

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201901012

王伟妍, 李彩霞, 李湫, 等. 滇龙胆 8-羟香叶醇氧化还原酶基因的克隆与表达分析 [J]. 广西植物, 2020, 40(2): 200–209.

WANG WY, LI CX, LI Q, et al. Cloning and expression analysis of 8-hydroxygeraniol oxidoreductase gene in *Gentiana rigescens* [J]. *Guihaia*, 2020, 40(2): 200–209.

滇龙胆 8-羟香叶醇氧化还原酶基因的克隆与表达分析

王伟妍, 李彩霞, 李湫, 鄢秋紫, 张晓东*

(玉溪师范学院 化学生物与环境学院, 云南 玉溪 653100)

摘 要: 滇龙胆主要药效成分为龙胆苦苷, 而 8-羟香叶醇氧化还原酶基因 *Gr8HGO* 是龙胆苦苷生物合成途径的结构基因。为了研究 *Gr8HGO* 基因的功能, 该文克隆了滇龙胆 *Gr8HGO* 基因, 并进行表达分析。结果表明: (1) 共克隆到 5 个 *Gr8HGO* 基因, 其 GenBank 登录号分别为 KP722029.1 (*Gr8HGO*-1)、KP722030.1 (*Gr8HGO*-2)、KP722031.1 (*Gr8HGO*-3)、KP722032.1 (*Gr8HGO*-4)、KP723852.1 (*Gr8HGO*-5)。(2) *Gr8HGO*-1 基因全长 1 062 bp, 编码 353 个氨基酸, 其他 4 个基因全长 1 131 bp, 编码 376 个氨基酸; 理化性质分析结果表明 5 个蛋白单体相对分子质量约 40 kD, 理论等电点在 5.47~5.95 之间, 均为疏水稳定蛋白。(3) 信号序列分析结果表明 5 个蛋白均不含信号肽、跨膜螺旋和叶绿体转运肽; 亚细胞定位分析结果表明 5 个蛋白可能定位于细胞质; 结构域预测结果表明除 *Gr8HGO*-1 蛋白仅包含乙醇脱氢酶 N 端结构域 (IPR013154) 和 C 端结构域 (IPR013149) 外, 其他 4 个蛋白还包含聚酮合酶、烯酰还原酶结构域 (IPR020843)。(4) 系统发育分析结果表明这些 *Gr8HGO* 蛋白与长春花 *Cr8HGO* 蛋白亲缘关系最近。(5) qPCR 结果表明 *Gr8HGO* 基因主要在叶中表达, 在根和茎中表达量很低。该研究为后续龙胆苦苷生物合成途径的解析奠定基础。

关键词: 滇龙胆, 8-羟香叶醇氧化还原酶, 克隆, 生物信息学, 基因表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)02-0200-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and expression analysis of 8-hydroxygeraniol oxidoreductase gene in *Gentiana rigescens*

WANG Weiyan, LI Caixia, LI Qiu, YAN Qiuzi, ZHANG Xiaodong*

(College of Chemistry Biology and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, Yunnan, China)

Abstract: Gentiopicroside is the main active ingredient in *Gentiana rigescens*, while 8-hydroxygeraniol oxidoreductase gene *Gr8HGO* is a structural gene involved in gentiopicroside biosynthesis. In order to study the function of *Gr8HGO* gene, the *Gr8HGO* gene in *G. rigescens* was cloned and its expression analysis was conducted in this study. The results were as follows: (1) Five *Gr8HGO* genes were cloned and their GenBank accession numbers were KP722029.1 (*Gr8HGO*-1), KP722030.1 (*Gr8HGO*-2), KP722031.1 (*Gr8HGO*-3), KP722032.1 (*Gr8HGO*-4) and KP723852.1

收稿日期: 2019-03-27

基金项目: 国家级大学生创新性项目(201811390017); 云南省地方本科高校基础研究联合专项(2017FH001-024); 云南省应用基础青年项目(2016FD113) [Supported by the National Innovative Program for College Students (201811390017); Yunnan Local Colleges and Universities Basic Research Joint Special Program (2017FH001-024); Yunnan Applied Basic Youth Program (2016FD113)]。

作者简介: 王伟妍(1998-), 女, 内蒙古赤峰人, 研究方向为药用植物分子生物学, (E-mail) 1368092016@qq.com。

*通信作者: 张晓东, 博士, 副教授, 研究方向为植物代谢基因工程, (E-mail) zxd95@126.com。

(*Gr8HGO-5*), separately. (2) The length of *Gr8HGO-1* gene was 1 062 bp encoding 353 amino acids, while the other four genes were 1 131 bp encoding 376 amino acids; The results from physicochemical analysis showed that the relative molecular weight of these five *Gr8HGO* proteins were approximately 40 kD, and their theoretical pI ranged from 5.47 to 5.95, which were all hydrophobic stable proteins. (3) Signal sequence analysis showed that five proteins did not contain signal peptides, transmembrane helices and chloroplast transit peptides; Subcellular localization analysis indicated that these five proteins might be localized in cytoplasm; Domain prediction results showed that beside the *Gr8HGO-1* contained only alcohol dehydrogenase N-terminal (IPR013154) and C-terminal (IPR013149) conserved domains, the other four also contained polyketide synthase, enoylreductase domain (IPR020843). (4) Phylogenetic analysis showed that these five *Gr8HGO* proteins had the closest relationship with *Cr8HGO* in *Catharanthus roseus*. (5) The results of qPCR suggested that *Gr8HGO* gene was mainly expressed in leaves, but very low in roots and stems. This study will lay a foundation for further analysis of the biosynthesis pathway of gentiopicroside.

