

五味子 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶基因的克隆及表达分析

李海燕¹, 刘久石², 王 婷¹, 刘宇阳¹, 王熙昂¹, 李宏博^{1*}

(1. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, 2-ODD) 是芳基萘类木脂素-鬼臼毒素合成途径的关键酶。为深入解析 *Sc2-ODD* 基因的表达及其功能, 本研究克隆了五味子 *Sc2-ODD* 基因, 并进行生物信息学分析、果实发育期基因表达特征分析、原核表达载体构建、蛋白诱导与纯化研究。五味子 *Sc2-ODD* 基因 ORF 全长 1 077 bp, 编码 358 个氨基酸, 蛋白分子质量 40.16 kD, 具 2OG-FeII_Oxy 结构域; 系统进化显示 *Sc2-ODD* 与长蒴黄麻 2-ODD 亲缘关系较近; qRT-PCR 结果显示 *Sc2-ODD* 表达量呈现果实膨大期快速增加而进入着色期迅速降低的变化趋势; 将 *Sc2-ODD* 基因插入到原核表达载体, 并构建 pGS21T-*Sc2-ODD* 重组表达载体, 转化 Rosetta (DE3), 经诱导表达获得大量融合蛋白, 利用 GST 融合蛋白纯化技术对融合蛋白进行纯化, 获得高纯度可溶性重组蛋白。研究结果为进一步研究 *Sc2-ODD* 基因在五味子芳基萘类木脂素代谢中的分子调控机制提供依据, 从而为利用基因工程提高五味子芳基萘类木脂素含量并最终提升五味子药材品质奠定基础。

关键词: 五味子; *Sc2-ODD*; 基因克隆; qRT-PCR; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: R282.12 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)09-2226-08

Cloning and expression analysis of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Schisandra chinensis*

LI Hai-yan¹, LIU Jiu-shi², WANG Ting¹, LIU Yu-yang¹, WANG Xi-ang¹, LI Hong-bo^{1*}

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: The 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (2-ODD) gene is regarded as the key enzyme gene involved with aryl naphthalene lignan-podophyllotoxin synthesis. To study the expression pattern and function of the *Sc2-ODD* gene, a full-length cDNA of the gene was cloned. Bioinformatic analysis, the expression pattern, and prokaryotic expression and purification were implemented. The open reading frame of *Sc2-ODD* gene was 1 077 bp and encoded 358 amino acids with a molecular weight of 40.16 kD. The *Sc2-ODD* protein contained the conserved 2OG-FeII-oxy sequence of the 2-ODD protein. The results of phylogenetic analysis revealed that *Sc2-ODD* is most closely related to *Corchorus olitorius* 2-ODD. qRT-PCR results showed that *Sc2-ODD* expression displayed obvious up-regulation at the fruit-swelling stage, then down-regulation in the fruit-coloring period. The *Sc2-ODD* gene was cloned into the bacterial expression vector pGS21T, the recombinant *Sc2-ODD* protein was expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) cells and the fusion protein was obtained and purified by GST fusion protein purification technology. This study will lay a foundation for further research on the function and expressional regulation of the *Sc2-ODD* gene in the aryl naphthalene lignans biosynthesis pathway, and also provides a scientific basis for improving the lignan content and the medicinal quality of *Schisandra chinensis* using plant genetic engineering.

收稿日期: 2020-06-29; 修回日期: 2020-08-05.

基金项目: 2018 年全国中药资源普查项目 (1102-01042918001).

*通讯作者 Tel: 86-24-88487143, E-mail: lhb@syau.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1068

Key words: *Schisandra chinensis*; Sc2-ODD; gene cloning; qRT-PCR; prokaryotic expression; protein purification

五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 为五味子科五味子属多年生落叶木质藤本植物, 主要分布于辽宁、吉林、黑龙江等地, 是我国温带针阔叶混交林和暖温带针叶阔叶林区域, 经历第四纪冰川时期后保留下来的第三纪古老植物种之一。其皮肉甘酸, 核中辛苦, 甘、酸、辛、苦、咸五味俱有, 故名“五味子”。五味子是临床常用中药, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效, 用于久嗽虚喘、梦遗滑精、遗尿尿频、久泻不止、自汗盗汗、津伤口渴、内热消渴、心悸失眠等症的治疗^[1-3]。目前国内外学者已从五味子中分离出100多种木脂素类化合物^[4-7], 近期课题组发现五味子中亦含有芳基萜类木脂素—鬼臼毒素类化合物。现代药理研究表明鬼臼毒素可以通过抑制微管蛋白的聚合、阻断中期相细胞分裂, 或者抑制DNA拓扑异构酶活性, 从而起到显著的抗尖锐湿疣、抗艾滋病毒、抗肿瘤等作用^[8-11]。鬼臼毒素经过化学修饰后, 获得的高效低毒的半合成衍生物GP7、VP-16、VM-26、NK611等对小细胞肺癌、淋巴瘤、子宫癌、皮肤癌、乳腺癌等多种肿瘤疾病均有很好的疗效, 具有广阔的应用前景^[12,13]。然而, 目前鬼臼毒素的传统和主要来源是从资源稀少或濒危的鬼臼类植物中提取, 且含量很低, 期望通过寻找可替代植物, 并通过基因工程手段提高植物中鬼臼毒素含量, 或利用异源生物反应器生产鬼臼毒素, 是解决资源短缺问题的可行途径。五味子果实中鬼臼毒素的发现给鬼臼毒素的研究和利用开辟了新的方向。

