

鱼腥草 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因克隆与差异表达

魏 麟, 伍贤进*, 黎晓英, 刘胜贵, 唐玉莲, 贺安娜, 王 丹

怀化学院 生命科学系 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南 怀化 418008

摘 要: 目的 克隆鱼腥草 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (DXR) 基因, 并分析其差异表达。方法 采用 RT-PCR 方法获得 DXR 基因 cDNA 序列, 并对 DXR 蛋白进行理化性质、蛋白二级结构及三维结构预测分析, 并预测了该蛋白功能; 利用实时荧光定量 PCR 方法检测了 DXR 基因在鱼腥草的地下茎、地上茎、叶、花中的表达情况。结果 克隆获得的 DXR 基因长为 1 416 bp, 编码 471 个氨基酸。生物信息学预测 DXR 蛋白不含跨膜区, 不含信号肽。DXR 基因在鱼腥草的叶片中表达丰度最高, 其次是地下茎, 再次是地上茎, 花中表达量最低。结论 首次从鱼腥草中克隆了 DXR 基因, 为进一步阐明该基因在鱼腥草萜类化合物代谢途径中的重要作用奠定基础。

关键词: 鱼腥草; 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶; 萜类化合物; RT-PCR; cDNA 序列

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)24-3607-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.024.020

Cloning and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in *Houttuynia cordata*

WEI Lin, WU Xian-jin, LI Xiao-ying, LIU Sheng-gui, TANG Yu-lian, HE An-na, WANG Dan

Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Key Laboratory of Xiangxi Medicinal Plant and Ethnobotany of Hunan Higher Education, Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua 418008, China

Abstract: **Objective** To clone the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Houttuynia cordata* and analyze the differential expression. **Methods** The cDNA sequence of DXR was cloned from *H. cordata* by using RT-PCR strategy. The physical and chemical properties, secondary structure, and three-dimensional structure of the DXR protein were forecasted and analyzed, and its function was predicted. The differential expression of DXR gene in rhizome, stems, leaves, and flowers was analyzed by fluorescent quantitative PCR. **Results** The cDNA contained a 1 416 bp open reading frame and encoded a predicted protein of 471 amino acids. Bioinformatics predicted that no transmembrane region and signal peptide were present in DXR. Relative real-time PCR analysis indicated that DXR showed the highest transcript abundance in leaves, moderate level in rhizomes, lower level in stems, and the lowest level in flowers. **Conclusion** This study clones DXR gene from *H. cordata* for the first time, and provides a foundation for exploring the mechanism of this gene for the terpenoid biosynthesis in *H. cordata*.

Key words: *Houttuynia cordata* Thunb.; 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; terpenoids; RT-PCR; cDNA sequence

萜类化合物是药用植物的主要有效成分之一^[1], 其合成途径有 MEP (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) 途径和 MVA (mevalonate) 途径。1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR) 是 MEP 途径中的第 2 个重要限速酶, 它催化前体 1-

脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP) 发生分子重排并进行还原反应生成 MEP, 被多数研究认为此步反应是 MEP 途径一个“碳流”的分支点和萜类代谢工程最重要的调控靶点^[2], 具有重要的研究意义。目前, DXR 基因序列已在阳春砂^[3]、银杏^[4]、丹参^[5]等许多药用植物中

收稿日期: 2014-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870230); 湖南省高校创新平台开放基金项目 (12K132); 湖南省科技计划重点项目 (2013FJ6090); 湖南省科技计划项目湘西科技开发专项 (2014FJ4207)

作者简介: 魏 麟 (1974—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为分子遗传学。Tel: (0745)2851037 E-mail: hhweilin@163.com

***通信作者** 伍贤进, 博士, 教授, 主要从事药用植物学与分子生物学研究。Tel: 13607459358 E-mail: hhwuxianjin@163.com

被成功克隆,且普遍以单基因形式存在。但是在大宗传统中药——鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb. 中该基因还未见该基因的任何报道。

本研究应用 RT-PCR 方法扩增鱼腥草 *DXR* 基因 cDNA 片段,并对其蛋白质序列进行生物信息学及不同组织器官中的特异性表达分析,为在药用植物中有效利用该基因和合理开发鱼腥草的药用价值奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb. 样品经中央民族大学龙春林教授鉴定,种植于怀化学院鱼腥草种植园,于 2013 年 6 月 5 日采集同一株鱼腥草的地下茎、地上茎、叶片、花等样品,洗净后,经乙醇擦拭及焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理,立即放入液氮中保存,带回实验室,于 -80°C 冰箱保存备用。

RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、Taq 酶、克隆载体 pMD 18-T Vector、质粒提取试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒、菌种 JM109、DNA 相对分子量标记, T4 DNA 连接酶、荧光定量试剂盒 SYBR Prime ScriptTM RT-PCR Kit 及电泳类试剂等,均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 鱼腥草地下茎、地上茎、叶片及花 RNA 提取方法按照 Trizol 试剂说明书进行,提取后进行电泳、纯度、浓度测定;并于 -80°C 保存备用。

1.2.2 cDNA 链合成 根据试剂盒说明书进行,反转录产物分离纯化后置于 -20°C 保存备用。

1.2.3 引物设计 通过分析鱼腥草高通量转录组数据,发现一个被注释为 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (*DXR*) 的转录本 (Unigene2525),同已报道的其他植物 *DXR* 基因的核苷酸序列 (AB294701、FJ459894、HQ874658、GQ921844、AY494186) 进行比对,应用 Oligo 6 软件设计引物。上游引物 *DXR*-F: 5'-ATGGCGTTGAGATTGCAGCTC-3'; 下游引物 *DXR*-R: 5'-TCAAGCAGCAACAGGACTTAG-3', 由生工生物工程 (上海) 股份公司合成。

1.2.4 PCR 扩增 反应体系和反应条件参照文献报道^[6],其中退火温度为 56°C 。

1.2.5 扩增片段的克隆测序、序列分析及 *DXR* 生

物信息学分析 对 PCR 产物进行回收,连接载体 pMD 18-T Vector,并转化感受态细胞 JM109,蓝白筛选后,过夜培养白色菌落,提取质粒并鉴定,然后送生工生物工程 (上海) 股份公司测序。采用 DNASTar 软件包分析与处理序列,在 NCBI 网站上 Blast 比对及 BioEdit 软件分析,并用 Mega6 软件^[7]进行 UPMAG 聚类分析。采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具对鱼腥草 *DXR* 基因编码蛋白的理化性质及结构与功能进行预测^[8-10]。

1.2.6 相对荧光定量 PCR 表达分析 利用实时荧光定量 PCR 的方法检测 *DXR* 基因在鱼腥草根 (地下茎)、茎 (地上茎)、叶、花中的相对表达量,采用美国 ABI7500 实时 PCR 检测系统,上游引物 *qDXR*-F 序列为: 5'-ATTAGTTGCCATTAAGAACG-3', 下游引物 *qDXR*-R 序列为: 5'-CAGTGACAGCATCAGGGT-3'。实时 PCR 检测的反应体系如下: $5\mu\text{L}$ $2\times\text{SYBR}^{\circledR}$ PremixEx TaqTM, 正反引物均为 $0.3\mu\text{L}$, cDNA 模板 $2\mu\text{L}$; 加 ddH₂O 至 $10\mu\text{L}$, 反应程序: 95°C 、3 min, 95°C 、10 s, 48°C 、20 s, 72°C 、30 s, 35 个循环,实时 PCR 反应以鱼腥草 18 S rDNA 为内参,18 S rDNA 序列设计引物 18 S-F: 5'-CCTCCGGCGTTGTTACTTTG-3' 和 18 S-R: 5'-CCCGACTGTCCCTGTAATCA-3', 每个反应重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 鱼腥草 *DXR* 基因克隆

以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板,用引物 *DXR*-F 和 *DXR*-R 进行 PCR 扩增。电泳检测发现约在 1 400 bp 处有一条亮带见图 1。对于扩增产物进行测序,其结果经 Blast 比对确定为鱼腥草 *DXR* 基因序列,经 ORF Finder 预测,该序列含有一个完整的开放阅读框,推测编码 471 个氨基酸,见图 2。

