

独行菜 *LaSPS* 基因的克隆与生物信息学分析及原核表达

赵 乐^{1,2}, 马利刚^{1,2}, 韩杜苑¹, 冯卫生^{1,2}, 郑晓珂^{1,2}

(1. 河南中医学院 药学院, 河南 郑州 450046; 2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心 河南 郑州 450046)

摘 要:以独行菜(*Lepidium apetalum*)幼苗叶片为试材,采用 PCR 方法,扩增得到 *LaSPS* 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF),构建 pET-32a-*LaSPS* 原核表达载体并在大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中表达 *LaSPS* 重组蛋白。结果表明:*LaSPS* 基因 ORF 长 1 269 bp,编码 422 个氨基酸,包含茄呢醇焦磷酸合酶结构域,是异戊烯基合成酶家族的成员;序列分析发现,*LaSPS* 蛋白定位于叶绿体中,不含信号肽没有跨膜区;通过序列比对和系统进化分析,显示 *LaSPS* 蛋白与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtSPS2 蛋白相似度为 91%,亲缘关系最近;在大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中成功表达 *LaSPS* 重组蛋白,为研究 *LaSPS* 基因在独行菜质体醌生物合成途径中的功能奠定了基础。

关键词:独行菜;茄呢醇焦磷酸合酶;基因克隆;序列分析;原核表达

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0092-08

质体醌(plastoquinone, PQ)和泛醌(ubiquinone, UQ)是植物体内主要 2 种含有异戊二烯基侧链的醌类,它们作为电子载体参与多种生化反应^[1]。质体醌存在于叶绿体中,是光合电子传递链的组成成分,参与电子从光系统 II 传递到细胞色素 b_6f 复合体,是植物光合作用不可缺少的重要部分,而泛醌存在于线粒体中,是呼吸电子传递链的组成成分,参与电子从 NADH 脱氢酶复合体传递到细胞色素 bc_1 复合体,是生物氧化过程不可缺少的成员^[2-3]。质体醌和泛醌都含有的异戊烯基侧链,是苯醌的衍生物,不同物种的质体醌和泛醌含有不同长度的异戊烯基侧链。大多数植物的质体醌和泛醌都含有 9 或 10 个异戊烯基单位的侧链,如在拟南芥中含有 PQ-9 和 UQ-9^[4]。

质体醌和泛醌的异戊烯基侧链来源于异戊烯基

焦磷酸(IPP)和它的异构体二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)。在植物中 IPP 和 DMAPP 主要由存在于细胞质中的甲羟戊酸途径(mevalonic acid pathway, MVA pathway)和存在于质体中的甲基赤藓糖醇磷酸途径(methylerythritol phosphate pathway, MEP pathway)来合成^[5]。同位素标记试验显示泛醌的异戊烯基侧链来源于 MVA 途径生成的 IPP,而质体醌的异戊烯基侧链则来源于 MEP 途径生成的 IPP^[6-7]。异戊烯基侧链从 IPP 和 DMAPP 开始合成,先形成较短的异戊烯基链,如 15 碳的法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)和 20 碳的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP),然后由一系列多聚异戊烯基焦磷酸合成酶(polyprenyl diphosphate synthase)催化,这些酶都具有异戊烯基转移酶(prenyl transferases)的活性,以 IPP 为单位,每次延伸 5 个碳原子。这些多聚异戊烯基焦磷酸合成酶已在不同的微生物中被克隆,从原核生物细菌到真核生物酵母,但是在高等植物中对这些多聚异戊烯基焦磷酸合成酶还研究较少^[8-10]。目前仅在拟南芥、水稻和西红柿克隆得到了茄呢醇焦磷酸合酶(solanesyl diphosphate synthase, SPS),用来合成 45 碳的茄呢醇焦磷酸,进一步合成质体醌 PQ-9^[1,11-12]。

独行菜(*Lepidium apetalum* Willd.)属十字花科独行菜属植物,其种子称为北葶苈子,是泻肺平喘、利水消肿的重要中药^[13]。现已从独行菜中分离得到多种化学

第一作者简介:赵乐(1983-),男,博士,讲师,现主要从事药用植物分子生物学等研究工作。E-mail:zhaole1983@126.com

责任作者:郑晓珂(1961-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事中药活性成分及作用机制等研究工作。E-mail:zhengxk.2006@163.com

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973 计划”资助项目(2013CB531802);河南中医学院博士科研基金资助项目(BSJ2011-07)。

收稿日期:2015-12-16

成分,有强心甘、异硫氰酸和硫苷类、脂肪油类、生物碱类、黄酮类、酚酸类、香豆素类、类萜类等,其药理作用有改善心血管功能、细胞毒活性、止咳平喘、利尿等^[13]。目前独行菜方面的研究多集中于化学成分的分离和药理作用的研究,关于光合作用中质体醌和电子传递链中泛醌的研究尚鲜见报道。

根据课题组前期获得的大量独行菜转录组数据,其中有一个注释为茄呢醇焦磷酸合酶(SPS)的基因,该研究首次从独行菜中克隆了 SPS 基因的 cDNA 序列,进行生物信息学分析,发现 LaSPS 蛋白可能定位在叶绿体,参与质体醌的生物合成,然后将 LaSPS 基因克隆至原核表达载体 pET-32a 中,构建重组质粒 pET-32a-LaSPS,成功在大肠杆菌中表达 LaSPS 蛋白,为进一步研究 LaSPS 基因在独行菜光合电子传递链组分质体醌生物合成中的作用和功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

独行菜采自河南省伏牛山自然保护区,由河南中医学院董诚明教授和谢晓龙博士鉴定为十字花科植物独行菜属独行菜,取其种子在 16 h、23℃光照,8 h、20℃黑暗条件,于人工气候箱中培养,采其幼苗叶片作为供试材料。

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、RNase-Free DNaseI、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司。反转录试剂盒 TransScript II Reverse Transcriptase、大肠杆菌感受态细胞 Trans5α 和 BL21(DE3)购自北京全式金生物科技有限公司。Ex Taq 酶、限制性核酸内切酶(*Eco*RI、*Xho*I)、pMD19-T Vector、T₄ DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司。引物合成、样品测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.2 叶片总 RNA 提取及 cDNA 的合成

