

参赛队员姓名： 曾若曦

中学： 上海市民办平和学校

省份： 上海市

国家/地区： 中国

指导教师姓名： 李超 李海修

指导教师单位： 华东师范大学

论文题目： 半枝莲克拉维醇焦磷酸合酶（KPS）

活性中心关键氨基酸的定点突变及其对克罗烷

二萜合成的影响

# 半枝莲克拉维醇焦磷酸合酶 (KPS) 活性中心关键氨基酸的定点突变及其对克罗烷二萜合成的影响

[曾若曦]

[上海市民办平和学校]

## Abstract

半枝莲是传统药用植物，其克罗烷类二萜具有抗肿瘤、抗炎等潜在药用价值。克拉维醇焦磷酸合酶 (KPS) 催化香叶基香叶基焦磷酸 (GGPP) 环化生成克拉维醇焦磷酸 (KPP)，是克罗烷二萜合成途径的关键酶，但其活性中心关键氨基酸及构效关系尚不清晰。本研究以半枝莲 KPS 为对象，首先利用 Swiss-Model 进行同源建模，以 *Grindelia hirsutula* 二类二萜合酶 (PDB: 9B99) 为模板构建 KPS 三维结构；随后采用 MOE 进行底物 GGPP 与 KPS 的分子对接，以 F269、D385 为锚点，并在 4.5 Å 范围内筛选结合口袋关键残基，确定 G216、I272、W376、L419、W512 等潜在靶点。根据氨基酸的空间位阻、疏水性和芳香性，针对 5 个关键残基设计 6 种定点突变体，并通过重叠延伸 PCR 构建突变片段，同源重组至 pEAQ 载体，经大肠杆菌筛选、测序后转入农杆菌 GV3101。进一步将野生型及突变型 KPS 与 HMGR、GGPPs 共表达于本氏烟草瞬时表达体系，以增强前体 GGPP 供应，并利用 GC-MS 检测产物克拉维醇。结果表明，野生型 KPS 可催化生成克拉维醇；多数突变体产物峰显著降低，说明这些残基对维持 KPS 催化活性与底物特异性具有重要作用；其中 I272L 突变体的克拉维醇产量明显高于野生型，且副产物极少。本研究从计算模拟与植物瞬时表达两个层面解析了半枝莲 KPS 活性中心关键氨基酸的功能，并发现 I272L 可作为提高克罗烷类二萜产量的候选突变位点，为后续酶工程与合成生物学研究提供了依据。

**关键词：**半枝莲；克拉维醇焦磷酸合酶；克罗烷二萜；分子对接；定点突变；

# 1 绪论

## 1.1 研究缘起与问题提出

我曾经在野外进行攀岩运动时因运动前未热身，不幸在攀爬岩壁的过程中“倒挂”在岩壁上，最后发现大腿内侧韧带被拉伤了。我不得不停止攀岩运动，去临近的中医院进行治疗。医生所开的敷料主要成分是半枝莲提取物，而这种植物也很迅速地缓解了韧带拉伤造成的剧痛。由此，我对半枝莲这一植物本身产生了极大的兴趣，希望可以进一步研究该药用作物及其活性成分。

## 1.2 半枝莲的药用价值和现代药理研究进展

根据被子植物种系发生学组第四版 (APG IV)，半枝莲 (*Scutellaria barbata*) 隶属于唇形科黄芩属下。半枝莲为多年生草本植物，广布于亚洲东部与东南部各国，在中国境内主要分布于中国中部及华南地区，喜欢生长于潮湿的环境。在中国民间，半枝莲一直以来都是一味传统的药材，它具有清热解毒、活血化淤等功效（《中国植物志》第 65 (2) 卷，1977），在现代也常用于临床医学。有试验表明配制半枝莲与白花蛇舌草 (*Scleromitrion diffusum*) 的联合制剂，用于卵巢癌细胞系，可以显著地诱导癌细胞死亡，这一作用在半枝莲于试剂中的占比提升至最高时抗癌效果最好 (Tang et al., 2023)。半枝莲自身的粗提物在用于治疗疾病时，也有优秀的表现。另一项研究表明，同样是对卵巢癌细胞系，半枝莲自身的组分在粗提物中提升至一定比例时，可以显著地诱导癌细胞凋亡，同时抑制癌细胞的迁移 (Wang et al., 2024)。可见，半枝莲的药用价值贯穿古今。

## 1.3 半枝莲主要活性次生代谢产物及其药理功能

综合多项研究显示，半枝莲的药用价值主要源自其植株内丰富的次生代谢产物，如黄酮类、萜类物质。从半枝莲中提取的黄酮类化合物野黄芩苷，对于人免疫缺陷病毒的蛋白酶 (HIV-1 PR) 与严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 的蛋白酶 (Cat-L PR)，可以较好地抑制这些蛋白酶的活性 (Tang et al., 2023)，显示了其在抗病毒领域上的前景。从半枝莲中提取的另外一种黄酮类化合物圣草酚，则可以通过缓解细胞坏死的情况，减轻胰腺炎的症状 (Tian et al., 2025)，体现了其在消炎方面的价值。而半枝莲中的许

多萜类物质, 则表现出了在抗肿瘤等方面的作用。从半枝莲中分离出的二萜半枝莲碱 A, 经实验证明可以在乳腺癌细胞系中, 诱导活性氧介导的 DNA 损伤与细胞凋亡, 同时对于正常的上皮细胞有较低的细胞毒性 (Hao et al., 2023)。半枝莲植株内的多数二萜, 如上文所提及的半枝莲碱 A, 被证实属于克罗烷类二萜。半枝莲植株内被发现的克罗烷类二萜有 150 多种。仅是在一项 2023 年的研究中, 就有半枝莲植株内的 40 种克罗烷类二萜化合物被描述 (S. Li et al., 2023)。对于种类如此繁多的克罗烷类二萜, 它们不乏各种有药用作用者。例如, 多种半枝莲型克罗烷二萜 (Scutebata) 在体外实验中, 针对不同癌细胞系, 均表现出了较低的半数致死量 (IC<sub>50</sub>) (Yang et al., 2018), 显示出半枝莲型克罗烷二萜在抗肿瘤方向有良好的前景。在另一项针对从半枝莲植株内提取的 4 种半枝莲型新克罗烷二萜 (Scuttenline) 的研究中, Scuttenline C 通过抑制一氧化氮的产生与显示的低半数致死量 (Feng et al., 2021), 表现出了潜在的抗炎症活性。由此可见, 克罗烷类二萜的生物合成有重大意义。

#### 1.4 克罗烷类二萜的植物分布与功能多样性

值得注意的是, 克罗烷合成途径在被子植物中广泛存在, 相应地, 该途径的下游产物与衍生物也有不同的作用。唇形科筋骨草属下的九味一枝蒿 (*Ajuga bracteosa*) 中亦分离出了克罗烷类二萜, 具体种类为筋骨草型克罗烷二萜 A-E (Ajubractin)。与主要作用为药用的半枝莲型克罗烷二萜不同, 筋骨草中的克罗烷类二萜主要作用为作为拒食素防止昆虫啃食植株本身, 对棉花夜蛾 (*Spodoptera littoralis*) 的实验 (Castro et al., 2011) 证实了这一点。在唇形科的鼠尾草属下的迷幻鼠尾草 (*Salvia divinorum*) 中也检测出了克罗烷类二萜。迷幻鼠尾草作为一种很早便被生活在墨西哥的马萨特克人 (Mazatec) 驯化的作物, 长期以来被用于当地的占卜仪式, 原理是使用迷幻鼠尾草后产生的幻觉。经过现代科技检验后, 在迷幻鼠尾草内提取到了有致幻性的物质鼠尾草酮 A, 通过结合  $\kappa$  型阿片受体激活相关通路产生幻觉 (Butelman & Kreek, 2016)。克罗烷类二萜也广泛存在于唇形科之外的其他植物中。青牛胆 (*Tinospora sagittata*) 是防己科青牛胆属下的植物, 其植株内被检测出的防己内酯 A、B (tinospurin), 对癌细胞系的测试中获得了较低的 IC<sub>50</sub>, 证明其有潜力发展为抗癌药物。由此可见, 克罗烷合成途径有很大的开发潜力与价值。

