

· 资源与鉴定 ·

独行菜幼苗叶片乙酰 CoA 酰基转移酶基因克隆、 序列分析与原核表达

赵乐^{1,2}, 马利刚^{1,2}, 杨泽岸¹, 冯卫生^{1,2}, 匡海学³, 郑晓珂^{1,2*}

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450046; 3. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:研究独行菜强心苷生物合成途径的相关基因,从独行菜幼苗叶片中克隆强心苷生物合成途径关键酶乙酰 CoA 酰基转移酶(acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT)基因,进行序列分析和原核表达。方法:根据独行菜转录组数据中 LaAACT 基因序列设计特异性引物,克隆得到 LaAACT 基因的 cDNA 序列,构建 pET-32a-LaAACT 原核表达载体,诱导表达 LaAACT 重组蛋白。结果:LaAACT 基因 ORF 全长为 1 212 bp,编码 403 个氨基酸。序列分析结果显示 LaAACT 蛋白没有跨膜区,不含信号肽,位于细胞质中,含有硫解酶家族保守结构域。系统进化结果显示 LaAACT 蛋白与十字花科植物的 AACT 蛋白亲缘关系较近。通过 IPTG 诱导,在大肠埃希菌中成功表达 LaAACT 重组蛋白,并得到了纯化的 LaAACT 重组蛋白。结论:首次从独行菜幼苗叶片中克隆了 LaAACT 基因,建立其稳定的原核表达体系,为 LaAACT 蛋白抗体的制备,进一步研究 LaAACT 基因在独行菜强心苷生物合成途径中的功能奠定了基础。

[关键词] 独行菜幼苗叶片; 酶乙酰 CoA 酰基转移酶; 基因克隆; 序列分析; 原核表达

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0034-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110034

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1507.034.html>

[网络出版时间] 2016-11-07 15:07

Cloning, Sequence Analysis, and Prokaryotic Expression of LaAACT Gene From Leaves of *Lepidium apetalum* Seedlings

ZHAO Le^{1,2}, MA Li-gang^{1,2}, YANG Ze-an¹, FENG Wei-sheng^{1,2}, KUANG Hai-xue³, ZHENG Xiao-ke^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine

Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China; 3. College of Pharmacy,

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the key enzyme genes involved in cardiac glycosides biosynthesis pathway, acetyl-CoA C-acetyltransferase (AACT) gene, from leaves of *Lepidium apetalum* seedlings, and conduct sequence analysis and prokaryotic expression analysis. **Method:** Based on the transcriptome data of *L. apetalum*, specific primers were designed to obtain cDNA sequence of LaAACT gene, construct prokaryotic expression vector pET-32a-LaAACT and induce the expression of recombinant LaAACT protein. **Result:** LaAACT gene had ORF full length of 1 212 bp, which encoded a protein of 403 amino acid residues. Sequence analysis indicated that LaAACT protein located in cytoplasm had no transmembrane domain and signal peptide, and the conserved domains of thiolase super family were detected. Phylogenetic analysis indicated that LaAACT protein had the closest relationship with AACT protein from cruciferous plant. The recombinant LaAACT protein was successfully expressed

[收稿日期] 20161206(008)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划“973 计划”项目(2013CB531802);河南省科技攻关计划项目(162102310468);河南中医学院博士科研基金项目(BSJJ2011-07)

[第一作者] 赵乐,博士,讲师,从事药用植物分子生物学研究,Tel:18503896960,E-mail:zhaole1983@126.com

[通讯作者] * 郑晓珂,博士,教授,从事中药活性成分及作用机制研究,Tel:0371-65575963,E-mail:zhengxk.2006@163.com

in *E. coli* BL21 (DE3) cells and finally, the recombinant LaAACT protein was purified through Ni^{2+} affinity chromatography. **Conclusion:** LaAACT gene was isolated from leaves of *L. apetalum* seedlings for the first time, and the stable prokaryotic expression system of pET-32a-LaAACT was constructed. This study could provide fundamental information for antibody preparation of LaAACT protein and provide basis for functional researches of LaAACT gene in cardiac glycosides biosynthesis pathway.

