

藏药川西獐牙菜中 SmMK 基因的克隆及生物信息分析

李晓雪¹, 向蓓蓓^{2*}, 孙继奇¹, 白艳玲¹, 朱晔荣¹, 马琳², 冯林林², 王勇^{1*}

1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071

2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

摘要: **目的** 了解川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch 甲羟戊酸途径中的关键酶甲羟戊酸激酶基因 (MK) 的功能, 并进一步推进川西獐牙菜中的甲羟戊酸途径的研究。**方法** 根据川西獐牙菜的转录组信息, 获得了川西獐牙菜 MK (SmMK) 基因的全长 cDNA 序列, 并且设计了特异性引物, 利用 RT-PCR 对该基因进行了克隆; 利用生物信息学方法, 对 SmMK 基因的序列进行分析; 构建原核表达载体 MBP-SmMK, 转入大肠杆菌 *Rosetta* (DE3) 中, 然后对 SmMK 基因进行了原核表达, 并对其进行了纯化。**结果** SmMK 基因 cDNA 全长为 1 164 bp, 共编码 387 个氨基酸。SmMK 与其他植物中的 MK 具有较高相似性。对其信号肽、跨膜区域、蛋白定位及二级结构和三维构象进行了预测分析。SDS-PAGE 检测表明所纯化蛋白与预期蛋白的大小相一致, 为 40 970。**结论** 为进一步研究川西獐牙菜中 MK 的功能奠定了基础, 并为进一步研究川西獐牙菜中的甲羟戊酸途径, 提高川西獐牙菜中类异戊二烯化合物的产量提供了依据。

关键词: 川西獐牙菜; 甲羟戊酸激酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 原核表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)13-3169-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.025

Cloning and bioinformatics analysis of SmMK gene in *Swertia mussotii*

LI Xiao-xue¹, XIANG Bei-bei², SUN Ji-qi¹, BAI Yan-ling¹, ZHU Ye-rong¹, MA Lin², FENG Lin-lin², WANG Yong¹

1. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China

2. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** In order to identify the function of the mevalonate kinase (MK) which is a key enzyme of the mevalonate pathway (MVA) in *Swertia mussotii*, and to improve the study of MVA in *S. mussotii*. **Methods** According to the SmMK gene sequence of transcriptome of *S. mussotii*, the specific primers were designed, the cDNA complete sequences was obtained by RT-PCR and the sequence was analyzed using bioinformatics. Prokaryotic expression vector MBP-SmMK was constructed and transformed into *Escherichia coli Rosetta* (DE3) for expression. **Results** The results showed that SmMK cDNA complete sequences had a length of 1 164 bp encoding 387 amino acid residues. The SmMK protein shared high identity with other MK proteins of plants. And the protein signal peptide, transmembrane region, location, secondary, and tertiary structures were analyzed and forecasted. The SDS-PAGE results showed that the expressed proteins were consistent with the anticipated size, which was 40 970. **Conclusion** This work will provide a foundation for research the SmMK protein functional and study MCA in *S. mussotii*. At the same time, it will supply the basis to improve the production of the isoprenoids.

Key words: *Swertia mussotii* Franch; mevalonate kinase; gene clone; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch 是龙胆科 (Gentianaceae) 獐牙菜属 *Swertia* L. 植物, 生长在海拔 3 000~5 000 m 的青海、西藏等高海拔较为寒

冷的地区^[1]。藏茵陈是“藏药八珍之一”, 始载于《四部医典》, 是藏药中极具特色的治疗热症、血液病和肝胆病的常用药物^[2]。而川西獐牙菜则是作为藏

收稿日期: 2019-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81303303); 天津市高等学校科技发展基金计划项目 (20130203)

作者简介: 李晓雪 (1993—), 女, 博士研究生, 研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail: 1074721546@qq.com

*通信作者 王勇, 男, 教授, 研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail: wangyong@nankai.edu.cn

向蓓蓓, 女, 副教授, 研究方向为药用植物生理与分子生物学。E-mail: xiangbeibei03230@163.com

茵陈的基原植物,全草入药,常被用于治疗黄疸型肝炎、肝硬化、肝腹水等疾病,并且现今已经生产片剂、针剂,疗效甚佳。其主要化学成分为萜类、环烯醚萜苷类、三萜类等,其中有效成分为獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷等均属于类异戊二烯化合物^[3-5]。植物类异戊二烯化合物是一类具有多种药理、生理活性的天然产物,植物中合成类异戊二烯等化合物,主要是通过甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径与甲基藜醇磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径进行合成^[6]。

MVA 途径主要存在于细胞质中,故而又称为细胞质途径。该途径以乙酰辅酶 A 为原料,经过一系列的酶促反应生成异戊烯基焦磷酸(IPP)^[6]。而人们熟知的许多重要的有效成分,例如,植物甾醇、胡萝卜素、青蒿素、丹参酮及紫杉醇等,均是植物中异戊二烯焦磷酸的下游产物^[7]。甲羟戊酸激酶(MK)则是在该途径中的限速酶之一,是催化甲羟戊酸转变为 5-磷酸甲羟戊酸的关键酶,负责将腺嘌呤核苷三磷酸(ATP γ)位的磷酸基团转移到甲羟戊酸第 5 位羟基,同时伴随着二磷酸腺苷(ADP)的释放^[8]。目前,不仅从拟南芥^[9]、小麦^[10]、茶树^[11]中分离鉴定出了 MK,而且三七^[9]、独行菜^[12]、滇龙胆^[13]、杜仲^[14]等许多药用植物中亦分离出了 MK 基因。

