

• 药材与资源 •

穿心莲香叶基香叶基焦磷酸合成酶基因的克隆与表达

王晓云^{1,2}, 陈蓉³, 张恩慧¹, 钟国跃^{1,2*}

1. 江西中医药大学江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心, 江西 南昌 330004

2. 江西省中药种质资源工程技术研究中心, 江西 南昌 330004

3. 桂林医学院, 广西 桂林 541004

摘要: 目的 从穿心莲中克隆穿心莲内酯合成途径中的香叶基香叶基焦磷酸合成酶(geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPS)基因, 并进行组织表达等特征研究。方法 采用CTAB-LiCl法从穿心莲茎和叶中提取总RNA, 简并引物扩增获得保守区段, RACE法获得基因全长, ProtParam等软件分析基因特征, 实时荧光PCR法检测不同发育时期穿心莲茎和叶中基因的表达。结果 获得了一个长1 047 bp的GGPS基因, 编码一条由348个氨基酸组成的蛋白质序列, 与长春花的GGPS蛋白亲缘关系较近, N端含有一个由47个氨基酸构成的质体信号肽。在穿心莲的茎和叶中, GGPS基因在花蕾期表达量较高, 初花期降低; 到了花果混合期表达量升高, 青果期下降。表明穿心莲花蕾期和花果混合期相关代谢成分的合成可能更活跃。结论 从穿心莲中克隆了GGPS基因, 为开展穿心莲内酯合成途径的调控奠定了基础。

关键词: 穿心莲; 穿心莲内酯; 生物合成途径; GGPS基因; 克隆; 表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)24-3727-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.020

Cloning and tissue expression of geranylgeranyl diphosphate synthase gene from *Andrographis paniculata*

WANG Xiao-yun^{1,2}, CHEN Rong³, ZHANG En-hui¹, ZHONG Guo-yue^{1,2}

1. Collaborative Innovation Center for the Modern Technology and Industrial Development of Jiangxi Minority Traditional Medicine, Nanchang 330004, China

2. Chinese Medicine Germplasm Resource Engineering Technology Research Center of Jiangxi Province, Nanchang 330004, China

3. Guilin Medical University, Guilin 541004, China

Abstract: Objective Andrographolide is the main bioactive substance in *Andrographis paniculata*, and popularly used as active pharmaceutical ingredient (API). We have cloned the gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *A. paniculata* and characterized its tissue expression pattern. **Methods** Total RNA was extracted with CTAB-LiCl extraction method; Conserved fragment was amplified and cloned with degenerated primers, and a full length ORF encoding geranylgeranyl diphosphate synthase was obtained with RACE method and analyzed by bioinformatic softwares, e.g. ProtParam. Tissue expression pattern was predicted with real time PCR. **Results** We have cloned a 1 047 bp GGPS gene encoding a sequence with 348 amino acids. This amino acid sequence contained a plastid targeted N-terminal signal peptide and has high similarities with the GGPS protein from *Catharanthus roseus*. The GGPS gene has expressed in a dynamic state in stems and leaves of *A. paniculata*. The expression reached a high level at bud stage, then decreased at early flowering stage, increased at flowering and early seed setting stage again, and finally decreased at seed setting stage. Considering the above expression characteristics, biosynthesis of metabolites regulated by GGPS was deduced more active at bud stage and flowering and early seed setting stage. **Conclusion** GGPS is a key enzyme in biosynthesis of andrographolide. We have cloned the GGPS gene from *A. paniculata*, and provide a sharp tool in genetic engineering of andrographolide biosynthesis pathway.

Key words: *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees; andrographolide; biosynthesis pathway; GGPS gene; cloning; expression

收稿日期: 2015-09-13

基金项目: 基于遗传与环境的穿心莲品质保障技术示范研究(2012BAI29B02)

作者简介: 王晓云(1971—), 女, 副教授, 主要从事中药资源与分子生药学研究。Tel: (0791)87118873 E-mail: wxy20052002@aliyun.com

*通信作者 钟国跃, 研究员, 主要从事中药资源、质量评价与民族药研究。Tel: (0791)87118873 E-mail: zgy1037@163.com

穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 为爵床科一年生草本植物, 有清热解毒、抗炎、消肿止痛作用。穿心莲内酯是穿心莲的主要活性成分, 属于二萜类化合物, 国内已经利用穿心莲内酯开发出多种中药产品, 包括天津天士力制药股份有限公司研制开发的穿心莲内酯滴丸、哈药集团三精制药股份有限公司生产的穿琥宁注射液等, 这些中药制剂在避免滥用抗生素方面发挥了一定的作用^[1]。穿心莲属于热带植物, 原产于印度半岛和斯里兰卡, 由于其野生资源匮乏和重要的药用价值, 在印度、斯里兰卡等被列为严禁出口的保护物种。我国的穿心莲系外来引种栽培物种, 药用首见于《岭南采药录》(1932 年), 以“春莲秋柳”之名记载^[2], 引种栽培至少已有 80 余年的历史, 现广西、广东、福建、海南、安徽、四川、陕西等省份均有种植, 除作药材外, 也用作穿心莲内酯的生产原料。然而, 有研究表明, 不同产地穿心莲药材质量差异显著, 穿心莲内酯的量相差 5~6 倍^[3]。另一方面, 由于各地引种穿心莲的种源单一, 穿心莲严格的自花授粉特性也阻碍了其遗传物质交流, 使得我国穿心莲的种质遗传多样性水平很低^[4], 种群适应性较弱。另外, 上述各穿心莲种植地的生态环境也存在较大的差异, 提示穿心莲中穿心莲内酯的量系受到穿心莲内酯体内生物合成水平和产地生态因子的双重影响。因此, 探讨穿心莲内酯的生物合成途径, 具有重要意义。

