

忽地笑 ABCG5 转运蛋白基因 (*LaABCG5*) 的克隆和表达分析

刘彦彤, 王 蓉, 汪 仁^①

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

摘要: 通过分析忽地笑 [*Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.] 比较转录组数据, 采用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆到 1 个 ABC 转运蛋白基因 *LaABCG5*。*LaABCG5* 基因全长 1 896 bp, 编码 631 个氨基酸。*LaABCG5* 的理论相对分子质量为 70 451, 理论等电点为 pI 8.37。*LaABCG5* 的二级结构中, α -螺旋、延伸链、 β -转角和无规则卷曲的氨基酸所占比例分别为 48.81%、13.47%、5.07% 和 32.65%。聚类分析结果显示: *LaABCG5* 与拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] ABCG5 转运蛋白的亲缘关系最近。*LaABCG5* 与海枣 (*Phoenix dactylifera* Linn.)、油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.)、番木瓜 (*Carica papaya* Linn.)、毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. et Gray) 和银白杨 (*Populus alba* Linn.) 的 ABCG5 转运蛋白的同源性在 62%~67% 之间。qRT-PCR 检测结果显示: *LaABCG5* 基因在忽地笑的根、鳞茎、叶片、花瓣和雌蕊中均有表达, 其中, 在叶片和雌蕊中的相对表达量显著高于其他组织; 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA 处理后 6 h, 忽地笑叶片中 *LaABCG5* 基因的相对表达量显著高于对照 (DMSO 处理后 6 h)。跨膜结构域和亚细胞定位结果显示: *LaABCG5* 定位于细胞膜。研究结果显示: *LaABCG5* 基因的表达具有组织特异性, 且受 MeJA 调控; *LaABCG5* 的定位与其功能相吻合。

关键词: 忽地笑; ABC 转运蛋白; 基因克隆; 基因表达; 亚细胞定位

中图分类号: Q785; Q943.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)02-0008-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.02.02

Cloning and expression analysis of ABCG5 transporter gene from *Lycoris aurea* (*LaABCG5*)
LIU Yantong, WANG Rong, WANG Ren^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(2): 8-15, 27

Abstract: Based on analyzing comparative transcriptome data of *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb., an ABC transporter gene *LaABCG5* was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology. The full-length of *LaABCG5* gene is 1 896 bp, which encodes 631 amino acids. Theoretical relative molecular mass of *LaABCG5* is 70 451, and its theoretical isoelectric point is pI 8.37. In the secondary structure of *LaABCG5*, the percentage of amino acids of α -helix, extended strand, β -turn, and random coil is 48.81%, 13.47%, 5.07%, and 32.65%, respectively. The result of cluster analysis shows that *LaABCG5* is the closest to ABCG5 transporter from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. The homology of *LaABCG5* with ABCG5 transporters from *Phoenix dactylifera* Linn., *Elaeis guineensis* Jacq., *Carica papaya* Linn., *Populus trichocarpa* Torr. et Gray, and *Populus alba* Linn. is 62%–67%. The detection results of qRT-PCR show that *LaABCG5* gene expresses in root, bulb, leaf, petal, and pistil of *L. aurea*, in which, its relative expression in leaf and pistil is significantly higher than that in other tissues; relative expression of *LaABCG5* gene from leaf of *L. aurea* after 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA treatment for 6 h is significantly higher than that in the control (after DMSO treatment for 6 h). The results of transmembrane domain and subcellular localization show that *LaABCG5* is localized on the cell membrane. It is suggested that the

收稿日期: 2019-09-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31700271; 31600074); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20170617)

作者简介: 刘彦彤(1995—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事忽地笑转运蛋白方面的研究。

^①通信作者 E-mail: rwang@cnbg.net

expression of *LaABCG5* gene shows tissue specific and is regulated by MeJA, and the location of *LaABCG5* is consistent with its function.

Key words: *Lycoris aurea* (L'Her.) Herb.; ABC transporter; gene cloning; gene expression; subcellular localization

忽地笑 [*Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.] 隶属于石蒜科 (Amaryllidaceae), 是国内常见的多年生草本植物, 全株含有丰富的生物碱, 包括水仙环素 (narciclasine)、加兰他敏 (galanthamine) 和石蒜碱 (lycorine) 等, 其中石蒜碱和水仙环素被用于治疗白血病, 还作为抗肿瘤药物^[1-2], 而加兰他敏是治疗小儿麻痹症、重症肌无力和阿尔茨海默症等疾病的关键药物^[3]。目前, 加兰他敏的主要获取方式是从石蒜科植物中提取, 但其含量仅在 0.08% 左右^[3]。加兰他敏的生物合成途径最早由 Barton 等^[4] 提出, 其中部分关键酶已经明确。在合成途径的上游, 酪氨酸脱羧酶 LaTYDC1 将酪氨酸转化为酪胺同 3,4-二羟基苯甲醛合成异喹啉类生物碱的前体骨架降孤挺花啶^[5]。Kilgore 等^[6-7] 在黄水仙 (*Narcissus pseudonarcissus* Linn.) 的鳞茎中先后发现 2 个关键酶, 即 4-O-甲基转移酶 NpN4OMT 和细胞色素 P450 NpCYP96T1。Sun 等^[8] 发现 O-甲基转移酶 LaOMT1 参与加兰他敏的合成, 且加兰他敏在忽地笑的花、鳞茎和叶片中含量较高。通过分析加兰他敏合成途径中关键酶的组织定位发现, 加兰他敏主要在鳞茎中合成^[6-7], 推测加兰他敏在合成部位与储存部位之间有特异转运蛋白, 参与了加兰他敏的跨膜转运和长距离运输。

ABC (ATP-binding cassette) 转运蛋白是一类跨膜蛋白, 全称为腺苷三磷酸结合盒转运蛋白, 这类转运蛋白通过水解 ATP 释放能量实现底物的跨膜转运^[9]。ABC 转运蛋白广泛存在于原核和真核生物体内, 参与激素转运、脂质分泌、有毒物质集中和次生代谢物转运等生理生化过程^[10], 在植物生长发育中发挥关键作用。ABC 转运蛋白结构主要包含 2 个部分, 分别是水解 ATP 的核苷酸结合结构域 (NBD, nucleotide binding domain) 和提供转运途径的含有多个 α -螺旋的跨膜结构域 (TMD, transmembrane domain)^[11]。NBD 位于膜的胞质面, 通过结合和水解 ATP 产生能量为转运底物提供动力。TMD 则是利用 NBD 释放的能量选择底物并进行跨膜运输。两者相辅相成共同实现了 ABC 转运蛋白的转运功能^[12]。

