

甘草 *DXS* 基因过表达及表达沉默对甘草酸生物合成的影响研究

杨 林¹, 汪逗逗¹, 田少凯¹, 张智新¹, 侯嘉铭¹, 肖 瑶^{2*}, 刘 颖^{1*}

(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: 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, *DXS*) 是萜类化合物前体物质合成途径 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP) 途径的第一个限速酶, 在甘草次生代谢过程中发挥着重要的调控作用。本课题组在前期转录组研究中发现 *DXS* 基因表达水平与甘草的指标性成分甘草酸的含量呈负相关, 因此本文拟通过毛状根培养体系, 从基因过表达和沉默两方面开展研究, 解析 *DXS* 基因对甘草酸生物合成的调控作用。本文克隆了甘草 *DXS* 基因 (GenBank 注册号: MN158121); 采用基因融合法构建了过表达载体 pCA-*DXS*; 根据 *DXS* 第一外显子设计 sgRNA 序列, 构建了 CRISPR/Cas9 基因编辑载体 pHSE-*DXS*; 以甘草胚轴为外植体材料, 采用发根农杆菌介导法诱导了 *DXS* 基因过表达和表达沉默的甘草毛状根体系。同时, 诱导了野生型甘草毛状根及含空质粒的阴性对照毛状根。采用 UPLC 法测定各甘草毛状根样品中甘草酸的含量, 结果显示: *DXS* 基因沉默组毛状根样品中甘草酸含量显著高于野生型和阴性对照组, 而 *DXS* 基因过表达甘草毛状根样品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 *DXS* 基因对甘草酸生物合成的负调控作用, 为解析 *DXS* 基因在萜类化合物代谢中的作用提供了理论依据, 也为进一步构建甘草酸生物合成分子调控网络奠定了基础。

关键词: 甘草酸; *DXS*; 基因过表达; CRISPR/Cas9; 毛状根

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)07-2025-08

The role of licorice *DXS* knockout and overexpression in glycyrrhizic acid biosynthesis

YANG Lin¹, WANG Dou-dou¹, TIAN Shao-kai¹, ZHANG Zhi-xin¹, HOU Jia-ming¹,
XIAO Yao^{2*}, LIU Ying^{1*}

(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: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (*DXS*) is a rate-limiting enzyme involved in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway for terpenoid precursor biosynthesis. *DXS* plays an essential role in glycyrrhizic acid (GA) biosynthesis. Based on our previous transcriptome study, there was a negative correlation between *DXS* expression and GA content. Therefore, we explored the regulatory role of *DXS* in GA biosynthesis using both gene overexpression and gene knockout in a hairy root culture system. *DXS* was cloned from *Glycyrrhiza glabra* L. (GenBank Accession No. MN158121). A plant binary expression vector pCA-*DXS* was constructed by a gene fusion method. The sgRNA sequence was designed based on the first exon of *DXS* to construct the gene editing vector pHSE-*DXS*. Hairy roots overexpressing or knocking out *DXS* were generated through an *Agrobacterium*-mediated method with licorice hypocotyls as explants. Wild-type hairy roots and negative control hairy roots containing empty plasmids were also evaluated. UPLC was used to determine the GA content in each licorice hairy

收稿日期: 2021-02-08; 修回日期: 2021-03-01.

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

Tel: 86-10-53912163, E-mail: xiaoyao9510@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0225

root line. Results showed that the content of GA in the hairy root group knocking out *DXS* was significantly higher than that in the wild-type and negative control groups, while in the hairy root group overexpressing *DXS* was significantly lower, suggesting that *DXS* plays a negative role in GA biosynthesis. This study provides a foundation for determining the function of *DXS* in terpenoid metabolism and for further establishment of a molecular regulatory network of GA biosynthesis.

Key words: glycyrrhizic acid; 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate synthase; gene overexpression; CRISPR/Cas9; hairy root

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza inflata*, *Glycyrrhiza glabra*) 是我国最常用的大宗药材之一, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛和调和诸药等功效, 素有“国老”之美誉。三萜类化合物甘草酸是《中华人民共和国药典》(2020版) 规定的甘草指标性成分之一^[1]。现代药理学研究表明甘草酸是甘草发挥抗病毒^[2]、抗炎^[3]、保肝^[4]等作用的主要活性成分, 临床应用广泛。因此, 提高甘草酸含量对于保证甘草药材的药效具有重要意义。

二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 和异戊烯焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 是萜类化合物的共同前体, 由 2-*C*-甲基-*D*-赤藻糖醇-4-磷酸 (2-*C*-methyl-*D*-erythritol 4-phosphate, MEP) 途径和甲羟戊酸 (mevalonate pathway, MVA) 途径共同合成。因此, 这两条途径均对甘草酸的生物合成具有重要影响。本课题组前期转录组研究表明, MEP 途径上 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate synthase, *DXS*) 基因的表达水平与甘草酸含量呈负相关^[5]。*DXS* 是 MEP 途径的第一个限速酶^[6], 在植物萜类生物合成过程中发挥着重要调控作用, 已有研究表明其基因表达水平高低直接影响萜类次生代谢产物的积累^[7], 但甘草中有关 *DXS* 基因的研究报道则较少。因此, 本文拟克隆甘草 *DXS* 基因, 并从基因过表达和沉默两个方面解析其对甘草酸生物合成的调控作用。

