

## 生物技术与方法

## 两种不同植物来源白藜芦醇生物合成关键酶——芪合酶催化效率比较

郭辉力<sup>1,2</sup>, 罗在柒<sup>1,2</sup>, 杨亚东<sup>3</sup>, 杨明峰<sup>2</sup>, 吕鹤书<sup>2</sup>, 柳春梅<sup>2</sup>, 杨静<sup>4</sup>, 王有年<sup>2</sup>, 马兰青<sup>2</sup>

1 北京林业大学 林学院, 北京 100083

2 北京农学院 农业部都市农业 (北方) 重点实验室, 北京 102206

3 北京农学院 植物科学技术学院, 北京 102206

4 中北大学 化工与环境学院, 山西 太原 030051

郭辉力, 罗在柒, 杨亚东, 等. 两种不同植物来源白藜芦醇生物合成关键酶——芪合酶催化效率比较. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1622–1633.

Guo HL, Luo ZQ, Yang YD, et al. Comparison of stilbene synthase from different plant sources for resveratrol biosynthesis. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1622–1633.

**摘 要:** 白藜芦醇是一种天然植保素, 且具有特殊的药理和保健功能, 芪合酶 (Stilbene synthase, STS) 是该化合物生物合成的关键酶和限速酶。白藜芦醇存在于有限几种植物且含量差异很大, 虎杖中白藜芦醇含量比葡萄、花生高 1 000 倍以上, 推测不同 STS 的催化能力有可能是白藜芦醇含量差异的原因之一。为验证上述推测, 文中通过 overlap PCR 技术从葡萄叶片基因组 DNA 中克隆得到葡萄 STS 基因, 连同前期工作中获得的虎杖 STS 基因 (*PcPKS5*), 进行了原核表达分析。诱导表达产物经过  $\text{Ni}^{2+}$  亲和柱纯化和 PD-10 柱脱盐后, 均得到分子量约 43 kDa 的可溶性纯化蛋白。酶促产物分析结果表明, 两种酶催化产物均为白藜芦醇。酶动力学分析表明, 虎杖 STS 催化效率 ( $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ) 是葡萄 STS 的 2.4 倍。文中从植物类型 III 聚酮化合物合酶 (Polyketide synthase, PKS) 超家族催化活性位点和保守位点角度分析了造成上述两种酶活性产生差异可能存在的原因。

**关键词:** 葡萄, 虎杖, 芪合酶, 基因克隆, 原核表达, 功能分析

**Received:** February 12, 2014; **Accepted:** May 21, 2014

**Supported by:** Key Natural Science Foundation of Beijing Municipality (No. 5111001), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31300620, 31370674), Foundation of Beijing Municipal Education Committee (Nos. KM201310020002, KM201310020015, KM201110020001, KM201210020009), Funding Project for Academic Human Resources Development in Institutions of Higher Learning Under the Jurisdiction of Beijing Municipality (No. PHR201108279).

**Corresponding author:** YOUNIAN WANG. Tel: +86-10-80797225; E-mail: wyn1951@126.com

Lanqing MA. Tel: +86-10-80797305; E-mail: lqma@bac.edu.cn

北京市自然科学基金重点项目 (No. 5111001), 国家自然科学基金 (Nos. 31300620, 31370674), 北京市教委面上项目 (Nos. KM201310020002, KM201310020015, KM201110020001, KM201210020009), 北京市属高校人才强教深化计划项目 (No. PHR201108279) 资助。

网络出版时间: 2014-05-28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140076.html>

# Comparison of stilbene synthase from different plant sources for resveratrol biosynthesis

Huili Guo<sup>1,2</sup>, Zaiqi Luo<sup>1,2</sup>, Yadong Yang<sup>3</sup>, Mingfeng Yang<sup>2</sup>, Heshu Lü<sup>2</sup>, Chunmei Liu<sup>2</sup>, Jing Yang<sup>4</sup>, Younian Wang<sup>2</sup>, and Lanqing Ma<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Urban Agriculture (North) of Ministry of Agriculture China, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

<sup>3</sup> Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

<sup>4</sup> School of Chemical Engineering and Environment, North University of China, Taiyuan 030051, Shanxi, China

**Abstract:** Resveratrol is a natural phytoalexin with special pharmacological and health functions. Stilbene synthase (STS) is a key and rate-limiting enzyme in the biosynthesis of resveratrol that is present only in a limited number of plants. The content of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* is more than 1 000 times higher than grapes and peanuts. We speculate that the catalytic ability of different STS may be one of the reasons causing differences in the content of resveratrol. To verify the above speculation, *Vitis vinifera* stilbene synthase gene (*VvSTS*) was amplified according to overlap PCR protocol with genomic DNA as template. *VvSTS* and *PcSTS* (*PcPKS5*) were analyzed through heterologous expression in *Escherichia coli*. The expression products were purified with Ni-NTA sepharose affinity chromatography and desalted through PD-10 column. The molecular weight of the two fusion proteins was about 43 kDa. Enzyme reaction and product analysis showed that the two products were resveratrol. The enzyme kinetic analysis showed that the catalyze efficiency ( $K_{cat}/K_m$ ) of *PcPKS5* was 2.4 times of the *VvSTS*. Our findings confirms that STS from certain plants has much higher catalytic capability.

**Keywords:** *Vitis vinifera*, *Polygonum cuspidatum*, stilbene synthase, gene cloning, prokaryotic expression, functional analysis

白藜芦醇 (Resveratrol) 化学名为3,4',5-三羟基-1,2-二苯乙烯, 是一种含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物, 在葡萄、虎杖、藜芦、决明子和花生等有限几种天然植物中存在。它是植物受到病原性进攻和环境恶化时产生的一种植保素, 对真菌性病害有明显拮抗作用。天然的白藜芦醇有顺、反两种结构, 自然界中主要以反式结构存在<sup>[1]</sup>。白藜芦醇具有众多的药理和保健功能: 抗肿瘤<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>、调节血脂<sup>[4]</sup>、保护脑和神经<sup>[5]</sup>, 延缓衰老、延长寿命、防止老年痴呆<sup>[6]</sup>等。白藜芦醇是红葡萄酒中的功效成分, 法国人在高脂肪、高蛋白、高能量饮食习惯下, 心血管疾病的发病率远低于其他欧美国家, 就是得益于经常饮用红葡萄酒。