根据蛋白质结构域的不同, 可以将大多数真核生物的 ABC 转运蛋白分为 8 个主要亚家族 (A 至 H), 其中, ABCG 转运蛋白是 ABC 家族中体系最大的亚家族, ABCG 亚家族具有结构域类型为 NBD-TMD 的反向序列, 与其他亚家族相区别^[13-14]。

植物中 ABC 转运蛋白参与多种次生代谢产物的运输, 如日本黄连 (*Coptis japonica* Makino) 中转运蛋白 CjMDR1 参与由胞外向胞内转运小檗碱 (berberine) 的运输过程^[15], 拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 中转运蛋白 AtABCG14 参与细胞分裂素由胞内向胞外的运输^[16], *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch et Schimp. 中转运蛋白 PpABCG7 参与蜡质由胞内向胞外的分泌过程^[17]。本研究通过对茉莉酸甲酯 (MeJA, methyl jasmonate) 处理忽地笑比较转录组数据的分析, 结合加兰他敏在忽地笑体内的分布和积累特性, 报道了 1 个可能参与加兰他敏转运和积累过程的 ABCG5 转运蛋白基因, 通过生物信息学分析、激光扫描共聚焦显微镜及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 确定了该转运蛋白的三级结构、跨膜结构域和亚细胞定位, 并对该转运蛋白基因的表达特性进行分析, 以期对石蒜科植物生物碱积累与转运的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

忽地笑的花于 2018 年 8 月采自江苏省中国科学院植物研究所药用植物资源苗圃, 根、鳞茎和叶片等于同年 10 月采自同一苗圃。所有样品于 -80 °C 保存。

实验使用的大肠杆菌感受态菌株 TOP10 和拟南芥原生质体载体 pAN580 为本实验室保存; SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自美国 Clontech 公司; RNAiso 试剂盒、T4 DNA 连接酶、pMD19-T 载体和 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Phanta Super-Fidelity

DNA Polymerase、AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix、2×*Taq* Master Mix (Dye Plus) 和 DL2000 DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; AxyPrep

DNA 凝胶回收试剂盒购自天津子涵生物科技有限公司。实验中所有引物(表 1)合成及核酸序列测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 1 供试引物序列及用途

Table 1 Sequences and usages of primers tested

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	用途 Usage
LaABC5-53	CCATCTGCATAAGGTGGTGGTGGAG	5'-RACE
LaABC5-101	ATGGCAGTACCGGTTCTTCGATCTTTC	5'-RACE
LaABC5-471	GAAGGGTACGAAAAGTACTGCATTGGCG	3'-RACE
LaABC5-547	AGAATGCGTCTAGACTCGGATTGAGTCC	3'-RACE
LaABC5-F	CTTCTAAAATGAAGAAATAGAAGGT	克隆全长 Cloning full length
LaABC5-R	CCTCATATTAAGAAGTATACTTCCA	克隆全长 Cloning full length
LaABC5-RT-F	CGCAGGTTAATGTCGTCGAG	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
LaABC5-RT-R	CTCCACCACCACCACCTTAT	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
LaTIP41F	GCAACCATCCAAAGTTTAACTGCT	实时荧光定量 PCR 内参 Real-time quantitative PCR internal reference
LaTIP41R	AATGTGCAAGCAGGGCTACTAA	实时荧光定量 PCR 内参 Real-time quantitative PCR internal reference
LaABC5-pAN580-F	ATGAATGATTACGCCAGCTTGCATG	亚细胞定位 Subcellular localization
LaABC5-pAN580-R	ACCTATGACATAAGATGTCAAC	亚细胞定位 Subcellular localization

1.2 方法

1.2.1 基因的克隆及序列比对

1.2.1.1 RNA 提取 参照 RNAiso 试剂盒操作手册,称取约 0.1 g 植物组织,液氮速冻后均匀研磨,加入 RNAiso reagent 1 mL,振荡混匀后室温静置 5 min,再加入三氯甲烷 200 μ L,振荡混匀后室温静置 5 min,12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;取上层水相,加入等体积异丙醇,轻柔混匀,室温静置 10 min,12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;去上清液,用体积分数 75%乙醇洗涤沉淀,12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,去上清液;待乙醇挥发后,沉淀用 RNase-free 水溶解。

1.2.1.2 基因全长克隆 根据 cDNA 已知的基因片段 755 bp 设计 RACE 特异性引物(引物序列见表 1),进行 5'-RACE 和 3'-RACE 巢式 PCR 反应。PCR 扩增体系总体积为 50.0 μ L,包含 5×SF Buffer 10.0 μ L、dNTP Mix 1.0 μ L、Phanta[®] Super-Fidelity DNA Polymere 1.0 μ L、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向和反向引物各 2.0 μ L、模板 cDNA 1.0 μ L 及 ddH₂O 33.0 μ L。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共 32 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收目的条带。回收的核酸片段与 pMD19-T 载体连接,转化大肠杆菌感受态菌株 TOP10,阳性菌落送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.1.3 生物信息学分析 使用 ORF finder([https://](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)

www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)分析并确定忽地笑 ABC5 基因的开放阅读框;通过 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行氨基酸序列比对分析;利用 MEGA 7.0 中 neighbor-joining(NJ)方法构建系统进化树;利用 DNAMAN 进行同源序列比对;通过 ExPASy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)在线分析蛋白质的理化性质;通过 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)在线分析蛋白质二级结构;通过 SWISS(<http://swissmodel.expasy.org/interactive>)模拟蛋白质三级结构;通过 TMHMM(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/?tdsourcetag=s_pcqq_aiomsg)在线分析蛋白质跨膜结构域。

1.2.2 基因相对表达量的比较

1.2.2.1 MeJA 处理 将成熟度较高的忽地笑种子播种于灭菌蛭石中,置于光照时间 16 $\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照强度 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ 、温度 22 $^{\circ}\text{C}$ 的光照培养箱中,用 1/4 MS 溶液浇灌,每隔 3 周更换 1 次蛭石,培养 9 个月。用一定量二甲基亚砜(DMSO, dimethyl sulfoxide)助溶 MeJA,用 ddH₂O 配制终浓度 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA 溶液。用 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA 溶液喷施幼苗叶片,对照组用等体积 DMSO 水溶液喷施,分别在喷施后 0、6、12、24 和 36 h 取叶片。所有样品于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2.2 qRT-PCR 分析 以忽地笑的 LaTIP41 基因作为内参基因^[18]。qRT-PCR 反应体系的总体积为