穿心莲内酯在穿心莲的茎、叶片和根系培养物中均可合成^[5-8]。研究表明, 穿心莲内酯的生物合成有 2 条途径, 一条为甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 途径, 定位在细胞质中; 另一条为 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径, 发生于质体中。在这 2 条途径中, 香叶基香叶基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 是穿心莲内酯合成的前体, 它是在香叶基香叶基焦磷酸合成酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPS) 的作用下, 由法尼基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 加上一个异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 基团后产生的。有学者克隆了 GGPS 基因的片段, 进一步检测结果表明, GGPS 基因的表达量与穿心莲内酯的合成量呈现高度正相关^[9]。本研究利用 RACE 技术, 从穿心莲中克隆了 GGPS 基因的全长序列, 并研究其在穿心莲茎、叶发育不同阶段的表达情况, 为穿心莲内

酯合成途径的调控奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

2015 年购买穿心莲种子, 6 月份种植在江西中医药大学神农园中, 长成植株后, 经江西中医药大学钟国跃研究员鉴定为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees。

1.2 仪器

PCR 扩增在 Bio Rad PCR 仪 (C1000 Touch) 上进行, 在 Bio Rad 化学发光成像系统 (ChemiDoc XRS⁺) 上检测扩增条带。连接产物的电击转化在 BTX 电穿孔仪 (Gene Pulser Xcell) 上进行。基因表达分析在 Applied Biosystems ViiA7 Real-Time PCR System 上进行。

1.3 试剂

CTAB、LiCl、PVP K25、Tris-HCl、EDTA、 β -巯基乙醇、DEPC、氯仿、异戊醇、NaAc 等总 RNA 提取所用化学试剂以及核酸电泳所用试剂均为分析纯, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司。Roche 逆转录试剂盒 (Transcriptor cDNA Synth. Kit 2)、Roche FS Universal SYBR Green Master 购自南昌东湖强生生物试剂经营部。SYBR Green 染料、SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒、克隆载体、连接酶、大肠杆菌菌株、Tks Gflex DNA 聚合酶等其他分子生物学试剂均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。PCR 产物和阳性单克隆测序由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司完成。所有引物均由苏州泓迅生物科技有限公司合成 (表 1)。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取

取穿心莲植株地上部分, 按文献方法^[10]提取总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取产物, 用于克隆全长基因。采用 Roche 逆转录试剂盒 (Transcriptor cDNA Synth. Kit 2) 获得 cDNA, 每个样品的总体积 20 μ L。首先在 12 μ L 总 RNA 中加入 1 μ L Anchored-oligo (dT) 18 Primer, 轻轻混匀后, 在 65 $^{\circ}$ C 反应 10 min; 然后再加入 4 μ L Buffer, 0.5 μ L RNase Inhibitor, 2 μ L dNTP mix, 0.5 μ L 反转录酶, 轻轻混匀, 在 55 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后, 转为 85 $^{\circ}$ C 反应 5 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。

表1 克隆 GGPS 基因所用的引物
Table 1 Primers used in GGPS gene cloning

引物用途	引物名称	引物序列(5'→3')
扩增保守区段 ^[8]	GGPS-F1	GAYGAYCTNCCNTGYATGGA
	GGPS-R1	ATRTCRTCMACHACYTGRAA
	GGPS-F2	CAYACBATGTC IYTMRTICA
	GGPS-R2	TIACRTC RAGAATRTCRTCHA
扩增 3'和 5'端	UPM long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	UPM short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
	5'PCR Primer IIA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	AP-GGPS-3'	GGCAGGGCAAGTGGTGGACATATGTT
	CTG0074 R1	CCGTCTTCCCCAGCTCCTCC
	CTG0074 R2	GACTCTGTTCGCACCTCCCAAT

2.2 克隆保守区段

按照文献方法^[11]进行 2 轮 PCR 扩增,反应总体积 20.0 μL , 包括 cDNA 产物 1.0 μL , 10 \times Ex Taq buffer 2.0 μL , dNTP mix (10 mmol/L) 1.6 μL , 上下游引物(第 1 轮为 GGPS-F2 和 GGPS-R2, 第 2 轮为 GGPS-F1 和 GGPS-R1, 10 $\mu\text{mol/L}$) 各 5 μL , ExTaq 0.3 μL 和 5.1 μL ddH₂O。第 1 轮 PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 20 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。第 2 轮 PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。反应结束后, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测产物。切胶回收清晰的条带后, 进行测序。

2.3 反转录获得 cDNA

按照 SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒说明书, 制备 5'RACE cDNA 和 3'RACE cDNA, 分别用于 5'RACE 和 3'RACE 反应。在配制反转录体系时, 根据文献方法^[12]使用了海藻糖 (trehalose) 和甜菜碱 (betaine), 因而对说明书中的反转录体系略加改动。