白藜芦醇来源于苯丙烷代谢途径<sup>[7]</sup>, 其生物

合成途径为: 苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 作用下裂解成反式肉桂酸, 肉桂酸在肉桂酸-4-羟基化酶 (Cinnamate-4-hydroxylase, C4H) 的催化作用下生成4-香豆酸, 之后在4-香豆酸辅酶A连接酶 (4-Coumarate-CoA ligase, 4CL) 的作用下合成4-香豆酰辅酶A, 最后, 芪合酶 (Stilbene synthase, STS) 催化1分子的4-香豆酰辅酶A和3分子的丙二酰辅酶A生成白藜芦醇 (图1)。芪合酶是该合成途径中最后一个关键酶, 也是关键的限速酶<sup>[8]</sup>。

白藜芦醇在有限的植物种类中的含量差异很大, 虎杖根茎中的白藜芦醇含量比葡萄、花生高 1 000 倍以上<sup>[9]</sup>, 我们推测不同 STS 的催化能力是造成白藜芦醇在不同植物中含量差异的

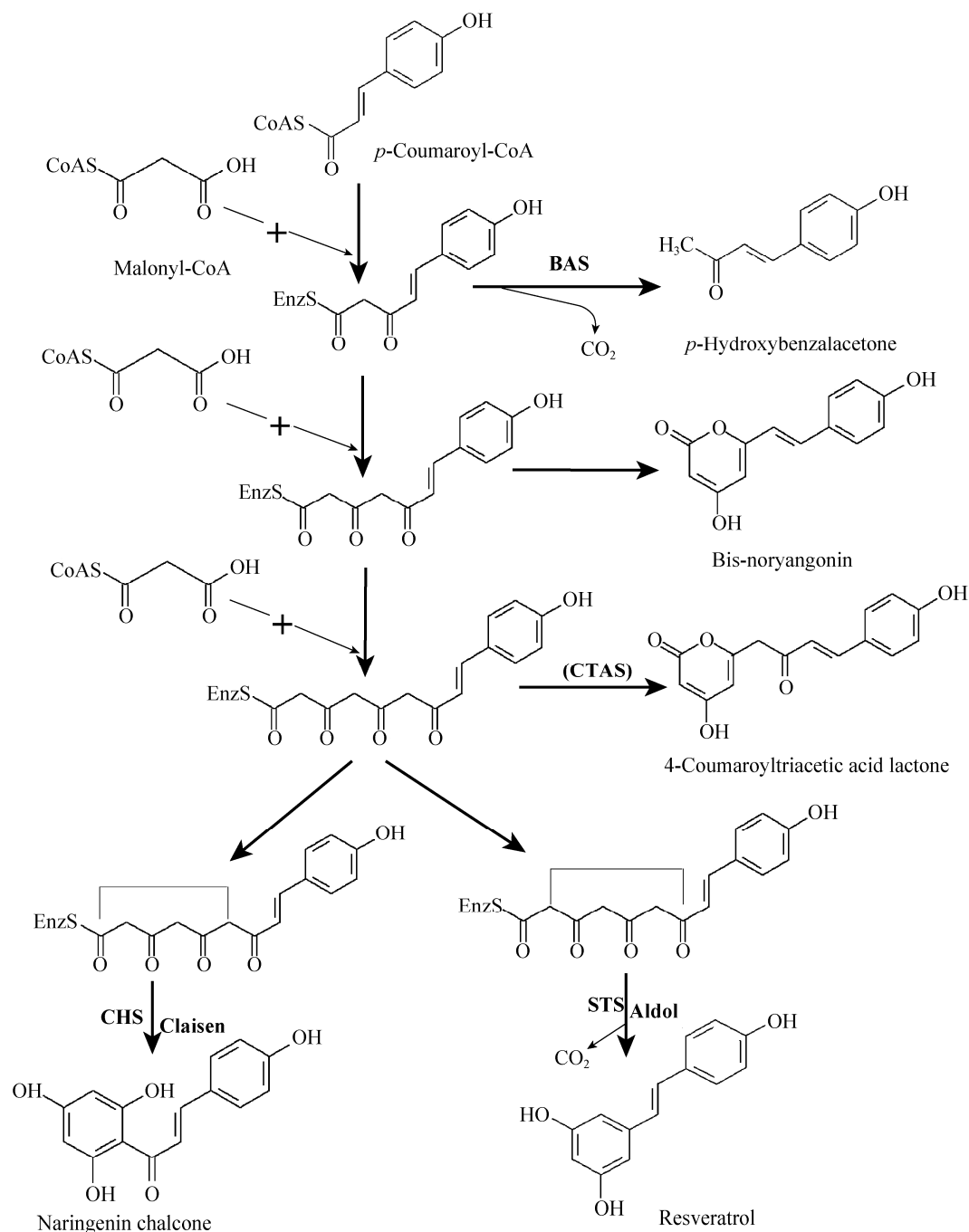


图1 白藜芦醇生物合成途径<sup>[10]</sup>

Fig. 1 The metabolic pathway of resveratrol<sup>[10]</sup>. The reactions for the conversion of 4-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA to *p*-hydroxybenzalacetone by the benzalacetone synthase (BAS), and to resveratrol by stilbene synthase (STS), and to naringenin by chalcone synthase (CHS). Polyketide pyrones, bis-noryangonin (BNY), and 4-coumaroyltriacetic acid lactone (CTAL) are derailment side products of the type III PKS reactions in vitro when the reaction mixtures are acidified before extraction.

