

## • 药材与资源 •

蛇足石杉中石杉碱甲合成相关基因 *HsPKSI* 的克隆及表达分析

沈 玉, 吴 昊, 吴德财, 姚诗晴, 李欣媛, 戴亮芳, 罗向东\*

江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022

**摘要:**目的 克隆蛇足石杉 *Huperzia serrata* 中石杉碱甲合成相关基因 *HsPKSI*, 解析其功能, 为揭示石杉碱甲生物合成机制奠定基础。方法 基于蛇足石杉转录组及 qRT-PCR, 筛选并克隆 *HsPKSI* 基因, 利用生物学信息分析预测其功能; 采用同源重组方法构建基因表达载体, 遗传转化至烟草中进行亚细胞定位和表达分析, 利用广泛靶向代谢组分析 *HsPKSI* 基因参与的生物合成通路的作用机制。结果 qRT-PCR 和 HPLC 结果表明不同组织间 *HsPKSI* 基因相对表达量与其石杉碱甲含量呈正相关。基因克隆、测序及生物信息学分析表明, *HsPKSI* 基因开放阅读框为 1 200 bp, 编码 399 个氨基酸, 编码蛋白具有酰基转移酶活性区域及多个辅酶 A 的结合位点。系统进化树分析表明, *HsPKSI* 蛋白与 25 个物种的聚酮合酶均具有较高的同源性, 其中与江南卷柏的亲缘关系最近。亚细胞定位结果表明 *HsPKSI* 蛋白在细胞核和细胞质均有表达。广泛靶向代谢组分析发现, *HsPKSI* 基因可以显著影响烟草次生代谢产物的积累, 并引起合成黄酮类的前体化合物和异喹啉类生物碱化合物的物质变化。结论 成功克隆并获得 *HsPKSI* 基因序列, 分析了基因表达模式、生物学功能及亚细胞定位, 揭示了该基因在类黄酮和生物碱合成等方面起重要作用, 为研究和揭示 HupA 合成代谢通路的分子机制提供科学依据。

**关键词:** 蛇足石杉; 聚酮合酶; 基因克隆; 烟草瞬时表达; 广泛靶向代谢组

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)18-6324-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.022

**Cloning and expression analysis of *HsPKSI* gene related to synthesis of huperzine A in *Huperzia serrata***

SHEN Yu, WU Hao, WU Decai, YAO Shiqing, LI Xinyuan, DAI Liangfang, LUO Xiangdong

College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

**Abstract: Objective** To clone *HsPKSI*, a gene related to the synthesis of huperzine A (HupA) in *Huperzia serrata*, and to analyze its function, laying the foundation for revealing the mechanism of HupA biosynthesis. **Methods** Based on the transcriptome analysis and qRT-PCR verification, the *HsPKSI* gene in *H. serrata* was identified and cloned. The gene expression vectors were constructed using the homologous recombination method, and then transferred it into tobacco (*Nicotiana benthamiana* L.) for subcellular localization and gene expression analysis. Subsequently, the action mechanism of *HsPKSI* gene involved in the related biosynthetic pathway were further analyzed by widely target metabolome analysis. **Results** The results of qRT-PCR and HPLC showed that the relative expression of *HsPKSI* gene was positively correlated with the content of HupA among the different tissues. Gene cloning, sequencing and bioinformatics analyses showed that the open reading frame of *HsPKSI* gene was 1 200 bp, encoding 399 amino acids. And the encoded protein had an acyltransferase active region and multiple coenzyme A binding sites. Phylogenetic tree analysis showed that the *HsPKSI* protein had high homology with the polyketide synthases of 25 species, and it has the closest genetic distance to *Moellendorfs Spikemoss Herb*. Subcellular localisation experiments showed that *HsPKSI* protein was located in the nucleus and cytoplasm. Widely targeted metabolome analyses showed that the *HsPKSI* gene could significantly affect the accumulation of tobacco secondary metabolites and induced changes in the synthesis of precursor compounds of flavonoids and isoquinoline alkaloid. **Conclusion** The *HsPKSI* gene sequence was successfully cloned and obtained, and the gene pattern, biological function and subcellular localization were analyzed. These results revealed that the *HsPKSI* gene play an important role in flavonoids and alkaloids synthesis, which will provide more scientific evidence for revealing the molecular mechanism of HupA biosynthetic pathway.

收稿日期: 2024-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32060074); 江西省自然科学基金资助项目 (20232ACB2050009)

作者简介: 沈 玉, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。Tel: (0791)88120390 E-mail: sheny202112@163.com

\*通信作者: 罗向东, 教授, 主要从事药用植物资源研究。Tel: (0791)88120390 E-mail: xdluolf@163.com

**Key words:** *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis.; polyketide synthase; gene cloning; tobacco transient expression; widely targeted metabolome

石杉碱甲 (huperzine A, HupA) 是最早从蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis. 中分离鉴定出的一种石松类生物碱, 是一种天然、高效、可逆性的第 2 代乙酰胆碱脂酶抑制剂<sup>[1]</sup>, 对治疗重症肌无力和阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 具有良好的功效<sup>[2]</sup>。由于蛇足石杉生长非常缓慢, 无法大规模人工繁殖<sup>[3]</sup>, 同时 HupA 含量极低 (小于 0.02%)<sup>[4]</sup>, 仅依靠野生蛇足石杉资源远不能满足市场需求。为解决 HupA 药源困境, 学者们尝试通过化学合成<sup>[5]</sup>、植物内生菌发酵<sup>[6]</sup>等途径获取 HupA, 但人工合成的 HupA 化学活性不高, 不良反应大且成本高昂<sup>[7]</sup>; 而内生菌发酵产率低且不稳定, 脱离蛇足石杉的菌株继代几次后甚至不再产 HupA<sup>[8]</sup>。目前 HupA 类药物生产仍主要依赖于野生蛇足石杉及其同属植物为原料, 这加剧了野生蛇足石杉的锐减。

随着合成生物学的迅速发展, 利用合成生物学技术可能是解决 HupA 药源瓶颈的最有效、最具发展潜力的途径之一。而利用合成生物学的前提是需要探明 HupA 生物合成通路的分子机制。关于 HupA 的生物合成代谢途径, 我国学者马晓强根据同位素标记法最早提出 HupA 合成通路假说<sup>[9]</sup>, 其他学者在此基础上提出了一个较为完善的以赖氨酸 (L-lysine) 起始的 HupA 生物合成通路假说<sup>[10]</sup>。该假说认为石榴碱 (pelletierine) 是 HupA 生物合成的重要前体物质之一, 而石榴碱的形成可能与植物 III 型聚酮合酶 (type III polyketide synthase, PKS) 催化聚酮缩合的功能密切相关。PKS 含有不同独立催化域的酮缩合酶, 催化产生了多种重要的药用植物次生代谢产物的核心结构, 包括黄酮类、二苯乙烯类、吡喃酮类等<sup>[11]</sup>。

此前, 胡莉琴<sup>[12]</sup>克隆了蛇足石杉中的 PKS 基因, 并通过大肠杆菌异源表达验证了 *HsPKS4* 具有催化 2 分子的丙二酰辅酶 A 形成 1,3-丙酮二羧酸活性, Nett 等<sup>[13]</sup>克隆了马尾杉 *Phlegmariurus phlegmaria* L. 中的 *PKS1*, 并通过异源表达验证 *PtPKS1* 验证其具有催化 HupA 前体物质石榴碱的合成能力。课题组前期基于转录组和荧光定量 PCR 分析发现, *HsPKS1* 在野生蛇足石杉根、茎和叶中基因的相对表达量与 HupA 含量呈正相关, 因此推测 *HsPKS1* 等 PKS 与 HupA 合成相关, 但尚未深入

