

陆英 HMGS 基因 cDNA 克隆、不同器官中的差异表达及生物信息学分析

姚元枝, 黎晓英, 郭文博, 刘宇, 魏麟*

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 克隆陆英 *Sambucus chinensis* 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGS) 基因并分析其差异表达。方法 采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 方法获得 HMGS 基因 cDNA 序列并对 HMGS 蛋白进行理化性质、蛋白二级结构及三维结构预测分析, 并预测了该蛋白功能; 利用 RT-PCR 方法检测了 HMGS 基因在陆英的根状茎、地上茎、叶、花中的表达情况。结果 克隆获得的 HMGS 基因 cDNA 全长为 1 401 bp, 编码 466 个氨基酸。生物信息学预测 HMGS 蛋白无跨膜区, 不含信号肽。HMGS 基因主要在陆英的花和根状茎中表达较高, 在叶中表达相对较低。结论 首次从陆英中克隆了 HMGS 基因, 为进一步阐明该基因在陆英萜类化合物代谢途径中的重要作用奠定基础。

关键词: 陆英; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶; 萜类化合物; 差异表达; 克隆

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)09-1578-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.022

cDNA cloning, difference expression in various organs, and bioinformatic analysis of HMGS gene in *Sambucus chinensis*

YAO Yuan-zhi, LI Xiao-ying, GUO Wen-bo, LIU Yu, WEI Lin

Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, 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 To clone 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthetase (HMGS) gene from *Sambucus chinensis* and analyze the difference expression. **Methods** The sequence of HMGS gene was cloned from *S. chinensis* by using RT-PCR strategy. The physiochemical properties, secondary structure, and three-dimensional structure of HMGS protein were forecasted and analyzed, and its structure and function were predicted. And the difference expression of HMGS gene in the rhizome, stems, leaves, and flowers of *S. chinensis* was analyzed by fluorescent quantitative PCR. **Results** The cDNA contains a 1 401 bp open reading frame and encodes a predicted protein of 466 amino acids. No transmembrane region and no signal peptide were present in HMGS protein. Relative real-time PCR analysis indicated that HMGS gene showed the higher transcript abundance was in the flowers and rhizomes, while was lower in the leaves. **Conclusion** The HMGS gene is first cloned from *S. chinensis* and the result will provide a foundation for elucidating the mechanism of the gene in the metabolism pathway of terpenoid in *S. chinensis*.

Key words: *Sambucus chinensis* Lindl.; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthetase; terpenoids; difference expression; clone

陆英 *Sambucus chinensis* Lindl. 又名接骨草、八棱麻、蒴藋等, 属于忍冬科 (Caprifoliaceae) 接骨木属 *Sambucus* L. 多年生草本植物。在国内分布广泛, 是一种传统中草药, 具有抗氧化^[1]、抗病毒^[2]和抗肿瘤^[3]等功效, 尤其对黄疸型和病毒性肝炎具有显著疗效^[4-6], 其发挥作用的主要成分均属萜类化

合物。在高等植物中, 萜类化合物主要由甲羟戊酸 (MVA) 途径合成, MVA 为萜类合成的前体。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (HMGS) 是 MVA 途径中的一个重要酶, 乙酰乙酰辅酶 A 与乙酰辅酶 A 在 HMGS 的催化下缩合成 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA)^[7]。目前, 已在拟南芥^[8]、橡

收稿日期: 2015-08-09

基金项目: 湖南省科技计划项目 (2011NK3045, 2013FJ6090); 湖南省生物类专业大学生创新训练中心资助

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: hhyaoz@163.com

*通信作者 魏麟, 博士, 副教授, 主要从事分子生物学研究。Tel: (0745)2851037 E-mail: hhweilin@163.com

胶树^[9]、长白杉、多花水仙^[11]、茶树^[12]、喜树^[13]等植物中成功分离、克隆到 HMGS 基因，而陆英 HMGS 基因未见任何报道。

本研究拟克隆陆英 HMGS 基因 cDNA 序列，利用生物信息学对其推导的氨基酸序列进行分析，检测该基因在不同组织器官中的表达特异性。为进一步研究该基因的分子调控机制并阐明其在陆英萜类合成途径中的重要作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品经怀化学院伍贤进教授鉴定为陆英 *Sambucus chinensis* Lindl.，种植于怀化学院植物园，于 2014 年 6 月 5 日采集同一株陆英的根状茎、地上茎、叶片、花等样品，洗净后，乙醇擦拭，经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理水及蒸馏水冲洗后，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、高保真 DNA 聚合酶 Prime STARHS DNA Polymerase、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 陆英根状茎、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，反转录产物合成后置于 -20 °C 保存备用。

