



姜黄倍半萜合酶基因 *C1FLDH* 的克隆和原核表达分析

林洪铭, 温思琦, 李花, 江民超, 刘建福, 于海玲, 王明元, 王奇志

引用本文:

林洪铭, 温思琦, 李花, 等. 姜黄倍半萜合酶基因 *C1FLDH* 的克隆和原核表达分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2026, 34(3): 337–345.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.5010>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

铁皮石斛 *DoSMT2* 基因的克隆与表达分析

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591–598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

三角梅 *cDOPA 5GT* 基因的克隆和光照对其表达的影响

Cloning of Cyclo-DOPA-5-glucosyltransferase Gene from *Bougainvillea glabra* and Effect of Illumination on Its Expression

热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 75–81 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4233>

姜黄地上部分化学成分的研究

Chemical Constituents from Aerial Parts of *Curcuma longa*

热带亚热带植物学报. 2017, 25(1): 87–92 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3604>

升振山姜茎的黄酮类成分

Flavonoids from the Stems of *Alpinia hainanensis* 'Shengzhen'

热带亚热带植物学报. 2017, 25(5): 517–522 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3736>

青花菜 *BoSCL3* 基因的克隆和渍水胁迫下的表达特征分析

Cloning *BoSCL3* Gene from *Brassica oleracea* var. *italica* and Expression Analysis under Waterlogging Stress

热带亚热带植物学报. 2021, 29(2): 195–200 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4263>

向下翻页, 浏览PDF全文

姜黄倍半萜合酶基因 *CiFLDH* 的克隆和原核表达分析

林洪铭, 温思琦, 李花, 江民超, 刘建福*, 于海玲, 王明元, 王奇志

(华侨大学园艺科学与工程研究所, 福建 厦门 361021)

摘要: 姜黄倍半萜合酶法尼醇脱氢酶基因(*CiFLDH*)是萜类化合物合成途径中的关键限速酶。为探讨提高姜黄萜烯类化合物产量, 该研究通过同源克隆获得 *CiFLDH* 的 cDNA 序列, 其开放阅读框(ORF)为 855 bp, 编码 295 个氨基酸。生物信息学分析表明, *CiFLDH* 蛋白的相对分子量为 31 kDa, 等电点为 6.79, 为脂溶性疏水中性蛋白。构建 pCE32a-*FLDH* 原核表达载体, 并在大肠杆菌 DH5 α 中进行表达分析, 重组菌株的 SDS-PAGE 电泳检测结果表明目的蛋白大小为 37 kDa。GC-MS 分析表明, *CiFLDH* 蛋白可能催化 3,5-二甲氧基苯酚生成[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮,6H-3-(苯甲基)-吡咯。这为深入理解姜黄萜类化合物合成的调控机制提供了新的视角, 也为通过基因工程手段提高姜黄萜烯类化合物产量奠定基础。

关键词: 姜黄; 法尼醇脱氢酶基因; 生物信息学; 萜烯合酶; 原核表达

doi: 10.11926/jtsb.5010 CSTR: 32235.14.jtsb.5010

Cloning and Prokaryotic Expression Analysis of Sesquiterpene Synthase Gene *CiFLDH* from *Curcuma longa*

LIN Hongming, WEN Siqi, LI Hua, JIANG Minchao, LIU Jianfu*, YU Hailing, WANG Mingyuan, WANG Qizhi

(Institute of Horticulture Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China)

Abstract: The farnesol dehydrogenase gene (*CiFLDH*) of *Curcuma longa* is a key rate-limiting enzyme in the terpene compound synthesis pathway. To explore the improvement of terpene compound production in *C. longa*, the cDNA sequence of *CiFLDH* was obtained through homologous cloning. The open reading frame (ORF) of *CiFLDH* was 855 bp, encoding 295 amino acids. Bioinformatics analysis indicated that the relative molecular mass of *CiFLDH* protein was 31 kDa, with an isoelectric point of 6.79, and it was a liposoluble, hydrophobic and neutral protein. The pCE32a-*FLDH* prokaryotic expression vector was constructed and expressed in *Escherichia coli* DH5 α . The SDS-PAGE electrophoresis results of the recombinant strain showed that the size of the target protein was 37 kDa. GC-MS analysis indicated that the *CiFLDH* protein might catalyze 3,5-dimethoxyphenol to generate [1,2-a]pyrazine-1,4-dione, 6H-3-(benzyl)-pyrrole. These would provide a new perspective for in-depth understanding of the regulatory mechanism of curcuminoid terpene synthesis and lay a foundation for increasing the production of curcuminoid terpene compounds through genetic engineering.

Key words: *Curcuma longa*; Farnesol dehydrogenase gene; Bioinformatics; Terpene synthase; Prokaryotic expression

姜黄(*Curcuma longa*)为热带和亚热带的姜科(Zingiberaceae)多年生草本植物, 其根茎可同时作为

中草药和药膳食材使用, 其药效成分包含属于酚类的姜黄素和萜烯类的挥发油^[1]。目前对姜黄挥发油

收稿日期: 2025-02-13 接受日期: 2025-04-02

基金项目: 福建省科技计划项目(2024N3007)资助

This work was supported by the Project for Science and Technology Plan in Fujian (Grant No. 2024N3007).

作者简介: 林洪铭(2002年生), 男, 硕士研究生, 主要从事药用植物代谢工程研究。E-mail: 1445572931@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: 907153549@qq.com

的研究主要集中在姜黄挥发油成分分析,姜黄挥发油的化学成分绝大多数为倍半萜类、少数为单萜类,主要成分包括 α -姜黄酮、 β -姜黄酮、芳姜黄酮、姜烯、 α -姜黄烯、 β -倍半水芹烯、莰术二酮和吉马烯等^[2-3]。国内外已有大量研究证明倍半萜具有较高的利用价值,具有较强的香气和生物活性,例如 α -法尼烯、法尼醇、石竹烯等是重要的香料^[4-5];小白菊内酯、木香烯内酯、愈创木烷倍半萜等倍半萜具有消炎、抗菌、镇痛以及抗肿瘤等生物活性^[6-7]。

