

引用格式:

林孝东, 莫长明, 穆德添, 赵欢, 黄华学, 邵瑛瑛, 陈文强, 刘代, 梁任繁, 唐其. 罗汉果*SgTCP6*基因克隆、生物信息学分析及转录激活研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(3): 33–41.

LIN X D, MO C M, MU D T, ZHAO H, HUANG H X, SHAO Y Y, CHEN W Q, LIU D, LIANG R F, TANG Q. Cloning, bioinformatics analysis and transcriptional activation analysis of *SgTCP6* from *Siraitia grosvenorii*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(3): 33–41.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



罗汉果*SgTCP6*基因克隆、生物信息学分析及转录激活研究

林孝东¹, 莫长明², 穆德添¹, 赵欢³, 黄华学⁴, 邵瑛瑛¹, 陈文强¹, 刘代⁴, 梁任繁², 唐其^{1*}

(1.湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128; 2.广西壮族自治区农业科学院, 广西 南宁 530007; 3.首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 4.湖南华诚生物资源股份有限公司, 湖南 长沙 410221)

摘要: 基于罗汉果基因组和转录组信息, 筛选得到罗汉果TCP转录因子家族*SgTCP6*基因, 对其进行生物信息学分析, 并结合酵母单杂交实验验证其是否参与罗汉果甜苷合成关键酶基因*SgUGT94*的调控。结果显示: *SgTCP6*基因编码序列(CDS)全长为618 bp, 编码205个氨基酸残基, 相对分子质量为21 942, 定位于细胞核中, 是一种不稳定的亲水蛋白, 且不含信号肽和跨膜区, 为非分泌蛋白。多序列比对结果显示该基因与葫芦科苦瓜TCP基因的亲缘关系较近。罗汉果不同时期果实基因共表达关联分析结果显示, *SgTCP6*与*SgUGT94*表达存在极显著相关性。*SgUGT94*上游2 000 bp启动子区域含有4个TCP顺式作用元件。酵母单杂交结果表明, *SgTCP6*可能参与罗汉果甜苷V合成关键酶基因*SgUGT94*的调控。

关键词: 罗汉果; TCP 转录因子; 生物信息学; 酵母单杂交; 葡萄糖基转移酶

中图分类号: S567.19 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2025)03-0033-09

Cloning, bioinformatics analysis and transcriptional activation analysis of *SgTCP6* from *Siraitia grosvenorii*

LIN Xiaodong¹, MO Changming², MU Detian¹, ZHAO Huan³, HUANG Huaxue⁴,
SHAO Yingying¹, CHEN Wenqiang¹, LIU Dai⁴, LIANG Renfan², TANG Qi^{1*}

(1. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 4. Hunan Huacheng Biotech, Inc., Changsha, Hunan 410221, China)

Abstract: Based on the genome and transcriptome information of *Siraitia grosvenorii*, the TCP transcription factor family *SgTCP6* gene was screened and analyzed by bioinformatics, and whether it was involved in the regulation of the key enzyme gene *SgUGT94* in the synthesis of mogroside was verified by yeast one-hybrid. The result showed that *SgTCP6* gene CDS was 618 bp in length, encoded 205 amino acid residues, and had a relative molecular mass of 21 942. It was subcellularly localized in the nucleus and was an unstable hydrophilic protein without a signal peptide or transmembrane region, thus making it a non-secretory protein. Multiple sequence alignment results showed that the gene was closely related to TCP in *Momordica charantia*. The co-expression analysis results of genes in *Siraitia grosvenorii* fruits at different stages showed that there was a significant correlation between the expression of *SgTCP6* and *SgUGT94*. The analysis results of the 2 000 bp promoter upstream of *SgUGT94* revealed that this region contained four TCP binding sites. The yeast one-hybrid results showed that *SgTCP6* might be involved in the regulation of the key enzyme gene *SgUGT94* in the synthesis

收稿日期: 2024-11-20

修回日期: 2025-05-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1200200); 国家自然科学基金项目(32270398, U20A2004, 82173915); 湖南省重点研发项目(2022NK2004)

作者简介: 林孝东(1999—), 男, 重庆开州人, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究, lx0908321@163.com; *通信作者, 唐其, 博士, 教授, 主要从事药用植物遗传改良研究, tangqi@hunau.edu.cn

of mogroside V.

Keywords: *Siraitia grosvenorii*; transcription factor TCP; bioinformatics; yeast one-hybrid; glucosyltransferase

罗汉果[*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey]为葫芦科罗汉果属植物,是我国传统中药材,具有清热润肺、利咽开音、滑肠通便的作用,主要用于治疗肺热燥咳、咽痛失音、肠燥便秘^[1]。此外,罗汉果还具有抗癌^[2]、抗炎^[3]、抗氧化^[4]、止咳祛痰^[5]和降糖^[6]的药理活性。罗汉果果实特有的药效成分甜苷V是一种葫芦烷型四环三萜化合物,甜度为普通蔗糖的300多倍,是一种新型甜味剂,具有天然、安全、低热量等特性。甜苷V提取物作为代糖具有广阔的应用前景。ITKIN等^[7]完整解析了罗汉果甜苷V的生物合成途径,发现其下游途径主要包括罗汉果醇的形成以及糖基化反应。*SgUGT720-269-1*与*SgUGT94-289-3*(以下简称*SgUGT94*)这2个基因主要在糖基化过程中发挥作用。首先,罗汉果醇在糖基转移酶*SgUGT720-269-1*的作用下,先后于C24、C3位上生成罗汉果甜苷I-A1和罗汉果甜苷II E;其次,糖基转移酶*SgUGT94*在罗汉果甜苷II E的C24位的葡萄糖链上添加一个葡萄糖,生成罗汉果甜苷III E;而后分别在C3、C24位的葡萄糖支链上随机添加一个葡萄糖生成罗汉果IV A、赛门苷;最后,在上述2个产物上补齐C24或C3上的糖基,生成罗汉果甜苷V。

