

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.04.004

欧阳蒲月, 刘永亮, 梁永枢, 等. 广藿香八氢番茄红素合成酶 *PcPSY1* 基因克隆和序列分析 [J]. 广西植物, 2013, 33(4): 449–455

Ouyang PY, Liu YL, Liang YS, et al. Cloning and sequential analysis of phytoene synthase (*PcPSY1*) gene in *Pogostemon cablin* [J]. Guihaia, 2013, 33(4): 449–455

广藿香八氢番茄红素合成酶 *PcPSY1* 基因克隆和序列分析

欧阳蒲月¹, 刘永亮², 梁永枢¹, 曾少华³, 莫小路^{4*}

(1. 广东食品药品职业学院, 广州 510520; 2. 中国科学院 武汉植物园, 武汉 430074;
3. 中国科学院 华南植物园, 广州 510650; 4. 广东省中药研究所, 广州 510520)

摘 要: 根据已获得的广藿香转录组数据中的 *PSY* 转录本序列, 利用 Primer 3 在线设计基因全长扩增引物, 采用 RT-PCR 方法获得广藿香的八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, *PSY*) 基因。并利用在线分析平台和生物软件对该基因进行生物信息学分析。获得的广藿香 *PSY1* 基因长 1 550 bp, 编码 439 个氨基酸, 命名为 *PcPSY1*, GenBank 登录号为 KC862310; 预测了 *PcPSY1* 编码蛋白的结构与功能, 且基于 *PSY* 基因利用 NJ 法构建了与 21 个不同物种间的进化树, 进化树表明广藿香 *PcPSY1* 基因与桂花的 *PSY* 序列亲缘关系最近。成功克隆并分析广藿香 *PcPSY1* 基因的全长序列, 为进一步阐明广藿香萜类代谢途径奠定基础。

关键词: 广藿香; 八氢番茄红素合成酶; *PcPSY1* 基因; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: R931 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013) 04-0449-07

Cloning and sequential analysis of phytoene synthase (*PcPSY1*) gene in *Pogostemon cablin*

OUYANG Pu-Yue¹, LIU Yong-Liang², LIANG Yong-Shu¹,
ZENG Shao-Hua³, MO Xiao-Lu^{4*}

(1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China; 2. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 4. Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510520, China)

Abstract: Phytoene synthase (*PSY*) is a key enzyme in plant terpenoid biosynthetic pathway. According the transcriptome dataset of *Pogostemon cablin*, one unique sequence encoding *PSY* was discovered. The primers were designed according to the transcript sequence of *PcPSY1* from the *P. cablin* transcriptome dataset with Primer 3 online. The open reading frame of *PcPSY1* was cloned using RT-PCR strategy. The cDNA named as *PcPSY1* contains a 1 550 bp open reading frame and encodes a predicted protein of 439 amino acids. The GenBank accession number for this gene is KC862310. *PcPSY1* has no signal peptide. *PcPSY1* is highly homologous to other *PSY* protein in 21 different species and is more related to that from *Osmanthus fragrans*. This study cloned and analyzed mechanism of terpenoid biosynthesis in *Pogostemon cablin* plants.

Key words: *Pogostemon cablin*; phytoene synthase; *PcPSY1*; gene cloning; bioinformatical analysis

收稿日期: 2013-04-01 修回日期: 2013-06-15

基金项目: 广东省科技厅粤港关键领域重点突破项目(2009A03090101); 广州市科技计划基础研究项目([2013] 4100076); 广东食品药品职业学院课题(2012y2002)

作者简介: 欧阳蒲月(1978-), 女, 湖南邵阳人, 硕士, 讲师, 从事生物技术与药用植物资源研究, (E-mail) ouyangpy@gdzy.edu.cn.

* 通讯作者: 莫小路, 博士, 教授, 从事药用植物资源研究, (E-mail) moxl@gdzy.edu.cn.

类胡萝卜素是一系列呈现黄色、橙色和红色的萜类色素物质,存在于所有的光合器中并具有氧化的特性,但动物体内不能直接合成类胡萝卜素,必须从食物中摄取。八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, *PSY*) 主要在质体中,是类胡萝卜素生物合成途径的第一个酶(Zhu *et al.*, 2007)。目前已证实,在番茄果实(Fraser *et al.*, 2002)、油菜种子(Pal-
aia *et al.*, 2003)、薯块茎(Ducureux *et al.*, 2005)、拟南芥种子(Lindgren *et al.*, 2003)、龙胆花瓣(Zhu *et al.*, 2002)和玉米胚乳(Li *et al.*, 2008)中,*PSY* 是类胡萝卜素生物合成中的限速酶。

广藿香(*Pogostemon cablin*) 为唇形科刺蕊草属植物,是中国药典收录的重要药用植物之一,以全草入药。味辛,性微温,归脾、胃、肺经。广藿香原产于菲律宾、马来西亚、印度等国家,自宋代传入我国已有 1000 余年历史(吴友根等, 2007),是“藿香正气丸(水)”、“抗病毒口服液”等中成药以及大量医药、香料和化妆品的主要原料。广藿香的功效成分主要为萜类化合物和黄酮类化合物(Hu *et al.*, 2006; Sundaresan *et al.*, 2009)。广藿香提取物中的萜类化合物杀锥虫(Kiuchi *et al.*, 2004)、具有杀螨(Wu *et al.*, 2012)、抗流感病毒(Kiyohara *et al.*, 2012)等活性。

