

文章编号:1001-6880(2016)10-1505-05

川芎咖啡酸-O-甲基转移酶基因的克隆及序列分析

朱建全,向 缅,李洋洋,俞继华,张 赶,王万军,廖 海*,周嘉裕*

西南交通大学生命科学与工程学院,成都 610031

摘要:克隆川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort)咖啡酸-O-甲基转移酶(COMT)基因并做序列分析。采用RT-PCR方法,以新鲜的川芎嫩叶cDNA为模板,克隆出川芎COMT基因的cDNA序列。此基因全长1328 bp,编码360个氨基酸。将得到的序列提交GenBank,序列号为KU942388。此川芎COMT具有植物O-甲基转移酶家族特征性的功能结构域,与中粒咖啡、牵牛花COMT的氨基酸序列同源性分别为70%、69%,推测其能够催化咖啡酸的氧甲基化反应。该川芎COMT基因的成功克隆为下一步活性验证及利用生物技术来生产阿魏酸奠定坚实基础。

关键词:川芎;咖啡酸-O-甲基转移酶;克隆;序列分析

中图分类号:Q785

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.001

Molecular Cloning and Sequence Analysis of Caffeic Acid O-Methyltransferase in *Ligusticum chuanxiong* Hort

ZHU Jian-quan, XIANG Mian, LI Yang-yang, YU Ji-hua, ZHANG Gan, WANG Wan-jun, LIAO Hai*, ZHOU Jia-yu*
School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

Abstract: In order to clone and sequence the cDNA encoding caffeic acid-O-methyltransferase (COMT) from *Ligusticum chuanxiong* Hort, the cDNA, encoding COMT, was amplified by RT-PCR with cDNA library of rhizome as the template. The full-length cDNA of COMT was 1328 bp with an open reading frame encoding 360 amino acids of protein. The accession number of COMT from *L. chuanxiong* in GenBank was KU942388. The COMT from *L. chuanxiong* has 70% and 69% nucleotide sequence homology to the sequence of COMT from *Coffea canephora* and *Ipomoea nil*, respectively. Comparison of the sequence *L. chuanxiong* with COMT from *C. canephora* and *I. nil* showed that COMT from *L. chuanxiong* possessed the same functional regions involved with COMT, suggesting *L. chuanxiong* COMT can participate in oxygen methylation of caffeic acid. This work underlaid the first step for using biotechnology to produce ferulic acid.

Key words: *Ligusticum chuanxiong* Hort; caffeic acid-O-methyltransferase; gene cloning; sequence analysis

伞形科植物川芎为四川道地药材^[1,2],其干燥根茎是常用中药材之一^[3,4]。阿魏酸为川芎的主要有效成分^[5],现代研究证明阿魏酸及其衍生物有保护神经系统^[6-8]、抗血栓^[9,10]、抗动脉粥样硬化^[11,12]等功效。阿魏酸的合成以咖啡酸与S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosly methionine, SAM)为底物,在咖啡酸-O-甲基转移酶(Caffeic acid O-methyltransferase, COMT)的催化下完成^[13,14](图1)。现有研究表明,COMT参与了阿魏酸合成的代谢调控,可能是阿魏酸和S-木质素生物合成的关键酶^[15-17]。COMT一般由360~365个氨基酸残基组成,具有咖啡酸结合域

和S-腺苷甲硫氨酸结合域,这些结构域是咖啡酸-O-甲基转移酶共有的特征。为获得川芎阿魏酸生物合成的遗传基础,本课题组开展了川芎转录组学研究^[18,19],所获的原始Reads数据经组装获得Unigene库,其中编号为C55080的Unigene功能注释为Caffeic acid 3-O-methyltransferase。该Unigene长度为1328 bp,含有完整的3'末端,将其命名为C5-COMT。本文以川芎嫩叶为试材,采用5'RACE技术克隆该基因的全长cDNA序列,对其进行序列分析,并构建原核表达载体。这为从分子水平上研究阿魏酸的生物合成机制,并为下一步活性验证及利用生物技术来生产阿魏酸奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

