

• 药材与资源 •

马蓝色氨酸合成酶基因的克隆及表达分析

马小毛¹, 宁书菊², 叶 齐¹, 胡永乐¹, 蔡国倩¹, 魏道智^{1*}

1. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

2. 福建农林大学作物科学学院, 福建 福州 350002

摘要: 目的 克隆马蓝 *Baphicacanthus cusia* 吲哚类生物碱合成途径的色氨酸合成酶 (tryptophan synthase, TSB) 基因, 命名为 BcTSB (GenBank 登录号 AYM45644.1), 对其生物信息学和表达进行分析。方法 基于前期马蓝转录组数据库, 获得 BcTSB 基因开放阅读框 (ORF), 运用生物信息学手段对基因功能做出初步预测, 构建 pET32a-BcTSB 原核表达载体, 并转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 检测。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测马蓝不同组织 (根、茎、叶) 中 TSB 表达水平。结果 克隆的 BcTSB 基因 ORF 长度为 1 452 bp, 编码 483 个氨基酸, 生物信息学预测为亲水性蛋白, 定位于叶绿体, 该蛋白相对分子质量为 51 665.89, pET-32a 载体包含 18 000 的标签。SDS-PAGE 分析在 70 000 处出现目的蛋白条带, 与理论预期值大小一致。qRT-PCR 分析显示 BcTSB 基因在马蓝不同组织中均有表达, 且在茎中的表达量最高。结论 通过对 BcTSB 基因的克隆及表达分析, 为进一步研究该基因功能及调控奠定了实验基础。

关键词: 马蓝; BcTSB 基因; 克隆; 生物信息学分析; 原核表达; qRT-PCR**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)24-6328-09**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.023**Cloning and expression analysis of tryptophan synthase gene BcTSB in *Baphicacanthus cusia***MA Xiao-mao¹, NING Shu-ju², YE Qi¹, HU Yong-le¹, CAI Guo-qian¹, WEI Dao-zhi¹

1. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Objective To clone the tryptophan synthase gene named as *BcTSB* (GenBank accession number AYM45644.1) involved in the synthesis pathway of indole alkaloids from *Baphicacanthus cusia*, meanwhile, the bioinformatics analysis and expression analysis were also performed. **Method** The open reading frame (ORF) of *BcTSB* gene was obtained by the database of prophase *Baphicacanthus cusia* transcriptome. The function of the *BcTSB* gene was preliminarily predicted by a series of bioinformatics tools. The entire protein-coding cDNA of *BcTSB* was cloned into the prokaryotic expression vector pET32a, then the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells, with IPTG induction. SDS-PAGE was used to investigate the situation of expression. The expression of the gene in root, stem and leaf was determined by using real-time PCR (qRT-PCR). **Results** The open reading frame (ORF) of cloned *BcTSB* gene was 1 452 bp, and encoding 483 amino acids, it was predicted by bioinformatics analysis as hydrophilic protein, being located in the chloroplasts. Bioinformatics analysis of the amino acid sequence showed that the molecular weight of encoded protein was 52 kDa, because prokaryotic expression vector pET32a contained 18 kDa label, SDS-PAGE results showed that a protein band at 70 000 was in consistent with molecular weight of the predicted protein. The QRT-PCR revealed that *BcTSB* gene was expressed in different tissues of *B. cusia*, the expression level of *BcTSB* in stems was much higher than that in roots and leaves. **Conclusion** In this study, *BcTSB* gene of *B. cusia* was cloned and its expression was analyzed successfully, which laid an experimental foundation for further study on the function and regulation of the gene.

Key words: *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek.; *BcTSB* gene; clone; bioinformatics analysis; prokaryotic expression; qRT-PCR

收稿日期: 2020-06-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573517); 福建省自然科学基金面上资助项目 (2019J01827)

作者简介: 马小毛 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生态学。E-mail: 2592300779@qq.com

*通信作者 魏道智 (1960—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为药用植物资源学。E-mail: weidz888@sohu.com

药用植物马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek. 属于爵床科马蓝属的多年生草本植物^[1], 福建产马蓝的根、茎、叶均具有药用价值, 根为中药的“南板蓝根”, 茎、叶经过加工制得的粉末状物为中药青黛^[2]。福建莆田市仙游县是高品质马蓝的道地原产地, 加工所得的青黛活性成分含量远高于《中国药典》规定标准^[3], 在全国同类产品中, 被认为质量最优, 在国内外市场上具有较高的声誉^[4]。研究表明, 马蓝中丰富的植物次生代谢产物是马蓝药效的重要物质基础^[5], 已发现的植物次生代谢产物包括生物碱、萜类、黄酮类、皂苷等, 吲哚类生物碱(靛蓝、靛玉红)被认为是马蓝中最重要的药效成分。研究发现, 靛蓝除了作为着色剂用于染色之外, 还具有抗菌、抗病毒、抗炎、增强免疫功能等关键功效; 靛玉红则具有抗肿瘤的作用^[6]。

植物体内吲哚类物质的合成和衍生一直是植物和药用植物学家关注的热点问题^[7], 一般认为马蓝中吲哚合成途径有 2 个, 一是莽草酸途径, 莽草酸在分支酸合成酶(chorismate synthase, CS)、邻氨基苯甲酸合成酶(anthranilate synthase, AS)、吲哚-3-甘油磷酸合成酶(indole-3-glycerol phosphate synthase, IGPS)、色氨酸合成酶 α (tryptophan synthase, TSA)等的作用下形成吲哚; 二是色氨酸途径, 色氨酸在色氨酸合成酶 β (tryptophan synthase β , TSB)的作用下形成吲哚, 吲哚形成后经细胞色素 CYP450 单氧化酶(cytochrome P450 monooxygenase, CYP450)氧化为 2-羟基吲哚和 3-羟基吲哚, 吲哚酚加氧聚合成靛蓝、靛玉红或衍生物为其他吲哚类物质^[8]。

