

## 桔梗 *DXS* 基因的原核表达、亚细胞定位和酶活性分析

董楠<sup>1</sup>, 余函纹<sup>1</sup>, 刘梦丽<sup>1</sup>, 李景<sup>1</sup>, 陈博文<sup>1</sup>, 常相伟<sup>1</sup>, 王举涛<sup>1</sup>,  
查良平<sup>1\*</sup>, 桂双英<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽 合肥 230012;  
3. 现代药物制剂安徽省教育厅工程技术研究中心, 安徽 合肥 230012; 4. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

**摘要:** 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, *DXS*) 是甲基赤藓醇磷酸 (2-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径中催化 3-磷酸甘油醛和丙酮酸缩合生成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (DXP) 的第一个关键酶。本研究通过反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 从桔梗根中克隆得到 *PgDXS1*、*PgDXS2*、*PgDXS3* 基因, 开放阅读框 (ORF) 全长分别为 2 160、2 208 和 2 151 bp, 分别编码 719、735、716 个氨基酸, 同源氨基酸序列分析表明桔梗与橡胶树、曼陀罗及甜菊的 *DXS* 基因编码的氨基酸序列具有较高同源性; 进一步构建原核表达载体 pET-28a-*PgDXS*s, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 成功诱导 3 个 *DXS* 蛋白的表达。亚细胞定位结果显示, *PgDXS1* 和 *PgDXS2* 蛋白主要定位于叶绿体中, *PgDXS3* 蛋白定位于叶绿体、细胞核和细胞质中。运用实时荧光定量 PCR 检测 3 个 *DXS* 基因在 2 个产区不同组织中的表达水平, 结果表明 3 个 *DXS* 基因均在太和桔梗叶中高表达。在茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导处理下, *PgDXS1*、*PgDXS2*、*PgDXS3* 基因表达水平在不同诱导的时间点 (3~48 h) 呈现先降后增高的趋势; 酶活性检测结果显示: 桔梗的 3 个组织中 *DXS* 酶活性在 MeJA 处理后不同的时间点也呈现先增加后降低的趋势。本研究为进一步阐明桔梗中萜类化合物合成途径 *PgDXS* 基因的生物学功能提供参考。

**关键词:** 桔梗; 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶; 基因克隆; 原核表达; 亚细胞定位; 酶活性分析

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-1059-10

## Prokaryotic expression, subcellular localization and enzymatic activity analysis of *DXS* gene from *Platycodon grandiflorum*

DONG Nan<sup>1</sup>, YU Han-wen<sup>1</sup>, LIU Meng-li<sup>1</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, CHEN Bo-wen<sup>1</sup>, CHANG Xiang-wei<sup>1</sup>,  
WANG Ju-tao<sup>1</sup>, ZHA Liang-ping<sup>1\*</sup>, GUI Shuang-ying<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 3. Engineering Technology Research Center of Modernized Pharmaceutics, Anhui Education Department (AUCM), Hefei 230012, China; 4. Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Technology and Application (AUCM), Hefei 230012, China)

**Abstract:** 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (*DXS*), the first key enzyme in 2-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway, catalyzes the condensation of glyceraldehyde-3-phosphate with pyruvate to 1-deoxy-xylulose-5-phosphate (DXP). In this study, *PgDXS1*, *PgDXS2*, and *PgDXS3* genes were cloned from the root of *Platycodon grandiflorum* (*P. grandiflorum*). The open reading frame (ORF) of *PgDXS1*, *PgDXS2*, and *PgDXS3* were 2 160, 2 208, and 2 151 bp in full length, encoding 719, 735, and 716 amino acids, respectively. Homologous

收稿日期: 2022-08-09; 修回日期: 2022-10-18.

基金项目: 国家自然科学基金区域联合基金项目 (U21A20406).

\*通讯作者 E-mail: guishy0520@126.com; zlp\_ahtcm@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0982

alignment results showed a high identity of PgDXSs with DXS in *Hevea brasiliensis*, *Datura stramonium* and *Stevia rebaudiana*. The recombinant expression plasmids of pET-28a-PgDXSs were constructed and transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) cells, and the induced proteins were successfully expressed. Subcellular localization results showed that PgDXS1 and PgDXS2 were mainly located in chloroplasts, and PgDXS3 was located in chloroplasts, nucleus and cytoplasm. The expression of three DXS genes in different tissues of two producing areas of *P. grandiflorum* were assayed via real-time fluorescence quantitative PCR, and the results showed that all of them were highly expressed in leaves of *P. grandiflorum* from Taihe. Under methyl jasmonate (MeJA) treatment, the expression levels of three PgDXS genes showed a trend of first decreasing and then increasing at different time points (3 - 48 h), and the activity of DXS showed a trend of first increasing and then decreasing in three tissues of *P. grandiflorum*. This study provides a reference for further elucidating the biological function of PgDXS in terpenoid synthesis pathway in *P. grandiflorum*.

**Key words:** *Platycodon grandiflorum*; 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; gene cloning; prokaryotic expression; subcellular localization; enzyme activity

桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根, 具有宣肺、利咽、祛痰、排脓的功效, 用于咳嗽痰多, 胸闷不畅, 咽痛音哑, 肺痛吐脓等症<sup>[1]</sup>。化学研究表明<sup>[2]</sup>, 桔梗中含有多种化学成分, 如桔梗皂苷、多糖类、黄酮类、酚酸类、脂肪酸(亚油酸、棕榈酸等)、聚炔类等。目前其化学成分研究主要集中在三萜类皂苷成分, 药理活性研究多以提取物及桔梗皂苷 D 为主<sup>[3]</sup>。现代药理研究表明其提取物具有抗炎<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>等多种药理活性。

桔梗皂苷为三萜类皂苷, 而萜类化合物以异戊二烯为结构单元, 是一种多样化且普遍存在的次级代谢产物, 在植物、细菌和哺乳动物中发挥重要的生物学功能<sup>[6]</sup>。根据异戊二烯的数目不同, 可将其分为单萜、倍半萜、二萜、三萜、四萜和多萜。尽管萜类化合物具有不同的结构和功能, 但都来源于相同的结构前体异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP)<sup>[7,8]</sup>。IPP 和 DMAPP 在高等植物中通过两种不同的生物合成途径合成, 即细胞质中甲羟戊酸途径 (MVA) 和质体中的甲基赤藓醇磷酸 (MEP) 途径<sup>[9,10]</sup>。1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (DXS) 是 MEP 途径的第一个关键酶基因<sup>[11]</sup>, DXS 在 MEP 途径中催化 3-磷酸甘油醛和丙酮酸缩合生成 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸 (DXP)<sup>[12,13]</sup>。随后 DXP 分别在一系列酶催化下生成 IPP 和 DMAPP<sup>[14]</sup>。Henriquez 等<sup>[15]</sup>通过农杆菌将马铃薯 DXS 基因转入到拟南芥中, 拟南芥过量表达马铃薯 *StDXS1* 基因后, 类胡萝卜素和叶绿素的积累量明显增加, 证明 DXS 是萜类化合物代谢途径的重要调节酶且控制其表达可影响植物体内萜类化合物的含量。

