

冬凌草 1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)基因克隆与分析

苏秀红, 尹磊, 陈随清*
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**为研究冬凌草二萜类合成的相关基因,在冬凌草转录组信息数据的基础之上,以冬凌草无菌苗为研究材料,克隆冬凌草二萜类合成的关键酶 1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶(1-deoxy-D-xyluloses-phosphatereductoisomerase, DXR)基因。**方法:**采用逆转录 PCR 技术克隆冬凌草 DXR 基因,实时荧光定量 PCR 法分析其组织表达模式。**结果:**DXR cDNA 基因全长 1 500 bp, DXR 基因开放阅读框为 1 422 bp, 编码 473 个氨基酸组成的蛋白质序列,理论相对分子质量为 51.39 kDa,等电点为 6.09,是一种亲水性蛋白。DXR 在茎中表达量相对较高,在愈伤组织中表达量最低。**结论:**研究结果为深入研究冬凌草 DXR 酶的活性和功能及为冬凌草二萜类化合物的生物合成机制、优良基因挖掘奠定基础。

[关键词] 冬凌草; 二萜; 1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶

[中图分类号] R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0037-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120037

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160426.1029.020.html>

[网络出版时间] 2016-04-26 10:29

Cloning and Analysis of cDNA Encoding Key Enzyme DXR in Diterpenoids Biosynthesis Pathway from *Rabdosiae Rubescentis* Herba

SU Xiu-hong, YIN Lei, CHEN Sui-qing*
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the genes related to the synthesis of diterpenoid. Based on the data of transcriptome sequencing, cDNAs encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatereductoisomerase (DXR) were obtained from the leaves of aseptic seedlings of *Rabdosiae Rubescentis* Herba. **Method:** DXR was obtained by reverse transcription PCR. Real-time quantitative PCR was used to detect the relative expression patterns of DXR in different tissues of *Rabdosiae Rubescentis* Herba. **Result:** Sequence analysis showed that the full-length cDNA of DXR was 1 500 bp and contains gene open reading frame (ORF) of 1 422 bp encoding 473 amino acids. The theoretical molecular weight was 51.39 kDa and the isoelectric point was predicted as 6.09, suggesting it was a type of hydrophilic protein. The expression pattern of the gene in different tissues was analyzed by Real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed the expression of DXR was relatively high in the stem and the lowest in callus. **Conclusion:** The results will provide a basis for studying the activity and function of DXR from *Rabdosiae Rubescentis* Herba, and lay a foundation for biosynthesis and gene mining of terpenoids.

[Key words] *Rabdosiae Rubescentis* Herba; diterpenoid; 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase

冬凌草为唇形科香茶菜属植物碎米桠 *Rabdosia rubescens* 的干燥地上部分,主要用于咽喉肿痛,瘰疬痞块,蛇虫咬伤。主产于我国山西、河南、湖北、四川等省份。由于在抗癌方面突出的疗效,故 1977 年

[收稿日期] 20151004(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173486);河南中医学院创新人才项目(2011XCXRC02)

[第一作者] 苏秀红,博士,副教授,从事中药生物技术研究, Tel:0371-65962746, E-mail:suxiuhong80@163.com

[通讯作者] * 陈随清,博士,教授,从事中药鉴定研究, Tel:0371-65962746, E-mail:suiqingchen5@163.com

版《中国药典》将此药收载。

迄今为止众多的研究表明,冬凌草所含的二萜类物质——冬凌草甲素、冬凌草乙素是其主要的抗癌成分^[1-2]。随着人们对萜类合成途径的深入研究发现,萜类物质的合成途径主要有甲羟戊酸(MVA)和赤藓糖磷酸途径(MEP)2种途径,前者主要为倍半萜、三萜和甾醇等物质来源;而后者主要为单萜、二萜、四萜类物质合成途径^[3]。作为二萜类物质的冬凌草甲素和冬凌草乙素,其来源主要为 MEP 途径。

