

白桦 BpHMGR 基因的结构及表达模式分析

李思达, 梁楠松, 周 珊, 詹亚光, 曾凡锁*

东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: **目的** 研究白桦 *Betula platyphylla* 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase, BpHMGR) 全长基因结构特征及编码蛋白质性质, 揭示其节律表达模式以及对外源 NO 信号分子的响应机制。**方法** 通过 RACE 技术克隆白桦 BpHMGR 基因, 应用生物信息学软件对 BpHMGR 及其编码蛋白进行详细分析, 利用实时荧光定量 PCR 定量分析 BpHMGR 基因在昼夜节律变化中的表达模式。根据 BpHMGR 氨基酸序列构建系统进化树, 分析昼夜节律以及外源 NO 对白桦叶片中 BpHMGR 转录水平的影响。**结果** BpHMGR 基因全长 1 764 bp, 包含完整开放阅读框, 已上传至 NCBI, 并获得登录号 KJ452334, 其编码蛋白由 587 aa 组成。白桦 BpHMGR 基因与大豆 (XP_003519474.1)、葡萄 (XP_002275827.1)、苜蓿 (XP_003617066.1) 亲缘关系较近。**结论** BpHMGR 随昼夜周期变化呈现出节律表达特性, 在夜晚 21:00 时达到峰值。初步揭示了外源 NO 能诱导白桦细胞内三萜代谢途径的关键酶 BpHMGR 基因上调表达, 进而促进三萜产物齐墩果酸的合成。**关键词:** 白桦; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 生物节律; 一氧化氮; 生物信息学分析

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)06-0982-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.06.021

Analysis on structure and expression pattern of BpHMGR gene in *Betula platyphylla*

LI Si-da, LIANG Nan-song, ZHOU Shan, ZHAN Ya-guang, ZENG Fan-suo

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To study the full-length gene structure characteristics and coding protein properties of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (BpHMGR) from *Betula platyphylla* (birch). This reveals the mechanism of rhythm expression pattern and its signaling molecule in response to exogenous NO. **Methods** The BpHMGR gene in birch was cloned by RACE technology. BpHMGR and its encoded protein were analyzed in detail by bioinformatics software. And the expression pattern in the circadian variation of BpHMGR gene was analyzed by real-time PCR. **Results** The full-length of BpHMGR gene was 1 764 bp, contained the complete ORF, encoding 587 amino acids (Genebank ID: KJ197336). According to BpHMGR amino acid sequence, phylogenetic tree was constructed. And the effect of circadian rhythm and exogenous NO on the transcription level of BpHMGR in the leaves of *B. platyphylla* was investigated. **Conclusion** BpHMGR gene, soybean (XP_003519474.1), grape (XP_002275827.1), and alfalfa (XP_003617066.1) have close genetic relationship. BpHMGR changes with the diurnal cycle showing the expression characteristics of rhythm, and reaches the peak at 9 pm. The up-regulation expression of key enzyme gene HMGR in the exogenous NO-induced birch intracellular triterpenoids metabolic pathway is initially revealed, so as to promote the synthesis of triterpene oleanolic acid product.

Key words: *Betula platyphylla* Suk.; 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase; biological rhythm; nitric oxide; bioinformatic analysis

白桦 *Betula platyphylla* Suk. 为桦木科 (Betulaceae) 桦木属 *Betula* L. 落叶乔木, 是我国东北及内蒙古林区的主要树种之一。白桦三萜类物质具有抗菌、抗病毒、利胆和保肝等作用, 白桦酯酸及其衍生物具有抗肿瘤和抗 HIV 等活性。此外, 白

桦植株中的齐墩果酸还具有抗炎、增强免疫功能、纠正体内异常蛋白代谢、防止肝硬化等功能, 是治疗肝炎的有效药物^[1], 由于其高效低毒等特性近年来受到科学家和医学工作者越来越多的关注^[2-5]。陆生生物, 例如植物能进化出具有一定可塑性的新陈

收稿日期: 2015-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (J1210053, 31200463); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2572014DA04)

作者简介: 李思达 (1991—), 男, 本科在读, 研究方向为植物基因工程。Tel: 15046126413 E-mail: 526078982@qq.com

*通信作者 曾凡锁 (1980—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事林木遗传育种和生物技术方面的研究。E-mail: zengfansuo@126.com

