

狭叶松果菊 3-脱氢奎尼酸合成酶基因 cDNA 的克隆 及其组织表达特征

谢 峻^{1,2,3}, 谈 锋^{1,2,3*}, 冯 巍¹, 陈 斌¹, 苏 静¹

(1. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715; 2. 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;

3. 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715)

摘 要:目的 克隆狭叶松果菊 *Echinacea angustifolia* 3-脱氢奎尼酸合成酶基因并考察其在各个组织中的表达情况。方法 采用快速扩增 cDNA 末端技术, 以狭叶松果菊组培苗 cDNA 为模板, 克隆出狭叶松果菊 3-脱氢奎尼酸合成酶基因全长序列并通过半定量 RT-PCR 分析其在不同器官中的表达模式。结果 克隆到的基因 (命名为 *EanaroB*) 全长为 1 424 bp, 编码一个 442 个氨基酸残基组成的多肽。其氨基酸序列与植物来源的 3-脱氢奎尼酸合成酶同源性都在 80% 左右。将得到的序列提交 Genbank, 序列号为 EU293857。半定量 RT-PCR 结果表明, 狭叶松果菊 *EanaroB* 基因在狭叶松果菊的根、茎、叶、花中均有表达, 但花和叶中的表达量较高, 在根和茎中较少。结论 采用 RACE 和 PCR 的方法从狭叶松果菊中克隆出了咖啡酸类化合物生物合成途径上的一个基因 *EanaroB*, 为进一步研究咖啡酸类衍生物生物合成代谢途径提供一定依据, 为今后利用基因工程技术提高咖啡酸类衍生物, 包括苯乙醇苷类物质松果菊苷的代谢工程打下一定基础。

关键词:狭叶松果菊; 3-脱氢奎尼酸合成酶; 组织表达特征

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)12-1967-04

Cloning of 3-dehydroquinase synthase cDNA from *Echinacea angustifolia* and its tissue expression characteristics

XIE Jun^{1,2,3}, TAN Feng^{1,2,3*}, FENG Wei¹, CHEN Bin¹, SU Jing¹

(1. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing 400715, China; 3. Key Laboratory of Plant Ecology and Resources in Three Gorges Reservoir Region, Chongqing 400715, China)

Abstract: **Objective** To clone 3-dehydroquinase synthase cDNA from *Echinacea angustifolia* and investigate its tissue expression characteristics in various tissues. **Methods** By using homology cloning and RACE-PCR, the cDNA encoding 3-dehydroquinase synthase was amplified with cDNA library of cultured plantlets as the template. The specificity expression profile in different tissues including roots, stems, leaves, and flowers of *E. angustifolia* was investigated by semi-quantitative RT-PCR as well. **Results** The full length cDNA of 3-dehydroquinase synthase (named as *EanaroB*) had 1 424 bp with an open reading frame encoding 442 amino acids of protein and its *EanaroB* was around 80% homologous with the sequences of 3-dehydroquinase synthase from other plants. The sequence was reported to the GeneBank and coded as EU293857. The results of semi-quantitative RT-PCR indicated that the expression of *EanaroB* was detected in different tissues, while only the expression in leaves and flowers reached to a high level. **Conclusion** The cDNA encoding EU293857 from *E. angustifolia* is cloned and reported. This work underlays the first step for exploring the pathway of caffeic acid derivatives biosynthesis and improving the content of caffeic acid derivatives including phenylethanoid glycosides.

Key words: *Echinacea angustifolia* DC.; 3-dehydroquinase synthase; tissue expression characteristics

狭叶松果菊 *Echinacea angustifolia* DC. 也称狭叶紫锥菊, 是菊科 (Compositae) 紫菀族 (Aster family) 松果菊属 *Echinacea* L. 植物, 原产美洲, 其花茎挺拔, 花朵大, 花型奇特有趣, 花群高低错落, 观

赏价值较高, 不仅是一种作小庭院花境的良好材料^[1], 更是印地安人的传统草药, 现在已是国际市场需求量最大的植物药之一, 在美国市场, 其年销售额超过 3 亿美元^[2]。其所含的主要药理活性物质是咖

