

· 基础研究 ·

鞘蕊苏赤霉素氧化酶基因的克隆及表达研究[△]黄晓^{1a}, 张恬^{2a}, 马朝芝¹, 刘焱文¹, 余坤^{1*}, 黄必胜^{1*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065; 2. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700

[摘要] 目的: 克隆和表达鞘蕊苏赤霉素氧化酶基因, 为提高湖北栽培的鞘蕊苏有效成分含量奠定基础。方法: 提取鞘蕊苏叶片的总 RNA, 利用套式聚合酶链式反应(PCR)技术克隆获得 CfGA01 基因全长。结果: 完整的赤霉素氧化酶基因全长 1234 bp, 编码 355 个氨基酸, 命名为 CfGA01; 通过构建系统进化树比较 CfGA01 与其他物种中的赤霉素氧化酶基因的亲缘关系, 发现 CfGA01 与丹参 GA 蛋白的亲缘关系比较近, 最后成功构建了赤霉素氧化酶基因原核表达载体 PGCFGA01, 并成功进行了表达。结论: 克隆得到鞘蕊苏赤霉素氧化酶基因全长并构建原核表达载体, 为研究鞘蕊苏有效成分合成酶奠定了基础。

[关键词] 鞘蕊苏; 赤霉素; 基因克隆

[中图分类号] R282.5; R284 [文献标识码] A [文章编号] 1673-4890(2019)10-1362-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190101006

Cloning and Expression of *Coleus forskohlii* Gibberellin Oxidase GeneHUANG Xiao^{1a}, ZHANG Tian^{2a}, MA Chao-zhi¹, LIU Yan-wen¹, YU Kun^{1*}, HANG Bi-sheng^{1*}

1. Hubei University of Chinese Medicine, College of Pharmacy, Wuhan 430065, China;

2. National resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective:** To clone and express the gene of Gibberellin oxidase and to lay a foundation for improving the content of effective components of *Coleus forskohlii* transplanted in Hubei province. **Methods:** Total RNA was extracted from the leaves of scabbard and the full length of CfGA01 gene was cloned by nested PCR. **Results:** The gibberellic acid oxidase gene with full length 1234 bp was named and could encode 355 amino acids. Comparing gibberellic acid oxidase gene in coleus with those in other species by phylogenetic tree, it was found that CfGA01 had the close genetic relationship with *Salvia miltiorrhiza* GA protein. Gibberellic acid oxidase gene of prokaryotic expression vector PFCfGA01 was successfully cloned and expressed. **Conclusion:** The full length of gibberellin oxidase gene of *C. forskohlii* was cloned and prokaryotic expression vector was obtained. This study provided the basis for the biosynthesis path way of the active component.

[Keywords] *Coleus forskohlii*(Willd.) Briq.; gibberellin; gene cloning

鞘蕊苏药材的基原植物为毛喉鞘蕊花 *Coleus forskohlii*(Wild.) Briq., 主产于印度, 在中国云南、福建亦有分布, 被植物学家界定为珍稀植物^[1]。鞘蕊苏以全草入药, 民间主要用于治疗哮喘^[2]、咳嗽等疾患, 疗效很好^[3]。鉴于鞘蕊苏良好药效作用, 本实验室与企业实施产学研结合, 以鞘蕊苏为君药, 开发了鞘蕊苏胶囊。现代科学研究表明, 鞘蕊苏有效成分为二萜类化合物异佛司可林(isoforskolin)^[4]。

萜类化合物以 5 碳异戊二烯(IPP)及其异构体二甲基丙烯基二磷酸(DMAPP)为原料^[5], 通过异戊二烯转移酶催化连接而成。IPP 和 DMAPP 以“头-尾”方式相连形成牻牛儿基焦磷酸(GPP)^[6], 通过法尼基焦磷酸合成酶(FPS)的作用, GPP 与 1 分子 IPP 结合形成法尼基焦磷酸(FPP)^[7], 再通过牻牛儿基焦磷酸合成酶(GGPPS)作用, FPP 与 1 分子 IPP 形成牻牛儿基焦磷酸(GGPP)^[8], GGPP 是二萜化合物的前体物

