

越南参变种异戊烯基焦磷酸异构酶基因的克隆与功能研究

王一博, 管丽娜, 曹小青, 王 雪, 程景平, 王宝婕, 徐福荣*, 马晓惠*

(云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 异戊烯基焦磷酸异构酶 (isopentenyl diphosphate isomerase, IDI) 是调控萜类生物合成的关键酶, 在人参皂苷生物合成过程中发挥着重要作用。本研究以越南参变种 (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*) 为材料, 基于已构建的转录组数据, 筛选并克隆出 2 条 IDI 基因, 分别为 *PvfIDI1* (GenBank 登录号 MZ736417) 和 *PvfIDI2* (GenBank 登录号 MZ736418)。生物信息学分析表明, *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 均为 924 bp, 编码 307 个氨基酸, 分子质量分别为 34.84 kDa 和 34.66 kDa, 理论等电点分别为 6.01 和 5.66, 均具有 TNTCCSHPL 和 WGEHELDY 两个保守序列。系统进化分析显示, *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 与三七 IDI 的亲缘关系最近。表达分析表明, *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 基因在越南参变种根、根茎、茎和叶中均有表达, *PvfIDI1* 在根茎中表达量最高, *PvfIDI2* 在茎中表达量最高。在大肠杆菌中成功表达其重组蛋白, 功能显色实验表明, *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 能促进番茄红素的积累, 说明 *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 编码有功能的 IDI 蛋白。*PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 的克隆及功能研究为 IDI 的进一步研究及利用 IDI 基因调控越南参变种中人参皂苷生物合成奠定了基础。

关键词: 越南参变种; 异戊烯基焦磷酸酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 功能显色

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)12-3362-08

Cloning and functional characterization of isopentenyl diphosphate isomerase genes from *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*

WANG Yi-bo, GUAN Li-na, CAO Xiao-qing, WANG Xue, CHENG Jing-ping, WANG Bao-jie,
XU Fu-rong*, MA Xiao-hui*

(School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: Isopentenyl diphosphate isomerase (IDI) is a key enzyme in the regulation of triterpenes biosynthesis and plays an important role in ginsenoside biosynthesis. In this study, two IDI genes, *PvfIDI1* (GenBank No. MZ736417) and *PvfIDI2* (GenBank No. MZ736418) were cloned from *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*. The open reading frame of both *PvfIDI1* and *PvfIDI2* was 924 bp encoding 307 amino acids. The molecular weights of *PvfIDI1* and *PvfIDI2* were 34.84 kDa and 34.66 kDa, respectively, with theoretical pIs of 6.01 and 5.66. Bioinformatic analysis indicated that *PvfIDI1* and *PvfIDI2* contained two conserved sequences: TNTCCSHPL and WGEHELDY. Phylogenetic analysis showed that *PvfIDI1* and *PvfIDI2* were closely related to *Panax notoginseng* IDI. Expression analysis showed that both *PvfIDI1* and *PvfIDI2* genes are expressed in root, rhizome, stem and leaf of *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*. However, *PvfIDI1* is highly expressed in the rhizome and *PvfIDI2* is highly expressed in the stem. *PvfIDI1* and *PvfIDI2* recombinant proteins were expressed in *E. coli*; a functional coloration experiment showed that *PvfIDI1* and *PvfIDI2* could promote the accumulation of lycopene, indicating that both

收稿日期: 2021-07-06; 修回日期: 2021-08-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760690); 云南省应用基础研究计划项目 (2018FB144); 中医联合专项资助项目 [2019FF002(-059)]; 中央本级重大增减支项目 (2060302).

*通讯作者 Tel: 13759178255, E-mail: xfrong99@163.com;

Tel: 13668710904, E-mail: maxiaohui1988@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0994

PvfIDI1 and *PvfIDI2* encode functional IDI enzymes. The cloning and functional studies on *PvfIDI1* and *PvfIDI2* provide a foundation for the further study of IDI and the regulation of ginsenoside biosynthesis in *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*.

Key words: *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*; isopentenyl diphosphate isomerase; gene cloning; bioinformatic analysis; functional coloration

越南参变种 (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), 俗称野三七, 为五加科人参属多年生植物, 发现于云南省红河州金平苗族瑶族傣族自治县, 是我国重要的药用植物资源^[1]。人参皂苷是越南参变种的活性成分, 其在越南参变种的总含量超过 10%^[2]。人参皂苷具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节等活性^[3], 在疾病治疗过程中发挥着重要作用。人参皂苷为三萜类化合物, 异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 及其异构体二甲基丙烯基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 为其生物合成的重要前体化合物。IPP 在生物体内主要经位于细胞质中的甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和质体中的 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径合成, 其在异戊烯基焦磷酸异构酶 (isopentenyl diphosphate isomerase, IDI/IPI) 的催化作用下和 DMAPP 进行互相转化。IDI 作为重要的调控萜类化合物生成的调节因子, 影响 IPP 和 DMAPP 的稳态比例, 进一步影响萜类化合物下游产物的生物合成^[4]。目前已对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)、雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*)、海岛棉 (*Gossypium barbadense*)、茶树 (*Camellia sinensis*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 等多种植物的 IDI 基因进行克隆及相关研究, 在表达了番茄红素生物合成关键酶基因的大肠杆菌中表达植物 IDI 基因, 番茄红素的积累量明显增加, 说明植物 IDI 能促进番茄红素的积累^[5-10]。IDI 与越南参变种中人参皂苷生物合成密切相关, 然而, 尚未有越南参变种中 IDI 基因的相关报道。