研究它的功能、作用及表达模式, 一定程度上影响了其进一步的研究和利用。为此, 本研究利用野生蛇足石杉和课题组此前创制的蛇足石杉叶状体为试材<sup>[14]</sup>, 进一步发掘、鉴定影响蛇足石杉体内 HupA 生物合成的 PKS 基因 (*HsPKS1*), 分析其在不同组织中的表达模式、生物学功能及亚细胞定位, 构建过表达载体并瞬时转化至本氏烟草中, 并通过广靶代谢组分析 *HsPKS1* 的基因功能和调控机制, 为研究和揭示 HupA 合成代谢通路的分子机制提供科学依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

本研究中的野生蛇足石杉植株取自福建省南平市, 经植物学涂艺声教授鉴定为蛇足石杉 *H. serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis.。课题组将新鲜带孢子的茎用于离体微繁殖, 并成功获得离体叶状体; 同批次取样剩余的野生蛇足石杉的根、茎、叶用液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱备用。蛇足石杉叶状体的培养条件为 (25 ± 1) °C, 光照周期为 2 000 lx, 以 13 h/11 h 昼夜周期生长, 继代培养 70 d 后, 取生长状态良好的蛇足石杉叶状体, 液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱备用。用于瞬时转化的本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* L. 种子播种在土壤中, 置于光照周期为 2 000 lx、温度为 28 °C、湿度为 60% 的培养箱中, 以 13 h/11 h 昼夜周期生长, 培养 4~5 周的烟草用于瞬时侵染。

### 1.2 仪器及试剂

ABI 7500 Real-time PCR system 购于 ThermoFisher 公司; 植物活体转化仪器购于上海万柏生物科技有限公司; 荧光探照灯 LUYOR-3280 购于上海路阳仪器有限公司; 质粒由河北省农林科学院经济作物研究所吴志明研究员课题组提供的 pCY-H05252 质粒进行改造; Mon Amp™ Chemo HS qPCR Mix 购于 Monad 生物公司; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA、限制性内切酶 *KpnI*、*SmaI* 和 *XbaI* 购于 Takara 公司; EcoRV 内切酶购于 NEB 公司; Trans Taq®-T DNA Polymerase、pEASY®-T1 Simple Cloning Kit、Trans Start® Fast Pfu Fly DNA Polymerase、pEASY®-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit、Easy Pure® Quick Gel Extraction Kit、

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  化学感受态细胞、根癌农杆菌 EHA105 购于全式金生物技术有限公司。引物合成及测序服务均由华大基因公司提供。

## 2 方法

### 2.1 HupA 的提取

参照本课题组此前的方法提取蛇足石杉中的 HupA<sup>[14]</sup>，最后干燥的样品用甲醇（色谱纯）提取 3 次得到提取液，用 0.22  $\mu$ m 滤膜将得到的提取液滤过到样品瓶中并进行 HPLC 分析。HupA 对照品质量分数  $\geq 98.0\%$ ，购自阿拉丁实业公司（中国上海）。称取 HupA 对照品，以 1.0 mg/mL 溶解在甲醇中配制成 HupA 标准母液。用甲醇稀释母液溶液，得到一系列浓度梯度的标准溶液，用于定量分析。采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理和显著性分析。

### 2.2 蛇足石杉总 RNA 提取、cDNA 合成和 HsPKS1 基因荧光验证及克隆

采用 Trizol 法提取获得质量与浓度合格的野生材料与组培材料 RNA 后，参照 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA 试剂盒说明书将野生根、茎、叶、组培的 RNA 反转录为 cDNA。本研究通过实验室前期测的蛇足石杉 3 代转录组数据筛选出

HsPKS1 基因序列。使用 Primer 5.0 软件对该基因序列进行基因克隆及荧光定量引物设计(表 1)。以 18S rRNA 作为内参基因，使用 ABI 7500 Real-time PCR system 仪器进行 qRT-PCR，反应体系参照 MonAmp™ Chemo HS qPCR Mix 的方法：预变性 95  $^{\circ}$ C、10 min，变性 95  $^{\circ}$ C、10 s，退火 60  $^{\circ}$ C、10 s，延伸 72  $^{\circ}$ C、30 s，40 个循环，3 个生物学重复，采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法统计 HsPKS1 基因相对表达量<sup>[15]</sup>。以野生蛇足石杉 cDNA 为模板，PCR 程序参照 Trans Start® Fast Pfu Fly DNA Polymerase 方法：预变性 95  $^{\circ}$ C、2 min，变性 95  $^{\circ}$ C、20 s，退火 60  $^{\circ}$ C、20 s，延伸 72  $^{\circ}$ C、30 s，35 个循环，最后 72  $^{\circ}$ C、5 min。用高保真酶（Trans Start® Fast Pfu Fly DNA Polymerase）扩增出 HsPKS1 基因片段，进行胶回收后连接到 T1-Simple 载体上、转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞。将大肠杆菌均匀涂布在含有 100 mg/L Kana 的 LB 固体培养基并在培养基中加入 IPTG 和 X-gal 进行蓝白斑筛选，37  $^{\circ}$ C 过夜培养。次日挑取白色单菌落并用表 1 中的克隆引物对菌液进行验证，然后进行测序验证，验证正确后将克隆成功的质粒命名为 HsPKS1-T1。

表 1 所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

功能引物	引物名称	引物序列 (5'-3')
荧光定量引物	PKS-F	GTTGGCTCTGCTCTCTTCGG
	PKS-R	ATCAATCCTGGCACGTCCTT
内参基因引物	18S-F	TTTCCATCCGACCCGTCTTG
	18S-R	GAGCCTCCACCAGAGTTTCC
克隆引物	HsPKS1- <i>KpnI</i> -F	GTACCATGACAATCAAGGGATCAGGG
	HsPKS1- <i>XbaI</i> -R	TCTAGATCAAATGTTGATACTTCTCAGCAA
同源重组引物	PKScz1-F	<u>AGAAGTAGGAGCTCGGTACC</u> ATGACAATCAAGGGATCAGGG
	PKScz1-R	<u>GAACGATCGTCGACTCTAGAT</u> CAAATGTTGATACTTCTCAGCAA
重组引物 2	PKScz2-F	<u>TAGAAGTAGGAGCTCGGTAC</u> ATG
	PKScz2-R	<u>CTCGAGCTTTCG</u> CAGATCCCCAT

划线部分为重组同源臂。

The underlined part is the recombinant homologous arm.

