

[ 8 ] 周先治, 高 晖, 孙新涛. 华重楼根茎腐烂病发病情况调查与病因分析[J]. 福建农业科技, 2021, 51(2): 37-40.

[ 9 ] 杨永红, 严 君, 刘君英, 等. 滇重楼根茎腐烂的调查及其主要害虫研究[J]. 中药材, 2009, 32(9): 1342-1346.

[10] 杨显秋, 孙孝全. 重楼人工种植病虫害防治的重要性分析[J]. 南方农机, 2018, 49(14): 80.

[11] 柳 敏, 周茂嫦, 李恒谦, 等. 重楼属植物真菌病害和防治方法研究进展[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(9): 15-18; 22.

[12] 赵彩呈, 洪英娣, 刘 丽, 等. 丽江滇重楼和白芨根腐病病原菌鉴定[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(5): 28-30; 35.

[13] 杨 瑾, 文 艺, 高素霞, 等. 河南产区丹参根腐病病原

鉴定[J]. 河南农业科学, 2021, 50(10): 92-98.

[14] 伍晓丽, 王 钰, 刘 飞, 等. 黄连根腐病镰刀菌属病原真菌鉴定[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1323-1328.

[15] 董 鲜, 马晓惠, 陈传娇, 等. 三七根腐病尖孢镰刀菌分离鉴定及致病作用研究[J]. 中药材, 2018, 41(1): 8-12.

[16] 文增叶, 李定华, 代梦瑶, 等. 三七根腐病原真菌尖孢镰刀菌的生物学特性分析[J]. 中药材, 2019, 42(9): 1978-1984.

[17] 王 瑞, 董林林, 徐 江, 等. 农田栽参模式中人参根腐病原菌鉴定与防治[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1787-1791.

[18] 杨林毅, 陈泽历, 赖清玉, 等. 滇黄精腐皮镰刀菌的分离鉴定[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(3): 65-67; 101.

## 茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因的克隆和表达分析

刘巍玮<sup>1</sup>, 吴君贤<sup>1</sup>, 徐 睿<sup>1</sup>, 管凤雅<sup>1</sup>, 胡健鹏<sup>1</sup>, 刘军玲<sup>2</sup>, 张亚中<sup>2\*</sup>, 刘 超<sup>3</sup>, 彭华胜<sup>4,5</sup>, 查良平<sup>1\*</sup>

[1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051; 3. 安徽医科大学基础医学院, 安徽 合肥 230032; 4. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700; 5. 中国医学科学院道地药材研究创新单元 (2019RU57), 北京 100700]

**摘要:** **目的** 从茅苍术中克隆萜类化合物生物合成途径中的甲羟戊酸-5-磷酸激酶 (*PMK*) 基因, 并对其进行序列分析、原核表达及基因表达分析。**方法** 基于茅苍术转录组数据, 采用 RT-qPCR 法克隆获得茅苍术的 2 条甲羟戊酸-5-磷酸激酶基因的全长序列, 命名为 *AIPMK1*、*AIPMK2*, 使用生物信息学软件预测 *AIPMK1*、*AIPMK2* 编码蛋白的特征; 利用 MEGA 6.06 软件构建系统进化树; 构建原核表达载体, 在大肠杆菌中诱导表达; 运用 RT-qPCR 检测该基因在不同产地茅苍术中的相对表达及经不同时间茉莉酸甲酯诱导后的表达情况。**结果** *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因的 ORF 长度分别为 1 512、1 590 bp, 分别编码 503 aa、529 aa。2 个基因的二级结构中  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲占比最高, 均属不稳定的酸性蛋白; 结构功能域分析证明 *AIPMK1*、*AIPMK2* 分别在 4~490 aa、40~527 aa 处包含甲羟戊酸激酶的保守结构域; 跨膜结构域分析预测, 两者均为膜外蛋白; SDS-PAGE 结果显示, 分别在 55、58 kDa 处有清晰的目的蛋白表达。基因表达结果显示, 在不同时间的茉莉酸甲酯诱导下 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的基因表达分别在 48、24 h 达到最高值, 且均在 3 h 表达最低。不同产地的茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因具有组织特异性, 两者均在岳西茅苍术的叶中表达量最高。**结论** 本研究首次克隆 2 条茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因, 并对其进行表达分析, 为进一步探究茅苍术萜类生物合成途径奠定基础。

**关键词:** 茅苍术; 甲羟戊酸-5-磷酸激酶; 基因克隆; 原核表达; 表达分析

**中图分类号:** R282      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2023)03-1018-07  
**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.058

**收稿日期:** 2022-05-10  
**基金项目:** 国家重点研发计划项目 (2019YFC1711505); 国家自然科学基金项目 (82073957)  
**作者简介:** 刘巍玮 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为中药资源及其质量评价。Tel: 17856913116, E-mail: fro0403@126.com  
\* **通信作者:** 张亚中 (1976—), 男, 博士, 主任中药师, 研究方向为中药质量分析。Tel: 13956985695, E-mail: yazhongzhang@hotmail.com  
查良平 (1987—), 女, 副研究员, 研究方向为中药资源及其质量评价。Tel: 18130028287, E-mail: zlp\_ahtcm@126.com

