

## 药用植物雷公藤 *JAZ* 基因家族的全基因组鉴定及功能分析

王柯燕, 唐丽媚, 吴林捷, 王雨婷, 陈夏唯, 屠李婵\*

(浙大城市学院医学院, 浙江 杭州 310015)

**摘要:** JAZ 蛋白作为茉莉酸途径的抑制因子, 对植物生长发育、植物次级代谢产物合成的调控具有重要作用。为研究雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) *JAZ* 基因家族的功能, 本研究系统鉴定了雷公藤 *JAZ* 基因家族成员, 分析其理化性质、基因染色体定位、系统进化树、蛋白质保守基序, 同时通过雷公藤转录组测序数据分析 *TwJAZs* 基因在不同部位的表达模式, 构建基因网络调控图谱, 最终基因克隆获得 18 条 *TwJAZs* 基因的全长序列。结果表明, 18 个 *TwJAZs* 基因不均匀地分布在 12 条染色体上, 其编码的氨基酸数量为 122~525 个, 分子质量为 13.87~54.73 kDa, 等电点为 6.83~10.27。亚细胞预测显示 13 个 *TwJAZs* 蛋白定位在细胞核上, 5 个位于细胞质和叶绿体上。系统进化树结果表明雷公藤 *JAZ* 家族蛋白可分为 5 个亚家族, 同一亚家族成员具有相似的保守基序。表达模式分析结果表明 *TwJAZs* 基因主要在花、叶、去皮茎中具有较高的表达, 且大部分 *TwJAZs* 基因在茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导 4 h 后的表达量最高。转录因子调控网络显示 *TwJAZs* 主要与 AP2/ERF-ERF、NAC、bHLH 等转录因子家族呈现强相关。本研究全面鉴定获得雷公藤中所有的 *JAZ* 基因家族序列, 初步明确了 *TwJAZs* 基因家族的结构和功能特点, 为深入研究 *TwJAZs* 蛋白功能和调控机制奠定重要基础。

**关键词:** 雷公藤; *JAZ*; 生物信息学分析; 表达模式; 基因克隆

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)04-1156-10

## Genome-wide identification and functional analysis of the *JAZ* gene family in *Tripterygium wilfordii*

WANG Ke-yan, TANG Li-mei, WU Lin-jie, WANG Yu-ting, CHEN Xia-wei, TU Li-chan\*

(School of Medicine, Hangzhou City University, Hangzhou 310015, China)

**Abstract:** JAZ proteins, as inhibitors in the jasmonic acid (JA) signaling pathway, play a crucial role in regulating plant growth and development, as well as the biosynthesis of secondary metabolites in plants. To explore the functions of the *JAZ* gene family in *Tripterygium wilfordii*, our study systematically identified the members of the *JAZ* gene family in *T. wilfordii*. We analyzed their physicochemical properties, chromosome localization, phylogenetic tree, and protein conserved motifs. Additionally, we investigated the expression patterns of *TwJAZs* in different tissues, constructed a gene regulatory network map, and ultimately cloned the full-length sequences of 18 *JAZ* genes. The results showed that the 18 *TwJAZs* were unevenly distributed across 12 chromosomes, encoding amino acid numbers ranging from 122 to 525, with molecular weights of 13.87 to 54.73 kDa, and isoelectric points ranging from 6.83 to 10.27. Subcellular localization prediction indicated that 13 *TwJAZs* were localized in the nucleus, while 5 *TwJAZs* were located in the cytoplasm and chloroplasts. The phylogenetic tree analysis revealed that the *JAZ* family proteins of *T. wilfordii* could be divided into five subfamilies, with members of the same subfamily sharing similar conserved motifs. Expression pattern analysis demonstrated that *TwJAZs* were predominantly expressed in flowers, leaves, and peeled stems, with most *TwJAZs* showing the highest expression

收稿日期: 2024-11-19; 修回日期: 2025-01-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204559); 浙江省自然科学基金资助项目 (LQ23H280002).

\*通讯作者 E-mail: tulichan@hzcu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1147

levels after 4 hours of methyl jasmonate (MeJA) induction. The transcription factor regulatory network shows that TwJAZs are strongly correlated with transcription factor families such as AP2/ERF-ERF, NAC, and bHLH. This study comprehensively identified all the *JAZ* gene family sequences in *T. wilfordii*, initially clarifying the structural and functional characteristics of the TwJAZs, and laying an important foundation for further research on the functions and regulatory mechanisms of TwJAZs.

**Key words:** *Tripterygium wilfordii*; JAZ; bioinformatics analysis; expression pattern; gene cloning

中药雷公藤作为我国传统中药,具有祛风除湿、清热解毒、杀虫止痒、舒筋活血通络的功效<sup>[1,2]</sup>。其代表性成分雷公藤甲素和雷公藤红素具有抗肿瘤、抗炎、抗风湿等药理活性,是近年来最有可能开发成为现代药物的天然产物<sup>[3]</sup>。茉莉酸(jasmonic acid, JA)及其衍生物是一种在植物生长发育、病害防御以及机械损伤阶段里具有重要调控作用的植物激素<sup>[4,5]</sup>。在前期研究中,已证明通过茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)诱导雷公藤悬浮细胞能显著促进雷公藤甲素等萜类活性成分在植物体内的合成积累<sup>[6]</sup>,但目前JA信号途径如何调控雷公藤甲素等萜类活性成分的生物合成仍有待探索。

JAZ(jasmoate ZIM-domain)蛋白作为JA途径的抑制因子,在响应JA信号途径中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。在低水平JA条件下,JAZ与JA信号途径的转录因子结合来抑制JA应答基因的表达;而在高水平JA下,JAZ会迅速降解,从而释放并触发JA信号通路的激活。Zhang等<sup>[8]</sup>进一步证实JAZ蛋白能够根据JA的存在与否来调整自身构象,扮演阻抑蛋白和受体蛋白两种角色,从而控制植物激素途径的抑制和激活。此外,JAZ还能与其他通路调控因子相互作用,对信号传导以及植物的生长和代谢具有广泛的影响<sup>[9,10]</sup>。因此,深入研究JAZ蛋白对药用植物次级代谢产物合成及积累的调控机制,在药用植物品种的优化与培育,以及提升其有效成分含量的实际应用中,蕴含着巨大的潜在价值。

