

薄荷柠檬烯-6-羟化酶基因(*MhL6OH*)的 克隆与表达分析

陈 吟, 亓希武, 徐东北, 陈泽群, 房海灵, 梁呈元^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]

摘要:从薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)叶 cDNA 中克隆到 1 个参与精油合成的柠檬烯-6-羟化酶基因, 命名为 *MhL6OH*, 编码的蛋白质为 MhL6OH。序列分析结果表明:该基因蛋白质编码区(CDS)全长 1 479 bp, 编码 492 个氨基酸残基; MhL6OH 蛋白的理论相对分子质量为 55 855.69, 理论等电点为 pI 8.71, 其二级结构中 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链和 β -转角的比例分别为 51.02%、30.49%、12.40% 和 6.10%, 且该蛋白质含有保守的细胞色素 P450 结构域, 说明薄荷 MhL6OH 蛋白属于 CYP71 家族的 D 亚家族。多重序列比对结果表明:薄荷 MhL6OH 蛋白与椒样薄荷(*M. piperita* Linn.) MpL6OH 蛋白和留兰香(*M. spicata* Linn.) MsL6OH 蛋白的氨基酸序列高度相似, 均具有细胞色素 P450 的血红素结合区; 并且, MhL6OH 蛋白与 MpL6OH 蛋白底物识别位点(SRS)的序列相似性更高, 二者的 SRS2、SRS3、SRS5 和 SRS6 序列完全相同, 仅分别在 SRS1 和 SRS4 序列上存在 1 个氨基酸差异, 说明 MhL6OH 蛋白与 MpL6OH 蛋白可能具有相似的底物识别特异性。系统进化树分析结果表明:薄荷与椒样薄荷的亲缘关系最近。组织表达特性分析结果显示:*MhL6OH* 基因的相对表达量在薄荷叶中最高, 并远高于其在茎和根中的相对表达量。原核表达分析结果显示:MhL6OH 蛋白能够在大肠杆菌[*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers]中高水平表达, 且其表达量随诱导时间延长而逐渐增大。研究结果显示:薄荷 *MhL6OH* 基因组织表达模式与其精油分布一致, MhL6OH 蛋白底物识别位点的特异性可能是薄荷醇为薄荷精油主要成分的重要原因。

关键词:薄荷; 柠檬烯-6-羟化酶基因(*MhL6OH*); 基因克隆; 生物信息学分析; 组织表达特性; 原核表达分析

中图分类号: Q943.2; Q786; S567.23⁺5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2019)02-0025-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2019.02.04

Cloning and expression analysis on limonene-6-hydroxylase gene (*MhL6OH*) of *Mentha haplocalyx*
CHEN Yin, QI Xiwu, XU Dongbei, CHEN Zequn, FANG Hailing, LIANG Chengyuan^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2019, 28(2): 25-31

Abstract: A limonene-6-hydroxylase gene involved in essential oil biosynthesis was cloned from cDNA of leaf of *Mentha haplocalyx* Briq., which was named as *MhL6OH*, and its encoded protein was MhL6OH. The sequence analysis result shows that the whole length of coding sequence region (CDS) of this gene is 1 479 bp, which encodes 492 amino acid residues. Theoretical relative molecular mass of MhL6OH protein is 55 855.69, and its theoretical isoelectric point is pI 8.71. In its secondary structure, percentages of α -helix, random coil, extended strand, and β -turn are 51.02%, 30.49%, 12.40%, and 6.10%, respectively, and this protein contains conserved cytochrome P450 domain, indicating that MhL6OH protein of *M. haplocalyx* belongs to D subfamily of CYP71 family. The multiple sequence alignment result shows that amino acid sequences of MhL6OH protein of *M. haplocalyx*, MpL6OH protein of *M. piperita* Linn., and MsL6OH protein of *M. spicata* Linn. are highly similar, and all of them contain heme binding region of cytochrome P450; moreover, the sequence similarity of substrate

收稿日期: 2018-08-16

基金项目: 江苏省植物资源研究与利用重点实验室项目(JSPKLB201811)

作者简介: 陈 吟(1994—), 女, 江苏淮安人, 硕士研究生, 主要从事药用植物次生代谢研究。

^①通信作者 E-mail: liangcy618@cnbg.net

recognition site (SRS) between MhL6OH protein and MpL6OH protein is higher, and their SRS2, SRS3, SRS5, and SRS6 sequences are completely identical, while there is only one amino acid difference in SRS1 and SRS4 sequences, respectively, indicating that MhL6OH protein and MpL6OH protein may have similar substrate recognition specificity. The phylogenetic tree analysis result shows that the genetic relationship between *M. haplocalyx* and *M. piperita* is the closest. Tissue expression characteristics analysis result shows that the relative expression level of *MhL6OH* gene in leaf of *M. haplocalyx* is the highest and much higher than that in stem and root. The prokaryotic expression analysis result shows that MhL6OH protein can highly express in *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers, and its expression level gradually increases with the elongation of induction time. It is suggested that the tissue expression pattern of *MhL6OH* gene of *M. haplocalyx* is consistent with its essential oil distribution, and the specificity of substrate recognition site of MhL6OH protein may be the important reason for menthol as main component of essential oil of *M. haplocalyx*.

