

• 药材与资源 •

滇重楼甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶基因的分子克隆与分析

杨莉^{1,2}, 樊小莉¹, 刘琴^{1,2}, 王芳^{1,2}, 刘静^{1,2}, 徐智斌^{1,2}, 冯波¹, 周强^{1,2}, 王涛^{1*}

1. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 目的 皂苷是滇重楼的主要药效成分, 获取滇重楼皂苷合成途径中关键基因(MVD)的cDNA全长序列, 并对该序列进行生物信息学及表达量分析。方法 通过同源克隆法得到滇重楼MVD cDNA的保守片段, 利用RACE技术获得MVD cDNA全长序列, 命名为PpMVD, 并进行生物信息学分析, 通过实时荧光定量(RT-PCR)法检测PpMVD在滇重楼不同组织中的表达情况。结果 PpMVD基因cDNA全长1 583 bp, 开放阅读框(ORF)长1 269 bp, 编码422个氨基酸, 该蛋白质的相对分子质量为46 820, 等电点为5.69, 不稳定性指数为45.40; 滇重楼PpMVD蛋白质二级结构中含有159个 α -螺旋, 占37.68%; 19个 β 折叠, 占4.50%; 69个延伸链, 占16.35%; 175个无规卷曲, 占41.47%; 该蛋白没有跨膜螺旋区, 且不存在信号肽, 其全部氨基酸都位于细胞膜表面; 该基因包含MVD1-Superfamily家族的保守结构域, 属于GHMP激酶蛋白家族成员; RT-PCR结果显示, 滇重楼PpMVD基因在种子、叶片、茎和块茎中均有表达, 但表达量呈显著差异($P>0.05$), 由高到低依次为块茎>叶片>种子>茎, 其中主要药用组织块茎中表达量最高, 为最低表达量(茎)的3.3倍。结论 首次克隆了滇重楼PpMVD cDNA全长序列, 并检测了该基因在滇重楼各组织中的表达量, 为进一步研究PpMVD基因在提高皂苷生物合成过程中的影响提供了基础, 并对重楼药用资源的可持续利用提供了支持。

关键词: 滇重楼; PpMVD; 基因克隆; 表达分析; RACE; RT-PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1435-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.027

Molecular cloning and analysis of pyrophosphomevalonate decarboxylase gene from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*YANG Li^{1,2}, FAN Xiao-li¹, LIU Qin^{1,2}, WANG Fang^{1,2}, LIU Jing^{1,2}, XU Zhi-bin^{1,2}, FENG Bo¹, ZHOU Qiang^{1,2}, WANG Tao¹

1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Objective Saponin is the primary effective component in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. The aims of this study are to obtain the full-length cDNA sequence of a key gene (i.e. MVD) in the saponin synthesis pathway and to analyze its bioinformatics and expression in different tissues. **Methods** Conserved fragments of MVD cDNA in *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were obtained by homologous cloning, and its full-length cDNA sequence was acquired by RACE, which was temporarily named PpMVD. Bioinformatics analysis was then conducted and the expression of PpMVD in different tissues of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The total length of PpMVD cDNA was 1 583 bp, and the length of ORF was 1 269 bp, which encoding 422 amino acids. The molecular weight of this protein was 46 820, isoelectric point was 5.69, and the instability index was 45.40. It contained 159 α -helix (accounted for 37.68%), 19 β -pleated sheet (accounted for 4.50%), 69 extended chains (accounted for 16.35%), 175 irregular curly (accounted for 41.47%) in the secondary structure of PpMVD protein which had no transmembrane helical region and signal peptide. This gene contained a conserved structural domain of MVD1-Superfamily which belonged to GHMP kinase protein family. The qRT-PCR results showed that the expression of PpMVD gene was significantly different in seed, leaves, stems, and tubers, i.e. tubers > leaf > seed > stem. The highest expression was

收稿日期: 2018-09-05

基金项目: 四川省科技计划项目(2017SZ0020)秦巴山区地道中药材多元化种植示范与推广; 中国科学院 STS 区域重点项目(KFJ-STZ-QYZD-006)秦巴山区特色高效农业关键技术集成与示范

作者简介: 杨莉(1993—), 女, 硕士, 主要从事中药重楼资源及快速繁殖方向的研究。Tel: 18113025013 E-mail: 765878739@qq.com

*通信作者 王涛, 男, 博士生导师, 研究员, 主要从事植物分子遗传及植物育种研究。E-mail: wangtao@cib.ac.cn

observed in tuber, which was about 3.3 times of that in stem. **Conclusion** In this study, we first cloned the full-length PpMVD cDNA sequence, and found that it was highly expressed in tuber, which was the major medicinal organ of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*. This study laid a foundation for the further study on the effect of PpMVD gene on the saponin biosynthesis, and facilitated the efficient and sustainable utilization of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*.

