

· 基础研究 ·

剑叶龙血树 4CL 基因的克隆及其功能预测[△]孙惠芳¹, 宋美芳¹, 张越¹, 李海涛¹, 王云强¹, 张忠廉^{1,2*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 云南分所/云南省南药可持续利用研究重点实验室,
云南 景洪 666100;

2. 道地药材国家重点实验室, 北京 100700

[摘要] 目的: 对剑叶龙血树 4CL 家族基因进行克隆及功能预测, 筛选出可能参与黄酮类生物合成相关的 4CL 基因, 为深入阐述龙血竭的形成机制奠定基础。方法: 在前期转录组测序数据的基础上, 初步筛选 4CL 家族基因, 并对其进行基因克隆及功能预测, 筛选可能与黄酮类及木质素类化合物合成相关的 4CL 基因; 以剑叶龙血树组培苗为研究对象, 对其进行过氧化氢、茉莉酸、水杨酸等胁迫处理, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 分析不同胁迫处理条件下 4CL 基因的相对表达变化规律。结果: 在剑叶龙血树转录组数据库中共注释得到 6 个 4CL 基因并成功完成其基因克隆; 其中 3 个基因 (*Dc4CL1*、*Dc4CL2* 和 *Dc4CL3*) 在龙血竭形成过程中呈现差异表达, *Dc4CL1* 基因和 *Dc4CL2* 基因的表达模式与木质素类化合物生物合成的关键酶基因表达变化趋势一致, 而 *Dc4CL3* 基因的表达模式与黄酮类化合物生物合成的关键酶基因表达变化趋势一致; 系统发育分析结果显示, *Dc4CL1* 和 *Dc4CL2* 属于 I 类 4CL 基因, 而 *Dc4CL3* 基因属于 II 类 4CLs 基因; 胁迫处理结果显示, *Dc4CL* 均有差异性表达变化, 其中 *Dc4CL3* 基因的相对表达量显著高于其他 *Dc4CL* 基因。结论: 对龙血竭形成过程中起关键催化作用的 4CL 基因进行初步的筛选, 其中 *Dc4CL1* 基因和 *Dc4CL2* 基因 (I 类) 可能主要参与木质素类化合物的生物合成, *Dc4CL3* 基因 (II 类) 可能是龙血竭形成过程中黄酮类化合物生物合成的关键催化酶基因。

[关键词] 剑叶龙血树; 4CL 基因; 木质素; 黄酮类

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)03-0513-10

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220517004

Cloning and Function Prediction of 4CL Genes in *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. ChenSUN Hui-fang¹, SONG Mei-fang¹, ZHANG Yue¹, LI Hai-tao¹, WANG Yun-qiang¹, ZHANG Zhong-lian^{1,2*}

1. Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization, Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China;

2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, Beijing, 100700, China

[Abstract] **Objective:** To perform cloning and function prediction of 4CL family genes in *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S.C.Chen and screen for 4CL genes that might be involved in flavonoid biosynthesis, aiming to lay the foundation for in-depth exploration of the mechanism of dragon's blood formation. **Methods:** On the basis of existing transcriptome sequence data, we preliminarily screened for 4CL family genes and then performed gene cloning and function prediction to screen for 4CL genes that might be related to the biosynthesis of flavonoids and lignins. *D. cochinchinensis* seedlings were subjected to stress treatments of hydrogen peroxide, jasmonic acid, and salicylic acid, and the relative expression patterns of 4CL genes under various stress conditions were analyzed through quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results:** In this study, six 4CL genes were annotated in the transcriptome database of *D. cochinchinensis* and successfully cloned. Among them, three genes (*Dc4CL1*, *Dc4CL2*, and *Dc4CL3*) showed differential expression during the dragon's blood formation. The expression patterns of *Dc4CL1* and *Dc4CL2* were consistent with the expression trends of key

[△] [基金项目] 中央本级重大增减支项目 (2060302); 国家重点研发计划重点专项 (2019YFC1712305); 云南省重大科技专项 (202002AA100007); 云南省科技人才和平台计划项目 (202105AG070011); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-032)

* [通信作者] 张忠廉, 副研究员, 研究方向: 中药资源与分子生药学; E-mail: zzl0605@163.com

enzyme genes related to lignin biosynthesis, while the expression pattern of *Dc4CL3* conformed to the trends of key enzyme genes related to flavonoid biosynthesis. Phylogenetic analysis revealed that *Dc4CL1* and *Dc4CL2* were class I *4CL* genes while *Dc4CL3* belonged to class II *4CL* gene. By stress treatment, it was found that all *Dc4CL* genes were differentially expressed under stress, and the relative expression of *Dc4CL3* was significantly higher than that of the other *Dc4CL* genes.

Conclusion: In this study, we preliminarily screened for the *4CL* genes that play key catalytic roles in the dragon's blood formation. Among them, *Dc4CL1* and *Dc4CL2* (class I) might be mainly responsible for lignin biosynthesis, while *Dc4CL3* (class II) might be involved in flavonoid biosynthesis.

[Keywords] *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen; *4CL* gene; lignins; flavonoids

龙血竭是我国传统名贵中药,素有“活血圣药”之称^[1],是百合科植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen的含脂木材经提取得到的树脂,具有活血散瘀、定痛止血、敛疮生肌的功效,主要用于治疗跌打损伤、瘀血作痛、妇女气血凝滞、外伤出血、疮疡久不收口等症状^[2]。目前,我国以龙血竭为原料的中成药生产企业多达20余家,市场年需求量大,且所需的龙血竭原料均为国外进口,跨境采购势必导致药材供应链薄弱、流通不畅、生产成本增加等问题,严重影响了龙血竭相关产业的可持续发展^[3-4]。龙血竭为胁迫诱导型药材,健康的剑叶龙血树无法形成龙血竭,只有在植株受到伤害胁迫或人工诱导后才能形成红色的树脂。基于目前龙血竭资源现状,如何深入阐释龙血竭的生物合成机制,并在此基础上开展人工诱导技术,成为实现龙血竭可持续利用及产业可持续发展的必然途径之一。