本研究根据前期实验中得到的川西獐牙菜转录组数据,分析得到了川西獐牙菜 MK (SmMK),并且通过设计特异性引物,利用 RT-PCR 扩增得到了其 cDNA 序列,并进行了克隆和测序。后利用生物信息学方法,将其与其他植物中的 MK 进行了同源性比较分析,以及对其二级结构、三维构象、跨膜结构及信号肽等信息进行了较为详尽的预测分析。构建原核表达载体 MBP-SmMK,转入大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行原核表达,并对该蛋白进行了纯化。为进一步研究 SmMK 的功能奠定了基础,同时为进一步研究川西獐牙菜中的 MVA 途径,从而提高川西獐牙菜中类异戊二烯化合物的产量提供了依据。

1 材料和试剂

1.1 材料

野生川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch 的种子,收采于中国青海省玉树县,由青海大学董汇泽教授进行分析鉴定。实验中所用到的材料为在实验室中光照 16 h,黑暗 8 h,22 ℃ 培养种植的川西獐牙菜植株。

1.2 试剂

pETMALc-H 原核表达载体由北京中国科学院植物所惠赠。大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans 5 α 、Rosetta (DE3) 菌种、TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase 和 pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 购于全式金生物有限公司;Easstep Super 总 RNA 提取试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司;Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 试剂盒、即用型蛋白质分析量标准(高)、BamH I 限制性内切酶、Sal I 限制性内切酶、10 $\times$ T Buffer、T4 连接酶、DL2000 DNA marker、DL15000 DNA marker 和 dNTP 均购自大连宝生物公司(TAKARA);异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside, IPTG)、卡那霉素、EDTA、Tris-HCl 均购自北京鼎国昌盛生物科技有限公司;Amylose Resin 购买于 NEB 公司;快速琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒购买于北京康为世纪有限公司;引物合成和基因测序由华大基因有限公司完成。

2 方法

2.1 川西獐牙菜叶片总 RNA 提取及 cDNA 合成

剪取新鲜已抽薹的川西獐牙菜叶片 0.04 g,放置于 1.5 mL 的 EP 管中,液氮速冻,用手持式研磨器迅速研磨成粉状,按照 Easstep Super 总 RNA 提取试剂盒的说明书进行叶片总 RNA 的提取,用 1% 的琼脂糖凝胶和 Nanodrop2000 进行 RNA 的质量检测。根据 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 试剂盒提供的说明书对叶片总 RNA 进行反转录合成 cDNA。

2.2 SmMK 基因的克隆

根据川西獐牙菜的转录组信息获得的 SmMK 基因全长序列并且结合原核表达载体 pETMALc-H 的多克隆酶切位点设计特异性引物,SmMK-up: 5'-CGGGATCCATGGAGGTAAGAGCCAGAGC-3'; SmMK-dp: 5'-ACGCGTCGACTTAGGAAGATCCGCTGAAGG-3' (下划线部分为酶切位点序列)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,50 μ L 的 PCR 体系: SmMK-up (10 μ mol/L) 1 μ L; SmMK-dp (10 μ mol/L) 1 μ L; dNTP (2.5 μ mol/L) 4 μ L; 5 $\times$ TransStart FastPfu Fly Buffer 10 μ L; 双蒸馏水 31 μ L; TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase (125 U/ μ L) 2 μ L; 川西獐牙菜叶片 cDNA 1 μ L。阴性对照为将该体系中的模板替换为 1 μ L 双蒸馏水。反应条件为 94 ℃、5 min; 94 ℃、

30 s; 60 °C、30 s; 72 °C、80 s; 31 个循环; 72 °C 延伸 10 min。获得的 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 用快速琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒进行切胶回收。根据 pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 的说明书, 将回收产物与 pEASY-Blunt Simple vector 进行连接, 转化进入 *Escherichia coli* Trans 5 α , 涂布于带有卡那霉素抗性的 LB 培养基上, 37 °C, 12 h 培养, 利用 PCR 挑选阳性克隆后, 送去华大基因公司进行测序。

2.3 SmMK 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 网站中的 BLAST 程序, 进行序列比对, 分析 SmMK 与其他植物的 MK 基因的同源性; 使用 DNAMAN 软件对氨基酸序列进行比对; MEGA 7.0 构建 neighbor-joining 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1 100 次。用 ExPASy Proteomics Server 网站提供的在线工具 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 对 SmMK 基因编码的蛋白进行详细的理化性质的分析。利用 SignalP4.0 Server 网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽的预测分析。利用在线工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对跨膜区进行预测。利用 TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 的在线网站、ProtComp (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>) 在线网站和 WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 在线网站对 SmMK 蛋白定位进行预测分析。采用 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org>) 在线软件分析蛋白质二级结构并利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维结构的预测。

2.4 构建原核表达载体

将测序正确的 pEASY-Blunt Simple vector-SmMK 质粒和载体 pETMALc-H 用 *Bam*H I、*Sal* I 在 37 °C 的培养箱中进行 4 h 双酶切。25 μ L 双酶切体系为质粒 8 μ L, *Bam*H I 2 μ L, *Sal* I 2 μ L, 10 $\times$ T Buffer 2 μ L, 双蒸馏水 11 μ L。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并用快速琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒进行切胶回收。二者的回收产物用 T4 连接酶进行连接后, 转入 Rosetta (DE3) 感受态中。涂布于含有卡那霉素的 LB 培养基上, 放置于 37 °C 培养箱中进行 12 h 过夜培养。挑选用 PCR 验

