

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201901052

林颖, 王燕燕, 于放. 长春花茉莉酸-异亮氨酸合成酶 CrJAR1 生物信息学分析与原核表达 [J]. 广西植物, 2020, 40(8): 1181–1187.
LIN Y, WANG YY, YU F. Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of jasmonic acid-isoleucine synthase CrJAR1 from *Catharanthus roseus* [J]. *Guihaia*, 2020, 40(8): 1181–1187.

长春花茉莉酸-异亮氨酸合成酶 CrJAR1 生物信息学分析与原核表达

林 颖, 王燕燕, 于 放*

(大连工业大学, 辽宁 大连 116034)

摘 要: 长春花 (*Catharanthus roseus*) 可以产生多种萜类吲哚生物碱, 其中包括多种天然的抗癌药物, 但合成含量很低, 茉莉酸信号通路可以调控这些萜类吲哚生物碱的生物合成, 茉莉酸-异亮氨酸合成酶为茉莉酸信号通路中的关键元件。为了研究其功能, 该文以长春花叶片为材料, 分析了 *CrJAR1* 基因所编码的氨基酸序列, 并进行原核表达。结果表明: *CrJAR1* 基因编码了 585 个氨基酸, 该蛋白不存在跨膜区域, 定位于细胞质中, 且该蛋白不含有信号肽; 进一步系统进化树分析表明, 长春花 *CrJAR1* 与笋瓜和番木瓜的 *JAR1* 同源性最高; 对二级、三级结构进行预测, 发现 *CrJAR1* 蛋白主要由 α -螺旋构成; 同时, 成功构建了 pET-30b-*CrJAR1* 重组表达质粒, 并经 IPTG 诱导后在大肠杆菌 BL21 中异源表达, 经 16、37 °C 分别诱导至 16 h 后, 均显示出最高的表达量。综上结果, 对长春花中 *CrJAR1* 蛋白进行生物信息学分析, 并成功在大肠杆菌中进行异源表达, 这对体外该蛋白功能的研究具有深远影响, 为调节茉莉酸信号通路甚至调控长春花中次级代谢产物的生物合成提供了指导。

关键词: 长春花, 茉莉酸-异亮氨酸合成酶, 序列分析, 三级结构预测, 原核表达

中图分类号: Q943 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)08-1181-07

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of jasmonic acid-isoleucine synthase CrJAR1 from *Catharanthus roseus*

LIN Ying, WANG Yanyan, YU Fang*

(College of Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China)

Abstract: *Catharanthus roseus* can produce a variety of terpenoid indole alkaloids, including a variety of natural anti-cancer, but the biosynthesis content is very low. The jasmonic acid signaling pathway regulates the biosynthesis of these

收稿日期: 2019-04-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31570303) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570303)].

作者简介: 林颖(1994-), 女, 辽宁大连人, 硕士研究生, 主要从事代谢调控与合成生物学研究, (E-mail)yinglin_0303@163.com。

*通信作者: 于放, 博士, 教授, 主要从事代谢调控与合成生物学研究, (E-mail)yufang@dlpu.edu.cn。

terpenoid indole alkaloids. The jasmonic acid-isoleucine synthase is a key component in the jasmonic acid signaling pathway. In order to study its function, the amino acid sequence of *CrJAR1* was analyzed, and prokaryotic expression was performed. Results had shown that the *CrJAR1* gene encoded 585 amino acids, and the protein did not contain transmembrane structure. The subcellular localization analysis showed that the protein might be localized in the cytoplasm, and the protein did not contain signal peptide. Further phylogenetic tree analysis showed that the *CrJAR1* had the highest homology with the *JAR1* of the *Cucurbita maxima* and *Carica papaya*. The secondary and tertiary structures were predicted, and it was found that the *CrJAR1* protein was mainly composed of α -helix. In addition, the recombinant expression plasmid pET-30b-*CrJAR1* was constructed and successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 after induction by IPTG. Induction at 16 and 37 °C after 16 hours, both showed the highest expression levels. In this paper, the bioinformatics analysis of *CrJAR1* protein in *Catharanthus roseus* was successfully carried out and heterologously expressed in *Escherichia coli*. The study will have deep effect on research of *CrJAR1* protein function *in vitro*, and provide instructive revelation for regulation of jasmonic acid signaling pathway, and even the regulation of the biosynthesis of secondary metabolites in *Catharanthus roseus*.