笔者在前期研究中,采用转录组学方法初步阐释了龙血竭的生物合成机制,发现剑叶龙血树在伤害诱导后,与木质素生物合成相关的合成基因表达呈下降的趋势,而与黄酮类化合物生物合成相关的关键合成基因表达呈上升趋势^[5]。木质素与黄酮类化合物生物合成途径均属于苯丙烷代谢途径,4-香豆酸辅酶A连接酶(4-coumarate: CoA ligase, 4CL: EC 6. 2. 1. 12)位于苯丙烷代谢途径的分支点上游,催化肉桂酸、4-香豆酸、咖啡酸、阿代酸和芥菜酸转化为相应的辅酶A (CoA) 酯^[6],这些CoA酯可作为许多次生代谢产物的生物合成底物,如黄酮类、异黄酮、二苯乙烯类、木质素、香豆素和酚类物质等^[7-9],因此,4CL基因在苯丙素与木质素、黄酮类等化合物^[8]生物合成的分叉点起着重要作用。植物中的4CL基因常以基因家族形式存在,如拟南芥中有4个4CL基因(*4CL1~4CL4*)^[9],水稻、玉米和白杨中也各筛选到5个4CL基因^[10-13]。研究表明,植物的4CL家族基因可以分为I类和II类两大类,其中I

类4CL基因主要参与木质素的生物合成,II类4CL基因则主要参与黄酮类化合物的生物合成^[8,11,13],因此,研究剑叶龙血树中不同类别的4CL基因,对深入阐述龙血竭的生物合成至关重要。

本课题组前期对人工伤害诱导处理下的剑叶龙血树进行二、三代转录组测序,并上传至美国国家生物技术信息中心(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>),SRA登录号为SRX100054976~SRX10005506)对结果进行初步筛选,一共获得了6个4CL基因^[5]。本研究对初步筛选到的4CL基因家族进行克隆、生物信息学及序列进化分析,并以剑叶龙血树组培苗为研究对象,对其进行过氧化氢(H₂O₂)、茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)等胁迫处理,实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析不同胁迫处理条件下4CL基因家族的相对表达变化规律,以期深入探究龙血竭形成的生物合成机制及在此过程中黄酮类化合物的生物合成机制提供参考。

1 材料

1.1 样品

茎和种子均收集于中国医学科学院药用植物研究所云南分所的龙血树种质资源圃内剑叶龙血树,树龄为10年且生长健壮,经中国医学科学院药用植物研究所云南分所的李海涛副研究员鉴定为剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen的茎和种子。收集到的剑叶龙血树种子在含培养基的组培瓶中进行萌发,待其生长半年后进行后期胁迫实验。

1.2 试剂

研究中所用大肠埃希氏菌菌株DH5 α (批号:9057)、Mighty TA-cloning Kit(批号:6028)、胶回收试剂盒TaKaRa Mini BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 4.0(批号:9762)、TaKaRa Ex Taq 酶(批号:

RR001Q)、高保真酶PrimeSTAR (批号: R045Q)、反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (批号: RR0470Q)、定量PCR试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (批号: DRR820A) 均购自宝日生物技术有限公司; 快速通用植物RNA提取试剂盒 (批号: 0416-50gk, 北京华越洋生物科技有限公司); 引物合成、T载体测序均委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 仪器

Tprofessional 96型PCR扩增仪、COMPACTM型电泳仪 (Biometra公司); Uvitec型凝胶成像系统 (Uvi公司); BioPhotometer Plus型核酸蛋白检测仪 (Eppendorf公司); CFX96型qRT-PCR仪 (Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 总RNA和cDNA制备

剑叶龙血树总RNA提取方法参考北京华越洋生物科技有限公司快速通用植物RNA提取试剂盒进行。RNA提取后使用核酸蛋白检测仪检测其260 nm和280 nm处吸光度(A)比值(A_{260}/A_{280})和浓度, 取 $A_{260}/A_{280}=1.9\sim 2.0$ 的RNA进行后续cDNA的制备, 制备方法参照PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser说明书进行。

2.2 剑叶龙血树4CL家族基因的筛选与克隆

在剑叶龙血树转录组数据库 (SRA登录号为SRX100054976~SRX10005506) 中检索“4CL”和“4-coumarate:coenzyme A ligase”并筛选出对应的核酸序列, 根据筛选到的剑叶龙血树4CL家族基因 (命名为Dc4CL1~Dc4CL6, GenBank accession ON807232~ON807237) 序列, 利用DNAMAN 6.0软件进行引物设计, 涉及引物序列见表1。以剑叶龙血树cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系: dNTPs Mixture ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4 μL , $5\times$ Prime STAR Buffer缓冲液10 μL , $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物各1 μL , cDNA模板200 ng, 高保真DNA聚合酶0.3 μL , 加ddH₂O至终体积50 μL 。PCR反应程序为98 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。利用0.8%琼脂糖电泳分离检测PCR扩增产物, 使用胶回收试剂盒 TaKaRa Mini BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0回收纯化目的条带。纯化后的产物按Mighty TA-cloning Kit说明书进行克隆实验, 选取阳性克隆、测序。

表1 本研究所用引物名称序列及产物长度

引物名称	序列 (5'→3')	产物长度/bp
Dc4CL1_F	ATGGGCTCAATTTCCTCGGAGATTA	1650
Dc4CL1_R	TTAGTGGCCGTTAGCAAATCCAG	
Dc4CL2_F	ATGGGCTCAATCCCCTCCGA	1629
Dc4CL2_R	TCAGTAGCTGTTAATAAATCCGACGG	
Dc4CL3_F	ATGGCAGCCCCAGTCGACCCC	1665
Dc4CL3_R	TCAGATCTTGTTGGTAGAAGTTGCAAG	
Dc4CL4_F	ATGATCACCATCGCCACCCCTGA	1680
Dc4CL4_R	TTAAGAAGAAGAGGAGGCAACTCTTG	
Dc4CL5_F	ATGGAAGAGCCCCACACTACT	1662
Dc4CL5_R	CTATGTAGAATTAGGGTAACATAGAGCAAGAC	
Dc4CL6_F	ATGGCGTCTCACTACAGCAG	1638
Dc4CL6_R	CTACAGTCTCGATCTTGCTTCT	
q-ACT_F	ACCGAGAGAGGGTACTCATT	254
q-ACT_R	CCAGCTCCTGCTCGTAATC	
RT4CL1_F	GTGCTGCCGCTGTTCCATA	185
RT4CL1_R	GCCGTGTTCTTCGCCATCT	
RT4CL2_F	TCCACATCTACTCGCTCAACTC	168
RT4CL2_R	GGTTCTTCGCCATCTCAACAAC	
RT4CL3_F	CGACGATGACGACGAAGTGT	195
RT4CL3_R	GCCTCCTCCGTGAGATCAGA	
RT4CL4_F	CTCAACACCTCTCAAGAGATCG	231
RT4CL4_R	CTCCTTGATAGTGGCGTTCTG	
RT4CL5_F	CTCTCCTACTCTCTACGCACCC	198
RT4CL5_R	GAAGACGATGGCAGGGTTGAC	
RT4CL6_F	TCGTGGACCAAACATGATGCA	233
RT4CL6_R	CAACAGCAGCATCTAATATCTCAG	

