

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

刘英冠¹, 吴庆珂¹, 何关顺², 汪阳东^{1*}, 杨素素¹, 陈益存¹, 高 暝¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 广西壮族自治区田林县林业局, 广西 田林 533300)

摘要:在转录组测序结果分析基础上,以山鸡椒 cDNA 为模板,克隆得到山鸡椒 1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶 *DXR* 基因 cDNA 全长,以山鸡椒基因组 DNA 为模板,设计引物、扩增拼接后获得山鸡椒 *DXR* 基因全长,命名为 *LcDXR*。序列分析表明,*LcDXR* cDNA 全长为 1 501 bp,5' 非编码区长 34 bp,3' 非编码区长 53 bp,开放阅读框长 1 413 bp,预测编码含有 470 个氨基酸残基的蛋白质,等电点为 6.62,分子量为 51.12 kD。*LcDXR* 基因全长为 12 601 bp,其中外显子 12 个,内含子 11 个。对来自 10 个种源的 *LcDXR* 基因编码区单核苷酸变异位点进行分析表明:在 cDNA 区间内共发现 10 个 SNP(single nucleotide polymorphism)位点,其中有 4 个单核苷酸变异导致了所编码的氨基酸的改变,为了分析氨基酸突变导致的蛋白质精细结构的变化,利用 Swiss-PDB Viewer 模拟 4 个突变位点氨基酸残基的替换。其中江西安远(AY)的突变 Lys119Thr 引起了氢键的变化,推测可能对酶的活性产生影响。研究结果为深入研究山鸡椒脱氧木酮糖 5-磷酸还原异构酶的活性和功能奠定了基础,同时为山鸡椒遗传育种提供理论依据。

关键词:山鸡椒;*DXR*;基因克隆;SNPs

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

Cloning and SNP Analysis of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerases (*DXR*) in *Litsea cubeba*

LIU Ying-guan¹, WU Qing-ke¹, HE Guan-shun, WANG Yang-dong¹, YANG Su-su¹, CHEN Yi-cun¹, GAO Ming¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Forestry Bureau of Tianlin County Guangxi Zhuang Autonomous Region, Tianlin 533300, Guangxi, China)

Abstract: Based on the results of transcriptome sequencing, the *DXR* gene cDNA was isolated from the flower bud of *Litsea cubeba* by the method of RT-PCR. At the same time, full-length sequence of *DXR* was first obtained from the genomic DNA by PCR and splice, and named as *LcDXR*. Sequence analysis showed that the full-length cDNA of *LcDXR* was 1 501bp, including 5' non-coding region 34bp and 3' non-coding region 53bp and encoded 470 amino acids. The theoretical molecular weight of *LcDXR* was 51.12kd and the isoelectric point was predicted as 6.62. The full-length gene was 12 601bp with 12 exons and 11 introns. Single nucleotide polymorphic (SNP) sites of *LcDXR* from 10 sources were analyzed, the results showed that there were 10 SNPs within cDNA region, and 4 SNPs lead to amino acids changes. Point mutation was analyzed by Swiss-PDB Viewer to find fine structure changes resulted by amino acids mutations. The Lys119Thr mutation in Anyuan, Jiangxi Province was shown to have H-bonds change, which may have an impact on the enzyme activity.

Key words: *Litsea cubeba*; *DXR*; gene cloning; SNPs

收稿日期:2014-09-02

基金项目:国家自然科学基金项目(31370576)

作者简介:刘英冠(1990—),女,山东青岛人,硕士研究生,主要从事化工油料植物分子遗传育种研究。

* 通讯作者:研究员,主要从事化工油料植物分子遗传育种研究。E-mail:wyd11111@126.com

萜类化合物(terpenoid)是自然界中种类最多的一类化合物,结构多样,广泛存在于植物和微生物中。据估计,植物体内的萜类化合物有 3 000 多种^[1],它们不仅在植物生长、发育等生命过程中发挥重要作用,而且是中草药的有效成分,同时也是一种重要的天然香料,广泛应用于医药、化工等重要领域。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,有两条合成途径,分别是位于细胞质中的甲羟戊酸途径(MVA)和存在于质体中的甲基-D-赤藓醇4-磷酸途径(MEP)或脱氧木酮糖-5-磷酸途径(DXP)^[2]。1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)参与DXP途径的第二步反应,催化DXP生成MEP,是该途径合成异戊二稀的第二个关键步骤,而DXR是该途径的第一个关键酶,在萜类合成途径中发挥重要作用,也是细胞萜类化合物代谢调控的重要位点^[3]。目前已从银杏(*Ginkgo biloba* L.)、橡胶(*Hevea brasiliensis* (H. B. K.) Muell. -Arg)、阳春砂(*Amomum villosum* Lour.)、金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)、喜树(*Camptotheca acuminata* Decne.)、长春花(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)等植物中分离鉴定了DXR酶基因^[4-9]。