原因之一。因此,对比和筛选来源于不同植物的STS,对于后续白藜芦醇的生物合成及调控研究具有现实意义。

本研究通过引物悬挂PCR (Overlap PCR) 技术克隆得到葡萄STS基因 (*VvSTS*), 构建了 pET30a-*VvSTS* 原核表达载体, 连同前期工作中构建的虎杖STS基因 (*PcPKS5*) 原核表达载体 pET30a-*PcPKS5*<sup>[10]</sup>, 分别对葡萄、虎杖STS基因进行原核表达、蛋白纯化, 在相同反应条件下对比来源于葡萄、虎杖STS的催化活性、酶学特性以及酶动力学参数, 筛选高活性STS, 以期对白藜芦醇生物合成提供关键基因元件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

京玉葡萄叶片取自中国科学院植物研究所, 叶片用液氮速冻后-80℃保存。

#### 1.1.2 主要试剂

pMD18-T Vector、DNA Ladder Marker、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III及相应缓冲液、T4 DNA 连接酶、*LA Taq* 聚合酶、dNTP Mixture、X-Gal、IPTG 均购于宝生物工程(大连)有限公司。

*TransStart*<sup>TM</sup> *FastPfu* DNA 聚合酶、*Blue Plus*<sup>TM</sup> II Protein Marker、*ProteinRluer*<sup>TM</sup> III 购于北京金式金生物技术有限公司。

高纯度质粒小提取试剂盒为康为世纪生物科技有限公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒为 OMEGA Bio-Tek 公司产品。

考马斯亮蓝 R-250、溶菌酶 Lysozyme、咪唑 Imidazole、DTT、EDTA、甘氨酸、巯基乙醇、丙烯酰胺储存液、溴酚蓝、SDS、甘油、甲醇、冰醋酸等用于蛋白纯化及电泳试验。

#### 1.1.3 引物

根据 GenBank 中已登录的葡萄芪合酶基因序列(登录号: DQ459351) 设计两个外显子的特异引物, 引物序列如表1所示。

以上引物的合成及克隆基因的测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的提取

参照徐美隆等<sup>[11]</sup>改良的 CTAB 法提取葡萄叶片基因组 DNA。

#### 1.2.2 DNA 的酶切与连接

酶切体系(20 μL): 重组质粒≤1 ng, 10×酶切缓冲液 2 μL, 限制性内切酶 10–15 U, ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 20 μL, 37℃反应 2 h。

表1 Overlap PCR 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers used in overlap PCR

Primer name	Primer sequence (5'–3')	Size (bp)
178F	GGGGGAATT <u>C</u> ATGGCTTCAGTCGAGGAATTTAGAAACG	38
178R	TGGATTTGTACATATGCGATTGAACTTCTTC	32
998F	TCAATCGCATATGTGACAAATCCATGATCAAG	32
998R	GGGGAAGCTTATTTGTAACCATAGGAATGCTATGTAACACAAC	43

Note: The underline in primer 178F showed endonuclease *EcoR* I, the underline in primer 998R showed endonuclease *Hind* III.



连接体系 (20  $\mu$ L): 外源 DNA 片段 200 ng, 载体片段 100 ng, 10 $\times$ 连接缓冲液 2  $\mu$ L, T4 DNA 连接酶 1 U, ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 20  $\mu$ L, 16  $^{\circ}$ C 连接过夜。

### 1.2.3 目的基因的诱导表达

将含有重组质粒 pET30a-*PcPKS5* (实验室保存) 和本次构建的 pET30a-*VvSTS* 的 Rosetta 阳性菌株过夜培养, 次日, 菌液以 1 : 100 稀释于含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素和 25  $\mu$ g/mL 氯霉素的 LB 液态培养基中, 37  $^{\circ}$ C 进一步培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右, 分别以不同浓度 IPTG (0.2、0.5、1.0 mmol/L) 和不同时间 (2、4、6、8、10、22 h) 进行诱导。收集各条件下等量菌体, 加入 SDS 样品缓冲液裂解, SDS-PAGE 分离检测。

### 1.2.4 蛋白纯化、脱盐与浓缩

以筛选的最佳条件诱导表达蛋白, 离心收集细胞, 加入抑制剂和溶菌酶后, 超声破碎, 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清过 Ni-NTA 亲和树脂层析柱纯化重组蛋白, 用含咪唑的洗脱液洗脱目的蛋白, 收集各部分进行 SDS-PAGE 检测。

纯化后的蛋白过 PD-10 柱脱盐, 用截留分子量 (MWCO) 10 000 的滤膜浓缩蛋白。

### 1.2.5 酶催化反应与产物检测

250  $\mu$ L 体外酶促反应体系含有 50  $\mu$ mol/L *p*-香豆酰辅酶 A、100  $\mu$ mol/L 丙二酰辅酶 A、0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液以及 2.0  $\mu$ g 纯化蛋白。反应体系于一定温度下反应 60 min 后, 加入终浓度 5% 的乙酸, 然后用 250  $\mu$ L 的乙酸乙酯萃取, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 挥干后, 用 50  $\mu$ L 50% 色谱甲醇溶解。

酶促反应产物经 Sunfire<sup>TM</sup> C18 反相柱 (5.0  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm) 的 Waters HPLC 检测。流动相为甲醇 (A) 和水 (B), 流速为

0.8 mL/min, 梯度洗脱条件: 10%–70% A 30 min、70% A 10 min。白藜芦醇最大吸收波长为 306 nm。

### 1.2.6 酶动力学分析

酶动力学常数的测定是在一个底物浓度饱和的情况下, 用另一个底物介于其  $K_m$  的 0.2–6.0 范围内的 5 个浓度值进行计算获得的。试验使用 250  $\mu$ L 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液反应体系。常数参数的测定在其主产物的最适反应温度和最适 pH 条件下完成。 $K_m$  和  $K_{cat}$  值由 Lineweaver-Burke 曲线的结果得出。

## 2 结果

### 2.1 葡萄芪合酶基因 *VvSTS* 的克隆

以提取的葡萄叶片 gDNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增两个外显子 178 bp 和 998 bp。PCR 扩增体系: 5 $\times$ TransStart<sup>TM</sup> FastPfu 缓冲液 10  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 5  $\mu$ L, 100 ng/ $\mu$ L gDNA 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L, TransStart<sup>TM</sup> FastPfu DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95  $^{\circ}$ C 20 s, 62  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共循环 35 次; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析, 将两个外显子条带回收, 按一定比例 (178 bp : 998 bp = 1 : 3) 混合后作模板, 178F、998R 为引物, Overlap PCR 扩增带有酶切位点的 *VvSTS*, 基因全长 1 176 bp。