目前在姜科植物竹根姜(*Zingiber officinale* ‘Zhugenjiang’)^[8]、生姜(*Z. officinale*)^[9]等中已有倍半萜生物合成途径中关键酶基因的相关研究,但有关姜黄倍半萜合酶法尼醇脱氢酶基因的作用尚未有相关研究报道。基于前期的转录组数据筛选得到候选基因倍半萜合酶法尼醇脱氢酶 FLDH,命名为 *CIFLDH*。通过特异性 PCR 扩增克隆得到 *CIFLDH* 基因的开放阅读框,对该基因进行生物信息学分析,并进一步构建重组表达载体进行蛋白原核表达对其功能初步分析,为姜黄萜烯类化合物合成调控机制以及提高萜烯类化合物产量提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为姜黄(*Curcuma longa*)组培苗,由福建省泉州市泉美生物科技有限公司提供。*E. coli* DH5 α 菌株、pET32a 载体、pCE2-TA/Blunt-Zero 载体(包含于试剂盒)购于 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自诺唯赞 Vazym; TA 聚合酶、PCR 反应试剂、T₄-DNA 连接试剂盒、QuickCut EcoR I、QuickCut Sal I 购自 TaKaRa 公司;引物合成及测序在擎科生物科技有限公司完成。

1.2 全长 cDNA 的克隆

从 NCBI 中查找姜黄近缘种 *CIFLDH* 蛋白的保守区设计引物 *FLDH-F*: 5'-CGGAATTCCGATGGG-GAAGGTTTTGGTGACG-3'和 *FLDH-R*: 5'-ACGC-GTCGACTCAGTATCTAATCATCCCAATTCTTT-GAG-3',并在引物上分别添加 *EcoR* I 和 *Sal* I 的酶切位点,用于扩增 *CIFLDH* cDNA 保守区。以反转录合成的姜黄 cDNA 为模板用于目的基因 *FLDH* 的 PCR 扩增,取适量产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,对目的条带进行纯化和胶回收,将胶回收产物与 PCE2 载体连接,并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态

细胞,涂布到含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体平板上,37 °C 培养 12~16 h,形成单菌落。随后挑取阳性单菌落进行菌液 PCR 检测,将检测结果阳性克隆的菌液送至擎科生物科技有限公司进行测序。

1.3 生物信息学分析

采用 ExPASy ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析测序成功后的 *CIFLDH* 基因编码蛋白质的基本理化特性;采用 InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>)分析 *CIFLDH* 蛋白的保守结构;采用 SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html)预测 *CIFLDH* 蛋白的二级结构;采用 SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测 *CIFLDH* 蛋白的三维结构;采用 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)和 SignalP 4.1 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)分析其跨膜结构域和信号肽。利用 DNAMAN 软件对测序结果进行比对以及 *CIFLDH* 与其他 FLDH 蛋白氨基酸序列进行多重比对;使用 MEGA 7.0 软件对 *CIFLDH* 与其他物种的 FLDH 蛋白氨基酸同源序列构建进化树。

1.4 *CIFLDH* 基因的原核表达

目的基因片段与原核表达载体 pET32a 使用 T₄ DNA Ligation Kit 试剂盒连接,将连接好的产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,接种到 LB 固体培养基上(卡那霉素或氨苄霉素抗性),挑取单菌落进行菌液 PCR 验证。菌液接种到含有 Amp 的 LB 液体培养基中,在 18 °C,180 r/min 下培养 16 h,同时设置只有 DH5 α 的阴性对照,以及在 37 °C,200 r/min 下培养的阳性对照。培养 16 h 后将菌液装于冻存管中,以 2 348 $\times$ g,4 °C 离心 20 min,弃上清液,收集菌体,使用 Tris-HCl (pH 7.5)缓冲液冲洗菌体沉淀 2 次,再用 15 mL 缓冲液重悬细胞沉淀,在 N&DN 系列触摸式超声波细胞粉碎机中破碎,程序设置为 75%功率(1 000W),超声 2 s,停 4 s,总破碎时间 20 min。破碎后的细胞转移至 100 mL 冻存管中,4 °C,11 363 $\times$ g 离心 35 min,上清液转移至新的 50 mL 离心管中,并向沉淀中加入 15 mL 缓冲液,涡旋震荡混匀,转移至新的 50 mL 离心管中。取 2.5 μ L 上样缓冲液加入新的 PCR 小管中,再分别加入 10 μ L 上清蛋白和沉淀蛋白,沸水浴 5 min 后冷却至室温,瞬时离心 15 s,进行 SDS-PAGE 电泳,观察不同处理对 FLDH 蛋白表达情况的影响。

1.5 GC-MS 成分分析

按照重组菌液:乙酸乙酯=1:1 的比例混合,混合均匀后进行萃取,将萃取液转移至旋转烧瓶,旋转蒸发至乙酸乙酯全部挥发完,旋转烧瓶中加入 5 mL 无水甲醇溶解,取 1 mL 溶解液转移至色谱进样小瓶中,进行 GC-MS 分析。气相色谱条件:使用配备有 HP-5ms 的石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)的气相色谱质谱联用仪(Agilent 7080B-5977A),柱温 70 °C 保持 1 min,然后以 20 °C/min 升温到 130 °C,再以 3 °C/min 升温到 180 °C,最后以 20 °C/min 升温到 220 °C 并保持 5 min。氦气为载气,流速为 1.0 mL/min,进样体积设置为 1 μL,分流比为 30:1,分流流量为 30 mL/min。质谱条件:电离方式为 EI 源,电子能量为 70 eV,离子源温度为 220 °C,质量扫描范围为 45~700 amu。基于计算机自动对比标

准普库 NIST 11 的检索结果,结合文献数据和标准图谱以及相对保留时间进行化学成分的比较鉴定,采用色谱峰面积归一化法,计算各组分的百分比含量。

2 结果和分析

2.1 *CIFLDH* 基因克隆

以姜黄 cDNA 为模板,进行目的基因的 PCR 扩增,PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见 *CIFLDH* 条带大小约为 900 bp,与目的基因大小一致(图 1)。基于姜黄转录组数据获得 *CIFLDH* 基因的 cDNA 序列,利用 DNAMAN 软件结合 NCBI ORF Finder 对 *CIFLDH* 基因 cDNA 序列进行分析,开放阅读框 ORF 为 885 bp,编码 294 个氨基酸(图 2)。结果表明 *CIFLDH* 目的基因克隆成功。

