



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

邢朝斌*, 龙月红, 何闪, 梁能松, 李宝财
(河北联合大学 生命科学学院, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的:克隆刺五加的法尼基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)基因,并对其进行生物信息学和表达分析。方法:采用 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆刺五加 FPS 基因的全长 cDNA 序列。运用生物信息学方法对该基因进行分析,预测其编码蛋白的结构与功能。并通过 RT-PCR 法检测 FPS 在不同器官中的表达情况。结果:刺五加 FPS 基因的 cDNA 全长为 1 499 bp, 开放阅读框长 1 029 bp, 编码 342 个氨基酸的蛋白, 包含 2 个富含天冬氨酸(DDXXD)的保守功能域。FPS 蛋白无跨膜区域, 定位于细胞质中。RT-PCR 的结果显示, 刺五加 FPS 基因在各器官中均有表达, 但表达量具有显著差异($P < 0.05$)。结论:首次分离并报道了刺五加 FPS 的 cDNA 克隆, 并证实其在不同器官中的表达量不同, 为进一步研究 FPS 对刺五加皂苷合成的影响和表达调控奠定了基础。

[关键词] 刺五加;法尼基焦磷酸合酶;克隆;表达分析

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* Harms 系五加科五加属植物, 根、茎、叶均可入药, 是我国传统的珍贵药用植物^[1], 具有明显的镇静、耐缺氧抗疲劳、抗肿瘤、抗辐射、提高机体免疫力、抗炎、抗过敏等多种生理活性及药理作用^[2-3]。从刺五加中分离出的以齐墩果酸为配基或在齐墩果烷型配基上连有单糖链或双糖链的三萜皂苷是其活性成分之一^[2]。

植物体内的三萜类化合物均需通过依赖甲羟戊酸的类异戊二烯途径合成^[4-5]。该途径中法尼基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)催化 2 个异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate)分子和 1 个二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate)分子生成法尼基二磷酸(farnesyl diphosphate, FPP), 为三萜皂苷生物合成的重要限速酶之一^[4-7]。目前已经从 10 余种植物中先后克隆出编码 FPS 的 cDNA 序列^[8], 但尚未见关于刺五加药用成分生物合成关键酶基因克隆的相关报道。本实验室在已经克隆出刺五加鲨烯合酶(squalene synthase, SS)、鲨

烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)、 β -香树酯醇合成酶(β -amyrin synthase, BAS) 3 个刺五加皂苷合成关键酶基因和可作为内参照基因的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因的基础上, 利用同源克隆法结合 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术首次克隆到刺五加 FPS 基因的 cDNA 序列, 并对其在不同器官中的表达进行了半定量 RT-PCR 分析, 为研究该基因在刺五加皂苷合成中的作用机制和表达调控奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 供试刺五加采自河北省兴隆县雾灵山国家级自然保护区, 经河北联合大学生命科学学院邢朝斌副教授鉴定为五加科植物刺五加 *E. senticosus*。以清水冲洗杂质, 滤纸吸干水分后的根、幼茎、叶片和叶柄为刺五加总 RNA 提取材料。

RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit, Dream Taq DNA 聚合酶(Fermentas 公司); 3'-Full RACE core set Ver. 2.0, PrimeScript 逆转录酶, TdT, RNase H, LA Taq DNA 聚合酶(Takara 公司); IPTG, X-gal, 质粒小提试剂盒(北京拜尔迪生物技术有限公司); 植物 RNA 提取试剂盒, dCTP, dNTP, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, PGM-T 克隆试剂盒, TOP-10 感受态细胞(天根生化科技(北京)有限公司); Taq DNA 聚合酶, PCR 产物纯化试剂盒(Biomiga 公司); 其他试剂均为国产分析纯。引物委托生工生物工程

[稿件编号] 20111204004

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701086); 河北省自然科学基金项目(C2009001252); 河北省自然科学基金-石药集团医药联合基金项目(H2012401006)

