

• 药材与资源 •

人參多向耐藥性轉運蛋白基因保守區序列的克隆及分析

張 儒^{1,2}, 黃景嘉¹, 謝小雷¹, 陳湘暉¹, 張變玲², 羅志勇^{1*}

1. 中南大學生物科學與技術學院 分子生物學研究中心, 湖南 長沙 410078

2. 湖南工程學院化學化工學院, 湖南 湘潭 411104

摘 要: **目的** 對人參多向耐藥性 (PDR) 轉運蛋白基因進行克隆及序列分析。**方法** 利用其他植物 PDR 基因的保守區域設計簡并引物, 以人參根總 RNA 為模板, 採用 RT-PCR 方法擴增人參 PDR 基因片段並連接至 pGEM-T Easy 載體上, 陽性克隆經 PCR 檢測後測序。**結果** 得到一段長 693 bp 的基因序列, 序列分析表明, 該片段編碼 231 個氨基酸, 與植物 PDR 基因核苷酸和氨基酸序列同源性分別在 76% 和 80% 以上。分析表明該序列屬於 PDR 轉運蛋白的核苷酸結合域, 具有 PDR 轉運蛋白的 C 端 Walker A、ABC 標籤模體和 C 端 Walker B 3 個保守功能域。**結論** 首次從人參中克隆出 PDR 轉運蛋白基因, 為研究人參次生代謝產物的轉運和累積機制奠定了基礎。

關鍵詞: 人參; 多向耐藥性 PDR 轉運蛋白; 次生代謝產物; 基因克隆; 序列分析

中圖分類號: R282.2 文獻標誌碼: A 文章編號: 0253-2670(2012)08-1590-05

Cloning and analysis on pleiotropic drug resistance transporter gene conserved fragments from roots of *Panax ginseng*ZHANG Ru^{1,2}, HUANG Jing-jia¹, XIE Xiao-lei¹, CHEN Xiang-hui¹, ZHANG Bian-ling², LUO Zhi-yong¹

1. Molecular Biology Research Center, School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410078, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, China

Abstract: Objective To clone and analyze the sequence of pleiotropic drug resistance (PDR) transporter gene from the roots of *Panax ginseng*. **Methods** Degenerate primers were designed based on the conserved sequences of the PDR genes from other plants. Total RNA from the roots of *P. ginseng* was used as template. PDR gene fragment was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and PCR products are sub-cloned into pGEM-T Easy vector. The positive clone identified by PCR was sequenced. **Results** A 693 bp gene fragment was obtained, encoding 231 amino acids. Sequence analysis suggested that the nucleotide sequence and the translated amino acid sequence shared over 76% and 80% of homology respectively with PDR transporter gene sequences from other plants. The predicted amino acid sequence was nucleotide-binding domain (NBD) and shared C-terminal Walker A, Walker B, and ATP-binding cassette (ABC) signature conserved functional domains with other plant PDR transporter gene. **Conclusion** It is the first report that PDR transporter gene is cloned from *P. ginseng*. This work provides a foundation for investigation on the transportation and accumulation mechanism of secondary metabolites in *P. ginseng*.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Meyer; pleiotropic drug resistance (PDR) transporter; secondary metabolite; gene cloning; sequence analysis

ATP-binding cassette (ABC) 轉運蛋白是存在於所有生物中的一類重要的跨膜運輸蛋白。此類轉運蛋白利用水解 ATP 釋放的能量跨膜轉運脂肪、蛋白質、類固醇和細胞代謝產物等^[1-2]。ABC 轉運蛋白在生物體內參與一些重要的生理過程, 如細菌耐藥性、

次生代謝產物累積和胁迫反應等, 已引起了人們的廣泛關注。ABC 轉運蛋白家族包括多向耐藥性 (pleiotropic drug resistance, PDR) 蛋白、多藥耐藥性 (multidrug resistance, MDR) 蛋白、多藥耐藥性相關蛋白 (MDR-associated protein, MRP) 等^[3-4]。

收稿日期: 2012-02-20

基金項目: 國家自然科學基金資助項目 (30470189, 81071821); 湖南省自然科學基金資助項目 (07JJ5096); 湖南省教育廳資助項目 (11C0329)

