

• 农业生物技术 •

洋葱 *AcFMO* 克隆及其在蒜氨酸生物合成过程中的功能分析

吴文卉^{1,2}, 徐洋^{1,2}, 张雅迪^{1,2}, 于郑娇^{1,2}, 庞雨濛^{1,2}, 秦蕾^{1,2*}, 王勇^{1,2*}

1 农业农村部东北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030

2 东北农业大学园艺园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

吴文卉, 徐洋, 张雅迪, 于郑娇, 庞雨濛, 秦蕾, 王勇. 洋葱 *AcFMO* 克隆及其在蒜氨酸生物合成过程中的功能分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1076-1088.

WU Wenhui, XU Yang, ZHANG Yadi, YU Zhengjiao, PANG Yumeng, QIN Lei, WANG Yong. Cloning and functional analysis of *AcFMO* from onion during alliin biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1076-1088.

摘 要: 黄素单氧化酶(flavin-containing monooxygenase, FMO)是 CSOs 生物合成途径中的关键酶, 具有硫氧化功能。为了探讨 FMO 在洋葱 CSOs 合成中的功能, 本研究基于转录组数据库和系统发育分析获得了一个可能参与蒜氨酸合成的 *AcFMO* 基因, 该基因的 cDNA 为 1 374 bp, 编码 457 个氨基酸, 在进化上与大蒜的 *AsFMO* 亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)表明 *AcFMO* 在洋葱的花中表达量最高, 在叶鞘中表达量最低。亚细胞定位结果显示 *AcFMO* 基因产物广泛分布于整个细胞。构建了酵母表达载体, 转化酵母后进行体外酶功能分析, 确定通过酵母真核表达的 *AcFMO* 蛋白在体外具有催化活性, 能够催化 S-烯丙基-L-半胱氨酸合成蒜氨酸。总之, *AcFMO* 的克隆和功能鉴定对了解洋葱中 CSOs 的生物合成具有重要的参考价值。

关键词: 洋葱; 蒜氨酸; 黄素单氧化酶; 硫氧化

资助项目: 黑龙江省重点研发项目(GA21B012); 黑龙江省高校协同创新成果项目(LJGXCG2022-040); 东北农业大学“东农学者计划”(19QC08)

This work was supported by the Heilongjiang Province Key Research and Development Project (GA21B012), the Heilongjiang Province University Collaborative Innovation Achievement Project (LJGXCG2022-040), and the Northeast Agricultural University “East Agricultural Scholar Program” (19QC08).

*Corresponding authors. E-mail: QIN Lei, qinlei@neau.edu.cn; WANG Yong, yongwang@neau.edu.cn

Received: 2022-07-24; Accepted: 2023-10-10; Published online: 2023-10-17

Cloning and functional analysis of *AcFMO* from onion during alliin biosynthesis

WU Wenhui^{1,2}, XU Yang^{1,2}, ZHANG Yadi^{1,2}, YU Zhengjiao^{1,2}, PANG Yumeng^{1,2},
QIN Lei^{1,2*}, WANG Yong^{1,2*}

1 Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (Northeast Region), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150030, Heilongjiang, China

2 College of Horticulture and Landscape Architecture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: Flavin-containing monooxygenase (FMO) is the key enzyme in the biosynthesis pathway of CSOs with sulfur oxidation. In order to explore the molecular regulatory mechanism of FMO in the synthesis of onion CSOs, based on transcriptome database and phylogenetic analysis, one *AcFMO* gene that may be involved in alliin synthesis was obtained, the *AcFMO* had a cDNA of 1 374 bp and encoded 457 amino acids, which was evolutionarily closest to the *AsFMO* of garlic. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) indicated that *AcFMO* was the highest in the flowers and the lowest in the leaf sheaths. The results of subcellular localization showed that the *AcFMO* gene product was widely distributed throughout the cell. A yeast expression vector was constructed, and the *AcFMO* gene was ecotopically overexpressed in yeast to further study the enzyme function *in vitro* and could catalyze the synthesis of alliin by S-allyl-L-cysteine. In summary, the cloning and functional identification of *AcFMO* have important reference value for understanding the biosynthesis of CSOs in onions.

Keywords: onion (*Allium cepa* L.); alliin; flavin monooxygenase; sulfur oxidation

洋葱(*Allium cepa* L.)为百合科葱属植物,又名葱头、圆葱、玉葱和球葱。洋葱在我国种植范围广泛,是目前公认具有一系列健康益处的最重要的园艺作物之一^[1]。洋葱富含多种营养成分,具有葱属植物特有的辛香风味,因其极高的药用价值和食疗保健功能被誉为“蔬菜皇后”^[2]。

S-烷基(烯)半胱氨酸亚砜(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, CSOs)是一类由半胱氨酸衍生的次级代谢物,广泛存在于葱属植物中。CSOs主要分为蒜氨酸(alliin)、异蒜氨酸(isoalliin)、丙氨酸(methiin)和甲硫氨酸(propiin)。蒜氨酸酶是CSOs的水解酶,主要存在于液泡中,在植物体

内与CSOs互相隔离、同时存在,当植物组织遭受外界损伤时,蒜氨酸酶(EC 4.4.1.4)与CSOs产生接触,并将CSOs水解为相应的亚磺酸^[3],由于亚磺酸的不稳定性,会立即转化为多种具有生物活性的含硫化合物,这些次生代谢产物使洋葱具有抗菌、抗真菌、抗病毒、免疫刺激、抗氧化、抗癌、抗血栓、降血糖和降低血压^[4-5]等功能。CSOs在洋葱保健功能上的重要性毋庸置疑,但迄今为止其生物合成的分子机制尚不明晰。目前在大蒜^[6]和拟南芥^[7]中的研究显示,黄素单氧化酶(flavin-containing monooxygenase, FMO)负责蒜氨酸的生物合成中的S-氧化反应,但它在洋葱中具体参与蒜氨酸合成的哪步反应

并不清晰。探究洋葱黄素单氧化酶(FMO)在蒜氨酸合成途径中的作用,对提高洋葱保健价值和开发功能性洋葱产品具有重要的理论意义及应用价值。

为了明确洋葱蒜氨酸生物合成及其代谢途径的相关步骤,本研究利用洋葱的转录组测序结果,筛选获得具有 S-加氧活性的黄素单氧化酶 *AcFMOs* 家族基因,依据进化树分析,选择了一个与大蒜 *AsFMO1* 亲缘关系最近的洋葱 *AcFMO* 基因进行克隆,通过该基因的表达分析、亚细胞定位及酵母转化后的体外酶功能分析,研究其对 S-烷基(烯)-L-半胱氨酸硫氧化物生物合成及其转化为各种含硫化合物的分子调控,为洋葱中 CSOs 的发生、生物合成及其转化为多种含硫化合物的化学转化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

基因克隆及表达材料所用材料为长日照洋葱品系 L17136,2021 年 2 月下旬播种,至 4 月中旬幼苗达到 4 片真叶时定植于哈尔滨市东北农业大学向阳基地。7 片真叶时选取生长健康的植株幼嫩叶片作为基因克隆材料;当年收获的鳞