代谢来适应环境的变化以及完成其生长发育进程,而这些过程需要合成大量类异戊二烯产物^[6-7]。其中高等植物通过异戊二烯基二磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)及其同分异构体烯丙基二磷酸合成出上千种类异戊二烯化合物和派生物^[8]。植物通过 2 个相互独立的通路合成 IPP 和烯丙基二磷酸:甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径,定位于细胞质基质^[9-10];甲基赤磷酸盐途径,定位于质体^[11-12]。MVA 代谢途径是萜类化合物生物合成的重要途径^[13]。通过该途径形成了植物中的倍半萜、三萜和甾醇等。在 MVA 代谢途径中,先由 3 分子乙酰辅酶 A (acetyl-coenzyme A, CoA) 缩合成 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA, HMG-CoA), 该反应在 Fe^{2+} 和质体醌(quinone)的辅助下由乙酰辅酶 A 酰基转移酶(acetyl-CoA acetyltransferase, AACT)和 HMG-CoA 合成酶(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA synthase, HMGS)共同催化完成^[14];随后, HMG-CoA 还原酶(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase, HMGR)催化 HMG-CoA 不可逆地形成具有 6 个碳原子的中间体甲羟戊酸(MVA), NADPH 为该反应的供氢体;在 ATP 和二价金属离子的参与下,甲羟戊酸激酶(mevalonate kinase, MK)和磷酸甲羟戊酸激酶(phosphomevalonate kinase, MPK)将 MVA 磷酸化,形成 MVAP 和 MVAPP;最后, MVAPP 在焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶(pyrophosphomevalonate decarboxylase, MDC)的作用下脱羧形成 IPP^[15]。目前已经明确的是 HMGR 是催化 MVA 通路的主要限速酶,对调控 MVA 途径至关重要^[16]。

前期研究表明,白桦酯醇和齐墩果酸等三萜类物质可以在白桦愈伤组织中积累^[17]。但是白桦产生萜类化合物的 MVA 代谢途径中白桦 HMGR (BpHMGR) 基因的表达模式尚不清楚。本实验重点研究 MVA 代谢途径中关键基因 BpHMGR 及其编码蛋白的特性,以及 BpHMGR 基因的节律表达模式,同时揭示其对外源信号分子 NO 的响应,为进一步研究 BpHMGR 基因的调控模式及其在 MVA 途径中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和处理

材料经笔者鉴定为长势良好的 2 年生白桦 *Betula platyphylla* Suk. 的幼苗。将白桦苗置于气候培养箱中培养,设置 12 h 光照和 12 h 黑暗的光

周期变化,连续培养 3 d 后取样。选取有代表性的叶片,液氮速冻,每隔 3 h 为一个时间点,连续 24 h。

外源 NO 处理以白桦悬浮细胞为实验材料,按 50 g/L 接种量接种于 100 mL B5 液体培养基中,培养条件为 120 r/min, 25 °C, 光照强度 2 000 lx, 光周期 16 h, 湿度 40%~50%, 培养周期 10 d。培养基为 B5 基本培养基,附加激素及质量浓度为 0.2 mg/L 6-BA 和 0.6 mg/L TDZ, 蔗糖 20 g/L, 酸水解酪蛋白 1 g/L, pH 5.5~6.0, 121 °C 高温高压灭菌 20 min。

硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)购自美国 Sigma 公司,溶于灭菌蒸馏水中后经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,在白桦悬浮细胞培养至第 8 天时添加至培养基中,终浓度 1 mmol/L,添加后 6、12、24、48、72 h,收获细胞,以同时期添加等体积灭菌水的材料为对照。每个处理重复 3 次。NO 清除剂 cPTIO [2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide potassium salt] 为 NO 专一性猝灭剂,亚铁氰化钾(potassium ferrocyanide, KFeCN)为 SNP 类似物,但不提供 NO,二者均购自美国 Sigma 公司,分别溶于灭菌水中并经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后添加入液体培养基中,其中 cPTIO 终质量浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$,于添加 SNP 前 30 min 加入, KFeCN 终浓度与最佳 SNP 终浓度相同。

1.2 BpHMGR 基因编码区全长的克隆

以白桦叶片作为材料,应用 CTAB 法提取总 RNA^[18-19]。应用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。应用 Clontech 公司 SMARTer™ RACE cDNA Amplification 试剂盒获得 BpHMGR 基因全长序列(RACE 引物见表 1)。应用凝胶回收试剂盒对特异性扩增产物回收纯化,纯化产物与 pMD18-T 载体连接,转化克隆进入 JM109 感受态细胞,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 BpHMGR 基因编码区序列的生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件对获得的 BpHMGR 基因的核苷酸序列进行分析,并推测其蛋白质编码氨基酸序列^[20]。使用 ProtParam 在线分析软件分析 BpHMGR 基因编码蛋白的理化性质^[21]。利用 ProtScale 在线分析软件中的 Kyte and Doolittle 算法分析 BpHMGR 蛋白的亲水/疏水性^[22]。使用 SignalP 在线分析工具的神经网络预测并分析 BpHMGR 蛋

表 1 实时荧光定量 PCR 采用的引物序列

Table 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR

引物名称	引物序列
Tu-sense	5'-TCAACCGCCTTGTCTCTCAGG-3'
Tu-anti	5'-TGGCTCGAATGCACTGTTGG-3'
BpHMGR-sense	5'-CCTCCTTCATCTACCTCCTTGCT-3'
BpHMGR-anti	5'-CTTGATCATCTCCTCGTCCTCTTC-3'
5'RACE 引物	5'-GTGAGGTGCACTCCAACCATCACC-3'
3'RACE 引物	5'-CCTCGCTGGCACCACCTTGTCTCC-3'
P1 (5'RACE 的 5'-CGCATCGCCAGTGCTGCAGC-3' 下游引物)	
P2 (3'RACE 的 5'-GCACCAACCGAGGGTGCAAGG-3' 上游引物)	