#### 1.5 克罗烷合成的研究进展

目前对于克罗烷合成途径的解析已有一定进展。我们在这里有必要对该代谢途径的前两部进行详细解释。克罗烷代谢途径起始于植物的质体中。其第一步反应的底物是香叶基香叶基焦磷酸 (GGPP)，经由克拉维醇焦磷酸合酶 (KPS) 环化后，释放产物克拉维醇焦磷酸 (KPP)。随后，底物 KPP 经由克拉维醇合酶 (KLS) 脱去焦磷酸基团，释放产物克拉维醇 (Kolavenol)。上述两步在多数植物中，包括半枝莲，相同，仅在环化方式、KPS 的结构与起源有差异。克罗烷合成途径另一条支路在起始的底物 GGPP 分支。此时，催化 GGPP 环化的酶为异克拉维醇焦磷酸合酶 (IKPS)，经反应后释放产物异克拉维醇焦磷酸 (IKPP)。之后，由异克拉维醇合酶 (IKLS) 催化底物 IKPP 脱去焦磷酸基团，生成产物克拉维醇的结构对映体异克拉维醇 (Isokolavenol)。

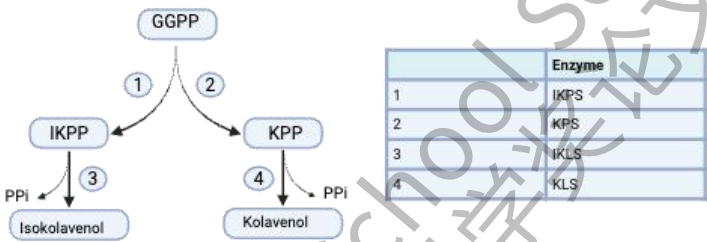


图 1、克罗烷合成途径前两步图示

### 1.6 KPS 的催化特性、保守结构域与功能决定性

注意到在克罗烷合成途径中，KPS 负责将 GGPP 环化，而环化方式在决定下游产物结构方面有决定性作用。因此，KPS 的酶活性在克罗烷合成途径中尤为重要。已有研究显示，KPS 遵循米氏动力模型催化 GGPP 环化。同时，体外试验表明 KPS 是单功能的酶 (X. Chen et al., 2017)。还需要注意的是，KPS 与 IKPS 同属于二类二萜合酶 (class II diTPS)。这一类酶的通常具有两段保守的氨基酸序列，即 DXDD 与 LLFSL。当 LLFSL 中的本丙氨酸突变为组氨酸时，该酶失去作为 KPS 的活性，通过气相色谱检测 KPS 介导的克罗烷合成途径下游产物含量与对映-柯巴基焦磷酸合酶 (eCPS) 介导的赤霉素合成途径下游产物含量，判断突变后的 KPS 获得了 eCPS 的功能，并通过量子化学计算进一步阐释了催化机制 (Potter et al., 2015)。综上，可见 KPS 在克罗烷合成途径中有决定性作用，其具有的高特异性，使体外实验中异源合成克罗烷类二萜时

需要格外注重保持 KPS 的酶活性。

## 1.7 本课题研究目的与内容

尽管已有研究表明 KPS 是克罗烷类二萜生物合成途径中的关键酶，且二类二萜合酶通常具有 DXDD 和 LLFSL 等保守基序，但半枝莲 KPS 活性中心中决定 GGPP 结合与环化的关键氨基酸残基仍未得到系统解析，其构效关系尚不清晰，这限制了克罗烷类二萜的酶工程改造与异源合成效率。为此，本研究以半枝莲 KPS 为研究对象，首先通过同源建模构建其三维结构，并利用分子对接预测 GGPP 在活性中心的结合模式，锚定 G216、I272、W376、L419 和 W512 等潜在关键残基；随后设计 6 种定点突变体，经重叠延伸 PCR、同源重组、测序验证后，与 HMGR、GGPPs 共表达于本氏烟草瞬时表达体系，并利用 GC-MS 检测产物克拉维醇的生成情况。结果表明，多数突变显著降低 KPS 催化活性，说明这些残基在维持活性中心空间构型、疏水环境和底物取向中具有重要作用；其中 I272L 突变体可显著提高克拉维醇产量。该研究从分子水平揭示了半枝莲 KPS 关键氨基酸与催化功能之间的关系，并为克罗烷类二萜的酶工程改造和异源生物合成提供了候选突变位点与理论依据。

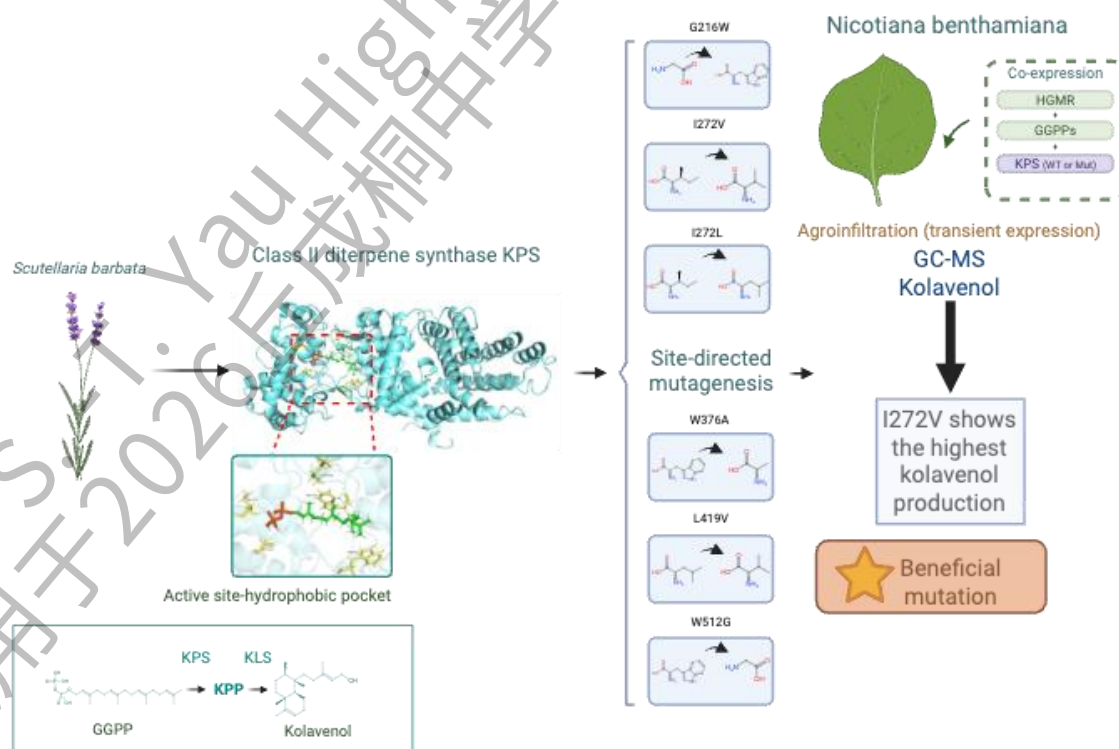


图 1、文章概述

## 2 实验和材料

### 2.1 实验材料

本课题使用的有关实验试剂及耗材如表 2.1 所示。

表 2.1 试剂与耗材

| 实验用品名称               | 生产商                    |
|----------------------|------------------------|
| 半枝莲 KPS 的 cDNA       | 华东师范大学生命科学学院植物学科实验室    |
| 拟南芥 HMGR 的 cDNA      | 华东师范大学生命科学学院植物学科实验室    |
| 南方红豆杉 GGPPs 的 cDNA   | 华东师范大学生命科学学院植物学科实验室    |
| 质粒载体 pEAQ            | 生工                     |
| 重叠延伸 PCR 引物          | 生工                     |
| 通用引物                 | 生工                     |
| 同源重组酶                | ABclonal               |
| 高保真酶                 | NEB                    |
| Taq 酶                | Aidlab Biotechnologies |
| 大肠杆菌感受态菌株 BL21 (DE3) | 唯地                     |
| 农杆菌感受态菌株 GV3101      | 唯地                     |
| 琼脂                   | 生工                     |
| 卡那霉素                 | 生工                     |
| 利福平                  | 生工                     |
| 庆大霉素                 | 生工                     |
| AS                   | 生工                     |

|                                                     |               |
|-----------------------------------------------------|---------------|
| 乙酸乙酯                                                | 国药沪试          |
| 甲醇                                                  | 国药沪试          |
| MS                                                  | Coolaber      |
| Tris                                                | 生工            |
| 盐酸                                                  | 国药沪试          |
| EDTA 二钠                                             | 生工            |
| 琼脂糖                                                 | 欣凯莱           |
| 氯化镁                                                 | 沪试            |
| MES                                                 | Sigma-Aldrich |
| FastPure Gel DNA Extraction Mini Mit                | 诺唯赞           |
| 氯化钠                                                 | 沪试            |
| 酵母提取物                                               | Oxoid         |
| 胰蛋白胨                                                | Oxoid         |
| FastPure Universal Plant Total RNA Isolation<br>Kit | 诺唯赞           |

