

雷公藤单加氧酶基因全长克隆及表达分析

周家伟¹ 刘雨佳¹ 胡添源¹ 张逸凤¹ 高伟¹ 黄璐琦²

(1 首都医科大学中医学院中医络病研究北京市重点实验室,北京,100069; 2 中国中医科学院
中药资源中心道地药材国家重点实验室培育基地,北京,100700)

摘要 目的:单加氧酶(Monooxygenase,MO)是一类通过在底物上加一个氧原子的加氧酶,在动植物体内参与多种代谢途径。本实验致力于从雷公藤转录组数据中克隆得到单加氧酶基因 cDNA 全长,并对克隆得到的 MO 基因进行初步的功能分析。方法:通过对雷公藤转录组数据中筛选得到 MO 基因片段设计特异性引物,克隆 MO 基因 cDNA 全长,通过生物信息学方法对得到的 MO 基因进行分析,主要包括多重序列比对,蛋白结构预测和构建进化树分析等。结果:根据分析结果 *TwMO* 基因全长为 2 193 bp,共编码 507 个氨基酸,等电点为 8.84,相对分子质量为 55.20 kDa,多重序列比对显示它与其他植物的 MO 基因具有较高的同源性。雷公藤悬浮细胞经外源茉莉酸甲酯(MeJA)诱导后,实时荧光定量结果显示,*TwMO* 的表达量明显增加,并在 48 h 达到最高,提示 *TwMO* 基因与雷公藤的次生代谢产物的生成有关。结论:本研究首次从雷公藤悬浮细胞中克隆得到 MO 基因,为进一步研究该基因的功能奠定基础。

关键词 雷公藤;克隆;基因;单加氧酶;表达分析

Cloning and mRNA Expression Analysis of Monooxygenase Gene from *Tripterygium wilfordii*

Zhou Jiawei¹, Liu Yujia¹, Hu Tianyuan¹, Zhang Yifeng¹, Gao Wei¹, Huang Luqi²

(1 Key Laboratory of Collateral Diseases, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2 State Key Laboratory of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract **Objective:** Monooxygenase (MO) is a kind of enzymes that can incorporate one atom of oxygen into the substrates in many metabolic pathways. This study aimed to clone the full-length cDNA of a MO from the transcriptome data of *Tripterygium wilfordii* and analyze its function. **Methods:** The full-length cDNA of monooxygenase (*TwMO*) was cloned from the transcriptome data of *Tripterygium wilfordii* by designing specific primers. The *TwMO* gene was then analyzed by a series of bioinformatics analysis. **Results:** It showed that the full length of *TwMO* cDNA was 2193 bp encoding 507 amino acids. The theoretical isoelectric point was 8.84 and the molecular weight was about 55.20 kDa. Sequence alignment and phylogenetic analysis demonstrated that *TwMO* had relative close relationship to MO from other species of plants. The relative expression level of *TwMO* after MeJA inducing was up-regulated and highest at 48 h, which suggested its regulatory role in special metabolites biosynthesis. **Conclusion:** This work laid the foundation for further studying the function of this monooxygenase in *Tripterygium wilfordii*.

Key Words *Tripterygium wilfordii*; Clone; Gene; Monooxygenase; Expression analysis

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.02.005

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)为卫矛科(Celastraceae)雷公藤属植物,其干燥根或根的木质部作为中药雷公藤使用。中药雷公藤在我国具有悠久的用药历史^[1],其具有祛风除湿、通络止痛、解毒杀虫、消肿散结等功效^[2]。雷公藤中的活性成分主要分为萜类和生物碱类,现代药理研究表明雷公藤中的有效成分如雷公藤甲素和雷公藤红素等具有抗肿瘤^[3]、抗炎抗风湿^[4]和神经营养活性^[5]等作用,另有研究报道雷公藤红素可以使正常肥胖小鼠体重下降45%,从而达到减肥的作用^[6]。雷公藤

红素和雷公藤甲素与青蒿素、辣椒素和姜黄素被列为最有可能被开发成为现代药物的5种传统天然药用化合物^[7]。

加氧酶属于氧化还原酶类,可以分为双加氧酶和单加氧酶。单加氧酶也称作羟化酶或羟氧酶,可以使底物和一个氧原子结合,而另一氧原子在氢供体(NADPH等)的作用下生成水^[8]。细胞色素P450属于单加氧酶中的一类,它参与多种体内代谢过程,与药物和毒物的代谢密切关系。此外,P450家族基因对中药中的活性成分的合成起着关键的作用,参

