

红豆杉细胞非甲羟戊酸途径关键酶基因 *dxr* 的克隆与分析

郑清平 余龙江* 刘 智 李默怡 向 福 杨 秦

(华中科技大学生命科学与技术学院生物工程系, 武汉 430074)

摘 要 近几年的研究表明,非甲羟戊酸途径可能是紫杉醇合成的主要途径,通过对各种不同来源的非甲羟戊酸途径关键酶 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(DXR)基因同源区域进行比较,设计出简并引物,利用 RT-PCR 技术从中国红豆杉(*Taxus chinensis*)悬浮细胞中扩增出 535bp 的基因片段。同源序列比对发现,推断的蛋白质序列与 *Arabidopsis thaliana* (Q9XFS9)、*Mentha x piperita* (Q9XES0)、*Synechococcus elongatus* (Q8DK30)、*Synechocystis* sp. PCC 6803 (Q55663)、*Nostoc* sp. PCC 7120 (Q8YP49)、*Synechococcus leopoliensis* (Q9RKT1)的一致性分别达到 95%、94%、80%、78%、78%和 73%。结合蛋白质保守区、特征区以及进化树分析,证实该基因确为 *dxr* 基因,首次报道从裸子植物中克隆到非甲羟戊酸途径关键酶的基因片段。

关键词 中国红豆杉悬浮细胞,非甲羟戊酸途径,5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶,RT-PCR

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0548-06

萜类是一大类植物次生代谢产物,结构复杂、种类繁多。许多具有特殊生物活性萜类如赤霉素、脱落酸、胡萝卜素、类胡萝卜素、棉酚、青蒿素、紫杉醇等都被开发成为非常有价值的商品。

萜类是以异戊二烯为基本单元构建的,异戊烯焦磷酸(IPP)是合成萜类的重要前体。长期以来,IPP 一直被认为是经甲羟戊酸途径合成的,该反应的限速步骤是 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)在还原酶(HMGR)的作用下生成甲羟戊酸(MVA)。因此,该途径被称为甲羟戊酸途径,一直被认为是萜类合成的经典途径^[1](图 1A)。但近年来,经¹³C 标记对植物和微生物萜类生物合成途径进行研究却发现许多与甲羟戊酸途径不一致的实验结果,并导致了新的类异戊二烯合成途径的发现^[2]。新途径以 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸作为反应起始,因此该途径又称为磷酸木酮糖途径或非甲羟戊酸途径^[2],该途径的主要反应步骤如图 1B 所示。

目前非甲羟戊酸途径中的一些酶已在部分植物和微生物中得到克隆。5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerases, DXR)是该途径中的关键酶,参与该途径的第二步反

应,催化直链的五碳糖形成带有支链的异戊酸前体^[3]。目前已相继在薄荷(*Mentha pipertia*)^[4]、胡椒(*Piper L.*)^[5]、长春花(*Catharanthus roseus*)^[6]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[7]和 *Synechococcus leopoliensis*^[8]中找到了该基因同源区,并作了描述。

但在萜类物质合成旺盛的针叶类植物中却未见对该基因及非甲羟戊酸途径的研究报道,为了证实红豆杉中是否也存在非甲羟戊酸途径,以便更深入研究紫杉醇生物合成途径及其分子调控机理,本文根据已发现的该途径中的关键酶 DXR 的基因进行同源序列的比对,然后进行简并引物的设计,并以红豆杉为材料,对该基因片段进行了克隆和序列分析。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验以中国红豆杉悬浮细胞(*Taxus chinensis* suspension cells)为材料,来源于胚芽经愈伤组织诱导和驯化培养获得的悬浮细胞系,已经经过 5 年的继代培养,由本实验室保存。

1.2 细胞培养与继代

基本培养基为改良 MS 培养基附加 NAA

收稿日期 2003-11-07,修回日期 2004-02-15。

基金项目 国家九五重点攻关(No.96-C02-03-01)、国家 863(No.102-C06-01-02)及教育部骨干教师基金。

* 通讯作者。 Tel: 86-27-87543633; Fax: 86-27-87540184; E-mail: yulj@mail.hust.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

