

• 药材与资源 •

濒危药用植物茅苍术法尼基焦磷酸合酶基因克隆及其表达分析

蒋 玲, 谷 巍*, 巢建国, 桑晓华, 韩 赟, 刘青芝, 席彩彩

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘 要: 目的 克隆茅苍术 *Atractylodes lancea* 倍半萜类成分生物合成关键酶法尼基焦磷酸合酶 (FPPS) 基因全长并分析其表达规律。方法 以茅苍术总 RNA 为模板, 运用同源克隆法和 RACE 技术克隆茅苍术 FPPS 基因 (AIFPPS) 的 cDNA 全长, 并进行生物信息学分析; 用 qRT-PCR 和 GC-MS 分析不同生长阶段 FPPS 在茅苍术根茎中的表达及倍半萜类成分变化, 并分析二者的相关性。结果 获得 AIFPPS 基因全长 cDNA 为 1 320 bp (GenBank accession no. KX443242), 含一个长 1 029 bp 的开放阅读框, 编码 342 个氨基酸, 包含 5 个保守功能域, 其中 2 个富含天冬氨酸 (DXXDD)。qRT-PCR 及 GC-MS 结果显示不同时期茅苍术 AIFPPS 基因表达量与倍半萜类成分呈显著正相关。结论 首次克隆获得 AIFPPS 基因的全长 cDNA, 初步证明 AIFPPS 基因是茅苍术倍半萜类成分生物合成途径中的重要调控位点, 为茅苍术倍半萜类成分生物合成途径阐明与生物工程应用提供科学依据。

关键词: 茅苍术; 法尼基焦磷酸合酶; 基因克隆; 基因表达; 倍半萜

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)04-0760-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.04.023

Gene cloning of farnesyl pyrophosphate synthase in *Atractylodes lancea* and its expression pattern analysis

JIANG Ling, GU Wei, CHAO Jian-guo, SANG Xiao-hua, HAN Yun, LIU Qing-zhi, XI Cai-cai

School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) from *Atractylodes lancea* and analyze its expression. **Methods** The full-length cDNA of FPPS in *A. lancea* was cloned via homology-based cloning and rapid amplification of cDNA ends approach. Also, the characterization of gene was revealed by bioinformatic analysis. The expression of FPPS was determined by qRT-PCR while the content of sesquiterpenes of rhizome in different growth stages in *A. lancea* was measured by GC-MS. Meanwhile the correlation between them was analyzed. **Results** The full-length cDNA (1 320 bp) of FPPS gene was obtained (AIFPPS, GenBank accession number KX443242), with an open reading frame of 1 029 bp, encoding 342 amino acids. The deduced AIFPPS protein sequence contained five conserved motifs, two of which is full of Asp (DXXDD). qRT-PCR and GC-MS results showed a significant positive correlation between the content of sesquiterpenes and AIFPPS expression level. **Conclusion** It can be primarily deduced that AIFPPS gene should be an important control point in the biosynthetic pathway of sesquiterpenes in *A. lancea*. This work provides scientific basis for clarifying the biosynthetic pathway of sesquiterpenes and application of biological engineering.

Key words: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; farnesyl diphosphate synthase; gene clone; gene expression; sesquiterpene

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 为菊科多年生草本植物, 其根茎具有燥湿健脾、祛风、散寒、明目等功能^[1], 是江苏省著名道地药材, 公认为优质的苍术商品, 近年来由于各种人为因素的

影响以及自身的生物学特性, 种群自身恢复能力较差, 其分布区及种群数量呈现明显衰退倾向, 已列为江苏省 4 种濒危药用植物之一^[2]。

茅苍术主要活性成分为挥发油, 主要包括 β -桉

收稿日期: 2016-08-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573520); 江苏省中药优势学科 II 期建设 (ysxk-2014); “六大人才高峰” 高层次人才项目 (2012-YY-009); 江苏省“333 高层次人才培养工程”; 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心资助项目

作者简介: 蒋 玲 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药资源生产与合成生物学。Tel: 15951938294 E-mail: jiangling0801@126.com

*通信作者 谷 巍, 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药资源生产与合成生物学。E-mail: guwei9926@126.com

叶醇 (β -eudesmol)、茅术醇 (hinesol)、苍术酮 (atractylone) 等倍半萜类和苍术素 (atractylodin) 等聚炔类成分。倍半萜类成分在植物体内主要通过 MVA 途径合成, 法呢基焦磷酸合酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPPS) 是 MVA 生物合成途径中的关键酶^[3-4], 催化 2 个异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 分子和 1 个二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 分子生成法呢基二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP)^[5-6], FPP 为倍半萜类等化合物提供 C15 骨架。现已有多种编码该酶的基因被克隆^[7-12], 迄今, 茅苍术 FPPS 基因 (AIFPPS) 全长的相关信息未见报道。

