

苏文慧, 齐迎春, 张利超, 等. 过表达 *SdC2'H* 基因对防风毛状根香豆素含量的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2025, 46(5): 759-766.
SU Wenhui, QI Yingchun, ZHANG Lichao, et al. Effect of overexpressing *SdC2'H* gene on coumarin content in hairy root of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. [J]. Journal of South China Agricultural University, 2025, 46(5): 759-766.

过表达 *SdC2'H* 基因对防风毛状根香豆素含量的影响

苏文慧¹, 齐迎春², 张利超³, 崔 伟¹, 杜瑞云¹, 崔晶晶¹, 王云贺¹, 杨利民¹, 韩忠明^{1,4}

(1 吉林农业大学 中药材学院/吉林省生态系统与生态恢复重点实验室, 吉林 长春 130118; 2 第九六四医院, 吉林 长春 130062; 3 承德市中药材绿色生态种植技术服务中心, 河北 承德 067000; 4 吉林吉隆东北沙棘产业有限责任公司, 吉林 大安 131300)

摘要:【目的】建立过表达对香豆酰辅酶 A 2'-羟化酶 (*p*-Coumaroyl CoA 2'-hydroxylase, C2'H) 基因的防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 毛状根培养体系, 解析 *SdC2'H* 基因对香豆素生物合成的调控作用。【方法】克隆 *SdC2'H* 基因; 采用基因融合法构建过表达 *SdC2'H* 基因的植物双元表达载体; 通过发根农杆菌 K599 转化法诱导防风毛状根; 利用 RT-qPCR 分析 *SdC2'H* 基因的表达水平; 采用 HPLC 测定防风毛状根系中的香豆素含量。【结果】防风 *SdC2'H* 基因 (GenBank 登录号: PV169361) 的开放阅读框长度为 813 bp, 编码蛋白含 270 个氨基酸。*SdC2'H* 蛋白具有亲水性, 属于不稳定蛋白, 无信号肽, 且跨膜位于膜外。系统进化树显示 *SdC2'H* 蛋白与伞形科植物紫花前胡 *Angelica decursiva* 亲缘关系最近。过表达 *SdC2'H* 基因的防风毛状根系中, *SdC2'H* 基因的表达水平显著高于空白对照 ($P<0.0001$), 香豆素含量显著高于空白对照 ($P<0.001$) 和空载体阴性对照 ($P<0.01$), 表明过表达 *SdC2'H* 基因可以提高防风毛状根中香豆素的含量。【结论】本研究证实了 *SdC2'H* 基因对防风中香豆素生物合成的促进作用, 为解析 *SdC2'H* 基因在防风香豆素类化合物代谢过程中的作用提供了理论依据, 也为探究香豆素生物合成的分子调控网络奠定了研究基础。

关键词: 防风; 对香豆酰辅酶 A 2'-羟化酶基因; 基因过表达; 毛状根; 香豆素

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2025)05-0759-08

Effect of overexpressing *SdC2'H* gene on coumarin content in hairy root of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.

SU Wenhui¹, QI Yingchun², ZHANG Lichao³, CUI Yi¹, DU Ruiyun¹, CUI Jingjing¹,
WANG Yunhe¹, YANG Limin¹, HAN Zhongming^{1,4}

(1 College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University/Key Laboratory of Ecosystem and Ecological Restoration of Jilin Province, Changchun 130118, China; 2 The 964th Hospital, Changchun 130062, China; 3 Chengde Chinese Herbal Medicine Green and Ecological Planting Technical Service Center, Chengde 067000, China; 4 Jilin Jilong Northeast Seabuckthorn Industry Co., Ltd., Daan 131300, China)

Abstract: 【Objective】To establish *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. hairy root culture system overexpressing *p*-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase (C2'H) gene, and explore the regulatory role of *SdC2'H* gene

收稿日期: 2025-02-02 网络首发时间: 2025-07-14 13:21:00

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20250714.1124.002>

作者简介: 苏文慧, E-mail: 2075628041@qq.com; 通信作者: 韩忠明, 主要从事中药资源及其开发研究, E-mail: hanzm2008@126.com

基金项目: 中央财政林业科技推广示范项目 (JLT2025-21)

in coumarin biosynthesis. 【Method】 The *SdC2'H* gene was cloned. A plant binary expression vector overexpressing *SdC2'H* was constructed through gene fusion method. The *S. divaricata* hairy roots were induced by using *Agrobacterium rhizogenes* K599 transformation method. The expression level of *SdC2'H* gene was analyzed by using RT-qPCR. The coumarin content in the hairy roots of *S. divaricata* was determined by HPLC. 【Result】 The open reading frame of *S. divaricata* *SdC2'H* gene (GenBank accession number: PV169361) was 813 bp in length, and the gene encoded a 270-amino acid protein. The *SdC2'H* protein was a hydrophilic, unstable protein with no signal peptide and was located outside the membrane. The phylogenetic tree showed that the *SdC2'H* protein had the closest relationship with *Angelica decursiva*. In *S. divaricata* hairy roots overexpressing the *SdC2'H* gene, the expression level of *SdC2'H* was significantly elevated compared to blank control ($P<0.0001$), while the coumarin content markedly exceeded both the blank control ($P<0.001$) and the empty vector negative control ($P<0.01$). This indicated that overexpressing *SdC2'H* gene could improve coumarin content in hairy roots of *S. divaricata*. 【Conclusion】 This study confirms that *SdC2'H* gene can promote coumarin biosynthesis in *S. divaricata*, provides a theoretical basis for analyzing the role of *SdC2'H* gene in metabolism of coumarins, and lays a foundation for investigating molecular regulatory network of coumarin biosynthesis.

