

三七 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶基因的克隆和生物信息学分析

张 萍, 刘迪秋, 葛 锋*, 赵恒伟

昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

摘 要: 目的 克隆三七总皂苷甲羟戊酸合成途径中的 1 个关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase, HMGR) 基因, 为进一步研究 HMGR 蛋白的功能及开展三七皂苷的合成生物学研究奠定基础。方法 根据 NCBI 上已公布的同属人参的 *HMGR* 基因全长序列(登录号 GU565097.1)设计特异性引物。利用 RT-PCR 技术, 以三七愈伤组织总 RNA 反转录的 cDNA 为模板扩增基因片段; 并对其编码的蛋白进行生物信息学预测和基因表达分析。结果 序列分析表明, 获得的三七 *HMGR* (命名为 *PnHMGR*) 基因的 cDNA 序列大小为 1 893 bp, 该序列与人参、刺五加和杜仲中 *HMGR* 基因的一致性分别达到 98%、93%、80%, 且含有大小为 1 725 bp 的开放阅读框, 经 Genbank 查询为一新的 cDNA。生物信息学预测 *PnHMGR* 基因编码蛋白包含 2 个跨膜区, 不含信号肽, 具有 HMGR 催化作用的活性中心结构域。实时荧光定量 PCR 检测到 *PnHMGR* 基因在三七细胞生长 30 d 表达量最高。结论 首次从药用植物三七中克隆得到 *HMGR* 基因的编码区序列, 为进一步鉴定 *PnHMGR* 的功能和开展三七皂苷的合成生物学研究奠定了基础。

关键词: 三七; 三七总皂苷; 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMGR); 基因克隆; 生物信息学

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)18-2684-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.021

Cloning and bioinformatic analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase gene from *Panax notoginseng*

ZHANG Ping, LIU Di-qiu, GE Feng, ZHAO Heng-wei

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: Objective *Panax notoginseng* is an important medicinal plant and its secondary metabolites, *P. notoginseng* saponins (PNS), synthesized by the mevalonate pathway are the active ingredients. The study on the gene of the key enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductases (*HMGR*) in the mevalonate pathway is helpful for the regulation of PNS syntheses. **Methods** The primers were designed according to *P. ginseng* *HMGR* (accession number: GU565097.1) from NCBI. Total RNA was extracted from the callus of *P. notoginseng*. The fragment of *HMGR* gene was amplified by reverse transcription PCR technology and analyzed. **Results** Sequence analysis showed that the cDNA sequence of obtained fragment (*PnHMGR*) was 1 893 bp, containing an ORF spanning 1 725 bp, and exhibited 98%, 93%, and 80% sequence identity with *HMGR* in *P. ginseng*, *Eleutherococcus senticosus*, and *Eucommia ulmoides*. The cDNA was a new one as searching in the Genbank. The bioinformatic analysis showed that *PnHMGR*-encoding protein contained two transmembrane regions and the HMGR catalytic domain, without signal peptide. The expression level of *PnHMGR* was the highest when the callus of *P. notoginseng* has grown for 30 d. **Conclusion** It is the first time to report *HMGR* gene isolated from *P. notoginseng*. The results will provide a groundwork for exploring the molecular function of *PnHMGR* involved in PNS biosynthesis based on the synthetic biology of *P. notoginseng*.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen; *P. notoginseng* saponins; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase (HMGR); gene cloning; bioinformatics

三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 又名田七、人参三七、金不换等, 为五加科人参属多年生草本植物, 是我国特有的药食两用的名贵中药材。

其味甘、微苦、性温, 归肝、胃、小肠经, 具有散瘀、止血、消肿、止痛等功效, 可用于治疗糖尿病、冠心病、心绞痛、血栓等, 三七总皂苷 (*Panax*

收稿日期: 2014-03-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31260070, 31060044)

作者简介: 张 萍, 女, 硕士在读, 研究方向为生物技术制药。Tel: 18826731619 E-mail: zhangping861022@126.com

*通信作者 葛 锋, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事生物技术制药。Tel: (0871)65920621 E-mail: gefeng@tsinghua.org.cn

notoginseng saponins, PNS) 为其主要活性成分^[1]。现代化学和药理学研究发现, PNS 在血液和造血系统、心脑血管系统、神经系统、免疫系统、泌尿系统、物质代谢、抗衰老、抗氧化、抗肿瘤等方面均有较好的生理活性^[2-3]。

