

• 药材与资源 •

地涌金莲 *O*-甲基转移酶基因的克隆与表达分析吴君芝^{1,2}, 林谷音^{1,2}, 王帆^{1,2}, 李丕睿², 吕威², 赵万里^{2*}, 陈雨^{1,2*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014

摘要: 目的 克隆地涌金莲 *Musella lasiocarpa* 中 *O*-甲基转移酶 (*O*-methyltransferase, OMT) 基因, 并对其生物信息学及表达模式分析。方法 基于地涌金莲转录组数据, 筛选并原核表达了 3 条 MIOMTs 酶基因 (*MIOMT1*、*MIOMT2* 和 *MIOMT3*)。利用软件对其进行生物信息学分析, 利用 MEGA11 构建系统发育树, 采用实时荧光定量 PCR 检测基因表达模式。结果 PCR 扩增得到 3 条 MIOMTs 基因; 3 个 MIOMT 蛋白长度为 289~400 个氨基酸, 相对分子质量在 3 147 360~4 526 756, 3 个蛋白均为不稳定的亲水性蛋白, 其中 MIOMT1 和 MIOMT2 不含跨膜区, MIOMT3 存在 2 个跨膜螺旋, 其 N 端位于胞质内。3 个蛋白主要定位于叶绿体, 不含有信号肽, 主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成, 含有 SAM 依赖的甲基转移酶超家族的保守结构域, 属于 SAM 依赖的甲基转移酶超级家族。系统进化分析表明, MIOMT1 与来源于大麦 *Hordeum vulgare* 的 Hv7OMT 和粳稻 *Oryza sativa* subsp. *japonica* 的 OsOMT17 聚为一支, MIOMT2 与冰叶日中花 *Mesembryanthemum crystallinum* 的 McPFOMT 聚为一支, 而 MIOMT3 与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 AtCCoAOMT1 聚为一支, 表明它们亲缘关系较近, 推测它们具有类似的生物学功能。通过对表达条件的初步优化, 重组工程菌 pMal-c4X-MIOMT1 和 pMal-c4X-MIOMT2 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中实现蛋白可溶性表达。组织特异性表达分析结果显示, *MIOMT1* 在地涌金莲不同组织相对表达量为: 叶片>苞片>种子, *MIOMT2* 和 *MIOMT3* 相对表达量为: 苞片>种子>叶片。结论 成功克隆获得地涌金莲 3 条 MIOMTs 基因并进行生物信息学分析和原核表达, 为后续酶的功能表征奠定基础。

关键词: 地涌金莲; 甲基转移酶; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR; 生物信息学分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5212-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.020

Cloning and expression analysis of *O*-methyltransferase genes in *Musella lasiocarpa*WU Junzhi^{1,2}, LIN Guyin^{1,2}, WANG Fan^{1,2}, LI Pirui², LYU Wei², ZHAO Wanli², CHEN Yu^{1,2}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China

Abstract: Objective To clone the *O*-methyltransferase (OMT) genes in *Musella lasiocarpa* and analyze their bioinformatics information and expression patterns. **Methods** Three MIOMTs enzyme genes (*MIOMT1*, *MIOMT2* and *MIOMT3*) were screened based on the transcriptomic data of *M. lasiocarpa* and prokaryotically expressed. Online software were used for bioinformatics analysis. Phylogenetic tree was constructed using MEGA11. Real-time fluorescence quantitative PCR was conducted to detect gene expression patterns. **Results** Three MIOMTs were cloned by PCR. The lengths of the three MIOMT proteins ranged from 289 to 400 amino acids, and the range of the predicted molecular weight was from 3 147 360 to 4 526 756. Three MIOMTs were unstable hydrophilic proteins. Both MIOMT1 and MIOMT2 lacked transmembrane regions, whereas MIOMT3 had two transmembrane helices with its N-terminal located in the cytoplasm. All the three proteins were mainly localized in chloroplasts, without signaling peptides. They mainly consisted of α -helical and irregular coiled structures, and contained conserved domains of the SAM-dependent methyltransferase superfamily. Phylogenetic analysis revealed that MIOMT1 clustered with Hv7OMT from *Hordeum vulgare* and OsOMT17 from *Oryza*

收稿日期: 2024-03-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (3207020751)

作者简介: 吴君芝, 女, 硕士研究生, 主要从事植物次生代谢产物生物合成研究。E-mail: 15535430762@163.com

*通信作者: 赵万里, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事植物活性成分生物合成研究。E-mail: zhaowanlitcm@126.com

陈雨, 男, 博士, 研究员, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: ychen@jib.ac.cn

sativa subsp. *Japonica*, while *MIOMT2* clustered with *McPFOMT* from *Mesembryanthemum crystallinum*. Additionally, *MIOMT3* clustered together with *AtCCoAOMT1* from *Arabidopsis thaliana*. The close relationships mentioned above suggested they might have similar biological functions. The soluble protein expression of recombinant vectors pMal-c4X-*MIOMT1* and pMal-c4X-*MIOMT2* in BL21(DE3) was achieved through preliminary optimization of the expression conditions. Tissue-specific expression analysis showed that relative expression levels of *MIOMT1* varied across different tissues as follows: leaves > bracts > seeds; whereas relative expression levels of *MIOMT2* and *MIOMT3* were found as bracts > seeds > leaves. **Conclusion** The cloning, bioinformatics analysis and expression analysis of three *MIOMTs* of *M. lasiocarpa* was completed, which lays the foundation for characterizing their functions.

Key words: *Musella lasiocarpa* (Franch.) C. Y. Wu ex H. W. Li; methyltransferase; gene cloning; quantitative real-time PCR; bioinformatics analysis

地涌金莲 *Musella lasiocarpa* (Franch.) C. Y. Wu ex H. W. Li 是芭蕉科 (Musaceae) 地涌金莲属 *Musella* L. 的多年生大型丛生草本植物, 为我国特有单种属植物^[1]。因其花絮直立于假茎之上, 状似莲花, 被誉为佛教圣花, 又名千瓣莲花、地金莲、千叶佛莲、矮芭蕉等^[2]。地涌金莲原产于我国云南和四川地区, 其花可入药, 具有收敛止血作用, 民间用于治疗白带、红崩及大肠下血, 茎汁可用于解酒及草乌中毒, 是西南地区民族医药的宝贵资源^[3]。已有研究从地涌金莲中分离鉴定含苯基非那烯酮 (phenylphenalenone) 类、二芳基庚烷类、甾醇类、长链脂肪类和黄酮类等化学成分合计 52 个, 其中苯基非那烯酮类化合物 34 个^[4-6], 是该植物的主要次生代谢产物。苯基非那烯酮类化合物是一类源自苯丙氨酸合成途径的多环二芳基庚烷类天然产物, 目前主要发现分布于单子叶植物芭蕉科 (Musaceae)、旅人蕉科 (Strelitziaceae) 和雨久花科 (Pontederiaceae) 植物中^[7], 是香蕉及其近缘植物中的自身防御性成分, 在抵御害虫、寄生线虫、病原微生物侵袭方面发挥了重要作用^[8-11]。

