

· 生物技术与方法 ·

菘蓝中松脂醇-落叶松脂素还原酶编码基因 *IiPLR2* 的克隆与功能分析

李蓉蓉, 马雪祺, 肖莹*

上海中医药大学中药研究所 中药新资源与品质评价中管局重点研究室 中药资源与生物技术中心,
上海 201203

李蓉蓉, 马雪祺, 肖莹. 菘蓝中松脂醇-落叶松脂素还原酶编码基因 *IiPLR2* 的克隆与功能分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2270-2281.

LI Rongrong, MA Xueqi, XIAO Ying. Cloning and functional characterization of the pinoresinol-lariciresinol reductase gene *IiPLR2* in *Isatis indigotica*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2270-2281.

摘要: 松脂醇-落叶松脂素还原酶(pinoresinol-lariciresinol reductase, PLR)是植物中木脂素生物合成的关键酶, 能连续催化两步反应分别生成落叶松脂素和开环异落叶松脂素。落叶松脂素等木脂素类成分是中药板蓝根发挥抗病毒活性的有效成分。为了研究板蓝根基原植物菘蓝中落叶松脂素生物合成关键酶 PLR 的功能, 从菘蓝(*Isatis indigotica*)中克隆得到 *IiPLR2* 基因序列, 全长 954 bp, 编码 317 个氨基酸; 多序列比对分析显示 *IiPLR2* 具有保守的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)结合基序; 进化树分析显示 *IiPLR2* 与来自拟南芥的 *AtPrR1* 聚在同一分支; 构建原核表达载体 pET32a-*IiPLR2*, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中进行蛋白诱导表达纯化; 体外酶活实验检测发现 *IiPLR2* 能够催化松脂醇生成落叶松脂素, 并能进一步催化落叶松脂素生成开环异落叶松脂素。*IiPLR2* 编码基因的克隆、序列分析及催化功能研究丰富了菘蓝中该类功能蛋白的认识, 完善了菘蓝木脂素生物合成途径, 为开展木脂素类成分的代谢调控和合成生物学研究提供了功能元件, 也为深入研究该类蛋白的空间结构与催化功能的关系等奠定了基础。

关键词: 菘蓝; 松脂醇-落叶松脂素还原酶; 木脂素; 落叶松脂素; 开环异落叶松脂素

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFC3504800, 2022YFC3501700); 国家自然科学基金(32170402); 上海市优秀学术带头人项目(23XD1423500)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFC3504800, 2022YFC3501700), the National Natural Science Foundation of China (32170402), and the Program of Shanghai Academic and Technology Research Leader (23XD1423500).

*Corresponding author. E-mail: xiaoyingtcm@shutcm.edu.cn

Received: 2024-01-09; Accepted: 2024-03-13; Published online: 2024-05-07

Cloning and functional characterization of the pinoresinol-lariciresinol reductase gene *IiPLR2* in *Isatis indigotica*

LI Rongrong, MA Xueqi, XIAO Ying*

Institute of Chinese Materia Medica Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory for New Resources & Quality Evaluation of Chinese Medicine Research and Development Center of Chinese Medicine Resources and Biotechnology, Shanghai 201203, China

Abstract: The pinoresinol-lariciresinol reductase (PLR), a crucial enzyme in the biosynthesis of lignans in plants, catalyzes a two-step reaction to produce lariciresinol and secoisolariciresinol. Lignans such as lariciresinol are the effective components of traditional Chinese medicine Radix Isatidis in exerting antiviral activity. In order to study the function of the key enzyme PLR in the biosynthesis of lariciresinol in *Isatis indigotica*, the original plant of Radix Isatidis, *IiPLR2* was cloned from *I. indigotica*, with a full length of 954 bp, encoding 317 amino acids. Multiple sequence alignment showed that *IiPLR2* contained a conserved nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-binding motif. The phylogenetic tree showcased that *IiPLR2* shared the same clade with *AtPrR1* from *Arabidopsis thaliana*. The prokaryotic expression vector pET32a-*IiPLR2* was constructed and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) competent cells for protein expression. The purified enzyme *IiPLR2* could catalyze the conversion of pinoresinol to lariciresinol and the conversion of lariciresinol to secoisolariciresinol. The cloning, sequencing, and catalytic functional analysis of *IiPLR2* in this study enrich the understanding of this kind of functional proteins in *I. indigotica* and supplement the biosynthesis pathways of lignans. Moreover, this study provides a functional module for further research on metabolic regulation and synthetic biology and lays a foundation for comprehensively revealing the relationship between the spatial structures and catalytic functions of such proteins.

Keywords: *Isatis indigotica*; pinoresinol-lariciresinol reductases; lignan, lariciresinol; secoisolariciresinol

菘蓝是十字花科(Brassicaceae)菘蓝属植物, 其根入药为板蓝根, 叶入药为大青叶, 具有清热解毒、凉血消斑、泻火定惊的功效^[1], 临床上多用于治疗流行性感、流行性腮腺炎、流行性乙型脑炎、急慢性肝炎、带状疱疹, 骨髓炎等^[2-4]。当下全球流感病毒肆虐, 抗病毒成分的相关研究备受关注。研究表明, 菘蓝中落叶松脂素及其衍生物(开环异落叶松脂素、罗汉松树脂和开环异落叶松脂素二葡萄糖苷等)均属于木脂素类化合

物, 具有较强的抗病毒活性^[5-8], 是中药板蓝根发挥抗病毒功效的重要物质基础^[1]。

目前, 菘蓝木脂素类成分的生物合成途径已经非常清楚, 该合成途径中的关键酶包括聚合蛋白酶(dirigent protein, DIR)^[9]、松脂醇-落叶松脂素还原酶(pinoresinol-lariciresinol reductase, PLR)^[10]、开环异落叶松脂素脱氢酶(secoiso-lariciresinol dehydrogenase, SIRD)^[11]和糖基转移酶(uridine diphosphate dependent glycosyltransferase, UGT)^[6,12]。

其中 PLR 被认为是木脂素生物合成途径最关键的催化酶之一,能够催化松脂醇生成落叶松脂素,并能进一步催化落叶松脂素生成开环异落叶松脂素,该还原步骤为呋喃、二苄基丁烷、二苄基丁内酯和芳基四氢萘等不同结构类型木脂素生物合成的关键节点^[13-14]。本课题组前期研究发现菘蓝中可能存在 3 个 PLR 编码基因(*IiPLR1*、*IiPLR2* 和 *IiPLR3*),并对 *IiPLR1* 进行了系统的功能研究^[10],且精细解析了其蛋白晶体结构^[15],为研究该催化酶家族其他成员奠定了基础。

本研究通过分子克隆技术获得了 *IiPLR2* 基因序列,对其进行了多序列比对、进化树构建、蛋白结构等生物信息学分析,并通过原核蛋白表达纯化进行了催化功能的评价,为后续开展基于此的菘蓝木脂素类成分生物合成与代谢调控研究提供了支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