收稿日期: 2009-04-20

作者简介: 谢 峻 (1981—), 男, 安徽人, 生物化学与分子生物学博士研究生。Tel: (023) 68367091

* 通讯作者 谈 锋 Tel: (023) 68252698 Fax: (023) 68252365 E-mail: tanfeng@swu.edu.cn

啡酸衍生物,包括绿原酸(chlorogenic acid)、菊苣酸(cichoric acid)、洋蓟酸(cynarin)和松果菊苷(echinacoside)等,它们具有增强人体免疫力的功效。目前国内外对狭叶松果菊的研究主要集中在植物化学成分和药理作用方面^[3]。闫晓慧等^[4]利用发根农杆菌转化的方法建立了狭叶松果菊毛状根的遗传转化体系,但对其次生代谢产物的合成途径,尤其是代谢途径上关键酶、限速酶基因的克隆及功能研究尚未见报道。

植物中的咖啡酸衍生物均由莽草酸途径(shikimic acid pathway)实现生物合成,赤藓糖-4-磷酸(磷酸戊糖途径)与磷酸烯醇式丙酮酸(糖酵解途径)结合经中产物莽草酸、苯丙氨酸,再经苯丙烷类代谢途径(phenylpropanoid pathway)转化为咖啡酸。尤其是绿原酸,其生物合成途径已基本阐明^[5]。绿原酸是由咖啡酸(caffeic acid)与奎尼酸(quinic acid)组成的缩酚酸,化学名 3-O-咖啡酰奎尼酸(3-O-caffeoylquinic acid),分子式: $C_{16}H_{18}O_9$, 相对分子质量: 354.30, 是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙烷类化合物。3-脱氢奎尼酸合成酶(*aroB*)是莽草酸途径中的第 2 个关键酶,其催化 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸合成绿原酸的前体物质 3-脱氢奎尼酸,3-脱氢奎尼酸一方面既参与合成绿原酸的前体物质奎尼酸,另一方面又参与合成绿原酸的前体物质咖啡酸。

本研究利用 RT-PCR 及 RACE 技术,通过克隆 3-脱氢奎尼酸合成酶基因(*EanaroB*),对其进行序列分析,并对其组织表达特征进行了研究。一方面为利用基因工程改造松果菊奠定基础,另一方面,为研究松果菊中咖啡酸衍生物,特别是松果菊苷的代谢工程打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料:松果菊取自于重庆西南大学植物园,于 2008 年 4 月采其根、茎、叶、花贮藏于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 松果菊总 RNA 的提取:取 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存的松果菊组培苗、根、茎、叶、花,按 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂盒提取总 RNA,用无 RNase 的 DNase I (天根公司)除去 RNA 中的痕量 DNA,于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.2 *EanaroB* 核心片段的克隆:*EanaroB* 核心片段所用引物根据从番茄^[6]和拟南芥中克隆的 3-脱氢奎尼酸合成酶基因的 cDNA 序列的保守区域

设计而成。序列为:*EanaroBs*:5'-CACTGTTATG-GCACAGGT(A/T)GATTC-3' 和 *EanaroBas*:5'-CA(C/A)(T/G)CCGCTTTC(C/T)TTCTCATC-3',RT-PCR 按照 TaKaRa RNA PCR Kit 操作,PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,接下来 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,48 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,共 28 个循环,最后再总延伸 10 min。PCR 产物纯化按照天根公司的 PCR 产物纯化试剂盒操作,将回收产物与 pMD18-T (TaKaRa) 连接亚克隆进 DH5 α 中,进行蓝白斑筛选,挑取白斑进行菌落 PCR 检测,阳性克隆送至上海英骏公司测序。

1.2.3 *EanaroB* 基因 5'端,3'端序列以及全长的克隆:根据核心片段扩增产物的测序结果,在其序列内部设计基因特异引物 *aroB5GSP1*:5'-CAACTTCAGCTTTGTTTTACACGAACG-3' 和 *aroB5-NGSP*:5'-AAGCTTGCATGTTCTTTTCTTGC-CACTC-3';*aroB3GSP*:5'-CTTTCTACCAGCCA-CAATGTGTGCTCATAG-3' 和 *aroB3NGSP*:5'-CACCGACACATTAAACACATTACCCGATAG-3'。RACE-PCR 扩增按照 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)的说明书进行。RACE 产物的纯化、克隆及测序按上述步骤操作。5' RACE、3' RACE 和核心片段进行多重比对(Vector NTI Suite 8.0)获得拼接全长 cDNA,根据拼接序列设计全长特异性引物:*aroBFLF*:5'-GAGCTCATGGCGTCGTCTTTCTGTC-3';*aroB-FLR5'*-TCTAGAAGATTTGCAAAACGCGTGC-AG-3',PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,接下来 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,共 30 个循环,最后再总延伸 10 min,克隆方法按上述步骤操作。