1.2.3 引物设计 通过分析陆英高通量转录组数据，发现一个被注释为 HMGS 的转录本，同已报道的其他植物（人参、三七、可可、烟草、三叶胶等）HMGS 基因的核苷酸序列进行比对，应用 Oligo 6 软件设计引物。上游引物 HMGS-F: 5'-ATGGCCTC-ACAGCAAAA-3'; 下游引物 HMGS-R: 5'-TCAGT-GACCGTTGACCAGT-3'，由生工生物工程（上海）股份公司合成。

1.2.4 PCR 扩增 反应体系和反应条件参照文献报道^[14]，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 HMGS 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，挑选白色单克隆菌落 20 个，分别进行过夜培养，并提取质粒，然后送生工生物工程（上海）股份公司测序。采用 DNASTar 软件包分析与处理序列，在 NCBI 网站上 Blast 比对及 BioEdit 软件分析，并用 Mega6 软件^[15]进行 UPMAG 聚类分析。采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具对陆英 HMGS 基因编码蛋白的理化性质及结构与功能进行预测^[16-18]。

1.2.6 相对荧光定量 PCR 表达分析 利用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 的方法检测 HMGS 基因在陆英根（根状茎）、茎（地上茎）、叶、花中的相对表达量，采用美国 ABI7500 RT-PCR 检测系统，上游引物 qHMGS-F 序列为：5'-TGGCATTGACCCTAAA CA-3'，下游引物 qHMGS-R 序列为：5'-AATAGCTGCTGCTC-CTCC-3'。RT-PCR 检测的反应体系如下：5 μL 2×SYBR[®] PremixEx 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、5 min，95 °C、20 s，60 °C、20 s，72 °C、20 s，40 个循环，RT-PCR 反应以陆英 18 S rDNA 为内参，18 S rDNA 序列设计引物 18S-F: 5'-CGGAAGGTCTGG GTAATC-3'和 18S-R: 5'-ACGTAATCAACGCAAGCT-3'，产物大小为 147 bp，每个反应重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 陆英 HMGS 基因克隆

以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板，用引物 HMGS-F 和 HMGS-R 进行 PCR 扩增。电泳检测发现约在 1 401 bp 处有一条亮带见图 1。对 20 份重组质粒的插入片段进行测序，结果序列一致，确定陆英 HMGS 基因为单拷贝。序列经 Blast 确定为陆英 HMGS 基因序列，经 ORF Finder 预测，该序列含有一个完整的开放阅读框，推测编码 466 个氨基酸，见图 2。

