (genomic DNA, gDNA), 进而克隆其启动子并分析其顺式作用调控元件, 以期了解其表达模式及其调控相应萜类合成的机制。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品栽培于广州中医药大学时珍山, 由广州中医药大学何国振教授鉴定为阳春砂 *A. villosum* Lour., 取其嫩叶保存至 -80 °C 冰箱。

1.2 试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型)、pLB 零背景快速克隆试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司; DH5 α 感受态细胞、PCR 酶 PrimerSTAR、LA Taq、DL2000 Maker、DNA 切胶回收试剂盒购于 Takara 公司; 引物合成和基因测序由北京擎科生物科技有限公司完成。

2 方法

2.1 阳春砂叶片 DNA 的提取

参照植物 gDNA 提取试剂盒的操作说明书, 提取阳春砂叶片基因组 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检测 DNA 完整性及浓度。

2.2 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS gDNA 序列扩增、分析及提交

以阳春砂叶片 gDNA 为模板, 使用 Primer STAR 高保真酶对 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 编码区的 gDNA 序列进行 PCR 扩增, 引物与从 cDNA 中克隆基因编码区的引物一致(表 1)。PCR 扩增条件: 98 ℃,

预变性 5 min; 98 ℃, 变性 10 s, 按相应退火温度退火 30 s, 72 ℃, 延伸 2.5 min, 30 个循环; 最后 72 ℃延伸 5 min。将 PCR 产物纯化后连接至 pLB 载体, 并转化至 *E. coli* DH5 α , 进行菌落 PCR 筛选阳性重组子并测序获得 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 的 gDNA 序列。利用 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)和 DNAMAN 软件, 将测序结果分别与已获得的 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 序列比对, 确定其 gDNA 序列后, 登录 GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit/>, 用 BankIt 提交 gDNA 序列。

表 1 扩增 gDNA 的引物

Table 1 Primers used for gDNA amplification

引物	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃
AvBPPS-F	ATGGCTACCCGTCAGTAACGTC	57.5
AvBPPS-R	CTAGATTGGATGGGTTTCGAGG	
AvHUS-F	ATGGAGAGGCCGTCGATCATAGCCC	
AvHUS-R	TTAAATAGGAAAAGGTTGAACCAATACGAG	58.0
AvLIS-F	ATGTCTGGCCTTCTTCTGCTC	
AvLIS-R	GATCAGCTTTACCCATCGACA	52.0

2.3 启动子克隆

根据 fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR) 引物设计原则和“2.2”项获得的 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS gDNA 序列, 在 5'端分别设计 3 条方向一致的特异性引物 (gene specific primers, GSP), 见表 2。FPNI-PCR 分为 3 轮扩增, 第 1 轮 PCR 取适量阳春砂叶片 gDNA, 用 9 条通用简并引物 FP1~9^[15]分别与 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 特异引物 GSP TPS3/TPS12/TPS6-1 进行热不对称 PCR; 第 2 轮 PCR 取第 1 轮 PCR 产物为模板, 巢式特异引物 FSP1 分别与 3 个基因的特异引物 GSP TPS3/TPS12/TPS6-2 进行普

通 PCR; 第 3 轮方法与第 2 轮类似, 以逐步分离目的 DNA 片段。将 3 轮 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 用第 3 轮 PCR 产物直接测序或连入 pLB 载体测序。利用 Clustal Omega 对测序结果与已获得的的目的基因 gDNA 序列分别比对, 确认 3'端与其 gDNA 序列的 5'端部分序列是否重叠。对于 AvBPPS, 在第 1 次 FPNI-PCR 获得部分启动子序列的基础上再设计 3 条特异引物 GSP TPS3-4~6 进行第 2 次 FPNI-PCR, 将获得的延长序列与第 1 次扩增的序列进行拼接后, 根据拼接序列 5'末端设计上游引物 TPS3-0F (表 2), 与 GSP TPS3-3 配对, 扩增完整更长的片段。

表 2 克隆启动子的特异性引物

Table 2 Primers used for promoters cloning

引物	引物序列 (5'→3')	用途
GSP TPS3-1	GAAGCCCTCTGATCTGGTCCTCACA	扩增 AvBPPS、AvHUS、AvLIS 的特异引物
GSP TPS3-2	CAGCTGCGAGCTCAGCCGCTCTAAA	
GSP TPS3-3	CGACGACGACCACTACACTCGATCG	
GSP TPS6-1	CGAGTTCACCCAACAAAGATTCAAGCTGAC	扩增 AvBPPS 启动子的延长片段
GSP TPS6-2	GACGAAAATCTTCCTTCATCATCTTTGAACCCG	
GSP TPS6-3	CATGTTGCCTGAGCAATCTAAACCGAAGAGAAAC	
GSP TPS12-1	GCATCTCGAATTTTCTCCTTGAGC	
GSP TPS12-2	CTTTGCTCTGAACGAAAGCTG	
GSP TPS12-3	GTCATTGCTCCATAAGTTGGGCTG	
GSP TPS3-4	GGACGTTACTTGACGGGTAGCCAT	扩增 AvBPPS 启动子的延长片段
GSP TPS3-5	GCGCGCGTATAAATAGAGAGAGC	
GSP TPS3-6	GGCTGAACAATTAATACAGACCTTC	
TPS3-0F	TGTGTAGTACCAAAACATATTTTCTATTTTCT	克隆 AvBPPS 启动子的

