

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.24292

CSTR: 32231.14.PSJ.2095-0837.24292

陈诗, 袁冲, 赵彬凯, 鹿昊辰, 何妍, 张景景, 刘义飞. 神农香菊萜类合酶基因 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的克隆与功能分析[J]. 植物科学学报, 2025, 43 (5): 671-681Chen S, Yuan C, Zhao BK, Lu HC, He Y, Zhang JJ, Liu YF. Cloning and functional characterization of the terpene synthase genes *CiaTPS1* and *CiaTPS2* from *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* Q. H. Liu et S. F. Zhang[J]. *Plant Science Journal*, 2025, 43 (5): 671-681

神农香菊萜类合酶基因 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的 克隆与功能分析

陈诗, 袁冲, 赵彬凯, 鹿昊辰, 何妍, 张景景, 刘义飞*

(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

摘要: 神农香菊 (*Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* Q. H. Liu et S. F. Zhang) 为神农架特有的植物资源, 其全株散发浓郁芳香。萜类化合物是其香气成分的重要来源, 而萜类合酶 (Terpene synthase, TPS) 是形成萜类骨架多样性的关键驱动酶。本研究基于神农香菊基因组数据, 克隆到 2 个 TPS 基因并对其进行了生物信息学、亚细胞定位和酶活性分析。研究结果显示: *CiaTPS1* 基因开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 全长 1 722 bp, 编码 573 氨基酸; *CiaTPS2* 基因的 ORF 全长 1 725 bp, 编码 574 个氨基酸。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 均具有萜类合酶保守结构域和基序, 属于 TPS-a 亚家族。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 均定位于细胞质和细胞核。通过大肠杆菌外源表达并纯化获得 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 重组蛋白。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 均能催化 GPP 生成以 α -松油烯为主的 8 种单萜类产物; *CiaTPS1* 催化 FPP 生成以 1-甲基-4-(6-甲基庚-5-烯-2-基) 环己-1,3-二烯为主的 10 种倍半萜类产物, 而 *CiaTPS2* 催化 FPP 生成以姜烯为主的 4 种倍半萜类产物。研究结果表明, *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 作为双功能萜类合酶, 可催化生成结构多样的单萜和倍半萜化合物, 研究结果可为神农香菊芳香物质合成机制及萜类代谢研究提供关键线索。

关键词: 神农香菊; 萜类合酶; 基因克隆; 亚细胞定位; 酶活性分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837 (2025) 05-0671-11

Cloning and functional characterization of the terpene synthase genes *CiaTPS1* and *CiaTPS2* from *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* Q. H. Liu et S. F. Zhang

Chen Shi, Yuan Chong, Zhao Binkai, Lu Haochen, He Yan, Zhang Jingjing, Liu Yifei*

(College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract: *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*, an aromatic plant endemic to the Shennongjia region, is characterized by its distinct whole-plant fragrance, primarily derived from terpenoid compounds. Terpene synthases (TPSs) catalyze the formation of diverse terpene skeletons and play a central role in volatile terpenoid biosynthesis. Based on genomic data from *C. indicum* var. *aromaticum*, two TPS genes, *CiaTPS1* and *CiaTPS2*, were cloned and subjected to bioinformatic characterization, subcellular localization, and functional enzymatic assays. Results showed that the open reading frame (ORF) of *CiaTPS1* was 1 722 bp in length,

收稿日期: 2024-11-29, 接受日期: 2024-12-10。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32270231)。

作者简介: 陈诗 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物次生代谢调控 (E-mail: chenshx2000@163.com)。* 通信作者 (Author for correspondence. E-mail: liuyifei@hbucom.edu.cn)。

encoding a 573-amino-acid protein, while the ORF of CiaTPS2 spanned 1 725 bp, encoding a 574-amino-acid protein. Both CiaTPS1 and CiaTPS2 contained conserved domains and signature motifs characteristic of plant TPSs and were classified within the TPS-a subfamily. Subcellular localization analysis revealed the dual presence of CiaTPS1 and CiaTPS2 proteins in the cytoplasm and nucleus. Recombinant CiaTPS1 and CiaTPS2 were produced via heterologous expression in *Escherichia coli* and subsequent purification. Both enzymes catalyzed the conversion of geranyl diphosphate (GPP) into eight distinct monoterpenes, with α -terpinene as the predominant product. CiaTPS1 additionally catalyzed the conversion of farnesyl diphosphate (FPP) into 10 sesquiterpenes, with 1-methyl-4-(6-methylhept-5-en-2-yl)cyclohexa-1,3-diene as the major compound, whereas CiaTPS2 generated four FPP-derived sesquiterpenes, with zingiberene as the primary product. These findings provide a molecular basis for understanding the biosynthesis of volatile terpenoids in *C. indicum* var. *aromaticum* and offer a foundation for future metabolic and evolutionary studies.

Key words: *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*; Terpene synthase; Gene cloning; Subcellular localization; Enzymatic activity analysis

神农香菊 (*Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* Q. H. Liu et S. F. Zhang) 是菊科菊属 (*Chrysanthemum*) 野菊 (*C. indicum* L.) 的变种, 局限分布于神农架高山 (>2 000 m) 环境, 因其全株散发浓郁芳香而得名^[1]。独特的芳香性状赋予了它在药用、日化和园艺等领域的开发和利用价值。神农香菊为神农架特有的中草药资源, 鄂西人民常以其花和叶阴干作香囊或作辛凉解表、清热药^[2]。现代药理学研究表明, 神农香菊精油富含萜烯和其他含氧化合物, 具有良好的抑菌消炎作用^[3]; 其茎叶提取物富含黄酮、酚酸和多糖类成分, 具有良好的抗氧化活性^[4, 5]。Feng 等^[6]利用神农香菊花精油和茎叶提取物为原料制备了微乳液水凝胶, 其更能有效传递生物活性成分并展现出优异的抗氧化、美白、抗衰和防晒等多重功效, 可作为极具前景的药物和化妆品原料加以应用。此外, 神农香菊作为改良栽培菊花芳香性状的重要种质资源, 也具有巨大的开发前景和应用潜力。

