

• 药材与资源 •

黄草乌异戊烯基焦磷酸异构酶基因的克隆与功能研究

马晓惠*, 曹小青, 管丽娜, 李国栋, 王一博*

云南中医药大学中药学院 云南省南药可持续利用研究重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 对黄草乌 *Aconitum vilmorinianum* 的异戊烯基焦磷酸异构酶 (isopentenyl diphosphate isomerase, IDI) 基因进行克隆及功能研究, 为黄草乌中二萜生物碱的生物合成途径解析奠定基础。方法 基于黄草乌的转录组数据筛选注释为 *IDI* 的基因, 设计特异性引物克隆其编码区, 利用相关软件对其进行生物信息学分析, 利用实时荧光定量 PCR 分析其在黄草乌不同器官中的表达情况, 在大肠杆菌中表达其重组蛋白, 利用功能显色验证其功能。结果 从黄草乌中克隆得到 1 个 *IDI* 基因 (*AvIDI*, Genbank 登录号 MZ814967)。生物信息学分析表明, *AvIDI* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 897 bp, 编码 298 个氨基酸, 分子式为 $C_{1516}H_{2362}N_{414}O_{452}S_{11}$, 相对分子质量为 33 970, 理论等电点为 5.94, 具有异戊烯基焦磷酸异构酶 TNTCCSHPL 和 WGEHELDY 2 个保守序列。系统进化分析显示, *AvIDI* 与黄龙胆 *Gentiana lutea* IDI 的亲缘关系最近。表达分析表明, *AvIDI* 基因在黄草乌根、茎、叶和花中均有表达, 在茎中表达量最高。在大肠杆菌中成功表达了 *AvIDI* 重组蛋白, 功能显色实验表明, *AvIDI* 编码有功能的 IDI 蛋白, 能促进大肠杆菌中番茄红素的积累。结论 克隆得到 *AvIDI* 基因, 并通过功能显色实验证明其编码有功能的 IDI 蛋白, 该研究为利用 *IDI* 基因调控黄草乌中二萜生物碱生物合成奠定了基础。

关键词: 黄草乌; 异戊烯基焦磷酸酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 功能显色

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)16-5142-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.16.023

Cloning and functional characterization of isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Aconitum vilmorinianum*

MA Xiao-hui, CAO Xiao-qing, GUAN Li-na, LI Guo-dong, WANG Yi-bo

Yunnan Key Laboratory of Sustainable Utilization of Southern Medicine, College of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To clone and functionally study the isopentenyl diphosphate isomerase (IDI) gene of *Aconitum vilmorinianum*, so as to lay a foundation for the analysis of the biosynthetic pathway of diterpene alkaloids in *A. vilmorinianum*. **Methods** The genes annotated as *IDI* were selected from the transcriptome data of *A. vilmorinianum*. Specific primers were designed to clone the coding regions. Bioinformatics analysis was performed with relevant software. Real-time quantitative PCR was used to analyze their expression level in different organs of *A. vilmorinianum*. The recombinant protein was expressed in *Escherichia coli*, and its function was verified by functional coloration experiment. **Results** An *IDI* gene (*AvIDI*, Genbank accession No. MZ814967) was cloned from *A. vilmorinianum*. Bioinformatics analysis showed that the open reading frame of *AvIDI* were 897 bp encoding 298 amino acids. The molecular formula of *AvIDI* was $C_{1516}H_{2362}N_{414}O_{452}S_{11}$. The molecular weight of *AvIDI* was 33 970 with a theoretical pI of 5.94. *AvIDI* contained two conserved sequences of TNTCCSHPL and WGEHELDY. Phylogenetic analysis showed that *AvIDI* was closely related to *Gentiana lutea* IDI. Expression analysis showed that *AvIDI* expressed in root, stem, leaf and flower of *A. vilmorinianum*, with highly expression in the stem. The recombinant protein of *AvIDI* was successfully expressed in *E. coli*. The functional coloration experiment in *E. coli* showed that *AvIDI* encoded a functional IDI protein and promoted the accumulation of lycopene. **Conclusion** The *AvIDI* was cloned and proven to encode a functional IDI protein. This study laid a foundation for the regulation of diterpenoid alkaloids biosynthesis in *A. vilmorinianum* with *IDI* gene.

