

黄草乌 *DXS* 基因克隆、生信学分析及表达载体构建



李一果^{1,2}, 杨雪婷¹, 牟凤娟³, 赵星¹, 年洪娟¹, 李昆志^{1,*}

¹ 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500

² 昆明市农业农村局, 云南昆明 650500

³ 西南林业大学林学院, 云南昆明 650224

摘要: 黄草乌是一种重要的中药材, 因其含有二萜类生物碱, 具有祛风散寒、活血止痛、抗抑肿瘤、除湿解毒等功效。二萜类生物碱生物合成需要通过萜类骨架代谢得到中间产物, 进而合成二萜类生物碱。萜类骨架合成包括 MVA 途径和 MEP 途径, 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶 (*DXS*) 是 MEP 途径第一个限速酶基因, 在萜类物质的合成中起到重要的调控作用。目的: 为掌握黄草乌 *DXS* 基因的特性。方法: 通过提取黄草乌叶片的 RNA 反转录为 cDNA, 依据黄草乌转录组数据, 设计引物克隆基因全长, 对编码蛋白序列进行生物信息学分析。构建过表达载体和抑制表达载体。结果: 该基因编码区为 1512 bp, 有 503 个氨基酸, 分子式为 $C_{2408}H_{3822}N_{652}O_{713}S_{22}$, 分子量为 54020.10, 等电点 pI 为 6.29, 不稳定性指数为 35.70, 属稳定蛋白。成功构建了过表达载体和抑制表达载体, 为进一步研究该基因在二萜生物合成途径中的功能提供科学的依据。

关键词: 黄草乌; 二萜; *DXS* 基因; 基因克隆; 表达载体

DOI: [10.57237/j.life.2023.02.004](https://doi.org/10.57237/j.life.2023.02.004)

Cloning, Bioinformatics Analysis and Expression Vector Construction of *DXS* Gene from *Aconitum vilmorinianum*

Li Yi-guo^{1,2}, Yang Xue-ting¹, Mou Feng-juan³, Zhao Xing¹, Nian Hong-juan¹, Li Kun-zhi^{1,*}

¹ Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

² Kunming Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Kunming 650500, China

³ Faculty of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: *Aconitum vilmorinianum* is an important Chinese medicinal herb, which contains diterpenoid alkaloids and has the functions of antirheumatic activity, improvement in human meridians, relief of swelling and pain, activation of the blood circulation, and inhibition of tumor growth. The biosynthesis of diterpenoid alkaloids requires intermediate products obtained through terpenoid skeleton metabolism, in order to synthesize diterpenoid alkaloids.

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (编号 31960071; 31760349).

*通信作者: 李昆志, likzkm@163.com

收稿日期: 2023-04-14; 接受日期: 2023-05-23; 在线出版日期: 2023-06-15

<http://www.lifescitech.org>

The synthesis of terpenoid skeletons includes the MVA pathway and the MEP pathway. 1-deoxyglucose-5-phosphate synthase (*DXS*) is the first rate limiting enzyme gene in the MEP pathway and plays an important regulatory role in the synthesis of terpenoids. Objective: To understand the characteristics of the *DXS* gene in *Polygonum multiflorum*. Method: By extracting RNA from the leaves of *A. vilmorinianum* and reverse transcribing it into cDNA, according to the transcriptome data of *A. vilmorinianum*, primers were designed to clone the full length of the gene, and the sequence of the coding protein was analyzed by bioinformatics. Construct overexpression vectors and inhibitory expression vectors. Results: The results showed that the coding region of the gene is 1512 bp, with 503 amino acids, molecular formula $C_{2408}H_{3822}N_{652}O_{713}S_{22}$, molecular weight 54020.10, the isoelectric point pI 6.29, the instability index 35.70, and belongs to the stable protein category. Successfully constructing overexpression vectors and inhibitory expression vectors can provide scientific basis for further research on the function of this gene in the diterpene biosynthesis pathway.

Keywords: *Aconitum vilmorinianum* Kom.; Diterpenoids; *DXS* Gene; Gene Cloning; Expression Vector

1 引言

黄草乌 (*Aconitum vilmorinianum* Kom.) 是毛茛科乌头属植物, 全世界有 350 种, 中国除海南以外都有分布, 有乌头属植物 200 余种, 云南是乌头属植物分布的中心, 有 66 种、25 个变种和 4 个变型[1, 2]。黄草乌是中国西南地区一种重要的中药材, 是云南白药、草乌甲素片、百宝丹、三乌胶、兽药草乌注射液等中成药的主要原料[3]。黄草乌主要的药效成分是滇乌碱、草乌甲素等二萜类生物碱, 具有祛风除湿、温经止痛、解毒消肿、散寒活血、抗抑肿瘤等功效[4]。目前, 黄草乌的研究主要集中在有效成份和药理作用方面, 研究发现二萜类生物碱有 47 种, 然而二萜类生物碱生物合成途径及功能基因方面的研究鲜有文献报道。

