

# 柿法呢基焦磷酸合酶基因的克隆与序列分析

尤 超, 赵 大 球, 梁 乘 榜, 陶 俊, 周 春 华

(扬州大学 园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

**摘 要:**在萜类生物合成途径中起重要作用的关键酶—法呢基焦磷酸合酶(Farnesyl Diphosphate Synthase, FPS), 对植物的生长发育、抗逆性以及次生代谢都起着重要的调节作用。通过 cDNA 末端快速克隆的技术(Rapid-amplification of cDNA Ends, RACE)从柿果实中克隆到法呢基焦磷酸合酶基因 cDNA 片段, 并进行了序列的相关分析。结果表明:所克隆的 FPS 基因和 NCBI 数据库中已登录的云杉、腊梅、百合等植物 FPS 基因核苷酸序列的同源性分别达到 88%、75%、73%, 并且与香蕉、水稻、橄榄等植物 FPS 基因氨基酸序列的同源性分别达到 72%、67%、66%。该基因已提交 GenBank 数据库, 登录号为 JN108022。

**关键词:**柿; 法呢基焦磷酸合酶; 克隆; 序列分析

**中图分类号:**Q 946.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)09-0105-04

萜类(Terpenes)是一类天然的烃类化合物, 是植物中最大的一类天然产物, 迄今为止已从植物中分离到超过 2 万多种萜类化合物。法呢基焦磷酸(Farnesyl pyrophosphate, FPP)处在许多萜类化合物合成的分支点上, 其合成的酶促反应被广泛认为是一个限速步骤。法呢基焦磷酸合酶(Farnesyl diphosphate synthase, FPS)催化两分子的异戊烯基焦磷酸(IPP)和一分子的二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)形成 15 碳的 FPP<sup>[1-2]</sup>, FPP 在其它酶的作用下可以合成倍半萜、三萜、聚戊烯醇、植物甾醇、多萜醇等萜类化合物<sup>[3]</sup>。

柿(*Diospyros kaki* L.)属于柿科柿属, 主要集中分布在中国、韩国、日本等国家, 在东南亚的一些国家也有少量分布<sup>[4]</sup>。柿果风味比较独特、营养也很丰富, 并且具有止渴、治痢、清热止血、健脾化痰等功能, 所以被誉为保健类水果。FPP 是柿果中许多萜类生物活性物质合成的前体物质, FPS 活性可能在一定程度上调控柿果中活性物质的含量, FPS 基因在植物自身免疫和防御反应中也起到了重要作用<sup>[5]</sup>, 特别是在植物适应环境、抗

逆及抗病方面起着关键的作用<sup>[6]</sup>。

近年来, 人们已相继从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[7]</sup>、青蒿(*Artemisia princeps*)<sup>[8]</sup>、胡椒薄荷(*Mentha piperita*)<sup>[9]</sup>、白羽扇豆(*Lupinus albus*)<sup>[10]</sup>等植物中获得 FPS 基因, 但在柿中尚未见报道。该研究拟利用 RACE 方法克隆柿果 FPS 基因 cDNA 片段, 并对其序列进行相关分析, 以期改良柿果实品质提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 供试材料为‘小方柿’, 于 2010 年 9 月 8 日采自扬州大学果园。果实采摘后带回实验室, 迅速将果肉切成较适宜的小块状, 在液氮中立即冷冻, 然后在 -80℃ 环境中保存备用。

1.1.2 试剂药品 RNA 纯化试剂盒 DNaseI、扩增试剂盒采用 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0、DL 2 000、DNA 凝胶回收试剂盒、LATAq DNA 聚合酶、PMD18-T 载体、DH5α 大肠杆菌、dNTP、BamHI、HindIII 等都是由 Takara 公司提供, 其它的试剂药品都是由国药集团化学试剂有限公司提供, cDNA 序列和引物均委托上海生物工程技术服务有限公司提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 引物设计合成 根据 GenBank 数据库中检索到的杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliver, AY162472)、青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk., GU121224)、青蒿(*Artemisia princeps*, GQ420346)等植物 FPS 基因保守区域的序列, 运用 DNASTAR、Primer Premier 5.0 等相关软件设计 2 条引物用于 RACE 扩增, 外引为: 5'-GGTT-

**第一作者简介:**尤超(1987-), 男, 安徽灵璧人, 硕士, 现主要从事银杏次生代谢调控研究工作。E-mail: kyzy518529@163.com。

**责任作者:**周春华(1974-), 男, 浙江江山人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事园艺植物有效成分生物代谢及成分分离提取与应用研究工作。E-mail: chzhou@yzu.edu.cn。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30771491); 中国博士后科学基金资助项目(20100471401); 江苏省博士后科学基金资助项目(0901055C); 江苏省科技基础设施建设计划(科技公共服务平台)资助项目(BM2010590)。

