

龙牙楸木三萜皂苷合成途径关键酶 *AeFPS* 基因的克隆及原核表达

赵春彦, 成 慧, 贾冬梅, 邹宏达, 原亚萍, 吴 颖*

吉林大学植物科学学院, 吉林 长春 130062

摘 要: 目的 克隆龙牙楸木法呢二磷酸合成酶 (*AeFPS*) 基因并进行原核表达。方法 以龙牙楸木为材料, 采用 RT-PCR 方法, 设计特异引物, 克隆 *AeFPS* 基因, 并将该基因定向插入 *Sca* I/*Bam* H I 切开的原核表达载体 pET-28a 上, 转化大肠杆菌 BL21, 于 28 °C, IPTG 诱导 5 h, 经 SDS-PAGE 电泳分析, 检测出明显的差异条带, Western blotting 进一步检测其为目的基因。结果 克隆到 *AeFPS* 基因 cDNA 全长为 1 040 bp, 含有 1 029 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 342 个氨基酸, GenBank 登录号为 HM219226.1。成功构建了原核表达质粒 pET28a/*AeFPS*, *AeFPS* 蛋白在 BL21 中高度表达, SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定了目标蛋白。结论 首次获得了 *AeFPS* 基因, 并将其连入原核载体中成功表达, 为研究 *AeFPS* 蛋白的活性及生化功能奠定了基础。

关键词: 龙牙楸木; 法呢二磷酸合成酶 (*AeFPS*) 基因; 原核表达; Western 杂交; 克隆

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2092-05

Cloning and prokaryotic expressing of *AeFPS* gene: a key enzyme of triterpene saponins biosynthesis in *Aralia elata*

ZHAO Chun-yan, CHENG Hui, JIA Dong-mei, ZOU Hong-da, YUAN Ya-ping, WU Ying

College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract: Objective Cloning and prokaryotic expressing of farnesyl diphosphate synthase gene (abbreviated as *AeFPS*) in *Aralia elata*. **Methods** The *AeFPS* gene was amplified by RT-PCR with specific primers from *A. elata* and inserted into the prokaryotic expression vector pET-28a which is digested by *Sca* I and *Bam* H I, then the recombinant vector was transformed into BL21 stain. After induced by IPTG at 28 °C for 5 h, the obvious difference between bands could be seen by SDS-PAGE and the *AeFPS* protein was detected by Western blotting too. **Results** The full-length cDNA of *AeFPS* (GenBank accession Number: HM219226.1) was 1 040 bp and contained a 1 029 bp open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 342 amino acids. The prokaryotic recombined plasmid pET28/*AeFPS* has been successfully constructed. The BL21 transformed recombined plasmid pET28/*AeFPS* had expressed *AeFPS* recombined protein effectively. The protein was detected by SDS-PAGE and Western blotting. **Conclusion** It is the first report that *AeFPS* gene could be cloned and expressed in *Escherichia coli*. This work is helpful for investigating the activities or other physiological functions of *FPS* protein.

Key words: *Aralia elata* (Miq.) Seem.; farnesyl diphosphate synthase (*AeFPS*); prokaryotic expression; Western blotting; cloning

龙牙楸木 *Aralia elata* (Miq.) Seem. 又名辽东楸木, 系五加科楸木属植物, 主要分布于我国东北。其性味辛苦, 有小毒, 药用部位主要是根皮、树皮及叶, 具有补气安神、活血化瘀、利尿消肿、除湿止痛之功效。用于治疗风湿性关节炎、肝炎、糖尿病、神经衰弱、肾炎水肿等^[1]。龙牙楸木的药效成分为三萜皂苷, 其皂苷元为齐墩果酸^[2]。三萜皂苷

的代谢合成途径目前已经明确^[3-6], 法呢二磷酸合成酶 (*AeFPS*) 为类异戊二烯合成途径的关键酶之一^[7-8], 在人参、三七、拟南芥、玉米、银胶菊、辣椒和棉花等 10 余种植物中有研究报道^[6-11]。基于此, 本研究首次在龙牙楸木中克隆得到 *AeFPS*, 并连接到原核表达载体上进行了原核表达, 为研究 *AeFPS* 蛋白生物学功能奠定了基础。

