

• 药材与资源 •

马蓝 *BcASB* 基因的克隆、生物信息学及表达分析马小毛¹, 宁书菊², 叶 齐¹, 胡永乐^{1,3}, 蔡国倩¹, 魏道智^{1*}

1. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

2. 福建农林大学作物科学学院, 福建 福州 350002

3. 武夷学院生态与资源工程学院, 福建 武夷山 354300

摘要:目的 克隆马蓝邻氨基苯甲酸合成酶 (anthranilate synthase, AS) *BcASB* 基因 (GenBank 登录号 QCF61930.1), 并对其进行生物信息学分析、时空表达分析以及检测马蓝有效成分靛蓝、靛玉红积累量随时间的变化。方法 通过 RT-PCR 和 RACE 技术, 克隆 *BcASB* 基因全长, 应用生物信息学的方法对该基因编码的蛋白进行各种理化性质测定, 二级结构和三级结构预测分析以及对核苷酸和氨基酸序列进行比对; 利用 qRT-PCR 技术检测 *BcASB* 基因在马蓝不同器官 (根、茎、叶) 中的表达模式以及在外源诱导子茉莉酸甲酯 (methyl-jasmonate, MeJA)、脱落酸 (abscisic acid, ABA)、水杨酸 (salicylic acid, SA) 和乙烯利 (ethephon, ETH) 诱导下的表达情况; 同时运用 HPLC 测定吲哚类生物碱靛蓝、靛玉红含量的变化情况。结果 克隆获得 *BcASB* 基因, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度为 765 bp, 编码 256 个氨基酸, 生物信息学表明, 该蛋白不含信号肽且无跨膜区, 亚细胞结构定位于叶绿体; qRT-PCR 检测结果表明, *BcASB* 基因在马蓝叶和茎中的表达量较高, 在根中表达较低; *BcASB* 基因可响应不同外源诱导处理, 而影响其转录; HPLC 检测结果显示靛蓝、靛玉红含量有着明显的变化。结论 成功克隆马蓝邻氨基苯甲酸合成酶 *BcASB* 基因, 为进一步阐释该基因在马蓝吲哚类生物碱合成途径的作用及表达调控研究奠定基础。

关键词: 马蓝; 邻氨基苯甲酸合成酶; 克隆; 生物信息学分析; 表达分析; 茉莉酸甲酯; 脱落酸; 水杨酸

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5697-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.024

Cloning, bioinformatic analysis and expression analysis of *BcASB* gene from *Baphicacanthus cusia*

MA Xiao-mao¹, NING Shu-ju², YE Qi¹, HU Yong-le^{1,3}, CAI Guo-qian¹, WEI Dao-zhi¹

1. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3. Ecology and Engineering College, Wuyi University, Wuyishan 354300, China

Abstract: Objective To clone the anthranilate synthase (AS) *BcASB* gene (GenBank accession number AYM45644.1) from *Baphicacanthus cusia*, and to analyze its bioinformatics and spatio-temporal expression, and detect the changes of indigo and indirubin accumulation in different time periods of *B. cusia*. **Methods** The full-length sequence of *BcASB* gene was cloned by quantitative RT-PCR and RACE techniques. The physical and chemical properties, secondary structure, and tertiary structure of *BcASB* protein were forecasted and analyzed, and the nucleotide and amino acid sequences were compared by bioinformatics technology. Quantitative real-time PCR was used to detect the *BcASB* gene expression levels in different tissues (roots, stems, leaves) of *B. cusia*. And its expression level under methyl jasmonate (MeJA), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), and ethephon (ETH) was detected by quantitative real-time PCR. Meanwhile, changes in the content of indole alkaloids indigo and indirubin were

收稿日期: 2021-02-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573517); 福建省自然科学基金面上项目资助 (2019J01827); 福建农林大学科技创新专项基金面上项目 (KFA20011A)

作者简介: 马小毛 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生态学。E-mail: 2592300779@qq.com

*通信作者: 魏道智 (1960—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物资源学研究。E-mail: weidz888@sohu.com

detected by HPLC. **Results** The *BcASB* gene, containing a 765 bp open reading frame (ORF) and encoded 256 amino acids, was cloned. No signal peptide and no transmembrane region were present in *BcASB* protein. And *BcASB* protein was located in chloroplast. Relative real-time PCR analysis indicated that *BcASB* gene showed the higher expression level was in the leaves and stems, while was lower in the roots. *BcASB* gene could respond to multiple treatments of methyl jasmonate (MeJA), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and ethephon (ETH), which promoted its transcription. HPLC test results show that the content of indigo and indirubin with a significant change. **Conclusion** The *BcASB* gene was cloned from *B.cusia*. The results provide a foundation for further elucidating the important role of this gene in the synthetic pathway of *B.cusia* indole alkaloids and expression regulation.

Key words: *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek; anthranilate synthase; cloning; bioinformatic analysis; expression analysis; jasmonate; abscisic acid; salicylic acid

马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek, 爵床科马蓝属的双子叶多年生草本植物^[1], 是我国南方常见药用植物。其茎叶炮制而成的青黛, 以福建产品品质最佳, 因此被称为建青黛, 是福建道地药材之一^[2]。马蓝化学成分研究报道, 马蓝中含有生物碱、萜类、黄酮类、皂苷等多种植物次生代谢产物^[3], 其中吲哚类生物碱被认为是马蓝中主要的药效成分, 分子药理实验表明, 靛蓝、靛玉红在人体的神经系统、免疫系统等方面发挥着显著的药理作用。近年来, 禽流感、甲型流感、新型冠状病毒等流行病肆虐频发, 推高了市场上以马蓝为基源的中药材的价格和需求, 因此加强对药用植物马蓝的研究具有重要的理论和实践意义^[4]。

目前, 应用分子生物学技术研究相应的生物合成途径, 克隆和分析关键酶基因是植物生物工程研究中提高特定代谢产物累积的重要手段之一^[5]。本研究中, 主要药效成分靛蓝、靛玉红的积累基于马蓝吲哚类生物碱合成途径, 一般认为, 吲哚生物合成途径包括 2 方面: 一是莽草酸途径, 二是色氨酸途径^[6]。莽草酸和色氨酸在分支酸合成酶 (chorismate synthase, CS)、邻氨基苯甲酸合成酶 (anthranilate synthase, AS)、色氨酸合成酶 (tryptophan synthase, TS)、细胞色素 CYP450 单氧化酶 (cytochrome P450 monooxygenase, CYP450)、尿苷二磷酸葡萄糖转移酶 (UDP-glycosyltransferase, UGT) 等一系列关键酶的作用下, 最终加氧聚合合成靛蓝、靛玉红等吲哚类生物碱或衍生为其他吲哚类物质, 因此, 邻氨基苯甲酸合成酶也被认为是调节色氨酸以及次生代谢产物积累的关键酶之一。