## 2.2 实验仪器与设备

本课题使用的仪器与设备如表 2.2 所示。

表 2.2 仪器与设备

| 仪器名称     | 型号与厂商          |
|----------|----------------|
| 旋蒸仪-旋转电机 | ELEYA NVP-1300 |
| 旋蒸仪-水浴锅  | ELEYA OSB-2200 |

|          |                                |
|----------|--------------------------------|
| 旋蒸仪-真空系统 | ELEYA NVP-1000                 |
| 高速离心机    | Hitachi S204725-3              |
| 电泳仪      | Tanon EPS-300                  |
| 热循环仪     | Bio-Rad S1000                  |
| 热循环仪     | Bio-Rad T100                   |
| 微量分光光度计  | Thermo Scientific NanoDrop One |
| 可见光分光光度计 | 菁华 JH 722s                     |
| 纯水机      | Rephile Direct-Pure            |
| 电热恒温培养箱  | 龙跃 LY13-420                    |
| 振荡培养箱    | 晏泉 MQD-S1R                     |
| 微波炉      | 格兰仕 G90F25CSPV-BM1 (G0)        |
| 微量天平     | sartorius BSA22025-CW          |
| 电热恒温水槽   | 一恒 DK-80                       |
| 气相色谱-质谱仪 | 7890B-5977B                    |

## 2.3 半枝莲 KPS 活性中心关键氨基酸预测与筛选

### 2.3.1 KPS 三维结构同源建模

同源建模使用软件为 Swiss model。采用 *Grindelia hirsutula* 的二类二萜合酶 (PDB 编号 9B99) 为模版，导入半枝莲 KPS 的 cDNA 序列进行序列比对与建模。

### 2.3.2 底物 GGPP 与 KPS 分子对接模拟

底物与酶的结合模式的预测通过分子对接软件 MOE 完成。对接力场采用 Amber:EHT 联合力场。对接靶点为 F269 与 D385。使用 Triangle Matcher 算法进行构

象放置，生成初始的结合构象库，共产生 30 个摆放姿态，并使用 London dG 评分函数进行初筛打分。接着，对结合口袋执行 rigid receptor 精炼，并采用 GBBI/WSA dG 重新评分，保留得分最优的 15 个姿态。根据分子对接结果，在上述氨基酸残基 F269 与 D385 中筛选正确的分子取向，并在找到正确的分子取向后在 4.5Å 范围内筛选残基残基设计点突变。

### 2.3.3 结合口袋残基的界定与突变靶点确定

如图 2 所示为锚定的结合口袋的重要残基，分别是第 216 位甘氨酸、第 272 位异亮氨酸、第 376 位色氨酸、第 419 位亮氨酸与第 512 位色氨酸。现为了研究各残基对酶活性的作用，根据各残基的物理与化学性质，设置了不同的突变型。其中，针对第 216 位甘氨酸，为验证其较小的空间位阻对底物与活性中心结合的作用，突变为空间位阻更大的色氨酸；针对第 272 位异亮氨酸，为验证其疏水侧链基团对疏水口袋形成的作用，突变为性质相似的缬氨酸与亮氨酸；针对第 376 位色氨酸，为验证其芳香环对催化的影响，突变为疏水的丙氨酸；针对第 419 位亮氨酸，采用突变异亮氨酸时相似的思路；针对第 512 位色氨酸，为了验证其空间位阻是否影响底物与活性中心结合，突变为空间位阻更小的的甘氨酸。因此，本项目设置这 5 个可能对 GGPP 的环化有重要作用的氨基酸残基为突变靶点，并拟通过后续实验验证该猜想。

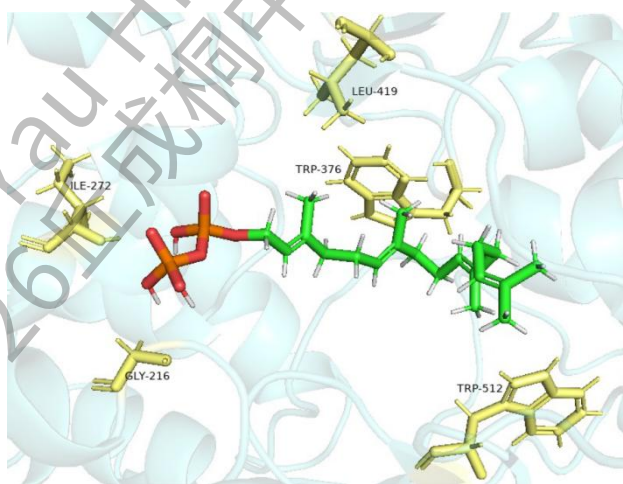


图 2、结合口袋重要残基

## 2.4 定点突变引物设计与目的基因片段扩增

#### 2.4.1 突变位点对应的重叠延伸 PCR 引物设计

取半枝莲的茎叶部分提取 RNA，纯化后进行逆转录，获得对应基因的 cDNA。此步骤由植物学科实验室提前完成。根据半枝莲 KPS 的 cDNA 序列（见补充材料），对每一个突变靶点，以编码该氨基酸的密码子的第一位与第三位碱基开始，分别向上游与下游延伸 12 个左右的碱基，作为重叠延伸 PCR 引物（后称 Adapter）覆盖区域。获取的半枝莲 KPS 的 cDNA 已敲除信号肽序列，使酶在细胞质中表达，便于萃取产物。同时，因后续需进行同源重组，cDNA 两端均已接上重组臂。Adapter 与 cDNA 上、下游接同源臂的引物序列（后简称上、下游引物）见补充材料。

同时准备半枝莲编码 HGMR 与 GGPPs 的 cDNA。这两种 cDNA 编码在上游合成 GGPP 的两种酶，均敲除信号肽。携带这两种 cDNA 的农杆菌菌株在进行烟草瞬时转录时一同转入烟草，提高底物 GGPP 在烟草叶片内的含量。

#### 2.4.2 PCR 扩增反应体系与程序

PCR 采用 25 $\mu$ l 的体系。突变的共分两轮 PCR 完成。在第一轮 PCR 中，在一组离心管中加入 0.75 $\mu$ l 的上游引物、0.75 $\mu$ l 的下游 Adapter、模版 cDNA 0.5 $\mu$ l、高保真酶 KOD1 体系二倍稀释，加入 12.5 $\mu$ l 与 10.5 $\mu$ l 的去离子水。另外一组加入 0.75 $\mu$ l 的下游引物、0.75 $\mu$ l 的上游 Adapter，其他条件同上。将 PCR 管放入热循环仪。95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟，然后进入 PCR 设定程序。95 $^{\circ}$ C 变性 20 秒，然后 55 $^{\circ}$ C 退火 25 秒，接着 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟 20 秒。程序共设置 34 轮次，总共持续约 2.5 小时。

第一轮 PCR 结束后对产物进行琼脂糖凝胶电泳，电泳结束后回收一轮 PCR 中扩增的片段。第二轮 PCR 中，每一组扩增后的片段均加入 0.25  $\mu$ L，并加入 0.75  $\mu$ L 的上游引物与下游引物。体系中其他条件不变。PCR 程序同上所述。第二轮 PCR 结束后，使用量程为 0.1-2.5 $\mu$ L 的移液枪取一滴片段，滴在分光光度仪下，测量 OD600。

#### 2.4.3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳与产物回收

首先配制 10 倍稀释的 TE 缓冲液。准备 pH 为 7.5 的 1M 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-盐酸）与 0.5M 的乙二胺四乙酸二钠（Na<sub>2</sub>EDTA），加入 Tris-盐酸 0.1L 与 Na<sub>2</sub>EDTA 0.02L。配制浓度为 1%的琼脂糖凝胶。其中，加入 5g 琼脂糖与 50mL 的 TE

