

茅苍术 *AICMK* 基因的克隆及原核表达分析

鲁继梅¹, 徐睿¹, 吴君贤¹, 邹立思^{2*}, 刘超³, 彭华胜^{1,4}, 查良平^{1*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046;
3. 安徽医科大学基础医学院, 安徽 合肥 230032; 4. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

摘要: 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶 [4-(cytidine-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase, CMK] 是生成萜类化合物 MEP 途径的关键酶之一。本研究以茅苍术转录组数据为依据, 克隆获得 *CMK* 基因序列, 命名为 *AICMK* (GenBank 登录号为 OM283293)。研究结果表明, *AICMK* 包含一个全长为 1 230 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 409 个氨基酸, 推测其相对分子质量为 44 752.53, 蛋白理论等电点为 6.67; 跨膜结构分析表明其无跨膜结构, 二级结构显示其主要由不规则卷曲 (48.17%) 结构组成; 同源氨基酸序列分析表明, 茅苍术与除虫菊、桂花、杜仲、忍冬、丹参 *CMK* 基因编码的氨基酸序列具有较高同源性; 系统进化树分析表明, 茅苍术 *AICMK* 与菊科植物 *CMK* 蛋白亲缘关系较近; 构建 pET-32a-*AICMK* 原核表达载体, 并转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达感受态, 蛋白表达结果显示其分子质量约为 65 kDa; 利用 qRT-PCR 分析 *AICMK* 基因在不同组织和茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理后的表达模式, 同时采用 ELISA 试剂盒测定茅苍术 *CMK* 酶活性, 结果表明, 不同产地茅苍术 *AICMK* 基因具有组织表达差异性, 且受外源 MeJA 诱导表达, 酶活结果显示不同产地茅苍术 *CMK* 酶活性均在叶中较高; 亚细胞定位显示该基因位于叶绿体中。本研究为进一步阐明茅苍术中萜类化合物合成途径 *AICMK* 基因的生物学功能提供参考。

关键词: 茅苍术; 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶; 基因克隆; 原核表达; 表达分析; 亚细胞定位

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2876-09

Cloning and prokaryotic expression analysis of *AICMK* from *Atractylodes lancea*

LU Ji-mei¹, XU Rui¹, WU Jun-xian¹, ZOU Li-si^{2*}, LIU Chao³,
PENG Hua-sheng^{1,4}, ZHA Liang-ping^{1*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 3. School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 4. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

Abstract: 4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase (CMK) was one of the key enzymes in the methylerythritol-4-phosphate (MEP) pathway to generate terpenoids. In this study, based on the transcriptome data of *Atractylodes lancea*, the sequence of the *CMK* gene was cloned, named *AICMK* (GenBank accession number OM283293). The results showed that *AICMK* contains a 1 230 bp open reading frame (ORF) encoding 409 amino acids. The deduced protein had a theoretical molecular weight of 44 752.53 and an isoelectric point of 6.67. Transmembrane structure analysis showed that there was no transmembrane structure, and the secondary structure of *AICMK* was predicted to be mainly composed of random coil. Homologous alignment revealed that *AICMK*

收稿日期: 2022-04-18; 修回日期: 2022-05-10.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82073957); 中央本级重大增减支项目 (2060302).

*通讯作者 Tel: 18130028287, E-mail: zlp_ahtcm@126.com; zlstcm@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0444

shared high sequence identity with the CMK proteins of *Tanacetum cinerariifolium*, *Osmanthus fragrans*, *Eucommia ulmoides*, *Lonicera japonica* and *Salvia miltiorrhiza*. Phylogenetic analysis indicated that *AICMK* protein had the higher homology with CMK protein of Compositae. The pET-32a-*AICMK* prokaryotic expression vector was constructed and a fusion protein with molecular mass of about 65 kDa was expressed in the *E. coli* BL21 (DE3). The qRT-PCR was used to analyze the expression pattern of *AICMK* gene in different tissues and after MeJA treatment. Meanwhile, the enzyme activity was determined by ELISA kit. The results showed that *AICMK* gene was tissue-expressed in different origins and its expression was induced by MeJA, and the results of the enzyme activity assay showed that the *AICMK* enzyme activity in different regions was higher in the leaves. The subcellular localization showed that *AICMK* was located in the chloroplast. This study provides a reference for further elucidating the biological function of *AICMK* gene in terpenoid synthesis pathway in *Atractylodes lancea*.

Key words: *Atractylodes lancea*; 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase; gene cloning; prokaryotic expression; expression analysis; subcellular localization

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 为菊科多年生草本植物, 是中药苍术的基源植物之一, 以根状茎入药, 具有燥湿健脾、祛风散寒、明目的功效, 用于治疗湿温、暑湿证、风寒痹证、夜盲等^[1]。茅术醇、 β -桉叶醇、苍术酮等倍半萜类化合物是茅苍术主要药效成分及质量评价指标, 依据其化学骨架可将两者归属于桉叶烷型倍半萜类化合物, 其中 β -桉叶醇可抑制肿瘤血管生成和肿瘤 HeLa、SGC-7901 与 BEL-7402 细胞的增殖, 还可以诱导白血病 HL-60 细胞凋亡, 具有抗肿瘤功效^[2,3], 苍术酮显著抑制 iNOS 和 COX-2 的表达而发挥抗炎镇痛的作用^[4]。茅苍术主要药效成分之一的茅术醇属于香根螺烷型化合物, 同样对 HL-60 细胞具有细胞毒性作用, 并且其对白血病 HL-60 细胞的抑制和诱导凋亡作用明显强于 β -桉叶醇^[5], 茅术醇还可以阻滞人肝癌 SMMC-7721 和 LM3 细胞的细胞周期于 G1 期来抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡, 因而具有保肝的功效^[6], 同时可以作为 H⁺ 和 K⁺-ATP 酶的抑制剂来发挥抗胃溃疡的作用^[7]。

