

蛇足石杉 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(*HsDXR1*)基因克隆与表达分析*

□罗红梅 李 标 林余霖 宋经元 何 柳 孙 超**

(中国医学科学院 药用植物研究所/濒危药材繁育国家工程实验室 北京 100193)
北京协和医学院

李榕涛 (中国医学科学院 药用植物研究所海南分所 海口 570100)
北京协和医学院

胡志刚 (湖北中医药大学药学院 武汉 430065)

摘 要: 基于本实验室已获得的蛇足石杉转录组数据, 获得一个编码 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR)的转录本, 分析其开放阅读框序列, 发现该转录本编码全长为 1 440 bp 的蛇足石杉 DXR 基因(*HsDXR1*), 含有 479 个氨基酸残基。采用 RT-PCR 方法获得了 *HsDXR1* 全长, 并对 *HsDXR1* 编码蛋白的理化性质、结构域及三维结构进行预测分析。结果显示 *HsDXR1* 编码蛋白的预测分子量为 51.496 1 kDa, 等电点为 6.44; 不含信号肽和跨膜区; 亚细胞定位预测表明该蛋白最可能定位于叶绿体; 具有 DXR 蛋白典型的结构域。实时荧光定量 PCR 检测 *HsDXR1* 基因在蛇足石杉的茎中表达量最高, 其次为根, 在叶中表达量最低。本研究获得了蛇足石杉 *HsDXR1* 基因的编码区序列, 为进一步研究 *HsDXR1* 在蛇足石杉萜类化合物生物合成途径中的功能奠定基础。

关键词: 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸还原异构酶 蛇足石杉 基因克隆 表达分析

doi: 10.11842/wst.2013.03.002 中图分类号: R282 文献标识码: A

萜类(Terpene)是广泛存在于植物体内的一类天然烃类化合物, 异戊二烯(Isoprene)是其骨架的基本组成单元, 化学通式为(C_5H_8)_n。依据所含异戊二烯数目的不同, 萜类化合物可分为单萜(Monoter-

pene, C₁₀)、倍半萜(Sesquiterpene, C₁₅)、二萜(Diterpene, C₂₀)、三萜(Triterpene, C₃₀)、四萜(Tetaterpene, C₄₀)和多萜(Polyterpene, C>40)等^[1]。萜类化合物通常是由甲羟戊酸途径(Mevalonate pathway, MVA)和/或丙酮酸途径(DXP)合成的, 两者都可生成萜类化合物的中间产物——异戊烯基

收稿日期: 2013-05-24

修回日期: 2013-06-04

* 国家自然科学基金委青年科学基金项目(30900113) 基于宏量 ESTs 的蛇足石杉转录组分析及石杉碱甲合成酶(HAS)基因的鉴定研究, 负责人: 罗红梅, 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT1150) 中药资源学, 负责人 陈士林。

** 通讯作者: 孙超, 副研究员, 硕士生导师, 主要研究方向: 中药资源学。

焦磷酸(Isopentenyl pyrophosphate, IPP)。丙酮酸途径又名丙酮酸-3-磷酸甘油醛途径(Pyruvate/glyceraldehydes-3-phosphate pathway)^[2],以丙酮酸(Pyruvate)和磷酸甘油(Glyceraldehydes-3-phosphate)为起始原料,在1-脱氧木糖-5-磷酸合成酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXPS)催化下聚合生成该途径的关键前体化合物1-脱氧木糖-5-磷酸(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP)。DXP在1-脱氧木糖-5-磷酸还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR)、2-甲基赤藓糖-4-磷酸胞苷转移酶(2C-methylerythritol-4-phosphate cytidyltransferase, MCT)、4-磷酸胞苷-2-甲基赤藓糖激酶[4-(cytidine 5'-diphospho)-2C-methylerythritol kinase, CMK]和2-甲基赤藓糖-2,4-环二磷酸合成酶(2C-methylerythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase, MECPTS)的催化下生成中间体2-甲基赤藓糖-4-磷酸(2C-methylerythritol-4-phosphate, MET),后者再经磷酸化、环化等步骤生成IPP,进而生成萜类化合物。因此,DXR是该途径中的关键酶之一,催化DXP生成甲基赤藓糖酸醇酯。植物DXR蛋白N端通常包含73~80个氨基酸残基,这是典型的质体转运肽序列,决定该酶定位于质体中^[3]。