Key words: *Mentha haplocalyx* Briq.; limonene-6-hydroxylase gene (*MhL6OH*); gene cloning; bioinformatic analysis; tissue expression characteristics; prokaryotic expression analysis

薄荷 (*Mentha haplocalyx* Briq.) 隶属于唇形科 (Labiatae) 薄荷属 (*Mentha* Linn.), 为常见的芳香植物之一, 广泛分布于北半球的温带地区, 在中国南方和北方各省均有栽培^[1]。薄荷的茎为方柱形, 叶具短柄, 叶片呈宽针形, 叶缘具细锯齿, 搓揉后散发出特殊的清凉香气^[2]。薄荷叶中含有多种生物活性物质, 具有重要的药用价值, 包括清凉止痒、抗早孕着床、抑制子宫收缩、利胆、祛痰、抗真菌和抗病毒等^[3]。

薄荷叶精油丰富, 主要为萜类化合物。不同薄荷属植物精油成分差异较大^[4], 留兰香 (*M. spicata* Linn.) 叶精油的主要成分为香芹酮 (carvone), 椒样薄荷 (*M. piperita* Linn.) 叶精油的主要成分为薄荷醇 (menthol) 和薄荷酮 (menthone), 而薄荷叶精油的主要成分为薄荷醇。根据挥发油成分差异, 薄荷属植物可分成不同的化学型, 包括薄荷醇化学型 (menthol chemotype)、薄荷酮化学型 (menthone chemotype)、香芹酮化学型 (carvone chemotype) 和辣薄荷烯酮氧化物化学型 (piperitenone oxide chemotype)^[5-6]。相关研究表明: 薄荷精油的合成途径起源于质体中的丙酮酸-磷酸甘油醛 (MEP) 途径, 上游的牻牛儿基二磷酸 (geranyl diphosphate) 经柠檬烯合酶 (limonene synthase, LS) 催化生成柠檬烯 (limonene), 而柠檬烯是多种精油成分合成的共同前体^[7-9]; 柠檬烯-3-羟化酶 (limonene-3-hydroxylase, L3OH) 和柠檬烯-6-羟化酶 (limonene-6-hydroxylase, L6OH) 能够催化柠檬烯羟基化反应, 分别生成反式异紫萜醇 (*trans*-isopipertenol) 和反式香芹酮 (*trans*-carvone), 其中, 反式异紫萜醇可被进一步催化成顺式异戊酮 (*cis*-isopulegone), 而反式香芹酮可被进一步催化成香芹

酮^[10-12]。可见, 柠檬烯羟基化反应是薄荷属植物精油合成的重要一步, 对其精油组成具有重要影响, 因此, 研究柠檬烯羟基化酶基因对于了解薄荷属植物精油的生物合成及组成差异具有重要意义。

鉴于此, 根据前期薄荷转录组测序获得的 *L6OH* 基因序列设计 1 对特定引物, 以薄荷叶 cDNA 为模板克隆到 1 个 *L6OH* 基因, 并对该基因进行了序列分析、二级结构预测、多重序列比对及系统进化分析; 并且, 利用实时荧光定量 PCR 技术分析了该基因在薄荷根、茎和叶中的表达特性; 同时, 对该基因编码的蛋白质进行了原核表达分析, 以期明确薄荷 *L6OH* 基因的组织表达特性及其与薄荷精油组成的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

以江苏省中国科学院植物研究所种质资源圃种植的薄荷品种‘68-7’的 1 年生苗为实验材料, 随机选择 3 株生长良好、长势基本一致且无病害的植株, 分别采集每个单株的根、茎 (植株中部节间的茎段) 和叶 (植株顶端的叶) 各 1 g 左右, 分别放入液氮中速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存, 备用。

扩增引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 将薄荷样品置于液氮中研磨成细粉, 按照植物多糖多酚总 RNA 快速提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司) 说明书提取总 RNA, 用 V-1600 型紫外分光光度计 (上海美普达仪器有限公司) 检测总 RNA 的质量; 检测合格

