

决明异分支酸合酶基因的克隆及表达分析^①

李关荣¹, 艾义¹, 谭燕¹, 米瑶¹,
朱林蕙¹, 李培江¹, 齐红艺²

1. 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400716; 2. 西南大学 药学院, 重庆 400716

摘要: 异分支酸合酶(Isochorismate synthase, ICS)控制着分支酸到异分支酸衍生的各种产物的分配, 据报道它是植物体内蒽醌类物质合成的限速酶。该文采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术克隆其基因全长(*SoICS*); 以荧光定量 PCR(FQ-PCR)测定其在植株各部位的表达谱并考察其与蒽醌质量分数的关系。结果表明, *SoICS* cDNA 全长为 2 103 bp(GenBank Accession KF547925); 有多个非典型的加尾信号; 含一个总长为 1 713 bp 的完整阅读框, 编码 570 个氨基酸; *SoICS* 含有 AtICS1 和 AtICS2 中与 ICS 催化活性相关的 5 个保守关键氨基酸残基; 其 N-端有 48 个氨基酸残基的推定前导序列; 具有典型的保守分支酸结合结构域; 有多个显著磷酸化位点; 其蛋白质三维结构是一个紧凑型球状结构; 系统分析显示, 决明 ICS 与蓖麻、毛果杨和山杨的 ICS 关系较近。FQ-PCR 分析表明, ICS 基因在叶中表达水平最高, 其次为茎、荚果皮、幼果和种子, 在根和花中的表达量最低; 总蒽醌、游离蒽醌和结合蒽醌质量分数的相关性达到极显著水平, 但 *SoICS* 转录本表达量和蒽醌质量分数之间没有达到显著相关水平。

关键词: 钝叶决明; 异分支酸合酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S567

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)9-0001-08

决明为小品中药材。决明子不仅具有广泛的药用价值, 而且也是很好的保健食品原料, 属食药同源的药材^[1-3]。蒽醌类化合物是地球上最丰富的天然醌类物质, 有着重要的药用^[1-3]和工业价值^[4-5]。它是中药决明子及许多其他药材(如大黄、虎杖、何首乌等)的主要药用成分之一^[6-11]。据报道, 异分支酸合酶(Isochorismate synthase, ICS)是从莽草酸途径^[12]向合成蒽醌和水杨酸两个分支途径的一个关键酶, 其活性控制着分支酸向此两个分支途径的流量, ICS 是水杨酸和蒽醌类化合物合成的限速酶^[9, 13-14]。在枯草杆菌^[13]、绿脓杆菌^[14]和大肠细菌^[15]中有关 ICS 的研究较多。植物中 ICS 的研究相对滞后^[16], 在拟南芥^[17-18]中有较详细的研究, 在茜草^[9]、诺丽^[19]、杨属植物^[20]、长春花^[21]等植物中也有报道。

本文以钝叶决明为材料, 设计特异性引物, 用 RACE 技术扩增决明的 ICS 全长 cDNA 基因, 并对其进行生物信息学分析; 根据其全长 cDNA 序列设计特异引物, 采用荧光定量 PCR 技术研究了钝叶决明植株各器官中 ICS 基因的表达差异, 同时考察了其转录本水平与蒽醌质量分数的关系。

① 收稿日期: 2014-05-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202946); 111 计划课题资助项目(104510-205001); 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2008BB5259)。

作者简介: 李关荣(1963-), 男, 四川营山人, 博士, 教授, 主要从事药用植物生物技术研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

钝叶决明 *Senna obtusifolia* L. : 重庆北碚大田常规种植的钝叶决明.

1.2 引物设计与合成

通过软件 Vector NTI Advance11 对 GenBank 中 *ICS* 基因序列进行多重比对, 设计了扩增决明 *ICS* 基因 cDNA 末端的特异引物, 全长 *ICS* 基因扩增引物以及 FQ-PCR 引物均为作者自行设计, 并均由 Invitrogen 上海公司合成, 其余引物取自相应的试剂盒(表 1).

