

DOI:10.11937/bfyy.201612021

冬凌草异戊烯基焦磷酸异构酶基因(*IDI*)克隆与分析

苏秀红, 尹磊, 陈随清

(河南中医学院药学院, 河南 郑州 450046)

摘要:以冬凌草无菌苗为试验材料,在冬凌草转录组信息数据的基础之上,采用逆转录 PCR 技术克隆到冬凌草二萜类合成的关键酶基因:异戊烯基焦磷酸异构酶基因(isopentenyl diphosphate isomerase, *IDI*),并对该基因进行了相关的生物信息学分析。结果表明:*IDI* cDNA 基因全长 1 050 bp,基因开放阅读框为 906 bp,编码 301 个氨基酸,其蛋白质序列理论分子量为 27.4 kDa,等电点为 5.06,是一种亲水性蛋白。采用实时荧光定量 PCR 法分析其组织表达模式,发现 *IDI* 在叶中表达量相对较高,在愈伤组织中表达量最低。

关键词:冬凌草;二萜;异戊烯基焦磷酸异构酶基因(*IDI*)

中图分类号:Q 945.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0080-06

萜类化合物是植物体内一种重要的次生代谢产物,它不仅在植物体生长、防御过程中有很重要的作用,而且是许多药用植物中存在的有效成分。冬凌草(*Rabdosia rubescens* Henrsl. Hara)属唇形科香茶菜属植物,具有清热解毒、活血止痛的作用。其最早作为民间治疗癌症的药物于河南济源发掘,之后对该药的化学成分及药理学研究发现,该植物富含萜类物质,且其主要有效成分冬凌草甲素、冬凌草乙素,为二萜类化合物。植物萜类合成的上游途径已基本探明,异戊烯基焦磷酸(IPP)作为所有萜类化合物合成的中心前体,有 2 条合成途径,即 mevalonate(MVA)、plastidial 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate(MEP)途径。在此 2 种途径中异戊二烯焦磷酸异构酶(*IDI*)催化异戊烯基焦磷酸(IPP)异构化形成二甲丙烯焦磷酸(DMADP),IPP 和 DMADP 是萜类化合物合成的重要前体物质,故 *IDI* 与萜类合成密切相关^[1]。为了探讨 *IDI* 在冬凌草二萜类物质,尤其是冬凌草甲素生物合成中作用研究奠定基础,现采用逆转录 PCR 技术从

冬凌草植株中克隆 *IDI* 基因,并进行生物信息学分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试冬凌草无菌苗及其愈伤组织,由课题组所在研究室培养。

供试试剂:RNA 提取试剂盒、cDNA 第 1 链合成试剂盒,均购自郑州诺唯赞试剂公司;Taq 酶、连接试剂盒购自 TaKaRa 公司;引物合成和基因测序由上海生物工程公司完成。*Escherichia coli* DH5 α 、pMD18-T Simple 载体均购自 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 冬凌草总 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

取冬凌草无菌苗叶片加液氮研磨,根据 RNA 提取试剂盒说明书提取冬凌草总 RNA,经紫外分光光度计、琼脂糖凝胶电泳检测后,采用 cDNA 第 1 链合成试剂盒合成冬凌草 cDNA 第 1 链。

1.2.2 cDNA 全长克隆 根据冬凌草转录组数据得到 *IDI* 基因全长 cDNA 序列信息,从 2 端非编码区设计 1 对特异性引物 Primer-F:GCCGCCACAATCAATGTTA; Primer-R: GATCAGTCTCAAACAAAGTGAATGA。以冬凌草叶片 cDNA 为模板,根据目的基因大小选用 Ex-Taq 酶,建立 50 μ L 反应体系,反应条件为 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 产物进行检测,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

第一作者简介:苏秀红(1975-),女,博士,副教授,研究方向为中药资源学。E-mail:suxiuhong80@163.com.

责任作者:陈随清(1965-),男,博士,教授,现主要从事中药鉴定的教学与科研工作。E-mail:suiqingchen@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173486);河南中医学院创新人才资助项目(2011XCXRC02);河南省青年骨干教师资助项目(2011GGJS-089);河南省教育厅科学技术研究重点资助项目(13A360613)。

收稿日期:2015-12-22

蓝白斑筛选,挑取白斑单克隆进行摇菌培养,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。

1.2.3 冬凌草 *IDI* 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、磷酸化位点、三级结构等预测,并比较同源序列,分别建立系统进化树。

