

南方红豆杉 DXS 基因的克隆与功能分析

王 辉^{1,2}, 冯国庆^{1,3#}, 李忠玥⁴, 邱 飞^{1,2}, 兰小中⁴, 廖志华^{1,2}, 杨春贤^{1,2*}

1. 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715
2. 西南大学-西藏农牧学院药用植物联合研发中心, 重庆 400715
3. 重庆外国语学校, 重庆 400039
4. 西藏农牧学院, 西藏 林芝 860000

摘 要: **目的** 从南方红豆杉 *Taxus chinensis* 获得紫杉醇生物合成途径关键酶 1-脱氧-D-木糖醇-5-磷酸合成酶 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS) 基因 (TcDXS) 并进行生物信息学和表达模式分析以及亚细胞定位和功能鉴定。**方法** 采用 RACE 技术获得 TcDXS 全长; 利用 qRT-PCR 分析 TcDXS 在南方红豆杉不同部位的表达情况; 采用亚细胞定位分析 TcDXS 在细胞中的位置; 用颜色功能互补实验检测 TcDXS 功能。**结果** 获得的 TcDXS 由 3 031 个核苷酸组成, 包含了 2 229 bp 编码区, 编码 742 个氨基酸, 其蛋白相对分子质量为 79 400, 等电点 (pI) 为 7.99; qRT-PCR 检测表明 TcDXS 在南方红豆杉的嫩叶柄中表达量最高, 其次是叶和皮, 根和茎中的表达量较低; 亚细胞定位结果表明, TcDXS 定位在叶绿体中; 功能互补实验结果表明, 在共同转化 pAC-BETA 和 pTrc-TcDXS 的大肠杆菌菌落呈现出橘黄色。**结论** TcDXS 的克隆和功能分析为深入研究紫杉醇生物合成途径和实现其代谢工程奠定了基础。

关键词: 南方红豆杉; 紫杉醇; 1-脱氧-D-木糖醇-5-磷酸合成酶; 亚细胞定位; 功能验证

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)19-4636-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.026

Molecular cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene from *Taxus chinensis*

WANG Hui^{1,2}, FENG Guo-qing^{1,3}, LI Zhong-yue⁴, QIU Fei^{1,2}, LAN Xiao-zhong⁴, LIAO Zhi-hua^{1,2}, YANG Chun-xian^{1,2}

1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China
2. TAAHC-SWU Medicinal Plant Joint R&D Centre, Chongqing 400715, China
3. Chongqing Foreign Language School, Chongqing 400039, China
4. Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Nyingchi 860000, China

Abstract: **Objective** To obtain the key enzymes of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) in taxol biosynthetic pathway from *Taxus chinensis* (TcDXS), and carry out the bioinformatics analysis, tissue profile, subcellular localization, and functional complementation assay. **Methods** RACE technologies were used to obtain the full length cDNA of TcDXS for the bioinformatics analysis. Semi-quantitative PCR was used to detect the gene expression levels in different parts of *T. chinensis*. The localization and function of TcDXS were carried out by subcellular localization and functional complementation assay. **Results** The full-length cDNA of TcDXS was 3 031 bp containing a coding sequence of 2 229 bp encoding a 742-amino-acid residues which was predicted to have a molecular weight of 79 400 and an isoelectric point of 7.99. The qRT-PCR results showed that the highest expression level of TcDXS was detected in petioles and followed by leaves and barks. However, the expression of TcDXS was very low in roots and stems. What's more, functional complementation assay results showed that the *E. coli*, co-transformed with PAC-BETA and pTrcTcDXS, was changed to orange. **Conclusion** TcDXS was considered to play an essential role in the control of taxol biosynthesis and provided a target for the metabolic engineering of taxol production and plant molecular breeding in *T. chinensis*.

收稿日期: 2018-03-16

基金项目: 国家“863”计划 (2011AA100605); 国家自然科学基金资助项目 (31370333); 教育部新世纪优秀人才计划 (NCET-12-0930)

作者简介: 王 辉 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程与遗传育种学。Tel: (023)8367146 E-mail: huiwang224@163.com

*通信作者 杨春贤 (1974—), 男, 副研究员, 主要从事甘薯和青蒿的育种。Tel: (023)68367146 E-mail: yangchx@swu.edu.cn

共同第一作者

Key words: *Taxus chinensis* Rehd. var. *mairei* Lemee et Levl.; taxol; DXS; subcellular localization; functional complementation verification

紫杉醇是重要的抗癌药物之一,临床对紫杉醇的需求量日益增长,但天然紫杉醇主要来自红豆杉属 *Taxus* L. 植物,如西藏红豆杉 *T. wallichiana* zucc.、东北红豆杉 *T. cuspidata* Sieb. et Zucc.、云南红豆杉 *T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu 和南方红豆杉 *T. chinensis* Rehd. var. *mairei* Lemee et Levl.。红豆杉中紫杉醇的含量极低,通过从红豆杉中分离获取紫杉醇的产量有限而且对植物资源破坏严重^[1],如何有效提高植物中紫杉醇产量是一个亟待解决的重要问题^[2]。