由于 *PSY* 是植物类胡萝卜素生物合成途径中一个限速酶(图 1),所以由 GGPP 生成八氢番茄红素这

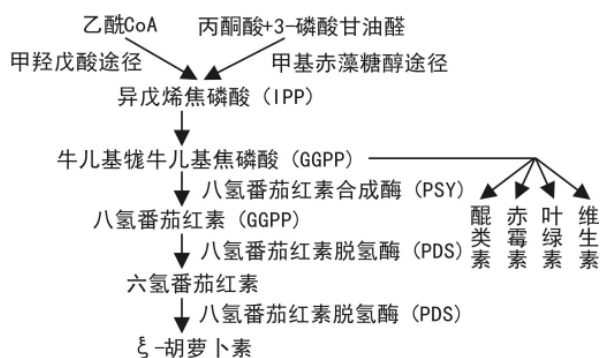


图 1 *PSY* 在类胡萝卜素合成中的位置

Fig. 1 Positions of the *PSY* gene in carotenoid synthesis

一步骤已成为类胡萝卜素代谢途径的“瓶颈”(朱长甫等, 2004)。但广藿香 *PSY* 的克隆与蛋白结构和功能方面的研究尚未见报道。本研究组在前期研究中获得大量的广藿香转录组信息,从中发现了可能参与萜类化合物中 *PSY* 基因信息。对广藿香的 *PcPSY* 基因进行克隆及生物信息学分析,为阐明广

藿香的萜类化合物生物合成途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验材料采自于广东食品药品职业学院药用植物标本园广藿香栽培地。选取海南广藿香展开幼叶及成熟黄褐色叶,迅速放入装有液氮的保温瓶中,后置于 -75°C 冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 的提取

取 -75°C 保存的幼叶及成熟叶,在 $180 \sim 200^{\circ}\text{C}$ 烘烤过的研钵中用液氮将其充分研磨,迅速倒入 DEPC 处理过的离心管中,待液氮挥发后,按 1 mL 试剂/100 mg 材料的比例加入适量的 Trizol,下面的步骤按说明书(RNA 提取试剂盒 TIANGEN DP421)进行。电泳检测总 RNA 的质量,并用紫外分光光度计(NANODROP 2000c)测定总 RNA 的浓度和纯度。

1.3 *PcPSY* 基因全长的获得

1.3.1 第一链 cDNA 的合成 初始反应体系的建立: Oligo dT(20 pmol/ μL , 广州凯基生物有限公司) 2 μL ; RNA 10 μL (嫩叶及老叶 RNA 各 5 μL); dNTPmix (25 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL ; RNase-free ddH₂O 12 μL ,将反应体系于 65°C 变性 5 min,取出后置于冰上 1 min 以上,向初始反应体系中加入下列试剂: 5 $\times$ first-strand buffer 8 μL ; 0.1 mol/L DTT 4 μL ; Super-script III 反转录酶(200 u/ μL) (Life 公司) 2 μL ; H₂O 2 μL ,再将总反应体系于 42°C 50 min, 70°C 15 min,于 PCR 仪上,进行第一链 cDNA 的合成。反转录产物 cDNA 可在 -20°C 保存。

1.3.2 基因克隆 反应体系: 3 μL 的第一链 cDNA (反转录产物稀释 10 倍) 为模板; 2.5 μL LA PCR buffer; 2 μL 正向及反向特异引物(10 mmol/L); 0.25 μL LA Taq DNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司);用无菌去离子水将体系补至 25 μL 。PCR 反应条件: 94°C 变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 57°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 30 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。结果检测: 取 PCR 产物 5 μL ,用 1% 琼脂糖电泳检测。

1.3.3 PCR 回收产物的纯化、连接、转化、克隆、测序

将上述 PCR 产物割胶,使用 Axygen 公司凝胶回收试剂盒过柱回收。回收程序依据试剂盒提供方法进行。各取 4.5 μL 回收产物,克隆到 PMD19-T 载体过夜连接。将连接产物转入 DH-5 α 大肠杆菌感

受态细胞,经涂布培养,在氯苄抗性平板上进行阳性克隆筛选,各取4~8个进行菌液PCR验证,后各取2个阳性克隆进行双向测序(广州中美泰和生物技术有限公司)。

1.3.4 序列的生物信息学分析 先将所测得的序列在NCBI数据库中进行BLAST搜索,初步确定这些基因的类别。使用ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 进行开放阅读框预测,再进行*PcPSY*基因的一系列分析:其编码蛋白的理化性质预测采用ExPASy Proteomics Server提供的在线工具ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>); *PcPSY*蛋白质结构搜索分别采用在线工具ExPASy PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>) 和美国国立生物技术信息中心(NCBI)在线工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。使用SignalP4.0Server进行分泌蛋白预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

SignalP/); 利用(<http://wolfpsort.org/>) WOLFPSORT进行蛋白定位信号预测;用<http://web.expasy.org/protscale>分析氨基酸序列/疏水性分析;<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>检测跨膜结构,使用InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/ipscan/>) 进行蛋白保守结构域搜索。采用SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质二级结构分析。采用MEGA5.1软件中内置的NJ法进行构建进化树。所有软件如无特殊说明,均采用默认参数。

