

播娘蒿 *hmgr* 基因保守区片段的克隆与分析

陈凤美¹, 曹小迎¹, 蒋继宏^{1*}, 张小平², 钱利武², 刘群¹

(1. 徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116; 2. 安徽师范大学 生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 通过比较 6 种植物的 8 条甲羟戊酸途径关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)基因同源区域, 设计简并引物, 利用 RT-PCR 技术成功地从播娘蒿叶中扩增出 458bp 的基因片段。通过 BlastP 比较, 所推断的播娘蒿 HMGR 蛋白序列与拟南芥(NP_177775)、萝卜(CAA48610)、杜仲(AAV54051)、胡黄连(ABC74565)、喜树(AAB69726)、龙胆草(BAE92730)的一致性分别达到 98%、96%、88%、89%、86% 和 87%。通过对蛋白质保守区、特征区以及进化树分析, 证实该片段确为 *hmgr* 基因片段, 该结果为首次报道。

关键词: 播娘蒿; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 基因克隆

中图分类号: Q781, Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)03-0386-04

Cloning and analysis of *hmgr* gene conserved fragments in *Descurainia sophia*

CHEN Feng-Mei¹, CAO Xiao-Ying¹, JIANG Ji-Hong^{1*},
ZHANG Xiao-Ping², QIAN Li-Wu², LIU Qun¹

(1. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China; 2. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Based on the design of degenerated oligonucleotides according to the conservative regions of eight 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases(HMGRs) from six plants and total RNA extracted from *Descurainia sophia*, a 458bp fragment of *hmgr* was obtained by using reverse transcription PCR strategy. Through sequence analysis by BlastP online, the resulting protein showed high homology to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, with 98% identification compared with *Arabidopsis thaliana* (NP_177775), 96% with *Raphanus sativus* (CAA48610), 88% with *Eucommia ulmoides* (AAV54051), 89% with *Picrorhiza kurroa* (ABC74565), 86% with *Camptotheca acuminata* (AAB69726) and 87% with *Gentiana lutea* (BAE92730). Deduced amino acid sequences were also analyzed by PROSITE, ClustalX and MEGA Ver. 3.1, and data present evidence for the existence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in *Descurainia sophia*. This is the first report of the *hmgr* gene isolated from *D. sophia*.

Key words: *Descurainia sophia*; 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase(HMGR); gene cloning

许多植物萜类化合物(如抗肿瘤药物紫杉醇和抗疟药青蒿素)都具有很好的药理活性,为解决当前西药毒副作用大及治疗癌症、艾滋病等疑难疾病提供了一条新的药物来源,因此植物萜类化合物引起了人们浓厚的兴趣。随着植物基因工程的飞速发

展,植物萜类代谢途径的研究取得了突破性的进展,人们通过对关键酶基因的分离克隆,表达调控进而对萜类次生代谢的合成途径和调控机制有了更为深入的了解(Newman & Chappell, 1999; Eisenreich 等, 1998)。现代研究认为萜类在植物体中的合成是

收稿日期: 2006-12-20 修回日期: 2007-03-28

基金项目: 徐州师范大学科研基金(04XLB34)[Supported by Science and Research Foundation of Xuzhou Normal University(04XLB34)]

作者简介: 陈凤美(1953-),女,江苏徐州人,副教授,主要从事药用植物生物技术方面研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail, jhjiang@xznu.edu.cn)

分为两部分的,一部分是甲羟戊酸途径,在细胞质中进行,产生倍半萜和三萜(Newman & Chappell, 1999);另一部分是丙酮酸-磷酸甘油醛途径,在细胞的质体中进行,产生单萜、二萜和四萜(Eisenreich 等,1998;Lichtenthaler,1999)。在甲羟戊酸途径中 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, HMGR) 是主要的 关键酶之一。目前,*hmgr* 基因已先后从甜瓜(Kato-Emori 等,2001)、红豆杉(Liao 等,2004)及杜仲(Jiang 等,2006)等植物中得到分离克隆。

播娘蒿(*Descurainia sophia*)隶属于十字花科(Cruciferae)播娘蒿属(*Descurainia*),为一或二年生草本,除华南外全国各地均有分布。其成熟干燥的种子俗称南葶苈子,为中药葶苈子的正品,具有止咳平喘、消肿利尿、强心之功效(国家药典委员会,2000)。南葶苈子种子中萜类含量较丰富(王新芳等,2005)。若能通过基因工程手段来调控萜类代谢途径的关键酶如 HMGR 等继而促进萜类活性代谢产物的合成积累将是一件十分有意义的事件。但迄今为止,国内外尚未见到有关播娘蒿萜类物质代谢合成途径及其关键酶基因如 HMGR 等的研究报告。此外,从不同物种中分离克隆 *hmgr* 基因,从而进一步研究 *hmgr* 基因的结构特征、分子进化以及生物学功能都是非常有意义的。本文首次克隆了播娘蒿 *hmgr* 基因的 cDNA 片段,并用生物信息学手段对其序列进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