川芎采集于都江堰川芎GAP种植基地。宿主

收稿日期:2016-04-25 接受日期:2016-06-20

基金项目:国家自然科学基金(31371232,31500276);成都市科技
技术研发项目(2015-HM01-00051-SF)* 通讯作者 Tel:86-28-87600965,E-mail:ddliao@home.swjtu.edu.cn;
spinezhou@home.swjtu.edu.cn

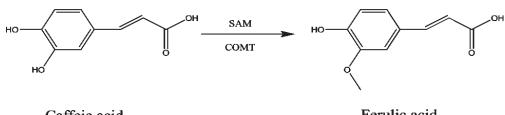


图 1 阿魏酸的生物合成

Fig. 1 Biosynthesis of ferulic acid

菌 DH5 α 由作者实验室保存。实验用 PCR 引物由上海生工生物工程有限公司负责合成。核酸测序由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成。

1.2 主要试剂

植物总 RNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒购于 Omega (USA) 公司;Taq DNA 聚合酶、反转录酶、T4 DNA Ligase、pMD19-T 等均为 Takara (Japan) 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 川芎总 RNA 的提取

川芎嫩叶用液氮研磨成粉,后续步骤按照 Ome-ga 公司 RNA 提取试剂盒说明书操作。

1.3.2 川芎 cDNA 的合成

以纯化的 RNA 为模板,以 Oligo dT (18)(表1) 为反转录引物,采用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA。具体的实验步骤按照 M-MLV 说明书进行。

1.3.3 川芎 C5-COMT 基因的转录组验证

根据川芎转录组中 C5-COMT 的部分序列,利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计一对引物 C5YZ1 和 C5YZ2(表 1)。PCR 反应体系为 cDNA 2 μL;两引物各 1 μL; dNTP (2.5 mM) 8 μL; MgCl₂ (2.5 mM) 4 μL; 10 × Ex Taq PCR buffer 5 μL; Ex Taq 酶 (5 u/μL) 0.5 μL; 用 ddH₂O 补足 50 μL。反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s、54 °C 30 s、72 °C 2 min, 反应 35 个循环, 72 °C 10 min, 4 °C 保存。以 C5YZ1 和 C5YZ2 为引物, 以反转录合成的 cDNA 为模板, 进行川芎 C5-COMT 基因的扩增。退火温度为 51 °C。

1.3.4 川芎 C5-COMT 基因的 5'RACE 克隆

根据转录组数据及验证克隆所得的序列,每条序列分别设计 2 条用于 5'RACE 克隆的特异性引物 5'C5 内和 5'C5 外(表 1)。结合两条 5'RACE 常用的 2 条通用引物 Oligo dT (11) 和 T7(表 1),通过巢式 PCR 扩增出 C5-COMT 基因的 5 端序列。第一轮 PCR 引物为 Oligo dT (11) 和 5'C5 外,模板为加 Ploy A 的 C5-cDNA,退火温度为 58 ℃。第二轮 PCR 引物为 T7 和 5'C5 内,模板为第一轮产物,退火温度为

57 °C。PCR 反应其余条件均与 1.2.3 一致。

1.3.5 川芎 C5-COMT 基因全长克隆

根据所获得的 COMT 拼接序列,在序列的 ORF 两侧分别设计一条引物,为 Q51 和 Q52(表 1),除退火温度变为 56.8 °C 外,PCR 反应其余条件与 1.3.3 一致。

表 1 本研究所用设计

Table 1 Primers for the research

Primer	Sequence 5' -3'
Oligo dT (18)	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTC TTTTTTTTTTTTTTTTTT
C5 YZ1	TCTATGGCACCTCTTCG
C5 YZ2	GACGGCTTAGTAACAACTGAA
5'CS 内	AGAGCCAAAGAGCTCCCATA
5'CS 外	CTTTCCGTACATCCGTGAGTG
Oligo dT (11)	AGGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTVN
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
Q51	CCAATGGAGCCTATGATCAATGT
Q52	GGAGATGTAGCCATTGTTGTGAT

1.3.6 PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,采用 OMEGA 公司的胶回收试剂盒回收后,与 pMD19-T 载体 (Takara, Japan) 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,含 100 mg/mL 青霉素的 LB 平板筛选阳性克隆。阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后,37 °C 培养 12 h,送由成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。

