

• 药材与资源 •

雷公藤 PTEN 基因全长克隆及表达分析

周家伟¹, 刘雨佳¹, 胡添源¹, 高伟^{1,2*}, 黄璐琦³

1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

2. 首都医科大学 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

3. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700

摘要: 目的 获得雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸肌醇 3-磷酸酶 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase, PTEN) 基因的 cDNA 全长, 并预测其生物学功能。方法 根据雷公藤转录组数据设计引物, 对雷公藤 PTEN (TwPTEN) 基因进行全长克隆; 通过生物信息学方法对得到的 TwPTEN 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 TwPTEN 基因全长为 2 247 bp, 共编码 614 个氨基酸, 等电点为 5.84, 相对分子质量为 66 900, 多重序列比对显示其与其他植物的 PTEN 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, TwPTEN 的表达量明显增加, 并在 12 h 达到最高, 提示 PTEN 基因与植物的次生代谢产物的产生有关。结论 本研究首次从雷公藤悬浮细胞中克隆得到 PTEN 基因, 为进一步研究 TwPTEN 基因的功能奠定基础。

关键词: 雷公藤; 磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸肌醇 3-磷酸酶; 克隆; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)07-1391-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.022

Cloning and mRNA expression analysis of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase gene from *Tripterygium wilfordii*ZHOU Jia-wei¹, LIU Yu-jia¹, HU Tian-yuan¹, GAO Wei^{1,2}, HUANG Lu-qi³

1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

2. Beijing Key Lab of TCM Collateral Disease Theory Research, Capital Medical University, Beijing 100069, China

3. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: **Objective** To clone the full-length cDNA of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase in *Tripterygium wilfordii* (TwPTEN) and predicted its biological functions. **Methods** The specific primers were designed based on the transcriptome data of *Tripterygium wilfordii*, TwPTEN gene was cloned by Polymerase Chain Reaction. The full-length cDNA of TwPTEN was then analyzed by a series of bioinformatics analysis. **Results** It was showed that the full length of TwPTEN cDNA was 2 247 bp encoding 614 amino acids. The theoretical isoelectric point was 5.84 and the molecular weight was about 66 900. Sequence alignment and phylogenetic analysis demonstrated that TwPTEN had relative close relationship to PTEN from other species. Differential expression analysis revealed that the relative expression level of TwPTEN increased significantly after being induced by methyl jasmonate (MeJA). It indicated that the TwPTEN gene was relative to the biosynthesis of secondary metabolites. **Conclusion** PTEN gene is firstly cloned from *T. wilfordii*, which provides a basis for further studying the functions of TwPTEN.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; PTEN; clone; bioinformatics analysis; expression analysis

雷公藤为卫矛科 (Celastraceae) 雷公藤属 *Tripterygium* Hook. f. 植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根或根的木质部, 具有活血化瘀、清热解毒、消肿散结、杀虫止血等功效^[1-2]。现代药理研究表明雷公藤中的有效成分具有抗肿

瘤^[3-5]、抗炎、抗风湿^[6]、神经营养活性^[7], 提高小鼠体内对瘦素的敏感性从而达到减肥^[8]等作用。

磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸肌醇 3-磷酸酶 (PTEN) 可以归为双磷酸酶家族, 它们既有蛋白磷酸酶活性又有磷酸肌醇磷酸酶活性。其在动物中调

收稿日期: 2016-08-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81373906); 国家自然科学基金优秀青年科学基金项目 (81422053)

作者简介: 周家伟 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: ZJW1132001@163.com

*通信作者 高伟, 男, 博士, 教授, 主要从事中药资源与分子生药学研究。Tel: (010)83911671 E-mail: weigao@ccmu.edu.cn

