

张晓东,李彩霞,王连春,等. 滇龙胆乙酰 CoA 转移酶基因的克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):94-98.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.023

滇龙胆乙酰 CoA 转移酶基因的克隆与表达分析

张晓东¹, 李彩霞¹, 王连春¹, 王元忠²

(1. 玉溪师范学院资源环境学院,云南玉溪 653100; 2. 云南省农业科学院药用植物研究所,云南昆明 650223)

摘要:根据滇龙胆转录组乙酰 CoA 酰基转移酶基因 *GrAACT* 序列设计引物,使用逆转录 PCR(RT-PCR)技术从滇龙胆幼叶扩增该基因,并进行序列分析、原核表达和组织特异性分析。结果表明:*GrAACT* 基因(登录号 KJ917163)开放阅读框长 1 215 bp,编码 404 个氨基酸;*GrAACT* 蛋白相对分子质量 41.41 ku,pI 值为 6.25,属于 AACT 蛋白家族成员,无信号肽,为疏水稳定蛋白,主要由 α -螺旋、无规则卷曲构成;*GrAACT* 蛋白具有 AACT 蛋白保守结构域:硫解酶 N 端结构域(第 12~272 位氨基酸)、硫解酶 C 端结构域(第 282~402 位氨基酸)、类硫解酶结构域(第 13~403 位氨基酸);在硫解酶 C 端结构域中,包含硫解酶保守位点(第 350~366 位氨基酸)、硫解酶活性位点(第 385~398 位氨基酸);滇龙胆 *GrAACT* 蛋白与长春花 *CrAACT* 蛋白亲缘关系最近;*GrAACT* 基因在大肠杆菌中表达的重组蛋白相对分子质量约为 67.41 ku;组织特异性表达分析结果表明,*GrAACT* 基因主要在茎、根中表达。

关键词:滇龙胆;乙酰 CoA 酰基转移酶;基因克隆;生物信息学分析;表达分析

中图分类号: S184;R282.71;Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0094-05

滇龙胆是传统中药龙胆的来源植物之一,也是云南省重要地道药材,主要分布于中国西南部,尤其是云南省山区地带;其根入药,用于治疗各种炎症、肝炎、风湿病和胆囊炎等^[1]。目前,医用龙胆需求量每年递增约 10%,而现有滇龙胆产量低、品质不高,且野生滇龙胆资源遭到人为大肆采挖^[2]。为选育优质、高产、高抗新品种,2013 年 6 月云南省已启动龙胆草航天育种工程^[3]。从中医药现代化角度来看,滇龙胆主要药效成分为龙胆苦苷,要从根本上解决龙胆草资源问题并保护野生滇龙胆,除筛选新品种之外,还必须弄清龙胆苦苷的生物合成途径及其调控机理,为通过基因工程手段生产龙胆苦苷奠定基础。

龙胆苦苷为裂环烯醚萜类化合物,在植物中主要通过质体 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)、胞质甲羟戊酸(MVA)途径合成^[4]。乙酰 CoA 酰基转移酶(又称乙酰乙酰 CoA 硫解酶,AACT,EC 2.3.1.9)是 MVA 途径中的第 1 个限速酶,能够催化 2 分子乙酰 CoA 形成 1 分子乙酰乙酰 CoA^[5]。目前,乙酰 CoA 酰基转移酶基因 *AACT* 已从拟南芥^[5]、丹参^[6]、胡萝卜^[7]、白木香^[8]、油茶^[9]等许多植物中分离。*AACT* 基因表达具有组织特异性,并被生物、非生物因素诱导。拟南芥中存在 2 个平行进化的同源基因,其中 *AtAACT1* 主要在维管系统中表达,*AtAACT2* 则在根尖、幼叶、茎上部和花药中大量表达,二者存在功能冗余;*AtAACT2* 的作用是为胞质定位、MVA 起源的异戊烯萜类生物合成途径合成大量

乙酰乙酰 CoA 前体^[5]。在生物诱导剂(100 mg/mL 酵母提取物)、非生物诱导剂(30 mmol/L Ag^+)共同诱导下,丹参 *SmAACT* 基因在诱导后 12 h 的表达量达到最高值^[10]。

目前,由于龙胆基因组资源极度匮乏^[11],导致龙胆苦苷生物合成途径并不清楚^[3]。本研究根据笔者实验室滇龙胆转录组数据库中的 *GrAACT* 基因序列,设计特异性引物,通过逆转录 PCR(RT-PCR)技术成功从滇龙胆幼叶中扩增到 *GrAACT* 基因,并进行序列分析、原核表达和组织表达特异性分析,以期为阐明滇龙胆龙胆苦苷生物合成途径及其调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

