

• 药材与资源 •

铁皮石斛 HDS 基因的克隆与初步表达分析

王翔, 吴林松, 吴秋菊, 林毅, 蔡永萍, 樊洪泓*

安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

摘要: 目的 从铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 中克隆 4-羟基-3-甲基-2-E-丁烯基-1-焦磷酸合成酶 (4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase, HDS) 基因, 在大肠杆菌中诱导融合蛋白, 并探究该基因在铁皮石斛不同组织中的表达规律。方法 采用 RT-PCR 和 RACE 等方法获取铁皮石斛 HDS (DoHDS) 的 cDNA 全长, 利用相关软件和在线网站进行生物信息学分析, 使用 Real-Time PCR 分析 DoHDS 在不同组织的表达特征, 构建原核表达载体 pET-28a (+)-DoHDS, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行诱导表达。结果 成功获得 DoHDS 的 cDNA 全长序列, GenBank 登录号为 KJ161312, 全长 2 666 bp, ORF 为 2 238 bp, 编码 745 个氨基酸。DoHDS 在各组织中均有表达, 在茎中表达量最高, 为原球茎的 5 倍; SDS-PAGE 结果显示诱导产物为 1 个相对分子质量 (82 700) 与理论值相符的融合蛋白。结论 克隆了 DoHDS 的 cDNA 全长序列, 探究其在不同组织中的表达模式, 建立了原核表达体系, 为后续研究 DoHDS 的功能提供了一定的理论基础。

关键词: 铁皮石斛; 4-羟基-3-甲基-2-E-丁烯基-1-焦磷酸合成酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)05-0803-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.020

Cloning and preliminary expression analysis on HDS gene in *Dendrobium officinale*

WANG Xiang, WU Lin-song, WU Qiu-ju, LIN Yi, CAI Yong-ping, FAN Hong-hong

School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: Objective To clone the 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (HDS) gene from *Dendrobium officinale*, induce fusion protein in *Escherichia coli*, and explore the regular pattern about HDS gene in different tissues of *D. officinale*. **Methods** RT-PCR and RACE technologies were used to clone the full-length cDNA of *DoHDS*. Using relevant softwares and online sites to analyze bioinformatics. Then the expression patterns of DoHDS were studied by real-time PCR. Constructing prokaryotic expression vector pET-28a (+)-DoHDS to induce the expression protein in *E. coli* BL21 (DE3). **Results** The DoHDS gene was successfully obtained (GenBank accession number KJ161312), the full-length cDNA was 2 666 bp and ORF was 2 238 bp, coding the protein containing 745 amino acids. Relative real-time PCR analysis indicated that DoHDS showed the higher transcript abundance in the stems, 5 fold higher than protocorm-like bodies. The SDS-PAGE results showed that a relative molecular weight of 82 700 recombinant protein was produced. **Conclusion** The cDNA encoding HDS from *D. officinale* is cloned. The prokaryotic expression vector and different tissues expression patterns of DoHDS are constructed. It is helpful for the future research on the mechanism of terpenoid biosynthesis in medicinal plants *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase; gene cloning; expression analysis

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, 又名黑节草, 多年生草本植物, 为兰科第 2 大属植物。它是一种常用名贵中药^[1], 至今已有 1 500 多年药用历史。历代医著如《道藏》《神农本草经》《本

草纲目拾遗》等均有记载^[2]。《中国药典》2010 年版中记载铁皮石斛具有益胃生津、滋阴清热的疗效, 主要用于口干烦渴、胃阴不足、病后虚热不退、阴虚火旺、骨蒸劳热等症^[3]。现代医学研究表明, 铁

收稿日期: 2015-08-19

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重点项目 (KJ2015A005); 江淮地区大学农业科技服务模式关键技术集成与示范 (2013BAD20B09)

作者简介: 王翔 (1990—), 男, 安徽宿松人, 硕士在读, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: wangxiang0668@163.com

*通信作者 樊洪泓 (1980—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为药用植物生物技术。Tel: (0551)65786216 E-mail: hhfan0551@126.com

铁皮石斛具有抗衰老、抗肿瘤、降血糖和提高免疫等作用^[4]。十几年来,国内外学者对铁皮石斛化学成分进行了大量研究,发现铁皮石斛化学成分多样,包括生物碱、多糖、酚类、联苄、倍半萜类和糖苷等,主要药用成分是多糖和生物碱^[5-6],这些药用成分受到了人们极大的关注,具有很重要的药用价值。有研究表明石斛中的生物碱大多属于萜类吲哚生物碱^[4,7],此类生物碱起源于 2 条途径,莽草酸途径(吲哚途径)和萜类途径(MVA、MEP 途径)。

4-羟基-3-甲基-2-*E*-丁烯基-1-焦磷酸合成酶(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase, HDS)参与 MEP 途径中的倒数第 2 个反应,催化 2-*C*-甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸生成 4-羟基-3-甲基-2-*E*-丁烯基-4-磷酸, HDS 属于 *gcpE* 蛋白超家族,是一种铁硫蛋白。目前 HDS 基因已从毛果杨^[8]、黄花蒿^[9]、萝芙木^[10]、银杏^[11]、长春花^[12]和拟南芥^[13]等植物中克隆出来,但在铁皮石斛中的克隆仍未见报道。有研究表明,拟南芥 HDS 起到调控代谢流作用^[13]和转录后相关调控作用^[12,14]。本实验以铁皮石斛为材料,采用 RT-PCR 和 RACE 等方法克隆铁皮石斛 HDS (DoHDS) cDNA 全长,并对其序列进行生物信息学分析、原核表达分析和不同组织的 Real-Time PCR 分析,为进一步研究 MEP 途径作用机制及 HDS 在萜类化合物合成中的作用提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

