

三七 GGPPS 基因 CDS 序列克隆及原核表达

唐美琼¹, 闵丹丹^{1,2}, 赵以民¹, 胡 营¹, 李 刚^{1*}

1. 广西药用植物园 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023

2. 九江市第三人民医院, 江西 九江 332000

摘要:目的 为研究 GGPPS 基因在三七中的功能, 从三七中克隆 GGPPS 基因 CDS 序列, 并进行原核表达。方法 以 3 年生三七叶组织为材料, 依据 Genbank 中已报道的 GGPPS 基因序列设计引物, 利用 RT-PCR 技术, 克隆得到编码区序列; 克隆片段连接到 pET-30α(+) 表达载体, 转入大肠杆菌 BL21 后, 在异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导下进行表达。结果 三七 GGPPS 基因 CDS 序列全长 1 032 bp, 编码 343 个氨基酸。SDS-PAGE 结果表明, 所构建的原核表达载体表达的融合蛋白大小在 29 000~44 000, 且表达产物主要以不溶性包涵体形式存在。结论 成功克隆了三七 GGPPS 基因 CDS 序列, 建立了稳定的原核表达体系, 为进一步研究其三七中的生物学功能奠定了基础。

关键词: 三七; GGPPS 基因; CDS; 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(2018)15-3667-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.028

Cloning and prokaryotic expression of CDS region from GGPPS gene of *Panax notoginseng*

TANG Mei-qiong¹, MIN Dan-dan^{1,2}, ZHAO Yi-min¹, HU Ying¹, LI Gang¹

1. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Conservation and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China

2. Third People's Hospital of Jiujiang, Jiujiang 332000, China

Abstract: Objective In order to study the function of geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPPS) gene, the CDS nucleotide sequence of GGPS was cloned from *Panax notoginseng*, and its prokaryotic expression was performed. **Methods** The primers were designed according to the reported GGPPS gene sequence in Genbank, and the coding sequence was obtained by RT-PCR. The prokaryotic expression vector was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 for the expression under the induction of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). **Results** The CDS of GGPS gene had a full length of 1 032 bp coding for 343 amino acids. Results of SDS-PAGE showed that a 29 000—44 000 protein was achieved and the recombinant protein was mainly in the form of insoluble inclusion body. **Conclusion** The CDS nucleotide sequence of GGPPS gene was successfully cloned, and the stable prokaryotic expression was established. This study will provide a foundation for the further functional researches of GGPPS gene in *P. notoginseng*.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPPS) gene; coding sequence; clone; prokaryotic expression

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科人参属植物, 主产于我国云南和广西, 具有散瘀止血、消肿止痛、补益健体等功效^[1]。现代医学研究证明, 三七素、黄酮、三萜皂苷等均为三七的主要活性成分, 其中, 三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 和部分单体皂苷在心血管系统、免

疫及抗炎、抗肿瘤等方面有较好的生理活性^[2]。三七是典型的阴生植物, 在种植过程中, 需要适当遮阳才有利于其生长、次生代谢及品质形成^[3-5]。目前, 对三七阴生习性的研究主要集中在三七光合生理生态和三七光合特性方面^[6-8], 而在遗传特性和基因分子水平方面的研究较少。

收稿日期: 2018-01-09

基金项目: 广西自然科学基金面上项目 (2015GXNSFAA139097); 广西自然科学基金项目 (2013GXNSFBA19087)

作者简介: 唐美琼 (1984—), 女, 助理研究员, 研究方向为药用植物分子生物学。Tel: (0771)5602850 E-mail: tangmeiqiong2006@163.com

*通信作者 李 刚, 男, 副研究员, 研究方向为药用植物遗传育种。Tel: (0771)5602850 E-mail: lggxu07@hotmail.com

香叶基香叶基焦磷酸合酶 (geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPPS) 是二萜类物质生物合成的关键酶, 已经从拟南芥^[9]、银杏^[10]、番茄^[11]、地黄^[12]等多种植物中分离得到 GGPPS 基因。将番茄的 LeGGPPS2 基因转化烟草, 能提高烟草叶绿素和类胡萝卜素合成、弱光下植物光合性能以及潜在的有害光氧化保护^[13]; 拟南芥中 GGPPS1 基因的突变体表现出不同程度的质体异常^[14]; 在烟草中表达向日葵的 GGPPS 基因表现出生长速度加快、早开花、结实多^[15]。另外, 由于 GGPPS 蛋白的底物法尼基焦磷酸 (FPP) 也是三萜化合物生物合成途径的前体^[16], 对 GGPPS 基因的研究也有助于了解三萜生物合成的调节机制。