Key words: *Catharanthus roseus*, jasmonic acid-isoleucine synthase (*JAR1*), sequence analysis, prediction of tertiary structure, prokaryotic expression

茉莉酸(jasmonic acid, JA)是一种植物激素,它在植物体内广泛存在,是植物的生长调节物质。在植物中,茉莉酸类物质可以作为调节信号,通过积累次级代谢产物,从而调节植物的防御应答反应(杜红梅等,2009)。茉莉酸及其衍生物能够影响生物体内多个基因的表达,从而影响植物次级代谢产物的积累(Vom et al., 2007)。当植物受到外源胁迫或内源影响时,会产生相应的信号,这些信号可以促进植物体内 JA 的生成,JA 从过氧化物酶体中生成,而后被运送到细胞质中,由茉莉酸-异亮氨酸合成酶(*JAR1*)作用形成茉莉酸-异亮氨酸(JA-Ile)。JA-Ile 促进泛素连接酶复合物(SCF^{COI1})与茉莉素 ZIM 结构域蛋白(*JAZ*)形成复合物,当形成复合物后,26S 蛋白酶就会把 *JAZ* 蛋白水解掉。*JAZ* 蛋白被水解后,之前被抑制活性的转录因子 *MYC2* 就会被释放出来,可以和下游靶基因的 G-box 相结合,从而影响下游基因的表达,进而影响不同的次级代谢途径,生成一系列次级代谢产物(Wasternack & Strnad, 2015; Wasternack & Song, 2016)。

长春花(*Catharanthus roseus*)是夹竹桃科长春花属植物,其自身能够产生超过 130 种萜类吲哚生物碱(terpenoid indole alkaloids, TIAs),其中包括目前应用最广泛的天然植物抗肿瘤药物长春碱(vinblastine)和长春新碱(vincristine),它们可用于

治疗恶性淋巴瘤、急性白血病等疾病,此外,长春花中的阿玛碱(ajmalicine)可以起到降低血压以及治疗心脏等病症(Li et al., 2013),而蛇根碱(serpentine)能够止痛。长春质碱(catharanthine)可以使血糖降低,并且还能够在消毒止血,同时还有利尿的功能,长春质碱还是合成长春碱、长春新碱等生物碱的前体化合物(向蓓蓓等,2010)。但是由于这些萜类吲哚生物碱分布于长春花的不同组织器官中(Rischer et al., 2006),且含量很少,导致提取困难,且因结构复杂,合成难度非常大,因此许多研究者是通过利用基因工程的手段来提高 TIAs 的产量(杨致荣等,2005)。而在长春花的茉莉酸信号通路中,螺旋-环-螺旋(bHLH)、AP2/ERFs 和 WRKY 三个家族的转录因子都参与调控了 TIAs 的生物合成,其中, *CrMYC2* 是通过与 AP2/ERFs 转录因子家族中的 *ORCA2/3* 启动子上的 G-box 相似元件相结合,从而激活了转录因子基因的表达,进而调控了大多数 TIAs 的生物合成途径(Zhang et al., 2011)。

JAR1 作为茉莉酸信号的重要元件,它能够形成 JA-Ile,在植物次生代谢调节方面具有非常重要的作用,但是目前对于长春花中 *CrJAR1* 蛋白的研究还很少。本课题组在前期工作中成功地克隆了长春花中的 *JAR1* 基因(徐岩等,2017),即

CrJAR1, 并且在长春花叶片中过表达了 *CrJAR1*, 发现显著提高了合成长春质碱和文多灵途径中相关关键酶基因的表达量, 并且促进了文多灵和长春质碱的积累。为了进一步研究长春花中 *CrJAR1* 蛋白在茉莉酸信号通路中的功能以及对下游 TIAs 的生物合成的影响, 本研究将 *CrJAR1* 进行原核细胞表达, 初步确定了表达条件, 并对该蛋白的氨基酸序列以及其结构进行了分析。这为体外研究 *JAR1* 功能、深入研究茉莉酸信号通路调控次级代谢产物的生成具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

