

忽地笑*LaABCG3*转运蛋白基因的克隆与表达分析

韩小康, 王蓉, 刘彦彤, 夏冰, 汪仁*

江苏省中国科学院植物研究所, 南京210014

摘要: 石蒜科植物体内的生物碱具有重要的药用价值, 尽管部分生物碱的生物合成途径已被发现, 但与其相关的转运机制尚未报道。本研究在忽地笑(*Lycoris aurea*)经茉莉酸甲酯(MeJA)处理后的差异转录组测序数据的基础上, 发现了一个ABC转运蛋白基因, 并命名为*ABCG3*。采用cDNA末端快速扩增(RACE)技术克隆了该基因的编码区全长2 157 bp, 编码719个氨基酸, 包含6个跨膜结构域。*LaABCG3*的组织分布与生物碱积累组织相重合。此外, 在MeJA处理下, *LaABCG3*的表达量和石蒜科生物碱, 包括加兰他敏、石蒜碱、水仙环素的含量均受到显著诱导。本研究为探索忽地笑中石蒜科生物碱的转运和积累机制打下了基础。

关键词: 忽地笑; 基因克隆; ABC转运蛋白; 茉莉酸甲酯; 石蒜科生物碱

ABC (ATP-binding cassette)转运蛋白广泛存在于原核和真核生物中, 大部分ABC转运蛋白通过结合并水解ATP释放能量来调控物质跨膜转运。在植物中, ABC转运蛋白参与脂质分泌、激素转运、有毒物质富集、多重药物抗性、转运次生代谢产物等多种生理生化过程(Çakır和Kılıçkaya 2013)。ABC转运蛋白分为ABCA、ABCB、ABCC、ABCD、ABCE、ABCF、ABCG、ABCH八个亚家族(Verrier等2008)。其中, ABCG亚家族包括WBC (white-brown complex)和PDR (pleiotropic drug resistance)两个分支。

近年来, 对ABCG转运蛋白的研究不断深入, 发现该转运蛋白具有多种生理生化功能, 除了转运抗生素、金属离子、植物激素、除草剂、木质素、脂质之外, 还参与对次生代谢产物的转运。植物次生代谢产物通常具有较高的生物活性, 其中生物碱是次生代谢产物的一种, 植物合成生物碱以抵御病虫害、食草动物啃食以及其他非生物胁迫(张明菊等2015)。生物碱的合成及储存都在相应的组织部位, 其中往往牵涉到由源到库的运输过程, 因此研究生物碱在植物体内的转运机制具有重要意义。研究表明, ABC转运蛋白在植物生物碱转运方面行使重要功能。*CrTPT2*基因是从长春花(*Catharanthus roseus*)叶中克隆的ABCG类转运蛋白基因, 在叶片表皮细胞中表达丰度最高, 在长春碱(catharanthine)处理后的叶中, *CrTPT2*的表达量升高; 当*CrTPT2*基因沉默后, 其转录水平下降60%, 同时叶片中的长春碱含量下降了25%。这表明*CrTPT2*蛋白参与长春碱转运的过程(Yu和De

Luca 2013)。此外, 烟草(*Nicotiana tabacum*)中的*NtWBC13*转运蛋白被发现具有转运烟碱(nicotine)的功能, 将*NtWBC13*基因在酵母表达系统中异源表达, 与对照相比, 转*NtWBC13*基因酵母菌株有更强的烟碱积累能力; 用RNAi沉默烟草中的*NtWBC13*基因后, 发现根中的烟碱积累减少(谢小东2014)。

石蒜科(Amaryllidaceae)生物碱包括加兰他敏(galanthamine)、石蒜碱(lycorine)、水仙环素(narciclasine)等。石蒜碱已经被证明能够抑制白细胞HL-60、KM3、Mcl-1的生长(Li等2007; Liu等2004, 2009), 所以石蒜碱有望成为治疗白血病的有效药物; 加兰他敏能够抑制乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性, 并且已经被用于治疗重症肌无力、小儿麻痹后遗症、青光眼、阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)(Ptak等2017); 水仙环素具有强氧化性和抗肿瘤活性(Kornienko和Evidente 2008)。忽地笑(*Lycoris aurea*)是石蒜科石蒜属的多年生草本植物, 忽地笑中的生物碱含量丰富, 然而这些生物碱在石蒜科植物体内的转运机制还未见报道。

本研究是在前期茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理的差异转录组测序的基础上, 从上调表

收稿 2017-11-01 修定 2018-03-20

资助 国家自然科学基金(31700271和31600074)、江苏省自然科学基金(BK20170617)、江苏省省属公益院所科研条件与能力建设项目(BM2015019)、海洋公益性行业科研专项(201505023)。