本研究基于越南参变种转录组数据, 筛选并克隆获得两条 IDI 基因, 利用生物学信息学软件对其编码蛋白的理化性质、跨膜结构域、蛋白结构、系统进化关系等进行分析, 采用实时荧光定量 PCR 分析其在越南参变种不同器官的表达情况, 并在大肠杆菌中异源表达验证其功能, 为今后利用 IDI 基因调控越南参变种中人参三萜皂苷生物合成奠定基础。

材料与amp;方法

材料 实验所用植物材料采自云南省红河州金平苗族瑶族傣族自治县, 经 DNA 条形码技术检测 18S

rRNA 基因和叶绿体 *matK* 基因^[1], 确定其为越南参变种 (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*)。样品冲洗干净, 经液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱。

DH5 α Chemically Competent Cell 购自翌圣生物科技 (上海) 有限公司; BL21 (DE3) Chemically Competent Cell 和 *Trans1-Blue* Chemically Competent Cell 均购自北京全式金生物技术有限公司。pCold GST DNA 购自宝生物工程有限公司; pTrc-*AtIDI* 和 pAC-LYC 由 Francis X Cunningham Jr. (Gantt) (美国马里兰州学院马里兰大学) 教授惠赠。

总 RNA 提取及 cDNA 合成 采用 Trizol 法分别提取越南参变种根、茎、叶和根茎的总 RNA, 用超微量紫外可见分光光度计 (DS-11, 美国 DENOVIKING) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, 用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (perfect real time) (TaKaRa) 将 RNA 反转录为 cDNA, -20 °C 保存备用。

基因克隆 分析课题组前期测序得到的越南参变种转录组数据, 转录组中共有 14 条序列注释为 IDI 基因, 通过 NCBI 在线序列比对和 ORF 分析最终获得 2 条具有完整开放阅读框的 IDI 候选基因。利用 Primer Premier 5.0 软件设计 IDI 基因全长无缝克隆特异性引物 (表 1)。以越南参变种根 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: PrimeSTAR HS (Premix) 25 μ L、正向和反向引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 1 μ L、cDNA 1 μ L、双蒸水 (ddH₂O) 22 μ L。反应程序: 94 °C 5 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 60 s; 34 个循环; 72 °C 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, PCR 产物纯化后连入原核表达载体 pCold GST DNA, 转化 DH5 α Chemically Competent Cell 感受态细胞, 于含氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) (100 mg·L⁻¹) 的 LB 平板上 37 °C 培养 12~16 h。挑取单克隆进行菌落 PCR 验证, 阳性结果送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。将验证正确的重组质粒命名为 pCold GST DNA-*PvfIDI1* 和 pCold GST DNA-*PvfIDI2*。

生物信息学分析 利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 在线分析 *PvfIDIs* 基因的 ORF 和同源性; 利用 ExPASy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *PvfIDIs* 蛋白的理化性

质; 利用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析 PvfIDIs 蛋白的跨膜区; 利用 SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 进行信号肽分析; 用 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 预测亚细胞定位; 使用 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 分析结构功能域; 使用 SOMPA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html) 预测蛋白的二级结构; 使用 SWISS-MODEL (<http://swiss-model.expasy.org/>) 预测蛋白的三级结构; 利用 BioEdit 软件进行氨基酸多重序列比对; 利用 NCBI 的蛋白质序列数据库搜索同源序列, 通过 MEGA6.0 构建系统进化树, bootstrap 为 1 000。

表达分析 根据克隆得到的 *PvfID1* 和 *PvfID2* 序列设计实时荧光定量 PCR 引物 (表 1), 以越南参变种根、茎、叶和根茎的 cDNA 作为模板。以 *ACT1*^[11] 作为内参基因, 采用 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 进行实时荧光定量 PCR 反应, 反应在 Roche LightCycler® 96 实时荧光 PCR 仪上进行。反应体系 20 μ L, 包括 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μ L、cDNA 2 μ L、正向反向引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 1 μ L 以及 ddH₂O 6 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 1 s。共设 3 个生物学重复, 每个样品设 3 个技术重复。用 LightCycler® 96 SW 软件分析结果。*PvfID1* 和 *PvfID2* 的相对表达量用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行计算, 在 SPSS 软件中使用 Duncan's multiple range test ($P < 0.05$) 分析 4 个部位中表达差异的显著性。

PvfIDIs 重组蛋白表达 将 pCold GST DNA-*PvfID1* 和 pCold GST DNA-*PvfID2* 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) Chemically Competent Cell, 挑取单克隆于含 Amp (100 mg·L⁻¹) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、250 r·min⁻¹ 培

养至吸光度 A_{600} 为 0.6~1.0, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1 mmol·L⁻¹, 15 $^{\circ}$ C 诱导培养 15 h。4 $^{\circ}$ C 离心收集菌体, 加入 PBS 缓冲液进行复溶, 在功率为 120 W, 5 s 超声/8 s 停歇的超声条件下低温超声破碎至液体澄清, 4 $^{\circ}$ C 离心分别收集上清和沉淀进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳分析。转化 pCold GST DNA 的 BL21 (DE3) 进行随进行实验作为对照。