后,取 3 μg 总 RNA,按照 M-MLV 逆转录聚合酶试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司]说明书逆转录合成 cDNA。

1.2.2 基因克隆 根据本项目组前期对薄荷转录组测序结果中预测的 *L6OH* 基因序列,利用 Primer Premier 5 软件设计 1 对特异引物,上游引物 L6OH-F 的序列为 5'-ATGGAGCTCAACCTTTTGTTCG-3',下游引物 L6OH-R 的序列为 5'-TTATTTATGGAGTGTGGGAACC-3'。扩增体系总体积 50.0 μL ,包括 10 \times buffer 5.0 μL , 25 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺ 4.0 μL , 20 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 4.0 μL , 叶 cDNA 模板 2.0 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹ 上游和下游引物各 2.0 μL , *Ex Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL , ddH₂O 30.6 μL 。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用质量分数 1.0%琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳检测,切下目的条带,用 Agarose Gel DNA Extraction 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]回收目的片段,将回收产物连接到 pMD19-T Simple Vector[宝生物工程(大连)有限公司]上,并转化到大肠杆菌[*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers] DH5 α 感受态细胞(北京擎科新业生物技术有限公司)中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下暗培养,挑取单菌落,筛选出阳性克隆并交给北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析 使用 BioEdit 软件对克隆的 *L6OH* 基因序列进行蛋白质编码区(CDS)预测和氨基酸翻译^[13],在 ExPASy 网站(http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool)对该基因编码蛋白质的理论相对分子质量和理论等电点进行预测,使用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对该基因编码蛋白质的结构域进行预测,使用 SOPMA 软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对该基因编码蛋白质的二级结构进行预测,使用 DNAMAN 7.0 软件将薄荷与 NCBI 数据库中椒样薄荷和留兰香的 *L6OH* 基因编码蛋白质的氨基酸序列进行多重比对,并基于相关蛋白质的氨基酸序列、使用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-joining 法构建薄荷及其他植物 CYD71 家族 D 亚家族成员的系统进化树^[14]。

1.2.4 组织表达特性分析 根据测序得到的薄荷 *L6OH* 基因序列设计用于实时荧光定量 PCR 反应的引物,上游引物 qL6OH-F 的序列为 5'-CGATTTTCG

AGTTCATCCCATTC-3',下游引物 qL6OH-R 的序列为 5'-GTCGGCATCAGTCATTCCTTG-3';使用薄荷 *Actin* 基因作为内参基因,用于 *Actin* 基因 PCR 反应的上游引物序列为 5'-CCAGGAATTGCTGATAGGATGAG-3',下游引物序列为 5'-GCGCCACCACCTTAATCTTC-3'。使用 qTOWER 2.2 荧光定量 PCR 仪(德国 Analytic Jena 公司)进行 PCR 反应,扩增体系总体积 20.0 μL ,包括 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 10.0 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹ 上游引物和下游引物各 0.5 μL , 根、茎或叶 cDNA 模板 2.0 μL , ddH₂O 7.0 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s,共 40 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 采集荧光信号。采用 2^{- $\Delta\Delta\text{C}_t$} 法^[15] 计算薄荷根、茎和叶中 *L6OH* 基因的相对表达量。实验进行 3 次生物学重复。

1.2.5 原核表达分析 使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 对原核表达载体 pET28a 进行双酶切,使用 TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]回收酶切后的载体;根据克隆的 *L6OH* 基因序列和 pET28a 载体序列设计含有同源臂的引物,上游引物 exL6OH-F 的序列为 5'-AATGGGTCGCGGATCCATGGAGCTCAACCTTTTGTTCG-3',下游引物 exL6OH-R 的序列为 5'-CCGCAAGCTTGTGCACTTATTTATGGAGTGTGGGAACC-3' (引物中下划线部分为同源臂序列);利用同源重组法获得重组载体 pET28a-L6OH;提取重组质粒,将其转入大肠杆菌表达菌株 Rosetta 感受态细胞中,涂布在含 25 mg \cdot L⁻¹ 卡那霉素的 LB 固体培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下暗培养;挑取单菌落,置于 LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r \cdot min⁻¹ 摇床上振荡培养;当 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时,加入诱导剂异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)至终浓度 1 mmol \cdot L⁻¹,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下暗培养,诱导 *L6OH* 蛋白表达。分别取诱导 0(诱导前)、1、2、3 和 4 h 的菌液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 6 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,收集沉淀,使用 SDS-PAGE 法^[16] 检测目的蛋白的表达情况。