2.3 剑叶龙血树4CL家族基因的生物信息学分析

4CL家族基因cDNA序列的开放阅读框架 (ORF) 查找及翻译借助DNAMAN 6.0和SnapGene 4.0完成, 利用DNAMAN 6.0完成4CL氨基酸序列比对; 使用ExPASyProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)、TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、WoLFPSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 等在线工具对蛋白质的相对分子质量、等电点、跨膜结构域和信号肽等进行分析和预测。

2.4 剑叶龙血树4CL家族蛋白的比对分析和系统进化分析

将Dc4CL基因编码的氨基酸序列提交至NCBI进行Blast检索, 在NCBI中下载了17个植物物种中的43个同源蛋白序列, 其蛋白名称和GenBank登录

号见表2, 利用DNAMAN 6.0将剑叶龙血树4CL家族蛋白与拟南芥和水稻的4CL蛋白进行多序列比对分析; 利用MEGA10.0将剑叶龙血树中克隆到的4CL家族蛋白与上述43个4CL蛋白采用邻接法(NJ)构建系统发育树。

2.5 剑叶龙血树组培苗胁迫处理

胁迫处理包括喷施0.5% H₂O₂, 0.5 mmol·L⁻¹的JA、SA, 紫外(UV)照射, 机械伤害(wounding)

即选2~3片健康的叶子, 每片叶子上用无菌牙签扎2~3个孔, 对照组不做任何处理。采集剑叶龙血树种子在含培养基的组培瓶中进行萌发, 待其生长半年后再选取大小一致、生长健壮组培苗进行胁迫处理, 分别在处理后0、5、10、20、30、48 h和3、5、10 d取样, 对照组和实验组每个时间段取3个生物学重复, 样品采集后液氮速冻于-80℃保存, 参照2.1项下方法进行RNA提取和cDNA制备。

表2 植物4CL蛋白的成员

植物名	拉丁学名	蛋白名称	GenBank 登录号
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	At4CL1	U18675
		At4CL2	AF106086
		At4CL3	AF106088
		At4CL4	AAM19949
深圳拟兰	<i>Apostasia shenzhenica</i> Z. J. Liu & L. J. Chen	As4CL-like	PKA60113.1
深山南芥	<i>Arabis lyrata</i> L.	Al4CL-like	XP_020869904.1
大豆	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Gm4CL1	AF279267
		Gm4CL2	AF002259
		Gm4CL3	AF002258
		Gm4CL4	X69955
陆地棉	<i>Gossypium hirsutum</i> Linn.	Gh4CL1	FJ479707
		Gh4CL2	FJ848870
紫草	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc.	Le4CL1	D49366
		Le4CL2	D49367
黑麦草	<i>Lolium perenne</i> L.	Lp4CL1	AAF37732
		Lp4CL2	AAF37733
		Lp4CL3	AAF37734
川桑	<i>Morus notabilis</i> Schneid.	Mn4CL1	EXB80937.1
		Mn4CL2	XP_010092099
		Mn4CL3	XP_010087481
		Mn4CL4	XP_010110729
烟草	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Nt4CL	D43773
		Nt4CL1	U50845
		Nt4CL2	U50846
稻	<i>Oryza sativa</i> L.	Os4CL1	NM001067888.1
		Os4CL2	NM001054354.1
		Os4CL3	NM001052604.1
		Os4CL4	NM001064787.1
		Os4CL5	NM001061935.1
短花野生稻	<i>Oryza brachyantha</i> A. Chev. & Roehr.	Ob4CL-like	XP_006649341.1
柳枝稷	<i>Panicum virgatum</i> L.	Pv4CL1	EU491511.1
		Pv4CL2	JF414903
		Pv4CL-like	XP_039780127.1
欧芹	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Hill.	Pc4CL1	X13324
		Pc4CL2	X13325
火炬松	<i>Pinus taeda</i> L.	Pinta4CL	P41636.1
颤杨与欧洲山杨杂交种	<i>Populus tremuloides</i> Michx. × <i>Populus tremula</i> L.	Poph4CL1	AF008184
		Poph4CL2	AF008183
颤杨	<i>Populus tremuloides</i> Michx.	Poptr4CL1	AF041049
		Poptr4CL2	AF041050
覆盆子	<i>Rubus idaeus</i> L.	Ri4CL1	AAF91310.1
		Ri4CL2	AAF91309.1
		Ri4CL3	AAF91308.1

2.6 qRT-PCR分析

以剑叶龙血树肌动蛋白(Actin)基因为内参^[5],利用对qRT-PCR对不同胁迫处理后的剑叶龙血树组培苗的*Dc4CL*家族基因进行相对表达量分析,所涉及引物序列见表1;qRT-PCR实验参照SYBR®*Premix Ex Taq*™ II(批号:DRR820A)试剂盒进行;基因的相对表达量由定量PCR仪自带软件CFX Manager进行分析。

