

中華大學生物資訊學系系統開發專題報告

探討紫蘇芳香精油檸檬烯合酶基因之潛在家族成員基因

Isolation of the potential family members of the limonene synthase gene for the aromatic essential oil of *Perilla frutescens*

專題組員:周棋宏、黃子君、陳品翰

專題編號:107002

指導老師:張慧玫 老師

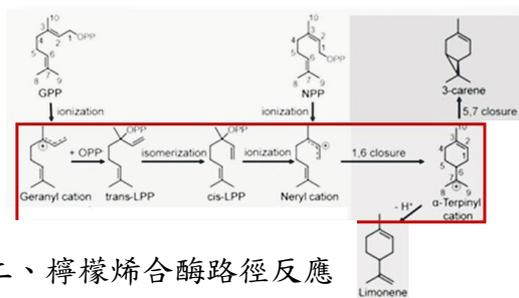
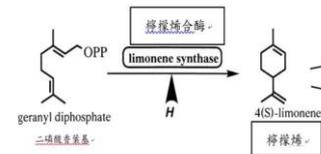
一、摘要

紫蘇精油是常用於化妝品與酒品中的芳香成分，二磷酸香葉基轉變成檸檬烯是紫蘇精油所有芳香成分路徑的源頭步驟。本專題主題是尋找紫蘇檸檬烯合成酶潛在家族成員基因，作為提供調節或開發香氣的潛在因子。利用文獻與資料庫的文獻比對，藉由PCR 我們成功找出與檸檬烯合成酶相似度88%的潛在家族成員基因，可提供香氣合成開發的關鍵步驟的參考調節因子。

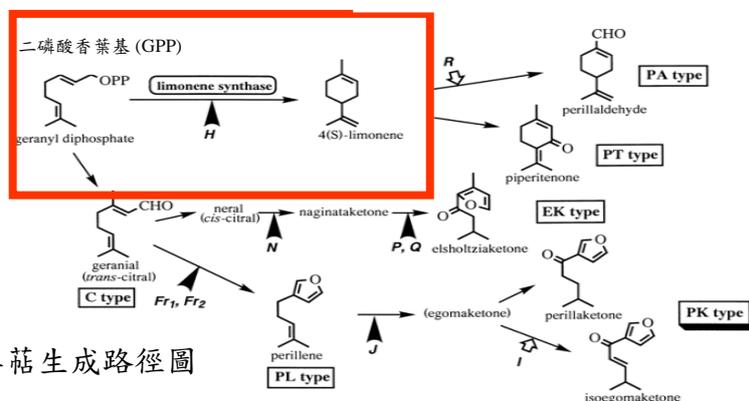
二、簡介

紫蘇 (*Perilla frutescens*) 精油是常用於化妝品與酒品中的芳香成分，二磷酸香葉基轉變成檸檬烯合酶是所有芳香成分路徑的源頭步驟根據論文 (Hosoi *et al.*, 2004)。紫蘇精油中的主要成分是紫蘇醛，占總量的50-60%，是紫蘇油濃郁氣味的主要來源。其它主要的萜烯類物質包含檸檬烯、石竹烯以及金合歡烯根據紫蘇維基百科。