Key words: *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.; *p*-Coumaroyl CoA 2'-hydroxylase gene; Gene overexpression; Hairy root; Coumarin

防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 为伞形科多年生草本植物，主要分布在中国、韩国和日本^[1]，以未抽薹的干燥根入药^[2]。防风药用历史悠久，在中医临床实践中已有 2000 多年的历史，是我国传统中药材的重要组成部分，具有解表祛风、胜湿、止痛解痉的功效^[3]。现代研究表明防风中含有挥发油、色原酮、有机酸、香豆素以及多糖等多种类别的化学成分，其中，香豆素类是防风的主要药效成分之一，具有抗炎、抗病毒、抗菌、保护心脏、诱导癌细胞凋亡等药理作用^[4]。

香豆素类化合物通过苯丙烷途径产生，根据母核上的取代基及其位置的不同，可分为简单香豆素、呋喃香豆素和吡喃香豆素，具有多种生物活性；在香豆素合成通路中多数基因均是以基因家族的形式存在于植物中，对香豆酰辅酶 A 2'-羟化酶 (*p*-Coumaroyl CoA 2'-hydroxylase, C2'H) 参与香豆素合成，属于 2-氧代戊二酸依赖性双加氧酶 (2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase, 2OGD) 超家族^[5]。邻羟基化反应是香豆素生物合成的关键步骤，C2'H 通过催化对香豆酰辅酶 A 和阿魏酰辅酶 A 的邻位羟基化，生成伞形酮前体与东莨菪碱前体，最后通过自发或酶促环化形成香豆素核心骨架。目前，在拟南芥^[6]、甘薯^[7]、芸香^[8]、白花前胡^[9]等物种中发现 C2'H 对对香豆酰辅酶 A 和阿魏酰辅酶 A 这 2 种底物均具有高度特异性；然而，在防风中尚未克隆到 C2'H 基因。因此，本研究拟克隆防

风 *SdC2'H* 基因，解析其对香豆素生物合成的调控作用。

毛状根是发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 侵染植物受伤部位使植物表面产生的一种病理表现^[10]，具有遗传稳定、繁殖速度快、容易进行基因操作等优点。毛状根不仅是研究植物基因功能的良好遗传体系^[11]，还可以合成具植物特征的次生代谢产物，因此在药用植物研究方面，毛状根的培养技术受到诸多关注，在丹参^[12]、人参^[13]、长春花^[14]等药用植物中取得显著进展。近年来，很多学者利用毛状根培养体系在不同植物中进行基因功能研究。例如，在丹参毛状根中过表达 *SmSCR1* 基因显著提高毛状根中丹参酮的含量^[15]；在黄芩毛状根中过表达肉桂酸 4-羟化酶 (Cinnamate 4-hydroxylase, C4H) 和 4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (4-Coumaroyl coenzyme A ligase, 4CL) 基因显著增加毛状根中黄芩酮的含量^[16]；在何首乌毛状根中过表达 2 种尿苷二磷酸依赖性糖基转移酶 (Uridine-diphosphate-dependent glycosyltransferases, UGTs) 基因使毛状根中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 (2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxy stilbene-2-O-β-D-glucoside, THSG) 含量显著提高^[17]。而在防风毛状根中进行基因过表达功能验证的研究报道较少。本研究前期利用茉莉酸甲酯 (Methyl jasmonate, MeJA) 诱导的防风毛状根转录组测序数据^[18]筛选出香豆素生物合成途径的关键基因 C2'H，利用无缝克隆技术，构建

含有 *SdC2'H* 基因的过表达载体, 利用毛状根遗传转化体系开展 *SdC2'H* 基因功能研究, 解析该基因在防风香豆素生物合成中的作用, 为阐明香豆素生物合成的分子调控网络提供基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

植物 RNA 提取试剂盒 (货号: ZP405)、cDNA 合成试剂盒 (货号: AT311)、快速高保真 DNA 聚合酶 (货号: AS131)、同源重组无缝克隆试剂盒 (货号: CU201) 购于北京全式金生物科技有限公司; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (货号: B518131)、限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Bst*E II、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (货号: B518191)、植物 DNA 提取试剂盒 (货号: B518262) 以及大肠埃希菌 DH5 α 感受

态细胞购于上海生工生物工程股份有限公司; pMD-19T 载体以及 DNA marker(BM2000、BM15000) 购于 TaKaRa 公司; K599 发根农杆菌感受态细胞采购自华越洋生物科技 (北京) 有限公司。

仪器包含 PCR 仪 ProFlex™(美国 ThermoFish)、恒温振荡培养箱 YAMATOIC412C(美国 Yamato)、离心机 (美国 ThermoFish)、琼脂糖凝胶电泳仪 DYY-8C(北京六一)、凝胶成像系统 GIS-2010(上海 Tanon)。

1.2 PCR 引物及程序

由上海生工生物工程股份有限公司完成所有 PCR 引物合成及测序工作, 试验所用引物信息及 PCR 反应程序参见表 1、2。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

