

过表达 *LIS* 基因对甘草毛状根中甘草酸生物合成的调控研究

柯铃钰, 陈姿伊, 丁文文, 张智新, 何平*, 刘颖*

(北京中医药大学生命科学院, 北京 102488)

摘要: 芳樟醇合酶 [(3*S*)-linalool synthase, LIS] 是单萜合成途径上的关键酶。本课题组前期在甘草转录组研究中发现 *LIS* 基因与甘草酸 (glycyrrhizic acid, GA) 的生物合成密切相关, 因此本研究拟利用甘草毛状根培养体系, 进一步解析 *LIS* 对甘草酸生物合成的调控作用。本研究克隆了甘草 *LIS* 基因 (GenBank 注册号: MZ169552); 采用基因融合法构建过表达 *LIS* 基因的植物双元表达载体 pCA-*LIS*; 利用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834) 介导法诱导甘草毛状根系; 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 进行 *LIS* 基因的表达水平分析; 最终采用 UPLC 法测定各甘草毛状根系中的甘草酸含量。结果显示, 过表达 *LIS* 基因的甘草毛状根系中, *LIS* 基因的表达水平显著高于野生型, 而甘草酸含量则显著低于野生型和阴性对照组, 表明 *LIS* 基因的表达水平与甘草酸含量呈负相关。本研究首次克隆得到甘草 *LIS* 基因, 通过反向遗传学策略证实了 *LIS* 基因对甘草酸生物合成的负调控作用, 为进一步完善甘草酸生物合成的分子调控网络提供了依据。

关键词: 甘草; 甘草酸; 芳樟醇合酶; 基因过表达; 毛状根

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)12-3686-09

Overexpression of (3*S*)-linalool synthase gene (*LIS*) regulates the glycyrrhizic acid biosynthesis in *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots

KE Ling-yu, CHEN Zi-yi, DING Wen-wen, ZHANG Zhi-xin, HE Ping*, LIU Ying*

(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract: (3*S*)-Linalool synthase (LIS) is a key enzyme involved in the monoterpene biosynthetic pathway. Based on our previous transcriptome study, the expression level of *LIS* gene was exceedingly related to glycyrrhizic acid (GA) biosynthesis. Therefore, we used hairy root culturing to further investigate the effect of *LIS* on the GA biosynthesis. A *LIS* gene (GenBank accession number: MZ169552) was cloned from *Glycyrrhiza uralensis*. The plant binary overexpression vector pCA-*LIS* was constructed by gene fusion. *G. uralensis* hairy roots overexpressing *LIS* were induced by the *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. The expression levels of *LIS* were analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and the contents of GA in hairy root lines were determined by UPLC. It was found that in the hairy root lines overexpressing *LIS*, the expression levels of *LIS* were significantly higher than that in the wild type, while the contents of GA were remarkably lower than those in the wild type and negative control. These findings indicate that the expression level of *LIS* is negatively correlated with the accumulation of GA. In this study, *LIS* was cloned from *G. uralensis* for the first time and the negative regulatory effect of *LIS* on GA biosynthesis was confirmed by reverse genetics. This work provides support for further improvement of the molecular regulatory network of GA biosynthesis in *G. uralensis*.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis*; glycyrrhizic acid; (3*S*)-linalool synthase; overexpression of gene; hairy root

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 始载于《神农本草经》, 是我国最常用的大宗药材之一, 具有清热解毒、缓急止痛、调和诸药等功效^[1]。现代药理学研究表明, 甘草中的三萜类化合物甘草酸 (glycyrrhizic acid, GA) 是其发挥功效的主要活性成分, 已证实其具有抗癌^[2]、抗炎^[3]、抗病毒^[4]等多种药理活性, 因此历版《中华人民共和国药典》均将其规定为中药材甘草的检测指标^[1]。然而, 本课题组前期调查显示, 约 50% 市售甘草药材中甘草酸含量未达到国家药典规定的最低标准 (2.0%)^[5]。因此, 提高栽培甘草中甘草酸含量对于保障甘草药材质量具有重要意义。

高等植物中萜类化合物的生物合成始于一对同分异构体, 即: 二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 和异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP), 它们经连续缩合形成不同萜类化合物的前体, 再通过各种骨架的排列及修饰, 从而产生类异戊二烯结构和功能的多样性^[6]。如图 1 所示, IPP 和 DMAPP 是由细胞质中的甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和质体中的 2-C-甲基-D-赤藻糖-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP) 途径共同合成的^[7]。通常认为, 来源于 MVA 途径的 DMAPP 和 IPP 主要用于合成倍半萜、三萜、甾醇等化合物, 而 MEP 途径

则提供 DMAPP 和 IPP 用于合成单萜、二萜、四萜等化合物^[8]。甘草酸属于三萜类化合物, 由 MVA 途径合成, 但同时受 MEP 途径的影响^[9]。DMAPP 和 IPP 通过牻牛儿牻牛儿基焦磷酸合酶 (geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPS) 缩合生成单萜途径前体牻牛儿基焦磷酸 (geranyl pyrophosphate, GPP), 而芳樟醇合酶 [(3S)-linalool synthase, LIS] 是催化 GPP 进一步形成芳樟醇 [(+)-linalool] 的关键酶^[10]。研究显示, 在金宣茶 (*C. sinensis* cv. Jinxuan) 和樟树 (*Cinnamomum camphora*) 中芳樟醇的释放量与 LIS 的表达量均呈正相关^[11,12]。LIS 属于萜烯合酶 (terpene synthase, TPS) 家族, 目前在 GenBank 中已注册 4 200 多条植物 TPS 基因序列, 包括: 北美云杉 (*Picea sitchensis*)^[13]、月季 (*Rosa chinensis*)^[14]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[15]、甜豌豆 (*Lathyrus odoratus*)^[16] 等。本课题组前期开展了甘草的转录组研究, 挖掘到影响甘草酸生物合成的 15 个核心差异表达基因^[17], LIS 即为其中之一。然而, 在甘草中尚未克隆得到该基因。因此, 本研究拟克隆甘草 LIS 基因, 并解析其对甘草酸生物合成的调控作用。

