

## 山茱萸 *CoG10H1* 基因的克隆和表达分析

原 梦<sup>1,2</sup>, 谭新杰<sup>1,2#</sup>, 邓 萍<sup>1,2</sup>, 王盼盼<sup>1,2</sup>, 许家齐<sup>1,2</sup>, 李文文<sup>1,2</sup>, 李义龙<sup>1,2</sup>, 吕淑芳<sup>1,2</sup>, 王玉龙<sup>1,2</sup>, 侯典云<sup>1,2\*</sup>

1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471023

2. 河南省药食兼用资源评价与创新利用工程研究中心, 河南 洛阳 471023

**摘要:** 目的 克隆山茱萸 *Cornus officinalis* *G10H1* 基因 (*CoG10H1*), 并进行相关的生物信息学分析、表达分析和亚细胞定位研究。方法 基于山茱萸转录组数据筛选并克隆 *CoG10H1* 基因, 并对其 *CoG10H1* 及其编码蛋白的理化性质、二级结构、三级结构等进行分析。利用实时荧光定量聚合酶链式反应 PCR (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 对 *CoG10H1* 进行组织特异性表达分析。构建 pCambia1300-*CoG10H1*-GFP 融合表达载体并侵染烟草叶片, 激光共聚焦显微镜观察 *CoG10H1* 蛋白的亚细胞定位。结果 *CoG10H1* 的 cDNA 长度为 1 497 bp, 编码 499 个氨基酸, 有 1 个信号肽, 在茎中表达量稍高, 果实和叶片中次之, 激光共聚焦显微镜下观察到 *CoG10H1* 蛋白定位于内质网中。结论 *CoG10H1* 蛋白属于细胞色素 P450 蛋白家族, 可能在马钱苷合成通路中的发挥关键作用, 为后续研究 *CoG10H1* 基因在马钱苷合成通路调控中的作用研究提供参考。

**关键词:** 山茱萸; *CoG10H1*; 生物信息学; 亚细胞定位; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)11-4036-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.11.023

## Cloning and expression analysis of *CoG10H1* gene from *Cornus officinalis*

YUAN Meng<sup>1,2</sup>, TAN Xinjie<sup>1,2</sup>, DENG Ping<sup>1,2</sup>, WANG Panpan<sup>1,2</sup>, XU Jiaqi<sup>1,2</sup>, LI Wenwen<sup>1,2</sup>, LI Yilong<sup>1,2</sup>, LYU Shufang<sup>1,2</sup>, WANG Yulong<sup>1,2</sup>, HOU Dianyun<sup>1,2</sup>

1. School of Agricultural, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

2. Henan Engineering Research Center for Evaluation and Innovative Utilization of homology of medicine and food, Luoyang 471023, China

**Abstract: Objective** The *CoG10H1* gene was cloned from *Cornus officinalis* and analyzed by bioinformatics, expression and subcellular localization. **Methods** The *CoG10H1* gene was screened and cloned based on the transcriptome data of *C. officinalis*, and the physicochemical properties, secondary structure, and tertiary structure of *CoG10H1* and its encoded protein were analyzed. The tissue-specific expression analysis of *CoG10H1* was conducted by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The pCambia1300-*CoG10H1*-GFP fusion expression vector was constructed and infected with tobacco leaves, and the subcellular localization of the *CoG10H1* protein was observed using a laser confocal microscope. **Results** The cDNA length of *CoG10H1* was 1 497 bp, encoding 499 amino acids, with one signal peptide. The expression level was slightly higher in the stem, followed by the fruit and the leaf. The *CoG10H1* protein was observed to be located in the endoplasmic reticulum under the laser confocal microscope. **Conclusion** The *CoG10H1* protein belongs to the Cytochrome P450 protein family and may play a crucial role in the synthesis pathway of loganin, providing a reference for subsequent studies on the role of the *CoG10H1* gene in the regulation of the loganin synthesis pathway.

**Key word:** *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; *CoG10H1*; bioinformatics; subcellular localization; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction

收稿日期: 2024-12-03

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (U1404829); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302); 河南省科技攻关项目 (242102110325); 河南省中药材产业科技特派员服务团项目; 中央引导地方科技发展资金项目 (Z20241471030)

**作者简介:** 原 梦 (2000—), 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: ym107107@163.com

**共同第一作者:** 谭新杰 (1998—), 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: txjly176@163.com

**\*通信作者:** 侯典云 (1975—), 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物资源评价与利用。Tel: (0379)64282340 E-mail: dianyun518@163.com

