

# 决明 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶和 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶的功能鉴定与表达分析

邓 银<sup>1</sup>, 夏 杰<sup>1</sup>, 符 莹<sup>1</sup>, 刘 倩<sup>1</sup>, 李小芳<sup>1</sup>, 廖 海<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>重庆市潼南区人民医院, 重庆 402660; <sup>2</sup>西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031

**摘要:**本研究根据决明三代转录组测序获得的 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (*CoDXS*) 和 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (*CoDXR*) 基因的全长序列设计特异性引物, PCR 扩增获得 *CoDXS*、*CoDXR* 基因的 OFR, 构建原核表达载体 pTrc-*CoDXS*、pTrc-*CoDXR* 在含有质粒 PAC-BETA 的 TOP10 重组菌中进行表达, 通过 TOP10 的菌斑颜色变化来验证 *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因的功能。利用实时荧光定量 PCR 来检测 *CoDXS*、*CoDXR* 基因在决明不同组织中以及六种胁迫条件下的表达情况。研究结果表明 *CoDXS*、*CoDXR* 基因的 OFR 分别为 2 127、1 416 bp, 编码的氨基酸数目分别为 708、471, 功能鉴定结果显示含有 *CoDXS*、*CoDXR* 基因编码区的 TOP10 菌斑呈现出深橘黄色; *CoDXS* 基因的表达趋势为: 花 > 茎 > 种子 > 叶 > 根, *CoDXR* 基因的表达趋势为: 叶 > 花 > 茎 > 根 > 种子。对 *CoDXR* 和 *CoDXS* 基因在不同的胁迫条件下的相对表达量检测分析发现, 在盐胁迫条件下: *CoDXS* 基因的表达量整体呈现出下降趋势, *CoDXR* 基因的表达量波动范围较小; 在 ABA 胁迫条件下: *CoDXS* 基因的表达量呈现出先下降上升趋势, *CoDXR* 基因的表达量呈现出上升趋势; 在 MeJA 胁迫条件下: *CoDXR* 和 *CoDXS* 基因的表达量均呈现出先下降后上升的趋势; 在 PEG6000 胁迫条件下: 对 *CoDXS* 基因表达量的影响较小, *CoDXR* 基因的表达量呈现出上升趋势; 在高温胁迫条件: *CoDXS* 基因呈现出下降趋势, 对 *CoDXR* 基因的表达影响较小; 低温胁迫条件下: *CoDXR* 和 *CoDXS* 基因的表达均呈现出下降趋势。

**关键词:** 决明; 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶; 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶; 功能鉴定; 表达分析

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)9-1599-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.9.019

## Functional identification and expression analysis of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in *Cassia obtusifolia*

DENG Yin<sup>1</sup>, XIA Jie<sup>1</sup>, FU Ying<sup>1</sup>, LIU Qian<sup>1</sup>, LI Xiao-fang<sup>1</sup>, LIAO Hai<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>People's Hospital of Tongnan Distric, Chongqing 402660, China;

<sup>2</sup>School of Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

**Abstract:** The specific primers were designed based on the full-length sequence of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (*CoDXS*) and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (*CoDXR*) genes from *Cassia obtusifolia*. The OFR sequences of *CoDXS* and *CoDXR* were cloned by PCR. Prokaryotic expression vectors of pTrc-*CoDXS* and pTrc-*CoDXR* were constructed and expressed in TOP10 containing plasmid PAC-BETA. The function of *CoDXS* and *CoDXR* genes were verified by the color change of TOP10. The expression levels of *CoDXS* and *CoDXR* genes in different tissues and six stress conditions were analyzed by fluorescent quantitative PCR. The results showed that the *CoDXS* gene contains a 2127 bp OFR and encodes a predicted protein of 708 amino acid. The *CoDXR* gene contains a 1416 bp OFR and encodes a predicted protein of 471 amino acid. The results of functional identification showed that TOP10 containing *CoDXS* and *CoDXR* genes appeared dark orange. Relative real-time PCR analysis indicated that *CoDXS* showed the highest transcript abundance in the flowers, moderate level

收稿日期: 2020-01-08 接受日期: 2020-06-24

基金项目: 四川省科技厅项目 (2017JY0222)