色氨酸合成酶一般存在于细菌、霉菌以及植物当中, 可从吲哚化合物和丝氨酸合成色氨酸, 包括 α 和 β 2 种亚基, α 亚基由 TrpA 编码, β 亚基由 TrpB 编码^[9]。在马蓝生物碱合成的过程中, 色氨酸合成酶发挥着重要的作用, 吲哚-3-甘油磷酸在 TSA 的作用下形成吲哚, 而色氨酸在 TSB 的作用下形成吲哚。因此, 可以看出色氨酸与马蓝体内吲哚含量关系密切。目前, 色氨酸合成酶在真菌^[10]和细菌^[11]中的研究较多, 杨树等^[12]克隆了菰蓝色氨酸合成酶基因 LiTSA, 并进行了生物信息学分析和表达模式分析的相关研究, 而马蓝吲哚类生物碱代谢路径研究中, TSB 行使的功能还未知。

因此本研究以前期马蓝转录组数据库为依据^[13], 通过 Gateway 克隆技术克隆到 BcTSB 基因, 并进行

生物信息学分析、原核表达以及时空表达分析, 旨在为深入研究该基因在马蓝吲哚生物碱合成途径中的分子调控作用奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品取自福建马蓝道地产地莆田市仙游县书峰乡马蓝栽培基地(118°39'51.00"E, 25°25'32.12"N), 经福建农林大学生命科学学院魏道智教授鉴定为马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek.。采回后存于本实验室-80 °C 冰箱保存备用。

1.2 试剂

克隆载体、原核表达载体: pENTR-D-TOPO、PET32a 均为本实验室保存。DH5 α Chemically Competent Cell 和 BL21 (DE3) 感受态细胞均购自上海唯地生物科技有限公司。RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、Sal I、BamH I 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、2 $\times$ TransTaq PCR Mix、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司, 质粒小提试剂盒、DNA Marker、蛋白质 Marker 均购自北京全式金生物技术有限公司, StarPrep 快速 DNA 胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。PCR 引物合成与测序均由福州尚亚生物有限公司完成。

1.3 仪器

Eppendorf PCR 仪(Eppendorf 中国有限公司); LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪、凝胶成像仪分析系统、高压灭菌锅、电泳仪(南京皓海仪器仪表有限公司)。

2 方法

2.1 引物的设计与合成

根据马蓝转录组数据库, 筛选目的基因 BcTSB, 利用 Blast 软件对 BcTSB 基因的编码区进行预测, 并在编码区利用 primer 5.0 设计引物, 本研究所用到的引物序列如表 1 所示, BcTSB 基因正反向引物前面分别添加 BamH I、Sal I 酶切位点及保护碱基, 32aTSB 正反向引物前面分别添加 BamH I、Sal I 酶切位点及保护碱基(下划线为酶切位点)。

2.2 总 RNA 的提取和 BcTSB 基因的克隆

总 RNA 的提取采用 Trizol 法, 根据试剂盒提取马蓝总 RNA, 将符合条件的 RNA 反转录成 cDNA, 并保存在-80 °C 冰箱。根据 BcTSB 基因的编码区序列, 应用 primer 5.0 设计特异性引物 P1(表 1), 以 cDNA 为模板对 BcTSB 基因进行扩增。PCR 扩增反应体系为 20 μ L: 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10 μ L,

表 1 引物和序列

Table 1 Primers and sequences

编号	引物名称	序列(5'→3')
P1	TSB-F	CGC <u>GGATCC</u> ATGTCTTGCGCAAAAAATTTCCAC
	TSB-R	ACGC <u>GTCGAC</u> TTTCTTCATCAGATATTCCATCACCG
P2	32aTSB-F	CGC <u>GGATCC</u> ATGTCTTGCGCAAAAAATTTCCAC
	32aTSB-R	ACGC <u>GTCGAC</u> TATTCTTCATCAGATATTCCATCACCG
P3	BcTSB-qpcr-F	CGATGAAGATGTGAGGCTGAT
	BcTSB-qpcr-R	CCCGACACCCACTGAATG
P4	β-actin-F	GAGGGCCAAAACAACTTGA
	β-actin-R	CCCTTATGTGCCTTTGCCTA

上下游引物各 1 μL, 模板 1 μL, ddH₂O 7.0 μL。PCR 反应体系为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环, 72 °C 在延伸 5 min, 4 °C 保温。

扩增后, 将验证成功的目的条带进行胶回收, 将回收获得的目的基因 DNA 片段与入门载体 pENTR-D-TOPO 载体进行连接, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 卡那霉素抗性筛选阳性克隆。随机挑取单克隆进行 PCR 和双酶切鉴定, 将鉴定为阳性的重组质粒命名为 pENTR-D-TOPO-BcTSB, 鉴定成功的重组菌送至福州尚亚生物技术有限公司进行测序处理。

2.3 BcTSB 基因生物信息学分析

采用 NCBI ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线软件对 BcTSB 基因的开放阅读框(ORF)进行预测; 采用 ExPASy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件对 BcTSB 基因编码的氨基酸进行理化性质的分析; 采用 ExPASy-ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线软件对 BcTSB 蛋白进行亲/疏水性分析; 采用 TMHMM Server 9(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线软件对 BcTSB 蛋白进行跨膜结构域分析; 采用 SignalP 4.1 对 BcTSB 蛋白的信号肽进行预测; 采用 Plant-PLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/#>) 在线软件对 BcTSB 蛋白进行亚细胞定位分析; 采用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 和 NetOGlyc 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 在线软件对 BcTSB 蛋白进行磷酸化与糖基化分析; 采用在线工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 对 BcTSB 蛋白保守结构域进行分析; 采用 NPS@: SOPMA secondary structure prediction 和 phyre2 软件分别进行二级结构和三级

