

• 药材与资源 •

滇龙胆 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因 *GrDXR* 的克隆、序列分析与原核表达张晓东¹, 赵 静¹, 李彩霞¹, 李 涛¹, 王元忠^{2*}

1. 玉溪师范学院资源与环境学院, 云南 玉溪 653100

2. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南 昆明 650223

摘要: 目的 从滇龙胆 *Gentiana rigescens* 幼叶中克隆萜类合成关键酶 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因 *GrDXR*, 进行序列分析和原核表达。方法 根据滇龙胆转录组中 *GrDXR* 基因序列, 设计引物, 通过 RT-PCR 扩增得到 *GrDXR* 开放阅读框 (ORF) 序列, 并进行 TA 克隆、测序和序列分析; 构建原核表达载体 pGEX-4T-1-*GrDXR*, 转入大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中, 在 IPTG 诱导下进行表达。结果 *GrDXR* ORF 全长 1 425 bp, 编码 474 个氨基酸。序列分析表明, *GrDXR* 基因是 DXR 家族成员; 蛋白质序列系统发育分析表明, *GrDXR* 与萝卜木 RvDXR、橡胶树 HbDXR 和长春花 CrDXR 亲缘关系较近。构建 pGEX-4T-1-*GrDXR* 重组质粒, 获得稳定的原核表达体系。SDS-PAGE 结果表明所表达蛋白与预期蛋白大小一致。结论 克隆了 *GrDXR* 基因, 建立其稳定的原核表达体系, 为进一步纯化 *GrDXR* 蛋白, 研究其结构和功能奠定基础。

关键词: 滇龙胆; 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因; 基因克隆; 序列分析; 原核表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)16-2378-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.019

Cloning, sequence analysis, and prokaryotic expression of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase *GrDXR* gene in *Gentiana rigescens*ZHANG Xiao-dong¹, ZHAO Jing¹, LI Cai-xia¹, LI Tao¹, WANG Yuan-zhong²

1. College of Resources and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China

2. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: Objective To clone the 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene *GrDXR* which is the key enzyme involving in the terpenoid biosynthesis from young leaves of *Gentiana rigescens*, and to perform its sequence analysis and prokaryotic expression. **Methods** According to the *GrDXR* gene sequence of *G. rigescens* transcriptome, a pair of primers were designed, and the ORF of cDNA sequence was obtained by RT-PCR. Then TA cloning, sequencing, and sequence analysis were performed. Prokaryotic expression vector pGEX-4T-1-*GrDXR* was constructed and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) for expression under the induction of IPTG. **Results** The ORF of *GrDXR* had a length of 1 425 bp coding for 474 amino acids. Sequence analysis showed that *GrDXR* was the member of DXR family. Results of phylogenetic analysis showed that *GrDXR* was close to RvDXR, HbDXR, and CrDXR. The pGEX-4T-1-*GrDXR* recombinant plasmid was constructed and the stable prokaryotic expression system was obtained. The SDS-PAGE results displayed that the expressed proteins were consistent with the anticipated size. **Conclusion** The *GrDXR* gene is successfully cloned, and the stable prokaryotic expression system is established. This study will provide a foundation for further purification, structural and functional research of *GrDXR* protein.

Key words: *Gentiana rigescens* Frach. ex Hemsl.; *GrDXR*; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression

龙胆苦苷是滇龙胆 *Gentiana rigescens* Frach. ex Hemsl.、龙胆 *G. scabra* Bge.、三花龙胆 *G. triflora* Pall. 和条叶龙胆 *G. manshurica* Kitag. 等龙胆科植

物中的主要有效成分^[1]。龙胆苦苷的生物合成主要来源于甲羟戊酸 (MVA) 途径和 2-*C*-甲基-*D*-赤藓糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径。在 MEP 途径中, 1-脱

收稿日期: 2014-03-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260608); 科技部“十二五”国家科技支撑计划项目 (2011BAI13B02-04); 云南省教育厅科学研究基金重点项目 (2013Z075)

