

杜仲 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 基因 cDNA 全长克隆与序列分析

刘攀峰¹, 杜红岩^{1*}, 乌云塔娜², 黄海燕¹, 朱高浦¹

(1. 中国林业科学研究院经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003;

2. 国家林业局经济林育种与栽培重点实验室, 湖南 长沙 410004)

摘要:以杜仲叶片 cDNA 为模板, 采用反转录 RCR 及 RACE 技术分离出 *DXR* 基因 cDNA 全长。序列分析结果表明该基因序列全长 1 814 bp, 共编码 478 个氨基酸, 推导的蛋白质分子量为 51.71 kD, 理论等电点 5.79, 命名为 *EuDXR*。推导的 *EuDXR* 蛋白质序列具有植物 *DXR* 酶的 5 个典型基序, 并预测出 26 个潜在的功能位点。系统进化树分析表明 *EuDXR* 蛋白与玉米、水稻亲缘关系最近, 其次为橡胶、拟南芥、烟草。

关键词:杜仲; *DXR*; 基因; 序列分析

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Cloning and Sequence Analysis of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Gene cDNA from *Eucommia ulmoides*

LIU Pan-feng¹, DU Hong-yan¹, WUYUN Ta-na², HUANG Hai-yan¹, ZHU Gao-pu¹

(1. Non-timber Forestry Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, He'nan, China;

2. Key Laboratory of Non-wood Forest Products of State Forestry Administration, Changsha 410004 Hu'nan, China)

Abstract: Homologous *DXR* gene cDNA was isolated from leaves of *Eucommia ulmoides* by method of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique, and named after *EuDXR*. The nucleotide sequence of *EuDXR* was 1 814 bp and contains an open reading frame (ORF) of 1 437 bp encoding 478 amino acids with a molecular weight of about 51.71 kD, and the theoretical isoelectric point of which was 5.79, representative motifs of plant *DXR* and 26 potential functional sites were deduced in the amino acids sequence of *EuDXR*. The results of phylogenetic analysis suggested that the protein sequence of *EuDXR* was more similar to that of *Zea mays* and *Oryza sativa* than other species, and followed by *Hevea brasiliensis*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*.

Key words: *Eucommia ulmoides*; *DXR*; gene; sequence analysis

萜类是自然界种类最为繁多的一类天然产物, 迄今已有 30 000 多种从植物体中分离出来, 同时一些萜类化合物仅在部分特定的分类群中合成^[1-2]。植物多种形式的生命活动如光合与呼吸代谢、生长发育调节、细胞信号转导、植物通讯及环境互作等过

程中萜类都发挥着重要作用^[3-5]。

1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(*DXR*)最早从大肠杆菌(*Escherichia coli*)中克隆出来^[6], 此后在多种原核及真核生物中相继被发现。目前在 GeneBank 中可检索到拟南芥(*Arabidopsis thaliana*

收稿日期: 2011-11-06

基金项目: 国家公益性行业科研专项(201004029)

作者简介: 刘攀峰(1984—), 男, 河南平顶山人, 博士研究生。研究方向: 杜仲栽培与育种; E-mail: pfeengl@126.com

* 通讯作者: 杜红岩(1963—), 男, 研究员, 博士生导师。主要从事杜仲育种、栽培与综合利用的研究。E-mail: dhy515@126.com

(L.) Heynh.)、橡胶 (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.)、红豆杉 (*Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd.)、玉米 (*Zea mays* L.)、银杏 (*Ginkgo biloba* L.)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.)、火炬松 (*Pinus taeda* Linn.) 等 59 种植物 *DXR* 基因的序列信息。一些实验结果认为 *DXR* 是 MEP 途径中的关键节点^[7-9], 如在胡椒 (*Piper nigrum* L.) 转基因植株中 *DXR* 的过量表达促进了精油类单萜物质的增加, 但也有些研究认为 *DXR* 的表达水平与萜类物质合成没有密切关系^[10-12]。

