

霍山石斛 β -1,4-木糖基转移酶 (IRX9) 基因克隆及生物信息学分析

周佩娜, 李 阳, 蒲天珍, 余 坤, 张秀桥, 龚 玲*

湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

摘要: 目的 克隆霍山石斛 β -1,4-木糖基转移酶 (IRX9) 基因, 并进行生物信息学、密码子偏性分析。方法 根据霍山石斛转录组数据获得的 IRX9 基因序列设计特异性引物, 通过 RT-PCR 技术得到 IRX9 基因 cDNA 的全长序列, 并进行生物信息学分析。结果 霍山石斛 IRX9 基因全长 1 533 bp, 包含一个长度为 1 047 bp 的开放阅读框, 编码 348 个氨基酸, 理论相对分子质量为 39 350, 等电点为 7.26, 为不含信号肽的亲水性稳定蛋白, 定位于质膜, 具有多个磷酸化位点和糖基化位点。系统进化树表明, 该序列与同科植物铁皮石斛的同源性最高, 且具有 GT-A 超家族的保守区域“DXD”。密码子偏性分析表明, 该基因偏好使用以 A/T 结尾的密码子, 具有 27 个偏性密码子, 烟草为该基因最适合的外源表达宿主。结论 成功克隆 IRX9 基因, 为从分子水平调控霍山石斛的生长发育和改善药材产量和品质提供理论基础。

关键词: 霍山石斛; β -1,4-木糖基转移酶; 基因克隆; 生物信息学分析; RT-PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1212-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.027

Cloning and bioinformatics analysis of β -1,4-xylosyltransferase IRX9 gene from *Dendrobium huoshanense*

ZHOU Pei-na, LI Yang, PU Tian-zhen, YU Kun, ZHANG Xiu-qiao, GONG Ling

College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective To clone IRX9 gene from *Dendrobium huoshanense* and perform the bioinformatics and codon bias analysis. **Methods** The full-length cDNA sequence was cloned from the IRX9 gene based on transcriptome sequencing data of *D. huoshanense* generated in our previous study by using RT-PCR and further analyzed by bioinformatic methods. **Results** The cloned IRX9 gene was 1 533 bp, containing a 1 047 bp open reading frame (ORF) which encoded 348 amino acids. The theoretical molecular weight was 39 350 and its isoelectric point was 7.26. IRX9 protein was a hydrophilic protein and had no signal peptide, which had multiple phosphorylation sites and glycosylation sites and might be located in the plasma membrane. Phylogenetic analysis indicated that sequence of amino acids had the highest homology with *D. candidum* and the conserved region “DXD” of the GT-A superfamily. Codon bias analysis showed that IRX9 gene preferred to use A/T ending codon, with 27 skewed codons. *Nicotiana* is the most suitable host for exogenous expression of IRX9 gene. **Conclusion** The IRX9 gene was cloned from *Dendrobium huoshanense* successfully and it provided a theoretical basis for regulating the growth and development of *D. huoshanense* and improving the yield and quality of *D. huoshanense*.

Key words: *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng; β -1,4-xylosyltransferase; gene cloning; bioinformatics analysis; RT-PCR

霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng 又称米斛, 由于药用价值高, 功效奇特, 在历史上被誉为“中华九大仙草之首”^[1]。现代研究证实, 霍山石斛的具有抗氧化^[2-4]、抗白内障^[5]、保肝^[6]、抗肿瘤^[7-8]、降血糖^[9]等多种生物活性, 已成为各类保健药品和保健食品开发的热门

对象。但是霍山石斛对生长环境的要求极其苛刻, 低温、高温及病原菌等逆境胁迫常常影响其生存和繁殖^[10-12], 导致霍山石斛药材产量及品质下降, 无法满足国内外市场的需求。

糖基转移酶广泛存在于植物体内, 与多糖、糖脂、糖蛋白、植物次生产物、核酸等生物分子的代

收稿日期: 2018-09-03

基金项目: 湖北中医药大学“青苗计划”项目 (2016ZZX019)

作者简介: 周佩娜 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: 18771036136 E-mail: 285030182@qq.com

*通信作者 龚 玲, 女, 讲师, 主要从事中药品种鉴定及新资源开发研究。E-mail: lg1224@163.com

谢密切相关,可以参与多种物质的糖基化,在植物抗逆境方面起着重要作用。按照所催化的底物的性质和序列相关性,生物界存在的糖基转移酶被划分成 90 多个不同的家族。 β -1,4-木糖基转移酶(IXR9)属于 GT43 家族成员之一,能够促进细胞壁主要组成物质木聚糖的合成,从而参与细胞壁的形成,影响植物的生长发育、逆境应答等功能^[13]。