结构预测; 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列的同源比对, 利用 MEGA 6.0 软件的 neighbor-joining (NJ) 法对 BcTSB 基因氨基酸序列与其他 16 种物种的 TSB 基因氨基酸序列的进化进行了评估。

2.4 pET32a-BcTSB 原核表达载体的构建和转化

利用 BamH、Sal I 限制性内切酶双酶切目的基因与 PET32a 载体质粒, 37 °C 酶切 3~4 h, 将酶切的目的片段和载体片段进行胶回收处理后, 用 T₄ 连接酶于 16 °C 中过夜连接, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 氨苄霉素抗性筛选阳性克隆, 37 °C 过夜培养。挑选阳性克隆进行 PCR 和双酶切鉴定; 鉴定为阳性的重组质粒, 送至福州尚亚生物技术有限公司测序, 测序成功后, 将重组表达载体命名为 pET32a-BcTSB, 将测序正确的 pET32a-BcTSB 转化 BL21(DE3)感受态细胞, 随机挑选单克隆进行 PCR 检测。

2.5 BcTSB 基因原核表达分析

将检测成功的菌液取 300 μL 转摇至 10 mL 含氨苄霉素抗性的 LB 液体培养基中, 放入 37 °C, 200 r/min 摇床中培养, 在波长为 600 nm 的分光光度计下检测吸光度(A)值为 0.6~0.8 即可, 在每组菌中分别加入 IPTG 2 μL, 终浓度 0.5 mmol/L, 20 °C 表达过夜, 37 °C 表达 3~4 h (取未加入 IPTG 的菌液作为对照), 从每组试管中均取 500 μL 菌液加入到 1.5 mL 离心管中, 6 000 r/min, 离心 5 min, 去上清, 留沉淀; 在沉淀中加 500 μL PBS 悬浮沉淀, 并用超声细胞破碎仪充分破碎细胞, 间隔 10 s, 超声 5 s, 循环 20 次, 超声之后, 6 000 r/min, 离心 5 min, 取上清和沉淀备用, 并取未离心的总蛋白作为对照, 在离心管中加入 20 μL 的 2×SDS-PAGE Loading Buffer 混匀; 放入煮样器 100 °C 煮 10 min 左右, SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。

2.6 BcTSB 基因时空表达分析

运用获得的 BcTSB 基因 cDNA 序列设计引物 P3 (表 1), 以马蓝 β -actin 作为内参基因设计内参特异引物 P4 (表 1)。以马蓝不同组织 (根、茎、叶) cDNA 为模板进行 qRT-PCR 分析。利用 Light Cycler96 实时荧光定量 PCR 仪进行反应, 每个样品 3 个生物学重复。qRT-PCR 反应体系为 20 μ L: qPCRmasterMix 10 μ L, 上下游引物各 0.6 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 6.8 μ L; qRT-PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C、30 s; 94 $^{\circ}$ C、5 s; 60 $^{\circ}$ C、20 s, 72 $^{\circ}$ C、20 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C、10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束绘制熔解曲线, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算基因的相对表达量^[14]。

3 结果与分析

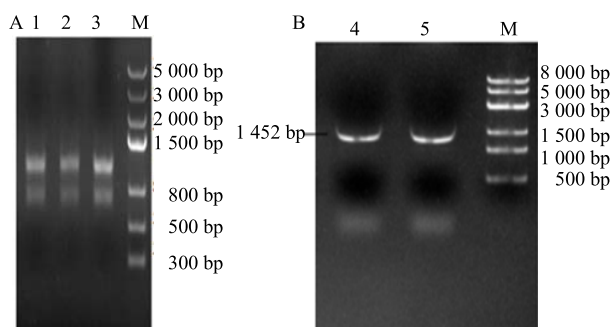
3.1 BcTSB 基因的克隆

3.1.1 总 RNA 的提取与检测 以马蓝根、茎、叶为材料提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳如图 1-A 所示, 有 28 S 和 18 S 2 条明显的条带, 28 S 条带亮度是 18 S 的 2 倍, 说明提取的 RNA 完整性良好, A_{260nm}/A_{280nm} 值为 1.8~2.0, RNA 质量浓度 ≥ 400 ng/mL, 符合后续实验要求。

3.1.2 BcTSB 基因的 PCR 扩增 以马蓝 cDNA 为模板, 采用 primer 5.0 设计正、反向引物 P1 (表 1), 经 PCR 扩增 BcTSB 基因后, 获得条带约为 1 452 bp, 与目的基因预期一致 (图 1-B)。

3.2 BcTSB 基因生物信息学分析

3.2.1 理化性质分析 蛋白理化性质分析发现 BcTSB 基因编码一条含 483 个氨基酸的肽链 (图 2),



M-Marker 1~3-RNA 条带 4~5-BcTSB 基因 PCR 产物
M-Marker 1—3-electrophoresis results of RNA 4—5-PCR
amplification products of BcTSB gene

图 1 马蓝 RNA 凝胶电泳 (A) 和 BcTSB 基因 (B) PCR 扩增
Fig. 1 Electrophoresis results of RNA in *B. cusia* and PCR
amplification of *BcTSB* gene