[△] [基金项目] 国家自然科学基金项目(31270405); 中央本级重大增减支项目(2060302)* [通信作者] 余坤, 教授, 研究方向: 中药资源; Tel: (027)68890106, E-mail: yukun_hbctm@163.com
黄必胜, 教授, 研究方向: 中药资源; Tel: (027)68890106, E-mail: huangxiao0430@sohu.com^a并列第一作者

质。本研究通过反转录 PCR 技术克隆得到赤霉素氧化酶基因, 并成功地构建了基因的表达载体。通过对 GA 氧化酶基因的克隆及表达载体构建, 研究二萜类化合物的合成途径中相关酶的功能, 为提高湖北通城种植鞘蕊苏药材中异佛司可林含量奠定基础。

1 材料

鞘蕊苏植物移植自湖北省通城县鞘蕊苏药材集中种植基地, 经湖北中医药大学药学院生药教研室吴和珍教授鉴定为唇形科植物毛喉鞘蕊花 *Coleus forskohlii* (Willd.) Briq., 将其植株种植于实验室, 保证植株健康的生理状态, 以备后续实验需要。

pMD18-T Vector (大连宝生物科技有限公司), DH5 α 感受态细胞 (天根生化科技有限公司), PGEX-4T-1 表达载体 (中国医学科学院药用植物研究所陈士林课题组赠予), QIAGEN RNeasy Plant Mini 试剂盒 (QIAGEN 技术有限公司), 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒 (天根生化科技有限公司), 3'-F μ LI RACE 试剂盒、La Taq 酶、DNA Marker (TaKaRa 公司), 2 \times Easq Taq Mix (北京全式金生物技术公司), Hind III 和 Xba I 限制性内切酶、PrimeScripTM 1stStrand cDNA synthesis Kit、SYBR PrimeScripTM RT-PCR Kit、Primer start Gxl 高保真酶、DNA Marker (TaKaRa 公司), 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 鞘蕊苏赤霉素 CfGA01 全长的克隆

步骤 1: 选取高通量转录组测序分析结果中的赤霉素氧化酶基因片段, 设计 5' 引物 (CfGAS-outer TCTGGCGGCACTGAAATCCA, CfGAS-inner CCAGA-ATCTCGCACGCCATCTT)、3' 引物 (CfGAS-outer CTT-GTGGTAGTTAGAATGGGC, CfGAS-inner TTGAAGA-AGCCCACCTCCT) 进行巢氏 RACE 实验, 得到基因全长序列。

步骤 2: 利用 DNAMAN 软件根据全长基因序列设计引物, 并引入酶切位点 (CfGAS-F-EcoR I gaat-tcACAACCACCACCAACTCATCTCTCT, CfGAS-R-Sal I gtcgacACCGGATGGAAGGGAGGGAACATTA), 用高保真 DNA 聚合酶扩增全长, 反应体系 (Prime star Gxl Polymerase 1 μ L、5 \times Prime star Gxl Buffer 10 μ L、F 1 μ L、R 1 μ L、cDNA 5 μ L、dNTP Mixture

4 μ L、RNase free dH₂O 28 μ L), PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 180 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 冷却, 待反应结束后将产物取出置于 4 $^{\circ}$ C 保存。分别用 EcoR I、Sal I 对提取的重组质粒与表载体 PFEX-4T-1 进行双酶切反应, 反应体系 (质粒/PFEX-4T-1 10 μ L、10 \times K Buffer 5 μ L、酶 1 1 μ L、酶 2 1 μ L、RNase free dH₂O 33 μ L), 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 反应 3 ~ 8 h, 65 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 灭活限制性内切酶。

步骤 3: 用 T4 连接酶将载体和质粒双酶切后的产物进行连接, 得到带有目的基因的重组质粒, 具体反应体系及条件如下: 连接酶 T4 1 μ L、10 \times T4Buffer 1 μ L、载体胶回收产物 4 μ L、质粒胶回收产物 4 μ L, 反应条件: 16 $^{\circ}$ C 空气浴连接 3 h 以上, 取 10 μ L 连接后的产物转化到 100 mL DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中, per 筛选阳性克隆, 并将阳性克隆送于生工测序, 将测序结果作比对后选取准确无误的阳性单克隆 2 ~ 4 个, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇菌培养过夜, 用以提取质粒, 将提取的质粒取少量做双酶切验证, 剩余的 -20 $^{\circ}$ C 保存, 表达载体构建结束, 挑取阳性单克隆至 2 mL 的无菌 EP 管中, LB 液体培养基培养 2 h 作为母菌, 并加入 40% 甘油混匀, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存^[9]。