迄今为止,关于霍山石斛的研究主要集中在组织培养、化学成分、药理等方面,从分子水平上研究霍山石斛生长及逆境胁迫响应等机制的报道较少。因此,本研究基于课题组前期霍山石斛转录组测序数据,采用基因克隆等方法,对霍山石斛 IRX9 基因进行研究,旨在进一步为揭示该基因在霍山石斛生长及抗逆方面的功能作用奠定基础,以期将来通过基因工程手段,为调控霍山石斛的生长发育和改善药材产量和品质提供理论基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

实验材料为课题组前期组织培养的霍山石斛新鲜叶片,经湖北中医药大学张秀桥教授鉴定为兰科石斛属植物霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng,清水洗净后于滤纸吸干水分,作为提取霍山石斛 RNA 的材料。

1.2 试剂

多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒购于天根生化科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购于北京擎科新业生物技术有限公司;PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、TaKaRa LA Taq、pMD18-T Vector Cloning Kit 购于大连宝生物技术有限公司;DH5 α 感受态细胞购于上海唯他生物技术有限公司;2 $\times$ Easy Taq Mix 购于北京全式金生物技术有限公司;引物合成和测序技术服务均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 的提取,按照 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录体系进行 cDNA 的合成。

2.2 霍山石斛 IRX9 基因全长的克隆

根据课题组前期霍山石斛转录组数据获得的 IRX9 基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,IRX9-F: 5'-CCTTAGAGATGGCAAC-ATTAGGCTTCAGT-3'; IRX9-Z: 5'-CCAAATCCA-

ACCGTTACCTCCCG-3'。以反转录的 cDNA 为模板,采用 LA Taq 反应体系进行 PCR 扩增,反应体系总体积为 25 μ L: MgCl₂ 2.5 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 10 $\times$ LA Taq Buffer II 2.5 μ L, cDNA 3 μ L, 正、反向引物各 1 μ L, ddH₂O 10.75 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C、5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s; 55 $^{\circ}$ C、45 s; 72 $^{\circ}$ C、90 s。35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 永久。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带切胶回收。用 TA-cloning Kit 的载体与目的基因连接,将阳性克隆送上海生工进行测序。

2.3 霍山石斛 IRX9 基因序列的生物信息学分析

利用 NCBI 在线软件 BLAST 对霍山石斛 IRX9 基因序列进行相似性搜索;利用 CodonW 和 EMBOSS 分析该基因密码子的相应参数;利用 DANMAN 软件寻找开放阅读框(ORF),并对其氨基酸序列进行蛋白同源性分析;蛋白的理化性质用 ExPASy、SOPMA 分析;采用 SignalP 4.1 Server 预测信号肽;利用 STRING 软件,以拟南芥蛋白数据库作为参考分析该蛋白与其他蛋白的相互作用;利用 NetPhos 3.1 Server 和 Net NGlyc 1.0 Server 预测蛋白的糖基化和磷酸化位点;利用 ExPasy-ProtScale 分析蛋白亲/疏水性;利用 PSORT 以及 SOPMA 和 SWISS-MODEL 分别进行蛋白的亚细胞定位和二、三级结构预测;蛋白跨膜结构域的预测采用 TMHMM Server v. 2.0;利用 MEGA6.0 构建系统发育树(Neighbor-Joining, NJ)。

3 结果与分析

3.1 霍山石斛 IRX9 基因 cDNA 克隆及序列分析

本实验提取得到的霍山石斛总 RNA 的 28 S 和 18 S RNA 2 条带清晰,无弥散拖尾等现象,且总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0。以提取的总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,发现在 1 500 bp 左右处出现的特异片段(图 1-A),与该基因片段预期大小基本一致。

将 PCR 产物进行 TA 克隆测序,发现霍山石斛 IRX9 基因序列全长为 1 553 bp (GenBank 登录号 MH507317)。该序列经 BLAST 搜索比对后发现与铁皮石斛相似性最高,说明该序列扩增正确。利用 DNAMAN 软件 ORF 框查询功能对序列进行信息分析,发现本序列的 ORF 全长 1 047 bp,编码 348 个氨基酸(图 1-B)。