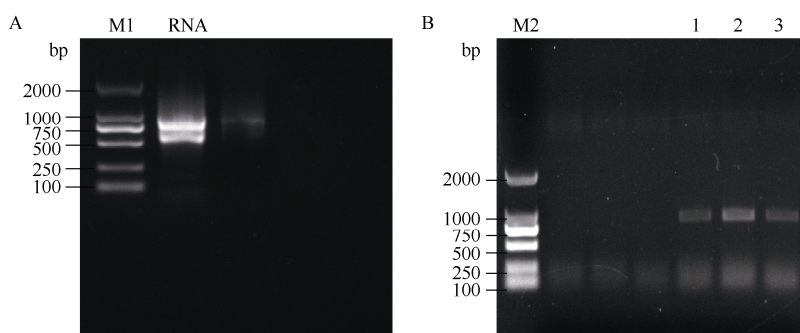


图 1 RNA 凝胶电泳(A)和 *FLDH* 基因克隆(B)。M1: RNA Marker; M2: DNA Marker; 1~3: *FLDH* 扩增产物。

Fig. 1 RNA gel electrophoresis (A) and *FLDH* gene cloning (B). M1: RNA Marker; M2: DNA Marker; 1~3: PCR product of *FLDH*.

```

1 ATGGGGAAGGTTTGGTGACGGGTGCTTCGGGCTTCTCGGCGGCGCCTCTGCCACCGGCTCCTTGCTGAGGGAAACGCGTATGTGCTTCGTGCGGCGGAGCAGCGACCTCAGCTCC 120
1 M G K V L V T G A S G F L G G R L C H R L L A E G N A V C A F V R R S S D L S S 40
121 CTGCCCCCTCTCGCACCCCGCGCTTGAGCTCGCCTACGGGACGTTACCGACCTACCCCTCTCTCGTGATGCCCTCCAGGGCTGTGACGCCCTATTCATACCGCTCGCTCGAGCCC 240
41 L P L S H P A L E L A Y G D V T D L P S L V D A L Q G C D A L F H T A A L V E P 80
241 TGGCTGCCGACTCTTCCATATTCTTCAGTAAATGTGGGAGGTCTACAGAATGTGTCGAGCAATTCATGAAACAAAGACACTGAAGAAGATTATATACATCATCCTTTTCGCT 360
81 W L P D S S I F F T V N V G G L Q N V L R A F H E T K T L K K I I Y T S S F F A 120
361 CTCGGTCCAAGTATGCTACATTCAGATGAGAAACAGATACATCAAGGACAGACATTTGCACAGAATATGAAAAGTCTAAAGCTGTTCAGATAAAATTCATTGCAAGCTGCAGCT 480
121 L G P T D G Y I A D E K Q I H Q G Q T F C T E Y E K S K A V A D K I A L Q A A A 160
481 GATGGGACACCAATTGTCTTCTTTACCCAGGAGTATCTATGGTTCCGGGAACTTACAGCTGGAATGTATTGCACGAATCTGATTGAACGTTTAAATGGGAGGCTGCCTGGTTAT 600
161 D G T P I V L L Y P G V I Y G S G K L T A G N V I A R I L I E R F N G R L P G Y 200
601 ATTGGTGGTGGAAATGATAGGGAATCACTTTGCCATGTTGAAGATGTGGTCAGTGGACATTTGCAGCTATGCATAATGGGCGACTAGTGAACGCTACTTGCCTACTGGAGAAAATGTA 720
201 I G G G N D R E S L C H V E D V V S G H I A A M H N G R L G E R Y L L T G E N V 240
721 TCACCTTAATCAAGCTTTGACAAGGCTGCAGCCATCACCATAACAAGCAAGCCATTTTCCACATCCCTTGCGCGTAATAGAAAATCTATGGCTTTATATCTGGTTTCTTTCTCCAATC 840
241 S L N Q V F D K A A A I T I T S K P F F H I P L A V I E I Y G F I S G F F S P I 280
841 ACAGGAAAGCTCCACTCATCAGCTACCCGAATGTGGAGGGGTGA
281 T G K L H S S A T R M W R G *

```

图 2 *CIFLDH* 基因核苷酸序列及编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *CIFLDH* gene and encoded amino acid sequence

2.2 *CIFLDH* 生物信息学分析

氨基酸分析 利用在线软件 ExPASy ProtParam tool 对 *CIFLDH* 基因编码蛋白进行理化性质分析。

预测 *CIFLDH* 蛋白的分子式为 $C_{1430}H_{2239}N_{383}O_{410}S_8$, 分子量 31 kDa, 等电点 6.79, 不稳定系数为 34.71, 脂肪族指数为 99.56, 氨基酸组成见表 1; 疏水性蛋

白占比较大,总平均亲水指数(GRAVY)为 0.186,初步推测 *CIFLDH* 基因编码的蛋白为较稳定的脂溶性疏水中性蛋白(图 3)。

表 1 *CIFLDH* 蛋白的氨基酸组成分析

Table 1 Amino acid composition analysis of <i>CIFLDH</i> protein					
氨基酸 Amino acid	数量 Number	%	氨基酸 Amino acid	数量 Number	%
Ala	28	9.5	Leu	33	11.2
Arg	13	4.4	Lys	12	4.1
Asn	9	3.1	Met	3	1.0
Asp	13	4.4	Phe	16	5.4
Cys	5	1.7	Pro	12	4.1
Gln	7	2.4	Ser	21	7.1
Glu	13	4.4	Thr	17	5.8
Gly	31	10.5	Trp	2	0.7
His	10	3.4	Tyr	9	3.1
Ile	20	6.8	Val	20	6.8