1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)是催化 MEP 途径第二步反应的酶,该反应将 DXP 转化为 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)。研究表明 DXR 参与了类异戊二烯的积累,是 MEP 途径上最重要的限速反应,也是萜类物质代谢工程最重要的靶点^[3]。在小立碗藓中(*Physcomitrella patens*)超量表达 DXR,能够促进萜类物质的合成,显示 DXR 也是调控萜类合成积累的有效调控靶点^[4]。迄今为止,该酶序列在多种植物中如长春花 *Tharanthus roseus*^[5],丹参 *Salvia miltiorrhiza*^[6],杜仲 *Eucommia ulmoides*^[7],柴胡 *Bupleurum chinense*^[8],雷公藤 *Tripterygium wilfordii*^[9],沉香 *Aquilaria sinensis*^[10],雨生红球藻 *Haematococcus pluvialis*^[11],薄荷 *Mentha haplocalyx*^[12] 等已经被克隆成功并进行了进一步的分析。但在萜类物质丰富的冬凌草植物中却未见有关该基因克隆的相关报道。尽管目前对二萜类的生物合成途径已有了基本的认识,然而对冬凌草甲素的生物合成途径及一些起重要作用的关键酶的功能和调控机制仍然处于未知阶段。为了深入了解冬凌草中冬凌草甲素的生物合成途径及其分子调控机制,本研究在转录组测序的基础之上,从冬凌草叶片中克隆得到 DXR 基因,并采用生物信息学的方法对该酶的基因及相应氨基酸序列的理化性质、系统演化关系等进行了预测和分析,最后采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)技术分析了该酶基因在冬凌草不同组织中的表达变化情况,旨在冬凌草二萜类化合物的生物合成机制、优良基因挖掘奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 冬凌草无菌苗,由课题组所在研究室培养。由河南中医学院陈随清教授鉴定为唇形科香茶菜属植物碎米桠 *R. rubescens*。

1.2 试剂 RNA 提取试剂盒(批号 DP432),cDNA 第一链合成试剂盒(批号 K1622),均购自郑州诺唯赞试剂公司;琼脂糖粉(111860),5 × TEA 缓冲液

(RT204)购自天根生物制品有限公司;Ex-Taq 酶(RR001Q),连接试剂盒(6022)购自 Takara 公司;引物合成和基因测序由上海生物工程公司完成。菌株 *Escherichia coli* DH5 α (9057)及载体 pMD-18T simple(6011)购自 Takara 公司。

1.3 冬凌草总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 取冬凌草无菌苗叶片加液氮研磨,根据购买的试剂盒说明书提取冬凌草总 RNA,紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳检测后,采用 cDNA 第一链合成试剂盒合成冬凌草 cDNA 第一链。

1.4 cDNA 全长克隆 根据冬凌草转录组数据得到 DXR 基因全长 cDNA 序列信息,从两端非编码区设计一对特异性引物:上游 5'-TCCAGTCGATCATACTCAACCA-3',下游 5'-GCACCTTCCATTCTTCAGC-3'。

以冬凌草叶片 cDNA 模版,根据目的基因的大小选用 Takara 生产的 Ex-Taq 酶,建立 50 μ L 反应体系,反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。采用 0.5% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳,目的条带采用回收试剂盒进行切胶回收,回收产物连接到 T 载体上,通过蓝白斑筛选,进行摇菌培养,做 PCR 阳性克隆检测后,将阳性克隆菌液送往上海生工进行双向测序。

1.5 冬凌草 DXR 基因 cDNA 序列的生物信息学分析 采用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接和比对,将拼接结果提交 NCBI 进行 BLAST 检索,进行基因确认。用 ORF finder 查找基因开放阅读框,并在线推导该基因序列的蛋白质序列,采用 ExPasy 软件分析蛋白质序列的理化性质、亲疏水性、跨膜区域、活性位点、磷酸化位点、二级结构、三级结构等预测,并比较同源序列,分别建立系统进化树。

