

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201403023

赵欢,莫长明,唐其,等. 罗汉果 *SgHMGR* 基因的克隆、分析及原核表达[J]. 广西植物, 2015, 35(6):796—801Zhao H, Mo CM, Tang Q, et al. Cloning, bioinformatics analysis and prokaryotic expression of *SgHMGR* in *Siraitia grosvenorii*[J]. *Guihaia*, 2015, 35(6):796—801

# 罗汉果 *SgHMGR* 基因的克隆、分析及原核表达

赵欢<sup>1</sup>, 莫长明<sup>2</sup>, 唐其<sup>3</sup>, 白隆华<sup>2</sup>, 马小军<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 广西药用植物园, 南宁 530023; 3. 湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128)

**摘要:** 罗汉果甜苷 V 是一种葫芦烷型四环三萜类物质, 作为主要的活性成分和甜味成分存在于成熟果实中, 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (*HMGR*) 作为萜类化合物生物合成途径中的第一个限速酶, 位于甲羟戊酸 (MVA) 途径中, 是罗汉果甜苷 V 生物合成途径中的重要调控位点。为了深入了解罗汉果甜苷 V 的生物合成途径, 该研究从罗汉果转录组数据中获得一条编码 *HMGR* 的 unigene, 以授粉后 3 d 的幼果作为实验材料, 通过 RACE 技术获得了 1 926 bp 的全长序列, 经过生物信息学软件分析, 发现该基因含有 1 749 bp 的开放阅读框, 编码 582 氨基酸残基, 含 2 段跨膜区, 分别位于 50~72 aa 和 93~115 aa, 亚细胞定位预测位于质膜或内质网上, 预测该蛋白没有信号肽, 系统进化树分析显示与同科植物黄瓜和甜瓜中 *HMGR* 基因的同源性最高。该研究采取去掉 N 端跨膜区的方法, 构建原核表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导在上清和沉淀中均有融合蛋白出现, 尤其在 25 °C 诱导过夜后上清中表达最明显。该文是首次对 *SgHMGR* 基因全长序列的克隆及原核表达的功能验证, 为进一步深化 *SgHMGR* 基因在罗汉果甜苷 V 生物合成途径中的功能及分子调控研究打下基础。

**关键词:** 罗汉果; 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶; 克隆; 原核表达

**中图分类号:** Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)06-0796-06

## Cloning, bioinformatics analysis and prokaryotic expression of *SgHMGR* in *Siraitia grosvenorii*

ZHAO Huan<sup>1</sup>, MO Chang-Ming<sup>2</sup>, TANG Qi<sup>3</sup>, BAI Long-Hua<sup>2</sup>, MA Xiao-Jun<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Plant Development of Chinese Academy of Medical Sciences &amp; Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China; 3. College of Horticulture &amp; Landscape, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** *Siraitia grosvenorii*, belonging to Cucurbitaceae, is an herbaceous perennial plant native to South China and north Thailand, and mostly prevalent in Guilin City of Guangxi Zhuang Autonomous Region. The fruits are widely used as Chinese traditional medicine and meanwhile they contain extremely sweet flesh. As the main active component and sweetener ingredient, mogroside V is a kind of cucurbitane type tetracyclic triterpenes which only exists in the ripe fruits of *S. grosvenorii*. In the proposed mogroside V biosynthetic pathway, there are two independent pathways for triterpenoid biosynthesis (MVA pathway and MEP pathway). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase (*HMGR*), the first rate-limiting enzyme in mevalonate (MVA) pathway of terpenes biosynthesis, is the important regulatory site in mogroside V biosynthetic pathway in *S. grosvenorii*. However, there is little

收稿日期: 2014-07-13 修回日期: 2014-12-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373914); 广西自然科学基金青年基金(2011GXNSFB018088)。