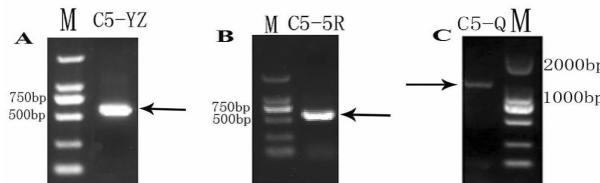


图2 川芎 C5-COMT 转录组(A)、5'RACE 片段(B)、基因全长(C)电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of transcriptome (A), 5' RACE (B) and COMT (C)

1.3.7 生物信息学分析

利用 NCBI 的 BLAST 在线分析工具进行核苷酸序列分析。蛋白质的等电点及分子量计算采用 ExPASY 网站的 Compute pI/Mw tool 进行。采用 DNAMAN 7.0 进行序列的同源性分析。利用 Vector NTI 11.5 软件预测氨基酸种类。利用 SignalIP 在线分析软件对序列进行信号肽存在分析。

2 结果与讨论

2.1 川芎 C5-COMT 基因克隆

以纯化的 RNA 为模板,以 Oligo(dT)18 为反转录引物,得到反转录的 cDNA,如图 2A 所示,片段长度为 576 bp。根据这条序列为 5'RACE 的巢式 PCR 设计特异性引物,得到 5'片段,长度为 648 bp,如图 2B 所示。用高保真酶扩增出的全长片段,全长为

```

1      CAAGGAATCCAATGGAGCCTATGATCAATGTTACACCGTCGAAGCAGAAGCTGTTGTTGCAATGCAC
1      M E P M I N V T P S E A E E A C L F A A M Q
76     TAGCAACTGCTCCGGTACTTCAATGGTCTAAAGCAGCCATTGAGCTTGACCTTTGGAGATCATGCTAAAG
22     L A T A S V L P M V L K A A I E L D L L E I I A K
151    CTGGTCGGGGCGCCCTATGTCAGCTCCGAATGAGCTACGCCCTATACGTCCAACTGGCACCCTCAAACCCGGATGCAACCGCTTA
47     A G P G A Y V T P N E L A S I L P T S N P D A P L
226    TGCCTGACCGCATCTCTCAGAGCTCGCTGAGCTACTGGTCTCAAATGTAAGCTCATTTGAGCTACCTAAATGGTC
72     M L D R I L R V L A S Y L V L K C K L I E L P N G
301    TCTCATGCGCACCATGGCTTGATGCCAGTGTGCAAATATTGATAAAAATGAAAGACGGTGTCTCATGGCAC
97     L L V R T Y G L M P V C K Y L I K N E D G V S S M A
376    CTCCTTCGCTCTCGTTAATGTAAGATTGATGAGCTGGTACTACCTGAAAGATGCGGTCTTGTATGGTG
122    P L S L F V N D K I M M E S W Y V L K D A V L L D G
451    GACTTCATTAACAAGGCGCTTGTAAATGACAATATGATTTACTGGCACGGGACCCCTCGATYCAATATGATCT
147    G P P K A R P M N Y D T G I D P R N M I
526    TTAAACCAAGGCTAAAGAGATCATTCACTTACATTATCAAGATAAGAACCTTGTGAAATTACATGGTTTCAAGGTC
172    P N Q A M K A H E S T M N K R I E N N G F E G
601    TGGGGCTTCTTAGTTGAGCTGCTGCTGGTACCGCTTCTCTGATATAATCATCTCCAAGTACCCAACTTATTA
157    L G S D V Y G G T G G A D P I S K W Y S M A
676    AAGGGGACAACCTTCGATCTCCCCCTGCTGTCAGGCTTCTGGCTCTATAATGGTCTTGAACATGTGGAG
222    K G I F D L P H V V K D A S S Y N V E H V G
751    GGGACATGTTATTAGTGCCCAAAGGAGAACGCCATTCTCCCTCAAGGCTTGTGATGTCATAATTGGACCCGATGAAG
247    G D M F I S V P K G E A I F L K W I C H N W T D E
826    AGTGTGAGATCTGATAAATTGATACCAAGACTCAGGGATGACGGAAAGGTAGTCGTGCAAGAGTCTATT
272    E C L K I L I N C Q Y Q A L T D D G K V V V A E S I
901    TTCGGGAGAACCTGAAACCTGACTTGTACTAAGACCGCTCTCATTTGATGCCATAATGGTATAGATGTTC
297    L R E K P E T S L V T V L H F D A I M L I D V
976    CTGGTGAAGAGAGGACTGAAAGAGTGTGGAGACTGGCTAAACGTGCAAGGATTAAACATTTCCACAAGT
322    P G G R E R T E K F E D L A K R A G F K H F H K
1051   CGTGTGTCCTTTAAATATTGATTGGAAATTGGTAAAGTGAAGCTTGTGATGAGAAAGGAGCTTCTCGTAGA
347   S C C A F N I W I M E F C K *
1126   ACTTATTAAGGAAATTATCATGCGCACATTGGCAGGAACTTGTGAAAGCTATGGATAGATGTTC
1201   CCCCTGTTGCTTAAATATTACTTATTTAAACATTGTAAGTGTGATATAATGAGCACAATTTTATTAAAA
1276   ATCTCCCATTTAAAAAAATATATATAAAAGAGCACAATTAAAAAA
```