缓冲液。轻微振荡后，置入 100 烤箱烘烤直至琼脂糖充分溶解。取出已经充分溶解的琼脂糖凝胶，加入 50 $\mu$ L 的 DNA marker，轻轻振荡，使其均匀地分布在琼脂糖凝胶液中。随后，准备电泳槽与梳子，倒入凝胶，等待 20 分钟后凝胶冷却，拔出梳子，将电泳槽置入电泳仪中，倒入 TE 缓冲液，使其没过凝胶。

取出上一轮次的 PCR 后得到的片段，每个突变体取 20  $\mu$ L，加入上样缓冲液 4  $\mu$ L，上样时每个泳道加入 12  $\mu$ L，上两个泳道。另备 marker，上样 6  $\mu$ L。电泳结束后，在紫外灯下切割含有目的片段的凝胶，回收至离心管中。加入试剂盒中的 Buffer GDP 100  $\mu$ L，55 摄氏度水浴 10 min。将原离心管中溶液转入吸附柱中，随后把吸附柱置入原离心管，12000 rpm 室温离心 1 分钟。弃上清，再将吸附柱置于离心管中，加入 Buffer GDP 300  $\mu$ L，静置 1 分钟后 12000 rpm 室温离心 1 分钟。弃上清，再将吸附柱置于离心管中，加入试剂盒中的 Buffer GW（已加入无水乙醇）至吸附柱中，12000 rpm 室温离心 1 分钟，重复二次。随后，弃上清，将吸附柱置于离心管中，12000 rpm 室温离心 2 分钟。然后将吸附柱置于新的离心管中，加入 20 $\mu$ L 去离子水，静置 2 分钟。随后，12000 rpm 室温离心 2 分钟，弃吸附柱，得到回收后的 DNA 片段。

## 2.5 重组表达载体 pEAQ 的构建与大肠杆菌的转化

### 2.5.1 培养基配比

共配置 1L 的 LB 培养基。其中，加入 5g 酵母提取物、10g 氯化钠、10g 胰蛋白胨、与 10g 琼脂，加入去离子水定容至 1L，充分混合后，121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 分钟。

### 2.5.2 同源重组连接反应

重组时选用 5 $\mu$ L 的体系。其中，pEAQ 质粒载体加入 1.32 $\mu$ L，同源重组酶 2 倍稀释以将目标片段克隆到质粒中，加入 2.5 $\mu$ L，加去离子水补至 5 $\mu$ L。根据第一轮重叠延伸 PCR 所得的每个突变片段的不同浓度，每个突变片段据此加入不同体积（见补充材料）。同源重组连接反应时，程序设计参照上文 PCR 程序设计，保持一致。

### 2.5.3 大肠杆菌感受态细胞的制备

转化采用 50 $\mu$ L 的体系。其中，加入感受态 Top10 大肠杆菌菌液 45 $\mu$ L，重组质粒 5 $\mu$ L。

转化时在冰上操作，0℃处理之后冰上静置 30 分钟。之后，42℃水浴锅热激 1 至 1.5 分钟，再冰浴 2 分钟。之后，在超净工作台处理，加入液体 LB 培养基补全至 200μl。最后 37℃、220rpm 恒温摇床复苏 1 至 2 小时。

#### 2.5.4 平板筛选

在涂板前准备平板。共准备 200mL 的 LB 培养基，另取 50 mg/mL 的卡那霉素与 100mg/mL 的氨苄青霉素，在 LB 培养基温度下降些许后，加入 LB 培养基使卡那霉素与氨苄青霉素以 1000 倍被稀释，具体各加入 200 μL。往培养皿中倒入些许未冷却的 LB 培养基，使得轻轻摇晃培养皿后，固体培养液可以平整地覆盖培养皿的底部。等待约 20 分钟左右，使 LB 培养基凝固。取 200 μL 菌液涂板。涂板后于 37℃恒温培养箱培养，待平板上出现较为明显的菌株后，每一个平板随机挑选 3 个菌落，进行菌液 PCR。

#### 2.5.5 PCR 验证与测序确认

PCR 程序同先前突变时的程序设计。值得注意的是，本次实验仅突变时使用高保真的 KOD 体系，在扩增片段时均使用 Taq 酶。PCR 结束后，在紫外灯下切割含目标片段的胶，放入 1.5ml 离心管。回收步骤同上所述。获得回收后的 DNA 片段，送测，公司为康为世纪，要求返样时返质粒。质粒用于后续农杆菌转化实验。

### 2.6 农杆菌工程菌株的制备与转化

#### 2.6.1 农杆菌阳性转化子的筛选与 PCR 复核

取-80℃保存的农杆菌感受态于室温融化。待其处于冰水混合物状态时，将其插入冰中。对于 6 组突变体与 1 组野生型质粒，每组使用 100μL 感受态细菌加入离心管中。取出先前反样的质粒，每组对应的质粒分别加入 10μL 至感受态细菌中。用手指轻叩管壁使质粒与感受态细菌充分混匀。将混合物于冰上静置 5 分钟，随后将离心管浸入液氮中，冷却 5 分钟。接着，捞出离心管，置于水浴锅中 37℃热激 5 分钟。最后，从水浴锅中捞出农杆菌，冰浴 5 分钟。

在超净工作台下工作，往每个离心管中加入 200 $\mu$ L 的无抗生素液体 LB 培养基。将菌液放在 28 $^{\circ}$ C 摇床，220rpm，复苏约 3 小时。这之后取出复苏后的菌液，6000rpm 离心 1 分钟瘦菌，留上清液约 100 $\mu$ L，再轻叩管壁重悬菌块。

取 200mL 熔化状态的无抗生素 LB 固体培养基，待培养基温度下降些许后，加入卡那霉素、庆大霉素、与利福平。卡那霉素与庆大霉素的浓度如前文准备大肠杆菌培养基时所示，且依旧作 1000 倍稀释处理。利福平母液浓度为 50  $\mu$ g/mL，也作 100 倍稀释，均加入 200  $\mu$ L。往培养皿中倒入些许未冷却的 LB 培养基，使得轻轻摇晃培养皿后，固体培养液可以平整地覆盖培养皿的底部。等待约 20 分钟左右，使 LB 培养基凝固。

取转化后的菌液 200 $\mu$ L 加入至固体 LB 培养基上，均匀地涂抹平板，随后倒置在 28 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中 2 至 3 天，观察是否有圆形的菌落生长。如有较为明显的菌株，依照先前处理大肠杆菌突变株的操作，取转化后的农杆菌感受态细胞送往测序，以确认含有编码 KPS 的核苷酸序列准确无误。

## 2.7 烟草瞬时转录

### 2.7.1 烟草的培养

在湿润的营养土中播撒少许烟草种子用保鲜膜覆盖以保持湿度，从而确保充分发芽。大概 7 天后进行移栽烟草。光周期为：晚上 11 点至第二天早上 7 点为黑暗条件，剩余时间均有光照。湿度约为 60%左右，温度为 26 $^{\circ}$ C 左右。

### 2.7.2 农杆菌侵染液的制备

准备 0.5M 的甲磺酰氯 (MS)、0.5M 的 2-吗啉乙磺酸 (MES)、1M 的氯化镁溶液、与 0.1M 的乙酰丁香酮 (AS)。临近侵染时再进行配制。其中，加入 MS 48.3 mL、MES 1 mL、氯化镁溶液 0.5mL、AS 0.2 mL，最终加入去离子水，补齐至 200mL。测定每个农杆菌菌株的 OD600 后，根据所得值，在每一管中加入 HMGR 菌株、GGPPs 菌株、与携带 KPS 的菌株。目标 OD600 为 0.3。最终加入侵染液补齐至 20ml。

## 2.8 气相色谱-质谱联用定性定量分析

### 2.8.1 样品制备

转化 5 天后摘取被转入农杆菌的烟草叶片放入 2ml 离心管，并用 -80℃ 液氮冷冻，研磨成细粉。加入 1ml 乙酸乙酯以提取二萜，并在 37℃、220rpm 恒温摇床过夜。之后，捞出先前制备的溶液中的植物组织残渣，再次加入乙酸乙酯，提纯样品。混合两次抽提所获的样品。随后，将溶液尽数倒入茄型烧瓶，进行旋蒸直到烧瓶中不可见液态样品，取下茄型烧瓶，加入 100μl 甲醇，充分混匀，随后转移小样至新的离心管中。

