

• 药材与资源 •

鸡血藤无色花色素还原酶基因 *SsLAR2* 克隆及功能分析

熊 峥, 林 泉, 李 莹, 柯 芳, 乔 柱, 余丽莹*, 秦双双*

广西壮族自治区药用植物园, 国家中医药传承创新中心, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室/广西中药资源普查与整理研究重点实验室, 广西 南宁 530023

摘要: 目的 克隆鸡血藤(密花豆 *Spatholobus suberectus* 的干燥藤茎)无色花色素还原酶基因 *SsLAR2*, 开展生物信息学及基因功能研究, 以期解析其在儿茶素生物合成中的作用。方法 以鸡血藤 cDNA 作为模板, 通过 RT-PCR 技术克隆 *SsLAR2*, 并对其开展系统的生物信息学分析。构建 *SsLAR2* 过表达载体, 遗传转化本氏烟草, 测定转基因植株中总黄酮含量、儿茶素含量以及儿茶素合成途径中关键酶基因的表达水平。结果 *SsLAR2* 基因全长 1 092 bp, 编码 363 个氨基酸, 相对分子质量为 40 513.75, 等电点为 5.75。 *SsLAR2* 蛋白为亲水性蛋白, 存在跨膜区域, 与木豆、毒羊豆及相思子等多种植物中的 LAR 蛋白同源性较高。 *SsLAR2* 启动子序列中包含光响应元件, 以及茉莉酸甲酯、赤霉素、水杨酸等多种植物激素的响应元件。基因功能分析表明, 过表达 *SsLAR2* 能显著提高转基因植株中总黄酮和儿茶素的含量以及儿茶素合成途径中关键酶基因的表达水平。结论 鸡血藤 *SsLAR2* 基因能够促进植物的儿茶素合成, 为深入解析鸡血藤儿茶素生物合成的调控机制, 开展相关的分子育种工作提供重要的基因资源和理论依据。

关键词: 鸡血藤; *SsLAR2*; 儿茶素; 生物信息学; 基因功能

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)14-5648-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.14.024

Cloning and functional analysis of leucoanthocyanidin reductase gene *SsLAR2* from *Spatholobi Caulis*

XIONG Zheng, LIN Quan, LI Ying, KE Fang, QIAO Zhu, YU Liying, QIN Shuangshuang

Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement/Guangxi TCM Resources General Survey and Data Collection Key Laboratory, National Center for Traditional Chinese Medicine (TCM) Inheritance and Innovation, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China

Abstract: Objective To clone the leucoanthocyanidin reductase gene *SsLAR2* from *Spatholobi Caulis* (dried rattan stem of *Spatholobus suberectus*), and conduct bioinformatics and function verification, in order to elucidate the role of *SsLAR2* gene in the biosynthesis of catechin. **Methods** *SsLAR2* was amplified from the cDNA of *Spatholobi Caulis* via RT-PCR and conducted systematic bioinformatics analysis. The *SsLAR2* overexpression vector was constructed and genetically transformed into *Nicotiana benthamiana*. The total flavonoid content, catechin content, and the expression levels of key enzyme genes in the catechin synthesis pathway were determined in the transgenic plants. **Results** The full length of *SsLAR2* gene was 1 092 bp in length, encoding 363 amino acids. The molecular weight of *SsLAR2* protein was 40 513.75, and the isoelectric point was 5.75. The *SsLAR2* protein was a hydrophilic protein with a transmembrane region, showing high homology with LAR proteins from various plants such as *Cajanus cajan*, *Gastrolobium bilobum* and *Abrus precatorius*. The promoter sequence of *SsLAR2* contained photoresponsive elements, as well as responsive elements for multiple plant hormones such as methyl jasmonate, gibberellin, and salicylic acid. Gene functional analysis revealed that overexpression of *SsLAR2* significantly increased the total flavonoid and catechin contents, as well as the expression levels of key enzyme genes in the catechin biosynthetic pathway in the transgenic plants. **Conclusion** Heterologous expression of *SsLAR2* can promote catechin biosynthesis in plants. This gene provides important genetic materials and a theoretical basis for in-depth dissection of the regulatory mechanisms underlying catechin biosynthesis and targeted molecular breeding of *Spatholobi Caulis*.

Key words: *Spatholobus suberectus* Dunn; *SsLAR2*; catechin; bioinformatics; gene function

收稿日期: 2026-2-20

基金项目: 国家重点研发计划(2024YFC3506703); 广西自然科学基金项目(2025GXNSFAA069354, 2020GXNSFBA159006); 广西中医药适宜技术开发与推广项目(GZSY2025005)

作者简介: 熊 峥(1988—), 硕士, 研究实习生, 研究方向为中药资源。E-mail: 369606419@qq.com

*通信作者: 秦双双(1986—), 博士, 研究员, 研究方向为中药资源。E-mail: qin_double@126.com

余丽莹(1974—), 硕士, 研究员, 研究方向为中药资源。E-mail: yuliyiing@vip.sina.com

鸡血藤的基原为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎, 为传统中药材, 是广西“桂十味”道地药材之一。鸡血藤具有活血补血、养血调经、通经活络的功效, 在花红片、金鸡胶囊、鸡血藤片等中成药中主要用于治疗月经不调、血虚、痛经、经闭、腰膝酸痛等症^[1]。在中医临床中, 鸡血藤还常用于肝癌、骨癌、胃癌等多种癌症伴随的贫血及血小板减少症的治疗。现代药理学研究表明鸡血藤的主要活性成分为黄酮类化合物, 其中儿茶素具有促进造血等功能并被推荐为鸡血藤质量标志物^[2-5]。

儿茶素在鸡血藤中的生物合成途径分为 3 个阶段。第 1 阶段^[6-8]: 苯丙氨酸 (phenylalanine) 通过苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 作用形成肉桂酸 (cinnamic acid), 再经过肉桂酸 4-羟化酶 (cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H) 催化形成 4-香豆酸 (4-coumaric acid), 接着由 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4-coumarate CoA ligase, 4CL) 催化生成香豆酰辅酶 A (*p*-coumaroyl CoA, 香豆酰-CoA)。第 2 阶段^[6, 9-10]: 香豆酰-CoA 在查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 作用下生成柚皮素查耳酮 (naringenin chalcone), 再经过查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 催化形成成为黄酮类化合物的关键前体槲皮素 (naringenin), 随后经黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H) 作用生成二氢山柰酚 (dihydrokaempferol), 接着在黄烷酮 3'-羟化酶 (flavanone 3'-hydroxylase, F3'H) 催化作用下生成二氢槲皮素 (dihydroquercetin)。第 3 阶段^[10-12]: 二氢槲皮素通过二氢黄烷醇 4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 催化生成无色花青素, 最后无色花色素还原酶 (leucoanthocyanidin reductase, LAR) 作用下生成儿茶素。

