

枸骨法尼基焦磷酸合酶 *IcFPS2* 基因克隆与原核表达分析

涂逸, 曾慧, 张威威*, 许锋, 廖咏玲, 叶家保

长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025

摘要:目的 克隆枸骨 *Ilex cornuta* 三萜皂苷生物合成途径中关键酶法尼基焦磷酸合酶 (farnesyl diphosphate synthase, *FPS*) 基因, 对其进行组织特异性表达分析, 构建原核表达载体并进行重组蛋白诱导表达, 探究其参与调控三萜皂苷生物合成的功能。**方法** 结合枸骨转录组数据设计特异性引物, 采用 PCR 技术从枸骨叶中扩增得到了 *IcFPS2* 基因的 cDNA 序列, 对其进行生物信息学分析; 通过实时荧光定量进一步分析其组织表达特异性, 构建原核表达载体 pET32a-*IcFPS2*, 并转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞, 经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导重组蛋白的表达。**结果** *IcFPS2* 基因长 1259 bp, 开放阅读框为 1050 bp, 编码 350 个氨基酸, 其蛋白质相对分子质量和等电点分别为 40 200、5.54。氨基酸序列比对分析表明枸骨与梔子、杜仲、甘草、绞股蓝、竹节参的 *FPS* 氨基酸序列具有较高的同源性。系统进化树分析显示, *IcFPS2* 蛋白与西洋参、人参、竹节参 *FPS* 蛋白聚为一支, 表明枸骨 *FPS* 蛋白可能与双子叶植物五加科 *FPS* 蛋白在功能上较为接近。实时荧光定量 PCR 分析表明, *IcFPS2* 基因在根中的表达量最高, 其次是叶, 而后是雄花和茎, 该基因在雌花中表达水平最低。原核表达分析结果显示, 构建的 *IcFPS2*-pET-32a 载体能在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达, SDS-PAGE 结果显示, 诱导的重组表达蛋白相对分子质量在 45 000 左右, 与预测的 *IcFPS2* 蛋白大小基本一致。**结论** 通过对 *IcFPS2* 基因的全长 cDNA 克隆与生物信息学分析、组织表达特异性分析和原核表达载体的构建, 为后续进一步研究法尼基焦磷酸合酶基因在枸骨三萜皂苷生物合成途径的功能供科学依据。

关键词: 枸骨; 法尼基焦磷酸合酶; 克隆; 表达分析; 原核表达

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4813-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.025

Cloning and prokaryotic expression analysis of farnesyl pyrophosphate synthase *IcFPS2* gene from *Ilex cornuta*

TU Yi, ZENG Hui, ZHANG Wei-wei, XU Feng, LIAO Yong-ling, YE Jia-bao

College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

Abstract: Objective To clone the key gene of chalcone synthase farnesyl diphosphate synthase (*FPS*) in triterpenoid saponins biosynthetic pathway of *Ilex cornuta*, analyze tissue-specific expression of the chalcone synthase, construct the prokaryotic expression vector and induce the recombinant protein to express, explore its function in regulating the biosynthesis of triterpenoid saponins. **Methods** Based on the transcriptome data of *I. cornuta* in the previous study, the full-length cDNA of *IcFPS2* was cloned by PCR from the leaves of *I. cornuta* and bioinformatics analysis was performed. The qPCR was used to further analyze the tissue-specific expression of *IcFPS2*. The prokaryotic expression vector pET32a-*IcFPS2* was constructed, transformed into BL21 (DE3) pLysS competent cells and the expression of recombinant protein was induced by IPTG. **Results** The size of *IcFPS2* gene was 1259 bp, containing an open reading frame (ORF) of 1050 bp and encoding 350 amino acids, its protein molecular weight and isoelectric point are 40 200 and 5.54, respectively. Amino acid sequence alignment analysis showed that *FPS* amino acid sequences of *I. cornuta* had high homology with those of *Gardenia jasminoides*, *Eucommia ulmoides*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Gynostemma pentaphyllum* and *Panax japonicus*. Phylogenetic tree analysis showed that the *IcFPS2* protein clustered with the *FPS* proteins of *Panax quinquefolius*, *P. ginseng* and *P. japonicus*, suggesting that the *FPS* protein of *I. cornuta* may be functionally close to the *FPS* protein of the dicotyledonous plant Pentaphyllaceae. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis showed that the expression of *IcFPS2* gene was highest in roots, followed by leaves, and then male flowers and stems, and the gene was

收稿日期: 2021-12-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31500546)

作者简介: 涂逸, 硕士研究生。研究方向为从事林木次生代谢分子调控机制研究。E-mail: ty1102903626@163.com

*通信作者: 张威威, 博士, 副教授。研究方向为从事林木次生代谢分子调控机制研究。E-mail: wwzhangchn@163.com

expressed at the lowest level in female flowers. The results of the prokaryotic expression analysis showed that the constructed pET32a-*IcFPS2* vector could be successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3), and the SDS-PAGE results showed that the induced recombinantly expressed protein was around 45 000, which was basically consistent with the predicted *IcFPS2* protein size. **Conclusion** The full-length cDNA cloning and bioinformatics analysis of *IcFPS2* gene, tissue-specific expression analysis and prokaryotic expression vector construction were used to provide scientific basis for further research on the function of farnesyl pyrophosphate synthase gene in triterpenoid saponins biosynthetic pathway of *I. cornuta*.