植物毛状根的形成是由发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 侵染而产生的一种病理表现。由于毛状根具有生长快速稳定^[18]、无需额外激素^[19]、可合成植物次

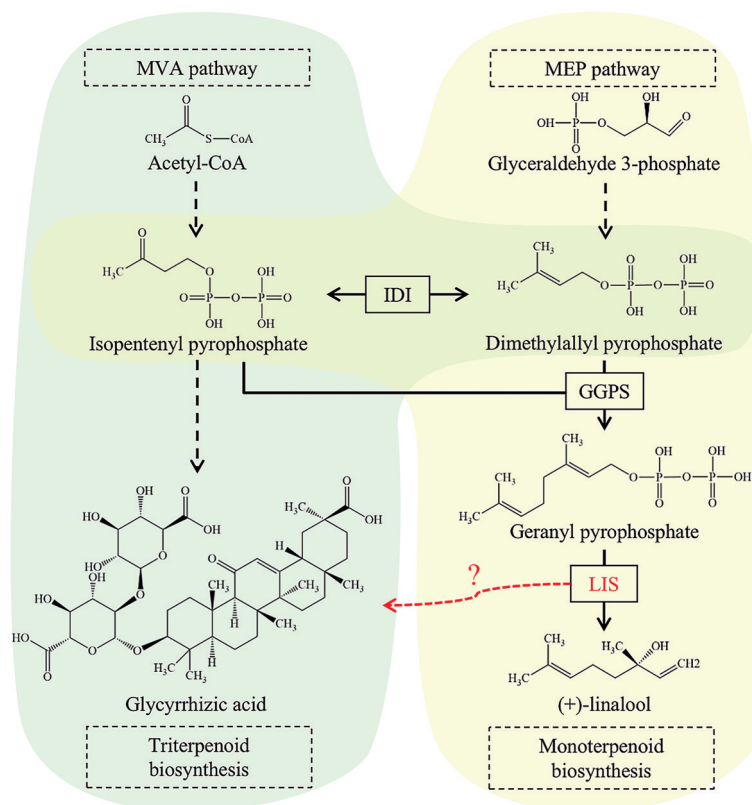


Figure 1 The biosynthetic pathway of triterpenoid and monoterpenoid in *G. uralensis*. MVA: Mevalonate; MEP: 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; IDI: Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase; GGPS: Geranylgeranyl pyrophosphate synthase; LIS: (3S)-Linalool synthase

生代谢产物^[20]等优点,已成为研究植物基因功能的良好遗传转化体系,如:在苦荞(*Fagopyrum tataricum*)毛状根中过表达*FtF3GT₁*基因可显著提高毛状根中总黄酮的含量^[21];在西伯利亚益母草(*Leonurus sibiricus* L.)毛状根中过表达*AtPAP₁*基因则可诱导高水平酚酸的积累^[22]。就甘草而言,本课题组前期已利用毛状根体系对甘草转录组数据中挖掘到的生长素应答蛋白基因(auxin-responsive protein IAA gene, *ARPI*)、 β -香树酯醇合成酶基因(β -amyrin synthase gene, *β -AS*)、UDP-葡萄糖 4-差向异构酶基因(UDP-galactose/glucose-4-epimerase gene, *UGE*)、查尔酮异构酶基因(chalcone isomerase, *CHI*)、阿魏酸 5-羟化酶基因(ferulate 5-hydroxylase, *F5H*)等陆续开展了研究,解析了这些功能基因对于甘草酸生物合成的调控作用^[9,23-25]。因此,本研究也将利用毛状根体系对*LIS*的功能开展研究,解析该基因在甘草萜类化合物代谢中的作用,为进一步构建甘草酸生物合成的分子调控网络提供依据。

材料与方 法

试剂与耗材 DNA/RNA 一站式提取试剂盒购于上海生工生物工程股份有限公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、GoldenView、DNA Marker (BM2000、BM15000)、高纯质粒小量快速提取试剂盒(离心柱型)、BM 无缝克隆试剂盒、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒均购于北京博迈德科技发展有限公司;卡那霉素(kanamycin, Kan)购于 Genview 公司;pMD-19T 载体、限制性内切酶 *Bgl* II、*Spe* I 等购于 TaKaRa 公司;头孢噻肟钠(cefotaxime

sodium, Cef) 和氨苄青霉素(ampicillin, Amp) 购于北京拜尔迪生物技术有限公司;甲醇(分析纯)购于天津西典化学科技有限公司;乙腈(色谱纯)购于赛默飞世尔科技(中国)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 99.45%;NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus、NovoScript[®] Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) 购于上海近岸科技有限公司。

仪器 A300 型 PCR 扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司);恒温振荡培养箱 DLHR-Q200(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司);1-13000 型离心机(美国 Sigma 公司);Gene PulserMXcell 穿孔仪(美国 BIO-RAD 公司);DYY-8 型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司);凝胶成像系统(北京百晶生物技术有限公司)。