菘蓝(*Isatis indigotica*)采集于海军军医大学药学院的植物园并由生药教研室张汉明教授鉴定。将菘蓝种子播撒在 1:1:3 的泥炭土、珍珠岩和蛭石中培养发芽,移至相同比例的土中培养,幼苗在 30 °C 光照 16 h、18 °C 暗环境 8 h 的培养箱中继续生长,绿肥水浇灌,收集生长 1 个月的菘蓝叶片。

1.1.2 试剂

TransZol Up Plus RNA Kit (ER501)、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞和质粒小提试剂盒均购于北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶 (*Not* I 和 *Psp*X I)购于 New England Biolabs 公司;大肠杆菌 BL21(DE3)感受态购于上海唯地生物技术有限公司;KOD-FX 聚合酶购于东洋纺(上海)生物科技有限公司;反转录试剂盒 PrimeScriptTM II

1st Strand cDNA Synthesis Kit 与非连接酶依赖型的单片段一步法克隆试剂盒 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 购于 TaKaRa Bio 公司;松脂素、落叶松脂素及开环异落叶松脂素标准品 (HPLC 纯度 \geq 95%)均购于默克公司;引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 菘蓝叶片总 RNA 提取及 cDNA 的合成

取新鲜的菘蓝叶片,用在液氮中冻过的剪刀剪下菘蓝叶片,放入含有钢珠的 RNase-free 离心管后迅速放入液氮中,用球磨机磨碎。菘蓝叶片的总 RNA 通过 RNA 提取试剂盒提取获得并测定浓度和纯度,再将所提取的总 RNA 反转录成 cDNA,测定浓度,-80 °C 冻存备用。

1.2.2 菘蓝 *IiPLR2* 基因的扩增及重组质粒构建

设计特异性引物(*IiPLR2*-F: 5'-TCCGTCGA CAAGCTTGCGGCCCGCATGGGAGAGAGCAA A-3'; *IiPLR2*-R: 5'-GTGGTGGTGGTGGTGCTC GAGTGATGAACGTTTTTAA-3',下划线为酶切位点)。扩增体系: ddH₂O 6.5 μ L, dNTPs 2.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L,上下游引物各 1 μ L (工作浓度 10 μ mol/L), 2 \times 缓冲液 12.5 μ L, KOD-FX 0.5 μ L; PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 2 min; 98 °C 高温变性 10 s, 55 °C 低温退火 30 s, 68 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 68 °C 延伸 10 min; 最后 4 °C 保存。将获得的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,判断目的基因条带大小。将条带大小正确的目的片段(带有酶切位点: *Not* I 和 *Psp*X I 作为酶切位点)连接至 pET32a 表达载体,转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单克隆进行鉴定,重组质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 *IiPLR2* 基因的生物信息学分析

使用 *IiPLR2* 基因的核苷酸序列进行开放阅读框(open reading frame, ORF) finder 寻找 ORF; 利用 ExPASy^[16]、NPS [NPS@: SOPMA secondary

structure prediction (ibcp.fr)^[17]、TMHMM 和 SignalP 5.0 等在线工具预测基因编码蛋白的相对分子质量、氨基酸序列和等电点等,同时对跨膜结构域、信号肽和亚细胞定位等性质进行预测分析;利用 SWISS-MODEL 在线工具^[18][SWISS-MODEL (expasy.org)]结合 PyMOL 软件预测得到 *iPLR2*-NADP⁺ 三维蛋白结构并将其与 *iPLR1*-NADP⁺ (PDB: 7CS3) 结构进行比较;同时运用 CLUSTALW [Multiple Sequence Alignment-CLUSTALW (genome.jp)]^[19] 结合 ENDscript/ESPrpt 在线网站 [ESPrpt 3.x/ENDscript 2.x (ibcp.fr)]^[20] 将氨基酸序列与不同来源的 PLR 氨基酸序列和二级结构进行比对;在 NCBI 数据库中选择了来源于不同植物的 PLR 氨基酸序列,利用 MEGA 7.0 软件^[21],使用 Maximum Likelihood 方法,bootstrap 重复次数设置为 1 000 次,构建系统进化树。

1.2.4 *iPLR2* 基因的原核表达与蛋白纯化

将测序正确的菌株转接至含终浓度为 50 mg/mL 氨苄西林(ampicillin, Amp⁺)的 LB 液体培养基中,220 r/min、37 °C 振荡至 $OD_{600}=0.6$;加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG, 终浓度为 0.5 mmol/L)后在 80 r/min、18 °C 条件下过夜。将过夜菌液在 8 000 r/min 离心 30 min,收集菌体;使用 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0, 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl)重悬菌体,再用超高压连续流细胞破碎仪破碎蛋白后离心(4 °C, 20 000 r/min, 45 min);将上清液(0.22 μ m 滤膜过滤)转移至新离心管中,使用 Ni-NTA 柱进行纯化,利用 Bradford 法^[22]测定蛋白浓度。同时分别取 10 μ L 未经 IPTG 诱导的蛋白、IPTG 诱导但未纯化和纯化过的蛋白提取液进行 SDS-PAGE 以检测蛋白表达情况,剩余蛋白于-80 °C 保存备用。

1.2.5 *iPLR2* 的体外酶活测定

反应体系(1 mL)由 TG 缓冲液[pH 7.0, 50 mmol/L Tris-HCl, 10% (质量分数)甘油]、150 μ mol/L NADPH、100 μ mol/L 松脂醇或 100 μ mol/L 落叶松脂素以及 5 μ g 的 *iPLR2* 纯蛋白组成。使用不添加 *iPLR2* 纯蛋白的体系作为对照。首先将纯蛋白、缓冲液和底物在 30 °C 下预孵育 5 min,然后添加 NADPH 开始反应,30 min 后加入 300 μ L 乙酸乙酯终止反应。使用乙酸乙酯(总计 3 \times 300 μ L)对反应产物进行萃取,浓缩后使用甲醇(200 μ L)复溶,用于三重四极杆质谱仪(Agilent 公司)检测松脂醇、落叶松脂素和开环异落叶松脂素的含量。色谱条件:色谱柱为 Thermo[®] C18 (150 mm \times 2.1 mm, 3.5 μ m),柱温为 35 °C,流速为 0.3 mL/min,流动相为乙腈(A)-5 mmol/L 乙酸铵水溶液(B),梯度洗脱(0-4 min, 15%A; 4.0-4.5 min, 50%A; 4.5-8.5 min, 85%A);质谱条件:选择电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)离子源,其温度为 350 °C,MS1 和 MS2 的温度为 105 °C;质谱喷雾针电压为 4 000 V,干燥气体与雾化气选用氮气,碰撞池气体为高纯氮气,压强为 0.1 MPa,雾化气压力设置为 40 psi,气体流速设置为 10 L/min;监测模式和扫描方式分别为负离子和多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式。其他质谱参数如表 1 所示。