紫杉醇的生物合成要经过3个阶段。首先是萜类化合物通用前体物的合成,即异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)的合成;其次是从牻牛儿苗基焦磷酸合成酶(geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS)开始,经过约20步酶促反应合成10-去乙酰基巴卡亭 III(10-deacetylbaicatin III, 10-DAB)或巴卡亭 III(Baccatin III),这是紫杉醇的母核部分;最后在紫杉醇母核的第13位碳原子上合成苯基异丝氨酸链^[3]。MEP途径和MVP途径都能为紫杉醇生物合成提供前体IPP和DMAPP^[3],但是MEP途径是位于质体中,而MVP途径位于胞质中。在合成紫杉醇前体的MEP途径中有7个关键步骤,其中1-脱氧-D-木糖醇-5-磷酸合成酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS)基因催化的反应是第一个限速反应,DXS通过控制质体中类异戊二烯前体IPP的供应,从而调控植物的初级代谢产物以及次级代谢产物,如紫杉醇、类胡萝卜素、VB₆和叶绿素等^[4]。

目前已经从大肠杆菌 *Escherichia coli* Csatellani et Chalmers、洋薄荷 *Monarda fistulosa* L.、甜椒 *Capsicum annuum* L.、番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill. 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. Heynh 等^[5-8]克隆到DXS,而裸子植物中仅有银杏 *Ginkgo biloba* L.、思茅松 *Pinus kesiya* Royle ex Gord. var. *langbianensis* (A. Chev.) Gaussen 和北美云杉 *Picea sitchensis* (Bong) Carr^[9-11]的DXS被克隆出来。本实验从南方红豆杉中克隆了DXS基因,分析了该基因组织表达和亚细胞定位,并对其进行功能验证,为紫杉醇生物合成的代谢工程研究提供候选靶基因。

1 材料

样品栽种于西南大学生命科学学院试验基地,选取树龄为5年左右,长势相当的3株红豆杉作为材料。经西藏农牧学院兰小中教授鉴定为南方红豆杉 *Taxus chinensis* Rehd. var. *mairei* Lemee et Levl.。将南方红豆杉整体从土壤中拔出,分别收集中段部位的主根、侧根和茎,随机采集多年生叶片(老叶)和对应的叶柄(老叶柄),整体采集当年生叶片(嫩叶)和对应的叶柄(嫩叶柄),以及整体剥取的树皮。各类材料收集后在液氮中速冻, -70℃ 贮存备用。

2 方法

2.1 总RNA的提取和cDNA的合成

用TIANGEN RNA Plant Buffer试剂盒提取RNA,并按相关说明书进行操作。用TaKaRa RNA PCR Kit (AMV)试剂盒进行反转录,经RNaseH酶解形成单链cDNA混合物。

2.2 南方红豆杉DXS(TcDXS)基因的克隆

通过在美国国家生物技术信息中心(NCBI)的网站上下载 *Catharanthus roseus* L. G. Don、银杏、甜菊 *Stevia rebaudiana* Bertoni、青蒿 *Artemisia annua* L.、拟南芥和大肠杆菌等物种的DXS基因的核苷酸序列,根据比对后的保守区域,设计核心片段的简并引物TcDXS-core-F和TcDXS-core-R(表1),以“2.1”项中的cDNA为模板,获得核心片段,再根据核心片段设计TcDXS基因5'端和3'端的引物(表1)。

用BD SMART RACE Advantage 2 PCR Kit (Clontech公司,美国)进行TcDXS基因的5'-RACE 2次扩增,第1次扩增体系:10×BD Advantage 2 PCR buffer, 5 μL; dNTP Mix (10 mmol/L) 1 μL; 50×BD Advantage 2 Polymerase Mix 1 μL; UPM, 5 μL; 5'-RACE Ready cDNA 2.5 μL; TcDXS基因5'-1, 1 μL; PCR-Grade H₂O 34.5 μL; 总体积50 μL。扩增条件:25×(94℃、30 s, 68℃、30 s, 72℃、3 min)。第2次扩增体系:10×BD Advantage 2 PCR buffer, 5 μL; dNTP Mix (10 mmol/L each), 1 μL; 50×BD Advantage 2 Polymerase Mix 1 μL; NUP 1 μL; 一扩PCR产物稀释50倍液1 μL; TcDXS基因5'-2 1 μL; PCR-Grade H₂O 40 μL; 总体积50 μL。扩增条件25×(94℃、30 s, 68℃、30 s, 72℃、3 min)→72℃、10 min。