JAZ蛋白最先从模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分离并鉴定获得,具有ZIM、Jas、NT三个保守结构域。目前,*JAZ*基因家族在拟南芥、玉米、二穗短柄草和水稻等植物上有较多报道,并在其表达方式、基因特征、蛋白质特征及功能已有相关研究,而在药用植物上的研究较少。最新研究发现,月季(*Rosa hybrida*)中的RhCBL4-RhCIPK3模块可以调控JAZ5的降解,来介导乙烯信号通路调节的花瓣衰老过程<sup>[11]</sup>。在萝卜(*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*)中,*JAZ*基因不仅参与对ABA、SA、MeJA、盐胁迫和低温胁迫的响应,还可能在萝卜块根的形成中发挥作用<sup>[12]</sup>。在拟南芥中,JAZ蛋白能与bHLH转录因子(TT8、GL3、EGL3)及R2R3 MYB转录因子(MYB75、GL1)相互作用,来

调控毛状体的启动和花青素的积累<sup>[13]</sup>。而Zheng等<sup>[14]</sup>对药用植物丹参中的*JAZ*基因功能也进行了相关研究。该研究发现在JA信号通路中,SmJAZ3蛋白通过与SmERF73转录因子的互作,从而调控丹参酮类活性成分的生物合成,这也为*JAZ*基因家族调控雷公藤萜类活性成分的生物合成提供了重要参考。

至今为止,关于雷公藤*JAZ*基因家族成员是否在其生长发育和次级代谢中参与调控萜类活性成分的生物合成,尚未有相关研究报道。本研究基于前期组装的高质量雷公藤染色体级别的基因组图谱,首次利用基因组数据开展雷公藤*JAZ*基因家族的全基因组鉴定,对雷公藤*JAZ*基因家族成员的生物信息学和基因表达模式等进行研究,明确雷公藤*JAZ*基因家族成员的特征,为深入研究雷公藤*JAZ*家族蛋白的功能机制奠定重要基础。

## 材料与方法

**植物材料** 本团队的雷公藤植株由福建省三明市永安市的大田桃源国有林场提供,该植株由福建省三明市永安市的大田桃源国有林场涂育合老师鉴定为卫矛科雷公藤属植物雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)。

**试剂、菌株和载体** GeneJET凝胶回收试剂盒(批号:91279139)、Phusion<sup>TM</sup> Plus PCR Master Mix(批号:01154558)、胰蛋白酶(批号:3110563)、琼脂(批号:23136204)、酵母提取物(批号:4304391-02)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;氯化钠(批号:CS31213550)购自北京酷莱搏科技有限公司;pEASY<sup>®</sup>-Blunt Zero Cloning Kit(批号:#Q40826)、Trans2K<sup>®</sup> Plus DNA Marker(批号:#Q20307)、6×DNA Loading Buffer(批号:#Q20722)、大肠杆菌Trans1-T1(批号:#Q4551130)购自北京金全生物技术有限公司;快速质粒小提试剂盒(DP105,批号:#X0616)购自天根生化科技(北京)有限公司;2×Flash PCR Master-Mix(Dye,批号:10380/01722)购自康为世纪生物科技股份有限公司。

**雷公藤基因家族分析** 课题组前期组装的雷公藤基因组图谱已上传至NCBI数据库(GenBank:

JAAARO000000000.1)<sup>[6]</sup>, 本研究所使用的雷公藤全基因组蛋白序列来源于NCBI数据库基于已上传的雷公藤基因组组装数据进行注释的版本 (NCBI RefSeq assembly: GCF\_013401445.1)。从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 获得 JAZ 家族蛋白保守结构域 TIFY 和 Jas 的隐马尔可夫文件 (ID: PF06200、PF09425)<sup>[15]</sup>。使用 TBtools<sup>[16]</sup> 的 Simple HMM Search 工具对雷公藤基因组所有蛋白序列进行保守序列筛选 ( $E$ -value < 0.05)。然后从 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 数据库中下载 13 个拟南芥 JAZ 蛋白序列, 基因编号分别是 AT1G19180、AT1G74950、AT3G17860、AT1G48500、AT1G17380、AT1G72450、AT2G34600、AT1G30135、AT1G70700、AT5G13220、AT3G43440、AT5G20900、AT3G22275。利用 TBtools<sup>[16]</sup> 的 BlastP 工具将拟南芥 JAZ 蛋白序列与雷公藤蛋白序列进行比对, 将  $E$ -value 设为  $1e-5$ 。2 种方法结果取交集, 再利用 NCBI 中的 Batch CD-search 进行保守结构域验证<sup>[15,17]</sup>, 最终筛选获得 TwJAZs 蛋白 32 条, 属于 18 个 *TwJAZs* 基因, 命名为 *TwJAZ1*~*TwJAZ18*, 并选择 *TwJAZ* 基因的最长转录本序列用于基因家族分析与基因全长克隆实验。

**雷公藤 RNA 提取、cDNA 合成与 JAZ 基因克隆** 选取新鲜的雷公藤嫩叶, 放入 2.0 mL 的离心管中, 加入无菌磁珠于液氮速冻冷却后, 使用混合型碾磨仪 MM 400 在低温环境中研磨 2 min。然后按照 CTAB-LiCl 法提取雷公藤嫩叶的总 RNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和质量, 并用 NanoDrop One<sup>C</sup> 型核酸定量仪测定 RNA 浓度。最后按照 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒的说明书进行反转录合成 cDNA, 保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中备

用。使用 Primer Premier 5 软件设计雷公藤 *TwJAZs* 基因的全长序列引物, 引物由北京擎科生物科技有限公司 (杭州) 合成 (表 1)。利用全长序列引物和 PCR 反应, 克隆获得 *TwJAZs* 基因全长序列。PCR 反应体系: 25.0  $\mu\text{L}$  的 Phusion<sup>TM</sup> Plus PCR Master Mix、正反引物各 2.5  $\mu\text{L}$ 、1.0  $\mu\text{L}$  cDNA 和 19.0  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。利用 Bio-Rad 的 T100<sup>TM</sup> PCR 仪进行扩增, 反应程序为: 98  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s、55  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s、循环 35 次; 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 8 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收目的条带后将回收产物连接 B-zero 载体、转化大肠杆菌 Trans-T1 感受态细胞中, 通过菌液 PCR 筛选后送测序验证<sup>[18]</sup>。

**雷公藤 JAZ 蛋白理化性质分析** 利用 ExPASy (<http://web.expasy.org/prot-param/>) 对雷公藤 JAZ 家族成员的理化性质进行预测与分析, 包括氨基酸数目、分子量、等电点、不稳定指数等指标。用 WOLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 预测雷公藤 JAZ 蛋白的亚细胞定位<sup>[19]</sup>。