神农香菊的芳香性状和其精油的药效学活性与自身丰富的萜类物质密切相关^[6, 7]。植物中萜类的生物合成途径主要包括甲羟戊酸 (Mevalonate, MVA) 和甲基赤藓糖醇-4-磷酸 (Methylerythritol 4-phosphate pathway, MEP) 途径。前者存在于细胞质中, 负责倍半萜 C15 和三萜 C30 的合成; 后者存在于质体中, 负责单萜 C10、二萜 C20 和四萜 C40 的合成。萜类合酶 (Terpene synthase, TPS) 是 MVA 和 MEP 途径中分别催化香叶基焦磷酸 (Geranyl pyrophosphate, GPP)、法尼基

焦磷酸 (Farnesyl pyrophosphate, FPP) 和香叶基香叶基焦磷酸 (Geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 形成骨架多样的单萜 C10、倍半萜 C15 和二萜 C20 的关键酶。由 TPS 催化产生萜烯及其下游修饰产物有助于植物促进自身的生长发育、防御病虫害和对抗生物及非生物逆境; 同时, 这些天然产物及其衍生物为人类提供丰富的药物 (如青蒿素、 β -榄香烯和紫杉醇等)、香料 (如香叶醇和吉玛烯 D 等) 和工业 (如二萜树脂酸等) 原料。

随着现代分子生物学技术的快速发展, 日益增多的 TPS 基因在药用植物中被克隆和表征, 包括: 野菊^[8]、黄花蒿 (*Artemisia annua* L.)^[9]、艾 (*A. argyi* H. Lévl. & Vaniot)^[10]、紫苏 (*Perilla frutescens* (L.) Britton)^[11]、鼠尾草 (*Salvia japonica* Thunb.)^[12]、银杏 (*Ginkgo biloba* L.)^[13] 和雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)^[14] 等。Liu 等^[15]、张凌宇^[16] 和 Zhong 等^[17] 基于转录组数据分别从神农香菊中克隆并表征 1、4 和 4 个 TPS 基因, 解析了神农香菊部分萜类物质合成的分子机制。然而神农香菊香气和活性成分涉及的萜类复杂多样, 与之相关的 TPS 基因还有待进一步挖掘和表征。本研究首次基于本课题组神农香菊的基因组数据 (未发表), 从中筛选并克隆到 2 个 TPS 基因, 并对其进行生物信息学分析、亚细胞定位分析, 原核表达与纯化及酶活性分析, 以期揭示神农香菊的香气与药效成分的形成机制, 利用基因工程技术对其进行改良提供理论依据, 并为促进神农香菊资源的综合开发奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

神农香菊样品于2022年10月20日采自湖北省神农架林区，通过扦插的方式，繁殖于本校中药资源多组学研究实验室中，待其花期，采取其盛花期花朵，经液氮速冻后保存于-80℃冰箱备用。*Hind* III、*Acc65* I和*EcoR* I内切酶购于爱博泰克生物有限公司。大肠杆菌DH5 α 和Rosetta (DE3)感受态细胞、根癌农杆菌GV3101感受态细胞购于上海唯地生物技术有限公司。 β -月桂烯、 α -松油烯、 γ -松油烯、芳樟醇和4-松油醇购自成都普思生物科技股份有限公司，D-柠檬烯和 α -松油醇购自武汉天植生物技术有限公司。pET-28a和pSuper1300-GFP质粒为实验室自存。FPP和GPP购自Sigma公司。引物合成及测序服务均由生工生物工程(武汉)股份有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 总RNA提取及cDNA合成

将保存于-80℃冰箱的神农香菊盛花期花朵取出，用液氮快速研磨成粉末，采用植物RNA提取试剂盒(Bioteke, RP3301)提取总RNA。使用1%琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop 2000检测总RNA的完整性、浓度和纯度。采用反转录试剂盒(Transgen, AH311)将检测合格的总RNA反转录为cDNA。

1.2.2 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 基因的克隆

从神农香菊基因组中获得*CiaTPS1*和*CiaTPS2*基因的开放阅读框(Open reading frame, ORF)序列，利用SnapGene软件设计特异性引物*CiaTPS1-F/R*和*CiaTPS2-F/R*(附表1¹⁾)。以上述cDNA为模板，采用KOD One™ PCR Master Mix (TOYOBO, KMM-101S)进行PCR扩增。扩增体系为KOD One™ PCR Master Mix 25 μ L，上、下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L，cDNA 2 μ L，ddH₂O 21 μ L。PCR反应程序为：98℃预变性3 min；98℃变性10 s，50℃退火5 s，68℃延伸20 s，共40个循环；68℃3 min结束反应，保存于4℃。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测无误进行切胶回收。回收产物与pEASY@-

Blunt Cloning vector (Transgen, CB101)连接后转化大肠杆菌DH5 α ，于37℃培养12 h后筛选阳性克隆测序。

1.2.3 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

使用NCBI网站的ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)工具查找目的基因的ORF；使用ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)分析氨基酸序列的理化性质；使用TMHMM2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)软件预测蛋白的跨膜结构域；使用SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)预测蛋白的信号肽；使用SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和NCBI中的CD search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析目的蛋白的保守结构域；利用SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa>)和SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)对目的蛋白进行二级和三级结构预测；使用Jalview软件对神农香菊和其他植物的TPS进行多序列比对；使用MEGAX64软件基于邻接法(Neighbor-Joining method)构建神农香菊和其他植物TPS的系统发育树，并通过iTOL网站(<https://itol.embl.de/>)美化系统发育树，Bootstrap值设置为1 000；亚细胞定位预测借助WoLF PSORT网站(<https://wolfsort.hgc.jp/>)进行。

1.2.4 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的亚细胞定位分析

通过*Hind* III和*Acc65* I双酶切pSuper1300-GFP获得线性化载体。根据*CiaTPS1*和*CiaTPS2*(不含终止密码子)序列及无缝克隆原理设计带有线载末端序列的引物*CiaTPS1-1-F/R*和*CiaTPS2-1-F/R*(附表1)，扩增相应目的片段，将胶回收后的此片段通过OneStep Cloning Kit (Vazyme, C112)连入线载构建重组质粒pSuper1300-*CiaTPS1/2*-GFP，将其转入大肠杆菌DH5 α 菌株，挑取阳性克隆测序。将测序无误的重组质粒和pSuper1300-GFP空载分别转化根癌农杆菌GV3101，挑取阳性克隆扩大摇菌。同时将携带细胞质和细胞核定位标志物质粒(Marker)的根癌

