

廖 燕, 尹松松, 龚林涛, 等. 薰衣草醇酰基转移酶基因(*AAT*)的克隆和表达分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(4): 599-606.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.04.003

薰衣草醇酰基转移酶基因(*AAT*)的克隆和表达分析

廖 燕¹, 尹松松¹, 龚林涛¹, 闫博文¹, 孙明辉¹, 苏秀娟^{1,2}, 王爱凡^{1,2}

(1.新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2.新疆农业大学薰衣草研究所/新疆作物遗传改良与种质创新重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 醇酰基转移酶(*AAT*)可以催化乙酰辅酶 A 与萜烯醇类物质的结合, 生成各类乙酸酯类化合物。为探明薰衣草 *AAT* 基因在酯类化合物合成中的调控作用, 本研究以薰衣草品系杂花叶片为供试材料, 利用反转录 PCR 技术克隆薰衣草 *AAT* 基因的 cDNA 序列, 该 cDNA 序列长度为 1 344 bp, 其编码蛋白质由 447 个氨基酸组成, 是非跨膜亲水性蛋白质, 属于 PLN02481 超级家族; 薰衣草 *AAT* 与黄色猴面花 *EgAAT* 亲缘关系最近, 相似度为 60.87%。*AAT* 基因在苞叶中的表达量最低, 在花瓣中的表达量最高; 在花冠不同发育时期, 该基因在盛花期表达量到达峰值。构建原核表达载体 pET-28a-*AAT*, 筛选了重组蛋白在大肠杆菌 *Transtetta* (DE3) 中的最适诱导表达条件, 诱导后获得的重组蛋白质相对分子质量为 5.026×10^4 , 重组蛋白以包涵体形式存在, 具有将芳樟醇催化合成乙酸芳樟酯的生物活性。本研究结果为进一步验证薰衣草 *AAT* 基因在酯类化合物合成过程中的功能提供了基础。

关键词: 薰衣草; 醇酰基转移酶基因(*AAT*); 克隆; 表达模式; 酶活性鉴定

中图分类号: S184 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)04-0599-08

Cloning and expression analysis of lavender alcohol acyltransferase gene (*AAT*)

LIAO Yan¹, YIN Song-song¹, GONG Lin-tao¹, YAN Bo-wen¹, SUN Ming-hui¹, SU Xiu-juan^{1,2}, WANG Ai-fan^{1,2}

(1. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. Lavender Research Institute of Xinjiang Agricultural University/Xinjiang Key Laboratory of Crop Improvement & Germplasm Enhancement, Urumqi 830052, China)

Abstract: Alcohol acyltransferase (*AAT*) can catalyze the combination of acetyl coenzyme A and terpene alcohols to produce various types of acetate compounds. In order to explore the regulatory role of lavender *AAT* gene in the synthesis of ester compounds, the cDNA sequence of lavender *AAT* gene was cloned by reverse transcription PCR using the leaves of lavender strain Zahua as the test material. The length of the cDNA sequence was 1 344 bp, and the encoded protein was composed of 447 amino acids, which was a non-transmembrane hydrophilic protein and belonged to the PLN02481 superfamily. The *AAT* in lavender was closely related to the *EgAAT* in yellow monkey-faced flower, with a similarity of 60.87%. The expression level of *AAT* gene was lowest in bracts and highest in petals. At different developmental stages of corolla, the expression of this gene reached the peak

收稿日期: 2023-04-27

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项 (2022B02036-1); 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31760429); 新疆维吾尔自治区科学技术厅“天山青年计划”优秀青年科技人才培养项目 (2020Q016); 国家级大学生创新训练计划项目 (201810758003); 作物学重点学科发展基金项目 (XNCD-KY2021015)

作者简介: 廖 燕 (2000-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事薰衣草遗传育种研究。(E-mail) 1642101080@qq.com

通讯作者: 苏秀娟, (E-mail) smm1980@yeah.net; 王爱凡, (E-mail) wangaifantop@163.com

at the full-bloom stage. Prokaryotic expression vector pET-28a-*AAT* was constructed. The optimal expression conditions of the recombinant protein in *Escherichia coli* *Transtetta* (DE3) were screened. The relative molecular weight of the recombinant protein was about 5.026×10^4 . The recombinant protein existed in the form of inclusion bodies and had the biological activity of catalyzing the synthesis of linalyl acetate from linalool. The results of this study provide a basis for further verifying the function of lavender *AAT* gene in the synthesis of ester compounds.

