

光果甘草 *ARPI* 基因的克隆和生物信息学分析

田少凯, 侯嘉铭, 高智强, 杨林, 张智新, 刘颖*
(北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488)

[摘要] **目的:**克隆光果甘草生长素/吲哚乙酸蛋白(Aux/IAA)(*GgARPI*)基因并进行生物信息学分析。**方法:**取光果甘草新鲜主根,提取 RNA,通过逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)克隆 *GgARPI* 基因互补脱氧核糖核酸(cDNA)序列,测序并对其进行生物信息学分析。**结果:**克隆得到长度为 686 bp 的 *GgARPI* 基因 cDNA 序列,包含 1 个 585 bp 的完整开放阅读框(ORF),编码 194 个氨基酸残基。生物信息学分析表明 *GgARPI* 编码蛋白为稳定亲水蛋白,相对分子质量 21.95 kDa,等电点 6.85,不含信号肽,无跨膜区,二级结构以无规卷曲为主,包含 1 个 Aux/IAA 蛋白超家族结构域。同源性分析表明 *GgARPI* 基因与豆科植物的亲缘关系较近,与单子叶植物谷子 *Setaria italica* 的进化关系最远。**结论:**首次克隆得到 *GgARPI* cDNA 序列,为进一步研究 *GgARPI* 基因的功能及其对甘草酸生物合成的分子调控机制奠定了基础。

[关键词] 光果甘草; 生长素响应蛋白; 生长素/吲哚乙酸蛋白; 甘草酸; 生物信息学; 开放阅读框; *GgARPI* 基因

[中图分类号] R22;R28;R931;Q78;R318 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0185-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191951

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190618.0930.006.html>

[网络出版时间] 2019-06-19 10:45

Cloning and Bioinformatic Analysis of *ARPI* Gene from *Glycyrrhiza glabra*

TIAN Shao-kai, HOU Jia-ming, GAO Zhi-qiang, YANG Lin, ZHANG Zhi-xin, LIU Ying*
(School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[Abstract] **Objective:** To clone the complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) of auxin/indole acetic acid protein (Aux/IAA) from *Glycyrrhiza glabra* (*GgARPI*) and analyze its sequence by bioinformatics. **Method:** RNA was extracted from fresh root of *G. glabra*, the cDNA sequence of *GgARPI* gene was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), then sequencing and bioinformatic analysis were performed. **Result:** The *GgARPI* cDNA sequence with the full length of 686 bp was obtained from *G. glabra*. The full open reading frame (ORF) was 585 bp, encoding 194 amino acid residues. The bioinformatic analysis showed that the protein coded by *GgARPI* was a stable hydrophilic protein, with a relative molecular weight of 21.95 kDa and isoelectric point of 6.85. It contained no signal peptides or transmembrane domain. Its secondary structure mainly consisted of random coil. An Aux/IAA superfamily was included in the conserved domain. Homology analysis indicated that it had a close evolutionary relationship with leguminous plants, and a distant evolutionary relationship with monocotyledon, such as *Setaria italica*. **Conclusion:** *GgARPI* cDNA sequence is successfully cloned from *G. glabra* for the first time, which will lay a foundation for studying the function of *GgARPI* and explaining the molecular regulatory mechanism of biosynthesis of glycyrrhizic acid in *G. glabra*.

[Key words] *Glycyrrhiza glabra*; auxin responsive protein; auxin/indole acetic acid protein; glycyrrhizic acid; bioinformatics; open reading frame; *GgARPI* gene

[收稿日期] 20190429(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503181)

[第一作者] 田少凯,在读硕士,从事药用植物功能基因与分子生药学研究,E-mail:tiansk0310@163.com

[通信作者] *刘颖,博士,副教授,从事药用植物功能基因与分子生药学研究,E-mail:liuyliwd@sina.com

甘草是我国最常用的大宗药材之一,素有“十方九草”之美誉,临床使用频率极高,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛和调和诸药等作用^[1]。现代药理学研究表明,甘草具有抗炎^[2]、抗病毒^[3]、抗氧化^[4]、抗菌^[5]、免疫调节^[6]、护肝^[7]、降低胆固醇^[8]等药理活性。除药用价值外,甘草在食品^[9]、农牧业^[10]等领域也有广泛应用。