作者簡介: 張 儒 (1979—), 男, 博士研究生, 研究方向為藥用植物有效成分生物合成調控。

*通訊作者 羅志勇 (1966—), 男, 博士, 教授, 博士生導師, 研究方向為藥用植物有效成分生物合成分子調控與抗腫瘤新藥創制。

E-mail: luo_zhiyong@hotmail.com

網絡出版時間: 2012-06-04 網絡出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120604.1100.003.html>

其中 PDR 蛋白是最大的亚族,具有与其他亚族不同的拓扑构型,是植物和真菌中特有的转运蛋白。

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科人参属多年生草本植物,自古以来拥有“百草之王”的美誉,更被东方医学界誉为“滋阴补生,扶正固本”之极品。人参的主要药用成分为人参皂苷,具有抗肿瘤、抗衰老、抑制细胞凋亡和增强免疫力等活性,已广泛应用于临床^[5-7]。但人参皂苷产量极低,远不能满足市场的需要。为了解决其产量低的问题,急需深入研究人参皂苷生物合成、转运和积累的分子机制,从而从根本上找到提高人参皂苷产量的有效方法。为了研究人参中人参皂苷转运与积累的作用机制,本研究利用序列同源性设计简并引物,以人参根总 RNA 为模板,反转录扩增人参 PDR 转运蛋白基因,初步分析其结构和功能,期望发现能够转运人参次生代谢产物的 PDR 基因。为深入研究人参皂苷等次生代谢产物的转运和积累机制奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

4年生人参根采自吉林抚松,经湖南省药品检验所赵勇主管药师鉴定为人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer; *Escherichia coli* DH5 α , 保存于中南大学生物科学与技术学院分子生物学研究中心;其他植物的 PDR 基因如下: *AtPDR1* (拟南芥), 基因号 BK001001; *AtPDR12* (拟南芥), 基因号 BK001011; *SpTUR2* (浮萍), 基因号 Z70524; *NtPDR1* (烟草), 基因号 AB075550; *NpPDR1* (烟草), 基因号 AJ404328.1; *TaPDR1* (小麦), 基因号 FJ185035。

1.2 试剂

pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、Taq 酶、连接酶和 AMV 反转录酶均购自 TaKaRa 生物工程有限公司;Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司;DNA Marker 购自 Fermentas 公司;茉莉酸甲酯 (MeJA) 购自 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 简并引物设计与合成

利用 Bioedit 软件对已知的 6 种植物 PDR 基因序列 (*AtPDR1*、*AtPDR12*、*SpTUR2*、*NtPDR1*、*NpPDR1* 和 *TaPDR1*) 进行同源性比对,找出高度保守的区域,采用 Primer 5.0 软件设计简并引物。P1: 5'-CCAGGIGTDCIACIGCIYTIATG-3'; P2: 5'-CATCCAIGTYGCGYGGRTTGTACC-3'。其中 Y=

C/T; D=A/G/T; R=A/G; I=次黄嘌呤核苷酸。

引物由上海 Invitrogen 生物有限公司合成。

2.2 人参根预处理及 PDR 基因诱导

取新鲜的 4 年生人参根,70%乙醇浸泡 30 s,转入 0.1%升汞中消毒 6~7 min,无菌水冲洗 3~5 次,每次 2~3 min。在无菌条件下,将消毒过的人参根接种至液体 MS 培养基中。加入 200 mmol/L MeJA 至终浓度为 200 μ mol/L,诱导 PDR 基因表达,培养 24 h 后提取人参根总 RNA。

2.3 总 RNA 提取和 PCR 扩增

参照 Trizol 试剂盒说明书,提取诱导后的人参根总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳和浓度检测后,以 oligod (T) 18 为引物,用 AMV 反转录酶合成 cDNA。以 cDNA 为模板,用简并引物 P1、P2 进行“touchdown”PCR 扩增。反应体系为:10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L、MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L、dNTP (2.5 mmol/L) 8 μ L、P1 (20 μ mol/L) 2 μ L、P2 (20 μ mol/L) 2 μ L、cDNA 2 μ L、dd H₂O 27.5 μ L 和 LA Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L。条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、45 $^{\circ}$ C 退火 2 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,2 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、42 $^{\circ}$ C 退火 2 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,2 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、40 $^{\circ}$ C 退火 2 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,2 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、50 $^{\circ}$ C 退火 2 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,26 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1.0%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

