

• 药材与资源 •

当归 *DXR* 基因保守区克隆和组织特异性表达分析雒 军^{1,2}, 王引权^{1,2*}, 温随超¹, 张金林^{3*}, 夏 琦¹

1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3. 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃 兰州 730020

摘 要: 目的 克隆当归 *Angelica sinensis* 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(*DXR*)编码基因部分保守区序列, 分析 *DXR* 基因在当归根、茎、叶中的特异性表达。方法 根据已克隆的植物 *DXR* 保守序列设计一对简并引物, 以当归叶片总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法扩增出 *DXR* 片段并连接到 pGEM-T Easy 载体上, 转化大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* DH5 α , 阳性克隆经 PCR 检测后测序。运用 RT-qPCR 方法, 以当归肌动蛋白基因 *Actin* 为内参基因, 检测 *DXR* 在当归不同组织中的表达量。结果 得到一段 564 bp 的 *DXR* 基因序列, 并在 GenBank 注册(登录号: KJ000259)。序列分析表明, 该片段编码 187 个氨基酸, 与 GenBank 中注册的海岛棉 *Gossypium barbadense* 等 6 个物种的 *DXR* 核苷酸序列同源性和氨基酸序列同源性均在 80% 以上; *DXR* 在叶中表达量最高, 相对表达量分别是茎和根组织中的 2.5 倍和 3.2 倍 ($P < 0.01$)。结论 本研究首次从当归中克隆出了 *DXR* 部分保守区序列, 并揭示了 *DXR* 在不同组织中的差异表达, 为有效利用该基因奠定前期工作基础。

关键词: 当归; 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶; 克隆; 肌动蛋白; RT-PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)13-1907-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.019

Cloning and tissue-specific expression analysis of conserved fragments of *DXR* gene from *Angelica sinensis*LUO Jun^{1,2}, WANG Yin-quan^{1,2}, WEN Sui-chao¹, ZHANG Jin-lin³, XIA Qi¹

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines of the College of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

3. College of Pastoral Agricultural Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

Abstract: Objective To clone the conserved cDNA fragment of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (*DXR*) gene from *Angelica sinensis* and to analyze its tissue-specific expression in roots, stems, and leaves. **Methods** A pair of degenerate primers were designed according to the conservative sequences of the cloned *DXR* from other plant species. The total RNA from the leaves of *A. sinensis* was as template, *DXR* fragment was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), connected to pGEM-T Easy vector then transformed into *Escherichia coli* DH5 α . The positive clone identified by PCR was sequenced. Taking *Actin* of *A. sinensis* as a reference gene, SYBR Green quantitative RT-PCR was used to detect the relative expression levels of *DXR* different tissues of *A. sinensis*. **Results** The *DXR* fragment of *A. sinensis* containing 564 bp encoding 187 amino acids was registered in Genbank (No.KJ000259). The sequence identity analysis suggested that both the obtained nucleotide sequence and its corresponding amino acid sequence shared more than 80% of homology with GenBank *DXRs* from *Gossypium barbadense* and other five higher plant species. *DXR* was expressed at the highest level in the leaves, and the relative expression levels in the leaves were 2.5 and 3.2 times relative to the stems and roots, respectively ($P < 0.01$). **Conclusion** A novel *DXR* fragment is cloned from *A. sinensis* and its tissue-specific expression in *A. sinensis* is investigated. This work might establish an experimental basis for the effective application of *DXR* in the future.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; gene cloning; actin; RT-PCR

收稿日期: 2014-02-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81060327, 81260616)

作者简介: 雒 军(1981—), 男, 硕士, 研究方向为中医药分子生物学研究。

*通信作者 王引权, 博士生导师, 教授, 研究方向为药用植物生理生态研究。Tel/Fax: (0931)8768293 E-mail: kjkfpp@163.com