PCR 引物及程序 引物合成及测序均由上海生物工程股份有限公司完成。所采用的全部引物信息如表 1 所示,全部 PCR 程序如表 2 所示。

甘草 LIS 基因克隆 采用 RNA 提取试剂盒从新鲜甘草根样中提取总 RNA,采用 cDNA 合成试剂盒逆转录获得 cDNA。利用 NCBI 在线工具 PrimerBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 设计引物 I (表 1),采用 PCR 程序 1 (表 2) 对 *LIS* 基因进行扩增,其 25 μ L 体系为: cDNA 1.0 μ L, LA Taq 酶 0.25 μ L, LIS-F1 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, LIS-R1 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, dNTPs (2.5 μ mol \cdot L⁻¹) 2.0 μ L, 10 \times LA PCR buffer (Mg²⁺) 2.5 μ L, ddH₂O 18.25 μ L。对 PCR 产物进行胶回收纯化,连入 pMD-19T 载体,16 $^{\circ}$ C 反应过夜。通过热激法将连

Table 1 Primer sequences used in this study

No.	Project	Primer	Sequence (5'-3')
I	<i>LIS</i> cloning	LIS-F1	ATGTCTACTGCAAATATAATGGCTG
		LIS-R1	TCAATAGCTAGGAAGAGATGTGAAG
II	Construction of <i>LIS</i> overexpression vector	LIS-F2	CTCTTGACCATGGTAGATCTATGTCTACTGCAAATATAATGGCTG
		LIS-R2	TTGATCGGGTACAGACTAGTTCAATAGCTAGGAAGAGATGTGAAG
III	Verification of <i>rolC</i> in hairy roots	R-F	CATATATGCCAAATTTACTACTAG
		R-R	GTTAACAAACTAGGAAACAGG
IV	Identification of exogenous <i>LIS</i> in transgenic hairy roots	GL-F	GCTTGACGCATACAATGCCT
		GL-R	CCGAAGCGGAGCAGCAGATAAC
V	β -Actin expression detection by RT-qPCR	qB-F	CAAAAGGATGCCTATGTGGG
		qB-R	CAGGAGCAACACGCAATTC
VI	<i>LIS</i> expression detection by RT-qPCR	qLIS-F	AGTTGGGACTTGTGACA
		qLIS-R	TCATCCAATGTGCCATAAGTGT

Table 2 PCR programs used in this study

No.	Project	PCR program
1	<i>LIS</i> cloning	94 $^{\circ}$ C 5 min, 35 cycles of 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 100 s, and 72 $^{\circ}$ C 5 min
2	Construction of <i>LIS</i> overexpression vector	94 $^{\circ}$ C 5 min, 35 cycles of 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 100 s, and 72 $^{\circ}$ C 5 min
3	Verification of <i>rolC</i> in hairy roots	95 $^{\circ}$ C 5 min, 34 cycles of 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, and 72 $^{\circ}$ C 5 min
4	Identification of exogenous <i>LIS</i> in transgenic hairy roots	95 $^{\circ}$ C 5 min, 34 cycles of 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, and 72 $^{\circ}$ C 5 min
5	β -Actin expression detection by RT-qPCR	95 $^{\circ}$ C 1 min, 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min
6	<i>LIS</i> expression detection by RT-qPCR	95 $^{\circ}$ C 1 min, 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min

接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在 LB (含 Amp 50 mg·L⁻¹) 平板上筛选阳性克隆, 并进行 PCR 验证, 将验证正确的菌液送测序。

甘草 LIS 生物信息学分析 采用 EsPASy-ProtParam 对甘草 LIS 序列进行理化性质分析; 采用 SOPMA 对甘草 LIS 进行二级结构分析; 采用 Swiss-Model 构建甘草 LIS 三级结构模型; 采用 SignalP 6.0 Server 对甘草 LIS 进行信号肽预测; 采用 NCBI 的 CD-search 对甘草 LIS 中的保守结构域进行预测; 从 GenBank 数据库中挑选 19 条来自不同种属的萜烯合酶蛋白序列, 使用 MEGA 11 软件对以上序列和本文克隆获得的甘草 LIS 进行聚类分析, 采用近邻聚类算法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树。

过表达 LIS 植物双元表达载体的构建 在 pCAMBIA1305.1 载体上, 于 *Bgl* II 及 *Spe* I 酶切位点插入 LIS 基因, 具体步骤如下: 依据 BM 无缝克隆试剂盒设计引物 II (表 1), 采用 PCR 程序 2 (表 2) 扩增带有载体同源臂的目标基因; 采用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Spe* I 在 37 °C 酶切 pCAMBIA1305.1 质粒 1 h; 对扩增获得的目标基因与线性化载体进行胶回收纯化; 采用 BM 无缝克隆试剂盒对以上二者 (载体与基因的摩尔比为 1:3) 进行连接, 50 °C、30 min; 通过热激法将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在含有 Kan (50 mg·L⁻¹) 的 LB 平板上筛选阳性克隆; 对阳性克隆进行 PCR 及测序验证; 将验证正确的质粒命名为 pCA-LIS。

重组发根农杆菌 ATCC15834 的构建 采用电转法 (C: 25 μ F, PC: 200 Ω , U: 2 400 V) 将重组质粒 pCA-LIS 导入发根农杆菌 ATCC15834 感受态细胞, 在 TY 平板 (含 Kan 50 mg·L⁻¹) 上筛选阳性克隆。采用引物 I (表 1) 和 PCR 程序 1 (表 2) 对阳性菌落进行 PCR 验证, 然后送测序验证。将验证正确的工程菌接种于 TY 液体培养基中, 在 25 °C、180 r·min⁻¹ 条件下振荡培养至对数生长期, 离心后重悬于等体积的 6,7-V 液体培养基^[26]中。