白的信号肽^[23]。使用 TMPred 在线工具预测和分析 BpHMGR 蛋白的跨膜结构^[24]。使用 COILS 在线分析工具预测和分析 BpHMGR 蛋白的卷曲螺旋^[25]。使用 wolf psort 在线工具对 BpHMGR 蛋白进行亚细胞定位分析^[26]。应用 GOR4 软件分析蛋白的二级结构^[27]。利用 NCBI 数据库 Conserved Domain Search Service (CD Search) 在线分析软件分析 BpHMGR 的保守结构域^[28]。应用 NCBI 数据库 Blast 对 BpHMGR 氨基酸序列进行同源序列比对, 搜索不同物种中的同源基因及蛋白。先采用 ClustalX 将氨基酸序列进行多序列比对分析, 然后利用 MEGA 5.0 软件, 算法为 Neighbor-Joining, 自检举 1 000 次, 构建系统发育进化树^[29-31]。

1.4 BpHMGR 基因的实时荧光定量 PCR 表达特性分析

以白桦微管蛋白基因 Tu 作为内参基因 (Genbank: FG067376), 引物分别为 Tu-sense 和 Tu-anti, BpHMGR 实时定量引物分别为 BpHMGR-sense 和 BpHMGR-anti (表 1)。实时荧光定量 PCR 所用试剂盒为 SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus (code No. QPK-212T) 购自于 TOYOBO 公司。PCR 反应体系: 模板 cDNA 2 μ L, Master Mix 10 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 用 ddH₂O 补足至总体积 20 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 30 s; 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 82 $^{\circ}$ C, 1 s 用于读板, 共 45 个循环。目标基因表达水平按照阈值 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算, 相对表达水平通过 SNP 处理与相应对照的比值来计算。以对照为 1 计算相对表达量。

1.5 齐墩果酸 HPLC 测定方法^[17]

将 SNP 及 cPTIO 处理后的材料置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中烘干 24 h 至恒定质量后称量, 进行齐墩果酸的提取与测定。在 5 mL 量瓶中, 放入 5.0 mg 齐墩果酸对照品 (批号 110709-200505, 购自中国食品药品检定研究院), 用 95%乙醇溶解并定容, 用 0.45 μ m 微孔有机滤膜滤过, 即得到质量浓度为 1 mg/mL 的齐墩果酸对照品溶液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏保存。取上述对照品溶液, 配成浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的溶液进样分析。根据流动相乙腈-水 (90:10), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为室温, 进样量 10 μ L, 检测波长 210 nm 的条件测定各质量浓度对照品峰面积, 纵坐标为峰面积, 横坐标为进样质量浓度 (mg/mL), 测定标准曲线, 建立回归方程为 $Y=106X+6\,903.1$, $r^2=0.999\,9$, 在测定范围内, 峰面积与质量浓度成线性相关。精密称取样品粉末 0.5 g, 以及少许适量沸石倒入 100 mL 圆底烧瓶中, 加入盐酸-乙醇溶液 (2:8) 25 mL, 90 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热回流 3 h, 放冷, 滤过, 量取滤液 15 mL, 再加入 15 mL 蒸馏水, 置于 80 $^{\circ}$ C 水浴上蒸去乙醇, 所剩溶液用乙醚萃取 3 次, 每次 20 mL, 低温 40 $^{\circ}$ C 蒸干获得的乙醚提取液, 用 1 mL 甲醇溶解所得残渣, 用 0.45 μ m 微孔有机滤膜滤过, 按照上述色谱条件测定样品中齐墩果酸的量。

2 结果及分析

2.1 BpHMGR 基因的氨基酸序列理化性质分析

HMGR 是 MVA 代谢途径中的第一个重要限速酶, 是 MVA 途径中的重要调节点。利用 CTAB 法提取白桦总 RNA, 以白桦 cDNA 为模板, 经过 RACE-PCR 方法, 获得了一条 1 764 bp 全长序列, 编码蛋白含有 587 个氨基酸。序列包含完整开放阅读框, 命名为 BpHMGR, 并已上传至 NCBI, 登录号为 KJ452334。对 BpHMGR 的氨基酸序列的理化性质进行分析, BpHMGR 蛋白的等电点 (pI) 6.76; 不稳定系数 40.85, 为不稳定蛋白 (不稳定系数小于 40 时, 预测蛋白质稳定, 反之则不稳定)。总平均疏水性为 0.011, 说明该蛋白为疏水性蛋白。蛋白质亲疏水性氨基酸的组成是蛋白质折叠的主要驱动力, 通过亲水性预测可以反映蛋白质的折叠情况。对 BpHMGR 蛋白进行亲水/疏水性分析 (>0.5 的区域为疏水区, <-0.5 的区域为亲水区, 0.5~-0.5 主要为两性区域), 结果表明 BpHMGR 蛋白共有 36 个疏水区和 28 个亲水区。