[通信作者] *邢朝斌, 副教授, 研究方向为分子药理学、药用植物细胞工程, Tel: (0315) 3726238, Fax: (0315) 3726341, E-mail: xing-zhaobin@yahoo.com.cn



(上海)有限公司合成, PAGE 纯化。

1.2 刺五加总 RNA 的提取 称取 0.1 g 刺五加根、幼茎、叶片和叶柄,按照植物 RNA 提取试剂盒的说明书提取刺五加总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,紫外分光光度计测定纯度和浓度。

1.3 刺五加 FPS 基因保守区的获得 利用 DNAMAN 6.0 软件分析人参 (DQ087959)、三七 (DQ059550)、西洋参 (GQ401664) 和积雪草 (AY787627) 的 FPS 基因的核苷酸序列,在保守区域设计一对寡核苷酸简并引物。上游引物 FPSS1: 5'-CAGAATGAGCGATCTGAAG-3', 下游引物 FPSX1: 5'-TGATCAACTT (C/G) TCATAGCTCT-3'。取总 RNA 3 μL ,以 Oligo (dT)₁₈ 为引物,根据 RevertAidTM First strand cDNA synthesis Kit 的说明进行逆转录反应。以逆转录获得的 cDNA 为模板 PCR 扩增刺五加 FPS 基因的保守片段。反应体系 50 μL ,其中引物 FPSS1 和 FPSX1 各 1 μL , 10 \times LA Taq Buffer (含 15 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂) 5 μL , 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 4 μL , 模板 cDNA 2 μL , LA Taq 酶 0.5 μL , 补 ddH₂O 至 50 μL 。反应条件为:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 退火 50 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 70 s。35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收纯化,克隆至 PGM-T vector 载体,转化大肠杆菌 TOP10 后提取重组质粒并测序,测序工作由 Takara 公司完成。

1.4 5'RACE 技术获取刺五加 FPS 基因 cDNA 5'末端序列 参照罗聪^[9] 的方法进行 5'RACE 扩增。根据 1.3 中所获得的刺五加 FPS 基因保守片段的 cDNA 序列,应用 Primer premier 5.0 设计 5'RACE 特异性引物 FPS52: 5'-CACTGCTTGTACCGCTTG-GCTC-3' 和 FPS51: 5'-CAGGGTTGACCTCTGCGTG-TAT-3'。锚定引物 AP 长: 5'-AAGCAGTGGTAT-CAACGCAGACTACCGGGGGGGGG-3', 通用上游接头引物 AP 短: 5'-AAGCAGTGGTATCAACG-CAGAGT-3'。取总 RNA 3 μL ,采用 PrimeScript 逆转录酶,以 AUP1: 5'-GGCCACGCGTCTGACTAG-TACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' 为引物,根据 Prime-Script 逆转录酶的说明进行逆转录反应,合成 cDNA 第 1 链。逆转录反应体系 25 μL 。逆转录完成后,按照说明书要求用 RNase H 处理 1 h。然后用 PCR 产物纯化试剂盒将 RNase H 产物纯化。纯化后的

产物根据 TdT 说明书的要求,以 50 μL 体系进行 TdT 末端加尾,加尾 2 h。加尾完成后用 PCR 纯化试剂盒纯化加尾产物,获得加尾的 cDNA。应用巢式 PCR 和降落 PCR 技术进行 RACE 扩增。第 1 轮 PCR 的引物为 AP 长和 FPS52。反应体系为:加尾产物 1 μL , dNTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.5 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , Dream Taq 酶 0.62 μL , Buffer 2.5 μL , 补 ddH₂O 至 25 μL 。反应条件为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火 62 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s, 共 2 个循环; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s, 共 2 个循环; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火 58 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s, 共 2 个循环; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火 56 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s, 共 2 个循环; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 退火 54 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s, 共 27 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 补充延伸 10 min。将第 1 轮产物稀释 100 倍后,取 1 μL 作为第 2 轮 PCR 的模板,以 AP 短和 FPS51 为引物,PCR 扩增 FPS 基因 5'末端 cDNA 序列,反应体系和反应条件同第 1 轮 PCR。参照 1.3 中的方法进行回收、克隆,并送 Invitrogen 公司进行测序。