收稿日期: 2011-03-11

基金项目: 吉林省科技厅资助项目 (3D510X806604)

作者简介: 赵春彦 (1983—), 女, 山东郓城人, 硕士研究生, 主要从事药用植物生物技术研究。

Tel: 13086808840 E-mail: zhaochunyan-1984@126.com

*通讯作者 吴 颖 E-mail: wuying35969@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

龙牙楸木 *Aralia elata* (Mig.) Seem 采自吉林大学植物科学学院药用植物园, 经吉林大学李彦舫教授鉴定为五加科楸木属龙牙楸木。pGM-T vector 购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌 DH-5 α 及质粒 pET-28a (载体含 Kan 筛选标记) 和 BL21 菌种为本实验室自制。

LA *Taq* 酶, 限制性内切酶 *Bam*H I、*Sac* I, T4-DNA 连接酶, RNA 提取试剂盒及 cDNA 第一链合成试剂盒购自 TaKaRa 公司; 一抗 His-Tag (2A8) Mouse mAb、沉淀性单组分 TMB 底物溶液均购自天根生化科技(北京)有限公司; 羊抗小鼠抗体(二抗)购自武汉博士德生物工程有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

引物由金斯特科技(南京)有限公司合成, DNA 测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 合成 采用 RNAiso plus 试剂盒提取龙牙楸木嫩芽的总 RNA, 利用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。RT-PCR 设计引物序列为 FP: 5'-CGCGGATCCGAATGAGCGATCTGAAGACGAG-3'; RP: 5'-CGAGCTCCTCAATTACTTACTTTTGCCGC-3'。

在 25 μ L 的反应体系中, dNTP 0.5 μ L (10 mmol/L), 引物各 1.0 μ L (10 μ mol/L), 模板 cDNA 200 ng, LA *Taq* 酶 0.25 μ L (5 U/ μ L), 10 $\times$ LA *Taq* 缓冲液 2.5 μ L, 加 dd H₂O 补足至 25 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 目的片段的回收、克隆测序与分析 将 PCR 产物回收后与克隆载体 pGM-T 连接。连接产物转化大肠杆菌 DH-5 α 感受态细胞, 涂布氨苄平板, 采用单菌落摇菌碱裂解法提取质粒, 对重组质粒进行 PCR、酶切鉴定, 上海生工对阳性克隆进行测序。将测序结果经 BLAST 软件进行同源性比对, 采用 NCBI 软件的 ORF finder 确定该基因的开放阅读框。利用 Expasy、SMART 软件进行蛋白质基本理化性质和功能位点分析。利用 DNAMAN 软件完成多序列比对。

1.2.3 原核表达载体的构建及鉴定 将含有目的基因的重组质粒 pGM*AeFPS* 和 pET-28a 分别用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 回收目的片段和载体, 经 T4-DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 转化大肠杆菌 DH-5 α 感受

态细胞, 在含有 10 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基上筛选重组子。选取阳性克隆, 经 PCR 检测和酶切鉴定验证重组质粒。重组质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 经过卡那霉素筛选阳性克隆、质粒 PCR 和酶切鉴定获得工程菌, 并命名为 BL21-pET28a-*AeFPS*。

1.2.4 重组蛋白的诱导分析 将阳性工程菌在含卡那霉素 (10 μ g/mL) 的液体 LB 培养基培养, 培养液 600 nm 处测吸光度 (*A*) 值, 培养至 *A*₆₀₀ 值为 0.7~1.0 时, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 异丙基硫代- β -D 半乳糖苷 (IPTG) 诱导 5 h, 分别收集上清和沉淀, 加上样缓冲液于沸水中煮 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 重组蛋白的 Western blotting 分析 表达产物经 12% SDS-PAGE 电泳后, 用 ST-I 型半干式转移电泳槽将目的蛋白转至 NC 膜上, 5% 脱脂蛋白封闭过夜, 特异结合组氨酸标签的小鼠单克隆抗体孵育 1~2 h; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠抗体孵育 1~2 h; 通过沉淀型单组分 TMB 底物溶液与 HRP 反应形成沉淀蓝褐色产物, 进行重组蛋白的 Western blotting 分析。

