

乳突果脂氧合酶基因的原核表达及酶活性测定

李靖^{1,2}, 赵沛基², 李云仙¹, 马长乐¹

(1. 西南林业大学, 云南 昆明 650224; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要:脂氧合酶(LOX)是植物十八碳酸途径中一个很重要的酶,该酶作用的产物在植物的生长发育过程中以及在植物对环境胁迫反应中起着重要的作用.通过PCR和酶切连接的方法,构建了乳突果脂氧合酶基因的原核表达载体,将其导入大肠杆菌BL21(DE3)中,在低温(15℃)条件下,表达出了有活性的酶蛋白,且该蛋白分子量与预期分子量相符.通过LC-ESI-MS检测,该酶可催化亚油酸生成9,10,11-三羟基-12-十八碳烯酸.推测在乳突果中,几丁质诱导的十八碳酸代谢途径是沿着9-LOX方向进行的.

关键词:乳突果;脂氧合酶;十八碳酸途径;原核表达;酶活性测定

中图分类号:Q 946

文献标志码:A

文章编号:1003-4315(2012)05-0156-05

Prokaryotic expression of lipoxygenase gene and crude enzyme activity assay from *Adelostemma gracillimum*

LI Jing^{1,2}, ZHAO Pei-ji², LI Yun-xian¹, MA Chang-le¹

(1. Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: Lipoxygenases are important enzymes in plant octadecanoic acid pathway. Products of this enzyme have important functions in plant growth and development, as well as in response to environmental stress. A prokaryotic expression vector of lipoxygenase gene from *Adelostemma gracillimum* was constructed through PCR and enzyme digestion connection method and a full length lipoxygenase cDNA was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3) under low temperature (15℃). Molecular weight of the recombinant protein was the same as the expected. Results of enzyme assay showed that the protein could catalyze linoleic acid to 9,10,11-trihydroxy-12-octadecenoic acid detected by LC-ESI-MS. It was speculated that octadecanoic acid pathway induced by chitosan differentiated to 9-LOX orientation.

Key words: *Adelostemma gracillimum*; lipoxygenase; octadecanoic acid pathway; prokaryotic expression; enzyme activity assay

脂氧合酶(LOX, EC 1.13.11.12)是含有非血红素离子的双加氧酶,广泛分布于动植物.它是植物十八碳酸代谢途径的关键酶,该途径也称LOX途径.该酶作用的产物在植物的生长发育过程中以及

在植物对环境胁迫反应中起着重要的作用^[1].在植物中,亚油酸和亚麻酸是LOX最常见的底物,根据其亚油酸加氧的位置特异性,将植物脂氧合酶分为2类:在亚油酸C-9位加氧的被称为9-LOX,而氧

第一作者:李靖(1978-),女,博士研究生,讲师,从事植物生物化学与分子生物学的研究. E-mail:lijing@swfc.edu.cn

通信作者:马长乐,男,博士,副教授,主要从事植物分子生物学的研究. E-mail:mcl@swfc.edu.cn

基金项目:云南省自然科学基金项目(2009ZC085M).

收稿日期:2012-09-20;修回日期:2012-10-18

原子加在 C-13 位的称为 13-LOX^[2]。

LOX 基因的表达贯穿于植物生活史的整个过程^[3-4]。一方面,在植物生长发育的各个阶段,包括种子的萌发、块茎的形成、结节的发育、果实的成熟以及植物体的衰老,都存在着相应 LOX 基因的表达^[5];另一方面,在自然生长环境中,植物体要面临许多环境胁迫因素,如机械刺激、虫咬、缺水、病原感染、高温或低温、氧胁迫和紫外辐射等都可诱导单个或多个 LOX 基因的表达^[6]。其次,外源诱导子,如几丁质、水杨酸、茉莉酸甲酯等也可诱导 LOX 基因的表达,这些诱导子多为病原体的组成成分或者是 LOX 代谢途径的组分^[7-8]。