本课题组前期从三七中克隆了 GGPPS 基因, 根据组织表达特点, 推测其很可能参与三七萜类合成及生长发育调控, 与三七阴生环境适应性有关^[17]。本研究进一步克隆了三七 GGPPS 基因 CDS 区序列, 构建了原核表达载体, 并在大肠杆菌 BL21 中成功表达, 以便于后续研究三七阴生习性和品质形成的分子机制, 实现品种的遗传改良。

1 材料与试剂

供试材料 3 年生三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 叶组织采自广西靖西县禄洞乡三七种植基地, 经广西药用植物园赵以民博士鉴定确认。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、克隆载体 pMD18-T 购自 Takara 公司, 表达载体 pET-30 α (+)、表达宿主菌 BL21 获赠于广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室。

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; PrimeScript $\odot$ R1st Strand cDNA synthesis Kit 购自 Takara 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自博日科技有限公司; X-Gal、IPTG、考马斯亮蓝快速染色液购自天根生化科技有限公司; Taq plus DNA Polymerase、限制性内切酶、T₄DNA 连接酶购自 Promega 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 GGPPS 基因 CDS 片段克隆

以 3 年生三七幼叶为材料, 按照试剂盒说明书提取三七总 RNA 并反转录合成第一链 cDNA, 保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

利用 Genbank 中已报道的 GGPPS 基因设计包含 CDS 区序列的引物, 并在正反向引物的 5' 端分别加入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列为 (划线序列为酶切

位点): CDS-GGPPS-F: 5'-CGCGGATCCATGGCGTTTGCAACATTTATGTCTT-3', CDS-GGPPS-R: 5'-CCCAAGCTTTTCGTGTATTGAAACCACAACTCCTA-3'。用反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 总反应体系为 25 μL , 其中 Taq plus mix 12.5 μL , 上下游引物各 1 μL , 模板 1 μL , 剩余 9.5 μL 用 ddH₂O 补齐。该 PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。对目的片段进行胶回收, T 载体连接转化 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选、菌落 PCR 验证, 挑选阳性克隆进行测序分析。

2.2 原核表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切测序正确的、含有目的基因的重组质粒和表达载体 pET-30 α (+), 分别回收目的片段和表达载体, 按照载体与目的基因 1:4 物质的量比, 用 T₄DNA 连接酶在 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。连接产物转化表达宿主 BL21 中, 在含有 100 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 挑取阳性克隆, 进行 PCR 检测及酶切鉴定, 并进行测序验证。

2.3 重组质粒的诱导表达

挑取测序正确的重组菌单菌落接种至含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜、180 r/min 振荡培养过夜。第 2 天按照 1:100 接种于 LB 液体培养基中 (含卡那霉素), 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养, 当 A_{600} 达到 0.5~0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达目的蛋白 6 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min 收集菌液, 超声波破碎细菌, 裂解产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min, 分别收集上清和沉淀。配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 分别取上清和沉淀 20 μL 加入 5 μL 5 $\times$ SDS Loading Buffer, 95 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 后, 采用垂直板电泳系统进行 SDS-PAGE 分析。分离胶和浓缩胶的配制参照 Takara 商品目录上的方法。

在此基础上, 通过在不同温度 (20、30、37 $^{\circ}\text{C}$)、不同浓度 IPTG (终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L) 和诱导处理不同时间 (0、2、4、6、12 h) 下诱导, 进行诱导条件的优化。

2.4 重组蛋白纯化

诱导后的重组菌经破碎后, 取沉淀, 用包涵体洗涤液 (Tris 0.65 mol/L, NaCl 0.05 mol/L, EDTA 0.001 mol/L, 0.005% TritonX-100, pH 8.0) 反复洗涤 3 次, 加入 Buffer B (Na₂HPO₄·2H₂O 0.1 mol/L, Tris 0.01

mol/L, 尿素 8 mol/L, pH 8.0) 于 4 °C 重悬并搅拌至溶解, 重悬液 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 加入至已混匀并平衡的 Ni-NTA 亲和色谱树脂中, 充分混匀后静置 10 min, 收集穿透液。加入 2 倍体积的 Buffer C (Na₂HPO₄·2H₂O 0.1 mol/L、Tris 0.01 mol/L、尿素 8 mol/L, pH 5.8), 反复冲洗柱子 3 次, 收集流出液, SDS-PAGE 检测蛋白纯化情况。