基金项目:“十三五”时期北京市属高校高水平教师队伍建设支持计划项目(CIT&TCD20170324);市教委科技+社科计划重点项目(KZ201710025022);国家自然科学基金面上项目(81773830)

作者简介:周家伟(1992.03—),男,博士研究生在读,研究方向:天然药物学,E-mail:jiaweizhou@ccmu.edu.cn

通信作者:高伟(1979.05—),男,博士,教授,研究方向:中药资源与分子生药学,E-mail:weigao@ccmu.edu.cn

与多种中药活性成分的生物合成过程^[9-10]。鲨烯环氧化酶也属于单加氧酶,它是三萜和甾醇生物合成上的关键酶基因,它的活性和功能影响着三萜和甾醇的生物合成。鲨烯在鲨烯环氧化酶和其辅酶细胞色素 P450 还原酶 (Cytochrome P450 Reductase, CPR) 的作用下生成环氧鲨烯^[11],环氧鲨烯再进一步转化为三萜或甾醇类物质。在植物中,鲨烯环氧化酶通过影响植物的甾醇和三萜类活性成分的合成进一步影响植物的生长和发育以及应对生物和非生物的压力。研究表明在拟南芥中发现的环氧鲨烯酶 SE1 基因影响着拟南芥的根和种子的发育而 SE3 基因影响胚芽的发育和大小^[12-13]。

鉴于单加氧酶对药用植物的生长发育和中药活性成分生物合成的重要性,本研究首次从雷公藤悬浮细胞中克隆得到一条 MO 基因,该基因全长 2193 bp,具有完整的开放阅读框,共编码 507 个氨基酸。通过生物信息学分析,初步分析了该基因编码蛋白的生物学功能。此外,本文研究了 *TwMO* 基因在茉莉酸甲酯诱导下的表达方式,为进一步研究 *TwMO* 基因在雷公藤中的作用奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 2-16K 型低温冷冻离心机 (Sigma 公司), MM400 型混合型球磨机 (Retsch 公司), Veriti™ 96 孔梯度 PCR 仪 (ABI 公司), GBOXHR 型紫外凝胶成像分析仪 (Syngene 公司), QuantStudio 5 Real-Time PCR System (ABI 公司) 等。

1.2 试剂 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Thermo 公司生产), Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒、快速小提质粒试剂盒和 RNA 纯化试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司生产), Easy taq 酶 (北京全式金生物技术公司生产), Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒 (上海普洛麦格生物产品有限公司生产), PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (宝生物工程 (大连) 有限公司生产), 2xPhusion HF PCR Master Mix (NEB 公司生产), KAPA SYBR® FAST qPCR Kit MasterMix (2X) Universal 试剂盒 (Kapa biosystems 公司生产)。菌株和质粒: Trans1-T1 感受态细胞、pEASY® -Blunt Zero vector (北京全式金生物技术有限公司生产)。

1.3 分析样品 雷公藤悬浮细胞由本实验室继代保存^[14]。

2 方法与结果

2.1 雷公藤总 RNA 的提取和精制 将雷公藤悬浮细胞加入茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导 (终浓度为 50

μM), 分别于诱导后 12、24、48 h 取材, 液氮速冻后存于 -80 °C 冰箱。取各诱导时间点雷公藤悬浮细胞 0.4 ~ 0.6 g, 液氮环境下研磨粉碎。采用 Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒提取 3 个时间点悬浮细胞的总 RNA, 用 RNA 纯化试剂盒对提取的总 RNA 进行精制。通过凝胶电泳检测 RNA 的质量。