**收稿日期:**2012-02-27

GGTGCCTTGAGTGG-3';内引为:5'-TGGTGATCCT-GAGGTGAT-3',并委托上海生物工程技术服务有限公司提供。

1.2.2 RNA 提取及纯化 提取柿果实 RNA 参照徐昌杰等<sup>[11]</sup>的 CTAB 法,并稍加改进。RNA 的后期纯化采用 Takara 公司的 DNaseI 试剂盒,具体操作参照其说明书进行。

1.2.3 cDNA 片段的获得 目的基因反转录的方法具体按照 Takara 公司的 3'-RACE Core Set Ver. 2.0 扩增试剂盒上的说明书进行。将反转录的目的基因依次根据 3'-RACE Core Set Ver. 2.0 扩增试剂盒的使用说明书分别进行 Outer PCR 和 Inner PCR。扩增后的产物利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4 通过 cDNA 片段获得质粒并检测 扩增后的产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,参照 Takara 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行目的片段的回收及纯化,然后用 pMD18-T 载体与 cDNA 片段连接,在 4℃ 的环境下 4 h 左右,最后转化感受态细胞 *DH5α*,通过挑菌筛选和酶切鉴定,从而获得质粒,委托上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.5 序列的相关分析 通过使用 MEGA 4.1 和 DNASTAR 等生物学分析软件,对核苷酸所编码的氨基酸序列进行分析和比对,同时根据氨基酸序列的分析比对结果构建分子系统进化树。其中,核苷酸及氨基酸序列的同源性比对在 NCBI 数据库中的比对工具 Blast 上进行<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 的检测与基因片段的扩增

从图 1 可看出,该方法提取的总 RNA 有 28S rRNA 和 18S rRNA 2 条清晰的条带,且很少有降解;同时反映 RNA 纯度的  $OD_{260}/OD_{280}$  比值为 1.83,  $OD_{260}/OD_{230}$  比值为 2.48,说明获得的 RNA 纯度很好,较少有蛋白质、糖等杂质的存在,而且测得的浓度指标符合反转录的要求,可用于下一步的克隆试验。

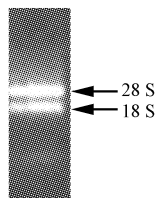


图 1 柿果实 RNA 的凝胶电泳图

Fig. 1 RNA gel electrophoresis map of persimmon fruit

该研究用从柿果实中所提取的 RNA 作为模板,通过 3'-RACE 方法进行 cDNA 片段 3' 端的扩增,然后用琼脂糖凝胶对扩增后的产物进行电泳鉴定及分析,得到 1 条长约 750 bp 的条带(图 2)。

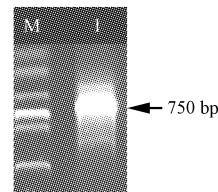


图 2 通过 RACE 方法获得的 cDNA 片段

注:M;DL 2 000;1,3'RACE 产物。图 3 同。

Fig. 2 cDNA fragment by RACE method

Note:M;DL 2 000;1,3' RACE product. The same as Fig. 3.

### 2.2 载体的克隆及质粒的测序鉴定

将由试剂盒回收的 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接,转化到感受态细胞 *DH5α* 后,不断摇菌,进而提取质粒,最后采用 *Bam*HI 和 *Hind*III 进行双酶切鉴定。由图 3 可知,获得的载体目的片段大小约为 750 bp,与扩增结果一致,说明目的片段克隆成功,再委托上海生物工程技术服务有限公司测序。

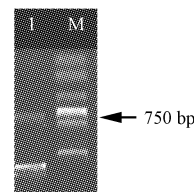


图 3 cDNA 片段的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction enzyme identification of cDNA fragments