Key words: lavender; alcohol acyltransferase gene (*AAT*); cloning; expression pattern; enzyme activity identification

薰衣草为唇形科薰衣草属,是一种珍贵的天然香料植物^[1],不仅具有良好的观赏价值,其花穗中提取的精油也被广泛用于美容、烹饪和香料工业以及医药保健领域^[2]。薰衣草精油主要由乙酸芳樟酯、芳樟醇等萜类物质组成^[3-4],乙酸芳樟酯是一种挥发性的芳香族单萜类化合物,具有清新、芳香的香气以及抗菌镇静等功效,是多种名贵植物精油的主要成分之一^[5-6]。高等植物中大部分萜类物质来源于异戊烯二磷酸(Isopentenyl pyrophosphate, IPP)和二甲丙烯二磷酸(Dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)两个前体物质,它们主要通过细胞质途径(Mevalonic pathway, MVA)和质体途径(2-C-Methylerythritol-4-phosphate pathway, MEP)合成^[7]。IPP 和 DMAPP 可以在醇酰基转移酶(*AAT*)的催化作用下合成各种类型的萜类化合物。醇酰基转移酶不仅可以催化异戊二烯和异戊烯醇的转化以及乙酰辅酶 A 与萜烯醇类物质的结合,还可以催化萜类化合物中的羟基和羧基等官能团的转化,从而生成异戊烯醇酯和各类乙酸酯类化合物,并调节萜类化合物的结构和生物活性^[8-11]。

近年来,国内外对植物 *AAT* 基因展开了广泛研究,例如已从月季^[12-13]、山木瓜^[14]、草莓^[15]、苹果^[16]等植物中获得了 *AAT* 基因,并对其调控功能开展了大量研究。Shalit 等^[12]从月季中获得的第一个 *AAT* 基因,可将月季中香叶醇、香茅醇等不同醇类底物催化合成对应的酯类化合物,该基因在月季花器官及盛开前期的转录水平达到最高峰值。李晋华^[13]验证了月季 *RcAAT* 基因主要参与了乙酸香叶酯的合成。Cristian 等^[14]确定了山木瓜 *VpAAT1* 基因参与了木瓜香气的形成。董静等^[15]发现转草莓 *FvAATW2* 基因的烟草可在发育早期合成酯类物质,转基因草莓果实中挥发酯含量显著提高。Li 等^[16]发现苹果 *MdAAT2* 基因参与了苹果酯类物质的合成。因此,*AAT* 基因对植物香气成分的合成具有一定的调控作用。

目前关于薰衣草醇酰基转移酶基因的研究未见报道。本研究以高油薰衣草品系杂花叶片为材料,克隆并分析了薰衣草醇酰基转移酶基因 *AAT* 的脱氧核糖核酸(Complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)序列,分析了该基因在薰衣草花器官中不同组织以及花冠不同发育时期中的表达情况,筛选了目的基因的原核表达条件,并进行了蛋白质的体外

酶活性检测,以期为进一步研究 *AAT* 基因在薰衣草酯类物质合成中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以新疆农业大学农学院薰衣草试验地的杂花品系叶片为克隆模板材料,以新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克族自治州伊宁县薰衣草品系杂花为表达分析材料,花香检测用新鲜样品,其余样品于-80℃超低温冰箱保存备用。

1.2 试验试剂

pET-28a 载体由本实验室提供,实时荧光定量 PCR 试剂盒,TransZol Up, pEASY®-T5 载体,大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,农杆菌 GV3101 感受态细胞,胶回收试剂盒,肉汤培养基(Luria-Bertani, LB),酵母提取物牛肉提取物(Yeast extract beef extract, YEB)液体培养基, LB、YEB 固体培养基,卡那霉素,利福平,乙醇,三氯甲烷,异丙醇,限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III, ProteinRuler® I, ProteinRuler® II, SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(变性)粉末, 10% SurePAGE™, Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒, T4 DNA 连接酶, 乙酰辅酶 A 和芳樟醇, 磷酸缓冲盐水(Phosphate-buffered saline, PBS)缓冲液粉末, 大肠杆菌 Transetta (DE3) 感受态细胞, 氯霉素, 质粒小提试剂盒。

1.3 薰衣草 *AAT* 基因的克隆

采用 TransZol Up 试剂盒提取薰衣草总核糖核酸(Ribonucleic acid, RNA), 用反转录试剂盒将其合成 cDNA。根据 NCBI 上公布的薰衣草醇酰基转移酶核苷酸序列(登录号: KM275343.1) 设计特异性引物 *AAT*-F 和 *AAT*-R(表 1)。以 cDNA 为模板, 扩增目的片段。反应体系: 上游引物 1 μ l, 下游引物 1 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μ l, 10 \times EasyPfu Buffer 5 μ l, EasyPfu DNA Polymerase 1 μ l, cDNA 1 μ l, 水 36 μ l^[17]。反应程序: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 40 s, 59℃退火 30 s, 72℃延伸 2 min, 35 个循环, 72℃延伸 10 min。将回收的目的 DNA 片段连接到 pEASY-T5 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经菌液 PCR 鉴定后的阳性克隆进行 DNA 测序。

1.4 生物信息学分析

使用 NCBI 上的 ORF Finder (<http://www.ncbi.>

nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi)工具分析基因序列的ORF,确定克隆得到的薰衣草AAT基因序列是否具有编码蛋白质的潜力。使用SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)对薰衣草AAT进行信号肽预测。使用COILS(http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)预测薰衣草AAT的卷曲螺旋结构。使用TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)分析薰衣草AAT的可能跨膜区。使用MEGA5对薰衣草AAT氨基酸序列进行比对,使用DNAMAN构建薰衣草AAT蛋白的系统进化树。