1) 如需查阅附表内容请登录《植物科学学报》网站(<http://www.plantscience.cn>)查看本期文章。

农杆菌扩大培养, 该 *Maker* 编码红色荧光蛋白。5 000 r/min 离心 10 min 收集上述菌体, 用 MMA (包含 0.2 mmol/L 乙酰丁香酮、10 mmol/L MES 和 10 mmol/L MgCl₂) 重悬, 调整 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8。将携带重组质粒或空载的农杆菌重悬菌液分别与携带 *Maker* 的农杆菌重悬菌液等体积混匀, 室温下避光孵育 2~3 h 后注射本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana* L.) 叶片。注射后黑暗放置 1~2 d, 再在 25 ℃, 16 h 光照/8 h 黑暗的环境下培养 2~3 d 后使用激光共聚焦扫描显微镜观察目标蛋白的亚细胞定位。

1.2.5 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的原核表达与纯化

原核表达采用携带组氨酸标签 (6×His-tag) 的 pET-28a 载体, 选择 *EcoR* I 和 *Hind* III 作为酶切位点。使用 *CiaTPS1*-2-F/R 和 *CiaTPS2*-2-F/R (附表 1) 引物扩增带有线性末端序列的目的基因片段, 并通过 OneStep Cloning Kit 连入线性载体构建 pET-28a-*CiaTPS1/2* 重组质粒, 将此重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性单克隆测序。将测序正确的重组质粒和 pET-28a 空载质粒经热激法分别转化蛋白表达菌株 Rosetta (DE3)。使用 0.1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 16 ℃ 诱导蛋白表达, 并通过 His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂 (YEASEN, 20502ES10) 纯化蛋白。纯化得到的蛋白经超滤管浓缩脱盐, 保存于 10% 甘油中, 随后分装置于 -80 ℃ 冰箱长期保存。

1.2.6 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的酶活性反应

配置 1 mL 反应体系 (包括: 50~100 μ g 纯化蛋白, 10 μ g GPP/FPP, 30 mmol/L HEPES buffer, 25 mmol/L DTT, 25 mmol/L MgCl₂ 和 5 mmol/L MnCl₂), 以空载粗酶为对照。向配置好的反应液加入 350 μ L 正己烷进行覆盖以收集反应产生的挥发性萜烯, 30 ℃ 孵育 2~4 h。待反应完毕后, 涡旋 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层正己烷, 经滤膜过滤后进行气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 分析。具体检测条件如下: 色谱柱为 Agilent HP-5MS 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μ m), 以氦气为载气, 流速为 1 mL/min。程序升温: 50 ℃ 保持 5 min, 按照 8 ℃/min 的速度升温至 300 ℃, 保持 5 min。进样口温度

为 250 ℃, 不分流模式。EI 离子源, 离子源温度 230 ℃, 全扫描模式。所有酶活产物通过将其质谱与 NIST20 质谱数据库比对以鉴定, 部分产物进一步通过与标准品的保留时间和质谱数据比对以鉴定。

2 结果与分析

2.1 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 基因的克隆

本研究以神农香菊总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 使用特异性引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果如附图 1¹⁾ 所示。将 PCR 产物胶回收并与 pEASY@-Blunt Cloning vector 连接后送测序。结果表明, *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 基因序列长度分别为 1 722 和 1 725 bp, 检测发现均为完整的 ORF。

2.2 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的生物信息学分析

2.2.1 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的理化性质与结构域分析

采用在线软件 ProtParam 分析 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 基因编码蛋白的理化性质, 结果显示, *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 分别编码 573 和 574 个氨基酸, 分子式分别为 C₃₀₀₅H₄₆₆₅N₇₈₅O₉₀₁S₂₃ 和 C₃₀₃₄H₄₆₉₉N₇₉₃O₉₀₃S₂₁, 蛋白相对分子质量分别为 66 943.20 和 67 405.72 Da, 理论等电点均为 5.18, 总平均亲水性 (GRAVY) 分别为 -0.415 和 -0.418, 不稳定系数 II 分别为 54.52 和 54.67, 都属于亲水性不稳定蛋白。在线软件 TMHMM2.0 预测结果发现, *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 蛋白均无跨膜结构域。SignalP-6.0 网站预测结果显示, *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 蛋白不含信号肽, 属于非分泌蛋白。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 蛋白在各自 N 端的 40~219 aa 处具有 Terpene_synth 结构域 (PF01397), C 端 250~516 aa 处具有 Terpene_synth_C 结构域 (PF03936), 都属于萜类合酶家族。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 核苷酸序一致性为 96.63%, 氨基酸序列一致性为 94.24%, 提示它们功能相似。

2.2.2 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的二级和三级结构预测

蛋白二级结构预测结果表明 (图 1: A), *CiaTPS1* 蛋白的二级结构由 68.24% 的 α -螺旋、

1) 如需查阅附图内容请登录《植物科学学报》网站 (<http://www.plantscience.cn>) 查看本期文章。

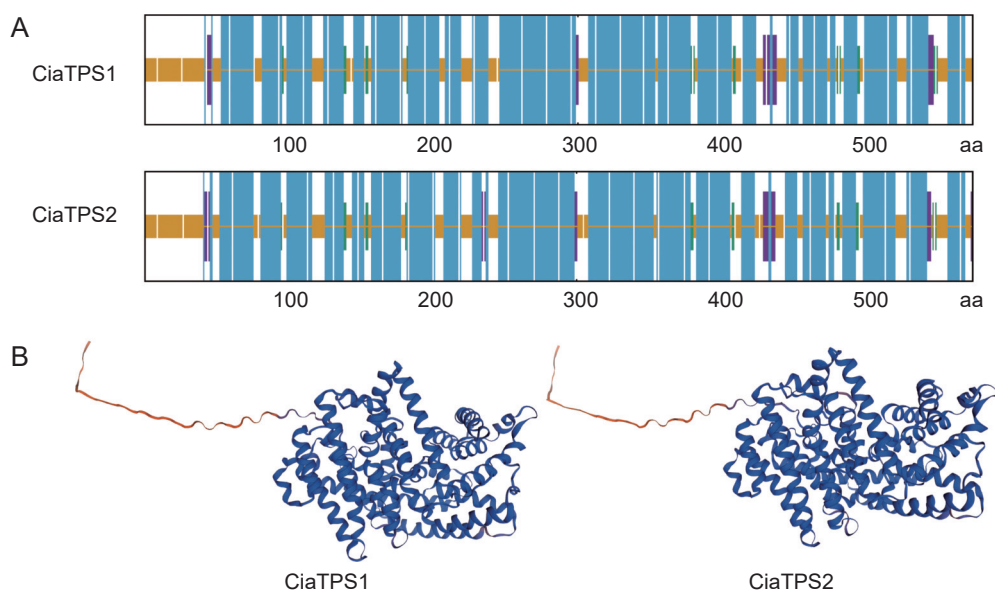


图 1 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的二级 (A) 和三级结构 (B) 预测
Fig. 1 Secondary (A) and tertiary structure (B) predictions of *CiaTPS1* and *CiaTPS2*

