

• 药材与资源 •

温郁金法呢基焦磷酸合酶 (CwFPPS) 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析

丁贤华^{1,2}, 张丽萍^{1#}, 费璇¹, 朱强³, 张金华⁴, 任仙樱⁵, 吴志刚^{1*}, 姜程曦^{1*}

1. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035

2. 安徽江南生物技术研究中心, 安徽 池州 247100

3. 安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800

4. 大理药业股份有限公司, 云南 大理 671000

5. 温州莪金医药有限公司, 浙江 乐清 325600

摘要: 目的 克隆温郁金 *Curcuma wenyujin* 萜类生物合成中的限速酶法呢基焦磷酸合酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS) 的全长 cDNA 序列。方法 根据温郁金转录组数据设计特异引物, PCR 扩增 FPPS 全长 cDNA 序列并对其进行生物信息分析; 构建“基因-GFP”融合表达载体, 利用农杆菌介导烟草叶片进行亚细胞定位分析; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测基因在植物组织中的特异性表达。结果 温郁金 CwFPPS 基因全长 1196 bp, 包含 1 个长为 1071 bp 的开放阅读框, 编码 356 个氨基酸, GenBank 登入号为 MT489462; CwFPPS 编码蛋白属于类异戊二烯生物合成酶超级家族 (C1) 成员, 包含 5 个保守的功能域, 其中 2 个是富含天冬氨酸 (DDXXD) 的活性中心; 亚细胞定位显示该蛋白位于泡质、细胞膜或细胞核上。qRT-PCR 分析表明, CwFPPS 基因在根茎中特异表达, 相对表达水平是叶片中的 13.7 倍。结论 克隆获得的温郁金 CwFPPS 基因全长及其特异表达信息, 可为后续进行基因功能鉴定及倍半萜成分的代谢工程研究提供依据。

关键词: 温郁金; 法呢基焦磷酸合酶; 克隆; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)22-6968-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.22.023

Cloning, subcellular localization and expression analysis of farnesyl pyrophosphate synthase in *Curcuma wenyujin* (CwFPPS)

DING Xian-hua^{1, 2}, ZHANG Li-ping¹, FEI Xuan¹, ZHU Qiang³, ZHAN Jin-hua⁴, REN Xian-ying⁵, WU Zhi-gang¹, JIANG Cheng-xi¹

1. School of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

2. Anhui Jiangnan Biotechnology Research Center, Chizhou 247100, China

3. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

4. Dali Pharmaceutical Co., Ltd., Dali 671000, China

5. Wenzhou Ejin Pharmaceutical Co., Ltd., Leqing 325600, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA sequence encoding farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) that is one of the important rate-limiting enzymes involved in terpenoid biosynthesis. **Method** Based on *Curcuma wenyujin* transcriptome database, specific primers were designed to amplify the full-length cDNA sequence of FPPS; the bioinformatics of the obtained sequence was further analyzed; GFP-fused constructs were prepared by cloning the full-length coding sequences of CwFPPS and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain by electroporation systems; the subcellular localization of CwFPPS protein was observed by injecting the mixture of agrobacteria containing the CwFPPS::GFP fusion vector into *Nicotiana benthamiana* leaves. The

收稿日期: 2021-05-06

基金项目: 温州医科大学人才项目 (89220027); 浙江省重点实验室项目 (2021E10013); 大理药业股份有限公司横向课题 (KJHX1603); 合肥未来药物开发有限公司横向课题 (KJHX2008); 安徽济人药业横向课题 (KJHX2009)

作者简介: 丁贤华 (1983—), 女, 安徽石台人, 硕士, 研究实习生, 研究方向为中药生物技术。Tel: (0577)86699891

*通信作者: 姜程曦 (1971—), 男, 安徽青阳人, 教授, 研究方向为中药生物技术研究。Tel: 18969715696 E-mail: jiangchengxi@126.com

