

• 药材与资源 •

绞股蓝鲨烯合成酶基因 GpSS1 的克隆、序列与表达分析及 MeJA 对其表达的影响

李茹芳¹, 刘世彪², 赵娜¹, 韩硕¹, 王慧¹, 路蒙蒙¹, 赵瑞¹, 郭惠红^{1*}

1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

2. 吉首大学生物资源与环境科学学院 生物系, 湖南 吉首 416000

摘要: 目的 克隆绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* 鲨烯合成酶基因 (GpSS1), 进行序列及表达分析, 并研究茉莉酸甲酯 (MeJA) 对其调节的影响。方法 基于 GenBank 提供的 GpSS 基因序列设计 GpSS1 引物, 利用 RT-PCR 方法获取 GpSS1 基因编码区序列; 运用 ProtParam 及 TMpred 软件预测 GpSS1 蛋白的理化性质和跨膜结构域; 采用 MotifScan 及 BioEdit 软件分析 GpSS1 酶催化活性保守区及蛋白多重序列比对; 实时荧光定量 PCR 分析 GpSS1 基因的表达模式及 MeJA 对其调节的影响。结果 GpSS1 (GenBank 号为 KU363976) 编码区长 1 254 bp, 编码 417 个氨基酸; GpSS1 基因具有 3 个与该酶催化活性相关的保守区、1 个天冬氨酸富含区和 1 个碳端内质网锚定区。GpSS1 基因在幼叶中表达最高, 其次是老叶, 在根茎中的表达较低。不同浓度 MeJA 喷施绞股蓝植株后均引起了 GpSS1 基因的表达上调, 其中 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 对 GpSS1 基因表达的影响最大。GpSS1 基因在幼叶和老叶中的表达均呈现出先逐渐上升后有所下降的趋势, 但在幼叶中的表达水平高于老叶。结论 绞股蓝 GpSS1 基因的克隆及 MeJA 对其调控的分析, 为进一步研究 GpSS1 基因的功能和 MeJA 对其调节的机制, 以及为改善绞股蓝皂苷品质或提高其产量提供了科学理论依据。

关键词: 绞股蓝; 三萜皂苷; GpSS1; 序列分析; 基因表达; 茉莉酸甲酯调节**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)15-2713-08**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.020**Gene cloning, sequence, and expression analysis of GpSS1 and its regulation by MeJA in *Gynostemma pentaphyllum***LI Ru-fang¹, LIU Shi-biao², ZHAO Na¹, HAN Shuo¹, WANG Hui¹, LU Meng-meng¹, ZHAO Rui¹, GUO Hui-hong¹

1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, China

Abstract: Objective To clone *Gynostemma pentaphyllum* squalene synthase gene (GpSS1) and analyze its sequence and expression pattern as well as its regulation in response to MeJA. **Methods** Primers were designed based on the sequence of GpSS (GenBank accession numbers: FJ906799) and GpSS1 was cloned by using RT-PCR method. Physicochemical properties and transmembrane regions of the deduced GpSS1 protein were predicted via ProtParam and TMpred programs, respectively. Conserved domains involved in catalytic activity of SS enzyme were identified using MotifScan and multiple sequence alignment was achieved using the BioEdit software. Expression pattern of GpSS1 and its regulation by MeJA were analyzed by quantitative real-time RT-PCR. **Results** GpSS1 contains an open reading frame of 1 254 bp encoding a putative protein of 417 amino acids. The protein has an aspartate-rich motif and an endoplasmic reticulum membrane anchoring region in addition to three conserved domains involved in catalytic activity of SS enzyme. The expression level of GpSS1 in young leaves was the highest, followed by that in old leaves, and the lowest was in rhizomes. The expression of GpSS1 was significantly upregulated in *G. pentaphyllum* leaves sprayed with different concentration of MeJA. The greatest upregulation of GpSS1 occurred in *G. pentaphyllum* leaves treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ MeJA. In both young and old leaves, the transcription of GpSS1 gradually increased and then decreased to varying degrees at 6—96 h after MeJA treatment. However, the expression level of GpSS1 was always higher in young leaves than that in old leaves. **Conclusion** The cloning of GpSS1 and

收稿日期: 2016-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31260039)

作者简介: 李茹芳, 在读硕士研究生, 从事药用植物分子生物学研究。E-mail: lirf13@163.com

*通信作者 郭惠红, 副教授, 硕士生导师, 从事药用植物分子生物学研究。E-mail: guohh@bjfu.edu.cn

analysis on the expression regulated by MeJA will be helpful for further elucidating the function of GpSS1 and its mechanism regulated by MeJA, as well as for improving the quality and content of gypenosides.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; triterpenoid saponin; GpSS1; sequence analysis; gene expression; MeJA regulation