萜类物质是广泛分布于生物界的一类天然产物, 也是重要生命物质, 萜类物质通过 MVA 途径和 MEP 途径合成萜类骨架。许多植物萜类代谢研究表明, 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶 (*DXS*) 是 MEP 代谢通路的关键酶[5, 6], 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中更是被鉴定为主要的限速酶, 也是该途径的关键调控位点[7]。目前已从 170 多种植物中克隆分离到 *DXS* 基因, *DXS* 基因表达具有组织特异性, 昼夜节律性, 与花朵、果实发育程度和品种有关。此外, *DXS* 基因表达会引起植物光合色素 (如叶绿素和类胡萝卜素), 内源激素 (如脱落酸和赤霉素) 和单萜、二萜等萜类物质含量的改变[8]。二萜类生物碱是黄草乌主要有效成份次生代谢产物, 生物合成代谢途径包括 MVA 代谢途径、MEP 代谢途径、FDS 调节途径和二萜骨架合成途径, 黄草乌 *DXS* 基因作为 MEP 途径上的第一个限速酶键基因[9]。然而到目前为止, 未见

国内外文献报道有关黄草乌 *DXS* 基因的研究。因此, 有必要开展黄草乌 *DXS* 功能基因的研究。

本研究以黄草乌为研究材料, 依据转录组测序得到的 CDS 序列设计引物, 通过 PCR 克隆得到了 1-脱氧-D-木糖-5-磷酸合酶, 将其命名为 Av*DXS*。进行酶活特性和生物学信息分析, 分别构建了过表达载体和抑制表达载体。本研究为黄草乌二萜生物碱生物途径解析提供了科学依据, 有助于推动后期黄草乌生物碱的定向生物合成, 并为黄草乌资源开发应用提供科学参考。

2 材料与方法

2.1 试验材料

黄草乌实验材料采集云南省禄劝县, 种植于昆明理工大学生命与技术学院的试验基地, 取根为材料, 洗净吸干水分切成小块后, 用锡箔纸包好立即放入液氮中处理后, 保存-80℃冰箱用于后续实验。

2.2 实验试剂

生化试剂: RNA 提取 Trizol 试剂、cDNA 反转录试剂、DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂, DNA Marker, 各种抗生素, 其它试剂。酶: 内切酶、DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。LB 培养基组分为 NaCl 10 g/L、Yeast Extract 5 g/L、Tryptone 10 g/L、固体培养基需要添加 1.5% 的琼脂粉, 115℃条件下灭菌 30 min。抗性试剂: 壮观霉素 (Spe)、氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan) 浓度为 100 mg/mL, 使用浓度为 100 μg/mL。

2.3 菌株与载体

本研究所用的大肠杆菌 DH5 α 感受态、农杆菌 GV3101 感受态购于昆明硕擎生物科技公司, T 载体为 pMD-18T、入门载体 pENTR2B、植物过表达载体 PK2WG7.0 和抑制表达载体 pK7GWIWG2 为本实验室保存。

2.4 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

RNA 提取采用 trizol 法。按照 trizol 试剂使用说明提取黄草乌总 RNA, 后用琼脂糖凝胶 (1.2%) 电泳检测 RNA 的纯度和完整性。按照反转录试剂盒的说明书添加各种试剂后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 冰上 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置合成 cDNA, 然后保存 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后续实验。

2.5 引物设计及基因 PCR 扩增

依据转录组测序获得的 *AvDXS* 基因序列设计引物和酶切位点, 上游引物 F: GGATCCATGACGGCTGGACAAGCATA, 酶切位点 BamHI (GGATCC); 下游引物 R: CTCGAGTCATACTTCCATGACATT GAAC, 酶切位点 XhoI (CTCGAG)。PCR 反应体系总体积 50 μL : 21 μL DDH $_2\text{O}$, 上下游引物各添加 1 μL , 稀释模板 2 μL cDNA, 25 μL Taq Master Mix。PCR 扩增条件: 预变性条件 94 $^{\circ}\text{C}$ 、90 s; 变性条件 94 $^{\circ}\text{C}$ 、40s, 退火条件 51 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 延伸条件 72 $^{\circ}\text{C}$ 、90s, 反应循环 35 个后, 延伸条件 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。

2.6 目的基因回收与 TA 克隆

按照胶回收试剂盒说明书操作回收 PCR 产物 DNA, 回收产物连接 PMD-18T 进行 TA 克隆, 按照 4 μL 目的基因、1 μL 载体, 5 μL Solution I 建立反应体系, 混匀后金属浴 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 2 h, 以大肠杆菌 DH5 α 感受态进行涂板转化、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养后选取单个菌落菌液培养, 提取质粒, 进行测序验证, 与目的序列进行比对, 得到 PMD-18T 目的基因的克隆载体。

2.7 目的基因的蛋白功能预测与分析

将测序结果使用 DNAMAN 软件转换成目的基因的氨基酸序列, 通过在线 protparam 软件 (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>) 对目的基因的蛋白质信息、磷酸化位点进行分析, 通过在线软件