本研究采用同源克隆法和 RACE 技术克隆 AIFPPS 基因的全长, 并对 AIFPPS 基因表达量与倍半萜类成分量进行相关性分析, 研究其在茅苍术品质形成过程中的表达规律, 为阐明茅苍术倍半萜类成分生物合成途径及其调控机制奠定基础, 为利用植物基因工程改善中药材品质提供科学依据。

1 材料

茅苍术采自道地产区江苏句容茅山, 经南京中医药大学谷巍教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.。茅苍术样品采集选择其生长发育的 6 个阶段: 出芽期 (3 月 15 日)、营养生长期 (5 月 15 日)、孕蕾期 (7 月 15 日)、开花期 (9 月 15 日)、结果期 (11 月 15 日) 及休眠期 (12 月 15 日)。取不同生长阶段茅苍术叶片和根茎分装于冻存管中, 在液氮中保存备用; 并取不同生长阶段茅苍术根茎用于测定苍术酮、茅术醇及 β -桉叶醇量。对照品苍术酮 (批号 C-084-15814, 质量分数大于 98%) 购于成都瑞芬思生物科技有限公司; 茅术醇 (批号 D1759, 质量分数大于 98%) 购于上海宝曼生物科技有限公司及 β -桉叶醇 (批号 140626, 质量分数大于 95%) 购于成都普菲得生物技术有限公司。

2 方法

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

RNA 的提取按照 Tiangen 公司总 RNA 提取试剂盒 (批号 DP419) 操作步骤进行, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, Bio-Rad Gel Doc XR+凝胶成像系统观察拍照, 并用 Eppendorf 蛋白核酸分析仪检测 RNA 纯度和浓度。cDNA 合成按照 Invitrogen 公司反转录试剂盒 (批号 C28025021) 操作步骤进行。

2.2 FPPS 基因保守区片段的克隆

根据 GenBank 提供的 FPPS 同源基因序列, 用引物设计软件 Primer primer 5.0 设计简并引物 CF、CR (引物序列见表 1), 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。以反转录后的 cDNA 为模板进行保守区片段的 PCR 扩增。在 20 μ L 反应体系中加入 10 $\times$ PCR 缓冲液 2 μ L, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1 μ L, rTaq DNA 聚合酶 2 U, 引物 (2.5 mmol/L) 各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 57 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将以上获得的 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 切胶, 纯化回收, 进行 TA 克隆, 筛选 5 个阳性克隆子进行测序, 测序由上海生工生物工程有限公司完成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'→3')
CF	ATGYTKGAYTAYAAAYGTNC SHGAGG
CR	TCCTGNACTTGRAARTADRTWCCCAT
GSP1	GGTTCAGATTGCCCAAGGTTGGTATG
GSP2	AACTGCCTATTACTCATTTCACCTTC
QF	GGGTAGTTACGGGGGACACTTACAC
QR	ACAGACAACATCTCCTCCTCTCATC
FPPSF	CTGCCCTTGTTGGTGCGTT
FPPSR	TTCTTGGGACATGGTTGCGA
18 SF	GTA GTTGGGCTTTGGGTTG
18 SR	AGCGTAGGCTTGCTTTGAG

2.3 RACE 及全长的扩增

根据 FPPS 基因保守区片段的测序结果, 在其序列内部设计 5'RACE 和 3'RACE 特异引物 GSP1 和 GSP2 (引物序列见表 1), 利用 Clontech 公司 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒扩增该基因的 cDNA 5'端和 3'端。5'RACE 以 5'RACE-ready first-strand cDNA 为模板, 按照 BD Advantage2 PCR kit 操作, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 57 $^{\circ}$ C、30 s, 68 $^{\circ}$ C、90 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C、5 min; 4 $^{\circ}$ C 终止反应。3'RACE 以 3'RACE-ready first-strand cDNA 为模板, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 57 $^{\circ}$ C、30 s, 68 $^{\circ}$ C、90 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C、5 min; 4 $^{\circ}$ C 终止反应。根据 5'RACE 和 3'RACE 测序结果拼接得到的全长 cDNA 设计引物 QF 和 QR (引物序列见表 1) 进行全长 cDNA 扩增。引物均由上海捷瑞生物工程有限公司

公司合成。全长扩增以茅苍术 cDNA 模板,在 50 μ L 反应体系中加入 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 4 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μ L, rTaq DNA 聚合酶 2 U, 引物 (2.5 mmol/L) 各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C、5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 54 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C、5 min; 4 $^{\circ}$ C 终止反应。产物由上海生工生物工程有限公司进行测序。

2.4 生物信息学克隆分析

将 AIFPPS 基因全长序列通过 BLAST 搜索 NCBI 的蛋白质和核苷酸数据库,并通过 DNAMAN 软件翻译成氨基酸序列,用 Clustal W13.0 分析软件与其他植物的 FPPS 氨基酸序列进行比较,根据同源比对结果,选择 18 种植物的 FPPS 氨基酸序列用 MEGA 5.0 的邻位相联法构建进化树并分析。

