

• 药材与资源 •

唇形科 8 种药用植物漆酶基因的发现与生物信息学分析

陈进芳¹, 陈祥慧¹, 李 卿^{2*}, 冯婧娴³, 周 正⁴, 张 磊⁴, 吴 宇^{4*}, 黄玉香⁵

1. 海南医学院第二附属医院药学部, 海南 海口 570311

2. 中国人民解放军海军军医大学附属上海长征医院药剂科, 上海 200003

3. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203

4. 中国人民解放军海军军医大学药学院, 上海 200433

5. 泉州医学高等专科学校药学院, 福建 泉州 362000

摘要: **目的** 分析漆酶在唇形科药用植物中的异同, 以为唇形科药用植物中漆酶的后续研究提供依据。 **方法** 通过生物信息学方法从唇形科 8 种药用植物的转录组数据库中发掘了 31 个完整漆酶基因并解析其特征, 包括序列的同源性、理化特征、信号肽、导肽、跨膜结构域、糖基化与磷酸化位点、二级结构和铜离子结构域等, 并对它们的进化关系以及表达模式进行了初步分析。 **结果** 唇形科药用植物漆酶基因均具有典型的漆酶结构特征, 相对分子质量在 62 000 左右, 多数含有分泌途径的信号肽, 无规则卷曲和延伸链是其二级结构的主要构成部分; 通过与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和丹参 *Salvia miltiorrhiza* 漆酶共同构建系统进化树, 能将其分为 7 个亚族。 **结论** 对唇形科药用植物漆酶基因的详细分析, 可为后续该酶基因的深入研究以及通过生物技术手段对唇形科药用植物药效物质进行代谢调控以及关键酶基因的定点突变提供参考信息。

关键词: 唇形科; 药用植物; 漆酶; 转录组; 生物信息学

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)16-4996-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.024

Discovery and bioinformatics analysis of laccases in eight medicinal plants of Labiatae

CHEN Jin-fang¹, CHEN Xiang-hui¹, LI Qing², FENG Jing-xian³, ZHOU Zheng⁴, ZHANG Lei⁴, WU Yu⁴, HUANG Yu-xiang⁵

1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, China

2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200003, China

3. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

4. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

5. School of Pharmacy, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China

Abstract: Objective To provide useful information for the further study of Labiatae laccases through sequence comparison among eight Labiatae medicinal plants. **Methods** Thirty-one full-length laccase genes were found from the transcriptome database of eight medicinal plants of Labiatae by bioinformatics method and their characteristics were analyzed, including sequence homology, physicochemical characteristics, signal peptides, target peptides, transmembrane helices, glycosylation and phosphorylation sites, secondary structure and Cu-oxidase domains. Their evolutionary relationships and expression patterns were also analyzed. **Results** The laccase genes of medicinal plants in Labiatae have typical laccase structures. Their molecular weight was about 62 000, and most of them contain signal peptides. Random coils and extended strands are the main components of the secondary structure of laccases.

收稿日期: 2021-02-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31770329); 国家自然科学基金资助项目(32070327); 国家重点研发计划资助项目(2019YFC1711100); 中国博士后科学基金资助项目(2019M661602); 泉州医学高等专科学校重点科技项目(XJK1601A)

作者简介: 陈进芳, 主管药师, 研究方向为医院药学和生物信息学分析。E-mail: chenjinfang8@163.com

*通信作者: 吴 宇, 助教, 主要从事药用植物功能基因发掘、表征和鉴定研究。E-mail: wuyuagnes@163.com

李 卿, 副主任药师, 主要从事药用植物代谢调控和生物信息学分析。E-mail: qli@smmu.edu.cn

The Labiatae laccases can be divided into seven subfamilies by constructing a phylogenetic tree with laccases of *Arabidopsis thaliana* and *Salvia miltiorrhiza*. **Conclusion** The detailed analysis of laccase genes in medicinal plants of Labiatae in this study will provide important information for further study of these genes as well as the regulation of the secondary metabolites of these medicinal plants through laccase mutation.

Key words: Labiatae; medicinal plants; laccase; transcription database; bioinformatics

漆酶是一种广泛存在于自然界(细菌、真菌、植物以及动物)中的含有多个铜离子的多酚氧化酶(EC1.10.3.2)^[1],最早由日本科学家 Yoshida 在漆树中发现,故而得名“漆酶”^[2]。它通过自由基催化反应机制以氧气作为电子受体直接氧化芳香族化合物或其介体,而后在介体的介导下氧化大分子木质素或者非酚型芳香族化合物,被广泛用于工业污水处理、纺织、造纸、食品、有机合成以及生物能源等领域^[3-4]。

漆酶在植物体内往往以基因家族形式存在^[5],目前在玉米 *Zea mays* Linn. 中发现了5个漆酶^[6],在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 中发现了17个漆酶^[7],在毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray 和欧洲云杉 *Picea abies* (L.) Karst. 中分别发现了49和112个漆酶^[8-9],在唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 中先后发现了29和65个漆酶^[10-11],这些漆酶功能各异,发挥着复杂作用,有些甚至发挥相反作用,这为我们研究漆酶功能及其作用机制带来了困难。

前期本课题组在研究丹参次生代谢产物过程中发现丹参漆酶与丹酚酸 B 生物合成密切相关^[10,12]。丹参是唇形科药用植物的代表,唇形科为一世界性分布的较大的科,有220余属3500余种,科内药用植物资源丰富^[13]。丹酚酸 B 为酚酸类物质,来源于苯丙氨酸代谢途径(phenylpropanoid pathway)。苯丙氨酸代谢途径的部分代谢产物,如黄酮、酚酸和木脂素等,是众多药用植物的药效物质,如黄芩中的黄芩苷,夏枯草、紫苏和鼠尾草属植物中的迷迭香酸等。为了给唇形科其他药用植物的漆酶研究提供依据,本研究借助薄荷基因组进化联盟(mint evolutionary genomics consortium)公布的转录组信息^[14],对唇形科常用药用植物的漆酶基因进行了挖掘、鉴定和详细的生物信息学分析,包括序列特征、信号肽、导肽、跨膜结构域、二级结构和铜离子结构域等,并对它们的进化关系以及表达模式进行了初步分析,以期对唇形科药用植物中漆酶的后续研究指明方向。