1.2.4 *IDI* 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 为模板, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(*GAPDH*)为内参,利用实时荧光定量 PCR 的方法检测 *IDI* 在不同组织中的表达情况。内参引物 Primer-F: AAACGCCTAACTTCG-CATCT; Primer-R: CCCGAGTATTGGACCTGATT。*IDI* 引物 Primer-F: CTGCTGAAGATGTGCCAGTC; Primer-R: CCGGACAATGAAGAGGAGAT。实时 PCR 检测的反应体系为 10 μ L 2 \times QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix(QIAGEN),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 提取与目的基因的获得

2.1.1 冬凌草总 RNA 提取与检测 冬凌草无菌苗总 RNA 经紫外分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 为 1.93,并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,蛋白质、酚类、多糖、等杂质已基本去除,总 RNA 纯度较高,从图 1 可以看出, rRNA 3 条条带(28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA)完整性较好,可以用于后续的试验操作。

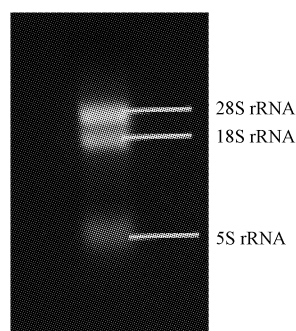


图 1 RNA 凝胶电泳检测

Fig. 1 RNA gel electrophoresis detection

2.1.2 *IDI* 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,由图 2 可知,特异性条带长度约为 1 050 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,经 PCR 检测,将阳性克隆菌液送往上海生工测序。

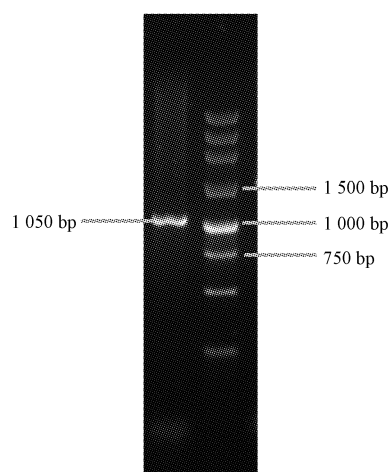


图 2 *IDI* 基因序列扩增产物

Fig. 2 Gene sequence amplification products of *IDI*

2.2 冬凌草 *IDI* 序列生物信息分析与系统发育树构建

2.2.1 理化性质及其细胞定位 利用在线 Translate 软件将 *IDI* 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,*IDI* 基因开放阅读框为 906 bp,编码 301 个氨基酸;总原子数为 3 851 个,原分子组成为 C_{1 231} H_{1 919} N₃₂₇ O₃₆₄ S₁₀;带负电的氨基酸有 42 个(Asp+Glu),带正电的氨基酸有 28 个(Arg+Lys),氨基酸组成中以 Leu (13.1%)、Asp(8.9%)、Glu(8.9%) 含量最高;不稳定系数为 26.33,属于稳定蛋白。将 *IDI* 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,发现多肽链中第 155 位分值最高(1.7)疏水性最强,第 40 位分值最低(-1.98),亲水性最强。总平均亲水性-0.32,属于亲水性蛋白。用 TMHMM 2.0 Server 分析冬凌草 *IDI* 跨膜结构,发现冬凌草 *IDI* 肽链位于膜外,不存在跨膜区域。使用 SignalP 程序预测 *IDI* 蛋白不具有信号肽。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 9 个氨基酸磷酸化位点(>0.5),其中 Ser 2 个,分别在肽链上第 8、163 位;Thr 3 个,分别在肽链第 75、76、221 位;Tyr 4 个,分别在肽链上第 39、66、94、176 位。

```

      10      20      30      40      50      60
MGDVTADSSM DAVQRRLMFE DECILVDEND HVGHESKYN CHLMEKIDSL NLLHRAFSV
      70      80      90     100     110     120
FLFNSK YELLQ QQRSTTKVTF PLVWTNTCCS HPLYRDESLI EENALGVRNA AQRKLLDELG
     130     140     150     160     170     180
IPAEDVPVDQ FTPLGRMLYK APSDGIWGEH EVDYLLFIVR DVSVHPNPDE VADVKEYVNR
     190     200     210     220     230
DLKELLRKAD AGEGLKLSP WFRLVVDNFI FKWWDHVEKG TLKEVIDMKT IHKLLEK

```

图3 IDI 蛋白序列

Fig. 3 Protein sequences of IDI

2.2.2 IDI 蛋白三级结构的预测 使用 SWISS-MODEL 程序对 IDI 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的大于 30% 即可建模,在 PDB 蛋白质数据库中选择与 IDI 序列一致性最高(52.23%)的 2ick.1.A 蛋白为模板进行同源建模,得到 IDI 结构模型(图 4)。



