



羟基红花黄色素A生物合成途径短链还原酶基因的特征及功能研究

王璐暖, 吴建辉, 何贝轩, 张彦洁, 郭美丽

Characterization and function of short-chain dehydrogenases/reductases in hydroxysafflower yellow A biosynthesis pathway

WANG Lunuan, WU Jianhui, HE Beixuan, ZHANG Yanjie, GUO Meili

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202201061>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

催化菘蓝活性木脂素生物合成的漆酶基因家族生物信息学分析

Bioinformatics analysis of laccases involved in active lignans' biosynthesis in *Isatis indigotica*

药学实践杂志. 2017, 35(3): 208-214 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.005

医院药品供应链深度合作实践效果分析

Analysis of the practical effect of deep cooperation on hospital pharmacy supply chain

药学实践杂志. 2019, 37(1): 91-93 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.021

用失效模式和影响分析法规范药品供应链协同服务平台在门诊药房领药中的应用

Application of FMEA regulated drug supply chain collaborative service platform for drug-receiving in outpatient pharmacy

药学实践杂志. 2019, 37(1): 86-90 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.020

公立医院供应链管理模式实践中存在的典型问题与对策分析

Analysis of typical practical problems and countermeasures of supply chain management mode in public hospitals

药学实践杂志. 2021, 39(4): 369-372 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202105125

长链非编码RNA人母系表达基因3在肿瘤发生中作用的研究进展

Research progress of lncRNA MEG3 in tumorigenesis

药学实践杂志. 2019, 37(5): 390-393,421 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.002

红花五味子茎低极性化学成分的GC-MS分析

Analysis of low-polarity components from stems of *Schisandra rubriflora* (Franch). Rehd. et Wils by GC-MS.

药学实践杂志. 2019, 37(6): 491-494 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.003



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

羟基红花黄色素 A 生物合成途径短链还原酶基因的特征及功能研究

王璐暖, 吴建辉, 何贝轩, 张彦洁, 郭美丽 (海军军医大学药理学系生药学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 探究参与红花黄酮类生物合成途径特别是羟基红花黄色素 A(HSYA)关键短链脱氢还原酶基因(SDRs)的功能。**方法** 基于红花转录组数据库以及代谢组数据库, 筛选参与 HSYA 生物合成途径的 SDRs, 用 qRT-PCR 法分析表达模式。采用无缝克隆技术构建过表达载体, 以农杆菌 GV3101 介导遗传转化云南巍山红花品系, 对转基因 T₂ 代植株进行阳性验证, 并对花冠 SDRs 的基因表达量进行分析, UPLC-Q-TOF/MS 法测定次生代谢物的含量。**结果** 筛选出 3 个参与 HSYA 生物合成途径的关键短链脱氢还原酶基因 *CtSDR1*、*CtSDR2*、*CtSDR3*, 表达量从高到低依次为花冠>叶>茎>根。花冠中表达量随花冠发育逐渐升高。对转基因 T₂ 代植株进行阳性验证后的花冠进行 qRT-PCR 分析发现: 与空白对照组相比, 转 *CtSDR3* 过表达 T₂ 代阳性植株花冠中 *CtSDR3* 基因的转录水平增加了 2~3 倍, 次生代谢物 HSYA 的含量提高了 7.1%~16.6% ($P<0.05$)。**结论** *CtSDR3* 可能参与了红花中黄酮类化合物特别是 HSYA 的生物合成, 为阐释 *CtSDR3* 在 HSYA 生物合成途径中的功能提供了数据支撑。

[关键词] 短链脱氢还原酶; 羟基红花黄色素 A; 红花

[中图分类号] S567.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2022)03-0218-08

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202201061

Characterization and function of short-chain dehydrogenases/reductases in hydroxysafflower yellow A biosynthesis pathway

WANG Lunuan, WU Jianhui, HE Beixuan, ZHANG Yanjie, GUO Meili (Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To explore the function of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) in safflower flavonoid, especially hydroxysafflower yellow A (HSYA) biosynthesis. **Methods** SDRs involved in HSYA biosynthesis pathway were screened based on safflower transcriptome database and metabolome database. The expression pattern was analyzed by qRT-PCR. The overexpression vector was constructed by seamless cloning technology, then genetically transformed to the Yunnan Weishan safflower strain by *Agrobacterium* gv3101. The transgenic T₂ generation plants were positively verified, and the gene expression of corolla SDRs was analyzed. The content of secondary metabolites was assayed by UPLC-Q-TOF/MS. **Results** Three SDRs genes named *CtSDR1*, *CtSDR2* and *CtSDR3* involved in HSYA biosynthesis pathway were screened. Their expression in safflower from high to low was corolla > leaf > stem > root. The expression level in corolla increased gradually with corolla development. qRT-PCR analysis of corolla with positive verification of genome insertion sequence showed that the transcription level of *CtSDR3* in corolla of T₂ positive plants increased by 2~3 times compared with the blank control group, and the content of secondary metabolite HSYA increased by 7.1%~16.6% ($P<0.05$). **Conclusion** *CtSDR3* may be involved in the biosynthesis of flavonoids, especially HSYA, in safflower. It provides the support data for explaining the function of *CtSDR3* in HSYA biosynthesis pathway.

