

图6 抗性植株
Fig. 6 Antiplantlet

References:

- [1] Qiu L, Qu L J, Yu H, *et al.* Advances in studies on *Erigeron breviscapus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 141-144.
- [2] Qiu L, Qu L J. The study of tissue culture system on *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. in genetic trans-

- formation [J]. *J Chuzhong Norm Univ* (楚雄师范学院学报), 2004, 78(3): 91-96.
- [3] Gu H Y, Qu L J, Ming X T, *et al.* *Plant Genes and Molecular Manipulations* (植物基因与分子操作) [M]. Beijing: The Publishing Company of Peking University, 1995.
- [4] Qin X M, Ye Y, Yu L. Factors affecting microprojectile bombardment-mediated transformation of sugarcane [J]. *Guhaia* (广西植物), 2003, 23(4): 339-342.
- [5] Liu W H, Li W X, Hu S L, *et al.* Study on influencing factors of tissue culture and biolistic bombardment in wheat [J]. *Acta Bot Boreal Occident Sin* (西北植物学报), 2002, 22(3): 602-610.
- [6] Zhi P R. *Plant Tissue Culture* (植物组织培养) [M]. Guangzhou: Publishing Company of Higher Education in Guangdong, 2003.
- [7] Ma Z H, Zhang Y F, Xu C X, *et al.* Tissue culture and genetic transformation of kentucky bluegrass via microprojectile bombardment [J]. *J Fudan Univ* (复旦大学学报), 1999, 38(5): 541-544.

三七法呢基焦磷酸合酶的基因克隆及序列分析

陈 莉, 蓝秀万, 李 坤, 朱 华, 吴耀生*

(广西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 对三七法呢基焦磷酸合酶(FPS)进行基因克隆及序列分析。方法 采用cDNA末端快速扩增法,以三七根总RNA为模板扩增出三七FPS基因。结果 序列分析表明,所克隆的cDNA序列全长1 409 bp,开放阅读框共编码343个氨基酸残基,推测的氨基酸序列与积雪草、灰白银胶菊、黄花蒿的FPS的氨基酸序列同源性最高,分别达95%、87%、86%。结论 首次分离并报道了三七FPS cDNA克隆,为进一步研究三萜皂苷生物合成机制及其在提高植物药用价值方面的应用奠定基础。

关键词:三七;法呢基焦磷酸合酶;cDNA末端快速扩增法

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)07-1080-04

Genetic cloning and sequence analysis of farnesyl pyrophosphate synthase in *Panax notoginseng*

CHEN Li, LAN Xiu-wan, LI Shen, ZHU Hua, WU Yao-sheng

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To clone and sequence the cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) from *Panax notoginseng*. **Methods** The cDNA, encoding FPS in *P. notoginseng*, was amplified by RACE strategy with the total RNA of root as the template. The fragment of FPS was cloned and sequenced. **Results** The analysis results revealed that the full-length cDNA had 1 409 bp with an open reading frame encoding 343 amino acids of protein. The FPS sequence had 95%, 87%, and 86% amino acid sequence homology to the FPS sequence of *Centella asiatica*, *Parthenium argentatum*, and *Artemisia annua*, respectively. **Conclusion** The cDNA encoding FPS from *P. notoginseng* is cloned and reported.

收稿日期:2005-09-28

基金项目:广西科学基金(桂科基 0342003-3)

作者简介:陈 莉(1979-),女(壮族),广西柳州人,在读硕士,从事植物基因工程研究。

Tel:(0771)5358817 E-mail:flowerhua_623@163.com

* 通讯作者 吴耀生 Tel:(0771)5358817 E-mail:wuyaozheng03@sina.com

This works provide a foundation for exploring the mechanism of saponins biosynthesis and application to the other medical plants.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; farnesyl pyrophosphate synthase (FPS); RACE

法呢基焦磷酸合酶(farnesyl pyrophosphate synthase, FPS, EC 2.5.1.10)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)^[1]。FPP 是植物体内甾体、皂苷、倍半萜、橡胶等许多萜类衍生物物质的合成前体,这些物质在植物的生长发育或抗病过程中具有重要作用^[2]。目前,已从拟南芥、玉米、银胶菊、辣椒和棉花等 10 余种植物中克隆出编码 FPS 的基因,使植物内萜类物质代谢调控机制和植物抗病机制研究深入到分子水平。