转录因子(TF)是一种能与特异DNA序列结合的蛋白,可以单独与其他蛋白形成复合体,提高或阻断特定基因对RNA聚合酶的招募,调控基因的表达。TCP(*teosinte branched1/cinninata/proliferating cell factor*)转录因子是植物特有的转录因子家族之一,参与调控玉米、金鱼草、水稻等多种植物的生理活动^[8-10]。TCP基因家族成员具有一个由60个左右氨基酸组成的TCP高度保守结构域,并形成碱性螺旋-环-螺旋结构(bHLH)^[11]。根据TCP保守结构域的氨基酸序列,可将TCP基因家族成员分为Class I(PCF或TCP-P家族)和Class II(TCP-C家族)这2个亚家族^[12]。Class II成员间也存在较大差异,还可分为CIN和CYC/TB1这2个分支^[13]。TCP家族蛋白主要在分生组织中调控植物的生长和发育过程,传导各种生理生化反应的信号,响应外界胁迫^[14]。此外,

还可参与次生代谢产物合成的调控^[15]。例如:短小蛇根草(*Ophiorrhiza pumila*)中喜树碱(CPT)及其衍生物被广泛用作治疗恶性肿瘤的化疗药物。WANG等^[16]对所有*OpTCP*基因与CPT生物合成途径中靶基因进行共表达关联分析,发现16个TCP基因中有9个与甲基赤藓醇磷酸途径(MEP)中的一些关键酶基因具有强相关性,推测短小蛇根草TCP基因在CPT及其前体生物合成中具有重要作用。在茶树(*Camellia sinensis*)中,*CsTCP3*、*CsTCP4*参与调控叶片形态发育并与儿茶素生物合成相关^[17]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,*AtTCP3*与R2R3-MYB蛋白相互作用,促进类黄酮类化合物的生物合成^[18];在高强光照下,过表达*AtTCP15*的拟南芥抑制花青素积累,其机制是调控花青素生物合成相关基因的转录因子的表达^[19]。草莓(*Fragaria ananassa*)中的FaTCP11蛋白可以识别并结合特定序列的DNA,推测可能是通过与MYB或bHLH家族转录因子互作,从而调控草莓原花青素和黄酮醇的合成基因的表达^[20]。黑枸杞(*Lycium ruthenicum*)毛状根中过表达*LrTCP4*基因后,包括地骨皮甲素在内的17种化合物含量相较于对照组均升高^[21]。黄花蒿(*Artemisia annua* L.)中的茉莉酸通过激活TCP14-ORA复合体促进青蒿素的生物合成^[22],而AaGSW1-AaTCP15/AaORA复合体也具有相同的作用^[23]。

目前,有关TCP转录因子调控罗汉果甜苷合成的研究较少。本文作者前期通过对罗汉果基因组、转录组以及甜苷含量进行联合分析,发现罗汉果TCP基因(*SgTCP6*)可能参与甜苷V的合成。因此,本文作者从罗汉果基因组中克隆得到*SgTCP6*的全长序列,对其理化性质、蛋白结构、保守基序、进化关系等进行分析,并将其与罗汉果甜苷V合成相关酶基因进行共表达关联分析,筛选出与*SgTCP6*关联性最高的关键酶基因,分析其启动子顺势作用元件;构建酵母表达载体进行酵母单杂交实验,验证*SgTCP6*能否与罗汉果甜苷合成关键酶基因发生互作,以期为进一步研究罗汉果TCP转录因子的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为罗汉果‘农院 B6’果实。罗汉果果实自授粉日期起，分别于 0、15、35、55、75、85 d 取样，之后用液氮速冻，保存于-80℃备用。

1.2 方法

1.2.1 *SgTCP6*基因与*SgUGT94*启动子序列的克隆

用多糖多酚 RNA 提取试剂盒(湖南艾科瑞生物

工程有限公司)提取不同时期果实 RNA 用于转录组测序，并通过逆转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA。罗汉果果实 DNA 通过植物 DNA 提取试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司)进行提取。基于前期基因组数据库筛选 TCP 结构序列并根据染色体位置对其进行命名。通过 SnapGene 软件分别设计 *SgTCP6*、*SgUGT94* 启动子(以下简称 *SgUGT94pro*)扩增引物(表 1)，之后将纯化产物与 pMD19-T 载体连接，转化 DH5α，挑取阳性单克隆经扩大培养后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表1 供试所用的引物序列