滇龙胆组培苗、盆栽苗均采自玉溪师范学院分子生物学实验室,经云南省农业科学院药用植物研究所金航研究员鉴定为滇龙胆(*Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl)。基因克隆所用材料为滇龙胆无菌苗幼叶,基因组织特异性表达分析所用材料为盆栽 3 年生滇龙胆的根、茎、叶,采样日期为 2014 年 5 月 17 日。

1.2 方法

按照多糖植物组织提取试剂 RNAiso(TaKaRa,大连)说明书提取滇龙胆幼叶总 RNA;按照逆转录试剂盒(TaKaRa,大连)说明书合成 cDNA。根据原核表达载体 pGEX-4T-1 多克隆酶切位点和笔者所在实验室前期测序的滇龙胆转录组 *GrAACT* 基因序列,设计 1 对特异引物 *GrAACT* BamH I-F、*GrAACT* Xho I-R(表 1)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为:0.5 μL TransTaq Taq DNA Polymerase High Fidelity(2.5 U/ μL ,北京全式金生物技术有限公司),5 μL 10 \times TransTaq HiFi Buffer II,4 μL dNTP(2.5 mmol/L,TaKaRa,大连),2 μL 模板,各 1 μL 正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$),加 dd H₂O 补足至 50 μL 。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,

收稿日期:2015-05-27

基金项目:国家自然科学基金(编号:81260608);国家科技支撑计划(编号:2011BAI13B02-04);云南省教育厅科学研究基金重点项目(编号:2015Z171)。

作者简介:张晓东(1980—),男,河南新郑人,博士,副教授,从事植物代谢基因工程研究。E-mail:zxd95@126.com。

通信作者:王元忠,硕士,助理研究员,从事药用植物资源评价与利用的研究。E-mail:boletus@126.com。

55.5℃ 30 s,72℃ 75 s,30 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,然后割胶,使用胶回收试剂盒 (Qiagen,德国)对目的片段进行回收,将其连接到 pMD19-T 载体 (TaKaRa,大连)。转化大肠杆菌 DH5α (TaKaRa,大连)后进行蓝白斑筛选,挑取 12 个白斑摇菌;使用试剂盒提取质粒 (北京百泰克生物技术有限公司),经酶切检测正确后进行测序[生工生物工程(上海)股份有限公司],获得重组质粒 pMD19-GrAACT。

1.2.1 GrAACT 基因的生物信息学分析 用 NCBI 网站的 BLAST 程序进行序列比对,用 Genetyx 6.1.8 进行翻译,用 DNAMAN 7 进行多序列比对,用 Clustal X2.1 进行比对,然后用 MEGA 6.0 软件内置的 NJ 法构建系统进化树,设置 Bootstrap = 1 000;利用在线数据库 (http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_11.html)进行稀有密码子分析。用 ChloroP 服务器 v1.1 进行叶绿体转运肽预测;用 Interpro 软件进行保守结构域预测;用 ProtScalee 软件进行疏水性分析;用 PredictProtein 对二级结构进行预测;用 Phyre2 ([http://www.sbg.bio.ic.ac.](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index)

[uk/phyre2/html/page.cgi?id=index](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index))对三级结构进行预测;用 ExPasy 中的 TMHMM 工具预测蛋白的跨膜螺旋区;用在线工具 WOLF PSORT 预测蛋白的亚细胞定位情况。

1.2.2 GrAACT 基因的荧光实时定量分析 分别取 3 年生滇龙胆的根、茎、叶,提取总 RNA,用 DNase I 处理除去基因组 DNA。用反转录试剂盒 (TaKaRa)合成第 1 链 cDNA。以转录组中 GrGAPDH 基因 (GenBank 登录号 KM061807)作为内参设计特异性引物 (表 1),PCR 条件:95℃ 3 min,95℃ 15 s,60℃ 31 s。根据 GrAACT 基因开放阅读框 (ORF)序列设计特异性引物 (表 1),使用 SuperReal PreMix Plus 试剂盒 [天根生化科技 (北京)有限公司]进行 qPCR,扩增条件为:95℃ 3 min,95℃ 15 s,60℃ 31 s;每个反应重复 3 次。反应在 ABI7000 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems)上进行扩增,扩增曲线、溶解曲线、标准曲线由定量 PCR 仪软件自动生成。使用内参基因 GrGAPDH 表达校准后,计算根、茎、叶中 GrAACT 基因的相对表达量。采用比较 C_T 值的“ $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ”的方法进行定量数据的分析处理。