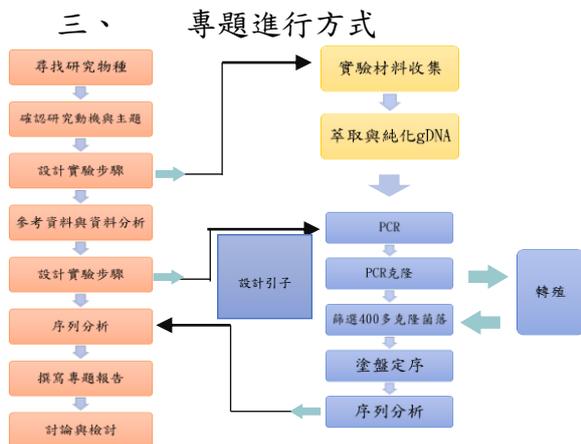
紫蘇依照主要氣味成分可有以下幾種的分型：紫蘇酮 (PK 型)、紫蘇醛 (PA 型)、紫蘇烯 (PL 型)、檸檬醛 (C 型)。本專題著重的檸檬烯合酶，可將二磷酸香葉 (GPP) 基由檸檬烯合酶轉化為檸檬烯、月桂烯、槭烯和芳樟醇 (如圖一)，是在單萜香味路徑的第一步，調控源頭產物有利於提高下游產物量，和單萜香味路徑的操作，有助於將來這些香氣生物合成 (Lei *et al.*, 2021) 的應用。而酶家族成員基因往往



圖二、檸檬烯合酶路徑反應



圖一、紫蘇單萜生成路徑圖



圖三、專題流程圖

我們將紫蘇基因組 DNA 純化萃取出，根據論文與 NCBI 資料庫所得已知的檸檬烯合酶 mRNA 序列，利用多重序列比對，在高保留區選合成檸檬烯合酶引子，以低黏合溫度聚合酶連鎖反應取得類似序列片段，再行讀序測試是否為相似序列(如圖三)。

四、 研究方法及步驟

(一) 實驗藥品

Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB), Isopropanol, PolyyVinylPyrrolidone (PVP), Proteinase K, Phenol/Chloroform, 5X Polymerase chain reaction Master Mix (BioKit), β -mercaptoethanol (β -ME), EtOH 75%, T₁₀E₁ buffer, SOC 培養液等所使用的藥品均為試藥級或以上等級藥品。

(二) 萃取 Genomic DNA 並純化

CTAB 植物基因體 DNA 萃取，根據標準 CTAB 植物基因組生物 DNA 抽取法依據步驟萃取 gDNA 並純化 (Doyle & Doyle, 1987)。

(三) 設計引子

於 NCBI 上找出紫蘇檸檬烯合酶 *Perilla frutescens* (-)-limonene-7-hydroxylase mRNA (GQ120438.1) 的基因序列，其旁系同源，並與檸檬烯合酶進行序列比對，比對資料為辣薄荷 PP450-2 limonene hydroxylase mRNA (EU108698.1), 辣薄荷 p450 isoform PM2 mRNA (AF124817.1), 辣薄荷

p450 isoform PM17 mRNA (AF124816.1), 薄荷檸檬烯化酶 (lih1) mRNA (EF546776.1) 比對，以 Novo Pro 進行多重序列比對出高保留區，尋找連續相似序列至少 20 鹼基字串的出高保留區(如圖四)。前置引子 (forward primer) 和反置引子 (reverse primer) 設計注意事項：

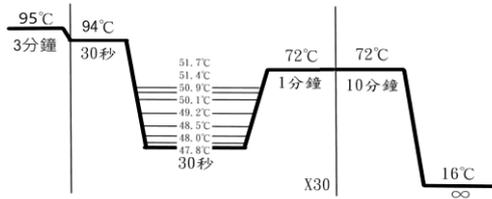
- (1) 前置和反置引子不可互補形成雙體 (heterodimer)。
- (2) 引子本身不可自黏形成雙體 (homodimer)。
- (3) T_m 黏合溫度 (annealing temperature) 差 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 內。
- (4) 前置和反置引子 3' 端要是 G 和 C 結尾。
- (5) GC 和 TA 比例約為 50%。

