千金藤苄基异喹啉生物碱合成相关 *SjOMT31* 基因克隆与功能表征

赵红艳[1]，钟雨萱[1]，刘志香[2]，刘柏梅[3]，彭红英[3]，王　灿[2, 4*]

1. 成都中医药大学医学技术学院，四川 成都　611137
2. 成都中医药大学中医药创新研究院，四川 成都　611137
3. 成都中医药大学药学院，四川 成都　611137
4. 成都中医药大学本草基因组学研究院，四川 成都　611137

摘　要：目的　克隆千金藤中 *SjOMT31* 基因，并对其进行生物信息学分析及体外酶活表征来探讨其功能。**方法**　通过 PCR 扩增获得 *SjOMT31* 的全长序列，并利用生物信息学分析蛋白结构。构建 PET-30a-SjOMT31 原核表达载体，并将其转入 BL21（DE3）大肠杆菌中进行诱导表达。蛋白纯化后进行体外酶活反应，对其功能进行表征。**结果**　从千金藤中扩增得到 *SjOMT31* 全长序列，生信分析发现 SjOMT31 为稳定亲水性蛋白，无跨膜结构域和信号肽，属于膜外蛋白。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）结果分析显示，利用原核表达系统成功诱导获得可溶性 SjOMT31 蛋白，体外酶促反应检测结果表明，SjOMT31 能够催化(*S*)-去甲乌药碱 C6、(*S*)-乌药碱 C7 和(*S*)-金黄紫堇碱及四氢非洲防己碱 C2 位羟基甲基化。**结论**　成功克隆 *SjOMT31* 基因，属于膜外蛋白；同时在大肠杆菌中实现了 SjOMT31 的异源表达，体外酶功能表征发现 SjOMT31 能催化苄基异喹啉类生物碱 C6、C7 和原小檗碱 C2 位羟基发生甲基化，为其在生物碱代谢中的作用提供了重要依据。

关键词：千金藤；*O*-甲基转移酶；苄基异喹啉生物碱；原核表达；功能表征

中图分类号：R286.12　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2025)18 - 6740 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.18.023

Cloning and functional characterization of *SjOMT31* gene related to benzylisoquinoline alkaloids biosynthesis in *Stephania japonica*

ZHAO Hongyan[1], ZHONG Yuxuan[1], LIU Zhixiang[2], LIU Baimei[3], PENG Hongying[3], WANG Can[2, 4]

1. College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
3. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
4. Institute of Herbgenomics, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective　This study aims to verify the function of the *SjOMT31* gene from Qianjinteng (*Stephania japonica*) through cloning, bioinformatics analysis and *in vitro* enzymatic activity assays. **Methods**　The full-length sequence of *SjOMT31* was amplified by PCR, and its protein structure was analyzed using bioinformatics tools. A prokaryotic expression vector, pET-30a-*SjOMT31*, was constructed and inserted into *Escherichia coli* BL21 cells to induce the expression of its protein. The purified protein was subjected to *in vitro* enzymatic activity assays to characterize its function. **Results**　The full-length sequence of *SjOMT31* was successfully cloned from *S. japonica*. Bioinformatics analysis revealed that SjOMT31 is a stable hydrophilic protein without transmembrane domains or signal peptides, indicating its classification as an extracellular membrane protein. SDS-PAGE results demonstrated that the soluble SjOMT31 protein was successfully induced using a prokaryotic expression system. *In vitro* enzymatic assays showed that SjOMT31 catalyzes the methylation of hydroxyl groups at the C6 position of (*S*)-norcoclaurine, the C7 position of (*S*)-coclaurine, and the C2 position of (*S*)-scoulerine and (*S*)-tetrahydrocolumbamine. **Conclusion**　The *SjOMT31* gene was successfully cloned and identified as an extracellular membrane protein. Heterologous expression of SjOMT31 in *E. coli* was achieved, and the purified protein was characterized for its *in vitro* enzymatic assays. SjOMT31 catalyzes the

收稿日期：2025-04-03

基金项目：国家自然科学基金项目（82504957）；四川省博士后创新人才支持项目（BX202206）；四川省自然科学基金青年项目（2025ZNSFSC1807）

作者简介：赵红艳，本科生，研究方向为中药学。E-mail: 3048338413@qq.com

***通信作者：**王　灿，助理研究员，从事中药活性成分生物合成研究。E-mail: wangcan@cdutcm.edu.cn

methylation of hydroxyl groups at the C6 and C7 positions of benzylisoquinoline alkaloids and the C2 position of protoberberine alkaloids. These findings provide critical insights into the role of SjOMT31 in alkaloid metabolism.

Key words: *Stephania japonica* (Thunb.) Miers; *O*-methyltransferase; benzylisoquinoline alkaloids; prokaryotic expression; functional characterization

千金藤 *Stephania japonica* (Thunb.) Miers 作为传统中药，其根或藤茎入药，具有清热解毒、利尿消肿、祛风止痛之功效。现代药理学研究揭示了其多种活性成分及临床应用价值[1]，其中千金藤啶碱和千金藤素已获国家药监局批准上市[2-3]。千金藤素具有广谱抗冠状病毒[4]、抗肿瘤[5]、抗炎[6]、抗寄生虫[7]等多种药理活性。随着其药用价值被广泛认可，市场需求逐年攀升。然而，由于其化学结构复杂且合成途径不清晰，目前主要依赖植物提取，面临植物体内含量低、提取工艺复杂、提取率不稳定等问题，且过度依靠野生植物加剧了其濒危危险。因此，解析千金藤素的生物合成途径并鉴定关键酶基因，是突破资源瓶颈的关键。

千金藤素的生物合成起始于 *L*-酪氨酸（*L*-tyrosine）转化为多巴胺（dopamine）和 4-羟基苯乙醛（4-hydroxyphenylacetaldehyde），二者在去甲乌药碱合酶（norcoclaurine synthase，NCS）的催化下缩合生成 (*S*)-去甲乌药碱 [8-9]。之后，3 种甲基转移酶和一种细胞色素 P450 酶参与催化(*S*)-去甲乌药碱转化为(*S*)-牛心果碱，这是不同生物碱生产中的重要中间体，包括吗啡、诺斯卡平、血根碱和小檗碱[10-11]。上述关键酶基因（*NCS*、*6OMT*、*CNMT* 等）已在罂粟科、小檗科植物中成功克隆，并用于构建微生物异源表达系统以生产苄基异喹啉生物碱（benzylisoquinoline alkaloids，BIAs）类化合物[12-14]。目前，千金藤素的生物合成通路尚未被完整解析。千金藤素的化学结构表明其合成途径中存在多个甲基化反应。因此，深入挖掘并鉴定千金藤素合成相关的甲基转移酶的功能，对于解析其生物合成途径具有重要意义。