甘草为多基原药材,2015 年版《中国药典》规定甘草为豆科植物乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis*, 光果甘草 *G. glabra* 和胀果甘草 *G. inflata* 的干燥根及根茎。同时规定指标性成分甘草酸的含量不得低于 2.0%^[1]。虽然三基原甘草均可入药,但甘草酸含量存在显著差异。本课题组前期对全国四大药材市场的甘草药材进行质量调查,结果发现市售甘草以乌拉尔甘草和光果甘草为主,且光果甘草中甘草酸含量最高^[11]。提示光果甘草是研究甘草酸生物合成分子调控机制的良好实验材料。

甘草酸的生物合成受多条代谢途径共同调控,大量文献报道显示植物激素与甘草酸的生物合成密切相关^[12-14],例如适当浓度的茉莉酸甲酯可以提高甘草幼苗中甘草酸的含量,而赤霉素则会降低甘草幼苗中甘草酸的含量^[12]。生长素在植物生长发育过程中扮演着重要角色,几乎参与植物生长发育的整个过程。本课题组前期对光果甘草进行了转录组测序分析,发现甘草酸含量变化与光果甘草生长素/吲哚乙酸蛋白(Aux/IAA)(GgARPI)基因的表达水平有密切关系,说明研究 GgARPI 基因功能有助于解析并调控甘草酸的生物合成过程。

ARPI 是植物信号转导途径上的基因,编码一类短周期蛋白 Aux/IAA,其结构上有 4 个保守结构域,在生长素信号转导过程中起着核心调控作用^[15]。ARPI 基因已经在大豆 *Glycine max*^[16],玉米 *Zea mays*^[17],拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[18],番茄 *Solanum lycopersicum*^[19]等植物中被成功克隆,但尚无甘草中的相关报道。本实验选择光果甘草为植物材料,根据本课题组前期对光果甘草转录组测序的实验结果设计特异性引物^[20],克隆其 ARPI 基因 cDNA 序列并进行生物信息学分析,为进一步研究甘草酸生物合成的分子调控机制提供参考。

1 材料

A300 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司),SW-CJ-1D 型洁净工作台(江苏苏州苏洁净化设备厂),DLHR-Q200 型恒温震荡培养箱(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司),

MDF-U3386S 型 -80 °C 超低温冰箱(日本 SANYO 公司),1-13 型离心机(美国 Sigma 公司),DYY-8 型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司),H6-1 微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂),BG-gdsAUTO510 型凝胶成像系统(北京百晶生物技术有限公司),Research Plus 型微量移液器(德国 Eppendorf 公司),Gene5 型酶标仪(美国 BioTek 公司)。

琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(批号 71661152),10 × LA PCR Buffer(批号 AH80373A),10 mmol·L⁻¹ dNTP(批号 131229018)以及核糖核酸酶(RNase)抑制剂(批号 716181BC)均购自北京博迈德生物技术有限公司;pMD-19T 载体(批号 AI52389A),BM2000 DNA Marker(批号 736568AH),寡聚胸腺嘧啶引物[Oligo(dT),批号 T2101BA],GoldenView(批号 745879GA),氨苄青霉素(Amp,批号 R1/69/372),大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞(批号 725981FF),LA Taq DNA 聚合酶(批号 AI51041A),6 × DNA loading buffer(批号 A7301A)均购自北京拜尔迪生物技术有限公司;LB 培养基所需药品(北京冠星宇科技有限公司,批号 1357059);一站式 DNA/RNA/蛋白提取试剂盒(批号 DA18KA6832),琼脂糖(批号 111860),M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(批号 AH20013A)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。来自中国医学科学院药用植物研究所的 2 年生光果甘草,经北京中医药大学刘颖副教授鉴定为豆科植物光果甘草 *Glycyrrhiza glabra*,采收新鲜的根样,-80 °C 保存。