使用植物总 RNA 提取试剂盒提取独行菜幼苗叶片总 RNA,用 NanoDrop 2000 和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的含量和完整性。以得到总 RNA 为模板,oligo (dT)为引物,使用反转录试剂盒,合成得到叶片 cDNA。

1.3 独行菜 SPS 基因克隆

根据课题组前期得到的独行菜转录组数据,用 Primer 5 软件设计 SPS 基因的特异性引物:LaSPS-Exp-F(5'-CG GAATTC ATGATGATGTCATGT -3',下划线部分为 *Eco*RI 酶切位点),LaSPS-Exp-R(5'-CCGCTCGAGCTAATCAATCCTTTC -3',下划线部分为 *Xho*I酶切位点),以叶片 cDNA 为模板,按照下列条件进

行 PCR 扩增:95℃ 2 min;95℃ 10 s,53.4℃ 15 s,72℃ 1 min 36 s,30 个循环;72℃延伸 10 min。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收与预期大小一致的条带,然后将其连接到 pMD19-T 载体上,转化大肠杆菌 Trans5α 感受态细胞,均匀涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上,37℃培养 12 h 后,经 PCR 检测后挑选阳性克隆进行测序。

1.4 独行菜 SPS 基因的生物信息学分析

将测序得到的序列通过 NCBI ORF Finder 查找开放阅读框,并通过 NCBI blastp 与 nr 数据库进行序列比对分析。LaSPS 基因编码蛋白的理化性质预测采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam;使用 InterPro Scan 预测蛋白的保守结构域;采用 SWISS-MODEL 进行蛋白质的三维同源建模;使用 SinalP4.0 Server 进行分泌蛋白预测;利用 Target P 1.1 Server 进行蛋白定位信号预测;跨膜区预测通过 TMHMM Server v. 2.0;使用 MEGA 5 软件相邻连接法(neighbor-joining)构建系统进化树。

1.5 独行菜 pET-32a-LaSPS 原核表达载体的构建与诱导表达

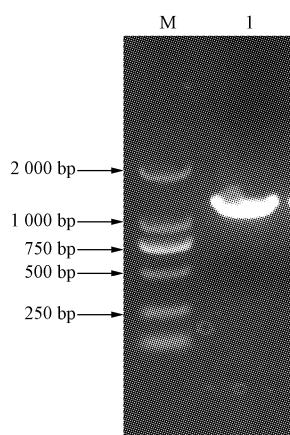
用 *Eco*RI和 *Xho*I分别对测序正确的测序正确的 pMD19-T-LaSPS 质粒和原核表达载体 pET-32a 进行双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳检测后,纯化回收目的基因片段和载体片段,回收后,用 T4 DNA Ligase 16℃的过夜连接,然后转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,均匀涂布在 LB 固体平板(含有 100 mg/L 的氨苄青霉素),挑取单克隆进行质粒的提取,然后用 *Eco*RI和 *Xho*I双酶切鉴定,酶切鉴定正确的质粒送北京三博远志公司测序。

将测序正确的单克隆接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃培养过夜后,按照 1:100 比例接种到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃、220 r/min 振荡培养至对数生长期(OD₆₀₀至 0.6),然后在 28℃、0.4 mmol/L IPTG、150 r/min 条件下培养 8 h,诱导独行菜 LaSPS 重组蛋白的表达。诱导完成后,用 SDS-PAGE (5%浓缩胶和 10%分离胶)检测重组蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 独行菜 LaSPS 基因的克隆

由图 1 可知,PCR 扩增得到 1 条 1 200 bp 左右的条带,与预期大小相符。经测序后得到独行菜 LaSPS 基因的 cDNA 序列,大小为 1 269 bp,编码 422 个氨基酸,LaSPS 基因序列信息已提交到 NCBI GenBank,注册号为 KT318734。



注:M,DL 2 000 DNA Marker;1,*LaSPS* 基因 ORF。
Note:M,DL 2 000 DNA Marker;1,ORF of *LaSPS* gene.

