

青蒿法呢醇合酶原核表达、纯化与功能鉴定*

李振秋** 金亚明 王 波

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘要 将经 RACE 方法克隆到的青蒿倍半萜合酶 cDNA (AF304444) 开放阅读框插入到原核表达载体 pET30a(+) 的 *Nco* I 和 *Bam* H I 酶切位点之间, 构建 N 端和 C 端均携带有 HIS₆ 表达标签的重组表达载体 pET30SESQ。将 pET30SESQ 转入大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactoside) 诱导蛋白表达, 表达产物经镍琼脂糖柱纯化。纯化蛋白加入酶促反应体系 (FPP), GC-MS 分析酶促反应体系的正己烷萃取物, 结果显示此重组酶可以催化 FPP 向法呢醇的转化。

关键词 法呢醇合酶 大肠杆菌表达 功能鉴定 青蒿

中图分类号 Q786

萜类化合物, 亦被称为萜组 (terpenome)^[1], 是自然界中结构相似但是数目众多的天然化合物组之一。迄今为止已发现了 55000 余种萜类化合物, 由于每年还会有大量的新结构化合物的报道, 因此这个数目还会不断增长^[2]。萜类环化酶的多样性及其催化特异性造成的催化产物的多样性是萜类化合物的多样性的首要原因^[3]。因此, 萜类环化酶催化机理特别是催化特异性的揭示成为解决萜类化合物多样性的首要课题。

青蒿 (*Artemisia annua* L.) 的地上部分, 作为传统的中药, 几个世纪以来, 一直被用于治疗多种发热的疾病。20 世纪 70 年代发现青蒿中的一种倍半萜衍生物—青蒿素, 具有高效的抗疟活性。随后, 青蒿的植物化学方面的研究多有报道^[4,6]。从叶片中分离鉴定出倍半萜化合物有 α -Copaene, β -caryophyllene, trans- β -farnesene, muurola-4,11-diene, selina-4,11-diene, germacrene D, β -selinene, bicyclogermacrene, germ-acrene A, γ -cadinene, α -humulene, amorph-4,11-diene^[5], 这说明在青蒿中存在着一大类倍半萜合酶催化产生如此众多的倍半萜类化合物。

据不完全统计, 从青蒿中分离的确定功能的倍半萜合酶已有 5 个, 是单个植物中种类报道较多的。其包括紫穗槐二烯合酶^[5, 7-8], epi-cedrol 合酶^[9-10], beta-

caryophyllene 合酶^[11], (E)- β -farnesene 合酶^[12] 和 germacrene A 合酶^[13] (图 1)。另外, 也有一些倍半萜合酶基因虽被克隆, 但是其具体功能并未鉴定, 这其中包括倍半萜合酶 (GenBank Accession No. AF304444)。前期工作显示, 单独原核表达此蛋白, 为包涵体形式表达, 因此其功能未能确定。本实验目的就是利用融合基因技术, 将此基因进行融合表达, 促进其可溶性, 并通过 HIS 标签技术纯化后测定其功能, 获得更多的倍半萜合酶序列和功能的对应关系数据, 为进一步通过点突

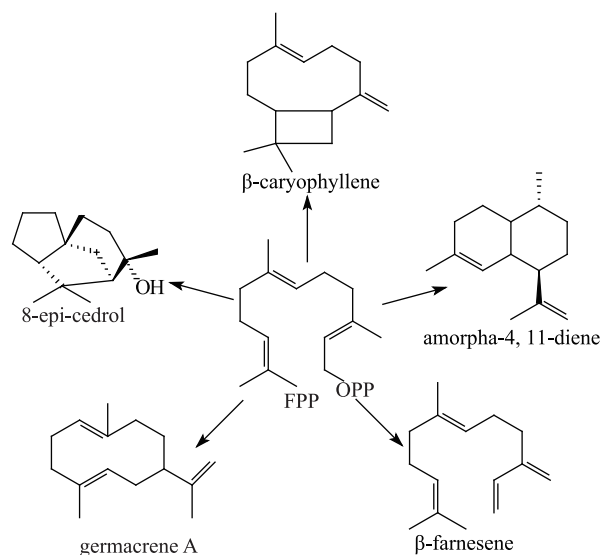


图 1 青蒿中分离的 5 个倍半萜环化酶催化的反应

Fig. 1 Reactions catalyzed by the five sesquiterpene synthases cloned from *Artemisia annua*