张金林, 博士生导师, 教授, 研究方向为植物生理及分子生物学研究。E-mail: jlzhang@lzu.edu.cn

挥发油 (volatile oil) 又称精油 (essential oil), 是当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 活性成分的重要组成部分之一, 其量约占当归总成分的 0.62%^[1]。现代药理研究表明, 当归挥发油能松弛子宫平滑肌、降低血压、改善心肌缺血、抗心律失常, 并且具有平喘、抑制中枢神经系统、提高机体免疫功能及抗炎镇痛等作用^[2]。萜类 (terpenoids) 是构成当归挥发油的主要组分之一^[3]。近年来, 随着生物化学、生物信息学、分子生物学等学科不断发展, 有关萜类物质生物合成途径已基本阐明^[4]。萜类物质通常存在 2 个相对独立的合成途径, 即位于细胞质中的甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和位于质体中的 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径^[5]。MVA 途径是在动物和酵母中首先发现的萜类合成途径, 主要合成甾醇、倍半萜、三萜等, 而 MEP 途径是在高等植物中质体中主要合成单萜、二萜等物质的途径^[6-7]。MEP 途径初始物丙酮酸 (pyruvate) 和 3-磷酸甘油醛 (D-GAP) 在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS) 的作用下转化成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (DXP)。DXP 在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR) 及还原型辅酶 II (NADPH) 的催化下分子重排形成 MEP。MEP 在 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合成酶 (4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase, CMS) 等一系列酶的催化反应下转化成萜类合成的前体物质异戊基焦磷酸 (IPP) 和二甲烯丙基焦磷酸 (DMAPP)^[8]。

甘肃是当归主产区, 年栽培面积和总产量都占全国 90% 以上, 目前对当归的研究主要集中在栽培耕作方式和药效药理等方面, 在基因层次的研究鲜有报道。为了阐明当归药材道地性的分子生物学基础, 需要对当归主要药效物质的生物合成途径和基因调控进行探索。在 MEP 途径中 DXS 虽然是第一步催化反应的酶, 但其催化产物 DXP 同时也是维生素 B1 和维生素 B6 生物合成的前体物质, 因此催化 DXP 转化为 MEP 的 DXR 才是 IPP 合成的关键酶^[9]。DXR 已成为当前的研究热点^[10-15], 但有关当归藁本内酯合成关键基因 *DXR* 及其表达规律的研究尚未见报道。本研究首次克隆当归 *DXR* 保守区序列; 并对其进行序列分析, 以及对当归 *DXR* 的组织特异性表达进行分析, 以期为当归 *DXR* 的全长克隆

及研究其在当归中萜类物质的生物合成与调节中的作用提供理论基础。

1 材料

当归植株于 2013 年 8 月采自甘肃岷县茶埠镇试验基地 (海拔 2 780 m, 东经 104° 06', 北纬 34° 29'), 经甘肃中医学院王引权教授鉴定为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels。田间挖取当归全株, 将其冷冻于装有干冰的泡沫箱中, 于当天带至实验室后迅速用去离子水冲洗干净, 将根、茎、叶分离后液氮迅速冷冻, 保藏于 -80 °C 超低温冰箱, 供作 RNA 提取材料。大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* DH5 α 由本实验室保存。

所用的分子生物学试剂主要包括: RNA 提取试剂十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)、LiCl 和聚乙烯吡咯烷酮 360 (PVP-360, Sigma 公司), cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa, 大连), Ex Taq DNA Polymerase (TaKaRa, 大连)、PCR 产物回收试剂盒 (TransGen, 北京)、PCR 产物克隆试剂盒 (Promega, 美国), DNA Marker (TransGen, 北京), SYBR Green 荧光定量试剂盒 (Promega, 美国), 其他生化试剂均为进口或国产分析纯产品。