控与细胞生长、代谢和凋亡相关的信号通路,目前主要被运用于抑制癌症等人类疾病。它能以磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸肌醇和水作为底物催化生成产物 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PtdIns (4,5) P₂) 和磷酸盐。在真核生物中,肌醇磷脂 (PIs) 在许多信号通路中作为第二信使,控制着细胞生理的重要方面包括膜动力、细胞器的识别、细胞骨架重排、生长、代谢、凋亡^[9]。PIs 由 7 个同分异构体组成: PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate)、PI4P (phosphatidylinositol 4-phosphate)、PI5P (phosphatidylinositol 5-phosphate)、PI (3,4) P₂ (phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate)、PI (3,5) P₂ (phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate)、PI (4,5) P₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) 和 PI (3,4,5) P₃ (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate), 它们有着特殊的亚细胞定位和作用^[10]。4,5-二磷酸磷脂酰肌醇也被称为 PIP₂, 它们是细胞膜小磷脂成分, PtdIns (4,5) P₂ 富集于质膜,是一些重要信号蛋白的底物。

在植物中, PTENs 通过脂质信号起着至关重要的作用, 它们在植物的生长和发展以及应对生物和非生物的压力作用目前已经被阐明^[11-12]。此外还有证据表明 PTENs 的功能域对肌丝蛋白的快速拉升有重要作用^[13]。从拟南芥中发现的 PTEN1 和 PTEN2 基因已被证实分别对花粉的发育和脂质信号有着重要作用^[14-15]。本研究首次从雷公藤悬浮细胞中克隆得到一条 PTEN 基因, 为进一步研究雷公藤 PTEN (TwPTEN) 基因的作用奠定基础。

1 材料

1.1 植物材料

雷公藤悬浮细胞由本实验室继代保存^[16]。

1.2 仪器

MM400 型混合型球磨仪 (Retsch 公司); 5810R 型低温冷冻离心机 (Eppendorf 公司); VeritiTM96 空梯度 PCR 仪 (ABI 公司); GBOXHR 型紫外凝胶成像分析仪 (Syngene 公司); TF7500 型 Real Time PCR System (ABI 公司)。

1.3 试剂

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒、快速小提质粒试剂盒和 RNA 纯化试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, Easy taq 酶、PrimeScript 1st Strand cDNA

Synthesis Kit 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 2xPhusion HF PCR Master Mix 购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.4 菌株和质粒

Trans1-T1 感受态细胞、pEASY-T3 vector 购自北京全式金生物技术有限公司。

2 方法

2.1 雷公藤总 RNA 的提取和精制

雷公藤悬浮细胞经茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导后分别于 12、24、48 h 取材, 液氮速冻后存于 -80 °C 冰箱。取各时间点悬浮细胞 0.4~0.6 g, 液氮环境下研磨粉碎。采用改良的 CTAB 法 (2×CTAB buffer: 2% 的 CTAB、100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、25 mmol/L 的 EDTA、2 mol/L 的 NaCl) 提取 3 个时间点的总 RNA, 用 RNA 纯化试剂盒进行纯化。通过凝胶电泳检测 RNA 的质量。

2.2 TwPTEN cDNA 全长纯化

以纯化后的总 RNA 为模板, 用 SMARTerTM Race cDNA Amplification Kit 试剂盒反转录为 cDNA 第一链。将雷公藤转录组数据在 NCBI 上进行 Blastx 比对, 设计全长扩增 (LC-PCR) 特异性引物 (表 1), 以 5'-RACE Ready cDNA 为模板, 在 PCR 仪上进行全长克隆。50 μL 的反应体系: 2.5 μL 的正向引物、2.5 μL 的反向引物、1 μL 模板 DNA、25 μL 的 2×Phusion HF PCR Master Mix、ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 程序为 98 °C、30 s; 98 °C、10 s, 55 °C、15 s, 72 °C、2 min, 35 个循环; 72 °C、5 min。用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对 PCR 产物进行回收, 取 4 μL 回收产物与 1 μL pEASY-T3 载体在 PCR 中 25 °C 连接 15 min 后, 转化入 50 μL 的 Trans1-T1 感受态细胞, 涂布于氨苄培养基上 37 °C 过夜培养。经菌液 PCR 初步鉴定后送公司测序, 由测序结果获得 TwPTEN 序列全长。

