

地黄*RgDXR*基因的克隆及表达分析

朱昀昊, 董诚明, 俎梦航, 李攀登, 赵乐*

河南中医药大学药学院, 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州450046

摘要: 本研究采用RT-PCR法对地黄*DXR*基因进行克隆, 并用生物信息学方法分析其功能结构域、系统进化等; 将地黄*DXR*基因克隆到原核表达载体pET-32a上, 使用大肠杆菌BL21菌株进行*RgDXR*蛋白的原核表达及纯化, 实时荧光定量PCR方法分析*RgDXR*在不同组织、不同内生菌诱导下的表达特性。获得的*RgDXR*基因cDNA全长为1 425 bp, 编码474个氨基酸。生物信息学分析发现*RgDXR*基因编码的蛋白质具有典型的*DXR*功能结构域, 属于植物*DXR*基因家族。系统进化树分析表明, 地黄*RgDXR*与芝麻亲缘关系最近。荧光定量PCR结果显示, 栽培品种‘北京3号’根中*RgDXR*表达量最高。内生真菌诱导实验表明, *RgDXR*基因的转录水平与梓醇等环烯醚萜类物质的含量成正相关。本研究克隆所得的地黄*RgDXR*基因属于*DXR*基因家族, 推测其可能与地黄中环烯醚萜类物质的生物合成有关。

关键词: 地黄; *RgDXR*基因; 生物信息学分析; 原核表达; 表达分析

地黄[*Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey.]为玄参科多年生的草本植物, 是我国著名的“四大怀药”之一。地黄在我国的使用历史悠久, 其干燥块根具有滋阴补肾、养血补血、凉血的功效(李红伟和孟祥乐2015)。大量研究表明, 地黄块根中富含的梓醇等环烯醚萜类成分是其主要的药用活性成分(Xiao等2014; Zhao等2015)。因此, 挖掘地黄环烯醚萜类次生代谢成分的生物合成相关功能基因, 对开展改良地黄品种具有重要意义。

在植物体内, 萜类骨架的生物合成主要通过位于细胞质中的甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径和位于质体中的2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径共同完成(Lange等2000; Vranova等2013)。1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, *DXR*)是植物萜类生物合成的MEP途径中的一个限制酶(图1)。*DXR*能催化DXP形成MEP (Carretero-Paulet等2002; Kuzuyama等2000), 继而在后续的一系列酶促反应下转化成萜类合成的共同前体异戊基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP) (Suzuki等2009)。大量研究表明, *DXR*的催化过程具有较低的反应速度(Brown和Parish 2008; Yu和Utsumi 2009), 因此可能是萜类合成中的限速步骤。*DXR*参与了植物中萜类产物的积累, 在萜类次生代谢产物的生物合成中发挥重要的调节作用(Liu等2015; Seetang-Nun等2008; Wu等2009; Yao等

2008)。Sun等(2015)、朱昀昊等(2016)分别利用高通量测序技术构建了地黄转录组数据库, 并通过生物信息学挖掘了地黄萜类骨架生物合成及后修饰相关基因, 为后续地黄环烯醚萜生物合成相关基因的克隆奠定了基础。*DXR*在药用植物萜类次生代谢产物的生物合成中起重要的调控作用, *DXR*基因序列已从雷公藤(祝传书等2014)、铁皮石斛(Wu等2009)、当归(雒军等2014)、红豆杉(郑清平等2004)等植物中成功克隆, 而地黄*DXR*基因的研究尚未见报道。

为了研究*DXR*基因在地黄环烯醚萜类成分合成中的功能, 本研究以前期构建的地黄转录组数据库为基础, 采用RT-PCR方法克隆得到了一个地黄*DXR*基因, 并构建了原核表达载体, 得到纯化的*DXR*蛋白。应用生物信息学和实时荧光定量PCR方法, 分析了该基因的序列特征及其在不同组织、不同内生菌诱导子作用下基因表达模式, 为进一步探讨地黄*DXR*基因在地黄活性成分积累中的分子功能奠定了基础。

材料与方法

1 材料与试剂

1.1 材料

野生地黄及‘北京3号’地黄植株均种植于河南

收稿 2016-10-08 修定 2017-01-24

资助 国家自然科学基金(81603232)、国家“十二五”科技支撑计划(2011BA106802)和河南中医学院博士科研基金(BSJJ2011-07)。

* 通讯作者(E-mail: zhaole1983@126.com)。

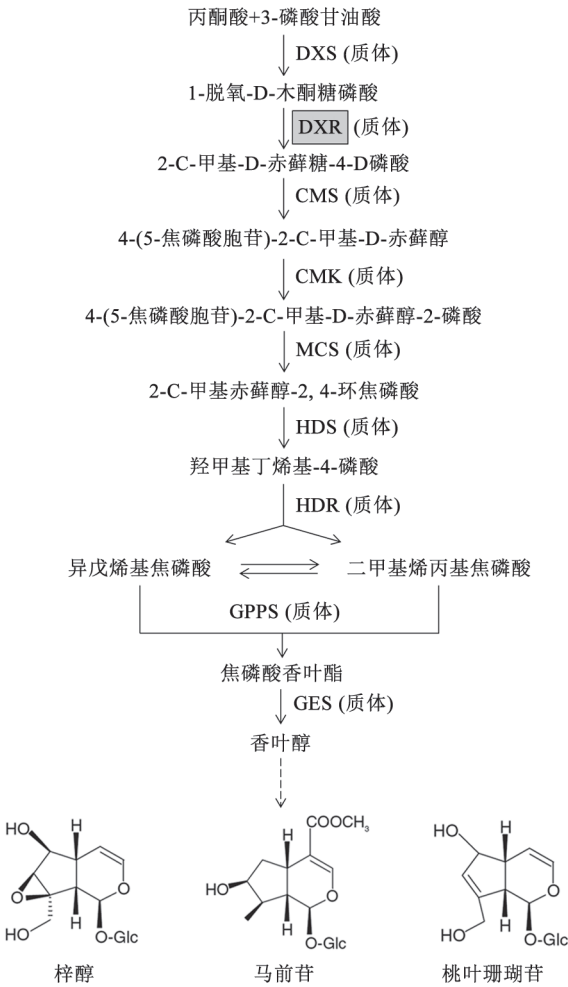


图1 推测的地黄环烯醚萜类次生代谢产物的生物合成途径
Fig.1 Putative pathway for iridoid biosynthesis in *R. glutinosa*

