

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.03.007

蜡梅异戊烯基焦磷酸异构酶基因 *CpIPI* 的克隆及表达分析^①

李 瑞, 张 杰, 马 婧, 李名扬

西南大学 园艺园林学院/重庆市花卉工程技术研究中心/南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400716

摘要: 从蜡梅花 cDNA 文库中克隆得到 1 个蜡梅异戊烯基焦磷酸异构酶基因, 命名为 *CpIPI*. *CpIPI* 基因的 cDNA 全长为 1 297 bp, 其中最大 ORF 框长为 879 bp, 编码 292 个氨基酸残基. *CpIPI* 蛋白质的相对分子量为 33.4 kDa, 理论等电点为 6.86. 生物信息学分析表明, 蜡梅 *CpIPI* 蛋白属于典型的 IPI 蛋白, *CpIPI* 基因是调控蜡梅萜类物质合成的关键基因. 荧光定量分析结果表明, *CpIPI* 基因在蜡梅的根中不表达, 但是在茎、叶和花中都有表达, 且在外瓣中的表达量最高. *CpIPI* 基因在蜡梅不同花期的表达量具有不规则差异性. 由此推测, 蜡梅 *CpIPI* 基因可能参与与花器官形成发育相关的萜类物质的合成.

关 键 词: 蜡梅; 异戊烯基焦磷酸异构酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S685.99

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)03-0035-07

异戊烯基焦磷酸异构酶基因 *IPI* (isopentenyl diphosphate isomerase), 是调控萜类代谢网络的关键酶基因^[1-2]. 萜类物质广泛存在于动物、植物、藻类、真菌、细菌等物种中^[3]. 对植物生长发育以及植物与生态环境之间的联系起着重要的作用^[4]. 萜类骨架以异戊二烯为基本单元, 主要通过甲羟戊酸途径和丙酮酸/磷酸甘油醛途径合成, *IPI* 则通过催化直接前体物质异戊二烯焦磷酸与其异构体二甲基丙烯基焦磷酸之间的相互转化, 调控萜类物质的合成^[5].

研究显示 *IPI* 为调控萜类代谢途径的关键基因^[6]. 1998 年 CAMPBELL 等人首次从拟南芥中克隆出与萜类物质合成相关的两个 *IPI* 基因, 分别为 *AtIPI1* 和 *AtIPI12*^[7]; 2000 年 CUNNINGHAM 等人经研究发现, 无论是单纯增加大肠杆菌中内源 *IPI* 的含量, 还是通过介导的方法引入外源 *IPI* 基因过表达, 都可以使类胡萝卜素产量增加^[8]; 随后, 汪业春等人首次从富含紫杉醇的山榛中克隆出控制紫杉醇生物合成的关键基因 *CgIPI*^[9]. 目前为止, 许多植物如玉米、山榛、枸杞、向日葵^[9-12] 等的 *IPI* 基因都已经相继克隆, 但是蜡梅的 *IPI* 相关基因还未见报道.

蜡梅 (*Chimonanthus praecox* (L.) Link), 落叶灌木, 是我国古老的孑遗植物, 也是我国重要的传统名花之一^[13], 花期从 11 月到翌年 3 月. 蜡梅不仅是珍贵的花木, 而且是重要的天然香料作物^[14]. 本文从实验室已构建的蜡梅花 cDNA 文库^[15] 中克隆了 1 个蜡梅异戊烯基焦磷酸异构酶基因, 命名为 *CpIPI*. 利用生物信息学分析、荧光定量 PCR 等研究手段对获得的 *CpIPI* 基因进行探究分析, 以待揭示该基因在蜡梅中的生理功能, 为进一步研究萜类物质合成中的关键酶奠定基础.

① 收稿日期: 2015-01-06

基金项目: 国家自然科学基金(31370698); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(XDJK2013A004).

作者简介: 李 瑞(1990-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事生物技术与花卉遗传育种研究.

通信作者: 李名扬, 教授, 博士研究生导师.