2.2 *TwMO* cDNA 全长克隆 cDNA 第一链以精制后的总 RNA 为模板, 通过 SMARTer™ Race cDNA, Amplification Kit 试剂盒反转录后得到。根据雷公藤转录组数据注释, 筛选出 MO 基因片段, 对 MO 基因片段设计特异性扩增引物。见表 1。以获得的 cDNA 第一链为模板, 在 Veriti™ 96 孔梯度 PCR 仪上进行全长扩增。50 μL 的反应体系: 1 μL 模板 DNA、25 μL 的 2xPhusion HF PCR Master Mix、2.5 μL 的正向引物、2.5 μL 的反向引物、ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应条件为: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物通过凝胶电泳分离后, 目标条带用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收, 取 1 μL pEASY® -Blunt Zero 载体与 4 μL 回收产物在 PCR 仪中 25 °C 反应 15 min 后, 将连接产物与 50 μL 的 Trans1-T1 感受态细胞混合, 冰浴 30 min 后, 42 °C 水浴 45 s, 冰浴 2 min 后加入 500 μL 的 LB 培养基, 37 °C, 180 转培养 1 h, 涂布于 LB + 氨苄培养基上 37 °C 培养过夜。单克隆菌经菌液 PCR 鉴定后, 阳性克隆送公司测序 (北京睿博兴科生物技术有限公司生产), 由测序结果获得 *TwMO* cDNA 全长序列。

2.3 雷公藤 *TwMO* 基因生物信息学分析 将测序得到的 *TwMO* 序列结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上 Blast 搜索蛋白质和核苷酸数据库, 并在 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 上查找开放阅读框 (ORF) 和翻译成氨基酸序列。主要采用一些网上软件包进行生物信息学分析^[15], 如采用 Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) 进行结构域比对, ExPASy 在线服务器的 Compute PI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/) 预测理论等电点与相对分子量, TRMHMMserver v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜域分析, SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维同源建模。用 DNAMAN 软件、ClustalW 软件和 MEGA 6 软件分别对 *TwMO* 基因所编码的氨基酸序列进行多重比对, 与其他来源的 MO 氨基酸序列进行比较和构建

Neighbor-joining 系统进化树。

2.4 雷公藤 *TwMO* 基因的表达分析 雷公藤悬浮细胞经茉莉酸甲酯诱导后,取不同诱导时间点(0,4,12,24,48,72 h)的雷公藤悬浮细胞,采用 RNA 提取试剂盒提取不同处理时间点的悬浮细胞的总 RNA。用 FastQuant RT Kit 试剂盒反转录成 cDNA,以雷公藤 actin 基因作为内参,进行 *TwMO* 基因相对表达检测,引物设计。见表 1。反应体系:2 × Fast qPCR Master Mix 10 μL,cDNA 1 μL,正反引物(10 mmol/L)各 0.4 μL,PCR-grade water 7.8 μL,50 × Rox High 0.4 μL。反应程序为:95 ℃ 3 min,95 ℃ 3 s,60 ℃ 30 s,40 个循环;65 ~ 95 ℃ 做溶解曲线分析。反应结束后对荧光值扩增曲线和融解曲线进行分析。生物重复和技术重复各 3 次,采用 2^{-△△CT} 法分析结果。

表 1 引物序列

反应名称	引物	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
LC-PCR	<i>TwMO</i> -F	AATGCTCTAAGCCTCGCAT	2 193
	<i>TwMO</i> -R	GGAATAATCAATCCACCACTA	
RT-PCR	<i>TwMO</i> -F	GTTGGTGGTTGGAGCCG	197
	<i>TwMO</i> -R	CGATGTGTCTAAACTTGTCCC	
	actin-F	AGGAACCACCGATCCAGACA	289
	actin-R	GGTGCCTGAGGTCTCTGTT	

2.5 结果

2.5.1 雷公藤 *TwMO* 全长 cDNA 的获得 由雷公藤转录组数据通过全长 PCR 克隆得到 *TwMO* 基因的 cDNA 全长序列为一条 2 193 bp 的 cDNA 特异性片段,结果。见图 1。

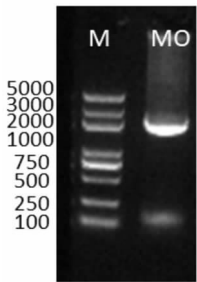


图 1 雷公藤 *TwMO* 基因全长 cDNA 电泳检测

注:M. Trans 2K plus Marker;MO. 目的基因条带;单位为 bp

2.5.2 雷公藤 *MO* 基因序列分析 通过 ORF Find 在线软件对 *TwMO* 基因全长 cDNA 序列进行分析,预测其共编码 507 个氨基酸,且含有完整开放阅读框(Open reading frame, ORF),位于 243 ~ 1 766 bp 区域;序列的 1 ~ 243 bp 为 5URT,1 766 ~ 2 193 bp 为 3 URT。Blast 的结果显示 *TwMO* 与毛果杨 *Populus trichocarpa* 81% 相似,与甜橙 *Citrus sinensis* 79% 相似,与胡桃 *Juglans regia* 77% 相似,与麻风树 *Jat-*

