

## 厚朴 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶基因的鉴定及挥发油成分分析

查良平<sup>1,2</sup>, 杨健<sup>2</sup>, 刘爽<sup>2</sup>, 赵玉洋<sup>2</sup>, 袁媛<sup>2\*</sup>, 黄璐琦<sup>2\*</sup>, 余淑琳<sup>2</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 中国中医科学院中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

**摘要:** 目的 在厚朴转录组测序基础上, 对厚朴 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (DXS) 基因 DXS1 (MoDXS1) 和厚朴 DXS2 (MoDXS2) 基因进行全面的生物信息学分析。方法 利用生物信息学方法对厚朴 MoDXS1 和 MoDXS2 基因编码氨基酸序列的理化特性、亲/疏水性、功能域、二级结构、三级结构和系统发育进化等进行分析 and 预测; 采用实时荧光定量 PCR 分析厚朴 MoDXS1 和 MoDXS2 基因的相对表达量。结果 MoDXS1 和 MoDXS2 均为不稳定的亲水蛋白, 蛋白结构域分析显示 MoDXS1、MoDXS2 与其他植物的 DXS 基因有很高的同源性; 二级结构均为混合型结构的蛋白质,  $\alpha$ -螺旋是所有基因多肽链中大量的结构元件, 利用同源建模法对三级空间结构进行了预测; 同源序列对比显示 MoDXS 家族与烟草、丹参和拟南芥的 DXS 蛋白具有较高的同源性; 系统进化树分析表明 MoDXS1 与其他被子植物亲缘关系较近, 但 MoDXS2 单独聚为一支; 实时荧光定量 PCR 结果显示 DXS1 在厚朴与凹叶厚朴间无显著差异, 但 DXS2 在凹叶厚朴中的表达量要明显高于厚朴; GC-MS 检测结果表明, 3 种指标性成分  $\beta$ -石竹烯、 $\beta$ -氧化石竹烯和  $\beta$ -桉叶油醇在凹叶厚朴皮或叶中的量均高于厚朴。结论 本研究结果为解析厚朴萜类次生代谢调控机制奠定了理论基础。

**关键词:** 厚朴; DXS 合成酶; 转录组; 萜类; 生物信息学

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)24-3734-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.024.021

## Identification of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase and analysis on essential oil in *Magnolia officinalis*

ZHA Liang-ping<sup>1,2</sup>, YANG Jian<sup>2</sup>, LIU Shuang<sup>2</sup>, ZHAO Yu-yang<sup>2</sup>, YUAN Yuan<sup>2</sup>, HUANG Lu-qi<sup>2</sup>, YU Shu-lin<sup>2</sup>

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

**Abstract: Objective** Based on the data of transcriptome sequencing of *Magnolia officinalis*, MoDXS1 and MoDXS2 genes were completed in detail by using bioinformatics methods. **Methods** MoDXS1 and MoDXS2 genes were analyzed and predicted by the tools of bioinformatics in the following aspects: physical and chemical characteristics of amino acid sequences, function domain, hydrophobicity or hydrophilicity, secondary structure and tertiary structure of protein, molecular phylogenetic evolution, and so on; The expression levels of MoDXS1 and MoDXS2 were identified by real-time PCR. **Results** ORF Finder indicated that MoDXS1 and MoDXS2 genes were full-length, and they all were unstable hydrophobic proteins; Structural domain of MoDXS1 and MoDXS2 showed high homology with other plants; The secondary structures all were hybrid architecture, and alpha helices were the major motifs, tertiary structure of protein was predicted by Homology modeling; Sequence alignment that MoDXS family had relative close relationship to the DXS of *Nicotiana tabacum*, *Salvia miltiorrhiza*, and *Arabidopsis thaliana*; The results of evolutionary relationship analysis showed that MoDXS1 had relative close relationship to angiosperm, but MoDXS2 was clustered in a clade solely; The expression levels of DXS1 in *M. officinalis* and *M. officinalis* var. *biloba* were not significantly different, but the expression level of DXS2 in *M. officinalis* var. *biloba* was higher than that in *M. officinalis*. By applying the technique of GC-MS, the contents of major volatile components  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -caryophyllene oxide, and  $\beta$ -eudesmol in *M. officinalis* var. *biloba* are higher than those in *M. officinalis*. **Conclusion** The results provide theoretical reference for studies on secondary metabolic regulation in terpenoid of *M. officinalis*. **Key words:** *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.; 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate; transcriptome; terpenoids; bioinformatics

