

# 青天葵 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 基因片段的鉴定和分析

黄琼林<sup>1</sup>, 何 瑞<sup>2</sup>, 詹若挺<sup>2</sup>

(1. 广东医学院, 广东 湛江 524023; 2. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心,  
岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006)

**摘 要:** 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS)是植物萜类 MEP 生物合成途径的第一个限速关键酶, 提高其编码基因的表达可提高植物萜类化合物的含量。该研究在青天葵全转录组测序数据中获取青天葵 DXS 基因片段序列, 利用生物信息学方法对其系统发育进化、保守功能域、理化性质、亲/疏水性、跨膜结构域、信号肽等进行分析 and 预测, 并采用 RPKM 法分析其在青天葵叶片和球茎的表达量, 为后期利用 DXS 基因调控青天葵萜类成分的生物合成提供理论依据。结果表明: *NfDXS* 基因片段序列长度为 2 154 bp, 编码含有 718 个氨基酸、分子量约为 77.45 kDa 的亲水性蛋白, 与其它 DXS 同源性可达 80%。*NfDXS* 具有 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶功能域, 没有信号肽和跨膜结构域, 二级结构表现为混合型结构蛋白质。*NfDXS* 基因在青天葵中的表达趋势为: 叶片>球茎。

**关键词:** 青天葵; 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶; 生物信息学; 表达量

**中图分类号:** Q 946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2015)22-0114-04

青天葵属兰科毛唇芋兰(*Nervilia fordii* (Hance) Schltr.)的全草或叶片, 是岭南地区名贵中药, 又叫独叶莲、独脚莲、独脚天葵等, 具有清肺止咳、清热解毒、散瘀消肿的功效<sup>[1]</sup>。植物化学研究表明, 萜类化合物是青天葵主要化学成分, 是发挥抗炎镇痛、抗肿瘤等功效的物质基础之一<sup>[2-3]</sup>。因此, 在药效成分较为清楚的前提下, 通过植物基因工程整体提高青天葵萜类化合物的含量, 是提高青天葵药效, 缓解青天葵资源匮乏困境的可考虑方法之一。

植物萜类生物合成途径主要有 2 条, 分别是位于细胞质中的甲羟戊酸途径(MVA pathway)和位于质体中的甲基-D-赤藓醇-4-磷酸途径(MEP pathway)<sup>[4]</sup>。MEP 途径以 3-磷酸甘油醛和丙酮酸为起始反应物, 在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phos-

phate synthase, DXS)的作用下缩合成第 1 个重要中间体 1-去氧木糖-5-磷酸酯(DXP), 经异构化和还原反应, 形成第 2 个重要中间体 2-甲基赤藓糖-4-磷酸酯(MEP), 再经去磷酸化、环化等步骤生成 IPP 和 DMAPP, 从而衍生各种萜类化合物<sup>[5]</sup>。因此, DXS 被认为是 MEP 途径的第一个限速关键酶<sup>[6]</sup>。研究表明, 提高 DXS 编码基因的表达可以促进萜类化合物的合成<sup>[7-9]</sup>。目前, DXS 基因已从阳春砂<sup>[9]</sup>、鱼腥草<sup>[10]</sup>、沉香<sup>[11]</sup>等多种药用植物中克隆和功能鉴定。

该研究通过 RNA-seq 高通量测序获取青天葵 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶编码基因片段序列, 并对其进行生物信息学和表达量分析, 为后期青天葵 DXS 的克隆和功能鉴定以及利用其调控青天葵萜类化合物的生物合成提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

在课题组前期完成的青天葵转录组 Illumina RNA-seq 高通量测序的基础上, 该研究以“1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase”为检索词, 以  $E < 10$  为标准, 获得注释的青天葵转录组基因数据库中查找编码青天葵 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶的 Unigene 序列。另外, 在 GenBank

**第一作者简介:** 黄琼林(1986-), 男, 博士, 讲师, 现主要从事医学生物化学等研究工作。E-mail: perfectqh@163.com.

**责任作者:** 何瑞(1972-), 女, 博士, 研究员, 现主要从事中药资源可持续利用等研究工作。E-mail: ruihe@gzucm.edu.cn.

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30701090); 广东省自然科学基金博士启动资助项目(2015A030310519); 广东医学院博士学位人员科研启动资助项目(B2013017)。