3.2 霍山石斛 IRX9 基因编码蛋白的生物信息学分析

利用 NCBI 中的 Conserved Domain 搜索后发

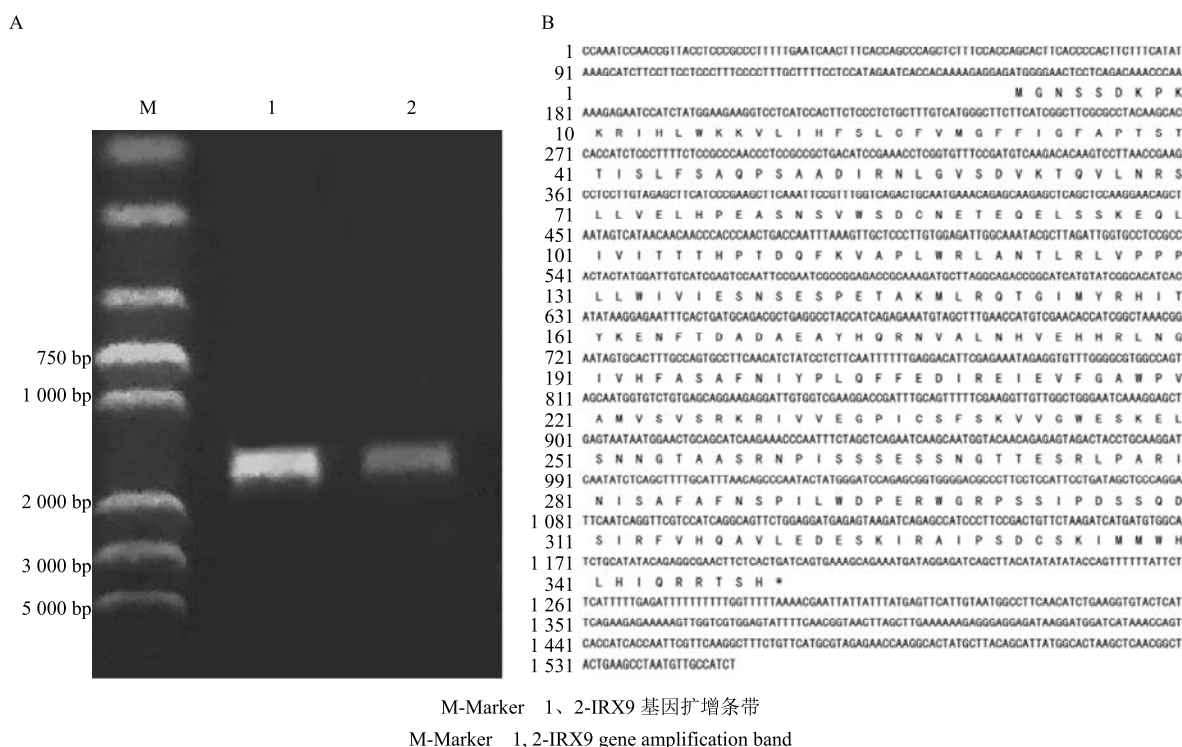


图 1 霍山石斛 IRX9 基因的 PCR 扩增 (A) 和 cDNA 序列 (B)

Fig. 1 PCR amplification (A) and cDNA sequence (B) of IRX9 gene from *D. huoshanense*

现 IRX9 基因编码的蛋白有 5 个 β -1,3-葡萄糖醛酸转移酶 (β -1,3-glucuronyltransferase I, GlcAT-I) 的活性位点 (苏氨酸 Thr-104、组氨酸 His-106、异亮氨酸 Ile-133、丝氨酸 Ser-195、苯丙氨酸 Phe-197), 属于糖基转移酶 A (glycosyltransferase family A) 超家族成员, 隶属于糖转移酶 GT43 家族 (图 2)。利用在线软件 ProtParam 对霍山石斛 IRX9 基因编码氨基酸进行序列分析, 发现其相对分子质量为 39 350; 等电点为 7.26; 分子式为 $C_{1758}H_{2742}N_{492}O_{514}S_{11}$; 不稳定指数为 52.60; 脂肪族指数为 86.01; 总平均疏水性为 -0.253, 为亲水性蛋白。在 IRX9 基因编码氨基酸的分布中, 丝氨酸含量最高为 12.1%, 其次是异亮氨酸为 7.8%, 半胱氨酸和缬氨酸最少均为 1.1%。其中负电荷残基 (Asp+Glu) 有 36 个, 正电荷残基 (Arg+Lys) 36 个。

利用 STRING 在线软件, 以拟南芥蛋白数据库

作为参考分析 IRX9 蛋白与其他蛋白的相互作用, 发现 IRX9 和 GAUT12 (参与果胶的组装和分配, 并参与次生壁葡萄糖醛酸的合成, 可能参与葡萄糖醛酸还原端糖基序列的合成) 互作分数最高为 0.973, 其次与 GUT2 (参与次生细胞壁的主要成分-半纤维素葡萄糖醛酸木聚糖的合成, 可能参与葡萄糖醛酸木聚糖骨架的伸长, 尤其是木聚糖侧链的形成) 互作分数较高, 此外还与 FRA8、PARVUS、GUT1、CESA4、PGSIP1、IRX3、PGSIP3 相互作用, 说明 IRX9 蛋白可能与细胞壁的形成和木聚糖的积累相关 (图 3)。利用 Net NGlyc 1.0 Server 预测霍山石斛 IRX9 蛋白的糖基化位点, 发现该蛋白 6 个糖基化位点 (3、67、87、163、252、280) (图 4-A)。利用 NetPhos 3.1 Server 预测霍山石斛 IRX9 蛋白的磷酸化位点和蛋白激酶结合位点, 发现该蛋白共有磷酸化位点 38 个 (图 4-B), 其中丝氨酸 29 个, 苏氨酸 8 个, 酪氨酸 1