DXS 首次在薄荷 *Mentha piperita* 中克隆得到后, 已在近百种植物中克隆得到该基因^[8]。根据目前报道, 植物中的 *DXS* 基因家族编码 3 种类型 *DXS* 蛋白, 均催化 MEP 途径的第一步反应, 但在萜类生物合成过程中的作用略有不同。*DXS1* 与类胡萝卜素及叶绿素的合成相关^[9]; *DXS2* 参与如青蒿素等特定萜类化合物的生物合成^[10]; *DXS3* 的相关报道较少, 部分研究表明其参与合成某些萜类植物激素^[11]。

毛状根是发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 感染植物后于植物创伤表面诱导产生的一种病理组织, 其具有生长稳定、培养条件可控、方便施加处理等优点, 是研究植物基因功能的良好遗传体系^[12,13]。目前,

已有学者利用毛状根体系在不同植物中开展基因过表达或沉默的相关研究, 如: 在丹参 *Salvia miltiorrhiza* 毛状根中过表达转录因子 *SmWRKY2* 可显著增加毛状根中丹参酮的含量^[14]; 在杜鹃 *Duboisia leichhardtii* 毛状根中沉默喹啉酸磷酸核糖基转移酶 (quinolinic acid phosphoribosyl transferase, QPT) 基因可显著提高毛状根中东莨菪碱的含量^[15]; 在马铃薯 *Solanum tuberosum* 毛状根中敲除转录因子 *St16DOX* 可显著降低毛状根中甾体糖类生物碱的积累^[16]。本课题组前期研究也表明在甘草 *G. uralensis* 毛状根中过表达查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 和查尔酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 基因能显著提高毛状根中黄酮类化合物的含量^[17,18], 过表达 β -香树脂醇合成酶 (β -amyrin synthase, β -AS) 基因可显著增加甘草毛状根中甘草酸的含量^[19]。因此, 本文也将采用甘草毛状根培养体系, 对 *DXS* 基因的功能开展研究, 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

PCR 引物及程序 本文中采用了大量的 PCR 方法, 为方便起见, 将所有 PCR 引物列于表 1, 程序列于表 2。本文全部引物合成及测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

甘草 *DXS* 基因克隆 采用 RNA 提取试剂盒 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司) 提取甘草根样总 RNA; 采用 cDNA 合成试剂盒 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司) 逆转录获得甘草 cDNA; 利用基因组文件 (<http://ngs-data-archive.psc.riken.jp/Gur-genome/download.pl>) 获得甘草 *DXS* 基因 CDS 序列, 使用 Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 设计特异性引物 PP1, 并采用 PCR 程序 1 对 *DXS* 基因进行扩增。采用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 (北京博迈德基因技术有限公司) 对 PCR 产物进行胶回收纯化, T 连接 (pMD-19T 载体, TaKaRa 公司), 转化大肠杆菌 Top 10 感受态细胞 (北京博迈德基因技术有限公司), 在含有氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 50 mg·L⁻¹ 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 并对其进行 PCR 验证和测序验证。

Table 1 Primers used in this study

Code	Objective	Sequence (5'-3')
PP1	<i>DXS</i> gene cloning	F: CACCCTTTTCCCCATTTCATCC R: TTTCAGGTCCCAATTCAAGATCCC
PP2	Construction of <i>DXS</i> overexpression vector	F: CTCTTGACCATGGTAGATCTCACCCCTTTTCCCCATTTCATCC R: TTGATCGGGTACAGACTAGTTTTCAGGTCCCAATTCAAGATCCC
PP3	Verification of CRISPR/Cas9 <i>DXS</i> knock out vector	F: TCAAAAAGGCCCTGGGAATC R: ACTGAAAAGTACAAAACCACTGAA
PP4	Identification of <i>rolC</i> in every hairy root line	F: CATATATGCCAAATTACTACTAG R: GTTAACAAACTAGGAAAACAGG
PP5	Amplification of the first exon of <i>DXS</i> in hairy root lines knocking out <i>DXS</i> gene	F: GTTTGGTTCCTTGGACAGGC R: TCATCTCCTTGTCTGGCT

