

• 药材与资源 •

长柄石杉 *L*-赖氨酸脱羧酶基因克隆及序列分析宋育红^{1,2}, 陈作毅¹, 张君诚^{1*}

1. 复旦大学-三明学院 天然药物工程研究中心, 福建 三明 365004

2. 三明学院资源与化工学院, 福建 三明 365004

摘要: 目的 在对长柄石杉 *Huperzia serrata*、闽浙马尾杉 *Phlegariurus minchegensis*、华南马尾杉 *Phlegariurus austrosinicus* 和有柄马尾杉 *Phlegariurus petiolatus* 4种石杉科植物的 *L*-赖氨酸脱羧酶 (*L*-lysine decarboxylase, LDC) 基因编码区进行克隆的基础上, 对长柄石杉的 LDC 基因全长序列进行分析并预测其蛋白结构。方法 采用 RT-PCR 技术, 以石杉科植物叶片提取的总 RNA 为模板克隆得到 LDC 基因编码区序列, 通过 BLAST 比对和 MEGA5.0 软件对克隆的序列进行分析。采用 RACE 技术获得石杉科广布种长柄石杉的 LDC 基因全长序列, 并对其蛋白的二级结构及三维结构进行预测分析。结果 克隆的 4 种石杉科植物 LDC 基因序列与数据库中被注释为编码 LDC 的基因序列保持高度的相似性, 长柄石杉 LDC 蛋白与 NCBI 中的蛇足石杉 LDC 氨基酸序列相似性很高, 与蕨类植物江南卷柏的同源性也较高。长柄石杉 LDC 基因编码区全长为 1 266 bp, 编码 403 个氨基酸, GenBank 登录号 KF040056。结论 克隆得到 4 种石杉科植物的 LDC 基因, 分析了长柄石杉 LDC 基因的全长序列并预测其蛋白结构, 为进一步阐明石杉科植物石杉碱甲生物合成途径奠定基础。

关键词: *L*-赖氨酸脱羧酶; 石杉科; 基因克隆; 序列分析; 长柄石杉; 闽浙马尾杉; 华南马尾杉; 有柄马尾杉

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)21-3228-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.019

Cloning and sequence analysis of *L*-lysine decarboxylase gene in *Huperzia serrata* var. *longipetiolata*

SONG Yu-hong^{1,2}, CHEN Zuo-yi¹, ZHANG Jun-cheng¹

1. Research Center of Natural Medicines Engineer, Sanming College, Fudan University, Sanming 365004, China

2. College of Resources and Chemical Engineering, Sanming University, Sanming 365004, China

Abstract: Objective To obtain and analyze the full-length *L*-lysine decarboxylase (LDC) gene sequence of *Huperzia serrata* var. *longipetiolata* and predictively analyze its protein structure on the basis of cloning the coding region of LDC gene from four species of Huperziaceae. The species are *Huperzia serrata* var. *longipetiolata*, *Phlegariurus minchegensis*, *Phlegariurus austrosinicus*, and *Phlegariurus petiolatus*. **Methods** The LDC coding region sequences were cloned by RT-PCR strategy with the template of total RNA extracted from the leaves. Then the sequences were analyzed by means of BLAST and MEGA 5.0. The full-length of LDC gene sequence of *H. serrata* var. *longipetiolata* was obtained by RACE technology. And then the secondary structure and three-dimensional structure of LDC protein were predictively analyzed. **Results** The coding region sequences were highly similar to the lysine decarboxylase in the database. And the encoding protein of *H. serrata* var. *longipetiolata* was highly similar to the amino acid sequences of *H. serrata* in NCBI, and with high homology to *Selaginella moellendorffii*. The full-length LDC gene sequence of *H. serrata* var. *longipetiolata* contained 1 266 bp open reading frame and encodes a predicted protein of 403 amino acids. The GenBank accession number for this gene is KF040056. **Conclusion** The LDC genes of the four species of Huperziaceae are cloned in this study. The full-length LDC gene sequence of *H. serrata* var. *longipetiolata* is obtained and analyzed, and its protein structure is predictively analyzed. The result will provide a foundation for exploring the mechanism of huperzine A biosynthesis in the plants of Huperziaceae. **Key words:** *L*-lysine decarboxylase; Huperziaceae; gene cloning; sequence analysis; *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. var. *longipetiolata* (Spring) H. M. Chang; *Phlegariurus minchegensis* (Ching) L. B. Zhang; *Phlegariurus austrosinicus* (Ching) L. B. Zhang; *Phlegariurus petiolatus* (C. B. Clarke) H. S. Kung et L. B. Zhang