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 是菊科苍术属多年生草本植物，始载于《神农本草经》，具有燥湿健脾、祛风散寒、明目等功效<sup>[1]</sup>，其有效成分是挥发油形式的萜类化合物，如茅术醇、苍术酮、 $\beta$ -桉叶醇等。现代药理学研究显示， $\beta$ -桉叶醇具有抗肿瘤活性，通过部分抑制 ERK 信号通路对血管生成产生抑制作用，证实  $\beta$ -桉叶醇可以作为治疗血管生成疾病的候选药物。同时它也被认为对组胺刺激的胃分泌有抑制作用，可以有效预防胃溃疡。茅术醇被证实对癌细胞具有细胞毒作用及抗炎活性。苍术酮通过抑制肥大细胞脱粒或稳定肥大细胞，改善肥大细胞介导的过敏反应，且 40 mg/kg 苍术酮可减少甲型流感病毒诱导的肺损伤<sup>[2-3]</sup>。

萜类化合物的生物合成途径主要有 2 条，分别为存在于细胞质中的甲羟戊酸 (MVA) 途径和存在于质体中的 2-甲基-*D*-赤藓糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径。在 MVA 途径中，有 3 个连续依赖 ATP 的限速反应，PMK 催化第 2 个限速反应，在下游途径中消耗 1 个 ATP，催化 5-磷酸-甲羟戊酸生成甲羟戊酸-5-二磷酸 (MVAPP)<sup>[4]</sup>，在萜类代谢途径中起重要作用。研究表明，植物中 *PMK* 基因表达量同萜类化合物含量密切相关，对下游产物的生成也存在显著影响<sup>[5]</sup>。Yuan 等<sup>[6]</sup> 分析了芍药生物合成途径中关键酶基因的表达量与其化合物成分的相关性，发现 *PMK* 基因表达同芍药苷和苯甲酰芍药苷的积累存在相关性。因此，开展茅苍术萜类合成途径关键酶 PMK 的基因克隆及表达分析研究对其萜类物质的合成具有重要意义。

如今，MVA 途径合成相关酶在各个物种中均进行深入研究，如山茱萸<sup>[7]</sup>、紫草<sup>[8]</sup>、杜仲<sup>[9]</sup>、茅苍术<sup>[10-11]</sup>等。与动物和细菌相比，植物的 *PMK* 基因报道较少，至今仍仅限于阳春砂<sup>[12]</sup>、橡胶树<sup>[13]</sup>、茉莉花<sup>[14]</sup>等，而茅苍术 *PMK* 基因的分子特性、表达模式尚不清楚。本研究以药用植物茅苍术为材料，首次克隆 2 条 MVA 途径的关键酶 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因的 cDNA 序列，通过生物信息学分析、原核表达对其进行研究，并采用 qRT-PCR 技术检测其在不同组织和不同产地中的 *PMK* 基因特异性表达及 MeJA 诱导下的基

因表达模式，以期为深入研究 *PMK* 基因在茅苍术中的萜类成分生物合成中的分子机制奠定基础。

1 材料

茅苍术样品采自江苏南京及安徽岳西，经中国中医科学院彭华胜教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.，经鉴定后样品按照各个组织分为根状茎、茎、叶。茅苍术种子购自于湖北十堰，经 1/2MS 培养基培养 5 个月后用 200  $\mu$ mol/L 茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导处理，分别在处理 0、3、6、9、12、24、48 h 时取样。样品处理后保存于-80  $^{\circ}$ C 冰箱，凭证标本保存于安徽中医药大学。

大肠杆菌 *Trans1-T1* 感受态细胞及 BL21 (DE3) 表达感受态细胞均购于北京全式金生物技术股份有限公司。引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 使用超快速植物 RNA 提取试剂盒说明书提取茅苍术根状茎、茎、叶中的总 RNA，用 TaKaRa 反转录试剂盒进行反转录，将所得茅苍术 cDNA 置于-20  $^{\circ}$ C 冰箱备用。

2.2 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因 cDNA 克隆 以反转录后的茅苍术 cDNA 为模板，设计并使用以下基因特异性引物进行 PCR 扩增。上游引物 *AIPMK1*-F 5'-ATGGCAGTGAT TGCATCTGCTCCTG-3'，*AIPMK2*-F 5'-ATGGGGGTGTTCTCTC CCCATCTTC-3'；下游引物 *AIPMK1*-R 5'-TCACCCAATCCTA ATTGAAGAAATA-3'，*AIPMK2*-R 5'-TCACTTGGCCCGAGG ATCATCACTC-3'。PCR 扩增产物经电泳检测、切胶回收并与克隆载体 pEASY-Blunt Zero 相连接，选取菌液 PCR 中阳性克隆菌液由苏州金唯智生物科技有限公司测序。

2.3 *AIPMK* 基因的生物信息学分析 所涉及的生物信息学网站见表 1，并使用软件 PyMOL 进行三维结构建模；通过软件 DNAMAN 进行同源氨基酸比对；软件 MEGA 6.06 用以构建 Neighbor-joining 系统进化树，bootstrap 重复次数为 1 000 次。

表 1 在线分析功能网站及网址

| 网站          | 功能           | 网址链接                                                                                                                                                        |
|-------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NCBI        | 相似性比对分析      | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>                                                                                     |
| ORF Finder  | 查找基因开放阅读框    | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/</a>                                                               |
| ExPASy      | 预测蛋白理化性质     | <a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>                                                                           |
| NPS         | 预测蛋白质二级结构    | <a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html">https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html</a> |
| SWISS MODEL | 三级结构预测       | <a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a>                                                                                   |
| CDD         | 蛋白质结构域分析     | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</a>                                     |
| TMHMM       | 蛋白序列的跨膜结构域分析 | <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>                                                                   |