Key words: *Aconitum vilmorinianum* Kom.; isopentenyl diphosphate isomerase; gene cloning; bioinformatics analysis; functional coloration

收稿日期: 2022-02-09

基金项目: 中央本级重大增减支项目 (2060302); 云南省科技人才和平台计划 (202105AG070012)

*通信作者: 马晓惠, 讲师, 从事分子生药学研究。E-mail: maxiaohui1988@126.com

王一博, 硕士, 从事分子生药学研究。E-mail: 2498927287@qq.com

黄草乌 *Aconitum vilmorinianum* Kom. 又被称为藤草乌、昆明堵喇、昆明乌头等, 为毛茛科乌头属多年生草本植物^[1], 其块根作为药材黄草乌入药^[2-3], 是云南白药、云南红药等伤科药的重要原料。黄草乌具有祛风散寒、解毒消肿、活血止痛等功效^[4], 其主要毒性成分和有效成分是二萜生物碱类成分^[5-6], 二萜生物碱的生源合成途径受到广泛关注。二萜生物碱的氨基化过程发生在二萜环状碳骨架形成后, 其因氨基化过程较晚而被称为假生物碱(pseudoalkaloids)^[7]。根据二萜生物碱的化学结构, 科研工作者提出了其生源途径: 通过细胞质中的甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径和质体中的 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径合成异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP), 其在异戊烯基焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IDI/IPI)的催化作用下和其异构体二甲基丙烯基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)进行互相转化, IPP 和 DMAPP 在牻牛儿基焦磷酸合酶(geranyl diphosphate synthase, GPS)、法呢基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)和牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPPS)的作用下合成二萜前体牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP), GGPP 在二萜合酶的作用下环化、重排形成二萜生物碱的基本环状碳骨架结构考烷(kaurane)和阿替烷(atisane), 二者在氨基转移酶及细胞色素 P450 等酶的作用下发生氨基化、氧化等反应形成阿替生(atisines)型和维特钦型(veatchines) C₂₀ 二萜生物碱, atisines 和 veatchines 进一步通过重排、脱氨基等反应生成其他 C₂₀、C₁₉ 和 C₁₈ 类二萜生物碱^[7-9]。IDI 通过调节 IPP 和 DMAPP 的稳态比例影响二萜生物碱的生物合成, 黄草乌中 IDI 基因的克隆及功能研究对黄草乌中二萜生物碱的生物合成途径研究具有重要意义。

本研究基于黄草乌转录组数据, 从黄草乌中克隆获得 1 条 IDI 基因, 对其编码蛋白的理化性质、保守结构域、系统进化关系等进行分析, 用实时荧光定量 PCR 分析其在黄草乌不同器官的表达情况, 并在大肠杆菌中异源表达研究其功能, 为今后利用 IDI 基因调控黄草乌中二萜生物碱的生物合成奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

植物样品于 2019 年 10 月采自云南省玉溪市澄

江县梁王山, 经云南中医药大学李国栋副教授鉴定为黄草乌 *A. vilmorinianum* Kom.。黄草乌冲洗干净后经液氮速冻后留样保存于云南省道地濒危中药材繁育与栽培工程技术研究中心实验室-80 °C 冰箱。DH5 α Chemically Competent Cell 购自翌圣生物科技(上海)有限公司; BL21 (DE3) Chemically Competent Cell 和 Trans1-Blue Chemically Competent Cell 均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 试剂

pCold GST DNA 购自宝生物工程有限公司; pTrc-AtIDI 和 pAC-LYC 由 Francis X Cunningham Jr. Gantt (美国马里兰州学院马里兰大学) 教授惠赠。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 法提取黄草乌根、茎、叶、花的总 RNA, 用超微量紫外可见分光光度计(DS-11, 美国 DENOVIXING)和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (perfect real time) (TaKaRa 公司) 将 RNA 反转录为 cDNA, cDNA 保存于-20 °C 冰箱。

2.2 基因克隆

从黄草乌转录组中共获得 1 条注释为 IDI 基因的序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计全长无缝克隆特异性引物 pCold-AvIDI-F (5'-GGT-ACCCTCGAGGGATCCATGTCGACGATCGGATT-GAAC-3') 和 pCold-AvIDI-R (5'-TCTAGACTG-CAGGTCGACTCAAGTCAATTGTGGATTG-3')。以黄草乌根 cDNA 为模板扩增其全长, PCR 反应体系(50 μ L): PrimeSTAR HS (Premix) 25 μ L、正向和反向引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L、cDNA 1 μ L、双蒸水(ddH₂O) 22 μ L。反应程序: 94 °C、5 min; 98 °C、10 s, 55 °C、15 s, 72 °C、60 s, 34 个循环; 72 °C、10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后纯化, 连入原核表达载体 pCold GST DNA, 转化 DH5 α 感受态细胞, 于含氨苄青霉素(ampicillin, AMP)(100 mg/L) 的 LB 平板上, 37 °C 培养 12~16 h。从平板上挑取单克隆进行菌落 PCR 验证, 阳性结果送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序正确的重组质粒命名为 pCold GST DNA-AvIDI。