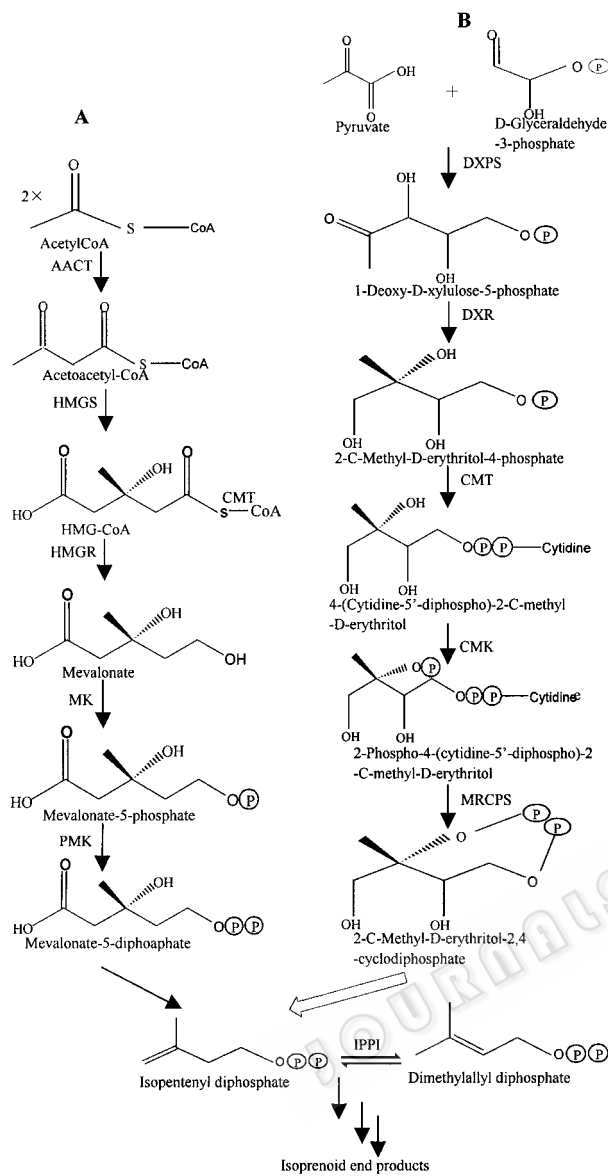


图 1 异戊烯焦磷酸合成途径 (A) 为甲羟戊酸途径 (B) 为非甲羟戊酸途径

Fig.1 Biosynthesis of IPP via the mevalonate pathway (A) and the DXP pathway (B)

The circled P denotes the phosphate moiety.

The large open arrow indicates several as yet unidentified steps.
Isopentenyl diphosphate isomerase (EC 5.3.3.2)
is abbreviated as IPPI

0.5mg/L 6BA 0.5mg/L 2,4-D 0.2mg/L 蔗糖 30 g/L , pH5.8。每 250 mL 三角瓶装 75mL 培养基,鲜细胞接种量为 100g/L,在 120 r/min,23℃ 下摇瓶暗室培养。每隔 15d 继代 1 次。

1.3 总 RNA 提取及 mRNA 纯化

参照一步法异硫氰酸胍法^[9]进行改良,提取中国红豆杉细胞的总 RNA。取 5g 新鲜细胞放入研钵中,加入液氮,迅速研磨成均匀的粉末,转入预冷的

50mL 离心管中。向离心管中加入 15mL 变性液,于涡旋混合器上振荡均匀。将离心管放置于冰上,加入 1.5mL 2mol/L 的 NaAc (pH4.0),15mL 水饱和酚和 3mL 氯仿/异戊醇,混合均匀,冰浴放置 15min。4℃,15 000r/min 离心 30min,转移上层水相至另一干净的离心管中,加入等体积的异丙醇,混匀,-20℃ 放置 1h。4℃ 13 000r/min 离心 25min,去除上清,沉淀溶于 5mL 变性液中。加入 5mL 水饱和酚和 2mL 氯仿/异戊醇,冰浴 10min 4℃ 13 000r/min 离心 30min。转移上清至另一干净的离心管中,加入 600μL 2mol/L 的 NaAc (pH4.0)和等体积的异丙醇,-20℃ 放置 30min。4℃ 13 000r/min 离心 20min,沉淀用 75% 乙醇清洗 2 遍,晾干后溶于适量体积的 DEPC 焦碳酸二乙酯处理水中。经紫外检测和甲醛变性凝胶电泳检测后分装,-70℃ 保存。mRNA 纯化采用磁珠分离法 (Promega 公司)。