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 为葫芦科绞股蓝属多年生草质藤本植物, 广泛分布于中国、日本、韩国和朝鲜等亚洲国家^[1]。绞股蓝因能合成和积累人参皂苷类物质而被称为“南方人参”^[2]。绞股蓝皂苷对炎症、肝炎、心血管疾病和癌症等多种疾病具有防治作用, 是一种名贵的中药材, 具有良好的应用前景和较高的经济价值^[3-7]。迄今为止, 已发现 100 种绞股蓝皂苷与人参皂苷有类似骨架的达玛烷型结构^[8], 其中 4 种绞股蓝皂苷 (Gyp-3、4、8、12) 与人参皂苷 (Gin-Rb₁、Rb₃、Rd、F₂) 的结构完全相同^[9]。与人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 相比, 绞股蓝不仅有更广阔的资源供给, 而且栽培周期更短, 因此绞股蓝是一种经济的人参替代品^[8,10]。

绞股蓝皂苷属于三萜类皂苷, 三萜皂苷的生物合成是通过甲羟戊酸途径获得的, 大致可分为 3 个步骤。首先是异戊烯基焦磷酸 (IPP) 经过一系列的转化生成法尼基焦磷酸 (FPP), 然后 FPP 转化成鲨烯, 最后鲨烯经过环化、氧化、羟基化及糖基化作用生成三萜皂苷^[11]。鲨烯合成酶 (squalene synthase, SS) 在三萜皂苷生物合成途径中起着重要的作用, 它催化 2 分子的 FPP 缩合生成鲨烯^[12-13], 而鲨烯是三萜类皂苷合成的重要前体物质。研究表明, 刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms SS 基因的过量表达能促进三萜类皂苷的大量合成^[14]。因此, SS 基因是绞股蓝皂苷生物合成途径中的关键酶基因。

茉莉酸甲酯 (MeJA) 是一种植物特有的生长调节物质, 在植物的防御反应、生长发育及次生代谢中发挥重要作用, 可以调控植物抗毒素、生物碱、黄酮类物质、酚酸类及萜类等相关化合物的合成^[15-16]。MeJA 主要以信号分子的形式调控相关酶基因的表达, 影响关键酶活性, 从而影响次生产物的代谢。研究表明, MeJA 对 SS 基因的表达具有调节作用。例如在人参不定根组织培养中, 培养基中施加一定浓度的 MeJA 后, 促进了人参 SS 基因的表达^[17]; 又如在茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 种菌培养基中施加一定浓度的 MeJA 后, 茯苓 SS 基因的表达上调^[18]。这些研究均是在细胞或组织培养基中施用 MeJA 来考察 MeJA 对 SS 基因表达的

影响。然而, 通过叶面喷施 MeJA 的效果如何还知之甚少, MeJA 对绞股蓝 SS 基因的调节作用也未见报道。

为了研究 SS 及 MeJA 在绞股蓝皂苷合成途径中的作用, 本研究对绞股蓝 SS1 基因 (GpSS1) 进行克隆、序列及表达模式分析, 并通过喷施不同浓度的 MeJA 来观察 SS 基因表达的变化, 旨在为揭示绞股蓝皂苷生物合成的分子调控及 MeJA 对 GpSS1 的调节机制奠定一定的工作基础, 以及为生产实践中改善绞股蓝皂苷品质或提高其产量提供一定的科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

绞股蓝植株 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 由吉首大学刘世彪教授鉴定并提供。供试材料种植在含有营养土的盆 (5 L) 中, 放置在温度为 (22±2) °C 的生长室里培养。

1.2 方法

1.2.1 绞股蓝叶片总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成 参照文献的方法^[19], 使用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司) 提取绞股蓝叶片总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量。以提取的总 RNA 为模板, 采用 Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (天根生化科技有限公司) 将 RNA 反转录合成 cDNA 第一链。

1.2.2 GpSS1 基因的克隆 根据 GenBank 数据库中的 GpSS 序列 (登录号为 FJ906799) 设计 GpSS1 引物, 上游引物: 5'-ATGGGCAGTTTTGGGGCGAT-TCT-3', 下游引物: 5'-TCACATTGATTGGTTGGC-CG-3'。参照之前的方法^[20]以反转录生成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μL: 4 μL cDNA 模板 (200 ng), 上下游引物各 1 μL (20 pmol/L), 8 μL dNTP (200 μmol/L), 0.8 μL Ex Taq 聚合酶 (2.5 U) (TaKaRa), 1×Buffer 补足至 50 μL。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 进行 25 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。反应结束后将 PCR 的全部产物进行凝胶电泳检测, 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (天根生化科技有限公司) 回收 PCR 产