2.3 生物信息学分析

利用 NCBI (National Center for Biotechnology

Information) 在线分析 *AvIDI* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 和同源性; 利用 ExPASy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析 *AvIDI* 蛋白的理化性质; 利用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线分析 *AvIDI* 蛋白的跨膜区; 利用 SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 分析信号肽; 用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测 *AvIDI* 的亚细胞定位; 使用 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 分析 *AvIDI* 的结构域; 使用 SOMPA (https://npsa.prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 在线预测蛋白的二级结构; 使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白的三级结构; 利用 BioEdit 软件进行氨基酸序列多重比对; 利用 NCBI 的蛋白质序列数据库搜索同源序列, 用 MEGA6.0 构建系统进化树, bootstrap 为 1000。

2.4 表达分析

根据 *AvIDI* 序列设计实时荧光定量 PCR 引物 *AvIDI*-qRT-F (5'-GCTTCTGGATGAAGTGGGTA-TT-3') 和 *AvIDI*-qRT-R (5'-ATTTGACGTCGCGGA-CTATG-3'), 以 *EF1 α* 作为内参基因^[10], 实时荧光定量 PCR 反应在 Roche LightCycler® 96 实时荧光 PCR 仪上进行。qRT-PCR 反应体系 (20 μ L): TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$) 10 μ L、cDNA 2 μ L、正向反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 双蒸水 (ddH₂O) 6 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C、30 s; 95 $^{\circ}$ C、5 s, 55 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、10 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、1 s。黄草乌根、茎、叶和花各设 3 个生物学重复, 每个样品设 3 个技术重复。用 LightCycler® 96 SW 以及 SPSS 软件分析结果。*AvIDI* 的相对表达量用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算。

2.5 *AvIDI* 重组蛋白表达

将重组质粒 pCold GST DNA-*AvIDI* 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) Chemically Competent Cell, 挑取单克隆于含 AMP (100 mg/L) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 250 r/min 培养至吸光度 (A_{600}) 为 0.6~1.0, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1 mmol/L, 于 15 $^{\circ}$ C 诱导培养菌液 15 h。离心收集菌体, 加入 PBS 缓冲液复溶, 用超声波细胞破碎仪以 5 s/8 s 程序超声破碎菌体至液体澄清, 4 $^{\circ}$ C 离心收集上清和沉淀, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝

胶电泳分析蛋白表达情况。以转化 pCold GST DNA 的 BL21 (DE3) 进行随行实验作为对照。

2.6 功能显色

限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切表达载体 pTrc-*AtIDI*, 切胶回收获得链状 pTrc 载体; 以重组质粒 pCold GST DNA-*AvIDI*1 为模板, 用 pTrc-*AvIDI*-F (5'-GGGGTACCATGTCGACGATC-GGATTGAA-3') 和 pTrc-*AvIDI*-R (5'-CGGGAT-CCTCAAGTCAATTTGTGGATTGTT-3') 为引物进行 PCR 扩增, PCR 产物纯化后用 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切, 酶切产物纯化后用 T4 连接酶与链状 pTrc 载体进行连接, 连接产物转化 Trans1-Blue Chemically Competent Cell, 于含 AMP (100 mg/L) 的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 菌落 PCR 验证并送测序, 将测序结果正确的重组质粒命名为 pTrc-*AvIDI*。将质粒 pTrc、pTrc-*AtIDI* 和 pTrc-*AvIDI* 分别与 pAC-LYC 共转化 Trans1-Blue 感受态细胞, 于含 AMP (100 mg/L) 和氯霉素 (chloramphenicol, Cm, 20 mg/L) 的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。同时将 pAC-LYC 转化 Trans1-Blue 感受态细胞, 于含 Cm (20 mg/L) 的 LB 平板上培养。将菌落 PCR 验证正确的单克隆点于含 AMP (100 mg/L) 和 Cm (20 mg/L) 的 LB 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d, 观察菌斑的颜色变化。

