

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201911019

张成阁, 刘换换, 宗亚仙, 等. 北美鹅掌楸 *LtuFPPS1* 基因克隆与组织表达分析 [J]. 广西植物, 2021, 41(6): 961–969.ZHANG CG, LIU HH, ZONG YX, et al. Cloning and tissue expression analysis of *LtuFPPS1* gene in *Liriodendron tulipifera* [J]. *Guihaia*, 2021, 41(6): 961–969.

# 北美鹅掌楸 *LtuFPPS1* 基因克隆与组织表达分析

张成阁<sup>1,2</sup>, 刘换换<sup>1,2</sup>, 宗亚仙<sup>1,2</sup>, 李火根<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心, 南京 210037; 2. 林木遗传与生物技术教育部重点实验室, 南京 210037)

**摘要:** 法尼基焦磷酸合酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPPS) 是植物萜类物质合成前体法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 的关键合成酶。为探究北美鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera*) 萜类合成途径的分子机制, 该文利用北美鹅掌楸转录组数据, 通过设计特异性引物, 采用 RACE 技术克隆得到 *LtuFPPS1* 基因的全长序列并进行生物信息学分析。结果表明: (1) *LtuFPPS1* 基因全长 1 460 bp, 开放阅读框 (ORF) 长 1 056 bp, 编码 351 个氨基酸, 蛋白质分子量为 40 589.45 D, 等电点为 5.19, 不稳定系数为 43.50, 归类为不稳定蛋白; *LtuFPPS1* 基因所编码的蛋白不含信号肽, 定位于线粒体, 是一种不稳定亲水性蛋白, 具有类异戊二烯类化合物合酶的特征结构域,  $\alpha$ -螺旋为其氨基酸序列的主要二级结构。(2) 进化树和同源序列分析表明, 北美鹅掌楸 *LtuFPPS1* 蛋白与乐昌含笑 (*Michelia chapensis*) 的 FPPS 蛋白的亲缘关系更近。(3) 组织表达分析结果发现, *LtuFPPS1* 基因在北美鹅掌楸雌蕊中的表达量最高, 其高低顺序为雌蕊>花芽>茎>雄蕊>萼片>叶片>花瓣>根, 据此推测萜类代谢物在花器官中的合成相对较多。综上所述, *LtuFPPS1* 基因为萜类合成酶基因, 可为从分子生物学层面探究北美鹅掌楸萜类物质的合成提供一定的理论帮助。

**关键词:** 北美鹅掌楸, *LtuFPPS1* 基因, 基因克隆, 生物信息学分析, 组织表达

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2021)06-0961-09

## Cloning and tissue expression analysis of *LtuFPPS1* gene in *Liriodendron tulipifera*

ZHANG Chengge<sup>1,2</sup>, LIU Huanhuan<sup>1,2</sup>, ZONG Yaxian<sup>1,2</sup>, LI Huogen<sup>1,2\*</sup>

(1. Southern Modern Forestry Collaborative Innovation Center, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Key Laboratory of Forest Genetic &amp; Biotechnology, Ministry of Education, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** Farnesyl diphosphate synthase (FPPS) is a key synthase for the synthesis of farnesyl pyrophosphate (FPP), a precursor of plant terpenoids. In order to investigate the molecular mechanism of terpenoid synthesis in *Liriodendron tulipifera*, the full-length sequence of the *LtuFPPS1* gene was cloned by RACE technology and analyzed by bioinformatics using the transcriptome data of *L. tulipifera*, by designing specific primers. The results were as follows: (1) The length of *LtuFPPS1* gene was 1 460 bp and ORF was 1 056 bp, coding 351 amino acids. The protein molecular weight was 40 589.45 D, the isoelectric point was 5.19, and the instability coefficient was 43.50, which was classified as

收稿日期: 2020-03-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31770718, 31470660); 江苏省高校优势学科(PAPD) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770718, 31470660); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)].

作者简介: 张成阁(1994-), 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种研究, (E-mail) cgzhang@njfu.edu.cn.

\*通信作者: 李火根, 博士, 教授, 研究方向为林木遗传育种, (E-mail) hgli@njfu.edu.cn.

unstable protein. The protein encoded by the *LtuFPFS1* gene was an unstable hydrophilic protein that was localized to mitochondria and contains no signal peptide. It had a characteristic domain of isoprenoid compound synthase, and the secondary structure of amino acid sequence was mainly  $\alpha$ -helix. (2) The phylogenetic tree and homologous sequence analysis showed that the *LtuFPFS1* protein of *L. tulipifera* was more closely related to the FPFS protein of *Michelia chapensis*. (3) The results of tissue expression analysis revealed that the *LtuFPFS1* gene was the most highly expressed in the pistil of *L. tulipifera*, and its order was pistil > flower bud > stem > stamen > sepal > leaf > petal > root. Based on this, it is speculated that terpenoid metabolites are relatively more synthesized in flower organs. In summary, the *LtuFPFS1* gene is a terpene synthase gene, which can provide some theoretical help for exploring the synthesis of terpenoids in *L. tulipifera* from the molecular level.

**Key words:** *Liriodendron tulipifera*, *LtuFPFS1* gene, gene cloning, bioinformatics analysis, tissue expression

自然界中木兰科 (Magnoliaceae) 鹅掌楸属 (*Liriodendron*) 树种为第三纪孑遗树种, 现仅存两个种: 鹅掌楸 (*L. chinense*) 和北美鹅掌楸 (*L. tulipifera*) (罗群凤等, 2016)。萜类物质作为北美鹅掌楸花香的主要成分, 对鹅掌楸虫媒传粉具有重要的影响。因此, 研究萜类化合物的合成对北美鹅掌楸的遗传育种具有重要意义。