2 结果与分析

2.1 *AeFPS* 基因 cDNA 序列的扩增及序列分析

以逆转录合成的 cDNA 第一链为模板, 利用特异引物 FP、RP 进行 PCR 扩增, 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增带为单一的大小约为 1 000 bp 的片段 (图 1)。克隆到 pGM-T 载体上经 PCR、酶切鉴定后测序, 结果为 1 040 bp, 利用 NCBI 的 ORF finder 功能确定包含完整的开放阅读框为 3~1 031 bp, 编码 342 个氨基酸 (图 2)。

利用 Expasy 中的 ProtParam 进行该氨基酸序列

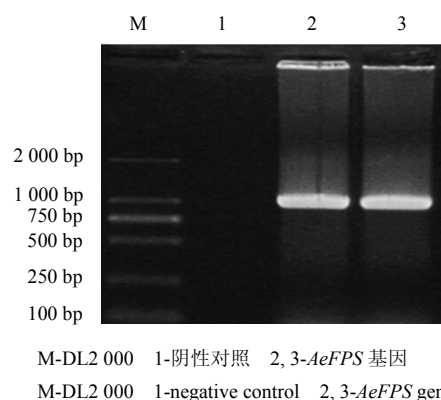


图1 *AeFPS* 基因 RT-PCR 扩增电泳图

Fig. 1 RT-PCR electrophoretogram of *AeFPS* gene

基本理化性质的分析, 相对分子质量为 39 559.6, 等电点为 5.83。带正电荷的氨基酸残基(天门冬氨酸和谷氨酸)总数为 50 个, 带负电荷的氨基酸残基(精氨酸和赖氨酸)的总数为 44 个。该蛋白质不稳定指数为 39.04, 说明蛋白质是稳定的。利用 Signal P 3.0 Server 蛋白信号肽预测服务器分析蛋白

AeFPS, 该蛋白 N 端不含信号肽序列。通过 DNAMAN 与人参、西洋参、积雪草、蒿属、烟草、拟南芥等氨基酸序列的同源性比对, 同源性达到 80% 以上(图 3)。因此可以确定克隆到的基因为 *AeFPS* 基因。首次克隆得到该基因, GenBank 登录号为 HM219226.1。

```
GAATGAGCGATCTGAAGACGAGATTTCTGGAGGTACTCTGTTCTGAAATCCGAGCTACTCAACGACCCTG
M S D L K T R F L E U Y S U L K S E L L N D P
CTTTCGAGTTCCAGATGATCTCGCCATGGGTGCAAGGATGCTGGACTATAATGTGCTGGAGGAAAGC
A F E F T D D S R Q W U E R M L D Y N U P G G K
TGAATCGAGGGCTATCTGTTATTGACAGCTACAGTTGCTGAAGAAGGAAAGAACTAAGTGATGATGAAA
L N R G L S U I D S Y K L L K E G K E L S D D E
TTTTCTTTCAAGTGCACCTGGTTGGTCATTGAATGGCTTCAAGCTTATTTCTTGTGCTGATGATATTA
I F L S S A L G W C I E W L Q A Y F L U L D D I
TGGATAGCTCTCATCGCCGAGAGGTCAACCCGTGTTGGTTCAGATTACCTAAGGTTGGTATGCTGCGTAA
M D S S H T R R G Q P C W F R L P K U G M I A U
ATGATGGCATATTACTTCGCAACCATATCCCAAGGATTTCTCAGAAGCATTTCGACAAAAGCCTTACTATG
N D G I L L R N H I P R I L K K H F R Q K P Y Y
TGGATCTGTTGGATCTATTTAATGAGGTAGAACTCCAGACAGCTTGTGGACAGATGATAGATTGATACCA
U D L D L N D E U E F Q T A C G Q M I D L I T
CCCTTGTAGGAGAGAAAGACTTATCGAATACTCATTGCCTATTTCATCGCCGGATTGTGCAGTACAAAAGT
T L U G E K D L S K Y S L P I H R R I U Q Y K T
CTTACTATCATTTTACCTTCCAGTGGCTGTGCACTTCTTATGTCAGGCGGAGATCTGGAGAAACATACTA
A Y Y S F L P U A C A L L M S G G D L E K H T
ATGTAAGACATACTTATTGAAATGGGAACCTATTTTCAAGTGCAGGATGATTATCTGGATTGCTTTGGTG
N U K D I L I E M G T Y F Q U Q D D Y L D C F G
CACCAGAGGTGATTGGGAAGATTGGCACAGATTTGAAGATTTCAAGTGCCTGCTGCTTGGTTGTAAGACAC
A P E U I G K I G T D I E D F K C S W L U U K A
TGGAACTTTCTAAGCAGGAACAAAGAAGTTTTACATGAGAAGTATGGAAGGATGATCCGGCCTCTGTAG
L E L S N E E Q K K F L H E N Y G K D D P A S U
CAAAAGTGAAGAGCTTTATCACACTCTCAAGCTTCAGGATGATTTTGGCAGTATGAGAGCAAGAGCTATG
A K U K E L Y H T L K L Q D U F A E Y E S K S Y
ACAAAGTTCATCAAGTTCATCCGAGCCAGCGGTACAAGCAGTGTAAATCATTCTTGGGAA
D K L I K L I E A H P S Q A U Q A U L K S F L G
AGATATATAAGCGCGCAAAAGTAAGTAATTGAG
K I Y K R Q K * U I
```

