

• 药材与资源 •

金钗石斛中 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶基因的克隆及特征分析

李 清, 李 标*, 郭顺星*

中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 克隆金钗石斛 *Dendrobium nobile* 中 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGS) 基因 DnHMGS, 并进行生物信息学和表达分析。方法 采用反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)、cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术获得 DnHMGS 基因 cDNA 全长; 生物信息学分析编码蛋白的理化特性、结构域等特征; 用 DNASTAR、MEGA 软件分别进行氨基酸多序列比对和进化树构建分析; 借助实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测基因组织表达模式。结果 DnHMGS 基因全长为 1 816 bp (GenBank 注册号 KX789180), 编码一条由 474 个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量为 52 458.47, 等电点 5.98。DnHMGS 蛋白具有植物 HMGS 酶的典型结构域和活性中心, 与凤梨、稻、玉米等单子叶植物亲缘关系较近。DnHMGS 基因具有组织表达特异性, 接菌前, DnHMGS 转录本在金钗石斛叶中的表达量最高, 为根、茎中的 2 倍以上。但接菌后 DnHMGS 基因表达情况转变为茎>叶>根。结论 首次从金钗石斛中克隆得到 HMGS 基因的全长 cDNA, 该基因的分子鉴定为进一步揭示该基因在金钗石斛萜类物质合成代谢途径中的作用及菌根真菌影响石斛碱生物合成的调控机制奠定了基础。

关键词: 金钗石斛; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)12-2502-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.12.022

Molecular characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene from *Dendrobium nobile*

LI Qing, LI Biao, GUO Shun-xing

Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To clone and characterize a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGS) gene DnHMGS in *Dendrobium nobile*. **Methods** RT-PCR and RACE technologies were used for gene cloning. Characteristics including the physicochemical properties and conserved domain of the deduced DnHMGS protein were determined by a series of bioinformatics tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed by DNASTAR and MEGA softwares, respectively. qRT-PCR was employed to examine the tissue specific expression pattern of DnHMGS. **Results** The full length cDNA of DnHMGS was 1 816 bp (GenBank accession No. KX789180) and encoded a 474-amino-acid protein with a molecular weight of 52 458.47 and an isoelectric point (pI) of 5.98. The deduced DnHMGS protein, like other HMGS proteins, constituted typical domain and active site. Multiple sequence alignment and phylogenetic analyses demonstrated that DnHMGS was closely related to *Ananas comosus*, rice, and maize monocots. Proteins analysis revealed that DnHMGS was expressed in the three included organs. The transcripts were the most abundant in the leaves with more than twice that in the roots and stems. However, the expression of DnHMGS changed to stems > leaves > roots when *D. nobile* infected by *Mycena* sp. **Conclusion** The full length cDNA of DnHMGS is indentified from *D. nobile* for the first time. Molecular characterization of DnHMGS will be useful for further functional elucidation of the gene involving in isoprenoid biosynthesis pathway in *D. nobile*, and help us understand the molecular mechanism of *Mycena* sp. which

收稿日期: 2016-10-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31170314, 81473331)

作者简介: 李 清 (1991—), 女, 在读硕士, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: liqing9102@163.com

*通信作者 李 标, 研究员, 硕士生导师, 主要从事药用植物菌根分子生物学研究。E-mail: libiao@126.com

郭顺星, 研究员, 博士生导师, 主要从事药用植物菌根生物学研究。E-mail: sxguo1986@163.com

better encourages the biosynthesis of dendrobine.

Key words: *Dendrobium nobile* Lindl.; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; gene cloning; real time quantitative PCR

金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生附生草本植物, 也是历史上记载最早的石斛习用种类。其新鲜或干燥茎入药, 具有益胃生津、滋阴清热等功效, 是历代《中国药典》中药用石斛最重要的基源药材^[1]。现代研究发现, 石斛碱是金钗石斛最主要的有效成分, 具有显著的抗炎^[2]、抗肿瘤^[3]、抗白内障^[4]、降血糖^[5]等功效, 显示出广阔的应用和开发价值。然而, 石斛碱的量在金钗石斛中并不高, 远远无法满足市场的需求, 进一步加剧了金钗石斛野生资源的破坏, 因此, 通过基因工程手段提高金钗石斛中石斛碱的量意义重大。

石斛碱属倍半萜类生物碱, 具有基本的倍半萜骨架^[6]。甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径是倍半萜生物合成中 C5 单位的主要来源^[7], 因而, 深入研究该途径中的关键酶基因对促进石斛碱的合成尤为重要。

