

红树林植物杯萼海桑法呢基焦磷酸合酶的基因克隆及序列分析

王 峰^{1,2}, 吴秋红¹, 高 辉¹, 张自德¹, 李秀英¹, 张 光^{1*}

1. 暨南大学药学院 基因组药物研究所, 广东 广州 510632

2. 中药药效物质基础及创新药物研究广东省高校重点实验室, 广东 广州 510632

摘 要: 目的 对杯萼海桑 *Sonneratia alba* 萜类化合物生物合成途径的关键酶法呢基焦磷酸合成酶 (Farnesyl pyrophosphate synthase, FPS) 基因的编码 cDNA 序列进行克隆, 为研究杯萼海桑萜类化合物生物合成与基因调控奠定基础。方法 结合杯萼海桑根的转录组注释, 根据编码区序列设计引物, 通过 PCR 方法克隆杯萼海桑 FPS (SaFPS) 基因的编码区 cDNA。结果 PCR 扩增了一个长 1 029 bp 的基因片段, 该片段编码由 342 个氨基酸组成的 SaFPS。同源性比对结果显示基因编码蛋白与甘草的 FPS 具有氨基酸一致性达 86%。其具有异戊烯基转移酶的 2 个典型保守功能域。进化树分析结果显示, 与甘草 *Glycyrrhiza uralensis*、苜蓿 *Medicago truncatula*、羽扇豆 *Lupinus albus* 具有较近的亲缘关系。实时荧光定量 PCR 结果显示 SaFPS 基因在花中表达量较高, 果实、茎、叶中表达量相对较低。结论 首次从红树林植物杯萼海桑中克隆 FPS 基因获得其编码区序列, SaFPS 基因具有组织表达特异性。本研究为分析基因表达特性及其在生物合成中的功能奠定基础。

关键词: 法呢基焦磷酸合成酶; 杯萼海桑; 基因克隆; PCR; 序列分析

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)16-2294-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.020

Cloning and sequence analysis of Farnesyl pyrophosphate synthase gene in a mangrove tree *Sonneratia alba*

WANG Feng^{1,2}, WU Qiu-hong¹, GAO Hui¹, ZHANG Zi-de¹, LI Xiu-ying¹, ZHANG Guang¹

1. Institute of Genomic Medicine, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To clone the full length cDNA encoding Farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) which played an important role in terpenoid biosynthesis pathway in *Sonneratia alba* and to provide the basis for the further studies on biosynthesis and gene regulation of terpenoid. **Methods** According to the annotation of root transcriptome in *S. alba*, primers were designed and cDNA of *S. alba* Farnesyl pyrophosphate synthase (SaFPS) gene was cloned from *S. alba* by PCR. **Results** The complete coding sequence of SaFPS gene was 1 029 bp and encoded a protein of 342 amino acids. The deduced SaFPS amino acid sequence exhibited 86% identity to the FPS of *Glycyrrhiza uralensis*. The predicted SaFPS shared two conserved functional domains. Phylogenetic analysis on the amino acid sequence of SaFPS with those of other plants showed that SaFPS was closely related to *G. uralensis*, *Medicago truncatula*, and *Lupinus albus*. It showed that SaFPS was highly expressed in flowers while lowly expressed in fruits, stems, and leaves by real-time PCR analysis. **Conclusion** The SaFPS gene is cloned from a mangrove tree *S. alba* for the first time and the expression of SaFPS is tissue specific. This research lays a foundation for studying the gene expression pattern and regulating the functions of SaFPS in terpenoid biosynthesis.