2 方法

2.1 光果甘草总 RNA 的提取和逆转录 取光果甘草主根于液氮中研磨至粉末,使用一站式 DNA/RNA/蛋白提取试剂盒提取光果甘草总 RNA。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量及完整性,利用酶标仪测定不同波长下的吸光度 A,计算 A_{260 nm}/A_{280 nm},以确定所提 RNA 的纯度及浓度。以光果甘草总 RNA 为模板,Oligo(dT)为引物,采用 M-MLV 反转录试剂盒反转录生成 cDNA。

2.2 GgARPI 基因 cDNA 序列的 PCR 扩增 根据甘草的基因组文件(<http://ngs-data-archive.psc.riken.jp/Gur-genome/download.pl>)确定 GgARPI 基因的 CDS 序列(coding sequences),使用美国国立生物技术信息中心(NCBI)的 Primer-BLAST,在基因的 CDS 两端设计引物,分别为 ARPI-F(5'-ACAATGAAAACAAGGTGGCAT-3')和 ARPI-R(5'-

ACTTCCAAGAACCCATGCTGAA-3')。采用 25 μL 的 PCR 扩增体系,包括模板 cDNA 1 μL , RNase-free 水 18.25 μL , 上游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.5 μL , 下游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.5 μL , dNTP 2.0 μL , $10\times$ LA PCR Buffer 2.5 μL , LA *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μL 。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s(35 个循环); 74 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

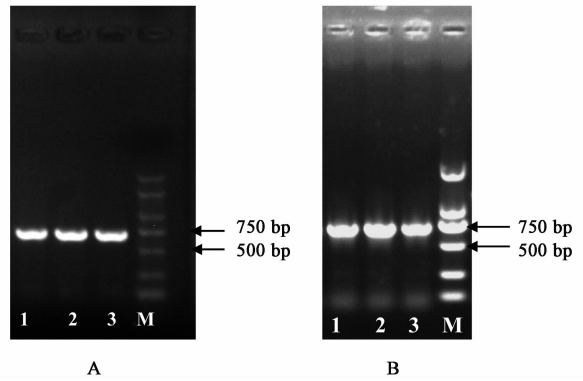
2.3 *GgARPI* 基因 cDNA 序列的胶回收、连接、转化及测序 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果,采用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行胶回收纯化。将胶回收产物与 pMD-19T 载体于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 12 h,将连接产物转化进大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,涂于含 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Amp 的 LB 培养基平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 12 h; 随机挑取单菌落,接种于含 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Amp 的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养 12 h; 对菌液进行 PCR 扩增,阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.4 生物信息学分析 采用 ContigExpress 9.10 对双向测序结果进行拼接,得到 *GgARPI* 基因的全长 cDNA 序列; 利用 EditSeq 7.10 寻找开放阅读框(ORF),并翻译成氨基酸序列; 将所得 ORF 及氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对; 使用在线工具 EsPASy-ProtParam 分析氨基酸序列的理化性质; 使用 SOPMA 和 Swiss-Model 分别分析氨基酸序列的二级结构和三级结构; 采用 NCBI 的保守结构域数据库(CDD)预测蛋白的保守结构域; 采用在线软件 SignalP 4.1 Server 预测其信号肽; 采用 TMHMM Server 2.0 预测蛋白跨膜结构域; 利用 MEGA 6.0 进行 cDNA 序列及氨基酸序列的聚类分析。

3 结果

3.1 光果甘草 *GgARPI* 基因克隆 光果甘草总 RNA 提取结果呈现清晰的 18S, 28S 和 5.8S 条带, 酶标仪检测结果显示 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 处于 1.8 ~ 2.0, 表明总 RNA 质量合格,可用于后续实验。以逆转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得了长度约为 680 bp 的特异性条带,与目的基因长度一致,扩增结果见图 1(A)。连接转化后菌液 PCR 获得了与目的基因长度一致的条带,表明目的基因成功连接至 pMD-19T 载体,扩增结果见图 1(B)。

3.2 *GgARPI* cDNA 及氨基酸序列的 BLAST 分析 测序拼接结果显示所得片段长度为 686 bp, EditSeq 7.10 分析显示其 ORF 全长 585 bp, 共编码 194 个氨基酸残基。在 GenBank 上对所得 cDNA 序列进行注