倍半萜类化合物是苍术属植物的主要活性成分, 目前已有 98 种倍半萜类成分从苍术属植物根状茎中得到分离^[8], 现代药理作用研究表明这些化合物具有广泛的生物学功能, 如抗肿瘤、抗炎、免疫调节、神经保护、抗过敏等^[9]。4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶 (CMK) 是生成萜类化合物的 MEP 途径的第四步酶, 在 ATP 存在的条件下, 使 4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓糖醇磷酸化形成 4-(5'-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇-2-磷酸。作为 MEP 途径的唯一激酶, 通过病毒诱导基因沉默 (VIGS) 技术降低 MEP 通路中 *CMK* 基因的表达水平, 结果叶片出现黄变表型, 叶绿素和类胡萝卜素等萜烯类物质含量降低, 证明 *CMK* 在萜类化合物的生物合成中发挥着重要作用^[10]。范雨芳等^[11]在拟南芥中过表达 *AaCMK*, 叶绿素 a、b 及类胡萝

卜素含量增加。Chen 等^[12]对水稻中一个绿色可逆转的黄叶突变体 gry340 进行研究, 发现参与类异戊二烯生物合成 MEP 通路的 *CMK* 基因发生单核苷酸突变, 导致水稻出现绿色可逆的黄叶表型。另外, 由于 MEP 途径的酶在人类细胞中的缺失及对细菌生存的重要性, 导致其具有成为药物靶点的潜力^[13]。Kadian 等^[14]的研究表明 *CMK* 是多种致病菌生存所必需的基因, *CMK* 基因可成为一种新型抗疟药物靶点。

目前已从多种药用植物中克隆出 *CMK* 基因, 并进行了生物信息学分析及功能分析, 如雷公藤^[15]、樟树^[16]、黄花蒿^[11]、盾叶薯蓣^[17]、丹参^[18]等, 本研究在获得茅苍术转录组数据的基础上, 从茅苍术中克隆得到 MEP 途径的关键酶基因 *AICMK*, 进行生物信息学分析、原核表达分析和亚细胞定位研究, 利用 qRT-PCR 技术及酶联免疫法 (ELISA) 分别检测不同产地、不同组织茅苍术 *AICMK* 基因的表达模式和酶活性, 同时测定经茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理后不同时间段的 *CMK* 基因相对表达量, 旨在为开展 *CMK* 的生物学功能研究提供指导, 也为茅苍术萜类化合物合成代谢途径研究奠定基础。

材料与方法

样品 茅苍术样品采自江苏南京、安徽岳西, 经安徽中医药大学彭华胜教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC., 凭证标本保存于安徽中医药大学。经鉴定后分别按不同组织分为根状茎、茎、叶, 用液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱。茅苍术种子购自于湖北十堰, 在 1/2MS 固体培养基中培养 5 个月, 培养温度为 25 °C, 光周期为 16 h/8 h, 之后转移至 1/2MS 液体培养基, 于液体培养基中加入终浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MeJA 溶液, 分别在诱导 0、3、6、9、12、24、48 h 时取样, 以根为取样部位, 用液氮速冻后保存

于-80 °C冰箱。

菌株、载体与试剂 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans1-T1 感受态细胞、大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 表达感受态细胞、pEASY-Blunt Zero Cloning Kit、TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase 高保真酶、切胶回收试剂盒 EasyPure Quick Gel Extraction Kit、无缝拼接试剂盒 pEASY Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 均购自于北京全式金生物技术有限公司; 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、华越洋超快速植物 RNA 提取试剂盒均购自于北京华越洋生物科技有限公司; pET-32a 载体购自于武汉淼灵生物科技有限公司; 反转录试剂盒 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自于 TaKaRa 公司; 2×Realab Green PCR Fast mixture 试剂盒购自于北京兰博利德商贸有限公司; 酶联免疫分析 (ELISA) 试剂盒购自于上海研谨生物科技有限公司; *Bam*H I 购自于 NEB 公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自于 Sigma 公司。引物合成由上海生工生物有限公司完成; 其他试剂均为国产分析纯。

总 RNA 提取及 cDNA 合成 参照华越洋超快速植物 RNA 提取试剂盒操作说明提取江苏南京、安徽岳西茅苍术根状茎、茎、叶中总 RNA 及湖北十堰茅苍术根中总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量, 利用超微量紫外分光光度计 (Denovix DS-11+) 选择 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0 的总 RNA 为反转录模板, 参照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录, 获得茅苍术的 cDNA, 保存于-20 °C 冰箱。

AICMK 基因克隆 以经反转录获得的茅苍术 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物, 上游引物 AICMK-F: 5'-ATGGCGCAATGGCTGCTTCCCCCT-3', 下游引物 AICMK-R: 5'-TTATTCAGCATTACTAGATCGGTCT-3', PCR 扩增采用 TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase, 反应条件为 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 20 s, 56 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用切胶回收试剂盒回收与预期大小一致的条带, 将其与克隆载体 pEASY-Blunt Zero 连接, 转化至大肠杆菌 (*E. coli*) Trans1-T1 感受态细胞中, 挑选单菌落并进行菌液 PCR 验证, 将阳性克隆菌液送至苏州金唯智公司测序。

AICMK 基因的生物信息学分析 利用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 获取 AICMK 基因的开放阅读框 (ORF); 使用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线工具 BLAST 进行氨基酸序列的相似性比对分析; 利用 ExpASY (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测该基因编码的蛋白理化性质, 包

括相对分子质量、理论等电点、不稳定系数等; 利用 NPS (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html)、SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 及 PyMOL 软件对蛋白进行二级结构和三级结构的预测; CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质结构域分析; TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白序列的跨膜结构域分析; 运用 DNAMAN 软件对茅苍术与其他植物进行同源氨基酸序列比对; 用 MEGA 6.06 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1 000 次; 用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测该基因的亚细胞定位。