**收稿日期:** 2015-07-29

数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)中下载阳春砂、高良姜等植物 *DXS* 基因序列。

## 1.2 试验方法

利用 CLustalX 和 MEGA 5.1 软件对 *NfDXS* 以及其它 16 种 *DXS* 基因进行多重比对并构建系统发生树。采用 OMIGA 软件将 *DXS* 基因核苷酸序列翻译成氨基酸序列,采用 NCBI 的 Conserved Domains Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测青天葵 *DXS* 基因编码蛋白的保守功能域;利用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protParam/>) 分析氨基酸序列,计算基因编码蛋白的基本理化参数,并运用 ProtScale 在线工具 (<http://web.expasy.org/protScale/>) 分析蛋白的亲/疏水性特征;分别采用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 TargetP1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 完成青天葵 *DXS* 蛋白的跨膜结构域和信号肽的预测;通过 SOPMA 在线工具 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 分析青天葵 *DXS* 蛋白的二级结构分析。

## 1.3 项目测定

利用 RPKM 法(Reads Per Kb per Million reads)计算青天葵 *DXS* 基因在叶片和球茎的表达量,计算公式为:RPKM (*DXS*) = (1 000 000 C)/(NL/1 000)。设 RPKM (*DXS*) 为编码青天葵 *DXS* 基因的 Unigene 的表达量,则 C 为唯一比对到编码青天葵 *DXS* 基因的 Unigene 的读数,N 为唯一比对到所有 Unigene 的总读数,L 为编码青天葵 *DXS* 基因的 Unigene 碱基数。

## 2 结果与分析

### 2.1 青天葵 *DXS* 片段检索结果

在青天葵全转录组测序数据库检索到注释为 *DXS* 基因的 Unigene 16585,其长度为 2 154 bp,编码 718 个氨基酸,命名为 *NfDXS*。

### 2.2 *NfDXS* 系统发育分析

如图 1 所示,*NfDXS* 与单子叶植物油棕、阳春砂、高良姜、姜花 *DXS* 基因聚在一起,而双子叶植物来源的 *DXS* 基因则聚集成另外一个分支,这与传统植物进化结

果相一致。*NfDXS* 与其它来源的 *DXS* 基因具有较好的保守性,其中,*NfDXS* 与油棕 *DXS* 基因的同源性高达 80%。系统发育分析结果初步表明 *NfDXS* 为编码青天葵 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合酶的基因。