吴志刚 (1979—), 副研究员, 主要从事药用植物次生代谢产物研究。E-mail: wuzhigang177@126.com

#并列第一作者: 张丽萍 (1996—), 女, 河北唐山人, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: (0577)86591685

real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the gene expression profiles in different tissues. **Results** Sanger sequencing showed that the full-length *CwFPPS* is 1196 bp (GenBank accession number: MT489462), which contains an open reading frame of 1071 bp, encoding 356 amino acids. The *CwFPPS* encoding protein belongs to the member of the isoprenoid biosynthetic enzyme superfamily (C1) and contains 5 conserved functional domains, 2 of which are rich in aspartic acid (DDXXD) as active zones of FPPS enzyme. Subcellular localization indicated that the protein is located in the cytoplasm, as well as the cell membrane. The *CwFPPS* was specifically expressed in rhizome and its relative expression level was 13.7-fold compared to that in leaves. **Conclusion** *CwFPPS* gene in *Curcuma Wenyujin* was successfully cloned and its expression pattern in tissues were obtained, which provides a basis for further gene functional identification and metabolic engineering of high-value sesquiterpenoids.

Key words: *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C.Ling; FPPS; cloning; subcellular localization; expression analysis

温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 为姜科姜黄属多年生草本植物, 是我国传统道地药材, 其根茎、块根采用不同炮制方法可制成临床上常用的“温莪术”“片姜黄”和“温郁金”3 味中药, 具行气化瘀、清心解郁、利胆退黄等功效^[1]。研究表明, 温郁金主要成分为倍半萜, 其中蓬莪术二烯、莪术醇、郁金二醇、莪术烯、 δ -榄香烯、 β -榄香烯等活性成分具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、镇痛等药理作用, 开发应用前景广阔, 如 β -榄香烯已被开发成年产值达 40 亿元的抗肿瘤产品^[2-3]。然而, 植物体内重要活性成分含量十分有限, 且温郁金受连作障碍、种质退化、成分稳定性低、生产成本高等因素限制, 依靠传统“种植-提取”药源的方法面临挑战, 愈发难以满足生产需求。

随着合成生物学的发展, 以大肠杆菌、酵母工程菌或模式植物为底盘的代谢工程技术已成为近年来发掘开发新药源的热点领域。此过程中, 克隆及表达合成途径的限速酶是最为关键的。C₁₅ 型的法呢基二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 是合成倍半萜的前体物质, 是由 2 分子异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和 1 分子二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 在法呢基二磷酸合成酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS) 催化下缩合而成^[4]。当前, 小麦、白木香、黄花蒿等多个植物 FPPS 基因被克隆^[5-8], 甚至被应用代谢产物调控工程设计中, 而温郁金 FPPS 基因尚未见相关报道。

项目组前期在构建温郁金花、叶、根茎及块根全长转录组中发现, 1 条长为 1343 bp 的 FPPS 转录本 (il_HQ_W_c88364/f29p10/1344) 在温郁金根茎中特异表达。鉴于此, 本研究依据此转录本序列设计特异引物, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 从温郁金根茎中克隆 FPPS 基因 cDNA 全长序列并进行生物信息学分析, 利用烟草叶片瞬时转化体系验证亚细胞定位, qRT-PCR 检测基

因各组织表达模式, 为今后温郁金重要活性成分的生物合成调控途径及代谢工程研究提供依据。

1 材料与试剂

1.1 药材样品

样品采自温州瑞安陶山镇种植基地 (E120° 51', N27° 83'), 由温州医科大学吴志刚副研究员鉴定为温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen & C. Ling。根据温郁金发育规律^[9], 花、叶、根茎等组织分别于花期、叶丛期、根茎始发期和块根形成期进行收集, 每个部位收集 3 份。材料经洗净、切碎, 液氮下研成粉末并于 -80 °C 保存备用。本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* Domin 种子 (本实验室保存) 播种于直径 7 cm 的营养钵中 (腐殖质: 蛭石 1:1), 25 °C 下每日 12 h 的光照培养 30 d, 用于亚细胞定位分析。

1.2 菌株与载体

Escherichia coli TOP10 菌株为本实验室保存, 根癌农杆菌 GV3101 购自上海唯地生物技术有限公司, pCambia 1302 表达载体购自南京钟鼎生物技术有限公司。

1.3 工具酶与主要试剂

pfu DNA 聚合酶、Taq 酶, T4 DNA 连接酶及限制性内切酶、SYBR Premix Ex Taq™ 荧光定量 PCR 试剂盒及 RNA 纯化试剂盒均购自 TaKaRa Bio 公司 (大连), CV1401-Zero Background pTOPO-TA cloning kit 购自北京艾德莱生物有限公司, cDNA 反转录试剂盒购自美国 Applied Biosystems™ 公司, DNA 回收纯化试剂盒、质粒小提试剂盒购自美国 AXYGEN 公司。PCR Buffer 缓冲液、ddH₂O、琼脂糖等均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。引物合成及测序由南京钟鼎生物技术有限公司完成。