AICMK 原核表达载体构建与诱导表达 依据 AICMK 基因的测序结果, 以 *Bam*H I 为酶切位点设计引物, 上游引物 *Bam*H I-AICMK-F: 5'-AGGCCATGGCTGATATCGGAATGGCGCAATGGCTGCTTCCCCCT-3', 下游引物 *Bam*H I-AICMK-R: 5'-CGACGGAGCTCGAATTCGGATTATTACAGCATTACTAGATCGGTCT-3', 以重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增。将扩增产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收, 同时对原核表达载体 pET-32a 质粒进行 *Bam*H I 酶切处理, 切胶回收, 将切胶回收产物用无缝拼接试剂盒于 50 °C 连接 30 min, 连接产物转化至大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞中, 挑取单克隆菌落进行菌液 PCR 验证, 阳性菌落测序及提取质粒, 将测序正确的重组质粒 pET-32a-AICMK 转化至 BL21 (DE3) 表达感受态中, 构建原核表达宿主菌。将原核表达菌液按照 1:100 的比例加到含 Amp 抗性的 LB 培养液中, 37 °C、200 r·min⁻¹ 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6, 取 1 mL 菌液为阴性对照, pET-32a 空载为空白对照, 加入终浓度为 0.4 mmol·L⁻¹ IPTG 于 16 °C 低温诱导过夜, 取 1 mL 菌液 4 °C、10 000 ×g 离心 3 min 弃上清, 加入等体积 PBS (pH 7.2~7.4) 清洗后加入 50 μL ddH₂O, 获得 AICMK 的全菌, 剩余菌液离心获取菌体, 5 mL His Buffer A (20 mmol·L⁻¹ Na₃PO₄·12 H₂O、500 mmol·L⁻¹ NaCl、20 mmol·L⁻¹ 咪唑) 重悬, 冰浴下超声破碎 10 min, 5 s/5 s 间隔, 4 °C、10 000 ×g 离心后获得 AICMK 的蛋白上清。为获得纯化的 AICMK 蛋白, 本研究采用离心法对其进行操作, 吸取 1 mL 上清与已清洗的 500 μL Ni-NTA Resin 混合, 在定轨振荡器上 120 r·min⁻¹ 振摇 1 h, 4 °C、500 ×g 离心 5 min 弃上清, 1 mL His Buffer A 重悬, 4 °C、500 ×g 离心 5 min 弃上清, 重复 3 次。用咪唑梯度洗脱, 洗脱浓度依次为 20、100、300、500 mmol·L⁻¹, 分管收集经 300、500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱的洗脱液各

50 μL , 在全菌、上清及洗脱液中分别加入 10 μL 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 混匀, 沸水煮 8 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分析。

***AICMK* 组织表达谱及 MeJA 诱导表达谱分析**
采用实时荧光定量 PCR 检测江苏南京、安徽岳西两产地茅苍术 *AICMK* 基因的组织特异性表达模式及经 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 诱导后 *AICMK* 基因的表达模式。取南京、岳西茅苍术各 3 株, 从根状茎、茎、叶中分别提取 RNA, 取湖北十堰茅苍术组培苗 3 株, 从根中提取经 MeJA 分别处理 0、3、6、9、12、24、48 h 的 RNA, TaKaRa 试剂盒反转录获得 cDNA, 利用 Primer Premier 5.0 设计 *AICMK* 荧光定量特异性引物, 用于组织表达谱分析的 *AICMK* 上游引物 q-*AICMK*-F1: 5'-TAGTAATGCTGCAACTGCTCTT-3', 下游引物 q-*AICMK*-R1: 5'-AAGGGCACATCTGAGCCAATC-3', 用于 MeJA 诱导表达谱分析的 *AICMK* 上游引物 q-*AICMK*-F2: 5'-TCGCTTGTCAACTAATGTGCCT-3', 下游引物 q-*AICMK*-R2: 5'-GCATTACTACTTCCAC CACCAA-3', 以茅苍术内参基因 UBQ2 进行校正^[19], 上游引物 UBQ2-F: 5'-GGTTGAGGGGAGGAATGC-3', 下游引物 UBQ2-R: 5'-AGACGAAGGACAAGGTGA-3'。参照 2 \times Realab Green PCR Fast mixture 试剂盒说明书进行扩增, 反应体系为 1 μL cDNA 模板、10 μL 2 \times Realab Green PCR Fast mixture、0.2 μL ROX Dye、0.2 μL ROX Dye II 及 1 μL 引物, ddH₂O 7.6 μL , 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 每个反应体系重复 3 次。利用 MX3000P 荧光定量 PCR 仪 (美国安捷伦科技有限公司) 进行 qRT-PCR 检测, 相对定量分析采用 2 $^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行分析^[20]。

***AICMK* 酶活性测定** 取江苏南京与安徽岳西茅苍术各 3 株, 分别称取根状茎、茎、叶 0.1 g, 加入 900 μL 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 溶液, 匀浆机处理 2~3 min, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液备用。参照酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒操作说明测定江苏南京、安徽岳西两产地茅苍术不同组织中 CMK 酶活性。

亚细胞定位 为研究 *AICMK* 蛋白在植物细胞中的定位, 根据 *AICMK* 基因序列设计带有酶切位点的引物 ALCMK-GFP-F: 5' TCGACCCCGGGGTACCGG AATGGCGGCAATGGCTGCTTCCCCCT 3', ALCMK-GFP-R: 5' TCGCCCTTGCTCACCATGGATTTCAGCAT TACTAGATCG GTCTACA 3', 以携带目的基因的克隆载体为模板, PCR 扩增后切胶回收, 与经 *Bam*H I 酶切的载体 pRI101-eGFP 的切胶回收产物重组后转化至大

肠杆菌 Trans1 T1 感受态细胞中, 以 PCR 阳性菌液进行测序, 确定表达载体构建成功后将其转入根癌农杆菌 GV3101 中, 于 YEB 液体培养基 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜培养, 离心重悬, 用无菌注射器吸取菌液注射于烟草叶片下表皮, 弱光条件下培养 2~3 天后于激光共聚焦显微镜 (ZESSI 710) 下观察荧光信号在烟草表皮细胞中的分布。