2 结果与分析

2.1 *iPLR2* 编码基因的克隆与蛋白核苷酸序列分析

以菘蓝 cDNA 为模板,测试扩增得到的片段电泳条带大小与理论目的基因长度(954 bp)相符合(图 1A)。利用 ORF finder 对基因的 cDNA 序列进行分析,*iPLR2* 基因的全长为 954 bp,编码 317 个氨基酸(图 1B),序列上传至 NCBI 获得基因序列号(GenBank 登录号: PP061232)。

表 1 松脂醇、落叶松脂素、开环异落叶松脂素的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of pinoresinol, lariciresinol and secoisolariciresinol

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
Pinoresinol	357.1	151.1	135.0	30.0
Lariciresinol	359.2	329.0	100.0	3.0
Secoisolariciresinol	361.1	164.9	135.0	20.0

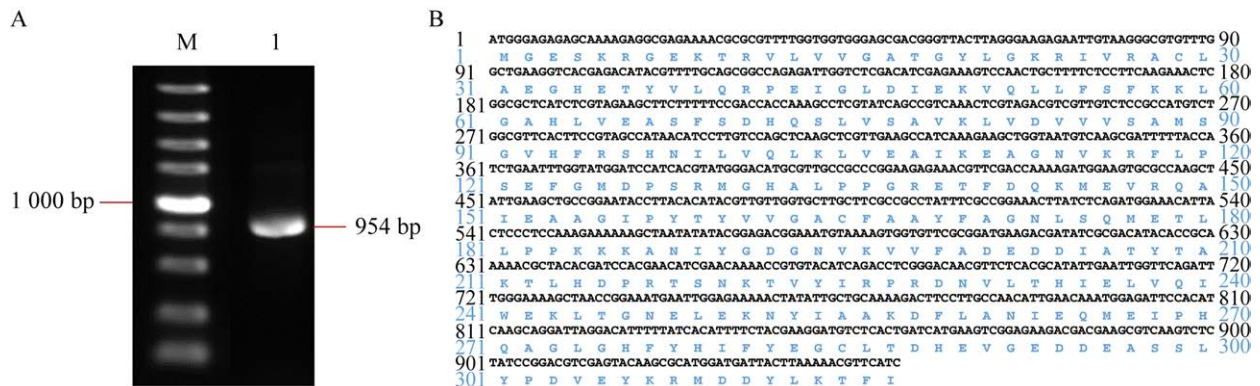


图 1 *IiPLR2* 的基因克隆 A: *IiPLR2* 的核酸电泳图. M: DNA marker; 1: *IiPLR2* 基因的 PCR 产物检测. B: *IiPLR2* 的核苷酸序列(黑色)和氨基酸序列(蓝色)

Figure 1 Gene cloning of *IiPLR2* from *Isatis indigotica*. A: Nucleic acid electropherogram of *IiPLR2*. M: DNA marker; 1: PCR product of the *IiPLR2* gene. B: Nucleotide sequence (Black) and amino acid sequence (Blue) of *IiPLR2*.

2.2 *IiPLR2* 蛋白理化性质分析

使用在线软件 ExPASy 对 *IiPLR2* 进行理化性质分析,结果显示 *IiPLR2* 理论等电点是 5.86, 相对分子质量是 35.54 kDa; 它的脂肪指数、蛋白不稳定指数和亲水性总平均值分别是 90.41、43.06 和 -0.215, 其氨基酸残基中带正电荷(Arg+Lys)残基总数是 36, 负电荷(Asp+Glu)残基总数是 44, 疏水氨基酸多于亲水氨基酸的数量, 初步推断为不稳定的疏水蛋白(图 2A)。利用 TMHMM 在线预测蛋白跨膜结构, 结果显示, *IiPLR2* 没有显著的跨膜区, 位于细胞膜内机率几乎为 0, 位于膜外机率大于 1.2, 提示 *IiPLR2* 可能位于膜外(图 2B); 根据 SignalP 5.0 在线预测信号肽, 结果表明 *IiPLR2* 含有信号肽的可能性为 0.020 8%, 推测其不存在信号肽, 为非分泌蛋白, 且该蛋白合成后不发生转运(图 2C)。植物亚细胞定位在线工具 Plant-mPLOC 预测结果

表明, *IiPLR2* 可能定位于细胞质上, 在细胞质内发挥功能。

2.3 *IiPLR2* 蛋白二级和三级结构分析

利用在线工具 NPS 分析 *IiPLR2* 二级结构, 结果显示: *IiPLR2* 蛋白的二级结构元件中 α -螺旋所占的比例最高, 有 126 个氨基酸, 占 39.75%; 无规卷曲包含 114 个氨基酸, 占 35.96%; 延伸链包含 56 个氨基酸, 为 17.67%; β 折叠所占比例最低, 包含 21 个氨基酸, 占 6.62% (图 3A)。SWISS-MODEL 在线分析获得以 *AtPrR1-NADP⁺* (PDB: 7CSA) 作为同源模板的 *IiPLR2-NADP⁺* 蛋白三维空间模型, 氨基酸相似性为 90.97%, 全球性模型质量评分为 0.9。 *IiPLR2* 的结构与 *AtPrR1*^[15] 同为 2 个头尾相接的二聚体构象, 每个单体均包含 2 个结构域, 即 N 端 NADPH 结合结构域 (NBD: N-terminal NADPH binding domain) 和 C 端底物结合结构域 (SBD: C-terminal