采取野生型长春花叶片为材料。pET-30b 载体和大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞均为本实验室保藏。TRNzol Reagent 试剂、RNase free DNase I、TIAN Script M-MLV 反转录酶、pGM-T 载体、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; Prime STAR 酶、ExTaq 酶、限制性核酸内切酶 (*Kpn* I、*Sac* I)、 T_4 DNA 连接酶购自 Takara 公司; 琼脂糖凝胶购自美国 Promega 公司; 其他试剂如乙醇、氯仿、异丙醇等均购自北京化工厂。

1.2 长春花 *CrJAR1* 蛋白的氨基酸序列分析

长春花 *CrJAR1* 基因的克隆在本实验室的前期已经完成 (徐岩等, 2017)。通过 ExPASy Proteomics Server 提供的在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>) 分析 *CrJAR1* 蛋白的氨基酸组成, 并且预测 *CrJAR1* 基因编码的蛋白质的理化性质, 通过 InterPro Scan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 来分析蛋白质的保守区域。分别使用 TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 及 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析长春花 *CrJAR1* 蛋白的亚细胞定位、是否含有信号肽以及跨膜区域, 通过 MEGA 5.1 软件的 UPGMA 法构建系统进化树, 使用在线软件 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 预测 *CrJAR1* 蛋白的二级结构, 使用

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive/RR9Bez/models/>) 预测三级结构。

1.3 pET-30b-*CrJAR1* 重组质粒的构建

利用限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 对 pGM-T-*CrJAR1* 质粒和 pET-30b 载体进行双酶切, 37 °C 恒温培养 3 h, 使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离。将酶切后的 *CrJAR1* 基因片段和 pET-30b 载体进行胶回收, 通过 T_4 DNA 连接酶连接, 连接体系: $10 \times T_4$ DNA Ligation Buffer 1 μ L, 回收的 pET-30b 载体 3 μ L, 酶切后的 *CrJAR1* 5 μ L, T_4 DNA Ligase 1 μ L。在 4 °C 连接 24 h。将连接产物 pET-30b-*CrJAR1* 转化到大肠杆菌 XL-10Gold 超级感受态细胞中。将连接产物 pET-30b-*CrJAR1* 加入到大肠杆菌 XL-10Gold 超级感受态细胞中, 冰上放置 5 min, 42 °C 水浴 30 s, 冰上放置 10 min, 加入 700 μ L 新鲜 LB 培养基, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 37 °C 震荡 1 h 后, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 涂布于平板上。挑取单菌落, 并利用 *CrJAR1* 引物进行菌落 PCR 验证, 确定阳性克隆, 并将正确的样品进行测序验证。

1.4 蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE 检测

将测序正确的阳性克隆接入 50 mL LB 培养基中, 37 °C 复苏, 并以 2% 的接入量接入 200 mL LB 培养基中, 37 °C 震荡培养至 OD_{600} 为 0.6 左右时, 加入 IPTG, 终浓度分别为 0.4、1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别在 16、37 °C 下诱导培养, 分别收集不同时间的表达产物 (0、2、4、8、16 h)。分别配制分离胶和浓缩胶, 首先配制浓度为 10% 的分离胶, 再配制浓度为 5% 的浓缩胶, 进行电泳时, 在浓缩胶部分, 首先保持电压为 80 V, 当到达分离胶以后, 调整电压, 使电压保持在 120 V, 当样品至分离胶底部时, 关闭电源, 将分离胶取出, 用考马斯亮蓝进行染色, 脱色后检验。

2 结果与分析

2.1 长春花 *CrJAR1* 氨基酸序列分析

长春花 *CrJAR1* 基因编码 585 个氨基酸 (图 1), 通过 ExPASy Proteomics Server 提供的在线软件 ProtParam 预测分析 *CrJAR1* 基因所编码的蛋白质