1 材料

根据薄荷基因组进化联盟的工作成果^[14],从

Dryad Digital Repository 数据库(<https://doi.org/10.5061/dryad.tj1p3>)中下载黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi、夏枯草 *Prunella vulgaris* L.、荆芥 *Nepeta cataria* L.、紫苏 *Perilla frutescens* L.、留兰香 *Mentha spicata* L.、广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.、西班牙鼠尾草 *Salvia hispanica* Vahl、撒尔维亚 *Salvia officinalis* L. 8种唇形科药用植物的转录组数据及其注释结果,每种植物的基本概况和转录组数据信息如表1所示。

2 方法

2.1 漆酶基因的获取

以漆酶英文名称“laccase”和其保守结构域——铜离子结构域名称“Cu-oxidase”为关键词,在8种药用植物的转录组注释结果中分别搜索相关基因,将获得的基因通过 blastx 比对方法,在美国国立生物技术信息中心(national center of biotechnology information, NCBI)公共数据库中进行同源序列比对,根据比对结果,筛除非漆酶基因和片段基因。筛选后的基因通过 Vector NTI 11 软件取其开放阅读框(open reading frame, ORF),利用 MEGA5 软件将其翻译成氨基酸序列后,再次通过 blastp 比对方法在 NCBI 数据库中进行候选漆酶基因的同源比对,确认其是否具有完整的漆酶功能域。

2.2 漆酶的生物信息学分析

筛选得到的漆酶氨基酸序列通过 ProtParam 在线工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)进行理化特性预测分析,包括漆酶的氨基酸数量、蛋白质相对分子质量、等电点、蛋白质不稳定性系数等;漆酶的信号肽预测在 SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)上完成;用 TargetP-2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)进行漆酶的导肽预测;用 SoftBerry 中的 ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/>)对漆酶进行亚细胞定位预测;跨膜结构域的预测分析通过 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)完成;蛋白糖基化位点预测在 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)和 YinOYang 1.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>)完成。

表1 8种唇形科药用植物的基本信息和转录组数据

Table 1 Information and transcriptome assembly statistics of eight medicinal plants of Labiatae

物种	属	药用部位	功效	碱基总数/ bp	重叠群 数目	最大长 度/bp	平均长 度/bp	中间长 度/bp	N50/bp	GC/%
黄芩	黄芩属	干燥根	清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎 ^[15]	42 426 408	47 546	13 895	892	519	1458	41
紫苏	紫苏属	干燥成熟果实、干燥叶（或带嫩枝）和干燥茎	紫苏子降气化痰、止咳平喘、润肠通便；紫苏叶解表散寒、行气和胃；紫苏梗理气宽中、止痛、安胎 ^[15]	48 124 310	56 682	15 760	849	503	1355	42
广藿香	刺蕊草属	干燥地上部分	芳香化浊、和中止呕、发表解暑 ^[15]	48 370 261	63 803	11 361	758	470	1113	42
夏枯草	夏枯草属	干燥果穗	清肝泻火、明目、散结消肿 ^[15]	67 224 261	81 302	9623	827	511	1254	44
荆芥*	荆芥属	全草	在欧洲各地民间用于防治胃病、贫血以及其它多种疾病，在我国用于防治感冒 ^[13]	40 334 985	47 098	12 242	856	522	1337	42
留兰香	薄荷属	叶、嫩枝或全草	用于感冒发热、咳嗽、头痛、咽痛、胃肠胀气、跌打瘀痛、目赤辣痛、鼻衄及小儿疮疖等 ^[13]	45 228 147	55 713	15 382	812	482	1273	43
撒尔维亚	鼠尾草属	挥发油	叶的浸液能治疗咽喉炎 ^[13]	45 479 726	50 293	15 793	904	534	1463	44
西班牙鼠尾草	鼠尾草属	全草	可以做蔬菜食用，入药具有防腐、抗菌和消炎的作用 ^[16]	42 765 964	48 634	12 266	879	513	1427	44
尾草										

*此品非《中国药典》记载的荆芥正品，《中国药典》记载的荆芥实为裂叶荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq., 其干燥地上部分和干燥花穗分别以荆芥和荆芥穗入药^[15]

*This is *Nepeta cataria* L. and it is not the Chinese medicine recorded in Chinese pharmacopoeia. In *Chinese Pharmacopoeia*, it is *Schizonepeta tenuifolia* Briq. with its aerial part used as schizonepetae herba and the dried flower spikes used as schizonepetae spica^[15]

cbs.dtu.dk/services/YinOYang/)上进行；磷酸化位点预测用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)完成。利用蛋白质二级结构预测工具 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)在线完成漆酶蛋白的二级结构预测分析，包括 α -螺旋、 β -折叠、无规则卷曲和延伸链等。

2.3 漆酶的结构域序列分析

通过 Pfam 33.1 (<http://pfam.xfam.org/>)寻找漆酶的3个铜离子结构域，利用 MEGA5 软件的 ClustalW 程序对3个铜离子结构域分别进行多序列比对，并用 WEBLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)对漆酶铜离子结构域的氨基酸组成进行可视化分析，所有参数选择默认设置。