萜类化合物是植物重要的次生代谢物, 包括醌类、胡萝卜素类、甾体类和植物激素等, 在植物中具有信息传递、调控生长、化学防御和构建植物香型等作用 (Huang et al., 1999)。萜类物质主要以二甲基丙烯基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 和异戊二烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 为底物, 通过在细胞质中进行的甲羟戊酸途径 (Mevalonate pathway, MVA) 和在叶绿体中进行的 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸途径 (2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway, MEP) 生成, 是由多种酶基因共同参与的复杂过程。其中 MVA 途径主要负责倍半萜物质的合成而 MEP 途径主要负责单萜、双萜的合成 (Dudareva & Negre, 2005)。MVA 和 MEP 途径不是单独存在的, 在整个代谢网络中经常存在物质的交换。萜类物质在绝大多数生物体内都有发现, 在植物中的种类更为多样 (蒋素华等, 2018)。

法尼基焦磷酸合酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPFS) 属于短链的异戊烯基转移酶家族, 是萜类代谢途径中的反应分支点, 在萜类物质合成的 MVA 途径中起到了引导反应流程中碳走向的作用 (朱晗, 2017)。因此, 如果 FPFS 的结构或者活性发生改变会影响下游类异戊二烯化合物产生, 流入各类萜类化合物分支的碳通量就会发生改变, 进而影响到下游萜类物质的合成。法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 是萜类物质合成途径

中的重要产物, 是合成众多萜类物质的前体, FPFS 以牻牛儿基焦磷酸 (geranyl diphosphate, GPP) 与 DMAPP 或 IPP 为底物, 通过酶促反应生成 FPP (李永波等, 2012)。FPFS 基因作为萜类化合物合成 MVA 途径的关键酶基因, 克隆鉴定 FPFS 基因, 对萜类化合物生物合成途径的研究具有重要价值。目前已从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (Delourme et al., 1994)、青蒿 (*Artemisia carvifolia*) (Matsushita et al., 1996)、烟草 (*Nicotiana tabacum*) (段娜娜等, 2010) 等植物中克隆鉴定出 FPFS 基因, 但尚未见北美鹅掌楸 FPFS 基因克隆及生物信息学分析方面的报道。

本研究从前期测得的北美鹅掌楸转录数据库中筛选得到 FPFS 基因序列, 使用 RACE 技术从北美鹅掌楸中克隆鉴定到 FPFS 基因, 并对其进行生物信息学分析和组织表达分析, 以期探究该基因在北美鹅掌楸萜类代谢途径中的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

材料来源于南京林业大学下蜀实习林场鹅掌楸种源林。采集北美鹅掌楸 (种源为美国佐治亚州) 的根、茎、叶片、花芽、萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊的样品放入液氮中速冻, 在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存。

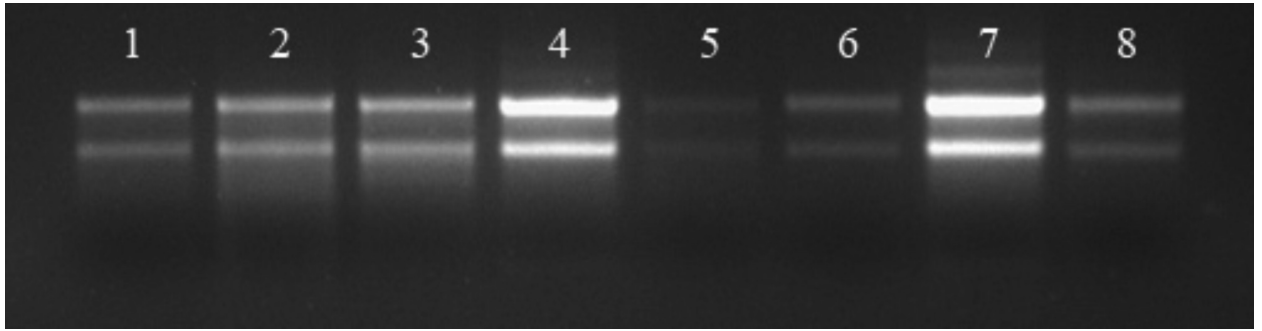
试剂: RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、5' RACE 和 3' RACE 试剂盒、购买于全式金公司的 DNA 回收凝胶试剂盒、pEASY Blunt T-1 Cloning Kit 克隆载体和大肠杆菌感受态细胞; 引物通过南京金斯瑞生物科技有限公司合成, DNA 序列测序由上海杰李生物技术有限公司完成。

### 1.2 RNA 的提取和 cDNA 的合成

将 RNA 提取所用到的器材做无菌、无霉处理, 参考 RNA 提取试剂盒说明书提取北美鹅掌楸不同

组织的 RNA。提取过程需在超净工作台进行来确保 RNA 不会受到污染。提取完成后,使用超微量分光光度计(Thermo Nanadrop2000)检测所提取 RNA 的浓度,其中 OD260/OD230 与 OD260/OD280 的值均在 2.0 左右。使用琼脂糖凝胶电泳检测所提取

的 RNA,条带清晰无明显降解现象,28S RNA 条带亮度是 18S RNA 条带亮度的 2 倍,符合后续实验的要求(图 1)。将提取的 RNA 分别稀释为  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,参考反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。



1. 根; 2. 茎; 3. 叶; 4. 花瓣; 5. 花芽; 6. 雄蕊; 7. 雌蕊; 8. 萼片。

1. Root; 2. Stem; 3. Leaf; 4. Petal; 5. Flower bud; 6. Stamen; 7. Pistil; 8. Sepal.

图 1 不同部位总 RNA 凝胶电泳检测

Fig. 1 Detection of total RNA gel electrophoresis in different parts

### 1.3 *LtuFPFS1* 基因全长的获取

基于已有的北美鹅掌楸转录组数据,检索得到一条 *FPFS* 基因的 EST 序列。使用 Oligo7 软件设计中间片段特异性 PCR 引物(表 1),以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。对扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测后切胶回收。将切胶得到的中间片段基因序列连接到 pEASY-Blunt 载体后转化到大肠杆菌感受态细胞,挑取阳性克隆送去公司测序。基于已得到的中间片段使用 Oligo7 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 引物,使用巢式设计按照上述方法扩增 3'RACE 和 5'RACE 片段。将扩增得到的三个片段进行拼接得到基因全长。