* 通讯作者(jswangren@aliyun.com)。

达的10个ABC转运蛋白基因(Wang等2017)中,选取了与石蒜科生物碱组织分布相一致的*LaABCG3*基因为研究对象,并通过cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆了*LaABCG3*基因的全长。经生物信息学分析预测*LaABCG3*蛋白的三级结构和跨膜结构域。通过荧光定量PCR确定*LaABCG3*的组织表达特异性。此外,还检测了经MeJA处理后忽地笑叶片中*LaABCG3*的表达量变化和3种石蒜科生物碱含量的变化。本实验为后续研究石蒜科生物碱的转运机制打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2016年8月中旬,在江苏省中国科学院植物研究所药用植物资源苗圃采集忽地笑[*Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.]的花和花葶;2016年10月,在同一地点采集根、鳞茎、种子、叶。将部分成熟种子种植于蛭石中,并用1/2MS溶液浇灌,在光照培养箱中繁育忽地笑种子苗。培养条件设置为16 h (22°C)光照培养和8 h (20°C)暗培养,每个月换一次蛭石。最终将生长8个月的忽地笑种子苗用于处理实验。

大肠杆菌菌株TOP10为本实验室保存;SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit购自Clontech公司;T4 DNA连接酶、pMD19-T载体、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix染料法荧光定量PCR试剂盒、Trizol、ExTaq mixture、DL2000 DNA Marker购自南京诺唯赞生物科技有限公司;AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒购于天津子涵生物科技有限公司。引物合成与测序均由上海生工生物技术有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA提取

称取新鲜组织100 mg,在液氮中充分研磨,加入1 mL Trizol震荡混匀,室温放置5 min;加200 μ L 氯仿,震荡15 s,放置5 min,13 684 \times g离心10 min;取上层水相400 μ L,加等体积异丙醇颠倒混匀,静置10 min,13 684 \times g离心10 min;去上清,加1 mL75%

乙醇洗涤沉淀,13 684 \times g离心10 min,去除上清;待管内液体挥发完全,加入30 μ L RNase-free水溶解沉淀,最后通过1%琼脂糖凝胶电泳,观察RNA的条带状态,并通过紫外分光光度计检测RNA的质量。

1.2.2 RACE克隆基因全长

根据已知片段(755 bp),分别向两端设计了5'-RACE和3'-RACE扩增引物(表1)。PCR扩增体系总体积为25 μ L,其中含2 \times ExTaq mix 12.5 μ L、cDNA 1 μ L、上下游引物各1 μ L (10 μ mol \cdot L⁻¹)、ddH₂O 9.5 μ L。PCR程序为:95°C预变性5 min;95°C变性30 s、56°C退火30 s、72°C延伸90 s,共30个循环;72°C延伸10 min。4°C下保存。反应结束后用1%琼脂糖凝胶电泳,通过AxyPrep DNA胶回收试剂盒回收扩增条带,将回收到的条带连接到pMD19-T载体上,后转入TOP10大肠杆菌感受态细胞,挑取单克隆菌落PCR验证,将验证成功的单菌落扩大培养并送测序。

1.2.3 生物信息学分析

通过NCBI网站中的BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序进行氨基酸序列比对,确定目的基因;通过ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)确定开放阅读框,预测目的基因的氨基酸序列;通过BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行氨基酸序列比对分析;用MEGA 7软件中的neighbor-joining (NJ)法构建系统进化树;通过DNAMAN软件进行同源序列比对,确定保守区域;通过ExPASy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)在线预测蛋白的理化性质;SOPMA在线软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)预测蛋白的二级结构;SWISS (<https://www.swissmodel.expasy.org/interactive/yhanFW/models/>)模拟蛋白的三级结构;利用TMHMM在线分析(<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=59DEC6E2000017BC4F-C37F62&wait=20>)预测蛋白的跨膜结构域。

1.2.4 组织定量

根据PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (perfect real time)反转录试剂盒说明书,首先对提取的RNA去DNA,然后通过反转录酶将其反转录为cDNA。并以cDNA作为实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)的模板。忽

表1 引物汇总

Table 1 Primer summarization

名称	序列(5'→3')	用途
LaABCG3-146	CGAGTTGCTTCCCTAGCCCTTCCCTTAC	5'-RACE
LaABCG3-156	CACTGCAATTCGAGTTGCATCCCTAGCC	5'-RACE
LaABCG3-561	GTGCCTACTGGCGAACGGAAGGTCTAATG	3'-RACE
LaABCG3-683	GGATTTCGATATGACCTTCCCTCAGCCCGT	3'-RACE
LaABCG3-F	TATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGC	克隆全长
LaABCG3-R	GGAACAACATTTTCCACTTTAAC	克隆全长
LaABCG3-RT-F	ACTGGCGAACGAAGGTCTAA	荧光定量PCR
LaABCG3-RT-R	CAACCGCAAATGATGTCCCA	荧光定量PCR
LaTIP41F	GCAACCATCCAAAGTTAACTGCT	荧光定量PCR内参
LaTIP41R	AATGTGCAAGCAGGGCTAGTAA	荧光定量PCR内参

地笑*TIP41*基因作为内参(Ma等2016)。qRT-PCR反应体系总体积为20 μL , 包括AceQ qPCR SYBR[®] Green Master Mix 10 μL 、上下游引物(表1)各0.5 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、模板2 μL 、灭菌蒸馏水7 μL 。每个样品设3次重复。荧光定量PCR扩增程序: 95°C预变性5 min; 95°C变性15 s、56°C退火15 s、72°C延伸20 s, 40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

