

艾纳香*BbMNR1*基因克隆及生物信息学分析

孔德静*, 梁进丽*, 罗贤红, 孙雯雯, 梁琳, 鞠志刚#

贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2024年1月15日; 录用日期: 2024年3月13日; 发布日期: 2024年3月19日

摘要

艾纳香为贵州十大苗药之一, 具有较高的药用价值, 其萜类化合物可预防虫害、影响花的香味及果实风味。(+)–新薄荷醇脱氢酶(MNR)是一种单萜脱氢酶, 参与单萜物质(+)–新薄荷醇和(+)–异薄荷醇的合成。本文通过RT-PCR技术从艾纳香中克隆到*BbMNR1*基因, 并进行生物信息学分析。结果表明, *BbMNR1*基因完整开放阅读框全长为903 bp, 共编码300个氨基酸。*BbMNR1*序列生物信息学显示, 该蛋白分子量为32.57 KDa, 理论等电点为5.41, 属于非跨膜亲水性稳定蛋白, 定位于细胞质。*BbMNR1*蛋白二级结构中以 α -螺旋为主, 占总结构的47.67%, 与三级结构预测相符。系统进化树分析可得, 艾纳香*BbMNR1*与曼陀罗花(*Datura stramonium*)和辣椒(*Capsicum annuum*)亲缘关系最近。本研究将为进一步研究*BbMNR1*调控萜类化合物生物合成的分子机理奠定基础, 同时也为改善艾纳香的品质提供理论支撑。

关键词

艾纳香, (+)–新薄荷醇脱氢酶基因, 生物信息学, 原核表达

Cloning and Bioinformatics Analysis of *BbMNR1* Gene from *Blumea balsamifera*

Dejing Kong*, Jinli Liang*, Xianhong Luo, Wenwen Sun, Lin Liang, Zhigang Ju#

Pharmacy School, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Jan. 15th, 2024; accepted: Mar. 13th, 2024; published: Mar. 19th, 2024

Abstract

As one of the ten major Miao medicines in Guizhou Province, the terpenoids of the *Blumea balsamifera* have high medicinal value, which can prevent insect pests and fruit flavor. (+)–neomenthol

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 孔德静, 梁进丽, 罗贤红, 孙雯雯, 梁琳, 鞠志刚. 艾纳香 *BbMNR1* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 生物过程, 2024, 14(1): 15-22. DOI: /10.12677/bp.2023.141003

dehydrogenase (*MNR*) is a monoterpene dehydrogenase involved in the synthesis of the monoterpenes (+)-neomenthol and (+)-isomenthol. In this study, *BbMNR1* was cloned by RT-PCR and subjected to bioinformatic analysis. The results showed that the complete open reading frame of the *BbMNR1* gene was 903 bp and encodes 300 amino acids. Bioinformatic analysis showed that the protein was a non-transmembrane hydrophilic stable protein with a molecular weight of 32.57 kDa and a theoretical isoelectric point of 5.41. The secondary structure of *BbMNR1* protein is dominated by α -helix, accounting for 47.67% of the total structure, which is consistent with the prediction of the tertiary structure. Phylogenetic tree analysis showed that *BbMNR10*, *Datura stramonium* and *Capsicum annuum* was closely related. This study will lay a foundation for further research of the molecular mechanism of *BbMNR1* regulating the biosynthesis of terpenoids and also provide theoretical support for improving the quality of *Blumea balsamifera*.

Keywords

Blumea balsamifera, (+)-Neomenthol Dehydrogenase Gene, Bioinformatics, Prokaryotic Expression

