

• 药材与资源 •

滇龙胆香叶醇-10-羟化酶基因克隆、生物信息学分析和表达

周 伟, 李 媛, 吴昕怡, 刘小莉*

云南中医学院中药学院, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 克隆滇龙胆 *Gentiana rigescens* 香叶醇-10-羟化酶 (geraniol-10-hydroxylase, G10H) 基因, 对其进行定量表达以及生物信息学分析。方法 采用 PCR 技术获得 G10H 的 cDNA 序列, 对 G10H 蛋白进行理化性质、二级结构和三级结构等生物信息学分析, 并利用实时荧光定量 PCR 方法检测 G10H 基因在滇龙胆根、茎、叶中的表达情况。结果 克隆得到滇龙胆 G10H 基因, 全长为 1 400 bp, ORF 1 248 bp, 编码 415 个氨基酸。生物信息学预测该基因编码蛋白质分子式为 $C_{2131}H_{3390}N_{586}O_{615}S_{17}$, 等电点为 7.62, 不稳定系数为 44.20, 疏水性系数 GRAVY 为 -0.245。G10H 基因在滇龙胆根、茎、叶中均有表达, 其中在根中表达量最高, 茎中最低。结论 首次从滇龙胆中克隆得到了 G10H 基因, 为进一步阐明该基因的羟化功能在滇龙胆龙胆苦苷生物合成途径中的重要作用奠定基础。

关键词: 滇龙胆; 香叶醇-10 羟化酶; 基因克隆; 生物信息学; 基因表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)03-0546-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.020

Molecular cloning, differential expression, and bioinformatics analysis of G10H gene in *Gentiana rigescens*

ZHOU Wei, LI Yuan, WU Xin-yi, LIU Xiao-li

College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To clone the geraniol-10-hydroxylase (G10H) gene from *Gentiana rigescens* and analyze the gene expression. **Methods** The cDNA sequence of G10H was obtained from *G. rigescens* using PCR technique. The physical and chemical properties, secondary structure and tertiary structure of G10H protein were forecasted and analyzed using related software. The expression of G10H gene was detected using real-time PCR in roots, stems, and leaves of *G. rigescens*. **Results** The cloned G10H gene was 1 400 bp including 1 248 bp open reading frame and encoding a predicted protein of 415 amino acids. Bioinformatics predicted that the gene encoding protein molecular formula was $C_{2131}H_{3390}N_{586}O_{615}S_{17}$, the isoelectric point was 7.62, the instability coefficient was 44.20, and the hydrophobic coefficient was -0.245. RT-PCR showed that G10H gene expressed in all organs. And the highest expression level was found in roots, while the lowest in the stems. **Conclusion** This G10H gene is cloned from *G. rigescens* for the first time. The results provide a foundation for exploring the mechanism of gentiopicoside biosynthesis in *G. rigescens*.

Key words: *Gentiana rigescens* Franch.; geraniol-10-hydroxylase; gene cloning; bioinformatics; gene expression

滇龙胆是常用药材龙胆的基原植物之一, 是南方地区龙胆药材的主要来源, 具有清热燥湿、泻肝胆实火的功效, 是龙胆泻肝片、龙胆注射液、苦胆草片等 200 余种中成药的主要原材料。滇龙胆的主要成分是龙胆苦苷、獐牙菜苦苷等裂环烯醚萜类 (secoiridoids) 化合物, 药理研究表明这些成分具有保肝利胆、抗炎、抗病毒等作用^[1-2], 很多研究表明香叶醇-10-羟化酶 (geraniol-10-hydroxylase, G10H)

在环烯醚萜的生物合成中发挥关键作用, 其催化底物香叶醇在 C-10 位置上羟基化而生成 10-羟基-香叶醇。裂环烯醚萜类化合物, 是由环烯醚萜类物质在 C-7、C-8 处开环演变而来, 目前已在长春花^[3-4]、川西獐芽菜^[5]、秦艽^[6]等少数物种中被克隆, 且已证明该酶在川西獐牙菜中的裂环烯醚萜类化合物獐牙菜苦苷合成过程中起着重要调节作用。研究生物合成途径中相关酶基因对于阐明生物合成途径, 进而

收稿日期: 2016-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660634); 云南省科技计划项目 (2014FZ077); 云南省教育厅重点项目 (2013Z002); 云南省应用基础研究-中医联合专项 [2015FB205(-024)]

作者简介: 周 伟 (1991—), 女, 湖北秭归人, 在读硕士研究生, 研究方向为中药资源开发与利用。Tel: 18487262510 E-mail: 745326682@qq.com

*通信作者 刘小莉 (1977—), 女, 山东烟台人, 副教授, 博士, 研究方向为中药资源开发与利用。Tel: (0871)65918127 E-mail: kmxunzi@aliyun.com