甲基化是 BIAs 生源途径中关键修饰反应，甲基基团的引入显著改变化合物的极性、分子立体构型，进而影响其药理活性[15-16]。甲基转移酶按底物的作用位点分为 *O*-甲基转移酶、*C*-甲基转移酶、*N*-甲基转移酶、*S*-甲基转移酶等。*O*-甲基转移酶通过催化羟基或羧基的甲基化反应，显著丰富了植物次生代谢产物的化学多样性[15]。在 BIAs 生物合成研究领域，学者们在 *O*-甲基转移酶的鉴定与功能表征方面已取得显著进展[17-19]。目前，已从罂粟 *Papaver somniferum*、日本黄连 *Coptis japonica* 等植物中鉴定出多种 OMTs，如 6OMT、4’OMT、3’OMT、7OMT、7’OMT、9’OMT 和 CoOMT[17,20]。这些 OMTs 主要参与苄基异喹啉类、原小檗碱类及阿朴啡类生物碱的甲基化修饰过程[9]。例如，6OMT 与 4’OMT 分别催化 BIA 核心骨架的 C6 位和 C4’羟基甲基化[21]。研究发现，部分 *O*-甲基转移酶在 BIAs 生物合成中的催化功能表现出底物的杂泛性和羟基的交叉区域选择性[22]。例如，Nn7OMT 能催化双苄基异喹啉骨架（异莲心碱）C7 位、单苄基异喹啉骨架（(*S*)-去甲乌药碱、(*S*)-乌药碱）的 C6 与 C7 位和原小檗碱骨架（(*S*)-金黄紫堇碱）的 C9 位羟基发生甲基化[23]。延胡索 *Corydalis yanhusuo O*-甲基转移酶（CyOMT1-7）对 C3′、C4′、C6、C7 或 C9 位羟基存在交叉的区域选择性[24]。此外，少数植物 OMTs 能催化 2 至 5 类不同结构类型的化合物进行甲基化[25]，如紫金牛 *Ardisia japonica* AjOMT1 可催化黄酮类、香豆素类、苯丙素类化合物、萜类、苄基异喹啉生物碱类[26]；NnOMT6 能催化单苄基异喹啉类、阿朴啡类、原小檗碱类和苯丙酸类化合物发生氧甲基化[27]。然而，千金藤氧甲基转移酶的功能基因尚未见报道。

本研究聚焦千金藤根中高表达的 *SjOMT31* 基因，系统开展该基因的生物信息学分析，并通过异源表达体系表征 SjOMT31 蛋白功能，探究其底物杂泛性和酶学性质，为千金藤素生物合成途径解析提供参考。

1 材料

1.1 菌株及载体

大肠杆菌 DH5α 感受态购自唯地生物科技有限公司，BL21（DE3）感受态购自生工生物工程有限公司，pET-30a 载体由本实验室提供。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、同源重组试剂盒、2×Phanta Flash Master Mix（Dye Plus）、DL5000 DNA marker、10×DNA Loading buffer 购自诺唯赞生物科技有限公司，2×NG PCR Master Mix 购自惠凌生物技术有限公司，SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、异丙基-β-*D*-硫代半乳糖苷（isopropyl β-*D*-thiogalactoside，IPTG）、*S*-腺苷甲硫氨酸（*S*-adenosylmethionine，SAM）购自索莱宝生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

乙腈、蛋白胨、甲醇、甲酸、10×Green Buffer、限制性内切酶（*Sal* I、*Bam*H I）购自赛默飞世尔科技公司，HyPurTNi-NTA6FF（His-Tag）预装重力柱纯化试剂盒购自生工生物工程有限公司，双色预染蛋白 Marker 购自上海雅酶生物医药科技有限公司。(*S*)-金黄紫堇碱（批号 B30190）、(*S*)-四氢非洲防己碱（批号 B21203）、(*S*)-*N*-甲基乌药碱（批号 B32832）、(*S*)-牛心果碱（批号 B52471）、蝙蝠葛新林碱（批号 B29561）、莲心碱（批号 B20730）、异莲心碱（批号 B21637）对照品购自上海源叶生物科技有限公司，(*S*)-去甲乌药碱（批号 WKQ-0350260）和(*S*)-乌药碱（批号 WKQ-0003249）对照品购自四川省维克奇生物科技有限公司，(*S*)-亚美罂粟碱（批号 PS1571-0010）、(*S*)-3′-羟基-*N*-甲基乌药碱（CAS 号 138644-99-2）、(*S*)-延胡索乙素（批号 PS08091701）、防己诺林碱（批号 PU0822-0025）、蝙蝠葛苏林碱（批号 PS3245-0020）、蝙蝠葛碱（批号 PS0771-0020）对照品购自成都普思生物科技股份有限公司，质量分数均大于 98%。

2 方法

2.1 *SjOMT31* 基因克隆与原核表达载体的构建

基于本实验室的千金藤基因组数据，采用 Snap gene 软件设计 *SjOMT31* 基因的特异性扩增引物（表 1），以千金藤 cDNA 为模板，利用 2×Phanta Flash Master Mix（Dye Plus）扩增 *SjOMT31* 基因序列。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检验扩增产物，选取符合预期大小的条带进行切胶回收，并测定 DNA 浓度后备用。接着，使用 *Sal* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶对 pET-30a 空载质粒进行双酶切，通过胶回收试剂盒获得线性化载体。通过同源重组方法将 *SjOMT31* 片段与线性化载体连接，构建重组质粒 pET30a-SjOMT31，经热激法转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。挑取单菌落进行菌液 PCR，筛选阳性克隆并送 Sanger 测序验证序列正确性。提取阳性菌液质粒，并转化 BL21（DE3）感受态细胞，涂布于卡那霉素（Kana）抗性 LB 平板，37 ℃培养 12 h 后挑取单菌落，再次通过菌液 PCR 验证重组质粒的完整性。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列（5’-3’）
SjOMT31-KF	ATGGATTCTACTGTTCTGCAGAAAC
SjOMT31-KR	TCATTTAAGAAATTCGACGACCC
30a-SjOMT31-*Bam*HIF	gccatggctgatatcggatccATGGATTCTACTGTTCTGCAGAAAC
30a-SjOMT31-*Sal*IR	tgcggccgcaagcttgtcgacTCATTTAAGAAATTCGACGACCC
pET30a-T7-F	TAATACGACTCACTATAGGG
pET30a-T7t-R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