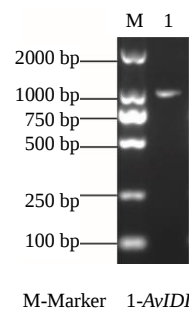
3 结果与分析

3.1 *AvIDI* 的基因克隆

以黄草乌根的 cDNA 为模板扩增 *IDI* 基因, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, *AvIDI* 在 1000 bp 附近有明亮的条带 (图 1), 与黄草乌转录组中 *IDI* 长度一致, 将 PCR 产物连入表达载体 pCold GST DNA, 获得重组质粒 pCold GST DNA-*AvIDI*, 测序结果表明, *AvIDI* 的 ORF 为 897 bp, 编码 298 个氨基酸。

3.2 生物信息学分析

3.2.1 理化性质分析 *AvIDI* 蛋白的相对分子质量



M-Marker 1-*AvIDI*

图 1 *AvIDI* 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification of *AvIDI*

为 33 970, 理论等电点 (pI) 为 5.94。跨膜结构域分析结果表明, AvIDI 蛋白无跨膜结构, 为非膜蛋白。信号肽分析表明, AvIDI 蛋白无信号肽, 为非分泌蛋白。亚细胞定位预测结果表明, AvIDI 蛋白定位于叶绿体上。结构域分析表明 (图 2), AvIDI 含有 NUDIX 水解酶域 (NUDIX hydrolase_dom, 116 ~ 255 aa) 和 IPP 异构酶的结构域 (IsopentenylPP_isomerase_typ1, 86~268 aa)。蛋白二级结构预测结果显示, AvIDI 蛋白二级结构中 α -螺旋占 54.03%, 延伸链占 12.08%, β -转角占 5.37%, 无规则卷曲占 28.52%, AvIDI 蛋白的主要结构元件是 α -螺旋和无规则卷曲。以人类 IDI 蛋白 (2i6k.1.A) 为模板 (序列相似度为 53.30%), 用 SWISS-MODEL 模拟构建 AvIDI 蛋白质的三级结构, 结果见图 3。

3.2.2 多重序列比对及系统发育树分析 NCBI 在线 blast 分析表明, AvIDI 蛋白与黄龙胆 IDI 蛋白相似度最高, 相似度为 91.06%。用 BioEdit 将 AvIDI 的氨基酸序列与其他物种已报道有功能的 IDI 氨基酸序列进行多重序列比对, AvIDI 具有 IDI 蛋白高度保守的 TNTCCSHPL 和 WGEHELDY 序列 (图 4)。在 NCBI 中下载已报道的 IDI 蛋白