2 方法

2.1 引物设计与合成

通过对 GenBank 中拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Accession: NM_001203671)、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Accession: FJ476255)、薄荷 *Mentha piperita* Linn. (Accession: AF116825)、金鱼草 *Antirrhinum majus* L. (Accession: AY770406) 和美丽帽柱木 *Mitragyna speciosa* Korth. (Accession: JQ038374) 等植物 *DXR* 编码基因 CDS 序列进行同源比对, 找出高度保守区段, 按照相似性高和简并性低的原则, 利用 Primer 6.0 生物软件设计一对简并引物 (P1、P2), 用于扩增当归 *DXR* 片段, 推测目的片段长度为 564 bp。P1: 5'-GGCTCCATTGGVACTCAGAC-3', P2: 5'-CTTCAGAGCATCBGCTACTTT-3', 其中 V=G、A、C, B=G、T、C。

参照克隆并测序的当归 *DXR* 片段序列, 利用 Primer 6.0 生物软件设计出一对用于 *DXR* 荧光定量 PCR 检测的特异引物 (P3、P4), 扩增长度为 112 bp。P3: 5'-GCCGATTTCAGAGCATTCTGC-3', P4: 5'-TCCACAGGCAAGTCCCTAAA-3'。参照当归 *Actin* 片段序列^[16], 设计出一对荧光定量 PCR 内参

基因检测的特异引物(P5、P6),扩增长度为109 bp。P5: 5'-TGGTATTGTGCTGGATTCTGGT-3', P6: 5'-TGAGATCACCACCAGCAAGG-3'。以上所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2 总 RNA 的提取

当归根、茎及叶组织总 RNA 的提取参照文献方法进行^[17],并略作修改。实验中所用到玻璃容器、离心管和去离子水在 RNA 提取前均用焦碳酸二乙酯(DEPC)处理,以变性灭活 RNase。具体操作步骤如下:取1 g材料置于含液氮和少量石英砂的研钵中充分研磨成粉末状。取约1/10的粉末转入内含0.9 mL 65℃预热的提取缓冲液的离心管中,提取缓冲液成分包括100 mmol/L Tris-Cl、2% CTAB、2% PVP-360、30 mmol/L EDTA、1.5 mol/L 的 NaCl 和 2%的 β -巯基乙醇。充分振荡混匀后置于65℃水浴锅孵育20 min,期间每5分钟充分振荡1次。冷却至室温后,加等体积氯仿-异戊醇(24:1),剧烈振荡30 s,12 000×g、4℃离心10 min。水相转入另一离心管,加约1/3体积10 mol/L 的 LiCl,混匀后置-20℃冰箱30 min。12 000×g、4℃离心10 min,沉淀溶解于0.5 mL 无 RNase 的去离子水,加0.5 mL 水饱和酚抽提1次,再加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)抽提1次,12 000×g、4℃离心10 min。水相转入另一离心管,加1/10体积3 mol/L pH 5.4 的醋酸钠,再加1体积预冷的异丙醇,置-20℃冰箱30 min。12 000×g、4℃离心10 min,沉淀悬浮于500 μ L 无 RNase 的去离子水配制的70%乙醇。12 000×g、4℃离心10 min,弃去上清液,沉淀干燥后溶于50 μ L 无 RNase 的去离子水。

将提取到的总 RNA 在使用和保存之前进行检测,使用分光光度计(Thermo BioMate 3,美国),根据吸光度(A)值测定所提总 RNA 的纯度(A_{260}/A_{280} 在1.8~2.0,说明 RNA 无污染)及浓度;并依照测定出的 RNA 浓度确定下一步实验中合成 cDNA 所需模板的用量,未使用的 RNA 保存于-80℃超低温冰箱;采用非变性琼脂糖凝胶电泳方法判断总 RNA 的完整性。

2.3 cDNA 模板合成和 PCR 扩增

按照试剂盒说明书,以当归根叶片总 RNA 合成 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。反应体系是在200 μ L PCR 管中加入下列组分:无菌去离子水35.8 μ L、MgCl₂(25 mmol/L)5 μ L、10×PCR