[**Key words**] leaves of *Lepidium apetalum* seedlings; acetyl-CoA C-acetyltransferase; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression

独行菜是十字花科植物,在我国分布广泛,其干燥成熟的种子,称为北葶苈子,是中医临床上常用的泻肺平喘、利水消肿中药^[1],此外北葶苈子在强心、改善心血管功能、调节血脂等方面也具有显著的药理作用^[2]。通过对其药效物质基础及作用机制研究,目前已从独行菜中分离得到强心苷类、黄酮类、三萜类、生物碱类、硫苷类等多种化学成分,其中强心苷类化合物具有强心、保护心肌和改善心血管功能等作用,是独行菜重要的药效物质基础之一^[3]。虽然在化学和药理学方面,对独行菜强心苷类成分的研究已有良好的基础,但是关于其生物合成途径及关键基因的报道目前较少,由于独行菜中强心苷类成分含量较低,所以进行独行菜强心苷类成分生物合成途径的研究,对今后利用生物技术提高强心苷类成分含量或者通过合成生物学生产强心苷类成分具有重要意义。

强心苷类化合物和三萜类化合物结构类似,在独行菜体内通过萜类化合物生物合成途径产生,即通过位于细胞质中的甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA pathway)^[4] 和位于质体中的甲基赤藓醇磷酸途径 (methylerythritol phosphate pathway, MEP pathway)^[5] 衍生而来。其中乙酰 CoA 酰基转移酶 (acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT) 是 MVA 途径的第 1 个关键酶,催化 2 个分子的乙酰 CoA 缩合为乙酰 CoA,属于硫解酶 (thiolase) 家族。硫解酶有 2 种类型, I 型硫解酶 (EC 2.3.1.16, 3-ketoacyl-CoA thiolase, KAT) 和 II 型硫解酶 (EC 2.3.1.9, acetoacetyl CoA thiolase, AACT)^[6]。I 型硫解酶位于线粒体和过氧化物酶体中,主要催化脂肪酸 β -氧化的最后一步反应,使脂肪酸的碳链在 β 位断裂,硫解生成 1 分子乙酰 CoA 和少了 2 个碳原子的脂酰 CoA^[7]。II 型硫解酶位于细胞质中,主要催化 2 分子乙酰 CoA 缩合生成乙酰乙酰 CoA,乙酰乙酰 CoA 是生物体激素、胆固醇、酮体、萜类等物质合成的重要前体物^[8]。

目前,AACT 基因已从拟南芥^[9]、丹参^[10]、油茶^[11]、白木香^[12]、雷公藤^[13]、鱼腥草^[14] 等植物中成

功克隆,并进行生物信息分析和表达分析,而独行菜 AACT 基因还未见有报道。本研究首次从独行菜幼苗叶片中克隆得到了 MVA 途径第一个关键酶 AACT 基因的 cDNA 序列,命名为 LaAACT,并进行序列分析和原核表达,通过 Ni^{2+} 亲和色谱获得纯化的 LaAACT 重组蛋白,这将为今后研究 LaAACT 基因在独行菜强心苷类化合物生物合成途径中的功能奠定基础。

1 材料

北葶苈子采自河南省伏牛山自然保护区,经河南中医药大学陈随清教授和董诚明教授鉴定为十字花科植物独行菜 *Lepidium apetalum* 的干燥成熟的种子,将种子种植于人工气候箱中,待种子萌发出 4 片真叶后,将幼苗转移到 1/2 Hoagland 营养液中继续培养,每隔 3 d 更换 1 次营养液,培养 30 d 后,取独行菜幼苗的根、茎、叶,经液氮速冻后保存于 -80°C 超低温冰箱中备用,本研究所用材料为独行菜幼苗叶片。