茎贮藏后,于 2022 年 4 月中旬定植,6 月中旬取 5 株洋葱植株的鳞茎、叶片、花茎、花和叶鞘,分别按取样部位混合,用于基因表达分析。所有样品经液氮速冻后储存于-80 °C 用于下一步试验。

亚细胞定位所用的材料为本氏烟草。烟草种子播种于营养土中,出苗后设置光照培养箱的生长条件为:温度 26 °C,相对湿度 60%,光照/黑暗时长为 16 h/8 h^[8]。当烟草生长到 7-8 叶期取健壮的第 4-5 片真叶用于试验。

本实验所用的 pCBC-MT1T2、pSuper1300-eGFP、pTRV1、pYES2、pHUN411、pTRV2 载体和酿酒酵母 WAT11 菌株由本实验室保存,大肠杆菌 DH5 α 感受态购于北京擎科生物科技有限公司哈尔滨分公司,GV3101 农杆菌感受态和 pEASY-T3 载体均购于北京全式金生物技术股份有限公司。

1.2 引物

依据转录组测序数据筛选得到 *AcFMO* (90340)基因的编码序列(coding sequence, CDS)全长序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *AcFMO* 的基因克隆、基因表达分析以及载体构建引物。引物信息见表 1。

表 1 文中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Purposes	Primer name	Primer sequence (5'→3')
Construction of <i>AcFMO</i> subcellular localization vectors	<i>AcFMO</i> -F'	GCTCTAGAATGATTTCCCTCATCTTATTTGTC
	<i>AcFMO</i> -R'	GGGGTACCTGAAAGATATTTGTTGAAAGTTTC
<i>AcFMO</i> CDS full-length sequence amplification	<i>AcFMO</i> -F	ATGATTTCCCTCATCTTATTTGTC
	<i>AcFMO</i> -R	TTATGAAAGATATTTGTTGAAAGTT
<i>AcFMO</i> yeast vector construction	<i>AcFMO</i> -J-F	GGGGTACCATGATTTCCCTCATCTTATTTGTC
	<i>AcFMO</i> -J-F	GCTCTAGATTAGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCTGA AAGATATTTGTTGAA
<i>AcFMO</i> q-PCR	<i>AcFMO</i> -q-F	CCATAACTATCGTATCCCTGAACC
	<i>AcFMO</i> -q-R	AGTGCCCTCAGTTATTGACCTATT
β - <i>AcActin</i> (housekeeping gene in onion) q-PCR	β - <i>AcActin</i> -F	ACACGGCCTGGATAGCAACAT
	β - <i>AcActin</i> -R	AGAGCAGTATTCCCAAGCATT

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

利用 TRIzol 试剂法提取洋葱 L17136 营养生长期幼嫩叶片总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性。cDNA 第一条链根据 TOYOBO 的 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 说明书操作。

1.2.2 *AcFMO* 基因的克隆

提取洋葱总 RNA, 检测 RNA 完整性和 RNA 浓度, 样品 RNA 达到要求后进行反转录, 反转录按照 TOYOBO 的 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 说明书操作。高效率逆转录试剂盒反转录后, 通过 PCR 扩增获得 *AcFMO* 基因的全长。反应总体积 20 μ L, 包括 KOD Mix 10 μ L, 引物(*AcFMO*-F, *AcFMO*-R, 浓度 10 μ mol/L)各 0.8 μ L, cDNA 2 μ L, 灭菌水补充至 20 μ L。扩增反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 20 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 10 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.3 *AcFMO* 生物信息学分析

利用 MEGA 7.0 软件对引自于 NCBI 的拟南芥、水稻、大蒜的 FMO 与 *AcFMO* 同源氨基酸序列进行系统进化树分析。利用 DNAMAN 对 *AcFMO* 的氨基酸序列与大蒜和拟南芥的 FMO 进行同源序列比对分析。

1.2.4 *AcFMO* 基因的表达模式分析

提取洋葱根、茎、叶、花茎和花组织的 RNA, 反转录后, 调整各组织的 cDNA 均一化为 100 ng/ μ L。以 *AcFMO*-q-F 和 *AcFMO*-q-R 进行 qPCR 分析, 内参基因为 β -*Actin*。反应体系为: cDNA 模板 2 μ L、SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 10 μ L、*AcFMO*-q-F (10 μ mol/L), *AcFMO*-q-R (10 μ mol/L)各 0.8 μ L、ddH₂O 6.4 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s。通过 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法^[9]和 Excel 2013 进行数据分析。每个样品设 3 个

生物学重复, 每个生物学设 3 个技术重复。

1.2.5 *AcFMO* 亚细胞定位分析

选取 pSuper1300-eGFP 载体上 *Xba* I 和 *Kpn* I 限制性酶切位点进行引物设计(表 1), 在下游引物设计时去掉终止密码子(TAA), 并在 5'端再加上 *Kpn* I 限制性酶切位点(图 1A)。PCR 体系及条件同 1.2.2。利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Kpn* I 分别酶切 pSuper1300-eGFP 载体和目的片段, 胶回收双酶切后的产物, T4 DNA 连接酶切后的载体与目的片段。将连接产物转化至大肠杆菌, 鉴定阳性克隆后, 测序后提取质粒, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。将重组载体 pGFP-*AcFMO* 和空载体 pSuper1300-eGFP 利用冻融法转化至农杆菌, 具体操作见北京全式金生物技术股份有限公司 GV3101 农杆菌感受态说明书。将浸染液注射到幼嫩烟草叶片(大约 4-6 周)中, 暗处理 24 h 后, 在 16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 2 d, 切取注射过浸染液的烟草叶片, 利用激光共聚焦显微镜进行荧光成像。

1.2.6 目的基因真核表达和功能验证

利用 pYES2 载体上 *Kpn* I 和 *Xba* I 这 2 个限制性酶切位点设计引物(表 1), PCR 体系及条件同 1.2.2。将 *AcFMO* 基因以及 C-端含 6His 标签的 DNA 片段通过酶切连接的方法插入多克隆位点上, 经测序确认成功。构建酵母载体 pYES2-*AcFMO*-6His(图 1B)。PCR 扩增目的片段后将 pYES2 载体和目的片段双酶切, T4 DNA 连接酶连接载体与目的片段, 连接产物转化至大肠杆菌, 利用浑浊的菌液为模板进行 PCR 扩增, 鉴定阳性克隆, 测序后提取质粒, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

重组载体转化酵母所需溶液: 聚乙二醇/醋酸锂(PEG/LiAc)溶液, 1.1 \times 醋酸锂缓冲液(TE/LiAc)溶液, 0.9% (质量体积分数) NaCl 溶液。制备酵母感受态, 转化至酵母感受态^[10]。