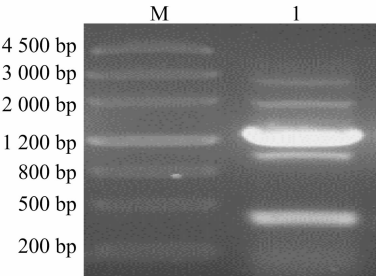
表 1 GrAACT 基因克隆和荧光定量分析的引物序列

基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 T_m (℃)
GrAACT 基因克隆	GrAACTBam HI - F	GGATCCATGGCTCCAGCAACAGC	55.5
	GrAACTXho I - R	CTCGAGTTACAGAAGCTCTACAACAAGGG	55.5
GrAACT 基因 qPCR	GrAACT - F	CAGTTGAAGTGCCTTGCTGGAA	60.0
	GrAACT - R	ACCGCTGACCAAGACTAAAGC	60.0
GAPDH 内参基因	GrGAPDH - F	AAGCGAGGTGCGAAGAAAGT	60.0
	GrGAPDH - R	AAGGAGCAAGACAGTTGGTTGT	60.0

2 结果与分析

2.1 滇龙胆 GrAACT 基因的克隆

以滇龙胆幼叶 cDNA 为模板,使用表 1 中的基因特异性引物 GrAACTBamHI - F、GrAACTBamHI - R 扩增出约 1 200 bp 的片段,详见图 1。通过 TA 克隆获得重组质粒 pMD19-GrAACT。



M—DNA marker III; 1—GrAACT 基因扩增结果
图1 滇龙胆 GrAACT 基因的 PCR 扩增结果

2.2 GrAACT 基因的生物信息学分析

2.2.1 GrAACT 基因的 ORF 分析和多序列比对分析 利用 Genetyx 软件对 GrAACT 基因的 ORF 序列进行分析,结果显示:该基因 (GenBank 登录号 KJ91716)长 1 215 bp,编码 404 个氨基酸。利用 GenBank 数据库的 BLASTp 程序对 GrAACT 蛋白进行比对分析,结果表明:滇龙胆 GrAACT 蛋白与长春花 CrAACT 蛋白的序列相似性最高 (88.61%),与单子叶植物玉

米 ZmAACCT 蛋白的相似性 (78.55%)稍低。利用 DNAMAN 7 将 GrAACT 蛋白序列与 NCBI 中相似性较高的部分序列进行多序列比对分析,结果表明:GrAACT 蛋白与已知蛋白序列相比保守性较高 (图 2)。利用 Mega 6.0 将 GrAACT 氨基酸序列与 NCBI 中相似性较高的部分序列进行系统发育分析,结果显示:滇龙胆 GrAACT 蛋白与长春花 CrAACT 蛋白处于同一进化支 (图 3),表明二者亲缘关系较近。

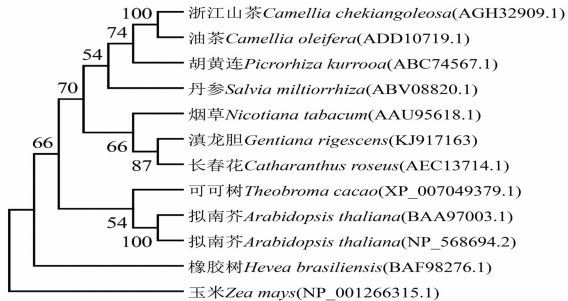
2.2.2 GrAACT 蛋白的理化特性分析 使用 ExPASy ProtParam tool 对 GrAACT 蛋白进行分析,结果表明:GrAACT 蛋白单体相对分子质量为 41 410 u, pI 值为 6.25,这与丹参 SmaACT 蛋白^[6]、油茶 CoAACT 蛋白^[9]、拟南芥 ATAAC2 蛋白^[5]类似;带正电氨基酸残基 (Arg + Lys)数为 36 个,带负电氨基酸残基 (Asp + Glu)数为 38 个,化学式为: C₁₈₁₂ H₂₉₅₉ N₅₀₉ O₅₆₂ S₁₇;不稳定指数为 27.92,属稳定蛋白;脂肪指数为 98.56,总平均疏水性 (GRAVY)为 0.178,为疏水蛋白 (图 4)。GrAACT 蛋白含 20 种基本氨基酸,其中丙氨酸含量最高,为 13.9%;其次是甘氨酸、缬氨酸,含量分别为 11.9%、9.9%;色氨酸含量最低,为 0.5%。