1.4 *dxr* 基因引物的设计

在 GenBank 搜索植物来源的 DXR 序列,选取 *Artemisia annua* (AF182287) *Catharanthus roseus* (AF250235) *Arabidopsis thaliana* (AF148852) *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Q55663) *Mentha x piperita* (AAD24768.1) 进行了同源性比较 (ClustX 1.81)。通过比对,发现其氨基酸序列中有 7 处较大的保守区域,从 N-端至 C-端依次为 GSTGSIGTQTLDIV, VVTGIVGCAG, AGKDIALANKETLIAG, LPADSEHSAIFQC, IILTASGGAFRD, KGLEVIEAHYLFQ, SVLAQLG WPDMLRP,采用 primer premier 5 软件分析,运行结果表明 I 区和 VII 区比较适合设计引物,依据上述信息设计 PCR 简并扩增引物 (引物 1)。其中 Sense primer 5'GCA (A,T,G,C) ACT CAG AC (A,T,G,C) (C,T)T (A,T,G,C) GA (T,C) AT3'; Antisense primer 5' ACG CAT ATC (ATGC)GG CCA (ATGC)CC 3'。

1.5 RT-PCR 反应体系及反应条件

RT-PCR 采用 TaKaRa 公司生产的 RT-PCR 试剂盒,cDNA 链合成反应总体积为 20μL,其中 mRNA 10ng,25mmol/L MgCl₂ 4μL,10 × RNA PCR buffer 2μL,dNTP Mixture (10mmol/L each) 2μL,RNase Inhibitor 0.5μL,Reverse Transcriptase 1μL,Oliga dT-Adaptor primer 1μL 反应程序为 45℃ 30min,99℃ 5min 终止反应。cDNA 合成结束后,在体系中继续添加 25mmol/L MgCl₂ 6μL,10 × RNA PCR buffer 8μL TaKaRa Taq 聚合酶 0.5μL 25mmol/L 上下游引物各 1μL,总体积 100μL。PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 5min,接着进行

5 个循环的扩增(94℃ 1min, 40℃ 1min, 72℃ 1min),然后再进行 30 个循环(94℃ 1min, 45℃ 1min, 72℃ 1min),最后 72℃ 温育 10min。

1.6 PCR 产物回收、克隆

PCR 产物经胶纯化回收 Kit(Omega 公司)纯化,溶解于 20 μ L 10mmol/L TE(pH8.0)中,取 7 μ L 与 pGEM-T Easy Vector(Promega)在 4℃ 连接 16 h 以上,将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,感受态细胞制备参照文献 [10]。取 200 μ L 转化产物涂布于含 IPTG 和 X-gal 的 Amp(60mg/L)LB 平板,37℃ 培养过夜,白斑菌落即为阳性克隆。

1.7 重组克隆的验证及序列测定

随机挑选 5 个左右白斑菌落,接种于含 Amp(60 mg/L)的 LB 液体培养基中,使用质粒提取 kit(Omega 公司)提取质粒,与空载体环化质粒(蓝斑菌落中含有的质粒)进行 0.7% 琼脂糖电泳比较,挑选其中分子量增大的质粒,采用上文中的 *dxr* 简并引物进行扩增,扩增结果与 RT-PCR 相同的质粒为验证的阳性质粒,提交上海申友公司进行序列测定。

1.8 序列比较和软件分析

将克隆得到的 *dxr* 片段核苷酸序列在 GenBank 中进行同源搜索,然后根据推断得到的蛋白质序列,运用 Blast P 软件进行同源分析比较。用 PROSITE 软件在线分析该蛋白质的基本结构域。用 Clustal X (1.81)将其氨基酸序列与其他不同物种来源的 DXR 进行多序列同源比较,找出该序列中存在的保守结构域。