Key words: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Fanch.) Hand. -Mazz.; PpMVD; gene cloning; expression analysis; RACE; RT-PCR

滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Fanch.) Hand. -Mazz. 是中国传统道地性药材, 谓有消肿止痛, 凉肝定惊, 抗肿瘤等功效, 早在《神龙本草经》中就有记载, 有着悠久的药用历史^[1]。研究表明, 甾体皂苷作为滇重楼的主要药用成分, 其苷元主要为异螺甾烷醇类的薯蓣皂苷元和偏诺皂苷元, 由甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA) 合成^[2]。在 MVA 途径中, 异戊二烯焦磷酸 (soprenyl diphosphate, IPP) 是甾醇皂苷合成途径中的重要中间产物^[3]。而 IPP 是由甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶 (pyrophosphomevalonate decarboxylase, MVD) 催化 5 碳的焦磷酸甲羟戊酸去羧基化后产生的, 因此 MVD 基因的表达情况将对各类甾醇皂苷的生物合成量起着重要作用^[4]。目前针对药用植物 MVD 的研究也越来越多, 邢朝斌等^[5]研究发现, 刺五加 MVD 的表达量和皂苷含量间就存在着显著的正相关关系, 从银杏^[6]、刺五加^[7]、牛樟芝^[8]、灵芝^[9]、穿心莲^[10]、金钗石斛^[11]、人参^[12]、独行菜^[13]等药用植物中都成功分离出 MVD 基因, 但是在延龄草科中未见报道。因此, 对滇重楼 MVD 的研究有助于了解其主要药效成分皂苷的合成及调控机制, 为高效及可持续利用皂苷等药用成分提供支持。

本实验以滇重楼为研究材料, 利用生物信息学根据其他植物 (铁皮石斛、百合杂交种、人参和刺五加等) MVD 基因保守片段设计引物, 通过 RACE 实验扩增出 3' 和 5' 区域, 首次获得滇重楼块茎中 MVD 基因的 cDNA 全长, 并且通过实时荧光定量 RT-PCR 检测该基因在块茎、茎、叶和种子中的表达情况, 为研究 MVD 基因在滇重楼皂苷合成中的作用机制和表达调控奠定基础。

1 材料

滇重楼采自于云南省重楼种植公司, 经测序和纪运恒专家鉴定^[14]为滇重楼 *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (Fanch.) Hand. -Mazz.。取其新鲜种子、叶片、茎以及块茎作为提取总 RNA 的材料。Trizol 提取液、氯仿、乙酸钠、 β -巯基乙醇、PVP、Trans Script All-in-One First-Strand cDNA Synthesis Super Mix, Trans Start FastPfu Fly DNA Polymerase [全式金 (北京) 生物技术有限公司], 3'-full RACE Core

Set with Prime ScriptTM (TaKaRa), Trans Start TOP Green qPCR Super Mix (全式金生物技术有限公司), SMARTer RACE (Clontech), Peasy-Blunt 载体, Trans1-T1 感受态细胞, 引物由擎科生物有限公司合成。

2 方法

2.1 滇重楼 MVD 基因 (PpMVD) 保守区段的获得

参考 4 种提取滇重楼根茎总 RNA 方法的研究, 以改良 Trizol 法^[15]对滇重楼新鲜块茎进行总 RNA 提取, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 并且用紫外分光光度计检测其浓度。根据全式金反转录试剂盒 Trans Script All-in-One First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 使用说明, 取 3 μ L 总 RNA 作为模板, 以 Oligo (dT)₁₈ 为引物逆转录合成第一链 cDNA。

根据已经克隆出的其他物种 (刺五加、人参等) 的 MVD 基因进行序列比对 (DNAMAN 软件), 在保守区段设计一对寡核苷酸引物, 上游引物: MVD-F1 (5'-GACCGCATGTGGCTCAACGG-3'), 下游引物: MVD-R1 (5'-GTGCAGACAGCAATC-AGTTCATGC-3')。以 Trans Start FastPfu Fly DNA Polymerase 为 DNA 聚合酶, 对 PpMVD 基因保守区段进行扩增。反应体系如下: 模板 cDNA 1 μ L, 引物 MVD-F1, MVD-R1 各 1 μ L, Trans Start FastPfu Fly 酶 0.5 μ L, 5 $\times$ Trans Start FastPfu Fly 缓冲液 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L, ddH₂O 补至 25 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C、2 min; 95 $^{\circ}$ C、20 s; 58 $^{\circ}$ C、20 s; 72 $^{\circ}$ C、10 s。35 个循环之后 72 $^{\circ}$ C、5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳之后, 切胶回收目的条带, 将纯化产物克隆至 Peasy-Blunt 载体, 转化至感受态细胞 Trans1-T1 后提取重组质粒, 送至擎科生物有限公司进行测序。