2.4 扩增片段胶回收、连接、测序及分析

将 PCR 产物胶回收后连接至 pGEM-T Easy 载体上,并转化大肠杆菌 DH5 α 。PCR 初步鉴定正确后,将重组质粒 pGEM-PDR 送上海 Invitrogen 公司测序。测序结果利用 NCBI 中的 Blast 工具与 GenBank 的 dbEST 数据库和蛋白数据库进行同源性比对和结构域分析。并使用 MEGA4 软件以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发生树。系统树中分支的置信水平用自引导值(Bootstrap test)估计,重复 1 000 次。

2.5 MeJA 诱导及半定量 RT-PCR 分析

以 200 μ mol/L MeJA 分别诱导人参根 0、12、24 和 48 h,提取各时间点人参根总 RNA。以 oligod (T) 18 为引物,AMV 反转录酶合成 cDNA,并以 β -actin 为内参,利用 PCR 扩增 PDR 基因。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、60 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PDR 扩增引物:F: 5'-GTGGGGCTGGGAAG-ACCACTCT-3'; R: 5'-GCTCCAGTATCCTGCT-

ATGCGA-3'; β -actin 扩增引物: F: 5'-CGTGAT-CTTACAGATAGCT TCATGA-3'; R: 5'-AGAGA-AGCTAAGATTGATCCTCC-3'.

3 结果

3.1 RNA 提取及 PCR 扩增

以人参根为材料提取总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测结果显示提取的 RNA 完整性较好 (图 1)。以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板, 以简并引物“touchdown”PCR 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2), 显示出与理论推测值 (700 bp) 一致的明亮条带。胶回收纯化该片段, 连接至 pGEM-T Easy 载体上, 转化 *E. coli* DH5 α , 从转化的平板上挑取阳性克隆, 提取质粒进行 PCR 扩增, 经检测片段大小约为 700 bp (图 3), 与简并引物扩增的片段大小一致。

3.2 基因测序及序列分析

阳性质粒经 PCR 检测后, 对重组质粒进行测序, 得到一段长度为 693 bp 的序列 (图 4), 分析预测其编码 231 个氨基酸。Blast 比对结果显示, 该片段与其他植物的 PDR 基因序列的同源性在 76% 以上。推测的氨基酸序列与 *TaPDR1*、*AtPDR1*、*SpTUR2*、*NpPDR1*、*NtPDR1* 和 *AtPDR12* 比对 (图 5), 结果表

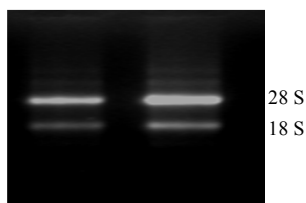


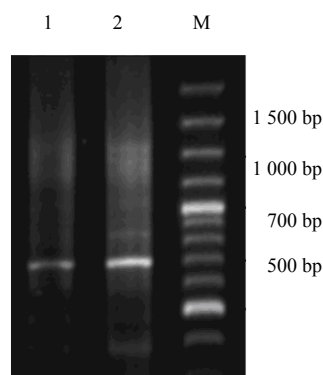
图 1 人参根总 RNA 凝胶电泳结果

Fig. 1 Gel electrophoresis of total RNA from roots of *P. ginseng*

```
CCAGGGGTGCTGACGGCGTTGATGGGAGTTAGTGGGGCTGGGAAGACCACTCTGATGGATGTCTTGG
CTGGTAGAAAAACGGGTGGCTATATCGAGGGAACAATTACTATATCTGGTTACCCAAAAAAGCAAGAA
ACTTTTGCTCGCATAGCAGGATACTGTGAGCAAACCTGATATCCATTCCCCTCATGTTACAGTTTTCGAG
TCCTTGCAATATTCAGCATGGCTTCGGTTGCCTCCTGAAGTTGATACAGCAACCAAGCAGATGTTTGTT
GAGGAAGTTATGGAGCTTGTGGAGCTGACTCCATTGAGAGAAGCACTTGTAGGATTGCCCGGTGTAG
ATGGTCTTTCAACCGAGCAACGCAAGAGGCTGACCGTTGCAGTTGAGTTAGTGGCTAATCCATCTATA
ATTTTCATGGATGAGCCAACCTCAGGGCTTGATGCTAGGGCAGCAGCAATAGTGATGAGAACAGTGA
GAAACACAGTGGATACTGGACGAACCGTTGTGTGCACCATTCACCAGCCAAGCATCGACATATTTGAT
GCTTTTGATGAGTTGTTTCTATTAAACGAGGAGGTGAAGAAATATATGTTGGTCCATTAGGCCGTCTT
TCTTGCCATTTGATTGAGTACTTTGAGGGAATTGAGGGAGTTAGTAAATAAAAGACGGCTACAACCC
GGCGACCTGGATG
```