Key words: *Ilex cornuta* L.; farnesyl pyrophosphate synthase; cloning; expression analysis; prokaryotic expression

枸骨 *Ilex cornuta* L. 为冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属常绿灌木或小乔木, 在我国长江中下游地区各省均有栽培。枸骨是一味传统的药食同源植物, 其主要药用部位是枸骨的干燥叶, 常用于治疗风湿痹痛、肺癆咳嗽、劳伤失血等症状^[1], 同时也是“苦丁茶”的主要原料之一^[2]。三萜皂苷 (triterpenoids saponins) 是枸骨的主要活性成分^[3], 现代药理学研究表明枸骨三萜皂苷具有调血脂、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等作用^[4-8]。三萜皂苷还广泛分布于人参^[9]、金铁锁^[10]、三七^[11]、无患子^[12]等药用植物中。近年来随着枸骨药用价值不断被挖掘, 医药等行业对枸骨的需求日益增加。因此, 研究枸骨三萜皂苷的分子机制及提高枸骨药材中三萜皂苷的含量具有重要意义。

枸骨三萜皂苷主要是通过甲羟戊酸途径合成而来的, 法尼基焦磷酸合酶 (farnesyl diphosphate synthase, *FPS*) 是该生物合成途径中的一个关键酶。*FPS* 是甲羟戊酸途径中的主链延伸酶, 催化二甲基烯丙基二磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 和香叶基二磷酸 (geranyl diphosphate, GP) 与异戊烯基二磷酸的连续缩合生成法尼基二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP); *FPS* 也是第一个承担流向各个化合物分支点反应底物的酶^[13]。因此, *FPS* 蛋白的活性和功能会影响下游萜类物质的合成^[13]。目前, *FPS* 基因已在广藿香^[14]、赤芝^[15]、独行菜^[16]、千里光^[17]等多种植物中被成功克隆与鉴定。本研究从枸骨叶中扩增得到 *FPS* 基因序列, 并进行生物信息学分析, 组织表达模式分析, 以及原核表达研究, 以期为进一步弄清枸骨 *FPS* 基因的功能, 解析三萜皂苷合成通路奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

枸骨的根、茎、叶、雄花和雌花组织采摘于长江大学校园, 液氮速冻后转至 -80 °C 冰箱保存, 用于后续 RNA 提取和基因表达分析。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取和 cDNA 合成 从 -80 °C 取出冻存的枸骨各组织材料, 使用液氮研磨至粉末, 依据 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 提取试剂盒说明提取各组织的总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸浓度检测仪检测 RNA 的质量、完整性以及浓度。按照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明进行 cDNA 第一链反转录。

1.2.2 枸骨 *IcFPS2* 基因的克隆 根据枸骨转录组数据^[18-20]挖掘出 2 条法尼基焦磷酸合酶基因序列, 分别为 *IcFPS1*、*IcFPS2*, 本研究对其中的一个 *IcFPS2* 展开试验。利用 Primer5 软件设计特异性克隆引物 (表 1), 以枸骨 cDNA 为模板进行 PCR 反应。反应体系共 50 μL, 包括 2×Rapid Taq Master Mix 25 μL, 上下游引物各 2 μL, cDNA 1 μL 及 ddH₂O 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C、3 min, 95 °C、15 s, 58 °C、15 s, 72 °C、30 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 按照 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒纯化回收扩增产物, 将回收产物连接至 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态, 37 °C 200 r/min 振荡培养 1 h, 涂布于含 50 μg/mL Amp 的 LB 培养平板上, 37 °C 倒置培养过夜。挑取单菌落活化并进行菌液 PCR 验证, 将阳性的单克隆菌液送至上海生物工程公司测序。

1.2.3 枸骨 *FPS* 基因的生物信息学分析 利用 NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 在线工具进行 *IcFPS2* 序列同源比对, DNAMAN 软件完成蛋白质序列翻译, 采用在线工具 SPOMA 进行蛋白质二级结构预测, 使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行蛋白理化性质分析。利用 Vector NTI Suite V11.5 软件对多种植物的 *FPS* 蛋白进行氨基酸序列比对分析, 利用 Clustal X 2.0 和 MEGA 6.0 软件, 采用邻接法 (NJ)