表 1 本文使用的引物对及序列

用 途	引物名称	引 物 序 列
3'-RACE 1 st Amp	ICS3-1	5'-GTTTGTGGG(T/C)TTCCA(A/G)CAGAAG-3'
	GeneRacer 3'P	5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'
3'-RACE 2 nd Amp	ICS3-2	5'-TATGC(T/G)GGGACAGGGATAGT-3'
	GeneRacer 3'NP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
5'-RACE 1 st Amp	ICS5-1	5'-GAGCAACTTGGTGAAGTGAAG-3'
	Clontech UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCA
5'-RACE 2 nd Amp	ICS5-2	5'-GAGTTCTAGCTCATCCCACTC-3'
	Clontech NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
Full length <i>ICS</i> Amp	FsoICS3S	5'-ATGGCAACCGGAGCTGCACACA-3'
	RsoICS3S	5'-ATTGATGGTGCTCAATGCTCATATACAGTC-3'
FQ-PCR Internal control	F18S	5'-AACCAAACATCTCACGACAC-3'
	R18S	5'-GCAAGACCGAAACT-CAAAG-3'
<i>ICS</i> FQ-PCR	FsoICSQ	5'-CTCAAGACATCTCAGTTCACCAAGTT-3'
	RsoICSQ	5'-GCTCAATGCTCATATACAGTCAACCT-3'

1.3 供试试剂

柱式小量植物组织 RNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 小量柱式回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 反转录试剂盒、GeneRacer Kit 购自 Invertrogen 公司; SMARTTM RACE, PrimeScriptTM, RT Reagent Kit, ExTaqTM Hot Start 购自宝生物工程(大连)有限公司; Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker DL-2000/5000、pMD19-T 载体等购自上海生工生物工程技术服务有限公司; Gold-View 核酸染料购自北京赛百盛基因技术有限公司; 基因测序由英骏上海公司完成.

1.4 决明总 RNA 提取和反转录

分别取盛花期决明根、茎、叶、花蕾、花、荚果皮、幼嫩种子、幼果组织各 0.1 g 于液氮中研磨, 按照柱式小量植物组织抽提试剂盒说明, 提取总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测质量符合要求后, 分别进行反转录, 获得 cDNA 第一链, 冻存于-20 ℃备用.

1.5 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增

用 GeneRacer 试剂盒和 SMARTTM RACE 试剂盒, 分别进行 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增.

1.5.1 决明 *ICS* 基因 cDNA 的 3' 末端一扩反应

使用基因特异引物 ICS3-1 和 GeneRacer Kit 提供的 GeneRacer 3'P 为引物对, 用从各植物部位获得的 cDNA 的等量混合 cDNA 为模板, 进行 3' 末端一扩反应. 扩增体系为 ddH₂O 17.25 μL, 10× buffer 2.5 μL, dNTP(10 mmol/L) 0.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, 3'P(10 μmol/L) 0.5 μL, ICS3-1(10 μmol/L) 0.5 μL, 总 cDNA 0.5 μL, Taq 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL, 总体积 25 μL. 扩增程

序为: 94 ℃ 2 min, 94 ℃ 1 min, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min.

1.5.2 决明 ICS 基因 cDNA 的 3' 末端巢扩反应

使用基因特异引物 ICS3-2 和 GeneRacer Kit 提供的 GeneRacer 3'NP 为引物对, 以 0.5 μL 3'-RACE 一扩产物作为模板, 进行决明 ICS 基因的 3' 末端巢扩反应. 反应体系和扩增程序同一扩.

1.5.3 决明 ICS 基因 cDNA 的 5' 末端一扩反应

使用 5'RACE 基因特异引物 ICS5-1(表 1)与 SMART™RACE 试剂盒提供的引物 ClontechUPM 为引物对, 用总 cDNA 为模板, 进行 5' 端一扩反应. 扩增体系为 ddH₂O 17.25 μL, 10×buffer 2.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, UPM(10 μmol/L) 0.5 μL, ICS5-1(10 μmol/L) 0.5 μL, 3' RACE cDNA 0.5 μL, Taq 酶(5 U/μL)0.25 μL, 总体积 25 μL. 扩增程序为: 94 ℃ 2 min, 94 ℃ 1 min, 57 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 35 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min.

1.5.4 决明 ICS 基因 cDNA 的 5' 末端巢扩反应

使用 5'RACE 的基因特异引物 ICS5-2 与 SMART™RACE 试剂盒提供的 3' 末端巢扩引物 ClontechN-UP 为引物对, 以 0.5 μL 一扩产物作为模板, 进行决明 ICS 基因的 5' 末端巢扩反应. 反应体系和 PCR 扩增程序同一扩.

