

DOI:10.11686/cyxb2015477

http://cyxb.lzu.edu.cn

杨毅, 陆姗姗, 刘萍, 田蕾. 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因克隆与表达分析. 草业学报, 2016, 25(8): 128-135.

YANG Yi, LU Shan-Shan, LIU Ping, TIAN Lei. Cloning and expression analysis of a lysine decarboxylase gene in *Sophora alopecuroides*. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(8): 128-135.

# 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因克隆与表达分析

杨毅, 陆姗姗, 刘萍\*, 田蕾

(宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:** 赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC)基因是苦豆子中氧化苦参碱(oxymatrine, OMA)生物合成的第一个关键酶基因。根据近缘物种苦参的赖氨酸脱羧酶基因设计特异引物, 同源克隆法克隆了苦豆子赖氨酸脱羧酶基因的蛋白质编码区序列, 全长 1368 bp, 命名为 Sa-LDC, GenBank 登录号为 KM249871。生物信息学分析表明 Sa-LDC 编码区序列无内含子, 与苦参和狗苦参的 LDC 序列一致性均达到 97%; 属于Ⅲ型 5-磷酸吡哆醛依赖酶[type Ⅲ pyridoxal 5-phosphate (PLP)-dependent enzymes, PLPDE-Ⅲ]超基因家族, 功能活跃。Sa-LDC 编码 455 个氨基酸残基, 其编码的肽链相对分子质量 49.14 kD, 理论等电点 5.63, 无信号肽和跨膜结构; 在其氨基酸序列中具有产喹诺里西啶生物碱的特征性保守位点 Phe<sup>340</sup>; 系统进化树将苦豆子与其他产喹诺里西啶类生物碱的植物聚为一类。qPCR 和 HPLC 检测显示, 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因的表达和氧化苦参碱的积累均受干旱胁迫的影响, 且基因的表达量与氧化苦参碱的积累呈正相关关系。

**关键词:** 苦豆子; 赖氨酸脱羧酶基因; 基因克隆; 基因表达; 氧化苦参碱

## Cloning and expression analysis of a lysine decarboxylase gene in *Sophora alopecuroides*

YANG Yi, LU Shan-Shan, LIU Ping\*, TIAN Lei

College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

**Abstract:** In the biochemical metabolic processes of *Sophora alopecuroides*, a lysine decarboxylase (LDC) gene is one of the key enzyme genes involved in the process of Oxymatrine biosynthesis. In the present study, the full length of the LDC coding sequence in *S. alopecuroides* was cloned using a pair of specific primers designed based on the LDC sequence of *Sophora flavescens* and was named Sa-LDC (gene bank accession number: KM249871). Sa-LDC belongs to the Type Ⅲ Pyridoxal 5-phosphate (PLP)-Dependent enzyme supergene family, is comprised of a 1368 bps open reading frame (ORF) without intron, and has 97% identity with the LDC of *Echinosophora koreensis* and *S. flavescens* in GeneBank. Its nucleotide sequence encodes 455 amino acid residues whose putative protein had a relative molecular mass of 49.14 kD and the theoretical isoelectric point of 5.63 without signal peptide and transmembrane structure. Interestingly, the deduced amino acid sequence of Sa-LDC had the conserved amino acid residue (Phe<sup>340</sup>) in quinolizidine alkaloid producing plants. Therefore, the *S. alopecuroides* and other quinolizidine alkaloid producing plants were placed into a single group in the phylogenetic tree. In addition, the real time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and high performance liquid

收稿日期: 2015-10-12; 改回日期: 2016-01-04

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金(NZ14033)资助。

作者简介: 杨毅(1989-), 男, 四川内江人, 硕士。E-mail: kismet\_young@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liupnxdx@126.com

chromatography (HPLC) results showed that both the *LDC* expression level and oxymatrine content were influenced by polyethylene glycol (PEG) stress, and that *LDC* expression and oxymatrine accumulation in *S. alopecuroides* were correlated.

**Key words:** *Sophora alopecuroides*; lysine decarboxylase gene; gene clone; gene expression; oxymatrine

苦豆子(*Sophora alopecuroides*)是豆科槐属多年生草本植物<sup>[1]</sup>,广泛分布于宁夏、新疆、内蒙古、甘肃、西藏等的荒漠和半荒漠地区,由于其根茎繁殖力极强,根系发达,枝叶繁茂,在地表干沙层能抗风蚀,是西北地区生态环境保护中优良的固沙植物<sup>[2]</sup>。氧化苦参碱(oxymatrine, OMA)又称苦参素,是苦豆子中重要的生物碱之一,不仅在抗肝损伤、抗肿瘤、抗心血管疾病等方面有良好的疗效,还具有镇痛、免疫调节和治疗慢性乙型肝炎等多种功效<sup>[3]</sup>。