2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, 2-ODD) 催化 Yatein 合成去氧鬼臼毒素, 是鬼臼毒素合成途径的关键酶^[14]。2-ODD 基因家族是含铁非血红素氧激活酶超级家族中的最大亚家族, 广泛分布在病毒、细菌、真菌、植物、动物包括人类中, 催化包括羟基化、卤化、去饱和、差向异构、扩环、

环氧化在内的各种反应, 其底物包括氨基酸、苯丙素类化合物、黄酮类化合物、生物碱、糖、非核糖体肽、聚酮和生物大分子, 如蛋白质、脂质、DNA 和 RNA 等, 在催化复杂反应方面表现出明显的多功能性^[15]。目前研究表明 2-ODD 基因家族成员的序列保守性约为 17%~75%, 参与不同代谢的基因保守性有一定差异, 因而不同的 2-ODD 蛋白具有不同的生物活性, 2-ODD 家族基因在赤霉素和黄酮类化合物的合成途径研究比较清楚, 如赤霉素合酶 (gibberellin 20 oxidase, GA20 ox)、黄酮合酶 (flavonol synthase, FLS)、黄酮酮羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H)、花青素合成酶 (anthocyanidin synthase, ANS)^[16-21]。目前对五味子 *Sc2-ODD* 基因的相关研究还未见报道, 对五味子 *Sc2-ODD* 基因的研究有助于阐明五味子芳基萜类木脂素代谢途径。本研究克隆得到了五味子 *Sc2-ODD* 基因的全长 cDNA 序列, 构建原核表达载体诱导重组蛋白大量表达, 并对该蛋白进行纯化, 为进一步深入研究五味子 *Sc2-ODD* 基因功能及其酶促动力学等奠定基础。

材料与方法

材料 供试五味子叶片及果实采自沈阳农业大学五味子种质资源圃。五味子展叶期采集五味子幼嫩叶片, 用去离子水冲洗干净, 滤纸吸干水分后放于液氮中, 带回实验室置于 -80 °C 超低温冰箱保存, 用于后续克隆及定量分析。五味子进入结果期时, 即花后 20 天, 每隔 30 天定期采摘五味子不同发育阶段的果实 (图 1), 去离子水冲洗干净, 滤纸吸干水分后放入液氮中, 带回实验室, 放入 -80 °C 冰箱中保存备用。

试剂 LB 培养基购自北京拜尔迪生物技术有限公司; 凝胶回收试剂盒、克隆载体 pMD™ 18-T、大肠杆菌 DH5 α 菌株、感受态细胞 TOP10、Rosetta (DE3)、2 \times

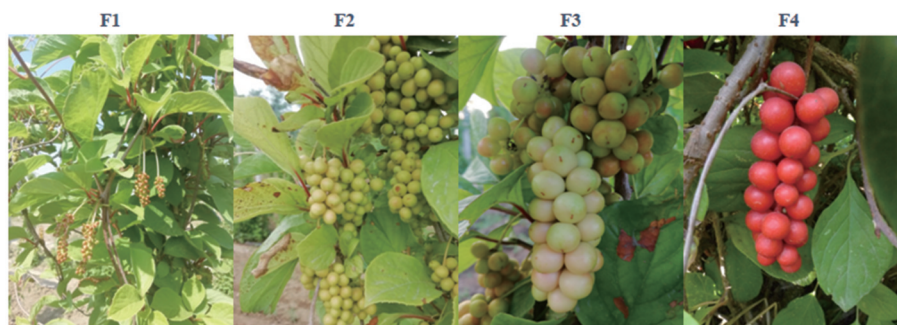


Figure 1 The four periods (F1, F2, F3 and F4) for fruit development of *Schisandra chinensis*

SuperReal PreMix Plus 购自天根生化科技有限公司; 柱式植物 RNAout 试剂盒 (CAT#: 71203-50) 购自天泽基因有限公司; pGS21T、pET32T、T4 DNA Ligase、2×Taq Master Mix、PCR 产物回收试剂盒、胶回收试剂盒、DL2000 bp Marker、DL5000 bp Marker、中分子量蛋白 Marker、6XHis 标签蛋白纯化试剂盒 (Ni-IDA)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、GST 融合蛋白纯化试剂盒购自 ProbeGene 公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS) 购自 Amresco 公司; 异丙基硫代 β -D-半乳糖苷 (IPTG)、氨苄青霉素 (Amp)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自 Sigma 公司; 其他常规试剂购自国药集团。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。测序工作由上海生工生物工程公司完成。