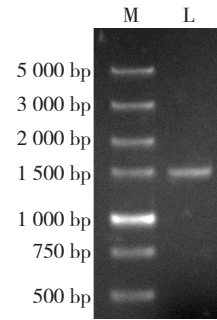
2 结果和分析

2.1 基因克隆及序列分析

根据转录组测序数据预测的 *L6OH* 基因序列设计引物,以薄荷叶 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,结果

(图 1)表明:从薄荷叶 cDNA 中克隆到 1 条长度约 1 500 bp 的明亮条带。经测序,该条带为 *L6OH* 基因,命名为 *MhL6OH*,GenBank 登录号为 MK285052。

生物信息学分析结果表明:*MhL6OH* 基因蛋白质编码区(CDS)全长 1 479 bp,共编码 492 个氨基酸残基(图 2);该基因编码的蛋白质命名为 MhL6OH,该蛋白质的理论相对分子质量为 55 855.69,理论等电点为 pI 8.71;该蛋白质的二级结构中, α -螺旋的比例为 51.02%,无规则卷曲的比例为 30.49%,延伸链的比例为 12.40%, β -转角的比例为 6.10%(图 3)。此外,该蛋白质还含有保守的细胞色素 P450 结构域(图 4),根据细胞色素 P450 超家族分类标准^[17],MhL6OH



M: DNA marker; L: *MhL6OH* 基因 *MhL6OH* gene.

图 1 薄荷 *MhL6OH* 基因扩增结果

Fig. 1 Amplification result of *MhL6OH* gene of *Mentha haplocalyx* Briq.

```

1 ATGGAGCTCAACCTTTGTGCGTACTTATAATCTCGTGGCAACCTATACCGTATCCCTCCTAAATAAGCAATGGCGAAAACCGAAAATCC
  M E L N L L S V L I I L V A T Y T V S L L N K Q W R K P K S
91 CAACAAAACCGCCTCCGAAGCTGCCGGTATCGGCCACCTCCACCTCCTCTGGGGAGGGCTGCCGCCAGCACCTACTTAGGAGCATC
  Q Q N Q P P K L P V I G H L H L L W G G L P P Q H L L R S I
181 GCCCGAGAGTACGGCCGATCGCACGTGACAGTAGGAGAAGTGTACTCGGTGGTGTCTGCTCGGGCGGAGCCCGAAGCAAGCGATG
  A R E Y G P V S H V Q L G E V Y S V V L S S A E A A K Q A M
271 AAGGTGCTGGACCCAACTTCGCTGACCGGTCGACAGCGTCGGGTCCCGGATCATGTGGTACGACAACGATGACATCATCTTCAGCCCT
  K V L D P N F A D R F D S V G S R I M W Y D N D D I I F S P
361 TACAACGATCACTGGCCAGATGCGGAAGATCTGCGTGACAGAGCTGCTGAGCCGAAGAACGTCAGGTCTTCGGGTTCCATAAGGCAG
  Y N D H W R Q M R K I C V T E L L S P K N V R S F G F I R Q
451 GAGGAGATCGAGCGCTCATCCGGTGTGAAGCAGTCCGGTGGGCGCGCGGTGCGAGTGACGGAGGAGGTGTCGAAGATGCTGTCGCTC
  E E I E R L I R L L K Q S V G A P V D V T E E V S K M S C V
541 GTCGTGTGACGGGCTGCGTTCGGGAGCGTCTCAAGGACAGGGTTCGTTGGCAGAGTTGGTGAAGGAGCGCTGGCAATGGCGTCCGGG
  V V C R A A F G S V L K D Q G S L A E L V K E A L A M A S G
631 TTTGAGGTGAAGGATCTATACCCTTCTCTTGGCTCTTAAACCTGCTTAGCTTCAACAATTACAGGTTGAAGAGGATACGCCCGCCCTC
  F E V K D L Y P S S W L L N L L S F N N Y R L K R I R R R L
721 GACCACATCTTGACGGGTTCTGGAGGAGCATAGGGTGAAGAAGAGCGCGAGTTTGGAGGCGAGGACATCGTCGAGCTTCTTTTCAGG
  D H I L D G F L E E H R V K K S G E F G G E D I V D V L F R
811 ATGCAGAAAGGCGAGCATCAAAATCCCATTACTTCAATGGCATCAAGGGTTTCATCTTTAACACCTTCTCCGCGGAGCTGAGGCA
  M Q K G S D I K I P I T S N G I K G F I F N T F S A G A E A
901 TCTTCGACGGCCATCTCATGGGCGTCTCGGAATGATGAGGAATCCGGCGGAGATGGCCAAGTGCAGGCGGAGGTAAGAGAGGCGCTC
  S S T A I S W A L S E L M R N P A E M A K V Q A E V R E A L
991 AAGGAAAAGACAAGCGTGGATTTGAGCGAGGTGCAAGAGCTAAAATACATGAGATCGGTGGTGAAGGAGACCCCTGAGGCTGCATCTCCC
  K G K T S V D L S E V Q E L K Y M R S V V K E T L R L H P P
1 081 TTCCCAATTAATCCCAAGACAATCCAGAGAAGAATGCGAGATTAACGGTTCTATATTCCAGCCAGAAGTGAATCTTGATCAACGCTGG
  F P L I P R Q S R E E C E I N G F Y I P A R T R I L I N A W
1 171 TCTATCGTAAGGGATCCCTCTACTGGGAAGATCCTGACACCTTCCGCCCGAGAGATTCGATGAGGTTCCAGGGATTTTCATGGGAAAC
  S I V R D P L Y W E D P D T F R P E R F D E V S R D F M G N
1 261 GATTTGAGGTTTATCCCATTCGGGCGGGTCAAAGAATCTGCCCGGTTTACATTTCCGGCTGGCAAATATTGAGATCCCATTTGGCGCAA
  D F E F I P F G A G Q R I C P G L H F G L A N I E I P L A Q
1 351 CTGCTCTACCACTTCGATTTGAAAATTGCCTCAAGGAATGACTGATGCCGACTTGTACATGGCGGGGACCCAGGCTTTCTGGGCAAGA
  L L Y H F D W K L P Q G M T D A D L Y M A G T P G L S G P R
1 441 AAGAAAAATGTTGCTTGGTTCACACTCCATAAATAA
  K K N V C L V P T L H K *