铁皮石斛组培苗取自安徽农业大学生命科学学院,由安徽农业大学蔡永萍教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 RNAPrep Pure Plant Kit、FastQuant RT Kit 购自北京 Tiangen 公司; RACE 试剂盒、pMD18-T 载体试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 均购自 TaKaRa 公司; EasyTaq Buffer、EasyTaq DNA Polymerase、dNTPs 购自北京全式金公司。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取与反转录

取新鲜的铁皮石斛组培苗 0.1 g,用灭菌水清洗去除残留培养基,并用滤纸吸干,液氮中迅速研磨成粉末,然后按照 RNAPrep Pure Plant Kit (Tiangen) 说明书进行 RNA 提取。利用超微量分光光度计检测 RNA 浓度和质量。并以此为模板按照 FastQuant RT Kit 说明书进行 RNA 反转录成 cDNA。

2.2 引物设计

根据 GenBank 上已登录的 HDS 氨基酸序列,如拟南芥、毛果杨、黄花蒿、萝芙木、银杏、长春花等,利用 DNAMAN 软件比对氨基酸同源性,挑选两段高度保守区段序列设计简并引物(表 1)。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of primers

引物用途及预测大小	引物名称	引物序列 (5'-3')
核心片段(约 850 bp)	HDS-S	GATGGYTCTGTWCYMATGTC
	HDS-R	GGTCCATTBACAATRCADCCC
3'RACE(约 700 bp)	HDS-3-OUT	GTTGGCAGGGTTCATTCTTC
	HDS-3-IN	GTGGATGGTTTTGGCGATGG
5'RACE(约 1 600 bp)	HDS-5-OUT	CTGACAAGGGAACCAAAATG
	HDS-5-IN	CATCAGCATCATCGACAGGA
cDNA 全长(约 2 600 bp)	HDS-CDS-S	GCCGGGATCCATGATGGTAGCTGGAACCTATTCAACC(下划线为 BamH I 酶切位点)
	HDS-CDS-R	AATAGCCGGCCCTACTCTTCTGCAGGCGGATCGACCCAA(下划线为 Not I 酶切位点)
qRT-PCR(约 200 bp)	HDS-RTS	CGGGGACGAACGATATGAGG
	HDS-RTR	TGAACCCTGCCAACCTTCTC
	β -actin-RTS	GGTATTGTGTTGGATTCCG
	β -actin-RTR	TGAGTAGCCCCTCTCTGTGAG

2.3 DoHDS 保守区片段的扩增

首先以反转录合成的 cDNA 为模板, 利用引物 HDS-S 和 HDS-R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 上下游引物各 1.5 μL , 模板 cDNA 2 μL , 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , dNTP (10 mmol/L) 2 μL , Taq 酶 (5 U/ μL) 0.25 μL , 最后用 ddH₂O 补充至总体积 25 μL ; 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再次延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 根据 DNA 胶回收试剂盒 (生工) 说明书回收目的片段, 然后连接克隆载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经氨苄固体培养基过夜培养后, 挑取单菌落经菌液 PCR 鉴定后委托上海生工有限公司进行测序。

2.4 DoHDS 的 RACE 扩增及全长 cDNA 序列的获得

参照 TaKaRa 3'-Full RACE Kit 和 5'-Full RACE Kit 说明书将铁皮石斛总 RNA 分别反转录成 cDNA; 按照 TaKaRa 3'RACE 和 5'RACE 试剂盒说明书, 以及已得到的核心片段序列, 使用 Primer Premier 5.0 设计 3'RACE 和 5'RACE 反应所需的巢式引物: HDS-3-OUT、HDS-3-IN、HDS-5-OUT、HDS-5-IN (表 1); 分别对 DoHDS 的 3'端和 5'端进行巢式 PCR 扩增, PCR 产物的回收、TA 克隆与测序方法均同“2.3”项。将 DoHDS 的核心片段、3'端和 5'端序列利用 DNAMAN 软件进行拼接, 获得该基因的全长 cDNA 序列。根据拼接得到的全长序列, 分别在 5'端和 3'端设计特异性引物 HDS-CDS-S、HDS-CDS-R (表 1), 进行 PCR 扩增得到目的基因, PCR 产物的回收、TA 克隆与测序方法均同上。

2.5 DoHDS 生物信息学分析

将获得的 DoHDS 编码的氨基酸序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对分析, 利用 DNAMAN 软件对已发表的其他植物的 HDS 编码的氨基酸序列进行同源性分析, 并通过 MEGA6.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。在线网站分析, 预测相对分子质量及等电点 (<http://web.expasy.org/protparam/>), 进行疏水性分析 (<http://web.expasy.org/protscale/>), 跨膜结构分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), 预测信号肽 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 亚细胞定位分析 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/output.php>), 蛋白质的二级结构分析 ([https://npsa-prabi.ibcp.](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)

[fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))。

2.6 DoHDS 的组织特异性表达分析

采用 RNAPrep Pure Plant Kit 试剂盒分别提取同一生长时期铁皮石斛原球茎、根、茎、叶的总 RNA, 用超微量分光光度计检测 RNA 浓度和质量。将上述总 RNA 按照 1 μg 的量用 PrimeScriptTM RT reagent Kit (TaKaRa) 反转录成 cDNA。以持家基因 β -actin^[15] (引物 β -actin-RTS 和 β -actin-RTR, 表 1) 为内参; 根据 DoHDS 的全长 cDNA 序列采用 Primer Premier 5.0 设计实时荧光定量 PCR 引物: HDS-RTS 和 HDS-RTR (表 1)。反应体系: 10 μL SYBR[®] Premix Ex TaqTM II, 2 μL cDNA, 0.8 μL HDS-RTS 和 HDS-RTR, 0.4 μL ROX, 用 ddH₂O 补至 20 μL ; 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、34 s, 40 个循环。实验进行 3 次重复; 结果采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法来计算 DoHDS 在不同组织的相对表达量。

2.7 DoHDS 的原核表达分析

2.7.1 原核表达载体的构建 根据目的基因 DoHDS 的核苷酸序列设计带有 BamH I 和 Not I 酶切位点的引物 HDS-CDS-S 和 HDS-CDS-R (同全长引物, 表 1) 来扩增 DoHDS 的 cDNA 全长。PCR 产物的胶回收、TA 克隆等方法均同“2.3”项。测序验证正确后提取 pMD18-T-DoHDS 质粒, 用 BamH I 和 Not I 酶将 HDS-pMD18-T 质粒和原核表达载体 pET-28a (+) 质粒分别进行双酶切, 胶回收后用 T4 连接酶于室温过夜连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 过夜培养, 挑取阳性单菌落进行菌液 PCR 鉴定后, 提取质粒后进行酶切验证, 获得原核表达载体 pET-28a (+)-DoHDS。

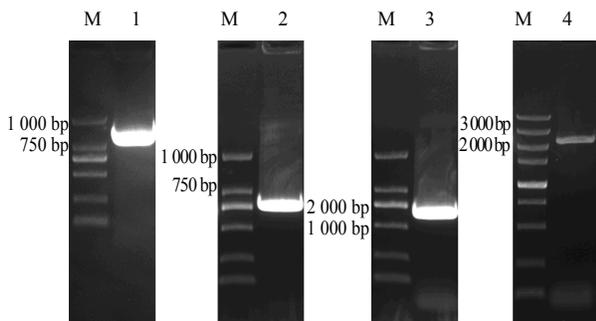
2.7.2 原核蛋白的诱导 将构建好的原核表达载体 pET-28a(+)-DoHDS 转化到表达菌株 BL21 (DE3) 中, 在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上过夜培养后, 挑取阳性单菌落到 5 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养, 培养一段时间后菌液 A₆₀₀ 值达到 0.6~0.8, 进行 PCR 鉴定, 再加入 0.2 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达, 每隔 1 h 取 1 mL 菌液备用。空载质粒 pET-28a (+) 和不加 IPTG 诱导 DoHDS 蛋白表达的操作同上。将上述收集的菌液 12 000 \times g 离心 5 min 后用 5 \times Loading Buffer 重悬菌体。然后 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min, 12 000 \times g 离心 2 min, 收集上清液。取 10 μL 上清液进行 SDS-PAGE 电泳、染色、脱色。

3 结果与分析

3.1 DoHDS 全长的克隆

以铁皮石斛 cDNA 为模板,用简并引物 HDS-S、HDS-R(表 1)扩增得到 1 条约 850 bp 的 PCR 产物,扩增产物符合引物设计的大小(图 1)。胶回收产物经 TA 克隆和测序分析得到该基因中间片段,长度为 821 bp,将该片段在 NCBI 的数据库中进行 Blast 比对分析,发现该序列与其他植物的 HDS 核酸序列相似度较高,推测此序列为 DoHDS 基因的核心片段。

根据已经获得的 DoHDS 核心序列设计 3'RACE 和 5'RACE 引物(表 1),进行巢式 PCR 扩增,获得 HDS 的 3'端 699 bp(图 1)和 5'端 1 572 bp(图 1),用 DNAMAN 软件拼接 DoHDS cDNA 全长,并设计全长引物(表 1),以铁皮石斛的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,经测序得到一段大小为 2 666 bp 的片段(图 1)。将该片段再次在 NCBI 的数据库中进行 Blast 分析,进一步验证所得基因序列为 DoHDS 的 cDNA 完整序列。其中开放阅读框(ORF)长度为 2 238 bp, 5-UTR 149 bp, 3-UTR 279 bp, 编码 745 个氨基酸,命名为 DoHDS,并提交至 NCBI 数据库(GenBank 登录号 KJ161312)。



M-Marker 1-核心片段产物 2-3' RACE 产物 3-5' RACE 产物
4-全长 cDNA 扩增
M-Marker 1-core fragment product 2-3' RACE product
3-5' RACE product 4-full-length cDNA amplification

图 1 DoHDS 基因全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Clone of full-length cDNA of DoHDS gene

