

鱼腥草 HMGR 基因 cDNA 克隆、差异表达及蛋白质结构分析

魏 麟, 黎晓英, 刘胜贵, 王 丹, 黄豪兰, 龙 强, 蒋玉红, 郭文博, 伍贤进*

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 克隆鱼腥草 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 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 HMGR 基因 cDNA 序列并对 HMGR 蛋白进行理化性质、蛋白二级结构及三维结构预测分析, 并预测该蛋白功能; 利用 RT-PCR 方法检测 HMGR 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 HMGR 基因 cDNA 全长为 1 626 bp, 编码 541 个氨基酸。生物信息学预测 HMGR 蛋白含 2 个跨膜区, 不含信号肽。HMGR 基因主要在鱼腥草的花中表达, 其他器官中表达相对较低, 地下茎中表达量最低。结论 首次从鱼腥草中克隆了 HMGR 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作用奠定基础。

关键词: 鱼腥草; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 萜类; RT-PCR; cDNA 序列

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)18-3815-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.023

Molecular cloning, sequence identification, and expression analysis of HMGR gene in *Houttuynia cordata*

WEI Lin, LI Xiao-ying, LIU Sheng-gui, WANG Dan, HUANG Hao-lan, LONG Qiang, JIANG Yu-hong, GUO Wen-bo, WU Xian-jin

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, Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua 418008, China

Abstract: **Objective** To clone and analyze the expression difference sequence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) gene from *Houttuynia cordata*. **Methods** The sequence of HMGR was cloned from *H. cordata* by RT-PCR strategy. The physical and chemical properties, secondary structure, and three-dimensional structure of the HMGR protein were forecasted and analyzed, and its structure and function were predicted. And the different expression of HMGR gene in rhizome, stems, leaves, and flowers were analyzed by fluorescent quantitative PCR. **Results** The cDNA contained a 1 626 bp open reading frame and encoded a predicted protein of 541 amino acids. Two transmembrane regions and no signal peptide were present in HMGR. Relative real-time PCR analysis indicated that HMGR showed the highest transcript abundance in the flowers, and the lowest levels in the rhizomes. **Conclusion** This study cloned and expression analyzed HMGR gene from *H. cordata* for the first time. The result will provide a foundation for exploring the mechanism of terpenoid biosynthesis in *H. cordata*.

Key words: *Houttuynia cordata* Thunb.; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; terpenoids; RT-PCR; cDNA sequence

萜类化合物是鱼腥草主要有效药用成分之一, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGR) 是萜类化合物合成途径中重要的限速酶^[1-2], 其活性是将

3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原成甲羟戊酸 (MVA)。植物的 HMGR 结构由 4 个部分组成: N-末端、跨膜区、连接区和 C-末端区。具有催化活性的 C-末端区和跨膜区在不同物种中高度保守, HMGR

收稿日期: 2017-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870230); 湖南省科技计划项目 (2013FJ6090, 2014FJ4207); 湖南省高校创新平台开放基金项目 (15K100); 湖南省生物类专业大学生创新训练中心资助及植物学湖南省高校“十二五”重点建设学科资助 (ZWX2016-07)

作者简介: 魏 麟 (1974—), 男, 博士, 副教授, 主要从事分子生物学与分子遗传学方面研究。Tel: (0745)2851037 E-mail: hhweilin@163.com

*通信作者 伍贤进, 博士, 教授, 主要从事药用植物资源评价。Tel: (0745)2851037 E-mail: hhuxianjin@163.com

的催化区有 4 个保守的基元^[3]。HMGR 基因在调控植物萜类化合物的生物合成中发挥关键作用。目前在药用植物中克隆和研究 HMGR 基因已成为近年的研究热点,许多药用植物的该基因已被成功克隆。如雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.^[4]、阳春砂 *Amomum villosum* Lour.^[5]、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.^[6]、秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall^[7]等,并已初步确定 HMGR 基因以基因家族的形式存在^[8]。但是到目前为止,鱼腥草 HMGR 基因还未见任何报道。

本研究拟克隆鱼腥草萜类合成途径关键酶 HMGR 基因 cDNA 序列,并分析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鱼腥草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

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 2013 年 6 月 5 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质量浓度测定 (表 1); 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 1 个被注释为 HMGR 的转录本 (CL8672),同已报道的长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (M96068)^[9]、马铃薯 *Solanum tuberosum* L. (L01400)^[10]、龙虎草 *Euphorbia pekinensis* Rupr. (EF062569)^[11]、蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. (HQ857601) HMGR 基因的核苷酸序列进行比对,应用 Oligo 6 软件设计引物。引物 HMGR-F 和 HMGR-R 序列见表 2,由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 2 PCR 引物