山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 是落叶灌木或乔木, 药用部位是其干燥成熟果肉, 又名山萸肉、枣皮、药枣等, 味酸涩, 性微温, 是我国的传统药材和临床常用的名贵中药, 记载于《神农本草经》<sup>[1-3]</sup>。山茱萸共分离出 300 余种化学成分, 包括环烯醚萜类、鞣质、有机酸、挥发油类等<sup>[4-5]</sup>。其中含量最高的化学成分是环烯醚萜苷类, 主要包括马钱苷、莫诺苷、山茱萸新苷、獐芽菜苷等化合物, 马钱苷和莫诺苷的含量最高<sup>[6]</sup>。

环烯醚萜合成途径主要有甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和 2-甲基-4-磷酸-D-赤藓糖醇 (2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径<sup>[7]</sup>。研究表明, 香叶基焦磷酸 (geranyl pyrophosphate, GPP) 是不同萜类的重要分界点, 多种萜类通过 GPP 传递至生物碱、单萜、二/三萜等合成途径<sup>[8-10]</sup>。在马钱苷合成途径中, GPP 先去磷酸化反应, 之后在香叶醇合酶 (geraniol synthase, GES) 催化下转化为香叶醇, 接下来在香叶醇-10-羟化酶 (geraniol 10-hydroxylase, G10H) 作用下在 C-10 位置精准发生羟基化反应, 进而生成 10-羟基-香叶醇。这个羟基化反应不只是马钱苷合成途径中第一个限速环节, 更是决定了流向马钱苷途径的碳通量的关键步骤。

G10H 属于细胞色素 P450 家族 (cytochrome P450, CYP450)<sup>[11]</sup>, 是一个很大的植物超基因家族<sup>[12]</sup>, 因其与 CO 结合后在 450 nm 处有特异吸收峰而得名<sup>[13]</sup>, CYP450 蛋白可以参与催化苯丙烷类、萜类等物质的合成<sup>[14]</sup>。*CrG10H* 基因首次从长春花中克隆得到, 并且在长春花和酵母中进行体内、体外验证得出 *CrG10H* 蛋白存在特定的酶活性, 在环烯醚萜类物质合成途径中起到重要的调控作用<sup>[15-16]</sup>。G10H 蛋白属于 CYP450 单加氧酶的 CYP76 亚家族成员, 已经在长春花中筛选鉴定的 CYP76B6 和在鼠耳芥、烟草中筛选鉴定的 CYP76C4 都是 G10H 蛋白<sup>[16-17]</sup>。目前, 长春花<sup>[16]</sup>、喜树<sup>[18]</sup>、短小蛇根草<sup>[19]</sup>、川西獐芽菜<sup>[20]</sup>、荆芥<sup>[21]</sup>等 22 个物种中的 *G10H* 基因已经被研究报道, 这充分说明了 *G10H* 基因在植物体内发挥着重要的调控作用<sup>[22]</sup>。

本实验基于全长转录组数据, 筛选并克隆 *CoG10H1* 基因, 并进行生物信息学分析和组织特异性表达分析, 探究 *CoG10H1* 蛋白的亚细胞定位, 为研究 *CoG10H* 基因的功能提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

山茱萸材料种植于河南科技大学农场, 经河南科技大学戴攀峰副教授鉴定为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *C. officinalis* Sieb. et Zucc.。取山茱萸的茎、叶和果实迅速放入液氮速冻, 储存于-80 °C 超低温冰箱。

### 1.2 仪器

JY04S-3D 型凝胶成像分析系统 (君意电泳有限公司)、NanoDrop 2000 型微量分光光度计、FV3000 型激光扫描共聚焦显微镜 (Olympus 有限公司)、Lightcycler96 型实时荧光定量 PCR 仪 (Roche 有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

取适量山茱萸叶片和果实, 置于液氮中快速研磨成粉末, 称量 70.0 mg 粉末混合物, 按照 RNA 快速提取试剂盒说明书提取山茱萸总 RNA, 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳确认 RNA 无降解情况后, 用微量分光光度计测定 RNA 浓度, 按照 First Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA clearer) 试剂盒步骤进行反转录, 得到 cDNA 后储存于-20 °C。

### 2.2 *CoG10H1* 基因的克隆与鉴定

根据本课题组的山茱萸转录组数据筛选出 *CoG10H1*, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 *CoG10H1* 基因的特异性引物 *CoG10H1*-F: 5'-CACTACACACAGCCTAACA-3'; *CoG10H1*-R: 5'-CTGAATATTACAATATTGCTTGC-3'。以山茱萸 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 体系 1.0 μL KOD-Plus-Neo, 5.0 μL 10×PCR Buffer, 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 3.0 μL, 2 mmol/L dNTPs 5.0 μL, 10 μmol/L *CoG10H1*-F 1.5 μL, 10 μmol/L *CoG10H1*-R 1.5 μL, 2.0 μL cDNA, 31.0 μL RNase-free ddH<sub>2</sub>O; 反应程序为 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 1 min, 40 s; 33 个循环; 72 °C, 5 min。之后将纯化产物与 pMD18-T 载体连接, 转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 挑取阳性单克隆送公司测序, 测序结果与转录组数据进行比对, 比对成功的菌液加入等体积的 50% 甘油, 储存于-80 °C 超低温冰箱中。