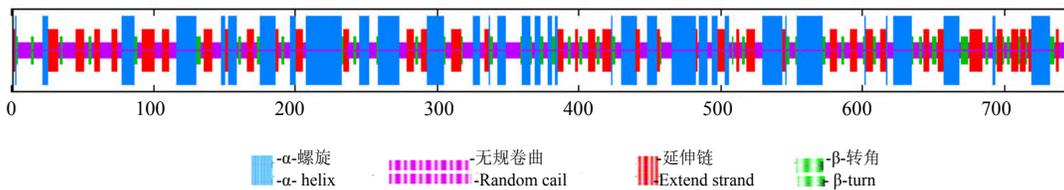


图 2 DoHDS 蛋白的二级结构预测

Fig. 2 Predicted second arystructure of DoHDS protein in *D. officinale*

3.2 DoHDS 生物信息学分析

利用在线网站 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 DoHDS 蛋白相对分子质量为 82 700, 等电点 5.81, 化学式 $C_{3646}H_{5843}N_{1015}O_{1104}S_3$ 。利用 PBIL LYON-GERLAND 信息库对 DoHDS 蛋白序列进行二级结构预测,分析可知 DoHDS 蛋白由 α -螺旋、 β -转角、伸展链和无规则卷曲组成。其中 α -螺旋共 261 个, 占总蛋白质的 35.03%; β -转角 81 个, 占总蛋白质的 10.87%; 伸展链 172 个, 占总蛋白质的 23.09%; 无规卷曲 231 个, 占总蛋白质的 31.01%(图 2)。分析疏水性最小峰值为-3.056, 在第 210 和 211 个氨基酸位置, 疏水性最大峰值为 2.522, 在第 680 个氨基酸位置, 分析可知 DoHDS 编码的蛋白质为亲水性蛋白。TMHMM 跨膜结构分析表明, DoHDS 蛋白无跨膜结构, 分析得知 DoHDS 蛋白位于膜外。SignalP 4.1 Server 预测 DoHDS 蛋白无信号肽。亚细胞定位分析表明, DoHDS 蛋白定位于叶绿体的机率为 0.147, 线粒体为 0.026, 其他细胞器为 0.677。

通过 DNAMAN 软件对铁皮石斛 DoHDS 编码的氨基酸序列在 NCBI 上与多种植物进行氨基酸序列进行 Blast 比对(图 3), 与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh、毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.、茶树 *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze、萝芙木 *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baill、银杏 *Ginkgo biloba* L. 和长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 等植物同源性高达 89%。说明 HDS 在进化过程中较为保守。与其他植物氨基酸序列比对后发现, 均含有多个保守半胱氨酸残基活性位点(图 3), 这些活性位点可能参与催化底物还原过程中铁硫键的形成^[16-17]。利用 MEGA 6.0 软件中的 Neighbor-Joining 方法, 将 DoHDS 蛋白与 GenBank 登录的 11 种植物的 HDS 蛋白构建系统进化树, 进行聚类分析。结果表明(图 4), DoHDS 蛋白与同为单子叶植物的海枣 *Phoenix dactylifera* L. HDS 蛋白聚为一类。