同时采用 Phylip(Version 3.6 alpha)软件包对选取的 19 种不同物种来源的蛋白质进行分析,作出进化上相互关系的预测。

1.9 *dxr* 基因来源验证

根据测序得到的 *dxr* 序列,采用 primer premier 5 软件设计特异性引物(引物 2),其中 Sense primer 5' TGG AGA AAC TGA AGG AGG TA3'; Antisense primer: 5'CTT ATT GAA CAG GGT GGC3'。从中国红豆杉 mRNA 中通过 RT-PCR 扩增序列(条件同 1.5),测序后比较获得的特异性片段的序列与先前获得的 *dxr* 序列的同源性。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

中国红豆杉总 RNA 的甲醛变性凝胶的电泳结果如图 2,从图中可以清晰地看出 3 条 rRNA 条带(5S rRNA、18S rRNA、28S rRNA),其中 28S rRNA 条带

的亮度大约为 18S rRNA 的 2 倍,说明了总 RNA 良好的完整性。

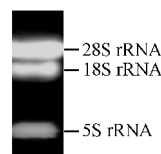


图 2 总 RNA 电泳

Fig.2 Total RNA gel electrophoresis

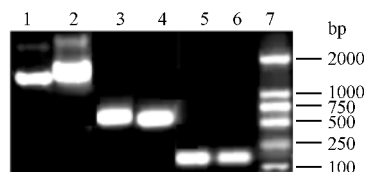


图 3 *dxr* 基因克隆的电泳分析

Fig.3 Analysis of the cloned *dxr* gene by gel electrophoresis

1 pGEM-T Easy; 2 pGEM-T Easy + *dxr*;

3 PCR product of pGEM-T Easy + *dxr* (primer 1);

4 RT-PCR product of *Taxus chinensis* cells (primer 1);

5: PCR product of pGEM-T Easy + *dxr* (primer 2);

6: RT-PCR product of *Taxus chinensis* cells (primer 2);

7: DL2000 DNA marker

进一步通过紫外分光光度法测得吸光值 A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280} 分别为 0.308、0.622、0.336, A_{260}/A_{230} 为 2.02, A_{260}/A_{280} 为 1.85。 A_{260}/A_{280} 比值介于 1.7 到 2.0 之间, A_{260}/A_{230} 比值大于 2.0,为典型的 RNA 吸收值,说明酚类、蛋白质和无机盐等杂质已排除。异硫氰酸胍法经过改良,可以从中国红豆杉细胞中提取出完整和高纯度的 RNA,总 RNA 得率达到每克新鲜细胞含 2.5mg RNA。

2.2 *dxr* 基因克隆与序列分析

通过 RT-PCR,从中国红豆杉细胞培养物 mRNA 中成功地克隆到了一条片段,大小在 450bp 左右,符合引物设计推断的片段大小。PCR 片段纯化后,TA 克隆到 pGEM T-easy 载体上,蓝白斑筛选获得阳性转化子,进一步提取质粒,验证转化子大小,然后将分子量明显增大的重组质粒作为模板,用原引物进行 PCR 扩增,验证重组质粒插入的片段的大小,表明重组质粒中插入的片段为 RT-PCR 克隆得到的片段。测序后,根据测得的结果,设计特异性引物(引物 2),又从中国红豆杉细胞培养物的 mRNA 中扩增到一个特异性小片段(149bp)。通过序列分析比较,发现特异性引物(引物 2)扩增得到小片段的序列与简并性引物(引物 1)扩增得到的具有 100% 的同源性,从而证明了扩增得到的 *dxr* 基因来源于中国红

3 讨 论

目前,在细菌、真菌、古细菌、藻类、高等植物和原生动物中均发现有非甲羟戊酸途径的存在。在高等被子植物中,如拟南芥、长春花、薄荷中已找到非甲羟戊酸的关键酶类。在这些植物中,甲羟戊酸途径与非甲羟戊酸途径同时存在。甲羟戊酸途径存在于胞质和线粒体中,主要与甾类、倍半萜类和泛醌的合成有关;质体中类异戊二烯(半萜、单萜、二萜和类胡萝卜素)的合成则主要依赖非甲羟戊酸途径^[1]。

