

• 药材与资源 •

丹参 *SmCYP76S7* 基因的克隆、亚细胞定位和表达分析

张顺仓, 刘肖宇, 邱琳, 程琪茗, 马喆晨, 符婷

扬州大学生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009

摘要: 目的 克隆获得丹参 *SmCYP76S7* 基因序列, 并对其进行生物信息学和表达特性分析。方法 克隆获得 *SmCYP76S7* 的 cDNA 及基因组 DNA 序列, 运用生物信息学软件对该基因及其编码蛋白进行结构和理化性质分析。构建融合表达载体 pEGAD-*SmCYP76S7-eGFP*, 转化烟草后分析 *SmCYP76S7* 蛋白的亚细胞定位。利用 qRT-PCR 测定 *SmCYP76S7* 基因在各器官中的表达量, 同时分别利用不同光质和茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理丹参幼苗和丹参毛状根, 探究 *SmCYP76S7* 基因对光质和 MeJA 的响应。结果 *SmCYP76S7* 基因包含 2 个外显子和 1 个 1 506 bp 的开放阅读框, 编码 501 个氨基酸。该基因在根、茎、叶和花中均有表达, 其中花中表达量最低。*SmCYP76S7* 蛋白除定位于内质网外, 还分布于多个细胞结构。*SmCYP76S7* 基因的表达在红光处理和 MeJA 处理样品中显著上调, 是典型的光和 MeJA 诱导基因。结论 *SmCYP76S7* 基因是 CYP76 家族成员, 结合其表达特性和同家族其他成员的催化活性, 该蛋白很可能参与丹参酮类成分的生物合成, 其具体的生物学作用值得进一步深入挖掘。

关键词: 丹参; 细胞色素 P450; 基因克隆; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4500-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.021

Cloning, subcellular localization and expression analysis of *SmCYP76S7* gene from *Salvia miltiorrhiza*

ZHANG Shuncang, LIU Xiaoyu, QIU Lin, CHENG Qiming, MA Zhechen, FU Ting

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: Objective To clone the gene sequence of *SmCYP76S7* and analyze its bioinformatics and expression characteristics. **Methods** The cDNA and genomic DNA sequences of *SmCYP76S7* were cloned, and the structure and physicochemical properties of the gene and its encoded protein were analyzed by bioinformatics software. The fusion expression vector pEGAD-*SmCYP76S7-eGFP* was constructed, and the subcellular localization of *SmCYP76S7* protein was analyzed after transformation into tobacco. The expression level of *SmCYP76S7* gene in various organs was determined by qRT-PCR. Meanwhile, the seedlings and hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* were treated with different light quality and (methyl jasmonate) MeJA respectively to investigate the responses of *SmCYP76S7* gene to light quality and MeJA. **Results** The *SmCYP76S7* gene contained two exons and one open reading frame of 1506 bp, encoding 501 amino acids. This gene was expressed in root, stem, leaf and flower, with the lowest expression level in flower. In addition to the endoplasmic reticulum, *SmCYP76S7* protein was also distributed in several other cell structures. The expression of *SmCYP76S7* gene was significantly up-regulated in red light and MeJA treated samples, it was a typical light and MeJA-inducing gene. **Conclusion** *SmCYP76S7* gene is a member of the CYP76 family. Combined with its expression characteristics and catalytic activity of other members in this family, *SmCYP76S7* probably participates in the biosynthesis of tanshinones, and its detailed biological role is worth further investigation.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; cytochrome P450; gene cloning; subcellular localization; expression analysis

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 为唇形科鼠尾草属 血管疾病的治疗。丹参的主要有效成分为水溶性的多年生草本植物, 以根及根茎入药, 常被用于心脑血管 酚酸类成分和脂溶性的丹参酮类成分, 目前已从该

收稿日期: 2023-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31700257); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(23)3113); 江苏省中医药科技发展计划项目 (MS2022154)

作者简介: 张顺仓, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药资源及药用植物次生代谢调控研究。E-mail: zhangsc@yzu.edu.cn

植物中分离得到酚酸类成分 20 余种,丹参酮类成分 70 余种^[1]。酚酸类成分的生物合成主要包括苯丙氨酸途径和酪氨酸途径 2 条平行的上游途径,其产物分别为 4-香豆酰辅酶 A 和 3,4-二羟基苯基乳酸(丹参素),二者在迷迭香酸合酶(rosmarinic acid synthase, RAS)的作用下形成 4-香豆素酰-3',4'-二羟基苯基乳酸(4-coumaroyl-30,40-hydroxyphenyllactic acid, 4C-DHPL),进而在细胞色素 P450 蛋白 SmCYP98A14 的催化下合成迷迭香酸^[2]。丹参酮类成分为典型的二萜醌类化合物,其上游生物合成途径同样包括 2 条平行的支路,即甲基赤藓糖醇磷酸(2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP)途径和甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径。上游途径产生异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)和二甲烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)后通过香叶酰基二磷酸合酶(geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS)催化生成香叶酰基二磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP),GGPP 环化后经细胞色素 P450 蛋白的修饰形成各类丹参酮类成分^[3]。

