

• 药材与资源 •

罗汉果法呢基焦磷酸合成酶基因的克隆及其序列分析

蒙姣荣¹, 陈本勇¹, 黎起泰², 李 惠³, 陈保善^{1*}

1. 广西大学 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 微生物与植物遗传工程教育部重点实验室, 广西 南宁 530004

2. 广西大学农学院, 广西 南宁 530004

3. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 对罗汉果甜苷 V 生物合成途径的关键酶法呢基焦磷酸合成酶 (Farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS) 基因的全长 cDNA 序列进行克隆, 为研究罗汉果甜苷 V 生物合成与基因调控奠定基础。方法 根据植物 FPPS 基因保守功能域设计简并引物, 通过 PCR 和 RACE 方法克隆罗汉果 FPPS 基因的全长 cDNA。结果 获得罗汉果 FPPS (SgFPPS) 基因的全长 cDNA 序列共 1 354 个核苷酸, 包含一个 1 026 核苷酸的开放阅读框架 (open reading frame, ORF), cDNA 编码的蛋白包含 342 个氨基酸, 推断蛋白质相对分子质量为 3.92×10^4 。NCBI Blastx 结果显示, SgFPPS 基因编码的蛋白与苹果树来源 FPPS 具有最高同源性, 氨基酸一致度达 85.1%。SgFPPS 具有异戊烯基转移酶的 5 个典型保守功能域。进化树分析结果显示, SgFPPS 基因与苹果树的 FPPS 具有较近的亲缘关系。结论 首次克隆 SgFPPS 基因的全长 cDNA 序列, 为分析 SgFPPS 基因表达特性及其在罗汉果甜苷 V 生物合成中的功能奠定基础。

关键词: 法呢基焦磷酸合成酶; 罗汉果甜苷 V; 生物合成; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2512-06

Cloning and sequence analysis of Farnesyl pyrophosphate synthase gene in *Siraitia grosvenorii*

MENG Jiao-rong¹, CHEN Ben-yong¹, LI Qi-qin², LI Hui³, CHEN Bao-shan¹

1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources and the Key Laboratory of Microbial and Plant Genetic Engineering of the Ministry of Education, Guangxi University, Nanning 530004, China

2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China

3. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To clone the full length cDNA encoding Farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) gene associated with mogroside V biosynthesis pathway in *Siraitia grosvenorii* and to provide basis for further studies on biosynthesis and gene regulation of mogroside V. **Methods** Degenerate primers were designed based on the conserved functional domains found in FPPS. A full-length cDNA of *S. grosvenorii* FPPS (designated as SgFPPS gene) was cloned by the polymerase chain reaction (PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). **Results** The full length cDNA of SgFPPS composed of 1 354 nucleotides was obtained. The open reading frame (ORF) of SgFPPS is 1 026 bp in length, corresponding to a predicted polypeptide of 342 amino acid residues with a molecular mass of 3.92×10^4 . The deduced SgFPPS amino acid sequence exhibited 85.1% identity to the FPPSs of *Malus x domestica*. The predicted SgFPPS shared five conserved functional domains involved in the typical prenyltransferase with the FPPSs of varied species. Phylogenetic analysis on the amino acid sequence of SgFPPS with those of other plants showed that SgFPPS was closely related to *M. x domestica*. **Conclusion** The full length cDNA of SgFPPS is cloned and reported for the first time. This work lays a foundation for studying the gene expression pattern and regulatory functions of SgFPPS in mogroside V biosynthesis.