山鸡椒(*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.)又名山苍子,隶属樟科(Lauraceae)木姜子属(*Litsea* Lam.),是我国南方重要的油料经济树种^[10]。山鸡椒叶、花、果实均含芳香油,果皮含油量达3%~4%,山鸡椒精油一般多指山鸡椒果皮中提取的精油,为挥发性萜类化合物,主要成分是柠檬醛,含量在60%以上,是合成紫罗兰酮系列香料的主要原料,这些香料广泛用于高档化妆品、香皂等日用化工产品生产中。山鸡椒精油因为具有柠檬果香和杀菌作用,被用为天然的食品添加剂和食物防腐剂^[11]。除此之外,山鸡椒精油在平喘、抗心律失常、抗氧化等方面具有突出优点,药用前景广阔^[12]。目前,对于山鸡椒萜类生物合成、功能基因开发和利用方面的研究较少,对山鸡椒DXR基因的克隆及序列分析未见报道。本研究以山鸡椒果实为材料,在前期转录组测序的基础上,克隆得到山鸡椒DXR基因的cDNA全长,进而获得DXR基因全长,对基因序列及推导的氨基酸序列进行生物信息学分析,并对来自10个地区共计22株单株的山鸡椒DNA进行SNPs分析,同时分析了氨基酸变异对蛋白质结构的影响,为今后研究单核苷酸多态性和表型的关系,进一步为山鸡椒良种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2011年3月,于2010年栽植在浙江富阳市鹿山街道栋山村的山鸡椒原生种源试验林中,随机选取了能够反应山鸡椒分布范围的22株植株,每个种源随机选取1~3株,该试验林包括山鸡椒自然分布区的10个种源,分别来自湖南永州(YZ)、福建建瓯(JO)、贵州织金(ZJ)、贵州毕节(BJ)、江西安远(AY)、江西分宜(FY)、福建永安(YA)、四川长宁(CN)和浙江富阳(H)。植株取样部位为花蕾或者嫩茎,液氮速冻后-80℃保存备用。同年5月,于浙江富阳中国林科院亚热带林业研究所后山采取山鸡椒果实,液氮速冻后-80℃保存,用于RNA提取和基因的克隆。

1.2 试剂

大肠杆菌(*Echerichia coli*) DH5 α 、pMD-18T Vector Cloning Kit、反转录试剂盒 SuperScript III 购自 Invitrogen 公司, Cobuddy 超保真快速 DNA 聚合酶、2 \times GoldStar Best MasterMix 购自北京康为世纪生物技术有限公司。所有引物由上海生工生物有限公司合成。

1.3 实验和分析方法

1.3.1 山鸡椒总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成 按照植物 RNA 快速提取试剂盒操作提取山鸡椒 RNA,将满足实验要求的 RNA 放于-80℃冰箱备用。按照反转录酶 III 试剂盒的使用说明进行单链 cDNA 的合成。

1.3.2 *LcDXR* 全长 cDNA 的扩增 以高通量测序得到 *LcDXR* 拼接全长作为模板,利用 Primer Primer5.0,设计扩增引物 *LcDXR*-F: 5'-GGGATTTCAAAGCCATCTCTTCTCG-3', *LcDXR*-R: 5'-CCAACAGAGGGACTAGCATTTCATTC-3',以山鸡椒 cDNA 为模板,用 Cobuddy 超保真快速 DNA 聚合酶进行 PCR 反应,扩增基因 cDNA 全长。反应体系为 20 μ L,包括模板 50 ng,上下游引物各 0.8 μ L, 5 \times Cobuddy PCR Buffer 4 μ L, dNTP Mix 1.6 μ L, Cobuddy 超保真快速 DNA 聚合酶 0.2 μ L, RNase-Free Water 补足 20 μ L。反应程序:98℃ 预变性 3 min, 98℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳,进行胶回收纯化。

将回收纯化的 PCR 产物进行加 poly A 反应,反应体系为 10 μ L,包括 10 \times Ex Taq Buffer(Mg²⁺ plus) 1 μ L, dNTP 2 μ L, Ex Taq 酶 2.5 μ L, ddH₂O 1.5 μ L,

回收片段 3 μL 。加尾反应条件为 70 $^{\circ}\text{C}$, 30 min。

将加尾反应的产物用 pMD-18T Vector Cloning Kit 进行连接, 构建 pMD-18T-*LcDXR* 载体。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 涂布于含有 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 挑选阳性克隆进行菌液 PCR 鉴定和测序鉴定, 选择测序正确的克隆扩大培养, 提取质粒并保存菌株。

1.3.3 *LcDXR* 基因全长的获取 将获得的山鸡椒 *DXR* 基因 cDNA 序列在 NCBI 比对, 找到其它物种中与山鸡椒 *DXR* 基因同源的序列, 初步判断山鸡椒 *DXR* 基因中外显子与内含子的位置以及大小, 根据推测出的相邻外显子的位置信息设计引物, 以山鸡椒基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 的方法分段扩增出基因的全长。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 条带回收后送往上海生工生物有限公司测序。测序结果用 DNAMAN 软件打开并进行序列比对, 根据 cDNA 序列及引物信息, 除去重复序列, 拼接出山鸡椒 *DXR* 基因的全长, 并利用 Splein (NCBI) 构建基因的结构图。

