

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2017.10064

赵桂红, 石宏, 张妮妮, 陆苗, 王晶, 李焘. 菘蓝 *CYP83B1* 基因的克隆与表达分析[J]. 植物科学学报, 2017, 35(1): 64–72Zhao GH, Shi H, Zhang NN, Lu M, Wang J, Li T. Cloning and expression analysis of *CYP83B1* from *Isatis indigotica* Fort. [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(1): 64–72

菘蓝 *CYP83B1* 基因的克隆与表达分析

赵桂红, 石宏, 张妮妮, 陆苗, 王晶, 李焘*

(药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西师范大学, 西安 710119)

摘要: 对菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) *CYP83B1* 基因进行了克隆与表达模式分析。结果显示, *liCYP83B1* 基因全长为 1652 bp, 包含 2 个外显子和 1 个内含子; cDNA 全长为 1500 bp, 编码 499 个氨基酸。*liCYP83B1* 编码的蛋白没有跨膜结构域和信号肽, 主要定位于内质网膜, 属于亲水性蛋白, 二级结构主要由无规则卷曲螺旋和 α -螺旋组成, 与萝卜 (*Raphanus sativus* Linn.)、欧洲油菜 (*Brassica napus* L.)、甘蓝 (*Brassica oleracea* L.) 和芜菁 (*Brassica rapa* L.) 等植物的 *CYP83B1* 蛋白具有较高的同源性。qRT-PCR 分析结果表明, *liCYP83B1* 基因在菘蓝的根、茎、叶、花和果中均有表达, 且以叶中的表达量最高; 在幼苗期、生长期和花期稳定表达且均显著高于萌芽期; 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 和葡萄糖 (glucose, Glu) 能够显著促进该基因的表达, 而低温 (4℃) 和水杨酸 (salicylic acid, SA) 处理对其表达具有一定的抑制效应。本研究结果可为进一步探讨 *liCYP83B1* 基因的功能提供参考。

关键词: 菘蓝; *CYP83B1*; 基因克隆; 生物信息学; 表达模式

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)01-0064-09

Cloning and expression analysis of *CYP83B1* from *Isatis indigotica* Fort.

Zhao Gui-Hong, Shi Hong, Zhang Ni-Ni, Lu Miao, Wang Jing, Li Tao*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The *CYP83B1* gene of *Isatis indigotica* Fort. was cloned and its expression patterns were analyzed. Results showed that the length of the *liCYP83B1* gene was 1652 bp, and included two exons and one intron. The full length cDNA of *liCYP83B1* was 1500 bp, encoding a protein of 499 amino acids. *liCYP83B1* was a hydrophobic protein located in the endoplasmic reticulum, without a transmembrane domain or signal peptide. Its secondary structure mainly included alpha helixes and irregular coils. Homologous comparison illustrated that *liCYP83B1* has close relationship with *Raphanus sativus* Linn., *Brassica napus* L., *Brassica oleracea* L., and *Brassica rapa* L. qRT-PCR analysis indicated that *liCYP83B1* was expressed in root, stem, flower, and fruit, and highly expressed in leaf. It was also highly expressed in the seedling, vegetative growth, and flowering stages, compared with the germination period. Moreover, *liCYP83B1* could be induced significantly by methyl jasmonate (MeJA) and

收稿日期: 2016-06-14, 退修日期: 2016-07-25。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31200221); 陕西省自然科学基金项目 (2016JQ3007); 陕西师范大学研究生培养创新基金 (2015CXSO25)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31200221), Fundamental Research Funds for the Central Universities (GK201405001), and Innovation Funds of Graduate Programs, SNNU (2015CXSO25)。

作者简介: 赵桂红 (1990–), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生物技术 (E-mail: zhaoguihong2014@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: litao@snnu.edu.cn)。

glucose (Glu), but repressed by low temperature (4°C) and salicylic acid (SA). Results in this experiment provide reference for further functional study on *liCYP83B1*.

Key words: *Isatis indigotica* Fort.; *CYP83B1*; Gene clone; Bioinformatics; Expression pattern

菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 为十字花科菘蓝属两年生草本植物, 主要分布于我国陕西、甘肃、内蒙古、河北、江苏等地。其干燥的根和叶分别称为“板蓝根”和“大青叶”, 为常见的大宗药材, 具有清热解毒、凉血消斑、利咽止痛的功效^[1,2]。所含的有效成分主要包括棕榈酸、靛蓝、靛玉红、腺苷、色胺酮、谷甾醇和芥子油苷等, 临床上主要用于流行性乙型脑炎、上呼吸道感染、流行性感胃等疾病的治疗^[3]。随着菘蓝有效成分及药理活性的逐步明确, 其临床应用日益受到重视。

芥子油苷, 也称硫代葡萄糖苷或硫苷 (glucosinolate, GS)^[4,5], 是一类由氨基酸衍生的含氮含硫的重要植物次生代谢产物, 可对抗昆虫取食以及病原体侵染, 在十字花科植物的防御机制中发挥着重要作用^[6,7]; 其代谢产物(如酚乙基异硫代氰酸盐、苯甲基异硫代氰酸盐等)具有抗癌活性, 而吲哚族芥子油苷的水解产物则对肿瘤形成起到抑制作用^[8]。芥子油苷的化学结构主要由 β -D-硫葡萄糖基、硫化脲基团以及来源于氨基酸的侧链 R 所组成。根据其侧链氨基酸前体的不同, 将芥子油苷分为脂肪族芥子油苷、芳香族芥子油苷和吲哚族芥子油苷^[9]。*CYP83B1* 基因编码的蛋白在生长素和吲哚族芥子油苷的生物合成过程中具有重要作用^[10], 属于细胞色素 P450 基因家族中的 CYP83s 亚家族, 目前已在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、芥菜 (*Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss.) 和小白菜 (*Brassica campestris* L.) 等多种十字花科植物中得到克隆。野生型拟南芥中的 *CYP83B1* 酶能够催化吲哚-3-乙醛脲进入吲哚族芥子油苷合成途径^[11], 而 *cyp83B1* 突变体中吲哚-3-乙醛脲则主要被转化为吲哚-3-乙醛进入生长素合成途径^[12], 使其过量积累吲哚-3-乙醛和生长素, 表现为高激素显型 (high-IAA phenotypes), 表型为子叶延长及不定根增加等特征^[13]。尽管 *cyp83B1* 突变体中缺乏吲哚族芥子油苷, 但其缺失程度不如 *cyp79B2/B3* 双突变体^[14,15], 这是因为在芥子油苷合成途径上的 *CYP83A1* 酶可在一定程度上弥补 *CYP83B1* 的功能, 参与吲哚族芥子油