图 2 *AeFPS* 的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA and deduced amino acid sequences of *AeFPS* gene

ARALIA FLATA.TXT	.. NSDLKTRFLEVYS VLKSELLNDPAFEFTDDSRQWERMLDYNVPGGKLNRLSVI	DSYKLLKEGKELSDDEI	FLSSALCVQI	EVLQAY	88																																																					
MEDICAGO TRUNCATULA.TXT	.. NADLKSSTELNYS VLKSELLNDPAFEFTDDSRQWERMLDYNVPGGKLNRLSVI	DSYRLKKEGKELNDEI	EQASALCVQI	EVLQAY	88																																																					
NICOTIANA TABACUM.TXT	.. NSDLKTRFLEVYS VLKSELLNDPAFEFTDDSRQWERMLDYNVPGGKLNRLSVI	DSYKLLKEGKELSDDEI	KASALCVQI	EVLQAY	15																																																					
PANAX GINSENG.TXT	.. NSDLKTRFLEVYS VLKSELLNDPAFEFTDDSRQWERMLDYNVPGGKLNRLSVI	DSYKLLKEGKELSDDEI	FLSSALCVQI	EVLQAY	88																																																					
PANAX NOTOGINSENG.TXT	.. NSDLKTRFLEVYS VLKSELLNDPAFEFTDDSRQWERMLDYNVPGGKLNRLSVI	DSYKLLKEGKELSDDEI	FLSSALCVQI	EVLQAY	88																																																					
ARABIDOPSIS THALIANA.TXT	.. NSDLKTRFLEVYS VLKSELLNDPAFEFTDDSRQWERMLDYNVPGGKLNRLSVI	DSYKLLKEGKELSDDEI	FLSSALCVQI	EVLQAY	88																																																					
ARTEMISIA ANNUA.TXT	MSI DLKSTFLNYS VLKSDLLHDPSFEFTDDSRQWERMLDYNVPGGKLNRLSVI	VDSFKLLKOGNDIT	TEGEVFLSALCVQI	EVLQAY	89																																																					
CAPRICUM ANNUM.TXT	.. MSDFSKFNEAYY VLKSELLNDPAFEFTDDSRQWERMLDYNVPGGKLNRLSVI	DSYSLDDGKELTDEI	EKASALCVQI	EVLQAY	88																																																					
CENTELLA ASIATICA.TXT	.. NSDLKTRFLEVYS VLKSDLLNDPAFEFTDDSRQWERMLDYNVPGGKLNRLSVI	DSYKLLKEGKELSDDEI	VLSALCVQI	EVLQAY	88																																																					
Consensus	flvldldi nd s trrgqpcw	vgm a ndg llrn h ril hf k yvv l dlfneve qta gqndiitt	gekd l ky																																																							
ARALIA FLATA.TXT	FLVLDLDI	MS	ST	TRRGOPCVFRLPKVGM	A	NDG	LLRNH	PR	I	DKHIERCP	YVYV	LD	DLFNEVE	CTACGCM	DLI	ITLNGEKDLS	KY	178																																								