### 2.8.2 色谱条件与质谱参数

使用配备 Agilent DB-5HT 色谱柱 (30 m × 0.25 mm × 0.1 μm) 的 GC7890B-MS7200B QTOF 系统 (美国加利福尼亚州帕洛阿尔托) 对样品进行分析。转染的本氏烟草 (\*Nicotiana benthamiana\*) 样品的进样量为 2 μL，酶促反应样品的进样量为 5 μL；进样采用分流模式 (分流比 5:1)，进样口温度设定为 250 °C。气相色谱 (GC) 升温程序为：初始温度 50 °C 保持 2 min，以 4 °C/min 升至 110 °C，以 8 °C/min 升至 250 °C，以 10 °C/min 升至 310 °C 并保持 5 min。质谱 (MS) 离子源温度设定为 230 °C，质荷比 (m/z) 扫描范围为 50 至 350。载气流速为 1 mL/min。关于二萜类化合物的 GC-MS 分析方法，可参考既往文献 (Andersen-Ranberg et al., 2016) 中的描述。

## 3 结果与讨论

### 3.1 半枝莲 KPS 三维结构模型与结合口袋的界定

#### 3.1.1 KPS 同源模型的建立与评估

如图 3 为使用同源建模软件 Swiss Model 建模后得到的半枝莲 KPS 的三维结构。该模型符合二类二萜合酶的典型结构形式。具体而言，半枝莲 KPS 同源模型呈现以 α-螺旋为主的紧凑折叠，由 N 端结构域和 C 端结构域组成，活性中心位于两个结构域的

交界处。模型中可以识别出二类二萜合酶特有的 DXDD 与 LLFSL 保守基序，二者在三维空间中均靠近底物结合口袋，提示其可能分别参与 GGPP 焦磷酸基团的质子化、环化引发以及反应中间体的稳定。活性口袋内部以疏水残基为主，形成一个有利于 GGPP 柔性链折叠与环化的疏水环境，这与 class II diTPS 催化 GGPP 环化的结构特征一致。

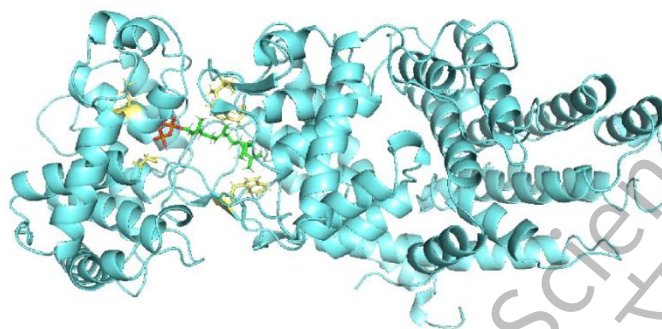


图 3、通过同源建模获得的 KPS 三维图

### 3.1.2 分子对接预测 GGPP 的结合模式

分子对接的结果如图 4 显示 GGPP 主要由一个疏水口袋包围。其中，对于形成疏水口袋有重要作用的疏水氨基酸残基是 Gly-216、Ile-272、Trp-376、Leu-419、Trp-512。对于这些氨基酸残基，初步推断他们的部分性质对 GGPP 的环化起到了关键性作用。

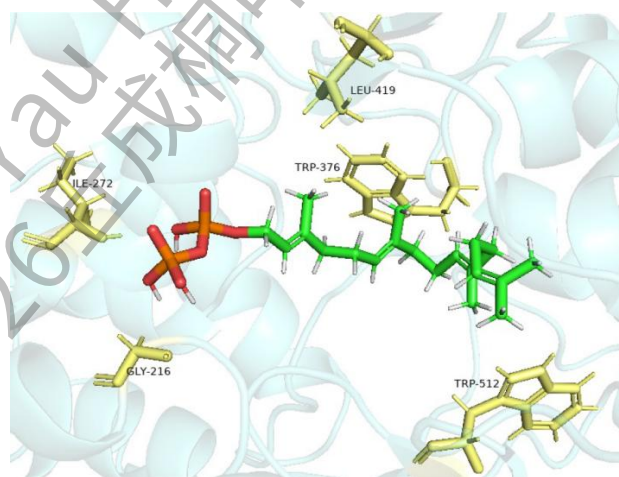


图 4、分子对接预测的 GGPP 结合模式

通过氨基酸残基的种类我们锁定了具体需要突变的氨基酸与突变后的种类。首先是第 216 位的甘氨酸残基。甘氨酸的侧链基团仅有一个氢原子，拥有较小的空间位阻。因此，我们判定位于这一位点的残基通过减小空间位阻，为底物的进入或者环化提供必要

的空间。对于其他的四个氨基酸残基，首先，鉴于他们都属于侧链非极性或者是有芳香环的氨基酸，因此他们极有可能共同作用，形成疏水口袋，构成催化的必要条件。其次，对于第 376 号色氨酸与第 512 号色氨酸，已知色氨酸属于芳香族氨基酸，因此其芳香环，如共轭电子云，可能会对稳定底物等方面起到重要的作用。因此，我们选取这些氨基酸残基作为突变体的对象研究。

## 3.2 定点突变体的成功构建与验证

### 3.2.1 重叠延伸 PCR 扩增突变体片段

扩增片段约为 2400bp 左右，如图标注所示，位于凝胶中上部位置。经电泳证明，突变体已成功构建。结果如图 5 所示，泳道 1 为野生型 KPS 扩增片段，泳道 2-5 分别为 G216W、I272V、I272L 和 W376A 突变体，泳道 8 为 DNA marker。各泳道在约 2400 bp 处均出现清晰、单一的主带，与野生型条带位置一致，且位于 3000 bp marker 条带下方，符合去除信号肽并连接同源重组臂后 KPS 片段的预期长度。由于定点突变仅改变个别碱基，并不改变片段长度，因此突变体与野生型在电泳中迁移率一致，说明突变未导致片段缺失或异常拼接。同时，各泳道未见明显引物二聚体及非特异性杂带，第一轮 PCR 产生的短片段也已通过第二轮重叠延伸有效拼接为全长产物，表明 Adapter 引物设计合理、PCR 条件适宜。上述结果表明，G216W、I272V、I272L、W376A 等定点突变已成功引入半枝莲 KPS 编码序列。随后，将约 2400 bp 处的主带切胶回收，用于 pEAQ 载体同源重组；重组质粒经转化、菌液 PCR 及测序验证后，可进一步用于农杆菌介导的烟草瞬时表达。

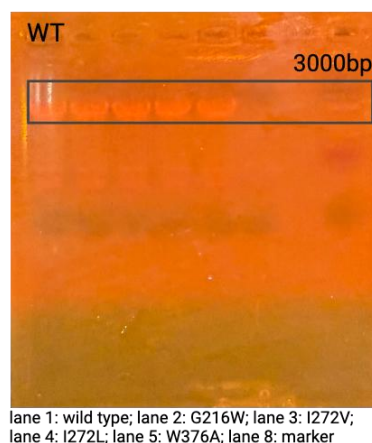


图 5、琼脂糖凝胶电泳对应的部分突变片段的条带

### 3.2.2 重组质粒的转化与阳性克隆测序鉴定

将重组的 pEAQ 质粒转入感受态的农杆菌，使用卡那霉素、庆大霉素与利福平的三重抗性的培养基筛选菌落。如图所示为部分重组质粒载体的构建，培养基的小型圆形菌落为筛选后得到的重组菌落。将重组的 pEAQ 质粒转入感受态的农杆菌 GV3101 后，使用含卡那霉素、庆大霉素与利福平的三重抗性 LB 平板进行筛选。由于重组 pEAQ 质粒携带卡那霉素抗性，GV3101 菌株背景本身具有利福平抗性，并携带庆大霉素抗性的辅助质粒，因此只有成功导入重组质粒且质粒未丢失的农杆菌转化子才能在三抗平板上正常生长。如图 6 所示，a、b、c 分别为 W512G、野生型和 G216W 转化后的三抗筛选平板，平板上均可见分布较均匀的圆形单菌落，而未转化农杆菌因不具备完整抗性组合不能生长。阳性单菌落的出现初步说明重组 pEAQ 质粒已成功导入农杆菌 GV3101。

随后，从每个三抗平板上随机挑取若干单菌落，接种于含相应抗生素的液体 LB 培养基中，于 28℃、220 rpm 条件下培养至菌液浑浊。以菌液为模板，使用 KPS 基因特异性引物或 pEAQ 载体通用引物进行菌液 PCR 复核。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，阳性克隆在约 2400 bp 处出现清晰、单一的特异性条带，与野生型及前期重叠延伸 PCR 扩增的目的片段长度一致；阴性对照无相应条带。该结果进一步排除了假阳性菌落，证明重组质粒已稳定转入农杆菌。