A. 目的基因; B. 菌液; M. DNA Marker; 1 ~ 3. 3 个 PCR 样本

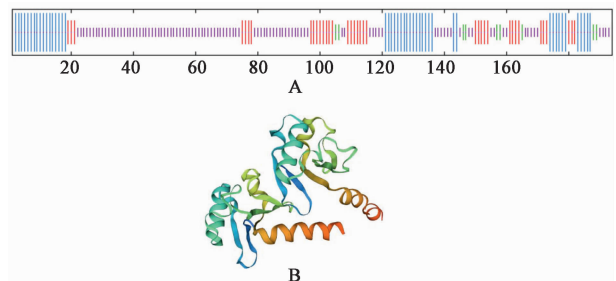
图 1 *GgARPI* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *GgARPI* gene

册,注册登录号为 MK638907。ORF 序列以及氨基酸序列经 NCBI 数据库 BLAST 比对,该片段与大豆的生长素响应蛋白基因相似度 86%, 蛋白序列的相似度 79%, 证明已成功克隆得到光果甘草 *GgARPI* cDNA 序列。

3.3 *GgARPI* 蛋白理化性质分析 利用在线工具 ProtParam 对 *GgARPI* cDNA 编码的氨基酸序列进行理化性质分析,得蛋白分子式 $\text{C}_{961}\text{H}_{1525}\text{N}_{271}\text{O}_{301}\text{S}_8$, 理论相对分子质量 21.95 kDa, 等电点 6.85, 其总平均亲水性(GRAVY) -0.813, 不稳定指数 49.83, 表明 *GgARPI* 为亲水性蛋白且结构稳定。

3.4 *GgARPI* 蛋白二级结构、三级结构预测 利用 SOPMA 对 *GgARPI* 进行二级结构预测,见图 2(A), *GgARPI* 蛋白序列中含 α -螺旋 24.74%, 延长链 19.07% 及无规卷曲 51.55%, 说明 *GgARPI* 的二级结构主要以无规卷曲为主。采用在线软件 Swiss-Model 构建 *GgARPI* 蛋白三级结构模型,见图 2(B)。



A. 二级结构; B. 三级结构; 图 A 中蓝色为 α -螺旋; 紫色为无规卷曲; 红色为延长链; 绿色为 β -转角

图 2 *GgARPI* 蛋白的二级及三级结构预测

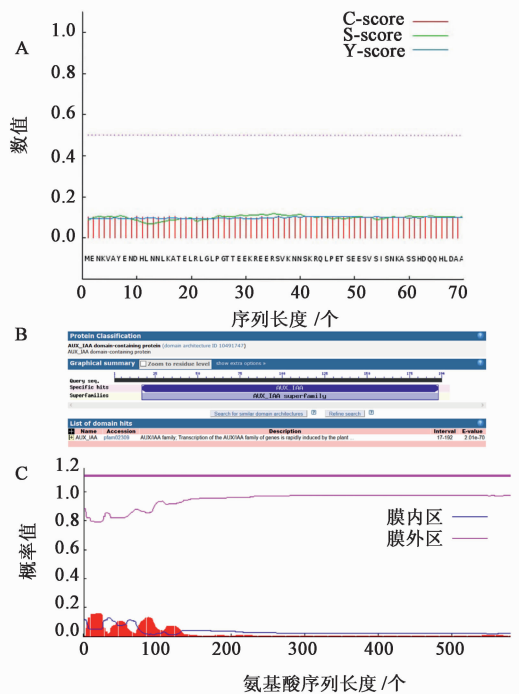
Fig. 2 Prediction of secondary and tertiary structure of *GgARPI* protein

3.5 *GgARPI* 保守结构域、跨膜结构域及信号肽的预测 利用 SignalP 4.1 Server 在线软件进行信号肽

预测,见图 3(A),结果发现原始剪切位点分值和信号肽剪切位点分值为 0,说明 GgARPI 结构中不含信号肽。使用 NCBI 的 CDD 预测 GgARPI 的保守结构域,见图 3(B),结果表明 GgARPI 属于 *Aux/IAA* 超基因家族。运用 TMHMM Server 2.0 对 GgARPI 进行跨膜结构域预测,见图 3(C),结果显示蛋白位于跨膜区和膜内部的概率很低,该蛋白基本位于膜外。