### 2.3 HsPKS1 生物信息学分析

利用在线 ProtParam 工具和 ExPASy 网站上的在线工具 Prot Scale 进行蛋白理化性质分析；使用 Signal P 5.0 在线软件和 Deep TMHMM 在线软件分析预测 HsPKS1 蛋白的信号肽区域及跨膜结构；运用 Cell-Ploc 2.0 在线软件对 HsPKS1 蛋白的亚细胞定位进行分析预测；运用 GORIV 在线软件和 SWISS MODEL 工具预测 HsPKS1 蛋白的二级和三级结构；运用 Blast 工具筛选出同源性较高的序列，运用 MEME 在线工具比对筛选出的同源氨基酸序列保守

区域，并利用 MEGA 11 软件和极大似然法构建 HsPKS1 蛋白的进化树。

### 2.4 载体构建及转化烟草

根据 HsPKS1 的 CDS 序列设计重组引物 PKScz1-F、PKScz1-R (表 1)，并利用 Taq 酶进行 PCR 扩增获得重组片段。然后用 *KpnI* 和 *XbaI* 限制性内切酶对 pCY-H05252 质粒进行酶切以获得线性化 pCY-H05252 片段，将重组基因片段与线性化 pCY-H05252 片段利用无缝克隆试剂盒进行重组连接，获得过表达质粒 pCY-HsPKS1 并转入农杆菌

EHA105 中。挑取农杆菌单菌落接种于含 50 mg/L 卡那霉素 (Kana) 和 25 mg/L 利福平 (Rif) 的 LB 液体培养基中, 将其置于 28 °C 下振荡培养。在 600 nm 的波长下, 测菌液的吸光度为 0.6 时, 离心收菌。加入瞬时转化液 (10 mmol/L MES-KOH, pH 5.5、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、100 μmol/L 的乙酰丁香酮混合液) 重悬 1 h 后用于侵染烟草。将烟草分为实验组和空白组, 每组重复 3 次。使用植物活体转化仪 PTS-Mini (上海万柏) 进行瞬时转化, 该仪器是通过空气压力使受试植物或组织能够快速形成小孔, 让农杆菌通过小孔渗入组织, 进而达到侵染转化植物的目的。植株浸没于农杆菌侵染液中, 将仪器参数设置为 8 kPa、30 s 进行烟草转化实验, 转化结束后黑暗培养 1 d, 正常光照培养 3 d, 用购置于上海路阳生物技术有限公司 LUYOR-3280LB 荧光探照灯, 采用 488 nm 波长的紫外灯进行照射并检测转化效果。

## 2.5 *HsPKS1* 亚细胞定位

为了验证 *HsPKS1* 编码蛋白的亚细胞定位情况, 采用无缝克隆方法对 pCY-H05252 质粒改造。利用重组引物 2 (表 1) 对 *HsPKS1*-T1 质粒进行 PCR 扩增, 随后进行凝胶电泳并进行胶回收, 将基因重组片段标记为: DNAG1。利用 *KpnI* 和 *SmaI* 限制性内切酶对 pCY-H05252 质粒进行酶切后, 将载体酶切产物用 PCR 纯化试剂盒纯化 (纯化产物标记为 custom Vector), 随后进行同源重组反应, 反应体系为: 10 μL Biorun 2×Easy Clone Mix, 5 μL DNAG1, 5 μL custom Vector。PCR 反应体系: 37 °C、30 h。随后将得到的产物转化至大肠杆菌 DH5α, 然后将其涂布于含 100 mg/L Kana LB 固体培养基并在 37 °C 培养。随后挑取单菌落用重组引物 2 进行菌液验证, 选取阳性菌株进行 *EcoRV* 内切酶酶切重组质粒质控和测序验证, 验证结果正确, 表明成功获得由启动子驱动 *HsPKS1* 与 *eGFP* 融合共表达载体并命名为 pCY-*HsPKS1*-*eGFP*。参考烟草叶片注射瞬时转化体系<sup>[6]</sup>, 将融合表达载体和空载体一同在转化至根癌农杆菌 EHA105, 将携带质粒的农杆菌分别注射至生长状态相似的烟草中, 每组重复 3 次。将注射完成的烟草植株弱光培养 2 d 后, 取注射后的烟草叶片在 Nikon 公司的 C2-ER 激光共聚焦显微镜观察 GFP 荧光信号。

## 2.6 转 *HsPKS1* 基因烟草代谢组学分析

取“2.4”项转化成功的瞬转基因烟草和空白对

照烟草, 分别剪取鲜质量为 13.5 g 烟草叶片, 均匀分为 3 组, 每组 4.5 g, 将 6 组烟草叶片经液氮速冻后于 -80 °C 保存。将 2 种材料真空冷冻干燥, 粉碎成粉末, 称定质量 50 mg, 溶解于 1.2 mL 70% 甲醇提取物中。每 30 min 涡旋 1 次, 每次持续 30 s, 共 6 个涡流。离心 (12 000 r/min, 3 min), 取上清液, 用 0.22 μm 滤膜滤过上清液, 保存于进样瓶中, 用于后续基于超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 的广泛靶向代谢组分析 (湖北武汉迈维有限公司)。

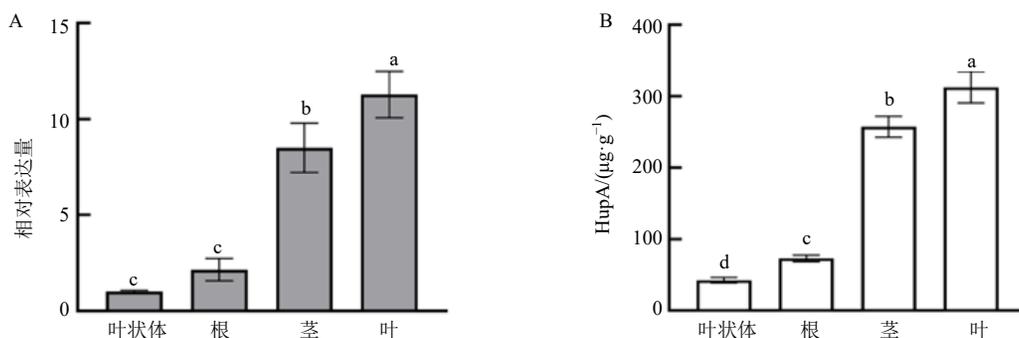
## 3 结果与分析

### 3.1 不同组织间 HupA 含量差异及 *HsPKS1* 基因的表达特性

本实验室前期通过野生蛇足石杉和组培叶状体的转录组分析, 共筛选出 14 个与 HupA 合成相关基因, 其中 *PKS* 家族的基因有 3 个<sup>[7]</sup>。利用 qRT-PCR 对野生蛇足石杉不同组织 (根、茎、叶) 和组培材料中的这几个 *PKS* 基因进一步分析发现, 不同组织间的 *HsPKS1* 基因相对表达量差异显著, 野生蛇足石杉根、茎和叶中的 *HsPKS1* 基因表达量分别是蛇足石杉离体叶状体的 2.10、8.44 和 11.23 倍 (图 1-A)。利用 HPLC 高效液相色谱对不同组织的 HupA 含量测定发现, 离体叶状体与野生蛇足石杉根、茎和叶中的 HupA 含量具有显著性差异, 分别为 42.56、73.17、257.48 和 312.63 μg/g (图 1-B)。其中 HupA 含量最高的是叶, 其次是茎。比较 qRT-PCR 荧光定量和 HupA 含量分析结果发现, 不同组织间的 *HsPKS1* 基因表达量与其 HupA 的含量呈正相关, 结果表明 *HsPKS1* 基因可能在 HupA 的合成过程中起重要的作用。

### 3.2 *HsPKS1* 基因的克隆与鉴定

以野生蛇足石杉 cDNA 为模板, 根据 *HsPKS1* 特异性引物进行 PCR 扩增后进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 得到如图 2-A 所示条带均一, 大小为 1 200 bp 左右的 *HsPKS1* 基因片段, 将切胶回收后的基因片段与 T 载体连接, 将连接产物转入大肠杆菌。挑取 10 个白色大肠杆菌单菌落进行 PCR 检测, 检测结果如图 2-B 所示, 2、5、7~9 号样品的条带与阳性对照质粒的条带大小一致, 且空白无条带 (图 2-B)。经测序比对分析发现, 蛇足石杉中的获得的 5 条序列与 NCBI 查找的 DQ979827.1 (*H. serrata*, *HsPKS1*) 序列相比, 蛇足石杉中 *PKS1* 的 572 位碱基均由 T 变成 C, 发生了无义突变, 同源率为 99.72%。

