

红花 2-甲基-6-叶绿基-1,4-苯醌甲基转移酶基因的克隆及表达分析

代斯宁¹, 王文玲³, 韩怡来¹, 齐冬梅¹, 顾天瑶¹, 崔琪¹, 官丽莉^{1,2*}, 李海燕^{1,2}, 李校堃^{2*}

1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

3. 吉林中粮生化有限公司, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 克隆红花维生素 E 合成相关关键酶 2-甲基-6-叶绿基-1,4-苯醌甲基转移酶 (MPBQ MT) 基因, 并进行生物信息学及表达分析, 为红花维生素 E 生物合成及调控机制研究奠定基础。方法 根据红花种子转录组数据库中的中间序列, 采用 RT-PCR 和 RACE 方法从红花种子中克隆 MPBQ MT 基因序列, 通过生物信息学对该基因蛋白的特征进行分析, 构建 MPBQ MT 与相关物种 MPBQ MT 的系统进化树, 利用 RT-PCR 方法分析在红花种子不同发育时期 MPBQ MT 基因的表达量。结果 MPBQ MT 基因全长 1 392 bp, 命名为 CtMPBQ MT, 具有完整的开放阅读框 (ORF), 共 1 038 bp, 编码 345 个氨基酸。生物信息学分析显示, 该基因编码的蛋白理论相对分子质量约为 38 900。保守结构域预测表明, 该基因编码的蛋白具有典型的 SAM 蛋白功能结构域。结合其他物种的 MPBQ MT 基因构建系统树表明, 红花 MPBQ MT 基因与其他物种氨基酸具有一定的同源性, 其中与向日葵和生菜同源性高达 89% 和 86%。实时荧光定量 PCR 分析表明, MPBQ MT 基因在红花开花后 50 d 的种子中表达量最高。结论 成功地对 MPBQ MT 基因进行克隆及表达分析, 为红花维生素 E 合成及调控机制研究奠定基础。

关键词: 2-甲基-6-叶绿基-1,4-苯醌甲基转移酶; RACE; 实时荧光定量 PCR; 红花; 维生素 E

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)18-2774-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.019

Cloning and expression analysis of MPBQ MT gene in safflower

DAI Si-ning¹, WANG Wen-ling³, HAN Yi-lai¹, QI Dong-mei¹, GU Tian-yao¹, CUI Qi¹, GUAN Li-li^{1,2}, LI Hai-yan^{1,2}, LI Xiao-kun²

1. Bioreactor and Drug Development Reseach Center, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. COFCO (Jilin) Bio-Chemical Co., Ltd., Changchun 130118, China

Abstract: Objective Safflower (*Carthamus tinctorius*) is an important natural source of vitamin E. 2-Methy-6-phytyl-1,4-benzoquinone methyltransferase (MPBQ MT) is a key enzyme in vitamin E synthesis pathway. MPBQ MT gene was cloned, bioinformatics was analyzed, and expression was analyzed to provide the foundation for the biosynthesis and regulation mechanism of vitamin E in safflower. **Methods** According to the intermediate sequence obtained from the database of the safflower seed, MPBQ MT gene sequence was cloned by RT-PCR and RACE techniques, and the protein characteristics were analyzed using bioinformatics and constructing phylogenetic tree. The expression of MPBQ MT gene in the different development stages was analyzed using real time-PCR. **Results** The full cDNA sequence of MPBQ MT gene was 1 392 bp, named CtMPBQ MT, contained an open reading frame (ORF, 1 038 bp), and encoded a protein of 345 amino acids with a predicted molecular mass of 38 900. The conserved structural domain analysis showed that it had the typical functional domains of SAM protein. Sequence alignment and phylogenetic tree analyses showed that the MT MPBQ gene had some homology with other amino acids, and among them CtMPBQ MT had 89% and 86% of consistency with MPBQ MT of *Helianthus annuus* and *Lactuca sativa*. The expression of CtMPBQ MT gene in safflower seeds at different development stages was determined by quantitative real-time PCR, it was found that the highest expression level of CtMPBQ MT gene was detected in 50 d after flowering. **Conclusion** MPBQ MT gene of safflower is successfully cloned, analyzed, and expressed, meantime a basis for the study on matter in the synthesis and regulation of vitamin E is provided.