细胞色素 P450 (CYP450) 是植物中最大的超基因家族,因其与 CO 结合后在 450 nm 处有特征吸收峰而得名。P450 蛋白具有广泛的催化活性,通过催化不同的底物参与苯丙烷类、萜类、生物碱等物质的合成^[4]。目前,CYP450 蛋白被分为 1 000 多个家族和 2 500 多个亚家族。不同家族成员 CYP450 蛋白之间的结构差异很大,但都包含一个高度保守的血红素结合域 FxxGxRxCxG^[5]。目前丹参中鉴定得到 116 条 CYP450 基因,被分为 38 个家族^[6]。多个 CYP450 基因被发现参与丹参酮类成分的生物合成,如 SmCYP76AH1、SmCYP76AH3、SmCYP76AH4、SmCYP76AK1、SmCYP71D373 和 SmCYP71D375 等^[6-9]。但丹参酮类成分的生物合成是一个复杂的过程,丹参酮骨架的修饰需要多个 CYP450 蛋白的参与,进一步挖掘可能催化丹参酮生物合成的 CYP450 基因将对解析丹参酮类成分完整的生物合成途径具有重要的理论意义。本研究从丹参中克隆获得与 SmCYP76AH1 及 SmCYP76AK3 等同属 CYP76 家族的 SmCYP76S7 基因,并对其进行生物信息学和表达特性分析,以期阐释其生物学功能奠定理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

丹参样品采自扬州大学试验田,经扬州大学生物

科学与技术学院丁海东教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bge., 取二年生丹参的根、茎、叶和花,经流水洗净后用于 total RNA 的提取。用于亚细胞定位的本氏烟草种子由本实验室留存。

RNAprep pure Plant Kit RNA 提取试剂盒、TIANSeq M-MLV (RNase H-) 反转录酶均购于北京天根生化科技有限公司。FastPure Plasmid Mini Kit、2×Phanta Max Buffer、dNTP Mix (10 mmol/L each)、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 均购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司。EcoRI、BamHI、CutSmart®Buffer (均购于纽伦伦生物技术(北京)有限公司。pEGAD-eGFP 质粒由本实验室留存,内质网定位 marker 质粒 ER-rk CD3-959 由扬州大学生物科学与技术学院胡学运教授惠赠。

1.2 仪器

5804R 型高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司), CYCP-31DN 型电泳仪 (北京六一有限公司), Zeiss LSM 880 NLO 型双光子荧光共聚焦显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司), HYQ-1805 型生物摇床 (武汉汇城生物科技有限公司), RXZ 型智能人工气候箱 (宁波江南仪器厂)。

2 方法

2.1 Total RNA 提取与 cDNA 合成

丹参总 RNA 提取按照天根 RNAprep pure Plant Kit RNA 提取试剂盒说明书进行。将所得 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,确认 RNA 无降解,可以用于后续研究后,按照 Vazyme Biotech 公司 HiScript® III RT SuperMix for qPCR 说明书进行 RNA 的反转录,获得 cDNA。

2.2 丹参 SmCYP76S7 基因 cDNA 和 DNA 序列的克隆

从丹参基因组中获得 SmCYP76S7 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列,设计基因特异性引物 CYP76S7-F 和 CYP76S7-R (表 1),以 cDNA 为模板,克隆目标序列的 ORF。利用 CTAB 法提取丹参基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板、CYP76S7-F 和 CYP76S7-R 为引物克隆获得 SmCYP76S7 基因的 DNA 序列,用于基因结构分析。

2.3 SmCYP76S7 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

利用 SanpGene 软件进行 ORF 和基因组 DNA 序列比对,查找目标基因的内含子,进行基因结构

表 1 所用引物序列
Table 1 Primer sequences used

用途	引物名称	引物序列 (5'-3')
基因克隆	CYP76S7-F	ATGAGCTTCAATCCTGTAACCA
	CYP76S7-R	TCAGAGTTTGGTGGGAATTG
亚细胞定位载体构建	CYP76S7-1-F	CGGCAGCGGCCGAATTCATGAGCTTCAATCCTGTAACCATG
	CYP76S7-1-R	GTTATCTAGATCCGGTGGATCCGAGTTTGGTGGGAATTGCT
qRT-PCR 表达量测定	qCYP76S7-F	ATGAGCTTCAATCCTGTAACCATG
	qCYP76S7-R	CTAGTTTAGCCAAGGAGCGGTG
	Actin-F	GGTGCCCTGAGGTCCTGTT
	Actin-R	AGGAACCAACCGATCCAGACA