揭示合成机制具有重要意义。

本课题前期对滇龙胆转录组进行了测序和分析,获得 G10H 的开放阅读框 (ORF),通过设计特异引物克隆到可能编码 G10H 的基因,运用生物信息学方法对该序列进行了同源性分析,预测了其编码蛋白的理化性质,最后通过实时荧光定量 PCR 技术对滇龙胆不同部位进行了表达分析,为后续进一步研究该基因功能以及与龙胆苦苷等主要成分的合成相关性研究奠定基础。

1 材料与试剂

样品于 2015 年 10 月采自云南省玉溪市新平县磨盘山,经云南中医学院刘小莉副教授鉴定为滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch., -80 °C 保存,用于提取 RNA。TakaRa Mini BEST plant RNA Extraction kit 试剂盒, Takara PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis kit 试剂盒购自宝生物工程有限公司;薄型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; pEASYOR-T1 Simple Cloning Kit 试剂盒,感受态细胞 *Trans1-T1* 均购自北京全式金生物技术有限公司。

2 方法

2.1 滇龙胆总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

使用 TakaRa Mini BEST plant RNA Extraction kit 试剂盒来提取滇龙胆的根、茎、叶 RNA,采用 Takara 公司的 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis kit 第一链合成试剂盒合成第一条链 cDNA, -20 °C 保存。

2.2 G10H 基因的克隆和鉴定

根据转录组测序获得的序列,将其进行 ORF-Finder 分析,发现其包含了完整的 ORF,根据 ORF 设计特异性引物,引物 F、R 见表 1,以“2.1”项的方法获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 25 μL: 引物 F 1 μL, 引物 R 1 μL, 模板 cDNA 1 μL, Mix (TakaRa Premix Taq) 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。扩增程序为 95 °C、5 min, 1 个循环; 95 °C、1 min, 49.5 °C、1 min, 72 °C、1.5 min, 35 个循环; 72 °C、10 min, 1 个循环。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,目的片段回收和纯化按照薄型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行。纯化产物连接载体 pEASY R-T1 Simple Cloning Vector,并转化感受态细胞 *Trans1-T1*,过夜培养鉴定阳性克隆后送昆明硕擎生物科技有限公司测序。

表 1 所用引物

Table 1 Primers used for this study

基因	引物名称	序列 (5'→3')
G10H	F	TTTCTTACAATTGCCTTCGG
	R	CCTTATTACAAGGGTACGGG
	GF	GGTTTCCGGTAATCGGCAGCCTCCA
	GR	CGTCGTAGGCATGGAAAGCGTTGGG
Actin	AF	CGACAATCGCTTAGCCCTACGCCTT
	AR	CCAGCAAATCCAGCCTTGACCATTC

2.3 G10H 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 上的 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析基因的 ORF; 利用美国国立生物技术信息中心网站 NCBI 上的 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对基因核苷酸序列进行 Blastx 比对。利用在线软件 ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 推测其编码蛋白的理论分子量、等电点和基因编码蛋白分子式; NPS@server (<http://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl?page=/NPSA/npsa-secons.hit>) 分析蛋白质的二级结构; 采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三维建模分析; TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析蛋白质的跨膜结构域。

2.4 G10H 基因的表达分析

按照“2.1”项的方法提取滇龙胆的根、茎、叶中 RNA,并逆转录成 cDNA。选取 actin 基因为内参,以 cDNA 为模板,根据 G10H 基因设计荧光定量 PCR 引物 GF、GR 和 AF、AR (表 1),按照下列组成配制 PCR 反应液: 2 × FastStart Essential DNA Green Master 10 μL; Primer_F (10 μmol/L) 0.4 μL, Primer_R (10 μmol/L) 0.4 μL; cDNA 模板 1 μL; ddH₂O 20 μL。PCR 扩增程序如下: 预变性 95 °C、10 min, 1 个循环; 95 °C、10 s, 60 °C、15 s, 72 °C、10 s 共 40 个循环。每个反应做 3 个重复。

3 结果与分析

3.1 滇龙胆总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。结果显示按照上述提取方法提取的 RNA 的 28 S 和 18 S 条带明亮清晰, RNA 28 S 亮度约为 18 S 亮度的 2 倍,且 2 条带均无明显拖尾,能满足后续实验。

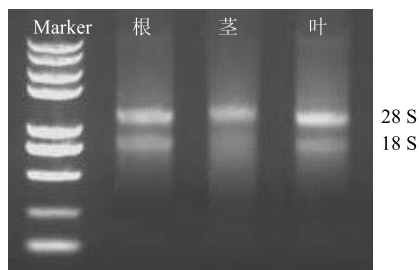
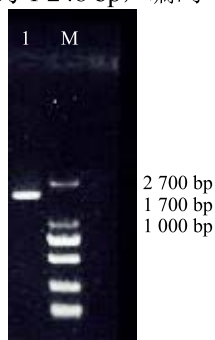