3 结果与分析

3.1 剑叶龙血树4CL家族基因筛选

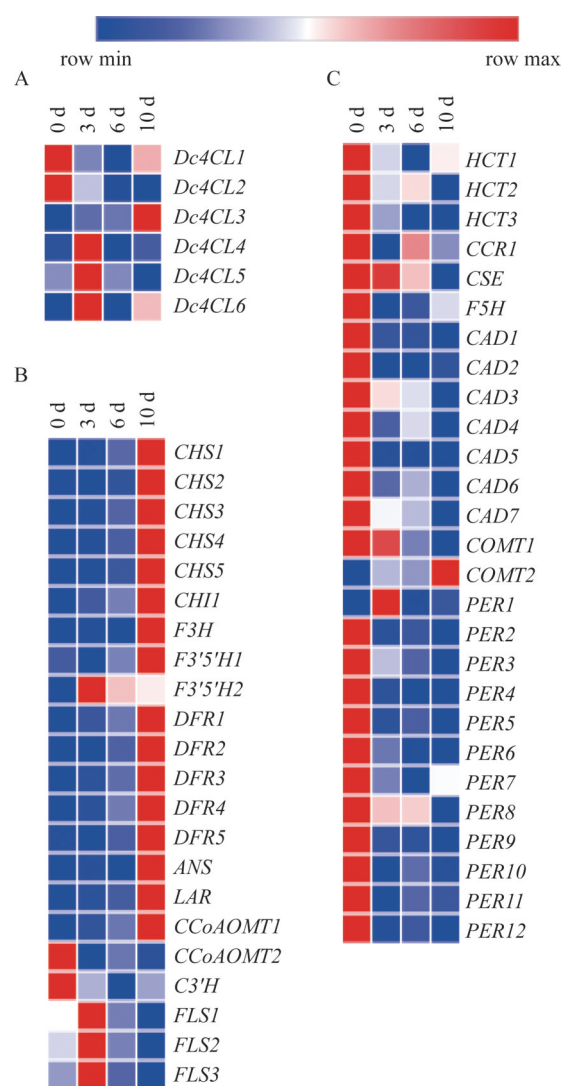
在剑叶龙血树转录组数据库中共筛选得到6个4CL基因,前期对剑叶龙血树人工伤害诱导处理0、3、6、10 d的转录组数据差异表达分析发现4CL家族基因中3个(*Dc4CL1*、*Dc4CL2*和*Dc4CL3*)在处理伤害过程中呈现差异表达,剑叶龙血树受到机械伤害时木质素合成途径关键酶基因表达下调,黄酮类合成途径关键酶基因表达上调^[5],通过与前期研究数据对比分析发现*Dc4CL1*基因和*Dc4CL2*基因的表达模式与木质素类化合物生物合成的关键酶基因表达变化趋势一致,而*Dc4CL3*基因的表达模式与黄酮类化合物生物合成的关键酶基因表达变化趋势一致(图1),因此,初步推测*Dc4CL1*基因和*Dc4CL2*基因可能参与木质素生物合成途径,*Dc4CL3*基因可能参与黄酮类生物合成途径。

3.2 剑叶龙血树4CL家族基因的克隆

根据在剑叶龙血树二代、三代全长转录组数据获得的6个4CL基因的序列设计引物,利用高保真酶对4CL家族基因的ORF进行克隆,PCR产物电泳检测结果见图2。借助DNAMAN 6.0和SnapGene 4.0对阳性克隆的测序结果进行拼接和分析,结果显示克隆测序结果与前期获得的转录组数据一致,统计测序得到的基因片段大小和编码氨基酸数量见表3。

3.3 剑叶龙血树4CL家族蛋白质的生物信息学分析

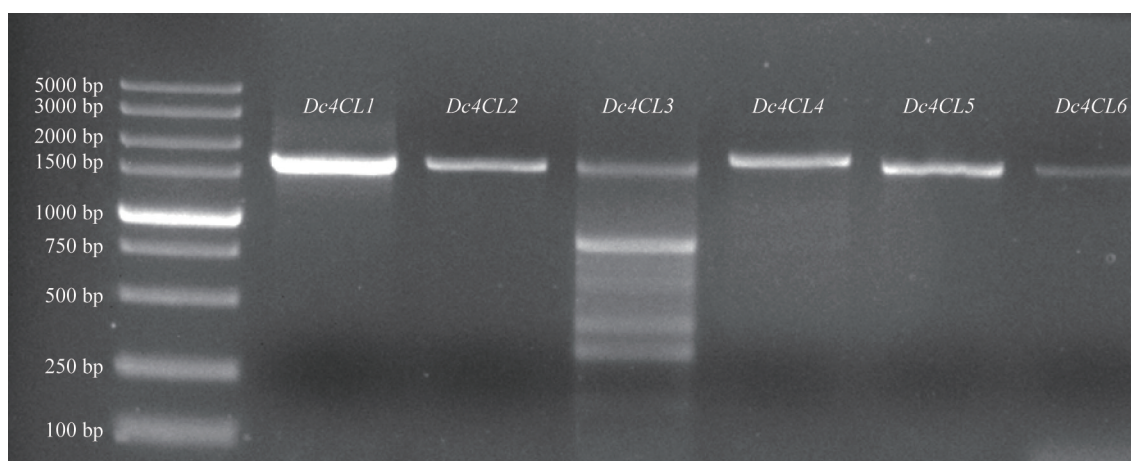
ExPASy分析显示*Dc4CL*家族的6个蛋白质相对分子质量为59 500~60 300,理论等电点为5.39~8.78;*Dc4CL1*、*Dc4CL2*不稳定系数均小于40,预测两者均属于稳定蛋白,*Dc4CL3*、*Dc4CL4*、*Dc4CL5*、*Dc4CL6*不稳定系数均大于40,预测其属于不稳定蛋白;*Dc4CL1*、*Dc4CL2*、*Dc4CL3*、*Dc4CL4*、*Dc4CL5*总平均亲水指数为正值,属疏水蛋白,仅



注: A. 剑叶龙血树4CL家族基因; B. 黄酮类生物合成途径关键基因; C. 木质素生物合成途径关键基因; 蓝色和红色分别代表低表达和高表达; 4CL. 4-香豆酸辅酶A连接酶; CHS. 查耳酮合成酶; CHI. 查耳酮异构酶; F3H. 黄烷酮3-羟化酶; F3'5'H. 黄酮3',5'-羟甲基化酶; DFR. 二氢黄酮醇还原酶; ANS. 花青素还原酶; LAR. 无色花青素还原酶; CCoAOMT. 咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶基因; C3'H. 莽草酸香豆酯/奎酸酯3'-羟化酶; FLS. 黄酮醇合成酶; HCT. 羟基肉桂酰CoA莽草酸羟基肉桂转移; CCR. 肉桂酰辅酶A还原酶; CSE. 咖啡酰莽草酸酯酶; F5H. 阿魏酸5-羟化酶; CAD. 肉桂醇脱氢酶; COMT. 咖啡酸3-O-甲基转移酶; PER. 过氧化物酶。