分子式为 $C_{2282}H_{3621}N_{635}O_{692}S_{20}$, 相对分子质量为 51 665.89, 理论等电点为 6.58, 脂溶指数为 87.08。亲水性总平均值 (GRAVY) 为 -0.096。在氨基酸残基的组成上, 丙氨酸 (Ala) 含量最高, 占 11.8%。ExPASy-ProtScale 对亲疏水性分析表明, BcTSB 蛋白为亲水性蛋白 (图 3-A)。利用 NetPhos 3.1 Server 在线软件对 BcTSB 蛋白进行磷酸化位点预测分析, 结果表明 BcTSB 蛋白存在 22 个磷酸化位点, 包含 13 个丝氨酸 (Ser)、5 个苏氨酸 (Thr)、4 个酪氨酸 (Tyr), 表明该蛋白对植物的代谢方面起着重要的调节作用。利用 NetOGlyc 4.0 Server 软件对 BcTSB 蛋白糖基化位点分析表明, BcTSB 序列共包含 12 个糖基化位点。

3.2.2 BcTSB 蛋白结构域、亚细胞定位、信号肽及跨膜区预测 使用 SMART 软件对 BcTSB 蛋白进行结构域分析表明, 该蛋白属于 Trp-synth-beta-II 超家族 (图 3-B)。使用 TMHMM 进行跨膜区预测结果显示, BcTSB 基因只含有 Outside 区, 推测 BcTSB 基因编码的蛋白不含跨膜结构域 (图 3-C)。同时使用 SignalP 进行分析结果显示, 在 N 端 70 bp 范围内, BcTSB 基因未预测出信号肽区域 (图 3-D)。利用 Plant-PLoc 软件对 BcTSB 蛋白进行亚细胞定位分析, 结果表明, BcTSB 基因编码的蛋白可能在叶绿体中发挥着重要的作用。

3.2.3 二级结构和三级结构预测 运用 SOPMA 在线软件对 BcTSB 基因氨基酸序列的二级结构进行预测, 分析结果表明, 该蛋白的二级结构元件包括 α 螺旋 (37.68%), 无规则卷曲 (38.30%), β 折叠延伸链 (14.91%) 和 β 转角 (9.11%) (图 4-A), α 螺旋和无规则卷曲为该蛋白二级结构的主要元件。

马蓝 BcTSB 蛋白三级结构模型是运用 Phyre2 建模软件模拟而出, 是在二级结构基础上盘绕、折叠产生的特定空间结构 (图 4-B)。

3.2.4 BcTSB 蛋白序列比对和系统进化树分析 通过 NCBI 在线 Blastp 对蛋白进行同源序列搜索, 选取独脚金 (GER52969.1) 等 16 种不同物种的 TSB 氨基酸序列, 采用 DNAMAN 软件对氨基酸进行氨基酸序列进行多重序列比对 (图 5), 发现 BcTSB 蛋白与其他蛋白保守区域相似性最高达到 88%, 表明 BcTSB 蛋白的保守性较高。利用 MEGA 6.0 软件的 NJ 法, 构建不同生物 TSB 的进化树, 结果发现 BcTSB 基因与药用植物独脚金 (GER52969.1)、红鼠尾草 (TEY67686.1) 亲缘关系较近, 可聚为一支 (图 6)。