OMA 属于喹诺里西啶类生物碱(quinolizidine alkaloids, QAs),赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC)是 QAs 生物合成第一酶,它可催化赖氨酸脱羧生成戊二胺(尸胺),3 个戊二胺分子和 4 个丙酮酸盐在 17-氧基-鹰爪豆碱合酶(17-oxosparteine synthase)的作用下生成 17-氧基-鹰爪豆碱(也称金雀花碱,17-oxosparteine)和 4 个丙氨酸,17-氧基-鹰爪豆碱经脱氢金雀花碱生成鹰爪豆碱,再经一系列生化代谢最终转化为 OMA<sup>[4-7]</sup>。*LDC* 作为喹诺里西啶生物合成途径的第一个酶基因,在 OMA 生物合成过程中有着至关重要的作用。2011 年 Bunsupa 等<sup>[8]</sup>对产 QAs 与不产 QAs 的两种羽扇豆通过差异基因表达谱(differential gene expression profile)分析证明 *LDC* 的表达与植物合成 QAs 直接相关;2012 年 Bunsupa 等<sup>[7]</sup>分别从苦参(*Sophora flavescens*)、狗苦参(*Echinosophora koreensis*)、羽扇豆(*Lupinus angustifolius*)、蓝花贗靛(*Baptisia australis*)及小叶野决明(*Thermopsis chinensis*)中分离出 *LDC* 序列,并将其转入烟草悬浮细胞和毛状根中进行功能验证,同时明确产 QAs 的植物其 *LDC* 中均具有 Phe<sup>340</sup>。杜次等<sup>[9]</sup>在蛇足石杉(*Huperzia serrata*)中克隆到 2 个序列一致性高达 95.3%的 *LDC* 序列,通过原核表达均得到可催化赖氨酸脱羧形成尸胺的产物。由于苦豆子重要的生态和药用价值,和其他产 QAs 的植物相比,对苦豆子 *LDC* 的研究目前还很少,而关于 OMA 生物合成与代谢途径中关键基因及其调控机理更是知之甚少。鉴于此,本研究采用同源克隆法克隆苦豆子活性成分 OMA 生物合成关键酶基因 *LDC*,并进行生物信息学分析,探讨 PEG 胁迫下苦豆子 *LDC* 表达与 OMA 含量变化的相互关系,为今后详细研究苦豆子 *LDC* 的生物学功能和作用机理奠定基础,也为研究氧化苦参碱生物合成和代谢调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦豆子植株由宁夏大学农学院李晓伟博士鉴定为 *Sophora alopecuroides*,荚果于 2013 年采于宁夏永宁县杨和乡(106.14° E,38.14° N),标本号为 103,于室温自然风干后脱粒并精选,-20℃低温保存。

1.2 苦豆子 LDC 基因 gDNA 和 cDNA 全长序列克隆

采用改良的 SDS(十二烷基磺酸钠)法<sup>[10]</sup>提取 gDNA。总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成参照试剂盒说明书进行。

参照 NCBI 已公布的苦豆子近缘物种苦参 *LDC* cDNA 序列设计特异性引物 Sa-LDC-Pri(表 1),分别以苦豆子 gDNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物连接至 PMD18-T 载体,转化感受态大肠杆菌菌株 TOP10,氨苄青霉素抗性平板筛选阳性克隆,阳性单克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 用于基因克隆及荧光定量 PCR 的引物序列

Table 1 Primers used in gene clone and qPCR

引物名称	登录号	引物序列
Primer name	Accession No.	Primer sequence (5'→3')
Sa-LDC-Pri	AB561138.1	F:ATGCCTACACTAGTAACTGAG
		R:AACTATTGGTTTAGGTGTTGC
QLDC-Pri	KM249871	F:TACCTATAACGGAATCATC
		R:ATTGCCAGCAATGTAGAGT
Lectin-Pri	DQ011517.1	F:GCATAAACTATAACGCTGCCACT
		R:CTTGAGAATCCAACCCTGACC

### 1.3 苦豆子 LDC 生物信息学分析

将测序获得的赖氨酸脱羧酶基因序列提交至 NCBI 进行 BLAST 比对。采用 MEGA 5.0 Neighbor-Joining 法构建系统进化树<sup>[11]</sup>, ExPASy-ProtParam tool 进行蛋白质理化性质分析<sup>[12]</sup>, TMHMM 分析跨膜结构<sup>[13]</sup>, SOPMA 在线软件预测蛋白的二级结构<sup>[14]</sup>, PSORT 在线软件进行亚细胞定位预测<sup>[15]</sup>, www.predictprotein.org 在线网站预测蛋白质修饰位点<sup>[16]</sup>, SignalP 4.1 预测信号肽<sup>[17]</sup>, Swiss model 构建蛋白质三维模型<sup>[18]</sup>。

