

## 本氏烟草中异源合成抗癌药物葫芦素前体

郭兆宽<sup>1,2,3</sup>, 王益娜<sup>1,2,3</sup>, 李志远<sup>1,2,3</sup>, 冯孝林<sup>1,2,3</sup>, 陈庚<sup>1,2,3</sup>, 舒彦宇<sup>1,2,3</sup>,  
张广辉<sup>2,3</sup>, 郝冰<sup>2,3</sup>, 杨生超<sup>2,3\*</sup>

1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201; 2. 云南农业大学西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 云南昆明 650201; 3. 云南特色植物提取实验室, 云南昆明, 650106

**摘要:** 葫芦素具有显著的抗癌活性, 解析其生物合成途径对异源生产葫芦素具有重要意义。葫芦素首先由葫芦二烯醇 (Cuol) 在氧化鲨烯环化酶 (OSCs) 家族的葫芦二烯醇合酶 (CBS) 催化下生成 2,3-氧化鲨烯, 后者在细胞色素 P450 (CYP) 等酶催化下氧化修饰产生葫芦素系列化合物。本研究在建立高效的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的瞬时表达体系的基础上, 将雪胆 (*Hemsleya chinensis* Cogn.) CBS 基因 (*HcOSC6*) 与截短的燕麦 (*Avena strigosa*) 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶基因 (*tHMGR*) 共表达, 通过不断优化烟草共表达体系, 将本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 叶片中的 Cuol 产量从 2.832 mg/g (干重) 提高到 9.48 mg/g (干重)。同时, 将雪胆的 *HcCYP87D20* 共渗入烟草叶片, 获得葫芦素生物合成的重要中间体 11-羰基-20 $\beta$ -羟基-葫芦二烯醇。本研究结果将为葫芦素的高效异源合成提供理论依据。

**关键词:** 葫芦素; 瞬时表达; 雪胆; 本氏烟草

中图分类号: R914 文献标识码: A

## Heterologous Synthesis the Precursors of Anticancer Drug Cucurbitacins in *Nicotiana benthamiana*

GUO Zhaokuan<sup>1,2,3</sup>, WANG Yina<sup>1,2,3</sup>, LI Zhiyuan<sup>1,2,3</sup>, FENG Xiaolin<sup>1,2,3</sup>, CHEN Geng<sup>1,2,3</sup>, SHU Yanyu<sup>1,2,3</sup>,  
ZHANG Guanghui<sup>2,3</sup>, HAO Bing<sup>2,3</sup>, YANG Shengchao<sup>2,3\*</sup>

1. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 2. National and Local Joint Engineering Research Center for Germplasm Innovation and Utilization of Southwest Chinese Medicinal Materials, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 3. Yunnan Characteristic Plant Extraction Laboratory, Kunming, Yunnan 650106, China

**Abstract:** The elucidation of cucurbitacin biosynthesis pathway is essential for heterologous production due to its significant anticancer activity. The biosynthesis of cucurbitacin starts from cucurbitadienol (Cuol) catalyzed by cucurbitadienol synthase (CBS) of the oxysqualene cyclase (OSCs) family to form 2,3-oxysqualene which subsequently catalyzed by cytochrome P450 (CYP) and other enzymes for oxidative modification to produce various cucurbitacins. In this study, an efficient transient expression system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was established. The CBS gene (*HcOSC6*) from *Hemsleya chinensis* and truncated 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase gene (*tHMGR*) from *Avena strigosa* were continuously optimized in the tobacco co-expression system to increase Cuol yield from 2.832 mg/g (DW) to 9.48 mg/g (DW) in *Nicotiana benthamiana* leaves. Meanwhile, *HcCYP87D20* of *H. chinensis* was also co-infiltrated into tobacco leaves to obtain 11-carbonyl-20 $\beta$ -hydroxy-cucurbitol. This study would provide a theoretical basis for efficient heterologous production of cucurbitacin.

**Keywords:** cucurbitacin; transient expression; *Hemsleya chinensis* Cogn; *Nicotiana benthamiana*

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.01.020

收稿日期 2022-04-02; 修回日期 2022-06-20

基金项目 云南省科技计划项目 (No. H2801)。

作者简介 郭兆宽 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 合成生物学。\*通信作者 (Corresponding author): 杨生超 (YANG Shengchao), E-mail: 13099437499@163.com。

葫芦素 (cucurbitacins) 是一类以葫芦烷为骨架的四环三萜类化合物，主要存在于葫芦科植物中<sup>[1]</sup>，具有显著的抗癌活性<sup>[2-5]</sup>。葫芦科植物罗汉果 (*Siraitia grosvenori*) 中的一些葫芦烷糖苷 (罗汉果苷) 有很强的甜味，是糖尿病患者的潜在糖类替代品<sup>[6]</sup>。解析葫芦素和葫芦烷糖苷的生物合成途径，对于瓜类作物育种、葫芦素单体和罗汉果苷的生物合成具有重要意义。

葫芦素与绝大多数植物三萜类化合物相似，植物体内的三萜化合物骨架的生物合成始于甲羟戊酸途径，代谢途径是以乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 为起始原料合成异戊二烯焦磷酸 (IPP) 和二甲烯丙基焦磷酸 (DMAPP)。这类代谢产物在一系列催化酶的催化作用下形成 2,3-氧化角鲨烯 (2,3-oxidosqualene)，即四环三萜化合物的前体物质 (图 1)。通常情况下大多数四环三萜化合物的基本碳骨架都由一类氧化鲨烯环化酶催化 2,3-氧化角鲨烯的船式或椅式构象形成<sup>[7]</sup>。研究表

明，葫芦素生物合成起始于 2,3-氧化鲨烯环化形成的葫芦二烯醇 (Cuol)，是由氧化鲨烯环化酶 (OSCs) 家族的葫芦二烯醇合酶 (CBS) 催化<sup>[8-10]</sup>。在大多数情况下，OSC 催化形成的四环三萜骨架在细胞色素 P450 的催化下，通过引入羟基、羧基进行特定部位的氧化修饰，从而衍生出更多的终产物和中间体。前人研究发现甜瓜中葫芦素 B 和西瓜中葫芦素 E 的多功能 CYP87D20 连续不断地催化 Cuol 的 C11 氧化和 C20 位羟化，形成 11-羰基-20β-羟基-Cuol (11-carbonyl-20β-hydroxy-Cuol)，接下来 CYP81Q59 催化其 C2 位的 β 羟化，形成 11-羰基-2,20β-二羟基-Cuol<sup>[8-9]</sup> (11-carbonyl-2,20β-dihydroxy-Cuol) (图 1)。

雪胆中的雪胆素 (包括葫芦素 IIa 和葫芦素 IIb) 属于典型的葫芦素 F (cucubitin F)，其葫芦烷型骨架的 C3-羟基为 α 型 (图 2)<sup>[10]</sup>，这是葫芦素 F 的典型结构特点之一。同时葫芦素 F 与其他葫芦素结构中有许多相同修饰基团，比如葫