目前, DXS 基因已从多种植物中成功分离并探究其在生物合成途径中的调控作用, 如月月桂<sup>[11]</sup>、薰衣草<sup>[16]</sup>、南方红豆杉<sup>[17]</sup>, 而桔梗 DXS 基因尚未报道。为探

究桔梗三萜皂苷的生物合成机制, 本研究对桔梗萜类 MEP 途径第一个关键酶基因 DXS 基因进行克隆和功能鉴定, 利用在线网站和软件对 3 个 PgDXS 基因编码蛋白进行生物信息学分析。构建 3 个 PgDXS 的原核表达载体和亚细胞瞬时表达载体, 进行原核表达和亚细胞定位观察。同时, 探究 MeJA 不同诱导时间对桔梗 DXS 基因表达及其酶活性的影响, 为深入研究桔梗三萜皂苷的生物合成分子机制奠定基础。

## 材料与方法

**样品** 桔梗样品分别采自安徽桐城、安徽太和, 经安徽中医药大学桂双英教授鉴定为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC., 经液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱。桐城桔梗种子播种于 MS 固体培养基, 选取长势一致的桔梗组培苗转移至 1/2 MS 液体培养基中, 生长 4 周。

**菌株、载体与试剂** 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) Trans1-T1 感受态细胞、*E. coli* BL21 (DE3) 表达感受态细胞、切胶回收试剂盒 EasyPure<sup>®</sup> Quick Gel Extraction Kit、质粒提取试剂盒 EasyPure<sup>®</sup> HiPure Plasmid MiniPrep Kit、无缝拼接试剂盒 pEASY<sup>®</sup>-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit、ProteinFind<sup>®</sup> Anti-His Mouse Monoclonal Antibody 及 ProteinFind<sup>®</sup> Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (北京全式金生物技术有限公司); 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、快速通用植物 RNA 提取试剂盒 (北京华越洋生物科技有限公司); Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (NEB 公司); pET-28a 载体 (武汉淼灵生物科技有限公司); 反转录试剂盒 PrimeScript<sup>™</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa 公司); ProteinIso<sup>®</sup> Ni-NTA Resin (上海生工生物工程股份有限公司); 卡

那霉素 (Kana, 上海源叶生物科技有限公司); 植物DXS酶联免疫 (ELISA) 试剂盒 (上海研谨生物科技有限公司); 1/2 MS培养基 (北京索莱宝科技有限公司); MS培养基 (PhytoTech公司); 引物均由上海生工生物有限公司合成。

**基因数据获取** *PgDXS*基因序列来源于桔梗转录组数据 (本实验室), 序列去冗余后进行功能注释。其他物种DXS的氨基酸序列从GenBank数据库获得。根据快速通用植物RNA提取试剂盒说明书, 从桔梗根中提取总RNA, 通过1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA完整性, 并利用超微量紫外分光光度计 (Denovix DS-11+) 测定总RNA的 $A_{260}/A_{280}$ , 选择比值1.8~2.0区间的总RNA反转录。参照PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书进行反转录, 获得桔梗的cDNA, 保存于-20℃冰箱。

***PgDXS*基因克隆** 根据桔梗转录组数据库, 采用Primer Premier 5.0设计*PgDXS1*、*PgDXS2*、*PgDXS3*基因特异性引物 (表1)。以cDNA为模板, PCR扩增采用Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, PCR反应条件为98℃预变性2 min; 98℃变性10 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 35个循环; 72℃延伸5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用切胶回收试剂盒回收与预期大小一致的条带, 将其与克隆载体pEASY-Blunt Zero连接, 转化至*E. coli* Trans1-T1感受态细胞中, 挑选单菌落并进行菌液PCR验证, 将阳性克隆菌液送至苏州金唯智公司测序。

***PgDXS*基因生物信息学分析** 利用ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 获取*PgDXS*基因的开放阅读框 (ORF); 使用NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线工具BLAST进行氨基酸序列的相似性比对分析; 利用ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测该基因编码的蛋白理化性质, 包括相对分子质量、理论等电点、不稳定系数等; 利用NPS ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_phd.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html))、SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 及PyMOL软件对蛋白进行二级结构和三级结构的预测; CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质结构域分析; 利用NetPhos (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 进行磷酸化位点预测; 使用SignalP4.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测; 运用ClustalW软件, 将3个*PgDXS*氨基酸序列与其他植物的氨基酸序列进行比对; 用MEGA 6.06软件构建Neighbor-joining系统进化树, bootstrap重复次数为1 000次。

***PgDXS*原核表达载体构建与诱导表达** 依据测序所得序列, 以*BamH I*为酶切位点设计引物 (表1), 以重组质粒为模板, 经PCR扩增、1%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 对PCR产物进行切胶回收, 同时采用*BamH I*限制性内切酶对载体pET-28a进行线性化, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 并进行切胶回收, 将切胶回收产物用无缝拼接试剂盒于50℃连接30 min, 产物转化至Trans1-T1感受态细胞, 挑取单菌落, 菌液经PCR验证及公司测序, 提取阳性菌液质粒, 将pET-28a和测序正确的重组质粒pET-28a-*PgDXS1*、pET-28a-*PgDXS2*和pET-28a-*PgDXS3*转化至BL21 (DE3) 感受态细胞, 37℃, 至 $A_{600}$ 值为0.6~0.8时, 取出500 μL菌液作为未诱导菌液, 将pET-28a-*PgDXS*在0.8 mmol·L<sup>-1</sup>异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 条件下16℃诱导12 h, 收集菌液作为全菌, 全菌与未诱导菌液于10 000 ×g离心1 min, 去上清, 加入1 mL 1× PBS缓冲液重悬菌体, 10 000 ×g离心1 min, 去上清, 加入50 μL ddH<sub>2</sub>O重悬菌体, 加入10 μL的loading buffer, 混匀, 煮沸8 min, 10 000 ×g离心3 min, 上清即为样品。通过改变温度 (16、20、25、30和37℃)、诱导时间 (2、4、8、12和24 h)、IPTG浓度 (0、0.2、0.4、0.6、0.8和1 mmol·L<sup>-1</sup>) 和 $A_{600}$  (0.2、0.4、0.6、0.8和1), 筛选得到最佳诱导条件。配制12%的SDS-PAGE分离胶进行SDS-PAGE电泳检测分析。

**亚细胞定位** 以目的基因序列设计引物 (表1), 以构建到T载体的质粒为模板, 进行PCR扩增及切胶回收, 采用*BamH I*限制性内切酶对载体pRII01-GFP线性化, 酶切产物纯化后与目的基因PCR产物进行无缝拼接, 重组产物转化至Trans1-T1感受态细胞。经过PCR鉴定, 筛选阳性菌液送至苏州金唯智公司测序并提取质粒。确定表达载体构建成功后将其转入根癌农杆菌GV3101中, 将阳性菌液于10 mL YEB液体培养基 (含50 μg·mL<sup>-1</sup> Kana, 20 μg·mL<sup>-1</sup> 利福平) 中, 28℃、180 r·min<sup>-1</sup>培养15~24 h, 离心重悬, 调整 $A_{600}$ 至0.6~1, 室温静置3 h。将P19菌液与目的基因的菌液等比例混合, 注射于烟草叶片下表面。将注射完成的烟草植株弱光培养48 h后, 切取浸染区域, 制片, 采用激光共聚焦显微镜 (ZEISSI 710) 观察亚细胞定位结果。