O-甲基化是植物次生代谢产物重要的常见后修饰, 可以改变次生代谢物的物理化学特性, 包括稳定性、溶解度等, 形成了丰富的天然产物结构^[12]。目前已经从芭蕉科等上述 3 科单子叶植物中分离得到了具有多个羟基位点 *O*-甲基化修饰的苯基非那烯酮类天然产物^[13]。经 *O*-甲基化修饰的苯基非那烯酮类化合物通常可以增强其生理活性。例如, Hidalgo 等^[14]发现苯基非那烯酮 *O*-甲基化后可以显著增强其对香蕉黑条叶斑病的病原体—斐济球孢菌的抑菌活性。Lazzaro 等^[15]研究发现, 苯基非那烯酮 4'位羟基 *O*-甲基化后对引起香蕉枯萎病 (香蕉巴拿马病) 的病原体尖孢镰刀菌的抑菌活性更强。地涌金莲中已鉴定的苯基非那烯酮类化合物多为其 *O*-甲基化产物^[4-6], 提示该植物存在丰富的苯基非那烯

酮 *O*-甲基化后修饰酶, 是研究挖掘该类后修饰酶基因的理想植物对象。

植物次生代谢产物的 *O*-甲基化是以 *S*-腺苷蛋氨酸 (*S*-adenosylmethionine, SAM) 作为甲基供体, 由 *O*-甲基转移酶催化完成的^[16]。SAM 依赖的 *O*-甲基转移酶通常相对分子质量在 23 000~43 000, 具有 SAM 结合保守结构域^[17]。SAM 依赖的 *O*-甲基转移酶在苯丙烷类化合物、香料如香草醛、激素如褪黑素、抗生素如芳香族聚酮化合物、生物柴油如脂肪酸甲酯、生物碱等次生代谢产物的生物合成中发挥着重要的功能^[18]。然而, 目前鲜见参与苯基非那烯酮生物合成的 *O*-甲基转移酶的报道。本研究以地涌金莲种子转录组数据为参考, 筛选到 3 条表达量高的 *O*-甲基转移酶基因, 命名为 *MIOMT1*、*MIOMT2*、*MIOMT3*。对其进行特异性引物设计, 通过 PCR 技术克隆 cDNA 全长, 随后进行了生物信息学分析、初步原核表达, 并采用实时荧光定量 PCR 方法检测了 3 个 *O*-甲基转移酶基因在地涌金莲种子、叶片、苞片中的表达水平。本研究结果可以为进一步鉴定 *MIOMT1*、*MIOMT2* 和 *MIOMT3* 的催化功能奠定基础, 为解析苯基非那烯酮 *O*-甲基化后修饰的分子机制提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

地涌金莲采集于云南省楚雄市南华县, 移栽至江苏省中国科学院植物研究所实验基地, 经江苏省中国科学院植物研究所陈雨研究员鉴定为芭蕉科植物地涌金莲 *M. lasiocarpa* (Fr.) C. Y. Wu ex H. W. Li。

1.2 仪器

Nano100 型微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司); Veriti 96-Well 型梯度 PCR 仪 (Applied Biosystems); Tanon EPS-300 型琼脂糖凝胶电泳仪 (上海天能生命科学有限公司); BIO-RAD CFX-Opus 96 荧光定量 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司);

凝胶成像仪（上海天能生命科学有限公司）；垂直电泳仪（上海天能生命科学有限公司）。

2 方法

2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

取地涌金莲的新鲜种子、叶片和苞片于液氮中保存，研钵预冷，在钵体中将样品迅速研磨成粉，按照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（天根生化科技北京有限公司）说明书提取 RNA，设置 3 个生物学重复，-80 °C 保存备用。接着使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit（南京诺唯赞生物科技股份有限公司），以 Oligo（dT）18Primer 为引物，将 RNA 逆转录成 cDNA，用作基因克隆和荧光定量 PCR 的模板。

2.2 地涌金莲 O-甲基转移酶基因筛选与克隆

基于课题组前期得到的地涌金莲种子转录组数据（GeneBank: PRJNA1009687），以 O-甲基转移酶保守结构域 PF01596.12 或 PF00891 进行 HMMER 检索和同源比对^[19-20]，获得 3 条表达量较高的 O-甲基转移酶基因——MIOMT1、MIOMT2、MIOMT3 的完整基因序列。使用诺唯赞的在线引物设计工具 CE Design 设计 MIOMT1 无缝克隆的引物，线性化酶切位点选择 EcoRI 和 SalI，小写字母表示同源臂。使用 SnapGene 设计 MIOMT2 和 MIOMT3 基因扩增的双酶切引物，酶切位点选择 EcoRI 和 SalI（引物序列见表 1）。

使用高保真酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase P505（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）扩增片段。PCR 总体系 50 μL，包括各组织 cDNA 混和模板 1 μL，上、下游引物各 2 μL，2× Phanta Master Buffer 25 μL，dNTP 1 μL，ddH₂O 18 μL。PCR 程序为：预变性 95 °C，3 min；变性 95 °C，15 s；退火 58 °C，15 s；72 °C 延伸 2 min，循环 35 次；72 °C 彻底延伸 5 min。扩增产物加入 5 μL 10×Loading Buffer 混合均匀，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，切胶回收目的基因条带。参照 E.Z.N.A.Gel Extraction Kit（美国 Omega 公司）说明书回收目的片段。

