

致,有待对其内源激素水平等进一步研究其机制。本实验的丛生芽诱导率、每个外植体产生的不定芽数量均较低,有待进一步优化。同时再生植株的东莨菪碱、莨菪碱的量及其遗传稳定性等有待研究。基于发根的转基因颠茄植株再生体系的建立,为利用植物基因工程技术实现颠茄托品烷类生物碱特别是东莨菪碱的代谢工程及开展分子育种奠定了基础。

References:

- [1] Strahl B, Atanas P. A rapid densitometric method for the analysis of hyoscyamine and scopolamine in solanaceous plants and their transformed root cultures [J]. *Phytochem Anal*, 2004, 15: 141-145.
- [2] Zhang L, Kai G Y, Lu B B, et al. Metabolic engineering of tropane alkaloid biosynthesis in plants [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(2): 136-143.
- [3] Zhang L, Ding R X, Chai Y R, et al. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 6786-6894.
- [4] Lu B B, Zang L, Kai G Y, et al. Establishment of hairy root culture of *Hyoscyamus niger* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(12): 1864-1868.
- [5] Yang C X, Yang Y J, Peng M F, et al. Establishment of hairy root cultures of *Atropa belladonna* [J]. *J Southwest China Norm Univ* (西南师范大学学报), 2006, 31(2): 115-118.
- [6] Yang C X, Chen M, Liao Z H, et al. Establishment of the exogenous gene expression system based on *Atropa belladonna* hairy roots [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 2006, 33(5): 1103-1105.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Subroto M A, John D H, Pauline M D. Development of shooty teratomas from several solanaceous plants: growth kinetics, stoichiometry and alkaloid production [J]. *J Biotechnol*, 1996, 45: 45-57.

茅苍术 *HMGR* 基因保守区片段的克隆与分析

刘 群¹, 曹小迎¹, 蒋继宏^{1*}, 戴传超²

(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. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要:目的 对茅苍术 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, *HMGR*) 进行基因克隆及序列分析。方法 采用 cDNA 末端快速扩增技术, 以茅苍术嫩叶总 RNA 的 cDNA 为模板扩增茅苍术 *HMGR* 基因的保守区片段。结果 序列分析表明, 所克隆的 cDNA 保守区序列长度为 458 bp, 而且同时得到了两个核苷酸序列的同源性为 84.28% 的片段, 相应的氨基酸序列的同源性为 92.11%。分别命名为 *HMGRcr1*, *HMGRcr2*。推断这可能是该基因家族中的两个成员。而且同源序列比对发现, 推断的 *HMGRcr1* 氨基酸序列和 *HMGRcr2* 氨基酸序列与其他植物都有较高的同源性。结论 首次分离并报道了茅苍术 *HMGR* cDNA 克隆, 为进一步研究萜类生物合成机制及其在提高植物药用价值方面提供理论依据。

关键词:茅苍术; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 基因克隆

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1551-04

Cloning and analysis of *HMGR* gene conserved fragments in *Atractylodes lancea*

LIU Qun¹, CAO Xiao-ying¹, JIANG Ji-hong¹, DAI Chuan-chao²

(1. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China;

2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: **Objective** To clone and sequence cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (*HMGR*) from *Atractylodes lancea*. **Methods** The cDNA, encoding *HMGR* in *A. lancea*, was amplified by RACE strategy with the cDNA of the total RNA of young leaves as the template. The partial fragments of *HMGR* were cloned and sequenced. **Results** The analysis results revealed that the conserved fragments were 458 bp. At the same time, the two fragments had been obtained 84.28% identification in nucleotide acid and 92.11% identification in corresponding amino acid, named as *HMGRcr1* and *HMGRcr2*, respectively. It was deduced that they may be members of the *HMGR* gene family in *A. lancea*. **Se-**

收稿日期: 2006-12-20

基金项目: 江苏省药用植物重点实验室开放课题资助(02AXL12)

作者简介: 刘 群 (1984-), 女, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 主要从事药用植物生物技术的研究工作。

* 通讯作者 蒋继宏 Tel: (0516)83403515 E-mail: jhjiang@xznu.edu.cn

quencing analysis showed that *HMGRcr1* and *HMGRcr2* had high identity with *HMGR* from other plants.

Conclusion The cDNA encoding *HMGR* from *A. lancea* is cloned and reported for the first time. The work will provided a foundation for exploring the mechanism of terpenes biosynthesis and application to the other medicinal plants.