图4 IDI 蛋白三级结构模型

Fig. 4 The deduced 3-D structure of IDI protein

2.2.3 序列比对分析 在 NCBI 网站上通过 BLASTP 比对 Nr 蛋白数据库的结果,图 5 表明,冬凌草蛋白与毛喉鞘蕊花(*Plectranthus barbatus*)的 IDI(AHG98058.1)序列相似性最高为 95%,其次为丹参(*Salvia miltiorrhiza*) (ABV08818.1, 94%)、芝麻(*Sesamum indicum*) (94%, XP_011084658.1)、绒毛状烟草(*Nicotiana tomentosiformis*) (91%, XP_009608528.1)、林地烟草(*Nicotiana sylvestris*) (91%, XP_009791229.1)。

2.2.4 系统进化树分析 从 NCBI 中选取其它植物的 IDI 序列作为参考,使用 Phylogeny. fr 网站的“One Click”模式构建系统进化树。从图 6 可以看出,冬凌草

的 IDI 与唇型科植物毛喉鞘蕊花亲缘关系最近,其次为丹参。

2.2.5 IDI 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。由图 7 可知,IDI 在愈伤组织中的表达量最低,叶中表达量较高,叶的表达量是根的 1.5 倍,是茎的 2.4 倍,是愈伤组织表达量的 19.3 倍。

3 讨论

冬凌草中富含二萜类化合物,有关冬凌草二萜类生物合成途径的研究鲜有报道。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。IDI 催化异戊烯基焦磷酸(IPP)异构化形成二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP),是萜类化合物生物合成途径中的关键酶^[1];在萜类合成途径中 IDI 直接影响萜类合成 5 碳前体库代谢流的流向,是下游代谢途径的总开关。目前已经从多种植物中分离获取,如拟南芥^[2]、马铃薯^[3]、玉米^[4]、橡胶草^[5]等,该试验在转录组测序的基础之上,采用 RT-PCR 技术首次获得了 IDI 基因完整的 cDNA,其全 cDNA 的克隆、生物信息学分析为后续基因功能研究奠定了基础。

研究表明杜仲中 IDI 过量表达能够提高聚异戊二烯类次生代谢产物的形成^[6]。IDI 的过量表达也可增强番茄红素的合成^[7]。荧光定量分析结果表明,IDI 在愈伤组织中的表达量最低,叶中表达量较高,根、茎次之。课题组前期研究结果表明,冬凌草叶中冬凌草甲素含量最高、茎中次之^[8],愈伤组织中未检测到冬凌草甲素^[9],这一结果与前期的研究结果基本一致,作为 MVA、MEP 途径上最受关注的关键酶基因之一,在冬凌草甲素的生物合成途径中该基因是否调控冬凌草的生物合成有待进一步研究。

注:毛喉鞘蕊花 *Plectranthus barbatus* (AHG98058.1); 丹参 *Salvia miltiorrhiza* (ABV08818.1); 芝麻 *Sesamum indicum* (XP_011084658.1); 绒毛状烟草 *Nicotiana tomentosiformis* (XP_009608528.1); 甘薯属肯尼亚 *Ipomoea* sp. *Kenyan* (BAI47570.1); 林烟草 *Nicotiana sylvestris* (XP_009791229.1); 克莱门柚 *Citrus clementina* (XP_006428595.1); 橙子 *Citrus sinensis* (XP_006480432.1); 马铃薯 *Solanum tuberosum* (XP_006345824.1); 番茄 *Solanum lycopersicum* (NP_001234853.1); 番茄 *Solanum lycopersicum* (ABX55779.1); 马铃薯 *Solanum tuberosum* (XP_006350410.1); 柚 *Citrus maxima* (AHL43878.1); 杜仲 *Eucommia ulmoides* (AGJ03660.1); 库洛胡黄连 *Picrorhiza kurroa* (ABO14800.1); 烟草 *Nicotiana tabacum* (BAB40973.1); 枸杞 *Lycium chinense* (AHN92037.1); 番茄 *Solanum lycopersicum* (NP_001289822.1); 番茄 *Solanum lycopersicum* (ACS34993.1); 柴胡 *Bupleurum chinense* (ACV74320.1); 鹰嘴豆 *Cicer arietinum* (XP_004492840.1)。