2.2.3 GrAACT 蛋白的二级结构、三级结构分析 利用 SSpro 方法对 GrAACT 蛋白进行二级结构分析,结果表明:该蛋白二级结构中 α-螺旋 (H)占 39.11%,无规则卷曲 (C)占 40.10%,延伸带 (E)占 20.79%。利用 Swiss-Model Workspace 的自动模式预测 GrAACT 蛋白的三级结构,结果见图 5,该模型以人线粒体乙酰 CoA 酰基转移酶 [2f2s.1.C]为模板,在第 13—404 位氨基酸处建模,序列相似度为 52.73%。

滇龙胆 <i>Gentiana rigescens</i> (KJ917163)	...MAPATAE...SISKRDVCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	75
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (AAU95618.1)	...MAPAAD...SIKRDVCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	75
长春花 <i>Catharanthus roseus</i> (AEC13714.1)	...MAPAAKN...SIKRDVCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	76
浙江山茶 <i>Camellia chekiangoleosa</i> (AGH32909.1)	...MAPAATASADSVKSRDCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	79
可可树 <i>Theobroma cacao</i> (XP_007049379.1)	MAPTAAASD...SIKRDVCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	78
油茶 <i>Camellia oleifera</i> (ADD10719.1)	...MAPAATASADSVKSRDCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	79
胡黄连 <i>Picrorhiza kurroo</i> (ABC74567.1)	...MAPAAA...DSIKRDVCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	75
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> (BAF98276.1)	...MAPVAAA...EIKRDVCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	75
丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> (ABV08820.1)	...MAPEAA...SINKRDVCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	74
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_568694.2)	...MAHTSE...SVNPRDCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	74
玉米 <i>Zea mays</i> (NP_001266315.1)	...MPSN...GIAPRDCHVGVARTFPGGFLGTLSSLSATKLGSHAEQALKRANVDPSLVEVFGNVLANSNDGQAF	72
相同部分	a dvc vgv rtp ggflg s atklgs ai alk a dp v ev fgnvlsan gqap	
滇龙胆 <i>Gentiana rigescens</i> (KJ917163)	ARQAALGAGIPNTVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	158
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (AAU95618.1)	ARQAALGAGIPNTVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	158
长春花 <i>Catharanthus roseus</i> (AEC13714.1)	ARQAALGAGIPNTVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	159
浙江山茶 <i>Camellia chekiangoleosa</i> (AGH32909.1)	ARQAALGAGIPNSVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	162
可可树 <i>Theobroma cacao</i> (XP_007049379.1)	ARQAALGAGIPNSVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	161
油茶 <i>Camellia oleifera</i> (ADD10719.1)	ARQAALGAGIPNSVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	162
胡黄连 <i>Picrorhiza kurroo</i> (ABC74567.1)	ARQAALGAGIPNTVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	158
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> (BAF98276.1)	ARQAALGAGIPNSVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	158
丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> (ABV08820.1)	ARQAALGAGIPNSVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	157
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_568694.2)	ARQAALGAGIPNSVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	157
玉米 <i>Zea mays</i> (NP_001266315.1)	ARQAALGAGIPNTVCTITNKVCASGKATMLAAQSIQLGNDVWVAGGMSMSNPVYLDABARKGSRGHDLSVDSMLKDL	155
相同部分	arqaa gagipn v ct nkvcasg ka aqsiqlg nd vvagmsmsn pky a arkgshr ghd lvd m kdgl	
滇龙胆 <i>Gentiana rigescens</i> (KJ917163)	WVINYDCMGVCAEACENHEISREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	241
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (AAU95618.1)	TDVYKDCMGVCAEACENHKITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	241
长春花 <i>Catharanthus roseus</i> (AEC13714.1)	WVINYDCMGVCAEACENHITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	242
浙江山茶 <i>Camellia chekiangoleosa</i> (AGH32909.1)	WVINYDCMGVCAEACENHITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	245
可可树 <i>Theobroma cacao</i> (XP_007049379.1)	WVINYDCMGVCAEACENHITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	244
油茶 <i>Camellia oleifera</i> (ADD10719.1)	WVINYDCMGVCAEACENHITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	245
胡黄连 <i>Picrorhiza kurroo</i> (ABC74567.1)	WVINYDCMGVCAEACENHITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	241
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> (BAF98276.1)	WVINYDCMGVCAEACENHITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	241
丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> (ABV08820.1)	WVINYDCMGVCAEACENHITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	240
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_568694.2)	WVINYDCMGVCAEACENHITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	240
玉米 <i>Zea mays</i> (NP_001266315.1)	WVINYDCMGVCAEACENHITREDOYVOSFERGIAAQDCGAFSMEIVFVBSGGRGKSTIVDQDGLKDAALRK	238
相同部分	dvy d mg cae ca re gd s rgiaa af wei p ev grg p kd l k d kl k	
滇龙胆 <i>Gentiana rigescens</i> (KJ917163)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	324
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (AAU95618.1)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	324
长春花 <i>Catharanthus roseus</i> (AEC13714.1)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	325
浙江山茶 <i>Camellia chekiangoleosa</i> (AGH32909.1)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	328
可可树 <i>Theobroma cacao</i> (XP_007049379.1)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	327
油茶 <i>Camellia oleifera</i> (ADD10719.1)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	328
胡黄连 <i>Picrorhiza kurroo</i> (ABC74567.1)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	324
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> (BAF98276.1)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	324
丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> (ABV08820.1)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	323
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_568694.2)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	323
玉米 <i>Zea mays</i> (NP_001266315.1)	LRPSREBTGGTVAGNASSISDGAALVLVSGEKLKLGCHUTAKRGYADAAQPEFTTAPATAIPKTAISNAGLEASQIDV	321
相同部分	lrps k g vtagnassisdgaal lvs g l l v i gy daa pe ftt pa aipk a l s d	
滇龙胆 <i>Gentiana rigescens</i> (KJ917163)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	403
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> (AAU95618.1)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	403
长春花 <i>Catharanthus roseus</i> (AEC13714.1)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	404
浙江山茶 <i>Camellia chekiangoleosa</i> (AGH32909.1)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	407
可可树 <i>Theobroma cacao</i> (XP_007049379.1)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	406
油茶 <i>Camellia oleifera</i> (ADD10719.1)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	407
胡黄连 <i>Picrorhiza kurroo</i> (ABC74567.1)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	403
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> (BAF98276.1)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	403
丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> (ABV08820.1)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	399
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_568694.2)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	402
玉米 <i>Zea mays</i> (NP_001266315.1)	YEINEAFVAVLANCKLIGLNPEKVNVEGGAVSLGHPLGCSGARILVTLGLVQRKNGKYGVGVCNCGGGGASALVLEI	400
相同部分	eineaf v l n kll e nv ggav lghplgcsgaril tllg l	

