

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201811016

引文格式: 曾祥玲, 邹晶晶, 王彩云. 桂花萜烯合酶(TPS)的生物信息学与原核表达分析 [J]. 广西植物, 2019, 39(5): 624–632.  
ZENG XL, ZOU JJ, WANG CY. Bioinformatic and prokaryotic expression analysis of terpene synthase (TPS) from *Osmanthus fragrans* [J].  
*Guihaia*, 2019, 39(5): 624–632.

# 桂花萜烯合酶 (TPS) 的生物信息学与原核表达分析

曾祥玲<sup>1,2</sup>, 邹晶晶<sup>1,2</sup>, 王彩云<sup>2\*</sup>

(1. 湖北科技学院 核技术与化学生物学院, 湖北 咸宁 437100; 2. 华中农业大学 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 挥发性萜烯类化合物是植物花和果实中重要的香气活性物质, 萜烯合酶(TPS)的种类和功能决定物种中萜烯类物质的多样性。桂花作为重要的香花植物, 萜烯类物质是其花香的重要成分, 但有关桂花萜烯合酶的研究却并不多。为揭示桂花萜烯类物质的生物合成机理, 该研究利用生物信息学分析了4个TPS蛋白的理化性质、亚细胞定位及其结构, 在原核表达系统中进行4个TPS蛋白的体外表达, 并对可溶性的TPS4重组蛋白进行了体外酶反应功能分析。结果表明:(1)4个TPS蛋白的理化性质差异较小, 但仅有TPS4蛋白定位于其他靶向, 不含信号肽, 延伸链的比例较低, 在靠近氨基端的区域内不含延伸链。(2)4个TPS蛋白在原核系统中均可成功表达, 但仅有TPS4获得了可溶性重组蛋白。(3)将纯化的TPS4重组蛋白分别与GPP、NDP和FPP进行反应, 均只检测到一种产物, 分别为反式- $\beta$ -罗勒烯、 $\beta$ -水芹烯和 $\alpha$ -法呢烯。这为揭示植物萜烯类物质生物合成的分子机理提供了参考, 对从蛋白水平研究桂花花香基因功能奠定了基础。

**关键词:** 桂花, 萜烯合酶, 原核表达, 花香

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2019)05-0624-09

## Bioinformatic and prokaryotic expression analysis of terpene synthase (TPS) from *Osmanthus fragrans*

ZENG Xiangling<sup>1,2</sup>, ZOU Jingjing<sup>1,2</sup>, WANG Caiyun<sup>2\*</sup>

(1. School of Nuclear Technology and Chemistry &amp; Biology, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, Hubei, China; 2. Key Laboratory for Biology of Horticultural Plants, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Volatile terpenes are important aroma active compounds in flowers and fruits of plant. Diversities of terpenes are usually determined by type and function of terpene synthase in different species. *Osmanthus fragrans* is an important fragrant plant, in which terpenes are the important components of floral scent. But there are few studies on terpene synthase in *O. fragrans*. To reveal the biosynthesis mechanism of terpenes in *O. fragrans*, we predicted the physicochemical properties, subcellular localization and structure of four TPS proteins by bioinformatics, and expressed them in prokary-

收稿日期: 2018-12-21

**基金项目:** 国家自然科学基金(31600569); 湖北省自然科学基金(2017CFB235); 湖北省教育厅科学技术研究项目(Q20182802); 湖北科技学院博士启动基金(2016-19XB002); 咸宁市科技计划项目(XNKJ-1808); 大别山资源创新项目(2015TD02) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31600569); Natural Science Foundation Program of Hubei Province (2017CFB235); Science and Technology Research Program of Hubei Provincial Department of Education (Q20182802); PhD Start-up Fund Program of Hubei University of Science and Technology (2016-19XB002); Science and Technology Plan Program of Xianning City (XNKJ-1808); Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains (2015TD02)]。

**作者简介:** 曾祥玲(1987-), 女, 湖北宜昌人, 博士, 讲师, 研究方向为园林植物品质生理与分子生物学, (E-mail) 15927332442@163.com。

**通信作者:** 王彩云, 博士, 教授, 主要从事园林植物品质生理与分子生物学研究, (E-mail) wangcy@mail.hzau.edu.cn。

otic expression system. Finally, the function of soluble TPS4 recombinant protein was analyzed by enzyme reaction *in vitro*. The results were as follows: (1) The physicochemical properties of the four TPS proteins had relatively little difference. Only TPS4 protein locating in other targets without signal peptide had low proportional extended strand and no extended strand near amidogen terminal. (2) All of the four TPS proteins were successfully expressed in prokaryotic system, but only TPS4 obtained soluble recombinant protein. (3) The purified TPS4 recombinant protein was reacted with GPP, NDP and FPP respectively, and only one product (trans- $\beta$ -ocimene,  $\beta$ -phellandrene and  $\alpha$ -farnesene) was detected. The results provide reference for functional analysis of floral scent related gene at protein level in *O. fragrans* and for revealing the molecular mechanism of terpenes biosynthesis in plant.