邻氨基苯甲酸合成酶大多存在于植物细胞质体内, 是由 α 亚基和 β 亚基组成的复合酶^[7], α 亚基是关键催化亚基, 而 β 亚基为 α 亚基的催化反应提供氨基^[8]。早在 1992 年, Niyogi 等^[9]首次从模式植物拟南芥中克隆出编码 AS α 亚基的基因。随后, 于 1995 年, Bohlmann 等^[10]从芸香中克隆出编码 AS α 亚基的基因。此后陆续有科学家从水稻^[11]、烟草^[12]、

长春花^[13]、喜树^[14]等植物中分离克隆出编码 AS α 亚基的基因。与 AS α 亚基相比, 有关 AS β 亚基的研究相对较少, 但近年来, 也有研究者从水稻中分离获得了编码 AS β 亚基的基因^[15], 且表明了 2 个 β 亚基之间在酰胺基转移酶活性方面的功能差异。前期, 课题组已从马蓝中分离克隆了邻氨基苯甲酸合成酶 AS α 亚基编码的 *BcASA* 基因 (GenBank 登录号 MH976794), 本实验则对 AS β 亚基编码的 *BcASB* 基因进行研究。目前, 在马蓝生物碱合成途径的研究中, 尚未见邻氨基苯甲酸合成酶 AS β 亚基的相关报道, 因此, 要阐释马蓝药效物质合成途径, 没有 *BcASB* 基因的克隆和生物学信息的挖掘和分析是不完整的。

因此, 本实验在前期马蓝转录组数据研究的基础上, 通过 RT-PCR 和 RACE 技术从马蓝邻氨基苯甲酸合成酶中分离克隆了 AS β 亚基编码的基因, 获得完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 命名为 *BcASB*。通过生物信息学分析, 预测该基因编码蛋白的结构和功能, 最后运用实时荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 对 *BcASB* 基因在马蓝不同部位的表达进行分析以及检测马蓝叶在不同外源诱导子处理下的表达情况和马蓝有效成分靛蓝、靛玉红积累量的变化情况, 为今后研究该基因的功能以及马蓝吲哚类生物碱合成途径的研究奠定科学基础。

1 材料与试剂

样品采自福建农林大学药植园, 经福建农林大学生命科学院魏道智教授鉴定为马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于后期 RNA 的提取。

克隆载体 pENTR/D-TOPO 为本实验保存, RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; DNA Marker、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、2 $\times$ TransTaq PCR Mix 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、实时荧光定

量 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司；茉莉酸甲酯 (methyl-jasmonate, MeJA)、脱落酸 (abscisic acid, ABA)、水杨酸 (salicylic acid, SA)、乙烯利 (ethylene, ETH) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司；色谱甲

醇、色谱乙腈、色谱甲酸均购自默克股份两合公司；靛蓝、靛玉红对照品购自上海源叶生物科技有限公司，其他试剂均为国内分析纯。引物合成和样品测序由福州铂尚生物有限公司完成，引物序列见表 1。

表 1 基因克隆和荧光定量 PCR 引物

Table 1 Sequences of primers designed for gene clone and real-time PCR

引物用途	引物名称	引物序列 (5'→3')
基因克隆	BcASB-F	CCGGAATTCATTTTACCACAGCAGAAGCCA
	BcASB-R	ACGCGTCGACTGCAGCTTCCTTTCTCTCAATC
荧光定量 PCR 引物	BcASB-qpcr-F	CGATGAAGATGTGAGGCTGAT
	BcASB-qpcr-F	CCCACACCCACTGAATG
荧光定量 PCR 内参基因引物	β -actin-F	GAGGGCCAAAACAAACTTGA
	β -actin-R	CCCTTATGTGCCTTTGCCTA

2 方法

2.1 马蓝总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

使用 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa Mini BEST Universal RNA Extraction Kit) 提取马蓝总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计 NanoDrop 2000 检测 RNA 的完整性、浓度和纯度。当 28 S 是 18 S 的 1.5~2 倍时, 说明提取的 RNA 完整性较好, A_{260}/A_{280} 为 1.9~2.0, RNA 浓度 ≥ 400 ng/mL 时, 说明纯度和浓度较高, 可用于后续实验。根据反转录试剂盒说明书 (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser), 以提取到的马蓝总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链, 于 -20°C 保存备用。

2.2 BcASB 基因的克隆及鉴定

根据实验组前期建立的马蓝转录组数据库信息, 使用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 BcASB 基因 ORF 序列的特异性引物 (BcASB-F, BcASB-R), 以“2.1”项中合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 30 μL : 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 15 μL , 正反向引物各 1 μL , 模板 cDNA 3 μL , ddH₂O 10 μL 。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min^[16]。反应结束后, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 使用试剂盒回收和纯化目的片段, 将纯化后的产物与入门载体 pENTR/D-TOPO 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 均匀涂布在含有卡那霉素 (Kan) 抗性的 LB 平板上过夜培养, 筛选阳性克隆进行菌液 PCR, 并将阳性克隆送至福州铂尚生物有限公司测序。

2.3 BcASB 基因的生物信息学分析

使用 NCBI-ORF Finder 平台查找和分析基因的 ORF, 并将 ORF 翻译成氨基酸序列。利用 ExPASy-ProtParam tool 软件预测基因编码蛋白的分

子式、理论相对分子质量、等电点等各种理化性质; 通过 Plant-PLoc 在线分析软件初步预测蛋白的亚细胞定位; 利用 NetPhos 3.1 Server 和 NetOGlyc 4.0 Server 分别对蛋白的磷酸化位点和糖基化位点进行预测分析; 采用 TMHMM Server v.2.0 进行蛋白跨膜结构的预测; 通过 SignalP 4.1 Server 对信号肽进行预测; 分别使用在线软件 SOPMA 和 SWISS-MODEL 预测蛋白的二级结构和三维结构; 通过 Blast 对马蓝 ASB 基因与芝麻、烟草、丹参、陆地棉等 15 种植物的同源序列进行分析, 使用 DNAMAN 软件进行同源序列的比对; 利用 MEGA 6.0 软件对预测的氨基酸序列与 GenBank 上的其他序列进行系统进化分析, 采用 NJ 法 (neighbor-joining) 绘制系统进化树, bootstrapping 参数为 1000 个重复。

2.4 BcASB 基因在马蓝中的诱导表达

采取马蓝的根、茎、叶, 按照“2.1”项方法提取总 RNA, 以总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链, 测定 BcASB 基因在马蓝不同器官中的表达模式。以 β -actin 为内参基因^[17], 根据克隆获得的 BcASB 基因序列, 通过 Primer Premier 5.0 设计荧光定量 PCR 引物 (表 1)。分别用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA、SA、ABA、ETH 4 种不同外源激素对马蓝植株进行胁迫处理, 对处理后不同时间点 (0、1、2、4、6、8、12、24、36、72 h) BcASB 基因表达量进行荧光定量 PCR 表达分析。反应体系为 20 μL : SYBR Premix Ex TaqTM 10 μL , 正反向引物各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , ddH₂O 7 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s; 40 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。实验设计 3 次技术重复, 每个样品 3 次重复, 扩增曲线、溶解曲线、标准曲线由定量 PCR 仪软件自动生成。反应结束后采用