26.18% 的随机卷曲、2.79% 的延伸链和 2.79% 的 β -折叠组成；*CiaTPS2* 蛋白的二级结构由 67.60% 的 α -螺旋、26.48% 的随机卷曲、3.14% 的延伸链和 2.79% 的 β -折叠组成。基于黄花蒿倍半萜合酶 E- β -farnesene synthase 2 (E7BTW7.1.A) 的晶体结构对 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 蛋白进行同源建模 (图 1: B)，发现 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 与黄花蒿 E- β -farnesene synthase 2 的氨基酸序列一致性分别为 71.45% 和 72.20%，GMQE 值均为 0.92。表明 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 具有相似的二级和三级结构。

2.2.3 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的多序列比对和系统进化树构建

将 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 与菊科其他植物萜类合酶进行多序列比对 (图 2: A) 发现它们都具有萜类合酶保守基序 RRX8W、RxR、DDXXD 和 NST/DTE。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 序列高度相似，其 RxR 和 NST/DTE 基序完全一致，而两者的 RRX8W 和 DDXXD 基序都仅存在 1 个氨基酸残基的差异。植物 TPS 家族可被划分为 TPS-a~TPS-h 共 7 个亚家族。为了研究 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 亚族分类及可能功能，本研究下载了隶属于 TPS-a 至 TPS-h 亚家族的 16 个物种的 23 条 TPS 序列，构建了 *CiaTPS1*、*CiaTPS2* 与上述 TPS 序列的系统发育树 (图 2: B)。结果

显示，*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 都位于 TPS-a 亚家族系统发育分支中，该进化枝常与被子植物倍半萜合酶相关。推测 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 编码倍半萜合酶，可能参与与倍半萜合成相关的 MVA 途径。

2.3 亚细胞定位分析

预测结果显示，*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 蛋白均最可能定位于细胞核。基于网站预测结果和文献中关于 TPS-a 亚族成员普遍参与定位于细胞质的 MVA 途径的报道，选择了携带 *Maker* 质粒的农杆菌分别和携带 pSuper1300-*CiaTPS1/2*-GFP 与 pSuper1300-GFP 质粒的农杆菌共同注射烟草叶片，2~3 d 后利用激光共聚焦显微镜检测烟草下表皮细胞中融合蛋白的分布。结果表明 (图 3)，*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 融合蛋白的绿色荧光在细胞质和细胞核均有分布，且与 *Maker* 的红色荧光完全重合，表明该蛋白定位于细胞质和细胞核。这一结果进一步支持 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 基因可能参与 MVA 途径，并编码倍半萜合酶的推测。而 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 蛋白在氨基酸序列、二级和三级结构以及亚细胞定位方面的相似性也进一步表明它们可能具有类似的功能。

2.4 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的原核表达与纯化

将测序无误的质粒 pET-28a-*CiaTPS1/2* 转入大肠杆菌表达菌株 Rosetta (DE3)，通过 IPTG

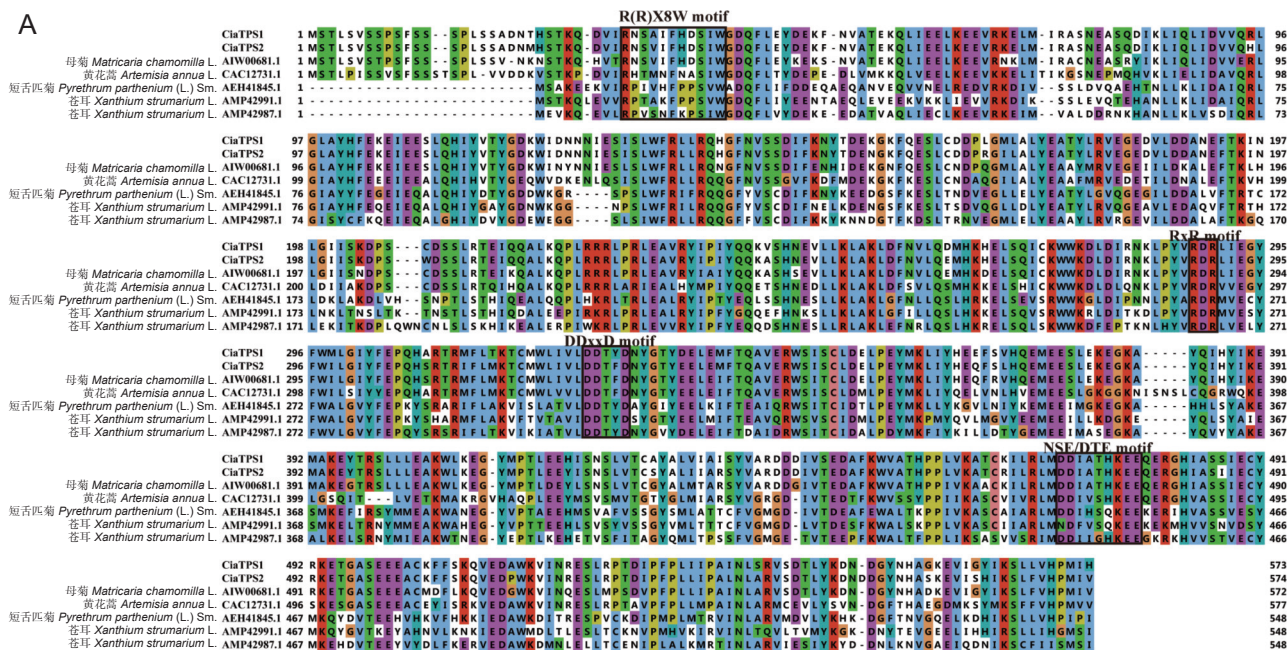


图 2 CiaTPS1、CiaTPS2 和其他植物 TPS 的多序列比对 (A) 和系统进化树分析 (B)