构建 *FPS* 系统进化树, 使用 Bootstrap 对系统树可信性进行检验, 重复 1000 次。

1.2.4 *IcFPS2* 基因的组织特异性表达分析 根据 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒和 PrimeScript™1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明书, 分别提取枸骨新鲜组织根、茎、叶、雄花和雌花的总 RNA 并反转录为 cDNA。根据 *IcFPS2* 基因 cDNA 序列设计定量引物, qRT-PCR 内参基因选用的是 *IcGAPDH* (表 1)。反应总体积为 20 μ L, 包括 $2\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, 正反引物各 0.4 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、10 s, 共 35 个循环, 溶解曲线为 95 $^{\circ}$ C、15s, 60 $^{\circ}$ C、60 s, 95 $^{\circ}$ C、15 s。qRT-PCR 实验分别设置一个阴性对照, *IcFPS2* 基因相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[18]计算, 进行 3 次生物学重复与 3 次技术重复。

1.2.5 原核表达分析 为了鉴定 *IcFPS2* 基因的生物学功能, 利用 pET32a 载体, 进行了该基因的原核表达分析。实验选择 *EcoR* I 和 *Hind* III 作为酶切位点, 设计含酶切位点的扩增引物 (表 1)。以枸骨

叶 cDNA 为模板扩增获得 *IcFPS2* 基因序列, 进行胶回收纯化, 采用北京全式金生物质粒提取试剂盒提取 pET32a 质粒。采用双酶切法, 分别对 *IcFPS2* 基因和 pET32a 质粒进行酶切, 酶切产物纯化后使用 T4 连接酶连接。用热激法将重组质粒载体 pET32a-*IcFPS2* 转入 DH5 α 大肠杆菌感受态, 活化后涂布在含有 Amp 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 菌液 PCR 筛选阳性单克隆, 送至上海生物工程公司测序。将构建成功的重组质粒 pET32a-*IcFPS2* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 感受态, 经菌落培养、PCR 鉴定后挑选阳性单菌落到含 Amp 的 LB 液体培养基中活化 12 h。取活化好的菌液按 1:50 的稀释比例加至含有抗生素的 50 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床 200 r/min 培养到 A_{600} 值 0.6~1.0, 加入不同浓度的 IPTG, 28 $^{\circ}$ C 诱导蛋白表达 0、4、8 h, 以转化空载体 pET32a 的表达作为对照。收集诱导菌液, 在 4 $^{\circ}$ C 以 5000 r/min 冷冻离心 5 min 得到菌体沉淀, 使用 200 μ L 蛋白提取缓冲液重悬菌体, 低温下超声破碎菌体 30 min, 12 000 r/min 冷冻离心 10 min 得到样品上清蛋白, 取 10 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

引物名称	引物序列 (5'→3')	用途
<i>IcFPS2</i> -F	ATTAAGACCATCTGTGGAGCCTAGC	基因克隆
<i>IcFPS2</i> -R	GGGTGACAGGTTTGTATAGCATCCA	
<i>qR-IcFPS2</i> -F	ACAGATTACCGAAGGTTGGTATG	实时荧光定量 PCR
<i>qR-IcFPS2</i> -R	GGTTGTCTGGAATTCTACCTCATTA	
<i>IcGAPDH</i> -F	TATCAACGGCTTCGGTCGCA	内参基因
<i>IcGAPDH</i> -R	GGACGGAGTCGTACTTGAGCAT	
<i>yh-IcFPS2</i> -F	CGGAATTCATGGCAAATCTGAACGGAACCTAC	构建原核表达载体
<i>yh-IcFPS2</i> -R	CCCAAGCTTCTACTTCTGCCTCTTGTATATCTTA	

2 结果与分析

2.1 *IcFPS2* 基因 cDNA 克隆与序列分析

以反转录的 cDNA 为模板, 利用 PCR 和 TA 克隆得到 *FPS* 基因的 cDNA 序列 (图 1), 经测序和在线工具 NCBI-Blast 比对, 此 cDNA 序列与其他物种的 *FPS* 基因序列具有较高的一致性, 说明克隆获得的 cDNA 序列为枸骨的 *FPS* 基因, 命名为 *IcFPS2*。该 cDNA 长为 1259 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 1050 bp, 编码 350 个氨基酸 (图 2)。