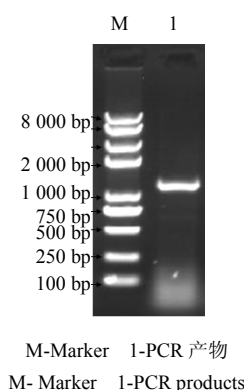


图1 鱼腥草 *DXR* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *DXR* in *H. cordata*

```

ATGGCGTTGAGATTGCAGCTCCAGCTGAAATTGGAAGTGTTCCTTTTCATGGATTCCGGA
M A L R L Q L P A E I G S V S F M D S G
AGATTGAATCGCCAGAACTCTCAAAGGAGAACTACGTTTCAGGACGAGGAGAGGAAATAA
R L N R Q N L K G E T T F R T R R G N K
ATGACATTTGTGAGGGGAGCGCGGTGTTCCGCGCAGGGACCTCTACCGGCTTGGCCTGGG
M T F V R G A R C S A Q G P L P A W P G
TGTGCTGTTCTGAGCCAGGCCGGAAGATATGGGATGGACCAAGCCGATCTCAATCGTT
C A V P E P G R K I W D G P K P I S I V
GGATCGACCGGTTCAATCGGAACACAGACACTGGACATAGTAGCTGAGAACCACATAAA
G S T G S I G T Q T L D I V A E N P H K
TTTGAGGTTGTTGCATTGGCTGCCGGTTCAAATGTGACTCTCCTTGGCGAGCAGGTCAA
F E V V A L A A G S N V T L L A E Q V K
ACCTTCAAACCTCGATTAGTTGCCATTAAGAACGAGTCTTTGATGAATGAATCAAAGAG
T F K P R L V A I K N E S L M N E L K E
GCTCTGTCTGATTGTGACCAACCACTGAGATCATCCAGGCGAGGAAGGTGTCGTAGAG
A L S D C D H K P E I I P G E E G V V E
GTCGCTCGACACCCGTGATGCTGTCACTGTGGTCACAGGCATAGTAGGATGTGCAGGTTG
V A R H P D A V T V V T G I V G C A G L
AGGCCAACTGTAGCTGCAATACAAGCAGGAAAAGACATAGCATTAGCTAACAAAGAGACC
R P T V A A I Q A G K D I A L A N K E T
TTGATTGGGGGGGTCCTTTTGTGCTTCTTGTCTCATAAACATAAAGTTAAATACTT
L I A G G P F V L P L A H K H K V K I L
CCTGCTGATTGAGAACATTCTGCCATATTCCAGTGATCCAAGGGTTGCCAGAAGGTGCA
P A D S E H S A I F Q C I Q G L P E G A
CTTAGACGCATCATATTAAGTGCATCTGGAGGCGCTTTCAGGGACTGGCCTGTTGAAAA
L R R I I L T A S G G A F R D W P V E K
CTGAAGGAAGTGAAAGTTGCTGATGCACTGAAGCATCCTAACTGGAATATGGGCAAAAG
L K E V K V A D A L K H P N W N M G K K
ATTACTGTTGACTCAGCCACTCTTTTCAACAAGGGTCTGGAAGTCATTGAAGCTCACTAT
I T V D S A T L F N K G L E V I E A H Y
CTGTTTGGGGCTGAGTATGATGATATTGAGATTGTGATTCACCCACAGTCAATTATTCAT
L F G A E Y D D I E I V I H P Q S I I H
TCGATGATTGAGACACAGGATTCTTCAAGTTTGGCCCACTGGGATGGCCGGACATGCGT
S M I E T G D S S V L A Q L G W P D M R
CTACCAATTCTTTACACATTATCATGGCCAGAAAGAATATACTGTTCTGAGATAACCTGG
L P I L Y T L S W P E R I Y C S E I T W
CCTCGCCTTGACCTTTGCAAGCAGGGCTCTCTAACCTTTAAAGCTCCTGATAATGTGAAA
P R L D L C K Q G S L T F K A P D N V K
TATCCTTCCATGGATCTTGCTTATCTGCTGGACGAGCTGGAGGTACCATGACTGGAGTG
Y P S M D L A Y S A G R A G G T M T G V
CTTAGTGCTGCGAATGAGAAAGCTGTTGAGATGTTTCATTAAACGAGAAATCAACTATCTG
L S A A N E K A V E M F I N E K I N Y L
GACATATTCAAGATTGTGGAGCTAACGTGTGATAAACATAGGTCAGAACTCATCGCCAAC
D I F K I V E L T C D K H R S E L I A N
CCTTCGCTGGAGGAGATCGTGCAATTACGATTTGTGGGCTCGAGACTATGCTGCTAGTTTG
P S L E E I V H Y D L W A R D Y A A S L
CAACCCACTTCTGGTCTAAGTCTGTTGCTGCTTGA
Q P T S G L S P V A A *

```

划实线部分为 NADPH 结合基序；划虚线部分为 DXR 结合基序

NADPH binding motif segment was marked with full line, DXR binding motif segment was marked with imaginary line

图2 鱼腥草 DXR 基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleic acid sequence and supposed amino acid sequence of DXR gene in *H. Cordata*

