

4.4 种间、产地间及不同采收期生物活性比较: 罗文等^[2]为有效控制山楂(果实)药材质量,建立了10批山楂药材的HPLC指纹图谱。在本实验中,比较不同山楂叶效价指纹峰的总效价值,可以更客观地反映中药的质量。如表3所示,山楂叶、山里红叶、野山楂叶、单叶山楂叶和云南山楂叶的总效价值分析为18.29、14.50、69.92、14.92和19.05。说明其抗O₂^{·-}活性大小为:野山楂叶>云南山楂叶>山楂叶>单叶山楂叶≈山里红叶,结果与实验测得结果一致。

参考文献:

- [1] Rigelsky J M, Sweet B V. Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2002, 59(5): 417-422
- [2] Beier A, Konigstein R P, Samec V. Clinical experiences with a crataegus pentaerythrityl-tetranitrate combination drug in heart diseases due to coronary sclerosis in old age [J]. *Wien Med Wochenschr*, 1974, 124(24): 378-381
- [3] Taskov M. On the coronary and cardiogenic action of crataegon [J]. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*, 1977, 3(4): 53-57
- [4] 杨宇杰, 林静, 王春民, 等. 山楂叶总黄酮对大鼠高血脂症早期干预的实验研究[J]. *中草药*, 2008, 39(12): 1848-1850
- [5] Granger D N, Hollowath M E, Parks D A. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals [J]. *Acta Physiol Scand*, 1986, 548(suppl): 47.
- [6] Zweier J L, Flaherty J T, Weisfeldt M L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 476
- [7] Periera da Silva A, Rocha R, Silva C M, et al. Antioxidants in medicinal plant extracts: A research study of the antioxidant capacity of *Crataegus*, *Hamamelis* and *Hydrastis* [J]. *Phytother Res*, 2000, 14(8): 612-616
- [8] Bahorun T, Gressier B, Trotin F, et al. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations [J]. *Arzneimittel-Forschung*, 1996, 46(11): 1086-1089
- [9] 刘荣华, 陈兰英, 朱根华, 等. 单叶山楂叶中多元酚类成分及其抗氧化活性研究[J]. *中草药*, 2007, 38(10): 1541-1544
- [10] 刘荣华, 余伯阳, 陈兰英, 等. 山楂叶抗大鼠PMN呼吸爆发谱效关系研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(15): 1884-1889
- [11] 刘荣华, 余伯阳, 邱声祥, 等. 山楂叶中多元酚类成分抗超氧阴离子活性研究及构效关系分析[J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(14): 1066-1069
- [12] 罗文, 刘斌, 王伟, 等. 山楂药材HPLC指纹图谱研究[J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(1): 39-42

北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 IPPI 的全长 cDNA 克隆及其序列分析

隋春¹, 战晴晴^{1,2}, 魏建和^{1*}, 陈怀琼¹, 杨成民¹, 郑亭亭¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 目的 克隆北柴胡皂苷生物合成途径关键酶异戊烯基焦磷酸异构酶(EC 5.3.3.2, isopentenyl diphosphate isomerase, IPPI)的全长cDNA,为研究柴胡皂苷的生物合成与基因调控奠定基础。方法 PCR 矩阵法快速筛选北柴胡全长cDNA文库。结果 获得了北柴胡IPPI的全长cDNA(GenBank No. gq433719),其核苷酸序列长1117 bp,编码319个氨基酸的蛋白。NCBI Blastx 结果显示与胡萝卜 *Daucus carota* subsp. *sativus* (abb52064)的IPPI氨基酸序列相似性最高,一致性为92%,相似度为97%。保守结构域搜索显示含有IPPI共有的催化活性位点、金属结合位点及Nudix基序。TargetP1.1和SignalP3.0分析表明北柴胡IPPI N端含有长26 bp的叶绿体信号肽。结论 首次克隆了北柴胡IPPI的全长cDNA,将促进后续北柴胡IPPI基因表达特性及其在柴胡皂苷合成代谢中功能的研究。

关键词: 北柴胡; 柴胡皂苷; 异戊烯基焦磷酸异构酶(IPPI); cDNA文库; PCR 矩阵法

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1178-07

Full-length cDNA cloning and sequence analysis of isopentenyl diphosphate isomerase involved in saikosaponin biosynthesis pathway of *Bupleurum chinense*

SUI Chun¹, ZHAN Qing-qing^{1,2}, WEI Jian-he¹, CHEN Hua-qiong¹,
YANG Cheng-min¹, ZHENG Ting-ting¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

* 收稿日期: 2009-09-18

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目(2006BA109B01); 中央级院所长科研基金项目(YZ-1-10)