20.0 μL , 包含 AceQ[®] qPCR SYBR[®] GreenMaster Mix 10.0 μL 、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向和反向引物各 0.5 μL 、模板 cDNA 1.0 μL 及 ddH₂O 8.0 μL 。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[8] 计算基因的相对表达量。

1.2.3 亚细胞定位 首先利用在线软件 WoLF PSORT ([https:// wolfsort. hgc. jp/](https://wolfsort.hgc.jp/)) 预测忽地笑 ABCG5 转运蛋白的亚细胞定位, 然后用引物 LaABCG5-pAN580-F 和 LaABCG5-pAN580-R 克隆获得不含终止密码子的 *LaABCG5* 片段, 并将其构建到 pAN580 载体中与绿色荧光蛋白 (GFP) 标签融合表达。根据 Yoo 等^[19] 的方法, 将构建的 pAN580-LaABCG5-GFP 与本实验室构建的膜定位标记载体 pAN580-PIP2A-mCherry 同时转化拟南芥原生质体, 避光孵育 12~16 h, 用 Zeiss LSM780 激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司) 在激发光波长 488 nm、发射光波长 505~530 nm 条件下进行观察。

1.3 数据统计

利用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计, 采用 Student-Newman-Keulsa 方法进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 *LaABCG5* 基因全长克隆

根据前期忽地笑比较转录组数据库中 *LaABCG5* 基因的部分序列信息设计引物, 结合 RACE 克隆技术, 分别获得已知片段 5' 端长度为 1 052 bp 和 3' 端长度为 780 bp 的 DNA 片段, 再设计引物获得长度为 2 135 bp 的序列。经 ORF finder 分析 *LaABCG5* 基因的开放阅读框, 编码区长度为 1 896 bp (图 1), 编码 631 个氨基酸。

2.2 系统进化树与同源序列比对分析

将 *LaABCG5* 的氨基酸序列与其他植物 ABC 转运蛋白的氨基酸序列进行聚类分析, 结果 (图 2) 表明: *LaABCG5* 与拟南芥 ABCG5 转运蛋白 (GenBank 登录号为 OAP10401.1) 的同源性最高, 然后与烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) ABCG10-like 和 ABCG23-like 转运蛋白 (GenBank 登录号分别为 XP_016437027.1 和 XP_016433361.1) 聚为一支。*LaABCG5* 与拟南芥 ABCG1 和 ABCG16 转运蛋白 (GenBank 登录号分别为 OAP11713.1 和 OAP04470.1)

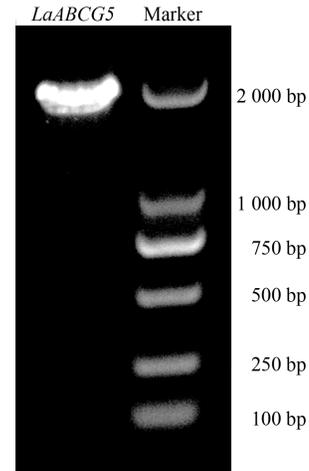
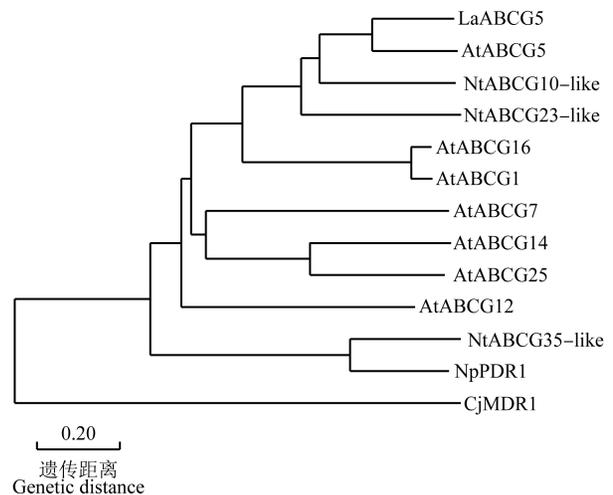


图 1 *LaABCG5* 基因的 PCR 扩增图谱

Fig. 1 PCR amplification pattern of *LaABCG5* gene



LaABCG5: 忽地笑 ABCG5 转运蛋白 ABCG5 transporter from *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.; AtABCG5, AtABCG16, AtABCG1, AtABCG7, AtABCG14, AtABCG25, AtABCG12: 分别为拟南芥中 ABCG5、ABCG16、ABCG1、ABCG7、ABCG14、ABCG25 和 ABCG12 转运蛋白 Respecting ABCG5, ABCG16, ABCG1, ABCG7, ABCG14, ABCG25, and ABCG12 transporters from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., respectively; NtABCG10-like, NtABCG23-like, NtABCG35-like: 分别为烟草中 ABCG10-like、ABCG23-like 和 ABCG35-like 转运蛋白 Respecting ABCG10-like, ABCG23-like, and ABCG35-like transporters from *Nicotiana tabacum* Linn., respectively; NpPDR1: 皱叶烟草 PDR 转运蛋白 PDR transporter from *Nicotiana plumbaginifolia* Viv.; CjMDR1: 日本黄连 MDR 转运蛋白 MDR transporter from *Coptis japonica* Makino.

图 2 *LaABCG5* 与其他植物 ABC 转运蛋白的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *LaABCG5* and ABC transporters from other plants