### 1.4 苦豆子植株的 PEG 胁迫、qPCR 和 OMA 含量测定

选取大小均匀、饱满、无虫蛀的苦豆子种子,浓硫酸处理 20 min,清水冲洗干净后,置 25 ℃ 恒温黑暗培养箱中萌动种子,待露白后播种于直径 40 cm 的花盆中,自然条件下生长至幼苗约 15 cm 高,连根挖出彻底洗净根部泥土,用吸水纸吸干表面水分后,将根系全部浸泡于质量分数为 10%,20%和 30%的 PEG 6000 溶液中以胁迫苦豆子植株,以去离子水为对照,每一处理 3 组重复。分别于 0,1,4,8 和 24 h 时采集叶片,一部分液氮速冻后-80 ℃ 保存用于 qPCR,另一部分 120 ℃ 杀青后烘干,用于测定 OMA 含量。

qPCR 反应在 Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪(ABI)上进行,以苦豆子 *Lectin* 序列为模板设计内参引物 *Lectin-pri*,以测序获得 *LDC* 序列设计荧光定量引物 *QLDC-pri*(表 1),采用 20 μL 体系:SybrGreen qPCR Master Mix 10 μL,上下游引物各 1 μL,cDNA 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 7 μL。扩增程序:95 ℃ 3 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 40 s,40 个循环。按照  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算出基因的相对表达量,即  $\Delta Ct$  目标基因 =  $Ct(LDC) - Ct(Lectin)$ ;  $\Delta\Delta Ct(LDC)$  = 处理组( $\Delta Ct LDC$ ) - 对照组( $\Delta Ct LDC$ ),相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct(LDC)}$  [19]。

OMA 提取和测定参照杨毅等<sup>[20]</sup>的方法。

### 1.5 统计分析

利用 DPS 6.0 进行方差分析,Excel 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 苦豆子 LDC gDNA 和 cDNA 的克隆与生物信息学分析

**2.1.1 苦豆子 LDC 基因克隆及序列分析** 分别以苦豆子 gDNA 和 cDNA 为模板,利用特异性引物 SaLDC-Pri 进行 PCR 扩增,都获得约 1400 bp 大小的条带(图 1)。经测序比对后发现,该基因 gDNA 和 cDNA 序列完全一致,编码区全长 1368 bp(图 2),说明该基因无内含子。将该编码区序列提交至 NCBI 进行 BLAST 比对后发现,序列与狗苦参和苦参 *LDC* 序列一致性均达到 97%,与小叶野决明和蓝花腓葜 *LDC* 序列一致性达到 86%,与羽扇豆 *LDC* 序列一致性达到 82%,表明扩增所得序列确实为苦豆子 *LDC* 编码区序列。将序列提交至 GenBank,命名为 Sa-LDC,登录号 KM249871。

**2.1.2 Sa-LDC 蛋白结构分析** 通过对 Sa-LDC 开放阅读框分析发现,该基因共编码 455 个氨基酸残

基,Sa-LDC 蛋白含 PLPDE\_III\_ODC、Orn\_Arg\_deC\_N、LysA、PRK08961 和 PLN02537 五个结构功能域,属于 III 型 5-磷酸吡哆醛依赖酶[type III pyridoxal 5-phosphate (PLP)-dependent enzymes,PLPDE-III]超基因家族;在该蛋白第 75~405 个氨基酸范围内,存在多个活性位点,推测该氨基酸序列范围可能是 Sa-LDC 的功能区域。理化性质和二级结构预测显示 Sa-LDC 属于水溶性蛋白,分子式为 C<sub>2192</sub>H<sub>3416</sub>N<sub>574</sub>O<sub>658</sub>S<sub>25</sub>,分子量为 49.14 kD,无信号肽和跨膜结构,理论等电点 5.63,带负电残基(Asp+Glu)数 49,带正电残基(Arg+Lys)数 42,氨基酸整体

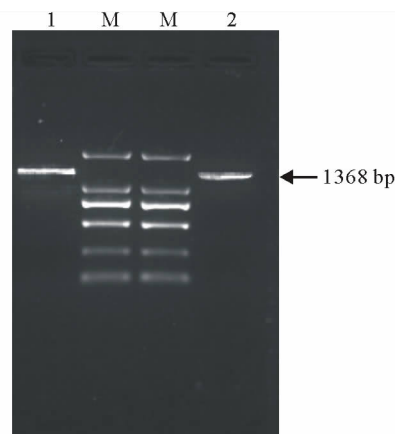


图 1 Sa-LDC 基因 gDNA 和 cDNA 扩增结果

Fig. 1 The electrophoresis results of Sa-LDC genes

1,2 分别为以苦豆子 cDNA 和 gDNA 为模板扩增的赖氨酸脱羧酶基因; Marker: 从上到下依次为 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp。1: LDC fragment obtained from the template of cDNA; 2: LDC fragment obtained from the template of gDNA; M: 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp from top to bottom.