图 4 人参 PDR 基因片段核苷酸序列

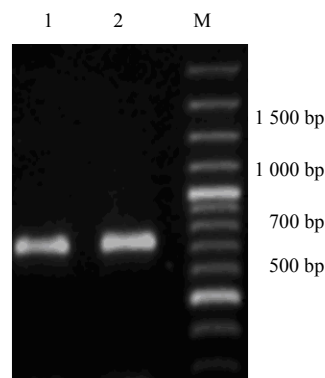
Fig. 4 Nucleic acid sequence of PDR gene fragment from roots of *P. ginseng*



1、2-PCR 产物 M-DNA Marker
1 and 2-PCR product M-DNA Marker

图 2 人参 PDR 基因简并引物扩增结果

Fig. 2 Amplification of PDR gene degenerate primers for roots of *P. ginseng*



1、2-PCR 产物 M-DNA Marker
1 and 2-PCR product M-DNA Marker

图 3 阳性质粒 PCR 鉴定结果

Fig. 3 PCR identification of positive plasmids

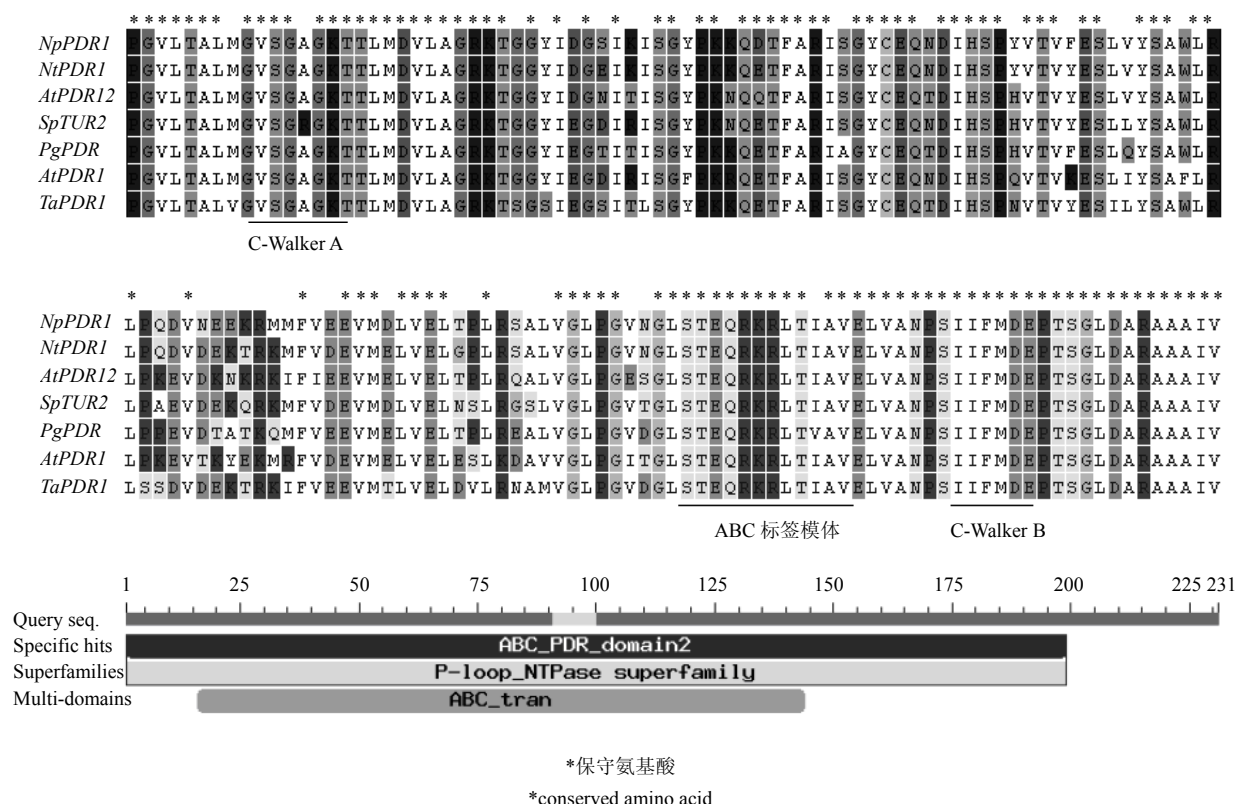


图 5 *PgPDR* 的推测氨基酸序列比对及结构域分析

Fig. 5 Alignment and domain analysis of deduced amino acid sequence of *PgPDR*

明该基因片段属于 PDR 转运蛋白家族，命名为 *PgPDR* (*P. ginseng* pleiotropic drug resistance)。氨基酸结构域分析发现 *PgPDR* 属于 PDR 转运蛋白基因的核苷酸结合域 (nucleotide-binding domain, NBD)，其编码的肽段位于细胞质。*PgPDR* 包含 PDR 基因 C 端保守序列 C-Walker A (GVSGA/RGKT)、ABC 标签模体 (ABC signature motif) (LSTEQRKRLTI/VA) 和 C-Walker B (IIFMDE) 3 个保守域 (图 5 划线部分)。使用 MEGA4 软件以邻接法构建系统发生树 (图 6)，将 7 个基因分为 3 个族，与 *PgPDR* 同源性最近的 I 族基因是 *AtPDR1*、*NtPDR1*、*NpPDR1* 和 *SpTUR2*，氨基酸一致性分别为 87%、87%、87% 和 86%；与 III 族 *AtPDR1* 和 IV 族的 *TaPDR1* 氨基酸一致性为 82% 和 81%。