3 结果与分析

3.1 GGPPS 基因 CDS 片段克隆

提取 3 年生三七叶组织总 RNA 并电泳检测, 28 S、18 S 条带清晰, RNA 提取浓度及完整度好(图 1)。

以 cDNA 为模板 PCR 扩增目的基因, 得到 1 100 bp 左右的片段(图 2), 与预测片段长度相符。通过 TA 克隆获得重组质粒 pT-GGPPS, 测序结果表明 GGPPS 基因的 CDS 序列长 1 032 bp, 与前期课题组已提交至 NCBI 的登录号为 KM486564 的序列一致。

3.2 GGPPS 基因原核表达载体的构建

质粒 pT-GGPPS 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 消化后, 连接到相同酶消化处理的原核表达载体 pET-30α(+) 上, 转化至 BL21 感受态细胞中, 挑取

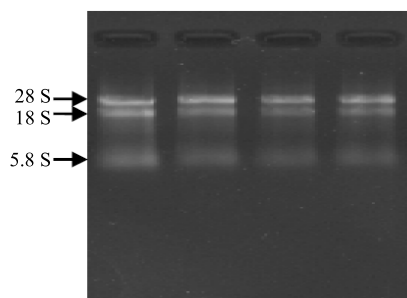
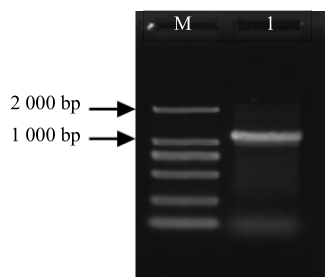


图 1 三七总 RNA 琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA of *P. notoginseng*

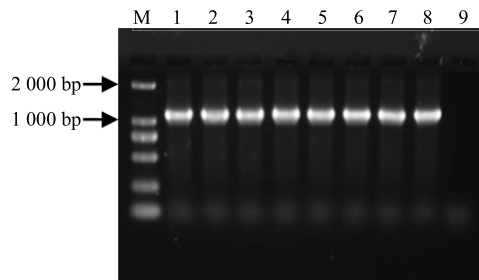


M-Marker 1-扩增产物
M-Marker 1-amplification products

图 2 GGPPS 基因 CDS 区 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification products of CDS region from GGPPS gene

单克隆若干, 进行菌落 PCR 验证(图 3), 提质粒进行双酶切鉴定(图 4)。重组质粒经再次测序表明, 所克隆的目的基因与原序列一致, 未发生突变, 说明重组质粒 pET-30α(+)-GGPPS 构建成功。

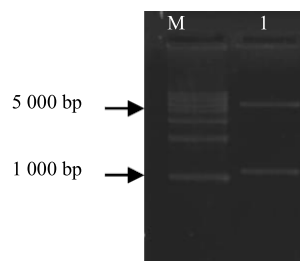


M-Marker 1~9-扩增产物

M-Marker 1~9-amplification products

图 3 pET-30α (+)-GGPPS PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of pET-30α (+)-GGPPS by PCR



M-Marker 1-*Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切

M-Marker 1-double digestion by *Bam*H I and *Hind* III

图 4 pET-30α (+)-GGPPS 质粒双酶切结果

Fig. 4 Double digestion of pET-30α (+)-GGPPS plasmid

3.3 GGPPS 基因诱导表达及条件优化

测序正确的重组质粒 pET-30α(+)-GGPPS 转化至 BL21 后在 IPTG 诱导下进行表达, 在 29 000~44 000 有一条明显的蛋白带。对其诱导体系的优化结果显示, 诱导温度及 IPTG 浓度对重组蛋白的表达量影响并不明显, 从 20~37 °C 均能够进行重组蛋白的表达, 各温度下表达量无显著差异; IPTG 浓度在 0.1~1.0 mmol/L 蛋白表达量变化不大, 但不添加 IPTG 时, 蛋白不表达(图 5); 随着诱导时间的延长, 蛋白表达量不断增加, 诱导 4 h 后蛋白的表达量基本稳定(图 6)。

3.4 重组蛋白表达形式鉴定及蛋白纯化

含质粒 pET-30α(+)-GGPPS 的重组菌在优化后的低温诱导体系: 诱导温度 20 °C, IPTG 终浓度 0.1 mmol/L, 诱导 4 h 后, 离心收集菌体, 超声波破碎后, 将上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 检测, 结果见图 7, pET-30α(+)-GGPPS 融合蛋白主要存在