证过的阳性转化子, 送华大基因公司测序。

2.5 SmMK 原核表达与纯化

在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 对 Rosetta-MBP-SmMK 及对照组 Rosetta-MBP 在 37 °C、200 r/min、12 h 的条件下进行小量培养。接种 500 μ L 菌液于 400 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 25 °C、200 r/min、8 h 扩大培养, 至菌吸光度 (A) = 0.6~0.8 后接入 0.1 mmol/L 的 IPTG, 进行 16 °C、200 r/min、12 h 诱导。

将诱导后的菌液于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 按照 1:20 的比例加入 CB 缓冲液 (20 mmol/L pH=7.4 Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA), 将菌体悬浮, 在冰上进行超声破碎。将破碎后的悬浮液进行 4 °C、5 000 r/min、20 min 离心, 弃去沉淀收集上清液。在上清液中按照 1:100 的比例加入 Amylose Resin 填料, 放置在冰上 60 r/min 摇动 1 h 后 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液留下填料。用 CB 缓冲液 1 mL 进行重悬填料并放置在冰上 60 r/min 摇动 5 min 后 4 °C、3 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液, 如此重复 3 次。在 CB 缓冲液中加入 10 mmol/L 的麦芽糖溶解后, 加该溶液 200 μ L 到填料中放置在冰上 60 r/min 摇动 5 min 后, 4 °C、3 000 r/min 离心 1 min, 收集上清液进行 SDS-PAGE (4.5%浓缩胶和 12.5%分离胶) 电泳检测。

3 结果与分析

3.1 SmMK 基因 cDNA 的克隆

通过 RT-PCR 对 SmMK 基因的开放阅读框 (ORF) 进行扩增。得到 1 条 1 164 bp, 编码 387 个氨基酸的特异性片段 (图 1)。并且证明其与预测的 SmMK 基因 (登录号为 BankIt2084830Seq MG897161) 的序列信息是一致的 (图 2)。

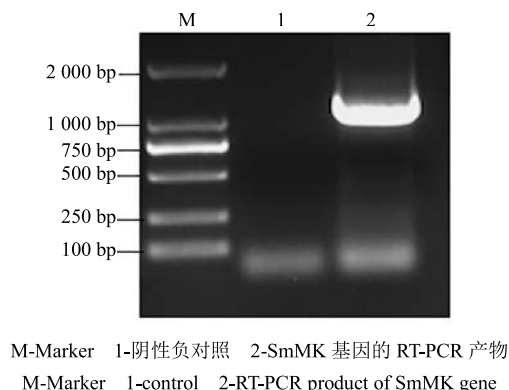


图 1 SmMK 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 RT-PCR detection of SmMK gene

```

1  ATGGAGGTAAAGACCAGAGCTCCAGGGAAGATAATACTAGCAGGAGAGCATGCTGTGGTACACGGATCAACCGAATGGCTGCGGTATT
1  M E V R A R A P G K I I L A G E H A V V H G S T A M A A A I

91  GATCTCTATACTTATGTTTCCCTCCGCTTTCCACCCCTTCTGAGAATGAAGATACACTTAACTCCACCTGAAGGATATGGATTGGAA
31  D L Y T Y V S L R F P T P S E N E D T L K L H L K D M D L E

181  TTTTCTTGGCTGTTGGAAAAATTAAGATGCTTTCCCTGATTGGGTGGCATTAGTGCATCTTCCCAGCATCATGCTCATTGGAGATC
61  F S W P V G K I K D A F P D L G G I S A S S P A S C S L E I

271  ACAAAGTAATCGCATCTCTAGTTGAAGAACAACAATTCCAGAGACGACGACCGGACTCGCTTCTGGCATTCTGCATTCTCTGGCTC
91  T K V I A S L V E E Q Q I P E T Q T G L A S G I S A F L W L

361  TACATTGCTATCCATGGGTGCAAAACGGCAGTAGCGTTGTACCTCCGAGCTCCCTTGGATCAGGCTTGGGTTCTTCAGCTGCTTCA
121  Y I A I H G C K P A V A V V T S E L P L G S G L G S S A A L

451  TGTGTTGCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTTTGTGAGATTGAGTAAATCTGGATTTTCACTACCAAGGCTGGCAATGTATGGGGACTCT
151  C V A L S A A L L A L S D S V N L D F S H Q G W Q M Y G D S

541  GAGCTTGACTTGGTCAATAAATGGGCTTCGAGGGCGAAAAGATTATCCACGGAACCATCAGGAATAGACAATACAGTAAGCACCTAT
181  E L D L V N K W A F E G E K I I H G K P S G I D N T V S T Y

631  GGCAACATGATCAAAATTCGGTCTGGTGAGTTGACACGGGTAAAGACTAATGCTGATCAGCAATACAAAAGTTGGG
211  G N M I K F R S G E L T R V K T N M P L K M L I T N T K V G

721  AGAAACACCAAGGCATTGGTTGACAGGTGTTTCAGAGAGGACAATGAGACATCAGAATGCTATGGCTGCAGTTTTCAATGCAGTTGATTCC
241  R N T K A L V A G V S E R T M R H Q N A M A A V F N A V D S

811  ATCAGCAGCGAAATGGCTTCATTATCCAGTCACTGTTTCTGACGATCTTGCCATAACTGAGAAGGAAGAGAAGTTGGCAGAAGTATG
271  I S S E M A S I I Q S P V S D D L A I T E K E E K L A E L M

901  GAAATGAATCAGGGATTGCTTCAGTCTATGGGAGTTAGCCATTCTTCTATAGAAACTGTGCTTAGAACAACCTTGAATACAAAGTTGGCT
301  E M N Q G L L Q S M G V S H S S I E T V L R T T S K Y K L A

991  TCCAATTTGACCGGAGCGGGGGTGGAGGCTGTGTTGACGCTGTTGCCAACCTTATTATCAGGAACCGTGGTTGATAAAGTCATCGCG
331  S K L T G A G G G G C V L T L L P T L L S G T V V D K V I A

1 081  GACCTAGAATCATGTGGATTCCAATGTTTATTGCTGGAATTGGGGGAAGAGGCATGGAGATTTCTTCAGCGGATCTTCCTAA
361  D L E S C G F Q C F I A G I G G R G M E I S F S G S S *

