



山皂荚*GjCYP71D1*基因表达分析及在三萜合成中的功能鉴定

董明², 张玉琦², 李影², 武文博², 王硕², 孟春雨², 刘梦轻², 尹静^{1,2,*}

¹东北林业大学东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 哈尔滨150040

²东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

*通信作者(yinjing20135@163.com)

摘要: 皂荚树含有重要的五环三萜化合物, 因其广泛的药理活性而具有重要价值。本研究以山皂荚组培苗叶片为材料, 通过RT-PCR方法克隆了一个CYP450新基因, 并对其进行一系列生物信息学分析; 采用qRT-PCR方法检测该CYP450基因、*GjLus* (羽扇豆醇合酶)基因在不同处理下(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SA、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯利和机械伤害)及不同组织部位的表达模式。研究表明, 该CYP450为新基因, 基因开放阅读框(ORF)为1 533 bp, 编码含有510个氨基酸, 与决明(*Senna tora*) *CYP71D10*的相似度最高, 为75.8%, 暂命名为*GjCYP71D1*。*GjCYP71D1*的表达具有组织特异性, 该基因在茎中和叶中表达量分别是根中的87.0%和89.9%。*GjCYP71D1*和*GjLus*响应不同生长调节物质的诱导, 在MeJA、SA、GA₃、ABA、乙烯利和机械伤害诱导下, 均表现出相似的表达模式。通过瞬时侵染本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)发现*GjCYP71D1*具有催化白桦脂醇合成的功能, 为山皂荚CYP450基因功能挖掘及鉴定奠定基础。

关键词: 山皂荚; CYP450; 三萜化合物; 表达特性; 基因功能

Expression analysis of *GjCYP71D1* gene from *Gleditsia japonica* and identification of its function in triterpene synthesis

DONG Ming², ZHANG Yuqi², LI Ying², WU Wenbo², WANG Shuo², MENG Chunyu²,
LIU Mengqing², YIN Jing^{1,2,*}

¹Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

²College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

*Corresponding author (yinjing20135@163.com)

Abstract: The *Gleditsia* tree contains important pentacyclic triterpenoid compounds that are valuable for their broad pharmacological activity. In this study, a new CYP450 gene was cloned from the leaves of *Gleditsia japonica* tissue culture seedlings by RT-PCR, and a series of bioinformatics analyses were carried out. The expression patterns of *GjCYP71D1* and *GjLus* (*lupinol synthase*) genes under different treatments (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SA, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ethephon and mechanical damage) and different tissue parts were detected by qRT-PCR. The results showed that the CYP450 was a new

收稿 2022-09-13 修定 2023-03-24

资助 黑龙江省自然科学基金(ZD2023C004)和东北林业大学本科创新项目(202110225336)。

gene, the gene open reading frame (ORF) was 1 533 bp, contained 510 amino acids, and the similarity with cassia (*Senna tora*) CYP71D10 was the highest, at 75.8%, tentatively named GjCYP71D1. GjCYP71D1 has tissue specificity, and its expression in stem and leaf was 87.0% and 89.9% of that in root, respectively. GjCYP71D1 and GjLus showed similar expression trends under the induction of different treatments of MeJA, SA, GA₃, ABA, ethephon and mechanical injury. Through transient infection of *Nicotiana benthamiana*, GjCYP71D1 has the function of catalyzing betulin synthesis, which lays a foundation for the excavation and identification of CYP450 gene function in *G. japonica*.

Key words: *Gleditsia japonica*; CYP450; triterpenoid; expression characteristics; gene function

山皂荚(*Gleditsia japonica*)是我国特有的豆科皂荚属树种之一, 落叶乔木; 刺粗壮, 常分枝, 多呈圆锥状, 茎和枝通常有粗糙的棘。山皂荚是典型的多功能特色经济林树种, 具有重要的生态价值、经济价值和药用价值, 既可作为轻化工业和食品工业的重要原料林, 又可作为珍稀名贵的木本中药材(王召伟等2021)。皂荚树不同部位均可入药, 刺用于治疗疥疮和皮肤病, 豆荚可用作传统的抗炎药, 用于治疗由炎症引起的一些呼吸系统疾病, 其化学成分包含有黄酮、皂苷、三萜、酚类及氨基酸等。药理学研究结果表明, 皂荚粗提物具有良好的化学稳定性和生物活性, 在抗炎、抗肿瘤、抗过敏、抗HIV、抗氧化、抗高脂血症、镇痛、抗菌等方面都有着重要的作用(Zhang等2016; 李建军等2018; Cai等2019)。

三萜类化合物具有广泛的生物活性, 如抗癌、保肝、抗糖尿病、抗炎、抗氧化和抗菌等, 具有重要的制药和工业应用(Sandeep和Ghosh 2020; 于安东等2022)。皂荚属物种富含三萜, 含量在17%~20%, 包括羽扇烷型三萜白桦脂醇、白桦脂酸, 环阿奇醇型三萜齐墩果酸。研究报道, 白桦脂醇、白桦脂酸具有抗菌、抗寄生虫、抗病毒、抗炎、抗蛇毒血清、保护内脏、抗糖尿病、抗动脉粥样硬化及抑制肿瘤和艾滋病毒等作用(Rzepka等2022; 尹静等2009)。白桦脂醇可通过抑制肝星状细胞、降低I型胶原蛋白和 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达来减轻肝纤维化, 具有保护肝纤维的功能(Liu等2022); 同时发现它可以通过抑制p38通路, 抑制宫颈癌细胞增殖, 提高NK细胞杀伤力, 进而提高机体免疫水平(罗芳等2022)。白桦脂醇也具有显著改善老年痴呆的能力, 改善学习记忆能力和空间认知

能力(金艳等2021)。白桦脂醇前体羽扇豆醇具有抗炎、抗氧化、促进伤口愈合、抑制肿瘤细胞转移的作用(韦燕飞等2021), 也可抑制人乳腺癌MCF-7细胞的增殖、迁移和侵袭, 其作用机制可能与抑制Wnt/ β -catenin信号通路相关基因的表达有关(曹文富等2022)。