Key words: *Gentiana rigescens*, 8-hydroxygeraniol oxidoreductase, cloning, bioinformatics, gene expression

滇龙胆 (*Gentiana rigescens*) 为龙胆科 (*Gentianaceae*) 龙胆属 (*Gentiana*) 植物, 主要分布于我国西南地区的云南、四川、贵州等地 (中国植物志编委会, 1988)。在传统中药中, 滇龙胆药用部位为根, 具有清热燥湿、泻肝胆火的作用 (国家药典委员会, 2015)。现代研究表明滇龙胆根部主要药用成分为一种单萜类化合物龙胆苦苷 (Zhang et al., 2015; 张晓东等, 2016)。在植物中, 龙胆苦苷的生物合成可分为三个阶段。第一阶段是由质体 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径和胞质甲羟戊酸 (MVA) 途径合成原料异戊二烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基丙烯基焦磷酸 (DMAPP) (Hua et al., 2014); 第二阶段是以 IPP 和 DMAPP 为原料, 经过缩合、氧化、还原、糖基化、甲基化等步骤, 生成裂环番木鳖苷 (Miettinen et al., 2014; Munkert et al., 2015); 第三阶段是萜类化合物经过修饰形成龙胆苦苷 (黄璐琦和刘昌孝, 2015)。8-羟香叶醇氧化还原酶 (8-hydroxygeraniol oxidoreductase, EC 1.1.1.324, 在已报道文献中简称为 8HGO、10HGO) 是龙胆苦苷生物合成途径第二阶段中的第四个催化酶, 能够催化 8-羟香叶醇、8-羟香叶醇、8-氧香叶醛和 8-氧香叶醛之间的转化 (Ikeda et al., 1991; Salim et al., 2013; De Luca et al., 2014; Miettinen et al., 2014; Dugé De Bernonville et al., 2015; Liu et al., 2015; Padhan et al., 2015; Cao et al., 2016; Rai et al., 2017)。

鉴于 8HGO 在单萜生物合成中的重要性, 8HGO 基因已从长春花 (Miettinen et al., 2014)、喜树 (Valletta et al., 2010)、川西獐牙菜 (Liu et al., 2017)、秦艽 (Cao et al., 2016)、大花胡麻草等多

种植物中分离。但是, 目前 8HGO 基因仅在长春花中的研究最为清楚。在长春花中, *Cr8HGO* 蛋白在 8-羟香叶醇、8-羟香叶醛、8-氧香叶醇、 NAD^+ 存在的条件下, 根据组合和培养时间的不同, 产生以上三种复合物和 8-氧香叶醛的混合物的相对比例不同, 因此, 该酶被命名为 8-羟香叶醇氧化还原酶 (图 1) (Miettinen et al., 2014)。在 NAD^+ 辅因子存在下, *Cr8HGO* 蛋白不能转换 8-氧香叶醛, 在辅因子 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 存在下, *Cr8HGO* 蛋白不能催化 8-羟香叶醇、8-羟香叶醛、8-氧香叶醇三个底物 (Miettinen et al., 2014)。有趣的是, *Cr8HGO* 蛋白对香叶醇、反式-2-己烯醇、法尼醇、橙花醇、异苯基苄醇、辛醇等初级醇也具有相对较高的活性 (Miettinen et al., 2014)。由于存在 4 种相互转化的化合物和 8 种可能的反应, 反应动力学相当复杂, 因此反应常数无法确定 (Miettinen et al., 2014)。在基因表达方面, 长春花 *Cr8HGO* 基因的表达受非生物因素的影响。在长春花悬浮培养细胞中, *Cr8HGO* 基因能够被茉莉酸甲酯 (MeJA) 强烈诱导表达; 而在幼苗中, *Cr8HGO* 基因在 MeJA 处理 6 h 后被轻微诱导表达; 在悬浮细胞中过表达 *ORCA2* (硬脂酸应答的长春花花分生组织决定基因 2/乙烯响应因子) 并不能诱导 *Cr8HGO* 的表达, 过表达 *ORCA3* 反而抑制 *Cr8HGO* 基因的表达 (Miettinen et al., 2014)。在 UV-B 胁迫 15 min 和 60 min 下, 长春花幼苗叶片中 *Cr10HGO* 基因表达上调 0.75 倍; 在 UV-B 胁迫后, 黑暗培养 72 h, *Cr10HGO* 蛋白含量是对照组的 1.98 倍, 其下游产物异胡豆苷增加约 5 倍 (Zhu et al., 2015)。

为了探究滇龙胆 *Gr8HGO* 基因是否参与龙胆

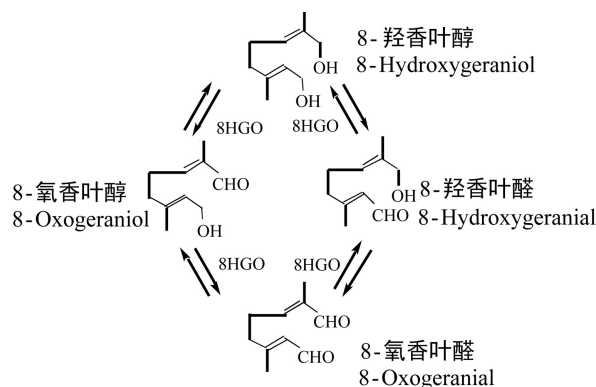


图 1 Gr8HGO 酶催化的反应

Fig. 1 Reactions catalyzed by Gr8HGO enzyme

苦苣生物合成、其他单萜的生物合成等代谢过程,为龙胆苦苣和单萜类生物合成提供优质基因资源,本研究根据前期本课题组的滇龙胆叶和根的转录组数据库,设计引物,对滇龙胆 *Gr8HGO* 基因进行克隆,并进行序列分析、原核表达载体构建和组织器官特异性表达分析,为今后阐明 *Gr8HGO* 基因在龙胆苦苣合成中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

滇龙胆 (*Gentiana rigescens*) 植株采自于临沧耀阳生物医药有限公司后箐基地,种植于玉溪师范学院后勤基地。使用滇龙胆幼叶进行 RNA 提取,使用土壤栽培两年生滇龙胆的根、茎和叶进行基因表达分析,取样日期为 2018 年 4 月 30 日。

1.2 方法

1.2.1 叶片总 RNA 提取、反转录及 *Gr8HGO* 基因 ORF 的克隆 使用植物 RNA 提取试剂盒 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (Takara, 大连) 进行滇龙胆幼叶总 RNA 的提取;使用逆转录试剂盒 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, 大连) 进行 cDNA 的合成。参照 pET32a 原核表达载体的多克隆位点和滇龙胆转录组数据库中 *Gr8HGO* 基因序列,设计一对特异性引物 Gr8HGOBamHI-F: GGATCCATGACTAAAACCATTA CTCCTGC (下划线为 *Bam*HI 酶切位点), Gr8HGOXhoI-R: CTCGAGTTAAACTTAATTACAA CCTTAACAC (下划线为 *Xho*I 酶切位点)。以上述

cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经回收后克隆到 pMD19-T 载体 (Takara, 大连)。转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞 (Takara, 大连) 后。挑取菌落后,提质粒,经双酶切检测正确后送生工生物工程股份有限公司进行 DNA 测序,获得重组质粒 pMD19-*Gr8HGO*。

