

蛇足石杉 *HsCAO2* 基因的克隆、生物信息学分析及载体构建

刘爱佳^{1,2}, 陈晓英^{1,3}, 李 翠^{1,3}, 闫志刚⁴, 冯世鑫⁴, 张占江⁴, 雷 明^{1,3*}, 缪剑华^{1,3*}

1. 广西壮族自治区药用植物园 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023

2. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

3. 广西壮族自治区药用植物园 广西壮族自治区中药资源智慧创制工程研究中心, 广西 南宁 530023

4. 广西壮族自治区药用植物园, 广西 南宁 530023

摘要: 目的 为筛选高活性的蛇足石杉铜胺氧化酶 (copper-containing amine oxidase, CAO), 通过生物工程方法实现石杉碱甲 (huperzine A, HupA) 的合成、为加快新药创制进度提供理论依据。方法 基于蛇足石杉转录组测序得到的 CAO 序列片段, 利用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术, 扩增、拼接并验证获得该基因的全长 cDNA 序列, 并将其命名为 *HsCAO2*。结果 通过 RACE 技术得到 *HsCAO2* 的 cDNA 全长为 2696 bp, CDS 为 2199 bp, 编码 732 个氨基酸。氨基酸序列同源性比对发现, *HsCAO2* 具有保守的氨基酸位点和 Cu²⁺ 结合位点; 进化树分析结果表明, *HsCAO2* 与蛇足石杉中的另一个 CAO (*HsCAO1*) 同源性最高, 达 91.67%; 蛋白质结构分析结果表明, *HsCAO2* 也可能在生物体里以同源二聚体的形式存在。在此基础上, 进一步分别构建了超表达载体 pOX-*HsCAO2* 和体外蛋白表达载体 pET-28a(+)-*HsCAO2*。结论 *HsCAO2* 很可能是蛇足石杉中的一个新的功能性 CAO, 且超表达载体和体外蛋白表达载体的成功构建为进一步研究其功能奠定了基础。

关键词: 蛇足石杉; 石杉碱甲; 铜胺氧化酶; 基因克隆; 载体构建

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)23-7309-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.23.025

Cloning, bioinformatics analysis and expression vector construction of *HsCAO2* from *Huperzia serrata*

LIU Ai-jia^{1,2}, CHEN Xiao-ying^{1,3}, LI Cui^{1,3}, YAN Zhi-gang⁴, FENG Shi-xin⁴, ZHANG Zhan-jiang⁴, LEI Ming^{1,3}, MIAO Jian-hua^{1,3}

1. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China

2. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

3. Guangxi Engineering Research Center of TCM Resource Intelligent Creation, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China

4. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China

Abstract: Objective To screen copper-containing amine oxidase (CAO) with high activity from *Huperzia serrata*, reinforce the synthesis of huperzine A (HupA) by bioengineering method, so as to provide the theoretical basis for the progress of new drug development. **Methods** Based on RNA-seq data and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, a CAO-like gene named *HsCAO2* was identified from *Huperzia serrata*. **Results** The full length of *HsCAO2* cDNA and coding sequence (CDS) was 2696 and 2199 bp, respectively, encoding a 732-amino acids deduced protein. Sequence alignment results indicated *HsCAO2* contained both conserved domains and Cu²⁺ binding sites. Phylogenetic analysis showed that *HsCAO2* shared the highest similarity (91.67%) with *HsCAO1*, another CAO verified in *H. serrata*. The

收稿日期: 2021-05-03

基金项目: 国家中药材产业技术体系 (CARS-21); 对发展中国家科技援助项目 (KY201904001); 广西创新驱动发展专项资金项目 (桂科 AA18242040); 广西壮族自治区药用植物园基金 (桂药基 202002)

作者简介: 刘爱佳 (1995—), 硕士研究生, 主要从事药用植物资源研究。Tel: (0771)3132106 E-mail: 1435145742@qq.com

*通信作者: 缪剑华 (1961—), 研究员, 主要从事药用植物保育学研究。Tel: (0771)2443020 E-mail: mjh1962@vip.163.com

雷 明 (1982—), 副研究员, 主要从事药用植物资源研究。Tel: (0771)5602850 E-mail: leiming@gxyyzwy.com

secondary and 3-D structures of HsCAO2 simulated by online softwares indicated that HsCAO2 might exist as homodimers in *H. serrata*. Furthermore, the overexpression vector pOX-HsCAO2 and *in vitro* protein expression vector pET-28a (+)-HsCAO2 were constructed. **Conclusion** HsCAO2 might be a new functional CAO which has not been reported before in *H. serrata*. The successful construction of the overexpression vector and *in vitro* protein expression vector lays a foundation for further study of its biological function.

