

• 药材与资源 •

阳春砂二酮辅酶 A 合成酶的基因克隆及序列分析

杨恩泽¹, 高 辉¹, 吴秋红¹, 王 峰^{1,2*}

1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632

2. 中药药效物质基础及创新药物研究广东省高校重点实验室, 广东 广州 510632

摘 要: 目的 对阳春砂姜黄素生物合成途径的关键酶二酮辅酶 A 合成酶(diketide CoA synthase, DCS)基因的编码 cDNA 序列进行克隆, 为研究阳春砂姜黄素生物合成与基因调控奠定基础。**方法** 结合阳春砂的转录组注释, 根据编码区序列设计引物, 通过 PCR 方法克隆阳春砂 DCS 基因的编码区 cDNA。**结果** PCR 扩增了一个长 1 170 bp 的基因片段, 该片段编码由 389 个氨基酸组成的 DCS。同源性比对结果显示基因编码蛋白与姜黄的 DCS 具有氨基酸一致性达 96%, 与水仙等植物的查耳酮合酶(chalcone synthase, CHS)氨基酸一致性达 66%~69%。进化树分析结果显示, 与姜黄 *Curcuma Longae* 具有较近的亲缘关系。**结论** 首次从阳春砂中克隆 DCS 基因获得其编码区序列, 为分析基因表达特性及其在姜黄素生物合成中的功能奠定基础。

关键词: 二酮辅酶 A 合成酶; 阳春砂; 基因克隆; 序列分析; 姜黄素

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)21-3037-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.018

Gene cloning and sequence analysis of diketide CoA synthase in *Amomum villosum*YANG En-ze¹, GAO Hui¹, WU Qiu-hong¹, WANG Feng^{1,2}

1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Objective To clone the full length cDNA encoding diketide CoA synthase (DCS) gene which plays an important role in curcumin biosynthesis pathway in *Amomum villosum*, and to provide the basis for the further studies on biosynthesis and gene regulation of curcumin. **Methods** According to the annotation of root transcriptome of *A. villosum*, primers were designed and cDNA of DCS gene was cloned from *A. villosum* by PCR. **Results** The complete coding sequence of DCS gene was 1 170 bp and it encoded a protein of 389 amino acids. The deduced DCS amino acid sequence exhibited 96% identity to the DCS of *Curcuma Longae* and 66%—69% identity to the chalcone synthase (CHS) of *Narcissus tazetta*. Phylogenetic analysis on the amino acid sequence of DCS with those of other plants showed that DCS was closely related to *Curcuma Longae*. **Conclusion** The DCS gene is cloned from *A. villosum* for the first time. This research lays a foundation for studying the gene expression pattern and regulatory functions of DCS in curcumin biosynthesis.

Key words: diketide CoA synthase (DCS); *Amomum villosum* Lour.; gene cloning; sequence analysis; curcumin

阳春砂仁为姜科豆蔻属植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的干燥成熟果实, 是广东省阳春市地道特产南药, 是我国四大南药之一。阳春砂的花、果、根、茎均可入药, 其中以果实为主。砂仁, 性辛、温, 入脾、肺、膀胱、大小肠。具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎之功效, 用于湿浊中阻、脘痞

不饥、脾胃虚寒、呕吐泄泻、胎动不安等症^[1-4]。阳春砂仁含有多种有机酸、单萜、黄酮、甾醇及苯丙素类等, 为新药研究提供大量资源^[5]。

二酮辅酶 A 合成酶(diketide-CoA synthase, DCS)属于植物类型 III 聚酮化合物合酶超家族(plant-specific type III polyketide synthases superfamily, type III

收稿日期: 2013-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30700704)