收稿日期: 2015-05-10

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2012J01145); 福建省生物学重点学科开放基金项目

作者简介: 宋育红 (1965—), 女, 副教授, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: song0598@163.com

*通信作者 张君诚, 男, 教授, 博士, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: 5988603101@163.com

石杉科 (Huperziaceae) 植物为多年生拟蕨类植物, 是最古老的植物类群之一, 现存马尾杉属 *Phlegmariurus* (Herter) Holub 和石杉属 *Huperzia* Bernh. 两属, 马尾杉属主要分布于长江以南, 现知 23 种; 石杉属广布全国, 现知 25 种^[1]。因其植株中的次生代谢生物碱石杉碱甲 (huperzine A, HupA) 是一种高效且低毒的乙酰胆碱酯酶活性抑制剂, 可作为老年性痴呆症治疗的临床特效药物^[1], 深受医药学界广泛关注。然而 HupA 在石杉科植物全草中的量甚微, 野生资源生物量小、生长缓慢、物种濒临灭绝^[2-4], 无法满足市场用药需求; 在结构化学方面, HupA 开环的吡啶酮环和六氢吡啶环结构的复杂性, 导致化学合成成本昂贵, 因此到目前为止, 未见 HupA 成功产业化生产的报道^[5]。目前 HupA 的获得仍全部依赖于天然石杉科植物全草的提取, 持续增长的 HupA 需求使石杉资源遭到严重破坏^[6]。随着近年石杉碱代谢途径和调控机制研究的深入, 生物合成与代谢工程已然成为生产 HupA 最有潜力的途径之一, 因此对合成与代谢途径中的关键 (限速) 酶的研究显得十分重要, 目前对有关 HupA 生物合成途径中关键酶基因的研究报道不多: Luo 等^[7-8]认为细胞色素 P450 参与到石杉碱的特殊构象催化反应中, 并起着关键作用; 杜次等^[9]对蛇足石杉的赖氨酸脱羧酶基因进行了克隆与分析; 张君诚等^[10]对 HupA 生物合成与代谢调控关键基因的差异表达进行了分析。目前 HupA 生物合成的起始物已经被证实为 L-赖氨酸^[11], L-赖氨酸脱羧酶 (L-lysine decarboxylase, LDC) 为 HupA 生物合成途径上第一个关键限速酶^[12-13], 对该酶基因的克隆及功能分析将有助于阐明 HupA 生物合成代谢途径。本实验对长柄石杉 *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. var. *longipetiolata* (Spring) H. M. Chang、闽浙马尾杉 *Phlegariurus minchegensis* (Ching) L. B. Zhang、华南马尾杉 *Phlegariurus austrosinicus* (Ching) L. B. Zhang 和有柄马尾杉 *Phlegariurus petiolatus* (C. B. Clarke) H. S. Kung et L. B. Zhang 4 种石杉科植物 LDC 基因序列进行克隆, 通过 RACE 技术获得了石杉科植物中开发利用价值高的广布种长柄石杉^[14]的 LDC 基因全长序列, 并预测了其蛋白质结构, 为进一步阐明石杉科植物 HupA 生物合成途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

1.1.1 材料 长柄石杉、闽浙马尾杉、华南马尾杉和有柄马尾杉于 2012 年夏季采自福建省尤溪县高山

村的福建省石杉科植物种质资源圃。全草采集株高为 10~12 cm 的植株, 采集后用清水冲洗干净, 用吸水纸吸干表面水分, 保存于-80 °C 超低温冰箱备用。植物材料由复旦大学潘胜利教授鉴定。大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 菌株由本实验室提供。