2.2 SjOMT31 的生物信息学分析

通过 Expasy 在线网站对 SjOMT31 蛋白的理化性质进行分析；通过 SPOMSA 在线工具分析 SjOMT31 蛋白的二级结构；通过 Swiss model 在线网站上选取整体模型质量估计（global model quality estimate，GMQE）值较高的 *Fragaria ananassa O*-甲基转移酶与 *S*-腺苷同型半胱氨酸和原儿茶醛复合物的 *O*-甲基转移酶为模板进行建模；通过 SignalP-6.0 和 TMHMM-2.0 分别预测 SjOMT31 蛋白的信号肽和跨膜结构域；使用 Clustalw 进行氨基酸比对；使用 MEGA6.0 软件构建 SjOMT31 与其他 OMTs 的系统进化树，采用邻接法（neighbor-joining，NJ）模型，并进行 1 000 次 bootstrap 统计学检验，网络链接见表 2。

表 2 生物信息学分析网站链接

Table 2 Bioinformatics analysis websites

项目列表	网址
NCBI 同源基因比对分析	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
蛋白理化性质分析	https://web.expasy.org/protparam/
蛋白信号肽预测	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/
蛋白跨膜结构域预测	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
蛋白二级结构预测	https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html
蛋白三级结构预测	https://swissmodel.expasy.org/
多序列比对	https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi

2.3 SjOMT31 原核表达与蛋白纯化

挑取 pET-30a-SjOMT31-BL21 单菌落，接种于含 50 μg/mL Kana 的 5 mL LB 培养基中，37 ℃、200 r/min 条件下过夜培养。菌液以 1∶100 的比例扩大培养至 A_{600} 约为 0.6，随后加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG，在 16 ℃下继续培养 16 h 以诱导蛋白表达。通过在 4 ℃，12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，并将其重悬于 20 mL Buffer A（50 mmol/L Tris-HCl，300 mmol/L NaCl，15 mmol/L 咪唑，10%甘油，pH 8.0）中，随后用高压细胞破碎仪破碎细胞。接着，4 ℃离心 12 000 r/min 15 min，取上清液并通过 0.22 μmol/L 水系滤膜滤过，准备进行纯化。使用 HyPurTNi-NTA6FF（His-Tag）预装重力柱纯化上清样品，借助 2 mL Buffer B（50 mmol/L Tris-HCl，300 mmol/L NaCl，500 mmol/L 咪唑，10%甘油，pH 8.0）洗脱柱上的组氨酸标签蛋白得到纯化的 OMT 重组蛋白。之后，使用 Amicon®Ultra 离心超滤管 10 000 MWCO（Merck）将重组蛋白置换到 Storage Buffer 缓冲液（100 mmol/L NaH_2PO_4，10%甘油，pH 7.2）。通过 SDS-PAGE 电泳检测检测蛋白表达和纯化情况，并采用 Bradford 法测定纯化蛋白的浓度。

2.4 SjOMT31 体外酶促反应

分别选择 5 个 1-BIAs[(*S*)-去甲乌药碱、(*S*)-乌药碱、(*S*)-*N*-甲基乌药碱、(*S*)-3′-羟基-*N*-甲基乌药碱和 (*S*)-牛心果碱]，6 个 bisBIAs（防己诺林碱、蝙蝠葛新林碱、蝙蝠葛苏林碱、蝙蝠葛碱、莲心碱和异莲心碱），2 个四氢原小檗碱类生物碱[(*S*)-金黄紫堇碱和(*S*)-四氢非洲防己碱]为底物，检测 SjOMT31 蛋白的催化活性。以空载（pET-30a）粗酶液为阴性对照，每个反应设置 3 个重复。体外酶促 100 μL 体系：纯化蛋白 100 μg，10 mmol/ SAM 5 μL、5 mmol/L 底物 2 μL、使用 100 mmol/L PBS 缓冲液（pH 7.2）补足体系。实验组和对照组 30 ℃、200 r/min 反应 16 h 后，加入 100 μL 分析甲醇终止反应。12 000 r/min 离心 10 min 后，取上清过滤后进行 LC-MS/MS 检测。

2.5 SjOMT31 酶活产物鉴定

利用超高效液相串联三重四极杆质谱联用仪（Agilent 6475 Triple Quadrupole LC-MS/MS System）对酶促反应产物进行检测。以 Agilent-ZORBAX-300SB-C_{18} 柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）为固定相，以含有 0.1%甲酸的超纯水（A 相）和色谱乙腈（B 相）为流动相，线性梯度洗脱，洗脱梯度为 0～0.3 min，5% B；0.3～3.5 min，5%～45% B；3.5～5.5 min，45%～95% B；5.5～7.0 min，95% B；7.0～7.1 min，95%～5% B；7.1～8.0 min，5% B。柱温 40 ℃；进样量 5 μL；体积流量 0.6 mL/min。质谱仪的参数设置如下：检测离子对为莲心碱 611.3→206.1、异莲心碱 611.3→192.1、甲基莲心碱 625.3→206.1、防己诺林碱 609.3→367.2、粉防己碱 623.3→381.2、蝙蝠葛新林碱 597.3→192.1、蝙蝠葛苏林碱 611.3→192.1、蝙蝠葛碱 625.3→206.1、氧甲基蝙蝠葛碱 639.3→206.1、(*S*)-金黄紫堇碱 328.2→178.1、(*S*)-四氢非洲防己碱 342.2→178.1、(*S*)-tetrahydropalmatrubine 342.2→192.1、(*S*)-延胡索乙素 356.2→192.1、(*S*)-去甲乌药碱 272.1→107.1、(*S*)-乌药碱 286.2→107.1、(*S*)-去甲亚美罂粟碱 300.2→107.1、(*S*)-*N*-甲基乌药碱 300.2→107.1、(*S*)-亚美罂粟碱 314.2→107.1、(*S*)-3′-羟基-*N*-甲基乌药碱 316.2→192.2、(*S*)-牛心果碱 330.2→192.1、劳丹宁 344.2→192.1；ESI 正离子模式，鞘气温度 375 ℃，毛细管电压 2 500 V，干燥气温度 250 ℃，鞘气体积流量 11 L/min，干燥气体积流量 7 L/min，雾化器压力 35 psi，使用 MRM 模式上机检测。

实验采用 Agilent 1260 Infinity II超高效液相色谱联用 Bruker tims TOF Pro 2 质谱系统进行化合物分离与鉴定，使用 Agilent Poroshell 120 EC-C_{18} 液相色谱柱（100 mm×4.6 mm，2.7 μm）进行样品分离，流动相为 0.1%甲酸水溶液（A）-0.1%甲酸乙腈溶液（B），体积流量 0.6 mL/min，柱温 40 ℃，进样体积 5 μL。梯度洗脱程序如下：0～0.3 min，5% B；0.3～3.0 min，5%～45% B；3.0～4.0 min，45%～95% B；4.0～5.9 min，95% B；5.9～6.0 min，95%～5% B，并平衡至 7.0 min。质谱检测采用 ESI 正离子模式（＋4 500 V）运行，干燥气温度 220 ℃，体积流量 8 L/min，雾化气压力 1.8 bar，质谱扫描范围为 *m/z* 50～1 300，采用数据依赖采集模式（data dependent acquisition，DDA），碰撞能量阶梯设置 20～50 eV。

