

秦艽 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶基因 (*GmDXR*) 的克隆和表达分析

化文平^{1,2*}, 岑文¹, 孔维维¹

1. 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西师范大学生命科学院, 陕西 西安 710062

2. 陕西学前师范学院 生物科学与技术系, 陕西 西安 710100

摘要: 目的 从药用植物秦艽 *Gentiana macrophylla* 中克隆了萜类成分合成途径的关键酶——5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶 (1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR) 基因, 分析其序列特征及表达方式。方法 克隆了秦艽 DXR 基因 (*GmDXR*), 分析了 *GmDXR* 编码蛋白序列的特征, 并采用实时定量分析了 *GmDXR* 的表达模式。结果 秦艽 *GmDXR* 基因包含 1 个完整的长 1 428 bp 的 ORF 框, 编码 475 个氨基酸; *GmDXR* 与罗芙木、番茄等植物 DXR 蛋白具有很高的同源性 ($\geq 85\%$), 无跨膜结构域、信号肽等结构, 主要定位于叶绿体中。定量 PCR 结果显示, *GmDXR* 主要在秦艽的叶中进行表达, 受到植物激素茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 的诱导。结论 *GmDXR* 含有 DXR 蛋白的保守结构特征; 在秦艽不同器官中 *GmDXR* 基因表达不同, 且受到 MeJA 的诱导。该研究为今后研究秦艽环烯醚萜类化合物的生物合成机制提供了依据。

关键词: 秦艽; 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶; 序列分析; 表达模式; ORF 框

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)12-1758-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.021

Cloning and expression analysis of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene from *Gentiana macrophylla* (*GmDXR*)

HUA Wen-ping^{1,2}, CEN Wen¹, KONG Wei-wei¹

1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

2. Department of Life Sciences and Technology, Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710100, China

Abstract: Objective To clone the gene sequence of the key enzyme in synthesis pathway of terpenoids, 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) from *Gentiana macrophylla* (*GmDXR*) and to analyze its characteristic and expression. **Methods** *GmDXR* gene was cloned and the sequence characterization was analyzed with bioinformatics methods, then the expression patterns of *GmDXR* were studied by real-time PCR. **Results** *GmDXR* gene contained a completed open reading frame of 1 428 bp encoding 475 amino acids, *GmDXR* has high homology ($\geq 85\%$) with DXR proteins from *Rauvolfia verticillata*, *Lycopersicon esculentum*, and other plants. Further analysis showed that *GmDXR* had non-transmembrane domain structure and signal peptide, which mainly located in the chloroplast. Quantitative PCR results showed that *GmDXR* mainly expressed in the leaves of *G. macrophylla* and could be induced by plant hormone such as methyl jasmonate (MeJA). **Conclusion** *GmDXR* contains conserved structures of DXR protein. *GmDXR* expresses variously in different organs of *G. macrophylla* and could be induced by MeJA. It is very helpful for the future research on biosynthetic mechanism of iridoid compounds in *G. macrophylla*.

Key words: *Gentiana macrophylla* Pall; 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; sequence analysis; expression pattern; open reading frame

秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall 是我国一种重要的传统中药, 具有保肝抑菌抗炎和抗病毒等多方面作用。临床上对风湿骨关节病、脑出血后遗症等均有不错的疗效。近年随着中药研究手段的发展, 秦艽的一些新的药理作用相继被发现, 如抗肿瘤作

用、调节中枢神经系统及免疫系统等^[1-2]。其临床应用前景必将更加开阔, 而野生秦艽资源已远远不能满足现今的市场需求。目前秦艽已被列入《国家重点保护野生药材物种名录》, 是国家三级保护野生药材^[3]。为缓解中药资源危机, 研究药物有效成

收稿日期: 2014-01-28

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (2014JQ3105, 2014JQ3112); 陕西省博士后基金; 陕西学前师范学院博士专项

*通信作者 化文平, 男, 博士, 讲师, 主要研究药用植物次生代谢。E-mail: huawenping@126.com

分合成途径,利用分子育种来提高药材资源量已刻不容缓。

秦艽中主要的药用有效成分是以龙胆苦苷(gentiopicroside)为主的多种裂环烯醚萜苷类化合物。萜类物质(terpenoids)是一类以异戊二烯为结构单元的化合物的统称,也称作类异戊二烯(isoprenoids)。其广泛存在于自然界中,且种类繁多。迄今人们已发现的萜类化合物中有半数以上是在植物中发现的^[4]。秦艽中的龙胆苦苷(gentiopicroside)、獐牙菜苷(sweroside)、獐牙菜苦苷(swertiamarin)等物质都属于萜类化合物的衍生物^[5]。