丹参	.MAGVAFVASTGLKSPREHGLGPKSMDFVRAIC...ELQRVKEGASAVANIRNSNFGSETNELPASGGSLL	71
拟南芥	.MAGVLPFAPVSGIIPES.KVGFQKSMNLRVIC...EVRSLRSARRVSVIRNSN.CGSDLELDEL.PASGGSLL	69
毛果杨	.MAGVAFVASTGLKSPREHGLGPKSMDFVRAIC...ELQRVKEGASAVANIRNSN.TGDEIIVEL.PASGGSLL	69
茶树	.MAGVAFVASTGLKSPREHGLGPKSMDFVRAIC...ELQRVKEGASAVANIRNSN.FGSEIIVEL.PASGGSLL	69
罗芙木	.MAGVAFVASTGLKSPREHGLGPKSMDFVRAIC...ELQRVKEGASAVANIRNSN.FGSEIIVEL.PASGGSLL	69
长春花	.MAGVAFVASTGLKSPREHGLGPKSMDFVRAIC...ELQRVKEGASAVANIRNSN.FGSEIIVEL.PASGGSLL	69
铁皮石斛	.MAGVAFVASTGLKSPREHGLGPKSMDFVRAIC...ELQRVKEGASAVANIRNSN.FGSEIIVEL.PASGGSLL	69
Consensus	m g f k i n s g e l p a s g s l l	73
丹参	VFRKYCESLKTIVRRKTRTMVVG.VRGSHPFIR.QTMTTCTKQDIAGTVGVNRIAD.GADVVR.TVQGRREA	146
拟南芥	VFRKYCESLKTIVRRKTRTMVVG.VRGSHPFIR.QTMTTCTKQDIAGTVGVNRIAD.GADVVR.TVQGRREA	144
毛果杨	VFRKYCESLKTIVRRKTRTMVVG.VRGSHPFIR.QTMTTCTKQDIAGTVGVNRIAD.GADVVR.TVQGRREA	144
茶树	VFRKYCESLKTIVRRKTRTMVVG.VRGSHPFIR.QTMTTCTKQDIAGTVGVNRIAD.GADVVR.TVQGRREA	144
罗芙木	VFRKYCESLKTIVRRKTRTMVVG.VRGSHPFIR.QTMTTCTKQDIAGTVGVNRIAD.GADVVR.TVQGRREA	144
长春花	VFRKYCESLKTIVRRKTRTMVVG.VRGSHPFIR.QTMTTCTKQDIAGTVGVNRIAD.GADVVR.TVQGRREA	144
铁皮石斛	VFRKYCESLKTIVRRKTRTMVVG.VRGSHPFIR.QTMTTCTKQDIAGTVGVNRIAD.GADVVR.TVQGRREA	144
Consensus	vp kyces ktvrrktrtmvvg vr gs hpir qmtttctkdvartvgnriad gad vvr tvqgr ea	148
丹参	CACQIKKSLVQKSYIPLVADIHFAFVA.RV.ECFKIRVNPNGNFADRAAQFQLEYEDDYCKELHIEHCF	221
拟南芥	CACQIKKSLVQKSYIPLVADIHFAFVA.RV.ECFKIRVNPNGNFADRAAQFQLEYEDDYCKELHIEHCF	219
毛果杨	CACQIKKSLVQKSYIPLVADIHFAFVA.RV.ECFKIRVNPNGNFADRAAQFQLEYEDDYCKELHIEHCF	219
茶树	CACQIKKSLVQKSYIPLVADIHFAFVA.RV.ECFKIRVNPNGNFADRAAQFQLEYEDDYCKELHIEHCF	219
罗芙木	CACQIKKSLVQKSYIPLVADIHFAFVA.RV.ECFKIRVNPNGNFADRAAQFQLEYEDDYCKELHIEHCF	219
长春花	CACQIKKSLVQKSYIPLVADIHFAFVA.RV.ECFKIRVNPNGNFADRAAQFQLEYEDDYCKELHIEHCF	219
铁皮石斛	CACQIKKSLVQKSYIPLVADIHFAFVA.RV.ECFKIRVNPNGNFADRAAQFQLEYEDDYCKELHIEHCF	219
Consensus	gac ik lvq y iplvadihfaf va rv ecfkirkvnpngnfadrraqf y yqkel hie f	223
丹参	SPLVWCKKYGRA.RGTNHGSLSCRIMSY.GDSPRGVMSAFD.ARICRKL.DHNF.FSM.ASNFV.MV.CAYRL	296
拟南芥	SPLVWCKKYGRA.RGTNHGSLSCRIMSY.GDSPRGVMSAFD.ARICRKL.DHNF.FSM.ASNFV.MV.CAYRL	294
毛果杨	SPLVWCKKYGRA.RGTNHGSLSCRIMSY.GDSPRGVMSAFD.ARICRKL.DHNF.FSM.ASNFV.MV.CAYRL	264
茶树	SPLVWCKKYGRA.RGTNHGSLSCRIMSY.GDSPRGVMSAFD.ARICRKL.DHNF.FSM.ASNFV.MV.CAYRL	294
罗芙木	SPLVWCKKYGRA.RGTNHGSLSCRIMSY.GDSPRGVMSAFD.ARICRKL.DHNF.FSM.ASNFV.MV.CAYRL	294
长春花	SPLVWCKKYGRA.RGTNHGSLSCRIMSY.GDSPRGVMSAFD.ARICRKL.DHNF.FSM.ASNFV.MV.CAYRL	294
铁皮石斛	SPLVWCKKYGRA.RGTNHGSLSCRIMSY.GDSPRGVMSAFD.ARICRKL.DHNF.FSM.ASNFV.MV.CAYRL	294
Consensus	plv kckkygra r gtnhgslscrimsy gdsprgmvesafe aricrkl dhnf fsm asnpv mv cayrl	298
丹参	LVAEMVWQNDYPLHLGVTEAGEGEDGRMKSAIGIGTLL.DGLGDTIR.SLTEPPEE.IDPCR.LANHGMRPRL	371
拟南芥	LVAEMVWQNDYPLHLGVTEAGEGEDGRMKSAIGIGTLL.DGLGDTIR.SLTEPPEE.IDPCR.LANHGMRPRL	369
毛果杨	LVAEMVWQNDYPLHLGVTEAGEGEDGRMKSAIGIGTLL.DGLGDTIR.SLTEPPEE.IDPCR.LANHGMRPRL	369
茶树	LVAEMVWQNDYPLHLGVTEAGEGEDGRMKSAIGIGTLL.DGLGDTIR.SLTEPPEE.IDPCR.LANHGMRPRL	369
罗芙木	LVAEMVWQNDYPLHLGVTEAGEGEDGRMKSAIGIGTLL.DGLGDTIR.SLTEPPEE.IDPCR.LANHGMRPRL	369
长春花	LVAEMVWQNDYPLHLGVTEAGEGEDGRMKSAIGIGTLL.DGLGDTIR.SLTEPPEE.IDPCR.LANHGMRPRL	369
铁皮石斛	LVAEMVWQNDYPLHLGVTEAGEGEDGRMKSAIGIGTLL.DGLGDTIR.SLTEPPEE.IDPCR.LANHGMRPRL	369
Consensus	lvaem w qndyplhlgvteagegedgrmkksaigigtll dglgdtir sltepp ee idpcr lan hgmr p r l	373
丹参	CGVAFPEHNR.YYFCQRRGGLP.QKEGEVDYR.VLHRDGSVLMSS.D.LM.FELLY.SLA.KL.VGMFFK	446