2.4 *AIPMK* 原核表达载体构建及诱导表达 对测序正确的 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因序列进行分析，以 BamH I 作为酶切位点设计上下游引物，上游引物 BamH I-*AIPMK1*-F 5'-AGCTCGGTACCTCTGAGGGAATGGCAGTGATTGCATCTGCTC CTG-3'，BamH I-*AIPMK2*-F 5'-AGCTCGGTACCTCTGAGGGA

ATGGGGGTGT TCTCTCCCATCTTC-3'；下游引物 BamH I-*AIPMK1*-R 5'-TCGACAAGCTTGAATTCGGATCACCCAATCCTA ATT GAA GAAATA-3'，BamH I-*AIPMK2*-R 5'-TCGACAAG CTTGAATTCGGATCACTTGCCCGAGGATCATCCACTC-3'，以重组质粒作为模板，PCR 扩增后切胶回收，将目的基因片

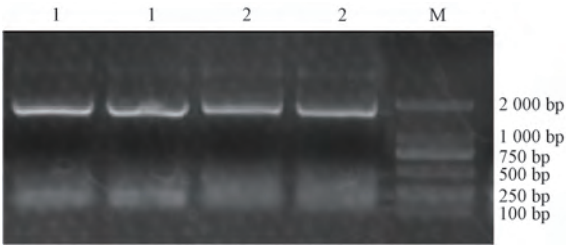
段与酶切的原核表达载体拼接后转化至大肠杆菌 *Trans1*-T1 感受态细胞,菌液 PCR 后,送阳性菌液测序并提取质粒,将测序正确的载体重组质粒 pCold- I -AIPMK1 和 pCold- I -AIPMK2 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达感受态中,构建原核表达宿主菌,以 pCold- I 空载体转入 BL21 (DE3) 表达感受态作为阴性对照。菌液在 37 ℃、200 r/min 下振荡培养,待  $OD_{600}$  达 0.4~0.6 时加入终浓度为 0.4 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG),于 16 ℃ 低温诱导过夜,收集得到 AIPMK1、AIPMK2 全菌。

2.5 RT-qPCR 法分析不同产地茅苍术的组织表达模式 对南京、岳西茅苍术的 *AIPMK1*、*AIPMK2* 进行组织表达模式分析,使用外源激素 MeJA 对湖北十堰茅苍术的根状茎进行胁迫处理,对 0、3、6、9、12、24、48 h 后的 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因表达模式进行监测。以茅苍术内参基因 *UBQ2* (GenBank No. KY\_411965) 作为实验中 *AIPMK1*、*AIPMK2* 转录的拷贝数据的校正,设计内参基因引物为 *AIUBQ2*-F 5'-GGTTGAGGGGAGGAATGC-3', *AIUBQ2*-R 5'-AGACGAAGGACAAGGTGA-3'。利用 Primer Premier 5.0 软件设计茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因的荧光定量引物。上游引物 q-*AIPMK1*-F 5'-CATCTATGGTTGGTGCTG ACA-3', q-*AIPMK2*-F 5'-GCTGCTTTACTACATTACCTTGGG-3'; 下游引物 q-*AIPMK1*-R 5'-GACACCTCTATACGTTTCCCAAT-3', q-*AIPMK2*-R 5'-CAAACCCACTGCCAACTTTCC-3'。按照 2×Realab Green PCR Fast mixture 试剂盒说明书配置反应体系并设置扩增条件。样品设定 3 个重复,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行分析。

3 结果

3.1 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因的克隆及序列分析 基于茅苍术转录组数据得到 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的 cDNA 作为模板,使用特异性引物对其进行 RT-PCR 扩增,见图 1。所得测序结果与在线软件 ORF Finder 中对 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因序

列的预测结果相一致, *AIPMK1*、*AIPMK2* 的 ORF 长度分别为 1 512、1 590 bp。



注: M 为 DL 2000 DNA maker, 1 为 *AIPMK1* 基因扩增产物, 2 为 *AIPMK2* 基因扩增产物。

图 1 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因克隆

*AIPMK1*、*AIPMK2* 蛋白序列使用 BLAST 进行序列比对,结果显示, *AIPMK1*、*AIPMK2* 与 GenBank 中已注册植物 PMK 氨基酸序列之间存在较高的同源性,其中 *AIPMK1* 与刺苞菜蓟 PMK (XP\_024997030.1) 的氨基酸序列相似度为 92.03%,与向日葵 PMK (XP\_022029028.1) 的氨基酸序列相似度为 88.65%,与莴苣 PMK (XP\_023739465.1) 的氨基酸序列相似度为 88.21%; *AIPMK2* 与黄花蒿 PMK (PWA75498.1) 的氨基酸序列相似度为 88.24%,与除虫菊 PMK (GEV35940.1) 的氨基酸序列相似度为 82.76%,与银白杨 PMK (XP\_034888261.1) 的氨基酸序列相似度为 75.76%。将两条基因命名为 *AIPMK1* (GenBank 登录号为 OM283271), *AIPMK2* (GenBank 登录号为 OM283272)。

