

类黄酮异戊烯转移酶基因在酿酒酵母中的表达

袁田田¹, 高娟², 刘小烛^{1*}

(1. 西南林业大学林学院, 云南昆明 650224; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明 650204)

摘要 目的 对类黄酮异戊烯转移酶基因在酿酒酵母中的表达进行研究。方法 以粗毛淫羊藿为材料, 对其类黄酮异戊烯转移酶基因(*EaPT1*)进行克隆, 并构建重组质粒, 将其转化至酿酒酵母 *INVSc1* 中表达, 进行黄酮类底物粗酶检测。结果 获得了大小约 1 200 bp 的 *EaPT1* 基因; 经 SDS-PAGE 检测, 重组质粒转化后的酵母菌有疑似 *EaPT1* 的表达产物; 粗酶检测中未能检测到 *EaPT1* 酶活性。结论 为粗毛淫羊藿植物次生代谢, 特别是类黄酮生物合成途径的解析奠定基础。

关键词 淫羊藿苷; 重组质粒; 异戊烯转移酶; 酿酒酵母

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2012)18-09596-02

Expression Analysis of Flavonoid Prenyltransferase-like Genes in *Saccharomyces Cerevisia*

YUAN Tian-tian et al (College of forestry, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract [Objective] The aim was to study the expression of flavonoid prenyltransferase-like genes in *Saccharomyces cerevisia*. [Method] Using the *Epimedium acuminatum* as material, the flavonoid prenyltransferase-like gene (*EaPT1*) was cloned, and with the construction of recombinant plasmid which expressed in *Saccharomyces cerevisia*, the crude enzyme was detected by flavonoid substrate. [Result] An about 1 200 bp *EaPT1* gene was obtained; through the SDS-PAGE detection, the *Saccharomyces cerevisia* which had been transformed in recombinant plasmid had as if *EaPT1*'s expression product; there was no *EaPT1* enzymatic activity in the crude enzyme detection. [Conclusion] It prepared the ground for the analysis of secondary metabolism of *Epimedium acuminatum*, specially the synthetic route of flavonoid organism.

Key words Icariin; Recombinant plasmid; Prenyltransferase; *Saccharomyces cerevisia*

传统中草药粗毛淫羊藿为淫羊藿属植物, 富含异戊烯黄酮类化合物^[1], 如淫羊藿苷和淫羊藿定等, 具有增加免疫和调节内分泌的作用^[2-3]。催化异戊烯单元转移到黄酮类化合物的酶称为类黄酮异戊烯转移酶(Flavonoid Prenyltransferase), 属膜结合型芳香族异戊烯转移酶^[4]。目前已有较多有关类黄酮异戊烯转移酶的研究^[5-8]。

据研究, 植物异戊烯转移酶有在大肠杆菌中表达成功的, 也有在酵母中表达成功的, 陈倩倩等在试验中首先选择了大肠杆菌表达体系和表达载体 pET32a(+), 但无论怎样变换诱导条件, 始终没有在 SDS-PAGE 电泳中检测到可溶的或包涵体形式的目标条带, 之后更换表达载体 pColdTFDNA 和 pGEX-4T4, 仍不见目标蛋白表达^[9]。这可能是由于 *EaPT1* 含有 9 个跨膜区, 属典型的跨膜蛋白, 难以在大肠杆菌表达体系实现异源表达^[9]。而酿酒酵母细胞具有一定的后修饰系统, 因此可选用酿酒酵母以 pYES2 为表达载体的真核表达体系进一步对 *EaPT1* 进行表达研究。酿酒酵母是最安全的基因工程表达受体, 已广泛用于功能基因的表达^[10], 且酿酒酵母表达的重组蛋白质具有较好的活性和稳定性^[11], 其在食品工业中有着几百年的应用历史, 属安全型基因工程受体系统^[12]。大豆 GmG4DT 的异戊烯转移酶催化活性, 即是通过酵母表达体系才得以鉴定的^[13]。