1.6 DXR 基因的组织特异性表达分析 以冬凌草无菌苗的根、茎、叶、愈伤组织 cDNA 为模版,GAPDH 为内参,利用 Real-time PCR 的方法检测 DXR 在不同组织中的表达情况。

内参引物:上游 5'-AAACGCCTAACTTCGCATCT-3',下游 5'-CCCGAGTATTGGACCTGATT-3'。

DXR 引物:上游 5'-TGTGTGCAAGAGGGAGAA CA-3',下游 5'-CACTGGAATTGTTGGCTGTG-3'。

Real-time PCR 检测的反应体系:2xQuantiNova SYBR Green PCR Master Mix(QIAGEN)10 μ L,正反向引物均为 0.4 μ L,cDNA 模板 2 μ L;加 ddH₂O 至 20 μ L,反应程序:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30

s, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 冬凌草总 RNA 提取与检测 冬凌草无菌苗总 RNA 在紫外分光光度计下, A_{260}/A_{280} 为 1.93, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测可以看出(图 1)蛋白质、酚类、多糖、等杂质已基本去除, 总 RNA 纯度较高, 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示, 可以清晰地看出 rRNA 3 条条带(28 S rRNA, 18 S rRNA, 5 S rRNA), 说明所提 RNA 完整性较好, 可以用于后续的实验操作, 可以用于后续的实验操作。

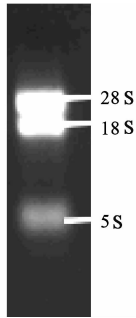


图 1 RNA 凝胶电泳检测

Fig. 1 RNA gel electrophoresis detection

2.2 DXR 基因的 cDNA 全长克隆 以反转录得到的 cDNA 为模板及根据转录组所设计的引物进行 PCR 扩增, 经过 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 特异性条带长度约为 1 500 bp, 将回收产物克隆到 pMD18-T 载体后, 通过蓝白斑筛选, 对白斑菌点进行摇菌培养, 然后做 PCR 检测, 然后将阳性克隆菌液, 送往上海生工测序。见图 2。

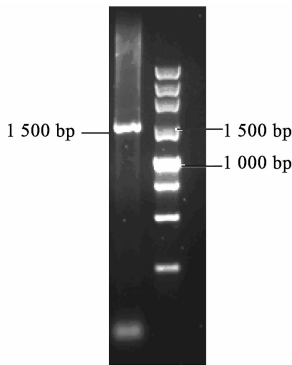


图 2 DXR 基因序列扩增产物

Fig. 2 DXR gene sequence amplification products of *Rabdosia Rubescens* Herba

2.3 冬凌草 DXR 序列生物信息分析与系统发育树构建

2.3.1 理化性质及其细胞定位 利用在线 Translate 软件将 DXR 的 cDNA 全长序列翻译成氨基酸序列, 提交到 Expasy 在线软件系统的工具对其

进行基本理化性质的分析, DXR 基因开放阅读框为 1 422 bp, 该基因编码 473 个氨基酸残基的蛋白, 原分子组成为 $C_{2307}H_{3677}N_{615}O_{678}S_{16}$, 总原子数为 7 293, 相对分子质量为 51.39 kDa, 等电点为 6.09, 带负电的氨基酸有 55 个(Asp + Glu), 带正电的氨基酸有 49 个(Arg + Lys), 不稳定系数是 39.86, 推测其为稳定蛋白。见图 3。

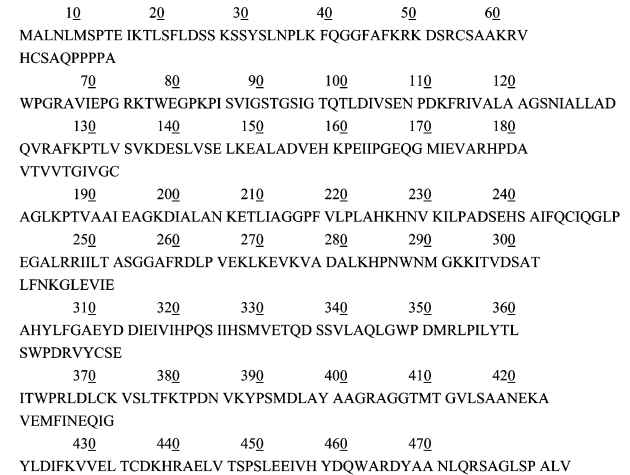


图 3 DXR 蛋白质序列

Fig. 3 Protein sequences of DXR

将 DXR 蛋白的氨基酸序列提交到 ExPASy 在线服务系统的 ProtScale 工具, 选择 Kyte and Doolittle 算法, 计算出各种氨基酸标度上的蛋白质的亲疏水性, 从整体来看, 亲水性氨基酸分布多于疏水性氨基酸, 可认为冬凌草 DXR 蛋白是亲水性蛋白。