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

艾纳香(*Blumea balsamifera*)属菊科(Compositae)艾纳香属(*Blumea*)植物, 多为一年或多年生草本、亚灌木或灌木, 常年有香气, 是贵州十大苗药之一, 也是贵州重点发展的中药材品种之一[1]。艾纳香始载于《本草拾遗》, 其味辛、微苦, 性温, 具有祛风除湿、温中止泻、活血解毒的功效, 可用于治疗风寒感冒、头风痛、风湿痹痛、寒湿泻痢、跌扑伤痛等[1]。艾纳香挥发油具有抗氧化[2]、抗菌[3] [4]、抗病毒[5]等药理作用。随着艾纳香药理作用及化学成分的深入研究, 以艾纳香及其副产品为原料生产的药物逐渐增多[6], 如咽立爽滴丸。王国盼等[7]从艾纳香叶 CO₂ 超临界提取物中共鉴定出 78 种成分, 其中有 5 种萜类衍生物(31.90%)、44 种脂肪族化合物(18.58%)、10 种芳香族化合物(18.50%)、12 种含氮化合物(14.54%)及部分其它成分。此外, 因艾纳香具有独特的香味, 还在日用行业及食品行业中被广泛应用。自 2009 年起, 艾纳香慢慢成为创新药物及化妆品邻域新的研究热点, 对艾纳香专利中各小类下大组统计分析, 发现以未确定结构药物制剂数量最多, 有 361 件, 占比 45.4%; 其次为化妆品或类似的梳妆用配制品, 有 81 件, 占比 10.2% [8]。

新薄荷醇是一种环状单萜类化合物, 是薄荷精油中薄荷醇的立体异构体[9]。因为它的降温作用, 常被用作食品、化妆品和药品的调味剂。研究报告, 新薄荷醇对人表皮样癌(A431)细胞具有较好的抑制作用, 可使 A431 细胞阻滞于 G2/M 期, 亚二倍体细胞增多。还可通过调节不能降解 HA 的透明质酸酶的表达来抑制 A431 细胞的生长, 并且干扰透明质酸酶的结构导致细胞的凋亡。由此通过抑制微管蛋白聚合和透明质酸酶活性来延缓皮肤癌细胞的生长[10]。新薄荷醇脱氢酶(MNR)参与单萜物质的合成, 属于氧化还原酶家族。MNR 酶可催化(-)-薄荷酮、(+)-异薄荷酮转化生成(+)-新薄荷醇及(+)-异薄荷醇[11]。目前, 对艾纳香的研究主要集中在化合物的分离鉴定及药理药效等方面, 对其萜类物质的合成途径尚不明晰[6]。本课题组以艾纳香叶片为实验材料, 对克隆获得到的 *BbMNR* 的基因序列进行生物信息学分析, 并进行体外蛋白的制备, 可为后续功能的验证及萜类物质合成途径的研究提供一定的理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

本研究所用艾纳香(*Blumea balsamifera*)和 Jm109 感受态由本实验室保存。RNA 提取试剂盒为康为世纪生物科技有限公司; DL2000 maker、pMD18-T、PCR 扩增试剂、核酸内切酶和逆转录试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖为北京索莱宝科技有限公司; DNA 纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒为购自天根生化科技(北京)有限公司。

2.2. 实验方法

2.2.1. 艾纳香 *BbMNRI* 基因的克隆

采集 I 期(芽)、II 期(幼叶)、III 期(嫩叶)、IV 期(成熟期)、V 期(衰亡期)新鲜艾纳香叶片提取其 RNA 送北京百迈客生物科技有限公司构建转录组文库, 通过基因注释筛选候选基因。并将 RNA 逆转录为 cDNA, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物(表 1), 以艾纳香 cDNA 为模板, 特异性扩增出目的片段经琼脂糖凝胶回收与 pMD18-T 载体连接, 转入 Jm109 感受态细胞, 通过对单克隆菌落进行 PCR 验证及酶切验证为阳性克隆后, 送生工送生工生物工程(上海)有限公司测序。

Table 1. Primers were used in this study

表 1. 本研究所用引物

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>BbMNRI</i> -F	ACTTTAAGTTCATCGCCTCC
<i>BbMNRI</i> -R	CGTTCATTCAAAGGATGCTATACC

2.2.2. 艾纳香 *BbMNRI* 生物信息学分析软件

运用 DNAMAN 和 MEGA 软件进行多序列比对及系统进化树的构建, 利用生物信息学软件(表 2)对 *BbMNRI* 氨基酸序列蛋白质理化性质、二级结构以及三级结构分析。