编号 Code	项目 Item	名称 Name	正向序列(5'→3') Forward sequence	反向序列(5'→3') Reverse sequence
S1	<i>SdC2'H</i> 基因克隆	SdC2'H-1	ATGCATATTGTTAATCATGG	TCATATCTTTGCAAACCTCGA
S2	<i>SdC2'H</i> 基因过表达载体构建	SdC2'H-2	TGACCATGGTAGATCTATGCATA TTGTTAATCATGGAGTCCCCA	ATTCGAGCTGGTCACCTCATATC TTTGCAAACCTCGAGAGTGTCC
S3	植物双元表达载体构建	1304	GCAACAGGATTCAATCTTAAGA	ATTGTGAAGATAGTGGA AAAAGG
S4	毛状根中 <i>rolB</i> 验证	<i>rolB</i>	GCCAGCATTTTTGGTGA ACT	GGCACTGAACTTGCCGTTAT
S5	转基因毛状根外源 <i>SdC2'H</i> 鉴定	hrHyg	ATCATCGAAATTGCCGTCAA	ATGGCGTGATTTCATATGCG
S6	利用RT-qPCR检测 <i>EF1-α</i> 表达	<i>EF1-α</i>	AGGCTCTTCAGGAGGCTCTTC	CAATGTGACAGGTGTGGCAATC
S7	利用RT-qPCR检测 <i>SdC2'H</i> 表达	q-C2'H	ATGCATATTGTTAATCATGGAGTCC	GCAACGCAAAGAATCTACGA

表 2 PCR 程序
Table 2 PCR programs

编号 Code	项目 Item	程序 Program
1	<i>SdC2'H</i> 基因克隆	94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 45 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35次循环; 72 ℃ 10 min
2	<i>SdC2'H</i> 基因过表达载体构建	94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 68 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35次循环; 72 ℃ 10 min
3	植物双元表达载体构建	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1.5 min, 35次循环; 72 ℃ 10 min
4	毛状根中 <i>rolB</i> 验证	94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35次循环; 72 ℃ 10 min
5	转基因毛状根外源 <i>SdC2'H</i> 鉴定	94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 55 s, 72 ℃ 1 min, 35次循环; 72 ℃ 10 min
6	利用RT-qPCR检测 <i>EF1-α</i> 表达	95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 10 s, 40次循环
7	利用RT-qPCR检测 <i>SdC2'H</i> 表达	95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 10 s, 40次循环

1.3 防风 *SdC2'H* 基因克隆及生物信息学分析

采用植物 RNA 提取试剂盒提取新鲜防风叶片总 RNA, 采用 cDNA 合成试剂盒逆转录获得 cDNA。使用 Vector N TI 设计引物 S1(表 1) 对 *SdC2'H* 基因进行 PCR 扩增, 采用反应程序 1(表 2); 反应体系

(20 μ L) 为 cDNA 1.0 μ L、2 $\times$ TransTag HiFi PCR SuperMix II 10.0 μ L、上游引物 (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)1.0 μ L、下游引物 (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)1.0 μ L、ddH₂O 7.0 μ L。利用琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 扩增产物, 在 16 ℃ 恒温条件下与 pMD-19T 载体过夜连接。将连接产物转

入大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 在含 50 mg·L⁻¹ Amp 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 随机选取若干阳性克隆进行 PCR 鉴定, 对确认符合要求的阳性菌液样本进行测序。

基于 ExPasy-ProtParam 在线平台解析 SdC2'H 蛋白的理化参数; 通过 SOPMA 在线工具预测其二级结构组成; 利用 Swiss-Model 进行三级结构建模; 通过 SignalP6.0 Server 在线平台进行信号肽特征预测; 借助 NCBI 的 CD-search 工具进行保守结构域鉴定; 从 GenBank 选取 16 个跨物种同源序列, 将其与本研究获得的防风 SdC2'H 序列共同导入 MEGA 11 软件进行多序列比对, 基于近邻聚类算法构建系统进化树。

1.4 构建过表达 SdC2'H 基因的植物双元表达载体

选取 pCambia1304 载体 Bgl I 与 BstE II 酶切位点作为 SdC2'H 基因插入位点, 按照同源重组无缝克隆试剂盒的要求设计同源臂引物 S2(表 1), 并进行 PCR 扩增, 采用反应程序 2(表 2); 对质粒 pCambia1304 进行 Bgl I 和 BstE II 双酶切处理 (37 °C、1 h); 按照 Basic Assembly 反应体系对琼脂糖凝胶电泳纯化扩增产物的目标基因及线性化载体 (物质的量比 2:3) 进行重组连接, 在 PCR 仪中于 50 °C 温育 15 min; 将重组连接产物转化至大肠埃希菌 Trans1-T1 感受态细胞, 在含 50 mg·L⁻¹ Kan 的 LB 固体培养基上随机挑选阳性单菌落; 对扩大培养的阳性菌液进行 PCR 分子鉴定与测序验证, 将确认无误的重组质粒命名为 pCA-SdC2'H。

1.5 构建重组发根农杆菌 K599

利用冻融法将重组 pCA-SdC2'H 质粒导入发根农杆菌 K599 感受态细胞, 在含 50 mg·L⁻¹ Kan、50 mg·L⁻¹ Str 的 YEB 固体培养基上随机选取阳性克隆; 选取引物 S3(表 1) 配合 PCR 程序 3(表 2) 对阳性克隆进行 PCR 检测与测序; 将经测序确认的重组农杆菌接种至含有相应抗生素的 YEB 液体培养基中, 于 28 °C 摇床以 180 r·min⁻¹ 振荡培养至对数期, 测定菌液 D_{600 nm} 为 0.6~1.0 时离心, 收集菌体, 以等体积 1/2MS 液体培养基进行重悬^[18]。