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[18-19]计算分析 *BcASB* 基因在不同处理下的相对表达量。

2.5 激素诱导下吲哚类生物碱靛蓝、靛玉红含量的测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 YMC C_{18} (200 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A) -0.04%甲酸水溶液 (B) (0.04%甲酸水溶液的制备: 移液枪吸取 400 μ L 甲酸置于含 200 mL 蒸馏水的容量为 1000 mL 蓝盖瓶中, 加蒸馏水至 1000 mL, 摇匀后, 超声脱气 20 min); 检测波长为 289 nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μ L。梯度洗脱过程: 0~5 min, 15%~20% A; 5~10 min, 20%~25% A; 10~15 min, 25%~30% A; 15~20 min, 30%~35% A; 20~25 min, 35%~15% A。色谱图见图 1。

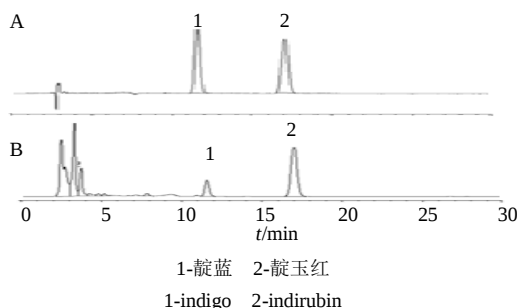


图 1 对照品混合溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed solution (A) and test solution (B)

2.5.2 对照品溶液的制备 称取靛蓝对照品适量, 精密称定 15 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 精密加入含 50% *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 的甲醇溶液 (超声溶解 30 min), 配制成质量浓度为 1.5 mg/mL 的溶液, 用 0.45 μ m 和 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。称取靛玉红对照品适量, 精密称定 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 精密加入含 50% DMF 的甲醇溶液 (超声溶解 5 min), 配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 用 0.45 μ m 和 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5.3 供试品溶液的制备 取经 80 $^{\circ}$ C 烘干至恒定质量的马蓝叶片 (不同激素、不同时间处理), 粉碎机粉碎过 40 目筛, 精密称取粉末 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 50% DMF 的甲醇溶液, 45 $^{\circ}$ C 超声溶解后定容, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.5.4 线性关系考察 精密吸取混标对照品溶液

适量, 加入甲醇进行倍比稀释, 分别得到对照品系列浓度。0.22 μ m 微孔滤膜滤过后, 依据“2.5.1”项色谱条件, 取 10 μ L 进样测定。以峰面积积分值 (Y) 对浓度 (X) 进行线性回归, 得到各对照品的回归方程, 靛蓝 $Y=0.6973X+3.8053$, $R^2=0.9996$, 线性范围为 15.0~320.0 μ g/mL; 靛玉红 $Y=22.3726X-6.8053$, $R^2=0.9997$, 线性范围为 5.0~50.0 μ g/mL。

2.5.5 重复性试验 按样品测定方法对同一批号 6 份供试品样品进行测定, 计算靛蓝、靛玉红 RSD 分别为 1.47%、1.65%, 表明该方法重复性良好。

2.5.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (记录配制日期) 依样品测定色谱条件, 分别于 0、2、4、24 h 注入液相色谱测定, 计算靛蓝、靛玉红含量的 RSD 分别为 1.59%、1.99%。

2.5.7 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液, 按照上述色谱条件连续测定 6 次, 考察日内精密度, 测得靛蓝、靛玉红的 RSD 分别为 1.77%、2.74%。

2.5.8 加样回收率试验 取重复性试验同一批号样品 6 份, 各约 0.5 g, 分别精密加入靛蓝、靛玉红对照品溶液, 制备成加样供试品溶液, 并分别测定和计算加样回收率。结果显示, 靛蓝、靛玉红平均加样回收率分别为 97.3%、103.9%, RSD 分别为 1.17%、1.76%。

3 结果与分析

3.1 马蓝 *BcASB* 基因的克隆与序列分析

以马蓝总 RNA 反转录后获得的 cDNA 为模板, 用设计的特异引物 *BcASB*-F、*BcASB*-R 进行 PCR 扩增反应, 结果显示单一明亮的条带 (图 2), 经测序后得到正确的序列, 大小为 765 bp (命名为 *BcASB*),

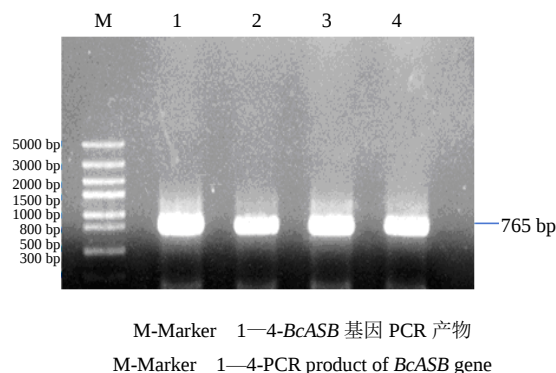


图 2 PCR 扩增 *BcASB* 基因

Fig. 2 PCR amplification of *BcASB* gene

编码 256 个氨基酸。将该基因的序列信息提交 NCBI GenBank, 登录号为 QCF61930.1, *BcASB* 基因核苷酸和氨基酸序列如图 3 所示。

3.2 马蓝 *BcASB* 蛋白的生物信息学分析

3.2.1 理化性质和细胞定位分析 通过 ExPASy-ProtParam tool 软件推测该基因编码蛋白的分子式为 $C_{1256}H_{1956}N_{342}O_{369}S_9$, 相对分子质量为 28 039.96, 理论等电点 (pI) 为 7.22, 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys) 为 24, 带负电荷的残基总数 (Asp+Glu) 为 24, 该蛋白不稳定性指数 (II) 为 45.40, 推测该蛋白属于不稳定蛋白, 脂肪指数为 81.84, 亲水性的平均值 (GRAVY): -0.210, 说明该蛋白属于亲水性蛋白。通过 NetPhos 3.1 Server 预测该蛋白共包含 43 个磷酸化位点, 其中包括丝氨酸 (serine) 21 个, 苏氨酸 (threonine) 13 个和酪氨酸

(tyrosine) 9 个; 使用 NetOGlyc 4.0 Server 软件预测该蛋白包含 3 个糖基化位点; 通过 Plant-PLoc 在线软件预测显示 *BcASB* 蛋白定位于叶绿体。

3.2.2 信号肽及跨膜区的预测分析 通过 SignalP 4.1 预测蛋白的信号肽, 结果显示无信号肽存在, 说明该蛋白为非分泌型蛋白 (图 4-A); 使用 TMHMM Server v.2.0 预测跨膜结构, 结果显示 *BcASB* 蛋白不包含跨膜区, 为非膜蛋白 (图 4-B)。