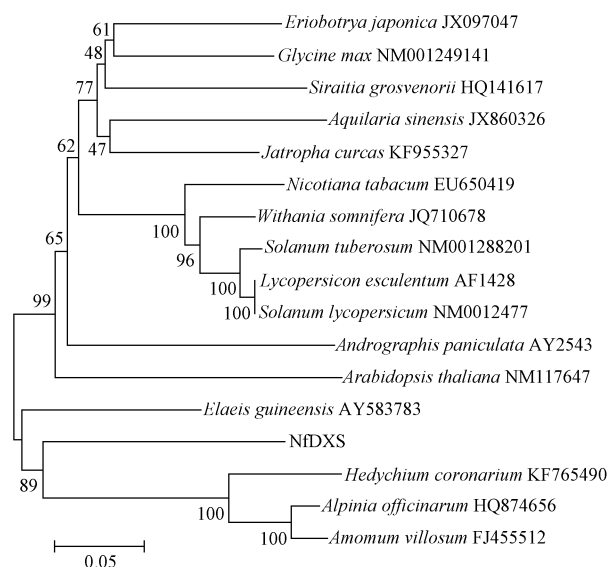


图 1 不同植物 *DXS* 基因的系统发育树

### 2.3 *NfDXS* 蛋白功能域分析

通过分析编码蛋白序列上的保守功能域和结合位点,可以推测基因的功能。将 *NfDXS* 核苷酸序列翻译至氨基酸序列,提交至 CDD 数据库计算。结果表明,*NfDXS* 编码蛋白在 111~366 个氨基酸、401~556 个氨基酸和 576~699 个氨基酸分别存在硫胺素焦磷酸-1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合酶(TPP\_DXS)功能域、1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合酶嘧啶结合(TPP\_PYR\_DXS\_TK\_like)功能域、转酮醇酶(Transketolase, TK)功能域,另外还有多个硫胺素焦磷酸(Thiamine pyrophosphate, TPP)结合功能位点。此外,*NfDXS* 编码蛋白在 75~708 个氨基酸之间具有 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 多功能结构域,表明其具有 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合酶的功能。因此,*NfDXS* 确定为青天葵 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合酶编码基因。将 *NfDXS* 核苷酸序列提交至 GenBank,获得的登记号为 KR817906。

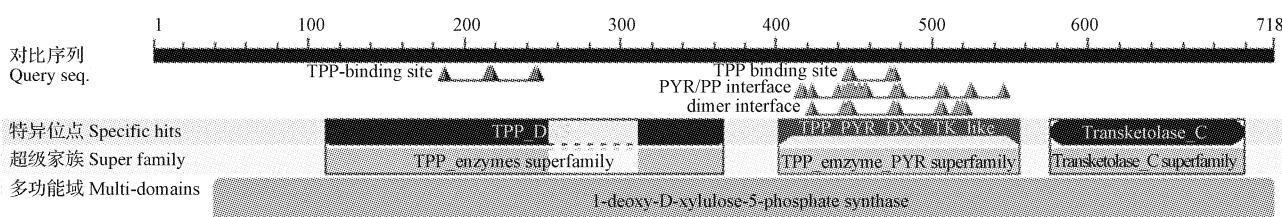


图 2 *NfDXS* 编码蛋白保守功能域

## 2.4 NfDXS 蛋白的理化性质分析

利用 ExPASy ProtParam 在线工具预测 NfDXS 蛋白的相对分子量、等电点、脂溶性指数、两亲性指数等理化特征。NfDXS 分子量约为 77.45 kDa, 等电点为 6.59。碱性氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 71, 酸性氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 76。脂溶性指数为 88.76, 总平均亲水性指数为 -0.102。ExPASy ProtScale 软件分析结果表明, NfDXS 蛋白属于亲水性蛋白。

## 2.5 NfDXS 蛋白的跨膜结构和信号肽分析

利用 TMHMM 软件预测 NfDXS 蛋白序列的跨膜结构域, 结果如图 3 所示, NfDXS 蛋白不含跨膜结构域, 整条多肽链均处于细胞膜外。由此可以推测, 青天葵 DXS 蛋白不经过跨膜转运, 可能直接在质体中发挥催化萜类相关物质合成的功能。

信号肽位于分泌性蛋白 N 端, 一般由 16~26 个氨基酸残基组成, 包括疏水核心区、信号肽的 N 端和 C 端 3 个部分组成; 它在分泌性蛋白合成结束之前将被切除<sup>[12]</sup>。TargetP 1.1 Server 分析结果显示, 青天葵 DXS

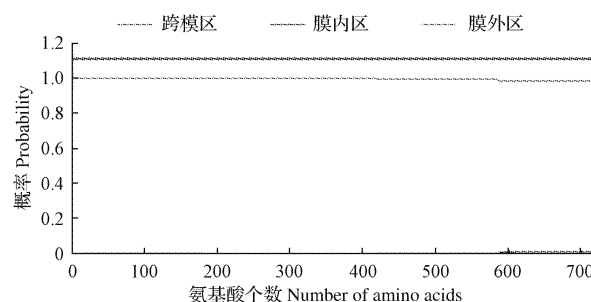
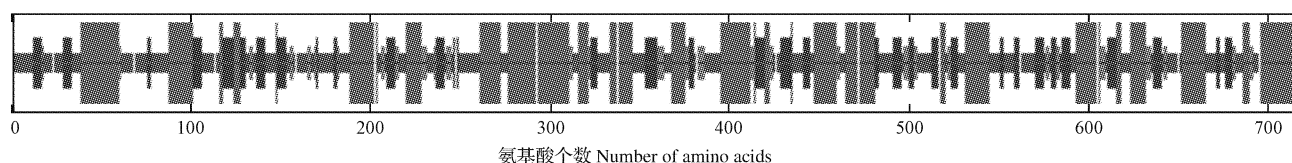