1.5 3'RACE 技术获取刺五加 FPS 基因 cDNA 3'末端序列 根据 1.3 所获得的刺五加 FPS 基因片段的 cDNA 序列,应用 Primer premier 5.0 设计 3'RACE 特异性外侧引物 FPS32: 5'-ACCCTGTTGGTTCAGAT-TAC-3' 和内侧引物 FPS31: 5'-ACCAGAGGTGATT-GGGAAGA-3'。取 3 μL 总 RNA,以 3'RACE Adaptor 为引物,参照 3'-Full RACE core set Ver. 2.0 逆转录部分的说明进行逆转录反应,以 3'RACE outer primer: 5'-TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT-3' 和 FPS32 引物对进行套式 PCR 的 outer PCR 反应,反应体系中模板量为 3 μL ,其他按照说明书进行。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 53 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 20 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 outer PCR 产物 1 μL ,以 3' RACE inner primer 和 FPS31 进行套式 PCR 的 inner PCR 反应,反应体系按说明书进行。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 70 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。套式 PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶后参照 1.3 中的方法回收、克隆,并送 Invitrogen 公司进行测序。

1.6 刺五加 FPS 基因全长的拼接与 PCR 验证 利用 DNAMAN 6.0 软件将 1.3 中获得的保守序列和 1.4 中获得的 5'末端序列, 1.5 中获得 3'末端序列进



行拼接,获得刺五加 *FPS* 基因的全长 cDNA 序列。根据拼接的序列,设计扩增包含刺五加 *FPS* 基因 cDNA 起始密码子的上游引物 FPSS: 5'-GAATGAGCGATCTGAAGGC-3' 和包含终止密码子的下游引物 FPSX: 5'-GTAAATTACTACTTTTGGCC-3'。以 1.3 中逆转录的 cDNA 为模板,PCR 扩增 *FPS* cDNA 的全长序列。PCR 反应体系为 25 μ L,其中引物 FPSS 和 FPSX 各 1 μ L,10 \times LA *Taq* Buffer (含 15 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂) 2.5 μ L,2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2 μ L,模板 cDNA 1 μ L,LA *Taq* 酶 1 μ L,补 ddH₂O 至 25 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C,5 min;94 $^{\circ}$ C,1 min;48 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,80 s,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶后,参照 1.3 中的方法回收、克隆,并送 Invitrogen 公司进行测序。

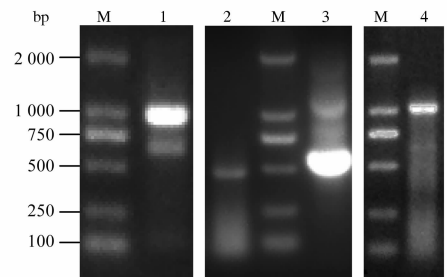
1.7 刺五加 *FPS* 基因的生物信息学分析 通过 DNAMAN 6.0 将刺五加 *FPS* 基因 cDNA 全长序列翻译成氨基酸序列;OFR Fider 查找开放阅读框 (ORF);ExPASy 在线服务器的 ProtParam 预测蛋白质的基本理化性质;PROSITE 进行蛋白质功能结构域分析;PSORT 服务器进行蛋白的亚细胞定位;http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html 进行蛋白质二级结构分析;使用 MEGA 5.05 软件中的 Neighbor-Joining (邻位相连法,NJ)法构建系统发育树。使用 SWISS-MODEL 进行蛋白质的三维结构预测。