该试验以粗毛淫羊藿为试验材料, 根据植物芳香族异戊烯转移酶保守序列设计简并引物, 通过相似性的同源克隆策

略及其 RACE 技术获得一条全长基因并命名为 *EaPT1*。将 *EaPT1* 与酵母表达载体 pYES2 重组, 获得 pYES2/*EaPT1* 重组体并转化至酵母中表达, 进行体外功能鉴定, 旨在发现一类新的类黄酮异戊烯转移酶, 为粗毛淫羊藿植物次生代谢, 特别是类黄酮生物合成途径的解析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 重组质粒 PMD18-T/*EaPT1* (由实验室其他成员完成); 宿主载体 pYES2; 酵母菌 *INVSc1* (Invitrogen 公司); LB 培养基; YPD 培养基; SC-U 培养基; P-buffer1 [50 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 10 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 乙酸钾, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF]; P-buffer2 [0.5% KH₂PO₄, 3.68% CaCl₂·2H₂O, 5.73% TES buffer (pH 7.2)]; Lysis buffer [50 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 10 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L potassium acetate, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride]; Zymolyase buffer [50 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 10 mmol/L MgCl₂]; 蜗牛酶 (上海生物工程有限公司); 融菌酶; 非 EB 胶回收试剂盒 (上海华舜生物技术有限公司); BIO-RADSDS 蛋白电泳装置等。

1.2 方法

1.2.1 *EaPT1* 基因的获得 以重组质粒 PMD18-T/*EaPT1* 为模板, 加入上游引物 (5'-CGGGATCCAAAATGGATTCTCTA-3') 及下游引物 (5'-GGAATTCTCATCTGACCAAT-3'), 经 PCR 扩增获得 *EaPT1* 基因的特异性条带。

1.2.2 构建对酵母的转化质粒及其表达 将目的片段回收并与 pYES2 连接得到 pYES2/*EaPT1*, 将构建好的表达载体 pYES2/*EaPT1* 转化到酿酒酵母尿嘧啶缺陷型菌种 *INVSc1*, 在 SC-U 选择培养基上筛选转化子。参照 Invitrogen 公司 pYES2 操作手册制备其感受态细胞, 并进行化学转化和重组蛋白的表达。

基金项目 云南省高等学校本科实验教学示范中心“林木生物技术实验中心”、“生物学”云南省高校优势重点学科及西南林业大学“大型仪器设备共享平台”资助。

作者简介 袁田田 (1987-), 女, 山东临沂人, 硕士, 从事植物功能基因克隆与表达的研究, E-mail: Tammy1211@163.com。* 通讯作者, 教授, 硕士生导师, 从事生物化学与分子生物学方面的研究。

收稿日期 2012-03-08

1.2.3 酵母细胞的破碎。

(1) Vortex 方法。重悬菌体于 P-buffer1, 4 °C 离心; 弃上清, P-buffer1 重悬菌体, 使 OD_{600} 达 50 ~ 100, 加入等体积 acid-washed glass beads, 混匀 30 s, 冰上放置 30 s, 重复 10 ~ 20 次; 最大转速离心 10 min, 取全菌和上清分别进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。

(2) 蜗牛酶方法。称量菌体的重量, 重悬菌体于 2 至 4 个体积的冰浴水中(1 个体积当作 1 L BJ926 $OD_{600} = 1.0$ 时产生 2 ~ 3 ml 菌体), 4 °C 离心, 弃上清; 重悬菌体于 1 个体积的 Zymolyase buffer, 室温放置 15 min; 4 °C 离心, 3 倍体积的 Zymolyase buffer 重悬, 同时加入蜗牛酶(20 ~ 40 mg 每克细胞), 30 °C 下 50 r/min 振荡 1 h; 4 °C 离心原生质体, 去上清; 清洗原生质体, 轻柔地用 2 个体积的冰浴 Zymolyase buffer 重悬, 1 500 g 离心 5 min; 重复该步骤 2 次; 轻柔地将原生质体重悬于 2 个体积的 Lysis buffer, 1 500 g 离心 10 min; 将原生质体重悬于 1 个体积的 Lysis buffer; 超声 3 min, 1 500 g 离心 15 s, 取全菌和上清分别进行蛋白电泳。

(3) 融菌酶方法。菌体重悬在 1 ml 冰浴去离子水中, 4 °C 离心, 去上清; 用 1 ml 10.3% 冰浴蔗糖重悬菌体, 4 °C 离心, 去上清; 菌体用 1 ml 冰浴 P-Buffer2 重悬, 4 °C 离心, 去上清, 重复 1 次; 菌体用 P-Buffer2 重悬, 同时加入融菌酶 100 μ l (50 mg/ml), 30 °C 下 50 r/min 振荡 1 h; 离心原生质体, 去上清; 1 ml 冰浴 P-Buffer2 清洗 3 次, 4 °C 离心, 去上清; 超声 3 min, 1 500 g 离心 15 s, 取全菌和上清分别进行蛋白电泳。