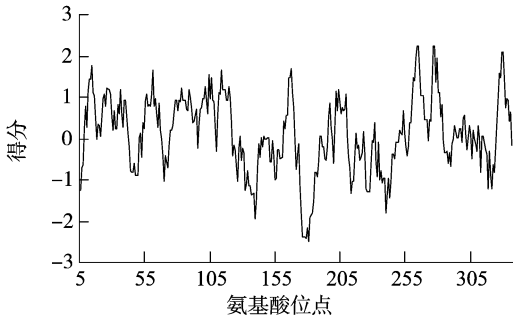
黑色部分表示相似性=100%；深灰色部分表示相似性的范围：75%≤相似性<100%；
浅灰色部分表示相似性的范围：-50%≤相似性<75%

图2 滇龙胆GrAACT蛋白与其他植物AACT蛋白的多序列对比分析结果



数值代表从1 000次重复计算得到的bootstrap百分比(%)

图3 滇龙胆GrAACT蛋白与其他植物AACT蛋白的系统发育分析结果



得分为正表示疏水；得分为负表示亲水

图4 滇龙胆GrAACT蛋白的疏水性分析

2.2.4 GrAACT 蛋白保守结构域分析 使用 InterPro 在线工
具对 GrAACT 蛋白的保守结构域进行分析,结果表明:GrAACT

蛋白包含 3 个保守结构域,它们分别为疏解酶 N 端结构域
(IPRO20616,第 12—272 位氨基酸)、疏解酶 C 端结构域

(IPR020617, 第 282—402 位氨基酸)、类硫解酶结构域 (IPR016039, 第 13—403 位氨基酸) (图 6)。在硫解酶 C 端结构域中, 包含硫解酶保守位点 (THIOLASE_2, 第 350—366 位氨基酸)、硫解酶活性位点 (THIOLASE_3, 第 385—398 位氨基酸)。