Key words: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGR); gene cloning

萜类是一大类植物次生代谢产物,结构复杂,种类繁多。许多具有特殊生物活性萜类如赤霉素、脱落酸、胡萝卜素、类胡萝卜素、棉酚、青蒿素、紫杉醇等都被开发成为非常有价值的商品。萜类是以异戊二烯为基本单元构建的,异戊烯焦磷酸(IPP)是合成萜类的重要前体。植物类异戊二烯代谢是植物体内重要的代谢途径,它是植物生命活动必不可少的环节之一,如与植物生长调节相关的植物激素、起光保护作用的类胡萝卜素、调节细胞膜流动性的甾体、起电子转递作用的质体醌等物质的生物合成均源于植物类异戊二烯代谢途径。此外,在调节植物与环境作用的关系方面,通过植物类异戊二烯代谢所形成的次生代谢产物无疑充当着重要的角色,如倍半萜次生代谢物是许多植物自身防御的重要植保素。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)是植物细胞质甲羟戊酸代谢的第一个关键酶,相关的研究报道很多^[1]。长期以来,IPP一直被认为是经甲羟戊酸途径合成的,该反应的限速步骤是HMGR的作用下生成甲羟戊酸(MVA)。虽然近年来,经¹³C标记对植物和微生物萜类生物合成途径进行研究却发现许多与甲羟戊酸途径不一致的实验结果,并导致了新的类异戊二烯合成途径的发现。该途径以1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸作为反应起始,因此该途径又称为磷酸木酮糖途径或非甲羟戊酸途径^[2,3]。但作为萜类合成的经典途径甲羟戊酸途径,该途径的第一步限速酶HMGR的研究,对于更深入研究整个萜类物质的合成途径及其分子调控机制,有重要的意义。据相关文献报道,在植物中*HMGR*基因是一个多基因家族,如水稻中已经发现有该基因的3个成员即*HMGR1*、*HMGR2*、*HMGR3*^[4]。

茅苍术为菊科苍术属多年生草本植物,又名南苍术,为江苏省著名的道地药材,性味辛、苦、温。归脾、胃、肝经,具有燥湿健脾、祛风、散寒、明目等功能,临床上应用十分广泛,是一味很有开发前景的中药^[5]。已有文献报道茅苍术挥发油中萜醇类组分及倍半萜烯类组分的量较高^[6]。本研究根据已发现的该途径中的关键酶HMGR的基因进行同源序列的

比对,然后进行简并引物的设计,并以茅苍术为材料对该基因片段进行了克隆和序列分析。

1 材料与方法

1.1 材料:本实验所用材料是采自茅山地区的江苏著名的道地药材茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.,由南京师范大学戴传超博士提供,保存于-80℃冰箱。

1.2 试剂:BD-SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 购自美国Gibco公司,柱式胶回收纯化试剂盒购自上海华舜(Watson)生物工程有限公司,Taq酶、pGEM-T Easy Vector System 1 购自Promega公司。

1.3 方法

1.3.1 茅苍术嫩叶总RNA的提取:由于茅苍术植物的次生物质较多,因此茅苍术植物的总RNA的提取参照庄军平等^[7]报道的方法,略有改进。(1)取1g茅苍术的幼嫩叶片,液氮速冻后研磨成粉末,移入50mL离心管。(2)加入10mL 65℃预热的抽提缓冲液(2%)CTAB,100mmol/L Tris/HCl(pH 8.2),2mol/L NaCl,20mmol/L EDTA(pH 8.0),2% PVPP和4% β-巯基乙醇,剧烈震荡1min后65℃预热10min。(3)冷却至室温后加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),混匀后于11 000×g、4℃离心15min。(4)取上清液,加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1),混匀后于11 000×g、4℃离心15min。(5)取上清液,加两倍体积的无水乙醇和1/10体积的3mol/L醋酸钠(pH 5.2),-80℃沉淀至少1h。(6)取出后于11 000×g、4℃离心15min。(7)沉淀用3mol/L醋酸钠(pH 5.6)淋洗后于15 000×g、4℃离心10min。(8)沉淀溶于500μL DEPC水中,继续再用氯仿-异戊醇抽提1次。(9)取上清液,加入两倍体积的乙醇和1/10体积的3mol/L醋酸钠,-80℃沉淀1h后离心,沉淀用70%乙醇洗1次后将沉淀溶于500μL DEPC水中。(10)再加入2/3体积的8mol/L氯化锂溶液,4℃存放过夜。(11)隔天取出后15 000×g、4℃离心30min。(12)沉淀再用70%乙醇洗两次后溶于焦碳酸二乙酯(DEPC)

水中, -80°C 冰箱中保存备用。

1.3.2 引物的设计与合成: 引物的设计依据已知植物的 HMGRs 保守序列设计。Sense primer 序列为: 5'-GG[G/C/T]GATGC[A/T/C]ATGGG[G/A]ATGAA[C/T]ATG-3', Antisense primer 序列为: 5'-AC[A/T/C]GT[A/C/G]CC[A/C]ACCTCAATNGA[A/T/G]GGCAT-3'。引物的合成由北京奥科生物技术有限公司完成。