3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGS) 是 MVA 途径中的第一个关键酶, 可以催化 1 个乙酰辅酶 A 与乙酰乙酰辅酶 A 缩合成 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA, 该化合物可继续被 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR) 催化成甲羟戊酸 (mevalonic acid), 即萜类 5 碳单位异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 的前体^[8]。研究发现, HMGS 的活性与植物细胞中的类异戊二烯化合物如橡胶、树胶、乳干胶等的量呈正相关关系^[9]; 而通过过量表达 HMGS 基因, 灵芝三萜量、印度芥菜的甾醇量及其抗逆性可显著提高^[10-11]。由此可见, HMGS 对植物细胞类异戊二烯物质的合成及植物的生长发育至关重要。目前, 已有部分植物的 HMGS 基因被成功克隆, 如白木香^[12]、陆英^[13]、杜仲^[14]、果香菊^[15]、喜树^[16]、多花水仙^[17]。但对金钗石斛 HMGS 基因的研究仍处于空白。

本研究首次克隆了金钗石斛 HMGS (DnHMGS) 基因的 cDNA 全长, 对其序列进行生物信息学分析, 并通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 考察该基因在金钗石斛接菌与不接菌处理下根、茎、叶中的表达和积累情况, 为解析金钗石斛石斛碱合成机制及菌根真菌对金钗石斛石斛碱合成的影响奠定基础, 为该领域的研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 无菌组培苗和小菇真菌 *Mycena* sp. 均由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所郭顺星研究员鉴定并在本实验室保存。选取在 1/2 MS 培养基上生长到 3~5 cm 的金钗石斛无菌苗, 将 PDA 培养基上纯培养的小菇真菌菌块接种于其中, 24~26 °C, 光照 1 500 lx, 光照时间 10 h/d 条件下继续培养。9 周后取样, 冻于液氮中。以不接菌处理为对照。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 RNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN, 德国) 操作说明制备各样品总 RNA, Nano Drop[™] 2000 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 分析 RNA 质量、纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。按照 Prime Script[™] RT Reagent Kit (Takara, 日本) 操作说明, 逆转录合成 cDNA, -20 °C 保存备用。

1.3 RACE 与 RT-PCR 验证

通过 NCBI 的 BlastX 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf.html>) 分析, 发现 1 条 1 986 bp 的 Unigene c90508-g3 序列被注释为 HMGS, 且具有完整的开放阅读框 (open readingframe, ORF) 和完整的 5'UTR。根据比对序列设计 1 条基因特异引物, 按照 SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本) 说明书进行 3'-RACE PCR 反应。以 1 μg 金钗石斛总 RNA 为模板, 利用 SMARTScribe[™] Reverse Transcriptase (Clontech, 日本) 进行逆转录合成 3'-RACE ready cDNA。3'-RACE 引物为 HMGS-F: 5'-CCTGC-GTCAGTCTAGTCATGTGGATGGC-3'。HMGS-F 与 UPM 引物结合, 按照试剂盒中 Program1 程序进行 3'-RACE。PCR 体系为 25 μL, 包括 2×SeqAmp[™] PCR Buffer 12.5 μL, SeqAmp[™] DNA Polymerase 0.5 μL, 3'-RACE ready-cDNA 1.25 μL, HMGS-F (10 μmol/L) 0.5 μL, 10×UPM 2.5 μL, ddH₂O 7.75 μL。PCR 产物经电泳分析, 回收目的条带。克隆并测序, 与原序列拼接后, 设计 ORF 引物 HMGS-ORF-F: 5'-TTGAGAAGGAGCCGACGAGAGG-3' 和 HMGS-ORF-R: 5'-TCCAAGCATATCACCATTGGCACTT-3' 以及 5'UTR 引物 HMGS-5'UTR-F: 5'-TTGAGAA-

GGAGCCGACGAGAGG-3' 和 HMGS-5'UTR-R: 5'-CACATGACTAGACTG-ACGCAGGAAG-3', 以金钗石斛茎 cDNA 为模板, Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase-Ex Taq[™] (Vazyme, 中国) 进行 RT-PCR。反应体系为 25 μ L, 包括 2 \times Phanta Max Buffer 12.5 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μ L, dNTP Mix 0.5 μ L (10 mmol/L), 正/反向引物 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C、3 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物经克隆、测序分析以验证基因 cDNA 全长的可靠性。

1.4 基因克隆和序列分析

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 (Aidlab, 中国) 纯化目的片段, 连接至 pTOPO-Blunt Vector (Aidlab, 中国), 转化大肠杆菌 Escherichia coli DN5 α 感受态细胞, 随机挑选 5 个克隆送金唯智公司测序。使用 BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、PRF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 进行分析 cDNA 序列; 用 ExPASy Protomics Server 的 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>) 和 PROSITE SCAN (<http://prosite.expasy.org/>) 在线分析 HMGS 蛋白质的结构域和基元; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 分析蛋白质理化性质和二级结构; 采用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 构建蛋白质三维建模; SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白质信号肽和跨膜区域; PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 进行蛋白质亚细胞定位分析。采用 DNASTAR 7.1 进行氨基酸序列对比分析; 借助 MEGA 6.0 构建系统进化树。

