

Molecular Cloning and Expression Analysis of the Full-Length cDNA of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase (DXS) Gene from Cultivated Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

Juanjuan Zhang, Xiaoyi Chen, Jun Fang, Zhifan Yang*

College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan Hubei

Email: *sailiangzhf@gmail.com

Received: Jun. 10th, 2018; accepted: Jun. 25th, 2018; published: Jul. 2nd, 2018

Abstract

1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) gene from *Nicotiana tabacum* was cloned by using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) strategies. The complete cDNA sequence of DXS is 2386 bp in length, and contains an open reading frame (ORF) encoding 718 amino acid residues (GenBank accession number: CBA12009). The pI/MW (molecular weight) of the deduced protein is 7.31 and 77.413 kDa. The protein is most similar to DXS of *Capsicum annuum* with the highest amino acid identity of 96%, and to DXS of *Solanum lycopersicum* with the next highest amino acid identity of 95%. Phylogenetic analysis constructed with 10 plant DXSs showed that the deduced DXS formed a cluster with those from *C. annuum* and *S. lycopersicum*. Northern blot analysis revealed *N. tabacum* DXS gene is predominantly expressed in leaf and stem, and expressed at a very low level in root and flower, suggesting that the gene product is involved in metabolism of allelochemicals in green tissues. This work laid a foundation for improving the quality of tobacco fragrance by transgene in the near future.

Keywords

Cultivated Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase (DXS), Gene Cloning, Gene Expression

烟草1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)基因全长cDNA的克隆及表达分析

章娟娟, 陈小艺, 方君, 杨之帆*

*通讯作者。

湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉
Email: sailyangzhf@gmail.com

收稿日期: 2018年6月10日; 录用日期: 2018年6月25日; 发布日期: 2018年7月2日

摘要

利用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)结合快速扩增cDNA末端(RT-PCR)技术克隆了烟草1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)基因的全长cDNA(GenBank accession number: CBA12009)。序列分析表明该基因全长2386 bp, 含有一个编码718个氨基酸残基的开放阅读框(ORF)。根据cDNA序列预测的蛋白质的理论等电点和分子量分别为7.31和77.413 kDa。该蛋白与辣椒和番茄的DXS的氨基酸序列的同源性分别达到96%和95%。对来自10种植物(包含烟草)的DXS的聚类分析显示, 烟草的DXS与辣椒和番茄的DXS同属一个支系。Northern杂交分析显示, DXS基因在叶片和幼茎中表达水平最高, 而在根和花器官中表达水平很低, 这表明该基因的产物可能在绿色组织中参与次生物质的代谢。该基因cDNA序列的获得为通过基因工程途径改良烟叶香气品质奠定了基础。

关键词

烟草, 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS), 基因克隆, 基因表达

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

萜类物质(terpenoids)是广泛分布于生物界的一类天然产物, 无论是单萜、倍半萜、双萜还是三萜四萜, 都在生物体内起着极其重要的作用, 参与形成酯类、防御毒剂、生长激素等。烟草的重要次生代谢途径之一是萜类分子的代谢。萜类物质一般由若干个异戊二烯单位构成, 根据其数目的多少可分为单萜、倍半萜、双萜、三萜、四萜、多萜等不同的类型分子。其中三萜、四萜分子往往是初生代谢产物, 这包括类胡萝卜素、赤霉素、脱落酸、叶绿素、甾醇等, 为烟草生长发育所必需; 而单萜、倍半萜、双萜则是次生代谢产物, 它们是烟叶挥发物和烟草腺体分泌物的主要组成成分, 与烟叶的抗性和香气品质密切相关[1][2][3][4], 这也表明增加低分子量的萜类分子的含量将有助于提高烟叶的香味。要实现这一目的, 提高其前体异戊烯基焦磷酸(IPP)的含量是十分必要的。IPP是由质体中的DXPS途径形成的, 并参与单萜、双萜、四萜生物的合成。因此利用基因工程手段提高烟叶香气可以考虑对DXPS途径进行分子调控。1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase)DXS参与该途径的第一个催化步骤, 催化丙酮酸与甘油醛-3-磷酸合成脱氧木酮糖-5-磷酸。DXS也是该途径的重要限速酶之一, 其过量表达会在宏观上增加低分子量萜类分子的含量, 可使得这些与香气密切相关的物质在烟叶中过量积累, 进而提升烟叶的香气, 同时烟草原有风味也得到了保证。

在烤烟制作过程中使用了降焦工艺, 烟气中香气也被降低, 这一定程度上影响到香烟的品质。目前在实际生产中多通过杂交选育新品种、优化栽培条件等措施提高烟叶香气量, 而利用基因工程手段改良烟叶香气将为烟草业的发展提供一个崭新的途径。目前转化DXS基因的转基因烟草在国内外尚未见报道。