ropha curcas 75% 相似,与没药叶天竺葵 *Pelargonium myrrhifolium* 75% 相似等。Interpro 结构域分析结果显示 *TwMO* 有与 FAD 结合有关的 FAD/NAD(P)-binding domain(53 ~ 326,374 ~ 451)功能域。见图 2。DANMAN 对没药叶天竺葵(AKF43264)、长果种麻黄 *Corchorus olitorius*(OMO88316)、土瓶草 *Cephalotus follicularis*(GAV67558)、桃蝶木天竺葵 *Pelargonium tetragonum*(AKF43266)、天竺葵 *Pelargonium x hortorum*(AKF43268)、马德拉老鹳草 *Geranium maderense*(AKF43250)、暗花老鹳草 *Geranium phaeum*(AKF43251)和野大豆 *Glycine soja*(KHN10936)的氨基酸序列进行多重序列比对,结果表明 *TwMO* 与其他植物的 MO 氨基酸序列具有较大的相似性,平均为 82.46%。见图 3。

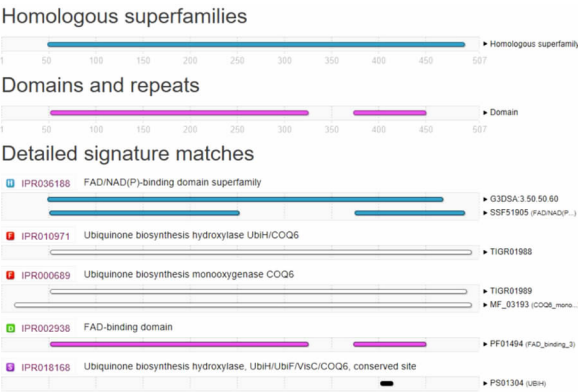


图 2 *TwMO* 氨基酸序列保守功能域



图 3 雷公藤 *TwMO* 氨基酸序列与其他植物 MO 氨基酸序列多重序列比对

2.5.3 *TwMO* 氨基酸序列的系统进化分析 将雷公藤 MO 氨基酸序列与 GenBank 中其他 30 种生物

的 MO 氨基酸序列进行比对分析,在软件 MEGA6 中采用相邻连接法构建系统进化树,进行聚类分析。见图 4。*TwMO* 在本文所选蛋白中与土瓶草的 MO 基因亲缘关系较近。

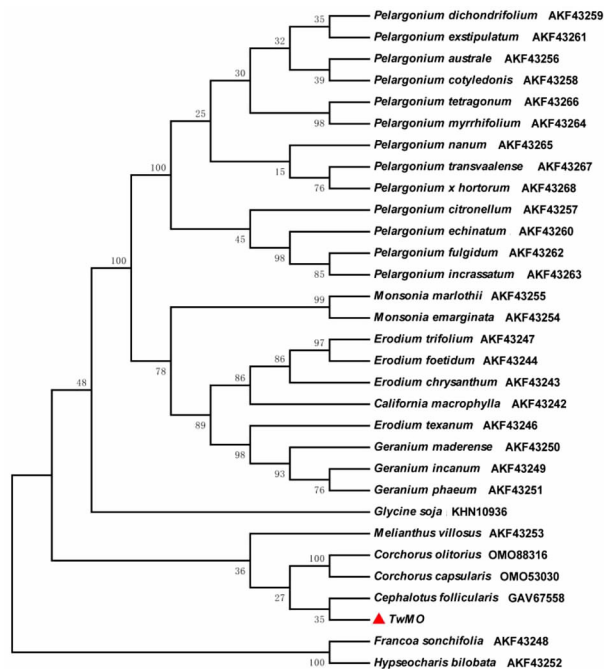


图 4 MO 系统进化树

2.5.4 *TwMO* 理化性质和 3D 结构预测 EsPASy 在线软件对 *TwMO* 氨基酸序列的理化性质分析,结果为 *TwMO* 的蛋白质分子质量为 55.2 kDa,等电点为 8.84。跨膜域分析结果显示其为膜蛋白。见图 5。*TwMO* 三维同源模型以 4n9x.1.A 蛋白为模板构建 *TwMO* 蛋白的三级结构,该蛋白三级结构预测模型。见图 6。

