

• 药材与资源 •

刺五加 MDD 基因启动子的克隆与生物信息学分析

李志栋, 杨 果, 尤鹏升, 国红玉, 邢朝斌, 龙月红*

华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063000

摘 要: 目的 克隆并分析刺五加甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶 (mevalonate diphosphate decarboxylase, MDD) 基因的启动子序列。方法 根据刺五加 MDD 基因的 cDNA 序列, 采用 PCR 扩增和热不对称交错 PCR (TAIL-PCR) 技术, 克隆 MDD 基因 5' 端的 DNA 序列及启动子序列。利用 PlantCARE 等软件对其进行生物信息学分析。结果 克隆得到长 1 423 bp 的刺五加 MDD 基因启动子序列及长 1 024 bp 的 5' 端 DNA 序列。该启动子序列含有 49 个 TATA-box、25 个 CAAT-box。还含有脱落酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、胚乳表达必须顺式作用元件、干旱胁迫响应元件、光响应元件等多种顺式作用元件, 以及 2 个 MYBHv1 与 2 个 MYB 结合位点。结论 首次克隆并分析了刺五加 MDD 基因的启动子序列, 为该基因的表达调控奠定了基础。

关键词: 刺五加; MDD 基因; 启动子; 克隆; 生物信息学分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)21-3871-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.21.020

Cloning and bioinformatic analysis of mevalonate diphosphate decarboxylase gene promoter in *Eleutherococcus senticosus*

LI Zhi-dong, YANG Guo, YOU Peng-sheng, GUO Hong-yu, XING Zhao-bin, LONG Yue-hong

College of Life Science, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

Abstract: **Objective** To clone and analyze the sequence of mevalonate diphosphate decarboxylase (MDD) gene promoter from *Eleutherococcus senticosus*. **Methods** According to the full length of MDD cDNA sequence, using PCR cloning and TAIL-PCR methods, we are cloning 5' DNA sequence and promoter sequence of MDD gene. And bioinformatic analysis is used. Such as PlantCARE. **Results** We have cloned the 5' DNA sequence successfully, with full length of 1 024 bp. And the promoter sequence is 1 423 bp. Bioinformatic analysis shows that the promoter sequence has 49 TATA-box and 25 CAAT-box. In addition, the promoter has some cis-acting elements responsive to abscisic acid, environmental stresses, MeJA, required for endosperm expression, light-regulated and so on. Last but not least, there have two MYBHv1 and two MYB binding sites. **Conclusion** We have firstly cloned and analyzed the *E. senticosus* MDD gene promoter sequence. It is important to its expression.

Key words: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.; mevalonate diphosphate decarboxylase gene; promoter; clone; bioinformatic analysis

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., 为五加科 (Araliaceae) 灌木, 分布于我国东北、华北, 韩国、日本以及俄罗斯远东地区, 其根、茎、叶均可入药, 是传统珍贵药用植物。其具有抗疲劳、防止记忆力衰退以及提高机体免疫力等多种生理活性及药理作用, 三萜皂苷类化合物为其主要活性成分之一^[1]。由于过量开采、野生条件下繁殖能力差等原因, 刺五加已被列为渐危

物种, 致使现有的刺五加资源难于满足市场需求^[2]。因此, 在阐明刺五加皂苷合成机制的基础上, 通过基因表达调控等生物技术手段提高刺五加的皂苷量有望成为解决这一供需矛盾的有效措施。

已有的研究表明, 在药用植物体内萜类化合物的生物合成中, 甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶 (mevalonate diphosphate decarboxylase, MDD) 催化 ATP 与甲羟戊酸焦磷酸反应生成 C5 化合物异戊烯基焦磷酸

收稿日期: 2016-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31570683); 河北省教育厅资助科研项目 (QN2014102); 华北理工大学培育基金 (SP201508); 华北理工大学大学生创新创业训练计划 (X2015170)