图 1 PCR 扩增 *LaSPS* 基因 ORF

Fig. 1 PCR amplification of *LaSPS* gene ORF

```

1      ATGATGATGTCATGTCGAAATATAGACTTGGGTACGAGTGTCTTGATCTGATGCCATGCGGGTGTCTTCTAGC
1      M M M S C R N I D L G T S V L D L M P C G C S S S
76     TCTTCTTACAAAGTCGTCGATTCTGTCTGTGAATTGTCGAAGAATGTTGTAGGATTGGTGCCAAAGCTAT
26     S S S T S R R F L S V N C S K N V C R I G G K S Y
151    GGTGGGAATTTGGTATTTCTACGTCGAGATTTGGGAGTTGCAGAGCGGTTCTGTCTAAACCCAGGAAAAATCT
51     G G N L V F L R R D F G S C R A V P A K P K E N S
226    CTTGTCAATGGTATAGGGCAAGATAAACAGTGATGCTCAATCTGAGGCAAGAGTCACAAAGCCTATATTTTG
76     L V N G I G Q D K T V M L N L R Q E S Q K P I S L
301    GAAAGTTTGTTCGAAGTAGTAGCTGATGATTTGCAGAGGTGAATGACAATCTCTTATCGATTGTTGGTGCAGAA
101    E S L F E V V A D D L Q R L N D N L L S I V G A E
376    AATCCAGTTTGTATATCTGCGGCTGAACAAATTTTAGTGTCTGGTGGTAAAGGATGAGGCTCGTTGGTATTTC
126    N P V L I S A A E Q I F S A G G K R M R P G L V F
451    CTTGTATCAGAGCCACTGCGGAATTAGCAGGCCTAAAGGAACCTTACAATAGAACATCGGCGTTAGCTGAGATC
151    L V S R A T A E L A G L K E L T I E H R R L A E I
526    ATTGAGATGATTCATACAGCAAGTTTGATACAGATGACGTGTTAGATGAAAGTGATATGCGAAGAGGAAAGGAA
176    I E M I H T A S L I H D D V L D E S D M R R G K E
601    ACGGTTTCATGAGCTTTTCGGAACAAGAGTAGCTGTATTAGCTGGAGACTTCATGTTGCTCAAGCTTCATGGTAC
201    T V H E L F G T R V A V L A G D F M F A Q A S W Y
676    TTAGCAATCTGAAACCTCGAAGTCATTAAGCTCATCAGTCAGGTGATCAAGATTTTGCAAGCGGTGAGATA
226    L A N L E N L E V I K L I S Q V I K D F A S G E I
751    AAACAAGCATCGAGTTTATTCATTTGATGTTGAGCTTGATGATTACTTATTAAGAGTTACTACAGACAGCT
251    K Q A S S L F N C D V E L D D Y L L K S Y Y K T A
826    TCATTAGTAGCTGCAAGCACCAAGAGCTGCAATTTTCAGTAAAGTTGAAACCGAAGTTGACAGCAATGTAT
276    S L V A A S T K G A A I F S K V E T E V A E Q M Y
901    CAATTTGGGAAGAATCTGGGTTTATCTTTCAAGTAGTTGATGACATTTTGGACTTCACTCAGTCCACAGAGCAG
301    Q F G K N L G L S F Q V V D D I L D F T Q S T E Q
976    CTAGGGAAGCCTGCAGCCAAATGATTAGCCAAAGTAACATAACCGCGCCAGTGATCTTCGCGCTAGAGAAATGAA
326    L G K P A A N D L A K G N I T A P V I F A L E N E
1051   CTAAGGCTAAGAGAGATCCTTCAGTCTGAGTTCTGTGAGCCTGGCTCGCTTGAAGAGGCAATTGACATAGTTAAA
351   L R L R E I L E S E F C E P G S L E E A I D I V K
1126   AATTGCGGTGGGTCAAAAAGAGCTCAAGAATTGGCTAAGGAGAAAGCTGAATCTGCGTTAAAGAATCTGAATTGT
376   N C G G V K R A Q T E L A K E K A E S A L K N L N C
1201   CTTCCAGAAGTGGCTTCAGATCAGCCCTTGAAGGATATGGTGTGTTAATCTTGAAGGATTATTAG
401   L P R S G F R S A L E D M V M F N L E R I D *
    
```

图 2 *LaSPS* 基因 cDNA 编码区序列及对应氨基酸序列

Fig. 2 Coding sequence and amino acid sequence of *LaSPS* gene cDNA

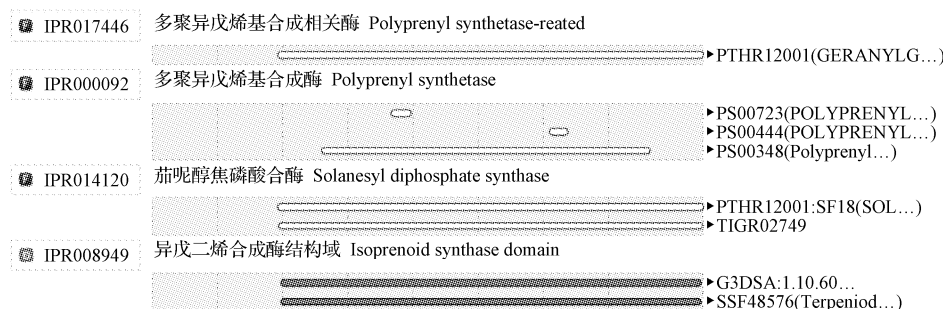


图 3 InterProScan 预测 *LaSPS* 蛋白的保守结构域

Fig. 3 InterProScan prediction of conserved domain of *LaSPS* protein

2.2 独行菜 *LaSPS* 基因编码蛋白的生物信息学分析

2.2.1 理化性质分析 *LaSPS* 基因编码 422 个氨基酸残基,通过 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 预测 *LaSPS* 基因编码蛋白的分子式为 $C_{2033}H_{3295}N_{559}O_{633}S_{22}$,分子量是 46.40 kDa,等电点为 5.15,带负电残基 (Asp + Glu) 为 58,带正电残基数 (Arg + Lys) 为 47。该蛋白的不稳定系数为 43.49,说明 *LaSPS* 蛋白不稳定,亲水性系数为 -0.053,说明该蛋白为亲水性蛋白。*LaSPS* 基因的 cDNA 编码区序列及对应氨基酸序列如图 2 所示。

2.2.2 保守结构预测 使用 InterProScan 预测的 *LaSPS* 蛋白的保守结构域如下:多聚异戊烯基合成相关酶 (polyprenyl synthetase-related) (IPR017446)、多聚异戊烯基合成酶 (polyprenyl synthetase) (IPR000092)、茄呢醇焦磷酸合酶 (solanesyl diphosphate synthase) (IPR014120)、异戊二烯合成酶结构域 (isoprenoid synthase domain) (IPR008949)。

2.2.3 信号肽、亚细胞定位及跨膜区预测 利用 Signal P4.1 Server 预测 LaSPS 蛋白为分泌蛋白,不具有信号肽。利用在线软件 Target P1.1 Server 预测 LaSPS 蛋白的亚细胞定位情况,结果表明 LaSPS 定位于叶绿体中(图 4),利用 TMHMM Server v.2.0 预测 LaSPS 的跨膜区,结果表明 LaSPS 蛋白无跨膜区(图 5)。

名称 Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
LaSPS	422	0.769	0.057	0.029	0.133	C	2
分界值 Cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000		

注:Len 表示序列长度,cTP 代表序列含有叶绿体转运肽,mTP 代表序列含有线粒体靶向肽,SP 代表序列含有分泌途径的信号肽,other 代表在细胞内其它地方,Loc 表示根据得分预测亚细胞定位(C 表示叶绿体,M 表示线粒体,S 表示分泌途径),RC 表示预测的可靠性等级(分为 1 到 5 级,数值越小表示预测的可信度越高)。

Note:Len represents sequence length,cTP represents the sequence contains a chloroplast transit peptide,mTP represents the sequence contains a mitochondrial targeting peptide,SP represents the sequence contains a secretory pathway signal peptide,other represents any other location in the cell,Loc represents the prediction of localization based on the scores (C, Chloroplast; M, Mitochondrion; S, Secretory pathway),RC represents the reliability class of prediction (from 1 to 5, the lower the value of RC the safer the prediction).