图 3 川芎 C5-COMT 的 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 *L. chuanxiong* C5-COMT cDNA and deduced amino acid sequence

注: * 代表终止密码子

Note: * indicated the stop codon

2.2 川芎 C5-COMT 的同源性分析

通过 DNAMAN 7.0 软件进行同源性分析,发现 C5-COMT 序列与中粒咖啡 (GenBank accession no. Q8LL87)、牵牛花 (GenBank accession no. BAE94403)、蓖麻 (GenBank accession no. XP_002525818)、葡萄 (GenBank accession no. XP_003634161) 的同源性分别为 70%、69%、69%、70%。如图 4 所示。并且通过序列比对以及文献上关于 COMT 的保守结构域的报道,我们找到了 7 条保守结构域。分别为结构域 1:LDRILRLL(73-80), 2:(V/L)VDVGGGTG(200-208), 3:(L/I)KGINF DLPHV(L/V)(221-232), 4:PGVEHVG DDMF(240-250), 5:VPKGDAIFMKWI(253-264), 6:ALPK(N/D)GKVI(L/V)AECILP(283-298), 7:GGKERTEK(E/D)FEAL(323-335)。其中结构域 1、3、4、7 为 SAM 结合相关结构域,而结构域 2、5、6 则为咖啡酸结合相关结构域。其中,His-266、Glu-294 与 Glu-326 等 3 个残基在不同植物来源 COMT 的氨基酸序列中均高度保守,它们被认为是参与形成了酶的

1272 bp,如图 2C 所示。C5-COMT 全基因序列见图 3,同时采用 DNA MAN 7.0 软件将基因序列进行 ORF 分析,并将其翻译成氨基酸序列见图 3。C5-COMT 基因全长 1328 bp,ORF 起始于第 12 bp 的 ATG,终止于 1094 bp 的 TAA,共 1083 bp,编码 360 个氨基酸长度的多肽。已将得到的序列提交 GenBank,序列号为 KU942388。

“底物口袋”。由于“底物口袋”含有大量的酸性氨基酸,推测咖啡酸的 3-OH 在酸性环境中极易发生断裂,释放质子,产生 3-O⁻离子(亲核基团),后者即与 SAM 的甲基发生甲基转移反应,最终形成阿魏酸。

2.3 川芎 C5-COMT 蛋白的生物信息学分析

经过不同生物信息学分析网站与软件分析,C5-COMT 蛋白的分子量为 40035.80 Da,等电点为 5.12。C5-COMT 蛋白中中性疏水性氨基酸占 39.17%,中性亲水氨基酸占 21.39%,酸性氨基酸占 12.5%,碱性氨基酸占 9.17%,带电荷氨基酸则占 29.44%。C5-COMT 蛋白不含有信号肽,整体偏亲水性。

3 结论与展望

阿魏酸是重要的医药产品和化工原料,主要是通过提取与化学合成的方式制备,然而这些方法常常存在提取效率低、成本较高与污染环境缺点。目前,随着对阿魏酸生物合成机理研究的深入,通过生