作者简介: 张晓东, 男, 博士, 讲师, 主要从事植物代谢基因工程方面的研究。Tel: 15925236961 E-mail: zxd95@126.com

*通信作者 王元忠, 男, 助理研究员, 主要从事药用植物资源评价与利用的研究。Tel: 13888829994 E-mail: boletus@126.com

氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR, EC 1.1.1.267)是限速酶^[2],它能够催化1-脱氧-D-木酮糖5-磷酸(DXP)异构化并还原生成MEP,该反应需要 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 的参与。目前,DXR基因已从拟南芥、水稻、玉米、番茄、橡胶树、喜树和银杏等许多植物中分离^[3],而且橡胶树^[4]、大豆^[5]、节节麦、拟南芥等植物中存在2个或多个DXR基因。Rohdich等^[6]将拟南芥*AtDXR*基因在大肠杆菌中表达,结果其纯化蛋白可催化DXP形成MEP。DXR基因的表达受光、茉莉酸甲酯、机械损伤、真菌诱导子和植物根共生菌等的调控^[3,7-9]。在薄荷中过表达DXR基因,能够使薄荷精油产量提高50%^[10]。在长春花*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don中,*CrDXR*基因表达量与单萜吡喃生物碱的累积呈正相关^[11]。过表达DXR基因刺激MEP途径衍生的类异戊二烯精油^[9]和转基因拟南芥中紫杉烯^[12]的合成,而减少DXR基因表达则导致彩斑现象、色素减少和叶绿体发育停滞。在烟草叶绿体中过表达*NtDXR*基因,导致叶绿素a、 β -胡萝卜素、叶黄素、百合黄素、玉米黄素和谷固醇等各种类异戊二烯萜类量增加^[13]。在马达加斯加长春花*Madagascar periwinkle Herb*中,异恶草酮(clomazone)和膦胺霉素(fosmidomycin)对DXR蛋白的表达影响却很小^[14]。因此,植物DXR蛋白在萜类合成和代谢中起着重要作用。

滇龙胆为传统中药材龙胆的主要植物来源之一^[15]。目前,国内外对龙胆的研究主要集中在种子萌发^[16-17]、DNA条码^[18-19]、转录因子功能^[20-21]、育种等方面,而对滇龙胆*GrDXR*基因克隆和功能分析尚未有报道。本研究根据滇龙胆转录组中*GrDXR*基因序列,设计特异性引物,通过RT-PCR技术成功从滇龙胆幼叶中扩增到*GrDXR*基因,进行序列分析和原核表达。结果表明pGEX-4T-*GrDXR*工程菌在37℃、终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导下成功表达出目的蛋白。本研究为滇龙胆*GrDXR*蛋白的功能研究及通过在龙胆中过表达*GrDXR*基因提高龙胆苦苷量的研究奠定基础。

1 材料和试剂

1.1 材料

滇龙胆*Gentiana rigescens* Frach. ex Hemsl.植株栽培于玉溪师范学院资源环境学院分子生物学实验室。实验材料为滇龙胆无菌苗的幼叶。大肠杆菌DH5 α 和Rosetta(DE3)菌种购买于北京全氏金公司。

1.2 试剂

多糖植物组织提取试剂RNAiso、反转录试剂盒、TA克隆试剂盒、限制性内切酶、IPTG、X-gal等均购自于宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;原核表达载体pGEX-4T-1由玉溪师范学院分子生物学实验室保存;引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2 方法

2.1 叶片总RNA提取、*GrDXR*全长cDNA的克隆和测序

按照多糖植物组织提取试剂RNAiso说明书提取滇龙胆幼叶的总RNA;按照逆转录试剂盒说明书合成cDNA。根据原核表达载体pGEX-4T-1多克隆酶切位点和转录组中滇龙胆*GrDXR*基因序列,设计一对特异引物*GrDXR* BamHI-F: GGATCCATGGCTTTGAATTTGCTCTCC, *GrDXR* XhoI-R: CTCGAGTCACACTAAAGCAGGGCTCT。以cDNA为模板进行PCR扩增,反应条件:94℃、3 min;94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30个循环;72℃延伸7 min。*GrDXR*基因PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳分离,割胶后,使用胶回收试剂盒按照说明书对目的片段进行回收,将其连接到pMD19-T载体上,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,涂布于添加100 mg/L氨苄青霉素+IPTG+X-gal的LB固体平板上,37℃培养13 h后挑取白斑,37℃、250 r/min摇床培养后提取质粒,经酶切鉴定正确后进行测序,获得重组质粒pMD19-*GrDXR*。

2.2 *GrDXR*基因的原核表达载体构建

对质粒pGEX-4T-1和pMD19-*GrDXR*分别进行BamHI和XhoI双酶切,回收载体片段和目的基因,按物质的量比1:4进行过夜连接,然后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,涂布于添加100 mg/L氨苄青霉素的LB固体平板,12 h后挑取克隆摇菌后提质粒,经酶切检测正确后,获得表达载体pGEX-4T-1-*GrDXR*。

2.3 *GrDXR*基因的生物信息学分析

使用NCBI网站上的BLAST程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行序列比对,应用Genetyx进行翻译,并预测蛋白质相对分子质量和等电点(PI)等,使用DNAMAN 7进行多序列比对;使