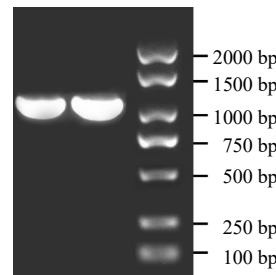
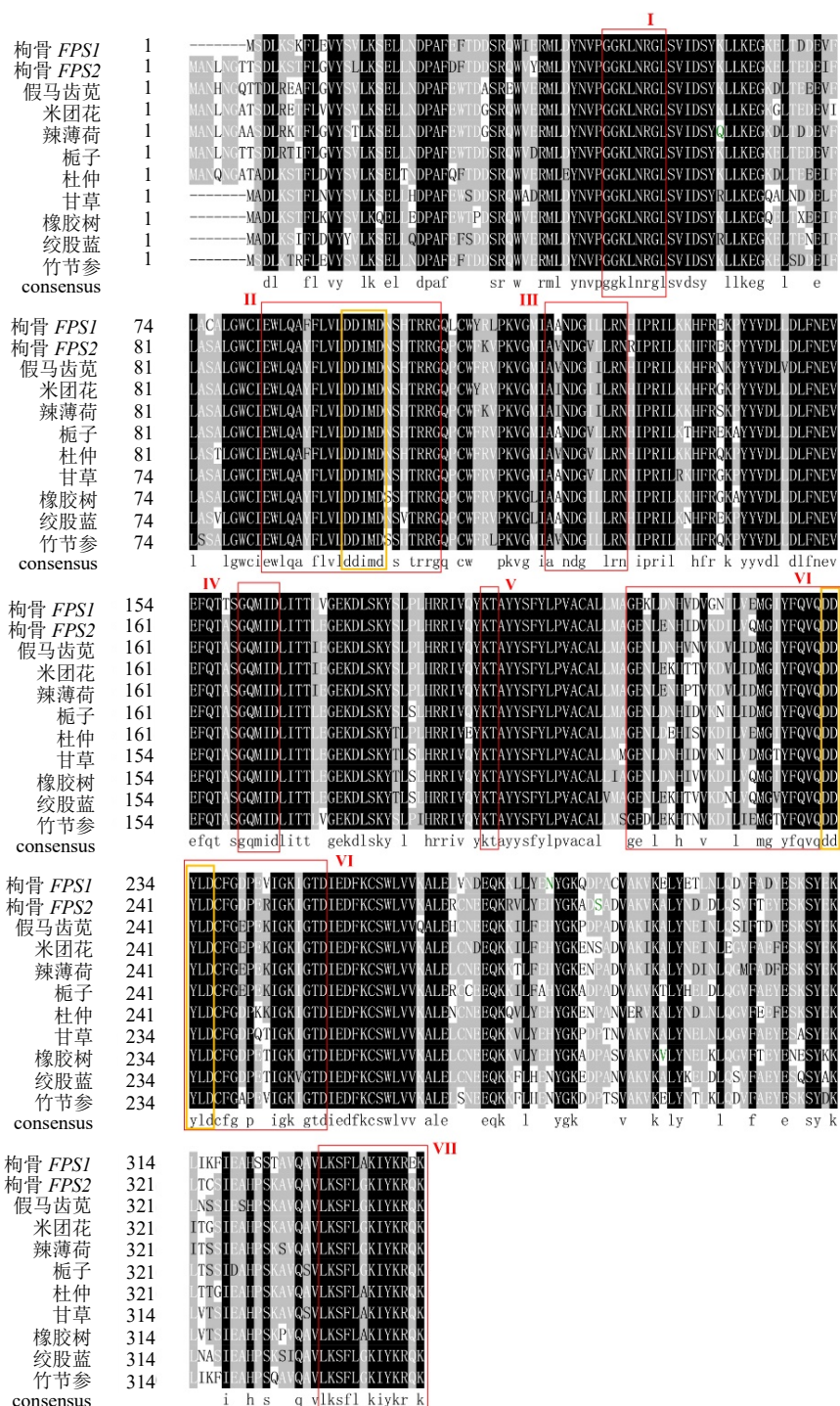


图 1 *IcFPS2* 基因扩增

Fig. 1 *IcFPS2* gene amplification

图 2 *IcFPS2* 基因 cDNA 序列和推测的氨基酸序列

2.2.3 枸骨 IcFPS2 蛋白质的系统进化分析 为了研究枸骨 IcFPS2 蛋白质与 *IcFPS1* 及其他植物 FPS 蛋白质的亲缘关系, 基于 *IcFPS2* 的氨基酸序列, 利用 BlastP 在线工具, 检索了人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer、西洋参 *P. quinquefolius* L.、竹节参 *P. japonicus* (T. Nees) C. A. Meyer、一串红 *Salvia splendens* Ker-Gawler、栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 等 11 种植物的 FPS 蛋白序列, 采用 ClustaIX 2.0 和 MEGA 6.0 软件构建了 FPS 蛋白序列系统进化树 (图 4)。进化树结果显示, IcFPS1 蛋白和 IcFPS2 蛋白都与人参、西洋参和竹节参的蛋白聚类在同一分支上, 表明枸骨 FPS 蛋白可能与双子叶植物五加科 FPS 蛋白在功能上较为接近。在枸骨中, 推测 IcFPS1、IcFPS2 可能协同调控枸骨萜类化合物的合成。