2 结果与分析

2.1 广藿香 RNA 的提取

通过普通琼脂糖电泳检测RNA,结果如图2:a所示(H1为嫩叶,H2为老叶)。28S,18S的两条带清晰,其中28S RNA亮度约为18S RNA的两倍,说明

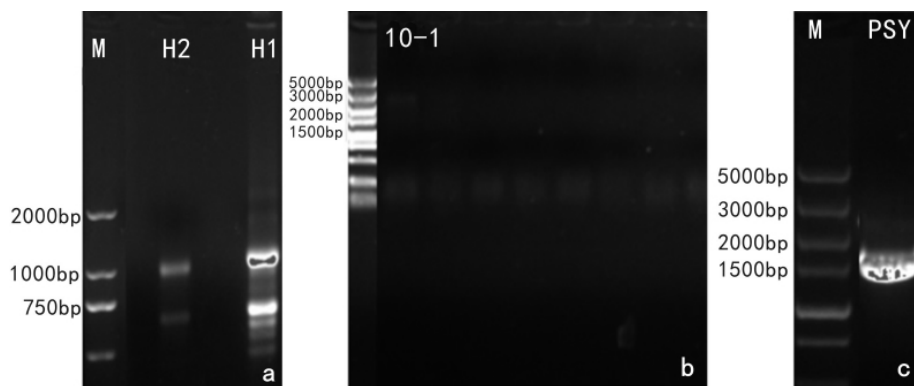


图2 凝胶电泳 a. RNA提取普通琼脂糖电泳检测图; b. *PcPSY1*阳性克隆检测结果; c. *PcPSY1*PCR产物。

Fig. 2 Gel electrophoresis a. Total RNA from Pogostemon cablin; b. *PcPSY1* PCR product; c. *PcPSY1* positive clone test results.

运用该方法所提取的广藿香叶片总RNA完整性好,几乎无降解。用紫外分光光度计NANODROP 2000c检测,H1的 A_{260} 、 A_{280} 吸收值分别为1.80、0.41,浓度为230 ng/ μ L;H2的 A_{260} 、 A_{280} 吸收值分别为1.93、0.99,浓度为563.3 ng/ μ L。

2.2 *PcPSY1* 基因的克隆

根据广藿香转录组中长为1749 bp的Uni-gene9035 phytoene synthase序列,利用ORF阅读框根据PRIMER3在线设计引物:正向引物(*PSY15'*-TTGGGTTGTTCCAAAAGTGA-3')、反向引物(*PSY25'*-AAGTGAAGGATGCCCCACTACA-3'),以广藿香老叶RNA与嫩叶RNA进行混合,以混合RNA为模板进行逆转录获得cDNA序列,利用RT-PCR扩增

得到一条1500 bp左右的条带,对于扩增所得条带进行回收、连接、转化、阳性克隆检测后进行测序后获得一条1550 bp的正确序列(图2:c),利用NCBI的ORF Finder预测该序列含有一个完整的开放总计框,长1550 bp,编码439个氨基酸,并与其它3个物种的PSY编码蛋白进行了比较(图3,图4)。将该基因命名为*PcPSY1*,GeneBank登录号为KC862310。

2.3 *PcPSY1* 基因编码蛋白特性分析

2.3.1 理化性质 *PcPSY1*预测编码569个氨基酸,利用ExPASy PROSITE对*PcPSY1*基因编码蛋白的理化性质进行预测分析。推测*PcPSY1*的分子式为 $C_{2196}H_{3477}N_{605}O_{646}S_{17}$,总分子量为49.26 KD,等电