冬凌草 DXR 蛋白经过 TargetP 1.1 serve 在线工具分析其转运肽, 得到如下结果: 叶绿体转运肽(chloroplast transit peptide, cTP)的分数是 0.654, 线粒体转运肽(mitochondrial transitpeptide, mTP)的分数是 0.051, 分泌途径信号肽(secretory pathway of signal peptide, SP)的分数是 0.015, 其中叶绿体转运肽的分值最高, 因此, 冬凌草 DXR 存在转运肽, 定位于叶绿体, 为 MEP 途径存在于质体中提供依据。

用 TMHMM 2.0 Server 分析冬凌草 DXR 跨膜结构, 结果显示冬凌草 DXR 肽链位于膜外, 不存在跨膜区域。结合转运肽的分析结果可以推断, DXR 蛋白在游离核糖体上合成完成后, 被转运到叶绿体中行使功能, 不与膜结合。

对冬凌草 DXR 蛋白磷酸化位点的预测, 有利于对其功能的进一步了解。利用 NetPhos 2.0 在线磷酸化位点分析工具进行预测。结果表明整个多肽链存在 25 个氨基酸磷酸化位点(>0.5), 其中丝氨酸 17 个, 分别在肽链上第 7, 15, 19, 20, 23, 25, 42, 45,

81,131,136,227,230,324,351,442,444 位;苏氨酸 4 个,在肽链第 73,93,328,377 位;酪氨酸 4 个,分别在肽链上第 24,309,383,421 位。

2.3.2 DXR 蛋白三级结构的预测 使用 SWISS-MODEL 程序对 DXR 蛋白进行三级结构同源建模。根据同源建模原理,目标蛋白与模板蛋白相似 >30% 即可建模,在 PDB 蛋白质数据库中选择与 DXR 序列一致性最高(44.48%)的 4 kp 7.1. A 蛋白为模板进行同源建模,得到 DXR 结构模型。见图 4。



图 4 DXR 蛋白三级结构预测

Fig. 4 Prediction of 3-D structure of DXR protein

2.2.3 同源比较及系统进化树分析 应用 DNAMAN 软件对多种植物的 DXR 蛋白氨基酸序列进行多重比对,分析植物同源蛋白。系统分化表明 DXR 与同科植物丹参 (*S. miltiorrhiza* ACK57535.1),毛喉鞘蕊花 (*Plectranthus barbatus* AAR99081.1),薰衣草 (*Lavandula angustifolia* AGQ04155.1) 关系较近,与双子叶植物,杜仲 (*E. ulmoides* AFU93071.1) 关系较远,同源系统进化树,见图 5。

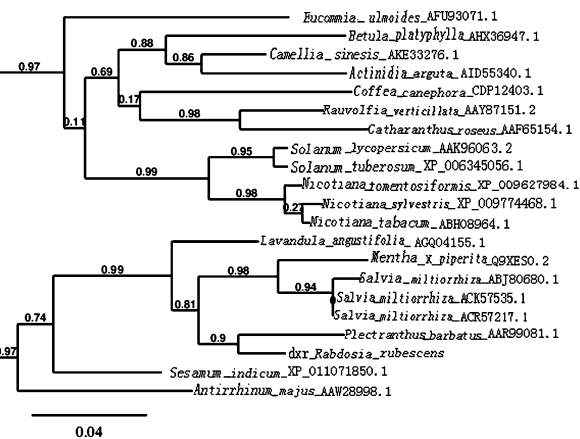


图 5 冬凌草 DXR 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of DXR from Rabdosiae Rubescens Herba