2.2 实时荧光相对定量 PCR

利用百泰克多糖多酚植物总 RNA 抽提试剂盒提取鞘蕊苏根、茎、叶和花各个组织的总 RNA, 然后分别用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计 (NanoDrop 2000) 通过波长 (A) 检测总 RNA 的质量和浓度。利用 TaKaRa 公司的 PrimeScrip RT reagent Kit 试剂盒将上述 RNA 反转录得到 cDNA, 利用 TaKaRa 公司的 SYBR premix Ex Taq kit 试剂盒在 Roche 公司 Light Cyclor 480 实时荧光定量仪上进行 qPCR。

2.3 CfGA01 基因功能验证

将重组表达载体与空载体 PGEX-4T-1 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 含空载体的大肠杆菌将被用作对照菌, 利用 IPTG 诱导启动子在大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中表达萜类合成酶基因, 并确定蛋白表达的最佳 IPTG 浓度、最佳时间和最佳温度。

3 结果与分析

3.1 RNA 提取

通过琼脂糖凝胶电泳 (1.0%) 检测鞘蕊苏根部和叶中提取的总 RNA, 观察是否能清楚地看到 28 s 和

18 s 的条带, 由图 1 观察条带清晰可见。将跑胶后的总 RNA 溶液用 Nanodrop2000 检测浓度和纯度, 其 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 和 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 比值分别为 2.01 和 2.13, 表明有轻微降解, 但它不影响后续实验的正常过程。

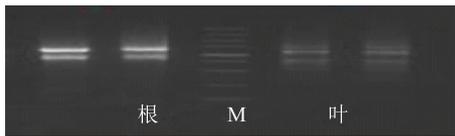


图 1 鞘蕊苏根和叶中提取的 RNA 的电泳图

3.2 3'、5'-RACE 扩增

根据高通量测序片段设计 GSP1 和 GSP2 引物。通用 3'引物和 5'引物进行巢式扩增, 通过研究不同的退火温度, 扩增 3'端和 5'端得到与目标片段大小一致的条带。通过凝胶回收目的片段, 并将目的片段的胶回收产物与 PMD18-T 载体连接, 连接产物转 DH5 α 感受态细胞中, 菌落过夜生长, 通过 PCR 挑选阳性克隆, 选择 2~4 个阳性克隆进行序列测序。通过凝胶电泳发现 CfGA01 3'端最佳退火温度为 62 $^{\circ}\text{C}$, 5'端最佳退火温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ (见图 2)。

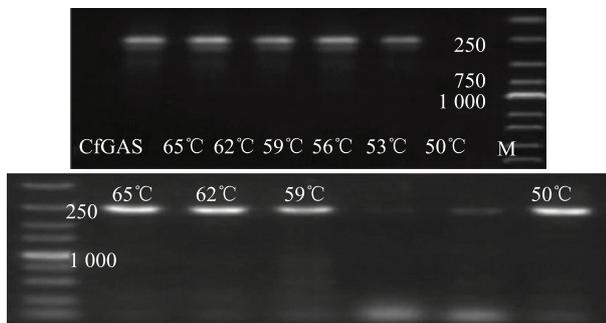


图 2 3'RACE、5'RACE 凝胶电泳图(由上到下)

3.3 鞘蕊苏 CfGA01 基因全长的拼接

测序结果用 MEGA 6.0 进行拼接, DNAMAN 6.0 软件进行分析, 比对结果显示 CfGA01 基因的总长度为 1234 bp, 包括 5'非编码区 72 bp, 993 bp 开放阅读框区, 169 bp 3'非编码, 终止密码子为 TAA。氨基酸数量为 408, 分子量为 45 874, 其中开放阅读框中的氨基酸数为 355, 分子量为 39 606。见图 3。

3.4 CfGA01 系统进化树

山茶花 *Camellia lipoensis*、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge、牵牛花 *Ipomoea nil*、大麻 *Marah macrocarpa*、毛状烟草 *Nicotiana tomentosiformis*、野生烟草 *N. attenuata*、美花烟草 *N. sylvestris*、烟草 *N. tabacum*、矮牵牛 *Petunia x hybrida*、节节麦 *Aegilops tauschii*

subsp. tauschii、小麦 *Triticum aestivum* 植物的 GAS 蛋白进行多重比对, 发现它们具有较高的同源性 (见图 4)。通过构建系统进化树, 发现 CfGA01 蛋白与丹参 GA 蛋白的亲缘关系比较近。