结果与分析

1 *AICMK* 基因的克隆及序列分析

以 cDNA 为模板的 PCR 扩增产物连接于 T 载体后转化至 Trans1-T1 感受态细胞中, 对阳性克隆菌液进行测序, 所得测序结果与经 DNAMAN 软件结合 ORF Finder 在线软件预测结果一致, 证明 *AICMK* 含有 1 个 1 230 bp 完整的开放阅读框。应用 BLAST 对茅苍术 *AICMK* 编码的氨基酸序列进行比对, 结果显示, *AICMK* 氨基酸序列与 GenBank 中已注册植物 CMK 氨基酸序列有较高的同源性, 其中 *AICMK* 与莴苣 CMK (XP_023766700.1) 相似度为 87.96%, 与甜叶菊 CMK (ABB88838.3) 相似度为 84.35%, 与向日葵 CMK (XP_022009055.1) 相似度为 83.99%, 与除虫菊 CMK (GEY28202.1) 相似度为 83.74%。比对结果表明所获得的基因属于 CMK 基因家族成员, 将该基因命名为 *AICMK* (GenBank 登录号为 OM283293)。

2 *AICMK* 基因的生物信息学分析

2.1 蛋白理化性质分析 利用在线工具 ExPASy 对 *AICMK* 编码蛋白进行理化性质分析。结果显示, *AICMK* 编码 409 个氨基酸, 相对分子质量为 44 752.53, 蛋白理论等电点为 6.67, 不稳定系数为 42.52, 脂肪指数为 78.95, 可初步判断 *AICMK* 为不稳定的酸性蛋白。

2.2 结构功能域与跨膜结构域分析 根据 NCBI 的 Conserved domains 在线工具预测, *AICMK* 蛋白具有 IspE 功能域 (图 1A)。根据 TMHMM2.0 在线工具对 *AICMK* 进行跨膜结构区域预测 (图 1C), 结果表明, *AICMK* 氨基酸中无跨膜结构存在, 为膜外蛋白。

2.3 二级和三级结构预测 利用 NPS 在线生物学工具对茅苍术 *AICMK* 蛋白的二级结构进行预测 (图 1B), 结果显示, 该蛋白的二级结构主要由无规则卷曲组成, *AICMK* 的无规则卷曲 (random coil) 在多肽链中共有 197 个, 占比为 48.17%, α -螺旋 (alpha helix) 在多肽链中共有 112 个, 占比为 27.38%, 延伸链 (extended strand) 共计 100 个, 占比为 24.45%, 推测无规则卷曲是其最多的二级结构元件, 散布于整个肽链中, 其次为 α -螺旋, 再者为延伸链, *AICMK* 中没有 β -转角 (β -turn)。利用 SWISS-MODEL 在线工具和 PyMOL 软件构建茅

苍术 AICMK 蛋白的三维空间模型 (图 1D)。

2.4 AICMK 和其他物种的氨基酸序列同源比对 利用 DNAMAN 在线分析工具对茅苍术 AICMK 氨基酸序列与除虫菊 TcCMK (XGEY28202.1)、桂花 OfCMK (AOT86859.1)、杜仲 EuCMK (AQZ26750.1)、忍冬 LjCMK (AGE10578.1) 和丹参 SmCMK (ABP96842.1) 进行多序列比对分析 (图 2), 结果显示, 这 6 种植物的同源率为 81.14%。根据序列分析结果表明, 茅苍术与

其他 5 种植物的氨基酸序列相似度较高, 都具有 IspE 蛋白所具有的 3 个保守基序: KINVFL、GLGGGS 和 MSGSGS, 其中前者为 4-(胞苷-5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓糖醇底物结合位点, 后两者为 ATP 结合位点^[14,21]。

2.5 AICMK 系统进化树分析 选取 GenBank 中注册的 18 种植物的 CMK 氨基酸序列, 分别来源于双子叶植物、单子叶植物、裸子植物、藻类和菌类, 用 MEGA

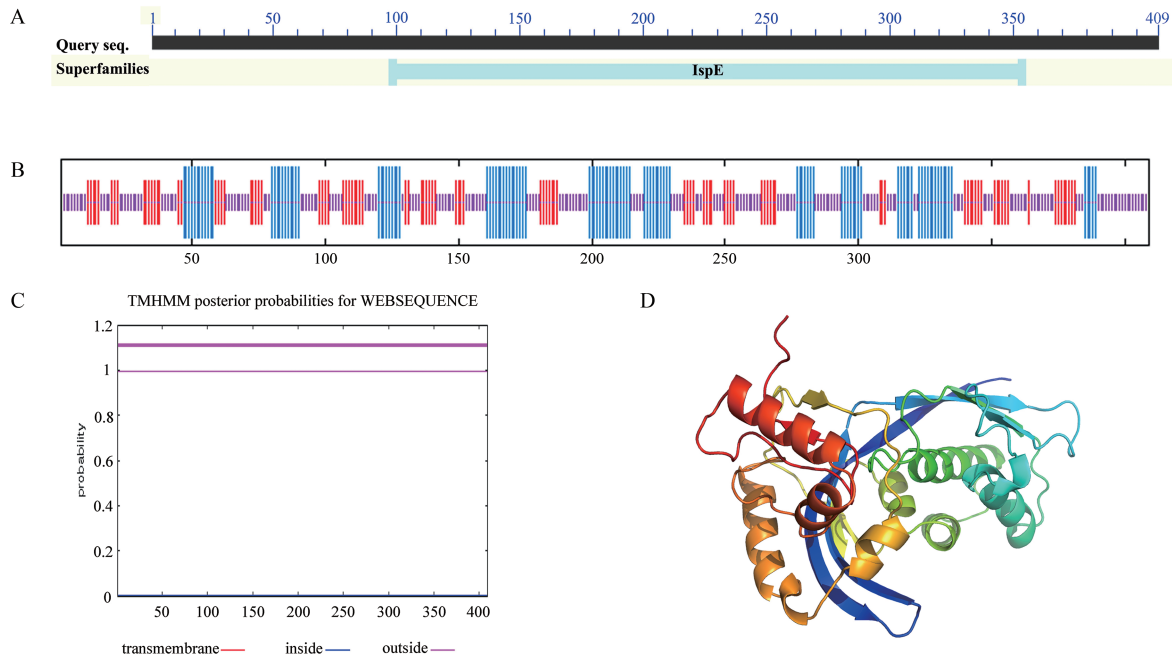


Figure 1 Bioinformatics analysis of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase gene of *Atractylodes lancea* (AICMK). A: The predicted conserved domains of AICMK; B: Secondary structure model of AICMK; C: The predicted transmembrane regions of AICMK; D: The predicted tertiary structure of AICMK