1.1.2 试剂 TRIzol RNA 试剂盒、DNA 凝胶回收纯化试剂盒、高纯度质粒中提试剂盒均为康为世纪公司产品; pGEM[®]-T Easy 载体系统试剂盒、M-MLV、Rnasin、Taq DNA 聚合酶均购自 Promega 公司; dNTP 和 DNA Marker 购于天根生物公司; Oligo-DT₁₈、LDC 基因扩增引物 LysD-F 和 LysD-R 由博尚生物技术有限公司合成。其他试剂均为分析纯国产试剂。

1.1.3 仪器 PTC-100 多功能热循环仪 (美国); GIS2008 型凝胶成像系统; 紫外可见光光度计 (UV-1240, 岛津公司); 制冰机 (ICE TWO-Q21); 高速冷冻离心机 (Multifuge X3FR, 美国 Thermo); 超低温冰箱 (MDF-U4086s, 三洋公司); 卧式高压蒸气消毒锅 (YXQ-WYD1600); 电热恒温水浴锅 (HHS-II-2K); 生化培养箱 (HPS-250); DYY 型双移定时电泳仪。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取和 cDNA 的合成 取 4 种石杉科植物新鲜材料, 使用康为世纪 TRIzol RNA 试剂盒提取总 RNA。用紫外分光光度计进行浓度及纯度的测定, 1% 的琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。再利用 Promega 公司的 M-MLV 反转录酶, 按照该试剂盒说明书提供的反应条件和步骤进行实验操作, 将 RNA 反转录成第一链互补链 DNA (cDNA)。

1.2.2 石杉科植物 LDC 基因的扩增及测序 根据美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. 的 EST 数据库序列 (GenBank: GO914645.1), 结合使用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计引物, 由博尚生物技术有限公司合成。引物为 LysD-F: 5'-GCAGCA-GTGGCAAGAAGA-3', LysD-R: 5'-T-GGGCAGTT-GAAGCAGAC-3'。以 4 种石杉科植物的 cDNA 为模板, 按照以下体系对 LDC 基因进行扩增: cDNA 2.5 μL, 10×缓冲液 5.0 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1.25 μL, dNTP mix (10 mmol/L) 1.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 4.5 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.75 μL, 终体积为 30.0 μL。反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 然后进行 32 个循环: 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延

伸 45 s; 循环结束后 72 °C 延伸反应 5 min, 4 °C 条件下保存。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 对扩增所得目的片段进行切胶回收。

将回收产物与 pGEM[®]-T Easy (USA Promega 公司) 载体连接, 使用新制备的 Top 10 感受态细胞进行转化, 在含有氨苄的 LB 平板上进行培养, 挑取单克隆菌落 PCR 扩增和电泳检测后选择阳性克

隆送公司测序。

1.2.3 长柄石杉 LDC 基因全长的调取 采用 RACE 技术获得广布种长柄石杉 LDC 基因全长序列, 所用引物见 (表 1)。RACE 结果经过纯化回收, 连接载体, 转化后提取质粒测序。5'-RACE 测序结果与 3'-RACE 测序结果经过 DNAMAN 软件拼接后得到 LDC 基因全长序列。

表 1 LDC 基因调取的扩增引物

Table 1 LDC gene retrieval and amplification primers

引物名称	引物序列 (5'→3')
5' RACE-P1	GGCCACGCGTCGACTAGTACCCCCCCCCCCCCCCCCC
5' RACE-P2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
3' RP1	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTvn
3' router	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTTTC
cb5r1	GAGCAATAAATGCATAAGCTTGTCG
cb5r2	CTGCAACAGCAAGTACTTCTCCAAC
cb3r1	GGCTGAAATGGCACGACAAGCTTATG
cb3r2	GGAAATGATCACGTGGTCTCAGC

1.2.4 LDC 基因生物信息学分析 采用 GOR 贝叶斯统计学法 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl) 进行 LDC 蛋白质二级结构分析, SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 分析预测 LDC 蛋白质的三维结构。氨基酸序列比对利用 NCBI 的蛋白质序列数据库进行, 通过 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。