(<https://www.novopro.cn/tools/secondary-structure-prediction.html>) 进行二级结构分析, 通过三维结构软件 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 建立蛋白模型, 通过在线软件 (<https://www.novopro.cn/tools/tmhmm.html>) 预测蛋白质跨膜区, 将蛋白序列与 uniprot 蛋白数据库 (<https://www.uniprot.org/blast>) 进行比对分析, 用 MAG7.0 软件构建目的基因的系统发育树。

2.8 过表达载体的构建

按照 Gateway 技术, 设计植物表达载体 PK-35S-*AvDXS* 构建方法, 构建表达载体。用 T/A 克隆获得 pMD18T-*AvDXS* 载体, 进行测序验证后, 提取质粒。对 pMD18T-*AvDXS* 和 pENTR2B 载体进行相对应的酶切位点进行双酶切, 胶回收。将 *AvDXS* 基因片段亚克隆到 pENTR2B 入门载体上, 连接 12-16 h, 以大肠杆菌 DH5 α 感受态进行转化涂板后、挑取单菌落菌液培养, 然后提取质粒测序验证, 得到入门克隆载体 pENTR2B-*AvDXS*。然后, 在 LR Mix Enzyme 的作用下, 将 pENTR2B-*AvDXS* 和植物过表达载体 pK7WGC2.0 进行 LR 反应 12 h, 将 *AvDXS* 基因重组后进入植物表达载体, 用大肠杆菌 DH5 α 转化涂板、挑单菌落培养后、取菌液 PCR 测序, 验证正确后提取质粒, 得到植物过表达载体 PK-35S-*AvDXS* 质粒。按照液氮冻融法的操作, 将 PK-35S-*AvDXS* 质粒转到农杆菌 GV3101 感受态中, 涂板挑单菌落菌液培养、菌液 PCR 测序验证正确, 获得 PK-35S-*AvDXS* 植物过表达载体菌株。

2.9 RNAi 抑制表达载体的构建

按照 Gateway 技术, 构建基因 RNAi (RNA 干扰) 植物表达载体 pK-35S-*AvDXS*-I-*AvDXS*。用 T/A 克隆获得 pMD18T-*AvDXS* 载体, 进行测序验证正确后提取质粒。对 pMD18T-目的载体和 pENTR2B 载体进行相对应的酶切位点进行双酶切, 胶回收。将目的基因片段亚克隆到 pENTR2B 入门载体上, 连接 12-16 h, 使用大肠杆菌 DH5 α 转化涂板、挑单菌落培养后、取菌液 PCR 测序验证正确后, 再提取质粒, 得到入门克隆载体 pENTR2B-*AvDXS*。然后, 在 LR Mix Enzyme 的作用下, 入门克隆载体和 RNAi 植物表达载体 pK7GWIWG 2.0 进行 LR 反应 12 h, 将目的基因同时正向和反向重组进入 RNAi 植物表达载体中, 使用大肠杆菌 DH5 α 转化涂板、挑单菌落培养、取菌液 PCR 测序验证正确后, 再提取质粒, 得到植物抑制表达载体 pK-35S-*vDXS*-I-*AvDXS*。

3 结果与分析

3.1 目的基因序列扩增的电泳检测

通过转录组测序数据，获得 *AvDXS* 序列，设计 PCR 引物，进行高保真 PCR 扩增和电泳检测（图 4A），PCR 扩增的 *AvDXS* 基因序列产物有一条较亮的条带。初步确认为 *AvDXS* 基因序列。

3.2 目的序列的获得

回收目的基因与 pMD-18T 克隆载体进行连接，用大肠杆菌 DH5 α 转化涂板、挑单菌落培养、取菌液 PCR 后测序验证正确、提取质粒，获得了 *AvDXS* 基因序列。使用 DNAMAN 分析软件将 RNA 序列翻译得到 *AvDXS* 氨基酸序列：MTAGQAYEAMNNAGFLDSNLIVVLND NKQVSLPTATLDGPATPVGALSSALSKLQASTKFRKL REAAKKVTKQIGGQTHEVAAKVDEYARGMMSAPGS TLFEELGLYYIGPVDGHNVEDLVKIFQNVKSLPAPGP VLVHIVTEKKGKGYPPAEAAADRMHGVVVFDPPTGK QFKSKAPTLSYTQYFAEALIREADVDDNNIVAIHAAMG GGTGLNYFQKKYPERCFDVGIAEQHAVTFAAGLATE GLKPFCAIYSSFLQRGYDQVVHVDVLQKLPVRFALD RAGLVGADGPTHCGAFDITYMACLPNMIVMAPSDEA ELIHMVATAAAIDDRPSCFRFRGNGIGAPLPSNLKGSP LEIGKGKILMEGTKVAILGYGSIVQNCVEAAKMLKTR DIAVTVADARFCKPLDTELIRRLAKEHEYLITVEEGSIG GFGSHVAHFLCLSGLLDGNLKLRSMLPDRYIDHGAP KDQIEEAGLSSWHISSTVLSLLGRSKEVLQFNGMEV*