本研究拟克隆烟草 DXS 基因的全长序列, 并研究其组织表达特异性, 为通过基因工程途径改良烟叶香气品质奠定基础。

2. 材料和方法

2.1. 材料

实验材料为中烟 90, 该烟草品种是中国农科院烟草研究所通过三亲杂交, 定向培育的烤烟新品种。

2.2. 主要试剂

Trizol (Invitrogen, USA), SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (BD Bioscience Clontech Company, USA), SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (BD Bioscience Clontech Company, USA), pGEM-T Vector (Promega, USA); 其它常规试剂均为国产分析纯。

2.3. 总 RNA 的提取及 RACE-Ready cDNA 的合成

利用 Trizol 法提取烟草叶片总 RNA, 用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 分别合成 5' RACE-Ready cDNA 和 3' RACE-Ready cDNA。合成前者的反应体系为 10 μ L, 含有 1 μ L 的 5'-RACE CDS Primer A, 1 μ L 的 BD SMART IITM A Oligonucleotide, 1 μ L 总 RNA(1 μ g/ μ L), 2 μ L 去离子水, 2 μ L 的 5 \times First-Strand Buffer, 1 μ L 的 20 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 1 μ L 的 10 mmol/L dNTP Mix 和 1 μ L BD PowerScript 反转录酶。3'cDNA 合成的反应体系为 10 μ L, 含有 1 μ L 的 3'-RACE CDS Primer A, 1 μ L 总 RNA(1 μ g/ μ L), 3 μ L 的去离子水, 2 μ L 的 5 \times First-Strand Buffer, 1 μ L 的 20 mmol/L DTT, 1 μ L 的 10 mmol/L dNTP Mix 和 1 μ L BD PowerScript 反转录酶。将反应体系在 42 $^{\circ}$ C 温育 1.5 hr 以保证 cDNA 第一链的合成反应完成。再用 Tricine-EDTA 缓冲液把反应体系稀释 10 倍待用。

2.4. 快速扩增 cDNA 末端(5'和 3' RACE)

根据烟草的 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)基因核心序列(登录号: AJ291721), 利用 Primer3 在线工具(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)设计基因特异性引物 GSP1 和 GSP2。GSP1:

5'-GCGTCGGACCATCTGCTCCAACAAGA-3'; GSP2: 5'-CGCTATGGGTGGTGGGACCGGTATGA-3'。

扩增 5'cDNA 末端的反应总体积为 15 μ L, 其中含有 10.6 μ L ddH₂O, 1.5 μ L 10 \times BD Advantage 2 PCR Buffer, 0.3 μ L 的 10 mmol/L dNTP Mix, 0.2 μ L 的 50 \times BD Advantage 2 Polymerase Mix, 0.6 μ L 的 5'RACE-Ready cDNA, 0.6 μ L 的 10 \times UPM, 0.3 μ L 的 10 μ mol/L GSP1。扩增 3'cDNA 末端的反应体系为 15 μ L, 含有 10.6 μ L ddH₂O, 1.5 μ L 的 10 \times BD Advantage 2 PCR Buffer, 0.3 μ L 的 10 mmol/L dNTP Mix, 0.2 μ L 的 50 \times BD Advantage 2 Polymerase Mix, 0.6 μ L 的 3'RACE-Ready cDNA, 0.6 μ L 的 10 \times UPM, 0.3 μ L 的 10 μ mol/L GSP2。使用 Touchdown PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 进行 5 轮循环; 接着 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 循环 5 轮; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 共 28 轮循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 1.0%的琼脂糖凝胶上电泳分开, 根据分子量标准判断并回收目的 DNA 片段, 连入 pGEM-T vector, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选重组子并测序。对来源于 5'和 3' RACE 的扩增产物分别测 4 个以上的克隆, 通过比较测序结果消除因 PCR 反应可能出现的错配碱基。

2.5. DXS cDNA 及其编码的氨基酸序列的分析

使用 DNAtools 6 软件进行核苷酸序列的翻译。使用 Clustal X v1.8 [5]软件进行氨基酸序列的比对分析。蛋白质理论等电点和分子量使用 Compute pI/MW 在线工具(http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)进行

预测。蛋白质前体的信号肽使用 SignalP 3.0 Server 在线工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)进行预测。分子系统树使用 ClustalX v1.8 软件中的 N-J 选项(自举检验次数=1000)进行构建[6]。此外蛋白质序列中可能存在的磷酸化位点使用 NetPhos 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)进行预测[7]。