\* 通信作者 Tel: 86-28-87600967; E-mail: dtliaohai@home.swjtu.edu.cn

in the stems, lower level in the seeds, and the lowest level in the roots. The *CoDXR* showed the highest transcript abundance in the leaves, moderate level in the flowers, lower level in the stems, and the lowest level in the seeds. Under salt stress; the expression level of *CoDXS* gene showed a downward trend, and the expression level of *CoDXR* gene fluctuated within a small range. Under ABA stress conditions; the expression level of *CoDXS* gene showed a downward and upward trend, and the expression level of *CoDXR* gene showed an upward trend. Under MeJA stress conditions; the expression levels of *CoDXR* and *CoDXS* genes showed a downward and upward trend. Under PEG6000 stress conditions; it had little effect on the expression level of *CoDXS* gene, and the expression level of *CoDXR* gene showed an upward trend. Under the heat stress conditions; the expression level of *CoDXS* gene showed a downward trend, and had little effect on the expression level *CoDXR* gene. Under cold stress conditions; the expression levels of *CoDXS* and *CoDXR* genes showed a downward trend.

**Key words:** *Cassia obtusifolia*; 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate synthase; 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductase; functional characterization; expression analysis

决明又称马蹄决明或假绿豆,系指豆科决明属植物决明(*Cassia obtusifolia* L.)和小决明(*Cassia tora* L.),具有降低血压血脂、清肝明目、润肠通便以及抗菌等药用价值<sup>[1,2]</sup>,2015版《中国药典》规定,决明的指标性成分主要包括橙黄决明素和大黄酚等蒽醌类化合物,蒽醌类化合物的生物合主要可成分为三个阶段,第一阶段是利用 PEP 和 E4P 合成 1,4-二羟基-2-萘酰辅酶 A,其主要参与蒽醌类化合物中 A 环和 B 环的形成。第二阶段是中间体 IPP 以及它的双键异构体 DMAPP 的合成<sup>[3,4]</sup>。这一阶段包含了两条途径,MVA 路径是以乙酰辅酶 A 为原料,经过 6 步反应,最终生成 IPP 和 DMAPP,MEP 途径是把磷酸甘油醛以及丙酮酸作为底物<sup>[3]</sup>,在 DXS 的作用下生成 DXP,随后在 DXR 的作用下,生成 2-甲基赤藓糖-4-磷酸,再经过环化、磷酸化等反应生成 IPP,其主要用于蒽醌 C 环的形成。第三阶段是利用 1,4-二羟基-2-萘酰辅酶 A 和 IPP、DMAPP 共同形成蒽醌骨架,经过羟基化、糖基化等反应后生成不同类型的蒽醌类化合物<sup>[5]</sup>。

DXS 作为 MEP 途径中的第一个限速酶,目前 DXS 基因有较深入的研究,有研究表明人们从大肠杆菌中获得了第一个 DXS 基因<sup>[6]</sup>,在此之后也从胡椒以及拟南芥等植物中成功获得 DXS 基因以及其同源基因<sup>[7,8]</sup>。有研究表明,DXS 基因的存在多数是通过基因家族的方式,例如在水稻以及苜蓿之中都含有 DXS 的编码基因<sup>[9,10]</sup>。在 MEP 途径中 DXS 基因对其的代谢流动具有重要的意义,将拟南芥的 DXS 在薰衣草中进行过量表达,结果表明,其能够明显提高薰衣草中的单萜烯精油的含量<sup>[8]</sup>。此外,在大肠杆菌中将类胡萝卜素生物合成有关的酶基因及 DXS 基因一起进行过量表达,发现能够大幅度增加类胡萝卜素的含量并且也可以提升 DXS 基因