收稿日期: 2015-07-07

基金项目: 国家“863”计划项目 (SS2014AA022201)

作者简介: 查良平, 博士研究生。E-mail: chaliangliang520@126.com

\*通信作者 袁媛 E-mail: y\_yuan0732@163.com;

黄璐琦 Email: huangluqi01@126.com

《中国药典》2010年版<sup>[1]</sup>记载厚朴来源于木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *M. officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮。厚朴分布于全国地区多个省区,不同产区的厚朴品质不一,以川朴(主产鄂、川)品质最优、温朴(主产闽、浙)次之<sup>[2]</sup>。厚朴的主要成分为厚朴酚等酚类、挥发油及生物碱,其挥发油中含有多种有效成分且被分离鉴别出来<sup>[3]</sup>。厚朴挥发油具有镇静和驱风健胃作用,其中以桉叶油醇以及其异构体的量最高,占挥发油总量的40%~50%<sup>[4]</sup>,属于萜类化合物。

萜类化合物的生物合成途径主要有2条,一条途径是位于胞质中的甲羟戊酸途径(MVA pathway)<sup>[5]</sup>;另一条途径是位于质体中的甲基-D-赤藓醇-4-磷酸途径(MEP pathway)<sup>[6-7]</sup>。在MEP途径中,1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS)为第一个限速酶,是单萜和双萜类芳香物质、类胡萝卜素(四萜)、VE和叶绿素等重要物质合成的关键调控位点。前人研究发现过度表达DXS基因,拟南芥植株中类胡萝卜素、VE、ABA和GAs等萜类物质质量显著上升<sup>[8]</sup>,证明了DXS基因在通过MEP途径提供前体的萜类的生物合成中起着重要作用。目前银杏<sup>[9]</sup>、黄花蒿<sup>[10]</sup>、穿心莲<sup>[11]</sup>和丹参<sup>[12]</sup>等药用植物中的DXS基因均有报道。本研究通过厚朴转录组数据首次得到厚朴DXS1、DXS2基因序列,通过生物信息学分析对其结构进行分析,采用实时荧光定量PCR比较了2种基因在厚朴与凹叶厚朴中的表达差异,并通过GC-MS测定了厚朴与凹叶厚朴中挥发性成分的量,为揭示厚朴DXS基因调控萜类次生代谢产物的生物合成机制提供可靠的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

Trace 1310 TSQ 8000 气相质谱仪(美国 Thermo Scientific™ 公司); $\beta$ -石竹烯(质量分数 $\geq 98\%$ )、 $\beta$ -氧化石竹烯(质量分数 $\geq 95\%$ )和 $\beta$ -桉叶油醇(质量分数 $\geq 98\%$ )对照品均购自美国 Acros Organics 公司;其余试剂均为分析纯。

供试材料来源于安徽省安庆潜山县,经中国中医科学院中药资源中心金艳助理研究员鉴定为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *M. officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils.。

### 1.2 基因数据获取

厚朴 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS)基因序列来源于厚朴转录组数据(本实验室保存),经冗余序列去除、序列组装,功能注释后分类。实验中其他物种的氨基酸序列均来自于 GenBank 数据库。

### 1.3 分析方法

使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找开放阅读框(ORF)。利用在线工具 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 预测基因编码蛋白的相对分子质量、氨基酸数目、等电点、不稳定系数、脂肪指数、亲水性/疏水性和编码区全长等理化性质;采用 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质结构域分析;采用 CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>) 进行蛋白质二级结构分析;利用 Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 程序,根据基因氨基酸序列进行建模,预测蛋白质的三级结构。用 DNAMAN 软件对序列进行多重比对,用 ClustalW 软件与其他植物的氨基酸序列进行比较,用 MEGA 6.06 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树,bootstrap 重复次数为 1 000 次。