用 Clustal X2.1 进行比对, 然后使用 MEGA6.0 软件内置的 NJ 法构建系统进化树, 设置 Bootstrap=1 000; 利用在线数据库 (http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_11.html) 进行稀有密码子分析。使用 ChloroP 服务器 v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>) 进行叶绿体转运肽预测; 使用 Interpro 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>) 进行保守结构域预测; 使用 ProtScale 软件进行疏水性分析 (<http://web.expasy.org/protscale>); 使用 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org>) 对二级结构预测, 使用 SWISS-MODEL 服务器 (<http://swiss-model.expasy.org/workspace>) 对三级结构预测; 利用 Expasy 中的 TMHMM 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 预测 GrDXR 蛋白的跨膜螺旋区; 利用在线工具 WOLF PSORT (<http://www.wolfpsort.org>) 预测 GrDXR 的亚细胞定位情况。

2.4 重组质粒 pGEX-4T-1-GrDXR 在大肠杆菌中的表达

利用热激法将重组质粒 pGEX-4T-1-GrDXR 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落接种于 3 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素 LB 液体培养基中, 37 ℃、250 r/min 培养 12 h。然后以 1:100 比例转接到无抗生素的 LB 液体培养基中, 37 ℃、250 r/min 培养 3 h 至 $A_{600} \approx 0.8$, 在 37 ℃、终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导下进行表达, 同时以相同条件的 pGEX-4T-1 转化菌作为对照。分别诱导 0、2、4、6 h 后收集菌液 2 mL。4 ℃、8 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加入 100 μ L ddH₂O、25 μ L 的 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 震荡悬菌, 沸水煮 5 min。4 ℃、13 000 r/min 离心 5 min。取 20 μ L 上清上样, 进行 SDS-PAGE (5%浓缩胶和 10%分离胶) 电泳检测。

3 结果与分析

3.1 滇龙胆 GrDXR cDNA 序列的克隆

以滇龙胆幼叶 cDNA 为模板, 扩增出 1 500 bp 左右的片段 (图 1)。通过 TA 克隆获得重组质粒 pMD19-GrDXR, 酶切检测正确后进行测序, 结果表明所扩增序列与转录组测序序列一致。

3.2 GrDXR 基因的生物信息学分析

利用 Genetyx 软件对 GrDXR 的序列进行分析, 结果显示 GrDXR 基因的开放阅读框(ORF)为 1 425 bp, 编码 474 个氨基酸, 将该序列上传至 GenBank 数据库, 获得登录号 KF941189; Gentyx 推测 GrDXR

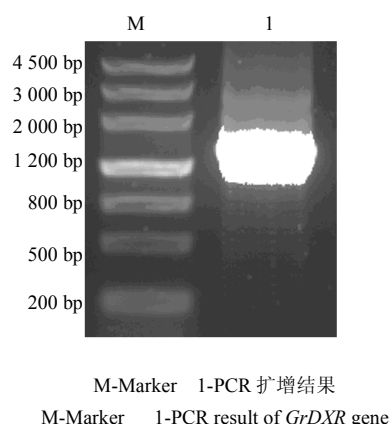


图 1 GrDXR 基因的 PCR 结果
Fig. 1 PCR result of GrDXR gene

蛋白相对分子质量为 51 340, pI 为 5.60。

利用 GeneBank 数据库中的 BLASTp 程序对 GrDXR 的氨基酸进行同源性分析, 结果表明滇龙胆 GrDXR 蛋白与萝芙木 HvDXR 蛋白和橡胶树 HvDXR 蛋白相似性最高 (89.64%), 与银杏 GbDXR 蛋白和紫杉 TcDXR 蛋白序列的相似性较低 (75.85%)。

利用 MEGA 软件将 GrDXR 氨基酸序列与从 NCBI 中挑选的同源性较高的部分已知序列进行系统进化分析, 结果表明滇龙胆与萝芙木、橡胶树和长春花亲缘关系较近, 与银杏、紫杉和喜树等植物中的 DXR 亲缘关系较远 (图 2)。

利用 DNAMAN 将 GrDXR 氨基酸序列与从 NCBI 中挑选的同源性较高的部分已知序列进行多序列比对分析, 结果表明 GrDXR 蛋白与已知蛋白序列高度保守 (图 3)。