Key words: *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev.; huperzine A; copper-containing amine oxidase; gene identification; vector construction

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. 又名千层塔, 为石杉科多年生草本蕨类植物。20 世纪 80 年代, Liu 等^[1]报道从蛇足石杉中提取到的一种生物碱——石杉碱甲 (huperzine A, HupA)。后续研究表明, HupA 是一种强效、可逆的乙酰胆碱酯酶的抑制剂, 并已应用于治疗阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD)。进一步研究发现, HupA 还可减轻肝缺血再灌注损伤^[2]、抑制癫痫发作^[3]、减轻急性心肌梗死引起的损伤^[4]、减轻新生儿缺氧缺血后的认知障碍和脑损伤^[5]。除此之外, 有最新研究表明, HupA 还能显著增强胰岛素神经元信号通路活性, 改善 2 型糖尿病的一些相关认知功能障碍^[6]。由此可以看出, HupA 具有广泛的应用前景。

除了蛇足石杉, 目前已知 HupA 只存在于其他少部分石杉属 *Huperzia* *Bemhardi* 和马尾杉属 *Phlegmariurus* L. 植物中^[7-9]。这些植物在自然环境中主要靠孢子繁殖, 但生长缓慢, 且孢子萌发和配子体受精有一定的困难性, 再加上人们长期无节制的采挖, 使得这些资源尤其是蛇足石杉已濒临灭绝^[10]。为解决资源短缺问题, 加快新药研发进度, 国内外在石杉属植物的组织培养、HupA 的化学合成等方面做了很多有意义的工作^[11-19], 但实现 HupA 的量化生产之路依旧困难重重。

解析蛇足石杉 HupA 的生物合成通路, 利用生物工程方法在细菌或酵母中实现 HupA 的批量生产, 是保护野生蛇足石杉资源、加快新药创制速度的另一条思路。此类方法已有多个成功的案例报道。Ro 等^[20-21]小组在酿酒酵母中组装了一条高效合成青蒿酸的代谢途径, 使最终的青蒿酸产量提高了 500 倍。根据同位素示踪等实验结果, 绘制了一条 HupA 生物合成通路图, 推测其生物合成可能是从赖氨酸脱羧生成尸碱开始, 再经过铜胺氧化酶 (copper-containing amine oxidase, CAO) 氧化去氨基形成哌啶后形成 HupA 前体物质, 再经过一系列的修饰, 最终生成 HupA^[22-24]。这其中, CAO 是关键酶之一。

截至目前, 仅有 2 篇关于蛇足石杉 CAO 的报道。2012 年, Sun 等^[25]报道从蛇足石杉中克隆到一个 CAO 基因。利用 pET22b (+) 载体, Sun 等^[25]成功实现了该蛋白的体外表达, 并将其与不同的底物孵育, 发现该蛋白具有催化尸胺合成哌啶的功能。最近, Peng 等^[26]基于转录组测序结果注释到 3 条 CAO unigenes, 但文中未公布其序列, 也并未对这些 unigenes 进行鉴定及 cDNA 全长的克隆。

本研究基于二代转录组测序数据, 结合 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术获得了一个 CAO-like 基因的 cDNA 全长, 并将其命名为 *HsCAO2*。在此基础上, 对该基因及其编码的蛋白序列进行了各种生物信息学分析, 并成功构建了超表达载体 pOX-HsCAO2 和蛋白体外表达载体 pET-28a (+)-HsCAO2, 为后续进一步鉴定 HsCAO2 的生物学功能以及优选 CAO 用于 HupA 在酵母或其他菌体中的人工生物合成提供重要理论依据。

1 材料与试剂

1.1 植物材料

实验材料由广西壮族自治区药用植物园重点实验室保存, 经广西壮族自治区药用植物园闫志刚主任技师、冯世鑫副研究员鉴定为蛇足石杉 *H. serrata* (Thunb. ex Murray) Trev.。

1.2 试剂与药品

rTaq、大肠杆菌 DH5 α 化学感受态细胞、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、5 minTM TA/Blunt-Zero Cloning Kit、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit、FastPure Plasmid Mini Kit 购于诺唯赞生物科技股份有限公司 (南京, 中国); KOD-Plus-Neo 酶购于 TOYOBO 公司 (东京, 日本); T4 连接酶、TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I 和 *Kpn* I 购于全式金生物技术有限公司 (北京, 中国); SMART RACE 5'/3' Kit 购于 Takara 公司 (东京, 日本); Quick-Start Protocol RNeasy Plant Mini Kit 购于 QIAGEN 公司 (杜塞尔多夫, 德国);

植物表达载体 pOX、体外蛋白表达载体 pET-28a(+) 保存于本实验室。引物合成单位是广州天一辉远基因科技有限公司。

2 方法

2.1 蛇足石杉全样 cDNA 的获取

采用 Quick-Start Protocol RNeasy Plant Mini Kit 提取蛇足石杉全样的总 RNA, RACE 模板 cDNA 的合成方法详见 SMART RACE 5'/3' Kit 试剂盒 (Takara 公司)。PCR 模板 cDNA 的反转录方法详见 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书。

2.2 HsCAO2 基因的克隆

基于蛇足石杉转录组数据, 筛选到一个 CAO-like 基因片段。依据该序列设计 RACE 引物。用于扩增 3'-RACE 的引物为 HsCAO2-3, 用于扩增 5'-RACE 的引物为 HsCAO2-5。