Table 1 Primers sequences for the test	
引物名称	引物序列
<i>SgTCP6</i> -1-F	ATGGGATCGGAGATCGTTC
<i>SgTCP6</i> -1-R	CTATTGGTCTCTGAAGACCTCC
<i>SgTCP6</i> -2-F	GGACTCTAGAGGATCCATGGGATCGGAGATCGT(<i>Bam</i> H I)
<i>SgTCP6</i> -2-R	GACCACCCGGGGATCCCTATTGGTCTCTGAAGACCTCC(<i>Bam</i> H I)
<i>SgTCP6</i> -3-F	CATCGATACGGGATCCATGGGATCGGAGATCGTTCTCC(<i>Bam</i> H I)
<i>SgTCP6</i> -3-R	TCATCTGCAGCTCGAGCTATTGGTCTCTGAAGACCTCTCTTC(<i>Xho</i> I)
<i>SgUGT94pro</i> -F	TTGAATTCGAGCTCGGTACCAATTTGTGAATTTAAGAGAGGTTCTGGG(<i>Kpn</i> I)
<i>SgUGT94pro</i> -R	GAGCACATGCCTCGAGATCGGCAGAGACTTTTGGGC(<i>Xho</i> I)

注：表中下划线表示括号内的酶切位点。

1.2.2 生物信息学分析

本研究所用生物信息学分析网站见表2。

利用DNAMAN软件进行氨基酸多序列比对；

使用MEGA 7.0软件构建*SgTCP6*蛋白进化树；使用TBools软件对分析得到的*SgUGT94*基因上游启动子区域中的顺式作用元件进行可视化分析。

表2 生物信息学分析网站

Table 2 Bioinformatics analysis website	
作用	网址
氨基酸翻译(Translate tool)	https://web.expasy.org/translate/
蛋白保守结构域预测(CDD)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml
蛋白理化性质分析(ProtParam)	https://web.expasy.org/protscale/
亚细胞定位预测(WOLFPSORT)	https://wolf-psort.hgc.jp/
蛋白跨膜结构预测(Deep TMHMM)	https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM
蛋白信号肽预测(SignalP 4.1 Server)	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/
二级结构预测(SOPMA)	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html
三级结构预测(SWISS MODEL)	http://swissmodel.ex-pasy.org/
热图绘制(ChiPlot)	https://www.chiplot.online/
顺式作用元件分析(Plant CARE)	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/

1.2.3 亚细胞定位

使用引物*SgTCP6*-2-F/R(表1，酶切位点*Bam*H I)扩增*SgTCP6*编码区，通过OK Clon DNA连接试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)将扩增产物与线性化载体pBI121-35S连接，构建重组载体，并将其与细胞核定位标记载体(pCAMBIA1300-35S-Histone-mrheny-NOS)及空载对照(pBI121-35S-GFP)共同转

化农杆菌GV3101。菌液经离心重悬于含乙酰丁香酮的浸润液，在黑暗中孵育3~4 h后注射本氏烟草叶片。48~72 h后制备叶片临时切片，使用共聚焦显微镜(ZEISS蔡司激光共聚焦显微镜Smartproof 5)观察荧光信号。

1.2.4 酵母表达载体构建

使用引物*SgTCP6*-3-F/R(表1，酶切位点*Bam*H I、

Xho I), 以总cDNA为模板扩增*SgTCP6*基因启动子序列, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后与双酶切线性化pGADT7连接, 转化DH5 α 后筛选阳性克隆并送测序; 基于课题组罗汉果基因组数据获取*SgUGT94*基因起始密码子(ATG)上游1 300 bp启动子序列, 设计pAbAi同源重组引物*SgUGT94pro*-F/R(表1, 酶切位点*Kpn* I、*Xho* I), 以DNA为模板, 构建表达载体pAbAi-*SgUGT94pro*。

1.2.5 诱饵载体自激活检测及*SgTCP6*蛋白与*SgUGT94*启动子互作验证

将pAbAi-*SgUGT94pro*载体经*Bsp*119 I单酶切线性化后, 按酵母单杂交试剂盒(北京酷来博科技有限公司)说明书转化Y1HGold菌株, 通过PCR验证阳性克隆。选取验证菌落用0.9% NaCl重悬至OD₆₀₀为0.2, 梯度稀释(原液、10倍、100倍、1 000倍), 各取10 μ L接种至含梯度浓度(0、100、200、300、500、800、1 000 ng/mL)金担子素(AbA)的SD/-Ura(酪氨酸缺陷型)培养基, 30 $^{\circ}$ C培养2~3 d, 确定200 ng/mL AbA为抑制自激活阈值浓度。制备酵母感受态后转化pGADT7-*SgTCP6*, 培养得到菌落后按梯度稀释菌液, 分别接种至含0和200 ng/mL AbA的SD/-Leu(亮氨酸缺陷型)培养基, 同条件培养后记录互作表型。