MEDICAGO TRUNCATULA.TXT	FLVLDLDI	MS	ST	TRRGOPCVFRLPKVGM	A	NDG	LLRNH	PR	I	DKHIERCP	YVYV	LD	DLFNEVE	CTACGCM	DLI	ITLNGEKDLS	KY	178																																								
NICOTIANA TABACUM.TXT	FLVLDLDI	MS	ST	TRRGOPCVFRLPKVGM	A	NDG	LLRNH	PR	I	DKHIERCP	YVYV	LD	DLFNEVE	CTACGCM	DLI	ITLNGEKDLS	KY	105																																								
PANAX GINSENG.TXT	FLVLDLDI	MS	ST	TRRGOPCVFRLPKVGM	A	NDG	LLRNH	PR	I	DKHIERCP	YVYV	LD	DLFNEVE	CTACGCM	DLI	ITLNGEKDLS	KY	178																																								
PANAX NOTOGINSENG.TXT	FLVLDLDI	MS	ST	TRRGOPCVFRLPKVGM	A	NDG	LLRNH	PR	I	DKHIERCP	YVYV	LD	DLFNEVE	CTACGCM	DLI	ITLNGEKDLS	KY	178																																								
ARABIDOPSIS THALIANA.TXT	FLVLDLDI	MS	ST	TRRGOPCVFRLPKVGM	A	NDG	LLRNH	PR	I	DKHIERCP	YVYV	LD	DLFNEVE	CTACGCM	DLI	ITLNGEKDLS	KY	178																																								
ARTEMISIA ANNUA.TXT	FLVLDLDI	MS	ST	TRRGOPCVFRLPKVGM	A	NDG	LLRNH	PR	I	DKHIERCP	YVYV	LD	DLFNEVE	CTACGCM	DLI	ITLNGEKDLS	KY	179																																								
CAPRICUM ANNUM.TXT	FLVLDLDI	MS	ST	TRRGOPCVFRLPKVGM	A	NDG	LLRNH	PR	I	DKHIERCP	YVYV	LD	DLFNEVE	CTACGCM	DLI	ITLNGEKDLS	KY	179																																								
CENTELLA ASIATICA.TXT	FLVLDLDI	MS	ST	TRRGOPCVFRLPKVGM	A	NDG	LLRNH	PR	I	DKHIERCP	YVYV	LD	DLFNEVE	CTACGCM	DLI	ITLNGEKDLS	KY	178																																								
Consensus	flvldldi nd s trrgqpcw	vgm a ndg llrn h ril hf k yvv l dlfneve qta gqndiitt	gekd l ky																																																							
ARALIA FLATA.TXT	ST	PI	TR	I	RY	Q	K	T	A	Y	S	F	L	P	A	C	A	L	L	M	S	G	G	D	L	E	K	H	T	267																												
MEDICAGO TRUNCATULA.TXT	ST	PI	TR	I	RY	Q	K	T	A	Y	S	F	L	P	A	C	A	L	L	M	S	G	G	D	L	E	K	H	T	251																												
NICOTIANA TABACUM.TXT	ST	PI	TR	I	RY	Q	K	T	A	Y	S	F	L	P	A	C	A	L	L	M	S	G	G	D	L	E	K	H	T	194																												
PANAX GINSENG.TXT	ST	PI	TR	I	RY	Q	K	T	A	Y	S	F	L	P	A	C	A	L	L	M	S	G	G	D	L	E	K	H	T	267																												
PANAX NOTOGINSENG.TXT	ST	PI	TR	I	RY	Q	K	T	A	Y	S	F	L	P	A	C	A	L	L	M	S	G	G	D	L	E	K	H	T	268																												