使用 Axygen 质粒小量抽提试剂盒提取质粒 pMal-c4X，随后采用 Takara 的 EcoRI 和 SalI 快切酶线性化载体 pMal-c4X。线性化体系：先加入 SalI 在 37 °C 酶切 30 min，再加入 EcoRI 酶切 1 h，酶切产物加入 5 μL 10×Loading Buffer 混和均匀，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，切胶回收目的条带。采用诺唯赞 C112 无缝克隆试剂盒对 MIOMT1 与线性化载体 pMal-c4X 进行连接。MIOMT2、MIOMT3 基因片段经 EcoRI/SalI 双酶切后与线性化载体 pMal-c4X 通过 T4 DNA 连接酶连接（Takara 公司，4 °C 过夜）。连接液转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，菌落 PCR 筛选阳性菌落送至安徽通用生物公司测序。

表 1 MIOMTs 基因扩增和 qRT-PCR 验证的引物序列

Table 1 Primer sequences of MIOMTs used for PCR amplification and qRT-PCR validation

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增大小/bp
MIOMT1-F	agggaaggatttcagaattcGGCGACACCCTCCTCCCA	1 125
MIOMT1-R	aagettgcctgcaggtcgacCTAATAGTGAGGCACTGTTGCTGTAA	
MIOMT2-F	CCGGAATTCAAAGCAGGTGATCGCCTCTATG	1 230
MIOMT2-R	ACGCGTCGACTCAAGCTTTCTTCTCTTCAAGCC	
MIOMT3-F	CCGGAATCCGTACGGCGAGTTCGACTCGGCAC	1 071
MIOMT3-R	ACGCGTCGACTCAGCACATGTCCGGCGGCCAG	
EF-α_qPCR-F	CATTCAAAAACCACTACCCATC	138
EF-α_qPCR-R	CTCCATTCATTCAGTCATCGC	
MIOMT1_qPCR-F	TCCAAGGTGCTTCAGGAAGTGTCCC	151
MIOMT1_qPCR-R	GTCTGGGACTCGTCATAA	
MIOMT2_qPCR-F	ATCACAGAGACGAGTCCACCCC	192
MIOMT2_qPCR-R	TTCCGCTAACAGGCCCCATAAA	
MIOMT3_qPCR-F	GCGGAGTGGGAGTGGTGTG	143
MIOMT3_qPCR-R	GGGCTTTCGGAAGGAGACG	

2.3 MIOMTs 生物信息学分析

使用在线网站对 MIOMTs 进行蛋白质序列生物信息学分析 (ExPASy、NCBI-Conserved Domains、

PSORT、SignalP-4.1、TMHMM-2.0、SOPMA、SWISS-MODEL), 有关网址见表 2^[21-22]。蛋白质系统进化分析利用 MEGA 11 软件。

表 2 生物信息学分析在线程序及网址

Table 2 Bioinformatics online programs and websites

在线程序	网址
ExPASy-ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/
ExPASy-ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/
NCBI-Conserved Domains	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd
PSORT	https://wolfsort.hgc.jp/
SignalP 4.1 Server	https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP4.1/
TMHMM	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
SOPMA	https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/

2.4 MIOMTs 原核表达

将构建成功的重组质粒导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 导入成功的菌株接入 100 mL 的 LB 培养基中, 在 37 °C、200 r/min 摇床中培养 3.5 h, 随后加入 0.4 mmol/L IPTG 在 16 °C 下诱导 16 h。将诱导好的菌液于 4 °C 低温下 6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 菌体加入 10 mL Tris-HCl buffer (pH 7.4) 重悬。重悬菌液超声破碎, 设置参数为 30% 功率, 超声 3 s 停 3 s, 超声 20 min。超声结束后, 将细胞破碎液 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min, 分离上清与沉淀。上清液加入 5×protein loading buffer 于金属浴中 100 °C 煮沸 10 min。离心后的菌体加入 Tris-HCl buffer 重悬, 同上操作制备蛋白样品。待蛋白样品冷却后进行 SDS-PAGE (12%) 电泳分析。

2.5 qRT-PCR

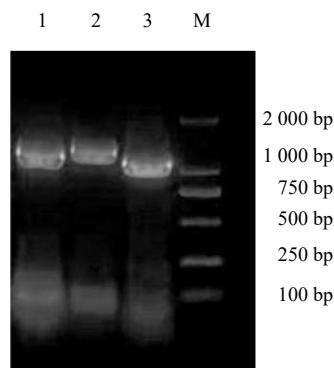
从地涌金莲转录组中筛选得到了注释为 *EF-α*、*ACT-1*、*UBQ-1*、*UBQ-2* 的内参基因。经预实验筛选, 以 *EF-α* 表达量最稳定, 选择 *EF-α* 作为内参基因。使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (表 1)。以地涌金莲种子、叶片、苞片的 cDNA 为模板, 设置 3 个生物学重复。使用 SYBR 荧光染料法进行定量 PCR 实验 (Q111 试剂, 南京诺唯赞生物科技有限公司), 反应体系 20.0 μL, 含 1 μL cDNA 模板, 上下游引物各 0.4 μL, 10 μL 2×AceQ qPCR SYBR Green Master Mix, 8.2 μL 无菌水。使用荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD CFX-Opus 96) 进行检测, 反应程序: 预变性 95 °C、30 s, 变性 95 °C、10 s, 退

火 60 °C、30 s, 循环 40 次; 60 °C 采集荧光信号。检测数据采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算相对表达量。

3 结果与分析

3.1 O-甲基转移酶基因克隆

以 O-甲基转移酶保守结构域 *PF01596.12* 或 *PF00891* 进行 HMMER Search 和同源比对, 获得 3 条表达量较高的基因—*MIOMT1* (XP_009396994.1)、*MIOMT2* (XP_009381663.1)、*MIOMT3* (XP_009416086.1) 的完整基因序列。通过 PCR 方法扩增出 3 条 *MIOMTs* 基因, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。*MIOMT1* 基因全长为 1 125 bp, 包含 1 个 1 095 bp 的完整开放阅读框; *MIOMT2* 基因全长 1 230 bp, 包含 1 个 1 203 bp 的完整开放阅读框; *MIOMT3* 基因全长 1 071 bp, 包含 1 个 870 bp 的开放阅读框。



