

巴戟天 *MoDXR* 基因及其启动子的克隆与分析

谢德金¹, 叶友杰¹, 杨德明¹, 张娅欣¹, 何天友², 陈礼光¹, 郑郁善^{1,2*}

(1. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学园林学院, 福建 福州 350002)

摘要: 从巴戟天中克隆 MEP 途径中的 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸还原异构酶基因 *MoDXR* 及其启动子序列, 并进行生物信息学分析、启动子区顺式作用元件分析, 以及进行原核表达分析。根据巴戟天转录组中 DXR 基因原始序列和 NCBI-ORFfinder 分析, 设计特异性引物, 并进行 RT-PCR 扩增和生物信息学分析; 采用染色体步移克隆 *MoDXR* 基因的 5'端启动子序列; 通过亚细胞定位分析 *MoDXR* 基因在细胞中的位置; 构建原核表达载体 pET-28a-*MoDXR*, 导入 BL21(DE3) 表达感受态细胞后, 在 IPTG 诱导下表达。从巴戟天中克隆的 *MoDXR* 基因, 其 cDNA 全长 2 015 bp, 预测的阅读框大小为 1 425 bp, 编码 474 个氨基酸, 分子质量为 51.27 kDa; BlastP 序列比对分析表明 *MoDXR* 基因与其他植物的 DXR 基因具有高度同源性, 如: 咖啡树 DXR (*CaDXR*)、萝芙木 DXR (*RvDXR*); 系统进化发育树分析显示, 巴戟天 *MoDXR* 蛋白与小粒咖啡和栀子的 DXR 蛋白聚为一类, 其亲缘关系最近; 由亚细胞定位可知 *MoDXR* 基因所编码的蛋白定位于叶绿体上; *MoDXR* 基因 5'端启动子序列长度为 1 493 bp, 包含了与光响应、胁迫响应和激素响应有关的多种调控元件; SDS-PAGE 结果表明 pET-28a-*MoDXR* 重组蛋白的大小与预期相符, 但是以不溶性的包涵体的形式表达。成功克隆了 *MoDXR* 基因及其启动子序列并对其进行生物信息学分析和启动子区顺式作用元件分析; 后期需要优化 *MoDXR* 原核表达体系, 为进一步纯化 *MoDXR* 蛋白, 研究其结构和功能奠定基础。

关键词: 巴戟天; 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因; 启动子; 生物信息学分析; 原核表达

中图分类号: Q756;Q812 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)02-0335-10

Cloning and analysis of the DXR gene and its promoter in *Morinda officinalis*

XIE De-jin¹, YE You-jie¹, YANG De-ming¹, ZHANG Ya-xin¹, HE Tian-you²,
CHEN Li-guang¹, ZHENG Yu-shan^{1,2*}

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002, China;

2. College of Landscape, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002, China)

Abstract: The objective of this research was to clone 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene (*MoDXR*) and its promoter sequence from *Morinda officinalis* and carry out bioinformatic analysis, *cis*-acting elements analysis, and prokaryotic expression. On the basis of the *MoDXR* gene sequence obtained from the *M. officinalis* transcriptome and with NCBI-ORFfinder analysis, a pair of specific primers were designed, and used for RT-PCR amplification. The promoter region sequence at the 5' end of *MoDXR* gene was isolated by the genome walking technique. Localization of *MoDXR* was carried out by subcellular analysis. The prokaryotic expression plasmid pET-28a-*MoDXR* was constructed and transfected into *Escherichia coli* BL21(DE3) chemically-competent cells; the recombinant plasmid expressed fusion protein after the induction by IPTG. The full-length cDNA of *MoDXR* was 2 015 bp, and open reading frame (ORF) size was 1 425 bp, and it encoded 474 amino acid residues and had a molecular mass of 51.27 kD. Sequence comparison with BlastP to the NCBI database revealed that *MoDXR* had high sequence similarity with many other DXRs, such as *Coffea arabica* DXR (*CaDXR*) and *Rauvolfia*

收稿日期: 2019-09-02; 修回日期: 2019-10-17.

基金项目: 福建省科技创新平台资助 (2008Y2001).

*通讯作者 Tel: 86-591-83856104, E-mail: zys1960@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0707

verticillata DXR (*RvDXR*). A phylogenetic tree revealed that *MoDXR* had its closest relationship with DXR from *Coffea arabica* and *Gardenia jasminoides*. The subcellular localization revealed that *MoDXR* protein was located on the chloroplast. Plantcare analysis indicated that the promoter region sequence of *MoDXR* was 1 493 bp, covering multiple light, stress, and hormone-responsive *cis*-regulatory elements; protein electrophoresis showed that the expressed protein was the anticipated size. This research lays the foundation for further purification and structural and functional characterization of the *MoDXR* protein.

Key words: *Morinda officinalis*; 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; promoter; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

茜草科的巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 为我国四大南药之一, 收录于中国药典, 以干燥根入药, 其生物活性成分以蒽醌类、环烯醚萜类和寡糖类为主, 具有补肾阳, 强筋骨, 祛风湿的功效^[1-5]。除此之外, 也有文献显示巴戟天中的蒽醌类物质对肝癌细胞有一定的抑制作用^[6]。巴戟天的生物活性成分中的茜草素型蒽醌类有机物的合成需要莽草酸途径和产生活性异戊二烯的甲基赤藓醇磷酸途径 (MEP) 或甲羟戊酸途径 (MVA) 的相互结合^[7]。莽草酸途径主要是形成茜草素型蒽醌的 A 环和 B 环, 而关于 C 环的形成前人认为以 MEP 途径为主^[8]。1-脱氧-*D*-木酮糖 5-磷酸还原异构酶基因 (DXR) 作为 MEP 途径的限速酶, 能够使 1-脱氧-*D*-木酮糖 5-磷酸 (DXP) 异构化为 MEP^[9,10]。关于植物中 DXR 基因的研究从最早的拟南芥^[11]、玉米^[12]、番茄^[13]到药用植物香樟^[14]、杜仲^[15]、长春花^[16]、丹参^[17]、雷公藤^[18]等物种已多有文献报道。茜草科的栀子^[19]、小粒咖啡^[20]、茜草^[21]的 DXR 基因也在近几年陆续被研究。在烟草中, 利用叶绿体转基因技术, 过表达 DXR 基因, 可以显著增加细胞中类异戊二烯的含量, 如: 叶绿素 a、胡萝卜素、叶黄素、玉米黄质及 β -谷甾醇等^[22]。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 敲除烟草中的 DXR 基因后, 转基因烟草呈现白化表型, 这也证明了 DXR 基因参与到了烟草的叶绿素合成的过程中^[23]。

现阶段巴戟天的研究主要集中在化学成分、提纯工艺、药理及栽培种植等方面, 对于巴戟天重要活性成分的生物合成途径相关基因的研究鲜有报道。本研究根据巴戟天的 DXR 原始转录组数据, 设计 *MoDXR* 基因的特异扩增引物, 利用 RT-PCR 技术从巴戟天根部组织中成功扩增到了 *MoDXR* 基因及其启动子序列, 并对其进行了生物信息学分析、启动子区顺式作用元件分析和原核表达分析。这为下一阶段通过转基因方法大幅提高巴戟天中茜草素型蒽醌类的含量提供了理论的可能, 并且丰富巴戟天的分子生物理论方面的研究。