2.3 DXR 基因在不同组织中的表达分析 分别采用检测合格的冬凌草根、茎、叶、愈伤组织的 RNA 反

转录获得 cDNA,以 GAPDH 为内参,采用实时荧光定量方法,测定该基因在根、茎、叶、愈伤中的相对表达量,结果表明,DXR 在愈伤组织中的表达量最低,茎中表达量较高,其中茎的表达量是根的 2.13 倍,是愈伤组织表达量的 5.4 倍,叶片中的表达量与根中表达量相似。见图 6。

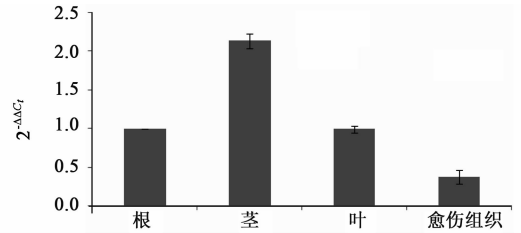


图 6 DXR 基因在冬凌草不同组织中的表达

Fig. 6 Expression of DXR gene in tissues of Rabdosiae Rubescens Herba

3 讨论

目前对冬凌草的研究仅限于组织培养^[13-14]、提取分离^[15]、药理作用^[16]等方面,对于冬凌草分子生物学方面的研究相对甚少,特别是对于其有效成分冬凌草甲素的生物合成途径的研究未见相关报道,这就为利用生物工程技术调控冬凌草甲素的合成造成很大阻碍。合成途径中对于关键酶结构和功能的研究是明确冬凌草甲素合成途径的主要方法。本研究所克隆的 DXR 酶属于二萜类合成上游途径中的一个很关键的酶。冬凌草中的 DXR 基因全长 1 500 bp,相对分子质量为 51.39 kD,等电点为 6.09,为稳定、亲水性蛋白,这与山鸡椒 DXR 蛋白研究结果相一致^[17-18]。同源比较发现,本研究所分离得到的 DXR 与双子叶植物同源性较高,特别是同科植物丹参、毛喉鞘蕊花、薰衣草关系较近,但又不同于他们,说明本研究 DXR 基因是首次报道的从冬凌草植物中分离得到的。

荧光定量分析结果表明,DXR 在愈伤组织中的表达量最低,茎中表达量较高,这可能与冬凌草不同部位或者不同组织中合成二萜类的物质有关,但结合前期笔者的研究结果来看,叶中冬凌草甲素含量最高、茎中次之^[19],愈伤组织中未检测到冬凌草甲素^[20],研究表明,过量表达 DXR 基因能提高植株中萜类物质的含量^[21],证明了 DXR 在萜类生物合成途径中发挥着重要作用。目前大多数学者在信号物质的刺激作用下来研究基因表达与代谢物质形成之间的关系。如 Yu 等^[22]发现小白菊 *Tanacetum parthenium* 中小白菊内酯的积累与 DXR 基因表达似乎没有一定的关系^[23],但是对青蒿^[24]、丹参^[25]、

银杏^[26]的研究却发现次生代谢产物的含量与 DXR 基因的表达模式基本一致。作为 MEP 途径上最受关注的酶基因之一,在冬凌草甲素的生物合成途径中该基因是否调控冬凌草甲素的化合物的生物合成有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 张俊峰,陈规划,陆敏强,等.冬凌草甲素诱导肝癌细胞凋亡中 Bcl-2 及端粒酶变化的研究[J].中国中药杂志,2006,31(21):1811-1814.

[2] 刘俊保,岳静宇.冬凌草甲素对 EC9706 细胞增殖、凋亡的影响[J].郑州大学学报,2014,49(1):8-11.

[3] 马靓,丁鹏,杨广笑,等.植物萜类生物合成途径及关键酶的研究进展[J].生物技术通报,2006(增刊):22-30.

[4] Pan X W, Han L, Zhang Y H. Sclareol production in the moss *Physcomitrella patens* and observations on growth and terpenoid biosynthesis [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2015, 9(3):149-159.