缓冲液5 μ L、dNTP(2 mmol/L)1.2 μ L、正反向引物(10 μ mol/L)1 μ L、cDNA 0.5 μ L 和 Taq DNA polymerase(5 U/ μ L)0.5 μ L,总体积为50 μ L。反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性30 s、56℃退火30 s、72℃延伸60 s,30个循环;最后72℃延伸10 min,4℃结束,PCR 扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶-化学发光成像系统(Bio-Rad CHEMI DOC XRS,美国)检测。目的片段回收和纯化按照回收试剂盒说明书进行。

2.4 阳性克隆的筛选、鉴定及测序

DNA 片段与 T 载体连接体系包括:T₄ DNA 连接酶的2×连接缓冲液5 μ L、pGEM-T Easy 载体0.5 μ L、纯化的 PCR 产物1.2 μ L(加入量以 PCR 产物-载体物质的量比1:1估算)、T₄ DNA 连接酶0.8 μ L,无菌去离子水补充至10 μ L,4℃连接过夜。连接产物全部加入到100 μ L 置于冰上的感受态 *E. coli* DH5 α 细胞中,冰浴20 min;42℃热激50 s;冰浴2 min。加入900 μ L 平衡至室温的液体 LB 培养基,摇菌1.5 h(37℃,150 r/min)。取100 μ L 菌液涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37℃培养过夜。次日挑选单菌落,进行菌落 PCR 检测,阳性克隆接种于含氨苄青霉素的液体培养基培养(37℃,150 r/min),培养过夜后装入菌种保藏管送生工生物工程(上海)有限公司测序。

2.5 序列的生物信息学分析

利用 NCBI 网站 Blast 工具进行基因序列同源性比对,序列的翻译和氨基酸序列同源性比对及作图等 DNAMAN 6.0 生物软件中进行,序列保守区分析在 NCBI 网站 Conserved Domain Database (CDD) 中进行。

2.6 DXR 在当归植株组织中的特异表达

采用实时荧光定量 PCR (Bio-Rad CFX96, 美国)测定 DXR 在当归植株组织中的特异表达。分别称取约0.1 g 当归根、茎、叶组织提取总 RNA,每个组织重复3次,然后用分光光度计测定浓度,计算并量取总 RNA 约100 ng。按试剂盒说明书进行 cDNA 的第一链合成,将 cDNA 用无菌去离子水稀释至30 μ L 后取1 μ L cDNA 作为模板进行荧光定量 PCR,每个 cDNA 模板做3管重复。反应体系:在200 μ L PCR 管中加入无菌去离子水7.4 μ L、2×qPCR mix 10 μ L、正反向引物(10 μ mol/L)0.8 μ L、cDNA 1 μ L,总体积为20 μ L。反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性15 s、60℃退火30 s、72℃

延伸 30 s, 40 个循环。荧光采集时间在 72 °C 延伸步骤, 扩增完成后利用 PCR 仪自带的程序进行溶解曲线测定。求取 3 个平行管的平均 C_t 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析方法对 *DXR* 进行相对定量表达分析。

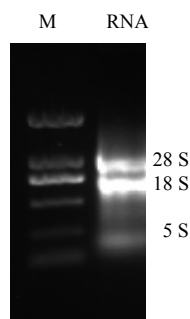
2.7 统计与分析

所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计和分析。根、茎、叶间 *DXR* 相对表达量差异性利用 ANOVA 分析, 数据通过 LSD 检验。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 的提取及检测

采用非变性琼脂糖凝胶电泳法对当归不同组织总 RNA 进行检测, 结果显示: 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带清晰, 没有其他杂质条带 (图 1), 说明提取的叶片总 RNA 的完整性较好; 经分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 平均值为 1.98, 表明总 RNA 的纯度较高, 可用于 cDNA 制备和 PCR 扩增。