三萜物质合成途径主要包括甲羟戊酸和甲基赤藓糖醇磷酸途径, 关键酶包括3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶、法尼基焦磷酸合酶、角鲨烯合酶、角鲨烯环氧化酶、羽扇豆醇合酶(lupeol synthase, LUS)、达玛烯二醇合成酶、 β -香树脂醇合成酶及下游的氧化基因细胞色素P450合酶(张玉琦2021)。LUS的功能是催化角鲨烯到羽扇豆醇, 羽扇豆醇进一步被CYP450氧化生成白桦脂醇和白桦脂酸。Konoshima等(1981)首次报道了从山皂荚中分离到刺囊酸; Okada等(1982)从山皂荚中分离到皂荚皂苷C。之后多位科学家从皂荚果实中分离鉴定11个皂苷A~G、N、O、P、Q8~10。徐哲等(2008)首次从皂荚刺中分离出白桦脂醇, 并通过核磁共振波谱法等技术确定了3 β -乙酰氧基-12-齐墩果烯-28-羧酸、木栓酮、白桦脂醇; 李万华等(2007)从皂荚刺中分离到5个白桦脂酸型三萜。

自细胞色素P450首次发现以来, 许多植物的CYP450家族基因被克隆, 并进行功能分析。目前, CYP450家族基因已在烟草(*Nicotiana benthamiana*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)等模式植物以及甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)、人参(*Panax ginseng*)等具有珍贵药用价值的植物中进行了相应的功能研究(崔会婷等2020; 毕权等2021)。细胞色素P450的作用主要包括参与植物次生代谢产物的合成, 如萜类、植物激素、信

号分子、防御物质等的代谢与合成。CYP450响应茉莉酸(jasmonate, JA)、水杨酸(salicylic acid, SA)、赤霉素(gibberellin acid 3, GA₃)和脱落酸(abscisic acid, ABA)等激素信号的诱导,在三萜类化合物的代谢中具有重要作用(杨杰等2021)。实验室前期研究表明,白桦中*BpCYP89S1*和*BpCYP86A182*响应JA和SA诱导,具有C-28氧化功能,可有效提高羽扇豆醇转化为白桦脂酸的能力(Yang等2021); *BpCYP71AN67*、*BpCYP94C168*可催化羽扇豆醇转化为白桦脂醇,并响应ABA激素信号(张玉琦2021)。也有研究表明, CYP450参与逆境胁迫的防御反应,茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)诱导基因*CYP6AE19*表达,促进环氧黄曲霉素B1 (AFB1)的合成, *CYP6AE19*的表达产物可使植物抵御昆虫的啃食(Poudel等2016)。在催化三萜合成的CYP450基因中,主要催化产物有齐墩果酸、甘草次酸、人参皂苷、甾醇等。CYP450基因家族庞大,如在白桦中有262个,拟南芥中1 249个,但目前仅有少数基因被鉴定功能。关于山皂荚三萜合成途径及其相关基因鲜见报道,本研究以山皂荚为材料,在山皂荚中挖掘与萜类合成相关的CYP450基因,以期为皂荚三萜途径解析奠定基础,同时为高附加值三萜及其皂苷生物合成提供新的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料和处理

于东北林业大学校园内40年生山皂荚(*Gleditsia japonica* Miq.)种子作为试验材料,取山皂荚种子经消毒灭菌,在MS培养基下进行无菌培养,温度25℃,湿度60%~80%,光照强度为80 μmol·m⁻²·s⁻¹,光照时间16 h。培养30 d后,选取长势良好、株高10 cm左右植株,进行不同处理: 10 μmol·L⁻¹脱落酸、100 mg·L⁻¹赤霉素、50 mg·L⁻¹水杨酸、100 μmol·L⁻¹茉莉酸甲酯、5 μmol·L⁻¹乙烯利(ethephon)和机械伤害处理(mechanical injury) (机械伤害是用手术剪把山皂荚组培苗的叶片剪开0.5 cm的伤口),不同生长调节物质处理浓度的确定来自实验室前期实验(Yang等2021)。将整株山皂荚苗放在MS液体培养基进行摇瓶培养,在处理0、6、12、24 h和48 h进行根、茎、叶取样,每种处理重复3次。所

有样品均液氮速冻后置于-80℃的冰箱中冷冻保存。利用本实验室前期获得的GV3101-Green-BpLus农杆菌株和pNC-Green-SubC-GjCYP71D1农杆菌混合瞬时侵染本氏烟草方法及进行白桦脂醇含量测定(张玉琦2021)。

1.2 *GjCYP71D1*基因编码区全长的克隆

以山皂荚叶片为材料,提取总RNA,反转录cDNA。OminiPlant RNA Kit (Dnase I)购自于北京康为世纪生物科技有限公司, Hifair® III 1st Stand cDNA Synthesis Kit和Hieff UNICON® Universal Blue Qpcr SYBR Green Master Mix购自上海翌圣生物科技有限公司,在实验室前期获得的山皂荚转录组数据库中选择一CYP450基因,用Primer 5设计特异引物; *GjCYP71D1*-F: 5' ATGGAGTTGGAACCCC-ATATT 3'; *GjCYP71D1*-R: 5' TTAACCTGCAGAT-GAGCTATACTTAAC 3'。以山皂荚cDNA为模板,反应体系为20 μL (10 μL Premix Taq™、1 μL *GjCYP71D1*-F、1 μL *GjCYP71D1*-R、1 μL cDNA、7 μL ddH₂O)。扩增程序为: 94℃ 2 min预变性; 94℃ 30 s变性、58℃ 30 s退火、72℃ 2 min延伸(30个循环); 72℃ 10 min延伸。扩增后经1%琼脂糖的凝胶电泳检测,将纯化产物与pGEM®-T Easy载体连接,取5 μL连接产物转化到100 μL Trelief™ 5α感受态细胞中,向其中加入500 μL LB液体培养基,37℃、200 r·min⁻¹复苏1 h后,取100 μL菌液涂于含50 mg·L⁻¹卡那霉素(Kanamycin)的LB平板上37℃培养8 h。阳性克隆委托哈尔滨睿博兴科生物技术有限公司进行测定。

1.3 *GjCYP71D1*基因生物信息学分析

用NCBI的Open Reading Frame (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)在线工具确定*GjCYP71D1*的编码区;通过NCBI的Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测*GjCYP71D1*基因ORF编码的氨基酸保守结构域;利用ExPASy网站的ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)生物信息学工具分析氨基酸的理化性质;利用ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)工具预测氨基酸序列的亲疏水性;利用GOR IV (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)工具预测蛋白质的