播娘蒿种子购自安徽亳州中药材市场,经安徽师范大学植物研究室张小平教授鉴定为南葶苈子正品。种子经过双氧水处理及升汞消毒处理后,播种于 MS0 培养基,25 °C 培养 4 周,长出的无菌苗置于 4 °C 处理 3 d。

1.2 总 RNA 的提取

按照 Trizol 试剂盒(TaKaRa)说明书操作分离总 RNA,提取的总 RNA 经 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳和 260~280 nm 波长的紫外光扫描来分析其质量。

1.3 兼并引物的设计与合成

兼并引物的设计依据 6 种植物的 7 条 HMGRs 保守序列设计(Genbank 中的序列号为:

CAU72145, CMCHMGCOAR, AB021862, ATHH-MG1, AY352338, AF429388, MAU43711)。上游引物序列为 5'-GG[G/C/T]GATGC[A/T/C]ATGGG[G/A]ATGAA[C/T]ATG, 下游引物序列为 5'-AC[A/T/C]GT[A/C/G]CC[A/C]ACCTCAATNGA[A/T/G]GGCAT-3'。引物合成由北京奥科生物技术有限公司完成。

1.4 cDNA 克隆及序列分析

播娘蒿的总 RNA 反转录成 cDNA 通过 RACE 试剂盒(Clontech)完成,所有操作步骤均按试剂盒说明书进行。以合成的 5'RACE cDNA 为模板,用两个上下游引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 °C 变性 3 min,然后是 35 个循环的 94 °C 1 min, 58 °C 1 min 和 72 °C 2 min。最后再 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后,切下目的片段,经回收纯化后与 pGEM-T Easy 载体连接,转化 DH5 α 大肠杆菌。在 LB/AMP^r/IPTG/X-Gal 平板上筛选阳性克隆,然后随机挑选经 EcoR I 酶切确认的重组质粒并测序,测序工作由北京奥科生物技术有限公司完成。将所测定的序列结果通过 BLASTN 和 BLASTP 搜索 National Center for Biotechnology Information(NCBI)的核苷酸和蛋白质数据库,将所测序列通过 DNAMAN 软件翻译成氨基酸序列并寻找做最大读码框,用 PROSITE 软件(Hulo 等,2006)在线分析该蛋白质的基本结构域,并通过 ClustalX 分析软件(Thompson 等,1997)与其它植物的 HMGR 氨基酸序列进行多重比对,用生物信息学软件 MEGA Ver. 3.1(Kumar 等,2004)构建进化树。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

播娘蒿总 RNA 的甲醛变性凝胶的电泳结果如图 1。从图 1 可以清晰地看出 2 条 rRNA 条带(18S rRNA、28S rRNA),其中 28S rRNA 条带的亮度大约为 18S rRNA 的 2 倍,说明了总 RNA 良好的完整性。紫外分光光度法测得 A_{260}/A_{280} 比值为 1.998,为典型的 RNA 吸收值。说明酚类、多糖、蛋白质和无机盐等杂质已经排除。

2.2 播娘蒿 *hmgr* 基因克隆与序列分析

通过 RT-PCR,从播娘蒿总 RNA 中成功地克隆到了一条片段,大小在 500 bp 左右(图 2)。PCR

片段纯化后,TA 克隆到 pGEMT_easy 载体上,蓝白斑筛选获得阳性转化子,进一步提取质粒,验证转化子大小,然后将分子量明显增大的重组质粒作为模板,用原引物进行 PCR 扩增,验证重组质粒插入的片段的大小,表明重组质粒中插入的片段为 RT-PCR 克隆得到的片段。测序结果为一大小为 458bp 的片段,将序列在 NCBI 网站上通过 BLASTN 在线比较,结果显示这条序列与其它植物的 *hmgr* 基因有很高的同源性,说明扩增到的序列就是播娘蒿的 *hmgr* 基因序列。