3.6 GgARPI cDNA 序列及氨基酸序列同源性分析

使用软件 MEGA 6.0 对克隆所得 GgARPI 和从 GenBank 中挑选的 16 条其他物种的 ARPI cDNA 序列进行聚类分析,见图 4。结果发现 GgARPI cDNA 序列和鹰嘴豆 *Cicer arietinum*,大豆 *Glycine max*,绿豆 *Vigna radiata* 等豆科植物的 ARPI cDNA 序列聚在一起,表明光果甘草和豆科植物亲缘关系最近;单子叶植物单独聚成一支,其中谷子 *Setaria italica* 与光果甘草距离最远,亲缘关系最远。对所得 GgARPI 序列和 GenBank 中挑选的 19 条其他物种的 ARPI 氨基酸序列进行聚类分析,见图 5。结果发现 GgARPI 与所有豆科植物的 ARPI 序列聚在一起,表明光果甘草和豆科植物亲缘关系最近;大戟科植物蓖麻和橡胶树聚在一起,与光果甘草亲缘关系较远。



C-score. 原始剪切位点分值;S-score. 信号肽剪切位点分值;Y-score. 综合剪切位点分值

图 3 GgARPI 信号肽 (A), 保守结构域 (B) 及跨膜结构域 (C) 预测
Fig. 3 Prediction of signal peptides (A), conserved domain (B) and transmembrane domain (C) of GgARPI