2 结果与分析

2.1 *SgTCP6*基因克隆及测序结果

以罗汉果果实cDNA为模板, 对*SgTCP6*基因(Chr04.g07864.m1)进行扩增, 扩增条带大小符合

预期结果(图1)。测序结果显示, 扩增条带序列长度为618 bp, 且核苷酸序列与基因组数据库中的一致, 表明成功获得*SgTCP6*基因扩增产物。

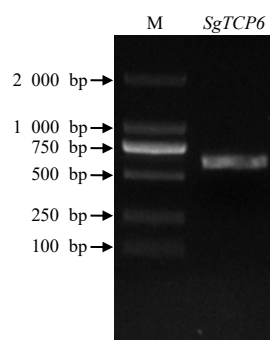


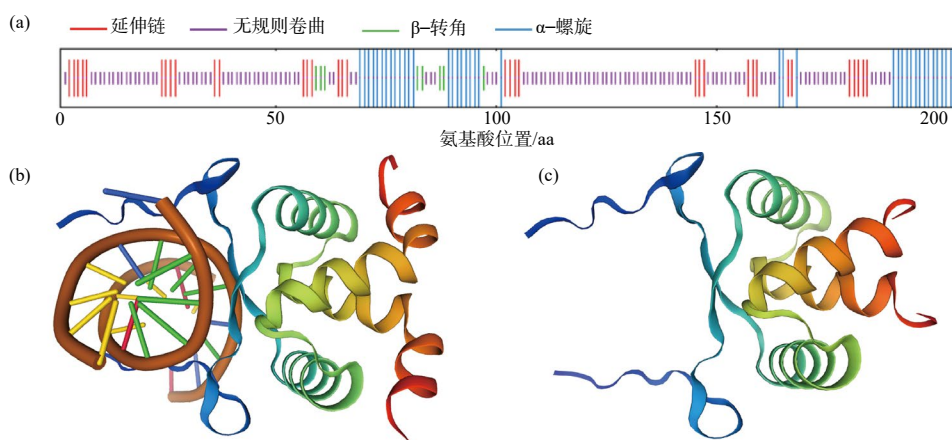
图1 *SgTCP6*基因的PCR产物电泳图

Fig.1 Electrophorogram of PCR product of *SgTCP6* gene

2.2 *SgTCP6*的生物信息学分析结果

该基因ORF全长618 bp, 由20种氨基酸组成, 编码205个氨基酸残基。蛋白质分子式为C₉₃₉H₁₅₁₅N₂₈₁O₃₀₁S₁₂, 相对分子质量为21 942, 理论等电点为6.96, 丝氨酸(12.7%)和丙氨酸(10.7%)占比最高。理化参数分析结果表明其为亲水性不稳定蛋白(亲水性总平均值为-0.370, 不稳定指数为77.91, 脂肪族指数为67.17)。Deep TMHMM跨膜结构预测结果显示无跨膜结构域; SignalP 4.1分析结果证实其不含信号肽, 为非分泌蛋白。

二级结构由无规则卷曲(59.02%)、 α -螺旋(19.51%)、延伸链(16.59%)和 β -转角(4.88%)组成(图2(a))。基于SWISS-MODEL, 以SMTL ID为7vp3.1.B(拟南芥AtTCP15, Class I-TCP-P亚族, 蛋白序列序



(a) *SgTCP6*蛋白的二级结构预测结果; (b) AtTCP15模型; (c) *SgTCP6*预测模型

图2 *SgTCP6*蛋白二级、三级结构预测结果

Fig.2 Prediction result of secondary and tertiary structures of *SgTCP6* protein

列相似性82.69%)^[24]的模板预测其三级结构, 全域模型质量估计值(GMQE)达0.68(见图2(b)和图2(c)); 有序结构域(α -螺旋、延伸链)的二级与三级预测结果一致, 说明核心功能区的建模可靠性较高; 而无规则卷曲占比不同则是 *SgTCP6* 蛋白二级和三级结构间主要的差异, 这也是预测模型的局限性所在, 预测结果需结合实验进一步验证。

通过NCBI分析发现 *SgTCP6* 蛋白含TCP家族保守bHLH结构域(basic-helix-loop-helix)(图3(a))。多序列比对结果显示其与苦瓜(84.62%)、冬瓜(82.21%)

及南瓜(81.43%)同源蛋白序列高度相似(图3(b))。将该蛋白与MANASSERO等^[8]制作的TCP蛋白结构域序列标识图进行对比, 发现罗汉果、苦瓜、冬瓜、南瓜这4个物种TCP蛋白碱性区域均缺失4个氨基酸, 符合Class I(TCP-P)亚家族特征。系统进化分析结果(图4)表明, *SgTCP6*与葫芦科物种(如苦瓜)中的相应蛋白聚为一支, 亲缘关系最近, 而与其他模式植物如番茄、拟南芥、水稻等中的相应蛋白的亲缘关系较远。



以序列相似性50%为阈值, 蓝色序列表示相似性为[50%, 75%]; 粉色序列表示相似性为[75%, 100%]; 黑色序列表示相似性为100%。

(a) NCBI 保守结构域分析; (b) 氨基酸多序列相似性比对

图3 罗汉果 *SgTCP6* 蛋白的保守结构域分析及氨基酸多序列比对结果

Fig.3 Conserved domain analysis and amino acid multiple sequence alignment result of *SgTCP6* protein in *Siraitia grosvenorii*