2.2 鱼腥草 DXR 基因编码蛋白特性分析

2.2.1 理化性质与细胞定位 鱼腥草 DXR 基因预测编码 471 个氨基酸，利用 ExPASy 在线软件对其蛋白的理化性质进行预测分析。推测其分子式为 $C_{2298}H_{3668}N_{624}O_{671}S_{18}$ ，相对分子质量是 51 351.2，等电点 (pI) 为 6.33。该蛋白的不稳定系数 (instability index) 为 39.16，属于稳定蛋白质。脂肪系数 (aliphatic index) 为 96.54，亲水性系数 (grand average

of hydropathicity) 为 -0.064，该蛋白不含信号肽和跨膜区。鱼腥草 DXR 蛋白定位于叶绿体上，分值为 0.651，可靠性为 III 级。

2.2.2 鱼腥草 DXR 蛋白的二级结构及三级结构预测 预测 DXR 蛋白的二级结构见图 3，该蛋白的二级结构中 α -螺旋占 36.94%、 β -折叠占 7.01%、无规则卷曲占 38.22%、自由延伸占 17.83%。由 SWISS-MODEL 预测 DXR 的三级结构见图 4。

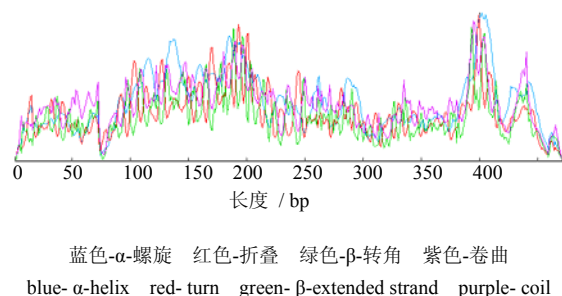


图 3 DXR 蛋白二级结构预测图

Fig. 3 Predicted secondary structure of DXR protein



图 4 DXR 蛋白三级结构预测图

Fig. 4 Predicted tertiary structure of DXR protein

2.3 鱼腥草 DXR 氨基酸序列的同源性及其亲缘关系分析

推导氨基酸序列比较结果表明, 鱼腥草 DXR 与阳春砂 (ACS26204)、橡胶树 (AAS94121)、麻风树 (AHL17584)、山胡椒 (AAY87151)、丹参 (ABJ80680)、甜叶菊 (ACI45244)、喜树 (ABC86579)、大麦 (CAE47438)、银杏 (AAR95700) 和大豆 (AEB91529) 的 DXR 蛋白质分子的相似度分别为 86.1%、84.6%、84.6%、83.0%、81.3%、80.9%、80.5%、80.2%、79.2% 和 74.7%, 表明 DXR 氨基酸序列同源性高, 进化过程中比较保守。UPMAG 聚类分析表明, 鱼腥草与阳春砂亲缘关系最近, 与大豆亲缘关系最远, 见图 5。

2.4 鱼腥草 DXR 基因的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 DXR 基因在地下茎、地上茎、叶、花等器官中的表达特异性, 结果表明该基因在叶中的表达量最高, 其次是地下茎, 再次是地上茎, 花的表达量最低 (图 6)。

3 讨论

萜类化合物是绝大部分中药材的重要药用成分, DXR 在萜类化合物合成 MEP 途径中发挥重要

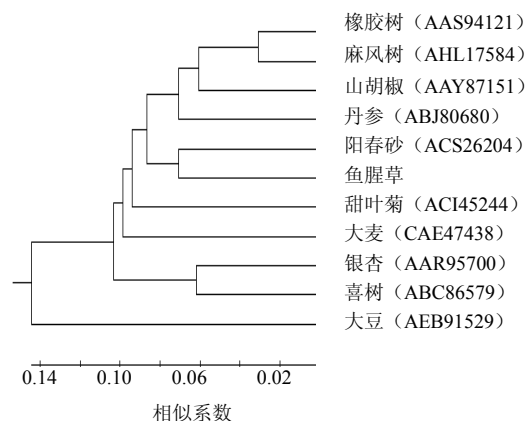


图 5 鱼腥草与其他植物 DXR 的 UPGMA 进化树

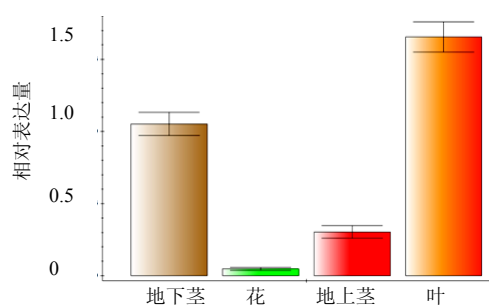
Fig. 5 UPGMA cladogram of DXR of *H. cordata* and other plants