1.3.4 *LcDXR* 序列生物信息学分析 利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Blast 程序与 CD Search 程序进行序列相似性检索与保守结构域分析, 并用 ORF Finder 程序查找基因 cDNA 开放阅读框。用 MEGA 5.0 软件进行氨基酸序列的多重比对以及系统发育树的构建。利用 ExPASy (<http://cn.expasy.org>) ProtParam 程序预测蛋白质相对分子量、理论等电点等理化性质和二级结构。运用 SWISS

```

61 CCTTCCTTTTGGCTTTCCCTTTTCGAGAAGAGATGGCTTTGAAATCCCCCTGCACGTAGACATCGGAGGAATCTCCTTCTGGATTCCAGCAAAGGAAGCCTTTGGAAGCTCAAAGG
1 M A L K S P L H V D I G G I S F L D S S K G S L W K L K G
181 AGGATTGTTTGAAGAGGAAGGAGAAATGGAATGCCACATGTAAGGTTAACCCGTGTGTTCTGCCAGGTGCTCCACCGCATGCCAGGACGAGCCGTTGTAGAGCCAGGACGGAAGGT
30 G F V L K R K E N G M P H V R L T R C S A Q V P P P A W P G R A V V E P G R K V
301 GTGGGATGGTCCCAAGCCTATCTCGATTGTTGGATCCACTGGTTCACCTGGAACCTCAGACTTTGGACATAGTAGCTGAGAACCCTGCAAAATTCAGAGTTGTTGCATGGCAGCCGGTTC
70 W D G P K P I S I V G S T G S I G T Q T L D I V A E N P D K F R V V A L A A G S
421 AAATGTGACCCCTTTCGACATCAGGTGAAGAGGTTCAAACCTCAACTGGTGTGTTAGAAACAGTTCATTAGTTGATGAATTTAAAGAGGCTTTGGCGGATGCATGAAATACAAGCCTGA
110 N V T L L A D Q V K R F K P Q L V A V R N E S L V D E F K E A L A D A E Y K P E
541 GATAATCTCGGAGAGCGGGTGTCTGATGAAGTTGACGTCACCCAGATGCTGTACAGTAGTCACAGGAATAGTAGGATGTGACAGGTTTGAAGCCTACAGTAGTGAATGAGGCCGG
150 I I P G E Q G V I E V A A R H P D A V T V L G I V G C A A G T K P T V A A I E A G
661 AAAAGACATTCATTGGCAAAAGAGACTGTGATTCAGGCGTCCCTTTGTAATCTCTCTGTCACAAAAGCATAAAAGTCAACTCTCTGCTGACTCAGAACATCTGCTATATT
190 K D I A L A N K E T L I A G G P F V L P L A Q K H K V K I L P A D S E H S A I F
781 CCAGTGATTCAAGTCTGCCAGGGTGCACCTACGGCGCATTTTGTACTGCTTCCGAGGGGCTTCAGGATTTGCCGTGTGAAAACTCAAGGAGGTGAAAGTTGCTGATGCTTT
230 Q C I Q G L P E G A L R R I I L T A S G G A F R D L P V E K L K E V K V A D A L
901 AAAGCATCTTAAGTACTGACTATGGAAAGAATCAGTGGATTGCGCCCTCTTCAACAAGGCTCTTGAAGTTATTGAAGCCACTATCTGTTGGAGCTGAATATGATGATTTGA
270 K H P N W T M G K K I T V D S A T L F N K G L E V I E A H Y L F G A E Y D D I E
1021 GATTGTGATTCATCCCAAGTCAATCATTCACTCAATGGTTGAGACCCAGGATTCATCAGTCTTGTCTGCTGAGTGGGATGGGCTGATATGCGCCTGCCAATCTTTACACAATGTCATGGCC
310 I V I H P Q S I I H S M V E T Q D S S V L A Q L G W A D M R L P I L Y T M S W P
1141 AGAGAAATTTATTGCTCTGAAATCACCTGGCCTCGGCTTGACCTTTGCAAGTTGGGCTCTCTGACATTTAAGGCTCTGATAATGTGAAATACCCATCCATGGATCTTGCTTACTCCGC
350 E R I Y C S E I T W P R L D L C K L G S L T F K A P D N V K Y P S M D L A Y S A
1501 GGCTTAATGGTTGACAGCTGAAGAGGGCATGTCTAGTCTTGTGGGCCCCATTGGACCA
470 A

```

左侧第 1 行数字为对应行核苷酸序号, 第 2 行为对应的氨基酸序号

图 2 *DXR* 全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

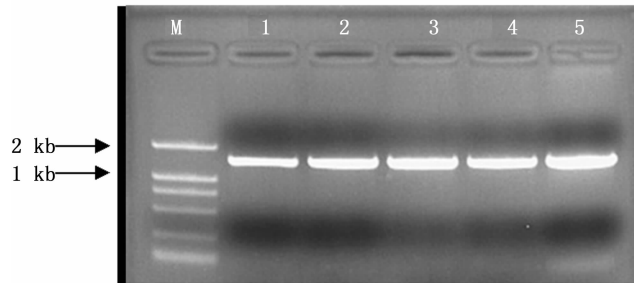
MODEL 预测 *LcDXR* 的三级结构。

1.3.5 SNP 的统计与分析 提取 22 株山鸡椒个体的 DNA, 送往上海生工生物有限公司进行 SNPs 的分析, 分析所有样本的外显子的 SNPs, 并将其对应到 cDNA 上。根据返回的 SNP 数据, 计算转换和颠换的 SNP 数量, 估算基因的核苷酸多样性水平, 进一步分析同义突变和非同义突变。利用 Swiss-PDB Viewer 预测由氨基酸取代所引起的蛋白质精细结构改变。

