

尾巨桉 *HMGR* 基因的克隆及表达分析蒋春¹, 张华玲², 彭江^{2*}

(1. 四川大学 生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610064;

2. 西南大学 生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 基于 RACE 技术克隆得到尾巨桉 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(*EuHMGR*) 基因全长为 1 955 bp, 包含 1 560 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 519 个氨基酸。生物信息学分析表明 *EuHMGR* 包含两个 HMG-CoA 结合基序和两个 NADP(H) 结合基序; 同源建模得到 *EuHMGR* 三维构象呈“V”型, 包含 N-结构域、S-结构域和 L-结构域。将 *EuHMGR* 组 DNA 与 cDNA 序列进行比对表明 *EuHMGR* 存在一个 319 bp 的内含子。通过实时定量 PCR 进行组织特异性表达分析表明 *EuHMGR* 在茎中的表达量最高, 叶次之, 在根中基本无表达。该研究为后续尾巨桉 *EuHMGR* 的功能验证以及遗传转化奠定基础。

关键词: 尾巨桉; *HMGR*; 生物信息学; 内含子; 组织特异性表达

中图分类号: Q943.2; Q946.85 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)01-0113-05

Molecular Cloning and expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase Gene from *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*

JIANG Chun¹, ZHANG Hua-Ling², PENG Jiang^{2*}

(1. Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, School of Life Sciences, Sichuan

University, Chengdu 610064, China; 2. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region,

Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (*HMGR*) was cloned by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) method, the full-length *EuHMGR* cDNA was 1955 bp, containing a 1 560 bp open reading frame, encoding a peptide of 519 amino acids. Bioinformatics analysis indicated *EuHMGR* contained two HMG-CoA binding motifs and two NADP(H) binding motifs; and it had a 3-D structure with “V” homology-based on modeling, containing N-domain, S-domain and L-domain. There was a 319 bp intron in *EuHMGR* gene genomic DNA sequence compared with the cDNA sequence. Tissue expression profile analysis by Real-Time quantitative PCR indicated *EuHMGR* expression was the highest in stem, followed by leaf and no expression in root. The paper would supply some information to the function analysis and genetic transformation of *EuHMGR* from *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*.

Key words: *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*; *HMGR*; bioinformatics; intron; tissue specific expression

尾巨桉(*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*)是尾叶桉(*E. urophylla*)和巨桉(*E. grandis*)的杂交种, 属于桃金娘科(Myrtaceae)桉树属(*Eucalyptus*)

(陈少雄等, 1999)。桉树是世界公认的三大速生树种(杨、松和桉)之一, 桉树已成为主要的工业原料来源(张宁南等, 2009)。桉树除了木材资源、园林绿化

收稿日期: 2011-08-02 修回日期: 2011-11-23

基金项目: 重庆市自然科学基金重点项目(2009BA1004); 三峡库区生态环境教育部重点实验室开放基金(EF200609)[Supported by the National Science Foundation of Chongqing(2009BA1004); the Open Foundation of Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education(EF200609)]

作者简介: 蒋春(1985-), 女, 四川德阳市人, 硕士, 主要植物转基因工程研究, (E-mail) Jiangchun85@gmail.com.

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: aiqun2009@163.com)

方面的用途外,其油腺细胞分泌的芳香精油有着更重要的价值,广泛应用于医药、香料、食品等工业,经济效益可观(田玉红等,2007)。工业上桉树精油产率一般为0.8%~5%,相对较低,故通过基因工程提高精油产率对林业经济的发展有着重大意义(宋永芳,1990)。

桉精油几乎全部由单萜、倍半萜以及它们的简单含氧衍生物所组成(Degenhardt等,2009)。植物萜类合成代谢有甲羟戊酸(MVA)和2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)两种途径,产生萜类物质的共同前体异戊烯基焦磷酸,再由它生成单萜、倍半萜、双萜等化合物。3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(HMGR)是MVA途径中的第一个关键酶,催化3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA生成甲羟戊酸(McGarvey等,1995)。Holmberg等(2003)将橡胶树HMGR和烟草C24醇甲基转移酶基因在烟草中共表达,结果烟草中的醇总含量提高2.5倍。Aquil等(2009)将长春花HMGR转化到青蒿中,与野生型相比,青蒿中的青蒿素含量提高22.5%。本研究基于RACE技术得到尾巨桉HMGR基因全长cDNA,并进行生物信息学、内含子以及组织特异性表达分析,为后续尾巨桉HMGR基因功能验证以及精油代谢工程改良奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