的表达水平<sup>[11]</sup>。

DXR 作为 MEP 途径中的第二个关键酶,在细菌以及植物中均有发现了,现已从许多植物(例如:水稻、拟南芥、玉米)当中成功克隆出 DXR 基因,在大多数植物中 DXR 基因的存在方式是单基因家族<sup>[12]</sup>。细菌中的 DXR 基因和植物中的有所差异,植物中的 DXR 的 N-端含有指导 DXR 定位在细胞质体中的一段保守的转运肽<sup>[13]</sup>。有研究表明,有许多因素都能够影响 DXR 的表达,例如 MeJA,光照等<sup>[14,15]</sup>。将 DXR 基因在胡椒以及薄荷植物中进行过量表达,能够使它们叶片中含有的精油的含量上升 50%,并且通过对比正常的植株,转 DXR 基因的胡椒和薄荷的植株整体表型以及其叶片中单萜的含量没有差别,这也可以表明 IPP 不仅仅来源于 MEP 途径<sup>[16]</sup>。将 DXR 基因在拟南芥中进行过量表达,能够提高其中的类胡萝卜素以及叶绿素的含量<sup>[17]</sup>。因此,DXR 作为 MEP 合成途径中的一个靶基因。蒽醌类化合物作为决明中重要药用活性成分,针对其主要活性成分的药理药效研究已经很成熟了,而对于蒽醌类成分的合成机理未曾进行深入的研究,为了获得决明中蒽醌化合物合成途径中基因的功能信息,本研究选择蒽醌化合物 MEP 合成途径上游的两个关键基因 *CoDXR* 和 *CoDXS* 进行初步的功能验证以及表达模式分析。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料

决明种子经西南交通大学周嘉裕副教授鉴定,种植于西南交通大学,收集决明植株的根、茎、叶、花、种子。将长势一致的决明幼苗移栽在花盆中,预培养 7 天后,将 MeJA (250  $\mu$ M)、ABA (100  $\mu$ M)、PEG6000 (100 mg/mL)、NaCl (200 mM) 溶液等体积均匀的喷洒到决明植株的叶片上,低温于 4  $^{\circ}$ C 培养,

高温于 37 °C 培养, 每组处理设置三个生物学重复, 并分别于 0、1、6、12、24、48 h 时取叶片。以上所有决明组织均储存于 -80 °C 低温冰箱。

## 1.2 主要试剂

Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek, USA); PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(perfect Real Time) (TaKara, Japan); TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RnaseH Plus) (TaKara, Japan); DNA Marker (TaKara, Japan); LA Taq DNA 聚合酶 (TaKara, Japan); 限制性内切酶 Pst I、EcoR I、Bgl II、BamH I、Not I (TaKara, Japan); MeJA (Sigma, USA); ABA (Sigma, USA); PEG 6000 (Sigma, USA); NaCl (Sigma, USA); 质粒 pTrec-AtIPI、PAC-BETA (ADD GENE, USA); 氨苄青霉素 (Amp); 氯霉素 (Chl); 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 TOP10 菌株为本实验是保存。

## 2 方法

### 2.1 RNA 提取、检测及反转录

利用 Plant RNA Kit 试剂盒提取决明各组织的 RNA, 进行电泳及纯度检测, 并利用 PrimeScript™

RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行反转录获得 cDNA 并保存于 -20 °C 备用。

### 2.1 CoDXS、CoDXR 基因的功能鉴定

#### 2.2.1 引入酶切位点的重组载体 pMD19-T-CoDXS、pMD19-T-CoDXR 的构建

设计带酶切位点的引物如表 1 所示, 以 cDNA 为模板, 对 CoDXS、CoDXR 基因的编码区进行克隆, 引入酶切位点。PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): 10 x LA PCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup> plus) 5.0  $\mu$ L, dNTP Mixture (2.5 Mm) 8.0  $\mu$ L, 上游引物 (10  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ L, 下游引物 (10  $\mu$ M) 1.0  $\mu$ L, cDNA 1.0  $\mu$ L, LA Taq 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 33.5  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 94 °C、4 min; 94 °C、30 s, Tm 30 s, 72 °C、1.5 min, 30 个循环; 72 °C、7 min; 4 °C、 $\infty$ 。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物经 DNA 纯化回收试剂盒纯化后, 与载体 pMD19-T 相连, 随后通过热激法转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 筛选获得阳性菌并送擎科生物技术有限公司进行测序。

表 1 用于构建表达载体的引物

Table 1 Primers for constructing expression vectors

引物 Primer	序列 Sequence(5'→3')
CoDXR-F(EcoR I)	CGGAATTCATGGCTCTGAATTTG
CoDXR-R(Bgl II)	GAAGATCTTCATGCAGGAATAGGA
CoDXS-F(Not I)	ATAACGGGGCCGCATGGCTCTTTGCCACATTCTC
CoDXS-R(BamH I)	CGCGGATCCTTATGACAAAACCTCTAATGCCTC