### 1.4 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 Trizol 法从厚朴和凹叶厚朴叶中提取总 RNA,琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 完整性。ND2000 测定总 RNA 的  $A_{260}$  和  $A_{280}$  值,选择  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8~2.0 的总 RNA 进行反转录。用所提取的总 RNA 经 TaKaRa 反转录试剂盒(TaKaRa Prime Script™ 1st strand cDNA Synthesis Kit)反转录成 cDNA。其过程为:总 RNA 模板 1  $\mu\text{L}$  (约 200 ng), dNTP 1  $\mu\text{L}$ , Radom 6 Mers 2  $\mu\text{L}$ , RNase free  $\text{H}_2\text{O}$  至 10  $\mu\text{L}$ , 离心,置于 PCR 仪上,65  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,之后冰上急冷。然后加入如下反应液:5 $\times$ Primer Script Buffer 4  $\mu\text{L}$ , RNase Inhibitor 0.5  $\mu\text{L}$ , PrimeScript RTase 1  $\mu\text{L}$ , RNase free  $\text{H}_2\text{O}$  4.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 条件为 30  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 42  $^{\circ}\text{C}$ 、60 min, 70  $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  维持,然后直接用于实时荧光 PCR 扩增或 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.5 Real-time PCR

从转录组中数据中获取厚朴内参照  $\beta$ -actin 和 DXS1、DXS2 的核苷酸序列,利用 Primer Premier 5.0 设计实时荧光定量引物,扩增产物长度在 100~250 bp,送由生工生物工程(上海)公司合成,引物序

列见表1。反应体系: 5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SYBR green, 0.2  $\mu\text{L}$  ROX Reference Dye, 0.2  $\mu\text{L}$  引物 F, 0.2  $\mu\text{L}$  引物 R, 1.0  $\mu\text{L}$  cDNA, 3.4  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 、34 s, 40 个扩增循环; dissociation stage。在罗氏 LightCycler<sup>®</sup> 480 荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量, 结束后分析溶解曲线。各基因表达量以内参基因  $\beta$ -actin 作为标准进行相对定量, 每个反应重复 3 次, 相对定量方法采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法分析结果。

表1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Real-time PCR primers

| 引物名称             | 引物序列(5'-3')            |
|------------------|------------------------|
| DXS1-F           | AACAGCATGGTTTGCAGATAAC |
| DXS1-R           | GATCAGGACCTCGTGTGATTAG |
| DXS2-F           | TCTTGCAGAGGGCAAGAATG   |
| DXS2-R           | ACTGTCACCTGAATGCCAAG   |
| $\beta$ -actin-F | GAATCCACGAGACCACATACA  |
| $\beta$ -actin-R | GAACCACCACTCAGCACTAT   |

## 1.6 厚朴中挥发性成分的测定

**1.6.1 色谱条件** 采用 TraceGOLD<sup>TM</sup> TG-5MS 气相色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ; Thermo Scientific<sup>TM</sup>, 美国), 程序升温 (初始温度 80  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 2 min; 以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 100  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 2 min; 再以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 250  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 16 min)。载气为氦气, 体积流量 0.7 mL/min; 进样量 1  $\mu\text{L}$ , 分流比 18.5:1, 进样口温度 250  $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件: 离子源为 EI; 电离电压: 70 eV; 离子源温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ; 溶剂延迟时间 3 min; 质谱范围  $m/z$  40~400; 扫描周期 0.3 scan/s。

**1.6.2 挥发性成分测定** 分别精密称取各对照品适量, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加正己烷溶解并稀释至刻度, 作为混合对照品储备液。取上述混合对照品溶液, 稀释成系列质量浓度, 按“1.6.1”项下条件测定, 以对照品质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 对照品峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 绘制标准工作曲线, 以对照品峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 得到回归方程分别为  $\beta$ -石竹烯  $Y=1.54\times 10^6 X-2.06\times 10^7$ ,  $r=0.999\ 5$ , 线性范围 100.0~800.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $\beta$ -氧化石竹烯  $Y=1.05\times 10^6 X+5.62\times 10^6$ ,  $r=0.999\ 7$ , 线性范围 100.0~800.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $\beta$ -桉叶油醇  $Y=2.06\times 10^6 X-6.50\times 10^7$ ,  $r=0.999\ 2$ , 线性范围 100.0~800.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

取干燥的样品粉末 100 g, 精密称定, 加蒸馏水 1 000 mL, 浸泡 4 h, 按《中国药典》2010 年版一部附录 XD 挥发油测定法甲法<sup>[1]</sup>提取挥发油。精密吸取经无水硫酸钠干燥的样品挥发油 0.20 mL 置 10 mL 棕色量瓶中, 以正己烷稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。按“1.6.1”项下条件进行 GC-MS 分析, 以外标法计算各挥发性成分量。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白质理化性质和结构域分析