M-Marker; 1-*MIOMT1*; 2-*MIOMT2*; 3-*MIOMT3*。

图 1 地涌金莲 *MIOMTs* 基因的扩增结果

Fig. 1 Amplification result of *MIOMTs* from *M. lasiocarpa*

3.2 MIOMTs 理化性质和跨膜区域分析、亚细胞定位预测及信号肽预测

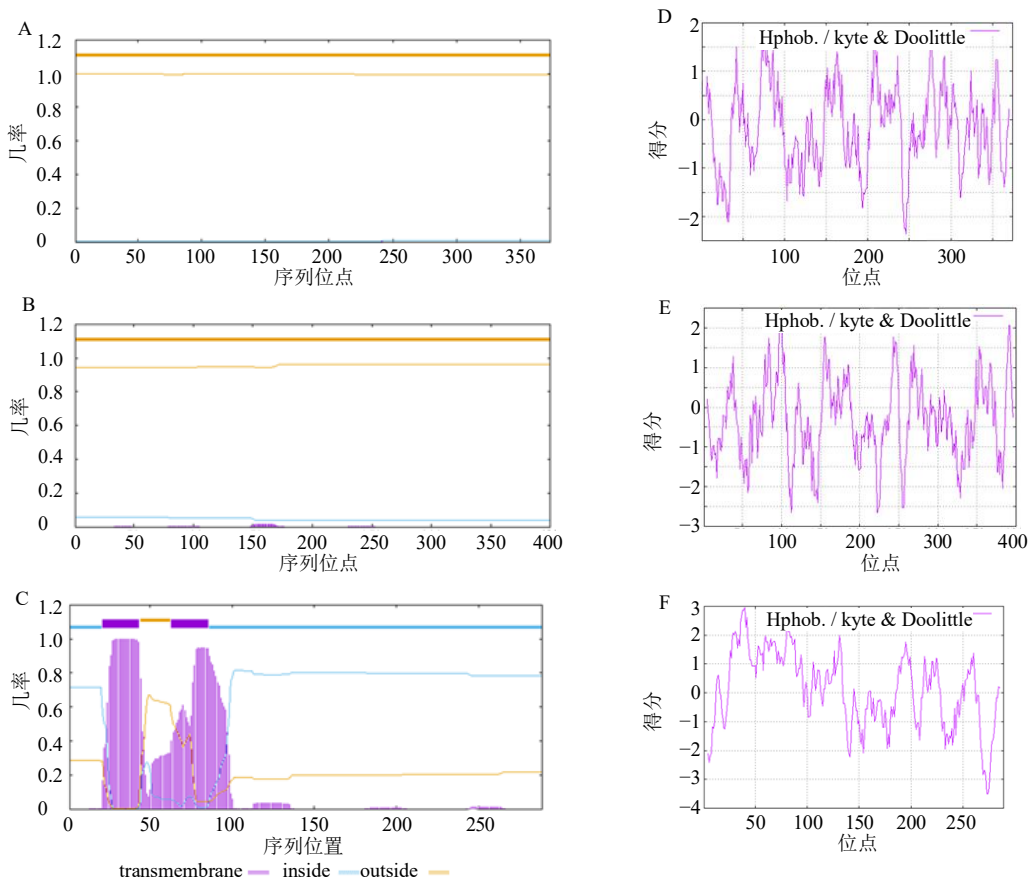
利用 ExPasy 在线网站对 MIOMTs 基因编码蛋白的相对分子质量、等电点、氨基酸组成等特征进行分析, 见表 3。ExPASy-ProtParam 分析表明地涌金莲 MIOMT1 基因编码 374 个氨基酸, 蛋白质分子式 C₁₈₄₉H₂₉₀₈N₄₉₈O₅₄₇S₁₁, 含有 40 个碱性氨基酸 (Arg+Lys) 和 40 个酸性氨基酸 (Asp+Glu), 等电点为 7.1, 不稳定指数为 48.01; MIOMT2 基因编码 400 个氨基酸, 蛋白质分子式 C₂₀₂₉H₃₁₅₆N₅₄₄O₆₀₁S₁₅, 含有 44 个碱性氨基酸 (Arg+

Lys) 和 52 个酸性氨基酸 (Asp+Glu), 等电点为 5.76, 不稳定指数为 49.25。MIOMT3 基因编码 289 个氨基酸, 蛋白质分子式 C₁₃₉₂H₂₂₄₃N₄₁₁O₃₈₉S₁₆, 含有 34 个碱性氨基酸 (Arg+Lys) 和 24 个酸性氨基酸 (Asp+Glu), 等电点为 9.84, 不稳定指数为 45.56。ExPASy-ProtScale 分析结果表明 MIOMT1、MIOMT2 和 MIOMT3 蛋白具有亲水性 (图 2-A~C)。3 个蛋白不稳定指数均>40, 是不稳定的亲水性蛋白。用 TMHMM-2.0 Server 对 MIOMT1、MIOMT2 和 MIOMT3 跨膜结构在线分析, 结果如图 2-D~F 所示。MIOMT1 和 MIOMT2 不具有跨膜

表 3 MIOMTs 蛋白的理化性质分析

Table 3 Physicochemical properties analysis of MIOMTs protein

基因名称	氨基酸数目	相对分子质量	等电点	不稳定指数	脂肪系数	亲水性平均值	亲疏水性
MIOMT1	374	4 121 910	7.10	48.01	88.74	0.183	亲水性
MIOMT2	400	4 526 756	5.76	49.25	86.47	0.321	亲水性
MIOMT3	289	3 147 360	9.84	45.56	96.30	0.108	亲水性



A, D-MIOMT1; B, E-MIOMT2; C, F-MIOMT3.

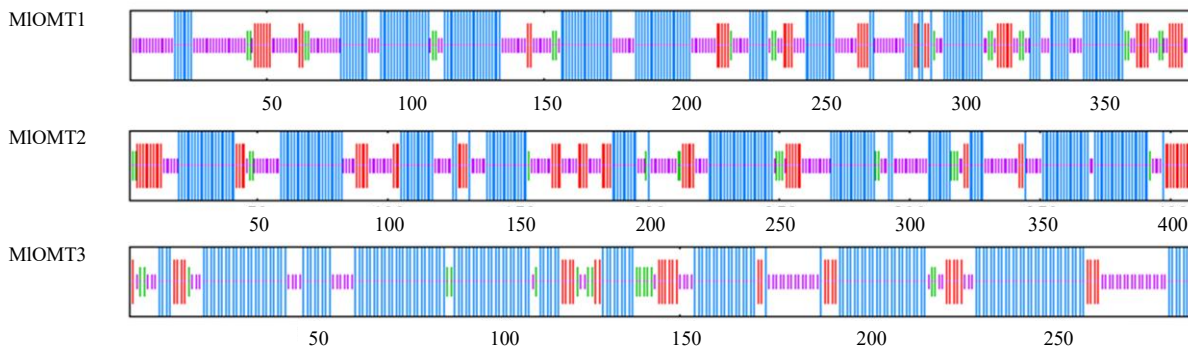
图 2 MIOMTs 蛋白亲水性预测 (A~C) 和跨膜结构域 (D~F)