2.4 配制引物工作液

UPM 引物需要配制成 10 倍混合液。先把 UPM Long 和 UPM Short 引物稀释成 10 $\mu\text{mol/L}$, 取 UPM Long 引物 4 μL , UPM Short 引物 20 μL , 最后加入 76 μL 灭菌水, 混合即成 10 \times UPM 引物工作液。其他引物均配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液。

2.5 3'RACE 反应

采用巢式 PCR 扩增 3'端序列。在第 1 轮扩增反应中, 首先配制总体积为 40.5 μL 的 Master mix, 由 34.5 μL ddH₂O、5.0 μL 10 \times Advantage 2 PCR buffer、

1.0 μL 50 \times Advantage 2 polymerase mix 组成。然后在 Master mix 中分别加入 2.5 μL 3'RACE cDNA 和 5.0 μL 10 \times UPM 引物, 使得总体积达到 50.0 μL 。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 、30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。将第 1 轮 PCR 产物用 TE 稀释 50 倍, 取 2.5 μL 用作模板, 分别加入 41.5 μL Master mix, 1.0 μL 5'Primer II A 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 AP-GGPS-3'引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 总体积 50.0 μL , 进行第 2 轮 PCR。扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 68 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 20 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。

反应结束后, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测产物。切胶回收清晰的条带后, 进行 TA 克隆, 筛选阳性单克隆后测序。

2.6 5'RACE 反应

使用 TaKaRa Tks Gflex DNA 聚合酶进行 2 轮巢式 PCR 扩增。第 1 轮扩增的反应总体积为 50.0 μL , 包括 2.5 μL 5'RACE cDNA, 25.0 μL 2 \times Gflex PCR buffer (Mg²⁺, dNTP plus), 1.0 μL Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/ μL), 0.5 μL 10 \times UPM 引物, 1.0 μL CTG0074 R1 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 15.5 μL ddH₂O; 第 2 轮扩增的反应总体积为 50.0 μL , 包括 1.0 μL 第 1 轮 PCR 反应液, 25.0 μL 2 \times Gflex PCR buffer (Mg²⁺, dNTP plus), 1.0 μL Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/ μL), 1.0 μL 5'PCR Primer IIA 引物和 CTG0074 R2 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 21.0 μL ddH₂O。2 轮 PCR 扩增条件均为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 30 个循环。

反应结束后, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测产物。

切胶回收清晰的条带后,进行 TA 克隆,筛选阳性单克隆后测序。

2.7 GGPS 基因的拼接、扩增和生物信息学分析

利用 CodonCode Aligner 软件进行序列拼接。根据拼接后的序列,设计两侧引物,从穿心莲 cDNA 中进行全长序列的扩增。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。切胶回收清晰的条带后,进行 TA 克隆,筛选阳性单克隆后测序。

BioEdit 软件进行开放阅读框(open reading frame, ORF)编码氨基酸序列的翻译,NCBI 网站上的 Conserved Domain Search 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行保守结构域分析,BlastP 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)做同源性搜索。采用 ProtParam 软件(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)计算蛋白质的相对分子质量和等电点,预测一级结构。采用 DNAMAN 软件进行蛋白质的多序列比对,MEGA6.06 软件构建系统进化树。用 ChloroP 1.1 Server 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)鉴定蛋白质的叶绿体定位信号序列。

2.8 GGPS 基因表达分析

在花蕾期、初花期、花果混合期、青果期,分别取穿心莲植株的地上部分,分离茎和叶,分别提取总 RNA,用于基因表达分析。每个时期各取 3 株。总 RNA 提取和反转录方法同上。

采用 SYBR Green 染料法,进行实时荧光定量 RT-PCR 反应,总体积为 10 μ L,GGPS 基因的扩增引物为 5'-GAGCAGAAATAACCAGCCATCA-3' 和 5'-CGGTAGAATAGATCAAATCGCAGT-3',预期产物大小为 207 bp;根据穿心莲 18S 核糖体 RNA 基因序列(GenBank: FJ002343.1)设计内参引物 5'-TTTCTGCCCTATCAACTTTCGA-3'和 5'-CTGCCTTCCTTGATGTGGT-3',预期产物大小为 125 bp。扩增程序是 95 $^{\circ}$ C、10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、30 s,40 个循环;熔解曲线是 95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、1 min,95 $^{\circ}$ C、15 s。

每个模板每次扩增 3 个复孔。实验重复 3 次,采用比较 CT 值法^[13]在 Excel 软件上分析相对表达量,通过单因素方差分析检验数据的差异显著性。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 提取

利用无液氮法,提取获得了质量较好的穿心莲总 RNA(图 1)。

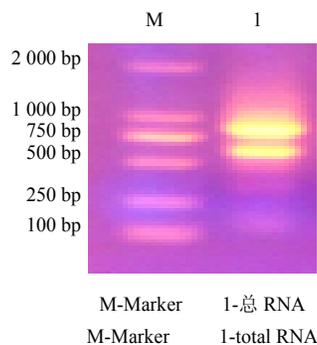


图 1 穿心莲总 RNA

Fig. 1 Total RNA extracted from *A. paniculata*

3.2 保守区段扩增和 RACE

保守区段扩增后,经琼脂糖凝胶电泳检测产物,略小于 500 bp 处有一条带。回收后,直接进行测序,获得 408 bp 保守区段。采用巢式 PCR 进行 3'RACE 扩增,在 500 bp 左右各有一条带;采用巢式 PCR 进行 5'RACE 扩增,在约 1 kb 处有条带。