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 是新生代第三纪孑遗植物, 不仅是重要的木本药用树种, 还是具有巨大开发前景的天然橡胶资源。在我国已有 2 000 多年的栽培历史, 适生区分布于全国 27 个省 (区、市)^[13]。杜仲叶、皮和果实中的多种活性成分都与萜类合成有关, 如环烯醚萜类的京尼平苷、京尼平苷酸及桃叶珊瑚苷, 其中京尼平苷和京尼平苷酸是理想的降压活性物质, 桃叶珊瑚苷具有镇痛、抗菌消炎作用^[14]; 此外具反式-聚异戊二烯化学结构的杜仲胶 (Gutta-Percha) 属多萜类, 它是一种新型的天然高分子功能材料, 可用于军事、橡胶工业、医疗和化工等领域^[15]。因此, 萜类生物合成途径相关功能基因的开发对杜仲基因工程研究与应用具有重要意义。目前对杜仲 *DXR* 基因的克隆尚无报道, 本研究从杜仲叶片总 RNA 中分离出 *DXR* 同源基因 cDNA 全长, 并进行了生物信息学分析, 旨在为杜仲萜类化合物的生物合成机制、优良基因挖掘及分子育种提供基础信息。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

杜仲叶片于 2011 年 4 月下旬采自中国林业科学研究院经济林研究开发中心院内‘华仲 6 号’杜仲良种, 清洗干净后投入液氮带回室内 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

RNA 提取试剂 Trizol、DEPC 等购自于 Sigma 公司 (美国), PVP、SDS 购自于上海生工, 其余试剂均为国产分析纯; RNA 反转录试剂盒、3'-RACE 及 5'-RACE 试剂盒购自于 Takara 公司 (大连); PCR 产物纯化和回收试剂盒、pGM-T 克隆载体试剂盒, 2 × Taq PCR MasterMix 及 DNA Marker 购自于 TIANGEN 公司 (北京); DH5 α 菌株购自于鼎国生物公司 (北京)。

1.2 叶片总 RNA 提取

采用改良的 Trizol 法提取杜仲叶片 RNA^[16-17], 提取完毕后测定样品 A_{260} 与 A_{280} 数值, 根据 A_{260}/A_{280} 比值, 估测 RNA 质量, 对满足实验要求的 RNA 样品保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.3 单链 cDNA 合成

实验操作按 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 说明书进行。取 RNA 约 2 μg , 按照说明书加入相应的试剂与引物, 设置反转录条件为: 室温 10 min; $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h; 冰浴 2 min 合成单链 cDNA。

1.4 引物设计

根据一段已知杜仲 *DXR* unigene 序列设计引物 P1: 5'-CGCAACCTCTTCAATCTTC-3', P2: 5'-GC-CGAGTCTACAGTTATCTT-3', 用于 *DXR* 特异片段扩增; 在此片段测序结果的基础上, 结合试剂盒 3'-RACE 及 5'-RACE 锚定引物序列 3O1: 5'-TAC-CGTCGTTCCACTAGTGATTT-3', 3I1: 5'-CGCGGATC-CTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3', 5O1: 5'-CAT-GGCTACATGCTGACAGCCTA-3', 5I1: 5'-CGCG-GATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG-3'; 设计适用于巢式 PCR 扩增的特异性引物 3P1: 5'-CTGT-GCCGGTTTGAAGCCTA-3', 3P2: 5'-TTCTTCCTGCT-GATTCCGAAC-3', 5P1: 5'-ATCGGGTGACGGGCAAC-CTCT-3', 5P2: 5'-AAGAAGCGTGACATTTGAACC-3'。

1.5 3'-RACE 及 5'-RACE 扩增

3'-RACE 及 5'-RACE 的 PCR 反应体系与反应条件参照 Takara 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 与 Takara 5'-Full RACE Kit 说明书操作。

1.6 PCR 产物的纯化及克隆测序

按 TIANGEN 通用型 DNA 纯化回收试剂盒说明进行 PCR 产物的回收; 按 pGM-T 克隆试剂盒说明将回收片段连接至 pGM-T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 将 100 μL 转化产物与 40 μL X-gal (20 mg \cdot mL⁻¹)、4 μL IPTG (50 mg \cdot L⁻¹) 混合后, 均匀涂布于含有 100 mg \cdot L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温过夜培养, 挑取白斑单菌落, 接种于含有 100 mg \cdot L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 200 r \cdot min⁻¹ 振荡过夜培养, EcoR I 酶切 2 h 以上或过夜, 电泳鉴定后送至南京金斯瑞生物公司测序。