物,将回收的 PCR 产物与 pMD-18T 载体 (TaKaRa) 连接,获得重组质粒 pMD-18T-GpSS1。将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 (天根生化科技有限公司),筛选阳性克隆并进行菌液 PCR 鉴定,将鉴定正确的重组质粒进行测序。

1.2.3 GpSS1 基因的序列分析 GpSS1 基因的核苷酸序列及其推断的氨基酸序列由 NCBI BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 鉴定。推断氨基酸序列的理化特性通过 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测,亲水性采用 ProtScale 程序 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析,蛋白的跨膜区采用 Tmpred 程序 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 预测,蛋白的功能区运用 MotifScan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 鉴定,多重蛋白序列比对采用 BioEdit 软件分析。

1.2.4 GpSS1 在绞股蓝营养器官中的表达分析 为了检测 GpSS1 基因在绞股蓝不同组织部位的表达情况,利用实时荧光定量 PCR 检测 GpSS1 在绞股蓝幼叶、老叶及根状茎中的表达量。实验所用绞股蓝材料均为长势一致的二年生植株,幼叶均指植株上部尚未完成形态建成的大小基本一致的浅绿色叶片;老叶均采自植株中下部已完成形态建成的大小一致的深绿色叶片;所试根状茎样品统一选取植株地下部分较粗的、淡黄色,直径约 5~6 mm 的根状茎。每个样品采自 3 株植株作为 3 个生物学重复。参照“1.2.1”项的方法提取绞股蓝样品的总 RNA 并反转录为 cDNA 第一链作为实时定量 PCR 所需的模板。根据 GpSS1 核苷酸序列设计基因特异引物,上游引物为 5'-ATGGGCAGTTTTGGGGCGAT-T-3',下游引物为 5'-GCGTTACGAAGCTGAGGCTG-AAG-3',扩增长度为 194 bp。绞股蓝内参基因 GpGAPDH 的部分序列 (348 bp) 参照文献方法^[21],根据 NCBI 上公布的其他物种 GAPDH 蛋白序列的保守区设计引物以同源克隆的方法获得。根据该序列设计内参基因特异引物,上游引物为 5'-TCACGGACAGTGAAGCATCAT-3',下游引物为 5'-ACCCTTCAAATGAGCAGCAGC-3',扩增长度为 193 bp。实时定量 PCR 反应体系为 20 μ L: 1 μ L 稀释 10 倍的 cDNA 第一链,上、下游引物各 0.4 μ L (200 nmol/L) 以及 10 μ L 2 $\times$ SYBR Premix, ddH₂O 补足 20 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 进行

40 个循环。PCR 产物的特异性通过溶解曲线分析。使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法进行荧光定量数据的分析。

1.2.5 绞股蓝植株的 MeJA 处理与 GpSS1 基因表达的实时定量检测 自 2015 年 6 月中旬开始,对绞股蓝植株的叶片分别喷施 25、50 和 100 μ mol/L 的 MeJA,以叶面充分润湿为准。在盆的上口、植株茎的下方覆盖一层保鲜膜避免叶面的液滴进入土中,对照喷施蒸馏水。在喷施后的 6、24、48、72、96 h 采集处理植株及对照的部分幼叶及老叶迅速放入液氮中速冻,然后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。每个 MeJA 处理浓度下的样品及对照样品,均采自 3 株绞股蓝植株作为 3 个生物学重复,共收集 54 个实验样品。

参照“1.2.4”项的实时定量方法检测 MeJA 处理对 GpSS1 基因表达的影响。

1.2.6 数据的分析 实验数据采用 SPSS 20.0 数据包进行差异显著性分析。每个数据均为 3 个生物学重复的平均值。3 个生物学重复是指来自 3 株样品平行进行检测。

2 结果与分析

2.1 绞股蓝叶片总 RNA 的质量检测

提取的绞股蓝叶片总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,可清楚看到 28S、18S rRNA 条带 (图 1-A),未见有 DNA 污染。用超微量分光光度计测得其 A_{260}/A_{280} 的值在 1.8~2.0,表明本试验所提取的绞股蓝叶片总 RNA 降解少且蛋白残留少,产量及完整度较高,可用于后续试验。