1.5 qRT-PCR 分析

分别用 500 ng 接菌/对照组金钗石斛根、茎、叶总 RNA 反转录成 cDNA, 以金钗石斛 actin 作为内参基因^[18], qRT-PCR 引物 HMGS-qPCR-F: 5'-GCGTT-CAGCAGGAATCATTAGAGG-3' 和 HMGS-qPCR-R: 5'-TCTCAAGCAAGGAAGTGACAAGTGT-3' 反应产生 161 bp 的扩增产物。将 cDNA 原液稀释 20 倍作为 qRT-PCR 反应模板。用 Light Cycler[®] 480II 实时荧光

定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 进行 qRT-PCR 反应。反应体系 15 μ L 包括 7.5 μ L 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Takara, 中国), 0.3 μ L 10 μ mol/L 正/反向引物, 1.5 μ L cDNA, 5.4 μ L ddH₂O。每个反应 3 个复孔, 3 次生物学重复。PCR 程序 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 40 个循环。反应结束绘制溶解曲线。根据 Light Cycler[®] 480 II HTC1 软件生成的循环阈值 (cycle threshold, C_t), 用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法^[19] 计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 DnHMGS 基因克隆和全长验证

通过 BlastX 分析比对可知原 Unigene 序列具有完整的 5'-UTR, 经过 3'-RACE 反应, 扩增产生长度约为 900 bp 的目标条带 (图 1)。克隆、测序获得 907 bp 的序列, 与原 Unigene 拼接分析获得一条 1 816 bp 的 cDNA。BlastX 分析表明其与 GenBank 中已注册的多种植物 HMGS 基因有较高的相似性 (>77%), 定名为 DnHMGS, 提交 GenBank 并获得注册号 (KX789180)。DnHMGS 基因的 ORF 长 1 425 bp, 5'-UTR 长 103 bp, 3'-UTR 长 288 bp。分别使用引物 HMGS-5'UTR-F/R 和 HMGS-ORF-F/R, 经 RT-PCR 扩增产生特异目的条带 (图 1), 克隆、测序, 前者获得一条 932 bp 的序列包括 5'-UTR, 后者获得一条 1 556 bp 的序列包含完整 ORF, 两者均与拼接序列一致, 进而验证成功获得 DnHMGS 基因的全长 cDNA。

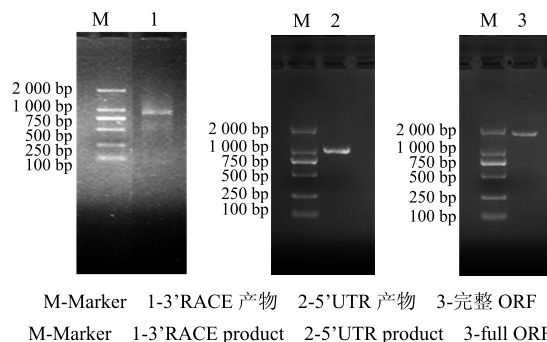


图 1 DnHMGS 基因经 RT-PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification of DnHMGS

2.2 DnHMGS 基因编码蛋白理化特性分析

ProtParam 预测 DnHMGS 基因编码蛋白的分子式为 C₂₃₄₅H₃₆₀₁N₆₀₇O₇₁₂S₂₄, 相对分子质量为 52 458.47, 等电点 5.98, 带负电残基 (Asp+Glu) 53, 正电残基 (Arg+Lys) 47, 该蛋白的不稳定系数 (instability index) 为 37.98, 属于稳定蛋白。脂肪系数 (aliphatic index) 为 74.51, 亲水性系数 (grand average of

hydropathicity, GRAVY) 为-0.230。用 SOPMA 对 DnHMGS 蛋白的二级结构进行预测,结果如图 2 所示, DnHMGS 蛋白的二级结构主要由 α -螺旋 (44.51%)、延伸链 (16.88%)、 β -转角 (9.07%) 和随机卷曲 (29.54%) 组成。 α -螺旋作为金钗石斛 DnHMGS 中最多的结构元件, 以无规卷曲散布于整个蛋白质中。