LAR 是植物儿茶素生物合成途径中的关键酶之一^[13]。目前, 已在茶 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze^[14-15]、苹果 *Malus halliana* Koehne^[16]、猕猴桃 *Actinidia arguta* (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq.^[17]以及荔枝 *Litchi chinensis* Sonn.^[18]等多种植物中克隆了 LAR 基因并开展了相应的功能研究。然而, 鸡血藤中 LAR 基因的功能尚未见报道。课题组前期通过对鸡血藤进行了不同器官转录组分析及儿茶素合成途径解析, 挖掘出 3 个 LAR 基因, 其中 *SsLAR2* 在鸡血藤药用部位茎中表达量较高^[19]。为了进一步探究 *SsLAR2* 在鸡血藤儿茶素生物合成中

的功能, 本研究基于已获得的鸡血藤基因组^[20]与全长转录组^[21]数据, 成功克隆了鸡血藤 *SsLAR2*, 并对其进行了生物信息学分析与遗传转化实验, 以明确其在儿茶素生物合成中的作用, 为鸡血藤的品种改良及分子育种提供参考依据。

1 材料与试剂

1.1 药材

鸡血藤药材栽培于广西药用植物园 (22°51'25"N, 108°21'58"E) 科研基地, 经广西药用植物园余丽莹研究员鉴定为密花豆 *S. suberectus* Dunn 的干燥藤茎。采集鸡血藤的嫩茎, 经液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱, 以备提取总 RNA。

1.2 仪器

Nano Drop one 仪器 (美国 Thermo Fisher 公司); A48141 基因扩增仪 (美国 Eppendorf 公司); ZF-5 凝胶成像分析系统 (美国 Thermo Fisher 公司); PowerPac™ 通用电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 440~485 nm 蓝光切胶仪 (上海生工有限公司); Acquity® UPLC I-Class 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); QTRAP® 6500 型三重四极杆质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); Thermo Sorvall ST16R 型离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); Varioskan LUX 多功能微孔板酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Quant Studio3 型定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 注射过滤器 (美国 PALL 公司)。

1.3 试剂

RNA 提取试剂盒 (货号 RC411, 中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 反转录试剂盒 (货号 SR511, 北京金沙生物科技有限公司); 超快速克隆试剂盒 (货号 C601, 中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 定量 PCR 检测试剂盒 (货号 027E2232EA, 中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司); DNA 胶回收试剂盒 (货号 DC301-01, 中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司); GV3101 农杆菌感受态 (货号 AC1003M, 上海唯地生物技术有限公司); 植物黄酮试剂盒 (货号 M0118A, 苏州梦犀生物医药科技有限公司); 儿茶素 (货号 SC8160, 质量分数 ≥ 98%, 北京索莱宝科技有限公司)。

2 方法

2.1 引物设计

利用在线网站 (<https://primer3.ut.ee>) Primer 3.0 设计引物, 引物合成服务由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供, 所有引物序列见表 1。

表 1 引物序列及其用途
Table 1 Primers used in this study and their purposes

引物名称	引物序列 (5'-3')	用途
<i>SsLAR2</i> -F	ATGACGGTGTCTGGCTGCCATTTCCT	基因克隆
<i>SsLAR2</i> -R	GCCCATAGCTGTTATTGGCACTG	
<i>SsLAR2</i> -F'	aagagacaggatccgaattcATGACGGTGTCTGGCTGCCAT	
<i>SsLAR2</i> -R'	acctccgaccggtgcactagtGCCCATAGCTGTTATTGGCAC	载体构建
35S-F	GACGCACAATCCCACTATCC	阳性鉴定
<i>Y-SsLAR2</i> -R	TCTCCTTCAGAACTCCTCCGTCAG	
<i>Q-SsLAR2</i> -F	ACTCTACCTTCTTGCTCCTCAG	表达量分析
<i>Q-SsLAR2</i> -R	CATCACTTGTTTCGCTCCTAC	
<i>NbPAL</i> -F	GACCTAATGGTGAGACCCTGAA	
<i>NbPAL</i> -R	AGAAAAGAGCGCGAGAATGTT	
<i>NbC4H</i> -F	CACTGGAAGAAACCCGAAGA	
<i>NbC4H</i> -R	CAACGCCAAACGGAAGATAT	
<i>Nb4CL</i> -F	ACTGGCGACATTGGGTTCA	
<i>Nb4CL</i> -R	ACTTCTCCGGCTTGCTCATC	
<i>NbCHS</i> -F	CTAGTGGAGTGGACATGCCC	
<i>NbCHS</i> -R	CCTTAGCCAGTCGGAACA	
<i>NbCHI</i> -F	CTGTCTTCTCTCGCCGCTAAATG	
<i>NbCHI</i> -R	GCCACCTTCTCTGAGTATTGCTTAC	
<i>NbF3H</i> -F	GCCAGACAAACCAGAAGGATG	
<i>NbF3H</i> -R	TCAGGCTGTGGACACTTTGG	
<i>NbDFR</i> -F	ATGTGGCAAAGATGGTCCG	
<i>NbDFR</i> -R	AAGGGAAGCAACTGTTTCTGTC	
<i>NbLAR</i> -F	GGAGAAAAGGAAAGTGAGAAGGTTG	
<i>NbLAR</i> -R	AGAGGAGGAGGAAGTTGAGAAGG	
<i>NbEF1α</i> -F	AGAGGCCCTCAGACAAAC	内参基因
<i>NbEF1α</i> -R	TAGGTCCAAAGGTCACAA	

小写字体为侧翼重组序列。
Lowercase letters indicate flanking recombination sequences.

2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 RNA 提取试剂盒提取鸡血藤总 RNA，利用 1%琼脂糖凝胶电泳观察 RNA 的质量，使用 Nano Drop one 超微量分光光度计检测 RNA 的浓度及纯度，利用反转录试剂盒将 RNA 反转录，合成 cDNA，保存于-20 ℃冰箱备用。

2.3 *SsLAR2* 基因克隆

通过 RT-PCR 技术克隆鸡血藤 *SsLAR2* 基因全长。使用基因特异性引物(表 1)，以反转录的 cDNA 为模板进行扩增。反应体系为：2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 25 μL，*SsLAR2*-F 1.5 μL，*SsLAR2*-R 1.5 μL，cDNA 2 μL，补充 ddH₂O 至 50 μL 总体积。反应程序：95 ℃预变性 3 min；35 个循环(95 ℃、15 s，55 ℃、15 s，72 ℃、1.5 min)；最后 72 ℃终延伸 5 min。反应完成后，使用 DNA 凝

胶试剂盒将 PCR 产物切胶回收。将回收产物与 5×TA/Blunt-Zero Cloning Mix 载体进行连接，接着转化至大肠杆菌 DH5α 中。通过 PCR 鉴定阳性菌落后，将样本送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。再使用 DNAMAN 软件比对序列，获取正确的 *SsLAR2* 基因序列。