2 结果与分析

2.1 *LcDXR* 基因的 cDNA 全长扩增

以反转录得到的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增, 经过琼脂糖凝胶电泳检测显示, 成功克隆到一条特异条带, 该片段大小在 1.5 kb 左右 (图 1)。将胶回收产物连接到 T 载体上, 测序后, 利用 ORF Finder 查找开放阅读框, 结果显示 *LcDXR* 开放阅读框为 1 413 bp, 5' 非编码区长 34 bp, 3' 非编码区长 53 bp, 编码含有 470 个氨基酸残基的蛋白质 (图 2)。



M: DL 2000 Marker; 1~5: *LcDXR* 的 cDNA 扩增产物

图 1 *LcDXR* 基因 cDNA 扩增的琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 LcDXR 基因全长的获取及序列分析

将上海生工生物有限公司返回的测序信息用 DNAMAN 打开,根据 cDNA 的序列信息及引物序列进行拼接,去除重复序列,得到了 *LcDXR* 基因的全

长。用 Salign 分析 *LcDXR* 基因结构,输入 cDNA 序列和基因全长序列,给出的结果如图 3。分析可知,*LcDXR* 基因全长为 12 601 bp,内含子 11 个,外显子 12 个。

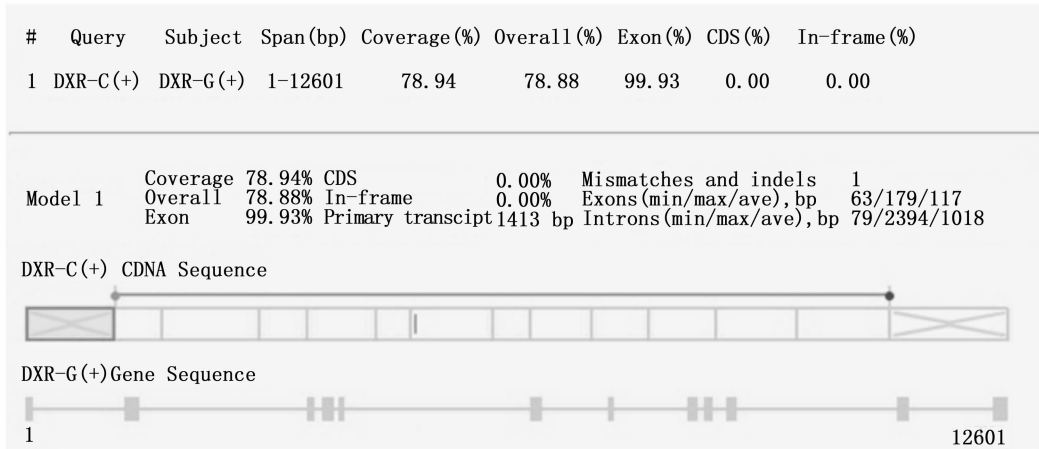


图3 *LcDXR* 基因结构

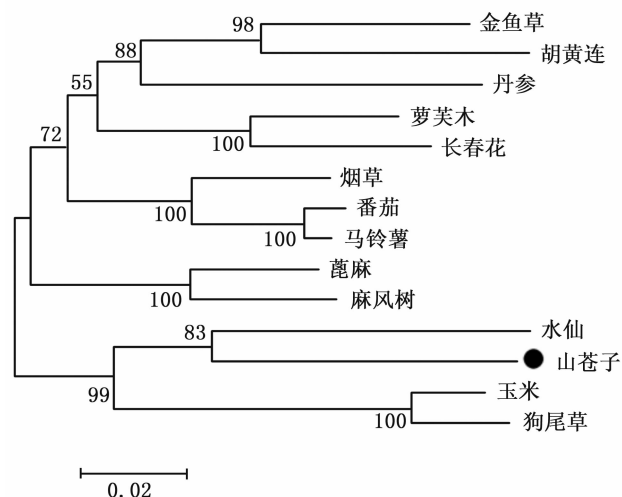
2.3 LcDXR 生物信息学分析

2.3.1 多序列比对及进化树分析 根据 *LcDXR* 的氨基酸序列检索 NCBI 数据库同源蛋白序列,构建了 DXR 与其它植物的 DXR 蛋白的系统进化树,如图 4 所示,山鸡椒 DXR 与单子叶植物水仙(*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem.)、玉米(*Zea mays* L.)和狗尾草(*Setaria viridis* (L.) Beauv.)的 DXR 亲缘关系较近。DNAMAN 对此 4 种植物 DXR 氨基酸序

列进行多序列比对,结果显示 4 种植物 DXR 的相似性达 92.2%,蛋白质功能域有着相同的氨基酸组成,即两个 DXR 结合基序(motif): LPADSEHSAI 和 NKGLEVIEAHY,两个 NADPH 结合基序(motif): GSTGSIGT 和 LAAGSNVT(图 5)。