1.2.4 组织差异表达分析:取 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存的狭叶松果菊根、茎、叶、花,按上述方法提取总 RNA,以松果菊根、茎、叶、花 RNA 为材料,利用管家基因 18S RNA,18SF:5'-ATGATAACTC-GACGGATCGC-3' 和 18SR:5'-CTTGGATGTG-GTAGCCGTTT-3'为内参,采用半定量 one-step RT-PCR (TaKaRa) 研究 *EanaroB* 在不同组织中的表达情况,引物 *EanaroBF*:5'-GACTGGTATG-GCACCAGGTGGATTC-3',*EanaroBR*:5'-TA-ATCCACTTTCTTTCTCATC-3'。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min。以凝胶定量分析软件 BandsCan Version 4.50 对电泳图进行条带密度扫描,分别获得不同组织 *EanaroB*

基因和 18S RNA 基因的条带密度值,以 $C_{EanaroB}$ 和 $C_{18S RNA}$ 表示,则 $EanaroB$ 基因的相对表达量 $IOD = C_{EanaroB} / C_{18S RNA}$ 。

2 结果与分析

2.1 狭叶松果菊 $EanaroB$ 基因的序列分析:凝胶电泳分别得到核心片段 3'端和 5'端,对其测序的结果表明,5'端为 905 bp,3'端序列为 640 bp,Blast 同源检索后推断所得片段即为目的基因末端序列。见图 1。

根据拼接序列设计全长特异性引物最终获得全长 1 424 bp 的狭叶松果菊 $aroB$ 基因,命名为 $EanaroB$,Genebank 登录号为 EU293857,利用 NCBI 提供的 ORF Finder 进行分析发现,该 cDNA 全长包含有一个 1 326 bp 的开放读码框,用 Protparam 预测 $EanaroB$ 编码蛋白的理化性质,推测该蛋白的分子式为 $C_{2164} H_{3449} N_{597} O_{636} S_{20}$,相对分子质量为 1

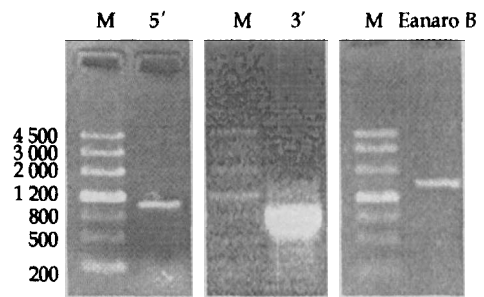


图 1 狭叶松果菊 $EanaroB$ 基因 RACE 扩增电泳图及全长 RT-PCR

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis analysis of $EanaroB$ RACE and full length RT-PCR in $E. angustifolia$

48 647.0,等电点 pI 8.74,稳定参数为 37.55,属稳定蛋白。该基因相应的氨基酸残基数为 442,所含氨基酸组成中 Leu 最多,占 10.4%。见图 2。