1.5 表达模式分析

提取薰衣草品系杂花花器官不同发育时期以及不同组织部位总RNA,反转录合成cDNA,根据AAT基因序列设计实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR)引物qAAT-F和qAAT-R,内参基因使用 β -actin-F和 β -actin-R^[17](表1),以提取的薰衣草cDNA为模板进行荧光定量PCR。每个样品设置3次重复,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析荧光定量数据^[18]。

1.6 AAT重组蛋白的表达条件优化

载体使用本实验室保存的pET-28a。以从薰衣草叶片中克隆的pEASY®-T5-AAT重组质粒为模板选择EcoR I和Hind III酶切位点,设计特异性引物pAAT-F和pAAT-R引物进行扩增(表1)。对酶切产物所需片段进行胶回收,纯化目的基因及线性载体,用T4连接酶连接后转化大肠杆菌DH5 α ,将测序正确的菌液进行pET-28a-AAT质粒提取,转化Transetta(DE3),菌液培养至光密度(Optical density, OD)600值为0.4~0.6,异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导浓度分别为0 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L,诱导时间分别为0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h,诱导温度分别为25℃、28℃、37℃,筛选最佳诱导剂浓度、诱导时间和培养温度^[19]。

1.7 AAT重组蛋白体外酶活性检测

采用筛选获得的最佳诱导条件诱导薰衣草AAT蛋白表达。按照Ni-NTA琼酯糖纯化树脂说明书进行蛋白纯化。蛋白体外酶活性测定参照曹香梅^[20]应用的方法,在含5 mmol/L乙酰辅酶A和10 mmol/L芳樟醇的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液[100 mmol/L Tris, pH 7.5, 2 mmol/L 二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)]中,添加重组蛋白(500

ng/ μ l),30℃水浴1 h,使用气相色谱-质谱联用仪(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)检测生成的产物。

表1 试验中所用AAT基因引物

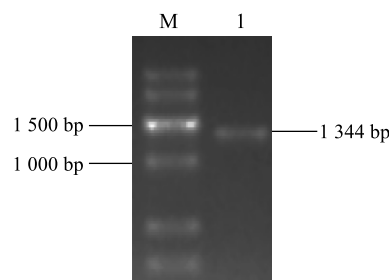
Table 1 AAT gene primers used in the experiment

引物名称	核苷酸序列(5'→3')
AAT-F	ATGGCATCCACCAAAACCCTGAC
AAT-R	TCACAATGCTGAAAGATTGAGAGTCC
qAAT-F	CCTCCCCCGATATCTCCAA
qAAT-R	CGCAGGCTGCCACGAT
β -actin-F	GCGAAATGCGATACTTGCTG
β -actin-R	CAACTTGCCTTCAAAGACTCG
pAAT-F	CGGAATTCATGGCATCCACCAAAACCCTGAC
pAAT-R	CCAAGCTTCAATGCTGAAAGATTGAGAGTCC

2 结果与分析

2.1 薰衣草醇酰基转移酶基因AAT的克隆和序列分析

以薰衣草品系杂花的叶片cDNA为模板,扩增获得AAT基因(图1)。利用NCBI的ORF Finder分析AAT基因序列,该基因碱基序列长度为1 344 bp,其编码的蛋白质由447个氨基酸组成,相对分子质量为 5.026×10^4 ,等电点为8.61。



M: Marker VII; 1: PCR产物。

图1 薰衣草AAT基因全长序列的扩增结果

Fig.1 Amplification results of the full-length sequence of AAT gene in lavender

在线程序预测发现,AAT蛋白无信号肽结构域,多肽链位于细胞膜外,无跨膜结构域存在,属于PLN02481蛋白超级家族,410位甘氨酸(Glycine, Gly)分值最小,为-2.989,亲水性最强;309位脯氨酸(Proline, Pro)分值最大,为2.111,亲水性最弱,预测该蛋白质为亲水性蛋白质。AAT蛋白的二级结构包含12个 α -螺旋、16个 β -折叠和29个无规则卷曲;蛋白质的三级结构无规

则卷曲较多,其结构与 PLN02481-2super 家族蛋白质的三级结构相似,推测该蛋白质和 PLN02481-2super 家族蛋白质的功能相似。

2.2 薰衣草 AAT 蛋白氨基酸序列的多重比较和进化树分析

薰衣草 AAT 蛋白与克莱门氏小柑橘、甜橙、旋蒴苣苔、黄色猴面花、山荆子、苹果、杨梅、荷花、烟

草、芝麻等 10 个物种 AAT 同源蛋白的氨基酸序列比对结果表明,这些序列均具有植物酰基转移酶 (*BAHD*) 家族特有的高度保守结构域 HXXXD (165-169 氨基酸残基) 活性位点和附加的 DFGWG (378-382 氨基酸残基) 结构域,同时也具有 *BAHD* 家族的保守结构域 LXXYYPLAGR (74-83 氨基酸残基) (图 2)。因此,薰衣草 AAT 基因属于 *BAHD* 基因家族。

