

忽地笑 γ -生育酚甲基转移酶基因 *LaTMT* 的克隆与表达分析

蔡黎丽^{1,2}, 徐晟¹, 马蕊¹, 汪仁^{1,2}, 夏冰^{1,2,①}

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014; 2. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014]

摘要: 采用 RACE 技术从忽地笑 [*Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb.] 叶片中克隆获得 γ -生育酚甲基转移酶 (γ -TMT) 基因, 命名为 *LaTMT*。序列分析结果显示: 该基因 cDNA 全长 1 458 bp, 其中开放阅读框 (ORF) 长 1 017 bp, 编码 338 个氨基酸残基。*LaTMT* 基因编码蛋白质的理论相对分子质量 37 560, 理论等电点 pI 8.70, 为亲水性蛋白, 无跨膜结构但具有信号肽结构; 并具有 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 甲基转移酶保守结构域, 包含 3 个 SAM 结合位点; 该蛋白的二级结构中包含 44.08% 的 α -螺旋、32.84% 的无规则卷曲、12.72% 的延伸链和 10.36% 的 β -转角。序列比对和系统进化树分析结果显示: *LaTMT* 蛋白属于 S-腺苷甲硫氨酸-依赖性 γ -生育酚甲基转移酶家族, 与其他植物 γ -TMT 蛋白的一致性为 64% ~ 75%; 在 NJ 系统树上, *LaTMT* 蛋白与单子叶植物 γ -TMT 蛋白聚为同一大类, 并与油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.) EgTMT 和美洲油棕 [*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés] EoTMT 聚为同一类, 亲缘关系最近。基因表达分析结果显示: *LaTMT* 基因可在大肠杆菌中成功表达, 且表达量随异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导时间的延长而增加; 在忽地笑的根、叶片、花苞、子房、雄蕊、花瓣和鳞茎中 *LaTMT* 基因均可表达, 其中在叶片中的相对表达量最高, 在子房、雄蕊和鳞茎中的相对表达量相对较低, 具有明显的组织特异性。研究结果表明: 忽地笑 *LaTMT* 基因在进化过程中具有很高的保守性; 该基因主要定位于叶绿体中, 并与忽地笑对非生物逆境胁迫的抗性相关。

关键词: 忽地笑; γ -生育酚甲基转移酶基因; 基因克隆; 序列分析; 表达分析

中图分类号: Q785; Q943.2; Q949.71+8.25 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2016)01-0001-08
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.01.01

Cloning and expression analysis on γ -tocopherol methyltransferase gene *LaTMT* from *Lycoris aurea* CAI Lili^{1,2}, XU Sheng¹, MA Rui¹, WANG Ren^{1,2}, XIA Bing^{1,2,①} (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25(1): 1-8

Abstract: Using RACE method, γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT) gene was cloned from leaf of *Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb., which was named *LaTMT*. The result of sequence analysis shows that full-length cDNA of *LaTMT* gene is 1 458 bp, in which, length of open reading frame (ORF) is 1 017 bp, and 338 amino acid residues are encoded. Theoretical relative molecular mass of the protein encoded by *LaTMT* gene is 37 560, theoretical isoelectric point is pI 8.70, which is a hydrophilic protein without transmembrane structure but with signal peptide structure. And this protein has S-adenosylmethionine (SAM) methyltransferase conserved domain and includes three SAM binding sites. Its tertiary structure includes 44.08% of α -helix, 32.84% of random coil, 12.72% of extended strand and 10.36% of β -turn. The analysis results of sequence alignment and phylogenetic tree show that *LaTMT* protein belongs to S-adenosylmethionine-dependent γ -tocopherol methyltransferase family, and its identity with γ -TMT protein from other plants is 64% - 75%. In NJ phylogenetic tree, *LaTMT* protein and γ -TMT protein from

收稿日期: 2015-10-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31301798; 31270339); 江苏省科技计划产学研联合创新资金——前瞻性联合研究项目(BY2014131); 江苏省植物迁地保护重点实验室开放基金项目(QD201302); 江苏省科技计划项目苏北科技发展计划——科技富民强县项目(SBN201310073)

作者简介: 蔡黎丽(1991—), 女, 江苏常州人, 硕士研究生, 主要从事药用植物学方向的研究。

①通信作者 E-mail: xiabingnb@sina.com

monocotyledon are clustered into the same large category, and this protein with EgTMT of *Elaeis guineensis* Jacq. and EoTMT of *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés is clustered into the same category, their relationship is close. The analysis result of genetic expression shows that *LaTMT* gene can express successfully in *Escherichia coli*, and its expression increases with prolonging of inducing time of isopropyl thiogalactoside (IPTG). Also, *LaTMT* gene can express in root, leaf, bud, ovary, stamen, petal and bulb of *L. aurea*, in which, relative expression is the highest in leaf, and that is relative low in ovary, stamen and bulb, with obvious tissue specificity. It is suggested that *LaTMT* gene from *L. aurea* has high conservation in evolutionary process, the gene is mainly located in chloroplast and is related to resistance of abiotic adversity stress.

Key words: *Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb.; γ -tocopherol methyltransferase gene; gene cloning; sequence analysis; expression analysis

维生素 E (V_E) 是维持人类和动物生长、繁殖所必需的重要物质, 在生物体中具有重要的代谢功能和抗氧化作用^[1-3]。植物中的 V_E 通常在光合器官中合成和积累, 植物中合成的 V_E 包括生育酚 (tocopherol) 和生育三烯酚 (tocotrienol), 根据其芳香环上甲基的位置和数目的不同, 还可分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4 种^[4], 其中 α -生育酚的活性最高。