Key words: Farnesyl pyrophosphate synthase; *Sonneratia alba* J. Smith; gene cloning; PCR; sequence analysis

红树林是生长在热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落^[1]。杯萼海桑 *Sonneratia alba* J. Smith 为海桑科 (Sonneratiaceae) 海桑属 *Sonneratia* L. f. 红树林植物, 分布广泛, 是整个海桑属 8 个种中分布最广的一个种。由于其独特的生长环境, 如处于高

盐度的水陆临界处, 根部长期缺氧, 常年接受热带、亚热带高强度光照等, 常常能够产生一些化学结构新颖, 生物活性多样的先导化合物, 为新药研究与开发提供资源。民间利用海桑成熟的浆果生产软饮料, 海桑的果实捣烂成糊状, 可以治疗扭伤, 其叶、

收稿日期: 2013-03-23

作者简介: 王 峰 (1979—), 博士, 副研究员, 主要从事生物技术药物研究。

*通信作者 张 光, 实验师, 主要从事生物技术药物研究。Tel: (020)38375022 E-mail: 24547680@qq.com

网络出版时间: 2013-07-05 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1530.005.html>

花和果实作为内科用药^[2]。

萜类化合物是植物初生代谢产物和次生代谢产物的重要成分,影响植物生长发育和品质形成,同时萜类化合物在植物自身免疫和防御反应中起重要作用,具有重要的药用价值。而在红树林植物中萜类化合物是其中量较高、种类较多的一类化合物^[3]。法呢基焦磷酸合酶(Farnesyl pyrophosphate synthase, FPS, EC21511110)是一种异戊烯基转移酶,是类异戊二烯途径的一个关键酶,它催化五碳原子的异戊烯基焦磷酸(IPP)和二甲基丙烯基焦磷酸(DMAPP)以1~4头尾连续缩合反应,形成15碳的法呢基焦磷酸(FPP)^[4-5],目前已经从三七^[6]、罗汉果^[7]、棉花^[8]等40多种植物中分离并克隆了FPS的cDNA序列。

目前对红树林植物中萜类化合物的提取分离多有报道,但对萜类化合物生物合成途径的相关酶的克隆未见国内文献报道。实验克隆了杯萼海桑FPS(SaFPS)基因,并通过生物信息学方法初步分析了酶的生物学功能,为进一步研究重组SaFPS的体外活性以及后期的转基因研究和萜类化合物生物合成与基因调控奠定了基础。

1 材料与试剂

杯萼海桑 *Sonneratia alba* J. Smith 取自中山大学,由笔者鉴定;PCR纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技公司;Taq聚合酶、pMD-18T、cDNA Synthesis Kit 购自Takara公司;抗生素购自鼎国公司;引物合成于上海英骏公司;其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 引物设计

根据Chen等^[9]的研究中已获得的杯萼海桑的转录组序列,按照引物设计原则,采用引物设计软件Primer 6.0,对杯萼海桑转录组序列中的FPS基因序列设计引物。正向FP: 5'-ATGGCGGATCTCA-AATCGAAGT-3',反向RP: 5'-CTACTTCTGCCT-CTTGTAGATTTTGCT-3'。

2.2 RNA提取及反转录

采用改良后的CTAB法进行。总RNA的完整性和纯度通过EB-琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白定量仪(Bio-Rad)检测。取1 μg总RNA,以Oligo(dT)为引物,按M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit说明操作,反转录生成cDNA。

2.3 PCR扩增及克隆

PCR反应体系为10×缓冲液8 μL,10 mmol/L

dNTP 8 μL,20 μmol/L FP 2 μL,20 μmol/L RP 2 μL,cDNA模板1 μL,Ex Taq聚合酶4 μL,加水至80 μL。PCR反应条件如下:94℃预变性5 min后,进行32个循环,程序为:94℃变性30 s,61℃退火30 s和72℃延伸1 min。扩增产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳分析和胶回收纯化连接至pMD-18T载体,并用CaCl₂法转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,涂布于含有氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)的LB培养基平板,37℃培养过夜。所得转化子用质粒提取试剂盒提取质粒DNA,重组子经质粒PCR鉴定后送交上海英骏公司测序。