```

图 2 川西獐牙菜 SmMK 基因 cDNA 编码区序列与氨基酸序列

Fig. 2 Coding sequence and amino acid sequence of SmMK gene cDNA

3.2 SmMK 基因的生物信息学分析

3.2.1 理化性质分析 利用 ExPASy Proteomics Server 的在线网站及 DNAMAN 软件对 SmMK 基因的序列编码的蛋白进行相关理化性质的预测。推测 SmMK 基因编码 387 个氨基酸，蛋白质的相对分子质量为 40 970，等电点 (pI) 为 5.45，分子式为 $C_{1805}H_{2917}N_{479}O_{562}S_{20}$ ，其中带有负电荷的氨基酸残基有 40 个，带有正电荷的氨基酸残基有 31 个。该蛋白的稳定指数为 32.26，说明 SmMK 蛋白具有一定的稳定性。其脂肪系数为 97.31，亲水性为 0.158，结果显示该蛋白是一个疏水蛋白。

3.2.2 SmMK 蛋白跨膜结构域的预测与分析 利用在线工具 TMHMM2.0 对 SmMK 的氨基酸序列的跨膜结构域进行了预测。根据预测的结果显示，该蛋白不含跨膜结构域 (图 3)。

3.2.3 SmMK 蛋白信号肽及定位的预测与分析 利用 SignalP4.0 Server 网站对 SmMK 蛋白信号肽进行预测后发现，SmMK 蛋白为非分泌型蛋白 (图 4)。并且利用 TargetP 1.1 Server 的在线网站对 SmMK 蛋白定位进行预测，结果显示该蛋白定位在叶绿体的分数为 0.016，线粒体为 0.259，其他位置为 0.444，含有信号肽的可能性为 0.315。利用 ProtComp 在线网站对 SmMK 蛋白定位进行预测，结果显示为在细胞质中的可能性为 8.7，线粒体中为 0.06，内质网中为 0.15，叶绿体中为 0.67。利用 WoLF PSORT 网站对 SmMK 蛋白定位进行预测，结果显示为在细胞核中为 7，叶绿体中为 2，细胞质中为 1，线粒体中为 1，内质网中为 1。由于预测软件所选用的预测方法不尽相同，故而在不同的网站利用不同的算法所显示的预测结果也有所不同。根据这 3 个软件预测的结果可知，TargetP 1.1 Server 在线网站

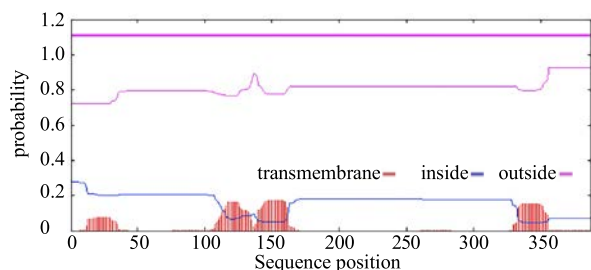


图 3 SmMK 蛋白跨膜结构域分析

Fig. 3 Prediction for transmembrane domain of SmMK

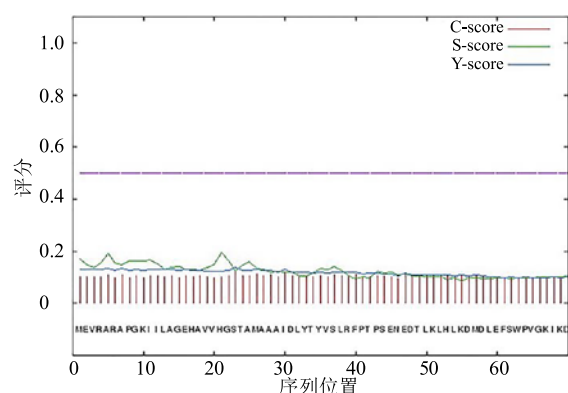


图 4 SmMK 基因编码的蛋白信号肽预测分析

Fig. 4 Prediction of signal peptide of SmMK protein encoding by SmMK gene

和 ProtComp 在线网站预测的结果一致, SmMK 蛋白定位于细胞质中, 而仅有 WoLF PSORT 网站预测的 SmMK 蛋白定位于细胞核中。故而可以据此推测 SmMK 蛋白定位于细胞质中。