Table 2. Bioinformatics analysis software

表 2. 生物信息学分析软件

生物信息学分析 Bioinformatics analysis	软件名称 Software brand	网址 Website
蛋白同源性检索	NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
蛋白理化性质分析	ExPASy-ProParam	https://web.expasy.org/protparam/
跨膜结构分析	TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
信号肽分析	SignalP 5.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/SignalP-5.0
结构域的预测	NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
亚细胞定位	Softberry	http://www.softberry.com/
二级结构	Predictprotein	https://predictprotein.org/visual_results?req_id=\$2y\$10\$jibYqN7hgHw11PuaQG9TuisPphbMBdn8ecnekbXq60HnEH6bW8mi
三级结构	SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/
三级结构评估	SAVES	https://saves.mbi.ucla.edu/

3. 结果与分析

3.1. 艾纳香 *BbMNRI* 基因克隆

本研究基于本课题组前期得到的艾纳香转录组数据, 筛选出五条候选的 MNR 基因, 其中基因 *BbMNRI* (序列号: F01_transcript_29671) 在艾纳香叶片中表达量最高(图 1(A))。以艾纳香总 RNA (图 1(B)) 为模板, 并设计引物, 通过 RT-PCR 技术克隆得到一条大小为 903 bp 基因(图 1(C)), PCR 胶回收产物与 pMD18-T 载体连接, 并转入 Jm109 感受态中。通过菌液扩增(图 1(D))及酶切产物(图 1(E)) 1% 琼脂糖凝胶电泳, 确定为阳性克隆, 将重组质粒送生工生物有限公司测序。测序结果与转录组数据相符, *BbMNRI* 基因开放阅读框(ORF)如(图 1(F)), 菌种-80℃ 保存。