CcAAT.SEQMATSLTFRVLRRAPEITAPAKPTREIKELSIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	96
CsAAT.SEQMATSLTFRVLRRAPEITAPAKPTREIKELSIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	96
DhAAT.SEQ	MASKKSLT...FRVTRCNELIIPSSPTPHLKFELSIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	98
EGAAT.SEQ	...MAALT...FRVTRCNELIIPSSPTPHLKFELSIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	94
MBAAT.SEQ	MASLFPSSIVFTVRRCPEIVAPAKATPYEFROI SIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	99
MdAAT.SEQ	MASLFPSSIVFTVRRCPEIVAPAKATPYEFROI SIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	99
MrAAT.SEQ	MASLSTSSIVFTVRRCPEIVAPAKPTREIKELSIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	100
NnAAT.SEQ	...MATSSIVFTVRRCPEIVAPAKPTREIKELSIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	98
NiAAT.SEQ	MDSKSSKIVFTVRRCPEIVAPAKPTREIKELSIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	100
SiAAT.SEQ	MASITNALT...FRVTRCNELIIPSSPTPHLKFELSIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	98
薰衣草AAT_SEQ	MASIKILT...FRVTRCNELIIPSSPTPHLKFELSIDDDCEGLRHFIVTIOFYKNEFVNGKDPVKVITREAVACTIVSYYPFAGRIREGENRKIMVDCITG	98
CcAAT.SEQ	EGVIFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	191
CsAAT.SEQ	EGVIFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	191
DhAAT.SEQ	EGVIFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	194
EGAAT.SEQ	EGVMFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	189
MBAAT.SEQ	EGIMFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	194
MdAAT.SEQ	EGIMFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	194
MrAAT.SEQ	EGVMFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	195
NnAAT.SEQ	EGVMFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	193
NiAAT.SEQ	EGIMFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	195
SiAAT.SEQ	EGVIFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	198
薰衣草AAT_SEQ	EGVMFTEACADVTILECF.GEA....IOPFFPGLLELILFVCGSAGVINCPHIIICVTRIRCCGFTFALRINHTMGDAAGIVCFMSAVGFIARGIRAFETVP	193
CcAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	291
CsAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	291
DhAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	294
EGAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	289
MBAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	294
MdAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	294
MrAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	295
NnAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	293
NiAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	295
SiAAT.SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	298
薰衣草AAT_SEQ	FVWRHVINARDEFFVITCTHEFYDEVADTKMTIIPDDVSHRSFFFGCEVSAIRRIIECHIRRCSAFEIITACIFRCRTITAIICPDEFEMRIICIVNAR	290
CcAAT.SEQ	SKINPFLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	390
CsAAT.SEQ	SKINPFLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	390
DhAAT.SEQ	TRNPFLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	393
EGAAT.SEQ	SRINPFLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	388
MBAAT.SEQ	SKFNPLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	393
MdAAT.SEQ	SKFNPLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	393
MrAAT.SEQ	AKFDPLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	394
NnAAT.SEQ	DRCPPLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	392
NiAAT.SEQ	SRFNPLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	394
SiAAT.SEQ	KRFNPLPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	397
薰衣草AAT_SEQ	NKNKPELPAGYCYGNAFAFVAITIAEKLKSNLGLFALIVRKAKNDVNEFYMSIADIMVIKGRPHFAVVRSLYVSDVTRAGGLVDFCWGRFVYCGGA	390
CcAAT.SEQ	KGCVGATPGVASFYTFPRNKKCEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	457
CsAAT.SEQ	KGCVGATPGVASFYTFPRNKKCEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	457
DhAAT.SEQ	KGCVGATPGVASFYTFPRNKKCEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	456
EGAAT.SEQ	KGCVGATPGVASFYTFPRNKKCEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	455
MBAAT.SEQ	KGRVVASY....YTPFRNRCGEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	456
MdAAT.SEQ	KGRVVASY....YTPFRNRCGEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	456
MrAAT.SEQ	KGCVGATPGVASFYTFPRNKKCEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	458
NnAAT.SEQ	KGCVGATPGVASFYTFPRNKKCEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	458
NiAAT.SEQ	KGCVGATPGVASFYTFPRNKKCEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	460
SiAAT.SEQ	KGCVGATPGVASFYTFPRNKKCEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	466
薰衣草AAT_SEQ	KGTIDVIGVNW...YTPFRNKKCEGCTIVVFVCIIPAPAMARFVFEIEKTIKGENEMVA....AESN..TNFITSAL	447

Cc. 克莱门氏小柑橘 (XP_006437408.1); Cs. 甜橙 (XP_006484694.1); Dh. 旋蒴苣苔 (KZV53802.1); EG. 黄色猴面花 (EYU41389.1); MB. 山荆子 (TQE08000.1); Md. 苹果 (RXH81406.1); Mr. 杨梅 (KAB1205273.1); Nn. 荷花 (XP_010275172.1); Ni. 烟草 (XP_016451575.1); Si. 芝麻 (XP_011085895.2)。