分析；利用 *SmCYP76S7* 的 DNA 序列在丹参基因组中进行本地 blast，获得目标基因起始密码子上游 2 000 bp 的启动子序列，利用在线软件 PlanCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子顺式作用元件分析；利用在线软件 Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/index.cgi>) 对氨基酸序列进行系统进化树分析；利用在线软件 EXPASY (https://web.expasy.org/prot_param/) 进行氨基酸序列理化特性分析；利用在线软件 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行目标蛋白的二级和三级结构预测。

2.4 *SmCYP76S7* 蛋白亚细胞定位分析

在 *SmCYP76S7* ORF 序列两端分别添加 *EcoR* I 和 *Bam*HI 酶切位点，将其连入 pEGAD-*eGFP* 质粒，构建过表达载体 pEGAD-*SmCYP76S7-eGFP*。将构建好的 pEGAD-*SmCYP76S7-eGFP* 和 pEGAD-*eGFP* 分别转化根癌农杆菌 GV3101，同时分别共转 ER-rk CD3-959 质粒作为内质网定位标志物 (Marker)，摇菌后注射烟草叶片。烟草暗处理 48 h 后于双光子荧光共聚焦显微镜下观察荧光信号分布情况，确定目标蛋白的亚细胞定位。

2.5 丹参植株和丹参毛状根样品的培养和处理

选取长势一致的 4 周龄丹参野生型幼苗，置于黑暗条件下生长 4 d 后分别在 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的白光、红光和蓝光下继续培养，于 0.5、1、3 h 后分别取样。培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ ，每组设置 10 个生物学重复。提取样品的总 RNA，经反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应，测定目标基因在不同光质处理组中的相对表达量。

利用 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 处理继代培养 18 d 的丹参毛状根 (丹参毛

状根培养条件：110 r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$)，分别在处理 0.5、1、2 h 后取样，提取样品总 RNA，通过 qRT-PCR 测定目标基因对 MeJA 处理的响应。

2.6 基因表达量测定

从两年生丹参的根、茎、叶、花以及处理后的样品中提取 total RNA，经反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应，测定目标基因的表达量。所用引物如表 1 所示，PCR 反应条件如下：95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s；95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s，40 个循环。熔解曲线条件设置为 65~95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s，每升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 时收集 1 次荧光。PCR 结果采用比较 C_t 法进行计算。

2.7 数据分析

利用 PASW Statistics 26 (SPSS 26.0) 软件对目标基因在不同器官或不同处理样品中的表达量进行差异显著性分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示， $P < 0.05$ 为差异显著。

3 结果与分析

3.1 *SmCYP76S7* 基因结构及启动子顺式作用元件分析

SmCYP76S7 基因包含 2 个外显子，长度分别为 897、584 bp，同时包含 1 个内含子，长度为 3150 bp，具体的基因结构如图 1-A 所示。利用在线软件 PlantCARE 对 *SmCYP76S7* 基因起始密码子 (ATG) 5' 上游 2 000 bp 的侧翼序列进行顺式作用元件分析。结果发现 TATA-box 位于转录起始位点上游 31 bp 处，符合真核生物 TATA-box 的位置特点。PlantCARE 分析结果表明，该启动子区域包含多个光响应元件，如 Box 4、G-Box、chs-CMA2a 及 LAMP-element 等，*SmCYP76S7* 基因的表达可能受光的诱导。此外，其启动子区域还包含茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif，推测茉莉酸甲酯同样影响其表达，启动子上具体的顺式作用元件分布情况如图 1-B 所示。

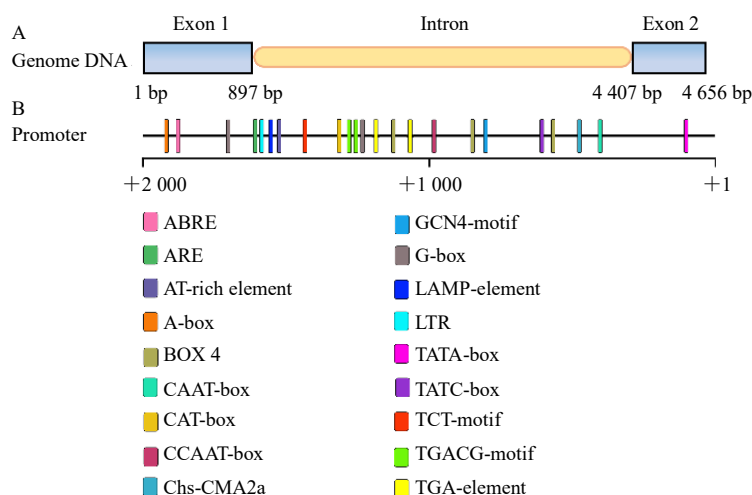


图 1 *SmCYP76S7* 的基因结构 (A) 和启动子顺式作用元件 (B) 分析

Fig. 1 Gene structure (A) and *cis*-acting element analysis in promoter region (B) of *SmCYP76S7*