TPS3 对应 AvBPPS, TPS6 对应 AvHUS, TPS12 对应 AvLIS

TPS3 corresponds to AvBPPS, TPS6 corresponds to AvHUS, TPS12 corresponds to AvLIS

2.4 启动子的生物信息学分析

用 Neural Network Promoter Prediction([http:// www.fruitfly.org/seq-tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq-tools/promoter.html)) 预测转录起始位点,以预测值 0.5 为 cut-off 值进行转录起始位点预测;将扩增得到的启动子序列提交到启动子顺式作用调控元件预测网 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行分析,预测启动子潜在的顺式作用调控元件。

2.5 AvBPPS、AvPS、AvLIS 和 AvHUS 在阳春砂 2 个转录组中的表达量分析

从阳春砂果实转录组^[10]和 MeJA 诱导的转录组^[16]中提取 AvBPPS、AvPS、AvLIS 和 AvHUS

对应的 RPKM (reads per kb per million reads) 值表征其表达量。

3 结果与分析

3.1 gDNA 的克隆和分析

PCR 分别获得大于 2 kb 的 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 的 gDNA 片段(图 1),测序获得其序列长度分别为 2374、2295、2362 bp,均包含了对应基因完整的开放阅读框(open reading frame, ORF)(表 2)。向 GenBank 提交了 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 的 gDNA 序列,分别获得序列号 MG763230、MN829545、MN829547,同时得到各基因外显子(E1~7)的分布数据(表 3)。

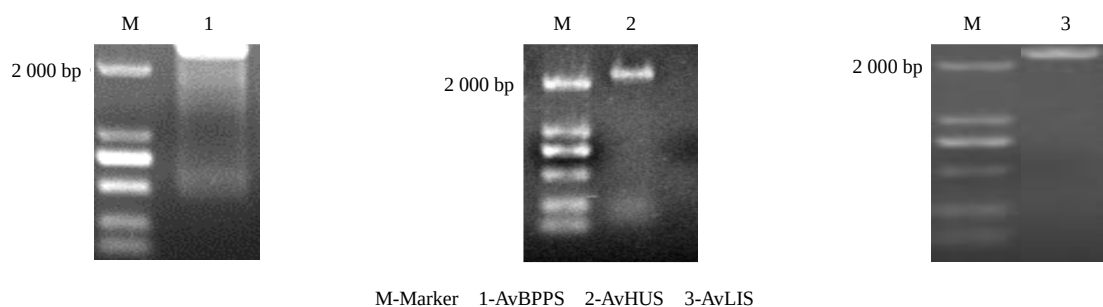


图 1 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS gDNA PCR 扩增片段

Fig. 1 gDNA PCR amplified fragments of AvBPPS, AvLIS and AvHUS

表 3 gDNA 外显子分布

Table 3 Exon distribution of gDNA

基因	长度/bp								
	gDNA	ORF	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
AvBPPS	2374	1791	1~234	320~593	685~1066	1205~1423	1511~1649	1731~1976	2078~2374
AvLIS	2295	1749	1~186	294~573	657~1038	1112~1330	1441~1579	1667~1912	1999~2295
AvHUS	2362	1671	1~135	239~491	592~970	1072~1290	1443~1578	1685~1933	2063~2362

对 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 的 gDNA 结构分析发现其均包含 7 个外显子和 6 个内含子(图 2),其中外显子 3(E3)的核苷酸序列最长。单萜合酶基因 AvBPPS(图 2-A)和 AvLIS(图 2-B)的结构相似,而倍半萜合酶基因 AvHUS(图 2-C)与它们的结构略有不同,其外显子 E1 的核苷酸序列比单萜合酶基因的 E1 序列短,因为倍半萜合酶中不存在质体转运肽。与植物萜类合酶催化功能密切相关的 4 个保守结构域(R, K) X₈W、RXR、DDXXD 和(N、D)D(L、I、V)X(S、T)XXXE 分别位于 E1、E4 以及 E6 和 E7,其中(N、D)D(L、I、V)X(S、T)XXXE 分布在 2 个外显子中(图 2)。

3.2 启动子克隆

用 FPNI-PCR 法克隆启动子,AvBPPS 在引物 FP2 第 3 轮 PCR 结果中出现特异性目的条带(图 3-A),测序结果表明该片段与 gDNA 5'端有 264 bp

重叠序列,初步确认获得其部分启动子序列。由于获得的净启动子片段较短,再次设计引物延长扩增后,在 FP3 第 3 轮 PCR 中出现特异性目的条带(图 3-B);测序结果表明该片段的 3'端与前述的启动子序列 5'端 153 bp 的序列一致,初步确认获得 AvBPPS 启动子的延长片段。将 2 次扩增获得的序列进行拼接,获得 795 bp 的序列,根据其 5'端设计上游引物与下游引物 GSP TPS3-3 配对(表 2),扩增获得约 800 bp 的长片段,并克隆到载体中测序(图 3-C);测序结果表明长片段与拼接序列的相似度为 99%。