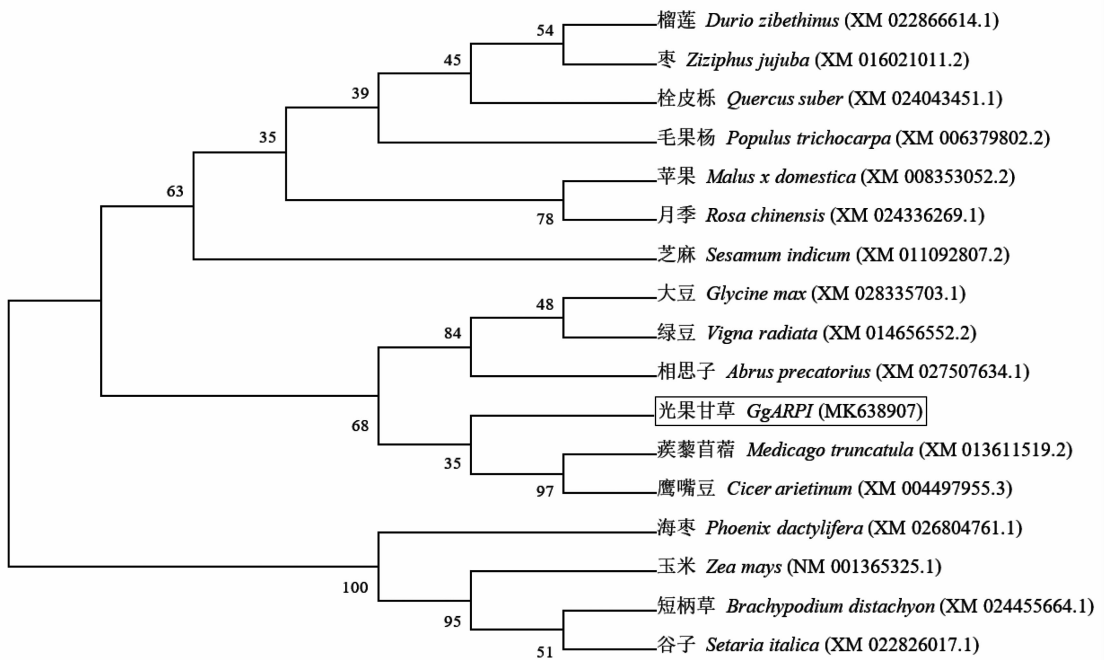


图 4 GgARPI cDNA 序列的系统进化树
Fig. 4 Cluster analysis of GgARPI cDNA sequences

4 讨论

生长素是第 1 种被发现的具有生长效应的植物内源性激素,在植物生长发育过程中起着重要作用。

生长素响应蛋白基因 ARPI 是一种经典的生长素诱导植物组织特异性表达的转录因子,其广泛分布于众多的高等植物中,能够快速被生长素诱导表达,

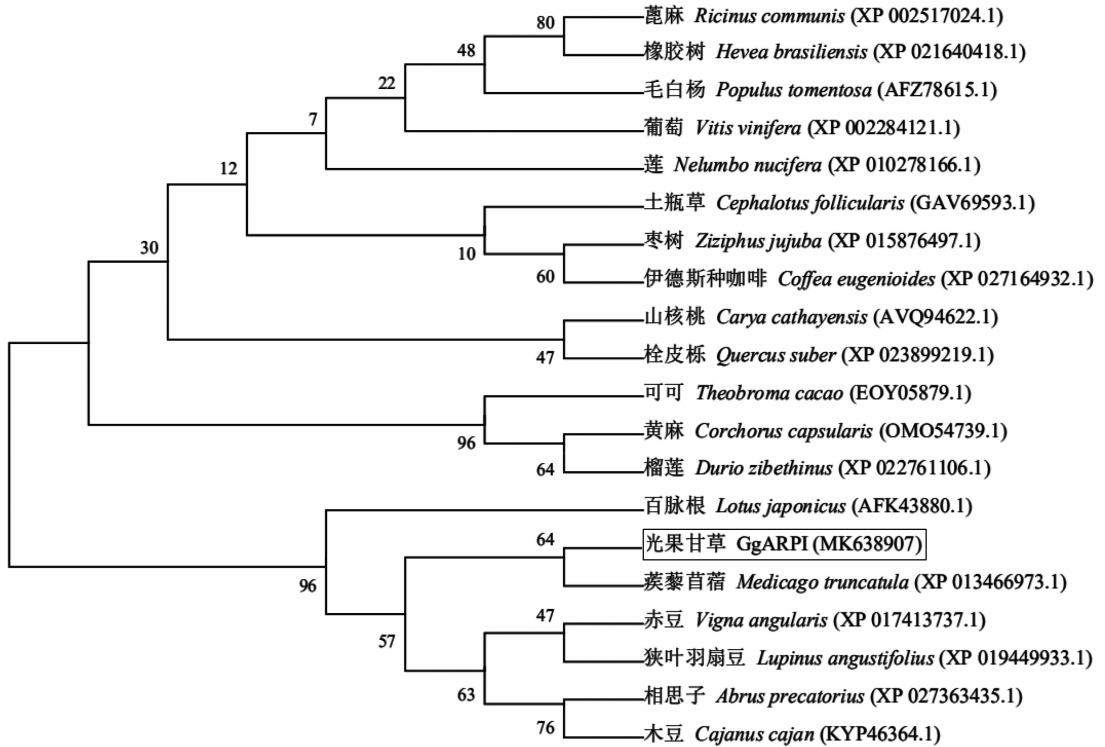


图 5 GgARPI 氨基酸序列的系统进化树
Fig. 5 Cluster analysis of GgARPI amino acid sequences

其编码产物 Aux/IAA 蛋白是生长素信号转导不可或缺蛋白^[21]。ARPI 基因在拟南芥中研究较多,迄今为止,拟南芥中已经分离出 29 个 ARPI 基因家族成员^[22]。目前,GenBank 已注册了 1 万多条与 ARPI 基因相关的核苷酸序列,但光果甘草 ARPI 基因尚未有报道。对生长素应答蛋白的研究主要集中在植物的生长和发育方面,很少关注其对植物次生代谢途径的影响作用。本课题组前期转录组测序研究结果发现,GgARPI 对甘草酸生物合成起正调控作用,作为调节生长素信号转导的枢纽因子,GgARPI 在激素影响甘草代谢产物生物合成中起到至关重要的作用,其基因表达量直接影响光果甘草三萜类有效成分的含量和产量。本研究首次克隆得到光果甘草 GgARPI 基因,测序结果表明所得基因长度 686 bp,包含 1 个 585 bp 的 ORF,生物信息学分析表明 GgARPI 基因编码蛋白为稳定亲水蛋白,平均相对分子质量 21.95 kDa,等电点 6.85,不含信号肽,无跨膜区域,保守结构域包含 1 个 Aux/IAA 超家族结构域,二级结构以无规则卷曲为主,聚类分析表明 GgARPI 基因种间区分度良好。在后续工作中本课题组将继续分析 GgARPI 的基因功能,为进一步研究甘草酸代谢途径的分子调控机制奠定基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:86-87.
[2] Kim Y W, ZHAO R J, Park S J, et al. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production [J]. Br J Pharmacol, 2008, 154 (1):165-173.
[3] Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, et al. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus *in vitro* [J]. PLoS One, 2013, 8(7):e68992.
[4] 韩雅慧,陶宁萍. 甘草黄酮提取及其抗氧化能力测定方法研究进展[J]. 山西农业科学, 2010, 38(11): 89-93.
[5] LONG D R, Mead J, Hendricks J M, et al. 18 β -Glycyrrhetic acid inhibits methicillin-resistant Staphylococcus aureus survival and attenuates virulence gene expression [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(1):241-247.
[6] Lee J Y, Lee J H, Park J H, et al. Liquiritigenin, a licorice flavonoid, helps mice resist disseminated candidiasis due to Candida albicans by Th1 immune response, whereas liquiritin, its glycoside form, does not [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(5):632-638.
[7] 汤丽娜,林峰,沈赞,等. 异甘草酸镁治疗抗肿瘤药物

- 引起的急性药物性肝损伤的Ⅲ期临床试验[J]. 肿瘤, 2012, 32(9): 738-743.