3.2.4 SmMK 蛋白二级结构与三维结构的预测与分析 利用 PredictProtein 在线软件对 SmMK 蛋白的二级结构进行了预测分析, 结果显示 α -螺旋 (H) 占 45%, β -折叠 (E) 占 5%, 无规卷曲 (C) 占 30%。利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件预测分析 SmMK 蛋白的三维构象, 发现其与人的 MK 的序列相似度为 38.44%, 据此来进行建模, 结果如图 5 所示, 预测的三维构象与预测的二级结构相一致。

3.2.5 SmMK 的聚类分析 利用 NCBI 网站的 blastp 功能将 SmMK 的氨基酸序列与 nr 非冗余数据库进行比对, 结果显示, SmMK 蛋白序列与滇龙胆的 MK 蛋白序列相似性最高, 相似度高达 94%, 属于 GHMP kinases N 超家族。选取其他的植物中与 SmMK 基因编码的蛋白相似度较高的 MK 蛋白的氨基酸序列, 分别为独行菜 *Lepidium apetalum* Willd.

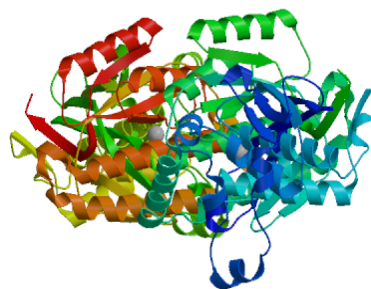


图 5 SmMK 蛋白质的三维结构预测

Fig. 5 Predicted three dimensional structure of SmMK

(ANV28272.1)、滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl (AJT35507.1)、三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen (AFN02124.1)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (AED93690.1)、水稻 *Oryza sativa* Japonica Group (XP_015614952.1)、毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr (AKF12263.1)、苹果 *Malus domestica* Borkh (XP_008388579.1)、巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg (AFJ74336.1)、胡黄连 *Picrorhiza kurrooa* Royle ex Benth (AGS18028.1)、美花烟草 *Nicotiana sylvestris* Speg & Comes (AGR67371.1)、假马齿苋 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst (AFJ93086.1)、小麦 *Triticum aestivum* L. (AFV51838.1)、长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (ADR65111.1)、黄灯笼辣椒 *Capsicum chinense* Jacq. (PHU10096.1)、苦瓜 *Momordica charantia* Linn. (XP_022150767.1)、菠菜 *Spinacia oleracea* L. (XP_021839101.1)、木豆 *Cajanus cajan* (Linn.) Millsp (XP_020211315.1)、棕榈 *Cajanus cajan* Jacq (XP_010906879.1)、亚麻荠 *Camelina sativa* (L.) Crantz (XP_010494008.1)、醉蝶花 *Tarenaya hassleriana* (Chodat) Iltis (XP_010524882.1)、芜菁 *Brassica rapa* L. (XP_009111761.1)、海枣 *Phoenix dactylifera* L. (XP_008790991.1)、赤豆 *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi (XP_017434056.1)、雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. F. (AMB15001.1)、蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn (XP_003626302.1) 共 25 个。利用 MEGA 7.0 构建 Neighbor-joining 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1 100 次 (图 6)。发现 SmMK 蛋白与滇龙胆、长春