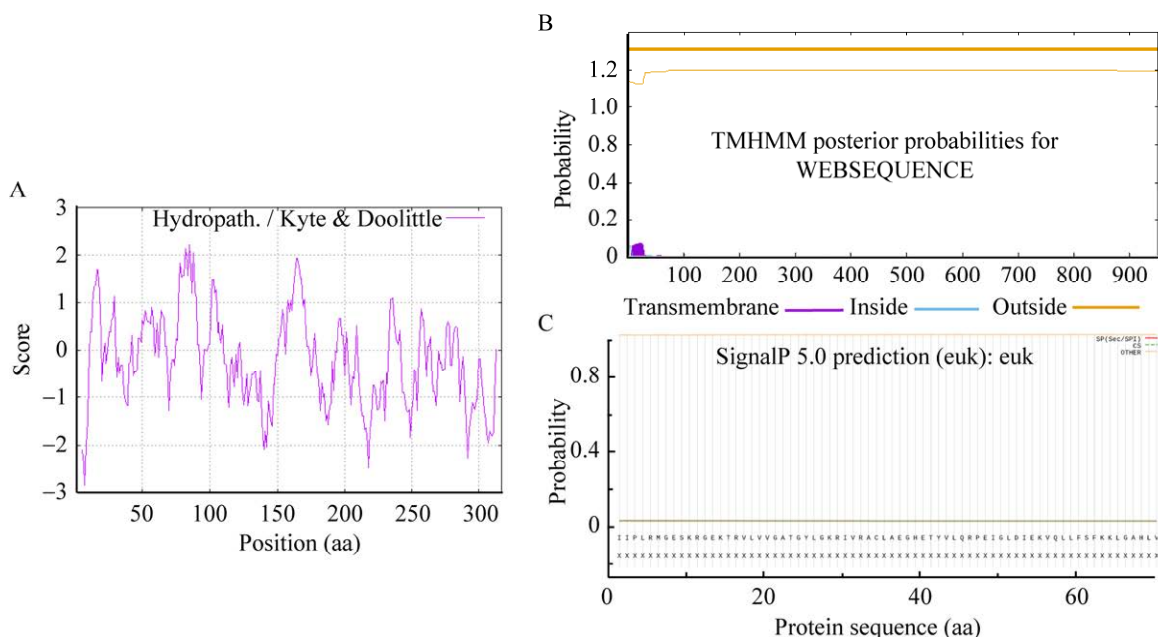


图 2 *LiPLR2* 氨基酸序列的亲水/疏水性(A)、跨膜结构域(B)以及信号肽预测(C)

Figure 2 Hydrophilic/hydrophobic properties (A), transmembrane domains (B) and signal peptide prediction (C) of *LiPLR2* amino acid sequences.

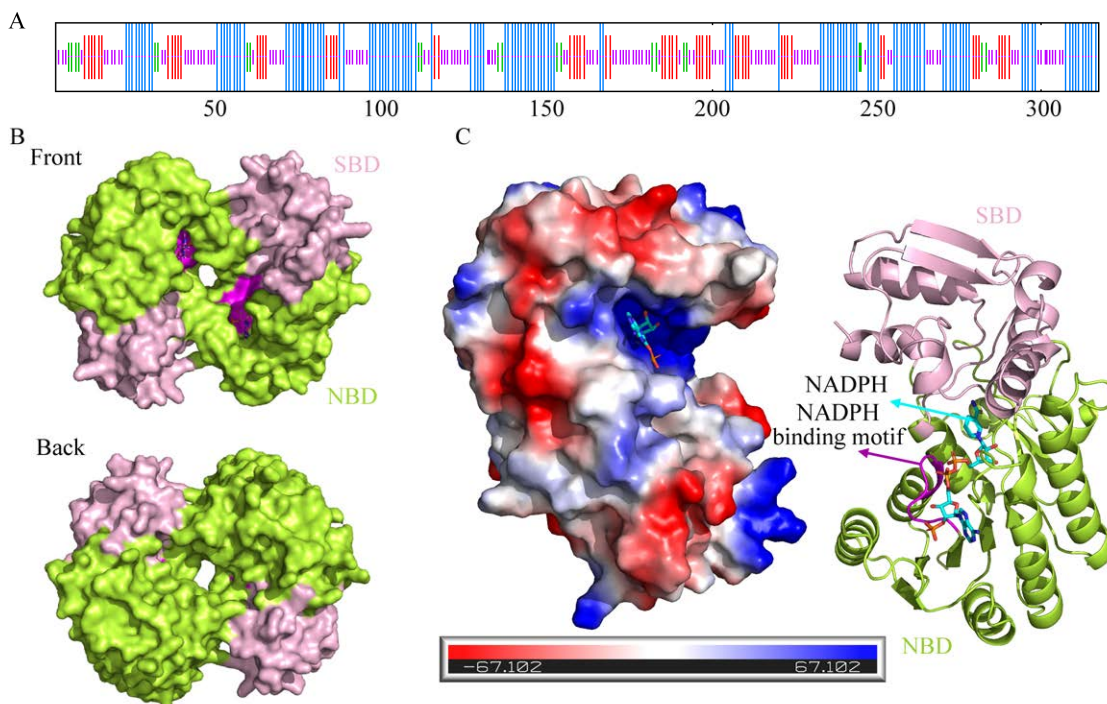


图 3 *LiPLR2* 的二级结构(A)和三级结构(B、C) A: 蓝色为 α -螺旋; 绿色为 β -折叠; 黄色为无规则卷曲; 红色为延伸链。B、C 为绿色为 N 端 NADPH 结合结构域; 粉红色为 C 端底物结合结构域; 洋红色为 NADPH 结合基序; 青色为 NADPH

Figure 3 Secondary (A) and tertiary and (B, C) structure of *LiPLR2*. A: Blue, alpha helix; Green, beta turn; Yellow, random coil; Red, extended strand. B and C: Green, n-terminal NADPH binding domain (NBD); Pink, C-terminal substrate binding domain (CBD); Magenta, NADPH binding motif; Cyan, NADPH.

substrate binding domain); 2 个结构域中间有个大凹槽(图 3B); 结构上还包含 NADPH 特异性结合基序 GXXGXXG (图 3C)。