二级结构; 利用SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)工具预测蛋白质的三级结构。

1.4 *GjCYP71D1*在不同处理下的表达分析

以*GjCYP71D1*序列设计荧光定量PCR引物, 同时设计羽扇豆醇合酶基因qRT-PCR引物, 以山皂荚微管蛋白基因*Tu*为内参。在7500 Software仪器上进行qRT-PCR。反应体系: Green Master Mix 10 μ L、上下游引物各0.4 μ L、cDNA 2 μ L, 加ddH₂O至20 μ L。扩增程序为: 95°C 2 min预变性; 95°C 10 s变性, 60°C 30 s退火(40个循环); 95°C 15 s变性; 60°C 1 min延伸; 95°C 15 s变性; 60°C 1 min延伸。引物序列如下, *GjCYP71D1*-F: 5' ATAGGCCTCATCTTCTTGCTGC 3'; *GjCYP71D1*-R: 5' TCTCATCTGCC-TCCAGTAACTCC 3'; *GjLus*-F: 5' TTTCTAT-TCCTCCATTACAGGCC 3'; *GjLus*-R: 5' AATGGTT-TCTTCTGGTGTCTG 3'; *GjTu*-F: 5' AGGGTTC-TTAGTCTTCAACGCTG 3'; *GjTu*-R: 5' GTAGA-GAGGACACTGTTGTAGGGC 3'。

2 实验结果

2.1 *GjCYP71D1*基因克隆与序列分析

光叶百脉根*CYP71D353*可将二氢羽扇豆醇连续氧化成20-羟基羽扇豆醇和20-羟基白桦脂酸(Krokida等2013)。因此以*CYP71D353*作为模板在实验室前期测序的转录组库搜索山皂荚*GjCYP71D1*, 结果显示相似度为48%。

以山皂荚组培苗cDNA为模板进行PCR扩增, 获得一条编码区(ORF)为1 533 bp的基因序列, 编码510个氨基酸(图1)。

2.2 *GjCYP71D1*基因蛋白质结构分析

利用ProtParam工具在线分析, *GjCYP71D1*分子量为59 133.32 Da, 理论等电点(pI)为8.69; 不稳定系数为46.48, 说明该蛋白为不稳定蛋白; 脂溶性系数是86.72, 为脂溶性蛋白; 总亲水性平均数是-0.115, 说明具有亲水性。利用ProtScale工具预测氨基酸序列的亲疏水性。*GjCYP71D1*在第29位置处该氨基酸具有最强的疏水性为3.778, 在142的位置处亲水性最强为-3.033。*GjCYP71D1*蛋白质的二级结构中, 45.68%为 α 螺旋, 10.56%为延伸链, 1.92%为 β 转角, 41.84%为无规则卷曲(图2)。

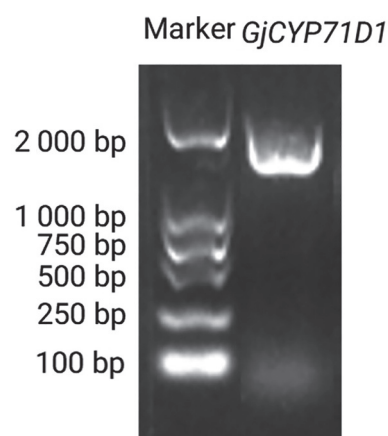


图1 *GjCYP71D1*基因克隆

Fig. 1 Cloning of *GjCYP71D1* gene

2.3 *GjCYP71D1*蛋白氨基酸序列比对

通过NCBI中BLAST检索与*GjCYP71D1*氨基酸蛋白同源性较高的物种CYP450, 结合BioEdit中的Cluster W方法将包括木豆(*Cajanus cajan*, KYP-42195.1、XP 020239683.1)、蒺藜苜蓿(XP 003600-323.1、XP 003617701.2、XP 003612313.2)、决明(KAF7831302.1)、野大豆(*Glycine soja*, KHN438-83.1)、光叶百脉根(*Lotus japonicus*, AHB62239.1)、拟南芥(NP 172767.1)进行比较, 相似度在71.0%~75.8%。*GjCYP71D1*具有一个保守的F××G×R×C×G的血红素结构域, 属于CYP450家族(图3)。系统进化树构建结果显示, *GjCYP71D1*与决明(*Senna tora*) *CYP71D10*基因亲缘关系最近(图4), 说明*GjCYP71D1*可能属于CYP71D家族成员, 且为新基因, 暂命名为*GjCYP71D1*。

2.4 *GjCYP71D1*在不同组织及处理下的表达模式

取山皂荚30 d的幼苗, 检测不同组织中*GjCYP71D1*表达变化。以根中的表达量为对照, 该基因在茎中表达量是根中的87.0%, 在叶中的表达量是根的89.9%, 根与茎中该基因表达量差异显著, 与叶中差异不显著(图5)。

不同处理下*GjCYP71D1*在茎和叶中的表达模式不同(图6和7)。在茎中, *GjCYP71D1*经MeJA诱导12 h时短暂升高后下降, 48 h达到最高值, 是对照的1 019.31倍; 在叶中, *GjCYP71D1*经MeJA诱导后48 h表达量最高, 是对照的17.7倍。在SA诱导下,