3.3 MeJA 诱导表达分析

图 7 为 200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 诱导人参根 0、12、24、48 h 后 *PgPDR* 基因表达结果。从结果中可以看出不同人参根中 *PgPDR* 基因表达受 MeJA 的诱导，其中 MeJA 诱导 24 h 时 *PgPDR* 的表达水平达到高峰，然后开始下降；而 $\beta\text{-actin}$ 基因不受 MeJA

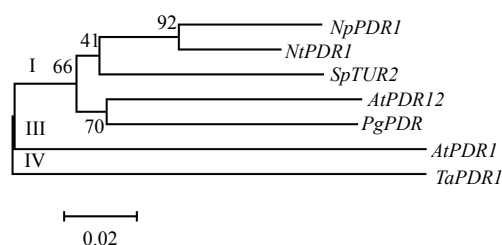


图 6 人参与其他植物 PDR 基因系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of PDR gene for roots of *P. ginseng* and other plants

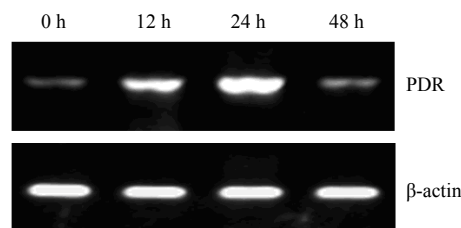


图 7 *PgPDR* 基因 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 7 RT-PCR identification of *PgPDR*

诱导，并且表达比较稳定。

4 讨论

PDR 是 ABC 转运蛋白家族中最大的亚族，是植

物和真菌中一类特有的转运蛋白, 该亚族各成员在结构上高度同源。浮萍 [*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid] *SpTUR2* 是第一个被鉴定的植物 PDR 基因, 其通过转运作用参与胁迫反应^[8]。烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) *NpPDR1* 受茉莉酸 (JA) 诱导, 并参与次生代谢产物的分泌, 在植物防御中发挥其功能^[9]。此外, 植物 PDR 转运蛋白参与多种有毒物质的吸收、积累和排出, 在机体防御过程中起重要作用。这些研究结果显示植物 PDR 基因在一些次生代谢产物转运及积累和开发抗耐药性药物等方面具有重要潜力。