3.2 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的生物信息学分析

3.2.1 蛋白质理化性质分析 使用在线软件 ExPASy 对茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的氨基酸序列进行理化性质分析,见表 2,并由此初步预测这 2 个甲羟戊酸激酶为不稳定的酸性蛋白。

表 2 茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的氨基酸序列理化性质

| 名称     | 氨基酸数目 | 相对分子质量/kDa | 理论 pI | 不稳定系数 | 脂肪指数  |
|--------|-------|------------|-------|-------|-------|
| AIPMK1 | 503   | 54 427.10  | 5.91  | 40.37 | 90.60 |
| AIPMK2 | 529   | 57 802.16  | 6.29  | 41.06 | 89.96 |

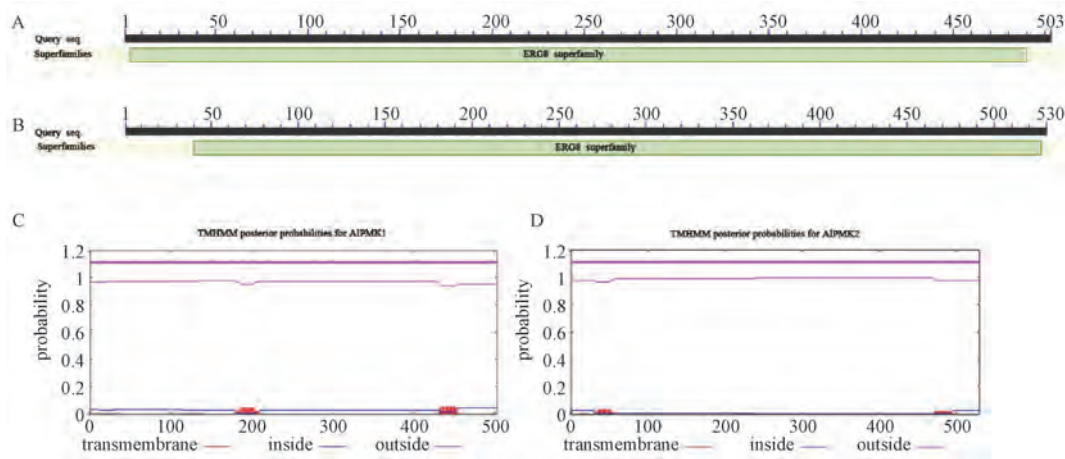
3.2.2 结构功能域与跨膜结构域分析 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的蛋白结构域经 NCBI 中的 Conserved domains 在线工具分析可知, *AIPMK1*、*AIPMK2* 分别在 4~490 aa、40~527 aa 包含甲羟戊酸激酶的保守结构域,见图 2A~2B,均属于 GHMP 激酶超家族成员。 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的跨膜结构区域通过在线软件 TMHMM2.0 进行预测分析见图 2C~2D,结果表明, *AIPMK1*、*AIPMK2* 氨基酸中均无跨膜结构存在,两者属于膜外蛋白。

3.2.3 二级和三级结构预测 NPS 在线生物学工具分析,见图 3A~3B,结果显示, *AIPMK1* 在多肽链中包含 207 个  $\alpha$ -螺旋、20 个  $\beta$ -转角、72 个延伸链、204 个无规则卷曲分别占比 41.15%、3.98%、14.31%、40.56%; *AIPMK2* 在多肽链中包含了 202 个  $\alpha$ -螺旋、25 个  $\beta$ -转角、70 个延伸链及 221 个无规则卷曲,分别占比 40.08%、4.73%、13.42%、

41.78%。由此可知, *AIPMK1*、*AIPMK2* 的二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋及无规则卷曲组成。使用在线服务器 SWISS-MODEL 结合 PyMOL 软件完成茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的蛋白建模并构建其三维空间模型,见图 3C~3D,结果表明,两者蛋白的三维结构具有一定的区别。

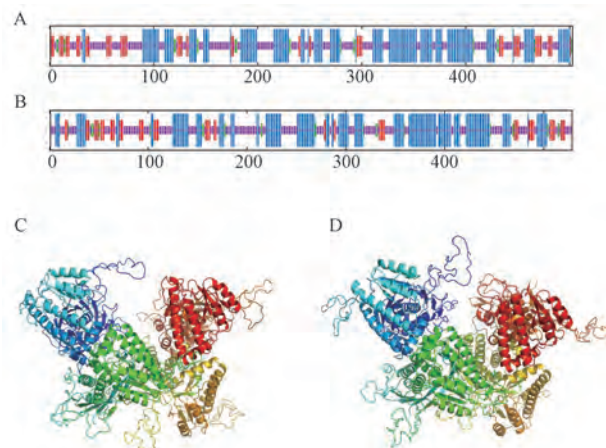
3.3 *AIPMK1*、*AIPMK2* 与其他物种的同源氨基酸序列比对

首先将茅苍术 *AIPMK1* 和 *AIPMK2* 的氨基酸序列通过软件 DNAMAN 对进行序列比对,一致性为 70.11%,说明两者之间存在一定差异。利用 GenBank 下载不同植物的 PMK 氨基酸序列,将茅苍术的 2 条序列与玉米 *ZmPMK1* (AFW88953.1)、玉米 *ZmPMK2* (DAA44419.1)、向日葵 *HaPMK1* (XP\_022029028.1)、向日葵 *HaPMK2* (XP\_021970137.1)、莴苣 *LsPMK1* (XP\_023739465.1)、莴苣 *LsPMK2* (PLY87854.1) 进行多序列比对分析,见图 4。将