2.2 信号肽、亚细胞定位及跨膜结构的预测和分析

信号肽是 N 端的一段氨基酸序列,指导分泌性蛋白到内质网膜上合成,在蛋白质合成结束之前被切除,信号肽位于蛋白质的 N 端,一般由 16~26 个氨基酸残基组成,其中包括疏水核心区、信号肽的 C 端和 N 端。对 BpHMGR 蛋白进行预测。结果表明,BpHMGR 蛋白可能不存在信号肽。分析 BpHMGR 蛋白的亚细胞定位位置,BpHMGR 蛋白在细胞膜和内质网的得分较高,都为 6,因此,BpHMGR 蛋白可能在细胞膜和内质网上起作用。

跨膜结构是蛋白质与膜内在蛋白的静电相互作用和氢键键合相互作用与膜结合的一段氨基酸片段,一般由 20 个左右的疏水性氨基酸残基组成,主要形成 α -螺旋。对 BpHMGR 蛋白进行跨膜结构分析。结果表明,BpHMGR 蛋白有 12 个跨膜结构域。其中,由内到外的跨膜结构域有 6 个,分别位于 58~77 位、98~116 位、237~256 位、443~472 位、511~529 位和 543~566 位,分数分别为 2 032、2 241、608、616、291 和 1 438;由外到内的跨膜结构域有 4 个,分别位于 58~77 位、98~115 位、238~259 位、443~467 位、509~532 位和 543~565 位,分数分别为 2 223、2 169、1 003、770、16 和 1 546 (分

数>500 为显著跨膜结构)。经 N-terminus outside 模型分析表明,其中由内到外的 98~116 位、443~472 位和由外到内的 58~77 位、238~259 位、543~565 位具有强烈的跨膜螺旋结构。据此分析,BpHMGR 蛋白既有由内到外的跨膜能力,又有由外到内的跨膜能力(图 1)。

2.3 BpHMGR 蛋白的二级结构预测与分析

对 BpHMGR 蛋白的二级结构进行分析。BpHMGR 蛋白都是由 α 螺旋(alpha helix)、延伸链(extended strand)、无规卷曲(random coil)所组成,并且分布于整个蛋白。其中, α 螺旋占 30.49%,延伸链占 18.74%,无规卷曲占 50.77%(图 2)。