表 1 所用到的引物
Table 1 Used primers

引物名称	序列 (5'→3')	用途
TcDXS-core-F	TGGGATGT (A/T/G) GGCCA (T/C) CAG (G/T) CATATC	克隆
TcDXS-core-R	CATGTG (C/A) A (T/A) (C/G) A (G/T) (T/C) TC (G/A) GCCTCATCA	
TcDXS 3'-1	GCTTGCCACAGAAGGATTGAAACCA	3' RACE
TcDXS 3'-2	GATCAGGTCGTTTCATGATGTTGATC	
3 Sites-Adaptor Primer	CTGATCTAGAGGTACCGGATC	
TcDXS 5'-1	ATCTCTTCCTGCTGCCATACCAAGGG	5' RACE
TcDXS 5'-2	AGCGCGCTTGGGGAAACCAGCTATA	
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
TcDXS-full-F	ATATTCAGTCCCTTTTCCTGGTTGC	克隆
TcDXS-full-R	TAACCTTTAAATATAAGGAATATTGTTGC	
18 S-F	CAGATACCGTCCTAGTCTCAAC	qRT-PCR
18 S-R	CAGCCTTGCGACCATACTC	
TcDXS-qrt-F	TTCCTTGCTACTGCTACTGTC	
TcDXS-qrt-R	GTGTAATATCCTTGGCTGCTTCTC	
TcDXS-fun-F	<u>AGGATCC</u> ATGGCAGCAACAATAGGAATGGGTT	功能互补实验
TcDXS-fun-R	GG <u>ACTAGT</u> GCAAAGTTATTGGAGATCAAAAGCAG	
TcDXS-TP-F	<u>GGTACC</u> ATGGCAGCAGCAATGG	亚细胞定位
TcDXS-TP-R	<u>GGATCC</u> CAGACACAATCCCATGCTTTC	

划线部分为酶切位点

The restriction sites were underlined

按照 TaKaRa 3'-Full RACE Core Set 的说明书进行 TcDXS 基因的 3'-RACE 的巢式扩增, 第 1 次扩增体系: 第 1 链 cDNA 1 μ L; 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L; MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L; ddH₂O 18.75 μ L; TaKaRa EX TaqTM 0.25 μ L; TcDXS 基因 3'-1 (20 μ mol/L) 0.5 μ L; 3Sites-Adaptor Primer (20 μ mol/L) 0.5 μ L; 总体积 50 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C、3 min, 30 $\times$ (94 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min) $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C、10 min。第 2 次扩增体系: 一扩 PCR 产物稀释 50 倍液 1 μ L; 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L; MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L; dNTP (10 mmol/L) 1 μ L; ddH₂O 38.75 μ L; TaKaRa EX TaqTM 0.25 μ L; TcDXS 基因 3'-2 (20 μ mol/L) 0.5 μ L; 3 Sites-Adaptor Primer (20 μ mol/L) 0.5 μ L; 总体积 50 μ L。扩增条件 94 $^{\circ}$ C、3 min, 30 $\times$ (94 $^{\circ}$ C、30 s, 58 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min) $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C、10 min。

将 TcDXS 的 5'端和 3'端 RACE 的产物经胶回收后连接到 pMD19-T 载体上, 并测序。在 Vector NTI Suite 8.0 将 3'-RACE、5'-RACE 和核心片段的序列拼接, 获得 TcDXS 基因电子全长序列。据此设计 TcDXS 基因全长序列引物 TcDXS-full-F 和

TcDXS-full-R(表 1), 以 cDNA 为模板, 并进行 PCR 扩增, 产物经胶回收后连接到 pMD19-T 载体, 并测序验证。

2.3 生物信息学分析

软件 Vector NTI Suite 8.0 用于预测 TcDXS 基因的开放阅读框 (ORF), 同源性比对使用 NCBI 在线 Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。TcDXS 使用在线生物信息学分析 (<http://bip.weizmann.ac.il/>), 其二级结构由 SOMPA 软件预测, 三维结构是基于同源建模 (Swiss-Model) 建立。用 MEGA 4.2 构建系统进化树^[12]。

2.4 TcDXS 基因的组织表达谱

采用 2 步法进行荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测。第 1 步, 按 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒的说明书将南方红豆杉的主根、侧根、茎、老叶、嫩叶、老叶柄、嫩叶柄和树皮的 RNA 反转录, 得到的 cDNA 第一链作为 qRT-PCR 检测的模板。反转录体系: MgCl₂ 2 μ L; 10 $\times$ RT Buffer 1 μ L; RNase Free dH₂O 3.75 μ L; dNTP Mixture 1 μ L; RNase Inhibitor 0.25 μ L; AMV Reverse Transcriptase

0.5 μL ; Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μL ; 样品 RNA 1 μL ; 总体积 10 μL 。反转录条件: 45 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min $\rightarrow$ 99 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min $\rightarrow$ 5 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。

第2步,按照宝生物公司 SYBR Premix ExTaqTM 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 的说明书,以第1步得到的 cDNA 第一链为模板,用基于 Beacon designer 软件设计的 TcDXS 基因 qRT-PCR 引物 TcDXS-qrt-R 和 TcDXS-qrt-R (表1, 扩增产物长度为 125 bp), 同时以 18 S rRNA (引物见表1) 作为内参 (扩增产物长度为 121 bp), 用荧光定量 PCR 仪 iQ5 (美国 Bio-Rad 公司) 进行检测。扩增体系为 SYBR Premix ExTaqTM, 10 μL ; 引物 1 0.8 μL ; 引物 2 0.8 μL ; cDNA 模板 1.6 μL ; ddH₂O 6.8 μL ; 总体积 20 μL 。每个反应重复 3 次, 包括不加模板的对照, 实验重复 3 次。检测条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 40 $\times$ (95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s), 然后进行溶解曲线分析: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 然后 60 $\sim$ 95 $^{\circ}\text{C}$ 升温过程, 此过程 20 min。检测各部位的 TcDXS 基因的表达量。