功能显色 用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切表达载体 pTrc-*AtIDI*, 切胶回收获得链状 pTrc 载体; 以重组质粒 pCold GST DNA-*PvfID1* 和 pCold GST DNA-*PvfID2* 为模板, 用 pTrc-*PvfID1*-F/R 和 pTrc-*PvfID2*-F/R 为引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 纯化后用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 进行酶切, 纯化后与链状 pTrc 载体进行连接, 连接产物转化感受态细胞 Trans1-Blue Chemically Competent Cell, 于含 Amp (100 mg·L⁻¹) 的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 菌落 PCR 验证并送测序, 将测序结果正确的重组质粒命名为 pTrc-*PvfID1* 和 pTrc-*PvfID2*。将质粒 pTrc-pTrc-*AtIDI*、pTrc-*PvfID1* 和 pTrc-*PvfID2* 分别与 pAC-LYC 共转化 Trans1-Blue 感受态细胞, 于含 Amp (100 mg·L⁻¹) 和氯霉素 (chloramphenicol, Cm) (20 mg·L⁻¹) 的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。同时将 pAC-LYC 转化 Trans1-Blue 感受态细胞, 于含 Cm (20 mg·L⁻¹) 的 LB 平板上培养。将菌落 PCR 验证正确的单克隆点于含 Amp (100 mg·L⁻¹) 和 Cm (20 mg·L⁻¹) 的 LB 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 3~4 天, 观察菌斑的颜色变化。

结果与分析

1 *PvfID1* 和 *PvfID2* 基因的克隆

以越南参变种根的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, *PvfID1* 和 *PvfID2* 在 1 000 bp 处均有单一明亮的条带 (图 1), 与转录组中

Table 1 Primers of *PvfIDIs* used for cloning, vector construction and quantitative analysis

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Function
pCold- <i>PvfID1</i> -F	GGTACCCTCGAGGGATCCATGTCAACCACAATCCTTTTC	Cloning and vector construction (pCold-GST-DNA) of <i>PvfID1</i>
pCold- <i>PvfID1</i> -R	TCTAGACTGCAGGTCGACTCATATCAATTTGTGAATAATTTTC	
pCold- <i>PvfID2</i> -F	GGTACCCTCGAGGGATCCATGTCAACCACATCCCCTTTTCAAG	Cloning and vector construction (pCold-GST-DNA) of <i>PvfID2</i>
pCold- <i>PvfID2</i> -R	TCTAGACTGCAGGTCGACTCATGTCAATTTGTGAATAGTTTTTC	
<i>PvfID1</i> -qRT-F	GTGTCGTTGGCCATGATACT	Quantitative analysis of <i>PvfID1</i>
<i>PvfID1</i> -qRT-R	TGCTGAAGGAGCAACTCATATT	
<i>PvfID2</i> -qRT-F	CTGCCAAATCCAAGTCCAAATC	Quantitative analysis of <i>PvfID2</i>
<i>PvfID2</i> -qRT-R	ACACGAGGAGAGAGAAGAGATAG	
<i>ACT1</i> -F	GATTCCGTTGCCAGAAGTA	Quantitative analysis of <i>PvfACT1</i>
<i>ACT1</i> -R	TCCTGATATCAACATCGCACTT	
pTrc- <i>PvfID1</i> -F	GGGGTACCATGTCAACCACAATCCTTTT	Vector construction (pTrc) of <i>PvfID1</i>
pTrc- <i>PvfID1</i> -R	CGGGATCCTCATATCAATTTGTGAATAATT	
pTrc- <i>PvfID2</i> -F	GGGGTACCATGTCAACCACATCCCCTTT	Vector construction (pTrc) of <i>PvfID2</i>
pTrc- <i>PvfID2</i> -R	CGGGATCCTCATGTCAATTTGTGAATAGTT	

IDI 大小一致, 将 PCR 产物连入表达载体 pCold GST DNA, 获得重组质粒 pCold GST DNA-*PvfIDI1* 和 pCold GST DNA-*PvfIDI2*, 测序结果表明, *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 的 ORF 均为 924 bp, 编码 307 个氨基酸。

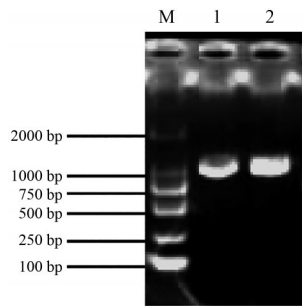


Figure 1 PCR amplification of *PvfIDI1* and *PvfIDI2*. M: DL2000 marker; 1: *PvfIDI1*; 2: *PvfIDI2*

2 *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 蛋白的生物信息学分析

2.1 理化性质分析 *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 蛋白的分子量分别为 34.84 kDa 和 34.66 kDa, 理论等电点 (pI) 分别为 6.01 和 5.66。信号肽分析表明, *PvfIDIs* 蛋白均

无信号肽, 为非分泌蛋白。跨膜结构域分析结果表明, *PvfIDIs* 蛋白均无跨膜结构, 为非膜蛋白。亚细胞定位预测结果表明, *PvfIDIs* 蛋白均定位于叶绿体上。结构域分析表明, *PvfIDIs* 均含有异戊烯基焦磷酸异构酶的结构域 (isopentenylIPP_isomerase_typ1, 95~277 aa) 和 NUDIX 水解酶域 (NUDIX_hydrolase_dom, 124~276 aa) (图 2)。蛋白二级结构预测结果显示, *PvfIDI1* 蛋白二级结构中 α -螺旋占 58.31%, 延伸链占 9.45%, β -转角占 2.61%, 无规则卷曲占 29.64%; *PvfIDI2* 蛋白二级结构中 α -螺旋占 50.16%, 延伸链占 11.07%, β -转角占 4.56%, 无规则卷曲占 34.2%。 α -螺旋和无规则卷曲是 *PvfIDIs* 蛋白的主要结构元件。用 SWISS-MODEL 预测 *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 蛋白质的三级结构, 以人类 IDI 蛋白 (2i6k.1.A) 为模板, *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 与模板序列的相似度分别为 49.34% 和 52.23%, 结果如图 3 所示。