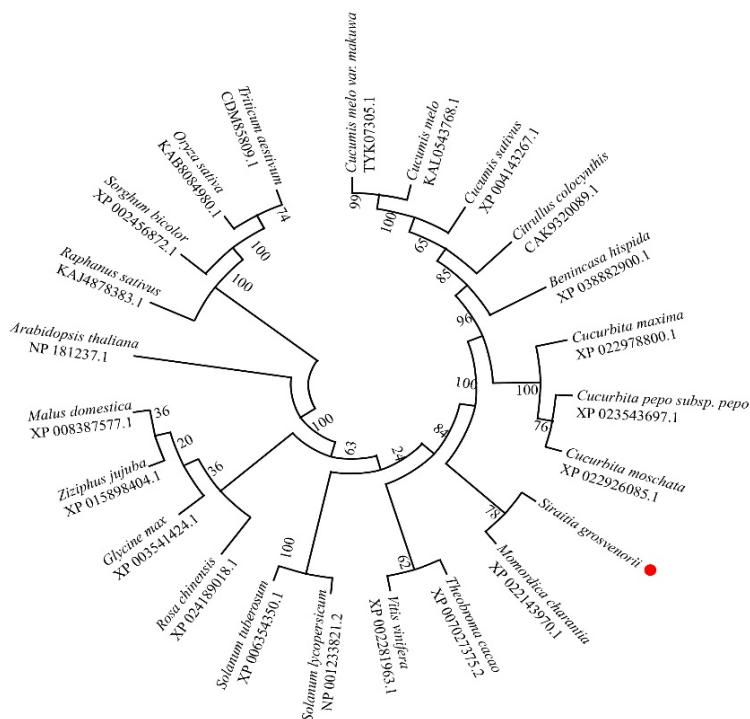


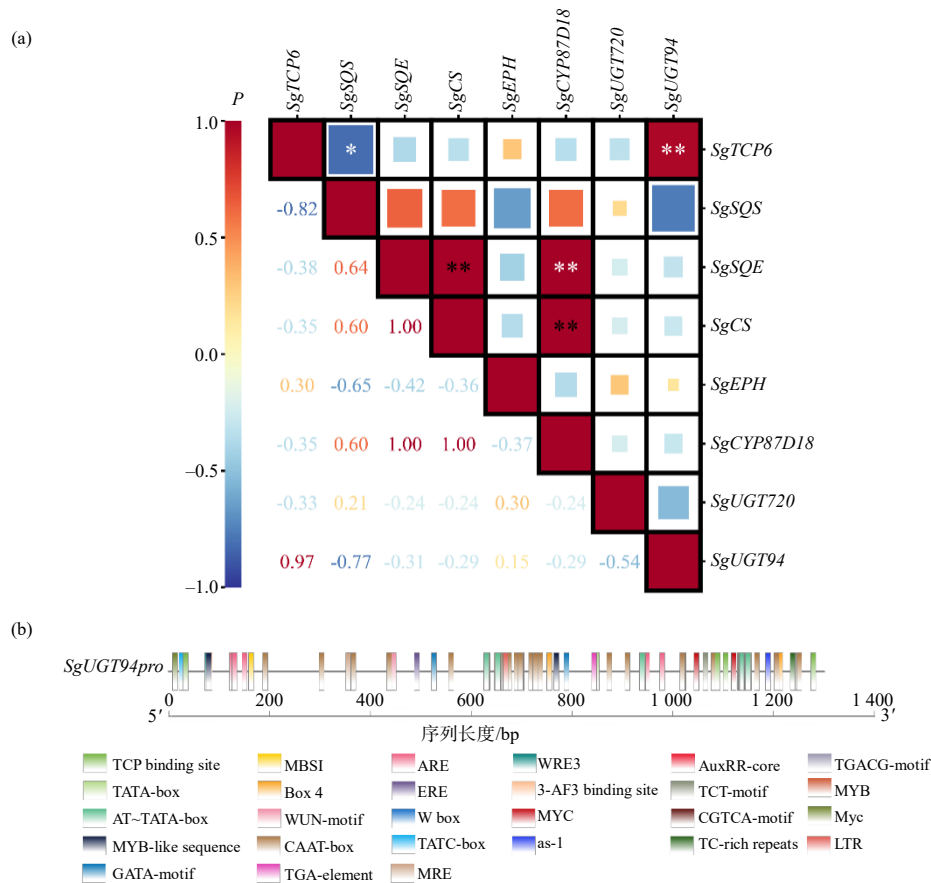
图4 罗汉果 *SgTCP6* 蛋白系统进化关系分析结果

Fig.4 Phylogenetic relationship analysis result of *SgTCP6* protein in *Siraitia grosvenorii*

2.3 SgTCP6与SgUGT94基因表达关联分析结果

基因共表达分析结果显示, *SgTCP6*与罗汉果甜苷V合成关键基因*SgUGT94*在果实(0~85 d)不同时期的表达量呈显著正相关(图5(a)), 提示其可能通过互作调控甜苷V生物合成; 而*SgTCP6*与其他合成关键基因表达量无显著正相关, 与*SgSQS*存在显著负

相关关系。 *SgUGT94*基因启动子顺式作用元件分析结果显示, 其包含103个元件, 含CAAT/TATA-box(52个)、AT~TATA-box(11个)、ARE(6个)及TCP结合位点(4个)。4个TCP结合位点富集于前1 300 bp区域(图5(b)), 提示*SgUGT94*可能受TCP转录因子调控, 二者协同作用可能驱动罗汉果甜苷V合成。



(a) *SgTCP6*与罗汉果甜苷合成酶基因表达量相关性分析(*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$); (b) *SgUGT94*启动子的顺式作用元件可视图