过表达 LIS 基因甘草毛状根的诱导及验证 在超净工作台中切取甘草无菌苗胚轴作为外植体材料, 浸泡于上述 6,7-V 重悬菌液中, 侵染 30 min 后转接于 6,7-V 平板, 黑暗条件下共培养 2 天。用 Cef 水溶液 (500 mg·L⁻¹) 浸泡外植体 5 min, 无菌水冲洗后重新接种于含 Cef (500 mg·L⁻¹) 的 6,7-V 平板上, 诱导过表达 LIS 基因甘草毛状根。同时, 采用发根农杆菌 ATCC15834 诱导野生型甘草毛状根, 采用携带 pCAMBIA1305.1 空质粒的发根农杆菌诱导阴性对照组甘草毛状根。每 7 天转接继代除菌, 逐代降低 Cef 的浓度, 直至发根农杆菌完全除净。使用 DNA 提取试剂盒提取各甘草毛状根系 DNA, 采用引物 III (表 1) 和 PCR 程序 3 (表 2) 对

毛状根样品的 *rolC* 基因进行 PCR 验证; 采用引物 IV (表 1) 和 PCR 程序 4 (表 2) 对过表达 LIS 基因甘草毛状根样品进行 PCR 验证。

甘草毛状根的液体培养 对以上验证正确的甘草毛状根进行液体培养, 步骤如下: 在无菌条件下称取生长状态良好的各甘草毛状根系样品 2.0 g, 转接入 6,7-V 液体培养基中, 每根系 3 重复, 25 °C、110 r·min⁻¹ 条件下振荡培养, 每隔 1 周换液 1 次, 3 周后收集毛状根样品, 洗净, 用于后续 LIS 基因表达水平及甘草酸含量测定。

甘草毛状根中 LIS 的表达水平分析 使用 RNA 提取试剂盒提取上述各毛状根系的总 RNA, 采用一步法逆转录合成 cDNA, 其反应体系为: 甘草 RNA 6.0 μ L, gDNA Purge 1.0 μ L, NovoScript[®] Plus 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 10.0 μ L, RNase-Free H₂O 3.0 μ L, 反应条件为: 50 °C 下孵育 15 min, 75 °C 再孵育 5 min, 以甘草 β -actin 基因作为内参, 利用 RT-qPCR 对甘草毛状根样品中 LIS 基因的表达水平进行分析。采用引物 V (表 1) 和 PCR 程序 5 (表 2) 对 β -actin 进行扩增, 采用引物 VI (表 1) 和 PCR 程序 6 (表 2) 对 LIS 基因进行扩增, 反应体系为: 基因 1.0 μ L, 上游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 1.0 μ L, 下游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 1.0 μ L, 2 \times NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 5.0 μ L, ddH₂O 2.0 μ L。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算 LIS 基因的相对表达水平。

UPLC 法测定甘草毛状根中甘草酸含量 采用本课题组前期建立的 UPLC 法对各甘草毛状根样品中的甘草酸进行含量测定^[27]。供试品制备: 将毛状根样品在 60 °C 下烘干至恒重, 粉碎后过 60 目筛; 精密称取各甘草毛状根样品粉末 0.1 g, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇水溶液, 超声提取 30 min (频率 40 kHz, 功率 500 W); 冷却后用 50% 甲醇水溶液补至 50 mL, 经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为 UPLC 供试品。线性: 精密称取甘草酸单铵盐 4.52 mg, 用 50% 甲醇水溶液配制成质量浓度为 0.085 8 mg·mL⁻¹ 的贮备液, 并稀释成浓度为 0.085 8、0.068 6、0.051 5、0.042 9、0.017 2、0.008 58、0.004 3 mg·mL⁻¹ 的梯度溶液进行线性分析。甘草酸含量测定: 采用 Waters UPLC ACQUITY 色谱系统 (配备 UPLC ACQUITY PDA e λ 检测器) 和 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m), 以乙腈 (A)-0.05% 磷酸液 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 程序见表 3, 柱温为 40 °C、流速为 0.3 mL·min⁻¹、进样量为 1 μ L, 于 250 nm 波长检测甘草酸。

结果与分析

1 基因克隆与生物信息学分析

由图 2a 可知, PCR 扩增得到了长度约为 1 800 bp 的

Table 3 Program of UPLC gradient elution

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

特异性条带, 测序结果显示, 该条带实际长度为 1 837 bp, 其中开放阅读框 (open reading frame, ORF) 全长为 1 743 bp, 使用在线 BLAST 比对显示该片段与豆科大豆 *Glycine max* 的 *LIS* cDNA 序列相似度为 83.76%, 其氨基酸序列的相似度为 74.74%, 表明所克隆序列为甘草 *LIS* 基因序列。在 GenBank 上对所获序列进行注册, 注册号为: MZ169552。由甘草 *LIS* 蛋白序列理化性质分析可知: 该蛋白分子式为 $C_{2936}H_{4620}N_{806}O_{870}S_{32}$; 理论分子质量为 66 155.78 Da; 等电点为 6.36; 不稳定指数为 45.19 (> 40), 可初步判断其为不稳定蛋白; 在哺乳动物网织红细胞内的最长半衰期为 30 h; 亲水性为 $-0.295 (< 0)$, 可认为其是亲水性蛋白。二级结构分析如图 2b 所示, 甘草 *LIS* 含有 69.41% 的 α -螺旋 (蓝色)、3.79% 的延长链 (红色) 和 27.07% 的无规卷曲 (黄