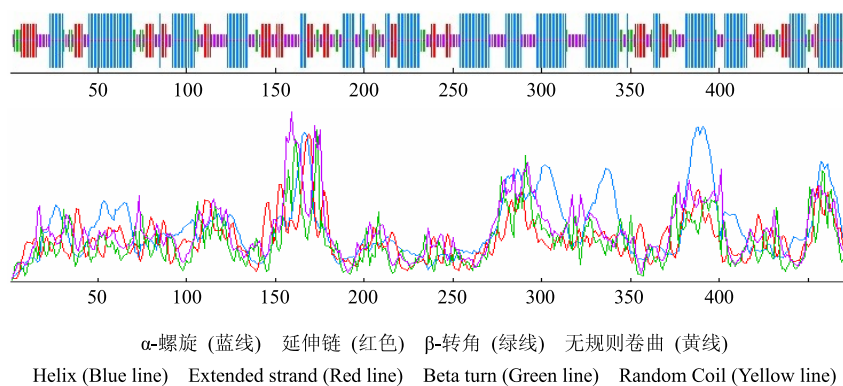


图 2 金钗石斛 DnHMGS 蛋白二级结构的预测

Fig. 2 Deduced secondary structure of DnHMGS protein

氨基酸残基就是 HMGS 酶活性中心最关键的氨基酸残基,符合已报道的植物 HMGS 蛋白的典型结构特征^[20]。

2.4 DnHMGS 蛋白信号肽、亚细胞定位、跨膜区预测分析

SignalP4.1 分析蛋白不含信号肽,与其他植物的 HMGS 蛋白预测结果一致^[21]。萜类代谢的 MVA 途径存在于细胞质中,可以推断,金钗石斛的 HMGS 酶在细胞质中合成后,不进行蛋白转运,保留在细胞质基质中,直接与代谢底物作用,参与萜类代谢合成。TMHMM2.0 分析结果显示, DnHMGS 蛋白不含跨膜结构域,由此推测该蛋白不经过跨膜转运,与信号肽分析相吻合。POSRT 预测蛋白定位于过氧化物酶体的可能性较高为 50.5%,定位于线粒体基质的可能性为 10.0%。

2.5 DnHMGS 蛋白三维建模

在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中,以蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中已提交的芥菜 *Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss. 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合酶 (PDB NO: 2f82) A 链晶体分子为模板,对 DnHMGS 蛋白进行三维结构建模 (图 3),结果显示 DnHMGS 蛋白与该蛋白有 54% 的序列相似,空间结构类似。

2.6 DnHMGS 基因编码蛋白的多序列比对分析

用 MegAlign 软件比较金钗石斛与海枣、欧洲

2.3 DnHMGS 编码蛋白结构域预测分析

利用 InterProScan 对蛋白结构域和功能位点进行分析,结果显示,从氨基酸残基的第 6 个位点到 177 位点处为 HMGS 蛋白的 N 端,第 178 个位点到 452 位点处为 HMGS 蛋白的 C 端。而在第 108~123 位点处是 HMGS 酶的活性中心,其中 120 位的 C

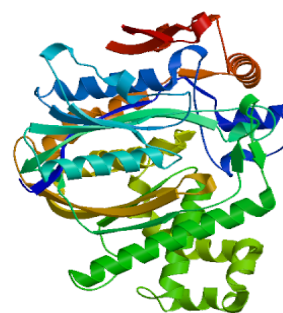


图 3 DnHMGS 蛋白三级结构的预测

Fig. 3 Deduced three dimensional structure of DnHMGS protein

水仙、凤梨、可可和野茶树 HMGS 基因编码的氨基酸序列,同源性均在 82% 以上。从图 4 中可以看出, DnHMGS 蛋白的功能域与其他植物 HMGS 蛋白的功能域有着几乎一致的氨基酸组成,具有 HMGS 活性所必须的典型的多肽位点,这一结果暗示功能结构域在分子进化中具有较高的稳定性和保守性。在 NCBI 的蛋白保守结构域数据库 (Conserved Domain Database, CDD) 中对金钗石斛 DnHMGS 预测蛋白的保守区进行分析,结果表明与该基因匹配的蛋白是羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶,整个蛋白基本都属于保守区。

2.7 DnHMGS 基因编码蛋白的系统进化树分析

进一步用 MEGA6.0 软件邻接法 (neighbor-joining) 构建 DnHMGS 与 20 条 HMGS 基因编码蛋白的系统进化树 (图 5)。从进化树结果可以看出,