2.6 SjOMT31 酶学性质考察

pH 对 SjOMT31 酶活性的影响：以 (*S*)-金黄紫堇碱为底物，测定 OMTs 在 30 ℃的条件下，pH 所用的梯度为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的相对酶活。根据缓冲液的有效缓冲范围，选择三种缓冲液：pH 4.0～5.0 使用 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液；pH 6.0～8.0 使用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液；pH 9.0～10.0 使用 100 mmol/L 甘氨酸-氢

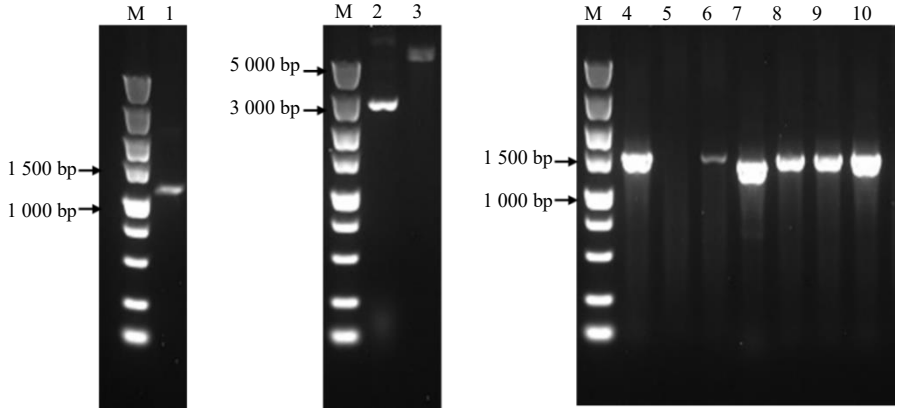
氧化钠缓冲液，pH 11.0 使用 100 mmol/L 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液。每个 pH 设 3 个重复，酶活反应体系和检测条件同上。

温度对 SjOMT31 酶活性的影响：以(*S*)-金黄紫堇碱为底物，在最适 pH 条件下测定 OMTs 在 4、15、25、30、37、45 ℃反应条件下的相对酶活，每个温度设置 3 个重复，酶活反应体系和检测条件同上。

3 结果与分析

3.1 千金藤 *SjOMT31* 基因克隆、重组表达载体构建与菌液 PCR 验证

基于本实验室的千金藤基因组数据，通过 PCR 方法扩增 *SjOMT31* 基因 cDNA 全长序列。经 1%琼脂糖凝胶电泳验证，扩增产物呈现单一清晰条带，大小约 1 100 bp，与目标基因理论长度一致（图 1）。Sanger 测序结果显示，该基因编码区全长 1 110 bp，可编码 369 个氨基酸。根据图 1，可以确认 pET-30a 载体已酶切成功。通过单菌 PCR 对 pET-30a-*SjOMT31* 的阳性鉴定（图 1），在 1 500 bp 附近观察到单一亮带，初步判定 *SjOMT31* 基因成功与载体 pET-30a 连接。最后将对应有条带的菌液送测，序列比对显示，它与千金藤基因组中 *SjOMT31* 基因编码区完全一致，表明本研究成功获得 pET-30a-*SjOMT31* 重组质粒，为后续异源表达及酶学功能解析奠定分子基础。



1-*SjOMT31* 扩增产物；2-pET-30a 空载；3-pET-30a 线载；4～10-pET-30a-*SjOMT31*-BL21 阳性鉴定电泳胶图；M-Marker。
1-PCR amplification product of *SjOMT31* gene; 2-the empty vector pET-30a; 3-the recombinant pET-30a vectors;B; 4—10 are the electrophoretic gel image for positive identification of pET-30a-*SjOMT31*-BL21; M-Marker.

图 1 *SjOMT31* 基因 PCR 扩增及重组 pET-30a 验证

Fig. 1 PCR amplification of *SjOMTT31* gene and verification of *SjOMT31* recombinant pET-30a

3.2 SjOMT31 蛋白质序列和结构分析

利用 Protparam 在线软件分析 SjOMT31 蛋白序列，结果表明 SjOMT31 编码蛋白的分子式为 $C_{3425}H_{5745}N_{1107}O_{1424}S_{256}$，理论相对分子质量为 40 950，理论等电点为 4.88，带正电荷的残基数（Asp＋Glu）为 48，带负电荷的残基数（Arg＋Lys）为 32，不稳定系数为 28.57，脂肪系数为 92.96，疏水性平均值（GRAVY）为−0.005，属于稳定的亲水性蛋白。SjOMT31 蛋白的二级结构主要由 α-螺旋、延伸链和无规则卷曲 3 部分组成（图 2-A），其中蛋白质中 α-螺旋占比 46.74%，延伸链占比 12.5%，无规则卷曲占比 40.76%。蛋白同源建模显示 SjOMT31 蛋白与 Tf6OMT 蛋白序列一致性为 44.15%，建模范围涵盖 15～368 位氨基酸，GMQE 值为 0.80（图 2-B）。SjOMT31 蛋白的跨膜结构域预测由图 2-C 可知，构成 SjOMT31 蛋白的氨基酸位于细胞膜外，不存在跨膜结构域，属于膜外蛋白。信号肽预测由图 2-D 可知，SjOMT31 蛋白质中无信号肽切割位点。

3.3 SjOMT31 蛋白的系统发育和序列分析

为研究千金藤 SjOMT31 蛋白的系统进化关系，本研究选取其他植物中已功能表征的 *OMT* 基因，并与千金藤 SjOMT31 进行系统进化树构建。如图 3 所示，进化树主要由 2 大进化枝构成，包括咖啡酰辅酶 A *O*-甲基转移酶（CCoAOMT）亚家族和咖啡酸 *O*-甲基转移酶（COMT）亚家族。千金藤 SjOMT31 被鉴定为 COMT 亚家族的成员，是一类依赖 SAM 为甲基供体的酶（图 3）。SjOMT31 与延胡索 CyOMT3 聚在同一类，其中 CyOMT3 能够催化苄基异喹啉生物碱骨架化合物和四氢原小檗碱骨架化合物羟基的甲基化。多序列比对结果显示，千金