```

*: 终止密码子 Stop codon.

图 2 薄荷 *MhL6OH* 基因蛋白质编码区(CDS)及其氨基酸序列

Fig. 2 Coding sequence region (CDS) of *MhL6OH* gene of *Mentha haplocalyx* Briq. and its amino acid sequence

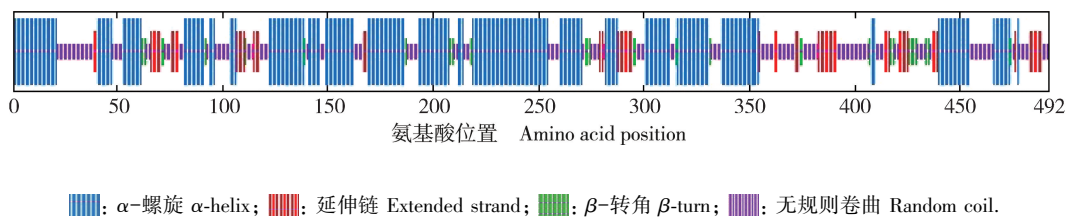


图 3 薄荷 *MhL6OH* 蛋白的二级结构预测
Fig. 3 Prediction of secondary structure of *MhL6OH* protein of *Mentha haplocalyx* Briq.

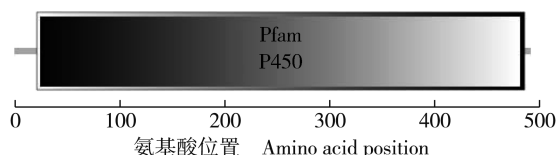


图 4 薄荷 *MhL6OH* 蛋白的结构域预测
Fig. 4 Prediction of domain of *MhL6OH* protein of *Mentha haplocalyx* Briq.