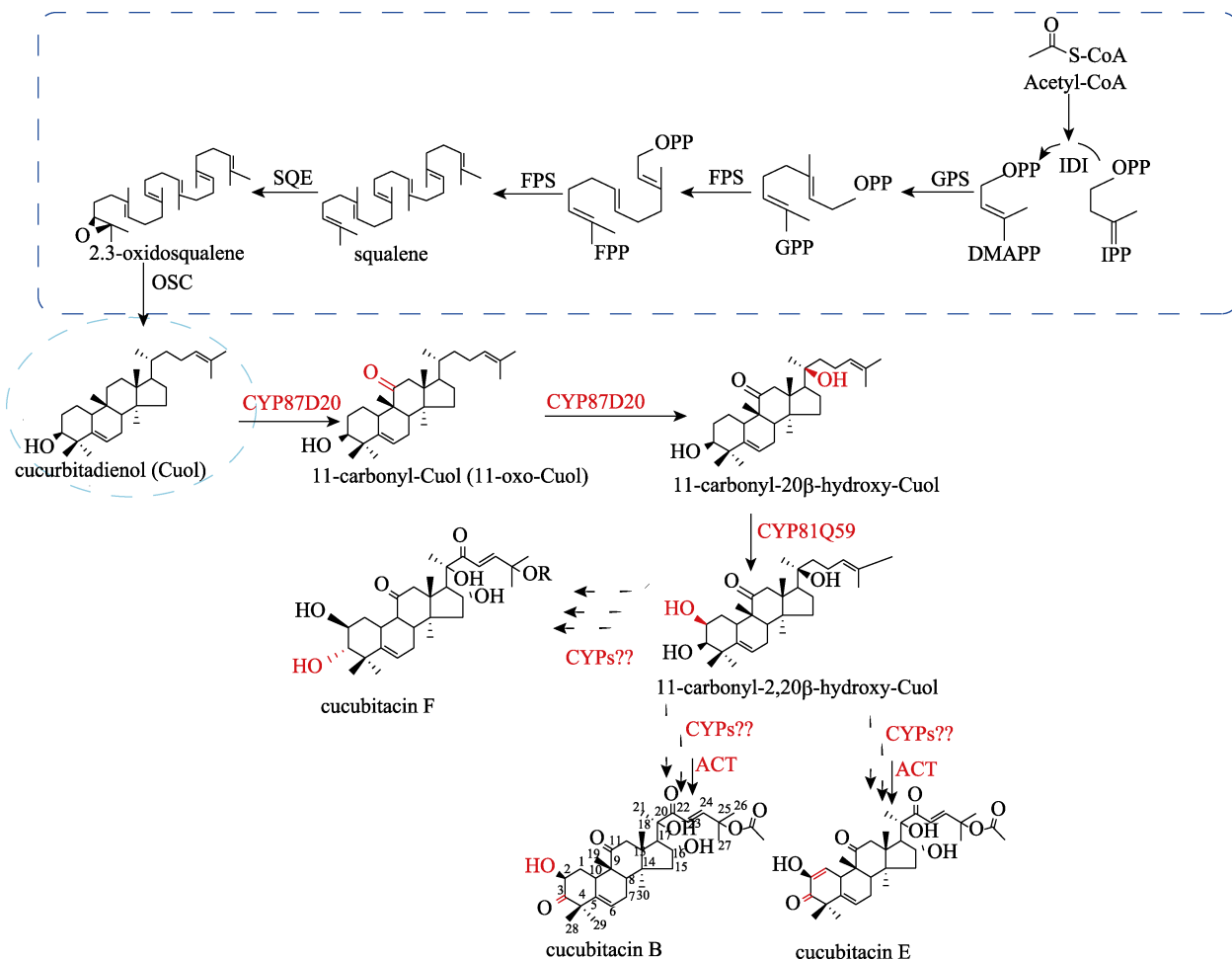
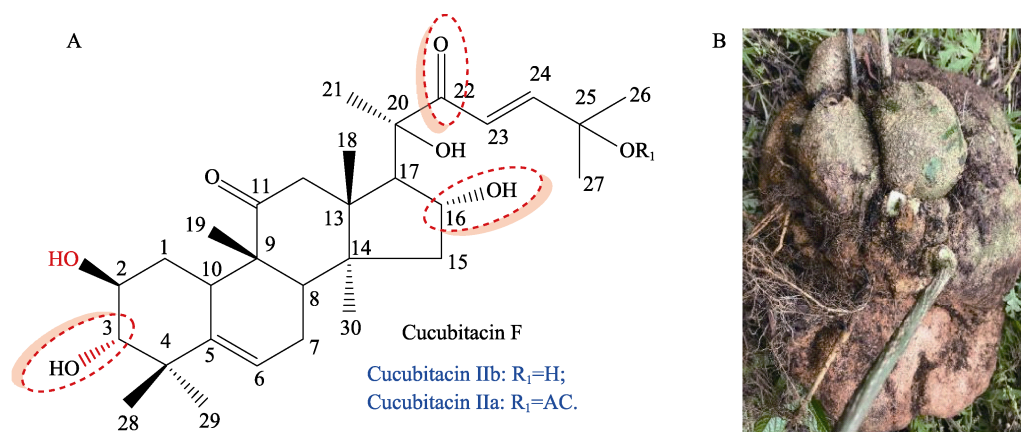


图 1 葫芦素中间体的生物合成路径  
Fig. 1 Biosynthetic pathway of cucurbitacin intermediates



Cucurbitacin IIb 为雪胆甲素, Cucurbitacin IIa 为雪胆乙素。  
Cucurbitacin IIb is *Hemsleya chinensis* Cogn. bilirubin A, Cucurbitacin IIa is *Hemsleya chinensis* Cogn. bilirubin B.

图 2 葫芦素 F 分子结构 (A) 和六年生雪胆块茎 (B)

Fig. 2 Molecular structure of cucurbitacin F (A) and six-year-old *Hemsleya chinensis* Cogn. tuber (B)

芦素 B (cucurbitacin B) 和 E (cucurbitacin E) 的 C11 氧化, C20 位羟化以及 C2 位的  $\beta$  羟化与葫芦素 F 共性; 葫芦素 B、E 与 F 在 C25 位羟基化修饰后, 然后再酰基化, 还有 C22 的酮基化和 C16 的  $\alpha$ -羟基化。因此, 亟待解析雪胆葫芦素 B、E 和 F 生物合成途径过程以及挖掘其他 *CYP450* 基因, 推进葫芦素全合成尤为重要。