[Key words] short-chain dehydrogenase reductase; hydroxysafflower yellow A; safflower

中药红花 (*Carthami Flos*) 是菊科植物红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥花, 传统本草学著作《本草纲目》记载, 红花具有活血散瘀, 通经止痛

的功效^[1], 其药材和制剂在临床上被广泛用于心脑血管疾病的预防和治疗。现代药理研究表明, 其主要药效物质是以羟基红花黄色素 A (hydroxysafflower yellow A, HSYA) 为代表的查尔酮类化合物和以蒽花苷为代表的黄酮醇类化合物, 这些化合物均具有良好的心脑血管损伤保护活性^[2-3]。红花药材的产量偏低, 每平方千米产量仅为 18.0~22.5 t^[4], 其中特有的 HSYA^[5]、红花红色素等查尔酮类成分在不同品种间差异较大^[6]。由于红花中的查尔酮类成分

[基金项目] 国家自然科学基金(81973421, 81473300); 国家重点研发计划(2019YFC1711100)

[作者简介] 王璐暖, 硕士研究生, 研究方向: 中药生物技术, Email: calm3696@foxmail.com

[通信作者] 郭美丽, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药资源学, Email: mlguo@126.com, Tel: (021)81871302

仅特异性地存在于花冠中^[7],加之体外组织培养再生率低^[8]等原因,对其功能基因的研究工作一直进展缓慢。特别是对于 HSYA 等红花特有的有效成分,其生物合成相关的功能基因尚不完全清楚,合成通路也未被完全解析^[9]。因此,用现代分子生物学技术手段以提高药效物质的含量,是提高红花品质,节约土地资源、降低制药成本的一条新途径。

短链脱氢酶/还原酶(short-chain dehydrogenases/reductases, SDR)在植物次生代谢物的生物合成中广泛参与各类碳-氧双键,碳-碳双键以及烯酮键的氧化还原催化反应。根据 SDRs 基因序列的特征结构,SDRs 超家族可以被分为 5 个亚家族^[10-14]。最早发现并且进行鉴定的两类主要短链还原酶命名为 classical 和 extend, classical 类的 SDRs 基因拥有长度约为 250 个氨基酸残基,被称为 Extended 类的 SDRs 基因在碳基末端因其含有多余的约 100 个氨基酸残基而得名。另外 3 种类型 SDRs 基因分别被命名为 intermediate、complex 和 divergent。这些类型的 SDRs 基因基于其结合辅酶类型和结合催化位点的不同进行命名分类。此外,SDRs 存在与传统类型不同的含有“rossmann-fold”保守结构域的氧化还原酶结构^[15-18]。

黄酮类化合物起源于莽草酸途径和苯丙素生物合成途径,1 个香豆酰辅酶 A(coumaroyl CoA)和 3 个丙二酰辅酶 A(malonyl CoA)在查尔酮合酶的作用下生成二氢查尔酮,然后经查尔酮异构酶催化为二氢黄酮,进一步在各类还原酶,聚合酶和糖基转移酶的作用下,生成终端次生代谢产物组合^[19-21]。红花中所含的主要有效成分 HSYA 具有查尔酮式结构,本课题组前期研究认为:HSYA 从前体物质到合成,中间存在必不可少的氧化还原过程。短链脱氢还原酶家族广泛参与植物体内次生代谢,这一类还原酶都带有相似的折叠结构以及催化位点,已有研究表明,其对苯丙烷代谢途径起重要作用^[22-23],但有关红花中还原酶基因相关报道较少^[24]。故笔者通过对红花转录组数据库、基因表达谱数据库以及代谢组数据库进行分析,筛选在 HSYA 生物合成途径的关键还原酶基因,并进行功能验证,以期揭示红花次生代谢成分生物合成途径,为定向调控红花的品质提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

云南巍山红花品系(ZHH0119),采自海军军医大学药学院温室,经海军军医大学郭美丽教授鉴定

为菊科植物红花(*Carthamus tinctorius* L.)。红花种植条件:温度恒定 25 °C,16 h 光照,8 h 黑暗。采集相关花与组织后迅速存放于液氮或者-80 °C 冰箱中冷冻。

1.2 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

按照 Trans ZOL Plant 植物总 RNA 提取试剂盒(北京全式金公司,中国)说明书方法提取红花花冠总 RNA,按照 Transtart One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 逆转录试剂盒(北京全式金公司,中国)说明书方法进行 cDNA 第一链的合成。cDNA 于-20 °C 保存。

1.3 基因筛选

基于数据库中的基因注释以“黄酮还原酶”和“黄酮类化合物生物合成”作为关键词进行检索,筛选出其中可能与 HSYA 生物合成相关的还原酶基因,将筛选基因不同花期时间的表达量,将其与红花代谢组数据库中同花期的芦丁(rutin)、山柰酚(kaempferol)、槲皮素(querctetin)、HSYA、柚皮素(naringenin)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(kaempferol-3-O-rutinoside)、山柰酚-3-O-葡萄糖苷(kaempferol-3-O-glucoside)、Carthamin、芹菜素(apigenin)、黄芩素(scutellarein)、木犀草素(luteolin)、苯丙氨酸(D-phenylalanine) 12 个主要成分的含量^[12,25]进行皮尔森相关性分析。

1.4 全长克隆及生物信息学分析

基于红花花冠 EST 转录组文库,结合第三代测序技术^[26-29]红花花冠全长转录组数据库筛选得到目的基因序列。在其 5'端、3'端分别设计特异性引物。按照 2× Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)高保真酶(南京诺唯赞公司,中国)说明书进行 PCR 扩增,扩增片段经 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒(北京全式金公司,中国)说明书操作回收后,连接于 pEASY-Blunt Zero Cloning Kit(北京全式金公司,中国)载体上,转化至大肠杆菌 T1 感受态细胞(北京全式金公司,中国)后,涂布在 LBA 平板上,恒温培养 37 °C 过夜,挑取阳性单克隆菌落^[30-31],送至上海生工生物有限公司进行菌液测序。

用 ExPASyProtParam 工具(<http://web.expasy.org/compute/>)对目的基因的理论等电点(pI),蛋白分子量(MW)和蛋白分子式进行预测。通过 Simple Molecule Architecture Research Tool 工具(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对目的基因编码的蛋白质结构功能域进行分析。使用 ProtScale(<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)以及 TMHMM(

www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)对蛋白质的亲/疏水性和跨膜区域做出预测。使用 SignalP 4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测目的蛋白是否含有信号肽。使用 NCBI BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对筛选出的 SDRs 基因进行 BLAST 序列比对。通过 Neighbor-Joining 相邻节点法构建系统发育进化树,自展分析法进行 1000 次重复^[32-34]。使用 PBILYON-GRLAND 数据库预测构建蛋白质二级结构模型。蛋白三级结构由 Protein Homology/analogy Recognition Engine 预测。用 WOLFPSORT 软件(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位预测。