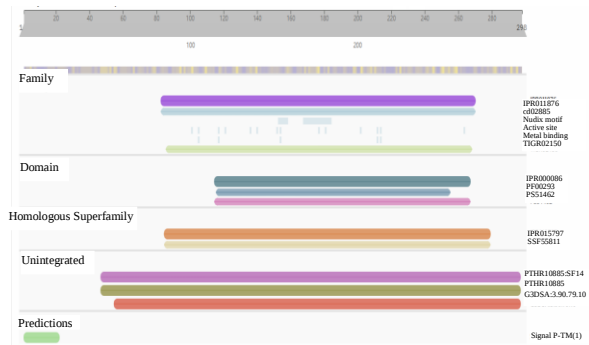


图 2 AvIDI 功能结构域预测

Fig. 2 Functional domain prediction of AvIDI



图 3 AvIDI 蛋白三级结构预测

Fig. 3 Three-dimensional structure analysis of AvIDI

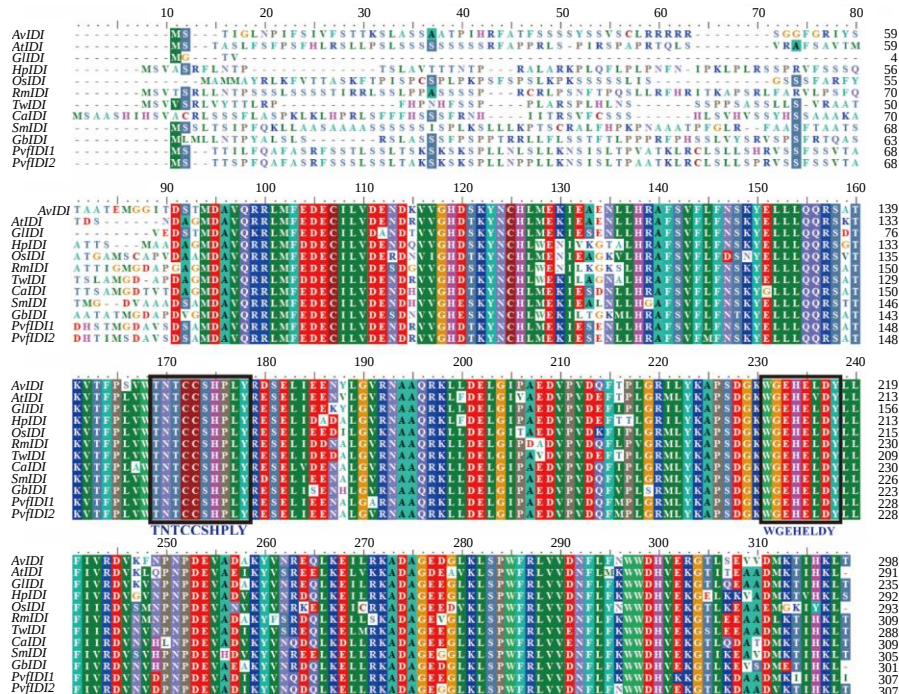


图 4 黄草乌与其他物种 IDI 氨基酸序列多重序列比对

Fig. 4 Multiple comparisons of IDI in *A. vilmorinianum* and other plants

AtIDI-Arabidopsis thaliana IDI (NP197148.3) GlIDI-Gentiana lutea IDI (BAE92732.1) HpIDI-Hypericum perforatum IDI (JAW07394.1) OsIDI-Opuntia streptacantha IDI (MBM5471501.1) RmIDI-Rhizophora mucronata IDI (MBW95860.1) TwIDI-Tripterogium wilfordii IDI (ALB26774.1) CaIDI-Camptotheca acuminata IDI (ABI13583.1) SmIDI-Salvia miltiorrhiza IDI (ABV08818.1) GbIDI-Gossypium barbadense IDI (ABI94388.1) PvIDI1-Panax vietnamensis var. fuscidiscus (MZ736417.1) PvIDI2-Panax vietnamensis var. fuscidiscus (MZ736418.1)

序列, 用 MEGA6.0 构建系统发育树, 结果表明, *AvIDI* 与植物 *IDI* 聚为一支, 与黄龙胆的亲缘关系最近 (图 5)。

3.3 *AvIDI* 在黄草乌不同器官的表达分析

以 *EF1α* 为内参基因分析 *AvIDI* 在黄草乌根、茎、叶和花中的表达, 结果如图 6 所示, *AvIDI* 在黄草乌各个器官中均有表达, *AvIDI* 在茎中表达量最高, 在根中表达量其次, 在叶和花中表达量较低。

3.4 *AvIDI* 重组蛋白表达

SDS-PAGE 电泳结果 (图 7) 显示, 含重组质粒 pCold GST DNA-*AvIDI* 的菌株在约 60 000 处有明显蛋白条带 (融合蛋白理论相对分子质量为 *AvIDI* 理论相对分子质量 33 970 与 26 000 的 GST 标签之和), 与预期 *AvIDI* 融合蛋白大小一致, 且上清和沉淀中均出现了明显的条带, 说明在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达了 *AvIDI*。

3.5 功能显色验证 *AvIDI* 功能

番茄红素是一种天然红色开链烃类胡萝卜素, 主

要存在一些红色果蔬中, 大肠杆菌本身不能自身产生番茄红素, 由于 pAC-LYC 中含有 3 个参与番茄红素合成的基因, 即香叶基香叶基焦磷酸合成酶 (*crtE*)、八氢番茄红素合成酶 (*crtB*) 和八氢番茄红素脱饱和酶 (*crtI*), 转化 pAC-LYC 的大肠杆菌可产生番茄红素, 菌斑颜色可以反映大肠杆菌中番茄红素的产量, 菌斑的颜色越深, 番茄红素的量越多^[11-12]。将 pTrc、pTrc-*AtIDI* 和 pTrc-*AvIDI* 分别与质粒 pAC-LYC 共转化大肠杆菌 *Trans1-blue*。从图 8 可知, 仅转化 pAC-LYC 的菌株 (P2) 在同时含有 AMP 和 Cm 的 LB 培养基上无法生长, 含有 pTrc 和 pAC-LYC 的菌株 (P1) 在同时含有 AMP 和 Cm 的 LB 培养基上能正常生长并呈现浅粉色, 说明其能产生少量番茄红素, 含有 pAC-LYC 及 pTrc-*AtIDI* 和 pTrc-*AvIDI* 的菌株 (分别为 At 和 Av) 均能正常生长, 且其颜色较 P1 深, 说明 At 和 Av 中产生的番茄红素较 P1 多, 由此表明, *AtIDI* 和 *AvIDI* 编码有功能的 IDI 蛋白, 均可以促进番茄红素的生物合成。