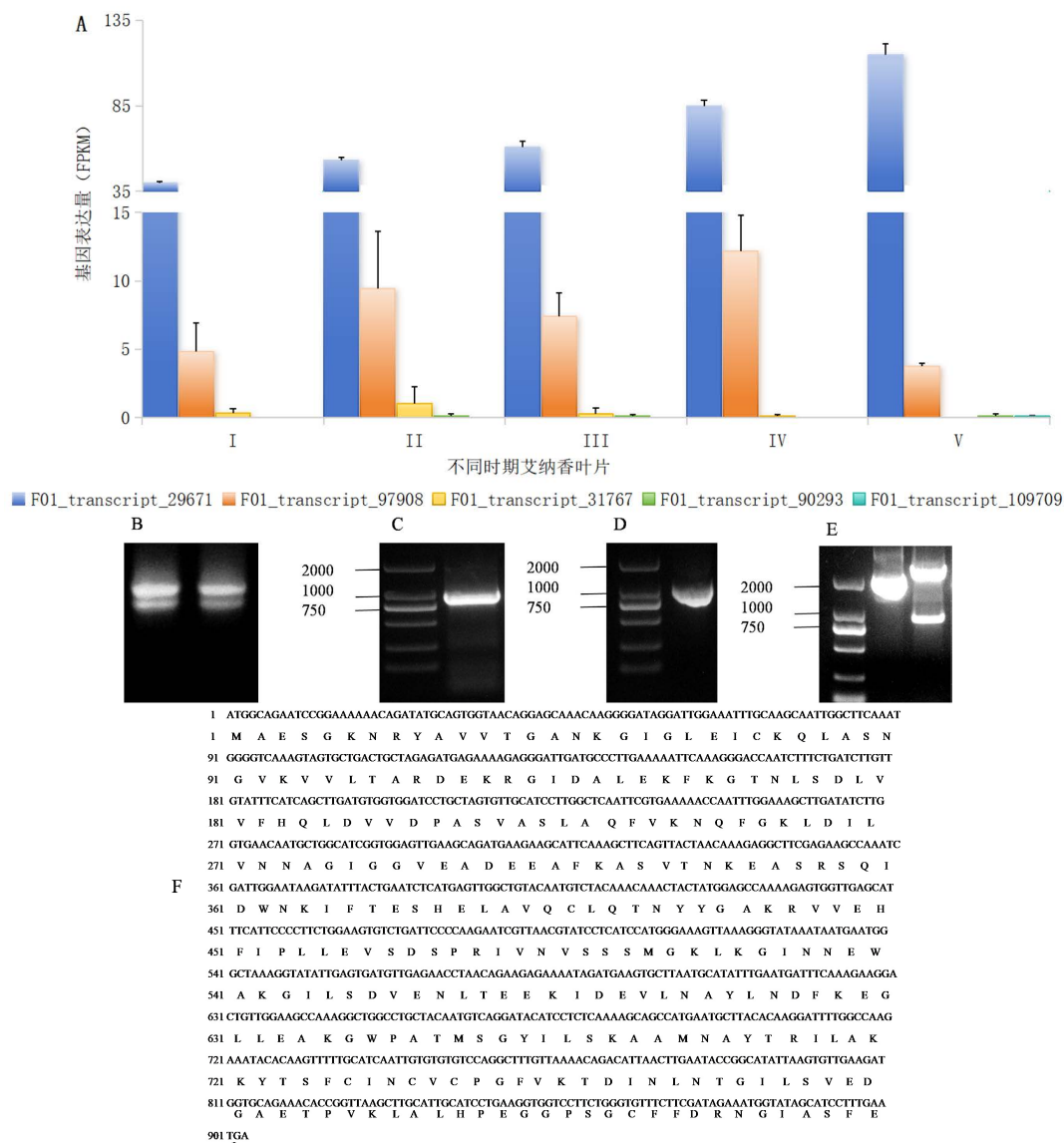


Figure 1. Cloning of *Blumea balsamifera BbMNRI* gene

图 1. 艾纳香 *BbMNRI* 基因克隆

注: M: DL 2000 DNA marker; A: 转录组数据; B: 总 RNA; C: PCR 扩增; D: 琼脂糖凝胶回收产物; E: 酶切验证; F: ORF 序列。

3.2. 艾纳香 *BbMNRI* 系统进化树构建及生物信息学分析

3.2.1. 艾纳香 *BbMNRI* 系统进化树构建

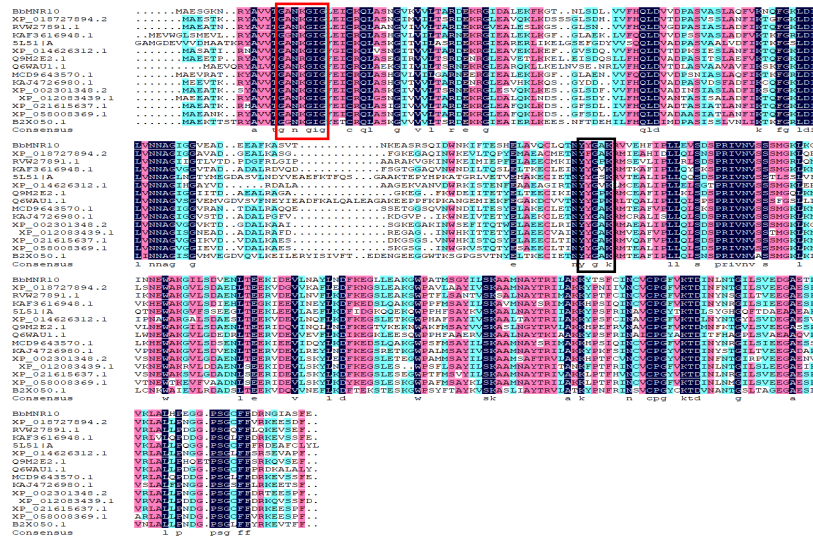


Figure 2. *BbMNRI* and other plant protein polysequences
图 2. 艾纳香 *BbMNRI* 与其他植物蛋白多序列比对