尾巨桉种于西南大学生态种植园,取其距茎尖第3~4轮叶片为试验材料。

1.2 质粒、菌株及试剂

pMD19-T载体、TaKaRa Taq™、DNA Ligation Kit Ver. 2.0、TAKARA RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自TaKaRa大连宝生物公司;RNA plant(mini)Kit 购自上海华舜生物技术有限公司。大肠杆菌DH5α菌株由西南大学三峡库区生态环境教育部重点实验室保存。

1.3 总RNA及基因组总DNA提取

按RNA plant(mini)Kit说明分别提取尾巨桉根、茎和叶总RNA;采用改良CTAB法(王关琳等,2002)提取叶基因组总DNA。总RNA及DNA都经1.2%琼脂糖凝胶电泳,并用NanoDrop 2000型分光光度计检测OD₂₆₀/OD₂₈₀值。

1.4 HMGR基因的克隆

根据HMGR基因保守片段,基于RACE技术得到HMGR基因3'端和5'端,在Vector NTI Suite 8中进行拼接得到HMGR基因cDNA全长,并进行生物信息学分析。

1.5 HMGR基因内含子分析

根据HMGR基因ORF,用软件Oligo6.0和DNASar设计3对引物,fgH1:5'-ATGGCCGC-CATCGTCGCCTTCG-3',rgH1:5'-TGGCCTTG-CAGCCCCTGTTCGTG-3';fgH2:5'-CACGAA-CAGGGGCTGCAAGGCCA-3',rgH2:5'-TAGAAGGCATGGTACAGAAACGTG-3';fgH3:5'-CGTTTCTGTGACCATGCCTTCTA-3',rgH3:5'-TTAAGAGGAGACCTTGGTAACGTCTTTGC-3'。以基因组DNA为模板,按TaKaRa Taq™说明于64、62℃和57℃进行PCR扩增得到gH1、gH2和gH3片段,经回收、转化及测序,并拼接得到HMGR基因组DNA序列,记为gDNA-HMGR;将HMGR的cDNA序列cDNA-HMGR与gDNA-HMGR进行比对,分析HMGR内含子情况。

1.6 HMGR基因组织特异性表达分析

根据内参基因18S(登录号:AY615679.1)和HMGR基因序列,用软件Beacon Designer7.6设计引物。18S基因引物为f18S:5'-ACTCATAAC-GACTCTCGGCAAC-3',r18S:5'-GCGT-TCAAAGACTCGATGGT-3';HMGR基因引物为fHMGR:5'-GAAAGGCGCTAACAAGGAGCTA-3',rHMGR:5'-GTACTTCATGTGGCTCTTCA-CG-3'。将尾巨桉根、茎和叶总RNA按TAKARA RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0说明逆转录合成cDNA第一链,按照SYBR® Premix Ex Taq™ II说明于58℃在Chromo 4实时定量PCR仪(Bio-Rad)进行反应,每组样品重复3次,采用2^{-ΔΔCT}法于软件Opticon Monitor 3中进行结果分析。

2 结果与分析

2.1 尾巨桉总RNA及DNA提取

尾巨桉根、茎和叶组织总RNA经电泳表明没有基因组DNA污染,28S与18S亮度接近2:1(图1)。OD₂₆₀/OD₂₈₀均在1.92~2.18之间,RNA完整性较好,降解程度较低,达到实验要求。尾巨桉叶总DNA经电泳检测表明没有RNA污染,OD₂₆₀/OD₂₈₀

在 1.65~1.87 范围内, DNA 纯度较高。

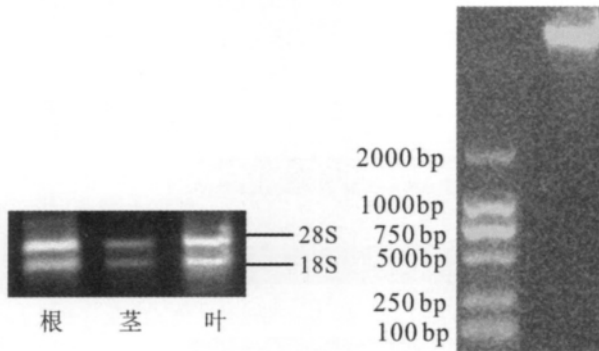


图 1 尾巨桉总 RNA 及总 DNA 提取

Fig. 1 Total RNA and DNA isolated from leaf of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*