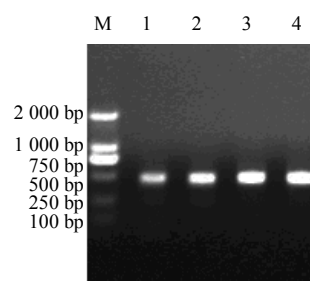
2 结果与分析

2.1 4 种石杉科植物 LDC 基因克隆与长柄石杉 LDC 基因全长序列分析

提取的 4 种石杉科植物的 RNA 经检测其浓度及纯度达到实验要求后反转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 利用 RT-PCR 技术扩增获得 4 种石杉科植物 LDC 基因 (图 1)。采用 RACE 技术获得的长柄石杉 LDC 基因全长序列为 1 266 bp, 4 种碱基的量分别为 A 29.5%、C 19.4%、G 24.4%、T 26.7%。双链的 DNA 分子大小为 780 410。该序列编码的蛋白质由 403 个氨基酸组合而成, 将核酸序列提交到 NCBI, GenBank 登录号为 KF040056。

2.2 长柄石杉 LDC 基因编码蛋白的二级结构及三维结构预测

使用 GOR 贝叶斯统计学法分析 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl), 结果表明长柄石杉 LDC 蛋白的二级结构中 α -螺旋 (α -helix) 结构占 34.49%, 延伸主链结构 (extended strand) 占



M-Marker 1-长柄石杉 2-闽浙马尾杉 3-华南马尾杉 4-有柄马尾杉
M-Marker 1-*H. serrata* var. *longipetiolata* 2-*P. mincheensis* 3-*P. austrosinicus* 4-*P. petiolatus*

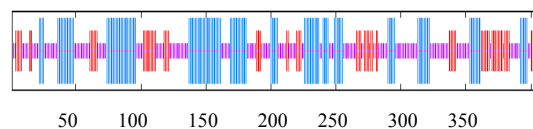
图 1 4 种石杉科植物 LDC 基因目的条带

Fig. 1 Gel electrophoresis of LDC gene in four plants from Huperziaceae

19.35%, 随机卷曲 (random coil) 占 46.15% (图 2)。使用 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测了 LDC 蛋白的三维结构, 第 63 至 242 位氨基酸参与了建模, 结果见图 3。

2.3 LDC 基因核酸序列比对与系统发生分析

将 4 种材料的 LDC 基因测序结果通过 Nucleotide blast 下的 Blastn 比对, 结果显示 Nucleotide collection (nr/nt) 核酸非冗余数据库^[16]中的蛇足石杉 LDC 全长基因 *Huperzia serrata* lysine decarboxylase 1 (LDB1) gene (Sequence ID: gb|JQ308624.1|) 和 *Huperzia serrata* lysine decarboxylase 2 (LDB2) gene



蓝色表示 α -螺旋, 红色表示延伸主链, 浅紫色表示随机卷曲
blue indicates α -helix; red indicates extended strand; light purple indicates random coil structure

图 2 长柄石杉 LDC 二级结构预测

Fig. 2 Prediction of LDC secondary structure in *H. serrata* var. *longipetiolata*

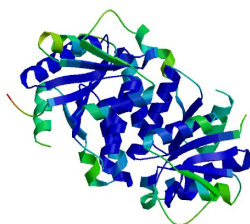


图 3 长柄石杉 LDC 三级结构预测

Fig. 3 Prediction of LDC tertiary structure in *H. serrata* var. *longipetiolata*

