

## 基于基因过表达及基因沉默解析 *F5H* 基因对甘草酸生物合成的调控研究

张智新<sup>1</sup>, 汪逗逗<sup>1</sup>, 杨林<sup>1</sup>, 田少凯<sup>1</sup>, 肖瑶<sup>2\*</sup>, 刘颖<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

**摘要:** 阿魏酸 5-羟化酶 (ferulate 5-hydroxylase, F5H) 是苯丙烷代谢途径上的关键酶。本课题组前期转录组测序研究显示 *F5H* 基因在甘草酸生物合成过程中起负调控作用, 因此本文拟克隆该基因, 并从基因过表达和沉默两个方面对这一调控作用进行深入研究。本文克隆得到甘草 *F5H* 基因 (GenBank 注册号: MK882511); 以 pCAMBIA1305.1 为载体骨架, 以 *Spe* I 和 *Bgl* II 为酶切位点, 利用基因融合法构建过表达载体 pCA-F5H; 根据 *F5H* 第一外显子设计 sgRNA 序列, 以 pHSE401 为载体骨架, 以 *Bsa* I 为酶切位点, 构建 CRISPR/Cas9 基因编辑载体 pHSE-F5H; 使用电转法将 pCA-F5H 和 pHSE-F5H 分别转入发根农杆菌 ATCC15834 感受态细胞; 以甘草胚轴为外植体材料, 利用发根农杆菌介导法分别诱导 *F5H* 过表达及沉默甘草毛状根系。同时, 构建野生型甘草毛状根以及携带空质粒的阴性对照甘草毛状根。利用 UPLC 法测定各甘草毛状根系中甘草酸的含量, 结果显示 *F5H* 基因沉默甘草毛状根体系中甘草酸含量显著高于野生型和阴性对照组, 而过表达 *F5H* 基因甘草毛状根系中甘草酸含量则显著低于野生型和阴性对照组。本文通过逆向遗传学策略, 从基因过表达和沉默两个方面证实了 *F5H* 基因对甘草酸生物合成的负调控作用, 为进一步构建甘草酸次生代谢分子调控网络奠定了基础。

**关键词:** F5H; 甘草毛状根; 甘草酸; 基因过表达; 基因沉默; CRISPR/Cas9

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)06-1719-08

## Ferulate 5-hydroxylase gene (*F5H*) regulation of glycyrrhizic acid biosynthesis determined by gene overexpression and knockout

ZHANG Zhi-xin<sup>1</sup>, WANG Dou-dou<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>1</sup>, TIAN Shao-kai<sup>1</sup>, XIAO Yao<sup>2\*</sup>, LIU Ying<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**Abstract:** Ferulate 5-hydroxylase (F5H) is a key enzyme involved in the phenylpropane metabolism pathway. Based on our previous transcriptome sequencing study, *F5H* played a negative regulatory role in glycyrrhizic acid (GA) biosynthesis. Therefore, in this study we cloned the *F5H* gene and investigated its regulatory effect on GA accumulation through gene overexpression and knockout. *F5H* was cloned from *Glycyrrhiza glabra* L. (GenBank Accession No. MK882511). A plant binary expression vector pCA-F5H was constructed by inserting *F5H* into pCAMBIA1305.1 at *Spe* I and *Bgl* II sites. The sgRNA sequences were designed based on the first exon of *F5H*. The CRISPR/Cas9 gene editing vector pHSE-F5H was constructed by inserting *F5H* sgRNA into pHSE401 at two *Bsa* I sites. pCA-F5H and pHSE-F5H were transfected into *Agrobacterium tumefaciens* ATCC15834, which was used to induce hairy root overexpressing or knocking out *F5H* with licorice hypocotyl as explants. At the same time, wild type and negative control hairy roots were also generated. UPLC was used to assay the GA content in

收稿日期: 2021-02-05; 修回日期: 2021-02-25.

\*通讯作者 Tel: 86-10-53912163, E-mail: liuyliwd@bucm.edu.cn;

Tel: 86-10-53912136, E-mail: xiaoyao9510@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0196

different hairy root lines, and results showed that the GA content in hairy root lines knocking out *F5H* was significantly higher, whereas in hairy root lines overexpressing *F5H* GA content was lower than that in the wild-type and negative control. In this work, through a reverse genetics strategy, the negative regulatory effect of *F5H* on GA biosynthesis was confirmed through gene overexpression and knockout. This work will lay a foundation for further elucidation of the molecular regulatory network of GA biosynthesis.