高等植物中的类异戊二烯都来源于前体物质异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)。IPP和DMAPP的合成依赖于2个独立的生物合成途径:甲羟戊酸途径(MVA)和2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径^[6]。而5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR)是MEP途径上的第2个关键酶,如长春花细胞中DXR基因过量表达会导致长春花中的单萜呋喃生物碱量增加^[7];在薄荷中过表达DXR基因,使薄荷油产量明显提高^[8];过量表达DXR基因能够有效提高青蒿中青蒿素的量^[9];在紫杉醇内生真菌合成紫杉醇的过程中DXR也发挥着作用^[10]。有研究显示在同种植物的不同器官中,裂环烯醚萜苷量有明显差异,但目前关于药用植物秦艽萜类成分合成途径中DXR基因的研究尚无报道。本实验对秦艽的*GmDXR*基因进行了克隆和编码蛋白序列特征的研究分析,并借助real-time PCR技术对秦艽不同器官的*GmDXR*表达量进行检测,初步了解了*GmDXR*的表达模式,为今后研究秦艽裂环烯醚萜类化合物的生物合成机制以及开展分子育种等提供依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

2011年7月于陕西省太白县中药驯化园内采集花期的秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall 样品及标本,标本由陕西师范大学生命科学学院田先华教授进行鉴定。一年龄样品移栽西师范大学试验田中。待幼苗适应生长,1个月后,用200 μmol/L的MeJA对幼苗进行喷洒处理,每2天收获1次,并将秦艽根和叶分别采集。按照秦艽根、茎、叶3个不同器官

部位采集未处理秦艽样品后,用于基因器官特异性表达检测。收集的样品立即于液氮中速冻,而后保存至低温冰箱(-80℃)内以用于总RNA提取。

1.2 主要试剂

RNA提取试剂盒购自OMEGA公司;SYBR Green II Premix Ex Taq和反转录试剂盒均购自TaKaRa生物公司。

2 方法

2.1 秦艽总RNA的提取与反转录

用OMEGA公司的RNA提取试剂盒分别提取秦艽根茎叶的总RNA,并以其为模板严格按照反转录试剂盒PrimeScript[®] RT reagent Kit (TaKaRa)说明书合成秦艽cDNA第一条链。

2.2 *GmDXR*基因的克隆

依据实验室高通量数据库中unigene18237基因序列,采用Premier Premier 5.0软件在完整ORF框两端设计引物(*GmDXR*-S: 5'-GGACGGATTACT-ATTGGAATCTTCG-3'和*GmDXR*-R: 5'-GCCCTTCATTACCATACAAAGT-3'),以反转合成的cDNA为模板。PCR反应程序为:95℃预变性3 min, 94℃变性30 s, 60℃退火20 s, 72℃延伸10 s, 45个循环。反应体系为:上下游引物各0.2 μL (10 pmol), Mix 10 μL, 模板cDNA 4 μL, ddH₂O 5.6 μL。经RT-PCR扩增,从秦艽cDNA文库中扩增得到了1条DXR基因(命名为*GmDXR*)。

2.3 *GmDXR*蛋白的生物信息学分析

采用生物信息学软件(<http://web.expasy.org/prot-param/>; <http://www.cbs.dtu.dk/>; <http://psort.hgc.jp/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对*GmDXR*基因编码氨基酸序列进行在线分析。分别采用ExPASy ProtParam, SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、PSORT (<http://psort.hgc.jp/>)和NCBI-CDS等工具预测蛋白质的理化性质、信号肽、跨膜结构、亚细胞定位以及保守结构域;用在线工具SOPMA以及SWISS-MODEL完成蛋白质二级结构和三维结构的分析。用BlastX和Clustal Omega完成氨基酸序列的同源性比对和多序列比对。以MEGA5.2构建植物DXR蛋白序列的分子进化树。