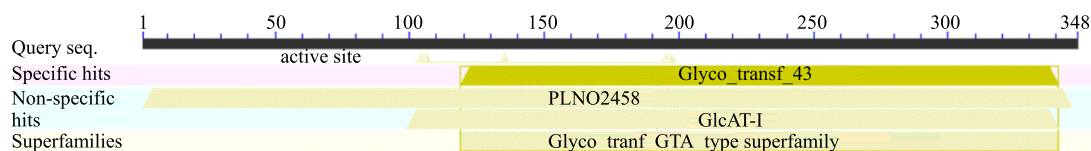


图 2 霍山石斛 IRX9 蛋白结构保守区域

Fig. 2 Conserved domain of IRX9 protein of *D. huoshanense*

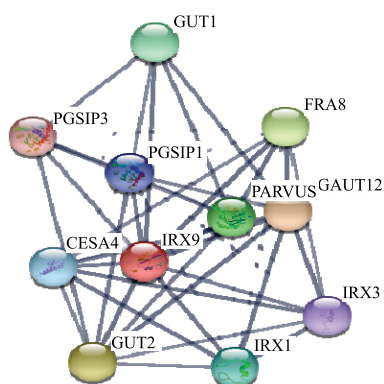


图 3 霍山石斛 IRX9 蛋白互作分析

Fig. 3 Protein interaction analysis of IRX9 in *D. huoshanense*

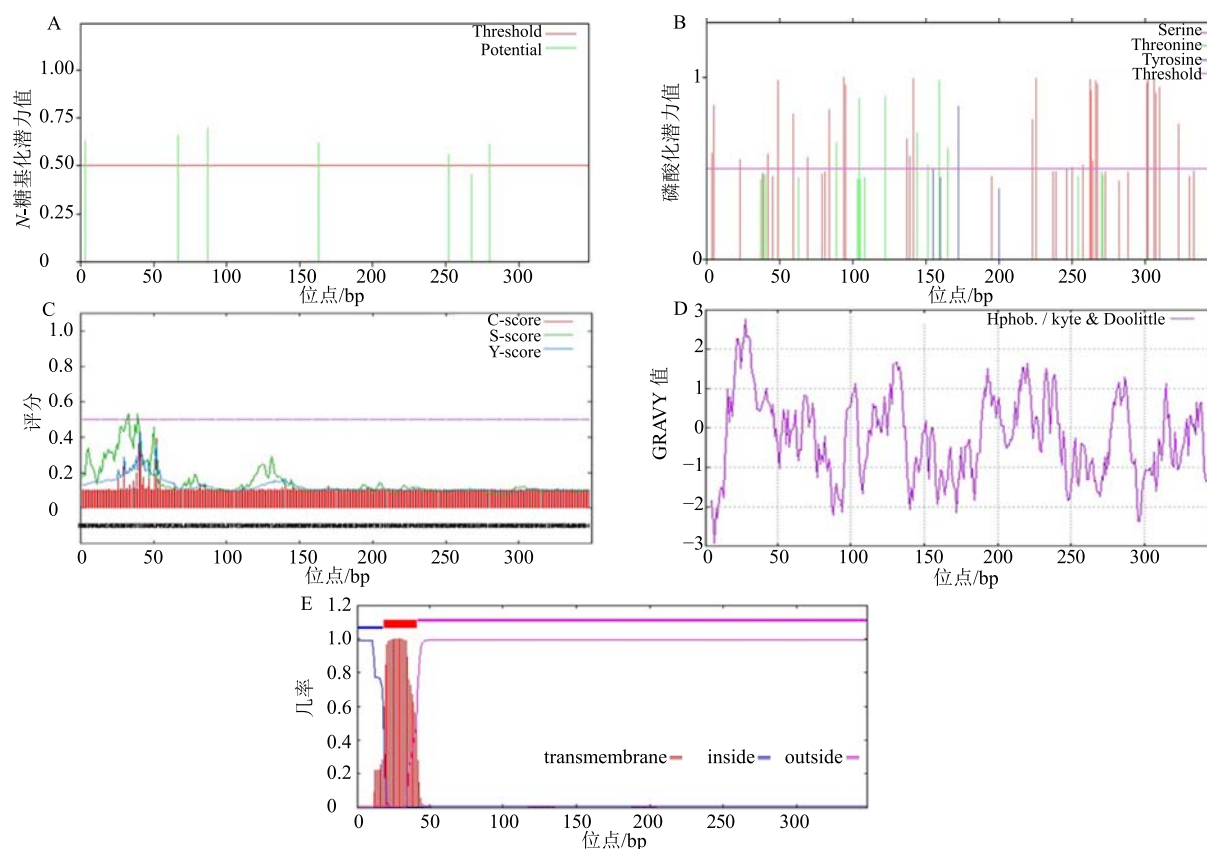


图 4 霍山石斛 IRX9 蛋白糖基化位点 (A)、蛋白磷酸化位点 (B)、蛋白信号肽 (C)、蛋白亲水性/疏水性 (D)、蛋白跨膜区 (E) 预测

Fig. 4 Prediction of potential glycosylation sites (A) of IRX9 protein in *D. huoshanense*, prediction of potential phosphorylation sites (B), protein prediction of signal peptide (C), protein predicted hydrophilicity/hydrophobicity (D) and protein transmembrane prediction (E)

0.300、0.790。说明 IRX9 蛋白最可能定位于质膜。TMHMM Server v. 2.0 的跨膜结构域分析发现该蛋白存在 1 个跨膜区 (1~41 位氨基酸, 图 4-E)。利用 SOPMA 对 IRX9 的二级结构进行分析, 结果表

明该蛋白二级结构中 α -螺旋 (H) 占 27.87%, β -折叠 (E) 占 5.46%, 无规卷曲 (C) 占 49.14%, 转角 (T) 占 5.46%。Swiss-Model Workspace 预测 IRX9 蛋白三级结构, 并利用 pymol 可视化处理后的结果

利用 DNAMAN 软件对霍山石斛 IRX9 基因编码氨基酸与其他植物进行同源比对,发现其与铁皮石斛 *Dendrobium catenatum* Lindl. (PKU66056.1)、油棕 *Elaeis guineensis* Jacq. (XP_010920919.1)、石刁柏 *Asparagus officinalis* L. (XP_020276313.1)、猴面花 *Erythranthe guttata* L. (XP_012831918.1) 具有较高相似性,分别为 97.13%、56.58%、55.46%、46.56%,同时还含有“DXD”高度保守的结构域(图 6)。利