Sc2-ODD 基因克隆 根据五味子果实 SMRT 转录组测序结果获得的全长 *Sc2-ODD* 序列, 利用 Primer 软件设计特异性引物, 引物序列见表 1。采用 Trizol 法^[22] 提取五味子 RNA, 并用 DNAase 去除 DNA 污染, 然后按照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒 (Clontech 公司) 实验操作步骤反转录为 cDNA, 以此为模板, 按照下列体系对五味子 *Sc2-ODD* 进行 PCR 扩增: 2 μ L dNTP (2.5 mmol·L⁻¹), 上、下游引物各 1 μ L, 2.5 μ L 10×PCR Buffer, 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 U· μ L⁻¹), ddH₂O 17.3 μ L, 1 μ L 模板 cDNA, 终反应体系为 25 μ L。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。用回收试剂盒纯化回收 PCR 产物, 纯化后与 pMD18-T 载体过夜连接, 然后转化 DH5 α 感受态, 在含氨苄青霉素的 LB 培养基上培养, 并进行蓝白斑筛选, 将含有目的产物的阳性克隆测序。

生物信息学分析 利用 NCBI 中的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 在线分析开放阅读框; 采用 ExPASy 中 ProtParam (http://web.expasy.org/compute_pi/) 分析 *Sc2-ODD* 氨基酸的组成及理化性质; SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析 *Sc2-ODD* 蛋白信号肽; ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 预测 *Sc2-ODD* 蛋白水性; TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

TMHMM/) 分析 *Sc2-ODD* 蛋白的跨膜结构域; NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure-re/cdd/wrpsb.cgi>) 预测 *Sc2-ODD* 蛋白的保守结构域; *Sc2-ODD* 蛋白二级结构和三级结构由 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html) 和 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) 在线完成。WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 和 SoftBerry ProtComp 9.0 (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=pro-loc>) 进行亚细胞定位预测; 利用 NCBI 的 protein blastp 检索 *Sc2-ODD* 的同源蛋白, 选取与 *Sc2-ODD* 基因编码的蛋白相似度较高的其他植物的 *2-ODD* 蛋白的氨基酸序列, 利用 Mega7.0 软件构建五味子 *Sc2-ODD* 和其他物种 *2-ODD* 的 Neighbor-joining 系统进化树, 进化距离的计算采用泊松校正法。

五味子 *Sc2-ODD* 的 qRT-PCR 表达分析 五味子不同发育时期果实总 RNA 提取参照柱式植物 RNAout 试剂盒 (CAT#: 71203-50) 说明书进行。选用 GAPDH 基因作为目标基因定量表达的内参基因, 测定 *Sc2-ODD* 的相对表达量。内参基因的引物序列、扩增所用引物序列见表 1。PCR 反应体系: 2×SYBR Green qPCR Master Mix 5 μ L, 上、下游引物各 0.1 μ L, 模板 10 μ L, 用超纯水补至终体积 20 μ L。PCR 反应在 Gene 9600 实时荧光定量 PCR 仪上运行。反应程序为: 95 °C 预变性 30 s; 定量分析 (95 °C 15 s→60 °C 30 s)×40; 熔解曲线: (95 °C 15 s→60 °C 60 s)×1; 降温 50 °C 30 s。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行相对定量分析。

原核表达载体的构建 根据原核表达载体 pGS21T 的序列信息和测序所得 *Sc2-ODD* 基因序列设计带 *Nco*I 和 *Xho*I 双酶切位点的特异引物 (表 1), 扩增 *Sc2-ODD* 基因 (accession No. MT812948) 完整 cDNA 序列。利用 *Nco*I 和 *Xho*I 对 PCR 产物和 pGS21T 原核表达载体分别进行双酶切, 酶切体系 50 μ L。按 1:2 量比 (载体-目的基因) 过夜连接, 42 °C 热激法转化至感受态细胞 TOP10, 涂布于含卡那霉素的 LB 固体培养基上, 挑选单菌落生长后用 T7 通用引物 PCR 扩增筛选阳性克隆, 提取质粒测序, 将构建正确的表达载体命名为

Table 1 Primer sequence

Primer usage	Primer name	Primer sequence (5'-3')
Sequence amplification	<i>Sc2-ODD</i> -1	ATGCCACCCAGCTGT
	<i>Sc2-ODD</i> -2	TCAAAGTCTGAAAGCGTCTACATAA
Construction of prokaryotic expression vector	<i>Sc2-ODD</i> - <i>Nco</i> I	CATGCCATGGCCACCCAGCTGTGTCAT
	<i>Sc2-ODD</i> - <i>Xho</i> I	CATGAAGCTTTCAAAGTCTGAAAGCGTCTACATAAGA
qRT-PCR amplification	<i>Sc2-ODD</i> -F	TGGGGCATCTCCAGGTC
	<i>Sc2-ODD</i> -R	CTTTGTCGTCGGTTGTTCGT
Reference gene	<i>GAPDH</i> -F	CAGTTGTTGATTTGACGGTGAG
	<i>GAPDH</i> -R	CAGAGCAATGCCAGCCTTAG

pGS21T-Sc2-ODD。

融合蛋白的诱导表达 将 pGS21T-Sc2-ODD 质粒转化 Rosetta (DE3) 感受态细胞, 从转化平板中挑取单克隆接种至 LB 液体培养基 (含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氨苄青霉素), 37°C 培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 加入终浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导 LHB-pGS21T 的表达, 37°C 诱导 2 h 后收集菌液, 提取细菌总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