1.6 决明 ICS 基因全长 cDNA 序列扩增

根据决明 ICS 基因 5'RACE 和 3'RACE 末端测序结果, 分别设计了正向引物 FsoICS3S 和反向引物 RsoICS3S. 以各组织总 cDNA 的等量混合物为模板, 扩增 cDNA 全长序列. 反应程序为: 94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 45 s, 56 ℃ 45 s, 72 ℃ 2 min 30 s, 40 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min.

1.7 PCR 产物的克隆纯化与筛选

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 利用胶回收试剂盒回收目的条带, 经纯化后, 连接到 pMD19-T 克隆载体上, 用热激法导入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 进行 Amp 抗性筛选和蓝白斑筛选. 分子检测确认了的阳性克隆子送上海英骏生物工程技术服务有限公司完成测序.

1.8 决明 ICS 基因的 FQ-PCR 分析

取大田常规种植盛花期决明不同部位材料 0.1 g, 于液氮中研磨, 按照柱式小量植物组织抽提试剂盒说明书步骤提取 RNA 并立即进行反转录, 获得各器官 cDNA 第一链. 以持家基因 18S rRNA 作为内参, 用根据全长 cDNA 序列设计的荧光定量 PCR 引物对 FsoICSQ 和 RsoICSQ, 进行 ICS 基因的表达分析. 反应程序为: 95 ℃ 预变性 2 min, 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 30 s, 40 个循环, 55~95 ℃ 作溶解曲线. 72 ℃ 收集荧光信号. 每个样品重复 3 次, 取其平均值.

1.9 蒽醌质量分数的测定

采用混合碱液法^[22].

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

提取纯化后各组织的总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳, 18S rRNA 和 28S rRNA 特征条带清晰, 无明显 RNA 降解和 DNA 污染(图谱未出示), 紫外吸收法测得 A260/A280>1.8, 符合质量要求.

2.2 SoICS 基因 3'-cDNA 末端的克隆

以各组织提取的总 RNA 反转录得到的 cDNA 的等量混合 cDNA 为模板, 分别进行 ICS 基因 3'-RACE 一扩和二扩. PCR 产物经电泳检测, ICS 基因一扩和二扩产物都在 500 bp 附近显示出单一亮带(图 1), 这与预测长度一致.

2.3 SoICS 基因 5'-cDNA 末端的克隆

以等量混合的总 cDNA 为模板, 进行 ICS 基因 5'-cDNA 末端的 RACE 一扩和二扩. PCR 产物经电泳检测, ICS 基因 5'-RACE 一扩 PCR 产物电泳显示, 在 1 800~2 000 bp 有条带, 5'-RACE 二扩在约 600~

2 000 bp有 4 条带,取相对分子质量最大的条带(近 2 000 bp)为目的条带(图 2).

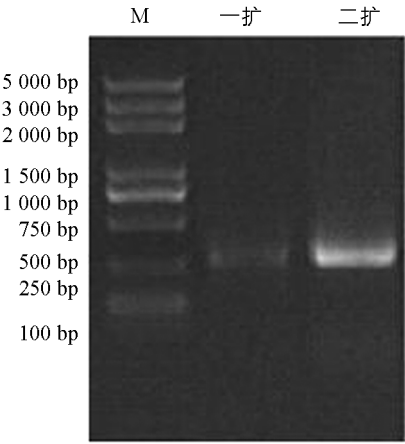


图 1 *SoICS* 3'-RACE 扩增产物

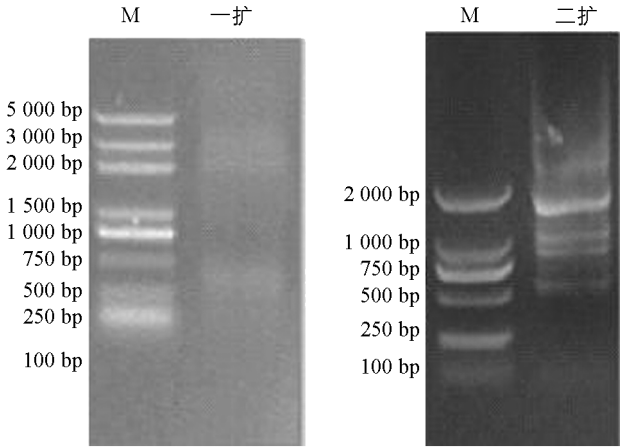


图 2 *SoICS* 5'-RACE 扩增产物

2.4 *SoICS* 基因全长 cDNA 的克隆

根据 *ICS* 基因 5'-和 3'-RACE 产物的测序结果,设计出用于克隆 *SoICS* cDNA 全长的引物: F*soICS*3S 和 R*soICS*3S (表 1),从决明混合总 cDNA 中扩增出一单一条带(图 3).