3.2.3 二级结构和三级结构预测 通过软件 SOPMA 预测 *BcASB* 蛋白的二级结构, 结果显示 α -螺旋 50 个, 占 19.53%; 不规则卷曲 117 个, 占 45.70%; β -折叠 25 个, 占 9.77%; 延伸链 64 条, 占 25.00% (蓝色代表 α -螺旋, 紫色代表不规则卷曲, 绿色代表 β -折叠; 红色代表延伸链),

```

1  ATTCACCACAGCAGAAGCCACCAATTCAAAAATCGAAGGGATTAGGTTCCGATCTAAGAACTGTCACAACACTCTTTCTATTTCGACT
1  I S P Q Q K P P F P K S E G I R F G S K N C H N I L S Y S T
91  CATCCGAAAAGGGTGTCTTGGGTTTACCAGAACCCGCGTGTACCAATCAGTACGCTTCCGGAAGAGCTCTGAATCCAAATTATAGTC
91  H P K R V L A V Y Q N T A V S P I S T S S G R A L N P I I V
31  ATCGATAATTATGACAGCTTACCTACATCTCTGCCAGTACCTGGGTGAGCTGGGATGCGTCTTCGAGGTATACAGAAATGATGAGCTA
181  I D N Y D S F I Y N L C Q Y L G E L G C V F E V Y R N D E L
61  ACTGTGTATGAGCTAAAAGGCAAAACCCAGAGGAATATTAATTTACCTGGACCTGGTACACCACAGGATTCGGGAATCTCGCTGCAA
271  T V D E L K G K N P R G I L I S P G P G T P Q D S G I S L Q
91  ACGGTGTGGAGCTTGGACCCACTGTACCAATTATTTGGTGTATGATGGGACTGCAGTGCATTGGGGAAGCTTTTGGAGGGAATTTGTG
361  T V L E L G P I V P L F G V C M G L Q C I G E A F G G K I V
121  AGATCTCCTTTTGGTGTGTACATGGAAGGTTCCCTGTATACTACAATGAGGGTGGGAAGATGGCTTTTGTGCTGATTACCAAAAC
451  R S P F G V V H G K G S P V Y Y N E G G E D G F F A G L P N
151  CCTTTCAGAGCTGCTAGGTACACAGCCTAGTGTATGAAAAAGGAAAGTTTTCAGTGTCTTCCCTTGAAATGACTGCATGGACAGAAGAT
541  P F R A A R Y H S L V I E K E S F P S A S L E M T A W T E D
181  GGGTTGATAATGGCTGCCGTCACAAAGTACACCAACATATACAGGGAGTTCAATTCCACCCAGAAAGCATATTACAAGCGAAGGAAGA
631  G L I M A A R H K V H Q H I Q G V Q F H P E S I I T S E G R
211  ACCATAGTTCGAAATTCATCAAAATGATTGAGAGAAAGGAAGCTGCA
721  T I V R N F I K M I E R K E A A
241
    
```

图 3 马蓝 *BcASB* 基因的核苷酸序列及对应的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence and amino acid sequence of *BcASB* gene in *B.cusia*

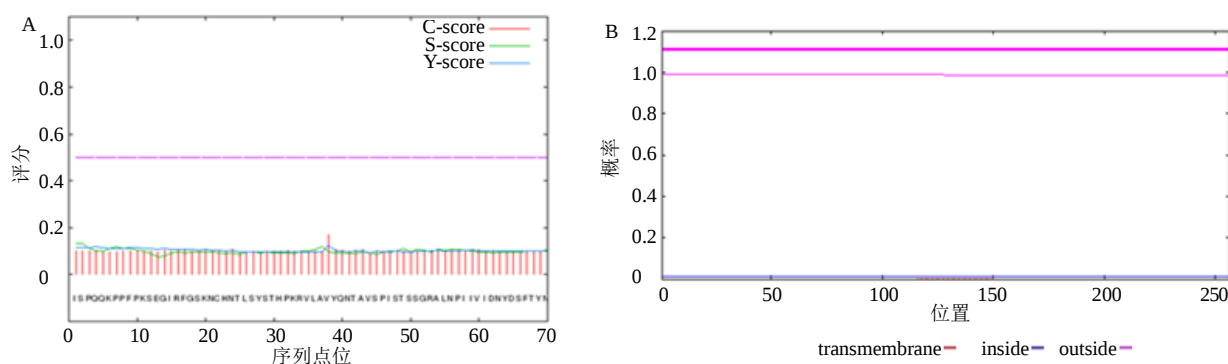


图 4 *BcASB* 蛋白信号肽 (A) 和跨膜区 (B) 预测

Fig. 4 Prediction of signal peptide (A) and transmembrane domains (B) of *BcASB* protein

这 4 个元件构成了 BcASB 蛋白的二级结构, 其中 α -螺旋和不规则卷曲为其主要结构元件, 散布于整个蛋白中 (图 5-A)。通过 SWISS-MODEL 软件预测蛋白的三级结构, 以谷氨酰胺酶为模板 (SMTL ID: 6qur.1.A), 在第 1~256 位氨基酸处建模, 三维模型覆盖率为 57.45%, 序列相似性为 0.48 (图 5-B)。

3.2.4 多重序列比对及系统进化树的构建 将 BcASB

基因编码的蛋白序列提交至 NCBI-Blastp, 与其他植物 ASB 蛋白序列进行同源比对, 结果显示马蓝 BcASB 与上百种 NCBI 上登录的植物有相似性, 挑选其中 15 种与马蓝相似度较高的植物蛋白序列, 利用 DNAMAN 软件对其进行多重序列比对 (图 6)。分析结果显示马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek (QCF61930.1) 与芝麻 *Sesamum indicum* Linn. (XP_011070537.2)、丹参 *Salvia splendens*

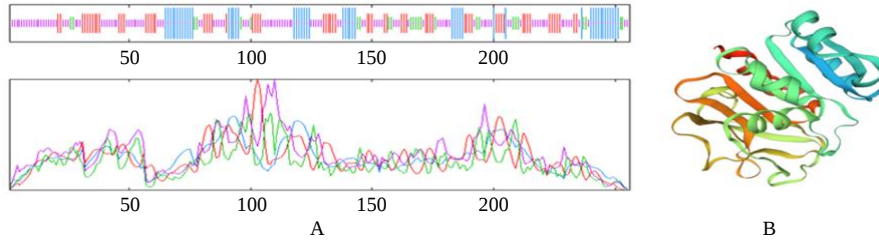


图 5 BcASB 蛋白二级结构 (A) 和三级结构 (B) 的预测

Fig. 5 Prediction of secondary structure (A) and tertiary (B) structure of BcASB protein