### 2.3 克隆基因的序列分析

测序结果表明,该 cDNA 片段长 756 bp,包含一个 316 bp 的开放阅读框(ORF),440 bp 3' 非编码区和 11 bp 的 poly(A) 尾巴,编码 104 个氨基酸。该基因已提交 GenBank 数据库,登录号为 JN108022(图 4)。

```

1  TGGTGATCCTGAGGTGATTGGGAAGATTGGAAGTGGCATTGAAGACTTCAAGTGCTCTTG
1  G D P E V I G K I G T G I E D F K C S W
61  GTTGATAGTGCAAGCCCTTGAACGCGCAATGAGAGCAACGTAAACAGTTATATGACAA
21  L I V Q A L E R A N E S Q R K Q L Y D N
121  TTATGGAAGGCAGATCCTTCTGTGTGTCAGCAGTTAAGGCAATATATAGGATCTTGG
41  Y G K A D P S C V A A V K A I Y R D L G
181  AATTCAAGATGTTTTCTGGAGTACGAGCGTTCTAGCCACAAGGAGCTGATTCTTCCAT
61  I Q D V F L E Y E R S S H K E L I S S I
241  TGAGGCTCAAGAGAATGAGTCAGTCAGCTGTGTGTTGAAGTCTCTCTGGGGAAGATATA
81  E A Q E N E S V Q L V L K S F L G K I Y
301  CAAGCGACAGAAGTAGGATTATAGTTCTGCGAGTTGTGTTCAGTGATCACCTTAATGA
101  K R Q K *
361  CTAATTTGGGTGCATATGACATGTTTGTTCATCATGTTGACATGGTGGTGCCTTTTGTAT
421  TTTTGGAAATAGAGTTTGAATAAATGTTGGGTTTCATTTCACTGATGGAAGACATT
481  CATCGTGATTCATAAATAGTTAAGGCGACTAATCTGAAGGAGTTTCATCTCAGTCACAGC
541  ATGGTAATTTGCAGAACTCTACTGTTGCAAAATTTGCACTAGATATGATACCTGACTTG
601  CTTCTATGTAACCTTAATCTTCTGTATTTGAAGAAAGCGGAAATGTTTAGGAATTCAA
661  AATTCAGAAAAGGCACAAGATATTATTCATCCCTATCTTATGTTGTCCCTACAGCATTG
721  CTTTATTTGGAATGCTTTTCAAGATCAAAAAA

```

图 4 柿 FPS 基因核酸序列及推断的氨基酸序列

注:推导的氨基酸序列已标注于相应核苷酸下,其它的均为非编码区;\* 代表终止密码子。

Fig. 4 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequence of the FPS gene

Note:The sequence of amino acids is marked in the corresponding nucleotide,the other are the non coding region;\* represents terminator codon.

在 NCBI 数据库中进行同源性检索,结果显示该基因 cDNA 片段与云杉 (*Picea abies*, EU432049)、腊梅 (*Chimonanthus praecox*, FJ415102)、百合 (*Lilium longiflorum*, JF273657)、香蕉 (*Musa acuminata*, AF470318)、积雪草 (*Centella asiatica*, AY787627)、水稻 (*Oryza sativa Japonica*, D85317) 和 玉米 (*Zea mays*, EU961678) 等植物 FPS 基因核苷酸序列的同源性分别达到为 88%、75%、73%、73%、72%、72% 和 71%, 并且氨基酸序列也与其它植物具有较高的同源性, 与香蕉 (*Musa acuminata*, AF470318)、水稻 (*Oryza sativa Japonica*, D85317) 和橄榄 (*Olea europaea*, ACD54843) 等植物 FPS 基因氨基酸序列的同源性分别达到 72%、67% 和 66%, 表明该片段为柿 FPS 基因。

#### 2.4 分子系统进化分析

为了进一步研究柿果实 FPS 基因与其它植物的亲缘关系, 该研究采用 MEGA 4.1 生物分析软件对柿 (*Diospyros kaki*, JN108022)、云杉 (*Picea abies*, EU432049)、腊梅 (*Chimonanthus praecox*, FJ415102)、积雪草 (*Centella asiatica*, AY787627)、水稻 (*Oryza sativa Japonica*, D85317) 和 玉米 (*Zea mays*, EU961678) 等植物 FPS 基因的氨基酸序列进行分子系统进化分析。由图 5 可知, 以水稻和柿等作为外类群, 分成两大分支, 首先柿和云杉聚为一大分支, 另一外类群的水稻和玉米先聚成一大分支, 最后两大分支汇聚在一起。这也与在 NCBI 数据库中核苷酸序列分析的结果基本吻合, 即柿和云杉等植物的遗传进化上存在很大的同源性。

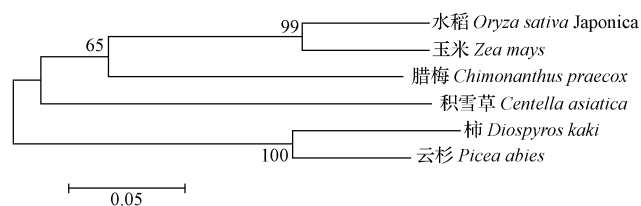


图 5 柿与其它植物 FPS 基因的进化树

Fig. 5 Persimmon fruits and other plant FPS phylogenetic tree of amino acid sequences