三七 *Panax pseudoginseng* var. *notoginseng* (Burk.) Hoo et Tseng 是一味具有止血、散瘀、消肿、定痛作用的传统中药,临床上主要应用于治疗吐血、咳血、衄血、便血、血痢、产后血晕、恶露不下、跌打瘀血、外伤出血、痈肿疼痛。其有效成分主要为三萜皂苷。本研究通过 RACE 这种以 PCR 为基础快速分离包含 3' 和 5' 末端的全长 cDNA 的方法,在无需构建 cDNA 文库的条件下,扩增获得了三七法呢基焦磷酸合酶基因全长 cDNA,并进行了序列分析和比较。对从分子水平上探讨三七皂苷生物合成机制具有重要意义,并为下一步法呢基焦磷酸合酶基因在植物中的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料:三七采自广西靖西县,为三七专业种植户所种植。采集 3~5 年生的三七,分离根,以约 5 g 为单位分装,迅速冻存于液氮中。

1.2 试剂:3'-Full RACE Core Set, pMD 18-T vector、末端脱氧核糖核酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TDT)、dATP 购自宝生物工程有限公司,柱式胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,其他试剂均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。*E. coli* XL1 blue 由广西大学惠赠。

1.3 方法

1.3.1 三七根 RNA 的提取:参照王关林等^[3]的方法加以改进后建立的异硫氰酸胍一步法。①称取 2.5 g 组织和 100 mg PVP 放于研钵中,加液氮研磨成粉末,转移至离心管。②加 15 mL 异硫氰酸胍提取缓冲液[4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 柠檬酸钠(pH

7.0), 0.5% 十二烷基肌氨酸钠,用前加 β -巯基乙醇至终体积分数为 2%],震荡离心管混合均匀。③依次加入 2 mol/L 醋酸钠(pH 4.0)1.5 mL、酚 15 mL 和氯仿-异戊醇(24:1)3 mL,旋涡震荡 3 min,冰浴 15 min。4 °C 下 15 000×g 离心 30 min,将上层水相转移至另一离心管。④加入等体积氯仿,重复抽提一次。⑤加 1/3 体积 5 mol/L KAc,混匀,冰浴 15 min, 13 000×g 离心 15 min,取上清。⑥加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)和等体积的异丙醇,混匀,短暂离心,挑去管底沉淀。置-20 °C 冰箱冷冻 30 min。4 °C 下 13 000×g 离心 30 min,去上清。⑦沉淀溶于 5 mL 异硫氰酸胍提取缓冲液,加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)和等体积的异丙醇,混匀后置-20 °C 冰箱冷冻 30 min~1 h。4 °C 下 13 000×g 离心 30 min。⑧沉淀用 70% 乙醇洗两遍,控干。⑨用适量 DE-PC 水溶解沉淀,-70 °C 保存。

1.3.2 3'RACE 扩增:根据基因库中已报道的已知植物 FPS 基因保守区域分析结果,运用专业引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 5' 端引物:5' GGA CTA CAA TGT GCC TGG AGG 3', 3 端引物为由 3'-Full RACE Core Set 提供的 Oligod T-3' site adaptor primer (Oligod T-CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC C),按 3'-Full RACE Core Set 介绍的方法进行 cDNA 第 1 条链合成和 PCR 扩增。用 AMV Reverse Transcriptase XL, 50 °C, 30 min 合成 cDNA 第 1 链,然后进行 PCR 扩增。反应条件:预变性 94 °C、5 min;变性 94 °C、1 min;退火 59 °C、1 min,延伸 72 °C、1.5 min。35 个循环结束后 72 °C 延伸 10 min,取 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳。

1.3.3 克隆与测序:PCR 产物从胶上回收后,克隆入 pMD 18-T vector,构建重组质粒,操作方法按 pMD 18-T vector 重组操作说明书(宝生物工程有限公司提供)进行。将重组质粒转化感受态 *E. coli* XL1 blue,通过蓝白斑、Sal I/Xba I 双酶切电泳及 PCR 筛选重组子。抽提质粒 DNA,送至上海鼎安生物科技有限公司测序。

1.3.4 5'RACE 及其引物设计:根据 3'RACE 测序结果,采用专业引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计基因特异性引物。其中 RT 引物为反转录引物; S1 和 S2 分别作为第 1 轮和第 2 轮 PCR 的下游引

