

钩藤 *STR* 基因及其启动子的克隆与分析

周 浩, 路星星, 敖雯雯, 廖海民, 张明生, 强 玮*

(贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室,
山地生态与农业生物工程协同创新中心, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 根据钩藤转录组中 *STR* 基因核心序列设计特异性引物, 并进行 RACE 扩增, 克隆到 *UrSTR* 基因 (GeneBank: OL310251) 的 cDNA 全长 1 541 bp, 编码 345 个氨基酸; 采用染色体步移克隆到 *UrSTR* 基因启动子 (GeneBank: OL310252) 序列 1 179 bp。系统进化发育树分析显示, 钩藤 *UrSTR* 蛋白与同为茜草科的美丽帽柱木和短小蛇根草的 *STR* 蛋白聚为一类, 其亲缘关系最近; 亚细胞共定位实验表明 *UrSTR* 蛋白定位于液泡膜上; SDS-PAGE 结果表明 pET-28a-*UrSTR* 重组蛋白成功表达且大小与预期相符; 启动子顺式作用元件分析表明其含有光响应、胁迫响应和激素响应有关的多种调控元件; 启动子活性分析 *UrSTR* 基因启动子具有转录活性。成功克隆了 *UrSTR* 基因及其启动子序列并对其进行生物信息学分析和启动子活性分析; 后期需要优化 *UrSTR* 原核表达体系, 为进一步纯化 *UrSTR* 蛋白研究其结构和功能奠定基础。

关键词: 钩藤; 异胡豆苷合成酶; 启动子; 亚细胞定位; 原核表达

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1526-11

Cloning and analysis of *STR* gene and its promoter from *Uncaria*

ZHOU Hao, LU Xing-xing, AO Wen-wen, LIAO Hai-min, ZHANG Ming-sheng, QIANG Wei*

(Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Collaborative Innovation Center for Mountain Ecology & Agro-Bioengineering (CICMEAB), College of Life Sciences/Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: On the basis of the *Uncaria* transcriptome, specific primers were designed for *UrSTR*. The full-length cDNA of *UrSTR* (GeneBank: OL310251) was 1 541 bp, encoding 345 amino acid residues, and the promoter region sequence of *UrSTR* (GeneBank: OL310252) was 1 179 bp. Phylogenetic tree is revealed that *UrSTR* had a closest relationship with *STR* from *Ophiorrhiza pumila* and *Ophiorrhiza japonica*. Localization of *UrSTR* protein is revealed located in the vacuole membrane. Plant-care analysis indicated that the promoter region sequence of *UrSTR*, covering multiple light, stress and hormone-response *cis*-regulatory elements, and verified transcriptional activity. The results of SDS-PAGE show that pET-28a-*UrSTR* recombinant protein was successfully expressed, and the size was anticipated. The *UrSTR* prokaryotic expression system needs to be optimized in the later stage. The research lays the foundation for further purification to study its structure and functional characterization of the *UrSTR* protein.

Key words: *Uncaria rhynchophylla*; strictosidine synthase; promoter; subcellular localization; prokaryotic expression

收稿日期: 2021-11-01; 修回日期: 2021-12-28.

基金项目: 贵州省基础研究计划 (黔科合基础-ZK [2022] 一般 096); 贵州大学培育项目 (贵大培育 [2019] 51 号); 贵州大学引进人才科研项目 (贵大人基合字 [2017] 58); 贵州省中药材现代产业技术体系建设项目 (GZCYTX-02); 国家喀斯特石漠化防治工程技术研究中心建设 (2012FU125X13); 贵州省生物学一流学科建设项目 (GNYL[2017]009).

*通讯作者 Tel: 13678505784, E-mail: wayneqiang@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1700

茜草科钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 是传统地道中药材, 收录于中国药典^[1], 多以干燥带钩茎枝入药, 其主要活性成分以钩藤碱 (rhynchophylline, RIN) 和异钩藤碱 (isorhynchophylline, IRN) 等单萜吲哚类生物碱 (monoterpene indole alkaloid, MIA) 为主, 具有镇静催眠、降血压、抗菌和抗癌等重要药理作用^[1-4]。单萜吲哚类生物碱的合成涉及复杂的多步酶促反应, 上游由环烯醚萜途径 (iridoid pathway) 和吲哚途径 (indole pathway) 分别生成一分子的裂环马钱子苷和色胺, 然后在异胡豆苷合成酶 (strictosidine synthase, STR) 的作用下经皮克特-施彭格勒反应 (Pictet-Spengler reaction) 耦合形成异胡豆苷, 它是超过 2 000 多种 MIA 的前体中心产物^[5-7]。以异胡豆苷为下游途径的起始位点, 在夹竹桃科、茜草科和马钱科等 MIA 资源植物中产生众多 MIA 的衍生物。大量的研究表明, *STR* 基因作为单萜吲哚类生物碱合成途径中关键的限速酶基因, 在植物的次生代谢途径中发挥了重要的作用。*STR* 基因最早从萝芙木 (*Rauvolfia serpentina*)^[8] 和长春花^[9] (*Catharanthus roseus*) 中克隆到并通过原核表达确定了其酶活性; 随后从短小蛇根草^[10] (*Ophiorrhiza pumila*)、日本蛇根草^[11] (*Ophiorrhiza japonica*)、臭味假柴龙树^[12] (*Nothapodytes foetida*) 和铁皮石斛^[13] (*Dendrobium officinale*) 中相继克隆到。在长春花中超表达 *STR* 基因显著促进了阿吗碱、长春碱和水草甘碱等 MIA 的积累^[14,15]; 在短小蛇根草中超表达 *STR* 基因显著促进喜树碱的积累^[16]; Singh 等^[12] 基于同源克隆的方法, 从假柴龙树中克隆到 *NfSTR* 基因, 在匍地蛇根草中异源表达后提高了喜树碱含量。MIA 家族成员广泛, 较为典型的有抗感染的喹啉、具有抗肿瘤活性的喜树碱和抗心律失常的阿吗灵等。而钩藤中主要活性成分 RIN 和 IRN 在抗抑郁、癫痫等中枢神经系统、糖尿病、心律不齐等心血管疾病以及消炎等各个方面都有重要的疗效作用^[4,17]。现阶段对于钩藤的研究仍主要集中于有效成分分离、药理学研究和规模化种植等方面, 对钩藤属植物主要活性成分 RIN 和 IRN 的生物合成途径基因研究鲜有报道。本研究基于遮阴处理下第 3 代转录组数据, 通过同源基因比对分析, 利用 RACE 和染色体步移技术成功扩增得到 *UrSTR* 基因和上游启动子序列, 并对其进行生物信息学分析、亚细胞定位分析和原核表达分析。为下一步解析 RIN 和 IRN 合成机制和通过转基因技术定向调控钩藤属植物次生代谢合成提供理论依据。

材料与方法

植物材料 选取生长良好、长势基本一致的 3 株

贵州大学实验基地种植的 4 年生钩藤, 分别对其根、茎、叶、花、果和钩等部位分别取样, 用于组织表达分析; 选取高度约 10 cm 的钩藤幼苗^[18]用于光照处理和发育表达分析实验, 所用材料均液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