### 2.2 序列分析

4 种植物类型 III PKS 家族基因氨基酸序列: 紫花苜蓿 *Medicago sativa* MsCHS2<sup>[12]</sup>、圆叶大黄 *Rheum tataricum* RtSTS<sup>[13]</sup>、虎杖 *Polygonum cuspidatum* PcPKS5<sup>[10]</sup> 以及本文中克隆的葡萄 *Vitis vinifera* VvSTS, 比较如图 2 所示。多序列的比对由 DNAMAN 软件分析得出。

MsCHS2	MVSVSEIRKAQRAEGPATILLAIGTANFANQVEQSTYEDYERKITNSDEHT	50
RtSTS	MAPEESRHAETAVERNRAATVLAIGTANFPNCYYQADFFDYERATNSDEHT	50
PcPKS5	MAA...STEEMMKATTAATVLAIGTANFPNCYYQADFFDYERATNSDEHT	48
VvSTS	MASVEEFRNAQRAKGPATILLAIGTATFDFCVYQSDYADYERFVTKSEHT	50
MsCHS2	BLKEKFCRLCKSMIKRRYMYLTEEILKENPNVCEYMAPSLDARQDMVVV	100
RtSTS	HLKQKFRICCKSMIEKRYLHLTEEILKENPNIASFEAPSLDVRHNIQVK	100
PcPKS5	HLKHKFRICCKSMIEKRYLQLTEDILKENPNIGAYEAPSLDVRHEIQVK	98
VvSTS	ALKKKENRICCKSMIKRRYHLTEEMLEDFPNIGAYMAPSLNIRQEITTA	100
MsCHS2	EVFRLGKEAAVKAIKEWGQPKSKITHLIVCTTSGVDMPGADYQLTKLLGL	150
RtSTS	BVVLGKEAATKAINEWGQPKSKITRLIVCCAGVDMPGADYQLTKLLGL	150
PcPKS5	GVAQLGKEAATKAMQEWGQPKSKITHLIVCCAGVDMPGADYQLTKLLGL	148
VvSTS	BVPLGKEAATKALKEWGQPKSKITHLIVCTTSGVDMPGADYKIANLLGL	150
MsCHS2	RPYVRRMYMYQQGCFAGGTIVRLAKDLAENNKGARVLVVGSEVTAVIFRG	200
RtSTS	QLSVKRFMYHLGCVAGGTIVRLAKDLAENNKGARVLVVRSEMTPICFRG	200
PcPKS5	NSSVKRFMYHLGCVAGGTIVRLAKDLAENNKGARVLVVGSEMTPICFRG	198
VvSTS	EPSVRRMYLYHQGCVAGGTIVRLAKDLAENNAGARVLVVGSEITVVFIRG	200
MsCHS2	PSDTHIDSLVGQALFGDGAADVIVGSDPEVEIEKPIEFMVWTAQTIAHIS	250
RtSTS	PSETHIDSLVGQALFGDGAADVIVGANPDLSIERPIFELISTSQTIIPHS	250
PcPKS5	PSETHIDSLVGQALFGDGAADVIVGANPDLTVEKPIFELISTAQTIIIPS	248
VvSTS	PSEDALDLSVGQALFGDGAADVIVGSDPEDISIERPIELIVSAAQTIIIPS	250
MsCHS2	DGAIDGHLREAGLTFHLLKDVGVSKNITKALVEAFEPDGISDYNSTFW	300
RtSTS	DGAIEGHLREVGLSFQLYQTVESLISNCTETCLSKAFTPNISDWNSTFW	300
PcPKS5	DGAIEGHLREVGLSFQLYQNVFALVSNITETCLSEAFTPNISNWNSTFW	298
VvSTS	DGAIAGNIREVGLTFFLWPNVETLLISENTEKCLTQAFDPLGISDWNSTFW	300
MsCHS2	IAHPGGFAILLQVEQKLAKPEKMNATREVLSEYGNMSSACVLFILDEMR	350
RtSTS	IAHPGGFAILLIEATVGLKKEKIKATRCVLNDYGNMSSACVEFFIMDEMR	350
PcPKS5	IAHPGGFAILLHVEATVGINKEKIKATRCVLNDYGNMSSACVEFFIMDEMR	348
VvSTS	IAHPGGFAILLAVEAKLNLKKKLEATREVLSEYGNMSSACVLFILDEMR	350
MsCHS2	KKSTQNGLETTGEGLEWGVLFEGFGPLTIETVVLRSAI..	389
RtSTS	KKSLANGQVITGEGLEWGVLFEGFGPGVTVETVVLRSSVPLIT	391
PcPKS5	KKSLENGHATTGEGLEWGVLFEGFGPGITVETVVLRSPVPII.	388
VvSTS	KKSLKGERATTGEGLEWGVLFEGFGPLTIETVVLRSPIMVT	391

图2 四个植物类型 III PKSs 家族基因氨基酸序列比较

Fig. 2 Amino acid sequence comparison of four type III PKSs of plant origin. Note: Black shading shows amino acid identities. The active site residues conserved in the type III PKSs (Cys164, His303 and Asn336, *M. sativa* CHS2 numbering) are marked with hash symbols, and residues for CoA binding are marked with crosses. CHS active site residues are marked with filled inverted triangle. The abbreviations for species and accession numbers are: MsCHS2 (*Medicago sativa* P30074), RtSTS (*Rheum tataricum* AAP13782), PcPKS5 (*Polygonum cuspidatum* ACC76753), VvSTS (amino acid sequence isolated in this work).