1.6 过表达 SdC2'H 基因防风毛状根的诱导、验证及培养

在超净工作台将防风无菌苗的叶片剪出伤口, 并放置在重悬于等体积 1/2MS 液体培养基的菌液中, 于 28 °C 摇床中震荡侵染; 10 min 后取出外植体在滤纸上擦干, 接种于 MS 固体培养基, 放置于 25 °C 恒温培养箱共培养 3 d; 3 d 后将外植体在无菌水中冲洗掉多余农杆菌, 吸干水分并转接到含有 50 mg·L⁻¹ Cef 的固体 MS 培养基中除菌培养^[18]。以

发根农杆菌 K599 诱导防风毛状根建立空白对照组 (CK), 同时分别利用携带 pCambia1304 空载体的工程菌诱导防风毛状根构建阴性对照组 (NC), 以及携带 SdC2'H 过表达载体的工程菌诱导防风毛状根构建过表达组 (SdC2'H⁺); 每周继代培养并梯度降低 Cef 质量浓度, 直至诱导获得防风毛状根; 随后通过植物 DNA 提取试剂盒获取各处理组毛状根系基因组 DNA, 分别选取引物 S4、S5(表 1) 配合程序 4、5(表 2) 进行 rolB 基因及 hrHyg 外源基因的 PCR 鉴定。参照西芸霏^[18] 的方法对上述鉴定正确的防风毛状根进行液体扩大培养, 操作如下: 无菌条件下称取 1.5 g 长势一致的防风毛状根系样本, 接种于含 1/2MS 液体培养基的锥形瓶中, 置于 25 °C 恒温摇床以 130 r·min⁻¹ 进行振荡培养, 每 7 d 更换 1 次新鲜培养基; 持续培养 21 d 后收获毛状根样本, 经蒸馏水冲洗后用于后续 SdC2'H 基因表达量检测与香豆素含量测定。每个处理设 3 次生物学重复。

1.7 防风毛状根中 SdC2'H 基因表达水平检测

通过植物 RNA 提取试剂盒提取各处理组毛状根系总 RNA, 并选用 cDNA 合成试剂盒进行 cDNA 合成, 反应体系为防风毛状根 RNA 4 μL、Anchored Oligo (dT)₁₈ 1 μL、2× TS Reaction Mix 10 μL、TransScript RT/RI Enzyme Mix 1 μL、gDNA Remover 1 μL、RNase-free Water 1 μL, 反应条件为 42 °C 孵育 15 min, 85 °C 加热 5 s 失活 TransScript RT/RI 与 gDNA Remover。以防风 EF1-α 基因作为内参基因, 利用 RT-qPCR 检测防风毛状根样品中 SdC2'H 基因的表达水平; 以引物 S6(表 1) 对 EF1-α 进行扩增, 采用 PCR 反应程序 6(表 2), 以引物 S7(表 1) 对 SdC2'H 进行扩增, 采用 PCR 程序 7(表 2), 反应体系均为基因 1.0 μL、上游引物 (10 μmol·L⁻¹)1.0 μL、下游引物 (10 μmol·L⁻¹)1.0 μL、SYBR Green Master Mix 10.0 μL、ddH₂O 7.0 μL; 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 SdC2'H 基因的相对表达水平^[19]。

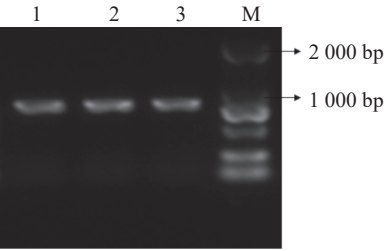
1.8 防风毛状根中香豆素含量的测定

用蒸馏水将毛状根冲洗干净, 并用滤纸吸干水分后置于 60 °C 烘箱, 干燥后的毛状根用研钵磨成细粉, 过 0.6 mm 孔径筛, 称取 0.2 g 样品, 加入 6 mL 甲醇, 于 60 °C 超声提取 1 h, 冷却, 滤纸过滤, 过 0.22 μm 滤膜。采用 HPLC 测定香豆素含量^[20]。

2 结果与分析

2.1 SdC2'H 基因克隆与生物信息学分析

如图 1 所示, PCR 扩增产物呈现 813 bp 的特异性条带, 经测序证实其实际长度与预期完全一致, 包含完整的 813 bp 开放阅读框。



1–3: *SdC2'H*, M: DNA marker.

图 1 *SdC2'H* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *SdC2'H* gene

BLAST 比对结果显示, 该序列与 *Kitagawia praeurptora* 的 *C2'H* cDNA 序列相似性为 93.33%, 氨基酸序列相似性为 94.44%, 确证其为防风 *SdC2'H* 基因序列, 并成功提交至 GenBank 数据库 (登录号: PV169361)。生物信息学分析显示, 防风 *SdC2'H* 蛋白分子式为 $C_{1386}H_{2191}N_{357}O_{401}S_9$, 理论

相对分子质量为 305 603 330, 等电点为 6.61, 不稳定指数为 37.50(<40), 是一个不稳定蛋白; 亲水性为 $-0.184(<0)$, 为亲水性蛋白。*SdC2'H* 蛋白质的二级结构以 α -螺旋和卷曲结构为主, 分别占比 34.81% 和 47.41%, 另外延伸链占据 17.78%。由三级结构模型预测可知, 该蛋白主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成。*SdC2'H* 蛋白位于跨膜区和膜内部的概率很低, 主要定位于膜外。信号肽预测值均为 0, 说明不含典型信号肽序列。保守结构域分析结果进一步显示, 防风 *SdC2'H* 属于 PLN03178 超家族, 聚类分析结果如图 2 所示。防风 *SdC2'H* 的氨基酸序列与伞形科植物紫花前胡 *Angelica decursiva* 和 *K. praeurptora* 的序列聚在一起, 亲缘关系较近, 说明防风 *SdC2'H* 和其他伞形科植物 *C2'H* 具有相似的功能。