植物总 RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (北京天根公司,批号分别为 DP437, DP103, DP204, DP209); 反转录试剂盒、大肠埃希菌感受态细胞 Trans5 α 和 BL21 (DE3) (北京全式金公司,批号分别为 AH101-02, CD201-02, CD601-02)。DL 2 000 DNA Marker, DL 10 000 DNA Marker, DNA Taq 酶,限制性核酸内切酶 (*Bam* HI, *Xho*I), pMD19-T Vector, T₄ DNA Ligase (日本 Takara 公司,批号分别为 3427A, 3584A, RR001A, 1010A, 1094A, 2011A); Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒 (北京康为世纪公司,批号 CW0894S); 原核表达载体 pET-32a (+) 为本实验室保存,其他试剂均为国产分析纯。引物合成、样品测序由北京三博远志公司完成。

2 方法

2.1 RNA 的提取与反转录 用植物总 RNA 提取试剂盒提取独行菜幼苗叶片总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 检测总 RNA 的完整性以及浓度和纯度。按照反转录试剂盒说明书,以提取得到的独

行菜幼苗叶片的总 RNA 为模板,以 oligo(dT)₂₀ 为引物,反转录合成得到独行菜幼苗叶片的 cDNA。

2.2 独行菜 LaAACT 基因克隆 根据实验室前期获得的独行菜转录组数据中 AACT 基因的序列信息,用 Oligo7 软件设计 1 对独行菜 AACT 基因的特异性引物,LaAACT: 上游(19 bp) 5'-CGTGTTGCTCTTCATCGTT-3', 下游(21 bp) 5'-CTAACA TTCAACTTCATGTGC-3',以反转录得到的独行菜幼苗叶片 cDNA 为模板,进行 PCR 反应,反应程序 95 ℃,2 min;95 ℃,10 s;55.5 ℃,15 s;72 ℃,1 min 35 s,30 个循环;72 ℃延伸 8 min,PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒切胶回收与预期大小一致的条带,与 pMD19-T 载体进行 T-A 连接,然后转化大肠埃希菌 Trans5 α 感受态细胞,经菌落 PCR 检测后挑选阳性克隆进行测序。

2.3 独行菜 LaAACT 基因的生物信息学分析 将测序得到的 LaAACT 基因的序列信息提交到 NCBI,通过 BLAST 与核酸和蛋白质数据库进行比对搜索,利用 NCBI ORF Finder 查找开放阅读框(open reading frame, ORF),使用 DNAMAN 软件将其翻译成氨基酸序列。使用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam tool 预测 LaAACT 基因编码蛋白的理化性质, PredictProtein 预测蛋白质的二级结构,使用 InterPro Scan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 预测保守结构域,采用 SWISS-MODEL 进行蛋白质的三维同源建模,使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽的预测,利用 Target P 1.1 Server 预测蛋白亚细胞定位,通过 TMHMM Server v. 2.0 预测蛋白跨膜区。使用 DNAMAN 软件对不同植物 AACT 蛋白的氨基酸序列进行多序列比对,使用 MEGA5 软件相邻连接法(neighbor-joining)构建系统进化树,bootstrap 检验的重复次数为 1 000 次。

2.4 独行菜 pET-32a-LaAACT 原核表达载体的构建 根据 LaAACT 基因的测序结果和生物信息学分析结果,设计 1 对 LaAACT 基因编码区的原核表达引物, LaAACT-Exp (23 bp) 5'-CGGGATCC ATGGCTCATACAGCA-3' (下划线部分为 BamH I 酶切位点),反向引物: LaAACT-Exp (24 bp) 5'-CCGCTCGAGTCAAAGGAGTTCAAG-3' (下划线部分为 Xho I 酶切位点),以测序正确的 pMD19-T-LaAACT 质粒为模板,用 PrimeSTAR HS Taq 扩增 LaAACT 基因的 ORF 序列,PCR 程序 95 ℃ 2 min,95 ℃ 10 s,57 ℃ 15 s,72 ℃ 1 min 20 s,30 个循环;72 ℃延伸 8 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,用 DNA