3.2 *SmCYP76S7* cDNA 及其编码氨基酸序列的理化性质分析

SmCYP76S7 包含一个长度为 1 506 bp 的 ORF, 编码 501 个氨基酸, 其中包括极性氨基酸 286 个, 非极

性氨基酸 215 个, 酸性氨基酸 62 个, 碱性氨基酸 63 个。预测 *SmCYP76S7* 蛋白的相对分子质量为 56 540, 等电点为 7.67。氨基酸序列中有包含典型的 PERF 结构域、K 螺旋、I 螺旋、血红素结合域等 (图 2)。

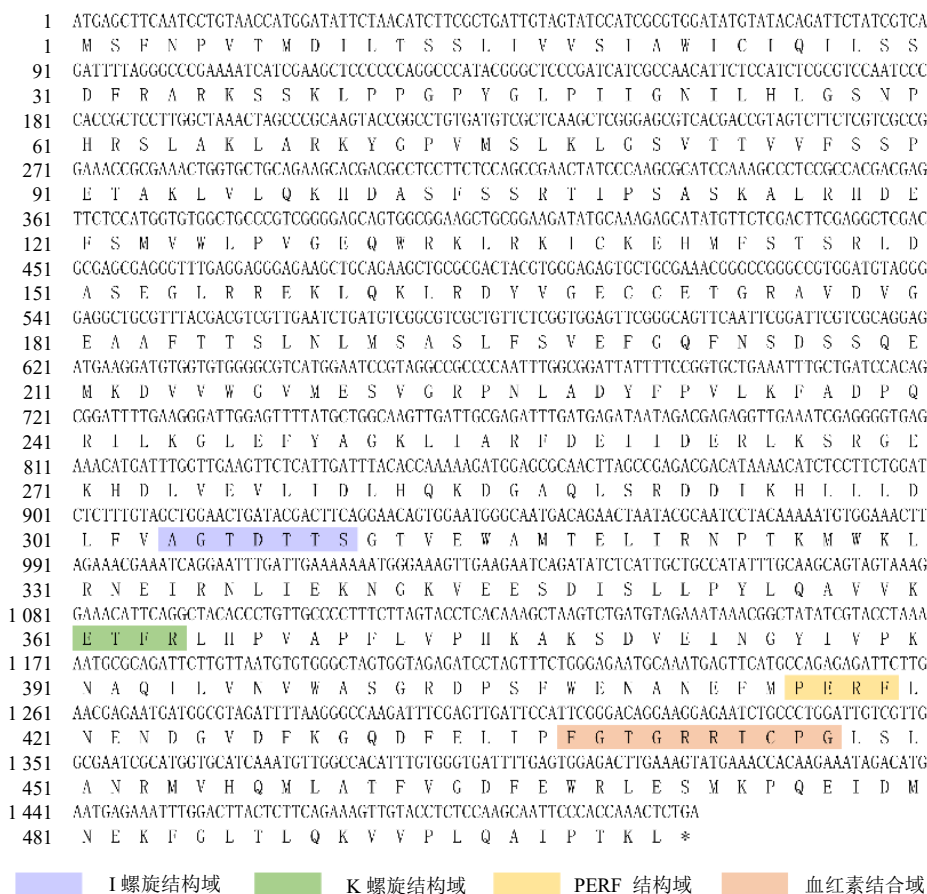


图 2 *SmCYP76S7* 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence of *SmCYP76S7* and its encoded amino acid sequence

3.3 SmCYP76S7 氨基酸序列的多序列比对及进化树分析

利用 DNAMAN 软件对包括 SmCYP76S7 在内的 5 条细胞色素 P450 氨基酸序列进行比对, 结果发现目标序列与其他序列具有较高的一致性, 并包含保守的血红素结合域 (图 3-A)。利用在线软件 Phylogeny.fr 对包括 SmCYP76S7 在内的 16 种植物中的细胞色素 P450 氨基酸序列进行进化树分析, 发现 SmCYP76S7 与一串红 *Salvia splendens* Ker Gawl.、独脚金 *Striga asiatica* (L.) Kuntze、芝麻 *Sesamum indicum* L. 及紫花风铃木 *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos 中的细胞色素 P450 进化距离较近, 与刺毛黧豆 *Mucuna pruriens* var. *hirsuta* (Wight & Arn.) Wilmot-Dear、非洲相思子 *Abrus precatorius* subsp. *africanus* Verdc.、决明 *Senna tora* (L.) Roxb. 及白橡树 *Quercus lobata* Née 中的细胞色素 P450 进化距离较远 (图 3-B)。