通过使用 ExPASy ProtParam tool 进行分析,

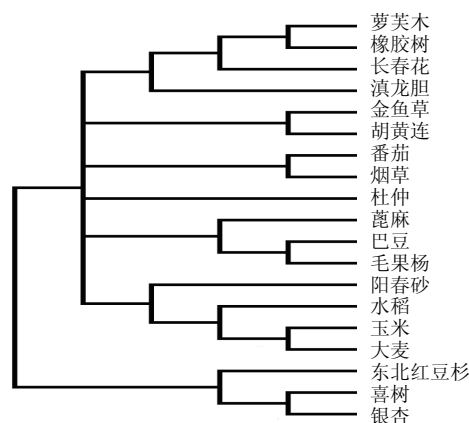


图 2 GrDXR 蛋白与其他植物 DXR 蛋白的系统发育分析
Fig. 2 Phylogenetic relationship of GrDXR protein and some other DXR proteins

GrDXR	MAINLLSPTEVKSISFLDSNSSTYNLSLTKQGSITFQ.KDGGAKFSKKIQCSVCQ...PPEAWPGRVAVPEPKHSDWGE	76
CsDXR	MAINLLSPAIEKKSISFLDSAKENQ...LEKLTGFSLSLRKDLG...RKVQCSVCS...PPPEAWPGRVAVPEPKHSDWGE	71
RvDXR	MAINLLSPTEIKTISFLDSKSNYNLNLKLGQGGFAFKKKDCCATVGKKIQCSVCP...PPEAWPGRVAVPEPKHSDWGE	77
CrDXR	MAINLSLSPFKIKTISFLDSKSNYNLNLKLGQGGFAFKKKDCCATVGKKIQCSVCP...PPEAWPGRVAVPEPKHSDWGE	77
RcDXR	MAINLLSPAELKSVSFLDSTRSQ...LEKLFCSFSLSLRKEFG...RKVQCSQA...PPPEAWPGRVAVPEPKHSDWGE	70
PtDXR	MAINLLSPAIEKKSISFLDSTKSNR...LEKLTGGSLSLRKDCGG...RRIQCSVQCNQPPPEAWPGRVAVPEPKHSDWGE	74
HbDXR	MAINLLSPTEIKTISFLDSKSNYNLNLKLGQGGFAFKKKDCCATVGKKIQCSVCP...PPEAWPGRVAVPEPKHSDWGE	77
相同部分	main lsp k sflds s l k g k g qcs q pp awpg a epk h s dw ge	
GrDXR	KPISIVGSTGSGTQTLDIVAENPKKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTEKPOLVAVRNESLVDLKEALSDVEDKPEIIPG	156
CsDXR	KPISIVGSTGSGTQTLDIVAENPKKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTEKPOLVAVRNESLVDLKEALSDVEDKPEIIPG	151
RvDXR	KPISIVGSTGSGTQTLDIVAENPKKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTEKPOLVAVRNESLVDLKEALSDVEDKPEIIPG	157
CrDXR	KPISIVGSTGSGTQTLDIVAENPKKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTEKPOLVAVRNESLVDLKEALSDVEDKPEIIPG	157
RcDXR	KPISIVGSTGSGTQTLDIVAENPKKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTEKPOLVAVRNESLVDLKEALSDVEDKPEIIPG	150
PtDXR	KPISIVGSTGSGTQTLDIVAENPKKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTEKPOLVAVRNESLVDLKEALSDVEDKPEIIPG	154
HbDXR	KPISIVGSTGSGTQTLDIVAENPKKFRVVALAAGSNVTLLADQVKTEKPOLVAVRNESLVDLKEALSDVEDKPEIIPG	157
相同部分	k p i s i v g s t g s g t q t l d i v a e n p k f r v v a l a a g s n v t l l a d q v k t e k p o l v a v r n e s l v d l k e a l s d v e d k p e i i p g	
GrDXR	EQGVIEVARHEDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIOLANKETLIAGPFVPLPAKHNVKILPADSEHSAIFQCIC	236
CsDXR	EEGVIEVARHEDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIOLANKETLIAGPFVPLPAKHNVKILPADSEHSAIFQCIC	231
RvDXR	EQGVIEVARHEDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIOLANKETLIAGPFVPLPAKHNVKILPADSEHSAIFQCIC	237
CrDXR	EQGVIEVARHEDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIOLANKETLIAGPFVPLPAKHNVKILPADSEHSAIFQCIC	237
RcDXR	EQGVIEVARHEDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIOLANKETLIAGPFVPLPAKHNVKILPADSEHSAIFQCIC	230
PtDXR	EQGVIEVARHEDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIOLANKETLIAGPFVPLPAKHNVKILPADSEHSAIFQCIC	234
HbDXR	EQGVIEVARHEDAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIOLANKETLIAGPFVPLPAKHNVKILPADSEHSAIFQCIC	237