2.4 漆酶的系统进化树构建

从 TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <https://www.arabidopsis.org/>)数据库中下载拟南芥漆酶家族成员共17条氨基酸序列作为参考序列，同时从已报导的丹参文献的 Supplementary Text 1 中获得丹参漆酶序列^[10]，利用 MEGA5 软件中的 ClustalW 程序对所有漆酶氨基酸序列进行多重序列比对，并用邻位连接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树，用自举 (Bootstrap) 方法检验进化树的拓扑结构，重复抽样次数设为1000，将大于50%的 Bootstrap 值显示在进化树上。结合拟南芥漆酶的分类^[7]，对唇形科药用植物漆酶进行分类。

2.5 漆酶基因表达量的热图绘制

薄荷基因组进化联盟对测序的物种进行了表达量统计，利用 R 语言，将漆酶基因对应的表达量从相应物种的表达量数据库中提取出来，用 MeV (Multi Experiment Viewer) 软件进行热图绘制。

3 结果与分析

3.1 唇形科药用植物漆酶基因的确认

薄荷基因组进化联盟对唇形科多种植物进行了转录组测序，并对组装后的基因序列进行了注释，注释依据为拟南芥、SwissProt 和 Pfam 数据库。通过“laccase”和漆酶保守结构域“Cu-oxidase”2个关键词，分别在黄芩、紫苏、广藿香、夏枯草、荆芥、留兰香、撒尔维亚和西班牙鼠尾草这8种药用植物的转录组中找到了42、50、58、81、40、64、53和50个漆酶相关注释结果。这些漆酶相关基因与 NCBI 数据库的同源比对结果显示，黄芩、紫苏、广藿香、夏枯草、荆芥、留兰香、撒尔维亚和西班牙鼠尾草中分别只有2、3、5、2、4、4、6和5条完整漆酶基因，其他基因均为漆酶片段基因或非漆酶基因。漆酶全长基因翻译成氨基酸后，与 NCBI 数据库的同源比对结果如表2所示。结果显示，这些漆酶与芝麻 *Sesamum indicum* L. 或丹参的漆酶同源，其中与芝麻漆酶同源的有19个，黄芩和广藿香的漆酶仅与芝麻漆酶同源。与丹参漆酶同源的漆酶蛋白有16个，这些漆酶中，与丹参漆酶相似度最高的是撒尔维亚漆酶 (SoLAC3)，相似度达91.63%。

表2 唇形科8种药用植物漆酶与同源蛋白的相似性比较

Table 2 Homologous comparison of laccases in eight medicinal plants of Labiatae

物种	序列编号	命名	同源基因			
			名称	来源	相似性/%	NCBI 登录号
黄芩	SCBA_c34991_g1_i1	SbLAC1	laccase-11	<i>S. indicum</i>	86.76	XP_011088411.1
	SCBA_c38519_g1_i2	SbLAC2	laccase-15-like	<i>S. indicum</i>	75.05	XP_011074134.2
夏枯草	PRVU_c22335_g1_i1	PvLAC1	laccase 33	<i>S. miltiorrhiza</i>	76.05	QCZ35200.1
	PRVU_c36259_g1_i1	PvLAC2	laccase-11	<i>S. indicum</i>	83.93	XP_011088411.1
荆芥	NECA_c28200_g1_i1	NcLAC1	laccase 12	<i>S. miltiorrhiza</i>	91.38	QCZ35179.1
	NECA_c34554_g1_i1	NcLAC2	laccase-11	<i>S. indicum</i>	82.91	XP_011088411.1
	NECA_c34853_g1_i1	NcLAC3	laccase-17	<i>S. indicum</i>	81.69	XP_011089492.1
	NECA_c37729_g2_i1	NcLAC4	laccase 33	<i>S. miltiorrhiza</i>	80.84	QCZ35200.1
紫苏	PEFR_c41241_g1_i1	PfLAC1	laccase-11	<i>S. indicum</i>	86.20	XP_011088411.1
	PEFR_c48465_g1_i1	PfLAC2	laccase 43	<i>S. miltiorrhiza</i>	85.74	QCZ35210.1
	PEFR_c48259_g1_i2	PfLAC3	laccase-11	<i>S. indicum</i>	87.84	XP_011088411.1
留兰香	MESP_c29064_g1_i3	MsLAC1	laccase 33	<i>S. miltiorrhiza</i>	81.88	QCZ35200.1
	MESP_c35889_g1_i1	MsLAC2	laccase 49	<i>S. miltiorrhiza</i>	66.90	QCZ35216.1
	MESP_c45191_g1_i1	MsLAC3	laccase-17	<i>S. indicum</i>	85.50	XP_011077639.1
	MESP_c45424_g5_i1	MsLAC4	laccase 49	<i>S. miltiorrhiza</i>	64.86	QCZ35216.1
广藿香	POCA_c41418_g1_i1	PcLAC1	laccase-11	<i>S. indicum</i>	86.69	XP_011088411.1
	POCA_c41847_g1_i1	PcLAC2	laccase-17	<i>S. indicum</i>	85.69	XP_011077639.1
	POCA_c44236_g1_i3	PcLAC3	laccase-4	<i>S. indicum</i>	86.71	XP_011077581.1
	POCA_c44536_g1_i1	PcLAC4	laccase-15-like	<i>S. indicum</i>	72.71	XP_011074134.2
	POCA_c38521_g1_i1	PcLAC5	laccase-15-like	<i>S. indicum</i>	80.74	XP_011074134.2
西班牙鼠尾草	SAHI_c28750_g5_i8	ShLAC1	laccase 33	<i>S. miltiorrhiza</i>	82.54	QCZ35200.1
	SAHI_c30143_g1_i1	ShLAC2	laccase 43	<i>S. miltiorrhiza</i>	87.99	QCZ35210.1
	SAHI_c21258_g1_i1	ShLAC3	laccase-17	<i>S. indicum</i>	84.01	XP_011077639.1
	SAHI_c30614_g1_i1	ShLAC4	laccase 13	<i>S. miltiorrhiza</i>	68.59	QCZ35180.1
	SAHI_c28162_g1_i1	ShLAC5	laccase-11	<i>S. indicum</i>	86.38	XP_011088411.1
撒尔维亚	SAOF_c18618_g1_i1	SoLAC1	laccase 33	<i>S. miltiorrhiza</i>	83.77	QCZ35200.1
	SAOF_c25233_g1_i2	SoLAC2	laccase-11	<i>S. indicum</i>	83.81	XP_011088411.1
	SAOF_c33810_g1_i1	SoLAC3	laccase 43	<i>S. miltiorrhiza</i>	91.63	QCZ35210.1
	SAOF_c28870_g1_i1	SoLAC4	laccase-11	<i>S. indicum</i>	84.62	XP_011088411.1
	SAOF_c30697_g1_i1	SoLAC5	laccase-17	<i>S. indicum</i>	78.58	XP_011089492.1
	SAOF_c36352_g2_i3	SoLAC6	laccase 21	<i>S. miltiorrhiza</i>	68.84	QCZ35188.1