图5 滇龙胆GrAACT蛋白的三维结构预测结果

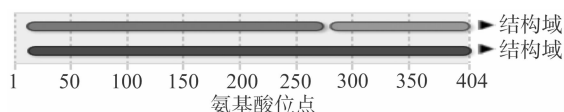


图6 滇龙胆GrAACT蛋白保守结构域的预测结果

2.2.5 GrAACT 蛋白信号肽分析 利用 ExPASy SignalP 4.1 服务器分析 GrAACT 蛋白, 未发现信号肽, 表明该蛋白为非分泌型蛋白。利用 TMHMM 工具预测 GrAACT 蛋白的跨膜螺旋区, 结果表明: GrAACT 蛋白不含有跨膜区域 (图 7)。

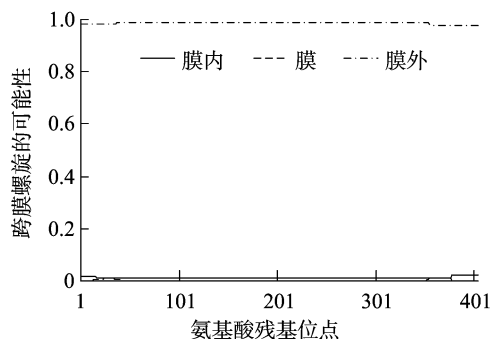


图7 滇龙胆GrAACT蛋白跨膜螺旋的可能性检测结果

2.2.6 GrAACT 蛋白亚细胞定位分析 使用 WoLF PSORT 软件进行亚细胞定位分析, 结果表明, GrAACT 蛋白在细胞质、叶绿体、过氧化物酶体的定位系数分别为 6.0、4.0、3.0。

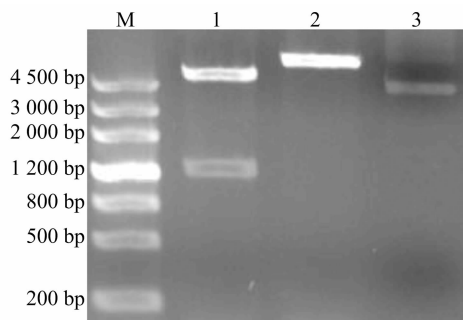
2.2.7 GrAACT 基因稀有密码子分析 使用在线软件对 GrAACT 基因进行稀有密码子分析, 结果表明: GrAACT 基因中稀有密码子占 1.48%, 且无二联或三联稀有密码子连续出现的情况, 因此可选用大肠杆菌表达菌 BL21 或 Rosetta (DE3) 进行原核表达。

2.3 GrAACT 基因原核表达载体的构建

使用酶切检测重组质粒 pGEX-4T-1-GrAACT, 结果表明: BamH I、Xho I 双酶切可切出目的基因和载体, 且二者长度之和等于 Xho I 单酶切产物长度 (图 8), 表明 GrAACT 基因已成功插入载体 pGEX-4T-1。

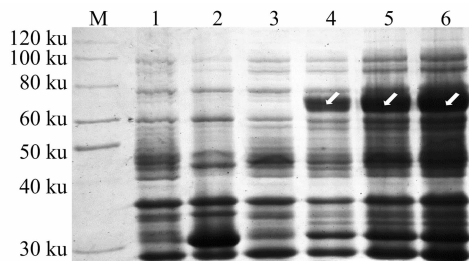
2.4 GrAACT 基因的原核表达

将重组质粒 pGEX-4T-1-GrAACT 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 后, 在 37 °C、1 mmol/L IPTG (终浓度) 下, 分别



M—DNA marker III; 1、2—质粒 pGEX-4T-1-GrAACT 的 BamH I、Xho I 双酶切, Xho I 单酶切结果; 3—质粒对照
图8 质粒pGEX-4T-1-GrAACT酶切检测结果

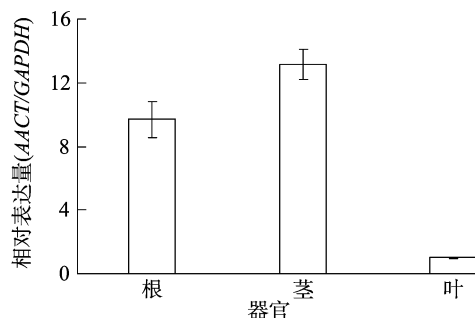
诱导表达 0、2、4、6 h 后, 提取细菌总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。结果表明: 与对照 (第 1~3 泳道) 相比, pGEX-4T-1-GrAACT 转化菌经 IPTG 诱导后, 在相对分子质量 67 410 u (含 GST 蛋白 26 000 u) 左右有 1 条蛋白条带, 并且随诱导时间增加, 其蛋白含量逐渐升高 (图 9), 表明重组质粒 pGEX-4T-1-GrAACT 在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中成功诱导表达了 GrAACT 蛋白。当温度为 37 °C、诱导时间为 6 h 时, 蛋白表达量最大 (图 9), 细胞破碎后可直接用于蛋白纯化。