物。互补的含同聚尾的锚定引物和相应的接头引物由 3'-Full RACE Core Set 提供。RT 引物: 5'TAT ATC TTT CCC AAG AAT 3'; S1: 5'TGG GAT ATG GTT GCG AAG 3'; S2: 5'ATC ATC AAG CAC CAG AAA 3'。按下列方法进行 cDNA 第 1 条链合成和 PCR 扩增。按 Fermentas RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit 使用说明, 以 RT 引物作为特异性反转录引物, 进行反转录反应, 合成 cDNA 第 1 链。用 RNase H 30 ℃ 反应 1 h 降解 mRNA-cDNA 杂化双链中的 mRNA, 然后通过柱式胶回收试剂盒纯化第一链 cDNA, 利用 TDT 在单链 cDNA 的 3'-末端加入同聚 A 尾, 作为 PCR 扩增模板。第 1 轮 PCR 反应条件为: 预变性 94 ℃、3 min; 变性 94 ℃、30 s; 退火 50.8 ℃、30 s, 延伸 72 ℃、45 s。35 个循环结束后 72 ℃ 延伸 10 min。取第 1 轮 PCR 产物作为模板, 进行第 2 轮巢式 PCR。第 2 轮 PCR 反应条件为: 预变性 94 ℃、4 min; 变性 94 ℃、30 s, 退火 52.8 ℃、30 s, 延伸 72 ℃、45 s。35 个循环结束后 72 ℃ 延伸 10 min, 取 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳。

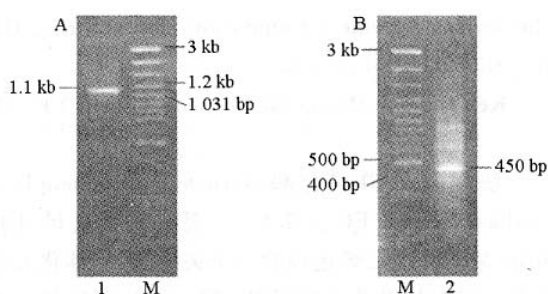
1.3.5 克隆与测序: PCR 产物从凝胶上回收后, 克隆入 pMD 18-T vector, 构建重组质粒, 操作方法按说明书进行。将重组质粒转化感受态 *E. coli* XL1 blue, 通过蓝白斑、*Sal* I / *Xba* I 双酶切电泳及 PCR 筛选重组子。抽提质粒 DNA, 送至上海鼎安生物科技有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 3'RACE 和 5'RACE: 3'RACE 和 5'RACE 结果如图 1 所示, 3'RACE 得到约 1.1 kb 的单一带。5'RACE 经过两轮巢式 PCR 扩增出约 450 bp 的片段, 与引物设计位置基本一致。

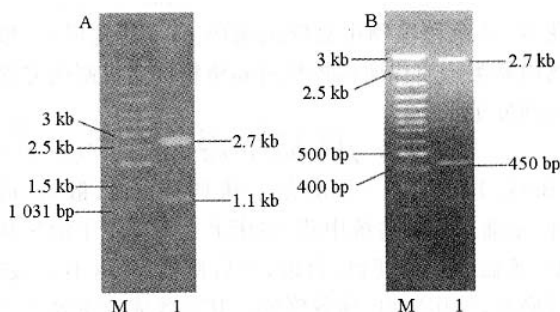
2.2 PCR 产物的克隆与测序: 分别将 PCR 产物从胶上回收后插入 pMD 18-T vector 上, 转化到感受态 *E. coli* XL1 blue 内, 分别挑取两个白斑, 提取质粒 DNA 后经 *Sal* I / *Xba* I 双酶切及 PCR 鉴定, 分别见有约 1.1 kb 和 450 bp 的插入片段(电泳图见图 2)。取两种质粒进行测序, 克隆的基因片段分别为 1 177 bp 和 445 bp。结果证明已分别将 3'RACE 所得的 1.1 kb 片段, 5'RACE 所得的 445 bp 片段成功克隆进入 pMD 18-T vector 上。

2.3 序列分析: 应用 Vector NTI Suite 6 软件对两条序列测序结果进行拼接, 获得的三七 FPS 基因全长为 1 409 bp, 核酸序列及推测的氨基酸序列见图 3。翻译起始位点为 130 碱基处, polyA 信号位于



1-3'RACE M-DNA Marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus) 2-5'RACE