1.2.5 MeJA处理及基因表达情况检测

MeJA用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)助溶, 溶于去离子水使终浓度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 对照为等量DMSO水溶液。取生长状态一致的种子苗进行水培处理, 分别处理0、6、12、24 h, 每个时间点的处理与对照各设置3次重复。

处理完成后, 分别提取处理与对照忽地笑种子苗叶中RNA, 提取方法同1.2.1, 反转录与定量方法同1.2.4, 引物见表1。通过计算各时间点处理与对照相对表达量的比值, 最终得到不同时间点基因的表达情况。

1.2.6 生物碱的萃取与检测

称取5 g忽地笑叶片, 充分研磨, 用5 mL甲醇萃取24 h, 期间超声3次, 每次30 min (Tian等2016)。将萃取液用0.22 μm 有机滤膜过滤后进行液相色谱(日本岛津, LC-20AT)检测。色谱柱为反向色谱柱 InertSustain C18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm)。流动相A为0.1%正二丁胺水溶液, 流动相B为乙腈。梯度程序为: 0~60 min, 5% B~50% B; 60~70 min, 50% B~100% B; 100% B 10 min; 80~85 min, 100% B~5% B; 5% B 10 min。流速为0.8 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温箱35°C; 分析波长290 nm。

1.3 数据统计与分析

数据差异显著性分析采用软件SPSS ver 17.0。

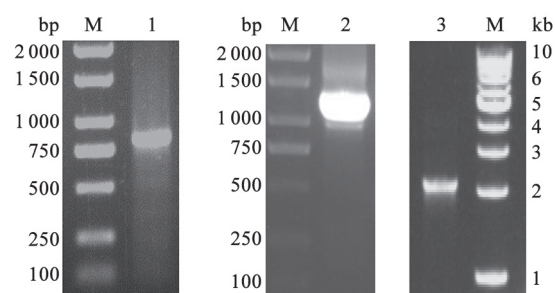
2 实验结果

2.1 *LaABCG3*全长克隆

通过RACE克隆技术, 克隆了目的基因的5'端1 138 bp片段和3'端803 bp片段, 根据拼接序列, 设计引物得到一条长度为2 895 bp的序列, 通过ORF finder在线分析其开放阅读框(open reading frame, ORF)全长为2 157 bp, 编码719个氨基酸, 设计全长引物, 扩增得到ORF全长(图1), 经测序发现与拼接序列一致。

2.2 系统进化树与同源序列比对分析

将本实验克隆的基因所编码的氨基酸序列与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的部分序列进行比对, 发现与AtABCG3同源性最高, 达到89.04%, 因此, 将该基因命名为*LaABCG3*。*LaABCG3*与AtABCG23聚为一支, 与其他拟南芥ABCG家族同源性不等(图2)。GenBank登陆号为MG733340。

图1 *LaABCG3*基因全长克隆Fig.1 Full-length cloning of *LaABCG3* gene

M: DNA marker; 1: 3'-RACE; 2: 5'-RACE; 3: ORF全长。

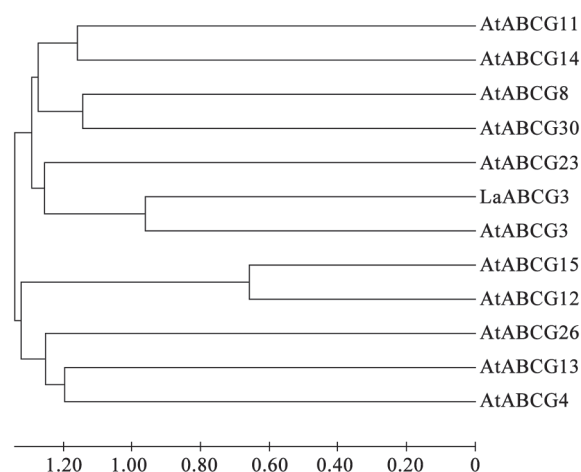


图2 忽地笑ABCG3和拟南芥ABCG家族的系统进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of ABCG3 from *L. aurea* and several ABCG proteins from *A. thaliana*

通过BLASTp在NCBI数据库中找到与LaABCG3氨基酸序列同源性较高的其他物种的ABCG3氨基酸序列, 结果发现LaABCG3与芝麻(*Sesamum indicum*) XP_020552601.1、葡萄(*Vitis vinifera*) APP-91577.1、拟南芥OAP10645.1、木豆(*Cajanus cajan*) XP_020231002.1、藜麦(*Chenopodium quinoa*) XP_021732333.1、铁皮石斛(*Dendrobium officinale*) XP_020702001.1、麻疯树(*Jatropha curcas*) XP_012064734.1的同源性达到72%~90% (图3)。

2.3 LaABCG3的三级结构、跨膜区域及功能位点预测

通过ExPASy分析LaABCG3蛋白的相对分子质量为80.12 kDa, 等电点为8.91。利用SOPMA在线软件预测的二级结构显示: 在该基因编码的氨基酸序列中, 289个氨基酸组成40.19%的 α -螺旋, 203个氨基酸组成28.23%的无规则卷曲, 158个氨基酸组成21.97%的延伸链, 69个氨基酸组成9.60%的 β -转角。通过SWISS在线预测软件, 发现PDB数据库中的ABCG5与LaABCG3氨基酸序列的同源性为32.28%, 以该蛋白结构为模板, 建模得到了LaABCG3的三级结构(图4-A)。