图 6 鱼腥草不同组织中 DXR 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative quantity of DXR expression in different tissues

作用。由于 DXP 是硫胺素 (vitamin B1) 和吡哆醇 (vitamin B6) 生物合成的前体物质, 被 DXR 催化生成 MEP, 此还原反应需要 NADPH 和 Mg^{2+} 等二价金属离子参与, 该过程体现了 DXR 属于 B 类脱氢酶^[11]。不同植物 DXR 通常含有相同的功能域: 即 LPADSEHSAI 和 NKGLEVIEAHY 2 个 DXR 结合区, 以及 GSTGS (I/V) GT 和 LAAGSN (V/I) 两个 NADPH 结合区, 这些结合区中具有 DXR 活性所必需的多肽位点, 在 DXR 催化过程中发挥重要作用^[2,12-13]。研究证明, DXR 是 MEP 途径的关键调控靶点, 在薄荷^[14]转基因植株中 DXR 过表达增加了挥发油中单萜类化合物的量; Tomohisa 等^[15]证明长春花中上调 DXR 基因表达明显增加单萜吲哚生物碱的量; Yortytot 等^[16]证明野生型橡胶 DXR 表达水平远远低于高产胶橡胶无性系。在药用植物中, DXR 作为萜类化合物合成途径中的关键酶, 其活性高低与量的多少决定着许多药用活性成分产量的多少。如何利用 DXR 的表达提高药

用活性成分在植株中的量,将成为提高中药材品质的有效手段。

本研究利用 RT-PCR 技术首次克隆了鱼腥草 DXR 基因的全长 cDNA 序列,其完整开放阅读框为 1 416 bp,编码 471 个氨基酸。对推导的氨基酸序列的结构和功能进行生物信息学分析,发现其氨基酸序列长短与其他植物相近,与其他植物一样,同样 DXR 蛋白质共有的结合域:2 个 DXR 结合域 (LPADSEHSAI 和 NKGLEVIEAHY,图 2 中虚线标示),两个 NADPH 结合域 [GSTGS (I/V) GT 和 LAAGSN (V/I),图 2 中实线标示],暗示鱼腥草 DXR 蛋白质功能与其他植物的功能相类似——催化前体 DXP 发生分子重排并在 NADPH 和二价金属离子参与下进行还原反应生成 MEP。推测该反应可能是鱼腥草植株萜类化合物 MEP 合成途径中“碳流”分配的重要调控靶点。不同植物中 DXR 蛋白质行使相似的功能,说明不同植物的 DXR 分子结构可能十分相似,从鱼腥草 DXR 氨基酸序列与其他植物的 DXR 同源性比较得到的结果,发现该蛋白在不同物种进化过程中十分保守,也提示 DXR 蛋白质在不同植物生命活动过程中所发挥的作用基本相似。

本研究结果将为进一步构建鱼腥草 DXR 基因过表达载体和遗传转化体系,为实现重要药用活性成分在植株中高效表达,为开展鱼腥草及类似以萜类化合物为主要药用活性成分植物药的药材品质改善奠定基础。

参考文献

- [1] 伍贤进. 鱼腥草种质资源与规范化栽培技术研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [2] Krueawan Y, Seiji T, Atiya R, et al. cDNA, from hevea brasiliensis latex, encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase [J]. *Plant Sci*, 2008, 175: 694-700.
- [3] 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.
- [4] 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(3): 234-240.
- [5] Wu S J, Shi M, Wu J Y, et al. Cloning and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene for diterpenoid tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage) hairy roots [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52(PT1): 89-95.
- [6] 付明, 魏麟, 余娟, 等. 显齿蛇葡萄查耳酮合成酶基因 cDNA 克隆及蛋白质序列分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(1): 85-89.
- [7] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [8] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195-201.
- [9] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 3381-3385.
- [10] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2714-2723.
- [11] Aengus M S, Roland L, Roberta P M F, et al. The crystal structure of *E. coli* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation [J]. *J Mol Biol*, 2005, 345: 115-127.
- [12] 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.
- [13] 李嵘, 王喆之. 植物萜类合成酶 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶的分子结构特征与功能预测分析 [J]. *植物研究*, 2007, 27(1): 59-67.
- [14] 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.
- [15] Tomohisa H, Shinya T, Shunsuke H, 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.
- [16] Yortyot S, Thomas D S, Wallie S. 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.