2.5 亚细胞定位 TcDXS 基因

根据 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 以及 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析 TcDXS 基因的质体转运肽的序列 (cTP)。用带有 *KpnI* 和 *BamHI* 酶切位点的引物 (表1) 克隆一段编码 63 个氨基酸的质体转运肽的序列 (cTP), 将 cTP 插入 pCambia1300-GFP 中, 形成 pCambia1300-TP-GFP。根据 Yoo 等^[13] 方法获得烟草的原生质体, 将 pCambia1300-TP-GFP 和 pCambia1300-GFP (对照) 分别导入烟草原生体, 25 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 14 h, 用 ZEISS LSM700 荧光聚焦显微镜观察^[14], 分别在在波长为 488 nm 和 555 nm 的激发光下观察到 GFP 和叶绿体。

2.6 TcDXS 功能互补实验

大肠杆菌中存在 MEP 途径, 可以合成 IPP 和 DMAPP, 但是不能合成 β -胡萝卜素, 因为大肠杆菌缺失从这 2 个前体分子到 β -胡萝卜素的生物合成途径。从 2 个前体分子 IPP 和 DMAPP 到 β -胡萝卜素还有 5 步反应, 而来源于欧文氏菌的 crtI 酶能催化从八氢番茄红素到番茄红素的 2 步反应。刘万宏^[15] 的研究组将来源于欧文氏菌的香叶基香叶基焦磷酸合成酶基因 (geranylgeranyl diphosphate synthase gene, crtE), 八氢番茄红素合成酶 (phytoene synthase gene, crtB)、八氢蕃

茄红素脱饱和酶 (phytoene desaturase gene, crtI) 和蕃茄红素环化酶 (lycopene cyclase, crtY) 4 个基因构建到一个质粒中, 即 pAC-BETA 质粒。将该质粒导入大肠杆菌后, 可以在本底水平上表达 β -胡萝卜素, 大肠杆菌菌落不会呈现橘黄色。将含有拟南芥的 pTrcAtIPI 质粒可以与 pAC-BETA 共转化大肠杆菌, 生产 β -胡萝卜素, 从而使大肠杆菌单斑呈现鲜艳的橘黄色。

用分别带有 *BamHI* 与 *SpeI* 酶切位点的引物 (表1) 克隆得到 TcDXS 基因, 再用 TcDXS 基因替换 pTrcAtIPI 质粒上 AtIPI 基因, 形成 pTrcTcDXS 质粒, 具体方法参照刘万宏^[15] 和 Cunningham 等^[16] 的方法。

3 结果与分析

3.1 TcDXS 基因的获得及生物信息学分析

3.1.1 TcDXS 基因的克隆 以 TcDXS 基因的 cDNA 作为模板, 用一对引物 (F-TcDXS-core 和 R-TcDXS-core, 表1) 成功地克隆到一个 1 197 bp 的 cDNA 片段, 测序后 BLAST 结果显示, 这一序列与其他已经报道过裸子植物的 DXS 基因有很高的相似性, 同时经过测序也证实此为 TcDXS 基因核心片段。基于此, 通过 5'-RACE 和 3'-RACE 得到一个 1 129 bp 5'端和一个 872 bp 3'端。用 TcDXS 基因全长序列引物 TcDXS-full-F 和 TcDXS-full-R 克隆得到 TcDXS 基因全长, 同时经过测序也证实此为 TcDXS 基因全长序列。经测序可知 TcDXS 基因全长序列是 3 031 bp (图 1-A), 包含 2 229 bp 的 ORF, 两侧分别是 1 129 bp 的 5'非编码区和 872 bp 含有 polyA 尾巴的 3'非编码区。TcDXS 包含 742 个氨基酸, 计算分子质量为 79 400, 以及由软件预测的 pI 为 7.9。

3.1.2 TcDXS 和其他 DXS 氨基酸序列的多重比对 多重比对结果表明 TcDXS 氨基酸序列与长春花 DXS 氨基酸序列具有 69% 一致性, 相似性为 80.9%; 同银杏相比则有 74.8% 一致性, 相似性为 84.7% (图 2)。在所有 DXS 中, 具有重要功能作用的质子传递域都位于蛋白质的 N 端 (图 2 中划线部分), 具有绝对保守的功能位点 His; 也都有硫胺焦磷酸结合域 (TPP-Binding site, 第 1 个和第 2 个框中部分) 和 DXS 的指纹氨基酸基序 DRAG (第 3 个框中部分)^[17]。