Key words: 2-methy-6-phytyl-1,4-benzoquinone methyltransferase; RACE; real-time PCR; *Carthamus tinctorius* L.; vitamin E

收稿日期: 2015-02-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”)项目(2011AA100606); 国家自然科学基金资助项目(31201237); 大学生创新创业项目(201410193045); 吉林省科技厅中青年领军人才及优秀创新团队项目(20111815); 教育部博士点基金-青年教师基金项目(20122223120002)

作者简介: 代斯宁(1992—), 女, 在读本科, 研究方向为生物技术。Tel: 18844144255 E-mail: 32233603@qq.com

***通信作者** 官丽莉(1982—), 女, 实验师, 主要从事药用植物与生物技术研究。Tel: 13504462608 E-mail: guanll2004@163.com

李校堃(1964—), 男, 教授, 主要从事生物反应器研究。Tel: 13676701796 E-mail: xiaokunli@163.net

维生素 E 又称为生育酚 (tocopherol), 是植物和光合微生物合成的一类脂溶性维生素, 在人类和动物的日常膳食中起着不可或缺的作用, 大量实验或临床研究表明, 维生素 E 具有显著的维持生育能力、抗氧化、抗肿瘤、抗衰老、预防心血管疾病、提高免疫力等多种功能^[1-2]。

随着生活水平的提高, 天然食品逐渐领导国际潮流。天然维生素 E 在安全性、吸收率及生物活性等多个方面优于合成产品, 因此医药、食品、化妆品等领域多转向使用天然维生素 E。在发达国家, 天然维生素 E 被大量用于抗衰老药品、营养补充剂、强化食品、乳制品、面包、口香糖等。而合成产品, 在欧美国家一般均作为动物饲料使用。在世界营养素中, 天然维生素 E 是需求量增长最快的品种, 产量每年以 10% 的速度增长, 在美国, 已有 35% 的居民日常服用天然维生素 E。食品和医药用维生素 E 主要依靠从天然产物中分离, 但是, 天然产物中维生素 E 的量少, 提取困难, 成本很大, 市场上对天然维生素 E 的需求越来越大^[3]。因此, 利用基因工程的方法提高作物中维生素 E 的量, 改进天然维生素 E 提取方法, 成为目前植物维生素 E 代谢研究的热点。

获取维生素 E 所需的油料作物种子中虽然维生素 E 的量丰富, 但是植物的种子中主要的维生素 E 成分是 δ -生育酚, δ -生育酚不易被人体吸收, 且生物活性很低, 生物活性高的维生素 E 成分为 α -生育酚和 γ -生育酚。2-甲基-6-叶绿基-1,4-苯醌甲基转移酶 (MPBQ MT) 是维生素 E 合成途径中的关键酶之一, 催化 2-甲基-6-叶绿基-1,4-苯醌 (MPBQ) 的甲基化, 产生 2,3-二甲基-6-叶绿基-1,4-苯醌 (DMPBQ)^[4]。MPBQ 和 DMPBQ 能够在生育酚环化酶 (TC) 的催化下分别产生 δ 、 γ -生育酚^[5]。 δ 、 γ -生育酚分别在 γ -生育酚甲基转移酶 (γ -TMT) 作用下分别甲基化生成 α 、 β -生育酚^[6]。在转基因大豆种子中特异表达 MPBQ MT 基因, 使大豆中的 δ -生育酚由原来占总生育酚 20% 降低到占 2%, MPBQ MT 突变体拟南芥种子中 δ -生育酚的量累积增加, γ -生育酚的量降低^[7]。因此, MPBQ MT 的表达及活性对决定植物维生素 E 的组成起着重要作用, 对培育高 γ -生育酚和 α -生育酚的新品系具有重要的指导意义。目前, MPBQ MT 基因的克隆多集中在拟南芥、大豆、花生、核桃、生菜、向日葵、蓝藻聚球藻^[8-11]等植物中。

鉴于红花作为重要的油料作物, 维生素 E 的量较高^[12], 但 MPBQ MT 基因及其功能研究还未见报道, 本研究用新一代测序技术 (Illumina/Solexa sequencing) 对红花花瓣的转录组进行测序^[13], 并以测序文库中高表达的 Uingene78404 片段为基础, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆红花 MPBQ MT (CtMPBQ MT) 基因的 cDNA 序列, 并对其序列进行生物信息学分析及表达分析, 为深入了解 MPBQ MT 基因在植物体内的表达特性和植物维生素 E 代谢途径的表达调控研究奠定基础, 为该基因的应用和富含高活性维生素 E 转基因植物的培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

红花样品采自吉林农业大学种植基地, 经吉林农业大学胡全德教授鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L。取开花后 5、15、30、50 d 的新鲜种子用于表达分析, 用开花后 50 d 种子 (成熟种子) 进行 MPBQ MT 基因克隆。剪取花苞, 取新鲜种子, 迅速放于液氮中, 锡箔纸包好后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