一致氨基酸用白色前景和黑色背景表示；保守氨基酸用白色前景和灰色背景表示；非相似氨基酸用黑色前景和白色背景表示；红色框表示显著相似性的 7 个区域；黄色框表示高度保守区域

Completely identical amino acids are indicated with white foreground and black background; Conserved amino acids are indicated with white foreground and grey background; Non-similar amino acids are indicated with black foreground and white background; Red boxes indicate seven regions of significant similarity; yellow boxes indicate highly conserved regions

图 3 FPS 氨基酸序列的多重比对
 Fig.3 Multiple alignments of amino acid sequences of FPS

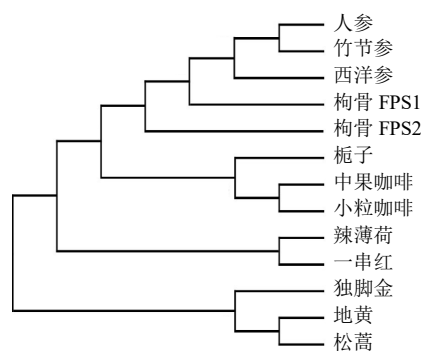


图 4 不同物种 FPS 基因的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of FPS genes from different species

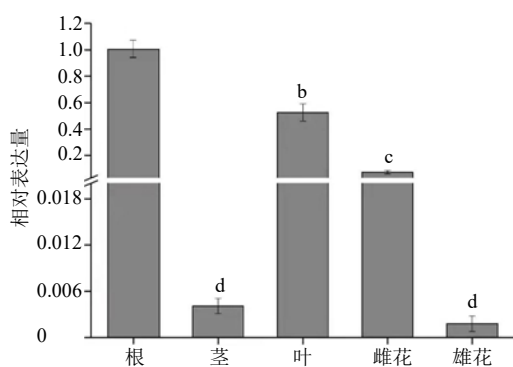
不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

图 5 IcFPS2 基因的表达分析

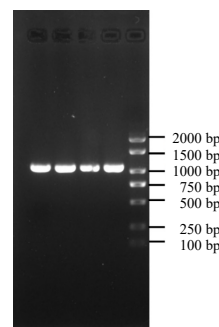
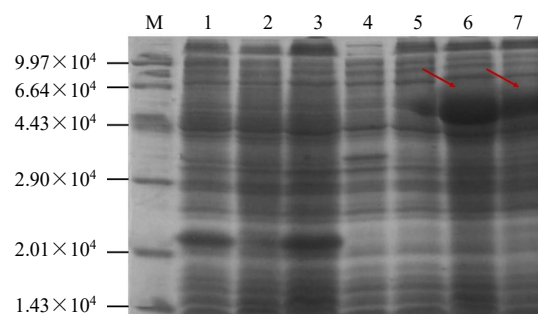
Fig. 5 Relative expression of IcFPS2 gene

2.3 IcFPS2 基因表达水平分析

为了探究 *IcFPS2* 基因的生物学功能, 通过 qRT-PCR 检测了 *IcFPS2* 在枸骨根、茎、叶、雄花和雌花中的表达模式。结果如图 5 显示, *IcFPS2* 基因在枸骨各个器官中均有表达; 其中, 在根中的相对表达量最高, 其次叶, 而后是雄花、茎, 在雌花中的表达量最低。该结果表明 *IcFPS2* 基因在枸骨的表达具有组织器官特异性。有研究表明, 植物 FPS 基因表达具有组织特异性, 并且伴随着类异戊二烯衍生物含量增加而增加^[19]。前期研究发现, 枸骨齐墩果酸在根中含量最高, 熊果酸在叶片中含量最高; 三萜化合物总含量在根中最高, 其次是叶和果实^[20]。本研究中 *IcFPS2* 基因也在根中的相对表达量最高, 与三萜皂苷组织分布呈现一致性, 因此, 推测可能也与枸骨三萜皂苷的生物合成量密切相关。

2.4 IcFPS2 基因的原核表达分析

本研究利用酶切位点 *EcoR* I 和 *Hind* III, 通过双酶切法构建了 pET32a-*IcFPS2* 原核表达载体。挑选转入大肠杆菌的克隆子, PCR 扩增得到了大小约 1100 bp 的条带 (图 6), 与目的片段大小一致; 进一步测序验证条带正确, 表明原核载体 *IcFPS2*-pET32a 构建成功。将构建成功的重组 pET32a-*IcFPS2* 原核表达载体导入大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 中, 加入不同浓度的 IPTG, 在 28 °C 条件下诱导蛋白表达, 0、4、8 h 后取样处理后进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果如图 7 所示, 以大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 为宿主菌, 1 mmol/L IPTG, 28 °C、200 r/min 振荡诱导 22 h 为条件, 在 45 000 附近位置出现了特异蛋白带, 特异蛋白带大小符合预期。未经诱导的含有重组质粒 pET32a-*IcFPS2* 的