从厚朴转录组数据中获得 MoDXS 2 条。ORF Finder 预测表明 MoDXS1 基因全长为 2 031 bp, MoDXS2 基因全长为 2 160 bp。ProtParam 蛋白理化特性预测, 结果表明 MoDXS1 基因编码氨基酸为 677 aa, 蛋白相对分子质量为 72 790, 理论等电点 (PI) 为 7.15, 脂肪指数 87.75; MoDXS2 编码氨基酸为 720 aa, 蛋白相对分子质量为 78 060, PI 为 6.15, 脂肪指数 91.57。MoDXS1、MoDXS2 均为不稳定的亲水蛋白。

利用 NCBI 的 Conserved domains 在线工具分析 MoDXS1 和 MoDXS2 蛋白的功能结构域。结果表明 MoDXS1 和 MoDXS2 都为多结构域蛋白, 其结构域分属于 TPP 酶家族、PYR-TPP 酶家族以及转酮醇酶-C 家族, 并包括 2 个 TPP 结合基序、PYR/PP 接触面和二聚体接触面等功能结构 (图 1)。

### 2.2 二级结构和三级结构预测

根据厚朴 MoDXS1、MoDXS2 基因的氨基酸序列, 利用 CFSSP 在线生物学工具预测多肽链中氨基酸序列的二级结构 (图 2)。结果显示, MoDXS1 的  $\alpha$ -螺旋在多肽链中共有 442 个 (65.3%),  $\beta$ -转角为 252 个 (37.2%), 延伸链共计 87 个 (12.9%); MoDXS2 的  $\alpha$ -螺旋在多肽链中共有 503 个 (69.9%),  $\beta$ -转角共计 445 个 (61.8%), 延伸链共计 88 个 (12.2%)。

使用 ExPASy 在线服务器的 SWISS-MODEL Homology Modeling 对 MoDXS1、MoDXS2、MoGCPE 和 MoLYTB 蛋白进行同源建模, 得到了蛋白的三维空间模型, 如图 3 所示。ExPASy structure assessment 程序评测推导, MoDXS1 蛋白模型 2o1s.1.A 得分为 0.86, 蛋白序列的相似性为 50.09%; MoDXS2 蛋白模型 2o1s.1.A 得分为 0.83, 蛋白序列的相似性为 43.19%。