Key words: Farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS); mogroside V; biosynthesis; gene cloning; sequence analysis

萜类化合物是植物初生代谢产物和次生代谢产物的重要成分, 影响植物生长发育和品质形成, 同时萜类化合物在植物自身免疫和防御反应中起重要作用, 具有重要的药用价值。罗汉果、青蒿和人参

收稿日期: 2011-06-13

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (桂科自 0832045); 广西创新能力建设项目 (桂科能 05112001-1B, 桂科能 05112001-1)

作者简介: 蒙姣荣 (1971—), 女, 广西忻城人, 博士, 副教授, 从事植物病理学和罗汉果功能基因组学等方面的研究。

Tel: (0771)3235266 E-mail: mengjiaorong@163.com.cn

*通讯作者 陈保善 Tel: (0771)3239566 E-mail: chenyaobj@gxu.edu.cn

等中药的主要活性成分即为萜类化合物。法呢基焦磷酸合成酶(Farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS)是植物萜类合成过程中一个关键酶^[1]。目前已经从三七、薄荷、青蒿、积雪草等40多种植物中分离并克隆了FPPS的cDNA序列^[2-3]。不同来源的FPPS合成酶基因具有较高的同源性,其中2个富含天冬氨酸的酶活性中心有很高的保守性^[4]。了解FPPS的特性是探明植物萜类化合物合成机制的重要环节之一。

罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex A. M. Lu et Z. Y. Zhang 是我国传统保健药材,具有清肺止咳、润肠通便等功效,作为一种保健食品和甜味剂已长期使用,近期研究表明罗汉果还具有抗癌和治疗糖尿病的作用^[5-7]。罗汉果甜苷 V (mogroside V) 是罗汉果主要有效成分之一,具有广泛的生物活性,并且安全、质好、无异味、甜度高,是鉴定罗汉果品质的一个重要指标。目前,对罗汉果的研究主要集中在罗汉果甜苷的提取分离、精确组分的测定及其药理活性方面^[6,8-9],对罗汉果甜苷 V 生物合成的分子机制的研究尚未见报道。罗汉果甜苷 V 是一种葫芦烷四环三萜类化合物^[10],推测 FPPS 在其生物合成过程中具有重要的作用。本研究克隆罗汉果法呢基焦磷酸合成酶基因(SgFPPS),为分析FPPS基因表达与罗汉果甜苷V合成关系,阐明罗汉果甜苷生物合成的分子机制,最终利用基因工程方法提高罗汉果甜苷V的量,为品质育种提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

罗汉果 B5 品种由广西大学农学院植保研究室林伟提供。3'RACE (rapid amplification of cDNA ends) 试剂盒、T₄ DNA 连接酶和 T 载体 (pGEM-T-easy vector) 购自 Promega 公司。5'RACE 试剂盒 (SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit) 购自 BD Biosciences Clontech 公司。*Eco* RI 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自上海开瑞公司。DNA 寡核苷酸引物由上海生工生物工程有限公司合成,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 核酸的提取 罗汉果 B5 品种组培苗种植在 25~30 ℃、日照 12~14 h 的条件下,按常规方法进行日常管理,采集 6 叶期叶片组织,参照 Sambrook

等^[11]的方法用异硫氰酸胍法提取总 RNA。

1.2.2 PCR 引物设计 根据青蒿、积雪草、拟南芥、水稻、银杏、啤酒花、银胶菊橡树、三齿艾草等植物的 FPPS 基因富含天冬氨酸的酶活性中心保守序列设计了简并引物, SgFPPS-F (5'-GGYTGGTGY ATTGAATGG-3') 和 SgFPPS-R (5'-TAAAAYGARTARTARGCHGTYYT-3') (Y 为 C/T, R 为 A/G, H 为 A、C 或 G)。以罗汉果总 RNA 为模板,用 3'RACE 试剂盒接头引物 (adapter primer (AP), 5'-GCCACGCGTCGA CTAGTACT (T)₁₆3') 合成 cDNA,用上述简并引物通过 PCR 获得 SgFPPS 基因部分序列。根据基因部分序列合成引物 SgFPPS-1F (5'-TATGGATAACTCCGT-CACACGAC-3')、SgFPPS3F (5'-CAACCCTGTTG-GTTTAGGTGC-3')、SgFPPS2R (5'-TCGCCGATGA-ATTGACAACGCG-3') 和 SgFPPS-4R (5'-AAGC-AGATCCACGTAATATG GCTT-3'),分别进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增。