2.2 绞股蓝 GpSS1 基因的克隆与序列分析

以绞股蓝叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得与预期片段长度相符的特异性条带 (图 1-B)。对 GpSS1

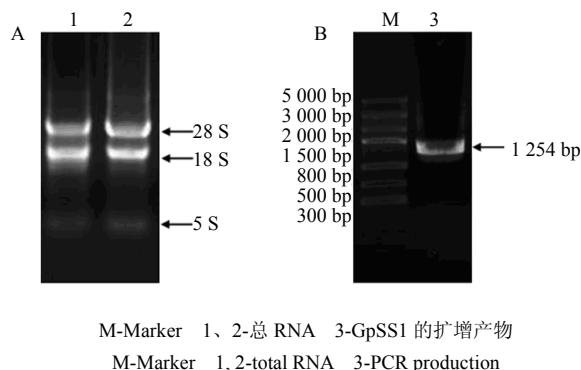


图 1 绞股蓝叶片总 RNA (A) 及 GpSS1 (B) 的 PCR 扩增产物
Fig. 1 Total RNA of *G. pentaphyllum* leaves (A) and PCR production of GpSS1 (B)

的序列分析得知,该基因编码区长 1 254 bp(GenBank 登录号: KU363976), 编码 417 个氨基酸(图 2-A)。与 GeneBank 提供的绞股蓝 SS(登录号: FJ906799)推断的蛋白序列相比,有 16 个氨基酸的不同(图

2-A)。鉴于之前未见对 GpSS1 基因核酸及氨基酸序列的理化分析以及所克隆的 GpSS1 基因与 GeneBank 上提供序列的错误的报道,本实验对所克隆的 GpSS1 基因的序列做了进一步深入的分析。

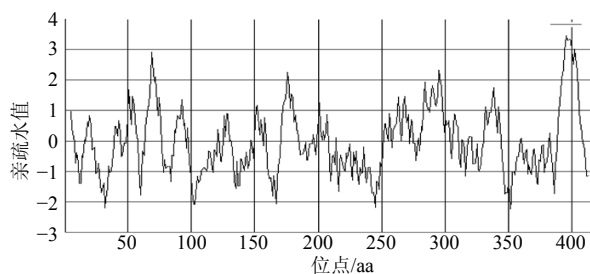
A

```

1 ATGGGCAGTTTGGGGCGATTCTCAGACACCCAGATGATTTTTATCCACTTTTGAAATTGAAAAATGGCTGCTAGAAATGTG
1 M G S F G A I L R H P D D F Y P L L K L K M A A R N
82 GAAAAGCAGATCCCAAGAACCCCATTTGGGGATTGTTTATTCATGCTTCATAAGGTTTCTCGTAGTTTGTCTCTCGTT
28 E K Q I P Q E P H W G F C Y S M L H K V S R S F A L V
163 ATTCAACAGCTTCAGCTTCAGCTTCGTAACGCTGTATGCATATTTATCTTGTCTTCGAGCCCTCGATACCGTTGAGGAT
55 I Q Q L Q P Q L R N A V C I F Y L V L R A L D T V E D
244 GATACAAGCATAGAAACAGGAATCAAAGTGCCCATTTCTAAAGCTTTCCACCATCACATATATAACCGTGACTGGCATT
82 D T S I E T G I K V P I L K A F H H I Y N R D W H F
325 TCATGTGGCACAAGCATTATAAGTTCTTATGGACGAGTTTCATCATGTTTCAACCGGTTTTCAGAGCTTGAGAAAGGG
109 S C G T K H Y K V L M D E F H H V S T A F L E L E K G
406 TATCAGGAGGCGATTGAGGATGTCACCAATCGTATGGGTGCAAGGAATGGCTAAATTCATATGCAAAGAGGTAGAGACCATT
136 Y Q E A I E D V T N R M G A G M A K F I C K E V E T I
487 GATGATTATGATGAATATTGCCACTACGTAGCTGGACTTGTGCGGCTAGGTTTGTCTAAGCTGTTCCATGCTTCAGGCTCA
163 D D Y D E Y C H Y V A G L V G L G L S K L F H A S G S
568 GAAGATCTGCTATCTGACTCTATATCCAATTCTATGGGCTTGTTCCTCAGAAAACAAACATTATTCGTGATTATTTGGAG
190 E D L L S D S I S N S M G L F L Q K T N I I R D Y L E
649 GATATCAACGAGATACAAAGTGTCGAATGTTTGGCCTCCGCAAAATTTGGAGCAAATATGTTGATAAATTAGAGGATTG
217 D I N E I P K C R M F W P R Q I W S K Y V D K L E D L
730 AAATATGAGGAGAATTTCGGTCAAGGCGTGCATTGCCTACACGATATGGTCACCAATGCTTTGATACATGTTGAGGAGTGT
244 K Y E E N S V K A V H C L N D M V T N A L I H V E C
811 CTGATATACATGTCTAGATTAAGAGATCTTCCATATTTCCATCTGTGCAATTCCTCAGATTATGGCTATTGGAACCTCTA
271 L I Y M S R L R D L S I F R F C A I P Q I M A I G T L
892 GCATTATGTTACAACAACATAGAAGTCTTCAGAGGTGTGGTCAAAATGCGACGGGGTCTTACTGCTAAGGTCATTGATCGA
298 A C Y N N I E V F R G V V K M R R G L T A K V I D R
973 ACAAAAACGATGGCTGATGTCTACGGAGCTTTCTTTGATTTCCTGTTATGCTGAAAGCTAAGGTCAACAGGAGCGATCCT
325 T K T M A D V Y G A F F D F S V M L K A K V R S D P
1054 AATGCTACTAAAACCTCAGTAGGCTGGAAGCAATACAGAAAACATGTCAGCAGTCTGGACTCCTGAACAAAAGGAAATTA
352 N A T K T L S R L E A I Q K T C Q Q S G L L N K R K L
1135 TATGTAGTAAGAAGTGAGCCAATGTACAATCCAATCTGATTGTGTCATAATTTTCAGCCTGTTATGCATCATACTTGCTTAT
379 Y V V R S E P M Y N P T L I V I I F S L L C I I L A Y
1216 CTCTCAGCAAACGGTTACCGGCCAACCAATCAATGTGA
406 L S A K R L P A N Q S M *