2.5 *SoICS* 全长 cDNA 及生物信息学分析

2.5.1 *SoICS* 的基因结构特征

经拼接得到 *SoICS* cDNA 全长为 2 103 bp(GenBank Accession KF547925),5'-UTR 为 50 bp,3'-UTR 为 340 bp. *SoICS* 含一个完整阅读框(1 713 bp),编码 570 个氨基酸;经分析表明加尾位点较丰富,存在 5 个非典型的聚腺苷酸加尾信号:ATAAT 3 个,ATTTA 2 个,但不具典型的加尾信号 AAATAAA(图 4). *SoICS* 基因的表达很可能受到可变剪接的调节.

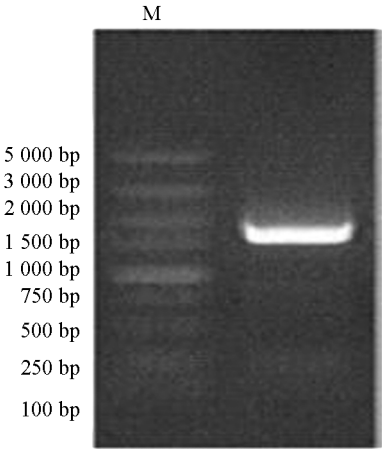


图 3 *SoICS* 全长 cDNA 基因扩增产物

BLASTn 分析表明,决明异分支酸合酶 cDNA 全长基因 *SoICS* 与蓖麻 *Ricinus communis* 的 *RcICS* 和杨属植物 *Populus* 的 *PtICS* 的同源性分别为 74%和 73%.

2.5.2 *SoICS* 编码的蛋白特征分析

利用 Vector NTI 11.0 翻译 *SoICS* 基因的 ORF,得到相应推定蛋白的基本理化性质,并与拟南芥 *AtICS1* (NP _ 565090.1)、*AtICS2* (NP _ 173321.4),山杨 *PtICS* (ACX46383.1),蓖麻 *RcICS* (XP002511526.1)蛋白的参数进行比较表明,推定的 *SoICS* 的氨基酸数、相对分子质量、等电点以及所带正负电荷氨基酸总数与这 3 个物种相似,但也存在一定的差异(表 2).