中医学院中药植物园，经河南中医学院董诚明教授鉴定为玄参科植物地黄[*Rehmannia glutinosa* (Gaetn.) Libosch. ex Fisch. et Mey]。挖取地黄全株，将根、茎、叶等组织分离，蒸馏水迅速冲洗后液氮速冻，保存于-80℃冰箱。供试菌株来自本实验室前期从地黄不同组织中分离的内生真菌菌株，编号为PB25、CB40、CB25、GG22、GB43。

1.2 试剂

RNA提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司，pMD18-T载体、DH5α、BL21感受态细胞、*Eco*RI等限制性内切酶购自TaKaRa公司。RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒购自Fermentas公司。QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix购自QIAGEN公司。

2 试验方法

2.1 内生真菌接种地黄组培苗

地黄组培苗在1/2MS培养基中培养14 d，转入蛭石培养基中，每瓶1株，适应3~4 d，备用。将供试菌株从斜面培养基中挑出接种至含有PDA培养基的培养皿中，置于培养箱中25℃培养，待菌丝长满生长至培养基表面1/2左右时，将菌落边缘生长旺盛的部分切成5 mm×5 mm的小块。将菌片移入蛭石培养基中，距离植株1~2 cm，每瓶接种1片，每组重复10瓶，以不接种内生真菌的地黄组培苗为对照。共培养30 d后，随机选择5瓶共培养组培苗，迅速摘取没有菌丝的叶片后混合均匀，液氮速冻，保存于-80℃冰箱备用。

2.2 总RNA提取与单链cDNA的合成

地黄不同组织总RNA的提取按照天根植物RNA取试剂盒说明书步骤进行，1%琼脂糖凝胶电泳确定RNA完整性。利用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit合成cDNA第一链，cDNA置-20℃保存备用。

2.3 地黄DXR基因cDNA全长的获得

选取地黄转录组数据库中注释为1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)且包含完整的开放阅读框(ORF)的unigene，从ORF两端非编码区设计特异性引物。以地黄叶片的cDNA为模板，以特异性引物RgDXR-F和RgDXR-R进行PCR扩增(表1)。使用天根公司大量琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒进行切胶回收纯化，并与pMD18-T载体进行连接，连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，通过菌落PCR鉴定的阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

2.4 生物信息学分析

利用在线网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对RgDXR进行ORF查找、氨基酸序列推导等分析。DNAMAN软件进行同源性比较分析，MEGA 6软件建立系统发育树。使用ProtParam tool在线软件进行RgDXR蛋白基本理化性质分析；使用在线TargetP软件进行RgDXR蛋白质体转运肽的预测；使用MEGA 6软件(Tamura等2013)进行多序列比对，并以Neighbor-joining法构建系统进化树。

2.5 RgDXR基因表达特性分析

实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 在Applied Biosystems公司Step One

表1 所用引物序列及用途
Table 1 Primers used for the study

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
RgDXR-F	TTTCTGCGTGTCTGGTAAG	基因克隆
RgDXR-R	CATTGGCATCATTTTCATTC	基因克隆
eRgDXR-F	CGGAATTCATGGCTCTGAATATGC	原核表达
eRgDXR-R	CCGCTCGAGTCATACAAGAACAGGG	原核表达
qRgDXR-F	CAACGAGAAAAGCTGTGGAAA	荧光定量PCR
qRgDXR-R	CCAATTCTGCTCGATGCTTA	荧光定量PCR
qTIP41-F	ATTGGGTAGATTGCCAGGAG	荧光定量PCR内参
qTIP41-R	CCATTGTCAGCCAATTCATC	荧光定量PCR内参

Plus 检测系统上进行。以文献报道的 *TIP41* (*TIP41-like protein*)为内参基因(Sun等2015)。每个样品设3个重复, 检测地黄品种‘北京3号’和野生地黄根、茎、叶等不同组织, 不同内生真菌侵染的‘北京3号’地黄组培苗叶片中*RgDXR*在转录水平上的相对表达量。qPCR检测的反应体系为20 μ L, 按照以下进行配置: 10 μ L 2 $\times$ QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN), 正反向引物 qRgDXR-F、qRgDXR-R均为0.4 μ L, cDNA模板2 μ L, 加ddH₂O至20 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C, 3 min; 95 $^{\circ}$ C, 10 s, 56 $^{\circ}$ C, 20 s, 72 $^{\circ}$ C, 30 s, 35个循环。扩增结束后进行溶解曲线测定, 采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 分析方法进行相对定量表达分析。

2.6 *RgDXR*基因原核表达载体构建

根据地黄*RgDXR*基因ORF区序列及原核表达载体pET32a(+)的多克隆位点序列设计一对引物 eRgDXR-F、eRgDXR-R (表1, 划线部分为酶切位点), 以测序正确包含ORF区序列的质粒为模板进行PCR扩增, 扩增产物连接至pMD18-T载体, 得到重组质粒pMD18-T-RgDXR, *Eco*RI和*Xho*I双酶切重组质粒pMD18-T-RgDXR和表达载体pET32a, 在T₄DNA连接酶作用下进行连接反应。连接产物转入大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 菌液PCR和双酶切初步筛选阳性克隆, 并对阳性克隆测序验证, 将测序正确的质粒转化大肠杆菌BL21感受态细胞, 获得融合表达载体pET32a-RgDXR。