红豆杉细胞可产生种类丰富的萜类物质,包括具有抗肿瘤活性的药物紫杉醇。紫杉醇及紫杉烷类属于二萜类,因此,极有可能来自于非甲羟戊酸途径的类异戊二烯作为合成前体。1996年,Eisenreich等将¹³C-葡萄糖和¹³C-乙酸加入到红豆杉培养细胞,发现¹³C标记进入紫杉烷中,因此推断类异戊二烯合成的另一途径——非甲羟戊酸途径在紫杉类植物的存在^[2]。本文实验结果首次从针叶类植物中扩增出非甲羟戊酸途径的关键酶基因 *dxr*,通过同源性比较、保守性区域比较以及蛋白特征性位点分析,发现与已经报道的 DXR 蛋白特性非常相似,因此可以推断克隆得到的片段就是中国红豆杉细胞 DXR 酶的 cDNA 片段。本文首次报道了从裸子植物中得到非甲羟戊酸途径关键酶的片段,而且证实了红豆杉植物中确实存在非甲羟戊酸途径,这为萜类物质,特别是紫杉醇的生物合成途径及分子调控机理的研究和应用奠定了坚实的基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Spurgeon SL, Puter JW. In: Biosynthesis of Isoprenoid Compounds

(Puter JW, Spurgeon SL Eds.), Wiley, New York, 1983, Vol. 1, pp. 1 - 46

[2] Eisenreich W, Menhard B, Hylands PJ *et al.* Studies on the biosynthesis of taxol: the carbon skeleton is not of mevalonate origin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 6431 - 6436

[3] Sigrid G, Stephanie BM, Hermann S. Isolation of the *dxr* gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylose 5-phosphate reductoisomerase. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **191**: 131 - 137

[4] Lange BM, Wildung MR, Mecaskill D *et al.* A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 2100 - 2104

[5] Bouvier FA, d'Harlingue A, Suire C *et al.* Dedicated roles of plastid transketolase during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol*, 1998, **117**: 1423 - 1431

[6] Bertrand V, Martine C, Audrey O *et al.* Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1517**: 159 - 163

[7] Schwender J, Müller C, Zeidler J *et al.* Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 1999, **455**: 140 - 144

[8] Miller B, Heuser T, Zimmer W. Functional involvement of a deoxy-D-5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Letters*, 2000, **481** (3): 221 - 226

[9] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156 - 159

[10] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990, **96**: 23 - 28

[11] Lan WX(兰文智), Yu LJ(余龙江), Cai YJ(蔡永君) *et al.* Advance on molecular biology of isoprenoids non-mevalonate pathway. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 2001, **21** (5): 1039 - 1047

Cloning and Analysis of cDNA Encoding Key Enzyme Gene(*dxr*) of the non-MVA Pathway in *Taxus chinensis* Cells

ZHENG Qing-Ping YU Long-Jiang* LIU Zhi LI Mo-Yi XIANG Fu YANG Qin

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Two distinct routes (classical mevalonate pathway and a novel mevalonate-independent pathway) are utilized by plants for the biosynthesis of isopentenyl diphosphate, the universal precursor of isoprenoids (Fig. 1). Present researches indicated that

Received: 11-07-2003

This work was supported by Grants from the Key Project of the Ninth Five-Year National Plan (No. 96-c02-03-01), the National High Technology Research and Development Project of China (No. 102-C60-01-02) and by the Ministry of Education (2000 year excellent youth teacher fund).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87543633; Fax: 86-27-87540184; ©-中国科学出版社微生物研究所联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