根据 RACE 结果,利用两侧引物进行扩增后,获得一条长 1 440 bp 的 DNA 序列,包含一个由 1 047 个核苷酸组成的 GGPS 基因的完整开放阅读框,编码 1 条由 348 个氨基酸组成的蛋白质序列(图 2)。

3.3 GGPS 基因生物信息学分析

ProtParam 软件分析结果表明,GGPS 蛋白的肽链由 20 种氨基酸组成,分子式为 $C_{1648}H_{2665}N_{449}O_{502}S_{18}$,理论相对分子质量为 37 378,等电点(pI)为 5.18,其中 Ala(12.4%)和 Leu(10.9%)量较高,Trp(0.3%)、Tyr(1.4%)和 Gln(1.7%)量较低。Ala、Trp 分别为 43 个(12.4%)和 1 个(0.3%)。带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)共 49 个,带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)有 36 个。不稳定指数 43.91,表明属于不稳定蛋白质。总平均疏水指数为 0.078。

保守结构域分析结果表明(图 3),GGPS 蛋白序列中包含 1 个反式-类异戊烯基焦磷酸合成酶(trans-isoprenyl diphosphate synthase)超家族的保守结构域。

亚细胞定位分析结果表明,GGPS 基因所编码氨基酸序列的 N 端包含 1 个由 47 个氨基酸构成的信号肽序列,可能定位于叶绿体或其他质体中。

序列比对结果表明,GGPS 蛋白序列的 N 端保守性较低,中间部分和 C 端保守性高;133~149 位和 266~278 位分别是 2 个多聚异戊二烯基合成酶的特异序列 LlhDDLpcmDnddlRRG 和 IGllFQVvDD-IID(图 4)。

```

ATGGGGGCCCTATATCTATCTCTCC
CTCGAGCAGAAATAACCAAGCCATCAATGGTGGATTACCGACTTCCAATACCTGCAGCCTCTCCGCTCTTG
CTCGCTTCTGCAACAAATAAAGGCACACAGCCGCTAAAGTGAATGAAAGGATTTTTATCATTTTCTTTGT
GAATTTTGGAAACTGAATAGGAATTTTGGGGTTTTTGAATTCGACTGCGATTTGATCTATTCTACCGACA
1   ATG AGT GCG GTG AAT CCA ATT GCG ACG TGG TCG CCG TCG ATT 45
1   M   S   A   V   N   P   I   A   T   W   S   R   S   I   15
46  TCC GGC GGA GGC TTC CGA CCG GAG CAA TTC AAT TTC CTC AAA CCC 30
16  S   G   G   F   R   P   E   Q   F   N   F   L   K   P   30
91  TCG AGG TTT CCG CCT ATG TCG ATT TCC TCT GCC ATA ATC GAG GAA 135
31  S   R   F   R   P   M   S   I   S   S   A   I   I   E   E   45
136 ACC GTC GCC ACC GGG AAA CCG CAT GCC TTC GAT CTC AAA AAG TAC 180
46  T   V   A   T   G   K   P   H   A   F   D   L   K   K   Y   60
181 ATG CTC AAC AAG GCG AGC GCC GTG AAC GCC GCC TTG GAG GAG GCG 225
61  M   L   N   K   A   S   A   V   N   A   H   A   L   E   T   A   75
226 GTC CCC GTC AGA GAT CCG GTC ACG ATA CAC GAA TCG ATG AGG TAC 270
76  V   P   V   R   D   P   V   T   I   H   E   S   M   R   Y   90
271 TCG CTT CTC GCC GGG GGG AAA CGC GTC CCG CCG ATG CTC TGC ATC 315
91  S   L   L   A   G   G   K   R   V   R   P   M   L   C   I   105
316 GCC GCC TGC GAG CTG GTC GGC GGT GAG CAG GCC GCC GCC CTC CCG 360
106  A   A   C   E   L   V   G   G   E   Q   A   A   L   F   120
361 GCC GCC TGT CCG CTC GAG ATG ANT GAC ACC ATG TCG CTG ATG CAC 405
121  A   A   C   A   V   E   M   I   H   T   M   S   L   M   H   135
406 GAC DCG CTC CCC TGT ATG GAC AAC GAC GAC CTG CGA AGG GGG AAA 450
136  D   D   L   P   C   M   D   N   D   D   L   R   R   G   K   150
451 CCG ACG AAC CAC AAG GTG TAC GGC GAG GAC GTC GCC GTC CTC GCC 495
151  P   T   N   H   K   V   Y   G   E   D   V   A   V   L   A   165
496 GGC GAG GCA CTC CTC GCC TTC GCC TTC GAA CAT TTG GCG ACG GCC 540
166  G   A   L   A   F   A   F   L   L   T   A   180
541 ACT GAG GAC GTC CCT ACC AAC ATG GTA GTA TCC GCC ATT GGT GAG 585
181  T   E   D   V   P   T   N   M   V   V   S   A   I   G   E   195
586 TTG TCA AGG TGC ATT GGT GCA GAG GGA TTG GTG GCA GGG CAA GTG 630
196  L   S   R   C   I   G   A   E   G   L   V   A   G   Q   V   210
631 GTG GAC ATA TGT TCG GAG GGG ATT TCG GAG GTG GGG CTG GAG CTT 675
211  V   D   I   G   S   E   G   I   S   E   V   G   L   E   L   225
676 CTA GAG TTC ATC CAC CTC CAG AAG ACG GCG GCG CTG CTG GAA GGT 720
226  L   E   F   I   H   L   H   K   T   A   A   L   L   E   G   240
721 TCA GTG GTG TTG GGC GCC ATA TTG GGA GGT GCG ACA GAG TCG GAA 765
241  S   V   V   L   G   A   I   L   G   G   A   T   E   S   E   255
766 GTG GAG CCG CTG AGG AAA TTC GCG AGG TGC ATC GGG CTG CTG TTC 810
256  V   E   R   L   R   K   F   A   R   C   I   G   L   L   F   270
811 CAG GTG GTG GAC GAC ATC CTA GAC GTG ACC AAG TGC TCG GAG GAG 855
271  Q   V   V   D   I   L   D   Q   L   E   G   F   D   F   285
856 CTG GGG AAG ACG GCC GGG AAG GAT CTG GTG GCG GAC AAG ACG ACA 900
286  L   G   K   T   A   G   K   D   L   V   A   D   K   T   T   300
901 TAC CCG AAG CTG ATC GGG ATT GAG AAG TCG AGA GAA TTT GCA GAT 945
301  Y   P   K   L   I   G   I   E   K   S   R   E   F   A   E   315
946 CAG CTG AAG AGG GAG GCT AAA GAG CAG CTG GAG GGG TTT GAT CCA 990
316  Q   L   K   R   E   A   K   E   Q   L   E   G   F   D   F   330
991 GGT AAA GCA GCT CCA TTG CTG GCC TTG GCT GAT TAC ATT GCT TCT 1035
331  G   K   A   A   P   L   L   A   L   A   D   Y   I   A   S   345
1036 AGG GAT AAT TGA 1047
346  R   D   N   *
TGCTTTCAATTGCAAGTTTAACTCAACTATTATGCTTATGTTGCTTTTGTATCTGCCCTTCTCTTGAATAA
GAAGAATATGACCTATTACTTTTTCTAAAAAAGTACTCTCTGCTTGATAC
CACTGCTTA
    
```