作者简介: 李志栋 (1994—), 男, 研究方向为药用植物分子生物学。

*通信作者 龙月红 (1974—), 女, 实验师, 研究方向为分子生物学。Tel: (0315)3725739 E-mail: lyhheuu@126.com

(isopentenyl pyrophosphate), 是萜类化合物生物合成过程中的一个关键酶^[3]。MDD 的超量表达可加快药用植物体内萜类化合物的合成速率^[4], 而启动子决定着特定基因表达的时间、空间以及强度等^[5]。因此, 克隆并分析药用植物次生代谢相关功能基因的启动子, 对深入了解药用植物药用成分的合成机理具有重要的意义。但目前尚未见有关刺五加功能基因启动子的相关报道。为此, 本研究克隆并分析了刺五加 MDD 基因启动子的 DNA 序列, 以期为刺五加 MDD 基因表达调控的研究提供理论依据。

1 材料

1.1 植物材料

供试刺五加采自辽宁省桓仁满族自治县, 经华北理工大学邢朝斌教授鉴定为五加科植物刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., 并栽植于华北理工大学花园。于 2015 年 4 月采其叶片, 用去离子水冲洗干净, 滤纸吸干水分后, 作为刺五加基因组 DNA 的提取材料。

1.2 试剂

X-Gal、IPTG、LB 培养基、氨苄青霉素购自北京拜尔迪生物技术有限公司。天根生化科技(北京)有限公司提供大肠杆菌 TOP-10 感受态细胞、新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、pGM-T cloning kit 以及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒。Ex Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。所需引物交由 Thermo Fisher 公司合成。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

称取 0.1 g 刺五加叶片, 参照新型植物基因组 DNA 提取试剂盒的说明书, 提取基因组 DNA, 并将 DNA 溶解于 30 μ L (pH 值为 7.0) dd H₂O 中, -80 $^{\circ}$ C 冻存。

2.2 MDD 基因 5'端 DNA 序列的获得

根据刺五加 MDD 基因的 cDNA 序列(GenBank 登录号为 JQ905594)^[6], 设计上、下游引物 MDD-25S (5'-ATTCCAACCTCTGTCTCTCTCTG-3') 和 MDD-470X (5'-ATACCCTTCTTCTCATCCTCAA-3')。以“2.1”项中提取的刺五加基因组 DNA 为模板, PCR 扩增刺五加 MDD 基因 5'端的 DNA 序列。总反应体系 25.0 μ L, 其中 1 μ L 模板, 2.5 μ L 10 $\times$ Ex Taq Buffer(Mg²⁺ plus), 上、下游引物各 1 μ L, 4 μ L dNTP mixture (2.5 mmol/L), 0.2 μ L Ex Taq DNA 聚合酶, ddH₂O 15.3 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C,

30 s; 54 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 5 min; 共 40 个循环。72 $^{\circ}$ C 补充延伸 10 min。用 2 % 的琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, 并切下目的条带。按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明, 回收目的条带。回收产物与 pGM-T 载体连接后, 转化至大肠杆菌 TOP-10 感受态细胞。将验证转化成功的阳性菌种送往 Thermo Fisher 公司测序。