2.3 TwPTEN 基因生物信息学分析

将测序得到的 TwPTEN 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, 并由 Primer Premier 5 软件翻译成氨基酸序列, 在 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 上查找开放阅读框 (ORF)。主要采用一些网上软件包进行生物信息学分析^[17], 如采用 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质量, Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>)

InterProScan/) 进行结构域比对, TRMHMMserver v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜域分析, predictprotein (<http://www.predictprotein.org/>) 进行二级结构预测, SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行二级结构分析和结构域的三维同源建模。用 DNAMAN 软件、ClustalW 软件和 MEGA 6 软件分别对 TwPTEN 基因所编码的氨基酸序列进行多重比对, 与其他植物的 PTEN 氨基酸序列进行比较和构建 Neighbor-joining (NJ) 系统进化树。

2.4 TwPTEN 基因的表达分析

雷公藤悬浮细胞经 MeJA 诱导后, 采用 CTAB

法提取不同处理时间 (0、12、24、48、72、240 h) 点的悬浮细胞总 RNA。用 FastQuant RT Kit 试剂盒 (天根) 反转录成 cDNA, 以雷公藤 EF1 α -F 基因作为内参, 引物设计见表 1。实时荧光定量 (RT-qPCR) 反应体系: 2 $\times$ Fast qPCR Master Mix 10 μ L, 正反引物 (10 mmol/L) 各 0.4 μ L, cDNA 1 μ L, 50 $\times$ Rox High 0.4 μ L, PCR-grade water 7.8 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C、3 min, 95 $^{\circ}$ C、3 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 40 个循环, 65~95 $^{\circ}$ C 做熔解曲线分析。反应结束后对荧光值扩增曲线和熔解曲线进行分析。生物重复 3 个, 技术重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析结果。

表 1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

反应名称	引物	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
LC-PCR	PTEN-F	CACATCACACCTCCATCCATAACT	2 247
	PTEN-R	CAACTCCAACCTTGCAATTTGTCTCT	
RT-qPCR	RTPTEN-F	CTGGCTCCAAACAGACGCA	129
	RTPTEN-R	TAAAGACAGAGGCATCGGCA	
	EF α 1-F	CCAAGGGTGAAAGCAAGGAGAGC	79
	EF α 1-R	CACTGGTGGTTTTGAGGCTGGTATCT	

3 结果与分析

3.1 TwPTEN 全长 cDNA 的获得

由雷公藤转录组数据得到 TwPTEN 基因的 cDNA 全长序列, 通过全长 PCR 克隆, 获得 1 条 2 247 bp 的 cDNA 特异性片段, 见图 1。

3.2 TwPTEN 基因序列分析

通过使用 DNAMAN 软件和 ORF Find 在线软件对 TwPTEN 基因全长 cDNA 序列进行分析, 推测其共编码 614 个氨基酸, 且含有 ORF, 位于 231~2 075 bp, 序列的 1~230 bp 为 5'UTR, 2 076~2 247 bp 为 3'UTR。Blast 的结果显示 TwPTEN 与蓖麻 *Ricinus*

communis L. 77%相似, 与麻风树 *Jatropha curcas* L. 76%相似, 与胡杨 *Populus euphratica* Oliv. 76%相似, 与梅 *Prunus mume* Sieb. 75%相似, 与甜橙 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 75%相似, 与可可 *Theobroma cacao* L. 75%相似等。DNAMAN 对木豆 *Cajanus cajan* (L.) Millsp.(KYP75347.1)、野大豆 *Glycine soja* Sieb. et Zucc (KHN06755.1)、棉花 *Clematis herpetala* Pall. (KHG04310.1)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (AAO13749.1)、桑树 *Morus notabilis* L. (XP_010107860.1)、蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn. (XP_013470088.1)、欧洲油菜 *Brassica napus* L. (CDX95448.1)、可可 (XP_007042495.1)、蓖麻 (XP_002518704.1) 的氨基酸序列进行多重序列比对, 结果表明 TwPTEN 与其他植物的 PTEN 氨基酸序列具有较大的相似性, 平均为 76.18%, 且具有 PTEN 蛋白家族共有的催化活性位点 (I/V) HCXAGXXR, 见图 2。Interpro 结构域分析结果显示 TwPTEN 有 Protein-tyrosine phosphatase-like 和与膜结合有关的 C2 功能域^[18], 258~268 bp 为蛋白质酪氨酸磷酸酶活性位点, 见图 3。