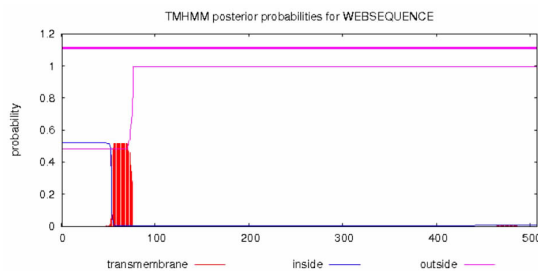


图 5 雷公藤 *TwMO* 蛋白跨膜分析

2.5.5 *TwMO* 诱导表达分析 MeJA 是一种广泛存在于植物中的防御激素,已有研究报道外源添加 MeJA 可以激发植物防御基因的表达,可以诱导植物次生代谢产物合成相关酶基因的表达,进而提高次生代谢产物在植物体中的产量^[16-17],使植物应对外界环境的胁迫。根据实时荧光定量 PCR 检测诱导后 *TwMO* 基因表达实验的数据,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量表达分析。见图 7。实验发现,经 MeJA 诱导后,

雷公藤 *TwMO* 基因表达量迅速上调,在 48 h 达到最大,提示该基因与雷公藤中的活性成分的生物合成相关。

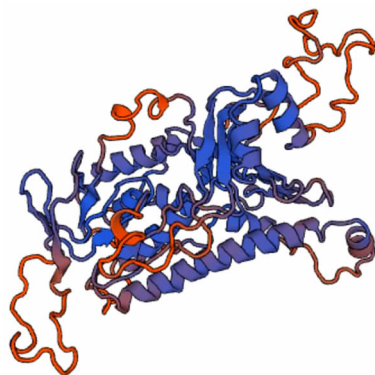


图 6 *TwMO* 蛋白三级结构预测模型

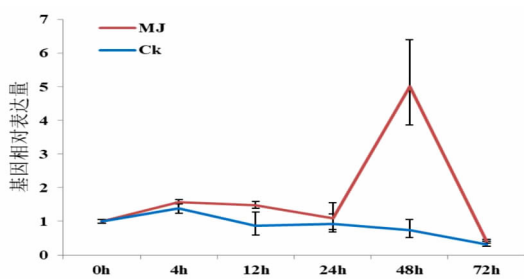


图 7 MeJA 诱导 *TwMO* 不同时间相对表达量

3 讨论

由于单加氧酶基因不仅对植物的生长发育起着重要的作用,同时也参与了中药活性成分的生物合成过程。研究单加氧酶的生化功能有助于通过分子水平揭示药用植物中活性成分的生物合成机制。本研究首次从雷公藤悬浮细胞中克隆得到一条 MO 基因。为了能进一步研究其具体的生化功能,本研究通过生物信息学分析方法对其核苷酸和氨基酸序列进行了分析,结果显示 *TwMO* 与已报道的 MO 基因具有很高的相似性,并且 *TwMO* 具有 MOs 所共有的与 FAD 结合有关的 FAD/NAD(P)-binding domain 功能域。此外,外源的 MeJA 激素诱导雷公藤悬浮细胞后,实时荧光定量对 *TwMO* 基因的表达分析结果表明,*TwMO* 在诱导后呈上升的趋势,表明其受到外源 MeJA 的调控,可能与植物的次生代谢产物合成有关。本研究克隆了 *TwMO* 的 cDNA 全长序列并对其理化性质和具体的生化功能进行的初步预测,为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

参考文献

- [1] 高伟,刘梦婷,程琪庆,等. 雷公藤的本草考证[J]. 世界中医药, 2012,7(6):560-562.
- [2] 刘为萍,刘素香,唐慧珠,等. 雷公藤研究新进展[J]. 中草药, 2010,41(7):1215-1218.
- [3] Yang H, Chen D, Cui Q C, et al. Celastrol, a triterpene extracted from