注：A 为 AIPMK1 结构功能域，B 为 AIPMK2 结构功能域，C 为 AIPMK1 跨膜结构域，D 为 AIPMK2 跨膜结构域。

图 2 AIPMK1、AIPMK2 的结构功能域与跨膜结构域



注：A 为 AIPMK1 二级结构，B 为 AIPMK2 二级结构，C 为 AIPMK1 三级结构，D 为 AIPMK2 三级结构。

图 3 AIPMK1、AIPMK2 的二级结构和三级结构

3 种植物的 PMK 与 AIPMK 的氨基酸序列进行多重序列比对后，结果显示，茅苍术与这 3 种植物的 PMK 基因同源性和氨基酸序列相似度较高，同时发现 AIPMK 在 45~53 位氨基酸“GKVLLAGGY”、222~228 位氨基酸“GLGSSA”、482~490 位氨基酸“GGGVPGAGG”分别具有 3 个特征 motif 及 1 个 ATP 结合位点。

3.4 AIPMK1、AIPMK2 的系统进化树分析 从 GenBank 中选取已注册的 19 种 PMK 氨基酸序列，来源于不同物种的蛋白在系统进化树中被聚集为 6 大类型，分别为双子叶植物、单子叶植物、裸子植物、藻类、细菌和真菌，采用邻接法通过 MEGA 6.06 软件构建系统进化树，见图 5。结果显示，其中茅苍术 AIPMK1 与刺苞菜蓟 CcPMK 序列被聚为同一分支，显示其具有较近的亲缘关系，证实了菊科植物 PMK 基因的同源性，但茅苍术 AIPMK2 单独聚为一支，推测 AIPMK1、AIPMK2 可能存在功能差异。

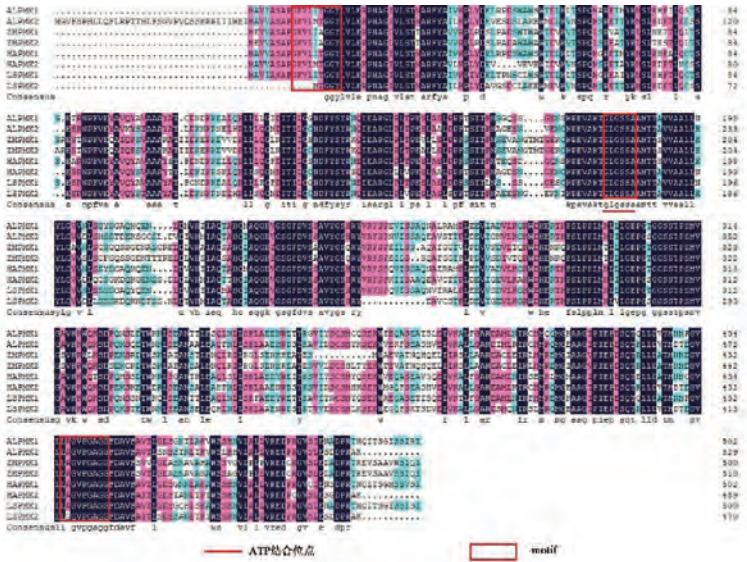


图 4 茅苍术、玉米、向日葵、莪苳 PMK 氨基酸序列同源性比对

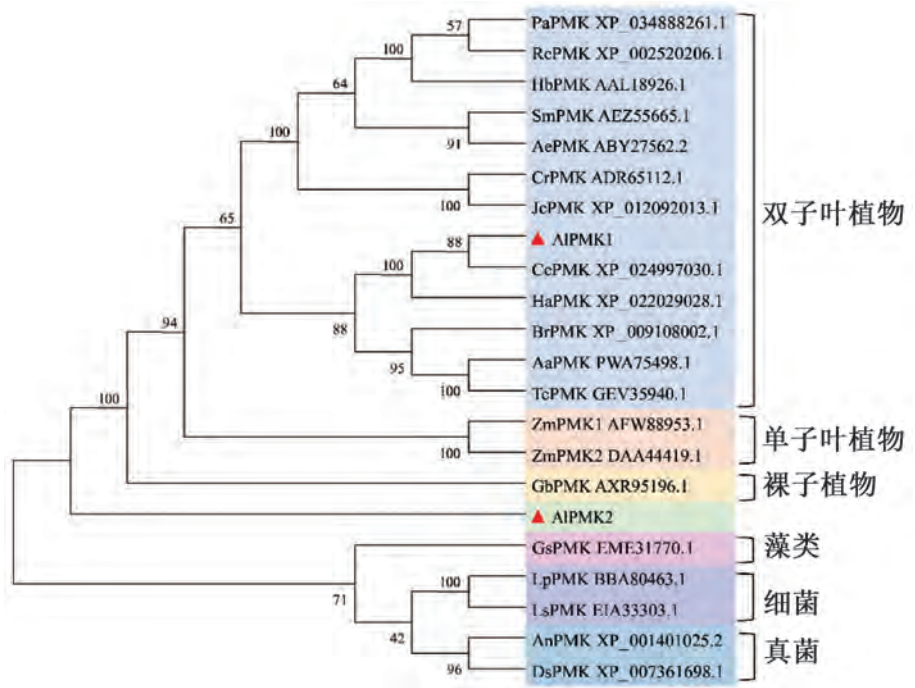
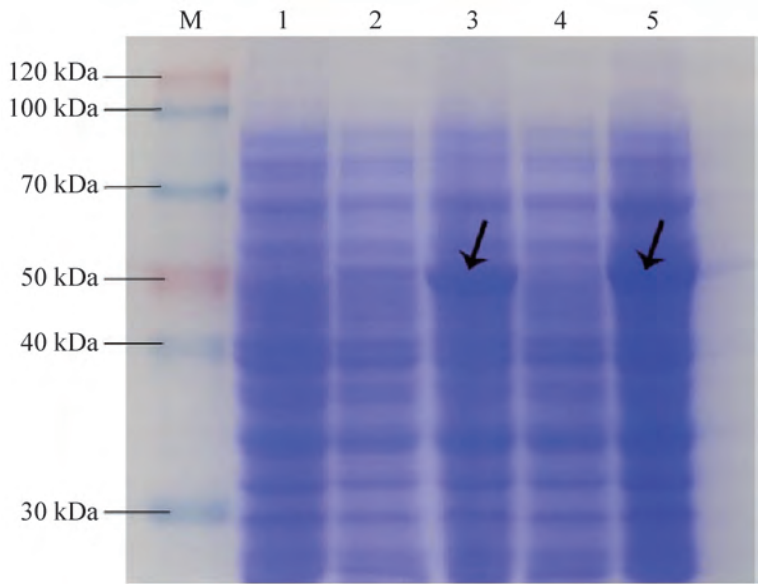