AIFPPS cDNA 的开放阅读框 (ORF) 查找与相应的氨基酸序列翻译使用 ORF Fider, 相对分子质量与理论等电点 (pI) 预测采用 ExPASy 在线服务器的 Compute Pi/Mw 工具,蛋白的理化性质预测采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam 进行分析。利用在线软件 SignalP 4.0 Server 预测 AIFPPS 的信号肽,利用 Wolfpsort 对 AIFPPS 蛋白的定位信号进行预测,利用在线软件 TMHMM 预测 AIFPPS 跨膜区域。二级结构预测使用 Dublin 大学的 Porter 服务器,三级结构预测使用 Swiss-Model 服务器,结构功能域分析采用 ExPASy 在线服务器的 Prosite Scanprosite。

2.5 qRT-PCR 分析

qRT-PCR 反应使用荧光定量 PCR 仪 (ABI7500, USA), 以 18 S 为内参基因 (18 SF 和 18 SR, 引物序列见表 1), 以不同生长时期茅苍术根茎 cDNA 为模板,设计荧光定量引物 FPPSF 和 FPPSR (引物序列见表 1) 进行 PCR 扩增,预计扩增产物 200 bp 左右,检测样品中 AIFPPS 基因的相对表达量,引物由上海捷瑞公司合成。在 20 μ L 的反应体系中加入 Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA) 10 μ L, 引物各 0.4 μ L (10 μ mol/L), 模板 cDNA 2 μ L, 并设置 3 个重复。阴性对照用 2 μ L 水代替模板。反应条件: 94 $^{\circ}$ C、30 s; 94 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、12 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 循环 45 次, PCR 反应结束后分析荧光值变化曲线以及熔解曲线。本实验以茅苍术生长发育的 6 个阶段的根茎为材料,每个阶段 3 个生物学重复,同时每个样品

设 3 个技术重复,并设置阴性对照。数据处理采用相对定量法,参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算分析。

2.6 GC-MS 分析^[13]

2.6.1 供试品溶液的制备 按《中国药典》2015 年版挥发油测定甲法提取苍术挥发油,每个生长阶段做 3 个生物学重复,所挥发油用醋酸乙酯定容,作为供试品溶液,0.45 μ m 滤膜滤过后供 GC-MS 分析用。

2.6.2 对照品溶液的制备 精密称取苍术酮、茅术醇及 β -桉叶醇对照品适量,分别置于 5 mL 量瓶中,醋酸乙酯溶解并定容至刻度,制成质量浓度分别为 20.86、10.50、17.86 mg/mL 的对照品储备液备用。

2.6.3 GC-MS 分析条件 Agilent6890N 气相色谱仪和 5973 型质谱联用仪,谱库为 NIST98, HP-5MS 毛细管色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m)。载气为氦气 (99.999%); 体积流量 1 mL/min; 进样口温度 250 $^{\circ}$ C; 分流进样,分流比为 40:1; 进样量 2 μ L; 柱升温程序:起始 40 $^{\circ}$ C,保持 5 min,以 3 $^{\circ}$ C/min 升温至 185 $^{\circ}$ C,保持 10 min,再以 5 $^{\circ}$ C/min 升温至 250 $^{\circ}$ C,保持 5 min。EI 离子源,源温 230 $^{\circ}$ C,电子能量为 70 eV,连接器温度 280 $^{\circ}$ C,溶剂延迟 5 min。扫描范围 m/z 33~350,电子倍增器电压为 2.4 kV。

2.7 相关性分析

使用 SPSS 软件对不同生长期茅苍术根茎中 AIFPPS 基因表达量与苍术酮、茅术醇及 β -桉叶醇量进行相关性分析,采用 SPSS 18.0 软件计算出 Pearson 相关系数。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 检测结果

茅苍术总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示条带清晰完整,28 S RNA 条带的亮度约为 18 S RNA 条带 2 倍, Eppendorf 蛋白核酸分析仪检测结果显示,总 RNA A_{260}/A_{280} 为 1.98,为典型的 RNA 吸光度值,说明提取的总 RNA 质量较好,无降解,蛋白质、多糖、酚和无机盐等杂质已排除,可用于后续实验 (图 1-A)。

3.2 AIFPPS 基因保守区片段的克隆

以茅苍术叶片总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,用简并引物扩增得到一条大约 600 bp 的 FPPS 基因的特异片段,符合引物设计推断的片段大小 (图 1-B)。PCR 片段纯化、克隆,经测序后得到其序列,长度为 583 bp。