2.4 *SsLAR2* 基因生物信息学分析

使用 DNAMAN 软件对 *SsLAR2* 基因进行序列分析。利用 Expasy 软件(<http://www.expasy.org/resources/compute-pi-mw>)分析 *SsLAR2* 蛋白的基本理化性质。在 NCBI Conserved Domain Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)完成保守结构域的预测。利用 MEGA 11.0 软件进行系统进化树分析，参数采用最大似然法(maximum likelihood, ML)，bootstrap 统计检验，

次数设置为 1 000。构建系统进化树涉及的物种及 NCBI 序列 ID 为木豆 *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (XP020233704.1)、相思子 *Abrus precatorius* L. (XP027361820.1)、毒羊豆 *Gastrolobium bilobum* R.Br. (XP061339266.1)、蔓花生 *Arachis duranensis* Krapov. & W. C. Greg. (XP052118230.1)、百脉根 *Lotus corniculatus* L. (ABC71324.1)、无忧花 *Saraca asoca* (Roxb.) W. J. de Wilde (XBR96858.1)、大豆 *Glycine max* (L.) Merr. (NP001352050.1)、鹰嘴豆 *Cicer arietinum* L. (XP004496202.1)、驴食豆 *Onobrychis viciifolia* Scop. (AEE98379.1)、欧洲桤木 *Alnus glutinosa* Medik. (XP062159208.1)、蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn. (XP003591830.1)、赤豆 *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi (KAG2401844.1)、木薯 *Manihot esculenta* Crantz (XP021633997.1)、杨梅 *Morella rubra* Lour. (AIX02997.1)、阿月浑子 *Pistacia vera* L. (XP031266518.1)、啤酒花 *Humulus lupulus* L. (XP062111204.1)、蓖麻 *Ricinus communis* L. (XP002524404.2)、枣 *Ziziphus jujuba* Mill. (XP048319249.1)、密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn (TKY69407.1) 和豆科植物 *Neltuma alba* (Griseb.) C. E. Hughes & G. P. Lewis (XP028776364.1)。通过 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 工具预测蛋白质的二级结构。利用 Protenix Server (<https://protenix-server.com/model/prediction/add>) 进行蛋白质三级结构的预测。采用 NetPhos3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 来预测 SsLAR2 蛋白的磷酸化位点。从鸡血藤基因组序列中提取 SsLAR2 基因上游 2 000 bp 的区域作为启动子序列, 利用 PlantCARE 在线网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子区域中的顺式作用元件。

2.5 SsLAR2 过表达载体构建

提取“2.3”项获得的阳性菌株质粒, 以该质粒为模板进行扩增, 引物、反应体系及程序见“2.3”项。将 PCR 产物切胶回收, 获得具有载体同源臂的 SsLAR2。使用限制性内切酶 Eco RI 和 Spe I 对载体 pC131-YFP 进行双酶切^[22], 载体酶切产物纯化后, 然后使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒, 将 SsLAR2 扩增产物和酶切载体产物进行重组, 将重组产物转化至大肠杆菌感受态细胞, 进行菌斑

PCR 鉴定后测序。

2.6 农杆菌转化

从测序正确的大肠杆菌菌液中提取重组质粒。取 1 μ L 质粒加入 50 μ L 农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰水浴 10 min, 液氮速冻 5 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 冰水浴 5 min。加入 500 μ L 不含抗生素的 LB 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 2 h 进行菌体复苏。取 100 μ L 菌液均匀涂布于含 50 mg/L 利福平的 LB 固体平板上, 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 72 h。挑取单菌落接种于含抗生素的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养用于后续实验。

2.7 遗传转化本氏烟草

采用叶盘法^[21]将目的基因转化至本氏烟草, 再生芽在含有 20 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 培养基上筛选培养, 获得健康抗性芽。通过 PCR (引物见表 1) 筛选阳性植株 (T0)。待阳性植株长大且根系发育充分后, 移栽至温室大棚进行常规培养。收获 T1 代种子后, 先经含 20 mg/L 潮霉素的 1/2 MS 培养基筛选, 再通过 PCR 确定阳性植株。选取长势良好的阳性植株移栽至盆中种植, 分别收集生长约 8 周的转基因和野生型 (WT) 本氏烟草植株茎部样品, 每个样品设 3 个生物学重复, 液氮速冻后于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于总黄酮与儿茶素含量测定及基因表达差异分析。

2.8 总黄酮与儿茶素的测定

2.8.1 总黄酮的测定 将样品烘干至恒定质量, 粉碎后过 40 目筛, 按植物黄酮试剂盒操作方法进行提取, 在多功能微孔板酶标仪上进行总黄酮检测^[21]。

2.8.2 儿茶素的测定 通过超高效液相色谱串联三重四极杆质谱 (UPLC-QQQ-MS/MS) 对儿茶素进行测定^[23]。

(1) 供试品溶液的制备: 准确称取 0.02 g 样品, 用 1.5 mL 70%乙醇在 50 $^{\circ}$ C 提取 2 h, 12 000 r/min 室温下离心 10 min。冷却上清液, 加入纯甲醇至 1.5 mL, 离心。上清液通过 0.22 μ m 注射过滤器滤过。

(2) 对照品溶液的制备: 称取儿茶素对照品, 加甲醇溶解配制质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液。

(3) 色谱条件: 提取液采用 Acquity[®]UPLC I-Class 系统进行洗脱。色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的超纯水, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈。柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样量为 1.0 μ L, 体积流量为 0.6 mL/min。梯度洗脱程序如下: 0~1.0 min, 95%

A; 1.0~3.5 min, 95%~70% A; 3.5~5.5 min, 70%~40% A。采用 QTRAP®6500 系统在多重反应监测 (MRM) 模式下进行电喷雾离子化源 (ESI, 负离子) QQQ-MS/MS 检测。最佳质谱操作设置为离子喷雾电压 4 500 V, 雾化气体为氮气, 气帘气 206.8 kPa, 雾化温度 550 °C。质谱参数前体离子对质量电荷比 (m/z) 为 288.9/202.9, 去簇电压 (DP) 为 -80 V, 碰撞能量 (CE) 为 -27 V, 细胞出口电位 (CXP) 为 -10 V。

(4) 标准曲线的绘制: 称取儿茶素对照品溶液, 加甲醇溶解配制质量浓度为 1、5、10、50、100、500、1 000 和 5 000 ng/mL 的对照品溶液, 分别进样, 以峰面积为横坐标 (X), 质量浓度为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线方程, 得到儿茶素标准曲线 ($Y=556X+5\,410$, $r=1.000\,0$), 根据标准曲线计算儿茶素质量浓度。