DnHMGS	MDLKGKLVGILAMDYIFPPFCVQQE...SLEAFD...GASKGKYTI...GLGQDCMAFCTELEDVISM...SLTVVTS...LLEKYQIDPKQIGR	80
海枣 (XP_008777803.1)	MPE-RKDVGVILAMDYIFPPFCVQQE...ALEAVD...GASKGKYTI...GLGQDCMAFCTELEDVISM...SLTVVTS...LLEKYQIDPKQIGR	79
欧洲水仙 (AHF81872.1)	MPEKAKDVGILAMDYIFPPFCVQQE...ALEAVD...GASKGKYTI...GLGQDCMAFCTELEDVISM...SLTVVTS...LLEKYQIDPKQIGR	80
凤梨 (OAY65044.1)	MG--CKDVGILAMDYIFPPFCVQQE...ALEAVD...GASKGKYTI...GLGQDCMAFCTELEDVISM...SLTVVTS...LLEKYQIDPKQIGR	77
可可 (XP_007040101.1)	---MAKLVGILAMDYIFPPFCVQQE...ALEAVD...GASKGKYTI...GLGQDCMAFCTELEDVISM...SLTVVTS...LLEKYQIDPKQIGR	78
野茶树 (AFC34137.1)	MASQQKLVGILAMDYIFPPFCVQQE...ALEAVD...GASKGKYTI...GLGQDCMAFCTELEDVISM...SLTVVTS...LLEKYQIDPKQIGR	80
DnHMGS	LEVGSSEIVDKSKSIKTWLMNIFEEY...GNTDIEGV...DSTNAC...YGGTAAL...FNCVNWV...ESSWDGRYGLV...VCTDSAVYAE...GPAR	160
海枣 (XP_008777803.1)	LEVGSSEIVDKSKSIKTWLMNIFEEY...GNTDIEGV...DSTNAC...YGGTAAL...FNCVNWV...ESSWDGRYGLV...VCTDSAVYAE...GPAR	159
欧洲水仙 (AHF81872.1)	LEVGSSEIVDKSKSIKTWLMNIFEEY...GNTDIEGV...DSTNAC...YGGTAAL...FNCVNWV...ESSWDGRYGLV...VCTDSAVYAE...GPAR	160
凤梨 (OAY65044.1)	LEVGSSEIVDKSKSIKTWLMNIFEEY...GNTDIEGV...DSTNAC...YGGTAAL...FNCVNWV...ESSWDGRYGLV...VCTDSAVYAE...GPAR	158
可可 (XP_007040101.1)	LEVGSSEIVDKSKSIKTWLMNIFEEY...GNTDIEGV...DSTNAC...YGGTAAL...FNCVNWV...ESSWDGRYGLV...VCTDSAVYAE...GPAR	157
野茶树 (AFC34137.1)	LEVGSSEIVDKSKSIKTWLMNIFEEY...GNTDIEGV...DSTNAC...YGGTAAL...FNCVNWV...ESSWDGRYGLV...VCTDSAVYAE...GPAR	160
DnHMGS	PTGGAAAIAMLIGPNAPIAFESK...YRGTHM...SHVYDFYK...PLASEY...PVVDGKLS...QTCYLMALD...SCYR...FCSKY...EKFEGK...QFS	240
海枣 (XP_008777803.1)	PTGGAAAIAMLIGPNAPIAFESK...YRGTHM...SHVYDFYK...PLASEY...PVVDGKLS...QTCYLMALD...SCYR...FCSKY...EKFEGK...QFS	239
欧洲水仙 (AHF81872.1)	PTGGAAAIAMLIGPNAPIAFESK...YRGTHM...SHVYDFYK...PLASEY...PVVDGKLS...QTCYLMALD...SCYR...FCSKY...EKFEGK...QFS	240
凤梨 (OAY65044.1)	PTGGAAAIAMLIGPNAPIAFESK...YRGTHM...SHVYDFYK...PLASEY...PVVDGKLS...QTCYLMALD...SCYR...FCSKY...EKFEGK...QFS	238
可可 (XP_007040101.1)	PTGGAAAIAMLIGPNAPIAFESK...YRGTHM...SHVYDFYK...PLASEY...PVVDGKLS...QTCYLMALD...SCYR...FCSKY...EKFEGK...QFS	237
野茶树 (AFC34137.1)	PTGGAAAIAMLIGPNAPIAFESK...YRGTHM...SHVYDFYK...PLASEY...PVVDGKLS...QTCYLMALD...SCYR...FCSKY...EKFEGK...QFS	240
DnHMGS	ISDADSVFVHSPYKLVQKSFARLY...FNDFLRN...SSVVDK...AREKLE...PFS...SL...S...NESY...QSRD...LERVS...QVAK...LYDE...KVO...PA	320
海枣 (XP_008777803.1)	ISDADSVFVHSPYKLVQKSFARLY...FNDFLRN...SSVVDK...AREKLE...PFS...SL...S...NESY...QSRD...LERVS...QVAK...LYDE...KVO...PA	319
欧洲水仙 (AHF81872.1)	ISDADSVFVHSPYKLVQKSFARLY...FNDFLRN...SSVVDK...AREKLE...PFS...SL...S...NESY...QSRD...LERVS...QVAK...LYDE...KVO...PA	320
凤梨 (OAY65044.1)	ISDADSVFVHSPYKLVQKSFARLY...FNDFLRN...SSVVDK...AREKLE...PFS...SL...S...NESY...QSRD...LERVS...QVAK...LYDE...KVO...PA	318
可可 (XP_007040101.1)	ISDADSVFVHSPYKLVQKSFARLY...FNDFLRN...SSVVDK...AREKLE...PFS...SL...S...NESY...QSRD...LERVS...QVAK...LYDE...KVO...PA	317
野茶树 (AFC34137.1)	ISDADSVFVHSPYKLVQKSFARLY...FNDFLRN...SSVVDK...AREKLE...PFS...SL...S...NESY...QSRD...LERVS...QVAK...LYDE...KVO...PA	320
DnHMGS	TLMPKQVGNMYTASLYAA...ASVIH...NK...STL...GG...QR...IV...MFSY...GSG...L...SS...MFS...B...K...L...ND...G...Q...H...P...F...S...L...S...N...I...A...V...L...N...V...A...E...K...L...E...A...R...H...E	400
海枣 (XP_008777803.1)	TLMPKQVGNMYTASLYAA...ASVIH...NK...STL...GG...QR...IV...MFSY...GSG...L...SS...MFS...B...K...L...ND...G...Q...H...P...F...S...L...S...N...I...A...V...L...N...V...A...E...K...L...E...A...R...H...E	399
欧洲水仙 (AHF81872.1)	TLMPKQVGNMYTASLYAA...ASVIH...NK...STL...GG...QR...IV...MFSY...GSG...L...SS...MFS...B...K...L...ND...G...Q...H...P...F...S...L...S...N...I...A...V...L...N...V...A...E...K...L...E...A...R...H...E	400
凤梨 (OAY65044.1)	TLMPKQVGNMYTASLYAA...ASVIH...NK...STL...GG...QR...IV...MFSY...GSG...L...SS...MFS...B...K...L...ND...G...Q...H...P...F...S...L...S...N...I...A...V...L...N...V...A...E...K...L...E...A...R...H...E	398
可可 (XP_007040101.1)	TLMPKQVGNMYTASLYAA...ASVIH...NK...STL...GG...QR...IV...MFSY...GSG...L...SS...MFS...B...K...L...ND...G...Q...H...P...F...S...L...S...N...I...A...V...L...N...V...A...E...K...L...E...A...R...H...E	397
野茶树 (AFC34137.1)	TLMPKQVGNMYTASLYAA...ASVIH...NK...STL...GG...QR...IV...MFSY...GSG...L...SS...MFS...B...K...L...ND...G...Q...H...P...F...S...L...S...N...I...A...V...L...N...V...A...E...K...L...E...A...R...H...E	400
DnHMGS	VLPEK...F...V...E...T...K...L...M...E...H...R...Y...G...A...K...D...F...V...T...S...K...D...S...L...L...S...P...G...T...F...Y...L...T...E...V...D...S...M...Y...R...R...F...Y...A...K...K...G...D...V...T...-...S...A...A...G...V...A...G...L...N...A...S...F...L...A...N...G...R	474
海枣 (XP_008777803.1)	VLPEK...F...V...E...T...K...L...M...E...H...R...Y...G...A...K...D...F...V...T...S...K...D...S...L...L...S...P...G...T...F...Y...L...T...E...V...D...S...M...Y...R...R...F...Y...A...K...K...G...D...V...T...-...S...A...A...G...V...A...G...L...N...A...S...F...L...A...N...G...R	473
欧洲水仙 (AHF81872.1)	VLPEK...F...V...E...T...K...L...M...E...H...R...Y...G...A...K...D...F...V...T...S...K...D...S...L...L...S...P...G...T...F...Y...L...T...E...V...D...S...M...Y...R...R...F...Y...A...K...K...G...D...V...T...-...S...A...A...G...V...A...G...L...N...A...S...F...L...A...N...G...R	470
凤梨 (OAY65044.1)	VLPEK...F...V...E...T...K...L...M...E...H...R...Y...G...A...K...D...F...V...T...S...K...D...S...L...L...S...P...G...T...F...Y...L...T...E...V...D...S...M...Y...R...R...F...Y...A...K...K...G...D...V...T...-...S...A...A...G...V...A...G...L...N...A...S...F...L...A...N...G...R	473
可可 (XP_007040101.1)	VLPEK...F...V...E...T...K...L...M...E...H...R...Y...G...A...K...D...F...V...T...S...K...D...S...L...L...S...P...G...T...F...Y...L...T...E...V...D...S...M...Y...R...R...F...Y...A...K...K...G...D...V...T...-...S...A...A...G...V...A...G...L...N...A...S...F...L...A...N...G...R	465
野茶树 (AFC34137.1)	VLPEK...F...V...E...T...K...L...M...E...H...R...Y...G...A...K...D...F...V...T...S...K...D...S...L...L...S...P...G...T...F...Y...L...T...E...V...D...S...M...Y...R...R...F...Y...A...K...K...G...D...V...T...-...S...A...A...G...V...A...G...L...N...A...S...F...L...A...N...G...R	467