2.2 PpMVD 基因 5' 末端序列

根据“2.1”项中已经获得滇重楼 MVD cDNA 设计引物: GSP1 (5'-TCCGAATCCCCTTCT-TCTCG-3')。采用 Clontech 公司的 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒进行 5' RACE cDNA 第一链的合成, 根据试剂盒使用说明, 取 2 μ L 总 RNA 进行逆转录反应, 以 GSP1 (5'-TCCGAATCCCCTTCTTCTCG-3') 和 UPM (试剂盒提供) 为引物进行 PCR 反应, 其中取上述逆转录产物 1.5 μ L, 其余按照试剂盒

使用说明添加。反应条件为: 94 ℃、30 s; 68 ℃、30 s; 72 ℃、2 min, 25 个循环。反应之后的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后按照“2.1”项进行回收, 克隆, 然后送至北京擎科梓熙生物公司进行测序。

2.3 PpMVD 基因 3' 末端序列

根据“2.1”项中已获得的 PpMVD 基因的部分 cDNA 片段, 设计 3'-RACE 特异性外侧引物 GSP2 (5'-GTAT GCGTGAGAGTGTGAAACAAG-3') 和内测引物 GSP3 (5'-CGAATAACGCAAATGGAAG-AAGC-3'), 采用 TaKaRa 公司的 3'-full RACE Core Set with PrimeScriptTM 试剂盒进行 3'-RACE cDNA 第一链的合成, 根据试剂盒使用说明, 取 2 μL 总 RNA 进行逆转录反应, 以 GSP2 (5'-GTATGCGTGAGAGTGTGAAACAAG-3') 和 3'-RACE Outer Primer 为引物进行套式 PCR 的第 1 轮反应, 取上述逆转录产物 3 μL, 其余按照说明书进行。反应条件为 94 ℃、3 min; 94 ℃、30 s; 60 ℃、30 s; 72 ℃、90 s, 35 个循环; 72 ℃、10 min。取第 1 轮 PCR 产物 1 μL, 以 GSP3 和 3'-RACE Inner Primer 为引物进行第 2 轮 PCR 反应, 反应体系其他组分参照说明。反应条件与第 1 轮相同, 30 个循环之后的套式 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后按照“2.1”项进行回收, 克隆, 然后送至北京擎科梓熙生物公司进行测序。

2.4 PpMVD 基因全长的拼接与验证

根据已得到的 5'-3' 末端序列, 设计引物扩增 PpMVD 基因的完整 ORF 引物序列如下: OF1 (5'-TATCACTGTACCCGCTGCCA-3'), OF2 (5'-CGAATAACGCAAATGGAAGAAG-3'), 并以“2.1”项中的逆转录产物 cDNA 为模板进行 PpMVD cDNA 全长扩增。PCR 反应体系为 25 μL, 其中模板 cDNA 1 μL, OF1 和 OR1 各 0.5 μL, 5×FastPfu Fly 缓冲液 5 μL, FastPfu Fly 酶 0.5 μL, 加 ddH₂O 至 25 μL。反应条件为 95 ℃、2 min, 95 ℃、20 s, 54 ℃、20 s, 72 ℃、20 s, 35 个循环之后 72 ℃、5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳之后, 回收, 克隆, 然后送至北京擎科梓熙生物公司进行测序。

2.5 PpMVD 基因的组织表达分析

利用 primer 5.0 设计定量 RT-PCR 的特异性引物分别是 QF1 (5'-CGTGGACGAGAAGAAGG-G-3') 和 QR1 (5'-CACCAAACAGGCTACGACA-3') 预计长度为 233 bp; 根据文献报道, 选定滇重楼 Actin 基因作为内参基因, 引物如下: AF1 (5'-CAGCAG ATGTGGATCTCAAAGG-3') 和 AR1