AvLIS 和 AvHUS 分别在引物 FP3 和 FP2 第 3 轮 PCR 结果中出现特异性目的条带,测序结果表明 AvLIS 和 AvHUS 目的片段分别与其 gDNA 5'端有 156 bp 和 220 bp 的一致序列,初步确认获得了 AvHUS 和 AvLIS 的启动子序列(图 4)。

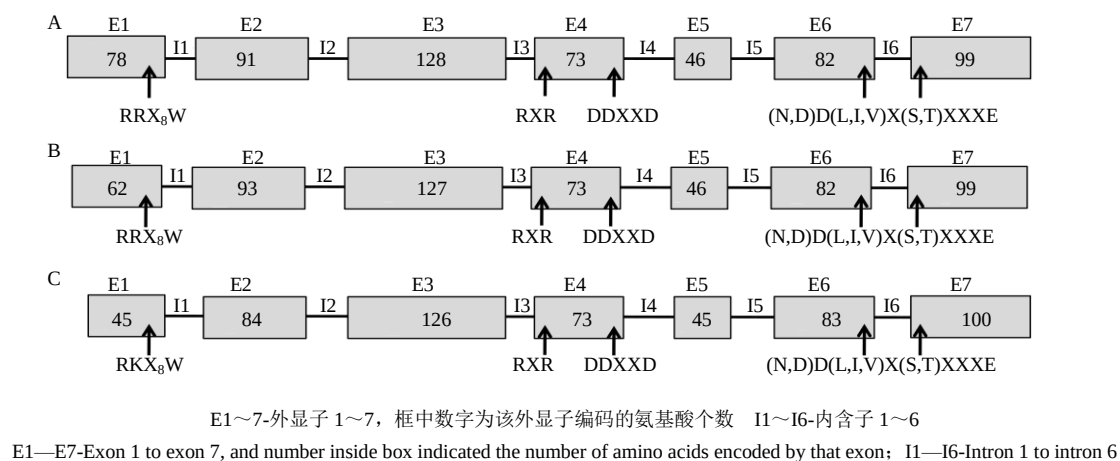
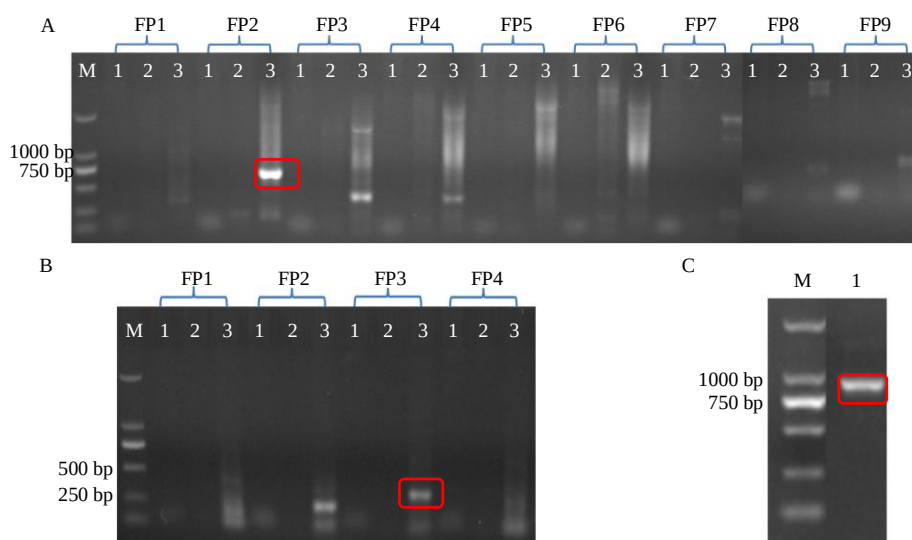


图 2 AvBPPS (A)、AvLIS (B) 和 AvHUS (C) 基因组结构示意图

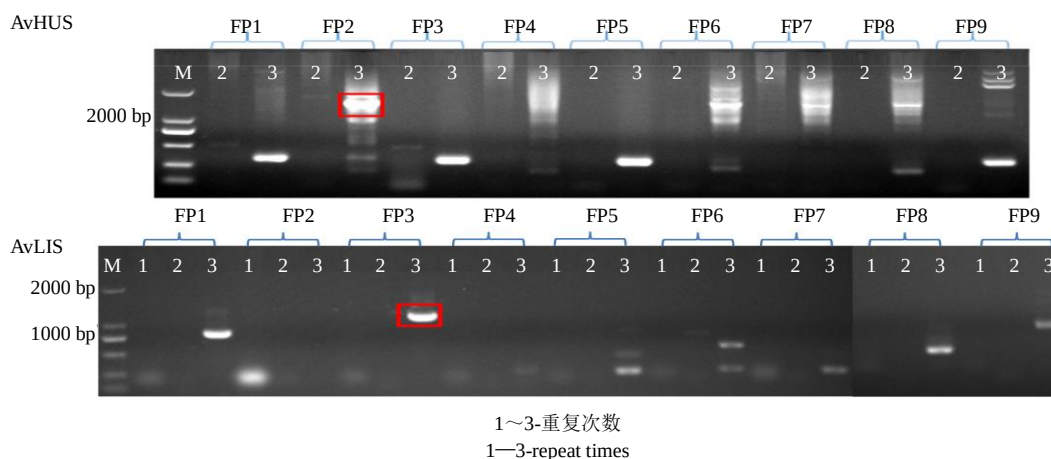
Fig. 2 Schematic diagram of genomic structure of AvBPPS(A), AvLIS (B) and AvHUS (C)