色), 三级结构模型如图 2c 所示。跨膜区域预测结果表明该蛋白高概率位于膜外; 信号肽预测结果显示, 对信号肽和切割位点的预测值均为 0, 说明其结构中不含信号肽; 保守结构域预测结果显示, 甘草 *LIS* 属于萜烯合酶/环化酶家族蛋白, 具有 *Terpene_cyclase_plant_C1* 保守结构域。聚类分析结果如图 2d 所示: 裸子植物 (紫色)、单子叶植物 (绿色)、双子叶植物 (橙色) 的 TPS 序列各自聚为一支; 甘草 *LIS* 序列 (红色框) 与豆科植物红豆 (*Abrus precatorius*)、野生大豆 (*Glycine soja*)、密花豆 (*Spatholobus suberectus*) 的 TPS 序列相距最近, 而与 3 种裸子植物相距最远, 此聚类结果与各物种的亲缘关系相一致。

2 过表达 *LIS* 基因甘草毛状根的诱导及验证

按照图 3 所示方法构建过表达甘草 *LIS* 基因的植物双元表达载体 pCA-*LIS*, 对其进行 PCR 验证, 结果如图 4a 所示: 扩增获得了长度约为 1 800 bp 的片段, 与目标序列 *LIS* 长度相符, 进一步测序结果显示该片段与上述注册序列甘草 *LIS* (MZ169552) 具有 100% 的一致性, 表明携带甘草 *LIS* 基因的双元表达载体构建成功。图 4b 是侵染后第 7 和 28 天的甘草毛状根样品, 包括: 野生型甘草毛状根 (wild type, WT)、含 pCambia1305.1 空质粒的阴性对照毛状根 (negative control, NC) 和过表达 *LIS* 基因的甘草毛状根 (*LIS*⁺), 均长势良好。图 4c 为各甘草毛状根系中 *rolC* 基因的 PCR 验证结果, 扩增

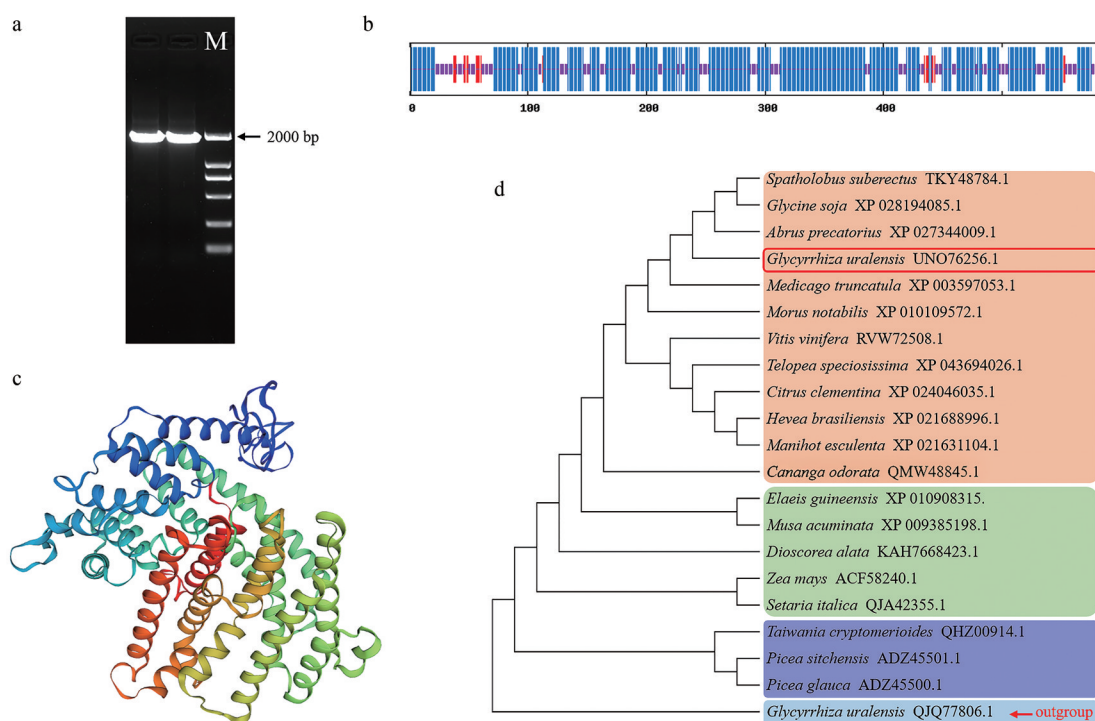


Figure 2 The cloning of *LIS* gene from *G. uralensis* and the bioinformatic analysis of *LIS*. a: The PCR verification result of *LIS* (M: DNA marker). b and c: The predicted secondary and 3D structures of *LIS*. d: The phylogenetic tree constructed based on 20 TPS orthologs