图 6 pET32a-*IcFPS2* 重组质粒阳性克隆检测Fig. 6 Detection of positive clones of pET32a-*IcFPS2* recombinant plasmid

M-Marker 1-空载体 pET32a 2~3-1 mmol/L IPTG 诱导空载 pET32a 表达 0、4 h 4-未经诱导的重组质粒 pET32a-*IcFPS2* 5~7-1 mmol/L IPTG 诱导重组质粒 pET32a-*IcFPS2* 0、4、8 h。

M-Marker 1-empty vector pET32a 2—3-1 mmol/L IPTG induced expression of empty pET32a for 0, 4 h 4-uninduced recombinant plasmid pET32a-*IcFPS2* 5—7-1 mmol/L IPTG induced recombinant plasmid pET32a-*IcFPS2* for 0, 4, 8 h

图 7 *IcFPS2* 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析Fig. 7 SDS-PAGE analysis of *IcFPS2* gene expression products

菌株不表达该蛋白。说明原核表达载体 pET32a-IcFPS2 构建成功,并通过 IPTG 诱导成功表达。且 1 mmol/L IPTG 条件下的 pET32a-IcFPS2 重组质粒成功在 4 h 和 8 h 时间内诱导出目的蛋白条带,但未经诱导的重组质粒不表达该蛋白。

3 讨论

三萜皂苷广泛分布在植物界中,在枸骨、人参、三七、黄芪、绞股蓝等植物中的含量较高。枸骨三萜皂苷不仅参与植物病原体、病害的防御、生长发育和感觉调控作用外,还具有抗炎、抗肿瘤、抗菌等多种药理功效^[21]。随着枸骨药用价值不断被挖掘,枸骨三萜皂苷生物合成途径也受到了越来越多学者的关注。为了进一步探究枸骨三萜皂苷生物合成途径中关键酶和目标基因的分子调控机制,本研究基于枸骨转录组数据,通过 PCR 技术成功的从枸骨叶中扩增得到了 1 个 FPS 基因的全长 cDNA 序列。同源氨基酸序列比对表明, IcFPS2 蛋白与 IcFPS1 蛋白的一致性为 83.7%,且 IcFPS2 的蛋白与栀子、杜仲、橡胶树、米团花、绞股蓝、甘草、竹节参等植物的 FPS 蛋白高度同源。还有来自原核和真核的所有 FPS 的显著相似性的 7 个区域 I~VII 几乎相同^[22],其中 II 和 VI 区域富含高度保守的天冬氨酸序列,分别为 DDXX (XX) D (D 为天冬氨酸, X 为任意氨基酸),被称为 FARM;另一个是 DDXXD,被称为 SARM^[23]。此外,系统进化树分析显示 IcFPS1、IcFPS2 蛋白与五加科 FPS 蛋白在进化关系上较近,推测 IcFPS1、IcFPS2 可能协同调控枸骨萜类化合物的合成。

三萜皂苷的分布具有组织和器官特异性,如人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer、桔梗 *Platycodon grandifloras* (Jacq.) A. DC.、灵芝 *Ganoderma lucidum* Karst (Curtis) P. Karst、三七的根,麦蓝菜 *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert) 的种子,罗汉果 *Siraitia grosvenori* (Swingle) C. Jeffrey ex A. M. Lu et Z. Y. Zhang 的果实和积雪草的茎、叶,白桦 *Betula platyphylla* Suk. 树皮和树叶等部位均积累着丰富的三萜皂苷^[24]。本研究实时荧光定量结果显示 IcFPS2 基因在枸骨的五个组织中的表达量存在差异性,其中在根中的表达量最高。目前已在多种植物中进行了 FPS 基因的分离与功能验证,如千里光 FPS 基因在花、叶、茎和根中均有表达,在根和叶中的表达量最高^[17];金铁锁 FPS 基因在根、叶、茎中均有差异表达,且在根中的表达量最高^[25];枸骨