取红花种子置于液氮中研碎, 总 RNA 提取方法按照 Trizol 试剂说明书进行, 提取后进行纯度及浓度测定; 并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。cDNA 合成根据 Biotek 公司反转录试剂盒操作进行, 反转录产物分离纯化后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 MPBQ MT 基因中间 cDNA 序列的克隆

根据 Solexa 测序获得的红花转录组序列中高表达的 Unigene78404 (480 bp), 按照引物设计原则, 采用引物设计软件 Primer 5.0, 对红花转录组序列中的 MPBQ MT 基因序列设计引物以反转录后的 cDNA 为模板进行中间 cDNA 序列的 PCR 扩增, 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s, $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

1.4 红花 MPBQ MT 基因全长 cDNA 克隆

根据已验证的红花 MPBQ MT 基因中间片段, 分别设计引物 5F、5R 和 3F、3R (表 1), 参照 Race 试剂盒进行 5'RACE 和 3'RACE。根据 3 段序列拼接获得的全长 cDNA 序列设计基因全长引物 (表 1), 获得目的基因的全长 cDNA。对 PCR 产物进行回收, 连接 pEASY-T1 Vector, 并转化 DH5 α 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选后, 挑取白色菌落过夜培养, 提取质粒, PCR、双酶切鉴定重组子, 然后测序 (由上海生工生物工程股份有限公司完成)。

表 1 本研究扩增红花 CtMPBQ MT 基因及 RT-PCR 所用的引物序列

Table 1 Primers used for cloning of CtMPBQ MT gene and RT-PCR

| 引物用途 | 引物名称及序列 (5'→3') |
|-------------------------|---|
| 中间片段引物 | MPBQ MT-F: AAAGGAGCCGTTGAAGGAAT MPBQ MT-R: ATGGCACCCAGAAGAAATCG |
| 5'RACE 和 3'RACE 引物 | 5F: CCTTCCCTCCTATCTTTAGAACCCTG 5R: GTGGGTCCGCCCAGTACTCGATGC 3F: ATCAGAGAAGCATAACAGGG 3R: ATCGGCCCAAAATGGTATC |
| 基因全长引物 | M1: ATGGGAAGAGCTCCTTGTTG M2: TCACAAGTTCTCATCTCCATC |
| qRT-PCR 引物 | qMPBQ MTF: ATCAAACCCACGGCGAAG qMPBQ MTR: TCTTGATACCTGGCCGAGAT |
| 18 S rRNA 基因 qRT-PCR 引物 | 18 S rRNA-F: GAGAAACGGCTACCACATCCAA 18 S rRNA-R: TCGTTTGAGCCCGGTATTGTTA |

1.5 生物信息学分析

ORF Finder 在线软件分析 MPBQ MT 基因 cDNA 的开放阅读框 (ORF) 与相应的氨基酸序列。将获得的 TC 基因全长序列通过 BLAST 搜索 NCBI 的蛋白质和核苷酸数据库, 并通过 DNAMAN 软件翻译成氨基酸序列, 利用 DNAMAN 软件对来源于各种植物的 MPBQ MT 的相关氨基酸序列进行同源比对。相对分子质量与理论等电点 (pI) 预测采用 ExPASy 在线服务器的 Compute Pi/Mw 工具, 二级结构预测使用 Dublin 大学的 Porter 服务器, 三级结构预测使用 Swiss-Model 服务器, 结构功能域分析采用 ExPASy 在线服务器 Prosite Scanprosite。

1.6 红花 MPBQ MT 基因表达分析

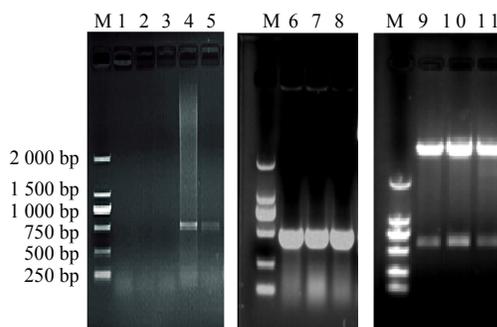
取开花后 5、15、30、50 d 的新鲜种子提取 RNA, 并反转录为 cDNA 用于 RT-PCR 分析。定量 PCR 反应体系: SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2×) 10 μL; 上下游引物 (表 1) 各 0.4 μL; ROX Reference Dye II (50×); DNA 模板 2 μL; ddH₂O 6.8 μL。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 RNA 浓度、纯度及 MPBQ MT 基因中间 cDNA 序列的克隆