2.4 FPS序列生物信息学分析

分析测序结果,推导开放读码框架(open reading frame, ORF)及编码蛋白的氨基酸序列,利用ProtParam、DAS TMfilter和ProtScale进行编码蛋白的各种基本理化特性、跨膜结构域和疏水性分析,利用NCBI(www.ncbi.nih.gov)的BLAST在线分析工具分别对GenBank的非冗余核酸数据库和非冗余蛋白数据库序列进行比对分析。采用Clustalx和PhyIip-3.69进行序列多重比较及系统进化树构建。并用SOPMA和SWISS-MODEL对该蛋白进行二级结构和三维结构预测。

2.5 杯萼海桑不同组织中FPS mRNA水平表达分析

应用IQTM Multicolor Real-Time PCR仪,以Actin为内参基因,检测样品中FPS基因的相对表达量。以杯萼海桑叶、茎、花、果cDNA为模板,利用Primer Primer 6.0设计序列特异的Real-Time PCR引物,进行PCR扩增。Actin RT-FP: 5'-GAG-GTTCCGATGTCCAGAAGTCC-3',Actin RT-RP: 5'-GCCTCCACTGAGCACGATGTTAC-3',FPS RT-FP: 5'-TTGGTGATCCACGACTATTGG-3',FPS RT-RP: 5'-CGACATTTGAAGCGTCAGGTTT-3'。利用SYBR Green I PCR Master Mix配制Real-Time PCR反应体系:cDNA 9 μL,上下游引物各0.5 μL,SYBR Mix 10 μL,总体积20 μL。反应程序:95℃、30 s;95℃、5 s,60℃、20 s,40个循环。通过分析溶解曲线考察Real-Time PCR反应的特异性,利用2^{-ΔΔCt}相对定量的方法来检测FPS基因在不同组织中的表达水平。

3 结果与分析

3.1 总RNA的质量

取2 μL提取的样品RNA用RNase-free水稀释10倍,用蛋白核酸分析仪测定,A₂₆₀/A₂₈₀=1.977,

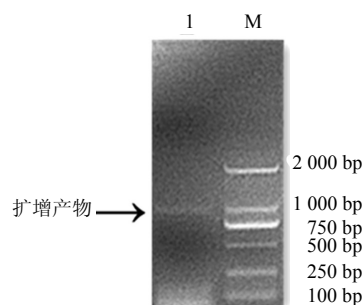
该比值接近于 2.0, 说明提取的 RNA 纯度较高。总 RNA 经电泳检测后可观察到清晰明亮的 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带以及一些细胞器 rRNA 条带, 条带都无拖尾, RNA 提取效果较好。

3.2 SaFPS 基因的克隆

RT-PCR 扩增产物经电泳后呈现出 1 条长约 1.1 kb 左右的单一特异性片段 (图 1), 其长度与预期大小相符, 经过测序得到了 SaFPS 基因的编码序列 (图 2), 测序结果已提交至 GenBank, 登录号为 JX681145。

3.3 序列生物信息学分析

测序所得到的 SaFPS 基因编码序列长 1 092 bp,



M-Marker 1-箭头所指处为 SaFPS PCR 扩增产物
M-Marker 1-arrow indicates SaFPS PCR amplification product