#### 2.2.2 pTrec-CoDXS、pTrec-CoDXR 重组表达载体的构建

分析质粒 pTrec-AtIPI 的多克隆位点发现只能利用质粒 pTrec 来构建原核表达载体 pTrec-CoDXS, 用 Pst I 酶切除 AtIPI 基因, 通过自连获得质粒 pTrec。然后将质粒 pMD19-T-CoDXS 和 pTrec 用 Not I 和 BamH I 进行双酶切, 质粒 pMD19-T-CoDXR 和 pTrec-AtIPI 用 EcoR I 和 Bgl II 进行双酶切, 将酶切产物纯化回收后进行连接随后转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 筛选阳性菌株并送至公司进行测序, 提取质粒 pTrec-CoDXS、pTrec-CoDXR 保存备用。

#### 2.2.3 构建表达菌株

将质粒 PAC-BETA 通过热激法转化到大肠杆菌 TOP10 中, 在含有 Chl(50 mg/L) 的固体培养基中进行筛选获得阳性 TOP10 重组菌, 分别将表达载体 pTrec-CoDXR、pTrec-CoDXS 转化到 TOP10 重组菌中,

在含 Amp(150 mg/L) 和 Chl(50 mg/L) 的双抗性平板上筛选出阳性克隆菌。

#### 2.2.4 构建对照菌株

将载体 pTrec-CoDXR、pTrec-CoDXS 分别导入 TOP10 中于含 Amp(150 mg/L) 的平板上培养; 将 pTrec 转化到携带有质粒 PAC-BETA 的 TOP10 重组菌中于含有 Amp(150 mg/L) 和 Chl(50 mg/L) 的双抗性平板上培养; 将携带有质粒 PAC-BETA 的 TOP10 重组菌于含有 Chl(50 mg/L) 的平板上培养; 将 TOP10 置于无抗性的平板上培养。

#### 2.2.5 比较携带有不同质粒的 TOP10 的生长情况

分别挑取 TOP10、PAC-BETA + TOP10、pTrec-CoDXS/pTrec-CoDXR + TOP10、pTrec + PAC-BETA + TOP10、pTrec-CoDXS/pTrec-CoDXR + PAC-BETA + TOP10 的单克隆在同一个双抗性平板上, 于 37 °C 培养 48 h, 观察菌斑颜色变化。

### 2.3 *Co*DXS、*Co*DXR 基因的 qRT-PCR 表达分析

利用 qRT-PCR 检测 *Co*DXS、*Co*DXR 基因在决明不同组织以及六种非生物胁迫条件下的相对表达量,以 2.1 所述获得的 cDNA 为模板,将 EF1 $\alpha$ 2 基因作为内参基因,使用 *Co*DXS、*Co*DXR 基因的特异性引物,如表 2 所示,利用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RnaseH Plus) 试剂盒在 LightCycler® 96 系

表 2 qRT-PCR 所用的引物

Table 2 Primers for qRT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence(5'→3')
EF1 $\alpha$ 2-F	TTGAAGAACGGTGATGCAGGTA
EF1 $\alpha$ 2-R	CACACTCTTGATGACTCCCACA
<i>Co</i> DXR-qF	CATAAACCTGAGATCATCCCTGG
<i>Co</i> DXR-qR	GTCTTTCCTGCTTCTATAGCA
<i>Co</i> DXS-qF	GATAAGATGAACACCATCAGGC
<i>Co</i> DXS-qR	CGCCAATAACAGCAACTACATG

## 3 结果与分析

### 3.1 原核表达载体 pTrc-*Co*DXS、pTrc-*Co*DXR 的构建

分别利用表 1 的引物进行 PCR 扩增,凝胶电泳检测如图 1 所示,测序结果显示 *Co*DXR、*Co*DXS 的 ORF 分别为 1 416、2 127 bp。将质粒 pTrc-AtIPI 利用 Pst I 进行单酶切,利用 EcoR I 和 Bgl II 进行双酶切,酶切检测结果如图 2A 所示,单酶切后得到一条 850 bp 左右的 AtIPI 条带,以及 3 500 bp 左右的 pTrc 骨架,其双酶切结果与预期一致。将质粒 PMD19-T-*Co*DXR 利用 EcoR I 和 Bgl II 进行双酶切,酶切检测结果如图 2B 所示,*Co*DXR 目的片段大小为 1 400 bp 左右。将获得的质粒 pTrc 和 PMD19-T-*Co*DXS 分别用 BamH I 和 Not I 进行双酶切,其酶切后检测如图 3 所示,*Co*DXS 目的片段大小为 2 100 bp 左右,经后续的回收转化,筛选出阳性克隆菌送公司测序以获得原核表达载体 pTrc-*Co*DXR 和 pTrc-*Co*DXS。