拟南芥	CGVAFPEHNR.YYFCQRRGGLP.QKEGEVDYR.VLHRDGSVLMSS.D.LM.FELLY.SLA.KL.VGMFFK	444
毛果杨	CGVAFPEHNR.YYFCQRRGGLP.QKEGEVDYR.VLHRDGSVLMSS.D.LM.FELLY.SLA.KL.VGMFFK	444
茶树	CGVAFPEHNR.YYFCQRRGGLP.QKEGEVDYR.VLHRDGSVLMSS.D.LM.FELLY.SLA.KL.VGMFFK	444
罗芙木	CGVAFPEHNR.YYFCQRRGGLP.QKEGEVDYR.VLHRDGSVLMSS.D.LM.FELLY.SLA.KL.VGMFFK	444
长春花	CGVAFPEHNR.YYFCQRRGGLP.QKEGEVDYR.VLHRDGSVLMSS.D.LM.FELLY.SLA.KL.VGMFFK	444
铁皮石斛	CGVAFPEHNR.YYFCQRRGGLP.QKEGEVDYR.VLHRDGSVLMSS.D.LM.FELLY.SLA.KL.VGMFFK	444
Consensus	gvafp ehnr yyfcqrr g glp qkege vdyr vlhrdgsvlms s d lm fell y sla kl vgmffk	448
丹参	CLATVCSILL.DP.FVEIDQVRLALAKRLHDSMGIPLSEQLT.PLNNV.VVW.LKELSGA.KLLPEGTRIV	521
拟南芥	CLATVCSILL.DP.FVEIDQVRLALAKRLHDSMGIPLSEQLT.PLNNV.VVW.LKELSGA.KLLPEGTRIV	519
毛果杨	CLATVCSILL.DP.FVEIDQVRLALAKRLHDSMGIPLSEQLT.PLNNV.VVW.LKELSGA.KLLPEGTRIV	519
茶树	CLATVCSILL.DP.FVEIDQVRLALAKRLHDSMGIPLSEQLT.PLNNV.VVW.LKELSGA.KLLPEGTRIV	519
罗芙木	CLATVCSILL.DP.FVEIDQVRLALAKRLHDSMGIPLSEQLT.PLNNV.VVW.LKELSGA.KLLPEGTRIV	519
长春花	CLATVCSILL.DP.FVEIDQVRLALAKRLHDSMGIPLSEQLT.PLNNV.VVW.LKELSGA.KLLPEGTRIV	519
铁皮石斛	CLATVCSILL.DP.FVEIDQVRLALAKRLHDSMGIPLSEQLT.PLNNV.VVW.LKELSGA.KLLPEGTRIV	523
Consensus	clatvcsill e p d r lalrkrl h ds smg i pl seq lt pl n n v v w l k e l s g a k l l p e g t r i v	
丹参	SVRGDEDELDLILN.VDPTMLNLEHTEKIGRVA.RRLFEYLSSENIN.FVIMHIC.FKGIH.RDLVGA	595
拟南芥	SVRGDEDELDLILN.VDPTMLNLEHTEKIGRVA.RRLFEYLSSENIN.FVIMHIC.FKGIH.RDLVGA	593
毛果杨	SVRGDEDELDLILN.VDPTMLNLEHTEKIGRVA.RRLFEYLSSENIN.FVIMHIC.FKGIH.RDLVGA	593
茶树	SVRGDEDELDLILN.VDPTMLNLEHTEKIGRVA.RRLFEYLSSENIN.FVIMHIC.FKGIH.RDLVGA	593
罗芙木	SVRGDEDELDLILN.VDPTMLNLEHTEKIGRVA.RRLFEYLSSENIN.FVIMHIC.FKGIH.RDLVGA	593
长春花	SVRGDEDELDLILN.VDPTMLNLEHTEKIGRVA.RRLFEYLSSENIN.FVIMHIC.FKGIH.RDLVGA	593
铁皮石斛	SVRGDEDELDLILN.VDPTMLNLEHTEKIGRVA.RRLFEYLSSENIN.FVIMHIC.FKGIH.RDLVGA	598
Consensus	svrgde de l il n v d p t m l n l e h t e k i g r v a r r l f e y l s e n i n f v i m h i c f k g i h r d l v g a	
丹参	GTIAG.LLVDG.GDQVLDLH.DGDFIFL.R.TSFNLLQCCMRNNTKTEYVSCPSGRTLFDLQ.ISA.GIRKTSHL	670
拟南芥	GTIAG.LLVDG.GDQVLDLH.DGDFIFL.R.TSFNLLQCCMRNNTKTEYVSCPSGRTLFDLQ.ISA.GIRKTSHL	668
毛果杨	GTIAG.LLVDG.GDQVLDLH.DGDFIFL.R.TSFNLLQCCMRNNTKTEYVSCPSGRTLFDLQ.ISA.GIRKTSHL	668
茶树	GTIAG.LLVDG.GDQVLDLH.DGDFIFL.R.TSFNLLQCCMRNNTKTEYVSCPSGRTLFDLQ.ISA.GIRKTSHL	668
罗芙木	GTIAG.LLVDG.GDQVLDLH.DGDFIFL.R.TSFNLLQCCMRNNTKTEYVSCPSGRTLFDLQ.ISA.GIRKTSHL	668
长春花	GTIAG.LLVDG.GDQVLDLH.DGDFIFL.R.TSFNLLQCCMRNNTKTEYVSCPSGRTLFDLQ.ISA.GIRKTSHL	668
铁皮石斛	GTIAG.LLVDG.GDQVLDLH.DGDFIFL.R.TSFNLLQCCMRNNTKTEYVSCPSGRTLFDLQ.ISA.GIRKTSHL	673
Consensus	g t i a g l l v d g g d q v l d l h d g d f i f l r t s f n l l q c c m r n n t k t e y v s c p s g r t l f d l q i s a g i r k t s h l	
丹参	FGVSAIMGCIIVNGFGEMAD.CFVYVGGAPGKIDLVGKTVVVG.GINNEHATDALIQIINDGGRVDFPAAE	742
拟南芥	FGVSAIMGCIIVNGFGEMAD.CFVYVGGAPGKIDLVGKTVVVG.GINNEHATDALIQIINDGGRVDFPAAE	717
毛果杨	FGVSAIMGCIIVNGFGEMAD.CFVYVGGAPGKIDLVGKTVVVG.GINNEHATDALIQIINDGGRVDFPAAE	740
茶树	FGVSAIMGCIIVNGFGEMAD.CFVYVGGAPGKIDLVGKTVVVG.GINNEHATDALIQIINDGGRVDFPAAE	740
罗芙木	FGVSAIMGCIIVNGFGEMAD.CFVYVGGAPGKIDLVGKTVVVG.GINNEHATDALIQIINDGGRVDFPAAE	740
长春花	FGVSAIMGCIIVNGFGEMAD.CFVYVGGAPGKIDLVGKTVVVG.GINNEHATDALIQIINDGGRVDFPAAE	740
铁皮石斛	FGVSAIMGCIIVNGFGEMAD.CFVYVGGAPGKIDLVGKTVVVG.GINNEHATDALIQIINDGGRVDFPAAE	740
Consensus	fgvsaimgciivngfgemad cfv y v g g a p g k i d l v g k t v v v g i n n e h a t d a l i q i i n d g g r v d f p a a e	745