V_E 在合成过程中首先生成 γ 和 δ 型, 然后在 γ -生育酚甲基转移酶 (γ -TMT) 的催化作用下分别生成 α 和 β 型^[5-6], 并且 α 和 β 型 V_E 活性较高, 因此, γ -TMT 是决定植物中 V_E 成分和活性的关键酶。目前, 研究者已对多种植物的 γ -TMT 基因进行了克隆和表达分析, 例如, 过量表达拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 的 γ -TMT 基因, 可使其叶片中 α -生育酚的比例从 87.5% 提高到 97.1%^[7]; 过量表达芥菜 [*Brassica juncea* (Linn.) Czern.] 的 γ -TMT 基因, 可使其叶片中 α -生育酚的含量提高 6 倍^[8]。因此, 克隆不同物种的 γ -TMT 基因并进行深入研究对改良植物 V_E 的品质和性状具有重要意义。

忽地笑 [*Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb.] 是石蒜科 (Amaryllidaceae) 石蒜属 (*Lycoris* Herb.) 多年生草本植物, 具有重要的观赏和药用价值。目前, 已从忽地笑鳞茎中提取获得包括加兰他敏 (galanthamine) 在内的多种石蒜科生物碱, 临床上用于治疗阿尔茨海默氏病和小儿麻痹症等疾病^[9]。作者所在课题组根据忽地笑的转录组测序结果, 从中筛选了部分可能参与忽地笑体内加兰他敏生物合成的相关基因片段^[10]。

在上述研究的基础上, 本课题组获得了 N 甲基转移酶 (NMT) 候选基因片段, 且利用 RACE 技术克隆得到 1 个忽地笑 γ -生育酚甲基转移酶基因, 并对其相关的生物信息学分析和原核表达等研究, 以期对石蒜属植物功能基因的合理开发奠定研究基础, 并为

药用植物资源的深度利用提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试多年生忽地笑叶片采自江苏省中国科学院植物研究所试验场。

原核表达载体 pET28a、大肠杆菌菌株 TOP10 和 BL21 为本实验室保存; SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; T₄ DNA 连接酶、pMD19-T 载体、反转录酶 M-MLV (RNase H⁻)、LA-Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶及实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ II 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 植物 RNA 提取试剂 Trizol、10×PCR buffer、MgCl₂、Taq DNA 聚合酶、dNTPs mixture 和 DL2000 DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA 纯化回收试剂盒购于上海浦迪生物科技有限公司。引物由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成; 由南京伯津生物技术有限公司进行测序。

1.2 方法

1.2.1 叶片总 RNA 的提取 参照植物 RNA 提取试剂说明书, 称取盛叶期的忽地笑单株嫩叶约 0.2 g, 于液氮中充分研磨, 加入 1 mL Trizol 振荡混匀后放置 5 min; 加入 0.2 mL 三氯甲烷, 振荡 15 s, 并静置 2~3 min, 12 000 g 离心 15 min; 取上层水相, 加入 2 倍体积无水乙醇, 于 -20 °C 静置 30 min, 12 000 g 离心 10 min; 沉淀用 1 mL 体积分数 75% 乙醇洗涤 2 遍, 然后用 RNase-free 水溶解, 最后用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度及完整性。

1.2.2 全长 cDNA 的克隆和测序 根据忽地笑转录组数据库, 选择注释为 γ -TMT 的基因片段, 设计 5'-

端序列和 3'-端序列的扩增引物(表 1)。RACE 扩增程序为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 40 s,52 °C 退火 25 s,72 °C 延伸 50 s,共 38 个循环。产物经质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用回收试剂盒回收片段;连接 pMD19-T 载体,并转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞;经 PCR 验证后,挑取阳性克隆子进行测序。

用 Vector NTI 软件对测序结果进行分析,并根据扩增片段的重叠部分对已知基因片段序列、5'-端扩增片段序列和 3'-端扩增片段序列进行拼接,得到该

基因的全长 cDNA 序列;随后用在线软件 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 找出开放阅读框(ORF),根据 pET28a 载体图设计带有酶切位点 *Bam*H I 和 *Hind* III 的引物 LaTMT-pETR 和 LaTMT-pETF(表 1);接着用 LA-*Taq* DNA 聚合酶进行 PCR,扩增其编码区序列,具体 PCR 扩增程序参照文献[11]。回收 PCR 扩增目标产物并连接 pMD19-T 载体,构建重组质粒 pMD-LaTMT,随后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞;经 PCR 验证后,挑取阳性克隆子进行测序,保留测序正确的菌液。

表 1 忽地笑 *LaTMT* 基因克隆及表达分析采用的引物序列

Table 1 Primer sequences used for gene cloning and expression analysis of *LaTMT* gene from *Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb.

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	用途 Application
LaTMT 3'-RACE-R1	AGATGCATTAGACCAA	3'-RACE
LaTMT 3'-RACE-R2	GGGAAAGTTTGTAGCG	3'-RACE
LaTMT 5'-RACE-F1	TGAATGCTGATCGGAT	5'-RACE
LaTMT 5'-RACE-F2	TCATCGGGTCGTAGTGT	5'-RACE
LaTMT-ORFF	ATGCGCACACTCCTCCACACGTG	扩增开放阅读框(ORF) Amplification of open reading frame (ORF)
LaTMT-ORFR	CTCTGGTTTACGGCATGTA	扩增开放阅读框(ORF) Amplification of open reading frame (ORF)
LaTMT-pETR	ATCGGGATCCCGTCCAGTCGAACCG	原核表达分析 Prokaryotic expression analysis
LaTMT-pETF	ATCGAAGCTTCTCTGGTTTACGGCAT	原核表达分析 Prokaryotic expression analysis
LaActinF	ATCCAGGCCGTCCTTTC	扩增内参基因 Amplification of reference gene
LaActinR	TGGAAGAGAACCTCTGGCA	扩增内参基因 Amplification of reference gene
LaTMT-RTR	GGGGTTAGGAGACAAAGTAT	检测 <i>LaTMT</i> 基因相对表达水平 Detection of relative expression of <i>LaTMT</i> gene
LaTMT-RTF	TTTCATCGGGTCGTAGTG	检测 <i>LaTMT</i> 基因相对表达水平 Detection of relative expression of <i>LaTMT</i> gene