图 1 G10H PCR

Fig. 1 PCR amplification of G10H of *G. rigescens*

3.2 G10H 基因的克隆和鉴定

PCR 扩增后在 1 700 bp 左右处有 1 条亮带(图 2), 与推测的目的片段大小一致, 初步认为是目的基因。将 PCR 产物纯化后克隆挑选阳性菌落进行 PCR 验证并测序, 测序结果得到 1 条全长 1 400 bp 序列(命名为 GrG10H), ORF 为 1 248 bp, 编码 415 个氨基酸。



1-GrG10H M-Marker

图 2 总 RNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of total RNA from *G. rigescens*

3.3 G10H 基因生物信息学分析

采用 NCBI 的 Blastx 程序对 GrG10H 序列进行比对分析显示, GrG10H 与金鸡纳树 *Cinchona calisaya* Wedd. (AGX93051.1)、长春花 *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don (Q8VWZ7.1)、秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. (AG197015.1)、短小蛇根草 *Ophiorrhiza pumila* Champ. ex Benth. (BAP90522.1)、芝麻 *Sesamum indicum* L. (XP 011099226.1) 等植物的 G10H 基因编码蛋白质相似度分别为 72%、71%、72%、71%和 69%。利用 ProtParam 推测编码蛋白分子式为 $C_{2131}H_{3390}N_{586}O_{615}S_{17}$, 相对分子质量为 47 610; 理论等电点为 7.62; 蛋白带负电残基 (Asp+Glu) 为 56, 带正电残基 (Arg+Lys) 为 57; 该蛋白不稳定系数为 44.20; 脂肪族系数为 93.44; 疏水性 GRAVY 值为 -0.245。NPS@server 分析该蛋白的二级结构主要由 43.51%的 α 螺旋; 13.22%的延伸链和

41.11%的无规则卷曲组成。SWISS-MODEL 以细胞色素 P450 2B4 (5iut.1.A) 作为模板, 对蛋白进行三维结构建模(图 3), 序列仅 21.78%的相似性。TMHMM Server v.2.0 预测该蛋白没有跨膜结构域。用 NCBI 的 Conserved Domain 预测蛋白保守区 G10H 属于植物细胞色素 P450 超基因家族 (c112078), 细胞色素 P450 是一种含血红素的多功能氧化酶, 参与各种化合物的氧化降解过程。

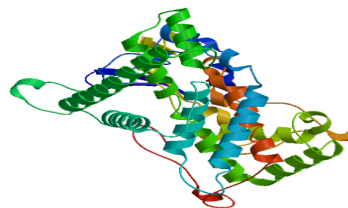


图 3 G10H 蛋白三级结构预测

Fig. 3 Tertiary structure prediction of G10H protein

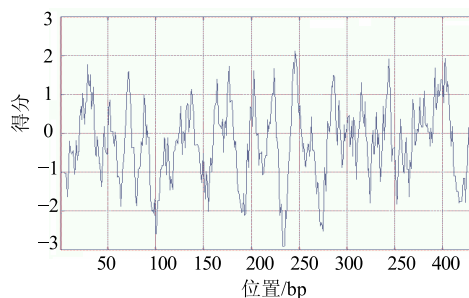


图 4 G10H 蛋白疏水性预测

Fig. 4 Hydrophobicity prediction map of G10H protein

3.4 G10H 氨基酸序列的系统进化分析

将 G10H 与 Genbank 中的川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch.、长春花、胡黄连 *Picrorhiza kurrooa* Royle ex Benth.、短小蛇根草、秦艽、喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 等 6 种植物的 G10H 氨基酸用 ClustalX(1.83) 软件进行比对, 用 MEGA6 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树, 进行聚类分析。结果如图 5 所示, 滇龙胆与同属植物秦艽亲