Sc2-ODD 融合蛋白的纯化 取含有 pGS21T-Sc2-ODD 重组质粒的 Rosetta (DE3) 菌株, 接种于 LB 液体培养基中放大培养, 收集细胞用冰浴的 Buffer D ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.0, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.1% Triton-100) 35 mL 重悬, $600 \sim 800 \text{ W}$ 超声裂解细胞 30 min, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后取上清过 GST 柱, 用 GST 融合蛋白纯化试剂盒对融合蛋白进行纯化, 并用 SDS-PAGE 电泳检测融合表达蛋白的纯化效果。

结果与分析

1 Sc2-ODD 克隆及序列分析

基因序列分析表明, *Sc2-ODD* 基因 cDNA 全长 1 085 bp, 利用 NCBI 的 ORF Finder 发现该序列含有完整的全长为 1 077 bp 的 ORF, 共编码 358 个氨基酸 (图 2)。通过 NCBI 数据库对该基因进行功能结构域预测,

结果表明 Sc2-ODD 是 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase 超家族蛋白。

2 Sc2-ODD 编码蛋白理化分析

ProtParam 分析预测 *Sc2-ODD* 基因编码蛋白的分子质量约 40.16 kD, 理论等电点 5.37, 正电荷残基 36 个, 负电荷残基 47 个, 总共 5 626 个原子, 分子式为 $\text{C}_{1812}\text{H}_{2790}\text{N}_{476}\text{O}_{539}\text{S}_9$, 脂肪指数为 84.13, 不稳定指数为 35.18, ProtScale 分析显示 Sc2-ODD 中亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸, 均匀分布在肽链中, 亲水性指数 (GRAVY) 的平均水平为 -0.246, 由此推断该蛋白属于稳定性亲水蛋白 (图 3)。

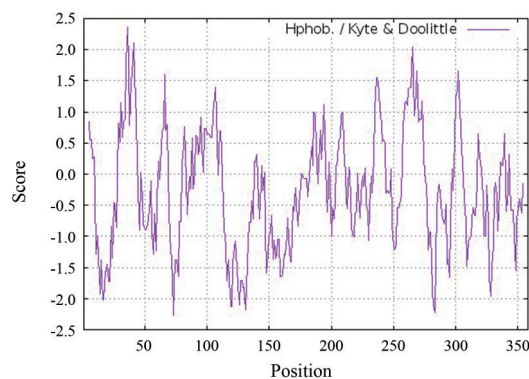


Figure 3 Hydrophilic and hydrophobic analysis of Sc2-ODD protein

```

1  ATGCCACCCCAGCTGTGTCATCGGCGACGGCAGAATACGATCGAGCCAAAGAAGTAAAGGAATTCGACGACTCTAAAATCGGTGTAAG
   M A T P A V S S A T A E Y D R A K E V K E F D D S K I G V K
91  GGTCTGGTCGATGCCGGTGAATCATCATTCCCGTTTCTTTGTCCACCCACCGGAAATCTTACCTATCTGAATTCATCATCAACAAA
   G L V D A G A I I I P R F F V H P P E N L T Y L N S S S T K
181 GAGATCCCTGTGATGACCTCGCCGATGTCATTCGACCGCCGATCGGAAATCGTCGAACATATCCGGCTGGCTTCTCACACATGGGGC
   E I P V I D L A D V N S D R R S E I V E H I R L A S H T W G
271 TTTTTCAGGTATCAACACGGAATCCCAACCTTCGTTCTCGATGAAACGATCGCCCGTAAATCGTTCAACGAACAACCGACAACA
   F F Q V I N H G I P T F V L D E T I A A V K S F N E Q P T T
361 TGAAATCAGAGTTCTACACTCGAGACCAAGGCTCCCGTTTGTAGATTCGCTACGAATTCGACCTTTTCCAGTCAAAGCGCGAGTTGG
   W K S E F Y T R D Q G S R F R F A T N F D L F Q S K A A S W
451 AGAGACACGATGCAGGTAAGGATGAGAAATATACCGACAATATTCCGGCGACCTACCGTAAAGAGATCCTTGATGGGAAGCCCATACG
   R D T M Q V R M E K Y T D N I P A T Y R K E I L A W E A H T
541 AAGTTCTGGCGGAGTCGTTGACGGAGTTGCTGTCGGAGGTTTAGGTGTGGGGTCGAGAAATCTGAAGGAGTTGTGTTGCCTCCAACG
   K V L A E S L T E L L S E G L G V G S R N L K E L C C L Q T
631 GTAGTCACTATTATCCGTTCTGTCCGCGAGCCGAGATGACTCTGGGAACGGCGAGCCATTCAGATCCAGGCATTTTGACGGTGTGCTG
   V G H Y Y P F C P Q P E M T L G T A S H S D P G I L T V L L
721 CAAGATCAGATCGGAGGATGACGGTGAAGCACGGCGAGGAGTGGATGCGCGTCAATCCGGTGGCCGGGGGACTTGTATTAAACGTCGGC
   Q D Q I G G L Q V K H G E E W I A V N P V A G G L V I N V G
811 GACTTTTTCGAGATAATATCTAATGATGAGTACAAGAGTGTGGAGCATAGAGTGTGGCCAACAATTGTCGAGAGCCAAGAATTTCAATA
   D F F E I I S N D E Y K S V E H R V L A N N C R E P R I S I
901 GTGACATCTTCAGTCCAAGTAAGATGGGAGACACTGATTTCTATGGTCTTTGCCAGATCTATTATCTCCAGAGAAACCCCTCTCTAC
   V T F F S P S K M G D T D F Y G P L P D L L S P E K P P L Y
991 CGGAATTTCACTGTTGGGGAATACATAGGGAAGTTTCTCAATAAGGGACTAGATGGCAAGTCTTATGTAGACGCTTTCAGACTTTGA
   R N F T V G E Y I G K F L N K G L D G K S Y V D A F R L *