材料与方法

材料 巴戟天植株栽植于福建农林大学园林学院

温室, 实验材料为 2 年生巴戟天的幼苗。经福建农林大学林学院邹小兴教授鉴定为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How。

试剂 总 RNA 提取试剂盒 (DP441) 和质粒提取试剂盒均购自天根生化科技有限公司, 反转录试剂盒 (6210A)、无缝克隆 (in-fusion HD cloning kit)、TB Green Premix Ex TaqII、Genome Walking Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司, 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司, DNA polymerase 分别购自 TOYOBO 公司的 KOD-Plus-Neo 酶和 TaKaRa 公司的 primestar max DNA Polymerase (045A), FastDigest EcoRI 限制性内切酶购自 Thermo-Fisher Scientific 公司, GV3101 根癌农杆菌化学感受态细胞、DH5 α 克隆感受态细胞和 BL21(DE3) 表达感受态细胞均购自上海唯地生物有限公司, 1 kb plus DNA marker 和卡那霉素均购自索莱宝公司, pCambia2300-35s-eGFP 双元表达载体和原核表达载体 pET-28a 由福建农林大学原料林研究所分子实验室保存, pEASY-T5 Zero Cloning Kit 载体和 Trans1-T1 感受态均购自北京全式金生物有限公司。

总 RNA、DNA 的提取和反转录 cDNA 第一链合成 按照总 RNA 提取试剂盒说明书和反转录试剂盒说明书的操作步骤分别提取巴戟天根、茎、叶 3 个组织部位的总 RNA, 并反转录合成相应的 cDNA 第一链, 后将原始浓度 cDNA 浓度调整至 100 ng· μ L⁻¹ 左右。采用 CTAB 法提取巴戟天的 DNA, 并进行浓度测定和琼脂糖凝胶电泳检测。

***MoDXR* 基因 ORF 区克隆** 由巴戟天转录组数据分析得到关于 *MoDXR* 基因的核心片段, 使用 Primer Premier5 软件分别设计 5'-RACE 和 3'-RACE 特异性扩增引物, 经 PCR 扩增的产物纯化后与 pEASY-T5 Zero Cloning Kit 载体连接后转化涂板, 菌液 PCR 验证后送福州铂尚测序公司测序, 测序后的序列使用 DNAMAN 软件进行拼接, 最终得到 *MoDXR* 基因的全长 cDNA 序列。使用 NCBI-ORFfinder 预测 *MoDXR* 基因的开放阅读框。根据预测的 *MoDXR* 基因的 ORF 区序列和原核表达载体 PET-28a 限制性酶切位点 EcoR I 序列设计

MoDXR 基因的一对特异性扩增引物 (表 1), KOD 酶反应体系 (50 μL): ① KOD-Plus-Neo 1 μL , MgSO_4 4 μL , dNTPs 5 μL , 10 \times PCR Buffer 5 μL , 引物各 1.5 μL , cDNA 模板 2 μL , ddH₂O 30 μL 。PCR 扩增反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共 30 个循环; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。② TaKaRa primeSTAR max 反应体系 (50 μL): primeSTAR max Premix 25 μL , 引物各 2 μL , cDNA 模板 2 μL , ddH₂O 19 μL 。PCR 扩增反应程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 100 s, 共 35 个循环。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检验合格后, 用 OMEGA 的 DNA 胶回收试剂盒纯化 PCR 扩增产物。

***MoDXR* 基因生物信息学分析** NCBI 的 ORFfinder 分析预测基因的开放阅读框; 使用 NCBI-BlastP、DNAMAN、NCBI-CDD 和 InterPro 软件进行蛋白序列的同源比对和保守结构域分析; 利用 MEGA7.0 软件的 Neighbor-Joining 法对巴戟天和其他植物 DXR 蛋白进行聚类分析; 运用在线工具 Rare Codon Caltor 进行稀有密码子预测; 运用在线处理软件 ExPASy-Protparam、ExPASy-ProtScale 和 NetPhos3.1server 分析预测 *MoDXR* 基因的所编码的氨基酸序列组成、理化性质、亲疏水性及磷酸化修饰位点; 分别用在线工具 TMHMMserver 2.0、SignalP 分析和预测跨膜结构域及信号肽分析; 运用 WoLF PSORT 在线工具进行 *MoDXR* 蛋白的亚细胞定位分析; 运用 ChloroP 在线工具预测叶绿体转运肽存在与否; 分别用在线工具 SOPMA 和 SWISS-MODEL 预测 *MoDXR* 蛋白的二级和三级结构; 运用 plantCARE 在线分析工具进行基因启动子区顺式作用元件分析。

***MoDXR* 亚细胞定位分析** 将 *MoDXR* 基因序列的终止密码子除去并进行克隆, 后将克隆片段与线性化质粒载体 pCAMBIA2300-35s-eGFP 连接。将 pCAMBIA2300-35s-*MoDXR*-eGFP 和 pCAMBIA2300-35s-eGFP (对照) 分别侵染烟草幼苗, 用 ZEISS Observer

A1 倒置荧光显微镜分别在 Fs 14HE (激发光: 510~560 nm) 通道观察叶绿体荧光信号, 和用 GFP (激发光: 470 nm) 通道观察 GFP 荧光信号。

***MoDXR* 基因启动子的分离** 依据 *MoDXR* 基因的 CDS 序列, 利用 Primer primer5.0 软件从 ATG 起始密码子下游 600 bp 内设计 3 条退火温度较高的特异性引物 (SP1、SP2 和 SP3) 进行巢式 PCR 反应 (表 1)。SP3 在 SP2 内侧, SP2 在 SP1 内侧, 与试剂盒提供的 4 种退火温度较低的兼并性引物 (AP1、AP2、AP3 和 AP4) 进行 3 次热不对称 PCR 反应。取上述 3 次 PCR 反应液 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收第 3 次 PCR 扩增产物, 将回收的 PCR 产物与 pEASY-T5 Zero 载体连接并测序。

***MoDXR* 基因原核表达载体构建** 挑取已导入 DH5 α 的 pET-28a 质粒载体单克隆, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 摇菌, 经菌落 PCR 验证后抽提质粒。用 FastDigest EcoRI 限制性内切酶单酶切 PET-28a 环状质粒载体, 反应体系 (20 μL): 质粒 17 μL (≤ 1 μg), FastDigest EcoRI 1 μL , 10 \times FastDigest Buffer 2 μL 。酶切反应程序: 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 80 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检验合格后, 用 OMEGA 的 DNA 胶回收试剂盒纯化酶切产物。将纯化的 *MoDXR* 基因扩增产物与线性化的载体 pET-28a 用 in-fusion 的方法重组连接并转化到 DH5 α 克隆感受态细胞中, 涂板并挑单克隆。37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 摇菌后, 经菌落 PCR 验证后, 送至铂尚生物技术公司测序, 最终将测序正确的 pET-28a-*MoDXR* 原核表达载体提取质粒后导入至 BL21(DE3) 表达感受态细胞中, 挑取部分单克隆加到含 5 mL 2 \times YT (含 kan) 培养基中的 50 mL 离心管中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下, 大约 3 h 后将菌液吸光度 (A) 值控制在 0.8 左右。1 500 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 倒掉上清, 重新加入含 kan 的 5 mL 2 \times YT 培养基, 再加入 100 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG, 使其终浓度为 1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 22 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下分别诱导 1~5 h 后提取蛋