1.2.3 序列分析 用 BLASTp 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行氨基酸序列比对分析;利用 DNAMAN 对 LaTMT 蛋白及与其同源的其他植物的 γ -TMT 氨基酸序列进行多重比对,采用 MEGA5.0 软件中 neighbor-joining (NJ) 法进行系统进化树构建;利用 ExPASy 软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 计算蛋白质理论等电点、理论相对分子量、亲水性和疏水性等;用在线软件 ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 查找序列 N 端信号肽;利用在线软件 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 对 LaTMT 蛋白的二级结构进行预测;利用 SWISS-MODEL 软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对 LaTMT 蛋白的三级结构进行预测;通过 PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) 数据库对 LaTMT 蛋白的功能结构进行预测。

1.2.4 基因的原核表达及 SDS-PAGE 电泳检测 对重组质粒 pMD-LaTMT 和空载体 pET28a 分别进行

*Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,用琼脂糖凝胶电泳检测并回收酶切产物;回收片段经 T_4 DNA 连接酶连接以获得重组质粒 pET28a-LaTMT,然后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞;经 PCR 验证后,挑取阳性克隆子进行测序;将测序验证正确的重组质粒 pET28a-LaTMT 和空载体 pET28a 转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,挑取阳性克隆子进行诱导表达。

将转入空载体 pET28a 和重组质粒 pET28a-LaTMT 的 BL21 菌株分别接种于 4 mL LB 液体培养基中培养,随后将菌液转接到 50 mL LB 液体培养基中,直至其 OD_{600} 达到 0.2,随后加入终浓度 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导表达;选取 IPTG 诱导 0、3、6、9 和 19 h 的菌液 1 mL,12 000 g 离心 5 min,弃上清液并加入 200 μL 无菌水重悬菌体,同时加入 50 μL 5 \times SDS 上样缓冲液,置于沸水浴中加热 10 min,室温下离心 20 min;取 30 μL 上清液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析,并记录分析结果。

1.2.5 组织表达特性分析 在忽地笑花期称取根、

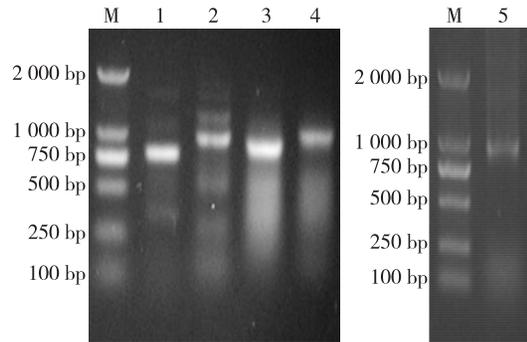
花苞、子房、雄蕊、花瓣和鳞茎约 0.1 g, 在盛叶期称取叶片约 0.1 g, 液氮速冻后迅速置于 -70 °C 冰箱保存; 参照植物 RNA 提取试剂说明书提取不同组织的总 RNA, 用 Random Primer 经反转录酶 M-MLV 将总 RNA 反转录成 cDNA; 以 cDNA 为模板, 分别根据内参基因 *LaActin* 和 *LaTMT* 基因的特异引物(表 1) 进行实时荧光定量 PCR 检测。PCR 反应体系总体积 15.0 μL, 包含 2.0 μL cDNA 模板、7.5 μL 2×SYBR Premix *Ex Taq II*、10.0 μmol · L⁻¹ 上游和下游引物各 0.1 μL、5.3 μL 重蒸水。扩增程序为: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s、60 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 20 s, 共 40 个循环。每个样品均设置 3 次重复。反应结束后, 利用 2^{-ΔΔCt} 法分析其相对表达量。

2 结果和分析

2.1 *LaTMT* 基因的克隆和序列分析

通过 PCR 扩增, 分别得到 *LaTMT* 基因片段的 5'-端和 3'-端序列(图 1); 去除载体序列后, 将测序验证正确的 5'-端扩增片段(961 bp) 和 3'-端扩增片段(956 bp) 与 *LaTMT* 基因已知序列进行拼接, 得到 1 条长度为 1 458 bp 的全长 cDNA 序列; 经 ORF Finder 软

件预测该基因的 ORF 长度为 1 017 bp(图 2)。对该基因的全长序列进行 BLASTx 分析, 发现其编码的蛋白具有典型的 S-腺苷甲硫氨酸(SAM) 甲基转移酶保守结构域, 因此, 将该基因命名为 *LaTMT*。根据预测得到的 ORF 序列设计特异引物 *LaTMT-ORFF* 和 *LaTMT-ORFR*, 并以反转录得到的忽地笑 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到约 1 100 bp 的 ORF 片段(图 1), 与预测的结果一致。



M: DL2000 marker; 1,3: 5'-RACE; 2,4: 3'-RACE; 5: 开放阅读框 Open reading frame.