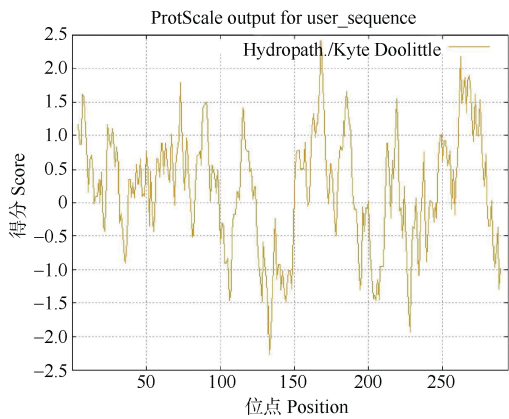


图 3 *CIFLDH* 蛋白疏水性分析
Fig. 3 Hydropobicity analysis of *CIFLDH* protein

跨膜结构域 SignalP 6.0 分析表明,*CIFLDH* 蛋白无信号肽(图 4: A)。图 4: B 中 Transmembrane

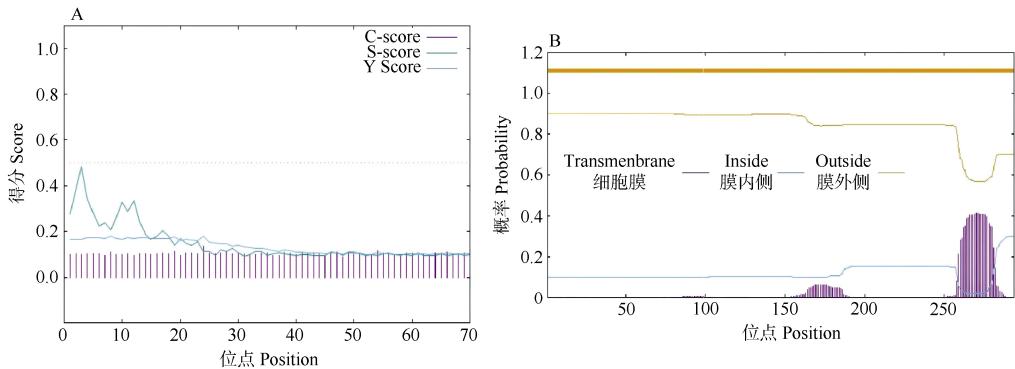


图 4 *CIFLDH* 蛋白的跨膜结构域分析。A: 信号肽; B: 跨膜结构域。
Fig. 4 Transmembrane domain analysis of *CIFLDH* protein. A: Signal peptide; B: Transmembrane domain.

表示跨膜区,数值越大,表明该氨基酸序列在跨膜区的可能性越大,结果表明 *CIFLDH* 蛋白的 258~281 位氨基酸之间有 1 个典型的跨膜螺旋区。这与其疏水性分析结果一致,说明 *CIFLDH* 蛋白为脂溶性疏水中性蛋白。

***CIFLDH* 蛋白结构** 利用 SOMPA 预测姜黄 *CIFLDH* 蛋白的二级结构中 α -螺旋占 46.13%,延伸链占 13.69%,无规卷曲占 33.04% (图 5: A); 利用 SWISS 网站在线预测 *CIFLDH* 蛋白的三维结构模型,GMQE 为 0.65, QMEAN 为 0.63 $\pm$ 0.5,说明预测结果可信度较高(图 5: B)。

进化树构建 利用 DNAMAN 软件将 *CIFLDH* 蛋白与其他植物同源蛋白氨基酸序列进行比对分析,一致性高达 80.55%,不同颜色代表不同的同源程度,黑色区域代表同源程度高达 100% (图 6); 利用 NCBI 中的 BlastP 在线软件检索 *CIFLDH* 蛋白的同源序列,选择同源性较高的 15 个同源序列利用 MEGA X 软件进行系统进化树分析(图 7),姜黄 *CIFLDH* 蛋白序列与同属植物生姜二氢黄酮醇 4-还原酶蛋白序列(KAG6482557.1)处于同一进化分支,亲缘性最高,可信度高达 100%,生姜二氢黄酮醇-4-还原酶属于还原酶类,这与 *CIFLDH* 蛋白预测结果一致。

2.3 姜黄倍半萜合酶 *CIFLDH* 原核表达

通过 T₄-DNA 连接酶将双酶切后回收的目的基因 *FLDH* 与使用 EcoR I 和 Sal I 酶切的 pET32a 载体连接,并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,通过对培养的菌液进行 PCR 验证(图 8: A),电泳条带明亮,说明 *FLDH* 成功与 pET32a 载体连接; 将 pET32a-*FLDH* 重组菌株进行细胞破碎 SDS-PAGE 电泳(图 8: B),pET32a-*FLDH* 重组菌株诱导的和未诱导的均

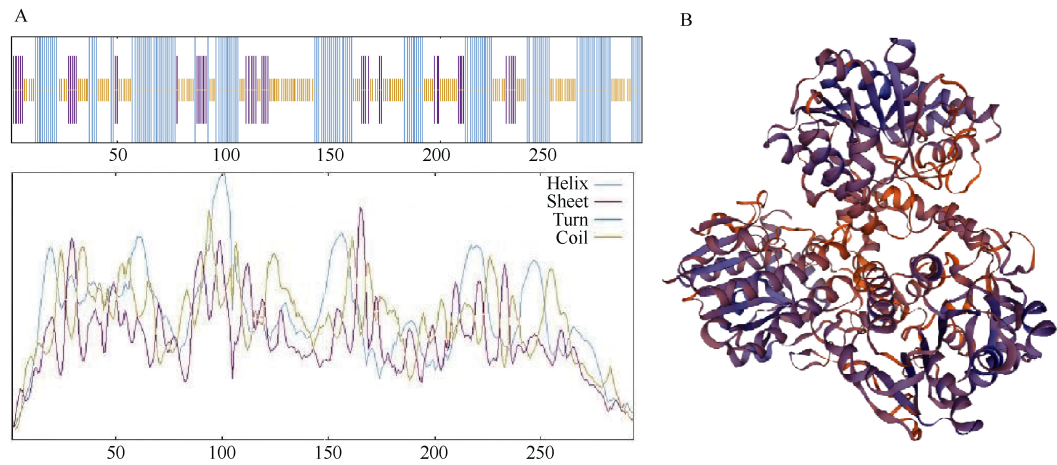


图 5 CIFLDH 蛋白结构预测。A: 二级结构; B: 三级结构。

Fig. 5 Structural prediction of CIFLDH protein. A: Secondary structure; B: Tertiary structure.