### 2.3 DXS 蛋白家族同源序列对比

用 DNAMAN 软件对 MoDXS 蛋白家族和拟南

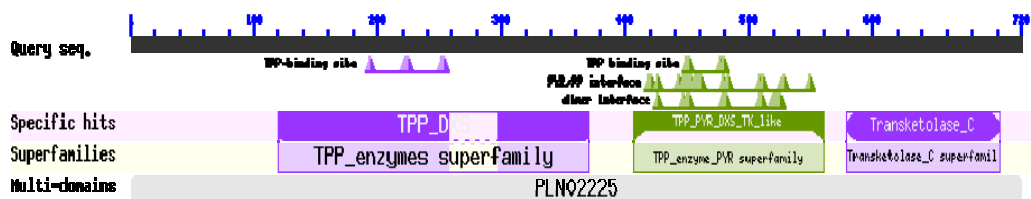


图 1 蛋白功能结构域分析

Fig. 1 Conserved domains analysis of deduced proteins

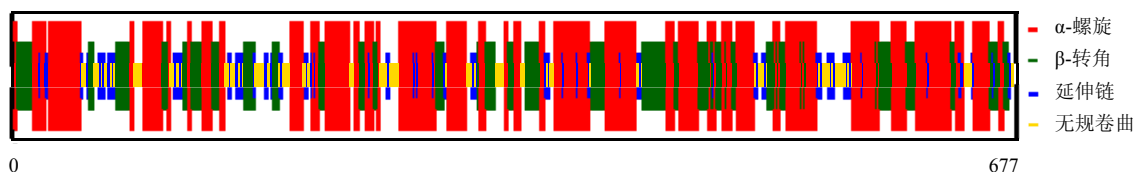


图 2 氨基酸结构中二级结构预测

Fig. 2 Predicted secondary structure of deduced proteins



图 3 蛋白三级结构预测

Fig. 3 Predicted tertiary structure of deduced proteins

芥 *Arabidopsis thaliana* (NP\_193291.1)、烟草 *Nicotiana tabacum* (CBA12009.1)、丹参 *Salvia miltiorrhiza* (ACF21004.1) 的氨基酸序列进行多序列对比, 不同物种 DXS 编码序列的结果如图 4 所示。分析表明 MoDXS1 与 MoDXS2 氨基酸序列均包含植物 DXS 蛋白典型的 TPP 结合基序、嘧啶结合基序和转酮醇酶 C 末端基序等 3 个保守基序, 与其他 3 种植物烟草、丹参和拟南芥 DXS 家族具有很高的同源性。结果表明 25 个 DXS 活性位点中出现 14 个不完全保守的氨基酸位点, 5 种同源 DXS 序列多重比对后相同的氨基酸位点有 346 个, MoDXS1 与 MoDXS2 之间相同的位点有 383 个。

#### 2.4 系统进化树分析

将 MoDXS1、MoDXS2 与 GenBank 中的其他植物的同源蛋白进行比对, 在软件 MEGA 6.06 平台上采用相邻连接法构建进化树, 进行聚类关系分析。结果如图 5, 从进化树中可以得知 MoDXS1 在进化树中与黄花蒿 *Artemisia annua* L. 亲缘关系最近, 可信度达 38%, 其次与唇形科的丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge、穿心莲 *Andrographis paniculata*

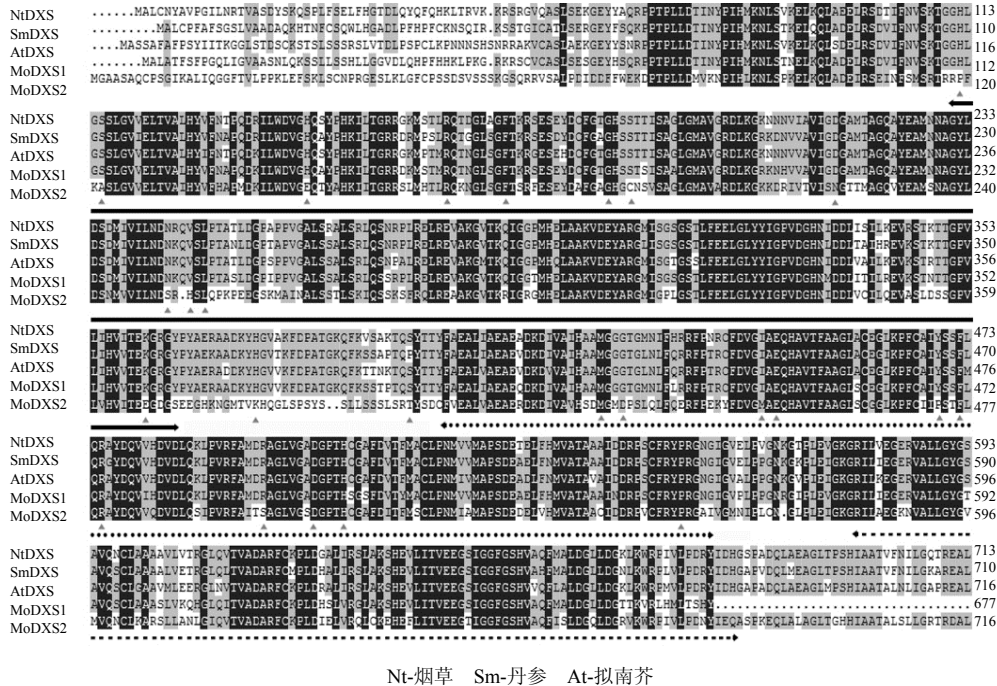
(Burm. f.) Nees 亲缘关系最近, 与其他被子植物聚为一个大的分支, 但 MoDXS2 单独聚为一支。

#### 2.5 基因表达分析

采用 Real-time PCR 分别分析了厚朴和凹叶厚朴叶中 DXS1、DXS2 基因的表达差异情况。结果显示, DXS1 和 DXS2 在厚朴与凹叶厚朴叶中均有明显表达, 其中 DXS1 在厚朴和凹叶厚朴中表达差异不明显, 但表达量均低于 DXS2; 而 DXS2 在凹叶厚朴中的表达量要明显高于厚朴。结果见图 6。