IcFPS1 在根中的基因表达量最高,叶中表达量次之,雄花中较低,在茎和雌花中的表达量最低^[26];橡胶草 FPS 在橡胶草的叶片中表达量最高,根、叶柄、种子次之,花中表达量最低^[27];金线莲中的 FPS 在根和茎中的相对表达量高,叶次之^[28];杜仲 FPS 在叶片和果实中广泛表达^[29]。这与本研究的 IcFPS2 基因表达结果相似。而人参 FPS 基因的表达水平随着生长周期的增加呈明显递减的趋势,其中在展叶期的表达量最高,而根中的表达量趋于 0^[30];刺五加 FPS 在幼茎中的表达量最高,叶柄和根次之,叶片中的表达量最低^[31]。这些研究表明 FPS 基因的转录水平在不同组织中表达可能与次生代谢产物的合成积累部位有关,而在不同的植物中又存在一定的个体差异性。法尼基焦磷酸合酶是甲羟戊酸途径中偏上游的第一个分支点的限速酶,在三萜皂苷合成途径中起着至关重要的作用。采用过表达方式提高三七 FPS 的转录水平,有利于促进三七皂苷的积累^[32];刘美佳等^[33]研究发现 *PjFPS* 转基因珠子参比野生型珠子参含有更高的皂苷含量。因此,通过调控 IcFPS2 基因的表达水平将有助于提高枸骨三萜皂苷的含量。

为进一步研究 FPS 基因在枸骨中的功能,构建了 pET32a-IcFPS2 载体,并且在大肠杆菌中异源表达,获得分子质量约为 45 000 的重组 IcFPS2 蛋白。

原核生物中表达载体有多种,其中 pET 是目前使用最为广泛且很便捷的载体之一^[34];同时, BL21 (DE3) 是一种高效表达且成本较低的表达系统^[35]。与吕燕李^[36]研究木薯的结论一致,本研究所选用的 pET32a 载体和大肠杆菌 BL21 (DE3) 可以高效、大量地诱导 IcFPS2 蛋白表达。周晨等^[37]利用大肠杆菌构建泽泻 FPS 基因的原核表达载体,为后期提高泽泻中原萜烷型四环三萜含量提供了科学依据;梁良等^[38]成功获得白木香 pET28a-AsSS4 重组蛋白,为揭示沉香倍半萜形成的分子机制奠定了基础;李铁铮等^[39]首次在大肠杆菌中表达了白木香的 AsERF1 蛋白,后期希望能够在蛋白水平上研究白木香中 AsERF1 的生物学功能奠定了分子基础。还有单婷玉等^[40]利用大肠杆菌构建山楂鲨烯合酶 *CpSQS1*、*CpSQS2* 基因的原核表达载体,为进一步研究山楂三萜生物合成途径提供了理论依据。