图 4 LaSPS 蛋白亚细胞定位预测

Fig. 4 Prediction of the subcellular location of LaSPS protein

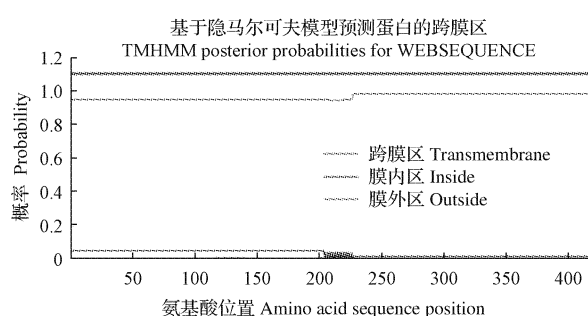


图 5 LaSPS 蛋白跨膜区预测

Fig. 5 Prediction of the transmembrane domains of LaSPS protein

2.2.4 三维结构预测 用 PredictProtein 对 LaSPS 蛋白的二级结构进行预测。结果显示,在该蛋白中 α -螺旋结构占 49.53%, β -折叠占 3.79%,无规则卷曲占 46.68%。用 SWISS-MODEL 预测 LaSPS 蛋白的三级结构,以拟南芥的一个长链焦磷酸合成酶(long-chain-length prenyl pyrophosphate synthase)(PDB ID:3AQ0)为模板,序列相似度为 39.43%,在第 102~422 位氨基酸建模,模型覆盖率 75%。

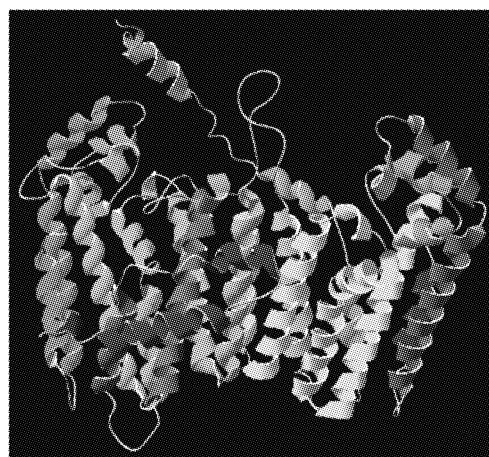


图 6 LaSPS 蛋白质三级结构预测

Fig. 6 Prediction of three-dimensional structure of LaSPS protein

2.2.5 多序列比对分析 依据 NCBI 网站上通过 blastp 比对 nr 蛋白数据库的搜索结果,独行菜 LaSPS 蛋白与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的位于叶绿体的 AtSPS2 蛋白(BAD88534.1)序列相似性最高,达 91%,与拟南芥位于线粒体的 AtSPS1 蛋白(BAD88533.1)相似度为 79%,与其它植物序列相似性较高的 SPS 蛋白为橡胶树(*Hevea brasiliensis*)HbSPS 蛋白(ABD92707.1)相似度为 71%,番茄(*Solanum lycopersicum*)SlSPS 蛋白(ABI63627.1)相似度为 67%,水稻(*Oryza sativa*)的位于叶绿体的 OsSPS2 蛋白(BAG90037.1)相似度为 63%,而与水稻位于线粒体中的 OsSPS1 蛋白(AK071299.1)的相似度只有 33%。使用 DNAMAN 8.0 软件对以上各种植物的 SPS 蛋白进行多序列比对,结果表明 LaSPS 蛋白与其它植物的 SPS 蛋白一样,都含有 2 个富含天冬氨酸[DD(X)nD]的保守序列(图 7)。

2.2.6 系统进化树分析 从 UniPort 数据库中,选取其它植物中参与异戊烯基侧链合成的酶,如法呢基焦磷酸合成酶(farnesyl diphosphate synthase,FPPS)、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶(geranylgeranyl diphosphate synthase,GGPPS)以及茄呢醇焦磷酸合酶(solaneyl diphosphate synthase,SPS),共 20 条蛋白序列作为参考,构建系统进化树。如图 8 所示,这些参与异戊烯基侧链合成的酶,分为三大类,一类是 SPS 系列,LaSPS 归属这一分支,其中 LaSPS 与 AtSPS2 亲缘关系较近,序列相似性为 91%,这与多序列比对分析结果一致;第二类是 GGPPS 系列,第三类是 FPPS 系列,这些酶都具有异戊烯基转移酶的活性(图 8)。