苷的合成过程^[16]。

迄今为止, 尚无对菘蓝 *CYP83B1* 基因的相关研究, 而该基因是否在菘蓝芥子油苷合成过程中发挥相应的生物学功能尚不明确。本研究以菘蓝为材料, 参考本实验室转录组测序结果, 克隆了菘蓝 *CYP83B1* 基因, 并对其进行生物信息学分析和表达模式研究, 以期为进一步探讨菘蓝芥子油苷的合成积累规律及调控机理提供有效的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 种子为本实验室保存。在温室中, 将种子播种于营养土中, 约 4 ~ 6 d 萌发, 待其长出第一对真叶后, 将幼苗移栽至花盆中, 每盆 2 ~ 4 株, 定期管理。培养条件: 温度 (25 ± 2) °C; 光照 16 h/d, 湿度 60% ~ 80%。植物 DNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、高保真酶、DNA marker、pMD19-T vector、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、*Escherichia coli* DH5 α 等均购自 TaKaRa 公司; 琼脂糖、氨苄青霉素、X-gal、IPTG 购自 Amersco 公司; 植物总 RNA 提取试剂盒购自 Aidlab 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 菘蓝总 RNA 和 DNA 的提取

按照植物总 RNA 提取试剂盒操作流程分别提取菘蓝不同器官、不同发育阶段、不同处理条件下的总 RNA; 以获得的总 RNA 为模板, 按照反转录试剂盒操作步骤获得 cDNA。参照植物 DNA 提取试剂盒制备菘蓝总 DNA。

1.2.2 引物设计

根据本实验室已经建立的菘蓝转录组数据库信息, 采用 ORF finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找菘蓝 *CYP83B1* 序列的 ORF, 并用 Primer premier 5.0 软件设计特异性引物。引物序列: F1: 5'-ATGGATCTCTTCTTGA-TTATTGCCG-3'; R1: 5'-TCAGATGTGCGTCCTT-GGTG-3'。引物合成和序列测定由华大基因公司

完成。

1.2.3 PCR 扩增及产物鉴定

分别以菘蓝 cDNA 和 DNA 为模板进行目的基因的 PCR 扩增(扩增条件为: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 2 min, 30 次循环; 72℃延伸 2 min)。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的条带, 连接到 pMD19-T 克隆载体并转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 筛选阳性克隆送测序。

1.2.4 生物信息学分析

根据目的基因的测序结果, 利用生物信息学软件对其进行核苷酸序列和氨基酸序列分析: Perot-Param 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)检测蛋白质的理化性质、分子量及等电点; TMHMM 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋白质跨膜结构域; Signal 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽; Psort Prediction 在线软件(<http://psort.hgc.jp/form.html>)预测蛋白质的亚细胞定位; NCBI-CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对氨基酸的保守结构域进行预测; SPOMA 软件预测蛋白质二级结构; SWISS-MODEL 软件(<http://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白质三级结构。

1.2.5 基因表达模式分析

对种子萌发后 10、30、90 d 龄以及花期的植株进行取材, 作为萌芽期、幼苗期、生长期和花期的研究材料。对花期植株进行根、茎、叶、花和果的取材。取幼苗期植株分别施以茉莉酸甲酯(MeJA, 500 μmol/L)、水杨酸(SA, 300 μmol/L)和葡萄糖(Glu, 9.0% W/V)溶液, 用量以喷施溶液均匀布满整个叶片为准, 并于 0、1、3、6、12、24、48、72 h 进行取材。另取 4℃处理相应时间条件下的叶片作为低温处理材料。各条件取材样本均用液氮速冻后于 -80℃贮藏。

采用 qRT-PCR 技术, 以菘蓝不同器官(根、茎、叶、花和果)、不同发育时期(萌芽期、幼苗期、生长期和花期), 以及经 MeJA、SA、Glu 及低温处理后的叶片 cDNA 为模板, 研究目的基因的表达模式。实验引物序列为: F2: 5'-CCTCAA-GACCCAAGACCTCA-3', R2: 5'-CACATCTTCCT-CATCTCACGGT-3'; 内参基因 *Actin*(AY870652.1)

的引物序列为: F3: 5'-AGGAATCGCTGACCG-TATG-3', R3: 5'-TGGACCCGACTCATCGTATT-3'。扩增条件: 95℃预变性 30 s, 95℃变性 10 s, 58℃退火 10 s, 72℃延伸 10 s, 45 次循环, 每次循环第 3 步进行荧光采集。每个样品重复 3 次, 采用 2^{-ΔΔCT}法进行数据分析^[17]。采用 SPSS 17.0 中 one-way ANOVA 方法进行单因素方差分析, 利用 Tukey test 分析各样品间基因表达差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 菘蓝 CYP83B1 基因的克隆

分别以菘蓝的 cDNA 和 DNA 为模板, 利用引物 F1、R1 进行 PCR 扩增, 获得长度为 1500 ~ 1800 bp 的片段(图 1), 扩增产物经凝胶回收、克隆并测序, 测得序列经 DNAMAN 软件分析获得该基因长为 1500 bp 的 ORF 区, 碱基组成为 A: 27.1%、T: 24.0%、G: 23.3%、C: 25.6%, 共编码 499 个氨基酸(图 2)。以 DNA 为模板, 测得该基因 DNA 全长为 1652 bp, 包括 2 个外显子和 1 个内含子, GenBank 登录号为 KX259478。经与萝卜(*Raphanus sativus* Linn.) CYP83B1(KF682448.1)比对发现, 二者相似性高达 94%, 将其命名为 *liCYP83B1*。

2.2 liCYP83B1 基因编码蛋白的理化性质分析

Prot-Param 分析结果表明, *liCYP83B1* 基因编码蛋白(*liCYP83B1*)含 499 个氨基酸残基, 分子结构式为 C₂₅₈₅H₄₀₆₇N₆₇₅O₇₁₅S₂₆, 分子量为 56.8753 kD, 等电点(pI)为 8.79, 含有碱性氨基酸残基(Arg + Lys) 64 个, 酸性氨基酸残基(Asp + Glu) 58 个; 消光

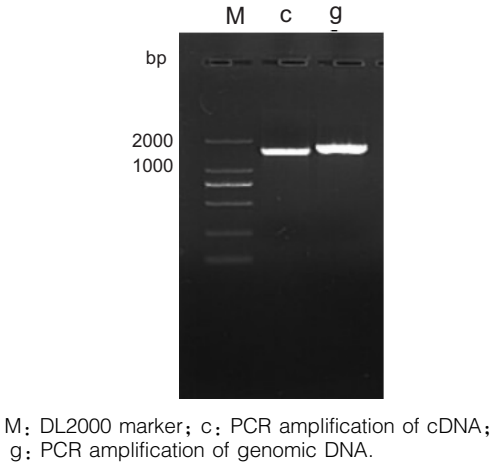


图 1 liCYP83B1 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of liCYP83B1

系数($M^{-1}cm^{-1}$, $\gamma = 280\text{ nm}$)为 49070, 不稳定系数为 37.04, 说明该蛋白较为稳定; N-端为蛋氨酸(Met); 疏水系数为 90.36, 总平均亲水性 GRA-VY 值为-0.139, 说明该蛋白为碱性蛋白质, 属于亲水性蛋白。