图 1 忽地笑 *LaTMT* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification result of *LaTMT* gene from *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.

```

1                                     GCCCACCATTTCGCCAAAAGAAG
24 ATGCGCACACTCTCCACACGCTGCGAGCTCCGATCACTCCGCTCCCAACTTCGCATCAAGCCAAGGAAGACCGGCATCCGCCGCTCCAGT
   M R T L L H T C E L P S L R S Q L R I K P R K T G I R R S S
114 CGAACCGCCCCGAACCGCGAGCCGAGCCGCTCCGACGCTCCGATGGCGCGCGCGATGATGGCTGAGGAGGGGATCCGCCGAGCTC
   R T G P E R A R P S R S A R A M A A A D D G L R R G I A E L
204 TACGACGAGTCTCGGGTGTGGAGAGCATCTGGGGGACCACATGCACCATGATTCTATGATTCGGATGCTGCGACCGATATTTCG
   Y D E S S G L W E S I W G D H M H H G F Y D S D V S T D I S
294 GACCACCGCTCGCTCAGATTCCGATGCTGAGGAGTCCGCTTAAATTCGCCGCGTGGAGATGATCCTCTAAAGAAAGCCCAAGAAGATA
   D H R L A Q I R M V E E S L K F A G V G D D P L K K P K K I
384 GTCGATGTTGGGTGCGGATAGGTGGAAGTTCTAGATATCTAGCAAAGAAGTTTGGAGCCAATTGTTGCGCATAACCTTGAGCCCTGTT
   V D V G C G I G C S S R Y L A K K F G A N C C G I T L S P V
474 CAAGCTCAAAGAGCACAAGCTCTTGCTCTGCGGAGGGGTAGGAGACAAAAGTATCCTTCCAAGTTGCAGATGCATTAGACCAACCTTTT
   Q A Q R A Q A L A V A E G L G D K V S F Q V A D A L D Q P F
564 TCTGATGGGAGTTTGATCTAGTTTGGTCCATGAAAAGTGGAGAGCATATGCCTGACAAGGAAAAGTTTGTAGCCGAATGGCACCGAGTA
   S D G E F D L V W S M E S G E H M P D K G K F V S E L A R V
654 GCAGCACCTGGGGCTACCATAATAATAGTGACATGGTGTATAGAGATCTCTCTCTGATGAAGAGACTACGACCCGATGAAAAGAAT
   A A P G A T I I I V T W C H R D L S P D E E T L R P D E K N
744 CTCTGAATAAGATATGCAATGCATATTACCTGCCAGAATGGTGTTCAGCCGCTGATTATGTCAAAATGCCCCAATCCTTAGCACTTAAG
   L L N K I C N A Y Y L P E W C S A A D Y V K I A Q S L A L K
834 GATATCAAGACAGCCGATTGGTCAGATAATGTAGCACCATTTTGGCCTGCTGTCATCCGATCAGCATTACATGGCGTGGTTTTACCTCG
   D I K T A D W S D N V A P F W P A V I R S A F T W R G F T S
924 TTGTTGCCAAGTGATGGAAGACGATACGTTGGGCACTGTAAATGCCACTGATGATCGAGGCTACAAGAAGAAATCTATTCAAATTTGCC
   L L R S G W K T I R G A L V M P L M I E G Y K K N L F K F A
1 014 GTCATTACATGCCGTAAACCAGACTAATCACATATCTTTACAAAATTAATTCACATCATCGCACTGTTCTTAGTACATAAAATTTGTT
   V I T C R K P E *
1 104 CTGGCCAGAATGGAAAAGTATGTTGCTATTGTTGGAGTATTAACACTAGTTATCGACGAAATCCAAGATGTATAATGTACCAGAAGTA
1 194 GCAAATTTCTGTAATGCTTAGCTTGGGATTTTTTCTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTT
1 284 AATTGCTGGCCCTTCTTTAGCTCACAGTATGTATACAAGCCATAGTCTTAAACAGTTCAACATGATGGAGTTGGGGCTGGAAATCTT
1 374 GTAAACTCTGAGATAATTTCAAGTTTTTATAATAATAAGCAGAAGCTTGTACTAGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

* : 终止密码子 Stop codon.

图 2 忽地笑 *LaTMT* 基因全长核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

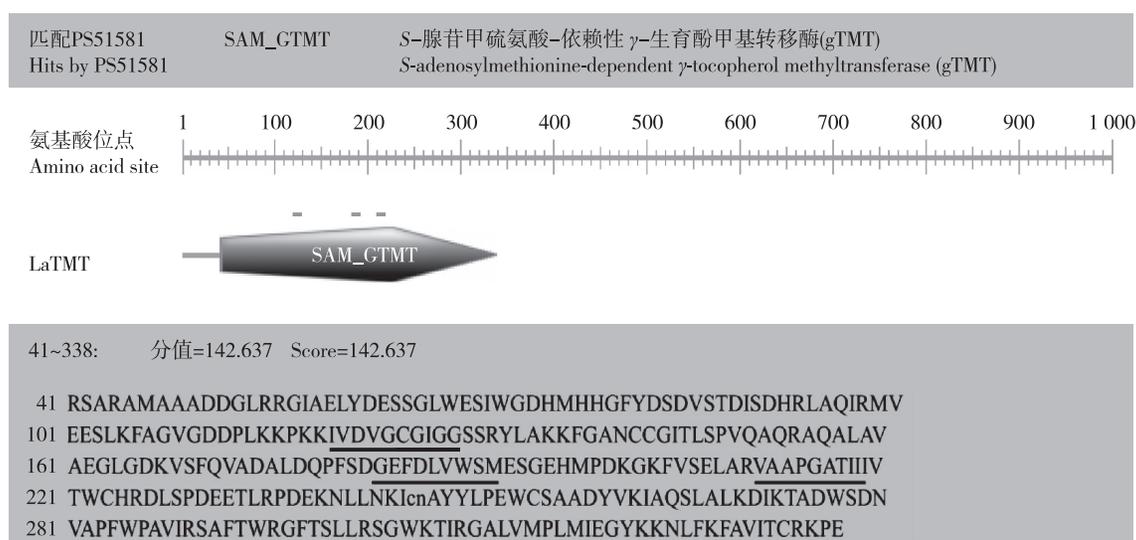
Fig. 2 Full nucleotide sequence of *LaTMT* gene from *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb. and its amino acid sequence encoded

2.2 *LaTMT* 基因编码的氨基酸序列的生物信息学分析

对 *LaTMT* 基因编码的氨基酸序列的分析结果表明:*LaTMT* 蛋白包含 338 个氨基酸残基(图 2),理论相对分子质量 37 560,理论等电点 pI 8.70;*LaTMT* 蛋白在 N 端有 44 个氨基酸的导肽;在 *LaTMT* 蛋白序列中,从 41 ~ 338 位的 298 个氨基酸具有 SAM-依赖性 γ -生育酚甲基转移酶(SAM_GTMT)家族特征(图 3)。此外,该蛋白还具有 3 个 SAM 结合位点,分别位于 120 ~ 129、183 ~ 191 和 210 ~ 219 位氨基酸处。二级结构预测结果显示:该蛋白中含有大量的 α -螺旋和