1 材料与方法

1.1 试剂与植物材料

大肠杆菌 Top10 是由重庆市花卉工程技术研究中心保存; EasyTaq 酶 (Lot # J10427)、克隆载体 pEASY-T1 均购于北京全式金生物技术有限公司; 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit 购于宝生物(大连)有限公司; 胶回收试剂盒、RNA 提取试剂盒 (RNAprep Pure Plant Kit) 均购于北京天根公司; SsoFast™ Eva Green Supermix 试剂盒购于成都百乐科技有限公司; DNA Marker 购自北京佰亿创新科技有限公司; 引物合成及 DNA 测序均由上海立菲生物技术有限公司完成.

试验所用的植物材料为馨口蜡梅 (*Chimonanthus praecox* var. *grandiflora*), 均采自北碚静观镇蜡梅基地. 蜡梅花 cDNA 文库是由重庆市花卉工程技术研究中心睦顺照等构建及保存^[15]. 将蜡梅种子催芽处理后放在人工气候培养室当中培养, 调节培养温度至 25 ℃(昼)/20 ℃(夜), 湿度约为 85%, 光周期为 16 h(昼)/8 h(夜), 光照度为 20 000 lx. 幼苗生长至五叶期时备用.

1.2 基因的克隆及序列分析

目标克隆子从蜡梅花 cDNA 文库中克隆得到. 克隆序列经 NCBI 中的 BLAST 进行同源序列查找 (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), 所得序列的同源序列比对采用 DNAMAN 软件进行; 构建同源序列系统发育树使用 MEGA5.1 软件; 分析 *CpIPI* 基因的序列结构和理化性质通过 BioXM2.6 软件完成.

1.3 蜡梅 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

分别取同一株幼苗上采集根、叶、茎(各设置 3 个重复); 选取 3 株处于相似花期的生长健壮且无病虫害的蜡梅, 在同一蜡梅植株上分别采集不同时期(包括萌动、蕾期、露瓣期、初开期、盛花期和落花期)^[14]的花芽, 以及盛花期不同花器官(包括外瓣、中瓣、内瓣、雄蕊和雌蕊), 收集材料于一 80 ℃ 保存.

使用总 RNA 提取试剂盒 (RNAprep Pure Plant Kit) 提取所取材料的 RNA, 然后以所提 RNA 为模板, 按 PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒说明书合成 cDNA 第一链, 保存于一 20 ℃, 作为 RT-PCR 的模板.

1.4 *CpIPI* 的表达分析

本研究以 *Tublin* 和 *Actin-b* 为内参基因(表 1)^[16], 采用 Eva Green 荧光染料法, 用 CFX96 (Bio-Rad) 实时荧光定量 PCR 仪对 *CpIPI* 在蜡梅不同发育时期、不同组织的表达量进行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR) 分析, 根据 SsoFast™ Eva Green Supermix 试剂盒 (Bio-Rad) 说明书配制反应体系, 每个样品设 3 个生物重复. 反应程序: 98 ℃ 预变性 30 s, 95 ℃ 变性 5 s, 58 ℃ 退火, 延伸 5 s (每次循环后采集荧光), 39 个循环. 试验数据通过 Bio-Rad Manager™ (Version 1.1) 软件进行分析, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法获得 *CpIPI* 的相对表达量^[17].

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
<i>Actin-b</i>	TTGGTCGCAGCTGATTGCTGTG	AGGCTAAGATTCAAGACAAGG
<i>Tublin</i>	CAAGCTTCCTTATGCGATCC	GTGCATCTCTATCCACATCG
<i>CpIPI</i>	CCATTTAACGCCAGTGGAGAAGGAT	GTTACGAACGCCGTGTATCGAAGCA