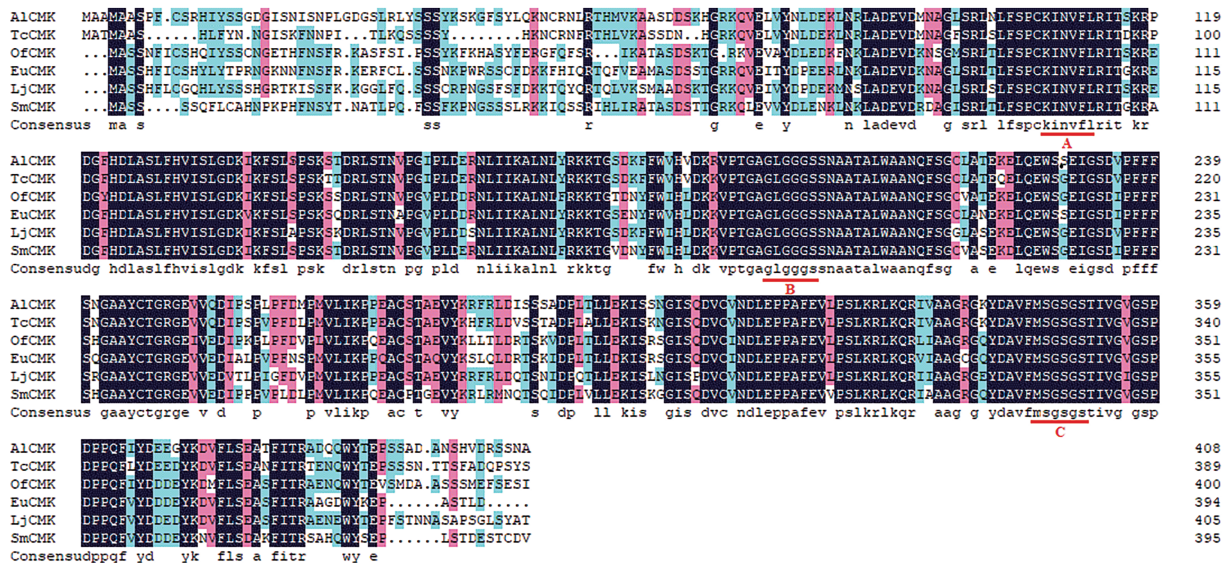


Figure 2 Amino acid sequence homology alignment of 4-(cytidine-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinases (CMKs) from *A. lancea*, *Tanacetum cinerariifolium*, *Osmanthus fragrans*, *Eucommia ulmoides*, *Lonicera japonica* and *Salvia miltiorrhiza*. All three important motifs involved in substrate and ATP binding are marked as A, B and C

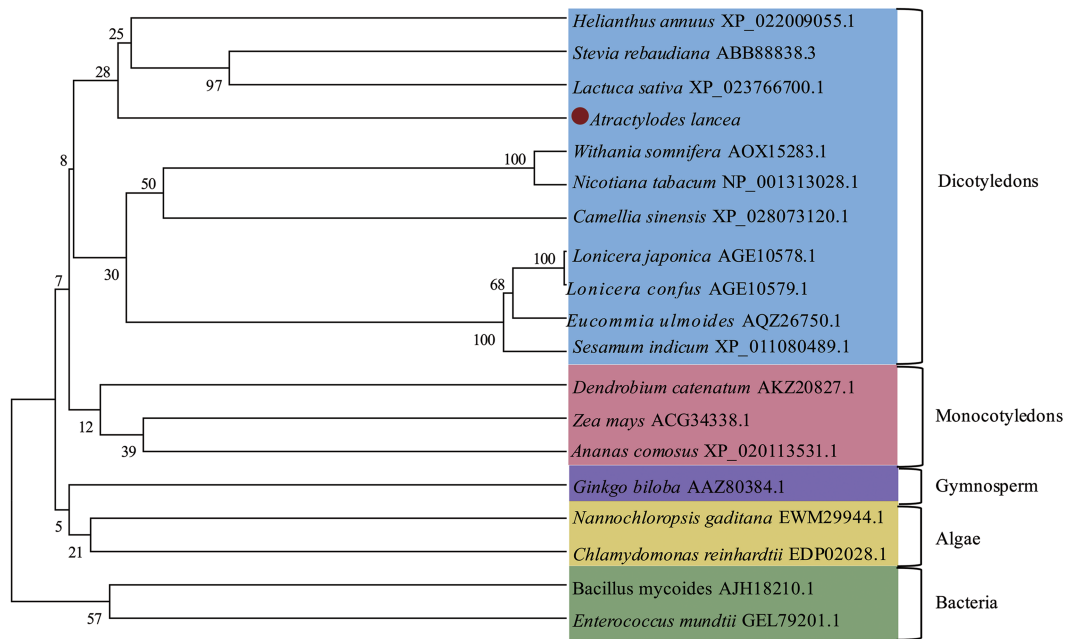


Figure 3 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of AICMK with some other CMKs

6.06 软件采用邻接法构建系统进化树 (图 3)。结果显示, 来源于不同物种的 CMK 蛋白归属于不同分支, 其中茅苍术 AICMK 与莴苣、甜叶菊、向日葵 CMK 亲缘关系较近, 进一步证实了菊科植物 CMK 的同源性, 然后与杜仲、华南忍冬等植物的 CMK 聚为一支, 归属于双子叶植物。

2.6 AICMK 原核表达载体构建及诱导表达分析 将重组质粒 pET-32a-AICMK 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达感受态细胞中, 经 IPTG 诱导重组蛋白的表达, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳验证。AICMK 蛋白分子质量为 44 752.53 Da, 其融合了 pET-32a 载体的标签序列 Trx-Tag、His-Tag 和 S-Tag, 分子质量约 20 kDa, 故与空载 pET-32a 相比, 含 AICMK 基因的重组蛋白的全菌及超声破碎后的上清液在约 65 kDa 处出现蛋白条带, 12% SDS-PAGE 结果显示与预期结果一致 (图 4)。对纯化后的蛋白用 300、500 mmol·L⁻¹咪唑进行洗脱, 经过 12% SDS-PAGE 分析获得目的蛋白条带, 且 500 mmol·L⁻¹咪唑洗脱后的纯化蛋白表达量稍高于 300 mmol·L⁻¹咪唑洗脱的纯化蛋白表达量。