1.5 目的基因表达模式分析

取盛花期新鲜红花根、茎、叶、花冠 4 个部位的新鲜组织和花期 I (开花前 3 d)、花期 II (开花当天)、花期 III (开花后 1 d)、花期 IV (开花后 3 d) 4 个花期的新鲜花冠,提取总 RNA,合成 cDNA 第一链后,在靠近 5'端处对各个基因设计引物,依据 Transtart Top Green qPCR super Mix(北京全式金公司,中国)试剂盒推荐体系,以 *Ct60s*(KJ634810)作为内参标记基因,进行 qRT-PCR 实验,结果使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行计算分析^[35]。

1.6 植物表达载体构建及红花体内功能初步验证

根据 *CtSDR3* 的开放阅读框和植物真核表达载体 pMT-39 序列信息,设计无缝克隆引物。以红花 cDNA 做模板,使用高保真酶进行 PCR 反应。产物经胶回收后依无缝克隆试剂盒说明书与经 NcoI 酶切线性化的 pMT-39 载体进行重组连接。重组载体转化大肠杆菌 T1 感受态细胞,挑取阳性克隆菌株扩大培养后抽提质粒,提取的 pMT39-*CtSDR3* 质粒用冷冻法转至农杆菌 GV3101 中。LBK+Rif 平板筛选阳性克隆后,取 1 ml OD600 = 0.8 的菌液经 6 000 r/min,离心 3 min 后用 1 ml 5% 蔗糖溶液重悬,加入 Silwet-L 1 μ l,用注射器注射于红花花柱,套袋避光^[35]。

在 pMT-39 的 35 s 启动子区域设计 5'端特异性引物,在目的基因 *CtSDR3* 中设计 3'端引物。取 T₂ 代新鲜叶 cDNA 第一链作为模板,2 \times Easy Taq PCR Mix(北京全式金,中国)推荐体系进行 PCR 反应,确定是否存在目的条带。采集 *CtSDR3* 阳性植株花冠以及 pMT-39 空载体对照植株的花冠,按照上述的 qRT-PCR 反应体系评价 *CtSDR3* 基因的过表达水平,使用 UPLC-Q-TOF/MS 检测 *CtSDR3* 过表达组和空载体对照组的黄酮代谢物含量,选择以 HSYA 为代表性成分的 8 个黄酮类化合物作为

检测对象。

1.7 原核表达载体构建及蛋白表达

根据 *CtSDR3* 的开放阅读框及蛋白表达载体 pGEX-6p-1 以及 pET-28a 序列信息,设计同源重组克隆引物^[34]。以红花花冠 cDNA 为模板,使用高保真酶进行 PCR 反应。PCR 产物经胶回收后依无缝克隆试剂盒说明书与经 XhoI、BamHI 酶切线性化的载体 pGEX-6p-1 以及 pET-28a 进行重组连接。重组载体转化大肠杆菌 T1 感受态细胞,挑取阳性菌株克隆扩大培养后抽提质粒,提取的重组质粒用热激法转至大肠杆菌 Rosseta(DE3)(上海唯地生物,中国)中。

在 20 ml LBA 液体培养基中培养至 OD600 为 0.6 左右,分 2 份 10 ml 菌液各加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 和生理盐水。恒温培养箱中 16 $^{\circ}$ C, 100 r/min 继续培养 16 h^[35-36]。菌液离心弃上清液,用 1 \times PBS 缓冲液洗涤两次后重悬。超声破碎仪中 40 kW,工作时间 5 s,循环间隔时间 25 s,共 15 个循环进行破碎^[16],裂解完成后取上清与沉淀 15 μ l,上样检测。

2 结果

2.1 基因筛选

通过分析,得到 contig325、contig483、contig2863 共 3 个与 HSYA 具有强相关性的基因($r>0.85$),见图 1。

2.2 全长克隆和生物信息学分析

3 个目的基因序列信息经测序验证结果如下: contig325 全长共 1 523 bp,开放阅读框 1341bp,编码 446 个氨基酸; contig483 全长 1 393 bp,开放阅读框 792 bp,编码 263 个氨基酸; contig2863 全长序列 1 527 bp,开放阅读框 1 023 bp,编码 340 个氨基酸。PCR 产物电泳结果如图 2 所示。

contig325 基因编码 446 个氨基酸,命名为 *CtSDR1*(GenBank 登录号: MW792035); Contig483 基因编码 263 个氨基酸,命名为 *CtSDR2*(GenBank 登录号: MW792036); Contig2863 基因编码 339 个氨基酸,命名为 *CtSDR3*(GenBank 登录号: MW792037)。系统进化树表明 *CtSDR1* 与蓟 *Cirsium japonicum* (Q QH14901.1) 同源性最高; *CtSDR2* 与小蓬草 *Erigeron canadensis* (XP_043636506.1) 同源性最高; *CtSDR3* 与小豆蔻 *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (KVI09 206.1) 同源性最高。Prot-param 分析 *CtSDR1* 基因所编码的蛋白质分子式 C₂₂₃₀H₃₃₄₆N₆₀₆O₆₃₉S₇, 相对分子量为 49.2 $\times 10^3$,理论等电点 pI=9.61; *CtSDR2*