2 结果与分析

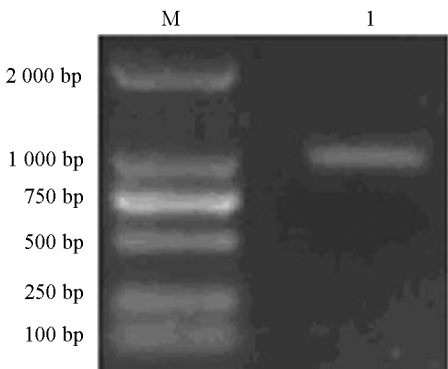
2.1 *CpIPI* 基因的获得及序列分析

随机测序后经 EST 序列分析表明, 文库相应的克隆子 *CpIPI* 上的 cDNA 片段可能属于蜡梅异戊烯基焦磷酸异构酶基因. 以跨序列 ORF 框的引物进行 PCR, 从蜡梅全基因组 cDNA 中扩增出大小一致的特异产物(图 1), 测序结果也完全一致, 表明已获得的 *CpIPI* 是蜡梅异戊烯基焦磷酸异构酶基因的全长 cDNA, 命名为 *CpIPI*.

克隆所得的 *CpIPI* 基因的 cDNA 序列全长为 1 297 bp, 具有一个编码 292 个氨基酸的完整的最大 ORF 框, 长度为 879 bp(图 2), 其中有 62 个酸性氨基酸, 48 个碱性氨基酸. 经 BioXM 预测该基因蛋白质的相对分子量为 33.4 kDa, 理论等电点为 6.86.

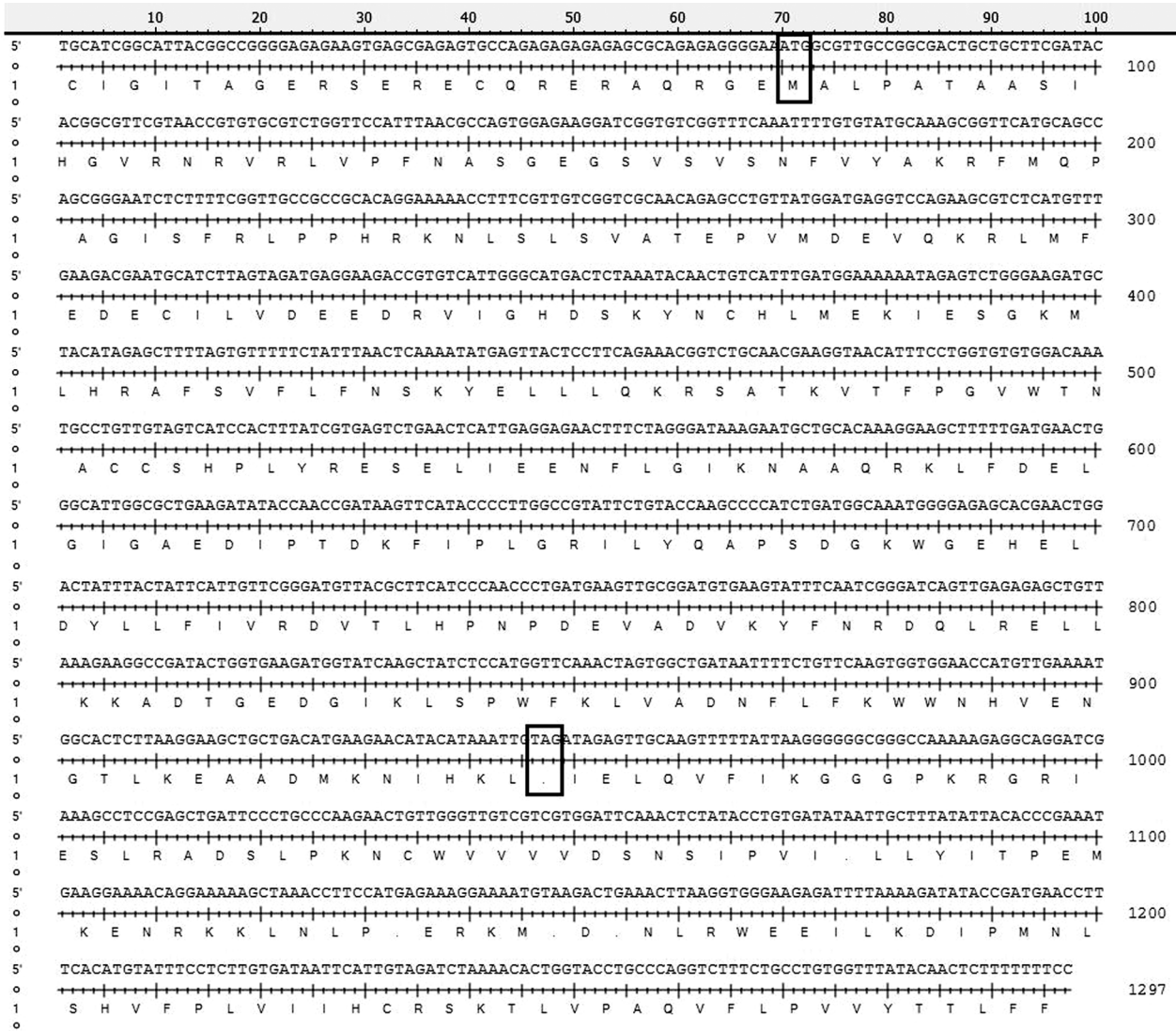
NCBI 数据库检索表明 *CpIPI* 蛋白属于 Nudix 水解酶超家族, 为多结构域蛋白, 包括 Nudix 基序和金属离子结合位点等功能结构. 从 NCBI 下载了甘薯 (*Ipomoea batatas*, AAZ94730)、胡黄连 (*Picrorhiza kurrooa*, ABO14800)、玉米 (*Zea mays*, AAQ14869)、紫花苜蓿 (*Medicago sativa*, AEC13301.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, AAL57687)、万寿菊 (*Tagetes erecta*, AAF29977.1) 等植物的异戊烯基焦磷酸异构酶基因序列, 通过 Lasergene7.0 MegAlign 软件与 *CpIPI* 进行多序列比对, 结果显示蜡梅 *CpIPI* 蛋白和其他植物中的 IPI 蛋白具有较高的同源性.