无规则卷曲以及少量的 β -转角和延伸链;总体上,*LaTMT* 蛋白的二级结构中包含 44.08% 的 α -螺旋、32.84% 的无规则卷曲、12.72% 的延伸链和 10.36% 的 β -转角。

以 PDB 数据库中的红藻(*Galdieria sulphuraria* P. De Luca, R. Taddei et L. Varano)肌氨酸二甲基甘氨酸甲基转移酶为模板(其与 *LaTMT* 蛋白的同源性为 23.99%),对 *LaTMT* 蛋白的三级结构进行建模,结果(图 4)显示:*LaTMT* 蛋白含有较多的 α -螺旋, β -转角只占少数。



下划线表示 SAM 结合位点的氨基酸残基 The underlines indicate amino acid residues of SAM binding sites.

图 3 忽地笑 *LaTMT* 基因编码的氨基酸序列的功能位点分析

Fig. 3 Functional site analysis on amino acid sequence encoded by *LaTMT* gene from *Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb.

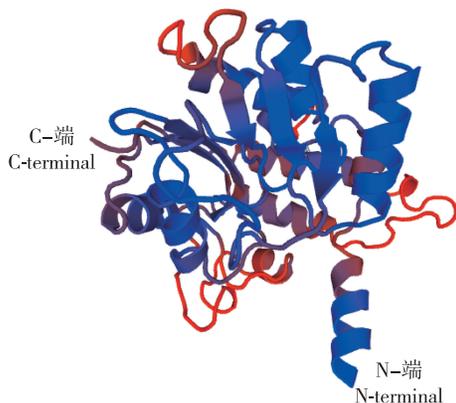


图 4 忽地笑 *LaTMT* 蛋白的三级结构

Fig. 4 Tertiary structure of *LaTMT* protein from *Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb.

2.3 *LaTMT* 基因编码的氨基酸序列的同源性及进化分析

对忽地笑 *LaTMT* 基因编码的氨基酸序列与其他植物的 γ -TMT 蛋白的氨基酸序列进行比对。结果表明:*LaTMT* 与油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)的 EgTMT、美洲油棕[*Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés]的 EoTMT、陆地棉(*Gossypium hirsutum* Linn.)的 GhTMT、橡胶树[*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.]的 HbTMT、可可(*Theobroma cacao* Linn.)的 TcTMT、小麦(*Triticum aestivum* Linn.)的 TaTMT 和玉米(*Zea mays* Linn.)的 ZmTMT 的一致性达 64% ~ 75%。多重比对结果(图 5)显示:忽地笑 *LaTMT* 基因编码的氨基酸序列与上述植物 γ -TMT 蛋白的氨基酸序列具有较大的

1MRTLLHTCEPSSL.....RSQLRK.....PRKTKG...I RRSRTGPERAR. P SRSARAMAAADDGRRGI AELYDESS	65
2MTSLLHTCEPSSLRLRSSLHRR.....SRLGGRTATPSHLSRPPRSRRPAAARVAMTTASDELGKGI AEFYDKSS	70
3SLLHTCEPSSLRLRSSLHRR.....SRLGGRTATPSHLSLPPRSRRPAAARVAMTTASDELGKGI AEFYDKSS	68
4MAAALQLQTH...PCFHGTCLQS.....PPRPSVSVFSSSRSPSSRRSLSAHVKAASSLST.TTQEGI AEFYDQSS	71
5MLLQCYLYPPSLLPQLRTNLQSS.....LFLPTRCRTSHAPLRLRSI TVKASI STVMADAQVTLKKGIAELYDESS	72
6MTSAFQASYSPLPYFPRACQRP.....PVRPVSFV. SSSRTCQSPARFMSI RVNAAASTTSDGASARDGI AEFYDESS	73
7MANSALLHSLSTAWTPRRRLD.....RASATRLAPSPGLSCRSRPTRSVRPMASSTTAARADAAPPGLKEGI AGLYDESS	78
8MAHAALLHCSQSSRS LAACRRGS.....HYRAPSHVPR...HSRRLRAVVS LRPMASS TAQAPA. TAPPGLKEGI AGLYDESS	75
1	GLWESI WGDHMHGFIYDS DVSTD...I SDHRLAQI RMVEESLKFAG. V. GDDPLKPKKIVDVGCGI GGSSRYLAKKYGANCCGI TLSPVQAQRAQALA	159
2	GLWESI WGDHMHGFIYDAGAPAT...I TGHRAAQI QMVEEALRFAA. V. SDDPLKPKKIVDVGCGI GGSSRYLAKKYGARCEGI TLSPVQVKRAHALA	164
3	GLWESI WGDHMHGFIYDAGAPAT...I TGHRAAQI QMVEEALRFAA. V. SDDPLKPKKIVDVGCGI GGSSRYLAKKYGARCEGI TLSPVQVKRAHALA	162
4	GLWEDI WGDHMHGFIYDPSNV...GSDHPAAQI RMEESLRFAG. I. TEDPANKPKTIVDVGCGI GGSSRYLARKYGARCEGI TLSPVQAGRANALA	165
5	GLWEALWGDHMHGFIYDVKVSGSLDHRRAQI RMEEALRFAGS. V. PEDPKKPKKIVDVGCGI GGSSRYLAKKYGARCEGI TLSPVQVQRANSLA	168
6	GLWEDI WGDHMHGFIYDPSNV...GSDNRS AQI RMEESLRFAG. I. SDDPAKPKTIVDVGCGI GGSSRYLARKYGARCEGI TLSPVQAGRANVLA	167
7	GLWESI WGEHMHGFIYDSGEAAS...MSDHRRAQI RMEEALAFAAVP...DDPTNPKKIVDVGCGI GGSSRYLANKYGARCEGI TLSPVQAERGNALA	172
8	GLWENI WGDHMHGFIYDSEEAAS...MADHRAQI RMEEALAFAGVPASDDPEKPKTIVDVGCGI GGSSRYLAKKYGARCEGI TLSPVQAERGNALA	171
1	VAEGLGDKVSIQVADALDQPFPDGQFDLWVSMESGEHMPDKKFKVSELARVAAPGATIIITWCHRDLSPDEETLRFDKLNLNKICNAYYLPWCESA	257