```

Figure 2 Nucleotide and amino acid sequence of *Sc2-ODD*

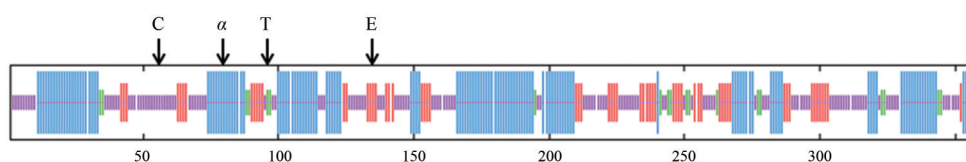


Figure 4 Predicted secondary structure of Sc2-ODD protein

3 Sc2-ODD 编码蛋白的结构预测

SignalP5.0 在线预测显示 Sc2-ODD 蛋白无明显信号肽序列, 是一种非分泌蛋白。TMHMM2.0 在线预测 Sc2-ODD 蛋白无明显跨膜结构域。SMART 结构域分析显示其含有 1 个具 2-酮戊二酸/Fe (II) 依赖性双加氧酶活性蛋白的高度保守 N 端区域、1 个 2OG-FeII_Oxy 结构域和 1 个低复杂区域。

利用 SOMPA 预测 Sc2-ODD 蛋白质二级结构 (图 4), 其中 α -螺旋 (H) 所占比例最大, 为 39.11%, 无规卷曲 (C) 为 38.55%, 延伸链 (E) 为 17.04%, β -转角 (T) 为 5.31%, 由此可见, Sc2-ODD 为混合型蛋白, α -螺旋 (H) 和无规卷曲 (C) 是其主要的结构元件。运用 Phyre2 数据库预测分析 Sc2-ODD 蛋白质三级结构, 三级结构预测结果与二级结构相符 (图 5)。

利用 SoftBerry ProtComp 9.0 对 Sc2-ODD 蛋白进行亚细胞定位预测, 结果显示该蛋白定位在细胞质的预测数值最高, 为 8.64, 其次是叶绿体、液泡, 预测数值分别为 0.57、0.39。采用 WoLF PSORT 在线对 Sc2-ODD 蛋白亚细胞定位进一步预测, Sc2-ODD 蛋白同样主要定位于细胞质, 推测其为细胞质蛋白。

4 Sc2-ODD 系统发育分析

利用 NCBI 的 blastp 功能将 Sc2-ODD 的氨基酸序列与 nr 非冗余数据库进行比对, 将 Sc2-ODD 蛋白序列

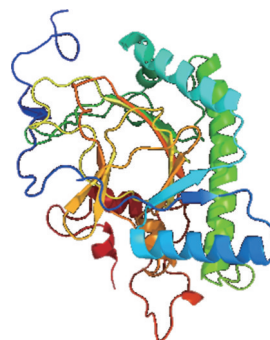


Figure 5 Predicted tertiary structure of Sc2-ODD protein

与其他物种进行同源性比较得知, Sc2-ODD 与桃儿七、扁桃、长蒴黄麻、豇豆等物种的 2-ODD 序列同源性较高, 序列一致性在 50%~58% 之间。用 MEGA7.0 的邻接法 (neighbour-joining, NJ) 对五味子、桃儿七等 16 个物种的 2-ODD 蛋白的氨基酸序列构建系统进化树 (图 6), 结果表明整个进化树分成两大分支, 五味子 Sc2-ODD 与红花、黄花蒿、桃儿七、独脚金、博落回等 12 个物种共聚一支, 与长蒴黄麻、扁桃、豇豆的 2-ODD 的亲缘关系相对较近。

5 五味子 Sc2-ODD 的 qRT-PCR 表达分析

利用 qRT-PCR 分析 Sc2-ODD 在五味子果实不同发育阶段的表达特性, 结果显示, Sc2-ODD 在五味子果实发育的不同阶段均有表达, Sc2-ODD 表达量呈现