VvSTS开放读码框大小为1 176 bp, 编码392个氨基酸, 蛋白分子量为43.1 kDa。本文克隆的VvSTS氨基酸序列与登录号DQ459351的氨基酸序列比较, 发现有一个氨基酸改变, Phe39改变为Tyr。Phe和Tyr均为芳香族类氨基酸, 且不在III型PKS家族酶的催化活性位点处, 对VvSTS活性不构成影响。

氨基酸序列比对结果发现, 即使具有相似的功能, 不同植物来源的STS同源性并不高, 如葡萄VvSTS氨基酸序列与*M. sativa* CHS2<sup>[12]</sup>、*R. tataricum* STS<sup>[13]</sup>氨基酸序列的同源性分别为71%和65%。PcPKS5氨基酸序列与*M. sativa* CHS2、*R. tataricum* STS氨基酸序列同源性分别为67%和87%。而VvSTS氨基酸序列与PcPKS5氨基酸序列的同源性为67%。

从图2可以看出, 植物类型III PKS家族的酶催化活性中心(三联体活性中心) Cys164、His303和Asn336(紫花苜蓿氨基酸序列顺序)在VvSTS中依旧是保守的, 且VvSTS包含85% CoA结合位点和93% CHS活性位点残基, 唯一发生改变的活性位点残基是Val98被Ile取代。PcPKS5也有三联体活性中心, 它包括69%的CoA结合位点和64% CHS活性位点<sup>[10]</sup>, 其中有5个活性位点残基改变, Val98、Thr132、Ser133、Val196和Thr197分别被Gln、Ile、Ala、Ile和Cys取代。

### 2.3 原核表达载体的构建与诱导表达

将Overlap PCR产物回收, 与pMD18-T载体连接, 转化TOP10感受态细胞, 用含有氨苄青霉素的X-Gal/IPTG/LB平板筛选阳性克隆菌, 扩大培养, 提取重组质粒pMD18-T-VvSTS, 测序分析VvSTS序列。分别用内切酶EcoR I、Hind III双酶切重组质粒pMD18-T-VvSTS和质粒pET30a, 回收VvSTS片段和线性pET30a, T4

DNA连接酶连接片段与载体, 构建原核表达载体pET30a-VvSTS, 转入TOP10感受态细胞中, 用含有卡那霉素的LB平板筛选。挑取单菌落扩大培养, 提取重组质粒, 用EcoR I/Hind III双酶切鉴定。

将构建成功的原核表达载体pET30a-VvSTS转化表达菌株Rosetta, 经含有卡那霉素和氯霉素的LB平板筛选, 得到阳性克隆。通过对比不同IPTG加量和不同诱导时间下表达量的差异, 选出最佳表达条件为:  $OD_{600}$ 为0.6左右时加入终浓度1.0 mmol/L的IPTG, 25 °C下诱导4 h, 进行大量表达。经Ni-NTA琼脂糖亲和层析纯化蛋白, 得到带有His标签的VvSTS重组蛋白, SDS-PAGE电泳图如图3所示, 其分子量大小约为43 kDa, 与预期大小相符。PD-10柱脱盐后SDS-PAGE电泳图如图4所示。经过截留分子量(MWCO) 10 000的滤膜浓缩后, 得VvSTS蛋白终浓度为1 mg/mL。

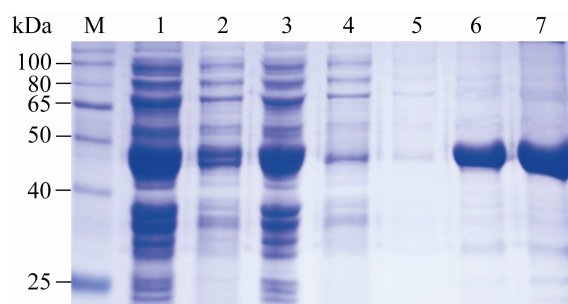


图3 VvSTS蛋白Ni<sup>2+</sup>树脂纯化后SDS-PAGE电泳图  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of VvSTS stained with Coomassie brilliant blue. M: protein molecular weight standard; 1: total protein from Rosetta cells harboring the His-tagged VvSTS construct after induction with IPTG for 4 h at 25 °C; 2: soluble fraction; 3: insoluble fraction; 4: unbound protein after Ni-NTA sepharose adsorption; 5: washing with elution buffer of low concentration of imidazole; 6, 7: recombinant VvSTS after Ni-NTA sepharose affinity chromatography.

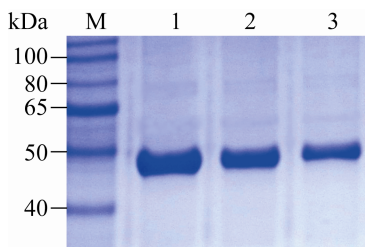


图4 VvSTS蛋白PD-10柱脱盐后SDS-PAGE电泳图  
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of VvSTS after desalting through PD-10 column. M: protein molecular weight standard; 1–3: recombinant VvSTS after desalting through PD-10 column.

虎杖芪合酶基因 (*PcPKS5*) 的原核表达载体已于实验室前期工作中构建成功<sup>[10]</sup>。通过对*PcPKS5*在不同诱导剂加量、不同诱导时间下表达量的比较,选出最优表达条件为:  $OD_{600}$ 为0.6左右时加入终浓度0.8 mmol/L的IPTG, 25 °C下,诱导6 h,做大量表达。经Ni-NTA琼脂糖亲和层析纯化后, SDS-PAGE电泳图如图5所示,纯化蛋白分子量大小与预期相符。PD-10柱脱盐后电泳图如图6所示。经过截留分子量 (MWCO) 10 000的滤膜浓缩后,得*PcPKS5*蛋白终浓度为2 mg/mL。

## 2.4 功能鉴定与酶学性质分析

白藜芦醇标准品高效液相色谱 (HPLC) 图谱如图7A所示。VvSTS催化

-香豆酰辅酶A (*p*-coumaroyl-CoA) 和丙二酰辅酶A (malonyl-CoA) 反应产物的HPLC图谱如图7B所示。标准品和催化产物的共色谱图如图7C所示,进一步证实了VvSTS在以

-香豆酰辅酶A和丙二酰辅酶A为底物时能有效催化白藜芦醇的合成。*PcPKS5*的功能及酶学性质见本实验室前期工作<sup>[10]</sup>。

## 2.5 VvSTS与PcPKS5的酶动力学分析

双倒数法 (Lineweaver-Burk) 测定VvSTS和*PcPKS5*酶动力学参数值,如表2所示。在同一体外酶促反应体系下,VvSTS与*PcPKS5*分别在