蛇足石杉[*Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray)]为石杉科石杉属蕨类植物,俗名千层塔,是我国传统民间草药,常用于治疗跌打损伤、瘀血肿痛、精神分裂、肌肉痉挛等疾病^[4]。蛇足石杉中除了含有其主要活性成分——石杉碱甲等生物碱外,还含有萜类化合物。其中,以千层塔三萜(Serratane)的研究较多。千层塔三萜又称锯齿石松烷三萜^[5],具有丰富的结构类型和多样的生物活性,例如:有抑制分泌型天冬氨酸蛋白酶^[6]、抗肿瘤^[7]等生理活性。目前已有多种萜类化合物从蛇足石杉中被分离出来,但其生物合成途径的研究仍鲜有报道。罗红梅等^[8]克隆了蛇足石杉的环阿屯醇合成酶(*HsCAS*) ;牛云云等^[9]从龙骨马尾杉中也克隆了一个环阿屯醇合成酶(*HcCAS1*)基因。殷秀梅等^[10]克隆并分析了蛇足石杉中的鲨烯氧化酶(*HsSQS1*)。随后,龙骨马尾杉中的法尼基焦磷酸合酶(*HcFPS1*)、蛇足石杉的鲨烯单加氧酶(*HsSE1*)等相继被克隆(未发表)。以上研究为开展蛇足石杉萜类化合物生物合成途径研究奠定了良好基础。

本研究从蛇足石杉中克隆的一个萜类DXP合成途径的限速酶基因——1-脱氧木糖-5-磷酸还原异构酶(*HsDXR1*),并利用生物信息学方法预测了其编码蛋白的结构域和三维结构,分析了蛋白的理化特性及可能的亚细胞定位情况;利用实时荧光定量PCR方法检测了基因在蛇足石杉根、茎、叶中的表达丰度,为后续开展*HsDXR1*的功能验证奠定基础。

一、材料与方法

1. 材料、试剂及仪器

(1)材料。

蛇足石杉(*Huperzia serrata*)全草,采自海南省霸王岭自然保护区(海拔1320 m,109°10'E,19°7'N)。采集后用清水冲洗干净后用吸水纸吸去水分,置于液氮速冻,-80℃保存、备用。大肠杆菌*DH5α*感受态购于北京全式金生物科技有限公司。

(2)试剂和仪器。

植物多糖多酚核糖核酸(RNA)提取试剂盒购于百泰克生物公司。PrimeScript反转录试剂盒、pMD19-T vector、SYBR®Premix Ex Taq™试剂盒、Pyrobest高保真酶均为日本宝生物公司(TaKaRa)产品。PCR产物胶回收试剂盒购于天根生物公司。引物由北京生物工程有限公司合成;序列测定由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。其它试剂均为国产分析纯试剂。仪器包括PCR扩增仪(ABI 9600);实时荧光定量PCR仪(ABI7500, USA);移液器(Gilson);凝胶成像系统(美国伯乐);紫外可见分光光度计(Nanodrop 2000,美国);高压蒸汽灭菌锅(Sanyo);-80℃超低温冰箱(Thermo);恒温水浴槽(北京精科华瑞仪器有限公司);DYY-8C型电泳仪(北京六一电泳厂);培养箱(北京议嘉林科技有限公司);制冰机(Scotsman);Sigma-1-14小型台式高速离心机(Sigma)等。