(5'-GCGAACAATCATAACCAAGCA-3')。提取滇重楼的种子、根、茎、块茎的总 RNA, 且设 3 个生物学重复, 按照“2.1”项方法, 进行逆转录反应, 以此 cDNA 为荧光定量 PCR 模板, 根据 TransStart TOP Green qPCR SuperMix 使用说明, 反应体系为 cDNA 模板 1 μL, 左右引物各 0.5 μL, 2×Mix 10 μL, 加水补至 20 μL。反应条件为 94 ℃、30 s, 94 ℃、5 min, 58 ℃、15 s, 72 ℃、10 s, 40 个循环。

2.6 PpMVD 基因的生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件将 PpMVD 基因的 cDNA 序列翻译成氨基酸序列, 并且进行氨基酸多序列比对, 构建进化树; 利用 Blast 软件 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 对核苷酸序列进行同源性比对; 利用在线分析工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找开放阅读框 (ORF); 利用 ExPASy 的 ProtParam Tool 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析氨基酸理化性质、蛋白质相对分子质量; 使用在线分析工具 SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>), 进行蛋白质二级结构的预测。

3 结果与分析

3.1 PpMVD 基因的克隆

利用引物 MVD-F1 和 MVD-R1, 由 RT-PCR 扩增得到大小约为 600 bp 的条带, 见图 1-A, 克隆测序得到 620 bp 的片段, 通过与百合杂交种、铁皮石斛等药用植物 MVD 基因序列进行比对, 其一致性达到 79%, 由此初步确定为 PpMVD 的部分保守片段。3'-RACE 套式 PCR 产物电泳结果见图 1-B, 条带大小约为 500 bp, 其中包含终止密码子; 5'-RACE PCR 产物电泳结果见图 1-C, 条带大小约为 550 bp, 其中包含起始密码子。将图 1-A 和 1-C 条带进行回收, 连接, 转化后测序, 将测序结果中去掉与中间片段重叠后的序列后分别得到 490 bp、470 bp 的核苷酸序列, 将 2 条序列在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 结果表明该序列与百合杂交种、铁皮石斛等其他物种中的 MVD cDNA 序列一致性达到 70%, 由此确定为 PpMVD 基因的 3' 和 5' 末端, 将保守序列与 3' 和 5' 末端进行拼接, 获得全长。利用引物 OF1 (5'-TATCACTGTACCCGCTGCCA-3'), OF2 (5'-CGAATAACGCAAATGGAAGAAG-3') 扩增 PpMVD cDNA 全长, 结果见图 1-D, 得到长为 1 500 bp 左右的核苷酸序列, 将该条带回收, 克隆, 测序, 将得到的序列与上述拼接结果进行对比, 两者完全相同。序列信息如图 2 所示。

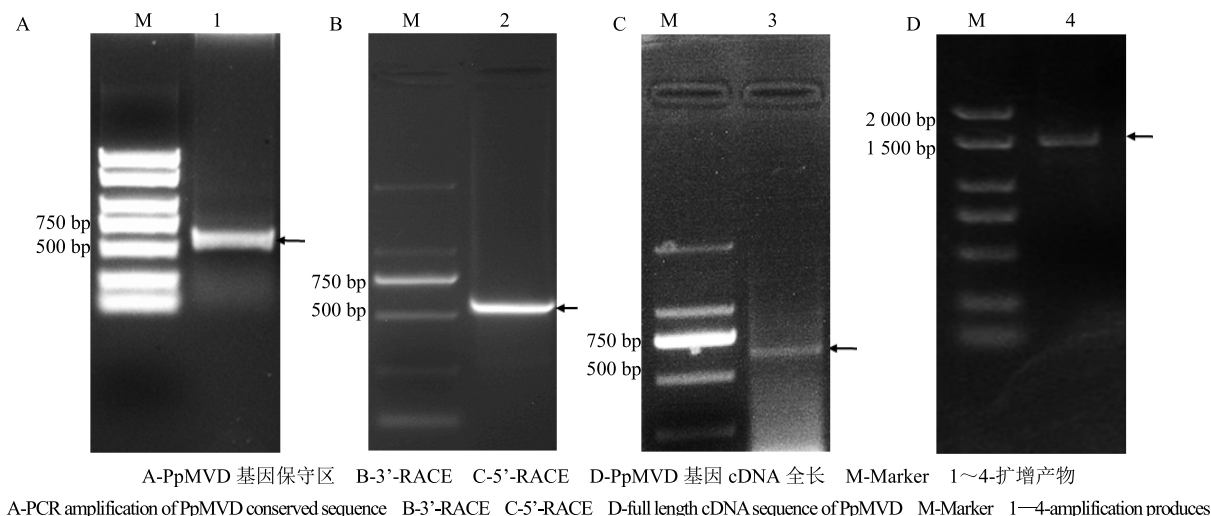


图 1 PpMVD 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of PpMVD from *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

