

党参 CpPMI1 基因的克隆与表达分析

王亚榕 王晓林 吉姣姣 曹守波 冯琪 高建平*

山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

摘要 磷酸甘露糖异构酶 1(phosphomannose isomerase, PMI1)催化果糖-6-磷酸(Fru-6-P)与甘露糖-6-磷酸(Man-6-P)之间的转化反应,参与党参多糖合成前体物质 GDP-甘露糖的合成,在多糖合成中发挥重要作用。本研究依据党参 *Codonopsis pilosula* 转录组数据中 PMI1 基因序列信息,设计特异性引物,克隆得到了党参 PMI1 基因全长,命名为 CpPMI1。通过生物信息学、原核表达以及 qRT-PCR 技术分析 CpPMI1 基因的表达与党参多糖合成之间的相关性。结果显示, CpPMI1 基因包含 1371 bp 的开放阅读框(ORF),编码 456 个氨基酸。蛋白理化性质分析预测其为疏水性非跨膜蛋白,有信号肽,含多个糖基化位点,结合蛋白保守结构域预测分析,该蛋白属于 cupin 超家族,且亚细胞定位于细胞质中。通过氨基酸序列比对及系统进化树分析,发现党参 PMI1 与其他物种的 PMI1 具有高度相似性,且同茄科植物番茄(*Solanum lycopersicum*)具有高度同源性。原核表达研究显示, CpPMI1 融合蛋白大小约为 50 kDa,同预测结果相近,目的蛋白为包涵体; qRT-PCR 结果表明, CpPMI1 基因具有时空表达特异性,从拉蔓期到花铃期、花期、结果期 CpPMI1 基因表达量呈逐渐降低趋势,差异显著($P < 0.05$),采挖期基因表达量显著升高,但是与花铃期相比,差异不显著,且均显著低于拉蔓期($P < 0.05$)。本文从党参中克隆得到 CpPMI1 基因,其表达水平与党参多糖含量高度相关,为进一步研究 CpPMI1 基因功能及药用植物中多糖类化合物生物合成途径的解析奠定了基础。

关键词: 党参; CpPMI1; 基因克隆; 生物信息学; 原核表达

1 方法

1.1 CpPMI1 基因全长 cDNA 的扩增

1.1.1 党参总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

按照康为世纪 Trizol 总 RNA 提取试剂说明书进行党参根系总 RNA 的提取,并反转录合成 cDNA。依据转录组文库中 CpPMI1 的基因序列分析,利用 Primer premier5.0 设计相关特异性引物并送生工合成。

1.1.2 CpPMI1 基因的克隆

以采挖期党参根系 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,配置反应体系: Ex Taq0.1 μ L, 10 \times Ex Taq Buffer 2.0 μ L, dNTP Mixture 1.6 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹CpPMI1 (F) 0.5 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹CpPMI1 (R) 0.5 μ L, 根系 cDNA 模板 1.0 μ L, ddH₂O 14.3 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C, 5min; 94 $^{\circ}$ C, 1min; 55 $^{\circ}$ C, 1min; 72 $^{\circ}$ C, 2min; 72 $^{\circ}$ C, 10min; 35 个循环; 10 $^{\circ}$ C 保存。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,利用胶回收试剂盒纯化回收目的条带。

1.1.3 CpPMI1 基因的 TA 克隆及鉴定

将上述目的片段连接至 pMDTM18-T 载体,所得重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布在含有 100 mg \cdot L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 倒置黑暗培养 13~16h。挑取单菌落,经菌液 PCR 和质粒 PCR 双重鉴定均为阳性后,将阳性菌液及质粒送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行双向测序。

2 讨论

PMI 催化可逆反应 D-Fru-6-P \rightleftharpoons D-Man-6-P, 其中, D-Fru-6-P 由糖酵解产生, D-Man-6-P 经一系列反应可生成党参多糖前体物质 GDP-甘露糖,从而进入多糖合成调控网络,因而 PMI 连接了糖酵解和多糖合成过程。此外, GDP-D-甘露糖还参与植物抗坏血酸(AsA)、细胞壁、糖基化蛋白、脂蛋白、糖基磷脂酰肌醇锚蛋白等的生物合成, PMI1 是这些合成通路中第一个重要的酶。目前已在甜橙(XP_006482242.1)、胡杨(XP_011035071.1)、桃(AGH25529.1)、甜瓜

(XP_008457018.1)、小豆(BAT82985.1)、番茄(XP_004233489.1)、白菜(AEJ89929.1)、拟南芥(BAD44244.1)等植物中发现,而在党参中尚未见报道。

本文从党参中首次克隆得到 CpPMI1 基因,全长 1534bp,包含 1371bp 的 ORF,编码 456 个氨基酸,预测编码蛋白的相对分子质量为 50.2kDa。

通过对 CpPMI1 进行生物信息学分析发现, CpPMI1 蛋白具有保守的 PMI1 催化位点,属于类 cupin 家族。Dunwell、Hewitson 等报道 PMI 属于 cupin family,进一步说明所克隆序列为 PMI1 基因。PMI 有三种,第一种类型为依赖于 Zn²⁺ 的单功能酶,第二种类型为双功能酶,除具有 type 1 的功能外,同时还具有 GDP-甘露糖焦磷酸化酶的活性,能利用 Zn²⁺、Co²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Ni²⁺ 等作金属辅因子;第三种类型与前两种几乎没有同源性,是单功能酶植物中多为 PMI1,本文克隆出的 PMI 有 PMI1 活性位点,三维结构预测以依赖于 Zn²⁺ 的 PMI1 为模型,证明克隆得到的为 type1PMI 基因。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2015.
 - [2] 针娟, 高建平, 曹玲亚. 党参多糖含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(03):498-500.
 - [3] 张向东, 高建平, 曹玲亚, 针娟. 中药党参资源及生产现状[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(03):496-498.
 - [4] Gao JP, Wang D, Cao L Y, et al. Transcriptome sequencing of *Codonopsis pilosula* and identification of candidate genes involved in polysaccharide biosynthesis[J]. Plos One, 2015, 10(2):e0117342.
 - [5] 张亚兰, 王绪敏, 王大鹏, 等. 藻类磷酸甘露糖异构酶基因的序列结构特点及系统进化分析[J]. 海洋湖沼通报, 2013, (1):75-84.
- 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2018YFC1706301); 国家重点基础研究发展计划(2019YFC1710800); 山西省重点研发计划重点项目(201603D3111005)。