1.2.3 3'RACE 和 5'RACE PCR 扩增 用 3'RACE 试剂盒合成 SgFPPS 基因 3'端的 cDNA。以获得的第 1 链 cDNA 为模板,第 1 条正向引物 SgFPPS-1F 与 AUAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3') 为引物进行第 1 次 PCR,再以第 1 次 PCR 产物为模板,以第 2 条正向引物 SgFPPS-3F 和 AUAP 为引物进行第 2 次 PCR,扩增特异性条带。

利用 5'RACE 试剂盒合成各基因的 5'端 cDNA。以获得的反应物为模板,第 1 条反向引物 SgFPPS-2R 和 UPM (5'-CTAATACGACTCACTA-TAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') 为引物,进行第 1 次 PCR,第 2 条反向引物 SgFPPS-4R 和 NUP (5'-AAGCAGTGGTATCAAC-GCAGAGT-3') 为引物,第 1 次 PCR 产物(稀释 100 倍)为模板进行第 2 次 PCR。

1.2.4 PCR 产物的克隆与重组质粒的鉴定 PCR 产物纯化后,与 pGEM-T 载体连接,按说明书进行操作。将连接产物转化大肠杆菌菌株 DH5 α 。在 X-gal/IPTG/Amp 琼脂平板 (LBA) 挑取白色菌落培养。用碱裂解法提取质粒,用 *Eco* RI 酶切鉴定筛选阳性克隆。

1.2.5 序列测定与分析 选取含有外源片段的阳性克隆由上海生工生物工程有限公司测序。序列测定结果采用 Blastx 程序进行同源性搜索,利用 Vector NT I (9.0) 软件进行 DNA 序列拼接、核酸、等电