2.3 *liCYP83B1* 基因编码蛋白的结构预测

利用 TMHMM 2.0 Server 软件对 *liCYP83B1* 的结构进行分析, 发现该蛋白不具跨膜结构域。SignalP-4.1 软件^[18] 分析结果表明, 该蛋白无信号肽, 属于非分泌蛋白。Psort Prediction 分析结果显

示, 该蛋白定位于内质网膜(可信度 0.820)。用 ExPASy NetPhos 2.0 Server^[19] 对其进行磷酸化位点预测, 发现 *liCYP83B1* 含有 7 个 Ser 位点、6 个 Thr 和 3 个 Tyr 位点, 共计 16 个蛋白激酶磷酸化位点, 表明 *liCYP83B1* 可能受蛋白磷酸激酶的调控。NCBI-CDD 预测到该蛋白的保守结构域在 1~499 肽链区间, 属于细胞色素 P450 基因家族。Prosites 分析结果进一步表明, 该蛋白具有典型的细胞色素 P450 基因家族特征, 即存在一个保守的血红素结合域: FGSGRRMCPA, 位于 434~443 肽链之间(图 3)。

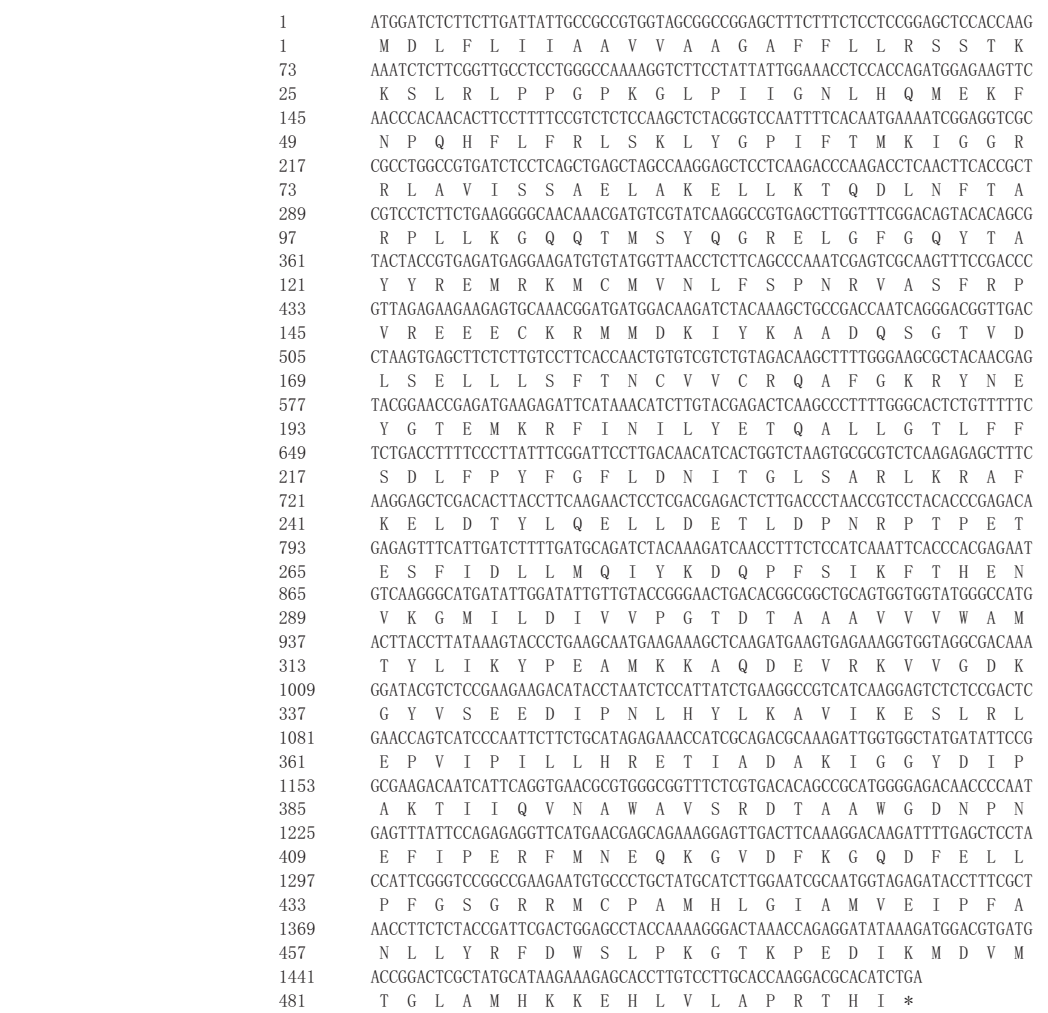


图 2 *liCYP83B1* 的核苷酸序列及编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *liCYP83B1* and the encoding amino acid sequence

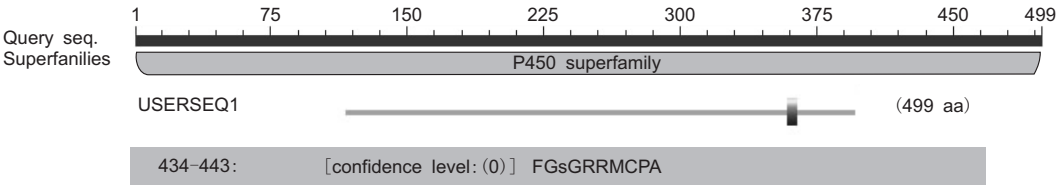


图 3 *liCYP83B1* 蛋白的功能结构域分析

Fig. 3 Functional domain analysis of *liCYP83B1*

2.4 *liCYP83B1* 基因编码蛋白的二级和三级结构预测

采用 SPOMA 预测 *liCYP83B1* 蛋白的二级结构, 分析结果显示该蛋白的二级结构中无规则卷曲螺旋(random coil)所占比例最多, 为 44.49%; 其次是 α -螺旋(alpha helix), 所占比例为 40.28%; 而延伸链(extended strand)所占比例为 15.23%。因此, α 螺旋和无规则卷曲螺旋是 *liCYP83B1* 蛋白的主要结构元件, 而延伸链分布在整个蛋白质结构中。利用 Swiss Model 程序^[20] 同源构建模型预测该蛋白的三维结构模型(图 4), *liCYP83B1* 三级结构中 α -螺旋和无规则卷曲所占比例较高, 其次为延伸链, 与其二级结构预测的结果一致。