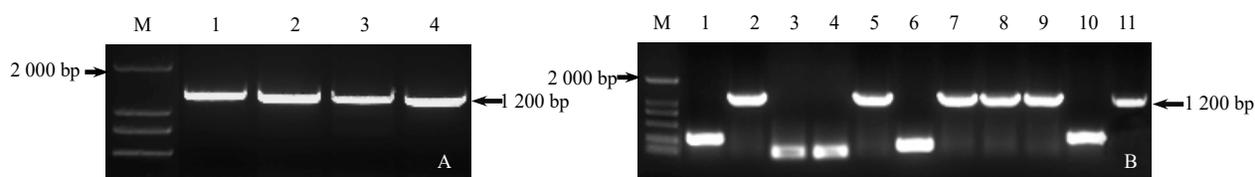


不同字母表示具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

图1 蛇足石杉不同组织间 *HsPKS1* 基因表达 (A) 与 HupA 含量 (B) 分析

Fig. 1 Analysis of *HsPKS1* gene expression (A) and HupA content (B) in different tissues of *H. serrata*



A 图为 *HsPKS1* 基因克隆的 PCR 扩增电泳图, M-Marker, 1~4 为 *HsPKS1* 基因片段; B 图为阳性单克隆 PCR 鉴定, M-Marker, 1~10 为待测菌, 11 为阳性对照。

A is the PCR amplification electrophoresis of the *HsPKS1* gene clone, M is Marker, 1-4 is the fragment of *HsPKS1* gene; B is the PCR identification of positive clone, M is Marker, 1-10 is the bacteria to be tested, 11 is the positive control.

图2 *HsPKS1* 基因克隆及检测

Fig. 2 *HsPKS1* gene cloning and detection

### 3.3 *HsPKS1* 生物信息学分析

蛋白理化性质分析表明, *HsPKS1* 蛋白相对分子质量为 43 366.92, 等电点为 6.38, 不稳定系数为 33.30 (稳定系数小于 40), 脂肪系数为 94.14, 亲水性为 -0.053, 表明 *HsPKS1* 为稳定的亲水性蛋白。通过蛋白质跨膜结构预测与信号肽分析, 发现此蛋白无跨膜结构, 且不含信号肽序列, 亚细胞定位预测结果大概率位于细胞质中, 推测该蛋白是位于细胞质的非分泌

蛋白。*HsPKS1* 蛋白二级结构的预测表明蛋白是无规则卷曲 (49.87%) 以及富含  $\alpha$  螺旋 (34.09%)。本研究选择 3awk.1.A 蛋白模型作为 PKS3 编码蛋白的三级结构模型结构预测。预测结果表明, *HsPKS1* 蛋白具有 4 个甘油 (glycerol, GOL) 配体和 2 个硫酸根离子 (sulfate ion,  $SO_4^{2-}$ ) 配体, 并且在 68、277、315 位氨基酸处有辅酶 A 结合位点, 174 位氨基酸酰基转移酶活性中心 (图 3)。

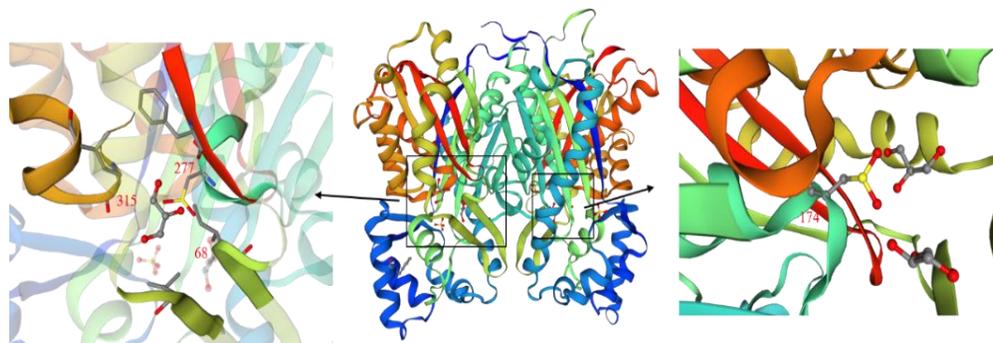


图3 *HsPKS1* 蛋白的三级结构预测及活性位点

Fig. 3 Tertiary structure prediction and active site of *HsPKS1* encoded protein

### 3.4 HsPKS1 系统进化树构建与分析

将 HsPKS1 氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对后从中筛选出同源性较高的 25 个物种的氨基酸序列进行比对分析。比对结果发现 HsPKS1 氨基酸序列与 25 个物种的 III 型 PKS (又名查耳酮合酶) 均有较高的同源性, 其中与蛇足石杉中 3AWJ\_A 基因的氨基酸序列同源性为 100%; 与豇豆 *Vigna unguiculata* 中 XP\_027913565.1 基因编码蛋白同源性为 95%; 与江南卷柏 *Selaginella moellendorffii* 的 XP\_002965309.1 编码蛋白同源性最低为 93%; 与马尾杉中的 *PtPKS1* 基因编码蛋白 QWQ66223.1 的同源性为 65.23%; 与蛇足石杉中的 *HsPKS4* 基因编码蛋白的同源性为 67.20%。将所选的 25 个蛋白的氨基酸序列与 HsPKS1 的氨基酸序列提交至

MEGA11 构建系统进化树 (图 4)。结果显示, 与 *HsPKS1* 亲缘关系最近的 2 个物种是钝鳞紫背苔和江南卷柏, 亲缘关系最近的蛋白是 3AWJ\_A 基因编码的蛋白, 这与 Blast 的比对结果相一致。

采用 MEME suite 工具分析预测不同物种 HsPKS1 蛋白的保守序列区域 (Motif), 并在进化树中标注了这些 Motif 区域在相应序列中的位置 (图 4)。结果表明, 每个分支上的蛋白具有相同或相似的 Motif 结构和排列顺序, 这显示了聚酮合酶蛋白的在不同种之间的相对保守性。其中与 3AWJ\_A、XP\_002965309.1 蛋白的 Motif 结构、位置及排列顺序相同, 并且 3 个蛋白在进化树中处于同一分支。进一步将 HsPKS1 蛋白与 HsPKS4 和 *PtPKS1* 相比, 它们具有相对保守 Motif 结构, 结果表明它们的功能域相似。