### 2.3 *CoG10H1* 基因的生物信息学分析

通过 InterPro<sup>[23]</sup> (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 以及 ProtParam 和 ProtScale 在线软件<sup>[24]</sup> (<https://www.expasy.org/resources/protparam>、<https://web.expasy.org/protscale/>) 对 *CoG10H1* 蛋白的结构

域和理化性质进行分析；采用 Cell-Ploc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 和 TMHMM 在线软件<sup>[25]</sup> (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测 CoG10H1 蛋白的亚细胞定位和利用和跨膜结构域；基于在线平台 SOPMA (<http://npsa-prabi.ibcp.fr>) 和 SWISS-MODEL<sup>[26]</sup> (<http://swissmodel.expasy.org/>) 分析预测 CoG10H1 蛋白的二级结构和三级结构；使用 MEGA 7.0 软件构建 CoG10H1 蛋白的系统发育树。

2.4 CoG10H1 基因的表达分析

从山茱萸的茎、叶、果实样品中提取 total RNA，经反转录获得 cDNA。设计 qPCR 的引物序列（表 1），以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应，反应体系见表 2，每个反应设计 3 个重复，通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法对 CoG10H1 基因在山茱萸不同组织的表达量进行计算，从而检测 CoG10H1 基因在山茱萸茎、叶、果实中的表达分布情况，最后用 GraphPad Prism 绘制实时表达量图。

2.5 山茱萸 G10H1 蛋白亚细胞定位分析

选择 BamH I 和 Sac I 作为双酶切位点，对 pCAMBIA 1300-GFP 载体进行双酶切，使用在线网

表 1 CoG10H1 基因 qRT-PCR 扩增引物

Table 1 qRT-PCR amplification primers of CoG10H1 gene

| 引物名称        | 引物序列（5'→3'）           |
|-------------|-----------------------|
| q-CoG10H1-F | GGCAGCCTGGTACAAGAATCA |
| q-CoG10H1-R | CCTCGCAAAGTTGATGCCA   |
| q-CoGAPDH-F | TATCAAGGAGGAGTCAGAGG  |
| q-CoGAPDH-R | CCATTCGTTGTCATACCAGG  |

表 3 亚细胞定位扩增引物

Table 3 Amplification primers for subcellular localization

| 引物名称                   | 引物序列（5'→3'）                                    |
|------------------------|------------------------------------------------|
| pCAMBIA 1300-CoG10H1-F | catgtcgactctagaggatccATGGATTCTTGAGCGTTGTACTATG |
| pCAMBIA 1300-CoG10H1-R | agaacacgggggactgagctcCGCATGGACAGGGACAGCA       |
| pCAMBIA 1300-Seq-F     | CCGCTGACGTAAGGGATGACG                          |
| pCAMBIA 1300-Seq-R     | CCGTCCAGCTCGACCAGGATG                          |

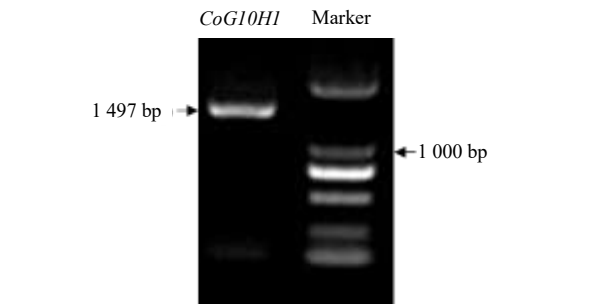


图 1 CoG10H1 基因的克隆结果

Fig. 1 Cloning results of CoG10H1 gene

表 2 qRT-PCR 反应体系

Table 2 qRT-PCR reaction system

| 试剂                                                  | 体积/μL |
|-----------------------------------------------------|-------|
| 2×Ultra SYBR Green qPCR Mix                         | 5.0   |
| q-CoG10H1-F/ q-CoGAPDH-F (10 μmol·L <sup>-1</sup> ) | 0.5   |
| q-CoG10H1-R/ q-CoGAPDH-R (10 μmol·L <sup>-1</sup> ) | 0.5   |
| cDNA                                                | 1.0   |
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O                       | 3.0   |