2.3 MDD 基因启动子的克隆

根据“2.2”项中获得的刺五加 MDD 基因 5'端的 DNA 序列, 应用 Primer premier 5.0 软件设计特异性 TAIL-PCR 的扩增引物 MDD-BY2 (5'-GCCGTAACCATCACCACCCATT-3'), MDD-BY3 (5'-TTCATCCCTCTTTCCCCAGTAC-3'), MDD-BY4 (5'-GGACTCACAGCAACAGTAGTAG-3') 以及随机简并引物 AD-5[5'-AG(A/T)G(A/C/G/T)AG (A/T)A(A/C/G/T)CA(A/T)AGG-3']。以“2.1”项中提取的刺五加基因组 DNA 为模板, 经连续 3 轮 TAIL-PCR 扩增刺五加 MDD 基因的启动子序列。TAIL-PCR 的反应条件和体系均参照 Liu 等^[7]的方法进行。第 1 轮 PCR 扩增使用 1 μ L 刺五加基因组 DNA 作为模板, 所用引物为 MDD-BY4、AD-5。第 2 轮 PCR 扩增使用 1 μ L 稀释 10 倍的第 1 轮 PCR 产物, 所用引物为 MDD-BY3、AD-5。第 3 轮 PCR 扩增使用 1 μ L 100 倍稀释的第 2 轮 PCR 产物, 所用引物为 MDD-BY2、AD-5。第 3 轮的 PCR 产物经 2 % 的琼脂糖凝胶电泳后, 将目的条带纯化、连接、转化。将验证转化成功的菌种送往 Thermo Fisher 公司测序。

2.4 生物信息学分析

将“2.2”项及“2.3”项中的测序结果进行拼接后, 使用 NCBI 网站的 Blast 软件进行序列比对, 确定是否为刺五加 MDD 基因的 5'端 DNA 序列及启动子序列。

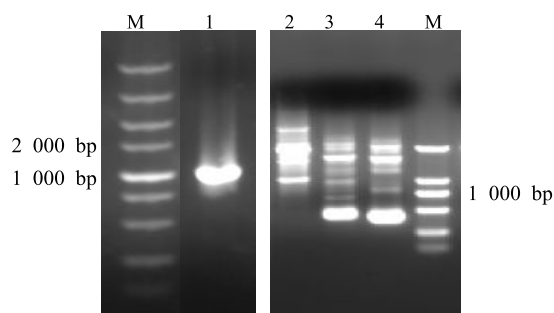
用 NNPP 软件 (<http://fruitfly.org:9005/seq-tools/promoter.html>) 对转录起始位点进行预测, 并结合本实验室刺五加 MDD 基因 cDNA 5'端 RACE 的结果进行分析, 最终确定转录起始位点。将扩增所得启动子序列提交到启动子顺式作用元件预测网 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PL-ACE/>) 以及 PlantCARE 软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 上进行分析^[8]。从而明确转录起始位点上游所含调控元件类型、数目、位置及功能等信息。

3 结果与分析

3.1 刺五加 MDD 基因 5'端 DNA 序列以及上游启动子序列的获取

根据 GenBank 中注册的刺五加 MDD 基因 cDNA 序列, 设计引物 MDD-25S、MDD-470X, PCR 扩增得到长度约为 1 050 bp 的条带 (图 1), 克隆测序得到 1 024 bp 的序列。使用 Blast 软件, 将所得序列进行比对分析, 证实为刺五加 MDD 基因 5'端的 DNA 序列。

根据“2.2”项中克隆的刺五加 MDD 基因 5'端 DNA 序列, 使用 Primer premier 5.0 软件设计引物 MDD-BY2、MDD-BY3、MDD-BY4 以及随机简并引物 AD-5。使用套式 PCR 扩增得到长度约为 1 600 bp 的启动子序列 (图 1)。纯化、连接、测序得到长度为 1 629 bp 的片段, 该片段包含 1 423 bp 的启动子序列。



M-Marker 1-MDD 基因 5'端 DNA 序列 2-第 1 轮 PCR 3-第 2 轮 PCR 4-第 3 轮 PCR

M-Marker 1-5'DNA sequence of MDD gene 2-The first PCR product 3-The second PCR product 4-The third PCR product

图 1 刺五加 MDD 基因 5'端 DNA 及启动子序列的克隆

Fig. 1 Gene cloning of MDD gene 5'DNA sequence and promoter sequence in *E. senticosus*