2.6. DXS 基因的组织表达特异性检测

利用 Trizol 法提取烟草幼茎、叶片、根尖和花朵的总 RNA。按文献[8]的方法进行 Northern 转膜和杂交。将各样品的总 RNA(20 μ g)在 1.5%(w/v)的变性琼脂糖胶上电泳分开,转到硝酸纤维素膜上,以 α -[32 P]dCTP 标记的 5'cDNA 片段为探针,进行分子杂交。杂交条件为 65 $^{\circ}$ C 16 hr;洗膜条件:用 1 \times SSC, 0.2%(w/v)SDS 于 65 $^{\circ}$ C 洗 15 min,再用 0.5 \times SSC, 0.1% (w/v) SDS 于 65 $^{\circ}$ C 洗 15 min;将洗好的膜与 X 光片夹于增感屏中,置于-20 $^{\circ}$ C 曝光 7 d。

3. 结果与分析

3.1. 烟草 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)基因 cDNA 的克隆

通过 SMART-RACE 扩增到 DXS 基因的 5'cDNA 片段和 3'cDNA 片段见图 1,大小分别约为 1.9 Kb 和 1.2 Kb。测序后经拼接获得了 DXS 基因的全长 cDNA 序列。

3.2. 由 cDNA 预测的蛋白质序列分析

该 cDNA 序列全长为 2386 bp,所含的开放阅读框(ORF)编码 718 个氨基酸残基(图 2)。在 cDNA 的 3'末端有 28 个脱氧核苷酸组成的 poly (A)。该 cDNA 全长序列已被登录到 GenBank 数据库(GenBank accession number: CBA12009)。

经预测,该蛋白序列中潜在的磷酸化位点可能有 19 个丝氨酸、11 个苏氨酸和 10 个酪氨酸的磷酸化位点,它们分别是第 24、51、57、59、87、107、159、174、176、248、269、273、315、346、392、549、634、645 和 683 位的丝氨酸残基,第 71、102、132、152、160、171、219、316、349、359 和 570 位的苏氨酸残基,第 64、65、128、178、224、232、305、375、553 和 678 位的酪氨酸残基。这些位点的磷酸化可能对于酶分子空间构象的维持及行使其正常功能是必需的。预测表明该蛋白序列中不存在跨膜结构域,而其理论等电点和分子量分别为 7.31 和 77.413 kDa。

将烟草的 DXS 与其它植物的 DXS 的氨基酸序列进行同源性比较,结果显示烟草的 DXS 与辣椒的

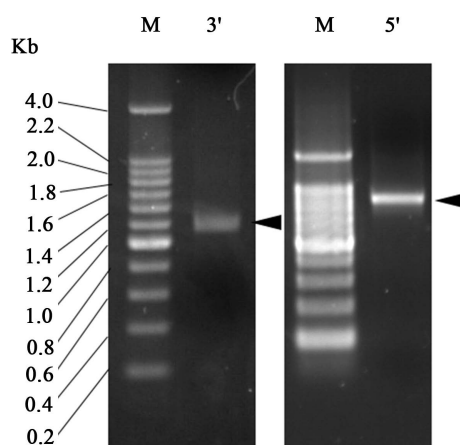


Figure 1. Amplification of a DXS gene from *N. tabacum* with RACE. M: 200 bp Ladder