3.3 氨基酸组成及理化性质

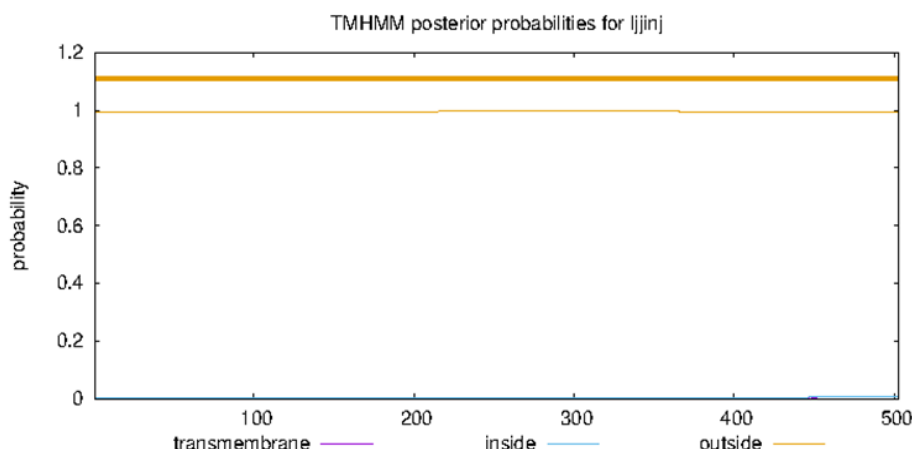
通过在线 ExPASyProtParam 软件对 *AvDXS* 基因编码的蛋白进行分析，结果表明，氨基酸数量为 503，分

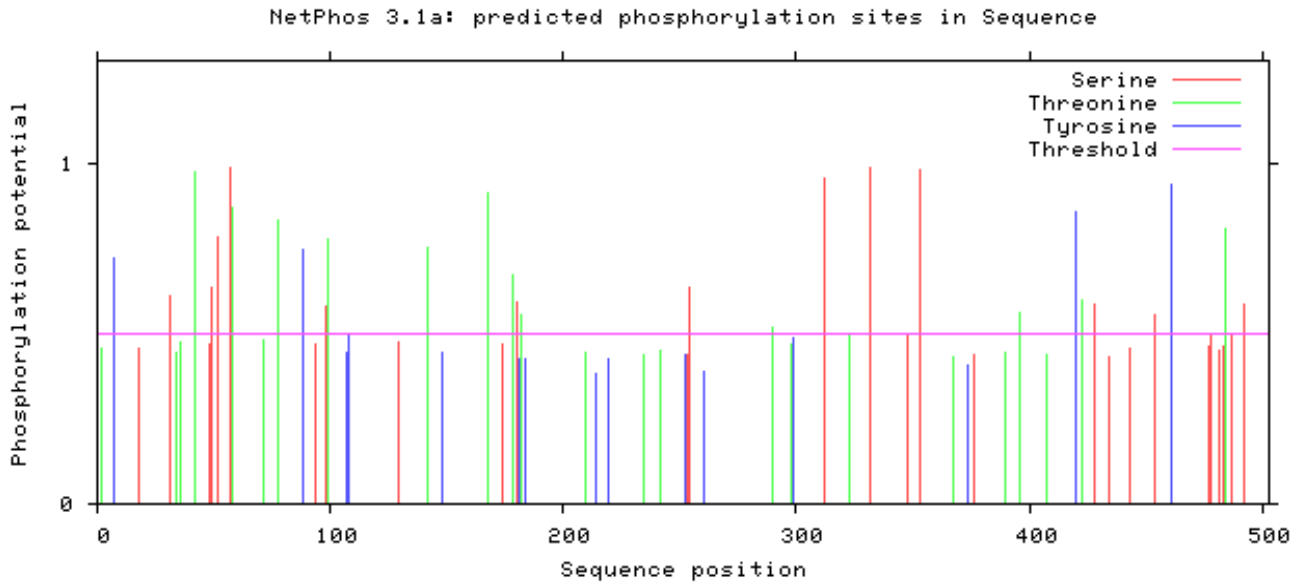
子量：54020.10，分子式：C₂₄₀₈H₃₈₂₂N₆₅₂O₇₁₃S₂₂，原子总数：7617。等电点 pI：6.29，氨基酸组成：丙氨酸 Ala (A) 11.1%，天冬酰胺 Asn (N) 3.2%，精氨酸 Arg (R) 3.8%，天冬氨酸 Asp (D) 5.4%，半胱氨酸 Cys (C) 1.6%，谷氨酰胺 Gln (Q) 3.2%，谷氨酸 Glu (E) 5.6%，甘氨酸 Gly (G) 9.3%，组氨酸 His (H) 2.8%，异亮氨酸 Ile (I) 5.2%，亮氨酸 Leu (L) 9.7%，赖氨酸 Lys (K) 6.2%，甲硫氨酸 Met (M) 2.8%，苯丙氨酸 Phe (F) 4.0%，脯氨酸 Pro (P) 5.4%，丝氨酸 Ser (S) 5.6%，色氨酸 Trp (W) 0.2%，苏氨酸 Thr (T) 4.8%，酪氨酸 Tyr (Y) 3.0%，缬氨酸 Val (V) 7.4%。