**Key words:** *Osmanthus fragrans*, terpene synthase (TPS), prokaryotic expression, floral scent

萜烯类化合物是植物中重要的挥发性物质,也是花和果实香味形成的重要活性物质,主要包含单萜、倍半萜和不规则萜类(Moses et al., 2013; Dudareva et al., 2013)。不同物种间的萜烯类物质成分和含量差异很大,熊敏等(2012)分析蜡梅花挥发油成分主要为倍半萜;蕙兰鲜花中主要是单萜类物质(张莹等,2013);梅花的挥发性成分中萜烯类物质含量很少(赵印泉等,2010)。物种内不同品种间在物质成分和含量上存在一定差异。杜永芹等(2013)比较不同品种蜡梅花精油成分发现,‘古蜡梅’中石竹烯占比较高,‘扬州黄’主要为 $\beta$ -萜澄茄油萜。由于萜烯类化合物在物种间或品种间的多样性,近年来已成为科学研究的热点。植物萜烯类化合物有两种合成途径:2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径(Methylerythritol-4-phosphate pathway, MEP)和甲羟戊酸途径(Mevalonate pathway, MVA)(Nagegowda, 2010)。萜烯合酶(Terpene synthase, TPS)是作用于萜烯物质合成最后一步的反应酶,将 MEP 途径产生的牻牛儿焦磷酸(Geranyl pyrophosphate, GPP)或 MVA 途径产生的法泥基焦磷酸(Farnesyl pyrophosphate, FPP)进一步催化成各种萜烯类化合物(Tholl, 2006; Degenhardt et al., 2009)。有的物种的 TPS 可催化 GPP 和 FPP 的顺式异构体橙花基二磷酸(Neryl diphosphate, NDP)和 Z,Z-FPP 产生新的化合物(Bleeker et al., 2011)。TPS 的种类和功能往往决定物种中萜烯物质的多样性,不同物种中萜烯合酶的种类和作用功能有很大的不同(Tholl et al., 2005; Garms et al., 2010; Martin et al., 2010)。目前关于萜烯合酶的挖掘和功能分析仅在拟南芥、葡萄、猕猴桃等少数物种中比较全面,其他

物种还有待研究。

桂花(*Osmanthus fragrans*)是著名香花植物,鲜花及精油在高端香水、香料和化妆品行业需求广泛。桂花花朵中的挥发性成分主要有萜烯类、芳香族类和酯类等物质(曹慧等,2009;杨秀莲等,2015)。萜烯类化合物是其主要成分,也是重要的香味活性物质,主要成分为单萜和不规则萜类(Xin et al., 2013; Cai et al., 2014)。不同桂花品种萜烯类物质的成分和含量差异大。Cai et al. (2014)的研究发现,‘厚瓣银桂’中反式- $\beta$ -罗勒烯最多,‘柳叶金桂’中 $\beta$ -紫罗兰酮最多,而‘镭橙丹桂’中芳樟醇最多。Zeng et al. (2015)进一步研究发现,TPS 是造成不同品种间萜烯类香气成分差异的关键基因,从中克隆了 4 个 TPS 基因成员,并在烟草中进行了初步的功能验证。本研究在课题组前期研究的基础上,对 4 个 TPS 蛋白的理化性质、亚细胞定位和结构进行生物信息分析,构建原核表达载体在大肠杆菌中进行体外表达,并纯化可溶性重组蛋白进行体外酶功能的验证,为揭示桂花萜烯类物质生物合成的分子机理提供参考,有助于将来提高和改善其他物种的香气。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

所用植物材料为华中农业大学校园苗圃内光照均匀且无病虫害的健康植株桂花品种‘柳叶金桂’(*Osmanthus fragrans* ‘Liuye jingui’)。对取样材料称重后立即置于液氮中速冻,尽快转移至-80℃冰箱保存备用。

## 1.2 方法

1.2.1 基因编码区序列获得 利用课题组前期克隆并已上传 NCBI 基因数据库的结果 [ GeneBank no. KT591180(TPS1)、KT591181(TPS2)、KT591182

(TPS3)和 KT591183(TPS4) ]。

1.2.2 蛋白生物信息学分析 利用生物信息学分析网站(表 1)预测编码蛋白理化性质、亚细胞定位、转运肽及蛋白质二级结构,为原核表达载体构

表 1 生物信息学分析网站与功能预测

Table 1 Website of bioinformatics analysis and function prediction

网站 Website	功能预测 Function prediction
ProtParam ( <a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a> )	理化性质分析 Physicochemical properties analysis
SignalP 4.1 Server ( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a> )	信号肽预测 Signal peptide prediction
TargetP 1.1 Server ( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a> )	亚细胞定位预测 Subcellular localization prediction
ChloroP 1.1 Server ( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/</a> )	转运肽预测 Transport peptide prediction
SPOMA ( <a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html">https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html</a> )	二级结构预测 Secondary structure prediction

建和体外蛋白功能解析提供依据。

1.2.3 原核表达载体的构建 根据基因编码序列设计引物,上游引物不含 ATG 起始密码子和 N-端信号肽序列,以 *Stu* I 和 *Xba* I 为双酶切位点,引物序列见表 2。以实验室保存的 TA-克隆载体为模板,将目的片段连接到 pET6xHN(Clontech 公司)原核表达载体上,挑取阳性克隆送公司测序。测序完全正确的原核表达载体转化 Transetta( DE3)( 全式金公司)感受态细胞。

1.2.4 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达及 SDS-PAGE 分析 挑取阳性的 Transetta( DE3) 菌株单克隆接种到 2 mL LB( 100 mg · L<sup>-1</sup> Amp) 培养基中,37 °C 200 r · min<sup>-1</sup> 振荡培养 12 h 后,将菌液按 1 : 50 的比例扩大培养,37 °C 200 r · min<sup>-1</sup> 振荡培养至 OD<sub>600 nm</sub> 为 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol · L<sup>-1</sup>,在 18 °C 150 r · min<sup>-1</sup> 的条件下诱导表达 14~16 h 后收集菌液。以不含目的基因的 pET6xHN-空载转化的 Transetta( DE3) 大肠杆菌为阴性对照。取收集的菌块加入 1/10 原菌液体积的 1 × PBS 缓冲液,加入溶菌酶至终浓度 0.75 mg · mL<sup>-1</sup>,并加入 DNase I 至 1U · mL<sup>-1</sup>,重悬,超声波 3 次,每次 10 s,期间在冰上放置 30 s。先 4 °C 10 000 ×g 离心 20 min,取上清至干净的离心管中,再用 1/10 原菌液体积的 1× PBS 缓冲液重悬