图 1 SaFPS 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of SaFPS gene

```

M A D L K S K F V R V Y S V L K E E L L Q D P A F E F T D N
1 ATG GCG GAT CTC AAA TCG AAG TTT GTG AGG GTG TAC TCG GTC CTG AAG GAG GAG TTG CTG CAG GAC CCG GCC TTC GAG TTC ACT GAC AAT
D R Q W V E R M L D Y N V P G G K L N R G L S V L D S Y K L
91 GAC CGG CAA TGG GTC GAA CGG ATG CTG GAC TAC AAT GTT CCT GGT GGC AAG TTG AAC CGT GGG CTA TCC GTT CTT GAC AGC TAT AAG TTG
L I E G R E L T D D E V F L A S A L G W C I E W L Q A Y F L
181 TTG ATA GAA GGA AGG GAA TTG ACT GAT GAT GAA GTA TTT CTT GCC AGT GCC CTT GGT TGG TGC ATT GAA TGG CTT CAA GCA TAT TTC CTT
V L D D I M D G S H T R R G Q P C W F R H P K V G L I A T N
271 GTT CTT GAT GAC AIT ATG GAC GGG TCA CAC ACA CGC CGT GGT CAG CCC TGC TGG TTC AGA CAT CCC AAG GTT GGC CTG ATT GCA ACA AAT
D G I L L R N H I S R I L K K H F R G K P Y Y V D L L D L F
361 GAT GGC ATT CTT CTT CGT AAC CAT ATT TCC CGA ATT CTG AAG AAG CAC TTT CGG GGA AAG CCT TAC TAT GTA GAT CTG TTG GAC TTA TTC
N E V E F Q T A S G Q M I D L I T T L E G E K D L S K Y T L
451 AAT GAG GTT GAG TTT CAG ACT GCA TCT GGC CAA ATG ATT GAC CTT ATC ACT ACA CTC GAG GGA GAA AAA GAT TTG TCA AAG TAT ACA TTA
S L H R R I V Q Y K T A Y Y S F Y L P V A C A L L M S G E N
541 TCA CTT CAT CGC CGT ATT GTT CAA TAT AAG ACT GGC TAT TAC TCA TTT TAC CTC CGG GTT GCC TGT GCC TTA CTA ATG TCG GGT GAG AAT
L D N H A D V K D I L V E M G T Y F Q V L D D Y L D C F G D
631 TTG GAC AAC CAT GCT GAT GTA AAG GAC ATC CTT GTT GAG ATG GGT ACT TAC TTC CAA GTT CTG GAT GAT TAC CTG GAC TGT TTT GGT GAT
P T T I G K I G T D I E D F K C S W L V V K A L E L C N E D
721 CCC ACG ACT ATT GGC AAG ATT GGG ACA GAT ATA GAA GAT TTC AAG TCG TCG TGG TTG GTT GTC AAA GCT TTG GAA CTC TGC AAC GAG GAC
Q K K L L H E N Y G K P D A S N V A E V K A L Y N E L N L Q
811 CAG AAG AAA CTG TTG CAT GAA AAC TAT GGG AAA CCT GAC GCT TCA AAT GTC GCA GAA GTT AAG GCG CTC TAC AAT GAG CTC AAT CTT CAG
G V F A E Y E S R S H E K L I T A I N A H P S K S V Q A V L
901 GGC GTT TTT GCT GAG TAC GAG AGC AGA AGC CAC GAG AAG CTG ATC ACC GCA ATC AAT GCT CAC CCA AGT AAG TCG GTG CAA GCA GTG CTC
R S F L S K I Y K R K *
991 AGG TCC TTC CTG AGC AAA ATC TAC AAG AGG CAG AAG TAG

```

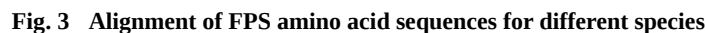
图 2 SaFPS 的编码区序列和氨基酸序列

Fig. 2 Coding sequence and amino acid sequence of SaFPS

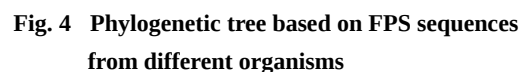
其编码的 SaFPS 蛋白包含 342 个氨基酸残基, 相对分子质量为 4.31×10^4 , 其中量最丰富的氨基酸是亮氨酸 (Leu), 占 13.5%, 量最少的氨基酸是色氨酸 (Trp), 占 1.5%, 理论等电点为 5.56。用 DAS TMfilter 在线工具对氨基酸序列的跨膜结构域进行预测, 结果表明 SaFPS 不存在跨膜结构域。结合转运肽的预测推断, SaFPS 在细胞质中合成前体蛋白后, 不进入其他亚细胞器, 而是留在细胞质中, 经过翻译后蛋白质加工成为成熟蛋白质发挥催化作用, 而不与膜脂结合。用疏水性分析结果表明, SaFPS 在 309 位 Arg 亲水性最强 (-2.778), 第 202 位 Glu 疏水性最强 (2.444)。整个多肽链表现为亲水性, 没有明