收稿日期: 2011-03-16 修回日期: 2011-04-15

* 国家自然科学基金青年基金资助项目 (30900111)

** 电子信箱: cell@hbu.edu.cn

变等技术研究萜类环化酶催化产物特异性提供材料。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体和试剂

大肠杆菌 DH5 α , BL21 (DE3) 为本实验室保存。pGEM-T 载体购自 Promega 公司, 携带有青蒿法呢醇合酶全长 cDNA 的载体 pGEMFSA, 原核表达载体 pET30a (+) 为本实验室保存。DNA 测序由北京华大中生生物科技发展有限公司完成, 寡核苷酸引物由上海生工生物工程公司合成。pfu DNA 聚合酶购自上海生工生物工程公司。限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司。法呢基焦磷酸(FPP)购自 Sigma 公司。

1.2 青蒿法呢醇合酶原核表达载体的构建

以携带有青蒿法呢醇合酶全长 cDNA 的载体 pGEMFSA 质粒为模板, 用正义引物 5'-GCCATGGCCACTTTTCTAGTTTGTAAATGCC-3', 反义引物 5'-TGCTCGAGAACTAAAGGATGAACAAGGAGC-3' (下划线处分别为 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点) 进行 PCR 扩增。DNA 聚合酶采用高保真 pfu DNA 聚合酶。PCR 参数为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 1 循环; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 25 循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增产物经 PCR 产物胶回收试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限公司)回收, 加 A 尾后连入 pGEM-T。重组质粒测序。经测序无突变的重组质粒用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切, 定向连入经相同双酶切的载体 pET30a (+) (图 2), PCR 和酶切鉴定重组原核表达载体, 经测序无突变的重组质粒 pET30SESQ 转化大肠杆菌 BL 21 (DE3)。

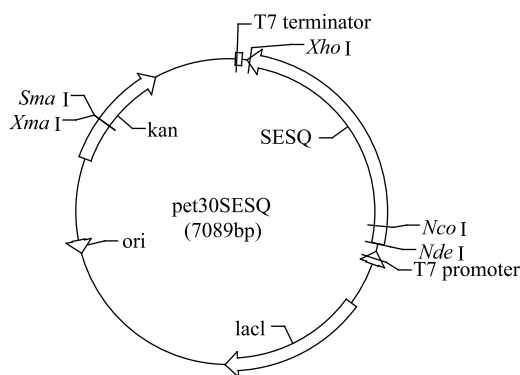


图 2 青蒿法呢醇合酶原核表达载体的构建

Fig. 2 Construction of *Artemisia annua* farnesol synthase *E. coli* expression vector

1.3 重组青蒿法呢醇合酶的诱导表达与纯化

含有重组表达质粒 pET30SESQ 和 pET30a (+) 的大

肠杆菌 BL21 (DE3) 单克隆分别接入 5 ml 含有 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日稀释 100 倍继续培养至 OD_{600} 为 0.6 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactoside), 28 $^{\circ}$ C 诱导表达 4、8、12 h。离心收获细菌培养物, 磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L PBS, pH 7.2) 重悬, 超声波冰上破碎。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清过 Ni^{2+} -琼脂糖柱(北京卓冠科技有限公司), 取适量洗脱液 SDS-PAGE 检测。Brandford 法测定蛋白含量。

1.4 重组法呢醇合酶的功能鉴定

取经 Ni^{2+} -琼脂糖柱纯化的重组法呢醇合酶蛋白 10 μ g, 加入 500 μ l 反应体系 (50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.2, 含 50 μ mol/L FPP, 25 mmol/L $MgCl_2$, 25 mmol/L 巯基乙醇), 上覆 200 μ l 正己烷, 37 $^{\circ}$ C 反应 5 h, 充分涡悬振荡后 10000 r/min 离心, 取上层正己烷抽提物 GC-MS 检测反应产物。GC-MS 分析条件为: GC-MS 分析条件为: 100 $^{\circ}$ C 5 min, 10 $^{\circ}$ C/min 升至 210 $^{\circ}$ C, 保持 10 min, 进样口温度 250 $^{\circ}$ C, 离子源温度 250 $^{\circ}$ C, GC-MS 仪器为岛津 GCMS-QP2010, 色谱柱为 DB-5ms (30 m \times 0.25 mm)。