[5] 达韩梅,赵博,安志刚.长春花萜类吲哚生物碱生物合成途径中重要酶(DXR、SLS、G10H、S. TR)基因的克隆与表达[J].植物研究,2007,27(5):564-568.

[6] 严向明.丹参酮代谢途径 DXR 基因的克隆、特性分析及功能初步验证和 DXSI 基因启动子的克隆[D].上海:上海师范大学,2010.

[7] 刘攀峰,杜红岩,乌云塔娜,等.杜仲 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因 cDNA 全长克隆与序列分析[J].林业科学研究,2012,25(2):195-200.

[8] 董乐萌,刘玉军.柴胡皂苷合成途径中三个关键酶基因片段的克隆与序列分析[J].世界科学技术—中医药现代化,2008,10(5):56-60.

[9] 祝传书,陈欣,郭嘉,等.雷公藤 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原酶基因(TwDXR)的克隆与表达分析[J].农业生物技术学报,2014,22(3):298-308.

[10] Liu J, Xu Y H, Liang L, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of the gene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Aquilaria inensis* (Lour.) Gilg [J]. *J Genet*, 2015, 94(2):239-249.

[11] Liang C W, Zhang W, Zhang X W. Isolation and expression analyses of methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway genes from *Haematococcus pluvialis* [J]. *J Appl Phycol*, 2015:1-10.

[12] 李嵘,王喆.植物萜类合成酶 脱氧 1-脱氧-D-木酮糖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.

[13] 苏秀红,董诚明,王春雷.冬凌草离体培养体系的建立及主要次生代谢产物的测定[J].西北植物学报,2008,28(2):310-316.

[14] 苏秀红,董诚明,王伟丽.冬凌草组织培养物中主要次生代谢产物积累动态的研究[J].中国中药杂志,2008,33(9):1080-1082.

[15] 董诚明,苏秀红,王伟丽.氮碳源对冬凌草再生植株生长及次生代谢产物的影响[J].西北植物学报,2009,29(3):494-498.

[16] 李吉学,李燕杰,陈百泉.冬凌草甲素提取纯化方法[J].河南大学学报:医学版,2010,29(1):10-12.

[17] 宋芳,冯一中,蒋小岗,等.冬凌草甲素对人胰腺癌 SW1990 细胞系生长抑制作用[J].中国药理学通报,2010,26(2):240-243.

[18] 刘英冠,吴庆珂,何关顺,等.山鸡椒 1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶 DXR 基因的克隆和 SNP 分析[J].林业科学研究,2015,28(1):93-100.

[19] 苏秀红,李雪菊,董诚明,等.冬凌草甲素、迷迭香酸在冬凌草植株内空间积累的动态规律[J].中国医药导报,2009,6(21):5-6.

[20] 张艳贞,董诚明,苏秀红,等.稀土元素对冬凌草愈伤组织生长及冬凌草甲素、乙素含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(3):132-135.

[21] 陈韵斐,张芳源,唐克轩.过量表达 DXR 基因提高青蒿中青蒿素的含量[J].上海交通大学学报:农业科学版,2012,30(5):19-23.

[22] Yu H, John D N, Zhang L. De novo transcriptome sequencing in *Ficus hirta* Vahl. (Moraceae) to investigate gene regulation involved in the biosynthesis of pollinator attracting volatiles [J]. *Tree Genet & Genomes*, 2015, 11(5):1-9.

[23] Zuo K, Ling H, Qiu C, 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.

[24] Xiang L, Zhu S Q, Zhao T F. Enhancement of artemisinin content and relative expression of genes of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* by exogenous MeJA treatment [J]. *Plant Growth Regul*, 2015, 75(2):435-441.

[25] Shi M, Luo X Q, Ju G H. Increased accumulation of the cardio-cerebrovascular disease treatment drug tanshinone in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by the enzymes 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase [J]. *Funct Integr Genomics*, 2014, 14(3):603-615.

[26] Sabater-Jara A B, Souliman-Youssef S, Novo-Uzal E, et al. Biotechnological approaches to enhance the biosynthesis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* [J]. *Phytochem Rev*, 2013, 12(1):191-205.

[责任编辑 邹晓翠]