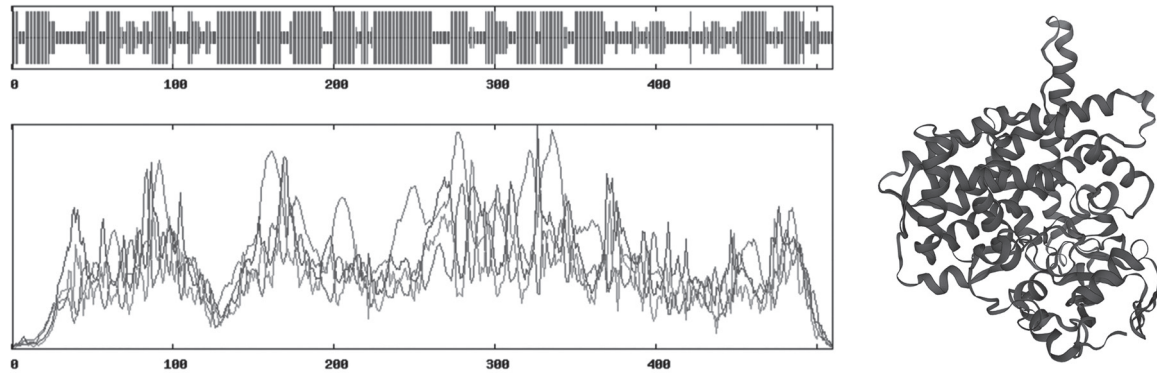


图2 GjCYP71D1蛋白结构预测

Fig. 2 Prediction of protein structure of GjCYP71D1

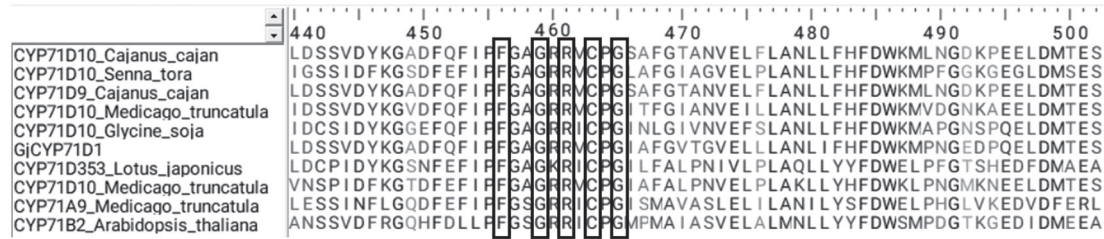


图3 GjCYP71D1血红素结构域

Fig. 3 The heme domain of GjCYP71D1

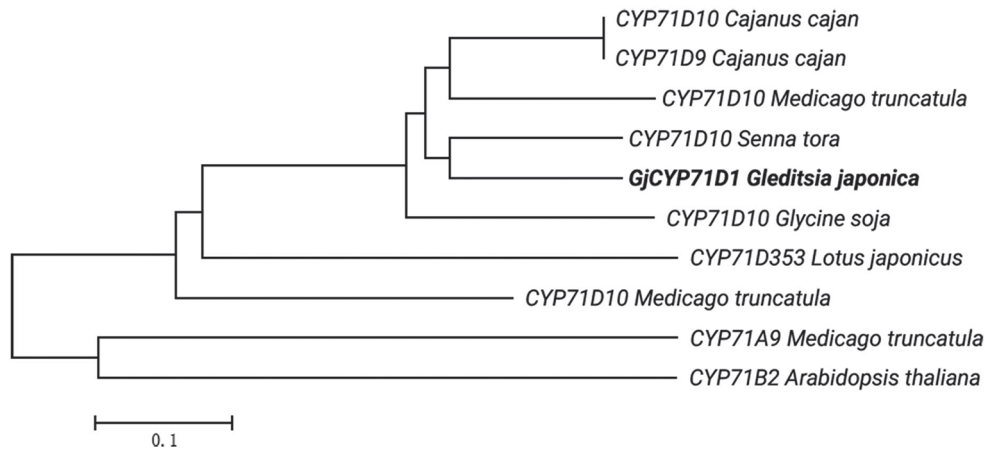


图4 GjCYP71D1系统发育树构建

Fig. 4 Phylogenetic tree construction of GjCYP71D1

*GjCYP71D1*在茎中的表达量逐渐积累, 48 h到达最高, 是对照组的11.06倍。 GA_3 主要诱导*GjCYP71D1*的表达, 茎和叶中*GjCYP71D1*在48 h表达量最高。在ABA诱导下, 茎中*GjCYP71D1*基因的表达

水平于48 h后表达量最高, 叶中*GjCYP71D1*基因表达量明显下降, 均低于对照。乙烯利诱导*GjCYP71D1*的表达, 茎和叶中*GjCYP71D1*表达量均在48 h达到最高。经机械伤害下, *GjCYP71D1*基因在茎

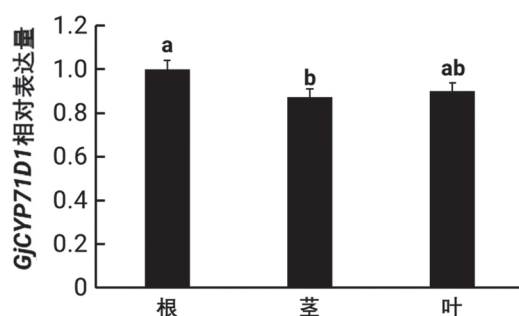


图5 GjCYP71D1组织特异性表达

Fig. 5 Tissue-specific expression of GjCYP71D1

运用邓肯多重比较, 不同字母代表达到显著差异水平($P < 0.05$)。

中的表达量于处理48 h达到最高; 在叶中, *GjCYP71D1* 基因的表达量下调, 且最低是对照的0.37%。

不同处理下 *GjLus* 在茎和叶中的表达模式也表现不同, 且与 *GjCYP71D1* 表达模式有相似趋势。MeJA 诱导48 h时, 茎和叶中三萜合酶基因 *GjLus* 表达量均最高。经SA诱导茎中 *GjLus* 表达量逐渐积累, 在48 h时表达量最高, 是对照的161.67倍; 在叶中 *GjLus* 基因先升后降, 在6 h表达量最高。经GA₃ 诱导, 在茎中 *GjLus* 基因的表达于6 h升高后下降再上升, 在48 h表达量最高; 在叶中 *GjLus* 基因在GA₃ 处理后24 h表达量最高, 达到对照组的1.63倍。经ABA诱导 *GjLus* 基因, 在茎中的表达量在48 h时最高; 在叶中 *GjLus* 经处理后表达量低于对照组。在茎中 *GjLus* 经乙烯利处理48 h后, 表达量最高, 而在叶中 *GjLus* 基因表达量低于对照组。通过机械伤害处理, *GjLus* 基因在茎中的表达量在处理48 h最高, 在叶中 *GjLus* 基因的表达量下调。

综上所述, *GjCYP71D1* 和 *GjLus* 响应不同生长调节物质的诱导, 在MeJA、SA、GA₃、ABA、乙烯利和机械伤害诱导下, 均表现相似的表达趋势。如经MeJA诱导 *GjCYP71D1* 和 *GjLus* 在茎中表达趋势相似, 48 h后的表达水平最高; 在叶中的表达量先下调, 随着MeJA处理时间延长, 表达量上升并高于对照组。同时, 经过ABA和机械伤害诱导, *GjCYP71D1* 与 *GjLus* 在叶中的表达量均低于对照组 (图6和7)。

利用瞬时侵染的方法将 *GjCYP71D1* 及前体基

因 *BpLus* 在本氏烟草中共表达, 对白桦脂醇的含量进行检测。野生型烟草中白桦脂醇的含量为0.091 mg·g⁻¹, *BpLus*、*BpLus*+*GjCYP71D1* 烟草的白桦脂醇含量分别为0.092和0.340 mg·g⁻¹, *BpLus*+*GjCYP71D1* 共表达的白桦脂醇含量是野生型烟草的3.7倍, 说明在白桦脂醇生物合成过程中 *GjCYP71D1* 基因发挥重要作用。