带负电,为酸性蛋白。不稳定系数为 41.92,是一个不稳定蛋白。疏水系数-0.02,脂肪系数为 81.08。其二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋(38.2%)和无规则卷曲(37.8%)构成(图 3)。亚细胞定位预测显示 Sa-LDC 蛋白最可能位于叶绿体中。由于该蛋白 N 端无信号肽剪切位点,推测其不属于分泌蛋白,在细胞质中合成后不能进行转运。此外,在 Sa-LDC 蛋白序列中找到产 QAs 植物的特征性保守位点 Phe<sup>340</sup>。

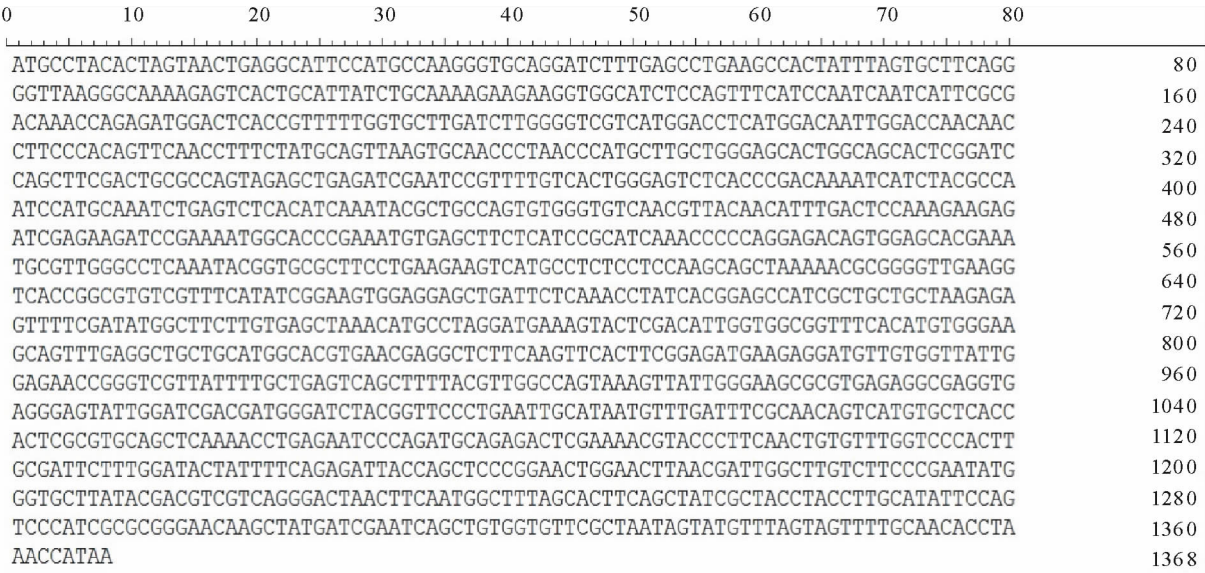


图 2 Sa-LDC 基因序列

Fig. 2 The sequence of Sa-LDC genes

2.1.3 Sa-LDC 氨基酸序列比对及系统进化树构建

将推导的氨基酸序列与 NCBI 上已公布的 L/ODC 蛋白进行 BLASTp 同源性比对发现, Sa-LDC 氨基酸序列与狗苦参和苦参的 LDC 氨基酸序列一致性高达 97%; 但与大豆 (*Glycine max*) LDC 氨基酸序列一致性仅为 77%。不同植物 L/ODC 氨基酸序列在功能区域相对保守, 差异主要存在于 N-端和 C-端。应用 Neighbor-Joining 法构建的系统进化树结果显示, 所有豆科植物被聚为一个大类, 苦豆子与苦参遗传距离最近, 与百脉根 (*Lotus japonicus*) 遗传距离最远; 所有产喹诺里西啶生物碱的植物聚为一类, 其氨基酸序列中均有特征性保守位点 Phe<sup>340</sup>; 大豆和蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 聚在一起, 百脉根则与它们的遗传距离较远, 单独分为一类(图 4)。总体上, 系统进化树与传统分类结果一致。

2.1.4 Sa-LDC 蛋白修饰位点分析 蛋白质翻译后修饰会直接影响其多种属性<sup>[21]</sup>。对 Sa-LDC 蛋白修饰位点分析发现, 该蛋白共含 8 种类型修饰位点, 分别是 N-糖基化位点、cAMP 和 cGMP 依赖型蛋白激酶磷酸化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白 II 磷酸化位点、酪氨酸激酶磷酸化位点、N-豆蔻酰化位点、酰胺化位点以及磷酸吡哆醛结合位点。