葫芦素这类化合物高度被氧化, 在植物中的含量较低同时其利用也受到限制, 提取纯化工艺复杂且耗时, 需投入大量的人力、物力等资源, 如前人曾从 375 kg 黄瓜叶片中分离到 480 mg 乙酰基葫芦素 C, 用于体外实验来研究葫芦素生物合成的关键酶基因功能, 巨大的材料投入和工作量令人望而生畏<sup>[11]</sup>。目前, 相关药物的开发中, 主要通过从植物中提取的方式来制备。要实现葫芦素的化学合成仍存在诸多挑战, 特别是葫芦素关键中间体化合物。随着合成生物学和代谢工程的发展, 为葫芦素中间体高效异源合成提供了新的契机, 农杆菌渗入法 (agro-infiltration) 即根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的瞬时表达是一种高效的生产植物三萜的合成生物平台<sup>[12-14]</sup>, 也是一种快速鉴定和发现三萜生物合成相关基因并验证功能的有效方法<sup>[15-18]</sup>。本研究尝试将前期鉴定的雪胆 (*Hemsleya chinensis* Cogn.) 的 CBS 同源基因 (*HcOSC6*) 和 *HcCYP87D20* 基因表达于本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 中, 获得葫芦素生物合成中间体 11-羰基-20 $\beta$ -羟基-葫芦二烯醇, 本研究结果将为葫芦素 B、E、F 的合成奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料和菌种 本氏烟草种子由本实验室保存。携带绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的质粒 pAN580 (pAN580-GFP) 购自武汉天问生物科技有限公司。瞬时表达载体 pEAQ-HT-DEST1 由东北林业大学薛哲勇教授惠赠。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌菌株 GV3101、EHA105 和 LAB4404 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。

1.1.2 仪器与试剂 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购自天根生化科技有限公司 (北京), Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase 购自 NEB 有限公司, EasyPure Quick Gel Extraction Kit, 2 $\times$ EasTaq PCR Mix 购自北京全式金生物技术股份有限公司, 2-(N-吗啡啉)乙磺酸 (MES)、卡那霉素 (Kan)、利福平 (Rif) 购自昆明傲雪商贸有限公司, Gateway entry clone (ALH328) 试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。

凝胶成像系统仪 (Protein Simple); 带有蓝色激发光的 LSM710 共聚焦激光显微镜 (Carl Zeiss, Inc., Jena, 德国); NanoReady 超微量紫外可见分光光度计, 安捷伦 1260 高效液相色谱仪, 真空渗透仪 (DGG-9000B 系列), 氮吹仪 (MD200-1A)。

### 1.2 方法

1.2.1 培养烟草 本氏烟草种子用 2% 次氯酸钠表面消毒后, 播种于 1/2MS 培养基上。待出芽后, 室温放置 1~2 d, 移栽到填充腐殖土的蔬菜育苗穴

盘上。置于人工气候室(25℃, 相对湿度 80%, 18 h 光照, 6 h 黑暗), 生长 5 周后用于农杆菌渗入。

**1.2.2 载体构建** 为快速判断外源基因是否在本氏烟草叶片中表达及细胞中的表达部位, 构建了携带 GFP 基因的 pEAQ-HT-DEST1-GFP 载体, 同时以 pAN580-GFP 载体<sup>[19]</sup>作为外源基因表达的亚细胞定位的阳性对照。利用引物 GFP-F 和 GFP-R, 从 pAN580-GFP 上扩增出 GFP 的编码序列并克隆雪胆的 *HcOSC6* 和 *HcCYP87D20* 基因。前人研究表明, 截短的 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶基因 (*tHMGR*) 与  $\beta$ -香树脂醇 (*SAD1*) 和 *CYP51H10* 共表达, 能够显著提高烟草瞬时表达系统的三萜产量<sup>[12]</sup>, 因此也克隆了糙伏毛燕麦 (*Avena strigosa*) *HMGR* 基因 (GenBank 登录号: KY284573) 截短的 417 个核苷酸的部分 (*tHMGR*)。

将扩增到的 *GFP*、*HcOSC6*、*HcCYP87D20* 和 *tHMGR* 基因切胶回收, 使用 Gateway entry clone 试剂盒 BP 克隆酶 II 混合物 (Invitrogen) 将胶回收产物克隆到 pDONR207 载体中。所构建体均在 Entry 载体中测序, 以验证克隆的完整性, 根据制造商的说明, 使用 LR 克隆酶 II 将相关的 Entry 载体中的基因克隆到 pEAQ-HT-DEST1 中。构建成功的 pEAQ-HT-DEST1-GFP、pEAQ-HT-DEST1-*HcOSC6*、pEAQ-HT-DEST1-*HcCYP87D20* 和 pEAQ-HT-DEST1-*tHMGR* 重组质粒以及载体 pAN580-*GFP* 通过冻融法转化到农杆菌感受态细胞里。

**1.2.3 本氏烟草的农杆菌渗入** 挑取构建好的工程菌单菌落在添加 LB (50 mg/mL Kan+ 50 mg/mL Rif) 液体培养基中, 28℃ 220 r/min 培养 24 h。从中吸取 200  $\mu$ L 加入含有上述新鲜培养基 50 mL 中, 继代培养至  $OD_{600}$  达 2.0 左右时以 5000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用含 10 mmol/L  $MgCl_2$ 、10 mmol/L MES 和 100  $\mu$ mol/L 乙酰丁香酮的缓冲液重悬菌体, 于 250 mL 配置成不同浓度菌液 ( $OD_{600}$  分别为 0.4、0.6、0.8、1.0), 放置在渗透槽中, 将整株烟草浸没在农杆菌液中, 在不同真空压力 (40、60、80、100 kPa), 以 5 周龄的烟草作为植物材料, 真空渗透时间为 3 min, 4 d 后采收烟草叶片, 取 100 mg 烟草叶片提取总 RNA, 反转录合成 cDNA, 并稀释至 200 ng/ $\mu$ L, 以此为模板进行半定量 PCR 以评价各因素对转化效率的影响。半定量 PCR 使用编码 GFP 基因上的特异引物 P-GFP-F 和 P-GFP-R, 使用延伸因子

1a (EF1a)<sup>[20]</sup>作为烟草内参基因, 使用 Image J 软件对核酸凝胶 GFP 目的条带进行灰度值分析。使用特异性引物见表 1。

表 1 本研究所用引物  
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
GFP-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAATGGTGAGCAAGGGCG
GFP-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AGACAGCTCGTCCATGCC
HcOSC6-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAATGTGGAAGTTAAAGA
HcOSC6-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ATCAGAATAAAGCGCCGATG
HcCYP87D20-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAATGTGGGCGGCGCC
HcCYP87D20-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ATCAATCATCTTAGGAGTGAAGTAAATAT
tHMGR-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAATGCCCGAGGAGGACG
tHMGR-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ATCAGCAGGCGATCTTGGACATGTCC
P-GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCG
P-GFP-R	GTACAGCTCGTCCATGCC
EF-F	CTGGTATTCTAAGGATGGACAGA
EF-R	AACCTTCTTGAGGTAGGAAGAAA