1.2.4 粗酶活性的检测。利用 Vortex 方法破碎半乳糖诱导的酵母细胞后, 4 °C 离心, 取上清进行反应, 反应体系为:

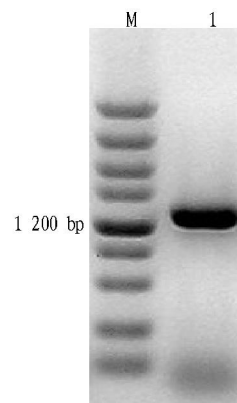
10 μ g DMAPP + 2 mmol/L naringenin + 5% 甘油 + 400 μ l 上清 + 2 mmol/L DTT + 5 mmol/L $MgCl_2$

37 °C 空气浴 18 h 后, 用乙酸乙酯萃取, 挥发干后, 用 100 μ l 甲醇溶解, LC/MS 检测, LC/MS 条件参照文献 [10]。

2 结果与分析

2.1 *EaPT1* 基因的获得 从重组质粒 PMD18-T/*EaPT1* 中以 PCR 的方法得到了目的基因 *EaPT1*。由图 1 可知, 目的基因片段分子量约为 1 200 bp, 与相应其他植物的 *EaPT1* 大小相当。

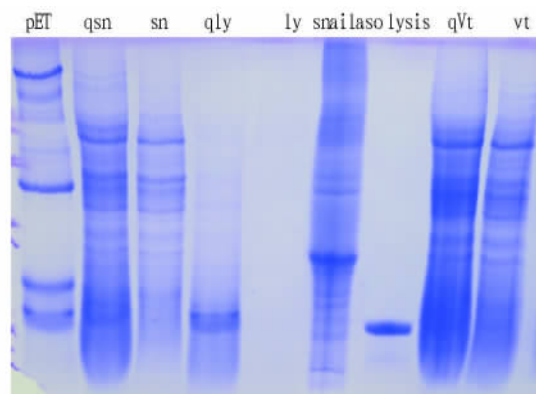
2.2 *EaPT1* 的表达 首先, 对构建的载体质粒 pYES2/*EaPT1* 进行了测序, 证实了 *EaPT1* 序列是正确的。然后, 通过化学转化将 pYES2/*EaPT1* 质粒转入酿酒酵母, 在营养缺陷型培



注: M. DNA Marker; 1. *EaPT1* 基因。

图 1 *EaPT1* 的 PCR 扩增电泳图谱

培养基 SC-U 平板上筛选出了转化成功的克隆。将克隆扩大培养后进行酵母菌细胞破碎, 用酵母菌细胞破碎提取液进行 SDS-PAGE 检测(图 2), 结果显示有疑似 *EaPT1* 的表达产物(蜗牛酶方法裂解、溶菌酶方法裂解及 Vortex 方法裂解的酿酒酵母有共同的蛋白质条带, 并与预测的表达载体 pYES2/*EaPT1* 表达蛋白 45 609.3 Da 基本一致。



注: pET 为空载体裂解蛋白; qsn、sn 分别为蜗牛酶方法裂解酿酒酵母的全菌和上清; qly、ly 分别为溶菌酶方法裂解酿酒酵母的全菌和上清; snailase、lysis 分别为蜗牛酶和溶菌酶本身的蛋白; qVt、Vt 为方法 Vortex 方法裂解酿酒酵母的全菌和上清。

图 2 酿酒酵母细胞及细胞破碎后的 SDS-PAGE 图谱

2.3 活性检测 采用 Vortex 方法来破碎酵母细胞来进行粗酶检测。以黄酮类 Naringenin 为底物, 进行酶反应检测 *EaPT1* 酶活性, 预计产物应该如图 3 所示。但通过 LC-MS 检测, 未能检测到预计的产物峰。