3 不同产地、不同组织茅苍术 AICMK 基因的表达模式及酶活性分析

本研究采用 qRT-PCR 对江苏南京、安徽岳西两产地 AICMK 基因组织表达模式进行分析 (图 5A), 江苏南京茅苍术的 AICMK 基因表达水平整体均高于岳西茅苍术, 南京茅苍术中 AICMK 基因在根状茎、茎中表达量较高, 在叶中表达量稍低, 为茎中表达量的 0.67 倍, 岳西茅苍术 AICMK 基因在根状茎中有较高表达, 在

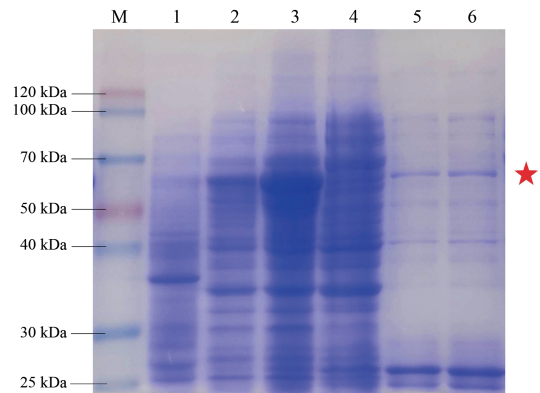


Figure 4 12% SDS-PAGE of AICMK recombinant protein. M: Protein marker; 1: Induced *E. coli* containing pET-32a; 2: Uninduced *E. coli* containing pET-32a-AICMK; 3: Induced *E. coli* containing pET-32a-AICMK; 4: Supernatant from the induced *E. coli* containing pET-32a-AICMK; 5: The purified recombinant protein elution with 300 mmol·L⁻¹ imidazole solution; 6: The purified recombinant protein elution with 500 mmol·L⁻¹ imidazole solution

茎、叶中表达量极低, 分别是根状茎中表达量的 0.06、0.22 倍, 这表明南京及岳西茅苍术中的 AICMK 基因在不同组织中的表达模式存在明显差异。

采用 ELISA 法测定江苏南京、安徽岳西两产地不同组织中 AICMK 酶活性 (图 5B)。南京茅苍术根状茎、茎、叶中 AICMK 酶的活性在叶中最高, 为根状茎的 1.33 倍。岳西茅苍术的酶活性由高到低依次为叶、根状茎、茎, 叶中 AICMK 酶活性分别为根状茎、茎中的 1.15、1.43 倍, 且南京与岳西茅苍术叶中 AICMK 酶的活性几乎一致。

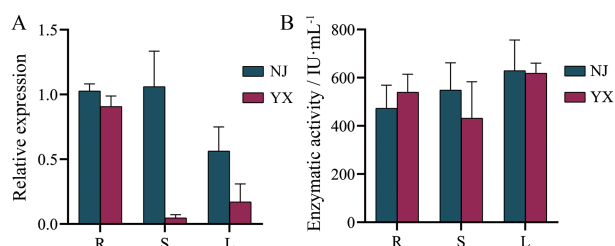


Figure 5 Expression levels (A) and enzymatic activity (B) of *AICMK* in different regions and different tissues. R: Rhizome; S: Stem; L: Leaf. NJ: *A. lancea* in Nanjing; YX: *A. lancea* in Yuexi. Data are shown as the mean \pm SD ($n = 3$)

4 MeJA 诱导下茅苍术 *AICMK* 基因的表达分析

采用 qRT-PCR 方法检测经 MeJA 处理后 *AICMK* 基因的表达模式, 结果见图 6, 基因的表达模式呈先降后升再降的趋势, 且 *AICMK* 在 3 h 表达量最低, 后逐渐升高, 至 24 h 对 MeJA 响应强烈, 为对照组的 1.92 倍, 说明茅苍术 *CMK* 基因在 24 h 时受到 MeJA 的诱导表达。

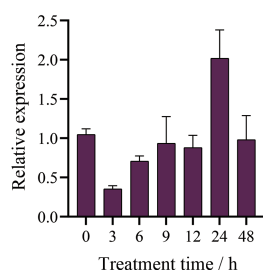


Figure 6 Expression analysis of *AICMK* induced by MeJA. Data are shown as the mean \pm SD ($n = 3$)

5 *AICMK* 亚细胞定位

为进一步了解 *AICMK* 蛋白在茅苍术中的功能, 本研究构建了 pRI101-eGFP-*AICMK* 融合表达载体, 转化至根癌农杆菌 GV3101 后转入烟草下表皮细胞中瞬时表达, 依据 *AICMK*-GFP 融合蛋白在 488 nm 激发光下散发绿色荧光, 叶绿体在 633 nm 激发光下显示自发红

色荧光, 两者叠加在一起显示黄色荧光, 表明 *AICMK* 定位于叶绿体 (图 7), 这与 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测结果一致。

讨论

中药苍术以菊科植物茅苍术 *A. lancea* 和北苍术 *A. chinensis* 的干燥根状茎入药, “起霜”是两者的鉴别要点, 也是茅苍术质量评价的重要特色指标^[22], 本课题组前期证实茅苍术的“起霜”与倍半萜化合物茅术醇和 β -桉叶醇等的积累有关^[23]。萜类化合物生物合成包括 MVA 和 MEP 两种途径, 其中存在着一系列具有调控作用且功能各异的酶, 催化萜类化合物前体物质 IPP、DMAPP 的生成, 已有报道称 IPP 可以在细胞质和质体中交互利用^[24], 银杏 *GbCMK1* 在烟草和拟南芥中的瞬时表达分析显示, *GbCMK1* 不仅在叶绿体中表达, 也可以进入细胞核中^[25], Wada 等^[26]提出嗜热菌 *Thermus thermophilus* HB8 *CMK* 的结构与 GHMP 超家族成员甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase, MK) 的结构相似, 且甲羟戊酸激酶的活性位点残基 Lys⁸ 和 Asp¹²⁵ 可能对 *CMK* 激酶具有催化作用。因此, MVA 与 MEP 途径并不是完全分裂的, 两者具有化学与分子层面的紧密联系。目前茅苍术 MVA 途径硫解酶家族成员 *KAT*^[27]、*AACT*^[28]、*HMGR*^[29] 及 MEP 途径中的 *DXS*^[30]、*MCT*^[31] 等基因已有了相关报道, *CMK* 作为茅苍术有效成分萜类化合物合成途径中的关键酶之一, 其基因型和分子机制还需进一步研究。