**雷公藤 JAZ 基因的染色体定位** 利用雷公藤基因组注释 GFF 文件和 TBtools<sup>[16]</sup> 软件, 对雷公藤 JAZ 基因家族成员的染色体分布进行可视化分析<sup>[20]</sup>。

**雷公藤 JAZ 家族的系统进化树构建** 利用 Mega X 软件<sup>[21]</sup> 构建雷公藤 JAZ 家族系统进化树。采用的方法为最大似然法 (maximum likelihood, ML), 采用的最优模型为 JTT+G+F model, 空位选项为 use all sites, 检验参数 bootstrap method 值取 500<sup>[22]</sup>。

**雷公藤 JAZ 基因结构和保守基序分析** 通过基因结构显示系统 GSDS 在线软件 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 将雷公藤 JAZ 家族成员的基因结构可视化<sup>[23]</sup>。利用在

**Table 1** Primers for gene cloning

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>TwJAZ1</i>	ATGGAGAGAGATTTTCTGGGACTGG	CTAATGTGTAGCCGGAAGAGGATAGG
<i>TwJAZ2</i>	ATGTCGAATTTTGTCAAACC	TAAATTCATGGACTCTTGCTTTCTC
<i>TwJAZ3</i>	ATGGAGAGAGATTTTCTGGGACTGG	TCAGCATTCCCGTTGATTGCTAATT
<i>TwJAZ4</i>	ATGTCGACCCGCCACGGA	TCACTGTGGTGATGGAACC
<i>TwJAZ5</i>	ATGGAGAGAGATTTCTGGGTTTGA	TCATGGATTCATGGCCAGCAGTTC
<i>TwJAZ6</i>	ATGTCGAGCTCGACGGAAGGTC	TCACTGTGGTGATGGAGCCATCAAG
<i>TwJAZ7</i>	ATGTCAAGAGCACCTGTGGAGCTCG	TTAGGACTGGCAAGCAAACGGCG
<i>TwJAZ8</i>	ATGGCAGGACCTGAAGTGAAG	TCAAGCAGCCTGAGGTTTATTAGA
<i>TwJAZ9</i>	ATGTCGACCCGGACGGAAGG	TCACTCCGGTGATAAGCCAAGCCA
<i>TwJAZ10</i>	ATGGATAGAGCACCAAGTGGAGCTCG	CTAGCAAGCAAAGGGCGACACAGAT
<i>TwJAZ11</i>	ATGGAGATAGATTTCTTGGGTT	TCACGGATTCATGGCTAGC
<i>TwJAZ12</i>	ATGATGAGATCAAGGAAGTGC	TAAATTAACAATGTATGGGGA
<i>TwJAZ13</i>	ATGAGAGCAATGAAGTGAATCTTG	TAAATTAACAGTGTATGGGGATTTT
<i>TwJAZ14</i>	ATGGACACTGGAGCCACGC	TTATTCTCCAGCAGCAAATGAGCAG
<i>TwJAZ15</i>	ATGGACACCGAAGCCATGCCGT	CTAAGTGATAGGGCTTCCAGGCTT
<i>TwJAZ16</i>	ATGAAAAGGAATTGCAATCTTGAAC	CTATTGATTGAAATGATGATAGGGG
<i>TwJAZ17</i>	ATGAAAAGGAATTGCAATCTTGAAC	CTATTGACTCGGGCGATGATAGG
<i>TwJAZ18</i>	ATGAGTCCAACTGCAATCTTG	CTAGTGATTAAAGGTATATGGAAT

线工具 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>) 对 18 个 *TwJAZs* 蛋白序列进行保守基序分析, 最终获得 18 个 *TwJAZs* 蛋白的保守基序<sup>[24]</sup>。

**雷公藤转录组分析** 基于课题组前期自测的 66 个雷公藤转录组测序数据<sup>[6]</sup> (SRA 数据库编号: SRX7094753、SRX7094754、SRX7094755、SRX7094756、SRX7094757、SRX7094758、SRX7094759、SRX7094760、SRX7094761、SRX7094763、SRX7094764、SRX7094765、SRX7094766、SRX7094767、SRX7094768、SRX7094769、SRX7094770、SRX7094774、SRX7094775、SRX7094777、SRX7094778、SRX7094779、SRX7094780、SRX7094781、SRX7094782、SRX7094783、SRX7094784、SRX7094785、SRX7094786、SRX7094789、SRX7094790、SRX7094791、SRX7094792、SRX7094793、SRX7094794、SRX7094795、SRX7094796、SRX7094797、SRX7094799、SRX7094800、SRX7094801、SRX7094802、SRX7094803、SRX7094804、SRX7094805、SRX7094739、SRX7094740、SRX7094751、SRX7094762、SRX7094776、SRX7094787、SRX7094798、SRX7094771、SRX7094772、SRX7094749、SRX7094750、SRX7094752、SRX7094773、SRX7094741、SRX7094742、SRX7094743、SRX7094744、SRX7094745、SRX7094746、SRX7094747、SRX7094748), 分析 *TwJAZs* 基因在根部(周皮、韧皮部、木质部)、茎部(茎皮、去皮茎)、叶部、花部及 MeJA 诱导下不同时间的基因表达量 (fragments per kilobase million, FPKM), 并利用 Heatmap 工具绘制雷公藤 *JAZ* 基因表达聚类热图, 用于进一步筛选差异表达的 *TwJAZs* 基因。

***TwJAZs* 网络调控图谱构建** 利用 MATLAB R2019b 软件进行雷公藤 *JAZ* 家族与转录因子家族的皮

尔森相关系数 (Pearson correlation coefficient) 的计算, 筛选与雷公藤 *JAZ* 家族强相关的转录因子家族 ( $r > 0.8$ ,  $P < 0.05$ ), 并通过 Cytoscape 软件 (version 3.9.1)<sup>[25]</sup> 构建 *JAZ* 家族-转录因子家族的调控网络图谱。

## 结果与分析

### 1 雷公藤 *JAZ* 基因家族成员的鉴定与克隆

为了获得雷公藤中的 *TwJAZs* 基因家族成员, 本研究利用 BLAST 比对和结构域筛选的方法, 在雷公藤基因组中共鉴定获得 18 条 *TwJAZs* 基因, 并设计 18 对特异性基因全长引物 (表 1)。以雷公藤嫩叶的 cDNA 作为模板, PCR 扩增获得 18 条基因条带, 经测序验证正确, 命名为 *TwJAZ1*~*TwJAZ18*。