TATCACTGTACCCGCTGCCATTATTTCTCACCACATCAAAGAAAATGGCGATCCT
 AATCCTCTGTTAAATCTCCATCTCCGCCGCCCTCGCCGAAAAACCGCTCTCTCTCACCACCGCTCGGAAACCTCTCTCTCACC
 GACGTCGGGAAACCGCTTTCTCTCTCGCCGAAACCGGTATCTAATCCCGGTTTGTGGGGAACGAGGGAACTAGGGTTTCACTTTAA
 CTCGTAGAAATCTCCGGCATTAGGGTTTGGGACTCCGGCGCACTTTAACTCGTAGAAATCTCCGGCATTAGGGTTTGGGACTCCGGCG
 1 ATGGCGAGGGAGTCGCAGAAATGGATCCTAATGGTGACGGGGAGAGCTCCGACGAACATTGCGGTGATCAAGTACTGGGGGAAGCGCGAC
 M A R E S Q K W I L M V T G R A P T N I A V I K Y W G K R D
 91 GAGAACTTAACCTCTCCATAAATGACAGCATCAGCGTCACCGGACCACTCTCCGCCACCACTCGCGCGTCCGCGCT
 E N L T L S I N D S I S V T L D P D H L S A T T T V A V S P
 181 AGCTTCGACAAGGACCGCATGTGGCTCAACAAGAAGGAGATTTCGATTTCGGGGGAGAGATACCAGAGCTGTTTGGGGGAGATTTCGAAGC
 S F D K D R M W L N K K E I S I S G E R Y Q S C L R E I R S
 271 CGGGCGGGGAATTTCGTGGACGAGAAGAAGGGGATTTCGATAAAGAAGGAGATTGGGAGAGGTTGCATGTCCACATTGACTCGTATAAT
 R A G E F V D E K K G I R I K K E D W E R L H V H I D S Y N
 361 AACTTCCCAACGGCAGCGGATTGGCTTCATCCCGGCTGGTTTTCGTTGCTTTCGTTTATTCTCTTGCAAACTAATGAATGTGAAATG
 N F P T A A G L A S S A A G F A C F V Y S L A K L M N V K M
 451 GAACTCGCGAGCTTTCTTCTATTGCAAGCAAGGTTCTGGCAGTGATGTCGTAGCCTGTTTGGTGGATTGTCAAGTGGACAATGGGA
 E L G E L S S I A R Q G S G S A C R S L F G G F V K W T M G
 541 AGTGATGCTAATGGATGTGACAGCAAGCAGTCCAATGTTAATGATACACATTGGAATGACTTGGTTATTATCATAGCAGTGGTGA
 S D A N G C D S K A V Q L V N D T H W N D L V I I A S V S
 631 TCGAGGCAGAAAGGAAGTAGCACAAGTGGTATGCGTGAGAGTGTGAAACAAGTGCTCTTTTGAATACAGGGCCAAGGTGGTAGTC
 S R Q K E T S S T T G M R E S V E T S A L L E Y R A K V V V
 721 CCAAGTCGAATAACGAAATGGAAGAAGCCATTAGAAATCGTGATTTCGATCATTGCCCCGATTACATGTGCAGACAGCAATCAGTTC
 P S R I T Q M E E A I R N R D F A S F A R L T C A D S N Q F
 811 CATGCAATATGCTTGGACACAAGCCCGCAATATTCTACATGAATGATACATCTCAGAGATAATCAACCTGGTTGAAAGATGGAACAT
 H A I C L D T S P I F Y M N D T S H R I I N L V E R W N N
 901 AATGAAGGAAACCAAGGTGGCTACACATCTGATGACAGGCCCTAATGACCGGTTATGATTGCGCCGAATCGAAAAGTGTGCTCTTCTT
 N E G T P Q V A Y T S D A G P N A V M I A P N R K A A A L L
 991 CTTCAAAGGCTCCTCTTTTATTTCCCTCCACCTGCAGATAATGAGTTATCCAGCTATCTATTAGGGGACAAAACCTACTGCAAGAATCT
 L Q R L L F Y F P P A D N E L S S Y L L G D K T I L Q E S
 1081 GGGATAGAGATTGGAAGATGTGGAAGCTTTGTGCCACCCCTGAAATCAATGACAAGGTTCCACCGATTGAGAGGACCAAGGTGAT
 G I E S L E D V E A L C P P P E I N D K V P P I Q R T T G D
 1171 ATCAGCTATTTTCATGTGCTAGGCTGGGAGGGGTACGATGGTGCTACCGAACGAAGATGAAGCTCTTTTAAGCGTGGAAGTGGGCTT
 I S Y F M C T R P G R G T M V L P N E D E A L L S V E T G L
 1261 CCAAAGTGAAGAGTACCTGGCTGCTTCTCCATTGCGTTATTCG
 P K *