各自的最适反应条件 (VvSTS: pH 7.0, 50 °C; *PcPKS5*: pH 7.0, 40 °C) 下催化

-香豆酰辅酶A和丙二酰辅酶A,生成白藜芦醇。从 $K_m$ 值可以看出,两种酶对

-香豆酰辅酶A均表现出更高的底物亲和力;而在整体催化效率 ( $K_{cat}/K_m$ ) 上,*PcPKS5*为VvSTS的2.4倍。

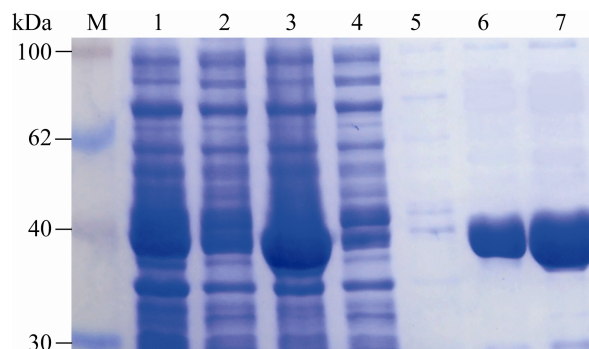


图5 *PcPKS5*蛋白纯化SDS-PAGE电泳图  
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of *PcPKS5* stained with Coomassie brilliant blue. M: protein molecular weight standard; 1: total protein from Rosetta cells harboring the His-tagged *PcPKS5* construct after induction with IPTG for 6 h at 25 °C; 2: soluble fraction; 3: insoluble fraction; 4: unbound protein after Ni-NTA sepharose adsorption; 5: washing with elution buffer of low concentration of imidazole; 6,7: recombinant *PcPKS5* after Ni-NTA sepharose affinity chromatography.

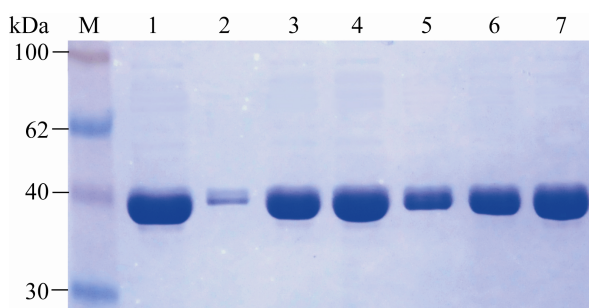


图6 *PcPKS5*蛋白PD-10柱脱盐后SDS-PAGE电泳图  
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of *PcPKS5* after desalting through PD-10 column. M: protein molecular weight standard; 1–7: recombinant *PcPKS5* after desalting through PD-10 column.



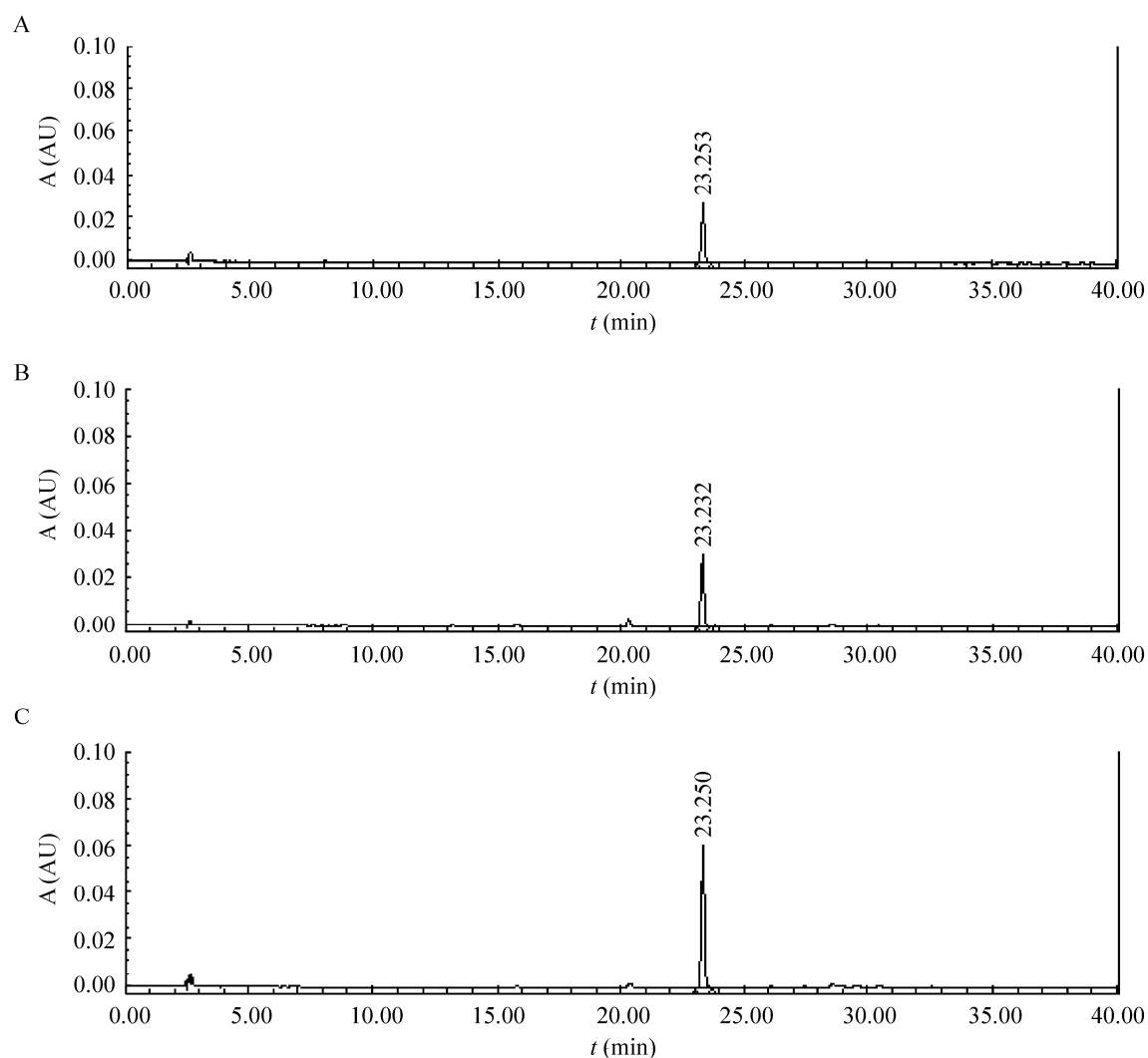


图 7 高效液相色谱 (HPLC) 检测图谱

Fig. 7 HPLC elution profiles. (A) HPLC elution profiles of resveratrol standard. (B) HPLC elution profiles of VvSTS enzyme *in vitro* reaction product. (C) HPLC elution profiles of resveratrol standard and VvSTS enzyme *in vitro* reaction product.