▲-半胱氨酸残基保守位点
 ▲-The conserved cysteine residues

图 3 铁皮石斛与其他植物 HDS 氨基酸序列同源性比对

Fig. 3 Homologous comparison on HDS amino acid sequence in *D. officinale* and other plants

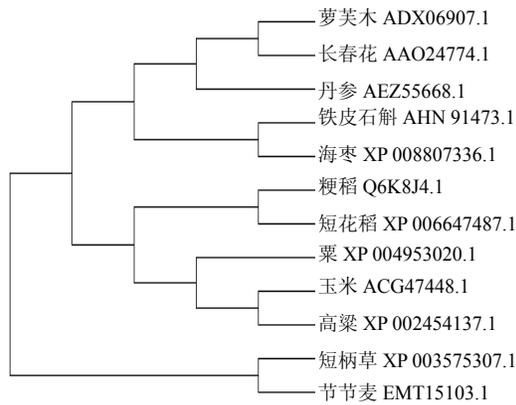


图 4 铁皮石斛与其他植物 HDS 氨基酸的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of HDS in *D. officinale* and other plants

3.3 DoHDS 在铁皮石斛不同组织中的表达分析

以铁皮石斛的原球茎、根、茎、叶为研究材料,选择持家基因 β -actin^[15]为内参,利用实时荧光定量 PCR 仪检测不同组织中 DoHDS 的表达水平。结果显示在铁皮石斛各组织中 DoHDS 都有表达,且表达量依次为茎>根~叶>原球茎(图 5);其中在茎中 DoHDS 表达量为原球茎的 5 倍。

3.4 DoHDS 的原核表达分析

3.4.1 DoHDS 的获得 使用含有 BamH I 和 Not I 酶切位点的引物扩增 DoHDS,经测序验证后,提取 pMD18-T-DoHDS 质粒,并使用 BamH I 和 Not I 同时进行双酶切 pMD18-T-DoHDS 质粒和 pET28a (+) 质粒,琼脂糖凝胶电泳结果如图 6-A 所示,形成单一的条带。结果表明酶切产物干净,没有拖带现象,说明酶切彻底。

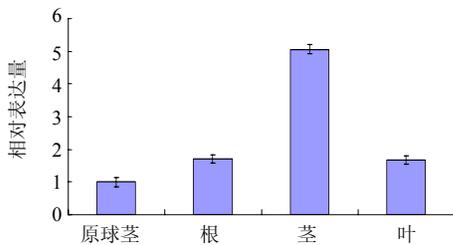
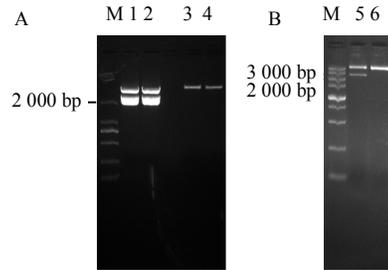


图 5 DoHDS 基因在铁皮石斛中的组织特异性表达分析

Fig. 5 Tissue-specific expression of DoHDS in *D. officinale*

3.4.2 pET-28a (+)-DoHDS 重组质粒的鉴定 将上述的酶切产物胶回收后用 T4 连接酶连接,得到的重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性单菌落进行菌液 PCR 验证,然后挑选其中一个菌落进行扩大培养,提取质粒,进行酶切验证。由图 6-B 显示



M-Marker 1、2-pMD18-T-DoHDS 质粒酶切产物 3、4-pET-28a (+) 质粒酶切产物 5-pET-28a (+)-DoHDS 质粒酶切产物 6-pET-28a (+) 质粒酶切产物

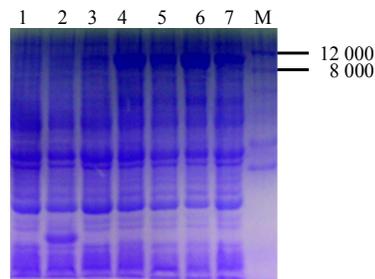
M-Marker 1, 2-pMD18-T-DoHDS plasmid by double enzymes digestion 3, 4-result of pET28a (+) vector plasmid by double enzymes digestion 5-pET-28a (+)-DoHDS plasmid by double enzymes digestion 6-result of pET28a (+) vector plasmid by double enzymes digestion

图 6 DoHDS 基因原核表达载体构建

Fig. 6 Construct DoHDS prokaryotic expression vector

pET-28a (+)-DoHDS 重组质粒经双酶切后出现 2 条非常清晰的带,且一条与原片段大小一致,另一条与 pET-28a (+)一致,说明 pET-28a (+)-DoHDS 重组质粒已经初步构建成功。