图 1. 利用 RACE 克隆烟草 DXS 基因。M: DNA 分子量标准

```

3 ATA CAA ACA AAC ACC ATG GCT TTG TGC AAC TAT GCA GTT CCA GGT ATT TTG AAC AGG ACA
1 M A L C N Y A V P G I L N R T
63 GTG GCT TCA GAT TAC TCA AAG CAG AGT CCT TTA TTC TCT GAA TTG TTT CAT GGA ACA GAT
21 V A S D Y S K Q S P L F S E L F H G T D
123 CTG CAG TAT CAG TTC CAA CAC AAA CTT ACT CGG GTC AAG AAA AGG TCA GGT GGG GTT CAG
41 L Q Y Q F Q H K L T R V K K R S R G V Q
183 GCA TCT TTG TCA GAA AAA GGA GAA TAC TAT GCA CAG ACA CCA ACA CCT CTT TTG GAC
61 A S L S E K G E Y Y A Q R P P T P L L D
243 ACT ATC AAC TAT CCC ATT CAT GAT ATT AAA AAT CTT TCT GTA AAG GAA CTT AAA CAA CTA GCA
81 T I N Y P I H M K N L S V K E L K Q L A
303 GAA GAA CTA AGA TGA GAT ACA ATC TTG AAT GTA TGA AAG ACT GGA GGT CAC CTT GGC TCA
101 E E L R S D T I F N V S K T G G H L G S
363 AGT CTT GGT GTT GTT GAG CTT ACA GTT GCT CTT CAT TAT GTC TTC AAT ACA CCC CAA GAT
121 S L G V V E L T V A L H Y V F N T P Q D
423 AGG ATA CTA TGG GAT GTT GGC CAT CAG TCT TAT CCT CAC AAA ATC TTG ACT GGT AGA AGA
141 R I L W D V G H Q S Y P H K I L T G R R
483 GGG AAG ATG TCA ACT CTT AGA CAG ACA GAT GGA CTT GCA GGA TTT ACT AAG CCG TCG GAG
161 G K M S T L R Q T D G L A G F T K R S E
543 AGT GAA TAT GAT TGC TTT GGC CAT CAG TCT TAT CCT CAC AAA ATC TTG ACT GGT AGA AGA
181 S E Y D C F G T G H S S T T I S A G L G
603 ATG GCT GTT GGA AGA GAT CTA AAA GGA AAG AAT AAC AAT GTT ATA GCT GTA ATA GGT GAT
201 M A V G R D L K G K N N N V I A V I G D
663 GGT GGG ATG ACA GCA GGT CAA GCT TAT GAA GCC ATG AAT AAT GCC GGT TAC CTA GAC TCT
221 G A M T A G Q A Y E A M N N A G Y L D S
723 GAT ATG ATT GTT ATT TTG AAT GAC AAT AGA CAA GTT TCG TTA CCT ACT GCT ACT CTA GAC
241 D M I V I L N D N R Q V S L P T A T L D
783 GGG CCG GCC CCT CCC GTT GGA GCT CTA AGC AGA GCT TTG AGC AGG TTG CAA TCT AAT AGA
261 G P A P P V G A L S R A L S R L Q S N R
843 CCT CTC AGA GAA CTA AGA GAA GCT GCT AAG GGA GTT ACT AAG CAG ATT GGT GGA CCT ATG
281 P L R E L R E V A K G V T K Q I G G P M
903 CAT GAG CTT GCT GCA AAA GTT GAT GAA TAT GCT CGT GGG ATG ATC AGT GGT TCC GGA TCA
301 H E L A A K Y D E Y A R G M I S G S G S
963 ACA TTG TTT GAA GAA CTT GGA CTT TAT TAT AAT GGT CCT GTG GAT GGT CAC AAC ATT GAC
321 T L F E E L G L Y Y I G P V D G H N I D
1023 GAT CTT ATT TCG ATT CTC AAA GAA GTT AGA AGT ACT AAA ACA ACA GGT CCA GTA CTG ATC
341 D L I S I L K E V R S T K T I G P V L I
1083 CAT GTT ATC ACC GAG AAA GGC AGA GGT TAT CCA TAT GCC GAG AGA GCT GCT GAC AAG TAT
361 H V I T E K G R G Y P Y A E R A A D K Y
1143 CAC GGA GTA GCC AAG TTT GAT CCA GCA ACT GGA AAG CAA TTC AAA GTT AGT GCC AAG ACT
381 H G V A K F D P A T G K Q F K V S A K T
1203 CAG TCC TAT ACG ACG TAC TTT GCG GAG GCT TTA ATT GCA GAA GAA GCA GAT AAG GAC
401 Q S Y T T Y F A E A L I A E A E A D K D
1263 ATT GTT GCA ATC CAT GCT GCT ATG GGT GGT GGG ACC GGT ATG AAC ATT TTC CAC CGT GCG
421 I V A I H A A M G G G T G M N I F H R R
1323 TTC CCA AAT CCG TGT TTT GAT GTT GGA ATA GCA GAA CAG CAT GCT GTA ACA TTT GCT GCT
441 F P N R C F D V G I A E Q H A V T F A A
1383 GGT TTG GCT TGT GAA GGC CTC AAA CCT TTT TGT GCA ATT TAT TCA TCT TTC TTG CAA AGA
461 G L A C E G L K P F C A I Y S S F L Q R
1443 GCT TAT GAC CAG GTA GTG CAT GAT GTT GAC TTG CAA AAG CTG CCT GTG ACA TTT GCA ATG
481 A Y D Q V V H D V D L Q K L P V R F A M
1503 GAC ACA GCT GGT CTT GTT GGA GCA GAT GGT CCG ACG CAT TGT GGT GCA TTT GAT GTT ACT
501 D R A G L V G A D G P T H C G A F D V T
1563 TTC ATG CCG TGT CTT OCT AAC ATG GTA ATG CCA AAG CTG CCT GAT GAA AGG GAG CTA ATG
521 F M A C L P N M V V M A P S D E T E L F
1623 CAC ATG GTA GCA ACT GCT GCT GCC AIT GAT GAC AGA CCA AGT TGT TTG ACA TAC CCA AGA
541 H M V A T A A A I D D R P S C F R Y P R
1683 GGA ATG GGG ATC GGT GTA GAG CTT CCG GTA ATG CCA AAA GGC CAT CCT GAT GAA AGG CTA GGT
561 G N G I G V E L P V G N K G T P L E V G
1743 AAA GGC AGG ATA TTG GTT GAA GGG GAG AGA GTG GCT CTA CTG GGA TAT GGC TCA GCA GTA
581 K G R I L V E G E R V A L L G Y G S A V
1803 CAG AAC TGT TTG GCT GCT GCT GCT TTA ACC CGT GGT TTA CAA GTA ACA GTT GCA
601 Q N C L A A A A V L V T R G L Q V T V A
1863 GAT GCA CGC TTC TGC AAA CCA CTG GAC GGT GCT CTC ATA AGG AGC CTC GCA AAA TCA CAC
621 D A R F C K P L D G A L I R S L A K S H
1923 GAG GTG CTG ATC ACT GTT GAA GAA GCA TTA ATT GGA GGT TTC GGG TCT CAT GTT GCT CAG
641 E V L I T V E E G S I G G F G S H V A Q
1983 TTT ATG GCC TTA GAT GGA CTT CTT GAT GGC AAG TTA AAG TGG AGG CCG ATA GTA CTT CCT
661 F M A L D G L L D G K L K W R P I V L P
2043 GAT CGA TAC ATT GAC CAC GGA TCT CCT GAT CAA TTG GCA GAA GGT GGT CTT ACG CCA
681 D R Y I D H G S P A D Q L A E A G L T P
2103 TCT CAC ATT GCA GCA ACA GTG TTT AAC ATT CTT GGA CAA ACC AGA GAA GCT CTA GAG GTT
701 S H I A A T V F N I L G Q T R E A L E V
2163 ATG ACA TAA GAT ATA AGA AAC TGT AGA AGT GAT AAC TTT AAA ATG TCT CAT TGT TAA
721 M T *
2223 ATA TGG TTT TAG GAC AAG TCC CCA GTT AAG GTG AGA ATA GTT GTA AGC TGA TAT AAC TAC
2283 CGT AAA CAA GTT TGA CAC ATA ATA CTT ATT CCT CTA AAT ATG TAA AGT TTC CAT GGC TGA
2343 TCC GCG GTT CAA ACC CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA

```

Figure 2. Nucleotide and the deduced amino acid sequence of DXS cDNA from *N. tabacum*

图 2. 烟草 DXS 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

DXS (登录号: O78328) 的相似性最高, 氨基酸同源性达 96%; 其次是番茄的 DXS (登录号: AAD38941), 达 95% (图 3)。

根据同源序列分析烟草 DXS 与其它 9 种植物的 DXS 的进化关系。从进化树(图 4)可以看出, 来自植物的 10 个 DXS 可分为 3 大类, 其中烟草的 DXS 与 4 种植物的 DXS 属于同一大类, 而在这一大类中, 烟草与辣椒, 番茄的 DXS 关系最密切, 它们形成一个独立的分支, 暗示了它们可能由一个共同的祖先进化而来[8] [9] [10], 在长期的进化过程中相当保守。系统分析结果还表明, 植物的 DXS 基因及其编码的蛋白质在进化过程中发生了重大分化。

3.3. 对 DXS 基因表达的 Northern 印迹杂交分析

通过 Northern 印迹杂交检测了 DXS 基因在烟草的根、茎、叶和花器官中的表达水平(图 5)。从图 5 可以看出, 在叶片中, DXS 基因的表达水平最高, 其次是在幼茎中, 而在根和花器官中该基因的表达水平很低, 仅检测到微弱的杂交信号。

4. 讨论

目前, 植物萜类物质在其生存和生长发育过程中的重要作用, 以及对疾病治疗和保健方面的有效性逐渐为人们所认识。萜类物质是通过异戊二烯代谢途径合成的, 首个关键酶 DXS 的研究虽仅有 10 余年