**实时荧光定量PCR** 运用实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 方法检测*PgDXS*基因在不同产地 (桐城、太和) 的桔梗根 (R)、茎 (S)、叶 (L) 的相对表达量。根据RNA提取试剂盒说明书, 以桐城 (TC)、太和 (TH) 桔梗的根、茎、叶为材料, 提取得到桔梗总RNA。以桔梗RNA为模板, 使用反转录试剂盒进行反转录。以桔梗actin基因作为内参, 根据*PgDXS*基因的全长序列, 采

用Primer Premier 5.0设计引物(表1)。PCR反应体系包括2× Realab Green PCR Fast mixture 10 μL、cDNA 1 μL、上游引物 0.5 μL、下游引物 0.5 μL、ROX Reference Dye 0.2 μL、ROX Reference Dye II 0.2 μL、RNase-free H<sub>2</sub>O 至终体积 20 μL。PCR反应条件: 95 °C, 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 15 s, 40个循环。实验重复3次, 绘制熔解曲线, 采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法分析基因的相对表达量。

**MeJA对桔梗DXS基因表达及DXS酶活性的影响** 将桔梗组培苗转移至1/2 MS液体培养基中培养4周, 取生长状况一致的幼苗中, 分别用MeJA (100 μmol·L<sup>-1</sup>) 处理0、3、6、9、12、24、48 h, 取桔梗根部样品, 液氮速冻后放-80 °C保存。运用qRT-PCR方法检测MeJA处理不同时间点的桔梗根中PgDXS基因的相对表达量。采用植物DXS ELISA试剂盒, 检测MeJA处理不同时间点的桔梗根、茎、叶中DXS酶活性。根据ELISA试剂盒说明书, 往预先包被DXS酶抗体的包被微孔中, 依次加入总蛋白、标准品、辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体, 经过温育并彻底洗涤。用底物四甲基联苯胺(TMB)显色, 颜色的深浅和样品中的DXS酶呈正相关。用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度, 计算DXS酶活性。

## 结果与分析

### 1 PgDXS基因的克隆及序列分析

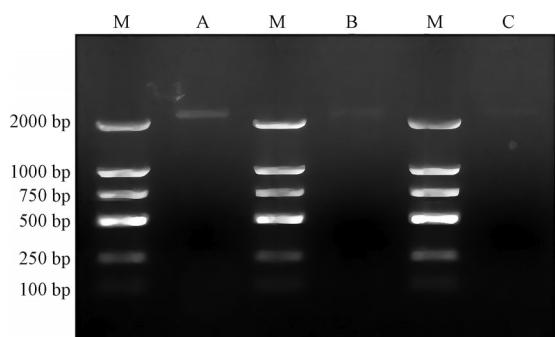
依据桔梗转录组数据文库, 对PgDXS基因序列进行分析, 结果显示, PgDXS1、PgDXS2、PgDXS3基因ORF全长分别为2 160、2 208、2 151 bp, 编码719、735、716个氨基酸。以桔梗cDNA为模板, 经过PCR扩增, 结果显示, PgDXS1、PgDXS2和PgDXS3基因电泳条带与目的基因条带大小一致(图1)。通过NCBI的BLAST功能, 对PgDXS1、PgDXS2和PgDXS3蛋白序列进行比对分析, 结果显示, PgDXS1与常春藤DXS (APY22341.1) 同源相似性为89.18%, 与胡桃DXS (XP\_018840579.1) 同源相似性为88.49%, PgDXS2与茶DXS (AJB84617.1) 同源相似性为78.30%, 与黄花蒿DXS (PWA79560.1) 同源相似性为77.26%, PgDXS3与莴苣DXS (XP\_023759602.1) 同源相似性为80.75%, 与茶DXS (XP\_028066861.1) 同源相似性为78.95%。比对结果表明, 所获序列均属于DXS家族, 命名为PgDXS1、PgDXS2和PgDXS3, GenBank登录号分别为ON206858、ON206859、ON206860。

### 2 PgDXS基因生物信息学分析

**2.1 蛋白理化性质分析** 利用在线工具ExPASy对PgDXS1、PgDXS2和PgDXS3基因编码蛋白进行理化性质分析, 结果显示, PgDXS1蛋白包括719个氨基酸残

**Table 1** Primer sequences. DXS: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; PgDXS: The DXS gene from *Platycodon grandiflorum*; GFP: Green fluorescent protein; F: Forward; R: Reverse. The underlined part is the restriction site of BamH I

Primer name	Primer sequence (5'-3')
PgDXS1-F	ATGGCTGTTTCTGCATTTCGATTCC
PgDXS1-R	CTAACTCATAATCTCCAGAGCTTGT
PgDXS2-F	ATGGCTTCTGTGGTATCCTGAAAA
PgDXS2-R	CTATATGCTGACAAGGTGAAGGCTA
PgDXS3-F	ATGGGGACTGCTTCAATTCAGCACC
PgDXS3-R	TTAGCACATCAAGAGAAGGGCTTCA
PgDXS1-28a-BamHI-F	GACAGCAAATGGGTCGCGGAATGGCTGTTTCTGCATTTCGATTCC
PgDXS1-28a-BamHI-R	CGACGGAGCTCGAATTCGGACTAATCATAATCTCCAGAGCTTGT
PgDXS2-28a-BamHI-F	GACAGCAAATGGGTCGCGGAATGGCTTCTGTGGTATCCTGAAAA
PgDXS2-28a-BamHI-R	CGACGGAGCTCGAATTCGGACTATATGCTGACAAGGTGAAGGCTA
PgDXS3-28a-BamHI-F	GACAGCAAATGGGTCGCGGAATGGGGACTGCTTCAATTCAGCACC
PgDXS3-28a-BamHI-R	CGACGGAGCTCGAATTCGGATTAGCACATCAAGAGAAGGGCTTCA
DXS1-BamHI-GFP-F	TCGACCCCGGGGGTACCGGAATGGCTGTTTCTGCATTTCGATTCC
DXS1-BamHI-GFP-R	TCGCCCTTGCTCACCATGGAATCATAATCTCCAGAGCTTGTCTT
DXS2-BamHI-GFP-F	TCGACCCCGGGGGTACCGGAATGGCTTCTGTGGTATCCTGAAAA
DXS2-BamHI-GFP-R	TCGCCCTTGCTCACCATGGATATGCTGACAAGGTGAAGGCTATCC
DXS3-BamHI-GFP-F	TCGACCCCGGGGGTACCGGAATGGGGACTGCTTCAATTCAGCACC
DXS3-BamHI-GFP-R	TCGCCCTTGCTCACCATGGAGCACATCAAGAGAAGGGCTTACCGG
q-PgDXS1-F	AGAATTACGAGAAGTTGCTAAGGGT
q-PgDXS1-R	CATCTATGCTGTGACCGTCAACA
q-PgDXS2-F	TTGCTGAAGCAGAAAGCGAT
q-PgDXS2-R	CAGCTGTGGCTACCATGTGC
q-PgDXS3-F	TGTTTGCTCCGCTATCCTAGA
q-PgDXS3-R	AACCGTTACCTCAATCCCAAGT
Actin-F	CAGTGGGCGAACAACCTGGT
Actin-R	ATCACGGCCAGCAAGGTC