#### 2.6 厚朴中挥发性成分的分析

$\beta$ -石竹烯、 $\beta$ -氧化石竹烯和  $\beta$ -桉叶油醇为厚朴叶和皮中的重要挥发性成分, 占其总挥发油的 50% 以上<sup>[4,13]</sup>, 故选择其作为指标性成分, 对采自安徽潜山的厚朴、凹叶厚朴叶和皮进行测定, 结果见表 2。从表 2 中可以看出, 在厚朴与凹叶厚朴的叶中, 均是  $\beta$ -石竹烯 >  $\beta$ -氧化石竹烯 >  $\beta$ -桉叶油醇; 在厚朴与凹叶厚朴的皮中, 均是  $\beta$ -石竹烯 >  $\beta$ -桉叶油醇 >  $\beta$ -氧化石竹烯, 且  $\beta$ -石竹烯量明显高于其他 2 种成分。此外, 3 种指标性成分在凹叶厚朴皮或叶中的量均高于厚朴。



Nt-烟草 Sm-丹参 At-拟南芥

Nt-Nicotiana tabacum Sm-Salvia miltiorrhiza At-Arabidopsis thaliana

图 4 MoDXS 氨基酸序列与同源序列的多重比对

Fig. 4 Multiple alignment of putative amino acids sequence of MoDXS with those of cloned DXS involved in other plants

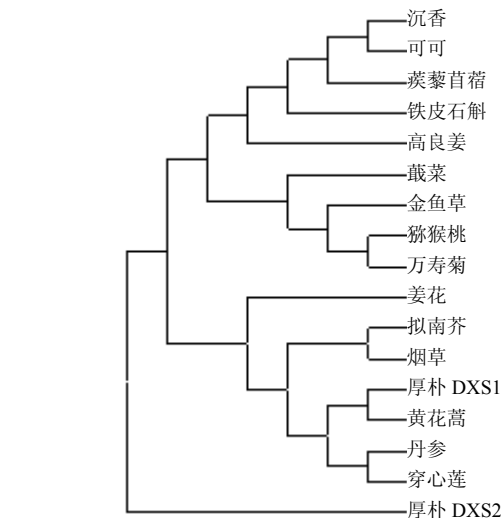


图 5 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of amino acid sequences

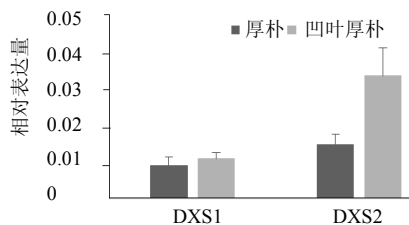


图 6 厚朴和凹叶厚朴中 DXS1 和 DXS2 的表达水平比较

Fig. 6 Expression levels of DXS1 and DXS2 between *M. officinalis* and *M. officinalis* var. *biloba*表 2 厚朴及凹叶厚朴中挥发性成分的测定 ( $n=3$ )Table 2 Determination of volatile components in *M. officinalis* and *M. officinalis* var. *biloba* ( $n=3$ )

| 药材       | 质量分数/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |                |               |
|----------|------------------------------------------|----------------|---------------|
|          | $\beta$ -石竹烯                             | $\beta$ -氧化石竹烯 | $\beta$ -桉叶油醇 |
| 厚朴 (叶)   | 17.06                                    | 16.02          | 15.65         |
| 凹叶厚朴 (叶) | 17.52                                    | 16.09          | 15.79         |
| 厚朴 (皮)   | 56.32                                    | 17.81          | 24.56         |
| 凹叶厚朴 (皮) | 62.63                                    | 18.08          | 27.54         |

## 3 讨论

厚朴为重要的药、食两用经济树种, 药用成分挥发油类多以倍半萜类为主, 如桉叶油醇、聚伞花素等。本研究首次对厚朴萜类合成 MEP 途径中的 DXS 基因家族进行了生物信息学和基因表达水平分析。ORF Finder 预测表明 MoDXS1 和 MoDXS2 基因均为全长; 蛋白结构域分析显示 MoDXS1、MoDXS2 与其他植物的 DXS 基因有很高的同源性; 利用同源建模法对厚朴的 DXS 基因进行分析, 预测了其整体空间结构; 同源序列对比显示 MoDXS 家族中的 MoDXS1、MoDXS2 与拟南芥、烟草和丹参的 DXS 蛋白具有较高的同源性; 系统进化树聚类分析显示 MoDXS1 与其他被子植物亲缘关系较近, 但 MoDXS2 单独聚为一支。