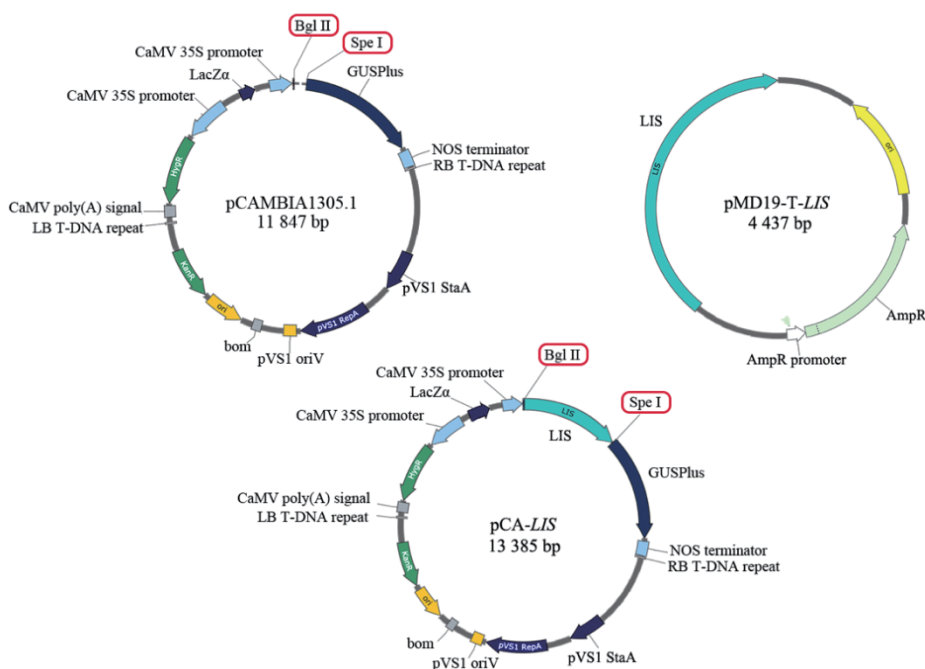


Figure 3 Construction of the recombinant overexpression vector pCA-*LIS*

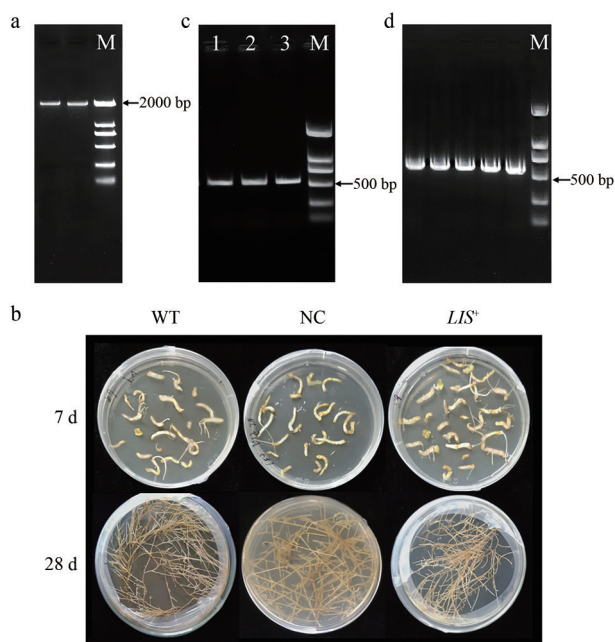


Figure 4 The induction and identification of *G. uralensis* hairy roots. a: *LIS* amplified from vector pCA-*LIS*. b: The *G. uralensis* hairy roots after induction and culturing for 7 d and 28 d. WT: Wild type hairy roots, NC: Negative control hairy roots containing empty pCambia1305.1. *LIS*⁺: Hairy roots overexpressing *LIS*. c: *rolC* amplified from hairy roots (Lane 1: WT, 2: NC, and 3: *LIS*⁺). d: The 500 bp-fragments (*GUS* + *LIS*) amplified from *LIS*⁺ hairy roots

获得了长度约为 600 bp 的条带, 测序结果显示其与发根农杆菌 *rolC* 基因 (DQ160187.1) 具有 100% 的一致

性。图 4d 为 *LIS*⁺ 毛状根中外源基因的 PCR 扩增结果, 扩增获得了长度约为 500 bp 的条带, 与预期长度相符, 测序结果显示该条带 5' 端 266 bp 与 pCambia1305.1 载体骨架上 *GUS* 基因序列 100% 一致, 3' 端 276 bp 与甘草 *LIS* 序列 (MZ169552) 100% 一致, 表明毛状根中的 *LIS* 基因序列为外源导入, 而非毛状根自带。以上结果证明, 已诱导获得过表达 *LIS* 基因的甘草毛状根系。

3 甘草毛状根中 *LIS* 基因的表达水平分析

通过 RT-qPCR 测定甘草毛状根中 *LIS* 基因的表达水平, 使用 GraphPad Prism 8 软件对其进行样品间单因素方差分析, 结果如图 5 所示: 5 个 *LIS*⁺ 根系中 *LIS* 基因的相对表达量均显著高于 WT。

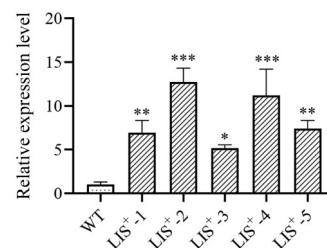


Figure 5 The relative expression levels of *LIS* in different *G. uralensis* hairy root lines ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs WT

4 甘草毛状根中甘草酸的含量检测

各甘草毛状根系经液体培养 21 天后的生长情况如图 6a 所示, 各毛状根系均长势良好。毛状根系中甘草酸含量测定的 UPLC 色谱图如图 6b 所示, 其中 1 为甘草酸