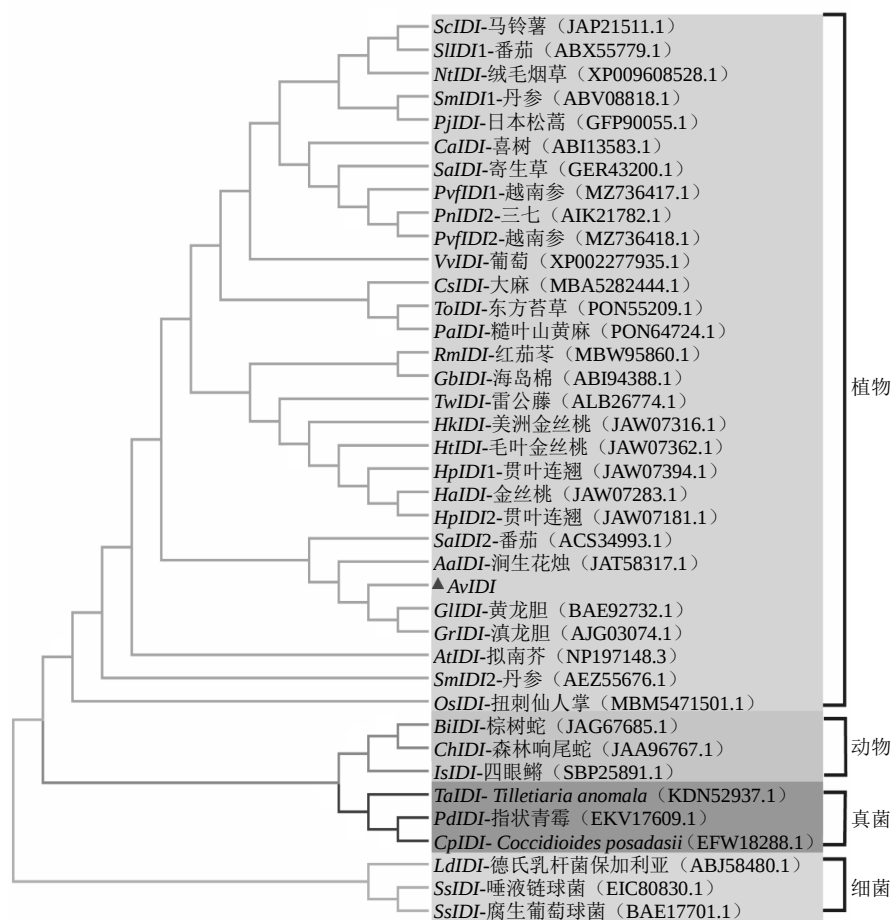
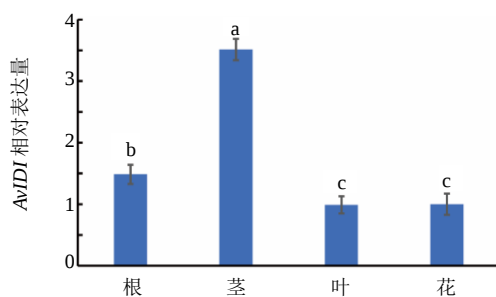


图 5 IDI 蛋白系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of IDI protein



不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters represent significant differences ($P < 0.05$)