	HMG-CoA 结合基序	NADP(H) 结合基序
<i>Artemisia annua</i>	194 EMPVGYVQIP.....TTEGCLVA.....DAMGMNM.....GTVGGGT	
<i>Nicotiana tabacum</i>	240 EMPVGYVQIP.....TTEGCLVA.....DAMGMNM.....GTVGGGT	
<i>Solanum lycopersicum</i>	237 EMPVGYVQIP.....TTEGCLVA.....DAMGMNM.....GTVGGGT	
<i>Camptotheca acuminata</i>	212 EMPVGYVQIP.....TTEGCLVA.....DAMGMNM.....GTVGGGT	
<i>Cyclocarya paliurus</i>	219 EMPVGYVQIP.....TTEGCLVA.....DAMGMNM.....GTVGGGT	
<i>Eucalyptus urophylla</i> × <i>E. grandis</i>	155 EMPVGYVQLP.....TTEGCLVA.....RCDGHEH.....GTVGGGT	
<i>Hevea brasiliensis</i>	240 EMPVGYVQIP.....TTEGCLVA.....DAMGMNM.....GTVGGGT	
<i>Pyrus pyrifolia</i>	243 EMPVGYVQIP.....TTEGCLVA.....DAMGMNM.....GTVGGGT	

图 2 尾巨桉与其它植物 HMGR 氨基酸序列多重比对
Fig. 2 Multiple alignment of deduced EuHMGR and HMGRs from other plants

2.2 HMGR 基因的克隆及生物信息学分析

基于 RACE 技术, 克隆得到尾巨桉 *HMGR* 基因 cDNA 全长 1 955 bp, 命名为 *EuHMGR*; 包含 1 560 bp 的 ORF, 编码 519 个氨基酸, GenBank 登录号为 GQ915611。尾巨桉与青钱柳(*Cyclocarya paliurus*)、橡胶树(*Hevea brasiliensis*)、沙梨(*Pyrus pyrifolia*)、青蒿(*Artemisia annua*)、普通烟草(*Nicotiana tabacum*)、喜树(*Camptotheca acuminata*)、番茄(*Solanum lycopersicum*) (登录号依次为 ABX82838 1、BAF 98281 1、ACE80213 1、AAA68966 1、AAL54878 1、AAB69726 1、AAB62581 1) 的 *HMGR* 氨基酸序列比对分析, 尾巨桉 *EuHMGR* 与其它物种一样, 具有两个 HMG-CoA 结合基序(图 2): EMPVGYVQLP 和 TTEGCLVA; 其中, TTEGCLVA 中的谷氨酸(Glu)在 *HMGR* 催化中起着重要作用。同时包括两个 NADP(H) 结合基序: RCDGHEH 和 GTVGGGT, 只显示其重要功能的结合基序(Liao 等, 2004)。

以(*Homo sapiens*)的 *HMGR*(2q6bA)为模型,

同源建模得到尾巨桉 *EuHMGR* 的三维构象呈一个“V”型(Istvan 等, 2000)。用 Accelrys Discovery Studio Visualizer 2.5 处理后的结果(图 3)。尾巨桉 *EuHMGR* 的空间结构与其它植物一样具有 3 个结构域: (1) 氨基末端的小的螺旋状的 N-结构域; (2) 位于中间部分大的 L-结构域, 其隐藏着两个 HMG-CoA 结合域(EMPVGYVQLP 和 TTEGCLVA); 以及一个有着像由 α -螺旋组成中心结构的棱柱形的 NADP(H) 结合域(GTVGGGT); (3) 螺旋状的小的 S-结构域, 包含 NADP(H) 结合域(RCDGHEH)。