方框中的氨基酸残基是金钗石斛 DnHMGS 蛋白的活性中心
Active site of DnHMGS was framed by box

图 4 DnHMGS 蛋白序列与 HMGS 同源蛋白序列的多重比对

Fig. 4 Multi-alignment of amino acid sequences in DnHMGS protein sequence and HMGS homologous protein sequence

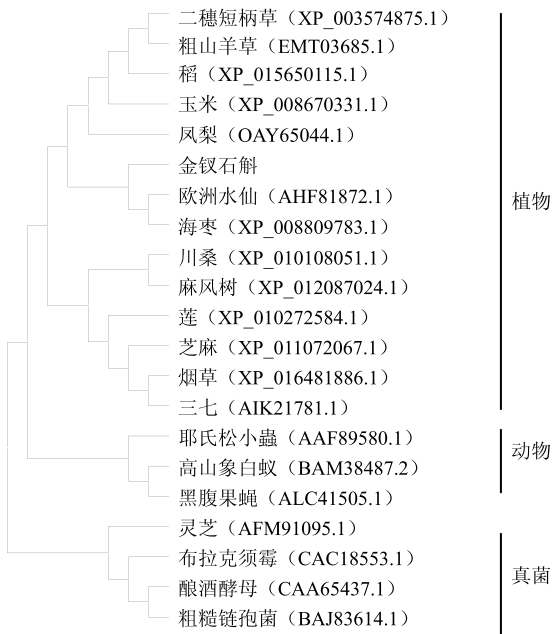


图 5 HMGS 氨基酸序列的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic analysis of HMGS