马蓝(QCF61930.1)	ISFQCKFFFEKSE.....GIRFGKNCNHTLSYSTHFRVLAVICNTAVSISTSSG	52
芝麻(XP_011070537.2)	MASLAAPSVSINQFFSLISPPQCHFFESRHO.....GLFF.TITPRKISYSAMFTPLAISKISPSINSPPG	18
白屈草(XP_012846214.1)	MASIVVF.SSSQSVIQINAKNTLSFHFQTLTILAFILSSGGSLAIRSEKILKRTAF..AISQNSSTFCVELSCIN	71
三叶草(XP_009795098.1)	MTAATASHVQAQAFHQTFLKLTQLTFLSLNLTSTF....SRVSGAKSC..RGLVVCSS..MAAEMHRAAVSGK	77
白杨(XP_034922077.1)	QKHILASS..SCNTLAFIFSGGSSLPFRSKNLETTF..VVCNSSVTCVELSCND	71
烟草(XP_033508047.1)	HAGIYFFSSSSQSAIHVNKNLTSLSS.....SGGAILMRSLKLTTHSAISVCNSSVTCVELSEPD	58
辣椒(XP_016540243.1)	MAASHVQITACQSRFSLKLTQHASFNLFSF....SRVSGAKSE..RGLVVCSS..VAALNHRVARNHNR	69
三果杨(XP_002314761.1)	MAASHVQITACQSRFSLKLTQHASFNLFSF....SRVSGAKSE..RGLVVCSS..VAALNHRVARNHNR	69
丹参(TEY57190.1)	MAANI...ITQSSILQKFFALSANTLQIFSLHRLSGLFPP..SRVGFLEKK..TGIVGAVLTSAVSESTSVLEN.FK	18
陆地棉(XP_016736060.1)	MAANI...ITQSSILQKFFALSANTLQIFSLHRLSGLFPP..SRVGFLEKK..TGIVGAVLTSAVSESTSVLEN.FK	72
海桐(XP_012438401.1)	MAAVTFQASLIQFFTLSSKLTQIFSLHRLSGLFPP..SRVGFLEKK..TGIVGAVLTSAVSESTSVLEN.FK	72
杏(CAB426527.1)	MAAVTFQASLIQFFTLSSKLTQIFSLHRLSGLFPP..SRVGFLEKK..TGIVGAVLTSAVSESTSVLEN.FK	71
石楠(XP_031388693.1)	MAATAAGTSHFSSLLFKSSTASSCVTCQGGHRLIPASSFLRLGLVARNG..ELCTARATSVTVEINRSFPL.AK	77
胡杨(XP_011024607.1)	MTAATASHVQAQAFHQTFLKLTQLTFLSLNLTSTF....SRVSGAKSC..RGLVVCSS..MAAEMHRAAVSGK	71
月季(XP_024193401.1)	MTAATASHVQAQAFHQTFLKLTQLTFLSLNLTSTF....SRVSGAKSC..RGLVVCSS..MAAEMHRAAVSGK	15
花生(XP_016191203.1)	MATTNSLSLHSTSLHQNFLSCRRSQSFHLTLILANQPT..SLSLSVSARENGWVFA..TGVLESSNSPV.AK	75
马蓝(QCF61930.1)	RAL....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	128
芝麻(XP_011070537.2)	REG....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	94
白屈草(XP_012846214.1)	RNF....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	147
三叶草(XP_009795098.1)	PR....TRPFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	154
白杨(XP_034922077.1)	GIR....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	147
烟草(XP_033508047.1)	EQ....TRPFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	135
辣椒(XP_016540243.1)	NGCRIRKPPFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	149
三果杨(XP_002314761.1)	GIR....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	145
丹参(TEY57190.1)	FF....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	92
陆地棉(XP_016736060.1)	NSK....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	148
海桐(XP_012438401.1)	NSK....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	148
杏(CAB426527.1)	RVN....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	147
石楠(XP_031388693.1)	RNE....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	153
胡杨(XP_011024607.1)	GIR....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	147
月季(XP_024193401.1)	RAN....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	91
花生(XP_016191203.1)	NST....PFTVICNYCSFTYNLCCYGGGCHDFVWRNDELIVGDFHFRFAGLISPGGFCDSGSLCTVLELGI	151
马蓝(QCF61930.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	208
芝麻(XP_011070537.2)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	174
白屈草(XP_012846214.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	224
三叶草(XP_009795098.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	234
白杨(XP_034922077.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	227
烟草(XP_033508047.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	215
辣椒(XP_016540243.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	229
三果杨(XP_002314761.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	225
丹参(TEY57190.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	172
陆地棉(XP_016736060.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	228
海桐(XP_012438401.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	228
杏(CAB426527.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	226
石楠(XP_031388693.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	233
胡杨(XP_011024607.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	227
月季(XP_024193401.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	171
花生(XP_016191203.1)	VPLFGVCMGLQCGEAFGGIVRFGVGHGKSGVYVIRGGEGDLGAGLNFPAARYBSLVIERKFFSASIDTAWT	231
马蓝(QCF61930.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	256
芝麻(XP_011070537.2)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	225
白屈草(XP_012846214.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	279
三叶草(XP_009795098.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	285
白杨(XP_034922077.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	278
烟草(XP_033508047.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	266
辣椒(XP_016540243.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	283
三果杨(XP_002314761.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	276
丹参(TEY57190.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	224
陆地棉(XP_016736060.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	280
海桐(XP_012438401.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	280
杏(CAB426527.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	277
石楠(XP_031388693.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	284
胡杨(XP_011024607.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	278
月季(XP_024193401.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	273
花生(XP_016191203.1)	EDGLMAARHVRHILGVQGFHFSIITEGDTVNNHRIKRRDA	281

图 6 不同物种 BcASB 氨基酸序列多重比对

Fig. 6 Multiple alignments of amino acid sequence of BcASB form different species

Bunge (TEY57190.1)、三果杨 *Populus trichocarpa* Carr (XP_002314761.1)、胡杨 *Populus euphratica* Oliv (XP_011024607.1)、月季 *Rosa chinensis* Jacq (XP_024193401.1)、陆地棉 *Gossypium hirsutum* Linn (XP_016703097.1) 等植物同源性达到 72%~88%, 总相似度达 72.01%。利用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树(图 7), 结果显示马蓝 *BcASB* 蛋白与茄科一年或有限多年生草本植物辣椒的亲缘关系最近, 可聚为一支, 与锦葵科陆地棉和海绵 *ASB* 蛋白亲缘关系最远。

3.3 *BcASB* 基因的时空表达分析

3.3.1 *BcASB* 基因在不同器官中的表达模式分析 分别提取马蓝根、茎、叶的总 RNA, qRT-PCR 法测定 *BcASB* 基因在马蓝不同组织的表达模式, 结果表明, *BcASB* 在 3 种不同的器官中均有表达, 但相对表达量存在一定差异, 在叶和茎中表达量显著高于根, 表达量从高到低呈现出叶>茎>根, *BcASB* 在叶中的表达量是茎的 2.01 倍, 根的 5.08 倍(图 8)。