### 1.4 *LtuFPFS1* 基因的生物信息学分析

通过 NCBI 在线预测 *LtuFPFS1* 基因的开放阅读框(ORF);在 NCBI conserved domain 中预测 *LtuFPFS1* 蛋白的保守结构域;利用 ExPasy ProtParam 对 *LtuFPFS1* 蛋白质的理化性质进行预测分析;通过 signalP 4.1 Sever 进行 *LtuFPFS1* 蛋白质信号肽分析(马际凯等,2019);使用 SOPMA 对 *LtuFPFS1* 蛋白的二级结构进行预测分析;利用 Phyre2 预测 *LtuFPFS1* 蛋白三级结构;利用 TargetP 1.1 Server 进行蛋白质亚细胞定位预测;将 *LtuFPFS1* 基因编码氨基酸序列与 NCBI 数据库中

表 1 基因克隆引物序列

Table 1 Primer sequence for gene cloning

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	退火温度 Annealing temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
cDNA fragments F	CAAGCATATTTTCTCGTCCTC	51.7
cDNA fragments R	TCTCTCTACTTCTGCCTCTT	54
3'RACE outer	ATCTCGACTGCTTTGGTGATCCT	58.2
3'RACE inner	GATGCAGCCCATGTAGCGAAG CTGAAG	63.8
5'RACE outer	GCATTGTGTACTTGGACAGATCT TTTTCTCCTCA	62.3
5'RACE inner	GTGTGTGCGATCCATCCATAA	55.3
ORFF	TACACACACACCCTCTGCTTC	56.8
ORFR	CTATTCTGTGTGACTCTCT	51.3
Actin97 F	TTCCCGTTGACAGTGGTC G	60
Actin97 R	TGGTCGCAACTGGTATCG	60
qrt-per F	TCTACGCTCGCTGAAATCCG	59.4
qrt-per R	GATACACCACCAAGCGAGCA	59.5

高同源性序列进行比对,使用 MEGA7.0 软件构建基因编码蛋白的系统进化树。

### 1.5 *LtuFPFS1* 基因组织表达分析

将提取的 RNA 稀释为  $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,后反转录成 cDNA。根据已获得的 *LtuFPFS1* 基因序列设

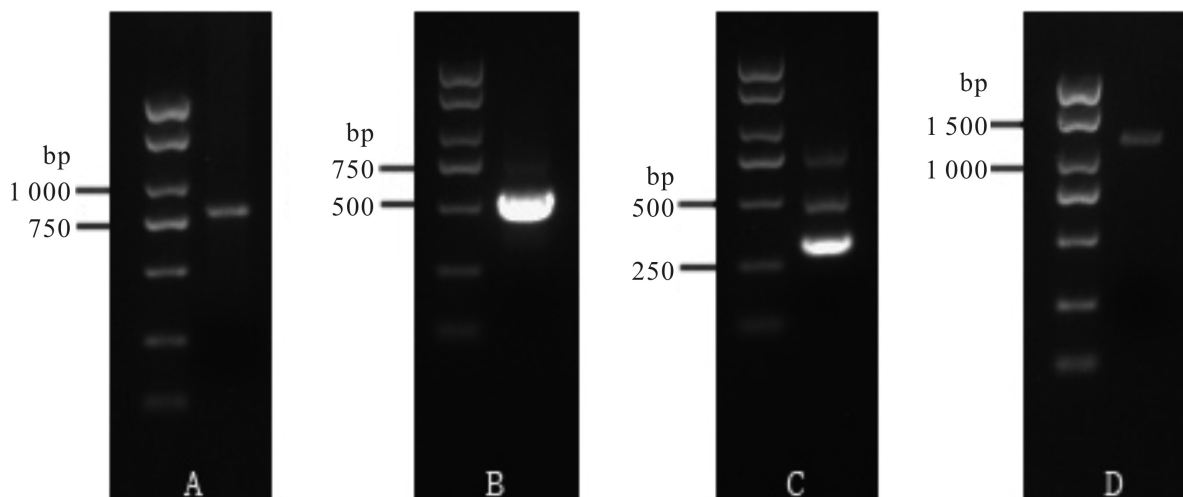
计 qPCR 引物,内参基因采用 *LcActin97* (Tu et al., 2019),每个样品和内参基因设置 4 个重复,进行实时荧光定量 PCR 反应来检测 *LtuFPPS1* 基因在各个组织中的表达量。反应程序和体系参考试剂盒说明书。

## 2 结果与分析

### 2.1 北美鹅掌楸 *LtuFPPS1* 基因全长的获取及命名

从实验室已有的北美鹅掌楸转录组数据中检索到一条 EST 序列,基于此序列设计引物扩增出中间片段长为 780 bp,在此中间片段的基础上设计

5'RACE和3'RACE引物,扩增出5'RACE和3'RACE片段的长度分别为354和326 bp(图2)。将扩增出的5'RACE、3'RACE和中间片段拼接起来得到基因全长为1460 bp。将基因全长放到NCBI网站的ORF finder在线预测到*LtuFPPS1*基因的ORF全长为1056 bp,5'端非编码区长72 bp,3'端非编码区长332 bp。从预测到的ORF两侧设计引物去验证ORF,得到的序列长度大小与原始拼接序列一致且无变异位点。将克隆获得的FPPS基因编码蛋白通过NCBI BLAST Protein与数据库进行比对,根据比对结果,将获得的目的基因命名为*LtuFPPS1*(登录号:MN834118)。