作者简介: 赵欢(1986-), 女, 河北行唐人, 博士研究生, 主要从事罗汉果分子生物学研究, (E-mail)53522722@163.com。

\*通讯作者: 马小军, 研究员, 主要从事药用植物分子育种研究, (E-mail)mayixuan10@163.com。

knowledge about function study of key genes involved in this pathway. In order to further understand mogroside V biosynthetic pathway, the full-length of *SgHMGR* was obtained by RACE-PCR method from 3 d after fertilization (DAF) of *S. grosvenorii* fruits based on the unigene of *HMGR* in transcriptome data, and further conducted by bioinformatic analysis. The recombinant prokaryotic vector was constructed using pET-32a and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for expression. The results showed that a full-length *SgHMGR* cDNA was cloned with 1 927 bp and it contained 1 749 bp open reading frame (ORF) encoding a protein of 582 amino acids (aa) (GenBank No.HQ128556.1). The theoretical molecular weight (MW) and isoelectric point (PI) of this predicted protein were 62.6 kD and 8.18, respectively. The predicted protein contained the conserved domain of *HMGR* and proved it to be a member of *HMGR* family. *SgHMGR* protein had the high homology with *Cucumis sativus* and *Cucumis melo* of Cucurbitaceae plants, which were both 88%. Its subcellular localization was predicted in plasma membrane or endoplasm. By *HMGR* gene structure prediction analysis, the predicted *SgHMGR* protein had two transmembrane domains in N-terminal which were located in 50-72 aa and 93-115 aa, respectively. Besides, there were no predicted signal peptides for *SgHMGR* protein. In order to avoid the influence of transmembrane domains on the heterologous expression, *SgHMGR* from 116 amino acids with no transmembrane domains was cloned and named as '*SgHMGR-1*' in this study. The MW and PI of *SgHMGR-1* were 49.6 kD and 5.95. The recombined vector was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and expressed by IPTG. The prediction indicated that the MW and PI of the recombined protein of *SgHMGR-1* and His were 65.8 kD and 5.95. The results of SDS-PAGE and Western blotting demonstrated that the fusion protein could be expressed in both supernatant and pellet after induction by IPTG overnight and it had highest expression in supernatant at 25 °C. This is the first report about cloning of full-length *SgHMGR* cDNA and its prokaryotic expression, and the recombined prokaryotic expression vector of *SgHMGR* was constructed successfully and could be expressed in BL21(DE3) of *E.coli*, which would lay foundation for further understanding of *SgHMGR* gene function and molecular regulation in mogroside V biosynthesis and provide reference about *HMGR* gene function study for other non-model plants.

**Key words:** *Siraitia grosvenorii*; HMG-CoA Reductase; cloning; prokaryotic expression

罗汉果甜苷属于葫芦烷型四环三萜类物质,本课题组根据罗汉果转录组数据,推导出甜苷可能的生物合成途径(Tang *et al.*, 2011)。罗汉果甜苷生物合成的前体物质是异戊烯二磷酸(IPP)和 3,3-二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP),二者是通过甲羟戊酸(MVA)和甲基赤藓糖醇磷酸化(MEP)两条途径形成,MVA 途径发生在胞质中,MEP 途径发生在质体中。这是三萜皂苷生物合成共有的途径,其中在 MVA 途径中 *HMGR*(3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶)催化 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA)生成甲羟戊酸(MVA),这一步反应是需要依赖于 NADP 的不可逆转的过程(Haralampidis *et al.*, 2002),*HMGR* 是该途径中的关键限速酶,可以受洛伐他汀的专一性抑制(Mrayam *et al.*, 2012)。异戊二烯类物质的产生受到限速酶活性的严格调控,一直被认为在其生物合成途径中起着重要的调控作用。

*HMGR* 基因广泛存在于细菌、真菌、动物和植物中。目前 *HMGR* 基因已在多种植物中得以克隆,如土木香(*Aquilaria sinensis*)(Xu *et al.*, 2013),人