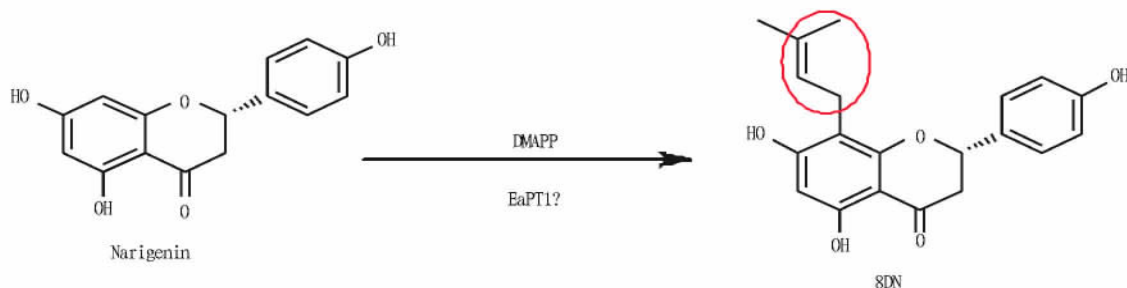


图 3 Naringenin 的预计产物

(下转第 9600 页)

功能相关性的研究较多,如在猕猴桃和番茄等果实的软化过程中,*XTH* 的活性增强,且表达量增加,说明 *XTH* 基因参与了果实的成熟与软化^[9-10]。王文泉等研究发现,*XTH* 基因在芝麻和小麦的根中受厌氧诱导表达,是新的与结构适应相关的耐渍基因^[11]。此外,*XTH* 基因的表达与组织膨大也有很强的相关性^[12]。近年的研究还表明,*XTH* 基因是一种植物的细胞程序性死亡相关基因,而且与花瓣衰老也有密切的关系^[13-14]。该研究克隆得到了菊花花瓣 *XTH* 基因的 cDNA 序列,并通过序列分析和信息生物学方法鉴定了分离基因的正确性,该结果为进一步研究 *XTH* 基因的结构与生物学功能以及菊花花瓣的生长发育机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 李娜. 团花树木葡聚糖转葡萄糖苷酶 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 北京: 北京林业大学, 2008: 3-8.
- [2] AUBERT D, HERZOG M. A new cDNA encoding a xyloglucan endotransglycosylase-related polypeptide (ATXTR8) preferentially expressed in seedling, root and stem of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Science, 1996, 121(2): 187-196.
- [3] SAAB I N, SACHS M M. Complete cDNA and genomic sequence encoding a flooding-responsive gene from maize (*Zeamays* L.) homologous to xyloglucan endotransglycosylase [J]. Plant Physiology, 1995, 108(1): 439-440.
- [4] UOZU S, TANAKA-UEGUCHI M, KITANO H, et al. Characterization of XET-related genes of rice [J]. Plant Physiology, 2000, 122(3): 853-859.
- [5] TOIKKANEN J H, MARJA-LEENA NIKU-PAAVOLA, MICHAEL BAILLEY, et al. Expression of xyloglucan endotransglycosylases of *Gerbera hybrid* and *Betula pendula* in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 130: 161-170.
- [6] YAMADA K, TAKAHASHI R, FUJITANI C, et al. Cell wall extensibility and effect of cell-wall-loosening proteins during rose flower opening [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26: 823-835.
- [7] 阙雪芹. 大丽菊花瓣衰老相关蛋白质组及 XET 基因的研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2010: 42.
- [8] BORRIS R, BUETTNER K, MAENTSAELAE P. Structure of the β -1,3-4,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: Homologies to other β -glucanases [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1990, 222(2/3): 278-283.
- [9] REDGWELL R J, FRY S C. Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening: implications for fruit softening [J]. Plant Physiology, 1993, 103(4): 1399-1406.
- [10] MACLACHLAN G, BRADY C. Endo-1,4- β -glucanase, xyloglucanase and xyloglucan endotransglycosylases activities versus potential substrates in ripening tomatoes [J]. Plant Physiology, 1994, 105(3): 965-974.
- [11] 王文泉, 郑永战, 梅鸿献, 等. 厌氧诱导木葡聚糖转葡萄糖苷酶 (XET) 基因在芝麻和小麦根中的表达 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(3): 258-263.
- [12] XU W, PURUGGANAN M M, POLISENSKY D H, et al. Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase [J]. Plant Cell, 1995, 7(10): 1555-1567.
- [13] PAUL CAMPBELL, JANET BRAAM. Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions [J]. Trends Plant Science, 1999, 4(9): 361-366.
- [14] SANE A P, SIDDHARTH KAUSHAL TRIPATHI, PRAVENDRA NATH. Petal abscission in rose (*Rosa bourboniana* var Gruss an Teplitz) is associated with the enhanced expression of an alpha expansin gene, RbEXPA1 [J]. Plant Science, 2007, 172: 481-487.
- [15] WANG X, TAN Y P, ZHOU J, et al. Expression of a tobacco glycosyltransferase gene driving promoter in transgenic tobacco [J]. Agricultural Science & Technology, 2010, 11(4): 83-85, 155.
- [16] 卢其能, 杨清, 沈春修. 马铃薯类黄酮 3-O-葡萄糖基化酶基因的克隆与表达分析 [J]. 华北农学报, 2009(4): 11-16.
- [17] WANG W W, TAN Y P, WANG C T, et al. Effects of glycosyltransferase gene sm-Ngt1 on the plant height of rice [J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(9): 1279-1282.
- [18] 胡耀辉, 朱蕾, 于寒松. 重组醇糖基转移酶表达条件的优化与纯化 [J]. 安徽农业科学, 2010(17): 9002-9004.