2 方法

2.1 RNA 提取与纯化

参照 CTAB 法^[10]提取样品总 RNA 并按 RNA 纯化试剂盒说明纯化, 1% 的琼脂糖电泳检测 RNA 完

整性、浓度和纯度。依据反转录试剂盒的说明反转录成 cDNA。

2.2 *CwFPPS* 基因克隆与测序

利用 Primer Premier 5.0 软件设计基因全长扩增引物 (FPPS-F: 5'-GTGCCATTCTTCGAGTGT-3', FPPS-R: 5'-TATTAGAAAATTGATCGTAAG-3')。以温郁金根茎 cDNA 为模板, 配制反应体系: 5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer (含 Mg^{2+}), 5 μ L dNTP, 1 μ L *Taq* 酶, 1 μ L 模板, 各 1 μ L 的上下游引物 (10 μ mol/L), 36 μ L ddH₂O。于 96 孔梯度 PCR 仪上进行扩增, 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 1 个循环; 然后 94 $^{\circ}$ C、30 s, 56 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1.5 min, 进行 35 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 7 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, PCR 产物切胶纯化回收, 连接 TOPO-TA 克隆载体, 转化大肠杆菌 TOP10 菌株, 挑取阳性菌株提取质粒并进行测序。

2.3 *CwFPPS* 基因的生物信息分析

ORF finder 在线软件编译 *CwFPPS* 基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 及翻译蛋白, NCBI 在线 CDD Tools (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 搜索蛋白保守结构域, 在线 BlastP 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索并下载相似性氨基酸序列 (identity > 75%) ClustalX2.0 进行氨基酸多序列比对, 并利用 MEGA7.0 软件中的极大似然法进行系统进化树分析, Bootstrap 值设为 1000。ExPASy 在线服务器 ProtParam 工具分析蛋白等电点、氨基酸分布、亲水性等情况; SignalP-5.0 Server 和 TMHMM Server v.2.0 在线预测蛋白信号肽及跨膜结构; WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测亚细胞定位情况。SOPMA 分析蛋白二级结构, 采用 SWISS-MODEL 在线工具进行三维同源建模。

2.4 *CwFPPS* 蛋白亚细胞定位

根据 *CwFPPS* 基因开放阅读框 (ORF) 序列, 在 *Nco* I 和 *Spe* I 酶切位点间设计全长拼接引物 (F: 5'-AGAACACGGGGGACTCTTGACCATGGGCATG-GCGGAGGCGACGGCGAACG-3'; R: 5'-GTGAA-AAGTTCTTCTCCTTTACTAGTCTTCTGCCTTTTGTAGATCTT-3'; 划线部分为酶切位点), 通过同源重组方法连接至 pCambia 1302 载体的 *Nco* I 和 *Spe* I 位点间, 获得 pCambia 1302-*CwFPPS* 重组质粒并转至 TOP10 克隆菌株, 阳性克隆子测序验证。连接反应体系: 引物各 0.5 μ L, 模板 0.3 μ L, 5 $\times$ Buffer

溶液 10 μ L, pfu DNA 聚合酶 0.5 μ L, dNTP (10 μ mol/L) 1 μ L, ddH₂O 加至 50 μ L。上述测序正确的质粒进行酶切鉴定, 反应体系为: 质粒 3 μ L, 内切酶 *Nco*I、*Spe*I 各 0.25 μ L, 10 $\times$ Buffer 1.0 μ L, ddH₂O 5.5 μ L。

将上述鉴定正确的重组质粒电转化法转入根癌农杆菌 GV3101 中, 固体培养 2 d 后, YEB 液体扩大培养 1 h, 离心弃清液; 沉淀菌体用 10 μ mol/L $MgCl_2$ (含 120 μ mol/L 乙酰丁香酮) 进行悬浮重悬, 稀释液 600 nm 吸光度 (*A*) 为 0.6 左右。以空载为对照, 取生长良好的烟草植株, 从叶片下表皮进行注射, 弱光培养 2 d, 激光共聚焦显微镜 (Nikon C2-ER) 下观察绿色荧光蛋白和融合蛋白表达情况。