1.2.2 原核表达载体构建 使用双酶切、连接的方法构建原核表达载体 pET32a-*Gr8HGO* (张晓东等, 2016)。

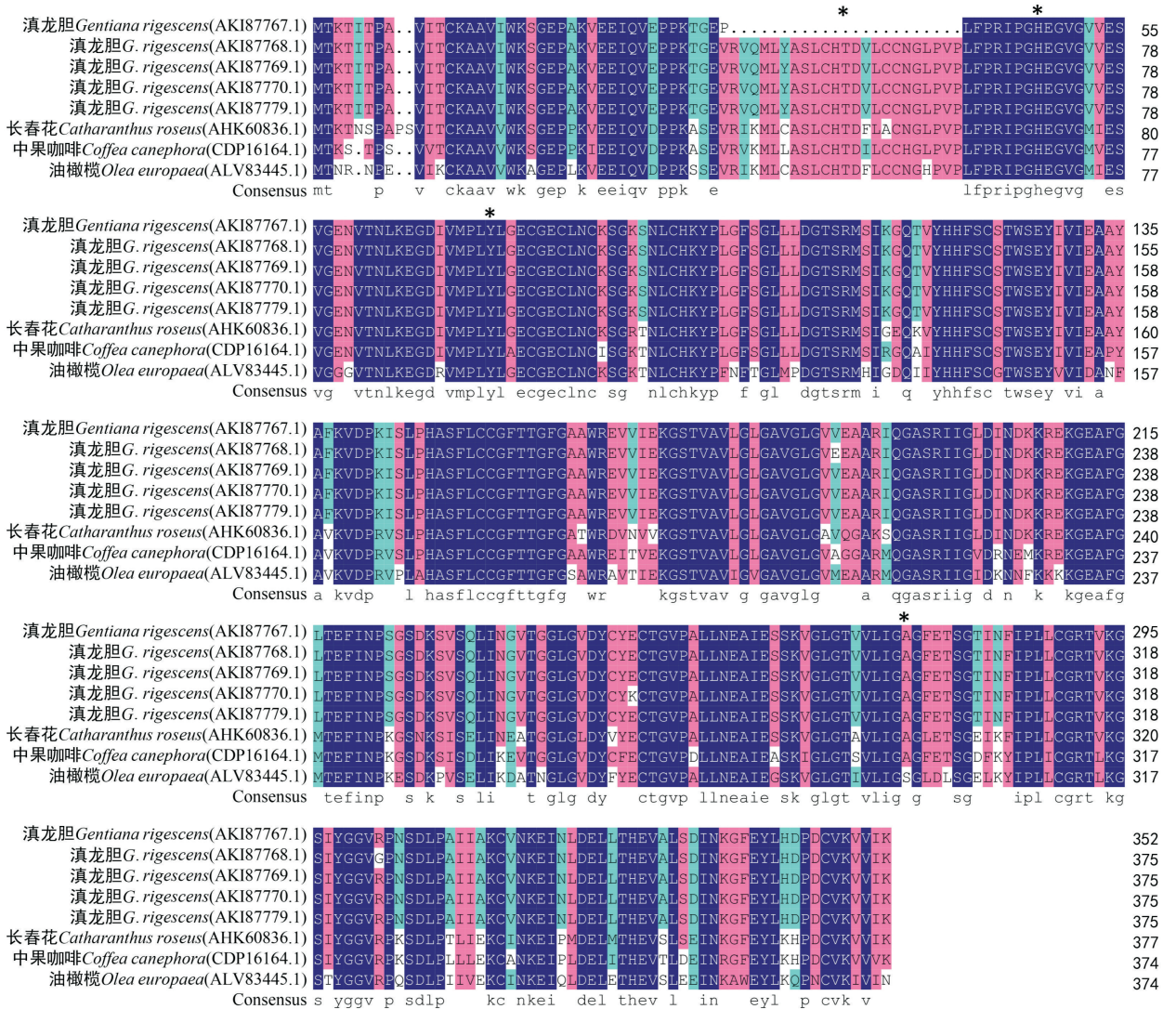
1.2.3 *Gr8HGO* 基因及其编码蛋白的序列分析 使用 NCBI-BLASTp 软件进行蛋白同源性比对,使用离线软件 DNAMAN 7 进行多序列比对;使用 MEGA X 离线软件的 Clustal W 进行多序列比对,然后使用 NJ 法创建系统发育树,Bootstrap = 1 000;利用网络软件对基因稀有密码子进行分析 (张晓东等, 2016)。使用 ChloroP v1.1 预测叶绿体转运肽;使用在线 InterPro 软件预测蛋白保守结构域;使用在线软件 ProtScale 分析蛋白的亲疏水性;使用在线软件 SPOMA 预测蛋白的二级结构;使用在线软件 Phyre2 预测蛋白的三级结构;使用 SWISS-MODEL 进行同源建模分析;利用 Expasy 中的 TM-HMM 服务器 V2.0 预测蛋白的跨膜螺旋区;利用 Plant-mPloc、WOLF PSORT 和 ProtComp 9.0 三个软件对蛋白的亚细胞定位情况进行预测。

1.2.4 *Gr8HGO* 基因的表达分析 分别提取两年生滇龙胆的根、茎和叶的总 RNA,使用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara, 大连) 合成第一链 cDNA。根据 *Gr8HGO* 基因序列设计一对特异性引物 qGr8HGO-F (5'-AGGA-CAAACACTGTACCACC-3') 和 qGr8HGO-R (5'-CAACCTCTCTCCAAGCTGCC-3'),用于所有 *Gr8HGO* 基因的表达分析。以滇龙胆 *GrACTIN* 基因为内参,使用嵌合荧光检测试剂盒 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Takara, 大连) 进行 qPCR。每个反应重复 3 次。反应在 LightCycler® 480 II 荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 上进行扩增,扩增结果使用内参基因校准后,采用比较 Ct 值的“ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ”的方法自动计算出根、茎、叶中 *Gr8HGO* 基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 滇龙胆 *Gr8HGO* 基因序列的克隆

以逆转录获得的 cDNA 为模板,使用基因特异



黑色表示相似性等于 100% ; 粉红色表示 75% ≤ 相似性 < 100% ; 浅蓝色表示 50% ≤ 相似性 < 75% 。
Black indicates similarity = 100% ; Pink indicates 75% ≤ similarity < 100% ; Light blue indicates 50% ≤ similarity < 75% .