人参皂苷属于三萜类化合物, 其生物合成途径复杂且受多种因素影响^[10-11]。除了研究合成途径对人参皂苷的生物合成调控外, 人参皂苷的积累也是研究的重要方向之一。在亚细胞水平, 皂苷生物合成中许多重要酶属于微粒体酶类, 而皂苷的积累则在液泡中^[12], 这就暗示人参等植物中存在皂苷转运蛋白。所以转运蛋白应该也是促进次生代谢产物积累的一个重要研究目标, 但迄今为止, 尚无相关的研究报道。

本研究首次采用简并引物从人参中克隆出 PDR 转运蛋白基因片段。PDR 转运蛋白由 2 个疏水性跨膜结构域 (*trans*-membrane domain, TMD) 和 2 个亲水性的 NBD 组成。*PgPDR* 片段中 Walker A 在细胞中可以形成 P 环并与另一个 NBD 中的 ABC 标签模体在界面处形成一个结合并水解 ATP 的间隙。TMD 中的折叠会和 NBD 中亚结构域边缘的沟结合, 实现 ATP 水解产生的能量从 NBD 到 TMD 的传递。因而, 该片段在物质跨膜转运中发挥重要作用。

通过进化树可将植物 PDR 基因分为 5 个亚族^[13]。其中 I 族是研究最多的一个亚族, 多个基因的功能已经被鉴定, 而且该族基因多属于诱导表达。JA 和 MeJA 可能是 I 族 PDR 基因的信号分子或者能诱导其表达, 进而转运植物次生代谢产物参与植物防御反应。本研究采用 MeJA 诱导克隆了 *PgPDR*, 通过分析发现其属于 I 族, 推测其可能具有转运次生代谢产物的能力。

本研究采用半定量 RT-PCR 证实 *PgPDR* 受 MeJA 诱导, 与 MeJA 诱导的人参皂苷合成酶基因表达有相似的变化趋势^[14]。推测 MeJA 诱导合成酶基因表达促进人参皂苷合成, 合成的人参皂苷可能激发转运系统, 从而促进次生代谢产物在细胞器或

者细胞内的积累。总之, 该研究首次从人参中克隆出 PDR 转运蛋白基因片段, 为进一步开展人参转运蛋白基因克隆和功能研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Theodoulou F L. Plant ABC transporters [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465(1/2): 79-103.
- [2] Goossens A, Hakkinen S T, Laakso I, *et al.* Secretion of secondary metabolites by ATP-binding cassette transporters in plant cell suspension cultures [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 1161-1164.
- [3] Verrier P J, Bird D, Burla B, *et al.* Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory [J]. *Trends Plant Sci*, 2008, 13(4): 151-159.
- [4] 霍晓奎, 刘克辛. ATP 结合盒转运体介导的肝癌多耐药研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(1): 1-5.
- [5] He W, Wu W K, Wu Y L, *et al.* Ginsenoside-Rg1 mediates microenvironment-dependent endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(1): 1-11.
- [6] Choi S H, Shin T J, Lee B H, *et al.* Ginsenoside Rg (3) enhances large conductance Ca^{2+} -activated potassium channel currents: A role of Tyr360 residue [J]. *Mol Cells*, 2010, 31(2): 133-140.
- [7] 高文芹, 贾力, 赵余庆. 人参的抗癌作用及其机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(1): 53-58.
- [8] van den Brule S, Muller A, Fleming A J, *et al.* The ABC transporter SpTUR2 confers resistance to the antifungal diterpene sclareol [J]. *Plant J*, 2002, 30(6): 649-662.
- [9] Trombik T, Jasinski M, Crouzet J, *et al.* Identification of a cluster IV pleiotropic drug resistance transporter gene expressed in the style of *Nicotiana plumbaginifolia* [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 66(1/2): 165-175.
- [10] 马琳, 王亚星, 藏埔, 等. 人参皂苷生物合成影响因素的研究进展 [J]. *特产研究*, 2011(1): 59-62.
- [11] 吴琼, 周应群, 孙超, 等. 人参皂苷生物合成和次生代谢工程 [J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(10): 102-108.
- [12] Jasinski M, Stukkens Y, Degand H, *et al.* A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(5): 1095-1107.
- [13] 张儒, 黄景嘉, 谢小雷, 等. 植物 PDR 型 ABC 转运蛋白的结构及功能 [J]. *生命的化学*, 2011, 31(1): 112-119.
- [14] Choi D W, Jung J, Ha Y I, *et al.* Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 557-566.