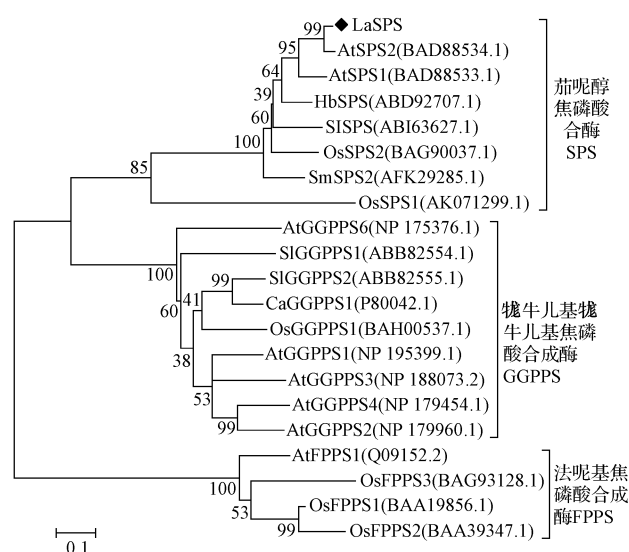
LaSPS	MM.MSCRNIDLGTSVLDDL.MPCGSSSSSSSTRRFLSVNCSKNVCRIGG..KSYGGNLVFLRRDF	61
AtSPS1	MM.TSCRNIDLGTMMMA.....CGCGR...RQFPS..LAKTVCKFTSSNRSYGG.....LV	45
AtSPS2	MM.MSCRNIDLGTSVLDDL.....HSCSSSSSTRRFLFGNSKTVCMIGG..RSCVGNLVFLRRDL	56
OsSPS1	MS....WRWALARRVAALGATSGGGDG.....ATAQAQRLFSSAAALLGRHPPPPSPPH	50
OsSPS2	MLSVSCPVRVMSRKALDFGQLASCRCR.....WAGRSGMRVAP..RRMPVCVCFVAS..	50
SlSPS	MMSVTCHNLEIGRTPLES...LACGCS.....FSKGVLRNVS..RRFSGKKLLSCR..	46
HbSPS	MMSMTCYSLDFGRTVFDL...AACGCSSNASIDRCSVRNYARSVYRTCN..RDYAARRSPYCRRD	60
Consensus		
LaSPS	GSCRAVPAKPKENSLVNGIGQDKTVMLNLRQESQKPISELSLEFVVAADDLQRLNDNLLSIVCAEN	126
AtSPS1	GSCKAVPTKSKEISLLNGIGQSQTVSFDLQKESQKPISELSLEFVVAADDLQRLNDNLLSIVCAEN	110
AtSPS2	ATCRAVPAKSKENSLVNGIGQDKTVMLNLRQESRKPISLETLEFVVAADDLQRLNDNLLSIVCAEN	121
OsSPS1	YQIRSKVVGCRGATFVSSRWLHDAQYQVRDGLSRSEEQDPFELVADELILANRLRSMVAEV	115
OsSPS2	PSQPGLAAVDVPAEAIIS...SARTTTM...IPERTSVSSLEFVVSDDLKLNNNIKSIVCAEN	107
SlSPS	QEFGRIS.TKASLTGLA....PVLDLNK...SEKPISELTNVFVVAADDLTLNKNLHNIVCAEN	102
HbSPS	SAWCRVSSTKAPETLLNGVSDPAVNLE...SRGPISLINVFEAVAGDILQTLNQIRSVCAEN	122
Consensus	e v l l l v a e	
LaSPS	PVLISAAEQIFGAGG...KRMREGLVFLVSRATAELAG.....LKEITTEHRRRLAEIEM	178
AtSPS1	PVLISAAEQIFGAGG...KRMREGLVFLVSRATAELAG.....LKEITTEHRRRLAEIEM	162
AtSPS2	PVLISAAEQIFGAGG...KRMREGLVFLVSRATAELAG.....LKEITTEHRRRLAEIEM	173
OsSPS1	EKLASAAFYHKKVGAEGKRRETVLLIMASALKFPLSDSTEVGVLTILANKLRTQCNIETTEM	180
OsSPS2	PVLISAAEQIFGAGG...KRMREGLVFLVSRATAELAG.....LKEITTEHRRRLAEIEM	159
SlSPS	PVLMSAAEQIFGAGG...KRMREGLVFLVSRATAELAG.....LKEITTEHRRRLAEIEM	154
HbSPS	PVLMSAAEQIFGAGG...KRMREGLVFLVSRATAELAG.....LKEITTEHRRRLAEIEM	174
Consensus	p l s a a f g k r r p l a l e i e m	
LaSPS	IHTASLIHDDVLDSDMRGKETVHELFGTRVAVLAGDFMFAQASWYLANLENIEVIKILISQVIK	243
AtSPS1	IHTASLIHDDVLDSDMRGKETVHELFGTRVAVLAGDFMFAQASWYLANLENIEVIKILISQVIK	227
AtSPS2	IHTASLIHDDVLDSDMRGKETVHELFGTRVAVLAGDFMFAQASWYLANLENIEVIKILISQVIK	238
OsSPS1	IHTASLIHDDVLDSDMRGKETVHELFGTRVAVLAGDFMFAQASWYLANLENIEVIKILISQVIK	245
OsSPS2	IHTASLIHDDVLDSDMRGKETVHELFGTRVAVLAGDFMFAQASWYLANLENIEVIKILISQVIK	224
SlSPS	IHTASLIHDDVLDSDMRGKETVHELFGTRVAVLAGDFMFAQASWYLANLENIEVIKILISQVIK	219
HbSPS	IHTASLIHDDVLDSDMRGKETVHELFGTRVAVLAGDFMFAQASWYLANLENIEVIKILISQVIK	239
Consensus	ih t a s l i h d d v l d s d m r g k e t v h e l f g t r v a v l a g d f m f a q a s w y l a n l e n i e v i k i l i s q v i k	
LaSPS	DFASGEIKQASSLFDCDVELEEDYLLKSYKKTASLVAASTKGAAIFSKVETEVAEQMYQFGKNLGL	308
AtSPS1	DFASGEIKQASSLFDCDVELEEDYLLKSYKKTASLVAASTKGAAIFSRVEPDVTEQMYEFGKNLGL	292
AtSPS2	DFASGEIKQASSLFDCDVELEEDYLLKSYKKTASLVAASTKGAAIFSKVESKVAEQMYQFGKNLGL	303
OsSPS1	HLVTGETMCHTSREQRSMDDYLLKSYKKTASLVAASTKGAAIFSKVETEVAEQMYQFGKNLGL	310
OsSPS2	DFASGEIKQASSLFDCDVELEEDYLLKSYKKTASLVAASTKGAAIFSGVSTTICEQMYEFGKNLGL	289
SlSPS	DFASGEIKQASSLFDCDVELEEDYLLKSYKKTASLVAASTKGAAIFSEVGSIDISEQMYQFGKNLGL	284
HbSPS	DFASGEIKQASSLFDCDVELEEDYLLKSYKKTASLVAASTKGAAIFSGVDSSVAEQMYEFGKNLGL	304
Consensus	g e q s y k y k t a s l s a i g n l l	
LaSPS	SFQVDDILDFTQSTTEGLGKPAANDLAKGNITAPVIFALENLRRLREIIESEFCEPGSLEEATDI	373
AtSPS1	SFQVDDILDFTQSTTEGLGKPAAGSDLAKGNITAPVIFALENLRRLREIIESEFCEAGSLEEATEA	357
AtSPS2	SFQVDDILDFTQSTTEGLGKPAANDLAKGNITAPVIFALENLRRLREIIESEFCEPGSLEEATEI	368
OsSPS1	AFQLDDILDFTGTSASLGKSLTDLRHGLTAPMLYAMEEFPQLHEVVDRCEDNPANVELALDY	375
OsSPS2	SFQVDDILDFTQSAEQLGKPAAGSDLAKGNITAPVIFALENLRRLREIIESEFCEPGSLEEATEI	354
SlSPS	SFQVDDILDFTQSAEQLGKPAAGSDLAKGNITAPVIFALENLRRLREIIESEFCEPGSLEEATEI	349
HbSPS	SFQVDDILDFTQSAEQLGKPAAGSDLAKGNITAPVIFALENLRRLREIIESEFCEPGSLEEATEI	369
Consensus	f q d d l d f t q s t t e g l g k p a a n d l a k g n i t a p v i f a l e n l r r l r e i i e s e f c e p g s l e e a t d i	
LaSPS	VKNCGGKRAQELAKEKAESALKNLNCLPRS.....GFRSALEDMMVFNLRBRI	421
AtSPS1	VTKGGGKRAQELAREKADDAIKNLNCLPRS.....GFRSALEDMMVFNLRBRI	405
AtSPS2	VRNRGGKRAQELAKEKAETALKNLNCLPRS.....GFRSALEDMMVFNLRBRI	416
OsSPS1	LQKSRGIEKTKELAREHANRAIKAEALPDSDDEDVLTSSRRALIDITERVITRT	429
OsSPS2	VHRSCGIRRAQELAKEKGDIALQNLNCLPRS.....QFRSTLENNVKNLRBRI	402
SlSPS	VKSCGGIQAQELAKEKADIAQNLNCLPRS.....PFOAALEEIVKNLRBRI	397
HbSPS	VKQCGGIRRAQELAKEKADIAQNLNCLPRS.....VFOAALEEIVKNLRBRI	417
Consensus	g l a e a l p l r	