作者简介: 杨恩泽(1990—), 男, 硕士研究生, 从事生物制药研究。E-mail: 160714351@qq.com

*通信作者 王 峰, 博士, 副教授, 从事生物制药研究。E-mail: 24547680@qq.com

PKS)。DCS 用于催化丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA) 与阿魏酰辅酶 A (feruloyl-CoA) 或对香豆酰辅酶 A (*p*-coumaroyl-CoA) 缩合生成阿魏酰二酮辅酶 A 或对香豆酰二酮辅酶 A, 为姜黄素类化合物合成的中间产物。在聚酮化合物生物合成起始反应中行使着关键的作用, 决定着化合物基本分子骨架的建成和代谢途径中碳硫走向, 是植物聚酮化合物生物合成途径的关键酶和限速酶^[6-7]。

DCS 被发现与另一种姜黄素合酶 (curcumin synthase, CURS) 共同作用时可大大提高姜黄素的产量。而姜黄根粉末具有抗炎、抗氧化、抗癌作用, 口服用来治疗消化不良、胃胀气、肝脏和尿道疾病。这些药用特性依赖于姜黄素类化合物, 包括姜黄素、去甲氧基姜黄素、二去甲氧基姜黄素。目前已经从姜黄根中分离并克隆了 DCS 基因, 对阳春砂 DCS 基因的克隆未见文献报道^[8]。

本实验克隆了阳春砂 DCS 基因, 并通过生物信息学方法初步分析了酶的结构特点和功能, 这为进一步研究重组阳春砂 DCS 的体外活性以及后期的转基因研究和聚酮类化合物生物合成与基因调控奠定了基础。

1 材料

样品由本实验室栽培, 经中山大学周仁超副教授鉴定为阳春砂 *Amomum villosum* Lour.; PCR 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; *Ex Taq* 聚合酶、pMD-18T、cDNA Synthesis Kit 购自 Takara 公司; 抗生素购自鼎国公司; 引物合成于上海英骏公司; 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 引物设计

根据本实验室已获得的阳春砂转录组序列, 按照引物设计原则, 采用引物设计软件 Primer 6.0, 对阳春砂转录组序列中的 DCS 基因序列设计引物。正向引物: 5'-ATGGAAGTGAACGGCTACCGCATG-3', 反向引物: 5'-CTAGTTCAGTCTGCAACTATGGAGG-3'。

2.2 RNA 提取及反转录

阳春砂叶片 RNA 的提取采用改良后的 CTAB 法进行。总 RNA 的完整性和纯度通过 EB-琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白定量仪 (Bio-Rad) 检测。取 1 μ g 总 RNA, 以 Oligo (dT) 为引物, 按 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 说明操作, 反转录生成 cDNA。

2.3 PCR 扩增及克隆

PCR 反应体系为: 10 $\times$ 缓冲液 8 μ L, 10 mmol/L

dNTP 8 μ L, 20 μ mol/L 正向引物 2 μ L, 20 μ mol/L 反向引物 2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, *Ex Taq* 聚合酶 4 μ L, 加水至 80 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 进行 32 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 10 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析, 胶回收纯化后连接至 pMD-18T 载体, 并采用 CaCl_2 法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 的 LB 培养基平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。所得转化子用质粒小提试剂盒提取质粒 DNA, 重组子经质粒 PCR 鉴定后送交上海英骏公司测序。

2.4 DCS 序列生物信息学分析

分析测序结果, 推导开放读码框架 (open reading frame, ORF) 及编码蛋白的氨基酸序列, 利用 ProtParam、DAS TMfilter 和 ProtScale 进行编码蛋白的各种基本理化特性、跨膜结构域和疏水性分析, 利用 NCBI (www.ncbi.nih.gov) 的 BLAST 在线分析工具分别对 GenBank 的非冗余核酸数据库和非冗余蛋白数据库序列进行比对分析。采用 Clustalx 和 Phylip-3.69 进行序列多重比较及系统进化树构建。并用在线网站 Psipred 和 Phyre2 对该蛋白进行二级结构和三维结构预测。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 质量