2.9 RT-qPCR 分析

利用超快速克隆试剂盒分别提取野生型与 *SsLAR2* 转基因烟草植株总 RNA, 并采用逆转录试剂盒将其反转录为 cDNA。以该 cDNA 为模板, 采用 qPCR SYBR Green 预混液, 按 20 μ L 反应体系进行 RT-qPCR 检测, 所用引物序列见表 1。以 *NbEF1 α* 作为内参引物, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 WT 和转基因本氏烟草中 *SsLAR2*、*NbPAL*、*NbC4H*、*Nb4CL*、*NbCHS*、*NbCHI*、*NbF3H*、*NbDFR*、*NbLAR* 基因的相对表达量。

2.10 统计分析

采用 Microsoft Excel 2019 进行数据整理作图, 数据结果采用 SPSS 19.0 软件中单因素方差分析 (Oneway ANOVA), 差异显著时进行 Tukey 多重比较, 差异显著水平为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。

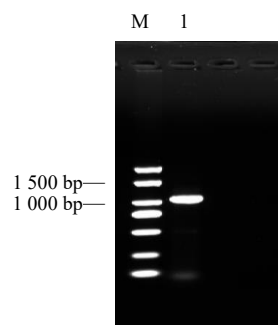
3 结果与分析

3.1 *SsLAR2* 基因克隆和序列分析

经 PCR 扩增和凝胶电泳检测观察, 获得的基因片段符合目的基因的预期大小 (图 1)。胶回收后进行测序, 结果利用 DNAMAN 软件比对后, 认为与目的基因的编码序列一致。对 *SsLAR2* 进行测序并确定长度为 1 092 bp, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAG。核苷酸含量分别为 A (28.57%, 312)、T (27.20%, 297)、G (23.90%, 261) 和 C (20.33%, 222)。

3.2 *SsLAR2* 蛋白理化性质

SsLAR2 的长度为 363 个氨基酸 (aa), 相对分子质量为 40 513.75, 等电点为 5.75。采用 ProtScale 分析 *SsLAR2* 的亲水性和疏水性, 其总平均亲疏水



M-Marker; 1-目的基因条带。

M-Marker; 1-target gene band.

图 1 *SsLAR2* 基因扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of amplified products of *SsLAR2* gene

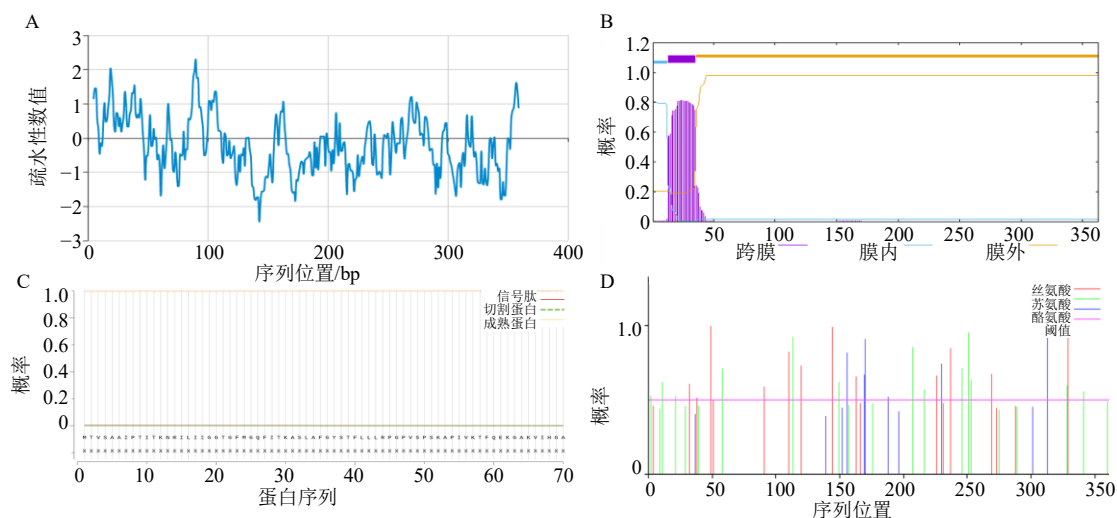
性 (GRAVY) 为 -0.183 (图 2-A), 推测其是一种亲水性蛋白质。用 TMpred 软件预测该蛋白的跨膜区域, 发现该氨基酸存在跨膜区域 (图 2-B)。跨膜序列起始位置为 13, 终止位置为 35, 序列为 NRILIGGTGFMGQFITKASLAF。采用 SignalP 5.0 软件预测该蛋白质的信号肽, 所编码蛋白质信号肽概率为 0.213%, 表明其不含信号肽, 推测其为非分泌蛋白 (图 2-C)。用 NetPhos3.1 预测了 *SsLAR2* 中的磷酸化位点, 发现该蛋白质含有 18 个丝氨酸磷酸化位点, 21 个苏氨酸磷酸化位点和 11 个酪氨酸磷酸化位点 (图 2-D)。

3.3 预测 *SsLAR2* 蛋白的二级和三级结构

采用 SOPMA 和 Phyre2 分别对 *SsLAR2* 蛋白的二级结构和三级结构进行预测。二级结构预测结果显示 (图 3-A), 该蛋白以无规则卷曲为主 (占 43.53%, 158 个 aa), 其次为 α 螺旋 (占 42.42%, 154 个 aa) 和延伸链 (占 14.05%, 51 个 aa)。*SsLAR2* 蛋白的三级结构主要由无规则卷曲、 α 螺旋和延伸链组成 (图 3-B), 与二级结构预测分析一致。

3.4 *SsLAR2* 蛋白的系统发育分析

将鸡血藤 *SsLAR2* 编码的氨基酸序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对后, 选择氨基酸序列同源性超过 50% 的 20 个物种 LAR 蛋白的氨基酸序列进行深入分析, 发现其与豆科木豆 (*CcLAR* 基因)、相思子 (*ApLAR* 基因) 和毒羊豆 (*GbLAR* 基因) 的编码氨基酸的同源性较高 (>75%)。相比之下, 与鼠李科的枣 (*ZjLAR* 基因)、大戟科的蓖麻 (*RcLAR* 基因) 和大麻科的啤酒花 (*HILAR* 基因) 等植物的编码氨基酸的同源性较低 (<70%) (图 4)。进一步



A-疏水性分析; B-跨膜结构域预测; C-信号肽预测; D-磷酸化位点预测。

A-hydrophobicity analysis; B-transmembrane structural domain prediction; C-signal peptide prediction; D-phosphorylation site prediction.