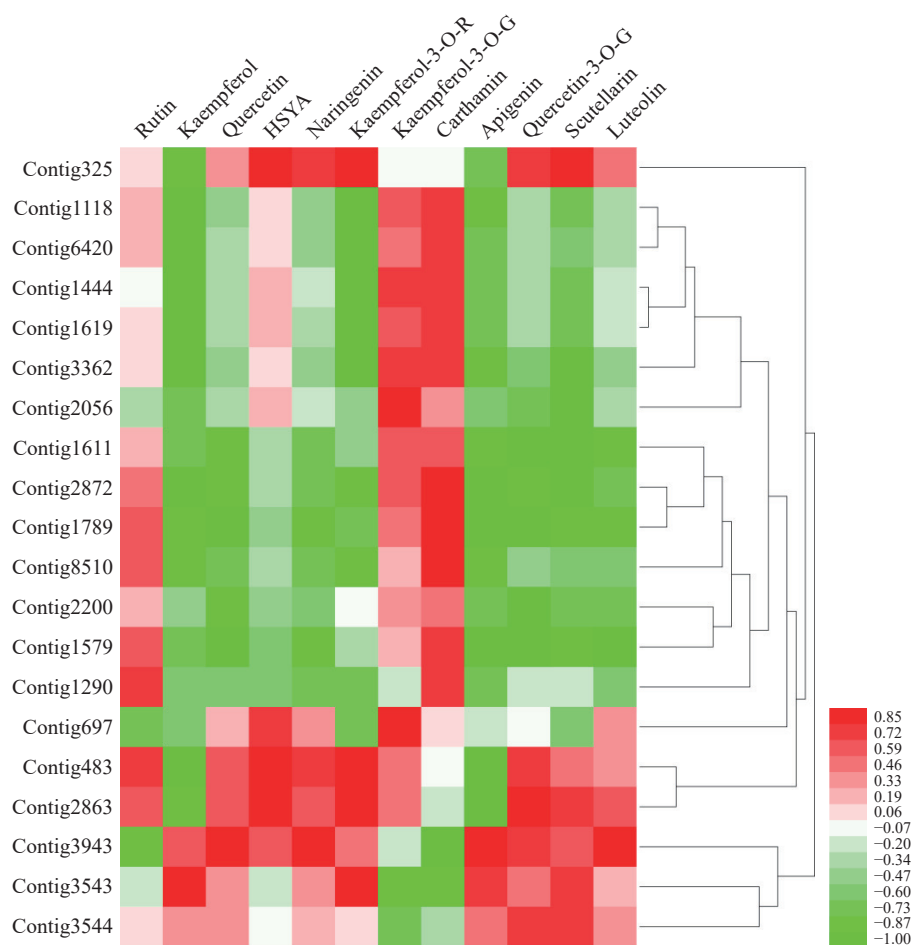


图1 不同花期红花还原酶基因表达量与黄酮类化合物积累量相关性分析热图

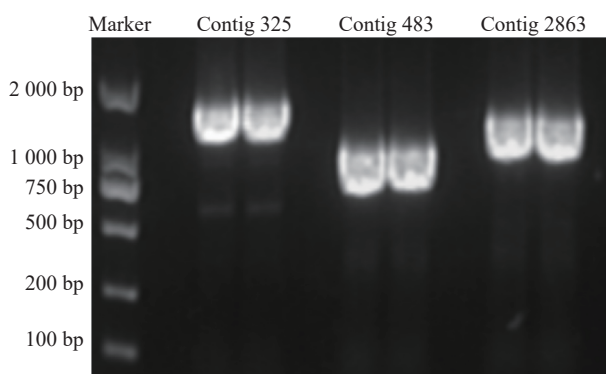


图2 PCR产物电泳图

基因所编码的蛋白质分子式 $C_{1289}H_{2072}N_{360}O_{379}S_{13}$, 相对分子量为 29×10^3 , 理论等电点 $pI=8.63$; *CtSDR1* 基因所编码的蛋白质分子式 $C_{1691}H_{2614}N_{442}O_{481}S_9$, 相对分子量为 37.1×10^3 , 理论等电点 $pI=6.80$ 。Prot Scale 分析预测 *CtSDR1*、*CtSDR2* 和 *CtSDR3* 蛋白为亲水性蛋白, 无信号肽属非分泌蛋白。蛋白跨膜性分析显示 *CtSDR1*、*CtSDR2* 和 *CtSDR3* 不含有跨膜区域, 为非跨膜蛋白。对 *CtSDR1*、*CtSDR2* 和 *CtSDR3* 蛋白二级结构的预测显示均属于不规则结构。对 *CtSDR1*、*CtSDR2*、*CtSDR3* 蛋白质三维结构预测

如图3所示。系统进化树如图4所示。亚细胞定位预测显示, *CtSDR1*、*CtSDR2*、*CtSDR3* 均可能定位于细胞质。

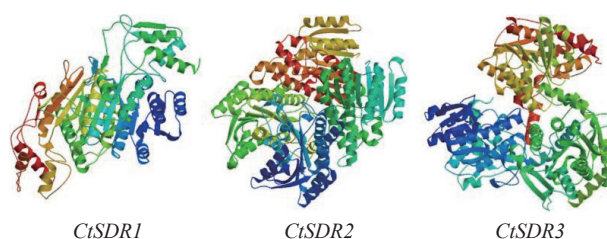


图3 *CtSDR1*、*CtSDR2*、*CtSDR3* 蛋白三级结构预测

2.3 目的基因表达模式分析

取红花花期的IV期的红花各个部位进行分析, 发现红花花冠内的 *CtSDR1*、*CtSDR2*、*CtSDR3* 基因表达量从高到低依次均为花冠>叶>茎>根。其中 *CtSDR1* 在花冠中的相对表达量约为根中的3倍, 而 *CtSDR2*、*CtSDR3* 在花冠中的相对表达量约为根中的4倍。将4个花期的红花花冠进行qRT-PCR分析表明, *CtSDR1*、*CtSDR2*、*CtSDR3* 花冠中表达量均随着花冠发育逐渐升高, 特别是 *CtSDR1*、*CtSDR2*、*CtSDR3* 的IV期花冠对比III期花

冠的表达量分别提高了 7.2 倍、2.7 倍、2.3 倍(图 5)。2.4 *CtSDR3* 植物表达载体构建及红花体内功能初步验证

构建真和表达载体并通过 PCR 鉴定后,我们从 19 株农杆菌浸染的子代植株中得到 5 株 pMT39-*CtSDR3* 阳性红花植株(图 6)。通过 qPCR 对其 *CtSDR3* 基因转录水平进行测定,结果发现阳性红