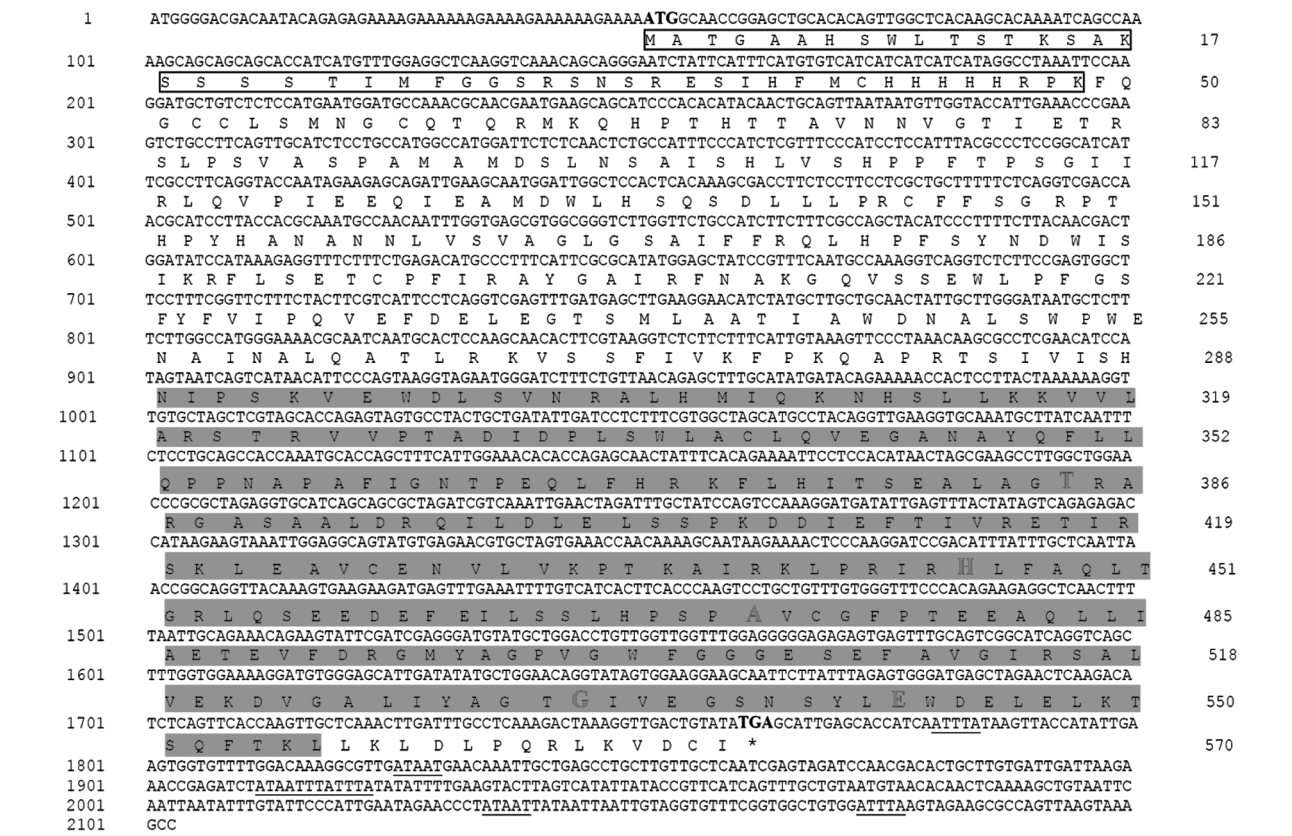
表 2 *SoICS* 基因推定蛋白的基本参数与其他物种的比较

蛋白质	氨基酸残基	相对分子质量 / $\times 10^4$	等电点	负电荷氨基酸残基总数 /(Asp+Glu)	正电荷氨基酸残基总数 /(Arg+Lys)
CoICS	570	6.332	7.34	54	54
AtICS1	569	6.257	5.65	67	60
AtICS2	512	5.660	5.79	66	56
PtICS	572	6.357	6.97	58	57
RcICS	556	6.149	6.68	56	54

对 SoICS 和拟南芥 AtICS1 (NP_565090.1)、AtICS2 (NP_173321.4)，山杨 PtICS (ACX46383.1)，蓖麻 RcICS(XP002511526.1)蛋白进行 NCBI 保守域搜索(NCBI Conserved Domain Search)，结果表明它们都存在保守的分支酸结合位点，与分支酸结合超家族(Chorismate binding superfamily)蛋白的活性结构相似。

SoICS 存在一个 48 个氨基酸残基推定的质体转运序列(Plastidic transit sequence)，此序列富含丝氨酸(S)和苏氨酸(T)残基，有 12 个丝氨酸(S)和 3 个苏氨酸(T)；此段中不含酸性的谷氨酸(E)和天冬氨酸(D)，同时还含碱性的精氨酸(E)3 个、赖氨酸(K)3 个及组氨酸(H)7 个，说明 SoICS 是一种质体酶。这与其他物种 ICS 的细胞定位报道一致(图 4)。

在 SoICS 相同位置，存在与拟南芥 AtICS1 和 AtICS2 完全相同的 5 个保守关键氨基酸残基，即 T³⁸⁴，H⁴⁴⁵，A⁴⁷²，G⁵³² 和 E⁵⁴² (图 4)。



核苷酸序列中，起始密码子和终止密码子用粗体表示；可变加尾位点用下划线表示；分支酸结合域用底纹表示；叶绿体转导序列用框表示；活性必需的保守氨基酸残基用大号字体突出显示；左右侧的数字分别为核苷酸和氨基酸序号。

图 4 SoICS 基因核苷酸序列和推导的氨基酸序列特征

用 NetPhos 2.0 预测 SoICS 的磷酸化位点表明，SoICS 存在多个显著的磷酸化位点，其中丝氨酸磷酸化位点 24~25 个，苏氨酸磷酸化位点 6 个，但无酪氨酸磷酸化位点，预示着多级磷酸化可能是其重要的调控方式。