1.7 杜仲 *DXR* 基因 cDNA 序列的生物信息学分析

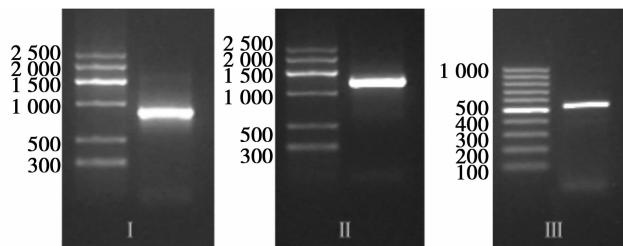
利用 NCBI Blast 程序进行序列相似性检索, 并用 ORF Finder 程序查找基因 cDNA 开放阅读框架;

利用 ExPASy ProtParam 程序与 ScanProsite 程序分析氨基酸残基数目与组成、蛋白质相对分子量、理论等电点以及功能位点等;利用 Predict Protein 预测蛋白质的细胞定位及二级结构;利用 TargetP 1.1 Server 进行信号肽的预测^[18];利用 ExPASy SWISS-MODEL 程序进行蛋白质的同源建模^[19];利用 Lasergene 软件进行蛋白质序列的多重比对并通过 MEGA 5 软件构建基因的系统进化树^[20]。

2 结果与分析

2.1 杜仲 DXR 基因 cDNA 全长的克隆

利用引物 P1, P2 在逆转录的 cDNA 模板上扩增出 1 条约 800 bp 的特异条带(图 1-I)。测序后将序列进行 BLAST 程序检索,与萝芙木 (*Rawolfia verticillata* (Lour.) Baill.; Accession No.: DQ779286.1)、长春花 (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don; AF250235.1)、橐豆 (*Glycine max* (L.) Merr.; HQ340241.1) DXR 核苷酸序列的同源性达到 80% 以上,确定该片段为杜仲 DXR 基因片段。据此段序列分别设计用于基因 3'-RACE 和 5'-RACE 序列扩增的特异引物,通过 PCR 扩增分别得到 1 条约 1 000 bp 和 1 条约 500 bp 的条带(图 1-II、III)。3 条基因片段序列拼接后得到 1 条长 1 814 bp 的基因序列,该序列与毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torrey & A. Gray; EU693020.1)、萝芙木 (DQ779286.1)、橡胶 (DQ473432.1)、丹参 (FJ476255.1)、长春花 (AF250235.1) DXR 全长基因序列的相似性分别为 81%、78%、78%、78% 和 77%。通过 NCBI 中 ORF finder 工具查找到该序列包含一个长 1 437 bp 的开放阅读框,编码序列与橡胶 (ABD92702.1)、蓖麻 (*Ricinus communis* L.; EEF52001.1), 萝芙木 (AAY87151.2) DXR 氨基酸序列的同源性分别为 86%、86%、85%。因此可确定该序列为杜仲 DXR 基因 cDNA 全长序列,将其命名为 *EuDXR*。