将菌液 PCR 验证为阳性的克隆送康为世纪测序，并将测序结果与半枝莲 KPS 原始 cDNA 序列及设计突变位点进行比对。测序结果显示，G216W、I272V、I272L、W376A、W512G 等突变位点均按预期成功引入，读码框完整，未发现额外碱基突变、缺失或移码。最终获得携带野生型及 6 种突变型 KPS 的农杆菌工程菌株，并保留甘油菌于 -80℃ 保存，为后续烟草瞬时表达及 GC-MS 产物分析提供了可靠材料。

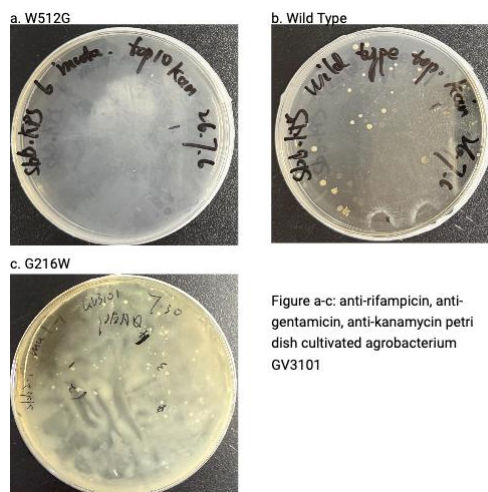


图 6、部分载体农杆菌三抗筛选后的菌株

### 3.3 突变对 KPS 催化功能的影响评估

#### 3.3.1 烟草瞬时转录表达体系中产物的 GC-MS 定性分析

如图为实验室培育的烟草。经细心培养后均处于非胁迫状态。烟草叶片呈现翠绿色，少有焦黄。烟草均直立生长，少有倒伏。查看后烟草无真菌侵染或害虫啃咬。同时，选取无花芽或掐去花芽少的烟草，使叶片能够得到充足的营养供应。因此，本批次的烟草适于进行烟草瞬时转录实验。在确认烟草材料状态良好后，按 2.7.2 所述方法制备农杆菌侵染液。将携带野生型或突变型 KPS 的 GV3101 菌株分别与 HMGR、GGPPs 菌株混合，调整 OD600 至 0.3，静置后采用叶片下表皮注射法侵染本氏烟草。注射后的烟草置于 26℃、相对湿度约 60%、光周期 16 h 光照/8 h 黑暗条件下继续培养。5 天后观察，注射区域叶色仍以翠绿为主，无明显坏死、黄化或严重皱缩，说明农杆菌侵染未对叶片造成显著胁迫，可用于后续代谢产物提取。

随后采集注射区域叶片，液氮速冻并研磨成细粉，加入乙酸乙酯过夜提取，经旋蒸浓缩、甲醇复溶后，采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 进行定性分析。以野生型 KPS 为对照，在克拉维醇对应的保留时间处可检测到典型质谱峰，其碎片离子特征与文献报道及数据库中的克拉维醇质谱图一致，表明烟草瞬时表达体系成功重建了 KPS 介导的 GGPP 环化反应。与野生型相比，G216W、I272V、W376A、W512G 等突变体在相同保留时间处的峰高和峰面积均出现不同程度下降，部分突变体甚至接近检测限，说明这

些位点的氨基酸侧链在维持 KPS 活性中心构象、疏水环境及底物正确取向上具有重要作用。其中, I272L 突变体在克拉维醇对应保留时间处的峰高和峰面积均高于野生型, 提示 Ile272 突变为 Leu 后可能增强了活性口袋与 GGPP 之间的疏水相互作用, 或优化了底物结合构象, 从而提高了环化效率。此外, 各样品中均未观察到明显的副产物峰, 表明上述突变主要影响 KPS 的催化效率, 而未显著改变其产物特异性。

综合上述 GC-MS 定性结果, 半枝莲 KPS 活性中心 G216、I272、W376、L419 和 W512 等残基确实参与 GGPP 的结合与环化过程, 其中 I272L 为提高克拉维醇产量的有益突变, 可作为后续克罗烷类二萜异源合成与酶工程改造的候选位点。



图 7、烟草瞬时表达体系中野生型及突变型 KPS 催化产物的 GC-MS 分析。野生型 KPS 可检测到克拉维醇特征峰; 多数突变体目标峰显著降低, I272L 突变体目标峰高于野生型

如图 8 所示了以  $m/z^* 189$  为提取离子 (EIC 189) 对野生型及突变型半枝莲 KPS 催化产物进行的 GC-MS 分析。克拉维醇在约 34.2 min 处洗脱, 其质谱图中可见  $m/z^* 189$ 、120、107、81、69 等特征碎片离子, 其中  $m/z^* 189$  为基峰, 与克拉维醇的典型质谱特征一致, 表明烟草瞬时表达体系中检测到的目标峰确为 KPS 催化 GGPP 环化后, 经烟草内源 KLS 脱焦磷酸生成的克拉维醇。野生型 KPS 组在 34.2 min 处出现清晰、对称的色谱峰, 说明 HMGR、GGPPs 与 KPS 共表达体系能够有效供应前体 GGPP, 并完成克罗烷合成途径前两步反应。

与野生型相比, I272V、W376A、L419V、W512G 等突变体在相同保留时间处的峰高和峰面积均显著降低。其中, W376A、L419V 和 W512G 的目标峰几乎接近检测

限, I272V 仅保留微弱峰信号。这一结果说明, 上述残基的侧链性质对维持 KPS 催化活性不可或缺。I272V 突变使异亮氨酸的  $\beta$ -分支侧链缩短为缬氨酸, 减少了与 GGPP 的疏水接触; W376A 和 W512G 分别破坏了色氨酸的芳香环和空间位阻, 可能影响活性口袋的疏水环境、底物取向或反应中间体的稳定; L419V 则缩短了亮氨酸侧链, 削弱了疏水口袋的完整性。这些突变均未产生明显的新副产物峰, 表明其主要降低 KPS 的催化效率, 而非显著改变产物特异性。

值得注意的是, I272L 突变体在 34.2 min 处的峰高和峰面积不仅未降低, 反而明显高于野生型, 且保留时间与野生型一致, 质谱碎片特征也相同, 说明 I272L 仍催化生成克拉维醇, 但产量显著提高。Ile 与 Leu 为同分异构体, 二者疏水性相近, 但 Leu 侧链的支链位置不同, 可能赋予活性口袋更高的柔性和更优的范德华接触, 从而增强酶与 GGPP 的疏水相互作用, 降低底物结合自由能, 提高环化效率。此外, I272L 样品中未检测到明显副产物, 表明该突变在提高产量的同时未牺牲产物纯度。

综合图 8 结果, 半枝莲 KPS 活性中心 G216、I272、W376、L419 和 W512 等残基不仅参与底物 GGPP 的特异性识别, 也直接影响酶的催化活性。多数突变导致克拉维醇产量大幅下调, 说明这些位点共同维持了活性口袋的空间构象和疏水环境; 而 I272L 作为唯一产量上调的突变, 展示了通过理性改造 KPS 提高克罗烷类二萜产量的潜力。若后续将该突变应用于克罗烷类化合物的异源生物合成或大规模发酵, I272L 可作为优先考虑的候选突变型。