来源不同物种的 HMGR 蛋白序列被准确聚为植物、真菌和动物 3 大类群。植物类群中又细分为单子叶植物与双子叶植物 2 类。DnHMGS 与凤梨、稻、玉米等单子叶植物聚为一类，其中与海枣、欧洲水仙的亲缘关系最近。

2.8 DnHMGS 基因表达特异性分析

分别提取接菌组与对照组 (CK) 的金钗石斛根、茎、叶的总 RNA，利用 qRT-PCR 技术检测接菌前后的金钗石斛根、茎、叶中 DnHMGS 基因转录本的表达模式 (图 6)。结果表明，在不接菌的条件下，DnHMGS 在金钗石斛 3 种器官中的相对表达量存在一定的组织特异性。以根的对照组为校正样本，接菌前 DnHMGS 在叶中的表达量最高，是根中的 2.18 倍，而茎中表达量与根中差异不大。在接菌后，DnHMGS 基因转录本在金钗石斛根、叶中的表达情况发生极大的变化，而在茎中的变化却不明显，最终呈现出茎>叶>根的趋势。茎中 DnHMGS 基因转录本的相对表达量分别是根、叶的 7.79 和 1.49 倍。

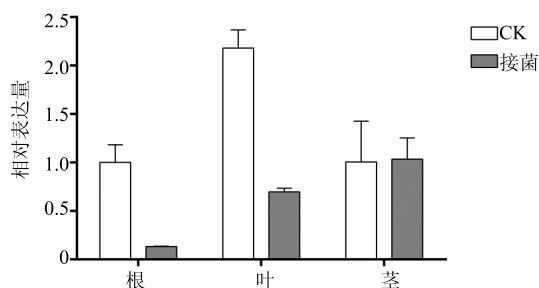


图 6 qRT-PCR 分析 DnHMGS 基因在金钗石斛接菌前后不同组织的表达模式

Fig. 6 qRT-PCR analysis on expression pattern of DnHMGS gene at different tissues of symbiotic *D. nobile* and asymbiotic

3 讨论

本研究首次克隆获得了 DnHMGS 基因全长，并进行了生物信息学分析。结果显示，该基因编码的氨基酸具有典型的 HMGS 酶的作用位点、模序和结构域，这些结构都是 HMGS 行使功能时不可缺少的组成单位。与此同时，在进化关系方面，DnHMGS 蛋白隶属植物类群的单子叶分支，与凤梨、稻、玉米等单子叶植物亲缘关系较近，这些都说明 DnHMGS 基因是高等植物 HMGS 基因家族的新成员，其编码蛋白极有可能参与金钗石斛 MVA 萜类合成途径。

基因表达研究是解析基因功能的首要前提，大量研究表明，植物中 HMGS 基因的组织表达模式存在较大的差异。如蓖麻花中 HMGS 表达量分别是叶和种子的 2.55 和 11.86 倍^[22]。但这种表达模式并非随机出现的，它往往与该组织中类异戊二烯化合物的量存在一定的正相关关系。Kai 等^[23]研究发现，TmHMGS 在红豆杉针叶和茎中呈高表达状态，但在根中却未见表达，与红豆杉地上部分紫杉醇量显著高于地下部分的宏观现象高度吻合。在本研究中，DnHMGS 在对照组金钗石斛中的表达模式也呈现出显著的组织特异性，叶中表达量显著高于根和茎。然而，这种表达模式却与金钗石斛根、茎的生物碱量高，叶片少的分布情况相悖^[24]。这可能是与本研究所取的样品苗龄比较小有关。此外，DnHMGS 基因所参与的 MVA 途径属于众多化合物生物合成过程中的上游通路，其产物通过各种加工修饰可生成甾醇、类胡萝卜素等多种非生物碱物质，故也有可能影响 DnHMGS 的表达量与生物碱的量不成正比。

对于同一组织或器官，HMGS 基因表达量受外界多种因素的影响，这很可能与其发挥生物学功能

有一定的关系。如茶叶中 HMGS 基因的表达量随叶片成熟度的增加而增加^[25]；白木香愈伤组织中 HMGS 的表达量经茉莉酸甲酯诱导后显著升高^[12]。通过接入共生真菌，本研究发现金钗石斛根、叶中的 DnHMGS 表达受到显著抑制，各器官中 DnHMGS 的表达情况转变为茎>叶>根。这也就是说，DnHMGS 的表达受到内生真菌的调控。而前期研究发现，接菌 9 周后，金钗石斛茎中石斛碱的量显著升高，为对照的 3 倍，这有可能与更多的代谢前体（乙酰辅酶 A，乙酰乙酰辅酶 A）从根、叶中流向茎，且茎中 DnHMGS 保持较高表达量有关，但具体机制有待深入研究。

