

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201311029

韩兴杰 徐玲玲 廖亮 等. 茶树 HMG-CoA 还原酶基因全长 cDNA 克隆及序列分析[J]. 广西植物 2015 35(2): 231–238

Han XJ, Xu LL, Liao L *et al.* Cloning and sequence analysis of HMG-CoA reductase full-length cDNA from tea (*Camellia sinensis*) [J]. *Guihaia* 2015, 35(2): 231–238

茶树 HMG-CoA 还原酶基因全长 cDNA 克隆及序列分析

韩兴杰¹, 徐玲玲^{1*}, 廖亮¹, 李同建¹, 邓辉胜¹, 樊启水², 徐小青³

(1. 九江学院 生命科学学院, 江西 九江 332000; 2. 江西修水茶叶科学研究所,

江西 修水 332400; 3. 九江市湖口县三里林场, 江西 湖口 332500)

摘要: 香气是茶叶的重要品质之一, 萜类物质不仅香气好, 而且沸点普遍较高, 是构成茶叶香气的重要物质基础, 决定着茶叶的香气品质, 也可作为茶叶香型划分的依据。在植物中, 倍半萜、多萜醇等通过胞质中的甲瓦龙酸(MVA)途径合成。HMG-CoA 还原酶(HMGR)催化 HMG-CoA(3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A)生成甲瓦龙酸, 是依赖 MVA 萜类合成途径的关键限速反应。为了有助于理解茶树萜类合成的分子遗传机制, 通过 RACE-PCR 方法从茶树中克隆了一个编码 HMG-CoA 还原酶的 cDNA 全长序列(命名为 *CsHMGR1*)。该序列由 1 979 bp 组成, 包含一个 1 722 bp 的完整开放阅读框, 编码 573 个氨基酸。其推定的编码蛋白与橡胶树、旱莲木、人参、荔枝、西洋参、丹参、罗汉果及龙眼的同源蛋白具有 80% ~ 82% 的序列一致性。利用 *CsHMGR1* 和其它物种 HMGR 同源蛋白的催化区域构建系统发育树, 表明其属于真核生物 I 类 HMGR 家族。结构分析表明, *CsHMGR1* 含有两个跨膜区, 推测其与其它真核生物同源蛋白类似地定位于内质网上; 含有两个 HMG-CoA 结合位点、两个 NADPH 结合位点、四个保守的催化活性残基及一个磷酸化位点, 说明磷酸化/去磷酸化很可能也是其活性调节的重要方式。表达分析表明, *CsHMGR1* 在“大叶龙”叶芽、母株叶芽及花芽都有较强的表达。其表达调控及生理活性对茶叶品质可能有重要影响, 并在其功能解析的基础上, 有可能作为茶叶品质鉴定及育种的一个依据。

关键词: 茶树; HMG-CoA 还原酶; HMGR; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S571.1; Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)02-0231-08

Cloning and sequence analysis of HMG-CoA reductase full-length cDNA from tea (*Camellia sinensis*)

HAN Xing-Jie¹, XU Ling-Ling^{1*}, LIAO Liang¹, LI Tong-Jian¹,DENG Hui-Sheng¹, FAN Qi-Shui², XU Xiao-Qing³

(1. College of Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China; 2. Xiushui Tea Research Institute of

Jiangxi, Xiushui 332400, China; 3. Sanli Forest Farm of Hukou County, Hukou 332500, China)

Abstract: Aroma is an important character of tea, and terpenoids, with preferable fragrance and relatively high boiling point, are substantial substances contributing to tea aroma, which not only determine the aroma quality of tea, but also provide a classification basis of scent types. In plants, sesquiterpenes and dolichol and so forth are synthesized via the cytoplasmic mevalonate-dependent pathway. The enzyme HMG-CoA reductase (HMGR) catalyzes the conversion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) to mevalonate, which is the committed step in the synthesis of isopre-

收稿日期: 2014-05-27 修回日期: 2014-07-25

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ10620)

作者简介: 韩兴杰 (1977-) 男, 黑龙江齐齐哈尔市人, 博士, 主要从事植物分子生物学与基因工程研究, (E-mail) hanxjie@foxmail.com。

* 通讯作者: 徐玲玲, 教授, 研究方向为植物分子生物学, (E-mail) lingl239@163.com。

noids via the MVA pathway. To help understand the molecular and genetic mechanisms underlying terpenoid synthesis of tea, a full-length cDNA encoding HMGR was cloned from tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by using the RACE-PCR technique (designated as *CsHMGR1*). It comprised 1 979 bp with a 1 722 bp intact open reading frame encoding a 573-amino-acid protein. The deduced protein showed 80% to 82% similarities to homologs from rubber tree (*Hevea brasiliensis*), common camptotheca fruit (*Camptotheca acuminata*), ginseng (*Panax ginseng*), litchis (*Litchi chinensis*), American ginseng (*Panax quinquefolius*), rooted salvia (*Salvia miltiorrhiza*), Momordica grosvenori (*Siraitia grosvenorii*) and longan (*Dimocarpus longan*). The phylogenetic tree constructed with the catalytic domain of *CsHMGR1* and homologs from other species indicated that *CsHMGR1* belonged to the eukaryotic class I HMGR family. *CsHMGR1* consisted of two transmembrane domains implying that it may be localized to endoplasmic reticulum (ER) similarly to other eukaryotic homologs. It also contained two HMG-CoA binding sites, two NADP(H)-binding sites, four conserved catalytic active residues and a phosphorylation site indicating that phosphorylation/dephosphorylation is likely a crucial mode of regulation of its biochemical activity. Tissue expression analysis indicated that *CsHMGR1* was expressed comparatively in the leaf buds of *C. sinensis* cv. Dayelong and in both leaf buds and floral buds of the mother plants. The regulation of expression and physiological activity of *CsHMGR1* are likely to impact greatly on tea quality and *CsHMGR1* may provide a basis of the quality evaluation and breeding of tea given that its function is further resolved.