I: 核心片段扩增, II: 3'末端序列扩增, III: 5'末端序列扩增
图 1 杜仲 DXR 基因 RT-PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳图

```

10CTTCTTCATTCACGTAAGTAGCCTCCACACACITCAACACACITCITCITACITTT
61TGCATATGATTCGCTCTAAATGAAGTCTCAAGCCGGAATTCACCGAAATTCGGGCG
121CGAAATATGCGCTCTGAATCTTCTCCCGGCAACCGAATTCATTCGGATTCGCTTCAT
1M A L N L L P R T E F N P V S F F H
181ACCTCCAATTCACACCGCAACCTCTCAAGCTCAAGCTTCGCTTCAAGACGAAAA
19T S K S N R N L F N L Q G G F A F K R K
241GACATTCGAGCAACAATTCGATTCAGACGTCATTCCTGCCGACGAGCGGGGGGGCG
39D I G A T N G L R V H C S A E E V G V A
301GTTGGCTCTCTCCGCTTGGCCGGAGCGGGCTTCGCGACCGCGCGGCAAAATTCGTC
59V A P P P A W P G R A V V E P G R K S W
361GATGGCGCGAAGCGATTTCAATTCGTGATTCACAGCTTCCTATTCGAACICAGACACIA
79D G P K P I S I V G S T G S I G T Q T L
421GACTGACTTCGGACATTCGACAAGTTAAGGTTCTGCGACITTCGCGCTGCTCAAAAT
99D I V A E N P D K F K V V A L A A G S N
481GTCACGCTCTTCGCTGATCAGGTGAAGACGCTTAAACCTCAATAGTTCGGCTTAGAANA
119V T L L A D Q V K T F K P Q L V A V R N
541GAGTCTTAGTTCATGAACICAAAGAAGCTTTCGCTGATCGCTGAATACACACCGAAAT
139E S L V D E L K E A L A D A E Y T P E I
601ATTCCTCGAGACGAGGAGTATAGACGTTGCCCTCAACCGAGATGCTGCTGCTGTGT
159I P G E Q G V I E V A R H P D A V T V
661ACTCGAATGACTGCTTCGCGGTTTGAAGCTCAGCTGCGCTGCCATAGAAGCAGGAAAA
179T G I V G C A G L K P T V A A I E A G K
721GACATAGCTTTGGCCAAATAGGACGACCCATTCGCTGGTGGTCTTTTTCCTTCCTGCT
199D I A L A N K E T L I A G G P F V L P L
781GCICACAACATAATATGTAAGATTCCTCCGCTGCTGATTCGCGACATTCGCGCATTTTCAG
219A H K H N V K I L P A D S E H S A I F Q
841TGTATCAAGCTTCGCTCAGGGTGCCTCTTAGGCGCATTTTCACAGCATCAGCGCGG
239C I Q G L P E G A C L R I I L T A S G G
901GCITTCAGGGATTTGCCITGCGATAAACCAAGACGTTAAAGTTCGCGATGCTTCGAAA
259A C F R D L P V D K L K D V K V A D A L K
961CATCCAACATCGAACATGGGAAAAAGATAACCTGACAGCTGCGCTACCTTTTCAATAAG
279H P N W N M G K I T V D S A T L F N K
1021GGCTTCAGATTCGCAAGCTCAGTCTTTTTCGAGCTGAATACGATGATTCGAGATC
299G L E V I E A H Y L F G A E Y D D I E I
1081GTTATTCACCGGCTGCTATATTCATTCGATGATGAAACACAGGATTCATCGGTTTTC
319V I H P Q S I I H S M I E T Q D S S V L
1141GCACAATTAGGATGCGCAGACATGCGTTTGGGATGCTATACAGCATGCTTCGCGCAGC
339A Q T L G W P D M R L P I L Y T M S W P D
1201AGGATTTCTGCTGCGATCAGTTCGCGCGCTGATCTTCGCAAGCTTTGGCTCATTTC
359R I F C S E I T W P R L D L C K L G S L
1261ACCTTCAAAATCGCGACAATGCAAAATACCTTCATGCGATTTGCCATTCGCTCGCGT
379T F K M P D N V K Y P S M D L G A Y A A G
1321CGAGCGCTGCGCAGCAGTACGAGTCTTAGCGCGCTAACGAGAAAGCGCTGAGATC
399R A G G T M T G V L S A A N E K A V E M
1381TTCATGCAACAAAAGATTCGGCTACCTGCGATATCTTAAAGTTCGCGACCTAACATCGGAT
419F I D E K I G Y L D I F K V V E L T C D
1441AAACACCGGCTCAATTCGCTGCTTCGCTGCGATGAAATTCGCTGATTCAGATTC
439K H R A C E L V S S P S L D E I V H Y D L
1501TGGCGCGCAAAATAGCGCGGAGCCACAAACCGCTCTTCGCTTAAAGCGCGCTTCGTC
459W A R K Y A A S L Q P S S G L S P A L V
1561TGAATGCGCGCGCGCGCGCTGCAATTCAGATTTTGAAGATGCAACCTAAGAAGAAATTCAT
*
1621GIGITGTAATTTGCTATCTTATTAATAAGGCGAAGTACGGGGATTTTCAGGGTACG
1681GGATCAATAAATGCTATCATTAGCAAAAATTTAAATAAATAACATATGTAATGATTT
1741TTTTCACCTAAATAATGTTTTTTTTTCTCTCAAAAAAAAACCTATAGTCAAAATCAGTA
1801GCGAGGATCGCG

```

图 2 杜仲 *EuDXR* 全长 cDNA 序列及推导的 DXR 氨基酸序列

2.2 杜仲 DXR 基因 cDNA 全长及预测蛋白质序列分析

EuDXR 5'端非编码区长 126 bp, 3'端非编码区长 251 bp, 编码区长 1 437 bp, 共编码 478 个氨基酸残基(图 2)。植物 DXR 同源蛋白序列具有 5 个保守区段^[21-22](图 2, 图 3), 在杜仲中 *EuDXR* 蛋白质序列具有 2 个 DXR 结合基序: LPADSEHSAI 和 NKGLEVIEAHY, 2 个 NADPH 结合基序: GSTGS (I/V) GT 和 LAAGSN (V/I) 以及 N 端富脯氨酸