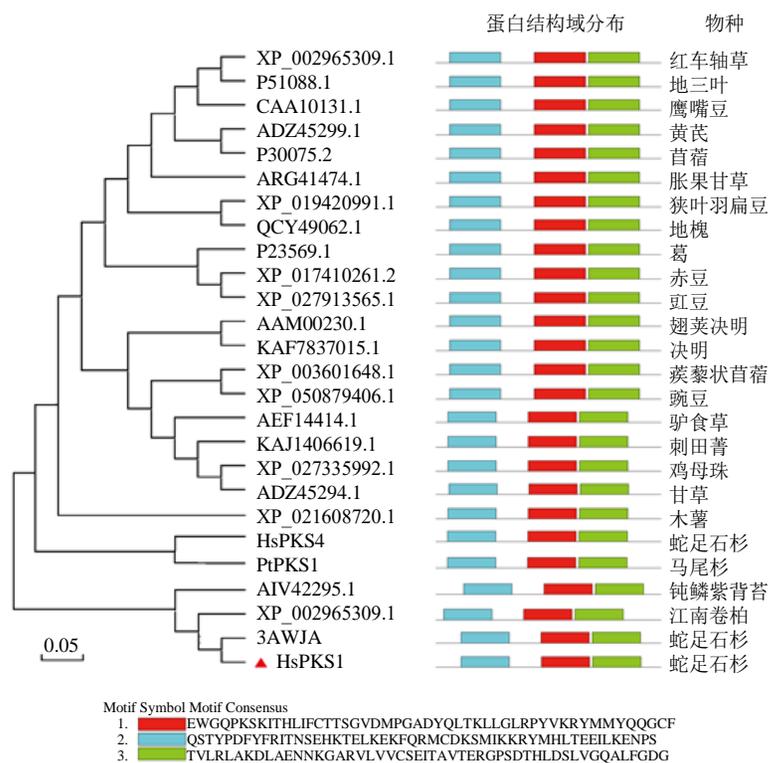


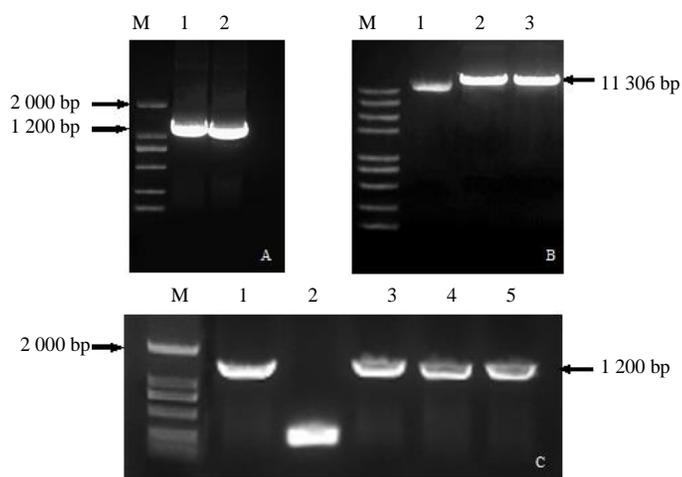
图 4 HsPKS1 与其他物种聚酮合酶进化树分析及蛋白结构域分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis and protein domain analysis of HsPKS1 and polyketide synthases from other species

### 3.5 HsPKS1 过表达载体构建

以克隆构建的 HsPKS1-T1 载体质粒为模板, 以 PKScz-F 和 PKScz-R 为引物 (表 1), 使用高保真酶扩增清晰明亮长度正确的 *HsPKS1* 基因片段 (图 5-A), 切胶回收获得 *HsPKS1* 重组片段。并用 *KpnI* 和 *XbaI* 限制性内切酶对 pCY-H05252 质粒进行酶切, 获得线性载体 (图 5-B)。将回收高质量的

*HsPKS1* 重组片段和线性化 pCY-H05252 载体进行同源重组连接, 并将重组产物转入大肠杆菌, 37 °C 过夜培养。次日挑大肠杆菌单菌落经 PCR 验证, 检测结果如图 5-C 所示, 3~5 号样品的条带与 1 号阳性对照质粒的条带大小一致, 且空白无条带。经测序分析发现, 测序结果与克隆出 *HsPKS1* 的序列一致表明 pCY-HsPKS1 表达载体构建完成。



A 图为 *HsPKS1* 基因片段电泳图, 1、2 为基因片段; B 图为 pCY-H05252 线性载体片段电泳图, 1 为质粒对照, 2、3 为线性载体; C 图为重组片段菌液验证电泳图, 1 为阳性对照, 2~5 为待测菌; M-Marker。

A is the electrophoresis picture of *HsPKS1* gene fragment, M is 2k marker, 1 and 2 are gene fragments; B is the electrophoresis picture of pCY-H05252 linear vector fragment, 1 is plasmid control, 2 and 3 are linear vectors; C is the electrophoresis chart of the recombinant fragment bacterial solution, M is Marker, 1 is the positive control, and 2-5 are the bacteria to be tested.

图 5 pCY-HsPKS1 过表达载体构建过程

Fig. 5 pCY-HsPKS1 overexpression vector construction process

### 3.6 亚细胞定位

为了进一步确认 *HsPKS1* 蛋白在细胞中的位置, 将 *HsPKS1* 基因重组至带有 eGFP 的 pCY-H05252 植物表达载体中, 从而获得重组融合表达载体, 利用 *EcoRV* 内切酶酶切重组质粒, 验证重组质粒实际片段大小是否与理论值一致。结果表明重组质粒实际片段大小与理论值一致 (图 6)。测序结果也正确, 表明成功获得 pCY-HsPKS1-eGFP 融合表达载体。将 pCY-HsPKS1-eGFP 表达载体转至农杆菌并注射于本氏烟草中获得表达, 利用激光共聚焦显微镜观察 GFP 信号在细胞内的分布。如图 7 所示, pCY-eGFP 空载体对照在整个叶片细胞中

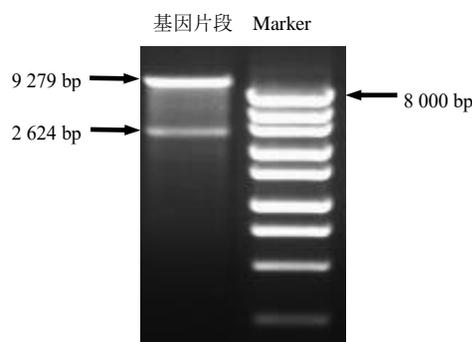


图 6 pCY-HsPKS1-eGFP 重组质粒准确性质控图  
Fig. 6 Accurate quality control map of pCY-HsPKS1-eGFP recombinant plasmid

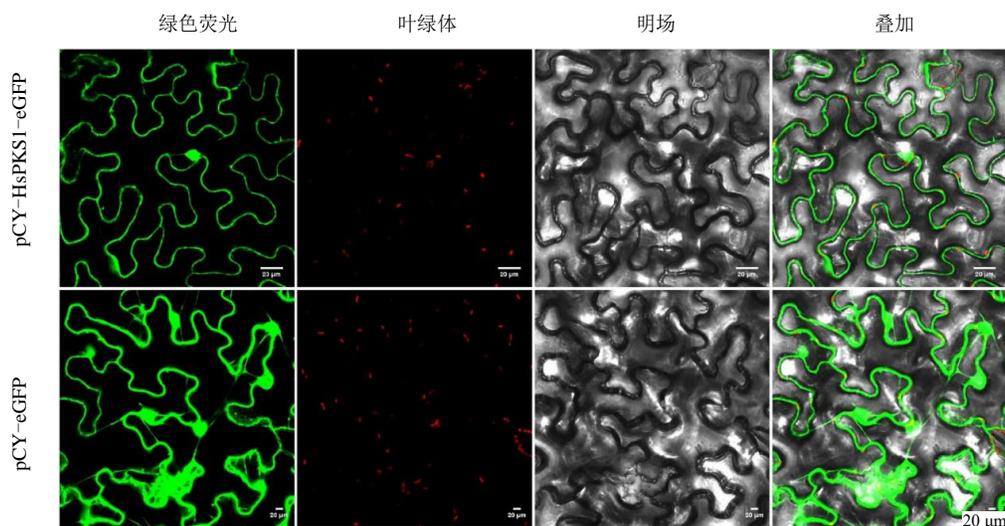


图 7 *HsPKS1* 蛋白在烟草中的亚细胞定位分析

Fig. 7 Subcellular localization of *HsPKS1* protein in *N. benthamiana*

均能检测到荧光信号, 而 pCY-HsPKS1-eGFP 在细胞质和细胞核中观察到绿色荧光, 结果表明 pCY-HsPKS1-eGFP 融合蛋白定位在烟草的细胞质和细胞核中。