Table 1 Primer sequences

Primer	Primer sequences	Usage
MoDXR-5' RACE	R1: 5'GCCATCCCAGTTGAGCCAATACA3' R2: 5'GGGCAAGAGGAAGGACAAAAGGA3'	5'RACE
MoDXR-3' RACE	F1: 5'GTTGGGAGGGTCCTAAGCCTATTTTC3' F2: 5'GTCACGGGAATTGTAGGGTGTGC3'	3'RACE
MoDXR	F: 5'ATGGGTCGCGGATCCGAATTCAATGGCTTTGAATTTGTTGACACC3' R: 5'TTGTCGACGGAGCTCGAATCTTATACGAGAGCAGGACTCAAACCA3'	Cloning
qPCR	F: 5'GCCTTGATCTTTGCAAGCTAGG3' R: 5'ATTTGCTGCACTCAGAACGC3'	qRT-PCR
Elongation factor 1 α (ef1 α)	F: 5'GGCTGCCGAGATGAACAA3' R: 5'CTCAAACCTCCACAAGGCAATA3'	Reference gene
MoDXR Specific Primer	SP1: 5'ACAGTTGCCCGCAGTCTTTTC3' SP2: 5'CCTTGAAAGTAAGTGTCCGTCTCT3' SP3: 5'GCAATCCAATTCAAATCAGCGAAGC3'	Thermal asymmetric interlaced PCR
MoDXR-SL	F: 5'ATTTGGAGAGGACAGGGTACCATGGCTTTGAATTTGTTGACACC3' R: 5'AGTGTGACTCTAGAGGATCTACGAGAGCAGGACTCAAACCA3'	Subcellular localization

白,将处理的样品各取 20 μL 经 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮兰染色,检验 *MoDXR* 蛋白表达情况。

***MoDXR* 基因表达量分析** 根据巴戟天转录组数据用 primer primer5 软件设计巴戟天内参基因和 *MoDXR*-qRT-PCR 的引物,经过巴戟天内参基因筛选验证,最终选择 elongation factor 1-alpha (*ef1 α*) 作为巴戟天的内参基因,其扩增效率为 97.836%,以及线性相关系数 $R^2=0.995$,扩增片段大小为 109 bp。*MoDXR*-qRT-PCR 引物扩增片段大小 131 bp (表 1)。两对引物熔解曲线为单峰,引物无二聚体,特异性良好。qRT-PCR 扩增体系 (20 μL): TB Green Premix Ex Taq 10 μL , 正反引物各 0.8 μL , RoxII 0.4 μL , cDNA 2 μL (100 ng· μL^{-1}), ddH₂O 6 μL 。扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 共 40 个循环; 熔解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。每个样品做 3 个平行实验,并做 3 个生物学重复,后用 Ct(2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$}) 法计算 *MoDXR* 基因在巴戟天根、茎、叶 3 个不同组织中的相对表达量。

结果与分析

1 巴戟天 *MoDXR* 基因克隆

按照 SMARTer RACE 5'/3'kit 试剂盒说明书操作步骤对 *MoDXR* 基因分别进行 5'/3'-RACE 扩增,经测序和拼接后得到片段长度为 2 015 bp 的全长 cDNA 序列,后经 Blastp 比对分析,确认所获得的片段为 DXR 基因,NCBI 的 ORFfinder 分析预测 *MoDXR* 基因的 cDNA 开放阅读框大小为 1 425 bp,编码 424 个氨基酸。以巴戟天的 cDNA 为模板,对 *MoDXR* 基因的 ORF 区进行克隆,经两种 PCR 聚合酶扩增和琼脂糖凝胶电泳检测,条带出现在 1 500 bp Marker 左右,大小与预期相符(图 1)。将两种方法纯化的克隆片段连接到 pET-28a 载体上,挑取部分阳性单克隆测序,最终验证 *MoDXR* 基因 ORF 序列与转录组数据相同。

2 巴戟天 *MoDXR* 生物信息学分析

根据巴戟天 *MoDXR* 基因的测序碱基序列用 NCBI 的 ORFfinder 分析预测 *MoDXR* 基因的 cDNA 开放阅读框大小为 1 425 bp,编码 424 个氨基酸(图 2)。

将巴戟天的 *MoDXR* 所预测的氨基酸序列用 NCBI 的 BlastP 进行同源序列比对,结果(图 3)表明巴戟天的 *MoDXR* 基因编码的氨基酸序列与罗芙木 (*RvDXR*)、咖啡树 (*CaDXR*)、梔子 (*GjDXR*) 和桂花 (*OfDXR*) 的同源性都在 90% 以上,其中与咖啡树的同源性高达 91.81%,而与桑树的同源性只有 85.35%,这说明 *MoDXR* 属于植物 DXR 蛋白家族。从不同物种的 DXR 氨基酸序列比对结果还可以看出 DXR 蛋白的 C 端相较于 N 端有高的保守性,DXR 氨基酸序列同源性差异主要来自于

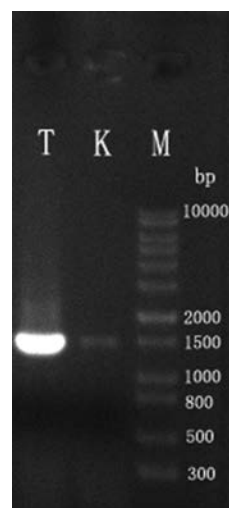


Figure 1 PCR amplification product of *MoDXR* gene. M: 1 kb plus DNA marker; T: PCR amplification product of TaKaRa; K: PCR amplification product of KOD

N 端,而 N 端主要是大部分植物 DXR 蛋白的质体转运肽所在区域。由 NCBI-CDD 和 InterPro 保守结构域分析可知巴戟天的 *MoDXR* 蛋白含有 3 个结构域(图 3): 第 80~208 位氨基酸残基组成的 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, N-terminal 结构域,第 222~305 位氨基酸残基组成的 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, C-terminal 结构域,第 337~458 位氨基酸残基组成的 DXP reductoisomerase C-terminal domain。

利用 MEGA7.0 软件的 Neighbor-Joining 法对 *MoDXR* 氨基酸序列和其他具有较高同源性的 DXR 氨基酸序列的植物进行系统进化分析,结果(图 4)显示,巴戟天的 DXR 氨基酸序列与咖啡树和梔子聚为一类,其亲缘关系最近,都属于茜草科的植物,而与葡萄、桑、可可、陆地棉、雷公藤、木薯和毛果杨的亲缘关系较远。