Key words: *Camellia sinensis*; HMG-CoA reductase; HMGR; gene cloning; sequence analysis

萜类 (terpenoids) 或称类异戊二烯 (isoprenoids) 广泛分布于植物、动物、微生物等体内。植物界中的萜类组成了植物天然化合物中最大的一类, 结构及生理作用复杂多样, 具有重要的应用及经济价值, 如单萜和倍半萜是挥发油的主要组分, 紫杉醇、青蒿素、银杏萜内酯等具有很高的药用价值 (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2002; Grochowski *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009)。尽管萜类存在结构上的多样性, 但生物合成都来源于异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 及其异构体 3,3-二甲基烯丙基焦磷酸 (3,3-dimethylallyl diphosphate, DMAPP)。在植物体内, 合成这两种中心化合物通过两种途径: 发生在胞质中的甲瓦龙酸 (mevalonic acid, MVA) 途径以及发生在质体中的甲基赤藓醇 4-磷酸途径 (methylerythritol 4-phosphate, MEP) 途径 (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2002; Grochowski *et al.*, 2006; Rohmer, 2007)。HMG-CoA 还原酶 (HMG-CoA reductase, HMGR) 催化 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA) 生成甲瓦龙酸, 是 MVA 途径的关键限速反应 (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2002; Rohmer, 2007)。

香气是茶叶的重要品质之一。萜类物质不仅香气好, 而且沸点普遍较高, 是构成茶叶香气的重要物质基础。萜类的组成决定着茶叶的香气品质, 也可作为茶叶香型划分的依据。单萜及倍半萜大都带有浓郁的甜香、花香和木香, 是各类茶的主要香气成分

(Zhang *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2008; He *et al.*, 2012)。近年来, 对萜类化合物及其生物合成途径的研究不断深入, 通过关键基因克隆利用基因工程手段选择性地调控萜类代谢途径, 改变萜类的含量及组成, 可从根本上改良植物性状和品质 (Ma *et al.*, 2006; He *et al.*, 2012)。本研究通过 RACE-PCR 技术从茶树中克隆了一个编码 HMG-CoA 还原酶 (HMGR) 的 cDNA 全长序列, 对它及其编码蛋白的序列和结构特征进行了分析, 并讨论了其在植物中的作用。茶树 HMG-CoA 还原酶基因的克隆, 为研究其在萜类合成中的功能提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

茶树 (*Camellia sinensis*) 材料取自江西省修水茶叶科学研究所, 大叶龙品系源自 1 株不开花无蕾芽突变体, 通过无性繁殖得到的后代 (Xu *et al.*, 2009)。2010 年 9 月采集大叶龙叶芽、母株花芽及叶芽, 立即放入液氮中, 带回实验室后保存于 -80 °C 冰箱; 基因克隆完成于 2011 年 3 月。

1.2 方法

1.2.1 茶树总 RNA 的提取 使用通用植物总 RNA 提取试剂盒 (RP3301, 百泰克生物技术公司, 北京), 具体试验步骤按照产品使用说明书进行。

1.2.2 5'-RACE 获得 5'-末端 cDNA 序列 5'-RACE 的引物设计和试验依照 SMARTer RACE cDNA Am-

plification Kit (Cat. No. 634923, Clontech) 进行。逆转录反应以茶树总 RNA 为模板, 使用 5'-RACE CDS Primer A 为引物, 并在 5'-末端添加接头 SMARTer II A Oligonucleotide, 再以逆转录 cDNA 产物为模板进行 PCR 扩增, 基因特异引物为 GSP1: 5'-GGCGAGACCTGGATGGGCATTGAA G-3'。

1.2.3 3'-RACE 获得 3'-末端 cDNA 序列 利用 5'-RACE 得到的 *HMGR* 序列设计特异引物, 3'-RACE 试验使用 Clontech SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 进行。以茶树总 RNA 为模板, 3'-RACE CDS Primer A 为引物进行逆转录反应。以逆转录 cDNA 产物为模板, 利用套式 PCR 进行 3'-末端扩增, 基因特异引物为 GSP2: 5'-TAAGAGGGCGGCGGCGAT-ACGGAGGG-3' (第一轮) 和 NGSP2: 5'-AATGGCTG-GTGCTCTTGGTGGCTTCA-3' (第二轮)。

利用 5'-RACE 和 3'-RACE 得到的序列, 通过一对引物扩增 cDNA 全长, 上游引物: 5'-GGTCCGAT-TCCGGCTAAAA-3', 下游引物: 5'-CATCATACGCT-TCGTGACCACT-3'。以上得到的 PCR 产物通过琼脂糖凝胶分析, 目的条带用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (Cat. SK8132, 上海生工公司) 进行回收纯化, 连接到 pUCm-T 载体 (上海生工公司) 测序工作由上海生工公司进行。

1.2.4 序列分析及系统进化树的构建 对不同克隆测序得到的结果, 用 Vector NTI 的子程序 Contig Express 进行序列拼接, 用 cDNA 序列及其编码的蛋白序列与 NCBI 数据库中的其它物种同源序列进行 BLAST 分析。蛋白序列对齐用 Clustalx 2.0 软件; 系统发育树的构建用 MEGA 5.2 软件的最小进化法, 并进行 Bootstrap 检测 (抽样次数为 1 000)。蛋白质序列跨膜区预测用 TMPred (http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)。蛋白质空间结构使用 Phyre2 线串法进行同源建模 (Kelley *et al.* 2009), 使用 3DLigandSite 进行配体结合位点分析 (Wass *et al.* 2010)。