2. 方法

(1)RNA提取及反转录^[8]。

(2)*HsDXR1*的序列扩增及测定。

以蛇足石杉cDNA为模板,按照以下PCR反应体系对基因进行扩增:cDNA 2.0 μL,Pyrobest酶0.2 μL,10 μmol上下游引物(F:gaattcATGGCAGCACT-CACTCTCCACT R:ctcgagTTAACTGTAACAGGTGCT-GATG)各0.6 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTP 0.6 μL,10×Pyrobest Buffer 3.0 μL,加ddH₂O补充使终体积为

30.0 μL 。反应程序为 94℃ 预变性 5 min ,然后进行 30 个循环 ,94℃ 30 s ,57℃ 30 s ,72℃ 2 min ,循环结束后 72℃ 7 min 延伸反应 ,10℃ 保温。PCR 扩增结果利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测 ,对扩增所得目的片段进行切胶回收。将回收产物与 pMD19-T 载体连接 ,转化 *DH5 α* 感受态细胞 ,在含有氨苄抗性的 LB 平板上进行培养 ,挑取单克隆经菌落 PCR 扩增和电泳检测后选择阳性克隆送公司测序。

(3) *HsDXR1* 编码蛋白的生物信息学分析。

使用在线的分析软件或网站对 *HsDXR1* 编码蛋白进行生物信息学预测分析 ,所使用的在线工具及相应网站链接如表 1 所示。

(4) 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 分析 *HsDXR1* 的表达特异性。

为了检测 *HsDXR1* 基因在不同组织/器官的表达情况 ,利用实时荧光定量 PCR 方法检测 *HsDXR1* 基因在蛇足石杉根、茎、叶中的相对表达量 ,实时定量 PCR 检测的反应体系为 :2 $\times$ SYBR $\text{\textcircled{R}}$ PremixEx TaqTM 10 μL ;正反向引物 (rF :ACAGCCACTCC-CTCTCTCAA ;rR :AGAAGCCGAGGAaCAAGACA) 浓度均为 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;cDNA 模板 1 μL ;加水补足至 25 μL 。每个反应体系至少重复 3 次。实时定量 PCR 扩增程序如下 :95℃ 30 s ,以下反应 40 个循环 ,95℃ 5 s ,60℃ 34 s ,循环结束。实时定量 PCR 反应均以蛇足石杉三磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*) 为内参基因 (F :TGAGGTCGTCGTTTTGAATG ;R :AGCTCCAGCTTGAATGTGCT) ,组织表达以叶中的表达量为对照。仪器采用美国 ABI7500 实时 PCR 检测系统。

二、结果与分析

1. 蛇足石杉 *HsDXR1* 基因的克隆

通过搜索蛇足石杉高通量转录组数据^[11,12] ,从中发现一个转录本被注释为 1-脱氧木糖-5-磷酸还原异构酶基因。分析发现该转录本具有一个完整的开放阅读框 (Open reading frame ,ORF) 。根据该开放阅读框序列设计基因全长扩增引物 ,以蛇足石杉全草 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板 ,利用 PCR 扩增获得一条长为 1 440 bp 的序列 ,对所扩增基因命名为 *HsDXR1*。对扩增片段进行切胶回收 ,再连入测序载体 ,转化大肠杆菌 *DH5 α* 感受态细胞 ,再利用菌落 PCR 方法鉴定阳性克隆 ,对所得阳性克隆进行测序 ,并将序列提交至国际公共数据库 GenBank ,获得序列登录号为 KC847064。