图2 薰衣草 AAT 蛋白的氨基酸序列比对

Fig.2 Amino acid sequence alignment of AAT protein in lavender

构建薰衣草(*Lavandula x intermedia*)与 10 个物种 AAT 蛋白的系统进化树,发现薰衣草 AAT 与黄色猴面花、旋蒴苣苔、芝麻、甜橙、克莱门氏小柑橘、杨梅、荷花、烟草、苹果、山荆子 AAT 的同源性分别

为 60.87%、60.05%、59.64%、59.49%、59.72%、59.77%、57.37%、57.4%、54.71%、56.01%,其中薰衣草 AAT 蛋白与黄色猴面花的蛋白相似性最高,为 60.87%(图 3),推测两者具有相似的分子功能。

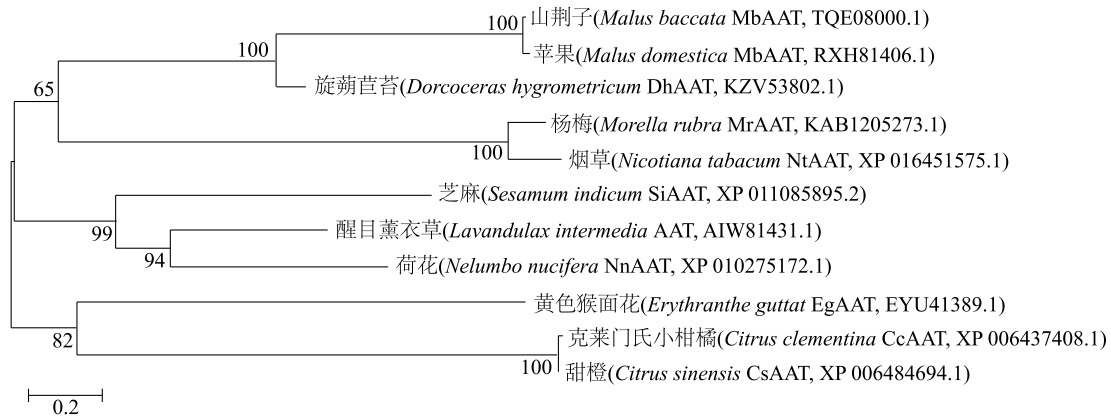


图 3 薰衣草 AAT 蛋白的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of lavender AAT proteins

2.3 薰衣草 AAT 基因的表达模式分析

分析 AAT 基因在不同组织和花冠不同发育时期的相对表达量(图 4),该基因在花瓣中的表达量最高,其次是花萼、雄蕊、叶片、雌蕊、苞叶;该基因在花冠花蕾期和初开期的表达量较低,半开期其表达量迅速上升,盛开期其表达量达到峰值,衰败期其表达量降低。

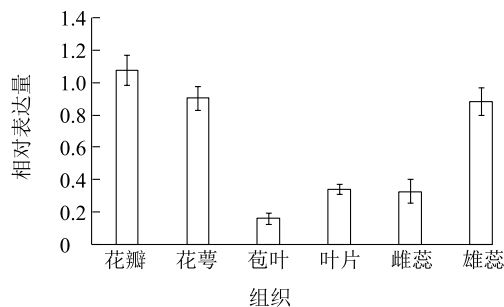
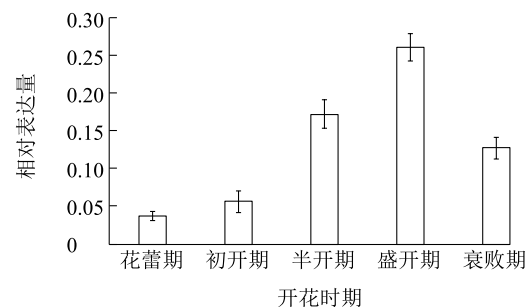


图 4 薰衣草 AAT 基因的时空表达

Fig.4 Spatial and temporal expression of lavender AAT gene

2.4 薰衣草 AAT 基因原核表达载体的构建及鉴定

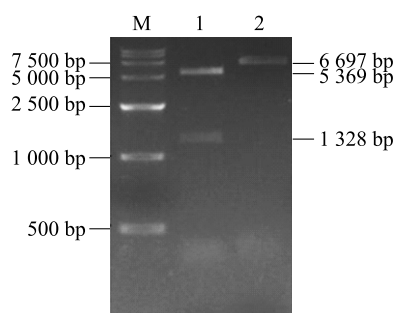
用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切 pET-28a 载体和 AAT 基因,将回收的 AAT 基因片段与载体 DNA 片段连接构建重组载体 pET-28a-AAT。双酶切电泳结果表明,酶切获取的小片段与 AAT 基因大小一致,大片段与 pET-28a 载体大小一致(图 5),表明表达载体构建成功。



2.5 薰衣草 AAT 重组蛋白的表达条件优化及可溶性鉴定

将重组表达载体 pET-28a-AAT 进行诱导表达。重组蛋白在 0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L 5 个 IPTG 浓度下均能表达,当 IPTG 终浓度为 0.6~0.8 mmol/L 时重组蛋白表达量最高(图 6A);在 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 的诱