参(*Panax ginseng*)(Luo *et al.*, 2013),甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)(Liu *et al.*, 2012),拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)(Enjuto *et al.*, 1994),荔枝(*Litchi chinensis*)(Rui *et al.*, 2012),甜瓜(*Cucumis melo*)(Kato-Emori *et al.*, 2001)和黄瓜(*Cucumis sativus*)(Accession No.XM\_004170850)。罗汉果作为药用植物和甜料作物具有食用药用双重价值,已对其生化、分子及遗传转化等方面开展了研究(Chiu *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2011; 莫长明等, 2014; 韦荣昌等, 2014; 曾黎辉等, 2005)。但目前关于罗汉果甜苷生物合成途径中关键酶的研究鲜有报道,尤其对第一个限速酶 *SgHMGR* 的克隆及功能研究尚未见有报道。本课题组完成了对罗汉果的转录组测序,分析找到了罗汉果甜苷生物合成过程中几乎所有的基因,从中发现了编码 *HMGR* 的 unigene。本研究对 *SgHMGR* 进行了 RACE 全长的克隆和生物信息学分析以及原核表达的研究,对于鉴定 *SgHMGR* 蛋白的功能,完善罗汉果甜苷生物合成途径及利用基因工程手段调控甜苷含量具有重要参考价值。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料与试剂

以罗汉果品种‘农院 B6’F014 为材料,种植于广西药用植物园中,于 8 月份取授粉后 3 d 幼果,迅速置于液氮中冷冻保存,随后-80 °C 冰箱中存放以备后用。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,第一链反转录试剂盒、pMD19-T 载体、DH5 $\alpha$  感受态细胞均购自 Takara 公司,RACE 试剂盒与 Advantage cDNA PCR 试剂盒购自 Clontech 公司,质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒均购自 Axygen 公司,Taq Plus DNA Polymerase 购自天根生化科技公司,其他试剂如乙醇、氯仿、异戊醇等均购自北京化工厂。

## 1.2 罗汉果 RNA 提取及 SgHMGR 的 RACE 全长克隆

利用 Tang *et al.* (2011) 的改良 Trizol 法提取罗汉果 3 d 果实的总 RNA。2009 年获得了罗汉果高通量测序,根据 SgHMGR 的 unigene 片段设计 5'-RACE 引物 (TTACAGCAGCAGGTTTCTT-GTCGGCAC) 和 3'-RACE 引物 (GCCGATGGC-TACGACGGAGGGTTGCTTG),利用 RACE 试剂盒操作说明进行 PCR 扩增。对目的片段进行胶回收,T 载体连接转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑选菌落 PCR 阳性克隆进行测序拼接。根据拼接序列,采用 Primer premier 5.0 软件设计引物,5'引物和 3'引物分别为 ATGGACCGCCGGCGTCCT 和 CTAG-GAGGAGACAGTGGT,PCR 克隆出完整的开放阅读框 SgHMGR-ORF。PCR 总反应体系为 25  $\mu$ L,其中 Taq Plus Mix 12.5  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L,模板 1  $\mu$ L,此外 10.5  $\mu$ L 用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。该 PCR 反应程序为 94 °C 5 min;94 °C 30s,58 °C 30 s,72 °C 70 s,40 个循环;72 °C 10 min。

## 1.3 罗汉果 HMGR 基因的生物信息学分析

利用 ExPAEy Proteomics Server 的在线软件 Protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>)对 SgHMGR 基因编码的蛋白进行理化性质的预测,通过 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), PSORT (<http://wolffsort.org/>)和 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)软件来预测 SgHMGR 蛋白的信号肽,亚细胞定位及跨膜区的位置。利用 NCBI 的 BLAST 来分析 SgHMGR 与其他物种 HMGR 蛋白的同源性,PROSITE 软件 ([\[prosite.expasy.org/\]\(http://prosite.expasy.org/\)\)用来分析其保守结构域,并通过 MEGA6 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树 \(Tamura \*et al.\*, 2013\)。](http://</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