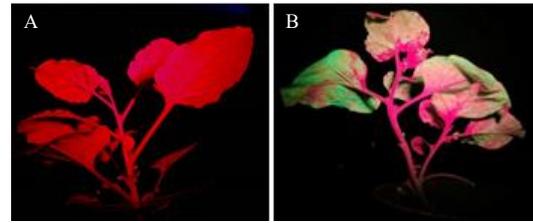
### 3.7 *HsPKS1* 瞬时表达及相关代谢物的变化特征

**3.7.1 *HsPKS1* 瞬时转化烟草** 利用该仪器将携带 pCY-HsPKS1 的 EHA105 农杆菌瞬转液转化至本氏烟草, 黑暗培养 1 d 后正常培养 3 d 后用荧光探照灯

检测转化效果。图 8-A 为空白对照组烟草，烟草叶片背面无绿色荧光。相较于对照组烟草，经 EHA105 农杆菌侵染后的大部分烟草叶片背面具有显著的绿色荧光(图 8-B)，说明 pCY-HsPKS1 瞬时转化成功，所携带的夜香树叶曲病毒 (CmYLCV) 启动子能够分别驱动 *HsPKS1* 与 *eGFP* 在烟草中获得表达。

**3.7.2 广泛靶向代谢组分析** 基于 UPLC-MS/MS 检测方法，从转基因烟草植株 (Nt-pks) 和野生型烟草植株 (Nt-CK) 的甲醇提取物 (每组 3 个重复) 中共检测到 1 802 种代谢物。将检测到的代谢物进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)，结果显示 Nt-pks 和 Nt-CK 样品之间代谢物存在显著差异，也反映了样本间重复性较好。根据以下标准选择差异累积代谢物: VIP ≥ 1.0 且倍数变化 ≥ 2 或 ≤ 0.5。Nt-pks

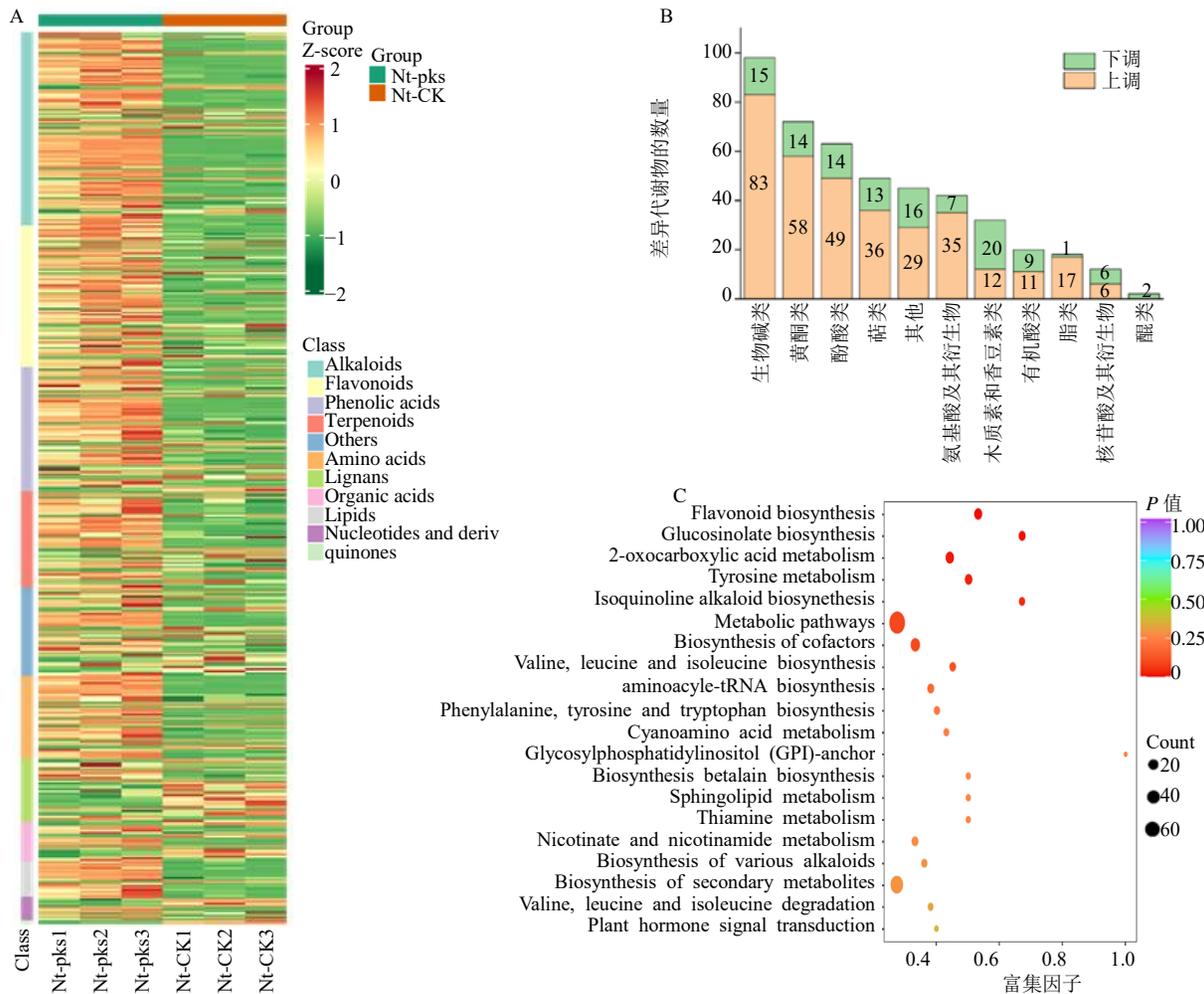
相比于 Nt-CK 筛选到差异代谢物 453 个，其中上调代谢物 336 个，下调代谢物 117 个 (图 9-B)。



A-野生型烟草植株；B-转 *HsPKS1* 在烟草中瞬时转化的植株。  
A is a wild-type tobacco plant; B is the transient genetically transformed tobacco plant for *HsPKS1* gene.

图 8 烟草瞬时转化植株绿色荧光鉴定

Fig. 8 Green fluorescence identification of transgenic *N. benthamiana*



A 图为聚类分析热图；B 图为差异代谢物的分类堆叠图；C 图为 KEGG 富集分析气泡图。

A is the heat map for cluster analysis; B is the taxonomic stacking of differential metabolites; C is the bubble map for KEGG enrichment analysis.