图1 剑叶龙血树苯丙素生物合成途径关键酶候选基因的表达水平

*Dc4CL6*总平均亲水指数为-0.064,属亲水性蛋白;TargetP 1.1 Server、TMHMM 2.0工具分析显示*Dc4CL*家族的6个蛋白质至少都存在1个跨膜结构域,但信号肽预测结果显示仅*Dc4CL5*有信号肽的存在;WoLFPSORT工具预测蛋白的亚细胞定位结果显示*Dc4CL1*、*Dc4CL2*蛋白存在于细胞质可能性最

图2 剑叶龙血树 *Dc4CL* 基因的克隆表3 剑叶龙血树 *4CL* 家族基因基本信息

基因名称	片段大小/bp	氨基酸数/个
<i>Dc4CL1</i>	1650	549
<i>Dc4CL2</i>	1629	542
<i>Dc4CL3</i>	1680	559
<i>Dc4CL4</i>	1665	554
<i>Dc4CL5</i>	1662	553
<i>Dc4CL6</i>	1638	545

大,而*Dc4CL3*、*Dc4CL4*、*Dc4CL5*、*Dc4CL6*蛋白存在于细胞膜上的可能性最大(表4)。

3.4 剑叶龙血树 *4CL* 家族蛋白的比对分析和系统发育分析

利用DNAMAN 6.0将剑叶龙血树的6个*4CL*蛋白与拟南芥和水稻的*4CL*蛋白进行多序列比对分析,拟南芥和稻 GenBank 登录号见表2。结果显示剑叶龙血树 *4CL* 家族蛋白与拟南芥和水稻中已分离的 *4CL* 蛋白有较高的同源性,而且*Dc4CL1*、*Dc4CL3*都含有植物 *4CL* 家族共同的保守功能结构域 Box I (PYSSGTTGLPKLG V) 和 Box II (GEICIRG)^[14]; *Dc4CL2*与其他 *4CL* 家族仅在 Box I 处没有突变,在 Box II 结构域处半胱氨酸(C)突变为色氨酸(W);

而*Dc4CL4*、*Dc4CL5*、*Dc4CL6*在 Box I 和 Box II 结构域均有不同位点的突变(图3)。

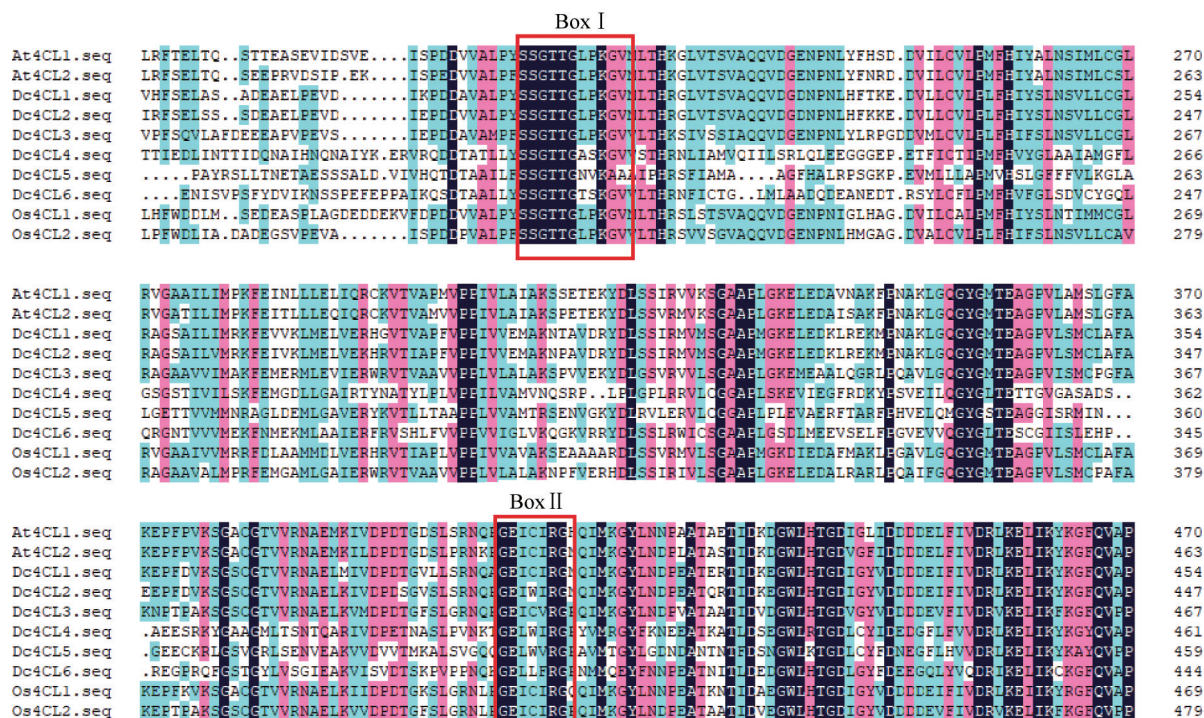
剑叶龙血树 *4CL* 家族蛋白与36个 *4CL* 蛋白的系统发育分析结果显示,这些 *Dc4CL* 蛋白被聚到3个大支(图4)。其中*Dc4CL1*、*Dc4CL2*被聚 *4CL* 家族的 I 类中即 Class I, 推测其与 Class I 中的 *4CL* 有相似的功能; *Dc4CL3*被聚 *4CL* 家族的 II 类中即 Class II, 推测其与 Class II 中的 *4CL* 有相似的功能;而 *Dc4CL4*、*Dc4CL5*、*Dc4CL6*与 *4CL*-like 聚到一支。据文献报道, *4CL* 家族 Class I 均与木质素的合成密切相关^[14], 推测 *Dc4CL1*、*Dc4CL2*也主要参与木质素的生物合成; *4CL* 家族 Class II 均与黄酮类化合物的合成密切相关^[15], 推测 *Dc4CL3*主要参与黄酮类化合物的生物合成, *Dc4CL4*、*Dc4CL5*、*Dc4CL6*属于 *4CL*-like, 与 Class I 和 Class II 有较远的亲缘关系。

3.5 剑叶龙血树 *4CL* 基因在胁迫处理下的相对表达特征

胁迫处理剑叶龙血树组培苗后,对 *4CL* 家族基因的相对表达量分析结果(图5)显示在 H_2O_2 、JA、SA、UV 和 wounding 5 种处理后 *Dc4CL* 基因均表现出不同的响应模式,但整体来说,除 *Dc4CL3* 基因