**1.2.4 烟草中的葫芦二烯醇的提取分析** 温室培养 4 d 后收获烟草叶片, 提取代谢物进行 GC-MS 分析。取 1.0 g 干燥叶片于液氮中冷冻后研磨成细粉, 用 5 mL 正己烷重复提取 3 次, 37℃ 下孵育 1 h, 之后超声提取 20 min。再用正己烷: 乙酸乙酯混合液 (4:1, V/V) 提取一次, 提取物短暂涡旋后以 5000 r/min 离心 10 min, 取 60  $\mu$ L 上清液到玻璃小瓶中, 用氮吹仪吹干浓缩。浓缩的提取物置于玻璃小瓶中, 加 40  $\mu$ L 三甲基甲硅烷基氧化物 (TMSCN) 衍生化。加入 TMSCN 后, 将样品转移到 MPS 的搅拌器中, 并在 40℃ 下孵育 40 min。衍生化后的干燥样品重悬于 200  $\mu$ L 萃取溶剂中, 即用 1 mL 正己烷重新溶解, 然后吸取每个样品 1  $\mu$ L 直接进样到 ISQ 型质谱联用的 GC 超气相色谱仪安捷伦中检测。以不分流模式 (脉冲压力 30 psi) 注入 1  $\mu$ L 样品 (进样口 250℃), 该程序涉及 2 min 的柱箱温度 170℃, 以 20℃/min 的速度升至 300℃。在 300℃ 下保持 11.5 min。溶剂延迟 8 min 后, 以扫描模式 (60~800 质量单位) 进行检测。使用 MassHunter 工作站 (Agilent) 软件进行数据分析。

**1.2.5 HPLC 检测方法** 测定定量葫芦二烯醇的含量, 在不同浓度下分别注入配好的葫芦二烯醇

标准品溶液, 采用 Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6 mm×250 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 流动相为 2% 纯水 (A), 98% 乙腈溶液 (B), 等度洗脱 0~26 min, 98% B; 检测波长为 200 nm, 进样体积 10 μL, 流速 0.8 mL/min, 柱温为 40℃。以 5 个浓度不同的对照品为横坐标, 所对应的峰面积为纵坐标绘制对照品标准曲线, 用于含量测定。

**1.2.6 UPLC-ESI-qTOF-MS 分析 11-羧基-20β-羟基-Cuol** 取 200 mg 烟草叶片于液氮中冷冻后研磨成细粉, 用 1 mL 乙酸乙酯重复提取 3 次, 37℃ 下孵育 1 h, 合并萃取液, 用氮吹仪浓缩干。浓缩物加入 200 μL 色谱甲醇溶解, 并用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 然后采用 UPLC-ESI-qTOF-MS (Agilent 1290, 四级杆串联飞行时间质谱 Agilent 6540) 进行检测, 检测条件: 色谱柱 Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4.6 mm×100 mm, 2.7 μm), 进样量 2 μL, 流速 0.8 mL/min。流动相是 0.1% 甲酸 (A 相) 和乙腈 (B 相), 采用线性梯度洗脱程序, 时间及 B 相的比例如下: 0 min, 30%; 16 min, 100%; 23 min, 100%; 28 min, 100%。质谱条件: 离子源采用是正离子模式, 气体温度 350℃, 喷雾电压 500 V; 碎裂电压 140 V; 锥孔电压 60 V; 射频电压 750 V, 扫描范围 50~1000 *m/z*。

## 2 结果与分析

### 2.1 农杆菌瞬时表达体系的构建

携带 pEAQ-HT-DEST1-GFP 载体和 pAN580-GFP 农杆菌菌液, 在  $OD_{600}=0.8$ , 真空压力 80 kPa 条件下, 农杆菌渗入 5 周龄烟草幼苗, 96 h 后激光共聚焦显微镜观察叶片中报告基因 GFP 的表达部位。发现 2 个载体农杆菌菌液渗入处理后, 细胞质、细胞核、细胞膜中均能观察到 GFP 的表达 (图 3), 表明构建的 pEAQ-HT-DEST1-GFP 瞬时表达载体在烟草叶片中稳定工作。

研究发现, 携带 pEAQ-HT-DEST1-GFP 载体的不同农杆菌菌株 (GV3101、EHA105 和 LBA4404) 渗入烟草后, GFP 表达量均在处理后第 4 天达到最高, 而且 EHA105 渗入植株的 GFP 表达量最高 (图 4A), 说明 EHA105 是最适宜瞬时转化的菌株, 而外源基因在渗入后第 4 天表达最高, 然后表达下降。EHA105 渗入本氏烟草的 GFP 表达效果 (图 4B)。比较不同浓度 ( $OD_{600}$  为 0.4、0.6、0.8、1.0) 的农杆菌 EHA105 菌液渗入效果, 农杆菌渗透液浓度  $OD_{600}=0.8$  时, GFP 的表达效率最高 (图 4C); 比较不同的真空渗透压力 (40~100 kPa) 发现, 真空压力为 80 kPa 时, GFP 的表达效率最高, 达到 80% (图 4D)。