2.7 *RgDXR*的原核表达及蛋白纯化

挑取已鉴定的阳性克隆单菌落, 接种于10 mL 含有50 μ g $\cdot$ mL⁻¹氨苄青霉素的液体LB培养基, 37 $^{\circ}$ C 200 r $\cdot$ min⁻¹培养至600 nm处吸光度(A₆₀₀)达到0.6时, 在0.4 mmol $\cdot$ L⁻¹ IPTG、28 $^{\circ}$ C、150 r $\cdot$ min⁻¹条件下培

养8 h, 同时以同样处理的pET32a质粒转化菌为对照。分别收集菌液2 mL, 离心收集菌体, 弃上清, 加入100 μ L SDS上样缓冲液, 悬浮混匀, 煮沸3 min后, 12 000 r $\cdot$ min⁻¹离心1 min, 取上清20 μ L进行SDS-PAGE分析。根据Ni-Agarose His标签蛋白纯化试剂盒(康为世纪公司)说明书纯化RgDXR重组蛋白。

2.8 统计与分析

所有数据采用SPSS 18.0软件进行统计和相关性分析。*RgDXR*基因相对表达量差异性采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和Duncan's新复极差法进行检验。

实验结果

1 *RgDXR*基因的克隆

如图2所示, 琼脂糖凝胶电泳后得到一条1 700 bp左右的条带, 经克隆测序后序列使用ORF Finder预测开放阅读框, 克隆所得序列含有一个大小为1 425 bp的完整的开放阅读框, 推测编码474个氨基酸, 其开放阅读框位于23~1 447 bp区域, 序列的1~22 bp为5'-非翻译区, 1 448~1 774 bp为3'-非翻译区。通过BLAST程序检索, 该片段与芝麻(*Sesamum indicum*, XP_011071850.1)、金鱼草(*Antirrhinum majus*, AAW28998.1)、山茶(*Camellia sinensis*, AKE33276.1)、咖啡(*Coffea canephora*, CDP12403.1)和丹参(*Salvia miltiorrhiza*, ACK57535.1)等植物中DXR蛋白序列相似度最高, 一致性分别为93%、91%、90%、89%和90%, 由此推断所获得的序列全长编码一段地黄DXR蛋白。将获得的地黄*DXR*基因序列提交GenBank, 命名为*RgDXR*, 获取基因登录号为KX058461。

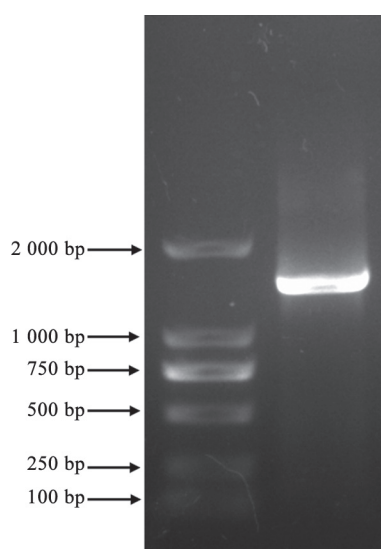


图2 地黄DXR基因cDNA的PCR扩增
Fig.2 PCR products of DXR gene cDNA

2 *RgDXR*基因的生物信息学分析

2.1 *RgDXR*基因的理化性质预测

*RgDXR*基因编码蛋白相对分子量为51.48 kb, 理论等电点为5.949。运用TMHMM Server. v.2.0在线跨膜结构域预测工具发现*RgDXR*蛋白不存在跨膜区。使用SignalP程序预测*RgDXR*蛋白不具有信号肽。利用在线分析工具SOPMA对*RgDXR*蛋白进行二级结构预测, 结果表明*RgDXR*蛋白由30.59% α -螺旋、23.48%延伸链、11.18% β -转角和34.39%不规则卷曲组成。

2.2 *RgDXR*蛋白功能结构域的预测

采用InterProScan在线结构域预测工具对地黄*RgDXR*蛋白的保守结构域进行分析, 结果发现,*RgDXR*具有4个典型的功能结构域, 在71~226位氨基酸处存在一个NAD(P)结合结构域(IPR016040), 80~208位氨基酸处存在一个DXR蛋白N端结构域(IPR013512), 222~305位和337~458位氨基酸处分别存在DXR蛋白C端结构域(IPR013644和IPR026877)。TargetP 1.1 Serve在线工具分析*RgDXR*蛋白序列发现, 其存在一段53 bp的质体转运肽序列, 并含有转运肽酶切位点, 由此可以推断*RgDXR*蛋白在质体外合成后, 在质体转运肽的作用下运输到叶绿体后发挥催化功能, 此推断与前人报道的MEP途径存在于质体中的研究相吻合。

2.3 *RgDXR*蛋白多序列比对及进化树分析

使用DNAMAN软件对不同物种来源的DXR蛋白进行多序列比对, 结果显示(图3), 地黄*RgDXR*蛋白具有2个与底物DOXP结合基序结合序列(LPADSEHSAI和NKGLEVIEAHY)、2个与NADPH结合序列[GSTGS(I/V)GT和LAAGSNV]、以及N端富含脯氨酸序列[PPPAWPG(R/T)A], 这符合植物中DXR蛋白家族的结构特征(Wu等2009)。