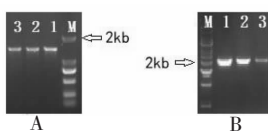


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

注: M; DNA marker; 泳道 1-3 (A); *Co*DXR; 泳道 1-3 (B); *Co*DXS.

Note: M; DNA marker; Lane 1-3 (A); *Co*DXR; Lane 1-3 (B); *Co*DXS.

统进行 qRT-PCR 检测,反应体系 (20  $\mu$ L): TB Green Premix EX Taq II (Tli RnaseH Plus) (2 X) 10  $\mu$ L、PCR Forward Primer (10  $\mu$ M)、0.8  $\mu$ L、PCR Reverse Primer (10  $\mu$ M) 0.8  $\mu$ L、cDNA 模板 (< 100 ng) 2.0  $\mu$ L、灭菌 ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L。qRT-PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C、1 min; 94  $^{\circ}$ C、10 s, 62  $^{\circ}$ C、10 s, 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C、20 s。实验数据利用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法进行统计分析。

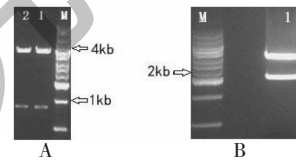


图 2 pTrc-AtIPI (A) 和 pM19-T-*Co*DXR (B) 酶切图

Fig. 2 Restriction map of pTrc-AtIPI (A) and pM19-T-*Co*DXR (B)

注: M; DNA marker; 泳道 2 (A); 利用 Pst I 酶切; 泳道 2 (A) 和 1 (B); 利用 EcoR I 和 Bgl II 酶切。Note: M; DNA marker; Lane 1 (A); Digestion with Pst I; Lane 2 (A) and 1 (B); Digestion with EcoR I and Bgl II.

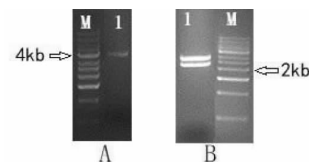


图 3 pTrc (A) 和 pM19-T-*Co*DXS (B) 酶切图

Fig. 3 Restriction map of pTrc (A) and pM19-T-*Co*DXS (B)

注: M; DNA marker; 泳道 1 (AB); 利用 BamH I 和 Not I 酶切。Note: M; DNA marker; Lane 1 (AB); Digested with BamH I and Not I.

### 3.2 pTrc-*Co*DXR 和 pTrc-*Co*DXS 在 TOP10 中的表达鉴定

TOP10、PAC-BETA + TOP10、pTrc-*Co*DXR/pTrc-*Co*DXS + TOP10 不能在双抗性平板上生长, pTrc + PAC-BETA + TOP10 没有携带 *Co*DXR/*Co*DXS 基因, 能够生长但  $\beta$ -胡萝卜素的积累较少, 菌斑颜色较

浅。pTrc-*CoDXR*/pTrc-*CoDXS* + PAC-BETA + TOP10 携带有 *CoDXR*/*CoDXS* 基因,能够生长且  $\beta$ -胡萝卜

素的积累较多,呈现出深橘黄色菌斑,如图 4 所示。

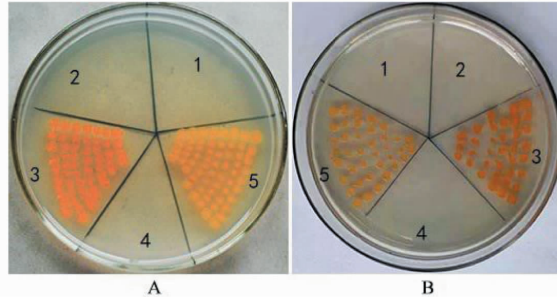


图 4 *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因功能鉴定图

Fig. 4 Function identification map of *CoDXS* and *CoDXR* gene

注:1(AB):TOP10;2(AB):PAC-BETA + TOP10;3(A):pTrc-*CoDXS* + PAC-BETA + TOP10;3(B):pTrc-*CoDXR* + PAC-BETA + TOP10;4(AB):pTrc + PAC-BETA + TOP10;5(AB):pTrc + PAC-BETA + TOP10。