1.8 刺五加 *FPS* 基因在不同器官中的表达分析 利用 Primer premier 5.0 软件,设计半定量 RT-PCR 扩增刺五加 *FPS* 基因的上游引物 RFPS:5'-TCATACACGCAGAGGTCA-3' 和下游引物 RFPSX:5'-CTCCTACAAGGGTGGTGA-3',预计扩增长度 218 bp;扩增刺五加 *GAPDH* 基因的上游引物 RGS:5'-GCAAGGACTGGAGAGGTGGA-3' 和下游引物 RGX:5'-AGTGGGAAGTTCGGAAGGACA-3',预计扩增长度 134 bp。以 1.3 中逆转录的 7 株刺五加的根、幼茎、叶片和叶柄的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 25 μ L:上下游引物 (10 mmol \cdot L⁻¹) 各 1 μ L,10 \times Buffer (含 15 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂) 2.5 μ L,2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2 μ L,模板 cDNA 1 μ L,*Taq* 酶 1 μ L,补 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C,5 min;变性 95 $^{\circ}$ C,30 s;退火 30 s,温度分别为 55 $^{\circ}$ C (*GAPDH*) 和 56 $^{\circ}$ C (*FPS*);延伸 72 $^{\circ}$ C,10 s。35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。将 5 μ L PCR 产物加样至

1.2% 琼脂糖凝胶样品孔中,在 1 \times TAE 电泳缓冲液中电泳鉴定 PCR 产物,紫外灯下观测电泳结果,照相后用凝胶影像分析软件 (Quantity one) 测定每个条带的光密度值,并计算样品 *FPS* 基因条带与内参照基因 *GAPDH* 条带的吸光度比值,该值作为 *FPS* 的半定量 RT-PCR 的结果。数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。应用 SPSS 17.0 软件处理数据,进行方差分析和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 刺五加 *FPS* 基因保守区段的获得 根据已知五加科植物 *FPS* 基因的保守序列设计引物,RT-PCR 扩增得到 950 bp 的条带,见图 1,将其连接 PGM-T 载体转化大肠杆菌 TOP10,测序结果经 NCBI 的 Blast 比对,确定 FPSS1 和 FPSX1 的扩增产物为刺五加 *FPS* 基因 cDNA 的部分片段。



1. *FPS* 基因保守区的 PCR 扩增; 2. *FPS* 基因的 5' RACE; 3. *FPS* 基因的 3' RACE; 4. *FPS* 基因 cDNA 全长的 PCR 扩增; M. DL 2 000 DNA marker。

图 1 刺五加 *FPS* 基因的克隆

Fig. 1 The clone of *FPS* from *Eleutherococcus senticosus*

2.2 RACE 获取刺五加 *FPS* 基因全长 以刺五加 cDNA 的加尾产物为模板,利用引物对 AP 长-PSSd2 和 AP 短-PSSd1 进行巢式 PCR 和降落 PCR 技术相结合的 5' RACE 扩增,获得长 450 bp 的片段,见图 1。以 3' RACE Adaptor 引物逆转录的 cDNA 为模板,利用引物对 3' RACE outer primer-FPS32 和 3' RACE inner primer-FPS31,应用基于巢式 PCR 的 3' RACE 扩增获得 550 bp 的片段 (图 1)。将所获得的保守区段和 5' 端、3' 端 cDNA 序列进行拼接,应用 NCBI 的 ORF finder 软件分析该 cDNA 序列的 ORF,发现该序列包含刺五加 *FPS* 基因的完整 ORF。以刺五加的 cDNA 为模板,用引物 FPSS 和 FPSX 扩增获得 1 040 bp 的 1 条带,见图 1,与预期大小相符。将该片段回收、克隆和