表 2 *Of*TPSs 原核表达载体构建所用引物

Table 2 Primers used for prokaryotic expression vector construction of *Of*TPSs

引物 Primer	序列 Sequence
TPS1-Y-F	5'-GAAGGCCTCTCGCCTAGTGTAACGC-3'
TPS1-Y-R	5'-GCTCTAGATCAATTAATAGGAGTGAAGAAACA-3'
TPS2-Y-F	5'-GAAGGCCTCTGCAGTCTACAAGAGATCC-3'
TPS2-Y-R	5'-GCTCTAGATTATGGACGGTGCACCAAG-3'
TPS3-Y-F	5'-GAAGGCCTCTGCTGCCCATGAACGAAC-3'
TPS3-Y-R	5'-GCTCTAGACTATGGCTGTGCAATTGAATG-3'
TPS4-Y-F	5'-GAAGGCCTCTGAGATATCAGGTGATCA-3'
TPS4-Y-R	5'-GCTCTAGATCAAATTAGAGGAAAGGGCTC-3'
pET-F	5'-TCGATCCCCGCGAAATTAATACGAC-3'
pET-R	5'-AGCAAAAAACCCCTCAAGACCCG-3'

沉淀。在得到的上清和沉淀悬浮液中分别加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液混匀,95 °C 加热 3~5 min,10 000 ×g 离心 2 min,上样进行 SDS-PAGE (5 %浓缩胶,12 %分离胶),检测蛋白表达结果。

1.2.5 重组蛋白的分离纯化及体外酶活性分析 取重组蛋白表达稳定而且可溶性较好的剩余菌液沉淀,按 1 mg 菌体沉淀加入 20 μL 菌体裂解液的比例加入 HisTALON xTractor Buffer,重悬沉淀。向每 2 mL HisTALON xTractor Buffer 中加入 1 μL DNase (1U · μL<sup>-1</sup>),轻轻混匀,冰浴 15 min,间歇性混合,4 °C 10 000 ×g 离心 20 min,小心收集干净的上清

液,用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜进行抽滤。参考说明书利用 HisTALONTM 重力柱(Clontech 公司)对重组蛋白进行纯化。用 Bradford 方法检测重组蛋白质的浓度,并将纯化过程中收集的各组分进行 SDS-PAGE 分析。为了后续研究不受影响,通过 PD-10 柱(GE 公司)过滤去除纯化后蛋白溶液中过量的咪唑,并将原有的洗脱缓冲液替换成反应缓冲液 [15 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MOPSO, 12.5 % (v/v) 甘油, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 抗坏血酸, 1  $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  吐温 20, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 氯化镁, 2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> DTT, pH 7.0]。向 5 mL 可密封的反应瓶中加入 50  $\mu\text{g}$  重组蛋白(以 100  $^{\circ}\text{C}$  加热 5 min 的 50  $\mu\text{g}$  重组蛋白为对照)和终浓度为 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的底物 GPP、FPP 或 NDP, 补加反应缓冲液至 2 mL, 混合均匀, 密封。置于 28  $^{\circ}\text{C}$  的摇床, 转速 125 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 反应 40 min。然后将固相微萃取(SPME)萃取头插入反应瓶内, 静置萃取 40 min。萃取完成之后, 进行 GC-MS 分析。

**1.2.6 GC-MS 分析** 用 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  HP-5MS 毛细管柱(J & W Scientific 公司)进行色谱分离, 以高纯度氦气(99.999%)为载气, 流速为 1.2 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。色谱分析条件: 起始柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ , 维持 3 min; 以 3  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度升至 73  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 3 min; 以 5  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  升至 220  $^{\circ}\text{C}$ , 维持 2 min。结合 HP5975B 四极质谱(Agilent Technologies 公司)进行质谱分析, 质谱条件如下: 传输线温度为 250  $^{\circ}\text{C}$ ; 离子源温度为 220  $^{\circ}\text{C}$ ; EI 电离模式; 电子能量为 70 eV; 扫描的质谱范围 45~450 amu。在相同的条件下, 对 C8-C40 的正构烷烃标样(每个化合物浓度为 0.005  $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ )(Sigma-Aldrich 公司)进行 GC-MS 分析, 计算目标物质的保留指数(RI)。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白质理化性质分析

登录 ProtParam 分析四个 TPS 蛋白氨基酸理化性质, 结果见表 3。TPS1 蛋白由 581 个氨基酸组成, 相对分子量 67.27, 理论等电点为 5.49, 负电荷残基 Asp+Glu 82, 正电荷残基 Arg+Lys 69, 半衰期为 30 h, 不稳定系数 55.60(不稳定系数 < 40 时稳定), 属于不稳定蛋白, 脂肪系数 92.19, 平均疏

水性为 -0.274, 为亲水蛋白。TPS2 蛋白由 555 个氨基酸组成, 相对分子量 63.68, 理论等电点为 6.08, 负电荷残基 Asp+Glu 74, 正电荷残基 Arg+Lys 65, 半衰期为 30 h, 不稳定系数 35.03, 属于稳定蛋白, 脂肪系数 87.35, 平均疏水性为 -0.350, 为亲水蛋白。TPS3 蛋白由 591 个氨基酸组成, 相对分子量 68.27, 理论等电点为 6.07, 负电荷残基 Asp+Glu 74, 正电荷残基 Arg+Lys 67, 半衰期为 30 h, 不稳定系数 48.01, 属于不稳定蛋白, 脂肪系数 88.97, 平均疏水性为 -0.299, 为亲水蛋白。TPS4 蛋白由 548 个氨基酸组成, 相对分子量 63.53, 理论等电点为 5.23, 负电荷残基 Asp+Glu 75, 正电荷残基 Arg+Lys 54, 半衰期为 30 h, 不稳定系数 52.04, 属于不稳定蛋白, 脂肪系数 97.12, 平均疏水性为 -0.247, 为亲水蛋白。