图 2 GGPS 基因编码的氨基酸序列

Fig. 2 Amino acid sequence of GGPS gene

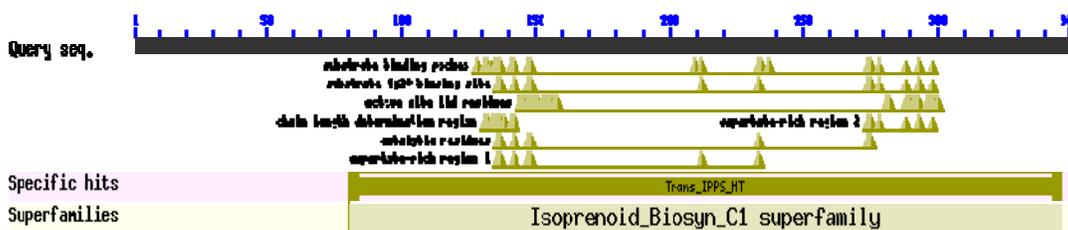


图 3 GGPS 基因所编码氨基酸序列的保守结构域

Fig. 3 Deduced conserved domain of GGPS gene encoding amino acid sequence

用最大似然法 (Maximum likelihood) 构建系统发育树, 结果表明, 穿心莲中的 GGPS 蛋白与已报道的长春花 (*Catharanthus roseus*) 的 GGPS 蛋白亲缘关系较近 (图 5)。

3.4 GGPS 基因表达分析

实时荧光 PCR 检测结果表明 (图 6、7), GGPS 基因在穿心莲茎和叶片中的表达量有相似的趋势。花蕾期表达量较高, 初花期降低; 到了花果混合期表达量升高, 青果期下降。表明花蕾期和花果混合期相关代谢成分的合成可能更活跃。单因素方差分析结果表明, 无论是在茎还是在叶片中, GGPS 基因在各发育阶段的表达量差异均不显著。

4 讨论

穿心莲内酯大量用作医药原料药。提高穿心莲

中的穿心莲内酯的量能够节省成本, 提高药效。研究表明, 进行穿心莲的细胞培养时, 在施加 5 μmol/L 茉莉酸甲酯 (MeJA) 的培养物中, GGPS 等 3 个基因的表达量大幅度提高, 穿心莲内酯的生物合成量也提高了 5.25 倍, 表明这 3 个基因高度影响了穿心莲内酯的生物合成, 是合成途径中的关键基因^[7]。因此, 本研究克隆的 GGPS 基因, 对于今后采取基因工程手段生产穿心莲内酯, 具有一定的利用价值。人们已经从辣椒、番茄、西瓜、丹参、烟草和银杏等植物中, 分离到了 GGPS 基因, 它们在萜类合成途径中起重要的作用, 能够催化合成 GGPP^[14]。有些植物的 GGPS 基因还具有双功能, 例如, 挪威云杉中的 GGPS 基因, 它可以催化合成香叶基焦磷酸 (geranyl diphosphate, GPP) 和 GGPP 2 种产物^[15]。