1.3.3 RT-PCR 反应: 通过 BD-SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (略改进) 使茅苍术的总 RNA 反转录成 cDNA。操作步骤按试剂盒说明书。以反转录合成的 cDNA 为模板, 用上述设计的一对引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94°C 预变性 3 min, 然后是 35 个循环的扩增 (94°C 、1 min, 60°C 、1 min, 72°C 、2 min), 最后在 72°C 再延伸 10 min。

1.3.4 PCR 产物回收、克隆及序列测定: PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的片段, 用胶回收试剂盒经回收纯化后与 pGEM-T Easy Vector (Promega) 在室温下连接 1 h 后, 置于 4°C 冰箱过夜, 将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。在 LB/AMP/IPTG/X-Gal 平板上筛选阳性克隆, 然后随机挑选 10 个白斑菌落, 抽提质粒和 PCR 扩增验证为阳性克隆的用于测序。测序工作由中国农业科学院作物科学研究所完成。

1.4 序列比较和软件分析: 将所测定的序列结果通过 BLASTP 或 BLASTX 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, 通过 Clustalw 分析软件与其他植物的 HMGR 氨基酸序列进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取: 茅苍术总 RNA 的甲醛变性凝胶的电泳结果见图 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。

进一步通过紫外分光光度法测得吸光度 (A) 值, A_{260}/A_{280} 比值为 1.988, 在 2.0 附近, 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排除。从而也说明此提取方法适合于药用植物苍术总 RNA 的提取。

2.2 茅苍术 HMGR 基因克隆与序列分析: 通过 RT-PCR, 从药用植物茅苍术总 RNA 中成功地克隆

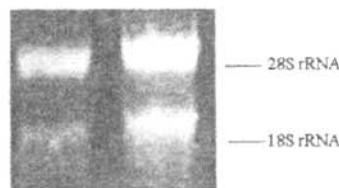
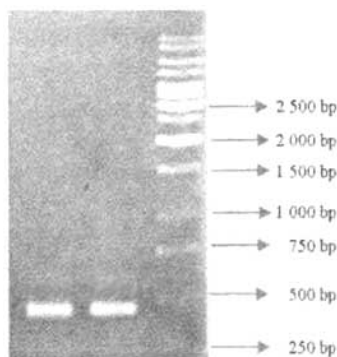


图 1 总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of total RNA

到了一条片段, 大小在 500 bp 左右 (图 2), 符合引物设计推断的片段大小。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, 然后将相对分子质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。测序结果大小为 458 bp 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他植物的 HMGR 基因有很高的同源性, 说明扩增到的序列就是茅苍术的 HMGR 基因的保守区。而且, 同时得到了两个核苷酸序列的同源性为 84.28% 的片段, 相应的氨基酸序列的同源性为 92.11%, 分别命名为 HMGRcr1、HMGRcr2。推断这可能是该基因家族中的两个成员。



M-DNA Marker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder)

图 2 保守区片段扩增产物

Fig. 2 Product of conservation fragments

2.3 推断的 HMGR 蛋白的同源比较、功能域及结构分析: 通过 BlastP 在线比较, 结果显示茅苍术推断的 HMGRcr1 氨基酸序列与海岛棉 *Gossypium barbadense* L. (NCBI 登陆号为 ABC71314, 下同)、喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. (P48021)、马铃薯 HMGR1 *Solanum tuberosum* L. (P48020)、马铃薯 HMGR3 (BAA93631) 一致性分别达到 93%、92%、89%、88%。推断的 HMGRcr2 氨基酸序列与喜树 (P48021)、万寿菊 *Tagetes erecta* L.

(AAC15475)、海岛棉(ABC71314)、陆地棉 *Gossypium hirsutum* L. (O64967) 一致性分别达到 95%、94%、90%、88%。

用 PROSITE 软件在线分析 (<http://us.expasy.org/prosite/>), 发现茅苍术推导的 HMGR 蛋白具有 HMGR 家族中的保守区域^[8], 并发现了特征位点(图 3、4)。同时分析了上面提到的不同来源 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。



蛋白激酶 C 磷酸化位点 38-40 SdK (■) 酪蛋白激酶 I 磷酸化位点 76-79 SlvE (N), 113-116 TqQD (K), 128-131 TmmE (X) N-肉豆蔻酰化位点 31-36 Gisg NY (I), 34-39 GnycSD (I), 88-93 GSavAG (V), 93-98 GSlgGF (W), 96-101 GGF-nAH (W), 114-119 GqdpAQ (X) 糖基化位点 85-88 NLTG (V) N-蛋白的氨基末端 C-为蛋白的羧基末端(图 4 同) protein kinase C phosphorylation site 38-40 SdK (■) casein kinase I phosphorylation site 76-79 SlvE (N), 113-116 TqQD (K), 128-131 TmmE (X) N-myristoylation site 31-36 GisgNY (I), 34-39 GnycSD (I), 88-93 GSavAG (V), 93-98 GSlgGF (W), 96-101 GGF-nAH (W), 114-119 GqdpAQ (X) N-glycosylation site 85-88 NLTG (V), N-amino terminal C-carboxy terminal (Fig. 4 is same)