图 2 SsLAR2 蛋白结构分析

Fig. 2 Structural analysis of SsLAR2 protein

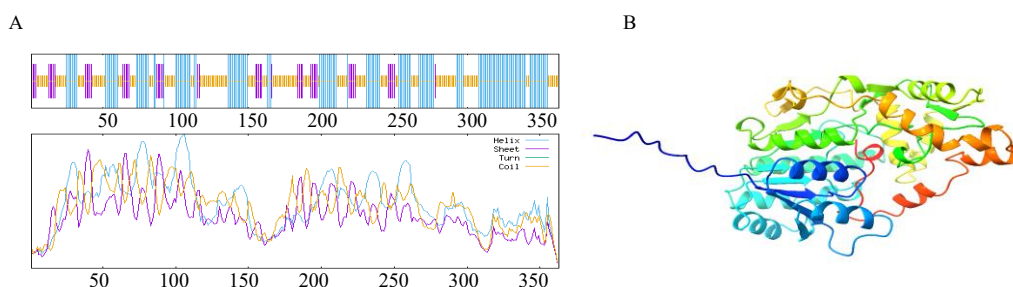


图 3 SsLAR2 蛋白二级结构 (A) 和三级结构 (B) 预测

Fig. 3 Prediction of secondary (A) and tertiary structures (B) of SsLAR2 protein

通过 ML 法构建系统发育树, 结果表明, 鸡血藤 SsLAR2 与木豆 (*CcLAR* 基因) 形成同一支, 与相思子 (*ApLAR* 基因)、毒羊豆 (*GblAR* 基因) 与百脉根 (*LcLAR* 基因) 在系统发育树中处于较近的分支 (图 5), 这表明了 SsLAR2 与这些物种之间较近的亲缘关系。

3.5 SsLAR2 基因启动子的序列分析

使用在线工具 PlantCARE 对 SsLAR2 上游 2 000 bp 的启动子序列进行了顺式作用元件分析。结果显示, 启动子序列不仅包含核心元件 (CAAT-box 和 TATA-box), 还包含 10 个光响应元件 (GT1-motif、MRE、GA-motif、Box 4 和 ATC-motif)。此外, 还包含 7 个与激素响应相关的顺式作用元件, 如茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 响应元件 (TGACG-motif 和 CGTCA-motif)、赤霉素 (gibberellic acid, GA) 响应元件 (P-box) 以及水杨酸 (salicylic acid, SA) 响应元件 (TCA-element)。此外, 还预测到植物生长发

育相关元件 (AT-rich element、circadian 和 O2-site) 与胁迫响应元件 (ARE) 等 (图 6)。

3.6 SsLAR2 调控儿茶素合成的功能研究

为了进一步验证 SsLAR2 对儿茶素生物合成的调控作用, 本研究构建了 pC131-SsLAR2 过表达载体, 并通过农杆菌介导法转化至本氏烟草。经 PCR 鉴定, 共获得 5 株阳性转基因株系, 分别命名为 OE4、OE8、OE9、OE11 和 OE14 (图 7-A)。RT-qPCR 检测结果显示, 这些株系中 SsLAR2 的表达量分别为 WT 的 15.27~690.61 倍 (图 7-B), 从中选取表达量较高的 3 个株系 (OE8、OE9 和 OE14) 进行后续分析。经观察, SsLAR2 过表达并未引起转基因植株明显的表型变化 (图 7-C)。然而, 过表达 SsLAR2 能显著提高转基因植株中总黄酮和儿茶素的含量。与 WT 相比, 过表达株系 OE8、OE9 和 OE14 植株总黄酮的含量分别提高了 213.62%、167.79% 和 115.78% (图 7-D), 儿茶素含量分别提