1.2.5 基因表达分析 茶树总 RNA 使用 DNase I (2270A, 宝生物工程公司) 消化处理, 以去除可能存在的 DNA 污染。以 oligo (dT) 为引物, 使用 RevertAid 试剂盒 (#K1621, Fermentas) 进行 cDNA 第一链的合成, 并用一对特异引物进行 RT-PCR 基因表达

分析, 上游引物: 5'-CTGACAACGGTGGACGATGAA-3', 下游引物: 5'-GCTGGCTTCTTATCCGAGCAA-3'。

2 结果与分析

2.1 茶树 *HMGR* 基因全长 cDNA 克隆

以茶树叶芽提取的总 RNA 为模板, 通过 5'-RACE 得到的 DNA 片段经过测序, 获得片段长度为 1 479 bp 的 DNA 序列 (不包括接头引物, 下同) (图 1)。与 NCBI 数据库中的序列进行比对, 该片段与其它物种 *HMGR* 基因的序列相似性为 76% ~ 89%; 其编码的氨基酸序列与其它物种 *HMGR* 蛋白的序列相似性为 71% ~ 80%, 由此可以确定获得的该序列片段属于茶树中的 *HMGR* 基因。利用获得的 5'-末端基因片段设计引物, 通过 3'-RACE 获得长度为 407 bp 的 *HMGR* 基因 3'-末端 cDNA 片段 (图 1)。将 5'-RACE 及 3'-RACE 得到的序列进行拼接, 得到茶树中 *HMGR* 基因完整的 cDNA 序列, 并用特异引物对其全长进行了克隆 (图 1)。

该 cDNA 序列由 1 979 bp 组成, 其 5'-cDNA 末端序列第一个碱基是 G, 符合真核生物基因转录一般从嘌呤 (主要是 A, 也可能是 G) 起始的特点, 5'-UTR (非翻译区) 的长度为 135 bp; 包含一个 1 722 bp 的开放阅读框, 编码 573 个氨基酸, 在近氨基末端存在 2 个跨膜区域; 3'-UTR 的长度为 122 bp, 尾部包含一段 poly(A) 结构, 其紧邻的上游碱基是 C, 符合植物 poly(A) 位点 (YA, Y = T 或 C) 的特征 (图 2)。将该 cDNA 命名为 *CsHMGR1* (GenBank 基因登录号: KF649853)。

2.2 氨基酸序列比对及结构分析

CsHMGR1 氨基酸序列与 NCBI 数据库序列进行比对, 与橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)、旱莲木 (*Camptotheca acuminata*)、人参 (*Panax ginseng*)、荔枝 (*Litchi chinensis*)、西洋参 (*Panax quinquefolius*)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)、罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*)、龙眼 (*Dimocarpus longan*) 的同源蛋白具有 80% ~ 82% 的序列一致性, 这说明 *CsHMGR1* 属于植物 *HMGRs* 家族。*CsHMGR1* 的氨基酸序列包含两个 HMG-CoA 结合位点 (EMPVGFVQIP 和 TTEGCLVA)、两个 NADP(H) 结合位点 (DAMGMNM 和 GTVGGGT)、四个

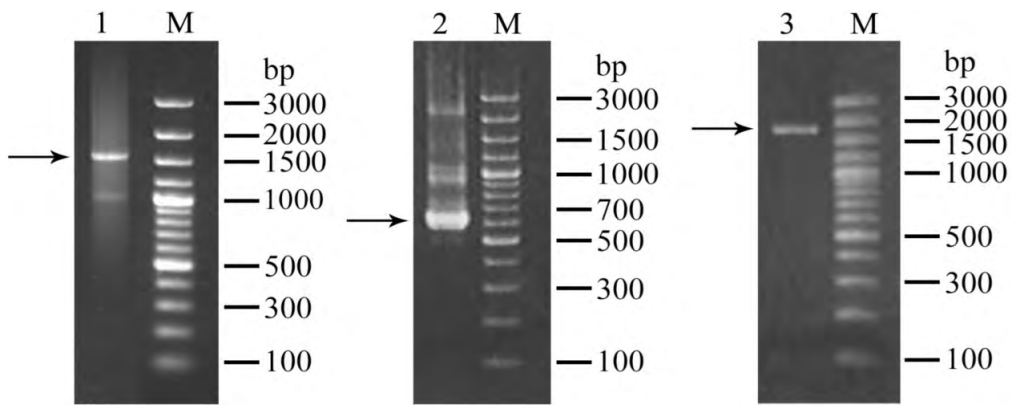


图 1 茶树 *HMGR1* 基因全长 cDNA 克隆 1. 5'-RACE; 2. 3'-RACE; 3. 基因全长; M. DNA 分子质量标准。

Fig. 1 Cloning of the full-length cDNA of *HMGR1* from tea

1 2 3. represent 5'-3'-RACE fragments and the full length gene respectively; M. DNA ladders.

GACTCCATCTCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCACCACCACCACGCCCATCATCAACAATCCTCAACCAAACACCAACAAAAC
CCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGCGGTCGGATCCGGCTAAAAATGGATGTTCCGCCGGCAAATGACAAGCCATACCCAAATCAGCC
M D V R R R N D K P S P K S A
GGCGAACCTCTGAAACCTCACCAGCGTAACGGCCAAGTAACCTCTCCCAAGCCCTCGGACGCTCTGCCCTTACCTCTCTACATCACC
G E P L K P H Q R N G Q V T S P K A S D A L P L P L Y I T N
GGCGTATTCTTACCCTCTTTTTCTCCGTGGCCTACTTCTCTCCACCGCTGGCGTGAGAAGATCCGCAACTCCATGCCCTCCACATC
G V F F T L F F S V A Y F L L H R W R E K I R N S M P L H I
GTCACCTCTCCGAGCTCGCCGGCTCATCTCGCTAAATCGCCTCCGTCTACCTCCTCGGCTTCTTCGGCTCGACTTCGTCCAGTCC
V T L S E L A A V I S L I A S V I Y L L G F F G I D F V Q S
CTCTCACCAGCAACCTCCCCGACTCTTGGGAAGACGACGACCTCGTCATTCTCCAAGACGACCGTTCGACTACCCCTTGCCCGCC
L L T G K P S P D S W E D D D L V I L Q D D R R T T P C A A
TCAATTGACTGCTCTCTCTCTCCGAAGCGGGCGGAAAGATCCGATCTGACACCGTGGACGATGAAGAAATATAAAAACGGTA
S I D C S S P P P K A A E K I P I Y L T V D D E E I I K S V
GTGGACGGAAAACGCCATCATACTACTGGAATCAAACCTCGGGGACTGTAAGAGGGCGCGGCATACGGAGGGTGCGTTGGAGAGG
V D G K T P S Y S L E S K L G D C K R A A A I R R V A L E R
GTTACCGGGAAGAGTCTAGATGGATTGCGGTTGGAGGGGTTGACTATGAGTCGATATGGGACAGTGTGTGAGATGCCGGTGGGGTT
V T G K S L D G L P L E G F D Y E S I L G Q C C E M P V G F
GTTTCAGATTCCGGTGGGGTGGGGACCGCTGTCTGGACGGGAGGGAGTACTCGGTGCCCATGGCCACCGGGAGGGTGTGGTT
V Q I P V G I A G P L L L D G R E Y S V P M A T T E G C L V
GCGAGCACTAACAGGGCTGTAAAGCTATATACGTGTCAGCGGACCCACAGTGTGTTGTTGAGAGATGGGATGACCAGAGCTCCGGT
A S T N R G C K A I Y V S G G A T S V L L R D G M T R A P V
GTAAGGTTCCGGACGGCGAAGAGCGGAGTGAAGTTTTCTTGGGAGACCCATCAACTTTGACACTCTCGCCTCATTTCAAC
V R F G T A K R A A E L K F F L E D P I N F D T L A V I F N
AAATCGACAGATTTGCAAGGCTACAAGGATTAATGTGCAGTAGCAGGAAAGAACTGTGACAGAGTTTATGTGTAGCACAGGGGAT
K S S R F A R L Q G I K C A V A G K N L Y T R F M C S T G D
GCAATGGGGATGAACATGCTCTAAAGGTGTCAGAGTCTTGAATTTCTTGAATGATTCCAGAAATGATTTCCAGACATGGATGTCATGGCAT
A M G M N M V S K G V Q N V L D F L Q N D F P D M D V I G I
TCTGGAACTTTTCTGCTCGGATAAGAAGCCAGCAGTGAAGTGGATTTGAAGGCGGGGAAATCAGTGTGTTGTTGAAGCAATCATCAA
S G N F C S D K K P A A V N W I E G R G K S V V C E A I I K
GAAGAGATAGTGAAGAAGGTGTGAAGACCAACGTGGCAGCTCTGTTGAGCTTAACATGCTCAAGAACCCTTACTGGTTCAGCAATGGCT
E E I V K K V L K T N V A A L V E L N M L K N L T G S A M A
GGTGTCTTGGTGCTCAATGCCCATGCCAGCAACATTGTTCTGCAGTGTACATAGCCACTGGCCAAGACCAGCTCAGAATATTGAG
G A L G G F N A H A S N I V S A V Y I A T G Q D P A Q N I E
AGCTCTCACTGCATCACCATGATGGAAGCTGTTAATGATGGCAAGACCTTCACATCTCTGTACCATGCCTCCATTGAGGTGGGAACA
S S H C I T M M E A V N D G K D L H I S V T M P S I E V G T
GTAGGAGGTGAACCAACTGGCATCTCAGTCAGCATGTCTGAACCTACTTGGAGTGAAGGTGAACCAAGAGTACCTGGGTCTAAT
V G G G T Q L A S Q S A C L N L L G V K G A N K E S P G S N
TCAAGGTTATTGGCAGCCATGTTGGCTTCTGTTCTTGGCTGGGAGCTATCCCTCATGTCAGCCATTGACAGTGGCCAGCTTGTAAAG
S R L L A A I V A G S V A G E L S L M S A I A A G G Q L V K
AGTCACATGAAGTACAACAGATCTAGCAAAGATATCACCAGGTTGCTTCTCTTAAGTGGTCAAGTAAATAAAAATCAAACCTTACG
S H M K Y N R S S K D I T K V A S S *
TAGCTCAAAGTGGTCACGAAGCGTATGATGTAATAATTAATTTTACTACAATGTGAGTCATATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 2 茶树 *HMGR1* cDNA 序列及其推定编码的氨基酸序列 横线上的位置表示该两段氨基酸序列为跨膜区。

Fig. 2 Sequence of *HMGR1* cDNA from tea and the deduced amino acid sequence

Two transmembrane (TM) regions in the amino acid sequence are underlined.