+	GTGGAGTAGC	AAAGGAACGC	GCAAGGTTAA	CGTAAACTGG	TTATGCAGAC	CAGGCAAGTT	TTTCAGAACG	70
+	TGTTGCATTA	GATGCATGAT	TTAGAAATAC	GTTGTGTAAC	TATATTGATG	CATATGTTAT	TATGTGCAAG	140
+	AATGTGTAAT	GTGCCTTTGT	GCAATACGTG	ATTTGAACCG	TTGATGTGCA	GTAGTTGATT	TAAAGTTGATT	210
+	GTTCTGCATT	GAACATATAT	GACATAATAA	ATGACATGCA	TGAAAAGCAT	GAAGTAGAGA	TTAAATGCAA	280
+	AGCATGATAT	ATGTATCCAT	GGCAAGCAT	AAGATGCATG	AAGCATGATG	AAGCATGATG	AACTGTGATT	350
+	ATGTGGTATG	TGAAACTGTT	AGACTTGCTT	AGCCGTCGTG	CTCACCCCTT	CTTAAACAA	AACATTACAG	420
+	AGAAGCTTGA	GGAAGCCGAT	TACTCCGGTA	GAGGCGATGG	TGAAGATTGA	CTAGCGAGTC	ATCAAGATCG	490
+	AAGCGTAGGT	GCTTTTATAG	TAAAACCCCTG	CGATCTAATA	AATTACCTTT	TTTTGTAAATA	CGTGTAAAGA	560
+	GTTTATGTTT	TGTTGTGCTA	TTAGCAAAACC	TAAAATGTCA	AGAGAACATT	TATAGATTAT	TTTAAATATCA	630
+	TTTTTCAGATG	TTGTCCTTTA	TGTACAAGGA	TAATAGATGT	TGTGATTGAA	TCATTGTATT	TATGATCTCA	700
+	AAGATGTAAAT	AGAATGTTTA	AAGTTTACGA	TTCTGGAATG	GAATATAGTT	GAAGTTGTAT	TCAAACGAAA	770
+	TGTTTGTATT	CATTTAAGGT	GTAATACCTA	GCGTATAGTA	ATAATTATAT	TTGCTTAAATG	ATTATAAGAC	840
+	GAATATAATT	AATTTAAACT	CAGGATTGAG	GTTACTTTTG	ACGGACCAGA	TCCGGAGTTA	ARGGAGCCCG	910
+	GATTTGGGGC	TGTCACAGTT	GGTATCGAGC	TCCGGGCCGA	GTAAGAGTGA	CCCAAAATAT	TATGGGTTAA	980
+	ATAAATTAA	TCCGATTTT	ACAGACCGAT	CAGGCCTGGA	CCAAATTTAT	GAGGTCTAAT	TTTTCGTHCA	1 050
+	ATTTTCATGTT	TAATTTCAAT	TTTTTGCTCG	TCTCTACTTC	CGACTCAAAC	CCTGTATCAA	CTTACTAATC	1 120
+	TGAAATATCA	ACGGCCCTAAA	ATTGGGGAAA	TTATAGGTTG	GGAATCCTAT	CAAGAACTAA	TTTCTCTCTCC	1 190
+	ATGACCACAT	GAAAATACTG	GAGTCACAAA	CGGACCGACA	CAGATCAATA	ATCAAAAGGAT	GAATTTAAAG	1 260
+	CTCCTTTAAT	TGAAATTCTA	AAAATTGTCT	TTAGGCTGAA	AACCCATTCA	AAGAGGTGGG	CCCATACTCA	1 330
+	AGAGTTGAGG	TTCTTCATAT	CCTCTGTAAA	TCCTTACATT	TACCTTTACA	TCTACATCTA	CATCTACATA	1 400
+	GACCCCATTT	CTTTTGTAA	ACA+1					

-TATA-box □-TCCA-box +1-转录起始位点
-TATA-box □-TCCA-box +1-transcriptional start site

图 2 刺五加 MDD 基因启动子序列以及部分 TATA-box、TCCA-box 结合位点

Fig. 2 Nucleotide sequence of *E. senticosus* MDD gene promoter and part of TATA-box and TCCA-box binding sites