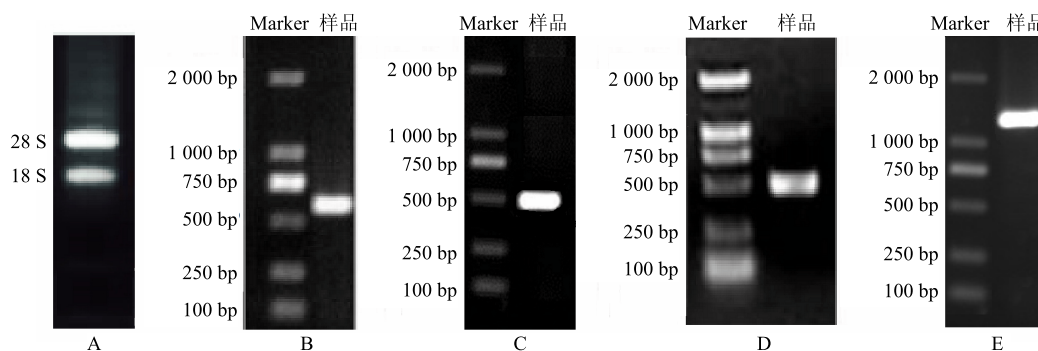


图 1 茅苍术总 RNA 电泳图 (A)、AIFPPS 保守区片段 (B)、5'RACE (C)、3'RACE (D) 和 AIFPPS 全长 cDNA (E) 凝胶电泳图

Fig. 1 Electropherogram of total RNA (A), AIFPPS conservation fragment (B), 5'RACE (C), 3'RACE (D), and AIFPPS full-length cDNA (E) from *A. lancea*

3.3 RACE 和 AIFPPS 全长 cDNA 序列

根据获得的茅苍术 FPPS 基因保守区序列设计特异引物, 进行 5'RACE 和 3'RACE PCR 扩增, 分别扩增出大约 400 bp 和 500 bp 的 DNA 片段, 结果见图 1-C、D。将 5'RACE 和 3'RACE 扩增片段克隆测序结果 (348 bp 和 460 bp) 与已有保守区片段拼接得到全长 cDNA (1 320 bp), 将所获得的 FPPS 基因全长命名为 AIFPPS。为了验证全长结果, 根据拼接得到的全长序列设计引物, 以 cDNA 为模板, 扩增 AIFPPS 全长序列并测序, 测序结果与拼接结果一致 (图 1-E)。将 AIFPPS 核酸序列提交至 Genbank 数据库, 获得的基因登录号为 KX443242。

3.4 AIFPPS 全长序列生物信息学分析

从茅苍术中克隆的 AIFPPS 基因全长 cDNA 序列为 1 320 bp (图 2), 翻译起始点为第 86 碱基处, 终止密码子为 TAG, 在两端有一个 85 bp 的 5'-UTR 和一个 206 bp 的 3'-UTR。包含了一个 1 029 bp 的完整 ORF, 编码 342 个氨基酸的蛋白。使用 NCBI Blastx 比对, 氨基酸序列与三脉紫菀 *Aster ageratoides* Turcz、银胶菊 *Parthenium hysterophorus* L、向日葵 *Helianthus annuus* L 等植物的同源性分别达到 90%、89%、89%。

3.4.1 AIFPPS 理化性质 利用 ExPASy Proteomics Server 在线软件 ProtParam 对 AIFPPS 基因编码蛋白的理化性质进行预测分析。推测 AIFPPS 的分子式为 $C_{1781}H_{2762}N_{448}O_{516}S_{12}$, 相对分子质量为 5 519, pI 为 5.49, 带正电残基 (Arg+Lys): 42, 负电残基 (Asp+Glu): 51。该蛋白的不稳定系数为 33.04, 为稳定蛋白; 脂肪系数为 95.15, 亲水性系数为 -0.196。

3.4.2 AIFPPS 的信号肽、亚细胞定位及跨膜区预测 在线软件 SignalP 4.0 Server 分析结果表明 AIFPPS 无信号肽, 为非分泌蛋白。Wolfpsort 预测表明

AIFPPS 最可能定位于细胞质和微粒[细胞质 0.450, 微粒 0.406, 线粒体基质空间 0.100, 溶酶体 (腔) 0.100]。用 TMHMM 预测 AIFPPS 跨膜区域, 此蛋白不含跨膜区, 全部存在于膜外。

3.4.3 AIFPPS 结构域分析 通过 Clustal W13.0 序列比对, AIFPPS 的功能域氨基酸组成与其他植物一致, 具有 FPPS 活性所必需的多肽位点, 含 5 个保守的功能域 (Asp-motif) (图 3)。FPPS 为异戊烯基转移酶, 该转移酶具有两个共同的氨基酸序列保守域 [LIVM] [LIVM]XDDXXDXXXXRRG 和 [LIVMFY] GXXFQ [LIVM]XDD [LIVMFY]X [DN], 它们也存在于茅苍术 AIFPPS 推测肽链的 90~104 氨基酸残基 [LVLDDIMDESHTRRG] 和 224~236 氨基酸残基 [MGTYFQVQDDYLD] 处, 富含天冬氨酸 (DDXXD)。

3.4.4 AIFPPS 的二级结构及三维结构预测 AIFPPS 蛋白的二级结构预测结果显示: α -螺旋和无规卷曲是 AIFPPS 的主要结构元件, β -折叠和延伸链散布于整个蛋白质中。由 Swiss-Model Workspace 在线分析软件建立 AIFPPS 三维结构模型如图 4 所示, AIFPPS 的功能域在空间布局上是由 α -螺旋围绕成一个“大空穴”的立体结构, “大空穴”的表面藏有 5 个功能保守 motif, 其中与底物相结合的 2 个 Asp-motif (DDXXD) 位于“空穴”的内壁, 推测 AIFPPS 的酶促催化反应在空穴中进行。