乳突果 (*Adelostemma gracillimum*) 为萝藦科鹅绒藤属植物,是一种重要的药用植物,主要分布于我国西南部,民间用其根作滋补强壮药和治疗小儿惊风症和风湿关节痛。先前,我们从乳突果愈伤组织中分离了 2 个三羟基十八碳烯酸,分别为 9,12,13-三羟基-10-十八碳烯酸和 9,10,11-三羟基-12-十八碳烯酸,它们为 9-LOX 作用于亚油酸的产物^[9]。同时在乳突果苗的培养体系中发现,经 150 mg/L 几丁质诱导 9 h 的乳突果组培苗产生了 9-LOX,该酶可催化亚油酸生成 9,10,11-三羟基-12-十八碳烯酸^[10]。由于三羟基十八碳烯酸具有抗真菌活性,提示十八碳烯酸代谢途径和具有化学防御功能的次生代谢途径在该植物中可能存在关联,所以,本研究选择了乳突果作为试验材料进行脂氧合酶的研究。

1 试验方法

1.1 原核表达载体的构建及重组质粒的转化

根据已经获得的乳突果脂氧合酶基因序列 (GenBank Accession No. DQ094169),合成 2 条特异引物用于基因扩增,5'端引物引入 *Sal* I 酶切位点 LSP1 (5'-CCGTCGACAA ATGCTGAAACAA ATTC-3'),3'端引物引入 *Not* I 酶切位点 LSP2 (5'-CAGCGGCCGCTTAAATTGACACACTG-3')。以含有阳性克隆的质粒为模板,通过 PCR 反应获得全长基因。PCR 扩增程序为:94 °C 3 min;95 °C 40 s,50 °C 40 s,72 °C 3 min,30 个循环;72 °C 7 min 30 s,电泳检测 PCR 产物。扩增到的全长基因通过双酶切连接到具有同样酶切位点的 pET32a+ (No-

vagen) 质粒,转化到大肠杆菌 DH5 α 中,进行测序验证插入基因片段的正确性。测序认为正确的重组质粒 (pET-LOX) 转化到表达宿主菌 BL21 (DE3) 中,-80 °C 冻存备用。

1.2 重组质粒 PET-LOX 的原核表达

取 10 μ L 含有重组质粒 pET-LOX 菌液保存液 (-80 °C 冻存) 到 10 mL SOB 培养基中,加氨苄青霉素 (100 mg/mL) 至终浓度 50 μ g/mL,于 37 °C 170 r/min 摇菌 16 h。从中取 4 mL 菌液到 125 mL 的 SOB 中,加入氨苄青霉素至终浓度 50 μ g/mL,于 37 °C 170 r/min 摇菌至 $D_{550} = 0.6 \sim 0.9$ 。同时做 pET32a+ 和 PS,其中 PS 为带有目的基因的重组载体,pET32a+ 为空载体对照。各取 2 mL 菌液,16 000 r/min 离心 1 min,弃上清,沉淀 -20 °C 保存备用^[11]。

向剩余菌液加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,放置于 15 °C 的控温摇床中,160 r/min 摇菌 20 h。取菌液 16 000 r/min 离心 1 min,沉淀 -20 °C 保存备用,用于 SDS-PAGE 检测^[11]。

1.3 样品超声破碎及 SDS-PAGE 电泳

向保存菌液沉淀中加入预冷的缓冲液 (pH 7.9, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L imidazole) 悬浮细胞,加入 0.1% 的 Triton X-100,再加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL。将菌液至于冰上超声 10 min (20 s 开 \rightarrow 20 s 关 \rightarrow 20 s 开),液氮速冻,30 °C 水浴溶解。重复 2 次。16 000 r/min 离心 1 min,保留上清。适量样品于 100 °C 煮沸 10 min 后,加样电泳 (8% 胶浓度,120 V) 1.5 h,考马斯亮蓝染色。

1.4 粗酶活性的鉴定

1 mL 的反应体系:亚油酸 20 μ L,粗酶液 200 μ L,磷酸钠缓冲液 780 μ L (pH 6.0),Tween20 2.5 μ L。配制好后于 20 °C,170 r/min 振摇,反应 1 h 后用 1 mL 的乙酸乙酯萃取 3 次,氮气吹干浓缩,溶于 1 mL 甲醇,用于 LC-ESI-MS 检测。