图 2 PpMVD 基因 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig. 2 Full length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of PpMVD

3.2 PpMVD 基因的生物信息学分析

PpMVD cDNA 全长 1 583 bp, 其中 5'非编码区区长 279 bp, 3'非编码区 36 bp, ORF 长 1 269 bp, 编码 422 个氨基酸。预测的蛋白质的相对分子质量为 46 820, 等电点 5.69, 肽链中正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 和负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu) 的

数目分别为 46 个和 52 个, 蛋白的分子式为 $C_{2056}H_{3266}N_{572}O_{636}S_{20}$, MVD 蛋白的不稳定指数为 45.40, 脂肪指数为 84.38。氨基酸序列与铁皮石斛 *Dendrobium catenatum* Kimura et Migo、百合杂交种 *Lilium hybrid cultivar* AMZ00815.1、蝴蝶兰 *Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rehb. f. 和油棕

Elaeis guineensis Jacq. 的一致性分别达到 80%、78%、77%、74%。

使用在线分析工具 SOPMA, 进行蛋白质二级结构的预测, 结果显示, 该蛋白含有 159 个 α -螺旋, 占 37.68%; 19 个 β -折叠, 占 4.50%; 69 个延伸链, 占 16.35%; 175 个无规卷曲, 占 41.47% (图 3)。使用在线工具 TMHMM, SignalP 分析得知, PpMVD 蛋白没有跨膜螺旋区, 且不存在信号

肽, 其全部氨基酸都位于细胞膜表面 (图 4、5)。使用 MEGA5.1, 采用邻接法, 构建了基于氨基酸序列的 PpMVD 与其他 20 个物种 MVD 的系统进化树 (图 6), 结果显示, 滇重楼与亲缘关系较近的百合杂交种, 兰科植物聚为一个分支, 进而与单子叶植物聚于一个分支, 与双子叶聚于一个大的分支, 真菌和动物聚于单独分支, 与传统分类结果相符^[10]。

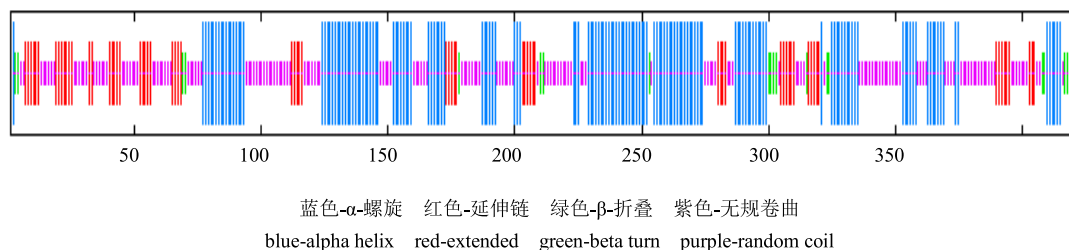


图 3 PpMVD 二级结构预测结果
Fig. 3 Predicted secondary structure of PpMVD

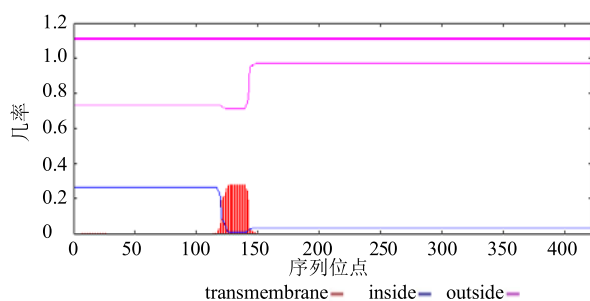


图 4 PpMVD 跨膜结构域预测结果
Fig. 4 Transmembrane prediction of PpMVD

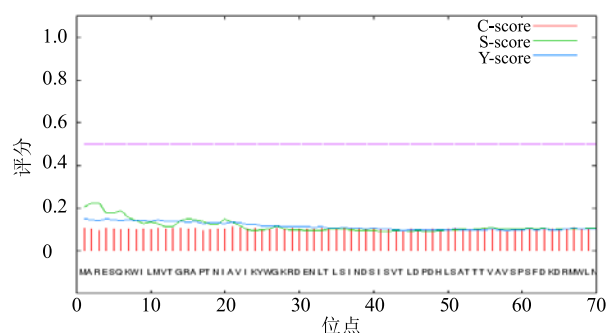


图 5 PpMVD 信号肽预测
Fig. 5 Signal prediction of PpMVD

3.3 PpMVD 基因的组织表达分析

不同组织部位 PpMVD 基因的表达量如图 7 所示, 结果显示, PpMVD 在种子、叶片、茎和块茎中均有表达, 但表达量存在显著差异 ($P < 0.05$), 表达量由高到低依次: 块茎 > 叶片 > 种