点的计算和推导的氨基酸序列的同源性分析等。用同源性和系统进化树分析的其他物种来源 FPPS 的信息见表 1。

表 1 用于进化分析的 FPPS 序列信息

Table 1 Information of FPPS used for evolution analysis

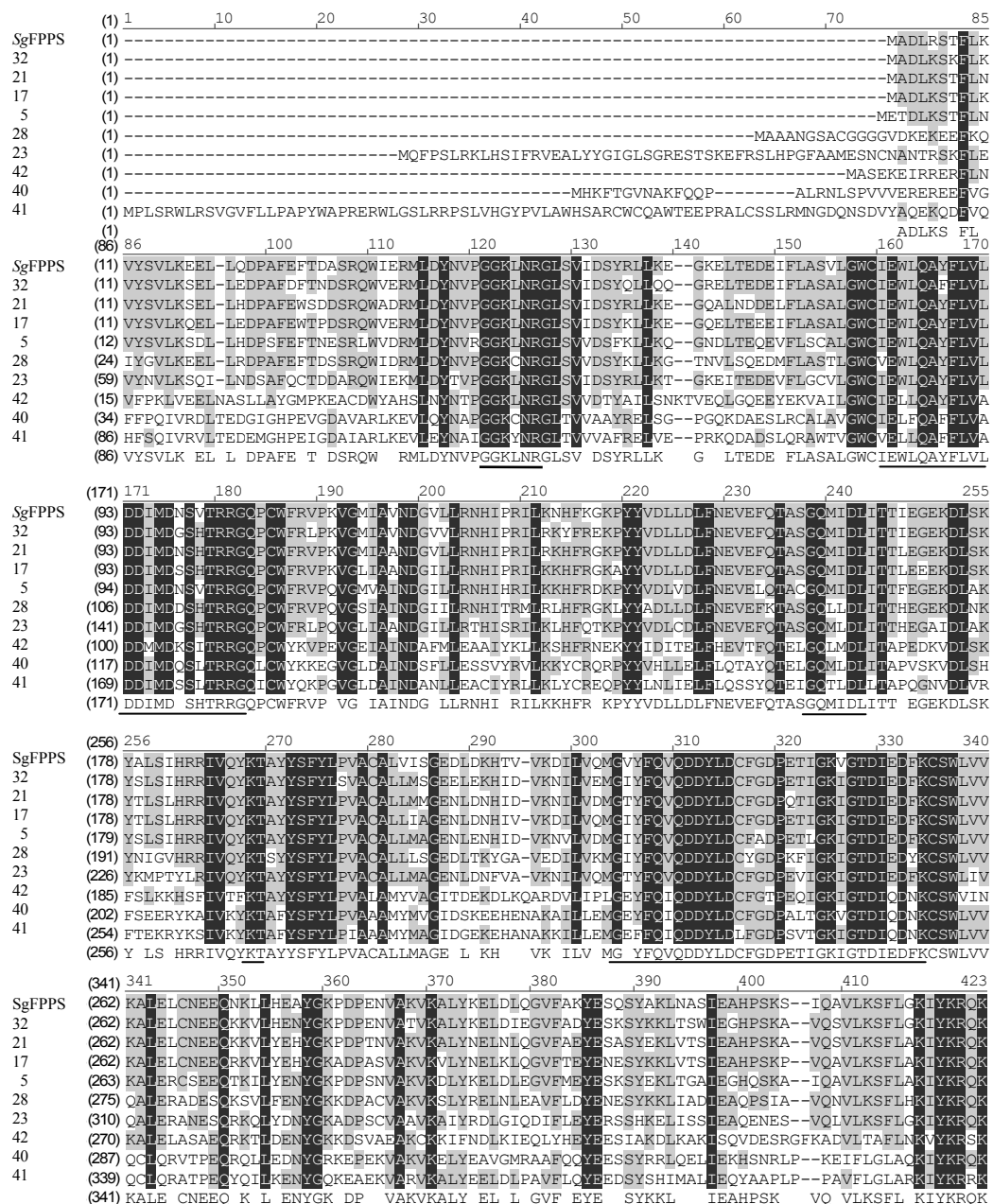
序号	种 名	科 名	GI 号	GenBank 登录号
1	楤木 <i>Aralia elata</i>	五加科	300431229	ADK12004.1
2	人参 <i>Panax ginseng</i>	五加科	68165941	AAAY87903.1
3	三七 <i>P. notoginseng</i>	五加科	66735446	AAAY53905.1
4	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	十字花科	15236002	NP_193452.1
5	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	十字花科	1146159	AAB07264.1
6	蜡梅 <i>Chimonanthus praecox</i>	蜡梅科	212960746	ACJ38671.1
7	啤酒花 <i>Humulus lupulus</i>	大麻科	13537421	BAB40665.1
8	三齿蒿亚种大鼠尾草 <i>Artemisia tridentata ssp. spiciformis</i>	菊科	32329199	AAP74720.1
9	三齿蒿亚种大鼠尾草 <i>A. tridentata ssp. Spiciformis</i>	菊科	32329197	AAP74719.1
10	青蒿 <i>A. annua</i>	菊科	1022770	AAC49452.1
11	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	菊科	3002542	AAC78557.1
12	母菊 <i>Matricaria chamomilla var. recutita</i>	菊科	151415019	ABS11699.1
13	银胶菊 <i>Parthenium argentatum</i>	菊科	1532052	CAA57893.1
14	杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	杜仲科	14422406	BAB60822.1
15	杜仲 <i>E. ulmoides</i>	杜仲科	15289750	BAB16687.2
16	大戟 <i>Euphorbia pekinensis</i>	大戟科	224808192	ACN63187.1
17	橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	大戟科	22676905	AAM98379.1
18	白羽扇豆 <i>Lupinus albus</i>	豆科	1346029	P49352.1
19	白羽扇豆 <i>L. albus</i>	豆科	1346028	P49351.1
20	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	豆科	285013665	ADC32809.1
21	甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	豆科	291585672	ADE18770.1
22	黄龙胆 <i>Gentiana lutea</i>	龙胆科	6681694	BAA88844.1
23	银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	银杏科	38684029	AAR27053.1
24	青钱柳 <i>Cyclocarya paliurus</i>	胡桃科	267847005	ACY80695.1
25	薄荷 <i>Mentha x piperita</i>	唇形科	14488053	AAK63847.1
26	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	唇形科	157072593	ABV08819.1
27	乐昌含笑 <i>Michelia chapensis</i>	木兰科	241994864	ACS74708.1
28	水稻 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group	禾本科	115465209	NP_001056204.1
29	水稻 <i>O. sativa</i> Japonica Group	禾本科	115439441	NP_001044000.1
30	玉米 <i>Zea mays</i>	禾本科	195624442	ACG34051.1
31	玉米 <i>Z. mays</i>	禾本科	162462162	NP_001105039.1
32	苹果 <i>Malus x domestica</i>	蔷薇科	20135548	AAM08927.1
33	四季橘 <i>Citrofortunella mitis</i>	芸香科	14573639	AAK68152.1
34	毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	杨柳科	224089549	XP_002308751.1
35	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	茄科	1491641	CAA59170.1
36	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	茄科	2935459	AAC73051.1
37	小果沉香 <i>Aquilaria microcarpa</i>	瑞香科	296939580	ADH95185.1
38	积雪草 <i>Centella asiatica</i>	伞形科	55710092	AAV58896.1
39	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	葡萄科	225462001	XP_002272641.1
40	红原鸡 <i>Gallus gallus</i>	雉科	3915686	P08836
41	人类 <i>Homo sapiens</i>	人科	4503685	NP_001995
42	啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	酵母科	6322294	NP_012368