利用 NanoDrop 分析仪进行 RNA 纯度及浓度测定, RNA 的浓度在 1 000 μg/μL 左右, 且 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.9 左右, 表明提取的 RNA 质量较好, 可继续后续实验。

MPBQ MT 基因中间 cDNA 序列的克隆根据红花转录组测序得到的中间片段, 设计引物, 以红花成熟种子 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得 500 bp 左右的目的带 (图 1-A)。经回收纯化后, PCR 产物与 pEASY-T 1 载体连接, 通过菌液 PCR 验证 (图 1-B) 和质粒的 EcoR V 和 Hind III 双酶切验证 (图 1-C), 测序结果正确。



1~3-阴性对照 4、5-RT-PCR 结果 6~8-菌液 PCR 验证图谱 9~11-酶切验证图谱 M-DNA Marker
1—3-negative control 4, 5-result of RT-PCR 6—8-result of PCR from bacterium 9—11-result of restriction M-Marker

图 1 红花 MPBQ MT 基因中间片段的验证

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis from MPBQ MT fragment

2.2 红花 MPBQ MT 基因全长 cDNA 克隆及序列分析

根据 MPBQ MT 基因中间片段设计 5' RACE 和 3' RACE 引物, 按照 RACE 试剂盒说明书进行 5' RACE 扩增和 3' RACE 扩增, 分别得到长度为 900 bp 左右

(图 2-A) 和 1 346 bp 左右 (图 2-B) 目的带。经过对红花 MPBQ MT 基因片段与得到的 3' 末端和 5' 末端序列拼接, 最后得到红花 MPBQ MT 基因 cDNA 全长序列 (图 2-C)。红花 MPBQ MT 基因全长 1 392 bp, 其中编码区 1 038 bp, 5' 端非翻译区包含 293 bp, 3' 端非翻译区 61 bp, 共编码 345 个氨基酸 (图 3), 命名为 CtMPBQ MT, GenBank 登录号为 KJ845348。利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 预测 CtMPBQ MT 基因编码蛋白的理化性质。CtMPBQ MT 基因编码蛋白由 345 个氨基酸编码, 分子式 C₁₇₈₀H₂₇₆₃N₄₇₇O₄₈₀S₁₃, 总原子数为 5 513。相对分子质量是 38 942.2; 理论等电点 (pI) 9.24, 带正电残基 (Arg+Lys) 为 45, 带负电残基 (Asp+Glu) 为 36。该蛋白的不稳定系数为 40.90, 表明 CtMPBQ MT 编码蛋白不稳定。脂肪系数为 88.67, 亲水性系数为-0.192, 表明 CtMPBQ MT 是一个水溶性蛋白。具有典型的保守的 SAM 功能结

构域, 位于 142~219 位氨基酸处。将其在 NCBI 上进行序列比对分析发现, 该基因与向日葵 MPBQ MT2 蛋白 (ABB52807.1)、生菜 MPBQ MT (ACP43457.1) 蛋白的同源性高达 89% 和 86% (图 4)。