3.2 唇形科药用植物漆酶蛋白的理化特性分析

将获得的31个完整漆酶蛋白通过ProtParam在线工具进行理化特性分析,包括氨基酸残基数量、蛋白质相对分子质量、理论等电点(PI)、不稳定系数和总平均亲水性等内容,结果如表3所示。

从表3中可以看出,漆酶的氨基酸残基数量在513~590个氨基酸范围内,与同科植物丹参漆酶的长度相似^[10]。其中氨基酸数量最多的是留兰香漆酶MsLAC4,包含590个氨基酸;西班牙鼠尾草漆酶ShLAC5的氨基酸数量最少,为513个。漆酶蛋白的相对分子质量在62 000左右,相对分子质量大小与氨基酸个数对应,最大的是留兰香漆酶MsLAC4,为66 580;最小的是西班牙鼠尾草漆酶ShLAC5,为57 060。文献记载,菘蓝漆酶为碱性蛋白,PI均在8.0以上^[17]。本研究中,漆酶蛋白的PI居于5.89~

9.33,其中11个漆酶的PI在7.0以下,20个漆酶的pI在7.0以上,表明唇形科植物漆酶中既有酸性蛋白,也有碱性蛋白,但以碱性蛋白居多,这与丹参漆酶类似,在丹参漆酶中,也是碱性蛋白居多^[10]。在参与分析的31个完整漆酶蛋白中,只有5个的不稳定系数在40以上,其它均小于40。蛋白的稳定性由不稳定系数来衡量,若不稳定系数大于40则该蛋白结构不稳定。此结果表明绝大多数参与分析的唇形科漆酶蛋白稳定性较好,MsLAC2、SbLAC2、SoLAC6、PcLAC5和ShLAC4的稳定性稍差。总平均亲水性系数(grand average of hydropathicity, GRAVY)用于衡量目的蛋白的总体平均亲水性,除了PfLAC2和NcLAC1,其余漆酶蛋白的GRAVY值均小于0,表明参与分析的绝大多数漆酶蛋白为亲水性蛋白。

表3 唇形科8种药用植物漆酶蛋白的理化特性分析

Table 3 Composition and physicochemical character analysis of laccases in eight medicinal plants of Labiatae

名称	氨基酸数量	相对分子质量	PI	不稳定系数	总平均亲水性	糖基化位点		磷酸化位点			信号肽		跨膜结构域
						N-glyc	O-glyc	丝氨酸	苏氨酸	酪氨酸	长度	分裂位点	
SbLAC1	563	62 540	8.06	35.25	-0.169	11	9	13	19	5	27	SEA-AV	是
SbLAC2	564	63 330	6.78	41.73	-0.203	13	10	22	13	10	23	ALA-RT	是
PvLAC1	566	62 750	6.30	34.65	-0.119	14	13	16	20	12	26	SHA-TT	是
PvLAC2	564	62 810	8.25	37.39	-0.111	10	5	9	17	7	28	VEA-VV	是
NcLAC1	557	60 550	9.30	33.13	0.001	8	16	18	20	4	21	VHG-VV	是
NcLAC2	559	62 480	8.24	36.14	-0.175	9	11	16	18	6	24	VEA-EV	是
NcLAC3	573	62 720	9.27	28.79	-0.050	14	12	17	24	6	25	VTG-RT	否
NcLAC4	565	62 960	6.03	33.77	-0.175	13	12	17	22	7	25	THA-TT	否
PfLAC1	559	62 360	7.32	38.38	-0.167	10	13	17	18	6	24	VEA-AV	是
PfLAC2	561	61 380	9.25	32.18	0.009	10	16	12	26	3	25	VQC-RV	否
PfLAC3	563	62 540	7.32	35.20	-0.116	11	6	11	16	7	27	ARA-AV	否
MsLAC1	562	62 540	5.89	34.02	-0.151	14	12	21	23	9	22	THA-TT	否
MsLAC2	585	65 820	6.02	40.73	-0.220	7	10	18	17	8	23	VHA-KV	否
MsLAC3	543	59 840	9.21	30.89	-0.050	15	11	13	22	7			否
MsLAC4	590	66 580	6.31	35.28	-0.224	5	8	16	22	7	26	VHA-LV	是
PcLAC1	560	62 630	8.28	37.21	-0.175	10	6	16	15	6	24	AEA-EV	否
PcLAC2	575	63 860	9.28	34.77	-0.145	14	11	16	22	5	28	AQA-ET	是
PcLAC3	557	60 910	9.00	33.38	-0.041	10	10	16	22	4	21	VES-RV	否
PcLAC4	562	63 010	6.65	34.88	-0.234	11	9	16	12	3	22	SHS-LV	是
PcLAC5	566	63 990	8.04	44.34	-0.217	9	9	22	14	9	26	GYA-LV	是
ShLAC1	560	62 530	6.16	36.41	-0.228	11	14	19	18	13	2	SHA-KT	否
ShLAC2	558	61 170	9.25	30.84	-0.029	9	12	11	27	5	22	VES-RV	否
ShLAC3	573	62 940	9.33	35.71	-0.029	16	9	14	21	5	28	VEA-AT	否
ShLAC4	577	65 730	6.47	46.80	-0.196	7	5	21	16	8	26	VQA-LV	是
ShLAC5	513	57 060	7.26	36.02	-0.180	9	12	15	19	5			否
SoLAC1	565	63 090	6.08	37.65	-0.245	14	21	21	24	12	26	THA-KT	否
SoLAC2	559	62 390	8.01	33.71	-0.169	11	8	14	20	7	24	VEA-AV	是
SoLAC3	526	57 170	9.12	28.81	-0.073	8	15	10	31	4			否
SoLAC4	563	62 750	8.58	35.46	-0.161	11	8	9	19	5	27	AKA-AV	是
SoLAC5	573	62 620	9.29	31.30	-0.058	16	15	23	20	7	24	VEG-RT	否
SoLAC6	565	63 390	6.12	42.13	-0.174	4	14	22	20	9	21	VDA-AV	否