3 讨论

根据陆地植物CYP450家族分类, CYP71属于多基因家族, 包括亚家族CYP705A、CYP71A、CYP71D、CYP81Q和CYP93E (杨杰等2018)。CYP71家族本身就代表了大部分植物的CYP450, 因此具有巨大的功能多样性。浦香东等(2018)研究证实 *SmCYP71D375* 在丹参体内催化丹参酮的生物合成; 烟草腺毛中的 *CYP71D16* 能催化叶面香气物质西柏三烯二醇的合成(付秋娟等2017)。 *ArCYP71D443* 在匍匐筋骨草的毛状根中参与了迄今为止未知的植物20-羟基蜕皮激素的生物合成(Yuki等2016)。本文研究获得的 *GjCYP71D1* 经生物信息学分析显示属于CYP71D亚家族新成员, cDNA序列ORF全长为1 533 bp, 编码含有510个氨基酸, 与决明 *CYP71D10* 基因相似度最高, 为75.8%, 推测该基因可能在次生代谢产物合成及抗逆过程中发挥重要功能。

三萜化合物合成分为3个阶段, 即前体角鲨烯合成、三萜骨架环化及CYP450后修饰氧化酶的氧化(Xu等2004)。羽扇豆醇合酶是将2,3-环氧角鲨烯转化成羽扇豆醇的关键酶(黄凤珍等2019), 是初级和次级代谢之间的关键分支点, 是白桦脂酸、白桦脂醇生物合成中关键酶。已报道参与羽扇豆烷型三萜皂苷生物合成的CYP450主要属于CYP71家族和CYP716 (CYP85)家族, 且目前报道只有 *CYP71D353* 属于CYP71家族, 其余均属于CYP716亚家族的C-28位氧化。有研究结果表明CYP716亚家族可以将羽扇豆醇氧化成白桦脂酸, 但是其在植物中的主要作用是氧化 α -香树脂醇和 β -香树脂醇(Khaki-mov等2015; Tamura等2017)。 *RoCYP716A155* 具有羽扇豆醇-28-氧化酶活性, 可以有效将羽扇豆醇转化成白桦脂酸(Huang等2019); 紫花苜蓿中 *CYP71-*

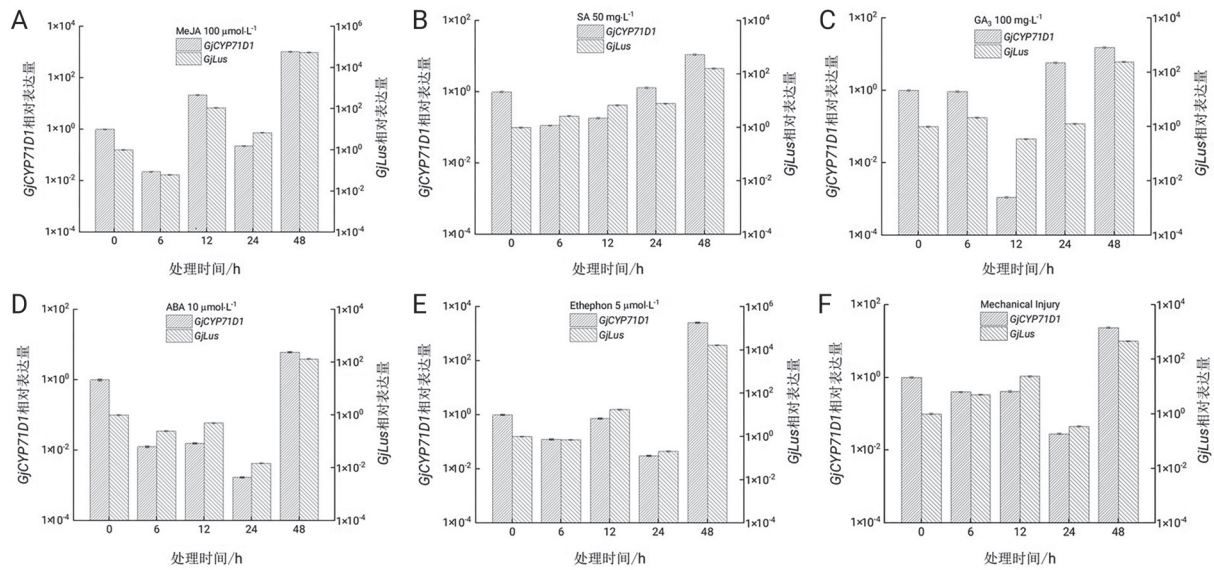


图6 *GjCYP71D1*和*GjLus*基因在MeJA、SA、GA₃、ABA、乙烯利和机械伤害处理下茎中的相对表达量
Fig. 6 Relative expression levels of *GjCYP71D1* and *GjLus* genes in stems treated with MeJA, SA, GA₃, ABA, ethephon and mechanical injury