Table 2 PCR programs used in this study

Code	Objective	Program
1	<i>DXS</i> gene cloning	94 °C 15 min, 35 cycles of 94 °C 60 s, 55 °C 60 s, 72 °C 120 s, and 72 °C 10 min
2	Construction of <i>DXS</i> overexpression vector	94 °C 15 min, 35 cycles of 94 °C 50 s, 55 °C 50 s, 74 °C 120 s, and 74 °C 10 min
3	Verification of CRISPR/Cas9 <i>DXS</i> knock out vector	95 °C 5 min, 30 cycles of 95 °C 1 min, 55 °C 50 s, 72 °C 30 s, and 72 °C 5 min
4	Identification of <i>rolC</i> in every hairy root line	94 °C 5 min, 35 cycles of 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, and 72 °C 10 min
5	Amplification of the first exon of <i>DXS</i> in hairy root lines knocking out <i>DXS</i> gene	95 °C 10 min, 29 cycles of 95 °C 50 s, 55 °C 40 s, 72 °C 20 s, and 72 °C 5 min

***DXS* 基因过表达载体的构建及验证** 根据BM无缝克隆试剂盒(北京博迈德基因技术有限公司)设计带有酶切位点 *Spe* I 和 *Bgl* II 及载体同源序列的引物 PP2, 以上述构建的 T 质粒为模板, 采用 PCR 反应程序 2 对 *DXS* 基因进行扩增, 并对 PCR 产物进行胶回收纯化。采用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Bgl* II (TaKaRa 公司) 对 pCAMBIA1305.1 (美国 Abcam 公司) 进行双酶切, 37 °C、1 h, 胶回收纯化载体片段。将 PCR 纯化产物与线性化载体 (摩尔比 3:1) 在 50 °C 条件下连接 30 min, 连接产物转化大肠杆菌 Top 10 感受态细胞, 在含有卡那霉素 (kanamycin, Kan) 50 mg·L⁻¹ 和潮霉素 (hygromycin, Hyg) 20 mg·L⁻¹ 的 LB 平板上筛选阳性克隆, PCR 及测序验证后, 将正确的质粒命名为 pCA-*DXS*。

***DXS* 基因编辑 CRISPR/Cas9 载体构建及验证** 根据 *DXS* 基因第一外显子, 使用在线工具 Benchling (<https://www.benchling.com/notebook/>) 设计 *DXS* 基因 sgRNA 前导序列: F: 5'-ATTGAAAGCTCCAACCTCCGAACCA-3'; R: 5'-AAACTGGTTCGGAGTTGGAGCTTT-3'。95 °C 下将单链 sgRNA 退火成双链 (5 min), 自然冷却至室温。采用限制性内切酶 *Bsa* I 对 pHSE401 (Addgene 公司) 进行酶切, 37 °C、1 h, 胶回收纯化线性化载体。利用 T4 DNA 连接酶 (NEB 公司) 连接线性化载体与退火后的 sgRNA, 25 °C、10 min, 连接产物转化大肠杆菌 Top 10 感受态细胞, 在 LB 平板 (+Kan 50 mg·L⁻¹) 上筛选阳性克隆。在两个 *Bsa* I 酶切位点的上下游 200 bp 处设计引物 PP3, 对基因沉默载体进行 PCR 验证, 测序验证后, 将正确的质粒命名为 pHSE-

DXS。

发根农杆菌 ATCC15834 工程菌的构建 在 C: 25 μF、PC: 200 Ω、U: 2 400 V 条件下采用电转法将重组质粒 pCA-*DXS* 和 pHSE-*DXS* 转入发根农杆菌 ATCC15834 感受态细胞, 在 TY (+Kan 50 mg·L⁻¹) 平板上筛选阳性克隆。分别采用引物 PP1、PCR 程序 1 和引物 PP3、PCR 程序 3 对携带 PCA-*DXS* 和 pHSE-*DXS* 的发根农杆菌工程菌进行 PCR 验证, 将 PCR 产物送测序。将测序验证正确的发根农杆菌工程菌接种于 TY 液体培养基中, 在 180 r·min⁻¹、25 °C 条件下进行液体悬浮培养至对数生长期 (OD₆₀₀ = 0.5), 收集菌液并离心, 重悬于等体积的 6,7-V 液体培养基中。

甘草毛状根的诱导及培养 在无菌条件下对饱满健康的甘草种子进行表面灭菌 (75% 乙醇浸泡 1 min, 1% 升汞浸泡 8 min), 无菌水冲洗 5 次, 无菌滤纸吸干多余水分, 接种于 MS 固体培养基, 在自然光照条件下培养 7~10 天即可获得甘草无菌苗。在超净工作台上切取甘草无菌苗的胚轴部位作为外植体材料, 完全浸没于上述 6,7-V 重悬菌液中 30 min, 无菌滤纸吸干多余菌液后转接于 6,7-V 固体培养基上, 在黑暗条件下共培养 2 天。采用 500 mg·L⁻¹ 头孢噻肟 (cefotaxime, Cef) 水溶液对甘草胚轴进行浸泡除菌 5 min, 转接于 6,7-V 固体培养基 (+500 mg·L⁻¹ Cef) 上。在相同条件下诱导野生型甘草毛状根 (诱导菌种为发根农杆菌 ATCC15834) 和阴性对照组甘草毛状根 (诱导菌种分别为携带空质粒 pCAMBIA1305.1 和 pHSE401 的发根农杆菌)。每隔 7 天转接继代, 并逐步降低 Cef 的