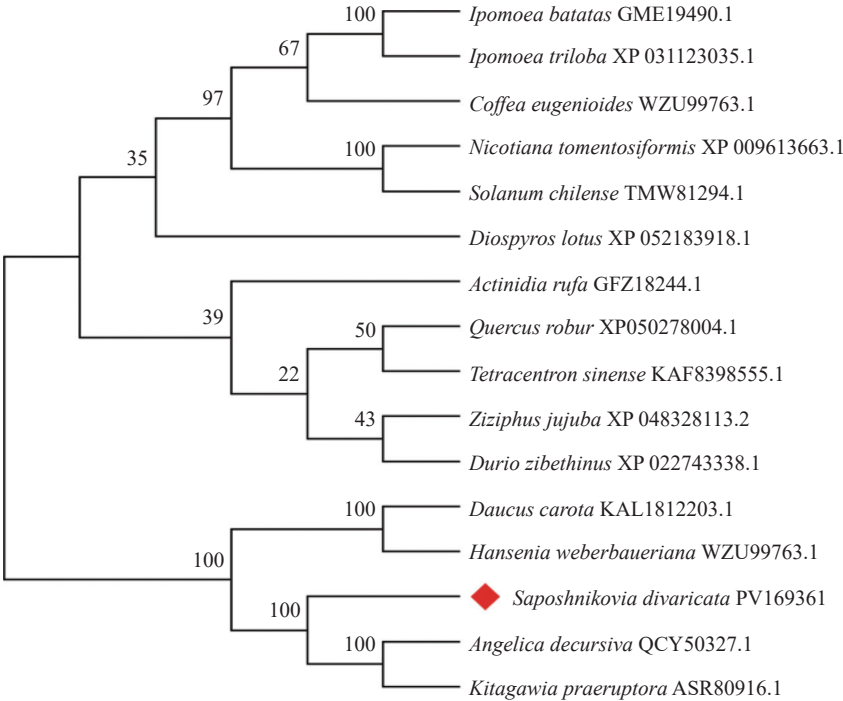


图 2 *SdC2'H* 氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *SdC2'H* amino acid sequence

2.2 过表达 *SdC2'H* 基因防风毛状根的验证

基于图 3 所示方法构建防风 pCA-*SdC2'H* 双元表达载体, 经 PCR 验证 (图 4) 显示, 特异性扩增条带长度为 813 bp, 与 *SdC2'H* 基因预期长度一致, 测序比对证实其与 GenBank 注册序列 (PV169361) 相似性为 100%, 确证成功构建了防风 pCA-*SdC2'H* 双元表达载体。侵染 7、30 d 后的毛状根样本如图 5 所示, 空白对照 (CK)、空载体阴性对照 (NC) 及过表达 *SdC2'H*(*SdC2'H*⁺)3 个处理组均长势良好。

图 6a 为各处理防风毛状根系中 *rolB* 基因的

PCR 验证结果, 扩增获得长度为 703 bp 的条带, 经测序比对, 与 K599 发根农杆菌中 *rolB* 基因序列完全匹配 (相似性 100%)。如图 6b 所示, *SdC2'H*⁺ 组特异性扩增出 418 bp 条带, 经测序比对, 与 *hrHyg* 基因序列完全匹配 (相似性 100%), 确证 *SdC2'H* 基因成功外源整合至毛状根基因组, 并排除内源性基因干扰。上述结果证实, 本研究成功诱导了过表达 *SdC2'H* 基因的防风毛状根。