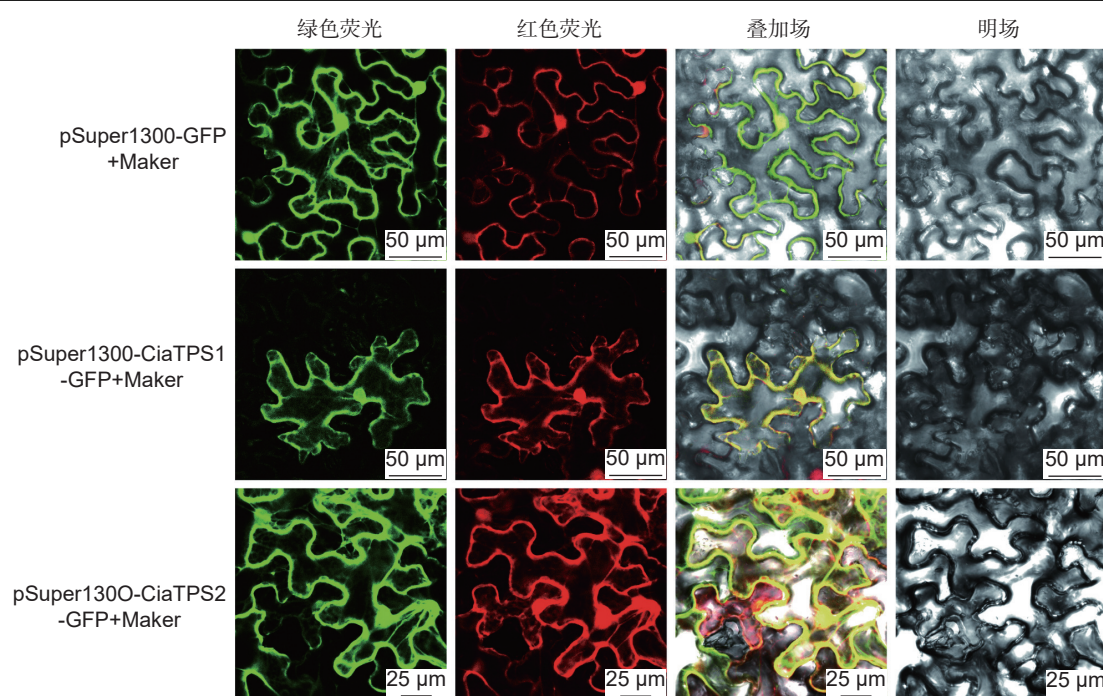
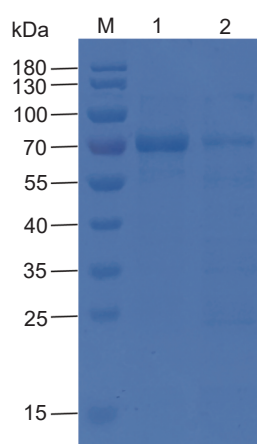
Fig. 2 Multiple sequence alignment (A) and phylogenetic tree (B) of CiaTPS1, CiaTPS2, and TPSs from other plants

低温诱导蛋白表达。利用 His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂纯化蛋白, 随后进行 10% SDS-PAGE 检测, 结果如图 4 所示, CiaTPS1 和 CiaTPS2 融合蛋白条带 (包含相对分子质量为 8 796 Da 的 His 标签) 出现在约 70 kDa 附近, 与其蛋白相对分子质量相符, 这一结果表明 CiaTPS1 和 CiaTPS2 融合蛋白的正确表达与纯化, 可用于后续的酶活实验。