浓度,直至 ATCC15834 工程菌发根农杆菌完全除净。

甘草毛状根验证 采用 DNA 提取试剂盒(生物工程(上海)股份有限公司)提取各甘草毛状根系 DNA,采用引物 PP4 和 PCR 程序 4 对各甘草毛状根样品的 *roIC* 基因进行 PCR 扩增,并进一步进行测序验证。采用引物 PP1 和 PCR 程序 1 对 *DXS* 基因过表达甘草毛状根样品中的 *DXS* 基因进行 PCR 扩增并进一步测序验证。采用引物 PP5 和 PCR 程序 5 对 *DXS* 基因沉默甘草毛状根样品中的 *DXS* 基因第一外显子进行扩增,将扩增产物连接至 pMD-19T 载体,并转化入大肠杆菌 Top 10 感受态细胞,在 LB 平板(+Amp 50 mg·L⁻¹)上筛选阳性克隆,随机挑取多个单克隆,测序至饱和,采用软件 DNAMAN 6.0.3.99 分析 *DXS* 基因的编辑情况。

UPLC 法测定甘草毛状根中甘草酸含量 甘草毛状根液体培养:无菌条件下称取验证正确且生长状态良好的各甘草毛状根样品 2.0 g,每个样品 3 个生物学重复,接种于 6,7-V 液体培养基中,于 25 °C、110 r·min⁻¹ 条件下培养 3 周。UPLC 供试品制备:将液体培养的各毛状根样品洗净,于 60 °C 条件下烘干至恒重,研磨成粉,过 60 目筛,收集粉末。精密称取上述各甘草毛状根样品粉末 0.1 g 于 50 mL 量瓶中,以 50% 甲醇水溶液定容,于频率 40 kHz、功率 500 W 条件下超声提取 30 min,采用 0.45 μm 滤膜对提取液过滤处理,作为 UPLC 分析的供试品。线性分析:精密称取甘草酸单铵盐标准品(成都曼斯特生物科技有限公司,纯度 98.86%) 4.34 mg,溶解于 50% 甲醇水溶液中,配制成浓度梯度溶液,梯度如下:0.085 8、0.068 6、0.051 5、0.042 9、0.017 2、0.008 58、0.004 3 mg·mL⁻¹。甘草酸含量测定:采用 UPLC 法对各甘草毛状根样品中的甘草酸进行含量测定^[20],色谱系统:配备 UPLC ACQUITY PDA eλ 检测器的 Waters UPLC ACQUITY;色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈 (A)/0.05% 磷酸溶液 (B),洗脱程序:0~1.36 min 14%~23% A 相,1.36~

3.26 min 23%~30% A 相,3.26~4.08 min 30%~34% A 相,4.08~4.76 min 34%~36% A 相,4.76~5.71 min 36%~42% A 相,5.71~6.53 min 42%~51% A 相,6.53~9.00 min 51% A 相,9.00~9.50 min 51%~14% A 相,9.50~12.00 min 14% A 相;柱温:40 °C;流速:0.3 mL·min⁻¹;进样量:1 μL;检测波长:250 nm。

结果与分析

1 *DXS* 基因克隆及载体构建

由图 1a 可知,PCR 扩增得到了长度约为 2 300 bp 的特异性条带,BLAST 比对结果显示该片段与豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的 *DXS* cDNA 序列相似度高达 89%,*DXS* 氨基酸序列的相似度高达 88%,表明所克隆序列为甘草 *DXS* 基因 cDNA 序列,在 GenBank 上对所获序列进行注册,注册号为:MN158121。重组质粒 pCA-*DXS* 的 PCR 验证结果如图 1b 所示,扩增获得了长度约为 2 300 bp 的片段,与目标序列 *DXS* 长度一致,测序结果显示此片段与上述注册序列 *DXS* (MN158121) 具有 100% 的一致性。重组质粒 pHSE-*DXS* 的 PCR 验证结果如图 1c 所示,扩增获得了长度约为 500 bp 的片段,长度符合引物 PP3 的扩增预期,测序结果表明此片段在两个 *Bsa* I 酶切位点之间包含与 sgRNA 序列一致性为 100% 的序列。以上结果表明重组质粒 pCA-*DXS* 和 pHSE-*DXS* 均构建正确。

2 甘草毛状根的培养

图 2 为培养 1 周和 4 周的甘草毛状根的生长情况,包括:野生型甘草毛状根 (wild type, WT)、携带空载体 pCambia1305.1 的阴性对照甘草毛状根 (NC-PCA)、携带空载体 pHSE401 的阴性对照甘草毛状根 (NC-PHSE)、*DXS* 基因过表达的甘草毛状根 (*DXS*⁺) 及 *DXS* 基因沉默的甘草毛状根 (*DXS*⁻),由图可见,培养 1 周时,外植体胚轴上尚未出现毛状根,随着继代和除菌的进行,在培养 4 周后,各毛状根系均长势良好,颜色为黄白色。