表 2 VvSTS 和 PcPKS5 酶动力学参数

Table 2 Steady-state kinetic parameters for VvSTS and PcPKS5

Enzyme	<i>p</i> -Coumaroyl-CoA			Malonyl-CoA		
	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
VvSTS	2.4	7.0	5 807	5.1	58.4	1 462
PcPKS5	3.7	4.4	13 910	3.9	23.2	2 836

### 3 讨论

STS 是植物类型 III 聚酮合酶超家族 (Plant-specific type III polyketide synthases superfamily) 成员之一, 其基因及蛋白一级结构序列具有较高的同源性, 是白藜芦醇生物合成的关键酶和限速酶。

大量研究表明, 白藜芦醇既对人类健康有保护作用, 又是一种植物抗毒素, 对植物病害有拮抗作用。白藜芦醇及其衍生物具有抗氧化、抗癌细胞增殖的活性<sup>[12-13]</sup>, 在肝脏保护、调节血脂、延长寿命等方面具有重要意义<sup>[14]</sup>。白藜芦醇植物基因工程研究是证明其在植物抗病中作用的重要方法, 葡萄 STS 基因转化烟草 *Nicotiana tabacum*, 提高了烟草对灰霉病 *Botrytis cinerea* 的抗病能力<sup>[15]</sup>。1976 年白藜芦醇作为植物抗毒素在葡萄 *Vitis vinifera* 中被发现<sup>[16]</sup>, 葡萄及其相关产品被认为是人类食品中白藜芦醇最主要的来源。虎杖 *Polygonum cuspidatum* 的主要功效成分包括白藜芦醇, 其含量是检测中药虎杖质量的重要指标之一, 它也是目前发现的白藜芦醇含量较高的物种。不同植物或同种植物不同组织部位中白藜芦醇的积累有明显差异<sup>[17]</sup>。葡萄 STS 转化烟草, 在烟草叶片中表达, 生成鲜重 300  $\mu\text{g/g}$  的白藜芦醇<sup>[15]</sup>。Beekwilder 等<sup>[18]</sup>利用 4CL 和葡萄 STS 融合基因外源转化 4-香豆酸合成白藜芦醇, 取得在重组大肠杆菌培养系统中白藜芦醇含量为 16 mg/L, 在重组酵母中为 6 mg/L 的研究结果。上述研究使用的均为葡萄 STS, 是否存在活性更好、效率更高的 STS 引起我们的兴趣。虎杖根茎中白藜芦醇的含量远高于葡萄中的含量<sup>[9]</sup>。推测不同 STS 的

催化能力是造成白藜芦醇在不同植物中含量差异的原因之一, 虎杖中有可能存在催化效率更高的 STS。

1984 年 Schoppner 研究证明 STS 对底物具有高度的专一性, *p*-香豆酰辅酶 A ( $K_m=2 \mu\text{mol/L}$ ) 是 STS 的最适底物<sup>[19]</sup>, 若换成其他结构类似物则无白藜芦醇生成。近年来, 关于葡萄 STS<sup>[20]</sup>和虎杖 STS<sup>[10]</sup>动力学参数的测定均有报道。由于各自的反应体系和反应条件有所不同, 导致两者动力学参数及催化效率没有可比性。为了筛选出更高活性芪合酶基因, 本研究在同一催化体系和试验批次下, 同时比较了两种不同植物来源 STS, 即来源于葡萄 VvSTS 和来源于虎杖 PcPKS5 的催化活性, 测定了各自在最适反应条件下的酶动力学参数。结果表明, VvSTS 和 PcPKS5 均对 *p*-香豆酰辅酶 A 具有高度的选择性。两者对 *p*-香豆酰辅酶 A 的催化效率 ( $K_{cat}/K_m$ ) 测定结果显示, PcPKS5 的活性为 VvSTS 的 2.4 倍, 进一步证明了不同来源 STS 催化活性确实存在差异, STS 活性的差异是造成了白藜芦醇在植物体内含量不同的原因之一。

迄今为止, 查尔酮合成酶 (Chalcone synthase, CHS) 是高等植物中最共同和分布最广泛的类型 III PKS, 所有已经得到功能验证的植物类型 III PKS 超家族其他成员 (包括 STS) 都来自于 CHS 广泛重复和后续的遗传变异<sup>[21]</sup>。基因重复和功能分化一直被看作是新基因起源的主要途径<sup>[22]</sup>。来自不同类群植物的 STS 基因在分子系统树上并不形成一个独立的分支, 而是分别于同一科植物的 CHS 基因结合在一起<sup>[23]</sup>。因此, 同为蓼科的 PcPKS5 与 RtSTS 具有高达 87% 的同源性, 且活性位点残基完全一致, 而同

具有 STS 活性的 VvSTS 与 PcPKS5 的同源性仅为 67%。在 CHS 活性位点残基中 VvSTS 只有 1 个改变, Val98 被 Ile 取代, 而 PcPKS5 改变了 5 个, Val98、Thr132、Ser133、Val196 和 Thr197 分别被 Gln、Ile、Ala、Ile 和 Cys 取代。VvSTS 和 PcPKS5 与 MsCHS2 的同源性分别为 71%和 67%。这些氨基酸的改变可能造成了不同的空间结构, 替代的氨基酸极有可能与酶活性有关。早先就有实验证明只需突变 CHS 中少数几个氨基酸, 就可使其具有 STS 活性<sup>[23]</sup>。植物类型 III PKS 家族内其他成员酶功能的多样性均来自其原型酶——CHS 活性位点的小的修饰, 这些小的变动影响了该类酶活性中心空间构象, 这种空间变化极大改变了酶分子的起始底物选择性、链延伸长度和环化反应机制<sup>[24]</sup>。有实验证明 STS 功能的获得主要是由于催化位点附近少数氨基酸的替换改变了活性中心的氢键骨架, 从而导致环化反应的特性发生改变<sup>[21,25]</sup>。STS 和 CHS 利用相同的底物, 即 *p*-香豆酰辅酶 A 和 丙二酰辅酶 A 形成相同的丁烯酮中间体。在后续反应中 STS 通过催化 C2/C7 aldol 环化生成白藜芦醇, 而 CHS 通过催化 C6/C1 克莱森环化生成柚皮素查尔酮(图 1)。Thr132 在 STS 和 CHS 不同的环化机制中发挥着至关重要的作用<sup>[25]</sup>。Thr132 位置的移动改变了围绕催化 Cys164 形成了“aldol-switch”硫酯酶样氢键网络, 从而使 STS 形成了与 CHS 不同的环化机制<sup>[26]</sup>。VvSTS 中 Thr132 是保守的, 而在 PcPKS5 中 Thr132 被 Ile 替代, 且两者催化产物均为白藜芦醇。为了进一步确定活性差异产生的原因, 氨基酸定点突变和蛋白晶体学分析等相关研究为我们下一步工作的重点。