使用MEGA 6软件进行Clustal W比对, 采用Neighbor-joining方法, 构建不同生物DXR基因进化树, 用以分析不同物种中的DXR基因之间的进化关系。如图4所示, 地黄*RgDXR*与双子叶植物芝麻、丹参、薰衣草、毛喉鞘蕊花等植物的DXR蛋白亲缘关系较近, 而与水稻等单子叶植物、红豆杉等裸子植物、小立碗藓等苔藓、衣藻等藻类、大肠杆菌等细菌、立枯丝核菌等真菌的DXR蛋白亲缘关系较远。

3 地黄*RgDXR*基因的表达特性分析

利用实时荧光定量PCR检测*RgDXR*在野生地黄和地黄品种‘北京3号’不同组织的表达差异, 结果显示(图5-A), 两种不同品种地黄的不同组织中均能检测到*RgDXR*的表达, 说明其属于组成型表达, 不存在表达的组织特异性。栽培品种‘北京3号’根中表达量最高, 野生地黄叶中的表达量最低。两个不同品种的地黄根中表达量均高于茎、叶, 这与传统中药中地黄以块根入药相符。栽培品种‘北京3号’块根膨大, 产量和药用品质较高, 环烯醚萜苷物质积累较多, 且*RgDXR*的表达量在‘北京3号’根和叶中显著高于野生地黄。

以CB25、CB40、GB43、GG22、PB25等5株内生真菌作为诱导子, 利用实时荧光定量PCR分析其对地黄*RgDXR*表达的影响。结果表明(图5-B), 除CB25外其他4株内生真菌均能提高*RgDXR*基因的表达量, 其中链格孢属内生真菌GG22处理后基因表达量最高, 是对照组的1.64倍, 而CB25菌株则显著抑制了基因的表达。

4 地黄*RgDXR*基因的原核表达与蛋白纯化

对重组质粒利用EcoRI和XhoI进行双酶切鉴定, 酶切后得到了1 400 bp左右的目的基因片段和载体片段, 将酶切正确的重组质粒送上海生工测序, 测序正确后证明已成功构建了pET-32-Rg-

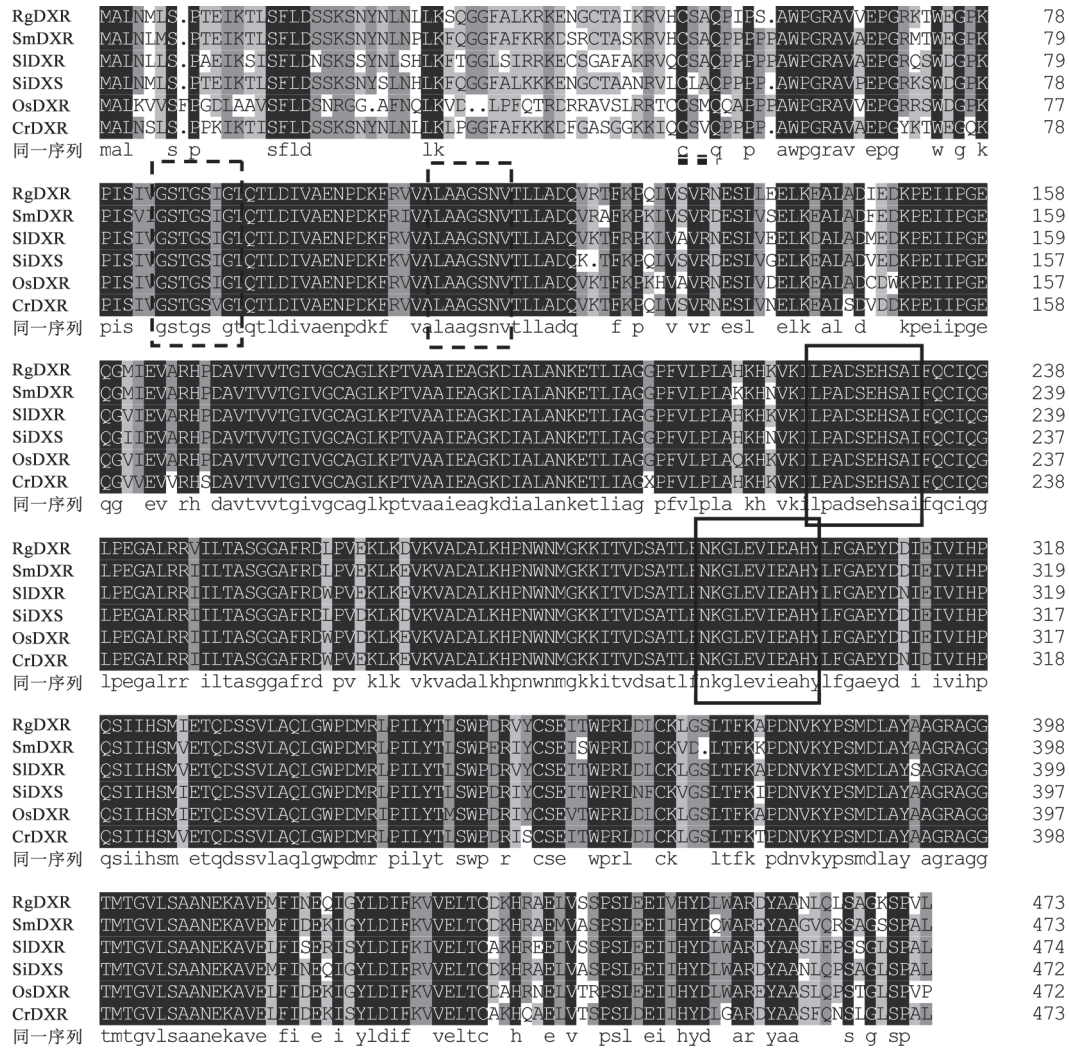


图3 不同植物DXR蛋白氨基酸序列的多重序列对比

Fig.3 Multiple alignment of DXR amino acid sequences from different plants

SmDXR: 丹参(*Salvia miltiorrhiza*, ACK57535.1); SiDXR: 西红柿(*Solanum lycopersicum*, AAK96063.2); SiDXR: 芝麻(*Sesamum indicum*, XP_011071850.1); OsDXR: 水稻(*Oryza Sativa*, AAL37560.1); CrDXR: 长春花(*Catharanthus roseus*, AAF65154.1)。实线框内为2个与底物DOXP结合基序结合序列LPADSEHSAI和NKGLEVIEAHY, 虚线框内为2个与NADPH结合序列GSTGS(I/V)GT和LAAGSNV, 下划线为剪切功能的保守位点CS(A/M/V)。