M-Marker RNA-叶片总 RNA
M-Marker RNA-Total RNA from leaves

图 1 叶片总 RNA 非变性琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Nondenaturing agarose gel electrophoresis of total RNA from leaves

3.2 RT-PCR 扩增

以当归叶片总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板, 用 *DXR* 简并引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。经检测, 扩增产物在 500~750 bp 处有一条亮带 (图 2), 与目的片段大小基本一致, 推测为 *DXR* 片段, 需要进一步测序鉴定。

3.3 阳性克隆的筛选、鉴定及测序

将回收纯化的目的片段连接到 pGEM-T Easy 克隆载体上, 转化 *Escherichia coli* DH5 α , 从转化的平板上随机挑取 5 个克隆并进行菌落 PCR 扩增, 经检测 1~5 号克隆扩增出大小约为 500~750 bp 的亮条带, 与 RT-PCR 结果一致, 可能为阳性克隆, 然后将阳性克隆进行菌液培养并进行测序, 测得一段

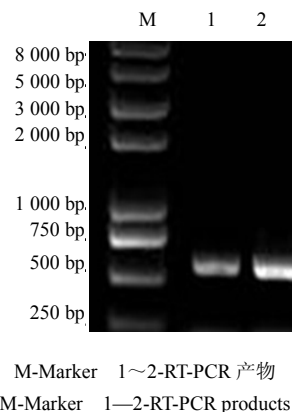


图 2 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

长度为 564 bp 的序列, 将该基因序列在 NCBI 网站的 GenBank 数据库中注册, 登陆号为 KJ000259。

3.4 序列分析

对克隆得到的基因片段进行初步的序列分析, 其编码 187 个氨基酸 (图 3)。Blast 比对结果显示该序列与 NCBI 基因库中海岛棉 *Gossypium barbadense* L. 等 6 个植物物种 *DXR* 核苷酸序列的相似性在 80% 以上 (表 1), 将推测的当归的 *DXR* 片段的氨基酸序列和其他植物 *DXR* 的氨基酸序列进行多重比较, 结果发现完全一致的氨基酸多达 150 个, 占总氨基酸数的 80%, 其与海岛棉、杭白菊 *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Tzvel.、黄花蒿 *Artemisia annua* L.、紫茎泽兰 *Ageratina adenophora* (Spreng.) King & H. Rob.、杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 和蓖麻 *Ricinus communis* L. 的氨基酸序列相似性分别为 92.02%、86.17%、86.17%、85.64%、90.96% 和 88.83% (图 4), 这表明本实验所克隆到的基因片段为当归 *DXR* 片段, 并将其命名为 *AsDXR*, 将所编码的肽段命名为 *AsDXR*。进一步对 *AsDXR* 进行保守结构域分析, 结果显示其为 *DXR* 的保守区域, 1~120 AA 为 *DXP_reductoisom* 蛋白超家族 (cl03657) 序列区域, 130~187 AA 为部分 *DXP_redisom* 蛋白超家族 (pcl07165) 序列区域, 这 2 个保守结构域均在 NADPH 的存在下催化 *DXP* 转化成 MEP, 为 *DXR* 的功能结构域^[7]。

3.5 *DXR* 在当归植株组织中的特异表达

总 RNA 的非变性琼脂糖凝胶电泳结果表明, 根、茎、叶组织中总 RNA 的 28 S 条带和 18 S 条带亮度相当 (图 5), 说明反转录总 RNA 浓度基本相同。实时荧光定量 PCR 扩增曲线显示, 对 *Actin* 和