## 1.4 重组质粒的构建及鉴定

TMHMM 软件预测到 SgHMGR 蛋白的 N 端 115 个氨基酸内有 2 端跨膜区,因此在构建原核重组质粒前,回避前面 115 个氨基酸。从 116 个氨基酸开始设计含有酶切位点 (*BgI* II/*XhoI*) F 引物 (AGATCTCAGTCTTTC ATAGCGCGT) 和 R 引物 (CTCGAGCTAGGAGGAGACAGTGGT),PCR 反应体系同全长克隆 PCR,得到目的片段用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后进行胶回收。回收 PCR 产物,连接 pMD19-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,Amp 筛选阳性克隆,经上海生工生物技术有限公司测序验证。用 *BgI* II 和 *XhoI* 双酶切重组质粒和原核表达载体 pET-30a(+),分别回收目的片段和表达载体,经 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接,反应体系:原核表达载体 pET-32a 载体 1  $\mu$ L,目的片段 1  $\mu$ L,3  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 5  $\mu$ L。在 16 °C 连接反应过夜。连接产物全部转化到大肠杆菌 LB21 (DE3) 中,利用载体上游引物 (T7 promoter) 和目的基因的下游引物 (R 引物) 通过菌落 PCR 鉴定,将阳性克隆测序验证。

## 1.5 目的蛋白表达

挑取单菌落于 5 mL 含有 kan (20  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 的 LB 培养基中,37 °C 培养过夜,按 1% 接种量转接至 5 瓶 20 mL 的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6,其中 2 瓶加入 IPTG 终浓度为 0.1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,2 瓶加入 20% 乳糖至终浓度为 1%,剩余 1 瓶不加任何诱导剂作为阴性对照。加入相同诱导剂的 2 瓶菌液分别置于 37 °C 和 20 °C 培养箱中振荡培养诱导蛋白表达;阴性对照瓶于 37 °C 中继续培养 4 h。37 °C 的菌液培养 4 h,20 °C 的菌液培养 16 h 后,分别吸取 10 mL 菌液离心收集菌体,加入 2 mL 破壁缓冲液 (20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> DTT, 0.1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA) 超声破碎菌体。12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min,上清液作为细胞破碎液的上清蛋白,沉淀加 1 mL 灭菌水作为沉淀蛋白。分别取 10  $\mu$ L 上述蛋白液,加 SDS-PAGE 上样缓冲液,100 °C 煮 5 min 进行电泳。浓缩胶和分离胶的浓度分别为 5% 和 12%,恒压 80V 进行浓缩胶电泳,待指示剂进入分离胶之后调至恒压 120V,电泳完毕经考马斯亮蓝

检测。

### 1.6 蛋白纯化和 Western blotting 检测

将 SDS-PAGE 胶内蛋白转移到 NC 膜上,用 TBST 漂洗 2 次加入封闭液,室温封闭 1 h。倒掉封闭液加入一抗鼠抗-His 单抗,4 °C 孵育过夜。洗净一抗后加入二抗 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,室温孵育 1 h。加入 ECL 工作液,反应 5 min,放入暗盒进行 X 光压片,再进行显影。

## 2 结果与分析

### 2.1 罗汉果 *SgHMGR* 基因的 RACE 克隆

通过 RACE 手段,克隆获得了 *SgHMGR* 基因的 5'-RACE 和 3'-RACE 的片段,经胶回收后测序验证分别为 1 276 bp 和 1 081 bp(图 1)。测序拼接后得到 *SgHMGR* 的全长为 1 926 bp 包含 81 bp 的 5'-UTR 和 96 bp 的 3'-UTR,预测 ORF 为 82~1 830 bp 共计 1 749 bp,编码的蛋白质包含 582 aa。该基因已登录 GenBank,登录号为 HQ128556.1。