DXR原核表达载体。重组质粒pET-32a-RgDXR转化感受态细胞*E. coli* BL21后, 用IPTG诱导重组蛋白的表达, 进行SDS-PAGE电泳检测, 电泳图谱经Quantity One (BIO-RAD)软件分析, 如图6所示, 含pET-32a空载体的菌株经IPTG诱导后, 由于pET-32a空载体中标签序列(Trx-Tag、His-Tag和S-Tag)的诱导表达, 在18 kDa处出现融合蛋白条带。而含pET-32a-RgDXR质粒的*E. coli* BL21菌株经IPTG诱导后, 在70 kDa左右处有一条蛋白质条带, 由于载体标签序列的融合表达, 该条带比RgDXR蛋白预

测分子量高18 kDa左右, 表明RgDXR蛋白成功在大肠杆菌中表达。

根据RgDXR重组蛋白的诱导条件, 扩大培养体积, 用超声裂解菌体, 裂解液经离心取上清, 利用 Ni^{2+} 亲和层析纯化目的蛋白, 最终得到纯化的RgDXR重组蛋白。纯化的RgDXR重组蛋白为后续蛋白体外催化功能的验证、蛋白表达分析、亚细胞定位检测等研究, 进一步明确RgDXR在地黄环烯醚萜类成分生物合成中的具体作用奠定了物质基础。

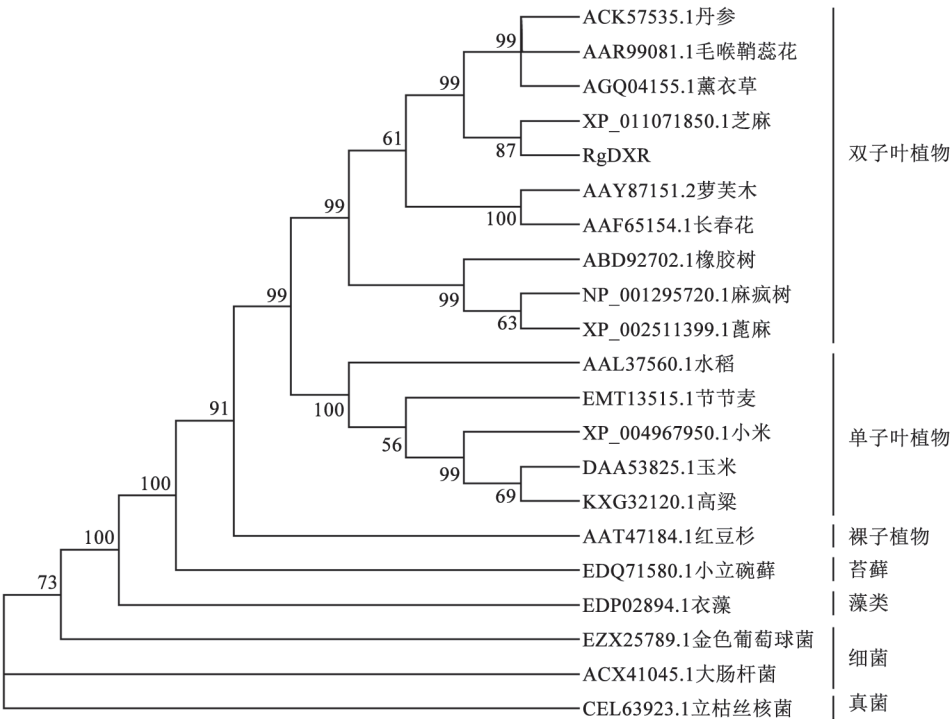


图4 RgDXR蛋白的系统进化分析
Fig.4 Phylogenetic analysis of RgDXR protein

丹参: *Salvia miltiorrhiza*; 毛喉鞘蕊花: *Plectranthus barbatus*; 薰衣草: *Lavandula angustifolia*; 芝麻: *Sesamum indicum*; 萝芙木: *Rauvolfia verticillata*; 长春花: *Catharanthus roseus*; 橡胶树: *Hevea brasiliensis*; 麻疯树: *Jatropha curcas*; 蓖麻: *Ricinus communis*; 水稻: *Oryza latifolia*; 节节麦: *Aegilops tauschii*; 小米: *Setaria italica*; 玉米: *Zea mays*; 高粱: *Sorghum bicolor*; 红豆杉: *Taxus chinensis*; 小立碗藓: *Physcomitrella patens*; 衣藻: *Chlamydomonas reinhardtii*; 金色葡萄球菌: *Staphylococcus aureus*; 大肠杆菌: *Escherichia coli*; 立枯丝核菌: *Rhizoctonia solani*。节点上的数值为通过bootstrap检验次数的百分数。