花植株中 *CtSDR3* 基因的转录水平得到显著增加,约为空白组株系的 2~3 倍,*CtSDR3* 的在花冠部位的高表达也证明了研究成功获取 *CtSDR3* 过表达红花植株(图 7)。通过 UPLC-QTOF/MS 技术测定阳性转基因红花株系组和空白对照组的目标化合物含量,包括 7 个红花花冠主要黄酮类化合物及苯丙烷类代谢途径上游关键物质苯丙氨酸(图 8),分

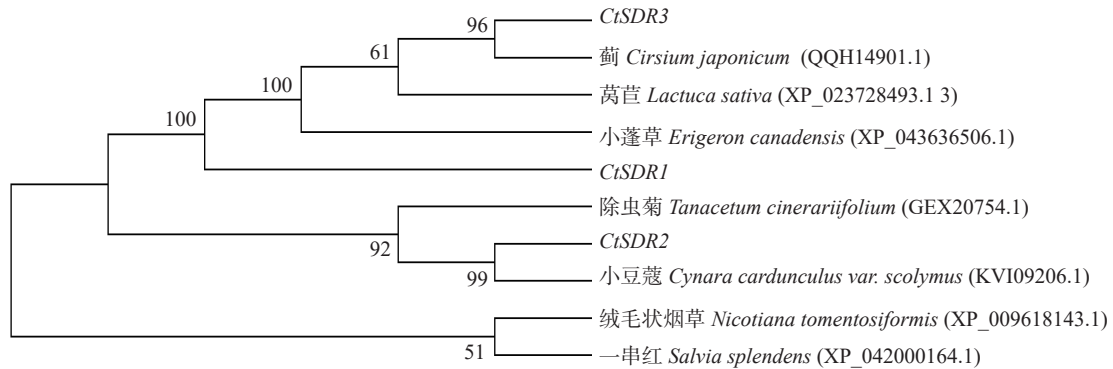


图 4 *CtSDR* 系统发育进化树

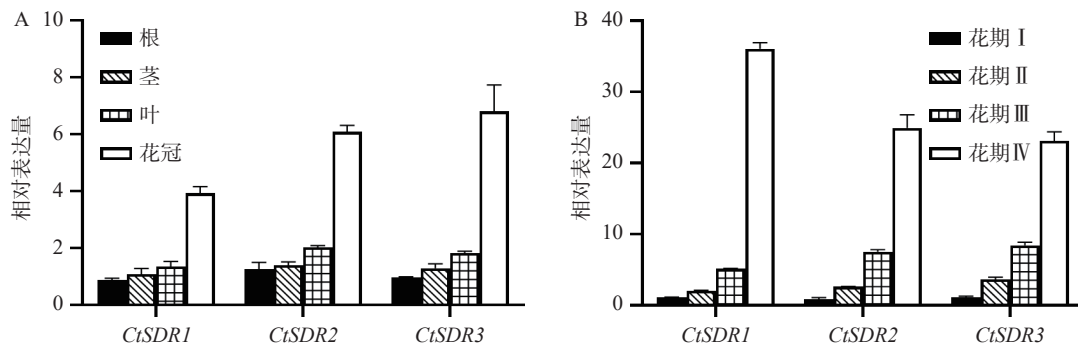


图 5 目的基因在不同部位(A)和不同花期(B)的表达水平

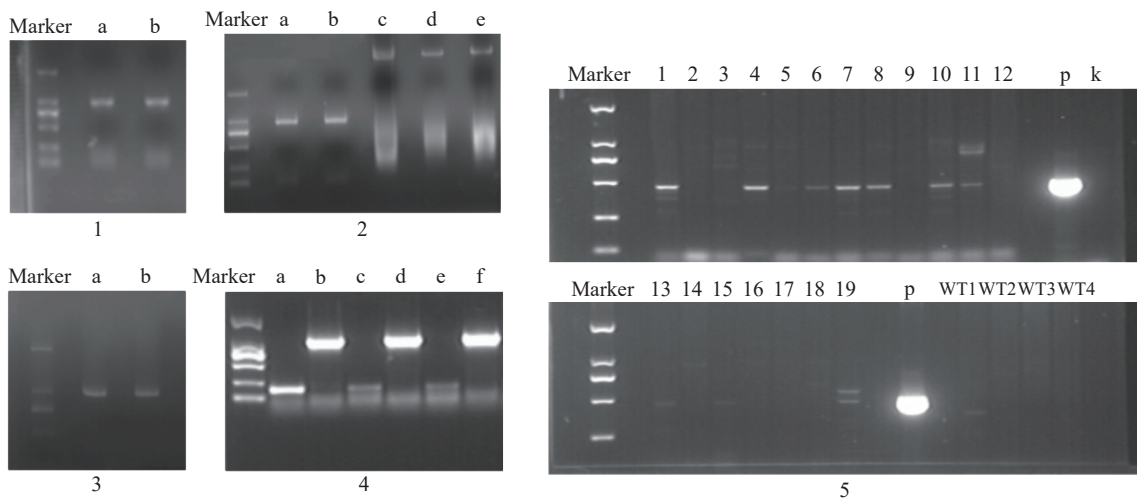


图 6 真核表达载体构建及阳性鉴定电泳图

注: 1. *CtSDR3* 基因开放阅读框(ORF)区扩增产物电泳图, a、b 泳道均为 *CtSDR3* 基因 ORF 区克隆 PCR 产物; 2. 真核表达载体 pMT-39 载体酶切产物电泳图, a、b 泳道为 *CtSDR3* PCR 产物, c 泳道为 pMT-39 载体, d、e 泳道为 pMT-39 线性化载体; 3. pMT39-*CtSDR3* 重组载体阳性转化子鉴定电泳图, a、b 泳道为阳性转化子菌液 PCR 产物; 4. pMT39-*CtSDR3* 质粒转化农杆菌 GV3101, a、c 和 e 泳道为空白对照组, b、d 和 f 泳道为阳性克隆菌液 PCR 产物; 5. 红花 pMT39-*CtSDR3* 阳性转化植株鉴定 PCR 产物电泳图, 1~19 为待鉴定植株, p 为 pMT39-*CtSDR3* 质粒, k 为空白组, WT 为野生型红花植株