2.3 防风毛状根中 *SdC2'H* 基因的表达水平

通过 RT-qPCR 定量检测防风毛状根中 *SdC2'H* 基因表达水平, 应用 GraphPad Prism 9.5 软件进行

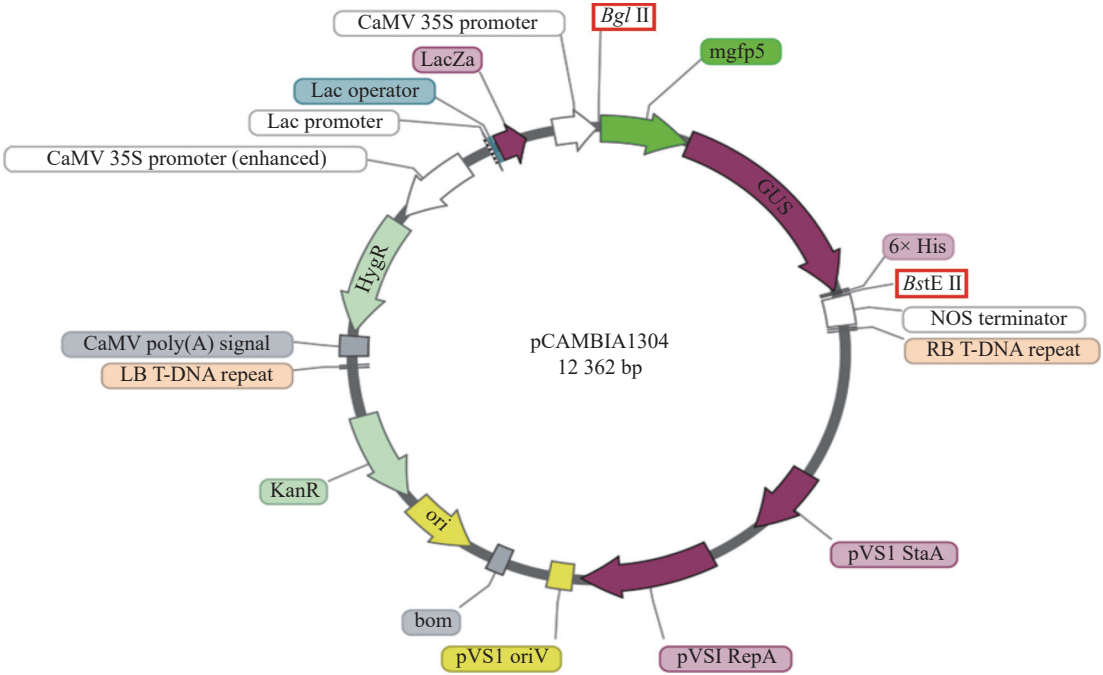
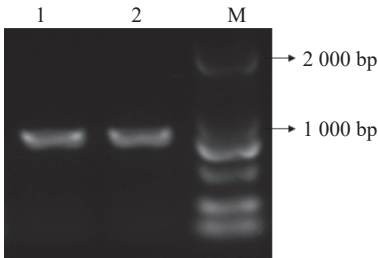


图 3 质粒 pCambia1304 图谱

Fig. 3 Mapping of plasmid pCambia1304



1–2: *SdC2'H*, M: DNA marker.

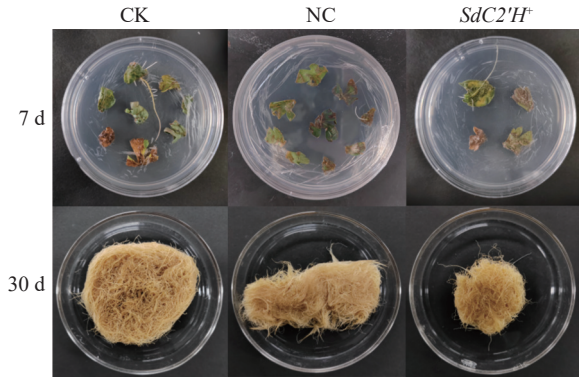
图 4 利用 PCR 验证 pCA-*SdC2'H* 二元表达载体

Fig. 4 PCR verification of pCA-*SdC2'H* binary expression vector

t 检验。如图 7 所示, *SdC2'H*⁺ 处理组基因表达水平显著高于空白对照组 (CK) ($P<0.0001$)。

2.4 防风毛状根中香豆素含量

如图 8 所示, 经 1/2MS 液体培养基培养 21 d

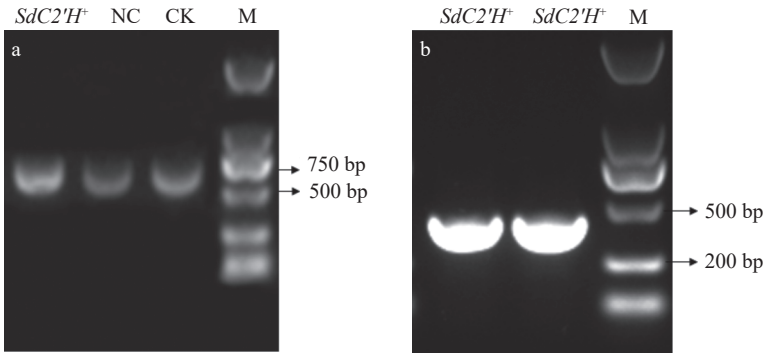


CK: 空白对照, NC: 空载体阴性对照, *SdC2'H*⁺: 过表达 *SdC2'H*。

CK: Blank control, NC: Negative control containing empty vector, *SdC2'H*⁺: Overexpressing *SdC2'H*.

图 5 诱导培养 7、30 d 后的防风毛状根

Fig. 5 *Saposhnikovia divaricata* hairy roots after induction and culture for 7 and 30 d

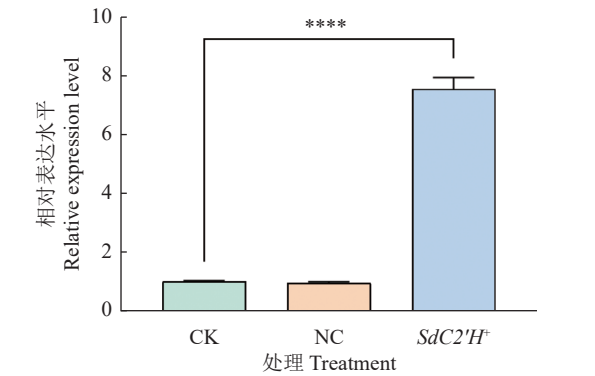


SdC2'H⁺: 过表达 *SdC2'H*, NC: 空载体阴性对照, CK: 空白对照, M: DNA marker。

SdC2'H⁺: Overexpressing *SdC2'H*, NC: Negative control containing empty vector, CK: Blank control, M: DNA marker.