Catharanthus roseus	MG_SANPENKNNS_MTKER	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	YSESS	SGI	CGC	DAPVMLD	78															
Ricinus communis	MG_STG	ETGMTCITQVSDE	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	AFLSPESD	SQF	CGC	DAPVMLD	76														
Camellia sinensis	MG_STS	ETGTC	HIDE	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	YAYVSESS	QV	CGC	DAPVMLD	76													
Ipomoea nil	MG_STT	ETGTC	HIDE	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	YAYVSESS	QV	CGC	DAPVMLD	76													
Anthriscus sylvestris	MG_NTITELLEPTLVNCD	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	YAYVSESS	QV	CGC	DAPVMLD	80															
Anni majus	MG_NTITELLEPTLVNCD	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	YAYVSESS	QV	CGC	DAPVMLD	80															
Coffee canephora	MG_NTITELLEPTLVNCD	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	YAYVSESS	QV	CGC	DAPVMLD	65															
Vitis vinifera	MG_NTITELLEPTLVNCD	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	YAYVSESS	QV	CGC	DAPVMLD	77															
Chuanxiang_CS-COMT	MG_STS	NTFTTILEST	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	YAYVSESS	QV	CGC	DAPVMLD	74														
Consensus	MEPMINVIPE	EECLM	EECLM	ASVLMVLK	EEL	LIE	GL	YAYVSESS	QV	CGC	DAPVMLD	74															
Catharanthus roseus	RILKE	LGAGVWVNT	EECLM	EECLM	FVCK	ED	DGV	AL	NN	DN	MESW	LKD	VIG	GG	PENKAY	158											
Ricinus communis	RILKE	LGAGVWVNT	EECLM	EECLM	FVCK	ED	DGV	AL	NN	DN	MESW	LKD	VIG	GG	PENKAY	158											
Camellia sinensis	RILKE	LTSYVNGVH	EECLM	EECLM	FVCK	ED	DGV	AL	NN	DN	MESW	LKD	VIG	GG	PENKAY	156											
Ipomoea nil	RILKE	LTSYVNGVH	EECLM	EECLM	FVCK	ED	DGV	AL	NN	DN	MESW	LKD	VIG	GG	PENKAY	159											
Anthriscus sylvestris	RILKE	LTSYVNGVH	EECLM	EECLM	FVCK	ED	DGV	AL	NN	DN	MESW	LKD	VIG	GG	PENKAY	160											
Anni majus	RILKE	LTSYVNGVH	EECLM	EECLM	FVCK	ED	DGV	AL	NN	DN	MESW	LKD	VIG	GG	PENKAY	160											
Coffee canephora	RILKE	LTSYVNGVH	EECLM	EECLM	FVCK	ED	DGV	AL	NN	DN	MESW	LKD	VIG	GG	PENKAY	145											
Vitis vinifera	RILKE	LTSYVNGVH	EECLM	EECLM	FVCK	ED	DGV	AL	NN	DN	MESW	LKD	VIG	GG	PENKAY	157											
Chuanxiang_CS-COMT	RILKE	LTSYVNGVH	EECLM	EECLM	FVCK	ED	DGV	AL	NN	DN	MESW	LKD	VIG	GG	PENKAY	154											
Consensus	FLR	I	Y	V	C	I	T	Z	Y	I	PVK	L	N	DGV	A	L	DK	MESW	LKD	V1	GG	PFKKA	154				
Catharanthus roseus	MTAEY	GDPRENKFVN	Q	MS	HSTI	Y	DK	GT	VV	GDTW	VCF	GGTGA	SN	SP	T	RKG	NE	LPB	HL	PFKKA	238						
Ricinus communis	MTAEY	GDPRENKFVN	Q	MS	HSTI	Y	DK	GT	VV	GDTW	VCF	GGTGA	SN	SP	T	RKG	NE	LPB	HL	PFKKA	238						
Camellia sinensis	MTAEY	GDPRENKFVN	Q	MS	HSTI	Y	DK	GT	VV	GDTW	VCF	GGTGA	SN	SP	T	RKG	NE	LPB	HL	PFKKA	236						
Ipomoea nil	MTAEY	GDPRENKFVN	Q	MS	HSTI	Y	DK	GT	VV	GDTW	VCF	GGTGA	SN	SP	T	RKG	NE	LPB	HL	PFKKA	239						