基于 SOPMA 的预测表明，SoICS 蛋白的二级结构中，随机卷曲所占比例最大，为 40.53%，这与含叶绿体转运序列的 SoICS 进入叶绿体前必须处于非折叠状态一致。其次是 α 螺旋和伸展链，分别为 37.19% 和 16.49%， β 转角所占比例最少，为 5.79%。在全蛋白中有 5~6 个大型 α 螺旋，随机卷曲穿插于其中。

用 Swiss-Model 对 SoICS 蛋白序列进行三级结构预测，同源建模(template ID: 3gseA)取得 ICS 蛋白三级结构模型，序列一致性为 23.542，表明 SoICS 是一紧凑的球形结构。

对 SoICS 推定氨基酸序列进行 Blastp 分析，包含前导序列的 SoICS 前体与蓖麻 RcICS、毛果杨 Ptre-ICS、山杨 PtICS 有较高的同源性。其中决明 SoICS 与蓖麻 RcICS 相似性为 64%，同源性为 77%；与毛果

杨 Pt ICS 相似性为 65%，同源性为 79%；与山杨 Ptri ICS 的相似性为 65%，同源性为 79%，与 AtICS2 的相似性为 58%，同源性为 74%，与 AtICS1 的相似性为 55%，同源性为 72%。

用 MEGA 4.0 对决明 ICS 基因推定蛋白序列及其他植物 ICS 蛋白序列构建的系统发育树表明(图 5)，决明 ICS 与蓖麻，毛果杨和山杨的 ICS 关系较近。

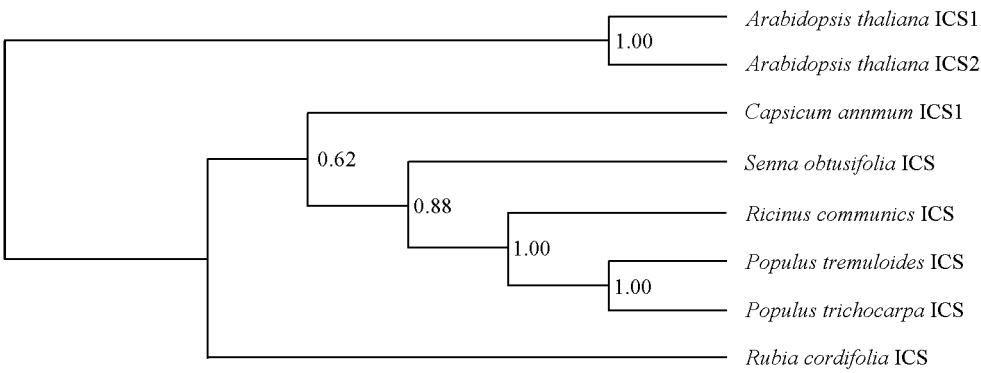


图 5 决明 ICS 蛋白与其他 ICS 蛋白的系统发育树

2.6 SoICS 在决明植株不同器官中的定量表达及其与蒽醌质量分数的相关性分析

FQ-PCR 的结果(表 3)表明，ICS 在决明叶中表达水平最高，其次为茎、荚果皮、幼果、幼嫩种子，在这 4 个部位表达水平相当，再次是花，在根和花蕾中的表达量最低。叶中的表达量约为茎、荚果皮、幼果或幼嫩种子的 3 倍。总蒽醌、游离蒽醌和结合蒽醌质量分数的相关性达到极显著水平；SoICS 转录本表达量和其他不同形式的蒽醌质量分数之间相关性不大，没有达到显著或极显著的水平。但转录本的相对表达量在叶片中表达相当高，在荚果皮、发育种子和幼果中表达较高。叶片中 SoICS 转录本水平与其蒽醌质量分数差异较大，可能是因为其表达不仅仅与蒽醌类化合物有关，同时还与叶绿醌和水杨酸的合成有关。

表 3 植株各部蒽醌质量分数与转录本相对表达量的相关性

烘干样	总蒽醌质量分数 /10 000 a	游离蒽醌质量分数 /10 000 a	结合蒽醌质量分数 /10 000 a	转录本表达 相对量(dRn)
根	2.987±0.144	0.464±0.023	2.523	0.188±0.031
茎	2.581±0.144	0.724±0.070**	1.857	0.934±0.094**
叶	2.663±0.190	0.607±0.050	2.056	3.438±0.156**
蕾	3.165±0.251	0.562±0.069	2.603	0.234±0.028
花	3.089±0.216	0.545±0.092	2.544	0.575±0.038**
荚果皮	2.631±0.360	0.513±0.046	2.118	1.094±0.040**
发育种子	21.046±0.252**	3.795±0.138**	17.251	0.906±0.069**
幼果	4.841±0.323**	1.748±0.092**	3.093	1.000±0.063**