表4 *Dc4CL* 家族蛋白的理化性质和亚细胞定位预测

蛋白名称	相对分子质量	分子式	理论等电点	不稳定系数	亲水性系数	是否存在信号肽	亚细胞定位	跨膜结构域位置
<i>Dc4CL1</i>	60 100	$C_{2684}H_{4295}N_{713}O_{792}S_{26}$	5.68	31.04	0.044	否	细胞质	230~251
<i>Dc4CL2</i>	59 500	$C_{2667}H_{4264}N_{700}O_{788}S_{24}$	5.39	38.64	0.034	否	细胞质	226~247
<i>Dc4CL3</i>	57 700	$C_{2672}H_{4265}N_{707}O_{792}S_{24}$	5.5	43.72	0.158	否	细胞膜	97~124, 132~157, 250~278, 290~309
<i>Dc4CL4</i>	60 300	$C_{2697}H_{4364}N_{728}O_{802}S_{15}$	8.78	42.65	0.039	否	细胞膜	83~111, 248~276
<i>Dc4CL5</i>	59 800	$C_{2697}H_{4298}N_{706}O_{788}S_{18}$	6.44	40.91	0.081	是	细胞膜	97~117, 124~144, 217~235, 243~269
<i>DC4CL6</i>	60 200	$C_{2703}H_{4283}N_{721}O_{796}S_{17}$	6.17	47.24	-0.064	否	细胞膜	61~81, 87~107, 225~252, 270~296