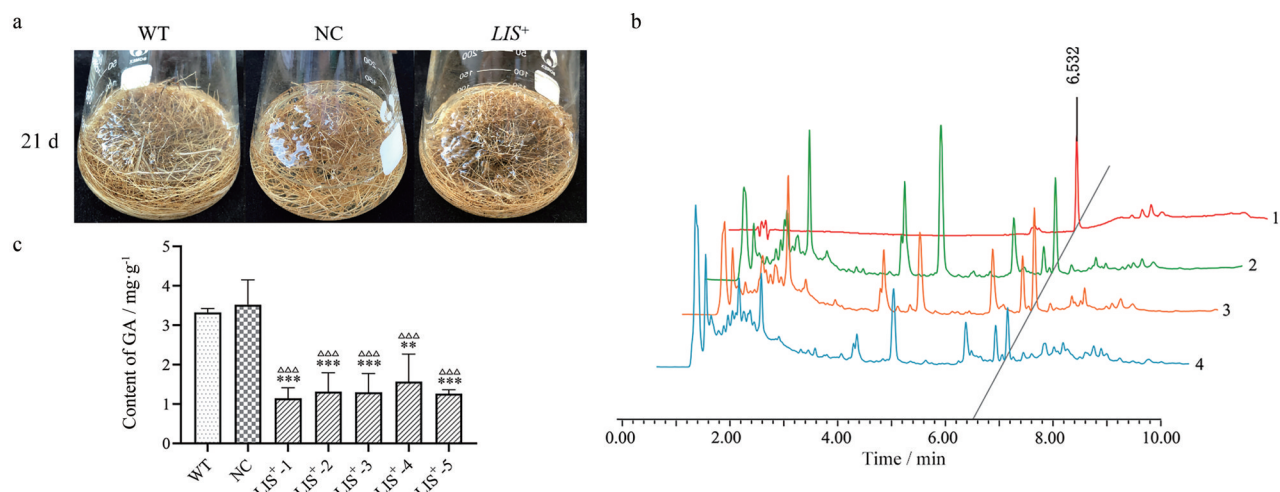


Figure 6 GA content analyses in *G. uralensis* hairy roots. a: Hairy root samples culturing in liquid 6,7-V media for 21 d. b: UPLC chromatograms. Lines 1–4 show the UPLC chromatograms of reference substance GA and the WT, NC, and *LIS*⁺ hairy root lines. c: GA content analyses in *G. uralensis* hairy root lines ($n = 3$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs WT; $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs NC

对照品色谱图,显示甘草酸保留时间为6.532 min,2~4依次为WT、NC和*LIS*⁺甘草毛状根系的色谱图。甘草酸标准曲线回归方程为: $Y = 2\ 683\ 455.37X - 1\ 660.17$ ($R^2 = 0.999\ 9$),线性范围为: $0.004\ 3 \sim 0.085\ 8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。图6c为各甘草毛状根系中甘草酸含量的柱状图,运用GraphPad Prism 8软件对甘草酸含量进行样品间单因素方差分析,结果显示所有*LIS*⁺样品中甘草酸含量均显著低于WT和NC样品。

讨论

本研究克隆了甘草*LIS*基因,构建了过表达载体pCA-*LIS*,通过发根农杆菌介导法诱导甘草胚轴外植体形成了野生型、阴性对照及过表达*LIS*基因的甘草毛状根系,通过RT-qPCR检测*LIS*基因的表达水平,并采用UPLC法测定各甘草毛状根系中的甘草酸含量。结果表明,过表达*LIS*基因的甘草毛状根系中,*LIS*基因的表达量显著高于野生型,而甘草酸含量则显著低于野生型和阴性对照组,表明*LIS*基因的表达水平与甘草酸含量呈负相关。

如前所述,高等植物的萜类合成涉及MVA和MEP途径,前者以乙酰辅酶A作为起始物,主要合成倍半萜、三萜及其他多萜;后者则以丙酮酸和3-磷酸甘油醛为起始物,主要合成单萜、二萜及类胡萝卜素等萜类化合物^[28]。乙酰辅酶A的生物合成除了泛酸这一通路之外,作为有氧呼吸的一环,也可从葡萄糖开始,经由丙酮酸氧化而生成。*LIS*作为单萜途径上的关键酶,其基因过表达上调了MEP途径,促进了丙酮酸和3-磷酸甘油醛的消耗,降低了乙酰辅酶A的合成,使得进入MVA

途径的前体化合物减少,从而导致甘草酸的含量下降。此外,植物中各种萜类化合物是由IPP和DMAPP按照不同比例缩合而成的^[29],如:位于胞质中的MVA途径合成的IPP和DMAPP通常按照2:1的比例合成倍半萜及三萜的前体化合物——法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP);而位于质体中的MEP途径则通常按照IPP:DMAPP为6:1的比例来合成单萜途径前体GPP和四萜途径前体牻牛儿牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)^[30]。虽然MVA和MEP途径在亚细胞区域中是彼此分开的,但有研究表明植物中这两条途径之间存在相互关联,胞质中的IPP能够进行跨质体膜的运输^[31]。因此,当*LIS*过表达时,其前体GPP的过量消耗将导致MEP途径上IPP的需求增多,促使MVA途径合成的IPP流向MEP途径,造成三萜途径前体FPP的合成量减少,这也是导致甘草酸含量下降的可能原因。

近些年来,大量研究均表明功能基因能够影响药用植物有效成分的生物合成,例如:在丹参(*Salvia miltiorrhiza*)毛状根中过表达*SmHMGR*₁、*SmHMGR*₂和*SmHMGR*₃可显著提高丹参酮的含量^[32];在青蒿(*Artemisia annua*)中过表达*AaTAR*₂可正向调节青蒿素和类黄酮的生物合成^[33]。同样地,在本课题组前期研究中也发现,过表达*CHS*和*CHI*可有效提高甘草毛状根中总黄酮的水平^[24,34];而过表达 *β -AS*和*UGE*则可使其甘草酸含量显著升高^[23]。今后,将继续以甘草毛状根为实验材料,对影响甘草酸生物合成的其他关键基因开展研究,完善甘草酸生物合成的分子调控网络,为甘草的大规模优培优选奠定基础。