迄今为止已经从三七组织中分离鉴定出 70 余种三萜类皂苷, 它们均属于达玛烷型四环三萜类。研究发现, 植物萜类化合物其生物合成有 2 条途径: 位于质体中的 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (MEP) 途径和位于细胞质中的甲羟戊酸 (MVA) 途径, 这 2 条途径产生萜类物质的共同前体为异戊烯基焦磷酸 (IPP), 再由它生成各种萜类化合物^[4-5]。普遍认为, MVA 途径为三七皂苷的主要生物合成途径。而 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 是植物 MVA 途径中的第 1 个关键酶, 连同 NADPH 催化 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 生成甲羟戊酸, 该反应是一个不可逆的过程, 也是萜类合成过程中的重要调控点^[6]。

鉴于 HMGR 基因在萜类物质生物合成中的关键作用, 目前已从西洋参^[7]、人参^[8]、刺五加^[9]、球药隔重楼^[10]和丹参^[11]等多种药用植物中克隆到相应的 HMGR 基因或者基因片段。三七作为传统中药材, 目前国内外尚未见到有关其 HMGR 基因的研究报道。本实验室首次克隆出三七 HMGR 基因 (命名为 *PnHMGR* 基因) 的编码区序列, 并对其编码的蛋白进行生物信息学预测。利用实时荧光定量 PCR 检测该基因在三七愈伤组织不同生长阶段的表达量。其结果对于在分子水平实现 PNS 生物合成的定向调节具有重要意义, 对进一步研究药用植物中萜类次生代谢产物合成机制具有参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物材料三七愈伤组织为本实验室保存的细胞株, 该愈伤组织由三七子叶诱导。大肠杆菌 DH5 α 感受态购于北京全式金生物科技有限公司。M-MVL 逆转录试剂盒、pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司。高保真 DNA 聚合酶、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶均购于 TaKaRa 公司。SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒和 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购于上海生工生物工程有限公司。本研究所用引物及相关测序均由上海生工生物工程有限公司完成。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取和 cDNA 的合成 取新鲜的三七愈伤组织 0.2 g, 在液氮中研磨成粉, 采用改良的异硫氰酸胍法提取三七总 RNA^[12]。利用紫外分光光度计进行纯度和浓度测定, 1.2% 的琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。取一定量提取的三七总 RNA, 以 Oligo(dT)₁₅ 为引物, 按照 M-MLV 逆转录酶说明书反转录成第一链 cDNA, 将产物置于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 *PnHMGR* 基因 cDNA 的扩增和测序 根据 GenBank 中报道的人参 HMGR 基因全长序列 (登录号 GU565097.1) 设计特异性引物 (表 1)。以三七 cDNA 为模板, 按照以下体系对三七的 *PnHMGR* 基因进行扩增: cDNA 3.0 μ L, *ex Taq* 酶 0.5 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L, dNTPs 4 μ L, 10 $\times$ 缓冲液 5.0 μ L, ddH₂O 36.5 μ L, 终体积为 50.0 μ L。反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 然后进行 30 个循环: 95 °C、30 s, 53 °C、30 s, 72 °C、2 min; 循环结束后 72 °C、10 min 延伸反应, 16 °C 保温。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 对扩增所得目的片段进行切胶回收。

表 1 *PnHMGR* 基因克隆和荧光定量分析的引物序列
Table 1 Primers for *PnHMGR* gene cloning and real-time PCR analysis

目标引物	引物序列 (5'→3')
基因克隆	正向 CCGCCGGAATATCCAATTCCATG
	反向 CACAATTTGCCAAACTTTACAGC
RT-PCR	正向 ACTCACC GCCATTGTCTCCCTTAT
	反向 ACCACGGATTTCACGATTCTTCTCG
18 S rRNA	正向 AACCATAAACGATGCCGACCAG
	反向 TTCAGCCTTGCGACCATACTCC