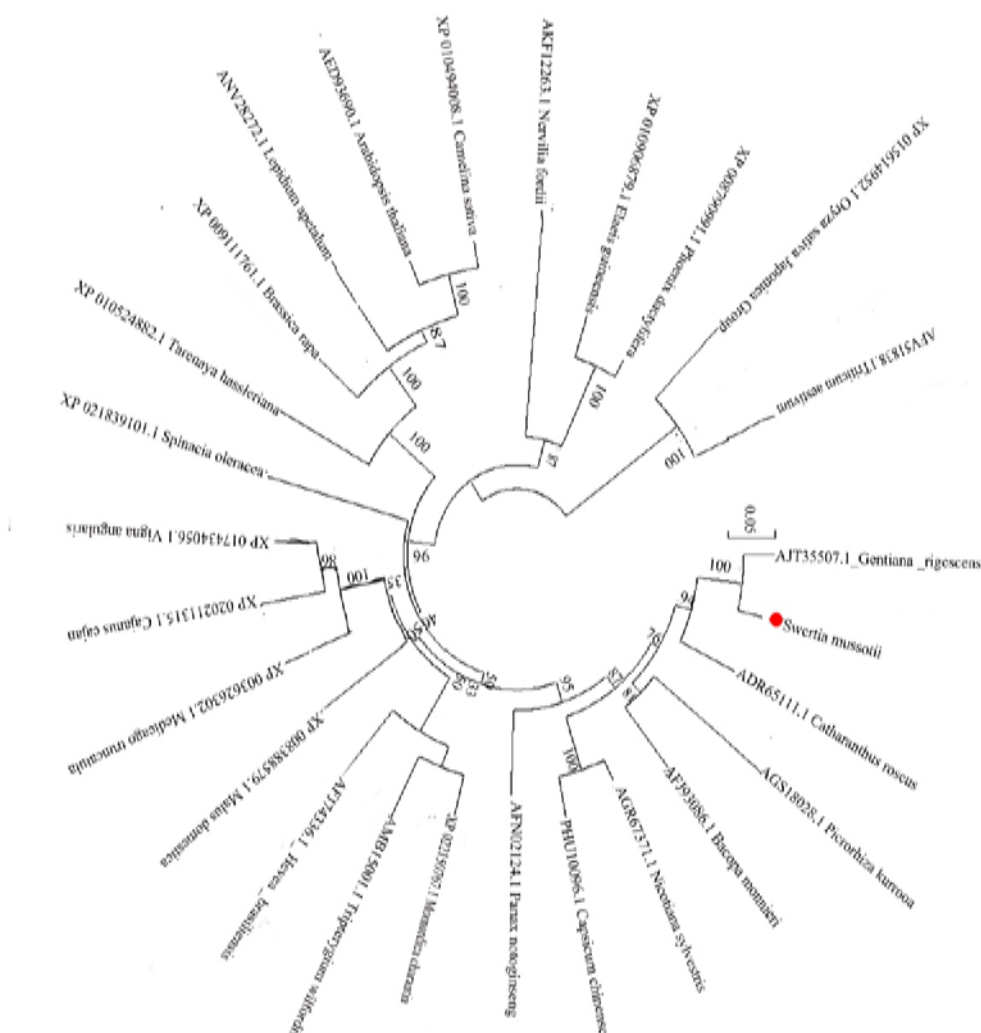


图 6 SmMK 与相关物种 MK 蛋白的系统发育分析

Fig. 6 Phylogenetic relationship of SmMK and MK proteins from other plants

花、胡黄连、假马齿苋的 MK 蛋白共聚一支。同时利用 NCBI 网站的 blastp 功能和 DNAMAN 软件将 SmMK 的氨基酸序列与滇龙胆、长春花、胡黄连、假马齿苋的 MK 蛋白的氨基酸序列进行了比对如图 7 所示，图 7 中不同颜色标出的区域表示 SmMK 蛋白质的氨基酸与其他植物中的 MK 氨基酸的同源程度，黑色区域代表同源程度高达 100%，结果可以表明它们之间确实具有较高的相似性。

3.3 SmMK 基因的原核表达载体的构建

将 pETMALc-H 载体和已经构建好的 pEAYuSY-Blunt Simple-SmMK (图 8) 双酶切后，进行琼脂糖凝胶电泳的检测。切胶回收目的产物后，连接转化进入 Rosetta (DE3) 感受态中。挑

选阳性转化子，提取质粒进行双酶切验证后 (图 9)，进行测序，正确无误后进行后续实验。

3.4 SmMK 基因的原核表达

用已经构建好的原核表达载体，参考 NEB 公司的 pMAL 系列载体的原核表达的说明书，并根据实际情况进行调整后进行 SmMK 基因的原核表达，并对表达出的蛋白进行了纯化。将 pETMALc-H 载体转入 Rosetta (DE3) 中作为阴性对照，简称为 Rosetta-MBP。将 Rosetta-MBP-SmMK 与阴性对照以相同条件诱导表达，将表达后的 Rosetta-MBP，Rosetta-MBP-SmMK 及 Rosetta-MBP-SmMK 纯化产物一起用 SDS-PAGE 进行检测。可以看到在 84 000 处有目的蛋白的出现，与之前所预测的蛋白大小是相一致的，见图 10。