3.5 qPCR 分析

CfGA01 参与赤霉素合成, 赤霉素是植物中的二萜类植物激素, 能够促进植物生长, 对整个发育过程起着重要作用。图 5 qPCR 结果表明 CfGA01 在根、茎、花和叶各个组织中都有分布, 而分布于叶和花中相对较高。

3.6 原核蛋白表达分析

通过图 6 SDS-PAGE 检测结果显示, IPTG 浓度为 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ 时, 在上清液中有表达, 但表达较少, 大量蛋白成为包涵体。

4 讨论

赤霉素在植物生长和发育中起着重要作用, 如种子萌发、叶芽生长、叶柄伸长、叶片扩大、花形成和发育、果实成熟等都与赤霉素有着重要联系。一般来说赤霉素的合成主要发生在植物的顶端部位, 即分生能力较强的部位, 如顶芽、发育叶和根尖。近年来随着植物功能基因组学和蛋白质组学的发展, 赤霉素研究取得重大进展, 特别是赤霉素生物合成途径, 起关键作用的酶基因已在许多植物中克隆出来, 如在拟南芥、水稻、豌豆、玉米、西红柿、草莓、莴苣、烟草、大麦和南瓜等植物中都发现了参与赤霉素合成与代谢的基因^[10], 然而在鞘蕊苏中相关基因报道较少。

本研究基于前期外源性 GA 处理植株有效成分含量减少的现象, 首次克隆并表达了鞘蕊苏中赤霉素氧化酶 CfGA01, 基因表达蛋白与烟草、小麦、丹参等的相似性都在 80% 以上, 进化关系与丹参最相近, 表明该基因序列比较保守。在 qPCR 的实验中, 研究发现鞘蕊苏中赤霉素氧化酶在叶中表达量最多, 而在根中表达量较少, 这种表达趋势不同于模式植物拟南芥和水稻的研究^[11], 表明鞘蕊苏中赤霉素氧化酶的合成及富集有其独特性。在鞘蕊苏不同组织中有效成分异佛司可林含量的研究中, 发现叶中异佛司可林含量最低, 而根中含量最高, 这同赤霉素氧化酶的表达量正好相反。赤霉素与异佛司可林由共同的前提化合物经过生物反应得到, 研究赤霉素氧化酶的功能, 为研究异佛司可林的生物合成提供科学依据, 为后续提高栽培鞘蕊苏有效成分含量奠定基础。