3.2 转录起始位点的预测

将启动子序列提交到 NNPP 软件, 预测转录起始位点, 以预测值 0.3 为判断的 cut-off 值。共找到 7 种可能的转录起始位点, 结合本实验室已克隆的刺五加 MDD 基因 5'端 RACE 的结果, 最终确定其转录起始位点位于起始密码子 ATG 上游 172 bp 处。

3.3 启动子序列所含顺式作用元件的名称、数目、位置及功能

将转录起始位点上游启动子序列提交到在线软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 上进行分析, 结果表明刺五加 MDD 基因启动子序列除包含 TATA-box、CAAT 增强子外 (图 2), 还含有 Box 4、G-Box、G-box、GATA-motif、GT1-motif、I-box 等多个光响应元件。以及 1 个脱落酸响应元件 ABRE; 2 个茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif、TGACG-motif (表 1)。此外, 该启动子序列还含有干旱胁迫响应元件 MBS, 与种子形成有关的 RY-element 元件, 胚乳表达调控元件 Skn-1-motif。并且发现了 2 个 MYBHv1 结合位点、2 个 MYB 转录因子结合位点 (表 1)。

3 讨论

本实验首次成功克隆、分析刺五加 MDD 基因启动子序列。该序列包含 GT1-motif、I-box 等 7 种光响应元件, 共 14 个调控位点, 说明光照可能是调节刺五加 MDD 基因表达的重要因素之一。增强光照, 是否会导致 MDD 基因的超量表达, 进而增加植株体内萜类化合物的积累量, 还有待进一步研究。

Jin 等^[9]的研究表明, 适当浓度的茉莉酸甲酯

表 1 刺五加 MDD 基因启动子序列所含顺式作用元件

Table 1 Cis-acting elements in sequences of *E. senticosus* MDD gene promoter

名称	位置/bp	+, -链	序列	功能
ABRE	165	+	TACGTG	包含于脱落酸响应元件中的顺式作用元件
	549	+	TACGTG	
Box 4	848	-	ATTAAT	包含于光响应元件中的部分 DNA 保护组分
CCAAT-box	178	-	CAACGG	MYBHv1 结合位点
	1 129	+		
CGTCA-motif	879	-	CGTCA	包含于茉莉酸甲酯响应元件中的顺式作用元件
G-Box	67	-	CACGTT	包含于光响应元件中的顺式作用元件
	549	-	CACGTA	
	165	-		
G-box	67	-	CACGTT	包含于光响应元件中的顺式作用元件
	385	-	CACGAT	
	165	+	TACGTG	
	549	+		
GATA-motif	1 165	-	GATAGGA	部分光响应元件
GT1-motif	25	+	GGTTAA	光响应元件
	975	+		
	1 058	+	GGTTAAT	
I-box	306	-	CTCTTCTGCT	部分光响应元件
MBS	926	-	CAACTG	包含 MYB 结合位点的干旱胁迫响应元件
MRE	587	+	AACCTAA	包含 MYB 结合位点的光响应元件
02-site	347	+	GATGATGAGG	包含于玉米醇溶蛋白代谢调控元件中的顺式作用元件
RY-element	245	+	CATGCATG	包含于种子特异性调控元件中的顺式作用元件
SKn-1-motif	241	-	GTCAT	胚乳表达必须顺式作用元件
	1 191	-		
	478	+		
TATCCAT/-motif	294	+	TATCCAT	
TGACG-motif	879	+	TGACG	包含于茉莉酸甲酯响应元件中的顺式作用元件
Unnamed-1	841	+	GAATTTAATTAA	6×10 ⁴ 蛋白质分子结合位点
Unnamed-11	1 393	+	TCCACATAGA	
Unnamed-4	3	-	CTCC	
	940	+		
	894	-		
	1 210	-		
	443	+		
	1 187	+		
	903	-		
	1 261	+		