本研究利用 NCBI 在线 Blastp 对 *BbMNRI* 蛋白同源序列比对后发现, *BbMNRI* 基因编码的蛋白序列与其他植物 MNR 序列进行多序列比对, 包括薄荷(*Mentha x piperita*) (5L51.A)、大豆(*Glycine max*) (XP_014626312.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Q9M2E2.1)、辣椒(*Capsicum annuum*) (B2X050.1)、薄荷(*Mentha x piperita*) (Q6WAU1.1)、曼陀罗花(*Datura stramonium*) (MCD9643570.1)、毛果杨(*Populus trichocarpa*) (XP_002301348.2)、麻风树(*Jatropha curcas*) (XP_012083439.1)、大桉(*Eucalyptus grandis*) (XP_018727894)、木薯(*Manihot esculenta*) (XP_021615637.1)、橡胶树(*Hevea brasiliensis*) (XP_058008369.1)、辣椒(*Capsicum annuum*) (KAF3616948.1)、葡萄藤(*Vitis vinifera*) (RVW27891.1)、苦楝(*Melia azedarach*) (KAJ4726980.1) (图 2)。他们均具有经典的短链脱氢酶/还原酶(SDR)活性位点基序 GXXXGXXG (图 2 红色方框)和 YXXXX (图 2 黑色方框), 艾纳香 *BbMNRI* 与曼陀罗花、辣椒相似度分别为 68.33%、67.24%, 可能行使相似的功能。

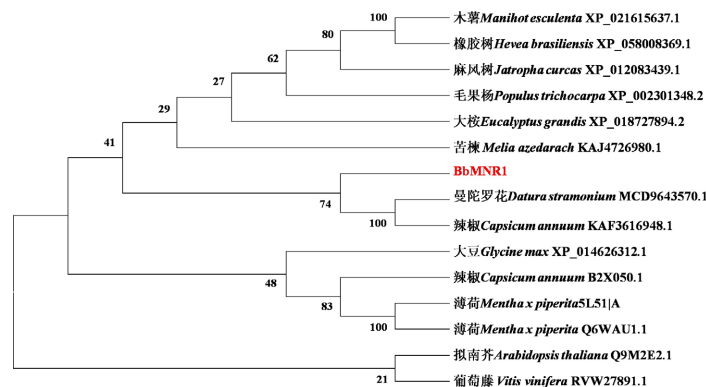


Figure 3. Phylogenetic tree of *BbMNRI* with other homologous proteins
图 3. 艾纳香 *BbMNRI* 和其他同源蛋白的系统进化树

利用 MEGA 软件对得到的 *BbMNR1* 序列进行系统进化树的构建, 采用邻近法构建进化树, 发现艾纳香 *BbMNR1* 与曼陀罗花和辣椒聚为一支(图 3), 说明其亲缘关系较近。

3.2.2. 艾纳香 *BbMNR1* 蛋白的生物信息学分析

本研究运用 ProtParam tool 在线工具对 *BbMNR1* 蛋白序列进行基本理化性质分析, 结果显示, 该蛋白由 300 个氨基酸编码组成, 相对分子质量为 32.57 kDa, 分子式为 $C_{1447}H_{2299}N_{387}O_{446}S_{10}$, 等电点为 5.41, 不稳定系数为 21.94, 平均亲水系数为 -0.112, 脂肪族氨基酸指数为 92.63。NCBI CDD 数据库显示该蛋白具有 card-red-PTCR-like-SDR 结构域, 属于 NADB-Rossmann superfamily (图 4(A))。亲疏水性预测分析显示, 疏水性最强的是第 151、251 位氨基酸残基, 指数为 1.7; 亲水性最强的是第 115 位氨基酸残基, 指数为 -2.2 (图 4(B))。 *BbMNR1* 蛋白不存在跨膜结构域(图 4(C)), 不含信号肽(图 4(D)), 为非分泌蛋白。亚细胞定位预测结果显示, *BbMNR1* 蛋白定位于细胞质。

二级结构预测结果显示, *BbMNR1* 蛋白的二级结构中含 47.67% 的 α -螺旋、28.67% 的无规则卷曲、14.67% 的延伸链、9.00% 的 β -折叠(图 4(E))。运用 SWISS-MODEL 以薄荷新薄荷醇脱氢酶(MpMNR, ID: 5151.1.A)为模板进行同源建模, 对 *BbMNR1* 蛋白的三级结构进行预测(图 4(F)), 结果显示, 该蛋白与模板的同源性为 54.21%; 全局模型质量估计(Global Model Quality Estimation, GMQE)值为 0.79。