2	TAEGLEDQVSIQVADALDQPFPDGQFDLWVSMESGEHMPDKTKFVYSELARVAAPGATIIITWCHRDLSPDEESLQFNELNLNKICNAYYLPWACSA	262
3	TAEGLEDQVSIQVADALDQPFPDGQFDLWVSMESGEHMPDKTKFVYSELARVAAPGATIIITWCHRDLSPDEESLQFNELNLNKICNAYYLPWACSA	260
4	KDQGLADKYSIQVADALDQPFPDGQFDLWVSMESGEHMPDKPKFVYSELARVAAPGGTIIITWCHRDLSPDEEDLQFWEKLNLRICNAYYLPWCST	263
5	AADGLADKASIQVADALDQPFPDGQFDLWVSMESGEHMPDKRKFVYSELARVAAPGARIIITWCHRDLSPDEESLQFWEKLNLRICNAYYLPWCESA	266
6	EAEGLADRYSIQVADALDQPFPDGQFDLWVSMESGEHMPDKAKFVYSELARVAAPGGKIIITWCHRDLSPDEESLQFWEKLNLRICNAYYLPWCST	265
7	AAQGLSDKASIQVADALEQPFPDGQFDLWVSMESGEHMPNKKQFVYSELARVAAPGATIIITWCHRDLSPDEESLQFWEKLNLRICNAYYLPWCSP	270
8	AAQGLSDQVSIQVADALEQPFPDGQFDLWVSMESGEHMPDKRKFVYSELARVAAPGGTIIITWCHRDLSPDEESLQFWEKLNLRICNAYYLPWCSP	269
1	ADYVKI AQSLSLKDIKTADWSDNVAFWPAVI RSAITWQGFISLRS GWKTI RGALVMPFMI EGYKKNLIFKFAITGRKPE.....	338
2	SDYVKI AQSLSLKDIKTADWSDNVAFWPAVI RSAITWQGFISLRS GWKTI RGALVMPFMI EGYKKNLIFKFAITGRKPT.....	343
3	SDYVKI AQSLSLKDIKTADWSDNVAFWPAVI RSAITWQGFISLRS GWKTI RGALVMPFMI EGYKKNLIFKFAITGRKPT.....	341
4	SDYKLL QSLSLQDIKAADWSDNVAFWPAVI RSAITWQGFISLRS GLKTI KGALVMPFMI QGYKQGLIFKFAITGRKPE.....	344
5	ADYVEMLESLSLQDIKTADWSDNVAFWPAVI RSAITWQGFISLRS GLKTI KGALVMPFMI QGYKQGLIFKFAITGRKPE.....	347
6	ADYKLL QSLSLQDIKAADWSDNVAFWPAVI RSAITWQGFISLRS GLKTI KGALVMPFMI EGYKQGLIFKFAITGRKPE.....	346
7	SDYVKI AESLSLQDIKTADWSDNVAFWPAVI QSAITWQGFISLRS GWKTI KGALVMPFMI QGYKQGLIFKFAITGRKPE.....	365
8	SDYVNI AKSLSLKDIKTADWSDNVAFWPAVI RSAITWQGFISLRTTGWKTI RGALVMPFMI QGYKQGLIFKFAITGRKPGAA.....	352

1: 忽地笑 *Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb.; 2: 油棕 *Elaeis guineensis* Jacq.; 3: 美洲油棕 *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés; 4: 陆地棉 *Gossypium hirsutum* Linn.; 5: 橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.; 6: 可可 *Theobroma cacao* Linn.; 7: 小麦 *Triticum aestivum* Linn.; 8: 玉米 *Zea mays* Linn.

图 5 忽地笑 *LaTMT* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 γ -TMT 的氨基酸序列的多重比对结果
 Fig. 5 Result of multiple alignment between amino acid sequence encoded by *LaTMT* gene from *Lycoris aurea* (L' Hér.) Herb. and γ -TMT amino acid sequence from other species

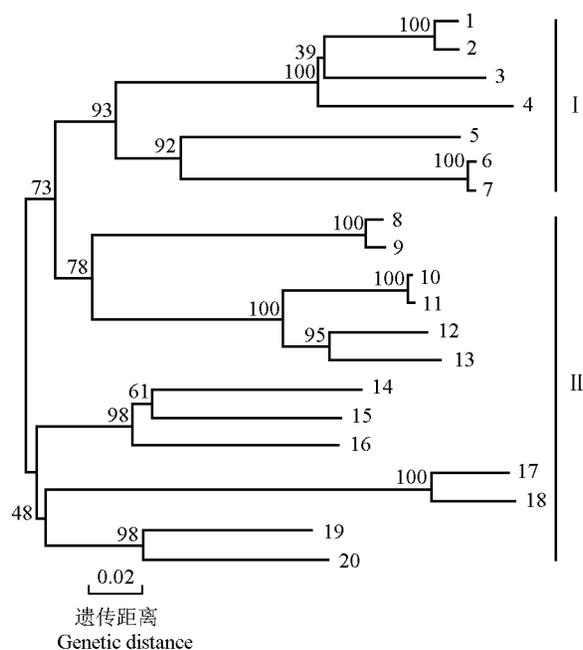
保守区域,同时连续相同的氨基酸残基数目较多,表明植物的 γ -TMT 蛋白具有较高的保守性。

选取与 *LaTMT* 蛋白的氨基酸序列一致性大于 60% 的植物的 γ -TMT 序列,采用 NJ 法构建系统进化树,结果见图 6。结果表明:不同植物的 γ -TMT 蛋白可分成单子叶植物源和双子叶植物源 2 大类,反映出 γ -TMT 蛋白的进化与其物种进化高度一致。此外,同一科属植物的 γ -TMT 蛋白聚在同一个分支上。例如:单子叶植物中,禾本科 (Poaceae) 的小麦、大麦 (*Hordeum vulgare* Linn.)、水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 和玉米的 γ -TMT 蛋白同属一个分支,亲缘关系较近;忽地笑 *LaTMT* 蛋白与棕榈科 (Arecaceae) 的美洲油棕和油棕的 γ -TMT 蛋白亲缘关系较近,处于同一进化分支上,说明它们的进化地位可能一致。双子叶植物中,同为茄科 (Solanaceae) 的 *Solanum lycopersicum* Linn. 和马铃薯 (*Solanum tuberosum* Linn.) 的 γ -TMT

蛋白亲缘关系最近,聚在同一分支;菊科 (Asteraceae) 的 *Carthamus oxyacanthus* Bieb.、红花 (*Carthamus tinctorius* Linn.)、向日葵 (*Helianthus annuus* Linn.) 和莴苣 (*Lactuca sativa* Linn.) 的 γ -TMT 蛋白聚在同一分支;豆科 (Fabaceae) 的大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.]、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.) 和百脉根 (*Lotus corniculatus* Linn.) 的 γ -TMT 蛋白的亲缘关系最近,形成同一分支;十字花科 (Brassicaceae) 的欧洲油菜 (*Brassica napus* Linn.) 和拟南芥的 γ -TMT 蛋白属于同一分支,而锦葵科 (Malvaceae) 的陆地棉和可可的 γ -TMT 蛋白也聚在同一分支上。 γ -TMT 的系统发育关系与各物种的经典分类关系基本一致。