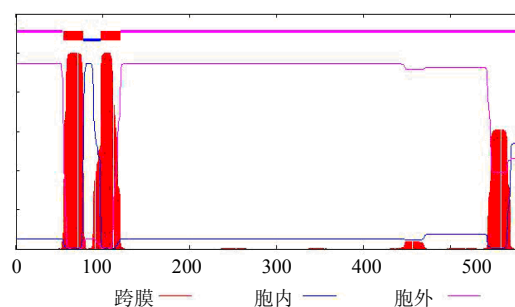


图 1 BpHMGR 蛋白跨膜结构域预测和分析

Fig. 1 Transmembrane domain prediction and analysis of BpHMGR protein

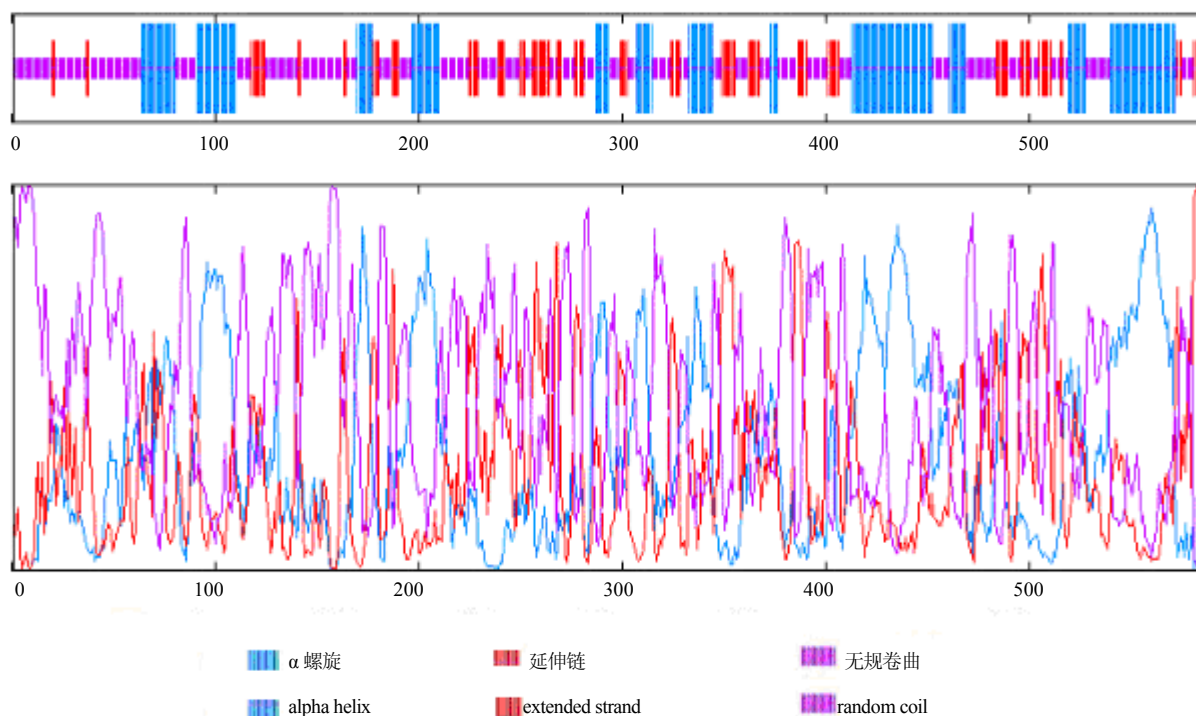


图 2 BpHMGR 蛋白二级结构预测

Fig. 2 Secondary structure prediction of BpHMGR protein

2.4 BpHMGR 蛋白的三维结构预测

对 BpHMGR 蛋白进行三级结构同源建模, 用 Swiss-PdbViewer 软件对建模结果进行处理。BpHMGR 蛋白同源建模结果如图 3 所示。同时, 利用软件的 α -碳与酰胺平面交角图功能, 可以找到 1 个残基与 1 个特定平面的构象角(二面角), 通过分析二面角, 可以判断一个模型的质量。蛋白的二面角分析结果表明, BpHMGR 蛋白结构不稳定。



图 3 BpHMGR 蛋白三级结构预测

Fig. 3 Tertiary structure prediction of BpHMGR protein

2.5 BpHMGR 蛋白结构域预测

根据催化残基、辅酶结合位点、底物结合袋、抑制剂结合位点、四聚体接口对 BpHMGR 蛋白的保守结构域进行预测。发现其含有植物 HMGR 基因具有的保守序列: NADPH 结合位点“DAMGMNM”和“GTVGGGT”, 只显示其重要功能的结合基序。同时包括 2 个底物 HMG-CoA 的结合位点“ELPIGYVQLP”和“TTEGCLVA”, 其中, TTEGCLVA 中的谷氨酸(Glu)在 HMGR 催化中起着重要作用^[32]。初步证明 BpHMGR 具有酶促活性, 判断该编码蛋白的结构域应当都属于 HMG-CoA reductase 超家族(图 4)。

2.6 BpHMGR 蛋白氨基酸序列比对及系统进化分析

对 BpHMGR 氨基酸序列进行同源序列比对并构建系统进化树。Blastp 比对结果如表 2 所示, BpHMGR 蛋白与荔枝、蓖麻、橡胶树、毛果杨、大豆、苜蓿的蛋白一致性较高, 说明同源性较高。

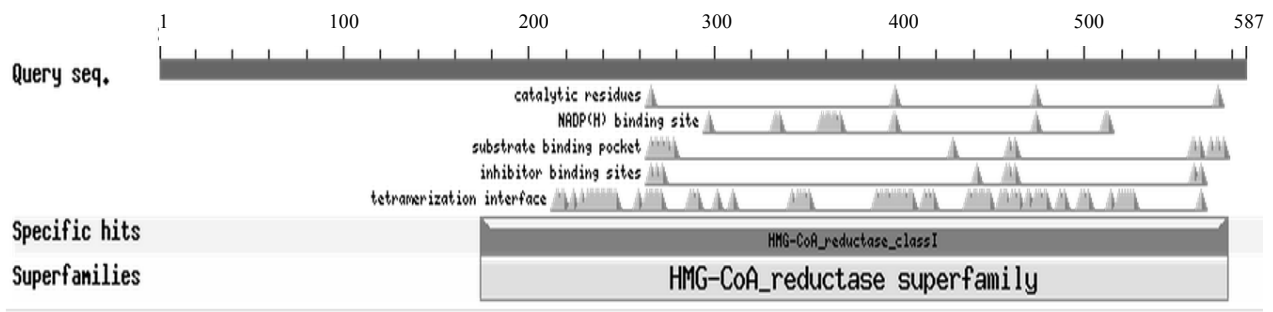


图 4 BpHMGR 蛋白保守结构域预测

Fig. 4 Prediction of conserved domain of BpHMGR

表 2 BpHMGR 基因序列与其他物种同源比对

Table 2 Homology comparison on BpHMGR gene sequence with other species

物种	登录号	比对得分	与 BpHMGR 蛋白的一致性比率/%
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	XP_002510732.1	979	82
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	XP_002301898.1	973	80
橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i>	AAU08214.1	952	82
荔枝 <i>Litchi chinensis</i>	ABF56518.2	947	84
杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	AAV54051.1	947	77
大豆 <i>Glycine max</i>	XP_003519474.1	946	79
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	XP_002275827.1	938	80
苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	XP_003617066.1	930	79
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	AAB87727.1	919	73
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	XP_004146762.1	914	80
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_177775.2	910	75
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	XP_004232593.1	908	72