2.5 CiaTPS1 和 CiaTPS2 的酶活性测定

为了鉴定 CiaTPS1 和 CiaTPS2 的功能, 分别

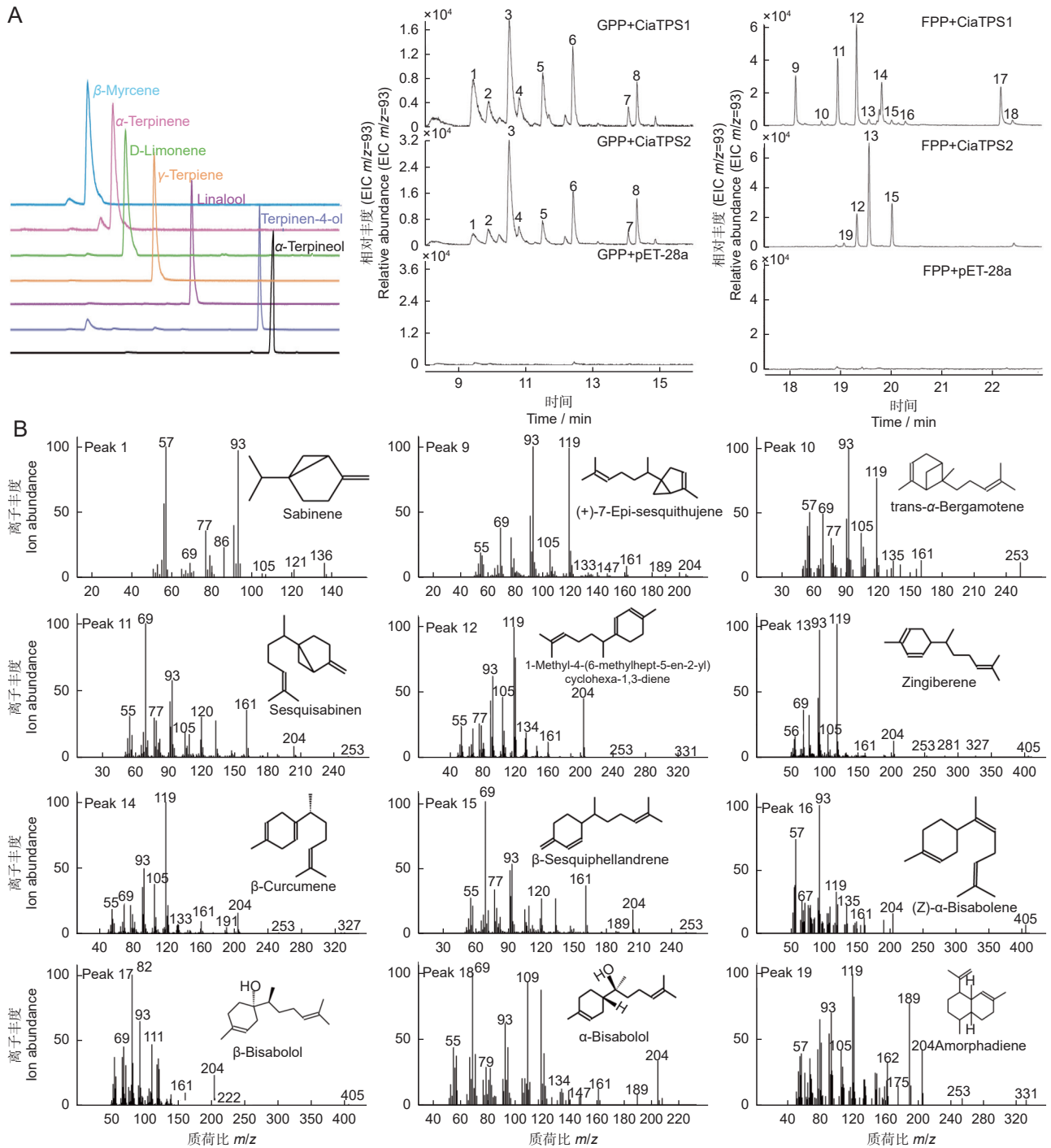
使用单萜和倍半萜前体物质 GPP 和 FPP 作为底物与纯化的目的蛋白进行体外酶促反应, 并通过 GC-MS 检测反应产物。结果显示 (图 5), CiaTPS1 和 CiaTPS2 均具有底物宽泛性及功能多样性。CiaTPS1 和 CiaTPS2 对于 GPP 的催化活性基本一致, 能够催化 GPP 形成 8 种单萜, 包括: 桉烯、 β -月桂烯、 α -松油烯、D-柠檬烯、 γ -松油烯、芳樟醇、4-松油醇和 α -松油醇。尽管之前的推测指出 CiaTPS1 和 CiaTPS2 可能具有相似的功能, 但实验结果表明它们对 FPP 展现出不同的催化活性。

图 3 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 蛋白的亚细胞定位分析Fig. 3 Subcellular localization analysis of *CiaTPS1* and *CiaTPS2*M: Marker; 1: *CiaTPS1*; 2: *CiaTPS2*.图 4 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测Fig. 4 SDS-PAGE analysis of *CiaTPS1* and *CiaTPS2* recombinant proteins

CiaTPS1 能够催化 FPP 生成 5 种主要产物：(+)-7-表倍半萜、倍半香桉烯、1-甲基-4-(6-甲基庚-5-烯-2-基)环己-1,3-二烯、 β -姜黄烯和 β -红没药醇，同时生成微量的反- α -佛手柑烯、姜烯、 β -倍半水芹烯、(Z)- α -红没药烯和 α -红没药醇；而 *CiaTPS2* 则能够催化 FPP 产生 1-甲基-4-(6-甲基庚-5-烯-2-基)环己-1,3-二烯、姜烯、 β -倍半水芹烯及微量的紫穗槐二烯。

3 讨论

神农香菊是生长于湖北神农架林区的珍稀物种，其独特的芳香特征使其成为药用、园艺和工业应用的新型资源型植物。挥发性萜类化合物是神农香菊中主要的芳香和精油活性成分来源，而 TPS 基因能有效调控植物中萜烯的种类和含量，因而挖掘神农香菊 TPS 基因并鉴定其功能，对于研究神农香菊芳香和药效组分中丰富的萜烯代谢物的生物合成机制具有重要意义。本研究基于神农香菊基因组数据筛选并克隆出 2 个 TPS 基因，分析结果显示，*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 蛋白在 N 端和 C 端分别具有 Terpene_synth 和 Terpene_synth_C 结构域，均属于 TPS 基因家族。TPS 基因家族是一个中等大小的家族，根据催化活性及植物类群分布，可被划分为参与初级代谢的 TPS-c 和 TPS-e/f 以及参与次级代谢的 TPS-a、TPS-b、TPS-d、TPS-g 和 TPS-h 共 7 个亚家族。其中，TPS-a 和 TPS-b、TPS-g 亚家族为被子植物特有，TPS-a 和 TPS-b 亚家族分别主要编码倍半萜和单萜合酶，而 TPS-g 亚家族编码非环化单萜、倍半萜或二萜合酶，三者的主要区别在于 TPS-a 亚家族的 RRX8W 基序不如 TPS-b 亚家族保守，而



A: CiaTPS1、CiaTPS2 与 GPP 或 FPP 酶活反应产物以及 7 种标准品的提取离子色谱图。**B:** 利用 NIST20 数据库鉴定的化合物的质谱及化学结构。峰 2~8 使用标准品鉴定, 峰 1 和峰 9~19 使用 NIST20 质谱数据库鉴定 (1: 桉烯; 2: β -月桂烯; 3: α -松油烯; 4: D-柠檬烯; 5: γ -松油烯; 6: 芳樟醇; 7: 4-松油醇; 8: α -松油醇; 9: (+)-7-表-倍半萜烯; 10: 反- α -佛手柑烯; 11: 倍半香桉烯; 12: 1-甲基-4-(6-甲基庚-5-烯-2-基)环己-1,3-二烯; 13: 姜烯; 14: β -姜黄烯; 15: β -倍半水芹烯; 16: (Z)- α -红没药烯; 17: β -红没药醇; 18: α -红没药醇; 19: 紫穗槐二烯)。

A: Extracted ion chromatograms (EIC) of enzymatic assay products of CiaTPS1 and CiaTPS2 utilizing GPP or FPP as substrates and seven authentic standards. **B:** Mass spectra and chemical structures of compounds identified utilizing NIST20 database. Peaks 2~8 were identified using authentic standards, while peaks 1 and 9~19 were identified using NIST20 database (1: Sabinene; 2: β -Myrcene; 3: α -Terpinene; 4: D-Limonene; 5: γ -Terpinene; 6: Linalool; 7: Terpinen-4-ol; 8: α -Terpineol; 9: (+)-7-Epi-sesquithujene; 10: trans- α -Bergamotene; 11: Sesquisabinene; 12: 1-Methyl-4-(6-methylhept-5-en-2-yl)cyclohexa-1,3-diene; 13: Zingiberene; 14: β -Curcumene; 15: β -Sesquiphellandrene; 16: (Z)- α -Bisabolene; 17: β -Bisabolol; 18: α -Bisabolol; 19: Amorphadiene).