图 3 赖氨酸脱羧酶蛋白结构三维模型

Fig. 3 Three-dimensional model of Sa-LDC protein structure

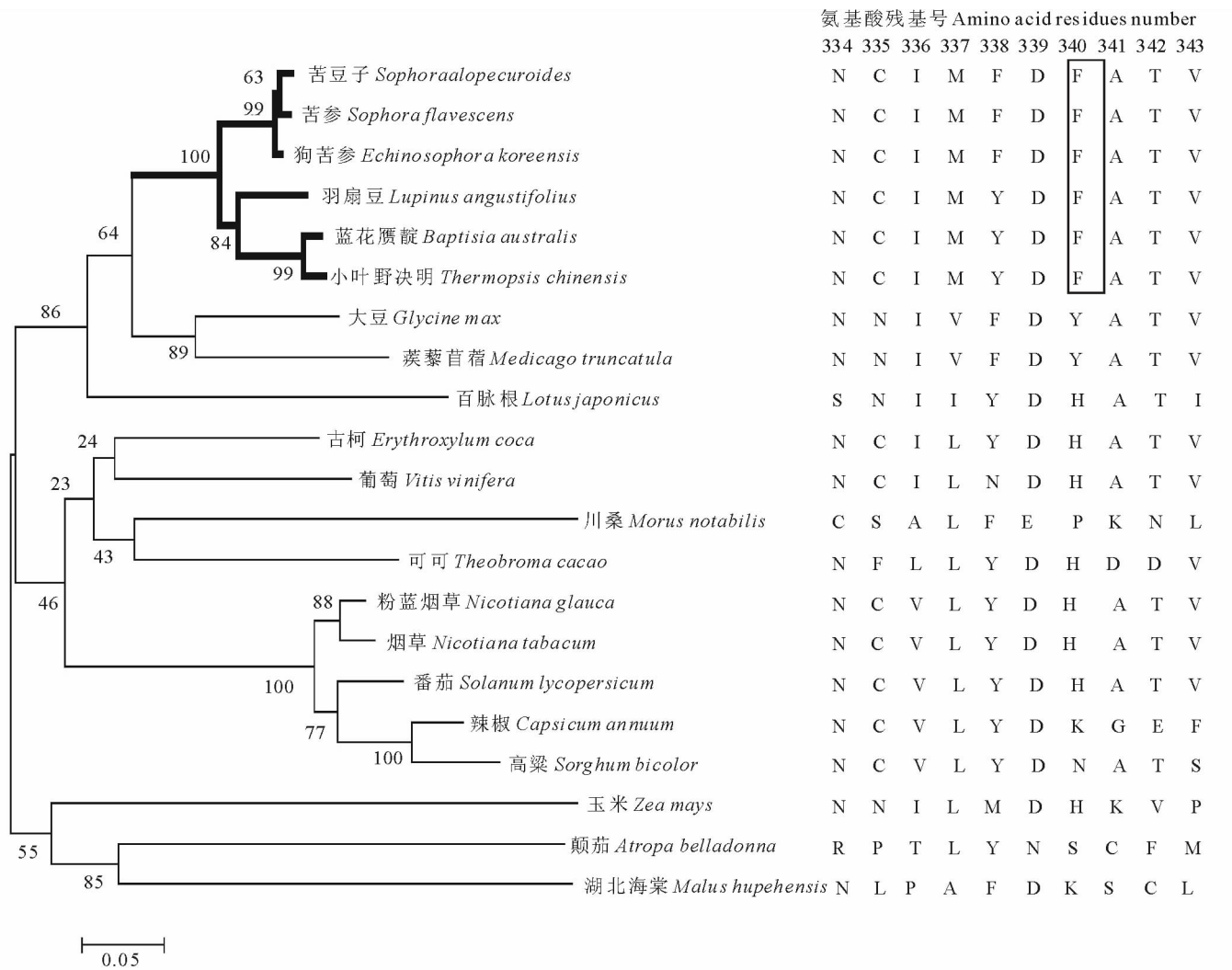


图 4 苦豆子 Sa-LDC 和 L/ODC 同源序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree estimated by the amino acid sequences of *S. alopecuroides* and other plant L/ODCs

粗线所示为产 QAs 植物;黑框所示为产 QAs 植物氨基酸序列特征性保守位点 Phe<sup>340</sup>。Bold line indicates the QAs-producing plants; Black box indicates the conserved amino acid residue Phe<sup>340</sup>.