taxol was synthesized mainly via non-mevalonate pathway , but not genetic evidence was showed. The second step in non-mevalonate pathway involves an intramolecular rearrangement and subsequent reduction of deoxyxylulose phosphate to yield 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate , and 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) with responsibility for this reaction was considered as a key enzyme. As a tool for the isolation of genes in terpenoid biosynthesis in plants , total RNA was prepared from *Taxus chinensis* suspension cells , a cell type highly specialized for diterpene (taxol). A reverse transcription-PCR strategy based on the design of degenerated oligonucleotides was developed for isolating the gene encoding a gymnosperm homolog of this enzyme from *Taxus chinensis* . Through sequence analysis by Blast P online , the resulting cDNA showed highly homologous to 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerases , with 95 % identification compared with *Arabidopsis thaliana* (Q9XFS9) , 94 % with *Mentha x piperita* (Q9XES0) , 80 % with *Synechococcus elongatus* (Q8DK30) , 78 % with *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Q55663) and *Nostoc* sp. PCC 7120 (Q8YP49) , and 73 % with *Synechococcus leopoliensis* (Q9RKT1). Deduced amino acid sequences were also analyzed by PROSITE , ClustalX (1.81) and Phylid (3.6 alpha) , and data present evidence for the existence of this deoxyxylulose phosphate reductoisomerase in *Taxus chinensis* . This is the first report of the *dxr* gene cloned from gymnosperm.

Key words *Taxus chinensis* suspension cells , non-movalonate terpenoid pathway , 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerases (DXR) , RT-PCR

第八届世界生物传感器大会在格拉纳达召开

第八届世界生物传感器大会于 2004 年 5 月 24 日至 26 日在西班牙格拉纳达会展中心召开。这次会议由 Elsevier 和 Biosensors & Bioelectronics 杂志共同组织、承办 ,大会主席是世界著名生物传感专家 Anthony P F Turner 教授。本届会议可以说是世界生物分析系统领域的一次大的盛会 ,邀请了一批国际知名学者就当前分析化学和分析生物技术发展的前沿与热点问题作了大会报告及专题报告。归纳起来 ,具有如下两个特点 :

- 1. 与会代表数和发表论文数为历史最高。共有 700 余名来自世界各地的学者参加了本届大会 ,经过组委会评议 ,从 657 篇申报论文中选出 540 篇作为会议论文 ,其中大会报告 5 篇 ,口头报告 109 篇 ,墙报 426 篇。
- 2. 涉及领域内容空前广泛 ,对 9 个专题进行了分组讨论。包括 核酸传感器和 DNA 芯片、免疫传感器、酶传感器、组织和全细胞传感器、用于生物传感器的天然与合成受体、新的信号转导技术、系统整合/蛋白质组学/单细胞分析、生物电化学/生物燃料/微分析系统、商业发展和市场。其中 ,单分子/细胞分析和生物印迹生物传感器由于它们良好的发展态势及在生命科学研究中的重要位置成为与会学者讨论的热点问题 ,最为引人注目。

大会组委会从 657 篇投稿中评选出 10 篇原创性研究论文作为本届大会的关键性报告(Keynote speech) ,同时授予论文作者 Biosensors & Bioelectronics 奖。其中 ,来自多伦多大学的 Thompson 教授撰写的“ 卡尔文纳米探针非标记检测蛋白质、核酸和细胞微阵列的研究 ”获得本届大会的一等奖。

我国学者在本届会议上共发表论文 32 篇 ,其中中国大陆 8 篇 ,台湾 20 篇 ,香港 4 篇。中国科学院武汉病毒研究所张先恩博士和周亚凤博士分别作了“ 基因技术 :生物传感器发展的契机 ”和“ MutS 蛋白介导的基因突变检测生物芯片 ”的口头报告 ,其它为墙报。

我国学者多年来一直建议能在中国召开世界生物传感器大会。在本届会议期间 ,我们再次向大会组委会成员详细介绍了中国在生物传感方面的发展现状和趋势 ,分析了在中国召开该会的优势 ,希望能在 2008 年在中国召开世界生物传感器学术大会。最后 ,大会组委会有关成员倾向于考虑我方这一建议。我们相信 ,如果能够实现 ,将为我国学者创造很好的与世界各国知名学者交流的机会 ,从而推动我国分析生物化学、分析生物技术及生物电子学等相关领域的发展。

(中国科学院武汉病毒研究所 周亚凤 文继开 张先恩)