同源性比较发现蜡梅 *CpIPI* 蛋白 N-端氨基酸不具有同源性, C-端氨基酸同源性较高. *CpIPI* 基因的序列具有两个高度保守的含有活性位点的 TNTCCSHPL (148~157) 和 WGEHEX₂DY (210~219) 结构域 (图 3), 其中半胱氨酸 (Cys, C, 161) 和谷氨酸 (Glu, E, 212, 214) 分别是 *CpIPI* 的活性位点. 可见 *CpIPI* 基因在长期的进化过程中是高度保守的.



M: DL2000 marker; 1: cDNA.

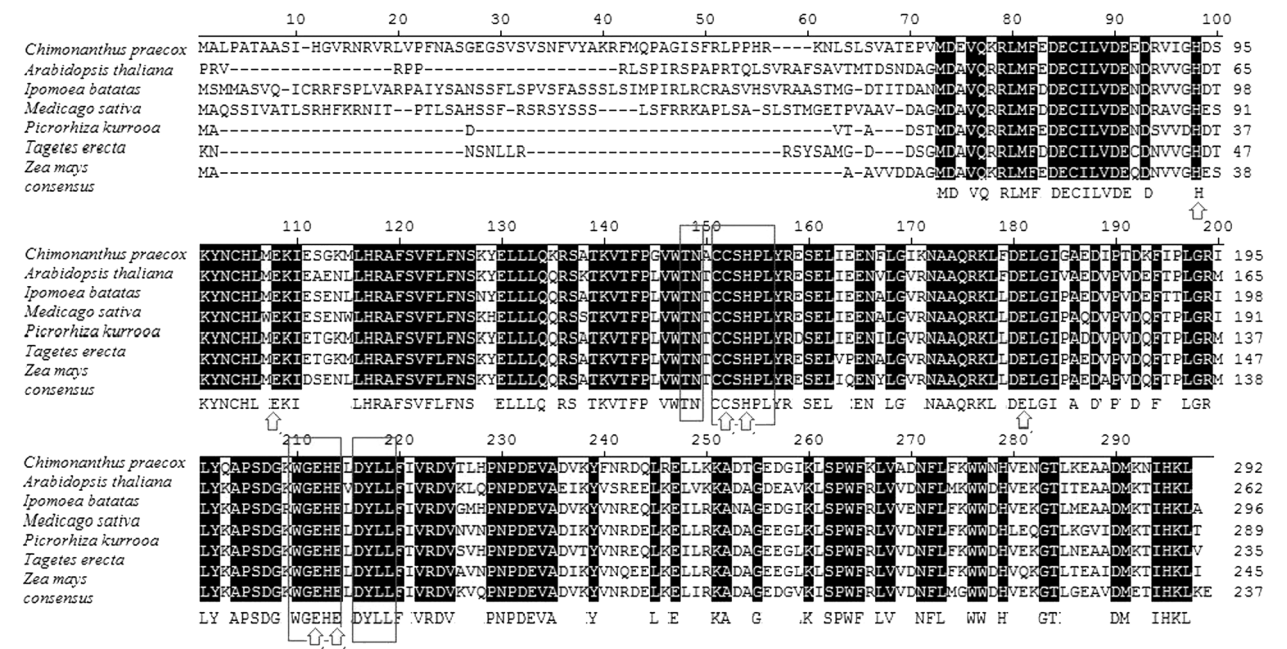
图 1 *CpIPI* 基因的 PCR 检测



ATG 表示起始密码子; TAG 表示终止密码子.

图 2 *CpIPI* 基因的 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

利用 MEGA5.1 软件, 将 GenBank 数据库中已登录的 14 种高等植物的 *IPI* 氨基酸序列与 *CpIPI* 氨基酸序列构建(bootstrap)neighbor joining(NJ)树(图 4). 结果显示, 这些高等植物来源于同一祖先, 蜡梅与水稻聚为一支, 与其亲缘关系较近, 其次是高粱和玉米. 由进化树可以看出, 随着植物的进化, *IPI* 基因的结构在发生分化, 但是在亲缘关系很远的植物之间也是相当保守的.



保守的半胱氨酸结构域和谷氨酸结构域分别用红色方框表示, 对 *IPI* 催化活力起关键作用的氨基酸残基用个表示. 所用植物 *IPI* 的 Genbank Accession Number 为: *Chimonanthus praecox* 蜡梅, *Arabidopsis thaliana* 拟南芥(AAB67741.1), *Picrorhiza kurrooa* 胡黄连 (ABO14800.1), *Ipomoea batatas* 甘薯(AAZ94730.1), *Medicago sativa* 紫花苜蓿(AEC13301.1), *Tagetes erecta* 万寿菊(AAF29977.1), *Zea mays* 玉米(NP_001105037.1).