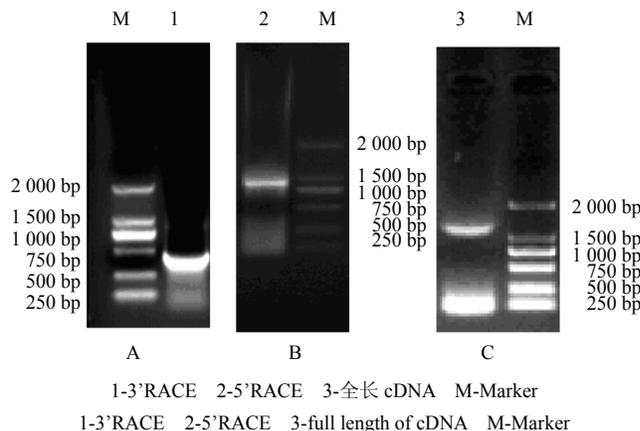


图 2 红花 MPBQ MT 基因全长 cDNA 的克隆

Fig. 2 Isolation of cDNA of MPBQ MT gene in safflower

```

1  CATCCCCACCTTCACACCCCTCTTCGCCACAAATTCIGCTTTCCTCTCTCCAAATGGTG
61  GTCAATGCTTATCAATCAATGCGGATTTGAGTCAATGGTAACCCCGTTCCTCAATTT
121  CTCACCAACCCTAACACCCCCAATTTGCAATGCAACAATTTGAGCTGAATCCCTACAA
181  ATCAGGTTTACGAGTTTTCGCACTAGGGTTTGTCTGAAGTTTGAATCGGTGAGTTT
241  GAAGTAAAGGATTACAAGTTTATGGATCTGGTTTTTTTGTATTGAACGACAATGGCT
                                     M A
301  TCTCAATGCTGTATGGGATCGAAAATCTCGCGATTTGAGAGGAAGAGTATCCCAAAT
      S S M L Y G A E N L A I V R G R V S P N
361  GGATATGGGTTTAAATGGTTCAGAAATGCAATGGGAGGAAGAGTCTCTCTCCATAGGATCAAT
      G L G F N G S E L H G R E K S L L P R I N
421  TTGGTTGTTGGGAATTCAAATTTGGAGGTAGAAGAAGCCATGTTTACCTAAATGCAGT
      L V V G N S N F G G R E T L V L P K C S
481  GTTCTGTCCAAAGGCCAGCTCCAGCCTAGATTCATCAACACAAAAAGGAGGCATTC
      V S V P R P A S Q P R F I Q H K K E A F
541  TGGTTCATAGGTTTGTGCGATTTGATGATCATGTGATAAACCTGGTCAATGGGACC
      W F Y R F L S I V Y D H V I N P G H W T
661  GAAGATATGAGAGATGAAGCGTTAGAGCCGGCGGATCTCCATAGCCGGAATATGATTTG
      K D M E D E A L E P A D L H S E N M I V
721  GTGGATTTGGTGGGGTACAGGGTTCACAACCTTAGGGATTGTAAACAAGTTGATGCT
      V D V G G G T G F T T L G I V K Q V D
781  AAGAATGTTACCAATTTGGATCAATCGCCTCACCAGCTTGGCAAAGCGAAGCAAAGGG
      K N V T I L D Q S P H Q L A K A K Q K E
841  CCGTGAAGGAATGCAAGATCATCGAGGGGGATGCGGAGGATCTCCCTTCAGAACTGAC
      P L K E C K I E G D A E D L P F R T D
901  TATGCTGATAGATATGATCTGCTGGAAGCAATCGAGTACTGGCCGGACCCACAAAGGAG
      Y A D R Y V S A G S I E Y W P D P Q R G
961  ATCAGAAAGCAATCAGGGTTCATAAGATAGGAGGGGAAGGCATGCTGATTTGGGCTGTT
      I R E A Y R V L K I G G K A C L I G P V
1 021  TATCCAACGTATTTGGCTGCTCGATTTTTCGATGACATGTTGGATGCTCTTCCAAAAGAG
      Y P T Y W L S R F F A D M W M L F P K E
1 081  GAAGAGTATATGAGTGGTTTGA AAAAGCTGGATCAAAGATGTCAGATCAAGAGGATC
      R E Y I E W F E K A G F E K D V Q I K E I
1 141  GGCCAAAATGGTATCGTGGGGTCCGTCGCCATGGTTTATCATGGGGTGCICGGTACC
      G P K W Y R G V R R H G L I M G C S V T
1 201  GGAATCAAACCCGCATCAGGGGATCACCTTTGCAAGCTGGGGCTAAAGTAGAGGACAT
      G I K P A S G D S P L Q L G P K V E D I
1 261  GAGAAGCCGGTGAACCCGTTCTGGTTCCTGGTCCGATTTCTCTGGGTGCCATGGCTGGA
      R K P V N P F V F L V R F L L G A M A G
1 321  GTCTACTATGTTGGTCTGCTGTTTACATGTTGGCTCAAGGACCAAATGTCCTCAAAAGGT
      V Y Y V L V P V Y M W L K D Q I V P K G
1 361  CAACCAATCTGAGCAATGTTAATTTGCTTTCIGGTTTGTATCAGATGATTTCTGAAAAA
      Q P I ***
      AAAAAAAAAA

```

“***” 标记的碱基序列为 MPBQ MT 基因的起始密码子; “_” 标记的碱基序列为 MPBQ MT 基因的终止密码子; 阴影部分为保守的 SAM 功能结构域
 “****” marked sequence is start codon; “_” marked sequence is stop codon; shaded part is a conserved SAM functional domain