2.2 序列比对及系统发育树分析 通过 NCBI 在线 Blast 比对发现, *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 蛋白与三七 IDI 蛋白相似度最高, 相似度分别为 95.1% 和 97.39%。利用 BioEdit 将 *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 的氨基酸序列与其他物

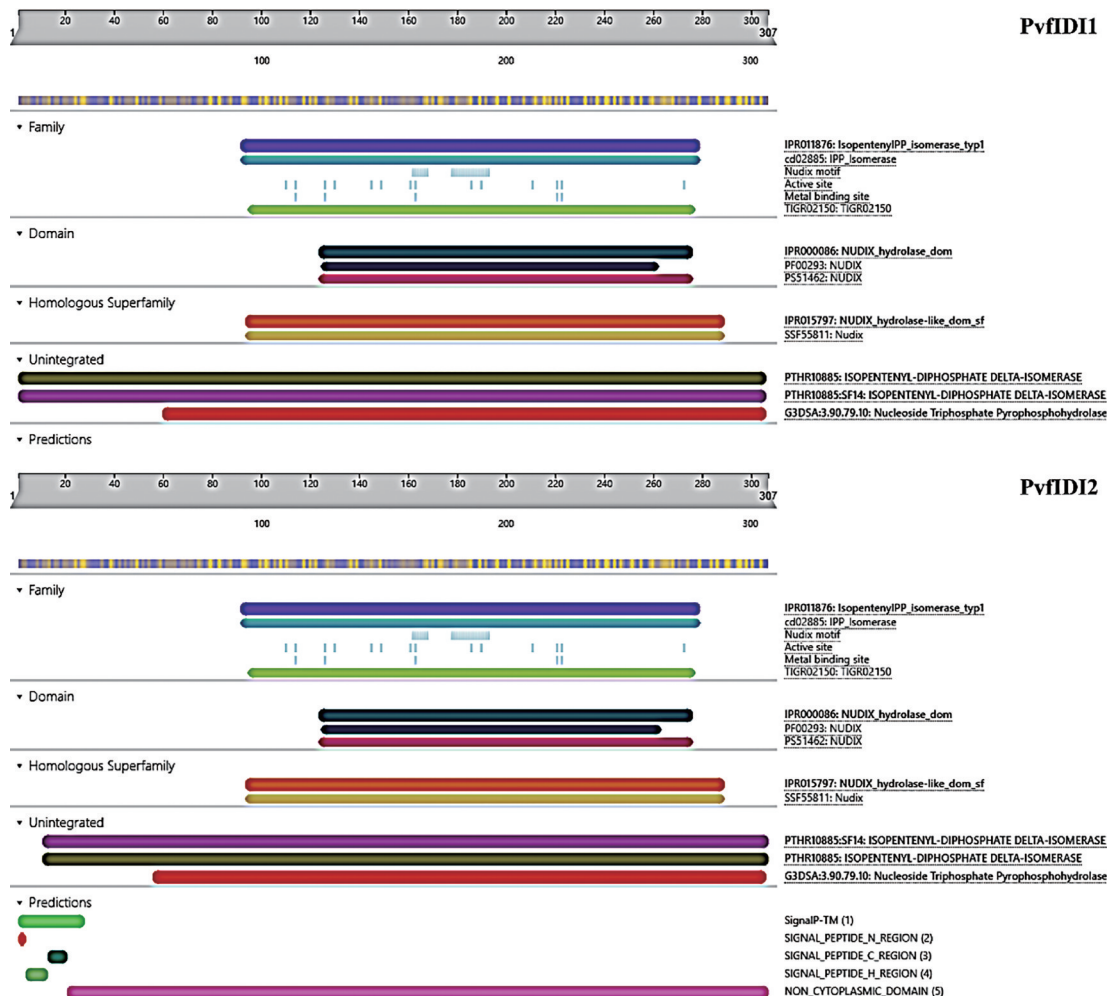


Figure 2 Functional domain prediction of *PvfIDI1* and *PvfIDI2*

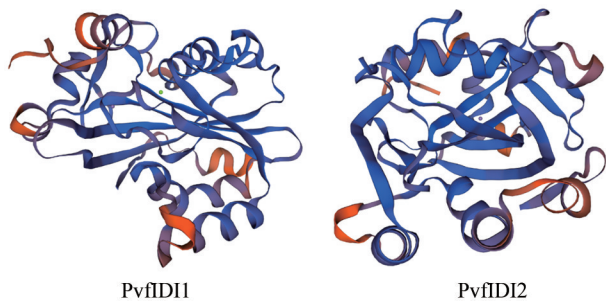


Figure 3 Three-dimensional structure analysis of PvfIDI1 and PvfIDI2

种的已报道有功能的 IDI 氨基酸序列进行多重序列比对, PvfIDIs 蛋白与其他植物的 IDI 序列相似性较高, 均具有高度保守的 TNTCCSHPL 和 WGEHELDY 序列 (图 4)。在 NCBI 中下载已报道的 IDI 蛋白序列, 用 MEGA6.0 构建系统发育树, PvfIDI1 和 PvfIDI2 与植物 IDI 聚为一支, 与三七的亲缘关系最近 (图 5)。