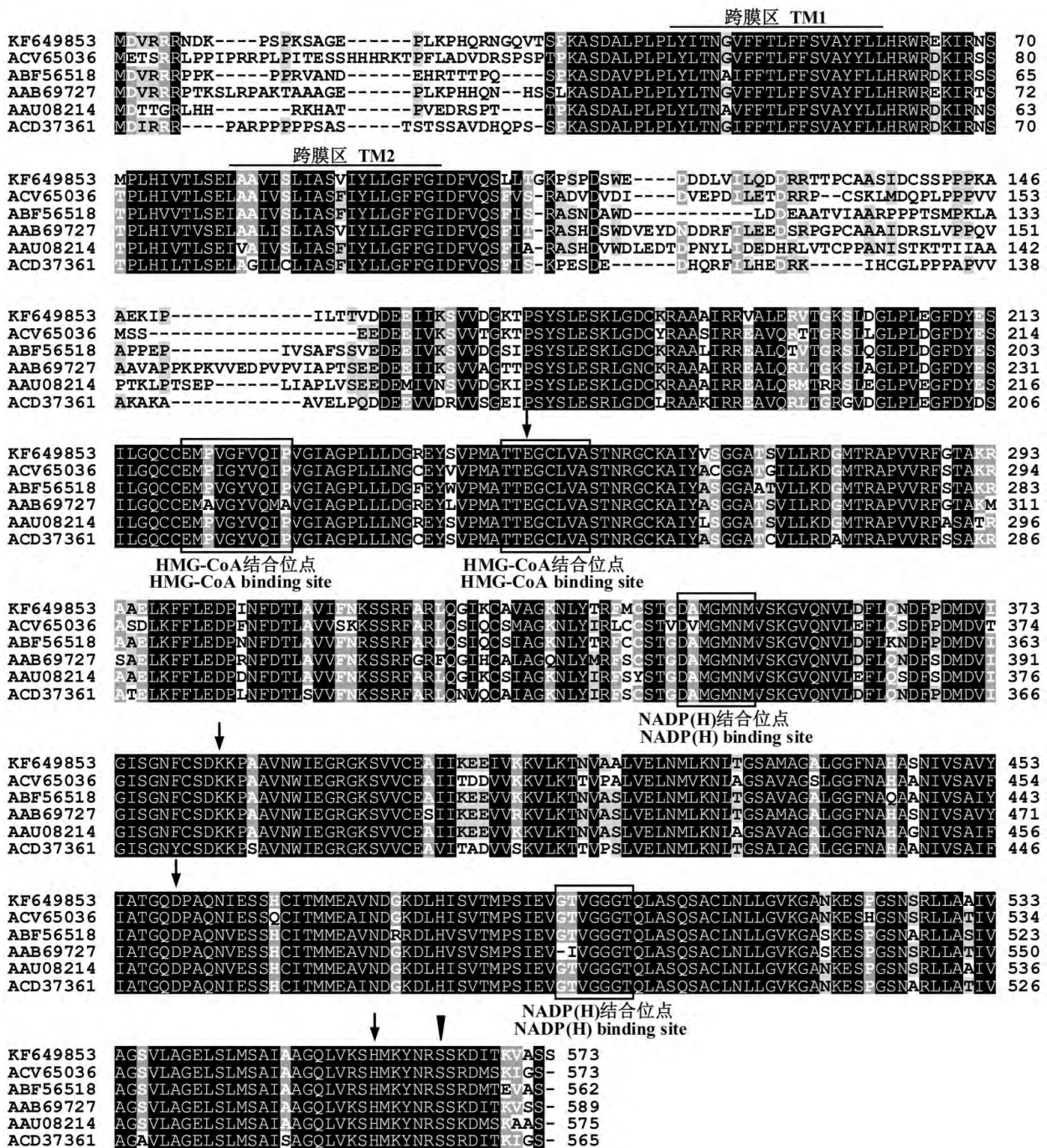


图3 茶树 HMGR1 与其它植物 HMGR 蛋白的多序列对齐 TM. 跨膜区; ↓催化活性位点; ▼磷酸化位点(丝氨酸 S)。序列来源分别为 KF649853(茶树) ,ACV65036(人参) ,ABF56518(荔枝) ,AAB69727(旱莲木) ,AAU08214(橡胶) ,ACD37361(丹参)。

Fig. 3 Multiple alignment of CsHMGR1 with other plant HMGRs TM. transmembrane region; ↓ Catalytic active sites; ▼ Phosphorylation site (serine S). Sequences are as follows: KF649853 (C. sinensis) ACV65036 (P. ginseng) ABF56518 (L. chinensis) AAB69727 (C. acuminata) AAU08214 (H. brasiliensis) ACD37361 (S. miltiorrhiza).

氨基酸残基 (E、K、D、H) 的催化位点和一个丝氨酸 (S) 磷酸化位点(图 3)。这些结构具有高度的保守性,在其它物种中也存在类似序列(Bochar et al., 1999; Istvan et al., 2000a; Friesen et al., 2004; Kuzuyama et al., 2010; Dai et al., 2011)。

使用 Phyre2 线串法对 CsHMGR1 蛋白质进行空间结构建模,并使用 3DLigandSite 进行配体结合位点分析。在 CsHMGR1 的三级结构中,包含多个 α-螺旋和 β-折叠结构,配体结合位点位于三维结构中部的凹陷处(图 4)。