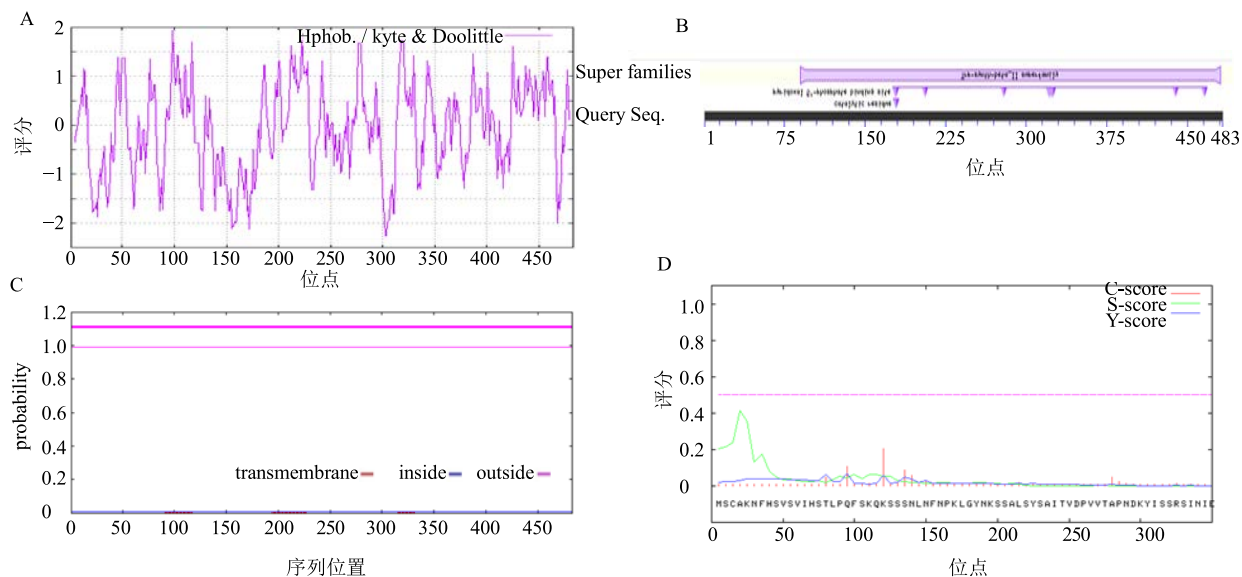
```

1 ATGCTTTCGCGCAAAAAATTTCCACTCCGTTTCTGTAATCCATTGACCCCTTCTCAATTC
1 M S C A K N F H S V S V I H S T L P Q F
61 TCCAAGCAAAAATCATCATCAATCTCAATTTCAACCCCAATAGGATATAATAATCT
21 S K Q K S S S N L N F N P K L G Y N K S
121 TCTGCATTAAATTATTCAGCCATAACTGTTGATCCAGTCGTGACTGCGCGGAATGATAAA
41 S A L S Y S A I T V D P V V T A P N D K
181 TATATTAGTAGTAGGAGTATAAATATTGAACCACTGTAAATCGGACATGGTCGCTTTG
61 Y I S S R S I N I E P T V K S D M V A L
241 ATCGATCAGGCTGAGGAGAAATCGGCTACCACTGGAAATTTGGTGGTTCGGAGGAGTC
81 I D Q A E E K S A T T G K F G A F G G V
301 TTCGTGCGGAGACGCTCGTGAGTTCCTTGAGCAAGCTGGCTGCTGAATTCACCTAATT
101 F V P E T L V S S L S K L A A E F N L I
361 CTACATGATCGGGATTTCAGGGTGAGCTCCAGGTTCCTTAAGGGACTACGTCGCGAGG
121 L H D R D F Q G E L Q V A L R D Y V G R
421 GAAACCCCGCTTTATTACGCGAAACGCTGTGCGGATTACTACAAGGGTAAGGGCAACGGA
141 E T P L Y Y A K R L S D Y Y K G K N G
481 CAGGCCCCGAGATTACTTGAAGCGTGAGGATCTCAACCATGGCGCGCTCACAAGATT
161 Q G P E I Y L K R E D L N H G G A H K I
541 AACACGCCATCGCGCAGGCTATGATCGCTCAGCGGATGGCGCGGACGAGTATTGTGGCC
181 N N A I A Q A M I A Q R M G R T S I V A
601 GCCACGGCGCGCGGACGCGCTCGCCACGGCGCGCTCGCGGAGCTCGGCGCTG
201 A T G A G Q H G V A T A A A C A K L G L
661 GAGTGACGGTTTTCTGGGCAACGTGGACATGGCCCGGCGAGCCACACGTCCTCTG
221 E C T V F V G N V D M A R Q P H N V L L
721 ATGAACATCTCGGCGCGGAAGTGAATCCGTCAAGGGAATGTTCAAGGACGCCACGTCG
241 M K H L G A E V K S V K G M F K D A T S
781 GAAGCCATTCGGAATGGGTTTGGGATTGGACCGCGGCTACTTACTCGCGGGGCGCG
261 E A I R N W V C D L D R G Y L L A G A A
841 GTCGGGCGCACCCGTTGCGGAGCATGGTCCGGGAGTTCAGGCGGTGATCGGGAAGGAA
281 V G P H P L P S M V R E F Q A V I G K E
901 ACGCGCGCGCAGGCGATGGAGAGTGGGCGGCAAGCCGACGCGGTGGTGGCTGCGTC
301 T R R Q A M E K W G G K P D A V V A C V
961 GGCAGCGGTCACACGCACTCGGATTTTACGAATTTGTCGCGATGAAGATGTGAGG
321 G S G S N A L G I F H E F V R D E D V R
1021 CTGATCGGCTGGAGGCGCGCGGCGGAATTGAGAGCGGTAGACACTCGGCCACGCTG
341 L I G V E A A G S G I E S G R H S A T L
1081 GCTAAGGAGATGTTGGAGTGATACCAAGGTGCAATGAGCTATCTTCCAGGACGATCAG
361 A K G D V G V Y H G A M S Y L L Q D D Q
1141 GGCCAAATATTCACCACTAGTGGGTGTCGGGTTAGAGTACCCAGCAGTATAGTCCG
381 G Q I I A P H S V G V G L E Y P A V S P
1201 GAGCTCAGTTTTCTCAAAGACATCGGACGAGCTGAATTTCACTCCGTTACGGATGAAGAA
401 E L S F L K D I G R A E F H S V T D E E
1261 GCCCTGGATGCGTATGCACTGTGTGCAAGACAGAAGAAATTTCCGGCGCTGGAGGCG
421 A L D A Y A L L C K T E G I F P A L E A
1321 GCGCACGCGGTGGCTATCTAGAAAAGTTTGTCCACGCTGGCGGTGGACGGAGCGAAA
441 A H A V A Y L E K L C P T L A V D G A K
1381 GTGGTGGTTAATTGCAGCGGCGTGGGACAAGGATGCGGGCGCGGTGATGAATATCTG
461 V V V N C S G R G D K D A G A V M E Y L
1441 ATGAAGAAATAG
481 M K K *

```

图 2 BcTSB 基因的核苷酸和氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and id sequences of BcTSB

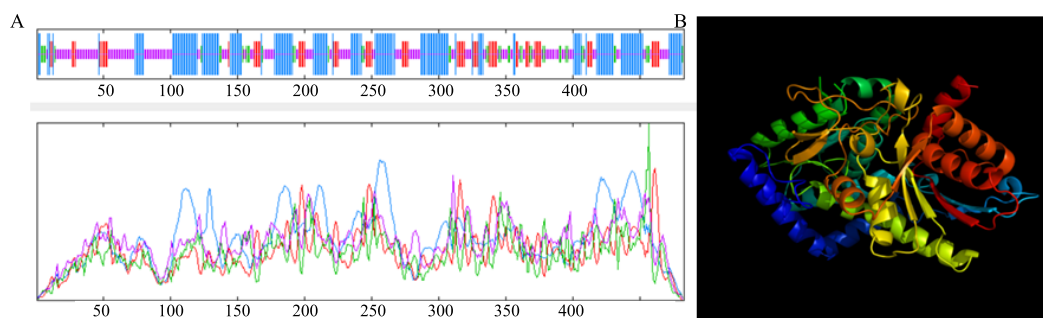


A-BcTSB 蛋白亲水性/疏水性预测 B-BcTSB 蛋白保守结构域预测 C-BcTSB 蛋白跨膜区预测 D-BcTSB 蛋白信号肽预测

A-prediction of hydrophilic/hydrophobic of BcTSB protein B-prediction of conservative domain of BcTSB protein C-prediction of transmembrane domain of BcTSB protein D-prediction of Signal peptide of BcTSB protein