2.4 *LaTMT* 基因的原核表达分析

由于 *LaTMT* 蛋白的 N 端具有预测的叶绿体导肽,而对于大肠杆菌表达系统,导肽的存在可能影响重组酶的表达及功能。因此,本研究在原核表达的时



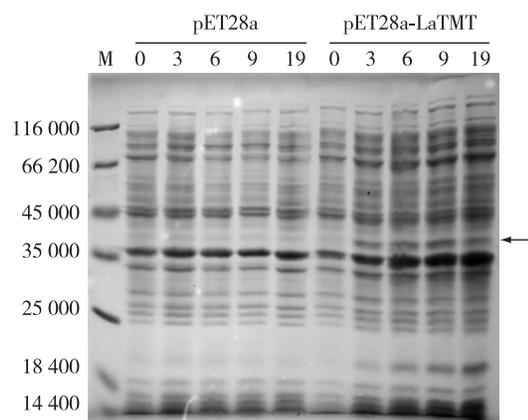
1: 大麦 *Hordeum vulgare* Linn.; 2: 小麦 *Triticum aestivum* Linn.; 3: 水稻 *Oryza sativa* Linn.; 4: 玉米 *Zea mays* Linn.; 5: 忽地笑 *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.; 6: 油棕 *Elaeis guineensis* Jacq.; 7: 美洲油棕 *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés; 8: *Solanum lycopersicum* Linn.; 9: 马铃薯 *Solanum tuberosum* Linn.; 10: *Carthamus oxyacanthus* Bieb.; 11: 红花 *Carthamus tinctorius* Linn.; 12: 向日葵 *Helianthus annuus* Linn.; 13: 莴苣 *Lactuca sativa* Linn.; 14: 大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.; 15: 蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn.; 16: 百脉根 *Lotus corniculatus* Linn.; 17: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; 18: 欧洲油菜 *Brassica napus* Linn.; 19: 陆地棉 *Gossypium hirsutum* Linn.; 20: 可可 *Theobroma cacao* Linn. 分支上的数据代表自展值 Datums above the branches indicate bootstrap values. I: 单子叶植物 Monocotyledon; II: 双子叶植物 Dicotyledon.

图 6 忽地笑 *LaTMT* 蛋白与其他植物 γ -TMT 蛋白的 NJ 系统树
Fig. 6 NJ phylogenetic tree of *LaTMT* protein from *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb. and γ -TMT protein from other species

候,设计了 1 对用以扩增 *LaTMT* 成熟蛋白编码区的引物 *LaTMT*-pETR 和 *LaTMT*-pETF。在构建 *LaTMT* 基因原核表达载体后,将转入空载体 pET28a 和重组质粒 pET28a-*LaTMT* 的表达宿主菌进行异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达,结果表明:经 IPTG 诱导后,含重组质粒 pET28a-*LaTMT* 的表达宿主菌出现 1 条相对分子质量约 37 000 的条带(图 7),与预测的 *LaTMT* 蛋白的理论相对分子质量一致,说明目标蛋白 *LaTMT* 成功表达。此外,随着 IPTG 诱导时间的延长,*LaTMT* 蛋白的表达量有显著的增加。

2.5 忽地笑不同组织中 *LaTMT* 基因的表达分析

以忽地笑 *LaActin* 基因为内参,采用实时荧光定量 PCR 方法分析 *LaTMT* 基因的组织表达模式,结果见图 8。由图 8 可见:*LaTMT* 基因在忽地笑的根、叶片、花苞、子房、雄蕊、花瓣和鳞茎中均有表达,且叶片



M: Marker; 0,3,6,9,19: 分别经异丙基硫代半乳糖苷诱导表达 0、3、6、9 和 19 h Induced expression by isopropyl thiogalactoside for 0, 3, 6, 9 and 19 h, respectively. 箭头示目标蛋白 The arrow indicates the target protein.

图 7 忽地笑 pET28a-*LaTMT* 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 7 SDS-PAGE electrophoresis pattern of pET28a-*LaTMT* of *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb. expressed in *Escherichia coli*

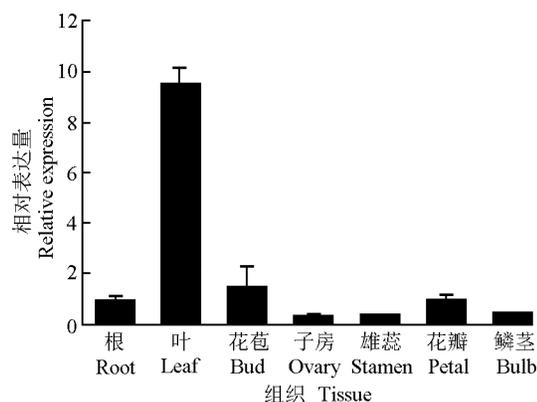


图 8 忽地笑不同组织中 *LaTMT* 基因的相对表达量
Fig. 8 Relative expression of *LaTMT* gene in different tissues of *Lycoris aurea* (L'Hér.) Herb.

中相对表达量最高,子房、雄蕊和鳞茎中相对表达量相对较低。表明 *LaTMT* 基因的表达具有一定的特异性。

3 讨论和结论

采用 RACE 方法从忽地笑中克隆得到 γ -TMT 基因,并命名为 *LaTMT*,该基因 cDNA 全长 1 458 bp,开放阅读框为 1 017 bp,编码 1 个具有 338 个氨基酸残基的多肽。*LaTMT* 蛋白在 N 端有 44 个氨基酸的叶绿体导肽,负责引导未成熟的 *LaTMT* 进入叶绿体,因

此,LaTMT蛋白可能主要在叶绿体中行使功能,这与“拟南芥、玉米和马铃薯等种类的 γ -TMT主要定位在叶绿体基质中^[12]”的结果相一致。LaTMT基因编码的氨基酸序列与其他植物的 γ -TMT基因编码的氨基酸序列一致性均在64%以上,说明该基因在进化上具有高度保守性。LaTMT蛋白与其他物种 γ -TMT蛋白具有相似的保守域,且在NJ系统树上与美洲油棕和油棕的 γ -TMT同源蛋白亲缘关系较近,进一步说明该基因在进化过程具有很高的保守性。此外,LaTMT基因属于SAM-GTMT基因家族中的1个成员。