A. 中间片段; B. 3'Race; C. 5'Race; D. 全长 ORF。

A. Intermediate fragment; B. 3'Race; C. 5'Race; D. Full length of ORF.

图 2 *LtuFPPS1* 基因凝胶电泳检测

Fig. 2 Detection of gel electrophoresis in *LtuFPPS1* gene

### 2.2 北美鹅掌楸 *LtuFPPS1* 基因编码蛋白分析

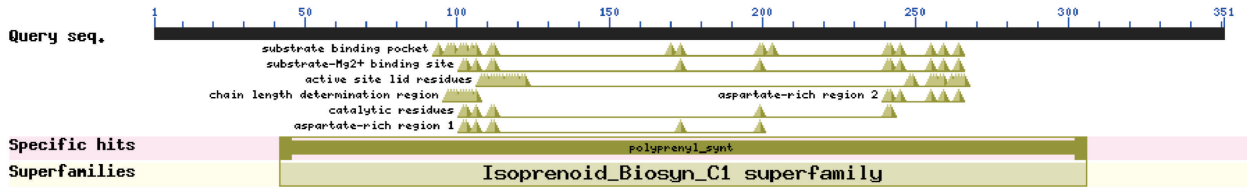
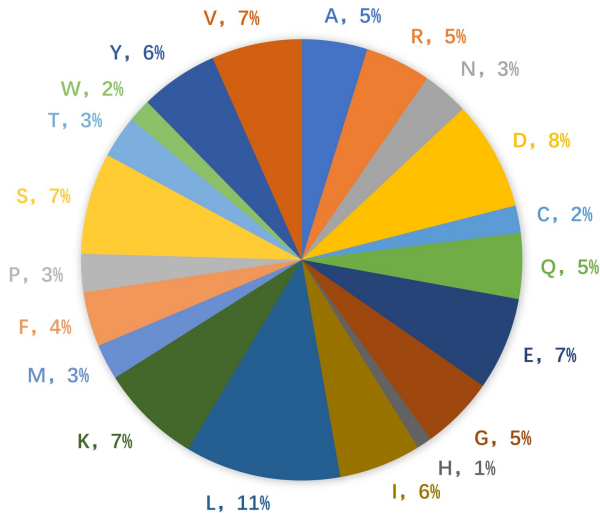
#### 2.2.1 *LtuFPPS1* 基因编码蛋白的理化性质预测分析

使用 NCBI 对 *LtuFPPS1* 基因编码蛋白的氨基酸序列进行保守结构域预测。预测结果可知 *LtuFPPS1* 基因所编码蛋白隶属于类异戊二烯合酶,共有 7 个保守结构域,包括底物结合位点、底物-Mg<sup>2+</sup>结合位点、活性位点盖残基、链长度决定区、催化位点、富含天冬氨酸区 1 和富含天冬氨酸区 2(图 3)。通过使用 Protparam 对 *LtuFPPS1* 蛋白一级理化性质进行预测分析,结果表明 *LtuFPPS1* 基因的 ORF 编码 351 个氨基酸,其理论等电点为 5.19,分子量为 40 589.45 D,蛋白质分子式为 C<sub>1827</sub>H<sub>2841</sub>N<sub>471</sub>O<sub>542</sub>S<sub>16</sub>,消光系数为 63 175,不稳

定系数为 43.50,其 Gravity 值为 -0.314,脂肪族氨基酸指数为 91.62,因此 *LtuFPPS1* 蛋白为不稳定亲水性蛋白。使用 predict protein 分析预测 *LtuFPPS1* 基因编码各种氨基酸的百分比,结果表明亮氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、缬氨酸是 *LtuFPPS1* 蛋白的几类重要氨基酸(图 4)。通过 signalP 4.1 Sever 程序对 *LtuFPPS1* 基因做蛋白质信号肽分析,结果表明 *LtuFPPS1* 蛋白不存在信号肽,可能是一种非分泌型蛋白。

#### 2.2.2 *LtuFPPS1* 基因编码蛋白二级、三级结构预测分析

使用 SOPMA 在线预测 *LtuFPPS1* 蛋白的二级结构,预测结果表明 *LtuFPPS1* 蛋白主要存在  $\alpha$ -螺旋(Hh)、无规则卷曲(Cc)、 $\beta$ -螺旋(Tt)和延

图3 *LtuFPPS1* 蛋白保守结构域预测Fig. 3 Prediction of *LtuFPPS1* protein conserved domain

A. 丙氨酸; R. 精氨酸; N. 天冬酰胺; D. 天冬氨酸; C. 半胱氨酸; Q. 谷氨酰胺; E. 谷氨酸; G. 甘氨酸; H. 组氨酸; I. 异亮氨酸; L. 亮氨酸; K. 赖氨酸; M. 蛋氨酸; F. 苯丙氨酸; P. 脯氨酸; S. 丝氨酸; T. 苏氨酸; W. 色氨酸; Y. 酪氨酸; V. 缬氨酸。

A. Alanine; R. Arginine; N. Asparagine; D. Aspartic acid; C. Cysteine; Q. Glutamine; E. Glutamic acid; G. Glycine; H. Histidine; I. Isoleucine; L. Leucine; K. Lysine; M. Methionine; F. Phenylalanine; P. Proline; S. Serine; T. Threonine; W. Tryptophan; Y. Tyrosine; V. Valine.

图4 *LtuFPPS1* 蛋白氨基酸组成Fig. 4 Composition of *LtuFPPS1* protein amino acid

伸链(Ee)这四种构象。其中Hh含有218个氨基酸,所占比例最高,占62.11%;Cc含有99个氨基酸,占28.21%;Tt含有10个氨基酸,占2.85%;Ee含有24个氨基酸,占6.84%。这四种构象贯穿了整个氨基酸链(图5)。为了更直观地了解蛋白结构,利用Phyre2工具并结合同源建模预测分析*LtuFPPS1*蛋白的三级结构(图6),预测是以青蒿(*Artemisia carvifolia*)的FPP蛋白为建模模板,结果表明*LtuFPPS1*基因所编码的蛋白符合FPPS基因的结构,属于FPPS基因。

2.2.3 *LtuFPPS1* 蛋白的亚细胞定位预测 用TargetP 1.1 Server 在线软件对*LtuFPPS1*蛋白进行

亚细胞定位预测(表2)。预测结果表明*LtuFPPS1*蛋白可能分布于线粒体。*LtuFPPS1*蛋白的cTP(叶绿体)、mTP(线粒体)、SP(分泌通路)、Other(其他)的分值分别为0.026、0.639、0.193、0.127,预测结果的可靠性级别(reliability class)为3。