本研究通过实时荧光定量 PCR 对厚朴与凹叶

厚朴中的 DXS 基因进行了表达差异分析, 其中 DXS1 基因在二者之间无显著差异, 表达量均很低, 但是 DXS2 基因在凹叶厚朴中的表达量要明显高于厚朴。在荧光定量的基础上, 通过 GC-MS 对厚朴与凹叶厚朴皮和叶中的 3 种挥发性成分进行测定, 结果表明凹叶厚朴的皮和叶中  $\beta$ -石竹烯、 $\beta$ -氧化石竹烯和  $\beta$ -桉叶油醇量均高于厚朴, 这正好与 DXS2 基因在凹叶厚朴中的表达量要明显高于厚朴结果相吻合。一般认为萜类成分差异与萜类合成途径关键酶的表达是有直接关系的, 因此厚朴和凹叶厚朴 DXS2 基因表达的差异可能会影响到其萜类成分前体 IPP 的合成, 进而影响萜类成分的生成。目前很多植物中均发现 DXS 的编码是由一个多基因家族组成, Walter 等<sup>[14]</sup>从疾黎苜蓿宿分离鉴定了 DXS 的 3 个 cDNA 序列, 这 3 个 cDNA 序列种的其中 2 个构建的原核表达产物具有 DXS 活性。拟南芥基因组<sup>[15-16]</sup>测出有 3 个 DXS 基因, 但实验证明只有 1 个 DXS 蛋白有功能。因此对于厚朴和凹叶厚朴中 DXS1 和 DXS2 基因表达差异原因以及功能验证, 有待于进一步深入研究。

植物功能基因的发掘和鉴定可以为基因育种、植物产量、品质和抗性改良开拓出广阔的前景。本研究结果显示了厚朴萜类物质生物合成 MEP 途径 DXS 基因结构和表达的多样性, 为深入探究 DXS 在厚朴萜类合成中所发挥的功能提供了一定参考。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 郁重彦. 厚朴药材品质差异评价及遗传稳定性研究 [D]. 临安: 浙江林学院, 2007.
- [3] 何小珍, 蒋军辉, 徐小娜, 等. GC-MS 联用技术分析厚朴挥发油化学成分 [J]. 应用化工, 2012, 41(2): 352-357.
- [4] 李玲玲. 厚朴挥发油化学成分研究 [J]. 中草药, 2001, 32(8): 686-687.
- [5] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 1995, 46(1): 521-547.
- [6] Banerjee A, Sharkey T D. Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation [J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(8): 1043-1055.
- [7] 高伟. 丹参酮类化合物生物合成相关酶基因克隆及功能研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2008.
- [8] Juan M E, Araceli C, Andreas R, et al. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 22901-22909.
- [9] Gong Y, Liao Z, Guo B, et al. Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. *Planta Med*, 2006, 72(4): 329-335.
- [10] Arsenault P R, Vail D R, Wobbe K K, et al. Effect of sugars on artemisinin production in *Artemisia annua* L.: transcription and metabolite measurements [J]. *Molecules*, 2010, 15(4): 2302-2318.
- [11] Yang D, Ma P, Liang X, et al. PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Physiol Plant*, 2012, 146(2): 173-183.
- [12] Sharma S N, Jha Z, Sinha R K, et al. Jasmonate-induced biosynthesis of andrographolide in *Andrographis paniculata* [J]. *Physiol Plantarum*, 2015, 153(2): 221-229.
- [13] 李星彩. 厚朴叶挥发油化学成分分析及其抗菌活性研究 [J]. 食品科技, 2013, 16: 271-275.
- [14] Walter M H, Hans J, Strack D. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots [J]. *The Plant J*, 2002, 31(3): 243-254.
- [15] Estévez J M, Cantero A, Romero C, et al. Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124(1): 95-104.
- [16] Rodríguez-Concepción M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(3): 1079-1089.