“+、-”-DNA 正, 负链

“+、-”-DNA positive, negative strand

(MeJA) 处理刺五加的植株后, 其皂苷类化合物产量有所上升。而本实验研究表明, 刺五加 MDD 基因启动子序列含有 CGTCA-motif、TGACG-motif 2 种 MeJA 响应元件。同样, Shi 等^[10]对灵芝 MDD 基因的研究也表明, 不同浓度的 MeJA 处理可不同程度地影响灵芝 MDD 基因的表达, 并进而提高其皂苷量, 但仅浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理时, MDD 基因的活性增强, 而浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, MDD 基因的活性反而被抑制。有趣的是, 灵芝 MDD 基因启动子序列同样含有 2 个 MeJA 响应元件^[10]。

本研究还发现, 刺五加 MDD 基因启动子序列中还含有与繁殖有关的响应元件, 如胚乳表达必须顺式作用元件 SKn-1-motif, 与种子形成有关的 RY-element 元件。但 Shi 等^[10]对灵芝 MDD 基因启动子的研究却未发现此类顺式作用元件。可能是由于刺五加与灵芝的亲缘关系较远的原因所致。

对不同性别植株刺五加皂苷生物合成关键酶基因表达的研究结果表明, MDD 基因的最大表达量出现在雌性植株, 且显著高于雄性植株中的表达量^[11]。一般认为, 高等植物的雌性植株一般对环境胁迫的耐受能力低于雄性植株^[12], 因此, 初步推测刺五加 MDD 在不同性别植株中的差异表达可能与 MDD 基因启动子序列中的干旱胁迫等逆境胁迫响应元件有关。

参考文献

- [1] 樊如强, 傅宏征, 金学英, 等. 刺五加有效成分提取工艺考察及不同产地刺五加中有效成分量的比较 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 260-264.
- [2] 李志芬, 杨 扬, 由香玲, 等. 通过体细胞胚发生快繁优良刺五加植株的技术 [J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(10): 19-21.
- [3] Abbassi S J, Vishwakarma R K, Patel P, *et al.* Bacopa monniera recombinant mevalonate diphosphate: Biochemical characterization [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 79: 661-668.
- [4] Rossoni L, Hall S J, Eatham G, *et al.* The putative mevalonate diphosphate decarboxylase from *Picrophilus torridus* is in reality a mevalonate-3-kinase with high potential for bioproduction of isobutene [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(7): 2625-2634.
- [5] Chang W C, Lee T Y, Huang H D, *et al.* PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups [J]. *BMC Genom*, 2008, doi:10.1186/1471-2164-9-561.
- [6] 邢朝斌, 龙月红, 何 闪, 等. 刺五加甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶基因的克隆与表达分析 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(10): 1950-1956.
- [7] Liu Y G, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. *Biotechniques*, 2007, 43(5): 649-650.
- [8] Dehqhan N F, Yarizade K. Bioinformatics study of delta-12 fatty acid desaturase 2 (FAD2) gene in oilseeds [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(8): 5077-5087.
- [9] Jin K A, Youngki P, Wi Y L, *et al.* Increase of eleutherosides and antioxidant activity in *Eleutherococcus senticosus* adventitious root by jasmonic acid [J]. *J Korean Forset Soc*, 2007, 96(5): 539-542.
- [10] Shi L, Qin L, Xu Y, *et al.* Molecular cloning, characterization, and function analysis of a mevalonate pyrophosphate decarboxylase gene from *Ganoderma lucidum* [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 6149-6159.
- [11] 邢朝斌, 孟春燕, 修乐山, 等. 不同性别刺五加皂苷合成酶基因表达及其对皂苷含量的影响 [J]. 经济林研究, 2013, 31(3): 81-85.
- [12] 胥 晓, 杨 帆, 尹春英, 等. 雌雄异株植物对环境胁迫响应的性别差异研究进展 [J]. 应用生态学报, 2007, 18(11): 2626-2631.