致性为 85.1%，相似性为 92.1%。将 SgFPPS 基因推测的氨基酸序列在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上进行蛋白质功能域保守序列数据库 (conserved domain database, CDD) 搜索, 发现 SgFPPS 蛋白具有典型的异戊烯基转移酶保守功能

域, 包含 5 个保守区域, 其中富含天冬氨酸的酶活性中心分别位于 94~98 位氨基酸 (DDIMD) 和 231~235 位氨基酸 (DDYLD) (图 3)。利用 MEGA 4.0 软件将获得的 *SgFPPS* 基因推导的氨基酸序列与 39 种植物 FPPS 基因家族的氨基酸序列进行多重比对并构建进化树, 发现 *SgFPPS* 与苹果树 FPPS 的亲缘关系最近 (图 4)。

3 讨论

FPPS 是植物萜类合成过程中的一个关键酶, 其活性与量的高低决定后续产物量的高低。随着植物萜类合成途径中相关酶的分离鉴定, 利用酶表达改变萜类物质组成或量已成为改变作物及中药品质的一种新手段^[12]。已有研究尝试通过过量表达内源或异源 FPPS 基因来提高中药活性成分的量或作物



相同和保守的氨基酸残基分别用黑色和灰色背景标记, 5 个保守功能域用下划线标注,

FARM 为第 1 个富含天冬氨酸功能域, SARM 为第 2 个富含天冬氨酸功能域

Identical and conservative amino acid residues are marked with black and gray backgrounds, respectively.

Consensus sequences shown below 5 highly conserved sequence domains. FARM-first Asp-rich motif; SARM-second Asp-rich motif

图 3 *SgFPPS* 的推测氨基酸序列及其与其他物种 FPPS 的同源性比较

Fig. 3 Homology comparison of deduced amino acid sequence of *SgFPPS* with FPPS sequences from other species

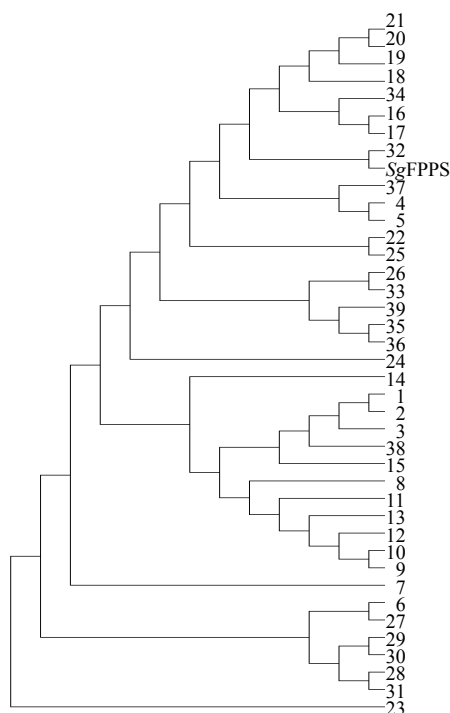


图 4 基于氨基酸序列的植物来源 FPPS 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of FPPS based on deduced amino acid sequences

