

文章编号: 1674-7054(2016)01-0089-03

广藿香中 PTS 基因不同时间点的表达分析

刘璐 吴友根 于靖 张军锋 杨东梅 陈萍

(海南大学 园艺园林学院, 海口 570228)

摘要: 利用荧光定量 PCR 技术, 分析 1 天中 8 个时间点广藿香叶片百秋李醇合成酶基因的表达情况。结果表明 6:00、9:00、12:00 和 15:00 时间点的 PTS 基因表达量较低, 0:00、3:00、18:00 和 21:00 的表达量均显著高于前 4 个时间点, 其中, 时间点 3:00 的表达量最高, 表明 PTS 基因的转录从夜间开始积累, 黎明前达到最高峰, 之后转录水平逐渐下降。

关键词: 广藿香; 生物钟; 百秋李醇合成酶(PTS)

中图分类号: S 567.2

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2016.01.015

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物, 以干燥地上部分入药, 是我国常用的芳香化湿中药, 具有芳香化浊、开胃止呕、发表解暑之功效。百秋李醇作为广藿香挥发油的主要成分, 是历版《中华人民共和国药典》规定的用于评价广藿香药材及广藿香油质量的指标成分^[1]。其功效除了抑菌和抗病毒外, 它还抑制 β -淀粉样蛋白的神经毒性而发挥保护神经的作用^[2]。百秋李醇合成酶 (pat-chouli alcohol synthase, 简称 PTS) 催化百秋李醇合成过程最后一步反应, 因此, 被认为是百秋李醇合成调控的关键酶。生物钟又称生理钟, 它是生物体内的一种无形的“时钟”, 实际上是生物体生命活动的内在节律性, 由生物体内的时间结构序决定。植物中, 生物钟通过调控导引节律的相位来调节植物的生理活动。研究表明, 植物萜类合酶基因的表达受生物钟调节, 通常以日为周期^[3]。百秋李醇是一种存在天然植物中的三环倍半萜化合物, 但 PTS 基因的表达是否受生物钟调节而在 1 天的不同时间点存在表达差异, 这点尚不明确, 迄今也尚未见与“广藿香光周期敏感性的分子机制”相关的研究报道。笔者通过实时荧光定量 PCR 检测, 对 PTS 基因在广藿香叶片中 24 h 的 8 个时间点的表达规律进行了研究, 以期对百秋李醇的代谢调控提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 供试的广藿香材料来源于海南大学园艺园林学院广藿香资源圃。24 h 内 8 个时间点 (0:00、3:00、6:00、9:00、12:00、15:00、18:00 和 21:00, 每隔 3 h 采样 1 次) 采集成熟的广藿香叶片, 用液氮冷冻处理样品, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。试验所用的主要试剂有 DEPC (Sigma 公司), SDS, CTAB, 异硫氰酸胍 (北京鼎国公司), 反转录试剂盒 (Fermentas 公司), SYBR 荧光染料购自 Roche 公司 (德国), 其余试剂均为进口或国产分析纯。荧光定量 PCR 为美国 Agilent 公司的 Mx3005P。试验中所用枪头、PCR 管、离心管等耗材, 均用 0.1% DEPC 处理过夜, 并于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌 20 min, 烘干, 备用。用于 RNA 提取的研钵、玻璃器皿均在 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下烘烤 6~8 h, 备用。

1.2 RNA 提取与 cDNA 的合成 RNA 抽提采用异硫氰酸胍-SDS 法^[4]。取 $4.5\text{ }\mu\text{L}$ RNA, 与上样缓冲液混合后, 点样于 1.2% 琼脂糖凝胶, 120 V 电压电泳 20 min, 用凝胶成像系统观察电泳条带并拍照记录。紫

收稿日期: 2015-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81360618, 31360210); 海南省中药现代化专项 (ZY201413)

作者简介: 刘璐 (1991-), 女, 海南大学园艺园林学院 2013 级硕士研究生, E-mail: 395305896@qq.com

通信作者: 吴友根 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 南药植物种质资源与开发利用, E-mail: wygeng2003@163.com