2. *HsDXR1* 基因编码蛋白的理化性质分析

利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 对 *HsDXR1* 基因编码蛋白质的理化性质进行预测 ,结果显示 *HsDXR1* 的分子式为 $\text{C}_{2305}\text{H}_{3679}\text{N}_{623}\text{O}_{685}\text{S}_{13}$,编码 479 个氨基酸 ,分子量是 51.496 1 kDa。等电点 pI 为 6.44 ,带正电残基 (Arg + Lys) 为 51 ,带负电残基 (Asp + Glu) 也为 54。该蛋白的不稳定系数 (the instability index) 为 39.79 ,说明 *HsDXR1* 稳定。脂肪系数 (Aliphatic index) 为 93.97 ,亲水性系数 (Grand average of hydropathicity ,GRAVY) 为 -0.047。

3. *HsDXR1* 编码蛋白的结构域及信号肽、亚细胞定位预测分析

InterProScan 保守结构域在线预测结果表明 ,*HsDXR1* 编码蛋白含有 3 个 1-脱氧木糖-5-磷酸还

表 1 预测分析 *HsDXR1* 编码蛋白特性所用的生物信息学在线工具

在线工具	网址	蛋白分析
ExPASy Proteomics Server	http://www.expasy.ch/tools/protparam.html	理化性质
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	结构域
SWISS-MODEL	http://swissmodel.expasy.org/	三维结构
SignalP3.0Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	信号肽
WOLF PSORT	http://wolfpsort.org/	定位信号
TMHMM Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	跨膜区

原异构酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase)保守结构域,分别是 IPR003821、IPR013512 和 IPR013644 这些结构域分别位于 82-470 位、85-213 位和 227-310 位氨基酸残基之间(表 2)。

4. *HsDXR1* 编码蛋白的三维结构建模

在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中,以运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的 DXR 蛋白(PDB:1R0K)为模板预测了 *HsDXR1* 编码蛋白的三维结构(图 1)。SignalP3.0Server*预测结果显示 *HsDXR1* 蛋白不具有信号肽。在线工具 WOLF PSORT**预测该蛋白的亚细胞定位情况如下:叶绿体的定位系数为 8.0(chlo: 8.0),细胞外基质的定位系数为 1.0(extr: 3.0);细胞质的定位系数为 1.0(cyto: 1.0);线粒体的定位系数为 1.0(mito: 1.0)。因此,*HsDXR1* 编码蛋白最可能定位于叶绿体中。利用 TMHMM Server v. 2.0***预测 *HsDXR1* 编码蛋白不含跨膜区。

5. *HsDXR1* 编码蛋白的氨基酸序列比对及蛋白的系统进化分析

将 *HsDXR1* 编码蛋白的氨基酸序列与拟南芥的 DXR(At5g62790)和水稻的 DXR(Os01g0106900)蛋白进行比对分析,结果如图 2 所示,*HsDXR1* 与拟南芥和水稻的 DXR 一样,成熟蛋白 N 末端具有富含脯氨酸的结构 PPPAWPGR,且在 N 端具有保守的 NADPH 结合位点 GSTGSIG,中部具有 2 个同源二聚体结合位点 LPADSEHSAIFQ 和 NKGLEVIEAHYLF。

为分析 *HsDXR1* 编码蛋白的系统进化情况,我们选取了杜仲(*Eucommia ulmoides*)的 DXR(AFU93070)、大豆(*Glycine max*)的 DXR(NP_001240062)、拟南芥

(*Arabidopsis thaliana*) 的 DXR (NP_201085)、丹参(*Salvia miltiorrhiza*)的 DXR(ACK57535)、水稻(*Oryza sativa Japonica Group*)的 DXR(NP_001041780)、水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)的 DXR(ADD82536)、火炬松(*Pinus taeda*)的 DXR(ACJ67022)、红豆杉(*Taxus cuspidata*)的 DXR(AAT47184)、银杏(*Ginkgo biloba*)的 DXR(AAR95700)、番茄(*Solanum lycopersicum*)的 DXR(NP_001234553)、胶球藻属(*Coccomyxa subellipsoidea* C-169)的 DXR(EIE23728)、雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)的 DXR(AEY80027)、杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)的 DXR(ACT21081)、颤藻蓝细菌(*Oscillatoria acuminata* PCC 6304)的 DXR(YP_007084792),采用 Neighbor-joining 法构建系统进化树(图 3)。细菌的 DXR 独立聚为一支,藻类的 DXR 聚为一支,其余的裸子植物和被子植物的 DXR 各聚为一支。蛇足石杉为蕨类植物,其 DXR 蛋白单独聚为一支(图 3)。