1	MGMLEEMPRE	FDPEQVITEF	EAMTEDAERV	QKETLKKILQ	ENGGTEYLMK	WGLDGRDPE	SFKNCVPIAT
71	HEDLEHYINR	IMEGDDSPIL	TEKPITISL	SSGTTTRGMPK	FVPFNDELME	TTMQIYKTSY	SFRNREFPVR
141	NGKCLQFIYS	SKQFKTKGGL	AAGTATTNVY	RDPKFKKTMK	AMQTPSCSPD	EVIFGPDFNQ	SLYCHLLCGL
211	IFWDEVQVIS	STFAHGIVHA	FRTFEHWEE	LCSDIREGKL	SSRISVPSIR	AAISKLLKPN	PELADRIYYK
281	CLRLSNWYGL	IPELFPNIRY	IYGIMTGSME	PYLKRLRHYA	GEVPLLSADY	GSSEGWIGAN	VNPKLPPEV
351	TYAVLPNIGY	FEFIPLKKCL	NGQEDGNSVS	LEAKPVGLTE	VKVGEEYEIL	VTSFAGLYRY	RLGDVWKVAG
421	FHNSTPELQF	ICRRNLLLLTI	NIDKNTEKDL	QLAVEAAAKV	LSEEKVEIVD	FTSRADSSTE	PGHYIIFWEI
491	SGEASDEILK	ECCNCLDKSF	LDAGYVSSRK	VNSIGPSELR	VWKRGTFHKI	LDHYVGLGAA	VSQFKTPRCI
561	GPTNGTVLQI	LCNNWKNYF	STAFS-				

图 1 CrJAR1 蛋白的氨基酸序列

Fig. 1 Amino acid sequence of CrJAR1 protein

的一些基本理化性质,推测 CrJAR1 蛋白的分子量为 65.95 kD,等电点 pI 为 5.73,分子式为 $C_{2959}H_{4614}N_{772}O_{880}S_{27}$,带正电荷的残基(Arg+Lys)总数为 65,带负电荷的残基(Asp+Glu)总数为 75,脂肪指数为 83.97,亲水性为 -0.254,不稳定指数为 40.02,这将 CrJAR1 蛋白归类为不稳定蛋白。通过使用 InterPro Scan 分析 CrJAR1 蛋白,其结果显示 CrJAR1 蛋白含有保守结构域,位于第 19~560 氨基酸处(茉莉酸酰胺合成酶,IPR031110),并且 CrJAR1 蛋白属于 GH3 家族。

JAR1 系统进化树分析结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,长春花与笋瓜和番木瓜的 JAR1 蛋白的亲缘关系比较近。SignalP 4.1 server 预测结果表明 CrJAR1 蛋白不含有信号肽,且不存在跨膜区域。通过使用 TargetP 1.1 Server 分析长春花 CrJAR1 蛋白的亚细胞定位,其中叶绿体的定位系数为 0.124,线粒体的定位系数为 0.086,其他位置为 0.912,因此该蛋白可能位于细胞质中。进一步利用 SOPMA 预测,发现 α -螺旋占 41.88%,不规则卷曲占 38.8%,表明它们构成了蛋白的主要结构,其次还包括部分延伸链(14.36%)和少部分 β -转角(4.96%)分散在蛋白质中。SWISS-MODEL 预测 CrJAR1 蛋白的三级结构,如图 3 所示,以 CrJAR1 蛋白的同源模型 5ech.2.A,在第 10~584 位氨基酸建模,其模型覆盖率为 64.51%。

2.2 原核表达载体重组质粒的构建

通过 *Kpn* I 和 *Sac* I 对测序正确的 pGM-T-

CrJAR1 质粒和 pET-30b 载体进行双酶切,分别回收载体片段和 *CrJAR1* 片段,通过 T_4 DNA 连接酶进行连接,构建 pET-30b-*CrJAR1* 原核表达载体,并转化到大肠杆菌 XL-10Gold 超级感受态细胞中。挑取单克隆菌落,经过 PCR 验证后,在 1 700 bp 左右存在明显条带。提取质粒后,用 *Kpn* I 和 *Sac* I 进行双酶切,其结果如图 4 所示,结果正确。将该菌液送至北京华大基因进行测序,测序结果与前期克隆 *CrJAR1* 基因的结果一致,证明 pET-30b-*CrJAR1* 原核表达载体构建成功。