**Figure 1** PCR amplification products of *PgDXS1*, *PgDXS2* and *PgDXS3*. M: DNA marker; A: *PgDXS1* gene band; B: *PgDXS2* gene band; C: *PgDXS3* gene band

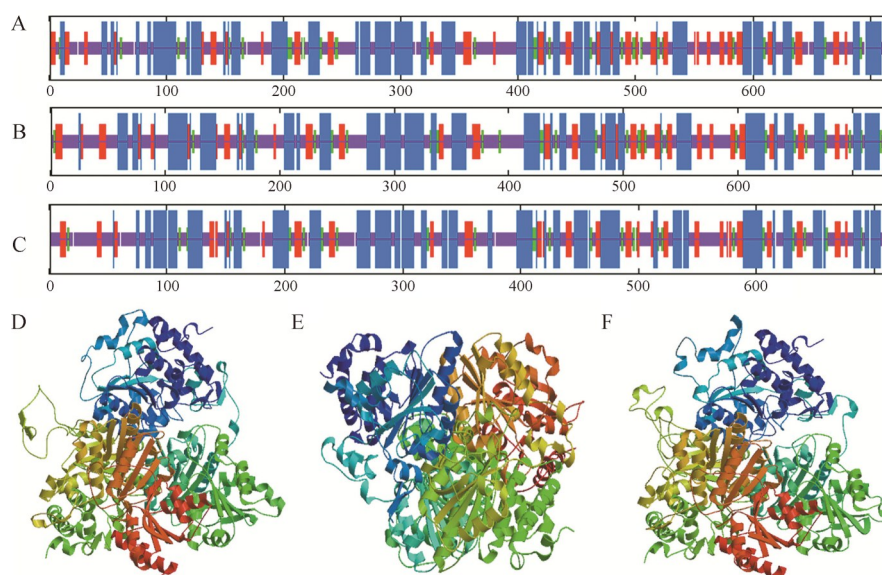
基, 蛋白理论等电点为 6.82, 相对分子质量为 76 873.83, 不稳定系数为 40.46, 脂肪指数为 89.44。PgDXS2 蛋白包括 735 个氨基酸残基, 蛋白理论等电点为 7.68, 相对分子质量为 78 818.18, 不稳定系数为 38.36, 脂肪指数为 88.12。PgDXS3 蛋白包括 716 个氨基酸残基, 蛋白理论等电点为 6.11, 相对分子质量为 77 919.75, 不稳定系数为 41.43, 脂肪指数为 93.30。初步判断 PgDXS1、PgDXS2 和 PgDXS3 蛋白均为不稳定蛋白。

**2.2 二级和三级结构预测分析** 利用 NPS 在线软件对 PgDXS1、PgDXS2 和 PgDXS3 蛋白的二级结构进行预测分析。结果显示 (图 2), PgDXS1、PgDXS2 和 PgDXS3 蛋白的二级结构中无规卷曲 (random coil) 所占的比例最高。PgDXS1 蛋白的二级结构中, 含有 277 个  $\alpha$ -螺旋, 占比 38.53%, 113 个延伸链 (extended strand), 占比 15.72%, 51 个  $\beta$ -转角 (beta turn), 占比

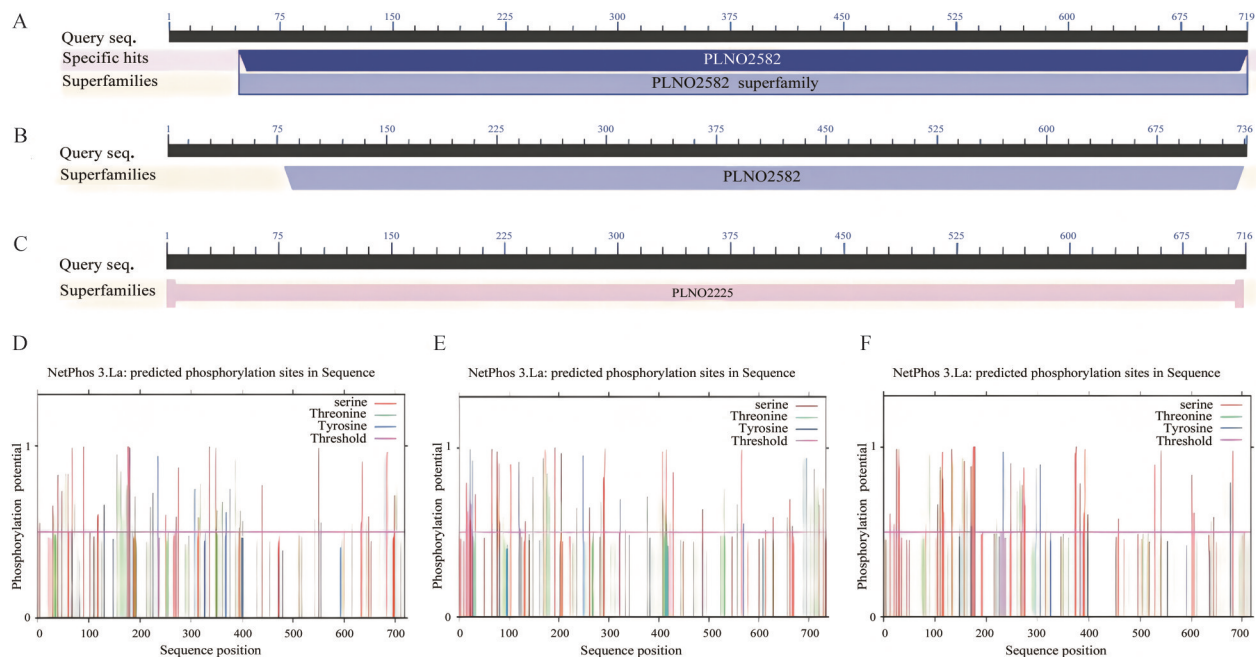
7.09%, 以及 278 个无规卷曲, 占比 38.66%。PgDXS2 蛋白的二级结构中, 含有 269 个  $\alpha$ -螺旋, 占比 36.60%, 121 个延伸链, 占比 16.46%, 51 个  $\beta$ -转角, 占比 6.94%, 以及 294 个无规卷曲, 占比 40.00%。PgDXS3 蛋白的二级结构中, 含有 272 个  $\alpha$ -螺旋, 占比 37.99%, 103 个延伸链, 占比 14.39%, 46 个  $\beta$ -转角, 占比 6.42%, 以及 295 个无规卷曲, 占比 41.20%。利用 SWISS-MODEL Workspace 在线软件对 PgDXS1、PgDXS2 和 PgDXS3 蛋白进行同源建模, 结合 PyMOL 软件预测得到 PgDXS1、PgDXS2 和 PgDXS3 三维空间模型 (图 2)。

**2.3 结构功能域及磷酸化位点预测** 蛋白质结构功能域的预测结果表明, PgDXS1、PgDXS2 和 PgDXS3 蛋白均具有 DXS 结构域 (图 3), 说明 3 个 PgDXS 蛋白均属于 DXS 超家族。利用 NetPhos 预测 PgDXS1、PgDXS2 和 PgDXS3 蛋白的磷酸化位点 (图 3)。PgDXS1 蛋白的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点个数分别为 30、23、10; PgDXS2 蛋白的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点个数分别为 32、24、7; PgDXS3 蛋白的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点个数分别为 38、16、5。