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
1	GGCTCCATTGGA	CTCAGACACTT	GACATAGTTG	CTGAAATCCG	GACAAATTC	AGAGTTGTAG	CACTTGTCTG	CTGTTCAA	TGTGACCC	TTCTGCTG	ATCAGGTCA	AGACATTCA
1	G S I G T Q T L D I V A E N P D K F R V V A L A A G S N V T L L A D Q V K T F R											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
121	CCTCAGTTAGTT	GCTTAGAAAT	GAGTCCTT	GATTAAAT	GAACTCAAG	GATGCCCT	TGGCGGAT	GCTGACTA	TAAAGCCG	GAGATCGT	TGCTGGGA	CAGGCGC
41	P Q L V A V R N E S L I N E L K D A L A D A D Y K P E I V A G E Q G V I E V A R											
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
241	CATCCAGACTGT	GTAAGTCA	GAGTACGA	AGTGTGTT	GCTGGTTA	AGCCAA	CAGTAGCT	GCTATAGA	AGCAGGAA	AGACATTG	CCCTTGCT	TAATAAG
81	H P D C V T A V T G I V G C A G L K P T V A A I E A G K D I A L A N K E T L I A											
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
361	GGTGGTCCCTT	TGCTCTCT	CTGCGATA	AGCATAAA	GATTCTTC	TCTGCGGA	TTCAAGCA	TCTGCAAT	ATTTCA	GTATTCA	AGGATTAC	CAGAAGG
121	G G P F V L P L A H K H K V K I L P A D S E H S A I F Q C I Q G L P E G A L R R											
	490	500	510	520	530	540	550	560				
481	ATAATATTAA	CGCGCTC	AGGTGAGC	TTTAGG	ACTTGC	CTGGATAA	ACTAAA	AGTTAA	AGTAGC	AGATGCT	CTGAAG	
161	I I L T A S G G A F R D L P V D K L K E V K V A D A L K											

图 3 当归 DXR 片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleic acid sequence and deduced amino acid sequence of DXR fragment from *A. sinensis*

表 1 当归与部分植物 DXR 片段核苷酸序列相似性比对

Table 1 Similarity comparison of DXR fragment nucleic acid sequences in *A. sinensis* and other plant species

物种名	相似度 / %	登录号
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i>	84	EF051345
杭白菊 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	83	AB205045
黄花蒿 <i>Artemisia annua</i>	82	AF182287
紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i>	82	FJ752422
杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	82	JX458820
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	81	XM_002511353

当归	GSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTERFPQLVAVRNES
海岛棉	GSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLVDQVKTEKFPQLVAVRNES
杭白菊	GSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLAEQIKAFKFPQLVSIKNES
黄花蒿	GSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLAEQIKAFKFPQLVSIKNES
紫茎泽兰	GSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQIKAFKFPQLVSIKNES
蓖麻	GSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTERFPQLVSVRDES
consensus	gsigtqtldivaenpdkfr vvalaagsnvtll q k f pqlv es
当归	LINELKDALADADYKPEIVAGEQGVIEVARHPDCVTAVTGIVGCAGLKPT
海岛棉	LVNELKEALADMEQKPEIIPGESGVIEVARHPDAVTVVTGIVGCAGLKPT
杭白菊	LVAELKEALAGSDYMPEIIPGDEGVVEVARHPDCVTVVTGIVGCAGLKPT
黄花蒿	LVAELKEALAGSDYMPEIIPGDEGVVEVARHPDCVTVVTGIVGCAGLKPT
紫茎泽兰	LVGELKEALAGADYMPEIIPGDEGVVEVARHPDCVAVVTGIVGCAGLKPT
蓖麻	LVDELKEALADVDEKPEIIPGEGGIVEVARHPDAVSVVTGIVGCAGLKPT
consensus	l elk ala pei g g evarhpd v vtgivgcaglkpt
当归	VAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLAHKHKVKILPADSEHSAIFQCI
海岛棉	VAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLAHKHKVKILPADFEHSAIFQCI
杭白菊	VAAIEAGKNIALANKETLIAGGPFVPLAHKHNVKILPADSEHSAIFQCI
黄花蒿	VAAIEAGKNIALANKETLIAGGPFVPLAHKHNVKILPADSEHSAIFQCI
紫茎泽兰	VAAIEAGKNIALANKETLIAGGPFVPLAHKHNVKILPADSEHSAIFQCI
蓖麻	VAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVPLAHKYNVKILPADSEHSAIFQCI
consensus	vaaieagk i lanketliaggp fvlplahk vkilpad eh saifqci
当归	QGLPEGALRRRIILTASGGAFRDIPVDKLKEVKVADAL
海岛棉	QGLPEGALRRRIILTASGGAFRDIPVDKLKEVKVADAL
杭白菊	QGFPEGALRRRIILTASGGAFRDIPVEKLKDVKVADAL
黄花蒿	QGFPEGALRRRIILTASGGAFRDIPVEKLKDVKVADAL
紫茎泽兰	QGFPEGLRRRIILTASGGAFRDIPVEKLKDVTVADAL
蓖麻	QGLPEGALRRRIILTASGGAFRDIPVEKLKDVKVADAL
consensus	qg peg lr iiltasggaf rd ip v klk v vad al