3.1.3 TcDXS 系统进化树分析 构建结果显示, 来自细菌、藻类、植物的 DXS, 形成 3 个大簇 (bootstrap 100% 支持率, 重复 1 000 次, 图 3), 微生物类群中

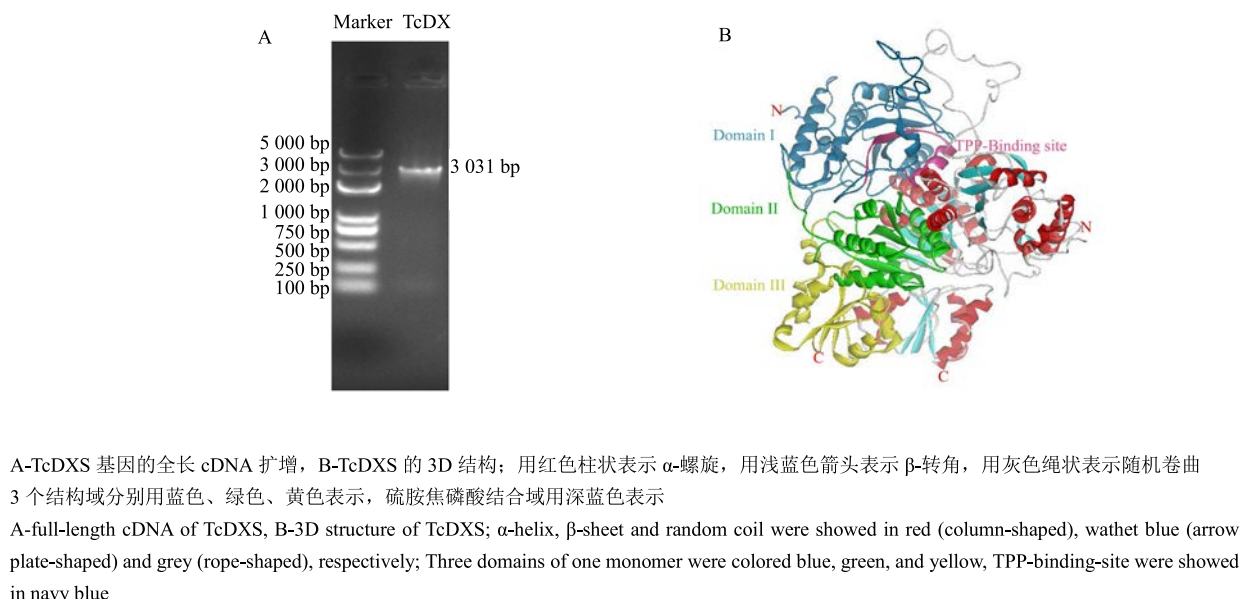
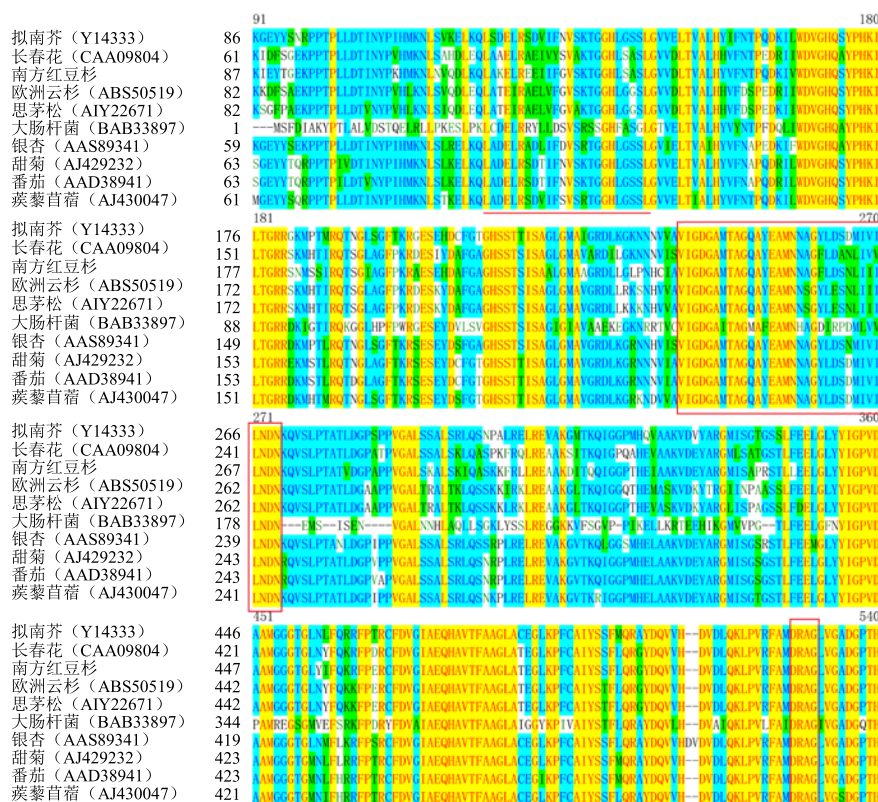


图 1 TcDXS 基因的全长 cDNA 扩增和 TcDXS 的 3D 结构

Fig. 1 Full-length cDNA and 3D structure of TcDXS



一致氨基酸和保守氨基酸残基分别显示为黑色背景和灰色背景; 其他氨基酸残基用黑色字体白色背景表示; DXS 中都有的硫胺焦磷酸结合域 (第 1 个和第 2 个框) 和 DXS 的指纹氨基酸基序 DRAG (第 3 个框中的部分) 用框标示