3.3 唇形科药用植物漆酶蛋白的糖基化和磷酸化位点分析

蛋白质糖基化和磷酸化都是对蛋白质的重要修饰作用,能调节蛋白质的功能,是蛋白质翻译后修饰的研究热点。真核生物的蛋白磷酸化位点主要发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基侧链的羟基上,不同的蛋白激酶可识别和修饰不同蛋白质的不同位点。本实验对唇形科8种药用植物的31个漆酶蛋白进行了糖基化和磷酸化潜在位点分析,结果如表3所示。参与分析的所有漆酶均含有潜在的糖基化和磷酸化位点。在糖基化位点分析中发现,SoLAC6的N-糖基化(N-glyc)位点最少,仅为4个;SoLAC5

和ShLAC3的糖基化位点最多,各有16个。O-糖基化(O-glyc)位点最少的是PvLAC2和ShLAC4,各为5个;SoLAC1的O-糖基化位点最多,有21个。在磷酸化位点分析中,酪氨酸位点个数明显少于丝氨酸和苏氨酸位点。SoLAC1蛋白的潜在磷酸化位点最多,达57个;PcLAC4蛋白的潜在磷酸化位点最少,为31个。

3.4 唇形科药用植物漆酶蛋白的信号肽、导肽和跨膜结构域的预测分析

信号肽是蛋白质N-末端一段编码长度为5~30个氨基酸的疏水性氨基酸序列,用于引导新合成蛋白质向通路转移的短肽链。漆酶信号肽预测结果显

示(表3),除了MsLAC3、ShLAC5和SoLAC3,其它漆酶都具有信号肽,信号肽长度和分裂位点如表3所示。为了验证这一预测结果,本研究又用导肽(导向序列)分析软件对漆酶进行了导肽分析,结果与信号肽预测结果一致,除了上述3个漆酶,其余漆酶的导肽均为分泌途径的信号肽,且预测长度与信号肽预测结果一致。亚细胞定位预测结果显示,所有漆酶都为分泌途径的蛋白。

利用在线工具TMHMM Server v. 2.0对所有漆酶进行跨膜结构分析,结果显示(表3),17个漆酶没有跨膜结构域,整条肽链都位于细胞膜之外;余下的14个漆酶分别具有1个跨膜结构域。

MsLAC3、ShLAC5和SoLAC3既没有信号肽,也没有跨膜结构域。

3.5 唇形科药用植物漆酶蛋白的二级结构预测分析

通过蛋白质二级结构预测工具SOPMA对唇形科31个漆酶蛋白的 α -螺旋、 β -折叠、延伸链和无规则卷曲等进行在线分析。如表4所示,唇形科漆酶蛋白家族成员中均存在 α -螺旋、 β -折叠、延伸链和无规则卷曲等蛋白质二级结构重要结构组件,但各结构组件所占比例明显不同。从表4可以看出,无规则卷曲是唇形科漆酶蛋白的主要二级结构,各漆酶蛋白的无规则卷曲比例均在47%以上,其次分别为延伸链和 α -螺旋, β -折叠所占比例最小,均在9%以下。

表4 唇形科8种药用植物漆酶蛋白的二级结构主要构成组件比例

Table 4 Proportion of main components in the secondary structure of laccases in eight medicinal plants of Labiatae

名称	α -螺旋/%	β -折叠/%	延伸链/%	无规则卷曲/%	名称	α -螺旋/%	β -折叠/%	延伸链/%	无规则卷曲/%
SbLAC1	15.28	6.75	28.95	49.02	PcLAC2	13.57	6.43	28.35	51.65
SbLAC2	15.60	6.74	29.08	48.58	PcLAC3	15.44	6.64	28.01	49.91
PvLAC1	15.90	6.71	28.62	48.76	PcLAC4	16.90	6.58	27.22	49.29
PvLAC2	15.07	6.38	26.42	52.13	PcLAC5	16.78	6.54	28.45	48.23
NcLAC1	15.08	6.64	28.90	49.37	ShLAC1	15.89	7.50	28.57	48.04
NcLAC2	15.38	6.26	28.80	49.55	ShLAC2	14.70	6.81	28.14	50.36
NcLAC3	12.39	6.63	28.80	52.18	ShLAC3	13.79	6.11	27.23	52.88
NcLAC4	16.28	7.61	28.50	47.61	ShLAC4	15.42	6.93	28.08	49.57
PfLAC1	15.92	6.08	27.73	50.27	ShLAC5	11.50	7.02	28.65	52.83
PfLAC2	15.86	6.60	28.52	49.02	SoLAC1	17.17	6.55	28.85	47.43
PfLAC3	17.05	6.57	27.00	49.38	SoLAC2	14.13	8.23	28.98	48.66
MsLAC1	15.84	6.58	29.36	48.22	SoLAC3	11.98	8.17	28.14	51.71
MsLAC2	15.90	6.15	28.03	49.91	SoLAC4	16.70	6.93	28.06	48.31
MsLAC3	11.97	6.26	29.47	52.30	SoLAC5	14.49	7.68	28.62	49.21
MsLAC4	17.12	5.76	26.95	50.17	SoLAC6	14.87	7.26	28.14	49.73
PcLAC1	15.54	6.43	27.32	50.71					