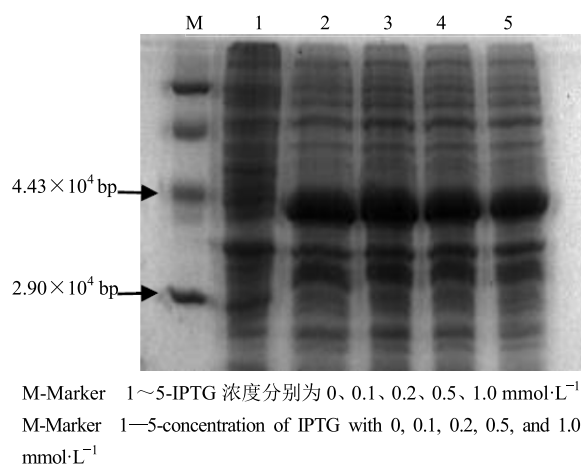


图 5 不同浓度 IPTG 诱导下 GGPPS 基因表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis on expression products of GGPPS gene induced by different concentration of IPTG

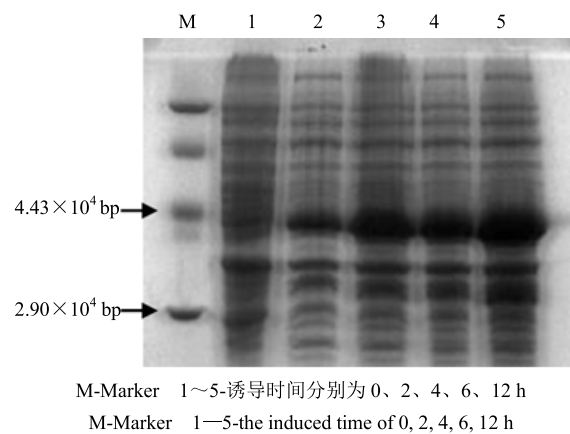


图 6 不同诱导时间下 GGPPS 基因表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis on expression products of GGPPS gene at different induction time

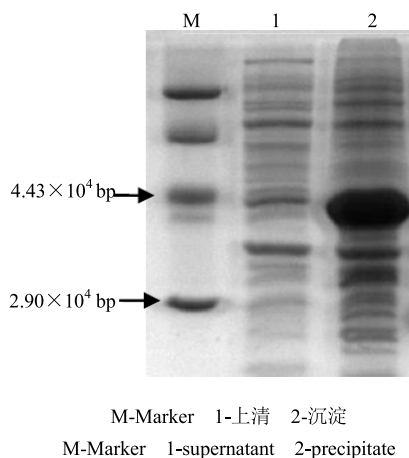


图 7 pET-30α(+)-GGPPS 融合蛋白表达形式鉴定

Fig. 7 Expression form identification of pET-30α(+)-GGPPS fusion protein

于沉淀中, 可见重组蛋白以包涵体形式存在。

取 Ni-NTA 纯化后的蛋白溶液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 观察纯化效果, 可见纯化后杂蛋白条带明显减少, 目的条带单一 (图 8)。

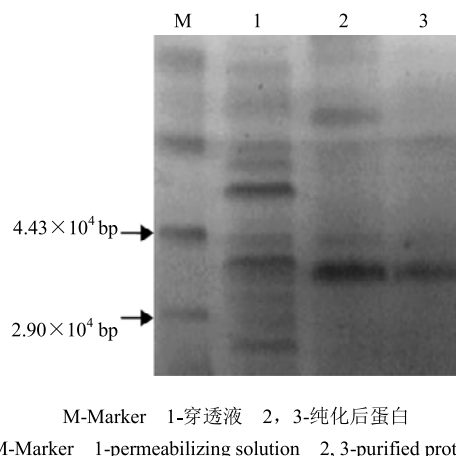


图 8 纯化 pET-30α(+)-GGPPS 融合蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of protein purification of pET-30α(+)-GGPPS fusion protein

4 讨论

随着研究的不断深入, 从越来越多物种中分离出 GGPPS 基因, 其功能也逐步展开研究。GGPPS 基因多以小的基因家族形式存在, 最高的是拟南芥中发现了 12 个 GGPPS 基因, 其中 10 个是有功能的, 且不同细胞器中 GGPPS 蛋白表达模式各不相同、在不同的合成途径中起作用^[18]。在三七转录组中, 仅检测到 1 个 GGPPS 基因, 开展基因克隆、体外表达、定点突变、分子互作等研究, 对于深入研究其在三七中复杂多样的生物学功能具有重要意义。