**Key words:** *F5H*; licorice hairy root; glycyrrhizic acid; gene overexpression; gene knockout; CRISPR/Cas9

甘草是我国最常用的大宗药材之一,始载于《神农本草经》,素有“十方九草”之美誉。甘草酸是反映甘草药材质量的指标性成分之一,2020版《中华人民共和国药典》<sup>[1]</sup>规定其含量不得低于2.0%。现代药理学研究表明甘草酸是甘草发挥抗癌<sup>[2]</sup>、抗炎<sup>[3]</sup>、抗糖尿病<sup>[4]</sup>等药理活性的主要有效成分。然而,本课题组前期对我国药材市场的甘草药材进行质量调查,发现近50%的甘草样品中甘草酸含量未达到国家药典的基本要求<sup>[5]</sup>。因此,如何提高栽培甘草中甘草酸的含量已成为影响甘草药效的关键问题。

甘草酸为五环三萜类化合物,是经由甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)代谢途径合成的。然而,高等植物体内代谢网络复杂,各通路彼此联通又相互制约。为了构建甘草酸生物合成的分子调控网络,本课题组前期开展了转录组学研究,发现:甘草酸的生物合成受糖代谢、植物激素信号转导、泛醌和萜类旁路途径、苯丙烷类代谢途径以及植物昼夜节律等通路的显著影响。在进一步筛选的15个关键功能基因中,阿魏酸5-羟化酶(ferulate 5-hydroxylase, *F5H*)基因的表达水平与甘草酸的含量呈负相关<sup>[6]</sup>。*F5H*作为苯丙烷代谢途径上的关键酶,可催化阿魏酸、松柏醇以及针叶醛5'位置的羟基化,是丁香基木质素合成途径的必要环节<sup>[7]</sup>。为了进一步明确*F5H*对甘草酸生物合成的调控作用,本论文拟采用反向遗传学策略,从基因过表达和沉默两个方面开展研究。

自1996年于拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)中首次克隆得到*F5H*基因以来<sup>[8]</sup>,已从白杨(*Populus tremula* × *alba*)<sup>[9]</sup>、洋麻(*Hibiscus cannabinus* L.)<sup>[10]</sup>、苜蓿(*Medicago sativa* L.)<sup>[11]</sup>、玉米(*Zea mays* L.)<sup>[12]</sup>等多种植物中克隆得到该基因。目前,GenBank数据库中已注册180多条植物*F5H*基因的cDNA序列。但*F5H*基因的研究多集中于木质素生物合成途径,如:*F5H*基因下调可导致苜蓿中丁香基木质素大量减少<sup>[13]</sup>;在苧麻(*Boehmeria nivea*)生长的不同时期,木质素含量与*F5H*基因的表达呈显著正相关<sup>[14]</sup>。而*F5H*基因对三萜生物合成的影响研究则尚未见报道。

毛状根,又称发根,是植株受到发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感染而产生的一种病理现象。

由于具有生长迅速、可合成植物次生代谢产物等优点,毛状根已成为研究药用植物次生代谢的理想材料,如:在罂粟(*Papaver somniferum* L.)毛状根中过表达salutaridinol 7-O-乙酰基转移酶(salutaridinol 7-O-acetyltransferase, SalAT)基因可提高吗啡类生物碱的含量<sup>[15]</sup>;在朝鲜当归(*Angelica gigas*)毛状根中过表达肉桂酸4-羟化酶(*A. gigas* cinnamate 4-hydroxylase, AgC4H)基因可明显增强地高辛醇的生物合成<sup>[16]</sup>。本课题组前期利用甘草毛状根过表达查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)基因,也发现黄酮类化合物的含量显著提高<sup>[17]</sup>。因此,本文也将利用毛状根培养体系解析*F5H*基因对甘草酸生物合成的调控作用,为进一步构建甘草酸生物合成的分子调控网络奠定基础。

## 材料与方法

**试剂与耗材** 植物双元表达载体pCAMBIA1305.1购于北京华越洋生物科技有限公司;沉默载体pHSE401由北京中医药大学生命科学学院王志标老师提供;大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞、大肠杆菌TOP 10感受态细胞、Golden View、BM无缝克隆试剂盒、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒、高纯质粒小量快速提取试剂盒均购于北京博迈德科技发展有限公司;氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、潮霉素(hygromycin, Hyg)、头孢噻肟钠(cefotaxime sodium, Cef)和Oligo(dT)购于北京拜尔迪生物技术有限公司;卡那霉素(kanamycin, Kan)购于Genview公司;T4 DNA连接酶和限制性内切酶*Bsa* I均购于NEB公司;pMD-19T载体、LA Taq DNA聚合酶、限制性内切酶*Bgl* II、*Spe* I均购于TaKaRa公司;一站式DNA/RNA/蛋白提取试剂盒(B618003)、M-MLV第一链cDNA合成试剂盒(BS249)均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;甲醇(分析纯)、乙腈(色谱纯)均购于鼎国昌盛生物科技有限公司;甘草酸单铵盐(MUST-16011310)购于成都曼斯特生物科技有限公司,纯度为98.86%。

**仪器** 1-13000型离心机(美国Sigma公司);DYY-8型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司);

A300型PCR扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司); 凝胶成像系统(北京百晶生物技术有限公司); 恒温震荡培养箱(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司); Gene PulserMXcell穿孔仪(美国BIO-RAD公司)。