PcPSY1	--MSVALLWVVSPTSEASYGTGFLDSVRDGSRLDSFRSIARCKNVIYSGRLSNGHK-NRRNFSSMSADLRYACLGGSSTFENGRLSLTSSLVATPAGEMTSLSEQRVYD
OfPSY1	--MSVALLWVISTTSEVSSSTGFLESVREGNRNLDSSRSISQGRNLICNGRFRGRK-YRNLSPHNSADRYFCQDKSNSGDRNLSVSSMVASPAGEMTSLSEQRVYD
NtPSY2	MSMSVALLWIVSPNSEVSGTGLDSVRDGNRVFVSSRFLARGNLMWNGRIKKGRQWRFSGSLIADSRVACLGGSRTENGSTFSVQSSLVASPAGEMTSLSEKKVYD
NtPSY1	MSMSVALLWVVSPTSEVSGTGLDSVRDGNRVFVSSRFLARGNLMWNGRIKKGR-QRWNFSGSLIADPRYSCLGGSRTENGSTFSVQSSLVASPAGEMTSLSEKKVYD
CcPSY	--MSVALLWVVLPISEVTNSIAFLPVRREGSRLDSSRFVGRGKNCLNCRLEKQKQ-QRWNSGYLNGDSRNCCLGGSRLKNRKFSPVPIPVVVSAPAGEIAMSSEQRVYD
PcPSY1	VVLKQAAALVKRKLKRNELGVKPDIVLPGLSLGLLSEAYDRCEVCAEYAKTFYLGTLMTPERRRAIWAIVVWCRRTDELVDGPNASHITPTALDRWEARLDDIFKGRPF
OfPSY1	VVLKQAAALVKRQLRSSENLEVKPDIVLPGLSLGLLSEAYDRCEVCAEYAKTFYLGTLMTPERRRAIWAIVVWCRRTDELVDGPNASHITPTALDRWEARLDDIFKGRPF
NtPSY2	VVLKQAAALVKRQLRSTDDLEVKPDIVLPGLSLGLLSEAYDRCEVCAEYAKTFYLGTLMTPERRRAIWAIVVWCRRTDELVDGPNASHITPTALDRWEARLDDIFKGRPF
NtPSY1	VVLKQAAALVKRQLRSTDELEVKPDIVLPGLSLGLLSEAYDRCEVCAEYAKTFYLGTLMTPERRRAIWAIVVWCRRTDELVDGPNASHITPTALDRWEARLDDIFKGRPF
CcPSY	VVLKQAAALVNRQLRSREDWDVKPDIVLPGLSLGLLSEAYDRCEVCAEYAKTFYLGTLMTPERRRAIWAIVVWCRRTDELVDGPNASHITPTALDRWEARLDDIFKGRPF
PcPSY1	DMLDAALADTVAFQFVDIQPFDMIEGRMDLWKSRYKTFDELYLYCYVAGTVGLMSVPMGIAPESQAPTESVYNAALALGLANQLTNILRDVGEDARRGRVILPQDE
OfPSY1	DMLDAALSDTVSKFPVDIQPFDMIEGRMDLWKSRYKTFDELYLYCYVAGTVGLMSVPMGIAPESQATTESVYNAALALGLANQLTNILRDVGEDARRGRVILPQDE
NtPSY2	DMLDAALSDTVSRFPVDIQPFDMIEGRMDLWKSRYKTFDELYLYCYVAGTVGLMSVPMGIAPESKATTESVYNAALALGLANQLTNILRDVGEDARRGRVILPQDE
NtPSY1	DMLDAALSDTVSRFPVDIQPFDMIEGRMDLWKSRYNFDLYLYCYVAGTVGLMSVPMGIAPESKATTESVYNAALALGLANQLTNILRDVGEDARRGRVILPQDE
CcPSY	DMLDAALSDTVSKFPVDIQPFDMIEGRMDLWKSRYKTFDELYLYCYVAGTVGLMSVPMGIAPESKATTESVYNAALALGLANQLTNILRDVGEDARRGRVILPQDE
PcPSY1	LAQAGLSDEDIFAGKVTDKWRIFMKQIKRARKFFDDAENGTELSASRWPVWASLLLYRQILDEIEANDYNNFTRRAYVSKPKKILALPIAYAKSLVPPSLKASSLV
OfPSY1	LAQAGLSDDDFAGKVTDKWRIFMKQIKRARKFFDDAENGTELSASRWPVWASLLLYRQILDEIEANDYNNFTRRAYVSKPKKILALPIAYAKSLVPP--SRASSPFV
NtPSY2	LAQAGLSDEDIFAGRVTDKWRIFMKQIKRARKFFDESEKGTELDASRWPVLTALLYRQILDEIEANDYNNFTRRAYVSKPKKLLTPIAYAKSLVPP--NRTSSPLA
NtPSY1	LAQAGLSDEDIFAGRVTDKWRIFMKQIKRARKFFDESEKGTELDASRWPVSTALLYRQILDEIEANDYNNFTRRAYVSKPKKLLTPIAYAKSLVPP--NRTSSPLA
CcPSY	LAQAGLSDEDIFAGKVTDKWRIFMKQIKRARKFFDEAENGTELSASRWPVWASLLLYRQILDEIEANDYNNFTRRAYVSKPKKLLALPMAYAKSLVPP--RTSSPLA
PcPSY1	KT--
OfPSY1	KA--
NtPSY2	KT--
NtPSY1	KT--
CcPSY	KMS