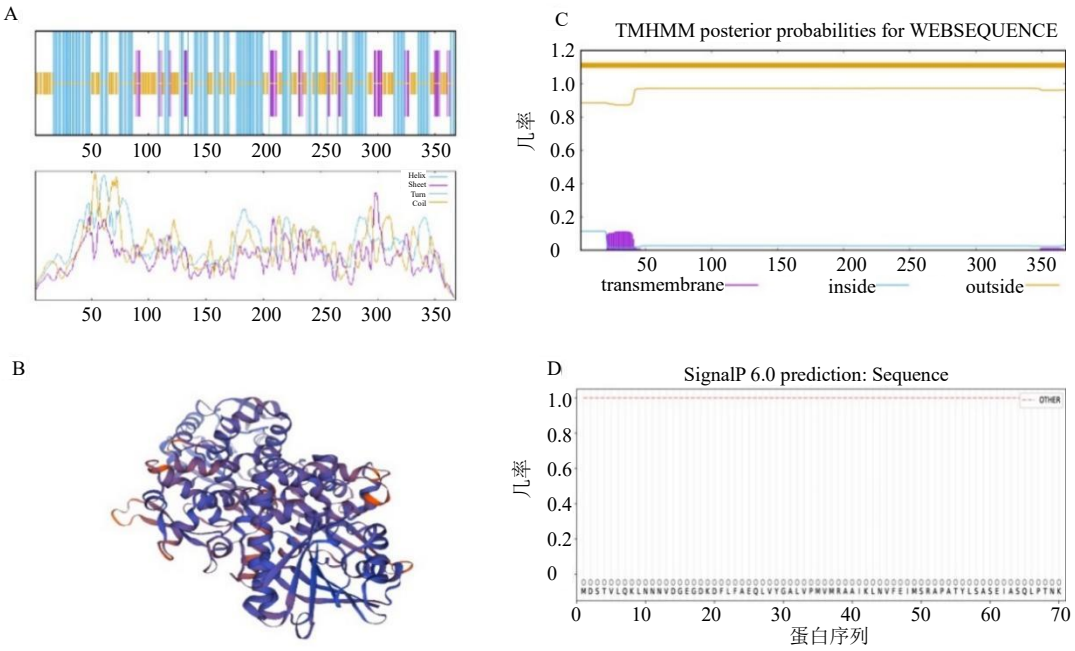


图 2　SjOMT31 二级结构 (A)、三级结构 (B)、跨膜结构域 (C) 及信号肽预测 (D)

Fig. 2　Secondary structure (A), tertiary structure (B), transmembrane domain (C), and signal peptide prediction (D) of SjOMT31

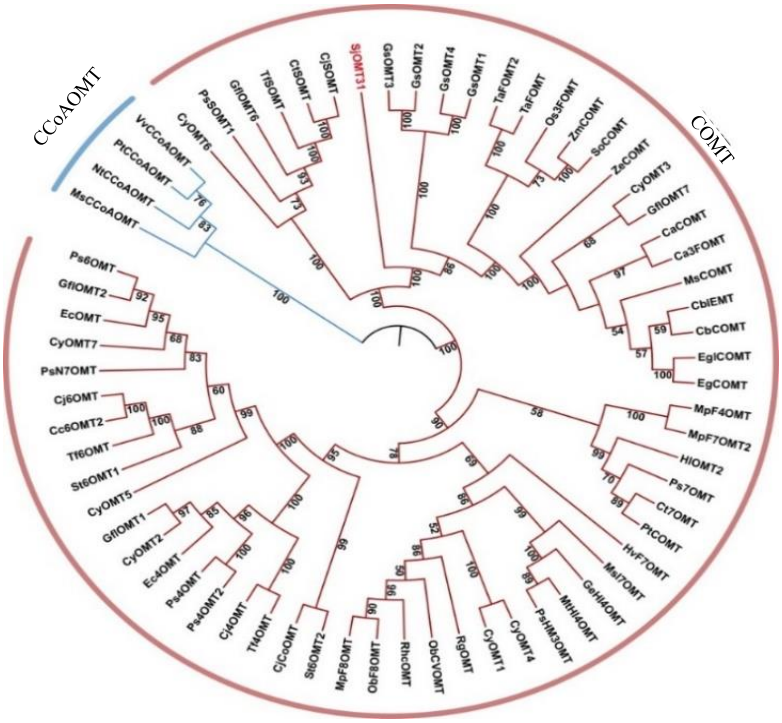
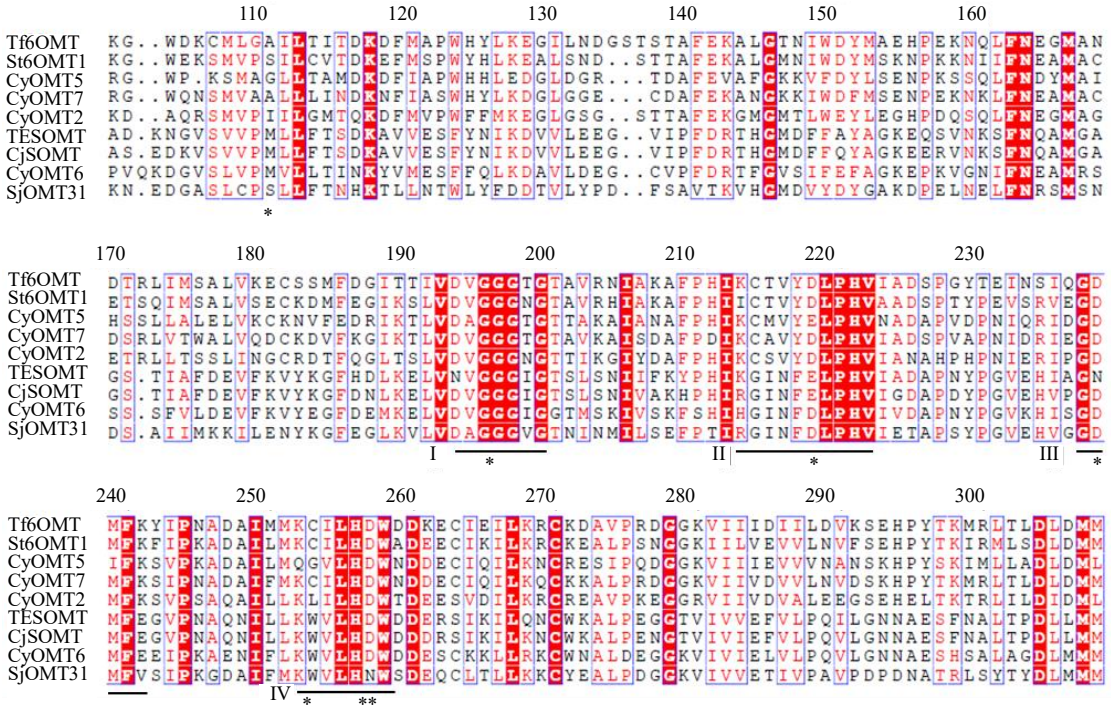