图 6 AvIDI 在黄草乌不同器官的表达分析

Fig 6 Expression of AvIDI in different organs of *A. vilmorinianum*

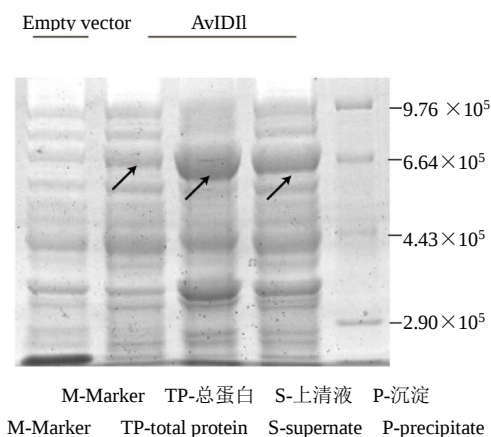


图 7 AvIDI 蛋白表达

Fig. 7 Expression of recombinant AvIDI

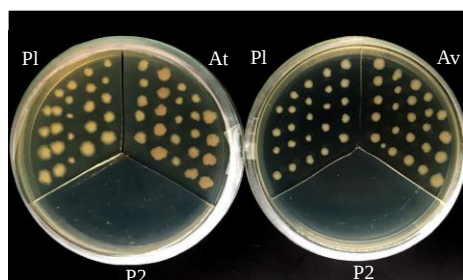


图 8 AvIDI 在大肠杆菌中的功能显色

Fig. 8 Functional identification of AvIDI in *E. coli*

4 讨论

乌头属含有多数药用植物，二萜生物碱是黄草乌等多种乌头属植物的镇痛活性成分，科研工作者构建了乌头属异叶乌头 *A. heterophyllum* Pritz.^[13-14]、乌头 *A. carmichaelii* Debeaux^[15-18] 和黄草乌^[19] 等多种植物的转录组，乌头属植物的转录组为二萜生物碱生物合成途径研究提供了大量基础数据，为二萜

生物碱生物合成途径中基因的功能鉴定奠定了基础。然而，关于二萜生物碱生物合成途径中相关基因的克隆及功能研究较少，Mao 等^[16] 从乌头中克隆并鉴定了 12 个二萜合酶，包括 7 个 AcCPS 和 5 个 AcKSL，7 个 AcCPSs 均催化 GGPP 生成 *ent*-copalyl diphosphate (*ent*-CPP)，而 AcKSL 催化 *ent*-CPP 分别生成 *ent*-kaurene、*ent*-atiserene 和 *ent*-13-epi-sandaraco- pimaradiene 3 种产物，该研究推动了二萜生物碱生物合成途径的解析进程。IPP 和 DMAPP 是萜类化合物的重要前体，二者在 IDI 作用下进行相互转化，IDI 通过调控 IPP 和 DMAPP 的比例及含量影响萜类及其衍生物的生物合成，因此 IDI 基因的克隆及功能研究对萜类化合物的生物合成途径研究及其应用具有重要意义。目前，茶树、烟草、拟南芥、雷公藤、丹参、海岛棉和越南参等多种植物的 IDI 基因已克隆获得，并通过原核表达或 RNAi 等方法对其进行功能研究^[20-26]。其中，茶树、拟南芥和越南参等植物中报道了 2 个 IDI 基因^[24-26]，而雷公藤和丹参等植物中仅报道了 1 个 IDI 基因^[20-21]。不同植物中的 IDI 基因数量不完全一致，可能由于不同植物中本身存在的 IDI 基因数量不一致，也可能与转录组测序深度有关，目前很多基因的挖掘都依赖于转录组，而转录组测序的深度与基因的完整性密切相关，为了全面深入挖掘相关基因，可充分结合基因组和转录组进行相关工作。

黄草乌是云南特色药用植物资源，二萜生物碱是其活性成分，为了研究黄草乌中二萜生物碱的生物合成途径，本研究从黄草乌中克隆得到 1 条 IDI 基因，对其进行了相关生物信息学分析，在大肠杆菌中成功表达 AvIDI 重组蛋白，并通过显色反应证明其编码有功能的 IDI 蛋白，能促进大肠杆菌中番茄红素的积累。黄草乌中 IDI 基因的克隆及功能研究为利用 IDI 基因调控二萜生物碱的生物合成奠定了基础。

志谢：美国马里兰州学院马里兰大学 Francis X Cunningham Jr. (Gantt) 教授惠赠实验所用载体，首都医科大学童宇茹博士对实验的指导。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李雪佩, 何俊, 贺水莲, 等. 黄草乌植物的研究进展[J]. 西部林业科学, 2017, 46(6): 1-7.
- [2] 重庆市中药饮片炮制规范及标准(2006 年版)[S]. 2006: 152.