注:保守序列 DD(X)nD 用黑色框标出。

Note: The conserved functional motifs, DD(X)nD, are boxed in black.

图 7 LaSPS 与其它植物中 SPS 蛋白的多序列比对分析

Fig. 7 Multiple sequence alignment of LaSPS and SPS from other plant species



注:用于构建此系统进化树蛋白的登陆号为拟南芥 AtSPS2 (BAD8534.1),拟南芥 AtSPS1 (BAD8533.1),橡胶树 HbSPS (ABD92707.1),番茄 SISPS (ABI63627.1),水稻 OsSPS2 (BAG90037.1),丹参 SmSPS (AFK29285.1),水稻 OsSPS1 (AK071299.1),拟南芥 AtGGPS6 (NP_175376.1),番茄 GGPPS1 (ABB82554.1),番茄 GGPPS2 (ABB82555.1),辣椒 CaGGPPS1 (P80042.1),水稻 OsGGPPS1 (BAH00537.1),拟南芥 AtGGPPS1 (BAH00537.1),拟南芥 GGPPS3 (NP_188073.2),拟南芥 GGPPS4 (NP_179454.1),拟南芥 AtGGPPS2 (NP_179960.1),拟南芥 AtFPPS1 (Q09152.2),水稻 OsFPPS3 (BAG93128.1),水稻 OsFPPS1 (BAA19856.1),水稻 OsFPPS2 (BAA36347.1)。

Note: The accession numbers of proteins used in this analysis are *Arabidopsis thaliana*, AtSPS2 (BAD8534.1), *A. thaliana*, AtSPS1 (BAD8533.1), *Hevea brasiliensis*, HbSPS (ABD92707.1), *Solanum lycopersicum*, SISPS (ABI63627.1); *Oryza sativa*, OsSPS2 (BAG90037.1); *Salvia miltiorrhiza*, SmSPS (AFK29285.1); *O. sativa*, OsSPS1 (AK071299.1); *A. thaliana*, AtGGPS6 (NP_175376.1); *S. lycopersicum*, GGPPS1 (ABB82554.1); *S. lycopersicum*, GGPPS2 (ABB82555.1); *Caesalpinia ammuu*, CaGGPPS1 (P80042.1); *O. sativa*, OsGGPPS1 (BAH00537.1); *A. thaliana*, AtGGPPS1 (BAH00537.1); *A. thaliana*, GGPPS3 (NP_188073.2); *A. thaliana*, GGPPS4 (NP_179454.1); *A. thaliana*, AtGGPPS2 (NP_179960.1); *A. thaliana*, AtFPPS1 (Q09152.2); *O. sativa*, OsFPPS3 (BAG93128.1); *O. sativa*, OsFPPS1 (BAA19856.1); *O. sativa*, OsFPPS2 (BAA36347.1)。

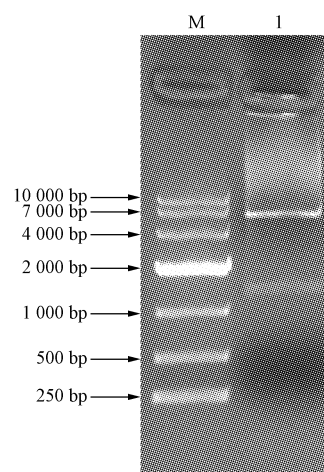
图8 LaSPS与其它植物SPS、GGPPS、FPPS蛋白的系统进化分析

Fig. 8 Phylogenetic analysis of LaSPS protein with other plant SPS, GGPPS and FPPS proteins

2.3 LaSPS原核表达载体的构建

用EcoRI和XhoI分别对原核表达载体pET-32a和测序正确的pMD19-T-LaSPS质粒进行双酶切,利用重组DNA技术,得到重组质粒pET-32a-LaSPS,然后转化大肠杆菌BL21(DE3),选择单克隆提取质粒后,用EcoRI和XhoI进行双酶切鉴定,结果显示有1200bp左右的目的条带和6000bp左右的载体条带(图9)。将双酶切鉴定正确的单克隆送到公司测序,测序结果显示重