图 5 AIPMK1、AIPMK2 与其他物种 PMK 氨基酸序列的系统进化树分析

3.5 AIPMK1、AIPMK2 原核表达载体构建及诱导表达分析 将构建好的重组质粒 pCold- I -AIPMK1、pCold- I -AIPMK2 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，并利用 IPTG 诱

导重组蛋白，进行 12% SDS-PAGE 电泳验证，见图 6。结果显示，pCold- I -AIPMK1、pCold- I -AIPMK2 分别在 55、58 kDa 处出现明显的特异蛋白条带，皆与预测的结果相一致。



注：M 为 Protein Marker，1 为 pCold- I ，2 为 PMK1 未诱导的全菌，3 为 PMK1 诱导的全菌，4 为 PMK2 未诱导的全菌，5 为 PMK2 诱导的全菌。

图 6 AIPMK1、AIPMK2 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图

3.6 AIPMK1、AIPMK2 的茉莉酸甲酯诱导表达分析 使用荧光定量 PCR 检测外源茉莉酸甲酯诱导对 AIPMK1、AIPMK2 基因表达量的影响，见图 7。MeJA 处理 0~48 h 后，以 0 h 作为对照，AIPMK1 的基因表达量呈现先降低后升高、再降低最后升高的趋势，在处理 48 h 后，AIPMK1 的基因表达量最高，为对照组的 1.18 倍。AIPMK2 的基因表达量则

表现为先降低，3~9 h 基因表达量升高，12 h 后降低，当 MeJA 处理 24 h 时，AIPMK2 的基因表达量达到峰值，是对照组的 3.43 倍，在 48 h 表达量降低，且低于对照组。总体来说，MeJA 处理后 AIPMK2 的基因表达量高于 AIPMK1。由此推测这 2 个基因对 MeJA 的响应具有一定差异，茅苍术 AIPMK2 表现出较强的信号应答反应。

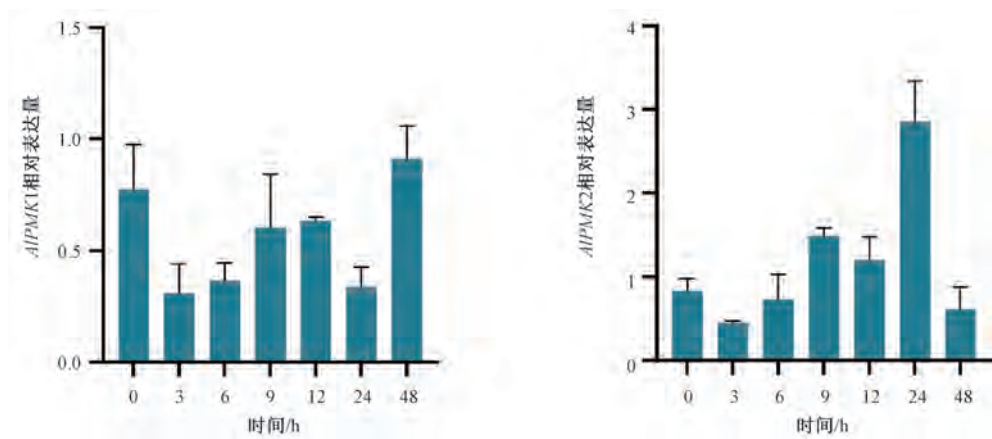


图 7 茉莉酸甲酯处理下 *AIPMK1*、*AIPMK2* 相对表达量

3.7 不同产地、不同组织茅苍术 *AIPMK1*、*AIPMK2* 的基因表达差异分析 采用实时荧光定量 PCR 对 *AIPMK1*、*AIPMK2* 组织表达模式进行分析, 见图 8。南京及岳西茅苍术中的 *AIPMK1* 在不同组织中的基因表达水平略高于 *AIPMK2*。其中, 岳西茅苍术中 *AIPMK1*、*AIPMK2* 及南京茅