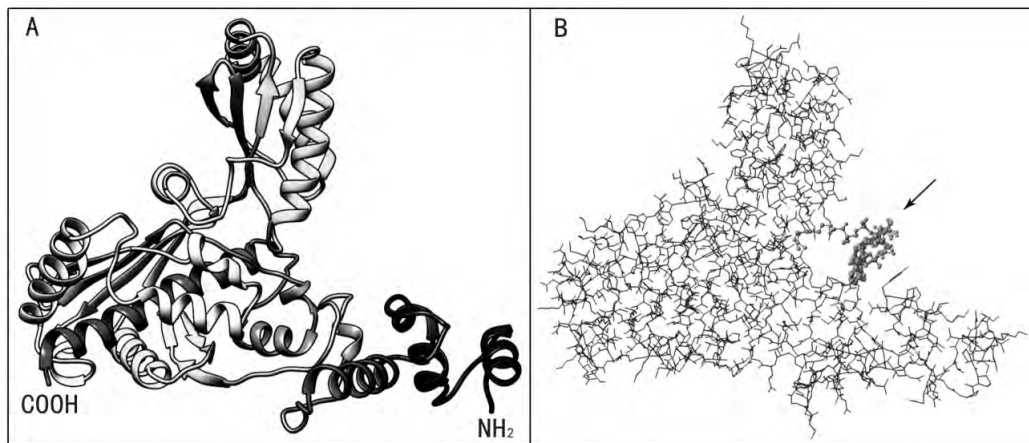


图 4 茶树 HMGR1 蛋白序列三维空间结构预测 A. 蛋白折叠结构(内示二级结构域); B. 蛋白质与配体(箭头所示)的结合。

Fig. 4 Predicted three-dimensional structure of the CsHMGR1 protein A. Dimensional folding configurations, wherein the secondary level structures are shown; B. Binding of the protein and ligands (arrowed).

2.3 HMGR 蛋白家族系统发育分析

HMGRs 是广泛存在于原核生物(细菌、古菌)和生物真核(真菌、植物、昆虫、哺乳动物)中的家族(Bochar *et al.*, 1999; Istvan *et al.*, 2000a; Friesen *et al.*, 2004; Kuzuyama *et al.*, 2010)。利用 CsHMGR1 和其它物种 HMGR 同源蛋白的催化区域构建系统发育树,茶树 CsHMGR1 和其它种植物 HMGR 蛋白聚类在一起,和动物、真菌的 HMGR 蛋白同属于 I 类(Class I) HMGRs,而细菌和古生菌的 HMGR 蛋白同时分布于 I 类和 II 类(Class II) HMGRs 中(图 5)。

2.4 CsHMGR1 的表达分析

以茶树肌动蛋白(Actin)基因为内参进行定量,通过 RT-PCR 对 CsHMGR1 进行组织表达分析。结果表明, CsHMGR1 在“大叶龙”叶芽、母株叶芽及花芽中均有较高水平的表达(图 6)。

3 讨论与结论

根据 HMGRs 催化活性区域序列特征,存在两种具有明显区别的类型。I 类(Class I)主要分布于真核生物,也存在于一些古生菌及细菌中;II 类(Class II)只存在于原核生物中(Bochar *et al.*, 1999; Friesen *et al.*, 2004; Kuzuyama *et al.*, 2010)。真核生物的 HMGRs 在 N-端含有 2~8 个跨膜区,以同源四聚体的形式定位于内质网上发挥作用;尽管在 N-端区域存在较大变异,但在 C-端(催化活性区域)十分保守。而原核生物 HMGRs 不含有跨膜区,是可溶性蛋白,以同源二聚体的方式行使功能(Roitelman *et al.*, 1992; Istvan *et al.*, 2001; Kuzuyama *et*

al., 2010)。茶树 CsHMGR1 属于 I 类的植物 HMGR 家族,在它们的 N-端序列差异较大,而 C-端十分保守。在 CsHMGR1 的 N-端含有两个跨膜区,推测其与其它真核生物同源蛋白类似地定位于内质网上。I 类 HMGR 以 NADPH 作为辅酶,而 II 类 HMGR 既有利用 NADPH 作为辅酶,也存在同时可以 NADPH 及 NADH 作为辅酶的情况(Kuzuyama *et al.*, 2010)。结构分析表明,位于 CsHMGR1 的 C-端催化区域含有两个 NADPH 结合位点。磷酸化(失活)和去磷酸化(激活)是真核 HMGRs 催化活性调节的普遍特征,磷酸化的丝氨酸位点精确地位于催化活性组氨酸位点 C-末端一侧的第六个残基位置(Goldstein *et al.*, 1990; Istvan *et al.*, 2000b)。在 CsHMGR1 组氨酸催化位点后的第六个残基位置为丝氨酸,推测为磷酸化位点,磷酸化/去磷酸化很可能也是其活性调节的重要方式。

在植物萜类物质的生物合成途径中,倍半萜、多萜醇、植物甾醇、油菜素内酯、细胞分裂素及蛋白质的异戊烯化通过胞质中的 MVA 途径,泛醌由胞质中合成的 IPP 前体输入到线粒体中合成(Rodríguez-Concepción *et al.*, 2002)。由此可见,作为依赖 MVA 萜类合成途径的关键基因,茶树 CsHMGR1 在植物生长发育调节、维持细胞功能及信号转导等过程中可能具有重要作用。挥发性倍半萜是构成茶叶香气(香型)的重要物质基础,茶树 CsHMGR1 可能参与这些呈香物质的合成。表达分析表明, CsHMGR1 在“大叶龙”叶芽、母株叶芽与花芽中均有较高水平的表达。其表达调控及生理活性对茶叶品质可能有重要影响,并在其功能解析的基础上,有可能作为茶叶