3 PvfIDI1 和 PvfIDI2 在越南参变种不同器官的表达分析

以 *ACT1* 为内参基因分析 *PvfIDIs* 在越南参变种根、茎、叶和根茎不同器官中的表达, 结果如图 6 所示。

PvfIDI1 和 *PvfIDI2* 在越南参变种各个器官中均有表达, *PvfIDI1* 在根茎中表达量最高, 而 *PvfIDI2* 在叶中表达量最高。*PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 在不同器官的表达量存在差异, 说明二者在越南参变种中的分工有所不同。

4 PvfIDI1 和 PvfIDI2 重组蛋白表达

IPTG 诱导转化质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3), SDS-PAGE 电泳结果 (图 7) 显示, 含重组质粒 pCold GST DNA-*PvfIDI1* 和 pCold GST DNA-*PvfIDI2* 的菌株在约 61 kDa 处均有明显蛋白条带, 与预期融合蛋白大小一致 [融合蛋白理论分子质量为 PvfIDIs 理论分子质量 (*PvfIDI1* 34.84 kDa, *PvfIDI2* 34.66 kDa) 与 GST 标签 (26 kDa) 之和], 且上清和沉淀中均出现了明显的条带, 表明 *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达。

5 功能显色验证 PvfIDI1 和 PvfIDI2 功能

将 pTrc、pTrc-*AtIDI*、pTrc-*PvfIDI1* 和 pTrc-*PvfIDI2* 分别与质粒 pAC-LYC [含有 3 个参与番茄红素合成的基因, 即香叶基香叶基焦磷酸合成酶 (*crtE*)、八氢番茄红素合成酶 (*crtB*) 和八氢番茄红素脱饱和酶 (*crtI*)] 共转化大肠杆菌 Trans1-Blue, 通过菌斑颜色判定大肠杆

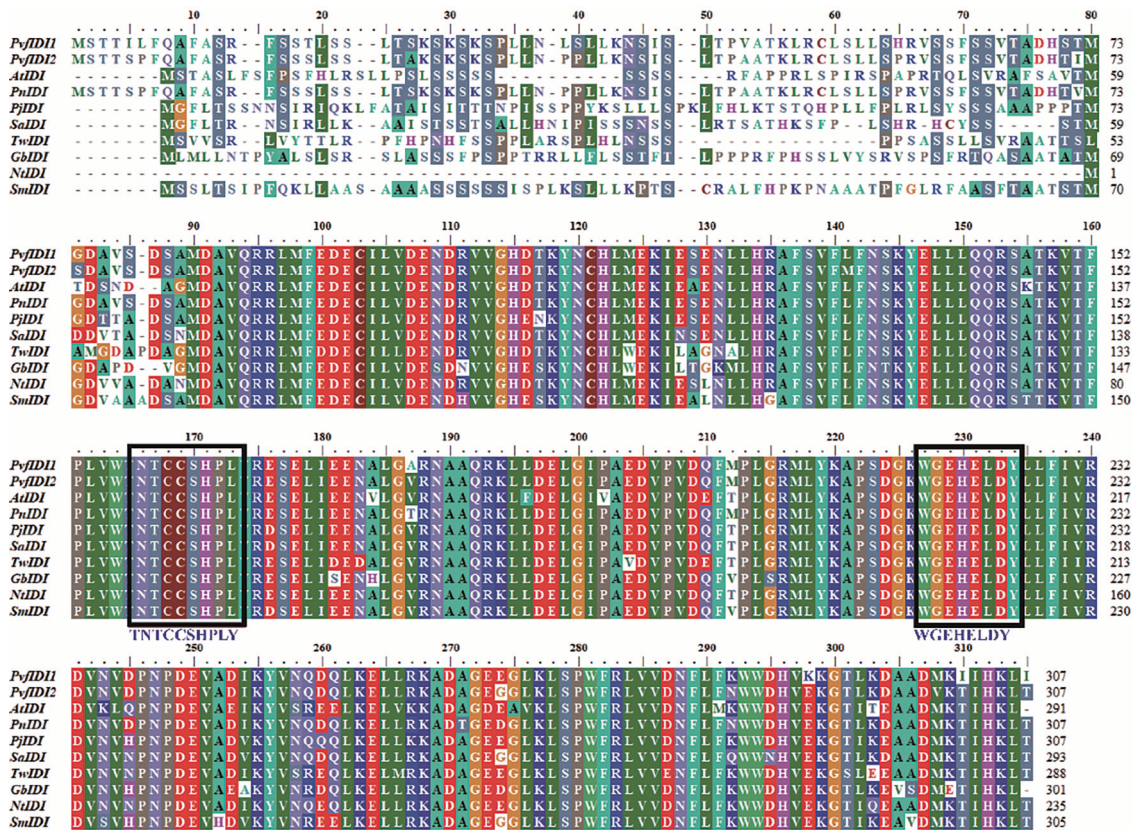


Figure 4 Multiple comparisons of IDI protein in *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* and other plants. AtIDI: *Arabidopsis thaliana* IDI (NP197148.3); PnIDI: *Panax notoginseng* IDI (AIK21782.1); PjIDI: *Phtheirospermum japonicum* IDI (GFP90055.1); SaIDI: *Striga asiatica* IDI (GER43200.1); TwIDI: *Tripterygium wilfordii* IDI (ALB26774.1); GbIDI: *Gossypium barbadense* IDI (ABI94388.1); NtIDI: *Nicotiana tomentosiformis* IDI (XP_009608528.1); SmIDI: *Salvia miltiorrhiza* IDI (ABV08818.1)