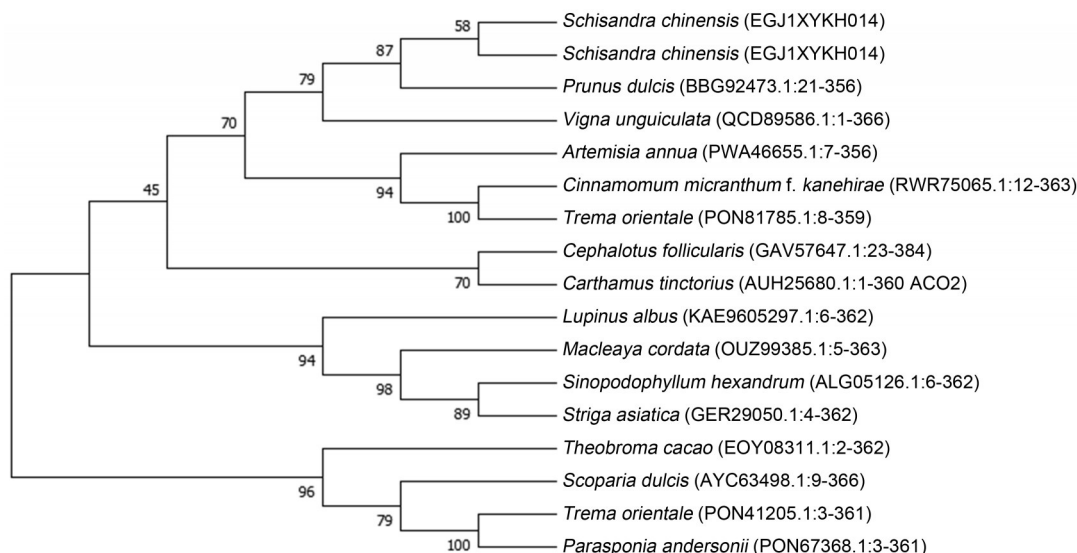


Figure 6 Phylogenetic tree of 2-ODD protein from *Schisandra chinensis* and other plants

先增加后降低的变化趋势(图7)。五味子完成授粉受精后,子房逐渐膨大成绿色幼果,花后20天(5月下旬) *Sc2-ODD* 表达量较低;花后20~50天(5月下旬至6月下旬)果穗、果粒迅速生长, *Sc2-ODD* 的表达量也随之大幅提高,花后50天其表达量达到整个发育时期的最高值;花后50~80天(6月下旬至7月下旬)果粒进一步膨大, *Sc2-ODD* 表达量较花后50天降低73.4%;花后80天(7月下旬)果实生长基本停止,进入着色期, *Sc2-ODD* 表达量继续下降。

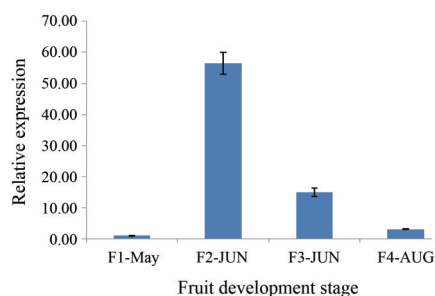


Figure 7 qRT-PCR expression analysis of *Sc2-ODD* at different development stages of *S. chinensis* fruits

6 五味子 *Sc2-ODD* 基因原核表达载体的构建

本研究采用 pGS21T 为载体,利用双酶切的方法构建了 pGS21T-*Sc2-ODD* 的原核表达载体,表达载体 pGS21T-*Sc2-ODD* 双酶切鉴定表明,目的基因已经成功连接到 pGS21T 载体上(图8)。

7 五味子 *Sc2-ODD* 融合蛋白的诱导表达

用已经构建好的原核表达载体 pGS21T-*Sc2-ODD*,转化 Rosetta (DE3) 菌株,挑取单克隆 37 °C 培养

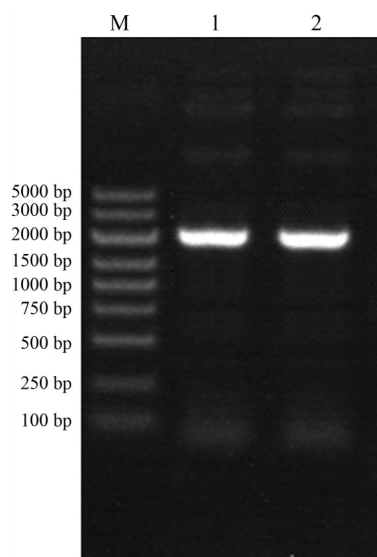


Figure 8 Double digestion and identification of induced protein of recombinant vector pGS21T-*Sc2-ODD* by agarose gel electrophoresis

至 OD_{600} 为 0.6 左右,加入 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 电泳检测表明,经 IPTG 诱导后, pGS21T-*Sc2-ODD* 在 66 kD 处存在明显的特异蛋白质条带(图9), *Sc2-ODD* 生物信息学预测的分子质量约为 40 kD,加上 GST 标签后约为 66 kD,据此判断其为诱导表达的 *Sc2-ODD* 重组蛋白。

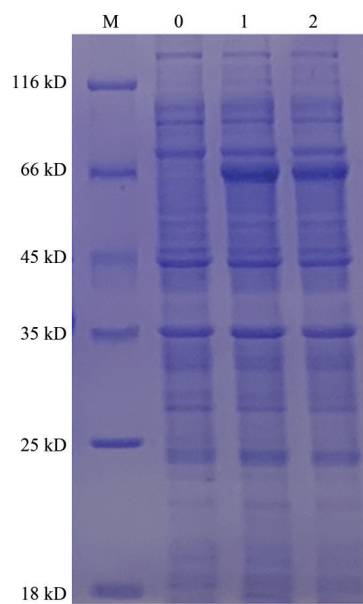


Figure 9 SDS-PAGE analysis of the recombinant plasmid-induced protein of *Sc2-ODD*. M: Medium molecular weight protein marker; 0: Non-induced proteins; 1, 2: Induced proteins