### 2 雷公藤 *JAZ* 蛋白理化性质分析

ExPASy 分析结果显示 (表 2), 雷公藤 *JAZ* 家族成员蛋白质的氨基酸数目为 122~525 个, 分子质量为 13.87~54.73 kDa, 平均亲水性在 -0.877~-0.183, 均为亲水性蛋白。大部分 *JAZ* 蛋白等电点在 9 左右, 为碱性蛋白, 而 *TwJAZ18* 等电点为 6.83, 为酸性蛋白, 结果说明雷公藤 *JAZ* 家族成员大多是碱性蛋白。18 个 *TwJAZs* 蛋白中, 仅有 *TwJAZ11* 为稳定蛋白 (instability index < 40)。通过 WOLF PSORT 对雷公藤 *JAZ* 家族蛋白进行亚细胞定位预测, 结果显示绝大部分成员定位在细胞核上 (表 2), *TwJAZ2*、*TwJAZ8* 和 *TwJAZ9* 定位在叶绿体上, *TwJAZ5* 和 *TwJAZ11* 定位在细胞质上。

### 3 雷公藤 *JAZ* 基因的染色体分布

在雷公藤基因组 23 条染色体上, *TwJAZs* 基因仅不均匀地分布在 12 条染色体上, 分别为 Chr1、Chr3、Chr4、Chr6、Chr9、Chr10、Chr13、Chr14、Chr16、Chr17、

**Table 2** Analysis of the physicochemical properties and subcellular localization of *JAZ* gene family in *T. wilfordii*

Gene name	Gene accession number	Subcellular localization	Amino acids length	Molecular mass/Da	pI	Instability index	GRAVY	Aliphatic index
<i>TwJAZ1</i>	XM_038823720.1	Nucleus	475	50 000.36	9.48	59.00	-0.311	71.37
<i>TwJAZ2</i>	XM_038825238.1	Chloroplast	188	20 507.21	9.30	47.77	-0.570	61.81
<i>TwJAZ3</i>	XM_038832473.1	Nucleus	525	54 734.12	9.63	56.77	-0.340	72.76
<i>TwJAZ4</i>	XM_038839784.1	Nucleus	267	29 396.56	8.76	60.22	-0.415	70.56
<i>TwJAZ5</i>	XM_038841851.1	Cytoplasm	372	39 398.01	9.52	46.19	-0.215	76.64
<i>TwJAZ6</i>	XM_038842845.1	Nucleus	243	26 511.32	8.92	60.64	-0.379	67.08
<i>TwJAZ7</i>	XM_038847386.1	Nucleus	199	21 995.15	9.54	69.42	-0.524	72.96
<i>TwJAZ8</i>	XM_038855066.1	Chloroplast	210	22 335.41	8.39	54.65	-0.421	73.90
<i>TwJAZ9</i>	XM_038856651.1	Chloroplast	259	28 336.48	7.55	48.04	-0.479	71.20
<i>TwJAZ10</i>	XM_038856882.1	Nucleus	197	21 779.84	9.52	55.87	-0.538	79.64
<i>TwJAZ11</i>	XM_038862888.1	Cytoplasm	309	32 640.27	7.87	39.04	-0.183	76.47
<i>TwJAZ12</i>	XM_038865522.1	Nucleus	130	15 173.15	9.50	85.68	-0.877	64.46
<i>TwJAZ13</i>	XM_038866766.1	Nucleus	122	13 867.57	9.14	71.03	-0.772	71.89
<i>TwJAZ14</i>	XM_038863286.1	Nucleus	346	37 057.45	8.62	48.86	-0.566	66.24
<i>TwJAZ15</i>	XM_038843897.1	Nucleus	301	32 761.85	8.70	53.08	-0.644	64.78
<i>TwJAZ16</i>	XM_038864546.1	Nucleus	122	13 984.79	8.91	52.35	-0.765	79.02
<i>TwJAZ17</i>	XM_038868010.1	Nucleus	127	14 451.3	10.27	66.92	-0.746	82.13
<i>TwJAZ18</i>	XM_038864545.1	Nucleus	139	15 630.34	6.83	86.73	-0.783	55.40

Chr20和Chr23(图1)。其中,在Chr13染色体上分布最多,共5个*TwJAZs*基因定位在该条染色体上。此外,各有2个*TwJAZs*基因定位在Chr9和Chr14染色体上,其余9条染色体都只有1个*TwJAZ*基因。

#### 4 雷公藤JAZ家族的系统进化树

利用18个*TwJAZs*蛋白与拟南芥<sup>[26]</sup>、葡萄<sup>[27]</sup>、番茄<sup>[28]</sup>和丹参<sup>[29]</sup>中的JAZ蛋白构建系统发育进化树(图2)。结果发现,拟南芥、葡萄、番茄、丹参和雷公藤的JAZ蛋白根据聚类关系可分为五个亚族(group I~V),雷公藤JAZ蛋白成员在第IV亚族分布最多,在第III亚族分布最少。其中,*TwJAZ2*、*TwJAZ4*、*TwJAZ6*和*TwJAZ9*属于第I亚族;*TwJAZ8*、*TwJAZ14*和*TwJAZ15*

属于第II亚族;*TwJAZ7*和*TwJAZ10*属于第III亚族;*TwJAZ12*、*TwJAZ13*、*TwJAZ16*、*TwJAZ17*和*TwJAZ18*属于第IV亚族;*TwJAZ1*、*TwJAZ3*、*TwJAZ5*和*TwJAZ11*属于第V亚族。此外,从图2进化树分析结果可以看出,雷公藤的JAZ家族成员与葡萄的JAZ家族成员进化关系相对较近。

#### 5 雷公藤JAZ基因结构分析

雷公藤JAZ基因结构分析结果显示,不同成员之间基因结构的差异较大,各成员中的CDS数量为2~8个(图3)。它们的外显子-内含子结构表明,*TwJAZ12*、*TwJAZ13*、*TwJAZ16*、*TwJAZ17*和*TwJAZ18*的基因结构最简单,只包含2个CDS、2个UTR和1个Intron;*TwJAZ7*~