利用 CodonW 和 EMBOSS 软件分析霍山石斛 IRX9 基因的有效密码子数 (effective number of codons, ENC)、不同位置的 GC 含量 (GC1s、GC2s、GC3s)、总 GC 含量、密码子适应指数 (codon adaptation index, CAI)、同义密码子相对使用度 (relative synonymous codon usage, RSCU), 发现

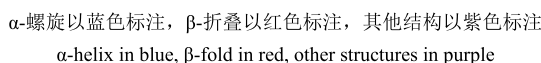


Fig. 5 Tertiary structure of IRX9 protein (A) in *D. huoshanense* and active site in tertiary structure (B)

霍山石斛	SSQDSIRFVHQAVLEDESIRAIIPSD.CSKIMMHLHIQR	RTSH.....	34
铁皮石斛	SSQDSIRFVHQAVLEDESIRAIIPSD.CSKIMMHLHIQR	RTSH.....	34
猴面花	TSQNSIRFVRKEVLEEEAKVKIGITGGSKVLLDLHIS.		33
石刁柏	TSQDSIKFKVQEVVLEDESKLKAIPSD.CSKIMLHLHIPR	TLTTSPPSSSQSKNR	36
油杉	TSQDSFKFKVQEVVLEENKLIKIPFD.NSKIMLHLHIPR	VIPLFPFRQQR.	34
Cons	tsdsdsirfv	vledesk kaipsd cskimlwhlhi r	

Similarity is set to 50% as threshold, greater than or equal to 50% is highlighted in blue, greater than or equal to 75% is in pink, and 100% is in dark blue

Fig. 6 Comparison of IRX9 amino acid sequences between *D. huoshanense* and other plants