组质粒pET-32a-LaSPS中LaSPS的序列与目的基因LaSPS序列一致,未发生碱基突变或移码突变,表明已成功将LaSPS基因克隆到原核表达载体pET-32a上。



注:M,DL 10 000 DNA Marker;1,EcoRI和XhoI双酶切结果。

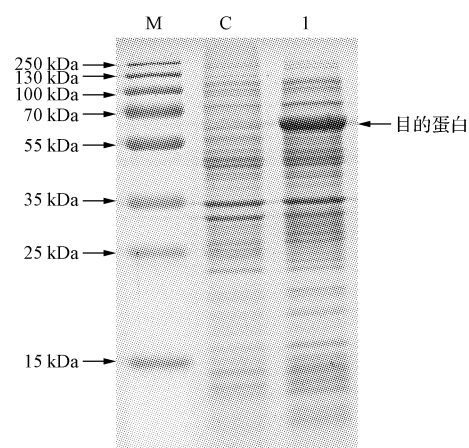
Note: M, DL 10 000 DNA Marker; 1, Double digestion result by EcoRI and XhoI.

图9 原核表达载体pET-32a-LaSPS的双酶切鉴定

Fig. 9 Identification of prokaryotic expression vector pET-32a-LaSPS with double digestion

2.4 LaSPS蛋白的原核表达

将测序正确的pET-32a-LaSPS质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)后,当大肠杆菌生长至OD₆₀₀为0.6时,在28℃、0.4 mmol/L IPTG、150 r/min条件下培养8 h,诱导行菜LaSPS重组蛋白的表达。如图10所示,提取



注:M,蛋白分子量标准;C,含pET-32a空载体的E.coli菌株在28℃、0.4 mmol/L IPTG条件下诱导8 h表达的总蛋白;1,相同条件下含pET-32a-LaSPS质粒的E.coli菌株表达的总蛋白。

Note: M, Protein Marker; C, The total proteins of *E. coli* containing pET-32a induced with 0.4 mmol/L IPTG at 28℃ for 8 h; 1, The total proteins of *E. coli* containing pET-32a-LaSPS induced under the same condition.

图10 LaSPS重组蛋白的原核表达

Fig. 10 Prokaryotic expression of recombinant LaSPS protein

总蛋白进行 SDS-PAGE 分析,在约 60 kDa 处出现目的蛋白条带,与预测的重组 *LaSPS* 的蛋白分子量符合,而含有空载体(pET-32a)的对照样品,同样条件下诱导表达后,在 60 kDa 处未见条带出现。结果表明,*LaSPS* 蛋白成功在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。

3 讨论

质体醌是光合电子传递链中不可缺少的组分,在植物中一般含有 9 个异戊烯基单位的侧链,如 PQ-9,对于植物的光合作用极为重要。该研究首次从独行菜中克隆了一条参与质体醌合成的基因 *LaSPS*,并利用生物信息学方法分析了 *LaSPS* 基因编码的蛋白序列,结果表明 *LaSPS* 与其它植物中 SPS 蛋白相似性较高,含有异戊烯基合酶和茄呢醇焦磷酸合酶保守结构域,具有 DD(X)nD 的保守序列,具有异戊烯基转移酶活性。通过多序列比对和系统进化树分析,发现 *LaSPS* 蛋白与 AtSPS2 蛋白有 91% 的相似性,亲缘关系最近。拟南芥中目前报道有 2 种茄呢醇焦磷酸合酶,分别为 AtSPS1 和 AtSPS2,负责拟南芥中泛醌和质体醌的类异戊烯基侧链的合成,进一步研究表明,AtSPS1 定位于线粒体中,是线粒体呼吸电子转移不可缺少的条件;AtSPS2 定位于叶绿体中,是叶绿体光合电子转移的必要条件^[4]。TARGET P 预测 *LaSPS* 蛋白定位于叶绿体中,所以,独行菜 *LaSPS* 蛋白可能和拟南芥的 AtSPS2 为同一类型的酶,功能也相似,定位于叶绿体中,参与质体醌的生物合成。

该研究通过构建原核表达载体 pET-32a-*LaSPS*,成功在大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中表达了独行菜 *LaSPS* 蛋白,大肠杆菌 BL21(DE3)菌株可以增加细胞质中蛋白质二硫键的形成,使得蛋白的可溶性更好,同时,利用 pET-32a 载体表达的重组蛋白 N 端带有 6 个 His Tag 标签,方便后续重组蛋白的纯化^[14]。这些结果为纯化 *LaSPS* 蛋白,进一步研究 *LaSPS* 蛋白的生物学活性,以及 *LaSPS* 基因在独行菜质体醌生物合成途径中的生物学功能奠定了基础。

参考文献

[1] JONES M O, PEREZ-FONS L, ROBERTSON F P, et al. Functional

characterization of long-chain prenol diphosphate synthases from tomato[J]. *Biochemical Journal*, 2013, 449(3): 729-740.

[2] DOYLE M, LI L, YU L, et al. Identification of a Mr=17,000 protein as the plastoquinone-binding protein in the cytochrome b6-f complex from spinach chloroplasts[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(3): 1387-1392.

[3] ERNSTER L, LEE I Y, NORLING B, et al. Studies with ubiquinone-depleted submitochondrial particles[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1969, 9(3): 299-310.

[4] JUN L, SAIKI R, TATSUMI K, et al. Identification and subcellular localization of two solanesyl diphosphate synthases from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(12): 1882-1888.

[5] RODRIGUEZ-CONCEPCION M, BORONAT A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(3): 1079-1089.

[6] DISCH A, HEMMERLIN A, BACH T, et al. Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenol side chain in tobacco BY-2 cells[J]. *Biochemical Journal*, 1998, 331: 615-621.

[7] FUKUSAKI E, TAKENO S, BAMBA T, et al. Biosynthetic pathway for the C45 polyprenol, solanesol, in tobacco[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68(9): 1988-1990.