- [3] 云南省中药材标准-第一册: 2005 年版 [S]. 2005: 26.
- [4] 王丽苹, 陈强威, 沈志滨, 等. 黄草乌及其炮制品的毒性和镇痛作用研究 [J]. 中药材, 2018, 41(8): 1864-1868.
- [5] 温玉莹, 王丽苹, 沈志滨, 等. 黄草乌及其炮制品对心脏毒性的作用和机制研究 [J]. 中药材, 2019, 42(6): 1277-1282.
- [6] 黎虽宇, 刘小赞, 唐春萍, 等. 黄草乌炮制前后生物碱含量及心脏毒性差异研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5588-5593.
- [7] Devkota K P, Sewald N. Terpenoid alkaloids derived by amination reaction [J]. *Nat Prod*, 2013: 923-951.
- [8] Cherney E C, Baran P S. Terpenoid-alkaloids: Their biosynthetic twist of fate and total synthesis [J]. *Isr J Chem*, 2011, 51(3/4): 391-405.
- [9] 肖培根, 王锋鹏, 高峰, 等. 中国乌头属植物药用亲缘学研究 [J]. 植物分类学报, 2006, 44(1): 1-46.
- [10] 曾礼芳, 李国栋, 王宝婕, 等. 黄草乌实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(12): 3116-3122.
- [11] Alonso-Gutierrez J, Chan R, Batth T S, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production [J]. *Metab Eng*, 2013, 19: 33-41.
- [12] Cunningham F X Jr, Sun Z, Chamovitz D, et al. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942 [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(8): 1107-1121.
- [13] Malhotra N, Kumar V, Sood H, et al. Multiple genes of mevalonate and non-mevalonate pathways contribute to high aconites content in an endangered medicinal herb, *Aconitum heterophyllum* Wall [J]. *Phytochemistry*, 2014, 108: 26-34.
- [14] Pal T, Malhotra N, Chanumolu S K, et al. Next-generation sequencing (NGS) transcriptomes reveal association of multiple genes and pathways contributing to secondary metabolites accumulation in tuberous roots of *Aconitum heterophyllum* Wall [J]. *Planta*, 2015, 242(1): 239-258.
- [15] Rai M, Rai A, Kawano N, et al. De novo RNA sequencing and expression analysis of *Aconitum carmichaelii* to analyze key genes involved in the biosynthesis of diterpene alkaloids [J]. *Molecules*, 2017, 22(12): 2155.
- [16] Mao L Y, Jin B L, Chen L L, et al. Functional identification of the terpene synthase family involved in diterpenoid alkaloids biosynthesis in *Aconitum carmichaelii* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(10): 3310-3321.
- [17] Zhao D K, Shen Y, Shi Y N, et al. Probing the transcriptome of *Aconitum carmichaelii* reveals the candidate genes associated with the biosynthesis of the toxic aconitine-type C₁₉-diterpenoid alkaloids [J]. *Phytochemistry*, 2018, 152: 113-124.
- [18] 张大燕, 文欢, 王伟, 等. 乌头萜类生物合成代谢的转录组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 45-50.
- [19] Li Y G, Mou F J, Li K Z. De novo RNA sequencing and analysis reveal the putative genes involved in diterpenoid biosynthesis in *Aconitum vilmorinianum* roots [J]. *3 Biotech*, 2021, 11(2): 96.
- [20] Tong Y R, Zhang M, Su P, et al. Cloning and functional characterization of an isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 63(6): 863-869.
- [21] Zhang X N, Guan H Y, Dai Z B, et al. Functional analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase of *Salvia miltiorrhiza* via color complementation and RNA interference [J]. *Molecules*, 2015, 20(11): 20206-20218.
- [22] Wang Y C, Qiu C X, Zhang F, et al. Molecular cloning, expression profiling and functional analyses of a cDNA encoding isopentenyl diphosphate isomerase from *Gossypium barbadense* [J]. *Biosci Rep*, 2009, 29(2): 111-119.
- [23] Yan N, Zhang H B, Zhang Z F, et al. Organ- and growing stage-specific expression of solanesol biosynthesis genes in *Nicotiana tabacum* reveals their association with solanesol content [J]. *Molecules*, 2016, 21(11): 1536.
- [24] Phillips M A, D'Auria J C, Gershenzon J, et al. The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(3): 677-696.
- [25] 陈丹, 王鹏杰, 陈笛, 等. 茶树 CsIDI1 和 CsIDI2 基因的克隆及其表达分析 [J]. 西北植物学报, 2018, 38(5): 800-807.
- [26] 王一博, 管丽娜, 曹小青, 等. 越南参变种异戊烯基焦磷酸异构酶基因的克隆与功能研究 [J]. 药学报, 2021, 56(12): 3362-3369.

[责任编辑 时圣明]