### 2.2 蛋白亚细胞定位和信号肽预测

利用常用在线工具 TargetP 1.1 Server 对 TPS 蛋白进行亚细胞定位预测, 结果见表 4。TPS1 定位在叶绿体中的概率为 0.831, 线粒体为 0.131, 为分泌蛋白的可能性 0.028, 其他的可能性为 0.067, 因此定位于叶绿体的可信度最高。TPS2 位于叶绿体的概率为 0.226, 线粒体为 0.530, 为分泌蛋白的可能性 0.028, 其他的可能性为 0.196, 因此有可能定位于线粒体。TPS3 定位于叶绿体的概率为 0.409, 线粒体为 0.222, 为分泌蛋白的可能性 0.071, 其他的可能性为 0.245, 因此可能定位于叶绿体。TPS4 位于叶绿体的概率为 0.145, 线粒体为 0.147, 为分泌蛋白的可能性 0.100, 其他的可能性为 0.804。SignalP 4.1 Server 分析 4 个 TPS 蛋白未出现明显的信号肽和信号肽剪切位点, 结果未列出。ChloroP 1.1 Server 分析 TPS1 和 TPS3 的转运肽长度分别为 47 个和 38 个氨基酸。

### 2.3 TPS 蛋白二级结构预测

运用 SPOMA 预测 TPS 二级结构, 结果如表 5 和图 1。TPS1 蛋白中 391 个氨基酸形成  $\alpha$ -螺旋, 占比最多, 为 67.30%; 32 个氨基酸形成延伸链, 占比 5.51%; 21 个氨基酸形成  $\beta$ -转角, 占比 3.61%; 还有 137 个形成无规则卷曲, 占整条链 23.58%。TPS2 蛋白中 369 个氨基酸形成  $\alpha$ -螺旋, 占比最多, 为 66.49%; 23 个氨基酸形成延伸链, 占比 4.14%;

表 3 *OfTPS* 蛋白的一级结构预测结果  
Table 3 Analysis of primary structure of *OfTPS* proteins

一级结构特性 Primary structural trait	预测结果 Prediction result			
	TPS1	TPS2	TPS3	TPS4
氨基酸数目 Number of amino acid	581	555	591	548
分子量 Molecular weight (kDa)	67.27	63.68	68.27	63.53
等电点 PI	5.49	6.08	6.07	5.23
负电荷残基 Asp+Glu Negatively charged residues Asp+Glu	82	74	74	75
正电荷残基 Arg+Lys Positively charged residues Arg+Lys	69	65	67	54
半衰期 Half-life (h)	30	30	30	30
不稳定系数 Instability index	55.60	35.03	48.01	52.04
脂肪系数 Aliphatic index	92.19	87.35	88.97	97.12
平均疏水性 Grand average of hydrophobicity	-0.274	-0.350	-0.299	-0.247

表 4 *OfTPS* 蛋白的亚细胞定位预测结果  
Table 4 Prediction of subcellular localization of *OfTPS* proteins

亚细胞定位 Subcellular localization	预测结果 Prediction result			
	TPS1	TPS2	TPS3	TPS4
叶绿体转运肽 cTP	0.831	0.226	0.409	0.145
线粒体靶向肽 mTP	0.131	0.530	0.222	0.147
分泌途径信号肽 SP	0.028	0.048	0.071	0.100
其他靶向肽 Other TP	0.067	0.196	0.245	0.804
预测位置 Prediction location	C	M	C	—
可信度 Reliability class	2	4	5	2
转运肽长度 cTP-length	47	—	38	—

21 个氨基酸形成  $\beta$ -转角, 占比 3.78%; 还有 142 个形成无规则卷曲, 占整条链 25.59%。TPS3 蛋白中 399 个氨基酸形成  $\alpha$ -螺旋, 占比最多, 为 67.51%; 25 个氨基酸形成延伸链, 占比 4.23%; 17 个氨基酸形成  $\beta$ -转角, 占比 2.88%; 还有 150 个形成无规则卷曲, 占整条链 25.38%。TPS4 蛋白中 379 个氨基酸形成  $\alpha$ -螺旋, 占比最多, 为 69.16%; 20 个氨基酸形成延伸链, 占比 3.65%; 19 个氨基酸形成  $\beta$ -转角, 占比 3.47%; 还有 130 个形成无规则卷曲, 占整条链 23.72%。从图 1 可以看出, TPS1、TPS2、TPS3 蛋白在 N 端均存在延伸链, TPS1 的延伸链密度最大, TPS3 次之, TPS2 较少。TPS4 的 N 基端没有延伸链。TPS1 的 N 端延伸链涵盖 59 个氨基酸的区域内, TPS2 涉及 42 个氨基酸的区域, TPS3 涉及 46 个

氨基酸的区域。

## 2.4 TPS 重组蛋白的原核表达分析

原核表达载体的构建过程中, TPS1 和 TPS3 分别去掉了 47 和 38 个氨基酸的转运肽, 四个蛋白的 N 端均增加了 24 个氨基酸的组蛋白标签, 经 ProtParam 预测的重组蛋白分子量分别为 65、66、67、66 kDa。构建正确的原核表达载体转化至大肠杆菌 *Transetta DE3* 中, 经过诱导, 4 个重组蛋白都能够在大肠杆菌中顺利地表达, 表达蛋白的分子量介于 50~70 kDa 之间, 说明与预期的蛋白大小一致 (图 2; A)。对表达的重组蛋白进行溶解度分析, 结果只有 TPS4 蛋白在上清液中有表达, 其他三个重组蛋白在上清液中几乎检测不到 (图 2; B)。将 TPS4 蛋白进行进一步的蛋白分离与纯化,