图5 *SgTCP6*与罗汉果甜苷合成酶基因关联性分析

Fig.5 Correlation analysis of *SgTCP6* and mogrosides synthase gene

2.4 亚细胞定位结果

为验证该蛋白发挥功能的具体亚细胞位置, 构

建*SgTCP6*与GFP的融合蛋白, 利用本氏烟草叶片进行瞬时表达。结果(图6)显示, 空载对照组GFP荧光

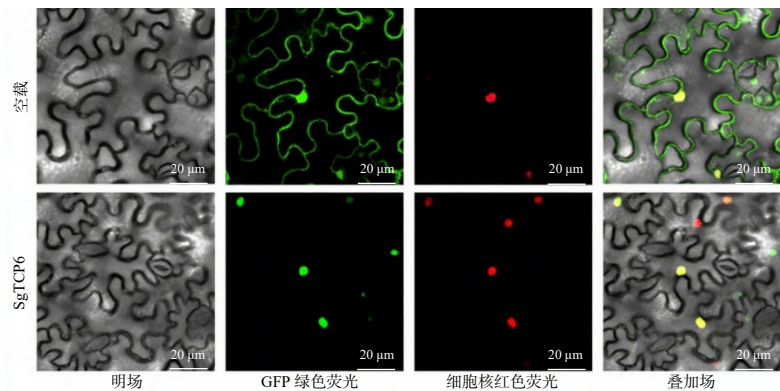


图6 罗汉果*SgTCP6*蛋白亚细胞定位

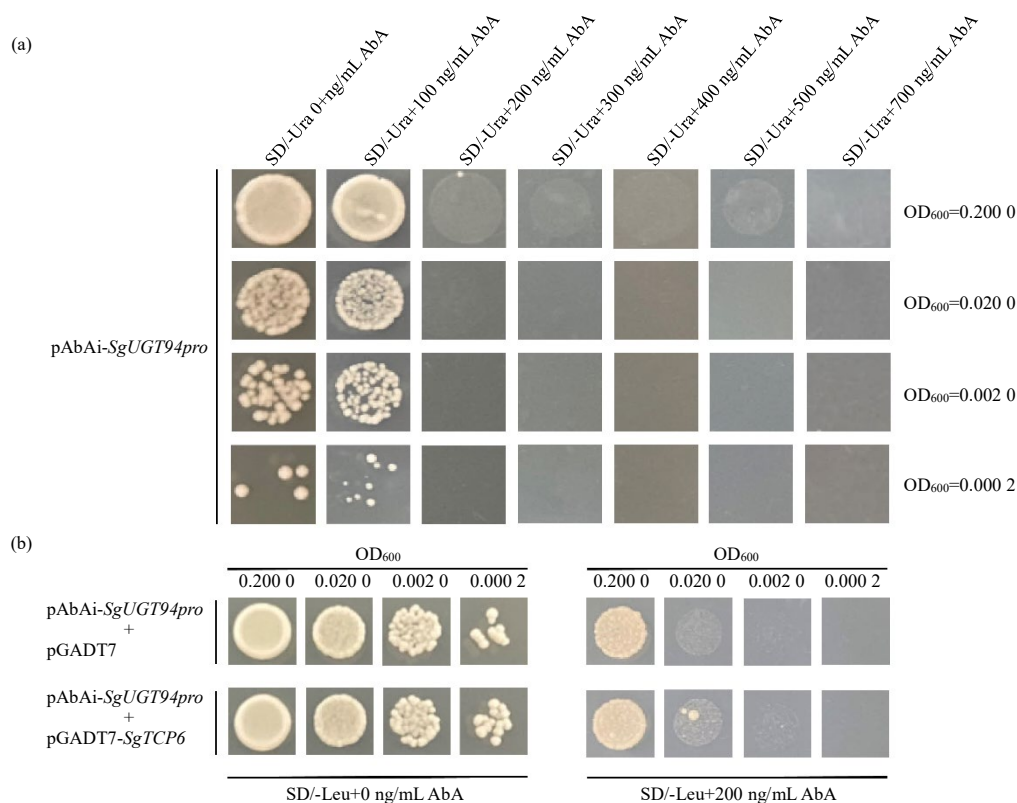
Fig.6 Subcellular localization of *SgTCP6* protein

在整个细胞中分布, *SgTCP6*与GFP的融合蛋白荧光信号则主要集中在细胞核中。

2.5 酵母单杂交实验结果

*SgUGT94*基因启动子自激活实验结果显示, 最佳抑制自激活的AbA浓度为200 ng/mL(图7(a))。互作结果显示: 在0 ng/mL AbA条件下, 阴性对照组

(pAbAi-*SgUGT94pro*与pGADT7共转组)和互作实验组(pAbAi-*SgUGT94pro*与pGADT7-*SgTCP6*共转组)均正常生长; 而在200 ng/mL AbA条件下, 阴性对照组在菌液OD₆₀₀=0.02即稀释10倍后生长受到抑制, 而互作实验组仍能表现出一定的生长能力(图7(b)), 证实*SgTCP6*可在一定程度上激活*SgUGT94*启动子转录活性。



(a) *SgUGT94pro* 自激活分析; (b) *SgTCP6* 蛋白与 *SgUGT94pro* 互作验证
图7 *SgTCP6*蛋白与*SgUGT94pro*的酵母单杂交实验结果

Fig.7 Experimental result of yeast one-hybrid between *SgTCP6* protein and *SgUGT94pro*