外分光光度计测其纯度和浓度。总 RNA 参照 Fermentas 反转录试剂盒说明书进行反转录。

1.3 引物设计与 RT-PCR 验证 利用内参基因 18S rRNA 和 PTS 基因检测 cDNA 质量 根据 GenBank 中广藿香 PTS 基因和内参基因 18S rRNA 的 mRNA 序列 采用 Primer 5 软件按照荧光定量 PCR 引物原则设计 PCR 引物 引物由北京诺赛基因组研究有限公司合成。PTS 基因扩增片段引物 ,PTS-F: CGAGCAAT-ACGCATCTCATCAC; PTS-R: AATCTTCACTCAGCTCCCTTCT。内参引物 ,18S-F: TCAACCATAAACGATGC-CGACC; 18S-R: TTTCAGCCTTGCACCATACTCC。设计的荧光引物进行 RT-PCR 验证用 25 μL 体系 程序为 98 °C 30 s; 98 °C 10 s; 53 °C 30 s; 72 °C 1 min; 72 °C 7 min; 中间 3 步 40 个循环。

1.4 荧光定量 PCR 反应 荧光定量 PCR 按 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 试剂盒说明书进行 样本和内参分别设 3 个重复 ,ROX 作为校正荧光 ,18S rRNA 为内参。反应在 96 孔 PCR 板中进行。反应体系 20 μL: SYBR Green Master 10 μL; 正反引物各 0.6 μL; ROX Reference Dye(50 ×) 0.4 μL; 模板 cDNA 2.0 μL; dd H₂O 6.4 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 30 s 95 °C 变性 10 s 60 °C 退火和延伸 34 s ,后两步 40 个循环; 融解曲线反应程序: 由 60 °C 递进升温到 95 °C ,步进 0.5 °C ,恒温 10 s。

1.5 数据处理与分析 采用 ΔΔCT 法对荧光定量 PCR 扩增数据进行处理 ,CT 值与基因的表达量成反比 ,即 CT 值越大 ,表达量越小。基因的表达量为 2^{-ΔΔCT} ,ΔCT = 目标基因的 Ct 值 - 同一样本内参基因的 CT 值 ,ΔΔCT = 处理组(ΔCT 目标基因) - 对照组(ΔCT 目标基因) ,每个样品设 3 次重复 利用统计学软件 SAS 对数据进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量检测 提取的总 RNA 采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,所有样品 RNA 的 28S 和 18S 条带清晰完整 ,无弥散现象(图 1) ,说明 RNA 的质量较好。经分光光度法检测 ,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.8 ~ 2.0 之间 ,表明 RNA 的纯度较高 样品中存在的多糖、多酚或蛋白等杂质较少 符合后续实验的要求。

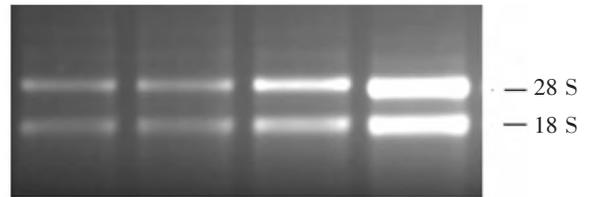


图 1 RNA 电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of RNA

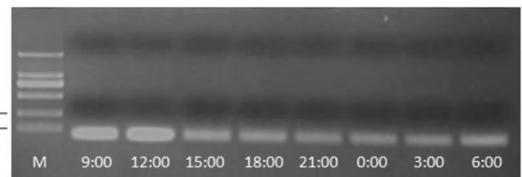
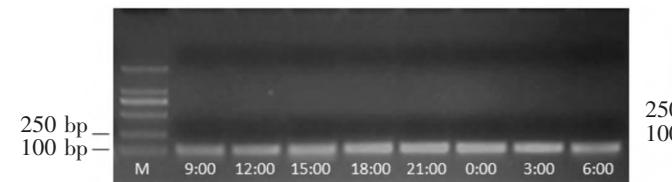


图 2 PTS 基因(左)和 18S rRNA(右)RT-PCR 电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of PTS (L) and 18S rRNA (R) RT-PCR

2.2 PTS 和 18S rRNA 基因 RT-PCR 检测 将设计用于荧光定量 PCR 的 PTS 和 18S rRNA 引物通过 RT-PCR 检测 ,在所有样品中扩增以验证 cDNA 的质量及扩增产物的准确性和特异性。图 2 为以上 2 个基因 RT-PCR 的电泳图谱 结果显示 ,在 100 ~ 250 bp 间均有较亮特异条带 ,无非特异性产物 ,片段大小与预期相符 ,说明 cDNA 第 1 链反转录成功 ,扩增反应具有较高的专一性 ,所设计的引物可以用于荧光定量 PCR 分析。