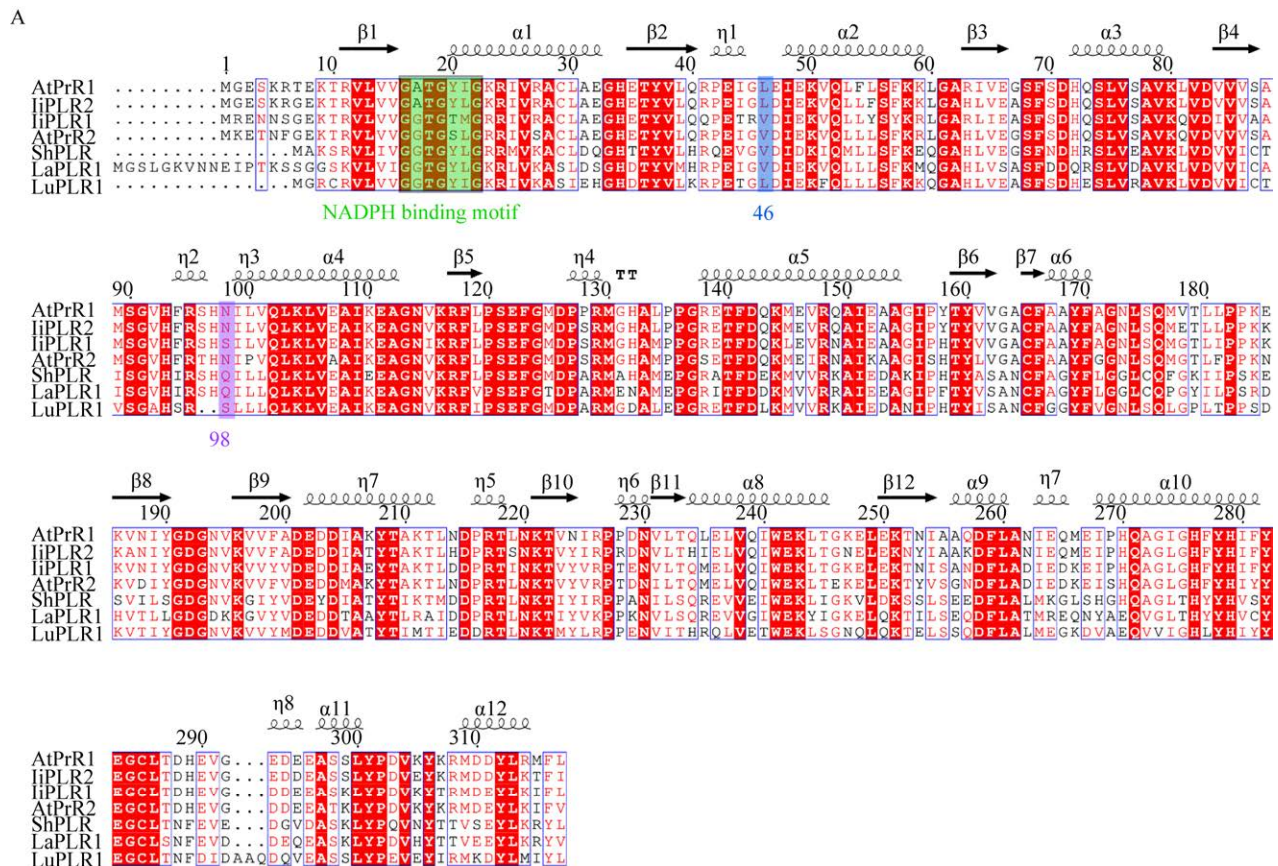
2.4 *iiPLR2* 氨基酸的序列同源比对和系统进化树构建

使用 ESript 3.0 在线进行序列同源比对, 结果显示: *iiPLR2* 氨基酸序列与来源于拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *AtPrR1* (NP_174490.1) 和 *AtPrR2* (NP_001319922.1) 的同源性分别为 90.85% 和 81.07%; 与来源于菘蓝 (*Isatis indigotica*) 的 *iiPLR1* (AEA42007.1) 的同源性为 82.65%; 与来源于桃儿七 (*Sinopodophyllum hexandrum*) 的 *ShPLR* (ABY75535.2) 的同源性为 60.77%, 与来源于白亚麻 (*Linum album*) 的 *LaPLR* (AJ849358.1) 的同源性为 58.67%, 与来源于亚麻 (*Linum usitatissimum*) 的 *LuPLR1* (AJ849359.1) 的同源性为 62.82%; 与其他植物中的 PLR 一样, *iiPLR2* 具有保守的 NADPH

结合结构域(图 4A)。对不同物种的 PLR/PrR 进行系统进化树分析显示: 该进化树由多分支组成, 来源于菘蓝的 *iiPLR1* 和 *iiPLR2* 与来源于拟南芥的 *AtPrR1* 和 *AtPrR2* 分布在同一支上, 均来源于十字花科植物, 其中 *iiPLR2* 和 *AtPrR1* 属于同一分支, 提示 *iiPLR2* 可能具有和 *AtPrR1* 相似的功能(图 4B)。

2.5 *iiPLR2* 与 *iiPLR1* 的三级蛋白结构比较

iiPLR2 和 *iiPLR1* 蛋白中 $\beta 4$ 环的氨基酸序列非常相似(图 4A), 但 *iiPLR2* 中 $\beta 4$ 环 C 末端对应 Asn98 的残基在 *iiPLR1* 中被替换为 Ser98。如图 5 所示, *iiPLR2*^{N98} 到 NADPH 之间的距离是 4.7 Å; 而 *iiPLR1*^{S98} 到 NADPH 之间的距离是 2.1 Å, 推测 *iiPLR2* 的氨基酸位点 N98 与辅因子 NADPH 之间距离过远不利于反应的发生; 此外, 丝氨酸侧链足够短, 能够保留在 NADPH 的鸟嘌呤基团下方, 而天冬酰胺侧链由于空间位阻而不能如此。综上, 我们推测与 *iiPLR1* 相比, *iiPLR2*



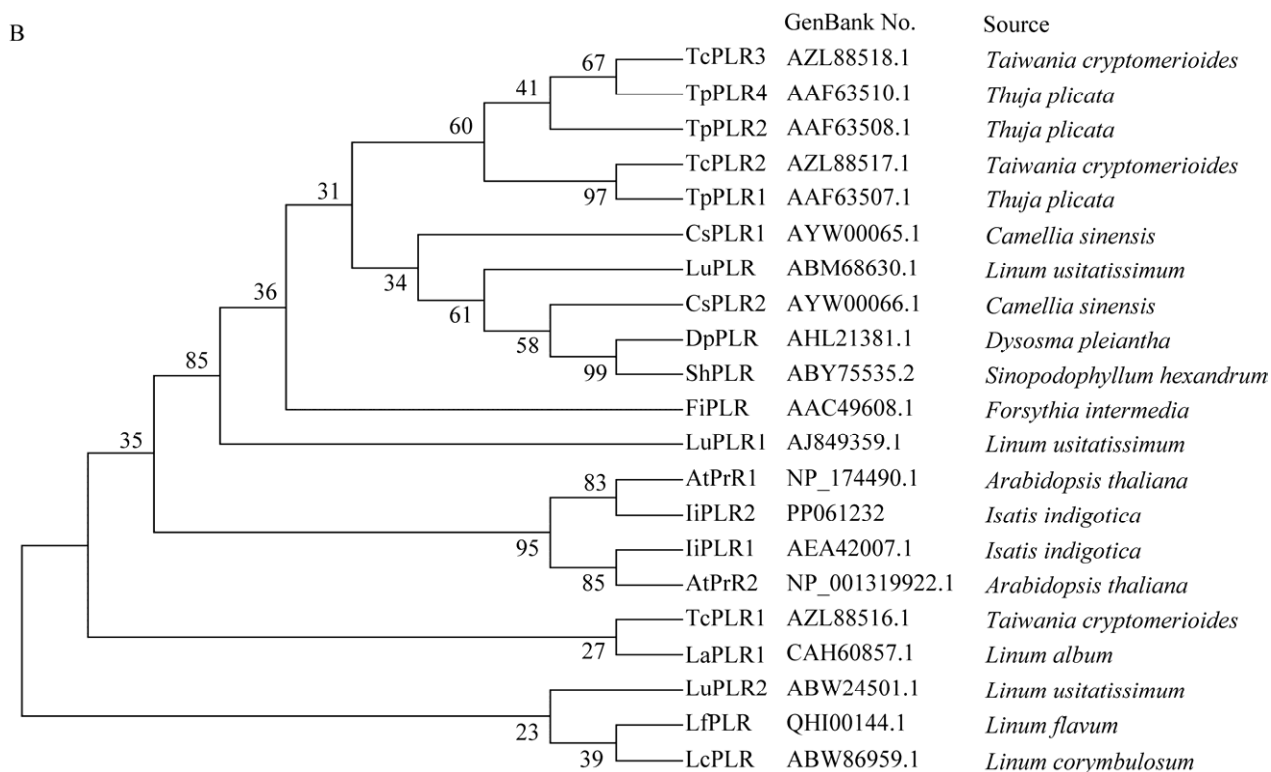


图 4 不同植物来源的 PLR 氨基酸序列比对(A)和系统进化树(B) 绿色: NADPH 结合基序; 蓝色: 第 46 位氨基酸位点; 紫色: 第 98 位氨基酸位点

Figure 4 Amino acid sequence homology alignment (A) and phylogenetic tree (B) of PLR from different plants. Green: NADPH binding domain; Blue: Amino acid site 46; Purple: Amino acid site 98.