2.3.2 *LcDXR* 氨基酸组成及理化性质分析 ExPASy ProtParam 程序预测的山鸡椒 DXR 蛋白质等电点为 6.62,分子量为 51.12 kD。氨基酸组成以亮氨酸(10%)、丙氨酸(10%)含量为最高(图 6),蛋白质不稳定系数为 32.32,为稳定蛋白质,ExPASy ProtScale 预测 *LcDXR* 为亲水性蛋白。PreditProtein 预测 *LcDXR* 亚细胞定位于叶绿体,TMHMM 工具对山鸡椒 DXR 氨基酸序列的跨膜结构域进行预测,山鸡椒 DXR 整条肽链都位于膜外,也即山鸡椒 DXR 不存在跨膜结构域。用 TargetP、ChloroP 对山鸡椒 DXR 氨基酸序列的转运肽进行预测,结果表明,该序列含有叶绿体转运肽的分值最高(0.576),叶绿体转运肽包含 47 个氨基酸,含有转运肽酶切位点。由此可以推断山鸡椒 DXR 蛋白在质体外合成后,在转运肽的作用下运输到叶绿体,由特异的水解蛋白切去转运肽,成为成熟的蛋白质,不与膜脂结合。此推断与 DXP 途径在细胞中的作用部位是质体的事实相吻合。

2.3.3 *LcDXR* 二级结构及保守结构域分析 利用 SOPMA 工具对 *LcDXR* 二级结构进行预测,如图 7 所示,*LcDXR* 中 α 螺旋含量为 37.23%,延伸链为



拉丁学名:胡黄连(*Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell.),丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge.),萝芙木(*Rauwolfia verticillata* (Lour.) Baill.),烟草(*Nicotiana tabacum* Linn.),番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.),马铃薯(*Solanum tuberosum* L.),蓖麻(*Ricinus communis* Linn.),麻风树(*Jatropha curcas* Linn.)。

图4 DXR 同源蛋白的系统进化树分析

玉米 ZmDXR	MAALKASFRGSLSAASFLDSSRGPLVQHKIDETFQRKGRKAISSRRRTCCSMCOAPPAAWPGRAVAEBGRRSWDGPKPISI	80
水仙 NtDXR	.MALKLPLPVDFGGVDFLDSSRGSEHPLKMGFPLKRRK.ERGTSLRRAGCSMCOAPPAAWPGRAVAEBGRKRSWDGPKPISI	78
狗尾草 SiDXR	MAALKASFRGSLSAASFLDSSRGPFQGHKIDETFQRKGRKAISSRRRTCCSMCOAPPAAWPGRAVAEBGRRSWDGPKPISI	80
山鸡椒 LcDXR	.MALKSPLHVDFIGGISFLDSSRGSLWKLKGFVLRKK.ENGMPHVRLTRCSAAPPAAWPGRAVAEBGRKRSWDGPKPISI	78
玉米 ZmDXR	VGSTGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLADQVKTEFEPFLVAVRNEALVDEEKEALADCEBEPKPEIIPGQGVII	160
水仙 NtDXR	VGSTGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLADQVKRENPFLLVAVRNEALVDEEKEALADCEBEPKPEIIPGQGVII	158
狗尾草 SiDXR	VGSTGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLADQVKTEFEPFLVAVRNEALVDEEKEALADCEBEPKPEIIPGQGVII	160
山鸡椒 LcDXR	VGSTGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLADQVKRESEFLLVAVRNEALVDEEKEALADCEBEPKPEIIPGQGVII	158
玉米 ZmDXR	EVARHPDAVIVVTGIVGCAGLKPVTAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVFLPLAKHKHKVILPADSEHSAIFQCIQGLSEG	240
水仙 NtDXR	EVARHPDAVIVVTGIVGCAGLKPVTAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVFLPLAKHKHKVILPADSEHSAIFQCIQGLSEG	238
狗尾草 SiDXR	EVARHPDAVIVVTGIVGCAGLKPVTAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVFLPLAKHKHKVILPADSEHSAIFQCIQGLSEG	240
山鸡椒 LcDXR	EVARHPDAVIVVTGIVGCAGLKPVTAAIEAGKDIALANKETLIAGGPFVFLPLAKHKHKVILPADSEHSAIFQCIQGLSEG	238
玉米 ZmDXR	ALRRVILTASGGAFRDFVDRLLKDKVADALKHPNWMGRKITVDSATLFNKGLVEIEAHYLFGAYDDEEIVIHPOSII	320
水仙 NtDXR	ALRRVILTASGGAFRDFVDRLLKDKVADALKHPNWMGRKITVDSATLFNKGLVEIEAHYLFGAYDDEEIVIHPOSII	318
狗尾草 SiDXR	ALRRVILTASGGAFRDFVDRLLKDKVADALKHPNWMGRKITVDSATLFNKGLVEIEAHYLFGAYDDEEIVIHPOSII	320
山鸡椒 LcDXR	ALRRVILTASGGAFRDFVDRLLKDKVADALKHPNWMGRKITVDSATLFNKGLVEIEAHYLFGAYDDEEIVIHPOSII	318
玉米 ZmDXR	HSMVETQDSSVLAQLGWFDMRRPILYTLMSWPERIYCSEITWPRDLCKLGLSLTFKAPDNVKYPSMDLAYBAGRAGGTMTG	400
水仙 NtDXR	HSMVETQDSSVLAQLGWFDMRRPILYTLMSWPERIYCSEITWPRDLCKLGLSLTFKAPDNVKYPSMDLAYBAGRAGGTMTG	398
狗尾草 SiDXR	HSMVETQDSSVLAQLGWFDMRRPILYTLMSWPERIYCSEITWPRDLCKLGLSLTFKAPDNVKYPSMDLAYBAGRAGGTMTG	400
山鸡椒 LcDXR	HSMVETQDSSVLAQLGWFDMRRPILYTLMSWPERIYCSEITWPRDLCKLGLSLTFKAPDNVKYPSMDLAYBAGRAGGTMTG	398
玉米 ZmDXR	VLSAANEKAVELFDEKISYLDIFKVEVETCDHRNBLVDRPSLEETIHYDLWARRYAASLQPSAGLSPVP	471
水仙 NtDXR	VLSAANEKAVELFDEKISYLDIFKVEVETCDHRNBLVDRPSLEETIHYDLWARRYAASLQPSAGLSPVP	469
狗尾草 SiDXR	VLSAANEKAVELFDEKISYLDIFKVEVETCDHRNBLVDRPSLEETIHYDLWARRYAASLQPSAGLSPVP	471
山鸡椒 LcDXR	VLSAANEKAVELFDEKISYLDIFKVEVETCDHRNBLVDRPSLEETIHYDLWARRYAASLQPSAGLSPVP	469