- [8] FU Y, ZHOU E, WEI Z, et al. Glycyrrhizin inhibits the inflammatory response in mouse mammary epithelial cells and a mouse mastitis model[J]. FEBS J, 2014, 281(11): 2543-2557.
- [9] 徐谓, 李洪军, 贺稚非. 甘草提取物在食品中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(10): 274-281.
- [10] 罗燕燕, 刘效栓, 李喜香, 等. 甘草渣化学成分及其综合利用的研究[J]. 西部中医药, 2017, 30(3): 138-141.
- [11] 杨瑞, 李文东, 马永生, 等. 不同基原甘草的分子鉴定及市售甘草药材的质量评价[J]. 药学学报, 2017, 52(2): 318-326.
- [12] 周雪洁. 干旱和外源激素对甘草生理特性及甘草酸积累的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [13] 张国运. 香菇多糖对植物根生长及其基因表达的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2015.
- [14] 李如来. 外源植物激素对甘草生长的影响研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2013.
- [15] 冯寒寒, 李超. 生长素信号转导研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(7): 24-30.
- [16] Singh V K, Jain M. Genome-wide survey and comprehensive expression profiling of *Aux/IAA* gene family in chickpea and soybean [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 918.
- [17] Ludwig Y, ZHANG Y, Hochholdinger F. The maize (*Zea mays* L.) *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* gene family: phylogeny, synteny, and unique root-Type and tissue-specific expression patterns during development [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78859.
- [18] XU F, HE S B, ZHANG J Y, et al. Photoactivated CRY1 and phyB interact directly with AUX/IAA proteins to inhibit auxin signaling in *Arabidopsis* [J]. Mol Plant, 2018, 11(4): 523-541.
- [19] SU L Y, Audran C, Bouzayen M, et al. The *Aux/IAA*, *Sl-IAA17* regulates quality parameters over tomato fruit development [J]. Plant Signal Behav, 2015, 10(11): e1071001.
- [20] 高智强, 胡婷, 张晓冬, 等. 光果甘草 *CHS* 基因的克隆与多态性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 32-38.
- [21] Lavy M, Estelle M. Mechanisms of auxin signaling [J]. Development, 2016, 143(18): 3226-3229.
- [22] LUO J, ZHOU J J, ZHANG J Z. *Aux/IAA* gene family in plants: molecular structure, regulation, and function [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): E259.

[责任编辑 刘德文]