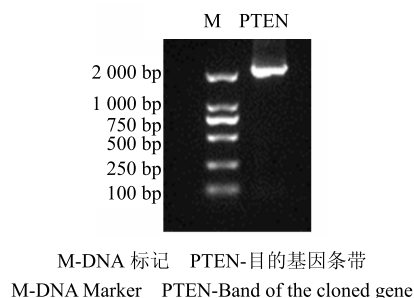


图 1 TwPTEN 基因全长 cDNA 电泳检测

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of full-length cDNA of TwPTEN

大豆	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	84
野大豆	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	85
棉花	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	71
拟南芥	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	80
桑树	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	71
蒺藜苜蓿	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	86
欧洲油菜	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	72
可可	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	71
蓖麻	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	75
TwPTEN	MSVP...ADVNSHPIKDPFTSFAKEIDEKASASVVSQ...DMSAHDASSISPTGISSWAKLISQPTIGSQDLSGSGAGASFA	76
Consensus	m 1 wak lk s n ks f	
大豆	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	170
野大豆	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	171
棉花	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	158
拟南芥	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	169
桑树	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	159
蒺藜苜蓿	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	172
欧洲油菜	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	157
可可	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	159
蓖麻	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	164
TwPTEN	RITSGLGRSPKSP...VADDSNNEATGQSLNLTGTTKGVDSKRAVAVGVKARHVVSQNKRRYQEGGFDLDITYITENIAMGFP	166
Consensus	ts g r spk p gtitkg vd sk av av vkarh vsqnkrryqe gfdld tyiten iamgfp	
大豆	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	260
野大豆	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	261
棉花	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	248
拟南芥	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	259
桑树	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	249
蒺藜苜蓿	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	262
欧洲油菜	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	247
可可	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	254
蓖麻	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	249
TwPTEN	AGDSSGFFCYVEGFYRNMEEVIRFETTHKQKYYVNYLCERLYDSLSEKVASFFPDHNCPPHILITSCFSAYSWLKEDIENNV	256
Consensus	agd ssgff yvegfyrn meevi f et hk kykynlc erlyd sl egk asfp dhncpp l sfc sayswlkediennv	
大豆	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	350
野大豆	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	351
棉花	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	338
拟南芥	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	349
桑树	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	339
蒺藜苜蓿	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	352
欧洲油菜	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	337
可可	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	339
蓖麻	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	344
TwPTEN	VVHCKAGMARTGLMISLLILKFFFTAEESMDYNNKRCVDCGKGLVPSQIRYVYFERILTYFNGENQCFERCMRGLRFLHRCFPYWR	346
Consensus	vvhckagmartglmi sll lkffftae d ynnkrc d kgl psqiryvkyfer ltyfng e r cmrlgrflhrcpywr	
大豆	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	430
野大豆	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	431
棉花	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	428
拟南芥	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	429
桑树	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	419
蒺藜苜蓿	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	432
欧洲油菜	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	417
可可	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	419
蓖麻	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	424
TwPTEN	PSITTSYHS...GVLFTKKHPTKDLSEDDWFAAPKKGVMVFALPGEPLTELADGFRIFHFDQGDFFYQWNTTMIENRK	426
Consensus	psit s h gvlft kkhptkdl e wf apkgvmvfalpgpepl gdfk fh qgdfy w nttm enr	
大豆	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	517
野大豆	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	518
棉花	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	513
拟南芥	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	514
桑树	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	504
蒺藜苜蓿	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	517
欧洲油菜	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	502
可可	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	504
蓖麻	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	508
TwPTEN	VINTSDIDGDKRKLSPSGFVEVVLDYNGDVVTS.KPEITTKKSDSSNNSSAFAPPESSSPAQNADRES...NKDDVFSIDGAE	511
Consensus	l t d fdkrlpspgf vevvl d e s k kddvfd e	
大豆	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...LG	593
野大豆	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...LG	593
棉花	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...LE	601
拟南芥	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...GVN	581
桑树	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...AE	578
蒺藜苜蓿	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...LD	592
欧洲油菜	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...GVN	562
可可	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...GVQ	580
蓖麻	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...VE	583
TwPTEN	QSGSSRSKQTKAPSEAVETVKNDSRVSESNNSTQNVANISHATEQVSL.GNKSSTFPFTHSASEFRSNVDGRVSS...VE	585
Consensus	qsgssrskqtka p seavetvkn dsrvses nnstqnvan ishateqvsl .gnk sstfpfthsa sefrsnv dgrvss ...lg	
大豆	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	621
野大豆	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	621
棉花	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	629
拟南芥	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	610
桑树	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	606
蒺藜苜蓿	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	620
欧洲油菜	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	591
可可	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	608
蓖麻	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	611
TwPTEN	VPSAE.SEPFMAADASVTFGDDDEYES	613
Consensus	sef maadasvf fgd es	