Fig. 5 Multiple sequence alignment analysis of IDI proteins

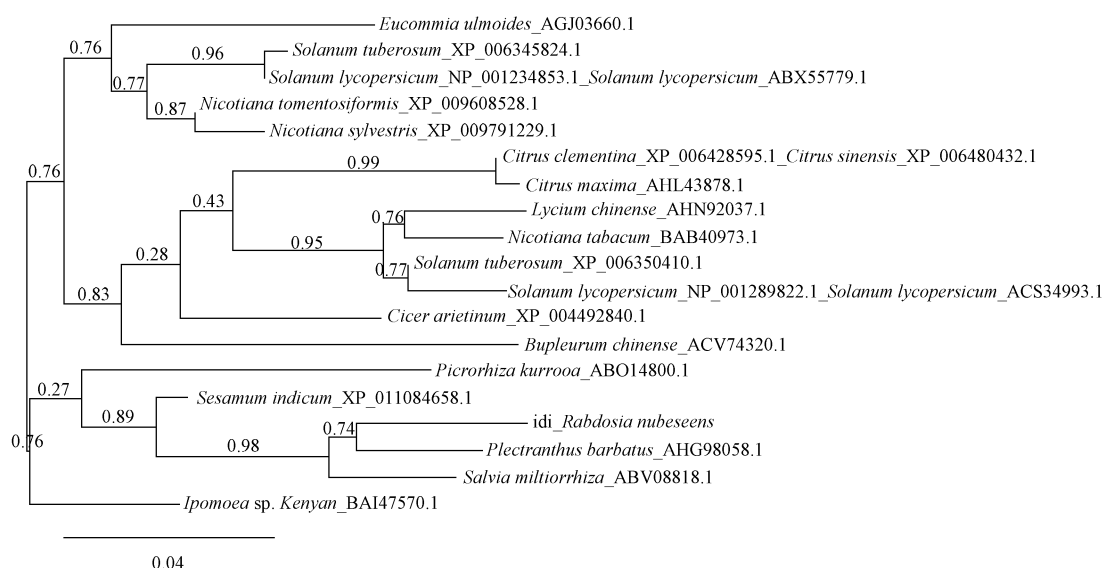


图6 冬凌草 IDI 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree analyses of IDI from various organism species

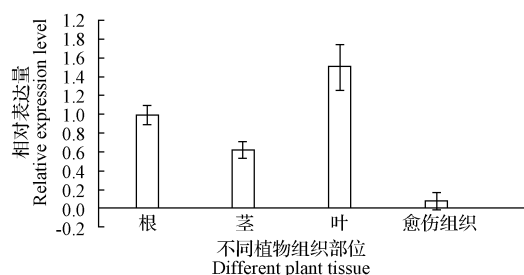


图7 IDI 基因在冬凌草不同组织中的相对表达量

Fig. 7 The relative expression level of IDI in tissues of *Rabdosia rubescens*

参考文献

- [1] 马靛,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.
- [2] CAMPBELL M,HAHN F M,POULTER C D,et al. Analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology,1998,36(2):323-328.

- [3] LIAO Z H,CHEN M I,YANG Y J. A new isopentenyl diphosphate isomerase gene from sweet potato;cloning,characterization and color complementation[J]. Biologia,2008,63(2):221-226.
- [4] 王伟,陆辉强,刘万宏. 玉米异戊烯基焦磷酸异构酶基因的克隆及其功能分析[J]. 西北植物学报,2008,28(9):1715-1719.
- [5] 仇键,刘实忠,张志平,等. 橡胶草异戊烯基焦磷酸异构酶基因的电子克隆及分析[J]. 生物信息学,2013,11(3):209-215.
- [6] CHEN R,HARADA Y,TAKESHI B,et al. Overexpression of an isopentenyl diphosphate isomerase gene to enhance *trans*-polyisoprene production in *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. BMC Biotechnology,2012(12):387-390.
- [7] 张伟,胡晓清,王小元. 阪崎克罗诺杆菌中异戊二烯焦磷酸异构酶(IDI)增强类胡萝卜素合成的研究[J]. 工业微生物,2014,44(5):23-29.
- [8] 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.
- [9] 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.