### 2.3 *LtuFPPS1* 基因编码氨基酸序列同源比对及系统进化树分析

在NCBI数据库中对*LtuFPPS1*基因编码氨基酸序列进行Blastp比对,结果表明其与乐昌含笑(*Michelia chapensis*)的同源性最高(96.01%),与腊梅(*Chimonanthus praecox*)、栓皮栎(*Quercus suber*)、栀子花(*Gardenia jasminoides*)、油棕(*Elaeis guineensis*)、胡桃(*Juglans regia*)等植物的同源性均大于75%。下载比对得分较高的氨基酸序列,包括:乐昌含笑、腊梅、栓皮栎、栀子花、油棕、胡桃、芦笋(*Asparagus officinalis*)、菠萝(*Ananas comosus*)、荷花(*Nelumbo nucifera*)、小果野蕉(*Musa acuminata*)、苞叶黄杨(*Albica bracteata*)、洛矶山耧斗菜(*Aquilegia coerulea*)、博落回(*Macleaya cordata*)、长花百合(*Lilium longiflorum*)、春兰(*Cymbidium goeringii*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、海枣(*Phoenix dactylifera*)、木瓜(*Carica papaya*)、黄芪(*Astragalus membranaceus*),再通过MEGA7.0软件构建*LtuFPPS1*基因编码蛋白系统进化树,分析结果表明北美鹅掌楸*LtuFPPS1*基因与乐昌含笑形成同一支,与腊梅的植物进化关系较近(图7)。

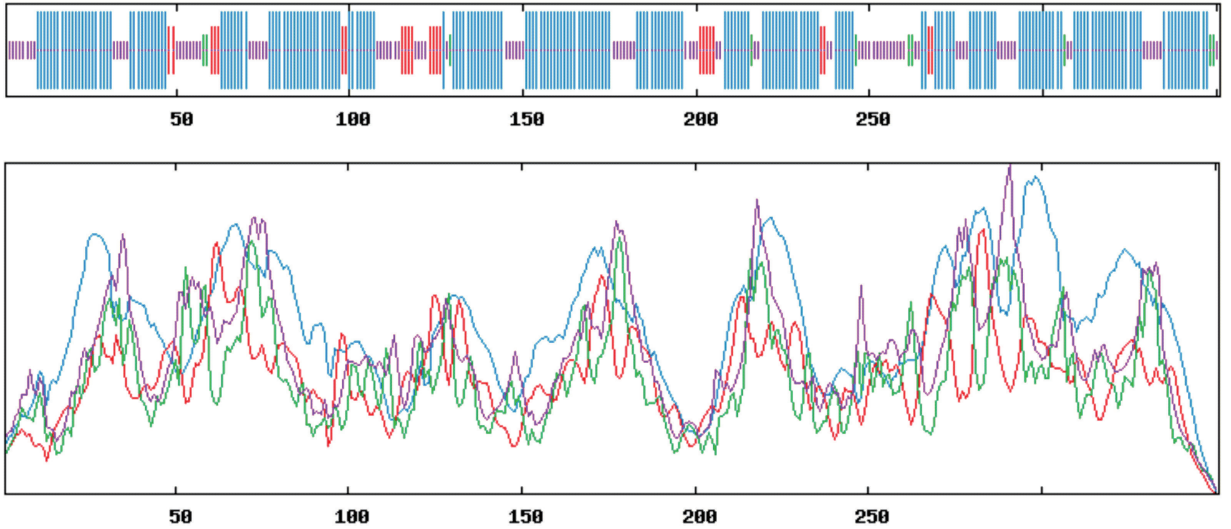
### 2.4 *LtuFPPS1* 基因的组织表达分析

通过对*LtuFPPS1*基因在北美鹅掌楸8个不同组织中的荧光定量结果分析表明,*LtuFPPS1*基因在雌蕊、茎和花芽中的表达量相对较高,且在雌蕊中的表达量高于茎和花芽,在雄蕊、萼片和叶片中的表达量接近,但在雄蕊中的表达量较之萼片和叶片略高,在花瓣和根中表达量较低,尤其在根中表达量最低。如图8所示,*LtuFPPS1*基因在这8个

表 2 LtuFPFS1 蛋白的亚细胞定位预测

Table 2 Prediction of subcellular location of LtuFPFS1 protein

名称 Name	长度 Length (aa)	叶绿体 cTP	线粒体 mTP	分泌通路 SP	其他 Other	位置 Location	可靠性级别 RC
LtuFPFS1	351	0.026	0.639	0.193	0.127	M	3



蓝线.  $\alpha$ -螺旋; 紫线. 无规则卷曲; 绿线.  $\beta$ -转角; 红线. 延伸链。

Blue line.  $\alpha$ -helix; Purple line. Random coil; Green line.  $\beta$ -turn; Red line. Extended strand.