红色框为其催化活性位点

conserved catalytic motifs in the red box

图2 TwPTEN 氨基酸序列与其他植物 PTEN 氨基酸序列多重序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of TwPTEN with other PTENs

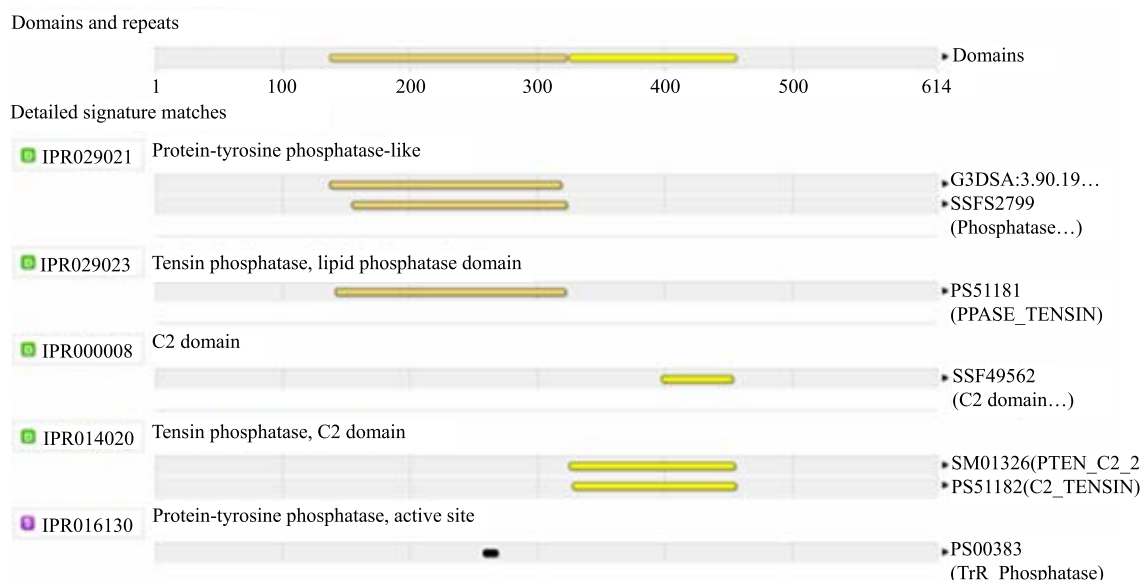


图 3 TwPTEN 氨基酸序列保守功能域

Fig. 3 Characteristic conserved region of deduced amino acid sequences of TwPTEN

3.3 TwPTEN 氨基酸序列的系统进化分析

将 TwPTEN 氨基酸序列与 GenBank 中其他 18 种植物的 PTEN 氨基酸序列进行比对分析, 用软件 MEGA6 中的 NJ 法构建系统进化树, 进行聚类分析, 结果见图 4, TwPTEN 属于植物 PTEN 分枝, 在本实验所选蛋白中与胡杨、蓖麻和麻风树的亲缘关系较近。