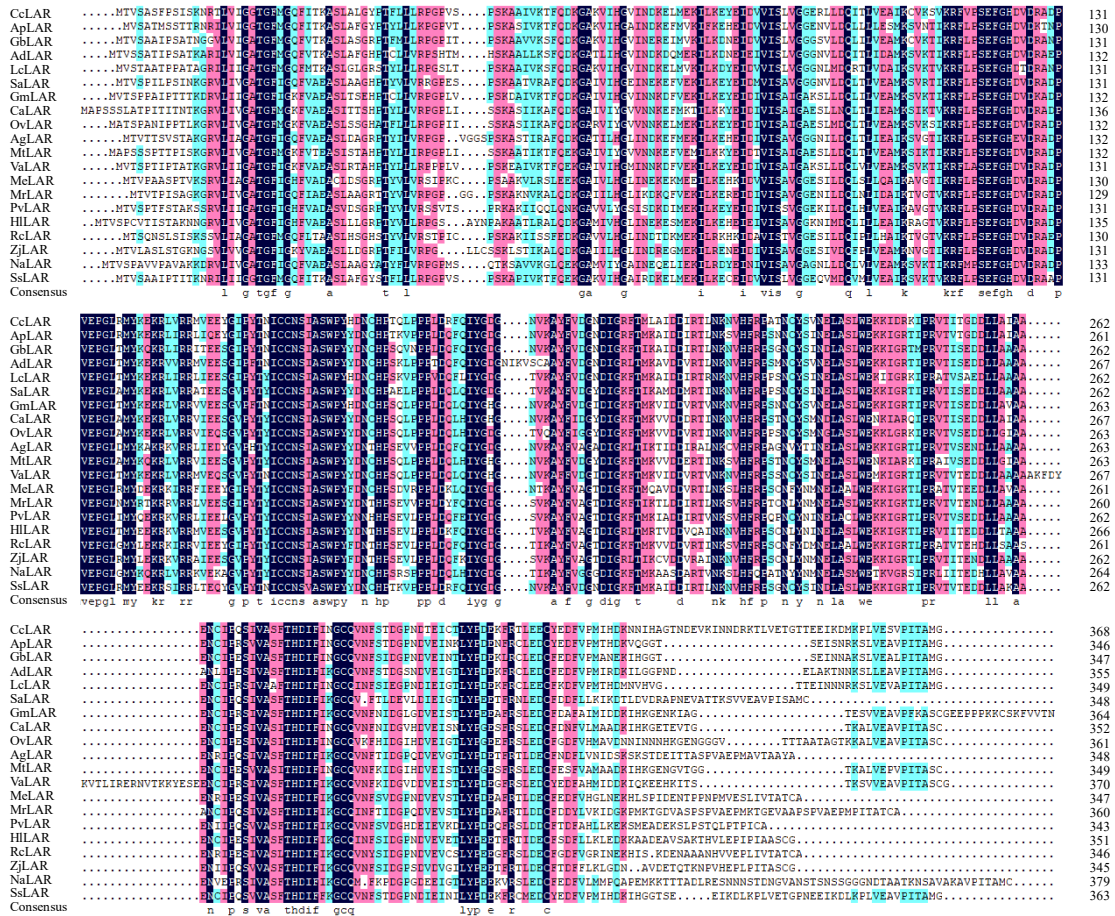


图4 *SsLAR2* 与其他物种 LAR 蛋白的序列比对

Fig. 4 Sequence alignment between *SsLAR2* and LAR proteins from other species

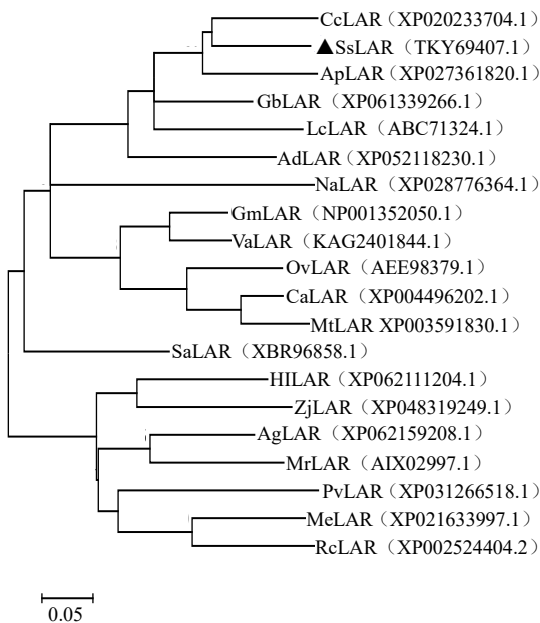


图 5 *SsLAR2* 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *SsLAR2*

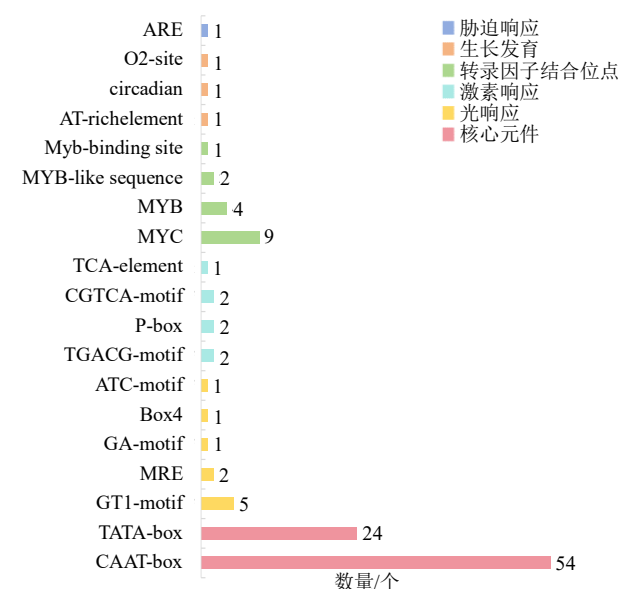
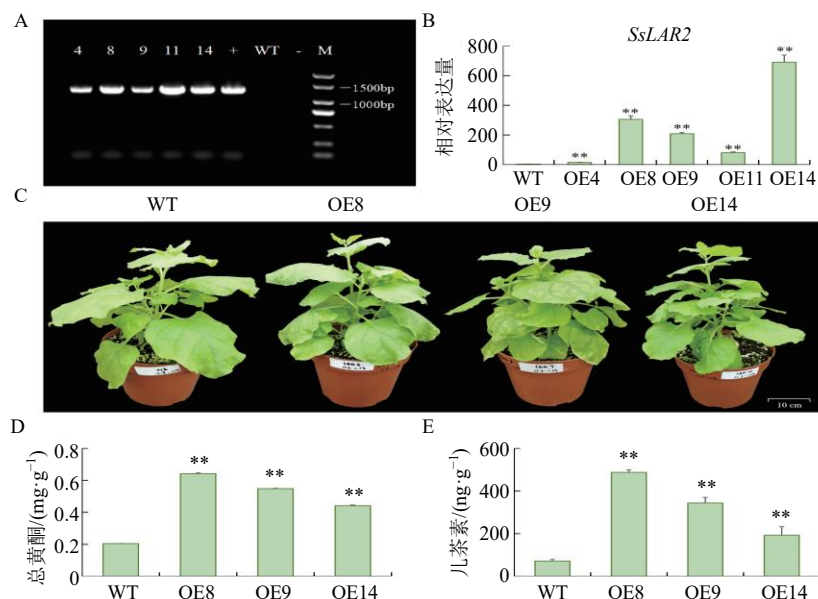


图 6 *SsLAR2* 启动子序列中的顺式作用元件分析

Fig. 6 Analysis of cis-acting elements of *SsLAR2* promoter sequence



A-过表达植株的 PCR 验证, 4、8、9、11、14 表示过表达株系, “+”表示阳性对照, WT 表示野生型, “-”表示阴性对照; B-荧光定量 PCR 测定; C-野生型及转基因植株形态; D-野生型及转基因株系总黄酮与儿茶素含量, 与 WT 比较: ** $P < 0.01$, 下同。A-PCR identification of overexpression plants, 4, 8, 9, 11, 14-overexpression lines, “+”-positive control, WT-wild type, “-”-negative control; B-RT-qPCR determination; C-morphology of wild type and transgenic plants; D-total flavonoid and catechin content of wild type and transgenic lines, ** $P < 0.01$ vs WT, same as below.

图 7 *SsLAR2* 过表达 (OE) 促进本氏烟草中黄酮含量

Fig. 7 *SsLAR2* overexpression (OE) promotes flavonoid content in *Nicotiana benthamiana*

高了 583.19%、382.13%和 170.20% (图 7-E)。

3.7 儿茶素生物合成途径关键酶基因表达分析

选取儿茶素生物合成途径上 8 个关键酶基因进行 RT-qPCR 分析, 如图 8 所示, 与 WT 相比, *NbCHS*、*NbCHI*、*NbF3H* 和 *NbLAR* 基因表达量均显著增加, 且以 *NbLAR* 的增加倍数最高。基因表达水平的具体倍数变化为 *NbCHS*: 4.19 倍 (OE8)、2.44 倍

(OE9)、5.13 倍 (OE14); *NbCHI*: 3.71 倍 (OE8)、3.71 倍 (OE9)、6.49 倍 (OE14); *NbF3H*: 4.56 倍 (OE8)、2.20 倍 (OE9)、5.67 倍 (OE14); *NbLAR*: 25.24 倍 (OE8)、20.31 倍 (OE9)、20.42 倍 (OE14)。此外, OE8 株系中的 *NbPAL* 和 *NbDFR*, OE9 株系中的 *NbC4H*, 以及在 3 个转基因株系中的 *Nb4CL*, 其表达水平与 WT 相比均无显著差异。