将回收产物与 pGEM-T easy 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, 在含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板上进行培养, 挑取单克隆菌落 PCR 扩增和电泳检测后选择阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。利用 Blast 对测序结果进行分析。

1.2.3 *PnHMGR* 的生物信息学分析 利用 GenBank “ORF finder” 查找所获得基因序列的开放阅读框 (open reading frame, ORF, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)。 *PnHMGR* 基因编码蛋白的理化性质预测采用 ExPASy Proteomics

Server 提供的在线工具 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 进行分析。利用在线工具 InterPro 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 对 PnHMGR 蛋白结构域进行分析。采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质二级结构分析和三维建模。利用在线软件 TMHMM Server, v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测 PnHMGR 蛋白的跨膜区。分泌蛋白预测使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。WOLFP-SORT (<http://wolfsort.org/>) 用于 PnHMGR 蛋白的定位信号预测。氨基酸序列相似性通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的蛋白质序列数据库进行, 并利用 DNAMAN 软件进行氨基酸多重序列比对。通过 MEGA 5.1 构建 Neighbor-joining 系统进化树。其他序列资料来源于 NCBI 蛋白质数据库中已注册的 HMGR 信息。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 为了检测 PnHMGR 基因在三七愈伤组织不同生长阶段的表达情况, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测该基因在三七愈伤组织不同生长阶段的表达量。选取生长状态较好的愈伤组织, 从其生长到 10 d 开始, 每隔 10 天取 1 次样, 液氮速冻, -80°C 保存。到第 50 天时进行最后 1 次取样。实时荧光定量 PCR 检测的反应体系如下: cDNA 1.0 μL , Go Taq® qPCR Master Mix ($2\times$) 25 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.2 μL , 加无核酸酶纯水补齐至体积为 50.0 μL 。每个反应重复 3 次。扩增程序如下: 热启动 95°C 、2 min; 然后进行 40 个循环: 95°C 、15 s, 60°C 、1 min。该反应以 18 S rRNA 基因为内参, 以第 10 天时细胞中 PnHMGR 的表达量为对照。

1.2.5 三七愈伤组织 PNS 的测定 利用香草醛-冰醋酸、高氯酸显色法测定三七愈伤组织中 PNS 的量。选取生长状态较好的愈伤组织, 从其生长到 10 d 开始, 每隔 10 天取 1 次样, 到第 50 天结束。每个时间点共设置 3 次重复实验, 每次重复实验取样量为 7 g, 显色完成后在波长 550 nm 下测其吸光度值。根据标准曲线计算皂苷量 (C), 由 $C\times$ 稀释倍数/愈伤组织样品干质量计算出 PNS 量。

2 结果与分析

2.1 三七总 RNA 的提取

通过琼脂糖凝胶电泳检测三七总 RNA (图 1):

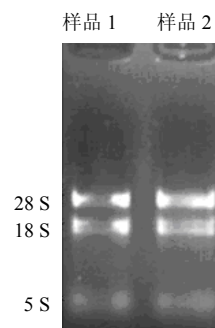


图 1 三七总 RNA 电泳图

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

28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带清晰完整, 亮度均匀, 比例约为 2:1, 点样孔周围无污染, 并且无明显的拖尾现象, 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 1.99, 表明采用该方法提取的 RNA 纯度较高, 质量较好。可用于后续实验。

2.2 PnHMGR 基因的克隆

根据同源克隆的原理, 从三七愈伤组织的 cDNA 中克隆到 1 个约为 2 000 bp 的片段 (图 2)。用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒按照说明书对目的片段进行切胶回收, 胶回收后的目的片段进行 T-A 克隆获得连接产物 pGEM-T-PnHMGR, 将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α , 氨苄青霉素筛选后经菌液 PCR 鉴定获得阳性克隆。随机挑选几个阳性克隆送测序。

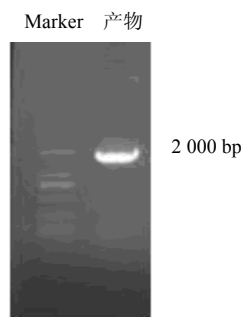


图 2 PnHMGR 的 PCR 产物

Fig. 2 PCR product of *PnHMGR*

测序结果是 1 个大小为 1 893 bp 的片段。在 NCBI 上用 Blast 对此序列进行在线比对, 发现该序列与人参、刺五加和杜仲中 HMGR 基因的序列相似性很高, 分别为 98%、93%、80%, 说明得到的这条序列可能为三七的 HMGR 基因。并且通过 NCBI “ORF finder” 分析发现: 该序列包含 1 个 1 725 bp