```

B



灰色标记的氨基酸是与 GenBank 提供的 GpSS(登录号: FJ906799)蛋白序列不同的位点;终止密码子用星号标出,纵坐标负值表示亲水,正值表示疏水,负值越大表示越亲水,介于+0.5~-0.5 为两性氨基酸

Amino acids in gray are different sequences sites with GpSS (GenBank accession numbers: FJ906799) protein. The stop codon is denoted by an asterisk. The negative values on vertical axis indicate hydrophilicity and the positive values indicate hydrophobicity. The more negative value is, the higher the hydrophilicity of the amino acids is. The values between +0.5 and -0.5 mainly denote amphoteric amino acids

图 2 绞股蓝 GpSS1 基因的序列分析 (A) 及 GpSS1 蛋白的亲水性分析 (B)

Fig. 2 Sequence analysis of GpSS1 (A) and hydropathy plot of predicted protein (B) of *G. pentaphyllum*

利用 ExPASy 站点的 ProtParam 程序预测绞股蓝 GpSS1 蛋白的分子式为 $C_{2161}H_{3404}N_{574}O_{602}S_{28}$, 相对分子质量为 47 960, 理论等电点为 8.33, 亲水性的总平均值为 -0.032。使用在线软件 ProtScale 对 GpSS1 蛋白的亲水性进一步分析表明,其亲水性低(图 2-B),这与之前的 ProtParam 预测结果是一致的。

已有研究表明植物 SS 蛋白是内质网膜结合蛋白^[22-23]。鉴于 GpSS1 蛋白的亲水性低,采用 Tmpred 软件分析了绞股蓝 GpSS1 蛋白序列的跨膜结构域(图 3),发现在该蛋白的 C 端存在 3 个跨膜区

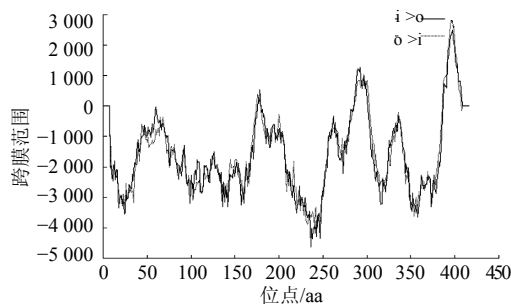


图 3 绞股蓝 GpSS1 蛋白跨膜结构域的预测
Fig. 3 Prediction on transmembrane domains in GpSS1 protein of *G. pentaphyllum*

(171~187、285~311、390~406)。这表明 GpSS1 蛋白通过其 C 端跨膜区锚定于内质网上, 而 N 端则伸向胞质溶液中。GpSS1 蛋白跨膜区的存在也解释了 ProtParam 和 ProtScale 软件分析其亲水性低的原因。