MeJA 通过诱导萜类化合物合成基因表达进而提高次生代谢产物的含量是近几年的研究热点, 蒋玲^[32]用外源 MeJA 诱导茅苍术萜类合成途径的 *HMGR*、*AIFPPS*、*AIHMGR*、*AISESI* 基因, 其表达量均呈现先升高后降低的趋势。通过 qRT-PCR 分析表明 *AICMK* 基因在 MeJA 处理后呈现先降低后升高再降低的趋势,

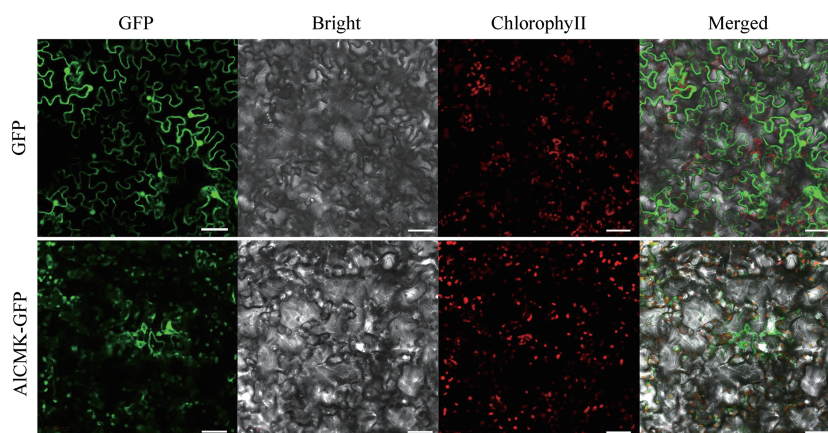


Figure 7 Subcellular localization of *AICMK*. Scale bar: 50 μ m

于 3 h 时基因表达量达到最低, 之后基因表达量逐渐升高, 在 24 h 达到诱导峰值, 表现出显著的诱导作用。有研究报道了杜仲 MVA、MEP 途径相关基因的时空表达模式, 分析了 *EuCMK* 基因分别在杜仲叶片与幼果中及在杜仲幼果与成熟果实中的表达差异性, 证明杜仲 *EuCMK* 基因存在时空表达差异^[33]。李贝宁等^[34]通过对不同产地丹参中 *CMK* 基因的表达水平与丹参有效成分含量积累的分析表明两者具有相关性, *SmCMK* 基因发挥着调控丹参酮类成分积累的作用。张曼^[35]的研究表明 *AaCMK* 在青蒿根、茎、叶等各个组织中均有表达, 但在青蒿素合成部位分泌型腺体中表达量最高, 有助于青蒿素的合成。本研究通过 qRT-PCR 技术对不同产地茅苍术 *AICMK* 基因的组织表达模式进行分析, 结果表明 *CMK* 基因在南京茅苍术的根状茎、茎、叶中均有较高表达, 在岳西茅苍术中仅在根状茎中有较高表达, 茎和叶中表达量均低, 证明茅苍术 *CMK* 基因存在组织特异性。南京、岳西两产地茅苍术根状茎、茎、叶中酶活性测定结果显示叶中的 *CMK* 酶活性高于其他组织。

Carretero-Paulet 等^[36]将 AtDXR 蛋白融合到可溶性绿色荧光蛋白 GFP 的 N 端, 于拟南芥幼苗中瞬时表达, 结果显示 DXR-GFP 融合蛋白激发荧光与叶绿体自发荧光共定位于叶绿体中。Lois 等^[37]的研究结果表明番茄 DXS 蛋白同样定位于叶绿体中。为探索茅苍术 *AICMK* 在细胞中的定位, 本文利用烟草瞬时转化法结合在线软件进行分析, 证明 *AICMK* 蛋白定位于叶绿体中, 这与大部分文献报道的 MEP 途径基因定位于质体中的结果一致^[38]。

本研究克隆获得 MEP 途径的唯一激酶 *CMK*, 对其进行生物信息学分析及原核表达分析, 为 *CMK* 基因的功能研究及萜类化合物合成过程中各关键酶的作用机制研究提供依据。*CMK* 基因作为 MEP 途径的关键酶基因, 对茅苍术萜类化合物合成具有重要调控作用, 关于其表达量与茅苍术有效成分含量积累之间的关系尚有待研究。