的开放阅读框, 编码 574 个氨基酸。同源性分析发现, 推衍的三七 HMGR 氨基酸序列与人参、刺五加和杜仲 HMGR 的氨基酸序列一致性分别为 97%、93%、81%。已有报道^[13]表明不同植物 HMGR 基因的开放阅读框的碱基数和所编码的氨基酸残基数相似。说明本研究已经成功克隆得到三七 HMGR 基因, 并将该基因命名为 *PnHMGR* 基因, 提交到 NCBI 中 GenBank 数据库, 获得的登录号为 KJ578757。

2.3 *PnHMGR* 基因编码蛋白序列相似性分析

将 *PnHMGR* 基因编码蛋白的氨基酸序列提交至美国国立生物信息技术中心 NCBI 的蛋白质序列数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行 BLASTP 在线比较, 结果显示, *PnHMGR* 蛋白序列与人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的 HMGR (ADI80346.1) 序列相似度最高, 达到 97%; 其次为刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms (93%, AFM77981.1)、杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. (81%, AAV54051.1)、蓖麻 *Ricinus communis* Linn. (80%, XP_002510732.1)、马铃薯 *Solanum tuberosum* L. (78%, XP_006342182.1)、秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. (79%, AFN89600.1)、葡萄 *Vitis vinifera* Linn. (79%, XP_002275827.1) 和毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray (78%, XP_002301-898.1)。

2.4 *PnHMGR* 基因编码蛋白的理化性质分析

利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 预测 *PnHMGR* 基因编码蛋白的理化性质。该蛋白由 574 个氨基酸组成, 分子式为 $C_{2729}H_{4386}N_{740}O_{819}S_{34}$, 总原子数为 8 708。相对分子质量是 61 757.3; 理论等电点 (pI) 为 6.60, 带正电残基 (Arg+Lys) 为 54, 带负电残基 (Asp+Glu) 为 56。该蛋白的不稳定系数为 46.43, 表明 *PnHMGR* 基因编码的蛋白质不稳定。脂肪系数为 95.12, 亲水性系数为 0.124。

2.5 *PnHMGR* 基因编码蛋白二级结构分析及三级结构预测

使用 SWISS-MODEL (<http://beta.swissmodel.expasy.org/>) 进行 *PnHMGR* 基因编码蛋白的二级结构分析, 该蛋白二级结构中 α -螺旋占 42.16%、 β -折叠占 14.11%、无规则卷曲占 43.73%。

在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中, 以人类的 HMGR 基因 (1dqa.1.A) 为模板, 对 *PnHMGR* 编码蛋白进行三维结构建模^[14] (图 3)。



图 3 *PnHMGR* 基因编码蛋白三维结构模型

Fig. 3 Three dimensional structure of *PnHMGR*-encoding protein

结果显示 *PnHMGR* 基因编码蛋白与人类的 1 个 HMGR 基因具有 56.17% 的序列相似性的类似空间结构。

2.6 *PnHMGR* 基因编码蛋白信号肽、亚细胞定位、跨膜区预测分析

使用 SignalP 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测 *PnHMGR* 基因编码蛋白不具有信号肽。在线工具 (<http://www.wolfsort.org/>) 预测该蛋白的亚细胞定位情况如下: 质体的定位系数为 8.0 (plas 8.0); 内质网的定位系数为 5.0 (E. R.: 5.0), 表明该蛋白最可能定位于质体或内质网。

利用 TMHMM Server, v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测 *PnHMGR* 基因编码蛋白具有 2 个跨膜区 (图 4), 分别是位于 A49~A71 以及 A84~A106 的多肽链。