作者简介: 隋春(1976-),女,吉林敦化人,博士,主要从事药用植物次生代谢方面的研究。

* 通讯作者 魏建和 Tel: (010)62818841 E-mail: wjianh@263.net

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA encoding isopentenyl diphosphate isomerase gene (IPPI) associated with saikosaponin biosynthesis pathway in *Bupleurum chinense* and to provide the basis for further studies on biosynthesis and regulation of saikosaponin. **Methods** Matrix-based PCR method was used to rapidly screen a *B. chinense* full-length cDNA library. **Results** The full-length cDNA of *B. chinense* IPPI was obtained (GenBank No. gq433719). The length of nucleotide sequence was 1 117 bp and an ORF with 319 amino acids was deduced. Blastx search showed it had the highest similarity to the corresponding protein from *Daucus carota* subsp. *sativus* (abb52064) with 92% identity and 97% similarity. Common conserved domains of IPPI were found in *B. chinense* IPPI including active site, metal binding site, and Nudix motif. A 26 bp long chloroplast signal peptide on the N terminal of the deduced amino acid sequence was predicted by Target P 1.1 and Signal P 3.0. **Conclusion** The full-length cDNA of *B. chinense* IPPI is cloned and reported here for the first time. This work will promote the studies on the gene expression pattern and regulatory functions of *B. chinense* IPPI in saikosaponin biosynthesis.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; saikosaponin; isopentenyl diphosphate isomerase (IPPI) gene; cDNA library; matrix-based PCR method

北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 是药用柴胡的重要来源之一。具有和解表里,疏肝,升阳的功能。用于感冒发热,寒热往来,胸胁胀痛,月经不调,子宫脱垂,脱肛等疾病的治疗^[1]。有关北柴胡植株植物学性状、愈伤组织培养及快繁和种子萌发等方面的研究较多^[2-4],但关于柴胡主要有效成分柴胡皂苷生物合成途径的分子基础研究比较匮乏,目前只有三岛柴胡 *B. falcatum* 皂苷合成途径上游的鲨烯合成酶(squalene synthetase, SS)全长 cDNA 和其他几个酶的部分 cDNA 得到克隆^[5]。另外,本实验室也已克隆到了北柴胡皂苷合成途径上游 4 个关键酶的部分 cDNA: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGR)、异戊烯基焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IPPI)、法尼基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)和 β -香树脂合酶(β -amyrin synthase, β AS)^[6]。

柴胡皂苷属于类异戊二烯化合物,是由基本的 C₅ 单元——异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)与其烯丙基异构体二甲丙烯基二磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)缩合后经一系列催化反应而形成^[7]。其中,IPP 和 DMAPP 两个异构体的相互转化由异戊烯基焦磷酸异构酶(EC 5.3.3.2, isopentenyl diphosphate isomerase, IPPI)催化。IPPI 是类异戊二烯化合物生物合成过程中的核心酶^[7]。多数植物体内存在两种不同亚细胞定位的 IPPI,是维持不同亚细胞部位 IPP 和 DMAPP 的适当水平所必须的^[8,9]。沉默普通烟草 *Nicotiana tabacum* IPPI 基因的表达会影响到质体内光合

色素的生物合成,导致植株白化^[8]。拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 两种 IPPI 的缺失突变体长日照条件下表现矮化和雄性不育,连续光照条件下色素的量降低,单一 IPPI 缺失突变体植株表型正常^[9]。

本试验在实验室已构建了盛花期柴胡根的全长富集 cDNA 文库基础上,利用 PCR 矩阵法筛选文库获得了 IPPI 全长 cDNA,并进行了序列分析,为推进 IPPI 在柴胡皂苷生物合成途径中的功能研究奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料:供筛选的文库为本实验室构建的盛花期柴胡根全长富集 cDNA 质粒文库。文库采用 SMART 技术建成。连接产物保存于 -80 ℃。经分析文库库容 1.1×10^6 ,重组率 93.2%。载体 pBluescript II SK,长 3.0 kb,插入片段平均长度 1.1 kb^[10]。使用的大肠杆菌感受态细胞 Top10 购自北京博迈德公司;96 孔菌体培养板及其一次性封板膜购自北京华中中生公司;PCR 反应使用北京博迈德公司的 $2 \times Taq$ PCR Mastermix;PCR 仪为 Biometra® TGRADIENT96。电泳 DNA Marker 为大连宝生物公司的 DL2000。

1.2 方法

1.2.1 cDNA 文库构建连接产物的转化及其滴度测定:取 -80 ℃保存的 cDNA 文库构建的连接产物 200 μ L 热激转化大肠杆菌感受态细胞 Top10。每 5 μ L 连接产物转化 100 μ L 感受态细胞。混合转化后的菌液加入到 60 mL LB 液体培养基(含 60 μ g/mL 氨苄青霉素中,37 ℃、200 r/min 摇培至对数生

长期后测定其滴度。取培养的菌液进行 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 倍数稀释, 分别取稀释后的菌液 200 μL 涂布于 LB 固体培养基(含 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$, 倒置培养过夜。计数每个平板上的菌落数, 绘制菌落数随稀释度变化的曲线, 确定菌液滴度及用于 PCR 矩阵筛选的菌液体积。