将扩增的 RACE 片段纯化后连接到 Blunt-zero 载体、转化 DH5 α 感受态细胞。待 LB+卡那霉素平板上长出大小合适的菌落后, 挑取若干白斑于 LB+卡那霉素的培养基中过夜培养。沾取适量菌液, 用通用引物 M13R 和 M13F 进行 PCR 验证后, 将扩增出目的条带的菌液送广州天一辉远公司测序。

2.3 HsCAO1 生物信息学分析

利用在线软件 ORFfinder ([https://www.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder)

[ncbi.nlm.nih.gov/orffinder](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder))、Conserved domains ([https://www. ncbi.nlm. nih.gov/Structure/cdd/ wrpsb. cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)) 和 Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih. gov/Blast.cgi](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) 查找 HsCAO2 的开放阅读框、保守结构域和同源序列; 利用 MEGA6.0 软件构建 HsCAO2 蛋白的进化树; 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列同源性比对; 利用在线软件 PSIPRED ([http://bioinf.cs.ucl.ac. uk/ psipred/psiform. html](http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html)) 对 HsCAO2 蛋白进行二级结构分析; 利用在线软件 SWISS-MODEL ([https:// swissmodel.expasy.org/](https://swissmodel.expasy.org/)) 对 HsCAO2 蛋白的三级结构进行分析。

2.4 pOX-HsCAO2 和 pET-28a(+) -HsCAO2 载体的构建

根据 HsCAO2 的 CDS 序列, 设计 pOX-HsCAO2 的构建引物 HsCAO2-SEN-KpnI 与 HsCAO2-ANTI-SaII 和 pET-28a(+) -HsCAO2 的构建引物 HsCAO2-SEN-EcoRI 与 HsCAO-ANTI-SaII (表 1)。PCR 扩增目的基因。目的片段与 Blunt-zero 载体连接后转化到 DH5 α 化学感受态细胞中。经广州天一辉远公司测序正确后, 提取 Blunt-zero- HsCAO2 质粒, 并使用相应的限制性内切酶分别对测序正确的质粒和 pOX、pET-28a(+) 载体进行酶切。目的片段先纯化, 随后用 T4 DNA 连接酶连接, 转化到 DH5 α 化学感受态细胞中。通过菌落 PCR 和酶切验证阳性克隆。

表 1 所用的引物

Table 1 Primers used in this study

功能引物	引物名称	引物序列 (5'-3')
3'-RACE 克隆	HsCAO2-3	GCACAGACTACAGGCTTTTTGCTCAG
5'-RACE 克隆	HsCAO2-5	CACCAGCCCATCGTTCCTCTTGT
克隆载体插入片段检测	M13-R	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
	M13-F	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
HsCAO2 编码区克隆	HsCAO2-SEN-KpnI	CGGGGTACCATGAGTTTCCATGGTGGGC
	HsCAO2-ANTI- SaII	ACGCGTCGACCTACCTCTCGTCAACATGG
	HsCAO2-SEN-EcoRI	CGGAATTCATGAGTTTCCATGGTGGGC
	HsCAO2-ANTI- SaII	GCGTCGACCTACCTCTCGTCAACATGG

3 结果与分析

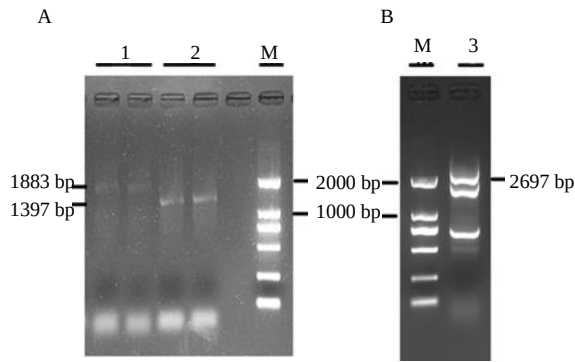
3.1 HsCAO2 cDNA 全长的克隆与序列分析

依据转录组数据分析得到的一个 HsCAO2 基因片段设计 RACE 扩增引物 (表 1), 得到了 HsCAO2 基因序列的 5'端和 3'端序列 (图 1-A 和 B), 并由此克隆到了 HsCAO2 2697 bp 的全长 cDNA 序列。经分析, 该序