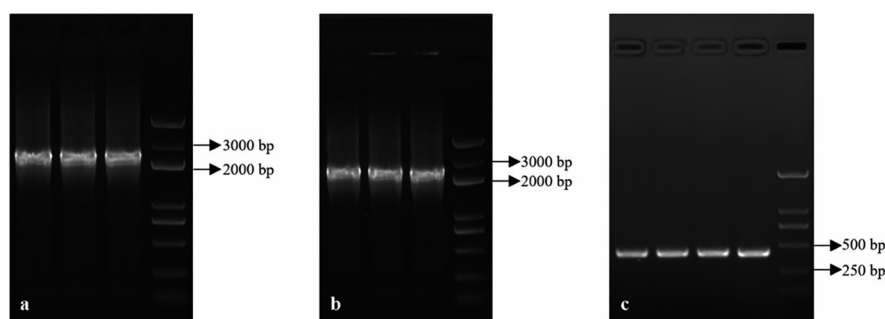


Figure 1 PCR verification results of *DXS* and recombinant vectors. a: *DXS* cloned from *Glycyrrhiza glabra* L. b: *DXS* amplified from pCA-*DXS*. c: 500 bp-fragments containing sgRNA sequences amplified from pHSE-*DXS*

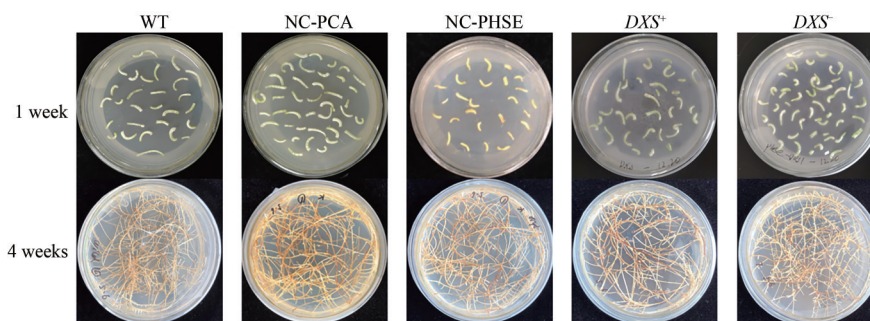


Figure 2 Licorice hairy roots after induction and culturing for 1 week and 4 weeks. WT: Wild type hairy root; NC-PCA: Negative control hairy root containing empty pCambia1305.1; NC-PHSE: Negative control hairy root containing empty pHSE401; DXS^+ : Hairy root over-expressing *DXS*, DXS^- : Hairy root knocking out *DXS*

3 甘草毛状根的验证

甘草毛状根中 *rolC* 基因的 PCR 扩增结果如图 3a 所示, 600 bp 的特异性条带清晰明亮, 测序结果显示其与 *rolC* 基因 (GenBank 登录号: DQ160187.1) 一致性为 100%。 *DXS* 基因过表达甘草毛状根系中 *DXS* 基因的 PCR 验证结果图 3b 所示, 扩增得到与目标基因 *DXS* 长度一致的条带, 测序结果显示其与 *DXS* 原序列一致性为 100%, 表明 *DXS* 基因过表达甘草毛状根系构建正确。 *DXS* 基因沉默甘草毛状根系中 *DXS* 基因第一外显子的 PCR 扩增结果如图 3c 所示, 获得了 480 bp 左右的条带, 长度正确; 克隆测序结果显示, 检测的 6 个甘草毛状根系中有 4 个发生了 *DXS* 基因编辑, 基因编辑率为 66.7%, 克隆测序峰图如图 3d 所示, *DXS* 基因编辑情况列于表 3 中。 4 个 *DXS* 基因沉默甘草毛状根系中 DXS^-1 和 DXS^-8 为杂合子, 均有不同数量的碱基剪除

发生; DXS^-9 和 DXS^-10 为纯合子, 且基因编辑情况相同, 均剪除 9 个碱基。 综上, 经过 PCR 验证及测序验证, 共获得了 5 组甘草毛状根样品, 即: WT (1 样品)、NC-PCA (1 样品)、NC-PHSE (1 样品)、 DXS^+ (6 样品)、 DXS^- (4 样品), 用于后续液体培养及 UPLC 分析。

4 甘草毛状根中甘草酸含量分析

液体培养 3 周后的各甘草毛状根系如图 4a 所示,

Table 3 *DXS* gene editing sites

Sample	Gene sequence	Editing effect
MN158121 (74-80 bp)	GCTCCAACCTCCGAACCATGG	-
DXS^-1-1	GCTCCAA-----ACCATGG	-6 bp
DXS^-1-2	GCTCCAAC-----CCATGG	-5 bp
MN158121 (82-90 bp)	CCGAACCATGGTTCAGAAA	-
DXS^-8-1	CCGAAC-----GGAAA	-9 bp
DXS^-8-2	CCGAAC-----AGAAA	-9 bp
DXS^-9	CCGAAC-----AGAAA	-9 bp
DXS^-10	CCGAAC-----AGAAA	-9 bp