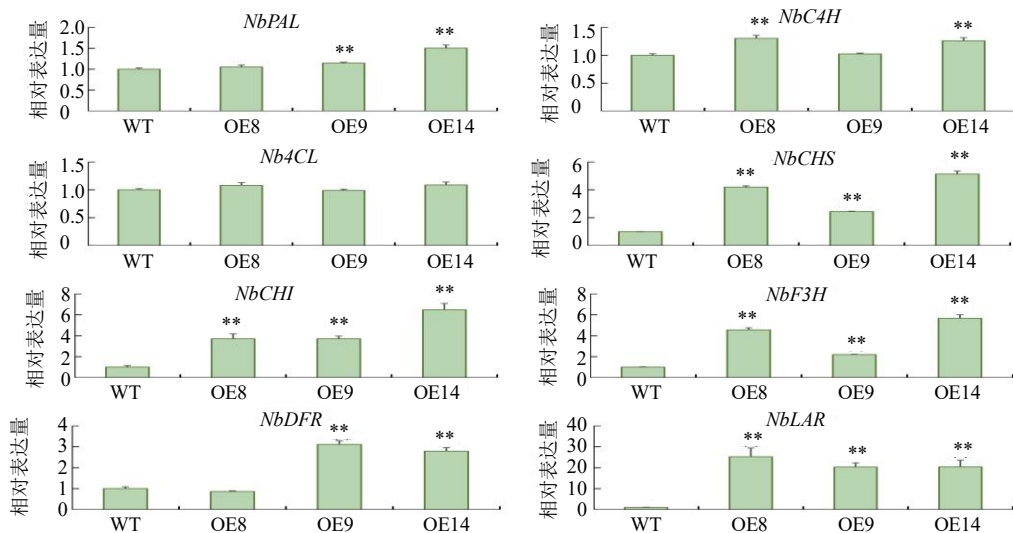


图 8 儿茶素生物合成途径关键酶基因表达分析

Fig. 8 Analysis of gene expression of key enzymes in catechin biosynthesis pathway

4 讨论

LAR 基因广泛存在于植物界中,最早成功克隆自豆科植物银叶山蚂蝗 *Desmodium uncinatum* L. 的叶片^[24],而模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 则缺失该基因^[25]。植物中 *LAR* 酶属于短链脱氢酶/还原酶超家族和 PIP 家族,其能还原醌类中间体,促进黄酮类化合物的形成与积累^[26]。生物信息学的分析结果显示, *SsLAR2* 蛋白中苏氨酸磷酸化位点占比最大,推测该蛋白质的磷酸化修饰主要以苏氨酸磷酸化为主,以丝氨酸和酪氨酸磷酸化为辅。蛋白质磷酸化修饰在植物发育和适应环境的信号转导中起着至关重要的作用,通过精确磷酸化信号级联中的关键成分,植物可以打开或关闭生长或防御所需的特定信号通路^[27]。关键酶的活性能够调控生物合成酚类化合物,细胞信号的转导受非生物胁迫而激活,使多种苯丙烷类途径中的关键酶转录水平表达量升高^[28]。系统进化树分析进一步揭示鸡血藤 *SsLAR2* 蛋白与豆科的木豆、相思子和毒羊豆的 *LAR* 聚类在一个分支上,而与鼠李科的枣、大戟科的蓖麻和大麻科的啤酒花等植物的 *LAR* 基因编码氨基酸的同源性较低。说明同科植物基因在进化中相对保守,而不同科属植物间的基因及氨基酸差异较大,这种差异符合植物分类学的特征。

SsLAR2 启动子中含有 MeJA 响应元件、GA 响应元件、SA 响应元件、厌氧胁迫响应元件以及多种光响应元件,表明该基因在鸡血藤中可能受激素信号和环境的调控。MeJA 是一种参与植物防御和发育的生长调节剂, Duan 等^[29]研究发现 MeJA 与紫外线 B (Ultraviolet B, UV-B) 照射协同能显著增加苹果花色素苷的积累。SA 能调节植物次生代谢物合成,增强对生物和非生物胁迫的耐受性。Karapinar 等^[30]通过外施 SA 溶液处理葡萄叶片,发现其叶片的总酚和黄酮含量均显著增加。此外, Cheng 等^[31]的研究表明,光照强度通过调控葡萄 *Vitis vinifera* 愈伤组织中 *LAR* 基因表达水平,影响黄酮醇、花青素和黄烷-3-醇的生物合成。尽管 2 个参与反式黄烷-3-醇合成 *LAR* 基因 (*VviLAR1* 和 *VviLAR2*) 对光强变化的响应模式不同,但其表达均受光响应顺式作用元件调控,且前者的启动子顺式作用元件对光强变化较后者更为敏感。根据以上研究,推测 *SsLAR2* 启动子区域的顺式作用元件可能通过调节该基因的表达效率与强度在儿茶素生物合成中发挥重要作用。

LAR 能催化无色花青素转化为儿茶素,其表达量的高低与儿茶素的含量直接相关^[32]。研究发现苹果中 *LAR* 的表达与儿茶素及原花青素 (proanthocyanidins, PA) 积累有关^[33],后者是以儿茶素类化合物为起始单体缩合形成的聚合物^[24]。Wang 等^[14]发现茶中 *CsLAR* 能催化儿茶素单体的生成,并抑制其聚合; *CsMYB5b* 转基因烟草通过上调 *NtLAR* 和 *NtANR* 的表达,增加儿茶素单体和聚合物的积累。张芷苓等^[15]发现,在“英红 9 号”茶的愈伤组织中过表达 *CsLAR* 能显著促进儿茶素类化合物的积累。这些研究表明 *LAR* 基因在儿茶素生物合成中发挥着重要作用。此外, *LAR* 基因具有很强的组织和时空表达的特异性。如周平等^[34]发现中国水仙 *Narcissus tazetta* var. *chinensis* 中 *NtLAR* 基因在花瓣和副冠中的瞬时表达量要低于鳞茎盘;李军等^[35]研究发现血人参 *Indigofera stachyodes* 中 *IsLAR1* 在根部具有较高的表达量。本研究选择在鸡血藤药用部位茎中具有较高表达量的 *SsLAR2*,通过在模式植物本氏烟草中进行过表达,发现 *SsLAR2* 能够激活本氏烟草内源的儿茶素生物合成途径,并引起途径中多个上游关键酶基因的表达同步上调,促进总黄酮及儿茶素的积累。这为利用代谢工程策略在非原生植物体系中定向生产高价值黄酮类产物提供了重要的基因资源和理论依据。

综上,本研究克隆了鸡血藤 *SsLAR2* 基因,并开展了系统的生物信息学分析,构建了过表达载体 pC131-*SsLAR2*,通过遗传转化本氏烟草,发现过表达 *SsLAR2* 能够显著提高本氏烟草总黄酮与儿茶素含量,并上调儿茶素生物合成途径中多个关键酶基因 (*NbPAL*、*NbC4H*、*NbCHS*、*NbCHI*、*NbF3H*、*NbDFR*、*NbLAR*) 的表达水平。这些结果表明, *SsLAR2* 在儿茶素生物合成中发挥正向调控作用。