导时长下均能表达,并且 AAT 蛋白的表达量与诱导时长呈负相关(诱导时间越长,表达量越低),当诱导时间为 2 h 时表达量达到最高(图 6B);在 25 ℃、28 ℃、37 ℃ 不同温度下均能诱导目标蛋白表达,当温度为 37 ℃,在 0.6~0.8 mmol/L 的 IPTG 和 2 h 条件下重组蛋白表达量最高(图 6C);因此,选择 IPTG 浓度为 0.6~0.8 mmol/L、诱导时间为 2 h、培养温度



M: Marker 15000; 1: 重组质粒 pET-28a(+)-AAT; 2: 重组质粒 pET-28a(+)-AAT。

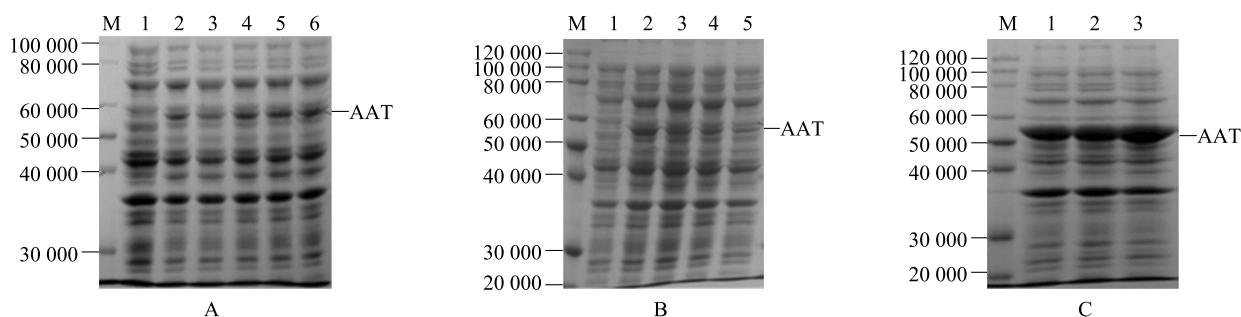
图 5 重组质粒 pET-28a(+)-AAT 的双酶切鉴定

Fig.5 Identification of recombination plasmid pET-28a(+)-AAT by double enzyme digestion

为 37 ℃ 作为该重组蛋白的最佳诱导表达条件。采用以上条件诱导获得的重组蛋白与目标蛋白相对分子质量大小一致 (5.026×10^4 , 图 7), 该蛋白质以包涵体形式存在。

2.6 薰衣草 AAT 蛋白的酶活性验证

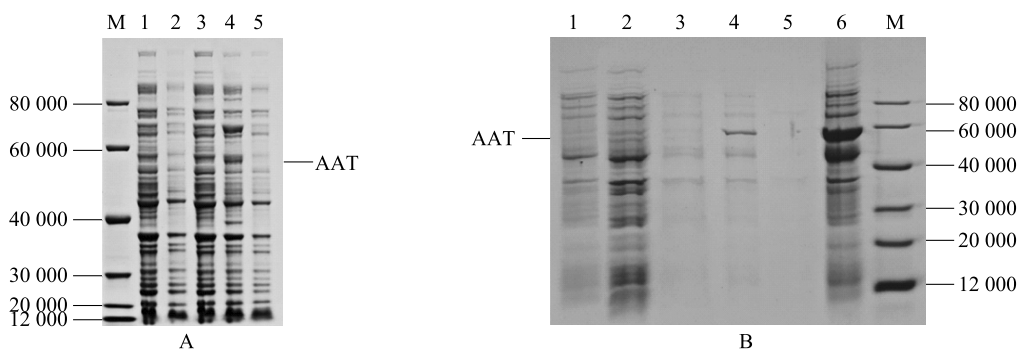
将纯化后的 AAT 蛋白和芳樟醇混合后进行酶活性检测, 当酶促反应进行至 25.583 min 时检测到了乙酸芳樟酯(图 8), 表明薰衣草 AAT 蛋白具有催化芳樟醇合成乙酸芳樟酯的生物活性。



A 中, M: ProteinRuler® II; 1~6 分别为 IPTG 浓度 0 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L。B 中, M: ProteinRuler® II; 1~5 分别为诱导时间 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h。C 中, M: ProteinRuler® II; 1~3 分别为诱导温度 25 ℃、28 ℃、37 ℃。

图 6 重组表达质粒 pET28a-AAT 诱导条件筛选结果

Fig.6 Screening results of induction conditions of recombinant expression plasmid pET28a-AAT



A 中, M: ProteinRuler® I; 1~5 分别为 pET-28a 空载全蛋白、pET-28a 空载诱导后蛋白、AAT 重组全蛋白、AAT 重组诱导蛋白、AAT 重组蛋白未诱导。B 中, M: ProteinRuler® I; 1~6 分别为 pET-28a 空载全蛋白、pET-28a 空载诱导后蛋白、AAT 重组全蛋白、AAT 重组诱导蛋白、AAT 重组蛋白诱导后破碎上清、AAT 重组蛋白诱导后破碎沉淀。