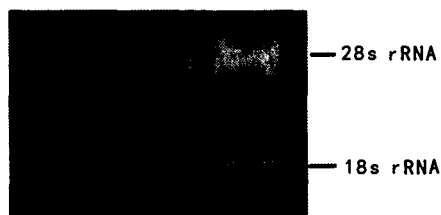


图 1 总 RNA 电泳
Fig. 1 Total RNA gel electrophoresis

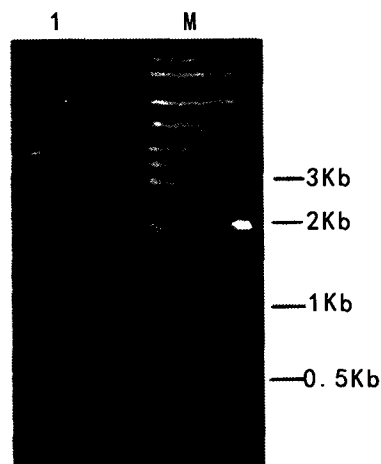


图 2 保守区片段扩增产物
Fig. 2 Product of conservation fragment
M: DNA Marker(GeneRuler™ 1kb DNA Ladder); 1: PCR product.

2.3 推断的 HMGR 氨基酸序列的同源比较、功能域及结构分析

由获得的 *hmgr* 基因序列推断出的 HMGR 氨基酸序列通过 BLASTP 在线比较,播娘蒿 HMGR 氨基酸序列与拟南芥 (NP_177775)、萝卜 (CAA48610)、杜仲 (AAV54051)、胡黄连 (ABC74565)、喜树 (AAB69726)、龙胆草 (BAE92730) 的一致性分别达到 98%、96%、88%、

89%、86% 和 87%。用 PROSITE 软件在线分析 (<http://us.expasy.org/prosite/>),发现播娘蒿推断的 HMGR 氨基酸序列具有 HMGR 家族中的保守区域,并发现了下列特征位点:一个蛋白激酶 C 磷酸化位点,两个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,六个 N 端豆蔻酰化位点(图 3)。同时分析了不同来源 HMGR 蛋白质序列的结构特点,发现它们同样拥有这些结构特点。

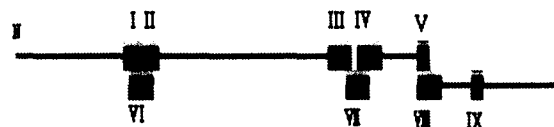


图 3 推断的 HMGR 中 152aa 的 prosite 分析结果
Fig. 3 Analysis of HMGR deduced 152aa by prosite
Protein kinase C phosphorylation site: 38-40 SdK (II); Casein kinase II phosphorylation site: 113-116 TqqD (V); 128-131 TmmE (IX); N-myristoylation site: 31-36 GsgNY (I); 34-39 GnycSD (VI); 88-93 GsavAG (III); 93-98 GSlgGF (VII); 96-101 GgfnAH (IV); 114-119 GqdpAQ (VIII).

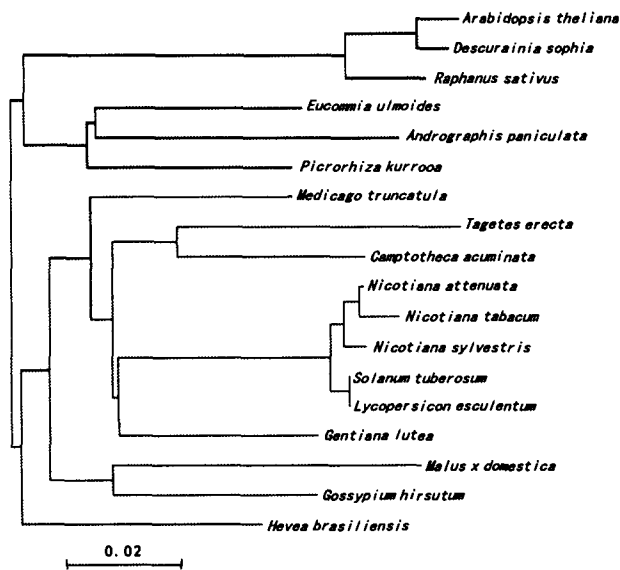


图 4 18 种植物 HMGR 部分氨基酸序列系统发育关系
Fig. 4 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of HMGR from *Descurainia sophia* and other 17 plants in GenBank database

2.4 推断的 HMGR 蛋白的进化分析

不同植物 HMGR 氨基酸序列所得出的系统演化关系虽不能真实反映植物在历史长河中的自然演化关系,但其结果对判断不同植物间的亲缘关系仍具有一定的借鉴意义(李嵘等,2006)。本实验对 Gen-

