

鱼腥草乙酰辅酶 A 酰基转移酶基因克隆、表达及生物信息学分析

姚元枝, 黎晓英, 魏麟*, 伍贤进*, 刘胜贵, 唐玉莲

怀化学院生命科学系 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南 怀化 418008

摘要: **目的** 通过克隆鱼腥草乙酰辅酶 A 酰基转移酶 (acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT) 基因 cDNA 全长, 并展开生物信息学分析和表达分析, 为解析鱼腥草萜类次生代谢产物的生物合成机制奠定基础。**方法** 采用 RT-PCR 方法获得 AACT 基因 cDNA 序列并进行生物信息学分析; 利用实时荧光定量 PCR 方法检测了 AACT 基因在鱼腥草的地下茎、地上茎、叶、花中的表达情况。**结果** 克隆获得的 AACT 基因 cDNA 全长为 1 218 bp, 编码 405 个氨基酸。生物信息学预测 AACT 蛋白不含跨膜区, 不含信号肽。AACT 基因在鱼腥草地上茎中的表达量最高, 达到 1.49, 其次是地下茎 0.96, 花和叶中的表达量相对较低, 分别为 0.20 和 0.10。**结论** 首次从鱼腥草中克隆了 AACT 基因, 为进一步阐明该基因在鱼腥草萜类化合物代谢途径中的重要作用奠定基础。

关键词: 鱼腥草; 乙酰辅酶 A 酰基转移酶; RT-PCR; cDNA 序列; 差异表达

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)01-0107-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.021

Cloning, expression, and bioinformatics analysis of acetyl-CoA C-acetyltransferase gene in *Houttuynia cordata*

YAO Yuan-zhi, LI Xiao-ying, WEI Lin, WU Xian-jin, LIU Sheng-gui, TANG Yu-lian

Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Huaihua University, Key Laboratory of Xiangxi Medicinal Plant and Ethnobotany of Hunan Higher Education, Huaihua University, Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua 418008, China

Abstract: Objective Acetyl-CoA C-acetyltransferase (AACT) is the initial enzyme in the terpenoid biosynthesis pathway of mevalonate (MVA), two units of acetyl-CoA were catalyzed to acetoacetyl-CoA. To clone the full length cDNA of AACT gene and carry out the bioinformatics analysis and expression analysis in order to provide the basis on resolving the mechanism of biosynthesis for terpenoid secondary metabolites from *Houttuynia cordata*. **Methods** The cDNA sequence of AACT gene was obtained from *H. cordata* by using RT-PCR strategy. And the different expression of AACT gene in the rhizomes, stems, leaves, and flowers of *H. cordata* was analyzed by fluorescent quantitative PCR. **Results** The cDNA contains a 1 218 bp open reading frame and encodes a predicted protein of 405 amino acids. No transmembrane region and signal peptide were present in AACT protein by bioinformatics prediction. Relative real-time PCR analysis indicated that AACT gene showed the highest transcript abundance in the stems and rhizomes of *H. cordata* lower levels in the flowers and leaves, the values of them were 1.49, 0.96, 0.20, and 0.10, respectively. **Conclusion** This AACT gene is cloned from *H. cordata* for the first time. The results will provide a foundation for exploring the mechanism of the gene in terpenoid biosynthesis and metabolism in *H. cordata*.

Key words: *Houttuynia cordata* Thunb.; acetyl-CoA C-acetyltransferase; RT-PCR; cDNA sequence; differential expression

鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb. 为三白草科鱼腥草属多年生草本植物, 因全株有鱼腥味而得名。鱼腥草营养价值很高, 是人们常用的野生蔬菜^[1-2],

鲜鱼腥草氨基酸包括 Asp、Glu、Ser、His、Gly、Thr、Ala、Arg、Tyr、Val、Met、Phe、Ile、Leu、Lys 和 Pro 16 种氨基酸^[3], 干鱼腥草地下部分中蛋

收稿日期: 2014-07-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870230); 湖南省高校创新平台开放基金项目 (12K132); 湖南省科技计划重点项目 (2013FJ6090)

作者简介: 姚元枝 (1965—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为植物资源评价与分子生物学。Tel: (0745)2851037 E-mail: hhyaoyz@163.com

*通信作者 魏麟 E-mail: hhweilin@163.com

伍贤进 E-mail: hhwxianjin@163.com

白量为 7.1%~10.5%，可溶性糖为 7.1%~11.4%，脂肪为 4.6%~9.3%^[4-6]，鱼腥草中脂溶性维生素和可溶性维生素量均很丰富。其全草均可入药，已被国家卫生部正式确定为“既是药品，又是食品”的极具开发潜力的资源之一^[7]。鱼腥草中脂溶性维生素种类丰富，可能与其中挥发油量较高有关。挥发油是鱼腥草的重要有效成分，主要含萜类化合物，乙酰辅酶 A 酰基转移酶 (acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT) 是其甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 合成途径的第一个重要酶，能使 2 个分子的乙酰辅酶 A 缩合为乙酰乙酰辅酶 A。AACT 催化蛋白质的酰基化和去酰基化已成为真核生物蛋白质修饰中最普遍的方式之一，能调节蛋白质生物活性和基因表达，直接影响植物的生长发育及主要活性成分的合成，具有重要的研究意义。

目前，AACT 基因序列已在油茶^[8]、假马齿苋^[9]、丹参^[10]、显齿蛇^[11]等作物及药用植物中成功克隆，迄今鱼腥草 AACT 基因还未见有任何报道。本研究应用 RT-PCR 方法扩增鱼腥草 AACT 基因 cDNA 片段，并对其蛋白质序列进行生物信息学及不同组织器官中的特异性表达分析，为有效利用该基因和合理开发鱼腥草的药食两用价值奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb. 样品经中央民族大学龙春林教授鉴定，种植于怀化学院鱼腥草种植园，于 2012 年 6 月 28 日采集同一株鱼腥草的地下茎、地上茎、叶片、花等样品，洗净后，经乙醇擦拭及焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水溶液处理，立即放入液氮中保存，带回实验室，于 -80 °C 冰箱保存备用。

RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、Taq 酶、克隆载体 pMD 18-T Vector、质粒提取试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒、菌种 JM109、DNA 相对分子质量标记，T4 DNA 连接酶、荧光定量试剂盒 SYBR Prime ScriptTM RT-PCR Kit 及电泳类试剂等均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 鱼腥草地下茎、地上茎、叶片及花 RNA 提取方法按照 Trizol 试剂说明书进行，提取后进行电泳检测和纯度及浓度测定；并于 -80 °C 保存备用。

1.2.2 cDNA 链合成 根据试剂盒说明书进行，反转录产物分离纯化后置于 -20 °C 保存备用。

1.2.3 引物设计 通过分析鱼腥草高通量转录组数据，发现一个被注释为 AACT 基因的转录本 (CL8227)，同其他植物 AACT 基因的核苷酸序列 (AB294686、HQ128554、KC342946、FJ947159、GU594059) 进行比对，应用 Oligo 6 软件设计引物。上游引物 AACT-F: 5'-ATGGCTCCTGCAGCAGCTTC-3'; 下游引物 AACT-R: 5'-TTACATGAGCTCTAGCACA-3'，由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2.4 PCR 扩增 反应体系和反应条件参照文献报道^[12]，其中退火温度为 56 °C。

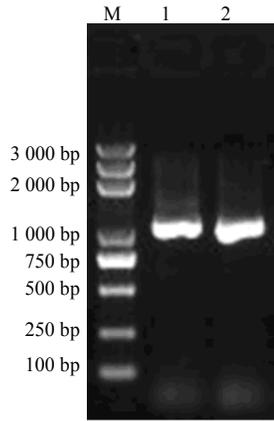
1.2.5 扩增片段的克隆测序、序列分析及 AACT 生物信息学分析 对 PCR 产物进行回收，连接载体 pMD 18-T Vector，并转化感受态细胞 JM109，蓝白筛选后，过夜培养白色菌落，提取质粒并鉴定，然后送生工生物工程 (上海) 有限公司测序。采用 DNASTar 软件包分析与处理序列，在 NCBI 网站上进行 Blast 比对及 BioEdit 软件分析，并用 Mega 4 软件进行 UPMAG 聚类分析。采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具对鱼腥草 AACT 基因编码蛋白的理化性质及结构与功能进行预测。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 表达分析 利用实时荧光定量 PCR 的方法检测 AACT 基因在鱼腥草根 (地下茎)、茎 (地上茎)、叶、花中的相对表达量，采用美国 ABI7500 实时 PCR 检测系统，上游引物 qAACT-F 序列为 5'-ATTACTGGGTATGCTGATG-C-3'，下游引物 qAACT-R 序列为 5'-TTTCCCGA-TGGAAGGTCTAG-3'。实时 PCR 检测的反应体系如下：5 μL 2×SYBR[®] Premix Ex TaqTM，正、反向引物均为 0.3 μL，cDNA 模板 2 μL；加 ddH₂O 至 10 μL。反应程序：95 °C、3 min，95 °C、10 s，60 °C、20 s，72 °C、30 s，35 个循环，实时 PCR 反应以鱼腥草 18 S rDNA 为内参，18 S rDNA 序列设计引物 18 S-F: 5'-CCTCCGGCGTTGTTACTTTG-3' 和 18 S-R: 5'-CCCGACT GTCCCTG TAATCA-3'，每个反应重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 鱼腥草 AACT 基因克隆

以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板，用引物 AACT-F 和 AACT-R 进行 PCR 扩增。电泳检测发现约在 1 200 bp 处有一条亮带，见图 1。对于扩增产物进行测序，其结果经 Blast 确定为鱼腥草 AACT 基因序列，经 ORF Finder 预测，该序列含有一个完整的开放阅读框 (ORF)，推测编码 405 个氨基酸，见图 2。



M-Marker 1、2-PCR 产物
M- Marker 1, 2-PCR products

图1 鱼腥草 AACT 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of AACT gene from *H. cordata*

```

ATGGCTCCTGCAGCAGCTTCCGATTCATTGCAGCCTCGAGATGTA
M A P A A A S D S L Q P R D V
CAATGGGAGGTTTTCTTGGCTCCCTCTCATCATTGTCTGCCACTA
P M G G F L G S L S S L S A T
TGCTCTGACAAGGGCAAACGTGGATCCAAAGCTCGTACAGGAGGT
A L T R A N V D P K L V Q E V
AATTTAGGGCAAGCTCCTGCGAGACAGGCTGCATTAGGCGCGGGA
N L G Q A P A R Q A A L G A G
CCATTAATAAAGTTTGCGCATCTGGAATGAAAGCAACTATGCTTG
T I N K V C A S G M K A T M L
TAATGATGTTGTTGTAGCGGGTGGCATGGAAAGTATGTCAAATGC
N D V V V A G G M E S M S N A
AAGGGATCTCGATTTGGAAATGATGCTATCATTGATGGGATGCTA
K G S R F G N D A I I D G M L
ATGATAATGCTATGGGCTCATGCGCTGAACTGTGTGCAGAGCAAC
N D N A M G S C A E L C A E Q
CTCATATGCTATTCAAAGCTTTGAGCGTGGGATGGCTGCTCAAAA
S Y A I Q S F E R G M A A Q N
GTTCCGGTTGAAATATCTGGTGGAAAGAGGGAGACCGTCCACGCTT
V P V E I S G G R G R P S T L
AATTTGATCCCGTGAAGCTTCGGAAGCTTCGGCCTACTTTTAAGG
K F D P V K L R K L R P T F K
CAATGCTTCTAGCATAAGTGATGGTGCTGCTGCATTGGTGTAGT
N A S S I S D G A A A L V L V
GGGCTTCAAGTCATTGCTAAGATTACTGGGTATGCTGATGCGGCT
G L Q V I A K I T G Y A D A A
CTCCAGCACTTGCCATACCAAAAAGCGATATCCACTGCTGGTTTTGC
A P A L A I P K A I S T A G L
AATAAATGAAGCTTTCTCTGTTGTAGCCCTTGCAAATCAGAACT
I N E A F S V V A L A N Q K L
AATGTGCATGGTGGAGCTGTGTCCCTAGGACATCCTCTTGGTTGT
N V H G G A V S L G H P L G C
TCTTGGGGGTGCTGAGACAGAGAAATGGAAAGCATGGAGTTGCTG
L L G V L R Q R N G K H G V A
ATCTGCGCTTGTGCTAGAGCTCATGTAA
S A L V L E L M *
    
```

图2 鱼腥草 AACT 基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleic acid sequence and supposed amino acid sequence of AACT gene from *H. cordata*

2.2 鱼腥草 AACT 基因编码蛋白特性分析

2.2.1 理化性质 鱼腥草 AACT 基因预测编码 405 个氨基酸，利用 ExPASy 在线软件对其蛋白的理化性质进行预测分析。推测其分子式为 $C_{1812}H_{2952}N_{514}O_{563}S_{19}$ ，相对分子质量是 41 555.6，等电点 (pI) 为 6.13。该蛋白的不稳定系数 (instability index) 为 30.59，属于稳定蛋白。脂肪系数 (aliphatic index) 为 96.69，亲水性系数 (grand average of hydropathicity) 为 0.188，该蛋白不含信号肽。

2.2.2 鱼腥草 AACT 的二级结构及三级结构预测 AACT 蛋白的二级结构如图 3 所示，该蛋白的二级结构中 α -螺旋占 42.96%、 β -折叠占 15.06%、无规则卷曲占 32.59%、自由延伸占 9.38%。由 SWISS-MODEL 预测的 AACT 三级结构如图 4 所示。

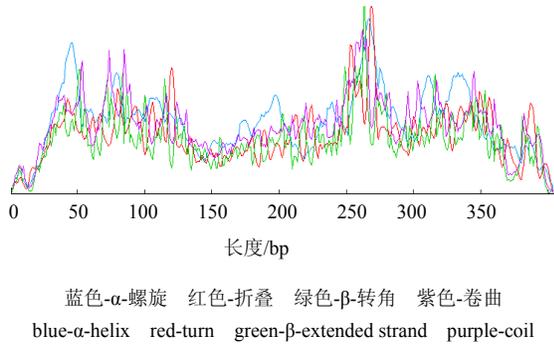


图 3 AACT 蛋白二级结构预测图

Fig. 3 Two-dimensional structure prediction of AACT protein

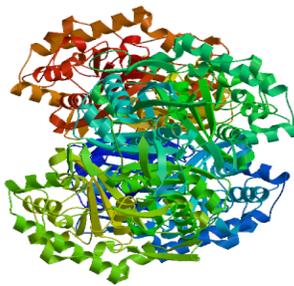


图 4 AACT 蛋白三级结构预测图

Fig. 4 Three-dimensional model prediction of AACT protein

2.3 鱼腥草 AACT 氨基酸序列的同源性及其亲缘关系分析

推导氨基酸序列比较结果表明, 鱼腥草 AACT 与橡胶树、油茶、山茶、三角叶杨、假马齿苋、小米、马铃薯、罗汉果、玉米和番茄的 AACT 蛋白质分子的相似度分别为 87.2%、84.9%、84.7%、83.0%、82.7%、80.8%、80.2%、80.0%、79.8%和 79.5%, 表明 AACT 氨基酸序列同源性高, 进化过程中比较保守。用 Mega 4 软件进行 UPMAG 聚类分析, 见图 5。

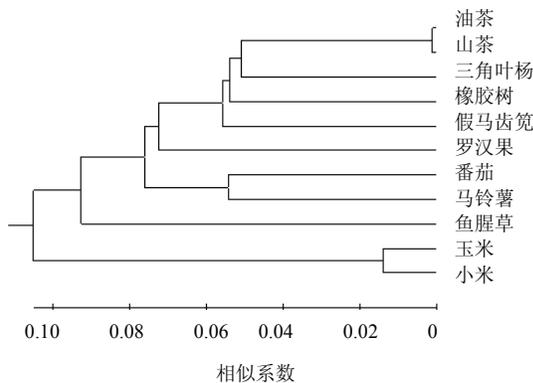


图 5 鱼腥草与其他植物 AACT 的 UPGMA 进化树

Fig. 5 UPGMA cladogram of AACT from *H. cordata* and other plants

2.4 鱼腥草 AACT 基因的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 AACT 基因在地下茎、地上茎、叶、花等器官中的表达特异性, 结果表明该基因在地上茎中的表达量最高, 达到 1.49, 其次是地下茎 0.96, 花和叶中的表达量相对较低, 分别为 0.20 和 0.10 (图 6)。

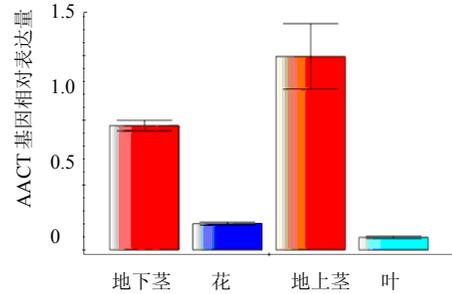


图 6 鱼腥草不同组织中 AACT 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression quantity of AACT gene in different parts of *H. cordata*

3 讨论

鱼腥草既是传统中药材, 也是口味独特的菜肴, 营养成分和药用成分的量丰富。鱼腥草属野生宿根性草本植物, 在我国南方各地均有其嫩茎叶及肥嫩的根茎出售, 被称为纯天然绿色食品、野菜中的佳品、高档蔬菜, 其脆嫩、纤维少、口感好, 深受消费者称道。民间对鱼腥草的食用历史悠久, 方法多种多样, 特别是在人民生活水平普遍提高, 崇尚绿色自然的当今社会, 其食用范围越来越广, 食用人群越来越多^[2,12]。鱼腥草为药食两用的植物, 早在唐代《新修本草》有“叶似荞麦, 肥地亦能蔓生, 茎紫赤色, 多生湿山谷阴处, 山南江左人好生食之”的记载。根据《南本草》《本草经疏》等古代医学书籍记载, 鱼腥草具有清热解毒、化痰止咳、杀菌消炎、排脓消肿、利尿和化食的功效, 可治疗肺炎、肺脓肿、热痢、疟疾、水肿、痔疮、中暑、肠胃炎等多种疾病^[13-17]。这同鱼腥草含有丰富的挥发油有关。挥发油中主要成分为萜类化合物, 而 AACT 是其 MVA 合成途径中的第一个发挥重要作用的关键酶, 是近年来植物生理生化和分子生物学的热点之一。随着对 MVA 途径关键酶的深入研究, 利用酶表达改变萜类物质在植株中的量, 必将是改变植株品质的有效手段之一。

本研究利用 RT-PCR 技术首次克隆了鱼腥草 AACT 基因的全长 cDNA 序列。所克隆的 AACT 基

因含一个完整的 ORF, 编码 405 个氨基酸。对推定的氨基酸序列的结构和功能进行生物信息学分析, 发现其没有信号肽序列。与其他植物的氨基酸序列进行比较, 结果显示, 鱼腥草 AACT 同其他植物 AACT 具有较高的相似性, 说明该蛋白在进化过程中比较保守。这可能与其在植物生命活动过程中所发挥的作用有关。

本研究首次成功克隆了鱼腥草 AACT 基因 cDNA 序列, 将为构建其过表达载体和遗传转化体系, 进一步实现萜类成分在植株中高效表达提供理论基础, 并为开展鱼腥草及类似以萜类化合物为主要活性成分植物的遗传改良、品质提高具有重要的理论意义和实践价值。

参考文献

- [1] 天然. 佳蔬良药“鱼腥草” [J]. 蔬菜, 2000(6): 32-33.
- [2] 王祥初. 野蔬·药膳鱼腥草 [J]. 园林, 2000(2): 41.
- [3] 吴三桥, 周建军, 李新生. 薇菜、蕺菜中氨基酸及其他营养成分含量的测定 [J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(3): 65-67.
- [4] 吴卫. 鱼腥草的研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(4): 367-368.
- [5] 伍贤进, 胡美忠, 卢红梅, 等. 鱼腥草生长发育规律及适宜采收期的研究 [J]. 作物杂志, 2006(5): 18-20.
- [6] 牛友芽, 钟凯, 伍贤进, 等. 两种居群鱼腥草生长规律比较及成分变化的研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(27): 8509-8511.
- [7] 张俭, 易灏, 伍贤进. 鱼腥草在家畜疾病防治上的应用 [J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(11): 41-42.
- [8] 张琳, 谭晓风, 胡姣, 等. 油茶乙酰 CoA 酰基转移酶基因 cDNA 克隆及序列特征分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(8): 108-112.
- [9] Vishwakarma R K, Ruby S S, Sonawane P D, et al. Molecular cloning, biochemical characterization, and differential expression of an acetyl-CoA C-acetyltransferase gene (AACT) of Brahmi (*Bacopa monniera*) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31(3): 547-557.
- [10] 崔光红, 王学勇, 冯华, 等. 丹参乙酰 CoA 酰基转移酶基因全长克隆和 SNP 分析 [J]. 药科学报, 2010, 45(6): 785-790.
- [11] 付明, 魏麟, 余娟, 等. 显齿蛇葡萄查耳酮合成酶基因 cDNA 克隆及蛋白质序列分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 85-89.
- [12] 伍贤进. 鱼腥草种质资源与规范化栽培技术研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [13] Kim G S, Kim D H, Lim J J, et al. Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen salmonella within the RAW 264. 7 macrophage [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(11): 2012-2017.
- [14] Kim D, Park D, Kyung J, et al. Anti-inflammatory effects of *Houttuynia cordata* supercritical extract in carrageenan-air pouch inflammation model [J]. *Lab Anim Res*, 2012, 28(2): 137-140.
- [15] Chen X, Wang Z, Yang Z, et al. *Houttuynia cordata* blocks HSV infection through inhibition of NF- κ B activation [J]. *Antiviral Res*, 2011, 92(2): 341-345.
- [16] Zhou N N, Tang J, Chen W D, et al. Houttuynin, an active constituent of Chinese herbal medicine, inhibits phosphorylation of HER2/neu receptor tyrosine kinase and the tumor growth of HER2/neu-overexpressing cancer cells [J]. *Life Sci*, 2012, 90(19/20): 770-775.
- [17] Toda S. Antioxidative effects of polyphenols in leaves of *Houttuynia cordata* on protein fragmentation by copper-hydrogen peroxide *in vitro* [J]. *J Med Food*, 2005, 8(2): 266-268.