ZmDXR: DAA53825.1; NtDXR: ADD82536.1; SiDXR: XP_004967949.1; 右侧数据代表每行最后一个氨基酸的编号

图 5 山鸡椒、狗尾草、玉米和水仙 DXR 多序列比对

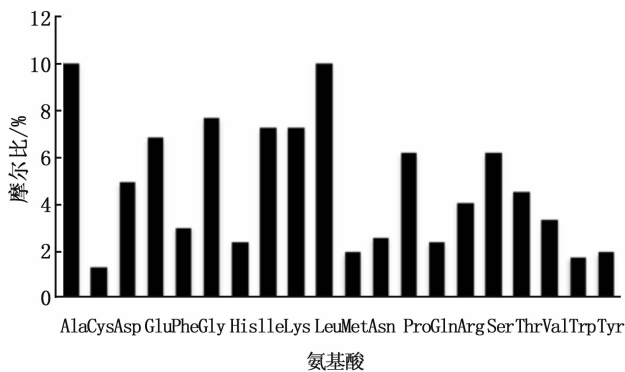


图 6 LcDXR 中每种氨基酸的摩尔比

Alpha helix (Hh) :	175 is	37.23%	Beta turn (Tt) :	29 is	6.17%
3 ₁₀ helix (Gg) :	0 is	0.00%	Bend region (Ss) :	0 is	0.00%
Pi helix (Ii) :	0 is	0.00%	Randon coil (Cc) :	183 is	38.94%
Beta bridge (Bb) :	0 is	0.00%	Aabiguous states (?) :	0 is	0.00%
Extended strand (Ee) :	83 is	17.66%	Other states :	0 is	0.00%

17.66%, 无规则卷曲占 38.94%, β 折叠为 6.17%, 可见 α 螺旋和无规则卷曲是该蛋白主要的二级元件, 延伸链与 β 折叠散布于整个蛋白质中。CD Search 程序对 DXR 保守功能域预测, LcDXR 为一多结构域蛋白, 分属于 DXP 还原异构酶家族、DXP-re-disom-C 家族以及 DXPR-C 家族(图 8)。

2.3.4 LcDXR 三级结构预测 以运动发酵单胞菌蛋白(PDB ID: 1r0k)为模板, 利用 SWISS-MODEL 对 LcDXR 蛋白质进行同源建模, 得到的蛋白三维构象如图 9 所示, 蛋白质在空间折叠成“V”形, 蛋白质“C”端和“N”端构成“V”形的两臂。

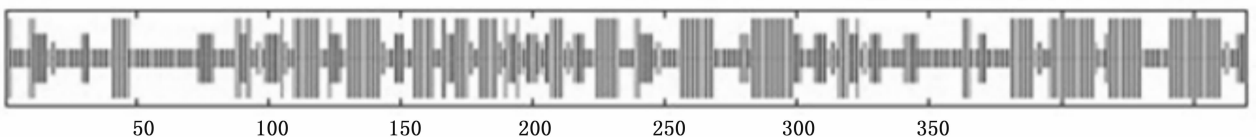


图 7 LcDXR 二级结构预测

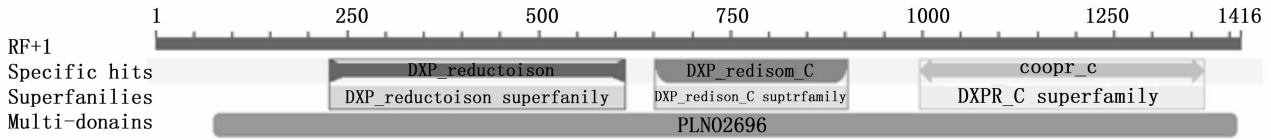


图8 LcDXR 保守功能域预测



图9 LcDXR 的三维结构

2.4 SNP 的统计与分析

2.4.1 SNP 位置及变异类型分析 对22个山鸡椒单株DNA进行测序分析,得出LcDXR基因编码区共有10个单核苷酸变异位点,平均179 bp有1个SNP(表1)。对LcDXR编码区的10个SNPs的分析得出,有8个属于转换,包括C-T 5个,A-G 3个;颠换2个,包括A-C 1个,G-T 1个(表2)。