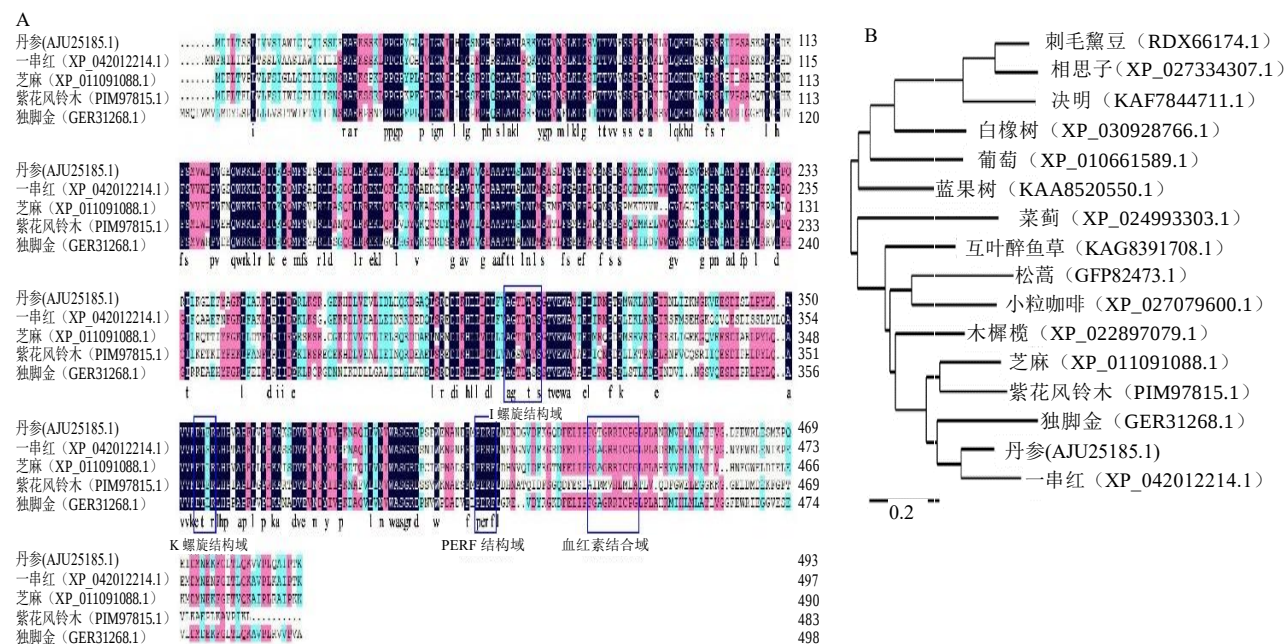


图 3 SmCYP76S7 氨基酸序列的多序列比对 (A) 及系统进化树分析 (B)

Fig. 3 Multiple sequence alignment of SmCYP76S7 amino acid sequence (A) and phylogenetic tree analysis (B)

3.4 SmCYP76S7 蛋白的二级及三级结构预测

SmCYP76S7 二级结构预测显示, 其由 31.54% 的无规卷曲、51.10% 的 α -螺旋、11.98% 的延伸链和 5.39% 的 β -转角构成 (图 4-A)。利用 SWISS-MODEL 对其三级结构进行预测, 其包含典型的血红素结合域, 符合 CYP450 蛋白的结构特征 (图 4-B)。

3.5 SmCYP76S7 亚细胞定位分析

配制烟草侵染缓冲液, 注射烟草细胞后观察融合蛋白的表达情况以确定目标蛋白的亚细胞定位。研究以 ER-rk CD3-959 质粒中的 mCherry 蛋白作为内质网定位标记。结果表明该蛋白定位于细胞核 (图 5, 白色箭头所示位置) 周围的内质网上, 同时在细胞其他部位也有分布, 提示其具有多重生物学功能 (图 5)。

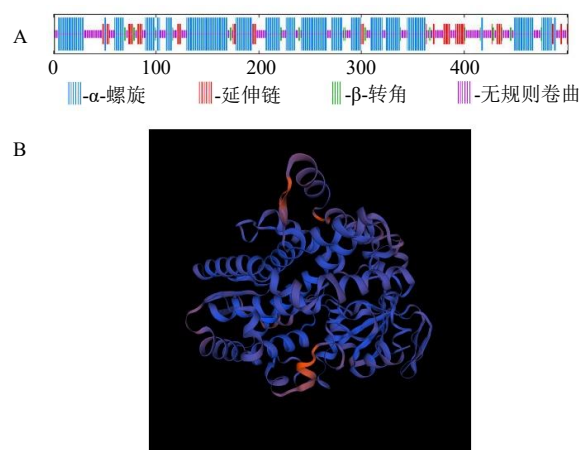


图 4 SmCYP76S7 蛋白的二级结构 (A) 和三级结构 (B) 预测

Fig. 4 Secondary structure (A) and tertiary structure (B) prediction of SmCYP76S7