站 (<https://crm.vazyme.com/cetool/single-fragment.html>) 设计 CoG10H1 基因的同源重组引物（表 3），以 pMD18-T-CoG10H1 质粒为模板扩增目的片段，通过无缝克隆试剂盒连接，转入大肠杆菌感受态 DH5α 中。挑取单克隆菌株送测，将测序正确的菌液扩繁，提取质粒

pCAMBIA 1300-CoG10H1-GFP，转入农杆菌感受态 GV3101 中，将含有内质网标记 ER-HDEL 和含有重组质粒的侵染液 1：1 混匀后注射到本氏烟草叶片下表皮，黑暗培养 2~3 d 后用激光扫描共聚焦显微镜观察结果。其中 GFP 绿色荧光蛋白激发波长为 488 nm，内质网标记蛋白带有 RFP 红色荧光蛋白，其激发波长为 587 nm。

3 结果与分析

3.1 CoG10H1 基因的克隆与鉴定

从本课题组的全长转录组数据中筛选得到 CoG10H1 基因，根据该序列设计特异性引物，以 cDNA 为模板，PCR 扩增得到约 1 500 bp 片段（图 1），CoG10H1 基因与 pMD18-T 载体连接后转入大肠杆菌 DH5α，菌液 PCR 检测阳性后送测（图 2），

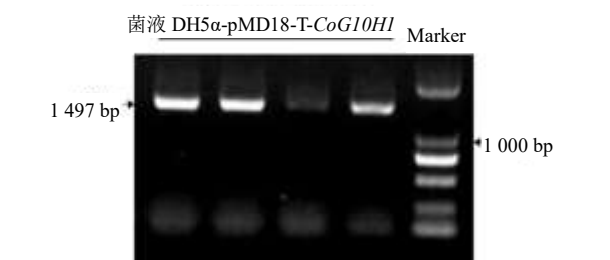


图 2 DH5α-pMD18-T-CoG10H1 菌液 PCR 结果

Fig. 2 PCR results of DH5α-pMD18-T-CoG10H1 bacterial solution

测序结果与转录组数据一致, cDNA 序列长度为 1 497 bp。

### 3.2 CoG10H1 蛋白质理化性质预测与跨膜结构域分析

从等电点、亲疏水性等方面对 CoG10H1 蛋白进行预测, 结果表明, *CoG10H1* 基因编码 499 个氨基酸, 理论等电点为 6.71, 总亲水性均值为-0.063, 不稳定系数为 51.51。

CoG10H1 蛋白属于 Cytochrome P450 蛋白家族 (图 3-a), 不存在跨膜结构域 (图 3-b), 具有 1 个信号肽 (图 3-c), 为疏水性蛋白 (图 3-d), 亚细胞定位预测为内质网 (图 3-f)。