仪器与试剂 激光共聚焦显微镜 (Nikon C2-ER); 凝胶成像系统 (上海培清科技有限公司, JS2012); PCR 仪 (BIO-RAD T100TM Thermal Cycler); 实时荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD)。总 RNA 提取试剂盒 (TSP412) 和胶回收试剂盒 (GE0101-200) 均购于重庆擎科生物科技有限公司; GUS 染色试剂盒 (SL7160) 购于北京酷来搏科技有限公司; 质粒提取试剂盒购于天根生化科技有限公司; 各种限制性内切酶、RNA 反转录试剂盒 (RR019A)、荧光定量 PCR 反转录 (RR037A) 试剂盒、荧光定量染料 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 和 T 载体 pMD19-T Vector 均购于 TaKaRa 公司; HiFi 酶购于全式金公司。本研究所使用的引物及测序工作均由重庆擎科生物科技有限公司提供。实验所用质粒为 pBWA (V) HS-GLosgfp 和 pET-28a, 感受态细胞为 DH5 α 和 Rosseta (DE3), EHA105A 根癌农杆菌感受态细胞均由本实验室制备保存。

总 RNA、DNA 的提取和反转录 cDNA 第一链合成 根据总 RNA 提取试剂盒说明书分别提取钩藤主根、茎、叶、花、果和钩等 6 个组织的总 RNA, 0.1% 琼脂糖凝胶电泳检验其完整性, 微量核酸蛋白测定仪检验其浓度和纯度, 根据反转录试剂盒说明书合成相应组织的 cDNA 第一链; 按照 DNA 提取试剂盒说明书提取钩藤幼嫩叶片 DNA, 进行琼脂糖凝胶电泳检测和浓度的测定。

***UrSTR* 基因的克隆** 由钩藤转录组数据分析得到关于 *UrSTR* 基因的核心片段, 使用 Premier6 软件设计 5'RACE 和 3'RACE 特异性扩增引物, PCR 扩增产物胶回收纯化后与 pMD19-T Vector 连接, 转化克隆感受态细胞 DH5 α 后涂板, 菌液 PCR 验证正确的送擎科生物公司测序。将这 3 段测序序列使用 Vector NTI 11.5 软件进行序列重叠分析, 最终得到 *UrSTR* 基因的 cDNA 全长。根据预测的 *UrSTR* 基因的 ORF 区序列设计一对特异性引物进行扩增, HiFi 酶反应体系 (25 μ L): HiFi buffer II 2.5 μ L, dNTPs 2 μ L, 引物各 0.5 μ L, HiFi 0.25 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 17.25 μ L。PCR 扩增反应程序: 95 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56.4 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 2 min, 25 °C 10 s。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 用擎科生物公司的 DNA 胶回收试剂盒纯化回收。

***UrSTR* 基因的生物信息学分析** 使用 Vector NTI

11.5 软件推导 *UrSTR* 基因编码的氨基酸序列。在线软件 ExPASy 对 *UrSTR* 基因编码蛋白的理化性质预测分析; 基于 NCBI 的 BlastP 检索, NCBI-CDD 预测其保守结构域, 利用 DNAMAN 对 *UrSTR* 蛋白和其他已报道的 *STR* 蛋白进行多序列比对分析; SignalP 5.0 和 Target P 预测其信号肽; NetPhos 3.1 软件预测其磷酸位点。使用 SOPMA 软件对 *UrSTR* 蛋白的二级结构进行预测分析; 进一步基于同源建模的方法, 使用 Swiss-model 软件进行三级结构建模分析。基于 Neighbor-Joining 统计学方法使用 MEGA X 软件构建系统进化树, 检测方法为 Bootstrap, 重复 1 000 次检验置信度。

***UrSTR* 基因的亚细胞定位分析** 将 *UrSTR* 基因序列终止密码子去除并进行克隆, 将纯化回收的克隆片段与 Bsa I 单酶切后的线性化载体 pBWA (V) HS-GLogfp 连接。转农杆菌 GV3101 后, 将 pBWA (V) HS-GLogfp 和 pBWA (V) HS-*UrSTR*-GLogfp 分别侵染烟草幼苗, 使用激光共聚焦显微镜观察荧光信号, 叶绿体通道的激发光 640 nm, 发射光 675 nm, GFP 荧光蛋白的激发光 488 nm, 发射光 510 nm。

***UrSTR* 基因的原核表达分析** 根据 *UrSTR* 基因的生物信息学分析结果表明, *UrSTR* 基因编码的氨基酸存在一段信号肽, 结合原核表达载体 PET-28a 限制性酶切位点 BamH I 和 Sal I 序列设计引物, 去除信号肽序列进行克隆, HiFi 酶反应体系 (25 μ L): HiFi buffer II 2.5 μ L, dNTPs 2 μ L, 引物各 0.5 μ L, HiFi 0.25 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 17.25 μ L。PCR 扩增反应程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56.4 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 2 min, 25 $^{\circ}$ C 10 s。重组连接后的质粒热激法转化到 DH5 α 克隆感受态细胞中, 涂板后挑取单克隆。37 $^{\circ}$ C、200 r \cdot min⁻¹ 振荡培养, 进行菌液 PCR 验证, 送重庆擎科生物科技有限公司测序。将测序正确的 pET-28a-*UrSTR* 原核表达载体扩大培养, 提取质粒导入至 Rosetta (DE3) 表达感受态细胞中, 挑取部分单克隆到 10 mL LB (含 kan) 的液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r \cdot min⁻¹ 进行一活; 按照 1:50 将一活菌液吸取到新鲜的 LB (含 kan) 的液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r \cdot min⁻¹ 进行二活, 约 3 h 后菌液吸光值 OD₆₀₀ 值约达到 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol \cdot L⁻¹ 的 IPTG。37 $^{\circ}$ C、180 r \cdot min⁻¹ 条件下分别诱导 1~5 h 提取蛋白, 使用煮沸法破碎样品 10 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min 后各取 10 μ L 经 SDS-PAGE 蛋白电泳和考马斯亮蓝染色, 检测 *UrSTR* 重组蛋白表达情况。

***UrSTR* 基因的启动子克隆及生物信息学分析** 根据已知的 *UrSTR* 基因开放阅读框区域, 设计引物 R-STR-W1、R-STR-W2 采用热不对称 PCR (Thermal

asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR) 进行第 1 次克隆^[19]; 设计引物 R-STR-W3、R-STR-W4、R-STR-W5 采用融合引物巢式 PCR (fusion primer and nested integrated PCR, FPNI-PCR) 进行第 2 次克隆^[20]。以 CTAB 法提取钩藤幼嫩叶 DNA 为模板, 将经过 1 次 TAIL-PCR 及 1 次 FPNI-PCR 扩得的启动子序列在 Vector NTI 11.5 上重叠拼接分析, 共得到启动子长度 1 179 bp, 高保真酶扩增测序验证后, 在 plant-CARE 在线分析工具中分析 *UrSTR* 基因启动子区顺式作用元件。

***UrSTR* 基因的启动子活性分析** 植物表达载体 pBI121 用 Hind III 和 Xba I 酶进行双酶切得到线性化片段, 与 PCR 扩增纯化得到的 *STR* 基因启动子片段重组连接, 得到目标表达载体 pBI121-STRpro::GUS。转化农杆菌 EHA105 后, 采用农杆菌叶片渗透法, 注射本式烟草叶片背面, 暗培养 2 天后, 进行 GUS 染色, 用作 STRpro 启动子的活性验证。

***UrSTR* 基因的表达分析** 采用实时荧光定量 PCR 法 (qRT-PCR) 检测 *UrSTR* 基因在 4 年生钩藤根、茎、叶、花、果和钩等 6 个组织, 幼苗中不同轮生叶和黑暗处理 3 天后连续光照下叶中的相对表达情况。按照 PrimeScriptTMRT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa, 大连) 试剂盒说明书将各组织部位的 500 ng RNA 反转录为 cDNA, 以各组织部位的 cDNA 为模板, 按照荧光染料试剂盒 TB Green Ex TaqTM II (TaKaRa, 大连) 说明书配置 PCR 反应体系, 反应体系详见文献^[18]; 内参基因 *GAPDH* 参考文献^[21], 本研究所用引物序列详见表 1。