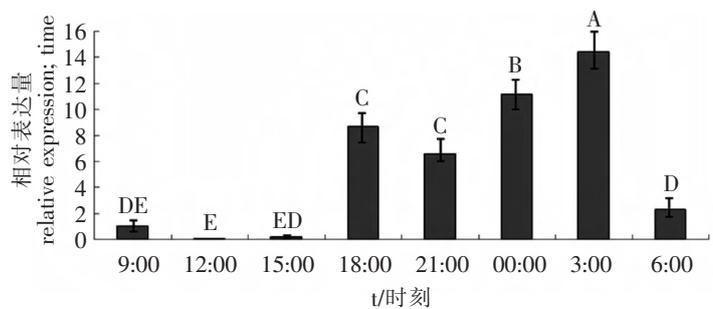


图 3 广藿香叶片 PTS 基因相对表达量

Fig.3 The PTS gene relative expression in leaves from Patchouli

2.3 生物钟对 PTS 基因表达的影响 以 PTS-R ,PTS-F 为引物 ,设定 9:00 的样品中 PTS 基因表达量为 1 采用相对定量的方法 ,分析广藿香成熟叶片在 24 h 内 8 个时间点的样品中 PTS 基因的相对表达水平 ,PTS 基因的表达在夜间出现高峰(图 3) ,3:00 时表达量为最高。基因表达峰首先出现在凌晨 ,之后表达

量逐渐下降,进入夜晚后表达又升高,完成一个循环周期。12:00 和 15:00 的表达量下降到 9:00 的 0.07 和 0.18 倍,0:00,3:00,6:00,18:00 和 21:00 的表达量都分别增加到了 9:00 的 11.16,14.38,2.28,8.68 和 6.56 倍。对不同时间点的表达数据采用方差分析发现 6:00,9:00,12:00 和 15:00 这 4 个时间段 PTS 基因的表达量差异不显著 ($P > 0.05$),而 0:00,3:00,18:00,21:00 与其他 4 个时间段的表达量存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

通过生物钟和光周期的调节,基因在 1 天中不同时间点的表达呈现出一定节律。如 Lu 等^[3]2002 年在青蒿中首次发现萜类生物合成受生物钟调控,萜类合酶基因的表达量和产物呈午后高而夜间低的变化规律。金鱼草中花香生物合成相关(E)- β -罗勒烯和月桂烯合酶基因也在白天表现出表达活性的高峰水平,在 15:00 表达量达到最高峰,在 0:00 下降到最低^[5]。本试验结果表明,在 1 天的不同时间点相关基因的表达存在差异,广藿香 PTS 基因的转录从夜晚就开始积累,黎明前达到最高峰,然后转录水平逐渐下降。这与 CAB 基因和 1,8-桉叶素合酶基因在拟南芥和烟草中的表达相类似^[6]。Harmer 等^[7]的研究也表明,“黎明前”这个相位对于某些代谢过程非常重要,许多基因在“黎明前”会有 1 个 RNA 峰。分析认为,可能是因为这些基因有利于在日出前积累具有光保护作用的化合物。

参考文献:

- [1] Xu Y, Wu Y G, Chen Y, et al. Autotoxicity in *Pogostemon cablin* and their allelochemicals [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2015, 25(2): 328–334.
- [2] Chen Y, Wu Y G, Xu Y, et al. Dynamic accumulation of sesquiterpenes in essential oil of *Pogostemon cablin* [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2014, 24(4): 626–634.
- [3] Lu S, Xu R, Jia J W, et al. Cloning and functional characterization of a β -pinene synthase from *Ariemisia annua* that shows a circadian pattern of expression [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1): 477–486.
- [4] 高志晖,魏建和,熊换英,等. 几种提取白木香茎干总 RNA 方法的比较 [J]. *生物技术通讯*, 2012, 5(23): 718–721.
- [5] Dunlap J C. Molecular bases for circadian clocks [J]. *Cell*, 1999, 96: 271–290.
- [6] Dudarevan, Martin D, Kish C M, et al. (E)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 1227–1241.
- [7] Harmer S L, Hogenesch J B, Straume M, et al. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock [J]. *Science*, 2000, 290: 2110–2113.

Expression Analysis of PTS Gene of *Pogostemon Cablin* at Different Time Points

LIU Lu, WU Yougen, YU Jing, ZHANG Junfeng, YANG Dongmei, CHEN Ping
(College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The patchouli alcohol synthase (PTS) gene was extracted by using real-time PCR technology from the leaves of patchouli (*Pogostemon cablin*) at eight time points in a day to study its expression change. The results showed that the expression of PTS gene was low at 6:00 am, 9:00 am, 12:00 pm and 15:00 pm, but increased much more at 18:00 pm, 21:00 pm, 0:00 am and 3:00 am. PTS gene transcription started to accumulate at night until it reached a peak before dawn, after which the level of transcription was gradually decreased.

Keywords: *Pogostemon cablin*; circadian clock; patchouli alcohol synthase.