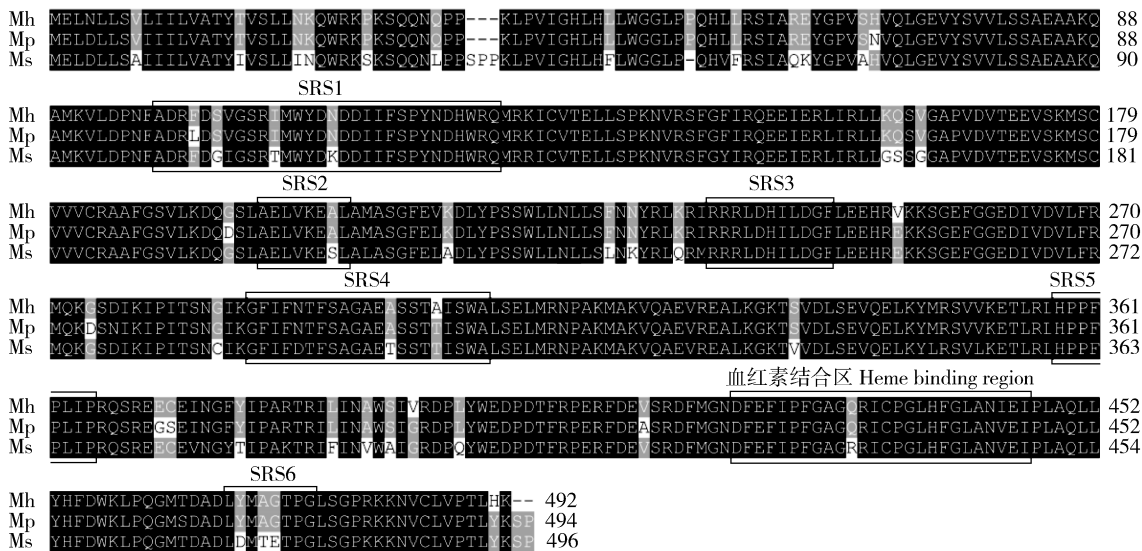
蛋白属于 CYP71 家族的 D 亚家族。

2.2 多重比对和进化分析

对获得的薄荷 *MhL6OH* 蛋白与 NCBI 网站中薄荷属植物椒样薄荷 *MpL6OH* 蛋白(登录号 AIS36970)和留兰香 *MsL6OH* 蛋白(登录号 Q6WKZ1.1)的氨基酸序列进行多重比对。比对分析结果(图 5)表明:

MhL6OH 蛋白与 *MpL6OH* 蛋白和 *MsL6OH* 蛋白的氨基酸序列高度相似,均具有细胞色素 P450 的血红素结合区 (heme binding region); 这 3 种薄荷属植物 L6OH 蛋白的底物识别位点 (substrate recognition site, SRS) 中 SRS3 和 SRS5 的序列完全相同,且 SRS1、SRS2、SRS4 和 SRS6 的序列仅有个别氨基酸存在差异。并且, *MhL6OH* 蛋白与 *MpL6OH* 蛋白的 SRS 序列的相似性更高,二者的 SRS2、SRS3、SRS5 和 SRS6 序列完全相同,仅分别在 SRS1 和 SRS4 序列上存在 1 个氨基酸的差异,说明 *MhL6OH* 蛋白与 *MpL6OH* 蛋白可能具有相似的底物识别特异性。

系统进化树分析结果(图 6)表明: *MhL6OH* 蛋白与 *MpL6OH* 蛋白首先聚在一起,并与苏格兰薄荷 (*Mentha gracilis* Sole) CYP71D94 蛋白和 *MsL6OH* 蛋



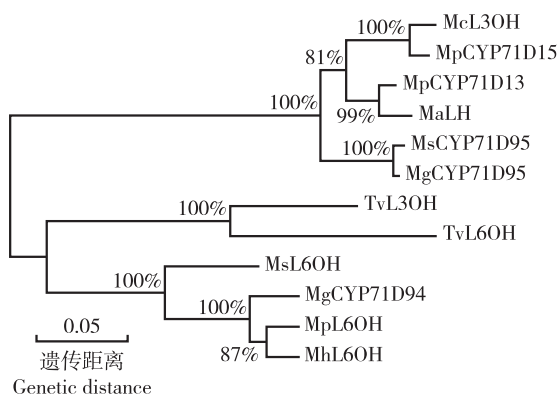
Mh: 薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq.; Mp: 椒样薄荷 *M. piperita* Linn.; Ms: 留兰香 *M. spicata* Linn. SRS1, SRS2, SRS3, SRS4, SRS5, SRS6: 表示不同的底物识别位点 Indicating different substrate recognition sites.

图 5 薄荷 *MhL6OH* 蛋白与椒样薄荷和留兰香 L6OH 蛋白的氨基酸序列的多重比对
Fig. 5 Multiple alignment of amino acid sequences of *MhL6OH* protein of *Mentha haplocalyx* Briq. with L6OH proteins of *M. piperita* Linn. and *M. spicata* Linn.