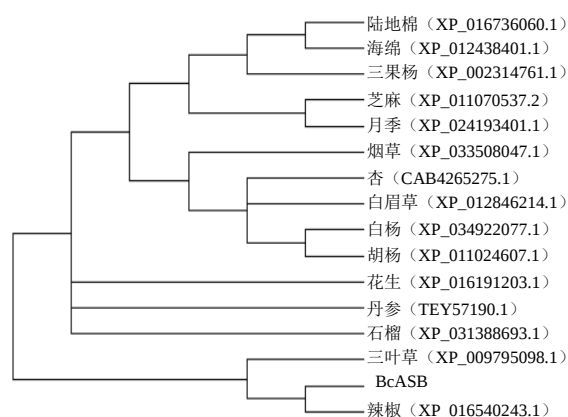
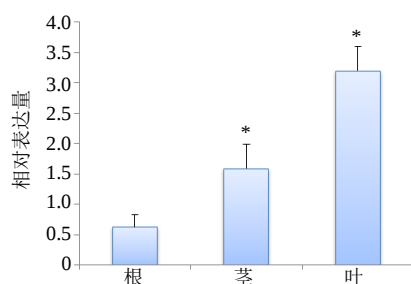


图 7 不同物种 *BcASB* 蛋白的系统进化分析

Fig. 7 Phylogenetic analysis of *BcASB* proteins from different species



*表示在 0.05 水平差异显著, $P < 0.05$, 下同

*Indicating significant difference at the 0.05 level ($P < 0.05$), same as below

图 8 *BcASB* 基因在各器官中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of *BcASB* gene in various organs

3.3.2 不同外源激素对 *BcASB* 基因诱导表达的影响 对马蓝叶片进行了 MeJA、SA、ABA、ETH 4 种不同外源诱导物的胁迫处理, 对不同时间点 *BcASB* 表达量进行 qRT-PCR 检测。检测结果表明, 用 MeJA 处理后, 马蓝 *BcASB* 基因表达量呈现先上升后下降的趋势, 在 4、6、8、12 h 时表达量显著高于其他检测点, 在 6 h 达到峰值, 与 0 h 处理点存在显著差异, 为 0 h 的 5.89 倍, 随后逐渐下降, 在 24、36、72 h 相对表达量水平接近(图 9-A)。用 SA 处理后, *BcASB* 基因表达量呈现先稳定后迅速上升的趋势, 在 24 h 达到峰值, 表达量为 0 h 的 3.2 倍, 而在 24、36、72 h 时 *BcASB* 基因的相对表达量显著高于其他检测点, 说明 SA 对基因的调节更为持久, 对植物代谢影响显著(图 9-B)。用 ABA 处理后, *BcASB* 基因表达量在 8、12、24 h 时相对表达量显著高于其他检测点, 在 0~4 h 趋于稳定, 在 6 h 小幅度上升, 为 0 h 的 1.5 倍, 8 h 达到峰值, 为 0 h 的 4 倍, 随后表达量逐渐下降, 但在 72 h 表达量仍然高于 0 h(图 9-C)。而用 ETH 处理后, *BcASB* 基因表达量在 6 h 达到峰值, 显著高于其他检测点, 为 0 h 的 1.58 倍, 24、36、72 h 时基因的表达量水平与其他检测点基本持平, 没有显著性的差异, 说明基因的相对表达量受 ETH 的影响较小(图 9-D)。上述结果说明 *BcASB* 基因可以响应多种外源诱导子处理。

3.4 激素诱导下靛蓝、靛玉红含量测定分析

3.4.1 马蓝不同组织中靛蓝、靛玉红含量测定 对马蓝不同器官根、茎、叶中的吲哚类生物碱靛蓝和靛玉红含量进行了测定(图 10), 研究结果显示, 靛蓝、靛玉红含量在马蓝叶、茎中的含量相差较大, 靛蓝在叶中的含量达到 400.98 $\mu\text{g/g}$, 是靛玉红含量的 10.1 倍, 靛蓝在茎中的质量分数为 650.58 $\mu\text{g/g}$, 是靛玉红含量的 14 倍, 而在根中, 两者含量没有显著性差异; 且靛蓝在叶和茎中的含量显著高于根, 而靛玉红在不同组织中的含量没有显著性差异。

3.4.2 不同激素处理的马蓝叶片中靛蓝、靛玉红含量测定 用 MeJA 处理马蓝叶片, 采取处理后不同时间点的叶片, 测定其含量的变化(图 11-A), HPLC 检测结果显示, 叶片中靛蓝、靛玉红的含量随着时间的变化呈现先上升后下降的趋势, 靛蓝在 4、6、8、12 h 时含量显著高于其他检测点, 在 6 h 达到最大值, 为 786.35 $\mu\text{g/g}$, 为 0 h 的 1.96 倍, 在 72 h 下降到初始水平。靛玉红的含量在 6 h 也达到最大值,

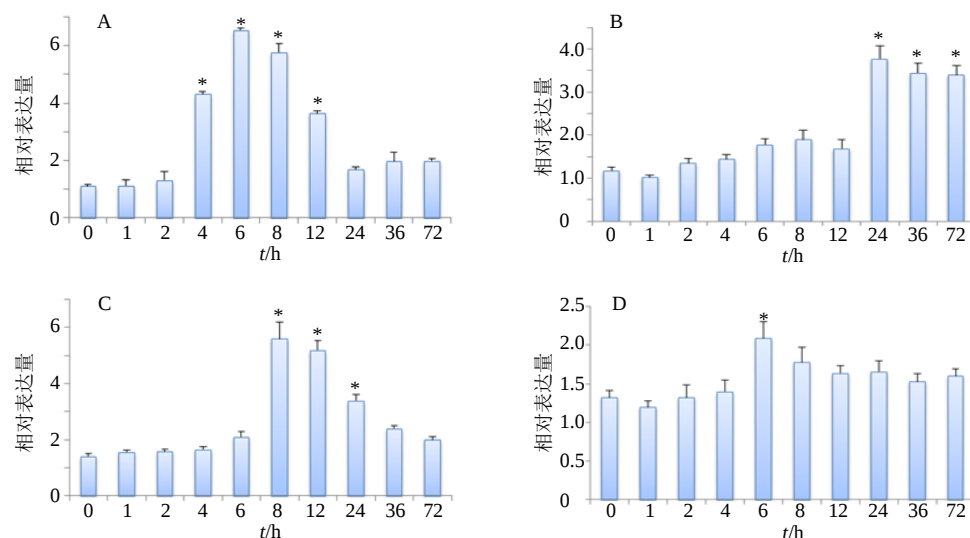


图9 MeJA (A)、SA (B)、ABA (C)、ETH (D) 胁迫下 *BcASB* 基因在不同时间点的表达

Fig. 9 Expression of *BcASB* gene at different time points under stress of MeJA(A), SA(B), ABA (C), and ETH (D)