质。在转基因青蒿中过量表达亚洲棉或青蒿的 FPPS 基因，转基因株系中青蒿素量均有一定提高^[13-14]。过量表达人参 FPPS 的转基因积雪草中甾醇和三萜类物质的量可提高 1.5 倍^[15]。提高在转化薄荷 FPPS 基因的烤烟中类胡萝卜素及萜烯类香气物质的量，对提高烟叶香气品质具有促进作用^[16]。

本研究根据植物 FPPS 保守区域，设计相应的简并性引物，利用 RT-PCR 和 RACE 技术从罗汉果中首次克隆了 SgFPPS 基因的全长 cDNA 序列。生物信息学方法分析结果表明，SgFPPS 合酶基因编码的蛋白具有 FPPS 5 个保守功能域，在氨基酸水平与苹果树的 FPPS 基因具有最高的同源性，一致性为 85.1%，推测罗汉果 FPPS 基因与其他作物的 FPPS 可能行使相同或相似的生物学功能，参与罗汉果甜苷 V 等重要萜类化合物的生物合成过程。目前本实验室已经构建了 SgFPPS 基因的 RNAi 和过量表达载体，并通过农杆菌介导转化罗汉果，SgFPPS 基因在罗汉果甜苷 V 合成中的作用研究正在进行中。

参考文献

[1] Bouvier F, Rahier A, Camara B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids [J]. *Prog Lipid*

Res, 2005, 44: 357-429.

- [2] 李 嵘, 王喆之. 植物法呢基焦磷酸合成酶的生物信息学分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2007, 15(2): 126-134.
- [3] 陈 莉, 蓝秀万, 李 坤, 等. 三七法呢基焦磷酸合酶基因的克隆及序列分析 [J]. *中草药*, 2006, 37(7): 1080-1083.
- [4] Chen A, Kroon P A, Poulter C D. Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure [J]. *Protein Sci*, 1994, 3: 600-607.
- [5] 肖培根. 新编中药志 [M]. 第 2 卷. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [6] 周 英, 郑 艳, Jeff E, 等. 罗汉果提取物和罗汉果苷 V 对胰岛素分泌的调节作用 [J]. *药理学学报*, 2009, 44(11): 1252-1257.
- [7] Takasaki M, Konoshima T, Murata Y, *et al*. Anticarcinogenic activity of natural sweeteners, cucurbitane glycosides, from *Momordica grosvenori* [J]. *Cancer Lett*, 2003, 198(1): 37-42.
- [8] 杨秀伟, 张建业, 钱忠明. 罗汉果中新的天然皂苷 [J]. *中草药*, 2008, 39(6): 810-814.
- [9] 周 兢, 王梦月, 李晓波, 等. HPLC 法测定罗汉果中罗汉果苷 V 和 11-氧化罗汉果苷 V [J]. *中草药*, 2007, 38(2): 196-198.
- [10] Matsumoto K, Kasai R, Ohtani K, *et al*. Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* (Cucurbitaceae) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(7): 2030-2032.
- [11] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Clone: a Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] 任 彦, 卢 钢, 曹家树, 等. 利用类萜代谢工程改良作物风味 [J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27: 319-324.
- [13] Han J L, Liu B Y, Ye H C, *et al*. Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48: 482-487.
- [14] Banyai W, Kirdmanee C, Mii M, *et al*. Overexpression of Farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) gene affected artemisinin content and growth of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2010, 103: 255-265.
- [15] Kim O T, Kim S H, Ohyama K, *et al*. Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng Farnesyl diphosphate synthase [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 403-411.
- [16] 李雪君, 崔 红, 刘海礁, 等. fps 转基因烤烟类胡萝卜素及其降解产物的研究 [J]. *中国烟草科学*, 2006, 27(3): 25-27.