图 4 当归与部分植物 DXR 片段氨基酸序列相似性多重比较

Fig. 4 Multiple comparison of amino acid sequence of DXR fragment in *A. sinensis* and other plant species

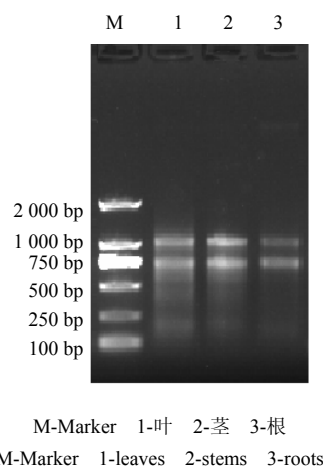


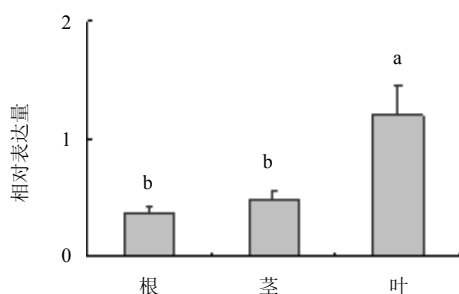
图5 当归根、茎、叶总RNA非变性琼脂糖凝胶电泳
Fig. 5 Nondenaturing agarose gel electrophoresis of total RNA from roots, stems and leaves of *A. sinensis*

DXR 的扩增效率良好, C_t 值在 21~28; 熔点曲线分析也充分表示扩增曲线有良好的特异性, 表现为单峰, 无非特异性荧光峰, *Actin* 和 *DXR* 的熔点曲线峰值分别出现在 86 和 84 °C。将荧光定量 PCR 的产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示扩增条带大小约为 110 bp, 与目的片段大小一致, 无引物二聚体条带。

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析当归根、茎、叶组织中 *DXR* 相对表达量, 结果显示 *DXR* 在植株各组织中均有表达, 但以叶片中表达量最高, 分别是茎和根中表达量的 2.5 倍和 3.2 倍, 差异性达到显著水平 ($P < 0.01$), 而茎和根中表达量相当 (图 6)。

4 讨论

MEP 途径是植物萜类合成的一条重要途径。许多研究表明, *DXR* 是调控 MEP 途径的关键代谢酶,



不同小写字母代表显著性差异 $P < 0.01$

Different lower-case letters represent significant difference $P < 0.01$

图6 *DXR* 在当归根、茎、叶中的相对表达量
Fig. 6 Relative expression levels of *DXR* in roots, stems, and leaves of *A. sinensis*