通过TMHMM分析LaABCG3蛋白的跨膜结构域, 结果显示: 氨基酸1~453、506~534、587~589、706~719在膜外; 氨基酸477~482、558~563、613~682在膜内; 氨基酸454~476、483~

505、535~557、564~586、590~612、683~705为跨膜区域(图4-B)。

2.4 LaABCG3的表达特性分析

用qRT-PCR检测LaABCG3基因在不同组织中的表达丰度, 结果显示LaABCG3在花瓣、子房、花萼、种子、叶、鳞茎、根中均有表达, 且在花瓣、子房、花萼、种子中相对表达量较高, 其中在花瓣中相对表达量最高, 而在根中相对表达量最低(图5-A), 表明LaABCG3基因在忽地笑中具有组织特异性。

用100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA处理忽地笑种子苗, 在处理6、12、24 h时分别检测处理和对照叶中LaABCG3的相对表达量, 以对照LaABCG3的表达量作为基础表达水平。结果显示: MeJA处理6和12 h后, LaABCG3基因的表达量升高, 分别是处理0 h的4.97和3.54倍, 而MeJA处理24 h时, LaABCG3基因的表达量则恢复到0 h的表达水平(图5-B)。

2.5 MeJA处理条件下生物碱含量的变化

用100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA处理忽地笑幼苗, 以甲醇萃取叶片中的生物碱, 通过高效液相色谱检测萃取液。结果发现在MeJA处理6 h后, 叶片中水仙环素含量为125.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 比对照含量略高; 处理12 h后, 水仙环素含量增加到241.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 约为对照的2倍; 处理24 h后, 水仙环素的含量降到95.14 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 低于对照水平(图6-A)。处理6 h石蒜碱含量为30.47 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 与对照组含量相当; 处理12和24 h后, 石蒜碱含量分别为51.10和49.56 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 均显著高于对照(图6-B)。处理6和12 h后, 加兰他敏含量分别为69.53和79.24 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 均与其对照无显著差异, 而处理24 h后加兰他敏含量上升为104.47 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW), 与对照相比有25%的增长(图6-C)。

3 讨论

加兰他敏是一种异喹啉类生物碱, 来源于石蒜科植物, 作为乙酰胆碱酯酶抑制剂, 被广泛用于预防和治疗轻中度阿尔兹海默氏病, 并已在全球69个国家获准销售。目前加兰他敏主要从石蒜科植物中提取, 但其在植物体内含量非常低, 约占每克植物干重的0.08%, 导致供求关系日益严峻(Ptak等2017)。因此, 国内外许多学者对加兰他敏的生