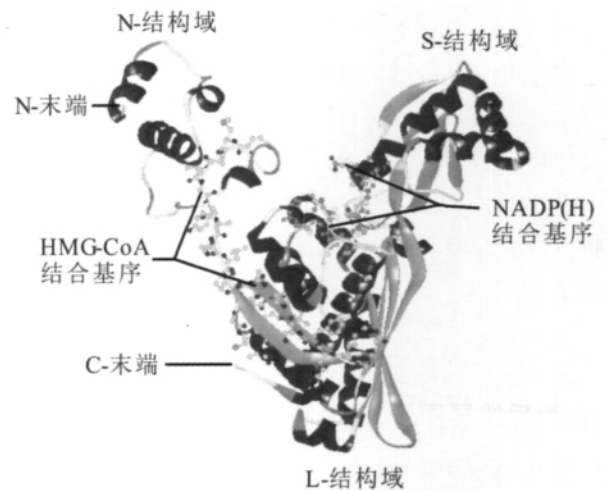


图 3 尾巨桉 *EuHMGR* 三维结构模型

Fig. 3 Three dimensional structure of *EuHMGR*

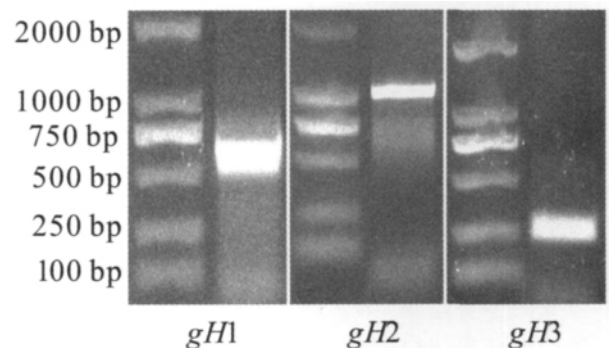


图 4 尾巨桉 *gDNA-EuHMGR* 扩增

Fig. 4 PCR products of *EuHMGR* ORF sequence from genomic DNA

2.3 HMGR 基因内含子分析

通过 PCR 扩增, 分别于 64、62 °C 和 57 °C 从基因组 DNA 中扩增得到大小为 634、1 020 bp 和 271 bp 的 3 个片段(图 4), 将这三个片段的序列拼接得到大小为 1 879 bp 的 *gDNA-EuHMGR*。 *gDNA-*

EuHMGR 与 *cDNA-EuHMGR* 比对表明, *EuHMGR* 在编码区内存在一个内含子, 长度为 319 bp (图 5), 只显示内含子部分比对序列。