M—ProteinRuler II; 1、2—37 °C、IPTG 终浓度为 1 mmol/L 下 pGEX-4T-1 空载体转化子分别诱导 0、6 h 的总蛋白表达量; 3~6—相同条件下融合表达菌分别诱导 0、2、4、6 h 的总蛋白表达量; 箭头所指为表达的蛋白
图9 37 °C 下不同诱导时间对 GrAACT 蛋白表达量的影响

2.5 GrAACT 基因的组织表达分析

取 3 年生滇龙胆的根、茎、叶, 提取总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 通过实时荧光定量 RT-PCR 分析 GrAACT 基因在根、茎、叶中的表达情况。图 10 结果表明: GrAACT 基因在茎中表达量最高, 分别约为叶、根的 13.17、1.36 倍, 表达量最低的是叶。



以叶为参照, 设定其中的表达量为 1
图10 滇龙胆 GrAACT 基因在根茎叶中的相对表达

3 讨论

滇龙胆药效成分龙胆苦苷是通过 MVA、MEP 途径合成

的,在前期笔者已经克隆了 MEP 途径关键酶 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因 *GrDXR*^[12]。为阐明龙胆苦苷生物合成途径及其调控机理,本研究克隆了 MVA 途径中的 *GrAACT* 基因。*AACT* 是 MVA 途径的第 1 个催化酶,因此滇龙胆中 *GrAACT* 基因的表达情况可以直接或间接影响龙胆苦苷的生物合成。研究表明,植物中如丹参^[6]、白木香^[8]、油茶^[9] *AACT* 蛋白均包含硫解酶 N 端结构域、C 端结构域和保守位点。本研究从滇龙胆幼叶中克隆获得 *GrAACT* 基因,其编码蛋白序列比对分析结果表明,GrAACT 蛋白属于 AACT 家族蛋白,具有硫解酶 N 端、C 端结构域,并且在 C 端具有保守位点:NVHGGAVALGHPLGCSG(第 350—366 位氨基酸)。这些结果表明,所克隆基因的确为滇龙胆乙酰 CoA 酰基转移酶基因。

根据底物链长特异性,硫解酶被分为 2 类:第 I 类是降解型硫解酶(EC 2.3.1.16),定位于线粒体、过氧化物酶体,在脂肪酸氧化中催化 3-酮脂酰 CoA 断裂产生乙酰乙酰 CoA、缩短的酰基 CoA;第 II 类是合成型硫解酶(EC 2.3.1.9),定位于细胞质,能够催化 2 分子乙酰 CoA 形成 1 分子乙酰乙酰 CoA^[13]。生物信息学分析结果表明,GrAACT 蛋白定位于细胞质,属于 II 型硫解酶,参与胞质中的 MVA 途径。在植物中,AACT 蛋白的定位还存在争议。在拟南芥中,参与 MVA 生物合成途径的 *AtAACT2* 蛋白定位于细胞质^[14];而对拟南芥过氧化物酶体蛋白质组研究结果表明,该蛋白也存在于过氧化物酶体^[15]。在向日葵(*Helianthus annuus*)乙醛酸循环体中,HaAACT 能够催化朝向乙酰乙酰 CoA 方向的反应^[16],说明过氧化物酶体中也存在 AACT。GrAACT 蛋白三维模型预测结果表明,该蛋白的活性形式为四聚体。在本研究中,GrAACT 单体相对分子质量为 41 410 u,其活性形式可能是单体,也可能是四聚体,这需要通过非变性 SDS-PAGE 进行进一步检测。