基序 PPPAWPGRA。与两种原核生物相比,包括杜仲在内的几种植物 *DXR* 氨基酸序列起始端多出约 80 个保守性较低的氨基酸残基,且在此段序列中包含一个与在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中发现的推测为 CS (A/V/M) 基序的剪接位点以及富脯氨酸保守基序 PPPAWPGRA^[23]。蛋白质序列 N 端不保守并富含丝氨酸残基被认作是典型的质体转运肽结构^[24]。比对不同物种 *DXR* 蛋白质序列的结果初步说明,推测的 *EuDXR* 蛋白质序列具有植物 *DXR* 蛋白的典型特征, N 端具有原核生物所没有的转运肽序列和一个较保守的切割位点,以及一段富脯氨酸的成熟蛋白的 N 端序列。

2.3 *EuDXR* 编码蛋白结构及功能预测

2.3.1 *EuDXR* 编码蛋白理化特性及细胞定位

ExPaSy ProtParam 程序预测 *EuDXR* 编码蛋白的分子量为 51.71 kD,理论等电点为 5.79;氨基酸组成中以丙氨酸(10.5%)、亮氨酸(9.8%)、缬氨酸(8.4%)含量为最高,蛋白不稳定系数为 36.37,属于稳定蛋白质。Predict Protein 在线预测该蛋白定位于叶绿体上,TargetP1.1 Server 对 *EuDXR* 转运肽的预测结果表明,该序列含有叶绿体转运肽,预测分值为 0.302,可靠性为 IV 级,且该转运肽可能包含 51 个氨基酸残基。



大肠杆菌 (BAA32426.1); 细长聚球藻 (*S. elongatus*; YP_173208.1); 拟南芥 (AF148852); 甜叶菊 (*S. rebaudiana* (Bert.) Bertoni; CAD22156.1); 番茄 (*S. lycopersicum* L.; NP_001234553.1); 橡胶 (ABD92702.1); 烟草 (*N. tabacum* L.; ABH08964.1); 火炬松 (ACJ67022.1)

图3 *EuDXR* 氨基酸序列与其它物种 *DXR* 氨基酸序列的多重比对

2.3.2 *EuDXR* 编码蛋白二级结构预测

Predict Protein 在线预测 *EuDXR* 蛋白二级结构中 α -螺旋占 38.7%; β -折叠占 14.44%; 螺环结构占 46.86%, 属于混合型结构的蛋白质。

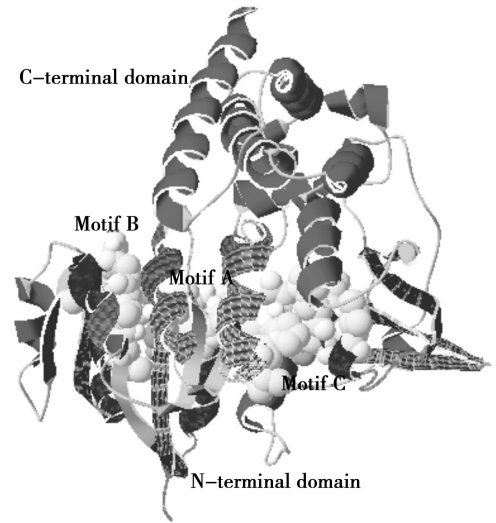
ExPaSy ScanProsite 程序分析 *EuDXR* 的基序类型分为 7 种,含有 26 个潜在的功能位点,包括 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (TsK, 19-21; SnR, 22-24; Tfk, 128-130; Tfk, 379-381); 11 个 N-端十四烷酰化位点 (GAt-

nGL,41-46;GStgSI,88-93;GSigTQ,91-96;GSnvTL,116-121;GIvgCA,180-185;GLkpTV,186-191;GLpeGA,242-247;GGtmTG,401-406;GTmtGV,402-407;GVIsAA,406-411;GLspAL,472-477);5个酪蛋白激酶II磷酸化位点(SaeE,51-54;SlvD,140-143;SmiE,328-331;Sw-pD,355-358;SldE,449-452);2个酰胺化位点(pGRK,73-76;mGKK,284-287);2个N端糖基化位点(NVTL,118-121;NESL,138-141);1个依赖cAMP和cGMP的蛋白激酶磷酸化位点(KKiT,286-289);1个酪氨酸激酶磷酸化位点(DnvY,381-388)。