取 2 μ L 提取的样品 RNA 用 RNase-free 水稀释 10 倍, 用蛋白核酸分析仪测定, $A_{260}/A_{280}=1.967$, 该比值接近于 2.0, 说明提取的 RNA 纯度较高。总 RNA 经电泳检测后可观察到清晰明亮的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带以及一些细胞器 rRNA 条带, 条带都无拖尾, RNA 提取效果较好。

3.2 DCS 基因的克隆

RT-PCR 扩增产物经电泳后呈现出 1 条长约 1.2 kb 左右的单一特异性片段 (图 1), 其长度与预期大小相符, 经过测序得到了阳春砂 DCS 基因的编码序列 (图 2)。测序结果已提交至 GenBank, 其登录号是 KF225598。

3.3 序列生物信息学分析

测序所得阳春砂 DCS 基因的编码基因长 1 170 bp, 其编码的 DCS 蛋白包含 389 个氨基酸残基, 相对分子质量 4.22×10^4 , 含量最丰富的氨基酸是 Leu, 占 12.05%, 含量最少的是氨基酸 Trp, 占 1.03%。理论等电点是 5.97。利用 SignalP 4.1 分析了阳春砂

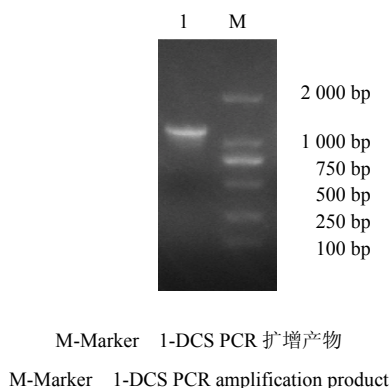


图 1 DCS 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of DCS gene

	M	E	V	N	G	Y	R	M	T	Q	S	A	D	G	P	A	T	I	L	A	I	G	T	A	N	P	T	N	V	V
1	ATG	GAA	GTG	AAC	GGC	TAC	CGC	ATG	ACT	CAG	AGC	GCC	GAC	GGG	CCG	GCG	ACG	ATA	TTG	GCT	ATT	GGC	ACG	GCC	AAC	CCC	ACC	AAC	GTC	GTA
	D	Q	N	A	C	P	D	F	Y	F	R	V	T	N	S	E	H	L	Q	E	L	K	A	K	F	R	R	I	C	E
91	GAT	CAG	AAC	GCT	TGT	CCC	GAT	TTC	TAC	TTC	CGG	GTC	ACC	AAT	TCG	GAG	CAT	CTG	CAG	GAA	CTC	AAA	GCC	AAG	TTT	AGG	CGC	ATC	TGT	GAG
	K	A	A	I	K	K	R	H	L	Y	L	T	E	E	I	L	R	E	N	P	S	L	L	A	P	M	A	P	S	F
181	AAA	GCG	GCC	ATC	AAG	AAG	AGG	CAC	TTG	TAC	TTG	ACG	GAG	GAG	ATT	TTG	CGG	GAG	AAC	CCT	AGC	TTG	CTG	GCC	CCC	ATG	GCG	CCC	TCG	TTC
	D	A	R	Q	A	I	V	V	E	A	V	P	K	L	A	K	E	A	A	E	K	A	I	K	E	W	G	R	P	K
271	GAT	GCG	CGG	CAG	GCG	ATC	GTG	GTG	GAG	GCG	GTG	CCG	AAG	CTG	GCG	AAG	GAG	GCG	GCG	GAG	AAG	GCG	ATC	AAG	GAG	TGG	GGC	CGC	CCC	AAA
	S	D	I	T	H	L	V	F	C	S	A	S	G	I	D	M	P	G	S	D	L	Q	L	L	K	L	L	G	L	P
361	TCG	GAC	ATC	ACG	CAC	CTC	GTC	TTC	TGC	TCC	GCG	AGC	GGA	ATC	GAC	ATG	CCC	GGC	TCC	GAC	CTG	CAG	CTC	CTG	AAG	CTG	CTC	GGG	CTC	CCG