产物纯化试剂盒回收纯化目的基因,然后用 BamH I 和 Xho I 对纯化的 PCR 产物和原核表达载体 pET-32a 进行双酶切,回收目的基因片段和载体片段,用 T₄ DNA Ligase 将目的基因片段和载体片段在 16 ℃ 的连接过夜,然后将连接产物转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,挑单克隆提取质粒,用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切鉴定,酶切鉴定正确的克隆送北京三博公司测序。

2.5 独行菜 LaAACT 重组蛋白的诱导表达与纯化 将测序正确的 BL21 (DE3) 单克隆(含 pET-32a-LaAACT 质粒)接种到 LB 液体培养基中,37 ℃,220 r·min⁻¹ 条件下培养过夜,第 2 天按照 1:100 比例接种到 LB 液体培养基中,继续在 37 ℃,220 r·min⁻¹ 下培养至对数生长期(吸光度 A₆₀₀ 至 0.6 ~ 0.8),然后在 0.4 mmol·L⁻¹ IPTG,28 ℃,150 r·min⁻¹ 条件下培养 8 h,诱导 LaAACT 重组蛋白的表达,诱导完成后,用 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达。

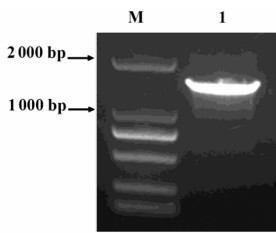
根据诱导条件,大量培养大肠埃希菌 BL21 (DE3) 菌株(含 pET-32a-LaAACT 质粒),诱导完成后在 4 ℃,8 000 × g 离心 5 min 收集菌体,在冰浴中超声破碎大肠埃希菌细胞,直到溶液变清。大肠埃希菌裂解液在 4 ℃,12 000 × g 离心 20 min,取上清经 0.45 μm 滤膜过滤后,利用 Ni²⁺ 亲和色谱,使用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化目的蛋白,用不同浓度(50,100,200,300,500 mmol·L⁻¹)咪唑进行洗脱,经 SDS-PAGE 检测后确定最佳咪唑洗脱浓度,收集单一条带的目的蛋白样品经过透析和超滤,得到纯化的 LaAACT 重组蛋白。

3 结果

3.1 独行菜 LaAACT 基因克隆 通过对本实验室前期获得的独行菜转录组数据进行分析,发现 1 条注释为 AACT 基因的转录本,长度为 1 521 bp,使用 NCBI ORF Finder 检测发现该基因的序列包含 1 个完整的 ORF,根据该基因的序列信息,设计 1 对特异性引物,进行 PCR 扩增,PCR 产物约为 1 500 bp,包含独行菜 LaAACT 基因完整的 ORF 序列,电泳结果如图 1 所示,测序后得到独行菜 LaAACT 基因的 ORF 序列大小为 1 212 bp,位于 213 ~ 1 424 bp 区域,编码 403 个氨基酸,1 ~ 212 bp 为 5' UTR,1 425 ~ 1 521 bp 为 3' UTR, LaAACT 基因的 cDNA 序列信息已经提交到 NCBI GenBank,登录号为 KU739418。见图 1。

3.2 独行菜 LaAACT 基因编码蛋白的生物信息学分析

3.2.1 理化性质分析 由 ExPASy Proteomics



M. DL 2 000 DNA marker; 1. LaAACT 基因的 PCR 产物

图 1 PCR 扩增 LaAACT 基因

Fig. 1 PCR amplification of LaAACT gene

Server 提供的 ProtParam tool 预测独行菜 LaAACT 蛋白的相对分子质量 41.38 kDa, 等电点是 7.00, 分子式为 $C_{1821}H_{2951}N_{511}O_{554}S_{16}$, 带负电荷的残基 (Asp + Glu): 36, 带正电荷的残基 (Arg + Lys): 36, 不稳定系数是 28.68, 说明该蛋白属于稳定蛋白。