Cloning and Expression of cDNA Encoding Key Enzymes(Isopentenyl Diphosphate Isomerase)in Diterpenoids Biosynthesis Pathway From *Rabdosia rubescens* Henrsl. Hara

SU Xiuhong, YIN Lei, CHEN Suiqing

(College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046)

Abstract: cDNAs encoding isopentenyl diphosphate isomerase were obtained from the leaves of aseptic seedlings of *Rabdosia rubescens* by reverse transcription PCR based on the results of transcriptome sequencing. The results showed that the full-length cDNA of IDI was 1 050 bp and contained an open reading frame(ORF)of 906 bp, encoding 301 amino

管状花目中多酚氧化酶的序列分析与功能预测

郭宏波, 孙奕玥, 舒志明, 梁宗锁, 张跃进

(旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以管状花目(Tubiflorae)中5个物种7个多酚氧化酶基因(PPO)序列为研究对象,采用序列对比分析和功能预测方法,研究了这些基因序列的碱基、酶蛋白氨基酸序列数量与比例,以及氨基酸序列中蛋白激酶C磷酸化、酪氨酸激酶II磷酸化、N-糖基化、N-豆蔻酰化、酰胺化、cAMP及cGMP蛋白激酶磷酸化6个功能位点结构域特征,以期揭示PPO酶调控的功能位点。结果表明:管状花目中丹参毛状根PPO基因含有G+C碱基最多,氨基酸中丙氨酸和亮氨酸含量也最高(16.9%),并含有最多的酪氨酸激酶II磷酸化位点(11个)。丹参毛状根PPO酶不具备信号肽结构,有1个卷曲螺旋,是无跨膜结构的亲水性蛋白。该试验为研究PPO酶调控酚酸类物质次生代谢的分子机制,特别是蛋白与蛋白、蛋白与基因之间的互作奠定了基础。

关键词:管状花目;丹参;多酚氧化酶;序列分析;功能预测

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0085-07

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)是由核基因编码,能与铜离子结合的金属蛋白酶,广泛存在于植物完整细胞的质体中,如丹参根质体、马铃薯块茎造粉体等。已有研究表明,PPO在苯丙烷代谢中发挥了重要作用^[1],并能响应多种生物(如病虫害)与非生物(如干旱)胁迫和信号分子(如茉莉酸)的调控^[2-5]。但其响应机制及在次生代谢调控中发挥的具体作用尚不清楚。

通过试验课题组前期发现,苯丙氨酸、肉桂酸和阿魏酸等酚酸类物质对丹参根中PPO活性具有低浓度促进高浓度抑制的作用^[6]。对PPO活性具有显著提升作用的酵母提取物能显著增加丹参毛状根PPO基因的表达;显著抑制酶活性的半胱氨酸、抗坏血酸和银离子则

显著抑制了PPO基因的表达,且PPO基因表达量上升,丹酚酸B积累增多,反之亦然^[7]。在干旱胁迫下,PPO基因的过表达可使植株中多酚含量增加^[8-9],酚类物质积累越多,抗胁迫能力就越强^[10]。抗性品系的总酚含量和PPO活性都比敏感品系高,在病虫害侵染后,马铃薯抗性品系的PPO活性升高速率比敏感品系快^[11]。这些证据表明,PPO基因和酶对酚酸类物质的积累具有调控作用。

作为PPO反应底物的酚酸类物质在药用植物中也广泛存在,如丹参、金银花和当归等。因PPO直接与酚酸类物质发生反应,是导致许多果蔬褐化的关键酶之一^[12],所以在园艺学中研究较多,主要集中在酶学性质分析、酶活性抑制剂的开发和基因克隆方面^[12],以期能在采后贮藏保鲜中有效抑制酶活性,但成效并不显著。

随着生物信息学的快速发展,对不同物种中PPO基因序列进行分析,并对酶功能位点进行预测,将会有力增强研究的针对性,使后续研究能效的设计试验,开展相关研究。该研究在课题组前期工作基础上,对丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)管状花目(Tubiflorae)的7个PPO基因序列进行分析,并对其蛋白序列及功能区域进行分析预测,该结果对阐明PPO的逆境机理和调控酚酸类物质代谢的分子机制,特别是蛋白与蛋白、蛋白与基因之间的互作具有重要意义。

第一作者简介:郭宏波(1977-),男,江苏泰州人,博士,副教授,现主要从事丹参雄性不育分子机制等研究工作。E-mail:hbguo@nwsuaf.edu.cn.

责任作者:张跃进(1960-),男,陕西乾县人,教授,现主要从事中药材规范化栽培的理论与技术等研究工作。E-mail:qxzhang@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373908);陕西省自然科学基金资助项目(2015JM3092,2016JM8108);西北农林科技大学基本科研业务资助项目(2016)。

收稿日期:2016-02-26

acids. The theoretical molecular weight was 27.4 kDa and the isoelectric point was predicted as 5.06 and it was a kind of hydrophilic protein. Real-time quantitative PCR was used to detect the relative expression levels of *IDI* in different tissues of *Rabdosia rubescens*. And the expression of *IDI* was relatively high in the leaves, the lowest expression in callus.

Keywords: *Rabdosia rubescens* Henrs. Hara; diterpenoid; *IDI*