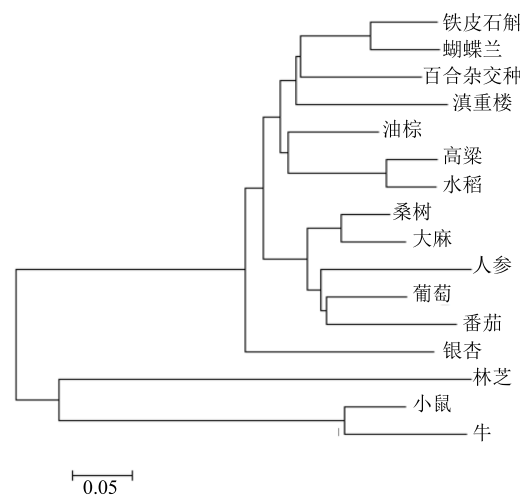


图 6 基于 MVD 氨基酸序列比对构建的系统进化树
Fig. 6 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of MVD organisms

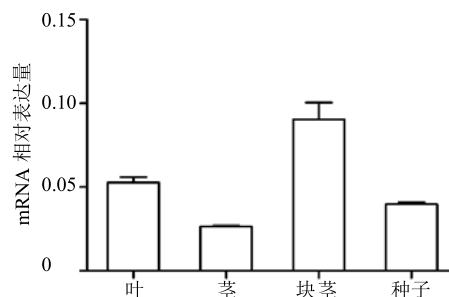


图 7 PpMVD 基因在各组织中的表达量
Fig. 7 Expression level of PpMVD in tissues

子>茎,其中块茎中表达量最高,为最低表达量(茎)的 3.3 倍。

4 讨论

滇重楼的主要药用成分为甾体皂苷,目前认为甾体皂苷的合成有 2 种途径:甲羟戊酸途径(MVA pathway)和丙酮酸途径(MEP pathway)。但是研究发现,这 2 个途径并不是单独存在的,它们均有中间产物 IPP 的产生,且 2 条途径中的 IPP 存在交流^[16-17]。因此,研究调控 IPP 合成的关键酶基因,即 MVD 的功能与表达情况对阐明皂苷的生物合成具有重要作用。本实验采用 RACE 技术克隆得到 PpMVD 基因的完整 cDNA 序列,其编码的氨基酸序列与延龄草科亲缘关系较近的百合杂交种、铁皮石斛和蝴蝶兰的 MVD 基因的一致性分别达到 80%、78%和 77%,表明该基因具有较高的遗传保守性。在结构上,PpMVD 蛋白没有跨膜螺旋区,且不存在信号肽,推测该蛋白在细胞质起始合成之后,不需要蛋白转运,直接在细胞质中发生作用,该结果与其他物种(金钗石斛、刺五加等)中推测的 MVD 蛋白二级结构一致^[11]。且 PpMVD 包含 MVD1-Superfamily 家族的保守结构域,属于 GHMP 激酶蛋白家族成员。根据氨基酸序列以及空间结构的相似性,PpMVD 属于 GHMP 中含有闭环 P 的经典激酶家族,他们的共同特征是在 α -螺旋和 β -折叠中存在 1 个含有 Pro-Xaa3-Gly-Ser-Ser-Ala-Ala 序列的 P 环结构,该结构与 ATP 的结合有关^[18]。同时,PpMVD 中也存在严格保守的 1 个亮氨酸,1 个天冬氨酸和 3 个半胱氨酸,推测这些保守结构与该蛋白的活化过程有关(如金钗石斛中推测该结构可能与 ATP 的结合、二硫键以及二聚体的形成有关^[11])。

RT-PCR 结果表明,PpMVD 在种子、叶片、茎和块茎中均有表达,其在块茎中表达量最高。块茎是滇重楼的传统药用部位,邢朝斌等^[5]发现在刺五加中 MVD 的表达量与皂苷含量间存在显著正相关关系,本研究结果也进一步证明在滇重楼中,PpMVD 基因也是调控皂苷合成的重要基因。除块茎以外,也检测到 PpMVD 在如叶片、茎和种子等其他部位表达,这和人研究结果一致,邢朝斌等^[7]在刺五加中,也在除药用部位(根茎)以外的其他组织(叶片和茎)中也检测到 MVD 基因的表达;而王知斌等^[19]发现在刺五加叶片中也存在皂苷,且具有药效。因此,推测在滇重楼中,除块茎外,叶片、种子等部位有作为备用入药组织部位的可能,从而