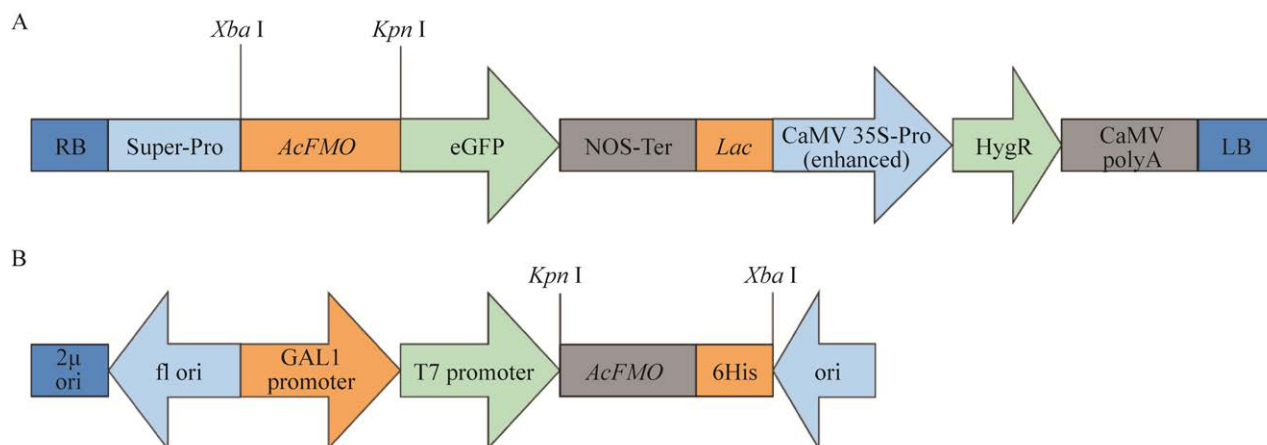


图 1 pGFP-AcFMO (A)与 pYES2-FMO (B)载体示意图

Figure 1 The pGFP-AcFMO vector (A) and the pYES2-FMO vector (B) map.

取超低温保存的重组酵母菌在缺尿嘧啶 (SC-URA)平板上(含 2%葡萄糖)上重划线培养, 使用 Coolber 公司的 Yeast Total Protein Extraction Kit 操作, -80°C 保存备用。然后进行 Western blotting 检测, 使用 GE ImageQuant800 进行化学发光成像检测, 保存图像结果。

以 S-烯丙基-L-半胱氨酸为底物, 与 *AcFMO* 基因酵母总蛋白进行体外反应, 反应后进行 HPLC 检测。具体步骤如下: 首先在离心管中加入终浓度为 $500\ \mu\text{mol/L}$ 的 S-烯丙基-L-半胱氨酸、 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 粗蛋白、 $50\ \text{mmol/L}$ Tris-HCl (pH 7.8)、 $500\ \mu\text{mol/L}$ NADPH、 $500\ \mu\text{mol/L}$ FAD、 $0.1\ \text{mmol/L}$ EDTA; 30°C 孵育 10 h; 反应物使用离心超滤装置去除反应混合物中的蛋白质 (分子量截留 $10\ \text{kDa}$); 反应物过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜, 将滤液转至液相专用小棕瓶的内插管中, 进行 HPLC 检测, 检测方法: Waters 1260 II 高效液相色谱仪, XDB-C18 ($4.6\ \text{mm}\times 150\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$), DAD 检测器, 检测波长为 $214\ \text{nm}$, $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=80:20$, 流速为 $0.7\ \text{mL/min}$, 进样量 $20\ \mu\text{L}$ 。

2 结果与分析

2.1 洋葱 FMOs 的筛选和 *AcFMO* 基因的克隆

基于本实验室洋葱转录组测序数据^[11], 结合注释及结构域分析, 筛选出了 7 个洋葱 FMO 成员(表 2), 为了获得与洋葱蒜氨酸合成相关的 FMO 基因, 以 MEGA 7.0 软件构建了洋葱 FMO 家族与拟南芥、大蒜和水稻 FMO 氨基酸序列的系统发育树。FMOs 的系统发育关系表明洋葱的 7 个 FMOs 分别属于 FMO 家族的 3 个分支。如图 2 所示, cluster-29851.101991 ($1\ 554\ \text{bp}$)、cluster-29851.120590 ($771\ \text{bp}$)属于 Plant clade I,

表 2 洋葱 7 个 FMO 基因列表

Table 2 List of 7 FMO genes in onion

Gene name	Gene length (bp)	Amino acid length (aa)
Cluster-29851.172991	1 218	405
Cluster-29851.172992	1 047	348
Cluster-29851.76044	1 128	375
Cluster-29851.76046	1 128	375
Cluster-29851.101991	1 554	517
Cluster-29851.120590	771	256
Cluster-29851.90340	1 374	457