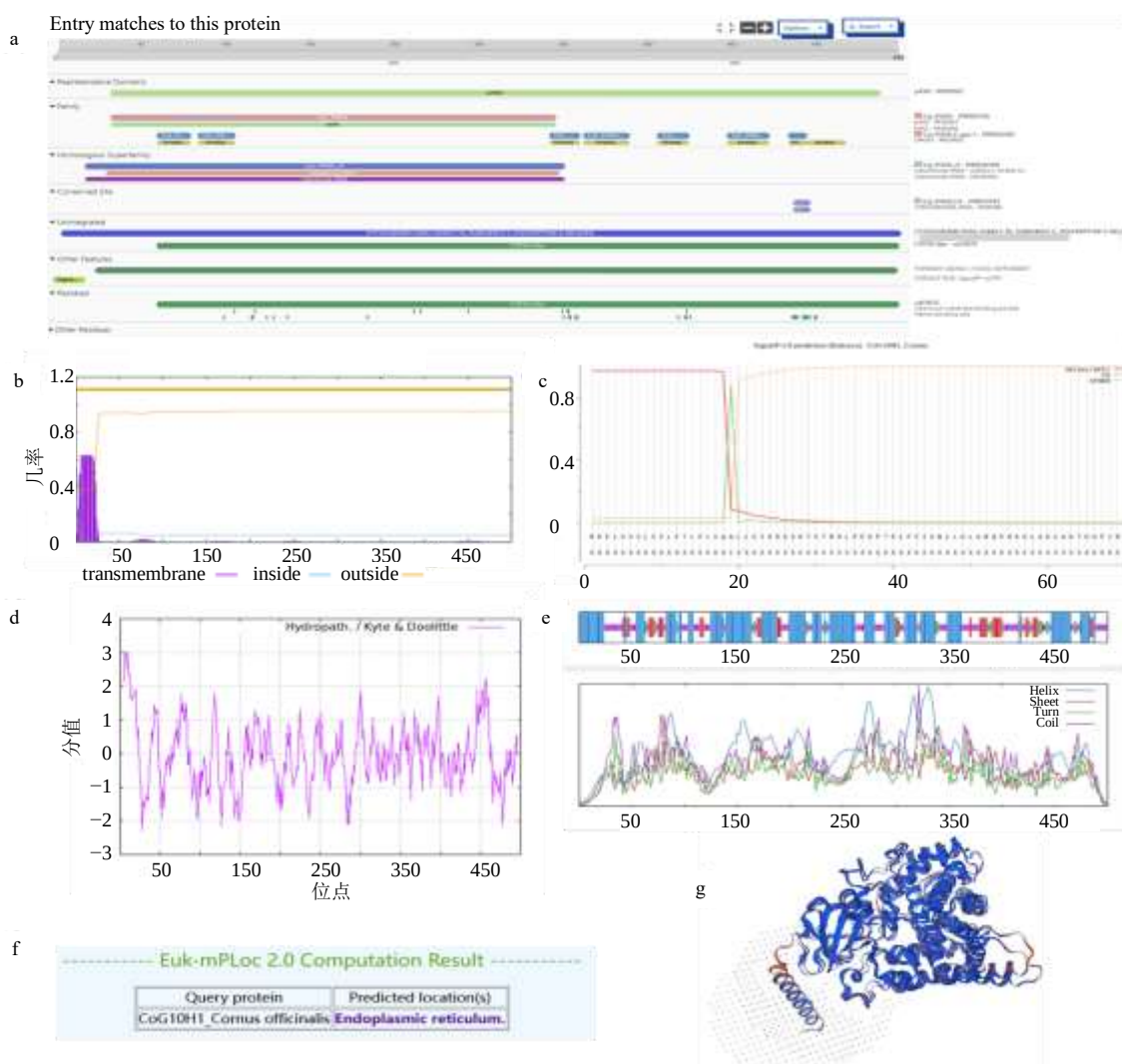
### 3.3 CoG10H1 蛋白的高级结构预测与分析

蛋 CoG10H1 蛋白的二级结构预测见图 3-e, 包括 49.70%  $\alpha$ -螺旋、6.41%  $\beta$ -转角、12.22% 自由延伸和 31.66% 无规则卷曲, 由此可见  $\alpha$ -螺旋是 CoG10H1 蛋白最主要的二级结构。

使用 SWISS-MODEL 在线网站对 CoG10H1 蛋白的三级结构进行预测分析 (图 3-g), 用 A0A5J4ZU75.1.A 为模板, 蛋白覆盖率为 79.64%。

### 3.4 CoG10H1 氨基酸序列的系统进化分析

构建山茱萸 CoG10H1 与其他物种的系统发育树 (图 4)。结果显示山茱萸 CoG10H1 蛋白与喜树聚集在同一支上, 与楝、陆地棉、可可聚集在一个



a-CoG10H1 蛋白家族; b-CoG10H1 蛋白跨膜结构域; c-CoG10H1 蛋白信号肽; d-CoG10H1 蛋白疏水性; e-CoG10H1 蛋白二级结构; f-CoG10H1 蛋白亚细胞定位; g-CoG10H1 蛋白三级结构。

a-CoG10H1 protein family; b-transmembrane domain of CoG10H1 protein; c-CoG10H1 protein signal peptide; d-CoG10H1 protein hydrophobicity; e-secondary structure of CoG10H1 protein; f-subcellular localization of CoG10H1 protein; g-tertiary structure of CoG10H1 protein.

图 3 CoG10H1 蛋白生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatics analysis of CoG10H1 protein

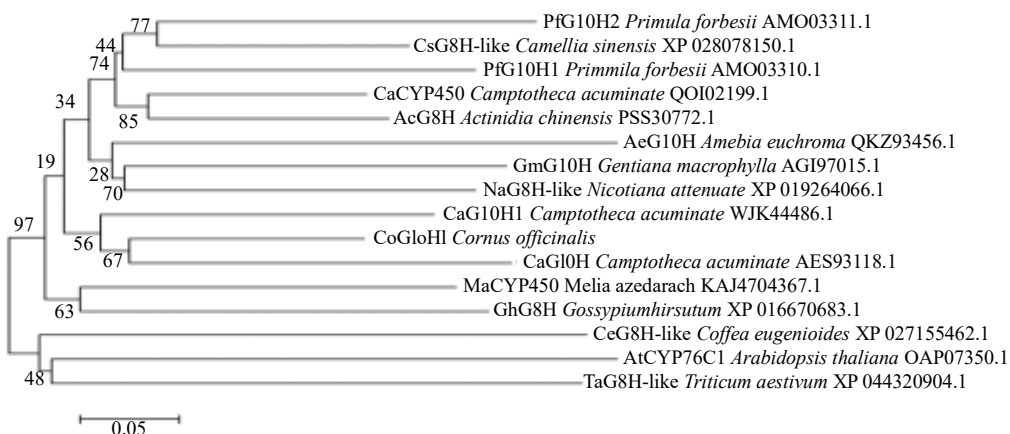


图 4 山茱萸 CoG10H1 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of CoG10H1 in *C. officinalis*

