

• 药材与资源 •

球药隔重楼 HMGR 功能基因保守区序列的克隆与分析

江雪梅¹, 刘学端^{1*}, 尹华群¹, 李迪强², 张于光²

1. 中南大学资源加工与生物工程学院, 湖南 长沙 410083

2. 中国林业科学研究院 森林生态环境与保护研究所, 北京 100091

摘要: **目的** 研究球药隔重楼次生代谢产物甾体皂苷甲羟戊酸合成途径的一个关键酶即 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 的基因, 有助于对活性物质的合成进行调控, 从而提高产量。**方法** 比较 NCBI 上公布的 11 种植物 11 条 HMGR 基因 mRNA 的同源保守区域, 设计简并引物, 利用 RT-PCR 技术, 以球药隔重楼新鲜茎总 RNA 反转录的 cDNA 为模板成功扩增出 404 bp 的保守区基因片段。**结果** 序列分析表明, 球药隔重楼 HMGR 基因片段与其他 7 种植物的一致性达到 76%~81%, 球药隔重楼 HMGR 氨基酸片段与其他植物有较高的同源性, 经 Genbank 查询为一新的 cDNA。**结论** 通过蛋白质特征区、保守区以及进化树分析, 初步确定该基因为 HMGR 基因, 这是首次从药用植物球药隔重楼中克隆得到甲羟戊酸途径关键酶 HMGR 的基因片段, 也是百合科植物首次获得的 HMGR 基因。

关键词: 球药隔重楼; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR); 基因克隆; RT-PCR; 保守区基因片段

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1190-04

Cloning and analysis of HMGR gene conserved fragments in *Paris fargesii*JIANG Xue-mei¹, LIU Xue-duan¹, YIN Hua-qun¹, LI Di-qiang², ZHANG Yu-guang²

1. School of Mineral Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China

2. The Research Institute of Forest Ecological Environment and Protection, The Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract: Objective *Paris fargesii* is an important medicinal plant and its secondary metabolites, steroidal saponins, synthesized by the mevalonate pathway are the active ingredients. The study on the gene of the key enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductases (HMGR) in the mevalonate pathway is helpful for the regulation of steroidal saponins syntheses. **Methods** In the basis of degenerate primers designed according to mRNA homologous conserved regions of 11 HMGRs from 11 plant species published on NCBI and total RNA extracted from the seedling of *P. fargesii*, a 404 bp fragment of HMGR was amplified by reverse transcription PCR technology, which is a new cDNA as searching in the Genbank. **Results** Sequence analysis showed that the obtained fragment had 76%–81% identification compared with other seven plant species. The deduced amino acid sequence was predicted to have a wider and higher homology with other plants. **Conclusion** Protein characteristic zones, conserved regions, and phylogenetic analysis by Prosite and ClustalX could give preliminary evidence for the existence of HMGR in *P. fargesii*, which is the report of HMGR gene isolated from the plants in Liliaceae for the first time.

Key words: *Paris fargesii* Franch.; 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMGR); gene cloning; RT-PCR; fragment in conserved regions

球药隔重楼 *Paris fargesii* Franch. 为百合科 (Liliaceae) 重楼属 *Paris* L. 多年生草本植物, 多分布于我国四川、云南、贵州、福建等地, 是重要的药用植物, 具有止血、抗癌、抑菌、镇痛、镇静以及

免疫调节等功效, 是云南白药的主要原料药^[1-2]。化学研究表明, 其主要有效成分是次生代谢产物甾体皂苷, 包括薯蓣皂苷元 (diosgenin) 和偏诺皂苷元 (pennogenin) 的二、三、四糖苷等^[3-5], 约占总化

收稿日期: 2010-12-16

基金项目: 创新研究群体科学基金项目 (2005DKA21404)