**2.4 PgDXS 和其他物种的氨基酸序列同源比对** 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对 (图 4), PgDXS1、PgDXS2、PgDXS3 氨基酸序列与橡胶树 HbDXS (BAF98288.1)、曼陀罗 DsDXS (MCD7460099.1) 及甜菊 SrDXS (ALJ30086.1) 具有较高的相似性, 分别为 75.81%、75.65% 和 74.97%。4 种植物的 DXS 基因相似度为 79.68%。PgDXS 蛋白包含 1 个硫胺素焦磷酸



**Figure 2** The secondary structure and predicted 3D structure model of PgDXS1, PgDXS2 and PgDXS3. A: PgDXS1 protein secondary structure; B: PgDXS2 protein secondary structure; C: PgDXS3 protein secondary structure; D: PgDXS1 protein tertiary structure; E: PgDXS2 protein tertiary structure; F: PgDXS3 protein tertiary structure

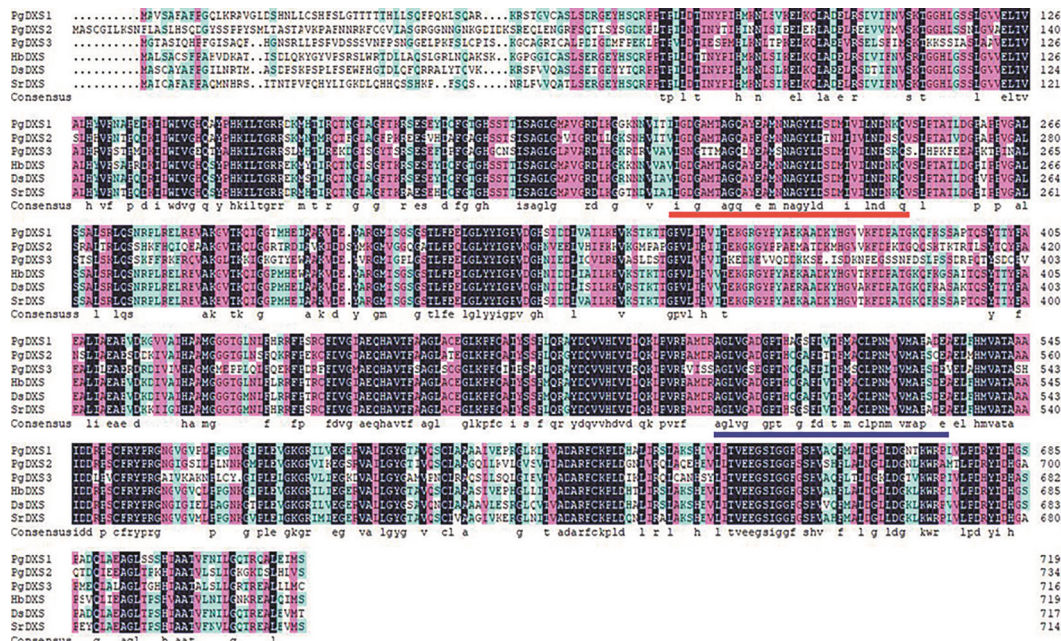


**Figure 3** Structural functional and transmembrane domains of PgDXS1, PgDXS2 and PgDXS3. A: Structural and functional domain of PgDXS1; B: Structural and functional domain of PgDXS2; C: Structural and functional domain of PgDXS3; D: Phosphorylation site of PgDXS1; E: Phosphorylation site of PgDXS2; F: Phosphorylation site of PgDXS3

结合位点: GDG (X) 8E (X) 4A (X) I1NDN 和 1 个转酮醇酶结构域: DRAGX28PX. 由序列比对结果可知, 4 种植物的 DXS 蛋白的 C 端与 N 端相比, 保守性更高, N 端是序列同源性差异的主要来源, 且 N 端主要是 DXS 蛋白的质体转运肽所在区域。

**2.5 PgDXS 系统进化树分析** 为了研究 PgDXS 的进

化关系, 使用 MEGA 6.0 构建了来自不同生物的 DXS 基因的系统发育树 (图 5)。系统发育树包括 4 个分支: 藻类、细菌、单子叶植物和双子叶植物, 3 个 PgDXS 均属于双子叶植物, 其中, PgDXS1 在进化树中与甜菊 DXS (ALJ30086.1) 聚为一支, 表明两者亲缘关系较高。PgDXS2 在进化树中与艾 DXS (QBB78630.1)



**Figure 4** Sequence alignment of PgDXS1, PgDXS2 and PgDXS3 with other plant DXS proteins. HbDXS: *Hevea brasiliensis* BAF98288.1; DsDXS: *Datura stramonium* MCD7460099.1; SrDXS: *Stevia rebaudiana* ALJ30086.1. Red line is thiamin ediphosphate binding site; blue line is transketolase domain

聚为一支,表明具有较高的亲缘关系。PgDXS1、PgDXS2和PgDXS3之间存在系统发育距离,可能表明酶具有不同功能。

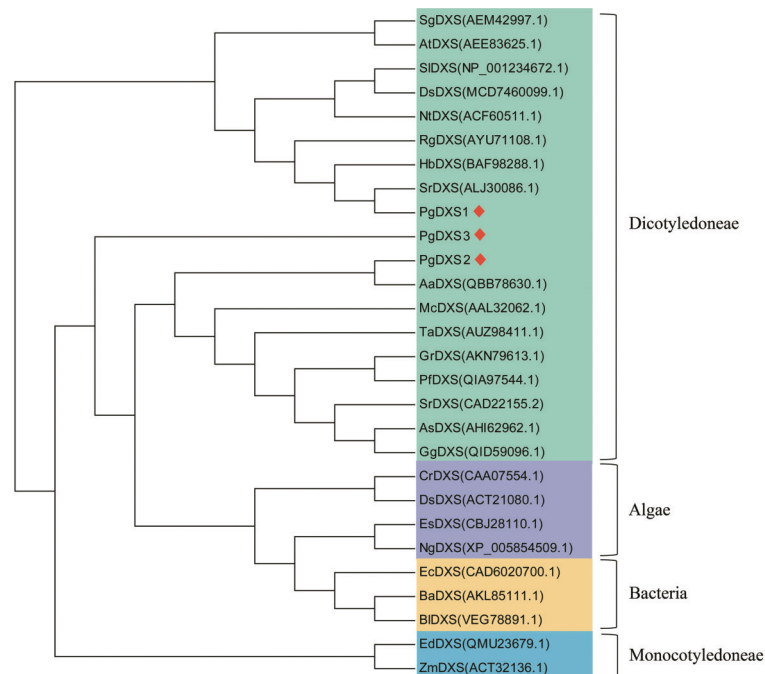
### 3 PgDXS基因原核表达

将重组质粒 pET-28a-PgDXS1、pET-28a-PgDXS2和 pET-28a-PgDXS3 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,经过菌液 PCR 及公司测序验证,得到阳性菌株。以 pET-28a 为对照,观察重组融合蛋白在 16 °C、0.8 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导条件下的表达情况,SDS-PAGE 电泳结果显示(图 6),pET-28a-PgDXS1、pET-28a-PgDXS3 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,全菌、上清中均有目