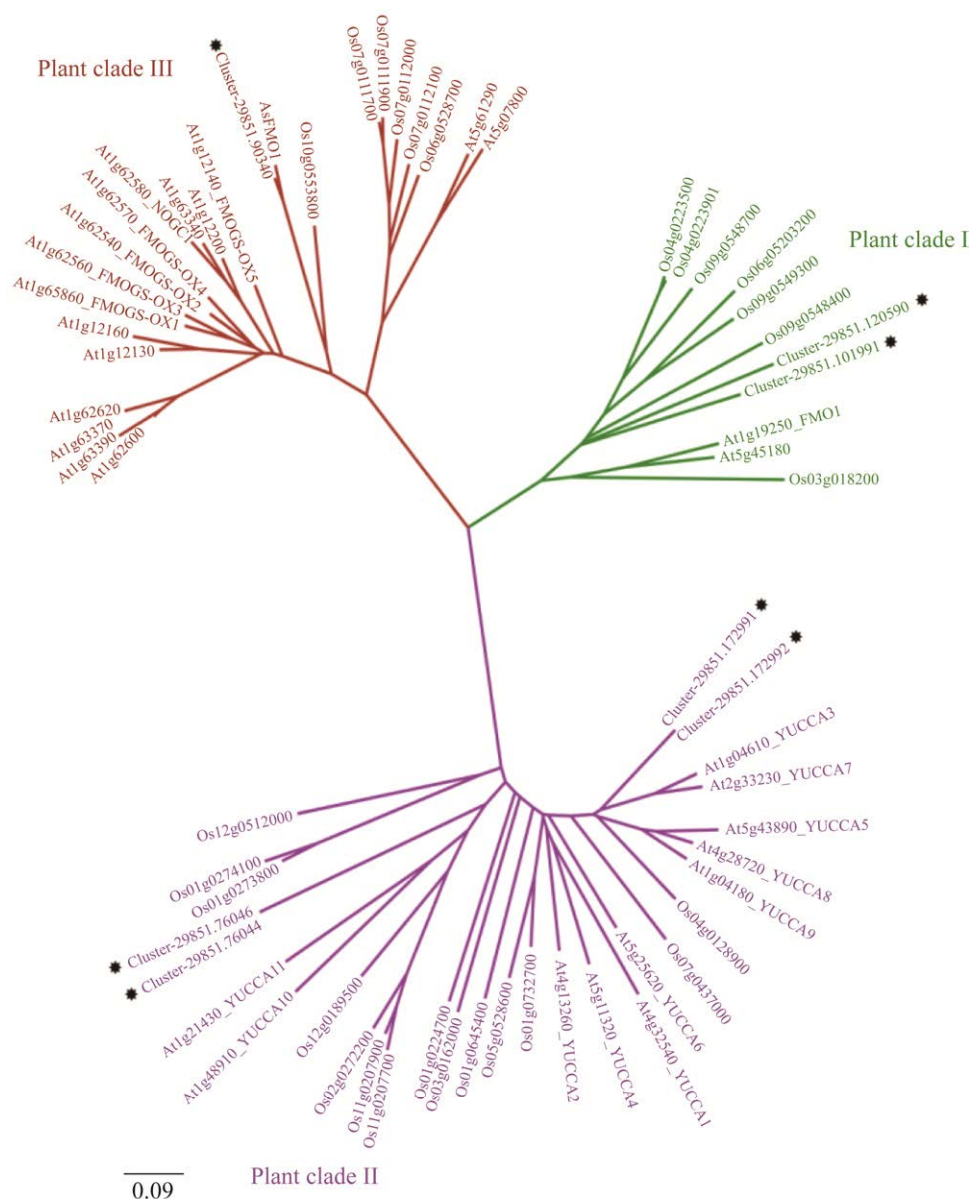


图2 FMO 进化树分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of FMO. The FMO gene of onions is marked with a black asterisk.

cluster-29851.172991 (1 218 bp)、cluster-29851.172992 (1 047 bp)、cluster-29851.76044 (1 128 bp)和 cluster-29851.76046 (1 128 bp)属于 Plant clade II, 只有 cluster-29851.90340 (1 374 bp)与拟南芥中负责芥子油苷生物合成的 5 个 FMO_{GS-ox} 基因处于 Plant clade III, 大蒜中参与蒜氨酸生物合成的 *AsFMO* 基因也处在这个分支上, 且与

cluster-29851.90340 (1 374 bp)紧密相邻, 说明二者在亲缘关系上最为接近。拟南芥中 FMO_{GS-ox} 和大蒜中 FMO 基因分别在芥子油苷和蒜氨酸生物合成中起着重要作用, 其所编码的黄素单氧化酶具有硫氧化作用, 这也表明了 cluster-29851.90340 (1 374 bp)基因可能参与洋葱中 CSOs 生物合成的 S-氧化反应, 因此, 将其

2.2 AcFMO 与大蒜、拟南芥 FMO 的同源性比对

利用软件将 *AcFMO* 与拟南芥中负责芥子油苷生物合成的 5 个 *FMO_{GS-OX}* 基因、大蒜中参与蒜氨酸生物合成的 *AsFMO* 基因的氨基酸序列进行多重比对分析, 结果发现这 7 个 FMOs 的序列一致性为 74%, 进一步分析其结构, 发现它们都存在 FAD 结合基序、TGY 基序、NADPH 结合基序和 FMO 识别序列基序(图 3)。*AcFMO* 编码的氨基酸具有 FAD 结合、TGY

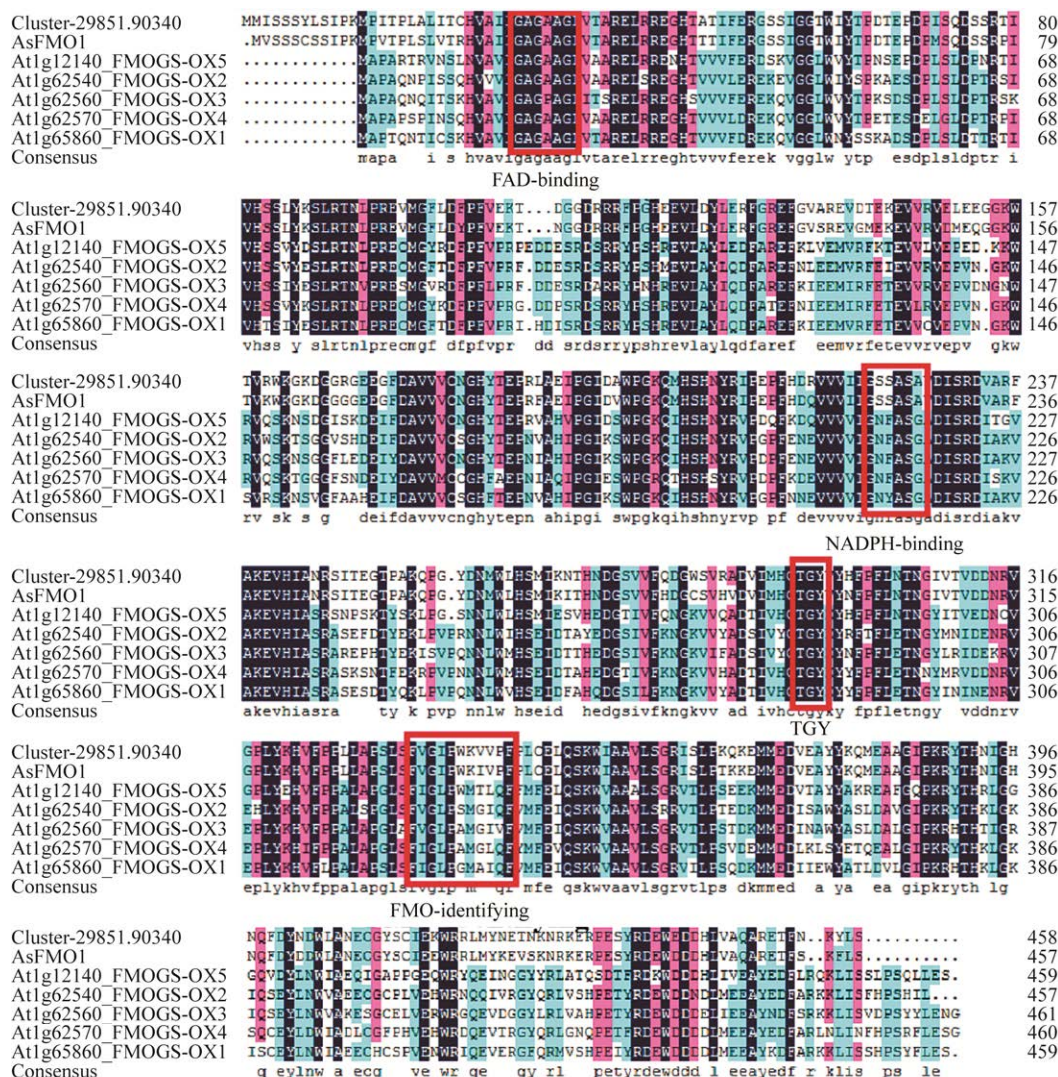


Figure 3 Homology comparison of FMO amino acid sequences.