- the Chinese “Thunder of God Vine” is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice[J]. Cancer Research, 2006, 66(9):4758-4765.
- [4] Astry B, Venkatesha S H, Laurence A, et al. Celastrol, a Chinese herbal compound, controls autoimmune inflammation by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells in the target organ[J]. Clinical Immunology, 2015, 157(2):228-238.
- [5] Lu L, Li F, Wang X. Novel anti-inflammatory and neuroprotective agents for Parkinson's disease[J]. Cns & Neurological Disorders Drug Targets, 2010, 9(9):232-240.
- [6] Junli L, Jaemin L, Mario Andres S H, et al. Treatment of obesity with celastrol[J]. Cell, 2015, 161(5):999-1011.
- [7] Corson T W, Crews C M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines; triumphs and trials[J]. Cell, 2007, 130(5):769-74.
- [8] Harayama S, Kok M, Neidle E L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases[J]. Annual Review of Microbiology, 1992, 46(46):565-601.
- [9] Guo J, Ma X, Cai Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones[J]. New Phytologist, 2016, 210(2):525-534.
- [10] Zhao Q, Cui M Y, Levsh O, et al. Two CYP82D Enzymes Function as Flavone Hydroxylases in the Biosynthesis of Root-Specific 4'-Deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis* [J]. Molecular Plant, 2017, 11(1):135-148.
- [11] Porter TD. Electron Transfer Pathways in Cholesterol Synthesis[J]. Lipids, 2015, 50(10):927-936.
- [12] Rasbery JM, Shan H, Leclair RJ, et al. Arabidopsis thaliana squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(23):17002-17013.
- [13] Laranjeira S, Amorim-Silva V, Esteban A, et al. Arabidopsis Squalene Epoxidase 3 (SQE3) Complements SQE1 and Is Important for Embryo Development and Bulk Squalene Epoxidase Activity[J]. 分子植物:英文版, 2015, 8(7):1090-1102.
- [14] 周家伟, 刘雨佳, 胡添源, 等. 雷公藤 PTEN 基因全长克隆及表达分析[J]. 中草药, 2017, 48(7):1391-1396.
- [15] 胡添源, 苏平, 张逸风, 等. 雷公藤单萜合酶基因 TwMS 的克隆及蛋白表达分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7):1312-1318.
- [16] Geyter ND, Gholami A, Goormachtig S, et al. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(6):349-359.
- [17] Misra RC, Ghosh S. Methyl jasmonate-elicited transcriptional responses and pentacyclic triterpene biosynthesis in sweet basil[J]. Plant Physiology, 2014, 164(2):1028-1044.

(2017-12-05 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 258 页)

等植物次生代谢产物生物合成途径功能基因的挖掘和功能研究中。

参考文献

- [1] Husna B, On T, Zhu YZ. Effects of purified *Salvia miltiorrhiza* extract on cardiac vascular smooth muscle hypoxic cells[J]. J Pharmacol Sci, 2007, 104(3):202-211.
- [2] Gao HW, Sun W, Zhao JP, et al. Tanshinones and diethyl blechnics with anti-inflammatory and anti-cancer activities from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) [J]. Sci Rep, 2016(6):33720.
- [3] Parajuli D R, Zhao Y Z, Jin H, et al. Anti-fibrotic effect of PF2401-SF, a standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza*, in thioacetamide-induced experimental rats liver fibrosis[J]. Arch Pharm Res, 2015, 38(4):549-555.
- [4] Cheng Q, Su P, Hu Y, et al. RNA interference-mediated repression of SmCPS (copalyl diphosphate synthase) expression in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* causes a decrease of tanshinones and sheds light on the functional role of SmCPS[J]. Biotechnol Lett, 2014, 36(2):363-369.
- [5] Ma Y, Ma XH, Meng FY, et al. RNA interference targeting CYP76AH1 in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* reveals its key role in the biosynthetic pathway of tanshinones[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(2):155-160.
- [6] 郭生虎, 王敬东, 马洪爱. 乌拉尔甘草毛状根的诱导及培养体系的建立[J]. 西北农业学报, 2012, 21(12):138-141.
- [7] 孔卫青, 杨金宏, 卢从德. 发根农杆菌诱导桑树毛状根体系的建立[J]. 西北植物学报, 2010, 30(11):2317-2320.
- [8] Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of mitradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(29):12108-12113.
- [9] Hatlestad GJ, Sunnadeniya RM, Akhavan NA, et al. The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production[J]. Nat Genet, 2012, 44(7):816-820.
- [10] 胡亚忱, 曲德业. 发根农杆菌诱导植物毛状根的发生及次生代谢物生产的研究进展[J]. 吉林师范大学学报:自然科学版, 2005, 26(1):31-32, 35.

(2017-12-05 收稿 责任编辑:张文婷)