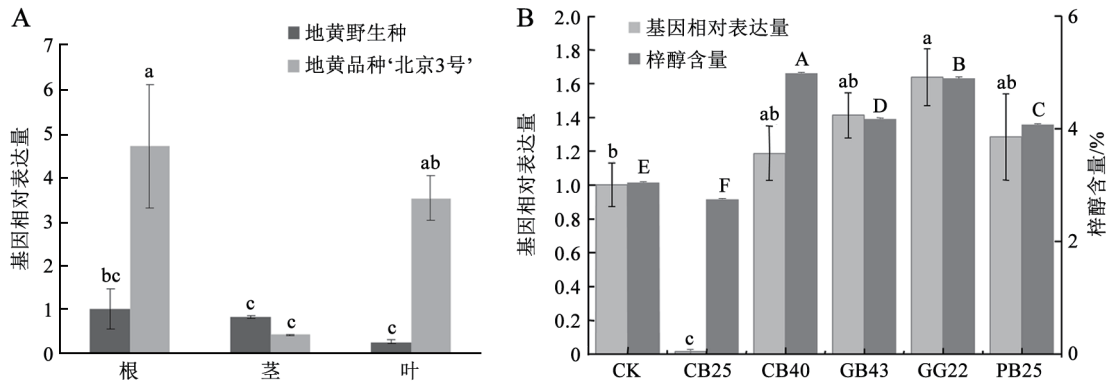


图5 RgDXR基因的表达模式分析

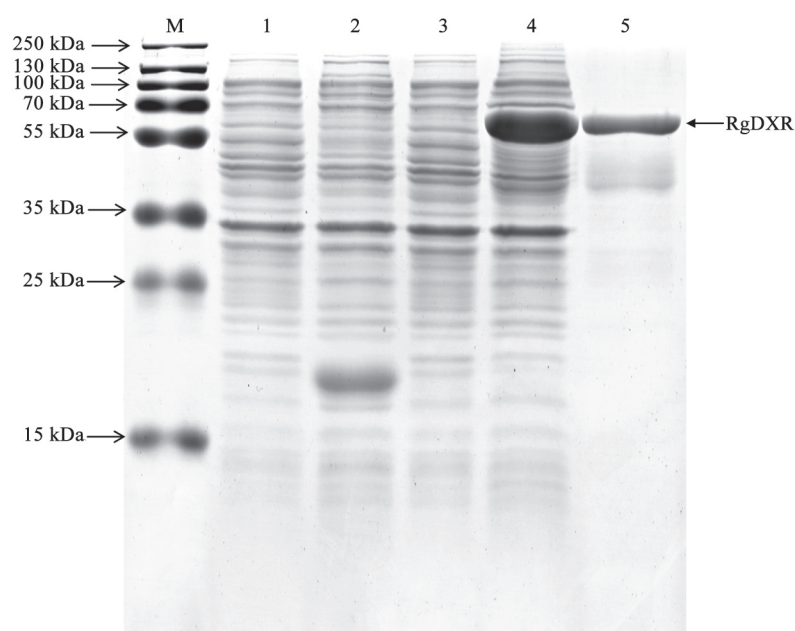
Fig.5 Expression patterns of RgDXR

A: RgDXR基因的组织特异性分析; B: RgDXR基因在不同内生真菌诱导子作用下表达模式。不同小写字母表示基因相对表达量有显著性差异($P<0.05$), 不同大写字母表示梓醇含量有显著性差异($P<0.05$)。

讨 论

目前, 已经发现五碳(C5)的异戊烯基二磷酸 (IPP) 和其异构体——二甲基丙烯基二磷酸

(DMAPP)的合成是通过两条位于不同亚细胞空间的途径进行的, 分别是位于细胞质中的以乙酰辅酶A为原料的MVA途径, 以及位于质体中的以丙酮

图6 *RgDXR*重组蛋白的原核表达与纯化Fig.6 Prokaryotic expression and purification of recombinant *RgDXR* protein

M: 蛋白分子量标准; 1: 未诱导的含pET-32a空载体的*E. coli*菌株; 2: IPTG诱导的含pET-32a空载体的*E. coli*菌株; 3: 未诱导的含pET-32a-*RgDXR*质粒的*E. coli*菌株; 4: IPTG诱导的含pET-32a-*RgDXR*质粒的*E. coli*菌株; 5: 纯化的*RgDXR*重组蛋白。

酸和甘油醛-3-磷酸为原料的MEP途径(周华等2014)。MVA途径主要供给合成倍半萜、三萜以及甾醇类(如油菜素内酯)的前体(FPP、C15), MEP途径则可能主要提供合成单萜、环烯醚萜的前体(GPP、C10)以及合成二萜、植醇、赤霉素和类胡萝卜素的前体(GGPP、C20) (Vranova等2013)。植物中萜类化合物, 在萜类骨架形成后还可能在细胞色素P450、糖基转移酶等后修饰酶的作用下发生进一步修饰, 如羟化、糖基化、甲基化、异构化、环氧化等(刘威等2014), 这些后修饰反应大幅度地增加了萜类化合物的种类、结构的多样性以及生物活性。*DXR*基因是MEP途径中重要的调控基因(Zhao等2011), 其编码的蛋白在生成萜类合成的共同前体——异戊烯焦磷酸(IPP)和后续种类繁多的萜类物质中发挥着至关重要的作用(Brown和Parish 2008; Carretero-Paulet等2006)。许多文献报道*DXR*基因的转录水平与萜类产物的含量具有较高的一致性(Hasunuma等2008; Liu等2015; Seetang-Nun等2008)。*DXR*基因在拟南芥中超表达能不影响上游*DXS*基因活性的前提下提高转基因植物中的萜类化合物的产量(Carretero-Paulet等2006)。将*Synechocystis* sp. strain PCC6803中*DXR*