长春花 (AGL91645.1)	.MSFVNSITTWVPAQSIYCLENGRS SSMRNSNLCHPLKNQLPISFFLSGTIRKPIF	54
金鱼草 (AAS82860.1)	.MSLVNPITTWSTTTTSKSPKNVQTTRSRSIILPHK...ISLFPSPFKSK.SK	49
丹参 (AEZ55681.1)	MSLLVNPLA...TTCVKDVHGRRRSR...GLLSTS	30
巴西橡胶树 (Q94ID7.1)	.MSSVN.LGSWVHTSYVLN.QATRSRSKSKSFLPFNPLKSLAISFAYRKSEKPI	52
蛇麻 (ACQ90682.1)	.MSSVN.LT.WVQTCSMFN.QAGRSR.SSTFNLLHYHPLKVPFQFQKRRPT	50
欧榛 (ABW06960.1)	.MSCVN.LSTWVQTCSMFN.QAGRSRSMSTPSFQILHPLKNIPISFIPKRRRSI	52
欧薄荷 (AAF08793.1)	MSALVNPVAKWPQITIGVKDVHGRRRSTRTLFQSHPLRTEMPFSLYFSSPLKAP	55
芒果 (AFJ52722.1)MSAVVNPIATWSRSISGGGFRPEQ.....FNFLKPSRFRP.	35
长春花 (AGL91645.1)	SCSRLSISAIITKEQTQEESKSKKEVAFSSTSSFDKRAYMTCKANSVNKAL	109
金鱼草 (AAS82860.1)	THLRFSSISILTKNP..QESSQKTSKDPTFT...LDFKTYMLEKASVNVKALEQ	98
丹参 (AEZ55681.1)	VKTR..ISAVYTKK...DKNP...TWAADFVKRYMVEKADSVNKALEA	70
巴西橡胶树 (Q94ID7.1)	SSVS...AITKEEETLQEEQNPP...SDFKSYMLOKGNINQALDA	96
蛇麻 (ACQ90682.1)	SSFS..ISAVLTKQEAUTEDEEQKS...TFNFRSYMVKANSVNOALDA	95
欧榛 (ABW06960.1)	SSVS..VSAVLTKEEDTLREEESESEA...RTFNFKTYMLOKANSVNOALDA	99
欧薄荷 (AAF08793.1)	ATFS..VSAVYTKKES.EIRDKDPAPS...TSPAFDFCYMLRKAASVNVKALEA	103
芒果 (AFJ52722.1)	.SL..VSAVLTKEETLREEEEDPKP...VDFKSYMLOKGNINQALDA	54
芒果 (AFJ52722.1)	MSIS...SAIIEET...VATGKPH...AFDLKMYLNKASAVNNALE	74
	ym k n al	
长春花 (AGL91645.1)	AVLVREPLKTHE SMRYSLLAGGKRVRLCITAAACELFGCTESVAMPSPACAVEMIH	164
金鱼草 (AAS82860.1)	AVLLKEPLKTHE SMRYSLLAGGKRVRLCITAAACELVGGLESTAMPSPACAVEMIH	153
丹参 (AEZ55681.1)	VVQKPEPLKTHE SMRYSLLAGGKRVRLCITAAACELVGGLESTAMPSPACAVEMIH	125
巴西橡胶树 (Q94ID7.1)	AIPLQEPKTHE SMRYSLLAGGKRVRLCITAAACELVGGNDSMAMPSPACAVEMIH	151
蛇麻 (ACQ90682.1)	AVLLREPQTHE SMRYSLLAGGKRVRLCITAAACELVGGDESAMPSPACAVEMIH	150
欧榛 (ABW06960.1)	AVSLKDPKTHE SMRYSLLAGGKRVRLCITAAACELVGGTESAMPSPACAVEMIH	154
欧薄荷 (AAF08793.1)	AVQKPEPLKTHE SMRYSLLAGGKRVRLCITAAACELVGGDESAMPSPACAVEMIH	158
芒果 (AFJ52722.1)	VVSIREPKTHE SMRYSLLAGGKRVRLCITAAACELVGGNESMAMPSPACAVEMIH	109
芒果 (AFJ52722.1)	AVPVRDEVTTHE SMRYSLLAGGKRVRLCITAAACELVGGQAAALPACAVEMIH	129
	p the mryslaggkrvrp lc acel gg a p ac vemih	
长春花 (AGL91645.1)	TMSLHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHKVFGEIVAVLAGDALLAFEFHIAATAKGV	219
金鱼草 (AAS82860.1)	TMSLHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHKIYGEIVAVLAGDALLAFSFEHVAKSTKGV	208
丹参 (AEZ55681.1)	TMSLHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHKVFGEIVAVLAGDALLSFAFEHVAVARGS	180
巴西橡胶树 (Q94ID7.1)	TMSLHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHIVFGEIVAVLAGDALLAFEFHIAVSLNV	206
蛇麻 (ACQ90682.1)	TMSLHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHKVFGEIVAVLAGDALLAFEFHVAVSVGV	205