2.5 qRT-PCR 分析

使用荧光定量 PCR 仪 (ABI7500, USA) 分析 *CwFPPS* 基因在温郁金不同组织中的表达模式。依据序列设计 qRT-PCR 特异引物 (F: 5'-TGGA-TTGCTTCGGTCATC-3'; R: 5'-ATCTTCAGTTGGCTCTCATT-3'), 产物 200 bp, 以 18 S 为内参基因 (F: 5'-GTAGTTGGGCTTTGGGTTG-3'; R: 5'-AGCGTAGGCTTGCTTTGAG-3') 为内参基因。配制反应体系如下: SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, 美国) 10 μ L, 正反引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 8 μ L, 并以 2 μ L 的 ddH₂O 代替模板作为阴性对照。反应程序: 95 $^{\circ}$ C、30 s, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、15 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 进行 40 个循环。每样品 3 次技术性和生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[11]统计基因相对表达水平。

3 结果与分析

3.1 *CwFPPS* 基因克隆与序列全长

根据温郁金转录组中 1 条在根茎中特异表达的 FPPS 转录本设计特异引物, 以根茎 cDNA 为模板, RT-PCR 扩增并经琼脂糖凝胶电泳检测, 发现在 1200 bp 处出现的特异条带 (图 1), 与预期的片段大小基本一致。PCR 产物连接 T 载体, 克隆测序发现温郁金 FPPS 基因全长为 1196 bp。ORF Finder 预测该基因序列含有 1 个完整的 ORF, 长为 1071 bp, 编码 356 个氨基酸残基, ORF 与原转录本一致。BlastP 比对显示该基因序列与其它物种的法呢基焦磷酸合酶高度相似, 命名为 *CwFPPS*, 序列提交至 GeneBank (登入号 MT489462)。

3.2 *CwFPPS* 序列生物信息分析

3.2.1 序列分析 Conserved domain 预测发现,

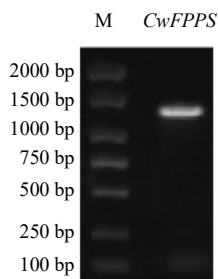


图 1 *CwFPPS* 基因的 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 1 Agrose gel electrophoretogram for PCR product of

CwFPPS 基因编码蛋白属于类异戊二烯生物合成酶超级家族 (C1) 成员, 是植物催化形成 FPP 的关键酶。结构域分析表明, *CwFPPS* 编码氨基酸序列具有 2 个天冬氨酸富集的保守结构域 Motif2 和 Motif5, 富含 DDXXD (图 2), 是结合 Mg^{2+} 、保证酶活性的重要功能域^[11]。除 Motif2、Motif5 以外, *CwFPPS* 蛋白还含有与底物结合的 $G_{60}K_{61}L_{62}N_{63}R_{64}$ (Motif1)、 $G_{174}Q_{175}X_{176}X_{177}D_{178}$ (Motif3) 保守区, 以及促进酶活性 $K_{204}T_{205}$ (Motif4) 位点 (图 2)。此外, ProParam Tool 在线分析显示, *CwFPPS* 蛋白相对分子质量为 40 630, 推测分子式为 $C_{1850}H_{2876}N_{472}O_{532}S_{12}$, 理论等电点 (pI) 5.93; 氨

基酸组成以亮氨酸比例最高, 达到 12.4%; 不稳定系数为 28.14, 脂肪系数为 96.69, 亲水性系数为 -0.205, 暗示该蛋白为稳定的亲水性蛋白。TMHMM 预测 *CwFPPS* 蛋白不含跨膜区, SignalP 5.0 进一步预测表明此蛋白不具备信号肽位点。