Caann	MALCAYAFPGILNRTVAVASDASKPTPLFSEWIHGTDLQFQFHQKLT-QVKKRSRTVQAS	59
Solyc	MALCAYAFPGILNR-TGVVSDSSKATPLFSGWIHGTDLQFLFQHKLTHEVKKRSRVVQAS	59
Nitab	MALCNYAVPGILNR-TVASDYKQSPFLFSELFHGTDLQYQFQHKLT-RVKKRSRGVQAS	57
	**** *.***** *.*.*.* :**** :*****: *::*** .***** ****	
Caann	LSESGEYTTQRPPTPIVDITINYP IHMKNLSL KELKQLADELRSDTIFNVSKTGGHLGSSL	119
Solyc	LSESGEYTTQRPPTPIVDITVNYPIHMKNLSL KELKQLADELRSDTIFNVSKTGGHLGSSL	119
Nitab	LSEKGEYYAQRPPPTLLDTINYP IHMKNLSV KELKQLAEELRSDTIFNVSKTGGHLGSSL	117
	.:*****:*.**:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Caann	GVVELTVALHYVFNAPQDRILWDVGHQSYPHKIL TGRREKMSL RQTNGLAGFTKRSESE	179
Solyc	GVVELTVALHYVFNAPQDRILWDVGHQSYPHKIL TGRRDKMSL RQTDGLAGFTKRSESE	179
Nitab	GVVELTVALHYVFNTPQDRILWDVGHQSYPHKIL TGRRGKMSL RQTDGLAGFTKRSESE	177
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Caann	YDCFGTGHSSTTISAGLGMVGRDLKGRNNNVIAVIGDGAMTAGQAYEAMNAGYLDSDM	239
Solyc	YDCFGTGHSSTTISAGLGMVGRDLKGRNNNVIAVIGDGAMTAGQAYEAMNAGYLDSDM	239
Nitab	YDCFGTGHSSTTISAGLGMVGRDLKGRNNNVIAVIGDGAMTAGQAYEAMNAGYLDSDM	237
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Caann	IVILNDRQVSLPTATLDGPVPPVGLSSAL SRLQSNRPLRELREVAKGVTKIGGPMHE	299
Solyc	IVILNDRQVSLPTATLDGPVAPVGLSSAL SRLQSNRPLRELREVAKGVTKIGGPMHE	299
Nitab	IVILNDRQVSLPTATLDGPAPPVGLSRAL SRLQSNRPLRELREVAKGVTKIGGPMHE	297
	*****.***** *****:*****:*****:*****:*****:*****	
Caann	LAAKVDEYARGMISGSGSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLISILKEVRSTKTTGPVLIHV	359
Solyc	LAAKVDEYARGMISGSGSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLIAILKEVRSTKTTGPVLIHV	359
Nitab	LAAKVDEYARGMISGSGSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLISILKEVRSTKTTGPVLIHV	357
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Caann	VTEKGRGYPYAERAADKYHGVAKFDPATGKQFKGSAKTQSYTTYFAEALIAEAEADKDIV	419
Solyc	VTEKGRGYPYAERAADKYHGVAKFDPATGKQFKASAKTQSYTTYFAEALIAEAEADKDIV	419
Nitab	ITEKGRGYPYAERAADKYHGVAKFDPATGKQFKVSAKTQSYTTYFAEALIAEAEADKDIV	417
	:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Caann	AIHAAMGGGTGMNIFLRRFPTRCFDVGIAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSFMQRAY	479
Solyc	AIHAAMGGGTGMNIFHRRFPTRCFDVGIAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSFMQRAY	479
Nitab	AIHAAMGGGTGMNIFHRRFPNRCFDVGIAEQHAVTFAAGLACEGLKPFCAIYSSFLQRAY	477
	*****:* ****.*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Caann	DQVVHVDLQKLPVRFAMDRAGLVGADGPTHCGAFDVTYMACLPNMVVMAPSDEAELFHI	539
Solyc	DQVVHVDLQKLPVRFAMDRAGLVGADGPTHCGAFDVTYMACLPNMVVMAPSDEAELFHM	539
Nitab	DQVVHVDLQKLPVRFAMDRAGLVGADGPTHCGAFDVTYMACLPNMVVMAPSDETELPHM	537
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Caann	VATAAAIDDRPSCFRYPNGIGVELPAGNKGIPLEVGKGRILVEGERVALLGYGSAVQN	599
Solyc	VATAAAIDDRPSCFRYPNGIGVELPAGNKGIPLEVGKGRILIEGERVALLGYGSAVQN	599
Nitab	VATAAAIDDRPSCFRYPNGIGVELPVGNKGIPLEVGKGRILVEGERVALLGYGSAVQN	597
	*****.*** *****:*****:*****:*****:*****:*****	
Caann	CLAAASVLESRLQVTVADARFCKPLDRALIRSLAKSHEVLITVEEGSIGFGSHVQFM	659
Solyc	CLDAAVLESRLQVTVADARFCKPLDHALIRSLAKSHEVLITVEEGSIGFGSHVQFM	659
Nitab	CLAAA VLVTRGLQVTVADARFCKPLDHALIRSLAKSHEVLITVEEGSIGFGSHVQFM	657
	.*.*.* :***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