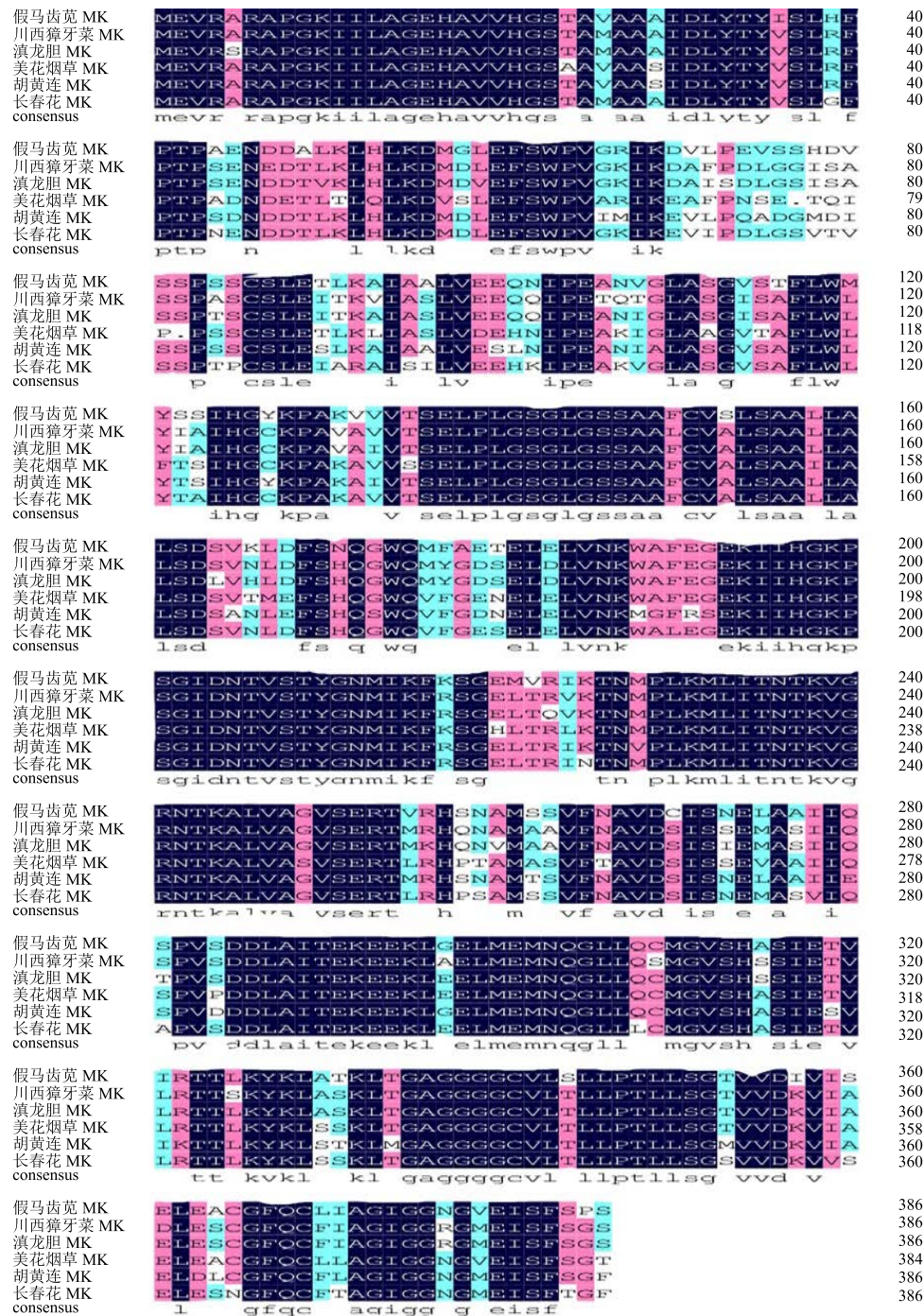


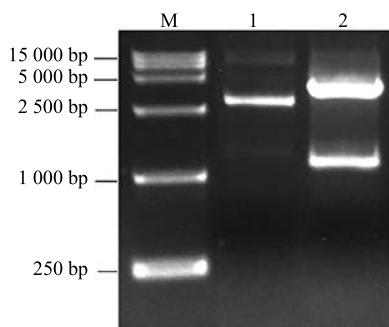
图 7 川西獐牙菜 SmMK 与其他植物中 MK 氨基酸序列的多序列比对

Fig. 7 Multiple sequence alignment of SmMK amino acid sequence with MK in other plants

4 讨论

藏茵陈作为“藏药八珍之一”，在藏医藏药典籍中是极具代表性的治疗热症的药物之一，在现在医学临床上治疗肝炎、肝硬化等疾病具有显著的疗效。作为其基原药用植物的川西獐牙菜则是众多学者关注研究的焦点所在，对于川西獐牙菜的研究较多集中在其药理活性、化学成分等方面，在分子生

物学的研究方面较少。近年来，本课题组基于转录组的方法，对川西獐牙菜有效成分的生源途径进行了深入的研究，克隆了一些关键酶编码基因 SmIS1、SmIS2、和 SmGPPS，并对其功能进行了验证^[5, 15]。由于川西獐牙菜引种困难，尚无大规模的人工种植栽培，市场对于其的需求与日俱增，其野生资源被大量采收破坏，不仅对环境和物种多样性造成了巨

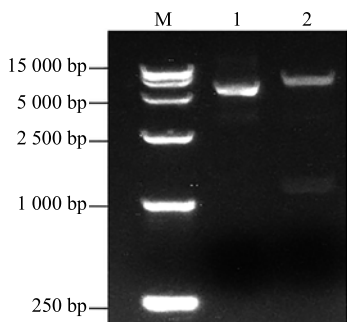


M-Marker 1-pEASY-Blunt Simple-SmMK 的质粒 2-利用 *BamH I*、*Sal I* 2 个限制性内切酶对 pEASY-Blunt Simple-SmMK 质粒进行双酶切

M-Marker 1-plasmid of pEASY-Blunt Simple-SmMK 2-plasmid pEASY-Blunt Simple-SmMK digested by *BamH I* and *Sal I*

图 8 pEASY-Blunt Simple-SmMK 载体的双酶切琼脂糖凝胶电泳

Fig. 8 Digestive detection of pEASY-Blunt Simple-SmMK plasmid



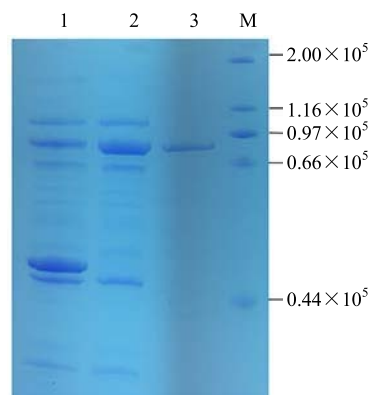
M-Marker 1-Rosetta-MBP-SmMK 的质粒 2-利用 *BamH I*、*Sal I* 2 个限制性内切酶对 Rosetta-MBP-SmMK 质粒进行双酶切

M-Marker 1-plasmid of Rosetta-MBP-SmMK 2-plasmid Rosetta-MBP-SmMK digested by *BamH I* and *Sal I*

图 9 Rosetta-MBP-SmMK 载体的双酶切琼脂糖凝胶电泳

大的威胁，而且也无法满足未来药用市场对其的需求^[1,16-17]。故而通过分子生物学和合成生物学的手段来提高獐牙菜苦苷、龙胆苦苷等异戊二烯类化合物的产量迫在眉睫。