2.4 *GmDXR*基因的表达分析

以“2.1”项中合成的样品cDNA稀释50倍后为模板进行实时定量PCR反应。以持家基因actin

(NCBI 登录号: KJ194570) 为内参 (actinS: 5'-CATCTGAAACGCTCGGCACC-3' 和 actinR: 5'-TGAAAGAAAACTGGCTTACATCGC-3'), 检测 *GmDXR* 基因的表达量。采用 Premier Premier 5.0 设计实时定量 PCR 扩增引物 (*GmDXR*-S: 5'-CCTTGTTAGCCAGGGCAATGTC-3' 和 *GmDXR*-R: 5'-TGGGATGGTCCAAAGCCGA-3')。PCR 反应程序: 95 °C、3 min; 95 °C、10 s, 60 °C、30 s, 50 个循环。每个样品重复 3 次。采用“比较 Ct 法的相对定量”法对数据进行分析, 并用 SPSS 13.0 中 one-way ANOVA 方法进行单因素方差分析, 利用 Tukey test 分析各样品间基因表达的显著性。

3 结果与分析

3.1 *GmDXR* 基因全长序列的克隆及分析

扩增产物经测序验证, 扩增 *GmDXR* 基因片段长 1 658 bp (图 1), 经 DNASTAR 对开放阅读框进行查找和翻译, *GmDXR* 包含 1 个 1 428 bp 的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 475 个氨基酸残基。

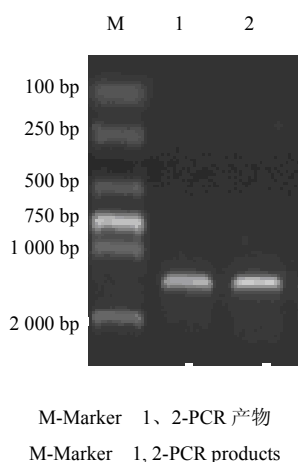


图 1 秦艽 *GmDXR* 基因扩增产物凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoretic analysis of PCR products of *GmDXR*

3.2 *GmDXR* 蛋白的生物信息学分析

3.2.1 不同物种间 *DXR* 基因所编码蛋白质的同源性分析 采用 NCBI 网站 BLAST X 程序进行蛋白序列比对分析显示, *GmDXR* 与其他植物中的 *DXR* 蛋白具有很高的同源性。其中 *GmDXR* 与萝芙木 (*Rauvolfia verticillata*, AAY87151.2)、番茄 (*Solanum lycopersicum*, AAK96063.2)、杜仲 (*Eucommia ulmoides*, AFU93071.1)、蓖麻 (*Ricinus communis*, EEF52001.1)、长春花 (*Catharanthus roseus*,

AAF65154.1)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge., ACK57535.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., AAF73140.1)、毛喉鞘蕊花 (*Plectranthus barbatus*, AAR99081.1) 和苜蓿 (*Medicago truncatula*, AES91160.1) *DXR* 蛋白的一致性分别达到 89%、87%、86%、85%、88%、83%、82%、81% 和 80%。采用 Clustal W 进行多序列比对分析以及在线工具 PROSCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=NPSA/npsa_proscan.html) 对 *GmDXR* 蛋白进行功能位点的查找发现, 不同物种间的 *DXR* 蛋白的保守性很高, 其功能域具备高度相似的氨基酸组成, *GmDXR* 有 2 个 *DXR* 结合基序 motif (LPADSEHSAI 和 NKGLEVIEAHY) 和 2 个高保守的 NADPH 结合位点 (GSTGSIGT 和 LAAGSNV), 并且在其 N 端存在一个脯氨酸富集的质体靶向序列 (QPPPAWPGR), 这段序列对于保持酶的活性和稳定性起着重要的作用 (图 2)。利用软件 MEGA5.2, 选用 Neighbor-Joining 方法, 以最适算法模型 JTT+G, 构建不同物种 *DXR* 蛋白的系统进化树 (图 3)。进化树显示 *GmDXR* 与长春花和萝芙木的 *DXR* 最接近。

3.2.2 *GmDXR* 蛋白的特性分析 ProtParam 软件预测结果显示: *GmDXR* 蛋白的理论等电点为 5.66, 相对分子质量为 51 590, 蛋白不稳定系数为 36.40, 属于稳定类蛋白。利用 SOPMA 程序对 *GmDXR* 氨基酸序列的二维结构进行预测, 结果显示, *GmDXR* 的蛋白二级结构组成为, α -螺旋占 36.63%、 β -转角占 6.32%、不规则卷曲占 37.26% 和延伸链占 19.79%。利用 TMHMM 2.0 Server 对 *GmDXR* 蛋白进行跨膜结构域的预测, 结果显示 *GmDXR* 蛋白没有跨膜区段。利用 SignalP 3.0 Server -prediction 对 *GmDXR* 蛋白进行信号肽的预测, 结果显示 *GmDXR* 蛋白没有信号肽。利用 PSORT 对 *GmDXR* 蛋白进行亚细胞定位, 显示该蛋白可能定位于叶绿体 (可信度 6.0)。结合其含有 N 端富集脯氨酸的质体靶向序列, 推测 *GmDXR* 蛋白主要在秦艽植物的叶绿体中发挥作用。