A-FPIN-PCR 扩增产物 B-FPIN-PCR 延长扩增片段 C-长片段 M-Marker
A-amplification of promoter using FPNI-PCR B-fragment of extend amplification using FPNI-PCR C-long fragment M-Marker

图 3 AvBPPS 启动子克隆

Fig. 3 Cloning of AvBPPS promoter



1~3-重复次数
1—3-repeat times

图 4 启动子 FPNI-PCR 扩增产物

Fig. 4 Amplification of promoter using FPNI-PCR

3.3 启动子的顺式作用调控元件及比较

AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 启动子序列的转录起始位点分别位于其起始密码子 ATG 上游 59、23、389 bp 处，截取转录起始位点上游序列，最终分别获得 470、934、762 bp 启动子序列。为了区分碱基的位置和正负链，从转录起始位点左边第 1 个碱基位置设为“-1”，依此类推。分别分析 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 启动子顺式作用调控元件的类型、数量及位置。AvBPPS(图 5-A)、AvLIS

(图 5-B) 和 AvHUS (图 5-C) 启动子均包含多个真核生物启动子保守元件，如 TATA-box 和 CAAT-box。AvBPPS 启动子中包含 GCN4-motif (TGAGTCA)——参与胚乳表达的顺式作用调控元件，还有 G-Box——与光响应的顺式作用调控元件，此外，还含有参与脱落酸反应、低温响应、MYB 结合位点等顺式作用调控元件。预测得分 (matrix score) 超过 5 分的元件见表 4。其中，GCN4-motif 是本研究最为关注的顺式作用调控元件。