图 6 基于 *rolB* (a) 和 *hrHyg* (b) 扩增的防风毛状根鉴定

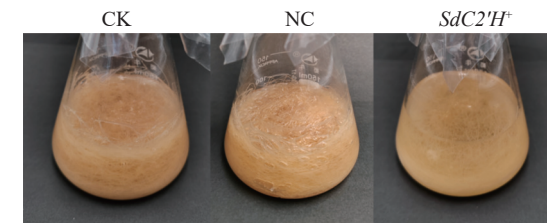
Fig. 6 Identification of *Saposhnikovia divaricata* hairy roots based on *rolB* (a) and *hrHyg* (b) amplification



CK: 空白对照, NC: 空载体阴性对照, *SdC2'H*⁺: 过表达 *SdC2'H*; ****表示在 $P<0.0001$ 水平差异显著 (t 检验)。
CK: Blank control, NC: Negative control containing empty vector, *SdC2'H*⁺: Overexpressing *SdC2'H*; **** indicates significant difference at $P<0.0001$ level (t test).

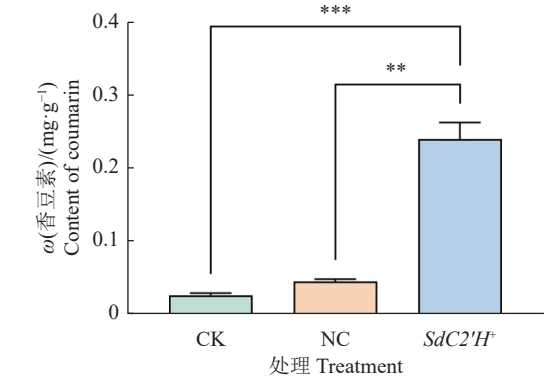
图 7 *SdC2'H* 在不同处理防风毛状根系中的相对表达水平
Fig. 7 Relative expression levels of *SdC2'H* in *Saposhnikovia divaricata* hairy roots of different treatments

后, 各处理防风毛状根均长势良好。采用 HPLC 检测各处理组防风毛状根系中香豆素含量 (图 9), 经采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行 t 检验, *SdC2'H*⁺



CK: 空白对照, NC: 空载体阴性对照, *SdC2'H*⁺: 过表达 *SdC2'H*。
CK: Blank control, NC: Negative control containing empty vector, *SdC2'H*⁺: Overexpressing *SdC2'H*.

图 8 在 1/2MS 液体培养基中培养 21 d 的防风毛状根样品
Fig. 8 *Saposhnikovia divaricata* hairy root samples cultured in 1/2 MS liquid media for 21 d



CK: 空白对照, NC: 空载体阴性对照, *SdC2'H*⁺: 过表达 *SdC2'H*; **和 ***分别表示在 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 水平差异显著 (t 检验)。
CK: Blank control, NC: Negative control containing empty vector, *SdC2'H*⁺: Overexpressing *SdC2'H*; ** and *** indicate significant differences at $P<0.01$ and $P<0.001$ levels respectively (t test).

图 9 不同处理防风毛状根系中的香豆素含量
Fig. 9 Coumarin contents in *Saposhnikovia divaricata* hairy roots of different treatments

组香豆素含量均显著高于空白对照组 (CK) ($P<0.001$) 与空载体阴性对照组 (NC) ($P<0.01$)。

3 讨论与结论

香豆素作为苯骈- α -吡喃酮类的芳香族天然产物, 在药用植物中广泛存在, 具有抗肿瘤、抗凝血及抗氧化等重要的药理活性^[21]。本研究从防风中成功克隆 *SdC2'H* 基因, 其开放阅读框为 813 bp, 编码蛋白含 270 个氨基酸。*SdC2'H* 蛋白一级结构分析显示其具有亲水性及结构不稳定特征, 且缺乏典型信号肽序列。二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 初步解析了该蛋白的折叠构象特征。由 C2'H 蛋白构建的系统进化树可见, 防风 *SdC2'H* 蛋白与伞形科植物紫花前胡亲缘关系最近, 推测防风 *SdC2'H* 可能与紫花前胡 C2'H 具有相似功能, 为后续解析防风香豆素生物合成的分子机制提供了依据。

近年来, 有关功能基因对药用成分生物合成调控的研究日益深入。Hwang 等^[22] 利用根瘤菌注射法, 在黄芪茎外植体中诱导过表达 *AmUGT15* 基因的毛状根, 其黄芪甲苷总量是野生型对照组的 4.2 倍。侯嘉铭等^[23] 利用发根农杆菌转化法将 *CHI* 基因在甘草毛状根中过表达, 其黄酮类有效成分的含量显著增加。本研究在防风中构建过表达载体 pCA-*SdC2'H*, 利用发根农杆菌诱导防风子叶外植体, 获得过表达 *SdC2'H* 基因的防风毛状根系, 其 *SdC2'H* 基因的表达水平显著高于空白对照, 且香豆素含量显著高于空白对照和空载体阴性对照, 证实该基因通过增强对对香豆酰辅酶 A 的催化效率正向调控香豆素合成通路。前人通过系统进化树分析发现, 白花前胡 PpC2'H 与欧防风 PsC2'H 具有较高的序列相似性^[24]。已有研究表明, C2'H 及 F6'H 介导的邻位羟基化反应是香豆素生物合成的关键步骤, 其中游离肉桂酸衍生物作为非活性底物参与催化过程^[8, 25], 例如, 拟南芥 AtF6'H1 和甘薯 IbF6'H1 对阿魏酰辅酶 A 表现出严格的底物特异性。本研究中 *SdC2'H* 基因对香豆素合成具有正向调控作用, 这一结果也与在拟南芥中过表达 *F6'H1* 促进东茛菪碱生成的研究结果^[26] 相似, 说明防风中 *SdC2'H* 基因和 *AtF6'H1* 基因可能具有高度相似的功能。

本研究成功构建了过表达 *SdC2'H* 基因的防风毛状根培养体系, 明确了 *SdC2'H* 基因在香豆素生物合成中的促进作用。今后, 将继续以防风毛状根为研究对象, 对影响香豆素生物合成的其他关键基因进行研究, 进一步解析香豆素生物合成的分子调控机制。

参考文献:

[1] KREINER J, PANG E, LENON G B, et al. *Saposhnikovia divaricata*: A phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2017, 15(4): 255-264.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 2020 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 156.