Figure 3. Deduced amino acid sequence and homology of *N. tabacum* DXS. Shown is the homology of the deduced DXS (CBA12009) with the other two DXSs: *Capsicum annuum* DXS (O78328) and *Solanum lycopersicum* DXS (AAD38941). Identical amino acids are indicated by asterisks and conservative substitutions by dots

图 3. 烟草 DXS 的氨基酸同源性序列比对分析。图中显示的是烟草的 DXS (CBA12009) 与辣椒的 DXS (O78328) 以及番茄的 DXS (AAD38941) 序列比对结果。其中完全保守的氨基酸用星号标识, 较保守的氨基酸用双点标识, 而一般保守的氨基酸用单点标识

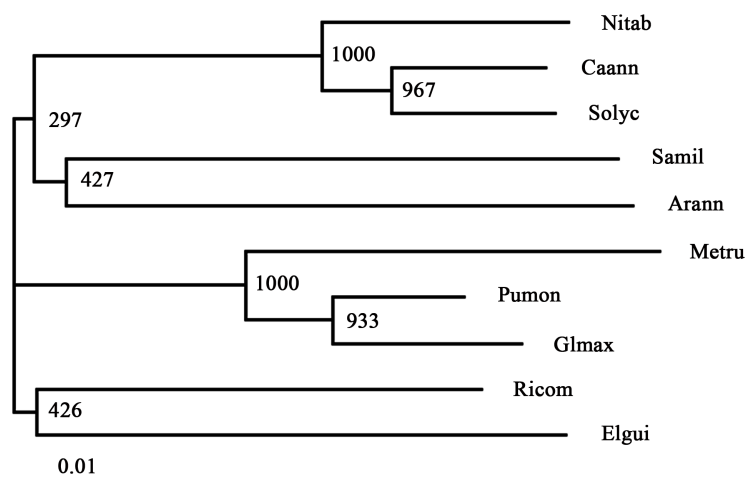


Figure 4. Phylogenetic tree of *N. tabacum* DXS with other plant DXS sequences constructed by the neighbor-joining method. Sequences used: Nitab: *N. tabacum*, GenBank accession number: CBA12009; Caann: *C. annuum*, O78328; Solyc: *S. lycopersicum*, AAD38941; Samil: *Salvia miltiorrhiza*, ACF21004; Arann: *Artemisia annua*, AAD56390; Metru: *Medicago truncatula*, CAD22530; Pumon: *Pueraria montana*, AAQ84169; Glmax: *Glycine max*, ACO72582; Ricom: *Ricinus communis*, EEF45457; Elgui: *Ricinus communis*, EEF45457. The tree was constructed with the highly conserved region of *N. tabacum* DXS. The bootstrap values with 1000 trials are shown on branches. The scale bar represents 0.01 nucleotide substitutions every site. The name is composed of a species abbreviation (the first two letters of the genus plus the first three letters of the specific name)

图 4. 使用邻接法构建的包含烟草的 DXS 与其它 9 种植物的 DXS 的进化树关系图。Nitab: 烟草, GenBank 登录号: CBA12009; Caann: 辣椒, O78328; Solyc: 番茄, AAD38941; Samil: 红参, ACF21004; Arann: 黄花蒿, AAD56390; Metru: 苜蓿, CAD22530; Pumon: 山葛, AAQ84169; Glmax: 大豆, ACO72582; Ricom: 蓖麻, EEF45457; Elgui: 油棕, EEF45457。1000 次的自举检验置信度值标于分支线上。比例尺代表每位点 0.01 个核苷酸的替换。名称用属名的前两个字母加上种名的前三个字母表示

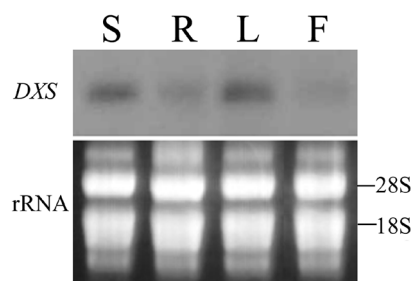


Figure 5. Detection of DXS gene expression by Northern blot hybridization, using the RNA samples extracted from the indicated tissues of *N. tabacum*, respectively. S: stem; R: root; L: leaf; F: flower. Total RNA acts as inner reference. The italic words “*DXS*” represent probes used in the hybridization experiment. “28S” and “18S” represent “28S rRNA” and “18S rRNA” from total RNA are indicated