结果与分析

1 *UrSTR* 基因的克隆

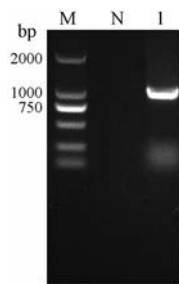
用长春花的 *CrSTR* 基因序列 (X53602.1) 在钩藤三代转录组数据库中进行 Blastn 检索, 筛选到 1 条序列相似性大于 90% 的 unigene, Pfam 和 Swiss-prot 均注释为异胡豆苷合成酶基因家族。设计核心片段引物、5'/3'RACE 引物分别进行扩增, 测序拼接后得到片段长度为 1 541 bp 的全长 cDNA 序列 (GeneBank: OL310251)。以钩藤的 cDNA 为模板, 使用高保真酶对 *UrSTR* 基因的 CDS 区进行克隆后琼脂糖凝胶电泳检测, 条带大小与分析相符 (图 1); 使用 Vector NTI 11.5 软件分析工具 Find ORF 对 *UrSTR* 基因的 cDNA 开放阅读框进行分析预测, 钩藤 *UrSTR* 基因的 ORF 区 1 038 bp, 编码 345 个氨基酸 (图 2)。

2 *UrSTR* 基因的生物信息学分析

使用 ExPASy 对其基本理化性质分析结果表明, 钩藤的 *UrSTR* 蛋白质分子质量为 38.05 kDa, 理论等电位

Table 1 Premier sequences

| Primer | Primer sequence | Usage | |
|------------|--|--------------------------------------|--------|
| F-STR-ORF | CAGCAAATGGGTCGCGGATCCTTCTGAAAGTATGGTTCTG | Clone of ORF | |
| R-STR-ORF | GTGCGGCCGCAAGCTTGTGCGACTGCTGCACCTGATAACAATGAA | | |
| LAD1-1 | ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC (G/C/A)N(G/C/A)NNNGGAA | Universal primer of <i>TAIL</i> -PCR | |
| LAD1-2 | ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC (G/C/T)N(G/C/T)NNNGGTT | | |
| LAD1-3 | ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)(G/C/A)N(G/C/A)NNNCCAA | | |
| LAD1-4 | ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)(G/A/T)N(G/C/T)NNNCGGT | | |
| AC1 | ACGATGGACTCCAGAG | Universal primer of <i>FPNI</i> -PCR | |
| FP-1 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGT NTCGA STWTS GWGTT | | |
| FP-2 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGT NGTCG ASWGA NAWGAA | | |
| FP-3 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGT WGTGN AGWAN CANAGA | | |
| FP-4 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGT AGWGN AGWAN CAWAGG | | |
| FP-5 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGT NGTAW AASGT NTSCA A | | |
| FP-6 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGT NGACG ASWGA NAWGAC | | |
| FP-7 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGT NGACG ASWGA NAWGAA | | |
| FP-8 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGT GTNCG ASWCA NAWGTT | | |
| FP-9 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGT NCAGC TWSCT NTSCCT | | |
| FSP1 | GTAATACGACTCACTATAGGGC | | |
| FSP2 | ACTATAGGGCACGCGTGGT | | |
| R-STR-W1 | GAGGCAACAGCGTGGGTC | | 5'RACE |
| R-STR-W2 | GTTAAAAGCGAAGGCGTTGGG | | |
| R-STR-W3 | CGTGGAATAGTGAAGACAGGAC | | |
| R-STR-W4 | CTGGTGGTCAGCAGGGACAA | | |
| R-STR-W5 | GACTAGTCAGTCTGAAATGGGT | | |
| F-STR-3-1 | TGGAATTACTGTTACGCCT | 3'RACE | |
| F-STR-3-2 | GTCTTTATTCCACGACTTTG | | |
| F-STR-proS | CAGCAAATGGGTCGCGGATCCTCGCCGAGTTTTTCAATTC | Prokaryotic expression | |
| R-STR-PRO | 5GTGCGGCCGCAAGCTTGTGCGACTGCTGCACCTGATAACAATGAA | | |
| F-STR-gfp | CAGTGGTCTCACAACATGTTTCTGTTAACCATAC | Subcellular localization | |
| R-STR-gfp | CAGTGGTCTCATAACAGACCAAGAAGCCTCTCCAT | | |
| qF-GAPDH | AGCAAGGACTGGAGAGGTGGAAG | qRT-PCR | |
| qR-GAPDH | CCGTTGAGGGCTGGAAGAAGCTTTC | | |
| qF-STR | TGGAATTACTGTTACGCCTAC | | |
| qR-STR | GTGGAATAAAGACCCGATGT | | |

**Figure 1** PCR product of *UrSTR* ORF. M: 2 000 DNA Marker; N: Negative control; 1: Amplified PCR product of *UrSTR* ORF

为 5.38, 不稳定系数为 25.96, 脂肪系数为 86.14, 总平均亲水性为 -0.198, 蛋白分子式为 $C_{1723}H_{2616}N_{452}O_{514}S_5$, 为酸性蛋白质。

将钩藤的 *UrSTR* 蛋白的氨基酸序列在 NCBI 中进行 BlastP, 结果表明: *UrSTR* 蛋白与茜草科的短小蛇根草 (*OpSTR*)、帽柱木 (*MsSTR*) 和日本蛇根木 (*OjSTR*) 的同源性都大于 90%, 说明钩藤 *UrSTR* 蛋白属于植物 *STR* 蛋白家族。氨基酸比对结果表明 (图 3): 不同物

种的 *STR* 蛋白氨基酸序列结构域位置有较高的保守性, 物种间 *STR* 蛋白氨基酸序列同源性差异主要来自 N 端和 C 端, 而有催化作用的底物结合位置多处在中间。NCBI-CDD 保守结构域分析表明 (图 3): 钩藤的 *UrSTR* 蛋白含有 2 个结构域, 第 141~229 位氨基酸残基 (Domin I) 组成 Str_synth super family, 这是 MIA 合成途径中异胡豆苷合成酶的关键结构域, 催化裂环马钱子苷和色胺结合生成异胡豆苷; 176~289 位氨基酸残基 (Domin II) 组成糖内酯蛋白的 YvrE super family 结构域, 参与细胞内碳水化合物的运输和代谢, 但目前相关的研究较少。

SignalP 5.0 和 Target P 预测其信号肽表明, *UrSTR* 蛋白存在信号肽的可能性为 0.998 7, 在 N 端有一段 20 个氨基酸的信号肽, 这表明 *UrSTR* 蛋白属于分泌性蛋白, 构建原核表达载体时可去除 N 端信号肽增加蛋白的表达量和可溶性。