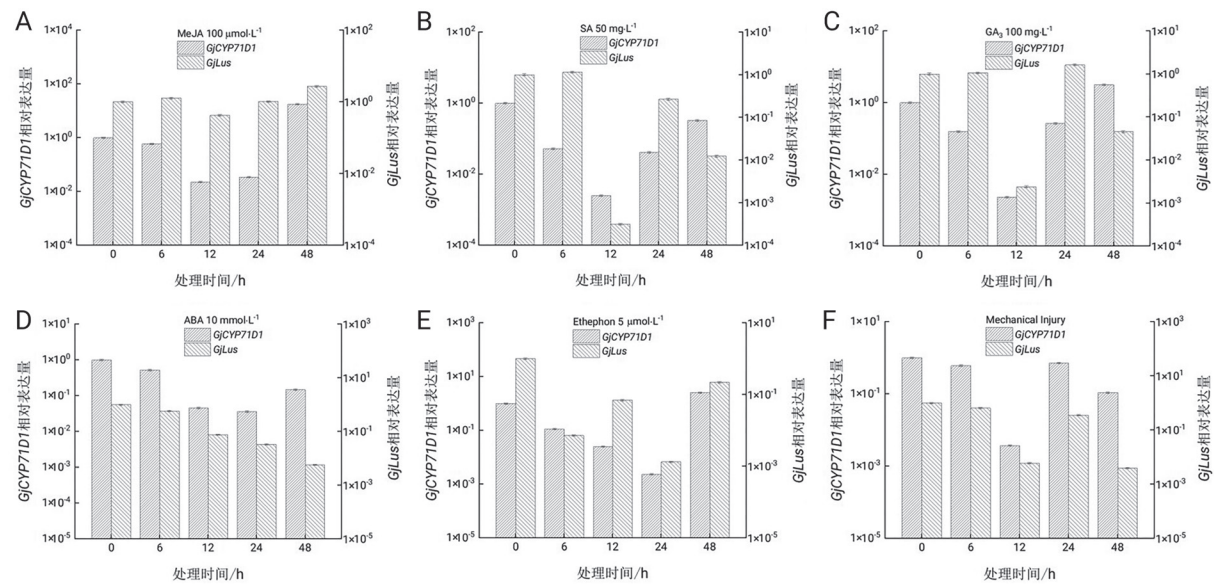


图7 *GjCYP71D1*和*GjLus*基因在MeJA、SA、GA₃、ABA、乙烯利和机械伤害处理下叶中的相对表达量
Fig. 7 Relative expression levels of *GjCYP71D1* and *GjLus* genes in leaves treated with MeJA, SA, GA₃, ABA, ethephon and mechanical injury

6A12可催化β-香树脂醇三步氧化成齐墩果酸,也可催化羽扇豆醇三步氧化成白桦脂酸(Carelli等2011)。甘草中的CYP716A179在工程酵母菌株中的异源表达可以分别催化β-香树脂醇、α-香树脂醇和羽扇豆醇产生齐墩果酸、熊果酸和桦木酸

(Tamura等2017)。拟南芥CYP716A1和CYP716A2都催化羽扇豆醇的单羟基化以产生白桦脂酸(Yasumoto等2016)。本文克隆的*GjCYP71D1*也属于CYP71家族,且与*GjLus*表达特征有协同效应。

通过分析基因表达的相似性能够初步鉴定基

因是否具有共表达特性,进而深入明确基因间相互作用网络。在植物代谢研究中发现,参与植物同一代谢途径中的基因能够共表达,并可能位于同一基因簇(Yang等2021)。例如,拟南芥中氧化鲨烯环化酶基因、CYP450基因(*CYP705A5*、*THAD*、*CYP708A2*、*THAD0*)和BAHD家族的酰基转移酶基因能够共表达,并位于同一基因簇上共同调节三萜类物质的生物合成。水稻的2号染色体上2个二萜环化酶基因和6个CYP450单加氧酶基因表达高度相关并形成基因簇提高水稻的防御应答(Field和Osborn 2008)。青蒿中与三萜合成相关的*OSC2*和*CYP716A14v2*基因具有共表达特性,促进3-氧化三萜类的生物合成(Moses等2015)。拟南芥中参与三萜生物合成的*CYP716A1*、*CYP716A2*与*PEN3*(*OSC*)共表达(Ehlting等2008)。相关报道均体现了CYP450和*OSC*基因之间共表达的关系,并共同参与三萜产物的合成。

激素在参与植物代谢和防御反应中具有重要作用,MeJA作为信号分子,对三萜皂苷类含量积累起促进作用。例如对鹅掌草进行MeJA对鹅掌草三萜皂苷flaccidoside II和其他型三萜皂苷如anhuienoside E含量积累具有促进作用(姚诗琪等2021, 2019)。MeJA诱导的防御酶变化促进粗毛纤孔菌三萜合成(刘东超等2022)。经MeJA诱导后,柴胡皂苷生物合成途径中关键酶基因的表达量及毛状根中柴胡皂苷含量明显提高(王晨等2021)。外源SA能够显著诱导灵芝甾醇的生物合成(李绍玮2022)。白桦悬浮细胞经SA、JA和ABA处理,可以提高次生代谢物含量(叶子诺等2021)。此外,GA₃及乙烯利等激素及其信号途径的互作在植物生长发育及次生代谢过程中也起着重要作用(胡国富等2022)。本研究发现,不同生长调节物质能够诱导*GjCYP71D1*和*GjLus*表达变化,且有相似的表达模式。在MeJA、SA、GA₃、ABA、乙烯利和机械伤害诱导下,*GjCYP71D1*和*GjLus*基因表达模式相似,但2个基因的表达模式在不同组织中存在差异,如叶中除MeJA和乙烯利处理外,两基因均呈下降趋势;而茎中2个基因随时间延长表达量有增加趋势,且在不同处理下叶中的表达量均显著低于茎中的表达。推测可能原因是MeJA、SA、GA₃、ABA、乙

烯利和机械伤害处理后有利于茎中三萜物质积累,而叶中代谢产物可能被降解或转移,导致叶中部分处理后2个基因表达有下降趋势,这也与在白桦、皂荚树三萜积累的研究结果相吻合,即白桦及皂荚树中三萜及皂苷化合物主要积累在茎皮部位(Yin等2012;王召伟等2021)。本实验明确了*GjCYP71D1*和*GjLus*基因在不同生长调节物质处理下的表达特征。通过检测瞬时侵染烟草中的白桦脂醇含量进一步验证了*GjCYP71D1*具有催化合成白桦脂醇的功能,为后续三萜物质合成调控提供了新的候选基因。

参考文献(References)

- Bi Q, Yao H, He DJ, et al (2021). Relationship between expression characteristics of *GuHMGR* gene and glycyrrhizic acid synthesis and accumulation in seedlings of *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Physiol J*, 57 (3): 569–578 (in Chinese with English abstract) [毕权, 姚华, 何大俊等(2021). 苗期乌拉尔甘草*GuHMGR*基因表达特性与甘草酸合成和积累关系的研究. *植物生理学报*, 57 (3): 569–578]
- Cai Y, Zhang CZ, Zhan L, et al (2019). Anticancer effects of *Gleditsia sinensis* extract in rats transplanted with hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Res*, 27 (8): 889–899
- Cao WF, Pan NS, Li Y (2022). Inhibitory effects and mechanisms of lupeol on proliferation, migration and invasion of human breast cancer MCF-7 cells. *Chin Arch Tradit Chin Med*, (10): 156–159 (in Chinese with English abstract) [曹文富, 潘年松, 李颖(2022). 羽扇豆醇抑制乳腺癌MCF-7增殖迁移和侵袭及机制研究. *中华中医药学刊*, (10): 156–159]
- Carelli M, Biazzi E, Panara F, et al (2011). *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins. *Plant Cell*, 23 (8): 3070–3081
- Cui HT, Jiang X, Zhang TJ, et al (2020). The research progress of plant cytochrome P450 family. *Chin J Grassland*, 42 (5): 173–180 (in Chinese with English abstract) [崔会婷, 蒋旭, 张铁军等(2020). 植物CYP450家族研究进展. *中国草地学报*, 42 (5): 173–180]
- Ehlting J, Sauveplane V, Olry A, et al (2008). An extensive (co-) expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 8 (1)
- Field B, Osborn AE (2008). Metabolic diversification— independent assembly of Operon-Like gene clusters in different plants. *Science*, 320 (5875): 543–547
- Fu QJ, Du YM, Liu XM et al (2017). Determination of cem-