图 9 *HsPKS1* 在本氏烟草中过表达的广靶代谢组分析

Fig. 9 Widely target metabolomic analysis of overexpression of *HsPKS1* in *N. benthamiana*

差异代谢物聚类分析发现生物碱、黄酮类和酚酸类化合物变化较大, Nt-pks 大多数上调, 而 Nt-CK 大部分下调 (图 9-A)。其中生物碱类包括酚胺类、吡啶类生物碱、异喹啉类生物碱等。黄酮类包括查耳酮、二氢黄酮和黄酮醇等。

根据 KEGG 数据库进一步对筛选出的 453 种差异代谢物的代谢通路进行富集分析。结果表明, *HsPKSI* 基因瞬转化至本氏烟草中表达后, 其差异代谢物共参与 68 条代谢通路。基于 KEGG 显著富集分析, 前 20 条代谢途径以气泡图的形式呈现 (图 9-C)。其中显著富集的前 5 个途径分别是类黄酮生物合成、硫代葡萄糖苷生物合成、2-氧代羧酸代谢、酪氨酸代谢和异喹啉生物碱生物合成 ( $P < 0.05$ )。进一步分析发现, 有 17 种类黄酮生物合成和异喹

啉生物碱生物合成相关的代谢物在烟草转化植株中显著上调 ( $P < 0.05$ ) (表 2), 其中 8 种为黄酮类物质, 6 种为生物碱, 酚酸、氨基酸衍生物和醛类化合物各 1 种。8 种黄酮类化合物中有 3 种是查耳酮衍生化合物, 分别是柚皮素查耳酮、异杞柳苷 (根皮苷查耳酮) 和 3,4,2',4',6'-五羟基查耳酮-4'-O-葡萄糖苷。6 种生物碱中有 3 种是异喹啉生物碱, 分别是 (2E)-3-(4-羟基苯基)-n-[2-(4-羟基苯基) 乙基] 丙-2-氨基甲酸、3,4,5-trihydroxy-6-[4-[(2-hydroxybenzoyl) amino] phenoxy] oxane-2-carboxylic acid 和 6,7-di-O-methyl-N-deacetylisoipecosidic acid, 均具有显著差异。以上结果表明 *HsPKSI* 基因可以引起一些黄酮类化合物和生物碱类化合物的显著变化。

表 2 *HsPKSI* 在本氏烟草中过表达后引发的主要差异代谢物

Table 2 Main differential metabolites in *N. benthamiana* produced by *HsPKSI* overexpression

物质	分类	CAS 号	P 值	差异倍数的对数	类型
柚皮素-7-O-新橙皮糖苷 (柚皮苷)	黄酮	10236-47-2	0.099 1	12.00	上调
3,4,2',4',6'-五羟基查耳酮-4'-O-葡萄糖苷	黄酮	-	0.029 1	2.08	上调
异杞柳苷 (根皮苷查耳酮)	黄酮	4547-85-7	$1.23 \times 10^{-3}$	2.55	上调
柚皮素查耳酮	黄酮	73692-50-9	$2.37 \times 10^{-3}$	1.59	上调
香橙素 (二氢山奈酚)	黄酮	480-20-6	$3.51 \times 10^{-3}$	4.09	上调
高圣草酚	黄酮	446-71-9	$4.05 \times 10^{-3}$	12.60	上调
柚皮素-7-O-葡萄糖苷 (樱桃苷)	黄酮	529-55-5	$3.94 \times 10^{-3}$	2.72	上调
橙皮素	黄酮	520-33-2	0.020 4	12.50	上调
反式-5-O-对香豆酰莽草酸	酚酸类	-	0.035 5	1.78	上调
L-酪胺	生物碱	51-67-2	$1.70 \times 10^{-6}$	2.43	上调
多巴胺	生物碱	51-61-6	$1.46 \times 10^{-3}$	3.57	上调
原儿茶醛	其他类	139-85-5	$4.76 \times 10^{-4}$	4.15	上调
L-酪氨酸	氨基酸及其衍生物	60-18-4	$6.61 \times 10^{-4}$	1.16	上调
新烟草碱	生物碱	581-49-7	$3.48 \times 10^{-3}$	-1.01	下调
(2E)-3-(4-羟基苯基)-n-[2-(4-羟基苯基)乙基] 丙-2-氨基甲酸	异喹啉生物碱	-	0.021 8	2.71	上调
3,4,5-trihydroxy-6-[4-[(2-hydroxybenzoyl) amino] phenoxy] oxane-2-carboxylic acid	异喹啉生物碱	-	0.026 8	-1.06	下调
6,7-di-O-methyl-N-deacetylisoipecosidic acid	异喹啉生物碱	-	0.027 1	-1.72	下调

#### 4 讨论

PKS 主要存在于植物中, 通过改变其底物特异性、缩合反应的步骤数量以及利用不同的环化反应来合成多种功能各异的产物, 因此 PKS 在次级代谢物的生物合成过程中发挥着关键作用<sup>[18]</sup>。目前已经从多种植物中成功克隆出 PKS 基因的 CDS 序列, 并对其催化和调控机制做了大量研究, 分析发现

PKS 可以催化生成类黄酮化合物生物合成的前体以及合成莨菪碱和形成可卡因托品烷生物碱骨<sup>[19]</sup>。本实验室前期通过野生蛇足石杉和组培的差异转录组分析, 共筛选出 14 个与 HupA 合成相关基因, 其中有 3 个 *HsPKS* 基因<sup>[17]</sup>, 并且 *HsPKSI* 在不同组织和样本中的基因表达量与 HupA 含量呈正相关。因此进一步研究 *HsPKSI* 基因在 HupA 生物合成代谢途

径中的功能具有重要意义,可为挖掘蛇足石杉中 HupA 生物合成相关的酶基因提供有用信息。

本研究对 *HsPKS1* 基因进行克隆鉴定,并通过生物信息学分析发现 HsPKS1 蛋白具有 PKS 家族的保守结构域的多个辅酶 A 结合位点和氨基酸酰基转移酶活性,证实 *HsPKS1* 属于 PKS 家族。HsPKS1 蛋白的结构和功能与 HupA 前体物质石榴碱的合成所需辅酶 A 的转移和酰基化的功能高度吻合<sup>[20]</sup>。系统发育树分析发现 HsPKS1 与其他物种的 PKS 具有较高的同源性,其中与江南卷柏亲缘关系最近,符合植物分类学特征。将 HsPKS1 与前人已经证实具有催化 HupA 前体物质合成的 HsPKS4 和 PtPKS1 进行比对发现, HsPKS1 与它们的同源性为 60%~70%,但具有位置相似的 Motif 结构,表明它们具有相似的功能域,因此认为 *HsPKS1* 可能与 HupA 合成相关<sup>[12-13]</sup>。然而,不同植物中的 PKS 蛋白在细胞中的定位不同。例如,拟南芥 PKS 蛋白定位于细胞核、内质网和液泡膜<sup>[21]</sup>。葡萄发育过程中的 PKS 蛋白定位于内质网和表皮细胞的细胞质中<sup>[22]</sup>。本研究的生物信息学预测分析 HsPKS1 蛋白位于细胞质中,但亚细胞定位分析结果表明该基因在细胞核和细胞质中均有表达。因此推测 *HsPKS1* 基因可能在细胞核和细胞质内均参与了聚酮类化合物和石榴碱的催化或调控,为进一步深入研究蛇足石杉中 *HsPKS1* 的功能提供科学依据。