(Sequence ID: gb|JQ308625.1|), 以及 EST 数据库中 *Huperzia serrata* Leaf 02980 (Sequence ID: GO 914645.1) 3 条序列与实验获得 4 种材料的 LDC 基因序列具有较高的相似性, 且数据库中的这 3 条序列皆被注释为编码 CDC 的基因, 可见克隆获得的 4 种材料的基因确为 CDC 基因。采用 MEGA5.0 软件将以上序列基于 Maximum Composite Likelihood 距离 (Bootstrap 重复 1 000 次) 构建 UPGMA 树型图, 由图 4 可见, 长柄石杉的 LDC 基因序列与数据库中的蛇足石杉 LDC 基因序列 LDB1、LDB2 (JQ308624.1、JQ308625.1) 及引物设计序列 LDC (GO914645.1) 聚类到一起, 说明长柄石杉与蛇足石杉的 LDC 基因序列具有高同源性, 而 3 种马尾杉属植物 (闽浙马尾杉、华南马尾杉和有柄马尾杉) 聚为一簇, 一定程度上验证了对石杉科植物分类的科学性。

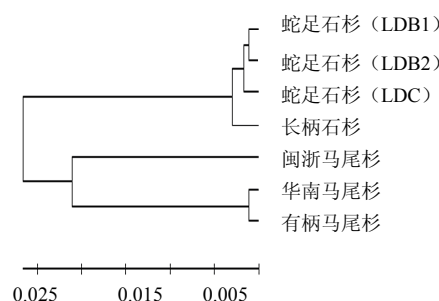


图 4 LDC 基因 UPGMA 图

Fig. 4 UPGAM tree of LDC gene

2.4 LDC 氨基酸序列比对与进化分析

将长柄石杉的 LDC 氨基酸全长序列与蛇足石杉的 LDC1 和 LDC2 氨基酸序列即 LDB1 (JQ308624.1) 和 LDB2 (JQ308625.1) 进行比对 (图 5), 从图 5 可以看出长柄石杉 LDC 氨基酸序列长度超过目前已获得的蛇足石杉 LDC, 在第 7、76、83、113、158、203、206、217~219、224、230、233 位, 长柄石杉 LDC 与 LDB1、LDB2 均有差异, 而在第 237~242 位长柄石杉 LDC 与 LDB1 高度相似而与 LDB2 有差异。长柄石杉 LDC 氨基酸序列与蛇足石杉 LDB1、LDB2 序列的相似性分别为 92.08% 和 89.11%, 说明长柄石杉与蛇足石杉的 LDC 基因有高的同源性, 可以认为它们的 LDC 基因是一个基因家族, 许多同源基因编码的蛋白催化同一类的生物反应, 同时也表明该基因功能域部分绝对保守。

从 NCBI 的非冗余蛋白数据库 (Nr) 中选取与 4 种石杉科植物 LDC 基因编码蛋白相似性高的 8 个物种 16 条 LDC 蛋白序列, 使用 Mega 5.0 软件构建 Neighbor Joining (NJ) 系统进化树 (图 6)。这些序列包括蛇足石杉 (gi|381392359|、gi|381392357|)、江南卷柏 *Selaginella moellendorffii* Hieron (gi|300164809|、gi|300172123|)、玉米 *Zea mays* L. (gi|414880785|、gi|195627148|、gi|195653861|)、桃 *Prunus persica* (L.) Batsch. (gi|462403512|)、毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. et Gray (gi|222841434|、gi|222855466|)、黄瓜 *Cucumis sativus* Linn. (gi|444327158|)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (gi|297319084|)、蓖麻 *Ricinus communis* L. (gi|223544575|、gi|223530312|、gi|223541391|) 等的 LDC 序列。从图 6 可见, 克隆的 4 种石杉科植物 LDC 氨基酸序列首先与石杉科的蛇足石杉的 LDC