本研究为进一步通过转基因验证 IcFPS2 基因

的生物学功能奠定了基础, 为后续通过基因工程手段提高枸骨三萜皂苷含量提供了一定的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王存琴, 何丹. 枸骨的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 包头医学院学报, 2016, 32(8): 160-162.
- [2] Kim J, Kang W, Min H. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Ilex cornuta* extract mediated by inhibition of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation [J]. *J Med Food*, 2017, 20(10): 981-988.
- [3] Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, et al. Triterpene biosynthesis in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65: 225-257.
- [4] 左文健, 梅文莉, 曾艳波, 等. 枸骨的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(27): 16560-16562.
- [5] 李艳芝, 刘树玲, 李岩, 等. 枸骨不同部位不同溶剂萃取物的抗菌与抗氧化活性研究 [J]. 中国药房, 2015, 26(13): 1776-1778.
- [6] 陈姝瑾, 王淳, 刘春英. 熊果酸对肺癌细胞 A549 自噬相关蛋白的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(6): 86-90.
- [7] 陈曦, 程博, 宋宁, 等. 长梗冬青苷对 CAC 模型小鼠结肠 miR-29a/TET3 及 STAT3 的作用 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 39-42.
- [8] 龙书可, 方玲子, 林菲娟, 等. 基于网络药理学结合分子对接探讨中药枸骨叶抗肿瘤的作用机制 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(3): 431-438.
- [9] 吕重宁, 路金才. 人参皂苷在不同商品人参中的分布研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(17): 5329-5338.
- [10] 李畏娴, 张爱丽, 钱子刚, 等. 金铁锁三萜皂苷合成生物学研究进展 [J]. 中国药业, 2019, 28(21): 9-12.
- [11] 臧灵飞, 张洪玲, 杨迪, 等. 三七地上茎 4 个转录因子基因转录水平的纵向变化及其与总三萜皂苷含量的关系 [J]. 贵州农业科学, 2020, 48(5): 31-36.
- [12] 徐圆圆, 贾黎明, 陈仲, 等. 无患子三萜皂苷研究进展 [J]. 化学通报, 2018, 81(12): 1078-1088.
- [13] Yin J, Li Y, Li C X, et al. Cloning, expression characteristics of a new FPS gene from birch (*Betula platyphylla* suk.) and functional identification in triterpenoid synthesis [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 154: 112591.
- [14] 卢昌华, 邓文静, 曾建荣, 等. 广藿香 FPPS 基因原核表达及茉莉酸甲酯对 FPPS 表达量的影响 [J]. 广西植物, 2021, 41(7): 1155-1164.
- [15] 徐晓兰, 赖荣才, 陈体强, 等. 赤芝 FPS 基因酵母单杂交文库构建及其上游转录因子的筛选 [J]. 中草药, 2020, 51(14): 3770-3776.
- [16] 马利刚, 赵乐, 付小蝶, 等. 独行菜法尼基焦磷酸合酶基因的克隆与原核表达 [J]. 河南农业科学, 2017, 46(9): 92-97.
- [17] 上官艳妮, 李林, 潘胤池, 等. 千里光过氧化物酶基因的 SSR 标记及序列分析 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1952-1959.
- [18] 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.
- [19] 李永波, 樊庆琦, 王宝莲, 等. 植物法尼基焦磷酸合酶基因(FPPS)研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(3): 321-330.
- [20] Zeng H, Zhu L, Ma L, et al. De novo transcriptome sequencing of *Ilex cornuta* and analysis of genes involved in triterpenoid biosynthesis [J]. *Inter J Agri Biol*, 2019, 22: 793-800.
- [21] Augustin J M, Kuzina V, Andersen S B, et al. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(6): 435-457.
- [22] Koyama T, Obata S, Osabe M, et al. Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: Molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification [J]. *J Biochem*, 1993, 113(3): 355-263.
- [23] Szkopińska A, Płochocka D. Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity [J]. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52(1): 45-55.
- [24] 徐圆圆, 陈仲, 贾黎明, 等. 植物三萜皂苷生物合成途径及调控机制研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2021, 51(5): 525-555.
- [25] 韩丽君. 金铁锁 HMGR、FPS、SE 和 P450 基因克隆、生物信息学及表达分析 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2016.
- [26] 马良琼, 曾慧, 罗彩霞, 等. 枸骨 IcFPS1 基因的克隆、表达及生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2019, 39(3): 328-335.
- [27] 曹新文, 王秀珍, 李永梅, 等. 橡胶草法尼基焦磷酸合酶基因的克隆与功能分析 [J]. 中国农业科学, 2016, 49(6): 1034-1046.
- [28] Yang L, Zhang J C, Li W C, et al. Cloning and characterization of farnesyl pyrophosphate synthase gene from *Anoectochilus* [J]. *Pak J Bot*, 2020, 52(3): 925-934.
- [29] Wang L, Jing T, Li T Z, et al. Identification and expression analysis of the *Eucommia ulmoides* farnesyl diphosphate synthase gene family to reveal the key gene

- involved in rubber biosynthesis [J]. *Acta Physiol Plant*, 2017, 40(1): 1-5.
- [30] 杨林林, 杨利民, 马秀杰, 等. 人参法尼基焦磷酸合成酶基因的表达及其与皂苷含量的关系 [J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(6): 695-702.
- [31] 邢朝斌, 龙月红, 何闪, 等. 刺五加法尼基焦磷酸合酶基因的克隆、生物信息学及表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1725-1730.
- [32] 杨延, 刘迪秋, 葛锋, 等. 三七细胞中过表达 FPS 基因对皂苷合成的影响 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(8): 59-64.
- [33] 刘美佳, 于怡琳, 姜森, 等. 珠子参中法尼基焦磷酸合酶(FPS)对皂苷生物合成的影响研究 [J]. 植物研究, 2018, 38(4): 611-618.
- [34] Arya R, Sabir J S M, Bora R S, *et al.* Optimization of culture parameters and novel strategies to improve protein solubility [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1258: 45-63.
- [35] Kim S, Jeong H, Kim E Y, *et al.* Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21(DE3) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(9): 5285-5293.
- [36] 昌燕李, 韦运谢. 木薯 MeCAMTA 基因的克隆与原核表达 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(3): 744-750.
- [37] 周晨, 田荣, 谷巍, 等. 泽泻法尼基焦磷酸合酶原核表达、功能验证及其免疫检测研究 [J]. 药学报, 2018, 53(9): 1571-1577.
- [38] 梁良, 郭庆梅, 张争, 等. 白木香倍半萜合酶基因 AsSS4 的克隆、原核表达与功能鉴定 [J]. 药学报, 2014, 49(12): 1724-1729.
- [39] 李铁铮, 郑一哲, 戎玉清, 等. 白木香 AsERF1 基因的克隆、亚细胞定位与表达分析 [J]. 药学报, 2020, 55(8): 1957-1964.
- [40] 单婷玉, 于大庆, 韩晓静, 等. 山楂鲨烯合酶 CpSQS1, CpSQS2 的基因克隆及原核表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1334-1341.

[责任编辑 时圣明]