图 3 马蓝 BcTSB 蛋白亲疏水性、结构域、跨膜区及信号肽预测

Fig. 3 Prediction of hydrophilic / hydrophobic, domain, signal peptide and transmembrane domain of BcTSB protein



A-BcTSB 蛋白二级结构预测 B-BcTSB 蛋白的三级结构预测

A-Secondary structure prediction of the BcTSB protein B-Tertiary structure prediction of BcTSB protein

图 4 BcTSB 蛋白二级结构和三级结构预测

Fig. 4 Secondary structure prediction and tertiary structure prediction of BcTSB protein

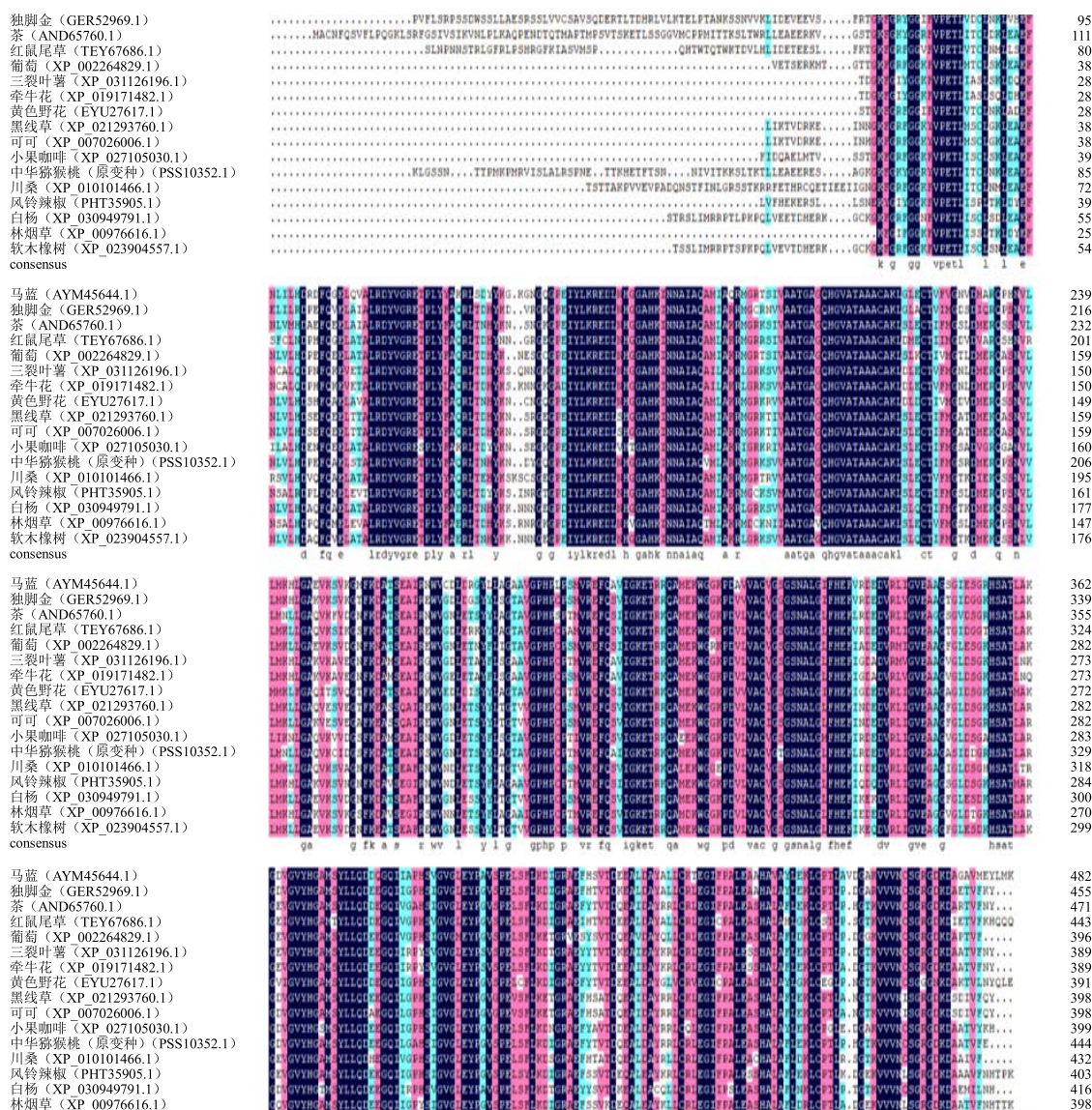


图 5 BcTSB 蛋白同源序列比对分析

Fig. 5 Homologous sequence alignment analysis of BcTSB protein

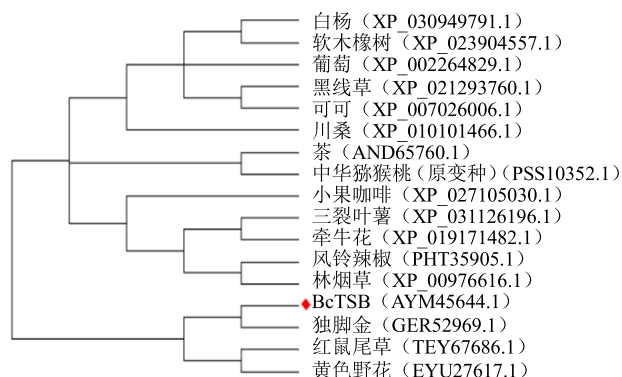


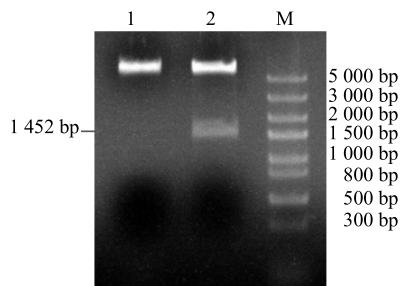
图 6 BcTSB 蛋白系统进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis of BcTSB protein