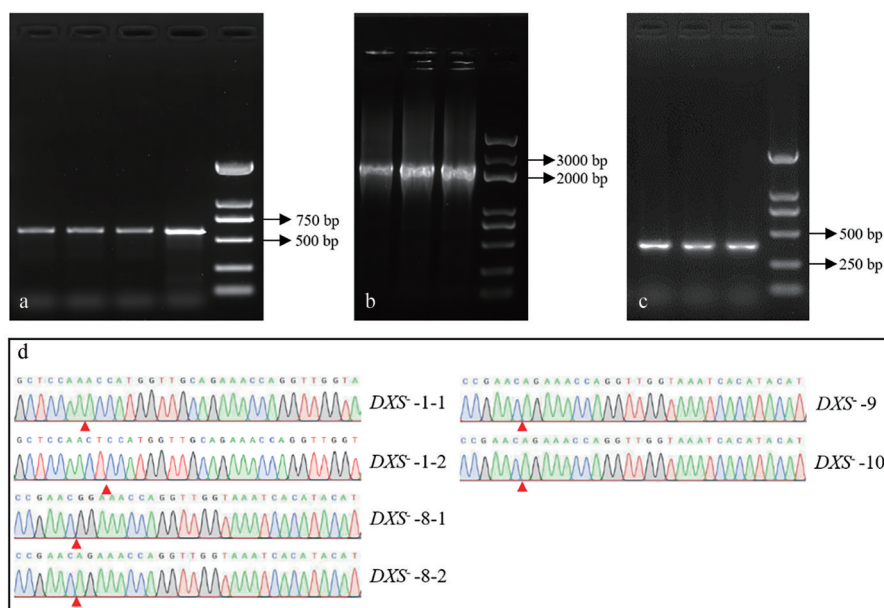


Figure 3 PCR and sequencing results. a: Shows the *rolC* amplified from each hairy root line; b: Shows the *DXS* amplified from DXS^+ lines; c: Shows the first exon of *DXS* amplified from DXS^- lines; d: Shows the editing sites of *DXS* gene in DXS^- lines. ▲: Editing sites

根系生长迅速且状态良好。UPLC 色谱图如图 4b 所示, I 为甘草酸对照品的色谱图, 显示甘草酸保留时间为 6.797 min, II~VI 依次为 WT、NC-PCA、NC-PHSE、 DXS^+ 、 DXS^- 毛状根样品的色谱图。甘草酸标准曲线回归方程为 $Y = 2\,792\,995.69X - 931.23$ ($R^2 = 1$), 线性范围为 $0.0043 \sim 0.0858 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。图 5a 为各甘草毛状根样品中甘草酸含量的比较分析, 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: 全部 6 个 DXS 过表达甘草毛状根样品中甘草酸含量均显著低于 NC-PCA, 4 个样品 (DXS^+ -2、3、5、6) 中甘草酸含量显著低于 WT; 4 个 DXS 基因沉默毛状根样品中有 3 个样品 (DXS^- -8、9、10) 的甘草酸含量显著高于 WT 及 NC-PHSE。图 5b 为 5 组毛状根样品中甘草酸含量的比较分析, 运用 SAS 8.0 软件对甘草酸含量进行组间非参数检验, 结果表明 DXS^- 组甘草毛状根中甘草酸含量显著高于 WT 组和 NC-PHSE 组, 而 DXS^+ 组中甘草酸

含量则显著低于 WT 组和 NC-PCA 组, DXS^+ 组的甘草酸含量仅为 DXS^- 组的 1/2。

讨论

本文克隆了甘草 DXS 基因, 分别构建了 DXS 过表达载体 pCA- DXS 和沉默载体 pHSE- DXS , 利用发根农杆菌 ATCC15834 介导法, 诱导产生了 DXS 基因过表达及沉默的甘草毛状根系 DXS^+ 和 DXS^- 。采用 UPLC 法分析各甘草毛状根样品中甘草酸的含量, 结果表明: DXS^- 组甘草酸含量显著高于 WT 组和 NC-PHSE 组, 而 DXS^+ 组甘草酸含量则显著低于 WT 组和 NC-PCA 组, 从而证实了 DXS 基因对甘草中甘草酸生物合成发挥负调控作用, DXS 基因沉默能显著提高甘草毛状根中甘草酸的含量, 此结果也与课题组前期转录组研究结果相吻合。