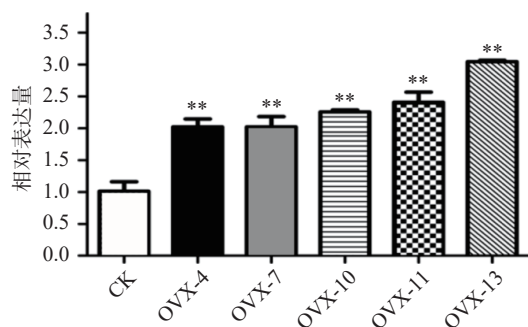


图7 过表达植株 *CtSDR3* 的相对表达量
** $P < 0.01$, 与 CK 组比较

别为: 野黄芩素 (scutellarein)、Carthamin、HSYA、山柰酚 (kaempferol)、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷 (kaempferol-3-*O*- β -D-glucoside)、山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷 (kaempferol-3-*O*- β -rutinoside)、芦丁 (rutin) 和苯丙氨酸 (D-Phenylalanine)。由图8可知, 与空白组相比, *CtSDR3* 过表达株系相较于空白组野黄芩素提高了 3.6%~9.8%, HSYA 提高了 7.1%~16.6%, 以及苯丙氨酸含量提高了 5.5%~15.7%, 具有显著性升高。其他化合物含量则有无显著性变化趋势。通过对过表达株系与空白组的含量分析, 我们认为 *CtSDR3* 基因过表达会引起红花中黄酮类物质的变化, 尤其是 HSYA 含量升高显著。同时, 苯丙氨酸代谢途径属于植物重要的次生代谢途径, 过表达组引起苯丙氨酸含量的显著上升, 上述指标性成分的变化也进一步说明 *CtSDR3* 对红花黄酮类

化合物次生代谢途径具有一定的影响, 但目前我们尚难以判断 *CtSDR3* 红花中影响次生代谢产物积累明确途径。

2.5 原核表达载体构建及蛋白表达

目的片段成功扩增, 将目的条带进行胶回收、纯化。*CtSDR1*、*CtSDR2*、*CtSDR3* 构建的 pGEX-6p-1、pET-28a 原核表达载体均有在大肠杆菌内表达, 但是 *CtSDR1*-pGEX-6p-1、*CtSDR2*-pGEX-6p-1、*CtSDR3*-pGEX-6p-1、*CtSDR1*-pET-28、*CtSDR2*-pET-28a、*CtSDR3*-pET-28a 表达的蛋白均形成包涵体, 存在于沉淀中。无法进行下一步大量纯化实验, 唯有 *CtSDR2*-pGEX-6p-1 诱导表达了存在于上清液的蛋白, 明显可以在上清液中观察到分子量约为 50 000 的蛋白条带 (图9)。

3 讨论

越来越多的红花药理学相关研究表明, 红花的主要药效物质包括查尔酮类、黄酮醇类等多种黄酮类化合物, 其中, 查尔酮类 HSYA 对脑缺血具有保护作用, 并且还能抗脑血栓形成以及抗氧化等。研究 HSYA 的生物合成途径, 对于 HSYA 的工业化生产具有重要意义。

本研究借助生物学分子技术、结合代谢组分析测定, 筛选出 3 个参与 HSYA 生物合成途径的关键短链脱氢还原酶基因 *CtSDR1*、*CtSDR2* 和 *CtSDR3*, 这 3 个基因序列具有高度保守性, 在不同器官的表

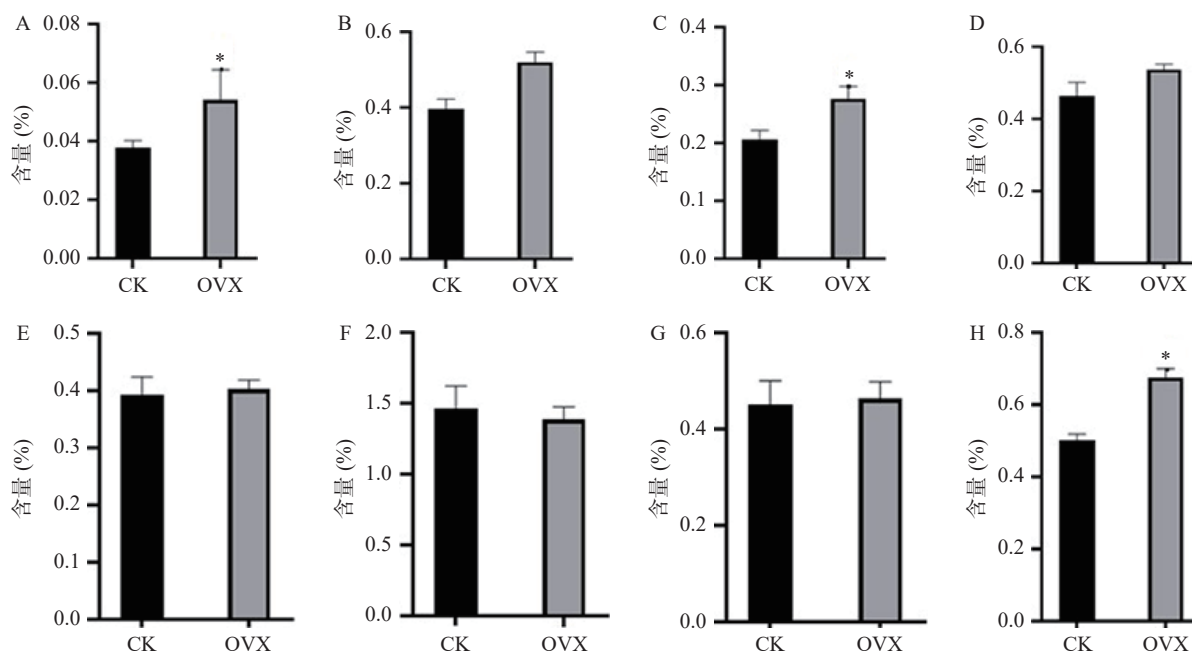


图8 阳性植株黄酮类化合物含量测定

注: A. 黄芩素; B. Carthamin; C. HSYA; D. 山柰酚; E. 山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷; F. 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; G. 芦丁; H. 苯丙氨酸; CK. 空白组株系; OVX. 阳性过表达株系