Identical amino acids were showed in white with black background, conserved amino acids were showed in black with gray background, other amino acids were showed in black with white background. Red frame represented TPP-Binding sites (the first and second red frames) and fingerprint amino acid motif DRAG (the third red frame)

图 2 来自不同物种 DXS 氨基酸序列多重比对结果

Fig. 2 Multiple alignments of amino acid sequence of DXS from different species

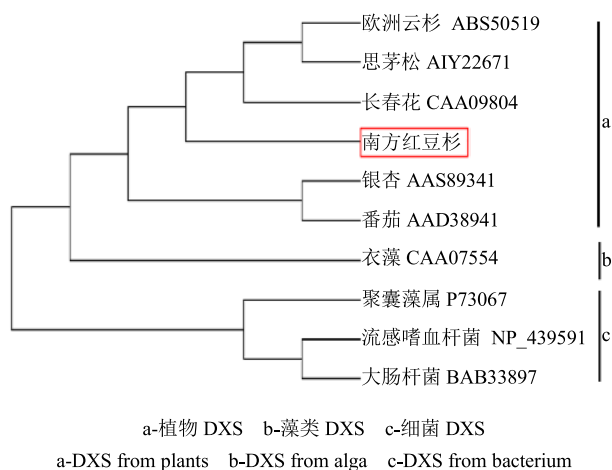


图3 DXS 分子系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic relationship of DXS from different plants

DXS (图3的c组)比植物类群中的DXS进化的时间更早。TcDXS在进化树中和其他植物中的DXS合为一簇,而且作为裸子植物中的一员,南方红豆杉DXS明显比被子植物的DXS进化都要早,这从分子角度为红豆杉的古老进化地位提供了另外一个佐证。

3.1.4 TcDXS 二级结构预测 预测结果表明TcDXS包括39.08%的 α -螺旋,14.82%的延伸链,7.14%的 β -转角以及38.95%的无规卷曲。因此 α -螺旋和无规卷曲是TcDXS最丰富的结构元件,延伸链和 β -转角散布于整个蛋白中^[18]。

3.1.5 TcDXS 三级结构预测 从建模结果看出,TcDXS和大肠杆菌DXS一致^[19-20],是由2个单体并行排列形成二聚体,每个单体包含3个结构域(分别为I、II、III)和活性位点(图1-B)。每个结构域中都包含有 α -螺旋、 β -转角,连接3个结构域的氨基酸残基包含有活性位点,其中的Asn和Met对于活性位点十分重要。该蛋白同样包含和其他蛋白的TPP结合位点(TPP-binding site)。

3.2 TcDXS 基因组织表达谱分析

分别以南方红豆杉8个不同部位的总RNA反转录合成的cDNA为模板,以18S为内参基因,对TcDXS基因在不同部位中的相对表达量进行分析。结果表明:TcDXS基因在主根、侧根、茎、老叶、嫩叶、老叶柄、嫩叶柄和树皮8个不同部位中均有不同程度的表达(图4),其中嫩叶柄中的表达量最高,老叶和树皮中的表达量次之,侧根和老叶柄中的表达量要比嫩叶和茎的高,主根中的表达量最低。

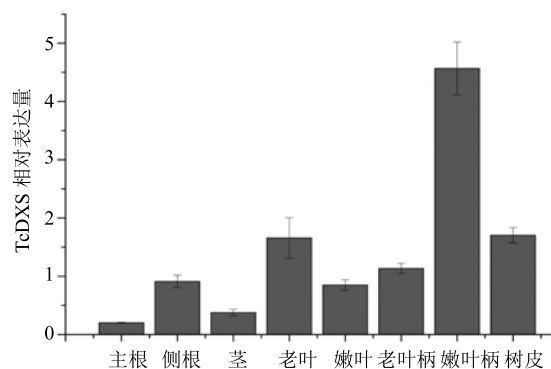


图4 TcDXS 基因在南方红豆杉不同器官中表达量

Fig. 4 Tissue profile of TcDXS

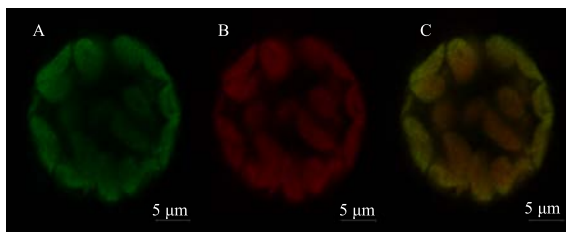
其中TcDXS基因在叶柄、叶、树皮中的表达量远高于木质化程度高的根和茎的表达量,表明TcDXS基因表达与叶绿素的合成有着密切的联系^[14,21]。