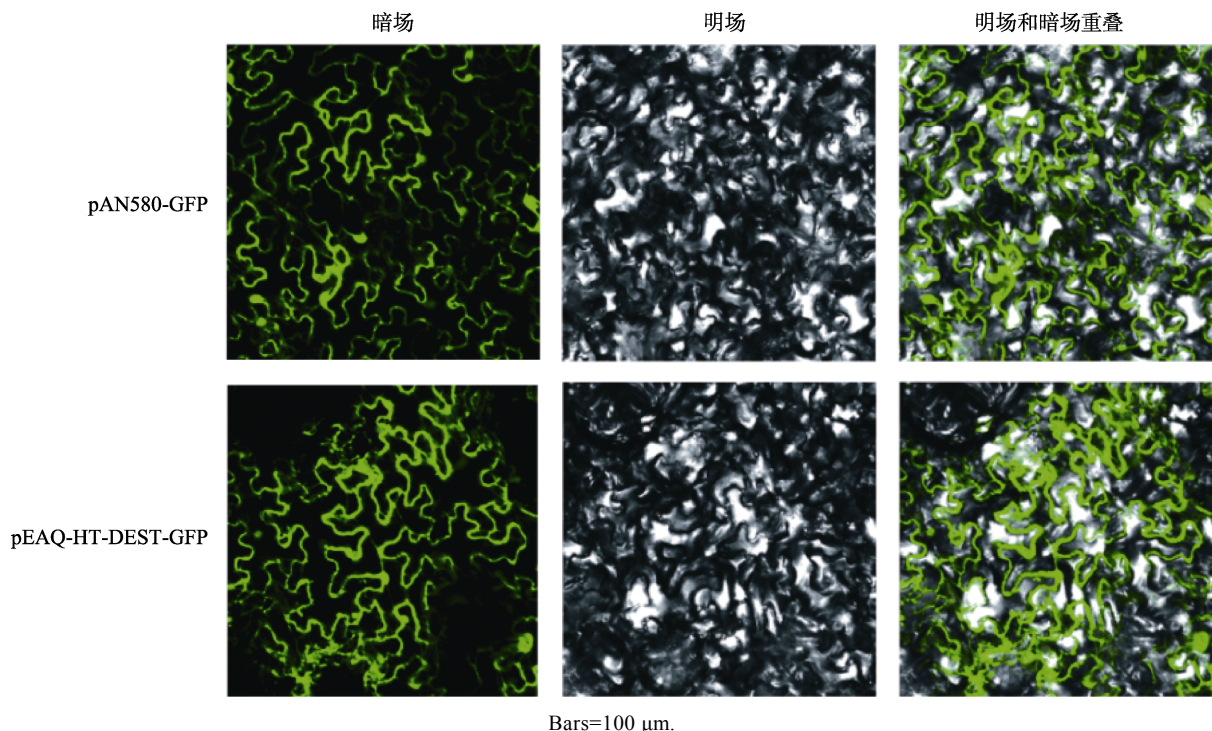
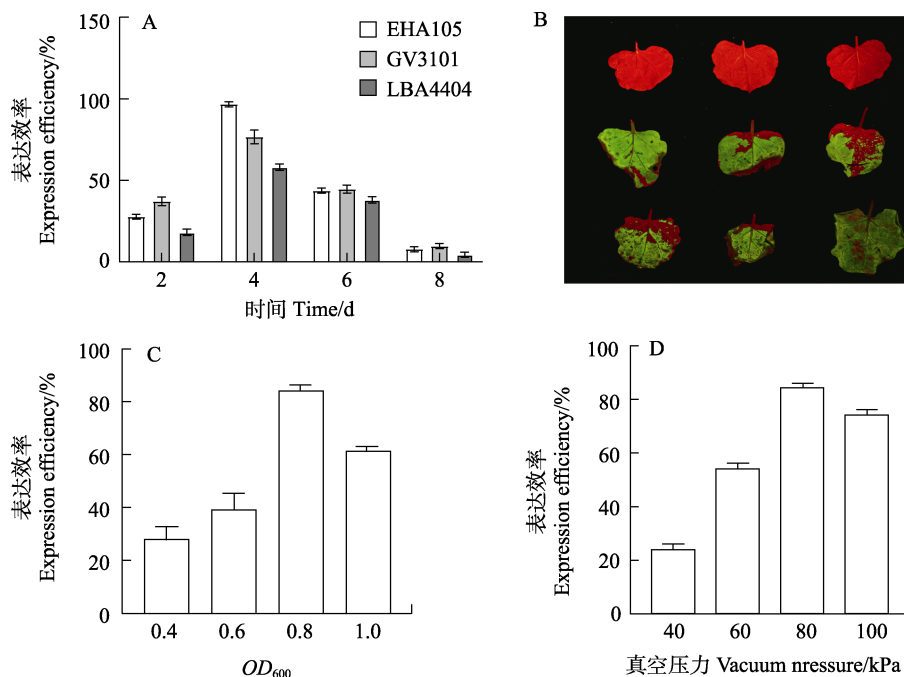


图 3 重组表达载体渗入后烟草叶片后 GFP 的表达情况

Fig. 3 GFP expression in tobacco leaves after infection with recombinant expression vector



A: 不同天数不同菌株的瞬时表达效率; B: pEAQ-HT-DEST1-GFP 渗入 4 d 后烟草表达情况 (红色表示未侵染, 绿色表示已侵染); C: 不同  $OD_{600}$  下 EHA105 的瞬时表达效率; D: 不同真空压力下 EHA105 的瞬时表达效率。

A: Transient expression efficiency of different strains on different days; B: Expression of pEAQ-HT-DEST1-GFP in tobacco after 4 days of infiltration (red indicates no infection, green indicates infection); C: Transient expression efficiency of EHA105 at different  $OD_{600}$ ; D: Transient expression efficiency of EHA105 under different vacuum pressures.

图 4 农杆菌渗入的不同因素对 GFP 瞬时表达效率的影响

Fig. 4 Effects of different factors of agro-infiltration on transient expression efficiency of GFP

## 2.2 瞬时表达产物葫芦二烯醇的 GC-MS 鉴定

提取瞬时表达 pEAQ-HT-DEST1-HcOSC6 的本氏烟草叶片, 进行 GC-MS 分析, 采用 HPLC 法测定其含量。在烟草叶片提取物出现新的分子离子峰 21.18 min (图 5A), 与葫芦二烯醇标准品的出峰时间一致, 且分子峰碎片吻合 (图 5C, 图 5D), 确定该峰为葫芦二烯醇。对照组中 pEAQ-HT-DEST1-GFP 渗透的烟草提取物中未发现葫芦二烯醇峰。由 HPLC 定量分析葫芦二烯醇 (图 5B), 绘制标准品标准曲线 ( $Y=1663.56953X-21.224813$ ,  $r=0.98567$ ;  $Y$  为峰面积,  $X$  为葫芦二烯醇含量), 测定葫芦二烯醇含量为 2.832 mg/g (干重), 当 pEAQ-HT-DEST1-HcOSC6 和 pEAQ-HT-DEST1-tHMGR 在烟草共渗透时, 葫芦二烯醇含量达到 9.48 mg/g (干重), 提高了 234.75%, 实现了葫芦二烯醇在本氏烟草中的高效生产。

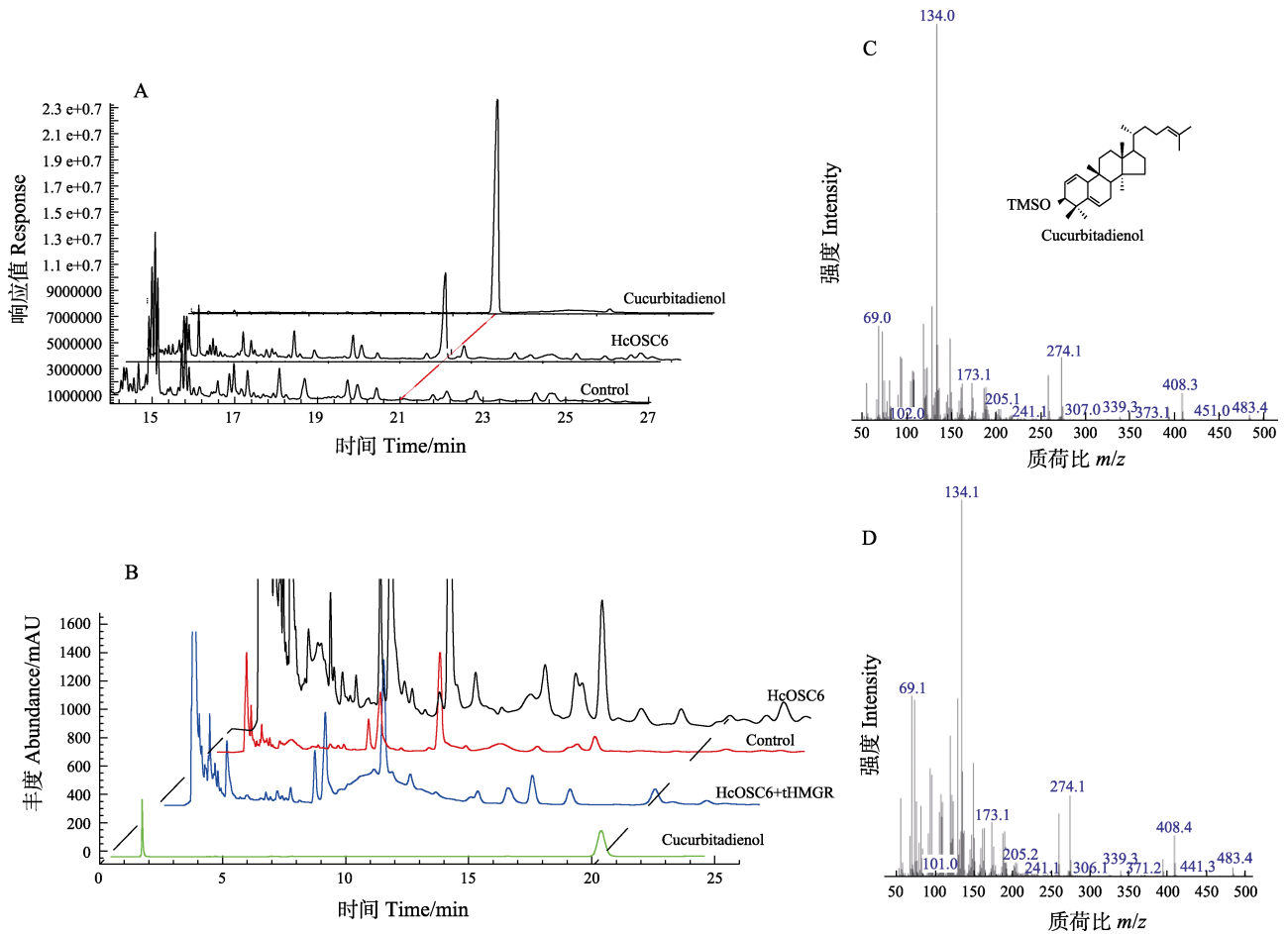
## 2.3 11-羰基-20 $\beta$ -羟基-Cuol 在本氏烟草中异源合成