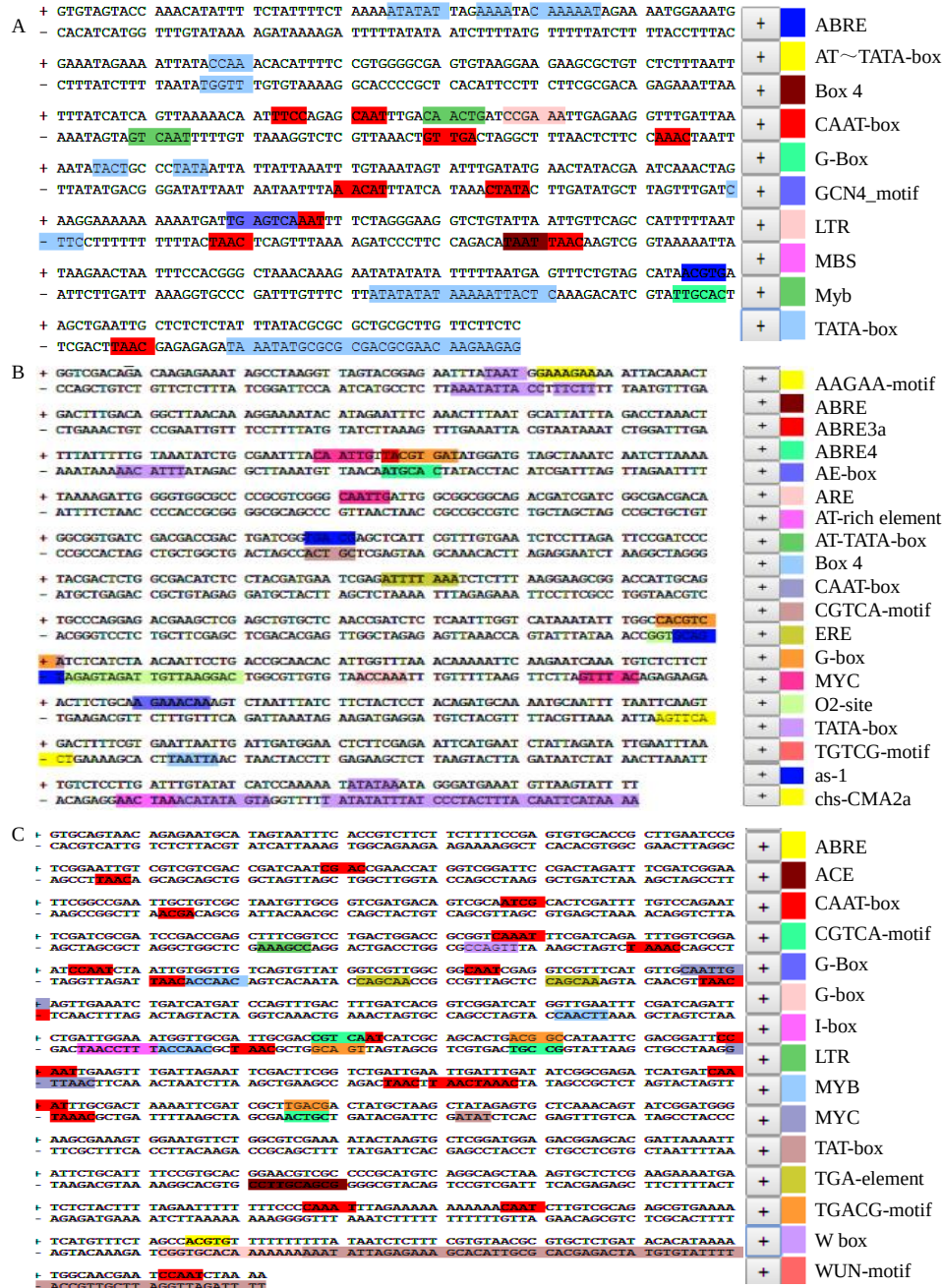


图 5 AvBPPS (A)、AvLIS (B) 和 AvHUS (C) 启动子序列及其顺式作用调控元件

Fig. 5 Sequences of AvBPPS (A), AvLIS (B) and AvHUS (C) promoters and their *cis*-regulatory elements

表 4 AvBPPS 启动子预测的顺式作用调控元件

Table 4 Predicted cis-acting regulatory element of AvBPPS promoter

元件名称	位置/bp	“+/-”链	得分	序列	功能
ABRE	-416	+	5	ACGTG	涉及脱落酸反应的顺式作用调控元件
AT~TATA-box	384	-	6	TATATA	
	386	-	6	TATATA	
Box 4	328	-	6	ATTAAT	涉及光响应性部分保守 DNA 模块
*CAAT-box	252	-	5	CAAAAT	启动子和增强子区域常见的顺式作用调控元件
	174	-	5	CAAAAT	
G-Box	415	-	6	CACGTT	参与光响应的顺式作用调控元件
GCN4-motif	-300	+	7	TGAGTCA	参与胚乳表达的顺式调控元件
LTR	-188	+	6	CCGAAA	参与低温响应的顺式作用调控元件
MBS	-180	+	6	CAACTG	参与干旱诱导的 MYB 结合位点
Myb	-180	+	6	CAACTG	
	150	-	6	TAACTG	核心启动子元件
*TATA-box	-35	+	6	ATATAT	
	440	-	7	TATAAAT	
	439	-	8	TATAAATA	

“+”链以转录起始位点左边第 1 个碱基的位置为-1; “-”当预测的 TATA-box 数目超过 3 个时, 仅展示得分最高的 3 个, 下表同

Position of first base at left of transcription initiation site was -1 in + chain; When number of predicted TATA-boxes exceeded three, only top three with highest matrix score were shown, same as below table

AvLIS 和 AvHUS 启动子顺式作用调控元件大体相似, 均含有涉及 MeJA 反应的顺式作用调控元件 CGTCA-motif/TGACG-motif; 还含有参与脱落酸反应的顺式作用调控元件 AAGAA-motif 和 ABRE 以及参与光响应的顺式调节元件 G-box。AvHUS 启动子中含有与代谢调节有关和厌氧诱导所必需的顺式调节元件; 而 AvLIS 启动子中含有参与低温响应和生长素反应的顺式作用调控元件, 还含有 MYB、MYC、I-box、W-box 等元件。W-box 可以与 WRKY 转录因子进行特异性结合从而调控目标基因的表达^[17]。启动子元件 AvLIS 和 AvHUS 预测得分超过 5 分的见表 5、6。

3.4 AvBPPS 在种子中特异表达及其对应萜类产物在种子中富集

课题组前期的研究比较了 AvBPPS 在阳春砂在多个组织部位的表达, 发现 AvBPPS 表现出种子特异表达的模式^[10]。本实验利用阳春砂的转录组数据^[10], 比较 4 个萜类合酶基因 AvBPPS、AvPS、AvLIS 和 AvHUS 的表达量, 发现它们在种子中均有表达, 但 AvBPPS 在种子中的表达量显著高于其他 3 个基因的表达量, 表现出在种子中特异表达的模式(图 6-A)。分析这 4 个酶对应的萜类产物含量, 其中 AvBPPS 的催化主产物 BPP 是阳春砂主要

药效成分乙酸龙脑酯、龙脑和樟脑的关键前体, AvBPPS 在种子中的高表达与其对应的萜类成分(包括直接产物与间接产物)在种子中的富集模式一致(图 6-B)。AvBPPS 在种子中的特异表达与其启动子含有的参与胚乳表达的元件 GCN4-motif 相符, 而其余 3 个基因的启动子均无 GCN4-motif, 与它们在种子中的低表达相符。

3.5 MeJA 处理后的 AvLIS、AvHUS 表达量及其对应萜类产物的分析

已克隆的 4 个萜类合酶基因 AvBPPS、AvPS、AvLIS 和 AvHUS 启动子中, 只有 AvLIS 和 AvHUS 含有 MeJA 调控的顺式作用调控元件, 其中 AvLIS 有 3 个此类元件, 而 AvHUS 有 2 个。根据本课题组之前对 MeJA 处理阳春砂的研究数据^[16], 分析 AvLIS 和 AvHUS 在 MeJA 诱导后其分别在果皮中的表达量与其对应的萜类产物含量, 发现 2 个基因均在低剂量(200 $\mu\text{mol/L}$)组表达量最低, 与溶剂对照组(CK)相比, AvLIS(图 7-A)在高剂量(600 $\mu\text{mol/L}$)组中表达量提高且其对应的萜类成分也相应提高, 表明 AvLIS 响应高浓度的 MeJA 诱导, 与其启动子含有 MeJA 调控的顺式作用调控元件相符; 而 AvHUS(图 7-B)在 2 个剂量组中的表达量均低于溶剂对照组, 其对应的萜类产物含量也变化不大, AvHUS 未表现出对 MeJA 的响应。