Fig. 2 Prediction of protein hydrophilicity (A—C) and transmembrane domains (D—F) of MIOMTs

区,属于非跨膜蛋白;MIOMT3 存在 2 个跨膜螺旋,共有 52 个氨基酸位于跨膜螺旋内,前 60 个氨基酸中有 25 个氨基酸位于跨膜区,跨膜结构主要定位于 N 端,N 端位于胞质内。WOLF PSORT 亚细胞定位结果初步判断 MIOMT1、MIOMT2 和 MIOMT3 主要定位于叶绿体。Singal IP 4.1 预测 MIOMT1、MIOMT2 和 MIOMT3 不含有信号肽,属于非分泌蛋白质。

3.3 MIOMTs 二级结构分析及三维结构预测

SOPMA 预测蛋白的二级结构如图 3 所示,MIOMT1 蛋白含有 41.93%的 α -螺旋、11.20%延伸链、5.21%的 β -转角、41.67%无规则卷曲;MIOMT2 蛋白含有 46.45%的 α -螺旋、15.40%延伸链、4.65%的 β 转角、33.50%无规则卷曲;MIOMT3 蛋白含有 60.9%的 α -螺旋、11.76%延伸链、5.54%的 β -转角、21.80%无规则卷曲。



蓝色代表 α -螺旋,红色代表 β -转角,紫色代表无规则卷曲。

Blue represents alpha helix, red represents beta turn, and purple represents random coil.

图 3 MIOMTs 的二级结构预测

Fig. 3 Secondary structure prediction of MIOMTs

采用 SWISS-MODEL 进行三维结构同源建模,蛋白结构如图 4 所示。结果显示 MIOMT1 与结构模板 Q33AG7_ORYSJ (*Oryza sativa* subsp *japonica*) 的氨基酸序列同源性达到 70.98%, GMQE 值为 0.82; MIOMT2 与 A0A4S8JDQ9_MUSBA (*Musa balbisiana*)

的氨基酸序列同源性达到 75.38%, GMQE 值为 0.89; MIOMT3 与 A0A2I0B4T2_9ASPA (*Apostasia shenzhenica*) 的氨基酸序列同源性达到 72.44%, GMQE 值为 0.86, 预测有 1 个跨膜结构域, 三维结构预测与二级结构预测结果一致, 预测效果较好。

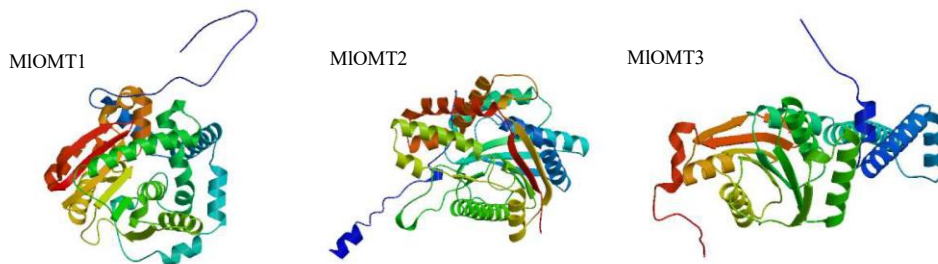


图 4 MIOMTs 蛋白三维结构预测

Fig. 4 3D structure prediction of MIOMTs protein

3.4 MIOMTs 保守结构域预测和系统发育分析

使用 NCBI-Conserved Domains 进行保守结构域分析,结果显示 MIOMT1、MIOMT2 和 MIOMT3 均含有 SAM 结合保守结构域,属于 SAM 依赖的甲基转移酶超级家族(图 5)。

为了分析 MIOMT1、MIOMT2 和 MIOMT3 的进化关系及可能功能,选择已报道的其他物种甲基转移酶与 MIOMT1、MIOMT2 和 MIOMT3 的氨基酸序列进行比

对,利用 MEGA11 软件构建系统发育树(Maximum Likelihood 法)。结果表明 MIOMT1 与大麦 *Hordeum vulgare* 的 Hv7OMT 和粳稻 *Oryza sativa* subsp. *japonica* 的 OsOMT17 聚为一支,MIOMT2 与冰叶日中花 *Mesembryanthemum crystallinum* 的 McPFOMT 聚为一支,而 MIOMT3 与来源于拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 AtCCoAOMT1 聚为一支(图 6),上述结果表明它们亲缘关系较近,可能具有类似的功能。

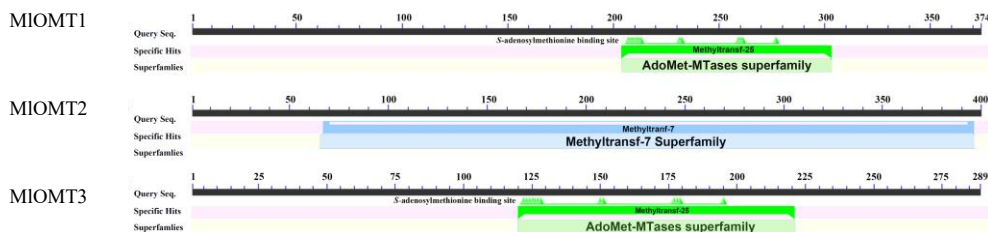


图 5 MIOMTs 蛋白保守结构域预测
Fig. 5 Conserved domain analysis of MIOMTs

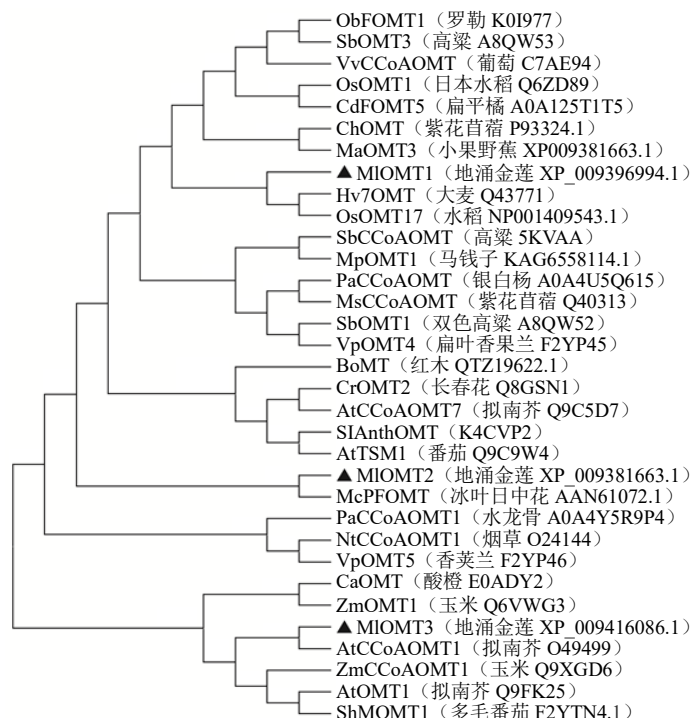


图 6 地涌金莲 MIOMTs 与其同源蛋白的系统进化分析
Fig. 6 Phylogenetic analysis of MIOMTs and their homologous proteins in *M. lasiocarpa*