由于农杆菌渗入法能够共表达多个目的基因, 异源合成不同单体化合物, 而无需逐步构建多个不同表达载体。大多数的 CYP450 氧化酶在

催化过程中都需要还原蛋白 (CPR) 的参与, 利用本氏烟草本身的特性, 一方面评估了农杆菌渗入本氏烟草内表达 CYP450 氧化酶的潜力, 另一方面在烟草中验证雪胆参与葫芦素生物合成的 CYP 同源基因 *HcCYP87D20*。结果显示, 在 *tHMGR*、*HcOSC6* 和 *HcCYP87D20* 共渗入烟草叶片中, 在 22.75 min 提取出 1 个特异代谢产物 ( $m/z$  457.3746  $[M+H]^+$ ) (图 6A), 与 11-羰基-20 $\beta$ -羟基-Cuol 标准品出峰时间一致, 且质谱图一致 (图 6B)。空白对照组 pEAQ-HT-DEST1-GFP 渗透的烟草中未发现 11-羰基-20 $\beta$ -羟基-Cuol。

## 3 讨论

随着合成生物学领域的飞速发展, 已阐明越来越多的天然药物的生物合成途径并实现高效异源合成, 烟草作为重要的植物异源生产平台受到人们的广泛关注。目前, 新冠肺炎 COVID-19 抗原已在烟草中实现了高效生产, 用于制备新冠疫苗。农杆菌渗入本氏烟草为高效、快速表达疫苗抗原或单体药物提供了一个新的平台, 然而, 如何提高植物体内蛋白质和单体化合物产量是目前



A: GC-MS 分子离子峰, 葫芦二烯醇为对照品, HcOSC6 为雪胆葫芦二烯醇, Control 为空白对照; B: HPLC 200 nm 吸收峰, 葫芦二烯醇为对照品, HcOSC6+tHMGR 代表葫芦二烯醇, Control 为空白对照; C: 葫芦二烯醇标准品质谱图; D: 烟草瞬时表达葫芦二烯醇质谱图。

A: GC-MS molecular ion peak, cucurbitadienol reference substance, HcOSC6 stands for cucumber cucurbitadienol, control stands for blank control; B: HPLC absorption peak at 200 nm, cucurbitadienol reference substance, HcOSC6+tHMGR stands for cucurbitadienol Enol, control represents blank control; C: Standard mass spectrum of cucurbitadienol; D: Mass spectrum of cucurbitadienol transiently expressed in *N. benthamiana*.