	L	C	V	N	R	V	M	L	Y	N	V	G	C	H	A	G	G	T	V	L	R	V	A	K	D	L	A	E	N	N
451	CTG	TGC	GTC	AAT	CGC	GTC	ATG	CTC	TAC	AAC	GTC	GGG	TGC	CAC	GCC	GGC	GGC	ACC	GTC	CTC	CGC	GTC	GCC	AAG	GAC	CTC	GCG	GAG	AAC	AAC
	R	G	A	R	V	L	A	V	C	S	E	V	T	V	L	S	Y	R	G	P	H	P	A	H	I	E	S	L	F	V
541	CGC	GGC	GCG	CGG	GTG	TTG	GCC	GTC	TGC	TCC	GAG	GTC	ACC	GTG	CTC	TCC	TAC	CGC	GGC	CCG	CAC	CCC	GCC	CAC	ATC	GAG	AGC	CTC	TTC	GTG
	Q	A	L	F	G	D	G	A	A	A	L	V	I	G	S	D	P	V	D	G	V	E	R	P	I	F	E	I	A	S
631	CAG	GCG	CTG	TTT	GGC	GAC	GCG	GCC	GCG	CTC	GTG	ATC	GAT	TCC	GAC	CCC	GTC	GAT	GGC	GTC	GAG	CGC	CCC	ATC	TTC	GAA	ATC	GCC	TCG	
	A	S	Q	V	M	L	P	E	S	E	E	A	V	G	G	H	L	R	E	I	G	L	T	F	H	L	K	S	Q	L
721	GCA	TCC	CAG	GTG	ATG	CTT	CCG	GAG	AGC	GAA	GAG	GCG	GTG	GGC	GGC	CAC	CTC	CGC	GAA	ATT	GGC	CTG	ACC	TTC	CAC	CTC	AAG	AGC	CAG	CTT
	P	S	I	I	A	S	N	I	E	Q	G	L	T	T	A	C	S	P	L	G	L	S	D	W	N	Q	L	F	W	A
811	CCG	TCG	ATC	ATC	GCG	AGC	AAC	ATC	GAG	CAG	GGC	CTC	ACG	ACG	GCG	TGC	TCG	CCG	CTG	GGA	TTG	TCG	GAC	TGG	AAC	CAG	CTG	TTC	TGG	GCG
	V	H	P	G	G	R	A	I	L	D	Q	V	E	A	R	L	A	L	E	K	D	R	L	A	A	T	R	H	V	L
901	GTT	CAC	CCG	GCG	GCG	CGG	GCG	ATC	CTG	GAC	CAG	GTG	GAG	GCG	CGG	CTC	GCG	CTG	GAG	AAG	GAC	CGG	CTC	GCC	GCG	ACG	CGG	CAC	GTA	CTC
	S	E	Y	G	N	M	Q	S	A	T	V	L	F	I	L	D	E	M	R	K	R	S	A	A	E	G	H	S	T	T
991	AGC	GAG	TAC	GGC	AAC	ATG	CAG	AGC	GCC	ACG	GTG	CTG	TTC	ATC	CTG	GAC	GAG	ATG	CGG	AAA	CGC	GCT	GCG	GAA	GGC	CAC	TCC	ACC	ACC	
	G	E	G	L	D	W	G	V	L	L	G	F	G	P	G	L	S	I	E	T	V	V	L	H	S	C	R	L	N	*
1 081	GGC	GAG	GGG	CTC	GAC	TGG	GCG	GTG	CTC	TTG	GCG	TTC	GGC	CCG	GGA	CTT	TCC	ATC	GAG	ACC	GTC	GTC	CTC	CAT	AGT	TGC	AGA	CTG	AAC	TAG

图 2 DCS 基因的编码区序列和氨基酸序列

Fig. 2 Coding sequence and amino acid sequence of DCS gene

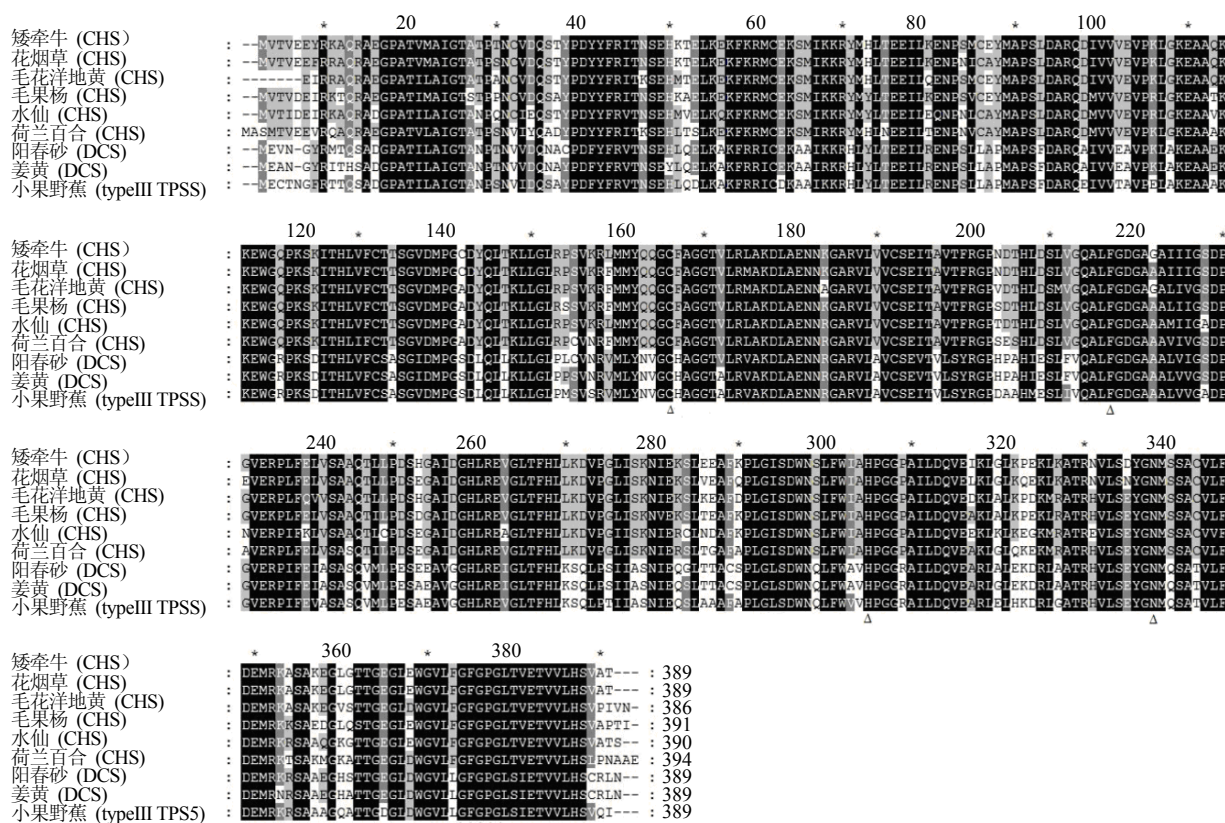
用 ClustalX 程序对 DCS 的氨基酸序列与姜黄 *Curcuma longa* L. 的 DCS 氨基酸序列, 小果野蕉 *Musa acuminata* 的植物类型三聚酮合酶 5 (type III PKS5) 氨基酸序列, 毛果杨 *Populus trichocarpa*、荷兰百合 *Lilium hybrid*、矮牵牛 *Petunia hybrida*、中国水仙 *Narcissus tazetta* var. *chinensis*、毛花洋地黄 *Digitalis lanata*、花烟草 *Nicotiana glauca* 的查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 氨基酸序列进行多序列对比。结果表明 (图 3): DCS 与姜黄 DCS 有 96% 的同源性, 与小果野蕉 type III PKS5 有 88% 的同源性, 与各类植物的 CHS 有 67%~69% 的同源性。DCS 拥有催化三联体 Cys163、His302、Asn335 和其他关键活性位点残基

DCS 的信号肽序列, 结果表明阳春砂 DCS 氨基酸序列无信号肽, 由此推测 DCS 基因在游离核糖体上起始合成后, 可能不进行蛋白转运, 而是保留在细胞质基质中直接催化二酮辅酶 A 的合成。用 DASTMfilter 在线工具对氨基酸序列的跨膜结构域进行预测, 结果表明 DCS 不存在跨膜结构域。进一步证明, DCS 在细胞质基质中合成后, 不经蛋白转运, 直接锚定于细胞质基质中的特定部位行使催化功能。用 ProtScale 在线工具分析, DCS 疏水性最强为 130 位 Ser (1.956), 亲水性最强为 118 位 Arg (-2.556)。整条多肽链表现为疏水性, 但没有明显的疏水区域。

Phe214, 以及植物类型三聚酮合酶的标签序列 GFPGP^[9-10]。

为了进一步研究 DCS 与其他植物同源基因的亲缘关系, 用 Phylip-3.69 软件采用邻接距离法 (Neighbour-joining, NJ) 构建系统发生进化树 (图 4), 可以看出 DCS 与姜黄 *C. longa*、小果野蕉 *M. acuminata* 亲缘关系较近。

运用 Psipred 在线工具预测阳春砂 DCS 蛋白的二级结构, 表明该蛋白含有 12 个 α 螺旋 (alpha helix), 占 39.59%; 12 个延伸链 (extended strand), 占 16.45%; 87 个无规则蜷曲 (random coil), 占 43.96%。利用 Phyre2 提交 DCS 蛋白序列, 在蛋白质结构库中搜寻模板, 最终 DCS 与苜蓿的 CHS



△-表示活性位点 ▲-表示标签序列
 △-indicates active site ▲-indicates tag sequence

图3 不同物种DCS同源氨基酸序列对比

Fig. 3 Comparison on homologous amino acid sequences of DCS for *A. villosum* and other species

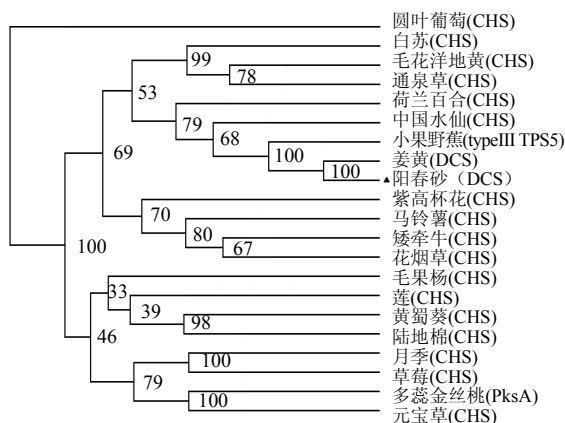


图4 不同物种DCS系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on DCS sequences from different species

蛋白晶体结构 (c1cm1A) 序列一致性达到 64%, 以 c1cm1A 为模板预测了 DCS 的三维模型 (图 5), 可见催化三连体 Cys163、His302、Asn335 围成一个空穴结构, 反应在这个空穴中催化进行。