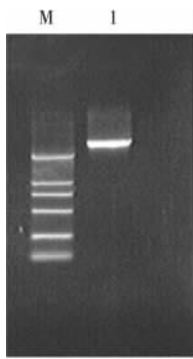
样品经过反相 HPLC 系统 (HPLC Waters 2695, C_{18} 反相柱 3.5 μ m, 3.0 mm \times 50 mm),流动相 A 为甲醇、B 为含 1% 甲酸的蒸馏水梯度洗脱,进样量为 10 μ L,流速为 0.2 mL/min。用 Thermo Finnigan LCQ Advantage 质谱仪进行 ESI-MS (离子阱) 分析,质谱仪参数设置分别为:Capillary Temp (270 °C),Sheath Gas Flow (15 psi),Source Current (80

μA),Capillary voltage(20 V). 流动相前 20 min 为 甲醇:水(63:37),25~30 min 为甲醇^[12].

2 结果与分析

2.1 重组质粒的转化

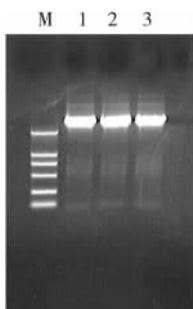
利用引物 LSP1 和 LSP2,通过 PCR 扩增得到了预期大小(编码区 2 589 bp)的单一一条带(图 1),反应产物进行基本的纯化、酶切、连接和转化步骤,得到了带有重组质粒 pET-LOX 的阳性克隆(图 2).经过测序反应,将序列正确的重组质粒(pET-LOX)转化到表达宿主菌 BL21(DE3)中进行表达.



M:DL2000 Marker(从上至下依次为:2 000,1 000,750, 500,250,100 bp);1: PCR 扩增产物

图 1 脂氧合酶全长 cDNA 的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of full length cDNA



M:DL2000 Marker (从上至下依次为:2 000,1 000,750, 500,250,100 bp); 1,2,3:PCR 扩增产物

图 2 带有重组质粒的阳性克隆的 PCR 扩增

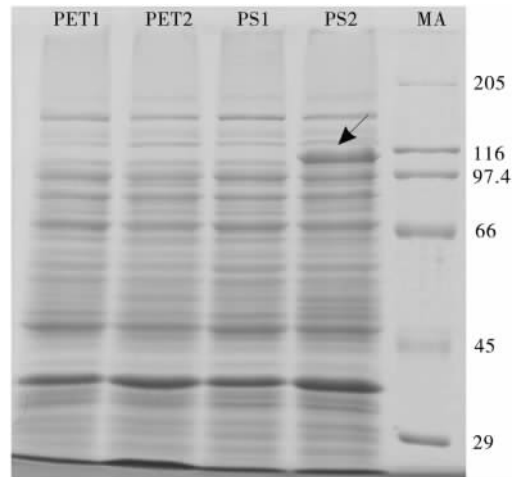
Fig.2 PCR amplification of positive clones with recombinant plasmid

2.2 重组质粒 pET-LOX 的原核表达

利用低温(15 ℃)表达法,成功地表达出了该重组融合蛋白.如图 3 所示,以空载体作为对照,在诱导前和诱导后都没有出现特异条带.而在转入了重组载体的菌体中,和诱导前相比,在 116.0 ku 左右

出现了明显的条带.

在聚丙烯酰胺凝胶中,由于引入凝胶的分子筛效应,电泳迁移率与蛋白质分子量的对数有下列关系: $\text{Log } Mr = K_1 - K_2 \mu_R$,式中 Mr 为相对分子量, K_1, K_2 都是常数, μ_R 是相对迁移率, $\mu_R = \text{样品迁移距离} / \text{前沿(染料)迁移距离}$.以 Marker 中几种相对分子量标准蛋白质的分子量对数值对其 μ_R 作图,得到标准曲线.表达出的融合蛋白在 SDS-PAGE 中测得的样品迁移率 μ_R 为 0.3,从标准曲线可以计算出 $y(\text{Log}Mr) = 2.044$,即该融合蛋白 $Mr = 110.7$ ku.根据蛋白质序列推算的目的蛋白约 98.0 ku,加上融合头约 13.2 ku(120 氨基酸残基 \times 110),所以融合表达出的蛋白质大小(110.7 ku)与预计值(98.0 + 13.2 = 111.2)相符合.