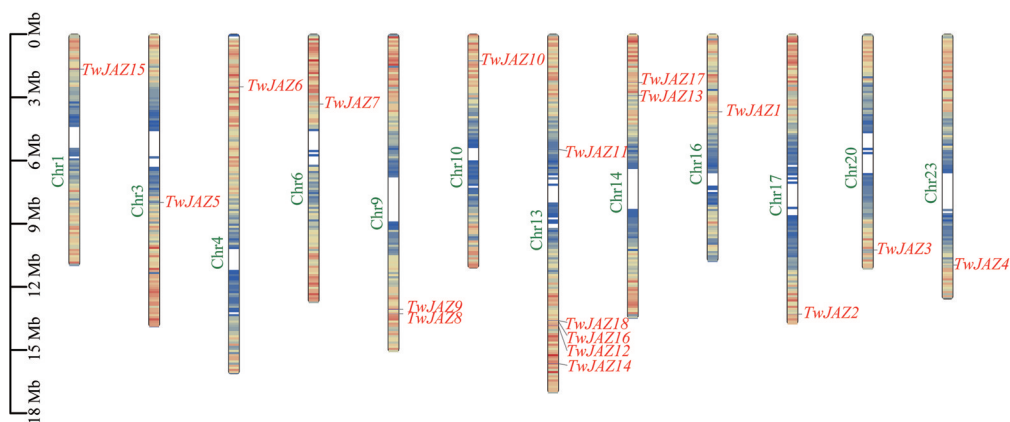


Figure 1 Chromosome localization of JAZ genes in *T. wilfordii*. Tw: *T. wilfordii*

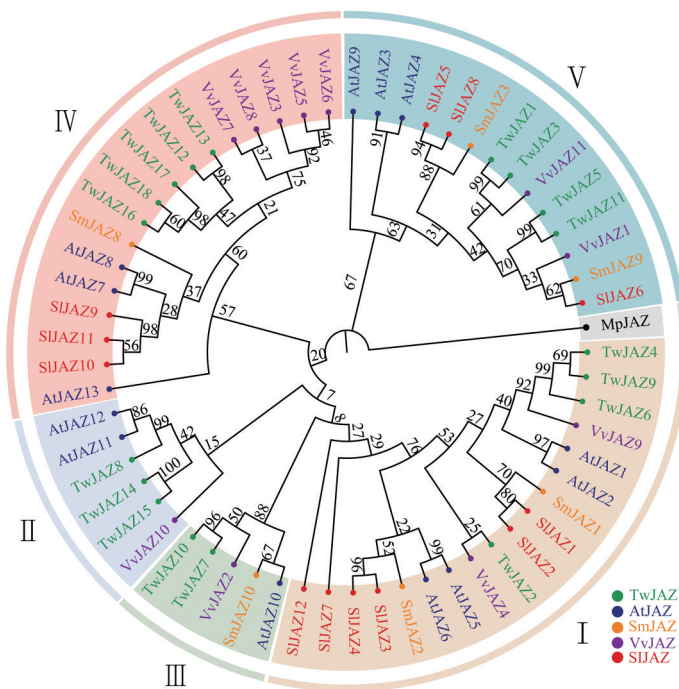


Figure 2 Phylogenetic tree of JAZ proteins in *T. wilfordii*. At: *Arabidopsis thaliana*; Sm: *Salvia miltiorrhiza*; Vv: *Vitis vinifera*; Sl: *Solanum lycopersicum*

10均具有5个CDS、2个UTR和4个intron; 而 *TwJAZ14* 的CDS数量最多, 具有8个CDS。

### 6 雷公藤 *JAZ* 蛋白的保守基序分析

对雷公藤 *JAZ* 家族成员的保守基序进行分析可进一步验证 *JAZ* 家族进化关系的正确性。保守基序分析结果表明各成员均含有 motif 1、motif 3, 是该家族最保守的两个蛋白基序 (图4)。不同亚族成员之间的 motif 个数和排列方式都相近, 与系统进化树的结果大致吻合。其中, motif 1、motif 2 和 motif 3 在各个亚家族中均存在, motif 8 仅存在于第I亚族, motif 7 和 motif 10

仅存在于第V亚族, 而 motif 9 存在于第I、II、IV、V亚族, 但不存在于III亚族。

### 7 雷公藤 *JAZ* 基因家族表达模式分析

为了揭示 *JAZ* 基因家族在 MeJA 处理下和不同组织的表达情况, 本研究分析了 66 个雷公藤转录组数据。首先, 通过 45 个雷公藤悬浮细胞的转录组测序数据的分析, 获得 *TwJAZs* 基因在对照和 MeJA 诱导下的表达量并绘制热图。如图 5A 所示, *TwJAZs* 在对照组和 MeJA 诱导下的表达模式不同, 大部分 *TwJAZs* 基因在 MeJA 诱导后表达呈现上调趋势, 且在 MeJA 诱导