植物中 MVA 与 MEP 途径是 2 条分别位于细胞质与质体的合成异戊二烯类化合物的重要途径。二者通过共用 IPP、DMAPP、FPP、GGPP、GPP 等中间代谢物建立了密不可分的联系。其中 MVA 途径是植物中尤为重要的次生代谢途径，其不仅影响着 MEP 途径的代谢，其产物植物甾醇还是细胞膜的组成成分，并且与细胞分裂素的合成、萜类药物有效成分例如紫杉醇、青蒿素的合成息息相关。MK 则是在 MVA 途径中不可或缺的关键限速酶，催化甲羟戊酸转变为 5-磷酸甲羟戊酸^[18]。



M-Marker 1-转入 Rosetta-MBP 载体的 Rosetta (DE3) 菌株 2-转入 Rosetta-MBP-SmMK 载体的 Rosetta (DE3) 菌株 3-转入 Rosetta-MBP-SmMK 载体的 Rosetta (DE3) 菌株纯化后的蛋白

图 10 重组蛋白的表达与纯化

Fig. 10 Expression and purified recombinant protein

目前已经在多种药用植物中克隆得到了 MK^[10-14]，本研究首次在川西獐牙菜中克隆得到了川西獐牙菜中的 SmMK，并且借助生物信息学方法对其进行了分析。SmMK 的氨基酸序列与其他植物 MK 的相似性较高，尤其是与滇龙胆^[13]的 MK 氨基酸序列相似性高达 94%。与已报道的滇龙胆^[13]、三七^[8]、杜仲^[14]相比，具有相同的 C 端结构域、N 端结构域和 ATP 结合结构域，同属于 GHMP 激酶超家族，推测 SmMK 可能具有其他植物 MK 蛋白相似的酶活性。

亚细胞定位对于蛋白质执行功能具有较大影响，而有报道显示，经不同的亚细胞定位软件预测，小麦^[10]、茶树^[11]、独行菜^[12]、三七^[8]等植物的 MK 蛋白均可能定位于细胞质中，这与本课题组对 SmMK 蛋白定位的预测结果一致。这些结论为利用荧光蛋白等手段研究 MK 蛋白的亚细胞定位提供了理论基础。

在接下来的工作中，本课题组将开展 SmMK 的体外酶活实验、制备抗体、蛋白结晶解析构象等工作以验证其功能，将继续完善川西獐牙菜的 MVA 途径，为利用合成生物学生产异戊二烯类化合物挖掘重要功能元件。

参考文献

- [1] 马 徐, 刘 越, 冯晓晓, 等. 藏茵陈川西獐牙菜的生物学研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(3): 948-950.

- [2] 宇妥·元丹贡布, 马世林. 四部医典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [3] 孟宪华, 陈德道, 张樱山, 等. 川西獐牙菜的化学成分、药理作用和临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(2): 176-179.
- [4] 井 灵, 张玉娟, 陈 志. 川西獐牙菜的化学成分及药理研究进展 [J]. 青海农林科技, 2014(4): 55-57.
- [5] 向蓓蓓, 李晓雪, 王 勇, 等. 川西獐牙菜牻牛儿苗基焦磷酸合成酶基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 962-970.
- [6] 王秋军, 张 犇, 王剑文. 药用植物类异戊二烯代谢途径及其活性产物合成调控研究进展 [J]. 植物学研究, 2012, 1(2): 23-29.
- [7] Liao P, Hemmerlin A, Bach T J, *et al.* The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(5): 697-713.
- [8] 郭 淑, 罗红梅, 陈士林. 三七甲羟戊酸激酶 PnMVK1 基因的克隆和生物信息学分析 [J]. 药学报, 2012, 47(8): 1092-1097.
- [9] Riou C, Tourte Y, Lacroute F, *et al.* Isolation and characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* mevalonate kinase by genetic complementation in yeast [J]. *Gene*, 1994, 148(2): 293-297.
- [10] 王宝莲. 小麦甲羟戊酸激酶基因克隆及功能分析 [D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2011.
- [11] 王鹏杰, 陈 丹, 曹红利, 等. 茶树甲羟戊酸激酶基因 CsMVK 克隆及表达特性分析 [J]. 南方农业学报, 2017, 48(10): 219-223.
- [12] 赵 乐, 马利刚, 俎梦航, 等. 独行菜 LaMK 基因克隆、生物学信息分析及原核表达 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(11): 924-930.
- [13] 张晓东, 李彩霞, 赵 静, 等. 滇龙胆甲羟戊酸激酶基因的克隆与表达分析 [J]. 贵州农业科学, 2015, 43(12): 196-202.
- [14] 乌云塔娜, 王 淋, 叶生晶. 杜仲甲羟戊酸激酶 (EuMK) 基因鉴定及生物信息学分析 [J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 6-12.
- [15] Xiang B, Li X, Wang Y, *et al.* Cloning and characterization of two iridoid synthase homologs from *Swertia mussotii* [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1387-1391.
- [16] 陈桂琛, 卢学峰, 孙 菁, 等. 藏药川西獐牙菜的引种栽培研究 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33(2): 272-273.
- [17] 赵纪峰, 刘 翔, 王昌华, 等. 珍稀濒危药用植物川西獐牙菜的资源调查 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(4): 845-850.
- [18] Simkin A J, Guirimand G, Papon N, *et al.* Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in plant [J]. *Planta*, 2011, 234(5): 903-914.