列有 2199 bp 的 CDS 序列, 推测其编码 732 个氨基酸。

3.2 HsCAO2 结构域、同源性比对、系统进化树和蛋白结构的分析

将 HsCAO2 与从 NCBI 中筛选到的同源性较高的几个物种的 CAOs 进行氨基酸序列同源性比对, 结果显示 HsCAO2 与蛇足石杉中的另一个 CAO

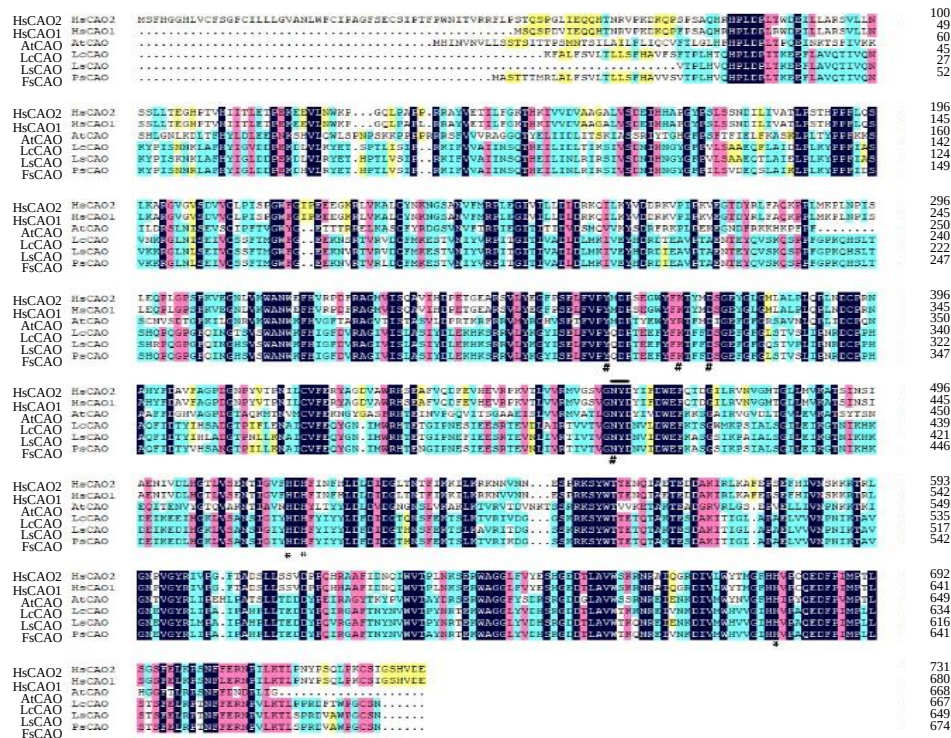


M-Marker 1-5'-RACE PCR 2-3'-RACE PCR 3-HsCAO2 cDNA 全长验证

M-Marker 1-5'-RACE PCR 2-3'-RACE PCR 3-verification of full length of HsCAO2 cDNA

图1 HsCAO2 同源片段的 RACE 扩增 (A) 和编码区全长扩增 (B) 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoretograms of RACE amplifications of HsCAO2 fragments (A) and full length amplification of HsCAO2 cDNA (B)



CAO 保守共识序列用横线表示, 铜离子结合位点用*表示, 对活化中心起关键作用的 4 个氨基酸残基用#表示; HsCAO1- *Huperzia serrata* CAO1, AER93284.1 AtCAO- *Arabidopsis thaliana* CAO, AAB87690.1 LcCAO- *Lens culinaris* CAO, AAB34918.3 LsCAO- *Lathyrus sativus* CAO, ALE71304.1 PsCAO- *Pisum sativum* CAO, BAA77206.1

— indicates conserved domains of CAO * indicates Cu²⁺ binding sites # indicates four key amino acid residues in activation center. HsCAO1-*H. serrata* CAO1, AER93284.1 AtCAO-*Arabidopsis thaliana* CAO, AAB87690.1 LcCAO-*Lens culinaris* CAO, AAB34918.3 LsCAO-*Lathyrus sativus* CAO, ALE71304.1 PsCAO-*Pisum sativum* CAO, BAA77206.1

图2 HsCAO2 与其他物种中的 CAO 氨基酸序列的同源性比对

Fig. 2 Sequence alignments of HsCAO2 and CAOs from other organisms

(HsCAO1) 的同源性最高, 达 91.67% (图 2)。与其他功能性的 CAOs 序列相似, HsCAO2 也含有保守共识序列 Asn-Tyr-Asp/Glu、保守的铜离子结合位点以及对活化中心起关键作用的 4 个氨基酸残基酪氨酸 (tyrosine, Tyr)、以及赖氨酸 (lysine, Lys)、Asp 和 Asn (图 2)。为进一步预测 HsCAO2 的进化关系, 使用 MEGA6.0 构建了 HsCAO2 与其他多个物种中 CAOs 的进化树, 结果表明 HsCAO2 与 HsCAO1 的亲缘关系最近 (图 3)。

HsCAO2 蛋白的二级结构分析结果表明, 其二级结构合理, 含有少部分 α -螺旋和 β -折叠, 大部分为无规则卷曲, 且整个序列中无信号肽、胞外酶、凹角螺旋等结构 (图 4)。以 PSAO and Xenon copper-containing amine oxidase (1W2Z_A) 为模板, 构建了 HsCAO2 蛋白的三级结构。结果如图 5 所示, HsCAO2 蛋白在体内可能以同源二聚体的形式存在并发挥催化功能。