2 结果与分析

2.1 青蒿法呢醇合酶原核表达载体的构建

利用 PCR 引入酶切位点的方法, 将经 RACE 方法克隆到的青蒿倍半萜合酶 cDNA (AF304444) 开放阅读框插入到原核表达载体 pET30a (+) 的 *Nco*I 和 *Xho*I 酶切位点之间, 获得了 N 端和 C 端均携带有 HIS₆ 表达标签的重组表达载体 pETSESQ, PCR 和酶切鉴定结果见图 3。

2.2 重组青蒿法呢醇合酶的诱导表达与纯化

携带有重组质粒 pET30SESQ 和 pET30a (+) 的大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4、8、16h

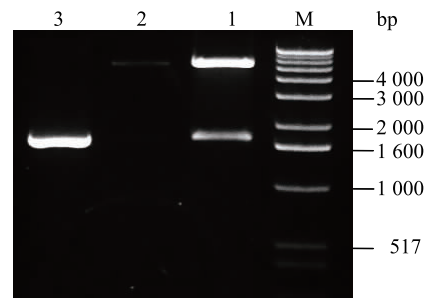


图 3 重组载体 pET30SESQ 的酶切和 PCR 鉴定
Fig. 3 Identification of recombinant vector by restriction endonuclease and PCR

M: DNA maker; 1: pET30SESQ *Nco* I, *Xho* I double digestion; 2: pET30a(+) *Nco* I, *Xho* I double digestion; 3: PCR product

后,菌体经超声波破碎,分别取少量破碎液和经离心后的蛋白上清 SDS-PAGE 电泳检测,结果显示 0.5 mmol/L IPTG 28℃ 诱导 8h 重组法呢醇合酶可溶性蛋白表达量已经达到较高水平,诱导 12h 则没有明显的增加。因此以诱导 8 h 扩大培养体积,获得的蛋白上清过 Ni^{2+} -琼脂糖柱纯化。分别取不同浓度咪唑洗脱液 SDS-PAGE 电泳检测,结果显示 300 mmol/L 咪唑洗脱液中包含有大小约为 70kDa 的蛋白,与预测的重组青蒿法呢醇合酶的大小 (72.8 kDa) 符合(图 4)。

2.3 重组青蒿法呢醇合酶的功能鉴定

取纯化的重组法呢醇合酶,加入到体外催化反应体系中,催化产物经正己烷萃取后,GC-MS 分析产物的成分。结果显示催化产物为多产物,其中主产物的质谱图和法呢醇标样质谱图相似度达到 95%,由此认定催化产物即为法呢醇(图 5)。此结果表明,全长 cDNA

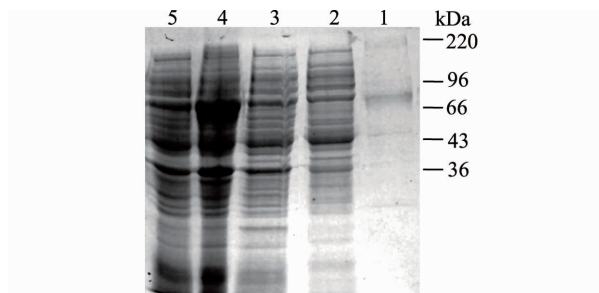


图 4 大肠杆菌表达青蒿法呢醇合酶 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS/PAGE of *Artemisia annua* farnesol synthase produced in *E. coli* strain BL21 (DE3)

1: Purified recombinant farnesol synthase; 2: Soluble fractions expressed by *E. coli* harboring pET30a(+) induced by IPTG; 3: Soluble fractions expressed by *E. coli* harboring pET30SESQ induced by IPTG; 4: Total protein expressed by *E. coli* strain BL21 (DE3) harboring pET30SESQ induced by IPTG; 5: Total protein expressed by *E. coli* strain BL21 (DE3) harboring pET30(+) induced by IPTG