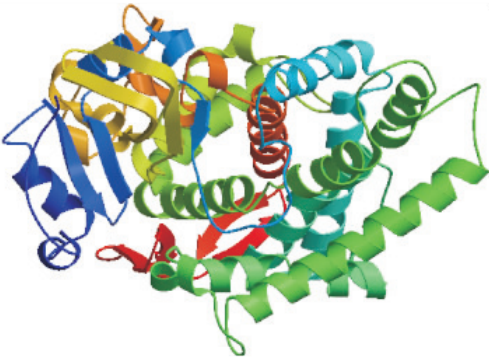


图 4 *liCYP83B1* 蛋白三级结构
Fig. 4 Predicted 3D structure of *liCYP83B1*

2.5 *liCYP83B1* 基因编码蛋白的同源性及系统进化分析

利用 DNAMAN 软件将 *liCYP83B1* 的氨基酸序列与其他 8 种植物进行比对发现(图 5), 菘蓝 *CYP83B1* 氨基酸序列与芜菁(*Brassica rapa*, XP_009107632.1)、欧洲油菜(*Brassica napus*, XP_013656444.1)、甘蓝(*Brassica oleracea*, XP_013605048.1)和萝卜(AHB11193.1)的氨基酸相似性均为 97%; 与芥蓝(*Camelina sativa*, XP_010447503.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_194878.1)、深山南芥(*Arabidopsis lyrata*, XP_002867299.1)和醉蝶花(*Tarenaya hassleriana*, XP_010530341.1)的相似性分别为 94%、96%、96%和 89%。多序列比对结果显示, 菘蓝 *CYP83B1* 与其他 8 种植物的 *CYP83B1* 结构类似, 均具有保守的血红素结合域(FxxGxRxCxG 序列)和氧结合域(A/G)Gx(D/E)T(T/S), 并含有 2 个

P450s 的标志性序列 KETLR(K-helix)和 PERF。此外, 利用 ClustalX1.8 和 MEGA5.0 对 *liCYP83B1* 氨基酸序列和已经在 GenBank 上登录的其他植物中 *CYP83B1* 的氨基酸序列进行比对, 并构建系统进化树(图 6), 结果显示, 菘蓝 *CYP83B1* 与萝卜(AHB11193.1)的亲缘关系最近。

2.6 *liCYP83B1* 基因的表达模式分析

在对菘蓝 *CYP83B1* 进行生物信息学分析的基础上, 本研究进一步分析了该基因在不同组织、不同生长发育阶段及不同处理条件下的表达模式, 结果显示(图 7), *liCYP83B1* 在菘蓝的根、茎、叶、花和果中均有表达(图 7: A), 且以叶中表达量最高, 其次是茎和花, 最后是根和果, 其差异最高可达 3.56 倍, 表明该基因的表达具有一定的组织特异性。不同生长发育阶段的基因表达分析结果显示(图 7: B), *liCYP83B1* 在菘蓝幼苗期、生长期和花期均有表达, 且显著高于萌芽期, 其差异最高可达 2.59 倍。

此外, 本研究还探讨了不同诱导子处理条件下 *liCYP83B1* 的表达模式。由图 7: C 可见, 用 500 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理 3 h 后, *liCYP83B1* 表达量显著升高, 最高达到对照的 30.13 倍, 此后该基因的表达逐渐下降, 但在 24 h 时又明显上升, 表达量达到对照的 24.03 倍。总体而言, *liCYP83B1* 显著响应 MeJA 信号诱导, 呈现明显上调的表达特征。采用 300 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理菘蓝, *liCYP83B1* 的表达显著下调, 但在 6 h 时出现明显的上调变化, 为对照的 1.54 倍(图 7: D)。采用 9.0% Glu 处理菘蓝后, *liCYP83B1* 的相对表达量随处理时间的延长呈现出较明显的升高趋势, 且在处理 48 h 时, 该基因表达量达到最高, 为对照的 6.74 倍, 但在 6 h 和 72 h 时该基因的表达量有所下降(图 7: E)。当用 4℃低温处理后, *liCYP83B1* 的表达量整体处于下调状态, 且在 3 h 时迅速降到最低值, 仅为对照的 3.8%(图 7: F)。

3 讨论

吡啶类芥子油苷合成途径是十字花科植物中重要的代谢途径之一, 细胞色素 P450 家族(CYP450)在吡啶类芥子油苷合成途径中扮演着重要的角色。CYP79B2/CYP79B3 以色氨酸为底物催化其形成吡啶乙醛肟, CYP83B1 对吡啶类乙醛