图 3 *CpIPI* 的同源蛋白多序列比对

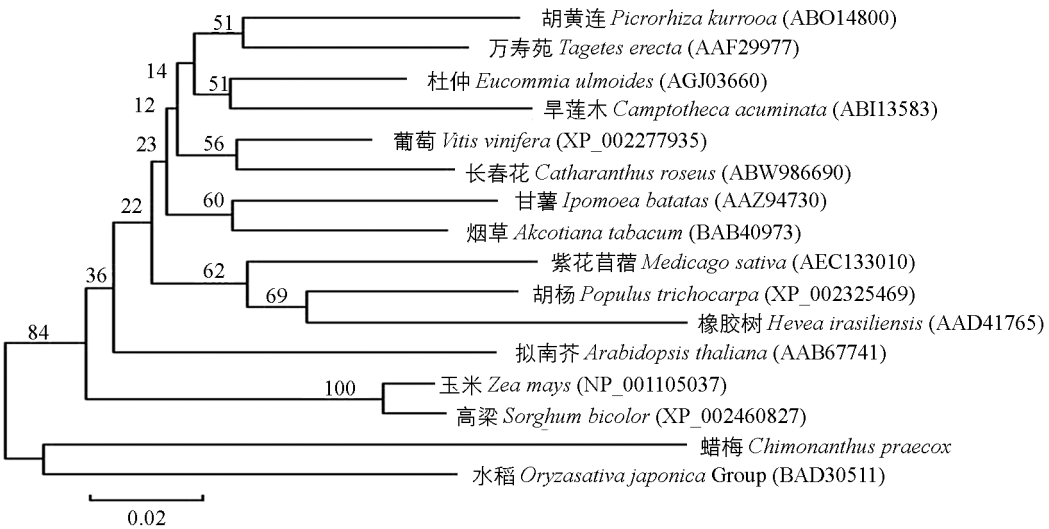


图 4 *CpIPI* 蛋白的进化树分析

2.2 *CpIPI* 表达分析

CpIPI 的实时荧光定量分析表明, 在蜡梅开花过程的不同时期中 *CpIPI* 具有表达差异性(图 5), 其中在露瓣期和落花期表达量最高, 其次是盛花期、初花期、蕾期和萌动期.

CpIPI 在蜡梅盛花期不同组织的表达分析表明, 蜡梅 *CpIPI* 除在根中不表达, 在其他组织中均有表达, 但表达水平差异较大(图 6). 在外瓣中的表达量最高, 在叶、雄蕊、中瓣、内瓣中次之, 在茎和雌蕊中最低.

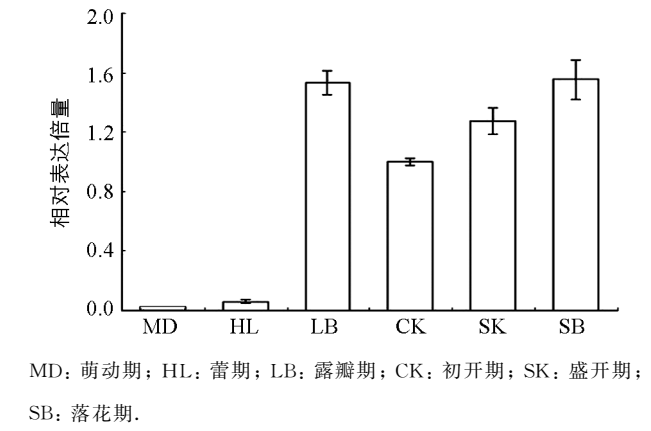


图 5 *CpIPI* 基因在不同花期的表达分析

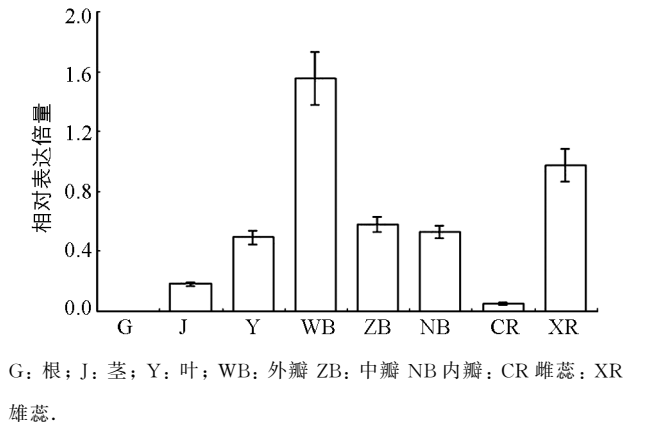


图 6 *CpIPI* 基因在不同组织中的表达分析

3 讨 论

本试验从蜡梅中克隆到 *CpIPI* 基因, 与甘薯、胡黄连、玉米、紫花苜蓿、拟南芥、万寿菊的异戊烯基焦磷酸异构酶 *IPI* 基因序列比对分析, 发现 *CpIPI* 与其具有高度的同源性; 生物信息学分析表明 *CpIPI* 编码的蛋白结构也具有 *IPI* 所共有的保守位点 TNTCCSHPL(148~157)和 WGEHEXDY(210~219), 以及半胱氨酸(Cys, 161)和谷氨酸(Glu, 212, 214)活性位点. 由此表明蜡梅 *CpIPI* 基因属于异戊烯基焦磷酸异构酶基因.