**PCR引物及程序** 由于本文在多个环节均用到PCR方法, 为方便起见, 将文中所有PCR引物列于表1中, 将所有PCR程序列于表2中。本文全部引物合成及测序均由上海生工生物工程有限公司完成。

**甘草 *F5H* 基因克隆** 采用一站式DNA/RNA/蛋白提取试剂盒从新鲜甘草根样中提取总RNA, 采用M-MLV第一链cDNA合成试剂盒逆转录获得cDNA。根据基因组文件 <http://ngs-data-archive.psc.riken.jp/Gur-genome/download.pl>, 利用NCBI在线工具Primer-BLAST设计引物对PP1(表1), 采用PCR程序1(表2)对*F5H*基因进行扩增。对PCR产物进行胶回收纯化, 连入pMD-19T载体, 16℃反应过夜。连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 在LB(含Amp 50 mg·L<sup>-1</sup>)平板上筛选阳性克隆, 分别进行PCR验证和测序验证。

***F5H* 基因过表达载体的构建** 图1为*F5H*基因过表达载体的构建策略, 以pCAMBIA1305.1为载体骨架, 采用基因融合法, 在*Spe* I和*Bgl* II位点插入*F5H*基因。根据BM无缝克隆试剂盒设计引物对PP2(表1), 采用PCR反应程序2(表2), 扩增带有*Spe* I和*Bgl* II位点序列及载体同源序列的*F5H*基因, 对PCR产物进行胶回收纯化。同时, 使用限制性内切酶*Spe* I和*Bgl* II在37℃对pCAMBIA1305.1双酶切1h, 对载体片段进行

胶回收纯化。使用BM无缝克隆试剂盒, 在50℃将线性化载体片段与PCR产物(摩尔比1:3)连接30min, 将连接产物转化大肠杆菌Top 10感受态细胞, 在含有Kan(50 mg·L<sup>-1</sup>)和Hyg(20 mg·L<sup>-1</sup>)的LB平板上筛选阳性克隆, 并进行PCR验证及测序验证, 将验证正确的质粒命名为pCA-*F5H*。

***F5H* 基因沉默载体的构建** 图2为*F5H*基因编辑CRISPR/Cas9载体的构建策略, 以pHSE401为载体骨架, 在两个*Bsa* I酶切位点之间插入*F5H*基因sgRNA片段。使用Benchling在线软件, 根据*F5H*基因的第一外显子设计sgRNA前导序列sgRNA-F(5'-3'): ATTGATCGCTGCGATAGCGAATAT和sgRNA-R(5'-3'): AAACATATTCGCTATCGCAGCGAT。将sgRNA在95℃退火5min成双链, 并自然冷却至室温。同时, 采用限制性内切酶*Bsa* I在37℃对pHSE401酶切1h, 将线性化载体胶回收纯化。采用T4 DNA连接酶, 在25℃将线性化载体与退火后的sgRNA连接10min, 将连接产物转化大肠杆菌Top 10感受态细胞, 在含有Kan(50 mg·L<sup>-1</sup>)的LB平板上筛选阳性克隆。在酶切位点*Bsa* I的前后各200bp设计引物对PP3(表1), 采用PCR反应程序3(表2)对基因沉默载体进行PCR验证, 并进一步进行测序验证, 将验证正确的质粒命名为pHSE-*F5H*。

**重组质粒转化发根农杆菌 ATCC15834** 采用电转法(C: 25  $\mu$ F, PC: 200  $\Omega$ , U: 2 400 V)将重组质粒pCA-*F5H*和pHSE-*F5H*导入发根农杆菌ATCC15834

**Table 1** Primer pairs used in this study

No.	Project	Sequence (5'-3')
PP1	<i>F5H</i> gene clone	F: TCCATGCACACACATTTCACG R: GTTGGGTGAGGGATAATAAACAGA
PP2	<i>F5H</i> overexpression vector construction	F: CTCTTGACCATGGTAGATCTTCCATGCACACACATTTCACG R: TTGATCGGGTACAGACTAGTGTGGGTGAGGGATAATAAACAGA
PP3	CRISPR/Cas9 <i>F5H</i> knockout vector verification	F: TCAAAAAGGCCCTGGAATC R: ACTGAAAAGTACAAAACCACTGAA
PP4	<i>F5H</i> identification in the recombinant ATCC15834	F: TTGCTTCACATGGGAGTTGC R: TGTGAGTTGCAGAGCCGAAG
PP5	<i>roC</i> gene identification in every hairy root sample	F: CATATATGCCAAATTTACACTAG R: GTTAACAAACTAGGAAACAGG
PP6	The first exon of <i>F5H</i> amplification from hairy root lines knocking out <i>F5H</i> gene	F: AAATCGCAAACCATGAGCAG R: TGCCACCATGTGGAGGAATC