2.3 重组蛋白的原核表达与 SDS-PAGE 分析

将 pET-30b-*CrJAR1* 转入 BL21 表达宿主中,复苏后扩大培养至 200 mL LB 培养基中,待 OD_{600} 为 0.6 左右时,取出 2 mL 菌液作为 0 h 样品,然后分别加入终浓度 0.4、1 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 在 16、37 $^{\circ}$ C 诱导条件诱导表达,并且在 2、4、8、16 h 四个时间点分别收集菌液。通过 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。如图 5 所示,在 70 和 50 kD 之间有明显条带,与 CrJAR1 蛋白的分子量 65.95 kD 相近,并且在 16、37 $^{\circ}$ C 两种温度诱导条件下,随着诱导时间的增加,条带明显加深,表明随着诱导时间的增加,CrJAR1 蛋白的表达量越来越多。上述研究为后续纯化以及体外研究提供一定依据。

3 讨论与结论

茉莉酸-异亮氨酸合成酶(JAR1)的功能在许

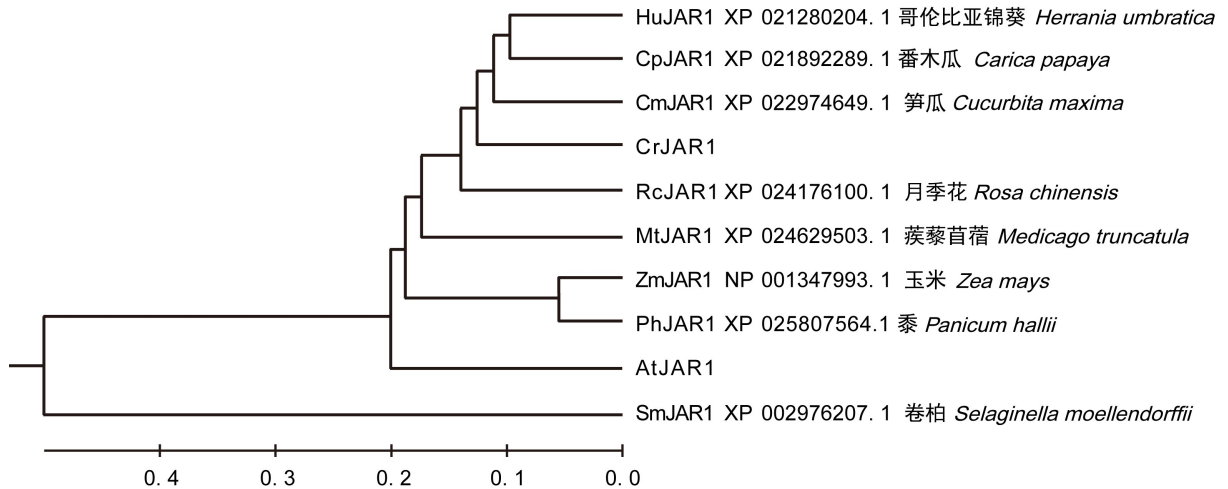


图 2 CrJAR1 系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of CrJAR1

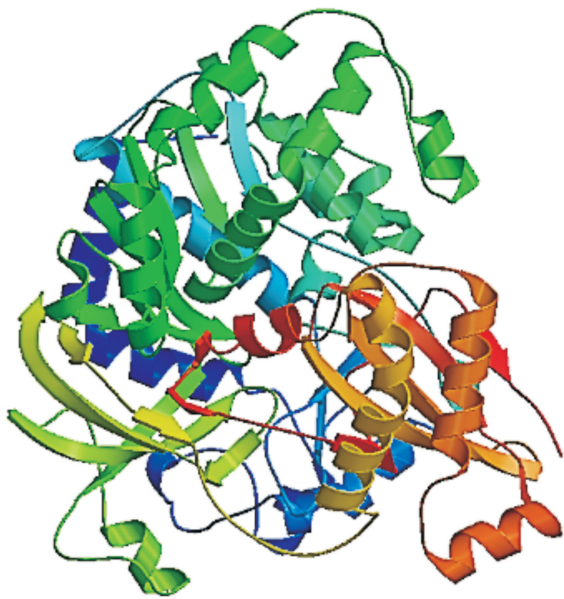


图 3 CrJAR1 蛋白质的三级结构预测

Fig. 3 Prediction of tertiary structure of CrJAR1 protein