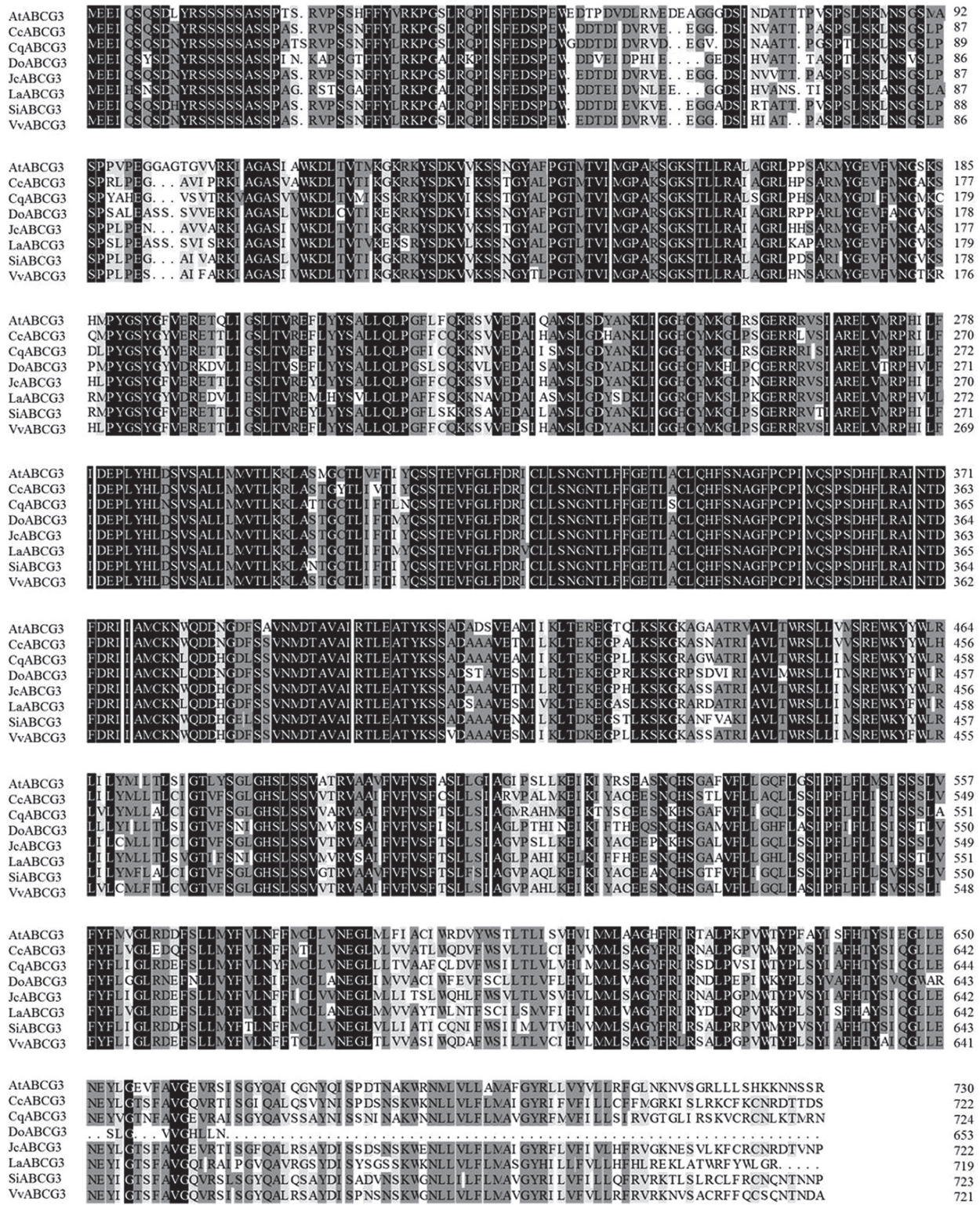


图3 *LaABCG3*与其他植物ABCG3蛋白氨基酸序列的多重比对

Fig.3 Amino acid sequence comparison between *LaABCG3* and other plant ABCG3 proteins

LaABCG3: 忽地笑MG733340; *SiABCG3*: 芝麻XP_020552601.1; *VvABCG3*: 葡萄APP91577.1; *AtABCG3*: 拟南芥OAP10645.1; *CcABCG3*: 木豆XP_020231002.1; *CqABCG3*: 藜麦XP_021732333.1; *DoABCG3*: 铁皮石斛XP_020702001.1; *JcABCG3*: 麻疯树XP_012064734.1.

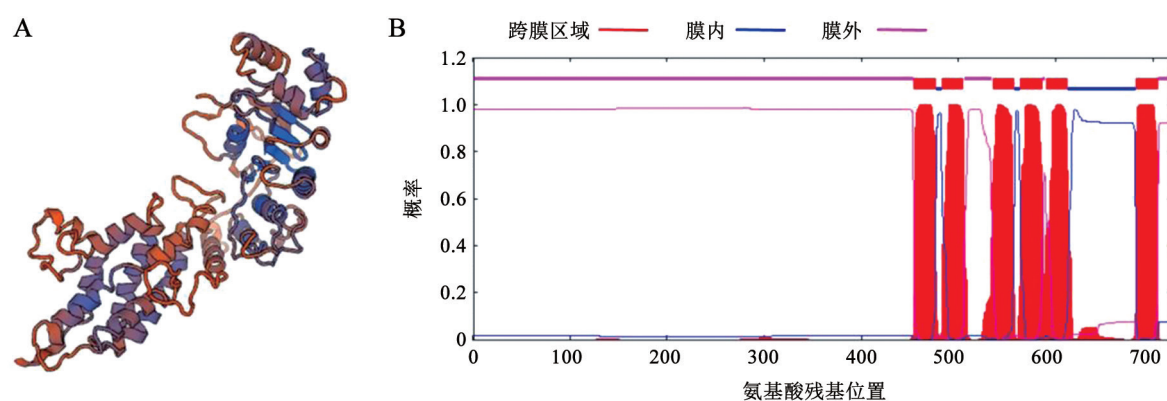
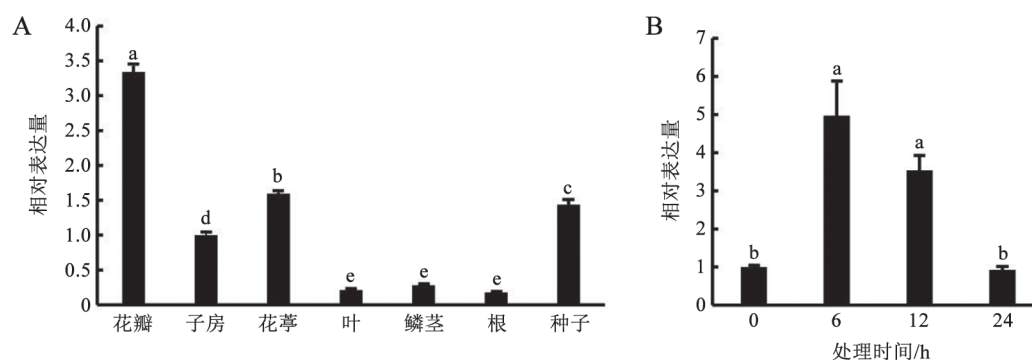


图4 LaABCG3的同源建模三级结构(A)和跨膜结构域预测(B)