3 结论与讨论

罗汉果果实中独特的代糖物质罗汉果甜苷V, 使其具有较高的经济价值^[25]。本研究结果表明, *SgTCP6*蛋白含有TCP蛋白家族的保守结构域并形成一个碱性螺旋-环-螺旋结构(bHLH), 判断*SgTCP6*属于Class I(PCF或TCP-P家族)亚家族。该蛋白理化性质表现与不稳定亲水蛋白的一致, 这与已有研究结果相符^[26-29]。该蛋白定位于细胞核内, 无跨膜结构域也无信号肽, 与其他物种TCP家族蛋白一致^[30-32], 说明*SgTCP6*作为核内转录因子, 可能通过直接结合靶基因*SgUGT94*启动子调控甜苷代谢通路。此外, 在三级结构预测中使用的对照蛋白即

转录因子AtTCP15已经在拟南芥中被证实具有调节花青素合成的功能, 因此, 推测*SgTCP6*在罗汉果中也具有类似的调节次生代谢产物的能力。

有关转录因子调控罗汉果甜苷V合成的研究较少。在已有研究中, 参与萜类化合物生物合成调控的转录因子主要为AP2/ERF、MYB、bHLH、WRKY、YABBY等^[33]。探究罗汉果TCP转录因子家族是否参与罗汉果甜苷V合成具有重要意义。张凯伦等^[34]通过表达谱与qRT-PCR初步筛选出4个可能参与罗汉果甜苷合成调控的bHLH转录因子及8个可能参与黄酮类化合物合成调控的MYB转录因子, 但并未研究筛选到的转录因子如何参与甜苷以及黄酮合成

的调控。石宏武^[35]构建酵母单杂文库后筛选到5个可能调控SgCDS的转录因子的编码基因,对候选基因SgERF1B和SgGATA8进行瞬时过表达后发现SgCDS基因表达量升高,说明二者具有正向调控SgCDS基因表达的作用;SgMYB1过表达36 h和48 h后SgCPR和SgUGT94的表达量也均有升高,说明该基因可能参与调控下游甜苷的生物合成。关于罗汉果中TCP转录因子调控次生代谢方面的研究极少,而本研究通过酵母单杂交实验验证SgTCP6能够与SgUGT94基因启动子中的TCP顺式作用元件结合,说明TCP转录因子很可能直接参与罗汉果甜苷V合成关键酶基因调控,这些结果可为后续进一步研究罗汉果转录因子功能提供参考。

SgTCP6的转录激活效果相对较弱,可能因为其在酵母中表达受阻,或通过间接方式调控SgUGT94基因,导致直接互作较弱,其具体机制需进一步验证。由于转录因子结合DNA序列具有特异性,需要分别构建带有顺式作用元件的荧光探针与SgTCP6蛋白进行凝胶迁移(EMSA)试验,探究SgTCP6结合SgUGT94启动子的具体结合位点。另外,由于甜苷V仅在罗汉果果实中合成的特殊性,导致无法通过转化拟南芥或烟草等模式植物验证SgTCP6基因的功能。石宏武^[35]、LIAO等^[36]采用农杆菌瞬时转化罗汉果材料,短时间内观察基因表达和化学成分积累变化,这是目前研究罗汉果基因功能的一个有效途径。稳定的罗汉果遗传转化技术在抗病^[37-39]、单性结实^[40]、毛状根^[41]研究等方面有一定程度的应用,但其低效性仍限制了功能基因组学研究。未来可着重构建高效的罗汉果遗传转化体系,为基因功能验证、代谢工程应用以及后续罗汉果分子育种提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部(2020年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 刘灿, 蔡天宇, 赵晓萌, 等. 罗汉果提取物诱导肺癌细胞A549凋亡的研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(9): 1310-1314.
- [3] 刘岩, 刘志洋. 罗汉果水提液对于急性咽炎模型大鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 159-162.
- [4] LIU H S, WANG C C, QIX Y, et al. Antiglycation and antioxidant activities of mogroside extract from *Siraitia grosvenorii*(Swingle) fruits[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(5): 1880-1888.
- [5] 陈敏, 王翠红. 罗汉果中罗汉果皂苷提取工艺的优化及其止咳祛痰作用[J]. 中成药, 2019, 41(5): 1129-1132.
- [6] ZHANG X B, SONG Y F, DING Y P, et al. Effects of mogrosides on high-fat-diet-induced obesity and nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. Molecules, 2018, 23(8): 1894.
- [7] ITKIN M, DAVIDOVICH-RIKANATI R, COHEN S, et al. The biosynthetic pathway of the nonsugar, high-intensity sweetener mogroside V from *Siraitia grosvenorii*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(47): E7619-E7628.
- [8] MANASSERO N G, VIOLA I L, WELCHEN E, et al. TCP transcription factors: architectures of plant form[J]. Biomolecular Concepts, 2013, 4(2): 111-127.
- [9] DOEBLEY J, STEC A, HUBBARD L. The evolution of apical dominance in maize[J]. Nature, 1997, 386(6624): 485-488.
- [10] LUO D, CARPENTER R, COPSEY L, et al. Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*[J]. Cell, 1999, 99(4): 367-376.
- [11] CUBAS P, LAUTER N, DOEBLEY J, et al. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development[J]. The Plant Journal, 1999, 18(2): 215-222.
- [12] NAVAUD O, DABOS P, CARNUS E, et al. TCP transcription factors predate the emergence of land plants[J]. Journal of Molecular Evolution, 2007, 65(1): 23-33.
- [13] MARTÍN-TRILLO M, CUBAS P. TCP genes: a family snapshot ten years later[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(1): 31-39.
- [14] VIOLA I L, GONZALEZ D H. TCP transcription factors in plant reproductive development: juggling multiple roles[J]. Biomolecules, 2023, 13(5): 750.
- [15] 唐羽翔, 高旭, 崔亚宁, 等. 植物TCP转录因子研究进展[J]. 科学通报, 2022, 67(33): 3964-3975.
- [16] WANG C, HAO X L, WANG Y, et al. Genome-wide identification and comparative analysis of the teosinte branched 1/cycloidea/proliferating cell factors 1/2 transcription factors related to anti-cancer drug camptothecin biosynthesis in *Ophiorrhiza pumila*[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 746648.
- [17] YU S W, LI P H, ZHAO X C, et al. CsTCPs regulate shoot tip development and catechin biosynthesis in tea plant(*Camellia sinensis*)[J]. Horticulture Research, 2021, 8: 104.
- [18] LI S T, ZACHGO S. TCP3 interacts with R2R3-MYB

- proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2013, 76(6): 901–913.
- [19] VIOLA I L, CAMOIRANO A, GONZALEZ D H. Redox-dependent modulation of anthocyanin biosynthesis by the TCP transcription factor TCP15 during exposure to high light intensity conditions in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2016, 170(1): 74–85.
- [20] 余昊唯. 影响草莓类黄酮途径的转录因子筛选与鉴定[D]. 成都: 四川农业大学, 2019.
- [21] CHAHAL A A, ZENG S H, YOUSAF Z, et al. Plant-specific transcription factor LrTCP4 enhances secondary metabolite biosynthesis in *Lycium ruthenicum* hairy roots[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2019, 136(2): 323–337.
- [22] MA Y N, XU D B, LI L, et al. Jasmonate promotes artemisinin biosynthesis by activating the TCP14-ORA complex in *Artemisia annua*[J]. Science Advances, 2018, 4(11): eaas9357.
- [23] MA Y N, XU D B, YAN X, et al. Jasmonate- and abscisic acid-activated AaGSW1-AaTCP15/AaORA transcriptional cascade promotes artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(7): 1412–1428.
- [24] ZHANG Y, XU Y P, NIE J K, et al. DNA-TCP complex structures reveal a unique recognition mechanism for TCP transcription factor families[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(1): 434–448.
- [25] CHEN N, CAO W C, YUAN Y Y, et al. Recent advancements in mogrosides: a review on biological activities, synthetic biology, and applications in the food industry[J]. Food Chemistry, 2024, 449: 139277.
- [26] 刘俊, 李龙, 吴耀松, 等. 杜仲TCP转录因子鉴定及生物信息学分析[J]. 中草药, 2022, 53(12): 3755–3765.
- [27] 王雷立, 董柯清, 张严玲, 等. 玉米DREB转录因子家族的全基因组鉴定与分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(3): 270–281.
- [28] 王世泽, 李云, 韩玉翠, 等. 烟草TCP家族成员鉴定及表达分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 226–238.
- [29] 杨婷, 黎成, 申佳瑜, 等. 茄子TCP基因家族全基因组的鉴定与分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2974–2988.
- [30] 石颖颖, 郑凯, 曲延英, 等. 海岛棉转录因子基因 *GbTCP44* 的克隆及特征分析[J]. 中国农业大学学报, 2021, 26(1): 33–42.
- [31] 郑凯, 曲延英, 倪志勇, 等. 海岛棉转录因子基因 *GbTCP27* 的克隆及表达特性分析[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(2): 24–33.
- [32] 杨懿. 菊花 *CmTCP2* 基因的克隆和表达分析[J]. 分子植物育种, 2025, 23(4): 1065–1072.
- [33] 李晓燕, 周瑾, 杜佳庚, 等. 转录因子调控植物挥发性有机物生物合成的研究进展[J]. 四川农业大学学报, 2024, 42(2): 264–276.
- [34] 张凯伦, 罗祖良, 郭玉华, 等. 不同生长时期罗汉果果实转录因子的转录组分析及酵母单杂交文库的构建[J]. 中国现代中药, 2016, 18(8): 945–950.
- [35] 石宏武. 罗汉果叶绿体基因组组装分析及葫芦二烯醇合酶基因转录因子研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [36] LIAO J J, LIU T Y, XIE L, et al. Heterologous mogrosides biosynthesis in cucumber and tomato by genetic manipulation[J]. Communications Biology, 2023, 6: 191.
- [37] 谭秀梅. 利用RNAi技术培育抗花叶病毒转基因罗汉果的研究[D]. 吉首: 吉首大学, 2015.
- [38] 杨华, 李惠敏, 覃屏生, 等. 罗汉果转抗病基因 *NPR1* 的研究[J]. 广西植物, 2011, 31(2): 250–254.
- [39] 朱英芝. 小西葫芦黄化花叶病毒罗汉果分离株及转基因罗汉果的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012.
- [40] 宁弋珍, 郝庆林, 李刚, 等. pBAR载体构建及其转化罗汉果的分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(12): 3910–3916.
- [41] 曾黎辉, 吴金寿, 柯石山, 等. 罗汉果遗传转化受体再生体系的建立及发根农杆菌转化初探[J]. 中国农学通报, 2005, 21(12): 403–406.

责任编辑: 伍锦花

英文编辑: 张承平