图3 *PcPSY* 与来源于其它三个物种 *PSY* 基因的蛋白序列比对图

桂花(AFK66771.1)、烟草(ADK25054.1, ADZ24219.1)、中粒咖啡(ABA43898.1)。

Fig. 3 Multi-alignment of *PcPSY* and other *PSY* proteins (made by MEGA5.10)*Osmanthus fragrans*(AFK66771.1), *Nicotiana tabacum*(ADK25054.1, ADZ24219.1), *Coffea canephora*(ABA43898.1)。

```

TTGGGTTGTTCCAAAAGTGAATTGACTTTAGAGGGTGGTCAATTTTATTAATAAGGAGAGAATATAAACTGATATAATTAGATAATCCTAGATTGTAGGTTGACC
1 M S V A L L W V V S P T S E A S Y G T G F L D S V R D G S R I L D S F
1 ATGCTCTGTTGCTTTGTTGTTGGGTTGTTTCCCAACTTCTGAGGCTCCTATGCACTGGATTGTTGGACTCTGTCCTGATGGAAGTCGAATCTCGATTCTTTT
36 R S I A R C K N V I Y S G R L S N G H K N R R N F S S M S A D L R Y A
106 AGGCTCTATTGCGAGGTGCAAGAAATGTGATCTATAGTGGTAGAATAGCAATGGTCATAGAATAGGAGGAATTTAGCTCTATGAGTCGACATTGAGGTATGCT
71 C L G G S T F E N G N R L S L T S S L V A T P A G E M T L S S E Q R V
211 TGTTTAGTGGTTCGACATTTGAGAATGGTAACAGGCTCTCTCTCACATCAAGTTTGGTAGCAACCCAGCAGGGGAGATGACCTTATCATCTGAACAAAGGGTT
106 Y D V V L K Q A A L V K R K L K R N E G L E V K P D I V L P G S L G L
316 TATGATGTGGTTCGAGCAAGCAGCTTTGGTAAAGAGAAAGTTGAAACGGAACGAGGGTTTGGAAAGTGAAGCCGATATTGTTCTTCTGGATCACTTGGTTTG
141 L S E A Y D R C G E V C A E Y A K T F Y L G T L M T P E R R R A I W
421 TTGAGTGAGGCTTATGATCTGTGCGAAGTATGTGCTGAATATGCCAAGACATTTTACCTTGGGACCTTGTGATGACACCGAGAGCGGAAGAGCTATCTGG
176 A I Y V W C R R T D E L V D G P N A S H I T P T A L D R W E A R L D D
526 GCAATATATGTCTGGTGCAGGAGAACCGATGAACCTTGTGACGGGCCAAATGCATCGCACATAACTCCAACGGCTTGGATAGTGGGAGGCAAGGCTGGATGAC
211 I F K G R P F D M L D A A L A D T V A Q F P V D I Q P F R D M I E G M
631 ATTTTCAAGGCCGCCCTTTTGACATGCTCGATGCTGATCCGATCTGTTGCTCAGTTTCTGTTGATATCCAGCCATTGACAGATATGATTGAGGGAATG
246 R M D L W K S R Y K T F D E L Y L Y C T Y V A G T V G L M S V P I M G
736 AGGATGGACCTGTGGAATCGAGATACAAAACCTTTGATGAGTTGTATCTGTACTGTTATTATGTGGCTGGTACGGTTGGATTAATGAGTGTGCGGATTATGGGC
281 I A P E S Q A P T E S V Y N A A L A L G L A N Q L T N I L R D V G E D
841 ATAGCACCAGGATCACAAGCTCCAACGAGAGTGTTTAATGCTGCTTTGGCATTAGGCTTTCGGAACAGTTGACCAATATACTAGAGATGTTGGAGAAGAT
316 A R R G R V Y L P Q D E L A Q A G L S D E D I F A G K V T D K W R I F
946 GCAAGAAGGGGAAGAGTGTATCTACCTCAGGACGAGTTGGCGCAGGCGGGGCTATCGGACGAGACATATTGCTGGGAAAGTGACGGATAAGTGGAGAATCTTC
351 M K K Q I K R A R K F F D D A E N G V T E L N S A S R W P V W A S L L
1051 ATGAAGAAGCAAATCAAGAGAGCAAGAAAATCTTCGATGATCGAGAGAATGGAGTGACAGAGCTCAACTCAGCCAGTCGATGGCCTGTGTGGGCGTCATTGCTG
386 L Y R Q I L D E I E A N D Y N N F T R R A Y V S K P K K I A L P I A
1156 CTGTACCGGCAGATCTGGATGAGATGAGGCGAAGCTACAACAACCTTACGCGGAGGGCGTACGTAAGCAAACCAAGAGATCATAGCTTTGCCAATTGCA
421 Y A K S L V P P L S K A S S S L V K T *
1261 TATGCAAGTCTCTTGTCTCTCCATTATCAAGGCTCATCTTCCCTTGTAAAGACATGCTGCTACCTAGAAATGGTTTATTATCAAGTTATAATTATCACATTA
ATATATATATCTTACAGGGAACACATCTTTTGTACATCATAAGGTATGACAATTCATGTAGTGGGCATCTTCACTT

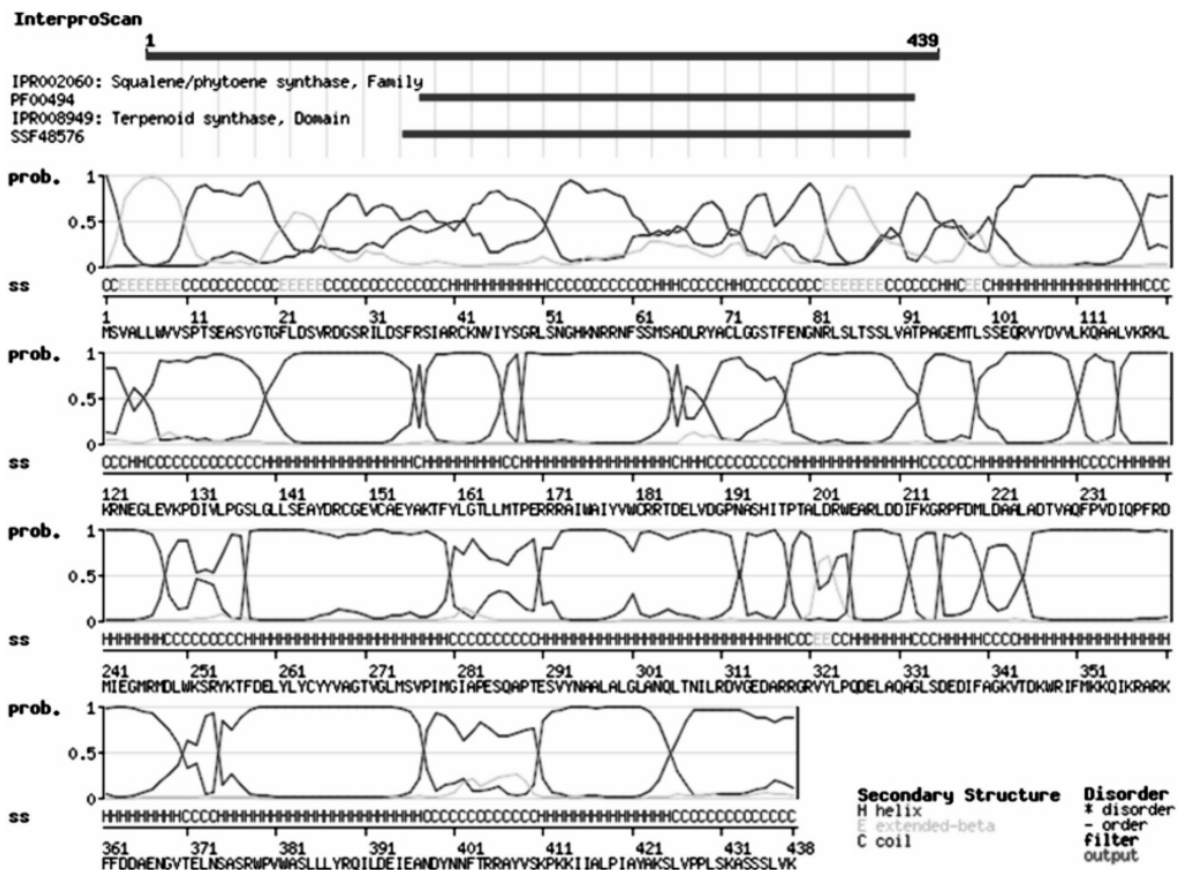
```