	10	20	30	40	50	60
1	GAAAATATATATCTGAGCTACTTCCCGCAGGCCACAACCACCACCAAGACTCATCTCTCT					
91	E N I Y L S Y F P Q A T T T T N T H L S					
	70	80	90	100	110	120
61	CAATTTAAATCAATGGTGTATGTCTCAAACCAGCAATCGAACAGTTGTGCGATGCCATG					
21	Q F K S M V Y V S K P A I E Q L S I A M					
	130	140	150	160	170	180
121	AACTGCACCGCATCCGCACTTCTCTCTCTTCCCACTGATCGACCTCTCCAAGCCC					
41	N C T A S A L L S S P F P L I D L S K P					
	190	200	210	220	230	240
181	GACTCCCAATCGCAGCTGGTCAAGGCCCTGCGAGGAGGTGGGCTTCTTCAAAGTCATCAAC					
61	D S Q S Q L V K A C E E V G F F K V I N					
	250	260	270	280	290	300
241	CACGGGCTCCCTTCCAATTCATCGCGGATTGGAAATCCCAAGCCCTCAAATCTTCTCC					
81	H G V P F Q F I A D L E S Q A L K F F S					
	310	320	330	340	350	360
301	CTCCCCCTATCCACAAACTCAAAGCCGGCCCCCGATCCCTTCGGCTACGGCAACAAC					
101	L P L S H K L K A G P P D P F G Y G N N					
	370	380	390	400	410	420
361	CTCATCGGCCTCAATGGCGATGTCGGGCTGGGTCGAATACTTCTCCTTAACGCCACGGCC					
121	L I G L N G D V G W V E Y F L L N A H A					
	430	440	450	460	470	480
421	CATTTAACTACCACAAGTTCCGCCCCCTTTCGGCCACAAGTTCCGGTCCGTTTGAAC					
141	H S N Y H K F A P L F G H K F R C V L N					
	490	500	510	520	530	540
481	GACTACTTATCGCGGTGAAGAAGATGGCGTGGAGATTCTGGAATGGTGGCGGAGGGA					
161	D Y L S A V K K M A C E I L E M V A E G					
	550	560	570	580	590	600
541	TTGAAGATTCAGCCGAAGAATGTGTTACGCAAGCTGCTGATGGATGACAGCGGACTCT					
181	L K I Q P K N V F S K L L M D E Q S D S					
	610	620	630	640	650	660
601	GTTTTCAGGGTGAACCACTACCCGCGCGGCGGAAAGTGAAGAATCCGGCGCCGGAAT					
201	V F R V N H Y P P R P E S E E S G G R N					
	670	680	690	700	710	720
661	GTGATCGGATTCGGGGAGCACACGACCCCGAGATAATCTCGGTTTTGAGATCCAACGAC					
221	V I G F G E H T D P Q I I S V L R S N D					
	730	740	750	760	770	780
721	AGCTCGGGGCTCCAAATATCGCTCAAGGATGGGATTGGATTTCAGTCCCGCCAGATCAA					
241	S S G L Q I S L K D G D W I S V P P D Q					
	790	800	810	820	830	840
781	CATTCCTTTCATTAATCTGGGCGACTCCTTGCAGGTGATGACGAATGGGAGTTCAAG					
261	H S F F I N V G D S L Q V M T N G R F K					
	850	860	870	880	890	900
841	ACCGTCCGGCATAGAGTGGTGGCCAAACAGCCGAAATCGAGGGTTTCAATGATTTATTT					
281	S V R H R V V A N S P K S R V S M I Y F					
	910	920	930	940	950	960
901	GGAGGACCACCGCTGAGTGAAGAATAGCTCCATTGCCTTTCATTAATGGAGGGAGATGAA					
301	G G P P L S E K I A P L P S L M E G D E					
	970	980	990	1000	1010	1020
961	GACAGCTGTACAAGGAGTTTACCTGGTTTGAATACAAAAATCTGTTTACAATTCTAGG					
321	D S L Y K E F T W F E Y K K S V Y N S R					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
1021	CTGGCTGATAATAGCTTGGGCTTTTTCGAGAAAATTCGAGCATCTTAATGTTCCCTCCCT					
341	L A D N R L G L F E K I A A S * C S L P					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
1081	TCCATCCGGTAAACTATGAAAGAGCCAATCGAATCTCGATCTCGATATCAATATCTCAAA					
361	S I R * T M K E P I E S R S R Y Q Y L K					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
1141	AAGAGATGCTTGTAGTTCTCCTTTTCTCCTTTCATTGTTACTGTAGTTTCATTGCAAT					
381	K R C L F S S P F L L S F V T V V H C N					
	1210	1220	1230			
1201	ATTTACACGAAAGAAATTTAATGTTTGTCAACA					
401	I S H E R N L M F V N					