NADPH 结合和 FMO 识别基序,其位置与 AtFMO (拟南芥)、AsFMO1 (大蒜)基序相同,进一步表明 *FMOs* 基因在物种进化过程中高度保守。

2.3 *AcFMO* 基因的表达模式分析

为明确 *AcFMO* 基因的时空表达特性,以 β -*AcActin* 为内参,利用 q-PCR 技术检测该基因在叶片、鳞茎、叶鞘、花和花茎中的基因表达情况。结果表明因不同器官中表达量差异达到极显著水平,表明 *AcFMO* 基因的组织特异性表达较强,它广泛表达于洋葱植株的各个器官;但在表达水平上,不同器官中表达量差异显著:以花中表达量最高,约为叶片、鳞茎和花茎的 2 倍;在叶鞘中表达量最低,表达量约为叶片、鳞茎和花茎的 50% (图 4)。

2.4 *AcFMO* 基因的亚细胞定位

根据载体 pSuper1300-eGFP 上的酶切位点 *Xba* I 和 *Kpn* I 设计 *AcFMO* 的克隆引物,构建亚细胞定位载体。对转化子进行 PCR 检测,如图 5A 所示,将得到 1 374 bp 的转化子质粒进行双酶切鉴定,如图 5B 所示,检测无误后送往华大基因测序,与基因序列比对完全一致,表明 pGFP-*AcFMO* 载体构建成功。

将 pGFP-*AcFMO* 融合载体与 pSuper1300-eGFP 空载分别注射到幼嫩的烟草叶片中,暗处理后,通过共聚焦显微镜观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)与融合蛋白的表达情况。如图 6 所示, pSuper1300-eGFP 空载体在 GFP 激发光下,细胞质、细胞核以及细胞膜都有绿色荧光蛋白信号, pGFP-*AcFMO* 融合蛋白

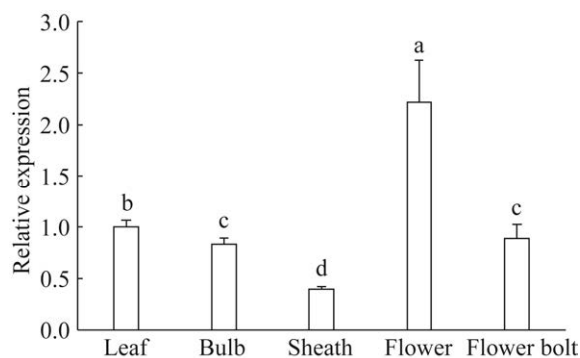


图 4 洋葱不同组织中 *AcFMO* 的相对表达量 Leaf: 叶片; Bulb: 鳞茎; Sheath: 叶鞘; Flower: 花; Flower bolt: 花茎. 不同小写字母表示差异表达显著水平($P<0.05$)

Figure 4 The relative expression of *AcFMO* in different tissues of onion. Different lowercase letters showed significant difference at 0.05 level.

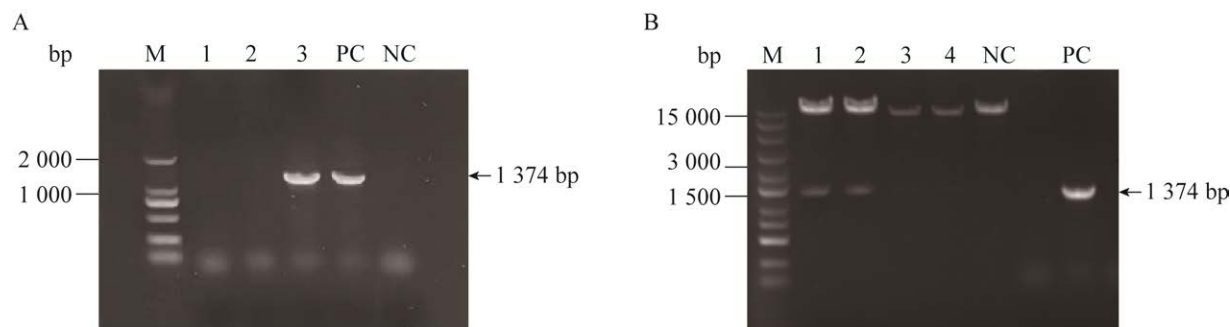


图 5 *AcFMO*-eGFP 菌液 PCR (A)及双酶切验证(B)

Figure 5 PCR (A) and double digestion verification (B) of *AcFMO*-eGFP bacterial broth. A: PCR validation of bacterial solution. M: DNA marker 2000; Lane 1–3 represents *Escherichia coli*. B: Double digestion validation. M: DNA marker 15000; Lane 1–4 is pGFP-*AcFMO* double digestion validation. NC: Negative control; PC: Positive control.

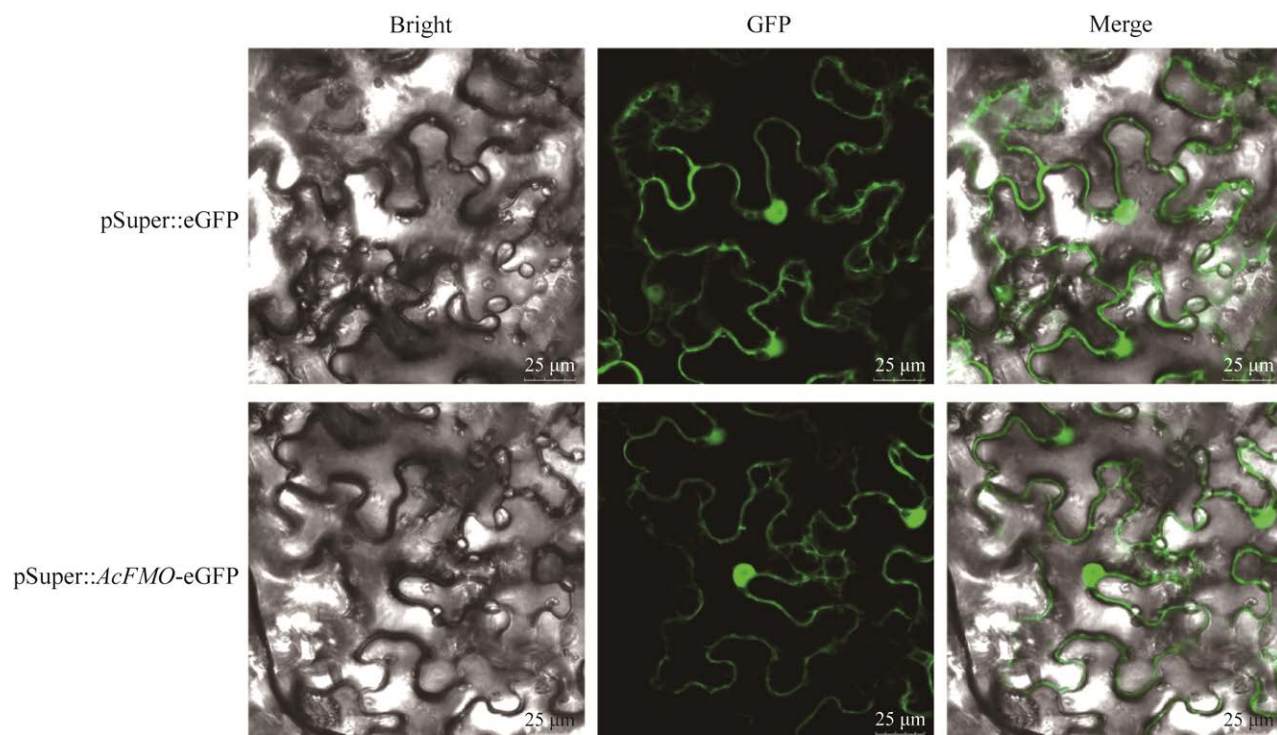


图6 pGFP-AcFMO 融合蛋白亚细胞定位分析 pSuper::eGFP 为空载体; pSuper::AcFMO-eGFP 为融合蛋白表达载体; GFP: 绿色荧光蛋白; Bright: 明场; Merge: 叠加图像