**Table 2** PCR programs used in this study

No.	Project	Program
1	<i>F5H</i> gene clone	94℃ 15 min, 35 cycles of 94℃ 60 s, 52℃ 60 s, 72℃ 120 s, and 72℃ 10 min
2	<i>F5H</i> overexpression vector construction	94℃ 15 min, 35 cycles of 94℃ 50 s, 52℃ 50 s, 74℃ 120 s, and 74℃ 10 min
3	CRISPR/Cas9 <i>F5H</i> knockout vector verification	95℃ 5 min, 30 cycles of 95℃ 60 s, 55℃ 50 s, 72℃ 30 s, and 72℃ 5 min
4	<i>F5H</i> identification in the recombinant ATCC15834	95℃ 5 min, 29 cycles of 95℃ 60 s, 56℃ 50 s, 72℃ 30 s, and 72℃ 5 min
5	<i>roC</i> gene identification in every hairy root sample	94℃ 5 min, 35 cycles of 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, and 72℃ 10 min
6	The first exon of <i>F5H</i> amplification from hairy root lines knocking out <i>F5H</i> gene	95℃ 10 min, 29 cycles of 95℃ 50 s, 53.5℃ 50 s, 72℃ 30 s, and 72℃ 5 min



LB 平板上筛选阳性克隆, 挑取多个单克隆送测序, 采用软件 DNAMAN 6.0.3.99 对基因编辑情况进行比对分析。将验证正确的毛状根系转接到 6,7-V 液体培养基中, 于 25 °C、110 r·min<sup>-1</sup> 条件下震荡培养。

**UPLC 法测定甘草毛状根中甘草酸含量** 毛状根液体培养: 在无菌条件下称取各毛状根样品 2.0 g, 每个样品 3 个重复, 传代于 6,7-V 液体培养基中, 置于 25 °C、110 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 21 天。UPLC 供试品制备: 将毛状根洗净、60 °C 烘干至恒重、打粉、过 60 目筛; 精密称取各甘草毛状根样品粉末 0.1 g, 置于 50 mL 容量瓶中, 用 50% 甲醇水溶液超声提取 30 min (频率 40 kHz, 功率 500 W), 放冷, 用 50% 甲醇水溶液补至刻度线, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为 UPLC 供试品。对照品及线性: 精密称取对照品甘草酸单铵盐 4.34 mg, 用 50% 甲醇水溶液溶解, 配成质量浓度为 0.085 8 mg·mL<sup>-1</sup> 的贮备液, 用 50% 甲醇水溶液稀释成以下浓度的梯度溶液: 0.085 8、0.068 6、0.051 5、0.042 9、0.017 2、0.008 58、0.004 3 mg·mL<sup>-1</sup>。UPLC 测定: 采用 UPLC 法对各毛状根样品中的甘草酸进行含量测定<sup>[18]</sup>, 采用配备 UPLC ACQUITY PDA e1 检测器的 Waters UPLC ACQUITY 色谱系统, 采用 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 以乙腈 (A) - 0.05% 磷酸液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 3, 柱温为 40 °C、流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>、进样量为 1 μL, 于 250 nm 波长检测甘草酸。

## 结果与分析

### 1 基因克隆及载体构建

由图 3a 可知, PCR 扩增得到了长度约为 1 800 bp 的特异性条带, 测序结果显示该序列与豆科植物大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr. 的 *F5H* 基因一致性为 82.6%, 表明扩增序列为甘草 *F5H* 基因序列, 将其在 GenBank 上注册, 序列注册号为: MK882511。图 3b 为重组质粒 pCA-F5H 的 PCR 验证结果, 获得了长度与 *F5H* 序列一致的扩增片段, 测序结果表明此片段与 *F5H* (GenBank

**Table 3** UPLC gradient elution program

Time/min	Acetonitrile (A)/%	0.05% Phosphoric acid (B)/%
0	14	86
1.36	23	77
3.26	30	70
4.08	34	66
4.76	36	64
5.71	42	58
6.53	51	49
9	51	49
9.5	14	86
12	14	86

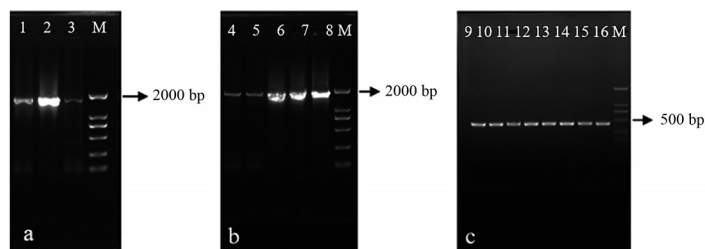
注册号: MK882511) 具有 100% 的一致性, 表明重组质粒 pCA-F5H 构建正确。图 3c 为重组质粒 pHSE-F5H 的 PCR 验证结果, 所得条带长度约为 500 bp, 符合引物对 PP3 的扩增预期, 且测序结果表明该扩增片段中含有正确的 sgRNA 序列 (一致性为 100%), 表明重组质粒 pHSE-F5H 构建正确。