3.3 TcDXS 亚细胞研究

TargetP分析表明,TcDXS在N端区域有63个氨基酸组成的转运肽^[22-23],这与DXS参与的MEP途径发生质体中的现象相吻合^[24]。为了确定TcDXS基因表达的蛋白在细胞中发挥功能的具体部位,构建了绿色荧光蛋白和TcDXS基因的融合表达载体,转到烟草原生质体中,获得高效瞬时表达,绿色荧光蛋白在波长488 nm的激发光下产生绿色荧光。对照GFP蛋白无定位功能,从而在细胞质和细胞核中都能观察到清晰的绿色荧光信号。在波长为488 nm的激发光下,表达pCambia1300-TP-GFP的烟草原生质体中检测到绿色荧光(图5-A),在波长为555 nm激发光下,观察到烟草原生质体中叶绿体的暗红色的自发荧光(图5-B),将波长为488 nm和555 nm激发光下的图像融合后(图5-C),荧光定位信号符合定位与叶绿体的信号特征,表明TcDXS的蛋白是定位于叶绿体中。

3.4 TcDXS 基因的功能验证

将含有pTrc-TcDXS重组质粒和pAC-BETA质粒的双质粒大肠杆菌XL1-Blue(实验组)和只含有pAC-BETA质粒的大肠杆菌XL1-Blue(对照组)同时用氨苄霉素(Amp)和氯霉素(Cm)的LB液体培养基在28℃扩大培养,当菌液 $A_{260}=0.6$ 时加入IPTG。1d后实验组的菌液明显变橘黄色,而对照组没有变成橘黄色,这一现象表明宿主菌中的TcDXS基因得到了表达,并且成功推动了 β -胡萝卜素下游合成途径, β -胡萝卜素得到了超量积累,使得菌液变橘黄色。



A-488 nm 激发光下 TcDXS-GFP 的绿色荧光 B-555 nm 激发光下叶绿体的自发荧光 C-A 和 B 图像融合, 在 A、B、C 图中的标尺都是 5 μm

A-confocal microscope images of TcDXS-GFP fluorescence at 488 nm B-chlorophyll autofluorescence at 555 nm C-merged images for A and B, bars in A, B, and C indicated 5 μ m

图 5 TcDXS-GFP 的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of TcDXS-GFP

在双抗培养基上同样可以生长的 XL1-Blue + pAC-BETA + pTrc 菌由于没有携带任何 MEP 途径上的基因的编码框,只能在本底水平上表达 β -胡萝卜素供自身生长需要,并没有明显的 β -胡萝卜素积累现象;相反, XL1-Blue、XL1-Blue + pAC-BETA、XL1-Blue + pTrc-TcDXS 则不能在双抗培养基上生长(图 6),证明了所获得的 TcDXS 具有 DXS 的功能。



图 6 TcDXS 基因功能验证

Fig. 6 Functional verification assay of TcDXS

4 讨论

DXS 是 MEP 途径中的第一个酶, 能催化丙酮酸和 3-磷酸甘油醛生成 1-脱氧-*D*-木糖醇-5-磷酸, 该酶促反应是 MEP 途径的限速反应^[4]。DXS 在植株的生长发育和环境适应性方面起到重要作用, 同时也为作为源头的限速酶控制着诸多重要次生代谢产物如叶绿素、维生素 E、类胡萝卜素、赤霉素和萜类等化合物的生物合成^[5]。

现有研究表明^[25-26], DXS 在二萜化合物如银杏内酯和丹参酮的生物合成中起到重要作用。紫杉醇也属于二萜化合物, 其基本前体为 5C 的线型分子 IPP 和 DMAPP, 由位于质体的 MEP 途径提供^[24]。在本研究中, 首次从南方红豆杉中克隆了编码

TcDXS 基因, 对其进行了生物信息学和基因表达分析并鉴定了该基因功能。同源序列对比显示 TcDXS 与被子植物长春花和裸子植物银杏 DXS 具有较高的相似性^[9], 同时也都具有 DXS 家族必需的质子传递域和硫酸焦磷酸结合域^[17], 表明这些功能域在分子进化中高度保守, 这是因为它们在代谢途径中都有相同的功能。系统进化树聚类显示 TcDXS 与裸子植物 DXS 的亲缘较近。功能鉴定结果表明, 共同转化 pAC-BETA 和 pTrcTcDXS 的大肠杆菌呈现出橘黄色, 这与 Suire 等^[14]和刘万宏^[15]的结果一致, 表明在宿主菌中的 TcDXS 基因得到了表达, IPP 和 DMAPP 的合成能力得到了增强, 推动了 β -胡萝卜素合成下游途径使 β -胡萝卜素得到大量积累, 证明了本实验获得的目标基因是一个具有 DXS 功能的基因^[14,16], 同时也证明了 DXS 催化的 MEP 途径上的反应对于萜类或异戊烯化合物的合成是一个十分重要的调节步骤, 过量表达 DXS 能够提高萜类或异戊烯化合物的含量^[16]。