Anthriscus sylvestris	MTAEY	GDPRENKFVN	Q	MS	HSTI	Y	DK	GT	VV	GDTW	VCF	GGTGA	SN	SP	T	RKG	NE	LPB	HL	PFKKA	240						
Anni majus	MTAEY	GDPRENKFVN	Q	MS	HSTI	Y	DK	GT	VV	GDTW	VCF	GGTGA	SN	SP	T	RKG	NE	LPB	HL	PFKKA	225						
Coffee canephora	MTAEY	GDPRENKFVN	Q	MS	HSTI	Y	DK	GT	VV	GDTW	VCF	GGTGA	SN	SP	T	RKG	NE	LPB	HL	PFKKA	237						
Vitis vinifera	MTAEY	GDPRENKFVN	Q	MS	HSTI	Y	DK	GT	VV	GDTW	VCF	GGTGA	SN	SP	T	RKG	NE	LPB	HL	PFKKA	234						
Chuanxiang_CS-COMT	WTN	Y	W	G	DPRKFA	FR	M	HSTI	D	K1	Y	G1	Y	G1	Y	GDTW	VCF	GGTGA	SN	SP	T	RKG	NE	LPB	HL	PFKKA	234
Consensus	m	y	w	g	dprkfa	fr	m	hsti	d	k1	y	g1	y	g1	y	gdtw	vcf	ggta	sn	sp	t	rkg	ne	lpb	hl	pfkka	234
Catharanthus roseus	PSFSY	QDVENVGGMDF	S	VE	PK	AIE	KWIC	I	D	GIRK	AI	NHHA	AI	EV	GV	LE	E	PE	S	T	Q	CTV	BHD	317			
Ricinus communis	PSFSY	QDVENVGGMDF	S	VE	PK	AIE	KWIC	I	D	GIRK	AI	NHHA	AI	EV	GV	LE	E	PE	S	T	Q	CTV	BHD	317			
Camellia sinensis	PSFSY	QDVENVGGMDF	S	VE	PK	AIE	KWIC	I	D	GIRK	AI	NHHA	AI	EV	GV	LE	E	PE	S	T	Q	CTV	BHD	315			
Ipomoea nil	PSFSY	QDVENVGGMDF	S	VE	PK	AIE	KWIC	I	D	GIRK	AI	NHHA	AI	EV	GV	LE	E	PE	S	T	Q	CTV	BHD	318			
Anthriscus sylvestris	PSFSY	QDVENVGGMDF	S	VE	PK	AIE	KWIC	I	D	GIRK	AI	NHHA	AI	EV	GV	LE	E	PE	S	T	Q	CTV	BHD	319			
Anni majus	PSFSY	QDVENVGGMDF	S	VE	PK	AIE	KWIC	I	D	GIRK	AI	NHHA	AI	EV	GV	LE	E	PE	S	T	Q	CTV	BHD	304			
Coffee canephora	PSFSY	QDVENVGGMDF	S	VE	PK	AIE	KWIC	I	D	GIRK	AI	NHHA	AI	EV	GV	LE	E	PE	S	T	Q	CTV	BHD	316			
Vitis vinifera	PSFSY	QDVENVGGMDF	S	VE	PK	AIE	KWIC	I	D	GIRK	AI	NHHA	AI	EV	GV	LE	E	PE	S	T	Q	CTV	BHD	314			
Chuanxiang_CS-COMT	PSNNY	VEVVGGMDF	S	VE	PK	AIE	KWIC	I	D	GIRK	AI	NHHA	AI	EV	GV	LE	E	PE	S	T	Q	CTV	BHD	314			
Consensus	a	g	v	q	vjgqfa	s	gir	kwic	i	d	girk	ai	nhha	ai	ev	gv	le	e	pe	s	t	q	ctv	bhd	314		
Catharanthus roseus	PMIAH	PGG	ERIK	F	DLA	G	IV	A	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	363	
Ricinus communis	PMIAH	PGG	ERIK	F	DLA	G	IV	A	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	364	
Camellia sinensis	PMIAH	PGG	ERIK	F	DLA	G	IV	A	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	362	
Ipomoea nil	PMIAH	PGG	ERIK	F	DLA	G	IV	A	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	364	
Anthriscus sylvestris	PMIAH	PGG	ERIK	F	DLA	G	IV	A	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	365	
Anni majus	PMIAH	PGG	ERIK	F	DLA	G	IV	A	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	365	
Coffee canephora	PMIAH	PGG	ERIK	F	DLA	G	IV	A	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	360	
Vitis vinifera	PMIAH	PGG	ERIK	F	DLA	G	IV	A	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	360	
Chuanxiang_CS-COMT	AMIIIV	PGG	ERIK	F	DLA	G	IV	A	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	AA	W	360	
Consensus	a	g	v	q	vjgqfa	s	gir	kwic	i	d	girk	ai	nhha	ai	ev	gv	le	e	pe	s	t	q	ctv	bhd	360		