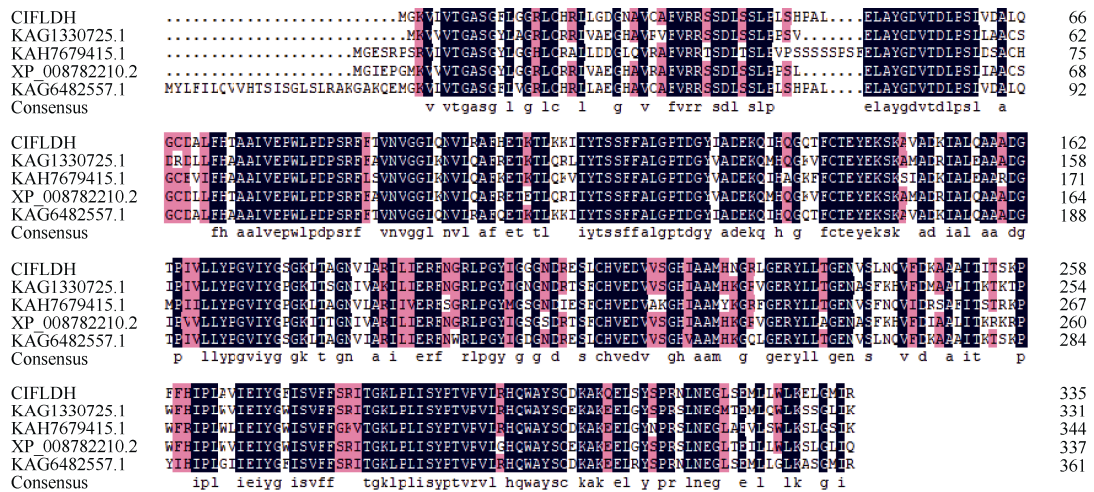


图 6 CIFLDH 与其他植物 FLDH 氨基酸序列比对

Fig. 6 Amino acid sequence alignment of CIFLDH with FLDH of other plants

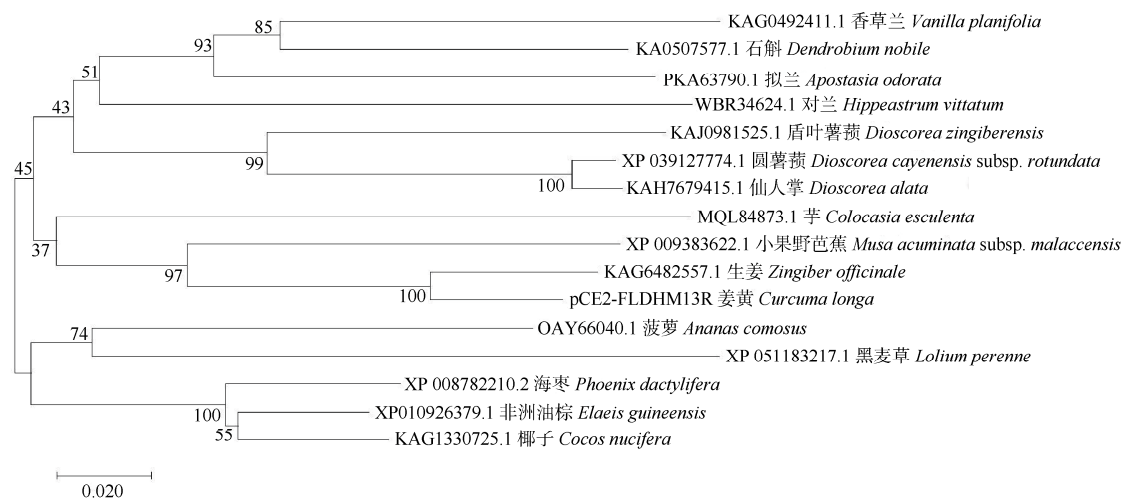


图 7 CIFLDH 蛋白的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of CIFLDH protein

有蛋白质表达, 蛋白质分子量约为 37 kD, 与预测的 31 kD 相近, 符合预期大小。目的蛋白主要在上清液中表达, 而在沉淀中表达较低, 说明 CIFLDH 蛋白是脂溶性分泌蛋白, 与 Pfam-A 预测结果一致。

2.4 pET32a-FLDH 重组大肠杆菌代谢产物分析

从表 2 和图 9 可见, 发酵液代谢产物主要成分为吲哚。与对照相比, 重组大肠杆菌产生[1,2-a]吡

嗪-1,4-二酮,6H-3-(苯甲基)-吡咯和 1,3,4-三甲基尿嘧啶 2 种新物质, 且诱导后的菌液产生的[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮,6H-3-(苯甲基)-吡咯是未诱导菌液的 5.42 倍, 而未诱导菌液中的 3,5-二甲氧基苯酚是诱导后菌液的 9.22 倍, 因此初步推测 FLDH 基因编码的蛋白质主要用于催化 3,5-二甲氧基苯酚生成[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮,6H-3-(苯甲基)-吡咯。

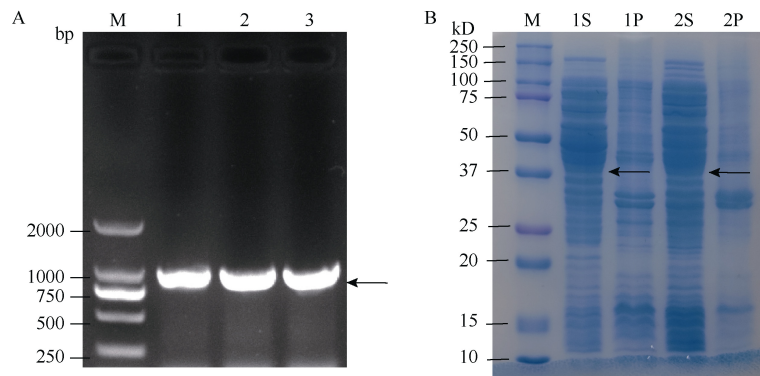


图 8 pET32a-FLDH 菌液的 PCR (A)和 SDS-PAGE (B)电泳验证。A: M: DNA Marker; 1~3: CIFLDH; B: M: 标准蛋白质; 1S: 未诱导上清液目的蛋白; 1P: 未诱导沉淀目的蛋白; 2S: 诱导上清液目的蛋白; 2P: 诱导沉淀目的蛋白。

Fig. 8 PCR (A) and SDS-PAGE (B) electrophoresis verification of pET32a-FLDH bacterial solution. A: M: DNA Marker; 1-3: CIFLDH; B: M: Standard protein; 1S: Uninduced protein in supernatant; 1P: Uninduced protein in precipitation; 2S: Induced protein in supernatant; 2P: Induced precipitation protein.