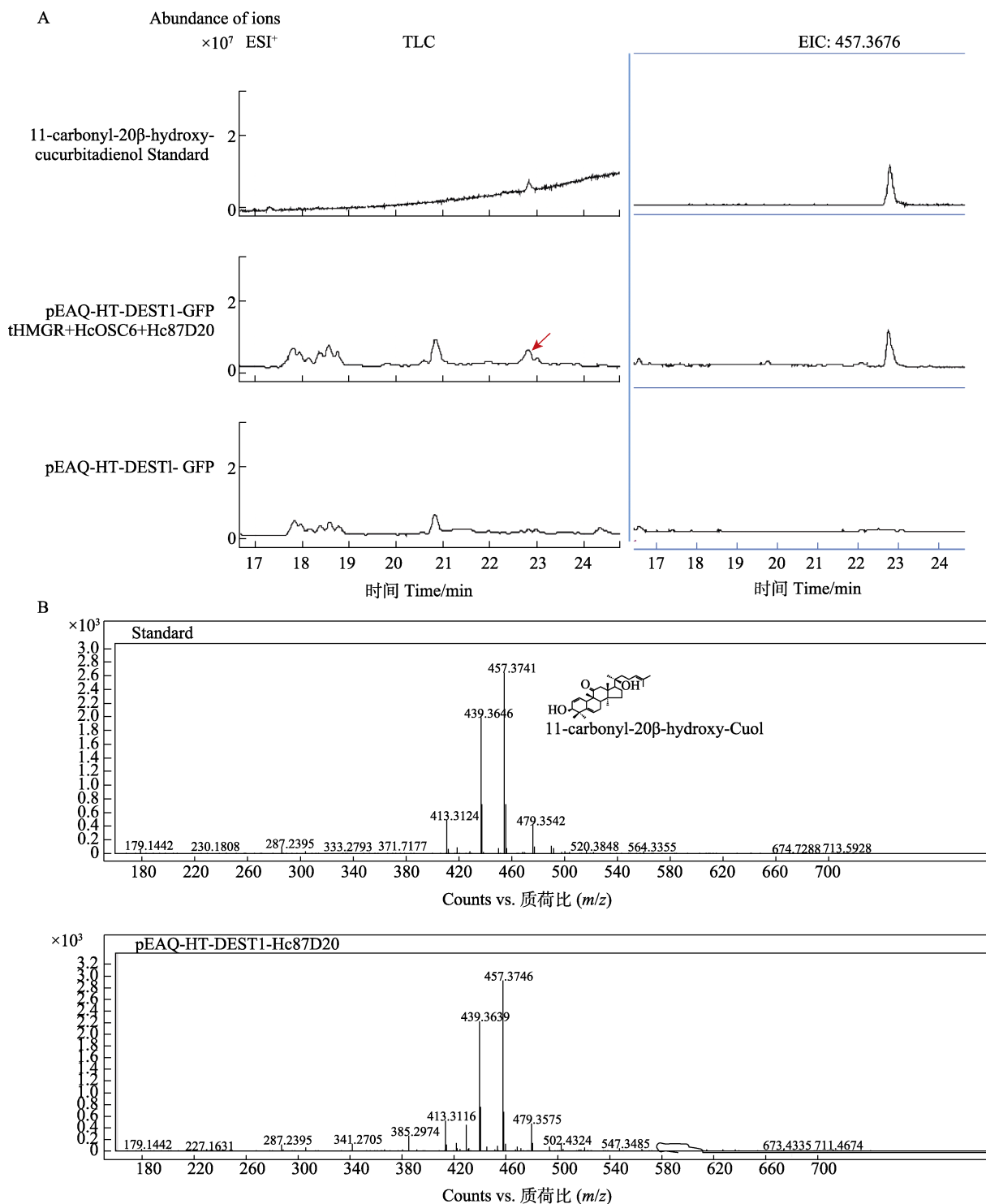
图 5 烟草中葫芦二烯醇产物的 GC-MS 和 HPLC 分析

Fig. 5 GC-MS and HPLC analysis of cucurbitadienol tobacco products

农杆菌渗入研究的重点和难点之一<sup>[21]</sup>。为了最大限度地提高基因表达水平, 研究人员试图在多个水平上优化该过程, 例如通过提高农杆菌转化率和改造特定载体包含增加转基因转录, 翻译衍生的元件<sup>[22]</sup>。农杆菌的遗传背景极大地影响植物病原体 T-DNA 转移载体的能力。因此, 本研究测试了 3 种常见的农杆菌携带 pEAQ-HT-DEST1-GFP 载体在本氏烟草中的 GFP 表达的能力, 高活力菌株 EHA105 在 4 d 时 GFP 表达量最高, 与其他 2 种菌株相比, EHA105 可能更有效地编码农杆菌 T-DNA 转运。农杆菌渗入过程中的菌渗透液浓度会影响基因表达效率, 过于稀释的菌渗透液可能会导致农杆菌细胞比例降低, 从而降低外源基因表达效率, 而浓度大的菌渗透液会导致农杆菌过

度生长并损伤烟草叶片组织, 影响本氏烟草细胞的转录或翻译能力, 进而影响外源基因的表达效率<sup>[23-24]</sup>。此外, 通过比较不同真空渗透压力发现, 真空渗透压力过低, 农杆菌不能有效地渗入, 压力过高可能严重影响植物的生理状态。因此, 本研究通过测试不同的农杆菌渗透条件, 探索最佳的渗透条件以期为下一步的基因异源表达奠定基础。

目前, 葫芦素 B、E 和 F 的生物合成尚未报道, 本研究选择了特异性地含有葫芦素 F 的雪胆为研究对象, 同时葫芦素 F 与其他葫芦素结构有许多相同修饰基团。本研究在本氏烟草验证雪胆的 *HcCYP87D20* 基因, 以葫芦二烯醇为底物下连续催化 C11 位和 C20 位生成了 11-羰基-20 $\beta$ -羟基-Cuol, 但葫芦素 F 依然有多个位点的氧化修饰机



A: LC-qTOF-MS 分析 *tHMGR*、*HcOSC6* 和 *HcCYP87D20* 在本氏烟草的表达提取物。箭头指示产生的特异质谱峰信号；ESI<sup>+</sup>为电喷雾电离正离子扫描模式；EIC: 457.3676 是提取质量为 457.3676 的色谱峰。B: 11-羰基-20β-羟基-Cuol 产物的 MS 分析。

A: LC-qTOF-MS analysis of *tHMGR*, *HcOSC6* and *HcCYP87D20* expressed extracts in *N. benthamiana*. The arrow indicates the specific mass spectrum peak signal generated; ESI<sup>+</sup> is electrospray ionization positive ion scanning mode; EIC: 457.3676 is the chromatographic peak with the extraction quality of 457.3676. B: MS analysis of 11-carbonyl-20β-hydroxyl Cuol products.

图 6 *Hc87D20* 在本氏烟草表达 11-羰基-20β-羟基-Cuol 产物的 LC-qTOF-MS 分析

Fig. 6 LC-qTOF-MS analysis of 11-carbonyl-20β-hydroxyl-Cuol products expressed by *Hc87D20* in *N. benthamiana*

理和基因未知，特别是 C-22 酮基和 C-16α 羟基位点等<sup>[8, 25]</sup>。C-22 酮基是所有葫芦素分子的另一共

同结构特征，酮基一般为羟基氧化而来。目前报道的 CYP90B 家族催化 C-22 位羟化，例如参与

油菜素内酯生物合成的 DWF4 基因 (CYP90B1), 能够催化菜油甾醇或 6-oxo-菜油甾醇的 C-22 羟化<sup>[26-27]</sup>, 在北美山藜芦 (*Veratrum californicum*) 甾体生物碱环巴胺的生物合成中, CYP90B27 则编码胆固醇 22-羟化酶, 催化胆固醇转化为 22(R)-OH-胆固醇, CYP90G1 能够转化 22-OH-22-氨基-胆固醇为 22-酮基-22-氨基-胆固醇<sup>[28]</sup>。催化 C-16 $\alpha$  羟基方面, 目前已报道有两类基因可以催化形成三萜类化合物的 C-16 $\alpha$  羟化。一类属于 CYP 基因, 分别是 *CYP716Y1* 和 *CYP716A141*, 编码 C16 $\alpha$ -羟化酶, 能够催化香树脂骨架的 C-16 $\alpha$  羟化<sup>[25]</sup>; 一类是马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 2-酮戊二酸依赖型加双氧酶 (2-ODD, St16-DOX), 编码类固醇 16 $\alpha$ -羟化酶催化(22S)-22,26-二羟基胆固醇的 C-16 $\alpha$ -羟化<sup>[26]</sup>。

在本研究中, 将雪胆 CBS 基因 (*HcOSC6*)、截短的燕麦 *tHMGR* 和 *HcCYP87D20* 共渗入烟草叶片中表达, 虽然 UPLC-ESI-qTOF-MS 检测到了 11-羰基-20 $\beta$ -羟基-Cuol, 但未检测到 11-羰基-Cuol, 这可能是 CYP87D20 氧化酶催化效率低, 导致 11-羰基-20 $\beta$ -羟基-Cuol 前体物质 11-羰基-Cuol 不足, 因此, 下一步将利用酶工程手段提高 CYP87D20 活性, 提高细胞色素 P450 氧化酶的催化效率, 以实现葫芦素植物工厂的高效生产。

#### 4 结论

本研究将 pEAQ-HT-DEST1-GFP 与 pAN580-GFP 载体转化到农杆菌感受态细胞中渗透本氏烟草, 确定在烟草细胞内定位结果一致。将雪胆 CBS 基因 (*HcOSC6*) 与截短的燕麦 *tHMGR* 共表达, 不断优化烟草共表达体系, 将烟草叶片中的葫芦二烯醇产量从 2.832 mg/g(干重)提高到 9.48 mg/g(干重)。同时, 将雪胆的 *HcCYP87D20* 共渗入烟草叶片, 获得了葫芦素生物合成的重要中间体 11-羰基-20 $\beta$ -羟基-Cuol, 实现了葫芦素中间体在本氏烟草中的异源生产, 为葫芦素的生物合成奠定了坚实的基础。