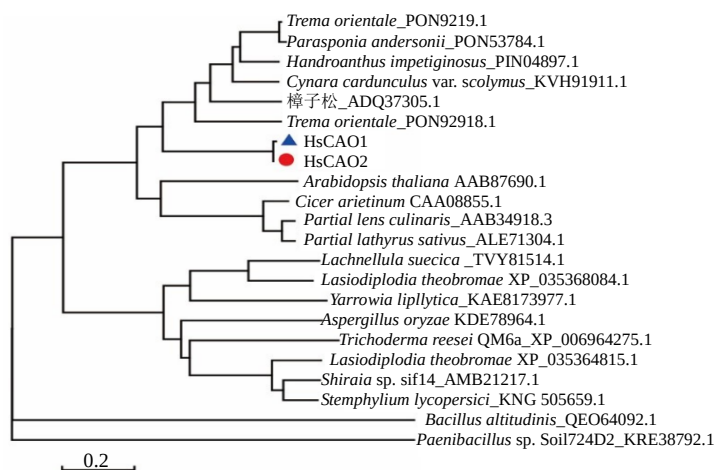


图 3 HsCAO2 的分子进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of HsCAO2 and CAOs from other organisms

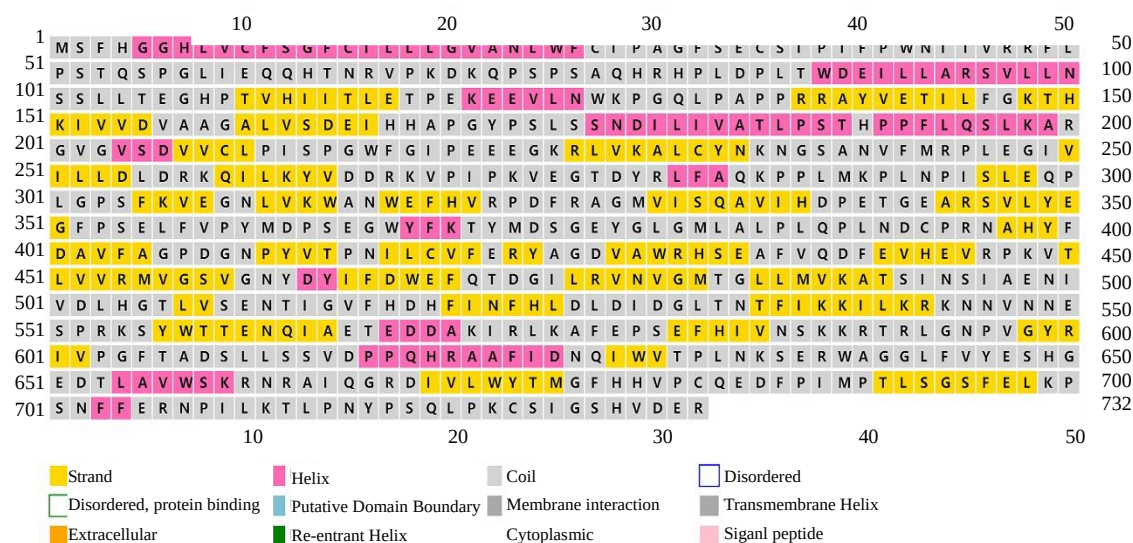


图 4 预测的 HsCAO2 蛋白二级结构

Fig. 4 Predicted secondary structure of HsCAO2

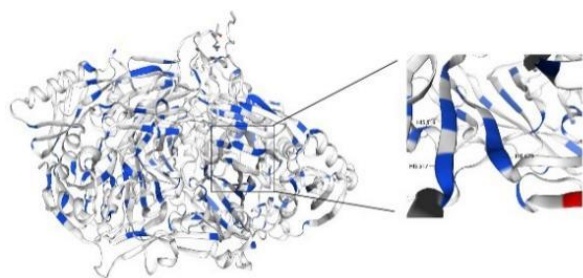


图 5 预测的 HsCAO2 蛋白三级结构和放大部分中的 3 个组氨酸残基为保守的 Cu^{2+} 结合位点

Fig. 5 Predicted 3-D structure of HsCAO2 and three histidine residues as conserved Cu^{2+} binding sites

3.3 HsCAO2 表达载体的构建

pOX-HsCAO2 重组载体构建过程如图 6 所示，在 HsCAO2 两端引入 *Kpn*I 和 *Sal*I 酶切位点，得到含 *Kpn*I 和 *Sal*I 酶切位点的 HsCAO2 基因，连接 Blunt-zero 克隆载体，得到 Blunt-zero-HsCAO2。用 *Kpn*I 和 *Sal*I 进行双酶切（图 7-A），大小为 2199 bp 左右的片段为目的片段，回收后与同样用 *Kpn*I 和 *Sal*I 进行酶切的 pOX 载体用 T4 DNA 连接酶连接，对重组质粒进行菌液 PCR 验证（图 7-B）和酶切验证（图 7-C），获得预期大小为 2199 bp 左右的目的片段，证明植物表达载体 pOX-HsCAO2 构建成功。同理如图 6 所示构建 pET-28a(+)-HsCAO2 载体，