多植物中都有所报道,其作为茉莉酸信号通路中的关键酶,在调控茉莉酸信号方面起着十分重要的作用(Chen et al., 2018)。在茉莉酸信号通路中,茉莉酸通过腺苷化与异亮氨酸共价结合形成茉莉酸-异亮氨酸,从而开启下游的信号传导途径,其JAR1关键酶的作用机理分为以下三个部分:腺苷化;共价结合;抗性基因表达的诱导(Shen et al., 2016)。长春花作为一种天然的抗癌抗肿

瘤药物,其本身含有多种萜类吲哚生物碱,但由于这些生物碱在长春花中的合成含量甚少(Pandey et al., 2016),其合成量远远小于需求量,所以近年来对于萜类吲哚生物碱的合成途径的研究越来越多(Caputi et al., 2018)。其中,针对茉莉酸信号调节长春花中萜类吲哚生物碱的合成相关研究还很少。在使用外源激素处理植物时,适宜的浓度和处理时间可以使产物大量合成,但浓度过高或处理时间过长则会使产量下降(乞永艳等, 2006),并且大量使用外源激素成本较高,且易造成环境污染。但通过基因工程的手段来影响相关基因的表达,则可以避免这些问题,并且可以提高长春花中次级代谢产物的产量,因此,成功克隆并且了解合成JA-Ile途径中的关键酶基因,对于目前的生产和研究来说是十分重要的。本实验室的前期研究发现可以通过对茉莉酸信号通路的级联放大来增加长春花中萜类吲哚生物碱的生物合成(徐岩等,2017),但对于CrJAR1蛋白的功能研究尚不完全。本研究克隆了长春花中的CrJAR1基因,并确定该基因编码585个氨基酸,并且对长春花CrJAR1蛋白进行了生物信息学分析。经过亚细胞定位分析,预测出该蛋白可能定位于细胞质中,表明CrJAR1蛋白是在细胞质中发挥功能的(Wasternack & Strnad, 2015; Wasternack & Song, 2016)。经过对CrJAR1蛋白的保守结构域进行预