### 3 结论与讨论

FPS 基因在类异戊二烯合成途径中发挥着极其重要的作用, 而类异戊二烯化合物又是许多植物重要代谢产物前体物合成的中间产物。该基因的克隆不仅为以后构建含有该序列的植物表达载体奠定了基础<sup>[13]</sup>, 而且经研究发现该基因与植物生长发育、适应外界环境以及抗逆性都密切相关<sup>[14]</sup>。近年来, FPS 基因在植物中克隆表达以及转基因的研究非常多, 如 FPS 基因在青蒿中过量表达, 青蒿素含量提高了近 4 倍<sup>[15]</sup>, 薄荷的 FPS 基因在烟草中转基因, 对赤星病抗性明显提高<sup>[16]</sup>。综合以上

的研究报道表明, 克隆柿 FPS 基因对于提高柿果实品质具有十分重要的作用。

前人研究表明, 柿转基因体系还存在诸多不足之处, 通过转基因来调控柿果实品质还有一定的难度, 特别是将其在 RACE 技术上的成功应用还有很多的技术难关。该研究在柿果中成功地获得了 FPS 基因的 3' 端序列, 而 5' 端序列的扩增做了很多次的尝试, 始终没有成功, 分析后认为, 与设计引物的特异性以及基因自身结构可能有一定的关联, 因此要获得柿果中 FPS 基因的 cDNA 全长还需要进一步去研究。但通过对该基因片段的克隆与分析, 有望为提高和改良柿果实的综合品质以及植物自身免疫和防御反应提供一定的理论依据。

大量植物的类胡萝卜素生物代谢及合成路径中的许多基因均已被克隆<sup>[17]</sup>, 但是所获得基因的酶结构特征不是很清晰, 缺乏对类胡萝卜素生物代谢及合成路径的系统研究, 到目前为止, 还没有发现对柿 FPS 基因在蛋白质水平上的研究。该研究通过对基因序列的分析, 柿和其它高等植物有着共同的法呢基焦磷酸生物合成途径, 在此合成途径中相关功能酶的作用是一致的, 如 HMG-CoA 还原酶、脱氧木酮糖 5-磷酸合成酶、脱氧木酮糖 5-磷酸还原异构酶、牻牛儿基焦磷酸合成酶、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶等<sup>[18-20]</sup>, 但是否因其酶的活性或者表达水平存在差异而造成类胡萝卜素基本含量差异还不是太清楚。因为以 FPP 为底物所合成的产物非常多, 在不同植物中有很大差异<sup>[21]</sup>, 所以 FPS 基因高水平表达能否提高柿果实中部分生物活性物质的含量有待进一步探索。

#### 参考文献

- [1] Cornish K. The separate roles of plant cis and transprenyl transferases in cis-1,4-polyisoprene biosynthesis [J]. Eur J Biochem, 1993, 218: 267-271.
- [2] Lange B M, Rujan T, Martin W, et al. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 13172-13177.
- [3] 周春华, 盛艳乐, 赵大球, 等. 银杏萜内酯的生物合成研究进展 [J]. 中药材, 2009, 33(6): 994-999.
- [4] 盛艳乐. 柿果实齐墩果酸和熊果酸含量分析及其合成的分子生物学研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2010.
- [5] 夏兰芹, 郭三堆. Bt 杀虫基因在转基因双价抗虫棉中的整合和遗传稳定性 [J]. 科学通报, 2001, 46(7): 565-568.
- [6] 周娟, 赵瑞强, 陈莉, 等. 三七法呢基焦磷酸合成酶原核表达载体的构建及其表达 [J]. 生物技术通报, 2009(9): 130-133.
- [7] Delourme D, Lacroute F, Karst F. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for farnesyl diphosphate synthase by functional complementation in yeast [J]. Plant Mol Biol, 1994(26): 1867-1873.
- [8] Matsushita Y, Kang W, Charlwood B V. Cloning and analysis of a cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from *Artemisia annua* [J]. Gene, 1996, 172: 207-209.
- [9] Mallavadhan U V, Panda A K, Rao Y R. Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros* [J]. Phytochemistry, 1998, 49(4): 901-951.