图4 *PcPSY* 全长 cDNA 序列及其推导氨基酸序列Fig. 4 Full-length cDNA and deduced amino acids sequence of *PcPSY*

点为 8.82; 带负电残基(Asp+Glu) 为 52, 正电残基
(Arg+Lys) 为 58。该蛋白的不稳定系数为 50.61, 脂

肪系数为 90.02, 亲水性系数为-0.206。

2.3.2 *PcPSY1* 的二级结构预测 对 *PcPSY1* 基因编

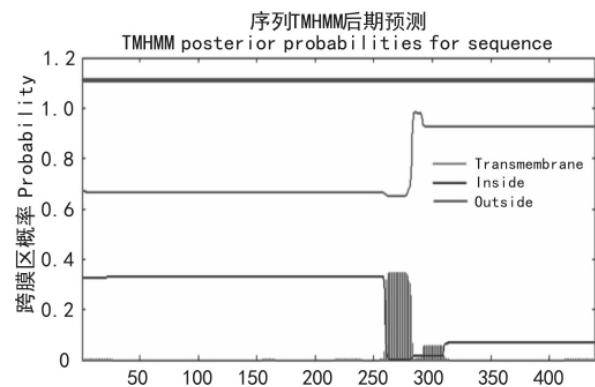
图 5 *PSY* 基因编码蛋白的二级结构预测Fig. 5 Secondary structure prediction of *PSY* gene encoding protein

码蛋白的二级结构进行预测(图 5), 可见无规则卷曲(L/C)所占比例较多, α -螺旋结构(H)与 β 片层(E)结构所占比例相当。

2.3.3 *PcPSY1* 跨膜区预测与蛋白定位信号预测
用 TMHMM 预测 *PcPSY1* 酶蛋白, 发现其部分肽链位于细胞膜上, 跨膜区较明显的位置在 216 ~ 313 aa 处。用 WOLFSORT 预测表明 *PcPSY1* 最可能定位在叶绿体中(Chlo: 10.0 nucl: 1.0 cyto: 1.0 mito: 1.0)。由此可推断该酶发挥功能的部位可能结合于生物膜上。

2.3.4 疏水性分析 应用 protscale 预测对八氢番茄红素脱氢酶蛋白的氨基酸序列/疏水性分析的结果表明, *PcPSY1* 多肽链第 5 位的亮氨酸具有最高的分值 2.467, 疏水性最强; 第 55 位的赖氨酸具有最低的分值 -3.089, 亲水性最强。整个来看, 其亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸, 为亲水蛋白(图 7)。

2.3.5 *PcPSY1* 结构域分析 通过 Prosite 数据库分析该蛋白质的结构位点, 发现 263 ~ 278 以及 299 ~ 324 为鲨烯合酶和八氢番茄红素合成酶特异识别区

图 6 *PcPSY* 酶蛋白跨膜区分析Fig. 6 Transmembrane region analysis of *PSY* gene protein

域。鲨烯合酶和八氢番茄红素合成酶的功能相似, 具有 3 个相同的保守域, 而 263 ~ 278 以及 299 ~ 324 区域是位于鲨烯合酶和八氢番茄红素合酶酶活中心的 2 个保守结构域(图 8)。

2.3.6 *PcPSY1* 基因系统进化 从 NCBI 数据库中 NCBI 的非冗余蛋白数据库(Nr)中选取与 *PcPSY1*

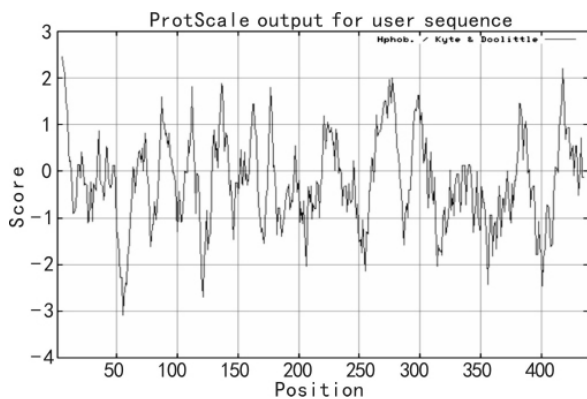


图7 PSY 酶蛋白疏水性分析

Fig. 7 Hydrophobicity profile of PSY protein

基因编码蛋白相似性较高的 22 条蛋白序列,采用 MEGA5.10 软件,内置的 NJ 法进行构建进化树。结果(图 9)表明:已克隆到的广藿香 *PcPSY1* 基因与桂