NetPhos3.1 server 分析表明, *UrSTR* 蛋白含有 19 个丝氨酸 (Ser)、8 个苏氨酸 (Thr) 和 4 个酪氨酸 (Tyr), 磷

```

1  ATGTTCTGTTAACACTACTTTTCATCGTCTTGTCCCTCTTTGGTGTTCATCTTCGCGGAGTTTTTCAATTCTCAAGTCAACCTACGCGCCCAACGCCTTCGCTTTTAAAC
1  M V L L T I T F I L F L S P L S V V Q S S P E F F Q F L K S P Y G P N A F A F N

121 TCAGCTGGTGAACITTTACGCTCGCCGTCGAAGATGGCAGAATTGTTAAGTATAAAGGATCAACAACGGGTTTTTCAGCCACGCTGTTGCTCCCAATCGAAGCAGGAGAAGTTGTGAG
41  S A G E L Y A A V E D G R I V K Y K G S N N G F S T H A V A S P I W N G E V C E

241 AATAATACTAAACCTCAGCTAAAAACCTTTTGTGGCGGGCATATGACCTCGGATTTCACTATGAAACACAGCAATTGTACATTGCTGATTGTTATTATGGTCTTGGTGGTGGATCT
81  N N T K P Q L K P F C G R A Y D L G F H Y E T Q Q L Y I A D C Y Y G L G V V G S

361 GAAGGAGGCATGCCTCAACTTGCTAGGAGTGCAGATGGAGTGAAGTCAAGTGGCTTTATGCCTTGGCTTGGACCGCAAACTGGCTTCGTTTACCTCACAGATGTTAGCACTAAA
121 E G G H A T Q L A R S A D G V D F K W L Y A L A L D Q Q T G F V Y L T D V S T K

481 TATGATGACAGAGGGTTCAAGACATCTGAGGATAAATGATACAACAGGAAGATTATCAAGTATGATCCCTCAACTAACGAAGCTAGAGTATTATGAATGGGCTGAACGTACACGGC
161 Y D D R G V Q D I L R I N D T T G R L I K Y D P S T N E A R V L M N G L N V P G

601 GGCACCGAAGTTAGCAGAGATGCTCATTCTGGTGTGCTGAATACTTGAGCCACAGAATTCTCAAGTATTGTTAAAGGGCCCTAAGGCAAACTACTCTGAGGTGTTATTAAGAGT
201 G T E V S R D G S F L V A E Y L S H R I L K Y W L K G P K A N T S E V L L K V

721 AGGGCCCGAGTACATAAAAAGGACCCATGATGGAGAATTTGGGTAGCGTCAAGTACAATAATGAATTACTGTTACGCTAGAGGTATAAAGTTTGACGAATTTGGCAACATTTTG
241 R G P G N I K R T H D G E F W V A S S D N N G I T V T P R G I K F D E F G N I L

841 GAAGTCGCCCCCTCCCTCTACCTCTATAAAGGTGAACATTGCAACAAGTTCAAGAGCATAACGGTGGCTTTACATCGGCTTTTATCCACGACTTTTGGTATATTACACAATTAC
281 E V V P I P L P Y K G E H F E Q V Q E H N G A L Y I G S L F H D F V G I L H N Y

961 GAGGGTTCATCTGATGCCAAAAAATATATAGATGGGGTCAATGGATCTTTGAATGGAGAGGCTTCTTTGGTCTGA
321 E G S S D A Q K N Y I D G V N G S L N G E A S L V *
    
```

Figure 2 ORF of *UrSTR* gene and the deduced amino acid sequence

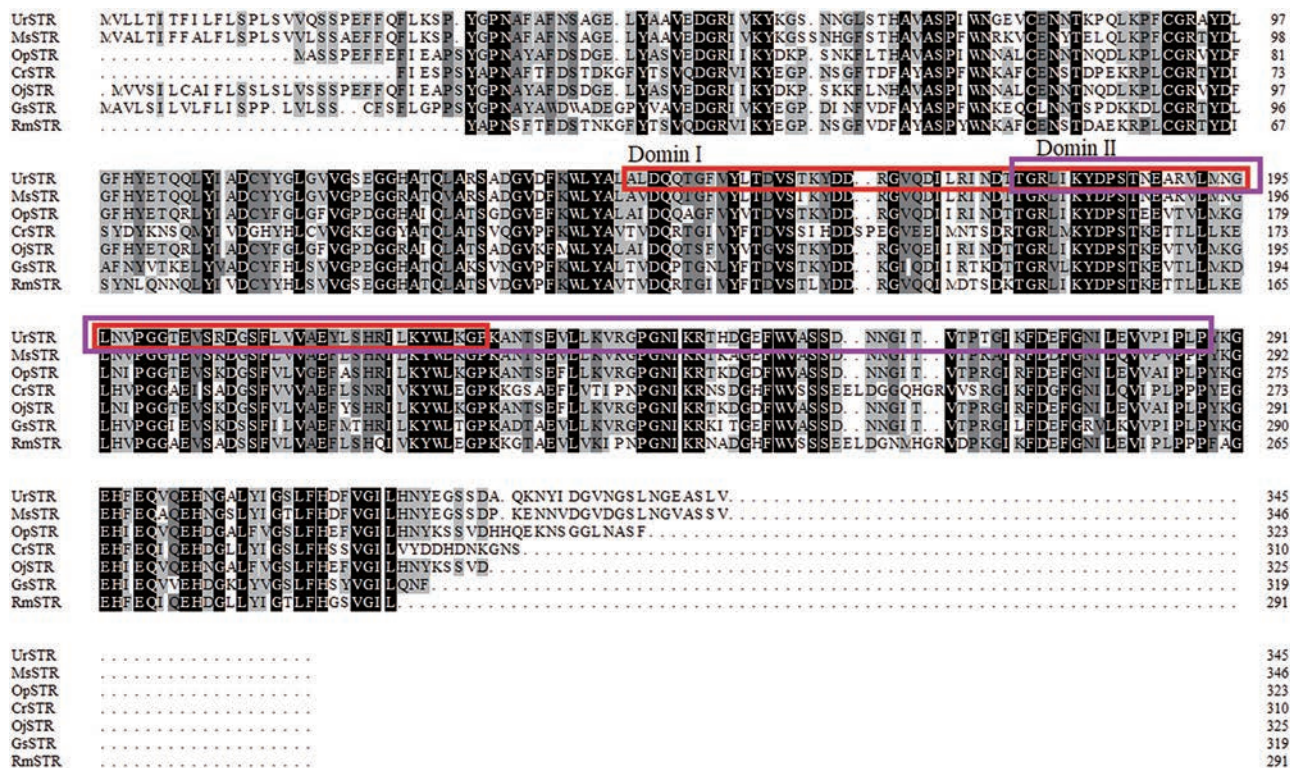


Figure 3 Multiple amino acid sequence alignments of *STR* between *Uncaria rhynchophylla* and other plants. Ms: *Mitragyna speciosa*; Op: *Ophiorrhiza pumila*; Cr: *Catharanthus roseus*; Oj: *Ophiorrhiza japonica*; Gs: *Gelsemium sempervirens*; Rm: *Rauvolfia mannii*

酸位点丰富且磷酸化修饰位点两端谷氨酸 (Glu) 数量较少。这说明 *UrSTR* 蛋白会有丰富的磷酸化修饰类型, 同时 *UrSTR* 蛋白表达的稳定性较低。

SOPMA 软件对 *UrSTR* 蛋白的二级结构分析结果表明 (图 4A): 钩藤 *UrSTR* 蛋白由 α 螺旋 (alpha helix, Hh)、延伸链 (extended strand, Ee)、 β 转角 (beta turn, Tt)

和无规则卷曲 (random coil, Cc) 等 4 种构象组成, 其中 Cc 占比最高为 43.19%, Ee 占比次之为 32.17%, Hh 占比为 15.07%, Tt 占比最低为 9.57%。SWISS-MODEL 进行 *UrSTR* 蛋白的同源建模图 4B 所示, *UrSTR* 蛋白主要由无规则卷曲和延伸链所组成。