MoDXR 基因氨基酸组成及其理化性质经由 ExPASy-ProtParam 分析可得: *MoDXR* 基因所编码的蛋白的分子质量为 51.27 kDa,理论等电点为 5.93,氨基酸组成中亮氨酸 (Leu)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、异亮氨酸 (Ile) 的比例较高,分别为 10.3%、9.9%、8.0% 和 7.4%。带负电荷的氨基酸残基 (Asp+Glu) 占 11.4% (54aa),带正电荷的氨基酸残基 (Arg+Lys+His) 占 12.3% (47aa)。其不稳定系数为 34.97,被划分为稳定的蛋白。总平均疏水系数 (GRAVY) 为 0.026。具体到每个氨基酸残基的亲疏水性分析,结合 ProtScale 在线工具的亲水性/疏水性的预测结果显示, *MoDXR* 基因所编码的氨基酸序列的 N 端部分序列表现出亲水性,而且整体的趋势是中心和靠近 C 端部分序列,疏水性氨基酸的比例偏高,

```

ACATGGGAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGCAAAATAACACAT TCAAATGTTGGCAGGCTCACGGACTTGGCAACCAAGTGTGCA
AAGAATAACTCGCTTTTCTGAACCTTTTCAGGCCGAAGGCTAGTTTGTTCG TTGCAAGTCTTCTTAAAAGAAAGATCTCATAGAGTAGATTAAG
CTCAAATTTGAAAAGTGTGGAGGGTTTTGGTGGTGAAGTTATT
1 ATGGCTTGAATTTGTGACACCACTGAAATCAAGAGCATTCTTCTGGAT TCTTCAAAGTCAAATFACAACCTTAATCTCTCAAG
M A L N L L L T P T E I K S I S F L D S S K S N Y N L N L L K 30
91 CTTC AAGGTGGAAATTTCTTAAAAGAAAGACTGGGGCACTGTTGGGAAGAAAATCAATGTTCCACAGTGCCACCTCTCCAGCA
L Q G G I S L K R K D C G A T V G K K I Q C S T V P P P P A 60
181 TGCCAGGACGGCTGTGCAGAACCTGGTGGAGAGTTGGAGGGTCTTAAGCCTATTTCAAGTGTGGATCAACAGGTTCCATGGT
W P G R A V A E P G R K S W E G P K P I S V V G S T G S I G 90
271 ACTCAGACTCGACATAGTTGCTGAGAATCCGGACAAATTTAGAGTTGTTGCACTTGCAGCTGGTTCAAATGACTCTTCTTCTGAT
T Q T L D I V A E N P D K F R V V A L A A G S N V T L L A D 120
361 CAGGTCAAGACATCAAACCTCAATTAAGTGGCTGAAGAAATGAGA CATTAGTTGACGAACCTGAAAGAGGCTTTGGCTGATGTTGAAC
Q V K T F K P Q L V A V R N E T L V D E L K E A L A D V E H 150
451 AAACCTGAAATTTCTGGAGAACGGGCTCATTAGGAGTCCGCCATCCGATGCTGTTACAGTGTCAAGGGAATGTAGGGTGT
K P E I I P G E Q G V I E V A R H P D A V T V V T G I V G C 180
541 GCAGGCTCAAGCCAACAGTGGCTGCATAGAACTGGAATAGACA TTGCTTTGGCTAATAAAGAGACGCTAATTGCCGGTGGCTTTT
A G L K P T V A A I E A G I D I A L A N K E T L I A G G P F 210
631 GTCCTTCTCTGCCCAAAACAAAGTGAAGTACTTCTGCTGATTCAGAACATTCGCTATATTCAGTGCATACAAGGTTGGCT
V L P L A H K H K V K I L P A D S E H S A I F Q C I Q G L P 240
721 GAGGGTGGCTCCGGCAATCTTTAAGCAGCATCTGGGGTGGCTT TTAGGGATTTGCCGTAGAAAAGTTGAAAGAGTTAAAGTAGCA
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 270
811 GATGCTTGAAGCATCTAATGGAACTGGGAAAGATTACTG TGGATCTGCCACCTATTTAATAAGGGTCTTGAAGTATTGAG
D A L K H P N W N M G K K I T V D S A T L F N K G L E V I E 300
901 GCCATTATCTTTATGGGGTGCATGATAACATTGAAATCGTTA TTCACCCCAATCCATACATCTATGTTGAAACACAGGAT
A H Y L Y G A D Y D N I E I V I H P Q S I I H S M V E T Q D 330
991 TCGTCTGATTTGGCTCAACTGGGATGGCTGATATGCGTTG CCAATCTTTACACCATGCTGCCAGAGAGGATTTACTGTTCTGAG
S S V L A Q L G W P D M R L P I L Y T M S W P E R I Y C S E 360
1081 ATAAGTGGCCCGCTTGTATCTTTGCAAGCTAGGTTCTTGCAT TCAAATCGCTGATAATGTGAAGTACCCATCAATGGACCTGGCA
I T W P R L D L C K L G S L T F K S P D N V K Y P S M D L A 390
1171 TATGCTGCTGGTGCAGCTGGAGGACCATGACTGGCTTCTGAG TG CAGCAATGAGAAGCTGTTGAGATGTTCAATCAATGAAAAATC
Y A A G R A G G T M T G V L S A A N E K A V E M F I N E K I 420
1261 AGCTATCTGACATTTTCAAGTTGTGGAGTGCATGCGAGAAGC ATCAAGCAGAACTGGTGTCTTCCATCTCTCGAGGAAATCATA
S Y L D I F K V V E M T C E K H Q A E L V S S P S L E E I I 450
1351 CACTTGTACTGTGGCCAGCTGACTATGCTGCCAATTTGCAAC CTTGCTGGTTGAGTCTGCTCTGTAATA
H F D L W A R D Y A A N L Q T S A G L S P A L V * 474
GGAAACAGGTGGCCATGGTGAACCTAGAGGCGCCTTTTGTCTT CTTA TGAGGATATCTTACAACCTGGATAGAATGAACGGTGGAGTTGGA
TGCAATGTATCATATCACTCAAATGAAATGAAAGAGCTTCTTAAT GT TCGATAATTTGGGTTATAAATTTCTATTATGAGCAACTATGC
GTGAAGCAGAGTTCAAGAGTTGGCAAAGTGAAGATTGTGATAGGAA CAT AACGCAAACTGGTGGATGCTAAAAGAACACAACTTTCCCGGG
CAITTCITTTGGAGAAATGAAAAAGTTTATTATACAGCAAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA AAAAAA

```

Figure 2 ORF of *MoDXR* gene and the predicted open reading frame

其中疏水性和亲水性最强的位点分别是第 174 位和 75 位, 整体趋向疏水性。这为接下来的蛋白质折叠和蛋白质二级结构预测提供了参考。

经 Rare Codon Caltor 在线工具预测 *MoDXR* 基因所编码的氨基酸序列中稀有密码子的比例为 8.6%, 选择 BL21(DE3) 表达感受态细胞用于 *MoDXR* 基因的原核表达分析。NetPhos3.1server 分析 *MoDXR* 基因所编码的氨基酸序列发现, 有 10 个可信度高的磷酸化位点, 包含 8 个丝氨酸 (Ser)、1 个苏氨酸 (Thr) 和 1 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点。这 10 个可信度高的磷酸化位点都没有特定的修饰激酶, 这说明 *MoDXR* 基因所编码的氨基酸序列不仅有较多的磷酸化位点而且修饰类型丰富。

SignalP 在线分析软件结果显示: 预测 *MoDXR* 基因可能存在信号肽位点的 C、S 和 Y 值都小于 0.2, 说明其不存在信号肽位点, 属于非分泌型蛋白。TMHMM 跨膜分析软件结果显示 *MoDXR* 基因所编码的氨基酸序列全部在膜外, 没有跨膜结构域, 不属于跨膜蛋白。

WoLF PSORT 在线工具亚细胞定位分析结果显示: *MoDXR* 蛋白可能定位于叶绿体上, 而 ChloroP 在线工具预测 *MoDXR* 基因所编码的氨基酸序列中不存在叶绿体转运肽, 但仍预测前导肽的长度为 66 个氨基酸残基。