基因转入烟草中过表达, 可提高烟草中 β -胡萝卜素、叶黄素等萜类物质的积累(Hasunuma等2008)。雷公藤不定根中*TwDXR*表达量可被 AgNO_3 和茉莉酸甲酯诱导, 并伴随萜类成分雷公藤内酯醇和次碱的积累(Tong等2015)。在丹参毛状根培养体系中, 添加高渗物质和酵母诱导子可以显著促进丹参毛状根中*DXR*基因的表达以及丹参酮的积累(Wu等2009)。本研究组前期研究发现, 地黄内生真菌可影响地黄中梓醇等环烯醚萜苷类成分的积累(杜真辉等2016)。不同的菌株对地黄次生代谢合成的影响不同, CB25诱导后地黄中梓醇合成受阻, 梓醇含量仅为2.74%、与对照相比下降了9.87%; 而CB40、GB43、GG22、PB25等4株内生真菌作为诱导子, 地黄梓醇分别含量达到4.98%、4.17%、4.89%和4.07%, 分别比对照增加44.98%、34.29%、43.97%和32.68% (图5)。不同菌株对*RgDXR*表达量的诱导效应不同, 能降低‘北京3号’地黄叶中梓醇含量的内生真菌CB25使*RgDXR*的表达受到显著抑制, 而能增加环烯醚萜类成分积累的4种菌株作为诱导子的地黄叶片中*RgDXR*的表达量显著提高。为了分析*RgDXR*基因对地黄梓醇生物合成的影响, 我们根据*RgDXR*基因表达量与

不同内生真菌侵染下地黄组培苗中梓醇的含量进行相关性分析, 结果可知, *RgDXR* 基因的表达式与梓醇含量呈极显著相关。内生真菌诱导子能调节梓醇的合成, 而地黄MEP途径中关键酶基因*RgDXR* 的与梓醇的含量均呈极显著相关, 因此推测*RgDXR* 基因可能参与地黄中梓醇等环烯醚萜类物质的生物合成与积累。

本研究克隆得到了一条地黄*DXR* 基因的全长cDNA序列, 命名为*RgDXR*, 生物信息学分析表明, 其属于植物*DXR* 基因家族。荧光定量PCR表明地黄*RgDXR* 基因在栽培品种‘北京3号’根和叶中的表达式要高于野生种, 通过内生真菌的诱导实验表明, *RgDXR* 的表达式与地黄中梓醇的含量呈显著正相关, 因此推测*RgDXR* 可能参与调控地黄次生代谢产物的生物合成。通过构建*RgDXR* 基因的原核表达载体, 获得了大肠杆菌表达的融合蛋白, 为后续制备用于蛋白质定位及表达分析的*RgDXR* 蛋白单克隆抗体提供了材料。

参考文献

- Brown AC, Parish T (2008). DXR is essential in *Mycobacterium tuberculosis* and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake. *BMC Microbiol*, 20 (8): 78
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodriguez-Concepcion M, Ferrer A, Boronat A, Campos N (2002). Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiol*, 129 (4): 1581–1591
- Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol*, 62 (4-5): 683–695
- Du ZH, Dong CM, Xiong YP, Yang CF, Wei S (2016). Effects of bacterial and compound fertilizer combination on yield and quality of *Rehmannia glutinosa*. *Crops*, (4): 146–149 (in Chinese with English abstract) [杜真辉, 董诚明, 熊玉萍, 杨朝帆, 魏硕 (2016). 菌肥与复合肥组合对地黄产量及品质的影响. *作物杂志*, (4): 146–149]
- Hasunuma T, Takeno S, Hayashi S, Sendai M, Bamba T, Yoshimura S, Tomizawa K, Fukusaki E, Miyake C (2008). Overexpression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production. *J Biosci Bioeng*, 105 (5): 518–526
- Kuzuyama T, Takahashi S, Takagi M, Seto H (2000). Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues. *J Biol Chem*, 275 (26): 19928–19932
- Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (24): 13172–13177
- Li HW, Meng XL (2015). Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Rehmannia glutinosa*. *Drug Evalu Res*, 38 (2): 218–228 (in Chinese with English abstract) [李红伟, 孟祥乐 (2015). 地黄化学成分及其药理作用研究进展. *药物评价研究*, 38 (2): 218–228]
- Liu J, Xu Y, Liang L, Wei J (2015). Molecular cloning, characterization and expression analysis of the gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. *J Genet*, 94 (2): 239–249
- Liu W, Chen H, Jin YZ, Qi HY (2014). Advances in alcohol dehydrogenase enzymes and their gene families in higher plants. *Plant Physiol J*, 50 (10): 1479–1493 (in Chinese with English abstract) [刘威, 陈昊, 靳亚忠, 齐红岩 (2014). 高等植物醇脱氢酶及其基因家族研究进展. *植物生理学报*, 50 (10): 1479–1493]
- Luo J, Wang YQ, Wen SC, Zhang JL, Xia Q (2014). Cloning and tissue-specific expression analysis of conserved fragments of *DXR* gene from *Angelica sinensis*. *Chin Trad Herbal Drugs*, 45 (13): 1907–1913 (in Chinese with English abstract) [雒军, 王引权, 温随超, 张金林, 夏琦 (2014). 当归*DXR* 基因保守区克隆和组织特异性表达分析. *中草药*, 45 (13): 1907–1913]
- Seetang-Nun Y, Sharkey TD, Suvachittanont W (2008). Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis*. *J Plant Physiol*, 165 (9): 991–1002
- Sun P, Xiao X, Duan L, Guo Y, Qi J, Liao D, Zhao C, Liu Y, Zhou L, Li X (2015). Dynamic transcriptional profiling provides insights into tuberous root development in *Rehmannia glutinosa*. *Front Plant Sci*, 6: 396
- Suzuki M, Nakagawa S, Kamide Y, Kobayashi K, Ohyama K, Hashinokuchi H, Kiuchi R, Saito K, Muranaka T, Nagata N (2009). Complete blockage of the mevalonate pathway results in male gametophyte lethality. *J Exp Bot*, 60 (7): 2055–2064
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30 (12): 2725–2729
- Tong Y, Su P, Zhao Y, Zhang M, Wang X, Liu Y, Zhang X, Gao W, Huang L (2015). Molecular cloning and characterization of *DXS* and *DXR* genes in the terpenoid biosynthetic pathway of *Tripterygium wilfordii*. *Int J Mol Sci*, 16 (10): 25516–25535
- Vranova E, Coman D, Grusissem W (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 64: 665–700
- Wu SJ, Shi M, Wu JY (2009). Cloning and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene for diterpenoid tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage) hairy roots. *Biotechnol Appl Biochem*, 52 (1): 89–95
- Xiao WQ, Yin GJ, Fan YT, Qiu L, Cang XF, Yu G, Hu YL, Xing M, Wu DQ, Wang XP, et al (2014). Catalpol ameliorates sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats via inhibiting ac-