表 2 pET32a-FLDH 菌液培养物的 GC-MS 分析

Table 2 GC-MS analysis of pET32a-FLDH liquid culture

峰号 No.	化合物 Compound	相对含量 Relative content /%			保留时间 (min) Retention time
		对照 Control	未诱导 Uninduced	诱导 Induced	
1	吲哚 Indole	83.83	64.28	67.81	7.791
2	1,3,4-三甲基尿嘧啶 1,3,4-Trimethyluracil	—	8.00	6.28	19.844
3	2-乙基-1,3,4-三甲基-3-吡唑啉-5-酮 2-Ethyl-1,3,4-trimethyl-3-pyrazolin-5-one	11.48	—	—	22.565
4	3,5-二甲氧基苯酚 3,5-Dimethoxyphenol	4.69	23.42	2.54	23.030
5	[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮,6H-3-(苯甲基)-吡咯 [1,2-a]Pyrazine-1,4-dione,6H-3-(phenmethyl)-pyrrol	—	4.31	23.38	23.384

3 讨论和结论

倍半萜合酶是甲羟戊酸途径合成萜类化合物的催化酶, 是萜类生物合成途径中的重要调控点, 在萜类化合物的合成中发挥极其重要的作用^[10]。自从烟草^[11-13]中的倍半萜合酶基因被克隆, 陆续有包括黄花蒿(*Artemisia annua*)^[14]、冷杉(*Abies fabri*)^[15]、茄科(*Solanaceae*)^[16]和紫芝(*Ganoderma sinense*)^[17]等 30 余种物种倍半萜合酶基因被克隆和研究。目前研究正在不断扩大, 以期在不同植物体内发现更多合成酶, 从而通过基因工程技术调控次生代谢途径

中关键酶基因的表达水平调控萜类化合物和次生代谢物的合成。

本研究成功克隆姜黄甲羟戊酸途径关键酶基因 CIFLDH, 构建 pCE32a-FLDH 原核表达载体, 为后续的基因工程应用奠定基础。通过 NCBI ORF Finder 分析其开放阅读框(ORF)为 885 bp, 编码 294 个氨基酸。通过生物信息学分析, 预测 CIFLDH 蛋白的分子式为 C₁₄₃₀H₂₂₃₉N₃₈₃O₄₁₀S₈, 相对分子量为 31 kDa, 等电点为 6.79, 总亲水性平均系数(GRAVY)为 0.186, 表明该蛋白为较稳定的脂溶性疏水中性蛋白。利用 SOMPA 对姜黄 CIFLDH 蛋白的二级结构的预测分

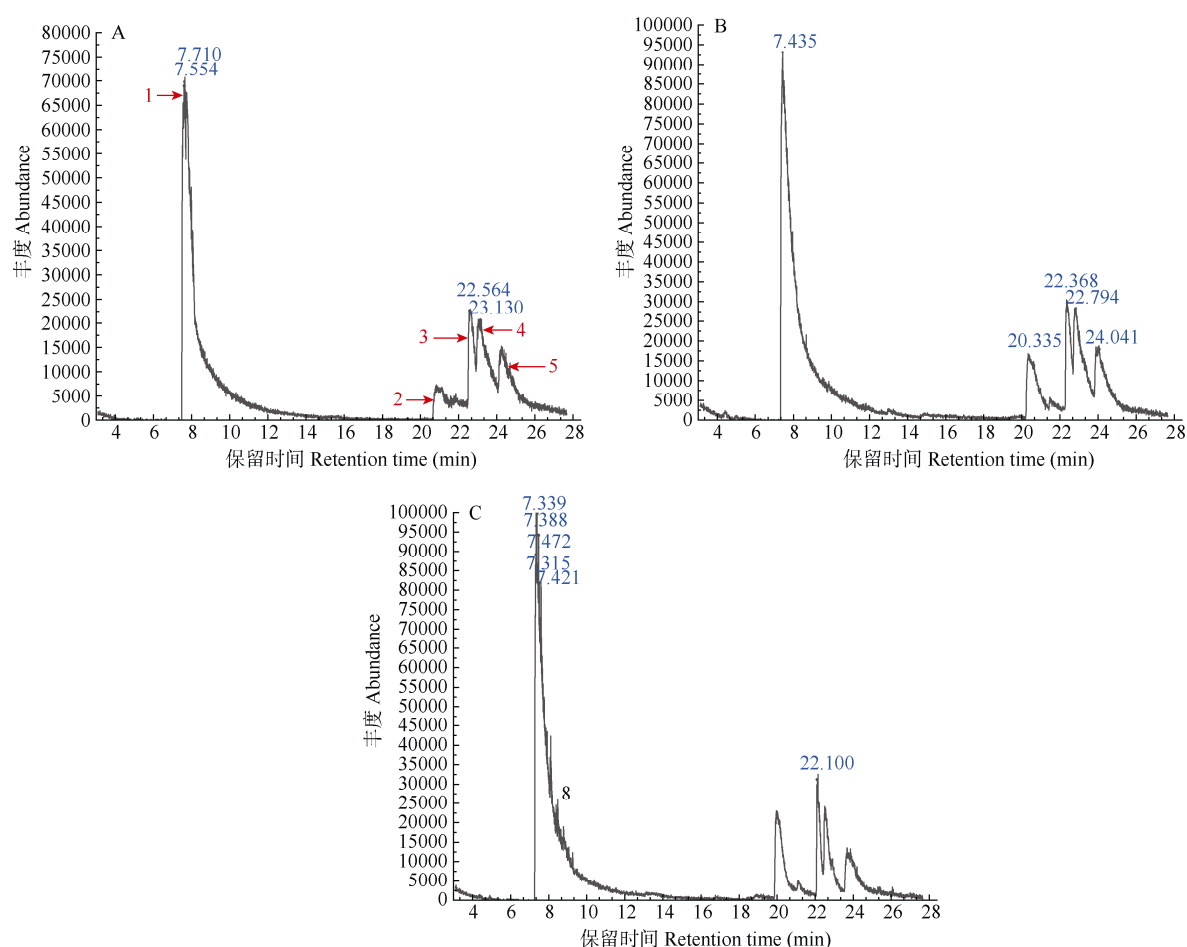


图9 pET32a-*FLDH* 重组大肠杆菌发酵液的 GC-MS 总离子流色谱图。A: 空白对照; B: 未诱导 pET32a-*FLDH* 重组菌液; C: 诱导 pET32a-*FLDH* 重组菌液。1~5 见表 2。

Fig. 9 GC-MS total ion chromatogram of pET32a-*FLDH* recombinant *E. coli* fermentation solution. A: Blank control; B: Uninduced recombinant bacterial solution of pET32a-*FLDH*; C: Induced recombinant bacterial solution of pET32a-*FLDH*. 1~5 see Table 2.