显的疏水区域。综合前述跨膜结构域的预测结果, 可以推断 SaFPS 不存在明显的疏水区域, 与植物 FPS 不存在跨膜结构域相一致。

用 ClustalX 程序对 SaFPS 的氨基酸序列与甘草 *Glycyrrhiza uralensis*、苜蓿 *Medicago truncatula* L.、羽扇豆 *Lupinus albus* L.、苹果 *Malus pumila* Mill. 等多种植物 FPS 的氨基酸序列进行多序列比对, 结果表明 (图 3) 各物种 FPS 氨基酸序列高度保守, SaFPS 与甘草 FPS 的氨基酸一致性达 86%。FPS 具有 2 个富含天冬氨酸 Asp 保守域 (DDXXD), 这 2 个天冬氨酸保守域 (Asp-motif) 被认为是烯丙基转移酶与底物异戊烯基焦磷酸相结合的位点^[10]。由 SaFPS 基因



运用 SOPMA 软件预测 SaFPS 蛋白的二级结构, 表明该蛋白含有 219 个 α 螺旋 (alpha helix), 占 64.04%; 18 个延伸链 (extended strand), 占 5.26%; 18 个 β 折叠 (beta turn), 占 5.26%; 87 个无规则蜷曲 (random coil), 占 25.44%。利用 SWISS-MODEL 提交 FPS 蛋白序列, 在蛋白质结构库中搜寻模板, 最终 SaFPS 基因的第 2~342 残基与人的 FPS 蛋白晶体结构 (4demF) 序列一致性达到 46.36%, 以 4demF 为模板预测了 SaFPS 的三维模型 (图 5), 可



见 FPS 在空间布局上是由 α 螺旋形成的“大空穴”立体结构,其酶促反应是在空穴中进行。

3.4 不同组织中 SaFPS mRNA 水平表达分析

Real-Time PCR 结果显示(图6),FPS 基因在杯萼海桑各组织中均有表达,其中在花中表达量较高,果实、茎、叶中表达量相对较低。该结果与 Cunillera 等研究结果相符,说明该基因具有组织表达特异性^[11-12]。

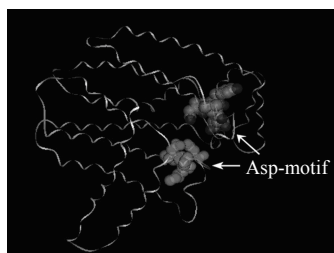


图5 SaFPS 的三维模型

Fig. 5 3D model of SaFPS

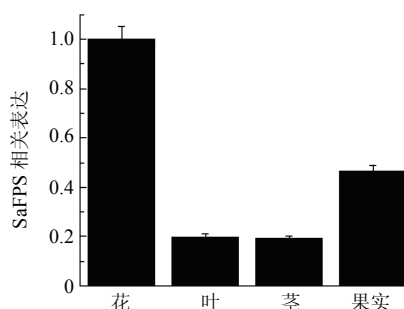


图6 不同组织 SaFPS mRNA 水平表达分析

Fig. 6 Expression of SaFPS mRNA in different tissues

4 讨论

FPS 是植物萜类物质合成过程中的一个关键酶,在类异戊二烯合成途径中发挥着极其重要的作用,其活性与量的高低决定后续产物量的高低。类异戊二烯途径是植物体内一条重要的次生物质代谢途径,多种与生长发育相关的激素(赤霉素、脱落酸、细胞分裂素)以及类胡萝卜素、质体醌、甾体和皂苷等各种萜类次生物质的生物合成都与该途径密切相关^[13]。随着植物萜类合成途径中相关酶的分离鉴定,利用酶表达改变萜类物质组成或量已成为改变作物及中药品质的一种新手段^[14]。

近年来 FPS 基因在植物中克隆表达以及转基因的研究非常多,比如在转基因青蒿中过量表达亚洲棉或青蒿的 FPS 基因,转基因株系中青蒿素量均有一定提高^[15-16];转入薄荷 FPS 基因的转基因烟草对