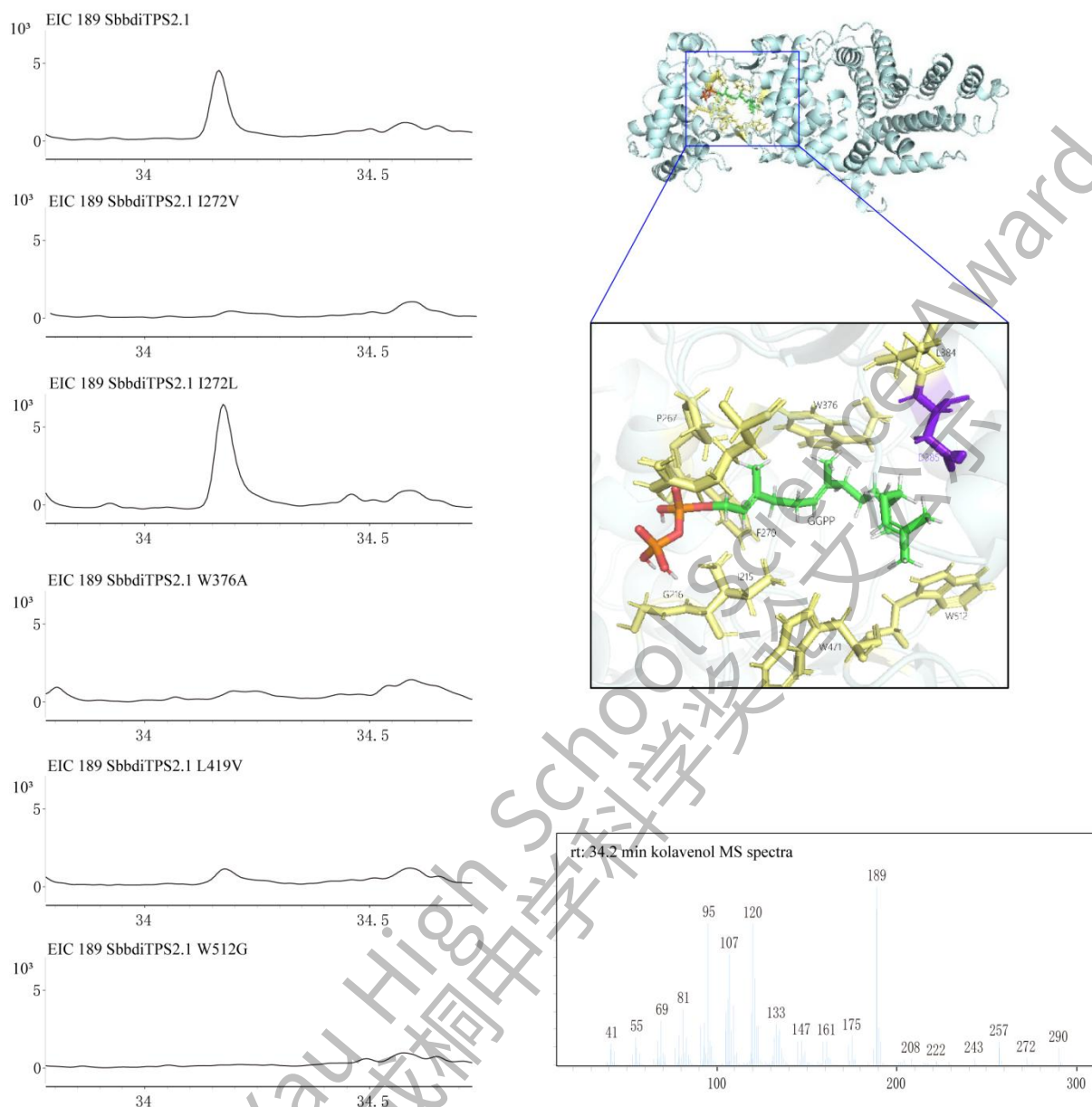


图 8、气相色谱-质谱连用测量后结果

### 3.3.2 突变对产物产量与组分纯度的分析

在这些峰图中，均未检测出副产物或副产物产量极少，因此，我们进一步判断，本次实验中突变的氨基酸残基，不仅是决定了 KPS 对底物 GGPP 的特异性，同时也更进一步决定了酶的活性。

构建的 6 个突变株中基本都出现了主产物产量大幅下调。值得注意的是 I272L，即第 272 号异亮氨酸突变为亮氨酸的突变株。这一组样品的气相色谱-质谱联用数据显示出了产物克拉维醇的大幅上调，并且在与野生型的峰图的对比下，甚至具有更为高耸的

产物峰。因此，如果后续要将生物合成克罗烷类化合物大规模投产，可以参考的方案是 I272L 突变型。

### 3.4 氨基酸残基结构与 KPS 催化效率的构效关系

#### 3.4.1 空间位阻与催化特异性

GGPP 是一种线性 C<sub>20</sub> 多烯焦磷酸，其进入 KPS 活性中心后，需要在疏水口袋中折叠成特定构象，使焦磷酸基团靠近 DXDD/LLFSL 等催化基序，并促使多烯链发生环化。结合图 4 的分子对接结果，GGPP 位于由 G216、I272、W376、L419 和 W512 等残基围成的结合口袋中。该口袋的空间尺寸和形状对底物取向、中间体稳定及产物特异性具有重要影响。

G216 的侧链仅为一个氢原子，是口袋中空间位阻最小的残基之一，可能为 GGPP 的进入、折叠或焦磷酸端取向提供必要空间。G216W 突变引入体积较大的色氨酸吡咯环，导致克拉维醇产量显著下降，说明该位点并非无关紧要，而是维持底物通道和口袋入口空间的关键。与之相对，W512G 虽然减小了侧链体积，但产物峰同样明显降低，提示 W512 的吡咯环并非单纯阻碍底物，而可能通过占据特定空间维持活性口袋的几何构型，防止 GGPP 在催化前采取非生产性构象。

I272V 和 L419V 分别缩短了异亮氨酸和亮氨酸的疏水侧链，可能在疏水核心中形成空腔，使底物结合松弛、构象限制减弱，从而降低环化效率。I272L 虽与 Ile 为同分异构体，但侧链分支位置不同，可能改变了空间匹配和底物诱导契合。W376A 去除色氨酸芳香环，既减小了空间位阻，也破坏了潜在的疏水/ $\pi$  相关相互作用，导致产物几乎检测不到。上述结果表明，KPS 活性口袋对空间位阻具有精细要求：侧链过大可能压缩口袋、阻碍底物进入；侧链过小则可能形成空腔、降低对 GGPP 的构象限制。空间位阻不仅影响底物 GGPP 的结合，也可能影响环化中间体的取向和稳定，从而决定催化效率。

在本实验检测条件下，各突变体均未出现明显副产物峰，提示这些突变主要降低 KPS 催化效率，而未显著改变产物特异性。但这一结论仍需更灵敏的检测方法和体外酶反应进一步验证，以排除微量其他环化产物的生成。

### 3.4.2 疏水相互作用与催化效率

GGPP 的异戊二烯链高度疏水，其在 KPS 活性中心中的结合主要依赖疏水效应和范德华力。由图 4 可见，I272、W376、L419 和 W512 等残基共同构成疏水口袋，为 GGPP 提供低介电环境，并可能稳定环化过程中产生的碳正离子中间体。因此，疏水相互作用的强弱和空间匹配程度直接影响 KPS 的催化效率。

I272L 可能使侧链与 GGPP 多烯链之间形成更优的范德华接触，或允许底物在口袋中发生更合理的诱导契合，从而降低底物结合自由能、提高环化效率。相反，I272V 使侧链缩短一个亚甲基，减少了与 GGPP 的疏水接触面积，导致产物产量下降。W376A 和 W512G 破坏色氨酸吲哚环，可能同时削弱芳香残基与 GGPP 双键之间的疏水堆积或  $\pi$  相关作用，并影响碳正离子中间体的稳定，因而目标峰接近检测限。L419V 缩短亮氨酸侧链，削弱了疏水网络完整性，也导致产量降低。

上述结果说明，疏水相互作用是 KPS 维持催化效率的重要因素：疏水接触越充分、空间匹配越合理，酶对 GGPP 的结合和环化越有利。结合已有研究报道 KPS 遵循米氏动力学 (X. Chen et al., 2017)，I272L 可能通过降低  $K_m$  或提高  $k_{cat}$  来提升产物量，后续可通过纯化酶动力学实验进一步验证。此外，各突变体均未检测到明显副产物，说明这些残基主要影响催化效率，而非显著改变产物纯度。

## 4 结论

综上所述，本研究围绕半枝莲克罗烷类二萜生物合成途径中的关键酶 KPS，结合同源建模、分子对接、定点突变与烟草瞬时表达体系，系统解析了其活性中心关键氨基酸残基对 GGPP 环化功能的影响。研究以 *Grindelia hirsutula* 二类二萜合酶 (PDB: 9B99) 为模板构建了半枝莲 KPS 三维结构，并通过分子对接确定了 G216、I272、W376、L419 和 W512 等位于疏水口袋的潜在关键残基。随后成功构建了 G216W、I272V、I272L、W376A、L419V 和 W512G 等突变体，经测序验证后与 HMGR、GGPPs 共表达于本氏烟草，利用 GC-MS 检测产物克拉维醇。结果表明，多数突变导致克拉维醇产量显著下降，说明这些残基在维持活性口袋空间构象、疏水环境和底物正确取向中具有重要作用；其中 I272L 突变体的克拉维醇产量明显高于野生型，且未检测到明显副产物，提示该突变可能通过优化侧链空间匹配和疏水相互作用提高 KPS 催化效率。本研究不仅从分子水平揭示了半枝莲 KPS 活性中心残基与催化功能之间的构效关系，也为克罗烷类