将绞股蓝 GpSS1 推断的蛋白序列与 GpSS 蛋白 (GenBank 登录号为 ACQ90302.1)、人参 SS 蛋白 (ACZ71037.1)、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. SS1 蛋白 (ADG36701.1)、北柴胡 *Bupleurum*

chinense DC. SS 蛋白 (ACX42426.1) 以及拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. SS 蛋白 (BAA06103.1) 序列进行比对, 发现它们都具有 3 个保守区 A、B、C (图 4), 这 3 个结构域被认为与 SS 蛋白催化活性有关^[24]。序列比对还发现 SS 蛋白具有 1 个天冬氨酸富含区 (DXXXD) 和 1 个 C 端保守的疏水区 (图 4)。前者可能是 SS 蛋白底物 (FPP) 的结合位点^[25], 而后者是 SS 蛋白在内质网上的结合位点^[26-27]。



保守区用黑框标出, 包括与 SS 蛋白催化活性有关的 3 个保守区 (A、B、C)、天冬氨酸富含区、C 端内质网锚定区
 Conserved regions are boxed, including the three conserved regions (A, B, C) involved in catalytic activity of SS, the aspartate rich motif, the putative ER anchoring motif

图 4 SS 基因氨基酸序列多重比对

Fig. 4 Multiple alignments of amino acid in sequence squalene synthase

2.3 GpSS1 基因的表达模式分析

对绞股蓝幼叶、老叶及根状茎中 GpSS1 基因表达水平的检测结果表明, GpSS1 在幼叶中的表达水平最高, 在老叶中的表达水平次之, 在根状茎中的表达最低 (图 5)。这与人参 SS 基因在人参营养器官中的表达模式是基本一致的^[11]。

2.4 MeJA 处理对 GpSS1 基因表达的影响

鉴于 GpSS1 在叶中的表达较高而在根状茎中的表达较低及取材的便利, 研究不同浓度 MeJA 喷施绞股蓝植株后 GpSS1 在绞股蓝叶片中的表达情况。

结果表明, 3 种不同浓度的 MeJA 处理绞股蓝叶片后, 与对照相比 GpSS1 基因在幼叶和老叶各个

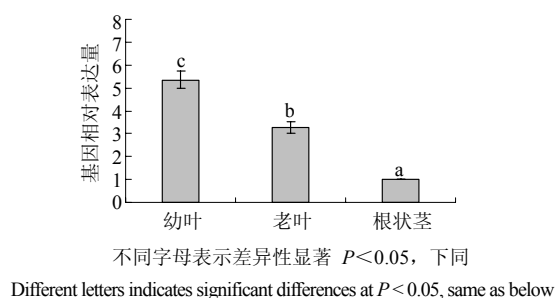


图 5 GpSS1 基因的组织表达模式分析

Fig. 5 Tissue-specific expression pattern of GpSS1 gene

检测时间点的表达水平均有一定的上调(图 6)。在 MeJA 处理后的 6~96 h, GpSS1 在幼叶和老叶中的表达水平均呈现出先逐渐上升后有所下降的趋势,但在幼叶中的表达高于老叶中的表达(图 6),这与 GpSS1 表达模式的分析结果(图 5)是一致的。在实验所设时间范围内,25 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理下幼叶与老叶中 GpSS1 的表达水平均在 24 h 达到了峰值,而 50、100 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理下幼叶与老叶中 GpSS1 的表达在 48 h 达到最高值(图 6)。推测这种现象可能是由 MeJA 的浓度大小决定的。在 MeJA 浓度较低时,由于 MeJA 对 GpSS1 表达的刺激较弱, GpSS1 的表达上调相应就会在较短的时间内完成;而当 MeJA 浓度较高时,其对 GpSS1 表达的刺激增强, GpSS1 的表达上调相应会持续更久而且上调幅度也会相应增强。在三岛柴胡 *Bupleurum falcatum* L. 根组织培养基中添加较低浓度 MeJA (20 $\mu\text{mol/L}$) 后, BfSS 基因的 mRNA 表达量在 3 h 即达到最大值^[27], 这与推测相符。更为重要的是,本实验发现