AvDXS 基因编码的蛋白带负电荷残基 55 个、正电荷残基 50 个。消光系数为 280 nm，估计半衰期为=30 h（体外），体内>20 h（酵母）和>10 h（大肠杆菌）。*AvDXS* 蛋白不稳定性指数=35.70，属稳定蛋白。脂肪指数为 90.62，亲水性总平均值为-0.030。磷酸化位点 67 个，丝氨酸（Serine）的磷酸化程度较高（图 1）。

3.4 蛋白的结构预测

通过在线（<https://www.novopro.cn/tools/secondary-structure-prediction.html>）进行二级结构预测，*AvDXS* 蛋白质的 α -螺旋结构占 46.89%，延伸结构占 14.67%，无规卷曲结构占 49.56%，无规卷曲结构占比最多，*AvDXS* 蛋白质的二级结构骨架是无规卷曲结构。通过三维结构软件（<https://swissmodel.expasy.org/interactive>）预测蛋白的三维结构，按照同源建模的要求，并建立了 *AvDXS* 的三维结构模型（图 2）。通过在线工具（<https://www.novopro.cn/tools/tmhmm.html>），预测蛋白质跨膜区（图 1），结果表明，所有氨基酸在胞外，*AvDXS* 蛋白可能为非跨膜蛋白。