相同部分	e g v i e v a r h e d a v t v v t g i v g c a g l k p t v a a i e a g k d i o l a n k e t l i a g p f v p l p a k h n v k i l p a d s e h s a i f q c i c	
GrDXR	GLPEGALRRILTASGGAFRDWPFVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKITVDSATLFNKGLEVIEAHYLFGADYDNIDIVIH	316
CsDXR	GLPEGALRRILTASGGAFRDWPFVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKITVDSATLFNKGLEVIEAHYLFGADYDNIDIVIH	311
RvDXR	GLPEGALRRILTASGGAFRDWPFVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKITVDSATLFNKGLEVIEAHYLFGADYDNIDIVIH	317
CrDXR	GLPEGALRRILTASGGAFRDWPFVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKITVDSATLFNKGLEVIEAHYLFGADYDNIDIVIH	317
RcDXR	GLPEGALRRILTASGGAFRDWPFVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKITVDSATLFNKGLEVIEAHYLFGADYDNIDIVIH	310
PtDXR	GLPEGALRRILTASGGAFRDWPFVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKITVDSATLFNKGLEVIEAHYLFGADYDNIDIVIH	314
HbDXR	GLPEGALRRILTASGGAFRDWPFVEKLKEVKVADALKHPNWNMGKITVDSATLFNKGLEVIEAHYLFGADYDNIDIVIH	317
相同部分	g l p e g a l r r i l t a s g g a f r d w p f v e k l k e v k v a d a l k h p n w n m g k i t v d s a t l f n k g l e v i e a h y l f g a d y d n i d i v i h	
GrDXR	PQSIHISMVETDSSVLAQLGWPDMDRLPILYTLSPWDRICSEITWPRLDLCKIGSLTFKAPDNVKYPSMDLAYAAGRAG	396
CsDXR	PQSIHISMVETDSSVLAQLGWPDMDRLPILYTLSPWDRICSEITWPRLDLCKIGSLTFKAPDNVKYPSMDLAYAAGRAG	391
RvDXR	PQSIHISMVETDSSVLAQLGWPDMDRLPILYTLSPWDRICSEITWPRLDLCKIGSLTFKAPDNVKYPSMDLAYAAGRAG	397
CrDXR	PQSIHISMVETDSSVLAQLGWPDMDRLPILYTLSPWDRICSEITWPRLDLCKIGSLTFKAPDNVKYPSMDLAYAAGRAG	397
RcDXR	PQSIHISMVETDSSVLAQLGWPDMDRLPILYTLSPWDRICSEITWPRLDLCKIGSLTFKAPDNVKYPSMDLAYAAGRAG	390
PtDXR	PQSIHISMVETDSSVLAQLGWPDMDRLPILYTLSPWDRICSEITWPRLDLCKIGSLTFKAPDNVKYPSMDLAYAAGRAG	394
HbDXR	PQSIHISMVETDSSVLAQLGWPDMDRLPILYTLSPWDRICSEITWPRLDLCKIGSLTFKAPDNVKYPSMDLAYAAGRAG	397
相同部分	p q s i i h s m v e t d s s v l a q l g w p d m d r l p i l y t l s p w d r i c s e i t w p r l d l c k i g s l t f k a p d n v k y p s m d l a y a a g r a g	
GrDXR	GTMTGVLSAANEKAVELFIDEKISYLDIRKVVETCDKHRAELVTSPLSEIIHYDIWREYAAAGVQGTLSLSPAL	473
CsDXR	GTMTGVLSAANEKAVELFIDEKISYLDIRKVVETCDKHRAELVTSPLSEIIHYDIWREYAAAGVQGTLSLSPAL	466
RvDXR	GTMTGVLSAANEKAVELFIDEKISYLDIRKVVETCDKHRAELVTSPLSEIIHYDIWREYAAAGVQGTLSLSPAL	473
CrDXR	GTMTGVLSAANEKAVELFIDEKISYLDIRKVVETCDKHRAELVTSPLSEIIHYDIWREYAAAGVQGTLSLSPAL	473
RcDXR	GTMTGVLSAANEKAVELFIDEKISYLDIRKVVETCDKHRAELVTSPLSEIIHYDIWREYAAAGVQGTLSLSPAL	466
PtDXR	GTMTGVLSAANEKAVELFIDEKISYLDIRKVVETCDKHRAELVTSPLSEIIHYDIWREYAAAGVQGTLSLSPAL	470
HbDXR	GTMTGVLSAANEKAVELFIDEKISYLDIRKVVETCDKHRAELVTSPLSEIIHYDIWREYAAAGVQGTLSLSPAL	473
相同部分	g t m t g v l s a a n e k a v e l f i d e k i s y l d i r k v v e t c d k h r a e l v t s p l s e i i h y d i w r e y a a a g v q g t l s l s p a l	