作者简介: 江雪梅 E-mail: j_x_m118@126.com

*通讯作者 刘学端 Tel: (0731)88830546 E-mail: xueduanliu@sina.com

合物数目的 80%。

甾体皂苷的生物合成途径首先是合成甲羟戊酸,再经甲羟戊酸途径合成鲨烯,随后在单加氧酶、环化酶的作用下形成胆固醇,然后经甾体的糖基转移酶和 β -糖苷酶的作用形成各种甾体皂苷^[6]。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-methyl-glutaryl-CoA reductase, HMGR)是主要的关键酶之一,因为它与 HMGCoA 合成酶以及硫解酶一起将乙酰 CoA 催化合成甲羟戊酸。目前,对植物次生代谢途径的研究已取得了较大的进展,现已克隆出许多关键酶基因,使得对具有重要药用价值的次生代谢产物的合成途径和调控机制有了较为深入的了解^[7]。HMGR 基因已先后从苹果^[8]、大戟^[9]及黄果茄^[10]等植物中得到分离和克隆。采用基因工程手段来调节关键酶 HMGR 在皂苷代谢途径中的表达从而促进药用活性代谢产物的积累具有重要意义及应用价值。根据有关文献报道,植物中的 HMGR 基因是一个多基因家族,如甜椒中发现的该基因的 3 个成员 HMGR1、HMGR2、HMGR3^[11]。但目前国内外尚未见到有关球药隔重楼甾体皂苷合成途径及其关键酶基因如 HMGR 的研究报道,甚至没有关于百合科植物 HMGR 基因的克隆报道。本实验首次克隆了百合科植物球药隔重楼 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

球药隔重楼 *Paris fargesii* Franch. 完整植株样品采集于湖南省壶瓶山国家级自然保护区,顶坪,1 750 m。由吉首大学张代贵研究员鉴定后摘取新鲜茎经过酒精擦拭及 DEPC 处理水洗涤后,用消毒医用手术剪切下,立即放入液氮中保存待用。

1.2 总 RNA 的提取

按照 Trizol 植物总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen)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 简并引物的设计与合成

依据 11 种植物的 11 条 HMGRs 保守序列设计(Genbank 中的序列号为:U95816、AY039230、AF429388、FJ755158、M96068、AY796343、DQ067558、DQ098012、EU263989、DQ916106、AY741133)上游引物序列为 5'-GATGC[A/C/G/T]-

ATGGGGATGAACATGGT-3',下游引物序列为 5'-CCATCATT[A/C/G/T]ACAGCTTC CATCAT-3'。引物合成由上海生工完成。

1.4 cDNA 的克隆及序列分析

球药隔重楼的总 RNA 通过 Promega 公司的反转录试剂盒(ImProm-IITM Reverse Transcription System)反转录成 cDNA,操作步骤按照其说明书进行。以合成的 cDNA 为模板,用 2 个上、下游引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为:50 μ L 体系中含 2 μ L cDNA,简并引物各 1 μ L(10 μ mol/L),2 \times Taq PCR Master mix 25 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳后,切下目的片段,经 Omega 回收试剂盒回收纯化后与 pGM-T Easy 载体(Tiangen)连接,转化 TOP10 大肠杆菌感受态(Tiangen)。经 LB/AMP/x-Gal/IPTG 平板筛选阳性克隆子,随机挑选经 EcoRI 酶切确认的重组质粒并测序,测序工作由南京金斯瑞生物测序公司完成。所测得的序列结果由 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上的 BLASTN(核苷酸数据库)进行在线序列比对,再将该核苷酸序列用 Dnastar 软件翻译成氨基酸序列并寻找最大读码框,用 Prosite 软件在线分析该蛋白质的结构域和特征位点。用 Clustal X 软件对预测蛋白与其他植物 HMGR 氨基酸序列进行多重比较并构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

球药隔重楼总 RNA 的甲醛变性凝胶电泳结果见图 1,可以清晰地看出 2 条 RNA 条带(18 S rRNA 和 28 S rRNA),其中 28 S rRNA 条带的亮度大约为 18 S rRNA 的 2 倍,说明总 RNA 具有良好的完整性。紫外分光光度法测得 A_{260}/A_{280} 值为 1.997,表明 RNA 基本没有降解,说明所提取的 RNA 质量较好,酚类、蛋白质和无机盐等杂质已基本排除。

2.2 球药隔重楼 HMGR 基因保守片段克隆与序列分析

以球药隔重楼总 RNA 为模板,利用 RT-PCR 方法成功克隆到了一条约 400 bp 的片段(图 2)。用 Omega 凝胶回收试剂盒对片段进行切胶回收,纯化后的片段克隆到 pGM-T 载体上,经过蓝白筛选获得阳性克隆子,随机挑取克隆子做穿刺菌进行测序。测序结果是一大小为 404 bp 的片段,在 NCBI 上用

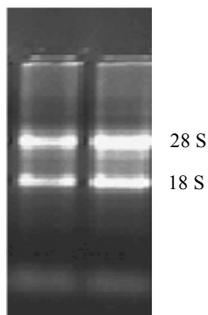
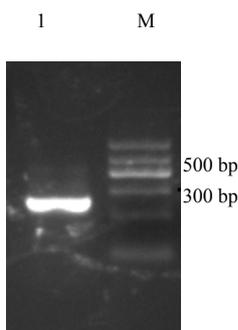


图 1 球药隔重楼总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA in *P. fargesii*



M-DNA 分子量标准 1-PCR 产物
M-DNA Marker 1-PCR product

图 2 同源保守片段扩增产物

Fig. 2 PCR product of homologous conserved fragment

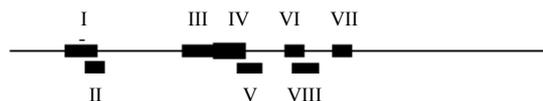
Blastn 将此序列进行在线比对,发现与其他 10 种植物的 HMGR 基因有着很高的同源性,说明扩增到的这条序列就是球药隔重楼的 HMGR 基因。同源性结果显示,球药隔重楼的 HMGR 基因与乐昌含笑 *Michelia chapensis* Dandy (DQ098012.1)、亚麻 *Linum usitatissimum* L. (FJ667605.1)、阳春砂仁 *Amomum villosum* Lour. (FJ455511.1)、蓖麻 *Ricinus communis* L.(XM_002510686.1)、苹果属 *Malux* Mill. (EF580921.1)、蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* (EU302817.1)、梨树 *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai (EU780784.1) 的相似度分别达到 81%、80%、79%、78%、78%、77%、76%。

2.3 预测的 HMGR 氨基酸序列的同源性比较、功能域及结构分析

用 Dnastar 软件推断出获得的 HMGR 基因片段的氨基酸序列,再通过 BLASTP 在线比较,显示球药隔重楼的氨基酸序列与西洋参 *Panax quinquefolium* L. (ACV65036.1)、阳春砂仁 *A. villosum*

(ACR02667.1)、北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. (ABY90137.1)、杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliver (AAV54051.1)、毛曼陀罗 *Datura innoxia* Mill. (AAY22199.1)、亚麻 *L. usitatissimum* (ACN38874.1)、蒺藜苜蓿 *M. truncatula* (ABY20976.1)、喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. (AAA33040.1)、乐昌含笑 *M. chapensis* (AAY87014.1) 的一致性分别达到 91%、90%、90%、89%、88%、88%、88%、87%、85%。经 Genbank 查询,该 cDNA 为一个新的 cDNA。

由 Prosite 在线软件 (<http://us.expasy.org/prosite/>) 分析,显示球药隔重楼 HMGR 氨基酸片段具有 HMGR 家族中的保守区域^[12],并发现了以下 3 个特征位点: 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 5 个 N-肉豆蔻酰化位点(图 3)。对上面提到的不同来源的 HMGR 蛋白序列的结构特点进行分析,发现它们与球药隔重楼具有同样的结构特点。通过同源比对分析,这一段蛋白片段中含有 3 个底物结合位点, 2 个催化残基, 4 个抑制剂结合位点和 11 个 NADP (H) 结合位点。



蛋白激酶 C 磷酸化位点: 37-39 SDK(II) 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点: 112-115 TGQD(VI), 127-130 TMME(VII) N-豆蔻酰化位点: 33-38 GNYCSD(I), 87-92 GSAVAG(III), 92-97 GSLGGF(IV), 95-100 GGFNAH(V), 113-118 GQDPAQ(VIII)
Protein kinase C phosphorylation site: 37-39 SDK (II) Casein kinase II phosphorylation site: 112-115 TGQD (VI), 127-130 TMME (VII) N-myristoylation site: 33-38 GNYCSD (I), 87-92 GSAVAG (III), 92-97 GSLGGF (IV), 95-100 GGFNAH (V), 113-118 GQDPAQ (VIII)

图 3 推断 HMGR 蛋白的 Prosite 分析结果

Fig. 3 Prosite analysis of HMGR deduced protein

2.4 推断的重楼 HMGR 蛋白进化分析

在 NCBI 上检索了 11 种不同植物的 HMGR 蛋白序列,用 Clusta 11.82 软件进行序列比对,然后分析进化关系并建立系统进化树。结果(图 4)表明推断的 HMGR 最先与水稻 (BAD10066) 及春砂仁 (ACR02667) 聚在一起,从一定程度上说明重楼与水稻和春砂仁的亲缘关系相较其他植物来说要近一些,这与它们都是单子叶植物而其他植物是双子叶植物的事实符合。其他植物的聚类情况与它们的管家基因如 18 S 的聚类情况相符,说明其系统关系一致。由于目前国内外对重楼属植物的分子水平研究