的同源性也较高, 与拟南芥其他 ABCG 转运蛋白也有一定程度的同源性。

采用 BLASTp 对 *LaABCG5* 与其他植物 ABCG5 转运蛋白的氨基酸序列进行多重比对, 结果 (图 3) 显

LaABC5MNDYASLHACRSTIMKEI GC E EA R NI NY IT Q TS K ST H PF K W S KEE VE .EAE R FT NK ...	60
EgABC5	MPRAL LK LS L TS Q NV TK AD R T Q GG V FL CL RC R PK PL SI Q MM K GC E EA R GI NY Q I S E R T H PF K W S R EE D G .E AI N H H H Q V PC	89
PtABC5MEQ K S AM K K Q W E EA T IC T Y K I ST KK R EH PF K I ET K Q IN Q EP K Q ..	48
PdABC5MM K GC E EA R GI SY E H I S E R T H PF K W S R E E D S .E AS .H H G H R .PC	45
CpABC5 MK K GC E EA T IC LS Y K W KT OK R DN PF K F ET T Q K Q Q VE VD Q K S D K Q ..	47
PaABC5 MK K GC E EA M GI SY K I ST KK R EN PF K I ET K QIN E EP K Q ...	41
Consensus	g eia e i y p f k	
LaABC5 TG HH V L K N V T C RA K P E IL AI V GP S G AG K ST L LE I L AG K L A N SS .S I F V N G K S T SK S DL R K K L SG Y V T Q R D L L F P	134
EgABC5	N LE V L P T T R G SS S K L R V R Q V L K N V S C R A K P E IL AI V GP S G AG K ST L LE I V AG K L T E P S P P T L L I N R K V V D K S D F R K I SG Y V T Q R D L L F P	179
PtABC5 V T N L EE A S L G A R H V L K D V Y OR A K P E IL AI V GP S G AG K S L L EV L AG K L T P Q SG .S I F V N Q N P I N K A Q F K K A SG Y V T Q R D L L F P	131
PdABC5	N LE V L P T T R ..S S K L R V Q V L K N V S C R A K P E IL AI V GP S G AG K ST L LE I L AG K L T E P S P Q T L L I N R K V V D K S DL R K K L SG Y V T Q R D L L F P	133
CpABC5 PS K LE E T ST G I R H V L K N V S C T A K P E IL AI V GP S G AG K S L LE V L AG K L A P Q AG.S I F V N Q E P I D K A R F K K I SG Y V T Q R D L L F P	130
PaABC5 V M D L EE A S L V A K H V L K D V F OR A K P E IL AI V GP S G AG K S L L E I L AG K L T P Q NG.T I F V N Q N P I D K A R F K K I SG Y V T Q R D L L F P	124
Consensus	vlk v c akp eilavgpsgags lle agkl p i n k k sgvytq d l p	
LaABC5	LL T V R ET L L F S A K L R L G D Q G L F D A R L S S R V D S L L EL G L G F V A G AR V C A S D G K I R G I SG G E R R R V S I G V E V H D P R I L L D E P T S G L D S L	224
EgABC5	LL T V R ET L L F S A R L R I G G.S L P P Q L S S R V E S L EL G L W S V D A R V G A S G R V R V SG G E R R R V S I G V D V H D P R V L L D E P T S G L D S T	268
PtABC5	LL T V R ET L L F S A K L R L R L... Q D Q L S E V K F M HE L G L D H V A M T R V G .. D R V R G I SG G E R R R V S I G V D V H D P R V L L D E P T S G L D S T	216
PdABC5	LL T V R ET L L F S A R L R L G G.S L P S Q L S S R V E S L EL G L G S V A D A R V G A S G R V R V SG G E R R R V S I G V D A V H D P R V L L D E P T S G L D S T	222
CpABC5	LL T V R ET L L F S A R L R I R Q... L A E L R S R V K S L V Q E L G L E H V A M T R V G... D R V R G I SG G E R R R V S I G V D V H D P R V L L D E P T S G L D S T	215
PaABC5	LL T V R ET L L F S A K L R L R L... Q A Q L S N V K S L M K L G L D E V A M T R V G... D R I R G I SG G E R R R V S I G V D A I H D P R V L L D E P T S G L D S	209
Consensus	lltv etl fsa lrl p l s v l elgl va rvg rg sggerrrvsigv hdp lildeptsgl ds	
LaABC5	S A A Q I V E M L K M A E R G R T V L S V H Q P G F R I V K L F S V M V L A E C E V H C C M E R I Q A S L R E A G L Q V A Q V N V E F A D S I D V L R Q R R R P	314
EgABC5	S A Q I V D M L K T M A E S R G R T V I L S H Q P G S R I V K L F S V L L A H G S V L H G T V D L S S H L R S L S L Q V L Q V N V E F A D S I D A L Q H K R Q .	357
PtABC5	S A Q I V I M L K I M A E R G R T I L S H Q P G F R I V K L F S V L L M A N G S V L H G T V D L G V N L R I M G M Q L E H A N V V E F A D S I D V Q Q R R V L	306
PdABC5	S A Q I V D M L K T M A E S R G R T V I L S H Q P G S R I V K L F S V L L A H G S V L H G T V D L S S H L R S L S L Q V L Q V N V E F A D S I D A L Q H K R Q .	311
CpABC5	S A Q I V I M L K V M A E R G R T I L S H Q P G F R I V K L F S V L L A D G S V L H G T M D L G V S L R S M G L Q L E H V N V E F A D S I E T F Q R Q . K Q M	304
PaABC5	S A Q I V I M L K V M A E R G R T I L S H Q P G F R I V K L F S V L L M A N G S V L H G T V D L G V N L R I M G M Q L E H V N V V E F A D S I E T I Q Q R E V L	299
Consensus	sa qi mlk mae rgrt s hqpg rivk s a g v h g l lr q p nvvefa si	
LaABC5	D L L V EE I Q S K Q..... H R C T L Q Q L H L K V V V DE F S V T G S T S F D L S Y N Y A N S R I E T I L A R R	375
EgABC5	E T L A E H H Q Q Q Q Q Q Q Q E Q R E A Q E Q P L L L P K K G E G I D O G R R D R C T L Q Q L H Q H K I V ... D E S L A G... F D L S Y D P N S R S E V A L T H R	440
PtABC5	Q O E T Q P Q L L S S T T K S R O K K V E V G E S R S G K F T Q Q L H Q Q S K V ... D E S I D F... G E D F L G F A N S R L O E T I L T H R	378
PdABC5	E T L V E H H Q Q Q... Q D R E A Q E Q P L L Q L P K K G E G I E . G K K D R C T L Q Q L H Q L K V... D E S L A G... F D F S Y D P N S R F E V I L T H R	390
CpABC5	Q Q E M Q S H V P A A P... V Q H K K G E G E T R S G K F T Q Q L H Q Q S K V... D E R L I K... G E D I P S D F A N S R L O E T I L T H	371
PaABC5	Q K E M Q P Q V L T S T T K P Q K K I E E V G E G R S G K F T Q Q L H Q Q S K V ... D E I I N V... E D F L G F A N S R L O E T I L T H	372
Consensus	tlqlf k v dee d nsr e il r	
LaABC5	F L K N V F R T EL F AC R T I Q M L I S G L V L G S I F D L K D K V .. I E R V L F A F L T F L L S C T E A L P I F L Q E R E I L M K E T S S C T Y R I S S V I A N	465
EgABC5	F L K N V F R T EL F AC R T I Q M L I S G L V L G S I F D L K D K V .. I E R V L F A F L T F L L S C T E A L P I F L Q E R E I L M K E T S S C S Y R V S S V V A N	528
PtABC5	F S K N I F R T EL F AC R T I Q M L I S G L V L G S I F Y N L K D L T G A E E R V L F A F L T F L L S C T E A L P I F L Q E R E I L M K E T S S C S Y R V S S Y A I AN	468
PdABC5	F L N N V F R T EL F AC R T I Q M L I S G L V L G S I F D L K D K V .. I E R V L F A F L T F L L S C T E A L P I F L Q E R E I L M K E T S S C S Y R V S S V V A N	478
CpABC5	F S K N I F R T EL F AC R T I Q M L I S G L V L G S I F Y N L K H D L I G A E E R V L F A F L T F L L S C T E A L P I F L Q E R E I L M K E T S C S Y R V S S Y A I AN	461
PaABC5	F S K N I F R T EL F AC R T I Q M L I S G L V L G S I F Y N E D L I G A E E R V L F A F L T F L L S C T E A L P I F L Q E R E I L M K E T S C S Y R V S S Y A I AN	462
Consensus	f n frt elfacrtiqml sglvlgisif l d ervglfaf ltflscttealpiflqereilmkets g yr ssy an	
LaABC5	A L V F V P F L I L I S L E S M P L Y W V L N S L D A F L F V L V I W L Y T A N S V V V C F S A L P N F I V G N S I S G V M G S F F L F S G Y F T A K A M P S Y	555
EgABC5	C L V F I P F L I L I A L L S V P L Y W V L N S R S F A F M Y F L L I W L Y T A N S V V V C F S A L P N F I V G N S I S G V M G S F F L F S G Y F I R K A M P S Y	618
PtABC5	C L V Y I P F L I L I A L L E T I P L Y W V L N P N E A F M H F L L I W L Y T A N S V V V C F S A L P N F I V G N S I S G V M G S F F L F S G Y F I SK H G M E N Y	558
PdABC5	C L V F I P F L I L I A L L S V P L Y W V L N S R S F A F M Y F L L I W L Y T A N S V V V C F S A L P N F I V G N S I S G V M G S F F L F S G Y F I R K A M P S Y	568
CpABC5	C L V Y I P F L I L I A L L E T I P L Y W V L N P N E A F L H F L L I W L Y T A N S V V V C F S A L P N F I V G N S I S G V M G S F F L F S G Y F I SK H G I F S Y	551
PaABC5	C L V Y I P F L I L I A L L E T I P L Y W V L N P N E A F M H F L L I W L Y T A N S V V V C F S A L P N F I V G N S I S G V M G S F F L F S G Y F I A K H G I E N Y	552
Consensus	lv pfl il ilf plyw vgl n af f l iwl lytansvvvcfsal pnfivgns i gvmgsfflfsgyf k p y	
LaABC5	W F M H Y S L F K Y P F E G L I N E F S G K R C L E Y R M G V L L D G N S L L H Q C L E K E K R W R D V V M L G F L A F R I S Y V I G	631
EgABC5	W F M H I S L F K Y P F E S L V N E F S D P G R C V H E M G L V L R G E D L S E E C L G E E S R W R V V M V C F I L A Y R F S Y L I R C R C V Q R G G L K R	708
PtABC5	W F M H Y S L F K Y P F E G L I N E F S S G K L E Y M G K M V S A E D L R E E C Y G E D G K R W V V I N V C F I L V R E I S Y V I L R L Y C P S .I S E F G	747
PdABC5	W F M H I S L F K Y P F E S L V N E F S G P C V K H E M G L V L R G E D L R E E C L G E E S R W R V V M V C F I L AY R F S Y L I M C R C V Q R G G L K R	658
CpABC5	W F M H Y S L F K Y P F E G L I N E F S S K C L E Y M G S C I V T C E D V L R E E C Y G E E S R W R V V M I C F I L V Y R E I S Y V I L R F R C S K... R S F R A	638
PaABC5	W F M H Y S L F K Y P F E G L I N E F S S G K L E Y M G K M V N A E D L R E E C Y G E D E K R W R V V I N V C F I L L Y R E I S Y V I L R F R C C P G . I R S E F G	641
Consensus	w fmh slfkypfe l nef g c g c l g wr vv m fi r sy i	
LaABC5	..	631
EgABC5	A L	710
PtABC5	S L	649
PdABC5	A L	660
CpABC5	A L	640
PaABC5	T L	643
Consensus		