3.2.2 序列相似性比对和进化分析 BlastP 显示 *CwFPPS* 蛋白与多个单子叶植物 FPPS 序列具有高度的相似性, 其中与同科植物红姜花 *Hedychium coccineum* Buch. -Ham. 的 FPPS 氨基酸序列 (AER12202.1) 一致性 (identity) 达 93.5%。选取 19 条一致性较高 (>75%) 的氨基酸序列进行多重比对发现, 这些序列均存在上述 5 个保守结构功能域, 暗示该基因功能性的保守。利用 MEGA7.0 软件中的最大似然方法构建系统进化树, 见图 3。结果表明, 温郁金与姜科的红姜花、芭蕉科的小果野蕉 *Musa acuminata* Colla 植物亲缘关系最近, 聚为一类, 而与铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura & Migo、霍山石斛 *D. huoshanense* C. Z. Tang & S. J. Cheng、春兰 *Cymbidium goeringii* (Rchb. f.) Rchb. f.、蝴蝶兰 *Phalaenopsis japonica* (Rchb. f.) Kocyan & Schuit 等兰科植物距离较远。

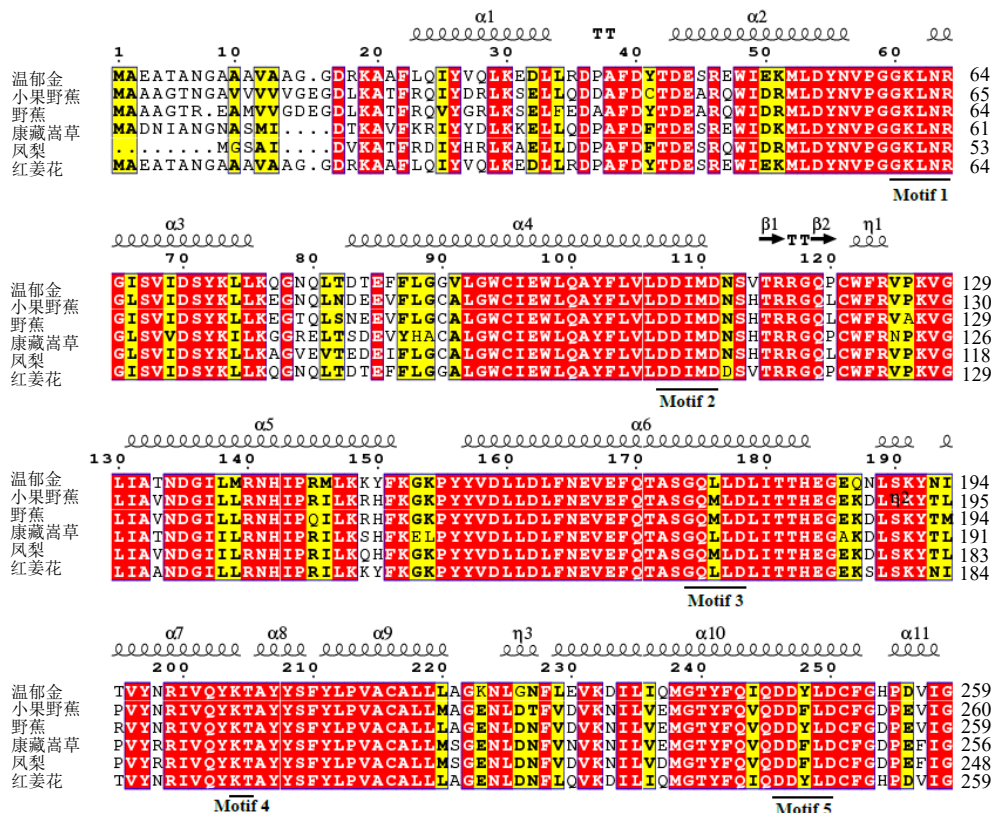


图 2 *CwFPPS* 蛋白与其他植物 FPPS 保守区序列的多重比对

Fig. 2 Multiple alignment of conserved region from *CwFPPS* and other typical plants