图 3 NfDXS 蛋白跨膜结构域预测

蛋白不含有信号肽结构, 表明青天葵 DXS 属于非分泌性蛋白。

## 2.6 NfDXS 蛋白二级结构分析

如图 4 所示, NfDXS 蛋白二级结构由  $\alpha$ -螺旋、不规则盘绕、 $\beta$ -转角和延伸链等元件组成, 各元件所占比例分别为 38.02%、34.96%、8.77% 和 18.25%。从蛋白的整体结构来看,  $\alpha$ -螺旋和不规则盘绕是 NfDXS 最大量的结构元件, 而延伸链和  $\beta$ -转角则相对分散于整条多肽链中。因此, NfDXS 为混合型结构的蛋白质。



注: 蓝色代表  $\alpha$ -螺旋, 紫色代表不规则盘绕, 红色代表延伸链, 绿色代表  $\beta$ -转角。

图 4 NfDXS 蛋白二级结构模拟图

## 2.7 NfDXS 基因表达量分析

在对转录组高通量测序数据的处理中, RPKM 法对测序长度和基因长度均作了归一化, 使得不同长度的基因在不同测序深度下得到的基因表达水平估计值具有可比性, 是目前最常用的基因表达量计算方法<sup>[13]</sup>。结果如图 5 所示, NfDXS 在叶片中的 RPKM 表达量高于在球茎中的 RPKM 表达量, 提示青天葵 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶基因的表达趋势为叶片>球茎。

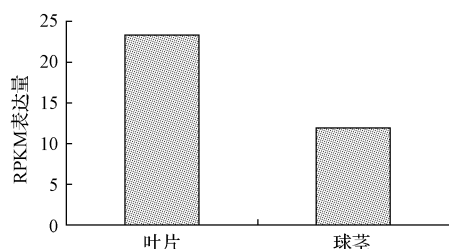


图 5 NfDXS 基因在青天葵球茎和叶片中的表达分析

## 3 讨论

生物信息学是以因特网和计算机为主要工具, 采用数理和信息科学的理论和方法, 分析生物学数据, 研究

生命现象的一门应用型交叉学科。它包含了生物信息的获取、加工、存储、分配、分析、解释等在内的所有方面, 来阐明和理解大量生物数据所包含的生物学意义。它在 1990 年人类基因组计划(HGP)的背景下应运而生, 随着基因组学、转录组学、代谢组学等大数据技术的迅速发展, 现已成为当今生命科学最具吸引力和重大的前沿领域。采用各种分子生物学数据库和分析软件对已知的核酸和蛋白序列进行分析, 从而推断及预测其结构和功能, 已成为生物信息学研究的一种趋势。通过生物信息学方法预测, 能为试验验证指明方向, 减少试验误差, 有利于科学研究的成功率<sup>[14]</sup>。

该研究应用生物信息学鉴定并分析 NfDXS 基因片段的核苷酸序列及其编码蛋白的氨基酸序列, 推测青天葵 DXS 蛋白在结构上属于以  $\alpha$ -螺旋和不规则盘绕为主要结构元件的混合型结构蛋白; 在功能上是具有非分泌性、亲水性蛋白, 并且不具有跨膜结构域, 在质体中发挥催化萜类生物合成。通过保守功能域预测, 青天葵 DXS 蛋白是一种转酮醇酶, 具有硫胺素焦磷酸\_1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合酶功能域、1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合酶嘧啶结合功能域和转酮醇酶功能域, 这一结论与 EU-



BANKS 等<sup>[15]</sup>生物 DXS 蛋白是一种依赖于焦磷酸硫胺素的转酮醇酶的论断相符合。此外,青天葵 DXS 蛋白还具有 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶合成酶多功能域,表明其具有催化萜类物质合成的作用。研究表明,植物 DXS 家族具有 2 个主要成员,DXS1 参与植物初生代谢过程中所需萜类物质的合成,而 DXS2 主要合成与植物次生代谢过程中所需的萜类化合物<sup>[16]</sup>。因此,该研究中获取的 *NfDXS* 基因及其编码蛋白如何调控萜类物质的合成还待进一步研究。