ChloroP 分析表明, 在 TcDXS 的 N 端上有 5 个氨基酸组成的质体转运肽 (cTP), 表明 cTP 尽管由核基因编码但却定位于质体^[14,24], 这已经在亚细胞定位的结果中得到证实, 暗示 TcDXS 基因也能参与叶绿体的形成, 对植物的正常的生长发育以及次生代谢产物的合成具有很重要的作用。基因表达分析是研究基因功能的重要载体, TcDXS 基因组织表达模式有较大的差异, TcDXS 基因的表达量在木质化程度较低的嫩叶柄中最高, 在木质化程度较高根和茎较低, 这一结果也表明 TcDXS 基因的分布与叶绿体有一定的关系, Lois 等^[4]和 Mandel 等^[8]在拟南芥的 DX 基因突变体中证明了 DXS 参与叶绿体的发育。同时, 紫杉醇的含量最高的部位是树皮, 而不是叶柄, 这暗示紫杉醇或者前体的合成和积累并不是在相同的部位, 有其特定的植物组织或者器官, 并且存在一定的转运途径, 这与郑德勇等^[22]的研究一致。这种现象的研究对药用植物南方红豆杉的采摘时期和采摘部位提供一个依据, 为紫杉醇的大规模生产提供指导。

总之, *TcDXS* 基因被认为在紫杉醇生物合成的控制中起着重要的作用, 是控制 MEP 途径关键性酶。如能将 *TcDXS* 基因在红豆杉属植物中过量表达, 将极大可能促进紫杉醇的生物合成, 从而提高植物中的紫杉醇含量, 期待红豆杉属植物在细胞培养、遗传转化方面取得新进展。

参考文献

- [1] Ketchum R E, Wherland L, Croteau R. Stable transformation and long-term maintenance of transgenic *Taxus* cell suspension cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(7): 1025-1033.
- [2] Wang Y D, Yuan Y J, Wu J C, *et al.* Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Biochem Engin J*, 2004, 19(3): 259-265.
- [3] Lois L M, Campos N, Putra, S R, *et al.* Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a trans-ketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxy-xylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxolbiosynthesis [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 1998, 95: 2105-2110.
- [4] Walter M H, Floss D S, Paetzold H, *et al.* Control of plastidial isoprenoid precursor supply: Divergent 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) isogenes regulate the allocation to primary or secondary metabolism [J]. *Isopren Synth Plants Microorgan*, 2012, 978(1): 251-270.
- [5] Hefner J, Ketchum R E, Croteau R. Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus Canadensis* and assessment of the of th role is prenyltransferase in cells induced for taxol production [J]. *Arch Biochem Biophy*, 1998, 360(1): 62-74.
- [6] Bouvier F, Harlingue A, Suire C, *et al.* Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117(4): 1423-1431.
- [7] Lange B M, Wildung M R, McCaskill D, *et al.* A family of trans-ketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 1998, 95(5): 2100-2104.
- [8] Mandel M A, Feldmann K A, Herrera-Estrella L, *et al.* A novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution [J]. *Plant J*, 1996, 9(5): 649-658.
- [9] Rodriguez-Concepción M, Lois L M, Gallego F, *et al.* Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett Plant J*, 2000, 473(3): 328-332.
- [10] 王 毅, 周旭等. 思茅松 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (DXS) 基因的克隆及功能分析 [J]. 林业科学研究, 2015, 28(6): 833-838.
- [11] Kim S M, Kuzuyama T, Chang Y J, *et al.* Identification of class 2 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisom-erase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis [J]. *Planta Med*, 2006, 72(3): 234-240.
- [12] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environ-ment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195-201.
- [13] Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. *Nat Protocols*, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [14] Suire C, Bouvier F, Backhaus R, *et al.* Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*, uncovering a new role of oil bodies [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124(3): 971-978.
- [15] 刘万宏. 紫杉醇前体合成途径两个关键酶基因克隆和分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [16] Cunningham F X, Sun Z R. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the the *Cyanobacterium Synechococcus* sp [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(8): 1107-1121.
- [17] Hahn F M, Eubanks L, Teata C A, *et al.* 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus* [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(1): 1-11.
- [18] Krushkal J, Pistilli M, Ferrell K M, *et al.* Computational analysis of the evolution of the structure and function of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a key regulator of the mevalonate-independent pathway in plants [J]. *Gene*, 2003, 313(1): 127-138.
- [19] Xiang S, Usunow G, Lange G, *et al.* Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(4): 2676-2682.
- [20] Xiang S, Usunow G, Lange G, *et al.* 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXS), a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis [J]. *Isopren Synth Plants Microorgan*, 2012, 978(1): 4614-4063.
- [21] 金 蓉, 朱长青, 徐昌杰, 等. 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)及其编码基因 [J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(5): 706-712.
- [22] 郑德勇. 我国 3 种红豆杉各部位紫杉醇含量的比较 [J]. 福建林学院学报, 2003, 23(2): 160-163.
- [23] Rohmer M, Knani M, Simonin P, *et al.* Isopr enoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [J]. *Biochem J*, 1993, 295(Pt2): 517-524.
- [24] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, *et al.* Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence [J]. *J Mol Biol*, 2002, 300(4): 1005-1016.
- [25] 杨 滢. 植物萜类代谢途径关键酶的比较及其在丹参中的表达分析 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2012.
- [26] 徐 友. 温度和光强对银杏生长和次生代谢产物合成的影响 [D]. 南京: 南京林业大学, 2016.