芜菁	MVENI QKQAVVNDLFLI AAMAVA AAFLLRSSSTKKSRLPPGPKGLPI GN LHQMEKFN PQHFLFRLS	70
欧洲油菜	MVENI QKQAVVNDLFLI AAMAVA AAFLLRSSSTKKSRLPPGPKGLPI GN LHQMEKFN PQHFLFRLS	70
甘蓝	NDLFLI AAMAVA AAFLLRSSSTKKSRLPPGPKGLPI GN LHQMEKFN PQHFLFRLS	58
萝卜	NDLFLI AAMAVA AAFLLRSSSTKKSRLPPGPKGLPI GN LHQMEKFN PQHFLFRLS	58
拟南芥	NDLFLI AGLNAA AAFLLRSSSTKKSRLPPGPKGLPI GN LHQMEKFN PQHFLFRLS	58
芥蓝	NDLFLI AGLNAA AAFLLRSSSTKKSRLPPGPKGLPI GN LHQMEKFN PQHFLFRLS	58
深山南芥	NDLFLI AALNAA AAFLLRSSSTKKSRLPPGPKGLPI GN LHQMEKFN PQHFLFRLS	57
醉蝶花	NDLFLI AALNAA AAFLLRSSSTKKSRLPPGPKGLPI GN LHQMEKFN PQHFLFRLS	58
菘蓝	MDLFLI AAMVA AAFLLRSSSTKKSRLPPGPKGLPI GN LHQMEKFN PQHFLFRLS	58
Consensus	mdl li a a af l kks rlp p g p k g l p i i g n l h q m e k f n p q h f l f r l s	
芜菁	KL YGPI F T N K I G G R R L A V I S S A E L A K E L L K T Q D L N F T A R P L L K G Q Q T N S Y G R E L G F G Q Y T A Y Y R E M R K M	140
欧洲油菜	KL YGPI F T N K I G G R R L A V I S S A E L A K E L L K T Q D L N F T A R P L L K G Q Q T N S Y G R E L G F G Q Y T A Y Y R E M R K M	140
甘蓝	KL YGPI F T N K I G G R R L A V I S S A E L A K E L L K T Q D L N F T A R P L L K G Q Q T N S Y G R E L G F G Q Y T A Y Y R E M R K M	128
萝卜	KL YGPI F T N K I G G R R L A V I S S A E L A K E L L K T Q D L N F T A R P L L K G Q Q T N S Y G R E L G F G Q Y T A Y Y R E M R K M	128
拟南芥	KL YGPI F T N K I G G R R L A V I S S A E L A K E L L K T Q D L N F T A R P L L K G Q Q T N S Y G R E L G F G Q Y T A Y Y R E M R K M	128
芥蓝	KL YGPI F T N K I G G R R L A V I S S A E L A K D L L K T Q D L N F T A R P L L K G Q Q T N S Y G R E L G F G Q Y T A Y Y R E M R K M	128
深山南芥	KL YGPI F T N K I G G R R L A V I S S A E L A K E L L K T Q D L N F T A R P L L K G Q Q T N S Y G R E L G F G Q Y T A Y Y R E M R K M	128
醉蝶花	KL YGPI F S N K I G S R R L A V I S S A E L S K D L L K T Q D L N F T A R P L L K G Q Q T N S Y G R E L G F G Q Y T A Y Y R E M R K M	127
菘蓝	KL YGPI F T N K I G G R R L A V I S S A E L A K E L L K T Q D L N F T A R P L L K G Q Q T N S Y G R E L G F G Q Y T A Y Y R E M R K M	128
Consensus	k l y g p i f t n k i g r r l v i s s a l k l k t q d n f t a r p l l k g q q t n s y g r e l g f g q y t y y r e m r k m	
芜菁	CMVNLFSFNRAVSRFPVREEECQRMMDKI YKAADCSGTVDLSELL SFTNCVVCRCQAF GKRYNE YGTENK	210
欧洲油菜	CMVNLFSFNRAVSRFPVREEECQRMMDKI YKAADCSGTVDLSELL SFTNCVVCRCQAF GKRYNE YGTENK	210
甘蓝	CMVNLFSFNRAVSRFPVREEECQRMMDKI YKAADCSGTVDLSELL SFTNCVVCRCQAF GKRYNE YGTENK	198
萝卜	CMVNLFSFNRAVSRFPVREEECQRMMDKI YKAADCSGTVDLSELL SFTNCVVCRCQAF GKRYNE YGTENK	198
拟南芥	CMVNLFSFNRAVSRFPVREEECQRMMDKI YKAADCSGTVDLSELL SFTNCVVCRCQAF GKRYNE YGTENK	198
芥蓝	CMVNLFSFNRAVSRFPVREEECQRMMDKI YKAADCSGTVDLSELL SFTNCVVCRCQAF GKRYNE YGTENK	198
深山南芥	CMVNLFSFNRAVSRFPVREEECQRMMDKI YKAADCSGTVDLSELL SFTNCVVCRCQAF GKRYNE YGTENK	198
醉蝶花	CMVNLFSFNRAVSRFPVREEECQRMMDKI YKASDSGTVDLSELL SFTNCVVCRCQAF GKRYNE YGTENK	197
菘蓝	CMVNLFSFNRAVSRFPVREEECQRMMDKI YKAADCSGTVDLSELL SFTNCVVCRCQAF GKRYNE YGTENK	198
Consensus	c m v n l f s f n r a v s r f p v r e e e c r m m d k i y k a a d c s g t v d l s e l l s f t n c v v c r c a f g k r y n e y g t e n k	
芜菁	RFI NI LYETCALLGTLFFSDFPFYFGLDNL TGLNARLKRAF KELD TYLQELLDETLDPSRPKPETESFI	280
欧洲油菜	RFI NI LYETCALLGTLFFSDFPFYFGLDNL TGLNARLKRAF KELD TYLQELLDETLDPSRPKPETESFI	280
甘蓝	RFI NI LYETCALLGTLFFSDFPFYFGLDNL TGLSARLKRAF KELD TYLQELLDETLDPSRPKPETESFI	268
萝卜	RFI NI LYETCALLGTLFFSDFPFYFGLDNL TGLSARLKRAF KELD TYLQELLDETLDPSRPKPETESFI	268
拟南芥	RFI NI LYETCALLGTLFFSDFPFYFGLDNL TGLSARLKRAF KELD TYLQELLDETLDPSRPKPETESFI	268
芥蓝	RFI NI LYETCALLGTLFFSDFPFYFGLDNL TGLSARLKRAF KELD TYLQELLDETLDPSRPKPETESFI	268