该研究通过转录组 RNA-seq 全测序挖掘青天葵 DXS 基因片段序列,并应用生物信息学方法对其进行功能鉴定和表达分析,以期为青天葵 DXS 基因及其蛋白的生物特征、青天葵萜类化合物生物合成的分子机制研究提供理论指导。

### 参考文献

- [1] 陈蔚文. 岭南本草(二) [M]. 广州:广东科技出版社,2010:326-351.
- [2] 梅全喜. 青天葵的化学成分药理作用与临床应用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2008,26(10):2239-2241.
- [3] 邱莉,徐灵源,缪建华,等. 青天葵植物化学成分和药理活性研究进展[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2258-2260.
- [4] 张长波,孙红霞,巩中军,等. 植物萜类化合物的天然合成途径及其相关酶[J]. 植物生理学通讯,2007,43(4):779-786.
- [5] 占爱瑶,由香玲,詹亚光. 植物萜类化合物的生物合成及应用[J]. 生物技术通讯,2010,21(1):131-135.
- [6] 罗永明,刘爱华,李琴,等. 植物萜类化合物的生物合成途径及其关键酶的研究进展[J]. 江西中医学院学报,2003,15(1):46-51.
- [7] MARTIN V J J, PITERA D J, WITHERS S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21: 796-802.
- [8] MUNOZ-BERTOMEU J, ARRILLAGA I, ROS R, et al. Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender [J]. Plant Physiol, 2006, 142(3): 890-900.
- [9] YANG J, ADHIKARI M N, LIU H, et al. Characterization and functional analysis of the genes encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the two enzymes in the MEP pathway, from *Amomum villosum* Lour [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(8): 8287-8296.
- [10] 魏麟,伍贤进,李胜华,等. 鱼腥草 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 1 基因克隆与表达分析[J]. 中草药, 2014, 45(11): 1607-1612.
- [11] XU Y, LIU J, LIANG L, et al. Molecular cloning and characterization of three cDNAs encoding 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. [J]. Plant Physiol Biochem, 2014, 82: 133-141.
- [12] 程波,杨伟俊,何江,等. 10 种药用植物萜类合酶(DXS)生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2015, 31(2): 146-152.
- [13] 王曦,汪小我,王立坤,等. 新一代高通量 RNA 测序数据的处理与分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(8): 834-836.
- [14] 李卿,邸鹏,陆文铨,等. 丹参柯巴基焦磷酸合酶的生物信息学分析[J]. 中草药, 2015, 46(6): 887-894.
- [15] EUBANKS L M, POULTER C D. Rhodobacter capsulatus 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase: steady state kinetics and substrate binding [J]. Biochemistry, 2003, 42(4): 1140-1149.
- [16] DAISUKE M, HOLGER J K, YOHEI S, et al. The single cellular green microalga *Botryococcus braunii*, race B possesses three distinct 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases[J]. Plant Sci, 2012, 185: 309.

## Identification and Analysis of DXS Gene Fragment in *Nervilia fordii*

HUANG Qionglin<sup>1</sup>, HE Rui<sup>2</sup>, ZHAN Ruoting<sup>2</sup>

(1. Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524023; 2. Research Center of Chinese Medicinal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine/Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource From Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou, Guangdong 510006)

**Abstract:** 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase is the first rate-limiting key enzyme of plant MEP terpenoids biosynthesis pathway. Enhancing the expression of DXS gene can promote the biosynthesis of terpenoids in plants. Here, one DXS gene fragment was identified from the transcriptome data of *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. and named as *NfDXS* using bioinformatics. *NfDXS* encoded 718 amino acids and the coding protein was hydrophilic protein with a molecular weight at 77.45 kDa. *NfDXS* protein contained a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase functional domain and none signal peptide and transmembrane region. Secondary structure prediction revealed *NfDXS* was a hybrid protein. The expression level of *NfDXS* gene in leaf was higher than in corm. The study would provide a firm foundation for regulating the synthesis of effective terpenoids by gene manipulation of DXS in *N. fordii*.

**Keywords:** *Nervilia fordii* (Hance) Schltr.; 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; bioinformatics; expression