3.2.2 保守结构域预测 用 InterPro Scan 预测 LaAACT 蛋白的保守结构域: 硫解酶类似结构域 (thiolase-like) (IPR016039), 硫解酶 N 端保守结构域 (thiolase N-terminal) (IPR020616), 硫解酶 C 端保守结构域 (thiolase C-terminal) (IPR020617), 此外 LaAACT 还有 3 个活性位点, 分别在多肽链 N 端的酰基-酶中间体活性位点 (93 ~ 111 位氨基酸残基) (IPR020615), C 端的硫解酶保守位点 (349 ~ 365 位氨基酸残基) (IPR020613), C 端的硫解酶活性位点 (位 384 ~ 397 氨基酸残基) (IPR020610), 说明 LaAACT 蛋白属于硫解酶家族的成员。

3.2.3 信号肽、亚细胞定位及跨膜区预测 根据 SignalP 预测 LaAACT 蛋白不含信号肽, TargetP 预测结果表明该蛋白可能位于细胞质中, 根据 TMHMM 预测 LaAACT 蛋白不含跨膜区, 为非膜蛋白。

3.2.4 二级结构和三维结构预测 用 PredictProtein 预测 LaAACT 蛋白二级结构, α -螺旋和无规则卷曲是其主要结构元件, α -螺旋占 43.18%, 无规则卷曲占 41.44%, β -折叠占 15.38%。用 SWISS-MODEL 预测 LaAACT 蛋白的三维结构 (图 2)。以大肠埃希菌硫解酶 (PDB ID: 4wys) 的晶体三维结构为模板, 在第 11 ~ 403 位氨基酸残基建模, 三维模型覆盖率为 97%, 序列的一致性为 48.84%, 根据预测结果 LaAACT 蛋白可能以同源四聚体的形式发挥作用。

3.2.5 多序列比对及系统进化分析 将 LaAACT 蛋白的氨基酸序列通过 NCBI blastp 比对 nr 非冗余蛋白数据库, blastp 比对结果显示 LaAACT 蛋白与亚麻荠 (*Camelina sativa*, CsAACT, XP_010482068), 油菜 (*Brassica napus*, BnAACT, XP_013644279), 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, AtAACT, NP_568694), 丹参

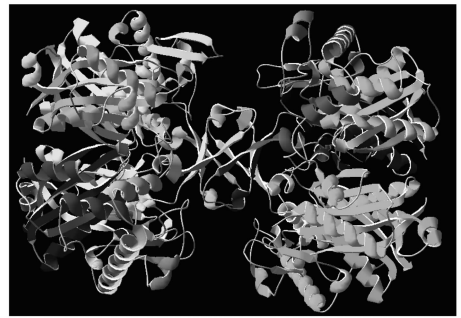


图 2 LaAACT 蛋白质三级结构预测

Fig. 2 Prediction of three-dimensional structure of LaAACT protein

(*Salvia miltiorrhiza*, SmAACT, XP_010942603), 三七 (*Panax notoginseng*, PnAACT, AIK21787), 玉米 (*Zea mays*, ZmAACT, NP_001148667), 烟草 (*Nicotiana tabacum*, NtAACT, AAU95618) 等植物的 AACT 蛋白序列相似度较高, 分别为 96%, 96%, 96%, 85%, 84%, 81%, 78%。用 DNAMAN 软件对这 8 种植物 AACT 蛋白的氨基酸序列进行多序列比对, 根据 InterPro Scan 预测结果 LaAACT 蛋白有 3 个活性位点, 分别是硫解酶的酰基-酶中间体活性位点 (93 ~ 111 位, VNKVCASGMKAVMFAAQSI), 硫解酶保守位点 (349 ~ 365 位, NVNGGAVSLGHPGCSG), 硫解酶活性位点 (384 ~ 397 位, GVGGVCNGGG-GASA), 这与其他植物中 AACT 蛋白的氨基酸序列一致。