3.5 MIOMTs 原核表达

使用 SDS-PAGE 电泳对 MIOMTs 大肠杆菌工程菌表达的蛋白进行检测, SDS-PAGE 结果见图 7。结果表明, 融合 MBP (42 000) 标签的 MIOMT1 和 MIOMT2 在重组大肠杆菌中检测到符合目的蛋白相对分子质量的条带, 表明其在大肠杆菌中能够可溶性表达, 其中 MIOMT1 能够实现大量的可溶性蛋白表达。而对含有 MIOMT3 的菌株中的蛋白进行检测, 发现该条件下 MIOMT3 无可溶性表达。

3.6 MIOMTs 基因表达分析

为了探究 *MIOMT1*、*MIOMT2* 和 *MIOMT3* 基因在地涌金莲组织中的相对表达情况, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *MIOMTs* 基因在不同组织中特异性表达量。如图 8 所示, 以种子为参照, *MIOMT1* 在叶片中具有显著性高表达, 苞片其次, 种子中相对表达量最低; *MIOMT2* 在苞片中显著性高表

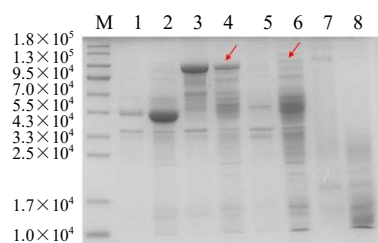
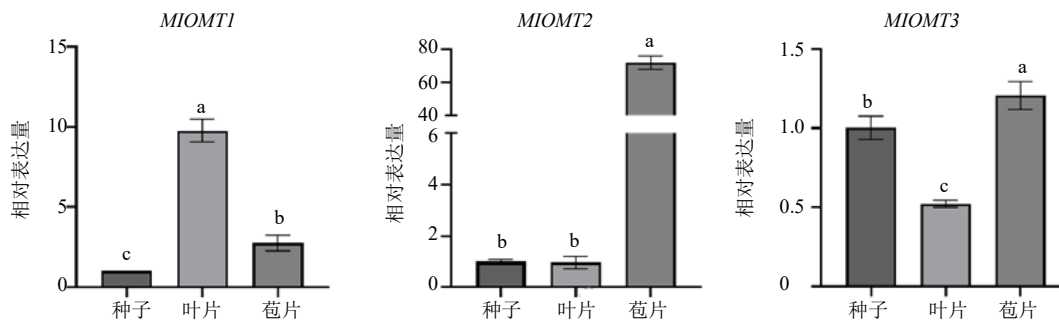


图 7 MIOMTs 重组蛋白 SDS-PAGE 检测
Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant MIOMTs

达, 种子和叶片中表达量较低; *MIOMT3* 在苞片中显著性高表达, 种子中表达量其次, 叶片中表达量最低。



不同小写字母代表显著差异 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图8 MIOMTs在地涌金莲不同组织部位中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression level of MIOMTs in different tissues of *M. lasiocarpa*

4 讨论

O-甲基转移酶参与到药用植物活性成分如苯基非那烯酮生物合成的重要步骤，前人为了探索苯基非那烯酮类化合物 *O*-甲基化的生物合成发生阶段，2010年 Otálvaro 等^[23]使用 ¹³C 稳定同位素饲喂栽培香蕉无菌苗 *M. acuminata* cv. William，并通过核磁共振技术导向分离标记化合物。研究表明，甲氧基通过 SAM 依赖的途径引入，且苯基非那烯酮化合物 4'-*O*-methylireanolone 的甲氧基更有可能是 ireanolone 由 *O*-甲基转移酶直接催化形成。然而，催化苯基非那烯酮的 *O*-甲基转移酶尚未得到表征，地涌金莲中多种 *O*-甲基化形式的苯基非那烯酮^[24-26]提示地涌金莲存在参与苯基非那烯酮生物合成的 *O*-甲基转移酶。

本研究从地涌金莲种子转录组中筛选出了 3 条表达量较高的 *O*-甲基转移酶，并对其进行生物信息学分析。MIOMT1、MIOMT2 和 MIOMT3 的相对分子质量在 31 000~45 000，与 *O*-甲基转移酶基因家族成员为 23 000~43 000 的大小一致^[27]。3 个蛋白均无信号肽，是不稳定的亲水性蛋白。MIOMT1 和 MIOMT2 不具有跨膜区，MIOMT3 存在 2 个跨膜螺旋，其 N 端位于胞质内。Psort 亚细胞定位预测 3 个蛋白主要定位于叶绿体，文献报道多数 *O*-甲基转移酶的亚细胞定位场所为叶绿体和细胞质^[28]。3 个蛋白的二级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成。NCBI 保守结构域分析结果表明这 3 个蛋白均具有 SAM 依赖的甲基转移酶超家族保守结构域，为甲基转移酶基因家族成员。

将 3 个 *O*-甲基转移酶构建至原核表达载体并进行蛋白表达。在 0.4 mol/L IPTG、16 °C 诱导 16 h 条件下，MIOMT1、MIOMT2 上清中可见少量表

达，后续可以考虑优化蛋白表达条件，如调整表达温度、转速和表达时间等参数或进行密码子优化以实现更大量可溶性表达^[29]。通过对表达温度、诱导剂加入量进行初步考察，也未见 MIOMT3 蛋白可溶性表达，分析原因可能由于原核表达载体的启动子、助融标签及密码子偏好等因素，导致植物来源的序列 MIOMT3 在原核细胞中无法正确折叠。后续将通过更换表达载体、表达菌株、密码子优化或更换真核表达载体在酵母中诱导表达^[30]，以实现其可溶性表达。