图 2 Gr8HGO 蛋白与其他植物 8HGO 蛋白的多序列比对结果
Fig. 2 Multiple sequence alignment of Gr8HGO proteins and 8HGO proteins in other plants

性引物共克隆到 5 个 *Gr8HGO* 基因, 分别为 *Gr8HGO*-1 (KP722029.1)、*Gr8HGO*-2 (KP722030.1)、*Gr8HGO*-3 (KP722031.1)、*Gr8HGO*-4 (KP722032.1)、*Gr8HGO*-5 (KP722052.1), 其中 *Gr8HGO*-1 基因 ORF 长 1 062 bp, 编码 353 个氨基酸; 其余 4 条基因 ORF 长 1 131 bp, 编码 376 个氨基酸。

2.2 *Gr8HGO* 基因的生物信息学分析

利用 GenBank 数据库中的 BLASTp 程序和 DNAMAN 7 对 *Gr8HGO* 蛋白的氨基酸序列进行相似性分析, 结果表明滇龙胆 *Gr8HGO*-1、*Gr8HGO*-2、*Gr8HGO*-3、*Gr8HGO*-4、*Gr8HGO*-5 蛋白与长春花

Cr8HGO 蛋白序列相似性均最高, 分别为 84.31%、84.31%、84.84%、84.57%、84.84%, 其次是中果咖啡 81.25%、81.07%、81.33%、81.07%、81.33%, 再次是油橄榄 73.86%、73.87%、74.13%、73.87%、74.13%。多序列比对分析结果表明 5 个 *Gr8HGO* 蛋白与已知 8HGO 蛋白序列相似性很高 (图 2), 总体相似度高达 91.27%。利用 MEGA X 将 *Gr8HGO* 氨基酸序列与 BLASTp 比对中相似性较高的蛋白氨基酸序列进行系统发育分析, 结果显示 5 个滇龙胆 *Gr8HGO* 蛋白与长春花 *Cr8HGO* 蛋白处于同一进化枝 (图 3), 表明它们的亲缘关系较近。



图 3 Gr8HGO 蛋白与其他植物
8HGO 蛋白的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of Gr8HGO proteins
and 8HGO proteins in other plants

使用 ExPASy ProtParam 工具对 5 个 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白的理化性质进行分析,结果表明在 N 端部分 Gr8HGO-1 蛋白比其他 4 个 Gr8HGO 蛋白少 23 个氨基酸,后 4 个 Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 蛋白大小相似(表 1)。与 Cr8HGO 相比,5 个 Gr8HGO 蛋白带正负电荷的氨基酸残基数目相差较大,导致其理论 pI 更偏酸性(表 1)。5 个 Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 都为疏水稳定蛋白,但是前者的疏水性更强(表 1)。使用 ProtScale 软件对 5 个 Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 蛋白进行疏水性分析,结果与表 1 一致。5 个 Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 蛋白在大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞体内的半衰期都分别大于 10、20 和 30 h。对 5 个 *Gr8HGO* 基因进行稀有密码子分析,结果显示这些基因中稀有密码子含量均低于 0.85%,且无稀有密码子连续出现的情况,因此可使用大肠杆菌 BL21 或 Rosetta(DE3)进行诱导表达。

利用 SPOMA 服务器对 5 个 Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 蛋白的二级结构进行分析,结果表明 Gr8HGO-1 的 α -螺旋(H)含量最高,延伸链(E)含量最低,5 个 Gr8HGO 蛋白的 β -转角(T)含量高于 Cr8HGO,Gr8HGO-2 中无规则卷曲含量最低(表 2)。

利用 SignalP 4.1 服务器对 5 个 Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 蛋白的信号肽序列进行分析,结果均没有发现信号肽,表明这些蛋白都是非分泌型蛋白(表 2)。使用 TMHMM2.0 软件预测 5 个 Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 蛋白的跨膜螺旋区,结果表明这些蛋白都不包含跨膜螺旋区域,为非膜蛋白(表 2)。使用 ChloroP v1.1 Server 对 5 个

Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 蛋白的叶绿体转运肽进行预测,结果表明这些蛋白不包含叶绿体转运肽(表 2)。

使用 Plant-mPLOC 软件和 ProtComp 9.0 软件进行亚细胞定位分析,结果是 5 个 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白均定位于细胞质(表 3)。而使用 WOLF PSORT Prediction 软件进行亚细胞定位分析的结果是这些蛋白最可能为分泌蛋白(表 3)。

利用 SWISS-MODEL Workspace 的自动模式预测 5 个 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白的三级结构,结果如表 4,表明滇龙胆 5 个 Gr8HGO 蛋白属于 II 类乙醇脱氢酶,而长春花 Cr8HGO 属于 III 类乙醇脱氢酶(图 4)。与其他蛋白相比,Gr8HGO-1 蛋白在 N 末端缺失 23 个氨基酸,导致其在三维结构模型上表现为蛋白左上侧的 β 片层结构减少(图 4)。

使用 InterPro71.0 在线软件对 5 个 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白进行保守结构域分析,结果表明 Gr8HGO-1 蛋白仅包含乙醇脱氢酶 N 端结构域(IPR013154)和 C 端结构域(IPR013149),而后 4 个 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白除具有以上两个保守结构域外,还具有聚酮合酶、烯酰还原酶结构域(IPR020843)(表 5)。在催化 Zn 结合位点方面,Gr8HGO-1 仅具有 2 个结合位点,而后 4 个 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白具有 4 个结合位点;在结构 Zn 结合位点方面,所有蛋白都具有 4 个结合位点;在 NAD 结合位点方面,Gr8HGO-1 仅具有 20 个结合位点,而后 4 个 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白则具有 22 个结合位点;在底物结合位点方面,Gr8HGO-1 仅具有 3 个结合位点,比后 4 个 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白少一个结合位点;在二聚体界面方面,所有蛋白都具有 29 个界面接触位点(表 5)。GO 注释结果表明所有蛋白均参与氧化还原过程(GO:0055114),分子功能为 Zn^{2+} 结合(GO:0008270)和氧化还原酶活性(GO:0016491),未预测到其在细胞组分中的作用。

2.3 *Gr8HGO-2* 基因原核表达载体构建

使用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 对质粒 pET32a-*Gr8HGO-2* 进行双酶切检测,结果能够切出目的片段和载体(图 5),表明 *Gr8HGO-2* 基因已成功插入原核表达载体 pET32a 中。