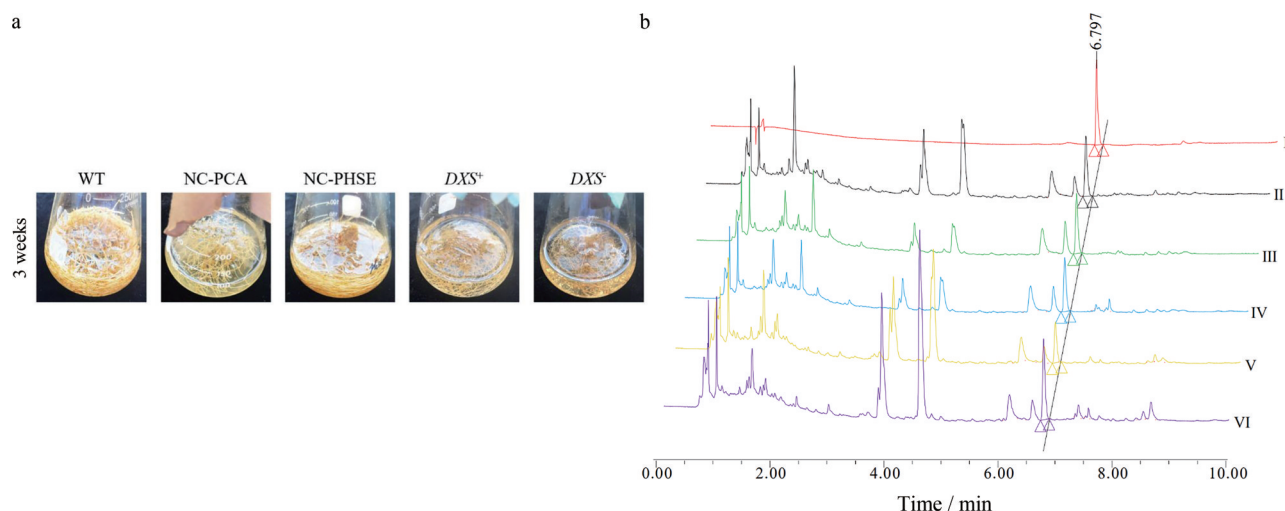


Figure 4 UPLC sample preparation and GA content assay. a: Hairy root samples culturing in liquid 6,7-V medium for 3 weeks. b: UPLC chromatograms. Line I is the UPLC chromatogram of GA reference substance, line II–VI are UPLC chromatograms of sample WT, NC-PCA, NC-PHSE, DXS^+ , and DXS^-

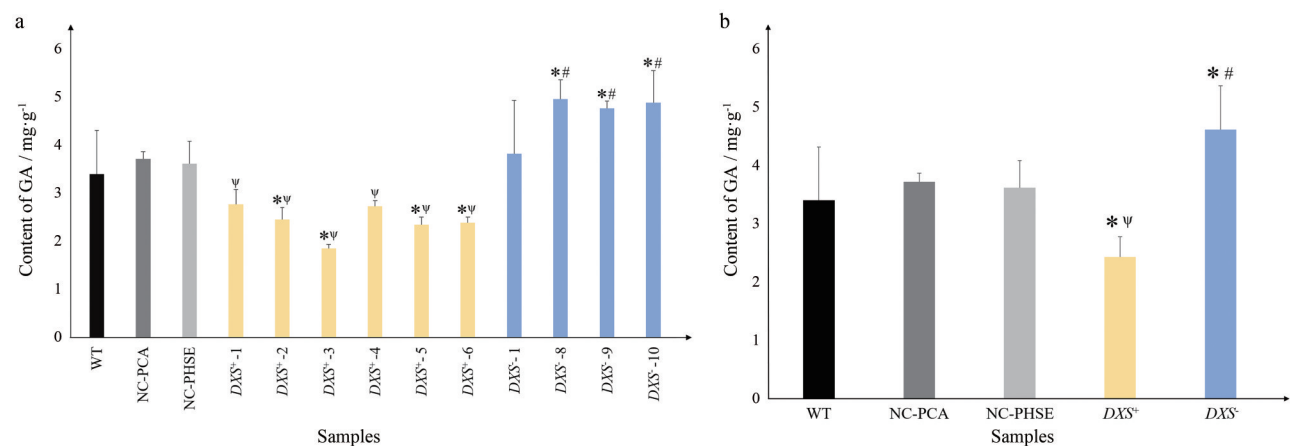


Figure 5 GA content analysis in licorice hairy roots. a: GA content in each hairy root sample; b: GA content in different groups. * $P < 0.05$ vs WT, # $P < 0.05$ vs NC-PCA, Ψ $P < 0.05$ vs NC-PHSE