深山南芥	RFI NI LYETCALLGTLFFSDFPFYFGLDNL TGLSARLKRAF KELD TYLQELLDETLDPSRPKPETESFI	268
醉蝶花	RFI NI LYETCALLGTLFFSDFPFYFGLDNL TGLSARLKRAF KELD TYLQELLDETLDPSRPKPETESFI	267
菘蓝	RFI NI LYETCALLGTLFFSDFPFYFGLDNL TGLSARLKRAF KELD TYLQELLDETLDPSRPKPETESFI	268
Consensus	r f i n i l y e t c a l l g t l f f s d l f p y f g l d n l t g l n a r l k r a f k e l d t y l q e l l d e t l d p s r p k p e t e s f i	
(A/G)Gx(D/E)T(T/S) motif		
芜菁	DLLMCI YKQDPFS KFTHENVKAM LDI VVP GTDTAAAVVVVAMTYLI KYPEAMKKAQDEVRNVV GDRGY	350
欧洲油菜	DLLMCI YKQDPFS KFTHENVKAM LDI VVP GTDTAAAVVVVAMTYLI KYPEAMKKAQDEVRNVV GDRGY	350
甘蓝	DLLMCI YKQDPFS KFTHENVKAM LDI VVP GTDTAAAVVVVAMTYLI KYPEAMKKAQDEVRNVV GDRGY	338
萝卜	DLLMCI YKQDPFS KFTHENVKAM LDI VVP GTDTAAAVVVVAMTYLI KYPEAMKKAQDEVRNVV GDRGY	338
拟南芥	DLLMCI YKQDPFS KFTHENVKAM LDI VVP GTDTAAAVVVVAMTYLI KYPEAMKKAQDEVRNVV GDRGY	338
芥蓝	DLLMCI YKQDPFS KFTHENVKAM LDI VVP GTDTAAAVVVVAMTYLI KYPEAMKKAQDEVRNVV GDRGY	338
深山南芥	DLLMCI YKQDPFS KFTHENVKAM LDI VVP GTDTAAAVVVVAMTYLI KYPEAMKKAQDEVRNVV GDRGY	338
醉蝶花	DLLMCI YKQDPFS KFTHENVKAM LDI VVP GTDTAAAVVVVAMTYLI KYPEAMKKAQDEVRNVV GDRGY	337
菘蓝	DLLMCI YKQDPFS KFTHENVKAM LDI VVP GTDTAAAVVVVAMTYLI KYPEAMKKAQDEVRNVV GDRGY	338
Consensus	d l l m c i y k d p f s k f t h e n v k a m l d i v v p g t d t a a a v v v v a m t y l i k y p e a m k k a q d e v r n v v g d r g y	
K-helix		
芜菁	VSEEDI PNLPYLKAVI KESLRL EPVI PI LLHRETI ADAKI GGYDI PAKTI QVNAAVSRDIAAWGDNPN	420
欧洲油菜	VSEEDI PNLPYLKAVI KESLRL EPVI PI LLHRETI ADAKI GGYDI PAKTI QVNAAVSRDIAAWGDNPN	420
甘蓝	VSEEDI PNLPYLKAVI KESLRL EPVI PI LLHRETI ADAKI GGYDI PAKTI QVNAAVSRDIAAWGDNPN	408
萝卜	VSEEDI PNLPYLKAVI KESLRL EPVI PI LLHRETI ADAKI GGYDI PAKTI QVNAAVSRDIAAWGDNPN	408
拟南芥	VSEEDI PNLPYLKAVI KESLRL EPVI PI LLHRETI ADAKI GGYDI PAKTI QVNAAVSRDIAAWGDNPN	408
芥蓝	VSEEDI PNLPYLKAVI KESLRL EPVI PI LLHRETI ADAKI GGYDI PAKTI QVNAAVSRDIAAWGDNPN	408
深山南芥	VSEEDI PNLPYLKAVI KESLRL EPVI PI LLHRETI ADAKI GGYDI PAKTI QVNAAVSRDIAAWGDNPN	408
醉蝶花	VSEEDI ANLPYLKAVI KESLRL EPVI PI LLPRETI ADIKI GGYDI PAKTI QVNAAVSRDIAAWGDNPN	407
菘蓝	VSEEDI PNLPYLKAVI KESLRL EPVI PI LLHRETI ADAKI GGYDI PAKTI QVNAAVSRDIAAWGDNPN	408
Consensus	v s e e d i p n l p y l k a v i k e s l r l e p v i p i l l h r e t i a d a k i g g y d i p a k t i q v n a a v s r d i a a w g d n p n	
PERF motif heme-binding motif		
芜菁	EFI PERFMNEKQGVDFKGQDFELLPGSGRRMCPAMHLGVAMVEI PFANLLYRFDWLSLPKGI KPEDI KMD	490
欧洲油菜	EFI PERFMNEKQGVDFKGQDFELLPGSGRRMCPAMHLGVAMVEI PFANLLYRFDWLSLPKGI KPEDI KMD	490
甘蓝	EFI PERFMNEKQGVDFKGQDFELLPGSGRRMCPAMHLGVAMVEI PFANLLYRFDWLSLPKGI KPEDI KMD	478
萝卜	EFI PERFMNEKQGVDFKGQDFELLPGSGRRMCPAMHLGVAMVEI PFANLLYRFDWLSLPKGI KPEDI KMD	478
拟南芥	EFI PERFMNEKQGVDFKGQDFELLPGSGRRMCPAMHLGVAMVEI PFANLLYRFDWLSLPKGI KPEDI KMD	478
芥蓝	EFI PERFMNEKQGVDFKGQDFELLPGSGRRMCPAMHLGVAMVEI PFANLLYRFDWLSLPKGI KPEDI KMD	478
深山南芥	EFI PERFMNEKQGVDFKGQDFELLPGSGRRMCPAMHLGVAMVEI PFANLLYRFDWLSLPKGI KPEDI KMD	478
醉蝶花	EFI PERFMNEKQGVDFKGQDFELLPGSGRRMCPAMHLGVAMVEI PFANLLYRFDWLSLPKGI KPEDI KMD	477
菘蓝	EFI PERFMNEKQGVDFKGQDFELLPGSGRRMCPAMHLGVAMVEI PFANLLYRFDWLSLPKGI KPEDI KMD	478
Consensus	e f i p e r f m n e k q g v d f k g q d f e l l p g s g r r m c p a m h l g v a m e i p f a n l l y r f d w l s l p k g i k p e d i k m d	
芜菁	VMTGLAMHKKDHLVLAPRTH	510
欧洲油菜	VMTGLAMHKKDHLVLAPRTH	510
甘蓝	VMTGLAMHKKDHLVLAPRTH	498
萝卜	VMTGLAMHKKDHLVLAPRTH	498
拟南芥	VMTGLAMHKKDHLVLAPRTH	498
芥蓝	VMTGLAMHKKDHLVLAPRTH	498
深山南芥	VMTGLAMHKKDHLVLAPRTH	498
醉蝶花	VMTGLAMHKKDHLVLAPRTH	497
菘蓝	VMTGLAMHKKDHLVLAPRTH	498
Consensus	v m t g l a m h k k h l v l a p r t h	