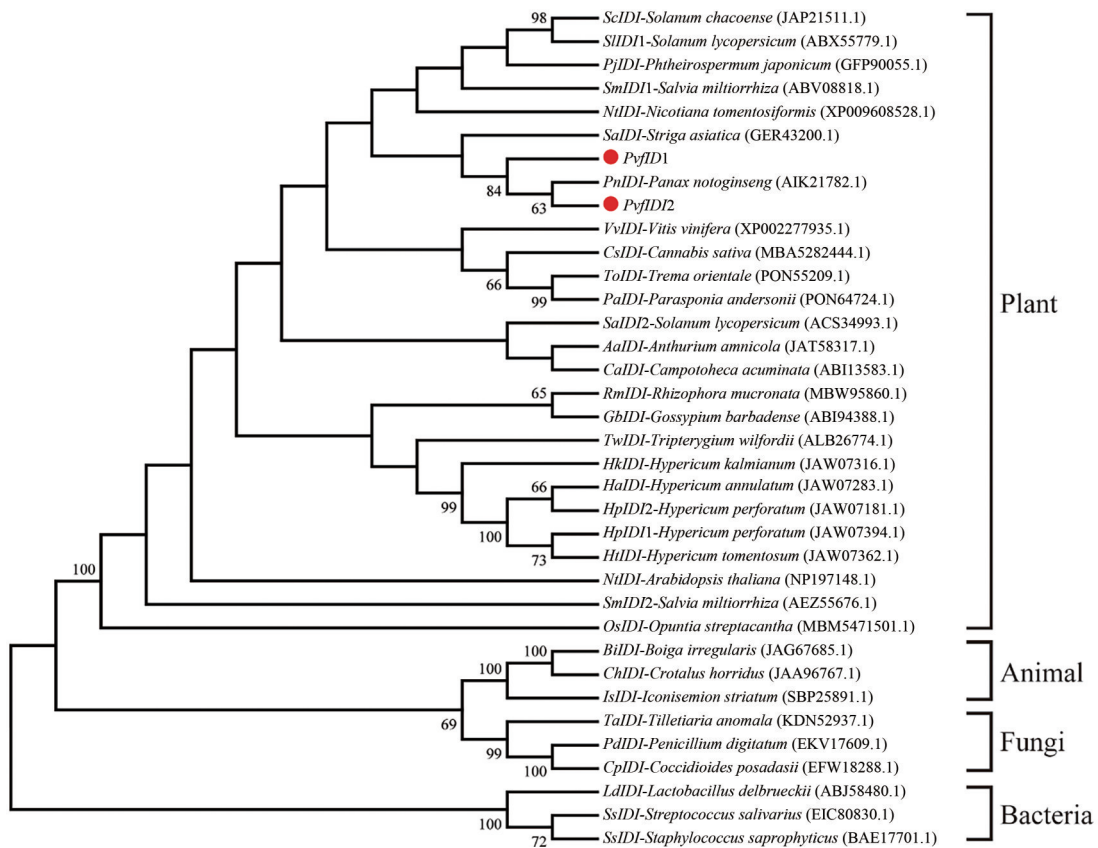


Figure 5 Phylogenetic tree of IDI protein

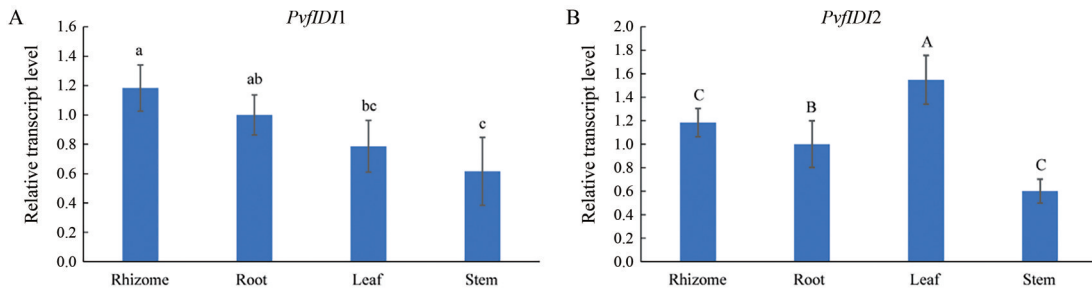


Figure 6 Expression of *PvfIDI1* (A) and *PvfIDI2* (B) in different organs of *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*. Different letters represent significant differences among the expression levels of the four organs using Duncan's multiple range test at $P < 0.05$ in SPSS