作者贡献: 柯铃钰撰写了论文; 刘颖和何平构思并设计了实验方案; 柯铃钰、陈姿伊和丁文文合作开展了相关实验, 对本论文同等贡献; 张智新协助分析了实验数据; 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) [M]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 88.
- [2] Lin SC, Chu PY, Liao WT, et al. Glycyrrhizic acid induces human MDA-MB-231 breast cancer cell death and autophagy via the ROS-mitochondrial pathway [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39: 703-710.
- [3] Choi M, Thuy LT, Lee Y, et al. Dual-functional dendrimer micelles with glycyrrhizic acid for anti-inflammatory therapy of acute lung injury [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 47313-47326.
- [4] Sun ZG, Zhao TT, Lu N, et al. Research progress of glycyrrhizic acid on antiviral activity [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2019, 19: 826-832.
- [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] Oldfield E, Lin FY. Terpene biosynthesis: modularity rules [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 1124-1137.
- [7] Abbas F, Ke YG, Yu RC, et al. Functional characterization and expression analysis of two terpene synthases involved in floral scent formation in *Lilium 'Siberia'* [J]. *Planta*, 2019, 249: 71-93.
- [8] Tian SK, Wang DD, Yang L, et al. A systematic review of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase in terpenoid biosynthesis in plants [J]. *Plant Growth Regul*, 2021, 96: 221-235.
- [9] Yang L, Wang DD, Tian SK, et al. The role of licorice *DXS* knockout and overexpression in glycyrrhizic acid biosynthesis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)* 2021, 56: 2025-2032.
- [10] Pragadheesh VS, Chanotiya CS, Rastogi S, et al. Scent from *Jasminum grandiflorum* flowers: investigation of the change in linalool enantiomers at various developmental stages using chemical and molecular methods [J]. *Phytochemistry*, 2017, 140: 83-94.
- [11] Mei X, Liu XY, Zhou Y, et al. Formation and emission of linalool in tea (*Camellia sinensis*) leaves infested by tea green leafhopper (*Empoasca (Matsumurasca) onukii* Matsuda) [J]. *Food Chem*, 2017, 237: 356-363.
- [12] Tian ZF, Luo QY, Zuo ZJ. Seasonal emission of monoterpenes from four chemotypes of *Cinnamomum camphora* [J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 163: 113327.
- [13] Keeling CI, Weisshaar S, Ralph SG, et al. Transcriptome mining, functional characterization, and phylogeny of a large terpene synthase gene family in spruce (*Picea* spp.) [J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 43.
- [14] Magnard JL, Bony AR, Bettini F, et al. Linalool and linalool nerolidol synthases in roses, several genes for little scent [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 127: 74-87.
- [15] Zhu T, Wang L, Rimbart H, et al. Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring genome assembly [J]. *Plant J*, 2021, 107: 303-314.
- [16] Bao T, Shadrack K, Yang S, et al. Functional characterization of terpene synthases accounting for the volatilized-terpene heterogeneity in *Lathyrus odoratus* cultivar flowers [J]. *Plant Cell Physiol*, 2020, 61: 1733-1749.
- [17] Gao Z, Tian S, Hou J, 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.
- [18] Qin YQ, Wang D, Fu JX, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation as an efficient system for gene function analysis in *Litchi chinensis* [J]. *Plant Methods*, 2021, 17: 103.
- [19] Talano MA, Oller AL, González PS, et al. Hairy roots, their multiple applications and recent patents [J]. *Recent Pat Biotechnol*, 2012, 6: 115-133.
- [20] Wang JW, Wu JY. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2013, 134: 55-89.
- [21] Lu X, He M, Zhang K, et al. Study on the cloning and transformation of rhamnose transferase *FtF3GT1* gene in tartary buckwheat [J]. *Crops (作物杂志)*, 2020, 36: 33-40.
- [22] Sitarek P, Kowalczyk T, Rijo P, et al. Over-expression of *AtPAP1* transcriptional factor enhances phenolic acid production in transgenic roots of *Leonurus sibiricus* L. and their biological activities [J]. *Mol Biotechnol*, 2018, 60: 74-82.
- [23] Wang DD, Zhang ZX, Yang L, et al. *ARPI*, β -*AS*, and *UGE* regulate glycyrrhizin biosynthesis in *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots [J]. *Plant Cell Rep*, 2021, 40: 1285-1296.
- [24] 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.
- [25] Zhang ZX, Wang DD, Yang L, et al. Ferulate 5-hydroxylase gene (*F5H*) regulation of glycyrrhizic acid biosynthesis determined by gene overexpression and knockout [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1719-1726.
- [26] Tian SK. Regulatory Study of *DXS* and *F5H* on the Glycyrrhizic Acid Biosynthesis in Licorice (甘草 *DXS* 和 *F5H* 基因对甘草酸生物合成的调控研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2021.
- [27] Hu T, Gao ZQ, Yin Y. 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.
- [28] Bergman ME, Davis B, Phillips MA. Medically useful plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of action [J]. *Molecules*, 2019, 24: 3961.
- [29] Bongers M, Perez-Gil J, Hodson MP, et al. Adaptation of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase enables volatile isoprenoid production [J]. *eLife*, 2020, 9: e48685.
- [30] Gutensohn M, Orlova I, Nguyen TT, et al. Cytosolic monoterpene biosynthesis is supported by plastid-generated geranyl diphosphate substrate in transgenic tomato fruits [J]. *Plant J*, 2013, 75: 351-363.
- [31] Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ. A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? [J]. *Prog Lipid Res*, 2012, 51: 95-148.
- [32] Jiang ZQ, Gao W, Huang LQ. Tanshinones, critical pharmacological components in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 202.
- [33] Zhou Z, Tan HX, Li Q, et al. Trichome and artemisinin regulator 2 positively regulates trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2020, 228: 932-945.
- [34] Yin YC, Hou JM, Tian SK, et al. Overexpressing chalcone synthase (*CHS*) gene enhanced flavonoids accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots [J]. *Bot Lett*, 2020, 167: 219-231.