1.2.2 PCR 矩阵筛选 cDNA 文库: 参考 Munroe 等^[11] 及胡迎春等^[12] 方法。取以上培养的菌液 4 mL (相当于文库原始库容的 6 倍左右) 稀释于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 使其终浓度约为 120 个重组子/100 μL 培养基。在 96 孔菌体培养板上(每板留出第 12 列和第 H 行)的 77 个孔中各加入 100 μL 稀释后的菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。然后按照每行及每列从各孔中分别取 10 μL 菌液置于对应行及列的空孔中混匀。最后分别从 PCR 板的第 12 列和第 H 行各孔中取 10 μL 菌液置于第 H12 孔。从各板的 H12 孔取 1 μL 菌液用于 PCR 扩增。根据扩增结果从含有阳性克隆的 PCR 板的 12 列和第 H 行的各孔中分别取 1 μL 菌液再进行 PCR 扩增。有 PCR 目标条带的行和列的交叉孔即为阳性克隆所在的孔。取阳性克隆孔中的菌液进行梯度稀释后涂布于含抗生素的 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后, 选择菌落分散好的平板, 挑取单斑, PCR 扩增, 选择阳性克隆。如果一定数量单斑的 PCR 扩增没有阳性克隆, 可再按照上述方法进行矩阵排列, 重复进行 PCR 扩增, 最终得到阳性克隆单菌落。

1.2.3 PCR 引物设计与合成: 外侧引物为 Kim 等^[5] 发表的引物序列, 由上海生工北京合成部合成。上游引物 I 1: 5'-CAAATATAATTGTCATCTGATGGAA-3', 下游引物 I 2: 5'-CCACCACTTVAWCAAGAAATTGTG-3'; 内侧巢式 PCR 引物及阳性对照(北柴胡 IPPI 部分 cDNA 重组子)由本实验室董乐萌提供。上游巢式引物: 5'-AGGTGACATTCCCTTTGGTG-3', 下游巢式引物: 5'-AGAAGCTTCCTCTGTGCAGG-3'。外侧和内侧引物扩增产物分别为 532 bp 和 118 bp。

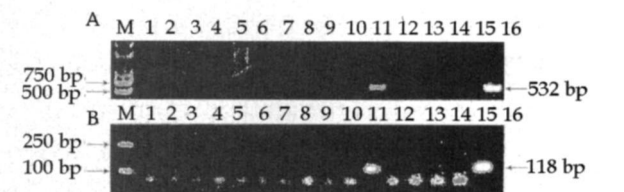
1.2.4 PCR 扩增体系及其反应条件: PCR 扩增总反应体系 25 μL , 其中 2 \times PCR mix 12.5 μL , 外侧(或内侧巢式)上、下游引物 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 各 1 μL , 菌液 1 μL , 重蒸超纯水 9.5 μL 。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s(巢式引物 PCR 为 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 和 1.5% (巢式引物 PCR) 的琼脂糖凝胶电泳

检测。

1.2.5 全长克隆的生物信息学分析: 阳性克隆由北京三博远志公司测序。序列提交至 GenBank。http://www.ncbi.nlm.nih.gov 网站上利用 Blastx 进行 Non-redundant protein sequences(nr) 数据库搜索。利用 DNAMAN 软件分析开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)、氨基酸序列多重比对及最大似然法(Maximum Likelihood) 构建植物 IPPI 分子亲缘关系树, 同时对亲缘关系树进行 Bootstrap 验证(重复 1 000 次)。利用 TargetP1.1 和 Signal P3.0^[13] 预测蛋白的亚细胞定位及信号肽序列。

2 结果与分析

2.1 PCR 矩阵法筛选获得阳性克隆: 本试验利用的 cDNA 文库库容 1.1×10^6 , 共 1 mL 连接产物。试验中取了 200 μL 转化大肠杆菌感受态细胞, 经培养、滴度测定及稀释后取 100 mL 菌液进行矩阵。首先完成了 15 板的菌液排布(涵盖原始库容的 1/50)。从每板的 H12 孔中取菌液进行 PCR 扩增, 图 1-A 和图 1-B 分别为外侧和内侧引物扩增结果。可以确定第 11 板为阳性板。进而以此板的第 H 行和第 12 列的各孔菌液为模板, 进行 PCR 筛选(图 2)。其中第 D 行和第 10 列为阳性, 可以确定 D10 孔为阳性孔。将这一孔内菌液进行密度梯度稀释, 从低密度涂板中随机选择单菌落, PCR 扩增得到了阳性单克隆。测序结果表明为 IPPI 的全长 cDNA。

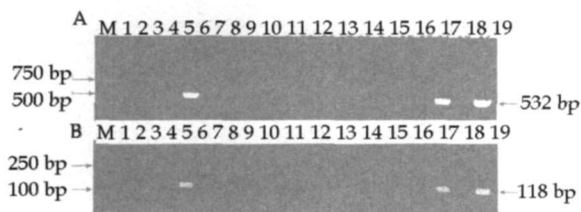


M-DL2000 DNA Marker 1~ 15 分别为来自 15 个菌体培养板 H12 孔的混合菌液 16 阳性对照
M-DL2000 DNA Marker 1-15-mixed bacteria in H12 cells from each of 15 cell culture plates 16-positive control