图3 GrDXR 与其他植物中 DXR 序列的比对结果

Fig. 3 Multiple sequence alignment of GrDXR with DXR sequences in other plants

GrDXR 蛋白相对分子质量为 51 350, 理论 pI 值为 5.66, 分子式为 $C_{2312}H_{3682}N_{606}O_{687}S_{12}$ 。半衰期为 30 h, 不稳定指数为 36.78, 属于稳定蛋白; 脂肪指数为 101.86, 总平均疏水性 (GRAVY) 为 0.013。蛋白质的疏水性通常依据蛋白的 GRAVY 值来预测, GRAVY 值在 2~-2, 若为正值, 则此蛋白为疏水蛋白, 反之则为亲水性蛋白。因此, GrDXR 为疏水蛋白 (图 4)。GrDXR 蛋白含有 20 种氨基酸, 其中亮氨酸的量最高, 为 10.5%; 其次是丙氨酸和丝氨酸, 分别为 9.5% 和 8.2%; 色氨酸量最低, 为 1.3%。对 GrDXR 进行稀有密码子分析, 结果表明 *GrDXR* 基因中稀有密码子占 1.05%,

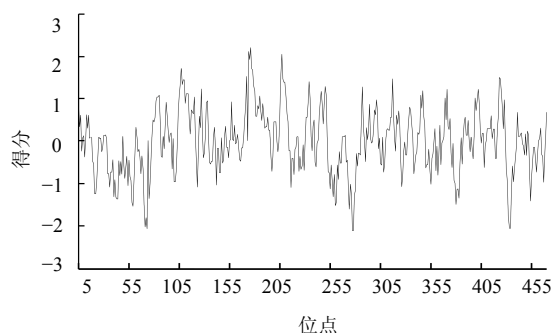


图4 GrDXR 蛋白的疏水性分析

Fig. 4 Hydrophobicity analysis of GrDXR protein

无二联或三联稀有密码子连续出现的情况, 因此可选用 BL21 或 Rosetta (DE3) 进行原核表达。

利用 SSpro 方法对 GrDXR 进行二级结构分析。结果表明该蛋白二级结构中 α -螺旋 (H) 占 39.03%, β -折叠 (E) 占 14.14%, 无规则卷曲 (C) 占 46.84%。利用 Swiss-Model Workspace 预测 GrDXR 蛋白的三级结构, 从图中可以看到 GrDXR 的三级结构主要由 α -螺旋结构和无规则卷曲组成, 与二级结构预测结果一致; 另外, 其三级结构形成能够结合底物的凹形区域 (图 5)。

采用 InterProScan 在线工具预测 GrDXR 蛋白的保守结构域。结果表明 GrDXR 蛋白具有 4 个保守结构域 (图 6), 分别为 NAD (P)-binding domain