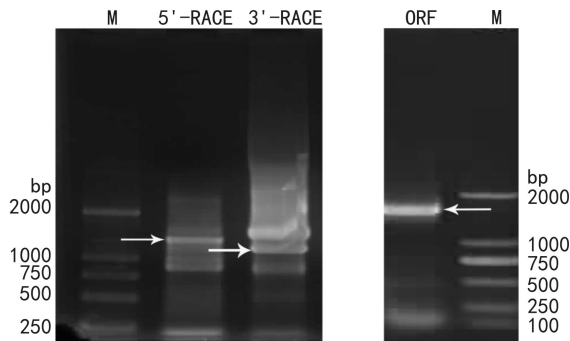


图 1 罗汉果 *SgHMGR* 基因 5'-RACE, 3'-RACE 和 ORF 扩增片段

Fig. 1 5'-RACE, 3'-RACE and ORF amplification of *HMGR* gene in *S. grosvenorii*

### 2.2 *SgHMGR* 蛋白的生物信息学分析

*SgHMGR* 编码的蛋白质分子式为  $C_{2754}H_{4419}N_{769}O_{832}S_{30}$ ,理论分子量为 62.6 kD,等电点为 8.18,带正电残基(Arg 和 Lys)为 57,带负电残基(Asp 和 Glu)为 54,不稳定系数为 37.15,归为稳定类别,脂肪系数为 92.03,亲水性系数为 0.059。ProSite 软件分析该蛋白属于 HMGR 家族成员,有一段保守结构域位于 168~572 aa(图 2)。

SignalP 4.1 Server 软件预测 *SgHMGR* 蛋白不具有信号肽,PSORT 软件预测该蛋白的亚细胞定

位:质膜的定位系数为 5.0,内质网的定位系数为 5.0,叶绿体的定位系数为 3.0,因此该蛋白很可能位于质膜或者叶绿体中。TMHMM Server v. 2.0 软件预测该蛋白有 2 段跨膜区,分别位于 50~72 aa 和 93~115 aa。将 *SgHMGR* 的蛋白序列提交到 NCBI 数据库经 BLAST 进行相似性比对,结果显示 *SgHMGR* 与葫芦科的黄瓜(XP 004146762.1)和甜瓜(BAA36291.1)相似性均最高达 88%,与荔枝(ABF56518.2)和烟草(*Nicotiana attenuate*) (AAL54878.1,AAO85554.1)的同源性分别达 83% 和 73%。我们从 NCBI 的 Nr 数据库中选取了 6 个物种的 6 条 HMGR 序列绘制系统进化树,包括黄瓜的 HMGR(XM 004170850.1),甜瓜的 HMGR(GU176320.1),拟南芥的 HMGR(NM 106299.3),烟草的 HMGR(U60452.1),荔枝的 HMGR(JN034589.1)和蓖麻(*Ricinus communia*)的 HMGR(XM 002510686.1),进化树如图 3 所示,*SgHMGR* 与葫芦科黄瓜和甜瓜同源性最近,与蓖麻同源性较远。

### 2.3 原核表达载体重组质粒的构建及鉴定

经预测,*SgHMGR* 蛋白 N 端 115 aa 内存在 2 段跨膜区极可能影响原核表达,因此从 116 个氨基酸开始设计含有酶切位点的引物来扩增 ORF,我们将去掉 N 端 115 aa 的 ORF 片段命名为 *SgHMGR-1*,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析,在 1 404 bp 左右出现特异性条带,大小与预期相符,测序正确。扩增产物与 pET-32a 载体连接转化到 BL21(DE3)感受态细胞中,用载体的上游引物和目的片段的下游引物进行 PCR 扩增,电泳结果得到单一的 1 404 bp 左右条带,阳性质粒送往睿博公司测序,结果表明重组表达质粒构建成功。ProtParam 在线软件预测 *SgHMGR-1* 的理论分子量为 49.5 kD,等电点为 5.96。构建到原核表达载体中含有 Trx 和 His 标签的融合蛋白理论分子量为 65.8 kD,等电点为 5.95。

### 2.4 重组质粒的诱导表达产物 SDS-PAGE 分析

0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 的 IPTG 诱导含有重组质粒的菌液,分别在 16、25、30 和 37 °C 下诱导过夜,菌液离心分别将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测,以未诱导的菌液上清和沉淀做对照,结果除了 16 °C 诱导温度下无特异条带外,在其余 3 组温度诱导的上清和沉淀中,在 45.0~66.2 kD 之间均有明显的特异条带,与融合蛋白 *SgHMGR-1* 预测大小 65.8 kD