- tivation of nuclear factor kappa B. *Int J Mol Sci*, 15 (7): 11957–11972
- Yao H, Gong Y, Zuo K, Ling H, Qiu C, Zhang F, Wang Y, Pi Y, Liu X, Sun X, et al (2008). Molecular cloning, expression profiling and functional analysis of a *DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Camptotheca acuminata*. *J Plant Physiol*, 165 (2): 203–213
- Yu F, Utsumi R (2009). Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cell Mol Life Sci*, 66 (18): 3043–3052
- Zhao M, Qian D, Liu P, Shang EX, Jiang S, Guo J, Su SL, Duan JA, Du L, Tao J (2015). Comparative pharmacokinetics of catalpol and acteoside in normal and chronic kidney disease rats after oral administration of *Rehmannia glutinosa* extract. *Biomed Chromatogr*, 29 (12): 1842–1848
- Zhao Y, Yang J, Qin B, Li Y, Sun Y, Su S, Xian M (2011). Biosynthesis of isoprene in *Escherichia coli* via methylerythritol phosphate (MEP) pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90 (6): 1915–1922
- Zheng QP, Yu LJ, Liu Z, Li MY, Xiang F, Yang Q (2004). Cloning and analysis of cDNA encoding key enzyme gene (*dxr*) of the non MVA pathway in *Taxus chinensis* cells. *Chin J Biotech*. 20 (4): 548–553 (in Chinese with English abstract) [郑清平, 余龙江, 刘智, 李默怡, 向福, 杨秦(2004). 红豆杉细胞非甲羟戊酸途径关键酶基因*dxr*的克隆与分析. *生物工程学报*, 20 (4): 548–553]
- Zhou H, Zhu Q, Yang YF, Yu FX, Qiu DY (2014). Progress in molecular biology study of *Taxus*. *Plant Physiol J*, 50 (4): 373–381 (in Chinese with English abstract) [周华, 朱祺, 杨艳芳, 余发新, 邱德有(2014). 红豆杉分子生物学研究进展. *植物生理学报*, 50 (4): 373–381]
- Zhu CS, Chen X, Guo J, Miu GP, Feng JT, Zhang X (2014). Cloning and expression analysis of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene (*DXR*) in *Tripterygium wilfordii*. *J Agric Biotech*, 22 (3): 298–308 (in Chinese with English abstract) [祝传书, 陈欣, 郭嘉, 缪国鹏, 冯俊涛, 张兴(2014). 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. *农业生物技术学报*, 22 (3): 298–308]
- Zhu YH, Zhao L, Dong CM, Zheng XK, Feng WS (2016). Analysis of the transcriptome of *Rehmannia glutinosa* uncovers putative iridoids backbone modification genes. *Modern Food Sci Technol*, 32 (10): 84–89 (in Chinese with English abstract) [朱昀昊, 赵乐, 董诚明, 郑晓珂, 冯卫生(2016). 地黄环烯醚萜合成后修饰相关基因的挖掘与分析. *现代食品科技*, 32 (10): 84–89]

Cloning and expression analysis of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene in *Rehmannia glutinosa*

ZHU Yun-Hao, DONG Cheng-Ming, ZU Meng-Hang, LI Pan-Deng, ZHAO Le*

School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China

Abstract: The *RgDXR* cDNA was amplified from *Rehmannia glutinosa* by reverse transcription PCR. Bioinformatics analysis was conducted to analyze the properties, functional domains and evolutionary relationships of the gene. *RgDXR* was inserted into the prokaryotic expression vector pET-32a, and then transformed into *E. coli* BL21. Gene expression in different organs and inducing conditions were detected by real-time quantitative PCR. The *RgDXR* cDNA sequence contained a 1 425 bp open reading frame and encoded a predicted protein of 474 amino acids. Bioinformatic analyses revealed that *RgDXR* exhibited typical features of the DXR domain and belonged to the plant DXR superfamily. Phylogenetic tree analysis showed that *RgDXR* had the closest genetic relationship with *Sesamum indicum*. Tissue expression pattern analysis revealed that the expression of *RgDXR* was tissue-specific, and accumulation of transcripts was highest in roots of cultivated varieties ‘Beijing No.3’. After induced by endophyte fungi, the mRNA expression level of *RgDXR* was tightly correlated with the abundance of iridoid, such as catalpol. It is speculated that *RgDXR* might participated in the iridoid biosynthesis in *R. glutinosa*.

Key words: *Rehmannia glutinosa*; 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene; bioinformatic analysis; prokaryotic expression; expression analysis

Received 2016-10-08 Accepted 2017-01-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 81603232), National ‘Twelfth Five-Year Plan’ Science and Technology Support Project of China (Grant No. 2011BAI06802) and Doctoral Research Fund of Henan University of Traditional Chinese Medicine (Grant No. BSJJ2011-07).

*Corresponding author (E-mail: zhaole1983@126.com).