3.6 唇形科药用植物漆酶蛋白的铜离子结构域分析

漆酶是一种糖基化的多铜氧化酶,含有3个重要的铜离子结构域,一般具有3个铜离子结合位点(T1、T2和T3),能结合4个铜离子。通过Pfam 33.1网络工具确定了漆酶3个铜离子结构域的位置和长度,它们在漆酶中以Cu-oxidase_3→Cu-

oxidase→Cu-oxidase_2 domain的顺序连接,Cu-oxidase_3、Cu-oxidase和Cu-oxidase_2 domain的平均长度分别为116、152和138个氨基酸。将3个铜离子结构域分别进行多重序列比对后,用WEBLOGO在线工具对漆酶铜离子结构域的氨基酸组成进行可视化分析(图1)。总高度表示此位置

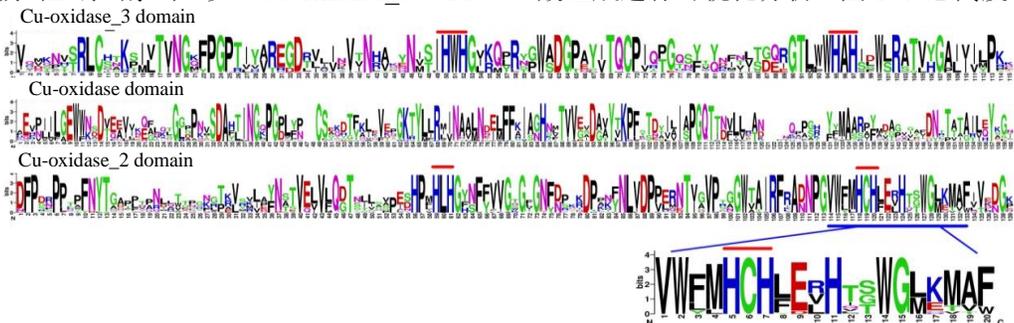


图1 唇形科8种药用植物漆酶的铜离子结构域

Fig. 1 Sequence logo of Cu-oxidase domains of the laccase proteins in eight medicinal plants of Labiatae

上的序列保守性，单个氨基酸代表出现的频率，HWH、HAH、HLH 和 HCH 是 4 个铜离子结合位点，蓝色下划线放大部分具有典型的蓝铜谱带，为漆酶显蓝色的重要结构位点。

3.7 唇形科药用植物漆酶的进化分析

为了检验本研究中 8 种唇形科药用植物的漆酶与同科植物丹参以及模式植物拟南芥漆酶的系统进化关系，利用 MEGA5 软件对这 10 种植物 77 个漆酶蛋白构建了系统进化树（图 2），并根据拟南芥漆酶的分类对唇形科漆酶进行分类^[7]。结果显示，此进化树能分成 7 个组别。第 I 组包括 8 个唇形科漆酶（3 个丹参漆酶）和 2 个拟南芥漆酶（AtLAC2 和 AtLAC17），AtLAC2 在盐胁迫下能大幅提高转录水平，并改变根的伸长以适应环境^[18]，提示第 I 组中的唇形科漆酶可能与植物的抗逆机制有关，很可能在盐胁迫下改变表达水平。第 II 组包括 17 个唇形科漆酶（3 个丹参漆酶）和 4 个拟南芥漆酶（AtLAC4、AtLAC10、AtLAC11 和 AtLAC16）。AtLAC4、AtLAC11 和 AtLAC17 与木质素的合成密切相关^[19-20]，基于该进化树结果，初步判断唇形科第 I 和 II 组漆酶成员具

有类似功能。第 III 组由 4 个丹参漆酶和 4 个拟南芥漆酶（AtLAC3、AtLAC5、AtLAC12 和 AtLAC13）组成。AtLAC5、AtLAC12 和 AtLAC13 能响应脱落酸（abscisic acid, ABA）信号^[7]，提示第 III 组中的这 4 个丹参漆酶可能对 ABA 信号也有响应。第 IV 组包括 28 个唇形科漆酶（16 个丹参漆酶）和 2 个拟南芥漆酶基因（AtLAC14 和 AtLAC15），AtLAC14 可能与低温、干旱、洪涝和盐胁迫有关^[7]，提示该组成员可能参与逆境生长。另外，该组中的 SmLAC20 与丹酚酸 B 合成相关^[10]，与 SmLAC20 距离最近的 SoLAC1 可能参与撒尔维亚的酚酸类成分合成。第 V 组包括 2 个丹参漆酶和 3 个拟南芥漆酶（AtLAC7、AtLAC8 和 AtLAC9），据报道称^[18]，敲除 AtLAC8 后，拟南芥花期提前，但是花枝的叶片减少，提示该组成员可能参与植物花和叶的发育。第 VI 组只有 1 个拟南芥漆酶 AtLAC1。第 VII 组包括 1 个丹参漆酶（SmLAC10）和 1 个拟南芥漆酶（AtLAC6），AtLAC6 在低温、洪涝、干旱和生物胁迫下均表现为基因下调^[7]，提示该组中的丹参漆酶 SmLAC10 在逆境胁迫下可能也有下调趋势。