3.2.5 原核表达载体 pET32a-BcTSB 的构建和转化 构建的重组质粒 pET32a-BcTSB 经 BamH I 和 Sal I 双酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证条带大小, BcTSB 基因条带大小约为 1 452 bp, pET32a 约 5 900 bp, 大小与预期结果一致 (图 7), 表明目的片段成功插入载体 pET32a 中。对阳性重组质粒测序, 结果与预期一致, 表明原核表达载体 pET32a-BcTSB 构建成功。

将构建成功的原核表达载体 pET32a-BcTSB 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 并用氨苄霉素抗性筛选阳性克隆, 对其进行 PCR 检测, 经琼脂糖凝胶电泳检测条带大小约为 1 452 bp, 表明原核表达载体 pET32a-BcTSB 已经成功转化 BL21 (DE3) 感受态细胞。

3.2.6 BcTSB 基因的诱导表达 用 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L) 诱导重组蛋白表达, 经 SDS-PAGE 电泳对融合蛋白表达形式进行分析, 结果表明, BcTSB

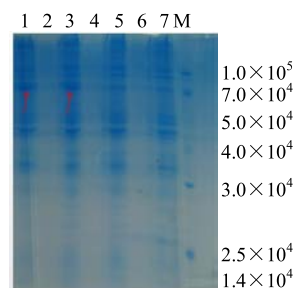


M-Marker 1-阳性质粒 pET32a 双酶切 2-pET32a-BcTSB 双酶切
M-Marker 1-Enzyme digestion of positive plasmid PET32a
2-Enzyme digestion of pET32a-BcTSB

图 7 pET32a-BcTSB 重组质粒双酶切鉴定

Fig. 7 Identification of recombinant plasmid pET32a-BcTSB by double enzyme digestion

基因的融合蛋白分布在沉淀里, 说明该蛋白以包涵体的形式存在。BcTSB 蛋白的大小约为 52 000, His-Tag 标签的相对分子质量为 18 000 左右, 故融合蛋白 BcTSB 的大小为 70 000 左右, 大小符合要求 (图 8)。



1~7 分别为 BcTSB 基因沉淀 (诱导)、上清 (诱导)、总蛋白 (诱导)、上清 (无诱导)、沉淀 (无诱导)、空载 (无诱导)、空载 (诱导) M-Marker

1—7 are BcTSB precipitation (induction), supernatant (induction), total protein (induction), supernatant (no induction), precipitation (no induction), no-load (no induction), no-load (induction) M-Marker

图 8 BcTSB 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 8 SDS-PAGE results of BcTSB recombinant protein

3.2.7 BcTSB 基因时空表达分析 分别提取马蓝根、茎、叶的总 RNA, 通过 qRT-PCR 检测 BcTSB 基因在马蓝各组织中的表达情况, 以内参基因的表达量为对照, 比较 BcTSB 基因在马蓝根、茎、叶中的表达量, 发现该基因在马蓝根、茎、叶中均有表达, 且在茎中表达量最高, 显著高于根和叶 (图 9)。

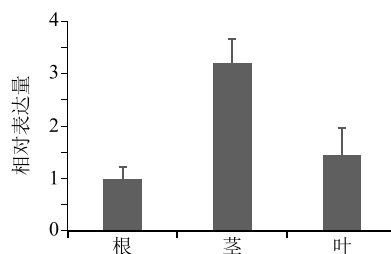


图 9 BcTSB 基因在马蓝不同组织中的表达分析

Fig. 9 Expression of BcTSB gene in different tissues in *B. cusia*

4 讨论

吲哚类生物碱是植物次生代谢的重要产物之一, 具有抗菌、抗炎、抗白血病、抗肿瘤等功能, 目前在马蓝研究中涉及到的吲哚类生物碱主要包括靛蓝、靛玉红、异靛蓝等。早在 1995 年, 杨秀贤等^[15]就从马蓝叶中提取、分离得到靛蓝、靛玉红。有关马蓝有效成分吲哚类生物碱的代谢途径以及有效成分靛

蓝、靛玉红的合成研究一直以来都是许多科学家关注的热点^[16], 一些人认为植物体内靛蓝的合成类似于微生物的合成途径, 虽然微生物工程在很大程度上已经降低了蓝靛大规模合成对环境带来的影响, 但是其产率和效率低, 成本高, 且依靠微生物的代谢途径还不足以满足市场及对植物体内代谢通路的了解^[17], 因此, 要获得高产、高质量的吲哚类生物碱, 深入蓝靛植物的次生代谢和调控的研究是十分必要的。