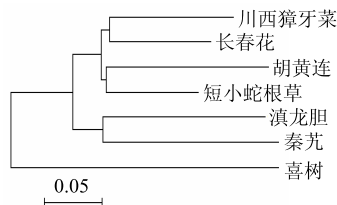


图 5 G10H 氨基酸序列 NJ 系统进化树

Fig. 5 Neighbor-joining dendrogram of G10H in *G. rigescens* and other plants

缘关系最近。

3.5 G10H 基因的表达特性分析

荧光定量 PCR 结果表明, G10H 基因在根、茎、叶中均有表达, 在根的表达量最高, 其次是在叶中表达量较高, 在茎中表达量最低 (图 6)。

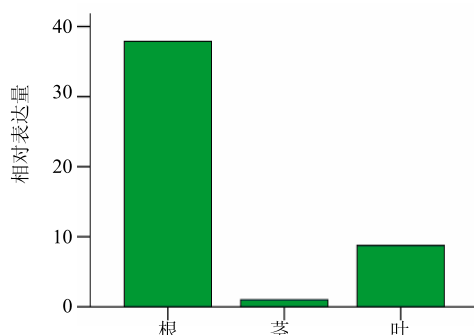


图 6 滇龙胆不同部位 G10H 相对表达量

Fig. 6 Relative quantity of G10H expression in different organs of *G. rigescens*

4 讨论

G10H 蛋白属于植物细胞色素 P450 超基因家族, 细胞色素 P450 是一种含血红色素的多功能氧化酶, 参与各种化合物的氧化降解过程, 特别是对环境毒素和致癌物具有很好的降解作用^[7]。已有研究证明此类蛋白参与环烯醚萜类和吲哚生物碱的生物合成, 并且是合成途径中的关键调控位点之一^[8-9]。现已证明 G10H 基因的表达能够促进 10-羟基香叶醇的积累, 进而促进了环烯醚萜类化合物在川西獐牙菜中的积累^[8]; 在长春花的生物碱生物合成中也是重要的调控位点^[10-11]。

目前, G10H 酶编码基因仅从长春花、川西獐牙菜、秦艽等少数植物中克隆得到。本研究立足于滇龙胆高通量转录组测序数据, 克隆得到 1 条 cDNA 序列, 全长 1 400 bp, ORF 为 1 248 bp 的序列。与川西獐牙菜、长春花、秦艽等的 ORF 有 152~243 bp 的差异^[5-8]。Blastx 比对结果显示滇龙胆 G10H 与其他物种的 G10H 基因同源性较高, 保守结构域分析显示滇龙胆 G10H 基因属于 P450 超基因家族, 说明滇龙胆 G10H 蛋白具有较高的结构保守性, 可以归类为 P450 酶。本研究中发现 G10H 在根中相对表达量最高, 茎、叶中较低, 与滇龙胆药用部位为根较为一致。这与其他物种中不尽一致^[6-8]。在长春花中还发现 G10H 与 DXS、DXR 和 MECS 酶基因存在共表达现象^[12]。滇龙胆 GrG10H 基因的表达量与龙胆苦苷量的相关性需要更多研究阐明。

本研究结果将为进一步研究 G10H 在滇龙胆植株中的表达情况, 以及其表达量与龙胆苦苷等裂环烯醚萜类化合物的具体相关性研究奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] 陈长勋, 刘占文, 孙嵘嵘, 等. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 814-816.
- [2] 张金渝, 沈涛, 杨维泽, 等. 云南道地药材滇龙胆资源调查与评价 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 890-895.
- [3] Collu G, Unver N, Peltenbu-Looman A M, et al. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis [J]. *FEBS Lett*, 2001, 508: 215-220.
- [4] 韩梅, 赵博, 安志刚, 等. 长春花萜类吲哚生物碱生物合成途径中重要酶 (DXR、SLS、G10H、STR) 基因的克隆与表达 [J]. 植物研究, 2007, 27(5): 564-568.
- [5] Wang J F, Liu Y L, Cai Y F, et al. Cloning and functional analysis of geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 from *Swertia mussotii* Franch [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(8): 1583-1590.
- [6] 化文平, 王喆之. 秦艽香叶醇-10-羟化酶 (G10H) 基因的克隆及序列分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 510-515.
- [7] 张晓东, 李彩霞, 李泽君, 等. 滇龙胆 GrCYP450-17 基因的克隆、序列分析与原核表达 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2678-2683.
- [8] 王俊峰. 川西獐牙菜体细胞杂交及其环烯醚萜类化合物合成相关基因香叶醇-10-羟化酶的克隆和功能验证 [D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [9] Wang C T, Liu H, Gao X H. Overexpression of G10H and ORCA3 in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 887-894.
- [10] Nitima S. Characterization of G10H promoter and isolation of WRKY transcription factors involved in catharanthus terpenoid indole alkaloid biosynthesis pathway [D]. Kentucky: University of Kentucky, 2011.
- [11] Gong Y F, Liao Z H, Pi Y, et al. Engineering terpenoid indole alkaloids biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus* hairy root cultures by overexpressing the geraniol 10-hydroxylase Gene [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ (Science)*, 2005, 10(S1): 8-13.
- [12] Burlat V, Oudin A, Courtois M. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites [J]. *Plant J*, 2004, 38(1): 131-141.