LaABC5: 忽地笑 ABCG5 转运蛋白 ABCG5 transporter from *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.; EgABC5: 油棕 ABCG5 转运蛋白 ABCG5 transporter from *Elaeis guineensis* Jacq.; PtABC5: 毛果杨 ABCG5 转运蛋白 ABCG5 transporter from *Populus trichocarpa* Torr. et Gray; PdABC5: 海枣 ABCG5 转运蛋白 ABCG5 transporter from *Phoenix dactylifera* Linn.; CpABC5: 番木瓜 ABCG5 转运蛋白 ABCG5 transporter from *Carica papaya* Linn.; PaABC5: 银白杨 ABCG5 转运蛋白 ABCG5 transporter from *Populus alba* Linn.

图 3 LaABC5 与其他植物 ABCG5 转运蛋白氨基酸序列的多重比对
Fig. 3 Alignment of amino acid sequences between LaABC5 and ABCG5 transporters from other plants

示: *LaABCG5* 与海枣 (*Phoenix dactylifera* Linn.) 和油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.) 的 ABCG5 转运蛋白 (GenBank 登录号分别为 XP_008810921.1 和 XP_010911492.2) 的同源性分别为 66.87% 和 66.57%, 与番木瓜 (*Carica papaya* Linn.) 和毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. et Gray) 的 ABCG5 转运蛋白 (GenBank 登录号分别为 XP_021899883.1 和 XP_002309921.2) 的同源性分别为 62.91% 和 62.83%, 与银白杨 (*Populus alba* Linn.) ABCG5 转运蛋白 (GenBank 登录号为 TKR79274.1) 的同源性为 62.20%。

2.3 *LaABCG5* 的蛋白质结构和跨膜结构域预测

LaABCG5 的蛋白质理化性质分析结果表明: *LaABCG5* 的理论相对分子质量为 70 451, 理论等电点为 pI 8.37。蛋白质二级结构预测结果显示: *LaABCG5* 的氨基酸序列中 α -螺旋有 308 个氨基酸, 所占比例为 48.81%; 延伸链有 85 个氨基酸, 所占比例为 13.47%; β -转角有 32 个氨基酸, 所占比例为 5.07%; 无规则卷曲有 206 个氨基酸, 所占比例为 32.65%。根据同源建模原理, PDB 数据库中已存在的 ABCG2 与 *LaABCG5* 的氨基酸序列的同源性达到 31.36%, 预测结果较好。使用 ABCG2 的蛋白质结构作为模板, 对 *LaABCG5* 的三级结构进行建模, 结果见图 4。