析表明, 二级结构中 α -螺旋占 46.13%, 延伸链占 13.69%, 无规卷曲占 33.04%, 意味该蛋白在不同的生理条件下或与其他分子相互作用时, 其结构可能会发生较大的变化, 既有整体良好的稳定性又有局部可调节的动态性。信号肽分析结果表明, *CIFLDH* 蛋白无信号肽, 跨膜结构域分析表明, *CIFLDH* 蛋白在 258~281 氨基酸之间有 1 个典型的跨膜螺旋区, 与疏水性分析结果一致, *CIFLDH* 蛋白为脂溶性疏水中性蛋白。

根据进化树分析结果, 从种属关系来看, 姜黄与同属植物生姜的关系更近, 而且跟二氢黄酮醇-4-还原酶亲缘关系最近。二氢黄酮醇-4-还原酶也是一种还原酶类, 在还原型辅酶 II (NADPH) 的参与下, 可选择性催化 3 种二氢黄酮醇(DHK、DHQ 和 DHM) 形成相应的不稳定无色花青素^[18]。此外, *CIFLDH*

蛋白与椰子(*Cocos nucifera*)、小果野蕉(*Musa acuminata*)和海枣(*Phoenix dactylifera*)等植物中法尼醇脱氢酶蛋白的亲缘关系较远, 表现为酶蛋白结构中的关键氨基酸残基的差异性, 从而导致它们的催化产物结构存在一定差异, 未来通过 X 射线晶体学或冷冻电镜技术剖析 *CIFLDH* 蛋白的三维结构, 以进一步确定其活性位点和底物结合域的具体结构。Ahmad-Sohdi 等^[19]对柔荑蓼新型 NAD(P)⁺-法尼醇脱氢酶的研究表明, 该酶是由分子量分别为 65 和 70 kDa 亚基组成的异源二聚体, 这与本研究 *CIFLDH* 的分子量(37 kDa)差距较大, 可能是由于编码蛋白的基因序列在不同物种间具有一定差异。Zifruddin 等^[20]研究表明小菜蛾法尼醇脱氢酶 PxFLDH 分子量为 27 kDa, 由具有结构保守的 Rossmann 折叠的单结构域、NAD(P)(H)结合区和结构多样化的 C 末端区组

成,属于短链醇脱氢酶的新亚家族;*PxFLDH* 作为甲羟戊酸途径的关键酶,在倍半萜无环组幼年激素 III 的合成中是一种重要的信号分子,可以将法尼醇氧化成法尼醛和法尼羧酸,这与本研究预测的 *CIFLDH* 结果相一致。Mohammed 等^[21]在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中过表达 *SoFLDH* 基因后通过 GC-MS 代谢产物分析,与野生型丹参(*Salvia miltiorrhiza*)相比,在转基因拟南芥叶片中检测到高表达的各种萜类化合物,因此得出 *SoFLDH* 蛋白负责多种形式的萜烯合成,尤其是二萜烯和倍半萜烯。本研究对 pCE32a-FLDH 重组大肠杆菌发酵液进行 GC-MS 代谢产物分析表明, *CIFLDH* 蛋白可能催化 3,5-二甲氧基苯酚产生[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮,六氢-3-(苯甲基)-吡咯,而前人^[22-23]的研究表明 *FLDH* 基因主要作用于法尼醇氧化成法尼醛和各种萜类化合物的合成,这与本研究法尼醇脱氢酶的催化产物不同,可能是由于发酵时间过短、发酵产物浓度过低,因此还需进一步进行功能验证。

本研究初步确定 *CIFLDH* 基因在姜黄萜烯合成途径中的作用,为姜黄萜烯类化合物的合成机制提供新的依据,对于提高姜黄萜烯类化合物的产量和开发其药用价值具有重要意义。*CIFLDH* 基因在萜烯合成途径中的代谢调控机理还有待进一步研究,可以通过基因敲除或过表达技术分析其在姜黄或其他植物中的功能,从而确定其在萜烯合成等代谢途径中具体的调控机制。