GQ120438.1_Perilla_frutescens (-)	TGCGCGGACGAGCCGACAGCATCGGCACCTAAGATCATGTGGTACGACAACAGGATCTC
紫蘇檸檬烯合酶	
EU108698.1_Mentha_x_piperita_clo	TGCGCGGAAACCGGTTTCGAGAGCATCGGGACGAGGATCATGTGGTACGACAACAGGACATC
辣薄荷	
AF124817.1_Mentha_x_piperita_cyt	TGCGCGGAAACCGGTTTCGAGAGCATCGGGACGAGGATCATGTGGTACGACAACAGGACATC
辣薄荷	
AF124816.1_Mentha_x_piperita_cyt	TGCGCGGAAACCGGTTTCGAGAGCATCGGGACGAGGATCATGTGGTACGACAACAGGACATC
辣薄荷	
EF546776.1_Mentha_arvensis_limon	TGCGCGGAAACCGGTTTCGAGAGCATCGGGACGAGGATCATGTGGTACGACAACAGGACATC
薄荷檸檬烯化酶	

圖四、為了設計引子尋找多重序列的高保留區，圖中藍色區所示為前置引子位置。

(四) 聚合酶連鎖反應 (PCR)

為了找出檸檬烯合酶潛在家族成員，設計溫度梯度 PCR (Gradient PCR) (如圖五)。PCR 聚合酶連鎖反應每管以 50 μL 在 PCR 反應，5xPCR Master Mix 10 μL , Genomic DNA 33ng/ μL 5 μL , UVddH₂O 31 μL , (Lim-F1 5'-CAG CAT CGG CAC TAA GAT CA -3') 和 (Lim-R1 5'-AAT GGA ACC TCA ACG TTT GC-3') 10 μM 引子各 2 μL ，原序列 mRNA (GQ120438.1) 的基因序列可得約 1560bp，若是家族成員可能出現不同的 PCR 產物長度。所得擴分子以 1.0% 洋菜膠作電泳分析，進行酒精沉澱。



圖五、Gradient PCR 反應溫度

PCR 產物3' 多一個 A，我們使用 pGeM-T 3' (Biokit)多一個 T 來做接合克隆。將烘乾後的產物於冰上以15 μ L UVddH₂O 回溶，加入2 μ L 10X Ligation Buffer，加入2 μ L Ligation，再加入 pGeM-T 載體 1 μ L，放入16°C 水浴槽反應24小時。

(五) 轉殖載體至勝任細胞

將載體 Heat shock 進勝任細胞 (BL21)，分別以轉殖原液100 μ L、100x 稀釋 (原液10 μ L+SOC 培養液 990 μ L)、200x 稀釋 (原液1 μ L+SOC 199 μ L)抹置 LB 盤上，放置於37°C 培養箱過夜。

(六) 大量篩選所要克隆菌落

我們利用菌落 PCR 的方法大量篩選。每管以 30 μ L 在 PCR 反應，我們將 PCR 黏合溫度設置為46.5°C，載體上的引子以10 μ M (T7 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3') (SP6 5'-TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA C-3')各 2 μ L，5X PCR Master Mix 6 μ L，UVddH₂O 20 μ L，以 cocktail 方式調配再分裝。採單菌落並分別塗在 LB-Amp 盤內保菌，放入37°C 培養箱過夜。經 PCR 後所得擴大大子以1.0% 洋菜膠作電泳分析，每批採21個菌落分別進行20批。尋找不同大小片段分別塗盤後送明欣生物科技讀序。

(七) 序列分析

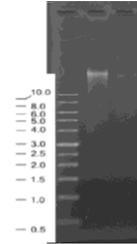
我們利用 NOVO Pro, 和 NCBI 工具中的 BLASTn, BLASTp, ORF finder, CDD, Blast Tree View，以及 ExpASy 的 UniProtKB BLAST 做序列分析。