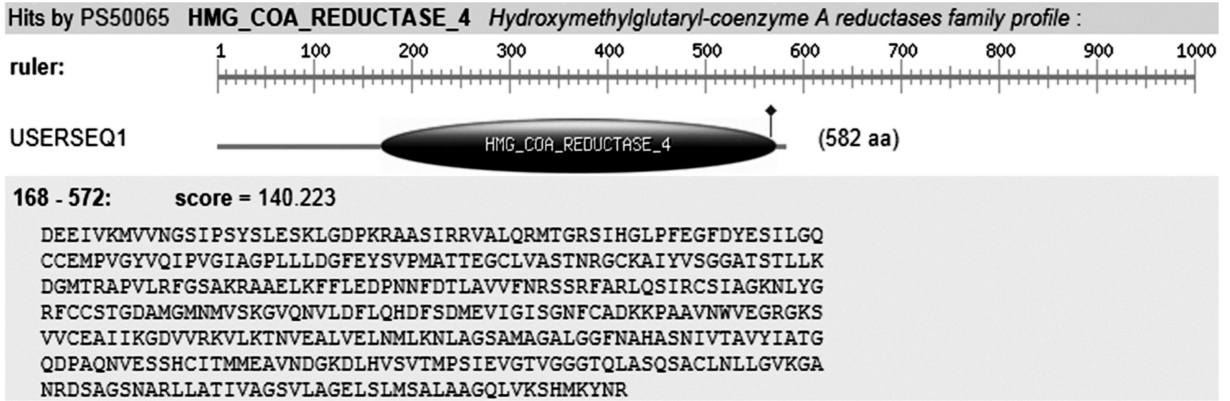


图 2 ProtSite 软件预测 SgHMGR 保守结构域

Fig. 2 Conserved domains of SgHMGR protein predicted by Protsite

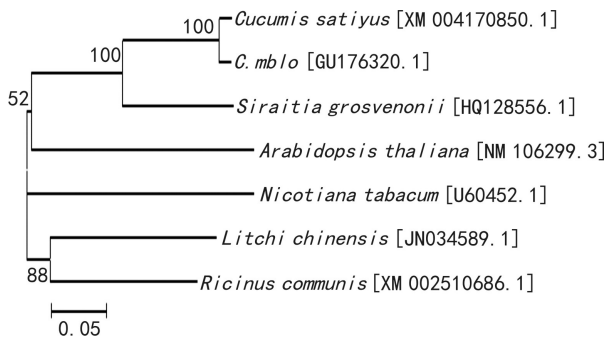


图 3 SgHMGR 系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of SgHMGR

一致,随着诱导温度升高,上清中的特异条带越来越少而沉淀中的越来越多。这表明重组质粒的上清和沉淀中均存在 SgHMGR 酶(图 4)。

### 2.5 Western blotting 鉴定

以未诱导的菌液作对照,显影结果表明对照没有任何条带,诱导处理的上清和沉淀均出现特异条带(图 5)。

## 3 讨论

HMGR 最初是在动物中发现,长期以来被认为是胆固醇合成中的限速酶,随着研究范围的扩大及深入,发现 HMGR 同样在植物萜类和甾醇合成途径中起着至关重要的调节作用,催化 MVA 途径中一步重要的限速反应。本文是首次在罗汉果中克隆到 1 条 SgHMGR 全长基因,然而目前罗汉果的遗传转化体系尚不完善,因此通过体外实验(如原核表达系统)来鉴定其功能是可行的。对 SgHMGR 原核表达及纯化是探索其功能及甜苷生物合成途径的