ARABIDOPSIS THALIANA.TXT	ST	PI	TR	I	RY	Q	K	T	A	Y	S	F	L	P	A	C	A	L	L	M	S	G	G	D	L	E	K	H	T	268																												
ARTEMISIA ANNUA.TXT	ST	PI	TR	I	RY	Q	K	T	A	Y	S	F	L	P	A	C	A	L	L	M	S	G	G	D	L	E	K	H	T	268																												
CAPRICUM ANNUM.TXT	ST	PI	TR	I	RY	Q	K	T	A	Y	S	F	L	P	A	C	A	L	L	M	S	G	G	D	L	E	K	H	T	267																												
CENTELLA ASIATICA.TXT	ST	PI	TR	I	RY	Q	K	T	A	Y	S	F	L	P	A	C	A	L	L	M	S	G	G	D	L	E	K	H	T	267																												
Consensus	l	h	r	i	v	q	y	k	t	a	y	s	f	l	p	a	c	a	l	l	m	s	g	g	d	l	e	k	h	t																												
ARALIA FLATA.TXT	NEEQKFL	HE	NY	G	K	D	P	A	S	V	A	K	V	E	L	N	T	L	K	L	D	V	E	A	E	S	K	S	D	K	L	I	K	L	I	E	A	H	P	S	K	A	V	A	V	L	K	S	F	L	G	K	I	Y	K	R	O	341
MEDICAGO TRUNCATULA.TXT	NEEQKFL	HE	NY	G	K	D	P	A	S	V	A	K	V	E	L	N	T	L	K	L	D	V	E	A	E	S	K	S	D	K	L	I	K	L	I	E	A	H	P	S	K	A	V	A	V	L	K	S	F	L	G	K	I	Y	K	R	O	251
NICOTIANA TABACUM.TXT	NEEQKFL	HE	NY	G	K	D	P	A	S	V	A	K	V	E	L	N	T	L	K	L	D	V	E	A	E	S	K	S	D	K	L	I	K	L	I	E	A	H	P	S	K	A	V	A	V	L	K	S	F	L	G	K	I	Y	K	R	O	234
PANAX GINSENG.TXT	NEEQKFL	HE	NY	G	K	D	P	A	S	V	A	K	V	E	L	N	T	L	K	L	D	V	E	A	E	S	K	S	D	K	L	I	K	L	I	E	A	H	P	S	K	A	V	A	V	L	K	S	F	L	G	K	I	Y	K	R	O	341
PANAX NOTOGINSENG.TXT	NEEQKFL	HE	NY	G	K	D	P	A	S	V	A	K	V	E	L	N	T	L	K	L	D	V	E	A	E	S	K	S	D	K	L	I	K	L	I	E	A	H	P	S	K	A	V	A	V	L	K	S	F	L	G	K	I	Y	K	R	O	342
ARABIDOPSIS THALIANA.TXT	NEEQKFL	HE	NY	G	K	D	P	A	S	V	A	K	V	E	L	N	T	L	K	L	D	V	E	A	E	S	K	S	D	K	L	I	K	L	I	E	A	H	P	S	K	A	V	A	V	L	K	S	F	L	G	K	I	Y	K	R	O	342
ARTEMISIA ANNUA.TXT	NEEQKFL	HE	NY	G	K	D	P	A	S	V	A	K	V	E	L	N	T	L	K	L	D	V	E	A	E	S	K	S	D	K	L	I	K	L	I	E	A	H	P	S	K	A	V	A	V	L	K	S	F	L	G	K	I	Y	K	R	O	342
CAPRICUM ANNUM.TXT	NEEQKFL	HE	NY	G	K	D	P	A	S	V	A	K	V	E	L	N	T	L	K	L	D	V	E	A	E	S	K	S	D	K	L	I	K	L	I	E	A	H	P	S	K	A	V	A	V	L	K	S	F	L	G	K	I	Y	K	R	O	342
CENTELLA ASIATICA.TXT	NEEQKFL	HE	NY	G	K	D	P	A	S	V	A	K	V	E	L	N	T	L	K	L	D	V	E	A	E	S	K	S	D	K	L	I	K	L	I	E	A	H	P	S	K	A	V	A	V	L	K	S	F	L	G	K	I	Y	K	R	O	341
Consensus	neeqkfl	he	ny	g	k	d	p	a	s	v	a	k	v	e	l	n	t	l	k	l	d	v	e	a	e	s	k	s	d	k	l	i	k	l	i	e	a	h	p	s	k	a	v	a	v	l	k	s	f	l	g	k	i	y	k	r	o	341