8 五味子 *Sc2-ODD* 融合蛋白的纯化

对五味子 *Sc2-ODD* 融合蛋白进行大量表达,重悬、超声裂解、离心后分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析,发现沉淀和上清中都有蛋白特异条带,表明该重组蛋白一部分以包涵体形式存在,一部分以可溶蛋白形式存在。取上清用 GST 融合蛋白纯化试剂盒对 *Sc2-ODD* 蛋白进行纯化,在 66 kD 处检测到很亮的蛋白纯化条带(图10)。但由于纯化后蛋白有轻微降解,在理论分子质量附近出现了两条分子质量相近的蛋白条带。*Sc2-ODD* 目的蛋白的获得为进一步深入研究该基因功能及表达调控等奠定了基础。

讨论

2-ODD 家族中多数蛋白都是参与次生代谢物合成的下游关键酶,且对植物响应非生物胁迫具有重要作用,目前已在拟南芥、丹参、毛曼陀罗、蓖麻、红花、毛果杨、南极黄丝瓜藤、黄花红砂等植物中分离并进行了功能验证,现有研究表明不同 2-ODD 蛋白在高级结构和功能上存在一定差异,在不同物种细胞中的分布

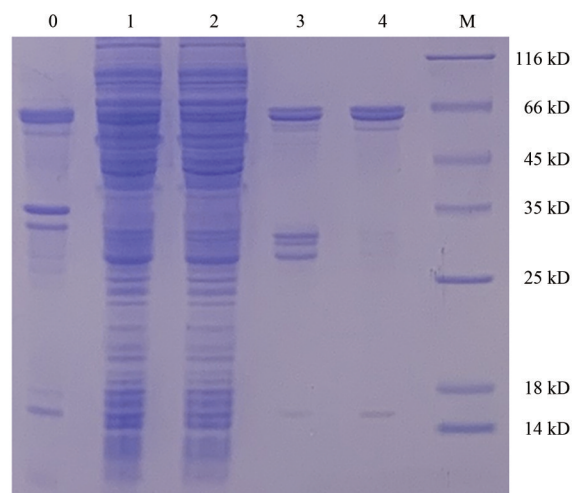


Figure 10 Purification analysis of Sc2-ODD protein. M: Medium molecular weight protein marker; 0: Sediment after ultrasonic treatment; 1: Supernatant after ultrasonic treatment; 2: Protein effluent after binding to the GST column; 3, 4: Effluent washed by wash Buffer

亦存在差异^[16-21]。2-ODD基因在五味子芳基萜类木脂素合成中的功能尚未明确,为此,本实验首次克隆了Sc2-ODD的cDNA序列,并对其蛋白进行了生物信息学分析,Sc2-ODD蛋白的分子质量约40 kD,理论等电点5.37,是一稳定性亲水蛋白,主要定位于细胞质,且具有2-ODD的基本功能保守结构域。通过比对发现,Sc2-ODD与桃儿七、扁桃、长蒴黄麻、豇豆等物种的2-ODD序列同源性较高,在50%~58%之间,不同植物中的2-ODD蛋白大小有一定差异,这意味着五味子中Sc2-ODD蛋白与其他植物的2-ODD蛋白可能存在结构或功能上的差异。

基因表达模式的分析可为基因功能研究提供线索,不同植物中2-ODD表达模式不同^[17,21,23]。本研究中Sc2-ODD在五味子果实发育不同阶段其表达量呈现先增加后降低的变化趋势,与五味子芳基萜类木脂素代谢途径中关键酶基因PLR的表达模式类似,这为进一步深入研究该基因在五味子芳基萜类木脂素生物合成中的功能及表达调控提供了理论依据。

原核表达系统具有遗传背景清楚、表达水平高、稳定性好、成本低及周期短等优势,是目前科学研究中酶活性体外表达及功能研究的重要方法,已经广泛应用于生命科学、中药学等领域^[23-25]。为了探究Sc2-ODD在五味子芳基萜类木脂素代谢途径中的作用,本研究首次从五味子中分离出Sc2-ODD基因,构建了其原核表达载体,在DE3宿主菌株中可以表达目的蛋白,并对融合蛋白进行了纯化,Sc2-ODD目的蛋白的获得为进一步深入研究该基因功能及表达调控等奠定了重要

的物质基础。

总之,本研究通过克隆五味子Sc2-ODD基因,构建Sc2-ODD基因的原核表达载体,诱导并纯化Sc2-ODD目的蛋白,为进一步揭示Sc2-ODD在五味子芳基萜类木脂素合成中的作用机制及其基因的调控与表达奠定基础,也为未来利用植物基因工程提高五味子活性成分含量、改善药材品质提供科学依据。