采用 MEGA X 软件对 *UrSTR* 蛋白氨基酸序列和

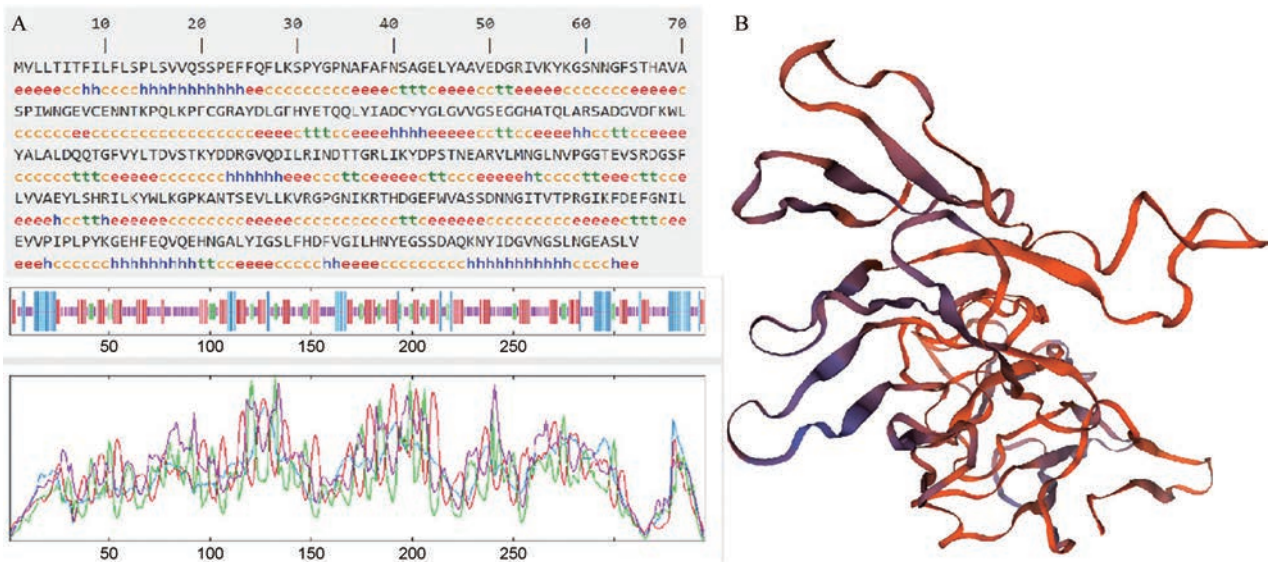


Figure 4 Secondary structure (A) and tertiary structure analysis of *UrSTR* protein (B)

其他有较高同源性的 *STR* 氨基酸序列使用 Neighbor-Joining 法进行系统进化分析, 结果 (图 5) 表明钩藤 *UrSTR* 蛋白与日本蛇根草、短小蛇根草和美丽帽柱木聚为一支, 亲缘关系最近, 这 3 个物种的 *STR* 均已报道分别参与合成 MIA 类的喜树碱和帽柱木碱, 都属于茜草科植物, 而与喜树、臭味假柴龙树、长春花、小蔓长春花、曼氏萝芙木和蟾蜍树的亲缘关系较远。

3 *UrSTR* 基因亚细胞定位分析

将 pBWA (V) HS-GLosgfp (对照) 和构建的融合表达载体 pBWA (V) HS-*UrSTR*-GLosgfp 和液泡膜 Marker 分别采用叶片渗透法侵染烟草叶片, 激光共聚焦显微镜下观察 *UrSTR* 蛋白在细胞中的定位情况, 结果 (图 6) 表明 pBWA (V) HS-*UrSTR*-GLosgfp 融合蛋白绿色荧光信号和液泡膜 Marker 的红色荧光相一致, 但 *UrSTR* 荧光信号较弱。表明 *UrSTR* 蛋白与液泡膜 Marker 存在共定位, *UrSTR* 蛋白定位于液泡膜上。

4 *UrSTR* 基因原核表达分析

生物信息学分析发现 *UrSTR* 蛋白 5' 端有一段 20 个氨基酸的信号肽, 设计引物去除信号肽, 构建原核蛋白融合表达载体 pET-28a-*UrSTR*, 将质粒 pET-28a-*UrSTR* 转化 Rosseta (DE3) 感受态细胞, 得到 *UrSTR* 蛋白表达工程菌。IPTG 诱导表达, 菌体煮沸破碎, 离心后取上清液经 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色, 结果 (图 7) 表明对照组 C 中未加 IPTG 的菌液未能诱导出 pET-28a-*UrSTR* 重组蛋白; pET-28a-*UrSTR* 重组蛋白在 1~5 h 内能被 IPTG 成功诱导表达, 在 4 h 时 pET-28a-*UrSTR* 重组蛋白的表达量就能达到最高, 蛋白条带在 29~44 kDa 之间, 与生物信息学预测的 38 kDa 一致。

5 *UrSTR* 基因启动子克隆及生物信息学分析

在 *UrSTR* 基因的 CDS 区设计 2 条特异性引物, 采用热不对称 PCR 进行第 1 次扩增得到 413 bp 启动子序列; 在此基础上再设计 3 条特异性引物采用融合

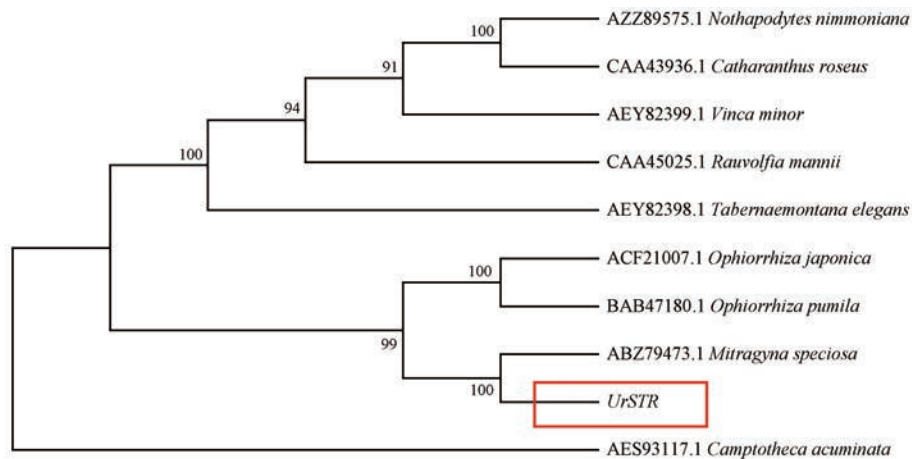


Figure 5 Phylogenetic tree analysis of *UrSTR*

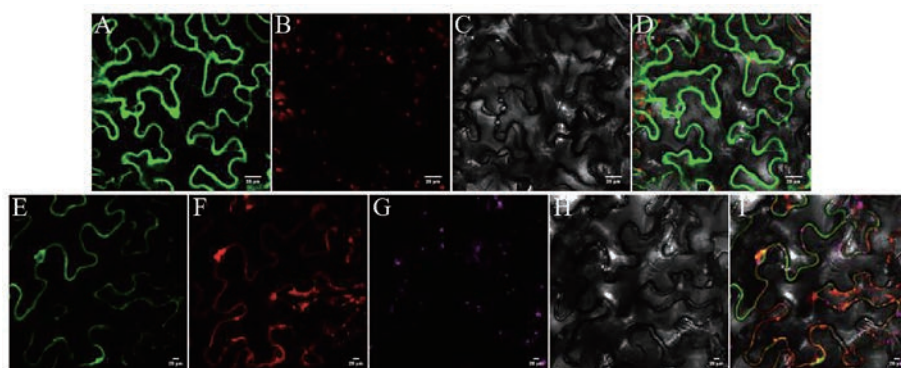


Figure 6 Subcellular localization of *UrSTR*-GLosgfp. A: GFP of 35s-GLosgfp (control check) in bright field; B: Chlorophyll autofluorescence; C: Bright field; D: Merged images; E: GFP of *UrSTR*-GLosgfp; F: Vacuole marker; G: Chlorophyll autofluorescence; H: Bright field; I: Merged images