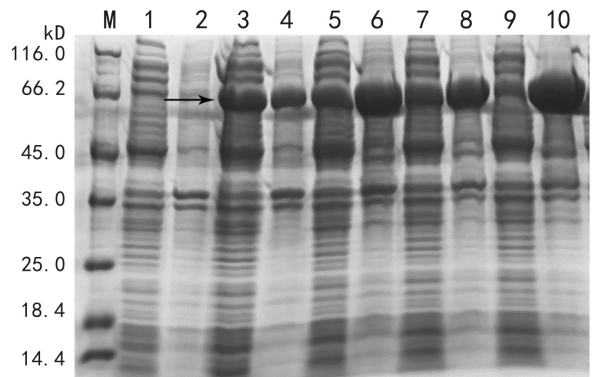


图 4 重组质粒不同温度下诱导表达的 SDS-PAGE 分析 M. 生工蛋白标记; 1. 未诱导(上清); 2. 未诱导(沉淀); 3. 16 °C 诱导过夜(上清); 4. 16 °C 诱导过夜(沉淀); 5. 25 °C 诱导过夜(上清); 6. 25 °C 诱导过夜(沉淀); 7. 30 °C 诱导过夜(上清); 8. 30 °C 诱导过夜(沉淀); 9. 37 °C 诱导过夜(上清); 10. 37 °C 诱导过夜(沉淀)。

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant plasmid after induced expression at different temperatures M. Sangon protein marker; 1. No IPTG (Supernatant); 2. No IPTG (Precipitate); 3. 16 °C overnight (Supernatant); 4. 16 °C (Precipitate); 5. 25 °C (Supernatant); 6. 25 °C (Precipitate); 7. 30 °C (Supernatant); 8. 30 °C (Precipitate); 9. 37 °C (Supernatant); 10. 37 °C (Precipitate).

前提和基础,将来可以借助转基因手段导入罗汉果中提高甜苷合成。研究人员试图通过过量表达 HMGR 基因来提高三萜类物质的含量,已经在多种植物中取得很大进展(Harker *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2013; Aquil *et al.*, 2009)。通过生物信息学分析,我们预测到 SgHMGR 基因与葫芦科其他植物 HMGR 基因同源性较高,在其 ORF 的 N 端存在 2 段跨膜区,很大程度上将影响该蛋白在原核系统中的表达,我们采取了回避 N 端跨膜区的方法克隆到

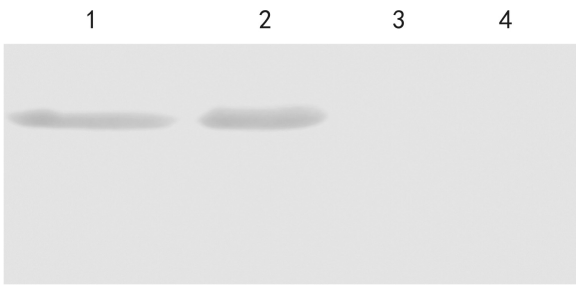


图 5 目的蛋白的 Western blotting 1. 在 25 °C 经 IPTG 诱导的上清; 2. 在 25 °C 经 IPTG 诱导的沉淀; 3. 未经诱导的上清; 4. 未经诱导的沉淀。

Fig. 5 Detection of target protein by Western blotting

1. Supernatant induced by IPTG at 25 °C; 2. Precipitate induced by IPTG at 25 °C; 3. Supernatant with no IPTG; 4. Precipitate with no IPTG.

*SgHMGR*-1 片段, 成功诱导了其在 *E. coli* 菌株 BL21(DE3) 中的表达, 并在上清和沉淀中均检测到融合蛋白的存在。IPTG 在不同温度下的诱导, 发现 *SgHMGR*-1 融合蛋白在 25 °C 中的表达最好, 此时上清中该蛋白的表达最高。本研究, 在罗汉果中我们首次详细报道了 MVA 途径中 *SgHMGR* 的全长克隆、生物信息学分析及原核表达, 明确了该基因序列, 初步确定了该基因编码 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶。目前的研究结果将有助于我们阐述罗汉果甜苷生物合成机制, 从某种程度上对于植物分类进化提供参考依据。