从 NCBI BLAST 的比对结果中, 选取 12 种植物, 3 种藻类和 4 种真菌的 AACT 蛋白序列与 LaAACT, 使用 MEGA5 软件相邻连接法 (neighbor-joining) 构建系统进化树 (图 3), 从进化树可以看出, 不同物种来源的 AACT 蛋白在进化上归属不同的分支, 分别聚为植物、藻类和真菌三大类, 其中藻类和植物聚为一大支, 真菌聚为一支, 在植物分支中双子叶植物和单子叶植物分别聚为两支, LaAACT 蛋白与植物来源的 AACT 蛋白同源性高于藻类, 属于植物分支中的双子叶植物, 与拟南芥、亚麻荠和油菜等十字花科植物亲缘关系较近。

3.3 独行菜 pET-32a-LaAACT 原核表达载体的构建 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 对带有酶切位点的 PCR 产物进行双酶切, 得到 LaAACT 基因片段, 然后将该片段插入到同样经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的原核表达载体 pET-32a 上, 构建原核表达载体 pET-32a-LaAACT, 转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑单克隆提取质粒后, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定 (图 4), 从电泳结果中可以看出有 6 000 bp 左右的载体片段和 1 200 bp 左右的目的基因片段。将酶切正确的单克隆送测序公司测序, 测序结果表

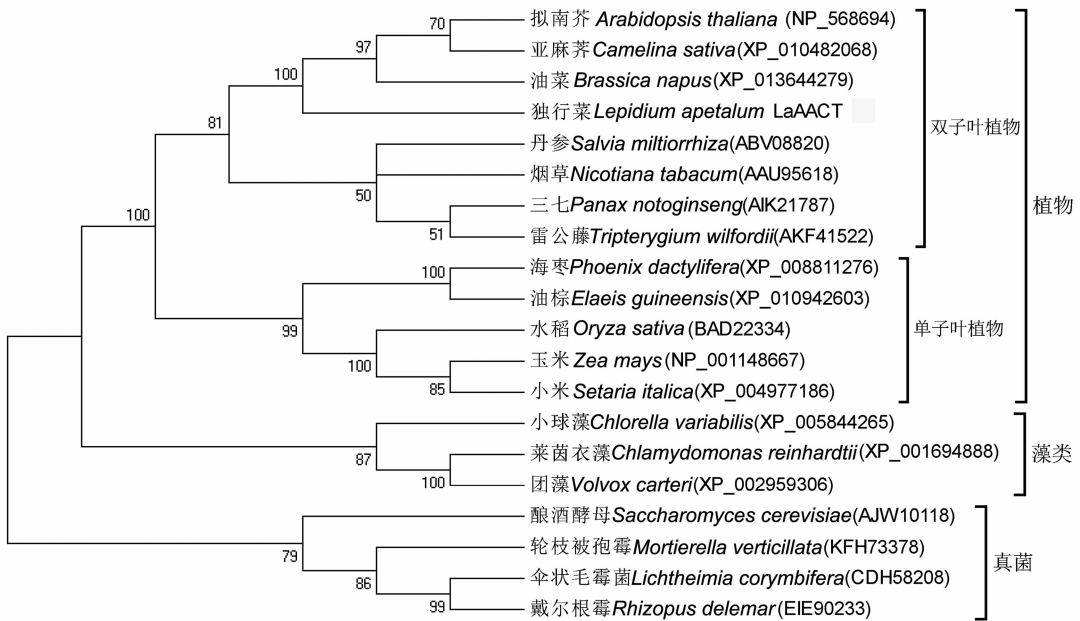
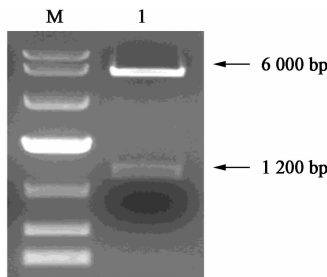


图 3 AACT 蛋白氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of AACT protein amino acid sequences



M. DL 10 000 DNA marker; 1. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切

图 4 原核表达载体 pET-32a-LaAACT 的双酶切鉴定

Fig. 4 Identification of prokaryotic expression vector pET-32a-LaAACT with double digestion method

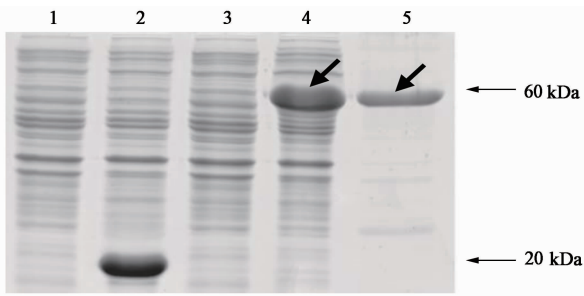
明重组质粒 pET-32a-LaAACT 中的 LaAACT 基因序列与目的基因 LaAACT 的 ORF 序列完全一致,没有发生碱基缺失或插入突变,说明原核表达载体 pET-32a-LaAACT 构建成功。

3.4 LaAACT 重组蛋白的原核表达与纯化 将测序正确的大肠埃希菌 BL21 (DE3) 单克隆 (含 pET-32a-LaAACT 质粒), 振荡培养, 当大肠埃希菌生长至对数期 (A_{600} 至 0.6 ~ 0.8), 在 28 °C, 0.4 mmol·L⁻¹ IPTG, 150 r·min⁻¹ 条件下培养 8 h, 诱导 LaAACT 重组蛋白的表达, 诱导完成后提取大肠埃希菌总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。当重组质粒 pET-32a-LaAACT 在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 菌株中表达时, 表达的 LaAACT 重组蛋白融合了 pET-32a 载体的标签序列 (Trx-Tag, His-Tag 和 S-Tag), 最终相对分子质量应为 61.38 kDa。SDS-PAGE 结果显示, 在 60 kDa 附近出现目的条带, 与预测的 LaAACT 重组

蛋白相对分子质量符合, 而含有空载体 (pET-32a) 的对照样品, 在同样条件 (28 °C, 0.4 mmol·L⁻¹ IPTG, 150 r·min⁻¹) 下培养 8 h 后, 未在 60 kDa 处出现条带, 而在 20 kDa 处出现条带, 因为 pET-32a 载体的标签序列 (Trx-Tag, His-Tag 和 S-Tag) 在 IPTG 诱导下也会表达蛋白, 大小约为 20 kDa (图 5), SDS-PAGE 结果表明 LaAACT 重组蛋白成功在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 菌株中表达。根据 LaAACT 重组蛋白的诱导表达条件, 将 LaAACT 重组蛋白在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 菌株中大量表达, 收集菌体, 经超声裂解后, 裂解液经离心取上清, 利用 Ni²⁺ 亲和色谱, 采用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化目的蛋白, 最终得到纯化的 LaAACT 重组蛋白 (图 5)。

4 讨论

独行菜作为中医临床常用中药, 关于其所含化学成分和药理学方面的研究已有良好的基础, 而作为独行菜药效物质基础之一的强心苷类化合物, 在生物合成途径及相关功能基因方面的研究较少。本研究首次从独行菜幼苗叶片中克隆得到了 LaAACT 基因, 通过生物信息学分析发现该基因编码蛋白的氨基酸序列含有硫解酶的保守结构域和活性位点^[6], 而且 LaAACT 蛋白与其他植物 MVA 途径中 AACT 蛋白的氨基酸序列高度同源, 属于硫解酶家族成员, 说明 LaAACT 是独行菜强心苷类化合物生物合成 MVA 途径的第 1 个关键酶乙酰 CoA 酰基转移酶基因, 具有重要的研究价值。JIN 等^[8] 发现拟南芥有 2 个 AtAACT 同源基因, AtAACT2 突变则会



1. 未诱导的含 pET-32a 空载体的 *Escherichia coli* 菌株; 2. IPTG 诱导的含 pET-32a 空载体的 *E. coli* 菌株; 3. 未诱导的含 pET-32a-LaAACT 质粒的 *E. coli* 菌株; 4. IPTG 诱导的含 pET-32a-LaAACT 质粒的 *E. coli* 菌株; 5. 纯化的 LaAACT 重组蛋白。箭头显示为 LaAACT 重组蛋白

图 5 LaAACT 重组蛋白的原核表达与纯化

Fig. 5 Prokaryotic expression and purification of recombinant LaAACT protein

导致拟南芥胚胎发生和雄配子传播出现问题,而且 AtAACT2 比 AtAACT1 对萜类物质的代谢影响较大。通过多序列比对和系统进化分析发现, LaAACT 蛋白与 AtAACT2 蛋白氨基酸序列有 96% 的相识性,亲缘关系较近,与 AtAACT1 蛋白只有 75% 的相似性,而且 AtAACT2 定位于细胞质^[15],根据 TargetP 预测 LaAACT 也位于细胞质,所以独行菜 LaAACT 蛋白可能和拟南芥 AtAACT2 蛋白为同一类型的酶,都属于 II 型硫解酶,功能也类似,参与萜类代谢和植株的发育过程。

通过构建原核表达载体 pET-32a-LaAACT,成功在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 菌株中诱导表达出 LaAACT 重组蛋白,并且目的蛋白表达量较高,pET-32a 载体(含有 Trx-Tag, S-Tag 标签)以及大肠埃希菌 BL21 (DE3) 菌株,可以增加在大肠埃希菌中表达的外源重组蛋白二硫键的形成,帮助蛋白质的折叠,提高外源重组蛋白的可溶性,同时利用 pET-32a 载体表达的外源重组蛋白 N 端带有 6 个 His-Tag 标签,方便纯化重组蛋白,所以采用 Ni²⁺ 亲和色谱的方法获得纯化的 LaAACT 重组蛋白,这为下一步制备 LaAACT 蛋白的抗体、进行体外催化实验以及研究 LaAACT 基因在独行菜强心苷生物合成途径中的功能奠定了基础,研究结果将有助于阐明独行菜强心苷生物合成途径及其调控机制,填补独行菜在功能基因研究方面的空白,并为今后通过生物技术提高独行菜强心苷类成分含量提供新的途径。

【参考文献】

[1] 冯志毅,王小兰,郑晓珂. 葶苈子的本草考证[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(9): 1938-1941.

[2] 李红伟,郑晓珂,弓建红. 独行菜和播娘蒿化学成分及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2013, 36

(3):235-240.

[3] 周喜丹,唐力英,周国洪,等. 南北葶苈子的最新研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4699-4708.

[4] Newman J, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway[J]. Crit Rev Biochem Molec Biol, 1999, 34(2): 95-106.

[5] Lichtenthaler H. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50(4): 47-65.

[6] Dyer J, Maina A, Gomez I, et al. Cloning, expression and purification of an acetoacetyl CoA thiolase from sunflower cotyledon[J]. Int J Biol Sci, 2009, 5(7): 736-744.

[7] Pereto J, Lopezgarcia P, Moreira D. Phylogenetic analysis of eukaryotic thiolases suggests multiple proteobacterial origins[J]. J Mol Evol, 2005, 61(1): 65-74.

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

[9] Lange B, Ghassemian M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism [J]. Plant Mol Biol, 2003, 59(6): 925-947.

[10] 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]. 药学学报, 2010, 45(6):785-790.

[11] 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:自然科学版, 2011, 31(8): 108-112.

[12] 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.

[13] 赵瑜君,张萌,刘雨佳,等. 雷公藤乙酰 CoA 酰基转移酶基因全长 cDNA 克隆及表达分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 847-852.

[14] 姚元枝,黎晓英,魏麟,等. 鱼腥草乙酰辅酶 A 酰基转移酶基因克隆、表达及生物信息学分析[J]. 中草药, 2015, 46(1): 107-111.

[15] Carrie C, Murcha M, Millar A, 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 Mol Biol, 2007, 63(1): 97-108.

【责任编辑 邹晓翠】