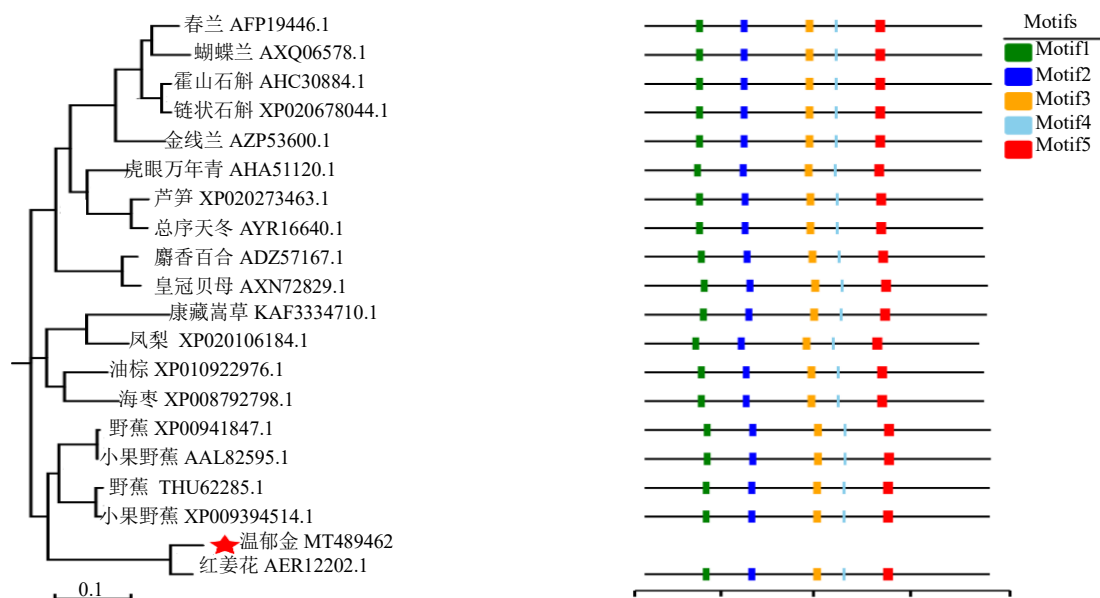


图 3 CwFPPS 蛋白与同源氨基酸序列的进化树分析及保守结构域

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis (Maximum Likelihood method) and conserved domain for CwFPPS and its homologous amino acid sequences

3.2.3 蛋白二级结构及同源建模 二级结构预测显示 CwFPPS 蛋白是由 62.9% 的 α 螺旋 (整条序列含有 16 个 α 螺旋区), 7.3% 的延伸链, 4.5% 的 β 折叠和 25.3% 的无规则卷曲构成。SWISS-MODEL 建模显示, CwFPPS 蛋白与 PDB 数据库中的法尼基二磷酸合成酶 1 嵌合体 (模板号: 4kk2.1.A) 序列一致性达到 70.96%, 序列的相似度为 0.52, 覆盖度为 0.94; 依据该模板建模显示 CwFPPS 蛋白是由 α 螺旋形成的同源双聚体寡核苷酸构成, 空间结构含有与底物结合的“口袋” (图 4)。

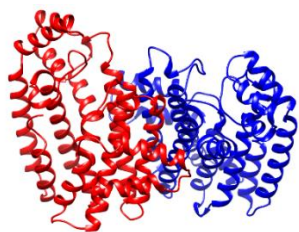


图 4 CwFPPS 蛋白三级结构预测

Fig. 4 Prediction of CwFPPS protein tertiary structure

3.3 CwFPPS 亚细胞定位

利用 WoLFPSORT 工具预测 CwFPPS 亚细胞定位, 此蛋白最大可能是定位于细胞质中。为验证该蛋白亚细胞定位, 构建 pCambia 1302-CwFPPS 载体, 并通过根癌农杆菌介导的烟草叶片的瞬时转化体系, 激光共聚焦显微镜下观察发现 CwFPPS::GFP 融合蛋白在细胞质与细胞膜上具有明显信号 (图 5)。

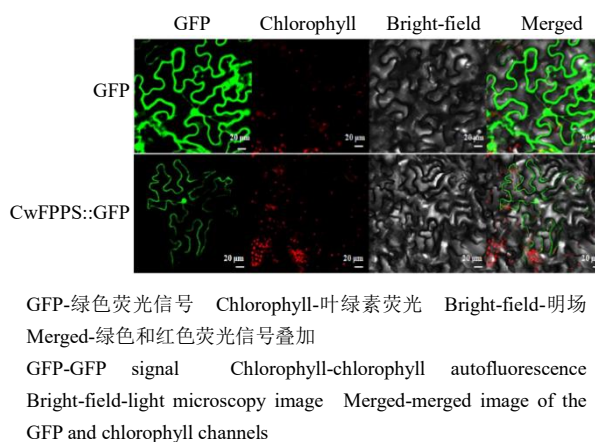


图 5 木氏烟叶草 CwFPPS 蛋白亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of CwFPPS in *N. benthamiana* leaves