图 3 不同植物 *AeFPS* 氨基酸序列比较

Fig. 3 Comparison on amino acid sequences of *AeFPS* gene from different plants

2.2 龙牙櫟木原核表达载体的构建和阳性工程菌的获得

目的片段及 pET-28a 经过 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 纯化、连接, 构建重组表达载体。单克隆经 PCR 和酶切检测为 1 000 bp 左右, 测序后序列比对确定 *AeFPS* 克隆到载体 pET-28a 上。

AeFPS 成功连接到 pET-28a 后, 转化 BL21 感受态细胞, 卡那霉素筛选重组子, 质粒提取 PCR (图 4) 和酶切 (图 5) 验证确定该基因已成功转化 BL21 菌。

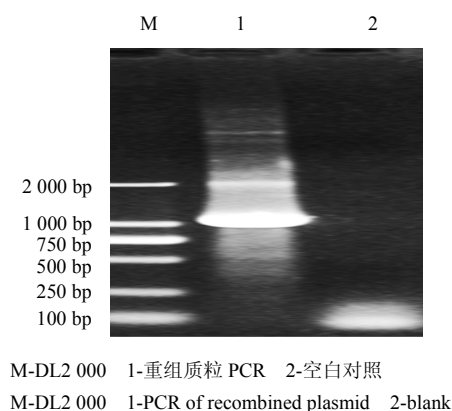


图 4 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification by PCR

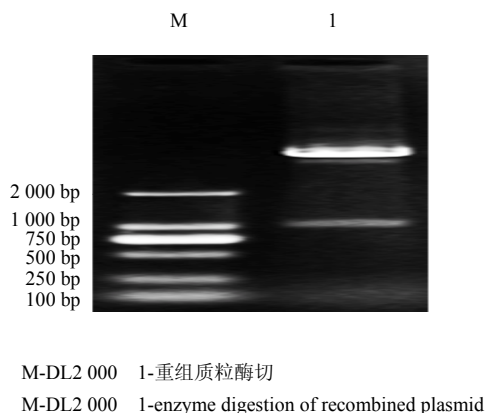


图 5 酶切鉴定

Fig. 5 Identification by enzyme digestion

2.3 目的基因的 SDS-PAGE 电泳

鉴定成功的阳性工程菌 BL21 同时划线选用菌落摇菌, 提取质粒 PCR 鉴定, 阳性菌液按菌液与培养基 1:100 比例扩播, 转化空载体 pET-28a 的 BL21 菌作为对照培养过程与阳性克隆同时进行。当 A_{600} 值处于 0.7~1.0 时, 分别从样品和对照中取出部分菌液作为未经 IPTG 诱导的对照, 剩余加入终浓度为 1.0 mmol/L IPTG, 诱导 5 h, 取各组菌液离心, 分离得上清和沉淀, 分别加入上样缓冲液煮

沸 10 min, 分别取 25 μ L 上样, SDS-PAGE 电泳结果显示上清和沉淀中均在 40 000 左右有明显的差异带 (图 6)。这与通过生物信息学软件预测的目的蛋白大小一致。

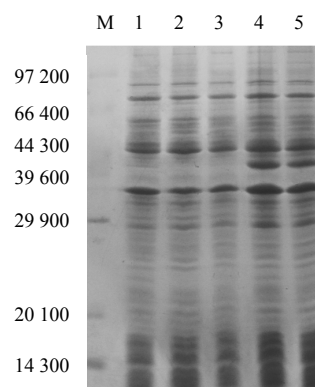


图 6 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 6 Electrophoretogram of SDS-PAGE