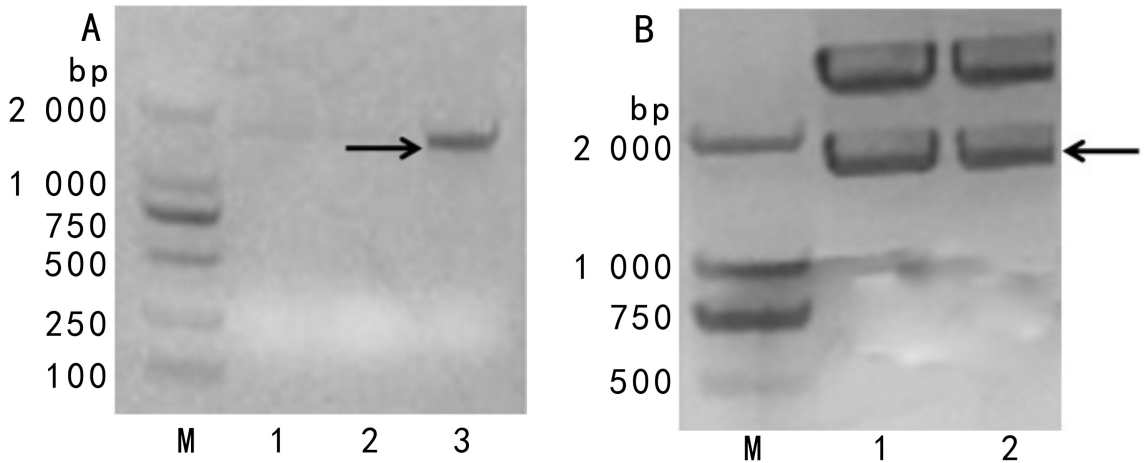
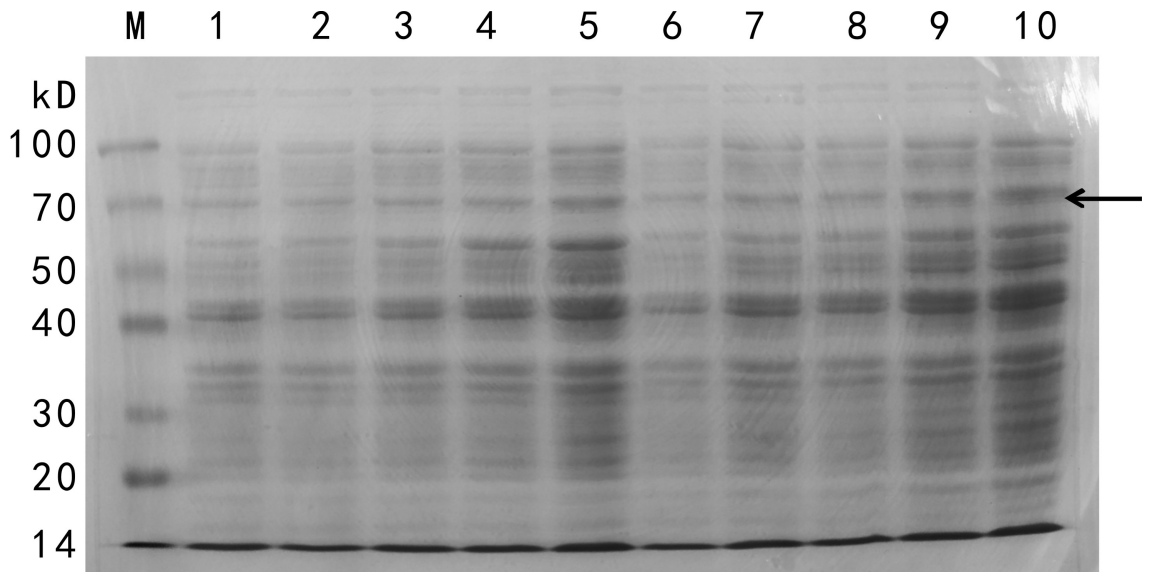


图 4 原核表达载体 pET-30b-*CrJAR1* 的 PCR 和酶切验证

Fig. 4 PCR and restriction enzyme digestion of prokaryotic expression vector pET-30b-*CrJAR1*



M. 蛋白 maker; 1-5. 16 °C 诱导 0、2、4、8、16 h 全菌; 6-10. 37 °C 诱导 0、2、4、8、16 h 全菌。

M. Protein maker; 1-5. 16 °C induced 0, 2, 4, 8, 16 h whole bacteria; 6-10. 37 °C induced 0, 2, 4, 8, 16 h whole bacteria.

图 5 不同温度诱导表达 *CrJAR1* 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of *CrJAR1* induced by different temperatures

测,发现该蛋白含有茉莉酸酰胺合成酶保守的结构域,属于 GH3 家族成员,并且通过进化树分析发现长春花 *CrJAR1* 蛋白与笋瓜和番木瓜的 *JAR1* 蛋白的亲缘关系比较近,表明 *CrJAR1* 蛋白可能是在长春花的茉莉酸信号途径中合成 JA-Ile 的关键酶。构建重组质粒 pET-30b-*CrJAR1*,并且成功在大肠杆菌 BL21 中异源表达 *CrJAR1* 蛋白。通过不同浓

度 IPTG 在不同温度下进行诱导,发现诱导表达 16 h 后,*CrJAR1* 蛋白表达量最高。此外,该酶体外功能验证也在进行。尽管如此,现阶段的研究仍有助于我们深入研究长春花中茉莉酸生物合成途径以及信号传导机制,并为研究长春花中次级代谢产物的生物合成提供依据。

目前对于长春花中次级代谢产物的研究主要

集中在次级代谢产物的合成途径上,但仍然有很多方面的因素可以影响次级代谢产物的生成,如内源外源的刺激以及多种植物激素如茉莉酸、水杨酸等的调控(Goldhaber et al., 2014)等,因此,我们将继续对长春花中茉莉酸-异亮氨酸合成酶的功能以及茉莉酸信号通路中其他重要的信号调节因子进行研究,进一步探讨它们对次级代谢产物合成的影响,为后续的研究奠定理论基础。