在线工具 SOPMA 对 *MoDXR* 蛋白的二级结构预测结果显示: 该蛋白的二级结构中 α 螺旋 (H)、 β 折叠 (E)、 β 转角 (T) 和无规则卷曲 (C) 的数量分别为:

168 (35.44%)、95 (20.04%)、38 (8.02%) 和 173 (36.50%)。SWISS-MODEL 预测的三级结构的图 5 中显示, 该蛋白主要是有 α 螺旋和无规则卷曲组成。

3 巴戟天 *MoDXR* 基因启动子区顺式作用元件分析

依据 *MoDXR* 基因的 CDS 序列设计 3 条特异性引物, 采用染色体步移的方法克隆得到了 *MoDXR* 基因 5' 端上游启动子区的长度为 1 493 bp (图 6)。由 plantCARE 在线分析软件分析结果可知 (表 2), 在 *MoDXR* 基因上游启动子区中含有基本启动子元件 CAAT-box 和 TATA-box; 多个光响应顺式作用元件, 如: AE-box、Box 4、Box II、G-box、GA-motif 和 TCT-motif; 与低温胁迫相关的响应元件 LTR; 参与防御和胁迫响应的顺式作用元件 TC-rich repeats; 厌氧诱导顺式作用元件 ARE; 还存在多种激素响应元件, 如: 脱落酸响应元件 ABRE、茉莉酸甲酯诱导顺式作用元件 CGTCA-motif、生长素响应元件 TGA-element; 此外, 还有与转录因子 MYB、MYB-like、Myb 和 MYC 结合位点有关顺式作用元件, 说明上述顺式作用元件能够响应外界环境的变化, 从而调控 *MoDXR* 基因的表达变化。

4 *MoDXR* 亚细胞定位分析

将 pCAMBIA2300-35s-eGFP (对照) 和构建的融合表达载体 pCAMBIA2300-35s-*MoDXR*-eGFP 分别侵染烟草幼苗, 验证含 eGFP 荧光信号的 *MoDXR* 蛋白在细胞中的定位。在 470 nm 激发光下可以观察到 GFP

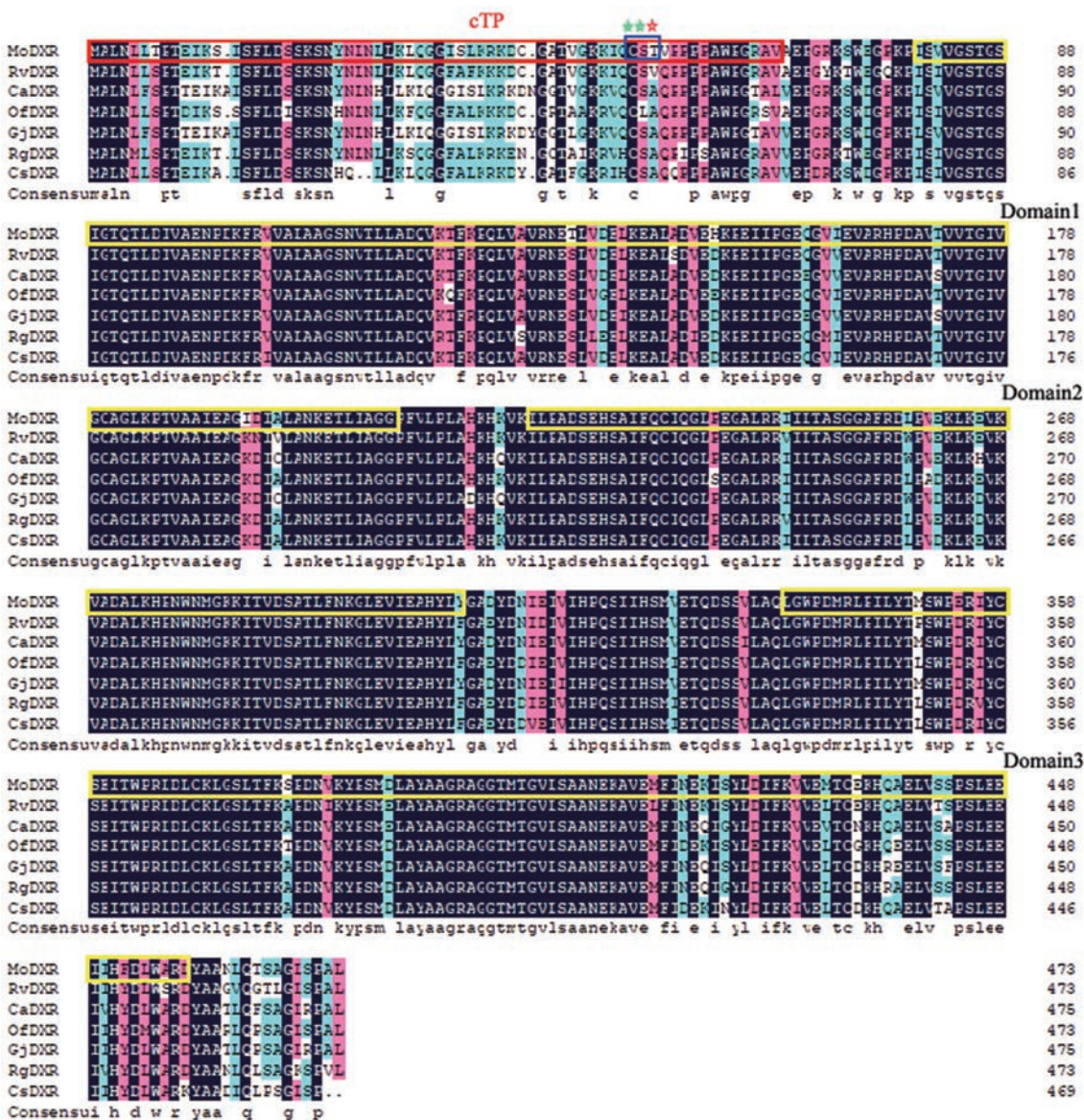


Figure 3 Multiple amino acid sequence alignments of DXR between *Morinda officinalis* and other plants. Mo: *Morinda officinalis*; Rv: *Rauvolfia verticillata*; Ca: *Coffea arabica*; Of: *Osmanthus fragrans*; Gj: *Gardenia jasminoides*; Rg: *Rehmannia glutinosa*; Cs: *Camellia sinensis*

绿色荧光信号, 在 510~560 nm 激发光下 (Fs 14 HE 通道) 可以观察到叶绿体自发荧光信号。由图 7 的 A、B 和 C 可知 pCAMBIA2300-35s-eGFP 空载含有的 eGFP 绿色荧光蛋白能够在 470 nm 激发光下产生绿色荧光信号, 但是没有定位功能, 在细胞质和细胞核中都能够观测到绿色荧光信号。由图 7D 可知在 470 nm 激发光下 pCAMBIA2300-35s-*MoDXR*-eGFP 融合表达载体能够检测到绿色荧光信号, 而在 510~560 nm 激发光下可以观察到叶绿体自发的暗红色的荧光信号 (图 7E), 将图 7 的 D 和 E 融合后, 融合表达载体绿色荧光信号和叶绿体自发的暗红色的荧光信号相一致, 表明 *MoDXR* 蛋白定位于叶绿体上。