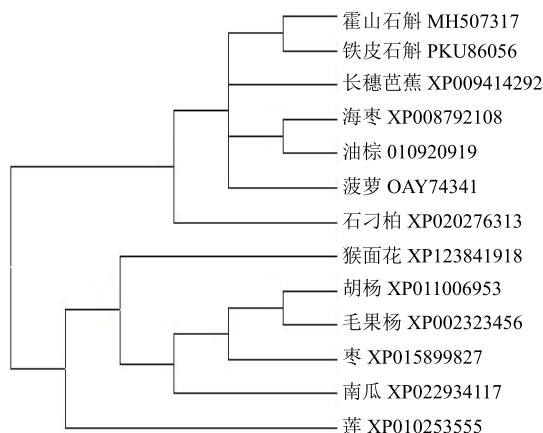


图 7 IRX9 氨基酸序列 NJ 树

Fig. 7 Phylogenetic analysis of IRX9 amino acid sequence

CAI 为 0.191 远小于 1, 说明该基因的表达水平并不高; ENC 为 55.504, 说明密码子偏性较弱; 总 GC 值为 0.454 5, GC1s、GC2s 和 GC3s 分别为 0.487 4、0.458 4 和 0.417 8 均小于 0.5, 说明该基因编码区的 AT 含量高于 GC 含量; 当 RSCU=1 时, 密码子没有偏好性; 当 RSCU>1 时, 密码子具有偏好性, 表 1 中 RSCU>1 的密码子共有 28 个, 其中 21 个以 A/T 结尾, 7 个以 G/C 结尾, 说明霍山石斛 IRX9 基因偏好于使用 A 或 T 结尾的密码子。

利用在线软件 EMBOSS-CHIP 分析霍山石斛 IRX9 基因密码子的使用频率, 在数据库 CodonUsage Database 查找拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.、

烟草 *Nicotiana glauca* L.、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 基因组的密码子偏好性, 霍山石斛的 IRX9 基因与拟南芥、烟草、酵母、大肠杆菌各密码子使用频率的比值分别用 Dh/At、Dh/Ns、Dh/Sc、Dh/Ec 表示 (表 2)。若 2 物种间的密码子使用偏好性差异较小, 该比值常在 0.5~2, 不在此范围内则差异较大, 差异较大的密码子个数越少则说明 2 种物种密码子偏好性相似, 有利于基因的异源表达。霍山石斛 IRX9 基因与拟南芥、烟草、酵母、大肠杆菌偏好性差异较大的密码子个数依次为 19、18、27、22, 说明烟草最适合该基因的异源表达。

4 讨论

植物在生长的过程中, 常常会遭受各种逆境胁迫, 严重时会影响其生长、产量及品质。植物为了抵抗逆境产生的伤害, 通过调控某些基因的表达改变抗逆物质的水平, 从而直接或间接参与抗逆的过程。糖基转移酶是一类负责分子发生糖基化过程的关键酶, 其产物可以组成细胞壁结构, 也可用于免疫反应, 细胞间信号的传递等, 在调节植物细胞代谢平衡、维持植物正常生长、参与植物抗逆境方面发挥重要作用^[14]。胡红群^[15]利用盐胁迫处理拟南芥后, 通过分析糖基转移酶的表达情况, 筛选出 2 个抗盐胁迫的糖基转移酶 UGT85A5 和 UGT91A1, 将其分别转入到拟南芥及烟草构建 2 种植物的过表达

表 1 霍山石斛 IRX9 RSCU>1 的密码子

Table 1 RSCU >1 of IRX9 of *D. huoshanense*

氨基酸	密码子	数量	RSCU	氨基酸	密码子	数量	RSCU
苯丙氨酸	TTC	19	1.03	丝氨酸	TCA	11	1.38
亮氨酸	CTT	11	1.74		AGC	11	1.38
	CTC	12	1.89	脯氨酸	CCT	10	1.14
异亮氨酸	ATT	10	1.50		CCA	16	1.83
	ATC	7	1.05	苏氨酸	ACT	6	1.20
缬氨酸	GTT	5	1.25		ACC	8	1.60
	GTG	5	1.25	丙氨酸	GCT	11	1.57
酪氨酸	TAT	8	1.23		GCA	8	1.14
终止密码子	TAA	11	1.22	半胱氨酸	TGT	12	1.20
	TGA	10	1.11	精氨酸	CGA	8	1.12
组氨酸	CAT	18	1.20		AGA	16	2.23
谷氨酰胺	CAA	12	1.14	甘氨酸	GGA	14	2.00
天冬酰胺	AAT	11	1.05	天冬氨酸	GAT	12	1.60
赖氨酸	AAA	15	1.36	谷氨酸	GAG	13	1.08

表 2 霍山石斛 IRX9 基因与酵母、大肠杆菌、烟草、拟南芥基因组密码子使用频率比较

Table 2 Comparison of codon usage frequency of IRX9 gene among genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Nicotiana sylvestris*, and *Arabidopsis thaliana*