2.3.3 杜仲 *EuDXR* 编码蛋白三级结构预测

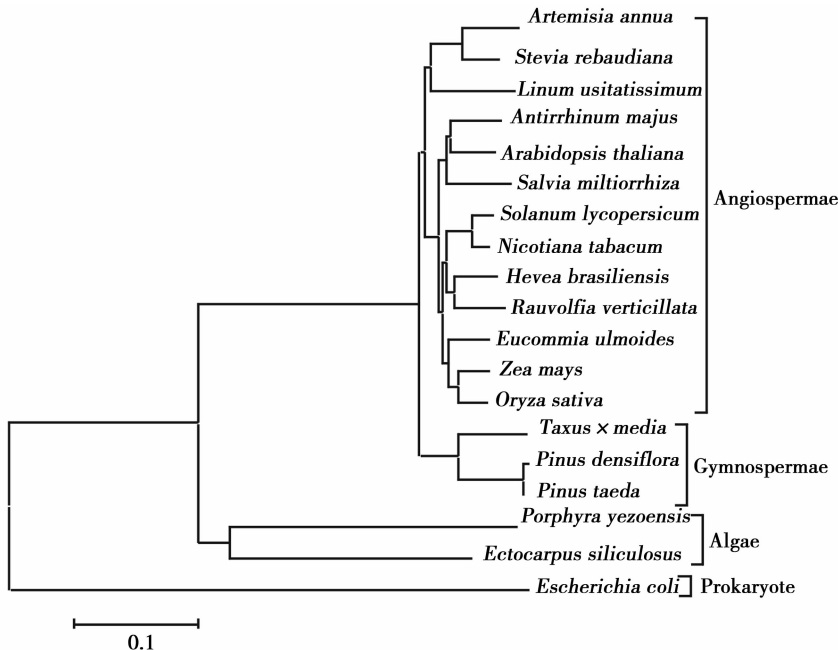
以运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)蛋白为模板(Accession NO.:1r0k)对*EuDXR*蛋白质同源建模,并利用Swiss PdbViewer 4.0.4对相应功能域进行标注,得到的蛋白三维构象如图4所示。ExPASy structure assessment 程序评测推导的*EuDXR*蛋白模型 QMEAN6 得分为 0.723,与运动发酵单胞菌氨基酸序列的相似性为 43.22%。在*EuDXR*蛋白三维模型中直观显示出其N端结构域、C端结构域、与

NADPH结合的两个保守基序(GSTGSIGT、LAAGSNV)以及另一保守基序(LPADSEHSAI)等功能结构的空分布特征。



Motif A:基序 GSTGS (I/V) GT; Motif B:LAAGSN (V/I); Motif C:基序 LPADSEHSAI

图4 *EuDXR* 编码蛋白三级结构模型



黄花蒿 (*A. annua* Linn., AAD56391.2);甜叶菊(CAD22156.1);亚麻(*L. usitatissimum* Linn., CAF22092.1);金鱼草 (*A. majus* L., AAW28998.1);拟南芥(AAF73140.1);丹参(ACK57535.1);番茄(NP_001234553.1);烟草(ABH08964.1);橡胶(ABD92702.1);
 萝芙木(AAY87151.2);玉米(NP_001105139.1);水稻(*O. sativa* L., AAL37560.1);曼地亚红豆杉(*Taxus x media* Rehd., AAU87836.1);赤松(*P. densiflora* Sieb. et Zucc., ACC54558.1);火炬松(ACJ67022.1);紫菜(*P. yezoensis* Ueda., ABI96275.1);褐藻(*E. siliculosus* (Dillw.) Lyngb., CBJ29720.1)大肠杆菌(BAA32426.1)