利用 Clustal X 1.83 软件对来自植物的不同物

gaactcccaaacggaagggctccaccagactctccactaccattcc

```
50 ATGGCGTGTCTTTCTGCCCCGAAACAGGCTTTGTCTTTTACCAATTGACCCACCAACTCCACCAATCCAGAGCAATTCGCGTGCACATA
M A S S F C P K Q A L S F T N S T H Q L H Q S R A I P R D I
140 CACGTTTCGTTTCCCTGCTCCCATCAGTTACCTTCTTCTAGGTGTGGGCTGAAGTCGAAAGCCACCACACGATTGAAGGTGTTGGCAACT
H V R F P A P I S S P S S R C G L K S K A T T R L K V L A T
230 TCTGCCACGAAGGTGATGGATCAGTCCAGTAAAGCGAGTTCACAGGCTCCTGCTGTTGTTGATGTGGATTAGGTGATCGGAGTTAT
S A T K V M D H S S S K A S S Q A P A V V D V D L G D R S Y
320 CCGATTATATCGGATCTGGTTTACTTGATCAACCGGATCTGTTACAGAGACATATTCATGGGAAGAGAGTCTTGTGGTCACTAACACC
P I Y I G S G L L D Q P D L L Q R H I H G K R V L V V T N T
410 ACAGTGGCACCTCTATCTTGGATAAAGTTGTAAGTGCTTTGACAGTTGGAAACCTAACGTTACAGTTGAAAGTGTGATTCTACCTGAT
T V A P L Y L D K V V S A L T V G N P N V T V E S V I L P D
500 GCGGAAAAGTACAAGGACATGGACACTCTAATGAAATACTTTGACAAAGCCATAGAGTCTCGATTGGACAGACGGTGTACATTTGTTGCC
G E K Y K D M D T L M K Y F D K A I E S R L D R R C T F V A
590 CTAGGTGGCGGTGTCATTGGTGACATGTCGGGATATGACAGGCTTCTTCTCCGTGGAGTAAATTCATCAAATTCCTACGACTGGTA
L G G G V I G D M C G Y A A A S F L R G V N F I K F L R L V
680 TGGCACACGGTGGATCTTCTGTTGGGGGAAAACGGGAATAAATCACCGATTGGGGAAGAACTTAATTGGTGCTTTCTACAGCCACAA
W H Q V D S S V G G K T G I N H R L G K N L I G A F Y Q P Q
770 TGTGTGCTCATAGACACCGACACATTAACACATTACCGATAGAGAATTATCTGGGGTTGCTGAGGTATCAAGTATGGCTTATT
C V L I D T D T L N T L P D R E L Y S G L A E V I K Y G L I
860 AGAGATGCTCCGTTTTCGAGTGGCAAGAAAAGAACATGCAAGCTTTATTGGCCAGGGACCTGAGGCTTTCACATATGCTATCAAGCGT
R D A P F F E W Q E K N M Q A L L A R D P E A F T Y A I K R
950 TCGTGTGAAAACAAAGCTGAAGTTGTATCCCAAGATGAGAAAAGTGGATTACGGGCGACACTAAACCTGGGTCATACATTTGGTAT
S C E N K A E V V S Q D E K E S G L R A T L N L G H T F G H
1040 GCATAGAAACTAGCTATGCTTACGGACATTGGCTTCATGGAGAAGCAGTTGCAGCTGGCACGGTAATGGCGGTGACATGTCATACCTG
A I E T S Y G Y G H W L H G E A V A A G T V M A V D M S Y R
1130 CTCGGTTGGATCGACAAATCCATCGTCGAACGAGTTAGCAACATCTTAAACAAGCCAAGCTGCCTACTACTCTCCAGAGATGATGACT
L G W I D K S I V E R V S N I L K Q A K L P T T P P E M M T
1220 GTAGACATGTTTACATCCGTCATGGCGGTGATAAAAAGGTGGCTGATGGGTTACTAAGACTCATCTCTTAAAGGTCCACTCGGAAGC
V D M F R S V M A V D K K V A D G L L R L I L L K G P L G S
1310 TGTGCTTCACCGGAGACTATGACCGAAAGGCTTGTGATGAACCCCTGCACGCGTTTTCGAAATCTTGAGcagaggtatagttctctatc
C V F T G D Y D R K A L D E T L H A F C K S *
1400 ggtaatgtgutaatgtgicgggtg
```

图 2 $EanaroB$ cDNA 全长推定的氨基酸序列,终止密码由 * 表示

Fig. 2 Deduced amino acid sequence of cDNA full length encoding $EanaroB$ gene, * denotes termination codon

种的 *aroB* 在蛋白质水平上进行多序列比对及同源性分析发现, *EanaroB* 编码的氨基酸序列与番茄、葡萄、拟南芥、山毛榉和绿脓杆菌的 *aroB* 同源性分别在 88%、74%、74%、73%、48%。将推测的氨基酸序列提交 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 分析发现, 其 94 位到 405 位含有一个典型的能够催化 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸生成 3-脱氢奎尼酸的脱氢奎尼酸结构域, 该结构域利用 NAD^+ 和 Zn^{2+} 作为辅因子先将 NAD^+ 还原为 NADH , 随后又在 3-脱氢奎尼酸从活性催化位点脱离之前将 NADH 氧化为 NAD^+ 。用 MEGA 3.0 构建系统进化树 (图 3), 结果显示 *aroB* 有共同的祖先, 但随后系统进化树明显分为两支: 一支为细菌类, 另一支为植物类。证明细菌和植物中 *aroB* 差异比较大。