Figure 6 Subcellular localization analysis of pGFP-AcFMO fusion protein. pSuper::eGFP is an empty carrier; pSuper::AcFMO-eGFP is the fusion protein expression vector; GFP: Green fluorescence protein; Bright: Bright field; Merge: Overlay the image.

在细胞质和细胞核上都产生绿色荧光, 表明 pGFP-AcFMO 的作用位置没有特异性, 它可以在整个细胞内硫氧化底物。

2.5 AcFMO 的真核表达与功能验证

将构建成功的酵母表达载体 pYES2-AcFMO-6His 和 pYES2 空载体分别转化至 WAT11 酿酒酵母中, 倒置培养 2-3 d 后, 转化成功的重组酵母能在尿嘧啶缺陷培养基上正常生长。挑酵母单菌落进行 PCR 验证, 扩增后获得 1 500 bp 左右的目的片段, 结果见图 7A。表明已成功构建 WAT11-pYES2 和 WAT11-pYES2-AcFMO 重组酵母菌株。

将 WAT11-pYES2 和 WAT11-pYES2-AcFMO-

6His 重组酵母菌在 SC-URA 培养基(2%半乳糖)中 30 °C 振荡培养 14 h, 诱导重组蛋白表达, 提取酵母总蛋白。利用 Western blotting 检测重组蛋白表达情况, 结果发现, AcFMO 蛋白在约 52 kDa 处出现了单一条带, 而阴性对照空载体没有条带, 表明 AcFMO 蛋白在 WAT11 中成功表达(图 7B)。

FMO 为蒜氨酸生物合成的关键基因, 研究表明大蒜中该基因能够催化 S-烯丙基-L-半胱氨酸硫氧化合成蒜氨酸^[12]。为了检测 AcFMO 蛋白是否具有催化活性, 以 S-烯丙基-L-半胱氨酸为底物并进行体外酶活性反应, 用 HPLC 技术检测反应后的产物中是否含有蒜氨酸。如图 7C 所示, 蒜氨酸标准品的保留时间为 1.519 min,

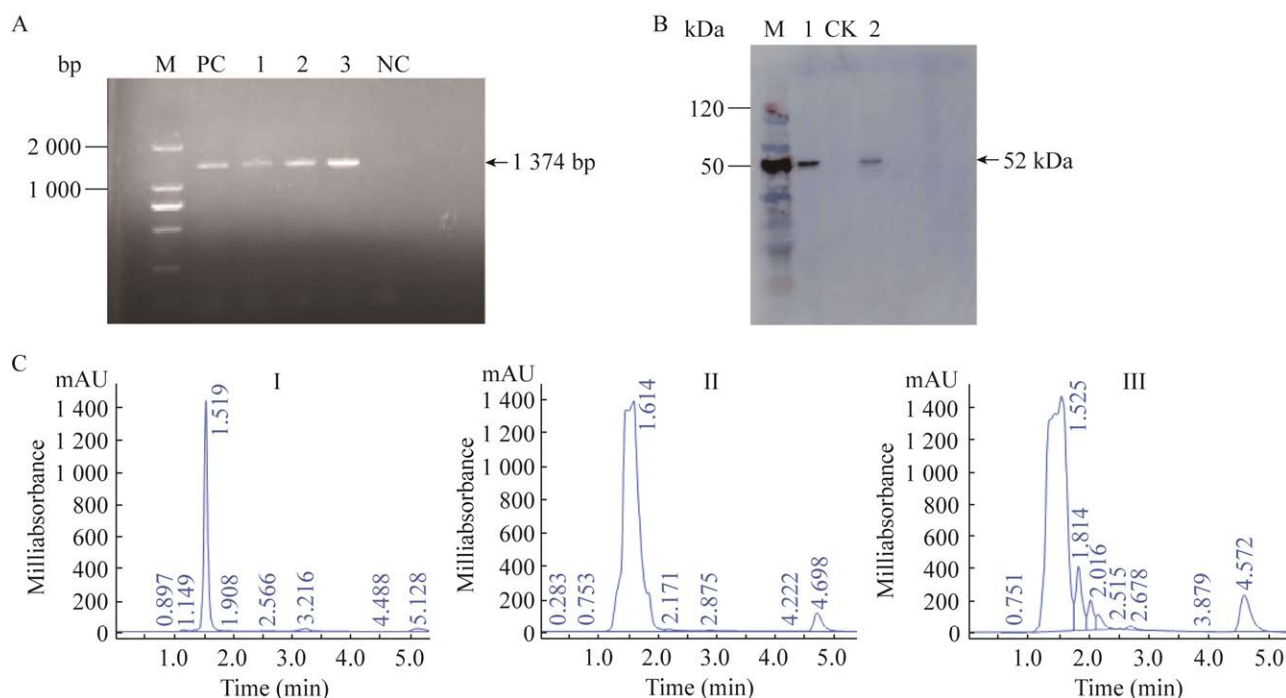


图 7 酵母菌落 PCR 验证、重组蛋白的 Western blotting 检测及 *AcFMO* 蛋白表达产物的 HPLC 分析
A: 酵母菌落 PCR 验证. M: DNA marker 2000; 1–3: WAT11-pYES2-*AcFMO*; NC: 阴性对照; PC: 阳性对照. B: 重组蛋白的 Western blotting 检测. M: Protein marker 120 kDa; 1–2: WAT11-pYES2-*AcFMO*; CK: WAT11-pYES2. C: *AcFMO* 蛋白表达产物的 HPLC 分析. I: 蒜氨酸标准品; II: 空载体催化后的产物; III: *AcFMO* 蛋白催化后的产物

Figure 7 PCR validation of yeast colonies, Western blotting detection of recombinant proteins, and HPLC analysis of *AcFMO* protein expression products. A: Yeast colony PCR verification. M: DNA marker 2000; 1–3: WAT11-pYES2-*AcFMO*; NC: Negative control; PC: Positive control. B: Western blotting detection of recombinant proteins. M: Protein marker 120 kDa; 1–2: WAT11-pYES2-*AcFMO*; CK: WAT11-pYES2. C: HPLC analysis of *AcFMO* protein expression products. I: Alliin standard; II: Empty carrier catalyzed products; III: *AcFMO* protein catalyzed product.