图 1 外侧引物(A)及内侧引物(B)PCR 扩增筛选 15 个菌体培养板结果

Fig 1 PCR Amplification of mixed bacteria from 15 cell culture plates with outer primers (A) and inter nested primers (B)

2.2 全长克隆的生物信息学分析: 所得的阳性单克隆经正反向测序及序列拼接后表明全长 1 117 bp。将得到的 cDNA 序列提交至 GenBank。登录号为 gq433719。NCBI blastx 在线搜索显示与胡萝卜 *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang (abb52064)、番茄 *Solanum lycopersicum* L. (abx55779)



M-DL2000 DNA Marker 1~7 分别为阳性板第 12 列的 A~G 孔混合菌液 8~18 分别为阳性板第 H 行的 1~11 孔混合菌液 19-阳性对照

M-DL2000 DNA Marker 1~7 mixed bacteria in A~G cells from the 12th line of positive plate 8~18 mixed bacteria in 1~11 cells from H arrow of positive plate 19-positive control

图 2 外侧引物(A)及内侧引物(B) PCR 扩增筛选阳性板第 12 列和第 H 行每孔结果

Fig 2 PCR Amplification of mixed bacteria from each cell of 12th arrow and H line in positive plate with outer primers (A) and inter nested primers (B)

```

1  aaaacaacaATGCTAGTATTTCGAGCAGTAAARACACCGATACAAGCCACAAACAGCATT
1  M L V F A A V K T P I Q A T T A F
61  TGCATCGAGATTCTCATCTTCGTCTGCTTCTCTTCTCTCATCTTCAAGATCTGTATC
21  A S K E S S S S A F S F S S S R S V S
121 TCTATCTATATATAATACTACTAGTAACAATATATATCGCACCAACACCATCTCCGCCCTC
41  L S I Y N T T S N N I Y R E N T I S A S
181 TGCCGCGGCTCTCTCTGTGTATCTACTCAIATCCGCTGATCTCACTGTCCTCTCCCTC
61  A A A L S C V S T H I R S S H S H S S S
241 CATCGCGGCTCCCGGGTACAGCCATGGCTGATGTCTGATCTTACCATTGGACGCTGT
81  F A A S A C T A M A D V A D S T M D A V
301 TCAGAGGCGGCTTATGTCGACGCGGAGTGIAATTTGGTGGATGAGAATGATCATGTGT
101  Q R R L M F D D E C I L V D E N D H V V
361 TGGTCATGAAATAAATAAACTGTCACTTGATGAAATAATGAATCTGAAATTTGCT
121  G H E N K Y N C H L M E K I E S E N L L
421 TCAGAGCTTTCACTGCTTCTTGTCTTACTCAAAAATAGAGTGTCTCTCGTCCGCAACG
141  H R A F T V F L F N S K Y E L L L Q O R
401 GTCTGCGACCAAGGTGACATTCCCTTTGGTGTGACAAACACCTGTTGACAGTCACCTCT
161  S A T K V T F P L V W T N T C C S H P L
541 GTACAGGGATCTGAGCTTATCGAAGAAAATGCATTAGGGGCAAGGAATGCTGCACAGAG
181  Y A R S E L I E E N A L G A R N A A Q R
601 GAAGCTTCTGATGACTTGGTATTCCTGCTGAGATGTTCTCTGTATCAATTTTGGC
201  K L L D E L G T P A E D V P V D Q F L P
661 TGTAGGTCGTATGCTGTACAAGGCACCTTCAGATGGCAAGTGGGAGAACATGAACTGGA
221  V G R M L Y K A P S D G K W G E H E L D
721 TTATCTCTTTTATTGTCCGAGATGTGAAAGTAAATTCCTAACCCCTGATGAAGTGTGTA
241  Y T L F T V R D V K V N P N P D E V A D
781 CATCAAAATGTCAACAAAAGACCAGCTGAAAGGTTGTGTGAGAAAAGCTCATGCACCTCA
261  I K Y V N K D Q L K E L L R K A D A G E
841 GGAGGGCTTGAAGCTGTCCGCTGGTTCAGGCTAGTGTGATAATTTCTTGTACAACCTG
281  E G L K L S P W F R L V V D N F L Y K W
901 GTCGGACCATGTCGAGAAAGGAAGTCTCGGTGAAAGTGTGATATGAAAACCATTACAA
301  W D H V E K G T L G E V A D M K T I H K
961 GTTGAATTGATaccaaacataattggatcggatctctacttgaalaaugaalaaaactagt
321  L T *
1021 tttaggatttttatttgactgtctgcaacogttagtatttgatacttagctttggattttat
1061 gaaatggttttgattaccgaaaaaacaaaaaaa
    
```

图 3 北柴胡 IPPI cDNA 序列及其编码蛋白氨基酸序列(TargetP1.1 和 SignalP3.0 预测的叶绿体信号肽有下划线标记;5′-和 3′-端非翻译区用小写字母表示)