图 3 红花 MPBQ MT 基因全长序列

Fig. 3 Full length sequence of MPBQ MT gene from safflower

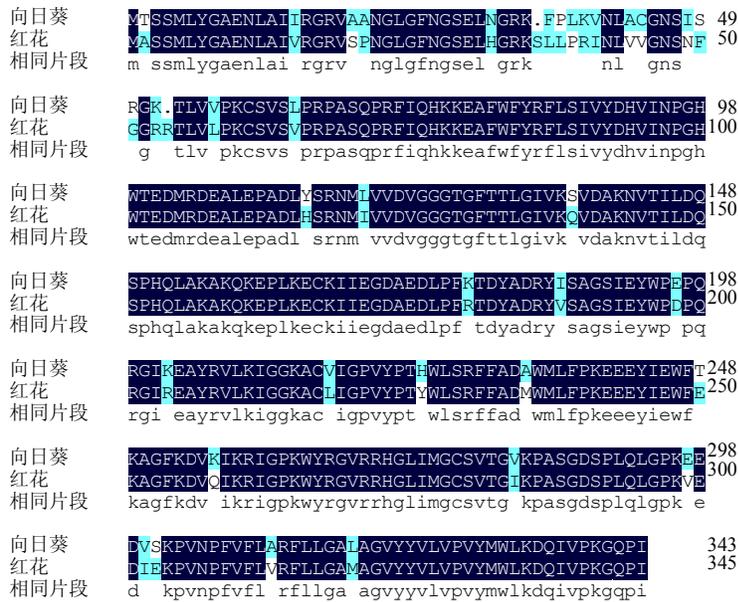


图 4 红花 MPBQ MT 氨基酸序列与向日葵同源性分析

Fig. 4 Homology analysis of amino acid sequence of MPBQ MT in safflower and sunflower

2.3 CtMPBQ MT 基因的同源性及系统树分析

利用 DNAMAN 软件对来源于各种植物的 MPBQ MT 的相关氨基酸序列进行同源比对, 结果发现克隆到的 CtMPBQ MT 基因与向日葵 *Helianthus annuus* 的同源性最高, 高达 89% (图 4)。从 NCBI 上搜索到其他 16 个物种的 MPBQ MT 蛋白序列, 利用 MEGA 软件进行多重序列比对, 并构建系统发生树 (图 5)。结果显示红花与向日葵、生菜的亲缘关系相对较近, 而与番茄、马铃薯亲缘关系相对较远。

2.4 CtMPBQ MT 编码蛋白二级结构分析及结构域预测

采用 NPS[®]server SOPM 分析进行 CtMPBQ MT 基因的编码蛋白二级结构分析, CtMPBQ MT 基因的编码蛋白二级结构中 α -螺旋 (alpha helix) 占 28.99%、延伸链 (extended strand) 占 24.06%、无规卷曲 (random coil) 占 36.52% (图 6)。利用 DictyOGlyc 在线工具对蛋白的糖基化位点进行预测。根据 P 值大于 0.5 即为存在糖基化位点为评分标准, CtMPBQ MT 蛋白仅存在 1 个糖基化位点, 是位于第 291 位丝氨酸 (Ser) (图 7)。这些修饰可能与 CtMPBQ MT 蛋白的生物学功能密切相关。

2.5 CtMPBQ MT 编码蛋白三维建模

在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中, 对 CtMPBQ MT 编码蛋白进行三维结构建模 (图

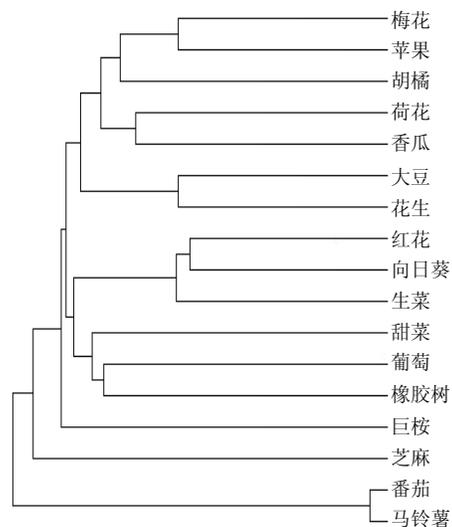


图 5 红花 MPBQ MT 蛋白与其他 16 种植物 MPBQ MT 蛋白的系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis on MPBQ MT protein in safflower with other 16 plant MPBQ MTs

8), 结果显示 CtMPBQ MT 编码蛋白是由 6 个 α -螺旋条带简单的缠绕在无规卷曲上的简单结构。

2.6 CtMPBQ MT 基因的表达分析

分别取开花后 5、15、30、50 d 的新鲜种子提取 RNA, 反转录为 cDNA。以 18 S rRNA 为内参基因, 采用 RT-PCR 方法分析 MPBQ MT 基因在红花种子不同发育时期的表达量。结果表明 (图 9), MPBQ MT 基因在开花后 50 d (成熟种子) 中相对表达量最高, 其他时期表达水平几乎一致, 均较低。