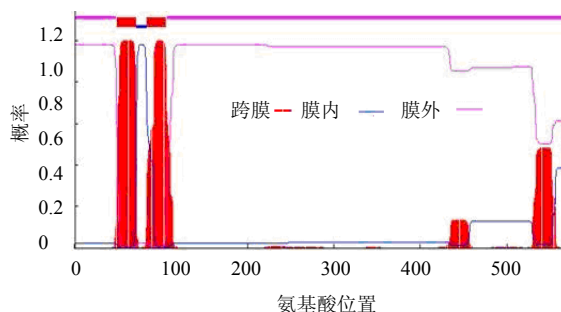


图 4 *PnHMGR* 基因编码蛋白跨膜螺旋区预测

Fig. 4 Predicted transmembrane helix regions of *PnHMGR*-encoding protein

2.7 *PnHMGR* 基因编码蛋白的功能结构域预测和分析

利用 Interpro 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 对 *PnHMGR* 基因编码蛋白的功能结构域进行预测, 结果见表 2。选取药用植物人参 (ADI80346.1)、刺五加 (AFM77981.1)、杜仲 (AAV54051.1)、

表 2 PnHMGR 蛋白功能结构域预测

Table 2 Prediction of functional domains of PnHMGR

登录号	功能描述	结构域所处氨基酸序列位置
IPR004554	真核类/古生菌类 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶结构域	160~564
IPR009029	3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶家族 I/II 底物结合结构域	147~278, 395~553
IPR023282	3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 N-末端结构域	155~230
IPR023074	3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶家族 I/II 催化结构域	231~277, 397~566
IPR009023	3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶家族 I/IIINAD/NADP 结合结构域	281~396, 281~397
IPR023076	3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶家族 I/II 保守结构域	340~354, 495~502, 549~562

秦艽 (AFN89600.1)、丹参 (AEZ55673.1)、西洋参 (ACV65036.1) 和 *PnHMGR* 的氨基酸序列利用 DNAMAN 软件进行多重序列比较分析, 得出 PnHMGR 蛋白与其他药用植物的 HMGRs 一样, 均具有 HMG-CoA 结合基序 (EMPIGYVQIP 和 TTEGCLYA) 和 NADP(H) 结合基序 (DAMGMNM

和 GTVGGGT) (图 5)。底物 HMG_CoA 结合基序和 NADP 结合基序对于植物 HMGRs 的功能非常重要, 并且在进化时具有较高的稳定性 (图 5)。不同植物中 HMGR 的 C-末端序列较 N-末端序列保守, 而 *PnHMGR* 基因编码蛋白的 C-末端序列和 N-末端序列同样具有上述特点^[8] (图 5)。

[illegible]

图 5 HMGRs 蛋白的序列比对

Fig. 5 Alignment of amino acid sequences of selected HMGRs

2.8 *PnHMGR* 基因编码蛋白的系统进化树分析

为了分析 *PnHMGR* 基因编码蛋白与其他 HMGRs 的系统进化关系, 从 GenBank 数据库中共选取 20 个物种的 21 条 HMGR 蛋白序列, 其中人参有 2 条不同序列。经过 ClustalW 比对并利用 MEGA5.1 中的 Neighbor-joining 方法, 构建植物、真菌、古细菌和动物各种不同生物 HMGRs 的进化树。古细菌包括 *Caldvirga maquilensis* IC-167 (YP_001540247.1)、*Pyrobaculum* sp. 1860 (YP_005084125.1)、*Thermococcus gammatolerans* EJ3 (YP_002959512.1); 真菌包括粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* (BAJ83615.1)、黑曲霉 *Aspergillus niger* (CAK48210.1)、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288c (NP_013636.1)、灵芝 *Ganoderma lucidum* (ABY84848.1); 动物包括斑马鱼 *Danio rerio* (NP_001014314.1)、小鼠 *Mus musculus* (EDL00884.1)、家兔 *Oryctolagus cuniculus* (XP_002723079.1)、人类 *Homo sapiens* (NP_001124468.1)、野猪 *Sus scrofa* (NP_001116460.1); 植物包括人参 *Panax ginseng* HMGR2 (AGL08682.1)、人参 (ADI80346.1)、西洋参 *Panax quinquefolius* (ACV65036.1)、荔枝 *Litchi chinensis* (ABF56518.2)、丹参 *Salvia miltiorrhiza* (AEZ55673.1)、胡黄连 *Picrorhiza kurrooa* (ABC74565.1)、杜仲 *Eucommia ulmoides* (AAV54051.1)、秦艽 *Gentiana macrophylla* (AFN89600.1)、刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (AFM77981.1); 采用上述生物的 HMGRs 序列构建的系统进化树 (图 6), 结果表明, HMGR 蛋白质具有明显的种族特异性, 这些序列分别聚类为植物、古细菌、真菌和动物的 HMGR 群。真菌和动物形成一个分枝, 又和植物形成一个大分枝。从进化树可以看出植物、古细菌、真菌和动物的 HMGRs 起源于同一个祖先。本研究克隆得到的 *PnHMGR* 基因编码蛋白聚类到植物 HMGR 群, 并且与人参的 HMGR (ADI80346.1) 亲缘关系最近。

2.9 三七愈伤组织不同生长阶段 *PnHMGR* 基因表达和 PNS 量的变化

利用实时荧光定量 PCR 方法检测 *PnHMGR* 基因在三七愈伤组织不同生长阶段表达量的变化情况 (图 7)。结果表明 *PnHMGR* 基因的表达量先升高后降低, 在细胞生长 30 d 时, 表达量最高, 但 PNS 量在培养 40 d 达到最高。 *PnHMGR* 基因的表达情况和

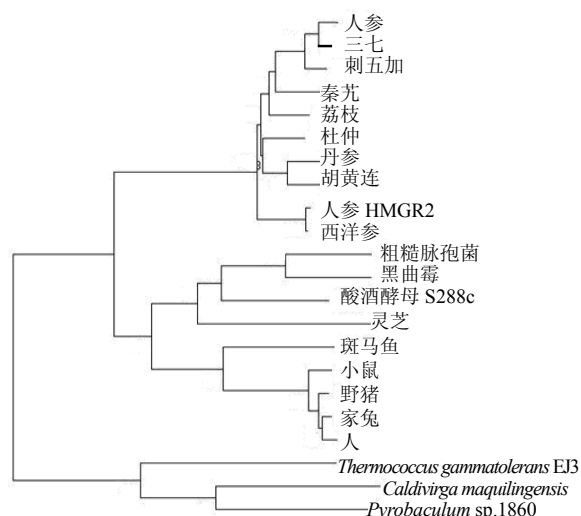


图 6 HMGRs 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of HMGRs protein

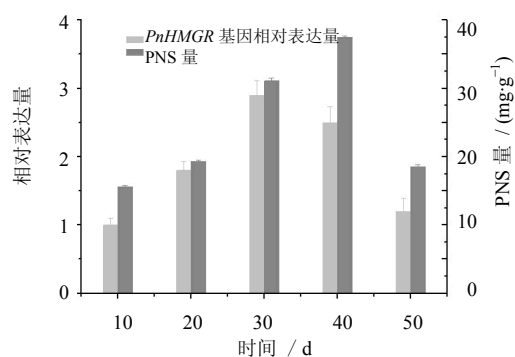


图 7 三七愈伤组织不同生长阶段 *PnHMGR* 基因表达量和 PNS 量

Fig. 7 Content of PNS and expression analysis of *PnHMGR* in different growth periods of *P. notoginseng*

PNS 的合成变化并没有“实时”对应关系, 这是因为在 PNS 生物合成的途径中, *PnHMGR* 基因处在比较前端的调控位置, 从 *PnHMGR* 基因的表达调控到终产物的生成, 中间还要经历多步酶催化反应, 同时, 生物合成的调控是一个复杂体系, 一条路径上的关键酶可能有多, 这就使得个别关键酶基因的表达情况不一定能够最终影响代谢产物的合成。

3 讨论

三七是我国的传统中药, 具有广泛的生理活性, 更是治疗心脑血管疾病的特效药, 市场需求高, 价格昂贵。然而, 三七为多年生草本植物, 生长周期长且环境特殊, 栽种地域较少且存在连作障碍, 传统栽培方法的产量难以满足快速增加的市场需求。