五、 主要成果

(一) genomic DNA 品質檢測結果

純化後紫蘇的全基因組片段，以

0.8% 洋菜膠和1Kb ladder 跑膠從圖六可知無明顯 RNA 與 gDNA 降解現象，經計算 gDNA 總量約為26 μ g，表示其品質良好。

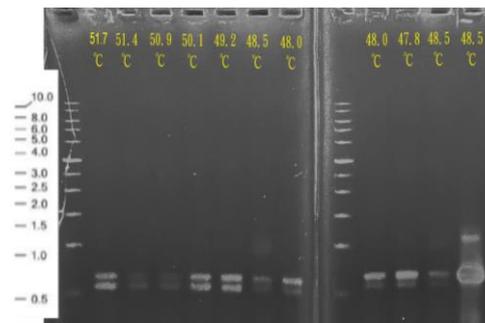


以0.8%洋菜膠和1Kb ladder (DNA 片段長度標準液)電泳圖

圖六、gDNA 品質檢測電泳圖

(二) Gradient PCR 結果

為了在紫蘇中找出家族成員基因，根據明新科技公司建議黏合溫度為 Lim-F1 (51.7°C), Lim-R1 (49.6°C)，而我們調降黏合溫度設在51.7°C 到47.8°C，大部分溫度出現在約600bp，700bp，在48.5°C 有1Kb，600bp，500bp 的 PCR 產物 (如圖七)。

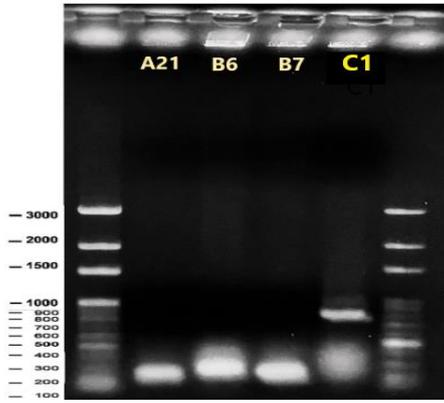


圖七、Gradient PCR 的結果

兩次測試發現600bp, 500bp 的 PCR 產物較常見，1Kb 較少出現。

(三) 篩選結果

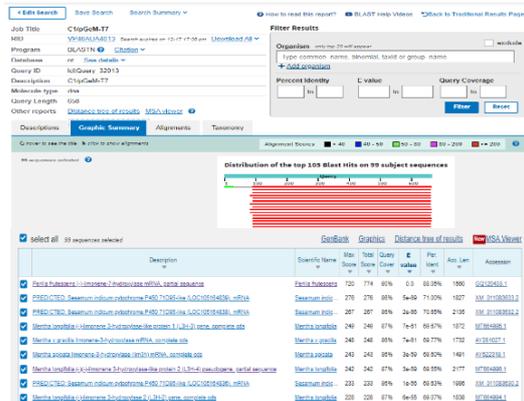
經過約400個菌落篩選，我們選出4個不同片段菌落，根據明新科技公司建議溫度 T7(Tm 為47.6°C)，SP6-1(Tm 為47.3°C)，我們將引子黏合溫度設置在46.5°C，我們得到 220bp (A21 菌落克隆)，325bp (B6 菌落克隆)，250bp (B7 菌落克隆)和750bp (C1 菌落克隆)，將4個菌落送定序 (如圖八)。



圖八、克隆 A21, B6, B7和 C1 嵌入大小估計

(四) 定序結果

克隆 A21, B6, 和 B7 定序後進行 BLAST 比對，A21, B7 無比對出相關物種或相關基因，B6 比對出大腸桿菌，此3克隆可能來自隨機汙染擴大結果。目前克隆 C1 可能是目前我們要找的檸檬烯合酶家族成員 (如圖九)。



圖九、相似基因與表列名單

克隆 C1 與 NCBI 資料庫的 BLAST 全比對，可高相似的(顯示為紅色) 且高遮蓋率的對到不同物種的 P450 和檸檬烯合酶，一直到第20名它的 E 值都還是 $2e^{-43}$ ，表示為非隨機的高相似。紫蘇檸檬烯合酶 GQ120438.1 排第一有 88% 核酸相似度(圖九)，表示克隆 C1 如預期在整個資料庫裡和 GQ120438.1 最像，因此克隆 C1 符合可能是家族成員基因的條件。