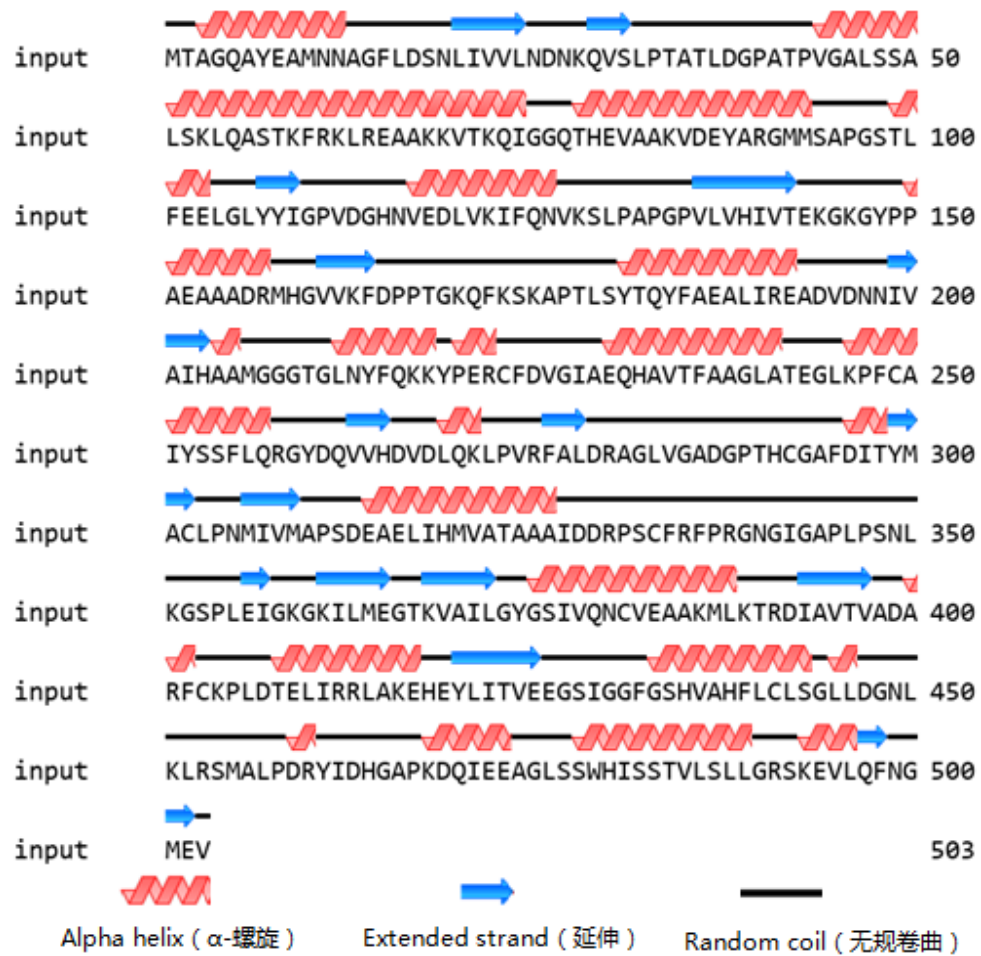


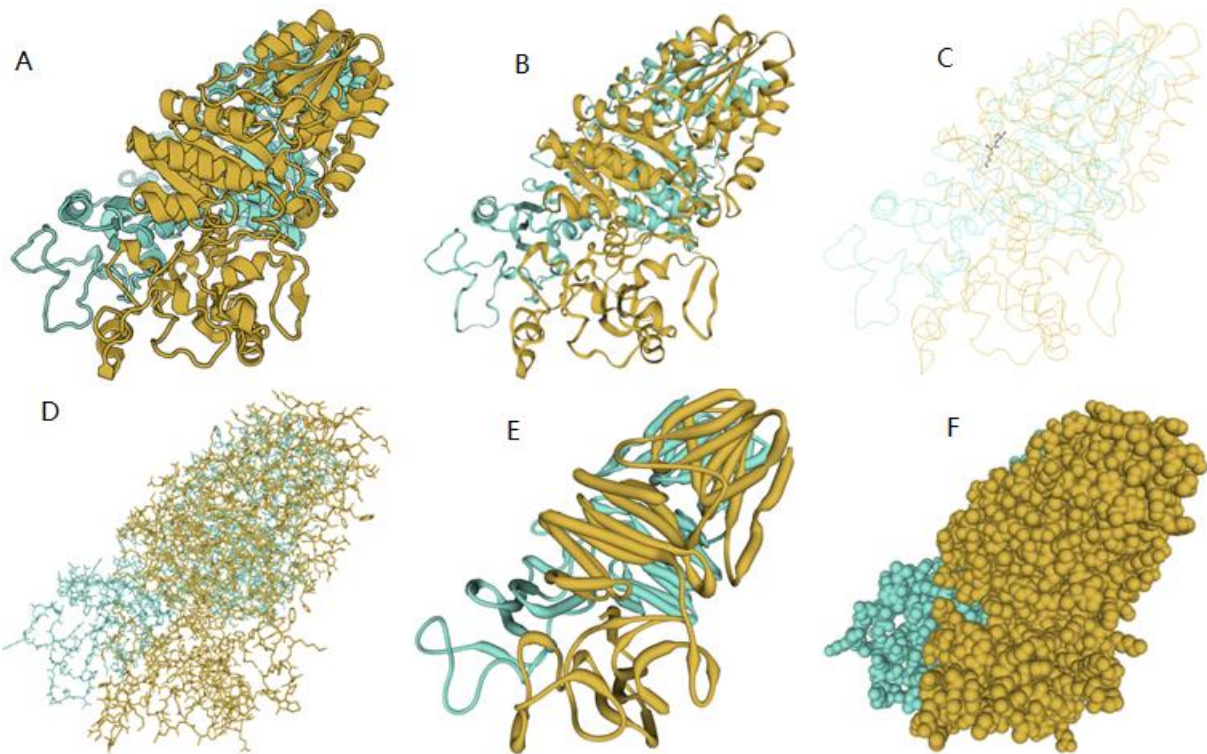
A: Serine: 丝氨酸; Threonine: 苏氨酸; Tyrosine: 酪氨酸; Threshold: 阈值。

B: 紫色为跨膜区域, 蓝色为胞内, 黄色为胞外。

图 1 AvDXS 蛋白的磷酸化分析和跨膜结构预测分析

Figure 1 Phosphorylation analysis transmembrane region prediction of AvDXS protein





注：A：等级图，B：概貌图，C：链状图，D：管状图，E：绳纹图，F：表面图。

图 2 *AvDXS* 蛋白二级结构和三维结构预测

Figure 2 Secondary Structure and three-dimensional diagram of *AvDXS* protein

3.5 同源性分析

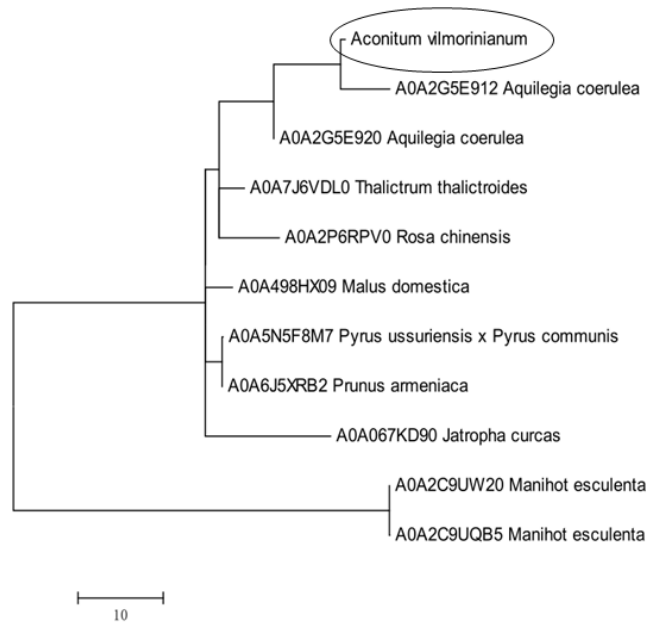


图 3 *AvDXS* 系统进化树分析

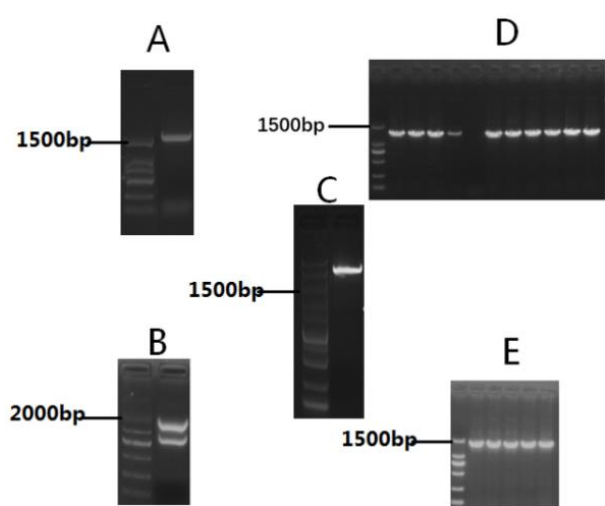
Figure 3 Phylogenetic tree analysis of *AvDXS*