表1 LcDXR 编码区单核苷酸变异位点

单株编号	单核苷酸位置									
	279	482	517	573	602	713	1 409	1 433	1 440	1 448
H1	C	T	A	A	G	G	C	C	C	T
H2	A	C	A	A	G	C	C	C	C	C
FY1	A	T	A	A	G	C	C	C	C	C
FY2	A	C	A	A	G	C	C	C	C	C
FY3	A	C	A	A	G	C	C	C	C	C
JD	A	C	A	A	G	C	C	C	C	C
JO1	A	C	A	A	G	C	C	C	T	C
JO2	A	C	A	A	G	C	C	C	C	C
YA1	C	T	A	A	G	C	C	C	C	T
YA2	A	C	A	A	G	T	C	C	C	C
ZJ1	A	C	A	A	G	T	T	T	C	C
ZJ2	A	C	A	A	A	T	T	C	C	C
BJ1	A	C	A	A	G	C	T	T	C	C
BJ2	A	C	A	A	G	T	T	T	C	T
YZ1	A	C	A	A	G	T	C	C	C	T
YZ2	A	C	A	A	G	T	C	C	C	T
AY1	A	C	G	A	G	C	C	C	C	T
AY2	A	C	A	A	G	T	C	C	C	C
AY3	A	C	A	G	G	T	C	C	C	C
CN1	A	C	A	A	G	C	C	C	C	C
CN2	A	C	A	A	G	T	C	C	C	T
CN3	A	C	A	A	G	C	C	C	C	C

表2 转换、颠换统计

基因	SNP 数量	转换		颠换	
		C-T	A-G	C-T	A-G
LcDXR	10	5	3	1	1

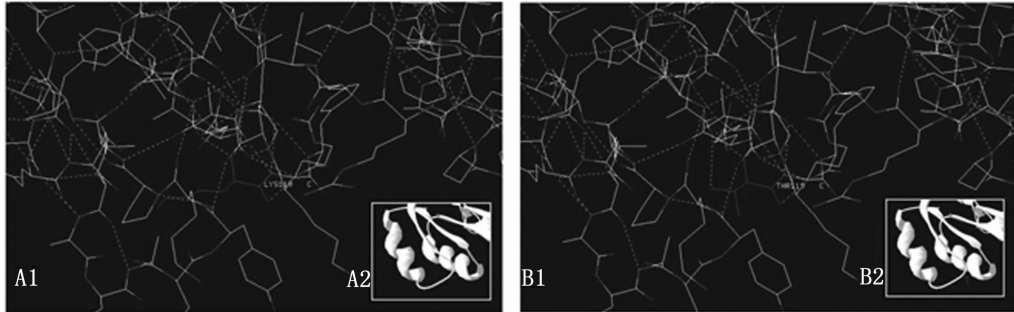
2.4.2 SNPs 引起的氨基酸变化 对检测到的10个编码区的SNPs进行了氨基酸编码突变类型的分类,主要分为同义突变、错义突变和无义突变。在这

10个SNPs中,有6个属于同义突变,其SNPs突变位点均位于密码子第3位核苷酸上;有4个属于错义突变,没有无义突变,这4个错义突变引起了氨基酸位点的突变,分别是氨基酸序列40位甲硫氨酸(Met)突变为亮氨酸(Leu),119位赖氨酸(Lys)突变为苏氨酸(Thr),138位赖氨酸(Lys)突变为谷氨酸(Glu),427位亮氨酸(Leu)突变为苯丙氨酸

(Phe)。

利用 Swiss-PDB Viewer 预测氨基酸突变引起的蛋白质精细结构的变化,发现 Met40 Leu 位于转运肽区域,对 *DXR* 酶结构没有影响;Lys119Thr 位于

NADPH 结合基序附近,氢键由 3 条变成 4 条,侧链变短(图 10);Lys138Glu 氢键由 4 条变成 5 条;Leu427Phe 对结构无影响,无键的形成和破坏。



A1:Lys119 的氨基酸结构;A2:A95 ~ A170 蛋白质三级结构(A119 为 Lys);B1:Thr119 的氨基酸结构;B2:A95 ~ A170 蛋白质三级结构(A119 为 Thr)

图 10 Swiss-PDB Viewer 分析氨基酸突变引起的结构变化和部分蛋白质结构

3 结论与讨论

DXR 是萜类生物合成途径 MEP 途径的关键酶,它由 NADPH 提供还原力,将 DXP 生成 MEP。此途径合成的 IPP 主要用于单萜、二萜和四萜的生物合成^[13],单萜是山鸡椒精油的主要成分,其中柠檬醛占单萜含量的 78.7%~87.4%^[14]。由此推断,山鸡椒中关键酶 *DXR* 基因的表达水平,可能影响山鸡椒单萜的产量,进而对山鸡椒精油的品质产生影响。为了研究 *DXR* 基因对植物萜类化合物合成的影响,在大肠杆菌、薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)、长春花等多种物种中克隆了 *DXR* 基因^[15-17],并利用基因工程的手段对 *DXR* 基因在萜类合成途径中的作用进行了研究,结果显示过量表达 *DXR* 基因可以促进相应的萜类化合物含量的增加,但目前在山鸡椒以及其它樟科植物中,关于 *DXR* 基因的克隆和功能未见报道。