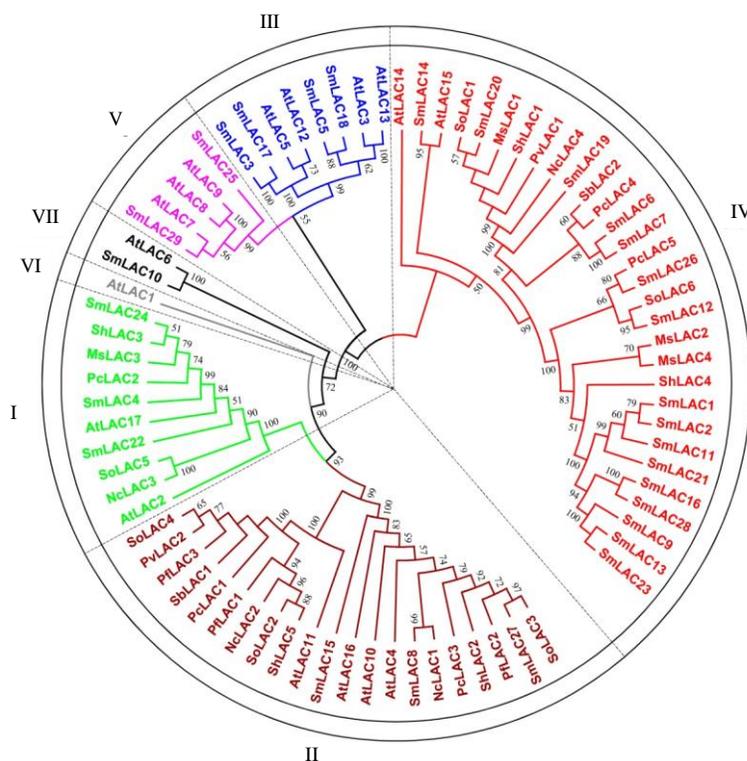


图 2 唇形科 9 种药用植物与拟南芥漆酶的 NJ 树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree of laccases among nine medicinal plants of Labiatae and *A. thaliana*

3.8 唇形科药用植物漆酶蛋白在叶片中的表达模式分析

根据转录组的 FPKM (fragments per kilobase million) 值, 利用 MeV 软件绘制热图, 分析漆酶家族成员在不同物种叶片中的表达情况, 各漆酶基因的表达量如图 3 所示。在黄芩中, SbLAC2 的表达量稍高于 SbLAC1; 在夏枯草中, PvLAC1 的表达量明显高于 PvLAC2; 在紫苏中, 3 个漆酶的表达量接近, PflLAC3 的表达量略高, PflLAC2 次之, PflLAC1 略低; 在荆芥中, NcLAC1 的表达量最高, NcLAC4 的表达量最低; 在留兰香中, MsLAC4 的表达量远远高于其它 3 个漆酶基因; 在广藿香中, PcLAC4 表达量最高; 在西班牙鼠尾草中, ShLAC4 的表达量最高, ShLAC1 次之; 在撒尔维亚中, SoLAC6 的表达量远高于其它 5 个漆酶, SoLAC1 次之, SoLAC2 和 SoLAC4 几乎不表达。

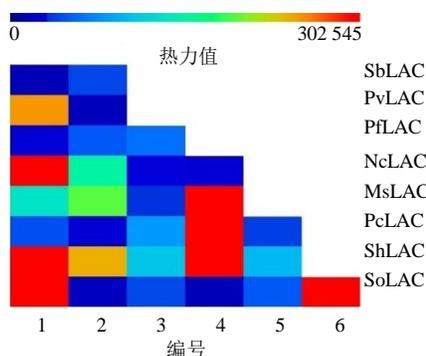


图 3 唇形科 8 种药用植物漆酶在叶片中的表达量热图

Fig. 3 Expression pattern of laccases in leaves of eight medicinal plants of Labiatae

4 讨论

漆酶作为一种广泛存在的酶, 其研究主要集中在真菌领域, 高等植物漆酶研究正在兴起。Berthet^[19]和 Zhao 等^[20]发现拟南芥漆酶中的 LAC4、LAC11 和 LAC17 能影响木质素合成; Pourcel 等^[21]发现漆酶与拟南芥种皮中黄酮类成分的合成相关; Ranocha 等^[22]和 Bryan 等^[23]在杨树中抑制表达 LAC3 后, 在木质部中发现了酚类物质的增加; Li 等^[10]发现漆酶能影响丹参中丹酚酸 B 的合成。这些结果充分表明, 漆酶在植物初生和次生代谢过程中发挥了重要作用。

无论是木脂素、黄酮类还是酚类物质, 都来源于苯丙氨酸代谢途径, 而苯丙氨酸代谢途径中的代谢产物, 正是很多唇形科药用植物的特殊药效物质基础, 如丹酚酸 B、迷迭香酸、黄芩苷、汉黄芩苷

和野黄芩苷等。研究苯丙氨酸代谢途径中的关键酶基因譬如漆酶, 对唇形科药用植物药效物质的代谢调控以及定点突变, 都具有重要意义。

本研究通过生物信息学方法, 对唇形科常见的 8 种药用植物漆酶基因进行了初步分析。首先从转录组数据库中寻找潜在的漆酶基因片段, 通过同源序列比对, 确认了这些漆酶基因的完整性。在此过程中, 从数据库中搜索到了大量漆酶相关基因, 但最后只得到少数几个完整的漆酶基因, 这可能与转录组测序和拼接技术有关, 后续可以通过基因克隆或是长片段转录组测序甚至基因组测序来获得完整的漆酶基因序列。