黄色代表相同的氨基酸；红色和蓝色代表同源的氨基酸残基；黑色方框表示 CYP450 保守的基序、区域和结构域。
Yellow indicates identical amino acids; Red and blue indicate homologous amino acid residues; Black box represents the CYP450s' conserved motifs, regions, and domains.
芜菁 (*Brassica rapa*, XP_009107632.1); 欧洲油菜 (*Brassica napus*, XP_013656444.1); 甘蓝 (*Brassica oleracea*, XP_013605048.1); 萝卜 (*Raphanus sativus*, AHB11193.1); 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NP_194878.1); 芥蓝 (*Camelina sativa*, XP_010447503.1); 深山南芥 (*Arabidopsis lyrata*, XP_002867299.1); 醉蝶花 (*Tarenaya hassleriana*, XP_010530341.1); 菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort., KX259478).

图 5 liCYP83B1 与其他植物同源蛋白氨基酸序列的多重比对

Fig. 5 Multiple alignment of amino acid sequences of CYP83B1 with homologues from other plant species

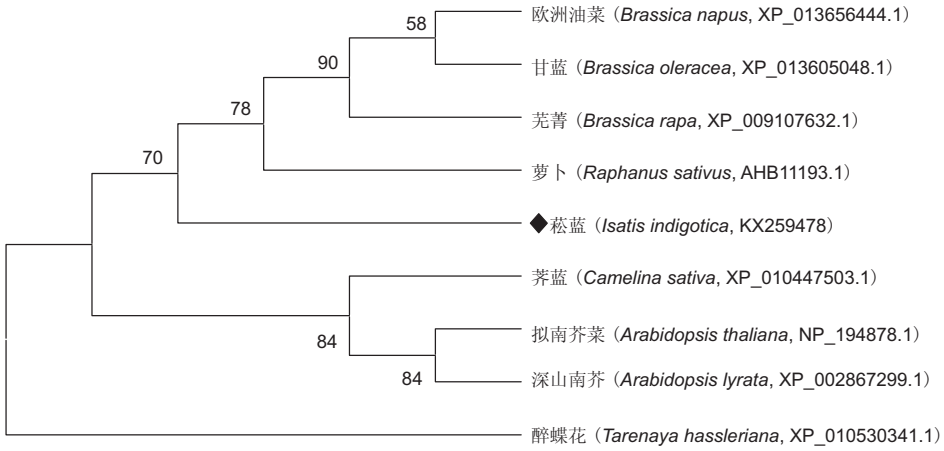
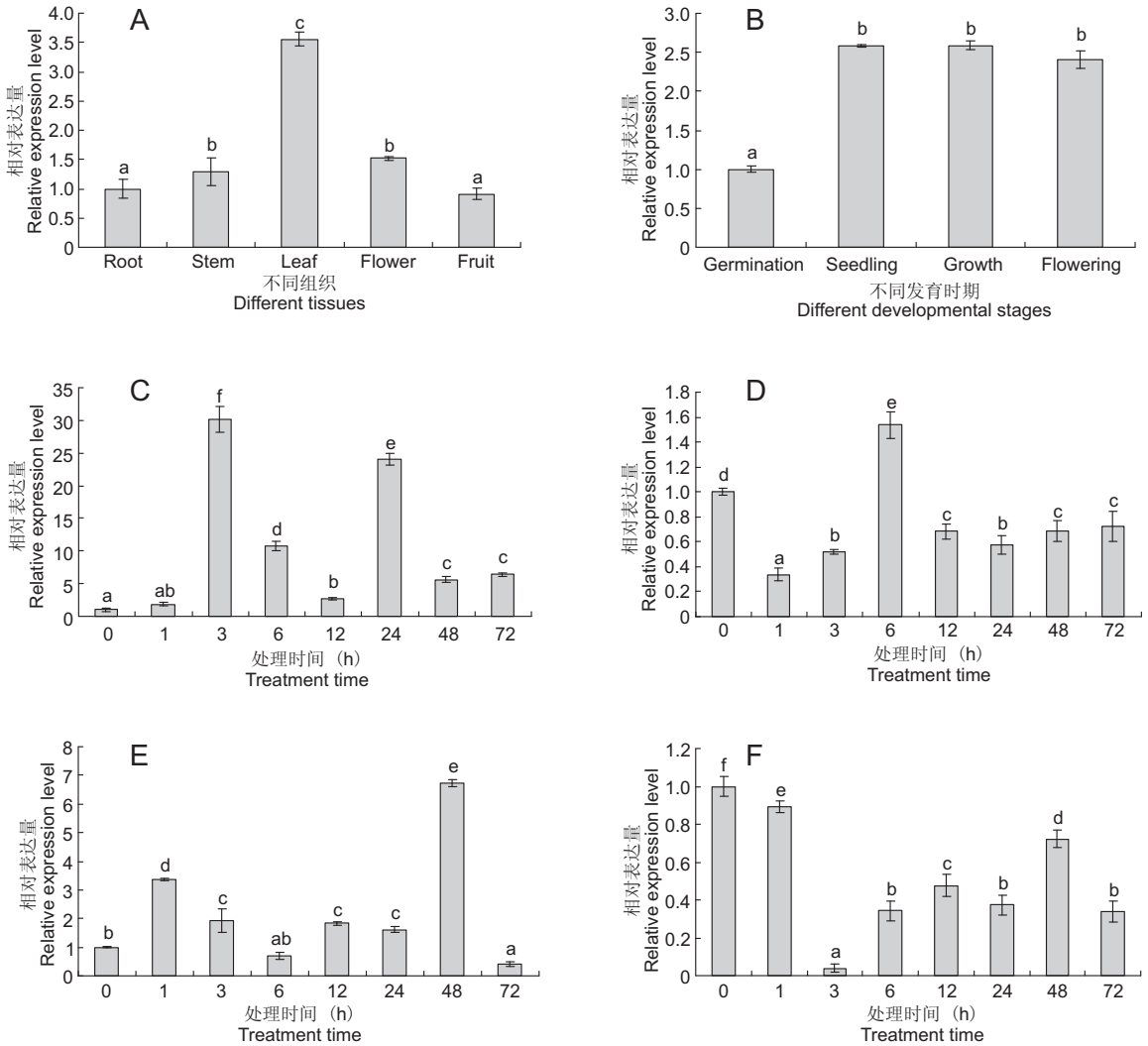


图 6 liCYP83B1 系统进化分析
Fig. 6 Phylogenetic analysis of liCYP83B1



A: 不同组织; B: 不同发育时期; C: 500 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸甲酯; D: 300 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸; E: 9.0%葡萄糖; F: 低温。不同小写字母表示基因相对表达量在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。
A: Different tissues; B: Different growth stages; C: 500 $\mu\text{mol/L}$ methyl jasmonate; D: 300 $\mu\text{mol/L}$ salicylic acid; E: 9.0% glucose; F: Low temperature. Different lowercase letters indicate significant differences in relative expression at the $P < 0.5$ level.

图 7 liCYP83B1 的表达模式研究
Fig. 7 Study on temporal expression of liCYP83B1

脲进入芥子油苷合成途径具有重要的调节作用。目前已对拟南芥、甘蓝、欧洲油菜等多种植物的 *CYP83B1* 基因进行了分离和克隆, 且以拟南芥 *CYP83B1* 基因研究最为深入^[21]。本研究成功获得了菘蓝 *CYP83B1* 基因的 cDNA 和基因组 DNA 序列。经生物信息学分析, 发现该基因属于细胞色素 P450 基因家族。进一步对其编码的蛋白进行亚细胞定位、信号肽和蛋白质二级、三级结构的预测, 结果表明, *liCYP83B1* 为无信号肽、无跨膜结构域的稳定型亲水性蛋白, 二级结构主要由无规则卷曲和 α 螺旋组成, 主要定位于内质网膜上。

芥子油苷生物合成的调节过程非常复杂。除了遗传因素, 芥子油苷的生物合成还受到发育时期、组织器官等因素的影响; 此外, 生物和非生物因子也可以影响芥子油苷的组分和含量, 如温度、氮硫营养、外源植物激素、机械损伤、动物捕食、病原体入侵等^[5]。本研究发现 *liCYP83B1* 在不同组织中的表达具有显著差异, 说明该基因表达具有组织特异性; 在菘蓝不同发育时期, *liCYP83B1* 在幼苗期、生长期和花期均稳定表达, 且显著高于萌芽期, 说明该基因的表达与植物生长发育的时期也具有一定的相关性。Frerigmann 等^[22] 研究发现, MYB 类转录因子 *MYB34* 能促进吲哚类芥子油苷合成相关基因 *CYP79B2*、*CYP79B3* 和 *CYP83B1* 等的表达。JA 可以影响芥子油苷生物合成转录因子 *MYB34* 和 *MYB51* 的表达, 从而使芥子油苷的含量增加^[23]。除了 MYB 类转录因子外, 芥子油苷的合成还受 DOF 家族转录因子 *OBP2* 的调节, 促进 *CYP83B1* 的表达增强, 从而使吲哚类芥子油苷的含量增加。而 *OBP2* 的表达受到植物激素(茉莉酸、生长素)、昆虫攻击和伤害的诱导^[24]。本研究结果表明, 外源 MeJA 可以促进 *liCYP83B1* 的高表达, 在 MeJA 处理 3 h 时, 其表达量达到对照的 30.13 倍。此外, 研究发现诱导吲哚类芥子油苷的生物合成过程中 SA 和 JA 存在相互拮抗的作用, 抑制 JA 信号或者增强 SA 信号均会引起芥子油苷积累的减少, 反之亦然^[25]。本研究结果也表明 SA 处理后 *liCYP83B1* 的表达受到明显抑制。糖可以调控多种芸薹属(*Brassica* L.) 植物中次生代谢产物的合成^[26], Gigolashvili 等^[27] 研究发现葡萄糖可以激活脂肪族重要调节因子 *MYB28* 的表达, Li 等^[28] 的基因芯片数据也显示葡萄糖处理可