### 3.3 *CoDXS*、*CoDXR* 基因在决明不同组织中的表达情况

利用实时荧光定量 PCR 检测 *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因在决明不同组织中的相对表达量,如图 5 所示,

*CoDXS* 基因的表达趋势为:花 > 茎 > 种子 > 叶 > 根,*CoDXR* 基因的表达趋势为:叶 > 花 > 茎 > 根 > 种子。

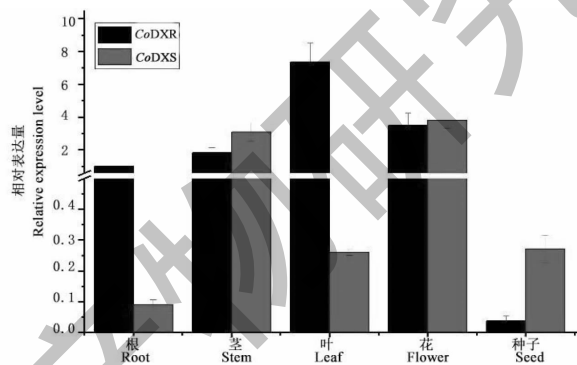


图 5 *CoDXS* 和 *CoDXR* 的表达模式分析

Fig. 5 Expression pattern analysis of *CoDXS* and *CoDXR*

### 3.4 *CoDXR*、*CoDXS* 基因在不同胁迫条件下的表达情况

对 *CoDXS*/*CoDXR* 基因在六种胁迫条件下的相对表达量进行分析,结果如图 6 所示。在盐胁迫条件下:*CoDXS* 基因的表达量呈现出下降趋势且于 12 h 时其表达量最低(0.09),*CoDXR* 基因的表达量于 1、6、12 h 时呈现出下降趋势且于 24 h 时表达量最高(1.4),其波动范围较小,这表明盐胁迫能降低 *CoDXS* 基因的表达量但对 *CoDXR* 基因的表达影响较小;在 ABA 胁迫条件下:*CoDXS* 基因的表达量在 1、6、12 h 时均有所降低,于 12、24、48 h 时呈现出上升趋势且于 48 h 时达到峰值(3.04),*CoDXR* 的表达量呈现出上升趋势且于 48 h 时最高(3.19),这表

明 ABA 胁迫能使 *CoDXS* 基因的表达出现较大的波动且使 *CoDXR* 基因的表达增加;在 MeJA 胁迫条件下:*CoDXS* 基因的表达量于 1、12、48 h 时有所下降且于 24 h 时最高(1.32),*CoDXR* 基因的表达趋势类似于 *CoDXS* 基因,于 24 h 时其表达量达到顶峰(2.06),由此可知在 MeJA 胁迫条件下 *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因的表达水平波动较大;在 PEG6000 胁迫条件下:*CoDXS* 于 6、12、24 h 时表达量有所降低,于 1 和 48 h 时趋近于初始水平,*CoDXR* 基因整体呈现出上升趋势且于 6 h 时达到了峰值(2.83),这说明在干旱条件下,*CoDXS* 基因的表达量波动不明显且 *CoDXR* 基因的表达量有所提高;在高温环境胁迫条件下:*CoDXS* 基因的表达整体呈现出下降趋势且

于 12 h 时最低(0.079), *CoDXR* 基因的表达量于 1 h 时有所上升,在 6、12、24 h 时有所减低但降低的量较少,在 48 h 时逐渐恢复到初始水平,这表明在高温环境中 *CoDXS* 基因的表达量有所降低,而 *CoDXR* 基因的表达相对较稳定。在低温环境胁迫条件下:*CoDXS* 基因的表达呈现出下降趋势且于 6 h 时表达量最低(0.05), *CoDXR* 基因的表达呈现出

下降趋势且于 12 h 时降至低谷(0.51),这表明在低温环境中, *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因的表达都呈现出降低趋势。综上分析, *CoDXR* 基因的相对表达量在 PEG6000、ABA 胁迫条件下均呈现出上升趋势,在低温胁迫条件下呈现出下降趋势; *CoDXS* 基因在 NaCl、低温、高温胁迫条件下均呈现出下降趋势。