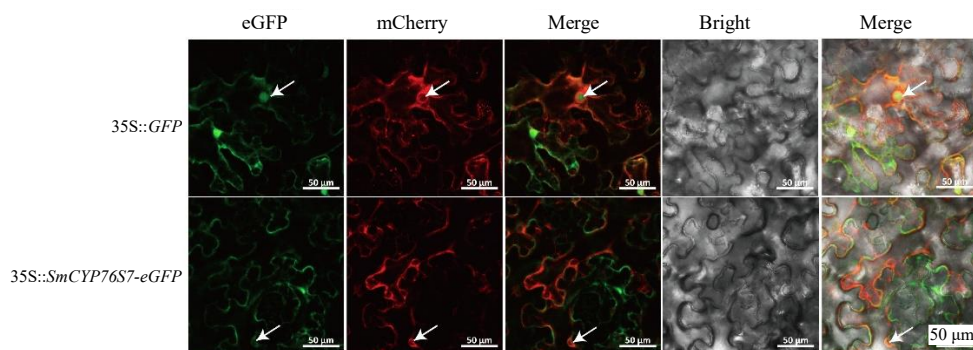
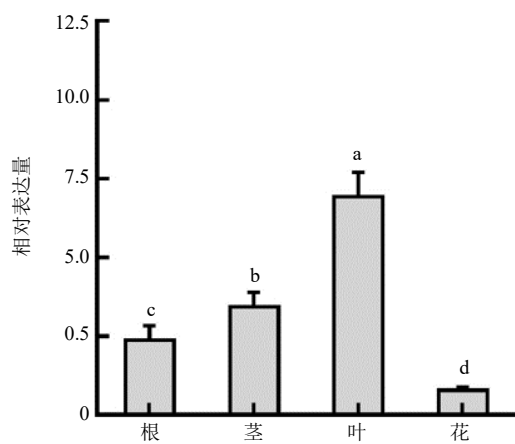


图 5 SmCYP76S7 亚细胞定位分析

Fig. 5 Subcellular localization analysis of SmCYP76S7

3.6 SmCYP76S7 的组织特异性表达分析

利用 qRT-PCR 分析了 SmCYP76S7 在不同器官中的表达情况。结果表明该基因在丹参的根、茎、叶和花中均有表达，其中在叶中的表达量最高，在根和茎中的表达量次之，在花中的表达量最低，推测其在丹参的不同组织器官中均可发挥生物学作用（图 6）。



不同字母表示差异显著 $P < 0.05$ ，下同。

Different letters indicate significant differences $P < 0.05$, same as below.

图 6 SmCYP76S7 在丹参不同器官中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of SmCYP76S7 in different organs of *S. miltiorrhiza*

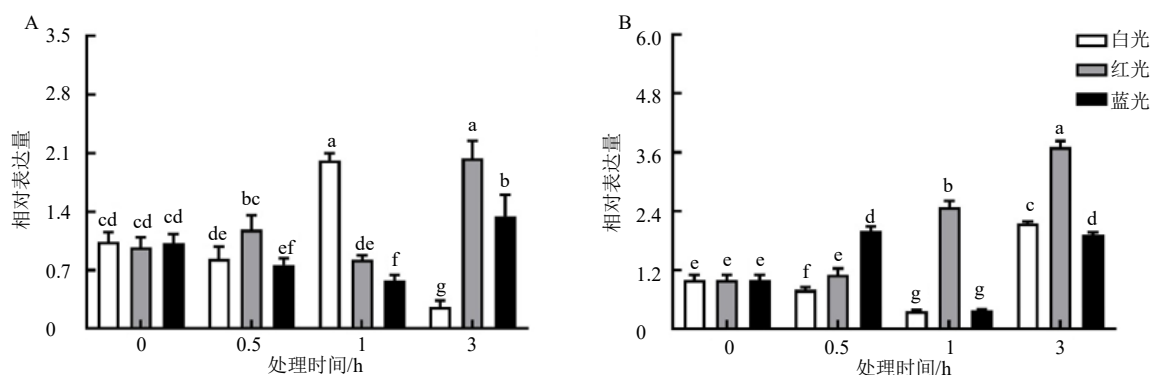
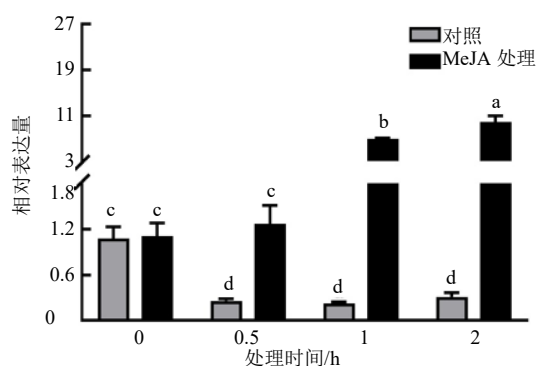
3.7 SmCYP76S7 对不同光质和茉莉酸甲酯处理的响应

SmCYP76S7 启动子顺式作用元件分析结果表明，该基因启动子区包含多个光响应元件和 MeJA 响应元件，提示该基因的表达受光和 MeJA 的诱导（图 1-B）。为了验证光和 MeJA 对该基因表达的影响，以不同光质和 MeJA 分别处理丹参植株和丹参毛状根，qRT-PCR 测定目标基因在不同处理组中的