参考文献:

- CAPUTI L, FRANKE J, FARROW SC, et al., 2018. Missing enzymes in the biosynthesis of the anticancer drug vinblastine in Madagascar periwinkle [J]. *Science*, 360: 1235-1239.
- CHEN HJ, FU TY, YANG SL, et al., 2018. FIN219/JAR1 and cryptochrome1 antagonize each other to modulate photomorphogenesis under blue light in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 14(3): e1007248.
- DU HM, TANG DM, HUANG DF, 2009. Effects of methyl jasmonate on *in vitro* tuberization of taro (*Colocasia esculenta*) [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci)*, 27(5): 480-484. [杜红梅,唐东梅,黄丹枫,2009. 茉莉酸甲酯对芋试管成球的影响 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 27(5):480-484.]
- GOLDHABER GD, MUSTAFA NR, VERPOORTE R, 2014. Jasmonic acid effect on the fatty acid and terpenoid indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Molecules*, 19(7): 10242-10260.
- LI CY, LEOPOLD AL, SANDER GW, et al., 2013. The ORCA2 transcription factor plays a key role in regulation of the terpenoid indole alkaloid pathway [J]. *BMC Plant Biol*, 13: 155-171.
- PANDEY SS, SINGH S, BABU CS, et al., 2016. Fungal endophytes of *Catharanthus roseus* enhance vindoline content by modulating structural and regulatory genes related to terpenoid indole alkaloid biosynthesis [J]. *Sci Rep*, 6:26583.
- QI YY, BOVY A, TANG YX, 2006. Effects of exogenous jasmonic acid on isoflavonoids in *Glycine max* [J]. *Soybean Sci*, 25(1): 87-90. [乞永艳,Arnaud Bovy,唐益雄,2006. 外源茉莉酸对大豆异黄酮的影响 [J]. 大豆科学, 25(1):87-90.]
- RISCHER H, ORESIC M, LAAKSO TS, et al., 2006. Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells [J]. *PNAS*, 103(14): 5614-5619.
- SHEN Q, LU X, YAN TX, et al., 2016. The jasmonate-responsive AaMYC2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 210: 1269-1281.
- TANG Q, MA XJ, MO CM, et al., 2011. An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis [J]. *BMC Genomics*, 12: 343-355.
- VOM ED, SOARES SM, KIJNE JW, et al., 2007. Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-hook DNA-binding proteins [J]. *Plant Physiol*, 144: 1680-1689.
- WASTERNAK C, SONG S, 2016. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription [J]. *J Exp Bot*, 68: 1303-1321.
- WASTERNAK C, STRNAD M, 2015. Jasmonate signaling in plant stress responses and development-active and inactive compounds [J]. *New Biotechnol*, 33: 604-613.
- XIANG BB, ZHU YR, WANG Y, 2010. Advances in genetic engineering of the alkaloid synthesis pathway of *Catharanthus roseus* [J]. *Bull Biol*, 45(10): 4-8. [向蓓蓓,朱晔荣,王勇,2010. 长春花吲哚生物碱合成途径的基因工程研究进展 [J]. 生物学通报,45(10):4-8.]
- XU Y, HAN YQ, YU F, et al., 2017. Promoting the biosynthesis of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* by overexpressing *JAR1* [J]. *Biotechnol Bull*, 33(6): 62-68. [徐岩,韩玉乾,于放,等,2017. 过表达长春花 *JAR1* 基因促进文朵灵和长春质碱的生物合成 [J]. 生物技术通报,33(6):62-68.]
- YANG ZR, MAO X, LI RZ, 2005. Research progress in genetic engineering of plant secondary metabolism [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 31(1): 11-18. [杨致荣,毛雪,李润植,2005. 植物次生代谢基因工程研究进展 [J]. 植物生理与分子生物学报,31(1): 11-18.]
- ZHANG HT, HEDHILI S, MONTIEL G, et al., 2011. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the *ORCA* genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant J*, 67(1): 61-71.

(责任编辑 周翠鸣)