6. *HsDXR1* 的组织特异性表达分析

利用实时荧光定量 PCR 方法检测了 *HsDXR1* 的组织表达特异性,结果表明该基因在蛇足石杉的茎中表达量最高,其次是根和叶(图 4)。

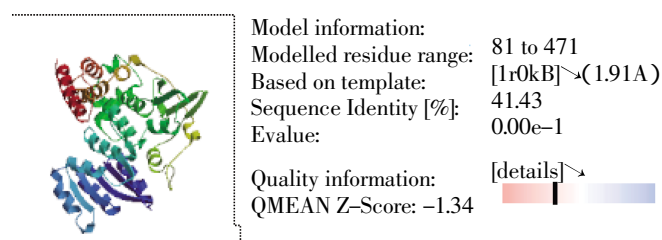


图 1 *HsDXR1* 编码蛋白的三维模型

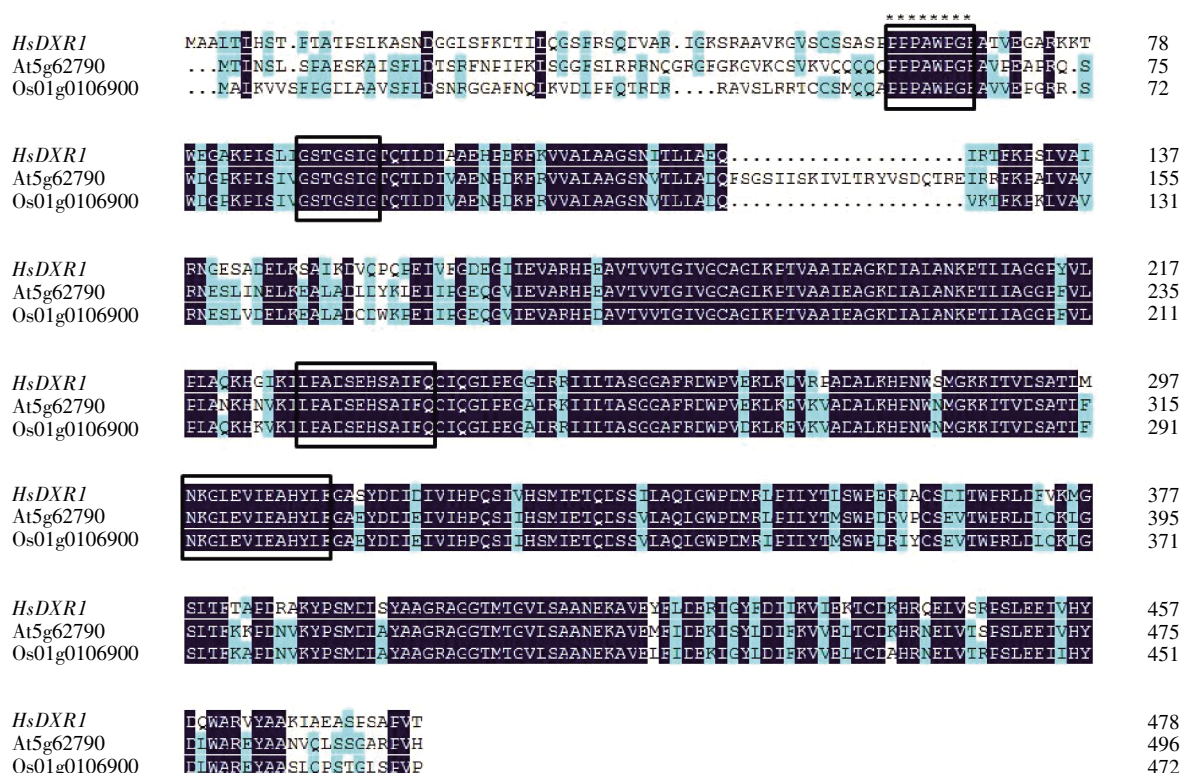
表 2 Interpro Scan 预测分析 *HsDXR1* 蛋白结构域

IPR 号	结构域	氨基酸位置	结构域简写
IPR003821	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, Family	82 - 470	Dxr: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoi
IPR013512	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, N-terminal, Domain	85 - 213	DXP_reductoisom