表 5 AvLIS 启动子预测的顺式作用调控元件

Table 5 Predicted cis-acting regulatory element of AvLIS promoter

元件名称	位置/bp	“+/-”链	得分	序列	功能
ABRE	-855	+	5	ACGTG	涉及脱落酸反应的顺式作用调控元件
	854	-	6	CACGTG	
	852	-	9	GACACGTGGC	
ACE	721	-	9	GCGACGTACC	参与光响应的顺式作用调控元件
*CAAT-box	-256	+	5	CAAAT	启动子和增强子区域常见的顺式作用调控元件
	270	-	5	CAAAT	
	534	-	5	CAAAT	
CGTCA-motif	-448	+	5	CGTCA	涉及 MeJA 反应的顺式作用调控元件
	585	-	5	CGTCA	
	466	-	5	CGTCA	
G-Box	854	-	6	CACGTG	参与光响应的顺式作用调控元件
	852	-	9	ACACGTGGC	
I-box	424	-	10	CCATATCCAAT	光响应元件
LTR	232	-	6	CCGAAA	参与低温响应的顺式作用调控元件
MYB	295	-	6	CAACCA	
	432	-	6	CAACCA	
	400	-	6	CAACCA	
MYC	-345	+	6	CAATTG	
	490	-	6	CAATTG	
*TATA-box	867	-	6	TATAAA	核心启动子元件
	866	-	7	TATAAAA	
	868	-	5	TATAA	
TGA-element	312	-	6	AACGAC	生长素反应元件
	331	-	6	AACGAC	
TGACG-motif	448	-	5	TGACG	涉及 MeJA 反应的顺式作用调控元件
	-585	+	5	TGACG	
	-466	+	5	TGACG	
W-box	253	-	6	TTGACC	
WUN-motif	21	-	9	AAATTACTA	
	22	-	8	AAATTACT	

4 讨论

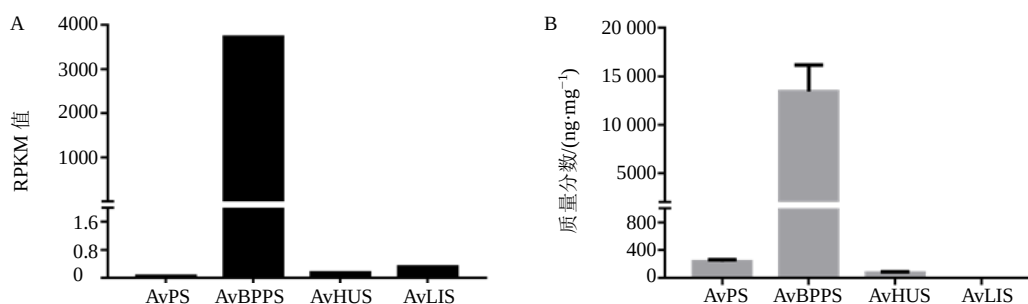
本实验通过 FPNI-PCR 获得了阳春砂 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 的启动子, 对其顺式作用调控元件的分析发现 3 个启动子均包含光响应元件 G-box, 这 3 个基因可能受光照的调控。文献报道 G-box 参与 UV-A 诱导, 拟南芥 COX5b-2 基因编码细胞色素 C 氧化酶 5b 亚基, 该基因受 UV-B 诱导表达, 其启动子中有一个保守的 G-box 元件, 突变此元件会使该基因丧失对 UV-B 诱导的响应^[18]。增强光照是否会提高 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 在

阳春砂果实中的表达, 进而增加其对应萜类化合物的积累量, 有待进一步研究。

课题组前期研究发现^[16], MeJA 处理阳春砂果实后, 大部分萜类的积累量明显上升, 如芳樟醇、蒾烯等, 说明 MeJA 能有效调控阳春砂中部分挥发性萜类成分的代谢^[16]。MeJA 处理阳春砂比较转录组显示, MeJA 诱导的代谢路径和次生代谢物生物合成路径中注释到的 Unigene 更多, 说明 MeJA 诱导促使较多的参与次生代谢的基因被激活^[16]。本实验发现 AvLIS 和 AvHUS 启动子含有涉及 MeJA

表 6 AvHUS 启动子预测的顺式作用调控元件
Table 6 Predicted *cis*-acting regulatory element of AvHUS promoter