3.3 *GmDXR* 基因的表达分析

研究显示, 多种植物中 *DXR* 基因存在 1~2 个成员, 不同成员在相应植物的不同器官部位中的表达量存在很大的不同, 而同一植物不同器官部位的萜类代谢物的类型和含量也存在很大的区别。因此, 研究 *GmDXR* 在秦艽植物不同器官中的表达特征对探究其参与合成的萜类物质类型具有指导作用。以

		质体靶向序列	NADPH 结合位点	NADPH 结合位点
杜仲 (AFU93071.1)	55	---PPP--AWPGRAVVEPGRKEWDGPKPISV3STGSIGT2TLDIVAENPDKFRVVALAAG		
长春花 (AAF65154.1)	57	---PPP--AWPGRVAEPCYKKTWEGGKPIISIV3STGSVGT2TLDIVAENPDKFRVVALAAG		
烟草 (ABH08964.1)	57	---PPP--AWPGRVAEAEARKTWGPKPISIV3STGSIGT2TLDIVAENPDKFRVVALAAG		
苜蓿 (AES91160.1)	58	---PPP--AWPGRVVEPGHKSWDGPKPISIV3STGSIGT2TLDIVAENPDKFRVVALAAG		
拟南芥 (AAF73140.1)	57	G---PPP--AWPGRALPEEFGNKTWEGPKPISIV3TGSIGT2TLDIVAENPDKFRVVALAAG		
拟南芥 (AAF73140.1)	57	QQQPPP--AWPGRVVEAEFRQSWDGPKPISIV3STGSIGT2TLDIVAENPDKFRVVALAAG		
丹参 (ACK57535.1)	57	---PPP--AWPGRVAEPEGRMTWEGPKPISIV3STGSIGT2TLDIVAENPDKFRVVALAAG		
Consensus	61	PPP--AWPGRV--EpggrktWdGpKPIsiv3sTGSiGT2TLDIVAENPDKFRVVALAAG		
杜仲 (AFU93071.1)	111	SNVFLADQVKTFKPKQLVVRNESLVDELKEALADSEHKPEIIPGEQGVIEVAPHDAVT		
长春花 (AAF65154.1)	113	SNVFLADQVKTFKPKQLVVRNESLVDELKEALSVDVDDKPEIIPGEQGVIEVVRHSDAVT		
烟草 (ABH08964.1)	112	SNVFLADQVKTFKPKQLVAVRNESELVEKDALADMEDKPEIIPGEQGVIEVARHPDAVT		
苜蓿 (AES91160.1)	114	SNVFLADQVKTFKPKQLVAVRNEALVEELKEALSVDVYKPEIIPGEQGVIEVARHPDAVT		
拟南芥 (AAF73140.1)	114	SNVFLADQVKTFKPKQLVAVRNESELVEELKEALDVEEKPEIIPGEQGVIEVARHPDAVT		
拟南芥 (AAF73140.1)	116	SNVFLADQVKTFKPKQLVAVRNESELVEELKEALADLDYKPEIIPGEQGVIEVARHPDAVT		
丹参 (ACK57535.1)	114	SNVFLADQVKTFKPKQLVVRNESLVSELKEALADSEDKPEIIPGEQGVIEVARHPDAVT		
Consensus	121	SNVFLADQVKTFKPKQLVAVRNESELVEELKEALADVEDKPEIIPGEQGVIEVARHPDAVT		
			DXR 结合基序	
杜仲 (AFU93071.1)	171	VVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLPLAKHKVKI1LPADSEHSAI		
长春花 (AAF65154.1)	173	VVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLPLAKHKVKI1LPADSEHSAI		
烟草 (ABH08964.1)	172	VVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLPLAKHKVKI1LPADSEHSAI		
苜蓿 (AES91160.1)	174	VVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLPLAKHKVKI1LPADSEHSAI		
拟南芥 (AAF73140.1)	174	VVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLPLAKHKVKI1LPADSEHSAI		
拟南芥 (AAF73140.1)	176	VVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLPLAKHKVKI1LPADSEHSAI		