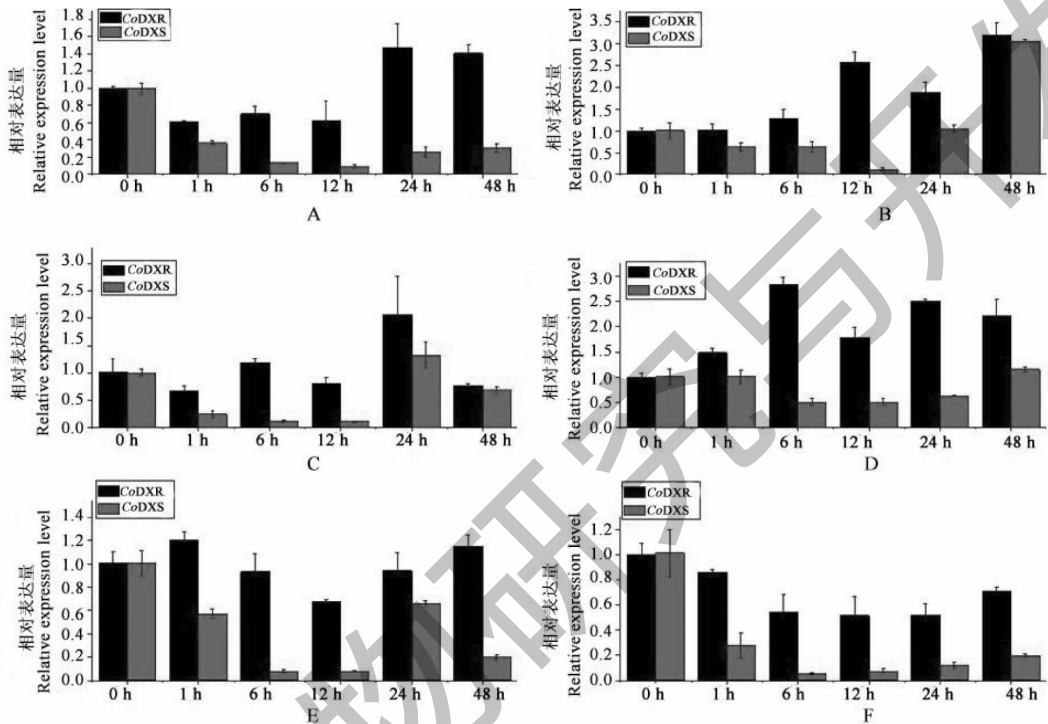


图 6 *CoDXR* 和 *CoDXS* 在不同胁迫条件下的表达模式分析

Fig. 6 Analysis of *CoDXR* and *CoDXS* expression patterns under different stress conditions

注: A: NaCl; B: ABA; C: MeJA; D: PEG6000; E: 高温; F: 低温。Note: A: NaCl; B: ABA; C: MeJA; D: PEG6000; E: Heat; F: Cold.

#### 4 讨论

本研究首次对决明蒽醌类化合物 MEP 途径中上游的两个关键基因 *CoDXS* 和 *CoDXR* 进行初步的功能鉴定,构建原核表达载体时应用了 PAC-BETA 和 pTrc-AtIPI 两种质粒。研究表明在大肠杆菌中存在 MEP 途径,能够生成用于合成  $\beta$ -胡萝卜素的 DMAPP、IPP,但从这之后, $\beta$ -胡萝卜素的合成路径有所缺失<sup>[18]</sup>。因此,大肠杆菌自身不能合成  $\beta$ -胡萝卜素,只有在大肠杆菌中引入与合成  $\beta$ -胡萝卜素相关的基因后,才能打通该通路。PAC-BETA 质粒携带了合成  $\beta$ -胡萝卜素的相关基因,它能使大肠杆菌在本底水平上表达  $\beta$ -胡萝卜素,但表达量较低,而当外源基因 AtIPI 转入时,克服了限速因素, $\beta$ -胡萝卜素大量积累从而使大肠杆菌菌斑呈现出深橘黄

色<sup>[19,20]</sup>。基于这个原理,将 AtIPI 基因替换成 *CoDXS* 或 *CoDXR* 基因的编码区,从而可以验证它们的功能,研究结果表明决明的 *CoDXR* 和 *CoDXS* 基因编码的蛋白具有典型的 DXR 和 DXS 功能,这为后续深入研究决明中蒽醌化合物生物合成有关基因提供了理论依据。