Fig.4 Tertiary structure homology-modeling (A) and transmembrane domains (B) of LaABCG3

图5 *LaABCG3*基因的组织表达特异性(A)和MeJA处理下不同时间的*LaABCG3*相对表达量(B)Fig.5 The expression pattern of *LaABCG3* gene in different tissues (A) and the relative expression levels of*LaABCG3* at different time under MeJA treatment (B)柱状图上的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); 图6同此。

物合成途径进行了研究, 加兰他敏的生物合成途径现已基本明确, 多个参与其生物合成的关键酶基因已被克隆, 通过分析加兰他敏合成途径中相关酶基因的组织表达特异性发现, 加兰他敏的主要合成部位是鳞茎(Kilgore等2014, 2016)。然而, 根据我们前期的研究结果发现, 加兰他敏主要积累在鳞茎、种子以及花序等组织中(Mu等2010)。这表明在忽地笑体内可能存在一条运输途径, 将加兰他敏由合成组织转移到储存组织。对加兰他敏在忽地笑组织器官与细胞中的定位发现, 加兰他敏主要分布在维管组织中的韧皮部与导管壁中, 且在花和根中有较高的含量, 由此提出生物碱通过维管组织定向运输的理论; 在细胞水平上, 为了减少对细胞的毒性作用, 加兰他敏则主要积累在液泡和细胞壁中(王晓燕等2007)。由此推断, 转

运蛋白在加兰他敏组织间的长距离运输、胞内的区隔和胞间的跨膜转运等过程中承担了重要的作用。

ABC转运蛋白在植物次生代谢产物的转运过程中扮演着重要的角色。1992年植物中的ABC转运蛋白被首次报道, 拟南芥中共有131个ABC转运蛋白基因, 其中ABCG家族最大, 有44个成员(王晓珠等2017)。ABC转运蛋白通常包含两部分: 核苷酸结合域(nucleotide-binding domain, NBD)结合并水解ATP, 为跨膜转运提供能量; 跨膜结构域(transmembrane domain, TMD), 是具有疏水性的非保守结构域, 主要由4~6个 α -螺旋组成跨膜通道, 能够特异性识别底物(Sánchez-Fernández等2001)。植物ABC转运蛋白已经被证实广泛参与植物次生代谢产物的跨膜转运以及长距离运输(Hwang等2016;

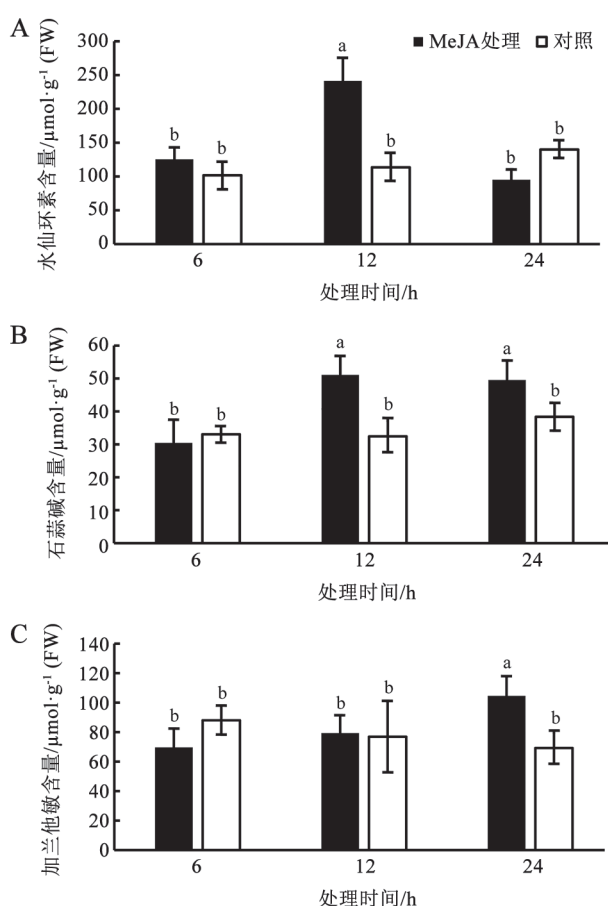


图6 MeJA处理后忽地笑叶片中水仙环素(A)、石蒜碱(B)以及加兰他敏(C)含量的变化

Fig.6 Narciclasine (A), lycorine (B) and galanthamine (C) contents in leaves of *L. aurea* seedlings under MeJA treatment

Li等2017; Yu和De Luca 2013)。其中ABCG类转运蛋白底物类型广泛,参与叶片角质蜡质的转运(Bird等2007)、绒毛层细胞脂类的转运(Zhu等2013)、吲哚类生物碱的转运(Demessie等2017)、萜类物质的转运(Crouzet等2013)。

基因的组织分布特性和其承担的生物学功能有密切的联系。Yu和De Luca (2013)通过分析长春花转运蛋白基因的组织表达特异性,并结合长春碱的组织特异性分布,成功定位到CrTPT2转运蛋白,证明该蛋白参与了长春碱由胞内向胞外分泌的过程。本研究基于前期MeJA处理下的差异转录组数据、候选基因的组织分布、加兰他敏的组织特异积累的特性筛选到转运蛋白LaABCG3。LaABCG3在生殖器官中有较高的表达量(图5-A),这同石蒜科植物生物碱的积累组织相吻合(Mu等