通过 *AvDXS* 与 uniprot 蛋白数据库 (<https://www.uniprot.org/blast>) 进行比对，检测与之序列覆盖率相对较高的木薯 (*Manihot esculenta*)、麻风树 (*Jatropha curcas*)、耧斗菜 (*Aquilegia coerulea*)、芸香唐松草 (*Thalictrum thalictroides*)、苹果 (*Malus domestica*)、秋子梨 (*Pyrus ussuriensis* × *P. communis*)、中国月季 (*Rosa chinensis*)、野杏树 (*Prunus armeniaca*) 8 种植物，并获得与 *AvDXS* 蛋白和其它植物 *DXS* 蛋白质序列，构建了系统发育树 (图 3)。 *AvDXS* 蛋白与耧斗菜的 *DXS* 蛋白 (编号：A0A2G5E912) 聚为一类，表现出较近的亲缘关系。

3.6 过表达和抑制表达载体构建

按照 Gateway 技术过表达载体和抑制表达载体的构建策略，以黄草乌 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增得到 *AvDXS* 基因的全长编码区，并含酶切位点的 cDNA 目的片段，通过连接酶反应与 pMD-18T 克隆载体连接后，转化到 DH5α 感受态中。将测序检测正确的 pMD-18T-*AvDXS* 和 pENTR2B 载体质粒分别用限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 双酶切，分别回收 *AvDXS* 基

因目的片段和线性载体片段。将回收的 *AvDXS* 基因片段和线性质粒载体进行连接, 构建了 pENTR2B-*AvDXS* 表达载体。将 pENTR2B-*AvDXS* 表达载体的菌液进行 PCR 检测、测序、验证正确目的基因序列。通过 LR 反应, 将 *AvDXS* 目的基因分别重组到过表达载体 pK7GWIWG2.0 和抑制表达载体 pK7WGC2.0, 成功构建了过表达载体 PK-35S-*AvDXS* 和抑制表达载体 pK-35S-*AvDXS*-I-*AvDXS* (图 4)。提取质粒后, 按照液氮冻融法的操作, 把目的载体转化到农杆菌感受态 GV3101 中, 分别获得了转 PK-35S-*AvDXS* 和抑制表达载体 pK-35S-*AvDXS*-I-*AvDXS* 农杆菌菌株。



注: A: *AvDXS* 基因扩增; B: pMD-18T-*AvDXS* 质粒酶切; C: pENTR2B-*AvDXS* 酶切; D: PK-35S-*AvDXS* 菌液 PCR; E: pK-35S-*AvDXS*-I-*AvDXS* 菌液 PCR。

图 4 表达载体 PK-35S-*AvDXS* 和 pK-35S-*AvDXS*-I-*AvDXS* 的构建

Figure 4 Vector construction of PK-35S-*AvDXS* and pK-35S-*AvDXS*-I-*AvDXS*

4 讨论

萜类化合物种类丰富, 在植物体内有 5 万种之多, 包括单萜、倍半萜、二萜、三萜、四萜和多萜。萜类化合物是药用植物一类重要的次生代谢产物, 是许多中药和中药复方的药效物质基础。萜类物质合成的最早发现的是 MVA 途径, 主要用于倍半萜和甾醇合成 [10]。MEP 途径和植物类胡萝卜素、单萜和双萜合成关系密切, 在萜类骨架合成的 MEP 途径中, *DXS* 酶基因是第一个限速酶基因。*DXS* 基因最初从大肠杆菌中获得, 后来在银杏 (*Ginkgo biloba*)、薄荷 (*Mentha canadensis*)、三七 (*Panax notoginseng*) 等植物中先

后被分离鉴定 [11-13]。青蒿素、紫杉醇、丹参酮等化合物已广泛用于临床并具有良好的疗效。

DXS 基因编码区长 2100 bp 左右, 编码 700 个左右氨基酸链, 相对分子量 70 kD 左右。如马铃薯 (*Solanum tuberosum*) *DXS* 基因 cDNA 全长 2421 bp, 编码区长 2160 bp, 编码 719 个氨基酸, 分子量为 77.8 kD。玫瑰 (*Rosa rugosa*) *DXS* 基因全长 2 091 bp, 包含 1494 bp 的开放阅读框, 编码 498 个氨基酸。天竺葵 (*Pelargonium hortorum*) *DXS* 基因 cDNA 全长 2505 bp, 包含长 2157 bp 的开放阅读框, 编码 792 个氨基酸, 分子量为 77.5 kD [8]。然而, 黄草乌的 *DXS* 编码区为 1512 bp, 有 503 个氨基酸, 分子量 54.02 kD, 不论是编码区、蛋白序列和分子量较小, 这可能与物种差异有关。