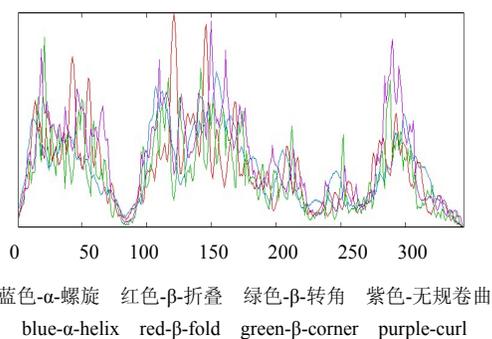


图 6 蛋白的二级结构分析

Fig. 6 Secondary structure analysis on MPBQ MT proteins

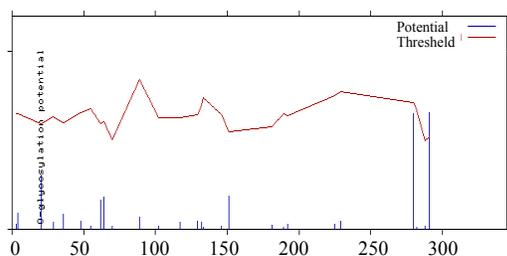


图 7 MPBQ MT 蛋白糖基化位点预测

Fig. 7 Prediction of glycosylation site of MPBQ MT protein

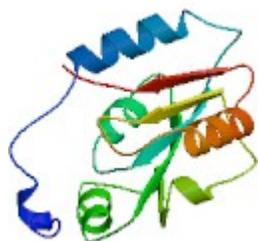


图 8 CtMPBQ MT 蛋白三级结构预测图

Fig. 8 Tertiary structure for conserved domain of MPBQ MT protein

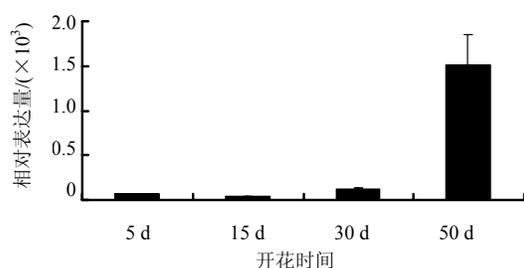


图 9 红花种子发育过程中 MPBQ MT 基因的表达

Fig. 9 Expression of MPBQ MT gene in different periods of safflower seed development

3 讨论

本研究利用红花转录组测序结果筛选出红花 MPBQ MT 基因的中间片段, 通过 PCR 方法验证该

中间片段的表达。通过 RACE 技术成功扩增到红花 MPBQ MT 基因的全长 cDNA 序列, 全长 1 392 bp, 其中编码区 1 038 bp, 5'端非翻译区包含 293 bp, 3'端非翻译区 46 bp, 共编码 345 个氨基酸。将其在 NCBI 上进行序列比对分析发现, 该基因与向日葵 MPBQ MT2 蛋白 (ABB52807.1)、生菜 MPBQ MT (ACP43457.1) 蛋白的同源性高达 89%和 86%。用 MEGA5.1 软件构建进化树, 结果显示, 红花 MPBQ MT 与向日葵、生菜亲缘关系最近, 经典植物分类学中红花和向日葵同属于菊科。通过 ProtParam 预测 CtMPBQ MT 基因编码蛋白由 345 个氨基酸编码, 分子式 C₁₇₈₀H₂₇₆₃N₄₇₇O₄₈₀S₁₃, 总原子数为 5 513。相对分子质量是 38 942.2; pI 为 9.24, 带正电残基 (Arg+Lys) 为 45, 带负电残基 (Asp+Glu) 为 36。该蛋白的不稳定系数为 40.90, 表明 CtMPBQ MT 编码蛋白不稳定。脂肪系数为 88.67, 亲水性系数为 -0.192, 表明 CtMPBQ MT 是一个水溶性蛋白。具有典型的保守的 SAM 功能结构域, 位于 142~219 位氨基酸处。基因表达分析结果表明红花 MPBQ MT 基因在种子发育成熟时表达量最高, 远远高于其他时期。本研究成功设计 RACE 引物及相应的 PCR 扩增条件以及 RT-PCR 条件, 成功克隆到 1 477 bp 的红花 MPBQ MT 基因, 并对该基因进行了生物信息学分析, 为红花 MPBQ MT 基因提供更详尽的信息。在已克隆的调控植物生育酚生物合成的 5 个关键酶基因中, 经遗传转化证明, 生育酚环化酶基因 (VTE1)、尿黑酸叶绿基转移酶基因 (VTE2)、VTE4、植醇激酶基因 (VTE5) 在功能上均能提高生育酚总量, 改变生育酚组成成分^[13]。VTE3 的表达及活性对植物生育酚总含量的影响不大, 但可以改变植生育酚的组成^[7]。由于临床上对天然药物的实际需求不断增加, 以及基因克隆与表达技术的不断进步, 近年来药用植物功能基因的克隆呈现迅速增长的趋势^[14-15]。维生素 E 代谢合成途径及相关基因的研究仍处于起步阶段。通过生物合成途径的研究, 推动药用植物次生代谢工程的发展, 提高中药材品质, 为重要的良种选育、规范化种植和质量控制提供技术支持, 将是中药材品质研究的前沿和热点^[16]。