2.4 Western blotting 分析

为了进一步验证 SDS-PAGE 电泳结果, 进行了 Western blotting 分析。因 pET-28a 载体本身含有组氨酸标签, 因此不用做纯化蛋白而直接将表达目的蛋白提取产物 SDS-PAGE 电泳后, 采用电转方式将蛋白转移到 NC 膜上, 5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 用特异结合组氨酸标签的小鼠单克隆抗体 His-Tag (2A8) Mouse mAb 孵育 1~2 h, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗孵育 1~2 h, 沉淀型单组分 TMB 底物溶液反应, 可以看到明显的特异条带。证明 *AeFPS* 基因在工程菌 BL21 中成功表达。

3 讨论

龙牙櫟木的药理作用与人参相似, 有“适应原样作用”^[12], 所以研究龙牙櫟木三萜皂苷具有重要的意义。三萜皂苷的代谢合成途径目前已经明确为甲羟戊酸代谢途径^[3-6]。*AeFPS* 基因催化合成的法呢二磷酸 (FPP) 不但是倍半萜类化合物的前体, 同时也是三萜类化合物合成的分支点^[4]。*AeFPS* 基因在多种植物中克隆及功能研究已有报道, 本研究首次在龙牙櫟木中克隆到该基因, 为研究龙牙櫟木体

内三萜皂苷合成代谢途径奠定了理论基础。

龙牙楸木作为药食两用的木本植物,市场需求量大,生长缓慢且周期长,又因为环境污染、资源的不合理利用等原因,目前已不能满足市场需求。随着生物技术的发展,以体外实验来模拟体内条件生产生物体内的化学成分正是目前科学界的研究热点,采用生物技术缓解资源短缺问题,是中药现代化的目的之一。本研究把目的基因导入到原核细胞表达,由于原核生物生长周期短、繁殖快因此可快速表达蛋白,为下一步蛋白纯化以及生物功能分析奠定了基础。同时也为以后的植物体外实验提供了理论依据。然而原核细胞与真核细胞存在着差异,因此该研究只是一个起步,更加深入的机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1997.
- [2] 孙桂波, 李 锐, 周莉玲, 等. 龙牙楸木化学成分与药理作用的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(2): 139-141.
- [3] 邢朝斌, 王一曼, 陈正恒, 等. 三萜皂苷的生物合成 [J]. 生命的化学, 2005, 25(5): 420-422.
- [4] Young S K, Jung H C, Sangkyu P, *et al.* Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyljasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum* [J]. *Planta*, 2011, 233(2): 343-355.
- [5] 刘 强, 丛丽娜, 张宗申, 等. 植物甾醇与三萜类皂苷生物合成基因调控的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19): 4844-4846.
- [6] 赵云生, 万德光, 陈 新, 等. 五环三萜皂苷生物合成与调控的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 327-330.
- [7] Ting Y, Cao X Y, Qian M, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of an organ-specific expressing gene coding for farnesyl diphosphate synthase from *Michelia chapensis* Dandy [J]. *Acta Physiol Planta*, 2011, 33(1): 137-144.
- [8] Kim O T, Bang K H, Jung S J, *et al.* Molecular characterization of ginseng farnesyl diphosphate synthase gene and its up-regulation by methyl jasmonate [J]. *Biol Planta*, 2010, 54(1): 47-53.
- [9] 吴 琼, 周应群, 孙 超, 等. 人参皂苷生物合成和次生代谢工程 [J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(10): 102-108.
- [10] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plantmol Biol*, 1995, 46: 521-547.
- [11] 周 娟, 赵瑞强, 陈 莉, 等. 三七法呢基焦磷酸合酶原核表达载体的构建及其表达 [J]. 生物技术通报, 2009(9): 130-133.
- [12] 张淑慧, 陈 静, 赵智勇, 等. 龙牙楸木的研究概况 [J]. 黑龙江医药, 2001, 14(4): 291.