3.4 CwFPPS 组织特异表达分析

为明确 CwFPPS 基因在温郁金不同组织表达情况, qRT-PCR 检测显示该基因在温郁金药用部位根茎、块根中具有较高表达, 反之在花、叶中表达较低 (图 6), 这可能与药用部位积累更高的萜类成分有关。其中, 根茎相对表达量是叶中的 13.7 倍。

4 讨论

本研究从温郁金根茎中成功克隆获得类异戊二烯生物合成酶超级家族 (C1) 成员之一的 CwFPPS 基因, 该基因编码 356 个氨基酸, 含有 2 个聚戊烯基合酶家族特有并高度保守的 DDXXD 的结构域

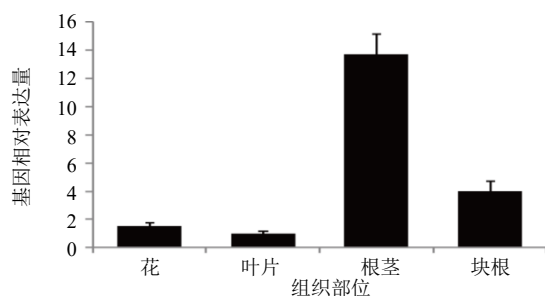


图 6 *CwFPPS* 基因组织特异性表达

Fig. 6 Expression profile of *CwFPPS* in different tissues

(Motif2、Motif5)。此 2 个功能区被认为是 FPPS 酶与底物结合的重要位点，其富含天冬氨酸的残基决定产物链长度和 FPPS 酶的活性，天冬氨酸突变或替代物能显著降低 FPPS 酶活性^[12-13]。多序列比对发现（图 2），*CwFPPS* 蛋白与其他植物 FPPS 氨基酸序列一样均具有上述 2 个功能域，暗示这些氨基酸残基在发挥酶与底物结合、催化中功能性保守。类似其它植物，*CwFPPS* 蛋白也包含 Motif1（GKXXR）、Motif3（GQXXD）、Motif4（KT）等保守区，这种序列保守性也可用来研究植物间的进化关系^[14]。*CwFPPS* 氨基酸序列与兰科、百合科、凤梨科、姜科、芭蕉科等单子叶植物的 FPPS 序列具有 70% 以上的一致性，系统进化进一步表明温郁金与同科植物红姜花、芭蕉科的小果野蕉聚为一类（图 3），说明它们间亲缘关系较近，预示 *CwFPPS* 对于研究温郁金系统进化地位具有一定应用价值。

由于亚细胞区室化作用，植物体内倍半萜一般是在细胞质中通过甲羟戊酸（mevalonate pathway, MVA）途径合成^[15]。*CwFPPS* 蛋白没有跨膜螺旋区且不存在信号肽，推测此蛋白在细胞质起始合成并直接在细胞质中酶促反应。通过在 *CwFPPS* 蛋白 C 端融合 GFP，融合蛋白在烟草表皮细胞的细胞质和细胞核上具有明显 GFP 信号，与预测和其它植物 FPPS 亚细胞定位研究结果基本一致^[16-17]。因而，初步认定 *CwFPPS* 定位于细胞质和细胞核上。

植物萜类合成常发生于特殊的组织或特殊发育阶段，合成途径中关键基因的表达具有组织特异性或显示时空特异性^[18]。研究发现，参与建泽泻 23-乙酰泽泻醇 B 合成的 *FPPS* 基因在叶片中表达最高，且与成分变化成正相关，白木香 *AsFPPS* 在根中表达量最高，广藿香 *FPS* 基因成熟期叶片中表达最高^[5, 19-20]。qRT-PCR 检测发现，*CwFPPS* 基因在根茎中具有特异表达，其相对表达水平是叶

片中的 13.7 倍，暗示其在根茎中发挥重要的生物学功能。而根茎是温郁金最重要的药用部位，是提取莪术油的唯一原料，相比其它组织部位倍半萜成分在该部位是最高的^[21]。这种潜在正关联性，暗示 *CwFPPS* 对促进温郁金倍半萜合成可能起着关键作用，但“基因-成分”关联性需要下一步进行基因功能学的验证。