表达情况。结果表明 SmCYP76S7 对不同光质具有不同的响应，且光处理后其在根和叶中的表达具有差异性。在根中，光处理 1 h 后，白光处理组中 SmCYP76S7 的表达量明显高于蓝光处理组和红光处理组；处理 3 h 后，目标基因在白光处理组中的表达量下降，而在红光处理组中的表达量明显提高，为白光处理组的 7.79 倍。在叶中，SmCYP76S7 对红光的响应更为明显，如光处理 1 h 后 SmCYP76S7 在红光处理组中的表达量分别是白光处理组和蓝光处理组中的 6.94 倍和 6.58 倍，光处理 3 h 后 SmCYP76S7 在红光处理组中的表达量分别是白光处理组和蓝光处理组中的 1.76 倍和 1.95 倍（图 7）。另外，SmCYP76S7 的表达也受到 MeJA 的诱导。在用 100 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理丹参野生型毛状根 1、2 h 后，SmCYP76S7 在处理组中的表达量分别为对照组中的 31.33 倍和 33.02 倍（图 8），提示其极有可能与茉莉素诱导的生物学过程相关。

4 讨论

CYP450 是植物中最大的超基因家族，参与多种物质的生物合成。研究表明该家族基因编码的氨基酸序列包含多个保守结构域，如 PERF 结构域（PxRx）、K 螺旋（ExxR）、I 螺旋 [(A/G)Gx(D/E)T(T/S)] 及血红素结合域（FxxGxRxCxG）等^[5]。本实验分析结果表明，SmCYP76S7 包含上述 4 个保守结构域且其分布位置符合典型的 P450 家族特征。SmCYP76S7 属于丹参 CYP76S 家族，与其同家族的 P450 蛋白具有相似的结构，如 SmCYP76AK2 二级结构由 48.28% α -螺旋、13.33% 延伸链和 32.53% 无规则卷曲构成，和 SmCYP76S7 在二级结构单元构成和比例上均具有很高的致性^[10]。P450 家族蛋白功能复杂，其不同成员的亚细胞定位也具有多样性，可以定位于包括

图 7 不同光质处理后 *SmCYP76S7* 在丹参根 (A) 和叶 (B) 中的表达量Fig. 7 Expression levels of *SmCYP76S7* in root (A) and leaf (B) after different light quality treatments图 8 MeJA 处理后 *SmCYP76S7* 的表达量Fig. 8 Expression levels of *SmCYP76S7* after MeJA treatment

内质网、质体、线粒体及高尔基体等多个细胞器^[5]。*SmCYP76S7* 的亚细胞定位分析结果表明, 其除定位于内质网外, 也分布于其他细胞结构, 暗示该蛋白具有多种生物学功能。

基因在不同组织器官中的表达丰度与其功能密切相关, 如蒺藜状苜蓿 *Medicago truncatula* L. *MsCYP72A67* 是溶血皂苷生物合成中重要的氧化酶, 其主要表达于根和叶等皂苷合成的特异性部位^[11]。玉米 *Zea mays* L. CYP 基因 *ZmCYP51G1* 可以催化钝叶醇去甲基化从而合成甾醇和膜甾醇, 其主要表达于玉米穗部^[12]。丹参中 *SmCYP76AH1*、*SmCYP76AK2* 及 *SmCYP76AK3* 均参与丹参酮类成分的生物合成, 其在根中的表达量显著高于其他器官^[8,13]。本研究中, *SmCYP76S7* 在根、茎、叶和花中均有表达, 其中在叶、茎和根中表达量较高, 在花中的表达量显著低于其他器官, 推测该基因在不同器官中可能具有不同的催化功能。

光是调控植物生长发育的重要环境因子, 同时

影响丹参中多种成分的合成积累。如红光和蓝光都可以改变丹参毛状根中丹参酮的积累, 红光处理可上调 *SmCPS*、*SmCYP76AH1* 等基因表达, 增加丹参酮II_A 的含量, 蓝光则显著抑制丹参酮II_A 的生物合成并下调关键酶基因的转录水平^[14]。我们前期研究利用红蓝混合光质 (红光: 蓝光=7: 3) 处理丹参幼苗, 处理组中迷迭香酸和丹酚酸 B 的含量分别为对照组的 2.24 倍和 2.01 倍^[15]。本研究中, 发现 *SmCYP76S7* 启动子区包含多个光响应元件, 如 Box 4、G-Box、chs-CMA2a、LAMP-element 等。利用不同光质处理丹参幼苗后, 结果表明 *SmCYP76S7* 的表达受白光和红光的诱导, 是典型的光诱导型基因。茉莉酸是植物中主要的激素之一, 参与植物对多种生物和非生物胁迫的抗性反应^[16]。MeJA 是丹参有效成分合成积累的诱导子, 可以同时促进酚酸类和丹参酮类成分的积累^[17-18]。*SmCYP76S7* 基因启动子区含有茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif, qRT-PCR 结果表明, 在 MeJA 处理后该基因的表达可以提高 30 倍以上, 推测该基因与 MeJA 诱导的丹参有效成分积累密切相关。