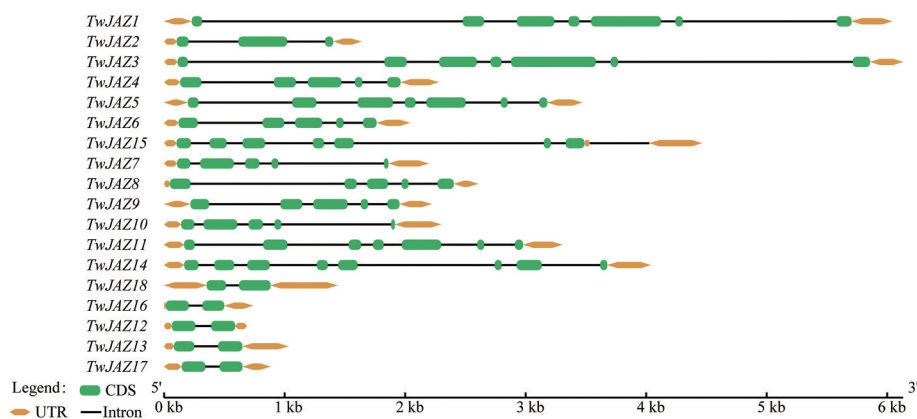


Figure 3 Gene structure of *JAZ* genes in *T. wilfordii*

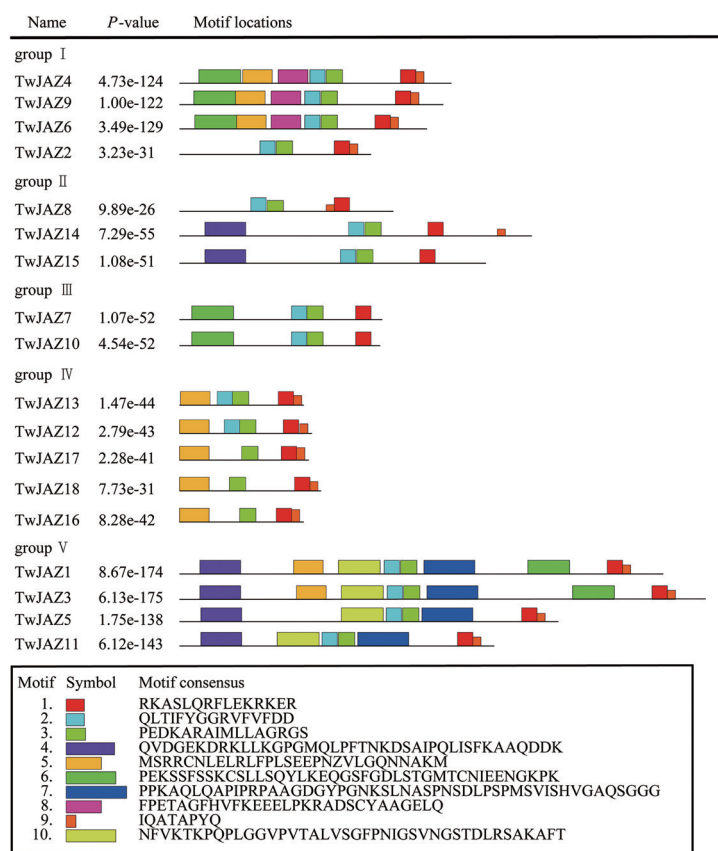
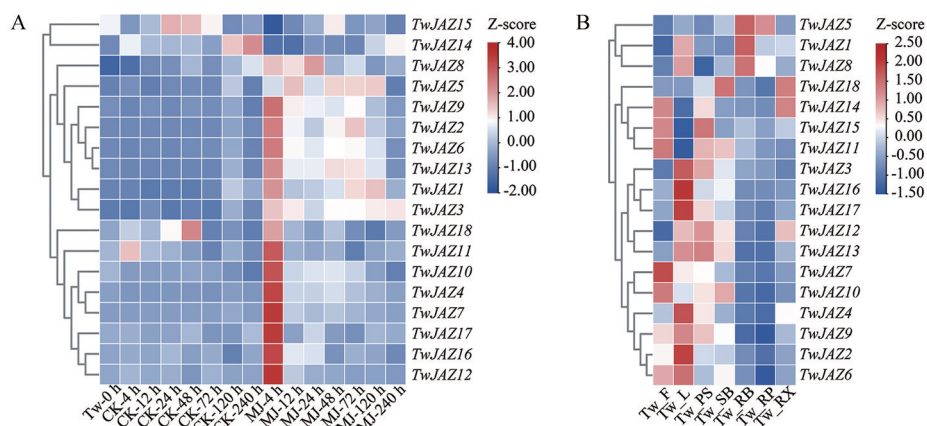


Figure 4 Conserved motifs of *JAZ* family members in *T. wilfordii*



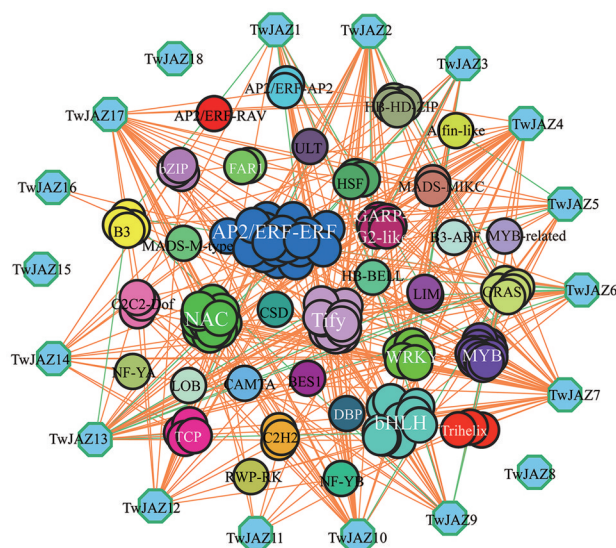
**Figure 5** Expression patterns of *TwJAZs*. A: Expression patterns of *TwJAZs* induced by MeJA in suspension cells of *T. wilfordii*. Tw\_0 h means that the suspension cells of *T. wilfordii* were collected for 0 h without any treatment. CK-4 h, CK-12 h, CK-24 h, CK-48 h, CK-72 h, CK-120 h, CK-240 h means that the *T. wilfordii* suspension cells were collected after control treatment for 4, 12, 24, 48, 72, 120, 240 h. MJ-4 h, MJ-12 h, MJ-24 h, MJ-48 h, MJ-72 h, MJ-120 h, MJ-240 h means that the *T. wilfordii* suspension cells were collected after induction treatment with MeJA for 4, 12, 24, 48, 72, 120 and 240 h, respectively. B: Expression patterns of *TwJAZs* in different tissues of *T. wilfordii*. Tw\_F: Flower; Tw\_L: Leaf; Tw\_PS: Peeled stem; Tw\_SB: Stem bark; Tw\_RB: Root bark; Tw\_RP: Root phloem; Tw\_RX: Root xylem

4 h后的表达量最高。

为了进一步研究雷公藤 *JAZ* 基因家族在雷公藤不同组织中的表达模式,本研究分析了雷公藤 21 个组织转录组测序数据,获得 *TwJAZs* 基因在 7 个不同组织部位的表达量并绘制热图。组织转录组分析结果表明(图 5B),大部分 *TwJAZs* 在雷公藤的花部(F)、叶部(L)和去皮茎部(PS)中的表达量较高。而 *TwJAZ1*、*TwJAZ5* 和 *TwJAZ8* 在根的周皮(RB)中的表达量最高,其中 *TwJAZ5* 基因在根的韧皮部(RP)中表达量也较高。

### 8 雷公藤 *JAZ* 家族与不同转录因子家族的调控网络

雷公藤 *JAZ* 家族与不同转录因子家族的调控网络图谱中(图 6), *TwJAZ8*、*TwJAZ15* 和 *TwJAZ18* 同任何转录因子家族均不呈现强相关。相比之下,其余雷公藤 *JAZ* 家族成员与 AP2/ERF-ERF、NAC、bHLH、Tify 家族成员呈现出强相关的数量最多,其次是与 GARP-G2-like、MYB、WRKY 家族成员的强相关,而与 Alfin-like、AP2/ERF-RAV、B3-ARF、BES1、LOB、MADS-M-type、NF-YA 等家族成员的强相关则相对较少,仅有少数 *TwJAZs* 与之存在显著的强相关。已知 bHLH、ERF、MYB、C2H2、WRKY 和 bZIP 等家族已陆续被证明在调控植物萜类生物合成中起着关键作用, *TwJAZ4*、*TwJAZ7*、*TwJAZ10*、*TwJAZ13*、*TwJAZ17* 与上述转录因子家族成员呈现较多强相关,推测 *TwJAZ4*、*TwJAZ7*、*TwJAZ10*、*TwJAZ13*、*TwJAZ17* 蛋白可能是调控雷公藤甲素等重要萜类活性成分生物合成的关键因子。