Bank 同源性搜索获得的 18 种植物的 HMGR 氨基酸序列进行了系统发育分析, 通过 MEGA3.1 软件用 Neighbor-joining 方法构建系统发育树, 按自展法(bootstrap)运行 1 000 次, 结果显示播娘蒿和拟南芥(NP_177775)亲缘关系最近, 它们最先与萝卜(CAA48610)聚在一起, 然后与杜仲(AAV54051)、穿心莲(AAP14352)和胡黄连(ABC74565)聚类合并, 再与苜蓿(ABE88827)、万寿菊(AAC15475)、喜树(AAB69726)、野生烟草(AAO85554)、烟草(AAL54878)、美花烟草(CAA45181)、马铃薯(Q41437)、番茄(AAB62581)、龙胆草(BAE92730)、苹果(AAK95406)、陆地棉(AAC05089)及橡胶树(AAU08214)聚类。

3 讨论

本实验首次从播娘蒿中扩增出甲羟戊酸途径的关键酶基因 *hmgr* 的保守区序列, 通过同源性比较、保守性区域比较以及蛋白特征性位点分析, 发现与已报道的 HMGR 蛋白特性很相似, 因此可推断克隆得到的片段就是播娘蒿 HMGR 的 cDNA 片段。

RACE 技术是近年来发展较成熟的一种 cDNA 末端快速扩增技术, 其原理是利用全长 cDNA 中间部分已知序列通过 PCR 技术扩增出 cDNA 3' 端和 5' 端。它具有快捷, 方便和高效等特点。本实验已通过 RACE 试剂盒得到了播娘蒿叶的 5' RACE cDNA, 并通过兼并引物获得了播娘蒿 HMGR 的 cDNA 的保守区片段, 这为克隆播娘蒿 HMGR 的全长基因进而利用基因工程技术提高播娘蒿中的有效化学成分的研究和应用奠定了坚实的基础。

参考文献:

国家药典委员会. 2000. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学

工业出版社; 274

- Eisenreich W, Schwarz M, Cartayrade A, et al. 1998. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms[J]. *Chem Biol*, **5**: R221
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, et al. 2006. The PROSITE database[J]. *Nucleic Acids Res*, **34**: 227—230
- Jiang JH, Kai GY, Cao XY, et al. 2006. Molecular cloning of a HMG-CoA reductase gene from *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. *Biosci Rep*, **62**(2): 171—181
- Kato-Emori S, Higashi K, Hosoya K, et al. 2001. Cloning and characterization of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in melon (*Cucumis melo* L. reticulatus) [J]. *Mol Genet Genomics*, **265**: 135—142
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, **5**: 150—163
- Li R(李嵘), Wang ZZ(王喆之). 2006. A bioinformatics analysis on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase, a key enzyme in plant Isoprenoid biosynthesis (植物萜类合成酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶的生物信息学分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **26**(5): 464—473
- Liao ZH, Tan QM, Chai YY, et al. 2004. Cloning and characterization of the gene encoding HMG-CoA reductase from *Taxus media* and its functional identification in yeast[J]. *Functional Plant Biol*, **31**: 73—81
- Lichtenthaler H K. 1999. The 1-deoxyxylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **50**: 47
- Newman JD, Chappell J. 1999. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **34**: 95
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, **24**: 4 876—4 882
- Wang XF(王新芳), Dong Y(董岩), Liu HL(刘洪玲). 2005. A study on chemical constituents of the essential oil from *Descurainia sophia* by GC-MS(播娘蒿挥发油化学成分的 GC-MS 研究)[J]. *Shandong J Trad Chin Med*(山东中医杂志), **24**(2): 112—114

(上接第 426 页 Continue from page 426)

- Su XF(苏秀芳), Lin Q(林强), Liang ZY(梁振益), et al. 2007. Study on the chemical constituents of essential oil from stems of *Cleidiocarpon cavaleriei*(蝴蝶果茎挥发油化学成分的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(5): 766—769
- Yin SM(殷树梅), Li ZF(李再峰), Yue BT(岳堡泰). 2001. Synthesis of iso-octyl palmitate(棕榈酸异辛酯的合成)[J]. *Chemical World*(化学世界), **42**(3): 146—147
- Zhang DX(张大昕), Jin GZ(金桂贞), Wang CR(王春荣). 1981.

- Study of wild plant oils-fatty acids compositions and acute toxicity trial(野生油料植物的调查和油的脂肪酸组成及其急性毒性实验)[J]. *Acta Nut Sin*(营养学报), **3**(4): 233—238
- Zhu JJ(朱俊洁), Meng XY(孟祥颖), Wu Y(乌垠). 2005. Analysis of the essential oils from fruits, stems, leaves, barks and trunk cores of *Prunus padns*(稠李果、茎、叶、皮及树干挥发油化学成分的分析)[J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学研究简报), **33**(11): 1 615—1 618