[8] OKADA K, SUZUKI K, KAMIYA Y, et al. Polyprenyl diphosphate synthase essentially defines the length of the side chain of ubiquinone[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1996, 1302(3): 217-223.

[9] OKADA K, KAMIYA Y, ZHU X, et al. Cloning of the *sdsA* gene encoding solanesyl diphosphate synthase from *Rhodobacter capsulatus* and its functional expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(19): 5992-5998.

[10] LIANG P H, KO T P, WANG A H. Structure, mechanism and function of prenoltransferases[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(14): 3339-3354.

[11] OHARA K, SASAKI K, YAZAKI K. Two solanesyl diphosphate synthases with different subcellular localizations and their respective physiological roles in *Oryza sativa* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(10): 2683-2692.

[12] HIROOKA K, BAMBA T, FUKUSAKI E, et al. Cloning and kinetic characterization of *Arabidopsis thaliana* solanesyl diphosphate synthase[J]. *Biochemical Journal*, 2003, 370: 679-686.

[13] 李红伟, 郑晓珂, 弓建红, 等. 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(3): 235-240.

[14] ROSANO G L, CECCARELLI E A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5(4): 172.

Cloning and Bioinformatic Analysis and Prokaryotic Expression of *LaSPS* Gene From *Lepidium apetalum*

ZHAO Le^{1,2}, MA Ligang^{1,2}, HAN Duwan¹, FENG Weisheng^{1,2}, ZHENG Xiaoke^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046; 2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450046)

Abstract: Taking leaves of *Lepidium apetalum* as experimental material, using PCR method, the open reading frame (ORF) of *LaSPS* gene was amplified, and the prokaryotic expression vector pET-32a-*LaSPS* was constructed and then *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the plasmid pET-32a-*LaSPS* in order to express recombinant

根癌农杆菌介导的萝卜遗传转化方法研究

喻晓敏¹, 吴雷², 王魁³, 李世升², 徐漫²

(1. 黄冈师范学院 黄冈师范学院学报编辑部, 湖北 黄冈 438000; 2. 黄冈师范学院 湖北省经济林木种质改良重点实验室, 大别山特色资源协同创新中心, 生命科学学院, 湖北 黄冈 438000; 3. 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:以“短叶-13”萝卜为试材, 采用浸花法, 使用含有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的根癌农杆菌浸泡生长状态良好的萝卜花序, 研究了农杆菌介导萝卜遗传转化的新方法。结果表明: GFP蛋白能够在萝卜幼根中成功表达。

关键词:转基因; 根癌农杆菌; 萝卜; 浸花法

中图分类号:S 631.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0099-04

萝卜(*Raphanus sativus* L.)属十字花科(Brassicaceae)萝卜属一年或两年生草本植物, 是油菜的近缘物种。萝卜在世界范围内广泛种植, 且有着十分悠久的种植历史。在长期的进化、栽培及选育过程中, 萝卜品种越发丰富, 在根形、根色、叶形、叶色及风味、收获期和抽苔期等方面表现各有差异。近年来有关萝卜的新型用途也渐渐呈现, 如叶用萝卜、食荚萝卜及油用萝卜等。随着萝卜用途的扩大, 萝卜在人们日常生活中显得日益重要的同时, 也逐渐成为众多学者开展科学研究的重要对象。萝卜的生长发育规律在个体、细胞及分子等多方面、多层次不断得到揭示。随着测序技术的飞速发展^[1], 许多物种基因测序工作正在进行, 像蕃茄、黄瓜、大

白菜及大豆等全基因组测序已完成。萝卜测序工作正在开展, 部分测序结果也被陆续公布。例如包含萝卜部分基因信息的数据库已由美国康奈尔大学开发建成, 该库(<http://bioinfo.bti.cornell.edu/radish>)包含大量基因序列信息, 主要有萝卜线粒体全基因组序列、表达序标签(EST)、单基因序列及其功能提示、生物化学信号通路及单核苷酸多样性(SNP)、简单序列重复标记(SSR)和遗传图谱等重要信息。另外, 日本学者也为日本萝卜(Daikon)建立了含有26 606个EST的小型数据库, 这些EST可拼接成10 381个unigene^[2]。最近, 日本学者公布了萝卜全基因组序列^[3], 为深入分析萝卜基因功能以及进一步改良萝卜种质资源提供了极大便利。

为了能更快捷且有针对性的改良萝卜种子、根形及其它重要性状, 将拟南芥已十分成熟的浸花转基因法在萝卜中作了尝试。萝卜遗传体系的建立, 一方面为解读萝卜基因的功能提供方便, 另一方面可极大促进萝卜种质改良及育种水平, 进而为社会经济发展服务。该研究报导了农杆菌成功介导的萝卜遗传转化新方法, 利用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)及卡那霉

第一作者简介:喻晓敏(1984-), 女, 硕士, 编辑, 现主要从事植物生物技术及出版学等研究工作。E-mail:21581872@qq.com.

责任作者:李世升(1983-), 男, 博士, 讲师, 现主要从事作物发育与育种等研究工作。E-mail:lishisheng2002@whu.edu.cn.

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2013CFC126); 湖北省教育厅自然科学基金资助项目(D20122703)。

收稿日期:2015-12-23

LaSPS protein. The results indicated that the ORF of *LaSPS* gene was 1 269 bp (GenBank accession number KT318734), which encoded a protein of 422 amino acid residues. The *LaSPS* protein which contained solanesyl diphosphate synthase domain was the member of 'polyprenyl diphosphate synthase' family. Bioinformatic analysis indicated that *LaSPS* protein which located in chloroplast had no transmembrane domain and signal peptide. The multiple alignment and phylogenetic analysis indicated that *LaSPS* protein showed the highest homology, 91% similarity, with *AtSPS2* protein from *Arabidopsis thaliana*. The prokaryotic expression vector pET-32a-*LaSPS* was constructed and the recombinant *LaSPS* protein was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. This study provided the foundation for follow-up research of its function in plastoquinone biosynthesis pathway.

Keywords: *Lepidium apetalum*; solanesyl diphosphate synthase; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression