

## · 药材与资源 ·

金铁锁  $\beta$ -香树素合酶 cDNA 的克隆、原核表达和功能鉴定刘家佳<sup>1</sup>, 谢 晖<sup>2</sup>, 陈海丰<sup>3</sup>, 钱子刚<sup>3\*</sup>

1. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650031

2. 复旦大学药学院, 上海 201203

3. 云南中医学院中药学院, 云南 昆明 650500

**摘要:**目的 克隆金铁锁 *Psammosilene tunicoides* 三萜皂苷生物合成途径中的关键酶基因—— $\beta$ -香树素合酶全长 cDNA, 并对其表达和分析, 为研究其在三萜皂苷合成途径的关键作用及次生代谢产物工程技术在金铁锁上的应用奠定基础。方法 应用 RT-PCR 和 RACE 等方法, 克隆金铁锁  $\beta$ -香树素合酶基因全长, 将目的片段转化大肠杆菌表达菌株 BL21 中, IPTG 诱导表达, 以 2, 3-氧化鲨烯为底物进行体外酶促, 采用 HPLC 法鉴定产物。结果 克隆得到金铁锁  $\beta$ -香树素合酶基因, 全长 2 882 bp, ORF 长 2 284 bp, 编码 760 个氨基酸。表达产物具有催化 2, 3-氧化鲨烯生成  $\beta$ -香树素合酶的活性。结论 克隆所得的全长 cDNA 通过大肠杆菌表达  $\beta$ -香树素合酶, 并能催化 2, 3-氧化鲨烯生成  $\beta$ -香树素, 为金铁锁次生代谢工程研究提供了重要的基础。

**关键词:** 金铁锁; 三萜化合物;  $\beta$ -香树素合酶; 基因克隆; 原核表达

**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)10-1456-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.10.019

## Cloning, prokaryotic expression, and functional identification of $\beta$ -amyrin synthase cDNA of *Psammosilene tunicoides*

LIU Jia-jia<sup>1</sup>, XIE Hui<sup>2</sup>, CHEN Hai-feng<sup>3</sup>, QIAN Zi-gang<sup>3</sup>

1. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650031, China

2. College of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

3. College of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

**Abstract: Objective** To clone, express, and characterize the full-length cDNA of  $\beta$ -amyrin synthase provided an important basis for the study on the key role in the biosynthetic pathway of triterpenoid saponins and secondary metabolism engineering applied to *Psammosilene tunicoides*. **Methods** The full-length cDNA fragment of *P. tunicoides* was isolated by the method of RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The fragment was transformed into *Escherichia coli* expression strain BL21, which was induced by IPTG and the crude recombinant enzyme was purified from *E. coli* cell. In the presence of 2, 3-oxidosqualene and other substances, 2, 3-oxidosqualene was converted into  $\beta$ -amyrin efficiently. The catalytic product of *P. tunicoides*  $\beta$ -amyrin synthase was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) and identified as  $\beta$ -amyrin. **Results** The full-length cDNA fragment of *P. tunicoides* is 2 882 bp and contains an open reading frame of 2 284 bp nucleotides, which codes for 760 amino acids. **Conclusion** The full-length cDNA can produce  $\beta$ -amyrin synthase by prokaryotic expression. The expression product has the catalytic activity of 2, 3-oxidosqualene into  $\beta$ -amyrin, which would provide an important basis for the secondary metabolism engineering to *P. tunicoides*.

**Key words:** *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu; triterpenoids;  $\beta$ -amyrin synthase; gene cloning; prokaryotic expression

金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu 是石竹科单种属金铁锁属植物, 分布于云南、贵州、四川和西藏等省, 主产于云南西北部、中部

和东北部。金铁锁被列为国家二级保护植物, 是“云南白药”的主要组成药材之一, 主要以根入药, 具有散瘀定痛、止血、消痈排脓的功效, 用于跌打损

收稿日期: 2013-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30960501)

作者简介: 刘家佳 (1986—) 女, 云南昆明人, 博士, 研究方向为药用植物生物技术。Tel: 13888355857 E-mail: 441603928@qq.com

\*通信作者 钱子刚 Tel: (0871)5918215 E-mail: qianzig@aliyun.com

伤、风湿痛、胃痛、创伤出血等的治疗<sup>[1]</sup>。长期以来,金铁锁完全靠野外采挖,加之自然生长缓慢,因而野生资源迅速减少,自然产量大幅降低。金铁锁资源已经不能满足“云南白药”等中成药的需求。但金铁锁皂苷结构复杂,人工合成困难,天然资源来源限制,欲从分子生物方面着手对此类化合物的主要合成途径进行研究。金铁锁的主要有效成分为金铁锁皂苷(主要为三萜皂苷元),具有抗炎和镇痛等重要药理活性<sup>[2]</sup>。三萜皂苷(triterpenoid saponins)是一类重要的植物次生代谢产物,广泛分布于植物界中,有抗菌和抗虫害的作用,可用作药物,具有重要的商业价值。 $\beta$ -香树素合酶是三萜皂苷合成中关键酶,2,3-氧化鲨烯经过2,3-氧化鲨烯环化酶(OSC)的环化作用得到三萜类骨架,然后在 $\beta$ -香树素合酶作用下得到 $\beta$ -香树素,再经过一系列酶的催化,包括细胞色素P450、酰基转移酶以及糖苷转移酶等生物转化最后得到极具药用价值的五环三萜皂苷<sup>[3]</sup>。本课题组将对 $\beta$ -香树素合酶的cDNA进行相关研究,阐明其在三萜皂苷合成途径中的关键步骤中的作用。为次生代谢产物工程技术在金铁锁上的应用奠定基础,对三萜皂苷的生物合成机制探究有重要意义。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料

样品采自西藏林芝,批号为20060822,由云南中医药大学钱子刚教授鉴定为石竹科金铁锁属植物金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu 的根。

### 1.2 试剂

试剂 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA ampification kit (Clontech 公司), LA Taq (TaKaRa 公司), Plasmid mini kit II (Biomiga 公司), bacterial protein extraction kit (Bio Basic 公司), NucleoTrap Gel Extraction Kit (Clontech 公司), pMD18-T Vector (TaKaRa 公司), pMD20-T Vector (TaKaRa), pEASY<sup>TM</sup>-E1 Expression Kit (TransGen Biotech 公司), Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell (TransGen Biotech 公司), BL21 (DE3) plysS Chemically Competent Cell (TransGen Biotech 公司), IPTG (TransGen Biotech 公司), 2,3-氧化鲨烯(95%, Sigma 公司)及常用分子生物学试剂,硅胶G板(青岛海洋化工有限公司)及其他生化试剂和分析纯试剂。

## 2 金铁锁 $\beta$ -香树素合酶基因的获得

### 2.1 总RNA的提取

采用 Trizol 法提取金铁锁根的总 RNA。

### 2.2 RACE-ready first-strand cDNA 的合成

提取的总 RNA 样品 1  $\mu$ g, 按照 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA ampification kit 说明书进行合成,产物加 100  $\mu$ L Tricine-EDTA 缓冲液稀释, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 2.3 5'-和 3'-RACE

以已得到的  $\beta$ -AS 核心基因片段为模板, Primer5.0 设计 5'-和 3'-RACE 反应引物, PBSS5: 5'-CTTCAACC-CAACAAGCCAACATACAC-3' 和 PBSS3: 5'-GGAAG-AGGTTTCGTTGGTCCGATTAC-3', 按照 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA ampification kit 说明书, PCR 条件为 94  $^{\circ}$ C、30 s, 72  $^{\circ}$ C、3 min, 5 个循环; 94  $^{\circ}$ C、30 s, 70  $^{\circ}$ C、30 s, 72  $^{\circ}$ C、3 min, 5 个循环; 94  $^{\circ}$ C、30 s, 68 s, 72  $^{\circ}$ C、3 min, 305 个循环; 4  $^{\circ}$ C 终止。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 并切胶回收后插入 pMD18-T Vector, 转入 Trans1-T1 感受态中, 菌株在含 80  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选, PCR 验证为阳性克隆的菌落测序。最后菌株 -80  $^{\circ}$ C 保种。

### 2.4 全长 $\beta$ -AS cDNA 的获得

用 BioEdit 软件拼接出全长序列, 用 Primer 5.0 设计扩增全长  $\beta$ -AS cDNA 的 PCR 引物, B1-1: 5'-ATTAGTATTAGTTGTAGCAC-3' 和 B1-2: 5'-AC-TTTCATTATTTGGACGT-3', 用 5'-RACE-ready first-strand cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 条件为 94  $^{\circ}$ C, 3 min; 94  $^{\circ}$ C, 30 s; 38  $^{\circ}$ C, 30 s; 72  $^{\circ}$ C, 3 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C, 10 min; 4  $^{\circ}$ C 终止。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 并切胶回收后插入 pMD20-T Vector, 转入 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 中, 菌株在含 80  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选, PCR 验证为阳性单克隆的菌落测序并 -80  $^{\circ}$ C 保种。

### 2.5 表达载体的构建

将全长  $\beta$ -AS 基因切胶产物插入 pEASY<sup>TM</sup>-E1 Expression Vector, 获得 p $\beta$ -AS-vector, 转入 Trans1-T1 感受态中, 菌株在含有 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选, PCR 验证为阳性单克隆的菌落测序并 -80  $^{\circ}$ C 保种。阳性单克隆菌株抽取质粒, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 2.6 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导原核表达和粗蛋白的提取

将 pEASY<sup>TM</sup>-E1 Expression Vector (空载体) 和 p $\beta$ -AS-vector 分别转入表达菌株 BL21 (DE3) plysS 中, 挑取经 PCR 验证的阳性单克隆菌株转入 50 mL 含有 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37

℃振荡培养至  $A_{600}=0.3\sim 0.5$ , 加入 100 mmol/L 的 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 32 ℃继续培养 3.5 h, 离心收集表达菌体, -80 ℃保存。粗蛋白的提取按照 Bacterial Protein Extraction Kit 说明书操作。提取的粗蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析, 将含有目的蛋白的提取液过 Sephadex G-25 小柱, 采用 Bradford 法测定蛋白量。

### 2.7 表达产物的功能鉴定

参照金铁锁鲨烯合酶体外酶促反应体系<sup>[4-5]</sup>, 取经  $Ni^{2+}$  琼脂糖柱纯化的重组鲨烯合酶蛋白 10  $\mu\text{g}$ , 以 2, 3-氧化鲨烯为底物, 进行体外酶促反应, 反应体系为 3 mmol/L NADPHNa<sub>4</sub>, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L DTT, 2% glycerin; 500  $\mu\text{g/L}$  酶液; 40  $\mu\text{g/L}$  FPP, 上覆 1 倍体积正己烷, 32 ℃ 10 h, 10 000 $\times g$  离心, 取上层有机相, 分别进行 TLC 及 HPLC。TLC 分析条件: 环己烷-醋酸乙酯 4:1; HPLC 分析条件: 色谱柱为 ODS 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 柱温 30 ℃; 流动相为甲醇-水 (75:25); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 210 nm; 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

## 3 结果与分析

### 3.1 总 RNA 的质量

琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA, 结果见图 1, 18 S 与 28 S 的比约为 1:2, 点样孔周围无污染。

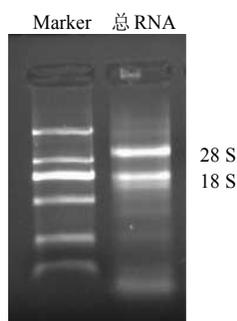


图 1 金铁锁总 RNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA in *P. tunicoides*

### 3.2 5'-和 3'-RACE

5'-RACE 片段约为 1 600 bp, 3'-RACE 片段约为 1 700 bp (图 2)。

### 3.3 全长 $\beta$ -AS cDNA 的合成

将 5'-RACE 和 3'-RACE 片段进行拼接后设计引物扩增后得到约为 2 700 bp 的全长  $\beta$ -AS cDNA 片段 (图 3)。测序后并对序列进行分析得到,  $\beta$ -AS cDNA 全长 2 882 bp, ORF 长 2 284 bp, 编码 760

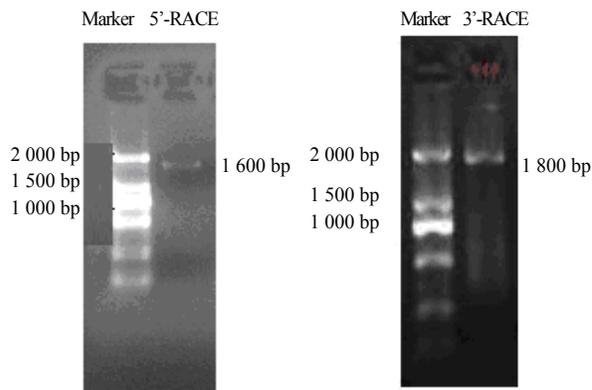


图 2 5'-RACE 和 3'-RACE 电泳检测

Fig. 2 Electrophoresis of 5'-RACE and 3'-RACE

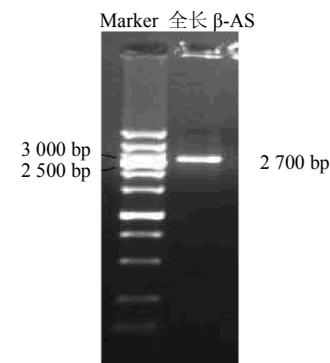


图 3 全长  $\beta$ -AS cDNA PCR 电泳检测

Fig. 3 Electrophoresis of full-length  $\beta$ -AS cDNA PCR

个氨基酸。经 EditSeq 软件分析得到蛋白质相对分子质量为 87 454.75, 等电点为 6.178。  $\beta$ -AS cDNA 全长与王不留行 *Vaccaria hispanica* (Neck.) Garcke 同源率为 87%; 与天南星 *Gypsophila paniculata* Blume 同源率为 88%; 与光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 同源率为 75%, 与人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 同源率为 70%, 与三七 *Panax notoginseng* Wall. var. *notoginseng* (Burkill) Hoo et Tseng 同源率为 70%。

### 3.4 表达载体的构建

首先将已得到的全长 cDNA 与 pEASY<sup>TM</sup>-E1 Vector 进行连接, 得到有目的 DNA 片段、具有 Amp 抗性、带 T7 启动子、His 标签的 pEASY<sup>TM</sup>-E1 Vector 融合表达载体质粒 p $\beta$ -AS-vector, 然后转入 Trans1-T1 感受态细胞, 经过 Amp 筛选的单克隆进行 PCR 验证为阳性克隆 (图 4)。将阳性克隆的重组质粒 p $\beta$ -AS-vector 抽提后 (图 5) 成功转入表达菌株 BL21 (DE3) plysS (图 6) 中, 经 Amp 筛选的阳性克隆经引物 T7 promoter primer 和目的基因反向引物 B1-2 进行 PCR 验证出正确表达方向的阳

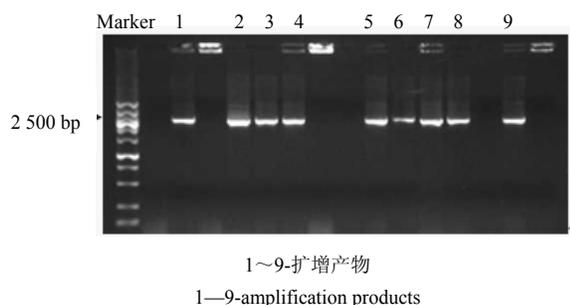


图4 pβ-AS-vector 转 Trans1-T1 阳性单克隆 PCR 鉴定  
Fig. 4 PCR of positive clone by transferring pβ-AS-vector into Trans1-T1

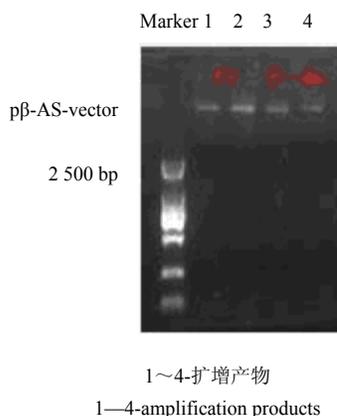


图5 pβ-AS-vector 质粒抽提  
Fig. 5 Extraction of pβ-AS-vector plasmid

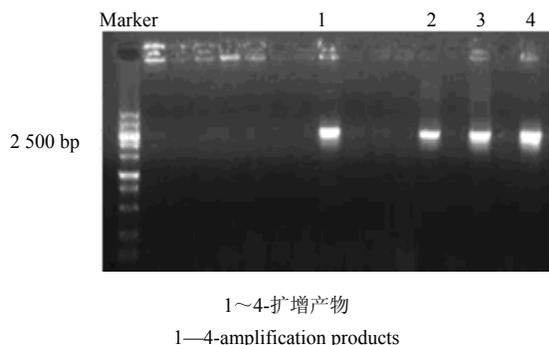


图6 pβ-AS-vector 转入表达菌株 BL21 (DE3) plysS 阳性克隆 PCR 鉴定  
Fig. 6 PCR of positive clone by transferring pβ-AS-vector into BL21 (DE3) plysS

性重组子, 用该阳性重组子进行蛋白表达。

### 3.5 IPTG 诱导原核表达

用 pEASY-E1 Vector 空载体, 转入 B21 (DE3) 作为对照, 装有 pβ-AS-vector 并具有正确表达方向的阳性重组菌株记作 β-1, 含有 pEASY-E1 Vector 空载体的 B21(DE3) 不表达蛋白, 含有 pβ-AS-vector 的阳性重组菌株在 IPTG 的诱导下表达出相应的蛋白, 大小为 87 000 左右。因此, β-香树素 synthase

在大肠杆菌中成功表达。经提取纯化的粗蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析 (图 7), 大小为 87 000 左右, 与预测结果一致。

### 3.6 全长 β-AS cDNA 的功能鉴定

3.6.1 TLC 分析<sup>[6-7]</sup> 经环己烷-醋酸乙酯 (4:1) 展开, 10% 的硫酸乙醇显色, 分析结果表明, 样品和对照品在同一位置显相同斑点且样品和对照品斑点重合, 表明样品中含有 β-amyrin (图 8)。

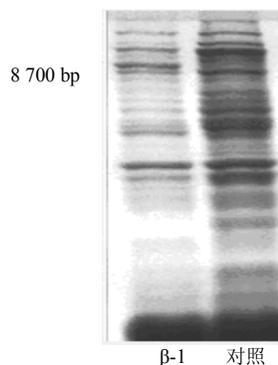
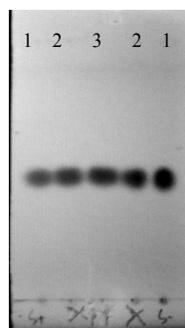


图7 表达蛋白的 SDS-PAGE 结果  
Fig. 7 SDS-PAGE of protein expression



1-β-香树素合成酶催化产物样品 2-样品与 β-amyrin 对照品混合物  
3-β-amyrin  
1-catalytic products of β-amyrin synthase 2-mixture of samples and β-amyrin reference substance 3-β-amyrin

图8 β-香树素合成酶催化产物的 TLC 分析  
Fig. 8 TLC analysis of catalytic products of β-amyrin synthase

3.6.2 产物的 HPLC 分析<sup>[8-9]</sup> 以甲醇-水 (75:25) 为流动相, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μL。结果分析表明, 在 210 nm, 保留时间为 3.5 min 处催化产物样品色谱图出现与 β-香树素相应的特征峰, 所以该样品含有 β-香树素。因此, 所得的全长 cDNA 可表达出催化 2, 3-氧化鲨烯生成 β-香树素的蛋白酶。

### 4 讨论

本研究中, 本课题组选择用金铁锁根提取总

RNA, 是因为金铁锁的药用部位是根部, 且有效成分在根部质量分数较高, 这样能更好地保证得到所要研究的基因片段。对金铁锁  $\beta$ -香树素合成酶基因序列进行分析显示, 该序列与本项目组前期所得金铁锁  $\beta$ -香树素合成酶基因核心片段序列的同源性为 99% (GenBank: EF533703.1), 证明其为金铁锁  $\beta$ -香树素合成酶基因。

在  $\beta$ -香树素合成酶基因的原核表达中, 本课题组选用根据融合表达载体改进的 pEASY Expression Vector, 并且高表达的 BL (DE3) plysS 菌株对其进行表达, 因为在对 BL (DE3) 和 BL (DE3) plysS 两种菌株进行筛选时发现, pEASY Expression Vector 对 BL (DE3) plysS 转化率高, 得到了可溶并完整的  $\beta$ -香树素合成酶蛋白, 通过  $\beta$ -香树素合成酶催化产物的 TLC、HPLC 分析, 表达产物具有催化 2, 3-氧化鲨烯得到  $\beta$ -香树素的活性。并且 BL21 (DE3) plys 的 T7 RNA 聚合酶基因能防止表达的融合蛋白质分解<sup>[10]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 王学勇, 邱德文, 蒋朝晖. 苗族药物金铁锁研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(11): 77-82.
- [2] 金虹, 谭克勤. 西南民族药金铁锁的研究现状及展

望 [J]. 中医药导报, 2005, 11(12): 66-67.

- [3] 刘强, 丛丽娜, 张宗申. 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.
- [4] 戴住波, 钱子刚, 胡运乾, 等. 金铁锁鲨烯合酶 cDNA 的克隆和功能鉴定 [J]. 药学学报, 2008, 43(12): 1245-1250.
- [5] Nakashim A T, Inoue T. Cloning, expression, and characterization of cDNA encoding *A. thaliana* squalene synthase [J]. *PNAS*, 1995, 92: 2328-2332.
- [6] Tetsuo K, Masaaki S, Yutaka E.  $\beta$ -Amyrin synthase cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 256: 238-244.
- [7] 周超, 孙伟, 宋刚. 人参北芪片主要成分的鉴别 [J]. 中国药业, 2008, 10(17): 34.
- [8] 郭杰, 徐嵬, 杨秀伟. 娑罗子中三萜皂苷成分的 HPLC 定量分析 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 767-770.
- [9] 秦学玲, 杨崇仁, 杨庆雄, 等. 金铁锁中 3-O-6'-甲基- $\beta$ -D 葡萄糖醛酸丝石竹苷的含量测定 [J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(6): 516-518.
- [10] Jennifer G, John J D. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification [J]. *J Bacteriol*, 1988, 170: 1245-1253.