Fig 3 cDNA Sequence of *B. chinense* IPPI and its deduced amino acid sequence (Chloroplast signal peptide predicted by Target P1.1 and Signal P3.0 is underlined; 5′- and 3′- untranslated regions are shown in normal letters)

和葛藤 *Pueraria montana* var. *lobata* (Willd.) Maeson & S. Almeida (aeq84167) 的相似性比较高,其中一致性分别为 92%、92% 和 89%,相似度分别为 97%、96% 和 94%。DNAMAN 软件寻找最大阅读框表明 cDNA 可翻译成 319 个氨基酸的蛋白(图 3)。NCBI 保守域在线查找,北柴胡 IPPI 含有保守的催化活性位点、金属结合位点和 Nudix 基序(图 4)。TargetP1.1 和 SignalP3.0 亚细胞定位和信号肽序列分析显示 N 端的 1~26 个氨基酸为蛋白定位于叶绿体的信号肽(图 3)。氨基酸序列同源性比较中可以看出不同植物来源的 IPPI N 端有很大差异,催化部位相似性很高(图 4)。依据 IPPI 氨基酸序列构建 34 种植物 47 条蛋白序列(其中 13 种植物中两个 IPPI 均有序列可查)的分子亲缘关系树(图 5)可以看出,北柴胡 IPPI 与同科植物胡萝卜 (abb52064) 的 IPPI 亲缘关系最近,其次是茶树

北柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	MLVFAAVKTPIQATTAFASRFSSSSAFSFFSSSRVLSIYNTTSNNIYRTNTISASAAA	60
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>MSSTLTTSYFQITLKRISVCSLPSSTSSNSLYPIILLKHKFSSFPVSVFSSS	52
胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	0
普通烟 <i>Nicotiana tabacum</i>MSLTTTTPSFQIWRRFIAASPIITCPSLSLVS	31
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>MSAASHIHVACRLSSFLASPKLKLHPRLSFFFHSSFRNHIITRSVFC	50
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>MSLTTRLLNAHATTRLSSSLPSSASPRYSH.....FLSTQFASPSLIQFPLTLKP	50
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>MSLTSRLLNTPATTRLSSSLSSSSSSSSPSPKRYFLHSNITPPSLRFLPLIKL	56
北柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	LSCVSTHIRSSSHSSSSIAASAGTAMADVAEISTMDAVQRLMFDDECIIVDENHVVGHE	120
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	ASSPCSNSTTLAAFSSIIAAPSFSMGAAVTISAMDAVQRLMFEDECIIVDENHVVGH	112
胡萝卜 <i>Daucus carota</i>MATTEITMDAVQRLMFDDECIIVDENHVVGHE	35
普通烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	VSKSPLLKSHRIAAALRCYSSSTRMGDAIACAMDAVQRLMFEDECIIVDENHVVGH	91
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	SSSHLSVRVSSYHSSVAAKATTSAMGDTATAGMDAVQRLMFEDECIIVDENHVVGH	110
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	SSTSSFSRVFSSSSA...ITATSTMGEPVGMMDAVQRLMFDDECIIVDENHVVGH	107
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	SS.SPFSRVFSSSRSTTASISSNSTMGDAIAGMDAVQRLMFEDECIIVDENHVVGH	115
一致氨基酸 Consensus	d mdavq rlmf decilvde d vvgH	
北柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	NKYNCHLMEKIESENLLHRAFTVFLFNSKYELLQORSATKVTFPLVWNTCCSHPLYRE	180
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	TKYNCHLMEKIESENLLHRAFSVFLFNSKYELLQORSATKVTFPLVWNTCCSHPLYRE	172
胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	NKYNCHLMEKIESENLLHRAFSVFLFNSKYELLQORSATKVTFPLVWNTCCSHPLYRE	95
普通烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	TKYNCHLMEKIESENLLHRAFSVFLFNSKYELLQORSATKVTFPLVWNTCCSHPLYRE	151
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	TKYNCHLMEKIESENLLHRAFSVFLFNSKYELLQORSATKVTFPLVWNTCCSHPLYRE	170
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	SKYNCHLMEKIESENLLHRAFSVFLFNSKYELLQORSATKVTFPLVWNTCCSHPLYRE	167
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	SKYSCHLMEKIESENLLHRAFSVFLFNSKYELLQORSATKVTFPLVWNTCCSHPLYRE	175
一致氨基酸 Consensus	ky chl e i n lhraf vflfnsk elllqrs tkvtfplvwntccshp yr	
北柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	SELIEENALGARNAAQRKLLDELGI EAEDVPVDFTELGRMILYKAFSDCKWGEHLDYLL	240
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	SELIEENVLCVRNAAQRKLLDELGI EAEDVPVDFTELGRMILYKAFSDCKWGEHLDYLL	232
胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	SELIEEKALGARNAAQRKLLDELGI EAEDVPVDFTELGRMILYKAFSDCKWGEHLDYLL	155
普通烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	SELIEENALGARNAAQRKLLDELGI EAEDVPVDFTELGRMILYKAFSDCKWGEHLDYLL	211
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	SELIEENALGARNAAQRKLLDELGI EAEDVPVDFTELGRMILYKAFSDCKWGEHLDYLL	230
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	SELIEEDALGARNAAQRKLLDELGI EAEDVPVDFTELGRMILYKAFSDCKWGEHLDYLL	227
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	SELIEEDSLGARNAAQRKLLDELGI EAEDVPVDFTEVGRMILYKAFSDCKWGEHLDYLL	235
一致氨基酸 Consensus	sel e lg rnaaqrkl delgi aedvpvd f p gr lyka sdg wgehldyll	
北柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	FIVRDVKVNPDPDEVAIVKYVNDQKELLRKADAGEEGLKLSFWFRLVVDNFIKFWWDH	300
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	FIVRDVKVNPDPDEVAIVKYVNDQKELLRKADAGEEGLKLSFWFRLVVDNFIKFWWDH	292
胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	FIVRDVKVNPDPDEVAIVKYVNDQKELLRKADAGEEGLKLSFWFRLVVDNFIKFWWDH	215
普通烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	FTVREVNMPDPDEVAIVKYVNDQKELLRKADAGEEGLKLSFWFRLVVDNFIKFWWDH	271
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	FIVRDVNVHNPDPDEVAIVKYVNDQKELLRKADAGEEGLKLSFWFRLVVDNFIKFWWDH	290
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	FIVRDVNVNPDPDEVAIVKYVNDQKELLRKADAGEEGLKLSFWFRLVVDNFIKFWWDH	287
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	FMVREVNMPDPDEVAIVKYVNDQKELLRKADAGEEGLKLSFWFRLVVDNFIKFWWDH	295
一致氨基酸 Consensus	f r v npdpdevad ky l llrk d ge g lspwfrl v nfl k w	
北柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	VEKGTILEAVDMKTIHKLT	319
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	VEKGTILEAADMKTIHKLI	311
胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	VOKGTILEAVDMKTIHKLT	234
普通烟 <i>Nicotiana tabacum</i>	LEKGTILEEVIDMKTIHKLT	290
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	VEKGTIQDADDMKTIHKLT	309
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	VENGTLKEAVDMKTIHKLS	306
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	AEKGTILEAVDMKTIHKLT	314
一致氨基酸 Consensus	gtl dm tihkl	