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. 2025: 209-210.
- [2] 秦双双, 朱艳霞, 韦坤华, 等. 鸡血藤的本草沿革与黄酮类成分及其药理学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2216-2223.
- [3] Zhang F, Ganesan K, Liu Q Q, et al. A review of the pharmacological potential of *Spatholobus suberectus* Dunn on cancer [J]. *Cells*, 2022, 11(18): 2885.
- [4] Zhou Z Y, Huan L Y, Zhao W R, et al. *Spatholobi Caulis* extracts promote angiogenesis in HUVECs *in vitro* and in zebrafish embryos *in vivo* via up-regulation of VEGFRs [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 200: 74-83.
- [5] 廖佳伟, 金晨, 陈志, 等. 鸡血藤化学成分、药理作用

- 研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6866-6877.
- [6] Araguirang G E, Richter A S. Activation of anthocyanin biosynthesis in high light—what is the initial signal? [J]. *New Phytol*, 2022, 236(6): 2037-2043.
- [7] Liu W X, Feng Y, Yu S H, *et al*. The flavonoid biosynthesis network in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12824.
- [8] Jiang L N, Gao Y F, Han L Q, *et al*. Designing plant flavonoids: Harnessing transcriptional regulation and enzyme variation to enhance yield and diversity [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1220062.
- [9] Khusnutdinov E, Sukhareva A, Panfilova M, *et al*. Anthocyanin biosynthesis genes as model genes for genome editing in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8752.
- [10] Qin S S, Wei K H, Cui Z H, *et al*. Comparative genomics of *Spatholobus suberectus* and insight into flavonoid biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 528108.
- [11] Yan H L, Pei X N, Zhang H, *et al*. MYB-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3103.
- [12] Jiang L Y, Yue M L, Liu Y Q, *et al*. A novel R2R3-MYB transcription factor FaMYB5 positively regulates anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in cultivated strawberries (*Fragaria × Ananassa*) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21(6): 1140-1158.
- [13] Stafford H A. Pathway to proanthocyanidins (condensed tannins), flavan-3-ols, and unsubstituted flavones [M]. Florida: CRC Press, 1990: 63-100.
- [14] Wang P Q, Zhang L J, Jiang X L, *et al*. Evolutionary and functional characterization of leucoanthocyanidin reductases from *Camellia sinensis* [J]. *Planta*, 2018, 247(1): 139-154.
- [15] 张芷苓, 张媛媛, 林晓蓉, 等. 茶儿茶素合成关键酶基因 CsANS 和 CsLAR 的功能鉴定 [J]. 园艺学报, 2024, 51(4): 804-814.
- [16] Li J L, Zhang Z X, Wang X, *et al*. Functional identification of LAR genes in apple (*Malus halliana*) demonstrates that it enhances saline-alkali stress tolerance [J]. *Plant Growth Regul*, 2024, 104(3): 1575-1588.
- [17] Sun S H, Qi X J, Zhang Z Z, *et al*. A structural variation in the promoter of the leucoanthocyanidin reductase gene AaLAR1 enhances freezing tolerance by modulating proanthocyanidin accumulation in kiwifruit (*Actinidia arguta*) [J]. *Plant Cell Environ*, 2024, 47(10): 4048-4066.
- [18] Zhong R H, Liu B, Wei J B, *et al*. Molecular and functional characterization of the key proanthocyanidin pathway enzymes anthocyanidin reductases and leucoanthocyanidin reductases in *Litchi chinensis* [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(46): 25972-25986.
- [19] 张娟娟, 刘雪梅, 李美欢, 等. 基于 WGCNA 挖掘鸡血藤儿茶素和表儿茶素合成途径关键基因 [J]. 中草药, 2025, 56(24): 9124-9134.
- [20] Qin S S, Wu L Q, Wei K H, *et al*. A draft genome for *Spatholobus suberectus* [J]. *Sci Data*, 2019, 6: 113.
- [21] Qin S S, Wei G L, Lin Q, *et al*. Analysis of the *Spatholobus suberectus* full-length transcriptome identified an R2R3-MYB transcription factor-encoding gene SsMYB158 that regulates flavonoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2024, 214: 108929.
- [22] Qin S S, Liang Y, Wei F, *et al*. The light-regulated SsMYB106 transcription factor promotes flavonoids in *Spatholobus suberectus* [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(11): 5292.
- [23] Qin S S, Liang Y, Wei G L, *et al*. Shade responses and resistant mechanisms in *Spatholobus suberectus* [J]. *Heliyon*, 2024, 10(6): e28077.
- [24] Tanner G J, Francki K T, Abrahams S, *et al*. Proanthocyanidin biosynthesis in plants purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 31647-31656.
- [25] Shirley B W, Kubasek W L, Storz G, *et al*. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis [J]. *Plant J*, 1995, 8(5): 659-671.
- [26] Maugé C, Granier T, d'Estaintot B L, *et al*. Crystal structure and catalytic mechanism of leucoanthocyanidin reductase from *Vitis vinifera* [J]. *J Mol Biol*, 2010, 397(4): 1079-1091.
- [27] Zhang W J, Zhou Y W, Zhang Y, *et al*. Protein phosphorylation: A molecular switch in plant signaling [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(7): 112729.
- [28] Sharma A, Shahzad B, Rehman A, *et al*. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress [J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2452.
- [29] Duan S C, Kim J H, Kim C K, *et al*. Role of methyl jasmonate on flavonoid pathway of UV-B-irradiated apple fruit [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(49): 27139-27149.
- [30] Karapinar L, Fereydouni R, Al-Khafaji S. Influence of salicylic acid on phytochemical constituents of halwani and kamali grapevine leaves [J]. *J Pharmacogn Phytochem*, 2025, 14(2): 605-609.
- [31] Cheng J, Yu K J, Zhang M Y, *et al*. The effect of light intensity on the expression of leucoanthocyanidin reductase in grapevine calluses and analysis of its promoter activity [J]. *Genes*, 2020, 11(10): 1156.
- [32] 贾展慧, 贾晓东, 许梦洋, 等. 薄壳山核桃原花青素合成关键酶基因的克隆与表达分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2022, 46(5): 49-57.
- [33] Liao L, Vimolmangkang S, Wei G C, *et al*. Molecular characterization of genes encoding leucoanthocyanidin reductase involved in proanthocyanidin biosynthesis in apple [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 243.
- [34] 周平, 范雨昕, 姚红, 等. 中国水仙LAR基因启动子的克隆及功能初步分析 [J]. 西北植物学报, 2019, 39(8): 1353-1360.
- [35] 李军, 王崇敏, 周涛, 等. 血人参原花青素合成关键酶基因 IsANR、IsLAR 的鉴定及分析 [J]. 分子植物育种, 2024, 22(24): 8048-8056.

[责任编辑 时圣明]