较大的分支上, 山茱萸 CoG10H1 蛋白与大花四照花、蓝果树、中华猕猴桃、大花窄叶油茶、喜树的序列同源性较高, 为 90.87%、79.48%、71.23%、70.42%、73.96%, 而与长春花、蛇根木等分支较远的序列同源性相对较低。

### 3.5 CoG10H1 基因的组织特异性表达分析

通过 Primer Premier 5.0 软件设计 CoG10H1 的 qRT-PCR 特异性引物, 并分析 CoG10H1 基因在不同组织中的表达, 结果表明, CoG10H1 基因在茎中的表达量稍高, 在果实和叶片中的表达量次之 (图 5)。

### 3.6 CoG10H1 蛋白的亚细胞定位分析

在激光共聚焦显微镜下观察烟草叶片下表皮的亚细胞定位分析 (图 6), 结果表明, 把内质网标记 ER-HDEL 和 pCAMBIA 1300-GFP 空载作为双对照时, pCAMBIA 1300-GFP 空载在细胞质和细胞核

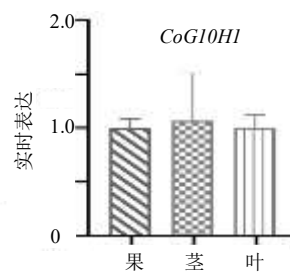


图 5 CoG10H1 基因在不同组织的表达水平

Fig. 5 CoG10H1 gene expression levels in different tissues of *C. officinalis*

中均发出绿色荧光, 而 ER-HDEL 标记仅在内质网上发出红色荧光。试验组中 CoG10H1 蛋白发出的绿色荧光与 ER-HDEL 标记发出的红色荧光存在重合, 并且在重合区域为黄色荧光, 这充分说明了 CoG10H1 蛋白是在内质网上表达, 与生物信息学分析中的亚细胞定位预测结果符合。

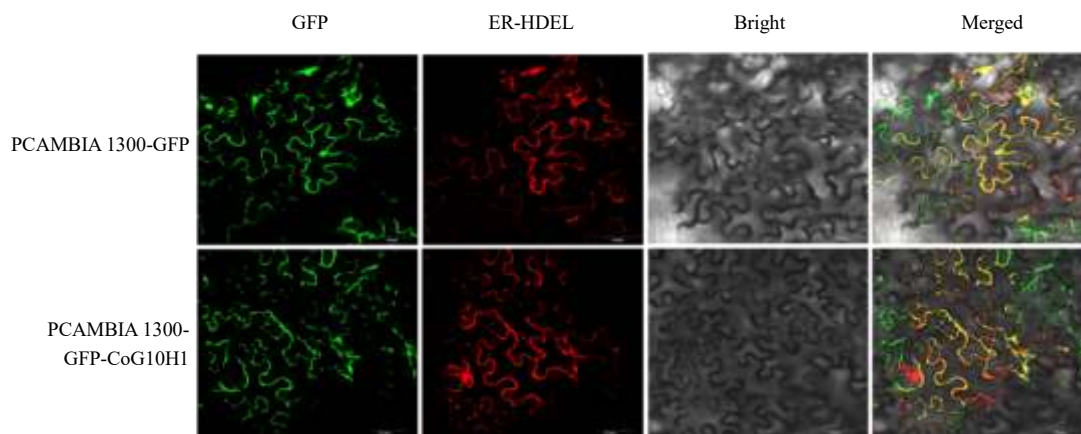


图 6 CoG10H1 蛋白在烟草叶片下表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of CoG10H1 protein in lower epidermal cells of tobacco leaves



#### 4 讨论

山茱萸是我国的大宗中药材,被国家卫生部在 2002 年列为可用于保健食品的物品之一,还是 2023 年国家拟新增的 9 种药食兼用物质之一。山茱萸的主要活性成分是环烯醚萜苷类物质,包括马钱苷、莫诺苷、7-脱氢马钱素、马鞭草苷、獐牙菜苷及山茱萸新苷等,这些统称为山茱萸环烯醚萜总苷<sup>[5]</sup>,其中马钱苷和莫诺苷是《中国药典》2020 年版规定的主要活性成分。