图 5 LtuFPFS1 蛋白的二级结构分析

Fig. 5 Analysis of secondary structure in LtuFPFS1 protein

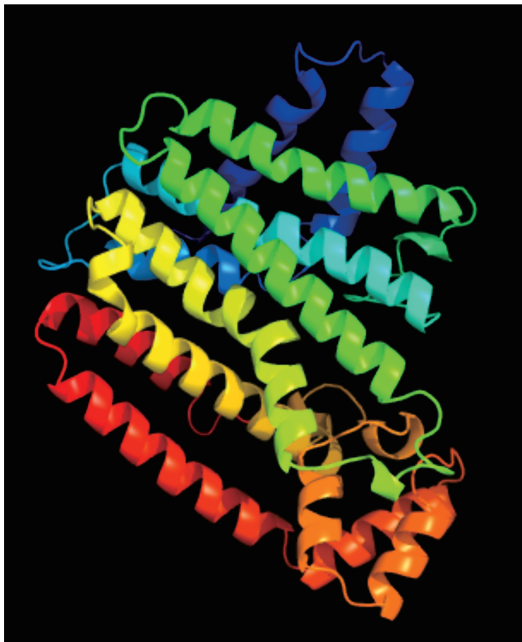


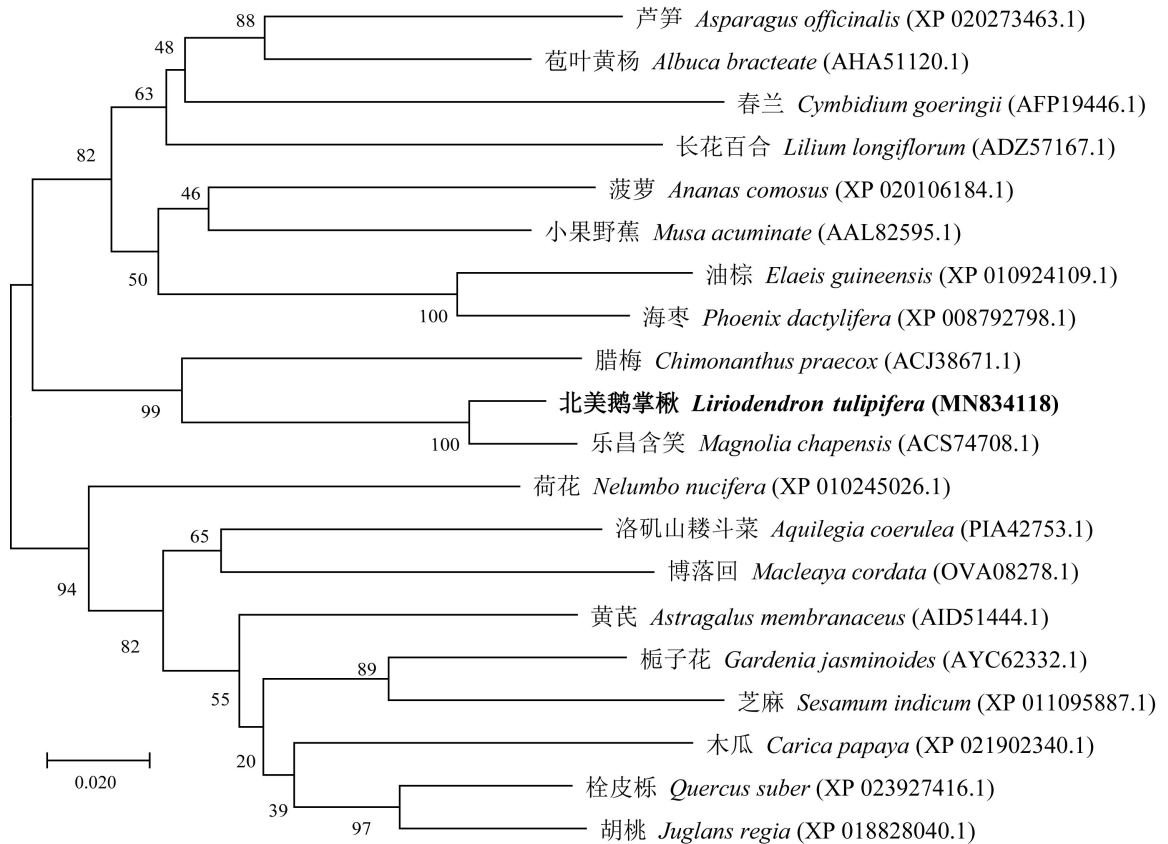
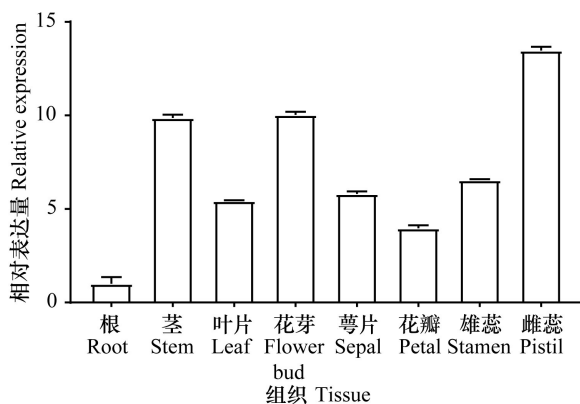
图 6 LtuFPFS1 蛋白三级结构预测

Fig. 6 Prediction of tertiary structure in LtuFPFS1 protein

组织中的相对表达量大小顺序为雌蕊>花芽>茎>雄蕊>萼片>叶片>花瓣>根。

### 3 讨论与结论

*FPFS* 基因是萜类物质合成的关键酶基因,在萜类物质合成过程中起到了重要的调节作用。如菊叶香藜 (*Dysphania schraderiana*) 精油中萜类的生物合成需要此基因的参与 (付苏宏等, 2019); 杜次等 (2015) 对杜仲 (*Eucommia ulmoides*) *EuFPFS* 基因的研究表明 *EuFPFS* 基因在杜仲萜类化合物及杜仲胶的合成中发挥重要作用; Chen et al. (2000) 在黄花蒿 (*Artemisia annua*) 中通过使用遗传转化的方法转入 *FPFS* 基因, 提高了转基因植株的青蒿素含量, 说明 *FPFS* 基因在萜类合成过程中发挥了重要的作用; Xiang et al. (2010) 从腊梅中克隆得到的 *CpFPFS* 基因在大肠杆菌中的表达产生活性, 证明了 *FPFS* 基因在花卉萜类生物合成途径中起到了调节作用。

图 7 *LtuFPPS1* 基因编码蛋白系统进化树Fig. 7 *LtuFPPS1* gene encoding protein phylogenetic tree图 8 *LtuFPPS1* 基因在北美鹅掌楸 8 个组织中的相对表达量Fig. 8 Relative expression of *LtuFPPS1* gene in eight tissues of *Liriodendron tulipifera*