图 3 HMGRcr1 蛋白 PROSITE 分析结果

Fig. 3 Analysis of HMGRcr1 deduced protein by PROSITE

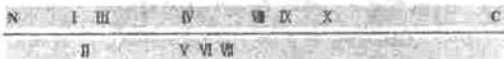


图 4 HMGRcr2 蛋白 PROSITE 分析结果

Fig. 4 Analysis of HMGRcr2 deduced protein by PROSITE

2.4 推断的 HMGR 蛋白的进化分析: 从 GeneBank 上选取 13 种植物的 HMGR 蛋白序列, 连同本研究中推断的茅苍术 HMGR1 和 HMGR2 蛋白序列一起进行进化上的分析。通过 MEGA3.1 软件按自展法(bootstrap)运算 1 000 次, 结果也表明, 推断的茅苍术的 HMGRcr1 与 HMGRcr2 是有一定的差别, 见图 5(中文名称后是各种植物在 NCBI 中的登陆号)。

3 讨论

本研究同时得到了两个不一样的片段, 推断应该是 HMGR 基因家族中的成员。从与其他植物的同源序列比较也能发现 HMGRcr1、HMGRcr2 有一定的差别。用 PROSITE 软件在线分析结果很明显地看到 HMGRcr1 比 HMGRcr2 多一个 Caseinki-

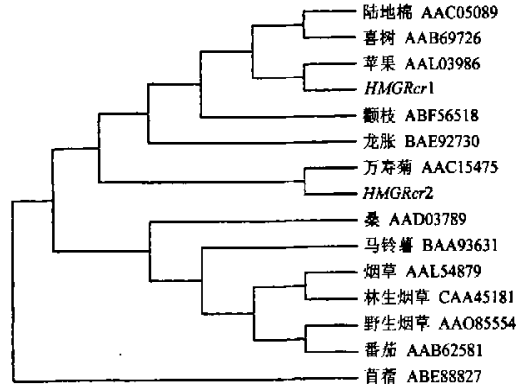


图 5 14 种植物 HMGR 蛋白在进化上的关系

Fig. 5 Phylogenetic relationship among HMGR

proteins in 14 kinds of plants

nase I phosphorylation site: 76-79 SlvE。同时因为目前所有报道的植物中, 认为 HMGR 都是由一个基因家族编码, 且不同种植物中的同源的数目不同。如陈大华等^[9]就从马铃薯中克隆到一个 HMGR 基因家族中的一个新成员。

当然 HMGRcr1 和 HMGRcr2 是否是茅苍术 HMGR 基因家族中的两个成员, 还得做进一步的验证。如特异性探针进行 Southern 杂交等手段。当然, 本研究只是探讨了 HMGR 基因的保守区片段, 还有待进一步进行其全长的扩增。

References:

- [1] Ju S J, Yan X F. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in higher plants [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2004, 40(1): 104-108.
- [2] Eisenreich W, Menhard B, Hylands P J, et al. Studies on the biosynthesis of taxol: the carbon skeleton is not of mevalonoid origin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6431-6436.
- [3] Chen J, Zhao D G. Research advances on the enzymes and their coding gene involved in plant terpene biosynthesis [J]. *Mole Plant Breed* (分子植物育种), 2004, 2(6): 757-764.
- [4] Kiml B R, Naml H Y, Kiml S U, et al. Reverse transcription quantitative-PCR of three genes with high homology encoding 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase in rice [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26: 985-988.
- [5] Liu H P, Chao J G. Tissue culture of *Atractylodes* (Thunb.) DC. [J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践), 2005, 19(5): 11-13.
- [6] Wang X N, Guo M C. The research on analysis of chemical constituents of the essential oil of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. [J]. *Chin J Health Lab Technol* (中国卫生检验杂志), 2003, 13(3): 295-297.
- [7] Zhuang J P, Su J, Chen W X. An effective method for high-quality RNA isolation from banana fruit [J]. *Mole Plant Breed* (分子植物育种), 2006, 4(1): 143-146.
- [8] Zheng Q P, Yu L J, Liu Z, et al. Cloning and analysis of cone encoding key enzyme gene (dxr) of the non-MVA pathway in *Taxus chinensis* cells [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工工程学报), 2004, 20 (4): 548-553.
- [9] Chen D H, Ye H C, Li G F, et al. Cloning and sequencing of HMGR gene of *Solanum tuberosum* and its expression pattern [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42: 724-727.