图 4 7 种植物 IPPI 氨基酸序列比对(催化活性位点、金属结合位点和 Nudix 基序分别由#、* 和 • 标记出)

Fig 4 Alignment of IPPI amino acid sequences from seven plants (active site, metal binding site, and Nudix motif are labeled by #, *, and •)

Melaleuca alternifolia (Maiden & Betche) Cheel (aal91980)、*Clarkia breweri* (A Gray) Greene (caa57947)、白杨 *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray (xp_002325469)、蓖麻 *Ricinus communis* L. (eef47402) 及橡胶树 *Hevea brasiliensis* Müll. Arg (baf98286 和 baf98287) 的 IPPI。不同植物来源的 IPPI 长度也有很大差异,主要存在于蛋白的 N 端。同一种植物的两个 IPPI 的亲缘关系表现不同,有些

植物的两个 IPPI 相距较近,如橡胶树、拟南芥、玉米 *Zea mays* L. 及水稻 *Oryza sativa* L. 等;而有些植物的两个 IPPI 相距较远,如番茄 *C. breweri*。这可能与不同植物中两个 IPPI 的亚细胞定位及功能差异大小有关。

3 讨论

本试验首次得到了北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 IPPI 的全长 cDNA (gq433719)。GenBank 序

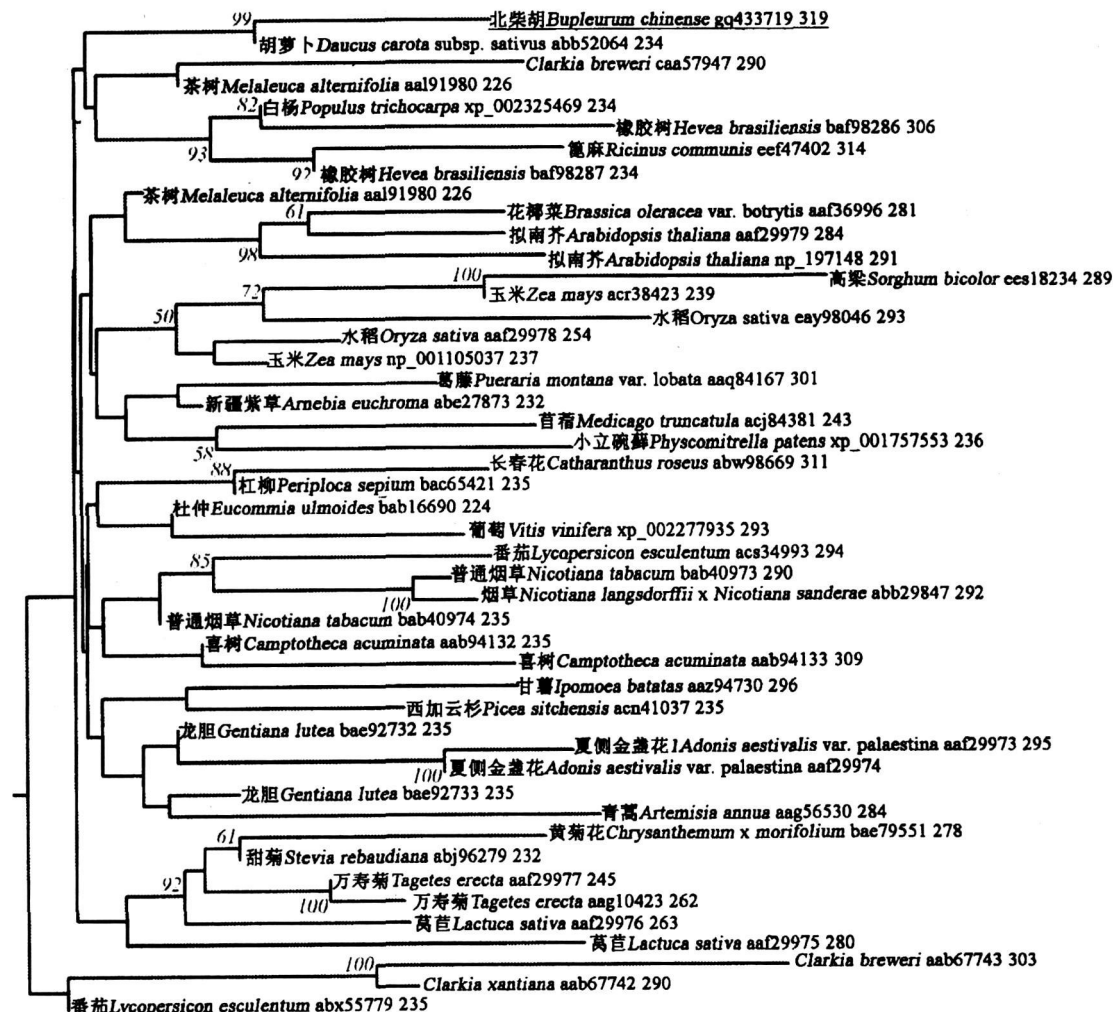


图 5 植物 IPPI 分子亲缘关系树(标尺表示遗传距离,数字表示大于 50% 的置信度,植物学名后为 GenBank 序列号及序列的氨基酸数目)

Fig 5 Genetic relationship tree of plants IPPI based on amino acid sequences (ruler represents genetic distance; Numbers represent confidence level above 50%; GenBank accession numbers and amino acid numbers are listed after plants scientific names)