图 7 薰衣草 AAT 重组蛋白原核表达及可溶性鉴定

Fig.7 Prokaryotic expression and solubility characterization of lavender AAT recombinant protein

3 讨论

挥发性酯类化合物作为贡献薰衣草香气的重要

组分, 在薰衣草发育过程中不断积累, 对于薰衣草精油的品质以及薰衣草相关产业的发展具有重要意义。本研究采用 RT-PCR 技术首次克隆了薰衣草

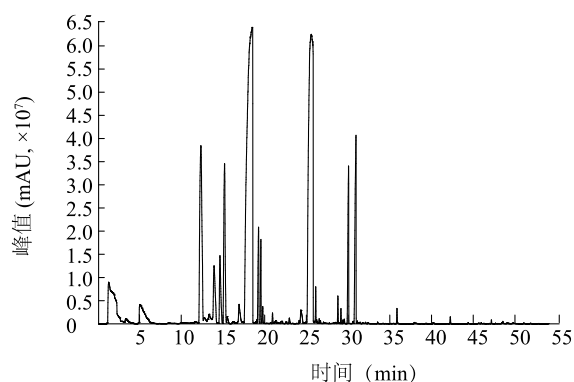


图8 薰衣草AAT酶活性验证

Fig.8 Validation of lavender AAT enzyme activity

AAT基因的全长cDNA。BAHD酰基转移酶家族中特有的HXXXD基序直接参与酶活性位点的催化作用,而DFGWG基序与蛋白质的稳定性、互动能力和信号转导过程相关^[21-22],推测薰衣草AAT蛋白也具有类似功能。AAT基因在植物中具有组织表达差异性。薰衣草AAT基因在花瓣中表达量最高,该结果与月季*RhAAT1*^[12]、桂花*OfAAT1*及柿子*DKAAT1*的表达情况相似^[23-24]。AAT基因在薰衣草花冠各个发育时期的表达量也不同。梅花*PmCFAT1*基因表达量随开花进程逐渐上升,在盛花期其表达量达到最高^[25]。玫瑰*RrAAT*基因在半开期的表达量达到最高,自盛花期逐渐下降^[26]。薰衣草AAT基因在盛花期其表达量达到峰值。薰衣草AAT基因在花器官不同发育时期的表达趋势与梅花*PmCFAT1*^[25]的表达趋势一致,均为在盛花期表达量达到最高,和玫瑰*RrAAT*^[26]自盛花期后下降的趋势一致。

通过体外酶活性试验鉴定目标蛋白的生物学功能,是确定相关基因是否参与调控酯类化合物合成的有效途径,而建立高效诱导表达体系则是该途径的前提条件。曹颖等^[27]采用优化后的表达条件在大肠杆菌中高效表达了番茄*SlAAT1*,体外酶活性试验结果表明该蛋白质具有醇酰基转移酶活性。在细胞裂解过程中蛋白质很容易降解,但采用本身缺少蛋白质水解酶的Transetta(DE3)感受态细胞作为表达受体,则可保证重组蛋白不会被降解^[28]。本研究采用优化后的表达条件在Transetta(DE3)细胞中诱导表达了以包涵体形式存在目的蛋白,出现表达的目的蛋白以包涵体形式存在的原因可能是大肠杆菌作为一种原核生物缺乏真核生物所具有的许多复杂

的折叠和翻译后的加工机制,这些机制包括蛋白质转运、拆分和修复错误的二硫键等,由于缺乏这些机制,大肠杆菌中表达的目标蛋白常常会有错配的二硫键产生,而这种二硫键可能会导致蛋白质在细胞内无法正确定位或功能失调,从而导致目的蛋白形成包涵体^[29-30]。对纯化后的目标蛋白进行体外酶活性检测,发现AAT蛋白具有催化芳樟醇合成乙酸芳樟酯的生物活性。

4 结论

本研究从薰衣草杂花品系叶片中克隆得到醇酰基转移酶基因AAT,全长1 344 bp,编码447个氨基酸;对AAT蛋白氨基酸序列进行多序列比对结果显示,该序列属于BAHD家族,系统进化树分析结果表明AAT蛋白与黄色猴面花AAT亲缘关系最近。AAT基因在苞叶中的表达量较低,在花瓣中的表达量相对较高,在花器官不同发育时期,AAT基因的表达呈先升高后降低的趋势。重组蛋白表达最适诱导条件为:IPTG浓度0.6~0.8 mmol/L、诱导时间2 h、培养温度37℃,对包涵体蛋白进行纯化复性发现其具有催化芳樟醇合成乙酸芳樟酯的生物活性。本试验结果为进一步验证AAT基因在薰衣草酯类物质合成中的作用奠定了基础,为今后利用基因工程手段培育精油产量高、品质优的薰衣草新品种提供了候选基因。

参考文献:

- [1] 张群,扎灵丽. 薰衣草的研究和应用[J]. 时珍国医国药, 2008(6):1312-1314.
- [2] 王玉芹,孙亚军,施献儿. 薰衣草精油的化学成分与药理活性[J]. 国外医药(植物药分册),2004(1):5-8.
- [3] 张健,蔡宝国,章苏宁,等. 薰衣草精油化学成分的GC-MS分析比较[J]. 食品工业,2007(5):52-54.
- [4] 徐洁华,文首文. 薰衣草挥发性有机物及其药理功效研究进展[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):979-980,983.
- [5] PICHESKY E, RAGUSO R A. Why do plants produce so many terpenoid compounds? [J]. The New Phytologist,2018,220(3):692-702.
- [6] DEHSHEIKH A B, SOURESTANI M M, DEHSHEIKH P B, et al. Monoterpenes: essential oil components with valuable features [J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2020, 20(20):958-974.
- [7] VRANOVÁ E, COMAN D, GRUISSEM W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis [J]. Annual Review of Plant Biology,2013,64:665-700.

- [8] 岳跃冲,范燕萍. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展[J]. 园艺学报,2011,38(2):379-388.
- [9] LAURA K H, GUTENSOHN M, SUZANNE T T, et al. Orthologs of the archaeal isopentenyl phosphate kinase regulate terpenoid production in plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2015,112(32):10050-10055.
- [10] 刘琬菁,吕海舟,李 滢,等. 植物萜类合酶研究新进展[J]. 植物生理学报,2017,53(7):1139-1149.
- [11] 魏恬恬,臧 姝,曾雨倩,等. 植物单萜类化合物的代谢调控[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2017,38(2):122-126.
- [12] SHALIT M, GUTERMAN I, VOLPIN H, et al. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/citronellolacetyl-transferase in developing rose petals[J]. Plant Physiol,2003,8(1):153-162.
- [13] 李晋华. 月月粉乙酰基转移酶基因 *RcAAT* 的克隆及功能分析[D]. 昆明:云南农业大学,2017.
- [14] CRISTIAN B, CARLOS G E, LIDA F, et al. VpAAT1, a gene encoding an alcohol acyltransferase, is involved in ester biosynthesis during ripening of mountain papaya fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(8):5114-5121.
- [15] 董 静,王桂霞,钟传飞,等. 森林草莓醇酰基转移酶基因 *FvAATW2* 功能研究[J]. 园艺学报,2018,45(1):41-50.
- [16] LI D P, XU Y F, XU G G, et al. Molecular cloning and expression of a gene encoding alcohol acyltransferase (*MdAAT2*) from apple (cv. Golden Delicious)[J]. Phytochemistry,2006,67(7):658-667.
- [17] 龚林涛,苏秀娟,廖 燕,等. 薰衣草芳樟醇合酶基因的克隆、表达及酶活性检测[J]. 作物杂志,2021,2021(6):78-87.
- [18] 尹松松,苏秀娟,龚林涛,等. 薰衣草 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因 *LaDXR* 的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种,2021,19(7):2193-2199.
- [19] 龚林涛,苏秀娟,尹松松,等. 薰衣草 *DXS* 基因的克隆、表达分析及原核表达[J]. 新疆农业科学,2020,57(7):1233-1242.
- [20] 曹香梅. 桃果实酯类芳香物质的代谢与调控研究[D]. 杭州:浙江大学,2019.
- [21] 王梦姣. 植物 BAHD 酰基转移酶家族研究进展[J]. 江西农业学报,2010,22(12):124-126.
- [22] 刘雨雨,莫 婷,王晓晖,等. 植物来源 BAHD 酰基转移酶家族研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(12):2175-2182.
- [23] 刘 愚,曾祥玲,郑日如,等. 桂花花瓣醇酰基转移酶基因的克隆与表达[J]. 华中农业大学学报,2016,35(1):36-42.
- [24] ELHADI M A M. 柿果实品质特性、香气成分分析及醇酰基转移酶基因(*DkAAT1*)的表达研究[D]. 扬州:扬州大学,2017.
- [25] 霍婷婷. 梅花花香相关基因 *PmCFATs* 的克隆和表达分析[D]. 北京:北京林业大学,2017.
- [26] 陈 陈. 玫瑰花香成分生物合成相关基因的克隆与表达分析[D]. 扬州:扬州大学,2012.
- [27] 曹 颖,胡尚连,张慧莹,等. 番茄醇酰基转移酶基因 *SlAAT1* 克隆、序列分析和原核表达[J]. 植物研究,2012,32(6):731-736.
- [28] 刘博文,王雪庆,孙 涛,等. 白蜡虫蜡酯合酶基因 cDNA 全长克隆及原核表达[J]. 林业科学研究,2016,29(4):610-614.
- [29] BAESHEN N A, BAESHEN N, SHEIKH A, et al. Cell factories for insulin production[J]. Microbial Cell Factories,2014,13(1):141-149.
- [30] FERRER-MIRALLES N, VILLAVARDE A. Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue[J]. Microbial Cell Factories,2013,12(1):113.

(责任编辑:蒋永忠)