丹参 (ACK57535.1)	174	VVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLPLAKHKVKI1LPADSEHSAI		
Consensus	181	VVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLPLAKHKVKI1lpadsehsai		
杜仲 (AFU93071.1)	231	F-QCIQGLPEGALRRRIILTASGGAFRDWPVDRKLKVADALKHPNWNMGKKITVDSATL		
长春花 (AAF65154.1)	233	F-QCIQGLPEGALRRRIILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKKITVDSATL		
烟草 (ABH08964.1)	232	F-QCIQGLPEGALRRRIILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKKITVDSATL		
烟草 (ABH08964.1)	234	F-QCIQGLPEGALRRRIILTASGGSFRDWPVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKKITVDSATL		
苜蓿 (AES91160.1)	234	FRVQCIQGLPEGALRRRIILTASGGAFRDWPVEKLKVADALKHPNWNMGKKITVDSATL		
拟南芥 (AAF73140.1)	236	F-QCIQGLPEGALRRRIILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKKITVDSATL		
拟南芥 (AAF73140.1)	236	F-QCIQGLPEGALRRRIILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKKITVDSATL		
丹参 (ACK57535.1)	234	F-QCIQGLPEGALRRRIILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKKITVDSATL		
Consensus	241	F-qCIQGLpEGALRriILTASGgaFRdWPVekLkEVKvADALKHPNwnMGKKITVDSATL		
			DXR 结合基序	
杜仲 (AFU93071.1)	290	FNKGLEVIEAHYLFGAEYDDIEIVIHPOSIIHSMVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILYTIS		
长春花 (AAF65154.1)	292	FNKGLEVIEAHYLFGAEYDDIEIVIHPOSIIHSMVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILYTIS		
烟草 (ABH08964.1)	291	FNKGLEVIEAHYLFGAEYDDIEIVIHPOSIIHSMVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILYTIS		
烟草 (ABH08964.1)	293	FNKGLEVIEAHYLFGAEYDDIEIVIHPOSIIHSMVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILYTIS		
苜蓿 (AES91160.1)	294	FNKGLEVIEAHYLFGAEYDDIEIVIHPOSIIHSMVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILYTIS		
拟南芥 (AAF73140.1)	295	FNKGLEVIEAHYLFGAEYDDIEIVIHPOSIIHSMVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILYTIS		
拟南芥 (AAF73140.1)	295	FNKGLEVIEAHYLFGAEYDDIEIVIHPOSIIHSMVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILYTIS		
丹参 (ACK57535.1)	293	FNKGLEVIEAHYLFGAEYDDIEIVIHPOSIIHSMVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILYTIS		
Consensus	301	FNKGLEVIEAHYLFgaeyDDieIVIHPOSIIHSMVETQDSSVLAQLGWPDMRLPILYTIS		