表 5 *Of*TPS 蛋白的二级结构预测结果  
Table 5 Analysis of secondary structure of *Of*TPS proteins

二级结构 Secondary structure	预测结果 Prediction results							
	TPS1		TPS2		TPS3		TPS4	
	个数 Number	占比 Percentage (%)	个数 Number	占比 Percentage (%)	个数 Number	占比 Percentage (%)	个数 Number	占比 Percentage (%)
$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -helices	391	67.30	369	66.49	399	67.51	379	69.16
延伸链 Extended strand	32	5.51	23	4.14	25	4.23	20	3.65
$\beta$ -转角 $\beta$ -turn	21	3.61	21	3.78	17	2.88	19	3.47
无规则卷曲 Random coil	137	23.58	142	25.59	150	25.38	130	23.72

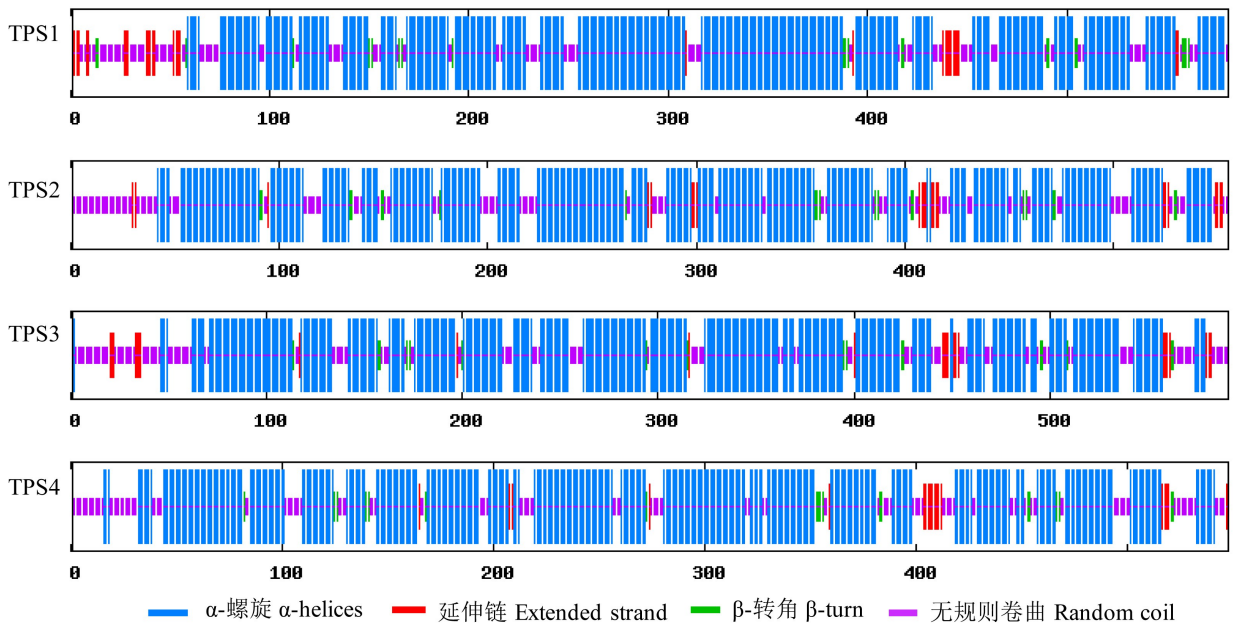


图 1 *Of*TPS 蛋白的二级结构

Fig. 1 Secondary structure of *Of*TPS proteins

整个蛋白的分离纯化过程如图 2:C 所示,最终能够得到较好完整性和较高纯度的 TPS4 重组蛋白,可用于进一步的蛋白功能分析。

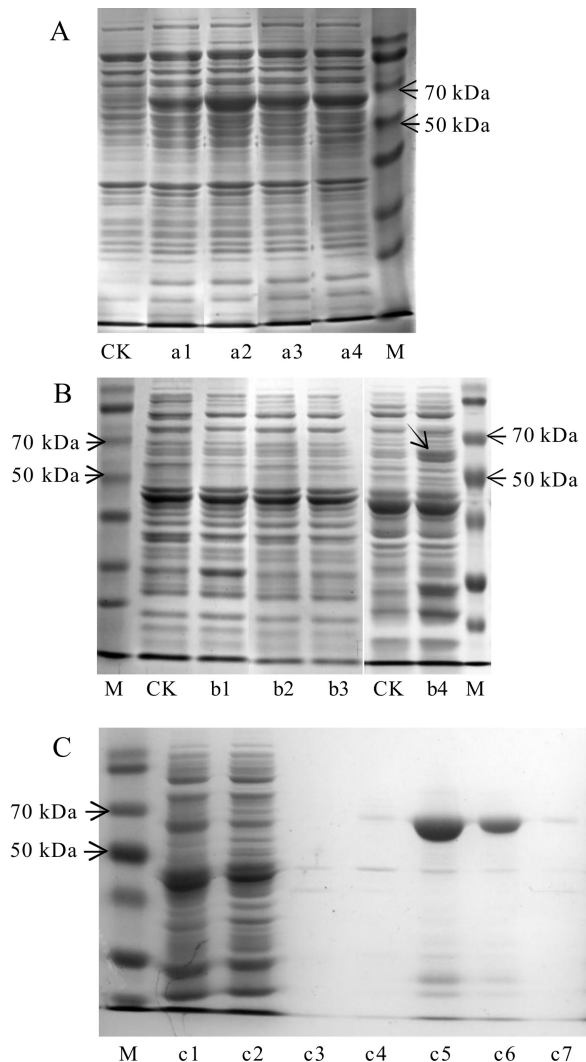
### 2.5 TPS4 重组蛋白的功能分析

将纯化的 TPS4 重组蛋白与底物 GPP、FPP 和 NDP 分别在反应缓冲液中进行反应,反应产物用 SPME-GC-MS 方法进行产物检测(图 3)。由图 3 可知,与经过高温加热失活后的 TPS 重组蛋白(CK)相比,未加热蛋白与 GPP 反应后,在保留时间( $RT$ ) 16.95 min 的位置出现明显特征峰,经过质谱特征和保留指数( $RI = 1047$ ) 鉴定为反式- $\beta$ -罗勒烯;与