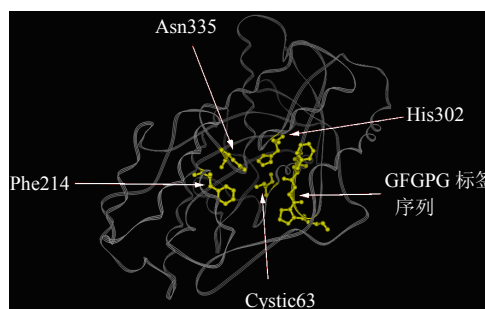


图5 DCS的三维模型

Fig. 5 3D model of DCS

4 讨论

DCS 用于合成具有二酮骨架结构的中间产物, 在姜黄素合成过程中先于 CURS 反应, 为 CURS 催化提供底物, 与 CURS 共同作用可大大提高姜黄素合成效率。由此可见 DCS 是植物聚酮化合物合成的关键酶, 在姜黄素合成过程中发挥极其重要的作用。随着植物 DCS 基因的分离和克隆, 利用酶表达进行相关药用活性物质的体外合成或改变作物及中药品

质成为可能。

生物信息学的迅速发展为功能基因组学的研究提供了更加便利的研究手段,利用生物信息学方法对克隆的基因进行功能预测能起到事半功倍的效果。目前,基于生物学试验数据与计算技术相结合交叉学科已逐渐成为后基因组时代的重要方法和前沿领域,也是当今生物学发展的必然潮流^[1]。本实验利用生物信息学方法对阳春砂 DCS 蛋白序列进行同源序列比对、分析,并构建进化树,对其结构和功能进行了预测。有助于揭示基因和物种的起源与进化,发现 DCS 蛋白功能,利于进一步利用相应的试验手段研究植物 DCS 的理化性质和分子生物学性质,以及聚酮化合物合成路径。同源性分析有助于发现新的 DCS 基因。而蛋白定位和功能结构域的推断,针对特定性状遗传改良的基因工程和代谢工程操作,将 DCS 基因进行克隆对于提高中药活性成分的量或作物品质具有十分重要的作用。

本研究首次从阳春砂中分离克隆 DCS 基因,该基因在蛋白质水平上与姜黄 DCS 具有 96%相似性,推测阳春砂 DCS 可能与姜黄 DCS 具有相同或相似的生物学功能。为后期的实验研究提供了理论参考,并为姜黄素的生物合成和调控奠定基础。

参考文献

- [1] 林伟强. 砂仁的研究与应用 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2008, 6(4): 391-392.
- [2] 尤小梅, 李远志, 廖有传, 等. 春砂仁根和叶提取物抗氧化活性研究 [J]. 食品科技, 2012(2): 226-228.

- [3] 朱金照, 冷恩仁, 陈东风, 等. 砂仁对大鼠胃肠运动及神经递质的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(4): 205-207.
- [4] Yang J, Adhikari M N, Liu H, *et al.* Characterization and functional analysis of the genes encoding 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase and 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase, the two enzymes in the MEP pathway, from *Amomum villosum* Lour. [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(8): 8287-8296.
- [5] 付琛, 陈程, 周光雄, 等. 阳春砂仁化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2410-2412.
- [6] 吕鹤书, 柳春梅, 路平, 等. 植物类型 III 聚酮合酶超家族晶体结构与功能 [J]. 生物工程学报, 2012, 28(1): 1-14.
- [7] Katsuyama Y, Miyazono K, Tanokura M, *et al.* Structural and biochemical elucidation of mechanism for decarboxylative condensation of β -keto acid by curcumin synthase [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(8): 6659-6668.
- [8] Katsuyama Y, Kita T, Funa N, *et al.* Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa* [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(17): 11160-11170.
- [9] 李成磊, 张晓伟, 吴琦, 等. 甜莽查尔酮合酶基因 Chs 的克隆及序列分析 [J]. 广西植物, 2011, 31(3): 383-387.
- [10] Morita H, Wanibuchi K, Nii H, *et al.* Structural basis for the one-pot formation of the diarylheptanoid scaffold by curcuminoid synthase from *Oryza sativa* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2010, 107(46): 19778-19783.
- [11] 张弢. 不同植物查尔酮合成酶 CHS 基因的生物信息学分析 [J]. 江西农业学报, 2012, 24(6): 5-8.