图 2 秦艽 GmDXR 与不同植物中的 DXR 的序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of GmDXR with DXR proteins in other plants

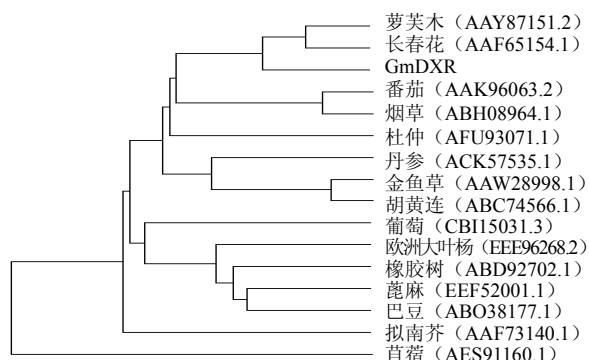


图 3 GmDXR 氨基酸序列与其他物种 DXR 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of GmDXR protein with other related proteins

秦艽的根、茎、叶为材料，选择秦艽 actin 为内参，对秦艽不同器官中 *GmDXR* 基因表达水平进行实时荧光定量检测。结果显示 *GmDXR* 主要在秦艽叶中表达，在根和茎中几乎不表达（图 4）。

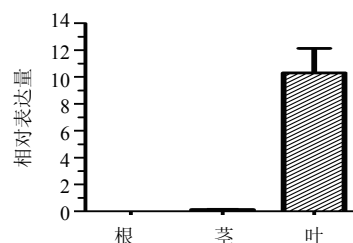


图 4 *GmDXR* 在秦艽不同部位中的表达

Fig. 4 *GmDXR* gene expression in different organs of *G. macrophylla*

茉莉酸类化合物是一类植物内源生长物质,具有重要的生理作用,同时,该类激素还可以诱导多种植物次生代谢物的合成积累^[11]。实时定量 PCR 的结果(图 5)显示,茉莉酸衍生物茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理 2 d 后秦艽叶中的 *GmDXR* 表达显著升高,而在秦艽根中的表达虽略有下降,但在处理 6 d 后根中 *GmDXR* 表达量回升。

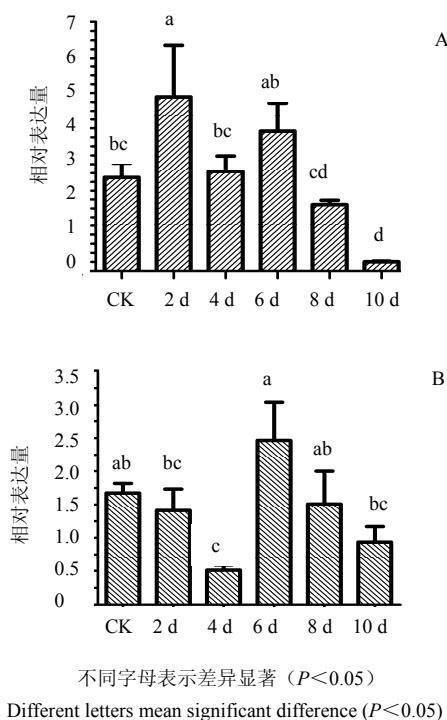


图 5 MeJA 处理后 *GmDXR* 在秦艽叶 (A) 和根 (B) 中的表达

Fig. 5 *GmDXR* gene expression in leaves (A) and roots (B) of *G. macrophylla* under MeJA treatment

4 讨论

高等植物的 MEP 途径定位于质体中,是萜类合成的一条重要途径。DXR 在 MEP 途径的调控中起重要作用。近年来,在拟南芥^[12]、红豆杉^[13]、薄荷^[14]、阳春砂^[15]、喜树^[16]、长春花^[17]等多种植物中克隆出了 *DXR* 基因,并对其与萜类化合物合成的关系进行了相关研究。但对于秦艽中 *DXR* 基因及其编码蛋白的研究尚无相关报道。本研究立足于实验室所建立的秦艽高通量转录组测序数据,从中克隆到一条与萝芙木和长春花 *DXR* 基因高度同源性的 *GmDXR* 基因。*DXR* 中的脯氨酸富集序列(QPPPAWPGR)具有质体靶向功能,并对保持酶活性和稳定性起着重要的作用^[18-19]。对不同物种的 *DXR* 序列进行比对,发现该序列在第一个位点上并不完全保守(拟南芥和秦艽为 Q, 苜蓿为 G, 烟草

为 A, 其余均为 P), 这可能与不同 *DXR* 蛋白定位于不同的细胞质体中有关。*DXR* 中 2 个 NADPH 结合位点 GSTGSIGT 序列在不同植物 *DXR* 蛋白中也存在变化(苜蓿中第 2 位的 S 由 C 替代; 长春花中 I 由 V 替代), 第 2 个 NADPH 结合位点序列 LAAGSNV 高度的保守; 2 个 *DXR* 结合基序 motif (LPADSEHSAI 和 NKGLEVIEAHY)除了苜蓿 *DXR* 中没有发现第一个基序外, 其余植物的 *DXR* 结合基序完全保守。

GmDXR 在植物器官表达模式上与烟草^[20]、丹参^[21]、阳春砂^[22]和高良姜^[23]等类似, 均为叶中的表达量高于根茎, 与喜树^[16]和银杏^[24]等木本植物中 *DXR* 的表达模式有所不同, 喜树和银杏的 *DXR* 均在茎中的表达量最高, 而在根和叶中的表达量较低。显示出 *DXR* 基因在表达上与叶绿素、类胡萝卜素等部分质体色素的量呈正相关^[20-21]。可能是因为秦艽叶中的叶绿素远高于根茎, 其主要在叶中表达, 同时也预示 *GmDXR* 可能在秦艽叶中环烯醚萜类物质的合成中起重要作用。