香叶醇-10-羟化酶(G10H)属于细胞色素 P450 家族中单加氧酶家族的 CYP76B 亚家族,它可以催化香叶醇的 C-10 加羟基反应进而生成 10-羟基香叶醇<sup>[26-27]</sup>。研究表明 G10H 在长春花生物碱的合成过程中发挥重要作用<sup>[28-30]</sup>,将 *orca3/g10h* 基因共转入长春花毛状根中可以提高萜类吲哚生物碱(TIAs)量<sup>[31]</sup>,在川西樟牙菜中过表达 *SmG10H* 可以提高环烯醚萜类物质的积累<sup>[20]</sup>,*GrG10H* 在滇龙胆的根中表达量最高,与其药用部位一致<sup>[32]</sup>,总的来说,G10H 蛋白在环烯醚萜类和吲哚生物碱的合成过程中起关键调控作用。从香叶醇开始,G10H 已经被证明是在马钱苷合成途径中的第一个关键酶基因<sup>[16]</sup>。

本研究从山茱萸的全长转录组数据中筛选并克隆出 *CoG10H1* 基因,长度为 1 497 bp,编码 499 个氨基酸,保守结构域分析显示 *CoG10H1* 蛋白属于细胞色素 P450 蛋白家族。构建山茱萸 *CoG10H1* 基因与其他物种的氨基酸序列系统发育树,可以看出 *CoG10H1* 蛋白序列与蓝果树科喜树的蛋白序列更接近同源,这大概是因为它们都属于山茱萸目。从进化关系上看,山茱萸目的山茱萸与茶、猕猴桃等杜鹃花目表现出来的树形结构与 APG IV 系统<sup>[33]</sup>所认为的进化关系相符合。本研究发现 *CoG10H1* 基因在山茱萸茎中的表达量稍高,在果实和叶片中的表达量次之,这与滇龙胆<sup>[34]</sup>、秦艽<sup>[35]</sup>、蜘蛛香<sup>[36]</sup>、广藿香<sup>[27]</sup>中的研究结果不完全一致,可能是因为不同中药品种的药用活性部位不同。

蛋白质亚细胞定位(protein subcellular localization)是研究蛋白质生物学功能的基础,对蛋白质组学研究具有重要意义<sup>[37]</sup>。亚细胞定位分析通常分为两部分,先通过生物信息学预测蛋白质的亚细胞定位,之后通过试验检测预测结果。*CoG10H1* 蛋白的亚细胞定位预测为内质网,之后通过在烟草叶片中的瞬时表达检测到其定位在内质网中,这与滇龙胆 *GrG10H1* 和 *GrG10H2* 的亚细胞定位预测结

果一致<sup>[34]</sup>,而在广藿香中 *PcG10H1* 的亚细胞定位预测为叶绿体<sup>[27]</sup>,在秦艽中 *GmG10H* 的亚细胞定位预测为细胞质<sup>[35]</sup>,这可能是因为物种不同导致亚细胞定位结果不一致。

本研究通过提取山茱萸叶片的总 RNA,经过 RT-PCR 扩增得到目的基因 *CoG10H1* 的 cDNA 序列,并进行生物信息学分析。组织特异性表达分析结果表明 *CoG10H1* 在茎中表达量稍高,果实和叶片中次之。通过构建融合表达载体 pCambia 1300-*CoG10H1*-GFP 进行亚细胞定位分析,结果表明 *CoG10H1* 蛋白定位在内质网上,与预测结果一致。

这些结果表明 *CoG10H1* 基因可能在马钱苷合成通路中的发挥关键作用,有利于对山茱萸马钱苷、莫诺苷合成途径分子机制的进一步研究,为后续研究 *CoG10H1* 基因在马钱苷合成通路中的调控作用提供参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020:92.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第六十九卷)[M].北京:科学出版社,1990:84.
- [3] Tenuta M C, Deguin B, Loizzo M R, et al. An overview of traditional uses, phytochemical compositions and biological activities of edible fruits of European and Asian *Cornus* species [J]. *Foods*, 2022, 11(9): 1240.
- [4] Huang J, Zhang Y W, Dong L, et al. Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 213: 280-301.
- [5] 杨青,余永亮,许兰杰,等.山茱萸化学成分研究进展[J].安徽农业科学,2022,50(21):25-27.
- [6] 侯亚迪,尚子慧,陈培,等.山茱萸环烯醚萜苷的化学成分及生物活性研究进展[J].中华中医药学刊,2024,42(6):69-76.
- [7] 张淑苹,褚洪月,李润竹,等.环烯醚萜类化合物生物合成及其代谢调控[J].分子植物育种,2024,54(3):1-11.
- [8] Guo M X, Lv H Z, Chen H Y, et al. Strategies on biosynthesis and production of bioactive compounds in medicinal plants [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 16(1): 13-26.
- [9] 朱三明,郑敏敏,田恬,等.植物次生代谢途径与调控研究进展[J].植物生理学报,2023,59(12):2188-2216.
- [10] DeMars M D 2nd, O'Connor S E. Evolution and diversification of carboxylesterase-like [4+2] cyclases in *Aspidosperma* and iboga alkaloid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(7): e2318586121.
- [11] Meehan T D, Coscia C J. Hydroxylation of geraniol and nerol by a monooxygenase from *Vinca Rosea* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973, 53(4): 1043-1048.