PET1:空载体诱导前;PET2:空载体诱导后;PS1:重组体诱导前;PS2:重组体诱导后;MA:SDS Marker

图 3 SDS-PAGE 分析重组蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig.3 Expression analysis of recombinant protein in *E. coli* by SDS-PAGE

2.3 目的蛋白的酶活性检测

以亚油酸为底物进行酶促反应,从 LC-ESI-MS 检测图谱上可以看到,产物的准分子离子峰为 m/z 353,保留时间为 9~10 min(图 4),可推断该化合物为 9,10,11-三羟基-12-十八碳烯酸^[9],是 9-LOX 作用于亚油酸的产物.可见表达出的蛋白质具有 9-LOX 活性.

3 讨论

近年来,国际上关于植物脂氧合酶的研究已有

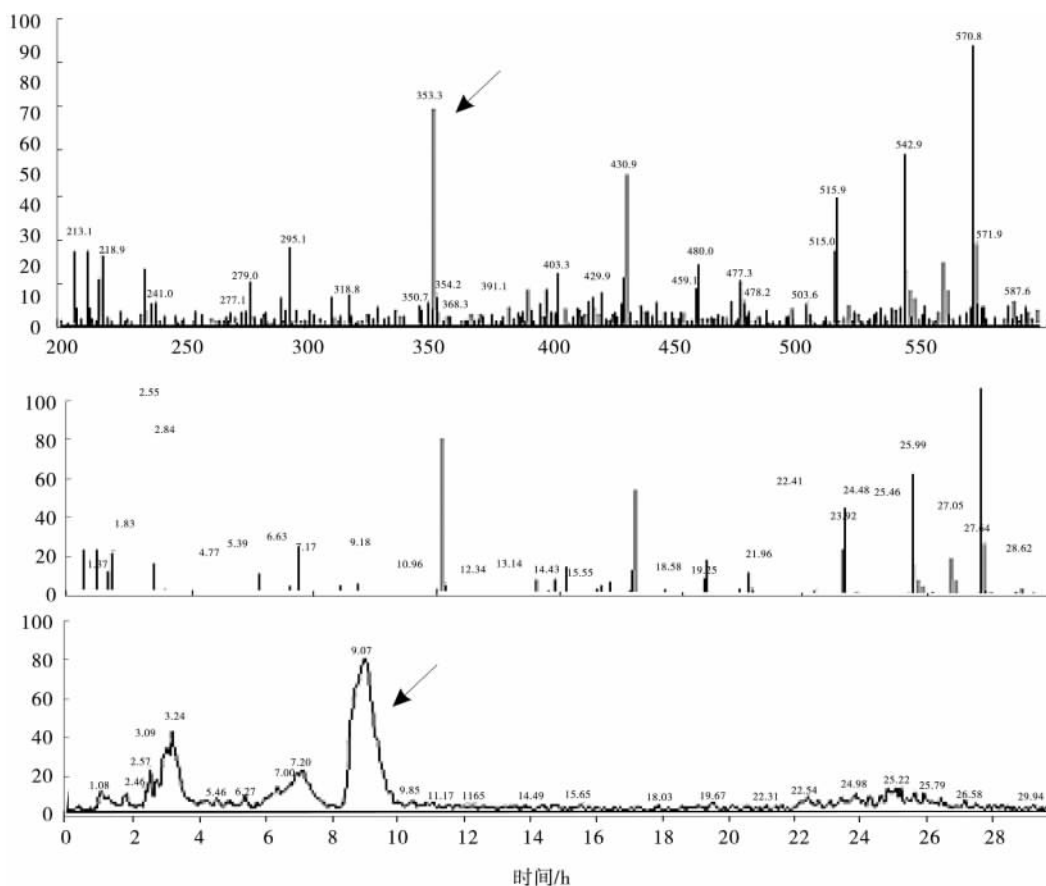


图 4 酶促反应产物 LC-ESI-MS 检测

Fig. 4 Enzyme products detected by LC-ESI-MS

很多. 许多植物的 LOX 基因序列已经知道, 这为研究它们之间的系统进化关系, 阐明基因序列、结构以及位置特异性和活性之间的关系提供了可能. 在过去的几十年中, 有关 LOX 途径的生化研究也取得了很大进展^[1]. 13-LOX 途径的次生代谢产物通过信号分子作用或直接起化学防御的作用, 如在受伤反应中茉莉酮酸酯和 OPDA 作为信号分子起作用^[13]; 有的产物对次生代谢起调节作用^[7], 此途径的研究报道很多, 尤其是 JA 途径, 已经研究的比较清楚, 而有关 9-LOX 途径的研究报道较少.