FPP 反应后,在保留时间( $RT = 1505$ ) 33.30 min 的位置出现特征峰,鉴定为  $\alpha$ -法呢烯;与 NDP 反应后,在保留时间( $RT = 1021$ ) 16.90 min 的位置出现微弱特征峰,鉴定为  $\beta$ -水芹烯。该蛋白与 3 种底物分别进行反应,都只产生一种化合物。

### 3 讨论

大肠杆菌原核表达系统具有遗传背景清楚、培养简单、应用广泛等特点,可用于蛋白功能验证、酶活性分析、抗体制备等多个领域 (Cabrita &



注: A. *OfTPS* 蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析; B. *OfTPS* 蛋白表达的溶解度分析; C. *OfTPS4* 蛋白分离纯化过程的 SDS-PAGE 分析。图(A)和(B)中 1 为 *OfTPS1*, 2 为 *OfTPS2*, 3 为 *OfTPS3*, 4 为 *OfTPS4*, CK 为空白对照。图(C)中的 c1 为纯化之前的上清液, c2 为经过纯化柱之后的上清液, c3 为经过平衡缓冲液洗脱后溶液, c4 为经过含  $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  咪唑的平衡缓冲液洗脱后溶液, c5-7 为经过含  $150 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  咪唑的洗脱液洗脱后的 *OfTPS4* 蛋白溶液。M 为蛋白标准分子量。

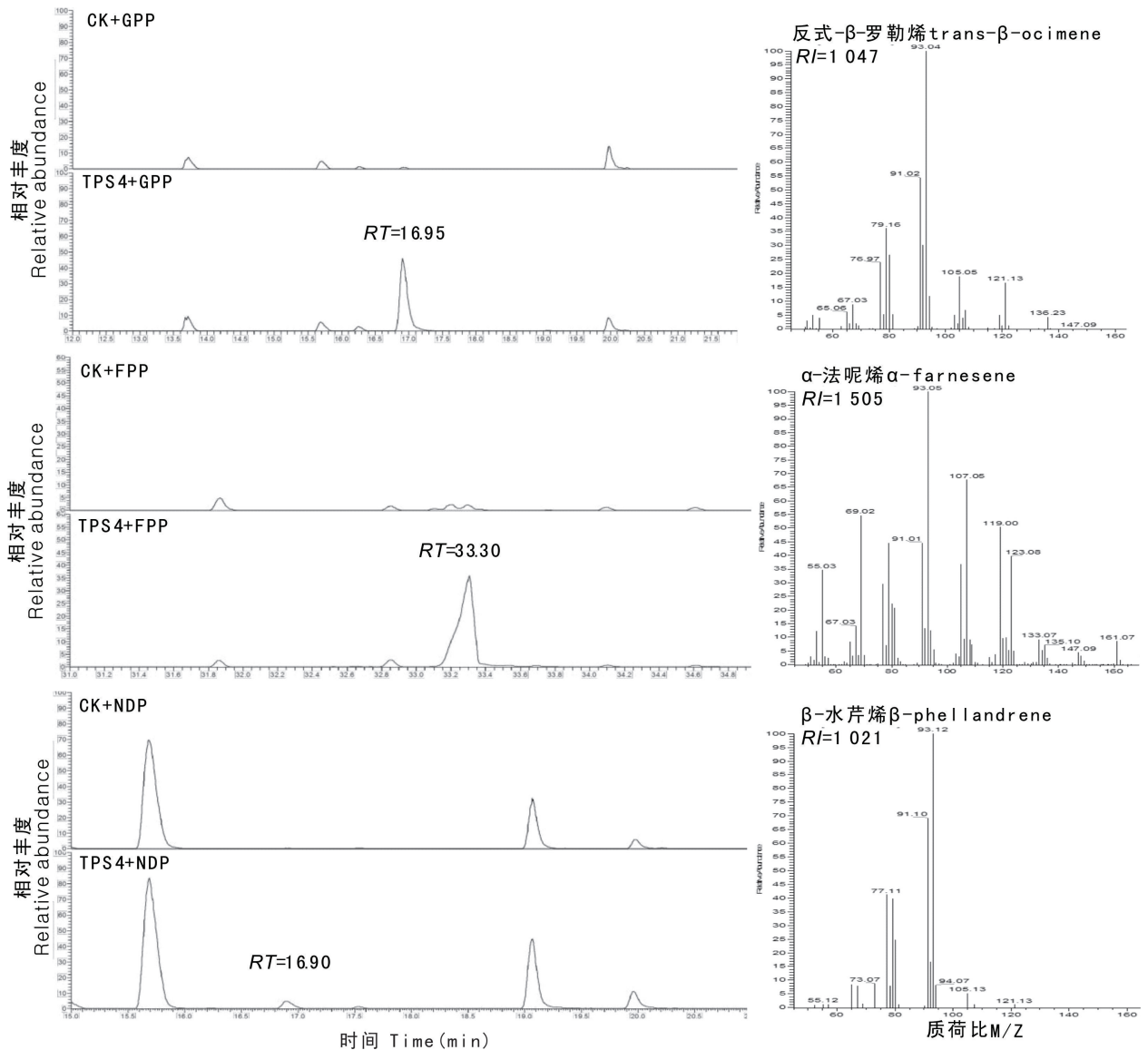
Note: A. SDS-PAGE analysis of *OfTPS* proteins expression in *Escherichia coli*; B. Solubility analysis of *OfTPS* proteins expression; C. SDS-PAGE analysis of *OfTPS4* protein purification process. In figure (A) and (B), 1 means *OfTPS1*, 2 means *OfTPS2*, 3 means *OfTPS3*, 4 means *OfTPS4*, CK means the blank control. In figure (C), c1 means the supernatant before purification, c2 means the supernatant undergoing the purification column, c3 means the solution after elution by equilibration buffer, c4 means the solution after elution by equilibration buffer including  $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  imidazole, c5-7 mean the solution after elution by elution buffer including  $150 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  imidazole. M represents the standard protein molecular weight.