欧榛 (ABW06960.1)	TMSLHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHKVFGEIVAVLAGDALLAFSFEHIAVSGV	209
欧薄荷 (AAF08793.1)	TMSLHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHMAFGEIVAVLAGDALLSFAFEHVAAAKGA	213
芒果 (AFJ52722.1)	TMSLHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHKVFGEIVAVLAGDALLAFSFEHMAVSVGV	164
芒果 (AFJ52722.1)	TMSLHDDLPCMDNDDLRRGKPTNHKVYGEIVAVLAGDALLAFEFHIAATAEDV	184
	tmsl hddlpcmdnddlrrgkptnh ge vavlagdall fe a t	
长春花 (AGL91645.1)	SSEIRIVRVVGETLAKCI GSEGLVAGQVVDVCSSECTADVGLDHELEFIHHTKTAALLE	274
金鱼草 (AAS82860.1)	SSDRIVRVVGETLAKCI GSEGLVAGQVVDVCSSEGMTEVGLDHELEFIHHTKTAALLE	263
丹参 (AEZ55681.1)	APERILRALGQIAKSI GAEGVLVAGQVVDVCSSEGMAEVGLDHELEFIHHTKTAALLQ	235
巴西橡胶树 (Q94ID7.1)	SSARIVRAVGETLAKAI GAEGVLVAGQVVDVCSSEGSEVGLDHELEFIHHTKTAALLE	261
蛇麻 (ACQ90682.1)	PPARILRAIGETLAKSI GAEGVLVAGQVVDVCSSEGLANVGLDHELEFIHHTKTAALLE	260
欧榛 (ABW06960.1)	PPERIVRVVGETLAVSI GSEGLVAGQVVDVCSSEGMAEVGLDHELEFIHHTKTAALLQ	264
欧薄荷 (AAF08793.1)	LPSRVVKA VGETLAKSI GSEGLVAGQVVDVCSSEGLKEVGLDHELEFIHHTKTAALLE	268
芒果 (AFJ52722.1)	PTNMVVSATIGETLAKSI GAEGVLVAGQVVDVCSSECTSEVGLDHELEFIHHTKTAALLE	219
	g l ig eglvagqvvd seg v l lefih hkta ll	239
长春花 (AGL91645.1)	GSVVLGATVGGANDEQISKLKRFARCI GLEFQVDDILDVTKSSOELGKTAGKDL	329
金鱼草 (AAS82860.1)	ASVVLGATVGGADDEDVEKLRKFARCI GLEFQVDDILDVTKSSOELGKTAGKDL	318
丹参 (AEZ55681.1)	GSVVMGATVGGAKEEEVERLRKFARCI GLMFOVDDILDVTKSSHELGKTAGKDL	290
巴西橡胶树 (Q94ID7.1)	GAUVLGATVGGTDEEVEKLRKFARCI GLEFQVDDILDVTKSSOELGKTAGKDL	316
蛇麻 (ACQ90682.1)	ASVVLGATVGGGTEQVEELRSFARCI GLEFQVDDILDVTKSSOELGKTAGKDL	315
欧榛 (ABW06960.1)	GAUVLGATVGGGSNEEVEKLRNFARCI GLEFQVDDILDVTKSSOELGKTAGKDL	319
欧薄荷 (AAF08793.1)	GSVVLGATVGGGKEEEVAKLRKFARCI GLEFQVDDILDVTKSSKELGKTAGKDL	323
芒果 (AFJ52722.1)	GSVVLGATVGGGSDDEVEKLRKFARCI GLEFQVDDILDVTKSSRELGKTAGKDL	274
芒果 (AFJ52722.1)	GSVVLGATVGGATESEVERLRKFARCI GLEFQVDDILDVTKSSOELGKTAGKDL	294
	vv gai gg lr a igl fq vddildvtk s elgktagkdl	
长春花 (AGL91645.1)	VADRVTYPKLLCIDEKSRFAEKLNRBAQEQLAEFDPEKAAPLIALANYIAYRD	382
金鱼草 (AAS82860.1)	VADRTTYPKLLCIDEKSRFAEKLNRBAQEQLAEFDPEKAAPLIALANYIAYRD	371
丹参 (AEZ55681.1)	VADRTTYPKLLCIDEKSRFAEKLNRBAQEQLAEFDPEKAAPLIALANYIAYRN	343
巴西橡胶树 (Q94ID7.1)	VADRVTYPKLLCIDEKSRFAEKLNRBAQEQLAEFDPEKAAPLIALANYIAYRQ	369
蛇麻 (ACQ90682.1)	VADRATYPKLLCIDEKSRFAEKLNRBAQEQLAEFDPEKAAPLIALANYIAYRQ	368
欧榛 (ABW06960.1)	VADRVTYPKLLCIDEKSRFAEKLNRBAQEQLAEFDPEKAAPLIALANYIAYRQ	372
欧薄荷 (AAF08793.1)	VADRVTYPKLLCIDEKSRFAEKLNRBAQEQLAEFDPEKAAPLIALANYIAYRD	376
芒果 (AFJ52722.1)	VADRTTYPKLLCIDEKSRFAEKLNRBAQEQLAEFDPEKAAPLIALADYIAYSD	327
芒果 (AFJ52722.1)	VADRTTYPKLLCIDEKSRFAEKLNRBAQEQLAEFDPEKAAPLIALADYIAYSD	347
	vadk typ l g ks e a l a l f aapl a yia r	