MIOMT1 与来自大麦 *Hordeum vulgare* 的 HvOMT1 和来自粳稻 *Oryza sativa* subsp. *Japonica* 的 OsOMT17 聚为一支。Hv7OMT 可以体外催化多种黄酮甲基化，如芹菜素、柚皮素、木犀草素、山奈酚等，其中催化形成的芹菜素 7 位羟基甲基化产物具有植物抗毒素的作用^[31]。OsOMT17 具有催化木犀草素、三粒小麦黄酮、杨梅素等黄酮类化合物的单步或多步 *O*-甲基化的作用。推测 MIOMT1 可能具有类似的催化活性^[32]。MIOMT2 与番杏科日中花属的植物冰叶日中花 *Mesembryanthemum crystallinum* 的 McPFOMT 聚成一支，McPFOMT 具有催化咖啡酸、咖啡酰辅酶 A 和一些黄酮醇化合物 *O*-甲基化的功能，其底物谱较广，推测 MIOMT2 也拥有相似的功能^[33]。MIOMT3 来自拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 AtCCoAOMT1 聚为一支，AtCCoAOMT1 参与木质素的生物合成，催化咖啡酰辅酶 A 羟基甲基化生成阿魏酰辅酶 A，使愈疮木基木质素转化成紫丁香基木质素，推测 MIOMT3 具有类似的功能^[34]。系统进化分析结果表明，3 个 MIOMTs 可能均具有催化羟基甲基化的生物学功能。苯基非那烯酮是地涌金莲中分离得率最高的次

生代谢产物(34个),且多数苯基非那烯酮类化合物是以O-甲基化的形式存在的(21个),而其他O-甲基化的线性二芳基庚烷类、甾醇类和脂肪类仅有4个^[4-6, 24-26],提示这3个酶很可能以多羟基的苯基非那烯酮类化合物为底物,参与苯基非那烯酮生物合成O-甲基化后修饰。

本实验室和其他实验室有关地涌金莲化学成分的研究结果表明,地涌金莲中苯基非那烯酮及其甲氧基化产物在苞片、种子和叶片中的含量有显著差异。此外苞片、种子和叶片是地涌金莲重要繁殖和营养器官,外观形态也具有显著差异。综合考虑地涌金莲苞片、种子和叶片的形态、功效和化学成分的差异,对MIOMT1、MIOMT2和MIOMT3在苞片、种子和叶片部位的表达模式进行分析,发现MIOMT1、MIOMT2和MIOMT3在不同组织部位的表达模式不同,MIOMT1在地涌金莲不同组织相对表达量为叶片>苞片>种子,MIOMT2和MIOMT3在地涌金莲不同组织相对表达量为苞片>种子>叶片。植物次生代谢途径中关键酶的空间表达特性是代谢产物合成和积累的重要影响因素^[35],后续可以联合苯基非那烯酮类化合物靶向代谢组学技术,研究不同组织部位的甲氧基苯基非那烯酮的化学结构和分布规律,鉴定出MIOMTs的催化底物,从而验证MIOMTs可能具有的苯基非那烯酮O-甲基化功能。

香蕉商业化生产大多采用无性繁殖的方法栽培3倍体香蕉品种,其在生长过程中容易受到多种病原体的侵袭,如斐济球腔菌*Mycosphaerella fijiensis*(黑条叶斑病)^[9]、尖孢镰刀菌*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*(香蕉枯萎病)^[36]、香蕉刺盘孢菌*Colletotrichum musae*(炭疽病)^[37]以及香蕉穿孔线虫*Radopholus similis*(香蕉烂根病)^[38]等,导致产量明显下降。化学防治是主要的控制措施,但是存在抗药性、农药残留、环境污染等问题,因此寻找新的、环境友好的保护治疗方法迫在眉睫。苯基非那烯酮作为植物中天然存在的植保素,通过光诱导产生单线态氧发挥功能,与传统农药相比有着不同的作用模式,具有开发为植物源抗菌农药的巨大潜力^[13,39-40]。Ocampos等^[41]发现*Schiekia timida*(Haemodoraceae)的种子提取物中含有10种苯基非那烯酮混合物可以作为单子叶植物的苗后除草剂,0.25 mg/mL提取物效果与1.69 mg/mL商业化除草剂草甘膦相当。已有研究表明苯基非那烯酮O-甲基

化后可以增强其抑菌活性^[12-13]。因此,解析香蕉植保素苯基非那烯酮生物合成途径中的O-甲基转移酶,不仅可以为制备更具潜在抗菌活性的植物源抗菌农药先导化合物提供绿色生物合成途径,而且对使用基因工程的方法提高香蕉的抗病能力提供科学依据。

综上所述,本研究对地涌金莲中苯基非那烯酮生物合成相关的O-甲基转移酶MIOMT1、MIOMT2和MIOMT3进行基因克隆与原核表达、生物信息学分析和组织特异性表达分析,可为后续MIOMTs的功能研究奠定基础,从而为鉴定出苯基非那烯酮O-甲基转移酶提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李文娟. 地涌金莲 EST-SSR 引物开发与遗传多样性的 SSR 分析 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012.
- [2] 潘庆杰. 地涌金莲种群遗传多样性研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
- [3] 李晓江. 地涌金莲资源的开发利用与可持续发展研究 [J]. 西昌学院学报: 自然科学版, 2001, 15(3): 3-5.
- [4] 唐靓, 李丕睿, 冯博雅, 等. 中国特有植物地涌金莲的化学成分及应用价值研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2023, 51(3): 15-22.
- [5] Lyu H, Chen Y, Gershenzon J, et al. Diarylheptanoid derivatives (musellins A—F) and dimeric phenylphenalenones from seed coats of *Musella lasiocarpa*, the Chinese dwarf banana [J]. *J Nat Prod*, 2023, 86(6): 1571-1583.
- [6] 唐靓, 乔思薇, 张国栋, 等. 地涌金莲根乙醇提取物的化学成分 [J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(1): 108-110.
- [7] Norman E O, Lever J, Brkljača R, et al. Distribution, biosynthesis, and biological activity of phenylphenalenone-type compounds derived from the family of plants, Haemodoraceae [J]. *Nat Prod Rep*, 2019, 36(5): 753-768.
- [8] Hölscher D, Dhakshinamoorthy S, Alexandrov T, et al. Phenalenone-type phytoalexins mediate resistance of banana plants (*Musa* spp.) to the burrowing nematode *Radopholus similis* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(1): 105-110.
- [9] Hölscher D, Vollrath A, Kai M, et al. Local phytochemical response of *Musa acuminata* × *balbisiana* Colla cv. 'Bluggoe' (ABB) to colonization by Sternorrhyncha [J]. *Phytochemistry*, 2017, 133: 26-32.
- [10] Hölscher D, Buerkert A, Schneider B. Phenylphenalenones accumulate in plant tissues of two banana cultivars in response to herbivory by the banana weevil and banana stem weevil [J]. *Plants*, 2016, 5(3): 34.
- [11] Otálvaro F, Nanclares J, Vázquez L E, et al. Phenalenone-type compounds from *Musa acuminata* var. "Yangambi km 5" (AAA) and their activity against *Mycosphaerella*