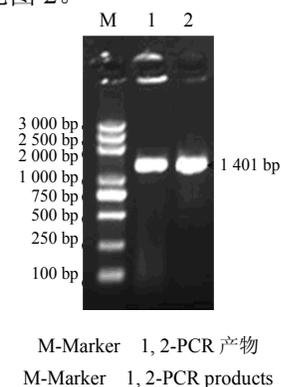


图 1 陆英 HMGS 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of HMGS in *S. chinensis*

```

ATGGCTTCACAGCAAAAAATGTTGGAATTTGCTATGGAAATCTACTTCCDDCTGCTTGTATCCAACAGGAATCGTTGGAGGCTC
M A S Q Q K N V G I L A M E I Y F P P A C I Q Q E S L E A
ATGATGGAGCTAGTAAAGGGAAATATACCATTGGGCTTGGACAAGATTGCATGGCAATTTTGTACTGAGGTGGAAGATGTCATCTCAATGA
H D G A S K G K Y T I G L G Q D C M A F C T E V E D V I S M
GCTTTCAGAGTTGTCATTTGCTGCTTGAGAAATATGGCAATGACCTTAAACAATTTGGTGGATGGAAGTAGCAGGAGGACTGTTATAG
S L T V V T S L L E K Y G I D P K Q I G R M E V G S E T V I
ACAAAGACAAATCCATCAAGACATTCCTTATGCAAATTTTGGAGACTGGGAAATACCGACATTGAAGGTGTTGACTCAACCAGTCTT
D K S K S I K T F L M Q I F E D C G N T D I E G V D S T N A
GCTADGGGGGACTGACGACTTGTCAACTGTGTCAATGGGTGGAGAGTAGTTCATGGGATGGGCGCTATGGACTTGTGTTTGCACAG
C Y G G T A A L F N C V N W V E S S S W D G R Y G L V V C T
ACAGTGGGCTTATGCCGAGGGACAGCTCGACCCADCGGAGGAGCAGCAGCTATTGCTATGCTAATAGGGCTGATGCTCTTATTGCAT
D S A V Y A E G P A R P T G G A A A I A M L I G P D A P I A
TTGAAAGCAAATTCAGGGGAGTCATATGCTCATGTATATGACTTTTACAACCCAACTTGCAGTGAATATCCGGTCTGCGATGGGA
F E S K F R A S H M S H V Y D F Y K P N L A S E Y P V V D G
AGCTTTACAAACTGTTACTTCTGTCATGGCACTGATTTGTTTCAAGCGTTTCTGTCACAAGTACGAAAATAGAAAGTAAACAGTTT
K L S Q T C Y L M A L D S C Y K R F C H K Y E K L E G K Q F
CAATGGCTGATGCTGATTAATTTGTTTCCATTC CCAATATAACAAGCTTGTTCAGAAGAGCTTTGCTAGATTAACTTCAACGACTTCT
S M A D A D Y F V F H S P Y N K L L V Q K S F A R L T F N D F
TAAGGAATACAGCTGTCGATGAAGTTGCTAAAGAAAAGCTGGTCCATTTTCAACTTTGACTGGTGACGAAAGTACCAAAGCCGCG
L R N T S S V D E V A K E K L V P F S T L T G D E S Y Q S R
ATTTGAAAAGGCATCCCAACAGTTCGCAAGCCCTTTATGATGCAAGGGTCAACCAACACTTTGATACCAAGCAAAATCGGAACA
D L E K A S Q Q V A K P L Y D A K V Q P T T L I P K Q I G N
TGTAACCTGCTCTCTTTATGCGGGCTTTCCTTATCCACAATAAGCATAGCAGCTGGATGGTAAATAGGGTAAATATGTTCTCAT
M Y T A S L Y A A F A S L I H N K H S T L D G N R V I M F S
ATGGGAGTGGGTTAATGCCACGATGTTTCAATCCATCTTTGGAAGGTCAACATCCCTTTAGCCTCTCAAATATGCAAGTGTGATGA
Y G S G L T A T M F S F H L C E G Q H P F S L S N I A S V M
ATGTTGCGGAGAGCTGAAGTCAAGGCATGATTTCTTCAGAAAATTTTGGAGAGCTTGAAGCTGATGGAGCATAGATATGGGGCAA
N V A E K L K S R H L P E K F V E T L K L M E H R Y G A
AAGACTTTGTACTAGCAAGGATGTAGCTTCTATCTCCAGGCADCTATCTCAGGAAAGTGCAGTCCATGTATAGAAGATTCTATG
K D F V T S K D C S L L S P G T Y Y L T E V D S M Y R R F Y
CCAAGAAGGACGGGACAAAATGAGAATGCAACACTGGTCAACGGTCACTGA
A K K D G D K T E N A T L V N G H *

```

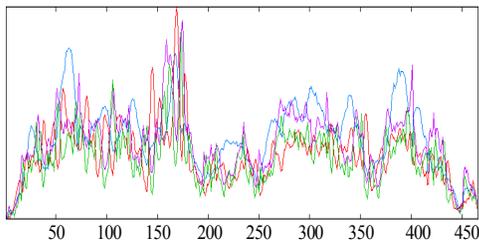
图 2 陆英 HMGS 基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleic acid sequence and supposed amino acid sequence of HMGS gene in *S. chinensis*

2.2 陆英 HMGS 基因编码蛋白特性分析

2.2.1 理化性质与细胞定位 陆英 HMGS 基因预测编码 466 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 C₂₃₀₅H₃₅₅₄N₅₉₆O₇₀₄S₂₈，相对分子质量是 51 776.8，等电点 (pI) 为 5.78。该蛋白的不稳定系数 (instability index) 为 40.65，属于稳定蛋白质。脂肪系数 (aliphatic index) 为 73.69，亲水性系数 (grand average of hydropathicity) 为 -0.226，该蛋白不含信号肽，不含跨膜区。