将 BpHMGR 氨基酸序列与之构建系统进化树 (图 5)。分析系统进化树结果表明, HMGR 蛋白主要聚为 3 类, 其中, BpHMGR 与大豆、苜蓿亲缘关系较近, 聚为一类; 橡胶树、蓖麻、毛果杨、拟南芥、黄瓜和荔枝聚为一类; 杜仲、烟草和番茄聚为一类。

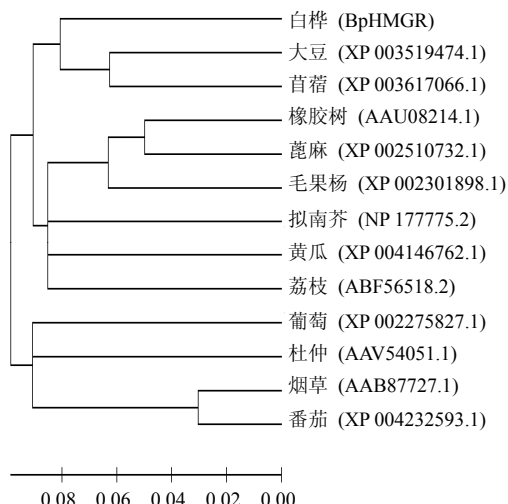


图 5 BpHMGR 蛋白系统进化树的构建

Fig. 5 Phylogenetic tree of BpHMGR protein

2.7 BpHMGR 基因节律表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 BpHMGR 基因进行相对定量表达。横坐标表示不同的时间点, 纵坐标表示各类关键基因的相对表达量, 以零点时的数据为基准点。如图 6 表示 BpHMGR 在 24 h 的相对表达量情况, 0:00 表达量最低, 之后开始上升, 当 6:00 给予光照处理时相对表达量开始降低, 12:00 时达到最低点, 之后开始上升, 18:00 时给予黑暗处理后相对表达趋于缓和, 21:00 达到最大值, 为 12:00 时的近 20 倍。

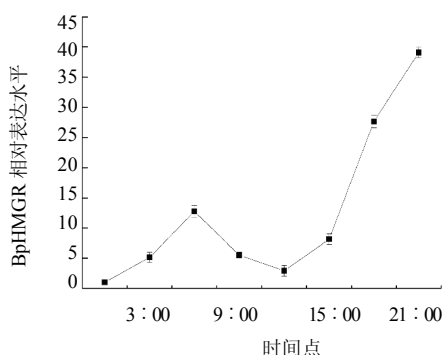
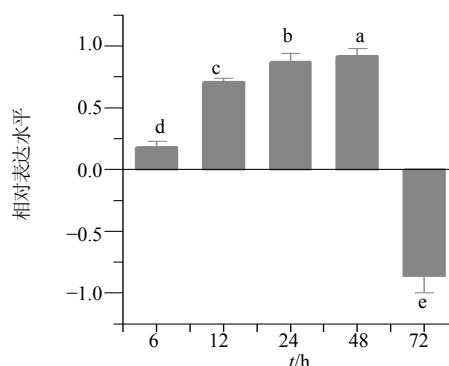


图 6 BpHMGR 不同时间的节律表达特征

Fig. 6 Expression characteristics of BpHMGR at different time points

2.8 BpHMGR 基因对外源 NO 信号的响应

白桦三萜合成关键酶 HMGR 是 MVA 途径的限速酶。外源 NO 诱导过程中 BpHMGR 基因相对对照的表达情况见图 7 (图中显示的数值为处理数值与对照数值的差值, 结果为正说明表达水平上调, 为负说明表达水平下调)。SNP 处理后 BpHMGR 基因表达水平表现为先上升后下降的趋势, 仅 72 h 低于对照, 48 h 表达量最高。KFeCN 和 cPTIO 加 SNP 处理组 12 h 虽然导致 BpHMGR 基因表达上调, 但是表达水平均显著低于 SNP 处理 (图 8)。综上可知, 外源 NO 诱导了三萜合成途径中关键酶基因 BpHMGR 的上调表达。



不同字母表示 0.05 显著水平, 下同

Different letters indicate differences in the level of 0.05, same as below

图 7 外源 NO 对 BpHMGR 基因表达的影响

Fig. 7 Effects of exogenous NO on expression of BpHMGR gene

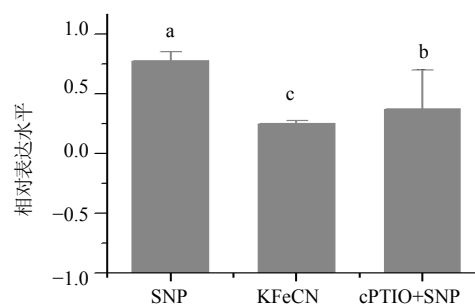


图 8 SNP、KFeCN、cPTIO+SNP 处理后 BpHMGR 的表达
Fig. 8 Expression of BpHMGR after treatment of SNP, KFeCN, and cPTIO + SNP

2.9 施加 SNP 对白桦细胞齐墩果酸量的影响

以终浓度为 1 mmol/L SNP 对白桦悬浮细胞进行处理, KFeCN 处理 12 h 细胞内齐墩果酸量并没有升高, 表明 SNP 释放 NO 后的残余成分对齐墩果酸量没有促进作用 (图 9)。cPTIO 预处理可清除 SNP 释放的 NO, SNP+cPTIO 处理 12 h, 细胞内齐墩果