3.4.3 DoHDS 蛋白的诱导表达与分析 重组质粒 pET-28a (+)-DoHDS 转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3)后进行诱导表达,以空载 pET-32a (+) 加 IPTG 与不加 IPTG 为对照, pET-28a (+)-DoHDS 重组质粒在 IPTG 诱导 1、2、3、4 h 后,分离蛋白进行 SDS-PAGE 检测。结果如图 7 所示,在 80 000~120 000 有不同于对照组的条带,显示诱导产物为一个相对分子质量(82 700)与理论值相符的融合蛋白,说明成功诱导表达了 DoHDS 蛋白,并发现不同时间的诱导对其表达量的影响不明显。



M-Marker 1-pET-28a (+) 不加 IPTG 诱导 2-pET-28a (+) 加入 IPTG 诱导 3-pET-28a (+)-DoHDS 不加 IPTG 诱导 4~7-ET-28a (+)-DoHDS 加入 IPTG 诱导 1、2、3、4 h

M-Marker 1-pET-28a (+) plasmid without IPTG 2-pET-28a (+) plasmid with IPTG 3-pET-28a (+)-DoHDS plasmid without IPTG 4~7-SDS-PAGE of analysis for pET-28a (+)-DoHDS plasmid by induced for 1, 2, 3, 4 h respectively

图 7 pET-28a (+)-DoHDS 在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达

Fig. 7 Expression of pET-28a (+)-DoHDS in *E. coli* BL21

4 讨论

铁皮石斛是我国兰科石斛属中珍稀濒危特有品种,具有重要的药用价值,其中生物碱是其主要药效成分之一。本研究从铁皮石斛中克隆出萜类化合物生物合成 MEP 途径上倒数第 2 个酶基因-DoHDS。HDS 被认为在 MEP 途径中起着关键的调节代谢流的作用^[13];而且其表达量的变化影响到萜类代谢物的产量。研究表明,DoHDS cDNA 全长 2 666 bp,编码了 745 个氨基酸;序列比对分析结果表明 DoHDS 与长春花、银杏和拟南芥等 HDS 具有很高的同源性,保守结构域分析显示 DoHDS 蛋白为一多结构域蛋白,属 gcpE 蛋白家族成员,结构域中包括保守的半胱氨酸残基活性位点、底物结合位点和催化位点^[18]。

本研究表明,在铁皮石斛的不同组织中 DoHDS 均有表达,但存在一定的表达差异。DoHDS 在茎、根与叶的表达量分别为对照(原球茎)的 5.1、1.69、1.68 倍,在茎中表达量最高,而萝芙木^[10]和茶树^[18]中,HDS 在叶片中的表达量均显著高于茎与根部。说明了同一基因在不同植物中,基因表达量不同;在同一植物不同组织中,基因表达量亦不相同。本实验构建了 pET-28a (+)-DoHDS 重组质粒,在大肠杆菌 BL21 成功诱导出 DoHDS 蛋白,其相对分子质量与预测一致,但不同时间的诱导对其表达量的影响不大。

总之,研究 DoHDS 在不同器官中的表达特征为探究 DoHDS 参与合成的萜类化合物代谢提供了理论依据;研究 DoHDS 在大肠杆菌中的表达情况为后续研究它的催化功能提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 包雪声, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 复旦大学出版社, 2001.
- [2] Ding G, Xu G, Zhang W, *et al.* Preliminary geoherbalsim study of *Dendrobium officinale* food by DNA molecular markers [J]. *Eur Food Res Tech*, 2008, 227(4): 449-456.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] Guo X, Li Y, Li C, *et al.* Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthetic genes and genetic markers [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 131-138.
- [5] 徐步青, 李振中, 张俊, 等. 不同培养条件对铁皮石斛类原球茎生物反应器培养的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 709-713.
- [6] Guevara-García A, San Román C, Arroyo A, *et al.* Characterization of the *Arabidopsis* clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. *Plant Cell Online*, 2005, 17(2): 628-643.
- [7] 严亮. 中国传统兰科药用植物铁皮石斛基因组及其生物学特性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [8] 刘立辉, 李成浩, 杨静莉, 等. 毛果杨 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-二磷酸合酶 (HDS) 基因的生物信息学分析 [J]. 安徽农业科学, 2012(3): 1300-1303.
- [9] 张祖荣, 廖志华, 彭梅芳. 黄花蒿 HDS 基因的克隆与功能分析 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 148-154.
- [10] Chen Z Y, Yang M, Ming C X, *et al.* Cloning and characterization of MECS and HDS genes from *Rauvolfia verticillata* [J]. *Plant Omics*, 2011, 4(2): 82-90.
- [11] Kim S M, Kim S U. Characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate synthase (HDS) gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(3): 973-979.
- [12] Oudin A, Mahroug S, Courdavault V, *et al.* Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(2): 13-30.
- [13] Querol J, Campos N, Imperial S, *et al.* Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis [J]. *Federation Eur Biochem Soc J Lett*, 2002, 514: 343-346.
- [14] Sauret-Gueto S, Botella-Pavia P, Flores-Perez U, *et al.* Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(1): 75-84.
- [15] Jin Q, Yao Y, Cai Y, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Dendrobium* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62352.
- [16] Reikittke I, Nonaka T, Wiesner J, *et al.* Structure of the E-1-hydroxy-2-methyl-but-2-enyl-4-diphosphate synthase (GcpE) from *Thermus thermophilus* [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(3): 447-451.
- [17] 吴秋菊, 武梅娟, 王翔, 等. 铁皮石斛 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 405-411.
- [18] 蒋正中. 茶树 MEP 途径中 HDS 与 HDR 基因的 cDNA 全长克隆, 功能分析与表达特征研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.