2.2.2 陆英 HMGS 的二级结构及三级结构预测 预测 HMGS 蛋白的二级结构如图 3 所示，该蛋白的二



蓝色-α-螺旋 红色-折叠 绿色-β-转角 紫色-卷曲
blue-α-helix red-turn green-β-extended strand purple-coil

图 3 HMGS 蛋白二级结构

Fig. 3 Secondary structure prediction of HMGS protein

级结构中 α-螺旋占 42.70%、β-折叠占 4.72%、无规则卷曲占 36.05%、自由延伸 16.52%。由 SWISS-MODEL 预测 HMGS 的三级结构如图 4 所示。

2.3 陆英 HMGS 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，陆英 HMGS 与人参、三七、可可、烟草、三叶胶、番茄、黄芪和丹参的 HMGS 蛋白质分子的相似度分别为 90.4%、90.2%、90.0%、86.2%、85.1%、85.1%、84.5% 和 84.0%，不同物种 HMGS 氨基酸序列同源性在 90.4%~84.0%。UPMAG 聚类分析表明，陆英与可可、人参和三七亲缘关系最近，与丹参亲缘关系相对较远，见图 5。

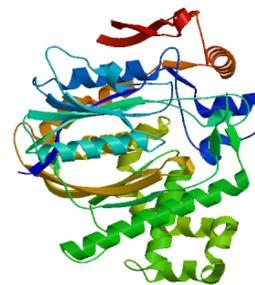


图 4 HMGS 蛋白三级结构

Fig. 4 Tertiary structure prediction of HMGS protein

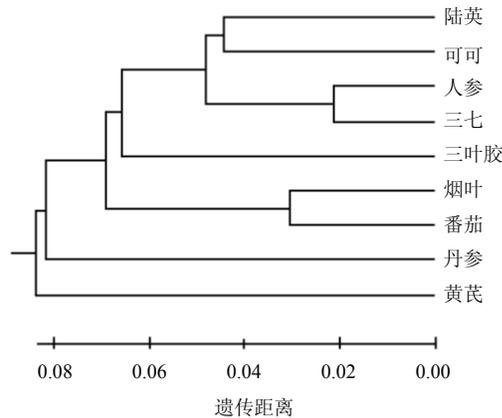


图 5 陆英与其他植物 HMGS 的 UPGMA 进化树

Fig. 5 UPGMA dendrogram of HMGS in *S. chinensis* and other plants

2.4 陆英 HMGS 基因的表达分析

利用 RT-PCR 检测 HMGS 基因在根状茎、地上茎、叶、花等器官中的表达特异性，结果表明该基因主要在根状茎和花中表达，在叶中的表达相对较低，见图 6。

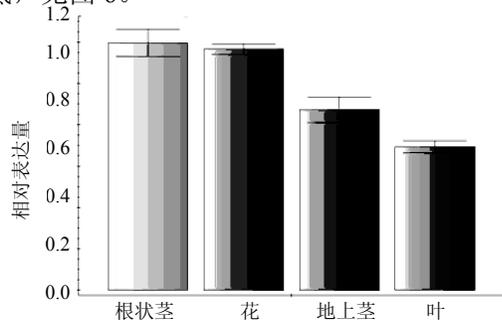


图 6 陆英不同组织中 HMGS 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression quantity of HMGS gene in different tissues of *S. chinensis*

3 讨论

HMGS 基因在很多植物中已被成功克隆，但在陆英中尚未见报道，本研究利用 RT-PCR 技术首次克隆了陆英 HMGS 基因的全长 cDNA 序列，其完整开放阅读框为 1 401 bp，编码 466 个氨基酸。对推导的氨基酸序列的结构和功能进行生物信息学分析，含有 HMGS 蛋白保守序列 GNTDIEGV DSTNACYGGTA，这是 HMGS 蛋白的典型特征，同时 HMGS 基因的同源序列在不同的物种中显示很强的保守性，该基因推测氨基酸序列与已报道植物的 HMGS 蛋白序列有很高的一致性（大于 80%），说明对 HMGS 的预测是完全可靠的。可见，克隆到的 HMGS 是陆英羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶基因。结果也提示 HMGS 蛋白质在不同植物生命活动过程中