花(*Osmanthus fragrans* AFK66771.1)的 PSY 序列同源性最高,与烟草(ADK25054.1、ADZ24219.1)、观赏烟(*Nicotiana langsdorffii* × *Nicotiana sanderae* ABB29857.1)、番茄(*Solanum lycopersicum* ABR57229.1、NP_001234812.1)、中粒咖啡(ABA43898.1)、梔子(*Gardenia jasminoides* AEF59491.1)、烟草属(*Ipomoea* sp. Kenyan BAI47572.1)、黄龙胆(*Gentiana lutea* ABN04109.1、ABN04108.1)、宁夏枸杞(*Lycium barbarum* AAW88383.1)等植物的亲缘关系次之,与芒果(*Mangifera indica* AFE85918.1)、美味猕猴桃(*Actinidia deliciosa* ACO53104.1)、番木瓜(*Carica papaya* ABG72805.1)、柿树(*Diospyros kaki* ACM44688.1)、木薯(*Manihot esculenta* ACY42670.1、ACY42669.1)、葡萄(*Vitis vinifera* AFP28795.1)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula* XP_

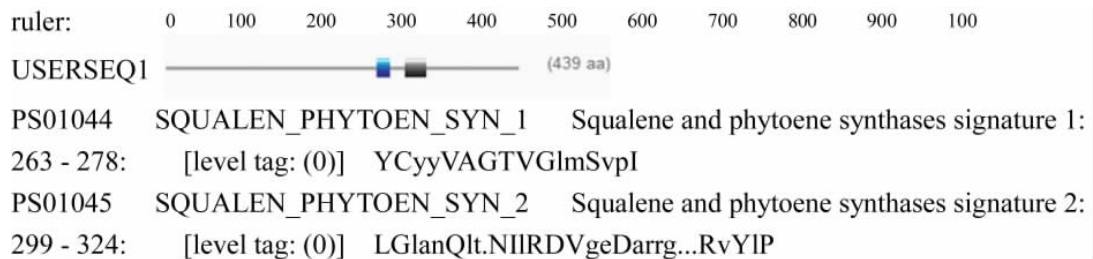


图8 Prosite 数据库分析 PSY 基因的结构位点

Fig. 8 Analysis of PSY gene structure of the site using Prosite database

003616147.1) 等植物的 PSY 序列亲缘关系较远。

3 讨论

广藿香为经典的芳香化湿药,其芳香化浊、开胃止呕功效特别显著。萜类化合物是其主要的活性成分。本研究成功克隆了广藿香萜类合成途径中的关键酶——八氢番茄红素合成酶(*PcPSY1*),其 cDNA 全长 1 550 bp,编码 439 个氨基酸,并对其进行测序及相关的生物信息学分析。广藿香的 PSY 基因的特征与草莓(李永平,2009)、龙胆(芦小单,2008)、烤烟(蔡刘体等,2011)、白菜型油菜(薛蕾等,2011)、甜瓜(王淑芬,2011)、君子兰(劳杉杉等,2012)的 PSY 基因相似。基于 PSY 基因利用 NJ 法构建的 21 个不同物种间的进化树表明 *PcPSY1* 基因与桂花的 PSY 序列同源性最高,与烟草、番茄等植物次之。上述预测结果证明了本研究中所克隆的

PcPSY1 基因的正确性。

多数植物都表达单一的 PSY 基因。但在有些植物中,PSY 是由多个基因编码,其表达具有器官或质体特异性(Bramley,2002),如番茄中有 2 个 PSY 基因,其中 *PSY1* 在花和果实中表达,控制番茄果实成熟过程中的八氢番茄红素合成酶,*PSY2* 则主要在叶中表达,控制绿色组织(包括成熟后仍表现为绿色的番茄果实)中八氢番茄红素(Bird *et al.*,1991; Ray *et al.*,1987)。本研究发现广藿香只有一个 PSY 基因。克隆广藿香 PSY 基因能为广藿香提供丰富的基因源,为后期利用基因工程改善广藿香奠定基础。

参考文献:

- 王淑芬. 2011. 甜瓜果实八氢番茄红素合成酶(PSY)的克隆、表达分析及遗传转化[J]. 泰安: 山东农业大学
李永平. 2009. 草莓类胡萝卜素合成相关基因的克隆[J]. 福州: 福建农林大学