图 1 FPS 3'RACE(A)和 5'RACE(B)琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of FPS fragment amplified by 3'RACE (A) and 5'RACE (B)



A-M: Marker 1-3'RACE 重组质粒经 *Sal* I / *Xba* I 酶切结果
B-M: Marker 1-5'RACE 重组质粒经 *Sal* I / *Xba* I 酶切结果
A-M: NDA Marker (1 kb DNA Ladder) 1-recombinant plasmid with 3'RACE digested by *Sal* I / *Xba* I
B-M: NDA Marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus) 1-recombinant plasmid with 5'RACE digested by *Sal* I / *Xba* I

图 2 3'RACE(A)和 5'RACE(B)产物重组质粒酶切鉴定图

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid with 3'RACE (A) and 5'RACE (B)

1 396 bp, 开放阅读框共编码 343 个氨基酸。本实验所克隆的基因序列已提交至 GenBank, 序列号为 DQ059550。使用 NCBI Blast 查询, 发现三七 FPS 基因的氨基酸序列与积雪草、灰白银胶菊、黄花蒿的 FPS 氨基酸序列的同源性最高, 分别为 95%、87% 和 86%。核酸序列同源性分别为 81%、66% 和 68%。同时在 GenBank 中未查询到五加科植物的 FPS 基因, 因此笔者首次分离并报道三七 FPS cDNA 克隆。

以 IPP 为底物的酶, 包括异戊烯基转移酶和萜类合成酶等, 都具有 DDXXD 保守域。异戊烯基转移酶则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]^[4,5], 它们

1 GATACGCACCTCTCTACCTCTTTCTCTCTATCGGACCATTTTCTTCTA
52 TCAGAATCCTCATCTCACCGCTCTTTCTCCCTCAGGCACAAAAACACAGAC
103 AGAATCGCACACATAAACAGCCAGATGAGCGATCTGAAGACGAGATT
M S D L K T R F
154 CTGGAGGTGTACTCTGTCTGAAATCCGAGCTACTCAACGACCGCTGTTTC
L E V Y S V L K S E L L N D P A F
205 GAGTTCACCGATGATTCTCGCCAATGGGTCGAGCGGATGCTGGACTATAAT
E F T D D S R Q W V E R M L D Y N
256 GTGCTGGAGGAAAGCTGAACCGAGGCTGTCTGTTATTACAGCTACAAG
V P G G K L N R G L S V I D S Y K
307 TTAAGTAAAGGAAAGAACTAAGTGATGATGAAATTTTCTTTCAAGT
L L K E G K E L S D D E I F L S S
358 GCACCTGGTGGTCATTGAATGGCTTCAAGCTTATTTTCTGGTGCTTGAT
A L G W C I E W L Q A Y F L V L D
409 GATATTATGGATAGCTCTCATACGCCGAGAGGTCAACCGTCTGGTTCAGA
D I M D S S H T R R G Q P C W F R
460 TTACCTAAGGTGGTATGATGCGGTAATGATGGCATATTACTCGCAAC
L P K V G M I A V N D G I L L R N
511 CATATCCCAAGGATTCTCAAGAAGCATTTCCGACAAAAGCCTTACTATGTG
H I P R I L K K H F R Q K P Y Y V
562 GATCTGTTGGATCTATTTAATGAGGTAGAATCCAGACAGCTTGTGGACAG
D L L D L F N E V E F Q T A C G Q
613 ATGATAGATTGTACCAACCCCTGTAGGAGAGAAAGACTGTGCAAAATAC
M I D L I T T L V G E K D L S K Y
664 TCATTGCCATTATCGCCGAGTGTGCAGTACAAAAGCTTACTACTCA
S L P I H R R I V Q Y K T A Y Y S
715 TTTTACCTCCAGTGGCCTGTGCACTTCTTATGTACAGTGAAGATCTGGAG
F Y L P V A C A L L M S G E D L E
766 AAACATTACTAGATGTAAGAGCATACTTATTGAAATGGGAACCTATTTT
K H L L D V K D I L I E M G T Y F
817 CAAGTGCAGGATGATTATCTGGATTGCTTTGGTGCACCTGAGGTGATTGGA
Q V Q D D Y L D C F G A P E V I G
868 AAGATTGGACAGATATTGAAGATTCAAGTGTCTCTGGTGGTAGTAAAA
K I G T D I E D F K C S W L V V K
919 GCACCTGGAACCTTTCTAACGAGGAACAAAAGATTCTTACATGAGAACTAT
A L E L S N E E Q K K F L H E N Y
970 GGAAGGATGATCGGCCCTCTGTAGCAAAAGTGAAGAGCTTTATAACACT
G K D D P A S V A K V K E L Y N T
1021 CTCAGCTTCAGGATGTATTTCGCCAGTATGAGAGCAAGACTATGACAAG
L K L Q D V F A E Y E S K S Y D K
1072 TTGATCAAAATTCATTGAAGCTCATCGAGCCAAGCGGTACAAGCAGTGTTA
L I K F I E A H P S Q A V Q A V L
1123 AAATCATCTCTGGGAAAGATATATAAGCGGCAAAAGTAAGTAATTGCTCA
K S F L G K I Y K R Q K stop
1174 GCGCGAGTTAGGATTTCAGGAATTGGAATGAAGCCTTGCCCGGATATTC
1225 ATTGTAATGCTCCAAATGGAGGGGAAGTTGTGTCTGTATCTCATAAACAT
1276 TAGTTGCAATTACTGATTGTATTGGCAATTAAGATGTTGTACTGTAATAA
1327 ATAAATGAGACCTGTGTTTGTAGGAGCTTAAAGTATATTCAAAATAAT
1378 TTTGTTGATTATTGTTCCAAAAAATAA