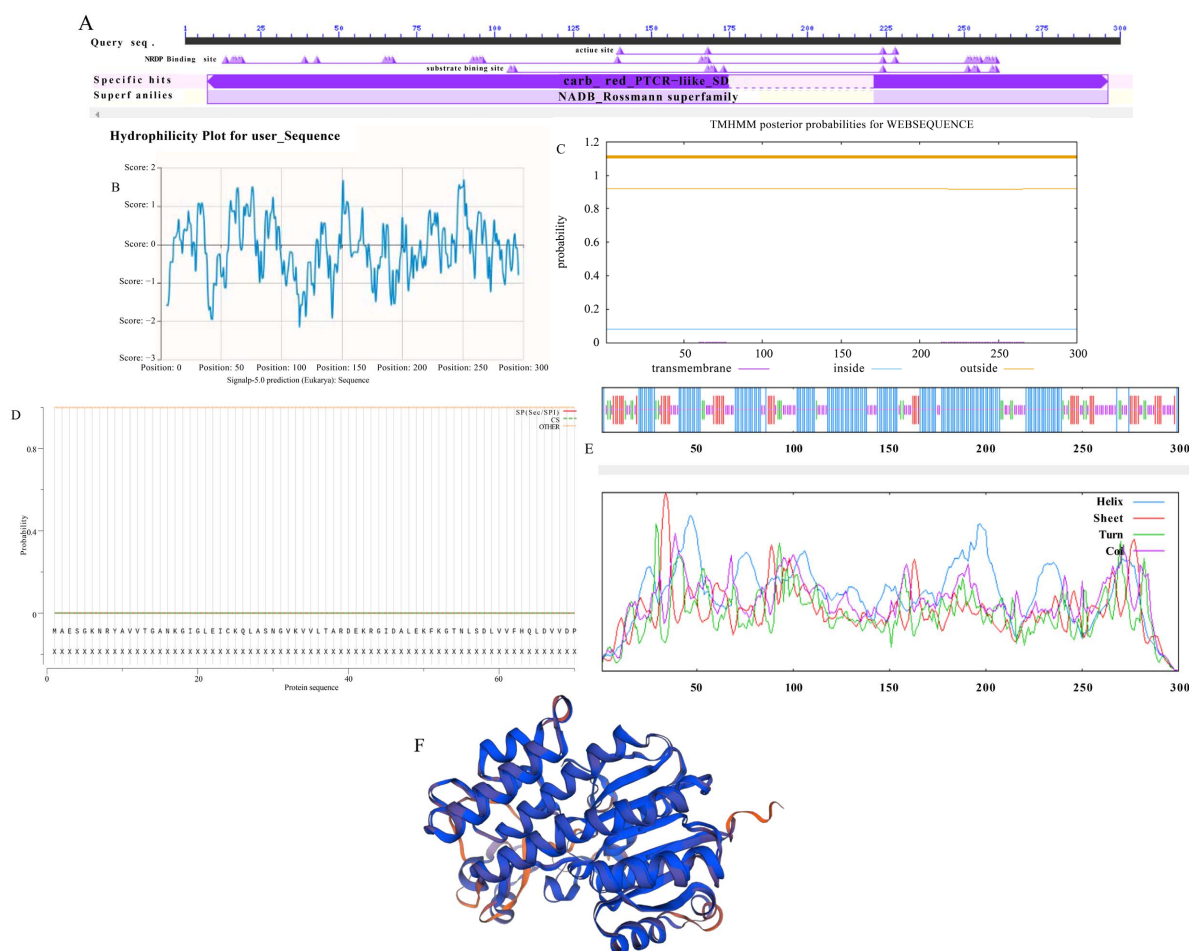


Figure 4. Bioinformatics Analysis

图 4. 生物信息学分析

注: A: 结构域预测; B: 疏水性预测; C: 跨膜结构域预测; D: 信号肽预测; E: 二级结构预测 F: 三级结构预测。

4. 讨论与结论

新薄荷醇是一种环状单萜类化合物, 与薄荷醇具有相似的原子排列及稳定性差异。新薄荷醇脱氢酶基因(MNR)在新薄荷醇的合成途径中起到至关重要的作用, MNR 属于氧化还原酶家族[9]。有研究表明, 新薄荷醇对人表皮样癌 A431 细胞有明显的抑制作用, 其作用机制是阻断细胞周期, 增加亚二倍体细胞的数量, 并影响微管蛋白聚合, 且新薄荷醇的抗增殖潜力相较于薄荷醇更好[10], 这意味着新薄荷醇在抗肿瘤中具有较大的潜力。