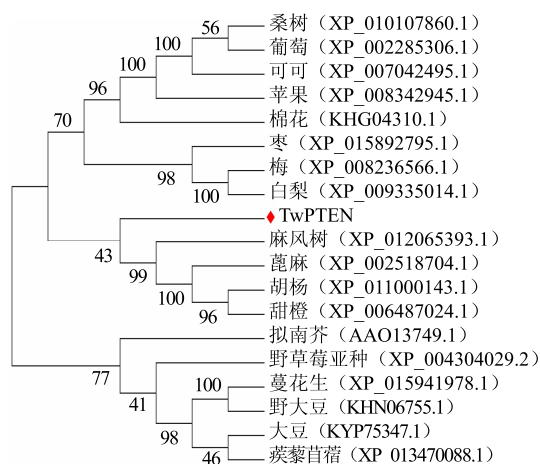


图 4 植物 PTEN 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of PTENs in plants

3.4 TwPTEN 理化性质和 3D 结构预测

EsPASy 在线服务器对 TwPTEN 氨基酸序列的分析结果为 TwPTEN 蛋白质的相对分子质量为 66 900, 等电点为 5.84。跨膜域分析结果显示其为非膜蛋白, 见图 5。

TwPTEN 蛋白的二级结构预测表明, 无规卷曲

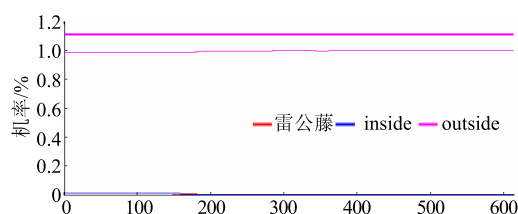


图 5 TwPTEN 蛋白跨膜分析

Fig. 5 Transmembrane domain analysis of TwPTEN protein

为其主要结构原件, 无规卷曲占 69.38%, α -螺旋结构占 15.80%, β -折叠占 14.82%。TwPTEN 三维同源模型以 3v0g.2.A 蛋白为模板构建 TwPTEN 蛋白的三级结构, 该蛋白三级结构预测模型见图 6。

3.5 TwPTEN 诱导表达分析

有研究表明 MeJA 与植物的次生代谢产物的生成有关^[19-20], 它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, 使植物应对外界环境的胁迫。根据 RT-qPCR 检测诱导后 TwPTEN 基因表达实验的数据, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量表达分析, 结果见图 7, 实验发现, 经 MeJA 诱导后, 雷公藤 TwPTEN 基因表达量迅速上调, 在 12 h 达到最大。

4 讨论

由于雷公藤显著的药理活性, 通过分子水平研究其生长发育和有效活性成分的生物合成机制具有重要意义。本研究首次从雷公藤悬浮细胞中克隆得到 1 条 PTEN 基因。通过生物信息学分析方法对其核苷酸和推测的蛋白质序列进行分析, 结果显