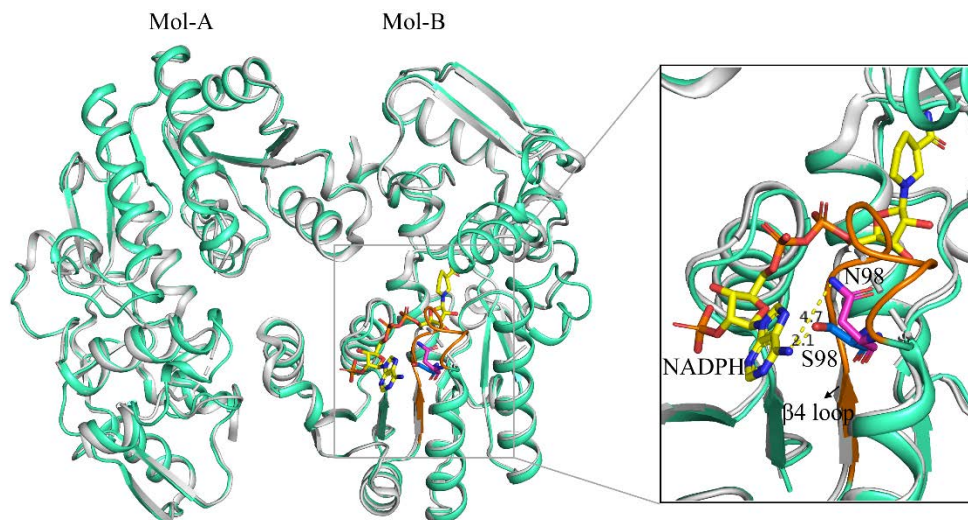


图 5 *IiPLR2*-NADP⁺(青绿色)与 *IiPLR1*-NADP⁺(PDB: 7CS3)(浅灰色)的结构差异 黄色: NADP⁺; 橙色: *IiPLR2*-NADP⁺的 β 4 环; 洋红色: *IiPLR2*^{N98}; 蓝色: *IiPLR1*^{S98}; 黄色虚线: 氢键

Figure 5 Structural differences between *IiPLR2*-NADP⁺ (green-cyan) and *IiPLR1*-NADP⁺ (PDB: 7CS3) (pale-grey). Yellow: NADPH; Orange: β 4 loop in *IiPLR2*-NADP⁺; Magenta: *IiPLR2*^{N98}; Blue: *IiPLR1*^{S98}; Yellow dashed line: Hydrogen bond.

的 N98 氨基酸位点有可能影响其催化活性。

2.6 *Ii*PLR2 的蛋白纯化及体外酶活

*Ii*PLR2 重组蛋白诱导表达后收集菌体，破碎蛋白，离心后取上清液和纯化蛋白液进行

SDS-PAGE，结果显示：上清液和纯化蛋白液中均出现明显的目的蛋白条带，与预测的 *Ii*PLR2 分子量大小一致，表明该蛋白表达纯化成功，且为可溶性蛋白(图 6A)。