图 4 川芎 C5-COMT 氨基酸序列比对

Fig. 4 Sequence alignments of *L. chuanxiong* C5-COMT amino acid sequence

物技术即酶促方法来制备阿魏酸,已成为一条对环境友好的绿色合成途径。本研究通过 5'RACE 技术成功获得了川芎 C5-COMT 基因的全长序列,该基因全长为 1328 bp,编码 360 个氨基酸长度的肽链。Hehmann 等^[20]发现大阿米芹 COMT(GenBank 登录号 Q6T1F5)的底物特异性不强,其能够催化咖啡酸、咖啡酸甲酯、5-羟阿魏酸等多种底物分子发生甲基化反应。尽管 C5-COMT 与大阿米芹 COMT 氨基酸序列的相似度仅为 67%,但是活性区域的氨基酸序列保守性较强,其中结构域 1、2 相似度为 87.5%,结构域 3 相似度为 91.7%,结构域 4 和 5 相似度为 83.3%,结构域 6、7 相似度分别为 62.5%、76.9%,仅有 Leu-200、Glu-256、Leu-261、Asp-287 与 Val-292 等少量残基存在差异,推测 C5-COMT 与大阿米芹具有相似的生物学活性,但还需要进一步的实验验证。因 C5-COMT 无信号肽,整体偏亲水性,推测其主要在胞浆中发挥酶促作用。通过 Blast 与同源性分析发现川芎 C5-COMT 酶的活性很有可能与 His-266 对咖啡酸苯环上的羟基去质子化有关,而 Glu-294, Glu-326 则对稳定 His-266 催化前后的 pKa 起着重要作用^[21]。本文的研究结果为下一步活性验证及利用生物技术来生产阿魏酸奠定坚实基础。

参考文献

- 1 Liu JL, Zheng SL, Fan QJ, et al. Optimisation of high-pres-

sure ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacity of polysaccharides from the rhizome of *Ligusticum chuanxiong*. *Int J Biol Macromol*, 2015, 76:80-85.

- 2 Huang J, Lu XQ, Zhang C, et al. Anti-inflammatory ligustilides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. *Fitoterapia*, 2013, 91: 21-27.
 - 3 Xu J, Chen HB, Liu J, et al. Why are Angelicae Sinensis radix and Chuanxiong Rhizoma different? An explanation from a chemical perspective. *Food Res Int*, 2013, 54: 439-447.
 - 4 Zhang L, Yang DH, Zhao X, et al. Metabolism of Chuanxiong Rhizoma decoction: Identification of the metabolites in WZS-miniature pig urine. *Fitoterapia*, 2015, 105: 177-186.
 - 5 Zhang XL, Liu LF, Zhu LY, et al. A high performance liquid chromatography fingerprinting and ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry chemical profiling approach to rapidly find characteristic chemical markers for quality evaluation of dispensing granules, a case study on Chuanxiong Rhizoma. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88: 391-400.
 - 6 Wu W, Lee SY, Wu X, et al. Neuroprotective ferulic acid (FA)-glycol chitosan (GC) nanoparticles for functional restoration of traumatically injured spinal cord. *Biomaterials*, 2014, 35: 2355-2364.
 - 7 Bunel V, Antoine MH, Nortier J, et al. Nephroprotective effects of ferulic acid, Z-ligustilide and E-ligustilide isolated from *Angelica sinensis* against cisplatin toxicity *in vitro*. *Toxicol In Vitro*, 2015, 29: 458-467.
 - 8 Hung HY, Wu TS. Recent progress on the traditional Chinese medicines that regulate the blood. *J Food Drug Anal*, 2016,