### 2 甘草毛状根的诱导及培养

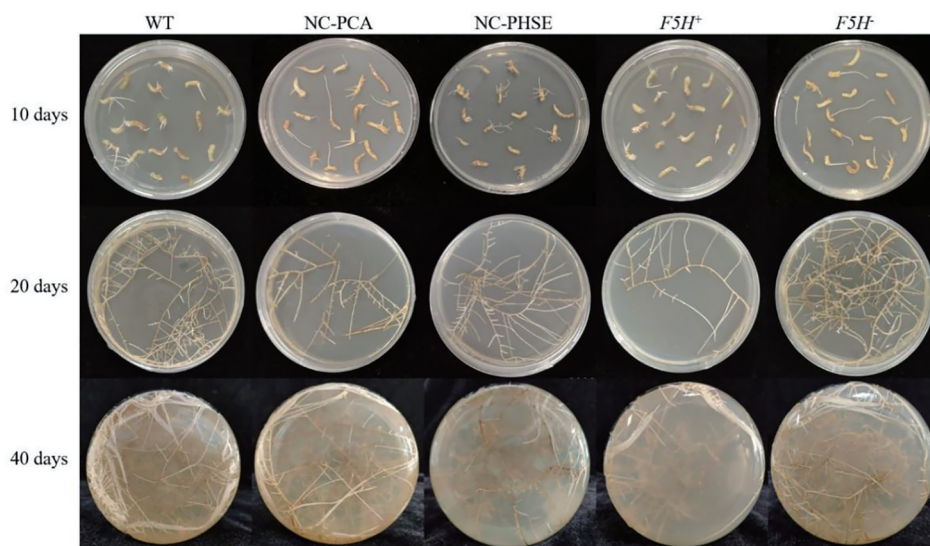
图 4 是诱导 10、20 和 40 天后各甘草毛状根系的生长情况, 由图可见: 野生型 (wild type, WT) 毛状根、含空载体 pCAMBIA1305.1 的阴性对照毛状根 (NC-PCA)、含空载体 pHSE401 的阴性对照毛状根 (NC-PHSE)、过表达 *F5H* 基因的毛状根 (*F5H<sup>+</sup>*) 以及 *F5H* 基因沉默的毛状根 (*F5H<sup>-</sup>*) 均长势良好。

### 3 甘草毛状根的验证

图 5a 为甘草毛状根中 *rolC* 基因的 PCR 扩增结果, 获得了长度约为 600 bp 的特异性条带, 测序结果显示其与 *rolC* (GenBank 登录号: DQ160187.1) 的一致性为 100%。图 5b 为 *F5H* 基因过表达毛状根系的 PCR 验证结果, 扩增得到长度约为 1 800 bp 的条带, 与目标基因 *F5H* 长度一致, 测序结果显示其与 *F5H* 原序列 (MK882511) 一致性为 100%, 表明所得根系为 *F5H* 基因过表达甘草毛状根系。图 5c 为 *F5H* 基因沉默毛状根系中 *F5H* 基因第一外显子的 PCR 扩增结果, 获得了长度约为 400 bp 的特异性条带, 产物长度正确, 清晰明亮。对扩增获得的片段进行克隆测序, 发现检测的 7



**Figure 3** PCR verification results of *F5H* and recombinant vectors. a: The *F5H* (Lane 1-3) cloned from *Glycyrrhiza glabra* L. b: The *F5H* (Lane 4-8) amplified from pCA-F5H. c: 490 bp-fragments containing sgRNA sequences amplified from pHSE-F5H (Lane 9-16). M is the DNA marker



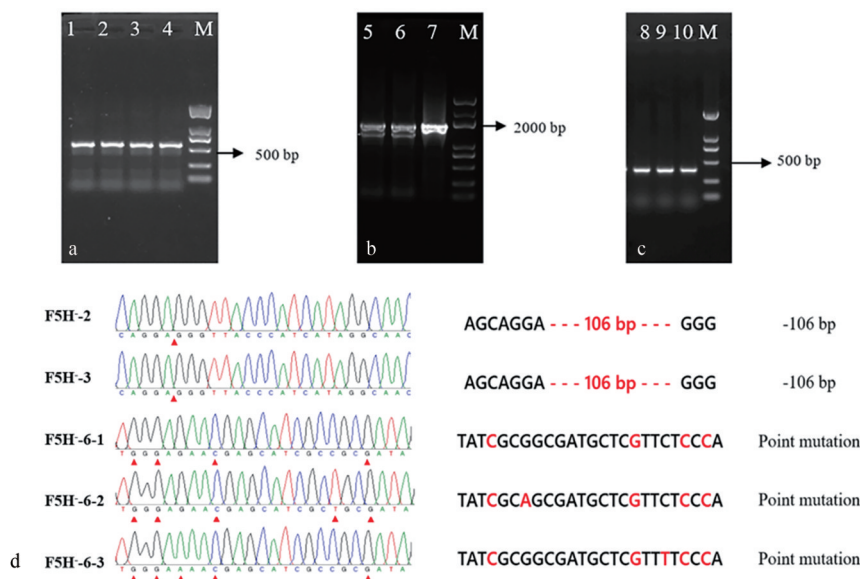
**Figure 4** Licorice hairy roots after induction and culturing for 10, 20, and 40 d. WT: Wild type hairy root line; NC-PCA: Negative control hairy root line containing empty pCAMBIA1305.1; NC-PHSE: Negative control hairy root line containing empty pHSE401; *F5H*<sup>+</sup>: Hairy root lines overexpressing *F5H*; *F5H*<sup>-</sup>: Hairy root lines knocking out *F5H*