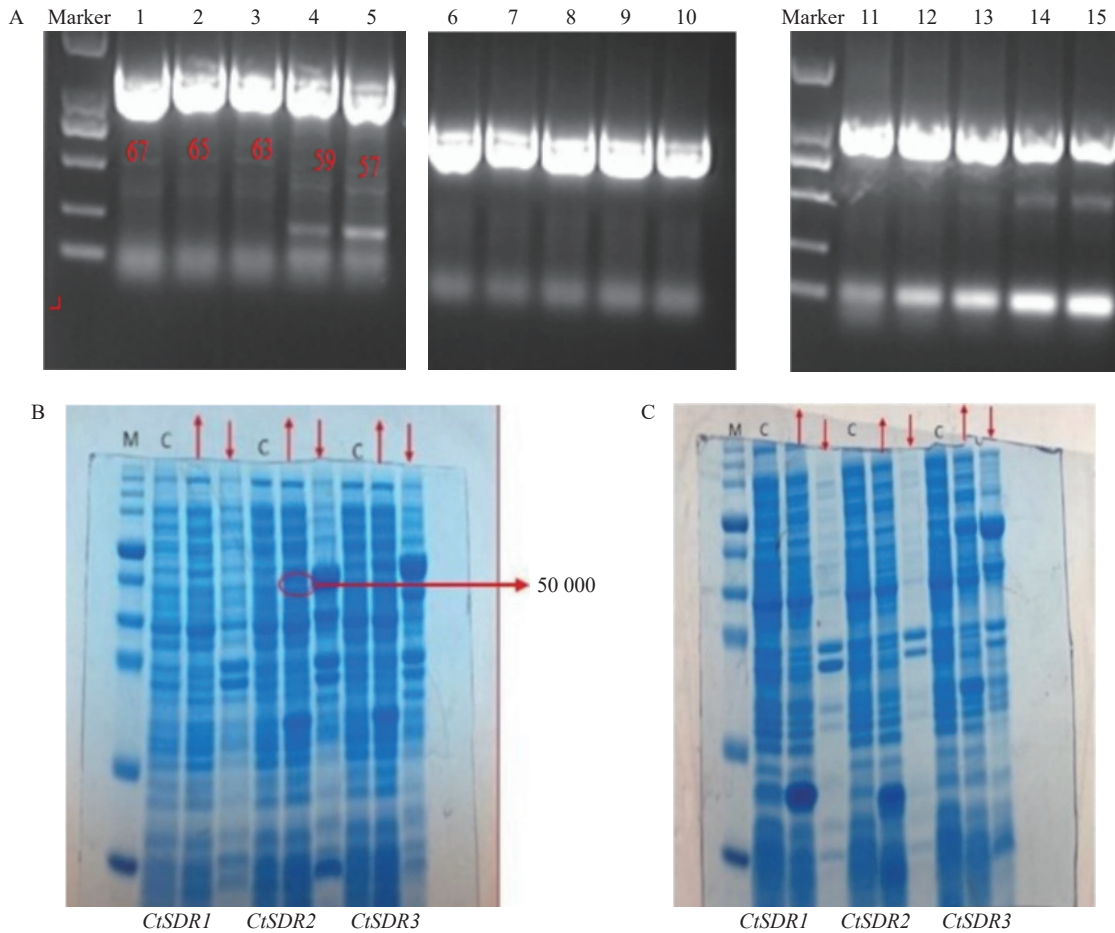


图9 目的片段 PCR 产物电泳及表达蛋白电泳分析

注: A.目的片段 PCR 产物电泳; 1~5 为 *CtSDR1*, 6~10 为 *CtSDR2*, 11~15 为 *CtSDR3*(其对应的 PCR 反应 T_m 值分别为 67 °C、65 °C、63 °C、59 °C、57 °C); B.pGEX-6p-1 蛋白表达电泳分析; C.pET-28a 蛋白表达电泳分析

达模式均呈现出花冠>叶>茎>根的特点,而且在花冠中的表达量随花冠发育逐渐升高,表明其很有可能参与红花中 HSYA 等主要药用成分的积累。进一步研究发现,转 *CtSDR3* 过表达 T_2 代阳性植株花冠中 *CtSDR3* 基因的转录水平增加了 2~3 倍,次生代谢物 HSYA 的含量提高了 7.1%~16.6% ($P<0.05$),验证了我们对 *CtSDR3* 在红花体内参与黄酮类化合物生物合成功能的推测。本研究中,体外表达 *CtSDR3* 蛋白,得到目的蛋白条带,但由于包涵体等原因,蛋白表达和纯化条件仍需要进一步摸索。下一步,我们将对可能起黄酮类生物合成途径的关键 SDRs 进行深入的生物学特性特别是酶结合位点的研究,为更好地阐释 SDRs 的生物学功能、利用分子生物育种技术培育高 HSYA 含量的红花新品种奠定基础。