氨基酸	密码子	密码子偏好的比值				氨基酸	密码子	密码子偏好的比值			
		Dh/Ec	Dh/Sc	Dh/Ns	Dh/At			Dh/Ec	Dh/Sc	Dh/Ns	Dh/At
丙氨酸	GCA	0.789	0.955	0.676	0.884	脯氨酸	CCA	4.182	1.691	1.317	1.922
	GCC	0.531	1.075	1.050	1.315		CCC	5.642	1.991	1.962	2.555
	GCG	0.119	0.624	0.823	0.430		CCG	0.155	0.730	0.806	0.450
	GCT	1.542	1.004	0.617	0.752		CCT	3.335	1.433	0.930	1.034
半胱氨酸	TGC	3.684	3.224	2.063	2.149	谷氨酰胺	CAA	1.719	0.850	1.080	1.196
	TGT	4.002	2.866	2.668	2.211		CAG	0.705	1.439	1.061	1.145
天冬氨酸	GAC	0.384	0.287	0.358	0.337	精氨酸	AGA	12.895	1.453	1.853	1.629
	GAT	0.774	0.617	0.652	0.634		AGG	3.684	0.841	0.561	0.703
谷氨酸	GAA	0.724	0.467	0.594	0.620		CGA	6.448	5.158	3.684	2.456
	GAG	1.397	1.310	0.901	0.781		CGC	0.720	5.208	2.763	3.563
苯丙氨酸	TTC	1.955	1.997	2.112	1.775		CGG	1.934	5.689	2.058	1.974
	TTT	1.205	1.334	1.475	1.597		CGT	0.354	0.907	0.542	0.645
甘氨酸	GGA	3.302	2.484	1.034	1.119	丝氨酸	AGC	1.488	2.171	2.171	1.883
	GGC	0.292	0.987	0.676	1.051		AGT	1.719	1.090	1.279	1.105
	GGG	0.406	0.967	0.518	0.569		TCA	3.488	1.138	1.457	1.163
	GGT	0.476	0.486	0.367	0.523		TCC	1.934	1.090	1.407	1.382
组氨酸	CAC	3.224	2.976	2.668	2.668		TCG	0.509	0.675	1.758	0.624
	CAT	3.744	2.560	3.224	2.523		TCT	1.593	0.576	0.618	0.537
异亮氨酸	ATA	1.161	0.326	0.547	0.461	苏氨酸	ACA	1.268	0.435	0.499	0.493
	ATC	0.437	0.787	0.974	0.732		ACC	0.614	1.218	1.460	1.502
	ATT	0.571	0.643	0.741	0.900		ACG	0.265	0.484	1.045	0.502
赖氨酸	AAA	0.994	0.692	1.022	0.942	缬氨酸	ACT	1.507	0.572	0.553	0.663
	AAG	1.539	0.440	0.418	0.414		GTA	0.365	0.328	0.348	0.391
亮氨酸	CTA	1.707	0.433	0.817	0.586		GTC	0.541	0.656	0.697	0.284
	CTC	1.646	4.298	1.951	1.442		GTG	0.285	0.895	0.556	0.556
	CTG	0.211	1.105	1.568	1.184		GTT	0.493	0.438	0.341	0.356
	CTT	1.675	1.730	0.838	0.883	色氨酸	TGG	0.761	0.930	0.768	0.774
	TTA	0.111	0.074	0.161	0.152		TAC	1.138	0.653	0.649	0.706
天冬酰胺	TTG	0.520	0.356	0.415	0.463	酪氨酸	TAT	0.832	0.823	0.916	1.060
	AAC	1.216	0.780	1.144	0.925		ATG	0.310	0.555	0.480	0.474
	AAT	1.004	0.596	0.937	0.954						

转基因植物,进一步的耐盐性分析发现,糖基转移酶 UGT85A5 和 UGT91A1 基因参与了植物的耐盐反应。高世超等^[16]克隆了青花菜 β -1,4-木糖基转移酶 (IRX9H) 基因,并模拟酸雨胁迫条件分析该基因的表达情况,结果表明该基因在青花菜抗酸雨胁迫中发挥了作用。综上,糖基转移酶基因在植物抵御不良环境和适应环境起着关键作用。因此,研究霍山石斛的糖基转移酶基因,可为提高霍山石斛自身的逆境生存能力,从而改善该药材的产量和品质提供理论依据。

本研究从霍山石斛中克隆到了 IRX9 基因,该基因 cDNA 全长 1 553 bp,包含 1 个长度为 1 047 bp 的开放阅读框。生物信息学分析表明 IRX9 基因编码 348 个氨基酸,预测理论蛋白质相对分子质量为

39 350,等电点为 7.2,属于 GT-A 超家族成员,含有 (GlcAT-I) 的部分区域。氨基酸同源性及系统发育树分析发现,霍山石斛与其他植物序列相似性高,与铁皮石斛的同源性可达 97.31%。同时,霍山石斛含有与其他物种相似的功能序列元件“DXD”。据报道“DXD”元件为 GT-A 超家族的重要特征,可以与二价阳离子配位,稳定核苷酸糖的结合,是糖基转移酶具有催化活性的重要元件^[16]。由此推断,霍山石斛也具有其他糖基转移酶相似的催化活性,可能在植物的生长及抵御不良胁迫环境具有重要作用。