萜类合成的MVA途径和MEP途径在植物细胞的不同区域独立进行,前者存在于细胞质中,主要合成倍半萜、三萜及一些多萜,后者则存在于质体中,主要合成单萜、二萜及类胡萝卜素等萜类化合物^[21]。MVA途径以乙酰辅酶A为起始物^[22,23],MEP途径则以3-磷酸甘油醛和丙酮酸为起始物^[24],但两途径之间也存在关联,包括一些中间代谢产物的交换,且有时会出现输送的单向性倾向^[25,26]。乙酰辅酶A的生物合成途径除了泛酸这一通路以外,也可从葡萄糖开始,中间经过了3-磷酸甘油醛和丙酮酸。*DXS*作为MEP途径上的第一个关键酶,其基因沉默,增加了3-磷酸甘油醛和丙酮酸的积累,这可能有利于细胞质中乙酰辅酶A的合成,使得MVA途径的起始底物增多,进而促进了作为三萜类物质的甘草酸的合成。当*DXS*表达量升高时,则不利于乙酰辅酶A的合成,从而导致甘草毛状根中甘草酸含量的下降。在*DXS*沉默甘草毛状根品系中,*DXS*⁻¹为杂合突变,在74~80 bp之间发生碱基剪除,与野生型及阴性对照甘草毛状根相比,*DXS*⁻¹样品中甘草酸含量不存在显著差异,分析发现剪除片段在*DXS*蛋白催化结构域之外,因此该片段丢失对*DXS*编码蛋白活性影响较小。*DXS*⁻⁸为杂合突变,*DXS*⁻⁹和*DXS*⁻¹⁰为纯合突变,三个样品均丢失82~90 bp之间的9个碱基,且甘草酸含量均显著高于WT组和NC-PHSE组,分析发现88~90 bp碱基所编码的半胱氨酸是底物三磷酸甘油醛的结合位点^[27],因此该基因片段丢失会显著影响*DXS*编码蛋白活性,从而影响MVA途径的生物合成,导致甘草酸含量升高。

今后将继续以甘草毛状根作为实验材料,陆续开展其他相关功能基因研究,全面阐释甘草酸生物合成途径分子调控网络,以期为提高栽培甘草的品质,以及为甘草毛状根的大规模培养和甘草酸的离体积累奠定基础。

作者贡献: 杨林撰写了论文;刘颖构思并设计了实验方案;杨林、田少凯和汪逗逗完成了实验;张智新和侯嘉铭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) [M]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 88-89.
- [2] 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.
- [3] Yang R, Yuan BC, Ma YS, et al. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb [J]. Pharm Biol, 2017, 55: 5-18.
- [4] Sun X, Duan XP, Wang CY, et al. Protective effects of glycyrrhizic acid against non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 806: 75-82.
- [5] 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.
- [6] Rodríguez-Concepción M, Ahumada I, Díez-Juez E, et al. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening [J]. Plant J, 2001, 27: 213-222.
- [7] Jadaun JS, Sangwan NS, Narnoliya LK, et al. Over-expression of *DXS* gene enhances terpenoidal secondary metabolite accumulation in *rose-scented geranium* and *Withania somnifera*: active involvement of plastid isoprenogenic pathway in their biosynthesis [J]. Physiol Plant, 2017, 159: 381-400.
- [8] Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, et al. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95: 2100-2104.
- [9] Kim BR, Kim SU, Chang YJ. Differential expression of three 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase genes in rice [J]. Biotechnol Lett, 2005, 27: 997-1001.
- [10] Zhang FY, Liu WH, Xia J, et al. Molecular characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene family in *Artemisia annua* [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 952.
- [11] Cordoba E, Porta H, Arroyo A, et al. Functional characterization of the three genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in maize [J]. J Exp Bot, 2011, 62: 2023-2038.
- [12] Roy A. Hairy root culture an alternative for bioactive compound production from medicinal plants [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2021, 22: 136-149.
- [13] Ron M, Kajala K, Pauluzzi G, et al. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model [J]. Plant Physiol, 2014, 166: 455-469.
- [14] Deng CP, Hao XL, Shi M, et al. Tanshinone production could be increased by the expression of SmWRKY2 in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Sci, 2019, 284: 1-8.
- [15] Singh P, Prasad R, Tewari R, et al. Silencing of quinolinic acid phosphoribosyl transferase (QPT) gene for enhanced production of scopolamine in hairy root culture of *Duboisia leichhardtii* [J]. Sci Rep, 2018, 8: 13939.
- [16] Nakayasu M, Akiyama R, Lee HJ, et al. Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the *St16DOX* gene [J]. Plant Physiol Biochem, 2018, 131: 70-77.
- [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] 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.
- [19] Yin YC, Zhang XD, Gao ZQ, et al. Over-expressing root-specific β -amyrin synthase gene increases glycyrrhizic acid content in hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Chin Herb Med, 2019, 11: 192-199.
- [20] 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.
- [21] Bergman ME, Davis B, Phillips MA. Medically useful plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of action [J]. Molecules, 2019, 24: 3961.
- [22] Bach TJ, Boronat A, Campos N, et al. Mevalonate biosynthesis in plants [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1999, 34: 107-122.
- [23] Newman JD, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1999, 34: 95-106.
- [24] Frank A, Groll M. The methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids [J]. Chem Rev, 2017, 117: 5675-5703.
- [25] Vranová E, Coman D, Gruișsem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis [J]. Annu Rev Plant Biol, 2013, 64: 665-700.
- [26] Rodríguez-Concepción M, Boronat A. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis [J]. Curr Opin Plant Biol, 2015, 25: 17-22.
- [27] Xiang S, Usunow G, Lange G, et al. Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 2676-2682.