测序后,与 5'端、3'端 cDNA 序列与保守区段拼接获得的序列进行比对,两者序列完全相同。

2.3 刺五加 *FPS* 基因的生物信息学分析 刺五加 *FPS* 基因全长 1 499 bp (GenBank 登录号 JQ178346),其中 5'端非翻译区(5'UTR)长 126 bp, 3'端非翻译区(3'UTR)长 344 bp,终止密码子为 TAG,ORF 长 1 029 bp,编码 342 个氨基酸,3'端有 poly A 尾。预测的蛋白质相对分子质量为 39.763 kD,理论等电点(PI)为 5.43。使用 NCBI Blast 比对,氨基酸序列与人参 *Panax ginseng*,西洋参 *P. quinquefolius*,龙牙楸木 *Aralia elata*,三七 *P. notoginseng* 和积雪草 *Centella asiatica* 的同源性分别达到 96.8% ,96.5% ,96.2% ,96.5% ,93.9% 。

通过 NCBI 的 Blast 比对发现,刺五加 *FPS* 蛋白与已知的蛋白质结构功能数据库中其他物种的 *FPS* 具有相似的结构功能域。刺五加 *FPS* 的 90 ~ 104 (LVLDDIMDSSHTRRG)和 224 ~ 236(MGYTFQVQD-DYLD)氨基酸残基处各含有一个作为异戊烯基转移酶所具有的氨基酸保守结构域。通过 TMHMM 软件分析得知,刺五加 *FPS* 蛋白无跨膜区域,全部存在于膜外,通过 PSORT 服务器的分析,初步判断刺五加的 *FPS* 定位于细胞质中。运用 SOPMA 软件预测刺五加 *FPS* 蛋白的二级结构,表明该蛋白含有 220 个 α 螺旋(alpha helix),占 64.33%;21 个延伸链(extended strand),占 6.14%;9 个 β 折叠(beta turn),占 2.63%;92 个无规则蜷曲(random coil),占 26.90%。刺五加 *FPS* 蛋白质的三维结构见图 2。



模型覆盖范围 1 ~ 342;模型样本[1ubyA] (2.40 Å);序列一致性 46.22%; Evalue 0.000 1。

图 2 刺五加 *FPS* 蛋白三级结构同源建模

Fig. 2 The *FPS* 3D structure predicted by Swiss-model

2.4 *FPS* 蛋白的分子系统进化分析 将刺五加 *FPS* 与 GenBank 中登载的 19 种植物的 *FPS* 蛋白进行聚类分析,构建 *FPS* 系统进化树,结果见图 3。刺五加与同为五加科的人参、三七、西洋参、龙牙楸木和积雪草亲缘关系最近,首先聚为 1 支,可信度 99%,随后和其他双子叶植物聚为 1 个大的分支,单子叶植物、裸子植物分别聚为 1 个分支,这与传统的分类结果相符。

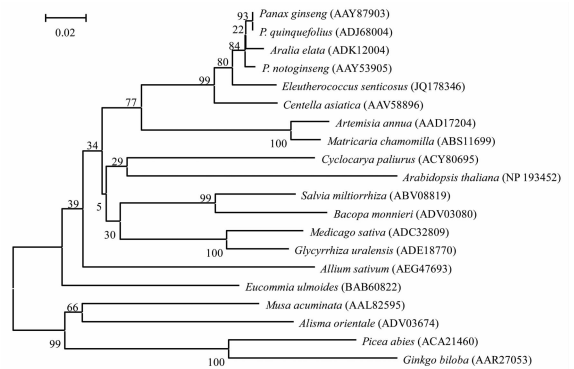
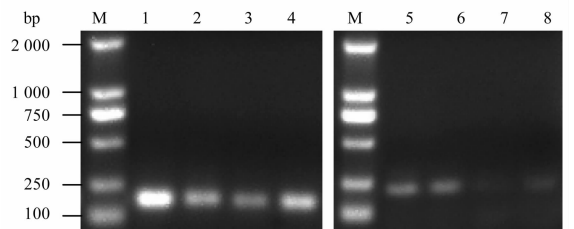