图3 鞘蕊苏 CfGA01 基因全长序列图

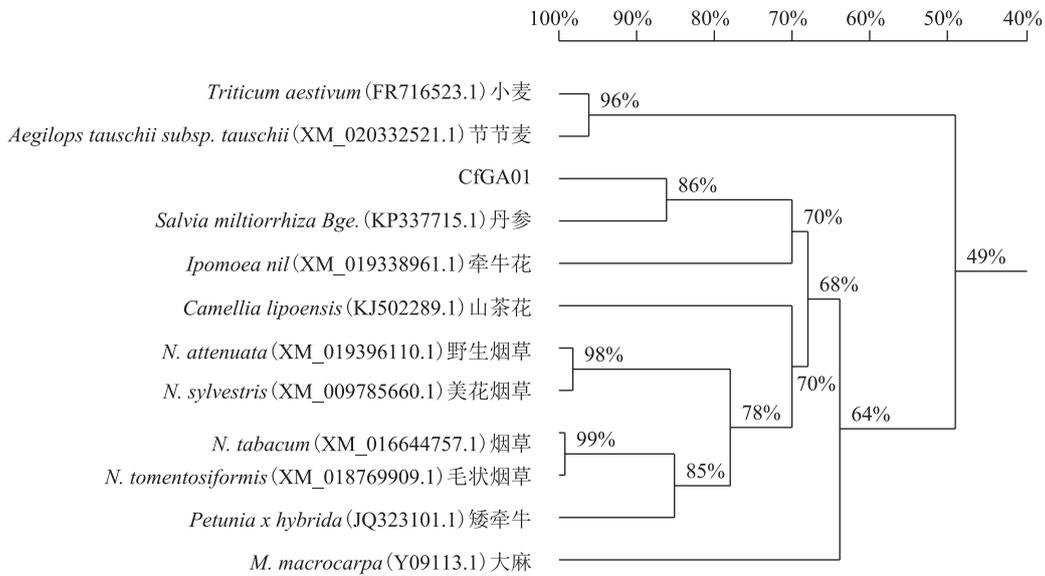


图4 鞘蕊苏 CfGA01 同源系统进化树

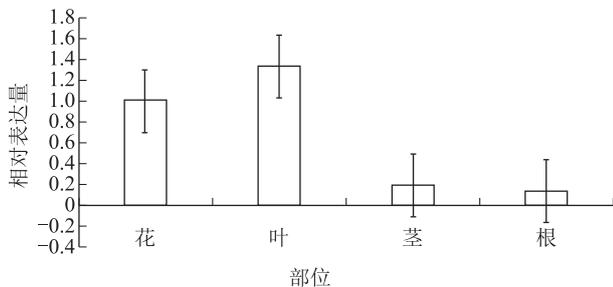


图5 CfGA01 在鞘蕊苏不同器官的相对表达量

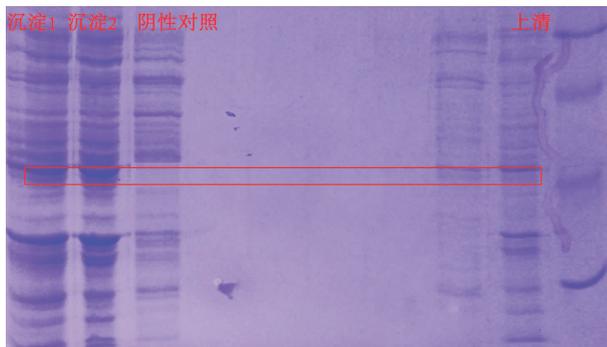


图6 PGEX-4T-1-CfGA01 蛋白表达图

参考文献

[1] 李水清, 杨巧容, 王小明, 等. 通城移植毛喉鞘蕊花的化学成分研究[J]. 中草药, 2006, 37(6): 824-826.
 [2] 殷嘉璐. 鞘蕊苏中半日花烷型二萜的平喘药效、定量分析与体外稳定性[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
 [3] 夏伟, 刘江. 毛喉鞘蕊花的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33(7): 64-67.

[4] 罗永明. 植物萜类化合物的生物合成途径及其关键酶的研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2003, 15(1): 46-49.
 [5] ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants[J]. Nat Prod Rep, 1999, 16(5): 565-574.
 [6] BOHLMANN J, G MEYERGAUEN, R CROTEAU. Inaugural article by a Recently Elected Academy Member; Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis [J]. PNATL Acad Sci USA, 1998, 95(8): 4126-4133.
 [7] TRAPP S C, CROTEAU R B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications [J]. Genetics, 2001, 158(2): 811-832.
 [8] TRITSCH D. Plant isoprenoid biosynthesis via the MEP pathway; in vivo IPP/DMAPP ratio produced by (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase in tobacco BY-2 cell cultures [J]. Febs Letters, 2010, 584(1): 129-134.
 [9] 黄晓. 基于转录组测序的紫外线促进鞘蕊苏有效成分 isoforskolin 合成机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2017.
 [10] 杜清. 丹参赤霉素合成与代谢相关基因家族的鉴定、分子克隆及表达分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
 [11] YOSHIMI Y, YUKARI T, KEI I, et al. Characterization of ent-kaurene synthase and kaurene oxidase involved in gibberellin biosynthesis from Scoparia dulcis [J]. J Nat Med, 2018, 3(72): 456-463.

(收稿日期: 2019-01-01 编辑: 王丽英)