5 巴戟天 *MoDXR* 蛋白原核表达分析

经 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮兰染色, pET-28a-*MoDXR* 重组蛋白在第 1~5 h 的表达情况显示 (图 8 左): 与未经 IPTG 诱导的对照 (C) 相比, pET-28a-*MoDXR* 重组蛋白分别在 1~5 h 内成功表达, 蛋白条带大小 (含 His 标签) 位于 55~72 kDa 之间, 与实际大小相符。在 22 °C、180 r·min⁻¹ 条件下, 菌液经 IPTG 诱导 1 h 后超声破碎, 用免疫磁珠的方法纯化 pET-28a-*MoDXR* 重组蛋白, 结果显示重组蛋白在沉淀中表达, 上清液中没有检测到 *MoDXR* 重组蛋白, 说明 pET-28a-*MoDXR* 在上述条件下主要在细胞质中以不溶性的包涵体的形式表达 (图 8 右)。

Table 2 List of *cis*-acting elements in upstream promoter element of *MoDXR*

Element name	Location	Function
ABRE	288 (-), 1 164 (-)	Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
AE-box	1 423 (+)	Part of a module for light response
ARE	417 (+), 1 293 (+), 783 (+)	Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
AT-rich element	1 055 (+)	Binding site of AT-rich DNA binding protein (ATBP-1)
Box 4	175 (+)	Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
Box II	1 163 (+), 287 (+)	Part of a light responsive element
GA-motif	670 (+)	Part of a light responsive element
TCT-motif	533 (-)	Part of a light responsive element
CAAT-box	27 (-), 41 (-), 135 (+), 172 (+), 352 (-), 376 (-), 395 (-), 225 (+), 434 (+)	Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
TATA-box	57 (+), 305 (+), 411 (-), 671 (+), 1 180 (+), 1 181 (-), 1 287 (-)	Core promoter element around -30 of transcription start
CGTCA-motif	325 (+), 404 (-), 502 (+), 680 (+), 1 201 (+), 1 280 (-)	Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGA-element	767 (+)	Auxin-responsive element
LTR	445 (+)	Cis-acting element involved in low-temperature responsiveness
G-box	288 (-), 285 (+), 1 161 (+), 1 164 (-)	Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
MBS	816 (+)	MYB binding site involved in drought-inducibility
MYB, MYB-like	168 (+), 261 (+), 438 (+), 616 (+), 855 (+), 960 (+), 1 032 (+), 1 137 (+)	MYB transcription factor binding site
Myb	816 (+), 993 (-)	Myb transcription factor binding site
MYC	433 (-)	MYC transcription factor binding site
TC-rich repeats	995 (-)	Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness

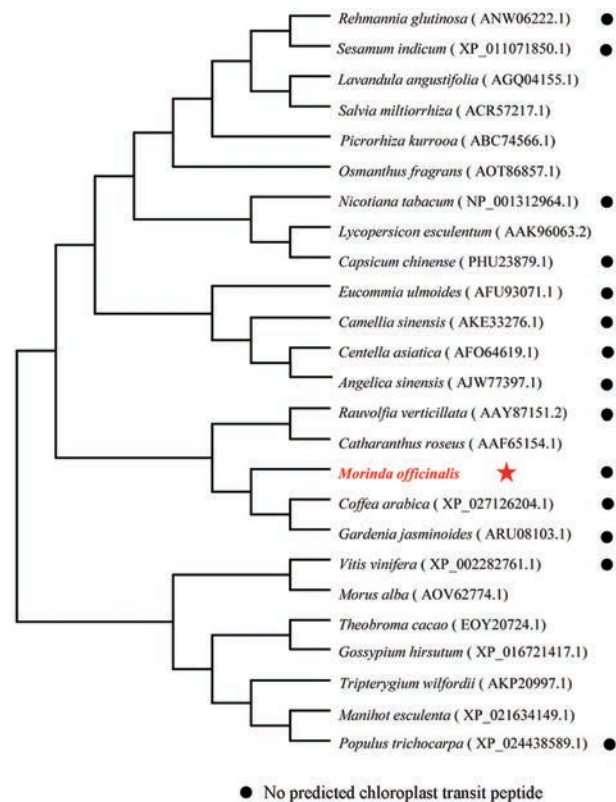


Figure 4 Phylogenetic tree analysis and chloroplast transit peptide prediction of 25 different plants on DXR amino acid sequence

6 巴戟天 *MoDXR* 基因相对表达量分析

以 *ef1α* 作为巴戟天的内参基因, 验证 *MoDXR* 基因在巴戟天根、茎、叶 3 个不同组织中的相对表达量,

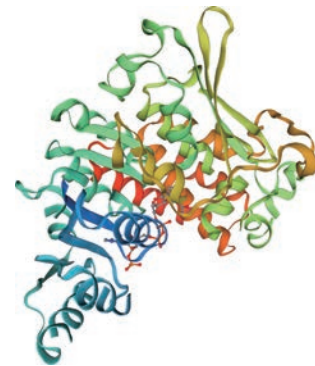


Figure 5 Predicted three dimensional structure of *MoDXR* protein

结果显示: *MoDXR* 基因在巴戟天幼苗的根、茎、叶 3 个不同组织的表达量有所不同, 其中以叶的表达量最高, 茎的表达量只有叶的 0.711 倍, 而根中 *MoDXR* 基因的表达量最低, 仅占叶的 47.1%。

讨论

本实验首次克隆了 *MoDXR* 基因的 cDNA 序列及其上游启动子区域, 并对启动子区域的顺式作用元件进行了分析。证实了 *MoDXR* 基因在巴戟天的根、茎和叶 3 个组织部位都有表达。此外, *MoDXR* 基因上游启动子区含有与环境因素应答和激素诱导有关的顺式作用元件, 今后可以通过非生物胁迫的方式调节 *MoDXR* 基因的表达。