蛋白质跨膜结构域的分析结果 (图 5) 显示: 膜内氨基酸为 1~385、442~461 和 519~524 位, 膜外氨基

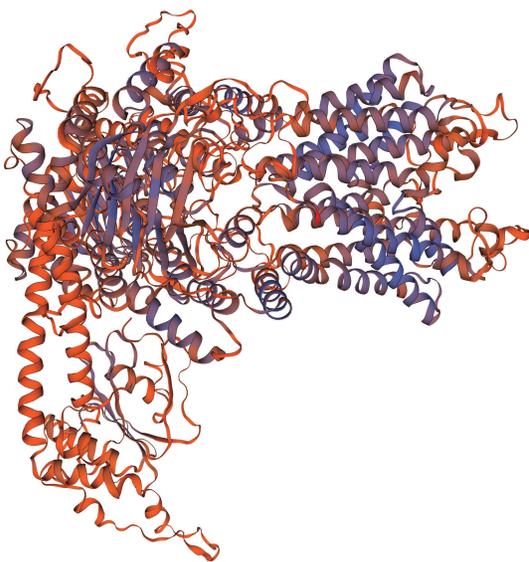


图 4 *LaABCG5* 的三级结构
Fig. 4 Tertiary structure of *LaABCG5*

酸为 409~418、482~495 和 548~612 位, 跨膜区域氨基酸为 386~408、410~441、462~481、496~518、525~547 和 613~630 位, 表明 *LaABCG5* 是一个膜定位的蛋白, 与转运蛋白的功能吻合。

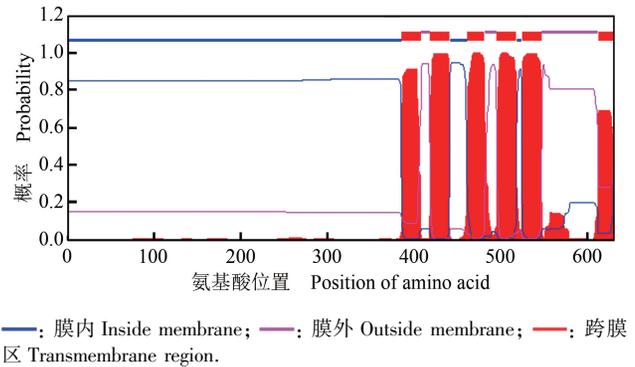


图 5 *LaABCG5* 的跨膜结构域
Fig. 5 Transmembrane domain of *LaABCG5*

2.4 不同组织中 *LaABCG5* 基因的表达特性分析

结果 (图 6) 显示: *LaABCG5* 基因在忽地笑的根、鳞茎、叶片、花瓣和雌蕊中均有表达, 其中, 在叶片和雌蕊中相对表达量较高, 显著高于其他组织, 而在鳞茎中相对表达量最低。说明 *LaABCG5* 基因在忽地笑中有组织表达特异性。

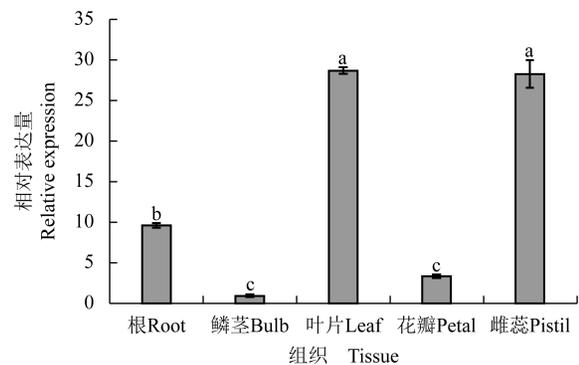


图 6 忽地笑不同组织中 *LaABCG5* 基因的相对表达量
Fig. 6 Relative expression of *LaABCG5* gene from different tissues of *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.

2.5 MeJA 处理后 *LaABCG5* 基因的表达特性分析

结果 (图 7) 显示: $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA 处理后 6 h, *LaABCG5* 基因相对表达量为对照 (DMSO 处理后 6 h) 的 8.16 倍, 二者间存在显著差异; $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA 处理后 12 h, *LaABCG5* 基因的相对表达量均与对照 (DMSO 处理后 12 h) 无显著差异。

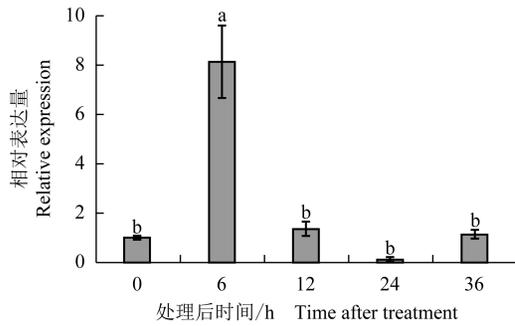
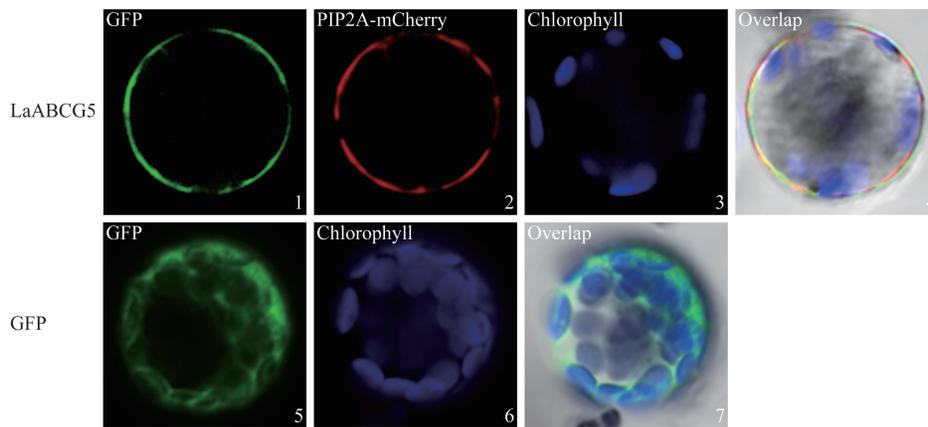