参考文献

- [1] LIU G T, WANG J. Research progress of *Curcuma* active ingredients and nano products in wound [J]. J Liaoning Univ Trad Chin Med, 2020, 22(9): 118–122. [刘国涛, 王军. 中药姜黄在创面治疗中研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(9): 118–122. doi: 10.13194/j.issn.1673-842x.2020.09.028.]
- [2] TIAN S H, DONG C P, WANG C L. Effect of drying technology on curcumin compounds and volatile oil in *Curcuma longa* L. [J]. Food Mach, 2021, 37(5): 169–175. [田思慧, 董春萍, 王车礼. 干燥工艺对姜黄中姜黄素类化合物和挥发油的影响 [J]. 食品与机械, 2021, 37(5): 169–175. doi: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.05.031.]
- [3] GUAN J, LI H, CHEN L, et al. Effect of brassinolide on synthesis of secondary metabolites in turmeric (*Curcuma longa* L.) [J]. SE Hort, 2023, 11(3): 172–176. [管婧, 李花, 陈龙, 等. 油菜素内酯对姜黄次生代谢产物合成的影响 [J]. 东南园艺, 2023, 11(3): 172–176. doi: 10.20023/j.cnki.2095-5774.2023.03.003.]
- [4] HUANG Y, XIE F J, CAO X, et al. Research progress in biosynthesis and regulation of plant terpenoids [J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2021, 35(1): 1799–1808. doi: 10.1080/13102818.2021.2020162.
- [5] BAO T T, KIMANI S, LI Y Q, et al. Allelic variation of terpene synthases drives terpene diversity in the wild species of the *Freesia* genus [J]. Plant Physiol, 2023, 192(3): 2419–2435. doi: 10.1093/plphys/kiad172.
- [6] WAWRZYN G T, QUIN M B, CHOUDHARY S, et al. Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in Basidiomycota [J]. Chem Biol, 2012, 19(6): 772–783. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.05.012.
- [7] XIA J, MA Y J, WANG Y, et al. Deciphering transcriptome profiles of tetraploid *Artemisia annua* plants with high artemisinin content [J]. Plant Physiol Biochem, 2018, 130: 112–126. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.06.018.
- [8] FUJISAWA M, HARADA H, KENMOKU H, et al. Cloning and characterization of a novel gene that encodes (S)- β -bisabolene synthase from ginger, *Zingiber officinale* [J]. Planta, 2010, 232(1): 121–130. doi: 10.1007/s00425-010-1137-6.
- [9] ZHANG S B, TANG H Q, CHEN D B, et al. Cloning and expression of *ZoHMGR* (a key gene for synthesis of spicy substance) in *Zingiber officinale* [J]. Guizhou Agric Sci, 2016, 44(8): 76–79. [张绍彬, 唐海芹, 陈德碧, 等. 生姜辛香物质合成途径关键基因 *ZoHMGR* 的克隆及表达 [J]. 贵州农业科学, 2016, 44(8): 76–79. doi: 10.3969/j.issn.1001-3601.2016.08.019.]
- [10] KOO H J, MCDOWELL E T, MA X Q, et al. Ginger and turmeric expressed sequence tags identify signature genes for rhizome identity and development and the biosynthesis of curcuminoids, gingerols and terpenoids [J]. BMC Plant Biol, 2013, 13: 27. doi: 10.1186/1471-2229-13-27.
- [11] YANG Q, LIU S H, YANG C Q, et al. Cloning and functional characterization of sesquiterpene synthase gene *NtTPS21* in tobacco [J]. Chin Tob Sci, 2022, 43(3): 39–46. [杨晴, 刘少华, 杨长青, 等. 烟草倍半萜合酶基因 *NtTPS21* 的克隆及功能鉴定 [J]. 中国烟草科学, 2022, 43(3): 39–46. doi: 10.13496/j.issn.1007-5119.2022.03.007.]
- [12] CHENG T, ZHANG K, GUO J, et al. Highly efficient biosynthesis of β -caryophyllene with a new sesquiterpene synthase from tobacco [J]. Biotechnol Biofuels Bioprod, 2022, 15(1): 39. doi: 10.1186/s13068-022-02136-8.
- [13] YANG P S, TANG S Y, LIU C B, et al. Three new sesquiterpenes from the stems of *Nicotiana tabacum* and their bioactivities [J]. J Asian Nat Prod Res, 2019, 21(2): 109–116. doi: 10.1080/10286020.2017.1408597.
- [14] XIANG L, HE P, SHU G P, et al. AabHLH112, a bHLH transcription

- factor, positively regulates sesquiterpenes biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 973591. doi: 10.3389/fpls.2022.973591.
- [15] THOMAS A, TILOTTA D C, FRAMPTON J, et al. Sesquiterpene induction by the balsam woolly adelgid (*Adelges piceae*) in putatively resistant fraser fir (*Abies fraseri*) [J]. *Forests*, 2022, 13(5): 716. doi: 10.3390/f13050716.
- [16] TAN J Y, CHENG Y G, WANG J M, et al. Research progress on chemical constituents of sesquiterpenoids from Solanaceae plants and their biological activities [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 2021, 52(16): 5062–5077. [谭金燕, 程艳刚, 王佳敏, 等. 茄科倍半萜类化学成分及其药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(16): 5062–5077. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.031.]
- [17] WEI Q H, WANG Q, CAO R, et al. Study on soluble expression conditions of sesquiterpene synthase GsSTPS2 from *Ganoderma sinense* [J]. *J Tianjin Univ Trad Chin Med*, 2022, 41(6): 780–788. [卫倩鹤, 王齐, 曹瑞, 等. 紫芝倍半萜合酶 GsSTPS2 可溶性表达条件的探索 [J]. *天津中医药大学学报*, 2022, 41(6): 780–788. doi: 10.11656/j.issn.1673-9043.2022.06.19.]
- [18] YU T T, NI X Z, GAO L H, et al. Advances in study of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) genes of higher plants [J]. *Bull Bot Res*, 2018, 38(4): 632–640. [于婷婷, 倪秀珍, 高立宏, 等. 高等植物二氢黄酮醇 4-还原酶基因研究进展 [J]. *植物研究*, 2018, 38(4): 632–640. doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2018.04.020.]
- [19] CHEN R, WEI Q H, LIU Y H, et al. Transcriptome sequencing and functional characterization of new sesquiterpene synthases from *Curcuma wenyujin* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 709: 108986. doi: 10.1016/J.ABB.2021.108986.
- [20] ZIFRUDDIN A N, MOHAMAD-KHALID K A, SUHAIMI S A, et al. Molecular characterization and enzyme inhibition studies of NADP⁺-farnesol dehydrogenase from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021, 85(7): 1628–1638. doi: 10.1093/bbb/zbab072.
- [21] ALI M, NISHAWY E, RAMADAN W A, et al. Molecular characterization of a Novel NAD⁺-dependent farnesol dehydrogenase *SoFLDH* gene involved in sesquiterpenoid synthases from *Salvia officinalis* [J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0269045. doi: 10.1371/journal.pone.0269045.
- [22] SATYAVEANTHAN M V, SUHAIMI S A, NG C L, et al. Purification, biochemical characterisation and bioinformatic analysis of recombinant farnesol dehydrogenase from *Theobroma cacao* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 161: 143–155. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2021.01.050.
- [23] BHANDARI J, FITZPATRICK A H, CROWELL D N. Identification of a novel abscisic acid-regulated farnesol dehydrogenase from *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(3): 1116–1127. doi: 10.1104/pp.110.157784.]