前期, 本课题组已从马蓝吲哚类生物碱合成途径中克隆得到 CS、AS、CYP450、IGPS 等几个关键酶基因, 并从马蓝转录组着手, 对基因进行了功能验证, 为马蓝药效物质合成途径的阐释提供了科学依据。色氨酸合成酶 TSB 亦是植物体内吲哚类生物碱合成途径的关键酶之一, 目前仅在拟南芥^[18]、玉米^[19]、水稻^[20]和菰蓝^[12]中分离、克隆了 TSB 基因。马蓝作为我国传统的药用植物, 截至目前为止尚未见到 BcTSB 基因的报道, 因此, 要阐释马蓝药效物质合成途径, 没有 BcTSB 基因的克隆和生物学信息的挖掘和分析是不完整的。本研究中, 首先克隆 BcTSB 基因的开放阅读框序列, 经分析表明, BcTSB 基因编码 483 个氨基酸, 相对分子质量为 51 665.89, 理论等电点为 6.58。通过生物信息学分析, 预测到 α 螺旋和无规则卷曲为该蛋白二级结构的主要元件, 三级结构是在二级结构基础上盘绕、折叠产生的特定空间结构、不含跨膜结构和信号肽, 是定位在叶绿体上的亲水性蛋白。氨基酸序列比对以及系统进化树分析结果表明, 马蓝 TSB 基因与其他植物的 TSB 基因一样具有较高的保守性和同源性, BcTSB 蛋白与其他蛋白保守区域相似性最高达到 88%, 且 BcTSB 基因与药用植物独脚金 (GER52969.1)、红鼠尾草 (TEY67686.1) 亲缘关系较近, 可聚为一支。通过构建原核表达载体 pET32a-BcTSB, 并在 BL21 (DE3) 成功表达 BcTSB 重组蛋白, 分析证明该蛋白以包涵体的形式存在, 说明 BcTSB 基因在此系统中可以较好的表达, 为进一步研究 BcTSB 基因的体外功能奠定基础。

组织特异性分析研究结果表明 BcTSB 基因在马蓝的根、茎、叶中均有表达, 且茎中的表达显著高于根和叶, 因此, 传统加工将茎、叶都作为青黛的加工资源, 这对了解和应用马蓝药用部位具有重要的实践意义。基于本研究结果, 将借助根癌农杆菌介导转化, 对马蓝进行有效的遗传改良, 以提高

吲哚类生物碱的含量, 进一步推动马蓝次生代谢和调控研究。

参考文献

- [1] 张青磊. 马蓝吲哚类生物碱合成关键基因 ASA 和 ASB 的克隆与功能研究 [D]. 泉州: 华侨大学, 2017.
- [2] 可晓旭. 不同外源物质处理对马蓝生理特性以及有效成分含量的影响 [D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [3] Heo B G, Park Y J, Park Y S, *et al.* Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant [J]. *Ind Crop Prod*, 2014, 56: 9-16.
- [4] Minami Y, Takao H, Kanafuji T, *et al.* Beta-glucosidase in the indigo plant: Intracellular localization and tissue specific expression in leaves [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(9): 1069-1074.
- [5] 黄玉香. 马蓝药效物质形成关键基因的挖掘与功能研究 [D]. 泉州: 华侨大学, 2017.
- [6] 曾美娟, 刁 勇. 马蓝次生代谢产物研究进展 [J]. 中国农学通报, 2016, 32(20): 30-34.
- [7] Lin W J, Huang W, Ning S J, *et al.* De novo characterization of the *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek transcriptome and analysis of candidate genes involved in indican biosynthesis and metabolism [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0199788.
- [8] 于 剑, 叶 齐, 宁书菊, 等. 马蓝等 79 种植物分支酸合成酶的生物信息学分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 721-730.
- [9] Miyanakoshi M, Yokosawa T, Wakasugi K. Tryptophanyl-tRNA synthetase mediates high-affinity tryptophan uptake into human cells [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(22): 8428-8438.
- [10] Wiest A, Barchers D, Eaton M, *et al.* Molecular analysis of intragenic recombination at the tryptophan synthetase locus in *Neurospora crassa* [J]. *J Genet*, 2013, 92(3): 523-528.
- [11] 郝大利, 诸葛斌, 方慧英, 等. 大肠杆菌 aroG 基因的定点突变及与 trpBA 基因的串联表达 [J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(5): 817-821.
- [12] 杨 树, 潘淑琴, 张丽红, 等. 菰蓝色氨酸合成酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2014, 42(6): 66-70.
- [13] Lin W J, Huang W, Ning S J, *et al.* Comparative transcriptome analyses revealed differential strategies of roots and leaves from methyl jasmonate treatment *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek and differentially expressed genes involved in tryptophan biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0212863.
- [14] 陈 勋, 刘畅宇, 陈 娅, 等. 灰毡毛忍冬 LmPAL1 基

- 因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 178-187.
- [15] 杨秀贤, 吕曙华, 吴寿金. 马蓝叶化学成分的研究 [J]. 中草药, 1995, 26(12): 622.
- [16] Kamelamela N, Zalesne M, Morimoto J, *et al.* Indigo-and indirubin-producing strains of *Proteus* and *Psychrobacter* are associated with purple rind defect in a surface-ripened cheese [J]. *Food Microbiol*, 2018, 76: 543-552.
- [17] 王佳妮, 杨乙丹. 中国古代蓝靛植物的栽培与价值利用 [J]. 古今农业, 2018(3): 12-20.
- [18] 平步云, 赵 军, 安丽君. 拟南芥叶色突变体 F03-06 的筛选及突变基因的克隆 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(21): 5664-5667.
- [19] Wang W, Dai Y, Wang M C, *et al.* Transcriptome dynamics of double recessive mutant, *o2o2o16o16*, reveals the transcriptional mechanisms in the increase of its lysine and tryptophan content in maize [J]. *Genes*, 2019, 10(4): E316.
- [20] Kisaka H, Kisaka M, Lee H Y, *et al.* Isolation of a cDNA for tryptophan synthase beta from rice and studies of its expression in a 5-methyltryptophan-resistant mutant of rice [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 38(5): 875-878.