IPR013644	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, C-terminal, Domain	227 - 310	DXP_redisom_C

* <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

** <http://wolfsort.org/>

*** <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

图2 *HsDXR1* 与拟南芥和水稻的 DXR 蛋白序列比对分析

三、讨论

蛇足石杉是石杉属蕨类植物，因其主要活性成分——石杉碱甲的分离及其在治疗老年性痴呆方面的显著活性而备受关注。随着石杉碱甲活性研究的深入，人们也开始探索蛇足石杉中其他次生代谢成分的分离及活性鉴定。本课题组基于本草基因组研究计划^[11-14]，在前期研究中，获得了蛇足石杉大量转录组信息，并从中发现了可能参与生物碱、萜类、黄酮等化合物的生物合成相关基因^[15,16]。

DXR (EC:1.1.1.267) 是植物萜类生物合成 DXP

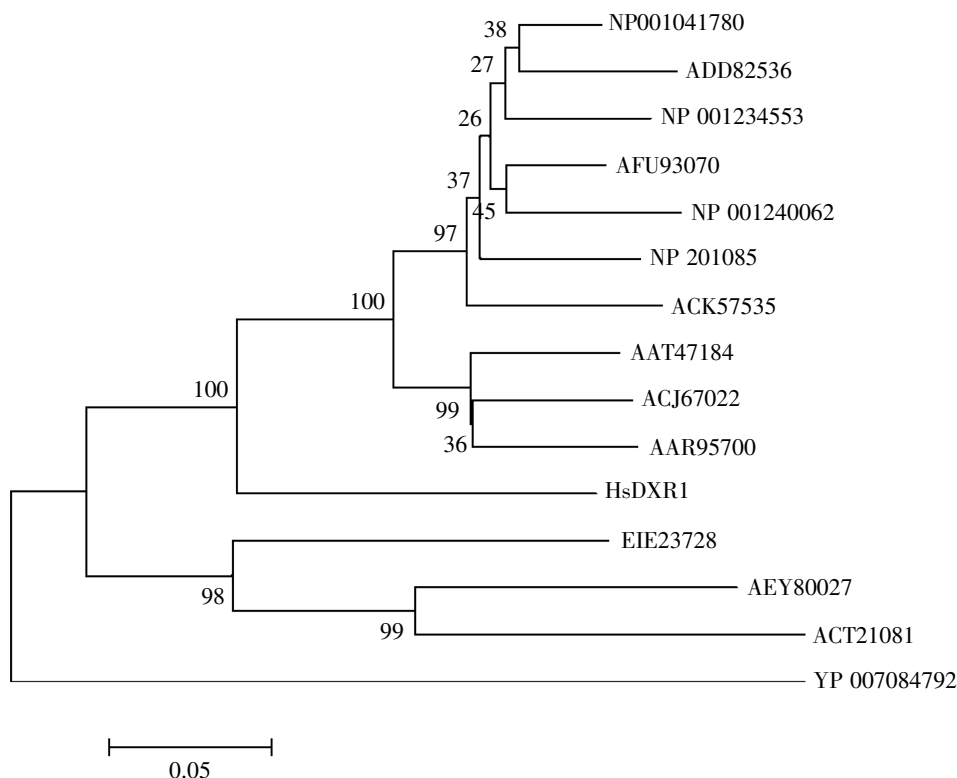
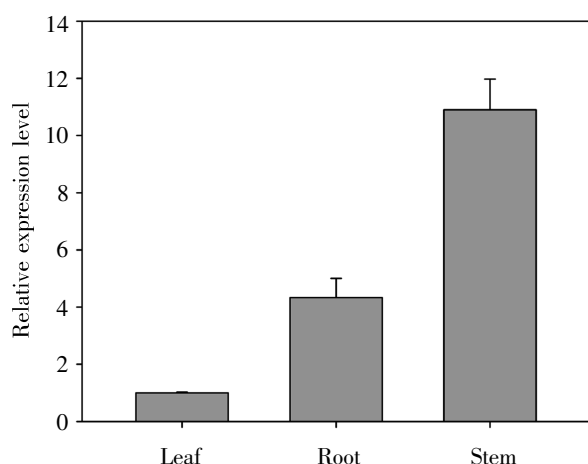