CYP450s 是丹参酮类成分下游途径上重要的催化酶类, 目前丹参中鉴定的 38 个 CYP450 家族中, CYP71 家族和 CYP76 家族多个成员参与丹参酮骨架的修饰。如 *SmCYP71D373* 和 *SmCYP71D375* 能够催化丹参酮骨架 C-16 位的羟基化和 C-14、C-16 位的醚环化以形成丹参酮类成分中的 D 环^[9]。*SmCYP76AH1* 能够催化次丹参酮二烯合成铁锈醇, *SmCYP76AH3* 进一步将铁锈醇氧化生成 11-羟基铁锈醇、柳杉酚及 11-羟基柳杉酚, 在 *SmCYP76AK1* 的作用下产生 11,20-二羟基柳杉酚^[8]。CYP76 家族

在其他物种中同样参与萜类物质的生物合成,如在酵母中异源表达苹果鼠尾草 *Salvia pomifera* CYP76AH24 可以氧化松香三烯的 C-12 和 C-11 从而生成 11-羟基铁锈醇,与 CYP76AK6 和 CYP76AK8 共同催化鼠尾草酸生物合成的大多数氧化反应^[19]。人参 *Panax ginseng* CYP716A53v2 可以作为原人参二醇 C-6 羟化酶参与合成达玛烷型人参皂苷^[20]。SmCYP76S7 属于 CYP76 家族,和 SmCYP76AH1、SmCYP76AK2 及 SmCYP76AK3 具有很高的氨基酸序列一致性和较近的进化距离。根据同家族蛋白功能保守的特点,该蛋白很可能参与丹参酮类成分生物合成的催化反应,其具体的生物学功能值得进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 万新焕,王瑜亮,周长征,等.丹参化学成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2020,51(3):788-798.
- [2] Shi M, Huang F F, Deng C P, *et al.* Bioactivities, biosynthesis and biotechnological production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(6): 953-964.
- [3] Lu S F. Biosynthesis and regulatory mechanisms of bioactive compounds in *Salvia miltiorrhiza*, a model system for medicinal plant biology [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2021, 40(3): 243-283.
- [4] Zhang L Y, Xu X Q, Badawy S, *et al.* A review: Effects of macrolides on CYP450 enzymes [J]. *Curr Drug Metab*, 2020, 21(12): 928-937.
- [5] 崔会婷,蒋旭,张铁军,等.植物 CYP450 家族研究进展[J].中国草地学报,2020,42(5):173-180.
- [6] Chen H M, Wu B, Nelson D R, *et al.* Computational identification and systematic classification of novel cytochrome P450 genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115149.
- [7] Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, *et al.* CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(29): 12108-12113.
- [8] Guo J, Ma X H, Cai Y, *et al.* Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones [J]. *New Phytol*, 2016, 210(2): 525-534.
- [9] Ma Y, Cui G H, Chen T, *et al.* Expansion within the CYP71D subfamily drives the heterocyclization of tanshinones synthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 685.
- [10] 李佳文.丹参 SmCYP76AK2 和 SmCYP76AK3 基因克隆及功能研究[D].西安:陕西师范大学,2020.
- [11] Biazzi E, Carelli M, Tava A, *et al.* CYP72A67 catalyzes a key oxidative step in *Medicago truncatula* hemolytic saponin biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(10): 1493-1506.
- [12] Li Y X, Wei K F. Comparative functional genomics analysis of cytochrome P450 gene superfamily in wheat and maize [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 93.
- [13] Li B, Li J W, Chai Y Q, *et al.* Targeted mutagenesis of CYP76AK2 and CYP76AK3 in *Salvia miltiorrhiza* reveals their roles in tanshinones biosynthetic pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 189: 455-463.
- [14] Chen I J, Lee M S, Lin M K, *et al.* Blue light decreases tanshinone II_A content in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots via genes regulation [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2018, 183: 164-171.
- [15] Zhang S C, Ma J Q, Zou H Y, *et al.* The combination of blue and red LED light improves growth and phenolic acid contents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 158: 112959.
- [16] Sohn S I, Pandian S, Rakkammal K, *et al.* Jasmonates in plant growth and development and elicitation of secondary metabolites: An updated overview [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 942789.
- [17] Xiao Y, Gao S H, Di P, *et al.* Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Physiol Plant*, 2009, 137(1): 1-9.
- [18] Hao X L, Shi M, Cui L J, *et al.* Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62(1): 24-31.
- [19] Ignea C, Athanasakoglou A, Ioannou E, *et al.* Carnosic acid biosynthesis elucidated by a synthetic biology platform [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(13): 3681-3686.
- [20] Han J Y, Hwang H S, Choi S W, *et al.* Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(9): 1535-1545.

[责任编辑 时圣明]