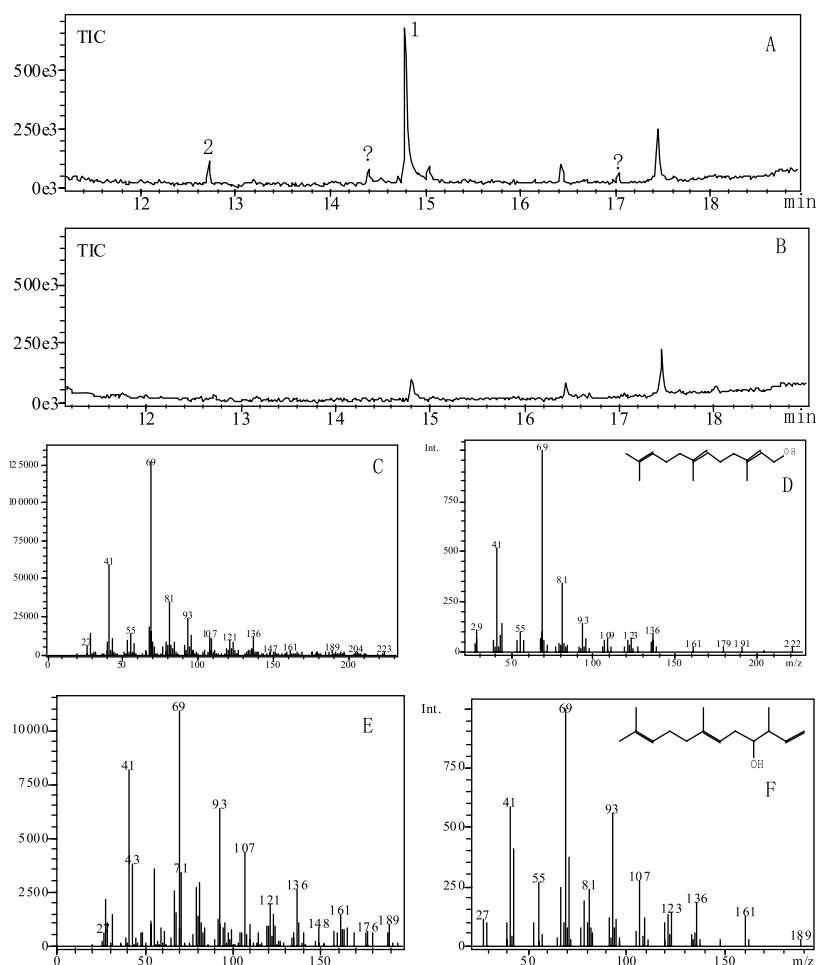


图 5 重组青蒿法呢醇合酶催化产物 GC-MS 分析

Fig. 5 GC-MS analysis of reaction product of recombinant *A. annua* farnesol synthase

A: Total ion chromatograms of the reaction products; B: Negative control; C: Mass chromatograms of peak 1; D: Mass chromatograms of authentic farnesol; E: Mass chromatograms of peak 2; F: Mass chromatograms of authentic nerolidol

(GenBank accession number AF304444) 编码的蛋白具有法呢醇合酶的功能。另外,在此酶的催化产物中,还有少量的橙花叔醇(nerolidol)。

3 讨 论

萜类化合物作为植物中数量最多的次生代谢物种,包括了多达55000种不同的化合物。萜类化合物如此众多的原因有:在生物合成中可以改变碳环中碳的数目,位置和立体构型,氧化的位置和程度,以及辅助结构的有无等^[14]。

在植物中,所有的萜类物质都是有萜类合酶催化形成的。植物萜类合酶可以分别催化 GPP(C_{10})、FPP(C_{15}) 和 GGPP(C_{20}) 为单萜、倍半萜和双萜,再经其它的化学修饰最终形成千万种不同的萜类物质。虽然这些不同的酶可以催化形成不同的产物,但是所有的萜类合酶的物理和化学特性都非常相似,其催化机制也是相同的。但是由于缺乏结构和功能之间的相关性的知识,现在我们很难根据酶的蛋白质序列和结构来推测其功能^[14]。因此找到更多的萜类合酶,特别是催化产物结构类似的,然后综合分析这些相关酶功能和氨基酸序列之间的关系,成为解决萜类合酶催化机制的首要工作。