酸量与对照持平 (图 9)。SNP 处理 12 h 齐墩果酸量为 1.308 9 mg/g, 是对照组 5.69 倍, 这与 SNP 对白桦中 BpHMGR 基因的促进表达结果一致, 初步说明外源 NO 影响了白桦细胞内三萜代谢途径的关键酶基因 HMGR, 进而调控了三萜产物齐墩果酸的合成。

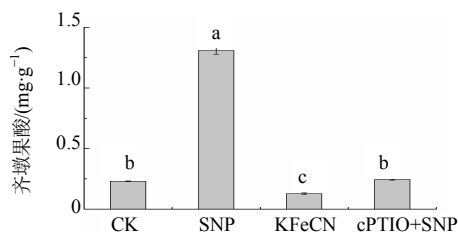


图 9 不同处理对白桦细胞齐墩果酸量的影响

Fig. 9 Changes of oleanolic acid content with treatment time

3 讨论

HMGR 催化类异戊二烯生物合成中 MVA 途径通路的第一步。在植物中, 这条通路为大量的类异戊二烯产物提供了前体, 这些类异戊二烯产物参与了多种生物功能, 包括参与膜的合成的甾醇类化合物的生成, 参与植物防御反应的倍半萜类植保素和类固醇配糖生物碱的合成, 调控生长和发育的油菜素内酯和细胞分裂素的合成, 蛋白法尼基和香叶基的异戊二烯化, 多萜醇的蛋白糖基化, 以及泛醌的呼吸作用等^[33-34]。已知的所有 HMGR 蛋白及其同源蛋白都锚定在内质网上, 并具有相同的膜拓扑结构^[35]。其 N 端区域以及保守催化结构域定位于细胞质, 而具有一个短的可伸展的氨基酸连接着细胞腔的 2 个跨膜区。这个与植物内细胞溶质中 MVA 的生物合过程完全一致^[35-36]。

植物的 HMGR 在 MVA 通路中起到了关键的调控作用, 不仅仅是对于植物的正常生长发育, 同时也是植物适应环境条件所必须的。与此一致的, 植物 HMGR 受到大量内源信号以及外援刺激的调控, 例如, 植物激素、钙、钙调蛋白、光、类异戊二烯生物合成的抑制、化学刺激、伤口、诱导子处理以及病原体攻击^[12, 33]。研究表明, HMGR 活力的调控应该决定在转录水平, 然而有人提出, HMGR 活力如果是转录后水平的调控, 调控的效果会更快更好^[34]。近期的研究表明, 拟南芥中蛋白磷酸激酶 2A (PP2A) 通过 5 个 β 蛋白家族成员在包括转录后等多水平调控 HMGR 的活力。但是这种调控方式并不常见^[7]。

本研究中, 获得了 BpHMGR 基因全长 1 764 bp, 推测其编码蛋白含有 587 个氨基酸, 为疏水性不稳定

蛋白, BpHMGR 基因具有跨膜结构域, 不存在信号肽。BpHMGR 蛋白可能在细胞膜和内质网上起作用, 属于 HMG-CoA reductase 超家族。Green 等^[37]的结果表明 8:00 到中午期间, 花卉中 HMGR 基因表达减少。其他的 MVA 基因如 HMGS、PMK、IDPI 在 20:00 时的表达量最高。这与本实验结果 (图 6) 类似, 当 6:00 给予光照处理后 BpHMGR 相对表达量开始降低, 12:00 时达到最低点, 18:00 时给予黑暗处理后, BpHMGR 基因的表达量开始增加, 在 21:00 达到最大值。这是因为光负调控 MVA 途径, MVA 途径中的限速酶 HMGR 在光下迅速下调。同时 HMGR 酶活性在光下迅速降低^[38]。当黑暗处理后 BpHMGR 基因开始积累, 在 21:00 时达到最大值。本研究结果表明 BpHMGR 的表达呈现出昼夜周期性节律变化, 在 21:00 时达到峰值。

Wu 等^[39]实时荧光定量 PCR 分析表明, NO 可以显著上调 HMGR 的表达。同时, SNP 处理 6 h 后, HMGR 的表达量为对照的 2.5 倍; 处理 12 h 后为对照的 3.4 倍。表现为随着处理时间的延长, HMGR 的表达量逐渐升高。这与本实验结果 (图 7) 类似, 在用 SNP 处理后 BpHMGR 的表达量逐渐上升, 在 48 h 达到最大值。该结果表明, 外源 NO 能够促进 BpHMGR 上调表达。本实验研究了生物节律及外源 NO 诱导对白桦 BpHMGR 表达模式和三萜量的影响, 为进一步研究 BpHMGR 基因的调控模式, 以及其在 MVA 途径中的作用奠定了基础。