空载体在 1.519 min 没有峰出现(图 7C), 而 *AcFMO* 蛋白的反应产物在 1.525 min 出现了峰, 与蒜氨酸标准品出峰时间一致(图 7C)。以上结果表明, 通过酵母真核表达的 *AcFMO* 蛋白在体外具有催化活性, 能够催化 S-烯丙基-L-半胱氨酸合成蒜氨酸。

3 讨论与结论

黄素单氧化酶(FMO)主要负责对各类物质进行氧化, 能修饰相关底物, 对病原菌也具有

一定的防御作用^[13]。植物 FMO 根据氨基酸序列的相似性分为 3 个分支, 各分支间的基因存在功能分化, 因此可以通过进化谱系分析中看出各种 *FMOs* 之间的同源相关性, 并预测出新的基因^[14]。本研究利用洋葱的转录组测序结果, 筛选出 7 个洋葱 *FMO* 基因, 与拟南芥、大蒜和水稻 FMO 氨基酸序列构建系统发育树。发现只有 cluster-29851.90340 与拟南芥中 5 个 *FMO_{GS-OX}* 处于 Plant clade III, 并且与大蒜 *FMO1* 紧密相邻, 说明二者在亲缘关系上最为

接近(图 2)。AtFMO_{GS-OX1-5} 参与芥子油苷代谢途径中的 S-氧化^[15], 大蒜 FMO1 是在蒜氨酸生物合成中负责 S-氧化反应, 将 S-烯丙基-L-半胱氨酸催化生成蒜氨酸^[12], 暗示了洋葱中 cluster-29851.90340 很可能是在蒜氨酸生物合成中负责 S-氧化反应的主要 FMO。一般来说, FMOs 需要 NADPH 作为辅助因子, FAD 作为催化活性的修复基团, 推导出 AcFMO 氨基酸序列包含植物 FMO 特有的 4 个保守基序, 即 FAD 结合基序、TGY 基序、NADPH 结合基序和 FMO 识别基序^[16], 并与已知植物 FMO 具有高度序列相似性, 表明 AcFMO 编码功能性 FMO 蛋白。

在蒜氨酸生物合成途径中, 中间产物 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基-L-半胱氨酸合成蒜氨酸有两条可能的路线(图 8)。一种可能的途径是 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT)催化 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基-L-半胱氨酸脱谷氨酰化产生 S-烯丙基-L-半胱氨酸, 黄素单氧化酶(FMO)以其为底物进一步硫氧化生成蒜氨酸; 另一种可能的途径是 FMO 先催化 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基-L-半胱氨酸硫氧化形成 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砜, 然后在 GGT 的作用下脱谷氨酰化得

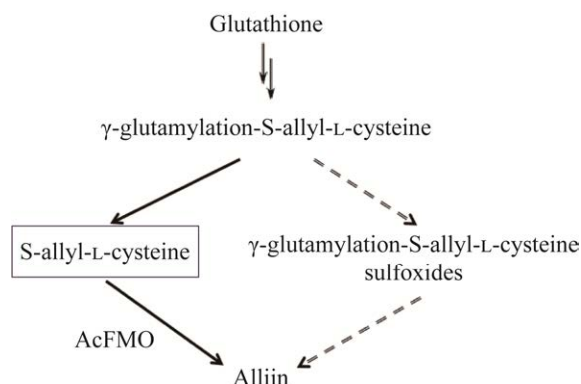


图 8 洋葱中蒜氨酸的生物合成

Figure 8 The biosynthesis of alliin in *Allium cepa*.

到蒜氨酸^[17-18]。这两条途径的脱谷氨酰化和硫氧化反应顺序有所不同。

大蒜 *AsGGT1*、*AsGGT2* 和 *AsGGT3* 对 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基-L-半胱氨酸脱谷氨酰化活性远远高于 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砜, *AsFMO1* 只对 S-烯丙基-L-半胱氨酸具有硫氧化活性, 而对 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基-L-半胱氨酸几乎没有硫氧化活性, 表明大蒜蒜氨酸的合成途径是先脱谷氨酰化, 然后硫氧化合成蒜氨酸^[7,19]。有学者认为, 洋葱中蒜氨酸的合成途径与大蒜不同, 是先硫氧化反应后脱谷氨酰化^[19], 为此, 本研究中构建了 AcFMO 的酵母表达载体, 利用 S-烯丙基-L-半胱氨酸作为底物进行体外酶活性验证。结果表明, AcFMO 重组蛋白能够催化 S-烯丙基-L-半胱氨酸硫氧化生成蒜氨酸, 确定了洋葱蒜氨酸的合成途径与大蒜一致, 先脱谷氨酰化, 然后硫氧化反应合成蒜氨酸^[20](图 8)。

大蒜相关研究发现, 蒜氨酸在地上绿叶组织中合成, 运送到地下鳞茎, 这是因为蒜氨酸由谷胱甘肽合成, 而叶绿体是谷胱甘肽生物合成的必需条件^[21-22]。在绿叶中合成的蒜氨酸以及中间产物 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基半胱氨酸通过维管系统运输到发育的鳞茎^[23], 因此成熟的大蒜鳞茎积累了丰富的蒜氨酸和 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基半胱氨酸^[24]。FMO 基因参与硫氧化, 但并不只参与蒜氨酸合成, 如韭菜中目前已发现有 12 个 *FMO* 基因, 其中 4 个在根、地下茎及叶中都有高量表达^[25]; 大葱中目前发现有 3 个 *FMO* 基因, 其中 *AfFMO1* 和 *AfFMO2* 为组成型表达^[26], 但功能未知。本研究中, AcFMO 在花中表达量最高, 约为叶片、鳞茎和花茎的 2 倍, 叶片、鳞茎和花茎次之, 而在叶鞘中表达量最低, 这一结果与蒜氨酸在洋葱不同部位中的含量差异一致^[27], 说明 AcFMO 参与了洋葱中蒜氨酸的合成。