注：a 表示总蒽醌、游离蒽醌与结合蒽醌质量分数的相关性达到极显著水平；** 表示不同部位之间质量分数达到 1% 极显著水平。

3 结论与讨论

由于异分支酸合酶是水杨酸和蒽醌生物合成的关键酶^[16,18,20,23]，决明 ICS 基因是否具有冗余性还值得研究。在微生物和拟南芥中存在的两个 ICS 基因，由于物种进化，是否在较复杂的高等植物中逐渐进化为一个尚不清楚。对杨属植物的 ICS 研究仅发现一个 ICS^[20]，且发生了大量的可变剪接。在拟南芥中表达时，杨树的 ICS 再次发生了可变剪接，但没有发生以弥补 AtICS1 类似功能的正常转录。由于杨树 ICS 的剪接位点序列是不寻常的，所以结合点序列，可变剪接，ICS 功能可能是一个因果链。推测拟南芥 ICS 的基因重复和杨树的可变剪接与它们各自独特的防御策略有关^[20]。SoICS 中存在丰富的非典型加尾信号，是

否存在同杨树一样的可变剪接?这有待进一步研究。SoICS 中存在 24~25 个显著的磷酸化位点,说明其活性可能受到多级磷酸化的修饰调控,以满足不同组织器官对此酶活性的要求。本文初步推导得到 SoICS 的叶绿体转运序列,可进一步通过比较其在叶绿体中成熟蛋白的序列而确证,为质体蛋白从胞浆到质体的转运机制研究奠定了基础。

荧光定量 PCR 得到的植株各部分 *SoICS* 转录本表达水平与各部位的结合蒽醌、游离蒽醌以及总蒽醌质量分数之间的差异没达到显著相关,说明 SoICS 在各种器官中的表达可能受到复杂的调控。决明 ICS 催化的产物异分支酸,在叶片或茎中还可用于合成叶绿醌和水杨酸等活性物质。

本研究首次从决明中克隆得到 *SoICS* cDNA 全长序列,了解了其基因编码和结构信息,明晰了其在植株各部的定量表达模式,这为进一步研究决明蒽醌类及水杨酸生物合成和调控的分子机制、利用基因改良等遗传操作提高决明中蒽醌类有效成分质量分数以及增强其抗逆性奠定了重要的基础。

参考文献:

- [1] 陈秋东,徐 蓉,徐志南,等. 决明子中蒽醌类化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2003, 20(2): 120—124.
- [2] 国家药典委员会. 中国药典:一部 [M]. 北京:化学工业出版社, 2005: 98.
- [3] 段淑娥,李 敏. 中草药中蒽醌化合物的研究进展 [J]. 西安文理学院学报, 2005, 8(1): 24—28.
- [4] 班卫平,申忠仁,宋文静,等. 蒽醌在造纸工业化学制浆中的作用研究 [J]. 染料工业, 1998, 35(3): 29—3.
- [5] PULLMAN G, DIMMEL D, PETER G. Trees Containing Built in Pulping Catalysts [R]. Washington D C: A Final Report to the United States Department of Energy, 2002.
- [6] 何菊英,刘松青. 决明子的药理作用及其临床应用 [J]. 药学实验杂志, 2001, 19(2): 111—113.
- [7] 连文琰. 中国决明属药用植物简报 [J]. 中草药, 1986, 17(9): 27—30.
- [8] 袁昌齐. 天然药物资源开发利用 [M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2000.
- [9] 张铁军,姜顺喜. 决明子的原植物研究 [J]. 中草药, 1993, 24(1): 40—42.
- [10] 中国医学科学院药物研究所. 中药志:三册. [M]. 北京:人民卫生出版社, 1984: 348.
- [11] 卢艳花. 中药有效成分提取分离技术 [M]. 北京:化学工业出版社, 2004: 159—167.
- [12] HERRMANN K M, WEAVER L M. The Shikimate Pathway [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 473—503.
- [13] ROWLAND B M, TABER H W. Duplicate Isochorismate Synthase Genes of *Bacillus subtilis*: Regulation and Involvement in the Biosyntheses of Menaquinone and 2,3-Dihydroxybenzoate [J]. J Bacteriol, 1996, 178(3): 854—861.
- [14] GAILLE C, REIMMANN C, HAAS D. Isochorismate Synthase (PchA), the First and Rate-Limiting Enzyme in Salicylate Biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. The J Bio Chem, 2003, 278(19): 16893—16898.
- [15] BUSS K, MÜLLER R, DAHM C, et al. Clustering of Isochorismate Synthase Genes *menF* and *entC* and Channeling of Isochorismate in *Escherichia coli* [J]. Biochimica et Biophysica Acta. Gene Structure and Expression, 2001, 1522(3): 151—157.
- [16] POULSEN C, VERPOORTE R. Roles of Chorismate Mutase, Isochorismate Synthase and Anthranilate Synthase in Plants [J]. Phytochemistry, 1991, 30(2): 377—386.
- [17] GARCION C, LOHMANN A, LAMODIÈRE E, et al. Characterization and Biological Function of Isochorismate Synthase 2 Gene of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2008, 147(3): 1279—1287.
- [18] STRAWN M A, MARR S K, INOUE K, et al. *Arabidopsis* Isochorismate Synthase Functional in Pathogen-Induced Salicylate Biosynthesis Exhibits Properties Consistent with a Role in Diverse Stress Responses [J]. J Bio Chem, 2007, 282(8): 5919—5933.
- [19] HONG T S, ROSLAN H A. Cloning of a Near Complete Isochorismate Synthase (ICS) cDNA from *Morinda citrifolia* L. [J]. Pertanika J Trop Agric Sci, 2008, 31(1): 101—105.
- [20] YUAN Y, CHUNG J D, FU X, et al. Alternative Splicing and Gene Duplication Differentially Shaped the Regulation of Isochorismate Synthase in *Populus* and *Arabidopsis* [J]. Proc National Acad Sci, 2009, 106(51): 22020—22025.