图 3 *FPS* 蛋白的系统进化树

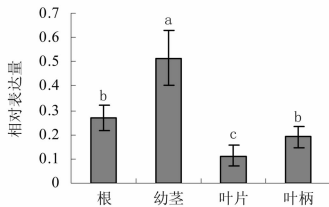
Fig. 3 Phylogenetic tree of *FPS* protein

2.5 刺五加不同器官中 *FPS* 基因的表达分析 刺五加 *GAPDH*, *FPS* 基因 RT-PCR 扩增的产物特异性强,无非特异性扩增和引物二聚体,见图 4。*FPS* 基因在刺五加根、幼茎、叶片和叶柄中均有表达,但表达量具有显著差异 ($P < 0.05$),见图 4,5。*FPS* 的最大表达量出现在幼茎中,为最低表达量(叶片)的 4.6 倍,根和叶柄次之,两者同时显著高于在叶片中的表达量 ($P < 0.05$),但两者间的差异不显著。



1. 根的 *GAPDH*; 2. 幼茎的 *GAPDH*; 3. 叶片的 *GAPDH*; 4. 叶柄的 *GAPDH*; 5. 根的 *FPS*; 6. 幼茎的 *FPS*; 7. 叶片的 *FPS*; 8. 叶柄的 *FPS*; M. DNA marker。

图 4 不同器官中刺五加 *FPS* 基因表达量的半定量 RT-PCR
Fig. 4 RT-PCR result of expression amounts of *FPS* gene in different organs of *Eleutherococcus senticosus*



不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 不同器官中刺五加 *FPS* 基因表达量的变化

Fig. 5 Expression variations of *Eleutherococcus senticosus* *FPS* gene in different organs

3 讨论

对于通过同源克隆法仅克隆了部分保守序列的基因而言, RACE 技术是获得基因全长的有效方法, 广泛应用于全长基因的克隆。在 RACE 技术中, 获得基因 3' 端比较容易, 而获得基因 5' 端则比较困难^[9]。笔者在罗聪等^[9]的 RACE 技术基础上进行了改良, 首先将 TdT 加尾的时间缩短为 2 h, 但仍大于说明书中的 1 h; 其次将 2 轮 PCR 的退火温度降低了 2 °C, 并将延伸时间延长了 30 s。结果表明, 2 h 的加尾完全满足后期的实验要求, 缩短了实验周期, 而降低温度和适当延长延伸时间可有效地获得基因的 5' 端未知序列。

本研究克隆的刺五加 *FPS* 基因与已报道的其他植物的同一基因相比, 编码区基本一致。一般认为作为异戊烯基转移酶的 *FPS* 具有 2 个富含天冬氨酸 (DDXXD) 的氨基酸序列保守域 [LIVM] [LIVM] XDDXXDXXXXRRG 和 [LIVMFY] GXXFQ [LIVM] XDD [LIVMFY] X [DN]^[6,10-11], 刺五加 *FPS* 蛋白 90 ~ 104 [LVLDDIMDSSHTRRG] 和 224 ~ 236 [MG-TYFQVQDDYLD] 位的氨基酸残基与此完全相符。刺五加 *FPS* 的跨膜分析和亚细胞定位的结果显示其无跨膜结构, 定位于细胞质中, 这与其他植物 *FPS* 在细胞质中合成前体蛋白后不进入其他亚细胞器, 而是留在细胞质中经过翻译后蛋白质的加工成为成熟蛋白质发挥催化作用, 而不与膜脂结合^[12] 的观点相一致。

已知物种的 *FPS* 的功能域在空间布局上是由 α -螺旋围绕形成的中间具一个“太空穴”的立体结构, 其中与底物相结合的 2 个富含天冬氨酸 (DDXXD) 的保守域位于“空穴”的内壁, *FPS* 的酶促催化反应就在空穴中进行^[6,12]。刺五加 *FPS* 蛋白的三维结构预测表明, 该蛋白与其他物种 *FPS* 的核心