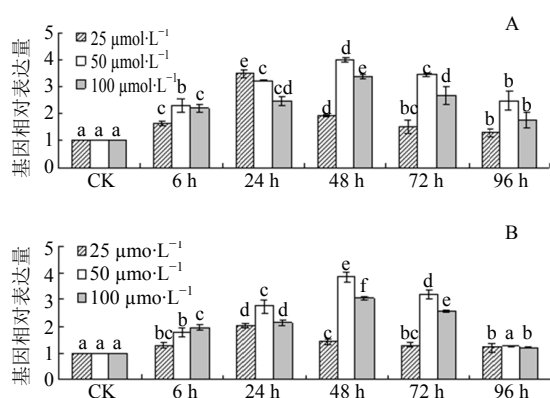


图 6 不同浓度 MeJA 处理下绞股蓝幼叶 (A) 和老叶 (B) GpSS1 基因的表达分析

Fig. 6 Relative expression of GpSS1 of *G. pentaphyllum* young leaves (A) and old leaves (B) in response to MeJA at different concentrations

GpSS1 的表达水平并未随着 MeJA 的浓度增大而持续增强, MeJA 处理浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时 GpSS1 的表达水平上调幅度最大,依次为 100 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 MeJA (图 6)。

3 讨论

虽然人参等药用植物 SS 基因的相关研究已有一些报道^[11,15,17-18],但植物 SS 同源基因的序列及表达在不同物种中会存在一定的差异。绞股蓝作为一种重要的药用植物,目前对其 SS 基因的研究少见报道。GenBank 上虽有绞股蓝 GpSS 基因的序列提供,但未见对其序列及表达的进一步分析。本实验克隆的 GpSS1 基因编码的蛋白与 GpSS 蛋白有 40 个核苷酸及 16 个氨基酸的不同(图 2-A),但与酶催化活性相关的 3 个保守区(A、B、C)在两者之间是完全相同的(图 4),这说明 SS 蛋白的催化功能结构域在植物进化中是高度保守的。两者存在一定氨基酸的差异可能由种源不同导致。GpSS1 也可能是绞股蓝 SS 基因家族的另一个成员。在人参中, SS 基因就是一个多拷贝基因,已发现其基因家族的 3 个成员^[24]。

SS 基因作为三萜皂苷生物合成途径中的一个关键酶基因,其表达水平的高低会影响植物体内三萜皂苷的合成^[14]。本研究发现 GpSS1 在叶特别是幼叶中的表达水平明显高于根状茎(图 5)。之前的研究表明,相同干质量下根状茎的皂苷含量显著高于叶^[28]。因此,推测幼叶可能是绞股蓝皂苷合成的主要部位,而根状茎是其主要的贮藏部位。

在植物次生代谢产物的生物合成过程中, MeJA 作为一种植物生长调节剂,可以调节代谢合成相关酶的表达来影响植物次生代谢物质的合成。已有研究表明,在培养基中添加一定浓度的 MeJA 能够促进人参不定根、洋甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 和蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn. 悬浮细胞中 SS 基因的表达^[15,29-31]。然而, MeJA 对绞股蓝 SS 基因的调节作用还未见报道。本研究结果不仅证实了 GpSS1 的表达受 MeJA 的调控(图 6),而且发现 GpSS1 的表达水平不会随着 MeJA 的浓度增大而持续增强,不是 100 $\mu\text{mol/L}$ 而是 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 对 GpSS1 表达的影响最大(图 6),这说明 MeJA 对 GpSS1 的表达调节有一定的浓度效应。在京大戟 *Euphorbia pekinensis* Rupr. 茎愈伤组织液体培养中施加不同浓度 MeJA (0~200 $\mu\text{mol/L}$) 诱导培养 36 h 后, EpSS 的表达在 MeJA 处理浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$

时上调幅度最大^[32]。而在人参不定根组织培养中,当培养基中施加不同浓度的 MeJA (0~20 $\mu\text{mol/L}$) 后, PgSS1 基因的转录水平随着 MeJA 浓度的增大而持续上调^[17]。因此,认为 MeJA 对 SS 基因表达调节的浓度效应在不同物种中是有差异的。这些研究结果为进一步阐明 MeJA 对植物 SS 基因的表达调控及在农业生产实践中通过 MeJA 来改善或提高绞股蓝皂苷量提供了一定的科学理论依据。