苍术中 *AIPMK1* 的基因表达模式一致, 表达量大小依次为叶>根状茎>茎, 而南京茅苍术中 *AIPMK2* 在根状茎中的表达量略大于叶, 表达量大小依次为根状茎>叶>茎。由此说明, 2 种茅苍术 *PMK* 基因的表达模式在不同组织及生长环境的影响下会存在显著差异。

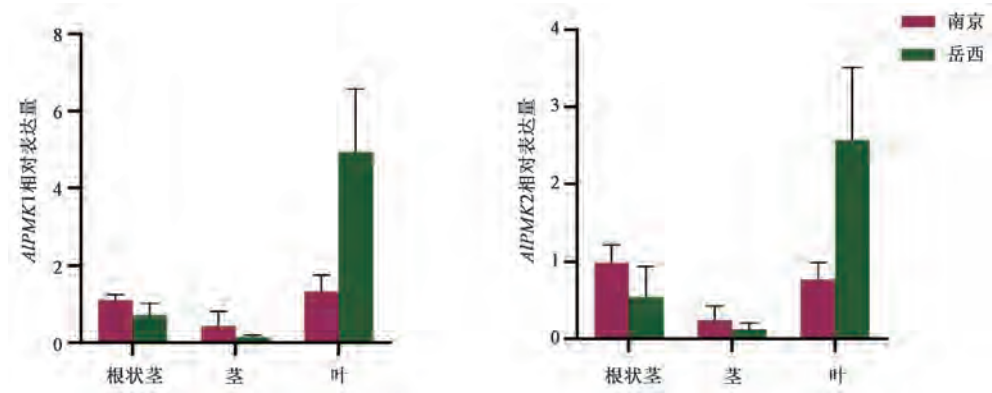


图 8 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因在茅苍术不同组织中的表达

#### 4 讨论

茅苍术作为一种著名的传统中药材, 迄今为止已有大量涉及其临床应用、制备工艺、药理作用及生物活性的相关报道<sup>[15-17]</sup>。茅苍术中的化学成分主要包括倍半萜、烯炔类、三萜等<sup>[18]</sup>, 倍半萜化合物作为苍术属植物主要活性成分之一, 合成于 MVA 途径, 前期已有关于茅苍术 MVA 途径中的 *AACT*<sup>[10]</sup>、*MVK*<sup>[19]</sup>, MEP 途径中 *MCT*<sup>[20]</sup>、*CMK*<sup>[21]</sup> 及三萜合成途径中 *SQS*<sup>[22]</sup> 等基因克隆及功能鉴定的相关研究, *PMK* 作为整个萜类合成途径中的重要调节位点之一, 具有重要的研究价值, 梅利那<sup>[23]</sup> 研究表明, 当马尾松的转录因子 *PmNAC* 采用农杆菌介导法成功转入烟草后, 会增长转基因植株的株高、茎粗、叶宽、叶长, 也能够提升叶绿素 a 和总叶绿素的含量, 其中的 *TbPMK* 基因的表达量同转基因株系中萜类化合物 *L-α*-松油醇等的相对含量也均有提升。本研究首次从茅苍术中克隆获得 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因, 利用生物信息学方法分析可知, *AIPMK1*、*AIPMK2* 不具有跨膜结构, 属于膜外蛋白。系统进化树分析显示 *AIPMK1* 与刺苞菜蓟 *CcPMK* 聚为一支, 而 *AIPMK2* 单独为

一支, 表明 *AIPMK1* 和 *AIPMK2* 之间的亲缘关系较远, 因此推测 *AIPMK1* 与 *AIPMK2* 可能具有酶活或功能上的差异<sup>[24]</sup>。

MeJA 作为一类广泛存在于植物中的抗损伤相关信号分子, 现已应用于多种药用植物次生代谢产物关键酶基因的调控。Niu 等<sup>[25]</sup> 发现, 檀香的不同组织经 MeJA 处理后, MVA 途径中的关键酶基因 *SaMK*、*SaPMK* 具有明显的升高响应。茅苍术中 *AIPMK1*、*AIPMK2* 分别在 MeJA 处理 48、24 h 基因表达量提高, 且 *AIPMK2* 对 MeJA 的响应程度较 *AIPMK1* 更高。由此推断, MeJA 可能会对不同种类的 *PMK* 基因具有不同的诱导作用。郑汉等<sup>[26]</sup> 研究发现, 香樟根、枝、叶中 *CcPMK* 基因的表达模式各异, 表明香樟精油中主要化合物含量的积累与 *CcPMK* 的表达水平相关联, 说明 *CcPMK* 基因在香樟精油生物合成途径中发挥重要作用。杨恩泽等<sup>[12]</sup> 分析 *AvPMK* 基因在阳春砂叶、茎、根中的表达模式, 发现 *PMK* 基因在阳春砂的叶片中表达量最高, 从而推断出叶是阳春砂萜类物质的主要合成场所。本研究通过 RT-qPCR 分析南京及岳西茅苍术中 *AIPMK1*、*AIPMK2* 基因的组织表达模式, 发现 *AIPMK1* 和 *AIPMK2* 均在岳西茅苍术

的叶中有较高的表达，而在根状茎及茎中的表达量低，在南京茅苍术的 3 个组织中 *PMK* 表达量均较低。表明 2 个 *PMK* 基因在茅苍术中具有组织表达特异性。

本研究对茅苍术中克隆的基因 *AlPMK1*、*AlPMK2* 进行生物信息学及表达分析，弥补菊科药用植物茅苍术 *PMK* 基因相关领域的空缺，有助于在分子水平上深入了解药用植物萜类物质的合成，也为进一步认知甲羟戊酸激酶基因提供理论基础。

参考文献：

[ 1 ] 王红阳, 蒋待泉, 康传志, 等. 药用植物苍术内生菌的研究进展及展望[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 4930-4935.