图3 DXRs 的进化树分析

图4 *HsDXR1* 的组织表达分析

参考文献

- 1 陈建, 赵德刚. 植物萜类生物合成相关酶类及其编码基因的研究进展. 分子植物育种, 2004, 2(6):757~764.
- 2 Eisenreich W, Schwarz M, Cartayrade A, *et al.* The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem Biol*, 1998, 5(9):221~233.
- 3 Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, *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. *Plant Physiol*, 2002, 129(4):1581~1591.
- 4 Guo B, Xu L L, Wei Y H, *et al.* Research advances of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.. *China J Chin Mater Med*, 2009, 34 (16): 2018~2023.
- 5 王小宁, 姜红祥. 扁枝蕨中锯齿石松烷型三萜的 NMR 化学位移全归属. 波谱学杂志, 2005, 22 (1):35~41.
- 6 Zhang Z, Elsohly H N, Jacob M R, *et al.* Natural products inhibiting candida albicans secreted aspartic proteases from *Lycopodium cernuum*. *J Nat Prod*, 2002, 65(7):979~985.
- 7 Reiko T, Toshifumi M, Yohei I, *et al.* Cancer chemopreventive activity of serratane-type triterpenoids on two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, 2003, 196(2):121~126.
- 8 罗红梅, 张鑫, 殷秀梅, 等. 蛇足石杉 *HsCAS1* 基因克隆及序列分析. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(1):1159~1165.
- 9 牛云云, 罗红梅, 陈士林, 等. 龙骨马尾杉环阿屯醇合成酶(*HsCAS1*)基因的克隆和生物信息学分析. 中国中药杂志, 2012, 37 (12): 1715~1719.
- 10 殷秀梅, 白志川, 牛云云, 等. 蛇足石杉鲨烯合酶 *HsSQS1* 基因克隆和序列分析. 药学报, 2012, 47(8):1079~1084.
- 11 陈士林, 孙永珍, 徐江, 等. 本草基因组计划研究策略. 药学报, 2010, 45(7):807~812.
- 12 陈士林, 朱孝轩, 李春芳, 等. 中药基因组学与合成生物学. 药学报, 2012, 47(8):1070~1078.
- 13 陈士林, 何柳, 刘明珠, 等. 本草基因组方法学研究. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(3):316~324.
- 14 孙超, 胡鸾雷, 徐江, 等. 灵芝: 一种研究天然药物合成的模式真菌. 中国科学 C, 2013, 43(5):1~10.
- 15 Luo H M, Sun C, Li Y, *et al.* Analysis of expressed sequence tags from the *Huperzia serrata* leaf for gene discovery in the areas of secondary metabolite biosynthesis and developmental regulation. *Physiol Plant*, 2010, 139(1):1~12.
- 16 Luo H M, Li Y, Sun C, *et al.* Comparison of 454-ESTs from *Huperzia serrata* and *Phlegmariurus carinatus* reveals putative genes involved in lycopodium alkaloid biosynthesis and developmental regulation. *BMC Plant Biol*, 2010, 10:209.
- 17 Lichtenthaler H K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50:47~65.