经生物信息学分析 *HsPKS1* 属于典型的 PKS 家族,也称查耳酮合酶,此家族的酶作用较为广泛,催化产生了多种重要的药用植物次生代谢产物的核心结构,包括黄酮类、吡喃酮类、间苯三酚类和喹诺酮类等活性化合物<sup>[10]</sup>。已有研究通过大肠杆菌异源表明 *HsPKS1* 可催化对羟基肉桂酰辅酶 A 生成查耳酮,该化合物是黄酮类化合物生物合成的重要前体<sup>[23]</sup>。本研究进一步将 *HsPKS1* 基因转化至烟草进行瞬时表达并进行广泛靶向代谢分析,结果表明,野生型与转基因植株的差异代谢物主要包括生物碱、黄酮类和酚酸类等化合物,这些化合物是参与黄酮类和异喹啉生物碱等生物合成代谢的重要前体物质。合成类黄酮的相关物质有 3 种查耳酮类化合物,分别是柚皮素查耳酮, 3, 4, 2', 4', 6'-五羟基查耳酮-4'-O-葡萄糖苷和根皮苷查耳酮(表 2)。前人的研究表明, PKS 能催化 4-香豆酰-CoA 的 C6-C3 单元与来自丙二酰-CoA 的 3 个 C2 单元进行连续缩合反应,然后产物的四酮中间体的 Claisen 型环化形成

柚皮素查耳酮<sup>[24]</sup>。本研究结果与前人结果一致。表明 *HsPKS1* 基因参与类黄酮前体物质的合成。

此外,植物 PKS 在生物碱的合成中也发挥重要作用。有学者对 *HsPKS1* 进行大肠杆菌异源表达活性分析,发现该基因可以催化 2-N-甲基-苯甲酰辅酶 A 和丙二酰 CoA 生成 1,3-二羟基-N-甲基吡啶酮<sup>[23]</sup>;前人研究表明植物中 PKS 可以催化 2-N-甲基-苯甲酰辅酶 A 与丙二酰 CoA 生成喹诺酮生物碱<sup>[25]</sup>;芸香科 PKS 催化 N-甲基邻氨基苯甲酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 缩合形成吡啶酮生物碱<sup>[26]</sup>。本研究通过 KEGG 显著富集到了异喹啉生物碱,表明 *HsPKS1* 基因可能影响了合成异喹啉生物碱前体物质的变化。同时在代谢组中分析发现有 3 种异喹啉生物碱,分别是(2E)-3-(4-羟基苯基)-n-[2-(4-羟基苯基)乙基]丙-2-氨基甲酸、3,4,5-trihydroxy-6-{4-[(2-hydroxybenzoyl) amino] phenoxy} oxane-2-carboxylic acid 和 6,7-di-O-methyl-N-deacetyl-isoipecosidic acid,均具有显著差异。以上结果表明 *HsPKS1* 可能在 HupA 及异喹啉类生物碱的生物合成具有重要作用。这为分析验证蛇足石杉中 *HsPKS1* 的基因功能及调控机制奠定了基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Kumar K, Kumar A, Keegan R M, *et al.* Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 297-307.
- [2] Benfante R, Di Lascio S, Cardani S, *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors targeting the cholinergic anti-inflammatory pathway: A new therapeutic perspective in aging-related disorders [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2021, 33(4): 823-834.
- [3] 李籽杉, 安周捷, 王婧, 等. 蛇足石杉主要活性成分及其生物合成研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(11): 3505-3517.
- [4] Cui L L, Noushahi H A, Zhang Y P, *et al.* Endophytic fungal community of *Huperzia serrata*: Diversity and relevance to the production of huperzine A by the plant host [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 892.
- [5] Zaki A G, El-Shatoury E H, Ahmed A S, *et al.* Response surface methodology-mediated improvement of the irradiated endophytic fungal strain, *Alternaria brassicae* AGF041 for Huperzine A-hyperproduction [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2021, 72(4): 427-437.
- [6] Sang X, Yang M H, Su J Q. Research on endophytic fungi

- for producing huperzine A on a large-scale [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2020, 46(6): 654-664.
- [7] Ferreira A, Rodrigues M, Fortuna A, *et al.* Huperzine A from *Huperzia serrata*: A review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology [J]. *Phytochem Rev*, 2016, 15(1): 51-85.
- [8] Le T T M, Pham H T, Trinh H T T, *et al.* Isolation and characterization of novel huperzine-producing endophytic fungi from *Lycopodiaceae* species [J]. *J Fungi*, 2023, 9(12): 1134.
- [9] Haley H M S, Payer S E, Papidochka S M, *et al.* Bioinspired diversification approach toward the total synthesis of lycodine-type alkaloids [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(12): 4732-4740.
- [10] Abe I. Biosynthesis of medicinally important plant metabolites by unusual type III polyketide synthases [J]. *J Nat Med*, 2020, 74(4): 639-646.
- [11] 逯锐琳, 张浩, 丁旭坡, 等. 白木香聚酮合酶基因 AsPKS02 的克隆及表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2021, 19(23): 7811-7817.
- [12] 胡莉琴. 千层塔内生真菌聚酮合酶 PKS 与赖氨酸脱羧酶 LDC 基因的功能研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.
- [13] Nett R S, Dho Y, Tsai C, *et al.* Plant carbonic anhydrase-like enzymes in neuroactive alkaloid biosynthesis [J]. *Nature*, 2023, 624(7990): 182-191.
- [14] Yang Y, Dai L F, Wu D C, *et al.* *In vitro* propagation, huperzine A content and antioxidant activity of three genotypic *Huperzia serrata* [J]. *Plants*, 2021, 10(6): 1112.
- [15] Chen Z W, Halford N G, Liu C H. Real-time quantitative PCR: Primer design, reference gene selection, calculations and statistics [J]. *Metabolites*, 2023, 13(7): 806.
- [16] 张悦婧, 李颖, 王娟娟, 等. 不同转化条件对 3 种农杆菌 *GFP* 基因在本氏烟草中瞬时表达的影响 [J]. *植物研究*, 2022, 42(1): 121-129.
- [17] 吴德财. 蛇足石杉中石杉碱甲合成相关基因 *HsPKS* 的筛选、克隆与表达分析 [D]. 南昌: 江西师范大学, 2023.
- [18] Kaur A, Ghai D, Yadav V G, *et al.* Polyketide synthases (PKSs) of secondary metabolism: *in silico* identification and characterization in orchids [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 41(12): 5486-5498.
- [19] Tian T, Wang Y J, Huang J P, *et al.* Catalytic innovation underlies independent recruitment of polyketide synthases in cocaine and hyoscyamine biosynthesis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4994.
- [20] 庞子萱, 吴季恒, 严豪, 等. 聚酮类化合物研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(6): 316-326.
- [21] Wang J, Wang X L, Zhao S F, *et al.* *Brachypodium* BdCHS is a homolog of *Arabidopsis* AtCHS involved in the synthesis of flavonoids and lateral root development [J]. *Protoplasma*, 2023, 260(3): 999-1003.
- [22] Feng Y Q, Tian X C, Liang W, *et al.* Genome-wide identification of grape *ANS* gene family and expression analysis at different fruit coloration stages [J]. *BMC Plant Biol*, 2023, 23(1): 632.
- [23] 王娟. 蛇足石杉聚酮合酶的克隆鉴定及其在组合合成中的应用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [24] Prasad A, Kumar R, Kumari S. Recent advances in synthetic aspects of naringenin flavonoid and its bioprotective effect (a review) [J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2023, 49(6): 1177-1197.
- [25] Bisht R, Bhattacharyya A, Shrivastava A, *et al.* An overview of the medicinally important plant type III PKS derived polyketides [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 746908.
- [26] Choi G S, Choo H J, Kim B G, *et al.* Synthesis of acridone derivatives via heterologous expression of a plant type III polyketide synthase in *Escherichia coli* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19: 26.

[责任编辑 时圣明]