通过查阅相关文献发现, 大部分植物中 *DXR* 基因

```

-1493 AGTGAAGAAG CATAGGCACT AGAATGTATT TGGAGTGTTC GATTTCACACA TCATGGCTAT
-1433 AAGAAGTAAA CAACTCACAA CAAAGAACCA CCCCAACTT AACTTGCAGAA ACAAGGAGAA
-1373 CCAGGGAATA TTAGACCAAT GGATGAAGCA TCATCACAAAC CTAGGCTTCA ACCAAATTTAA
-1313 TAAGAATCAA AGGCACTAGA ATGTTTTGGG AGTGTTCGAT TTCCACAATA CGGCTTTAAG
-1253 AAGCCAACAA CACACAACAA ACAACCACCC CAAACTTAAT TTGTGAAACA CGTAGAATTA
-1193 GCGAATATAA GACCAAGGGG TAAAGCGTCA TCACAACCTA GGTTTCTACT AGATTGATAA
-1133 GAATCAAAGG TAGTAGATTG TAATAGGAGG GTTTGATTG GAACTGACGG CTATAAGAAA
-1073 CCAACAACAC ACAACAAATA ACCACCCGAA ACTTAAGTTG TGAATAAGT AGAACTAGCA
-1013 AATATTAGAC CGATGGATGA AGCGTCATCA CAACCGAGGC TTGTACTGGA ATGGTAAGAA
-953 TAAAAGAGAC TAGAATGTAT TAGGTGTGTT TGATTGCAC CTCACGGCCA TAAGAAGCCT
-893 GTTAACACAC AACAAGCAAC CACCCCAAAC TTAATTTGCG AAACAAGTAG AACTAGGGAA
-833 CATTAGACCA ATAGATAAAT CGTCATCACA ACCTAGGCTT CAAATAAATT GAAAAGAATC
-773 AAAGGCACTA GAATGTATTA GCAGTGTTCG ATTTGCGATA ACAAGCAAAC GACACACCAG
-713 AAGAAACCAC CCCAAACTTA ACTTTCGAAA CAAGTACAAC TGGAGAATAT TAGACAATTG
-653 GATGAAGCGT CGTCGTAACC AAGGGTTTTT CCAGATTGAT ATGATTGGAA CACACTTGAA
-593 TGTATTAGGT GTGTTTCGATA TGCACCTCAC ATTTGTAAGC AGCACACAAC ACACACAAAG
-533 CAACCACCTT AAACCTAACT TGCGAAACAA GTACAGTTAG GGAATATTAG ACCAATGGAT
-473 GATTTCGCTT CACAACCAA ACTTCTACTA AATTGATAGA AATCAAAAGC ACTAGAATGT
-413 TTTGGGAGTG TTTGATTTC CCAATACGGC TTTAAGAAGC CATCAACACA CAACAAACAA
-353 CCACCCAAA CTTAATTTGT GAAACACGTA GAATTAGCGA ATATAAGACC AAGAGATAAA
-293 ACGTCATCAC AACCTAGGTT TCTACTAGAT TGATAAGAAC CAAAGGTAGT AGATTGTAAT
-233 AGGAGTGTTC GATTTGAAC TGACGGGTAT AAGAAACCAA TAACACATTC AAATGTTTG
-173 CAGGCTCAG GACTTGCAG CCAAGTGTAC GAAAGAATAA CTGCTTTTC TGAACTTTC
-113 AGGCCGAAGG GTAGTTTTGT TCGTTGCAAG TTCTTTCAA AGAAGAACT TCATAGAGTA
-53 GATTAAGCTC AAATTTGAAA AGTGTGGAG GGTTTTTGGT GGTGGAAGT ATTATG

```

Figure 6 The sequence of upstream promoter element of *MoDXR*

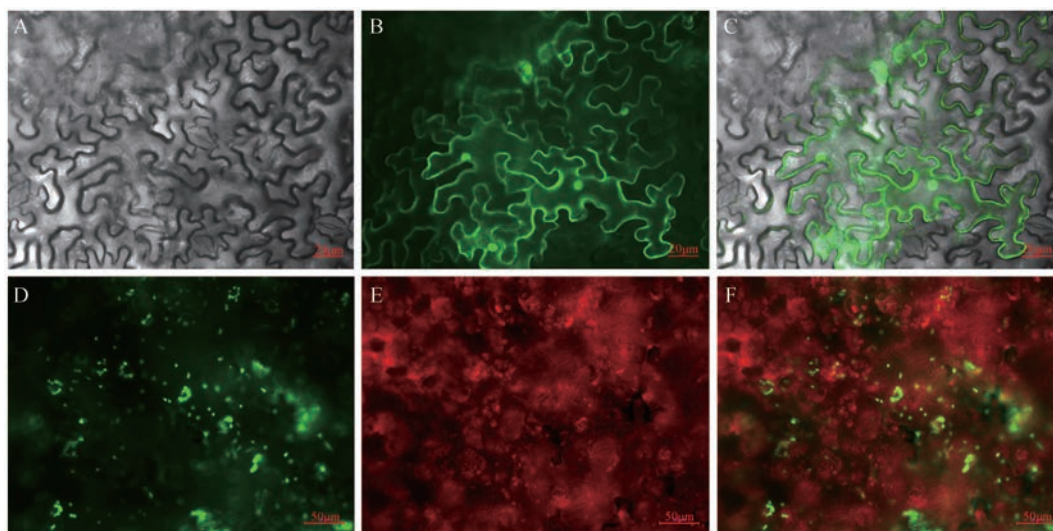


Figure 7 Subcellular localization of *MoDXR*-eGFP. A: Fluorescence microscope images of 35s-eGFP (control check) in bright field; B: Fluorescence microscope images of 35s-eGFP (control check) at 470 nm; C: Merged images for A and B; D: Fluorescence microscope images of *MoDXR*-eGFP at 470 nm; E: Chlorophyll autofluorescence at 510–560 nm; F: Merged images for D and E; bars in A, B and C indicated 20 μm , bars in D, E and F indicated 50 μm

只有一个单拷贝,但部分植物中存在两个拷贝,如:橡胶树^[24]、大豆^[25]。这些多拷贝的 *DXR* 基因有的在不同的组织中有不同的调控方式,也有的在不同的环境条件下表达出时空动态性。从本试验的研究中已确定了巴戟天中存在一个 *DXR* 基因,但是具体的拷贝数未来需要通过 Southern blot 或全基因组图谱的方法进行确

认。通过 NCBI-CDD 和 InterPro 保守结构域分析可知 *MoDXR* 蛋白含有 3 个结构域,这些保守结构域与其他植物的 *DXR* 蛋白的结构域高度同源。分析大部分 *DXR* 基因编码的氨基酸序列,N 端有如下特性:保守性较差但富含丝氨酸,有保守切割位点的质体转运肽,有一个保守的 Cys-Ser-X 基序,其中 X 代表了任何疏水

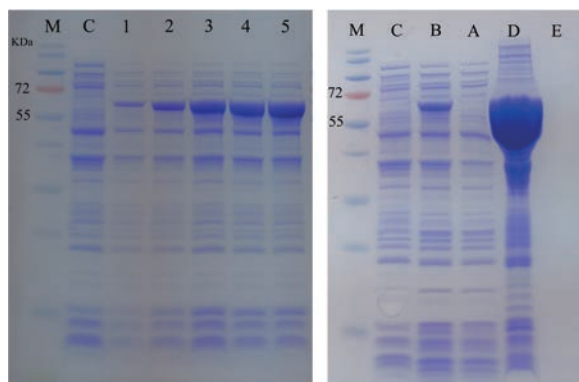


Figure 8 Effect of different inductive time on expression of pET-28a-*MoDXR* recombinant protein. M: Protein marker; C: Total protein of bacteria with 0 mmol·L⁻¹ IPTG; B: Total protein of bacteria with 1 mmol·L⁻¹ IPTG in 1 h; A: Supernatant of bacteria with 1 mmol·L⁻¹ IPTG in 1 h; D: Sediment of bacteria with 1 mmol·L⁻¹ IPTG in 1 h; E: Purified DXR target protein; 1-5: Total protein of bacteria with 1 mmol·L⁻¹ IPTG in 1, 2, 3, 4 and 5 h

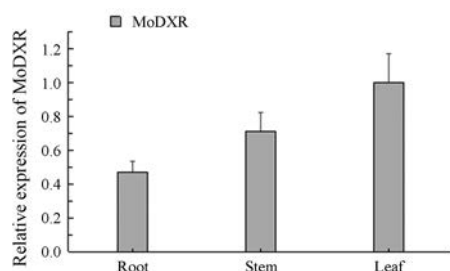


Figure 9 Relative Expression of *MoDXR* in different tissues from *Morinda officinalis*. Different lowercase letters indicate significant difference in relative expression of *MoDXR* in different tissues ($P < 0.05$)