赤星病抗性明显提高^[17]。以上的研究报道表明将 FPS 基因进行克隆对于提高中药活性成分的量或作物品质具有十分重要的作用。

本研究首次从红树林植物杯萼海桑中成功分离克隆 FPS 基因,生物信息学分析序列的结果表明,该基因的氨基酸序列具有植物 FPS 的 2 个保守核心区 DDIMD 和 DDYLD,在氨基酸水平与甘草的 FPS 基因具有最高的同源性,一致性为 86%,推测 SaFPS 基因与其他作物的 FPS 基因可能行使相同或相似的生物学功能,参与体内重要萜类化合物的生物合成过程。研究结果为后期的实验研究提供了一定的理论参考,并为萜类化合物生物合成与基因调控奠定基础。然而,克隆所得到的基因能否通过植物转基因技术提高萜类化合物的有效成分还有待于进一步研究。

志谢:中山大学生命科学学院周仁超副教授在实验材料和文章修改方面提供帮助!

参考文献

- [1] 钟才荣. 杯萼海桑的育苗技术 [J]. 福建林业科技杂志, 2004, 31(3): 116-118.
- [2] 林 鹏, 林益明, 杨志伟, 等. 中国海洋红树林药物的研究现状、民间利用及展望 [J]. 海洋科学, 2005, 29(9): 76-79.
- [3] 杨 维, 夏杏洲, 韩维栋, 等. 红树植物的化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 173-178.
- [4] Cornish K. The separate roles of plant *cis* and *trans* prenyl transferases in *cis*-1, 4-polyisoprene biosynthesis [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 218: 267-271.
- [5] Lange B, Rujan T, Martin W, *et al.* Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distant pathways across genomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(24): 13172-13177.
- [6] 陈 莉, 蓝秀万, 朱 华, 等. 三七法呢基焦磷酸合酶的基因克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1080-1083.
- [7] 蒙姣荣, 陈本勇, 黎起秦, 等. 罗汉果法呢基焦磷酸合成酶基因的克隆及其序列分析 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2512-2517.
- [8] 刘长军, 孟玉玲, 侯嵩生, 等. 棉花法呢基焦磷酸合酶 cDNA 克隆、序列分析及其在种子发育过程中的表达特征 [J]. 植物学报, 1998, 40(8): 703-710.
- [9] Chen S F, Zhou R C, Huang Y L, *et al.* Transcriptome sequencing of a highly salt tolerant mangrove species

- Sonneratia alba* using Illumina platform [J]. *Mar Genomics*, 2011, 4(2): 129-136.
- [10] Ohnuma S I, Hirooka K, Hemmi H, *et al.* Conversion of product specificity of archaeobacterial geranylgeranyl-diphosphate synthase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(31): 18831-18837.
- [11] 李永波, 樊庆琦, 王宝莲, 等. 植物法呢基焦磷酸合酶基因 (FPPS) 研究进展 [J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(3): 321-330.
- [12] Cunillera N, Arró M, Delourme D, *et al.* *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(13): 7774-7780.
- [13] 陈 新, 李玲玲, 吕慧贞, 等. 法呢基焦磷酸 (FPP) 的生物合成及其分子调控 [J]. *生物技术通报*, 2007(2): 67-71.
- [14] 任 彦, 卢 钢, 曹家树, 等. 利用类萜代谢工程改良作物风味 [J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(3): 319-324.
- [15] Han J L, Liu B Y, Ye H C, *et al.* Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48: 482-487.
- [16] Banyai W, Kirdmanee C, Mii M, *et al.* Overexpression of Farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) gene affected artemisinin content and growth of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2010, 103(2): 255-265.
- [17] 崔 红, 刘海礁, 李雪娟. 转外源法呢基焦磷酸合酶基因烟草抗赤星病研究 [J]. *作物学报*, 2006, 32(6): 817-820.