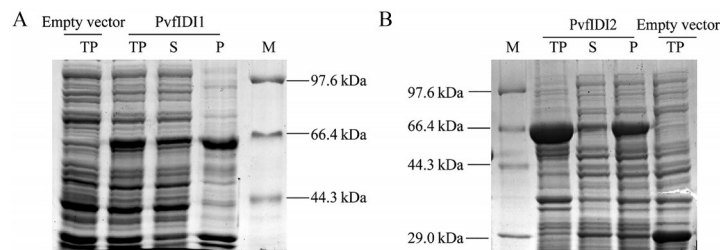


Figure 7 Expression of recombinant PvfIDI1 (A) and PvfIDI2 (B). M: Premixed protein marker (low); TP: Total protein; S: Supernate; P: Precipitate

菌中番茄红色的产量, 菌斑的颜色越深, 菌中产生的番茄红素越多。从图 8 可知, 仅转化 pAC-LYC 的菌株 (P2) 在同时含有 Amp 和 Cm 的 LB 培养基上无法生长, 含有 pTrc 和 pAC-LYC 的菌株 (P1) 能正常生长并呈现

浅粉色, 说明其能产生少量番茄红素, 含有 pAC-LYC 和 pTrc-*AtIDI*、pTrc-*PvfIDI1* 和 pTrc-*PvfIDI2* 的菌株 (分别为 At、Pvf1 和 Pvf2) 均能正常生长且呈现粉红色, 说明其产生的番茄红素较 P1 多, 可见 *AtIDI*、*PvfIDI1* 和

PvfIDI2 可以促进番茄红素的生物合成, 表明 *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 可编码有功能的 IDI 蛋白, 在番茄红素生物合成过程中发挥着重要作用。

讨论

人参皂苷是越南参变种的活性成分, 越南参变种中人参皂苷生物合成途径相关研究报道逐渐增加, Zhang 等^[12] 构建了越南参变种根的转录组文库, 并从中筛选了大量参与人参皂苷生物合成的候选基因, 目前, 已有 4 个鲨烯环氧酶基因从越南参变种中克隆获得, 并对其进行了相关生物信息学分析及原核表达^[13,14]。朱灵英等^[11] 对越南参变种实时荧光定量 PCR 内参基因进行筛选和验证, 确定越南参变种不同组织部位适宜的内参基因为 *ACT1* 和 *αTUB*, 为越南参变种中基因表达分析奠定了基础。

IPP 和 DMAPP 是萜类生物合成的重要前体, 二者的含量及比例影响萜类化合物的生物合成, IDI 调控 IPP 和 DMAPP 的相互转化, 在萜类生物合成过程中起着重要的调控作用, 植物中 *IDI* 的基因克隆及功能研究

对萜类生物合成途径研究具有重要意义。本研究从越南参变种中克隆得到两条 *IDI* 基因, 对其进行了相关生物信息学分析, 在大肠杆菌中成功表达其重组蛋白, 功能显色结果表明, *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 均能促进引入番茄红素生物合成途径重组质粒的大肠杆菌中番茄红素的积累, 说明二者编码的蛋白均具有功能。雷公藤、丹参和海岛棉等物种中仅报道了一条 *IDI* 基因, 而茶树、烟草和拟南芥等植物中均有两条相似性较高的 *IDI* 基因^[7-9], 越南参变种中也存在两条 *IDI* 基因, *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 在不同器官的表达量存在差异, 说明它们的功能不完全冗余, 在植物体内起着不同的作用, 而 *PvfIDI1* 和 *PvfIDI2* 在植物体内的功能后续可通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 等方法进行研究。

大肠杆菌由于缺乏番茄红素生物合成途径相关基因, 本身不能产生番茄红素, Francis X Cunningham Jr. 教授将番茄红素生物合成途径中香叶基香叶基焦磷酸合成酶 (*crtE*)、八氢番茄红素合成酶 (*crtB*) 和八氢番茄红素脱饱和酶 (*crtI*) 3 个基因构建至同一质粒, 形成重组质粒 pAC-LYC^[15,16], 将 pAC-LYC 转化至大肠杆菌,