## REFERENCES

- [1] Cheng LY, Liu SX. The application prospect and research status of resveratrol. Food Res Dev, 2005, 26(1): 25–27 (in Chinese).  
程丽英, 刘树兴. 白藜芦醇研究现状与应用展望. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 25–27.
- [2] Jang M, Pezzuto JM. Effects of resveratrol on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse kin. Cancer Lett, 1998, 134(1): 81–89.
- [3] Kimura Y, Ohminami H, Okuda H, et al. Effects of stilbene components of roots of *polygonum* ssp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats. Planta Med, 1983, 49(9): 51–54.
- [4] Nicholson SK, Tucker GA, Brameld JM. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. Proc Nutr Soc, 2008, 67(1): 42–47.
- [5] Vieira de Almeida LM, Piñeiro CC, Leite MC, et al. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. Neurochem Res, 2008, 33(1): 8–15.
- [6] Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, et al. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Curr Biol, 2006, 16(3): 296–300.
- [7] Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. Phytochemistry, 1977, 16(8): 1193–1196.
- [8] He SL, Zheng JG, Lin M, et al. Advances of biological function, regulatory mechanism of biosynthesis and genetic engineering of stilbenes in plant. J Agric Biotech, 2004, 12(1): 102–108 (in Chinese).  
何水林, 郑金贵, 林明, 等. 植物芪类次生代谢物的功能、合成调控及基因工程研究进展. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 102–108.
- [9] Gamini SJ, Hiranthi J, Eung-Seok L, et al. Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*. J Nat Prod, 1993, 56(10): 1805–1810.

- [10] Guo YW, Guo HL, Li X, et al. Two type III polyketide synthases from *Polygonum cuspidatum*: gene structure, evolutionary route and metabolites. *Plant Biotechnol Rep*, 2013, 7(3): 371–381.
- [11] Xu ML, Zhang Y, Ni XL. A high-quality extraction method for genomic DNA of grapevine. *North Hort*, 2011, (15): 172–174 (in Chinese).  
徐美隆, 章雨, 倪细炉. 一种高质量葡萄基因组 DNA 提取方法. *北方园艺*, 2011, (15): 172–174.
- [12] Ferrer JL, Jez JM, Bowman ME, et al. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol*, 1999, 6(8): 775–784.
- [13] Samappito S, Page JE, Schmidt J, et al. Aromatic and pyrone polyketides synthesized by a stilbene synthase from *Rheum tataricum*. *Phytochemistry*, 2003, 62(3): 313–323.
- [14] Dani C, Oliboni LS, Agostini F, et al. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicol in Vitro*, 2010, 24(1): 148–153.
- [15] Hain R, Reif HJ, Krause E, et al. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 1993, 361(6408): 153–156.
- [16] Langcake P, Pryce RJ. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Path*, 1976, 9(1): 77–86.
- [17] Cao Y, Zhang M, Yu HZ, et al. Study on determination of resveratrol in different plants and same plant tissues. *Hunan For Sci Technol*, 2003, 30(4): 32–34 (in Chinese).  
曹庸, 张敏, 于华忠, 等. 不同植物、同种植物不同组织部位中白藜芦醇含量变化研究. *湖南林业科技*, 2003, 30(4): 32–34.
- [18] Beekwilder J, Wolswinkel R, Jonker H, et al. Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Appl Environ Microb*, 2006, 72(8): 5670–5672.
- [19] Schöppner A, Kindl H. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *J Biol Chem*, 1984, 259(11): 6806–6811.
- [20] Dang W. The biochemical information research of resveratrol synthase from grape[D]. Xi'an: Northwest University, 2003 (in Chinese).  
党尉. 葡萄白藜芦醇合酶的生化信息研究[D]. 西安: 西北大学, 2003.
- [21] Austin MB, Noel JP. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep*, 2003, 20(1): 79–110.
- [22] Yang J, Gu HY. Duplication and divergent evolution of the CHS and CHS-like genes in the chalcone synthase (CHS) superfamily. *Chin Sci Bull*, 2006, 51(7): 745–749 (in Chinese).  
杨继, 顾红雅. 查尔酮合酶超家族 (chalcone synthase superfamily) 基因重复和分化的式样. *科学通报*, 2006, 51(7): 745–749.
- [23] Tropf S, Lanz T, Rensing SA, et al. Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *J Mol Evol*, 1994, 38(6): 610–618.
- [24] Ma LQ, Shi GL, Ye HC, et al. Plant-specific type III polyketide synthase superfamily: gene structure, function and metabolites. *Chin J Biotech*, 2010, 26(11): 1482–1492 (in Chinese).  
马兰青, 师光禄, 叶和春, 等. 植物类型 III 聚酮合酶超家族基因结构、功能及代谢产物. *生物工程学报*, 2010, 26(11): 1482–1492.
- [25] Austin MB, Bowman ME, Ferrer JL, et al. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. *Chem Biol*, 2004, 11(9): 1179–1194.
- [26] Lü HS, Liu CM, Lu P, et al. Plant-specific type III polyketide synthases superfamily: crystal structures and functions. *Chin J Biotech*, 2012, 28(1): 1–14 (in Chinese).  
吕鹤书, 柳春梅, 路平, 等. 植物类型 III 聚酮合酶超家族晶体结构与功能. *生物工程学报*, 2012, 28(1): 1–14.

(本文责编 郝丽芳)