3.4.5 不同植物 FPPS 氨基酸序列进化分析 选取 GenBank 中记载的 18 种植物的 18 条 FPPS 氨基酸序列与茅苍术 AIFPPS 氨基酸序列在软件 MEGA 5.0 平台上采用 Neighbor-Joining 方法构建进化树, 进行聚类分析, 见图 5。可以看出茅苍术与菊科植物亲缘关系最近, 聚为一类, 而与五加科、葫芦科等距离较远。

```

1 GGGTAGTTACGGGGGACACTTACACATATACTCTCTAGACTTTGACGAATAAATTAGCAGCATCTCACT
73 TGCAAATTCACAAATGAGCAGCGATCTGAAGTCCAAATTTATCGAAGTTTACGATACTCTGAAATCAGAGTTA
145 M S S D L K S K F I E V Y D T L K S E L
21 I N D P A F E F D D D S R Q W V E K M L D Y N V
217 CCTGGAGGAAAGTTGAACCGGGGCTCTCTGTTGTGACAGCTACAAGTTGCTTAAAGGAGGAGAACTGACC
45 P G G K L N R G L S V V D S Y K L L K G G E L T
289 GATGATGAGTTTCTTGTGATCTGCCCTTGGTTGGTGGTGAATGGCTTCAAGCATACTTCTTGTGCTT
69 D D E F F L A S A L G W C V E W L Q A Y F L V L
361 GATGATATCATGGATGAGTCTCATATACGCAGAGGTCAACCTTGTGGTTTCAAGTTCAGATTGCCAAGGTTGGTATG
93 D D I M D E S H I R R G Q P C W F R L P K V G M
433 ATTGCAGCAACGATGGAGTTCTTCTTCGCAACCATGTCCCGAAGTCTTAAAGAAACATTTCCGAGGAAAA
117 T A A N D G V L L R N H V P R I L K K H F R G K
505 CCTTATTATGTGGATCTACTGGACCTCTTCAACGAGGTAGAATTCAGACAGCCTCTGGACAGATGATTGAT
141 P Y Y V D L L D L F N E V E F Q T A D
577 TTGATCACTACACTTGTGGAGAGAAAGGTCTTTCGAAGTATTCTTTGTCTATTACCGCGGATTGTTTCAG
165 L I T T L V G E K G L S K Y S L S I H R R I V Q
649 TACAAAACGCTATTACTCATTTTACCTTCTGCTGTGCTGCTTATGTTCCGAGAGGATCTGGAC
189 Y K T A Y Y S F Y L P V A C A L L M F G E D L D
721 AATCATGTCCGGTGAAGGATGTACTTGTGAAATGGTACGTATTTCCAAGTGCAGGACGATTACCTAGAC
193 N H A V K D V L V E M G T Y F Q V Q D D T L D
793 TGTTTTGGTCTCTGAGGTGATTGGCAAGATTGGAACGACATTGAAGACTTCAAGTGTCTCTGTTAGT
237 C F G A P E V I G K I G T D I E D F K C S W L V
865 GTGAAAGCATTGGAACCTGCAAGTGAAGGAACTGTACCACCTCTGAACCTTGAGGTGTATTGAAGAGTATGAC
261 V K A L E L A N E E Q K K V L H E N Y G K K T D P
937 GCTTCGTTGCAAGTGAAGGAACTGTACCACCTCTGAACCTTGAGGTGTATTGAAGAGTATGAC
285 A S V A A K V K E L Y H T L N L E G V F E Y E S
1 009 ACGAGTTTACAAGAGCTGATCAGCTCGATTGAAGCTCAGCCGAGCAAGCAGTACAAGCGGTGCTGAATCT
309 T S Y K K L I T S I E A H P S K A V A V L K S
1 081 TCTTGGGGAAGATATCTAAGAGGCAAAAGTAGGGGGCATGGTATGTTATTTATACCAAGTATATCTGA
333 F L G K I S K R Q K *
1 153 TTTTGAAGTCCAAATCATTACAGTCCCTTTGATGAGAGGAGAGATGTTGTCTGTACCTTTTCCATTGTA
1 225 TCTTGCAGTATTCTAGTATGTGTAATAAGACATCTTTTCTGTTGTGAAGAACCAACCGTTTGAGGTGTT
1 297 GATTTCATTAATAAAAAAAAAA

```

起始密码子以方框表示, 终止密码子以*表示, 保守功能域以下划线表示

The initiation codon is boxed, asterisk show the termination codon and conserved function motifs are underlined

图 2 AIFPPS 基因全长序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of AIFPPS full-length cDNA from *A. lancea*