长柄石杉 LDC	ERYERMAAFIDPLPVKSSKFKRICVFCGSSSGKKSIVYSDA	80
蛇足石杉 LDC1	MEAFIDPLPVKSSKFKRICVFCGSSSGKKSIVYSDA	35
蛇足石杉 LDC2	MEAFIDPLPVKSSKFKRICVFCGSSSGKKSIVYSDA	35
相同序列	m afidplpvksskfkricvfcgsssgkks ysd	
长柄石杉 LDC	ALDLGRELVERKIDLVYGGGSGVGLMGLVAQKVHDGGCHVT	120
蛇足石杉 LDC1	ALDLGRELVERKIDLVYGGGSGVGLMGLVAQKVHDGGCHVT	75
蛇足石杉 LDC2	ALDLGRELVERKIDLVYGGGSGVGLMGLVAQKVHDGGCHVT	75
相同序列	al lgreilverkidlvvyggsgvglmglvaqkv dggchvt	
长柄石杉 LDC	GVIPKALMPSEISGPSVGEVLAVADMHQRKAEMARQAYAF	160
蛇足石杉 LDC1	GVIPKALMPSEISGPSVGEVLAVADMHQRKAEMARQADAF	115
蛇足石杉 LDC2	GVIPKALMPSEISGPSVGEVLAVADMHQRKAEMARQADAF	115
相同序列	gvipkalmipseisgpsvgevlavadmhqrkaemarqa af	
长柄石杉 LDC	IALPGGYGTLEELLEMITWSQLGIHDKFPVGLLNVDGYYNP	200
蛇足石杉 LDC1	IALPGGYGTLEELLEMITWSQLGIHDKFPVGLLNVDGYYNP	155
蛇足石杉 LDC2	IALPGGYGTLEELLEMITWSQLGIHDKFPVGLLNVDGYYNP	155
相同序列	ialpggygtleellemitwsqlgihdkfpvgllnvdgyynp	
长柄石杉 LDC	LLLEFEGKTEEGFIKPSKQIVVASTAHLLIRLEEYVP	240
蛇足石杉 LDC1	LLKLEDKGTEEGFIKPGFRQIVVASTAHLLIRLEEYVP	195
蛇足石杉 LDC2	LLKLEDKGTEEGFIKPGFRQIVVASTAHLLIRLEEVHHL	195
相同序列	ll lf kgteegfikp qivv astah ll rle	
长柄石杉 LDC	MHERVASRETWEMEQLGYSTITQNNHNVLLHFDLEQVERTG	280
蛇足石杉 LDC1	MHDGVAPRETWEIERLV.....	212
蛇足石杉 LDC2	LREKVRK.....	202
相同序列	v	

图 5 长柄石杉 LDC 蛋白与蛇足石杉 LDC 蛋白的同源性比较

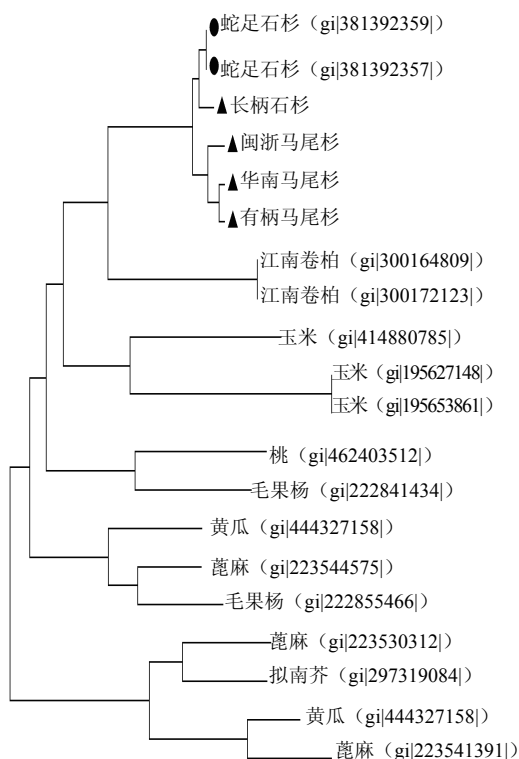
Fig. 5 Amino acid alignments of LDC between *H. serrata* var. *longipetiolata* and *H. serrata*