在拟南芥中,参与 MVA 途径的 *AtAACT2* 基因在根尖、幼叶、茎上部和花药中大量表达^[5]。组织表达特异性检测结果表明,GrAACT 基因在根中的表达量较高,因此推测:滇龙胆根部为龙胆苦苷生物合成的主要器官。滇龙胆用药部分为根,因为与叶、茎相比,根中龙胆苦苷含量最高^[17-18],这也为上述假说提供了证据。在拟南芥中,参与 MVA 途径的 *AtAACT2* 基因是多效基因。首先,*AtAACT2* 对于胚胎形成和正常的雄性配子传递是必需的,*AtAACT2* 突变体不能存活;其次,*AtAACT2* 基因的 RNAi 株系表现出多效的表型,包括减弱的顶端优势、延长的生活周期和开花时间、雄性不育、矮化、种子产量降低、根长变短和植物甾醇类质和量的改变等;再次,当外源添加甲羟戊酸后,*AtAACT2* 基因的 RNAi 株系以上的表型和生化改变都可逆转^[5]。本研究中的 GrAACT 蛋白与 *AtAACT2* 蛋白相似性高达 83.87%,GrAACT 基因是否也为多效基因,需要进一步试验验证。

本研究为滇龙胆的分子生物学研究提供基因资源,并为 *GrAACT* 基因功能的解析奠定基础。下一步将对 GrAACT 蛋白进行纯化和酶活分析,通过互补试验或过表达研究 *GrAACT* 基因的功能,从而为龙胆苦苷生物合成途径的阐明奠定基础。

参考文献:

[1] Suyama Y, Kurimoto S I, Kawazoe K, et al. Rigenolide A, a new

secoiridoid glucoside with a cyclobutane skeleton, and three new acylated secoiridoid glucosides from *Gentiana rigescens* Franch [J]. *Fitoterapia*, 2013, 91: 166-172.

[2] 金航, 张霁, 张金渝, 等. 滇龙胆 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2013.

[3] Zhang X, Allan A C, Li C, et al. De novo assembly and characterization of the transcriptome of the Chinese medicinal herb, *Gentiana rigescens* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(5): 11550-11573.

[4] Hua W, Zheng P, He Y, et al. An insight into the genes involved in secoiridoid biosynthesis in *Gentiana macrophylla* by RNA-seq [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(7): 4817-4825.

[5] Jin H, Song Z, Nikolau B J. Reverse genetic characterization of two paralogous acetoacetyl CoA thiolase genes in *Arabidopsis* reveals their importance in plant growth and development [J]. *The Plant Journal*, 2012, 70(6): 1015-1032.

[6] 崔光红, 王学勇, 冯华, 等. 丹参乙酰 CoA 酰基转移酶基因全长克隆和 SNP 分析 [J]. *药学报*, 2010, 45(6): 785-790.

[7] Bach T J, Boronat A, Campos N, et al. Mevalonate biosynthesis in plants [J]. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology*, 1999, 34(2): 107-122.

[8] 刘娟, 徐艳红, 杨勇, 等. 白木香乙酰乙酰基辅酶 A 硫解酶基因 (*AsAACT*) 的克隆与表达分析 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(6): 972-980.

[9] 张琳, 谭晓风, 胡姣, 等. 油茶乙酰 CoA 酰基转移酶基因 cDNA 克隆及序列特征分析 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2011, 31(8): 108-112.

[10] Gao W, Sun H X, Xiao H, et al. Combining metabolomics and transcriptomics to characterize tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1-14.

[11] Nakatsuka T, Yamada E, Saito M, et al. Construction of the first genetic linkage map of Japanese gentian (*Gentianaceae*) [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 1-15.

[12] 张晓东, 赵静, 李彩霞, 等. 滇龙胆 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因 *GrDXR* 的克隆、序列分析与原核表达 [J]. *中草药*, 2014, 45(16): 2378-2384.

[13] Meng Y, Li J. Cloning, expression and characterization of a thiolase gene from *Clostridium pasteurianum* [J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(16): 1227-1232.

[14] Carrie C, Murcha M W, Millar A H, et al. Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases (KATs) and acetoacetyl-CoA thiolases (ACATs) encoded by five genes in *Arabidopsis thaliana* are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63(1): 97-108.

[15] Reumann S, Babujee L, Ma C, et al. Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(10): 3170-3193.

[16] Oeljeklaus S, Fischer K, Gerhardt B. Glyoxysomal acetoacetyl-CoA thiolase and 3-oxoacyl-CoA thiolase from sunflower cotyledons [J]. *Planta*, 2002, 214(4): 597-607.

[17] 杨美权, 张金渝, 沈涛, 等. 不同栽培模式对滇龙胆中龙胆苦苷含量的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2011(1): 287-289.

[18] 王彩云, 张晓东, 沈涛, 等. 龙胆苦苷生物合成途径研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(3): 4-10.