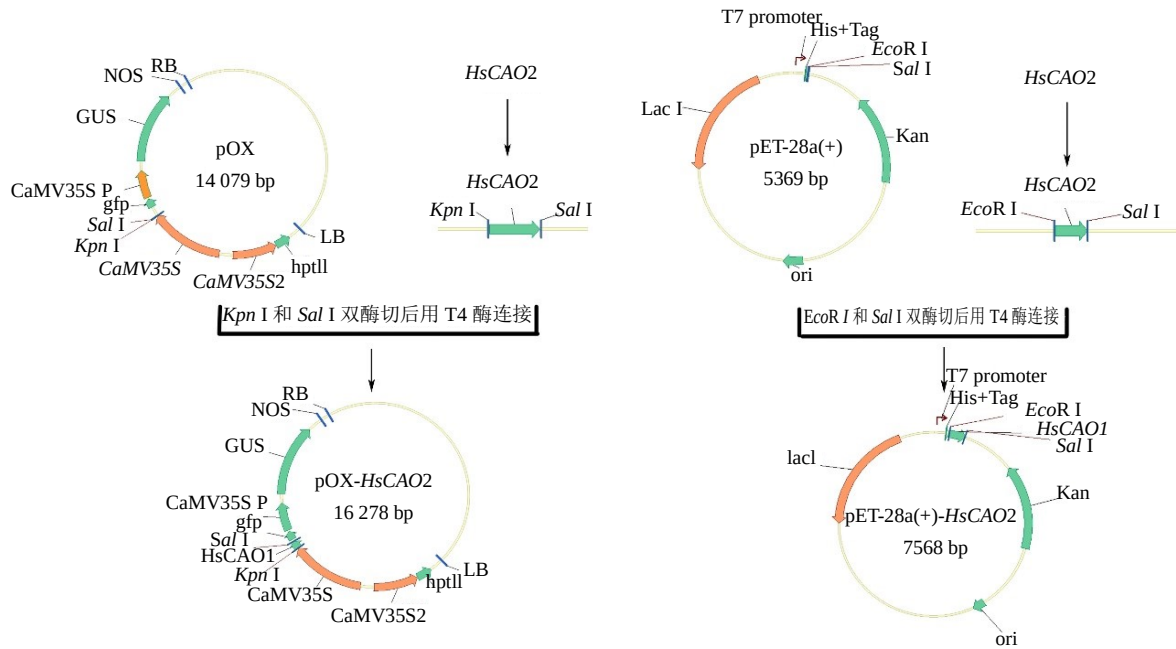
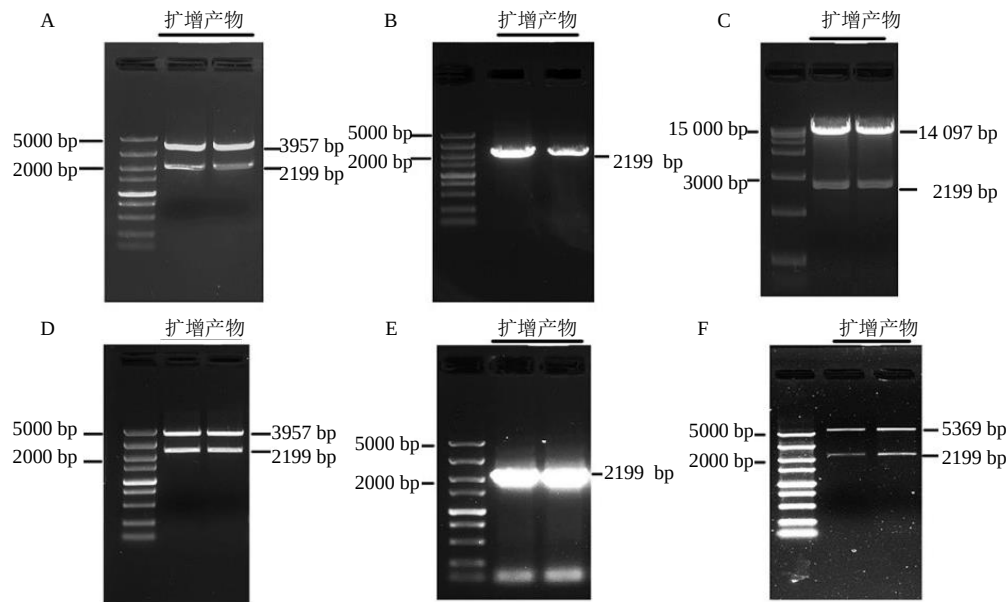


图 6 pOX-HsCAO2 和 pET-28a (+)-HsCAO2 重组载体构建过程示意图

Fig. 6 Schematic diagrams of vector construction process of pOX-HsCAO2 and pET-28a(+)-HsCAO2



A-含 *Kpn*I 和 *Sal*I 酶切位点的 *Blunt-zero-HsCAO2* 克隆载体的双酶切琼脂糖凝胶电泳图 B-pOX-HsCAO2 克隆 PCR 验证电泳图 C-pOX-HsCAO2 双酶切验证电泳图 D-含 *Eco*RI 和 *Sal*I 酶切位点 *Blunt-zero-HsCAO2* 克隆载体的双酶切琼脂糖凝胶电泳图 E-pET-28a(+)-HsCAO2 克隆 PCR 验证电泳图 F-pET-28a(+)-HsCAO2 双酶切验证电泳图