注: BOX I 表示保守的 AMP 结合功能域; BOX II 表示 (GEICIRG) 保守区。

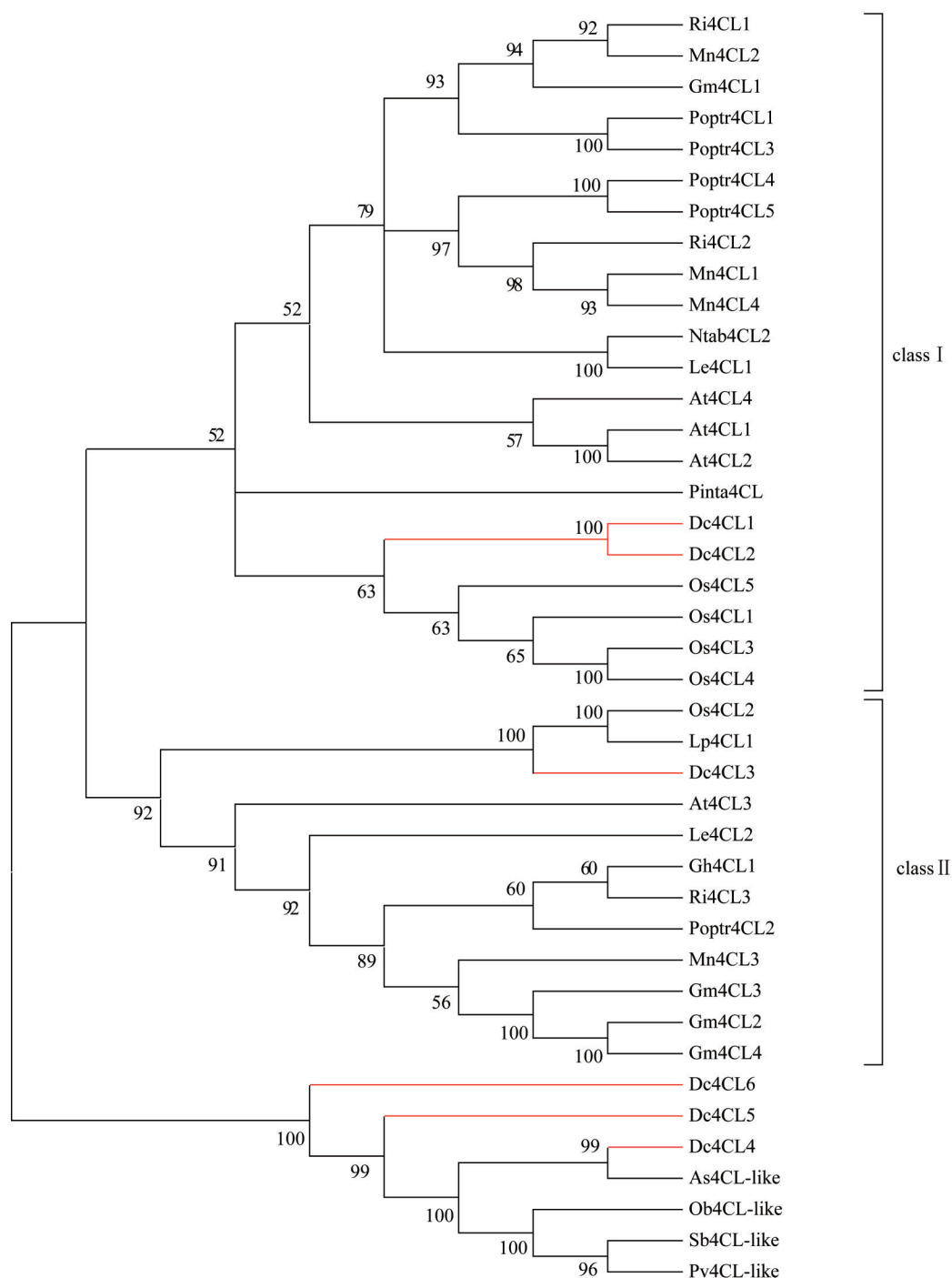
图3 Dc4CL 蛋白与拟南芥和稻 4CL 蛋白比对

外其他 5 个基因的相对表达量及表达变化趋势基本一致,而 *Dc4CL3* 的相对表达量均大于另外 5 个 4CL 基因,且表达变化趋势与外 5 个 4CL 基因不同。5 种胁迫处理,除 SA 和 UV 处理外,其余 3 种处理在胁迫处理初期(前 5 h),*Dc4CL1*、*Dc4CL2*、*Dc4CL5*、*Dc4CL6* 基因的相对表达量均明显下降,而 *Dc4CL3* 基因的相对表达量急剧上调,而 SA 处理中,*Dc4CL1*、*Dc4CL2*、*Dc4CL3*、*Dc4CL4* 这 4 个基因的相对表达量均急剧上调,*Dc4CL5* 基因、*Dc4CL6* 基因表达量平稳下调;处理中期,5 种胁迫处理过程中的 *Dc4CL* 基因表达量均出现不同程度的上调、下调波动性,但不同处理方法的基因表达变化趋势及变化幅度均有不同,如 *Dc4CL3* 基因,在 JA、UV 处理 30 h 即达到表达最大量,而在 H_2O_2 、SA 及 wounding 处理 3~5 d 才达到最高;对于 *Dc4CL1*、*Dc4CL2*、*Dc4CL4* 基因,其在 H_2O_2 、UV 及 wounding 处理 30~48 h 基因表达量达到最低值,而在 SA 处理 3 d 后才达到表达最低值;而 *Dc4CL5* 基因在 JA、UV 处理的整个过程中趋于平稳,而 *Dc4CL6* 基因在 SA 处理过程中变化幅度也不大。此外,不同诱导处理的变化趋势各有不同,如在 H_2O_2 处理后 *Dc4CL* 基因的相对表达量呈交替升降的变化趋势,相对表达量

在 30 h 到达最低值。

4 讨论

从龙血竭原植物剑叶龙血树二代和三代转录组数据库中筛选到 6 个 4CLs 家族的基因,并首次在剑叶龙血树中克隆到了这 6 个 4CL 基因。生物信息学分析预测结果显示,*Dc4CL1*、*Dc4CL2* 属稳定蛋白,*Dc4CL3*~*Dc4CL6* 属不稳定蛋白;*Dc4CL1*~*Dc4CL5* 属疏水蛋白,*Dc4CL6* 属亲水性蛋白;*Dc4CL* 家族都存在跨膜结构域,但仅 *Dc4CL5* 有信号肽的存在;*Dc4CL1*、*Dc4CL2* 蛋白存在于细胞质可能性最大,而 *Dc4CL3*~*Dc4CL6* 蛋白存在于细胞膜上的可能性最大。*Dc4CL* 家族的蛋白序列与拟南芥和水稻 4CL 的序列比对结果显示 *Dc4CL1*、*Dc4CL3* 都含有 4CL 家族共同的保守功能结构域 Box I 和 Box II;*Dc4CL2* 与其他 4CL 家族仅在 Box I 结构域处没有突变,但在 Box II 结构域有 1 个氨基酸的突变,而 *Dc4CL4*、*Dc4CL5*、*Dc4CL6* 在 Box I 和 Box II 结构域至少都有 1 个氨基酸的突变。系统进化分析结果显示 *Dc4CL1*、*Dc4CL2* 属于 4CLs 家族中的 I 类,*Dc4CL3* 属于 4CLs 家族中的 II 类,而 *Dc4CL4*、*Dc4CL5*、*Dc4CL6* 则聚到 4CL-like 支与 I 类和 II



注：红线表示本研究对象剑叶龙血树 4CL (*Dc4CL*) 基因的分支。

图 4 *Dc4CL* 蛋白及其同源蛋白的 NJ 系统发育树

类都有较远的亲缘关系。通过进一步对 *Dc4CLs* 家族的蛋白序列比对及系统发育分析，初步确定 *Dc4CL1*、*Dc4CL2* 属于 4CLs 家族中的 I 类，推测其可能主要参与木质素的生物合成；*Dc4CL3* 属于 4CLs 家族中的 II 类，推测其主要参与黄酮类化合物的生物合成；*Dc4CL4*、*Dc4CL5*、*Dc4CL6* 初步推测

他们可能属于 4CL-like 类。

前期的研究显示剑叶龙血树受到机械伤害时木质素合成途径关键酶基因表达下调，黄酮类合成途径关键酶基因表达上调^[5]。对人工伤害诱导处理的剑叶龙血树转录组数据分析发现，在伤害处理 0、3、6、10 d 后 *Dc4CL1* 基因和 *Dc4CL2* 基因的表达量显