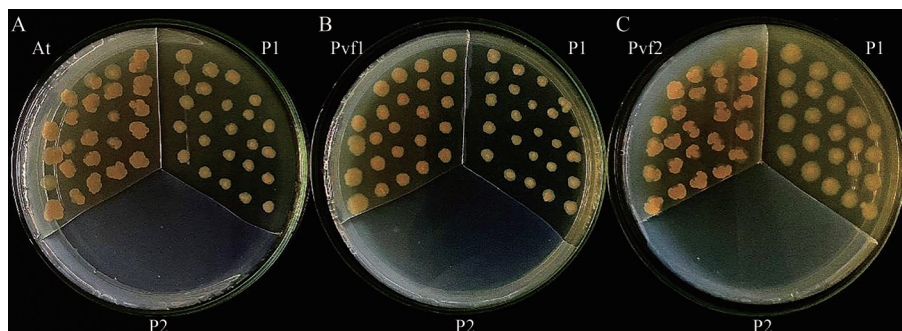


Figure 8 Functional identification of *PvfIDI1* and *PvfIDI2* in *E. coli*

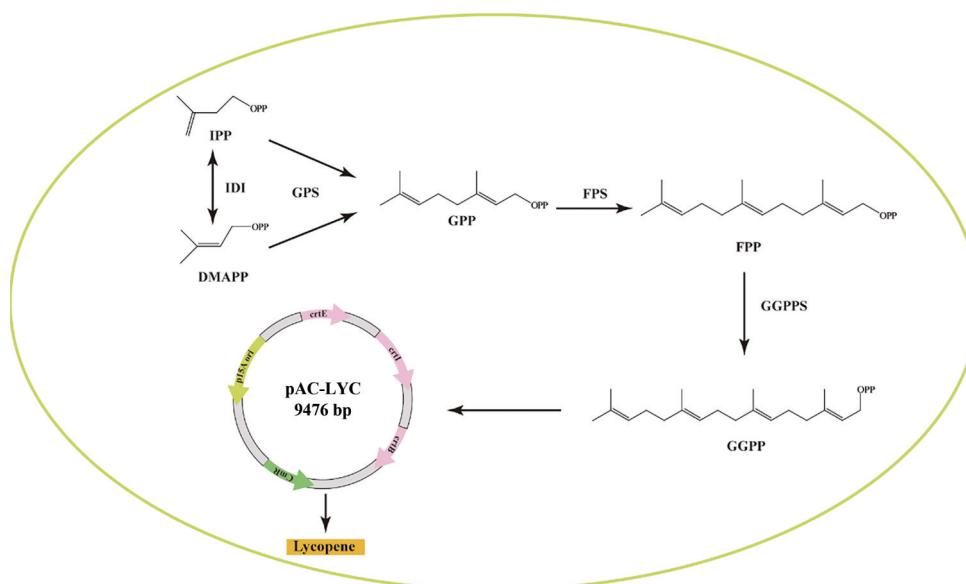


Figure 9 The biosynthetic pathway of lycopene

从而使大肠杆菌生成番茄红素(图9)。番茄红素本身具有颜色,通过菌落颜色即可初步判定番茄红素的含量。功能显色实验是验证IDI功能的有效方法,拟南芥、雷公藤、丹参等多种植物中IDI均采用此方法进行了功能研究^[5,6,9]。本研究中含有*PvfIDI1*和*PvfIDI2*的菌落颜色明显比仅含有空载的菌落深,表明*PvfIDI1*和*PvfIDI2*能促进番茄红素的积累,从而说明*PvfIDI1*和*PvfIDI2*编码的蛋白具有IDI蛋白的功能。*PvfIDI1*和*PvfIDI2*的克隆及功能研究为其他物种中IDI的研究提供了参考。

致谢:感谢美国马里兰州学院马里兰大学Francis X Cunningham Jr. (Gantt)教授惠赠实验所用载体,感谢中国中医科学院中药资源中心郭娟研究员对论文撰写提出的宝贵意见,感谢首都医科大学高伟教授和童宇茹博士对实验的指导。

作者贡献:马晓惠、徐福荣、王一博设计研究内容;王一博、管丽娜完成实验;马晓惠、王一博、管丽娜、曹小青、王雪、程景平和王宝婕完成数据分析;王一博撰写论文初稿;马晓惠和徐福荣修改论文。

利益冲突:本文所有作者之间不存在利益冲突。

References

- [1] Zhu S, Fushimi H, Cai S, et al. A new variety of the genus *Panax* from southern Yunnan, China and its nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA gene and *matK* gene [J]. *J Jpn Bot*, 2003, 78: 86-94.
- [2] Zhu S, Zou K, Fushimi H, et al. Comparative study on triterpene saponins of ginseng drugs [J]. *Planta Med*, 2004, 70: 666-677.
- [3] Christensen LP. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2009, 55: 1-99.
- [4] Nagegowda DA. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584: 2965-2973.
- [5] Zhang X, Guan H, Dai Z, et al. Functional analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase of *Salvia miltiorrhiza* via color complementation and RNA interference [J]. *Molecules*, 2015, 20: 20206-20218.
- [6] Tong YR, Zhang M, Su P, et al. Cloning and functional characterization of an isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 63: 863-869.
- [7] Wang Y, Qiu C, Zhang F, et al. Molecular cloning, expression profiling and functional analyses of a cDNA encoding isopentenyl diphosphate isomerase from *Gossypium barbadense* [J]. *Bioscience Rep*, 2009, 29: 11-119.
- [8] Chen D, Wang P, Chen D, et al. Cloning and expression of CsIDI1 and CsIDI2 in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Acta Bot Boreali-Occid Sin* (西北植物学报), 2018, 38: 800-807.
- [9] Phillips MA, D'Auria JC, Gershenzon J, et al. The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 677-696.
- [10] Yan N, Zhang H, Zhang Z, et al. Organ-and growing stage-specific expression of solanesol biosynthesis genes in *Nicotiana tabacum* reveals their association with solanesol content [J]. *Molecules*, 2016, 21: 1536.
- [11] Zhu LY, Wang YB, Wang BJ, et al. Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学报), 2020, 56: 327-335.
- [12] Zhang G, Ma CH, Zhang J, et al. Transcriptome analysis of *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus* discovers putative ocotillol-type ginsenosides biosynthesis genes and genetic markers [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 159.
- [13] Wang BJ, Zhu LY, Zhou QQ, et al. Cloning and prokaryotic expression of squalene epoxidase gene from *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2019, 25: 147-153.
- [14] Ma CH, Jiang NH, Deng MH, et al. Cloning and characterization of three squalene epoxidase genes in *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus*, a rare medicinal plant with high content of ocotillol-type ginsenosides [J]. *Pak J Bot*, 2016, 48: 2453-2465.
- [15] Alonso-Gutierrez J, Chan R, Bath T, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production [J]. *Metab Eng*, 2013, 19: 33-41.
- [16] Cunningham FJ, Sun Z, Chamovitz D, et al. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942 [J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 1107-1121.