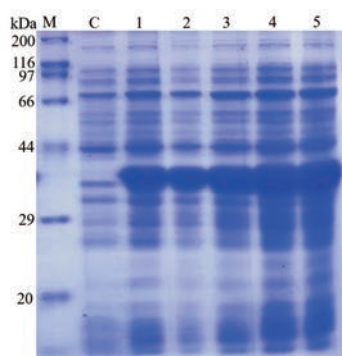


Figure 7 Effect of different inductive time on expression of pET-28a-*UrSTR* recombinant protein. M: Protein marker; C: Control group; 1–5 h: Total protein of bacteria with 1 mmol·L⁻¹ IPTG in 1, 2, 3, 4 and 5 h

引物巢式 PCR 进行扩增。共计克隆到 *UrSTR* 基因编码区上游序列 1 455 bp, 去除 5'UTR 区 287 bp, 共计得到 *UrSTR* 基因启动子 (GeneBank: OL310252) 共计 1 179 bp。在线软件 Plant-CARE 分析 *UrSTR* 基因启动子区域的顺式作用元件, 结果 (图 8) 表明 *UrSTR* 基因启动子含有基本转录元件 TATA-box 和 CAAT-box; 植物激素响应元件 ABRE、CGTCA-motif、TCA-element 和 P-box; 光响应元件 G-box、3-AF1 binding site 和 GT1-motif; 转录因子结合位点元件 MYB、MYB-like 和 MYC; 厌氧诱导顺式作用元件 ARE 和逆境响应元件 TC-rich repeats。启动子区域元件丰富, 说明钩藤 *UrSTR* 基因启动子能够响应植物激素胁迫、光调控和逆境等外界环境的变化, 从而调控 *UrSTR* 基因的表达。

6 *UrSTR* 基因启动子活性分析

将 pBI121::GUS (对照) 和构建好的 pBI121-STRpro::GUS 采用叶片渗透法侵染烟草, 验证 *UrSTR* 基因启动子活性, GUS 染色结果显示: 阴性对照未能染上蓝色 (图 9A), pBI121-STRpro::GUS 烟草具有较深

的蓝色 (图 9B), 说明克隆到的 *UrSTR* 基因启动子具有驱动下游基因转录的活性。

7 *UrSTR* 基因表达分析

实时荧光定量 PCR 检测 *UrSTR* 基因的相对表达量, 结果 (图 10) 表明在幼苗叶片的发育过程中, *UrSTR* 表达量由顶端往下急剧降低, 顶端叶 1 的 *UrSTR* 表达量最高, 是底端叶 4 的 34 倍, 叶 2 中 *UrSTR* 基因表达是叶 4 的 10 倍, 叶 3 中 *UrSTR* 基因表达是叶 4 的 5 倍 (图 10A); *UrSTR* 基因在茎中的表达量最高, 约为钩的 5 倍; 根中次之, 约为钩的 4 倍, 钩和果中的表达量最低 (图 10B)。黑暗处理 3 天, 在连续光照处理下, *UrSTR* 基因在 24 h 内能持续地诱导表达, 在 24 h 提高至 14 倍, 说明 *UrSTR* 是光响应基因 (图 10C)。

讨论

利用底盘细胞合成天然活性成分具有周期短、占据空间少和降低外在影响等优点, 为药源问题的获取提供新的思路, 具有广阔的应用场景。现阶段已成功在酿酒酵母中完成了莨菪碱和东莨菪碱^[22]、青蒿素^[23]、灯盏花素^[24]和甘草酸^[25]的全合成, 为解决土壤紧缺、快速获得天然活性成分和解决药源问题做出了巨大贡献。而解析合成途径基因是代谢工程的基础, 在之前的报道中发现双超表达 *STR* 和 *TDC* 显著促进了长春花中 TIAs 的积累, 而单超表达 *TDC* 时对 MIA 的积累无显著影响^[14]; 在短小蛇根草中双超表达 *STR* 和 *G10H* 显著促进喜树碱的积累^[16]。由此可见, *STR* 基因可作为解析 MIA 合成途径的突破口和 TIAs 代谢工程中的重要靶基因。

STR 压缩色胺和裂环马钱子苷合成异胡豆苷, 为包括钩藤碱在内的众多萜类吲哚生物碱的合成提供关键的前体物质。本研究克隆到的 *UrSTR* 基因 ORF 框

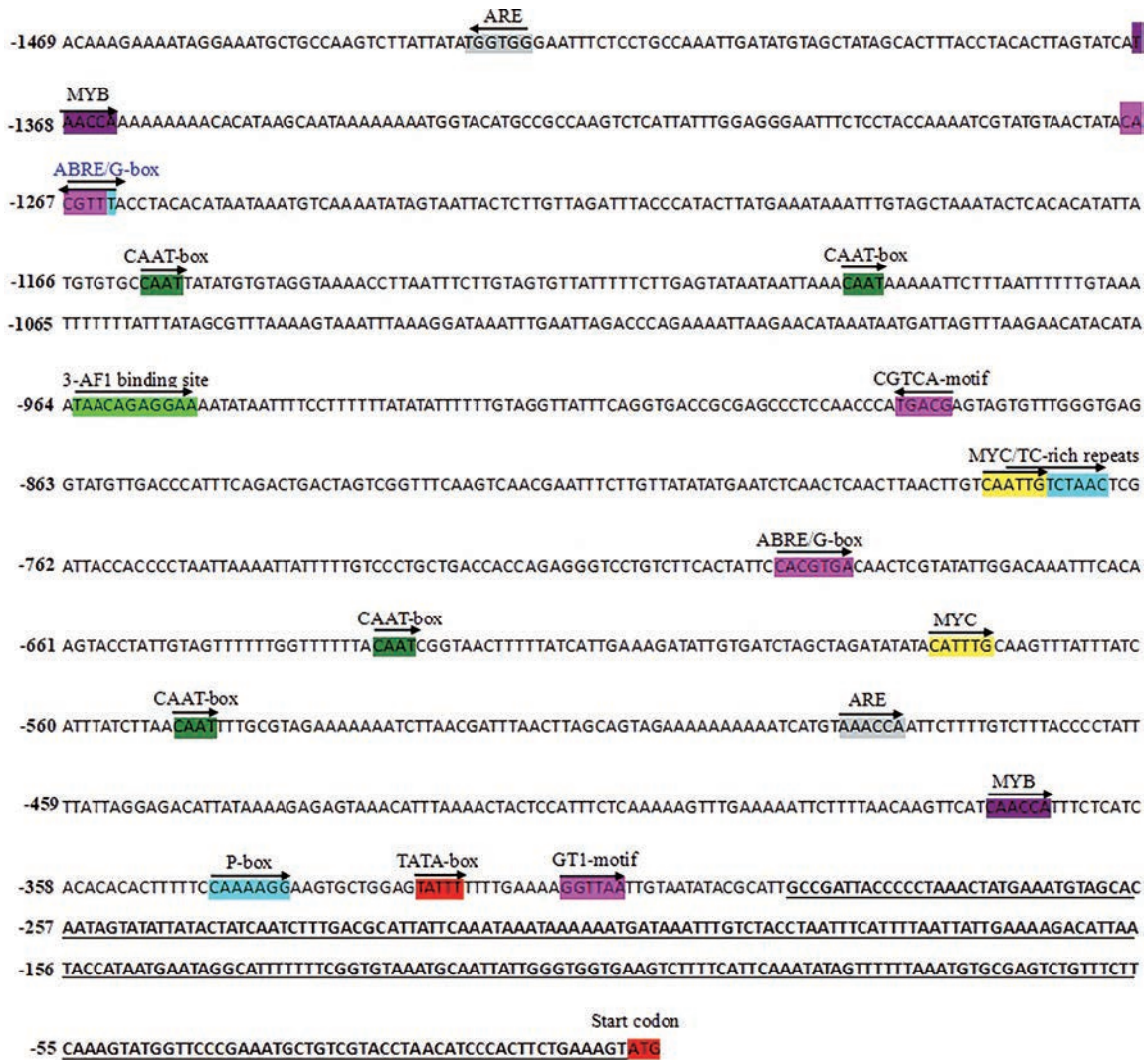


Figure 8 The sequence of upstream promoter element of *UrSTR*

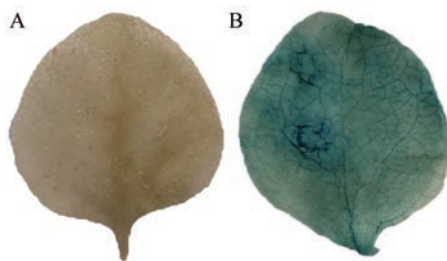


Figure 9 *UrSTR* gene promoter transient expression tobacco. A: Negative control; B: pBI121-STRpro::GUS transient expression tobacco GUS staining map