早期研究发现, 重组 MNR 酶可将(-)-薄荷酮转化为 95% (-)-(3R)-薄荷醇和 5% (+)-(3S)-新薄荷醇, 将(+)-异薄荷酮转化为 87% (+)-(3S)-新异薄荷醇和 13% (+)-(3S)-异薄荷醇。有研究表明, 与 MMR 相比 MNR 对薄荷酮还原的催化效率低约 2000 倍[11]。由此推测, 新薄荷醇含量少与 MNR 酶催化效率低有极大关系。随着进一步研究, 从桂花花瓣中克隆获得 1 个桂花 Of MNR 基因的 cDNA 全长, 采用 qPCR 技术检测了 OfMNR 在桂花 2 个品种的不同组织和不同花期中的表达量, 发现 OfMNR 在 2 个品种中花瓣的表达量均最高, 预示着 MNR 基因可能和桂花的香味成分的合成有关[12]。

本研究根据艾纳香转录组数据, 克隆得到 903 bp 大小的 *BbMNR1* 基因。并进行生物信息学分析, 结果显示该蛋白为不稳定的亲水性的非分泌蛋白, 且该蛋白具有经典的 SDR 保守结构域, 属于 NADB-Rossmann 超家族。大多数脱氢酶具有至少 2 个结构域, 第一个结构域在序列 N 末端与辅酶(通常是 NAD)结合, 第二个结构域与底物结合。后一个结构域决定底物特异性并包含参与催化的氨基酸[13]。该蛋白二级结构与三级结构预测显示, 其结构中主要为 α -螺旋和无规则卷曲。同时系统进化树分析发现, *BbMNR1* 蛋白与番茄 SITPS40 蛋白同源性较高, 属 TPS-c 亚型。TPS 基因家族包含 TPS-a、b、c、d、e/f、g、h 7 个亚家族, TPS-c 亚家族中主要包含小立碗藓中的 PpCPS/KS 和被子植物、裸子植物中的 CPS 蛋白[13]。此外, 詹亨[14]对艾纳香萜类合酶进行研究, 成功鉴定出 4 个单萜合酶基因和 1 个多产物萜类合酶基因, 进行烟草瞬时表达发现这些基因可在体内产生水芹烯、柠檬烯和 α -松油醇。目前, 已有许多与植物性状有关的基因被克隆出来, 并进行了功能的验证, 之后对 MNR 基因的研究也会更加深入[15][16][17][18]。

基因克隆技术已愈发成熟, 可从动植物及微生物中克隆到具有特定功能的基因, 如猪[19]、肉桂[20]、广藿香[21]和丹参[22]。综上所述, 为了揭示艾纳香中单萜代谢途径, 后续验证该基因的功能研究一方面可从体外酶活性检测进行, 另一方面可构建过表达载体, 通过转化模式植物进行体内代谢物含量测定验证 *BbMNR1* 基因的功能。艾纳香为贵州十大苗药之一, 有重要的药用价值。因此, 研究艾纳香中新薄荷醇脱氢酶对改善艾纳香品质有重要作用, 也可为其他植物 MNR 基因的研究提供思路。

基金项目

本研究由贵中医大创合字(2021) 36 号、贵州省科技厅基础研究项目(黔科合基础[2019] 1019 号)和贵州省“千层次”人才项目(贵中医[ZQ2018004])共同资助。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第五十八卷[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 19.
- [2] 郝文凤, 田玉红, 张倩, 董菲, 周旭凯. 艾纳香与马尾松精油的成分分析及抗氧化研究[J]. 中国调味品, 2021, 46(3): 34-39+44.
- [3] 王鸿发, 胡璇, 于福来, 王凯, 王丹, 陈振夏, 元超. 艾纳香抗植物病原菌活性成分研究[J]. 中国农学通报, 2018, 34(35): 105-110.
- [4] 元超, 舒雪纯, 张影波, 王凯, 谢小丽, 徐子琪, 袁媛. 艾纳香内生真菌抗细菌和炭疽菌的活性研究[J]. 中国农学通报, 2021, 37(23): 38-44.