研究表明, LIAO 等人从甘薯中分离得到的异戊烯基焦磷酸异构酶 *IPI* 基因有利于 β -类胡萝卜素的积累^[18]; KAZUNORI 等人也发现拟南芥异戊烯基焦磷酸异构酶基因 *IPI* 双突变体 *atipil*、*atipi2* 植株中甾醇和泛醌含量显著升高^[19]; SUN 等人将番茄异戊烯基焦磷酸异构酶基因 *SlIPI* 基因在大肠杆菌中异源表达也表现出类胡萝卜素的大量积累^[4]. 本研究将蜡梅 *CpIPI* 基因与甘薯、胡黄连、玉米、紫花苜蓿、拟南芥、万寿菊等物种的异戊烯基焦磷酸异构酶 *IPI* 基因序列比对分析发现, 蜡梅 *CpIPI* 与它们的同源性达 77% 以上. 因此推测蜡梅 *CpIPI* 与甘薯、拟南芥、番茄等物种 *IPI* 具有相似的萜类物质合成功能.

荧光定量分析表明蜡梅 *CpIPI* 基因, 在盛花期花器官中表达具有差异性, 其中在根中不表达, 在花器官中上调表达, 且在外瓣中表达量最高. 而在开花时期上表达也具有差异性, *CpIPI* 在萌动期和蕾期基本不表达, 蕾期和落花期中表达量最高, 在初开到落花期表达量依次增高. 这与 KAZUNORI 等人对拟南芥的 *AtIPI* 基因的组织特异性表达分析其在花中高量表达的结果相符^[19]. 研究表明, 在花香基因模式植物仙女扇中, 仙女扇 *IPI* 基因在外瓣中高量表达, 且该基因编码的芳香醇萜类物质主要在花器官中合成^[20]. KISHIMOTO 等人也发现在菊花花瓣发育过程中, 检测到其与萜类物质合成相关基因 *IPI* 的转录产物一直贯穿其花瓣生长发育^[21]. 由此我们推测 *CpIPI* 可能参与花器官形成发育相关的萜类物质合成. KAZUNORI 等人的实验还发现, 拟南芥 *atipil* 和 *atipi2* 双突变有雄性不育现象, 通过外源鲨烯对双突变体花蕾的处理可恢复其雄性不育^[17]. 综上所述, 蜡梅 *CpIPI* 可能参与影响雄蕊生长发育有关的萜类物质的合成.

参考文献:

- [1] ZHENG W, SUN F, BARTLAM M, et al. The Crystal Structure of Human Isopentenyl Diphosphate Isomerase at 1.7 Å Resolution Reveals Its Catalytic Mechanism in Isoprenoid Biosynthesis [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 366(5): 1447—1458.
- [2] BERTHELOT K, ESTEVEZ Y, DEFFIEUX A, et al. Isopentenyl Diphosphate Isomerase: A Checkpoint to Isoprenoid Biosynthesis [J]. *Biochimie*, 2012, 94(8): 1621—1634.
- [3] 吴立军. 天然药物化学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 219—220.
- [4] SUN J, ZHANG Y Y, LIU H, et al. A Novel Cytoplasmic Isopentenyl Diphosphate Isomerase Gene from Tomato (*Solanum lycopersicum*): Cloning, Expression, and Color Complementation [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2010, 28(3): 473—480.
- [5] BICK J A, LANGE B M. Metabolic Cross Talk Between Cytosolic and Plastidial Pathways of Isoprenoid Biosynthesis: Unidirectional Transport of Intermediates Across the Chloroplast Envelope Membrane [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 415(2): 146—154.
- [6] PHILLIPS M A, D'AURIA J C, GERSHENZON J, et al. The Arabidopsis Thaliana Type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases Are Targeted to Multiple Subcellular Compartments and Have Overlapping Functions in Isoprenoid Biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(3): 677—696.
- [7] CAMPBELL M, HAHN F M, POULTER C D, et al. Analysis of the Isopentenyl Diphosphate Isomerase Gene Family from Arabidopsis Thaliana [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 36(2): 323—328.
- [8] CUNNINGHAM F X, GANTT E. Identification of Multi-Gene Families Encoding Isopentenyl Diphosphate Isomerase in Plants by Heterologous Complementation in *Escherichia coli* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2000, 41(1): 119—123.
- [9] 汪业春, 唐克轩. 山榛中异戊烯焦磷酸异构酶基因的克隆及分析 [J]. *中国农业科技导报*, 2007, 9(4): 95—100.
- [10] 王 伟, 陆辉强, 刘万宏, 等. 玉米异戊烯基焦磷酸异构酶基因的克隆及其功能分析 [J]. *西北植物学报*, 2008, 28(9): 1715—1719.
- [11] 张爱香, 季 静, 王 罡, 等. 枸杞中 IPP 异构酶相关基因 (IPD) 的分离 [J]. *西北农业学报*, 2006, 15(3): 186—186.
- [12] 化文平, 王喆之. 向日葵异戊烯焦磷酸异构酶基因 (*ipi*) 的电子克隆和生物信息学分析 [J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(1): 81—86.
- [13] 芦建国, 李 娜. 重庆蜡梅品种资源及综合评价 [J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(5): 222—224.
- [14] 吴昌陆, 胡南珍. 蜡梅花部形态和开花习性研究 [J]. *园艺学报*, 1995, 22(3): 277—282.
- [15] 睦顺照, 李名扬, 蒋 安, 等. 蜡梅花 cDNA 文库构建及其高频出现脂转移蛋白 cDNA 的表达 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(3): 644—648.
- [16] 王 喆, 汤 玲, 睦顺照, 等. 蜡梅结瘤素基因 CpNOD 的克隆与表达分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2013, 35(2): 20—26.
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402—408.
- [18] LIAO Z, CHEN M, YANG Y, et al. A New Isopentenyl Diphosphate Isomerase Gene from Sweet Potato: Cloning, Characterization and Color Complementation [J]. *Biologia*, 2008, 63(2): 221—226.
- [19] OKADA K, KASAHARA H, YAMAGUCHI S, et al. Genetic Evidence for the Role of Isopentenyl Diphosphate Isomerases in the Mevalonate Pathway and Plant Development in Arabidopsis [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(4): 604—616.
- [20] PICHERSKY E, RAGUSO R A, LEWINSOHN E, et al. Floral Scent Production in *Clarkia* (Onagraceae) (I. Localiza-

tion and Developmental Modulation of Monoterpene Emission and Linalool Synthase Activity) [J]. Plant Physiology, 1994, 106(4): 1533—1540.

[21] KISHIMOTO S, OHMIYA A. Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Petals and Leaves of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) [J]. Physiologia Plantarum, 2006, 128(3): 436—447.

Cloning and Expression Analysis of an Isopentenyl Diphosphate Isomerase Gene *CpIPI* from *Chimonanthus praecox* (L.)

LI Rui, ZHANG Jie, MA Jing, LI Ming-yang

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Chongqing Engineering Research Center for Floriculture/
Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400716, China

Abstract: A novel gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase, designated as *CpIPI*, was cloned from the cDNA library constructed from *Chimonanthus praecox* flowers. The full-length cDNA of *CpIPI* was 1297 bp, with an ORF of 879 bp encoding a polypeptide of 292 amino acids. Bioinformatics analysis indicated that the protein of *CpIPI* belonged to typical IPI proteins and *CpIPI* played a key role in the biosynthesis of terpenoids in *Ch. praecox*. Its computational molecular weight was 33.4 kDa and the theoretical isoelectric point was 6.38. Real-time fluorescence quantitative PCR demonstrated that no expression signals of *CpIPI* were detected in roots but were detected in stems, leaves and flowers. Furthermore, the expression level of *CpIPI* in outer perianths was the highest. Overall, the expression of *CpIPI* increased steadily in different flowering periods. In conclusion, we speculate that *CpIPI* may participate in the biosynthesis of terpenoids related to floral organ formation and development in *Ch. praecox*.

Key words: *Chimonanthus praecox*; isopentenyl diphosphate isomerase(IPI); gene cloning; expression analysis

责任编辑 潘春燕