(上接第 9597 页)

3 讨论

由于其他植物异戊烯转移酶在大肠杆菌及酵母中表达获得了成功,笔者首先选择了大肠杆菌表达体系和表达载体 pET32a(+),使用许多方法,却始终未在 SDS-PAGE 电泳中检测到可溶的或包涵体形式的目标条带。考虑到 *EaPT1* 含有 9 个跨膜区,属典型的跨膜蛋白,故可能难以在大肠杆菌表达体系实现异源表达。由于酿酒酵母细胞具有一定的后修饰系统,文中选用酿酒酵母以 pYES2 为表达载体的真核表达体系进一步对 *EaPT1* 进行表达研究,在 SDS-PAGE 检测中显示有疑似 *EaPT1* 的表达产物,但在活性检测中未检测出活性。这可能是由于:①已经表达了有活性的酶蛋白,但检测体系有问题;②表达产物是酶蛋白,在提取过程中失活;③只表达了酶蛋白的部分片段;④酶蛋白就是不能表达。

酵母细胞有细胞壁,难以破碎,文中对酵母细胞的破碎采取了 3 种方法。图 2 比较了应用溶菌酶、蜗牛酶和 Vortex 方法裂解酵母的效果,从图中不难看出,溶菌酶方法、蜗牛酶方法对酵母细胞破碎不完全,不能够较好的将酵母细胞内的蛋白释放出来,Vortex 方法破碎酵母细胞的效果最好,破碎完全,后续可采用 Vortex 方法来破碎酵母细胞来进行粗酶检测试验。

该试验中,基因 *EaPT1* 在原核大肠杆菌表达系统和真核

酿酒酵母表达系统中,以 naringenin 为底物进行粗酶检测,未检测到活性,从而进一步确认该基因如陈倩倩等^[8]预测的一样,是参与维生素 E 合成的异戊烯转移酶基因。

参考文献

- [1] 张华峰, 杨晓华. 淫羊藿药材质量控制的问题与对策 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 160-163.
- [2] SHEN P, GUO B L, GONG Y, et al. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium socies* [J]. Phytochemistry, 2007, 68: 1448-1458.
- [3] DELL'AGLI M, GALLI G V, DAL CERO E, et al. Potent inhibition of human phosphodiesterase-5 by icariin derivatives [J]. Nat Prod, 2008, 71: 1513-1517.
- [4] 高娟, 曾英, 卢山. 芳香族异戊烯转移酶的研究进展 [J]. 植物学报, 2010, 45(6): 751-759.
- [5] 陈倩倩, 高娟, 曾英, 等. 粗毛淫羊藿的类黄酮异戊烯转移酶基因的克隆与表达分析 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(6): 575-580.
- [6] COVELLO P S, REED D W. Functional expression of the extraplastidial *Arabidopsis thaliana* oleate desaturase gene (FAD2) in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Plant Physiol, 1996, 111(1): 223-226.
- [7] BUSSINEAU C M, SHUSTER J R. Genetic stability of protein expression systems in yeast [J]. Dev Biol Stand, 1994, 83: 13-19.
- [8] 王弘, 郑文岭, 杨连生, 等. 以绿色荧光蛋白为报告基因的酿酒酵母表达载体的构建 [J]. 广东医学, 2002, 23(12): 1239-1240.
- [9] AKASHI T, SASAKI K, AOKI T, et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin [J]. Plant Physiol, 2009, 149(2): 683-693.
- [10] SASAKI K, TSURUMARU Y, YAZAKI K. Prenylation of flavonoids by biotransformation of yeast expressing plant membrane-bound prenyltransferase SN8DT-1 [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(3): 759-761.