作者贡献: 李海燕参与本研究的实验设计,并完成数据分析与论文撰写;刘久石参与实验设计;王婷、刘宇阳、王熙昂是本实验研究的执行人;李宏博是项目的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Editing Committee of Chinese Flora, Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Vol 30 (1). Beijing: Science Press, 1996: 252.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [3] Bensky D, Gamble A, Kaptchuk T. Chinese Herbal Medicine: Materia Medica [M]. Revised Edition. Seattle: Eastland Press, 1993: 376-378.
- [4] Szopa A, Ekiert R, Ekiert H, et al. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies [J]. Phytochem Rev, 2017, 16: 195-218.
- [5] Zhu L, Li B, Liu X, et al. Purification of six lignans from the stems of *Schisandra chinensis* by using high-speed countercurrent chromatography combined with preparative high performance liquid chromatography [J]. Food Chem, 2015, 186: 146-152.
- [6] Jiang P, Lu Y, Chen D. Authentication of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera* in Chinese patent medicines [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 131: 263-271.
- [7] Piao J, Liu L, Wang S, et al. Magnetic separation coupled with high-performance liquid chromatography mass spectrometry for rapid separation and determination of lignans in *Schisandra chinensis* [J]. J Sep Sci, 2018, 41: 2056-2063.
- [8] Broomhead AJ, Dewick PM. Tumour-inhibitory aryltetralin ligans in *Podophyllum versipelle*, *Diphylleia cymosa*, and *Diphylleia grayi* [J]. Phytochemistry, 1990, 29: 3831-3837.
- [9] Lv M, Xu H. Recent advances in semisynthesis, biosynthesis, biological activities, mode of action, and structure-activity relationship of podophyllotoxins: an update (2008-2010) [J]. Mini-Rev Med Chem, 2011, 11: 901-909.
- [10] Zhao CQ, Zhu YY, Chen SY, et al. Lignan glucoside from *Sino-*

- podophyllum emodi* and its cytotoxic activity [J]. Chin Chem Lett, 2011, 22: 181-184.
- [11] Tian DL, Liang CP, Chen H. Synthesis and cytotoxic activities of podophyllotoxin derivatives [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 4281-4287.
- [12] Mei X, Jiang YG, Lv JJ, et al. Anti-MDR tumor mechanism of CIP-36, a podophyllotoxin derivative [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 1193-1198.
- [13] Ardalani H, Avan A, Ghayour-Mobarhan M. Podophyllotoxin: a novel potential natural anticancer agent [J]. Avicenna J Phytomed, 2017, 7: 285-294.
- [14] Nag A, Choudhary S, Masand M, et al. Spatial transcriptional dynamics of geographically separated genotypes revealed key regulators of podophyllotoxin biosynthesis in *Podophyllum hexandrum* [J]. Ind Crops Prod, 2020, 147: 112247.
- [15] Guo CX, Hu YL, Zhang Y, et al. Developing a colorimetric assay for Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenase [J]. Anal Biochem, 2018, 548: 109-114.
- [16] Anzellotti D, Ibrahim RK. Novel flavonol 2-oxoglutarate dependent dioxygenase: affinity purification, characterization, and kinetic properties [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 382: 161-172.
- [17] Liu WC, Wang DH, Wang ZZ, et al. Cloning and expression analysis of 2-oxoglutarate dependent dioxygenase from *Salvia amiltiorrhiza* Bunge [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin (西北植物学报), 2012, 32: 1289-1294.
- [18] Martens S, Preuß A, Matern U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L [J]. Phytochemistry, 2010, 71: 1040-1049.
- [19] Zhang HR, Du C, Wang Y, et al. The *Reaumuria trigyna* leucoanthocyanidin dioxygenase (RtLDOX) gene complements anthocyanidin synthesis and increases the salt tolerance potential of a transgenic *Arabidopsis* LDOX mutant [J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 106: 278-287.
- [20] Li Q, Zhu TT, Zhang R, et al. Molecular cloning and functional analysis of hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H) in the poisonous and medicinal plant *Datura innoxia* mill [J]. Plant Physiol Biochem, 2020, 153: 11-19.
- [21] Tu YH, Li DQ, Fan LJ, et al. DOXC-class 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in safflower: gene characterization, transcript abundance, and correlation with flavonoids [J]. Biochem Syst Ecol, 2018, 80: 14-20.
- [22] Wei RC, Zhao H, Ma XJ, et al. Extraction of total RNA and cloning of *SgDHAR* gene from *Siraitia grosvenorii* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 115-123.
- [23] Li TZ, Zheng YZ, Rong YQ, et al. Gene cloning, subcellular localization and expression analysis of the *AsERFI* gene from *Aquilaria sinensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1957-1964.
- [24] Guan FF. Molecular Evolution and Functional Divergence of ODD Gene Family Related to GA Synthesis in *Populus trichocarpa* (毛果杨赤霉素合成相关的ODD基因家族分子进化和功能分析) [D]. Beijing: Beijing Forestry university, 2018.
- [25] Zhou C, Tian R, Gu W, et al. Prokaryotic expression, function verification and immunoassay activity of farnesyl pyrophosphate synthase of *Alisma orientale* (Sam.) Juzep [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1571-1577.