2010)。我们将LaABCG3作为参与石蒜科生物碱运输的候选蛋白。

MeJA在多数研究中作为次生代谢物合成表达的信号分子。MeJA处理雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)毛状根,结果发现在处理24 h内TwMDR基因的相对表达量在6 h达到最高,同时促进了雷公藤毛状根外排雷公藤碱(Miao等2017);此外,MeJA处理能够明显提高中国石蒜(*Lycoris chinensis*)体内生物碱的含量(Mu等2009)。本实验通过MeJA处理忽地笑种子苗,LaABCG3基因的表达量对MeJA的处理有显著响应,在处理24 h中其表达量呈现显著上升又下降到0 h水平的趋势(图5-B)。与此同时,植株体内的加兰他敏、水仙环素、石蒜碱的含量在MeJA处理后同样有显著变化。其中,加兰他敏和石蒜碱的含量明显上升,而水仙环素的含量在MeJA处理12 h处就出现快速的上升,而在24 h时有所降低(图6)。

转运蛋白基因的表达量与其底物在植物体内的含量有显著相关性。CrTPT2转运蛋白在长春花中能够将长春碱由胞内排到胞外,CrTPT2基因的表达量不仅受长春碱的诱导,而且会影响长春碱的含量,当CrTPT2的表达量被干扰降低60%时,导致长春碱在胞内积累,并对其合成通路产生反馈抑制,最终导致长春碱的含量降低(Yu和De Luca 2013)。在黄连(*Coptis japonica*)中,转运蛋白CjMDR1参与了小檗碱(berberine)由胞外到胞内的转运过程,CjMDR1组织定位于木质部,能够将木质部运输系统中的小檗碱转运到块状茎木质部细胞中,以此来完成小檗碱在块状茎中的积累,当CjMDR1基因被抑制表达后,转基因植株块状茎中小檗碱的含量明显降低(Shitan等2003, 2005)。结合我们的结果,LaABCG3的表达量和加兰他敏等生物碱的体内含量呈现相关性,由此推断LaABCG3有可能在加兰他敏或者其他石蒜科生物碱的转运和积累过程中起到一定的作用。

本研究基于前期差异转录组测序的结果,克隆了LaABCG3基因,通过生物信息学分析,明确了LaABCG3转运蛋白的分子进化关系和蛋白结构特点,并研究了LaABCG3基因的组织特异性表达以及石蒜科生物碱对MeJA的响应情况,为进一步探讨忽地笑生物碱跨膜运输和积累机制提供了有价值的参考。

参考文献(References)