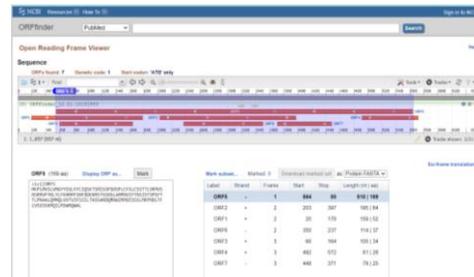
Perilla frutescens (-)-limonene-7-hydroxylase mRNA, partial sequence



圖十、克隆 C1 與紫蘇檸檬烯合酶 GQ120438.1 序列比對

將克隆 C1/pGeM-T 從 T7 載體引子方向讀序結果，與紫蘇 mRNA 進行針對性一對一核酸序列比對(圖十)，會發現 T7 是以反向讀序，因為序列順序是由大到小，所以從另外一邊的 SP6 載體引子方向讀序才是以正向讀序。而克隆 C1 全長讀序出 658 鹼基，其中只有 60 鹼基未對上目標 mRNA (GQ120438.1)。

接著我們利用 NCBI 的 ORF finder 將 C1 克隆胺基酸序列比對，找出轉譯框架。



圖十一、C1 克隆偵測 ORF finder 結果

將 C1-SP6 進行 ORF 偵測，有 7 種 ORF (如圖十一)，再做 NCBI Protein Blast，發現只有 ORF1, ORF2 和紫蘇檸檬烯合酶胺基酸相關，ORF4 和反向 ORF5, ORF7 Blast 比對與紫蘇檸檬烯合酶 ADC94830.1 胺基酸比對較無關，ORF3 和反方向 ORF6 Blast 比對無結果。

(-)-limonene-7-hydroxylase, partial [Perilla frutescens]



直接抽取紫蘇 mRNA 再反轉錄成 cDNA，找出 gDNA 片段，要跟 mRNA 反轉的 cDNA, 序列比對，才能定義出全基因的 Intron /Exon 完整結構分布。若要證實 C1 家族成員必須以 GPP 反應物將 C1 基因做出蛋白質測試是否產生哪種萜類。

八、 結語

經過一年半的練習與努力，在進行實驗時，還發現實驗室污染了，要在花心力去解決。一件一件事發現問題並解決問題，讓我們成長許多，也因此學到了許多知識。

九、 銘謝

特別感謝張慧攻老師在製作專題時進行的各種指導，在專題實驗進行時，提醒我們實驗注意事項，甚至在身體不適的時還關心我們實驗進度，讓我們可以在成果發表前如期完成實驗，將實驗結果呈現給大家看。

十、 參考文獻

- Doyle & Doyle. (1987) CTAB DNA Extraction Protocol. Kalisz Lab Polska.
- Gross Atan, and Katz Samuel G Katz. (2017) Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins.
- Hosoi Madoka, ITO Michiho, Yagura Toru, Adams Robert Phillip, and Honda Gisho. (2004) cDNA Isolation and Functional Expression of Myrcene Synthase from *Perilla frutescens*. U.S.A.
- Lei Dengwei, Qiu Zetian, Qiao Jianjun, and Zhao Guang-Rong. (2021) Plasticity engineering of plant monoterpene synthases and application for microbial production of monoterpenoids. *Biotechnol Biofuels* 14 : 147
- Lücker Joost, K Mazen. Tamer El, Schwab Wilfried, Verstappen Francel W. A., Plas Linus H. W. van der, J.

Bouwmeester Harro J. Bouwmeester, Verhoeven Harrie A. (2009) Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*)

紫蘇維基百科

<https://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%B4%AB%E8%98%87>

美國國家生物技術資訊中心

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

多重序列比對

<https://www.novopro.cn/tools/muscle.html>