图 3　SjOMT31 与其他 *O*-甲基转移酶基因的系统进化分析

Fig. 3　Phylogenetic analysis of SjOMT31 with other *O*-methyltransferase genes

藤 SjOMT31 在关键氨基酸残基上具有较高的保守性。这些关键残基包括 *S*-腺苷同型半胱氨酸/*S*-腺苷甲硫氨酸（SAH/SAM）相互作用区域以及 4 个保守的基序（标记为 I～IV），这些基序是植物 SAM 依赖的甲基转移酶 SAM 结合位点的特征（图 4）。唯一例外的是 SjOMT31 中的 D257N 突变。



*表示保守残基，即 BIA 结合位点（H256，D257），SAM 结合位点（G195，D218，D238，K252），以及 TfSOMT 中的 M110 残基；保守的基序I～IV下划线标出。

*indicate conserved residues, namely BIA binding sites (H256, D257), SAM binding sites (G195, D218, D238, K252) and residue M110 in TfSOMT; Conserved motifs I—IV are underlined.

图 4　SjOMT31 与其他 *OMT* 基因的多序列对比

Fig. 4　Multiple sequence alignment of SjOMT31 with other *OMT* genes

3.4　SjOMT31 重组蛋白原核诱导表达及纯化

通过在 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L，温度为 16 ℃，诱导时间为 16 h，对目标蛋白进行大量表达。应用 His 亲和色谱柱进行蛋白纯化，收集浓度为 500 mmol/L 咪唑洗脱组分，随后进行 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 结果表明，成功获得了 1 条高纯度的可溶性 SjOMT31 重组蛋白，相对分子质量为 40 950，与目标蛋白的大小基本相符（图 5）。

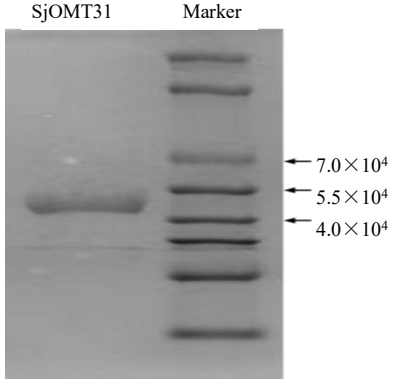


图 5　SjOMT31 蛋白纯化分析

Fig. 5　Purification analysis of SjOMT31 protein

3.5　SjOMT31 蛋白的体外功能表征

通过异源表达体系和体外酶促反应对 SjOMT31 功能进行表征，LC-MS/MS 检测结果表明，SjOMT31 能够催化 (*S*)-去甲乌药碱 C6 位的羟基甲基化，从而合成 (*S*)-乌药碱（图 6-A）。SjOMT31 还能够催化 (*S*)-乌药碱 C7 位的羟基甲基化，在保留时间 5.2 min 产生 1 个新化合物峰。二级质谱图显示该新化合物峰的母离子为$[M+H]^+$ *m/z* 300.151 7，并具有 *m/z* 107.046 4 的特征碎片离子，且其质荷比相对底物增加 14（即增加 1 个甲基的相对分子质量）。通过与文献数据对比确认，产物被鉴定(*S*)-去甲亚美罂粟碱（图 6-B）。此外，SjOMT31 还能够催化(*S*)-金黄紫堇碱 C2 位的羟基甲基化，生成 (*S*)-tetrahydropalmatrubine（图 6-C）；也可以催化(*S*)-四氢非洲防己碱 C2 位的羟基甲基化，合成(*S*)-延胡索乙素（图 6-D）。除了上述 4 个底物外，SjOMT31 对 (*S*)-*N*-甲基乌药碱、(*S*)-3′-羟基-*N*-甲基乌药碱、(*S*)-牛心果碱、蝙蝠葛新林碱、莲心碱、异莲心碱、防己诺林碱、蝙蝠葛苏林碱和蝙蝠葛碱均未显示酶活性。综上所述，SjOMT31 表现出了底物的杂泛性。