本研究利用北美鹅掌楸转录组数据,成功克隆出北美鹅掌楸 *LtuFPPS1* 基因。通过生物信息学预测分析得知,*LtuFPPS1* 基因的 ORF 全长为

1 056 bp,共编码 351 个氨基酸,其编码蛋白的分子量为 40 589.45 D,该蛋白中不存在信号肽,这与付苏宏等(2019)在菊叶香藜中和卢昌华等(2020)在广藿香(*Pogostemon cablin*)中的研究结果一致,且该蛋白不稳定,具有亲水性,属于非分泌型蛋白,已有研究表明多数分离的 *FPPS* 基因所编码的蛋白都是亲水性蛋白(Wang et al., 2010)。植物 *FPPS* 由基因家族编码,通常有多个 *FPPS* 蛋白亚型,如拟南芥中存在多个 *FPPS* 蛋白亚型,其中 *FPPS2* 蛋白亚型定位于细胞质,*FPPS1* 两个蛋白亚型定位于不同的细胞器,短亚型定位于细胞质中,而长亚型定位于线粒体内(Cunillrea et al., 1997)。*LtuFPPS1* 蛋白具有典型的类异戊二烯类化合物合酶的结构域,通过亚细胞定位预测得知该蛋白最有可能位于线粒体中,这与线粒体内存在 *FPP* 库的报道吻合(Cunillrea et al., 2000)。这一系列生物信息学预测结果与香樟(*Cinnamomum camphora*) (张瑶瑶等, 2018)、洋常春藤(*Hedera*

helix)(阮琴妹等,2016)等植物的 FPPS 蛋白预测结果一致。通过构建编码蛋白的系统进化树和同源序列分析表明北美鹅掌楸 *LtuFPPS1* 基因编码的蛋白与乐昌含笑中的 FPPS 蛋白的同源相似性较高,而乐昌含笑中的挥发油成分主要为萜类物质(邱金芬,2008),据此推测 *LtuFPPS1* 基因与北美鹅掌楸萜类物质的合成有关。北美鹅掌楸为木兰科鹅掌楸属植物,乐昌含笑为木兰科含笑属植物,说明同科植物在进化过程中的亲缘关系更近。

李永波等(2012)研究表明植物 FPPS 基因表达具有组织特异性,并伴随着萜类化合物含量的变化。通过组织表达特异性分析可知 *LtuFPPS1* 基因在北美鹅掌楸的多个组织中均有表达,但在各个组织中的表达强弱存在差异,具有组织特异性。*LtuFPPS1* 基因在雌蕊中表达量最高,在其他组织中表达量相对较低,尤其在根中表达量最低,整体看花器官中的表达量较其他器官略高,推测萜类代谢物在花器官中的合成量相对其他组织器官较高。

植物萜类化合物含量与 FPPS 基因的表达量成正相关。Kim et al.(2014)将人参 FPPS 基因构建过表达载体,并转化到人参的根中,实现了人参根中的 FPPS 基因过表达并引起人参皂苷产量的增多;王冰莹等(2012)将烟草中克隆得到的 FPPS 基因构建载体转入烟草中可以提高烟草叶片中类胡萝卜素的产量;崔红等(2008)利用烟草过表达薄荷的 FPPS 基因,结果发现烟草中倍半萜植保素的产量有了明显的提升;刘美佳等(2018)将珠子参过表达载体转入珠子参细胞中,获得阳性细胞,对比野生型细胞,转基因珠子参细胞系中, FPPS 基因表达量、FPPS 酶活性以及皂苷含量均有提高。因此,在分子水平上探究植物萜类的代谢、提高萜类物质的合成是目前的研究热点,其中相对合理有效的方法就是对萜类物质合成途径相关酶基因进行研究。本研究成功从北美鹅掌楸中克隆出 *LtuFPPS1* 基因并进行生物信息学分析和组织表达分析,以期探究该基因在北美鹅掌楸萜类代谢途径中的功能奠定基础。

## 参考文献:

CHEN DH, YE HC, LI GF, 2000. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

- transformation [J]. *Plant Sci*, 155(2): 179–185.
- CUI H, MU PL, LI XJ, et al., 2008. *fps* transgenic hairy roots culture *in vitro* and its resistance to *Phytophthora parasitica* [J]. *J Hunan Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 34(4): 422–425. [崔红, 慕平利, 李雪君, 等, 2008. 烟草 *fps* 转基因发状根的离体培养及其抗菌性 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 34(4): 422–425.]
- CUNILLERA N, BORONAT A, FERRER A, 1997. The *Arabidopsis thaliana* *FPS1* gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform [J]. *J Biol Chem*, 272(24): 15381–15388.
- CUNILLERA N, BORONAT A, FERRER A, 2000. Spatial and temporal patterns of GUS expression directed by 5' regions of the *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase genes *FPS1* and *FPS2* [J]. *Plant Mol Biol*, 44(6): 747–758.
- DELOURME D, LACROUTE F, KARST F, 1994. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for farnesyl diphosphate synthase by functional complementation in yeast [J]. *Plant Mol Biol*, (26): 1867–1873.
- DU C, LI J, PENG QZ, et al., 2015. Gene cloning and sequence analysis of farnesyl pyrophosphate synthase genes from *Eucommia ulmoides* [J]. *Life Sci Res*, 19(2): 100–105. [杜次, 李菁, 彭清忠, 等, 2015. 杜仲法尼烯基焦磷酸合酶基因 cDNA 全长的克隆与序列分析 [J]. 生命科学研究, 19(2): 100–105.]
- DUAN NN, YUE CP, MIAO HM, et al., 2010. Molecular cloning and sequence analysis of farnesyl pyrophosphate synthase gene in tobacco [J]. *Tobacco Sci Technol*, (1): 56–59. [段娜娜, 岳彩鹏, 苗红梅, 等, 2010. 烟草法尼基焦磷酸合酶基因的克隆及序列分析 [J]. 烟草科技, (1): 56–59.]
- DUDAREVA N, NEGRE F, 2005. Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 8(1): 113–118.
- FU SH, LEI M, ZHANG YQ, et al., 2019. Mining and bioinformatic analysis of FPPS gene from *Dysphania schraderiana* transcriptome database [J]. *Guihaia*, 39(6): 831–842. [付苏宏, 雷鸣, 张勇群, 等, 2019. 菊叶香藜转录组数据库中 FPPS 基因的挖掘与生物信息学分析 [J]. 广西植物, 39(6): 831–842.]
- HUANG KX, SCOTT AI, BENNETT GN, 1999. Overexpression, purification, and characterization of the thermostable mevalonate kinase from *Methanococcus jannaschii* [J]. *Protein Express Purif*, 17(1): 33–40.
- JIANG SH, WANG MF, HAO PA, et al., 2018. The cloning and expression analysis of FPPS gene from *Sedirea japonica* [J]. *Mol Plant Breed*, 16(23): 48–54. [蒋素华, 王默霏, 郝平安, 等, 2018. 萼脊兰 FPPS 基因的克隆及表达分析 [J]. 分子植物育种, 16(23): 48–54.]
- KIM YK, KIM YB, UDDIN MP, et al., 2014. Enhanced triterpene accumulation in *Panax ginseng* hairy roots overexpressing mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase



- and farnesyl pyrophosphate synthase [J]. ACS Synth Biol, 3(10): 773-779.
- LI YB, FAN QQ, WANG BL, et al., 2012. Advances in the study of plant farnesyl pyrophosphate synthase genes (*FPPS*) [J]. J Agric Biotechnol, 20(3): 321-330. [李永波, 樊庆琦, 王宝莲, 等, 2012. 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, 20(3): 321-330.]
- LIU MJ, YU YL, JIANG S, et al., 2018. Effect of farnesyl-pyrophosphate synthase (FPS) on the biosynthesis of saponins in *Panax japonicus* [J]. Bull Bot Res, (4): 611-618. [刘美佳, 于怡琳, 姜森, 等, 2018. 珠子参中法呢基焦磷酸合酶(FPS)对皂苷生物合成的影响研究 [J]. 植物研究, (4): 611-618.]
- LU CH, DENG WJ, ZENG JR, et al., 2020. Prokaryotic expression of *FPPS* gene from *Pogostemon cablin* and the effect of Methyl Jasmonate on the expression of *FPPS* [J]. Guihaia. DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201911032 [卢昌华, 邓文静, 曾建荣, 等, 2020. 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. DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201911032.]
- LUO QF, XU M, FENG YH, et al., 2015. Cloning and bioinformatics of chalcone synthase gene (*CHS*) in *Liriodendron tulipifera* and characterization of its tissue expression [J]. Sci Silv Sin, 51(5): 37-45. [罗群凤, 胥猛, 冯源恒, 等, 2015. 北美鹅掌楸 *LtCHS* 基因的克隆及生物信息学与组织表达特征分析 [J]. 林业科学, 51(5): 37-45.]
- MA JK, CHENG YL, ZHONG WP, et al., 2019. Full length cloning and tissue expression specific analysis of *LcKNOX3* transcription factor gene in *Liriodendron chinense* [J]. Mol Plant Breed, 17(2): 101-108. [马际凯, 成彦丽, 仲维平, 等, 2019. 鹅掌楸 *LcKNOX3* 转录因子基因全长克隆及组织表达特异性分析 [J]. 分子植物育种, 17(2): 101-108.]
- MATSUSHITA Y, KANG W, CHARLWOOD BV, 1996. Cloning and analysis of a cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from *Artemisia annua* [J]. Gene, 172(2): 207-209.
- QIU JF, 2008. Study on the *Antioxidant* and the fresh-keeping activity of virgin mary fruit [C]. Nanjing: Nanjing Forestry University. [邱金芬, 2008. 四中含笑挥发油的抗氧化及其对圣女果的保鲜活性研究 [C]. 南京: 南京林业大学.]
- RUAN QM, CAO XJ, SUN HP, et al., 2016. Cloning and sequence analyzing of farnesyl pyrophosphate synthase from *Hedera helix* [J]. J Hunan Agric Univ (Nat Sci Ed), 42(2): 136-141. [阮琴妹, 曹雄军, 孙化鹏, 等, 2016. 洋常春藤法呢基焦磷酸合酶基因的克隆与序列分析 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 42(2): 136-141.]
- TU Z, HAO Z, ZHONG W, et al., 2019. Identification of suitable reference genes for RT-qPCR assays in *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg [J]. Forests, 10(5): 441-456.
- WANG BY, YANG YX, RUN D, et al., 2012. Effect of over-expression of farnesyl pyrophosphate synthase (*fps*) gene on biosynthesis of carotenoids in tobacco [J]. Acta Tab Sin, 18(2): 44-48. [王冰莹, 杨永霞, 闰鼎, 等, 2008. *fps* 基因过量表达对烟叶类胡萝卜素生物合成的影响 [J]. 中国烟草学报, 18(2): 44-48.]
- WANG YC, MIAOZQ, TANG KX, 2010. Molecular cloning and functional expression analysis of a new gene encoding geranylgeranyl-diphosphate synthase from hazel (*Corylus avellana* L. Gasaway) [J]. Mol Biol Rep, 37(7): 3439-3444.
- XIANG L, ZHAO K, CHEN L, 2010. Molecular cloning and expression of *Chimonanthus praecox* farnesyl pyrophosphate synthase gene and its possible involvement in the biosynthesis of floral volatile sesquiterpenoids [J]. Plant Physiol Biochem, 48(10-11): 845-850.
- ZHANG YY, SONG L, LIU W, et al., 2018. Cloning and bioinformatic analysis of *FPPS* gene from *Cinnamomum camphora* [J]. Mol Plant Breed, 16(19): 6276-6281. [张瑶瑶, 宋丽, 刘伟, 等, 2018. 香樟 *FPPS* 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 16(19): 6276-6281.]
- ZHU H, 2017. Cloning and gene expression analysis of *Grifola frondosa* farnesyl diphosphate synthase gene sequence [C]. Changchun: Jilin Agricultural University. [朱晗, 2017. 灰树花法呢基焦磷酸合酶基因序列克隆及表达分析 [C]. 长春: 吉林农业大学.]

(责任编辑 何永艳)