A- Electrophoretogram of double enzyme digestion of recombinant *Blunt-zero-HsCAO2* using *Kpn*I and *Sal*I B- Electrophoretogram of verification of pOX-HsCAO2 colonies by PCR C- Electrophoretogram of double enzyme digestion of recombinant pOX-HsCAO2 D- Electrophoretogram of double enzyme digestion of recombinant *Blunt-zero-HsCAO2* using *Eco*RI and *Sal*I E- Electrophoretogram of verification of pET-28a(+)-HsCAO2 colonies by PCR F- Electrophoretogram of double enzyme digestion of recombinant pET-28a(+)-HsCAO2

图 7 构建 pOX-HsCAO2 和 pET-28a(+)-HsCAO2 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 7 Electrophoretograms of construction of pOX-HsCAO2 and pET-28a(+)-HsCAO2

构建过程中 *Eco*RI 和 *Sal*I 酶切 *Blunt-zero-HsCAO2* (图 7-D)、菌液 PCR 验证 (图 7-E) 和酶切验证 (图

7-F) 所得到的目的片段大小均为 2199 bp 左右, 证明 pET-28a (+)-HsCAO2 载体构建成功。

3 讨论

为适应生境、吸引昆虫传粉或对抗病原体和草食动物,植物会在体内合成各种各样的防御化合物^[27-28]。生物碱是植物体内最重要的防御化合物之一,大约 20%的植物均能合成生物碱。在目前已发现的约 12 000 种生物碱中,很多都具有潜在的药理活性,且一些已被开发为广泛使用的药物^[29]。生物碱一般由以苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)、Tyr、色氨酸(tryptophan, Trp)、鸟氨酸(ornithine, Orn)以及 Lys 等氨基酸为前体的初生代谢物进一步合成而来^[30]。

HupA 属于石松生物碱(lycopodium alkaloids),同位素示踪实验结果表明,HupA 生物合成通路的第一步是以 L-赖氨酸为底物,经过赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC)催化合成尸胺(xadaverine)^[22-23]。尸胺在铜胺氧化酶的作用下被催化成哌啶(piperidine),然后再经过多步未知的途径,最后合成 HupA^[22, 24]。这其中,CAO 是限速酶,且其催化底物尸胺是一种非常重要的中间产物,因为它也是喹啉类生物碱(quinolizidine alkaloids, QAs)以及具有哌啶环和吡啶(pyridine)环生物碱如胡椒碱(piperine)、山梗菜碱(lobeline)等重要生物碱的共有合成前体^[31]。

CAO 广泛存在于细菌、酵母、植物、真菌、动物等好氧生物中^[32]。CAO 的生物学功能非常广泛,不同物种间的 CAO 氨基酸同源性只有 20%~40%,但它们几乎都具有 2 个非常保守的活性位点—2,4,5-三羟基苯丙氨酸醌(2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone, TPQ)辅因子结合位点以及二价铜离子结合位点^[33]。本研究中,HsCAO2 的氨基酸序列在这些活性位点处也高度保守(图 2)。此外,与其他生物体中的 CAOs 类似,HsCAO2 在植物体内也可能是以同源二聚体的形式存在并发挥催化功能的(图 5)。进一步的进化树分析结果发现,HsCAO2 与蛇足石杉中另一个可以催化尸胺合成哌啶的 HsCAO1 亲缘关系很近(图 3)。这些结果表明,HsCAO2 可能也是蛇足石杉中另一个功能性的 CAO。

很多物种中都存在多个 CAOs。比如,拟南芥中有 10 个 CAOs,但它们参与的生物学过程既有不同之处,也有冗余性^[34-35]。为了进一步研究 HsCAO2 的功能,本研究成功构建了 HsCAO2 的超表达载体 pOX-HsCAO2 和体外蛋白表达载体 pET-28a(+)-HsCAO2(图 6、7)。后续将通过转基因和蛋

白酶-底物体外孵育实验来进一步验证 HsCAO2 的生物学功能。此外,HsCAO2 与 HsCAO1 以及 HupA 的时空表达模式的关联性分析,也将为进一步明晰不同的 CAOs 在 HupA 生物合成通路中的功能和分工奠定理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu J S, Zhu Y L, Yu C M, et al. The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity [J]. *Can J Chem*, 1986, 64(4): 837-839.
- [2] Xu Z, Wang Y. Huperzine A attenuates hepatic ischemia reperfusion injury via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(2): 701-706.
- [3] Damar U, Gersner R, Johnstone J T, et al. Huperzine A as a neuroprotective and antiepileptic drug: A review of preclinical research [J]. *Expert Rev Neurother*, 2016, 16(6): 671-680.
- [4] Sui X Z, Gao C Q. Huperzine A ameliorates damage induced by acute myocardial infarction in rats through antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory mechanisms [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(1): 227-233.
- [5] Wang L S, Zhou J, Shao X M, et al. Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury in neonatal rats after hypoxia-ischemia [J]. *Brain Res*, 2002, 949(1/2): 162-170.
- [6] Wang H Y, Wu M, Diao J L, et al. Huperzine A ameliorates obesity-related cognitive performance impairments involving neuronal insulin signaling pathway in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(2): 145-153.
- [7] Ma X Q, Jiang S H, Zhu D Y. Alkaloid patterns in *Huperzia* and some related genera of Lycopodiaceae Ssensu Lato occurring in China and their contribution to classification [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1998, 26(7): 723-728.
- [8] Ma X Q, Tan C H, Zhu D Y, et al. A survey of potential huperzine A natural resources in China: The Huperziaceae [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104(1/2): 54-67.
- [9] Ma X, Tan C, Zhu D, et al. Huperzine A from *Huperzia* species: An ethnopharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113(1): 15-34.
- [10] 龙华, 李菁, 李鹏, 等. 蛇足石杉扦插及芽胞繁殖研究 [J]. *中药材*, 2014, 37(7): 1115-1121.
- [11] Ma X, Gang D R. *In vitro* production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease [J].