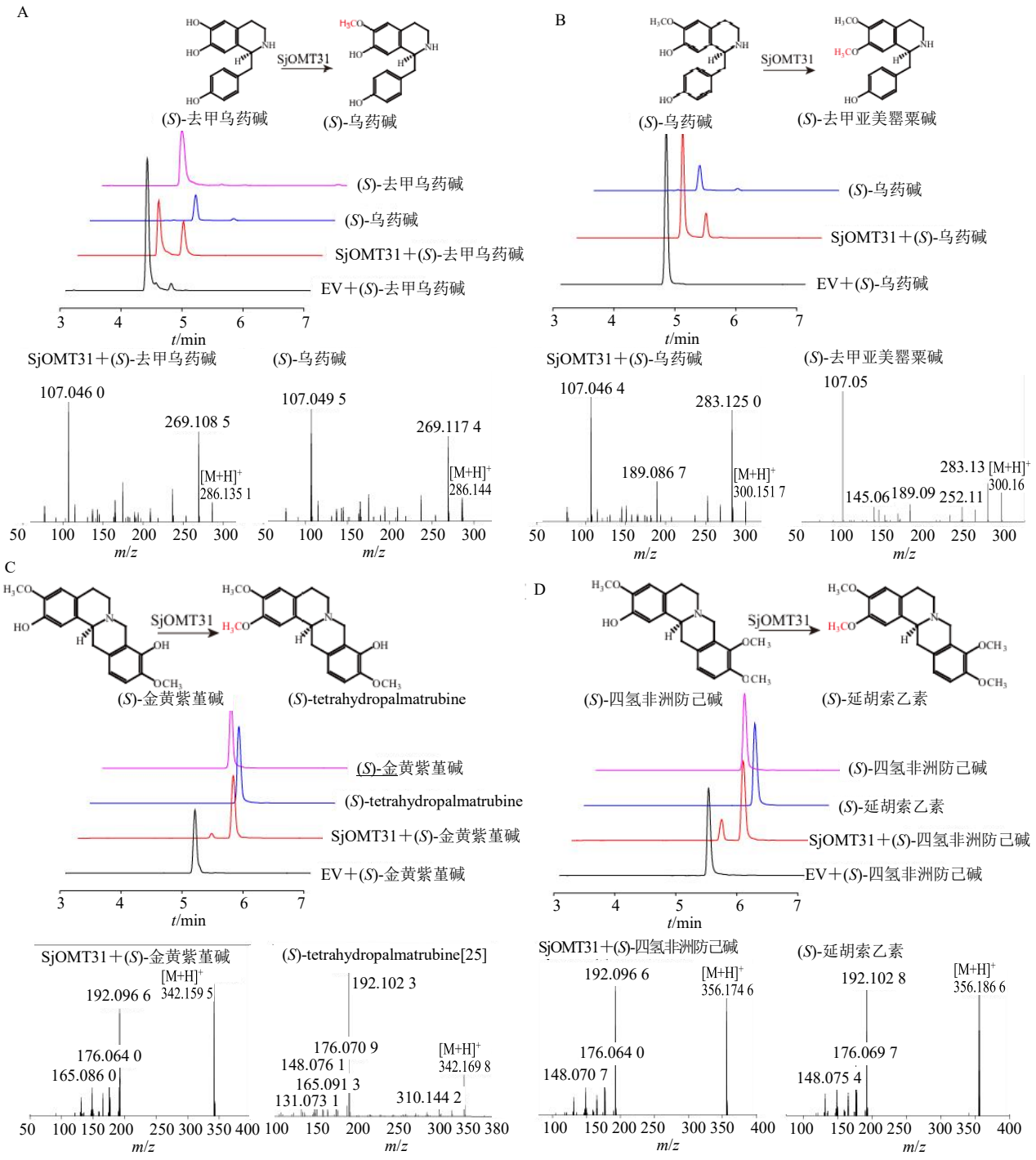


图 6　蛋白体外酶反应及 LC-MS/MS 检测

Fig. 6　*In vitro* enzyme reaction and LC-MS/MS detection

3.6　SjOMT31 蛋白的酶学性质

为评估 pH 对 SjOMT31 的活性影响，本研究配置了不同 pH 值的缓冲液：50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（pH 4.0、5.0）、50 mmol/L 磷酸钾缓冲液（pH 6.0、7.0 和 8.0）、100 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液（pH 9.0、10.0）和 100 mmol/L 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液（pH 11.0）。如图 7 所示，在 pH 6.0 条件下，SjOMT31 展现出相对最高的酶活性。为探究温度对 SjOMT31 活性的影响，通过检测不同温度（4～45 ℃）下催化产物生成量，结果发现该酶在 25 ℃条件下对(*S*)-金黄紫堇碱催化活性最高。

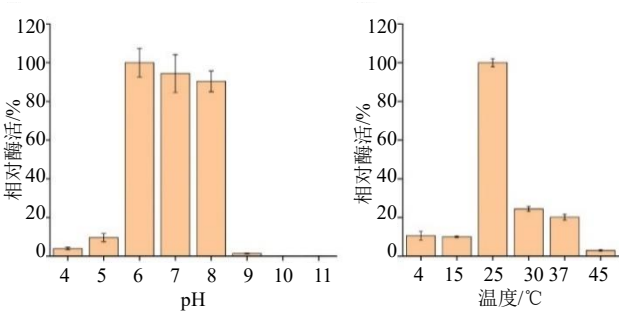


图 7 SjOMT31 的生化性质

Fig. 7 Biochemical charaterization of recombinant SjOMT31 protein

4 讨论

O-甲基转移酶是天然产物生物合成途径中的关键修饰酶，通过催化底物的羟基进行甲基化修饰显著提升了植物代谢产物的化学多样性，进而赋予其多样化的生物学功能[28]。现有研究表明，*O*-甲基转移酶不仅参与BIAs代谢物生物合成的核心路径，还在多种骨架化合物的后修饰中发挥关键作用，是其代谢产物结构和功能多样性的重要基础[29-31]。因此，*O*-甲基转移酶具有一定的研究价值和意义。基于此，本研究以千金藤为对象，开展了 *SjOMT31* 基因的克隆与系统生物信息学分析，同时探究其催化功能及酶学性质。

系统发育分析为OMTs的功能研究提供了理论依据。对 66 种已功能表征的 OMTs 系统发育分析发现，具有相似催化功能的酶聚集在一起，这为未知功能 OMTs 的表征提供了参考。例如，Cj6OMT、Cc6OMT2、Tf6OMT 和 St6OMT1 聚集在一起，均能够催化(*S*)-去甲乌药碱 C6 位羟基的甲基化。千金藤 SjOMT31 和 CyOMT3 聚集在同 1 个分支，推测 SjOMT31 可能具有催化 BIAs 化合物羟基的甲基化活性。研究发现，越来越多的 OMT 蛋白表现出底物杂泛性和交叉区域的选择性，例如 CyOMT5 能够使用(*S*)-3′-羟基-*N*-甲基乌药碱为底物，产生一个 7-*O* 甲基化的产物，而且 CyOMT5 在 3 种 BIAs 中表现出在特定位置（异喹啉的 C6 和 C7 位点）具有高效的甲基化活性[24]。因此，在开展 SjOMT31 蛋白的功能表征时，需选择苄基异喹啉生物碱、原小檗碱等多种类型的化合物作为底物，以全面解析其催化底物谱和区域选择性。

本研究通过分子克隆、原核表达及体外酶活测定等技术手段，对 SjOMT31 的催化功能进行表征。结果表明，SjOMT31 不仅能催化原小檗碱类骨架化合物 C2 位羟基甲基化，还能对苄基异喹啉类骨架化合物 C6 和 C7 位羟基进行甲基化修饰，表现出底物杂泛性和区域选择性特征。类似地，黄海罂粟中的 GFLOMT6 不仅能催化(*S*)-牛心果碱和(*S*)-codamine 的 C7 位羟基甲基化，还能催化(*S*)-牛心果碱 C3’位的羟基甲基化生成(*S*)-codamine[22]。此外，鹅掌楸中的 LcOMT3 能够催化(*S*)-乌药碱、(*S*)-*N*-甲基乌药碱和木兰箭毒碱的 C7 位羟基生成对应的甲基化产物[16]。尽管，目前已经从毛茛目植物中分离鉴定了多种 BIAs 生物合成途径的 *O*-甲基转移酶，部分也用于微生物平台中 BIAs 的异源生产和植物代谢工程[32-33]。然而，OMTs 酶表现出底物杂泛性，导致产生多种副产物，这对目标产物的定向合成构成了挑战。下一步本课题组将通过分子对接和分子动力学模拟技术挖掘 SjOMT31 酶的关键氨基酸残基位点，并构建突变体进行验证，探究其催化机制。同时开展千金藤素生物合成途径中其它关键酶的筛选验证，为解析千金藤素生物合成通路奠定实验基础。

5 结论

本研究从千金藤中成功克隆 1 条 *SjOMT31* 基因，通过生物信息学分析了 *SjOMT31* 的序列特征及系统进化关系，通过构建原核表达载体，诱导并纯化获得了 SjOMT31 的原核表达蛋白，进而检测其酶活。本研究初步证实了 SjOMT31 蛋白能催化 1-苄基异喹啉生物碱 C6、C7 位和原小檗碱骨架的 C2 位羟基甲基化，为苄基异喹啉类生物碱的绿色异源合成提供高效的基因元件。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Zhang S J, Huang W Z, Ren L L, *et al*. Comparison of viral RNA-host protein interactomes across pathogenic RNA viruses informs rapid antiviral drug discovery for SARS-CoV-2 [J]. *Cell Res*, 2022, 32(1): 9-23.