图 2 *OfTPS* 蛋白的原核表达及分离纯化结果

Fig. 2 Results of expression and isolation of *OfTPS* proteins in *Escherichia coli* Transetta DE3

Bottomley, 2004; Terpe, 2006)。获得产量高且以可溶形式表达的外源重组蛋白是实际应用的关键。但是,蛋白可溶性与自身氨基酸组成、蛋白亲水性、等电点等有一定关系,在原核系统中表达的真核蛋白往往以不可溶性的包涵体形式存在,不具备生物学活性(Wilkinson & Harrison, 1991; Shimada et al., 2005)。本研究将 4 个桂花 TPS 蛋白在大肠杆菌原核系统中实现了表达,但只有 TPS4 获得了可溶性蛋白,另外 3 个的重组蛋白均以包涵体形式存在。比较它们的理化性质发现,4 个 TPS 蛋白均为亲水性蛋白;TPS4 蛋白与其他三个蛋白的理化性质相差不大,仅 TPS4 等电点和正电荷残基略低,脂肪系数略高。亚细胞定位和信号肽预测发现,TPS1 和 TPS3 定位于质体,在蛋白的氨基端分别具有明显的 47 和 38 个氨基酸的转运肽。去除预测转运肽之后的 TPS1 蛋白等电点为 5.22,脂肪系数 95.19,正电荷残基 63,与 TPS4 蛋白相差不大(结果未列出)。可见,蛋白理化性质并不是引起其他三个 TPS 形成包涵体的主要原因。有研究发现,信号肽可导致原核表达系统中包涵体的形成(Bohlmann et al., 1998; Crowell et al., 2002)。本研究只有 TPS1 和 TPS3 预测到明显的转运肽,比较 4 个 TPS 蛋白的二级结构,结果发现,TPS4 中的  $\alpha$ -螺旋比例高于另外三个,而延伸链比例低于另外三个蛋白。在 TPS1、TPS2 和 TPS3 靠近氨基端的区域内均有延伸链的存在,而 TPS4 的氨基端不存在延伸链;而且 TPS1、TPS2 和 TPS3 的氨基端延伸链覆盖区域长于转运肽预测长度,说明它们实际的信号肽长度可能大于预测值。由此说明,蛋白质二级结构延伸链的比率和存在区域很可能影响蛋白在原核系统表达的溶解度。

萜烯合酶是一个中等规模的蛋白家族,大多萜烯合酶都具有催化 GPP 和 FPP 的双重功能,分别产生不同种类的萜烯类化合物(Tholl, 2006; Chen et al., 2011)。我们前期发现,在烟草中表达 4 个 TPS 基因均只能检测到一种产物,TPS4 基因的产物是一种倍半萜物质  $\alpha$ -法呢烯(Zeng et al., 2015)。本研究将可溶性的 TPS4 蛋白分别与 GPP、FPP 和 NDP 反应,分别检测到一种底物。相同体系下,将 TPS4 蛋白与 GPP 反应产生反式- $\beta$ -罗勒烯,



注：A. 重组 *OjTPS4* 蛋白与底物(GPP、FPP 和 NDP)反应产物的 GC 图；B. 目标产物的 MS 图。

Note: A. GC trace of reaction products by recombinant *OjTPS4* protein and its substrates (GPP, FPP and NDP); B. Mass spectra of the products.

图 3 *OjTPS4* 蛋白体外酶活性分析

Fig. 3 Enzyme activity analysis of *OjTPS4* protein *in vitro*

TPS4 蛋白与 FPP 反应产生大量的  $\alpha$ -法呢烯,与 NDP 反应只检测到少量  $\beta$ -水芹烯,说明 TPS4 蛋白催化底物 FPP 的活性最高,虽可催化 GPP 的顺式异构体 NDP,但效率不高。我们前期也发现,TPS3 基因在烟草中表达同样产生反式- $\beta$ -罗勒烯,而且 TPS3 和 TPS4 同聚为 TPS-b 亚家族(Zeng et al., 2015)。由此说明,桂花中的 TPS4 具有催化 GPP 和 FPP 的双重功能;与 TPS3 不仅起源较近,而且催化相同的反应,应属同工酶。虽然,烟草中的基

因表达和体外酶活性分析都证明从花瓣中获得的 TPS4 可产生倍半萜  $\alpha$ -法呢烯(Zeng et al., 2015)。但研究发现,桂花的花瓣挥发物中很少含有倍半萜类物质,也未曾检测到  $\alpha$ -法呢烯的存在(曹慧等,2009;Xin et al., 2013;杨秀莲等,2015)。这可能是由两方面的原因造成的:一是由于 TPS4 在桂花花瓣中的基因表达丰度太低;二是因为桂花花瓣中存在的 FPP 底物不足。本研究结果为揭示桂花萜烯类物质生物合成的机理提供参考,也为从