<i>Arctostaphylos lancea</i>	..MSSDIKSKFLIVYDTLKSEIINDEAFEEFDCSRQVERMLDYNVPGGKLNRLGLSVDSYLLKGGEE.L
<i>Gossypium arboreum</i>	..MADIRSAFLIVYDQLKSEIINDEAFEEFDCSRQVERMLDYNVPGGKLNRLGLSVDSYLLKGGKEL
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	..MADIKSTFLIVYEVKLSEIINDEAFEEFDCSRQVERMLDYNVPGGKLNRLGLSVDSYLLKGGQAL
<i>Aralia elata</i>	..MSDIKTRFLIVYEVKLSEIINDEAFEEFDCSRQVERMLDYNVPGGKLNRLGLSVDSYLLKGGKEL
<i>Leibnitzia anandria</i>	..MASDIKSKFLIVYEAALKSEIINDEAFEEFDCSRQVERMLDYNVPGGKLNRLGLSVDSYLLKGGN.V
<i>Ghrysanthemum lavandulifolium</i>	..MSIDIKSKFLIVYCSLKSEIINDEAFEEFDCSRQVERMLDYNVPGGKLNRLGLSVDSYLLKGGEE.L
<i>Taraxacum mongolicum</i>	..MSSDIKSKFLIVYETLKSEIINDEAFEEFDCSRQVERMLDYNVPGGKLNRLGLSVDSYLLKGGEEEL
<i>Aster ageratoides</i>	..MSTDIKSKFLIVYDTLKSEIINDEAFEEFDCSRQVERMLDYNVPGGKLNRLGLSVDSYLLKGGEE.L
	MGSSDIKSKFLIVYDTLKSEIINDEAFEEFDCSRQVERMLDYNVPGGKLNRLGLSVDSYLLKGGEE.L
<i>Arctostaphylos lancea</i>	IDIEFFIASALGWCEWQAYFLVLDDMDSSHRRGQPCWFRFEVGMIAVNDGILRNHIERILKKEHF
<i>Gossypium arboreum</i>	IQDEIFITISALGWCEWQAYFLVLDDMDSSHRRGQPCWFRFEVGMIAVNDGILRNHIERILKKEHF
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	NDDEIFITISALGWCEWQAYFLVLDDMDSSHRRGQPCWFRFEVGMIAVNDGILRNHIERILKKEHF
<i>Aralia elata</i>	SDIEIFITISALGWCEWQAYFLVLDDMDSSHRRGQPCWFRFEVGMIAVNDGILRNHIERILKKEHF
<i>Leibnitzia anandria</i>	TEDEIFITISALGWCEWQAYFLVLDDMDSSHRRGQPCWFRFEVGMIAVNDGILRNHIERILKKEHF
<i>Ghrysanthemum lavandulifolium</i>	TEDEIFITISALGWCEWQAYFLVLDDMDSSHRRGQPCWFRFEVGMIAVNDGILRNHIERILKKEHF
<i>Taraxacum mongolicum</i>	IDIEFFITISALGWCEWQAYFLVLDDMDSSHRRGQPCWFRFEVGMIAVNDGILRNHIERILKKEHF
<i>Aster ageratoides</i>	IDIEFFITISALGWCEWQAYFLVLDDMDSSHRRGQPCWFRFEVGMIAVNDGILRNHIERILKKEHF
<i>Arctostaphylos lancea</i>	RGKEYYIDIDLENEVEFQTAGGQIDLIITLVGKELSKYSLSIHRRIVQKTAAYSFYLFVACALLMF
<i>Gossypium arboreum</i>	RGKEYYIDIDLENEVEFQTAGGQIDLIITLVGKELSKYSLSIHRRIVQKTAAYSFYLFVACALLMF
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	RGKEYYIDIDLENEVEFQTAGGQIDLIITLVGKELSKYSLSIHRRIVQKTAAYSFYLFVACALLMF
<i>Aralia elata</i>	RQKEYYIDIDLENEVEFQTAGGQIDLIITLVGKELSKYSLSIHRRIVQKTAAYSFYLFVACALLMF
<i>Leibnitzia anandria</i>	RGKEYYIDIDLENEVEFQTAGGQIDLIITLVGKELSKYSLSIHRRIVQKTAAYSFYLFVACALLMF
<i>Ghrysanthemum lavandulifolium</i>	RSKSYIDIDLENEVEFQTAGGQIDLIITLVGKELSKYSLSIHRRIVQKTAAYSFYLFVACALLMF
<i>Taraxacum mongolicum</i>	RGKEYYIDIDLENEVEFQTAGGQIDLIITLVGKELSKYSLSIHRRIVQKTAAYSFYLFVACALLMF
<i>Aster ageratoides</i>	RGKEYYIDIDLENEVEFQTAGGQIDLIITLVGKELSKYSLSIHRRIVQKTAAYSFYLFVACALLMF
<i>Arctostaphylos lancea</i>	GEILDNEVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Gossypium arboreum</i>	GENLDNEVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	GENLDNEVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Aralia elata</i>	GGLEKETHVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Leibnitzia anandria</i>	GENLDNEVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Ghrysanthemum lavandulifolium</i>	GENLDNEVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Taraxacum mongolicum</i>	GENLDNEVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Aster ageratoides</i>	GEILDNEVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Arctostaphylos lancea</i>	NYGKKDEASVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Gossypium arboreum</i>	NYGKREAVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	NYGKREAVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Aralia elata</i>	NYGKREAVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Leibnitzia anandria</i>	NYGKREAVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Ghrysanthemum lavandulifolium</i>	NYGKREAVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Taraxacum mongolicum</i>	NYGKREAVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE
<i>Aster ageratoides</i>	NYGKREAVAVKVIIVEMGYFCVQDEYLDCEGPEVIGKIGTDIEDFKCSWVVKALELANEQRKVLFE