列查询表明目前已登录的柴胡属植物 IPPI 基因序列只有三岛柴胡和北柴胡的部分 cDNA (aba01560 及 aby90138), 分别为 530 bp 和 532 bp^[5,6]。与本试验得到的北柴胡 IPPI 的核苷酸序列一致性分别为 98% 和 97%, 氨基酸序列一致性分别为 98.87% 和 98.86%, 即都有两个氨基酸的差异, 差异位点均为 142 位 (aba01560 及 aby90138 是丝氨酸; gq433719 是苏氨酸) 和 295 位 (aba01560 是甲硫氨酸; aby90138 是异亮氨酸; gq433719 是酪氨酸)。由于多数植物体内存在两种不同亚细胞定位的 IPPI, 因此 aby90138 和 gq433719 可能分别为北柴胡两个不同的 IPPI cDNA, 其亚细胞定位及功能还有待进一步的试验分析。

柴胡皂苷生物合成途径研究是进行柴胡代谢调

控研究与应用的理论基础。IPPI 是合成途径中的关键酶之一, IPPI 全长 cDNA 的克隆及其生物学分析为后续基因功能研究奠定了基础。本试验筛选柴胡 cDNA 文库采用的 PCR 矩阵法具有快速灵敏、特异及高效等优点^[11,12], 能为获得其他柴胡功能基因的 cDNA 序列提供方法学借鉴, 也可为其他药材药效成分合成途径的酶基因克隆提供参考。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005
 [2] 李博, 郝贵茹, 常琦, 等. 北柴胡移植试管植株与种子植株植物学性状分析[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1634-1637.
 [3] 郝建平, 徐丽霞, 杨东方. 北柴胡愈伤组织诱导分化及不定芽增殖条件研究[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1234-1238
 [4] 郝建平, 徐笑飞, 杨东方, 等. 北柴胡快速繁殖及种子萌发条件研究[J]. 中草药, 2008, 39(5): 752-756
 [5] Kim Y S, Cho J H, Ahn J, et al. Upregulation of isoprenoid pathway genes during enhanced saikosaponin biosynthesis in the hairy roots of *Bupleurum falcatum* [J]. *Mol Cells*,