元件名称	位置/bp	“+/-”链	得分	序列	功能
AAGAA-motif	-52	+	7	GAAAGAA	
ABRE	485	-	5	ACGTG	参与脱落酸反应的顺式作用调控元件
	-177	+	5	ACGTG	
ABRE3a	-176	+	6	TACGTG	
ABRE4	176	-	6	CACGTA	
AE-box	-570	+	8	AGAAACAA	光响应元件
ARE	523	-	6	AAACCA	厌氧诱导所必需的顺式作用调控元件
AT-rich element	708	-	10	ATAGAAATCAA	富含 AT-DNA 结合蛋白的结合位点
AT~TATA-box	731	-	6	TATATA	
Box 4	643	-	6	ATTAAT	涉及光响应性部分保守 DNA 模块
*CAAT-box	477	-	5	CAAAT	启动子和增强子区域常见的顺式作用调控元件
	246	-	5	CCAAT	
	520	-	5	CCAAT	
CGTCA-motif	308	-	5	CGTCA	涉及 MeJA 反应的顺式作用调控元件
	-487	+	5	CGTCA	
ERE	-386	+	8	ATTTTAAA	
G-box	-485	+	6	CACGTC	参与光响应的顺式作用调控元件
	-176	+	6	TACGTG	
MYC	547	-	6	CATTTG	
	-169	+	6	CATTTG	
	-241	+	6	CATTTG	
O ₂ -site	484	-	9	GATGATGTGG	与代谢调节有关的顺式作用调控元件
	489	-	8	GATGA(C/T)(A/G)TG(A/G)	
*TATA-box	710	-	9	TATATAAATC	核心启动子元件
	146	-	7	TACAAAA	
	42	-	7	TATAAAT	
TGACG-motif	487	-	5	TGACG	涉及 MeJA 反应的顺式作用调控元件
	-308	+	5	TGACG	
chs-CMA2a	625	-	8	TCACTTGA	光响应元件的一部分



萜类含量数据来源于文献报道^[10]; B 中 AvPS 对应的萜类产物为 α -蒎烯和 β -蒎烯, AvBPPS 对应的萜类产物包括直接产物柠檬烯和月桂烯及间接产物樟脑、龙脑和乙酸龙脑酯, AvHUS 对应的萜类产物包括律草烯和石竹烯, AvLIS 对应的萜类产物为芳樟醇

The terpene content data are from the literature^[10]; the terpene products corresponding to AvPS in B are α -pinene and β -pinene; the terpene products corresponding to AvBPPS include the direct products limonene and myrcene and the indirect product camphor, borneol and bornyl acetate; terpene products corresponding to AvHUS include humulene and caryophyllene; terpene products corresponding to AvLIS are linalool

图 6 萜类合酶在种子中的表达量 (A) 及其对应萜类产物含量 (B)

Fig. 6 Expression of terpene synthase in seeds (A) and total content of terpenoid products (B)

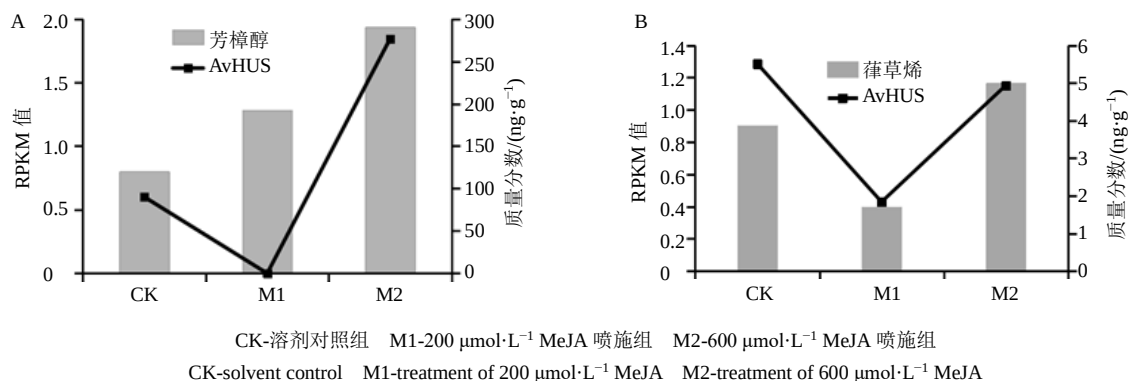


图7 AvLIS (A) 和 AvHUS (B) 在 MeJA 处理果皮中的表达量及其对应的萜类产物含量
Fig. 7 Expressions of AvLIS (A) and AvHUS (B) in MeJA treated pericarp and its corresponding terpenoids

调控的 CGTCA-motif/TGACG-motif 元件, AvLIS 响应 MeJA 的诱导且其对应萜类产物芳樟醇的含量也相应提高, 而 AvHUS 未表现出对 MeJA 的响应; 这 2 个基因启动子中涉及 MeJA 调控元件的数目不同, 有可能影响了其对 MeJA 响应的程度。