图 5 CiaTPS1 和 CiaTPS2 蛋白功能表征

Fig. 5 Functional characterization of CiaTPS1 and CiaTPS2 proteins

TPS-g 亚家族无 RRX8W 基序^[18]。系统发育分析显示 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 与 TPS-a 亚族成员聚为一簇, 推测其编码倍半萜合酶。依据结构和反应机理, TPS 可被划分为 I 和 II 类。在结构上, I 类 TPS 通过其 C 端特有的 DDxxD 和 NSE/DTE 基序而区别于具有 DxDD 基序的 II 类 TPS^[19], *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 均属于典型的 I 类 TPS。

亚细胞定位分析表明, *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 均定位于细胞质和细胞核, 这与 Zhong 等^[17] 的研究结果一致, 此外, 母菊 (*Matricaria chamomilla* L.)^[20] 和陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.)^[21] 的倍半萜合酶也具有相似的定位模式。体外酶促分析结果表明, *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 均表现出对 GPP 和 FPP 的双重催化活性。尽管 TPS 亚细胞靶向决定了它们在植物中使用的底物和形成萜烯产物的类型, 但有研究表明植物体内质体和胞质的萜类前体库存在动态的相互交流^[22], 据此推测这两种酶在植物体内也可能行使其单萜和倍半萜合酶的双重功能。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 基因序列高度相似, 表明它们可能是基因复制的结果, 然而它们对 FPP 催化活性的差异表明其功能发生了分化。基因复制往往伴随着基因的非功能化、新功能化或亚功能化^[23], 如 Chen 等^[10] 在艾中发现由串联复制而来的吉玛烯 D 合酶基因簇 *AarTPS111-116*, 尽管序列高度相似, 然而体外酶促实验显示仅 *AarTPS111* 可催化 FPP 生成吉玛烯 D, 其余串联复制基因均以微量的金合欢醇和橙花树醇作为主要产物; Han 等^[24] 的研究发现, 在闽楠 (*Phoebe bournei* (Hemsl.) Yen C. Yang) 8 号染色体上存在 2 个由 TPS-a 亚家族成员组成的特殊基因簇, 它们可能是由于包含 7 个串联复制 TPS 基因的祖先基因簇经历了一次独特的片段复制所致, 其中 *PbTPS-a20/a25*、*PbTPS-a21/a26* 和 *PbTPS-a22/a23* 基因对均存在不同程度的功能分化。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 的功能分化促进了神农香菊丰富的萜烯类化合物的形成。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 可催化 FPP 生成多种倍半萜类产物, 这可能与 I 类 TPS 的反应机理有关。I 类 TPS 通过与二价金属离子 Mg^{2+} 结合来促进异戊二烯焦磷酸基团的电离进而形成碳正离子中间体, 由于在不同的碳正离子中间体形成后其键重排具有随机性, 所以使用单个酶作用于单一底物时通常

会有多种产物^[25]。*CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 总共催化 GPP 和 FPP 产生 19 种产物, 其中, 芳樟醇、姜烯和倍半水芹烯是神农香菊挥发油的主要组成成分^[6, 26]。 β -倍半水芹烯是神农香菊的特征香气成分, 姜烯和 γ -松油烯为香菊的特征香气兼主体香气成分^[7]。这些挥发性萜类产物具备重要的生态作用, 如姜烯能够提高植物对于烟粉虱和节肢动物的抗性^[27]。另外, 芳樟醇、4-松油醇、和姜烯等产物具有抗氧化、抗菌、抗炎和抗癌等多种活性^[28-31], 可能是神农香菊精油活性成分的重要来源。

总之, 本研究首次克隆并初步解析了神农香菊 *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 基因的功能; 与之前报道的神农香菊 TPS 相比, *CiaTPS1* 和 *CiaTPS2* 展现出更为丰富的功能特性。相关结果为深入揭示神农香菊的芳香和活性成分形成的分子机制研究奠定了基础, 并为芳香菊品种的培育提供了新的基因资源。然而, 由于原核表达系统缺失了真核细胞中关键的蛋白质折叠和后修饰步骤, 例如糖基化和磷酸化等, 所表达的蛋白在天然构象和功能上可能与植物体内实际情况有所偏差, 后续可采用酵母和烟草系统进一步确定其功能。

参考文献:

- [1] 刘启宏, 张红旗, 贾卫疆, 杨笃厚. 湖北新资源植物——神农香菊的地理分布、生态习性与蕴藏量的调查研究 [J]. 武汉植物学研究, 1983 (2): 239-245.
Liu QH, Zhang HQ, Jia WJ, Yang DH. The investigation on geographical distribution, ecological, habit and storage quantity on a new resource plant of Hubei, *Dendranthema indicum* (L.) Des Monl. var. *aromaticum* [J]. *Plant Science Journal*, 1983 (2): 239-245.
- [2] 石世贵. 药用植物新资源——神农香菊 [J]. 植物杂志, 1994 (3): 20-21.
- [3] 张博雅. 神农香菊叶精油提取及对镰刀菌的抑制活性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021: 34-40.
- [4] 冯颖, 李彬, 周春苗, 叶利春, 卢山, 刘义飞. 神农香菊茎叶总黄酮与总酚的提取纯化和抗氧化活性研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24 (4): 1422-1432.
Feng Y, Li B, Zhou CM, Ye LC, Lu S, Liu YF. Extraction and purification of total flavonoids and total phenols from stems and leaves of *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* and study of antioxidant activity [J]. *Modernization*