[ 2 ] Koonrungsombhoon N, Na-Bangchang K, Karbwang J. Therapeutic potential and pharmacological activities of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(6): 421-428.

[ 3 ] Jun X, Fu P, Lei Y, *et al.* Pharmacological effects of medicinal components of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC[J]. *Chin Med*, 2018, 13: 59.

[ 4 ] 徐镇祥, 李美洁, 门 潇, 等. 甲羟戊酸途径的代谢支路调控策略的研究进展[J]. 生物加工过程, 2020, 18(1): 44-51.

[ 5 ] 何 海. 茯苓磷酸甲羟戊酸激酶基因克隆及功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.

[ 6 ] Yuan Y, Yu J, Jiang C, *et al.* Functional diversity of genes for the biosynthesis of paeoniflorin and its derivatives in *Paeonia* [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 18502-18519.

[ 7 ] 李志段, 段佩玲, 徐静雅, 等. 山茱萸萜类合成途径关键酶 *HMGR1* 基因的克隆与分析[J]. 中草药, 2020, 51(18): 4733-4738.

[ 8 ] 林红燕, 王 煊, 何 聪, 等. 中药植物紫草天然产物的生物合成及其功能研究进展[J]. 遗传, 2021, 43(5): 459-472.

[ 9 ] 王 淋, 杜红岩, 乌云塔娜. 杜仲 MVA 和 MEP 途径相关基因的亚细胞定位与表达分析[J]. 植物研究, 2017, 37(1): 52-62.

[ 10 ] Wu J X, Liu W W, Lu J M, *et al.* Cloning, prokaryotic expression, and purification of acetyl-CoA C-acetyltransferase from *Atractylodes lancea*[J]. *Protein Pept Lett*, 2022, 29(2): 156-165.

[ 11 ] 徐 睿, 单婷玉, 吴君贤, 等. 茅苍术硫解酶 *AIKAT* 基因的克隆及原核表达分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46

(19): 4950-4958.

[ 12 ] 杨恩泽, 陆颖锶, 吴秋红, 等. 阳春砂磷酸甲羟戊酸激酶的基因克隆与表达谱分析[J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2015, 36(2): 95-101.

[ 13 ] 邹 智, 杨礼富, 安 锋, 等. 4 种大戟科植物 *PMK* 基因家族的全基因组鉴定与分析[J]. 西南林业大学学报, 2013, 33(5): 46-53.

[ 14 ] 陈 笛, 王鹏杰, 郑玉成, 等. 茉莉花磷酸甲羟戊酸激酶基因克隆及表达分析[J]. 南方农业学报, 2018, 49(10): 1909-1916.

[ 15 ] 莫秋华. 不同产地苍术挥发油提取工艺及生物活性研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2019.

[ 16 ] 于 欢, 刘德文, 龚鹏飞, 等. 苍术炮制方法及其饮片的质量控制、药效评价研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(23): 194-200.

[ 17 ] 张明发, 沈雅琴. 苍术及其活性成分  $\beta$ -桉叶醇的神经药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2017, 14(1): 6-11.

[ 18 ] 刘 迪, 卢 昊, 冯团圆, 等. 不同采收期和干燥方法对茅苍术药材品质的影响研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 606-609.

[ 19 ] 王鹏杰, 陈 丹, 曹红利, 等. 茶树甲羟戊酸激酶基因 *CsMVK* 克隆及表达特性分析[J]. 南方农业学报, 2017, 48(10): 1741-1747.

[ 20 ] 简东琴, 曾令江, 杨颖舫, 等. 南方红豆杉 *MCT* 基因克隆、功能验证及组织表达特异性检测[J]. 南方农业学报, 2019, 50(7): 1408-1416.

[ 21 ] 范雨芳, 张 曼, 向礼恩, 等. 黄花蒿 *CMK* 基因的克隆与功能分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2254-2260.

[ 22 ] Wu J X, Xu R, Lu J M, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of two squalene synthase genes in *Atractylodes lancea*[J]. *Planta*, 2021, 255(1): 8.

[ 23 ] 梅利那. 马尾松产脂相关基因的挖掘及功能研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.

[ 24 ] 冉晓茹, 洪 骏, 晏法哲, 等. 植物 *PDCT* 基因家族的鉴定与生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(13): 4177-4187.

[ 25 ] Niu M Y, Xiong Y P, Yan H F, *et al.* Cloning and expression analysis of mevalonate kinase and phosphomevalonate kinase genes associated with the MVA pathway in *Santalum album*[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 16913.

[ 26 ] 郑 汉, 虞慕瑶, 濮春娟, 等. 香樟甲羟戊酸-5-磷酸激酶基因 *CcPMK* 的克隆和表达分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(1): 78-84.