GCN4-motif 是胚乳特异性表达所必需的顺式作用调控元件之一, 存在于大多数种子储藏蛋白基因和一些代谢关键酶基因的启动子中^[19]。GCN4-motif 的功能在水稻中已经很明确, 该顺式作用调控元件不但指导谷蛋白基因在胚乳中的特异表达, 还对其启动子的活性具有正调控作用^[20-21]。如在水稻种子贮藏蛋白中各种谷蛋白 (glutelin) 的编码基因都含有 GCN4 基序, 当其发生突变时, 大部分启动子活性会丧失, 还会使谷蛋白基因在叶片中表达^[21]。水稻中的转录因子 OsSMF1 与 GCN4-motif 相互作用, 可以调节种子贮藏蛋白的合成, 是淀粉合成的关键调控因子^[22]。本实验发现 AvBPPS 启动子中含有 GCN4-motif, 荧光定量 PCR 和转录组数据分析的结果表明 AvBPPS 在种子中特异表达, 且其相应的萜类产物乙酸龙脑酯、樟脑、龙脑等在种子中富集。砂仁以干燥成熟的果实入药, 其果实的结构以种子团为主, 干燥后果皮的占比更小, 因此, 种子实际上是砂仁 (包括阳春砂仁) 的主要药用部位。AvBPPS 启动子中含有的参与胚乳表达的顺式作用调控元件 GCN4-motif 为 AvBPPS 的种子表达特异性提供了支撑, 也为进一步揭示阳春砂乙酸龙脑酯、樟脑、龙脑等药效成分在药用部位种子中富集的机制提供了重要线索。

本实验首次从药用植物阳春砂的启动子中发现了参与胚乳表达和 MeJA 反应的顺式作用调控元件, 为深入探究萜类合成关键酶的种子表达特异

性和对 MeJA 响应的机制提供了基础, 为萜类代谢的调控提供了操作元件。后续将通过转基因实验验证启动子的功能, 特别是探究 AvBPPS 启动子的种子表达特异性, 以期更深入地探讨启动子调控基因表达和萜类合成的机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lange B M, Rujan T, Martin W, *et al.* Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes [J]. *PNAS*, 2000, 97(24): 13172-13177.
- [2] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China [J]. *Science*, 1985, 228(4703): 1049-1055.
- [3] Misra A, Srivastava N K, Srivastava A K, *et al.* Influence of gibberellic acid and arbuscular mycorrhizae inoculation on carbon metabolism, growth, and diterpene accumulation in *Taxus wallichiana* Zuccarini var. mairei [J]. *J Biophysics Struc Biol*, 2010, 2(2): 22-27.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 253.
- [5] 胡玉兰, 张忠义, 林敬明. 中药砂仁的化学成分和药理活性研究进展 [J]. *中药材*, 2005, 28(1): 72-74.
- [6] 岳跃冲, 范燕萍. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(2): 379-388.
- [7] Abbas F, Ke Y, Yu R, *et al.* Functional characterization and expression analysis of two terpene synthases involved in floral scent formation in *Lilium* 'Siberia' [J]. *Planta*, 2019, 249(1): 71-93.
- [8] Zhang X, Niu M, Teixeira da S J A, *et al.* Identification and functional characterization of three new terpene synthase genes involved in chemical defense and abiotic stresses in *Santalum album* [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 115.
- [9] Wang H, Ma D, Yang J, *et al.* An integrative volatile

- terpenoid profiling and transcriptomics analysis for gene mining and functional characterization of AvBPPS and AvPS involved in the monoterpenoid biosynthesis in *Amomum villosum* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 846.
- [10] 李萌. 阳春砂单萜和倍半萜合酶的功能鉴定及 BPPS 的功能比较 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [11] 王镜岩. 生物化学 [M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 236.
- [12] Joshi C P. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(16): 6643-6653.
- [13] Müller M, Knudsen S. The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box [J]. *Plant J*, 1993, 4(2): 343-355.
- [14] 李志栋, 杨果, 尤鹏升, 等. 刺五加 MDD 基因启动子的克隆与生物信息学分析 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3871-3875.
- [15] 王虹, 李萌, 马东明, 等. 阳春砂萜类合酶 AvTPS1 启动子的克隆及其活性分析 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2181-2187.
- [16] 王焕, 杨锦芬, 邓可, 等. 茉莉酸甲酯影响阳春砂挥发性萜类代谢和基因转录 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(7): 1528-1536.
- [17] 谢政文, 王连军, 陈锦洋, 等. 植物 WRKY 转录因子及其生物学功能研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(3): 46-54.
- [18] Comelli R N, Gonzalez D H. Identification of regulatory elements involved in expression and induction by sucrose and UV-B light of the *Arabidopsis thaliana* COX5b-2 gene, encoding an isoform of cytochrome c oxidase subunit 5b [J]. *Physiol Plant*, 2009, 137(3): 213-224.
- [19] 周淑芬. 种子特异性启动子研究进展 [J]. 福建农业科技, 2012(10): 71-74.
- [20] Yoshihara T, Washida H, Takaiwa F. A 45-bp proximal region containing AACAA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of the rice storage protein glutelin gene, GluA-3 [J]. *FEBS Lett*, 1996, 383(3): 213-218.
- [21] Wu C Y, Washida H, Onodera Y, et al. Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACAA motifs in a rice glutelin gene promoter: Minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression [J]. *Plant J*, 2000, 23(3): 415-421.
- [22] Kim J S, Chae S, Jun K M, et al. Genome-wide identification of grain filling genes regulated by the OsSMF1 transcription factor in rice [J]. *Rice: NY*, 2017, 10(1): 16.

[责任编辑 时圣明]