克隆基因只有通过表达才能探索和研究基因功能以及基因表达调控的机制。对 GGPPS 基因的报道多集中于基因克隆、时空表达、序列分析等方面^[19-21], 对其体外表达的研究甚少, 目前已有的报道中, 只有北葶苈子的 GGPPS 基因在 28 °C、0.4 mmol/L IPTG 条件下诱导 8 h, 可在大肠杆菌中得到融合表达蛋白, 但未开展诱导表达体系的优化及表达产物存在形式鉴定研究^[22]。在原核表达系统上研究三七 GGPPS 蛋白的表达, 将其编码基因 GGPPS 与原核表达载体 pET-30α(+) 重组, 并优化了表达体系, 通过 SDS-PAGE 检测表明, 三七 GGPPS 蛋白能与 His 标签蛋白形成融合蛋白, 在 IPTG 诱导体系中正确表达, 除了诱导表达时间外, 20~37 °C

诱导表达温度和 IPTG 浓度对蛋白的表达量影响不明显,但表达产物主要以包涵体形式存在。在后续的研究中,需要进行蛋白复性或者构建真核表达载体,及尝试催化底物反应以验证 GGPPS 蛋白活性。

参考文献

- [1] Hong D Y, Lau A J, Yeo C L, *et al.* Genetic diversity and variation of saponin contents in *Panax notoginseng* roots from a single farm [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(22): 8460-8467.
- [2] Ng T B. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*) [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(8): 1007-1019.
- [3] 罗美佳, 夏鹏国, 齐志鹏, 等. 光质对三七生长、光合特性及有效成分的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 610-613.
- [4] 匡双便, 张广辉, 陈中坚, 等. 不同光照条件下三七幼苗形态及生长指标的变化 [J]. 植物资源与环境学报, 2014, 23(2): 54-59.
- [5] Wang Z, Chen Y Y, Pan H J, *et al.* Saponin accumulation in flower buds of *Panax notoginseng* [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(2): 179-184.
- [6] 左瑞阳, 匡双便, 张广辉, 等. 三七 (*Panax notoginseng*) 对不同光照强度的生理生态适应性研究 [J]. 云南农业大学学报, 2014, 29(4): 521-527.
- [7] 李章田, 段承俐, 萧凤回. 人工光照对一年生三七形态和光合特性的影响 [J]. 云南农业大学学报, 2009, 24(5): 677-683.
- [8] 刘 丹, 崔秀明, 王朝梁, 等. 三七光合特性的初步研究 [J]. 西南农业学报, 1992, 5(2): 41-43.
- [9] Zhu X, Suzuki K, Okada K, *et al.* Cloning and functional expression of a novel geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(3): 357-361.
- [10] 张洪娟, 谭碧玥, 曹福亮. 银杏 *GbGGPS* 基因的克隆及序列分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2013, 37(4): 8-12.
- [11] 李翠萍, 夏蓓蓓, 翟军鹏. 番茄 *GGPS2* 基因的克隆与表达载体的构建 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2010, 32(10): 65-68.
- [12] 赵 乐, 马利刚, 俎梦航, 等. 地黄 *RgGGPPS2* 基因克隆、生物信息学分析及表达分析 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2269-2278.
- [13] 李翠萍. *LeGGP2*、*AtCAO* 与 *AtHEMA1* 基因对烟草耐弱光性的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [14] Ruppel N J, Kropp K N, Davis P A, *et al.* Mutations in Geranylgeranyl Diphosphate Synthase 1 affect chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) [J]. *Am J Bot*, 2013, 100(10): 2074-2084.
- [15] Tata S, Jung J, Kim Y H, *et al.* Heterologous expression of chloroplast-localized geranylgeranyl pyrophosphate synthase confers fast plant growth, early flowering and increased seed yield [J]. *Plant Biotechnol*, 2016, 14(1): 29-39.
- [16] 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): 420-421.
- [17] 闵丹丹, 唐美琼, 李 刚, 等. 三七香叶基香叶基焦磷酸合酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2090-2095.
- [18] Coman D, Altenhoff A, Zoller S, *et al.* Distinct evolutionary strategies in the GGPPS family from plants [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 1-12.
- [19] Liu C, Sun Z, Shen S, *et al.* Identification and characterization of the geranylgeranyl diphosphate synthase in *Deinococcus radiodurans* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2013, 58: 219-224.
- [20] 化文平, 宋双红, 智 媛, 等. 丹参 *SmGGPPS3* 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物科学学报, 2014, 32(1): 50-57.
- [21] 吕 品, 李 娜, 谷辉辉, 等. 西瓜牻牛儿苗基牻牛儿苗焦磷酸合酶基因的克隆及表达分析 [J]. 生物技术, 2014, 24(2): 11-15.
- [22] 马利刚, 赵 乐, 李英超, 等. 北葶苈子 *GGPS* 基因的克隆、序列分析与原核表达 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(3): 485-491.