途径中的一个关键酶, 主要参与单萜、二萜等化合物的合成。DXP 途径存在于质体中^[17]。过量表达 DXR 的转基因薄荷挥发油含量比野生型提高了 50%^[18]。在烟草中过量表达来源于蓝藻 (*Synechocystis* PCC6803) 的 DXR 基因, 提高了多种萜类物质的含量^[19]。这些研究表明 DXR 基因直接参与萜类物质的合成和调控。

蛇足石杉中 DXR 基因的克隆, 为在该植物中分离到相应的单萜、二萜等化合物提供证据。生物信息学预测表明, *HsDXR1* 编码蛋白含有典型的 1-脱氧木糖-5-磷酸还原异构酶保守结构域; 与拟南芥和水稻的 DXR 相比, 具有相同的 N 末端富含脯氨酸的结构及保守的 NADPH 结合位点, 同时具有 2 个同源二聚体结合位点, 这表明 *HsDXR1* 活性位点基序与其他植物 DXR 的分子结构分析一致。同时, 提示来源于不同植物的 DXR 功能域具有较高保守性。对 *HsDXR1* 蛋白的亚细胞定位预测结果显示, 该基因编码的成熟蛋白最可能定位于叶绿体, 在质体行使催化功能, 这与 DXP 合成途径的细胞定位是一致的。实时荧光定量 PCR 检测到 *HsDXR1* 在蛇足石杉的茎中表达量最高, 这与喜树 *CaDXR* 定位情况相一致, *CaDXR* 在茎部的表达量也高于叶片与根部的表达量^[20]。

本研究为验证 *HsDXR1* 的分子功能提供依据。后续将利用蛋白异源表达及功能互补等实验检测 *HsDXR1* 的生物学功能, 为阐明蛇足石杉萜类的生物合成途径奠定基础。

- 18 Hasunuma T, Takeno S, Hayashi S, *et al.* Overexpression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production. *J Biosci Bioeng*, 2008, 105(5):518~526.
- 19 Mahmoud S S, Croteau R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15):8915~8920.
- 20 Yao H, Gong Y, Zuo K, *et al.* Molecular cloning, expression profiling and functional analysis of a *DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Camptotheca acuminata*. *J Plant Physiol*, 2008, 165(2):203~213.

Cloning and Expression Analysis of *HsDXR1* in *Huperzia serrata*

Luo Hongmei¹, Li Biao¹, Lin Yulin¹, Song Jingyuan¹, He Liu¹, Sun Chao¹, Li Rongtao², Hu Zhigang³

(1. National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Hainan Branch Institute of Medicinal Plant Development (HBIMPLAD), Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Haikou 572522, China;

3. Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract: The transcript encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) was discovered from the transcriptome data of *Huperzia serrata*. The transcript contained an open reading frame with length of 1,440 bp and coded 479 amino acids. The full length of *HsDXR1* had been cloned using RT-PCR method. According the bioinformatic analysis, the molecular weight of *HsDXR1* protein was 51.4961 kDa and the pI was 6.44. No signal peptide and transmembrane site was discovered in *HsDXR1*, and the protein was most likely to be located in chloroplast. *HsDXR1* had the same domain similar to the DXR protein of *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. The expression level of *HsDXR1* was most abundantly in *H. serrata* stem, followed by root and leaf. This study cloned and analyzed *HsDXR1* gene from *H. serrata* for the first time. The result will provide a foundation for exploring the mechanism of terpene biosynthesis in *H. serrata* plants.

Keywords: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, *Huperzia serrata*, gene clone, expression analysis

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 陈士林)