有 1 038 bp, 与植物中其他物种所报道 *STR* 基因的 ORF 框长度接近^[7, 10, 11]。 *UrSTR* 蛋白与其他植物中 *STR* 蛋白结构域高度相似, 只有部分位点发生了变化, 这可能是因为它们都是催化色胺和裂环马钱子苷生成异胡豆苷。除此之外, *UrSTR* 蛋白还存在 YvrE super family 结构域, 可能与碳水化合物的转运和代谢相

关^[26], 然而目前有关于 *YvrE* 蛋白的研究还较少, 具体的功能还需要更深入的研究。系统进化树中钩藤、短小蛇根草、日本蛇根木和美丽帽柱木在同一支上, 同源关系较近且氨基酸相似度很高, 这可能是因为它们都属于茜草科, 同时暗示着它们具有相似的生物学功能。而喜树自成一支, 可能是因为在喜树中异胡豆苷合成酶是催化裂环马钱子酸与色胺缩合成异胡豆苷酸^[27], 进化过程中酶催化位点发生了变异或者进化。同时, 异胡豆苷合成酶广泛存在于动物和植物中^[27, 28], 在系统进化过程中逐渐分化成不同的功能, 在植物中合成 MIA 的前体异胡豆苷, 与水稻花药发育和花粉壁的形成有关^[29]; 在动物中与肌纤维的整合有关^[30], 本研究中 *UrSTR* 蛋白还具有 YvrE 结构域, 可针对其在钩藤中是否具有其他功能展开更深入的研究。

亚细胞结构的分区为蛋白质的生物学功能发挥提供合适的场所, 使不同功能蛋白间互不干扰。在 MIA

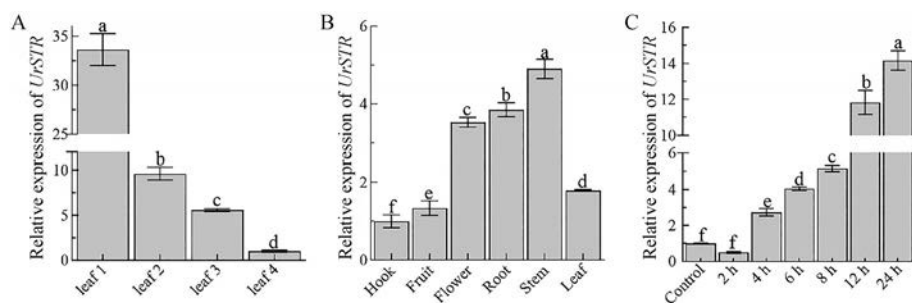


Figure 10 Relative expression of *UrSTR*. Different letters represent significant differences among the expression levels using Duncan's multiple range test at $P < 0.05$ in SPSS. A: Developmental ages were labeled from young (L1) to old (L4) leaf; B: Different tissues from *Uncaria rhynchophylla*; C: Induction of light after dark treatment

的合成途径中需要5种亚细胞结构(叶绿体、细胞质、细胞核、液泡和内质网)的参与^[15]。色氨酸通过吲哚途径在细胞质中生成色胺^[31]；香叶醇通过环烯醚萜途径在内质网中生成裂环马钱子苷^[32]。色胺和裂环马钱子苷被转运到液泡膜，异胡豆苷合成酶结合色胺和裂环马钱子苷生成众多MIA的前体异胡豆苷。由于STR蛋白是一个功能保守性蛋白^[33]，在MIA合成途径中于液泡膜上发挥着功能，本研究中*UrSTR*蛋白定位于液泡膜上，与Thomas等^[33]报道的长春花*CrSTR*蛋白定位结果一致。进一步说明*UrSTR*蛋白属于植物中STR蛋白家族。

植物基因启动子在基因的表达调控和功能发挥着重要的作用。本研究克隆到*UrSTR*基因启动子含有激素、光调控和转录因子等顺式作用元件，这暗示*UrSTR*基因能及时响应外界环境的变化，可能还参与钩藤植物的发育调控。本课题组前期使用MeJA和ABA处理钩藤幼苗^[18, 34]，*UrSTR*基因能被显著诱导表达，结合克隆到启动子域含有MeJA和ABA等响应元件，进一步揭示*UrSTR*基因受到显著诱导表达原因所在。同时，*UrSTR*基因启动子区域含有G-box、3-AF1 binding site和GT1-motif等光响应元件为解释光照处理下*UrSTR*基因持续表达提供了理论依据。构建*UrSTR*基因启动子表达载体瞬时表达本式烟草验证其具有转录活性，但并未进一步构建缺失片段启动子来验证启动活性的变化，还需进一步构建不同缺失长度的启动子来研究。此外应利用拟南芥为材料构建*UrSTR*基因启动子稳定遗传体系，研究*UrSTR*基因启动子在不同组织部位的表达情况，同时对该启动子的关键调控区域进行酵母单杂实验，筛选出能与*UrSTR*基因启动子结合的转录因子，为揭示钩藤中MIA生物合成机制提供理论依据。

发育表达分析结果表明*UrSTR*基因随着叶片的成熟表达量逐渐降低，这与Yasuyo等^[35]在短小蛇根草中

检测到*OpSTR*基因的表达结果一致。在喜树中同样检测到*CaTDC1*、*CaG80*和*Ca7DLS*等途径基因及部分转录因子的基因表达量随着叶片成熟而逐渐降低^[36]。这是因为植物的幼嫩枝叶易受到食草动物和病原微生物的侵害，而植物的次生代谢产物可抵御逆境胁迫，例如在长春花中机械损伤处发现次生代谢产物异胡豆苷的大量积累^[37]。因此，*UrSTR*基因随着叶片成熟表达量降低，是因为叶片的木质化和蜡质化程度加深，提高了叶片防御病原微生物的能力。组织表达结果表明钩藤*UrSTR*基因在钩藤的根、茎、叶、花、果和钩6个组织部位都有表达，其中在茎中的表达量最高。然而Yasuyo等^[35]在喜树和匍地蛇根草根茎叶中检测不到STR酶活性。这暗示在植物中STR合成位置具有差异性，在钩藤中的合成位置还需更深入的研究，为后续在钩藤中途径基因的鉴定提供更多的线索。研究发现萜类物质的合成具有昼夜节律性，如青蒿的β-pinene合成酶在光照下转录水平高于黑暗条件下^[38]。本研究在黑暗处理后在持续光照处理下钩藤*UrSTR*基因达到对照的14倍。而在喜树中*CaSTR*基因变化不显著^[26]，这可能是*CaSTR*基因启动子区不含有光响应顺式作用元件，而本研究中钩藤*UrSTR*基因启动子富含多种光响应顺式作用元件。