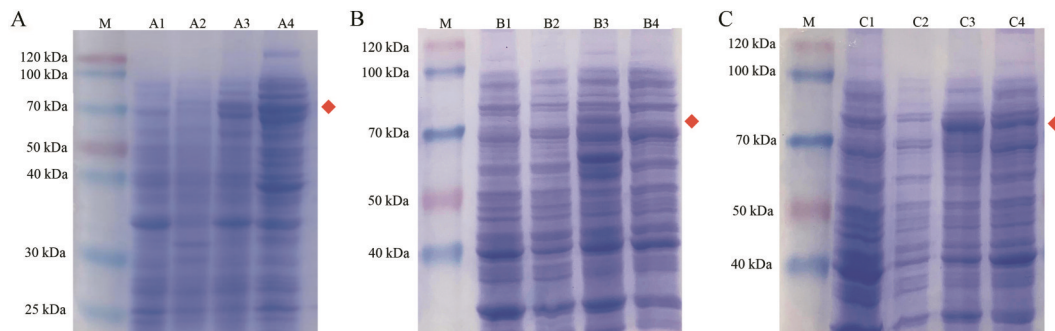
的基因的表达,分别在 84 和 85 kDa 出现条带,与预测结果一致。pET-28a-PgDXS2 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,全菌中有目的基因的表达,在 86 kDa 出现条带,与预测结果一致,上清无表达。

### 4 PgDXS基因亚细胞定位

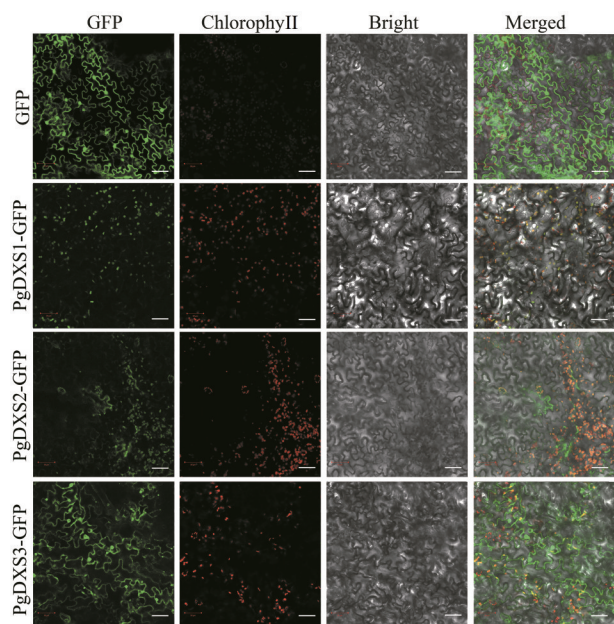
为了进一步分析 PgDXS 基因在烟草叶片表皮细胞中的定位,构建了重组质粒并转化至农杆菌 GV3101 感受态细胞,通过激光共聚焦显微镜观察蛋白的亚细胞定位(图 7)。GFP 蛋白分布于细胞质和细胞核中;PgDXS1 和 PgDXS2 蛋白主要位于叶绿体中,PgDXS3 蛋白位于叶绿体、细胞核和细胞质中。



**Figure 5** Phylogenetic analysis of PgDXS with those of other plant species. Sg: *Siraitia grosvenorii*; At: *Arabidopsis thaliana*; Sl: *Solanum lycopersicum*; Ds: *Datura stramonium*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Rg: *Rehmannia glutinosa*; Hb: *Hevea brasiliensis*; Sr: *Stevia rebaudiana*; Aa: *Artemisia argyi*; Mc: *Morinda citrifolia*; Ta: *Trachyspermum ammi*; Gr: *Gentiana rigescens*; Pf: *Primula forbesii*; As: *Aquilaria sinensis*; Gg: *Glycyrrhiza glabra*; Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*; Ds: *Dunaliella salina*; Es: *Ectocarpus siliculosus*; Ng: *Nannochloropsis gaditana*; Ec: *Escherichia coli*; Ba: *Bacillus atrophaeus*; Bl: *Bifidobacterium longum*; Ed: *Eleocharis dulcis*; Zm: *Zea mays*



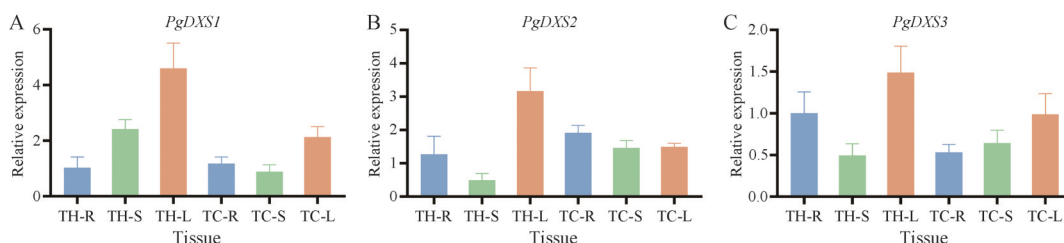
**Figure 6** Prokaryotic expression of PgDXS. A: A1: pET-28a; A2: Uninduced pET-28a-PgDXS1 strain; A3: Whole pET-28a-PgDXS1 strain; A4: pET-28a-PgDXS1 supernatant; B: B1: pET-28a; B2: Uninduced pET-28a-PgDXS2 strain; B3: Whole pET-28a-PgDXS2 strain; B4: pET-28a-PgDXS2 supernatant; C: C1: pET-28a; C2: pET-28a-PgDXS3 strain was not induced; C3: pET-28a-PgDXS3 whole strain; C4: pET-28a-PgDXS3 supernatant. M: Marker



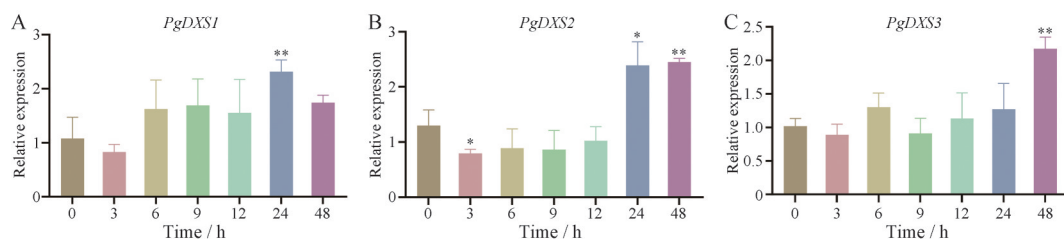
**Figure 7** Subcellular localization of PgDXS1, PgDXS2 and PgDXS3 proteins in *N. tabacum* epidermal cells. GFP is the green fluorescent protein channel; ChlorophyllII is the chloroplast autofluorescence channel; Bright is the brightfield channel; Merged is the merged image of the three channels of GFP, ChlorophyllII and Bright. Scale bar: 50  $\mu$ m

### 5 PgDXS 基因表达水平分析

采用 qRT-PCR 方法检测不同产地不同组织中基因表达水平 (图 8)。PgDXS1、PgDXS2 和 PgDXS3 基因在太和和桐城桔梗根、茎和叶 3 个组织中的表达水平均有特异性。太和桔梗 3 个组织中 PgDXS1 的表达量均高于桐城桔梗, 2 个产区的 PgDXS3 表达量都在叶中最高。3 个基因 PgDXS1、PgDXS2 和 PgDXS3 的表达水