- fijiensis* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(5): 887-890.
- [12] Lin Z, Hu Z W, Zhou L J, *et al.* A large conserved family of small-molecule carboxyl methyltransferases identified from microorganisms [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(20): e2301389120.
- [13] Kamo T, Kato N, Hirai N, *et al.* Phenylphenalenone-type phytoalexins from unripe buñgulan banana fruit [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(1): 95-101.
- [14] Hidalgo W, Duque L, Saez J, *et al.* Structure-activity relationship in the interaction of substituted perinaphthenones with *Mycosphaerella fijiensis* [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(16): 7417-7421.
- [15] Lazzaro A, Corominas M, Martí C, *et al.* Light- and singlet oxygen-mediated antifungal activity of phenylphenalenone phytoalexins [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2004, 3(7): 706-710.
- [16] Balasubramani S, Lv S, Chen Q Y, *et al.* A systematic review of the *O*-methyltransferase gene expression [J]. *Plant Gene*, 2021, 27: 100295.
- [17] Tan Y P, Yang J, Jiang Y Y, *et al.* Identification and characterization of two *Isatis indigotica* *O*-methyltransferases methylating *C*-glycosylflavonoids [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhac140.
- [18] 张香燕, 申晓林, 孙新晓, 等. 甲基转移酶在微生物合成天然产物中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1869-1886.
- [19] 彭昭欣. 不同柑橘种质中聚甲氧基黄酮评价、生物合成相关基因的挖掘与功能解析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- [20] Lu S W, Zhuge Y X, Hao T Y, *et al.* Systematic analysis reveals *O*-methyltransferase gene family members involved in flavonoid biosynthesis in grape [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2022, 173: 33-45.
- [21] 程波, 满尔哈巴·海如拉, 何江. 新塔花查耳酮合成酶基因克隆及表达分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(10): 3134-3141.
- [22] 张国宁, 李元玉, 马雪祺, 等. 菘蓝中咖啡酸氧甲基转移酶 *IiCOMT* 的克隆与表达分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 214-221.
- [23] Otálvaro F, Jitsaeng K, Munde T, *et al.* *O*-Methylation of phenylphenalenone phytoalexins in *Musaacuminata* and *Wachendorfia thyriflora* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(2/3): 206-213.
- [24] 杨维力, 田军, 白冰如, 等. 地涌金莲的化学成分 [J]. *中草药*, 2001, 32(8): 120-125.
- [25] Dong L B, He J, Li X Y, *et al.* Chemical constituents from the aerial parts of *Musella lasiocarpa* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2011, 1(1): 41-47.
- [26] Qin B, Shao Z Y, Zeng W, *et al.* Musellactone, A new lactone from *Musella lasiocarpa* [J]. *Jnl Chin Chemical Soc*, 2006, 53(2): 475-478.
- [27] Liao Z K, Liu X J, Zheng J, *et al.* A multifunctional true caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase enzyme participates in the biosynthesis of polymethoxylated flavones in citrus [J]. *Plant Physiol*, 2023, 192(3): 2049-2066.
- [28] 彭赛男, 李宇琨, 罗丹丹, 等. 艾叶类黄酮 *O*-甲基转移酶基因家族的鉴定及表达分析 [J]. *药学学报*, 2023, 58(4): 1069-1078.
- [29] 苗朝悦, 杜乐, 王佳琦, 等. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略 [J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43(9): 33-45.
- [30] 张欣然, 凌焱, 杨英. 毕赤酵母高效表达外源蛋白的分子水平策略 [J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(17): 321-328.
- [31] Christensen A B, Gregersen P L, Olsen C E, *et al.* A flavonoid 7-*O*-methyltransferase is expressed in barley leaves in response to pathogen attack [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 36(2): 219-227.
- [32] Lee Y J, Kim B G, Chong Y, *et al.* Cation dependent *O*-methyltransferases from rice [J]. *Planta*, 2008, 227(3): 641-647.
- [33] Ibdah M, Zhang X H, Schmidt J, *et al.* A novel Mg(2+)-dependent *O*-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(45): 43961-43972.
- [34] Fellenberg C, van Ohlen M, Handrick V, *et al.* The role of CCoAOMT1 and COMT1 in *Arabidopsis* anthers [J]. *Planta*, 2012, 236(1): 51-61.
- [35] 吴琼, 孙超, 陈士林. 西洋参 β -香树脂合成酶基因的克隆和生物信息学分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(11): 1476-1480.
- [36] Kamo T, Hirai N, Tsuda M, *et al.* Changes in the content and biosynthesis of phytoalexins in banana fruit [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(10): 2089-2098.
- [37] Kamo T, Hirai N, Iwami K, *et al.* New phenylphenalenones from banana fruit [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57(36): 7649-7656.
- [38] Hölscher D, Dhakshinamoorthy S, Alexandrov T, *et al.* Phenalenone-type phytoalexins mediate resistance of banana plants (*Musa* spp.) to the burrowing nematode *Radopholus similis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(1): 105-110.
- [39] Flors C, Nonell S. Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: Phototoxic phenalenone phytoalexins [J]. *Acc Chem Res*, 2006, 39(5): 293-300.
- [40] Casellas J, Reguero M. Photosensitization versus photocyclization: Competitive reactions of phenylphenalenone in its role as phytoanticipins in plant defense strategies [J]. *J Phys Chem A*, 2018, 122(3): 811-821.
- [41] Ocampos F, de Souza A, Antar G M, *et al.* Phytotoxicity of *Schiekia timida* seed extracts, a mixture of phenylphenalenones [J]. *Molecules*, 2021, 26(14): 4197.

[责任编辑 时圣明]