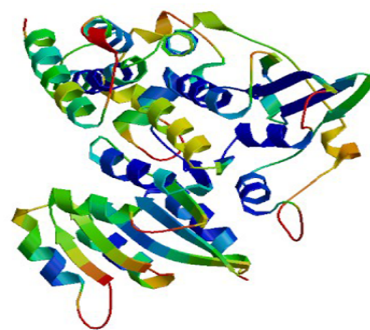


图 5 GrDXR 的三级结构预测

Fig. 5 Predicted three dimensional structure of GrDXR protein

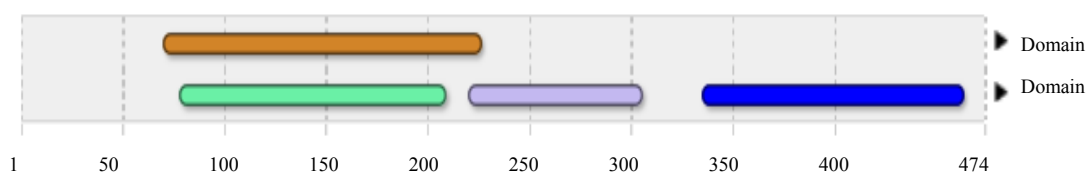


图 6 GrDXR 蛋白保守结构域的预测

Fig. 6 Prediction of conserved domains of GrDXR protein

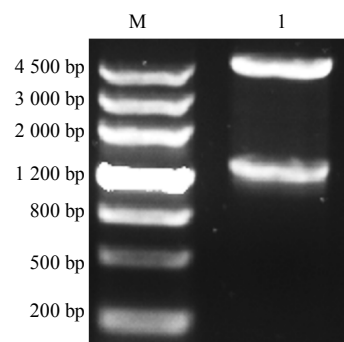
(IPR016040, 71-225), 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, N-terminal (IPR013-512, 79-207), 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, C-terminal (IPR013644, 221-304) 和 DXP reductoisomerase C-terminal domain (IPR026877, 336-462)。利用 ExPASy SignalP 4.0 Server 分析 GrDXR 蛋白, 未发现信号肽, 表明该蛋白为非分泌型蛋白。利用 ExPASy 中的 TMHMM 工具预测 GrDXR 蛋白的跨膜螺旋区, 结果表明 GrDXR 蛋白为非膜蛋白。利用在线工具 WOLF PSORT 预测 GrDXR 蛋白的亚细胞定位情况, 结果显示该蛋白可能定位于叶绿体。使用 ChloroP 在线软件对叶绿体转运肽进行预测, 结果表明 GrDXR 蛋白含有叶绿体转运肽, 为第 1~50 个氨基酸。

3.3 GrDXR 原核表达载体构建

使用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切质粒 pGEX-4T-1-*GrDXR*, 可切出目的片段 (图 7), 表明 *GrDXR* 基因已成功插入载体 pGEX-4T-1 中。重组表达质粒 pGEX-4T-1-*GrDXR* 测序结果表明, 目的基因与原序列一致, 且未出现碱基突变及移码现象。这些结果表明已获得正确的重组质粒 pGEX-4T-1-*GrDXR*。

3.4 GrDXR 蛋白的原核表达

将重组质粒 pGEX-4T-1-*GrDXR* 转化大肠杆菌

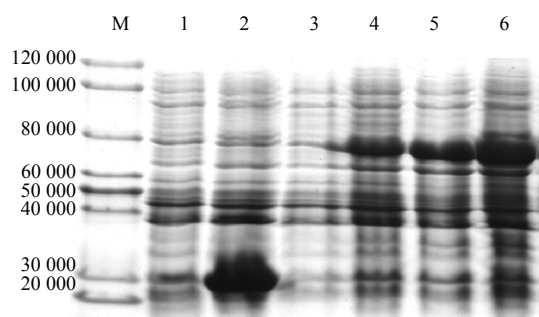


M-Marker 1-质粒 pGEX-4T-1-*GrDXR* 的 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切结果
M-Marker 1-digestion result of plasmid pGEX-4T-1-*GrDXR* by *Bam*HI and *Xho*I

图 7 质粒 pGEX-4T-1-*GrDXR* 酶切检测

Fig. 7 Digestion of pGEX-4T-1-*GrDXR* plasmid

Rosetta (DE3) 后进行 IPTG 诱导表达。在 37 °C、IPTG 终浓度为 1 mmol/L 下, 分别诱导表达 0、2、4、6 h 后, 提取总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。结果表明, 与对照相比, pGEX-4T-1-*GrDXR* 工程菌经 IPTG 诱导后, 在相对分子质量 77 340 (含 GST 蛋白) 左右有 1 条蛋白条带, 表明重组质粒 pGEX-4T-1-*GrDXR* 在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中诱导表达了 GrDXR 蛋白。当温度为 37 °C、诱导时间为 6 h 时, 蛋白表达量最大 (图 8), 可直接用于下一步的蛋白纯化。



M-Marker 1~2-pGEX-4T-1 转化菌诱导 0 和 6 h 的总蛋白 3~6-pGEX-4T-1-GrDXR 工程菌诱导 0、2、4 和 6 h 的总蛋白
M-Marker 1—2-pGEX-4T-1 bacteria with 1 mmol/L of IPTG induction for 0 and 6 h 3—6-pGEX-4T-1-GrDXR bacteria induced for 0, 2, 4, and 6 h

图 8 37 °C 下不同诱导时间对 GrDXR 蛋白表达量的影响
Fig. 8 Effect of different inducing time on expression of GrDXR protein at 37 °C