随着分子生物学向各学科领域的渗透以及生物信息学和蛋白质组学的应用,找出生物合成途径中的关键酶,实现其基因的克隆和高效表达,将成为以后大规模生产药用植物有效成分可行的办法。这不仅对于基础研究,而且对于增加中草药有效成分的含量,提高经济效益都具有重大的意义。有研究表明 HMGR 活性的急剧提高,可以诱导倍半萜环化酶活性,同时提高倍半萜植物抗毒素的产量^[15]。HMGR 基因的超表达可使黄花蒿中的萜类化合物的量提高 22.5%^[16]。灵芝中 HMGR 基因的超表达使灵芝酸的量增加 2 倍,中间体鲨烯和甾醇的积累也有所提高^[17]。

在 PNS 生物合成的途径中, HMGR 蛋白处在比较前端的调控位置,倍半萜、二萜、三萜的合成都必须有该酶的参与。本研究首次成功地从三七中扩增出 MVA 途径的关键酶 HMGR 的基因,生物信息学分析表明,该基因编码的蛋白与前人报道的 HMGR 蛋白特性非常相似,从 160~564 的氨基酸残基是 HMGR 家族的特异性识别序列。有研究发现,在植物中编码 HMGR 蛋白的通常是一个基因家族,在这些基因家族中,不同 HMGR 基因的表达可能控制着 MVA 代谢、“碳流”的流向,并决定着各种萜类最终产物的比例^[11]。本实验克隆到的 *PnHMGR* 基因可能只是三七 HMGR 基因家族中的一个成员,是否存在其他成员及该基因在三七皂苷生物合成中的作用都有待进一步研究。目前,本课题组正在进行三七中 *PnHMGR* 基因的超表达和 RNAi,力图从更深层地认识和了解 *PnHMGR* 基因的功能,明确 *PnHMGR* 基因在 PNS 生物合成途径中的地位和角色。

参考文献

- [1] Dong T X, Cui X M, Song Z H, *et al.* Chemical assessment of roots of *Panax notoginseng* in China regional and seasonal variations in its active constituents [J]. *Agric Food Chem*, 2003, 51: 4617-4623.
- [2] 乔春玲, 丁艳芬, 杨崇仁. 三七总皂苷药理研究进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(11): 25-30.
- [3] 杨志刚, 陈阿琴, 俞颂东. 三七药理研究新进展 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(4): 59-62.
- [4] 王 莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508.
- [5] 陈 莉, 吴耀生. 三萜皂苷生物合成途径及相关酶 [J]. 国外医药, 2004, 19(4): 156-161.
- [6] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 46: 521-547.
- [7] Wu Q, Song J, Sun Y, *et al.* Transcript profiles of *Panax quinquefolius* from flower, leaf and root bring new insights into genes related to ginsenosides biosynthesis and transcriptional regulation [J]. *Plant Physiol*, 2010, 138(2): 134-149.
- [8] 罗红梅, 宋经元, 李雪莹, 等. 人参皂苷合成生物学关键元件 HMGR 基因的克隆与表达分析 [J]. 药学学报, 2013, 48(2): 219-227.
- [9] 刑朝斌, 吴 鹏, 龙月红, 等. 刺五加 HMGR 基因的克隆与表达分析 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28(6): 1258-1262.
- [10] 江雪梅, 刘学端, 尹华群, 等. 球药隔重楼 HMGR 功能基因保守区序列的克隆与分析 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1190-1193.
- [11] Dai Z, Cui G, Huang L. Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoid tanshinone accumulation [J]. *Plant Physiol*, 2011, 168(2): 148-161.
- [12] 石 磊. 三七皂苷生物合成途径 SS, DS 基因的克隆和调控研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2012.
- [13] Campos N, Boronat A. Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 2163-2174.
- [14] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 343-350.
- [15] Chappell J, Nable R. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor [J]. *Plant Physiol*, 1987, 85: 469-473.
- [16] Aquil S, Husaini A M, Abdin M Z, *et al.* Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. *Planta Med*, 2009, 75(13): 1453-1458.
- [17] Xu J W, Xu Y N, Zhong J J. Enhancement of ganoderic acid accumulation by overexpression of an N-Terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme: A reductase gene in the basidiomycete *Ganoderma lucidum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(22): 7968-7976.