个毛状根系中有3个发生了*F5H*基因编辑, 基因编辑率为42.9%, 具体编辑情况如图5d所示: *F5H*-2和*F5H*-3发生纯合突变, 且基因编辑情况相同, 均剪除106个碱基, 发生移码突变; *F5H*-6为杂合突变体, 其编辑效果为错义点突变, 31位的异亮氨酸突变为缬氨酸, 33位的亮氨酸突变为苯丙氨酸。最终, 经过PCR验证及测序验证, 共获得WT (1样品)、NC-PCA (1样品)、NC-PHSE (1样品)、*F5H*<sup>+</sup> (11样品)、*F5H*毛状根 (3样品), 用于后续UPLC分析。

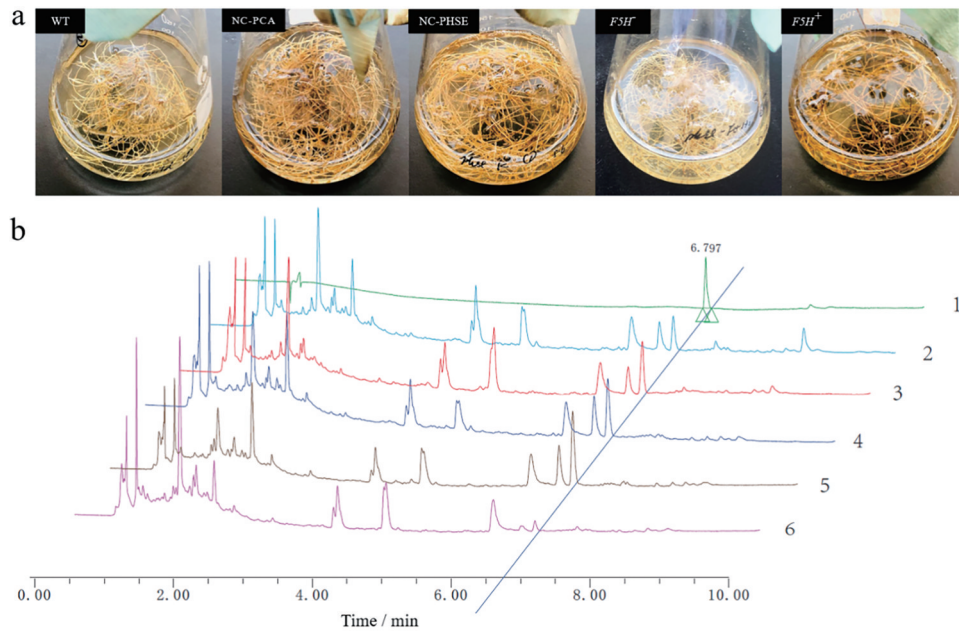
#### 4 甘草毛状根中甘草酸含量的UPLC检测

液体培养21天后的各甘草毛状根系如图6a所示,

根系生长迅速、状态良好。对各甘草毛状根系进行UPLC检测, 色谱图如图6b所示, 峰图1为甘草酸对照品色谱图, 显示甘草酸保留时间为6.797 min; 峰图2~6依次为WT、NC-PCA、NC-PHSE、*F5H*<sup>-</sup>、*F5H*<sup>+</sup>毛状根样品的色谱图。甘草酸标准曲线为 $Y = 2\,792\,995.69 X - 931.23$  ( $R^2 = 1$ ), 线性范围为0.004 3~0.085 8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。图7a为各甘草毛状根样品中甘草酸含量的柱状图, 运用SAS 8.0软件对甘草酸含量进行样品间非参数检验, 结果显示: 在*F5H*样品中, 纯合突变样品*F5H*-2和*F5H*-3的甘草酸含量显著高于WT和NC-PHSE样品, 杂合突变样品*F5H*-6的甘草酸含量与WT和NC-



**Figure 5** PCR and sequencing results. a: *roIC* amplified from each hairy root line (Lane 1-4); b: The *F5H* amplified from *F5H*<sup>+</sup> lines (Lane 5-7); c: The first exon of *F5H* amplified from *F5H*<sup>-</sup> lines (Lane 8-10); d: The editing sites of *F5H* in *F5H*<sup>-</sup> lines. M is the DNA marker