- bratriene-diol in tobacco by ultra performance liquid chromatography. *Chin Toba Sci*, 38 (3): 67–73 (in Chinese with English abstract) [付秋娟, 杜咏梅, 刘新民等(2017). 超高效液相色谱法测定烟草西柏三烯二醇. *中国烟草科学*, 38 (3): 67–73]
- Hu GF, Li WY, Xiao HC, et al (2022). Effects of ABA and GA₃ on seed germination, physiological characteristics and endogenous hormone contents of *Allium senescens* L. *Acta Agrest Sin*, (9): 2399–2406 (in Chinese with English abstract) [胡国富, 李韦瑶, 肖汇川等(2022). ABA和GA₃对山韭种子萌发、生理特性及内源激素含量的影响. *草地学报*, (9): 2399–2406]
- Huang FZ, Gao RX, Li M, et al (2019). Improve lupeol biosynthesis in *Arabidopsis* through overexpression of *AtLUP1*. *J Central South Univ For Technol*, 39 (6): 107–113 (in Chinese with English abstract) [黄凤珍, 高润昕, 李萌等(2019). 利用*AtLUP1*超量表达体系在拟南芥中合成羽扇豆醇. *中南林业科技大学学报*, 39 (6): 107–113]
- Huang JJ, Zha WL, An TY, et al (2019). Identification of RoCYP01 (CYP716A155) enables construction of engineered yeast for high-yield production of betulinic acid. *Appl Microbiol Biotech*, 103 (17): 7029–7039
- Jin Y, Fu ZH, Lin ZH, et al (2021). Effect of botulin on the expression of APH-1 and PEN-2 in hippocampal neurons of Alzheimer's model rats. *J Tianjin Univ Trad Chin Med*, 40 (3): 384–388 (in Chinese with English abstract) [金艳, 傅增辉, 林再红等(2021). 白桦脂醇对老年痴呆模型大鼠海马神经元APH-1及PEN-2表达的影响. *天津中医药大学学报*, 40 (3): 384–388]
- Khakimov B, Kuzina V, Erthmann PØ, et al (2015). Identification and genome organization of saponin pathway genes from a wild crucifer, and their use for transient production of saponins in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*, 84 (3): 1571–1581
- Konoshima T, Fukushima H, Inui H, et al (1981). The structure of prosapogenin obtained from the saponin of *Gleditsia japonica*. *Phytochemistry*, 20 (1): 139–142
- Krokida A, Delis C, Geisler K, et al (2013). A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol*, 200 (3): 675–690
- Li JJ, Shang XC, Zhou XT (2018). Summary of medicinal research on *Gleditsia sinensis*. *Biol Teach*, 43 (2): 68–69 (in Chinese) [李建军, 尚星辰, 周肖廷(2018). 皂荚药用研究概述. *生物学教学*, 43 (2): 68–69]
- Li SW (2020). Study on the regulation of exogenous elicitors on *Ganoderma lucidum* sterol biosynthesis pathway and related genes (dissertation). Hangzhou: Zhejiang A&F Univ (in Chinese with English abstract) [李绍玮(2020). 外源诱导子对灵芝甾醇生物合成途径及相关基因的调控作用研究鉴定(学位论文). 杭州: 浙江农林大学]
- Li WH, Li Q, Wang XG, et al (2007). A study on the anti-HIV activity of five lupane-type triterpenoids from the stings of *Gleditsia sinensis* Lam. *J Northwest Univ (Nat Sci Ed)*, (3): 401–403 (in Chinese with English abstract) [李万华, 李琴, 王小刚等(2007). 皂角刺中5个白桦脂酸型三萜抗HIV活性研究. *西北大学学报(自然科学版)*, (3): 401–403]
- Liu DC, Hu B, Zhou J, et al (2022). Methyl jasmonate and oleic acid-induced triterpenoid synthesis via changes in defensive enzyme activities in *Inonotus hispidus*. *J Central South Univ For Technol*, (9): 37–46 (in Chinese with English abstract) [刘东超, 扈博, 周姣等(2022). 基于茉莉酸甲酯与油酸诱导的防御酶变化与粗毛纤孔菌三萜合成. *中南林业科技大学学报*, (9): 37–46]
- Liu XY, Li D, Li TY, et al (2022). Vitamin A-modified betulin polymer micelles with hepatic targeting capability for hepatic fibrosis protection. *Eur J Pharm Sci*, 174: 106189
- Luo F, Gao Q, Fei ZY (2022). Effects of betulin on natural killer cell cytotoxicity and lymphocyte proliferative activity in mouse models of cervical cancer. *China J Mod Med*, 32 (6): 6–11 (in Chinese with English abstract) [罗芳, 高琴, 费志医(2022). 白桦脂醇对宫颈癌小鼠自然杀伤细胞杀伤力及淋巴细胞增殖活性的影响. *中国现代医学杂志*, 32 (6): 6–11]
- Moses T, Pollier J, Shen Q, et al (2015). OSC2 and CYP716A14v2 catalyze the biosynthesis of triterpenoids for the cuticle of aerial organs of *Artemisia annua*. *Plant Cell*, 27 (1): 286–301
- Okada Y, Takahashi K, Okuyama T, et al (1982). Gleditsia Saponins II. Locations of monoterpenyl moieties in the molecule of gleditsia saponin C (GS-C). *Plant Med*, 46 (10): 74–77
- Poudel AN, Zhang T, Kwasniewski M, et al (2016). Mutations in jasmonoyl-L-isoleucine-12-hydroxylases suppress multiple JA-dependent wound responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1861 (9): 1396–1408
- Pu XD, Xu ZC, Song JY (2018). Cloning and functional identification of novel *CYP71D375* related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Sci Sin Vitae*, 48 (4): 390–398 (in Chinese with English abstract) [浦香东, 徐志超, 宋经文(2018). 基于组学的丹参酮生物合成途径新基因*CYP71D375*克隆和功能研究. *中国科学: 生命科学*, 48 (4): 390–398]
- Rzepka Z, Bebenek E, Chrobak E, et al (2022). Synthesis and anticancer activity of indole-functionalized derivatives of betulin. *Pharmaceutics*, 14 (11): 2372
- Sandeep, Ghosh S (2020). Chapter 12-triterpenoids: structural diversity, biosynthetic pathway, and bioactivity. *Stud Nat Prod Chem*, 67: 411–461
- Tamura K, Seki H, Suzuki H, et al (2017). CYP716A179 functions as a triterpene C-28 oxidase in tissue-cultured