【参考文献】

- [1] 郭美丽,张汉明,张美玉.红花本草考证[J].中药材,1996(4): 202.
- [2] TU Y H, XUE Y R, GUO D D, et al. *Carthami Flos*: a review of its ethnopharmacology, pharmacology and clinical applications[J]. *REV BRAS FARMACOGN*, 2015, 25(5): 553-566.
- [3] WANG Y Q, ZHANG S S, NI H L, et al. Autophagy is involved in the neuroprotective effect of nicotiflorin[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 278: 114279.
- [4] 贾鑫磊,何贝轩,郭丹丹,等.红花花冠伸长相关基因 *CtXTH1* 的特征与功能研究[J].药学报,2019, 54(6): 1132-1140.
- [5] 张戈.红花的化学成分及品质评价[D].上海:第二军医大学,2001.
- [6] 张戈,郭美丽,张汉明,等.不同种质红花药材的高效液相色谱法指纹图谱研究[J].第二军医大学学报,2006, 27(3): 280-283.
- [7] 丁丽丽,段陈平,李芳,等.红花不同采收期及不同部位中羟基红花黄色素A及山奈素的含量变化[J].沈阳药科大学学报,2015, 32(1): 65-69.
- [8] 杨捷威,吴婷婷,郭美丽.红花组织培养的研究进展[J].药学服务与研究,2012, 12(1): 58-62.
- [9] HUANG L L, YANG X, SUN P, et al. The first Illumina-based de novo transcriptome sequencing and analysis of safflower flowers[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38653.

- [10] COSGROVE D J. New genes and new biological roles for expansins[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(1): 73-78.
- [11] CHENG H, LI L L, XU F, et al. Expression patterns of an isoflavone reductase-like gene and its possible roles in secondary metabolism in *Ginkgo biloba*[J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(5): 637-650.
- [12] MIN T, KASAHARA H, BEDGAR D L, et al. Crystal structures of pinoresinol-lariciresinol and phenylcoumaran benzylic ether reductases and their relationship to isoflavone reductases[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(50): 50714-50723.
- [13] 崔扬, 冯彦辉, 陈众峰, 等. 玉米短链脱氢酶基因IDP2557的克隆及其抗旱功能鉴定[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(22): 7300-7305.
- [14] 王化冰. 黄瓜短链脱氢酶SDR110C家族的生物信息学分析及CsSDR110C14的遗传转化[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [15] BRAY J E, MARSDEN B D, OPPERMANN U. The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: a bioinformatics summary[J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 178(1-3): 99-109.
- [16] JÖRNVALL H, HEDLUND J, BERGMAN T, et al. Superfamilies SDR and MDR: from early ancestry to present forms. Emergence of three lines, a Zn-metalloenzyme, and distinct variabilities[J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2010, 396(1): 125-130.
- [17] KALLBERG Y, OPPERMANN U, PERSSON B. Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models[J]. *FEBS Journal*, 2010, 277(10): 2375-2386.
- [18] OPPERMANN U, FILLING C, HULT M, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2003, 143-144: 247-253.
- [19] WU Y, WANG Y, MI X F, et al. The QTL GNP₁ encodes GA20ox1, which increases grain number and yield by increasing cytokinin activity in rice panicle meristems[J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(10): e1006386.
- [20] GUO T, CHEN K, DONG N Q, et al. GRAIN SIZE AND NUMBER1 negatively regulates the OsMKKK10-OsMCK₄-OsMPK₆ cascade to coordinate the trade-off between grain number per panicle and grain size in rice[J]. *Plant Cell*, 2018, 30(4): 871-888.
- [21] 靳甜甜. 植物次生代谢途径中黄酮类化合物的生物合成研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
- [22] LEE J, BURNS T H, LIGHT G, et al. Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase genes in cotton and their role in fiber elongation[J]. *Planta*, 2010, 232(5): 1191-1205.
- [23] SHAO M Y, WANG X D, NI M, et al. Regulation of cotton fiber elongation by xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase genes[J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(4): 3771-3782.
- [24] 谭政委, 鲁丹丹, 李磊, 等. 红花二氢黄酮醇4-还原酶基因*CtD-FRI*的克隆与分析[J]. *分子植物育种*, 2021: 1-12.
- [25] XU F, DENG G, CHENG S, et al. Molecular cloning, characterization and expression of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Juglans regia*[J]. *Molecules*, 2012, 17(7): 7810-7823.
- [26] SHOJI T, WINZ R, IWASE T, et al. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco[J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 50(3): 427-440.
- [27] 朱惠, 杨丽涛, 李杨瑞. 基于三代测序技术的转录组学研究[J]. *生物技术报*, 2014(11): 130-137.
- [28] PETIT P, GRANIER T, D'ESTAINTOT B L, et al. Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis[J]. *J Mol Biol*, 2007, 368(5): 1345-1357.
- [29] O'REILLY C, SHEPHERD N S, PEREIRA A, et al. Molecular cloning of the a1 locus of *Zea mays* using the transposable elements En and Mu1[J]. *EMBO J*, 1985, 4(4): 877-882.
- [30] 郝爱平. 植物二氢黄酮醇4-还原酶的生物信息学分析[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(6): 30-34.
- [31] ISHIDA T, HATTORI S, SANO R, et al. *Arabidopsis* transparent testa glabra2 is directly regulated by r2r3 myb transcription factors and is involved in regulation of glabra2 transcription in epidermal differentiation[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(8): 2531-2543.
- [32] ZHANG F, GONZALEZ A, ZHAO M Z, et al. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2003, 130(20): 4859-4869.
- [33] 郭丹丹. 红花黄酮类成分生物合成途径关键基因的特征和功能研究[D]. 上海: 海军军医大学, 2019.
- [34] GRÄFF M, BUCHHOLZ P C F, STOCKINGER P, et al. The Short-chain Dehydrogenase/Reductase Engineering Database (SDRED): a classification and analysis system for a highly diverse enzyme family[J]. *Proteins*, 2019, 87(6): 443-451.
- [35] STAVRINIDES A K, TATSIS E C, DANG T T, et al. Discovery of a short-chain dehydrogenase from *Catharanthus roseus* that produces a new monoterpene indole alkaloid[J]. *Chembiochem*, 2018, 19(9): 940-948.
- [36] ZHOU Y, ZHANG L, GUI J D, et al. Molecular cloning and characterization of a short-chain dehydrogenase showing activity with volatile compounds isolated from *Camellia sinensis*[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015, 33(2): 253-263.

[收稿日期] 2022-01-17 [修回日期] 2022-04-08

[本文编辑] 李睿旻