下划线部分表示多聚异戊二烯合成酶的特异序列

Those highly conserved regions of all poly prenyl diphosphate synthases are underlined

图 4 穿心莲 GGPS 基因编码氨基酸的序列比对

Fig. 4 Comparison on amino acid sequence encoded by GGPS of *A. paniculata*

在动物体内, GGPP 是合成大量生物活性分子的前体, GGPS 基因参与了多种蛋白质翻译后的修饰过程, 是癌症、神经退行性疾病和心脑血管疾病等疾

病的潜在治疗靶点^[16-17]。进一步对植物 GGPS 基因的功能进行精细研究, 发掘该基因在植物体内潜在的作用很有意义。

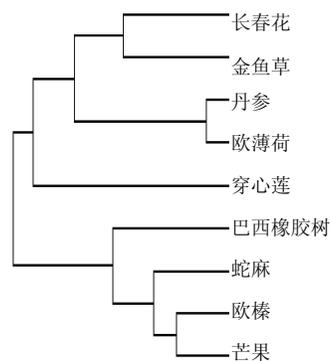


图5 穿心莲与其他植物GGPS蛋白的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of GGPS protein in *A. paniculata* and other plants

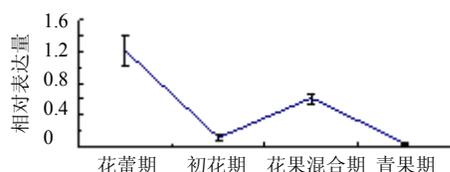


图6 GGPS基因在穿心莲茎片中的表达
Fig. 6 GGPS gene expression levels in stems of *A. paniculata*

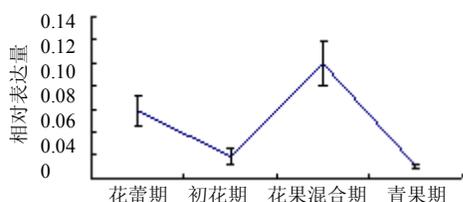


图7 GGPS基因在穿心莲叶片中的表达
Fig. 7 GGPS gene expression levels in leaves of *A. paniculata*

本研究从穿心莲中克隆了GGPS基因,长1 047 bp, 编码1条由348个氨基酸组成的蛋白质序列,与长春花的GGPS蛋白亲缘关系较近。它的N端包含1个由47个氨基酸构成的信号肽序列,可能定位于叶绿体等质体中。与叶片相比,GGPS基因在穿心莲的茎中表达更稳定。茎和叶片中,花蕾期表达量较高,初花期降低;到了花果混合期表达量升高,青果期下降。表明花蕾期和花果混合期相关代谢成分的合成可能更活跃。上述研究为进一步开展穿心莲内酯合成途径的调控奠定了基础。

志谢: 样品采集工作由中国中医科学院中药资源中心道地药材国家重点实验室完成。

参考文献

[1] 畅娜, 王学民. “天然抗生素”穿心莲内酯 [J]. 自我

药疗, 2014(10): 33-35.
 [2] 谢宗万. 常用中药名与别名手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
 [3] 陈蓉. 基于遗传与环境的穿心莲品质研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
 [4] 陈蓉, 王晓云, 宋毓宁, 等. 基于SRAP和SNP分子标记的国内穿心莲遗传多样性分析 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(23): 12-18.
 [5] Sharma S S, Jha Z, Sinha R K. Establishment of *in vitro* adventitious root cultures and analysis of andrographolide in *Andrographis paniculata* [J]. *Nat Prod Commun*, 2013, 8(8): 1045-1047.
 [6] Chao W W, Lin B F. Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian) [J]. *Chin Med*, 2010, 5(1): 17-31.
 [7] 陈娟, 谷巍, 段金彪, 等. 不同生长期穿心莲活性成分及关键酶基因差异表达研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3149-3152.
 [8] 靳鑫, 时圣明, 张东方, 等. 穿心莲化学成分的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 47-50.
 [9] Sharma S N, Jha Z, Sinha R K, et al. Jasmonate-induced biosynthesis of andrographolide in *Andrographis paniculata* [J]. *Physiol Plant*, 2015, 153(2): 221-229.
 [10] 沈文飏, 汪仁, 王益华, 等. 从水稻种胚中提取RNA的新方法 [J]. 遗传, 2003, 25(2): 208-210.
 [11] 张蕾, 戴住波, 崔光红, 等. 丹参牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶基因的克隆与分析 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2704-2708.
 [12] Pinto F L, Lindblad P. A guide for in-house design of template-switch-based 5' rapid amplification of cDNA ends systems [J]. *Anal Biochem*, 2010, 397(2): 227-232.
 [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
 [14] 吕品, 李娜, 谷辉辉, 等. 西瓜牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶基因的克隆及表达分析 [J]. 生物技术, 2014, 24(2): 11-15.
 [15] Schmidt A, Wächtler B, Temp U, et al. A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2): 639-655.
 [16] Park J, Matralis A N, Berghuis A M, et al. Human isoprenoid synthase enzymes as therapeutic targets [J]. *Front Chem*, 2014, 2: 50-56.
 [17] Wiemer A J, Wiemer D F, Hohl R J. Geranylgeranyl diphosphate synthase: an emerging therapeutic target [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 90(6): 804-812.