作者贡献: 查良平和彭华胜设计实验并提供资金; 鲁继梅和徐睿参与实验、分析数据和撰写论文; 吴君贤、邹立思、刘超提供实验技术支持。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 168.
- [2] Ma EL, Li YC, Tsuneki H, et al. Beta-eudesmol suppresses tumour growth through inhibition of tumour neovascularisation and tumour cell proliferation [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10: 159-167.
- [3] Acharya B, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. Therapeutic potential and pharmacological activities of β -eudesmol [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2021, 97: 984-996.
- [4] Chen LG, Jan YS, Tsai PW, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive constituents of *Atractylodes japonica* Koidzumi [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 2254-2262.
- [5] Masuda Y, Kadokura T, Ishii M, et al. Hinesol, a compound isolated from the essential oils of *Atractylodes lancea* rhizome, inhibits cell growth and induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells [J]. *J Nat Med*, 2015, 69: 332-339.
- [6] Guo WQ, Xu B, Meng QY, et al. Anti-tumor effect of hinesol on liver cancer via downregulating MEK/ERK and NF- κ B pathway in SMMC-7721 and LM3 cells [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2018, 32: 282.
- [7] Satoh K, Nagai F, Kano I. Inhibition of H^+ , K^+ -ATPase by hinesol, a major component of So-jutsu, by interaction with enzyme in the E_1 state [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59: 881-886.
- [8] Wang YM, Wang ZB, Sun YP, et al. Research progress on chemical structure and biological activity of sesquiterpenes from *Atractylodes* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 299-309.
- [9] Zhuang D, Qin J, Wang HY, et al. Medicinal compositions of *Atractylodis rhizoma*: a review [J]. *Chin J Bioproc Eng* (生物加工过程), 2021, 19: 306-313.
- [10] Ahn CS, Pai HS. Physiological function of *IspE*, a plastid MEP pathway gene for isoprenoid biosynthesis, in organelle biogenesis and cell morphogenesis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 66: 503-517.
- [11] Fan YF, Zhang M, Xiang LE, et al. Molecular cloning and characterization of *CMK* from *Artemisia annua* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2018, 43: 2254-2260.
- [12] Chen NG, Wang PR, Li CM, et al. A single nucleotide mutation of the *IspE* gene participating in the MEP pathway for isoprenoid biosynthesis causes a green-revertible yellow leaf phenotype in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59: 1905-1917.
- [13] Shan S, Chen XH. Crystallization and preliminary X-ray analysis of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (*IspE*) from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2011, 67: 821-823.
- [14] Kadian K, Vijay S, Gupta Y, et al. Structural modeling identifies *Plasmodium vivax* 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (*IspE*) as a plausible new antimalarial drug target [J]. *Parasitol Int*, 2018, 67: 375-385.
- [15] Tong YR, Su P, Zhao YJ, et al. Cloning and expression analysis of 4-(cytidine-5-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase gene in *Tripterygium wilfordii* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40: 4165-4170.
- [16] Jing L, Zheng H, Yao N, et al. Cloning and expression analysis

- of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase gene in *Cinnamomum camphora* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41: 1578-1584.
- [17] Qiao YY. Functional Cloning and Characterization of *CMK* Gene and *HDS* Gene from *Dioscorea zingiberensis* (盾叶薯蓣 *CMK* 基因和 *HDS* 基因的克隆与功能验证) [D]. Wuhan: Hubei University, 2017.
- [18] Wang XY, Cui GH, Huang LQ, et al. A full length cDNA of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase cloning and analysis of introduced gene expression in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2008, 12: 1251-1257.
- [19] Sang XH, Gu W, Chao J, et al. Selection of reference genes of *Atractylodes lancea* and its application in biosynthesis of active ingredients [J]. Plant Physiol J (植物生理学报), 2017, 53: 1680-1686.
- [20] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [21] Miallau L, Alphey MS, Kemp LE, et al. Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100: 9173-9178.
- [22] Yu DQ, Zha LP, Peng HS. Species and medical history of "Xishuang" medicinal materials [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 43: 2624-2627.
- [23] Yu DQ, Han XJ, Shan TY, et al. Microscopic characteristic and chemical composition analysis of three medicinal plants and surface frosts [J]. Molecules, 2019, 24: 4548.
- [24] Phillips MA, D'auria JC, Gershenzon J, et al. The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis [J]. Plant Cell, 2008, 20: 677-696.
- [25] Kim SM, Kim YB, Kuzuyama T, et al. Two copies of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase (*CMK*) gene in *Ginkgo biloba*: molecular cloning and functional characterization [J]. Planta, 2008, 228: 941-950.
- [26] Wada T, Kuzuyama T, Satoh S, et al. Crystal structure of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase, an enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid synthesis [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 30022-30027.
- [27] Xu R, Shan TY, Wu JX, et al. Cloning and prokaryotic expression of 3-ketoacyl-CoA thiolase gene *AIKAT* from *Atractylodes lancea* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 4950-4958.
- [28] Chen L, Chen LN, Wang M. et al. Cloning and sequence analysis of acetyl-CoA acetyltransferase gene (*AIAACT*) from *Atractylodes lancea* [J]. J Chin Mater Med (中药材), 2021, 44: 574-579.
- [29] Luo HM, Song JY, Li XY, et al. Cloning and expression analysis of a key device of *HMGR* gene involved in ginsenoside biosynthesis of *Panax ginseng* via synthetic biology approach [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2013, 48: 219-227.
- [30] Deng J, Wan QY, Gong L, et al. Cloning and analysis of *DXS* gene from *Atractylodes lancea* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 39-44.
- [31] Zhang M, Xiang LN, Wang H, et al. Molecular cloning and characterization of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase gene from *Artemisia annua* L. [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2016, 51: 1334-1339.
- [32] Jiang L. Transcriptomic Analysis of the Endangered Medicinal Plants *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. (濒危药用植物茅苍术转录组学研究) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2017.
- [33] Wang L, Du HY, Wuyun TN. Subcellular localization and expression analysis of genes from *Eucommia ulmoides* involved in MVA and MEP pathway [J]. Bull Bot Res (植物研究), 2017, 37: 52-62.
- [34] Li BN, Zhou XL, Huang LQ, et al. Correlation between expression level of functional genes and tanshinones' accumulation in *Salvia miltiorrhiza* from different areas [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2011, 36: 3406-3409.
- [35] Zhang M. Molecular Cloning and Characterization of the 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Cytidylyltransferase Gene, 4-(Cytidine 5'-Diphospho)-2-C-Methylery-Thritol Kinase Gene, 2-C-Methylerythritol-2,4-Cyclodiphosphate Synthase Gene from *Artemisia annua* L (青蒿 *AaCMK*、*AaMCT*、*AaMCS* 基因的克隆与功能分析) [D]. Chongqing: Southwest University, 2016.
- [36] Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, et al. Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. Plant Physiol, 2002, 129: 1581-1591.
- [37] Lois LM, Rodriguez-concepcion M, Gallego F, et al. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase [J]. Plant J, 2000, 22: 503-513.
- [38] Kim SM, Kuzuyama T, Chang YJ, et al. Cloning and functional characterization of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase (*GbMECT*) gene from *Ginkgo biloba* [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 1435-1441.