文献报导, 漆酶氨基酸序列相似性差异很大, 一般不同来源的漆酶相似性低于 50%^[24]。本研究中, 8 种药用植物漆酶与同源基因的氨基酸序列相似度在 64.86% (MsLAC4) ~91.63% (SoLAC3), 序列差异明显。它们与芝麻或丹参漆酶蛋白同源, 这也从分子层面上支持了这些物种的亲缘关系。除了黄芩, 其它 7 种药用植物以及丹参, 都是野芝麻亚科的植物, 与芝麻的亲缘关系较近。序列相似度最高 (91.63%) 的是撒尔维亚 SoLAC3 与丹参漆酶, 这可能是因为它们同属鼠尾草属植物, 亲缘关系更近的缘故。

漆酶氨基酸序列的差异虽大, 但其铜离子结合位点相对保守。作为一种含有 4 个铜离子的多酚氧化酶, 铜离子结构域是漆酶序列结构的特征部分。本研究中所有漆酶氨基酸序列均具有 3 个典型的漆酶 Cu-oxidase 结构域及 4 个铜离子结合位点, 表明它们均属于漆酶家族成员。

8 种药用植物漆酶蛋白的理化性质、糖基化和磷酸化位点、信号肽、导肽和跨膜结构域以及二级结构等特点, 都与同科植物丹参相似, 从序列特征上表明了这些植物与丹参的亲缘关系。

在漆酶的系统进化分析中, 根据拟南芥漆酶基因的功能, 将 31 个唇形科药用植物漆酶和 29 个丹参漆酶分为了 7 组。在拟南芥漆酶分析中, AtLAC6 与 AtLAC14、AtLAC15 归为第 IV 组^[7], 本研究中, AtLAC6 与 AtLAC14、AtLAC15 分属 2 组, 与陆地棉漆酶基因的分组情况一致^[25], 这可能是因为增加了漆酶的数量, 改变了进化树的结构, 导致 AtLAC6 与 AtLAC14、AtLAC15 分离。

本研究为深入研究唇形科药用植物漆酶蛋白功能和克隆其编码基因提供了可靠依据, 为通过生物

技术手段调控唇形科药用植物次生代谢物质的合成与积累,保障唇形科药用植物优良品质并不断开发优异品种提供了基因数据,这对发展和利用唇形科药用植物资源具有重要参考意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang J H, Feng J J, Jia W T, *et al.* Lignin engineering through laccase modification: A promising field for energy plant improvement [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8: 145.
- [2] Yoshida H. LXIII.—chemistry of lacquer (urushi). part I. Communication from the chemical society of tokio [J]. *J Chem Soc, Trans*, 1883, 43: 472-486.
- [3] Pogni R, Baratto M C, Sinicropi A, *et al.* Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(5): 885-896.
- [4] Pezzella C, Guarino L, Piscitelli A. How to enjoy laccases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(5): 923-940.
- [5] Hoegger P J, Kilaru S, James T Y, *et al.* Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences [J]. *FEBS J*, 2006, 273(10): 2308-2326.
- [6] Caparrós-Ruiz D, Fornalé S, Civardi L, *et al.* Isolation and characterisation of a family of laccases in maize [J]. *Plant Sci*, 2006, 171(2): 217-225.
- [7] Turlapati P V, Kim K W, Davin L B, *et al.* The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: Towards addressing the mystery of their gene function(s) [J]. *Planta*, 2011, 233(3): 439-470.
- [8] Koutaniemi S, Malmberg H A, Simola L K, *et al.* Norway spruce (*Picea abies*) laccases: Characterization of a laccase in a lignin-forming tissue culture [J]. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57(4): 341-348.
- [9] Lu S F, Li Q Z, Wei H R, *et al.* Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(26): 10848-10853.
- [10] Li Q, Feng J, Chen L, *et al.* Genome-wide identification and characterization of *Salvia miltiorrhiza* laccases reveal potential targets for salvianolic acid B biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 435.
- [11] Li C L, Li D Q, Zhou H, *et al.* Analysis of the laccase gene family and miR397-/miR408-mediated posttranscriptional regulation in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Peer J*, 2019, 7: e7605.
- [12] Di P, Zhang L, Chen J, *et al.* ¹³C tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(7): 1537-1548.
- [13] 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, 2006: 236.
- [14] Mint Evolutionary Genomics Consortium. Electronic address: Buell@msu.edu, Mint Evolutionary Genomics Consortium. Phylogenomic mining of the mints reveals multiple mechanisms contributing to the evolution of chemical diversity in Lamiaceae [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(8): 1084-1096.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 126.
- [16] 王琳. 西班牙鼠尾草在黑龙江地区的栽培技术研究及市场开发 [J]. 中国林副特产, 2012(5): 90.
- [17] 陈亮, 李卿, 陈军峰, 等. 催化菘蓝活性木脂素生物合成的漆酶基因家族生物信息学分析 [J]. 药学实践杂志, 2017, 35(3): 208-214.
- [18] Cai X N, Davis E J, Ballif J, *et al.* Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(11): 2563-2569.
- [19] Berthet S, Demont-Caulet N, Pollet B, *et al.* Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(3): 1124-1137.
- [20] Zhao Q, Nakashima J, Chen F, *et al.* Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(10): 3976-3987.
- [21] Pourcel L, Routaboul J M, Kerhoas L, *et al.* TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 2966-2980.
- [22] Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, *et al.* Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(1): 145-155.
- [23] Bryan A C, Jawdy S, Gunter L, *et al.* Knockdown of a laccase in *Populus deltoides* confers altered cell wall chemistry and increased sugar release [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(10): 2010-2020.
- [24] 丛汉卿, 徐立, 信彩云, 等. 植物漆酶的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(18): 8322-8323.
- [25] 赵晶, 李旭彤, 梁学忠, 等. 陆地棉漆酶基因家族鉴定及在黄萎病菌胁迫下的表达分析 [J]. 作物学报, 2019, 45(12): 1784-1795.

[责任编辑 时圣明]