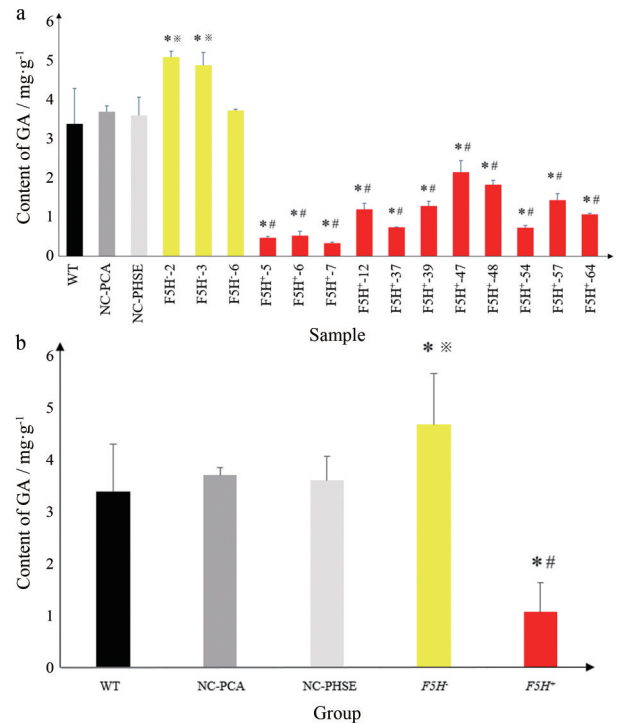
**Figure 6** UPLC sample preparation and GA content assay. a: Hairy root samples culturing in liquid 6,7-V medium for 3 weeks; b: UPLC chromatograms, line 1 is UPLC chromatogram of GA reference substance, line 2-6 are UPLC chromatograms of sample WT, NC-PCA, NC-PHSE, *F5H*, and *F5H*<sup>+</sup>

PHSE 无显著差异; 所有 *F5H*<sup>+</sup> 样品中甘草酸含量均显著低于 WT 和 NC-PCA 样品。图 7b 为甘草酸含量的组间比较分析, 运用 SAS 8.0 软件对甘草酸含量进行组间非参数检验, 结果显示: *F5H*<sup>+</sup> 组的甘草酸含量显著低于 WT 组和 NC-PCA 组, *F5H* 组的甘草酸含量显著高于 WT 组和 NC-PHSE 组, 且 *F5H*<sup>+</sup> 组的甘草酸含量仅为 *F5H* 组的 1/4。

## 讨论

本文构建了 *F5H* 基因过表达载体 pCA-*F5H* 和基因沉默载体 pHSE-*F5H*, 经由发根农杆菌 ATCC15834 介导法, 分别诱导产生了 *F5H* 基因过表达及沉默的甘草毛状根系 *F5H*<sup>+</sup> 和 *F5H*<sup>-</sup>。同时建立了野生型甘草毛状根系 WT 和阴性对照毛状根系 (NC-PCA 和 NC-PHSE)。UPLC 含量测定结果显示: *F5H*<sup>+</sup> 组甘草酸含量显著低于 WT 及 NC-PCA, 而 *F5H* 组甘草酸含量则显著高于 WT 及 NC-PHSE, 表明 *F5H* 基因表达水平与甘草酸含量呈负相关, 其表达量升高时甘草酸含量大幅下降, 而表达沉默时甘草酸含量明显上升, 同样也证实了课题组前期转录组研究的结果。

*F5H* 是苯丙烷代谢途径上的关键酶, 而苯丙烷代谢途径和产生甘草酸的 MVA 途径均通过消耗糖酵解产物来激活<sup>[9]</sup>。因此, 推测 *F5H* 基因表达量升高会导致流向萜类途径的糖酵解产物减少, 从而导致甘草酸含量降低。此外, 有研究表明 *F5H* 基因表达量的改变



**Figure 7** GA content analysis in licorice hairy roots. a: The GA content in each hairy root sample. b: The GA content in different groups. \* $P < 0.05$  vs WT; \*\* $P < 0.05$  vs NC-PHSE; # $P < 0.05$  vs NC-PCA

会影响植物中木质素的组成, 进而影响植物次生代谢<sup>[4]</sup>。同时, 木质素表达量和组成的变化也会影响植物的理化性质, 当丁香基木质素与愈创基木质素含量

比值变化较大时会改变植物中诱导子和防御基因的诱导水平<sup>[20]</sup>, 而萜类化合物在甘草防御应激过程中发挥着重要作用<sup>[21]</sup>。因此, 这也可能是 *F5H* 基因表达量变化导致甘草酸含量变化的潜在原因。