- of *Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2022, 24 (4): 1422–1432.
- [5] 阮文静, 赵耀鑫, 周捷, 马国飞, 赵玲. 神农香菊茎叶废弃物中多糖与总黄酮的含量测定和抗氧化活性研究 [J]. 武汉轻工大学学报, 2020, 39 (4): 9–14.
- Ruan WJ, Zhao YX, Zhou J, Ma GF, Zhao L. Study on the content determinations and antioxidant activities of polysaccharides and flavonoids from the waste stem and leaf portions of *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*[J]. *Journal of Wuhan Polytechnic University*, 2020, 39 (4): 9–14.
- [6] Feng Y, Li B, Hu J, Liu W, Tian XF, et al. Sustainable use of *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* as value-added green materials in microemulsion hydrogels[J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2023, 11 (9): 3820–3831.
- [7] Gao WJ, Zhang XY, Qiang WY, Kou XR, Chen F, et al. Differences in volatile composition and expression of genes involved in terpenoids biosynthesis in *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*[J]. *Sci Hort*, 2024, 337: 113461.
- [8] Feng LF, Lin Y, Cai YJ, Wei WK, Yang JF, et al. Terpenoid VOC profiles and functional characterization of terpene synthases in diploid and tetraploid cytotypes of *Chrysanthemum indicum* L.[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2023, 200: 107766.
- [9] Mercke P, Bengtsson M, Bouwmeester HJ, Posthumus MA, Brodelius PE. Molecular cloning, expression, and characterization of amorpha-4, 11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 381 (2): 173–180.
- [10] Chen HY, Guo MX, Dong ST, Wu XL, Zhang GB, et al. A chromosome-scale genome assembly of *Artemisia argyi* reveals unbiased subgenome evolution and key contributions of gene duplication to volatile terpenoid diversity[J]. *Plant Commun*, 2023, 4 (3): 100516.
- [11] Yang SM, Chu HY, Wang YX, Guo BL, An TY, Shen Q. Analysis of monoterpene biosynthesis and functional TPSs of *Perilla frutescens* based on transcriptome and metabolome[J]. *Med Plant Biol*, 2024, 3: e017.
- [12] Li CY, Yang L, Liu Y, Xu ZG, Gao J, et al. The sage genome provides insight into the evolutionary dynamics of diterpene biosynthesis gene cluster in plants[J]. *Cell Rep*, 2022, 40 (7): 111236.
- [13] Forman V, Luo D, Geu-Flores F, Lemcke R, Nelson DR, et al. A gene cluster in *Ginkgo biloba* encodes unique multi-functional cytochrome P450s that initiate ginkgolide biosynthesis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 5143.
- [14] Tong YR, Hu TY, Tu LC, Chen K, Liu TZ, et al. Functional characterization and substrate promiscuity of sesquiterpene synthases from *Tripterygium wilfordii*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 185: 949–958.
- [15] Liu Y, Ji WY, Wang X, Xia B, He M, Zhou YW. Identification and functional characterization of a new terpene synthase gene from *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum*[J]. *Hortic Sci*, 2023, 50 (1): 61–71.
- [16] 张凌宇. 神农香菊倍半萜合成酶 TPS 基因的筛选及功能解析 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023: 37-46.
- [17] Zhong J, Chen YY, Shi HJ, Zhou TJ, Wang C, et al. Identification and functional analysis of terpene synthases revealing the secrets of aroma formation in *Chrysanthemum aromaticum*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 279 (Pt 3): 135377.
- [18] Jia QD, Brown R, Köllner TG, Fu JY, Chen XL, et al. Origin and early evolution of the plant terpene synthase family[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119 (15): e2100361119.
- [19] Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom[J]. *Plant J*, 2011, 66 (1): 212–229.
- [20] Ling CC, Zheng LJ, Yu XR, Wang HH, Wang CX, et al. Cloning and functional analysis of three aphid alarm pheromone genes from German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) [J]. *Plant Sci*, 2020, 294: 110463.
- [21] Liu W, Zhang ZQ, Wu YC, Zhang YZ, Li XN, et al. Terpene synthases GhTPS6 and GhTPS47 participate in resistance to *Verticillium dahliae* in upland cotton[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2024, 213: 108798.
- [22] Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E, Bar E, Iijima Y, Pichersky E, Sitrit Y. Overexpression of the lemon basil α -zingiberene synthase gene increases both mono- and sesquiterpene contents in tomato fruit[J]. *Plant J*, 2008, 56 (2): 228–238.
- [23] Lynch M, Conery JS. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes[J]. *Science*, 2000, 290 (5494): 1151–1155.
- [24] Han X, Zhang JH, Han S, Chong SL, Meng GL, et al. The chromosome-scale genome of *Phoebe bournei* reveals contrasting fates of terpene synthase (TPS) -a and TPS-b subfamilies[J]. *Plant Commun*, 2022, 3 (6): 100410.
- [25] Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70 (15-16): 1621–1637.
- [26] 芦金清, 李竣. 神农香菊的挥发油化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (8): 598–599.

- Lu JQ, Li J. Chemical constituents in volatile oil from the flos of *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2002, 27 (8): 598-599.
- [27] Glas JJ, Schimmel BCJ, Alba JM, Escobar-Bravo R, Schuurink RC, Kant MR. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13 (12): 17077-17103.
- [28] Seshadri VD, Oyouni AAA, Bawazir WM, Alsagaby SA, Alsharif KF, et al. Zingiberene exerts chemopreventive activity against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced breast cancer in Sprague-Dawley rats[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36 (10): e23146.
- [29] Li JW, Thangaiyan R, Govindasamy K, Wei JX. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effect of zingiberene on isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental animals[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40 (6): 915-927.
- [30] 姜冬梅, 朱源, 余江南, 徐希明. 芳樟醇药理作用及制剂研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (18): 3530-3533.
- Jiang DM, Zhu Y, Yu JN, Xu XM. Advances in research of pharmacological effects and formulation studies of linalool[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40 (18): 3530-3533.
- [31] 杜清, 钟雨樨, 杨明, 陈蕾, 曾慧敏, 等. 松油烯-4-醇的药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (14): 265-271.
- Du Q, Zhong YX, Yang M, Chen L, Zeng HM, et al. Progress on pharmacological effect of terpinen-4-ol: a review[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2023, 29 (14): 265-271.

(责任编辑: 周媛)