提高重楼资源的利用率,促进其可持续利用,改善供不应求市场现状。但也有文献报道,MVD 的催化产物 IPP 不仅参与皂苷的生物合成,同时也参与生物体内其他物质的合成,例如激素、叶绿素等^[20-21],这也可能是在滇重楼叶片中检测到较高 PpMVD 基因表达量的另一原因,需进一步功能验证进行确定。

目前 PpMVD 基因的研究尚未见报道,本实验首次成功克隆了 PpMVD 的 cDNA 全长序列,并且发现该基因在块茎中表达最高,为研究该基因的表达对滇重楼皂苷合成的影响以及通过基因工程改造相关基因从而提高滇重楼药效成分含量的可能奠定了基础^[10]。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 黄贤校,高文远,满淑丽,等. 重楼属药用植物皂苷类化学成分及其生源途径的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 483-489.
- [3] Liao P, Hemmerlin A, Bach T J, *et al.* The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(5): 697-713.
- [4] Krepiy D, Mizioro H M. Identification of active site residues in mevalonate diphosphate decarboxylase: Implications for a family of phosphotransferases [J]. *Protein Sci*, 2004, 13(7): 1875-1881.
- [5] 邢朝斌,孟春燕,修乐山,等. 不同性别刺五加皂苷合成酶基因表达及其对皂苷含量的影响 [J]. 经济林研究, 2013, 31(3): 81-85.
- [6] Pang Y Z, Shen G A, Bergès T, *et al.* Molecular cloning, characterization and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a mevalonate diphosphate decarboxylase cDNA from *Ginkgo biloba* [J]. *Physiol Plantarum*, 2006, 127: 19-27.
- [7] 邢朝斌,龙月红,何 闪,等. 刺五加甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶基因的克隆与表达分析 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(10): 1950-1956.
- [8] Li J, Lin X J, Shao E. S, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mevalonate pyrophosphate decarboxylase in *Antrodia cinnamomea* [J]. *MATEC Web Confer*, 2016, 64: 3001-3010.
- [9] Shi L, Qin L, Xu Y, *et al.* Molecular cloning, characterization, and function analysis of a mevalonate pyrophosphate decarboxylase gene from *Ganoderma lucidum* [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 6149-6159.
- [10] 王晓云,陈 蓉,张恩慧,等. 穿心莲甲羟戊酸 5-焦磷

- 酸脱羧酶基因的克隆与表达 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 636-642.
- [11] 李 清, 李 标, 郭顺星. 金钗石斛焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶基因的克隆及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(2): 850-858.
- [12] 侯春喜. 人参皂苷生物合成关键酶基因 MVD 和 β AS 的克隆及 β AS 的反义表达 [D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [13] 赵 乐, 马利刚, 杨方方, 等. 独行菜磷酸甲羟戊酸激酶 LaPMK 基因克隆、生物信息学分析及原核表达 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3087-3093.
- [14] 刘 琴. 四川重楼属植物资源的收集评价及快繁技术研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2018.
- [15] 赵 爽, 潘少丽. 四种提取重楼根茎总 RNA 方法的研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1292-1294.
- [16] 陈 建, 赵德刚. 植物萜类生物合成相关酶类及其编码基因的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 757-764.
- [17] 刘 丽. 利用抑制剂对人参皂苷生物合成途径 MVA 与 MEP 的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [18] Xiao W, Chang H, Zhou P, *et al.* Genome-wide identification, classification and expression analysis of GHMP genes family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant System Evol*, 2015, 301(8): 2125-2140.
- [19] 王知斌, 郭江涛, 姜 海, 等. 刺五加叶的化学成分和药理作用研究 [J]. 中医药信息, 2013, 30(3): 29-32.
- [20] Barta M L, Skaff D A, Mcwhorter W J, *et al.* Crystal structures of staphylococcus epidermidis mevalonate diphosphate decarboxylase bound to inhibitory analogs reveal new insight into substrate binding and catalysis [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 23900-23910.
- [21] Weerasinghe S, Samantha D R. Simulation of structural and functional properties of mevalonate diphosphate decarboxylase (MVD) [J]. *J Mol Model*, 2010, 16(3): 489-498.