- Bird D, Beisson F, Brigham A, et al (2007). Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J*, 52: 485–498
- Çakır B, Kılıçkaya O (2013). Whole-genome survey of the putative ATP-binding cassette transporter family genes in *Vitis vinifera*. *PLoS ONE*, 8: e78860
- Crouzet J, Roland J, Peeters E, et al (2013). NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport. *Plant Mol Biol*, 82 (1-2): 181–192
- Demessie Z, Woolfson KN, Yu F, et al (2017). The ATP binding cassette transporter, VmTPT2/VmABCG1, is involved in export of the monoterpene indole alkaloid, vincamine in *Vinca minor* leaves. *Phytochemistry*, 140: 118–124
- Hwang J, Song W, Hong D, et al (2016). Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle. *Mol Plant*, 9 (3): 338–355
- Kilgore MB, Augustin MM, May GD, et al (2016). CYP96T1 of *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus* catalyzes formation of the para-para' C-C phenol couple in the Amaryllidaceae alkaloids. *Front Plant Sci*, 7: 225
- Kilgore MB, Augustin MM, Starks CM, et al (2014). Cloning and characterization of a norbelladine 4'-O-methyltransferase involved in the biosynthesis of the Alzheimer's drug galanthamine in *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus*. *PLoS ONE*, 9: e103223
- Kornienko A, Evidente A (2008). Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem Rev*, 108 (6): 1982–2014
- Li QQ, Zheng J, Li SZ, et al (2017). Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-isoleucine is essential for jasmonate signaling. *Mol Plant*, 10 (5): 695–708
- Li Y, Liu J, Tang LJ, et al (2007). Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncol Rep*, 17 (2): 377–384
- Liu J, Hu WX, He LF, et al (2004). Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS Lett*, 578 (3): 245–250
- Liu XS, Jiang JK, Jiao XY, et al (2009). Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells. *Cancer Lett*, 274 (1): 16–24
- Ma R, Xu S, Zhao YC, et al (2016). Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Lycoris aurea*. *Front Plant Sci*, 7: 536
- Miao GP, Han J, Zhang JF, et al (2017). A MDR transporter contributes to the different extracellular production of sesquiterpene pyridine alkaloids between adventitious root and hairy root liquid cultures of *Tripterygium wilfordii* Hook.f.. *Plant Mol Biol*, 95 (1-2): 51–62
- Mu HM, Wang R, Li XD, et al (2009). Effect of abiotic and biotic elicitors on growth and alkaloid accumulation of *Lycoris chinensis* seedlings. *Z Naturforsch C*, 64 (7-8): 541–550
- Mu HM, Wang R, Li XD, et al (2010). Alkaloid accumulation in different parts and ages of *Lycoris chinensis*. *Z Naturforsch C*, 65 (7-8): 458–462
- Ptak A, Morańska E, Saliba S (2017). Elicitation of galanthamine and lycorine biosynthesis by *Leucojum aestivum* L. and *L. aestivum* 'Gravety Giant' plants cultured in bioreactor RITA®. *Plant Cell Tiss Org*, 128 (2): 335–345
- Sánchez-Fernández R, Davies TGE, Coleman JOD, et al (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem*, 276 (32): 30231–30244
- Shitan N, Bazin I, Dan K, et al (2003). Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (2): 751–756
- Shitan N, Kiuchi F, Sato F, et al (2005). Establishment of *Rhizobium*-mediated transformation of *Coptis japonica* and molecular analyses of transgenic plants. *Plant Biol*, 22 (2): 113–118
- Tian CL, Wang P, Qin JX, et al (2016). Enzyme-assisted extraction and enrichment of galanthamine from *Lycoris aurea*. *Chin Herb Med*, 8 (2): 182–188
- Verrier PJ, Bird D, Burla B, et al (2008). Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci*, 13 (4): 151–159
- Wang R, Xu S, Wang N, et al (2017). Transcriptome analysis of secondary metabolism pathway, transcription factors, and transporters in response to methyl jasmonate in *Lycoris aurea*. *Front Plant Sci*, 7: 1971
- Wang XY, Wang PK, Huang MR, et al (2007). The localization of galanthamine in vegetative organ of *Lycoris aurea* Herb. *J Mol Cell Biol*, 40 (5): 339–345 (in Chinese with English abstract) [王晓燕, 王鹏凯, 黄敏仁等(2007). 加兰他敏在忽地笑营养器官中的定位. *分子细胞生物学报*, 40 (5): 339–345]
- Wang XZ, Sun WM, Ma YF, et al (2017). Research progress of ABC transporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol J*, 53 (2): 133–144 (in Chinese with English abstract) [王晓珠, 孙万梅, 马义峰等(2017). 拟南芥ABC转运蛋白研究进展. *植物生理学报*, 53 (2): 133–144]
- Xie XD (2014). Identification and functional characterization of *Nicotiana tabacum* ABC transporters involved in the transport of secondary metabolites (dissertation). Chongqing: Chongqing University (in Chinese with English abstract) [谢小东(2014). 烟草ABC转运蛋白家族鉴定及次生代谢物质转运的功能研究(学位论文). 重庆: 重庆大学]

- Yu F, De Luca V (2013). ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus*. Proc Natl Acad Sci USA, 110 (39): 15830–15835
- Zhang MJ, Wang HM, Wang SZ, et al (2015). Research on the mechanism of plant defense against vascular pathogens. Plant Physiol J, 51 (5): 601–609 (in Chinese with English abstract) [张明菊, 王红梅, 王书珍等(2015). 植物对维管束病原菌的防卫反应机制研究进展. 植物生理学报, 51 (5): 601–609]
- Zhu L, Shi JX, Zhao GC, et al (2013). Post-meiotic deficient anther1 (PDA1) encodes an ABC transporter required for the development of anther cuticle and pollen exine in rice. J Plant Biol, 56 (1): 59–68

Cloning and expression analysis of *LaABCG3* transporter gene from *Lycoris aurea*

HAN Xiao-Kang, WANG Rong, LIU Yan-Tong, XIA Bing, WANG Ren*

Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract: Amaryllidaceae alkaloids have been reported to be of important medical value. Although the biosynthetic pathway of some Amaryllidaceae alkaloids had been described in plants, their transport mechanism has not been illuminated. Based on the comparative transcriptome sequencing data of *Lycoris aurea* in response to methyl jasmonate (MeJA) treatment, an ATP-binding cassette (ABC) transporter gene, named as *LaABCG3*, was isolated. By using rapid amplification of cDNA ends (RACE) method, we cloned its full-length cDNA containing a 2 157-bp open reading frame (ORF) encoding a protein of 719 amino acids with 6 transmembrane domains. The expression pattern of *LaABCG3* was consistent with the accumulation pattern of Amaryllidaceae alkaloids. Besides, under MeJA treatment, both the expression level of *LaABCG3* and the contents of some Amaryllidaceae alkaloids including galantamine, lycoramine and narciclasine were significantly induced. This study will provide a theoretical basis for investigating Amaryllidaceae alkaloid transport and accumulation mechanism in *L. aurea*.

Key words: *Lycoris aurea*; gene cloning; ABC transporters; methyl jasmonate; Amaryllidaceae alkaloids

Received 2017-11-01 Accepted 2018-03-20

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31700271 and 31600074), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20170617), the Jiangsu Provincial Public Institutions Program for Research Conditions and Building Capacity (BM2015019), and the Public Science and Technology Research Funds Projects of the Ocean (201505023).

*Corresponding author (jswangren@aliyun.com).