[2] Qiu M H, Qu W M, Xu X H, *et al*. D(1)/D(2) receptor-targeting *L*-stepholidine, an active ingredient of the Chinese herb *Stephonia*, induces non-rapid eye movement sleep in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009, 94(1): 16-23.

[3] Liang D, Li Q, Du L N, *et al*. Pharmacological effects and clinical prospects of cepharanthine [J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8933.

[4] Leng L, Xu Z C, Hong B X, *et al*. Cepharanthine analogs mining and genomes of *Stephania* accelerate anti-coronavirus drug discovery [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 1537.

[5] Rattanawong A, Payon V, Limpanasittikul W, *et al*.

Cepharanthine exhibits a potent anticancer activity in p53-mutated colorectal cancer cells through upregulation of p21Waf1/Cip1 [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(1): 227-238.

[6] Nagano M, Kanno T, Fujita H, *et al*. Cepharanthine, an anti-inflammatory drug, suppresses mitochondrial membrane permeability transition [J]. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 2003, 35(2): 131-143.

[7] Desgrouas C, Dormoi J, Chapus C, *et al*. *In vitro* and *in vivo* combination of cepharanthine with anti-malarial drugs [J]. *Malar J*, 2014, 13: 90.

[8] Lee E J, Facchini P J. Tyrosine aminotransferase contributes to benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(3): 1067-1078.

[9] Tian Y, Kong L Z, Li Q, *et al*. Structural diversity, evolutionary origin, and metabolic engineering of plant specialized benzylisoquinoline alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2024, 41(11): 1787-1810.

[10] Dang T T, Facchini P J. Characterization of three *O*-methyltransferases involved in noscapine biosynthesis in opium poppy [J]. *Plant Physiol*, 2012, 159(2): 618-631.

[11] Park M R, Chen X, Lang D E, *et al*. Heterodimeric *O*-methyltransferases involved in the biosynthesis of noscapine in opium poppy [J]. *Plant J*, 2018, 95(2): 252-267.

[12] An Z J, Gao R R, Chen S S, *et al*. Lineage-specific CYP80 expansion and benzylisoquinoline alkaloid diversity in early-diverging eudicots [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(19): e2309990.

[13] Payne J T, Valentic T R, Smolke C D. Complete biosynthesis of the bisbenzylisoquinoline alkaloids guattegaumerine and berbamunine in yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(51): e2112520118.

[14] Pyne M E, Gold N D, Martin V J J. Pathway elucidation and microbial synthesis of proaporphine and bis-benzylisoquinoline alkaloids from sacred *Lotus* (*Nelumbo nucifera*) [J]. *Metab Eng*, 2023, 77: 162-173.

[15] Morris J S, Facchini P J. Molecular origins of functional diversity in benzylisoquinoline alkaloid methyltransferases [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1058.

[16] Cheng W J, Yao Y, Wang Q X, *et al*. Characterization of benzylisoquinoline alkaloid methyltransferases in *Liriodendron chinense* provides insights into the phylogenic basis of angiosperm alkaloid diversity [J]. *Plant J*, 2022, 112(2): 535-548.

[17] Hong U V T, Tamiru-Oli M, Hurgobin B, *et al*. Genomic and cell-specific regulation of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy [J]. *J Exp Bot*, 2025, 76(1): 35-51.

[18] Lee S, Park N I, Park Y, *et al*. *O*-and *N*-Methyltransferases in benzylisoquinoline alkaloid producing plants [J]. *Genes Genomics*, 2024, 46(3): 367-378.

[19] Xu Z C, Tian Y, Wang J, *et al*. Convergent evolution of berberine biosynthesis [J]. *Sci Adv*, 2024, 10(48): eads3596.

[20] Lam K C, Ibrahim R K, Behdad B, *et al*. Structure, function, and evolution of plant *O*-methyltransferases [J]. *Genome*, 2007, 50(11): 1001-1013.

[21] Cabry M P, Offen W A, Saleh P, *et al*. Structure of *Papaver somniferum O*-methyltransferase 1 reveals initiation of noscapine biosynthesis with implications for plant natural product methylation [J]. *ACS Catal*, 2019, 9(5): 3840-3848.

[22] Li K L, Chen X F, Zhang J B, *et al*. Transcriptome analysis of *Stephania tetrandra* and characterization of norcoclaurine-6-*O*-methyltransferase involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 874583.

[23] Chang L M, Hagel J M, Facchini P J. Isolation and characterization of O-methyltransferases involved in the biosynthesis of glaucine in *Glaucium flavum* [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(2): 1127-1140.

[24] 俞越童. 莲苄基异喹啉类生物碱生物合成途径中甲基转移酶的鉴定与功能研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2023.

[25] Bu J L, Zhang X H, Li Q S, *et al*. Catalytic promiscuity of *O*-methyltransferases from *Corydalis yanhusuo* leading to the structural diversity of benzylisoquinoline alkaloids [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: 152.

[26] 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.

[27] 刘琦, 闫锐琪, 谢冰寒, 等. 紫金牛中一个新颖底物杂泛性 *O*-甲基转移酶 [J]. 药学学报, 2023, 58(5): 1372-1382.

[28] Yu Y T, Liu Y, Dong G Q, *et al*. Functional characterization and key residues engineering of a regiopromiscuity *O*-methyltransferase involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Nelumbo nucifera* [J]. *Hortic Res*, 2022, 10(2): uhac276.

[29] Liscombe D K, Louie G V, Noel J P. Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(10): 1238-1250.

[30] Robin A Y, Giustini C, Graindorge M, *et al*. Crystal structure of norcoclaurine-6-*O*-methyltransferase, a key rate-limiting step in the synthesis of benzylisoquinoline alkaloids [J]. *Plant J*, 2016, 87(6): 641-653.

[31] Wang Z L, Li K L, Mao J Q, *et al*. Functional characterization and protein engineering of a *O*-methyltransferase involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis of *Stephania tetrandra* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 296: 139744.

[32] Pyne M E, Kevvai K, Grewal P S, *et al*. A yeast platform for high-level synthesis of tetrahydroisoquinoline alkaloids [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3337.

[33] Gou Y W, Li D F, Zhao M H, *et al*. Intein-mediated temperature control for complete biosynthesis of sanguinarine and its halogenated derivatives in yeast [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 5238.

[责任编辑 时圣明]