参考文献

- [1] 田丽婷. 齐墩果酸药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 884-886.
- [2] Hess S C, Brum R L, Honda N K, et al. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia Divergens* (Vochysiaceas) [J]. *J Ethnopharmacol*, 1995, 47(1): 97-100.
- [3] Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie R E, et al. Anti-AID Sagents 11 betulinic acid and platonic acids as anti HIV principles from *Syzygium claviflorum* and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(2): 243-247.
- [4] Pisha E, Chai H, Lee I S, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that function by induction of apoptosis [J]. *Nat Med*, 1995, 1(10): 1046-1051.
- [5] 刘志芹, 张庆云, 宋丽杨, 等. 白桦皮和白桦叶体外抗真菌作用研究 [J]. 天津药学, 2004, 16(3): 3-4.
- [6] Doblas V G, Amorim-Silva V, Posé D, et al. The SUD1 gene encodes a putative E3 ubiquitin ligase and is a

- positive regulator of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(2): 728-743.
- [7] Leivar P, Antolin-Llovera M, Ferrero S, *et al.* Multilevel control of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A [J]. *Plant Cell Online*, 2011, 23(4): 1494-1511.
- [8] Bouvier F, Rahier A, Camara B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids [J]. *Prog Lipid Res*, 2005, 44(6): 357-429.
- [9] McGarvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1015-1019.
- [10] Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34(2): 95-106.
- [11] Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(2): 78-84.
- [12] Rodríguez-Concepción M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(3): 1079-1089.
- [13] Hey S J, Powers S J, Beale M H, *et al.* Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified HMG-CoA reductase [J]. *Plant Biotechnol J*, 2006, 4(2): 219-229.
- [14] Bach T J, Boronat A, Caelles C, *et al.* Aspects related to mevalonate biosynthesis in plants [J]. *Lipids*, 1991, 26(8): 637-648.
- [15] McGarvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1015.
- [16] Hemmerlin A, Harwood J L, Bach T J. A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? [J]. *Prog Lipid Res*, 2012, 51(2): 95-148.
- [17] 尹静, 詹亚光, 李新宇, 等. 不同树龄白桦的不同器官及其组培苗诱导的愈伤组织中白桦酯醇和齐墩果酸的分布和量变化 [J]. *植物生理学通讯*, 2009(6): 610-614.
- [18] 曾凡锁, 南楠, 詹亚光. 富含多糖和次生代谢产物的白桦成熟叶中总 RNA 的提取 [J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(5): 913-916.
- [19] 梁楠松, 周 珊, 李蕾蕾, 等. 小黑杨 bHLH 转录因子基因和启动子的克隆与分析 [J]. *经济林研究*, 2013(4): 58-66.
- [20] Huang Y, Zhang L. Rapid and sensitive dot-matrix methods for genome analysis [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(4): 460-466.
- [21] Burge C B, Karlin S. Finding the genes in genomic DNA [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8(3): 346-354.
- [22] Walker J M. *The Proteomics Protocols Handbook* [M]. Totowa: Humana Press, 2005.
- [23] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, *et al.* Signal P 4. 0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(10): 785-786.
- [24] Hofmann K, Stoffel W. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments [J]. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1993, 374: 166-169.
- [25] Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences [J]. *Science*, 1991, 252(5099): 1162-1164.
- [26] Horton P, Park K J, Obayashi T, *et al.* WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. *Nucl Acids Res*, 2007, 35(Suppl 2): W585-W587.
- [27] Sen T Z, Jernigan R L, Garnier J, *et al.* GOR V server for protein secondary structure prediction [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(11): 2787-2788.
- [28] Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson J B, *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins [J]. *Nucl Acids Res*, 2011, 39(Suppl 1): D225-D229.
- [29] 李 军, 张莉娜, 温珍昌. 生物软件选择与使用指南 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [30] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [31] 梁楠松, 曾凡锁, 李 博, 等. 硝普钠 (SNP) 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导的白桦 Ty1-copia 类逆转座子的克隆及分析 [J]. *东北林业大学学报*, 2013(10): 69-74.
- [32] 蒋 春, 张华玲, 彭 江. 尾巨桉 HMGR 基因的克隆及表达分析 [J]. *广西植物*, 2012, 32(1): 113-117.
- [33] Stermer B A, Bianchini G M, Korth K L. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants [J]. *J Lipid Res*, 1994, 35(7): 1133-1140.
- [34] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 1995, 46(1): 521-547.
- [35] Campos N, Boronat A. Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. *Plant Cell Online*, 1995, 7(12): 2163-2174.
- [36] Harpaz-Saad S, Azoulay T, Arazi T, *et al.* Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(3): 1007-1022.
- [37] Green S A, Chen X, Nieuwenhuizen N J, *et al.* Identification, functional characterization, and regulation of the enzyme responsible for floral (E)-nerolidol biosynthesis in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. *J Expl Bot*, 2011, 63(5): 1951-1967.
- [38] Vranová E, Coman D, Gruissem W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 318-333.
- [39] Wu S J, Qi J L, Zhang W J, *et al.* Nitric oxide regulates shikonin formation in suspension-cultured *Onosma paniculatum* cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(1): 118-128.