本研究应用 RT-PCR 的方法,首次从山鸡椒果实中获得了含有 12 个外显子和 11 个内含子的 *LcDXR* 基因全长,并得到 1 501 bp 的 cDNA 全序列及其编码的包含 470 个氨基酸的蛋白质序列,通过 BLAST 程序发现山鸡椒 *DXR* 与水仙的 *DXR* 有着较高的同源性,进化树分析也表明两者距离较近。对山鸡椒 *DXR* 蛋白的氨基酸序列和二级结构进行了生物信息学分析,发现 *LcDXR* 是一个由 470 个氨基

酸组成的非跨膜蛋白,N 端含有叶绿体转运肽和转运肽酶切位点,对玉米、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh)、水稻(*Oryza sativa* L.)、亚麻(*Linum usitatissimum* Linn.)等 *DXR* 酶的氨基酸进行分析,也发现转运肽的存在^[18],作者推测山鸡椒 *DXR* 酶是在细胞质中合成后由转运肽运送至叶绿体,因为 *DXR* 是 DXP 途径的关键酶,而 DXP 途径仅存在于质体中,因此这一推断与 DXP 途径在细胞中的作用部位是质体相吻合。

SNP 是目前使用最广泛的遗传标记技术,具有分布广、数量多、遗传稳定性高等优点,可以在亲缘关系较近的种源间进行精确的遗传多样性研究。研究发现,某一性状或功能,大多是由许多 SNP 位点在遗传上共同作用的结果^[19],但是少数的 SNP 位点甚至单个位点也可能引起某一性状的改变,水稻的脱粒性状可能是一个位点突变导致的^[20]。本文对 10 个种源的 *DXR* 基因进行了 SNP 分析,揭示了该基因在种源间的多态性,10 个 SNP 位点中有 4 个 SNP 位点引起了氨基酸的改变,其中江西安远的氨基酸突变 Lys119Thr 发生在蛋白质 NADPH 结合基序附近,引起了氢键的变化,可能对 *DXR* 酶的活性产生了影响,进而对下游产物产生影响。2012 年斯林林等对 10 个地区的精油成分进行了分析,发现江西安远的柠檬烯含量最高^[14],因此这种推测有可能成立。为了验证这一猜测,下一步将进行定点突变,

分析验证 Lys119Thr 突变对酶活性的影响,并在全国山鸡椒自然分布区范围内,考虑到水分等环境条件的情况下,大范围对山鸡椒 SNPs 和含油率、精油品质等经济性状进行关联性分析,为山鸡椒遗传育种和优树选育奠定基础。

参考文献:

- [1] Page J E, Hause G, Raschke M, *et al.* Functional analysis of the final steps of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing[J]. *Plant Physiol.* 2004, 134(4):1401–1413.
- [2] Daum M, Herrmann S, Wilkinson B, *et al.* Genes and enzymes involved in bacterial isoprenoid biosynthesis[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13(2):180–188.
- [3] Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, *et al.* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate in an alternative non mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17):9879–9884.
- [4] Gong Y F, Liao Z H, Chen M, *et al.* Molecular cloning and characterization of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene from *Ginkgo biloba*[J]. *DNA Seq*, 2005, 16(2):111–120.
- [5] Yortytot S, Thomas D S, Wallie S, *et al.* Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis*[J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(9):991–1002.
- [6] 杨锦芬,阿迪卡利,陈蔚文,等. 阳春砂 1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因的克隆及表达分析[J]. *广州中医药大学学报*, 2010, 27(5): 551–558.
- [7] Dudarevan N, Andersson S, Orlova I, *et al.* The non mevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3): 933–938.
- [8] Yao H, Gong Y, Zuo K, *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.
- [9] Veau B, Courtois M, Oudin A, *et al.* Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1517(1):159–163.
- [10] 王旭,杨关锋. 我国山苍子开发利用的现状与发展对策[J]. *经济林研究*, 2010, 28(3):136–139.
- [11] 黄光文,卢向阳. 我国山苍子油研究概况[J]. *湖南科技学院学报*, 2005, 26(11):97–102.
- [12] 方学军. 山苍子油的功能及应用[J]. *湖南林业科技*, 2007, 34(3):82–84.
- [13] Lange B M, Rujan T, Martin W, *et al.* Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(24):13172–13177.
- [14] Si L, Chen Y, Han X, *et al.* Chemical composition of essential oils of *Litsea cubeba* harvested from its distribution areas in China [J]. *Molecules*, 2012, 17(6):7057–7066.
- [15] Kim S W, Keasling J D. Metabolic engineering of the non mevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72(4):408–415.
- [16] Proteau P J. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview[J]. *Bioorg Chem*, 2004, 32(6):483–493.
- [17] Veau B, Courtois M, Oudin A, *et al.* Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1517(1):159–163.
- [18] 李嵘,王喆之. 植物萜类合成酶 1-脱氧-D-木酮糖-5-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.
- [19] 夏小慧,张腾国. SNP 功能活性研究方法进展[J]. *现代生物医学进展*, 2009, (10):1995–1997.
- [20] Tao S. Genes and mutations underlying domestication transitions in grasses[J]. *Plant Physiol*, 2009, 149(1):63–70.