图 6 LDC 基因编码氨基酸序列的 NJ 进化树

Fig. 6 NJ tree phylogenetic analysis of LDC coding amino acid sequences

(gi|381392359)、(gi|381392357) 聚类在一起, 其中长柄石杉与蛇足石杉聚类为一分支, 而 3 种马尾杉属植物聚为一簇, 说明相对于其他石杉科植物, 长柄石杉 LDC 蛋白与 NCBI 中的蛇足石杉 LDC 氨基酸序列相似度最高。在系统发生树中, 石杉科植物与蕨类植物江南卷柏的 LDC 基因^[17](gi|300164809、gi|300172123) 的距离相对于其他植物如玉米 (gi|414880785、gi|195627148、gi|195653861), 桃 (gi|462403512), 毛果杨 (gi|222841434) 等植物的 LDC 基因的距离更为接近, 更加确定了其分类学上的依据。与拟南芥等植物的 LDC 氨基酸序列具有部分相似性。

3 讨论

由于 HupA 目前尚未能人工合成, 也未见通过组织培养^[5]、产 HupA 内生真菌发酵培养^[18-19] 等其他途径实现 HupA 来源产业化的报道, 药品生产仍完全依赖野生资源, 因此通过生物合成途径获得 HupA 成为一种有潜力的途径。有关石杉碱生物合成可能途径的研究, 已有学者进行了探索: 我国学者 Ma^[5]、谭昌恒等^[20]对 HupA 及相关的石松碱在石杉科植物体中代谢途径进行了初步的探讨, 较为完善地描述了从 L-赖氨酸为起始物合成 HupA 途径

中,各个中间物的相互转化^[21]。LDC 主要生物学功能催化 L-赖氨酸脱羧生成 1,5-戊二胺(尸胺)和二氧化碳。1,5-戊二胺是一种多胺,是生物体内广泛存在的具有生理活性的含氮碱^[22],是植物次生代谢产物生物碱合成的重要前体物质。张君诚等^[10]通过对 HupA 生物合成与代谢调控关键基因的差异表达分析,认为 LDC 基因编码的蛋白对 HupA 的积累具有明显的促进作用。

本实验对长柄石杉、闽浙马尾杉、华南马尾杉和有柄马尾杉 4 种石杉科植物 LDC 基因序列进行了克隆,长柄石杉为石杉科植物中的广布种,资源储量相对较高,具有较高的研究和利用价值;其他 3 物种 LDC 基因的克隆不仅有助于对长柄石杉 LDC 基因序列的分析,而且对石杉碱生物合成的后续研究有一定的意义,华南马尾杉与有柄马尾杉 HupA 量差异极大,后者约为前者的 10 倍^[23],二者对于产 HupA 基因的筛选具有较高的研究价值。

采用 RACE 技术首次获得石杉科广布种长柄石杉的 LDC 基因全长序列,编码区长为 1 266 bp,编码 403 个氨基酸,GenBank 登录号 KF040056,其序列长度超过目前已获得的蛇足石杉 LDC 序列(JQ308624.1、JQ308625.1 分别编码 212、202 个氨基酸^[7])。通过核酸序列及氨基酸序列的比对分析验证了所克隆的 LDC 基因的正确性。进化分析显示(图 6)长柄石杉 LDC 蛋白与 NCBI 中的蛇足石杉 LDC 蛋白氨基酸序列相似度最高。石杉科植物与蕨类植物江南卷柏的 LDC 序列同源性较高。研究结果丰富了为数不多的石杉科植物石杉碱生物合成与代谢调控可能途径中涉及到的关键酶基因序列,同时也为 L-赖氨酸脱羧酶基因的转导技术夯实了基础。石杉碱生物合成与代谢途径复杂,参与调控的酶种类繁多,已知的有赖氨酸脱羧酶、二胺氧化酶、细胞色素 P450、氮甲基转移酶等^[10,24],目前对关键酶基因的研究尚处起步阶段,还有更多的功能基因需要筛选研究,合成与代谢过程仍有许多不确定的中间体产物的存在,需要通过进一步深入研究以期为实现 HupA 生物合成奠定基础。

参考文献

- [1] 唐希灿. 石杉碱甲(双益平):一种有望治疗早老性痴呆症的药物[J]. 中国药理学报, 1996, 17(6): 481-484.
- [2] Ma X Q, Tan C H, Zhu D Y, *et al.* Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of *Huperziaceae* species in China [J]. *J Agric*

Food Chem, 2005, 53(5): 1393-1398.