- [5] 胡永, 段玉书, 苑春茂, 黄烈军, 李霞, 顾玮, 郝小江. 艾纳香中 1 个新倍半萜内酯及其细胞毒活性研究[J]. 中草药, 2019, 50(14): 3274-3278.
- [6] 范东生, 李玲, 王可可, 胡玉洁, 黄健, 周婵媛, 张文龙. 艾纳香化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中国药房, 2022, 33(10): 1274-1280.
- [7] 王国盼, 杨达, 陆安静, 等. GC-MS 分析艾纳香叶超临界提取物中的挥发性成分[J]. 遵义医科大学学报, 2023, 46(4): 415-423.
- [8] 谭道鹏, 郭振虎, 何莉, 等. 艾纳香相关专利信息分析[J]. 中国科技信息, 2021(20): 25-29.
- [9] Croteau, R.B., Davis, E.M., Ringer, K.L. and Wildung, M.R. (2005) (-)-Menthol Biosynthesis and Molecular Genetics. *Naturwissenschaften*, **92**, 562-577. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0055-0>
- [10] Fatima, K., Masood, N., Ahmad, W.Z., Meena, A. and Luqman, S. (2021) Neomenthol Prevents the Proliferation of Skin Cancer Cells by Restraining Tubulin Polymerization and Hyaluronidase Activity. *Journal of Advanced Research*, **34**, 93-107. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.06.003>
- [11] Davis, E.M., Ringer, K.L., McConkey, M.E. and Croteau, R. (2005) Monoterpene Metabolism. Cloning, Expression, and Characterization of Menthone Reductases from Peppermint. *Plant Physiology*, **137**, 873-881. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053306>
- [12] 徐晨, 李火根, 杨秀莲, 母洪娜, 顾春笋, 王良桂. 桂花(+)-新薄荷醇脱氢酶基因 *OjMNR* 的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2016, 14(6): 1389-1395.
- [13] 龚婉, 吕路琼, 王维东, 黄丽丽. 富士苹果 SDRs 家族基因 *MdSDR* 的克隆及序列分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(14): 4597-4604.
- [14] 詹亭. 艾纳香中 mono-TPSs 的功能鉴定[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广州中医药学, 2023.
- [15] 刘琬菁, 吕海舟, 李滢, 姚辉, 罗红梅. 植物萜类合酶研究新进展[J]. 植物生理学报, 2017, 53(7): 1139-1149.
- [16] 零唯, 覃艳红, 黄鼎, 明如宏, 谭勇. 绞股蓝萜类合成酶(TPS)基因家族鉴定及其在非生物胁迫下的表达分析[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(4): 930-938.
- [17] 刘少华, 赵希胜, 杨晴, 杨长青, 潘旭浩, 张建会, 李依婷. 烟草单萜合酶基因 *NtTPS2* 的克隆及功能鉴定[J]. 生物技术通报, 2021, 37(9): 132-141.
- [18] 罗家骏, 陆安彬, 龙本山, 段丽丽, 莫泽君, 舒彦淇, 皮凯, 刘仁祥. 烟草 *NtPhyA* 基因的生物信息学分析和功能验证[J]. 基因组学与应用生物学, 2023, 42(7): 674-683.
- [19] 刘宗立, 陈涛, 杨丹丹, 崔景香, 李川皓, 曾勇庆, 陈伟. 猪 *Nrf2* 基因克隆、生物信息学分析及启动子区转录活性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(7): 1328-1339.
- [20] 闵远洋, 李韵雪, 吕佳, 麦晋贤, 廖沛然, 杨全. 肉桂几丁质酶基因 *CcCHI* 的克隆及其原核表达[J]. 分子植物育种, 2022, 20(7): 2244-2251.
- [21] 姚尹伊, 何梦玲, 李莹莹, 等. 广藿香萜类化合物生物合成及代谢调控研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5560-5567.
- [22] 高颖, 姜金铸, 高营营, 等. 丹参萜类合酶基因家族的鉴定和表达模式分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(3): 142-151.