#### 参考文献

- [1] CHEN J C, CHIU M H, NIE R L, CORDELL G A, QIU S X. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities[J]. *Natural Product Reports*, 2005, 22(3): 386-399.
- [2] CHEN X P, BAO J L, GUO J J, DING Q, LU J J, HUANG M Q, WANG Y T. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer[J]. *Anti-cancer Drugs*, 2012, 23(8): 777-787.
- [3] KAUSHIK U, AERI V, MIR S R. Cucurbitacins-an insight into medicinal leads from nature [J]. *Pharmacognosy Reviews*, 2015, 9(17): 12-18.
- [4] CAI Y, FANG X, HE C, LI P, XIAO F, WANG Y, CHEN M. Cucurbitacins: a systematic review of the phytochemistry and anticancer activity[J]. *American Journal of Chinese Medicine*, 2015, 43(7): 1331-1350.
- [5] HUSSAIN H, GREEN I R, SALEEM M, KHATTAK K F, IRSHAD M, ALI M. Cucurbitacins as anticancer agents: a patent review[J]. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2019, 14(2): 133-143.
- [6] GONG X, CHEN N, REN K, JIA J, WEI K, ZHANG, LI M. The fruits of *siraitia grosvenorii*: a review of a chinese food-medicine[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1400.
- [7] SHIBUYA M, ADACHI S, EBIZUKA Y. Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis[J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(33): 6995-7003.
- [8] ZHOU Y, MA Y, ZENG J, DUAN L, XUE X, WANG H, LIN T, LIU Z, ZENG K, ZHONG Y, ZHANG S, HU Q, LIU M, ZHANG H, REED J, MOSES T, LIU X, HUANG P, QING Z, LIU X, TU P, KUANG H, ZHANG Z, OSBOURN A, RO D K, SHANG Y, HUANG S. Convergence and divergence of bitterness biosynthesis and regulation in *Cucurbitaceae*[J]. *Nature Plants*, 2016, 2(12): 16183.
- [9] DAVIDOVICH-RIKANATI R, SHALEV L, BARANES N, MEIR A, ITKIN M, COHEN S. Recombinant yeast as a functional tool for understanding bitterness and cucurbitacin biosynthesis in watermelon (*Citrullus* spp.)[J]. *Yeast*, 2015, 32(1):103-114.
- [10] 陈庚. 雪胆葫芦素 F 生物合成相关基因的鉴定及功能研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2020.  
CHEN G. Identification and functional study of genes related to the biosynthesis of icholacin F[D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [11] 马永硕. 黄瓜中苦味素的生物合成, 调控及转运机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.  
MA Y S. Biosynthesis, regulation and transport mechanism of bitter in cucumber[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017. (in Chinese)
- [12] REED J, STEPHENSON M J, MIETTIEEN K, BROUWER B, LEVEAU A, BRETT P. A translational synthetic biology platform for rapid access to gram-scale quantities of novel drug-like molecules[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42:

- 185-193.
- [13] DONG L, POLLTER J, BASSARD J E, NTALLAS G, ALMEIDA A, LAZARIDI E, BAK S. Co-expression of squalene epoxidases with triterpene cyclases boosts production of triterpenoids in plants and yeast[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 49:1-12.
- [14] STEPHENSON M J, JAMES R, BASTIAAN B, ANNE O. Transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves for triterpene production at a preparative scale[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(138): 58169.
- [15] GEISLER K, HUGHES R K, SANISBURY F, LOMONOSSOFF G P, REJZEK M, FAIRHUST S, OSBOURNE A. Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(35): 3360-3367.
- [16] CHRIST B, XU C, XU M, LI F S, WADA N, MITCHELL A J, WENG J K. Repeated evolution of cytochrome P450-mediated spiroketal steroid biosynthesis in plants[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3206.
- [17] LIU Q, KHAKIMOV B, CARDEENAS P D, COZZI F, OLSEN, C. E, JENSEN, K R, BAK S. The cytochrome P450 CYP72A552 is key to production of hederagenin-based saponins that mediate plant defense against herbivores[J]. *New Phytologist*, 2019, 222(3): 1599-1609.
- [18] SANISBURY F, THUEENMANA E C, LOMONOSSOFF G P. pEAG: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(7): 682-693.
- [19] REN R, GAO J, YIN D M, LI K, LU C Q, AHMAD S, WEI Y L, JIN J P, ZHU G F, YANG F X. Highly efficient leaf base protoplast isolation and transient expression systems for orchids and other important monocot crops[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 626015.
- [20] 杨丽萍, 王悦, 孟大伟, 吴艳菊, 金太成. 种子真空侵染法遗传转化体系的建立与优化[J]. *延边大学农学学报*, 2019, 41(1): 58-61.
- YANG L P, WANG Y, MENG D W, WU Y J, JING T C. Establishment and optimization of genetic transformation system by seed vacuum infection method[J]. *Journal of Agronomy of Yanbian University*, 2019, 41(1): 58-61. (in Chinese).
- [21] MIETTINEN K, POLLIER J, BUYST D, ARENDT P, CSUK R, SOMMERWERK S, GOOSSENS A. The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 14153.
- [22] NAKAYASU M, UMEMOTO N, OHYAMA K, FUJIMOTO Y, LEE H J, WATANABE B, MIZUTANI M. A dioxygenase catalyzes steroid 16 $\alpha$ -Hydroxylation in steroidal glycoalkaloid biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(1): 120-133.
- [23] CHEN Q. Expression and purification of pharmaceutical proteins in plants[J]. *Biological Engineering Transactions*, 2008, 1(4): 291-321.
- [24] NORKUNAS K, HARDING R, DALE J, DUGALE B. Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plant Methods*, 2018, 14(1): 1-14.
- [25] SHANG Y, MA Y S, ZHOU Y, ZHANG H M, DUAN L X, CHEN H M, HUANG S. Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber[J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1084-1088.
- [26] CHOE S, DILKES B P, FUJIOKA S, TAKATSUTO S, SAKURAI A, FELDMANN K A. The *dWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 1998, 10(2): 231-243.
- [27] FUJITA S, OHNISHI T, WATANABE B, YOKOTA T, TAKATSUTO S, FUJIOKA S, MIZUTANI M. *Arabidopsis* CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols[J]. *Plant Journal*, 2010, 45(5):765-774.
- [28] AUGUSTIN M M, RUZICKA D R, SHUKLA A K, AUGUSTIN J M, STARKS C M, O'NEIL-JOHNSON M, KUTCHAN T M. Elucidating steroid alkaloid biosynthesis in *Veratrum californicum*: production of verazine in Sf9 cells[J]. *Plant Journal*, 2015, 82(6): 991-1003.