图5 *EuDXR* 氨基酸序列与其它物种 *DXR* 氨基酸序列的系统进化树

2.3.4 *DXR* 编码蛋白的系统进化分析

利用MEGA5中Clustal W法对20个不同物种*DXR*蛋白序列比对,并用Neighbor-joining法构建了

系统进化树(图5)。发现高等植物、藻类以及细菌来源的*DXR*蛋白序列在进化上分别属于不同的分类群,*EuDXR*蛋白序列与玉米、水稻的亲缘关系最

为接近,进化距离分别为 0.064、0.064;其次为橡胶(0.070)、拟南芥(0.075)、烟草(0.084)、番茄(0.084)和金鱼草(0.087)。

3 讨论

定位于高等植物质体中的 MEP 途径是植物萜类合成的一条重要途径,多数研究表明 *DXR* 在 MEP 途径代谢网络的调控中起重要作用。本研究认为,从杜仲中分离出的 *EuDXR* 是高等植物 *DXR* 基因家族的新成员,在高等植物中具有较高的保守性。由 *EuDXR* 推导出的蛋白质序列被检测出多个潜在功能位点,表明 *EuDXR* 编码蛋白极有可能参与到杜仲 MEP 萜类合成途径中并行行使重要功能。

转运肽识别特殊膜蛋白,引导细胞质中合成的蛋白质输入线粒体和叶绿体,转运肽的预测和分析对正确认识和理解蛋白质的细胞定位及结构域的分选有着重要意义。预测的 *EuDXR* 编码蛋白具有转运肽序列,并存在转运肽酶切位点。由于 *DXR* 是 MEP 合成途径的一个作用酶,而 MEP 途径仅存在于细胞质体中,因而可进一步推断本研究克隆出的 *EuDXR* 基因其编码蛋白参与到杜仲 MEP 萜类合成途径中。但 *EuDXR* 是否为一个基因家族,其家族成员数量、表达产物的确切定位以及基因功能有待深入研究。

参考文献:

- [1] Bohlmann J, Keeling C I. Terpenoid biomaterials[J]. *Plant J*, 2008, 54(4): 656–669
- [2] Page J E, Hause G, Raschke M, *et al.* Functional analysis of the final steps of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1401–1413
- [3] Buchanan B B, 等. 植物生物化学与分子生物学[M]. 瞿礼嘉,等译. 北京:科学出版社, 2004: 1251–1253
- [4] McCarvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1015–1026
- [5] Rohmer M, Knani M, Simonin P, *et al.* Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate[J]. *Biochem J*, 1993, 295: 517–524
- [6] 马 靛, 丁 鹏, 杨广笑, 等. 植物类萜生物合成途径及关键酶的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2006(增刊): 22–30
- [7] Mahmoud S S, Croteau R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerases and menthofuran synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 8915–8920
- [8] Carretero-Paulet L, Cair A, Botella-Pavia P, *et al.* Enhanced flux the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants over-expressing 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase [J].

- Plant Mol Biol*, 2006, 62: 683–695
- [9] 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 Bioscience Bioeng*, 2008, 105: 518–526
- [10] Rodriguez-Concepcion 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*, 2001, 27: 213
- [11] Khemvong S, Suvachittanon W. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase from oil palm *Elaeis guineensis* Jacq[J]. *Plant Sci*, 2005, 169: 571–578
- [12] Yortyot S, Thomas D, Wallie S. 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
- [13] 李芳东, 杜红岩. 杜仲[M]. 北京:中国中医药出版社, 2001
- [14] 杜红岩. 杜仲活性成分与药理研究的新进展[J]. *经济林研究*, 2003, 21(2): 58–61
- [15] 严瑞芳. 杜仲橡胶的开发及应用概况[J]. *橡胶科技市场*, 2010(10): 9–13
- [16] 陈 建. 几种提取杜仲 RNA 方法的比较[J]. *林业科技开发*, 2007, 21(5): 19–21
- [17] 周明兵, 王红珍, 赵德刚. 杜仲叶和树皮总 RNA 的快速提取法 [[J]. *山地农业生物学报*, 2003, 22(5): 430–431
- [18] Henrik N, Jacob E, Søren B, *et al.* Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites [J]. *Protein Eng*, 1997, 10: 1–6
- [19] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195–201
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 2731–2739
- [21] Hongyan Y, Yifu G, Kaijing Z, *et al.* Molecular cloning, expression profiling and functional analysis of a *DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Campotheca acuminata* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165: 203–213
- [22] Krueawan Y, Seiji T, Atiya R, *et al.* cDNA, from *Hevea brasiliensis* latex, encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase [J]. *Plant Sci*, 2008, 175: 694–700
- [23] Lorenzo C P, 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
- [24] von Heijne G, Stepphuhn J, Herrmann R G. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides [J]. *Eur J Biochem*, 1989, 180: 535–545