通过基因调控和转基因是实现重要药用成分在植株中高效表达的有效途径^[26-28]。因此，进一步研究 DnHMGS 在金钗石斛中的功能和受调控的机制，构建金钗石斛 DnHMGS 基因过表达载体和遗传转化体系具有很好的实用意义。此外，本研究还为菌根真菌促进金钗石斛中石斛碱量提高的分子机制研究提供了基础。通过基因表达调控技术以控制植物萜类代谢流向石斛碱的合成，并结合菌根真菌的作用，将有望成为提高金钗石斛的品质的新方法。

参考文献

- [1] 张惠源, 张志英, 岳俊三. 中国中药资源志要 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [2] 张俊青, 吴 芹, 龚其海, 等. 金钗石斛生物总碱对脂多糖激活星形胶质细胞产生炎症因子的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(6): 824-827.
- [3] 安 欣, 任建武, 李虹阳, 等. 金钗石斛生物碱对 mcf-7 细胞线粒体凋亡通路的研究 [J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(5): 920-926.
- [4] 魏小勇, 龙 艳. 金钗石斛生物碱抗糖性白内障作用及蛋白质组学效应的实验研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 617-621.
- [5] 黄 琦, 李 菲, 吴 芹, 等. 金钗石斛总生物碱对四氧嘧啶所致糖尿病大鼠的保护作用 [J]. 遵义医学院学报, 2009, 32(5): 451-453.
- [6] Onaka T, Kamata S, Maeda T, et al. The structure of dendrobine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1964, 4(12): 506-512.
- [7] Miller F P, Vandome A F, Mcbrewster J. *Mevalonate Pathway* [M]. Beau Bassin-Rose Hill: Alphascript Publishing, 2010.
- [8] Liao P. Past achievements, current status and future perspectives of studies on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGS) in the mevalonate (MVA) pathway [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(7): 1005-1022.

- [9] Suwanmanee P, Sirinupong N. *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms* [M]. New York: Springer, 2012.
- [10] 任 昂, 欧阳翔, 师 亮, 等. 灵芝羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶基因的克隆及其表达特性 [J]. 菌物研究, 2013, 11(2): 142.
- [11] Hui W, Nagegowda D A, Reetika R, *et al.* Overexpression of *Brassica juncea* wild-type and mutant HMG-CoA synthase 1 in *Arabidopsis* up-regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance [J]. *Plant Biotechnol J*, 2011, 10(1): 31-42.
- [12] 刘 娟, 徐艳红, 杨 勇, 等. 白木香 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 (AsHMGS) 基因的克隆与表达分析 [J]. 植物研究, 2014, 34(1): 75-84.
- [13] 姚元枝, 黎晓英, 郭文博, 等. 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 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1578-1582.
- [14] 王 淋, 乌云塔娜, 叶生晶. 杜仲 EuHMGS 基因鉴定及生物信息学分析 [J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 13-20.
- [15] Cheng S, Wang X, Xu F, *et al.* Cloning, expression profiling and functional analysis of *CnHMGS*, a gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from *Chamaemelum nobile* [J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 316-330.
- [16] 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.
- [17] 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, 43(3): 289-294.
- [18] Chen W, Cheng X, Zhou Z, *et al.* Molecular cloning and characterization of a tropinone reductase from *Dendrobium nobile* Lindl. [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 40(2): 1145-1154.
- [19] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [20] Kai G Y, Li S S, Wang W, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase from *Camptotheca acuminata* [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2013, 60(1): 131-138.
- [21] Liu Y J, Zhao Y J, Zhang M, *et al.* Cloning and characterisation of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 19696-19707.
- [22] 邹 智, 谢贵水, 莫业勇, 等. 4 种大戟科植物 HMGS 基因家族的全基因组鉴定与分析 [J]. 西南农业学报, 2014, 27(6): 2259-2266.
- [23] Kai G, Miao Z, Zhang L, *et al.* Molecular cloning and expression analyses of a new gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase from *Taxus × media* [J]. *Biol Plantarum*, 2006, 50(3): 359-366.
- [24] 包英华, 白 音, 陈珺霞. 金钗石斛生物碱的组织化学定位研究 [J]. 广西植物, 2013, 33(2): 199-202.
- [25] 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, 22(5): 72-76.
- [26] Tang K, Shen Q, Yan T, *et al.* Transgenic approach to increase artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(4): 605-615.
- [27] Zhang J, Martin J M, Beecher B, *et al.* The ectopic expression of the wheat puroindoline genes increase germ size and seed oil content in transgenic corn [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 74(4/5): 353-365.
- [28] Couso I, Vila M, Rodriguez H, *et al.* Overexpression of an exogenous phytoene synthase gene in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* leads to an increase in the content of carotenoids [J]. *Biotechnol Prog*, 2011, 27(1): 54-60.