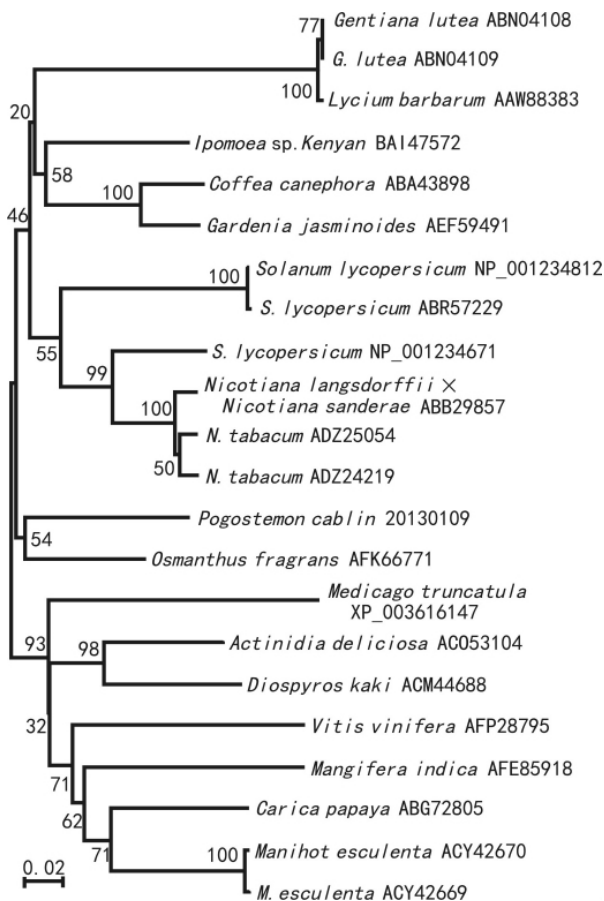


图9 基于 *PSY* 基因利用 NJ 法构建的不同物种间的进化树

Fig. 9 Phylogenetic tree of different species based on *PSY* gene using NJ Method

- 芦小单. 2008. 龙胆八氢番茄红素合成酶(*PSY*) 基因的克隆与功能分析 [J]. 长春: 东北师范大学
- Bramley PM. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development [J]. *J Exp Bot*, **53**: 2 107–2 113
- Bird CR, Ray JA, Fletcher JD, et al. 1991. Using antisense RNA to study gene function inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes [J]. *Bio Technol*, **9**: 635–639
- Cai LT(蔡刘体), Jiang GH(蒋光华), Lei B(雷波), et al. 2011. Cloning and sequence analysis of *T-psy1* gene from flue-cured tobacco(烤烟八氢番茄红素合成酶基因的克隆与序列分析) [J]. *Tobacco Sci Technol* (烟草科技), **2**: 58–63
- Ducreux LJM, Morris WL, Hedley PE, et al. 2005. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of β -carotene and lutein [J]. *J Exp Bot*, **56**: 81–89
- Fraser PD, Romer S, Shipton CA, et al. 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99** (2): 1 092–1 097

- Hu LF, Li SP, Cao H, et al. 2006. GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China [J]. *J Pharm Biomed Anal*, **42**: 200–206
- Kiuchi F, Matsuo K, Ito M, et al. 2004. New sesquiterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Pogostemon cablin* [J]. *Chem Pharm Bull*, **52**: 1 495–1 496
- Kiyohara H, Ichino C, Kawamura Y, et al. 2012. Patchouli alcohol: in vitro direct anti-influenza virus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth. [J]. *J Natl Med*, **66**: 55–61
- Lao SS(劳杉杉), Yuan ZM(苑志明), Qin ZW(秦智伟), et al. 2012. Cloning and sequence analysis of phytoene synthase cDNA from *Clivia miniata* Rogel (君子兰八氢番茄红素合成酶基因的克隆与序列分析) [J]. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), **43** (4): 113–116
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel ET. 2008. *PSY*, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis [J]. *Plant Physiol*, **146**: 1 333–1 345
- Lindgren LO, Stlberg KG, Hglund AS. 2003. Seed-specific overexpression of an endogenous Arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll and abscisic acid [J]. *Plant Physiol*, **132** (2): 779–785
- Ray JA, Bird CR, Maunders M, et al. 1987. Sequence of pTOM5 a ripening related cDNA from tomato [J]. *Nucl Acid Res*, **24**: 10 587
- Sundaresan V, Singh SR, Mishra AN, et al. 2009. Composition and comparison of essential oils of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Patchouli) and *Pogostemon travancoricus* Bedd. var. *travancoricus* [J]. *J Essent Oil Res*, **21**: 220–222
- Wu HQ, Li L, Li J, et al. 2012. Acaricidal activity of DHEMH, derived from patchouli oil, against house dust mite, *Dermatophagoides farinae* [J]. *Chem Pharm Bull*, **60**: 178–182
- Wu YG(吴友根), Guo QS(郭巧生), Zheng HQ(郑焕强). 2007. Textual research on history of introduction and herbal medicine of *Pogostemon cablin* (广藿香本草及引种历史考证的研究) [J]. *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **32** (20): 2 114–2 117
- Xue L(薛蕾), Yan GX(闫贵欣), Gao GZ(高桂珍), et al. 2011. Cloning and analyzing BrPSY gene of carotenoids biosynthesis in *Brassica rapa* L (白菜型油菜八氢番茄红素合酶基 BrPSY 的克隆与序列分析) [J]. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), **33** (3): 210–215
- Zhu C, Naqvi S, Gomez-Galera S, et al. 2007. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants [J]. *Trends Plant Sci*, **12**: 548–555
- Zhu C, Yamamura S, Koiwa H, et al. 2002. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea* [J]. *Plant Mol Biol*, **48**: 277–285
- Zhu CF(朱长甫), Chen X(陈星), Wang YD(王英典). 2004. Carotenoid biosynthesis in plants and application of its relative genes in gene engineering (植物类胡萝卜素生物合成及其相关基因工程中的应用) [J]. *Acta Photophysiol Sin* (植物生理与分子生物学报), **30** (6): 609–618