目前 *HMGR* 基因在药用植物的研究多集中在丹参、甘草和阳春砂等物种上(刘雨佳等, 2013), *HMGR* 通常是由多基因家族的形式存在, 而且不同植物同源基因的数目不同。这些基因在不同部位或不同生长发育期的表达模式不同, 这种差异性表达决定了“碳流”的流向。我们将继续从转录组数据中发掘是否存在 *HMGR* 的同家族基因, 拟开展 *SgHMGR* 基因的表达模式研究及真核表达, 进一步探讨罗汉果甜苷合成途径, 为通过基因工程手段有效促进三萜类生物合成进而提高甜苷含量奠定基础。

## 参考文献:

Aquila S, Hunaini AM, Abdin MZ, et al. 2009. Overexpression of the *HMG-CoA reductase* gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plant[J]. *Plant Med*, **75**(13): 1 453–1 458

Chiu CH, Wang R, Lee CC, et al. 2013. Biotransformation of mogrosides from *Siraitia grosvenorii* Swingle by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Agric Food Chem*, **61**(29): 7 127–7 134

Enjuto M, Balcells L, Campos N, et al. 1994. *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methyl-

glutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**(3): 927–931

Fu W, Ma XJ, Tang Q, et al. 2012. Karyotype analysis and genetic variation of a mutant in *Siraitia grosvenorii*[J]. *Mol Biol Rep*, **39**(2): 1 247–1 252

Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE. 2002. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **75**: 31–49

Harker M, Holmberg N, Clayton JC, et al. 2003. Enhancement of seed phytosterol levels by expression of an N-terminal truncated *Hevea brasiliensis* (rubber tree) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase[J]. *Plant Biotechnol J*, **1**(2): 113–121

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**(1): 135–142

Kim YK, Kim JK, Kim YB, et al. 2013. Enhanced accumulation of phytosterol and triterpene in hairy root cultures of *Platycodon grandiflorum* by overexpression of *Panax ginseng* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase [J]. *J Agric Food Chem*, **61**(8): 1 928–1 934

Liu LH, Ma XJ, Wei JH, et al. 2011. The first genetic linkage map of Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) based on ISSR and SRAP markers[J]. *Genome*, **54**(1): 19–25

Liu Y, Xu QX, Wang XY, et al. 2012. Analysis on correlation between 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene polymorphism of *Glycyrrhiza uralensis* and content of glycyrrhizic acid[J]. *Chin J Chin Mat Med*, **37**(24): 3 789–3 792

Liu YJ(刘雨佳), Zhang XN(张夏楠), Cheng QQ(程琪庆), et al. 2013. Advances in studies on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in terpenoids biosynthesis of medicinal plants (药用植物萜类生物合成 *HMGR* 基因研究进展)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **38**(19): 3 226–3 233

Luo HM, Song JY, Li XY, et al. 2013. Cloning and expression analysis of a key device of *HMGR* gene involved in ginsenoside biosynthesis of *Panax ginseng* via synthetic biology approach [J]. *Acta Pharm Sin*, **48**(2): 219–227

Mo CM(莫长明), Wang HY(王海英), Ma XJ(马小军), et al. 2014. Physiological regularities of *Siraitia grosvenorii* mogroside V biosynthesis(罗汉果甜苷 V 合成生理规律的研究)[J]. *J S Chin Agric Univ*(华南农业大学学报), **35**(1): 99–105

Mrayam D, Ali MN, Ghorbanali NZ. 2012. Bioinformatics study of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (*HMGR*) gene in Gramineae[J]. *Mol Biol Rep*, **39**: 8 925–8 935

Rui X, Caiqin L, Wangjin L, et al. 2012. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (*HMG1*) is highly associated with the cell division during the early stage of fruit development which determines the final fruit size in *Litchi chinensis* [J]. *Gene*, **498**(1): 28–35

Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, **30**(12): 2 725–2 729

Tang Q, Ma XJ, Mo CM, et al. 2011. An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis[J]. *BMC Genomics*, **12**: 343

(下转第 791 页 Continue on page 791)