图 5. Northern blot 杂交分析。探针为 5'末端的 cDNA 片段; L、S、F 和 R 分别代表烟草的叶、茎、花和根。以每个泳道中的 rRNA 作为内参。斜体 “*DXS*” 代表用于杂交中的基因探针。“28S” 和 “18S” 分别代表总 RNA 中的 “28S rRNA” 和 “18S rRNA”

历史, 但已经取得了令人瞩目的成就[11]。

在异戊二烯代谢途径中, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)是关键酶, 而 1-脱氧木酮酸-5-磷酸酯合成酶(DXS)、5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(DXR)均为萜类分子代谢途径中的限速酶。如 Chappell 等曾报道烟草倍半萜化合物会因为 HMGR 受到抑制而明显减少[12]。利用 CaMV 35S 启动子驱动薄荷的 DXR 基因并导入薄荷中, 转基因植株的薄荷精油的含量会显著提高, 甚至可达 50% [13] [14]。

我们知道烟叶香气是衡量其质量的重要因素之一, 但是烟草中香味成分复杂且繁多, 而且含量较低,

如果增加单一物质的含量并不能显著提高香味,而且有可能导致香气组分发生改变,使得烟叶香气发生质的改变。鉴于此,要通过遗传修饰的方式改良烟草香味,需要考虑把 HMGR、DXS 和 DXR 等基因同时进行转移,筛选出香味浓郁的转基因植株,实现对多酚类化合物合成关键基因表达的人为调控,从整体上来影响烟叶类黄酮化合物的含量,增加烟叶的香气量。

烟草的 DXR 和 HMGR 基因全长 cDNA 序列(登录号分别为: DQ839130 和 U60452)已获得。本研究通过 RACE 技术成功获得了烟草 DXS 基因的全长 cDNA 序列,并通过 Northern 印迹杂交证实了烟草 DXS 基因在绿色组织主要在叶片中高水平表达,为研究该基因的功能及通过转基因方式调控其表达,及进一步改良烟草香气品质打下了良好基础。

基金项目

湖北省教育厅重点项目(D20091007)和湖北省科技厅基金项目面上项目(2010CDB04504)。

参考文献

- [1] 史宏志, 刘国顺. 烟草香味学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 144-146.
- [2] 崔红, 宋志红. 类萜代谢工程研究进展及在烟草品种改良中的应用前景[J]. 中国烟草学报, 2003, 9(2): 35-38.
- [3] 金蓉, 朱长青, 徐昌杰. 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)及其编码基因[J]. 细胞生物学杂志, 2007(29): 706-712.
- [4] 刘玲, 余义勋. 植物香气的合成和代谢的分子生物学研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(6): 289-294.
- [5] Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876-4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- [6] Liaquat, A. (1996) TreeView: An Application to Display Phylogenetic Tree on Personal Computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.
- [7] Nielsen, H., Engelbrecht, Y., Brunak, S. and Heijne, G. (1997) Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Signal Peptides and Prediction of Their Cleavage Sites. *Protein Engineering, Design and Selection*, **10**, 1-6. <https://doi.org/10.1093/protein/10.1.1>
- [8] Fraser, D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W. and Bramley, P.M. (1994) Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiology*, **105**, 405-413. <https://doi.org/10.1104/pp.105.1.405>
- [9] Bouvier, F., D'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R.A. and Camara, B. (1998) Dedicated Roles of Plastid Transketolases during the Early Onset of Isoprenoid Biogenesis in Pepper Fruits. *Plant Physiology*, **117**, 1423-1431. <https://doi.org/10.1104/pp.117.4.1423>
- [10] Li, H., Ma, D., Jin, Y., Tu, Y., Liu, L., Leng, C., Dong, J. and Wang, T. (2015) Helper Component-Proteinase Enhances the Activity of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase and Promotes the Biosynthesis of Plastidic Isoprenoids in Potato Virus Y-Infected Tobacco. *Plant, Cell & Environment*, **38**, 2023-2034. <https://doi.org/10.1111/pce.12526>
- [11] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- [12] Facchini, P. and Chappell, J. (1992) Gene Family for an Elicitor-Induced Sesquiterpene Cyclase in Tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 3088-3092.
- [13] Lanne, M. and Croteau, R. (1999) Isoprenoid Biosynthesis via a Mevalonate Pathway in Plant. Cloning and Heterologous Expression of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase from Peppermint. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **365**, 170-174. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1168>
- [14] Mahmoud, S. and Croteau, R. (2001) Metabolic Engineering of Essential Oil Yield and Composition in Mint by Altering Expression of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase and Menthofuran Synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 8915-8920. <https://doi.org/10.1073/pnas.141237298>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2168-5665，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：br@hanspub.org