2.4 *Gr8HGO* 基因的组织表达分析

根据 5 个 *Gr8HGO* 基因序列,设计一对检测 5 个基因表达情况的引物,通过 qRT-PCR 技术对

表 1 Gr8HGO 蛋白的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of Gr8HGO proteins

蛋白 Protein	长度 Length	相对分子 质量 Relative molecular weight (kD)	理论 等电点 Theoretical pI	带正电氨基 酸残数目 Number of positively charged residues	带负电氨基 酸残数目 Number of negatively charged residues	不稳定 指数 Instability index	脂肪指数 Aliphatic index	总平均 疏水性 Grand average of hydropathicity	疏水蛋白 Hydrophobic protein
Gr8HGO-1	353	37.50	5.60	32	39	26.99	98.24	0.161	是 Yes
Gr8HGO-2	376	39.95	5.47	32	41	28.00	98.96	0.195	是 Yes
Gr8HGO-3	376	40.02	5.69	33	40	27.87	99.73	0.205	是 Yes
Gr8HGO-4	376	40.01	5.95	34	39	26.90	99.73	0.203	是 Yes
Gr8HGO-5	376	40.02	5.69	33	40	27.87	99.73	0.205	是 Yes
Cr8HGO	378	40.41	6.27	38	41	33.64	93.04	0.060	是 Yes

表 2 Gr8HGO 蛋白的其他性质

Table 2 Other properties of Gr8HGO proteins

蛋白 Protein	α-螺旋 α-helix (%)	β-转角 β-turn (%)	无规则卷曲 Random coil (%)	延伸链 Extended strand (%)	信号肽 Signal peptide	跨膜螺旋 Transmembrane helix	叶绿体转运肽 Chloroplast transit peptide
Gr8HGO-1	27.20	8.50	42.78	21.53	无 None	无 None	无 None
Gr8HGO-2	23.14	9.84	38.83	28.19	无 None	无 None	无 None
Gr8HGO-3	24.73	9.31	40.69	25.27	无 None	无 None	无 None
Gr8HGO-4	23.40	10.11	39.10	27.39	无 None	无 None	无 None
Gr8HGO-5	24.73	9.31	40.69	25.27	无 None	无 None	无 None
Cr8HGO	23.54	8.73	42.06	25.66	无 None	无 None	无 None

表 3 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白的亚细胞定位预测

Table 3 Subcellular localization prediction of Gr8HGO proteins and Cr8HGO proteins

蛋白 Protein	ProtComp 9.0	Plant-mPLOC	WoLF PSORT
Gr8HGO-1	细胞质 Cytoplasm	细胞质 Cytoplasm	胞外：5；细胞质：3；液泡：3；叶绿体：1；线粒体：1；内质网：1 Extracellular: 5; cytoplasm: 3; vacuole: 3; chloroplast: 1; mitochondrion: 1; endoplasmic reticulum: 1
Gr8HGO-2	细胞质 Cytoplasm	细胞质 Cytoplasm	胞外：6；细胞质：4；叶绿体：3；细胞核：1 Extracellular: 6; cytoplasm: 4; chloroplast: 3; nucleus: 1
Gr8HGO-3	细胞质 Cytoplasm	细胞质 Cytoplasm	胞外：5；细胞质：3；液泡：3；叶绿体：1；线粒体：1；内质网：1 Extracellular: 5; cytoplasm: 3; vacuole: 3; chloroplast: 1; mitochondrion: 1; endoplasmic reticulum: 1
Gr8HGO-4	细胞质 Cytoplasm	细胞质 Cytoplasm	胞外：5；细胞质：3；液泡：3；叶绿体：1；线粒体：1；内质网：1 Extracellular: 5; cytoplasm: 3; vacuole: 3; chloroplast: 1; mitochondrion: 1; endoplasmic reticulum: 1
Gr8HGO-5	细胞质 Cytoplasm	细胞质 Cytoplasm	胞外：5；细胞质：3；液泡：3；叶绿体：1；线粒体：1；内质网：1 Extracellular: 5; cytoplasm: 3; vacuole: 3; chloroplast: 1; mitochondrion: 1; endoplasmic reticulum: 1
Cr8HGO	细胞质 Cytoplasm	细胞质 Cytoplasm	胞外：6；叶绿体：3；细胞质：2；液泡：2；细胞核：1 Extracellular: 6; chloroplast: 3; cytoplasm: 2; vacuole: 2; nucleus: 1

表 4 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白的三维结构预测
Table 4 Three dimensional structure prediction of Gr8HGO proteins and Cr8HGO proteins

蛋白 Protein	模板 Template	建模位置 Modelling position	序列相似度 Sequence similarity
Gr8HGO-1	鼠Ⅱ类乙醇脱氢酶 [1e3e.1.A] Mouse Class Ⅱ alcohol dehydrogenase [1e3e.1.A]	9-353	39.65
Gr8HGO-2	鼠Ⅱ类乙醇脱氢酶 [1e3e.1.A] Mouse Class Ⅱ alcohol dehydrogenase [1e3e.1.A]	7-376	38.42
Gr8HGO-3	鼠Ⅱ类乙醇脱氢酶 [1e3e.1.A] Mouse Class Ⅱ alcohol dehydrogenase [1e3e.1.A]	7-376	38.42
Gr8HGO-4	鼠Ⅱ类乙醇脱氢酶 [1e3e.1.A] Mouse Class Ⅱ alcohol dehydrogenase [1e3e.1.A]	9-376	38.80
Gr8HGO-5	鼠Ⅱ类乙醇脱氢酶 P47H 突变体 [1e3l.1] P47H mutant of mouse Class Ⅱ alcohol dehydrogenase [1e3l.1]	7-376	38.42
Cr8HGO	鼠Ⅲ类乙醇脱氢酶 [3qj5.1.A] Mouse Class Ⅲ alcohol dehydrogenase [3qj5.1.A]	9-378	44.44