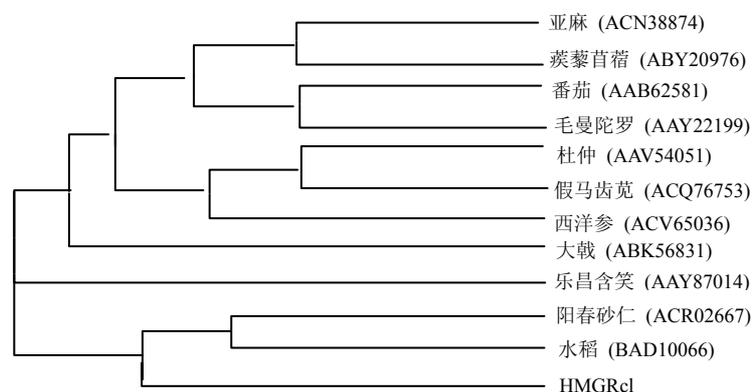


图 4 12 种植物 HMGR 蛋白在进化上的关系

Fig. 4 Phylogenetic relationship in HMGR proteins among 12 kinds of plants

非常有限, NCBI 中也没有与球药隔重楼同种的功能基因序列, 所以这个分子进化树只是提供了一定的参考, 具体的系统分类还有待进一步研究。

3 讨论

药用植物球药隔重楼具有抗癌、抗炎、清热止痛等多种药理作用, 但其分子生物学研究鲜有报道, 而 HMGR 被认为是合成球药隔重楼活性成分途径中最关键的限速酶^[13]。本实验首次从重楼属植物球药隔重楼中扩增出甲羟戊酸途径的关键酶基因 HMGR 的保守区序列, 通过保守性区域比较以及蛋白特征性位点等的分析显示与已报道的其他植物 HMGR 蛋白特性相似度较高, 可推断克隆得到的序列片段就是 HMGR 的 cDNA 片段。

利用 RACE 技术可以扩增出球药隔重楼 HMGR 基因的全长 cDNA, 并实现其在大肠杆菌中的表达, 已有使用转基因技术将 HMGR 基因导入目标酵母菌来提高有效成分量的报道^[14]。通过基因工程手段, 使用一些诱导物来提高生物合成途径中此限速步骤关键酶的表达量和活性, 从而提高目标药用活性化合物的生物合成水平, 以实现从基因水平上对其生物合成进行人工调控。

参考文献

[1] 赵志勇, 高文远, 黄贤校, 等. 重楼属植物分类学研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 244-246.
 [2] 黄贤校, 高文远, 满淑丽, 等. 重楼属药用植物皂苷类化学成分及其生源途径的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 483-489.
 [3] 黄贤校, 高文远, 谷克仁, 等. 毛重楼的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1366-1369.
 [4] 张树潘. 重楼属植物的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 海峡药学, 2007, 19(6): 4-7.

[5] 王羽, 高文远, 袁理春, 等. 滇重楼的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 17-20.
 [6] 陈莉, 张剑波. 甾体皂甙的生物合成 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(2): 316-320.
 [7] Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning with in the cytoplasmic pathway [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34(2): 95.
 [8] Pechous S W, Whitaker B D. Cloning and bacterial expression of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase cDNA (HMG1) from peel tissue of apple fruit [J]. *Plant Physiol*, 2002, 159(8): 907-916.
 [9] Cao X Y, Cao X, Zong Z, Ju X, *et al.* Molecular cloning, characterization and function analysis of the gene encoding HMG-CoA reductase from *Euphorbia pekinensis* Rupr. [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(3): 1559-1567.
 [10] Girija I D, Beena P S, Nazeem P A, *et al.* Molecular cloning of a cDNA fragment encoding 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase in kantkari (*Solanum xanthocarpum*) [J]. *J Trop Agric*, 2005, 43(1/2): 37-42.
 [11] Ha S H, Kim J B, Hwang Y S, *et al.* Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced Hmg2 from pepper (*Capsicum annuum*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1625(3): 253-260.
 [12] 郑清平, 余龙江, 刘智, 等. 红豆杉细胞非甲羟戊酸途径关键酶基因 dxr 的克隆与分析 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(4): 548-553.
 [13] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthesis pathway in plants [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol*, 1995, 46(1): 521-547.
 [14] Shimad H, Kondo K, Fraser P D, *et al.* Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(7): 2676-2680.