参考文献

- [1] Liu J Q, Wang C F, Chen J C, *et al.* Six new triterpenoid glycosides from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Helv Chim Acta*, 2009, 92(12): 2737-2745.
- [2] 边古箏, 禹玉华, 郁书君, 等. 药用植物绞股蓝研究进展 [J]. 农业与技术, 2014, 34(2): 1-5.
- [3] Circosta C, Pasquale R D, Occhiuto F. Cardiovascular effects of the aqueous extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(9): 638-643.
- [4] 李 华, 史美荣, 肖娅萍. 绞股蓝种质资源遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1666-1672.
- [5] Lu H F, Chen Y S, Yang J S, *et al.* Gypenosides induced G0/G1 arrest via inhibition of cyclin E and induction of apoptosis via activation of caspases-3 and-9 in human lung cancer A-549 cells [J]. *In Vivo*, 2008, 22(2): 215-221.
- [6] 卢汝梅, 潘立卫, 韦建华, 等. 绞股蓝化学成分的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2757-2761.
- [7] 史 琳, 赵 红, 张璐雅, 等. 绞股蓝药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 125-129.
- [8] Subramaniam S, Mathiyalagan R, Gyo I J, *et al.* Transcriptome profiling and insilico analysis of *Gynostemma pentaphyllum* using a next generation sequencer [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(11): 2075-2083.
- [9] Yang Y H, Yang J, Jiang Q H. Hypolipidemic effect of gypenosides in experimentally induced hypercholesterolemic rats [J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12(1): 109-116.
- [10] Choi K T. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(9): 1109-1118.
- [11] Niu Y Y, Luo H M, Sun C, *et al.* Expression profiling of the triterpene saponin biosynthesis genes *FPS*, *SS*, *SE*, and *DS* in the medicinal plant *Panax notoginseng* [J]. *Gene*, 2014, 533(1): 295-303.
- [12] 王 茜, 富 强, 王丽思, 等. 人参皂苷生物合成的相关酶及其基因的研究进展 [J]. 人参研究, 2012, 24(1): 40-46.
- [13] Han J Y, In J G, Kwon Y S, *et al.* Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(1): 36-46.
- [14] Seo J W, Jeong J H, Shin C G, *et al.* Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(8): 869-877.
- [15] Kim O T, Bang K H, Kim Y C, *et al.* Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2009, 98(1): 25-33.
- [16] 朱宏涛, 李 江, 李 元, 等. 茉莉酸甲酯对三七组培苗中总皂苷含量的影响 [J]. 西部林业科学, 2014, 43(2): 72-78.
- [17] Lee M H, Jeong J H, Seo J W, *et al.* Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 976-984.
- [18] Wang J R, Lin J F, Guo L Q, *et al.* Cloning and characterization of squalene synthase gene from *Poria cocos* and its up-regulation by methyl jasmonate [J]. *World J Microb Biot*, 2014, 30(2): 613-620.
- [19] 赵 娜, 张 媛, 李秋琦, 等. 文冠果 FAD2 的序列与功能分析 [J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(2): 86-93.
- [20] Zhao N, Zhang Y, Li Q Q, *et al.* Identification and expression of a stearyl-ACP desaturase gene responsible for oleic acid accumulation in *Xanthoceras sorbifolia* seeds [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 87(2): 9-16.
- [21] Guo H H, Wang T T, Li Q Q, *et al.* Two novel diacylglycerol acyltransferase genes from *Xanthoceras sorbifolia* are responsible for its seed oil content [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 266-274.
- [22] Busquets A, Keim V, Closa M, *et al.* *Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67(1/2): 25-36.
- [23] Masataka K, Seiko K, Akira A, *et al.* Accumulation of squalene in a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* by genetic modification of squalene synthase and squalene epoxidase genes [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): 1-21.
- [24] Kim T D, Han J Y, Huh G H, *et al.* Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(1): 125-137.
- [25] Bhat W W, Lattoo S K, Razdan S, *et al.* Molecular cloning, bacterial expression and promoter analysis of

- squalene synthase from *Withania somnifera* (L.) Dunal [J]. *Gene*, 2012, 499(1): 25-36.
- [26] Nguyen H T M, Neelakadan A K, Quach T N, *et al.* Molecular characterization of *Glycine max* squalene synthase genes in seed phytosterol biosynthesis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 73(6): 23-32.
- [27] Kim Y S, Cho J H, Park S, *et al.* Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum* [J]. *Planta*, 2011, 233(2): 343-355.
- [28] 刘世彪, 廖海民, 胡正海, 等. 绞股蓝营养器官各发育阶段结构与总皂甙含量相关性的研究 [J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(2): 144-148.
- [29] Choi D W, Jung J D, 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.
- [30] Hiroaki H, Pengyu H, Kenichiro I. Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(4): 404-411.
- [31] Suzuki H, Achnine L, Xu R, *et al.* A genomics approach to the early stages of saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2003, 32(6): 1033-1048.
- [32] 张文娟, 曹小迎, 蒋继宏. 茉莉酸甲酯诱导大戟三萜类代谢的研究 [J]. 广西植物, 2015, 35(4): 590-596.