图 7 MeJA 处理后忽地笑叶片中 *LaABCG5* 基因的相对表达量
Fig. 7 Relative expression of *LaABCG5* gene from leaf of *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb. after MeJA treatment

2.6 *LaABCG5* 的亚细胞定位分析

通过在线软件 WoLF PSORT 预测分析, *LaABCG5* 可能定位于细胞膜。为了进一步明确 *LaABCG5* 的功能及亚细胞定位, 构建 *LaABCG5*-GFP 融合蛋白用于拟南芥原生质体表达, 并通过激光扫描共聚焦显微镜进行观察, 结果(图 8)显示: *LaABCG5*-GFP 融合蛋白在细胞膜上有明显的表达, 且与共同转化表达的定位于细胞膜的 PIP2A-mCherry 标记蛋白有较好的重合。说明在亚细胞水平上, *LaABCG5* 主要定位于细胞膜。



1: 表达 *LaABCG5*-GFP (绿色) 的原生质体 A protoplast expressing *LaABCG5*-GFP (green); 2: 表达 PIP2A-mCherry (红色) 的原生质体 A protoplast expressing PIP2A-mCherry (red); 3: 原生质体的叶绿素(蓝色)Chlorophyll (blue) of the protoplast; 4: 1, 2 和 3 的叠加图像 Merged images of 1, 2, and 3; 5, 6, 7: 表达 pAN580-GFP 空载体的原生质体 A protoplast expressing pAN580-GFP empty vector.

图 8 *LaABCG5* 的亚细胞定位
Fig. 8 Subcellular localization of *LaABCG5*

3 讨 论

植物生长过程中会产生各种用于减少胁迫和自我保护且不参与生长和发育的物质, 称为次生代谢产物, 常见的植物次生代谢产物包括萜类、生物碱、芥子油和糖类^[20]。许多次生代谢产物有较高的药用价值, 如青蒿素、紫杉醇和小檗碱等^[21]。次生代谢产物的合成和代谢长期以来一直备受关注, 有关其转运和积累的运输过程也是研究人员的关注点之一。目前, 植物中 ABC 转运蛋白被认为在次生代谢产物的运输转导过程中承担了重要的角色^[22-24]。Chen 等^[25]定义了第 1 个 ABC 转运蛋白家庭成员是参与细胞的药物外排和促进多药耐药机制形成的多耐性 (MDR,

multidrug resistance) 转运蛋白, 将其归类于 ABCB 亚家族的一类转运蛋白。Shitan 等^[26]根据小檗碱主要特异性存储于日本黄连的根中, 在日本黄连根中发现了有转运小檗碱功能的 CjMDR1 转运蛋白。已有研究结果显示: 加兰他敏在忽地笑的花、鳞茎和叶片中含量较高^[8], 且在 MeJA 处理下中国石蒜 (*Lycoris chinensis* Traub) 中加兰他敏含量会显著增加^[27]。作者在 MeJA 处理忽地笑比较转录组数据库中发掘到一个在 MeJA 处理下相对表达量升高的 ABC 转运蛋白基因, 通过 NCBI 验证发现其与拟南芥中 *AtABCG5* 基因有较高的相似度, 故命名为 *LaABCG5*。*LaABCG5* 基因全长 1 896 bp, 编码 631 个氨基酸。生物信息学分析结构显示: *LaABCG5* 含有 6 个跨膜区域。qRT-PCR 结果显示: *LaABCG5* 基因在雌蕊和叶片中相对

表达量较高,与加兰他敏的积累组织^[8]部分重合;在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA 处理后 6 h, *LaABCG5* 基因的相对表达量较对照显著增加,与加兰他敏含量在 MeJA 处理后的变化^[27]也吻合。在亚细胞水平上, *LaABCG5* 定位于细胞膜。这些证据都体现了该基因的组织特异性和表达模式与其承担的功能有紧密联系。

Shitan 等^[15,26]研究认为,日本黄连中 *CjMDR1* 基因主要在其根状茎、叶柄和花中表达,而 *CjABCB2* 基因则相对集中在根状茎的木质部表达,二者组织定位不同,但是在不同的组织部位同样承担着小檗碱从胞外向胞内运输的转运功能, *CjMDR1* 可能在小檗碱含量不高的组织中起到积累小檗碱的作用,而 *CjABCB2* 则与小檗碱由根到根状茎的长距离转运相关。韩小康等^[28]的研究结果显示:MeJA 处理后 6 h, 忽地笑 *LaABCG3* 基因的表达水平升高了近 4 倍。*LaABCG3* 基因主要集中在花瓣和种子中表达^[28], *LaABCG5* 基因主要集中在雌蕊和叶片中表达,2 个基因的组织定位有明显的差异,推测在其承担的功能上可能有较好的互补。王晓燕等^[29]研究认为,在忽地笑不同器官中加兰他敏的亚细胞积累模式存在差异,这也暗示可能有多种转运蛋白在加兰他敏的转运过程中协同合作,共同完成。本研究新发现的 *LaABCG5* 为忽地笑体内次生代谢产物的跨膜转运和积累机制提供了候选研究对象,但其具体的转运功能仍待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] LI Y, LIU J, TANG L J, et al. Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest [J]. *Oncology Reports*, 2007, 17(2): 377-384.
- [2] KORNIENKO A, EVIDENTE A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narceclasin and its congeners [J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(6): 1982-2014.
- [3] PTAK A, MORANŃSKA E, SALIBA S, et al. Elicitation of galanthamine and lycorine biosynthesis by *Leucjum aestivum* L. and *L. aestivum* 'Gravity Giant' plants cultured in bioreactor RITA[®] [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 128(2): 335-345.
- [4] BARTON D H R, KIRBY G W, TAYLOR J B, et al. 866. Phenol oxidation and biosynthesis. Part VI. The biogenesis of Amaryllidaceae alkaloids [J]. *Journal of The Chemical Society (Resumed)*, 1963: 4545-4658.
- [5] WANG R, HAN X K, XU S, et al. Cloning and characterization of a tyrosine decarboxylase involved in the biosynthesis of galanthamine in *Lycoris aurea* [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6729.
- [6] KILGORE M B, AUGUSTIN M M, STARKS C M, et al. Cloning and characterization of a norbelladine 4'-O-methyltransferase involved in the biosynthesis of the Alzheimer's drug galanthamine in *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus* [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(7): e103223.
- [7] KILGORE M B, AUGUSTIN M M, MAY G D, et al. CYP96T1 of *Narcissus* sp. aff. *pseudonarcissus* catalyzes formation of the *para-para'* C-C phenol couple in the Amaryllidaceae alkaloids [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 225.
- [8] SUN B, WANG P, WANG R, et al. Molecular cloning and characterization of a *meta/para-O*-methyltransferase from *Lycoris aurea* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1911-1928.
- [9] DEAN M, ALLIKMETS R. Complete characterization of the human ABC gene family [J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2001, 33(6): 475-479.
- [10] LU X, DITTFGEN J, PIŚLEWSKA-BEDNAREK M, et al. Mutant allele-specific uncoupling of PENETRATION3 functions reveals engagement of the ATP-binding cassette transporter in distinct tryptophan metabolic pathways [J]. *Plant Physiology*, 2015, 168(3): 814-827.
- [11] HOLLAND I B, BLIGHT M A. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 293(2): 381-399.
- [12] SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ R, DAVIES T G E, COLEMAN J O D, et al. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(32): 30231-30244.
- [13] VERRIER P J, BIRD D, BURLA B, et al. Plant ABC proteins: a unified nomenclature and updated inventory [J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(4): 151-159.
- [14] 金宏滨, 刘东辉, 左开井, 等. 植物 ABC 转运蛋白与次生代谢产物的跨膜转运 [J]. *中国农业科技导报*, 2007, 9(3): 32-37.
- [15] SHITAN N, BAZIN I, DAN K, et al. Involvement of *CjMDR1*, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(2): 751-756.
- [16] ZHANG K, NOVAK O, WEI Z, et al. *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 3274.
- [17] BUDA G J, BARNES W J, FICH E A, et al. An ATP binding cassette transporter is required for cuticular wax deposition and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *The Plant Cell*, 2013, 25: 4000-4013.