结构完全相符, 这进一步说明刺五加 *FPS* 是一个在萜类生物合成途径中起作用的功能蛋白。

不同器官中表达量的分析结果表明, 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。这与建泽泻中 *FPS* 的最大表达量出现在叶片中^[6] 的结果完全相反。同时刺五加的皂苷仅存在于叶片中, 这可能是由于植物体内物质的运输作用所致, 具体的中间代谢产物与代谢终产物的合成可在不同的器官中进行^[6]。

目前刺五加中皂苷的生物合成功能基因研究尚未见报道。本文首次克隆了刺五加的 *FPS* 基因, 生物信息学分析结果表明该基因具有 *FPS* 活性所必需的多肽位点, 并证实 *FPS* 基因在不同器官中的表达量间存在显著差异。研究结果为分析 *FPS* 表达对刺五加皂苷含量的影响, 及对刺五加 *FPS* 进行表达调控奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 邢朝斌, 曹蕾, 陈龙. 刺五加鲨烯环氧酶基因 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 172.
- [2] 张宝香, 姜英, 张雅凤. 刺五加叶研究新进展[J]. 特产研究, 2009, 31(4): 69.
- [3] 涂正伟, 周渭渭, 单淇, 等. 刺五加的研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213.
- [4] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2002, 75: 31.
- [5] Kim O, Bang K, Jung S, et al. Molecular characterization of ginseng farnesyl diphosphate synthase gene and its up-regulation by methyl jasmonate[J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(1): 47.
- [6] 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.
- [7] Cunillera N, Arro M, Delourme D, et al. Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes[J]. J Biol Chem, 1996, 271(13): 7774.
- [8] 缪倩, 曹小迎, 李长根, 等. 青钱柳法呢基焦磷酸合酶基因的克隆及功能研究[J]. 植物研究, 2011, 31(3): 323.
- [9] 罗聪, 何新华, 陈虎, 等. 一种高效获取基因 5' 末端的 RACE 方法[J]. 植物生理学报, 2011, 47(4): 409.
- [10] Cane D E, Xue Q, Fitzsimons B C. Trichodiene synthase. Probing the role of the highly conserved aspartate-rich region by site-directed mutagenesis[J]. Biochemistry, 1996, 35(38): 12369.
- [11] Szkopinska A, Plochcka D. Farnesyl diphosphate synthase: regulation of product specificity[J]. Acta Biochim Pol, 2005, 52(1): 45.
- [12] 李嵘, 王喆之. 植物法呢基焦磷酸合酶的生物信息学分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(2): 126.



Molecular cloning of farnesyl diphosphate synthase from *Eleutherococcus senticosus* and its bioinformatics and expression analysis

XING Zhaobin^{*}, LONG Yuehong, HE Shan, LIANG Nengsong, LI Baocai
(College of Life Science, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[**Abstract**] **Objective:** To clone farnesyl diphosphate synthase (FPS) gene from *Eleutherococcus senticosus* and analyze the bioinformatics and expression of the gene. **Method:** The FPS full length cDNA was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The data was analyzed by bioinformatics method, the structure and function of FPS was deduced. The expression of FPS in different organ of *E. senticosus* was detected by RT-PCR. **Result:** The full length of FPS cDNA was 1 499 bp containing a 1 029 bp ORF that encoded 342 amino acids. The deduced protein sequence exhibited two Asp rich conserved motifs (DDXXD). Without transmembrane domain, FPS was located in cytoplasm. RT-PCR result showed that FPS gene expressed in different organs of *E. senticosus*. The expression amounts of FPS in different organs were different significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** The FPS gene of *E. senticosus* was successfully cloned for the first time, and provided a stable foundation for studying on its effect and expression control on *E. senticosus* saponins biosynthesis.

[**Key words**] *Eleutherococcus senticosus*; farnesyl diphosphate synthase; clone; expression analysis

doi:10.4268/cjcm20121207

[责任编辑 吕冬梅]