图 3 FPPS 基因氨基酸序列同源性比对

Fig. 3 Comparison on deduced amino acid sequences of AIFPPS and corresponding parts of other known FPPS

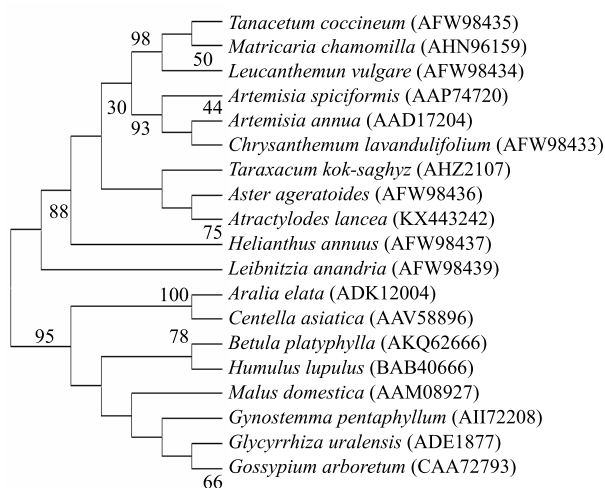


5 个功能域 GKLNR、DDIMD、GQMID、KT、DDYLD 分别以红色、绿色、黄色、紫色及橘色表示

The five motif GKLNR, DDIMD, GQMID, KT, DDYLD were colored red, green, yellow, purple and orange, respectively

图 4 茅苍术 AIFPPS 蛋白三级结构预测

Fig. 4 Three-dimensional structure of FPPS from *A. lancea*



图中数字代表置信度，数值越高代表可信度越高

The figure represents the confidence level, the higher value represents the higher credibility

图 5 19 种植物的 FPPS 氨基酸序列进化分析

Fig. 5 Phylogenetic tree of amino acid sequences of FPPS from 19 species

3.5 不同生长期 AIFPPS mRNA 表达分析

利用 qRT-PCR 检测 AIFPPS 在茅苍术不同生长阶段根茎中的相对表达量(图 6)。结果显示 AIFPPS 在茅苍术生长各阶段均有表达,以 3 月的苍术根茎 AIFPPS 为校正样本, AIFPPS 表达量总体呈上升趋势,九月份略有下降,11 月份达到最高,后下降。

3.6 不同生长期茅苍术活性成分测定

GC-MS 检测茅苍术不同生长时期根茎中苍术酮、茅术醇、 β -桉叶醇的量(图 7),结果显示 3 种倍半萜成分的量总体呈上升趋势,9 月份略有下降。其变化趋势与 AIFPPS 的表达量变化较为一致。

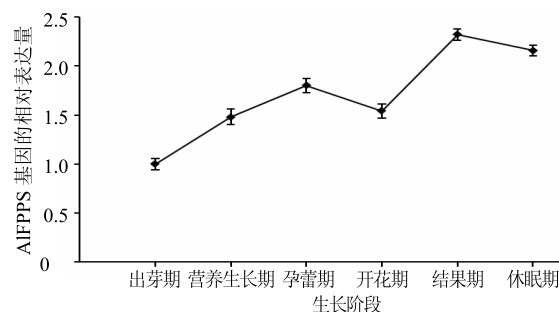


图 6 不同生长期 AIFPPS mRNA 表达分析

Fig. 6 mRNA expression of AIFPPS during different growing phases of *A. lancea* Rhizomes

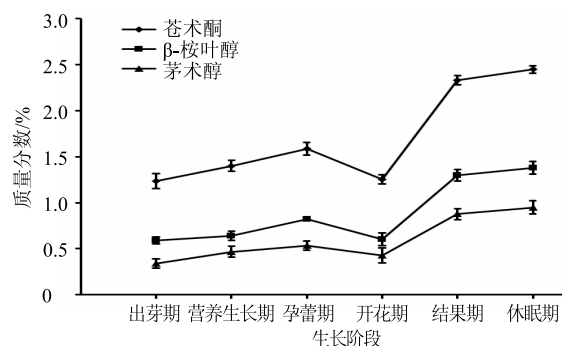


图 7 不同生长期茅苍术活性成分测定

Fig. 7 Content of active ingredients at different growing phases in *A. lancea*

3.7 相关性分析

使用 SPSS 18.0 统计软件对茅苍术根茎中的苍术酮、茅术醇及 β -桉叶醇的量与 AIFPPS 基因表达量进行相关性分析, Pearson 相关系数分别为 0.903 ($P < 0.05$)、0.901 ($P < 0.05$) 及 0.927 ($P < 0.01$), 表明 AIFPPS 基因表达量与茅苍术主要倍半萜成分量呈显著正相关。