REFERENCES

- [1] STARKENMANN C, NICLASS Y, TROCCAZ M. Nonvolatile *S*-alk(en)ylthio-L-cysteine derivatives in fresh onion (*Allium cepa* L. *cultivar*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(17): 9457-9465.
- [2] 江成英, 郭宏文, 张文学, 王亮, 赵晓岩. 洋葱的营养成分及其保健功效研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 305-309.
JIANG CY, GUO HW, ZHANG WX, WANG L, ZHAO XY. Research progress on nutritional components and health care efficacy of onion[J]. Food & Machinery, 2014, 30(5): 305-309 (in Chinese).
- [3] 王辉, 李景明, 马钊, 刘冬文, 倪元颖. 洋葱中含硫化化合物的生理功效[J]. 食品工业科技, 2005, 26(5): 187-189.
WANG H, LI JM, MA Z, LIU DW, NI YY. Physiological functions of sulfur-containing substances in onion[J]. Science and Technology of Food Industry, 2005, 26(5): 187-189 (in Chinese).
- [4] MCMANUS MT, JOSHI S, SEARLE B, PITHER-JOYCE M, SHAW M, LEUNG S, ALBERT N, SHIGYO M, JAKSE J, HAVEY M, McCALLUM J. Genotypic variation in sulfur assimilation and metabolism of onion (*Allium cepa* L.) III. Characterization of sulfite reductase[J]. Phytochemistry, 2012, 83: 34-42.
- [5] McCALLUM J, PITHER-JOYCE M, SHAW M, KENEL F, DAVIS S, BUTLER R, SCHEFFER J, JAKSE J, HAVEY MJ. Genetic mapping of sulfur assimilation genes reveals a QTL for onion bulb pungency[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114(5): 815-822.
- [6] YOSHIMOTO N, ONUMA M, MIZUNO S, SUGINO Y, NAKABAYASHI R, IMAI S, TSUNEYOSHI T, SUMI SI, SAITO K. Identification of a flavin-containing *S*-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic[J]. The Plant Journal, 2015, 83(6): 941-951.
- [7] LI J, HANSEN BG, OBER JA, KLIEBENSTEIN DJ, HALKIER BA. Subclade of flavin-monooxygenases involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2008, 148(3): 1721-1733.
- [8] ISKANDAROV U, SILVA JE, KIM HJ, ANDERSSON M, CAHOON RE, MOCKAITIS K, CAHOON EB. A specialized diacylglycerol acyltransferase contributes to the extreme medium-chain fatty acid content of *Cuphea* seed oil[J]. Plant Physiology, 2017, 174(1): 97-109.
- [9] EADY CC, KAMOI T, KATO M, PORTER NG, DAVIS S, SHAW M, KAMOI A, IMAI S. Silencing onion lachrymatory factor synthase causes a significant change in the sulfur secondary metabolite profile[J]. Plant Physiology, 2008, 147(4): 2096-2106.
- [10] 李芬, 王彦芹. 花花柴 *KcVP1* 基因的原核表达、酵母表达载体的构建及抗逆性功能分析[J/OL]. 分子植物育种, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230612.1752.024.html>.
LI F, WANG YQ. Prokaryotic expression of *KcVP1* gene, construction of yeast expression vector and stress resistance function analysis of *KcVP1* gene[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230612.1752.024.html> (in Chinese).
- [11] QIN L, MA HL, ZHANG X, ZHANG ZH, ZHANG X, WANG Y. Metabolomics and transcriptomics analyses provides insights into *S*-alk(en)yl cysteine sulfoxides (CSOs) accumulation in onion (*Allium cepa*)[J]. Scientia Horticulturae, 2023, 310: 111727.
- [12] YOSHIMOTO N, SAITO K. *S*-alk(en)ylcysteine sulfoxides in the genus *Allium*: proposed biosynthesis, chemical conversion, and bioactivities[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(16): 4123-4137.
- [13] REITER J, SLUSARENKO AJ, HÜBBERS A, ALBRECHT F, LEICHERT L. Allicin, a natural antimicrobial defence substance from garlic, inhibits DNA gyrase activity in bacteria[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2019, 310(1): 151359.
- [14] HUANG SJ, HOWINGTON MB, DOBRY CJ, EVANS CR, LEISER SF. Flavin-containing monooxygenases are conserved regulators of stress resistance and metabolism[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 630188.
- [15] YANG Y, HU Y, YUE YL, PU YN, YIN X, DUAN YW, HUANG AX, YANG YQ, YANG YP. Expression profiles of glucosinolate biosynthetic genes in turnip (*Brassica rapa* var. *rapa*) at different developmental stages and effect of transformed flavin-containing monooxygenase genes on hairy root glucosinolate content[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(3): 1064-1071.
- [16] 王传琦. 拟南芥 *AtIG12200* 基因在芥子油苷合成中的作用及组织定位的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2014.
WANG CQ. Role and tissue localization of *Arabidopsis AtIG12200* gene in glucosinolates synthesis[D]. Harbin:

- Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [17] HANSEN BG, KLIEBENSTEIN DJ, HALKIER BA. Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2007, 50(5): 902-910.
- [18] SCHLAICH NL. Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(9): 412-418.
- [19] LI JY, DADMOHAMMADI Y, ABBASPOURRAD A. Flavor components, precursors, formation mechanisms, production and characterization methods: garlic, onion, and chili pepper flavors[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(30): 8265-8287.
- [20] 徐欢欢, 李逸, 高伟, 王永勤, 刘乐承. 洋葱 γ -谷氨酰转肽酶 AcGGT 的克隆与鉴定[J]. 中国农业科学, 2021, 54(19): 4169-4178.
- XU HH, LI Y, GAO W, WANG YQ, LIU LC. Cloning and identification of γ -glutamyl transpeptidase AcGGT gene from onion (*Allium cepa*)[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(19): 4169-4178 (in Chinese).
- [21] UEDA Y, KAWAJIRI H, MIYAMURA N, MIYAJIMA R. Content of some sulfur-containing components and free amino acids in various strains of garlic[J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1991, 38(5): 429-434.
- [22] LANCASTER JE, ELVIRA MD, MARTIN LS. Production of flavour precursors (S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides) in photomixotrophic callus of garlic[J]. Phytochemistry, 1988, 27(7): 2123-2124.
- [23] BLOEM E, HANEKLAUS S, SCHNUG E. Influence of nitrogen and sulfur fertilization on the alliin content of onions and garlic[J]. Journal of Plant Nutrition, 2005, 27(10): 1827-1839.
- [24] SUN XD, ZHU SY, LI NY, CHENG Y, ZHAO J, QIAO XG, LU L, LIU SQ, WANG YZ, LIU C, LI BP, GUO W, GAO S, YANG ZM, LI F, ZENG Z, TANG Q, PAN YP, GUAN MJ, ZHAO J, et al. A chromosome-level genome assembly of garlic (*Allium sativum*) provides insights into genome evolution and alliin biosynthesis[J]. Molecular Plant, 2020, 13(9): 1328-1339.
- [25] LIU N, TONG J, HU M, JI Y, WANG B, LIANG H, LIU M, WU Z. Transcriptome landscapes of multiple tissues highlight the genes involved in the flavor metabolic pathway in Chinese chive (*Allium tuberosum*)[J]. Genomics, 2021, 113(4): 2145-2157.
- [26] LIAO N, HU Z, MIAO J, HU X, LYU X, FANG H, ZHOU YM, MAHMOUD A, DENG G, MENG YQ, ZHANG K, MA YY, XIA Y, ZHAO M, YANG H, ZHAO Y, KANG L, WANG Y, YANG JH, ZHOU YH, et al. Chromosome-level genome assembly of bunching onion illuminates genome evolution and flavor formation in *Allium* crops[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 6690.
- [27] 马慧丽. 洋葱种质资源综合评价及CSOs合成途径关键基因分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2023.
- MA HL. Comprehensive evaluation of onion germplasm resources and analysis of key genes in CSOs synthesis pathway[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2023 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)