利用 qRT-PCR 来检测 *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因在决明各组织表达情况, *CoDXS* 基因在花和茎中优势表达, *CoDXR* 基因在叶以及花中优势表达,推测这可能是因为在决明不同的生长阶段 *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因所参与的代谢过程有所差异,也可能与 *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因在 MEP 生物合成途径中所参与的过程以及所发挥的功能作用有关。

在调控植物代谢过程中,由于不同的胁迫条件

可引起诱导、促进或抑制作用, 从而影响植物体内次生代谢产物的形成与积累, 在六种非生物胁迫条件下, *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因表达有所差异, 呈现出不同的表达模式, 这可能与植物体内信号接收传导和应答机制有一定关系。本研究结果对于进一步研究 *CoDXS* 和 *CoDXR* 基因在逆境胁迫的调控机制以及萜醌化合物 MEP 合成途径中相关基因的研究奠定了基础。

#### 参考文献

- 1 Li YM. Research status and comprehensive utilization of *Cassia obtusifolia* [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2007, 19(11):62-64.
- 2 Shen YL, Xu D, Jing YM, et al. Determination of four components in seed of *Cassia obtusifolia* [J]. China Pharm (中国药业), 2020, 21(11):63-65.
- 3 Lu JC, Chen RS, Liu CH, et al. On the biosynthetic pathway of plant terpenes [J]. Bull Agr Sci Tech (农业科技通讯), 2009(3):78-80.
- 4 Zhan AY, You XL, Zhan YG. Biosynthesis and application of plant terpenoids [J]. Lett Biotech (生物技术通讯), 2010, 21(1):131-135.
- 5 Die F, Shi Q, Luo ZN, et al. Effects of GA3 and NAA on fatty acid degradation in germination and seedling growth of *Cassia obtusifolia* L. seed [J]. Med Plant, 2020, 2:1700-1704.
- 6 Sprenger GA, SchRken U, Wiegert T, et al. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol [J]. P Natl Acad Sci USA, 2017, 94:12857-12862.
- 7 Lange BM, Wildung MR, Mccaskill D, et al. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway [J]. P Natl Acad Sci USA, 2018, 95:2100-2104.
- 8 Jesús MOB, Isabel A, Roc 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, 142:890-900.
- 9 Estevez JM, Romero CKH, Jimenez LF, et al. Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-*C*-methyl-*D*-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2000, 124(1):95-103.
- 10 Kim B, Kim S, Yj. Differential expression of three 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate synthase genes in rice [J]. Biotechnol Lett, 2005, 27:997-1001.
- 11 Higgins J, Mayo J, Skarsgard P. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate synthases; differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots [J]. Plant J Cell Mol Biol, 2010, 31(3):243-254.
- 12 Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, et al. A 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-*C*-methyl-*D*-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis [J]. P Natl Acad Sci USA, 2015, 95:9879-9884.
- 13 Suzuki M, Muranaka T. Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis [J]. Lipids, 2007, 42(1):47.
- 14 Lorenzo CP, Iván A, Nuria C, et al. 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 [J]. Plant Physiology, 2002, 129(4):1581-1591.
- 15 Joachim H, Bettina H, Dieter S, et al. Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize [J]. Plant Physiol, 2004, 134:614-624.
- 16 Lange BM, Croteau R. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint [J]. Arch Biochem Biophys, 1999, 365(1):170-174.
- 17 Carretero-Paulet L, Cairó A, Botella-Pavía P, et al. Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase [J]. Plant Mol Biol, 2006, 62:683-695.
- 18 Chen XP, Xie LP, Zhang Q, et al. Use of MEP pathway overexpression to increase  $\beta$ -carotene production [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2014, 45:929-933.
- 19 Du GC, Liu M, Zhao Y, et al. Effects of different culture conditions on  $\beta$ -carotene production by *E. coli* engineering bacteria [J]. Food Sci (食品科学), 2008, 29(7):272-276.
- 20 Liu M, Liu JZ, Feng HR, et al. Expression of isoprene pyrophosphate isomerase and verification of its catalytic function [J]. J Wuhan Univ Sci Technol (武汉科技大学学报), 2013, 36:214-218.