- 2006, 22(3): 269-274
- [6] 董乐萌, 刘玉军, 魏建和. 柴胡皂苷合成途径中三个关键酶基因片段的克隆与序列分析[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2008, 10(5): 56-60
- [7] Ramos-Valdivia A C, van der Heijden R, Verpoorte R. Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis: a review of its biochemistry and function [J]. *Nat Prod Rep*, 1997, 14: 591-603
- [8] Nakamura A, Shimada H, Masuda T, et al. Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco [J]. *FEBS Lett*, 2001, 506(1): 61-64
- [9] Okada K, Kasahara H, Yamaguchi S, et al. Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 604-616
- [10] Sui C, Wei J H, Chen S L, et al. Construction of a full-length enriched cDNA library and analysis of 3111 ESTs from roots of *Bupleurum chinense* DC. [J]. *Bot Stud*, 2010, 51(1): 7-16
- [11] Munroe D J, Loebbert R, Bric E, et al. Systematic screening of an arrayed cDNA library by PCR [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92: 2209-2213
- [12] 胡迎春, 张开泰, 吴德昌, 等. PCR 快速筛选质粒 cDNA 文库方法的建立[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 19(5): 310-312
- [13] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence [J]. *J Mol Biol*, 2000, 300: 1005-1016

披针叶黄华种子中金雀花碱的定性和定量分析

周军辉¹, 李 静², 李 静¹, 王答祺¹, 李思锋^{1*}

(1. 陕西省西安植物园 陕西省植物研究所, 陕西 西安 710061; 2 陕西省生物医药重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要:目的 应用 HPLC 和 TLC 建立披针叶黄华种子中金雀花碱的定量和定性分析方法。方法 采用超声提取的方法获得样品, 分别采用 TLC 和 HPLC 对披针叶黄华种子中的金雀花碱进行定性鉴别和定量测定。结果 TLC 采用碱性硅胶为固定相, 以苯-丙酮-醋酸乙酯-甲醇(4: 2: 1: 1)为展开剂, 可清晰检出金雀花碱斑点; HPLC 分析中, 金雀花碱在 0.04~1.2 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。结论 本方法样品处理快速简便, 定性与定量分析分离效果好, 准确、快速、干扰少, 可用于披针叶黄华种子原料和金雀花碱产品的质量控制。

关键词:披针叶黄华种子; 金雀花碱; TLC; HPLC; 超声提取

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1184-03

披针叶黄华 *Thermopsis lanceolata* R. Br. 又名牧马豆、野决明, 系豆科(Leguminosae)野决明属(*Thermopsis* R. Br.)多年生草本植物, 分布于中国东北、华北及西北等广大地区, 资源丰富。据资料记载, 本种为有毒植物, 其主要有效成分金雀花碱(cytisine)对呼吸系统的作用类似烟碱, 能反射性地兴奋呼吸, 是一种临床上用于抗心律失常的生物碱类药物。近年来, 金雀花碱作为疗效确切的戒烟制剂原料引起国际医药界的关注, 研究表明, 以金雀花碱的酒石酸盐为主要成分的戒烟制剂的一年期戒烟有效率可达 22%, 具有可观的发展前景^[1]。我国学者从 20 世纪 70 年代已开始对其化学成分进行研究^[2,3], 其定量测定有紫外吸收法^[4]、原子吸收法^[5]及酸碱滴定法^[6], 本实验采用 TLC 法和 HPLC 法进行金雀花碱的定性和定量分析, 为相关的生产及检验工作提供实验依据。

1 仪器、药材与试剂

1.1 仪器: Waters 515 高效液相色谱仪(包括 Waters 515 泵, Waters 2487 检测器等), N2000 色谱工作站; Beckman 高效液相色谱系统(125 泵, 168PDA 二极管阵列检测器, 32Karat 工作站, 美国), Beckman 508 自动进样器。天津东康 DS6150 超声波清洗机(频率为 40 kHz, 功率为 150 W)。

1.2 药材与试剂: 药材共 10 批次, 于 2007 年和 2008 年分别在宁夏盐池, 内蒙古自治区阿拉善左旗、右旗、前旗, 新疆哈密、塔城、阿勒泰, 陕西榆林, 青海门源、互助彩集成熟的披针叶黄华的种子, 由陕西省植物研究所王答祺副研究员鉴定, 样本保存于陕西省植物研究所; 所用金雀花碱对照品购自 Sigma 公司, 质量分数在 99% 以上, 药材粉碎后过 40 目筛, 60 °C 干燥 3 h, 密封保存, 待用。HPLC 用甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 定性鉴别: 取披针叶黄华种子药材粉末 2

* 收稿日期: 2009-12-13

基金项目: 陕西省科学院项目(2008K-13)

作者简介: 周军辉(1978-), 男, 助理研究员, 主要从事天然药物化学分离与分析研究。

Tel: (029) 85251515 E-mail: zhousunhui@sohu.com

* 通讯作者 李思锋 Tel: (029) 85212196 E-mail: lisf60@sina.com