**Figure 8** The gene expression level of PgDXS. A: The gene expression level of PgDXS1; B: The gene expression level of PgDXS2; C: The gene expression level of PgDXS3. TH: Taihe; TC: Tongcheng; R: Root; S: Stem; L: Leaf



**Figure 9** Expression of PgDXS genes under methyl jasmonate (MeJA) stress. A: PgDXS1 gene expression under MeJA stress; B: PgDXS2 gene expression under MeJA stress; C: PgDXS3 gene expression under MeJA stress. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 group

平均在太和桔梗叶中最高, 呈现共性规律。

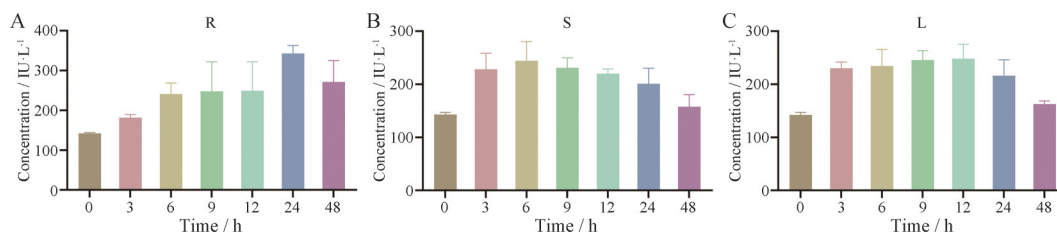
### 6 MeJA 对桔梗 DXS 基因表达及 DXS 酶活性的影响

**6.1 MeJA 对 PgDXS 基因表达量的影响** 在 MeJA 处理 0、3、6、9、12、24、48 h 后提取桔梗根部总 RNA, 测定 PgDXS 基因的相对表达水平 (图 9)。在 MeJA 处理后, PgDXS1 的表达水平在 3 h 时先降低, 随后 9 h 内增高, 24 h 达到最大值, 随后再降低。PgDXS2 的表达水平在 3 h 降低, 随后 12 h 内出现缓慢增高, 在 24 h 显著增加, 48 h 达到最大值。PgDXS3 的表达水平在 3 h 时降低, 6 h 出现增高, 随后在 9 h 降低, 最后 48 h 内逐步增加到最大值。PgDXS 基因表达水平整体呈现先降低后增高的趋势。由此表明, MeJA 处理桔梗植株后, 对 PgDXS 基因的表达量显示不同程度的提高作用。

**6.2 MeJA 对桔梗 DXS 酶活性影响** 在 MeJA 处理 0、3、6、9、12、24、48 h 后, 采用植物 DXS ELISA 试剂盒, 检测桔梗根、茎、叶中 DXS 酶活性 (图 10)。MeJA 处理后, 桔梗的不同组织中 DXS 酶活性均呈现先增加后降低的趋势, 其中, MeJA 处理后桔梗根、茎、叶中 DXS 酶活性分别在 24、6、12 h 达到最大值, 分别约为对照组的 2.4、1.7、1.7 倍。由此表明, MeJA 处理桔梗植株后, 能不同程度地提高桔梗根、茎、叶中 DXS 酶活性。

### 讨论

桔梗是一味中医临床的常用中药, 其主要活性成分是桔梗皂苷, 均属于齐墩果烷型五环三萜类皂苷<sup>[18]</sup>, 通过萜类化合物的生物合成途径产生, 即细胞质中 MVA 途径和质体中的 MEP 途径<sup>[19]</sup>。DXS 是 MEP 途径的第一个关键酶<sup>[20]</sup>。有研究表明, 过量表达 DXS 基因



**Figure 10** DXS enzyme activity of *P. grandiflorum* under MeJA stress. A: DXS enzyme activity in roots; B: DXS enzyme activity in stems; C: DXS enzyme activity in leaves. R: Root; S: Stem; L: Leaf

会提高药用植物中萜类化合物的含量<sup>[21]</sup>。Zhou等<sup>[22]</sup>利用农杆菌介导法诱导获得过表达*SmDXS1*和*SmDXS2*基因的丹参毛状根,用高效液相色谱法测定丹参酮的产量,与对照相比,*SmDXS1*和*SmDXS2*的过表达显著促进了丹参酮在转基因根中的积累,证明了DXS基因对于萜类物质的生物合成的重要性。

DXS基因家族具有较高的保守性,推测DXS基因在高等植物萜类化合物的生物合成途径中具有重要的作用<sup>[23]</sup>。近年来,DXS基因作为调控萜类化合物的生物合成途径的关键酶,在很多富含萜类化合物的药用植物中已有深入研究。Xie等<sup>[24]</sup>从巴戟天根部组织中成功克隆了3个*MoDXS*基因。Zha等<sup>[25]</sup>从厚朴和凹叶厚朴叶中鉴定出2个*MoDXS*基因,系统进化分析显示*MoDXS1*与其他被子植物亲缘关系较近,但*MoDXS2*独聚为一支。Liu<sup>[26]</sup>通过PCR进行cDNA末端快速克隆(RACE)从青蒿中获得了4条编码DXS的基因序列,研究表明,AaDXS1的功能主要是管家基因的作用,AaDXS2和AaDXS3可能参与了青蒿的次生代谢产物的合成,AaDXS4主要参与含量水平较低的MEP途径衍生物的合成。本研究从桔梗中成功克隆了3条DXS基因,生物信息学分析表明PgDXS蛋白属于DXS超家族,PgDXS与其他植物的DXS进行同源性比对结果表明不同植物的DXS蛋白的N端氨基酸序列保守性较差,是序列同源性差异的主要来源。DXS基因通常被分为3类,I型为管家基因;II型基因编码植物特异性的次生代谢产物;III型基因通常存在于植物基因组中,但其所编码酶的功能尚不清晰<sup>[27]</sup>。系统进化树分析表明*PgDXS1*属于I型、*PgDXS2*属于II型、*PgDXS3*属于III型,三者之间存在系统发育距离,推测DXS酶具有不同功能。

目前发现MEP途径的基因表达产物通常定位在质体,许多植物的DXS蛋白亚细胞已有研究,例如巴戟天<sup>[24]</sup>的3种*MoDXS*蛋白与青蒿<sup>[26]</sup>的4种AaDXS蛋白均定位于叶绿体上。本研究结果发现*PgDXS1*和*PgDXS2*蛋白主要定位于叶绿体中,*PgDXS3*蛋白定位于叶绿体、细胞核和细胞质中。3个PgDXS蛋白都在