图 3 FPS cDNA 序列及推测的氨基酸序列
Fig. 3 Nucleotide and deduced amino sequence
of cDNA encoding FPS

也存在于三七 FPS 基因推测肽链的 90~104 氨基酸残基[LVLDDIMDSSHTRRG]和 225~237 氨基酸残基[MGTYFQVQDDYLD]处。这两个富含天冬氨酸区域,可能代表这一类酶的活性中心^[4~6]。

3 讨论

对三七有效成分三七皂苷合成途径功能酶基因 FPS 的克隆研究,笔者采用了 RACE 技术。其中,5' RACE 是 RACE 技术的难点。采用 TDT 法进行 5' RACE,并对其进行了改良:首先,将 dATP 的终浓度由 0.5 mmol/L 改为 1 mmol/L;其次,在加入 TDT 之前,先 94 ℃变性 3 min,将可能存在的 DNA 双链变性成为单链 DNA;最后,延长反应时间,37 ℃保温过夜^[7]。经 PCR 产物测序,证实可经济有效地获得 5'末端未知序列。从而为 TDT 加尾法在 5'RACE 技术中的应用提供了实验证据。但由于 PCR 反应的复杂性,对于不同的 DNA 序列各种反应条件仍需作适当摸索方能达到最佳效果。

近年来,皂苷合成的分子机制及其调控已成为人参属植物研究的前沿和热点。利用 RACE 技术克隆了三七 FPS cDNA,这对进一步研究三七三萜皂苷生物合成途径及其代谢调控、FPS 基因的表达特征以及利用细胞或组织工程技术促进三七皂苷合成具有重要意义。

References:

- [1] 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.
- [2] Delourme D, Lacroute F. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for farnesyl diphosphate synthase by functional complementation in yeast [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26(6): 1867-1873.
- [3] Chen L, Zhu H, Li S, *et al.* The contrast test of methods of extracting total RNA from *Panax pseudoginseng* var. *notoginseng* [J]. *Lett Biotechnol* (生物技术通讯), 2005, 16(5): 528-530.
- [4] Marrero P F, Poulter C D, Edwards P A. Effect of site-directed mutagenesis of the highly conserved aspartate residues in domain I of farnesyl diphosphate synthase activity [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 21873-21878.
- [5] Chen A, Kroon P A, Poulter C D. Isoprenyl diphosphate synthase: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure [J]. *Protein Sci*, 1994, 3: 600-607.
- [6] Cane D E, Xue Q, Fitzsimmons B C. Trichodiene synthase. probing the role of the highly conserved aspartate-rich region by site-directed mutagenesis [J]. *Biochemistry*, 1996, 35 (38): 12369-12376.
- [7] Tang H, Chen S N, Yan B, *et al.* A method of cloning the 5'-end of cDNA [J]. *J Yunnan Univ: Nat Sci* (云南大学学报:自然科学版), 2001, 23(3): 238-240.