植物的正常生长发育,离不开具有多种生物学功能的蛋白及蛋白间的相互作用。STRING 分析了 IRX9 编码蛋白与其他蛋白的相互作用(以拟南芥

蛋白数据库作为参考),发现 IRX9 和其他蛋白如 GAUT12、GUT2 等相互作用一起促进细胞壁主要组成物质木聚糖的合成,从而影响生长发育、抗逆性等功能,而糖基化、磷酸化等蛋白修饰过程与 IRX9 蛋白的功能密切相关,分析该蛋白的糖基化及磷酸化位点发现,霍山石斛 IRX9 蛋白有 38 个磷酸化位点、6 个糖基化位点以及多个特异性的蛋白激酶结合位点。这些蛋白相互作用以及特殊位点的存在可能影响 IRX9 蛋白的活性,调节相关基因的表达。由此可见,为阐明霍山石斛生长发育及抗逆的分子机制,需进一步明确 IRX9 蛋白的具体功能。

目前大肠杆菌、酵母、烟草、拟南芥等模式生物异源表达系统的使用,在新基因的发现与蛋白功能研究上已经日趋成熟。但是尽管生物在自然界漫长的进化过程中沿用着同一套遗传密码,然而环境的变化、人为的干预、基因的突变等因素使得生物形成了自己独特的密码子偏好性,导致了外源基因的异源表达困难^[17],因此利用异源表达系统研究蛋白功能时有必要先对物种密码子偏性进行分析以及密码子的优化,以此为依据选择合适的表达宿主。本研究发现霍山石斛 IRX9 偏好于使用 A 或 T 结尾的密码子,且该基因编码区的 AT 含量高于 GC 含量。分析四种物种及霍山石斛 IRX9 的密码子使用频率,发现霍山石斛 IRX9 与烟草具有偏好性差异较大的密码子个数最少,说明该基因更适合在烟草中表达。这为今后 IRX9 蛋白功能的鉴定及定向改良霍山石斛品质提供了理论基础。

参考文献

- [1] 雪 声, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001.
- [2] 陈凤芹, 黄德武, 何 苗, 等. 霍山石斛胶囊抗氧化作用的研究 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(10): 54-58.
- [3] Huang G L, Chen X, Huang H L, *et al.* Chemical modifications and biological activities of polysaccharides [J]. *Curr Drug Targets*, 2016, 17(15): 1799-1803.
- [4] 查学强, 王军辉, 潘利华, 等. 石斛多糖体外抗氧化活性的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(10): 90-93.
- [5] 李秀芳, 邓媛元, 潘利华, 等. 霍山石斛多糖对糖尿病性白内障大鼠眼球晶状体组织抗氧化作用的研究 [J]. 中成药, 2012, 34(3): 418-421.
- [6] 田长城, 罗建平. 霍山石斛中不同多糖组分的保肝活性 [J]. 食品科学, 2015, 36(7): 162-166.
- [7] Li F, Cui S H, Zha X Q, *et al.* Structure and bioactivity of a polysaccharide extracted from protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense* [J]. *Intern J Biol Macromol*, 2015, 72: 664-672.
- [8] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75.
- [9] 李秀芳. 霍山石斛和四种药典石斛多糖降血糖活性比较研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2014.
- [10] 陶宏志, 汪学军, 韩彭垒, 等. 八种药剂防治霍山石斛煤污病病原菌研究 [J]. 齐齐哈尔大学学报: 自然科学版, 2017, 33(2): 53-56.
- [11] 吴进东. 油菜素内酯对霍山石斛抗冷性能的调控效应 [J]. 西北植物学报, 2015, 35(5): 985-990.
- [12] 吴进东, 陈 科, 刘苏一, 等. 油菜素内酯增强霍山石斛耐热性的研究 [J]. 中药材, 2017, 40(12): 2781-2784.
- [13] Lee C, Teng Q, Huang W, *et al.* The arabidopsis family GT43 glycosyltransferases form two functionally nonredundant groups essential for the elongation of glucuronoxylan backbone [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(2): 526-541.
- [14] 孟庆山, 尹 恒, 胡建恩, 等. 植物糖基转移酶在植物抗病过程中的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2013, 24(2): 290-293.
- [15] 胡红群. 拟南芥耐盐相关糖基转移酶基因的鉴定 [D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [16] 高世超, 钟凤林, 林义章, 等. 青花菜 β -1,4-木糖基转移酶 IRX9H 基因的克隆及在模拟酸雨胁迫下的表达分析 [J]. 热带作物学报, 2014, 35(04): 729-737.
- [17] Perlak F J, Deaton R W, Armstrong T A, *et al.* Insect resistant cotton plants [J]. *Biotechnology*, 1990, 8(10): 939-943.