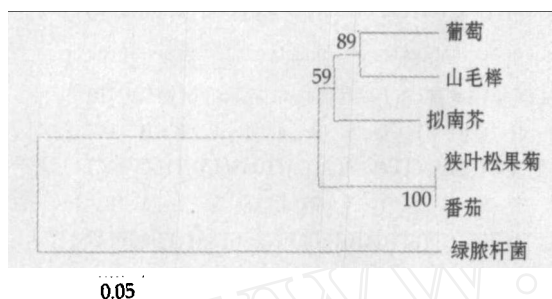


图 3 *EanaroB* 基因氨基酸序列进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of deduced amino acid sequence of *EanaroB* genes

2.2 狭叶松果菊 *EanaroB* 基因在不同器官中的表达: 分别提取根、茎、叶、花的 RNA 进行半定量 RT-PCR, 分析在不同器官中的表达模式, 结果表明, 狭叶松果菊 *EanaroB* 基因在狭叶松果菊的根、茎、叶、花中均有表达, 但花和叶中的表达量稍高。用 BandScan 凝胶分析软件测出每组各条带的完整吸光度值 (A), *EanaroB* 条带的吸光度值与 18S RNA 的吸光度值之比作为 *EanaroB* 的相对表达量, 在根中 *EanaroB* 基因的相对表达量根为 1.00, 茎为 1.03, 叶为 1.88, 花为 2.87, 表达水平高低依次为: 花 > 叶 > 茎 > 根。见图 4。

3 讨论

林源等^[7]对狭叶松果菊样品中酚类化合物进行了测定, 其中绿原酸在根、茎、叶中的量都不高, 却在花中检测到 2.66 mg/g; 而本研究中 *EanaroB* 基因在不同器官中表达结果表明 *EanaroB* 基因在花中的表达丰度最高, 叶中次之, 根和茎中较少, 这说明

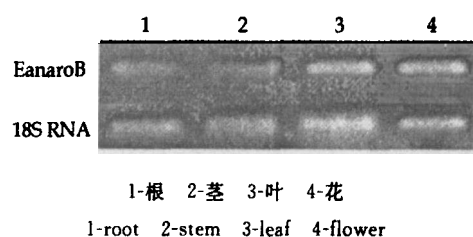


图 4 *EanaroB* 在狭叶松果菊不同器官中的表达
Fig. 4 RT-PCR Analysis of *EanaroB* expression in different tissues of *E. angustifolia*

EanaroB 基因的表达与绿原酸的合成存在一定联系, 推测在根、茎中 3-脱氢奎尼酸的积累量可能限制了奎尼酸的生物合成, 因而进入绿原酸生物合成的前体物质减少。但是, 绿原酸的合成取决于奎尼酸和咖啡酸的共同作用, 而咖啡酸的合成又是经过莽草酸途径, 再经苯丙烷类代谢途径一个复杂的代谢网络。此外, 狭叶松果菊中咖啡酸类衍生物的积累量和涉及咖啡酸类衍生物的生物合成代谢途径中的酶的表达量受其产地、生长条件、采收期以及生长年限的不同等诸多因素的影响, 所以绿原酸的产量是一个由内外因子综合影响的复杂过程。本研究采用 RACE 和 PCR 法从狭叶松果菊中克隆出咖啡酸类化合物生物合成途径上的一个基因 *EanaroB*, 为进一步研究咖啡酸类衍生物生物合成代谢途径提供一定依据, 为今后利用基因工程技术提高咖啡酸类衍生物, 包括苯乙醇苷类物质松果菊苷的代谢工程打下一定基础。

参考文献:

- [1] 刘进生. 优良观赏花卉松果菊的栽培技术 [J]. 中国林副特产, 2004, 68: 27.
- [2] Wang H M, To K Y. Agrobacterium-mediated transformation in the high-value medicinal plant *Echinacea purpurea* [J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 1087-1096.
- [3] 闫晓慧, 谈 锋. 3 种松果菊属植物的鉴别、活性成分及生物技术研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 300-303.
- [4] 闫晓慧. 狭叶松果菊组织培养、毛状根诱导及其松果菊苷和绿原酸积累的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [5] Stockigt J, Zenk M H. Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme and quinic acid [J]. *FEBS Lett*, 1974, 42(2): 131-134.
- [6] Bischoff M, Rosler J, Raesecke H R, et al. Cloning of a cDNA encoding a 3-dehydroquinate synthase from a higher plant, and analysis of the organ-specific and elicitor-induced expression of the corresponding gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31(1): 69-76.
- [7] 林 源, 刘仲义. HPLC 法同时测定松果菊属中 4 种酚类化合物 [J]. 化学研究与应用, 2006, 18(6): 749-752.