**Figure 6** Regulatory network of *JAZ* and other transcription factors family of *T. wilfordii*. Orange lines represent  $r > 0.8$ , and green lines represent  $r < -0.8$ . The darker the color, the stronger the correlation

### 讨论

雷公藤系卫矛科雷公藤属的藤本灌木植物,临床中多使用其根或根木质部入药,相关制剂作为疗效确切的免疫抑制剂被广泛用于治疗类风湿性关节炎<sup>[30,31]</sup>、狼疮性肾炎<sup>[32]</sup>、皮肤病<sup>[33]</sup>等。雷公藤的主要活性成分为雷公藤甲素和雷公藤红素。值得一提的是,对雷公藤甲素修饰后的化合物能有效抑制胰腺肿瘤的生长和扩散,具有治疗胰腺癌的潜力<sup>[34]</sup>。然而,雷公藤资源现状令人堪忧,其野生资源面临枯竭、栽培周期长且有效成

分含量低,加之遗传改良研究空白,限制了雷公藤资源的培育与开发。由此可见,对雷公藤进行基因组层面的研究显得尤为重要。

JAZ家族蛋白作为JA信号途径的抑制因子,在植物的生长、发育和应激反应中起关键作用<sup>[35]</sup>。因此,深入研究雷公藤JAZ蛋白调控雷公藤生长发育和代谢的功能、对提高其药效成分及优化培育品种具有潜在价值。当前,许多药用植物都已进行了基因组水平的JAZ基因家族鉴定,如在木薯基因组中鉴定了16个*MeJAZs*基因<sup>[36]</sup>;在丹参基因组中鉴定了9个*SmJAZs*基因<sup>[37]</sup>;在香椿基因组中鉴定了13个*TciJAZs*基因<sup>[38]</sup>。但遗憾的是,在极具经济和药用价值的传统药用植物雷公藤中,该家族的研究尚属空白。本研究利用生物信息学的方法,从雷公藤基因组中鉴定了18个*TwJAZs*基因,并将它们分为5个亚族,它们不均匀地分布在12条染色体上,推测*TwJAZs*基因在各自位置发挥不同的作用和功能。此外,绝大部分*TwJAZs*蛋白定位在细胞核上,这与目前绝大多数植物的JAZ蛋白定位相同。

最新研究指出,JAZ蛋白在多种植物中与抗寒性、病害抗性等生理过程紧密相关。例如,在苹果(apple)中,MIEL1和JAZ蛋白通过BBX37-ICE1-CBF模块共同调控JA介导的抗寒性<sup>[39]</sup>;在黄花苜蓿(*Medicago falcata* L.)中,其15个*MfJAZs*在调节黄花苜蓿低温耐受性的JA信号中起着重要作用<sup>[40]</sup>;在番茄(*Solanum lycopersicum*)中,*SlJAZ25*可能与JA和SA激素调节密切相关,在番茄抗灰斑病中起到负调控作用<sup>[41]</sup>;在甘蔗(*Saccharum* spp.)中,*ScJAZ22*、*ScJAZ24*、*ScJAZ28*、*ScJAZ30*和*ScJAZ31*在甘蔗应答叶枯病菌侵染过程中可能发挥积极的调控作用<sup>[42]</sup>;在葡萄中,*VvJAZ9*基因受低温诱导表达最为明显<sup>[43]</sup>。而本研究中的系统进化树分析结果显示,雷公藤与葡萄进化关系相近,推测与*VvJAZ9*相近的*TwJAZ4*、*TwJAZ6*、*TwJAZ9*蛋白可能具有相同的抗寒功能。

雷公藤萜类活性成分是雷公藤中最具成药潜力的活性成分。在转录组分析结果中,本研究发现18个*TwJAZs*在雷公藤不同组织中表达差异较大,猜测*TwJAZs*基因可能在相关器官的发育中发挥不同功能。相较于其他基因,*TwJAZ1*、*TwJAZ5*和*TwJAZ8*在根的周皮中高表达,而雷公藤甲素和雷公藤红素在根的周皮中含量最高,推测这3个基因可能参与调控雷公藤关键萜类活性成分的生物合成与积累。此外,在JAZ与转录因子的调控网络中,*TwJAZ4*、*TwJAZ7*、*TwJAZ10*、*TwJAZ13*、*TwJAZ17*与bHLH、ERF、MYB、C2H2、WRKY和bZIP等已被证明参与调控植物萜类生物合成的家族具有显著的相关性。因此,也推测*TwJAZ4*、

*TwJAZ7*、*TwJAZ10*、*TwJAZ13*、*TwJAZ17*可能是调控雷公藤重要萜类活性成分生物合成的关键蛋白。

综上所述,本研究系统鉴定了18个*TwJAZs*基因,并初步探索了雷公藤JAZ家族成员的功能,为雷公藤的生长发育与重要次级代谢提供了多个关键的候选因子,为进一步深入解析其家族功能和明确各个JAZ蛋白参与调控的具体路径和机制研究奠定了重要基础。

**作者贡献:**王柯燕负责本课题生物信息学分析和论文初稿的撰写;唐丽媚、吴林捷参与基因表达分析;王雨婷和陈夏唯参与相关性计算与调控网络的构建;屠李婵整体负责本研究的实验设计和论文审阅修改。

**利益冲突:**本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Gao W, Liu MT, Cheng QQ, et al. Herbal textual research on *Tripterygium wilfordii* [J]. World Chin Med (世界中医药), 2012, 7: 560-562.
- [2] Zhao WW, Jiang TT, Wang ZR, et al. Immunotherapy of pancreatic cancer with triptolide combined with ginsenoside Rg3 [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 1794-1803.
- [3] Corson TW, Crews CM. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials [J]. Cell, 2007, 130: 769-774.
- [4] Huang JL. Genome-Wide Identification and Functional Characterization of the Jasmonic Acid Signaling Regulator JAZ in Soybean (大豆茉莉酸信号调控因子JAZ的全基因组鉴定及功能分析) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.
- [5] Hu ZP, Xu J, Zhou T, et al. Methyl jasmonate stimulates the synthesis and accumulation of asperosaponin VI in the roots of *Dipsacus asper* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 2302-2307.
- [6] Tu LC, Su P, Zhang ZR, et al. Genome of *Tripterygium wilfordii* and identification of cytochrome P450 involved in triptolide biosynthesis [J]. Nat Commun, 2020, 11: 971.
- [7] Srivastava AK, Orosa B, Singh P, et al. SUMO suppresses the activity of the jasmonic acid receptor CORONATINE INSENSITIVE1 [J]. Plant Cell, 2018, 30: 2099-2115.
- [8] Zhang F, Yao J, Ke JY, et al. Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling [J]. Nature, 2015, 525: 269-273.
- [9] Sun C, Zhou XJ, Chen RM, et al. Comprehensive overview of JAZ proteins in plants [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2014, (6): 1-8.
- [10] Koh H, Joo H, Lim CW, et al. Roles of the pepper JAZ protein CaJAZ1-03 and its interacting partner RING-type E3 ligase CaASRF1 in regulating ABA signaling and drought responses [J]. Plant Cell Environ, 2023, 46: 3242-3257.
- [11] Chen CX, Ma YX, Zuo LX, et al. The CALCINEURIN B-LIKE