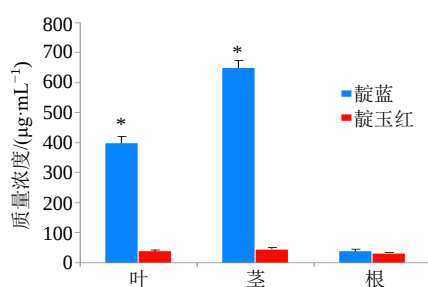


图10 马蓝不同组织中靛蓝、靛玉红含量测定

Fig. 10 Determination of indigo and indirubin in different tissues of *B. cusia*

为 66.38 $\mu\text{g/g}$, 为 0 h 的 2 倍, 在 36 h 下降到初始水平, 但靛玉红含量在各个检测点没有显著性差异。

用 SA 处理后 (图 11-B), 实验结果显示, 靛蓝含量随着时间的变化呈现先稳定后上升, 再下降而后维持稳定的趋势, 在 0~2 h 靛蓝含量维持稳定, 4 h 开始小幅上升, 8 h 含量达到最大值 653.36 $\mu\text{g/g}$, 且显著高于其他检测点, 为 0 h 的 1.69 倍, 8 h 后, 靛蓝含量下降, 并于 24 h 维持稳定水平, 和初始含量一致。而靛玉红含量随着时间的增长, 没有显著的变化, 在 6 h 出现了小幅上升, 但整体变化趋势处于稳定水平, 表明 SA 处理对马蓝叶片中靛玉红含量的影响不大。

在 ABA 的处理下 (图 11-C), 靛蓝含量随着时间的变化呈现先上升后下降再上升的趋势, 在 0~2 h 呈现上升趋势, 4~12 h 相对于 2 h 有下降的趋势,

但含量仍高于初始水平, 24 h 靛蓝含量达到最大值 600.58 $\mu\text{g/g}$, 36、72 h 呈现下降趋势, 但含量为 0 h 的 1.25 倍。而靛玉红含量随着时间变化没有显著差异, 在 24 h 达到最大值 60.36 $\mu\text{g/g}$, 在 72 h 含量下降到初始水平。

在 ETH 处理下 (图 11-D), 靛蓝含量在 0~4 h 呈现上升的趋势, 在 4 h 含量达到 750.68 $\mu\text{g/g}$, 随后呈现下降的趋势, 在 12 h 含量又持续上升, 在 72 h 达到最大值 790.69 $\mu\text{g/g}$ 。靛玉红含量同样呈现先上升后下降再上升的趋势, 在 0~4 h 呈现上升趋势, 在 4 h 含量达到最大值 80.69 $\mu\text{g/g}$, 在 6 h 之后, 含量呈现下降的趋势, 但在 72 h 含量上升至 70.36 $\mu\text{g/g}$, 为初始水平的 1.5 倍, 总体上含量在各个检测点没有显著性差异。

综上所述, 通过检测不同外源诱导子处理下, 不同时间点靛蓝、靛玉红积累量的变化, 发现在某个时间检测点靛蓝、靛玉红含量与 0 h 相比, 均发生了显著的上调, 这与 *BcASB* 基因的表达量相一致, 说明马蓝有效成分靛蓝、靛玉红积累量受基因表达的影响, 进一步说明基因表达在马蓝有效成分的合成中发挥着关键作用。

4 讨论

吲哚类生物碱 (靛蓝、靛玉红等) 作为植物次生代谢的重要产物之一, 具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、增强免疫等显著药理活性^[20]。ASB 是植物体内吲哚类生物碱合成途径的关键酶之一, 具有重

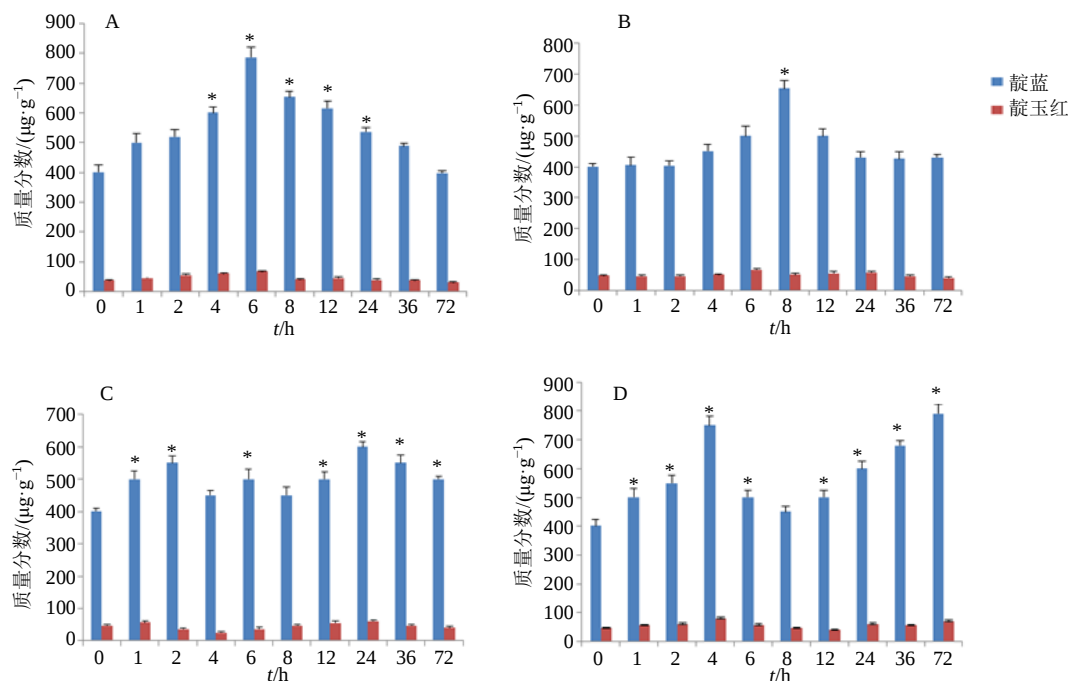


图 11 MeJA (A)、SA (B)、ABA (C)、ETH (D) 处理下马蓝叶片中靛蓝、靛玉红含量测定

Fig. 11 Determination of indigo and indirubin in leaves of *B. cusia* under MeJA (A), SA (B), ABA (C), and ETH (D) treatment

要的研究价值。近几年, ASB 的研究多集中在拟南芥、烟草这样的模式植物中, 在药用植物的研究中鲜见报道。本研究立足于前期建立的马蓝转录组数据库, 克隆了马蓝 *BcASB* 基因, ORF 区长为 765 bp, 编码 256 个氨基酸, 与芝麻的 ASB 同源性最高, 可达 88%。生物信息学分析结果显示, *BcASB* 蛋白相对分子质量为 28 039.96, 理论等电点为 7.22, 为非分泌型蛋白, 因此不具有识别信号的功能。*BcASB* 蛋白定位于叶绿体, 这与一般报道的 ASB 蛋白的定位结果一致。同时对蛋白的亲疏水性、信号肽、跨膜区、二级结构、三级结构作了详细的分析, 为马蓝 *BcASB* 基因提供了更多更详尽的信息。