4 讨论

法尼基焦磷酸酶是萜类 MVA 生物合成途径中的一个重要调节酶,在植物体内催化合成法尼基焦磷酸,为倍半萜化合物合成提供前体物质^[14]。

AIFPPS 氨基酸序列具有典型的该类酶所含保守功能域,其中 2 个富含 DDXXD,被认为是酶与底物结合的位点,代表这一类酶的活性中心^[15]。AIFPPS 跨膜区及亚细胞定位显示其无跨膜结构,主要存在于细胞质中,与植物 FPPS 不存在跨膜结构域的观点相一致。通过植物相关氨基酸序列的系统进化分析,茅苍术与菊科植物亲缘关系较近,体现了其在分子系统演化关系中所处的位置,也为植物分类学提供了佐证,为进一步认识植物基因功能提

供依据。

qRT-PCR 分析表明 AIFPPS 在不同生长时期茅苍术的根茎中均有表达, 其中 9 月份表达量较低, 与倍半萜类成分测定结果趋势较为一致, 这可能是由于 9 月份为茅苍术盛花期, 养分大部分输送给花果, 导致根茎因养分供应不足或部分养分转运至花果而出现表达量下降的现象。AIFPPS 表达量与倍半萜类成分量呈显著正相关, 进一步说明了 AIFPPS 是茅苍术 MVA 生物合成途径中的重要调控位点, AIFPPS 基因表达量与倍半萜类成分量在 12 月上旬的量均较高, 与传统的采收期一致, 也为最佳采收期的确定提供分子水平的科学依据。

利用 FPPS 基因过量表达可以有效提高活性成分的产量, 对改善药材品质具有重要作用。有研究表明, 过量表达青蒿的 FPPS 基因可以使转基因青蒿株系中的青蒿素量有一定的提高, 在人参发根中过量表达 FPPS 可以提高人参总皂苷的量^[16-17]。本实验首次克隆获得 AIFPPS 基因的全长 cDNA, 初步证明 AIFPPS 是茅苍术倍半萜类成分生物合成途径中的重要调控位点, 为茅苍术倍半萜类成分生物合成途径阐明与生物工程应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 邵 婧, 谷 巍, 巢建国, 等. 基于 ITS2 序列的茅苍术及其近缘种 DNA 分子鉴定 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1209-1215.
- [2] 李 琳, 谷 巍, 巢建国, 等. 濒危药用植物茅苍术花粉形态、活力测定及贮存研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 35-38.
- [3] Ahmed S, Zhan C, Yang Y, et al. The transcript profile of a traditional Chinese medicine, *Atractylodes lancea*, revealing its sesquiterpenoid biosynthesis of the major active components [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): 1-19.
- [4] 王凌健, 方 欣, 杨长青, 等. 植物萜类次生代谢及其调控 [J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(12): 1030-1046.
- [5] 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.
- [6] Vranová E, Coman D, Grussem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 665-700.
- [7] Zhao Y J, Chen X, Zhang M, et al. Molecular cloning and characterisation of farnesyl pyrophosphate synthase from *Tripterygium wilfordii* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125415.
- [8] Su S S, Zhang H M, Liu X Y, et al. Cloning and characterization of a farnesyl pyrophosphate synthase from *Matricaria recutita* L. and its upregulation by methyl jasmonate [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(1): 349-361.
- [9] Ferriols V M, Yaginuma R, Adachi M, et al. Cloning and characterization of farnesyl pyrophosphate synthase from the highly branched isoprenoid producing diatom *Rhizosolenia setigera* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10246.
- [10] 王 峰, 吴秋红, 高 辉, 等. 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 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2294-2299.
- [11] 徐 杰, 高水平, 史国安, 等. 芍药 FPPS 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 655-660.
- [12] Wang J R, Li Y Y, Liu D N. Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase gene involved in triterpenoids biosynthesis from *Poria cocos* [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 22188-22202.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [14] Guo L, Kong J Q. cDNA cloning and expression analysis of farnesyl pyrophosphate synthase from *Ornithogalum saundersiae* [J]. *Z Naturforsch C*, 2014, 69(5/6): 259-270.
- [15] 谷 巍, 吴启南, 巢建国, 等. 建泽泻法呢基焦磷酸合酶分子克隆、分布表达及生物信息学研究 [J]. 药学报, 2011, 46(5): 605-612.
- [16] Kim Y K, Kim Y B, Uddin M R, et al. Enhanced triterpene accumulation in *Panax ginseng* hairy roots overexpressing mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase and farnesyl pyrophosphate synthase [J]. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(10): 773-779.
- [17] Wang Y Y, Jing F Y, Yu S Y, et al. Co-overexpression of the HMGR and FPS genes enhances artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(15): 3396-3403.