FPPS 作为植物萜类合成途径的关键酶之一，利用“基因-代谢”工程手段获得萜类成分高产株系是近年来研究的重要手段。青蒿 *FFPS* 超表达的株系相比野生型植株倍半萜青蒿素增加了高 2~3 倍^[20]。在烟草叶片腺毛上异源表达西红柿 *zFPPS* 和萜类合成酶，产生了多种倍半萜化合物^[23]。研究也报道，人参 *PgFPPS* 基因过表达的毛状根株系（F17）中人参皂苷含量是野生型的 2.4 倍^[24]。本研究成功克隆获得了温郁金 *CwFPPS* 基因，该基因具有异戊二烯生物合成酶家族保守的活性功能域，并在根茎中具有特异表达。研究结果为后续利用代谢工程手段调控温郁金萜类成分提供了重要靶标基因，有益于温郁金重要价值萜类成分的开发利用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 217.
- [2] 尹国平, 张清哲, 安月伟, 等. 温郁金化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3354-3360.
- [3] 麻杰, 陈娟, 赵冰洁, 等. 抗癌药物 β -榄香烯及其衍生物的研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1184-1191.
- [4] Dhar M K, Koul A, Kaul S. Farnesyl pyrophosphate synthase: A key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development [J]. *New Biotechnol*, 2013, 30(2): 114-123.
- [5] 杨欣, 魏建和, 刘娟, 等. 白木香法呢基焦磷酸酶基因 *AsFPPS* 的克隆及表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3251-3255.
- [6] Banyai W, Kirdmanee C, Mii M, et al. Overexpression of farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) gene affected artemisinin content and growth of *Artemisia annua* L [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2010, 103(2): 255-265.
- [7] Zhang Y, Li Z X, Yu X D, et al. Molecular characterization of two isoforms of a farnesyl pyrophosphate synthase gene in wheat and their roles in sesquiterpene synthesis and inducible defence against aphid infestation [J]. *New Phytol*, 2015, 206(3):

- 1101-1115.
- [8] Peng B, Nielsen L K, Kampranis S C, *et al.* Engineered protein degradation of farnesyl pyrophosphate synthase is an effective regulatory mechanism to increase monoterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metab Eng*, 2018, 47: 83-93.
- [9] 陶正明, 吴志刚, 黄品湖, 等. 温郁金生长规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(20): 2110-2113.
- [10] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] 李永波, 樊庆琦, 王宝莲, 等. 植物法呢基焦磷酸合酶基因 (FPPS) 研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(3): 321-330.
- [13] Szkopińska A, Płochocka D. Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity [J]. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52(1): 45-55.
- [14] Qian J, Liu Y, Chao N, *et al.* Positive selection and functional divergence of farnesyl pyrophosphate synthase genes in plants [J]. *BMC Mol Biol*, 2017, 18(1): 3.
- [15] Tholl D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(3): 297-304.
- [16] 蒋玲, 谷巍, 巢建国, 等. 濒危药用植物茅苍术法呢基焦磷酸合酶基因克隆及其表达分析 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 760-766.
- [17] 张瑶瑶, 宋丽, 刘伟, 等. 香樟 FPPS 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(19): 6276-6281.
- [18] Nagegowda D A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(14): 2965-2973.
- [19] 谷巍, 吴启南, 巢建国, 等. 建泽泻法呢基焦磷酸合酶分子克隆、分布表达及生物信息学研究 [J]. 药学报, 2011, 46(5): 605-612.
- [20] 张贵翔, 吴友根, 陈赫, 等. 广藿香法呢基焦磷酸合酶基因(FPS)的克隆及生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(7): 2163-2170.
- [21] 孙敬茹, 卜俊玲, 赵欢, 等. 四种姜黄属药用植物根茎和块根挥发性代谢物的多元数据比较分析 [J]. 药学报, 2018, 53(8): 1215-1224.
- [22] 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(4): 482-487.
- [23] Sallaud C, Rontein D, Onillon S, *et al.* A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 301-317.
- [24] Kim Y K, Kim Y B, Uddin M R, *et al.* Enhanced triterpene accumulation in *Panax ginseng* hairy roots overexpressing mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase and farnesyl pyrophosphate synthase [J]. *ACS Synth Biol*, 2014, 3(10): 773-779.

[责任编辑 时圣明]