4 讨论

DXR 是 MEP 途径的限速酶^[2], 因此克隆和鉴定 DXR 基因功能对于 MEP 途径研究非常重要。一般地, 在植物基因组中 DXR 基因仅有 1 个拷贝^[5]。目前, 在滇龙胆转录组中, 仅检测到 1 个 *GrDXR* 基因。本研究从滇龙胆幼叶中成功扩增出 *GrDXR* 基因, 序列分析结果表明 GrDXR 蛋白与萝芙木、橡胶树和长春花中的 DXR 蛋白亲缘关系最近, 暗示着它们具有相同或相似的功能。DXR 蛋白催化 DXP 的反应需要 NADPH 的存在^[2], 因此 NADPH 结合结构域对 DXR 酶的活性至关重要。结构域预测结果表明, GrDXR 在其 N 端具有 NAD (P) 结合结构域 GSTGSIGT 和 LAAGSNV、中间具有 LPADSEHSAI 和 NKGLEVIEAHY 2 个底物结合结构域、DXR 的 N 末端和 C 末端结构域, 这与其他植物中的 DXR 高度同源^[22] (图 7), 进一步表明所克隆基因编码 GrDXR 蛋白。所有植物 DXR 成熟蛋白在 N 端都有 1 个富含脯氨酸的区域, 而在原核生物中却没有^[7]。在 GrDXR 蛋白 N 端 56~64 位存在富含脯氨酸的 PPPAWPGRA 结构域。叶绿体或质体转运肽存在于所有植物 DXR 蛋白中, 能够介导酶进入存在 MEP 途径的质体中^[23]。本研究中, 预测到 GrDXR 蛋白中存在叶绿体转运肽, 长度为 50 个氨基酸。酶基因的功能体现在蛋白质上, 本研究构建了原核表达载体 pGEX-4T-1-GrDXR, 转入大肠杆菌 Rosetta(DE3), 并成功诱导表达出 GrDXR 蛋白。该研究为滇龙胆

GrDXR 蛋白结构和功能研究奠定基础, 也为萜类代谢工程提供候选基因。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [2] 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*, 1998, 95(17): 9879-9884.
- [3] Yao H, Gong Y, Zuo K, *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.
- [4] Seetang-Nun Y, Sharkey T D, Suvachittanont W. Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(9): 991-1002.
- [5] Zhang M, Li K, Liu J, *et al.* Identification and differential expression of two isogenes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in *Glycine max* [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2012, 6(4): 363-371.
- [6] Rohdich F, Lauw S, Kaiser J, *et al.* Isoprenoid biosynthesis in plants-2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase (IspC protein) of *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS J*, 2006, 273(19): 4446-4458.
- [7] 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]. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1581-1591.
- [8] Hans J, Hause B, Strack D, *et al.* Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(2): 614-624.
- [9] Cordoba E, Salmi MLeón P. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(10): 2933-2943.
- [10] 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*, 2001,

- 98(15): 8915-8920.
- [11] Veau B, Courtois M, Oudin A, *et al.* Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *BBA-Gene Struct Expr*, 2000, 1517(1): 159-163.
- [12] Carretero-Paulet L, Cairó A, Botella-Pavía P, *et al.* Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase [J]. *Plant Mol Bio*, 2006, 62(4/5): 683-695.
- [13] Hasunuma T, Takeno S, Hayashi S, *et al.* Overexpression of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production [J]. *J Biosci Bioeng*, 2008, 105(5): 518-526.
- [14] Han M, Heppel S C, Su T, *et al.* Enzyme inhibitor studies reveal complex control of methyl-*D*-erythritol 4-Phosphate (MEP) pathway enzyme expression in *Catharanthus roseus* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62467.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [16] Zhang J, Zhang J, Wang Y, *et al.* Effects of tree species on seed germination and seedlings growth of Chinese medicinal herb *Gentiana rigescens* [J]. *Allelopathy J*, 2012, 29(2): 325-332.
- [17] Zhang J, Wang Y, Yang T, *et al.* Use of gibberellic acid to overcome the allelopathic effect of a range of species on the germination of seeds of *Gentiana rigescens*, a medicinal herb [J]. *Seed Sci Technol*, 2012, 40(3): 443-447.
- [18] Wong K L, But P P H, Shaw P C. Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal *Gentiana* species and their adulterants [J]. *Chin Med*, 2013, 8: 16.
- [19] Nakatsuka T, Saito M, Sato-Ushiku Y, *et al.* Development of DNA markers that discriminate between white-and blue-flowers in Japanese gentian plants [J]. *Euphytica*, 2012, 184(3): 335-344.
- [20] Nakatsuka T, Yamada E, Saito M, *et al.* Heterologous expression of gentian MYB1R transcription factors suppresses anthocyanin pigmentation in tobacco flowers [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(12): 1925-1937.
- [21] Nakatsuka T, Saito M, Yamada E, *et al.* Isolation and characterization of GtMYBP3 and GtMYBP4, orthologues of R2R3-MYB transcription factors that regulate early flavonoid biosynthesis, in gentian flowers [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(18): 6505-6517.
- [22] Reuter K, Sanderbrand S, Jomaa H, *et al.* Crystal structure of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(7): 5378-5384.
- [23] Yang J, Adhikari M N, Liu H, *et al.* Characterization and functional analysis of the genes encoding 1-deoxy-*d*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase and 1-deoxy-*d*-xylulose-5-phosphate synthase, the two enzymes in the MEP pathway, from *Amomum villosum* Lour [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(8): 8287-8296.