组织特异性表达结果表明, *BcASB* 基因在马蓝不同的器官中均有表达, 佐证了马蓝根、茎、叶均可入药一说, 且在叶中的表达量高于根和茎, 这与已经报道的喜树^[14]的研究结果具有一致性, 喜树中 AS 亚基编码的基因在其不同器官中均有表达, 且在幼苗的发育过程中表达量迅速升高。在水稻^[11]中, AS 亚基编码的基因在各组织中的表达模式却有所不同, *ASA₁* 在花序中的表达量高于根和叶, 而 *ASA₂* 在各组织的表达量差异不大, 这说明同源蛋白之间组织表达也具有一定的差异, 可能与蛋白参与的功能相关。MeJA、ABA、SA、ETH 在植物的代谢过程中发挥着重要的作用^[21-22]。本研究对马

蓝叶片进行了 MeJA、ABA、SA、ETH 这 4 种不同外源激素的胁迫处理, ASB 表达量和马蓝有效成分靛蓝、靛玉红积累量均呈现出不同程度的上调, 说明 *BcASB* 基因响应并介导外源诱导子对代谢的调控。这与拟南芥、水稻的表达情况相近。前期, Sun 等^[23]就在拟南芥的研究中发现 MeJA 会刺激邻氨基苯甲酸合成酶基因的转录, 从而促进拟南芥芽和根的生长。在水稻中也发现 AS β 亚基编码的基因也具有可诱导性^[15]。同时, 也有很多研究验证了不同的信号诱导可以促进植物次生代谢产物的产生^[24-25]。在马蓝等药用植物中, 其生物合成过程中的关键酶活性高低也会影响药效成分的产量, 因此, 提高关键酶基因在植物中的表达也是提高药用活性成分产量、提高中药材品质的有效手段之一^[26]。

近年来, 随着分子生物学技术的发展, 大多数的药用植物已经涉及分子生物学领域, 最活跃的研究领域就是与药用活性成分形成相关的关键酶基因的克隆研究^[27]。因此, 本研究通过克隆马蓝邻氨基苯甲酸合成酶 *BcASB* 基因, 以及对其进行生物信息学分析、时空表达分析, 并检测有效成分积累量的变化, 为后续构建基因超表达载体以及对该基因的功能研究奠定了基础, 同时对马蓝有效成分含量的提高具有积极作用, 有助于更深入的阐释马蓝吲哚类生物碱合成途径和调控机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 可晓旭. 不同外源物质处理对马蓝生理特性以及有效成分含量的影响 [D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [2] Lin W J, Huang W, Ning S J, et al. De novo characterization of the *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek transcriptome and analysis of candidate genes involved in indican biosynthesis and metabolism [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0199788.
- [3] 曾美娟, 刁勇. 马蓝次生代谢产物研究进展 [J]. 中国农学通报, 2016, 32(20): 30-34.
- [4] 张青磊. 马蓝吲哚类生物碱合成关键基因 ASA 和 ASB 的克隆与功能研究 [D]. 泉州: 华侨大学, 2017.
- [5] Yu J, Zhang Y H, Ning S J, et al. Molecular cloning and metabolomic characterization of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene from *Baphicacanthus cusia* [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 485.
- [6] 于剑, 叶齐, 宁书菊, 等. 马蓝等 79 种植物分支酸合成酶的生物信息学分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 721-730.
- [7] 钱旭, 于可济, 袁冠绅, 等. 植物中邻氨基苯甲酸合成酶的研究进展 [J]. 热带生物学报, 2015, 6(4): 504-511.
- [8] Poulsen C, Bongaerts R J, Verpoorte R. Purification and characterization of anthranilate synthase from *Catharanthus roseus* [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 212(2): 431-440.
- [9] Niyogi K K, Fink G R. Two anthranilate synthase genes in *Arabidopsis*: Defense-related regulation of the tryptophan pathway [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(6): 721-733.
- [10] Bohlmann J, DeLuca V, Eilert U, et al. Purification and cDNA cloning of anthranilate synthase from *Ruta graveolens*: Modes of expression and properties of native and recombinant enzymes [J]. *Plant J*, 1995, 7(3): 491-501.
- [11] Tozawa Y, Hasegawa H, Terakawa T, et al. Characterization of rice anthranilate synthase alpha-subunit genes OASA1 and OASA2. Tryptophan accumulation in transgenic rice expressing a feedback-insensitive mutant of OASA1 [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(4): 1493-1506.
- [12] Song H S, Brotherton J E, Gonzales R A, et al. Tissue culture-specific expression of a naturally occurring tobacco feedback-insensitive anthranilate synthase [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117(2): 533-543.
- [13] Sun J Y, Ma L, San K Y, et al. Still stable after 11 years: A *Catharanthus roseus* hairy root line maintains inducible expression of anthranilate synthase [J]. *Biotechnol Prog*, 2017, 33(1): 66-69.
- [14] Lu H, Gorman E, McKnight T D. Molecular characterization of two anthranilate synthase alpha subunit genes in *Camptotheca acuminata* [J]. *Planta*, 2005, 221(3): 352-360.
- [15] Kanno T, Kasai K, Ikejiri-Kanno Y, et al. In vitro reconstitution of rice anthranilate synthase: Distinct functional properties of the alpha subunits OASA1 and OASA2 [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(1): 11-22.
- [16] 安琪, 黄海峰, 张振兴, 等. 羊源多杀性巴氏杆菌 *sodA* 基因的克隆、表达及其生物信息学分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(8): 2067-2075.
- [17] 黄玉香. 马蓝药效物质形成关键基因的挖掘与功能研究 [D]. 泉州: 华侨大学, 2017.
- [18] 刘畅宇, 陈勋, 陈娅, 等. 不同品种灰毡毛忍冬 *ACS3* 基因克隆、表达及生物信息学分析 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2154-2164.
- [19] 夏小艳, 叶枫, 彭桂元, 等. 顺铂耐药宫颈癌细胞中沉默交配型信息调节因子 2 同源蛋白 1 的表达及其对细胞增殖的影响 [J]. 广西医学, 2020, 42(2): 176-179.
- [20] 周正, 郭志英, 谭何新, 等. 马蓝种质资源研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2017, 35(1): 1-4.
- [21] 程茂高, 乔卿梅, 李先芳. 不同外源激素对菰蓝叶片组织培养的影响 [J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2015, 35(1): 5-7.
- [22] 公培民, 宁书菊, 叶齐, 等. 马蓝色氨酸合成酶基因的克隆、序列及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(3): 873-881.
- [23] Sun J Q, Xu Y X, Ye S Q, et al. *Arabidopsis* ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(5): 1495-1511.
- [24] Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, et al. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(9): 1129-1132.
- [25] 胡永胜, 张磊, 陈万生. 菰蓝中肉桂酸-4-羟基化酶基因克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 101-106.
- [26] 姚元枝, 黎晓英, 郭文博, 等. 陆英 *HMGS* 基因 cDNA 克隆、不同器官中的差异表达及生物信息学分析 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1578-1582.
- [27] 康亚兰, 裴瑾, 刘薇, 等. 红花查尔酮合成酶基因的克隆、生物信息学分析及表达 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2385-2389.

[责任编辑 时圣明]