- [21] VAN TEGELEN L J P, MORENO P R H, CROES A F, et al. Purification and cDNA Cloning of Isochorismate Synthase from Elicited Cell Cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(2): 705—712.
- [22] 刘翠哲, 王汝星, 刘喜刚. 测定大黄中总蒽醌含量的分光光度法改进 [J]. *天津中医药*, 2004, 21(4): 335—336.
- [23] WILDERMUTH M C, DEWDNEY J, WU G, et al. Isochorismate Synthase is Required to Synthesize Salicylic Acid for Plant Defense [J]. *Nature*, 2001, 414(6863): 562—565.

The Cloning and Expressional Analysis of Isochorismate Synthase Gene of *Senna obtusifolia*

LI Guan-rong¹, AI Yi¹, TAN Yan¹,
MI Yao¹, ZHU Lin-hui¹, LI Pei-jiang¹, QI Hong-yi²

1. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Isochorismate synthase (ICS) controls the partition of chorismate to the isochorismate-derived products. It has been reported to be a rate-limiting enzyme in the pathway leading to the syntheses of salicylic acid and anthraquinones. This research cloned the full-length cDNA of ICS by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE), and its expression in different organs and its relationship with the mass ratio of anthraquinones in different plant organs was studied by fluorescent quantitative PCR. Results show that the full-length *SoICS* cDNA is 2 103 bp (GenBank Accession KF547925) and has multiple atypical tailing sites. *SoICS* contains a single complete reading frame of 1 731 bp, encoding 570 residues. The five key amino acid residues for the activity in At ICS1 and AtICS2 were also observed in *SoICS* and with the same orientation. There is a plastidic transit sequence of about 48 residues at the N-terminal and a typical conserved chorismate binding domain. Multiple dominant phosphorylation sites were found. Its 3D structure was a compact globule. Phylogenetic tree constructed showed that *SoICS* was close to *Ricinus communis* ICS (RcICS), *Populus trichocarpa* ICS (PtreICS) and *Populus tremuloides* ICS (PtICS). Fluorescent quantitative PCR analysis showed that *SoICS* had a highest level of expression in leaves, a comparable and intermediary level in stem, silique pericarp, immature fruits and seeds; and the lowest level of expression was in roots and flowers. The relationship between the mass ratio of the total, free and bound anthraquinones is extremely significant, but the relationship between the transcript levels of *SoICS* and the levels of anthraquinones in different organs is not significant.

Key words: *Senna obtusifolia*; Isochorismate synthase; gene cloning; Bioinformatics analysis; expressional analysis

责任编辑 夏 娟