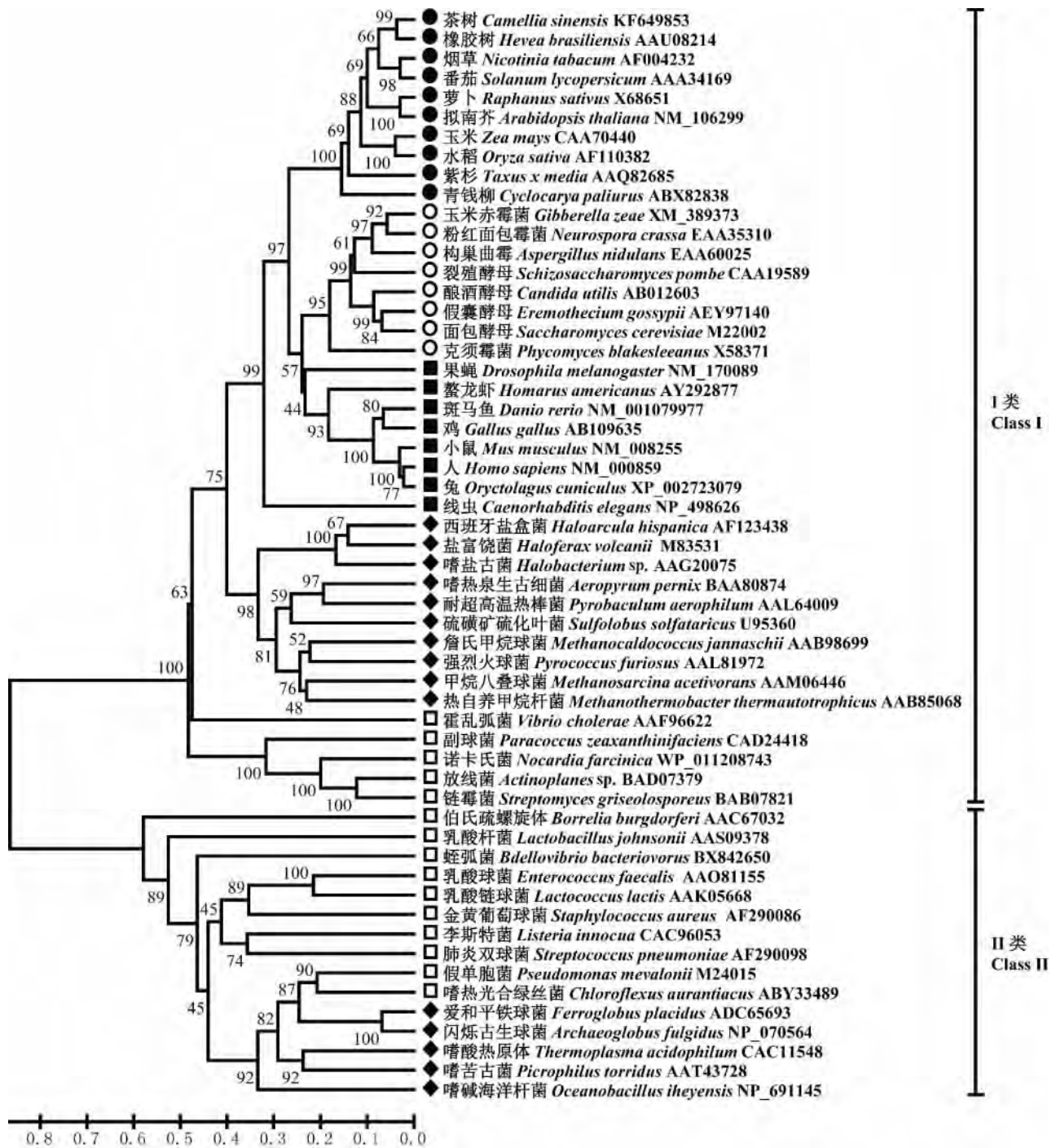


图 5 茶树 HMGR1 与其它物种 HMGR 同源蛋白的系统发育树 ●植物,○真菌,■动物,◆古生菌,□细菌。

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed with CsHMGR1 and homologous proteins ●Plant,○Fungi,■Animal,◆Archaea,□Bacteria.

品质鉴定及育种的一个依据。

单萜和倍半萜的合成及其上游的代谢反应,多是调控挥发性萜类物质合成的研究对象。研究表明,可通过改变萜类代谢途径关键基因的表达而改变植物的代谢流,从而改变植物的遗传性状、萜类代谢产物的产量及组成 (Ma et al., 2006; He et al.,

2012)。

本研究克隆了茶树 *CsHMGR1* 基因的 cDNA 全长序列,有助于对茶树萜类合成代谢途径的研究。其在茶树中的生理功能及对茶叶品质的作用,值得进一步深入研究。

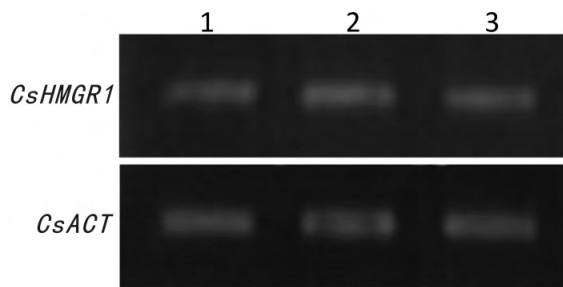


图 6 *CsHMGR1* 的组织表达分析

1. 大叶龙叶芽; 2. 母株叶芽; 3. 母株花芽。

Fig. 6 Tissue expression analysis of *CsHMGR1*

1. Leaf buds of *C. sinensis* cv. Dayelong; 2, 3. Leaf buds and floral buds of mother plants, respectively.

参考文献:

- Bochar DA, Stauffacher CV, Rodwell VW. 1999. Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. *Mol Genet Metab* **66**:122–127
- Dai Z, Cui GH, Zhou SF *et al.* 2011. Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoid tanshinone accumulation [J]. *J Plant Physiol* **168**(2):148–157
- Friesen JA, Rodwell VW. 2004. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases [J]. *Genome Biol* **5**(11):2 481–2 487
- Goldstein JL, Brown MS. 1990. Regulation of the mevalonate pathway [J]. *Nature* **343**(6 257): 425–430
- Grochowski LL, Xu HM, White RH. 2006. *Methanocaldococcus jannaschii* uses a modified mevalonate pathway for biosynthesis of isopentenyl diphosphate [J]. *J Bacteriol* **188**(9): 3 192–3 198
- He ZR(贺志荣), Xiang W(项威), Xu Y(徐燕) *et al.* 2012. Progress in the research of biosynthesis of volatile terpenoids and their glycosides in tea plant(茶树挥发性萜类物质及其糖苷化合物生物合成的研究进展) [J]. *J Tea Sci*(茶叶科学) **32**(1):1–8
- Istvan ES, Deisenhofer J. 2000a. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase [J]. *Bioch Bioph Acta*, **1 529**:9–18
- Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK *et al.* 2000b. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis [J]. *EMBO J* **19**(5):819–830
- Istvan ES, Deisenhofer J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase [J]. *Science*, **292**(5 519):1 160–1 164
- Kelley LA, Sternberg MJE. 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server [J]. *Nat Protoc* **4**:363–371
- Kuzuyama T, Hemmi H, Takahashi S. 2010. Mevalonate pathway in bacteria and archaea [J]. *Compr Nat Prod II: Chem Biol* **1**:493–516
- Ma L(马颢), Ding P(丁鹏), Yang GX(杨广笑) *et al.* 2006. Advances on the plant terpenoid isoprenoid biosynthetic pathway and its key enzymes(植物类萜生物合成途径及关键酶的研究进展) [J]. *Biotechnol Bull*(生物技术通报) Supp(增刊):22–29
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A. 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics [J]. *Plant Physiol* **130**:1 079–1 089
- Rohmer M. 2007. Diversity in isoprene unit biosynthesis: the methylerythritol phosphate pathway in bacteria and plastids [J]. *Pure Appl Chem* **79**(4):739–751
- Roitelman J, Olender EH, Bar-Nun S *et al.* 1992. Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum [J]. *J Cell Biol* **117**(5):959–973
- Wass MN, Kelley LA, Sternberg MJ. 2010. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures [J]. *Nucleic Acids Res* **38**:W469–473
- Xu LL(徐玲玲), Zhang MY(张美云), Li TJ(李同建) *et al.* 2009. Study on anatomy actin gene and molecular marker of tea cultivar Dayelong(大叶龙茶解剖学、肌动蛋白基因及分子标记的研究) [J]. *J Tea Sci*(茶叶科学) **29**(4):263–270
- Zhang CB(张长波), Sun HX(孙红霞), Gong ZJ(巩中军) *et al.* 2007. Plant terpenoid natural metabolism pathways and their synthases(植物萜类化合物的天然合成途径及其相关合酶) [J]. *Plant Physiol J*(植物生理学通讯) **43**(4):779–786
- Yu XY(于欣洋), Yue WJ(岳文杰), Li JH(李金辉) *et al.* 2008. Research progress on aromatic components of tea(茶叶香气研究进展) [J]. *Tea Sci & Technol*(茶叶科学技术) **3**:9–12
- Zhang ZZ(张正竹), Shi ZP(施兆鹏), Wan XC(宛晓春). 2000. Terpenoid substances and tea aroma(萜类物质与茶叶香气) [J]. *J Anhui Agric Univ*(安徽农业大学学报) **27**(1):51–54
- Zhou CH(周春华), Sheng YY(盛艳乐), Zhao DQ(赵大球) *et al.* 2009. Advances in the biosynthesis research of ginkgo terpenone lactones(银杏萜内酯的生物合成研究进展) [J]. *J Chin Med Mater*(中药材) **32**(6):994–999
- Wang YH(王瑛华), Chen G(陈刚), Chen XW(陈雄伟). 2007. Establishment of a high frequency efficient regeneration system from leaf in *Torenia fournieri* Linden(蓝猪耳叶片高频率再生体系的建立) [J]. *J Zhaoqing Univ*(肇庆学院学报) **28**(2):58–61
- Wang YH(王瑛华), Chen XW(陈雄伟), Chen G(陈刚) *et al.* 2011. Study on tissue culture and plant regeneration from *Torenia baillonii*(蔓性蝴蝶草叶片的组织培养及植株再生) [J]. *North Hortic*(北方园艺) **20**:121–124
- cytokinin(外源细胞分裂素对玉米叶原基分化的调控) [J]. *Acta Agron Sin*(作物学报) **34**(11):2 053–2 058
- Sauer A, Walther F, Preil W. 1985. Different suitability for *in vitro* propagation of rose cultivars [J]. *Gartenbauwiss* **3**:133–8
- Tao J(陶均), Li L(李玲). 2004. Study on the conditions of tissue culture and plantlet regeneration of *Torenia fournieri* L.(蓝猪耳组织培养和植株再生条件研究) [J]. *J S Chin Norm Univ: Nat Sci Ed*(华南师范大学学报·自然科学版) **4**:100–105

(上接第 254 页 Continue from page 254)