二萜的酶工程改造和异源生物合成提供了 I272L 这一候选突变位点。然而，本研究目前仅在烟草瞬时表达体系中进行了产物分析，尚未纯化酶并测定动力学参数，也未考察组合突变及不同植物宿主中的表达效果。后续可结合体外酶反应、分子动力学模拟和组合突变策略，进一步验证 I272L 的增产机制，并推动克罗烷类二萜的高效生物合成，为半枝莲药用活性成分的可持续生产提供理论依据与候选元件。

2026 S.-T. Yau High School Science Award  
仅用于2026丘成桐中学科学奖论文公示

## 参考文献

- [1] Andersen-Ranberg J, Kongstad KT, Nielsen MT, Jensen NB, Pateraki I, Bach SS, Hamberger B, Zerbe P, Staerk D, Bohlmann J, Møller BL, et al. 2016. Expanding the Landscape of Diterpene Structural Diversity through Stereochemically Controlled Combinatorial Biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition* 55: 2142–2146
- [2] Butelman, E. R., & Kreek, M. J. (2016). The widely available hallucinogenic plant salvia divinorum and its main component, salvinorin a. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse*, 2(69), 739–746.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800212-4.00069-8>
- [3] Castro, A., Coll, J., & Arfan, M. (2011). neo-Clerodane Diterpenoids from *Ajuga bracteosa*. *Journal of Natural Products*, 74(5), 1036–1041. <https://doi.org/10.1021/np100929u>
- [4] Chen, Q., Rahman, K., Wang, S.-J., Zhou, S., & Zhang, H. (2020). Scutellaria barbata: A Review on Chemical Constituents, Pharmacological Activities and Clinical Applications. *Current Pharmaceutical Design*, 26(1), 160–175.  
<https://doi.org/10.2174/1381612825666191216124310>
- [5] Chen, X., Berim, A., Dayan, F. E., & Gang, D. R. (2017). A (–)-kolavenyl diphosphate synthase catalyzes the first step of salvinorin a biosynthesis in salvia divinorum. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 1109–1122. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw493>
- [6] Feng, X. S., Yan, W., Bai, L. H., Wang, K., & Chen, X. Q. (2021). neo-clerodane diterpenoids from the aerial parts of *scutellaria barbata* with anti-inflammatory activity. *Chemistry & Biodiversity*, 18(12). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100693>

- [7] Hao, X., Feng, P., Zhang, Y., Wang, F., Wang, G., & Fei, H. (2023). Scutebarbatine a induces ROS-mediated DNA damage and apoptosis in breast cancer cells by modulating MAPK and EGFR/akt signaling pathway. *Chemico-Biological Interactions*, 378, 110487. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110487>
- [8] Li, H., Wu, S., Lin, R., Xiao, Y., Malaco Morotti, A. L., Wang, Y., Galilee, M., Qin, H., Huang, T., Zhao, Y., Zhou, X., Yang, J., Zhao, Q., Kanellis, A. K., Martin, C., & Tatsis, E. C. (2023). The genomes of medicinal skullcaps reveal the polyphyletic origins of clerodane diterpene biosynthesis in the family Lamiaceae. *Molecular Plant*, 16(3), 549–570. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.01.006>
- [9] Li, R., Morris-Natschke, S. L., & Lee, K.-H. (2016). Clerodane diterpenes: Sources, structures, and biological activities. *Natural Product Reports*, 33(10), 1166–1226. <https://doi.org/10.1039/c5np00137d>
- [10] Li, S., Xu, D., Jia, J., Zou, W., Liu, J., Wang, Y., Zhang, K., Zheng, X., Ma, Y.-Y., Zhang, X., & Zhao, D.-G. (2023). Structure and anti-inflammatory activity of neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry*, 213, 113771. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113771>
- [11] Mafu, S., Fischer, E., Addison, J. B., Riberio Barbosana, I., & Zerbe, P. (2016). Substitution of Two Active-Site Residues Alters C9-Hydroxylation in a Class II Diterpene Synthase. *ChemBioChem*, 17(24), 2304–2307. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600419>

- [12] Pelot, K. A., Hagelthorn, D. M., Hong, Y. J., Tantillo, D. J., & Zerbe, P. (2018). Diterpene Synthase-Catalyzed Biosynthesis of Distinct Clerodane Stereoisomers. *ChemBioChem*, 20(1), 111–117. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800580>
- [13] Potter, K. C., Zi, J., Hong, Y. J., Schulte, S., Malchow, B., Tantillo, D. J., & Peters, R. J. (2015). Blocking deprotonation with retention of aromaticity in a plant *ent*-copalyl diphosphate synthase leads to product rearrangement. *Angewandte Chemie*, 128(2), 644–648. <https://doi.org/10.1002/ange.201509060>
- [14] Qin, N., Wang, A., Li, Da, Wang, K., Lin, B., Li, Z., & Hua, H. (2015). Cytotoxic clerodane furanoditerpenoids from the root of *Tinospora sagittata*. *Phytochemistry Letters*, 12, 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.03.014>
- [15] Qiu, T., Li, Y., Wu, H., Yang, H., Peng, Z., Du, Z., Wu, Q., Wang, H., Shen, Y., & Huang, L. (2023). Tandem duplication and sub-functionalization of clerodane diterpene synthase originate the blooming of clerodane diterpenoids in *Scutellaria barbata*. *The Plant Journal*, 116(2), 375–388. <https://doi.org/10.1111/tpj.16377>
- [16] Tang, T.-T., Li, S.-M., Pan, B.-W., Xiao, J.-W., Pang, Y.-X., Xie, S.-X., Zhou, Y., Yang, J., & Wei, Y. (2023). Identification of Flavonoids from *Scutellaria barbata* D. Don as Inhibitors of HIV-1 and Cathepsin L Proteases and Their Structure–Activity Relationships. *Molecules*, 28(11), 4476. <https://doi.org/10.3390/molecules28114476>
- [17] Tian, S., Xin, G., Zhang, K., Wen, A., Yu, X., Ni, C., Liu, Y., Li, X., Cao, Y., & Huang, W. (2025). Eriodictyol from *Scutellariae Barbata* alleviates inflammation and necrosis via ZBP1-dependent signaling in acute pancreatitis. *Phytomedicine*, 145, 156926–156926. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2025.156926>

- [18] Walentiny, D. M., Vann, R. E., Warner, J. A., King, L. S., Seltzman, H. H., Navarro, H. A., Twine, C. E., Thomas, B. F., Gilliam, A. F., Gilmour, B. P., Carroll, F. I., & Wiley, J. L. (2010). Kappa opioid mediation of cannabinoid effects of the potent hallucinogen, salvinorin A, in rodents. *Psychopharmacology*, 210(2), 275–284. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1827-6>
- [19] Wang, Z., Liu, M., Li, G., Zhang, L., Ding, K., Li, S., Gao, B., Chen, P., Choe, H.-C., Xia, L., Yang, Y., Liu, Y., Sui, X., Ma, J., & Zhang, L. (2024). A herbal pair of *Scutellaria barbata* D. Don and *Scleromitrion diffusum* (Willd.) R.J. Wang induced ferroptosis in ovarian cancer A2780 cells via inducing heme catabolism and ferritinophagy. *Journal of Integrative Medicine*, 22(6), 665–682. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2024.10.001>
- [20] Yang, G.-C., Hu, J.-H., Li, B.-L., Liu, H., Wang, J.-Y., & Sun, L.-X. (2018). Six new neo-clerodane diterpenoids from aerial parts of *scutellaria barbata* and their cytotoxic activities. *Planta Medica*, 84(17), 1292–1299. <https://doi.org/10.1055/a-0638-8255>
- [21] yuan hui, Z. Z., & 中国科学院. 中国植物志编辑委员会. (1977). *中国植物志*.
- [22] Zhang, L., Zhang, J., Qi, B., Jiang, G., Liu, J., Zhang, P., Ma, Y., & Li, W. (2016). The anti-tumor effect and bioactive phytochemicals of *Hedyotis diffusa* willd on ovarian cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.027>