AvDXS 蛋白不稳定性指数为 35.70, 与青蒿 (*Artemisia annua*)、铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*)、杜仲 (*Eucommia ulmoides*)、银杏、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)、长春花 (*Catharanthus roseus*) 一样均属稳定蛋白。疏水性是决定蛋白质三维空间构象的一个重要因素, 疏水基团在维持蛋白质构象中起主要作用。青蒿、砂仁 (*Amomum villosum*)、铁皮石斛、沉香 (*Aquilaria sinensis*)、杜仲、穿心莲 (*Andrographis paniculata*)、银杏、丹参、长春花的 *DXS* 为亲水蛋白, 而黄草乌 *DXS* 蛋白亲水性总平均值为 -0.030, 与玫瑰 (*Rosa rugosa*) 一样为疏水蛋白。二结构分析发现, 黄草乌 *DXS* 的二级结构和青蒿、砂仁、铁皮石斛相同, 都以 α -螺旋和无规则卷曲为主。黄草乌 *DXS* 蛋白跨膜结构域分析发现, 不具有跨膜结构域, 这与青蒿、砂仁、铁皮石斛等药用植物 *DXS* 的跨膜结构域相似 [14]。

通过 *DXS* 氨基酸序列构建分子进化树的分析, 说明药用植物 *DXS* 有较高的保守性 [15]。*AvDXS* 蛋白与糙斗菜的 *DXS* 蛋白聚为一类, 表现较近的亲缘关系。然而, 有研究发现, 青蒿、砂仁、沉香、杜仲、穿心莲、丹参、玫瑰的 *DXS* 亲缘关系较近, 铁皮石斛、银杏、长春花的 *DXS* 亲缘关系较近 [14]。

5 结论

通过黄草乌生物碱合成关键基因 *AvDXS* 基因克隆、生物信息分析及表达载体构建的研究, 获得了 *AvDXS* 基因的碱基全长序列和氨基酸序列, 分析了基因的酶活特性和相关的生物信息。通过 getway 技术构建了

AvDXS 基因的过表达载体和抑制表达载体。这对深入研究黄草乌 *AvDXS* 基因功能、遗传转化、二萜类生物合成的分子机制、培育新种质等奠定基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 27 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 113-326.
- [2] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志 (第 11 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 51-108.
- [3] 肖小河, 陈士林, 陈善墉. 中国乌头属分布样式的数值分析 [J]. 植物学通报, 1992, 9 (1): 46-49.
- [4] 李一果. 黄草乌生物碱生物合成代谢途径及其关键基因的研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022.
- [5] Battistini MR, Shoji C, Handa S, *et al.* Mechanistic binding insights for 1-deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate synthase, the enzyme catalyzing the first reaction of isoprenoid biosynthesis in the malaria-causing protists, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* [J]. Protein Expres. Purif, 2016, 120: 16-27.
- [6] Rodriguez-Concepcion M, Boronat A. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis [J]. Curr. Opin. Plant Biol., 2015, 25: 17-22.
- [7] Wright LP, Rohwer JM, Ghirardo A, *et al.* Deoxyxylulose 5-phosphate synthase controls flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis [J]. Plant Physiol., 2014, 165 (4): 1488-1504.
- [8] 张浩宇, 樊俊苗, 王婷, 等. 植物萜类合成关键基因 *DXS* 研究进展 [J]. 生物技术通报, 2018, 34 (3): 1-8.
- [9] Li YG, Mou FJ, Li KZ. De novo RNA sequencing and analysis reveal the putative genes involved in diterpenoid biosynthesis in *Aconitum vilmorinianum* roots [J]. 3 Biotech, 2021, 11 (2): 96.
- [10] 金蓉, 朱长青, 徐昌. 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)及其编码基因 [J]. 细胞生物学杂志, 2007 (5): 706-712.
- [11] Lüttgen H, Rohdich F, Herz S, *et al.* Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-d-erythritol [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97 (3): 1062-1067.
- [12] Kim SM, Kuzuyama T, Chang YJ, *et al.* Identification of class 21-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis [J]. Planta Med., 2006, 72 (3): 234-240.
- [13] Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, *et al.* A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95 (3): 2100-2104.
- [14] 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.
- [15] 毛积鹏, 黄林旺, 郝静, 等. 植物 *DXS* 基因的系统发育和分子进化分析 [J]. 生物学杂志, 2022, 39 (2): 23-28.

作者简介

李一果

1973 年生, 博士研究生. 研究方向为药用植物资源开发利用及遗传育种工作.

E-mail: liyiguo73@126.com

李昆志

1963 年生, 教授. 研究方向为植物分子生物学与中药材资源研究.

E-mail: likzkm@163.com