- Phytochemistry*, 2008, 69: 2022-2028.
- [12] Ishiuchi K, Park J J, Long R M, *et al.* Production of huperzine A and other *Lycopodium alkaloids* in *Huperzia* species grown under controlled conditions and *in vitro* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 208-219.
- [13] Zhao X M, Wang Z Q, Shu S H, *et al.* Ethanol and methanol can improve huperzine A production from endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* ES026 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61777.
- [14] Shu S H, Zhao X M, Wang W J, *et al.* Identification of a novel endophytic fungus from *Huperzia serrata* which produces huperzine A [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(12): 3101-3109.
- [15] Yan R M, Zhang Z B, Wang Y, *et al.* Efficient strategy for maintaining and enhancing the huperzine A production of *Shiraia* sp. Slf14 through inducer elicitation [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(7): 1175-1179.
- [16] Ying Y M, Shan W G, Zhan Z J. Biotransformation of huperzine A by a fungal endophyte of *Huperzia serrata* furnished sesquiterpenoid-alkaloid hybrids [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(9): 2054-2059.
- [17] Thi Minh Le T, Thi Hong Hoang A, Thi Bich Le T, *et al.* Isolation of endophytic fungi and screening of Huperzine A-producing fungus from *Huperzia serrata* in Vietnam [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16152.
- [18] Cruz-Miranda O L, Folch-Mallol J, Martínez-Morales F, *et al.* Identification of a Huperzine A-producing endophytic fungus from *Phlegmariurus taxifolius* [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(1): 489-495.
- [19] Xu B F, Fan Z, Lei Y X, *et al.* Insights into pipercolic acid biosynthesis in *Huperzia serrata* [J]. *Org Lett*, 2018, 20(8): 2195-2198.
- [20] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [21] Ro D K, Ouellet M, Paradise E M, *et al.* Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid [J]. *BMC Biotechnol*, 2008, 8: 83.
- [22] Ma X Q, Gang D R. The *Lycopodium alkaloids* [J]. *Nat Prod Rep*, 2004, 21(6): 752-772.
- [23] Gerdes H J, Leistner E. Stereochemistry of reactions catalysed by L-lysine decarboxylase and diamine oxidase [J]. *Phytochemistry*, 1979, 18(5): 771-775.
- [24] Xu B F, Lei L, Zhu X C, *et al.* Identification and characterization of L-lysine decarboxylase from *Huperzia serrata* and its role in the metabolic pathway of *Lycopodium* alkaloid [J]. *Phytochemistry*, 2017, 136: 23-30.
- [25] Sun J Y, Morita H, Chen G S, *et al.* Molecular cloning and characterization of copper amine oxidase from *Huperzia serrata* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(18): 5784-5790.
- [26] Peng Q Z, Long H, Du C, *et al.* RNA-seq of aboveground sporophyte's transcriptome of *Huperzia serrata* and transcriptional understanding of early steps associated with huperzine biosynthesis in forest [J]. *Curr Plant Biol*, 2020, 24: 100159.
- [27] Pichersky E, Lewinsohn E. Convergent evolution in plant specialized metabolism [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 549-566.
- [28] Pichersky E, Gang D R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(10): 439-445.
- [29] De Luca V, St Pierre B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(4): 168-173.
- [30] Facchini P J. ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 29-66.
- [31] Leistner E, Spenser I D. Biosynthesis of the piperidine nucleus. Incorporation of chirally labeled (1-3H)cadaverine [J]. *J Am Chem Soc*, 1973, 95(14): 4715-4725.
- [32] Klema V J, Solheid C J, Klinman J P, *et al.* Structural analysis of aliphatic versus aromatic substrate specificity in a copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha* [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(13): 2291-2301.
- [33] Chang C M, Klema V J, Johnson B J, *et al.* Kinetic and structural analysis of substrate specificity in two copper amine oxidases from *Hansenula polymorpha* [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(11): 2540-2550.
- [34] Alharbi B, Hunt J D, Dimitrova S, *et al.* Mutation of *Arabidopsis* copper-containing amine oxidase gene *AtCuAOδ* alters polyamines, reduces gibberellin content and affects development [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): E7789.
- [35] Groß F, Rudolf E E, Thiele B, *et al.* Copper amine oxidase 8 regulates arginine-dependent nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(9): 2149-2162.

[责任编辑 时圣明]