- 24:221-238.
- 9 Hong Q, Ma ZC, Huang H, et al. Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. *Eur J Pharmacol*, 2016, 777:1-8.
- 10 Mancuso C, Santangelo R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem Toxicol*, 2014, 65:185-195.
- 11 Bacanlı M, Aydin S, Taner G, et al. The protective role of ferulic acid on sepsis-induced oxidative damage in Wistar albino rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38:774-782.
- 12 Ramar M, Manikandan B, Raman T, et al. Protective effect of ferulic acid and resveratrol against alloxan-induced diabetes in mice. *Eur J Pharmacol*, 2012, 690:226-235.
- 13 Singh R, Gupta P, Pandey VP, et al. Temporal expression of caffeic acid 3-O-methyltransferase (COMT) in mango (*Mangifera indica* var. Dashehari) fruit ripening. *LWT Food Sci Technol*, 2011, 44:1782-1785.
- 14 Dwivedi UN, Gupta P, Pandey VP, et al. Caffeic acid O-methyltransferase from *Leucaena leucocephala*: Cloning, expression, characterization and molecular docking analyses. *J Mol Catal B-Enzym*, 2014, 106:63-70.
- 15 Lee JE, Vogt T, Hause B, et al. Methyl jasmonate induces an O-methyltransferase in barley. *Plant Cell Physiol*, 1997, 389:851-862.
- 16 Nagy K, Actis-Goretta L, Redeuil K, et al. Identification of cholesteryl ester of ferulic acid in human plasma by mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2013, 1301:162-168.
- 17 Yoshihara N, Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, et al. Molecular cloning and characterization of O-methyltransferases from the flower buds of *Iris hollandica*. *J Photochem Photobiol*, 2008, 165:415-422.
- 18 Song T, Liu ZB, Li JJ, et al. Comparative Transcriptome of Rhizome and Leaf in *Ligusticum Chuanxiong*. *Plant Syst Evol*, 2015, 301:2073-2085.
- 19 Song T(宋涛), Feng B(冯斌), Li JJ(李娟娟), et al. Homology modeling and molecular docking of caffeic acid-3-O-methyltransferase from *Ligusticum Chuanxiong*. *Biotechnology (生物技术)*, 2015, 25:247-250.
- 20 Hehmann M, Lukac̆in R, Ekiert H, et al. Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L. *Eur J Biochem*, 2004, 271:932-940.
- 21 Green AR, Lewis KM, Barr JT, et al. Determination of the structure and catalytic mechanism of *Sorghum bicolor* caffeic acid O-methyltransferase and the structural impact of three *brown midrib12* mutations. *Plant Physiol*, 2014, 165:1440-1456.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

丁 克	戈惠明	王红兵	尹文兵	尹 胜	吕兆林
DING Ke	GE Huiming	WANG Hongbing	YIN Wenbing	YIN Sheng	LV Zhaolin
李良成	李国友	刘相国	孙黔云	孙桂波	孙昊鹏
LI Liangcheng	LI Guoyou	LIU Xiangguo	SUN Qianyun	SUN Guibo	SUN Haopeng
伍婉卿	陈益华	李芸霞	沐万孟	邱 莉	汪海波
WU Wanqing	CHEN Yihua	LI Yunxia	MU Wanmeng	QIU Li	WANG Haibo
张炳火	林昌俊	欧阳杰	周 文	易华西	罗应刚
ZHANG Binghuo	LIN Changjun	OU Yangjie	ZHOU Wen	YI Huaxi	LUO Yinggang
胡友财	高慧敏	唐金山	夏永刚	袁 涛	黄胜雄
HU Youcai	GAO Huimin	TANG Jinshan	XIA Yonggang	YUAN Tao	HUANG Shengxiong
韩淑燕	蓝蔚青	廖晨钟	潘卫东	薛永波	
HAN Shuyan	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	PAN Weidong	XUE Yongbo	