LaTMT基因在忽地笑的不同组织中均有不同程度的表达,其中在叶片中的相对表达量最高。Dellapenna^[6]认为生育酚的合成主要在高等植物的叶绿体中进行,因此LaTMT基因在叶片中的高度表达可能与此有关;而LaTMT蛋白N端具有叶绿体导肽的推测结果也进一步确认了这一结论。 V_E 在提高植物自身对非生物逆境胁迫的抗性(抗光氧化、抗寒、抗旱和抗盐碱等)和细胞信号转导等方面也有重要作用^[13-16],而通过 γ -TMT基因的表达提高植物体中 V_E 含量则可以缓解非生物胁迫对其造成的损伤^[17-18]。忽地笑对土壤水分、温度、酸碱性、荫蔽等环境因子的有极强的耐受性,推测LaTMT基因可能在其非生物胁迫抗性中起作用。此外,对LaTMT基因所具有的功能还需要进一步的验证。

参考文献:

- [1] BRIGELIUS-FLOHÉ R, TRABER M G. Vitamin E: function and metabolism [J]. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1999, 13: 1145-1155.
- [2] NIKI E. Evidence for beneficial effects of vitamin E [J]. The Korean Journal of Internal Medicine, 2015, 30: 571-579.
- [3] TRABER M G, SIES H. Vitamin E in humans: demand and delivery [J]. Annual Review of Nutrition, 1996, 16: 321-347.
- [4] FRYER M J. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol) [J]. Plant, Cell and Environment, 1992, 15: 381-392.
- [5] NETSCHER T. Synthesis of vitamin E [J]. Vitamins and Hormones, 2007, 76: 155-202.
- [6] DELLAPENNA D. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants [J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162: 729-737.
- [7] LI Y, ZHOU Y, WANG Z, et al. Engineering tocopherol biosynthetic pathway in *Arabidopsis* leaves and its effect on antioxidant metabolism [J]. Plant Science, 2010, 178: 312-320.
- [8] YUSUF M A, SARIN N B. Antioxidant value addition in human diets: genetic transformation of *Brassica juncea* with γ -TMT gene for increased α -tocopherol content [J]. Transgenic Research, 2007, 16: 109-113.
- [9] HARVEY A L. The pharmacology of galanthamine and its analogues [J]. Pharmacology and Therapeutics, 1995, 68: 113-128.
- [10] WANG R, XU S, JIANG Y, et al. *De novo* sequence assembly and characterization of *Lycoris aurea* transcriptome using GS FLX titanium platform of 454 pyrosequencing [J]. PLoS One, 2013, 8: e60449.
- [11] 别庆玲, 徐 晟, 傅江燕, 等. 一个新的忽地笑 O-甲基转移酶基因的克隆与原核表达 [J]. 植物生理学报, 2014, 50(5): 651-659.
- [12] 石 鹏, 曹红星, 李东霞, 等. 油棕等植物 γ -生育酚甲基转移酶的生物信息学分析 [J]. 热带作物学报, 2015, 36(2): 308-315.
- [13] HAVAUX M, EYMERY F, PORFIROVA S, et al. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Cell, 2005, 17: 3451-3469.
- [14] LI Z, KEASLING J D, NIYOGI K K. Overlapping photoprotective function of vitamin E and carotenoids in *Chlamydomonas* [J]. Plant Physiol, 2012, 158: 313-323.
- [15] SHINTANI D, DELLAPENNA D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering [J]. Science, 1998, 282: 2098-2100.
- [16] RIMBACH G, MINIHANE A M, MAJEWICZ J, et al. Regulation of cell signalling by vitamin E [J]. The Proceedings of the Nutrition Society, 2002, 61: 415-425.
- [17] JIN S, DANIELL H. Expression of γ -tocopherol methyltransferase in chloroplasts results in massive proliferation of the inner envelope membrane and decreases susceptibility to salt and metal-induced oxidative stresses by reducing reactive oxygen species [J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12: 1274-1285.
- [18] YUSUF M A, KUMAR D, RAJWANSHI R, et al. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1797: 1428-1438.

(责任编辑:张明霞)