2.2 PEG 胁迫下苦豆子叶片中 LDC 表达量和 OMA 含量的动态变化

用不同质量分数 PEG 溶液胁迫苦豆子植株根系,qPCR 结果表明苦豆子叶片中 LDC 表达量在胁迫前处于较低的水平,对照组叶片 LDC 表达量在去离子水中随时间延长呈上升趋势;在质量分数为 10%的 PEG 胁迫下,叶片中 LDC 表达量在 8 h 时骤然升高,与 0~4 h 时的表达量差异显著,是同时期对照组的 1.6 倍,胁迫前的 110 倍,随后表达量开始下降,在胁迫结束时其基因表达量与胁迫前相当;在 20%的 PEG 胁迫下,苦豆子叶片 LDC 表达量在 1 h 时达到最高,是同时期对照组的 27.5 倍,胁迫前的 343 倍。随胁迫时间延长,表达量下降,但在胁迫结束时其表达量仍然是胁迫前的 21 倍;在 30%的 PEG 胁迫下,基因表达量一直处于较低水平(图 5A)。PEG 胁迫也影响了苦豆子叶片中 OMA 的积累,使其含量发生变化。对照组中苦豆子叶片 OMA 含量在 1 h 时最低,随后逐渐升高,8 h 后与 0 h 叶片中 OMA 含量无显著差异;在 10%的 PEG 胁迫下,苦豆子叶片 OMA 含量在胁迫 8 h 时骤然上升,与 1~4 h 时的 OMA 含量差异显著且高于同时期对照组的 OMA 含量;苦豆子叶片 OMA 积累对 20%的 PEG 胁迫响应迅速,胁迫 1 h 时 OMA 含量升至最高,随后开始下降,在胁迫 24 h 时其含量与胁迫前无差异;30%的 PEG 胁迫显著抑制叶片中 OMA 积累,从胁迫开始直到结束,叶片中 OMA 含量均显著低于胁迫前(图 5B)。



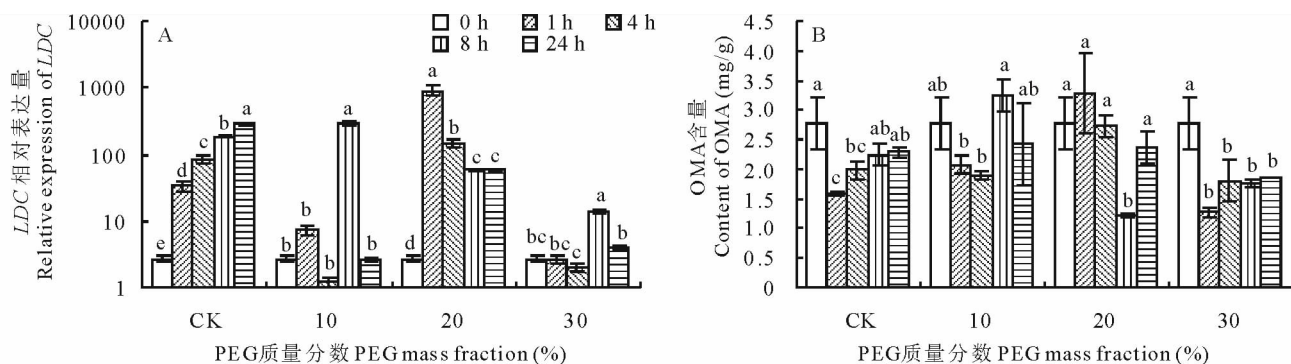


图 5 PEG 胁迫下苦豆子叶片中 *LDC* 表达量(A)和 OMA 含量(B)变化

Fig. 5 The *LDC* expression level (A) and OMA content (B) under PEG stress in *S. alopecuroides* leaves

不同小写字母表示差异显著;图 5A 中纵坐标为基因表达量的对数值。Different small letters indicate significant differences at 0.05 level; The y-coordinate is logarithm of gene expression level in Fig. 5A.

### 3 讨论

*LDC* 作为 QAs 生物合成的第一个关键酶基因,在苦豆子 OMA 生物合成和代谢过程中有至关重要的作用。本研究首次获得了苦豆子 *LDC* 编码区序列,命名为 Sa-*LDC*,GenBank 登录号 KM249871。对推测的 Sa-*LDC* 蛋白序列分析表明该蛋白属于Ⅲ型 5-磷酸吡哆醛依赖酶超基因家族。亚细胞定位预测显示该蛋白存在于叶绿体中,与 Wink 等<sup>[22]</sup>通过同位素示踪法研究的结果一致。除 L/ODC 外,同属该超基因家族的还有二氨基庚二酸脱羧酶(diaminopimelate decarboxylase, DapDC)、精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase, ADC)以及羧基降亚精胺脱羧酶(carboxynorspermidine decarboxylase, CANSDC)。该家族的酶主要在辅酶 5-磷酸吡哆醛的参与下,催化聚胺或赖氨酸脱羧的生化反应<sup>[23]</sup>。在 Sa-*LDC* 蛋白修饰位点中存在多个磷酸化位点和酰胺化位点,说明此蛋白主要由蛋白激酶和蛋白因子所激活以行使生化功能,极易被外界因素所调控。