- [3] 林如辉, 张丹凤, 张靖, 等. 不同种质资源蛇足石杉引种及差异蛋白比较分析[J]. 中草药, 2014, 45(1): 113-117.
- [4] 马英姿, 张慧, 王志毅, 等. 高温胁迫对蛇足石杉质膜透性及叶绿体结构的影响[J]. 中草药, 2013, 44(18): 2605-2610.
- [5] Ma X Q, Gang D R. *In vitro* production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(10): 2022-2028.
- [6] Ma X, Tan C, Zhu D, *et al.* A survey of potential huperzine A natural resources in China: The huperziaceae [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104(1/2): 54-67.
- [7] Luo H M, Li Y, Sun C, *et al.* Comparison of 454-ESTs from *Huperzia serrata* and *Phlegmariurus carinatus* reveals putative genes involved in lycopodium alkaloid biosynthesis and developmental regulation [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 209-213.
- [8] Luo H M, Sun C, Li Y, *et al.* Analysis of expressed sequence tags from the *Huperzia serrata* leaf for gene discovery in the areas of secondary metabolite biosynthesis and development regulation [J]. *Physiol Plant*, 2010, 139(1): 1-12.
- [9] 杜次, 李菁, 唐云涛, 等. 蛇足石杉赖氨酸脱羧酶基因的克隆、原核表达及其功能分析[J]. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1299-1307.
- [10] 张君诚, 陈作毅, 宋育红. 石杉碱甲生物合成与代谢调控关键基因的差异表达分析[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 1-5.
- [11] Castillo M, Gupta R, MacLean D, *et al.* Biosynthesis of lycopodine from lysine and acetate. The pelletierine hypothesis [J]. *Can J Chem*, 1970, 48(12): 1893-1903.
- [12] Wimo A, Winblad B, Jönsson L. An estimate of the total worldwide societal costs of dementia in 2005 [J]. *Alzheimer's Dementia*, 2007, 3(2): 81-91.
- [13] Jiang H, Luo X, Bai D. Progress in clinical, pharmacological, chemical and structural biological studies of huperzine A: A drug of traditional chinese medicine origin for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(21): 2231-2252.
- [14] Apostolova L G, Mosconi L, Thompson P M, *et al.* Subregional hippocampal atrophy predicts Alzheimer's dementia in the cognitively normal [J]. *Neuro Aging*, 2010, 31(7): 1077-1088.
- [15] 宋育红, 张君诚, 张杭颖, 等. 福建省石杉科(Huperziaceae)植物资源分布与群落特征研究[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2014, 53(3): 336-343.
- [16] Altschul S F, Gish W, Miller W, *et al.* Basic local

- alignment search tool [J]. *J Mol Biol*, 1990, 215(3): 403-410.
- [17] Banks J A, Nishiyama T, Hasebe M, *et al*. The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants [J]. *Science*, 2011, 332(6032): 960-963.
- [18] 苏经迁, 黄彬, 邱慧, 等. 产生物碱和石杉碱甲蛇足石杉内生真菌的初步研究 [J]. 中国药学杂志, 2013, 46(19): 1477-1481.
- [19] 鞠 鑫, 王 峻, 潘胜利. 4 种石杉科植物中产生石杉碱甲的内生真菌的分离及初步鉴定和 HPLC 测定石杉碱甲的含量 [J]. 复旦学报: 医学版, 2009, 36(4): 445-449.
- [20] 谭昌恒, 朱大元. 石松生物碱研究进展 [J]. 中国天然药物, 2003, 1(1): 1-7.
- [21] Hemscheidt T. Tropane and related alkaloids [J]. *Biosynthesis*, 2000, 209: 175-206.
- [22] 曹 敏. 多胺及其植物生理学作用 [J]. 植物生理学通讯, 1984, 6(1): 1-5.
- [23] 张君诚, 黄 晖, 张杭颖, 等. 武夷山脉石杉科植物石杉碱甲含量的研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 629-633.
- [24] 陈作毅, 张君诚. 石杉碱生物合成与代谢途径研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1815-1818.