快速上调 *MYB28* 基因的表达。本研究中葡萄糖处理菘蓝 48 h 后, *liCYP83B1* 表达量达到最高, 为对照的 6.74 倍。总体来看, MeJA 和 Glu 能够显著促进 *liCYP83B1* 的表达, 而低温和 SA 处理则对其表达呈现一定的抑制效应。

本研究首次克隆得到菘蓝 *CYP83B1* 基因, 并对其进行了生物信息学和表达模式分析, 相关研究结果对于进一步探讨菘蓝中芥子油苷类物质的生物合成途径和代谢调控机理具有参考价值, 为进一步研究该基因的功能、创建和培育高产芥子油苷的菘蓝新品种提供了依据。

参考文献:

- [1] 陈宇航, 郭巧生, 邓乔华, 田汉卿. 菘蓝不同种质活性成分动态积累及其药材品质比较[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1541-1545.
Chen YH, Guo QS, Deng QH, Tian HQ. Dynamic accumulations of bioactive components in different germplasm *Isatis indigotica* and comparative of its quality of medical material[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, 37(11): 1541-1545.
- [2] 杨飞, 徐延浩. 四倍体菘蓝基因组 DNA 甲基化的甲基化敏感扩增多态性分析[J]. 中草药, 2013, 44(3): 344-348.
Yang F, Xu YH. Analysis on genome DNA methylation of tetraploid *Isatis indigotica* by methylation sensitive amplification polymorphism[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(3): 344-348.
- [3] 郑剑玲, 王美惠, 杨秀珍, 吴立军. 大青叶和板蓝根提取物的抑菌作用研究[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(1): 18-19.
Zheng JL, Wang MH, Yang XZ, Wu LJ. Study on bacteriostasis of *Isatis indigotica* Fort. [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2003, 15(1): 18-19.
- [4] 赵宇, 孔稳稳, 沙伟, 李晶. 脂肪族芥子油苷侧链修饰酶基因 *FMOGS-OX4* 表达模式分析[J]. 植物科学学报, 2013, 31(4): 406-414.
Zhao Y, Kong WW, Sha W, Li J. Expression pattern of *FMOGS-OX4*, a biosynthetic gene involved in aliphatic glucosinolate side-chain modification[J]. *Plant Science Journal*, 2013, 31(4): 406-414.
- [5] Yan XF, Chen SX. Regulation of plant glucosinolate metabolism[J]. *Planta*, 2007, 226(6): 1343-1352.
- [6] Wang H, Wu J, Sun S, Liu B, Cheng F, Sun R, Wang X. Glucosinolate biosynthetic genes in *Brassica rapa*[J]. *Gene*, 2011, 487(2): 135-142.
- [7] 陈亚州, 阎秀峰. 芥子油苷在植物-生物环境关系中的作用[J]. 生态学报, 2007, 27(6): 2584-2593.
Chen YZ, Yan XF. The role of glucosinolates in plant-

- biotic environment interactions [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(6): 2584–2593.
- [8] Plate AYA, Gallaher DD. Effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(2): 287–292.
- [9] Wittstock U, Halkier BA. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(6): 263–270.
- [10] Zhu B, Wang Z, Yang J, Zhu Z, Wang H. Isolation and expression of glucosinolate synthesis genes *CYP83A1* and *CYP83B1* in pak choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* var. *communis* (N. Tsen & S. H. Lee) Hanelt) [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(5): 5832–5843.
- [11] Grubb CD, Abel S. Glucosinolate metabolism and its control [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(2): 89–100.
- [12] Grubb CD, Zipp BJ, Ludwig-Mülle J, Masuno MN, Molinski TF, Abel S. *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis [J]. *Plant J*, 2004, 40(6): 893–908.
- [13] Barlier I, Kowalczyk M, Marchant A, Ljung K, Bhalerao R, Bennett M, Sandberg G, Bellini C. The *SUR2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14819–14824.
- [14] Bak S, Feyereisen R. The involvement of two P450 Enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(1): 108–118.
- [15] Bak S, Tax FE, Fedmann KA, Galbraith DW, Feyereisen R. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(1): 101–111.
- [16] Naur P, Petersen BL, Mikkelsen MD, Bak S, Rasmussen H, Olsen CE, Halkier BA. CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 133(1): 63–72.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [18] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [J]. *J Mol Biol*, 2004, 340(4): 783–795.
- [19] 郭文芳, 刘德春, 杨莉, 庄霞, 张涓涓, 王书胜, 刘勇. 柑橘 *MYB15* 基因的克隆与表达分析 [J]. 植物科学学报, 2015, 33(6): 808–818.
- Guo WF, Liu DC, Yang L, Zhuang X, Zhang JJ, Wang SS, Liu Y. Cloning and expression analysis of *MYB15* genes from *Citrus* [J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(6): 808–818.
- [20] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195–201.
- [21] 石璐, 李梦莎, 王丽华, 于萍, 李楠, 国静, 阎秀峰. COI1 参与茉莉酸调控拟南芥吲哚族芥子油苷生物合成过程 [J]. 生态学报, 2012, 32(17): 5438–5444.
- Shi L, Li MS, Wang LH, Yu P, Li N, Guo J, Yan XF. COI1 is involved in jasmonate-induced indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(17): 5438–5444.
- [22] Frerigmann H, Gigolashvili T. MYB34, MYB51, and MYB122 distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Plant*, 2014, 7(5): 814–828.
- [23] Schreiner M, Krumbein A, Knorr D, Smetanska I. Enhanced glucosinolates in root exudates of *Brassica rapa* ssp. *rapa* mediated by salicylic acid and methyl jasmonate [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(4): 1400–1405.
- [24] Skirycz A, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanon MI, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I. DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2006, 47(1): 10–24.
- [25] Kliebenstein DJ, Figuth A, Mitchell-Olds T. Genetic architecture of plastic methyl jasmonate response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 2002, 161(4): 1685–1696.
- [26] Wei J, Miao H, Wang Q. Effect of glucose on glucosinolates, antioxidants and metabolic enzymes in *Brassica sprouts* [J]. *Sci Hortic*, 2011, 129(4): 535–540.
- [27] Gigolashvili T, Yatusovich R, Berger B, Müller C, Flugge UI. The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2007, 51(2): 247–261.
- [28] Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW. Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a relevance vector machine [J]. *Genome Res*, 2006, 16(3): 414–427.