BLASTp 同源性比对表明 Sa-*LDC* 氨基酸序列与同是豆科槐属的苦参和狗苦参亲缘关系最近,说明在亲缘关系相近的植物中 *LDC* 的保守性强,这与陈春艳等<sup>[24]</sup>在对甘肃红豆草(*Onobrychis viciaefolia* cv. "Gansu")无色花青素还原酶 LAR 基因的同源性分析结论相一致。*LDC* 的系统进化树分析表明苦豆子与苦参、狗苦参、蓝花腓葜、小叶野决明和羽扇豆这几种产 QAs 的植物聚为一类,且其氨基酸序列中都具有共同的特征性保守位点 Phe<sup>340</sup>,说明苦豆子的赖氨酸脱羧酶与这些植物的赖氨酸脱羧酶具有共同的起源。与 Bunsupa 等<sup>[25]</sup>研究结果所不同的是,本研究找到的 Phe 在氨基酸序列的第 340 位,而 Bunsupa 等<sup>[25]</sup>认为在氨基酸序列的第 344 位。

生物碱在保护植物中有着特殊的作用,有研究表明在遇到重度胁迫和生物侵扰时植物会瞬间大量合成生物碱<sup>[26-27]</sup>。Christiansen 等<sup>[28]</sup>对 3 种窄叶羽扇豆 3 个不同生长阶段的干旱胁迫研究认为,干旱造成窄叶羽扇豆种子中生物总碱含量发生变化,其中营养生长阶段的干旱胁迫促使其生物总碱含量上升;杨毅等<sup>[20]</sup>用不同质量分数的 PEG 胁迫刚萌动的苦豆子种子,发现轻度胁迫下子叶中 OMA 含量降低,但在重度胁迫下 OMA 含量又有所回升,且轻度和重度胁迫下 OMA 含量与 *LDC* 表达量的变化基本一致。本研究中苦豆子植株在 10% PEG 中胁迫 8 h,叶片中 *LDC* 表达量突然升高,与之对应的 OMA 含量也同时明显上升;同样,20% 的 PEG 胁迫 1 h 时叶片中 *LDC* 表达量的升高也促使 OMA 含量增加,说明苦豆子 *LDC* 的表达受干旱胁迫的调控,轻度的干旱(PEG≤10%)胁迫需要较长时间才能诱导 *LDC* 表达,并促使 OMA 合成;但在中度干旱(10%<PEG≤20%)胁迫下,较短时间即能诱导 *LDC* 的表达,并合成 OMA。可见 *LDC* 的表达量在一定程度上影响苦豆子 OMA 的含量,PEG 胁迫下苦豆子幼苗叶片中 *LDC* 表达量与 OMA 含量呈显著正相关( $r=0.543^*$ ),特别是当赖氨酸脱羧酶基因表达量明显上升或下降时,都直接影响了 OMA 的含量。但 OMA 在苦豆子植株中的生物合成过程极其复杂,赖氨酸脱羧酶基因只是其合成途径中最上游的一个基因,对最终的代谢产物影响有限<sup>[29]</sup>,同时,OMA 含量的高低还可能受代谢产物分布、转移和积累以及分解代谢等因素影响,其中的关系极为复杂,还有待深入研究。

## 4 结论

本研究首次从苦豆子中克隆获得 *LDC* 编码区全长序列,共 1368 bp,编码区无内含子,共编码 455 个氨基酸残基,生物信息学分析表明赖氨酸脱羧酶功能较为活跃,其氨基酸序列中具有产 QAs 的特征性保守位点 Phe<sup>340</sup>, *LDC* 的表达受干旱胁迫的影响,在一定程度上也影响 OMA 的积累。