本文对所分离到的脂氧合酶基因进行了原核表达, 由于脂氧合酶基因比较大 (2 589 bp), 在表达过程中很容易出现包涵体, 如刘瑞娟等^[14] 在 37 °C 条件下对拟南芥动蛋白 *AtOvKLP* 基因进行表达就生成了大量包涵体, 所以我们采用低温表达法避免了包涵体的产生. 同时对酶活性进行了鉴定, 检测到了反应产物——9, 10, 11-三羟基-12-十八碳烯酸的存在, 根据结构可知它为 9-LOX 作用于亚油酸的产

物. 可见在乳突果中, 几丁质诱导的十八碳酸代谢途径可能沿着 9-LOX 方向进行. 本试验结果为探索“诱导—9-LOX 途径—化学防御”之间的关系奠定了基础. 为了进一步确证产物以及确定加氧的位置特异性, 还需要对表达的蛋白进行纯化, 在产物的鉴定中辅以标准品作为参照.

参考文献

- [1] Grechkin A. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway[J]. *Prog Lipid Res*, 1998, 37(5):317-352
- [2] Brash A R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274:23679-23682
- [3] 李靖, 马长乐. 植物脂氧合酶研究进展[J]. *生物学杂志*, 2007, 24(6):5-8
- [4] Bhardwaj P K, Kaur J, Sobti R C, et al. Lipoxygenase in *Caragana jubata* responds to low temperature, abscisic acid, methyl jasmonate and salicylic acid[J]. *Gene*,

- 2011,483:49-53
- [5] Terp N, Göbel C, Brandt A, et al. Lipoxygenases during *Brassica napus* seed germination[J]. *Phytochemistry*, 2006,67(18):2030-2040
- [6] Kolomets M V, Chen H, Gladon R J, et al. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection[J]. *Plant Physiol*, 2000,124:1121-1130
- [7] 李靖, 赵沛基, 鲁春华, 等. 水杨酸诱导美登木悬浮细胞产生脂氧合酶及多羟基脂肪酸的研究[J]. *云南植物研究*, 2004,26(5):543-548
- [8] Lee A, Cho K, Jang S, et al. Inverse correlation between jasmonic acid and salicylic acid during early wound response in rice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,318(3):734-738
- [9] 赵沛基, 甘烦远, 沈月毛. 中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编[C]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 441-442
- [10] 马长乐, 李靖, 赵沛基. 乳突果苗的组织培养及脂氧合酶的诱导[J]. *广西植物*, 2009,29(3):386-389
- [11] Santino A, Iannacone R, Hughes R, et al. Cloning and characterisation of an almond 9-lipoxygenase expressed early during seed development[J]. *Plant Sci*, 2005,168(3):699-706
- [12] Göbel C, Feussner I, Hamberg M. Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002,1584:55-64
- [13] Creelman R A, Mullet J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997,48:355-381
- [14] 刘瑞娟, 王海庆, 沈裕虎. 拟南芥动蛋白 AtOvKLP 的序列分析及原核表达[J]. *甘肃农业大学学报*, 2010,45(3):151-155
- (责任编辑 胡文忠)

~~~~~

(上接第 155 页)

- [9] Ge W G, Ren J L. New existence theorems of positive solutions for Sturm Liouville BVPs [J]. *Appl Math Comput*, 2004,148:631-644
- [10] W G Ge, Xue C Y. Some fixed point theorems and existence of positive solutions of Two-point boundary-value problems [J]. *Nonlinear Analysis*, 2009, 70: 16-31
- [11] Yao Q L. Monotone iterative technique and positive solutions of Lidstone boundary value problems [J]. *Appl Math Computation*, 2002,131:477-485
- [12] Yao Q L. Existence and iteration of n symmetric positive solutions for a singular two-point boundary value problem [J]. *Comp Math Appl*, 2004,47:1195-1200
- [13] 张玲忠. 抽象二阶周期边值问题的拟上下解方法 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2003,38(3):304-307
- (责任编辑 许涛)