[3] 张军鹏, 庄辉, 刘斌, 等. 一测多评法测定防风中 6 个有效成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(7): 1163-1171.

[4] LEFÈVRE F, FOURMEAU J, POTTIER M, et al. The *Nicotiana tabacum* ABC transporter NtPDR3 secretes O-methylated coumarins in response to iron deficiency[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(18): 4419-4431.

[5] 段珍, 吴凡, 闫启, 等. 植物香豆素生物合成途径及关键酶基因研究进展[J]. *草业学报*, 2022, 31(1): 217-228.

[6] SUN X, ZHOU D, KANDAVELU P, et al. Structural insights into substrate specificity of feruloyl-CoA 6'-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10355. doi: 10.1038/srep10355.

[7] MATSUMOTO S, MIZUTANI M, SAKATA K, et al. Molecular cloning and functional analysis of the *ortho*-hydroxylases of *p*-coumaroyl coenzyme A/feruloyl coenzyme A involved in formation of umbelliferone and scopoletin in sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam[J]. *Phytochemistry*, 2012, 74: 49-57.

[8] VIALART G, HEHN A, OLRÉY A, et al. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits *p*-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): A missing step in the synthesis of umbelliferone in plants[J]. *The Plant Journal*, 2012, 70(3): 460-470.

[9] YAO R, ZHAO Y, LIU T, et al. Identification and functional characterization of a *p*-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase involved in the biosynthesis of coumarin skeleton from *Peucedanum praeruptorum* Dunn[J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, 95(1/2): 199-213.

[10] RON M, KAJALA K, PAULUZZI G, et al. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model[J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(2): 455-469.

[11] ROY A. Hairy root culture an alternative for bioactive compound production from medicinal plants[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2021, 22(1): 136-149.

[12] SU Y, LIN C, ZHANG J, et al. One-step regeneration of hairy roots to induce high tanshinone plants in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 913985. doi: 10.3389/fpls.2022.913985.

[13] KOCHAN E, SIENKIEWICZ M, SZMAJDA-KRYGIER D, et al. Carvacrol as a stimulant of the expression of key genes of the ginsenoside biosynthesis pathway and its effect on the production of ginseng saponins in *Panax quinquefolium* hairy root cultures[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(2): 909. doi: 10.3390/ijms25020909.

[14] SUN J, ZHAO L, SHAO Z, et al. Expression of tabersonine 16-hydroxylase and 16-hydroxytabersonine-O-methyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(3): 673-683.

[15] ZHOU W, WANG S, SHEN Y, et al. Overexpression of *SmSCR1* promotes tanshinone accumulation and hairy root growth in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 860033. doi: 10.3389/fpls.2022.860033.

[16] KIM Y S, KIM Y B, KIM Y, et al. Overexpression of cinnamate 4-hydroxylase and 4-coumaroyl CoA ligase prompted flavone accumulation in *Scutellaria baicalensis* hairy roots[J]. *Natural Product Communications*, 2014, 9(6): 803-807.

[17] CAI Q, LIU C, LIU L, et al. Molecular identification and functional characterization of two glycosyltransferases genes from *Fallopia multiflora*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1017122. doi: 10.3389/fpls.2022.1017122.

[18] 西芸霏. 防风毛状根转化体系建立及诱导子对其次生代谢影响的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.

[19] 寇佩雯, 刘长乐, 许玮珂, 等. 不同年份防风转录组学分析及有效成分生物合成关键基因挖掘[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(17): 4609-4617.

[20] 马丙如, 崔静轩, 王雨懿, 等. 防风药材质量的多指标综合评价[J]. *浙江农林大学学报*, 2024, 41(4): 715-723.

[21] 王荣香, 宋佳, 孙博, 等. 香豆素类化合物功能及生物合成研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(12): 79-90.

[22] HWANG C, YAN S, CHOE Y, et al. Efficient hairy root induction system of *Astragalus membranaceus* and significant enhancement of astragalosides via overexpressing *AmUGT15*[J]. *Plant Cell Reports*, 2024, 43(12): 285. doi: 10.1007/s00299-024-03370-0.

[23] 侯嘉铭, 尹彦超, 田少凯, 等. 过表达 *CHI* 基因提高甘草毛状根中黄酮类化合物含量的研究[J]. *药学学报*, 2021, 56(1): 319-327.

[24] KAWAI Y, ONO E, MIZUTANI M. Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants[J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(2): 328-343.

[25] KAI K, MIZUTANI M, KAWAMURA N, et al. Scopoletin is biosynthesized via *ortho*-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2008, 55(6): 989-999.

[26] HOENGENAERT L, WOUTERS M, KIM H, et al. Overexpression of the scopoletin biosynthetic pathway enhances lignocellulosic biomass processing[J]. *Science Advances*, 2022, 8(28): eabo5738.