蛋白水平研究桂花花香形成奠定基础。

## 参考文献:

- BLEEKER PM, SPYROPOULOU EA, DIERGAARDE PJ, et al., 2011. RNA-seq discovery, functional characterization, and comparison of sesquiterpene synthases from *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites* trichomes [J]. *Plant Mol Biol*, 77: 323–336.
- BOHLMANN J, MEYERGAUEN G, CROTEAU R, 1998. INAUGURAL ARTICLE by a recently elected academy member: Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 4126–4133.
- CABRITA LD, BOTTOMLEY SP, 2004. Protein expression and refolding—A practical guide to getting the most out of inclusion bodiprotein expression and refolding—A practical guide to getting the most out of inclusion bodies [J]. *Biotechnol Ann Rev*, 10(4): 31–50.
- CAI X, MAI RZ, ZOU JJ, et al., 2014. Analysis of aroma-active compounds in three sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars by gas-chromatography-olfactometry and GC-mass spectrometry [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 15(7): 638–648.
- CAO H, LI ZG, SHEN DL, 2009. GC/MS fingerprint analysis of *Osmanthus fragrans* Lour. in different varieties [J]. *Acta Hortic Sin*, 36(3): 391–398. [曹慧, 李祖光, 沈德隆, 2009. 桂花品种香气成分的 GC/MS 指纹图谱研究 [J]. *园艺学报*, 36(3): 391–398.]
- CHEN F, THOLL D, BOHLMANN J, et al., 2011. The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom [J]. *Plant J*, 66: 212–229.
- CROWELL AL, WILLIAMS DC, DAVIS EM, et al., 2002. Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 405(1): 112–121.
- DEGENHARDT J, KÖLLNER TG, GERSHENZON J, 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants [J]. *Phytochemistry*, 70: 1621–1637.
- DU YQ, TIAN XL, GAN JZ, et al., 2013. Essential oils extracted from different varieties of wintersweet (*Chimonanthus praecox*) [J]. *J Beijing For Univ*, 35(Suppl.1): 81–85. [杜永芹, 田晓龙, 甘建忠, 等, 2013. 不同品种蜡梅花精油成分的研究 [J]. *北京林业大学学报*, 35(增刊1): 81–85.]
- DUDAREVA N, KLEMPIEN A, MUHLEMANN JK, et al., 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds [J]. *New Phytol*, 198(1): 16–32.
- GARMS S, KOLLNER TG, BOLAND W, 2010. A multiproduct terpenesynthase from *Medicago truncatula* generates cadalane sesquiterpenes via two different mechanisms [J]. *J Organ Chem*, 75: 5590–5600.
- MARTIN DM, AUBOURG S, SCHOUWEY M, et al., 2010. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays [J]. *BMC Plant Biol*, 10: 226.
- MOSES T, POLLIER J, THEVELEIN JM, et al., 2013. Bioengineering of plant (tri)terpenoids: From metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro* [J]. *New Phytol*, 200(1): 27–43.
- NAGEGOWDA DA, 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation [J]. *FEBS Lett*, 584(14): 2965–2973.
- SHIMADA K, NAGANO M, KAWAI M, et al., 2005. Influences of amino acid features of glutathione S-transferase fusion proteins on their solubility [J]. *Proteomics*, 5(15): 3859–3863.
- TERPE K, 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(2): 211–222.
- THOLL D, CHEN F, PETRI J, et al., 2005. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers [J]. *Plant J*, 42(5): 757–771.
- THOLL D, 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 9: 297–304.
- WILKINSON DL, HARRISON RG, 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli* [J]. *Nat Biotechnol*, 9: 443–448.
- XIN HP, WU BH, ZHANG HH, et al., 2013. Characterization of volatile compounds in flowers from four groups of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars [J]. *Can J Plant Sci*, 93: 923–931.
- XIONG M, ZHOU MQ, XIANG L, et al., 2012. Analysis of essential oil in *Chimonanthus praecox* by GC-MS [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 31(2): 182–186. [熊敏, 周明芹, 向林, 等, 2012. 蜡梅花挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. *华中农业大学学报*, 31(2): 182–186.]
- YANG XL, SHI TT, WEN AL, et al., 2015. Variance analysis of aromatic components from different varieties of *Osmanthus fragrans* [J]. *J NE For Univ*, 43(1): 83–87. [杨秀莲, 施婷婷, 文爱林, 等, 2015. 不同桂花品种香气成分的差异分析 [J]. *东北林业大学学报*, 43(1): 83–87.]
- ZENG XL, LIU C, ZHENG RR, et al., 2015. Emission and accumulation of monoterpene and the key terpene synthase (TPS) associated with monoterpene biosynthesis in *Osmanthus fragrans* Lour [J]. *Front Plant Sci*, 6: 1232.
- ZHANG Y, LI XL, WANG Y, et al., 2011. Changes of aroma components in *Oncidium Sharry Baby* in different florescence and flower parts [J]. *Sci Agric Sin*, 44(1): 110–117. [张莹, 李辛雷, 王雁, 等, 2011. 文心兰不同花期及花朵不同部位香气成分的变化 [J]. *中国农业科学*, 44(1): 110–117.]
- ZHAO YQ, ZHOU SJ, PENG PH, et al., 2011. Analysis of volatile compounds from *Prunus mume* flowers [J]. *Guihaia*, 31(4): 554–558. [赵印泉, 周斯建, 彭培好, 等, 2011. 三轮玉蝶梅花挥发性成分的分析 [J]. *广西植物*, 31(4): 554–558.]