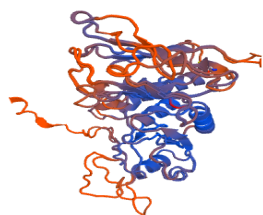


图 6 TwPTEN 蛋白三级结构预测模型

Fig. 6 Deduced three-dimensional structure of TwPTEN protein

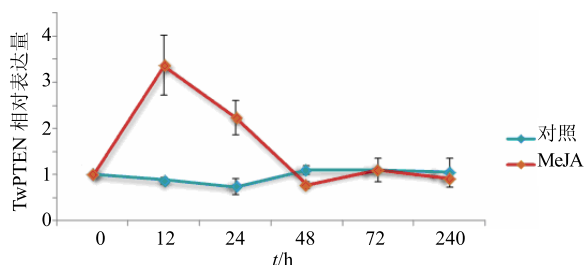


图 7 MeJA 诱导 TwPTEN 不同时间相对表达量

Fig. 7 Expression analysis of TwPTEN at different treatment time by RT-PCR

示 TwPTEN 与其他植物 PTEN 基因具有很高的相似性, TwPTEN 具有 PTENs 所共有的 Protein-tyrosine phosphatase-like 和 C2 功能域以及 (I/V)HCXAGXXR 催化活性位点。RT-qPCR 对 TwPTEN 基因的表达分析结果表明, TwPTEN 在 MeJA 诱导后呈上升的趋势, 说明其可能与植物的次生代谢产物合成有关, 其对次生代谢产物生成的具体作用机制还有待研究。此外, PTEN 基因对植物的生长发育具有重要的作用, 目前从拟南芥中克隆得到的 PTEN 基因已被证实具有控制信号传导和促进花粉发育等作用, 因此通过进一步研究 TwPTEN 基因对雷公藤生长发育调控作用的具体机制具有重要意义。鉴于 PTEN 基因对植物生理的重要作用, 本研究所克隆的 TwPTEN 的 cDNA 全长序列为进一步研究该基因的功能以及该基因对植物生理和有效成分的影响提供了物质基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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 Res*, 2006, 66(9): 4758-4765.
- [3] Qin D P, Zhou Y J, Zhang S Z, *et al.* Anti-inflammation of *Tripterygium wilfordii* Polycoride on Macrophages and Its Regulation to Inflammation via TLR4/NF- κ B [J].

Chin Herb Med, 2015, 7(2): 155-161.

- [4] 吴沁航, 符士源. 雷公藤甲素抗卵巢癌的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 1049-1052.
- [5] 吴少辉, 刘光明. 雷公藤内酯的提取、分析和药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 36-39.
- [6] 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]. *Clin Immunol*, 2015, 157(2): 228-238.
- [7] Lu L, Li F, Wang X. Novel anti-inflammatory and neuroprotective agents for Parkinson's disease [J]. *Cns Neurol Disorders Drug Targets*, 2010, 9(9): 232-240.
- [8] Junli L, Jaemin L, Mario A S H, *et al.* Treatment of obesity with celastrol [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 999-1011.
- [9] Martin T F. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking [J]. *Annual Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14(1): 231-264.
- [10] Paolo G D, Camilli P D. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics [J]. *Nature*, 2006, 443(7112): 651-657.
- [11] Hong Y, Zhang W, Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity [J]. *Plant Cell Envir*, 2010, 33(4): 627-635.
- [12] Munnik T, Vermeer J E M. Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants [J]. *Plant Cell Envir*, 2010, 33(4): 655-669.
- [13] Vidali L, van Gisbergen P A, Guérin C, *et al.* Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2009, 106(32): 13341-13346.
- [14] Gupta R, Ting J T, Sokolov L N, *et al.* A tumor suppressor homolog, AtPTEN1, is essential for pollen development in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(10): 2495-507.
- [15] Pribat A, Sormani R, Rousseaugueutin M, *et al.* A novel class of PTEN protein in Arabidopsis displays unusual phosphoinositide phosphatase activity and efficiently binds phosphatidic acid [J]. *Biochem J*, 2011, 441(1): 161-171.
- [16] 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.
- [17] 程琪庆, 何云飞, 李 耿, 等. 丹参 4-羟基-3-甲基-2-丁烯基焦磷酸还原酶基因的全长克隆与诱导表达分析 [J]. 药学学报, 2013, (2): 236-242.
- [18] Das S, Dixon J E, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(13): 7491-7496.
- [19] Geyter N D, Gholami A, Goormachtig S, *et al.* Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17(6): 349-359.
- [20] Misra R C, Ghosh S. Methyl jasmonate-elicited transcriptional responses and pentacyclic triterpene biosynthesis in sweet basil [J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(2): 1028-1044.