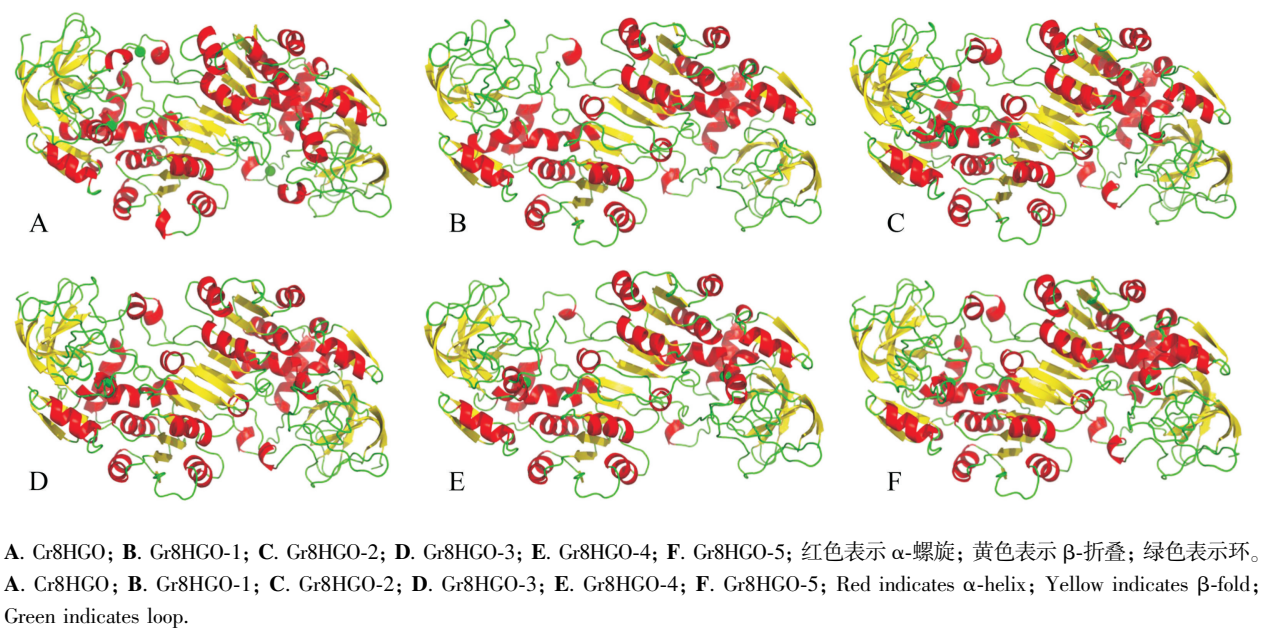


图 4 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白同源二聚体的三维结构预测

Fig. 4 Three-dimensional structure predictions of homodimers of Gr8HGO proteins and Cr8HGO proteins

Gr8HGO 基因在两年生滇龙胆的根、茎和叶等组织器官中的表达情况进行分析,结果显示 *Gr8HGO* 基因在叶中表达量最高,分别是根和茎中的 31.46 倍和 26.70 倍,根和茎中仅有少量表达(图 6)。

3 讨论

龙胆苦苷是滇龙胆、龙胆、三花龙胆和条叶龙胆、秦艽、川西獐牙菜等中药材的主要药效成分(Hua et al., 2014; 国家药典委员会, 2015; Liu et

al., 2017),因此克隆滇龙胆龙胆苦苷生物合成途径中的基因并对其进行组织特异性表达分析,对于揭示这一类药材主要药效成分的生物合成都具有重要意义。在滇龙胆生产中,主要存在龙胆苦苷含量低(Pan et al., 2015)和连作障碍(来源于临沧耀阳生物药业科技公司)两个问题,可通过合成生物学手段工厂化生产龙胆苦苷和培育高龙胆苦苷含量的新品种来解决,但前提是需要首先阐明龙胆苦苷的生物合成途径。8-羟香叶醇氧化还原酶是龙胆苦苷和其他单萜类生物合成途径中的

表 5 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白的保守结构域预测

Table 5 Conservative domain predictions of Gr8HGO proteins and Cr8HGO proteins

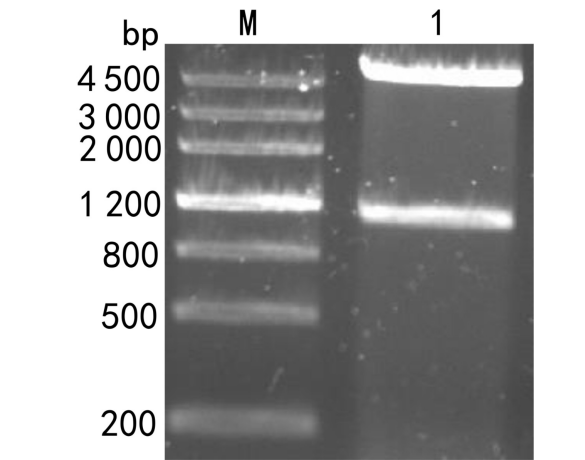
蛋白 Protein	结构域 Domain	催化 Zn 结合位点 Catalytic znic binding site	结构 Zn 结合位点 Structural znic binding site	NAD 结合位点 NAD binding site	底物结合 位点 Substrate binding site	二聚体界面 Dimer interface
Gr8HGO-1	乙醇脱氢酶 N 端结构域 (IPR013154) 和 C 端结构域 (IPR013149) Alcohol dehydrogenase, N-terminal (IPR013154) and C-terminal (IPR013149)	47H, 153C	77C, 80C, 83C, 91C	153C, 157T, 178G, 179L, 180G, 181A, 182V, 202D, 203I, 207K, 248C, 249T, 253A, 254L, 272I, 273G, 296S, 297I, 298Y, 348K	47H, 73Y, 274A	81L, 82N, 85S, 87K, 88S, 89N, 90L, 239G, 241G, 266L, 271L, 272I, 273G, 274A, 280G, 281T, 282I, 283N, 284F, 285I, 287L, 290G, 291R, 292T, 293V, 294K, 295G, 296S, 297I
Gr8HGO-2	聚酮合酶、烯酰还原酶结构域 (IPR020843);乙醇脱氢酶 N 端结构域 (IPR013154) 和 C 端结构域 (IPR013149) Polyketide synthase, enoylreductase domain (IPR020843); Alcohol dehydrogenase, N-terminal (IPR013154) and C-terminal (IPR013149)	49C, 51T, 70H, 176C	100C, 103C, 106C, 114C	50H, 51T, 176C, 180T, 201G, 202L, 203G, 204A, 205V, 225D, 226I, 230K, 271C, 272T, 276A, 277L, 295I, 296G, 319S, 320I, 321Y, 371K	51T, 70H, 96Y, 97A	104L, 105N, 108S, 110K, 111S, 112N, 113L, 262G, 264G, 289L, 294L, 295I, 296G, 297A, 303G, 304T, 305I, 306N, 307F, 308I, 310L, 313G, 314R, 315T, 316V, 317K, 318G, 319S, 320I
Gr8HGO-3						
Gr8HGO-4						
Gr8HGO-5						
Cr8HGO	聚酮合酶、烯酰还原酶结构域 (IPR020843);乙醇脱氢酶 N 端结构域 (IPR013154) 和 C 端结构域 (IPR013149) Polyketide synthase, enoylreductase domain (IPR020843); Alcohol dehydrogenase, N-terminal (IPR013154) and C-terminal (IPR013149)	51C, 53T, 72H, 178C	102C, 105C, 108C, 116C	52H, 53T, 178C, 182T, 203G, 204L, 205G, 206A, 207V, 227D, 228I, 232K, 273C, 274T, 278A, 279L, 297I, 298G, 321S, 322I, 323Y, 373K	53T, 72H, 98Y, 299A	106L, 107N, 110S, 112R, 113T, 114N, 115L, 264G, 266G, 291L, 296L, 297I, 298G, 299A, 305G, 306E, 307I, 308K, 309F, 310I, 312L, 315G, 316R, 317T, 318V, 319K, 320G, 321S, 322I

重要的催化酶(Cao et al., 2016),因此 *8HGO* 基因的表达情况能够直接影响这些药材龙胆苦苷的生物合成。本研究基于滇龙胆转录组数据库,在滇龙胆中克隆到 5 个 *8HGO* 基因,表明在滇龙胆中 *8HGO* 基因可能存在功能冗余现象。

高效的途径工程需要不同途径组分的细胞和亚细胞组织的精确知识(Miettinen et al., 2014)。本研究使用 Plant-mPLoc 和 ProtComp 9.0 软件对 5 个 Gr8HGO 蛋白和 Cr8HGO 蛋白进行亚细胞定位预测,结果为所有蛋白均定位于细胞质,这与通过 Cr8HGO 与 GFP 融合表达试验获得的长春花 Cr8HGO 蛋白定位结果一致(Miettinen et al., 2014)。而 WOLF PSORT 软件预测的结果却是 Gr8HGO 蛋白最可能为分泌蛋白,这是由于不同软件的预测方法不同所致。ProtComp 9.0 软件综合了蛋白质定位预测的许多方法,如基于神经网络

的预测方法,与已知定位同源蛋白的直接比较的方法,预测某些功能肽序列如线粒体和叶绿体信号肽、转运肽和跨膜区段的方法等。上海交通大学沈红斌教授开发的 Plant-mPLoc 软件,是基于已知定位的1 055个蛋白质序列数据库的预测方法,该软件解决了单个蛋白存在多种亚细胞定位的问题(Chou & Shen, 2010)。而 WOLF 软件是由日本人较早开发的基于分类信号模序和相关序列特征如氨基酸组成等进行预测的软件。因此,进行蛋白亚细胞定位预测时,需要使用多种软件进行综合分析。

在本研究中,三维模型预测结果表明,5 个 Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 蛋白的活性形式为二聚体,这与 5 个 Gr8HGO 蛋白与 Cr8HGO 蛋白都具有 29 个二聚体界面接触位点相一致,与在印度萝芙木中,Rs10HGO 蛋白活性形式是单体的结果不同



M. DNA Marker Ⅲ；1. 质粒 pET32a-Gr8HGO-2 的 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切。
M. DNA Marker Ⅲ；1. Digestion results of plasmid pET32a-Gr8HGO-2 by *Bam*HI and *Xho*I.

图 5 质粒 pET32a-Gr8HGO-2 的双酶切检测
Fig. 5 Detection of plasmid pET32a-Gr8HGO-2 by double digestions

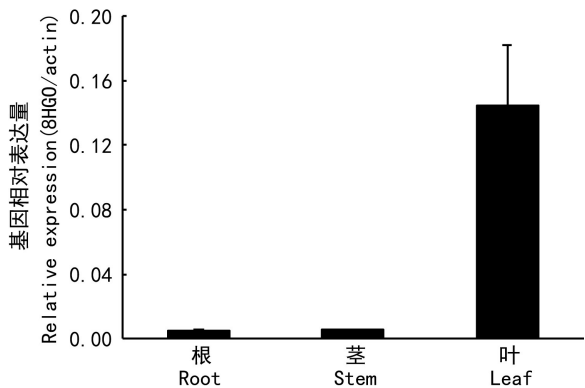


图 6 *Gr8HGO* 基因在根、茎和叶中的相对表达
Fig. 6 Relative expression of *Gr8HGO* gene in root, stem and leaf

(Ikeda et al., 1991)。因此,需要通过实验来进一步验证。

组织器官特异性表达分析结果显示,本研究中的 *Gr8HGO* 基因主要在叶中表达,而在根和茎中几乎不表达。这与滇龙胆的主要药效成分龙胆苦苷主要在叶中合成、根中累积的结果相一致(杨美权等, 2011; 朱宏涛等, 2011),这表明所克隆的 5 个 *Gr8HGO* 基因在叶中而不是根中促进龙胆苦苷的生物合成。由于 5 个 *Gr8HGO* 基因的高度相似性,很难设计特异性引物将它们的组织特异性表

达区分开,因此目前无法判断究竟是哪一个或哪几个 *Gr8HGO* 基因在叶中高表达,今后可采用高通量测序技术加以区分。我们的结果与在喜树中 *Ca8HGO* 主要在茎和叶中表达,在喜树碱累积的根中不表达的结果相一致 (Valletta et al., 2010)。而与在两年生花期的麻花艽 *Gs10HGO* 基因在花中表达量最高,其次是根,表达量最低的是叶的结果刚好相反 (Zhou et al., 2016),与在温室栽培的印度獐牙菜植株中 *Sc8HGO* 基因在叶和根中均表达 (Padhan et al., 2015)、在川西獐牙菜中 *Sm8HGO* 基因在根、茎、叶和花中的表达量差异不大 (Liu et al., 2017) 的结果也不同。以上结果表明滇龙胆和喜树具有相似的活性成分合成与累积模式,而与麻花艽和印度獐牙菜不同。下一步将对 *Gr8HGO* 蛋白进行诱导表达、蛋白纯化和酶活性分析,为该基因功能的阐明奠定基础。