- stolons of *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Cell Rep*, 36 (3): 437–445
- Wang C, An LC, Li JC, et al (2021). Cloning of the MYC2 transcription factor from *Bupleurum chinense* and analysis of jasmonate-induced regulation. *Plant Physiol J*, 57 (2): 439–450 (in Chinese with English abstract) [王晨, 安立成, 李剑超等(2021). 北柴胡MYC2转录因子的克隆及茉莉酸诱导的调控分析. *植物生理学报*, 57 (2): 439–450]
- Wang ZW, Zhang YH, Zhang X, et al (2021). Study on application value and comprehensive development of *Gleditsia sinensis*. *Forest By-Product Spec China*, (5): 80–81, 84 (in Chinese) [王召伟, 张玉华, 张霞等(2021). 皂荚树的应用价值及综合开发研究. *中国林副特产*, (5): 80–81, 84]
- Wei YF, Jin LJ, Liu SS, et al (2021). Research progress on anti-tumor effects of lupeol. *Chin Pharmacol Bull*, 37 (7): 897–901 (in Chinese with English abstract) [韦燕飞, 金丽杰, 刘莎莎等(2021). 羽扇豆醇抗肿瘤作用研究进展. *中国药理学通报*, 37 (7): 897–901]
- Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65 (3): 261–291
- Xu Z, Zhao XD, Wang YM, et al (2008). Identification and anti-tumor determination about anti-tumor components of *Gleditsia sinensis* Lam. stings. *J Shenyang Pharmaceut Univ*, (2): 108–111, 162 (in Chinese with English abstract) [徐哲, 赵晓嶙, 王漪檬等(2008). 皂角刺抗肿瘤活性成分的分离鉴定与活性测定. *沈阳药科大学学报*, (2): 108–111, 162]
- Yang J, Li Y, Zhang YQ, et al (2021). Functional identification of five *CYP450* genes from birch responding to MeJA and SA in the synthesis of betulinic acid from lupitol. *Ind Crops Prod*, 167: 113513
- Yang J, Zhan YG, Xiao JL, et al (2018). Advances in the function of cytochrome P450 in structural modifications of triterpenoid and sterol skeletons in plants. *Sci Sin Vitae*, 48 (10): 1065–1083 (in Chinese with English abstract) [杨杰, 詹亚光, 肖佳雷等(2018). 细胞色素P450在植物三萜和甾醇骨架修饰中的功能研究进展. *中国科学: 生命科学*, 48 (10): 1065–1083]
- Yao SQ, Cao S, Hou SH, et al (2019). Effects of methyl jasmonate on the accumulation of triterpenoid saponin anhuenoside E in *Anemone flaccida*. *J Hubei Univ Chin Med*, 21 (1): 38–40 (in Chinese with English abstract) [姚诗琪, 曹洒, 侯帅红等(2019). 茉莉酸甲酯对鹅掌草中三萜皂苷anhuenoside E含量积累的影响. *湖北中医药大学学报*, 21 (1): 38–40]
- Yao SQ, Cao S, Hou SH, et al (2021). Effects of methyl jasmonate on the accumulation of triterpenoid saponin flaccidoside II in *Anemone flaccida*. *J Hubei Univ Chin Med*, 23 (5): 38–41 (in Chinese with English abstract) [姚诗琪, 曹洒, 侯帅红等(2021). 外源性激素茉莉酸甲酯对鹅掌草中三萜皂苷flaccidoside II含量积累作用的分析研究. *湖北中医药大学学报*, 23 (5): 38–41]
- Yasumoto S, Fukushima EO, Seki H, et al (2016). Novel triterpene oxidizing activity of *Arabidopsis thaliana* CYP716A subfamily enzymes. *FEBS Lett*, 590 (4): 533–540
- Ye ZN, Zhai MX, Zhou MX, et al (2021). The effect of H₂S on the accumulation of indoleacetic acid (IAA), abscisic acid (ABA) and secondary metabolites in birch suspension cells. *J Anhui Agric Sci*, 49 (17): 117–121, 127 (in Chinese with English abstract) [叶子诺, 翟明霞, 周文洋等(2021). 硫化氢对白桦悬浮细胞中IAA·ABA和次生代谢物累积的影响. *安徽农业科学*, 49 (17): 117–121, 127]
- Yin J, Ren CL, Zhan YG, et al (2012). Distribution and expression characteristics of triterpenoids and OSC genes in white birch (*Betula platyphylla* Suk.). *Mol Biol Rep*, 39: 2321–2328
- Yin J, Zhan YG, Xiao JL, et al (2009). Synthesis and regulation of triterpene from *Betula platyphylla* Suk. *Plant Physiol Commun*, 45 (5): 520–526 (in Chinese with English abstract) [尹静, 詹亚光, 肖佳雷(2009). 白桦三萜的合成和调控. *植物生理学通讯*, 45 (5): 520–526]
- Yu AD, Liu L, Long R, et al (2022). Function and application prospect of plant UDP-glycosyltransferase (UGT). *Plant Physiol J*, 58 (4): 631–642 (in Chinese with English abstract) [于安东, 刘琳, 龙瑞才等(2022). 植物UDP-糖基转移酶(UGT)的功能及应用前景. *植物生理学报*, 58 (4): 631–642]
- Yuki T, Kiyoshi O, Hikaru S, et al (2016). Functional characterization of CYP71D443, a cytochrome P450 catalyzing C-22 hydroxylation in the 20-hydroxyecdysone biosynthesis of *Ajuga hairy roots*. *Phytochemistry*, 7 (127): 23–28
- Zhang JP, Tian XH, Yang YX, et al (2016). *Gleditsia species*: an ethnomedical, phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol*, 178: 155–171
- Zhang YQ (2021). Function identification of *BpCYP49* and *BpCYP71* genes in betulin synthesis (dissertation). Harbin: Northeast Forestry Univ (in Chinese with English abstract) [张玉琦(2021). *BpCYP49*、*BpCYP71*基因在白桦脂醇合成中的功能鉴定(学位论文). 哈尔滨: 东北林业大学]