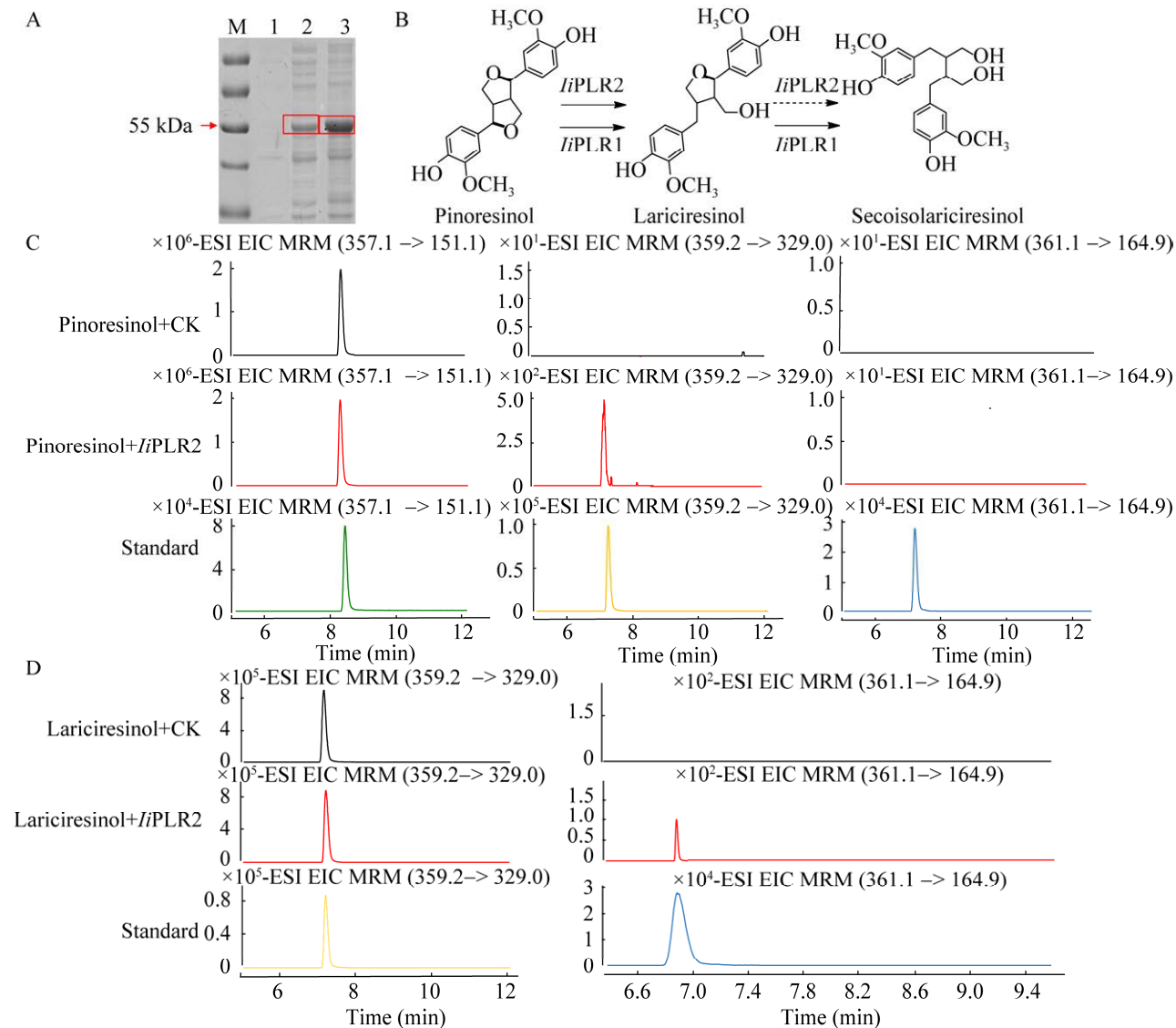


图 6 *Ii*PLR2 蛋白的表达纯化与酶活性检测 A: *Ii*PLR2 蛋白表达纯化图. M: 蛋白 marker; 1: 未诱导的蛋白; 2: IPTG 诱导的蛋白; 3: 纯化后的蛋白; B: *Ii*PLR2 催化木脂素生物合成途径中的两步连续还原步骤; C 和 D: 分别以松脂醇和落叶松脂素为底物时, *Ii*PLR2 酶促反应产物的 LC-MS 检测结果(绿色: 松脂素; 黄色: 落叶松脂素; 蓝色: 开环异落叶松脂素; 黑色: 阴性对照; 红色: *Ii*PLR2 反应)

Figure 6 Expression, purification and enzymatic activity determination of *Ii*PLR2 protein. A: The expression and purification of *Ii*PLR2 protein. M: Protein marker; 1: Uninduced protein; 2: IPTG induced protein; 3: Purified protein. B: Two continuous reduction steps catalyzed by *Ii*PLR2 involved in the biosynthesis pathway of lignans. C and D: LC-MS detection of reaction products catalyzed by *Ii*PLR2 using pinoresinol and lariciresinol as substrates, respectively (green: pinoresinol; yellow: lariciresinol; blue: secoisolariciresinol; black: negative control; red: reaction catalyzed by *Ii*PLR2).

分别以松脂醇和落叶松脂素为底物,通过体外酶活实验检测 *IiPLR2* 的催化活性(图 6B)。结果显示,当以松脂醇为底物时,与对照相比,反应液中检测到了和落叶松脂素对照品保留时间一致的产物,且产物的碎片离子与对照品一致,但未检测到与开环异落叶松脂素对照品保留时间一致的产物,说明 *IiPLR2* 能催化松脂醇生成落叶松脂素,但未能进一步生成开环异落叶松脂素(图 6C);当以落叶松脂素为底物时,与对照相比,反应液中检测到了和开环异落叶松脂素对照品保留时间一致的产物,且产物的碎片离子与对照品一致,但产生的量较少,说明 *IiPLR2* 能催化落叶松脂素生成开环异落叶松脂素,但催化活性与第一步反应相比较弱(图 6D),这与 *AtPLR1* 的催化活性^[15]相似。

3 讨论与结论

PLR 是在两分子木脂素单体初始二聚后参与木脂素生物合成的第一个酶,催化两个连续的还原步骤,催化松脂醇(双并四氢呋喃型)形成落叶松脂素(呋喃型),进而催化落叶松脂素(呋喃型)形成开环异落叶松脂素(二芳基丁烷型),是不同骨架类型木脂素形成的驱动力,是木脂素生物合成的关键酶^[13]。

研究表明,植物中往往同时存在多个 PLR 家族成员,并具有不同的催化特征^[14]。例如,拟南芥松脂醇还原酶 *AtPrR* 对松脂醇具有较强的底物偏好,而对落叶松脂素几乎没有催化作用,其中 *AtPrR1* 对落叶松脂素仅有较弱的活性,*AtPrR2* 对落叶松脂素完全无活性^[23];来源于亚麻的 *LuPLR1* 和 *LuPLR2* 均能够连续催化两步反应,但 *LuPLR1* 对松脂醇的催化效率高于落叶松脂素,而 *LuPLR2* 对落叶松脂素的催化效率高于松脂醇^[24-25];在北美乔柏中发现了 4 个 *TpPLR*,*TpPLR1* 能够连续催化两步反应,而 *TpPLR2* 无

法将落叶松脂素还原为开环异落叶松脂素^[26]。

本实验室前期研究发现菘蓝中可能存在 3 个 PLR 编码基因(*IiPLR1*、*IiPLR2* 和 *IiPLR3*),通过“转录组-代谢组”关联分析评价 *IiPLR1*、*IiPLR2* 和 *IiPLR3* 对菘蓝中抗病毒活性成分落叶松脂素生物合成的作用,结合基因敲除实验证明了 *IiPLR1* 在菘蓝落叶松脂素生物合成过程中起决定性作用:抑制 *IiPLR1* 的表达显著降低了菘蓝毛状根中落叶松脂素的含量,但抑制 *IiPLR2* 和 *IiPLR3* 的表达对落叶松脂素的含量积累无显著影响^[10]。随后,我们对 *IiPLR1* 进行了系统的功能研究:体外酶活检测发现 *IiPLR1* 能够连续催化两步反应;通过蛋白晶体结构解析阐明了 *IiPLR1* 与 *AtPrR2* 底物选择性差异的结构基础。进一步进行蛋白突变和催化活性检测发现,与野生型 *IiPLR1* 相比,突变体 *IiPLR1*^{S98N} 催化落叶松脂素转化为开环异落叶松脂素的效率降低,证明氨基酸残基 98 通过控制 β 4 环的摆动,影响了底物结合和产物释放,在催化落叶松脂素生成开环异落叶松脂素的过程中发挥重要作用^[10]。同时,为了进一步探明 *IiPLR2* 和 *IiPLR3* 的功能,通过菘蓝基因组注释获得了 *IiPLR2* 的全长序列和 *IiPLR3* 的部分片段(有待进一步研究)。

本研究成功克隆了菘蓝 *IiPLR2* 基因,其编码蛋白 *IiPLR2* 属于疏水蛋白,不具跨膜区域,不存在信号肽序列,可能定位于细胞质中,进化树分析发现菘蓝 *IiPLR2* 蛋白与拟南芥 *AtPrR1* 亲缘关系最近。体外酶活实验发现 *IiPLR2* 能够催化松脂醇(pinoresinol, Pin)生成落叶松脂素(lariciresinol, Lar),并能微弱催化落叶松脂素生成开环异落叶松脂素(secoisolariciresinol, Sec)。蛋白结构分析推测 *IiPLR2* 与 *IiPLR1* 催化活性的差异与 98 位氨基酸的差异密切相关。