## References:

- [1] Editorial Committee of Flora of China. Flora Reipublicae Popularis Sinicae[M]. Beijing: Science Press, 1998: 80-81.
- [2] Li A H, Sun Z J. The developmental situation and application potential of *Sophora alopecuroides* L. Journal of Ningxia University: Natural Science Edition, 2000, 21(4): 354-356.
- [3] Zhou F S, Mu Q. Chemical constituent and pharmacological activities of *Sophora alopecuroides* L. Chinese Wild Plant Resources, 2006, 25(4): 1-3.
- [4] Waller G R, Nowacki E K. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants[M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [5] Hartmann T, Schoofs G, Wink M. A chloroplast-localized lysine decarboxylase of *Lupinus polyphyllus*. FEBS Letters, 1980, 115: 35-38.
- [6] Wink M, Hartmann T, Witte L. Enzymatic synthesis of quinolizidine alkaloids in *Lupin chloroplasts*. Zeitschrift Fur Naturforschung, 1980, 35: 93-97.
- [7] Bunsupa S, Katayama K, Ikeura E, et al. Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in leguminosae. The Plant Cell Online, 2012, 24(3): 1202-1216.
- [8] Bunsupa S, Okada T, Saito K, et al. An acyltransferase-like gene obtained by differential gene expression profiles of quinolizidine alkaloid-producing and nonproducing cultivars of *Lupinus angustifolius*. Plant Biotechnology, 2011, 28(1): 89-94.
- [9] Du C, Li J, Tang Y T, et al. Cloning, prokaryotic expression and characterization of lysine decarboxylase gene from *Huperzia serrata*. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(8): 1299-1307.
- [10] Huang L X, Luo J, Li W C, et al. Comparison study on effects of different methods extracted from *Sophora alopecuroides* DNA. Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2009, (3): 8-9.
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [12] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server[M]// The Proteomics Protocols Handbook. New York: Humana Press, 2005: 571-607.
- [13] Möller S, Croning M D R, Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. Bioinformatics, 2001, 17(7): 646-653.
- [14] Sapay N, Guermeur Y, Deléage G. Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. BMC Bioinformatics, 2006, 7(1): 255.
- [15] Nakai K, Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. Trends in Biochemical Sciences, 1999, 24(1): 34-35.
- [16] Yachdav G, Kloppe E, Kajan L, et al. Predict protein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features. Nucleic Acids Research, 2014, doi: 10.1093/nar/gku366.
- [17] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786.
- [18] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. Nucleic Acids Research, 2014, doi: 10.1093/nar/gku340.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Yang Y, Tian L, Liu P, et al. The relationship between gene expression of lysine decarboxylase and matrine, oxymatrine accumulation in *Sophora alopecuroides*. Chinese Pharmaceutical Journal, 2015, 50(10): 846-849.
- [21] Ruan B J, Dai P, Wang W, et al. Progress on post-translational modification of proteins. Chinese Journal of Cell Biology, 2014, 36(7): 1027-1037.
- [22] Wink M, Hartmann T. Localization of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. Plant Physiology, 1982, 70(1): 74-77.
- [23] Schneider G, Käck H, Lindqvist Y. The manifold of vitamin B<sub>6</sub> dependent enzymes. Structure, 2000, 8(1): R1-R6.
- [24] Chen C Y, Ma H L, Dong W K. Cloning and expression analysis of a leucoanthocyanidin reductase (LAR) gene from *Ono-*

*brychis viciifolia* cv. Gansu. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(6): 177-187.

- [25] Bunsupa S, Yamazaki M, Saito K. Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. Frontiers in Plant Science, 2012, 3(4): 279-286.
- [26] Walter L. Plant Eco Physiology[M]. Beijing: China Agriculture University Press, 1997: 246.
- [27] Tang Z H, Yu J H, Yang F, *et al.* Metabolic biology of plant alkaloids. Chinese Bulletin of Botany, 2003, 20(6): 696-702.
- [28] Christiansen J L, Jornsgard B, Buskov S, *et al.* Effect of drought stress on content and composition of seed alkaloids in narrow-leaved lupin, *Lupinus angustijdius* L. European Journal of Agronomy, 1997, 7(4): 307-314.
- [29] Canel C, Lopes-Cardoso M I, Whitmer S, *et al.* Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. Planta, 1998, 205(3): 414-419.

## 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第四十卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 80-81.
- [2] 李爱华, 孙兆军. 苦豆子资源开发现状及前景初探. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2000, 21(4): 354-356.
- [3] 周福生, 穆青. 野生植物苦豆子的化学成分和主要药理作用. 中国野生植物资源, 2006, 25(4): 1-3.
- [4] 沃勒 G R, 诺瓦茨基 E E. 生物碱的生物学及其在植物中的代谢作用[M]. 朱太平, 佟绍华, 马忠武, 译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [9] 杜次, 李菁, 唐云涛, 等. 蛇足石杉 LDC 的克隆、原核表达及其功能分析. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1299-1307.
- [10] 黄丽霞, 罗静, 李文超, 等. 不同方法从苦豆子中提取 DNA 的效果比较研究. 宁夏农林科技, 2009, (3): 8-9.
- [20] 杨毅, 田蕾, 刘萍, 等. 苦豆子 LDC 表达与苦参碱和氧化苦参碱含量的关系. 中国药学杂志, 2015, 50(10): 846-849.
- [21] 阮班军, 代鹏, 王伟, 等. 蛋白质翻译后修饰研究进展. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(7): 1027-1037.
- [24] 陈春艳, 马晖玲, 董文科. 甘肃红豆草无色花青素还原酶 LAR 基因的克隆和表达分析. 草业学报, 2015, 24(6): 177-187.
- [26] Walter L. 植物生态生理学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997: 246.
- [27] 唐中华, 于景华, 杨逢, 等. 植物生物碱代谢生物学研究进展. 植物学通报, 2003, 20(6): 696-702.