对植物单萜、单萜、双萜和类胡萝卜素及其衍生物的生物合成具有重要影响^[4-5]。由于当归挥发油的组分和量与萜类化合物的生物合成密切相关, 因此深入研究当归 *DXR* 基因功能及其调控具有重要意义。本研究通过同源比对设计简并引物利用 RT-PCR 方法, 首次从当归叶片中扩增出 MEP 途径关键酶基因 *AsDXR*。通过同源性比对, 表明 *AsDXR* 与海岛棉、杭白菊、黄花蒿、紫茎泽兰、杜仲、蓖麻的同源性达 80% 以上, 由此可以推断 *AsDXR* 片段就是当归 *DXR* 酶的 cDNA 片段。通过对 *AsDXR* 进行保守结构域分析, 显示该序列为当归 *DXR* 的保守区域, 其包含着 *DXP_reductoisom* 和 *DXP_redisom* 两个蛋白超家族序列, 因此 *AsDXR* 是高等植物 *DXR* 家族的新成员, 具有较高的保守性。当归 *DXR* 可能参与到当归 MEP 萜类的生物合成途径, 但其是否只有一个基因家族, 表达产物的亚细胞定位、结构及特性等功能还有待于进一步研究。

通过 RT-qPCR 方法对 *DXR* 在当归叶、茎和根组织中的表达分析发现, *DXR* 在当归叶、茎和根组织中均有表达, 但表达水平有明显差异, 其中以叶片中的表达量最高。这可能与 MEP 途径是定位于质体中的萜类代谢途径和当归叶中含有丰富的叶绿体、叶绿素、类胡萝卜素有关^[18]。未来的研究方向应该是进一步对当归 *DXR* 编码基因全长克隆, 深入研究其功能和当归阶段发育过程中的组织表达; 同时应探讨当归 *DXR* 过量表达和敲除对萜类合成的效应, 以及重要胁迫因子对其表达的调控效应, 为揭示当归药材品质形成及种质遗传改良提供新的研究思路。

参考文献

- [1] 丁毅. 炮制对当归挥发油及多糖的影响 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(8): 496-497.
- [2] 杜俊蓉, 白波, 余彦, 等. 当归挥发油研究新进展 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1400-1406.
- [3] 裴媛, 谭初兵, 徐为人, 等. 当归苯酞类和萜类成分作用的虚拟评价 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 938-941.
- [4] Yu F, Utsumi R. Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(18): 3043-3052.
- [5] Vranová E, Coman D, Gruissem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 665-700.

- [6] Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(2): 78-84.
- [7] Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants [J]. *Nat Prod Rep*, 1999, 16(5): 565-574.
- [8] Roelofs A J, Jauhainen M, Mönkkönen H, *et al*. Peripheral blood monocytes are responsible for $\gamma \delta$ T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP [J]. *Br J Haematol*, 2009, 144(2): 245-250.
- [9] Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, *et al*. A 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17): 9879-9884.
- [10] Souret F F, Weathers P J, Wobbe K K. The mevalonate-independent pathway is expressed in transformed roots of *Artemisia annua* and regulated by light and culture age [J]. *In Vitro Cell Devpl*, 2002, 38(6): 581-588.
- [11] 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.
- [12] Dudareva N, Andersson S, Orlova I, *et al*. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3): 933-938.
- [13] 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 reductoisomerase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis [J]. *Planta Med*, 2006, 72(03): 234-240.
- [14] 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.
- [15] Wungsintaweekul J, Sirisuntipong T, Kongduang D, *et al*. Transcription profiles analysis of genes encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase and 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase in plaunotol biosynthesis from *Croton stellatopilosus* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(5): 852-856.
- [16] 吴永娜, 胡 静, 王引权, 等. 当归肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2485-2489.
- [17] Pandit S S, Mitra S S, Giri A P, *et al*. A quick method for isolating RNA from raw and ripe fleshy fruits as well as for co-isolating DNA and RNA from polysaccharide and polyphenol-rich leaf tissues [J]. *J Plant Biol*, 2007, 50(1): 60-64.
- [18] 王惠珍, 张新慧, 李应东, 等. 轮作与连作当归光合特性和挥发油的比较 [J]. 草业学报, 2011, 20(1): 69-74.