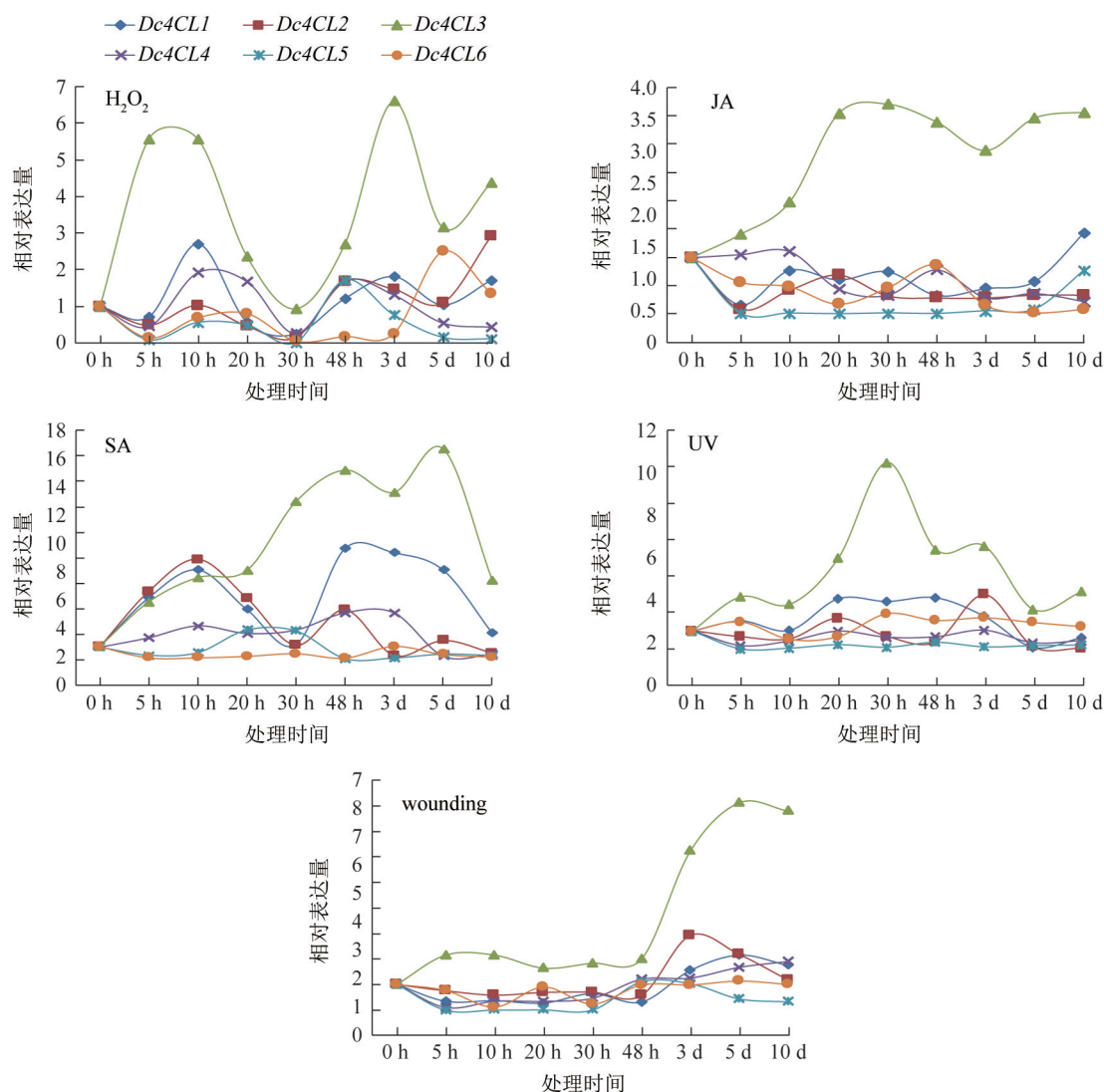


图5 H_2O_2 、JA、SA、UV和wounding处理对Dc4CL相对表达量的影响

著下调,而Dc4CL3基因的表达量显著上调。结合笔者前期的研究结果也间接证实了Dc4CL1、Dc4CL2基因可能主要参与木质素的生物合成,Dc4CL3基因可能参与黄酮类化合物的生物合成。银杏^[16]和剑叶龙血树^[5]在受到胁迫后苯丙烷类生物合成的前体可能更容易向黄酮类化合物生物合成的分支移动,从而促进类黄酮化合物的积累来抵御外界的胁迫。在对桑树*Morus alba* L. 4CLs家族基因的研究结果中显示,在SA、UV等各种胁迫处理后参与黄酮类化合物生物合成的Ma4CL3基因的相对表达量较其他Ma4CLs基因要高^[17]。本研究对剑叶龙血树组培苗进行 H_2O_2 、JA、SA等胁迫处理之后qRT-PCR结果显示,Dc4CL3的相对表达量均高于Dc4CL2、Dc4CL3两基因,基于以上结果初步推断Dc4CL3基因主要

参与黄酮类化合物的生物合成。

通过本研究可以初步推测剑叶龙血树Dc4CLs家族基因中Dc4CL1基因和Dc4CL2基因(I类)主要参与木质素类化合物的生物合成,而Dc4CL3基因(II类)主要参与黄酮类化合物的生物合成,以上研究结果为进一步探究剑叶龙血树中黄酮类化合物及龙血竭的生物合成机制提供一定的基础。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 缩印本. 上海: 上海科学技术出版社,1986:926.
- [2] 张越,宋美芳,李海涛,等. 珍稀名贵药材龙血竭基原及同属植物的DNA条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2021,46(9):2173-2181.
- [3] 林秀春,钟琮芯. 关于小花龙血树资源的开发利用与保

- 护问题[J]. 海南师范学院学报, 1991, 4(1): 76-78.
- [4] 程治英, 范昆. 龙血树属观叶植物及其繁殖方法[J]. 植物杂志, 1994(6): 17.
- [5] SUN H F, SONG M F, ZHANG Y, et al. Transcriptome profiling reveals candidate flavonoid-related genes during formation of dragon's blood from *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen under conditions of wounding stress [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 273: 113987.
- [6] BOERJAN W, RALPH J, BAUCHER M. Lignin biosynthesis[J]. Annu Rev Plant Biol, 2003, 54: 519-546.
- [7] SUN H Y, GUO K, FENG S Q, et al. Positive selection drives adaptive diversification of the 4-coumarate: CoA ligase (*4CL*) gene in angiosperms[J]. Ecol Evol, 2015, 5(16): 3413-3420.
- [8] LAVHALE S G, KALUNKE R M, GIRI A P. Structural, functional and evolutionary diversity of 4-coumarate-CoA ligase in plants[J]. Planta, 2018, 248(5): 1063-1078.
- [9] LI Y, KIM J I, PYSH L, et al. Four isoforms of *Arabidopsis thaliana* 4-coumarate: CoA ligase have overlapping yet distinct roles in phenylpropanoid metabolism[J]. Plant Physiol, 2015, 169(4): 2409.
- [10] SUN H Y, LI Y, FENG S Q, et al. Analysis of five rice 4-coumarate: Coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(3): 1151-1156.
- [11] XIONG W D, WU Z Y, LIU Y C, et al. Mutation of 4-coumarate: Coenzyme A ligase 1 gene affects lignin biosynthesis and increases the cell wall digestibility in maize brown midrib 5 mutants[J]. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 82.
- [12] RAO G D, PAN X, XU F, et al. Divergent and overlapping function of five 4-coumarate/coenzyme A ligases from *Populus tomentosa* [J]. Plant Mol Biol Report, 2015, 33(4): 841-854.
- [13] HU W J, KAWAOKA A, TSAI C J, et al. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(9): 5407-5412.
- [14] STUIBLE H P, BÜTTNER D, EHLTING J, et al. Mutational analysis of 4-coumarate: CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes[J]. FEBS Lett, 2000, 467(1): 117-122.
- [15] WEI X X, WANG X Q. Evolution of 4-coumarate: Coenzyme A ligase (*4CL*) gene and divergence of *Larix* (Pinaceae) [J]. Mol Phylogenet Evol, 2004, 31(2): 542-553.
- [16] ZOU K, LIU X D, ZHANG D, et al. Flavonoid biosynthesis is likely more susceptible to elevation and tree age than other branch pathways involved in phenylpropanoid biosynthesis in *Ginkgo* leaves[J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 983.
- [17] WANG C H, YU J, CAI Y X, et al. Characterization and functional analysis of 4-coumarate: CoA ligase genes in mul-berry[J]. PLoS ONE, 2016, 11(5): e0155814.

(收稿日期: 2022-05-17 编辑: 吴美琪)