- [12] 罗瑶, 净易尧, 胡本祥, 等. 远志细胞色素 P450 家族 PtCYP72A546 克隆、亚细胞定位与表达分析 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 919-927.
- [13] 张顺仓, 刘肖宇, 邱琳, 等. 丹参 *SmCYP76S7* 基因的克隆、亚细胞定位和表达分析 [J]. 中草药, 2024, 55(13): 4500-4507.
- [14] 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.
- [15] Meijer A H, Lopes Cardoso M I, Voskuilen J T, *et al.* Isolation and characterization of a cDNA clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH: Cytochrome P-450 reductase, an enzyme essential for reactions catalysed by cytochrome P-450 mono-oxygenases in plants [J]. *Plant J*, 1993, 4(1): 47-60.
- [16] Collu G, Unver N, Peltenburg-Looman A M, *et al.* Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis [J]. *FEBS Lett*, 2001, 508(2): 215-220.
- [17] Höfer R, Dong L M, André F, *et al.* Geraniol hydroxylase and hydroxygeraniol oxidase activities of the CYP76 family of cytochrome P450 enzymes and potential for engineering the early steps of the (seco)iridoid pathway [J]. *Metab Eng*, 2013, 20: 221-232.
- [18] Kusari S, Zühlke S, Spiteller M. Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(4): 764-775.
- [19] Asano T, Kobayashi K, Kashiwara E, *et al.* Suppression of camptothecin biosynthetic genes results in metabolic modification of secondary products in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 128-139.
- [20] Wang J F, Liu Y L, Cai Y F, *et al.* Cloning and functional analysis of geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 from *Swertia mussotii* franch [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(8): 1583-1590.
- [21] Lichman B R, Godden G T, Hamilton J P, *et al.* The evolutionary origins of the cat attractant nepetalactone in catnip [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(20): eaba0721.
- [22] 戴欣怡, 朱锦峰, 韦善屹, 等. 药用植物裂环烯醚萜苷类化合物生物合成途径关键酶基因研究进展 [J]. 西北植物学报, 2023, 43(3): 527-538.
- [23] Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S, *et al.* InterPro in 2022 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D418-D427.
- [24] Duvaud S, Gabella C, Lisacek F, *et al.* Expasy, the Swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W216-W227.
- [25] Hallgren J, Tsigos KD, Pedersen MD, *et al.* DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks [J]. *bioRxiv*, 2022, doi:10.1101/2022.04.08.487609
- [26] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, *et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [27] 欧阳蒲月, 李亚萍, 梁永枢, 等. 广藿香香叶醇-10 羟化酶基因克隆及在不同栽培种中的表达分析 [J]. 中药材, 2017, 40(2): 315-319.
- [28] Wang C T, Liu H, Gao X S, *et al.* Overexpression of G10H and ORCA3 in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(8): 887-894.
- [29] Suttanta N. Characterization of G10H promoter and isolation of WRKY transcription factors involved in *Catharanthus* terpenoid indole alkaloid biosynthesis pathway [D]. Lexington, KY, USA: University of Kentucky, 2012.
- [30] Gong Y F, Liao Z H, Pi Y, *et al.* Engineering terpenoid indole alkaloids biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus* hairy root cultures by overexpressing the geraniol 10-hydroxylase gene [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ (Science)*, 2005, 10(S1): 8-13.
- [31] 陈艺璇, 朱帅旗, 龚一富, 等. 共转 *orca3/g10h* 双基因长春花毛状根生物碱量及转录差异研究 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3272-3278.
- [32] 周伟, 李媛, 吴昕怡, 等. 滇龙胆香叶醇-10-羟化酶基因克隆、生物信息学分析和表达 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 546-549.
- [33] Group T A P. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III [J]. *Bot J Linn Soc*, 2009, 161(2): 105-121.
- [34] 王迎夏, 赵赛静, 田维圣, 等. 滇龙胆草中香叶醇 10-羟化酶基因的克隆、蛋白结构及表达分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(9): 1542-1553.
- [35] 化文平, 王喆之. 秦艽香叶醇-10 羟化酶 (*G10H*) 基因的克隆及序列分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 510-515.
- [36] 赵爽, 董婷婷, 唐红. 蜘蛛香香叶醇-10-羟化酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中药材, 2019, 42(5): 1007-1011.
- [37] 未丽, 刘建利. 植物蛋白质亚细胞定位相关研究概述 [J]. 植物科学学报, 2021, 39(1): 93-101.

[责任编辑 时圣明]