叶绿体中有定位,而PgDXS3蛋白在细胞核和细胞质中也有定位,推测其生物学功能可能会有所不同。

MeJA作为诱导子近年来常被用于促进多种植物的次生代谢产物研究。Hu等<sup>[28]</sup>研究发现,MeJA通过上调川续断皂苷VI合成关键酶基因的表达量,从而增加川续断皂苷VI的积累。Yao等<sup>[29]</sup>研究发现,MeJA处理鹅掌草根茎在一定程度上对鹅掌草中三萜皂苷含量积累具有促进作用。Zhu等<sup>[30]</sup>研究发现,外施MeJA能促进三七组培苗中总皂苷含量的增加,并在相对较低浓度范围内,三七组培苗中的总皂苷含量与MeJA浓度之间存在着显著正相关关系。在本研究中,MeJA处理桔梗植株后,*PgDXS1*、*PgDXS2*、*PgDXS3*基因在桔梗根部的表达水平在不同的时间点均整体呈现先降低后增高的趋势。同时,桔梗的不同组织中DXS酶活性在MeJA处理后,在不同的时间点却呈现先增加后降低的趋势,不同程度地提高了桔梗根、茎、叶中DXS酶活性。结果表明,MeJA处理对桔梗关键酶PgDXS基因的表达量和DXS酶活性表现出显著的诱导作用,为后期的基因功能研究奠定了基础。

本研究从桔梗中克隆获得桔梗皂苷生物合成途径的关键酶基因,并对其进行生物信息学及原核表达分析,为DXS基因的功能研究及萜类化合物生物合成提供了依据。DXS基因作为MEP途径的关键酶基因,对桔梗萜类化合物合成具有重要调控作用,期望通过以后的研究进一步揭示其表达量与桔梗有效成分含量积累之间的关系。

**作者贡献:** 桂双英和查良平设计实验并提供资金;董楠、余函纹、刘梦丽参与实验及论文撰写;李景、陈博文参与数据分析;常相伟、王举涛提供实验技术支持。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 289.
- [2] Chen DD, Hong T, Wang D, et al. A review of the research on the chemical constituents and pharmacological effects of *platy-*

- codon Grandiflorum* [J]. J Drug Eval (药品评价), 2020, 17: 9-11.
- [3] Xie XX, Zhang C, Zeng JX, et al. Antitussive and expectorant activities and saponin components of various extract fractions from *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. [J]. Chin New Drugs J (中国新药杂志), 2019, 28: 1647-1653.
- [4] Wang B, Gao Y, Zheng G, et al. Platycodin D inhibits interleukin-13-induced the expression of inflammatory cytokines and mucus in nasal epithelial cells [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 1108-1112.
- [5] Yang ZJ, Yang J, Hu X, et al. Migration and invasion effect of platycodin D for HCCLM3 cells [J]. Chin J Cancer Prev Treat (中华肿瘤防治杂志), 2018, 25: 238-242.
- [6] Li Y, Wang G. Strategies of isoprenoids production in engineered bacteria [J]. J Appl Microbiol, 2016, 121: 932-940.
- [7] Kalita R, Patar L, Shasany AK, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Centella asiatica* L. [J]. Mol Biol Rep, 2015, 42: 1431-1439.
- [8] Zhang CG, Ge YY, Liu HH, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *LtuHMGS* in *Liriodendron tulipifera* [J]. J Cent South Univ For Technol (中南林业科技大学学报), 2022, 42: 146-155.
- [9] Liao P, Hemmerlin A, Bach TJ, et al. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production [J]. Biotechnol Adv, 2016, 34: 697-713.
- [10] Bergman ME, Davis B, Phillips MA. Medically useful plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of action [J]. Molecules, 2019, 24: 3961.
- [11] Zheng YJ, Zhou WH, Zhang DQ, et al. Full length cloning and bioinformatics analysis of acetyl-CoA C-acetyltransferase gene in *Osmanthus fragrans* [J]. J Cent South Univ For Technol (中南林业科技大学学报), 2015, 35: 87-92.
- [12] Li R, Chen P, Zhu L, et al. Characterization and function of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) gene related to terpenoid synthesis in *Pinus massoniana* [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 848.
- [13] Pan X, Li Y, Pan G, et al. Bioinformatics study of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) genes in Solanaceae [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46: 5175-5184.
- [14] Yi X, He QL, Liu W. The biosynthesis of diterpenoids from plants [J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2019, 31: 458-472.
- [15] Henriquez MA, Soliman A, LI G, et al. Molecular cloning, functional characterization and expression of potato (*Solanum tuberosum*) 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 1 (*StDXS1*) in response to *Phytophthora infestans* [J]. Plant Sci, 2016, 243: 71-83.
- [16] Gong LT, Su XJ, Yin SS, et al. Cloning, expression analysis and prokaryotic expression of lavender *DXS* gene [J]. Xinjiang Agric Sci (新疆农业科学), 2020, 57: 1233-1242.
- [17] Wang H, Feng GQ, Li ZY, et al. Molecular cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene from *Taxus chinensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 4636-4643.
- [18] Li T, Xu WS, Li XW, et al. Advances in pharmacological studies of *Platycodon grandiflorum* [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2013, 29: 205-208, 223.
- [19] Gai JT, Wang P, Luo HY, et al. Identification, phylogenetic evolution and expression analysis of the mango (*Mangifera indica*) HMGR family genes [J]. Mol Plant Breeding (分子植物育种), 2021, 19: 5279-5285.
- [20] Tong Y, Su P, Zhao Y, et al. Molecular cloning and characterization of *DXS* and *DXR* genes in the terpenoid biosynthetic pathway of *Tripterygium wilfordii* [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16: 25516-25535.
- [21] Enfissi EM, Fraser PD, Lois LM, et al. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato [J]. Plant Biotechnol J, 2005, 3: 17-27.
- [22] Zhou W, Huang FF, Li S, et al. Molecular cloning and characterization of two 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase genes involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Mol Breed, 2016, 36: 124-136.
- [23] Gai JT, Wang P, Ye XX, et al. Identification of *Mangifera indica* *DXS* gene and comparison analysis with other plants [J]. Mol Plant Breeding (分子植物育种), 2019, 17: 46-54.
- [24] Xie DJ, Zhou CC, Yang K, et al. Cloning and analysis of *MoDXS* gene and its promoter in *Morinda officinalis* [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2021, 48: 577-589.
- [25] Zha LP, Yang J, Liu S, et al. Identification of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase and analysis on essential oil in *Magnolia officinalis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 3734-3739.
- [26] Liu WH. Study on Functional Differentiation of *AaDXS* Gene Family and Molecular Mechanism of Low Temperature Improving Artemisinin Production in *Artemisia annua* L. (青蒿 *DXS* 基因家族功能分化及低温促进青蒿素合成的分子机制研究) [D]. Chongqing: Chongqing University, 2016.
- [27] Zhang HY, Fan JM, Wang T, et al. Advances on key gene *DXS* involved in the terpenoid biosynthesis in plants [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2018, 34: 1-8.
- [28] Hu ZP, Xu J, Zhou T, et al. Methyl jasmonate stimulates the synthesis and accumulation of asperosaponin VI in the roots of *Dipsacus asper* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 2302-2307.
- [29] Yao SQ, Cao S, Hou SH, et al. Effects of methyl jasmonate on the accumulation of triterpenoid saponin flaccidoside II in *Anemone flaccida* [J]. J Hubei Univ Chin Med (湖北中医药大学学报), 2021, 23: 38-41.
- [30] Zhu HT, Li J, Li Y, et al. Effects of methyl jasmonate on the content of total saponin in tissue culture seedlings of *Panax notoginseng* [J]. J West China For Sci (西部林业科学), 2014, 43: 72-78.