白聚为一组,与其他植物 CYP71 家族 D 亚家族蛋白明显分离,说明薄荷与椒样薄荷的亲缘关系最近,与苏格兰薄荷和留兰香的亲缘关系也较近,但与其他植物的亲缘关系却相对较远。

2.3 组织表达特性分析

实时荧光定量 PCR 分析结果(图 7)表明:*MhL6OH* 基因的相对表达量在薄荷叶中最高,在茎中



McL3OH: 加拿大薄荷 L3OH 蛋白 L3OH protein of *Mentha canadensis* Linn.; MpCYP71D15: 椒样薄荷 CYP71D15 蛋白 CYP71D15 protein of *M. piperita* Linn.; MpCYP71D13: 椒样薄荷 CYP71D13 蛋白 CYP71D13 protein of *M. piperita*; MaLH: 亚洲薄荷 LH 蛋白 LH protein of *M. arvensis* Linn.; MsCYP71D95: 留兰香 CYP71D95 蛋白 CYP71D95 protein of *M. spicata* Linn.; MgCYP71D95: 苏格兰薄荷 CYP71D95 蛋白 CYP71D95 protein of *M. gracilis* Sole; TvL3OH: 百里香 L3OH 蛋白 L3OH protein of *Thymus vulgaris* Linn.; TvL6OH: 百里香 L6OH 蛋白 L6OH protein of *T. vulgaris*; MsL6OH: 留兰香 L6OH 蛋白 L6OH protein of *M. spicata*; MgCYP71D94: 苏格兰薄荷 CYP71D94 蛋白 CYP71D94 protein of *M. gracilis*; MpL6OH: 椒样薄荷 L6OH 蛋白 L6OH protein of *M. piperita*; MhL6OH: 薄荷 L6OH 蛋白 L6OH protein of *M. haplocalyx* Briq. 分支处百分数表示重复检验 1 000 次的靴带值 Percentages at the branches indicate bootstrap values for checking 1 000 replications.

图 6 薄荷 *MhL6OH* 蛋白与其他植物 CYP71 家族 D 亚家族蛋白的氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis on amino acid sequences of *MhL6OH* protein of *Mentha haplocalyx* Briq. and proteins of D subfamily of CYP71 family of other species

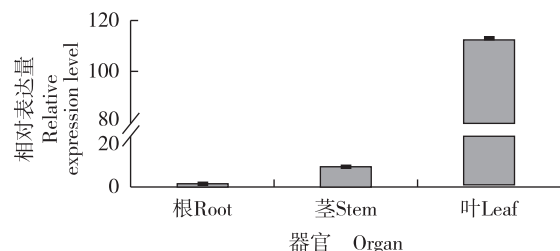


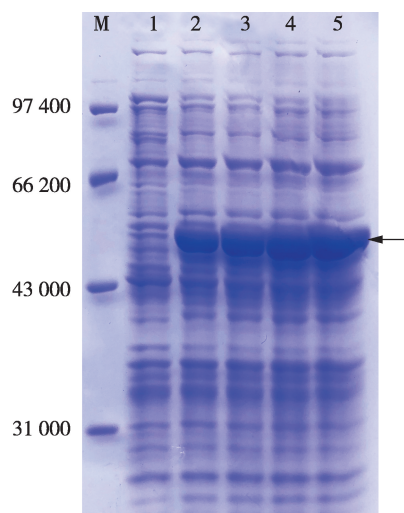
图 7 薄荷不同器官中 *MhL6OH* 基因的相对表达量

Fig. 7 Relative expression level of *MhL6OH* gene in different organs of *Mentha haplocalyx* Briq.

次之,在根中最低;并且,该基因在叶中的相对表达量远高于其在茎和根中的相对表达量。

2.4 原核表达分析

SDS-PAGE 电泳检测结果(图 8)表明:经 IPTG 诱导后,在理论相对分子质量 60 000 附近有 1 条明显的条带,该蛋白质大小与目的蛋白 *MhL6OH* 的理论相对分子质量相符;在诱导 1 h 即可大量表达,且随着诱导时间延长,该蛋白质的表达量逐渐增大。



M: 蛋白质标记 Protein marker; 1-5: 分别表示诱导 0、1、2、3 和 4 h Indicating induced for 0, 1, 2, 3, and 4 h, respectively. 箭头示 *MhL6OH* 蛋白条带 Arrow indicates *MhL6OH* protein band.

图 8 不同诱导时间薄荷 *MhL6OH* 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig. 8 SDS-PAGE electrophoresis pattern of *MhL6OH* protein of *Mentha haplocalyx* Briq. at different induction times

3 讨论和结论

L6OH 蛋白能够催化柠檬烯发生羟基化反应,是薄荷属植物精油合成途径中的一个重要酶。目前,已经在部分薄荷属植物中克隆到编码 L6OH 蛋白的基因^[18-19],其 CDS 长度为 1 485~1 491 bp,且编码的蛋白质均属于细胞色素 P450 超家族 CYP71 家族的 D 亚家族。本研究克隆到的薄荷 *MhL6OH* 基因 CDS 全长 1 479 bp,含有保守的细胞色素 P450 结构域,也属于 CYP71 家族的 D 亚家族。