综上所述,本研究对 *IiPLR2* 的序列、结构及催化功能等进行了较系统的研究,体外催化活

性评价证明其功能与来自拟南芥的 *AtPrR1* 类似,对松脂醇具有较强的底物偏好性,能催化松脂醇生成落叶松脂素,但对落叶松脂素的催化作用较弱(图 6)。本研究不仅补充完善了菘蓝木脂素生物合成途径,也为深入揭示 *LiPLR2* 的功能、阐明其蛋白结构与功能的关系、开展基于此的次生代谢调控及合成生物学研究等奠定了坚实的基础。

REFERENCES

- [1] 肖莹, 马瑞芳, 陈军峰, 杨颖博, 张磊, 陈万生. 板蓝根抗病毒活性成分生物合成的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(11): 1908-1913.
XIAO Y, MA RF, CHEN JF, YANG YB, ZHANG L, CHEN WS. Advances in biosynthesis of antiviral active components of *Isatidis radix*[J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2016, 18(11): 1908-1913 (in Chinese).
- [2] SU J, CHEN XM, XIE YL, LI MQ, SHANG Q, ZHANG DK, CAI XF, LIU H, HUANG HZ, ZHENG C, HAN L. Clinical efficacy, pharmacodynamic components, and molecular mechanisms of antiviral granules in the treatment of influenza: a systematic review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 318(Pt B): 117011.
- [3] FENG JX, HUANG DD, YANG YB, CHEN JF, QIU S, LV ZY, MA XQ, LI YY, LI RR, XIAO Y, CHEN WS. *Isatis indigotica*: from (ethno) botany, biochemistry to synthetic biology[J]. Molecular Horticulture, 2021, 1(1): 17.
- [4] EUBANK PLC, ABREU LG, VIOLANTE IP, VOLPATO LER. Medicinal plants used for the treatment of mucositis induced by oncotherapy: a systematic review[J]. Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer, 2021, 29(11): 6981-6993.
- [5] YANG L, WANG HQ, YAN HY, WANG K, WU S, LI YH. (-)-Lariciresinol isolated from the roots of *Isatis indigotica* fortune ex lindl. inhibits hepatitis B virus by regulating viral transcription[J]. Molecules, 2022, 27(10): 3223.
- [6] CHEN X, CHEN JF, FENG JX, WANG Y, LI SN, XIAO Y, DIAO Y, ZHANG L, CHEN WS. Tandem UGT71B5s catalyze lignan glycosylation in *Isatis indigotica* with substrates promiscuity[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 637695.
- [7] TAN YP, YANG J, JIANG YY, WANG J, LIU YH, ZHAO YJ, JIN BL, WANG X, CHEN T, KANG LP, GUO J, CUI GH, TANG JF, HUANG LQ. Functional characterization of UDP-glycosyltransferases involved in anti-viral lignan glycosides biosynthesis in *Isatis indigotica*[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 921815.
- [8] JANG WY, KIM MY, CHO JY. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-menopausal, and anti-cancer effects of lignans and their metabolites[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(24): 15482.
- [9] LI Q, CHEN JF, XIAO Y, DI P, ZHANG L, CHEN WS. The dirigent multigene family in *Isatis indigotica*: gene discovery and differential transcript abundance[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 388.
- [10] XIAO Y, JI Q, GAO SH, TAN HX, CHEN RB, LI Q, CHEN JF, YANG YB, ZHANG L, WANG ZT, CHEN WS, HU ZB. Combined transcriptome and metabolite profiling reveals that *LiPLR1* plays an important role in lariciresinol accumulation in *Isatis indigotica*[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(20): 6259-6271.
- [11] SHI XY, GENG JR, FENG JX, YANG YB, MA XQ, CHEN WS, XIAO Y. Identification and investigation of a novel NADP⁺-dependent secoisolariciresinol dehydrogenase from *Isatis indigotica*[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1035121.
- [12] CHEN JF, WANG Y, LIANG FY, ZHOU X, CHEN X, LU MH, SUN W, LI Q, YANG YB, HUANG DD, ZHANG L, XIAO Y, CHEN WS. *LiUGT71B2* catalyzes lignan glycosylation in *Isatis indigotica* with substrates specificity[J]. Industrial Crops and Products, 2023, 195: 116483.
- [13] 阴艳红, 陈万生, 肖莹. 植物中松脂醇-落叶松脂素还原酶催化特征研究进展 [J]. 植物学报, 2023, 58(4): 656-666.
YIN YH, CHEN WS, XIAO Y. Research progress on catalytic characteristics of pinoresinol-lariciresinol reductase in plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2023, 58(4): 656-666 (in Chinese).
- [14] MARKULIN L, CORBIN C, RENOUEAU S, DROUET S, GUTIERREZ L, MATELJAK I, AUGUIN D, HANO C, FUSS E, LAINÉ E. Pinoresinol-lariciresinol reductases, key to the lignan synthesis in plants[J]. Planta, 2019, 249(6): 1695-1714.
- [15] XIAO Y, SHAO K, ZHOU JW, WANG L, MA XQ, WU D, YANG YB, CHEN JF, FENG JX, QIU S, LV ZY,

- ZHANG L, ZHANG P, CHEN WS. Structure-based engineering of substrate specificity for pinoresinol-lariciresinol reductases[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2828.
- [16] WILKINS MR, GASTEIGER E, BAIROCH A, SANCHEZ JC, WILLIAMS KL, APPEL RD, HOCHSTRASSER DF. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112: 531-552.
- [17] COMBET C, BLANCHET C, GEURJON C, DELÉAGE G. NPS@: network protein sequence analysis[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(3): 147-150.
- [18] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, STUDER G, TAURIELLO G, GUMIENNY R, HEER FT, de BEER TAP, REMPFER C, BORDOLI L, LEPORE R, SCHWEDE T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [19] HIGGINS DG, SHARP PM. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer[J]. Gene, 1988, 73(1): 237-244.
- [20] ROBERT X, GOUET P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1): W320-W324.
- [21] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [22] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [23] NAKATSUBO T, MIZUTANI M, SUZUKI S, HATTORI T, UMEZAWA T. Characterization of *Arabidopsis thaliana* pinoresinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(23): 15550-15557.
- [24] HEMMATI S, von HEIMENDAHL CBI, KLAES M, ALFERMANN AW, SCHMIDT TJ, FUSS E. Pinoresinol-lariciresinol reductases with opposite enantiospecificity determine the enantiomeric composition of lignans in the different organs of *Linum usitatissimum* L[J]. Planta Medica, 2010, 76(9): 928-934.
- [25] von HEIMENDAHL CB, SCHÄFER KM, EKLUND P, SJÖHOLM R, SCHMIDT TJ, FUSS E. Pinoresinol-lariciresinol reductases with different stereospecificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum*[J]. Phytochemistry, 2005, 66(11): 1254-1263.
- [26] FUJITA M, GANG DR, DAVIN LB, LEWIS NG. Recombinant pinoresinol-lariciresinol reductases from western red cedar (*Thuja plicata*) catalyze opposite enantiospecific conversions[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(2): 618-627.

(本文责编 陈宏宇)