倍半萜合酶的产物有两种,一种为倍半萜烯,另一种为氧化的倍半萜烯(倍半萜醇),从已知功能的倍半萜合酶来看,产物为烯烃的占了绝大多数。只有少数的为倍半萜醇。Mercke 等^[9]报道了来自青蒿的 *epi*-cedrol 合酶,其催化主产物为 *epi*-cedrol,但是也有极微量的 Farnesol。Schnee 等^[15]也报道了一个来自玉米的倍半萜合酶,其催化产物为 (E)- β -Farnesene(26%), (E)-Nerolidol(29%), 和 (E,E)-Farnesol(45%)。而催化主产物为 Farnesol 的尚未见报道。

本文报道的 Farnesol 合酶,其产物除微量的 Nerolidol 外,主要产物为 Farnesol, Schnee 等^[15]对由 FPP 经酶催化产生 Farnesene、Farnesol 和 Nerolidol 的机制进行了预测,FPP 首先脱去焦磷酸基形成电荷非定域碳正离子,随后如果发生去质子化,就会形成 Farnesene,如果捕获水分子就会形成 Farnesol 或 Nerolidol。2005 年 Picaud 等^[12]从青蒿中分离到了 β -Farnesene 合酶。因此,详细比对从青蒿中分离的 β -Farnesene 合酶和 Farnesol 合酶的氨基酸序列,进一步利用点突变或结构域置换技术,研究其氨基酸序列和产物之间的关系,将为解决萜类合酶的催化机制提供

新的资料和证据。

参考文献

- [1] Christianson D W. Unearthing the roots of the terpene. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(2):141-150.
- [2] Thulasiram H V, Erickson H K, Poulter C D. Chimeras of two isoprenoid synthases catalyze all four coupling reactions in isoprenoid biosynthesis. *Science*, 2007, 316(5821):73-76.
- [3] Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R. Plant terpene synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(8):4126-4133.
- [4] Ma C, Wang H, Lu X, et al. Analysis of *Artemisia annua* L. volatile oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2007, 1150(1):50-53.
- [5] Bouwmeester H J, Wallaart T E, Janssen M H, et al. Amorpho-4, 11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 1999, 52(5):843-854.
- [6] Brown G D, Liang G Y, Sy L K. Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 2003, 64(1):303-323.
- [7] Chang Y J, Song S H, Park S H, et al. Amorpho-4, 11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 383(2):178-184.
- [8] Mercke P, Bengtsson M, Bouwmeester H J, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of amorpho-4, 11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 381(2):173-180.
- [9] Mercke P, Crock J, Croteau R, et al. Cloning, expression, and characterization of *epi*-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 369(2):213-222.
- [10] Hua L, Matsuda S P. The molecular cloning of 8-*epi*-cedrol synthase from *Artemisia annua*. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 369(2):208-212.
- [11] Cai Y, Jia J W, Crock J, et al. A cDNA clone for beta-caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 2002, 61(5):523-529.
- [12] Picaud S, Brodelius M, Brodelius P E. Expression, purification and characterization of recombinant (E)-beta-farnesene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 2005, 66(9):961-967.
- [13] Berteau C M, Voster A, Verstappen F W, et al. Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from a glandular trichome cDNA library. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 448(1-2):3-12.

- [14] Trapp S C, Croteau R B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 2001, 158(2):811-832.
- [15] Schnee C, Kollner T G, Gershenzon J, et al. The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage. *Plant Physiol*, 2002, 130(4):2049-2060.

***Escherichia coli* Expression, Purification and Functional Identification of Farnesol Synthase from *Artemisia annua* L.**

LI Zhen-qiu JIN Ya-ming WANG Bo

(College of life Sciences, HeBei University, Baoding 071002, China)

Abstract The open reading frame of sesquiterpene cyclase cDNA (AF304444) from *Artemisia annua* was subcloned into a bacterial expression vector pET30a(+) in frame with N-terminal and C-terminal HIS₆-tag, then recombinant vector pET30SESQ was introduced into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). Recombinant sesquiterpene cyclase was induced at 28°C by adding 0.5 mmol/L IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactoside) and purified using immobilized metal affinity chromatography on Ni²⁺ columns. GC-MS analysis showed that the recombinant sesquiterpene cyclase can catalyze the formation of farnesol from FPP.

Key words Farnesol synthase *Escherichia coli* expression Functional identification *Artemisia annua* L.