- [10] Aitken S M, Attucci S, Ibrahim R K, et al. A cDNA encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase from white lupin [J]. Plant Physiol, 1995, 108: 837-838.
- [11] 徐昌杰, 陈昆松, 张波, 等. 柑橘组织 RNA 提取方法研究[J]. 果树学报, 2004, 21(2): 136-140.
- [12] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [13] 郭冬, 李辉亮, 彭世清. 巴西橡胶树法呢基焦磷酸合酶基因 5' 调控序列的克隆及功能初步鉴定[J]. 热带农业工程, 2010, 34(6): 31-36.
- [14] 陈新, 李玲玲, 吕慧贞, 等. 法呢基焦磷酸(FPP)的生物合成及其分子调控[J]. 生物技术通报, 2007(2): 67-71.
- [15] Chen D H, Liu C J, Ye H C, et al. Ri-mediated trans-formation of *Artemisia annua* with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin in production [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1999, 57: 157-162.
- [16] 崔红, 刘海礁, 李雪娟. 转外源法呢基焦磷酸合酶基因烟草抗赤星病研究[J]. 作物学报, 2006(32): 817-820.
- [17] 赵大球, 周春华, 薛银芳, 等. 柿  $\epsilon$ -胡萝卜素脱氢酶基因的克隆与序列分析[J]. 生物技术通报, 2011(2): 103-106.
- [18] Sato M, Fujisaki S, Sato K, et al. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* has two cis-prenyltransferases with different properties and localizations. Implication for their distinct physiological roles in dolichol synthesis [J]. Genes to Cells, 2001, 6: 495-506.
- [19] Kurisaki A, Sagami H, Ogura K. Distribution of polyprenols and dolichols in soybean plant [J]. Phytochemistry, 1997, 44: 45-50.
- [20] Tanaka Y, Takagi M. Structural characterization of farnesyl-11 by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance [J]. Biochemical Journal, 1979, 183: 163-165.
- [21] Angela M, Montserrat A, David M, et al. Over expression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels [J]. Plant J, 2002, 30(2): 123-132.

## Cloning and Sequence Analysis for Farnesyl Diphosphate Synthase from Persimmon

YOU Chao, ZHAO Da-qiu, LIANG Cheng-bang, TAO Jun, ZHOU Chun-hua

(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009)

**Abstract:** Farnesyl diphosphate synthase (FPS) is a key enzyme in the biosynthetic pathway of terpenes, it plays an important regulatory role in plant growth, stress resistance and secondary metabolism. The cDNA fragment of FPS was cloned from persimmon fruit by RACE method, and sequence analysis was carried out. The results indicated that the nucleotide sequence *DkFPS* cDNA fragment was homologous to *Picea abies*, *Chimonanthus praecox* and *Lilium longiflorum* with percentage of 88%, 75% and 73%, respectively. The homology of amino acid sequence deduced from this cDNA fragment of *DkFPS* was 72%, 67% and 66% to *Musa acuminata*, *Oryza sativa* Japonica and *Olea europaea*, respectively. This gene had been submitted to GenBank database with accession number JN108022.

**Key words:** persimmon; farnesyl diphosphate synthase; cloning; sequence analysis

## 中国植物基因专家揭秘苹果由酸变甜奥秘

长在树上的苹果为什么开始是酸溜溜,成熟后会变得甘甜可口,中国科学院的植物基因专家近日找到了其中的奥秘,原来这与主导苹果淀粉特性的基因有关。中科院武汉植物园植物基因专家韩月澎、李绍华近日通报了一项研究成果。苹果之所以会从酸变甜是因为苹果等双子叶植物与单子叶禾本科植物相比,GBSS基因只有GBSSII单个家族,而SBEII基因也只有SBEIIa单个家族,这种基因水平上的差异可能是导致苹果淀粉特性不同于谷物淀粉的主要原因。

韩月澎说,淀粉合成比较复杂,受编码颗粒结合淀粉合成酶(GBSS)、可溶性淀粉合成酶(SS)、淀粉分支酶(SBE)、淀粉去分支酶(DBE)等诸多基因的调控。“淀粉并没有甜味,所以苹果未成熟前的味道主要是由苹果酸控制,因此是酸的。随着果实的成熟,苹果内的淀粉开始水解转入糖代谢,慢慢转化为葡萄糖、果糖和蔗糖,而苹果酸却在减少,所以苹果熟了,就变成甜的了。”韩月澎说。不过,葡萄糖、果糖和蔗糖这3种糖的甜度不一样,最甜的是果糖,其次是蔗糖,而葡萄糖甜味一般。韩月澎说:“这3种糖在苹果中的比例是有一个非常复杂的基因调控网络来决定的,目前科学家还在寻找这个基因调控网络”。

研究人员还发现一个有趣的现象:对400多份苹果栽培品种和野生资源进行检测发现,最酸的是野生苹果资源,它的有机酸含量比栽培品种的最高达56倍以上。韩月澎说:“这表明人类在苹果漫长的驯化过程中,逐渐淘汰了那些有机酸更多的苹果,驯化出了更甜的苹果”。

(来源:新华网)