MPBQ MT 是天然维生素 E 合成的关键酶基因^[17], 通过抑制或超表达该酶基因的表达, 可改变维生素 E 的量及组成比例, 这为后期维生素 E 生物合成的代谢调控研究奠定基础。在今后的研究中,

通过原核表达、亚细胞定位、超表达或抑制该基因在植物中的表达结合维生素 E 量变化的研究等对该基因进行功能验证,找出基因表达与维生素 E 合成的关联性,期望以基因工程手段干预增加或调整维生素 E 的量及组成比例成为现实,为后续红花维生素 E 的代谢调控研究奠定理论基础。

参考文献

- [1] Rebeiz C A, Benning C, Bohnert H J, *et al.* *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Volume 31): *The Chloroplast: Basics and Applications* [M]. Dordrecht: Springer, 2010.
- [2] Farius S, Nor R M, Cheng H M, *et al.* Alpha-tocotrienol is the most abundant tocotrienol isomer circulated in plasma and lipoproteins after postprandial tocotrienol-rich vitamin E supplementation [J]. *Nutr J*, 2012, 11: 5-16.
- [3] 卢作勇, 魏亮先. 世界主要原料药的市场现状和未来发展动向 [J]. *中国医药情报*, 1999, 5(2): 1011.
- [4] Shintani D K, Cheng Z, DellaPenna D. The role of 2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase in determining tocopherol composition in *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *FEBS Lett*, 2002, 511: 1-5.
- [5] Porfirova S, Bergmuller E, Tropf S, *et al.* Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(6): 12495-12500.
- [6] Shintani D, DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering [J]. *Science*, 1998, 282: 2098-2100.
- [7] Alison L, Van Eenennaam, Kim L, *et al.* Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(13): 3007-3019.
- [8] Dahnhardt D, Falk J, Appel J, *et al.* The hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 is not required for plastoquinone biosynthesis [J]. *FEBS Lett*, 2002, 523: 177-181.
- [9] 徐妙云, 周建, 张兰, 等. 大豆 2-甲基-6-植基-1,4-苯醌甲基转移酶基因 (GmVTE3) 的克隆及对转基因烟草种子中生育酚组成的影响 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(10): 1994-1999.
- [10] 郭安强, 万勇善, 刘凤珍. 花生 2-甲基-6-植基-1,4-苯醌甲基转移酶基因 VTE3 的克隆及多态性分析 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(9): 1685-1695.
- [11] 王灿灿, 杨克强, 孙翠, 等. 核桃 (*Juglans regia* L.) 维生素 E 代谢相关基因 jrVTE3 的克隆与分析 [J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2013, 44(2): 159-166.
- [12] Matthaus B, Ozcan M M, Juhaimi F Y. Fatty acid composition and tocopherol profiles of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed oils [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(2): 193-196.
- [13] Li H Y, Dong Y Y, Yang J, *et al.* De novo transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids [J]. *PLoS One*, 7(15): 1-10.
- [14] Cheng Z, Sattler S, Maeda H, *et al.* Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(3): 2343-2356.
- [15] Andy P, Brandle S, Kehr J, *et al.* Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser induced fluorescence detection [J]. *Transgenic Res*, 2000, 9(6): 243-260.
- [16] 康亚兰, 裴瑾, 刘薇, 等. 红花查尔酮合成酶基因的克隆、生物信息学分析及表达 [J]. *中草药*, 2014, 45(16): 2385-2389.
- [17] Liu F Z, Guo A Q, Wan Y S. Cloning and polymorphism analysis of the 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol methyltransferase gene (VTE3) in *Arachis hypogaea*, *A. duranensis*, and *A. ipaënsis* [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(2): 1859-1871.