发挥着相似的作用。陆英 HMGS 基因在根（根状茎）、花、茎（地上茎）、叶中的相对表达量分别为 1.197、1.167、0.872 和 0.693，由于 HMGS 是甲羟戊酸途径第 2 个催化酶，其产物（羟甲基戊二酸，CoA）经一系列酶促反应最终成为异戊烯焦磷酸，是萜类化合物的重要前体。以陆英的入药部位中萜类化合物的量来衡量药效，本实验结果 HMGS 基因相对表达量的差异可为陆英的入药部位的选取提供一定的理论依据。

植物萜类化合物具有重要的商业价值，被广泛用于工业、医药卫生等领域^[19]。萜类化合物是绝大部分中药材的重要药用成分之一，HMGS 在萜类化合物合成途径中发挥重要作用。研究表明，HMGS 的表达与相关萜类化合物的水平具有一定的相关性，逆境胁迫对 HMGS 的表达具有诱导作用^[20]。在药用植物中，HMGS 作为萜类化合物合成途径中的重要酶，其活性高低与量的多少决定着许多有效成分产量的多少。如何利用 HMGS 的表达提高有效药用活性成分在植株中的量，将成为提高中药材品质的有效手段。

因此，对陆英 HMGS 基因的克隆及进一步研究其在陆英中的功能和受调控的机制，并进一步构建陆英 HMGS 基因过表达载体和遗传转化体系，为实现重要药用成分在植株中高效表达，通过基因表达调控技术以控制植物萜类代谢流向挥发性萜类物质的合成从而提高陆英的药材品质具有重要意义。

参考文献

- [1] 吴丽霞, 吴铁松, 郑敏. 陆英煎剂对小鼠镇痛作用的实验研究 [J]. 今日药学, 2012, 22(8): 481-483.
- [2] 王文静, 王军, 饶高雄. 陆英的两种提取物对小鼠的抗炎镇痛作用 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26(3): 247-249.
- [3] 农朝赞, 黄华艺. 黄酮类化合物抗肿瘤作用的研究应用 [J]. 中国药房, 2004, 15(9): 568-569.
- [4] 王明时, 李景荣, 徐丽仙, 等. 陆英抗肝炎活性成分的化学研究 [J]. 南京药学院学报, 1985, 16(3): 15.
- [5] 黄电波, 黄清松. 陆英与乌索酸对大鼠全血黏度和红细胞沉降率的影响 [J]. 实用临床医学, 2012, 13(6): 10-12.
- [6] 曾琳玲, 杨威, 王茜莎, 等. 陆英颗粒对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤保护作用研究 [J]. 中国实用医药, 2007, 22(2): 12-14.
- [7] Bach T J, Boronat A, Caelles C, et al. Aspects related to mevalonate biosynthesis in Plants [J]. *Lipids*, 1991,

- 26(8): 637-648.
- [8] Montamat F, Guilloton M, Karst F, *et al.* Isolation and characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase [J]. *Gene*, 1995, 167(2): 197-201.
- [9] Suwanmanee P, Suvachittanont W, Fineher G B. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from *Hevea brasiliensis* (HBK) Mull [J]. *Arg Sci Asial*, 2002, 28(16): 29-36.
- [10] Wegener A, Gimbel W, Werner T, *et al.* Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1350: 247-252.
- [11] 李科, 何炎森, 陈晓静. 多花水仙 HMGS 基因的克隆 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2014, 25(3): 289-294.
- [12] 陈林波, 刘本英, 汪云刚, 等. 茶树 HMGS 基因的克隆与序列分析 [J]. 西北农业学报, 2013, 12(5): 72-76.
- [13] 王伟. 喜树毛状根培养体系的建立及喜树 hmgs 基因的克隆分析 [D]. 上海: 上海师范大学, 2009.
- [14] 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.
- [15] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [16] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(6): 195-201.
- [17] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(16): 3381-3385.
- [18] Guex N, Peitsch, M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(13): 2714-2723.
- [19] 占爱瑶, 由香玲, 詹亚光. 植物萜类化合物的生物合成及应用 [J]. 生物技术通讯, 2010, 21(1): 131-135.
- [20] 孙晋. 番茄萜类化合物生物合成途径相关酶基因的克隆与分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.