2.4 *HMGR* 基因组织特异性表达分析

通过实时定量 PCR 得到 *EuHMGR* 在不同组织中的相对定量表达结果(图 6), *EuHMGR* 在茎中

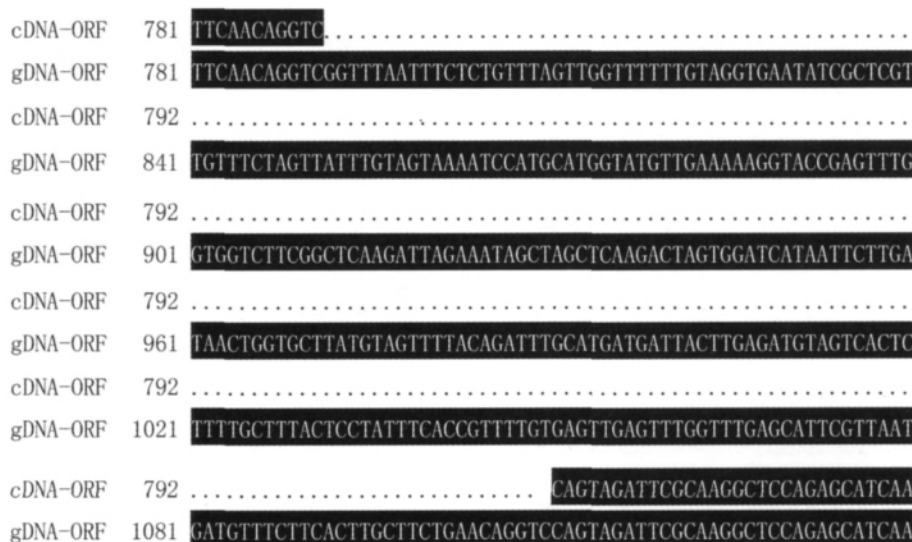


图 5 尾巨桉 *cDNA-EuHMGR* 与 *gDNA-EuHMGR* 比对

Fig. 5 Alignment of *EuHMGR* ORF sequences from cDNA and genomic DNA

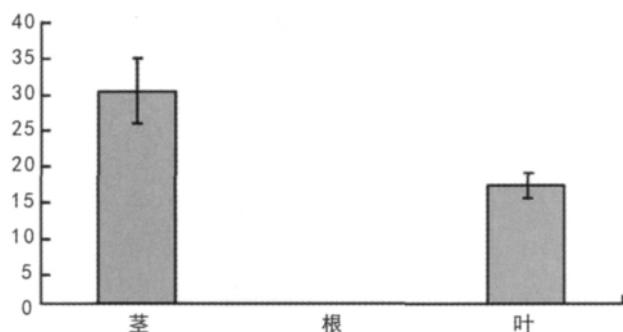


图 6 尾巨桉不同组织中 *EuHMGR* 的定量表达分析

Fig. 6 Relative quantitative expression analysis of *EuHMGR* in different tissues

的表达量最高, 叶次之, 而根中几乎无表达; 这结果与 Jiang 等(2006)的研究结果相一致。叶是桉树精油合成的主要组织, 其次是茎。叶油腺细胞中萜类相关代谢旺盛, *HMGR* 作为 *MVA* 途径中生成萜类前体物质的第一个关键酶, 在茎和叶中较高表达。

3 结论与讨论

目前, 在橡胶树 (Chye 等, 1991)、杜仲 (Jiang 等, 2006)、大戟 (Cao 等, 2010) 等植物中已成功克隆 *HMGR* 基因, 并进行了相关结构及功能分析。对已报道植物的 *HMGR* 进行功能结构分析得知, 通常

植物 *HMGR* 存在两个 *HMG-CoA* 结合基序 (EMPVGYYVQLP 和 TTEGCLVA) 以及两个 *NADP(H)* 结合基序 (DAMGMNM 和 GTVGGGT)。本研究所克隆得到尾巨桉 *EuHMGR* 功能结构基序与其它植物不同, 即第一个 *NADP(H)* 结合基序不是多数植物典型的 DAMGMNM 结构, 而是 RCDGHEH, 推测其为一个新的 *NADP(H)* 结合基序, 因为该结合基序中间部位与其它植物典型的结构一样存在一个甘氨酸 (G) 位点, 在甘氨酸后组成为组氨酸-谷氨酸-组氨酸 (HEH) 与其它植物典型的蛋氨酸-天冬酰胺-蛋氨酸 (MNM) 极为相似。为了验证这一假设, 可进一步表达、分离和提纯尾巨桉 *EuHMGR* 蛋白, 进行催化作用位点方面的研究。

前体 mRNA 需要将内含子剪接掉, 再经加工修饰才能形成有效的 mRNA。目前对内含子的功能尚不明确, 主要作用可能是通过外显子的复制和移动简化新基因的进化过程, 同时内含子可变剪接改变基因结构, 增加表达蛋白的多样性 (王悦兵等, 2008)。本研究表明尾巨桉 *EuHMGR* 基因包含一个大小为 319 bp 的内含子; 根据多数植物 *HMGR* 基因的克隆分析, *HMGR* 基因一般存在多个基因家族成员。尾巨桉中是否存在 *HMGR* 基因家族还不

清楚,后续工作将通过 Southern blot 进行验证,确定内含子剪接与各基因家族成员之间的是否存在一定联系,同时也有助于 *HMGR* 基因家族各成员的功能进行分析验证。

Schaller 等(1995)将橡胶树的 *HMGR* 基因转化到烟草中,结果 *HMGR* 的活性增强 3~8 倍,同时甾醇总含量提高近 6 倍。Manzano 等(2004)在拟南芥中超量表达其自身 *HMGR* 基因,结果也能够提高甾醇总含量。尾巨桉 *EuHMGR* 是否为精油代谢调控靶点,有待进一步进行遗传转化方面的研究;本研究为最终通过基因工程提高桉树精油产量奠定了一定基础。

参考文献:

- 王关琳,方宏筠. 2002. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社:724—744
- 王悦冰,郎志宏,黄大昉. 2008. 内含子对真核基因表达调控的影响[J]. 生物技术通报,(4):1—4
- 田玉红,张祥民,黄泰松,等. 2007. 桉叶油的研究进展[J]. 食品与发酵工业,33(10):139—143
- 陈少雄,杨建林,周国福. 1999. 不同栽培措施对尾巨桉生长的影响及经济效益分析[J]. 林业科学研究,12(4):357—362
- 张宁南,许涵,徐大平,等. 2009. 广东省尾巨桉和马尾相思人工林下植物多样性动态变化[J]. 林业科学研究,22(2):262—268
- 宋永芳. 1990. 桉树叶的利用[M]. 北京:中国林业出版社:22—23
- Aquil S, Husaini AM, Abidin MZ, et al. 2009. Overexpression of the HMG-CoA reductase Gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic artemisia annua plants[J]. Plant Med, 75(13):1453—1458
- Cao XY, Zong ZM, Ju XY, et al. 2010. Molecular cloning, characterization and function analysis of the gene encoding HMG-CoA reductase from Euphorbia Pekinensis Rupr[J]. Mol Biol Rep, 37(3):1559—1567
- Chye ML, Kush A, Tan CT, et al. 1991. Characterization of cDNA and genomic clones encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase from Hevea brasiliensis[J]. Plant Mol Biol, 16:567—577
- Degenhardt J, Kollner TG, Gershenzon J. 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants[J]. Phytochemistry, 70(15—16):21—1637
- Holmberg N, Harker M, Wallace AD, et al. 2003. Co-expression of N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and C24-sterol methyltransferase type 1 in transgenic tobacco enhances carbon flux towards end-product sterols[J]. Plant J, 36(1):12—20
- Istvan ES, Deisenhofer J. 2000. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase[J]. BBA-Mol Cell Biol L, 1529(1—3):9—18
- Jiang J, Kai G, Cao X, et al. 2006. Molecular cloning of a HMG-CoA reductase gene from Eucommia ulmoides[J]. Biosci Rep, 26:171—181
- Liao ZH, Tan QM, Chai YR, et al. 2004. Cloning and characterization of the gene encoding HMG-CoA reductase from Taxus media and its functional identification in yeast[J]. Funct Plant Biol, 31(1):73—81
- Manzano D, Fernandez-Busquets X, Schaller H, et al. 2004. The metabolic imbalance underlying lesion formation in Arabidopsis thaliana overexpressing farnesyl diphosphate synthase(ISOFORM 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous *HMGR* activity[J]. Planta, 219(6):982—992
- McGarvey DJ, Croteau R. 1995. Terpenoid Metabolism[J]. Plant Cell, 7(7):1015—1026
- Schaller H, Grausem B, Benveniste P, et al. Expression of the Hevea brasiliensis Arg. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction[J]. Plant Physiol, 109:761—770

(上接第 45 页 Continue from page 45)

- Li HP(李会平), Huang DZ(黄大庄), Wang ZG(王志刚), et al. 2004. Relationships between morphological characteristics and tissue structure of poplars and damage by Anophora glabripennis(杨树形态特征、组织结构与光肩星天牛危害的关系)[J]. J Northeast Fore Univ(东北林业大学学报), 32(6):111—112
- Li JX(李景秀), Guan KY(管开云), Da GW(大宫微), et al. 2007. Anatomy on leaf cross sections of Begonia from Yunnan, China(云南秋海棠属植物叶片横切面比较解剖研究)[J]. Guihaia(广西植物), 27(4):543—550
- Powell G, Tosh CR, Hardie J. 2006. Host plant selection by Aphids: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives[J]. Ann Rev Entomol, 51:309—330
- Pollard DG. 1973. Plant penetration by feeding aphids(Hemiptera: Aphidoidea): a review[J]. Bull Ent Res, 62:631—714
- Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M. 2005. Insect-Plant Biology (Second Edition)[M]. Oxford:Oxford University Press:29—47
- Washington JR, Walker GP. 1990. Histological studies of California red scale(Homoptera: Diaspididae) feeding on citrus[J]. Ann Entomol Soc Am, 83:939—948
- Xu B(徐斌), Shu QL(束庆龙), Chen CY(陈超燕). 2008. Effect of camphor tree yellowing on the bark structure(樟树黄化病对树皮构造特征的影响)[J]. J Anhui Agric Univ(安徽农业大学学报), 35(4):482—485
- Zhang ZJ(张振珏), Lin JY(林锦仪), Zhang YT(张永田). 1993. Feeding position of wax insect(Ericerus pela) on the Ligustrum lucidum and the influence of parasitism on host tissue(白蜡虫在女贞树上的取食部位及寄生对组织的影响)[J]. Acta Bot Sin(植物学报), 35(增刊):19—23