综上，本研究首次从钩藤中克隆到MIA途径基因*UrSTR*及其启动子，并验证了其功能定位情况，启动子具有转录活性。在Rosetta (DE3)细胞中成功表达了*UrSTR*重组蛋白，煮沸破碎后重组蛋白成功在上清液中检测到，为后续蛋白纯化和研究其结构和功能奠定基础。对进一步阐明钩藤MIA的合成调控机制，分子育种具有重要的意义。

作者贡献: 周浩完成本实验主要工作；敖雯雯和路星星构建了植物表达载体；周浩完成了数据分析和论文初稿的写作；强玮、廖海民和张明生共同指导论文的写作与修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 257.
- [2] Wei GY, Xu CY. Research progress on antihypertensive effects of rhynchophylline and isorhynchophylline [J]. China Med Pharm (中国医药科学), 2020, 10: 32-36.
- [3] Yu X, Zhu LL, Liu J, et al. Research progress on monoterpene indole alkaloids in *Uncariae Ramulus Cum Uncis* and their pharmacological activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 6052-6065.
- [4] Qin N, Lu X, Liu YJ, et al. Recent research progress of *Uncaria* spp. based on alkaloids: phytochemistry, pharmacology and structural chemistry [J]. Eur J Med Chem, 2021, 210: 112960.
- [5] Stöckigt J, Antonchick AP, Wu F, et al. The pictet-spengler reaction in nature and in organic chemistry [J]. Angew Chem Int Ed, 2011, 50: 8538-8564.
- [6] Wu SW, Yang MQ, Xiao YL. Synthetic biology studies of monoterpene indole alkaloids [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2018, 38: 2243-2258.
- [7] O'Connor SE, Maresh JJ. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis [J]. Nat Prod Rep, 2006, 23: 532-547.
- [8] Kutchan TM. Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant *Rauvolfia serpentina* in *Escherichia coli* [J]. FEBS Lett, 1989, 257: 127-130.
- [9] Treimer J, Zenk M. Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation [J]. Eur J Biochem, 1979, 101: 225-233.
- [10] Yasuyo Y, Hiroshi S, Mami Y, et al. Camptothecin biosynthetic genes in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*: cloning, characterization and differential expression in tissues and by stress compounds [J]. Plant Cell Physiol, 2003, 44: 395-403.
- [11] Lu Y, Wang HS, Wang W, et al. Molecular characterization and expression analysis of a new cDNA encoding strictosidine synthase from *Ophiorrhiza japonica* [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36: 1845-1852.
- [12] Singh S, Kamble SN, Satdive RK, et al. Heterologous overexpression of *Nothapodytes foetida* strictosidine synthase enhances levels of anti-cancer compound camptothecin in *Ophiorrhiza rugosa* [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2020, 141: 67-76.
- [13] Zhu YZ, Fan HH, Li DH, et al. Molecular cloning, bioinformatics analysis and expression of the strictosidine synthase in *Dendrobium officinale* [J]. Acta Sci Pol Hort Cult, 2020, 19: 111-124.
- [14] Canel C, LopesCardoso MI, Whitmer S, et al. Effects of overexpression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus* [J]. Planta, 1998, 205: 414-419.
- [15] Sharma A, Verma P, Mathur A, et al. Overexpression of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase enhanced terpenoid indole alkaloid pathway activity and antineoplastic vinblastine biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. Protoplasma, 2018, 255: 1281-1294.
- [16] Cui LJ, Ni XL, Ji Q, et al. Co-overexpression of geraniol-10-hydroxylase and strictosidine synthase improves anti-cancer drug camptothecin accumulation in *Ophiorrhiza pumila* [J]. Sci Rep, 2015, 5: 8227.
- [17] Zhang JG, Chen JJ, Geng CA. Advances in indole alkaloids from traditional Chinese medicine of *Uncariae Ramulus Cum Uncis* documented in Chinese Pharmacopoeia [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 685-695.
- [18] Zhou H, Qiang W, Ao WW, et al. Effect of exogenous abscisic acid on biosynthesis of alkaloids in *Uncaria* [J]. Mol Plant Breeding (分子植物育种), 2021.
- [19] Wang Z, Ye SF, Li JJ, et al. Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): a new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning [J]. BMC Biotechnol, 2011, 11: 109.
- [20] Liu YG, Chen YL. High-efficiency thermal asymmetric inter-laced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. Biotechniques, 2007, 43: 651-656.
- [21] Yu XS, Li X, Wang XH, et al. Screening and stability evaluation of reference genes in *Uncaria rhynchophylla* qRT-PCR analysis [J]. J Agric Biotechnol (农业生物技术学报), 2021, 29: 587-597.
- [22] Prashanth S, Christina DS. Engineering a microbial biosynthesis platform for *de novo* production of tropane alkaloids [J]. Nat Commun, 2020, 585: 614-639.
- [23] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. Nature, 2013, 496: 528-532.
- [24] Liu XN, Cheng J, Zhang GH, et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches [J]. Nat Commun, 2018, 9: 448.
- [25] Xu K, Zhao YJ, Nadeem A, et al. *O*-Glycosyltransferases from *Homo sapiens* contributes to the biosynthesis of glycyrrhetic acid 3-*O*-mono- β -*D*-glucuronide and glycyrrhizin in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Synth Syst Biotechnol, 2021, 6: 173-179.
- [26] Reshma SV, Nitish S, Nagendra HG. Characterization of a hypothetical protein YVRE from *Bacillus subtilis* indicates its key role as glucono-lactonase in pentose phosphate pathway and glucose metabolism [J]. Bioinformatics, 2017, 13: 430-438.
- [27] Cao N, Wang CH. Strictosidine synthase, an indispensable enzyme involved in the biosynthesis of terpenoid indole and β -carboline alkaloids [J]. China J Nat Med, 2021, 19: 591-607.
- [28] McCoy E, Galan MC, O'Connor SE. Substrate specificity of strictosidine synthase [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16: 2475-2478.
- [29] Zou T, Li SC, Li MX, et al. An atypical strictosidine synthase,

- OsSTRL2*, plays key roles in anther development and pollen wall formation in rice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 6863.
- [30] Gray CH, McGarry LC, Spence HJ, et al. Novel beta-propeller of the BTB-Kelch protein Krp1 provides a binding site for Lasp-1 that is necessary for pseudopodial extension [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 30498-30507.
- [31] Luca DV, Cutler AJ. Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 1987, 85: 1099-1102.
- [32] Miettinen K, Dong L, Navrot N, et al. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus* [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3606.
- [33] Thomas DM, Dnaiel RB, Ronald JB, et al. Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants [J]. *Planta*, 1991, 185: 148-152.
- [34] Lu XX, Qiang W, Fu W, et al. Effects of methyl jasmonate on alkaloids biosynthesis in *Uncaria rhynchophylla* [J]. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), 2021. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20210603.1049.004.html>
- [35] Yasuyo Y, Akiko U, Hiroshi S, et al. Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in camptothecin producing plants [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 461-470.
- [36] Chang CH, Liu ZW, Wang YY, et al. A bZIP transcription factor, *CaLMF*, mediated light-regulated camptothecin biosynthesis in *Camptotheca acuminata* [J]. *Tree Physiol*, 2019, 39: 372-380.
- [37] Bernonville TD, Carqueijeiro I, Lanoue A, et al. Flivory elicits a strong defense reaction in *Catharanthus roseus*: metabolomic and transcriptomic analyses reveal distinct local and systemic responses [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40453.
- [38] Lu S, Xu R, Jia JW, et al. Cloning and functional characterization of a β -pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 477-486.