MeJA 作为一种气态植物激素, 不仅能参与植物的防御反应, 还可以调节植物体的次生代谢通路。有研究显示 MeJA 能上调高良姜根茎中 *AoDXR* 的表达量^[23], 但在挪威云杉中 MeJA 略微抑制 *PaDXR* 的表达^[25], 而丹参根茎叶中 *SmDXR* 的表达均不受 MeJA 的诱导^[21]。本课题组的研究结果表明在受 MeJA 诱导后在短时间内秦艽叶中 *GmDXR* 的表达量显著升高; 秦艽根中 *GmDXR* 的表达受 MeJA 的诱导并不明显, 可能是 *GmDXR* 在秦艽根中表达较低缘故。

参考文献

- [1] 蔡秋生, 张志红, 高慧琴. 秦艽药理作用及临床应用研究进展 [J]. 甘肃中医学院学报, 2010, 27(6): 55-58.
- [2] 芦启琴, 娄灯吉, 沈建伟, 等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(29): 9299-9301.
- [3] 化文平, 王喆之. 秦艽香叶醇-10 羟化酶 (G10H) 基因的克隆及序列分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 510-515.
- [4] 郑洲翔, 范燕萍, 周纪刚, 等. 植物萜类合成酶 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原酶研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 5695-5696.
- [5] Wei S, Zhang P, Feng X, et al. Qualitative and quantitative determination of ten iridoids and secoiridoids in *Gentiana straminea* Maxim. by LC-UV-ESI-MS [J]. J

- Nat Med*, 2012, 66(1): 102-108.
- [6] 张长波, 孙红霞, 巩中军, 等. 植物萜类化合物的天然合成途径及其相关合酶 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 779-786.
- [7] Veau B, Courtois M, Oudin A, *et al.* Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Struct Express*, 2000, 1517(1): 159-163.
- [8] Mahmoud S S, Croteau R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8915-8920.
- [9] 陈韵斐, 张芳源, 唐克轩. 过量表达 DXR 基因提高青蒿中青蒿素的含量 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30(5): 19-23.
- [10] Soliman S S, Tsao R, Raizada M N. Chemical inhibitors suggest endophytic fungal paclitaxel is derived from both mevalonate and non-mevalonate-like pathways [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(12): 2497-504.
- [11] 张艳霞, 史玲玲, 戴向辰, 等. 茉莉酸及其衍生物: 一类重要的植物次生代谢诱导子 [J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2008, 21(3): 323-327.
- [12] Schwender J, Müller C, Zeidler J, *et al.* Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Lett*, 1999, 455(1/2): 140-144.
- [13] 郑清平, 余龙江, 刘 智, 等. 红豆杉细胞非甲羟戊酸途径关键酶基因 *dxr* 的克隆与分析 [J]. 生物工程学报, 2004(4): 548-553.
- [14] Lange B M, Croteau R. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 365(1): 170-174.
- [15] 杨锦芬, 阿迪卡利, 陈蔚文, 等. 阳春砂 1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因的克隆及表达分析 [J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(5): 510-516.
- [16] Yao H Y, Gong Y F, Zuo K J, *et al.* Molecular cloning, expression profiling and functional analysis of a DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(2): 203-213.
- [17] Veau B, Courtois M, Oudin A, *et al.* Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1517(1): 159-163.
- [18] Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, *et al.* Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. *J Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1581-1591.
- [19] Proteau P J. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview [J]. *Bioorg Chem*, 2004, 32(6): 483-493.
- [20] 朱晓宇, 王 景, 赵二卫, 等. 烟草 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶基因 (*dxr*) 的克隆和表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(2): 263-269.
- [21] Yan, X, Zhang L, Wang J, *et al.* Molecular characterization and expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31(5): 1015-1022.
- [22] 刘 卉, 杨锦芬, 詹若挺, 等. 阳春砂 DXR 超表达提高转基因烟草 DXR 活性及光合色素含量 [J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(1): 92-97.
- [23] 张春荣, 杨 全, 陈虎彪, 等. 高良姜 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸还原异构酶 cDNA 克隆与表达调控 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3208-3214.
- [24] Yao H Y, Gong Y F, Zuo K J, *et al.* Molecular cloning, expression profiling and functional analysis of a DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(2): 203-213.
- [25] Gong Y, Liao Z, Chen M, *et al.* Molecular cloning and characterization of a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Mitochondrial DNA*, 2005, 16(2): 111-120.