性氨基酸但以丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val) 和甲硫氨酸 (Met) 为主。除此之外, 还有一个富含脯氨酸 (Pro) 的保守区域^[11,26]。还有一点不同的是, *MoDXR* 蛋白 N 端保守的 Cys-Ser-X 基序中, X 代表了亲水性的苏氨酸 (Thr), 这与大部分植物 DXR 蛋白 N 端保守的 Cys-Ser-X 基序 X 代表疏水性的氨基酸不同。

本实验中用 pET-28a-*MoDXR* 构建的原核表达载体, 经 22 °C、190 r·min⁻¹ 和 1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的条件下, 在 BL21(DE3) 表达感受态细胞成功表达, 但是将细胞超声破碎后, 检测到重组蛋白是以不溶性的包涵体的形式存在于离心的沉淀中, 而在上清液中没有检测到, 这为以后的蛋白纯化带来了困难。张晓东构建的原核表达载体 pGEX-4T-1-*GrDXR*, 37 °C、1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的条件下, 在 Rosetta (DE3) 表达感受态细胞也成功表达除了滇龙胆的 DXR 蛋白, 但是没有验证 *GrDXR* 重组蛋白是不是在上清液中表达^[27]。在接下

来的实验中需要选择合适的载体, 和表达感受态, 以及优化培养条件, 尽量使 *MoDXR* 蛋白在细胞周质以正确的折叠形式表达, 为进一步纯化 *MoDXR* 蛋白, 研究其结构和功能奠定基础。

DXR 基因作为调控萜类化合物合成的限制性步骤, 主要合成单萜、二萜 (叶绿素、脱落酸及质体醌等)、四萜 (类胡萝卜素) 等萜类化合物, 通过 *DXR* 基因过表达可以显著提高相应萜类化合物的含量, 而敲除 *DXR* 基因后的拟南芥突变体除了能够降低相应萜类化合物的量外, 其表型发生了一系列变化, 如: 植物矮小, 白化, 腺毛数量减少及大部分气孔不能正常闭合^[22,28]。巴戟天 *DXR* 基因在其 3 个组织部位都有表达, 且叶中的相对表达量大于根和茎, 其他植物如丹参^[29]和高良姜^[30]中 *DXR* 基因在叶中的相对表达量大于根和茎, 而在地黄^[31]中 *DXR* 基因在根中的相对表达量大于叶和茎, 巴戟天、丹参及地黄以干燥根入药, 高良姜以根茎中的挥发油为有效成分, 这说明药用植物中含有主要有效成分的组织部位中 *DXR* 基因表达量不一定高, *DXR* 基因参与的只是萜类生物合成途径中的 MEP 途径, MVA 途径 (甲羟戊酸途径) 作为另外一条萜类 (倍半萜、三萜及甾体等) 合成方式也参与其中, 而且叶和茎组织中叶绿素的含量远大于根部, 这会造成萜类物质的分流。

References

- [1] Huang ZZ. Studies on Chemical Constituents and Their Bioactivities of *Morinda officinalis* How (巴戟天的化学成分及其生物活性研究) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2013.
- [2] Yang F. Studies on Chemical Constituents of the Roots *Morinda officinalis* How (巴戟天的化学成分研究) [D]. Tianjin: Tianjin University, 2016.
- [3] Ding P, Xu HH. Standardized Cultivation Technique of *Morinda officinalis* How (巴戟天规范化栽培技术) [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2003: 1-2.
- [4] Liao TS, Min JX, Pan LL, et al. Research progress on iridoid compounds in plants from Rubiaceae [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 1437-1450.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part 1 (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 75.
- [6] Yang ZM, Ou YF, Yi YT, et al. Isolation, identification and bioactivity of anthraquinones in *Morinda officinalis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 87-92.
- [7] Han YS, Van der Heijden R, Verpoorte R. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2001, 67: 201-220.

- [8] Han Y, van der Heijden R, Lefeber AWM, et al. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of *Cinchona* 'Robusta' proceeds via the methylerythritol 4-phosphate pathway [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59: 45-55.
- [9] 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 non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 9879-9884.
- [10] Wanke M, Skorupinska-Tudek K, Swiezewska E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate/2-*C*-methyl-*D*-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway [J]. *Acta Biochim Pol*, 2001, 48: 663-672.
- [11] 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 Physiol*, 2002, 129: 1581-1591.
- [12] 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.
- [13] Rodríguez-Concepción M, Ahumada I, Diez-Juez E, et al. 1-Deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening [J]. *Plant J*, 2010, 27: 213-222.
- [14] Zheng H, Jing L, Yao N, et al. Cloning and expression analysis of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (*CcDXR1*) in *Cinnamomum camphora* (L.) Presl [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1494-1501.
- [15] Liu PF, Du HY, Wu Yun TN, et al. Cloning and sequence analysis of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene cDNA from *Eucommia ulmoides* [J]. *Forest Res (林业科学研究)*, 2012, 25: 195-200.
- [16] 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: 159-163.
- [17] Yan X, Zhang L, Wang J, et al. Molecular characterization and expression of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31: 1015-1022.
- [18] 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.
- [19] Ji A, Jia J, Xu Z, et al. Transcriptome-guided mining of genes involved in crocin biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 518.
- [20] Htm T, Ramaraj T, Furtado A, et al. Use of a draft genome of coffee (*Coffea arabica*) to identify SNPs associated with caffeine content [J]. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 1756-1766.
- [21] Peng L, Zhang G, Yang YG, et al. Analysis of transcriptomes and exploring of anthraquinones biosynthetic pathway genes in *Rubia cordifolia* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2018, 49: 1890-1896.
- [22] Tomohisa H, Shinya T, Shunsuke H, et al. Overexpression of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production [J]. *J Biosci Bioeng*, 2008, 105: 518-526.
- [23] Nie M, Gao J, Luo P, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis and function analysis of DXR in *Nicotiana tabacum* [J]. *Tobacco Sci Technol*, 2016, 49: 1-7.
- [24] Seetangnun Y, Sharkey TD, Suvachittanont W. Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165: 991-1002.
- [25] Man Z, Liu J, Yu D. Identification and differential expression of two isogenes encoding 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in *Glycine max* [J]. *Plant Biotechnol Reports*, 2012, 6: 363-371.
- [26] Klaus R, Silke S, Hassan J, et al. Crystal structure of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 5378-5384.
- [27] Zhang XD, Zhao J, Li CX, et al. Cloning, sequence analysis, and prokaryotic expression of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase *GrDXR* gene in *Gentiana rigescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2014, 45: 2378-2384.
- [28] Xing S, Miao J, Li S, et al. Disruption of the 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in Arabidopsis [J]. *Cell Res*, 2010, 20: 688-700.
- [29] Yan X, Zhang L, Wang J, et al. Molecular characterization and expression of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31: 1015-1022.
- [30] Zhang CR, Yang Q, Chen HB, et al. Cloning and expression regulation of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase cDNA from *Alpinia officinarum* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2012, 37: 3208-3214.
- [31] Zhu YH, Dong CM, Zu MH, et al. Cloning and expression analysis of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Plant Physiol J (植物生理学报)*, 2017, 53: 563-571.