参考文献：

CAO XY, GUO XR, YANG XB, et al., 2016. Transcriptional responses and gentiopicroside biosynthesis in methyl jasmonate-treated *Gentiana macrophylla* seedlings [J]. PLoS ONE, 11(11): e0166493.
CHOU KC, SHEN HB, 2010. Plant-mPLoc: A top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization [J]. PLoS ONE, 5(6): e11335.
DE LUCA V, SALIM V, THAMM A, et al., 2014. Making iridoids/secoiridoids and monoterpenoid indole alkaloids: progress on pathway elucidation [J]. Curr Opin Plant Biol, 19: 35–42.
DUGÉ DE BERNONVILLE T, FOUREAU E, PARAGE C, et al., 2015. Characterization of a second secologanin synthase isoform producing both secologanin and secoxyloganin allows enhanced *de novo* assembly of a *Catharanthus roseus* transcriptome [J]. BMC Genomics, 16(1): 619.
Editorial Board of Flora of China, 1988. Flora Reipublicae Popularis Sinicae [M]. Beijing: Science Press, 62: 100. [中国植物志编委会, 1988. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 62: 100.]
HUA WP, ZHENG P, HE YH, et al., 2014. An insight into the genes involved in secoiridoid biosynthesis in *Gentiana macrophylla* by RNA-seq [J]. Mol Biol Rep, 41(7): 4817–4825.
HUANG LQ, LIU CX, 2015. Molecular pharmacognosy [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press: 239–243. [黄璐琦, 刘昌孝, 2015. 分子生药学 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社: 239–243.]
IKEDA H, ESAKI N, NAKAI S, et al., 1991. Acyclic monoterpene primary alcohol: NADP⁺ oxidoreductase of *Rauwolfia*

- serpentina* cells; the key enzyme in biosynthesis of monoterpene alcohols [J]. J Biochem, 109(2): 341–347.
- JIN H, ZHANG J, ZHANG JY, et al., 2013. *Gentiana rigescens* [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press: 1–5. [金航, 张霁, 张金渝, 等, 2013. 滇龙胆 [M]. 昆明: 云南科技出版社: 1–5.]
- LIU Y, SONG LL, YU WW, et al., 2015. Light quality modifies camptothecin production and gene expression of biosynthesis in *Camptotheca acuminata* Decne seedlings [J]. Ind Crop Prod, 66: 137–143.
- LIU Y, WANG Y, GUO FX, et al., 2017. Deep sequencing and transcriptome analyses to identify genes involved in secoiridoid biosynthesis in the Tibetan medicinal plant *Swertia mussoitii* [J]. Sci Rep, 7: 43108.
- MIETTINEN K, DONG L, NAVROT N, et al., 2014. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus* [J]. Nat Comm, 5: 3606–3616.
- MUNKERT J, POLLIER J, MIETTINEN K, et al., 2015. Iridoid synthase activity is common among the plant progesterone 5 β -reductase family [J]. Mol Plant, 8(1): 136–152.
- National Pharmacopoeia Committee, 2015. Chinese Pharmacopoeia [M]. Part I. Beijing: China Pharmacopoeia Science and Technology Press: 96. [国家药典委员会, 2015. 中国药典 [M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社: 96.]
- PADHAN JK, KUMAR V, SOOD H, et al., 2015. Contents of therapeutic metabolites in *Swertia chirayita* correlate with the expression profiles of multiple genes in corresponding biosynthesis pathways [J]. Phytochemistry, 116(1): 38–47.
- PAN Y, ZHANG J, ZHAO YL, et al., 2015. Investigation of metabolites accumulation in medical plant *Gentiana rigescens* during different growing stage using LC-MS/MS and FT-IR [J]. Bot Stud, 56(1): 14.
- RAI A, KAMACHI H, SUZUKI H, et al., 2017. *De novo* transcriptome assembly and characterization of nine tissues of *Lonicera japonica* to identify potential candidate genes involved in chlorogenic acid, luteolosides, and secoiridoid biosynthesis pathways [J]. J Nat Med, 71(1): 1–15.
- SALIM V, YU F, ALTAREJOS J, et al., 2013. Virus-induced gene silencing identifies *Catharanthus roseus* 7-deoxyloganic acid-7-hydroxylase, a step in iridoid and monoterpene indole alkaloid biosynthesis [J]. Plant J, 76(5): 754–765.
- VALLETTA A, TRAINOTTI L, SANTAMARIA AR, et al., 2010. Cell-specific expression of tryptophan decarboxylase and 10-hydroxygeraniol oxidoreductase, key genes involved in camptothecin biosynthesis in *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae) [J]. BMC Plant Biol, 10(1): 69.
- YANG MQ, ZHANG JY, SHEN T, et al., 2011. Effects of different cultivation modes on gentiopicroside content in *Gentiana rigescens* [J]. J Jiangsu Agric Sci, (1): 287–289. [杨美权, 张金渝, 沈涛, 等, 2011. 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, (1): 287–289.]
- ZHANG XD, ALLAN AC, LI CX, et al., 2015. *De novo* assembly and characterization of the transcriptome of the Chinese medicinal herb, *Gentiana rigescens* [J]. Int J Mol Sci, 16(5): 11550–11573.
- ZHANG XD, LI CX, WANG YZ, 2016. Cloning and expression analysis of *GrCMS* gene in *Gentiana rigescens* [J]. Bull Bot Res, 36 (2): 258–265. [张晓东, 李彩霞, 王元忠, 2016. 滇龙胆 *GrCMS* 基因的克隆与表达分析 [J]. 植物研究, 36(2): 258–265.]
- ZHOU DW, GAO S, WANG H, et al., 2016. *De novo* sequencing transcriptome of endemic *Gentiana straminea* (Gentianaceae) to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients [J]. Gene, 575(1): 160–170.
- ZHU HT, ZHENG CW, ZHAO P, et al., 2011. Content analysis of gentiopicroside in wild and tissue culture seedlings of *Gentiana rigescens* [J]. Nat Prod Res Dev, 23 (3): 482–485. [朱宏涛, 郑传伟, 赵平, 等, 2011. 野生坚龙胆及其组培苗中龙胆苦苷的含量分析 [J]. 天然产物研究与开发, 23(3): 482–485.]
- ZHU W, YANG BX, KOMATSU S, et al., 2015. Binary stress induces an increase in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. Front Plant Sci, 6: 582.

(责任编辑 周翠鸣)