在 *F5H* 体系中, 基因编辑情况相同的纯合突变样品 F5H-2 和 F5H-3 中甘草酸的含量均显著高于 WT 和 NC-PHSE; 而杂合突变样品 F5H-6 中甘草酸的含量则与 WT 及 NC-PHSE 无显著差异。对其原因进行分析, 认为杂合突变样品 F5H-6 发生突变的两个位点位于酶的催化结构域以外, 对 *F5H* 基因编码蛋白的活性影响较小, 因此未引起甘草酸含量的显著变化; 而纯合突变样品 F5H-2 和 F5H-3 均剪除了 106 bp 的长片段, 基因发生了移码突变, 致使 *F5H* 基因丧失了原有功能, 从而对甘草的次生代谢产生影响, 并导致甘草酸含量的升高。

今后将继续以甘草毛状根为实验材料, 通过逆向遗传学策略进一步分析其他影响甘草酸生物合成的关键基因的功能, 为全面构建甘草酸生物合成的分子调控网络奠定基础。

**作者贡献:** 张智新撰写了论文; 刘颖构思并设计了实验方案; 张智新、汪逗逗和杨林完成了实验; 田少凯分析了相关实验数据; 所有作者均阅读并参与修改了这篇文章。

**利益冲突:** 本文作者均没有利益冲突。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典一部) [S]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 86-87.
- [2] Huang RY, Chu YL, Jiang ZB, et al. Glycyrrhizin suppresses lung adenocarcinoma cell growth through inhibition of thromboxane synthase [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33: 375-388.
- [3] Qu L, Chen C, He W, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating autophagy through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Am J Transl Res, 2019, 11: 2042-2055.
- [4] Li Y, Yao N, Zhang T, et al. Ability of post-treatment glycyrrhizic acid to mitigate cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic mice [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e926551.
- [5] Yang R, Li WD, Ma YS, et al. The molecular identification of licorice species and the quality evaluation of licorice slices [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 318-326.
- [6] Gao ZQ, Tian SK, Hou JM, et al. RNA-Seq based transcriptome analysis reveals the molecular mechanism of triterpenoid biosynthesis in *Glycyrrhiza glabra* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2020, 30: 127102.
- [7] Guo XY, Hu SL, Cao Y, et al. Research progress on the *F5H1* gene regulating S lignin biosynthesis and its genetic improvement on bamboo in the future [J]. J Fujian Forest Sci Technol (福建林业科技), 2007, 34: 234-237, 243.
- [8] Meyer K, Cusumano JC, Somerville C, et al. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93: 6869-6874.
- [9] Stewart JJ, Akiyama T, Chapple C, et al. The effects on lignin structure of overexpression of ferulate 5-hydroxylase in hybrid poplar [J]. Plant Physiol, 2009, 150: 621-635.
- [10] Kim J, Choi B, Park YH, et al. Molecular characterization of ferulate 5-hydroxylase gene from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) [J]. Sci World J, 2013, 2013: 421578.
- [11] Sakiroglu M, Sherman-Broyles S, Story A, et al. Patterns of linkage disequilibrium and association mapping in diploid alfalfa (*M. sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2012, 125: 577-590.
- [12] Andersen JR, Zein I, Wenzel G, et al. Characterization of phenylpropanoid pathway genes within European maize (*Zea mays* L.) inbreds [J]. BMC Plant Biol, 2008, 8: 2.
- [13] Reddy MS, Chen F, Shadle G, et al. Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102: 16573-16578.
- [14] Tang YH, Liu F, Xing HC, et al. Correlation analysis of lignin accumulation and expression of key genes involved in lignin biosynthesis of Ramie (*Boehmeria nivea*) [J]. Genes (Basel), 2019, 10: 389.
- [15] Sharafi A, Hashemi Sohi H, Mousavi A, et al. Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of salutaridinol 7-O-acetyltransferase gene via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2013, 29: 2125-2131.
- [16] Park NI, Park JH, Park SU. Overexpression of cinnamate 4-hydroxylase gene enhances biosynthesis of decursinol angelate in *Angelica gigas* hairy roots [J]. Mol Biotechnol, 2012, 50: 114-120.
- [17] Hou JM, Yin YC, Tian SK, et al. Overexpressing of chalcone isomerase (*CHI*) gene enhances flavonoid accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 319-327.
- [18] Hu T, Gao ZQ, Yin YC, et al. Determination of seven flavonoids in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and *Glycyrrhiza glabra* L. by UPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2019, 39: 763-771.
- [19] Wang L, Shi LL, Zhang YX, et al. Biosynthesis and regulation of the secondary metabolites in plants [J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究), 2007, 28: 500-508.
- [20] Gallego-Giraldo L, Pose S, Pattathil S, et al. Elicitors and defense gene induction in plants with altered lignin compositions [J]. New Phytol, 2018, 219: 1235-1251.
- [21] Shirazi Z, Aalami A, Tohidfar M, et al. Triterpenoid gene expression and phytochemical content in Iranian licorice under salinity stress [J]. Protoplasma, 2019, 256: 827-837.