- 5 种重金属的残留量[J]. 中兽药学, 2011, 9(11): 833-835.
- [10] 李 丹. 血府逐瘀丸质量控制方法和金属元素测定研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学药学院, 2008: 7.
- [11] 李贝贝, 王 瑾, 艾则孜古丽·居麦, 等. 新疆红花与产地的微量元素相关性分析[J]. 生命科学仪器, 2018, 16(6): 50-57.
- [12] 徐德聪, 孙庆业, 沈章军, 等. 铜尾矿库剑叶金鸡菊根际尾矿和植株的重金属元素含量及相关性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(1): 27-36.
- [13] VAFAIE A, EBADI A, RASTGOU B, et al. The effects of potassium and magnesium on yield and some physiological traits of safflower (*Carthamus tinctorius*) [J]. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 2013, 5(17): 1895-1900.
- [14] HOUSHMANDFAR A, MORAGHEBI F. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc on seed germination and seedling growth of safflower [J]. African Journal of Agricultural Research, 2011, 6(6): 1463-1468.
- [15] 许 靖, 满雪玉. 原子吸收光谱法在药物分析中的应用[J]. 中国资源综合利用, 2018, 36(2): 84-86.
- [16] 翟宇鑫, 陈 军, 李 傲, 等. ICP-AES 法测定南酸枣及其提取物中矿物质元素含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(4): 1052-1055.
- [17] 舒 风, 张远志, 王宏磊, 等. ICP-MS 测定汞的记忆效应的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(2): 189-191.
- [18] SAYYAD G, AFYUNI M, MOUSAVI S, et al. Effects of cadmium, copper, lead, and zinc contamination on metal accumulation by safflower and wheat [J]. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 2009, 18(2): 216-228.
- [19] 田大年, 丁润梅, 汪 岭. 微波消解原子吸收法测定宁夏红花中微量元素含量的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(23): 11565-11567.
- [20] 张宏杰. 铜、铅胁迫对红花生长发育及 GSH 表达的影响[D]. 新乡: 河南师范大学生命科学学院, 2013: 38.
- [21] 简在友, 孟 丽, 许桂芳, 等. 红花对土壤矿物质元素的吸收和积累[J]. 广西植物, 2014, 34(4): 557-560.
- [22] 贾宏涛, 谭 勇, 孙 霞, 等. 施肥对红花生长和产量的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2010, 33(5): 394-397.
- [23] 胡喜巧, 杨文平, 黄 玲, 等. 红花对氮磷钾的吸收与分配规律研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(7): 32-37.
- [24] 胡学礼, 胡尊红, 杨 谨, 等. 花油两用红花新品种‘云红花五号’和‘云红花六号’的选育研究[J]. 中国农学通报, 2017, 33(17): 58-65.

(责任编辑: 张明霞)

(上接第 15 页 Continued from page 15)

- [18] MA R, XU S, ZHAO Y, et al. Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Lycoris aurea* [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 536.
- [19] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. Nature Protocols, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [20] 李 彦, 周晓东, 楼浙辉, 等. 植物次生代谢产物及其积累的因素研究综述[J]. 江西林业科技, 2012(3): 54-60.
- [21] 董妍玲, 潘学武. 植物次生代谢产物简介[J]. 生物学通报, 2002, 37(11): 17-19.
- [22] KLEIN M, BURLA B, MARTINOIA E. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants [J]. FEBS Letters, 2006, 580(4): 1112-1122.
- [23] YU F, DE LUCA V. ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(39): 15830-15835.
- [24] DEMURTAS O C, DE BRITO FRANCISCO R, DIRETTO G, et al. ABCG transporters mediate the vacuolar accumulation of crocins in saffron stigmas [J]. The Plant Cell, 2019, 31(11): 2789-2804.
- [25] CHEN C J, CHIN J E, UEDA K, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug resistant human cells [J]. Cell, 1986, 47(3): 381-389.
- [26] SHITAN N, DALMAS F, DAN K, et al. Characterization of *Coptis japonica* CjABCB2, an ATP-binding cassette protein involved in alkaloid transport [J]. Phytochemistry, 2013, 91: 109-116.
- [27] MU H M, WANG R, LI X D, et al. Effect of abiotic and biotic elicitors on growth and alkaloid accumulation of *Lycoris chinensis* seedlings [J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2009, 64(7/8): 541-550.
- [28] 韩小康, 王 蓉, 刘彦彤, 等. 忽地笑 *LaABCG3* 转运蛋白基因的克隆与表达分析 [J]. 植物生理学报, 2018, 54(4): 627-635.
- [29] 王晓燕, 王鹏凯, 黄敏仁, 等. 加兰他敏在忽地笑营养器官中的定位 [J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(5): 339-345.

(责任编辑: 张明霞)