- 4/CBL-INTERACTING PROTEIN 3 module degrades repressor JAZ5 during rose petal senescence [J]. *Plant Physiol*, 2023, 193: 1605-1620.
- [12] Jia K, Yan CY, Zhang J, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *JAZ* gene family in turnip [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 21330.
- [13] Qi TC, Song SS, Ren QC, et al. The jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-repeat/BHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23: 1795-1814.
- [14] Zheng H, Jing L, Jiang XH, et al. The ERF-VII transcription factor SmERF73 coordinately regulates tanshinone biosynthesis in response to stress elicitors in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *New Phytol*, 2021, 231: 1940-1955.
- [15] Li N, Song ZH, Fan YX, et al. Identification of *JAZ* gene family in *Cajanus cajan* and expression analysis in response to pathogenic fungus Cc1-1 [J]. *J Agric Biotechnol (农业生物技术学报)*, 2021, 29: 1495-1505.
- [16] Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13: 1194-1202.
- [17] Guo B, Qin JF, Li N, et al. Genome-wide identification and expression analysis of SHMT gene family in foxtail millet (*Setaria italica* L.) [J]. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2024. <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.s.20241030.0852.002>.
- [18] Yu YX, Long LJ, Li CZ, et al. Cloning and interacted protein identification of *API* homologous gene from *Lonicera macranthoides* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 2880-2888.
- [19] Jiang LP, Xu HF, Cheng L, et al. Identification and expression analysis of WRKY gene family in *Chrysanthemum nankingense* [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med (世界科学技术-中医药现代化)*, 2024, 26: 2374-2384.
- [20] Yan WQ, Ni YX, Jia M, et al. Identification and analysis of the *JAZ* gene family in sesame [J]. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2024. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240124.1712.004>.
- [21] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35: 1547-1549.
- [22] Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences [J]. *Comput Appl Biosci*, 1992, 8: 275-282.
- [23] Hu B, Jin JP, Guo AY, et al. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31: 1296-1297.
- [24] Bailey TL, Boden M, Buske FA, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: W202-W208.
- [25] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13: 2498-2504.
- [26] Lamesch P, Berardini TZ, Li D, et al. The arabidopsis information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D1202-D1210.
- [27] Zhang Y, Gao M, Singer SD, et al. Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e44465.
- [28] Chini A, Ben-Romdhane W, Hassairi A, et al. Identification of TIFY/JAZ family genes in *Solanum lycopersicum* and their regulation in response to abiotic stresses [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0177381.
- [29] Pei TL. The Function of *SmJAZ* in Regulating the Biosynthesis of Salyianolic Acids and Tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* (*SmJAZ* 基因在调控丹参酮类和酚酸类物质合成中的功能研究) [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019.
- [30] Lin JJ, Tao K, Gao N, et al. Triptolide inhibits expression of inflammatory cytokines and proliferation of fibroblast-like synoviocytes induced by IL-6/sIL-6R-mediated JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Curr Med Sci*, 2021, 41: 133-139.
- [31] Tang YJ, Liu QP, Feng YX, et al. Tripterygium ingredients for pathogenicity cells in rheumatoid arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 583171.
- [32] Wang YJ, Li YX, Li S, et al. Progress in traditional Chinese medicine and natural extracts for the treatment of lupus nephritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 149: 112799.
- [33] Bodi G, Sa Y, Ye YP, et al. Clinical effects of Leigongtongduogan Pian combine with total glucosids of Paeony Capsule in the treatment of chronic idiopathic urticaria [J]. *Clin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2014, 30: 414-416.
- [34] Chugh R, Sangwan V, Patil SP, et al. A preclinical evaluation of minnelide as a therapeutic agent against pancreatic cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 156ra139.
- [35] Kazan K, Manners JM. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 22-31.
- [36] Lin CY, Guo X, Yu XH, et al. Identification of *Manihot esculenta* JAZ genes and their response pattern to different stresses [J]. *J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报)*, 2024. <https://link.cnki.net/urlid/44.1374.Q.20240616.1636.004>.
- [37] Ma PD, Pei TL, Lv BB, et al. Functional pleiotropism, diversity, and redundancy of *Salvia miltiorrhiza* Bunge JAZ family proteins in jasmonate-induced tanshinone and phenolic acid biosynthesis [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhac166.
- [38] Song HY, Duan ZH, Wang Z, et al. Genome-wide identification, expression pattern and subcellular localization analysis of the *JAZ* gene family in *Toona ciliata* [J]. *Ind Crops Prod*, 2022, 178: 114582.
- [39] An JP, Wang XF, Zhang XW, et al. Apple B-box protein BBX37 regulates jasmonic acid mediated cold tolerance through the JAZ-BBX37-ICE1-CBF pathway and undergoes MIEL1-mediated ubiquitination and degradation [J]. *New Phytol*, 2021, 229: 2707-

- 2729.
- [40] Yang M, Zang JR, Wang ZY, et al. Expression pattern analysis of 15 *JAZ* genes related to low temperature response in *Medicago falcata* [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2023, 21: 2211-2219.
- [41] Sun YG, Liu CX, Liu ZB, et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the *JAZ* gene family in resistance to gray leaf spots in tomato [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 9974.
- [42] Lou WY, Sun TT, Cen GL, et al. Identification and expression analysis of the sugarcane *ScJAZ* gene family based on transcriptome [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2021, 19: 2142-2155.
- [43] Liu DS, Feng M, Fan SS, et al. Screening and verification of *JAZ9* gene interacting proteins in *Vitis vinifera* [J]. *J Fruit Sci* (果树学报), 2023, 40: 1294-1311.