不同薄荷属植物的精油组成差异很大,L6OH 蛋白催化活性差异是造成薄荷属植物精油组成差异的重要原因^[11]。底物识别位点对 L6OH 蛋白的催化活性具有重要作用,留兰香 *MsL6OH* 蛋白的底物识别位

点中单个氨基酸的变化就能改变其催化活性^[20]。薄荷 *MhL6OH* 蛋白与椒样薄荷 *MpL6OH* 蛋白的底物识别位点高度相似,仅分别在 *SRS1* 和 *SRS4* 序列上存在 1 个氨基酸差异,说明二者具有相似的底物识别特异性。薄荷精油的主要成分为薄荷醇^[4],该成分与椒样薄荷中的薄荷酮为同一类型的成分,据此推测 *MhL6OH* 蛋白和 *MpL6OH* 蛋白底物识别位点的特异性导致其催化柠檬烯 6-羟化反应的活性降低,致使薄荷和椒样薄荷精油中的香芹酮含量很低;并且, *L3OH* 蛋白催化柠檬烯 3-羟化反应是薄荷和椒样薄荷的主要反应,导致薄荷醇和薄荷酮累积。

Wang^[21]发现,薄荷精油主要在腺毛中合成和储存,而腺毛主要分布在叶表面,说明薄荷精油主要在叶中积累;Ahkami 等^[11]发现,薄荷属植物精油合成途径的相关基因均可在腺毛中表达。本研究结果表明:*MhL6OH* 基因在薄荷的根、茎和叶中均可表达,且该基因在叶中的表达水平远高于茎和根,可见薄荷 *MhL6OH* 基因的组织表达模式与其精油分布一致。

参考文献:

- [1] 李维林,梁呈元.薄荷属植物研究与利用[M].南京:江苏凤凰科学技术出版社,2018:1-2.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:377.
- [3] 梁呈元,李维林,张涵庆,等.薄荷化学成分及其药理作用研究进展[J].中国野生植物资源,2003,22(3):9-12.
- [4] YU X, LIANG C, FANG H, et al. Variation of trichome morphology and essential oil composition of seven *Mentha* species [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2018, 79: 30-36.
- [5] LIANG C Y, LI W L, XIA B, et al. Chemical composition of essential oils of two *Mentha* species [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2010, 46: 656-657.
- [6] LIANG C Y, LI W L, LIU Y, et al. Essential oil composition of *Mentha crispata* [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2012, 48: 1089-1090.
- [7] TURNER G W, CROTEAU R. Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136: 4215-4227.
- [8] CROTEAU R B, DAVIS E M, RINGER K L, et al. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics [J]. *Naturwissenschaften*, 2005, 92: 562-577.
- [9] COLBY S M, ALONSO W R, KATAHIRA E J, et al. 4S-Limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*): cDNA isolation, characterization and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 23016-23024.
- [10] LUPIEN S, KARP F, WILDUNG M, et al. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase [J]. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 1999, 368: 181-192.
- [11] AHKAMI A, JOHNSON S R, SRIVIDYA N, et al. Multiple levels of regulation determine monoterpenoid essential oil compositional variation in the mint family [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8: 188-191.
- [12] KARP F, MIHALIAK C A, HARRIS J L, et al. Monoterpene biosynthesis: specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1990, 276: 219-226.
- [13] ALZHAIRY A M. BioEdit: an important software for molecular biology [J]. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2011, 2: 60-61.
- [14] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 596-1599.
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [16] CARRARO U, CATANI C. A sensitive SDS-PAGE method separating myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscles reveals the heterogenous nature of the embryonic myosin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1983, 116: 793-802.
- [17] NELSON D R. Cytochrome P450 and the individuality of species [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 369: 1-10.
- [18] WÜST M, CROTEAU R B. Hydroxylation of specifically deuterated limonene enantiomers by cytochrome P450 limonene-6-hydroxylase reveals the mechanism of multiple product formation [J]. *Biochemistry*, 2002, 41: 1820-1827.
- [19] BERTEA C, SCHALK M, MAU C J D, et al. Molecular evaluation of a spearmint mutant altered in the expression of limonene hydroxylases that direct essential oil monoterpene biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 1203-1211.
- [20] SCHALK M, CROTEAU R. A single amino acid substitution (F363I) converts the regiochemistry of the spearmint (-)-limonene hydroxylase from a C6- to a C3-hydroxylase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97: 11948-11953.
- [21] WANG G. Recent progress in secondary metabolism of plant glandular trichomes [J]. *Plant Biotechnology*, 2014, 31: 353-361.

(责任编辑:佟金凤)