Table 2 PCR primers

引物	序列
HMGR-F	5'-ATGGACGTGCGCCGAGGCAC-3'
HMGR-R	5'-CATGAAGCAGCTTTGCATACA-3'
qHMGR-F	5'-ACACTCTGGCGGTTGTCTTC-3'
qHMGR-R	5'-TGTCTGGATAATCGGTTTGG-3'
18 S-F	5'-CCTCCGCGCTTGTTA CTTTG-3'
18 S-R	5'-CCCGACTGTCCCTG TAATCA-3'

1.2.4 PCR 扩增 反应体系和反应条件参照文献报道^[9],其中退火温度为 58 °C。

1.2.5 扩增片段的克隆测序、序列分析及 HMGR 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) 股份有限公司测序。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^[10]进行 UPMAG 聚类分析。采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具对鱼腥草 HMGR 基因编码蛋白的理化性质及结构与功能进行预测^[11-13]。

1.2.6 相对荧光定量 PCR 表达分析 利用 RT-PCR 的方法检测 HMGR 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 RT-PCR 检测系统,RT-PCR 检测的反应体系如下: 5 μL 2×SYBR[®] PremixEx TaqTM,上游引物 qHMGR-F 及下游引物 qHMGR-R (序列见表 2) 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,RT-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 和 18 S-R (序列见表 2),每个反应重复 3 次。

表 1 鱼腥草不同部位 RNA 提取质量

Table 1 RNA quality detection from different organs of *H. cordata*

部位	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)
地下茎	1.85	2.13	2.03
地上茎	1.88	2.01	1.98
叶	1.90	2.10	2.01
花	1.89	2.25	2.21

2 结果与分析

2.1 鱼腥草 HMGR 基因克隆

以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板,用引物 HMGR-F 和 HMGR-R 进行 PCR 扩增。电泳检测发现约在 1 600 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 HMGR 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 541 个氨基酸,见图 2。

2.2 鱼腥草 HMGR 基因编码蛋白特性分析

2.2.1 理化性质与细胞定位 鱼腥草 HMGR 基因预测

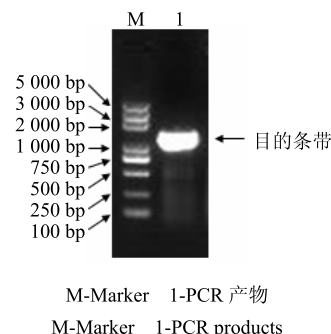
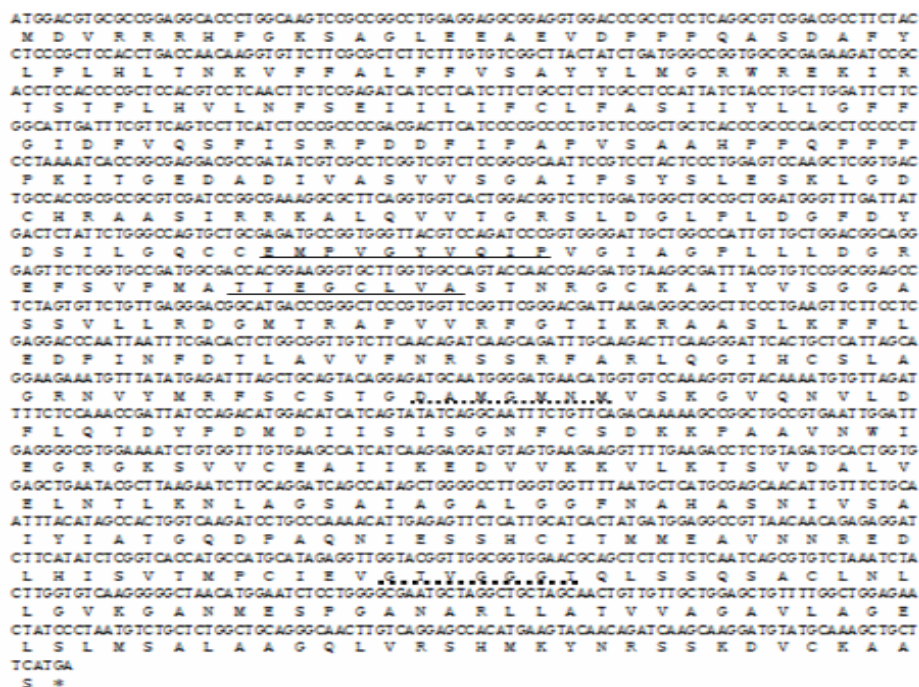


图 1 鱼腥草 HMGR 的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of HMGR of *H. cordata*



划实线部分为 HMGR 结合基序;划虚线部分为 NADPH 结合基序
HMGR binding motif segment was marked with full line, NADPH binding motif segment was marked with imaginary line

图 2 鱼腥草 HMGR 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 HMGR gene fragment of *H. cordata*

编码 541 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 $C_{2565}H_{4093}N_{701}O_{758}S_{30}$,相对分子质量为 57 841.7,等电点 (pI) 为 7.10。该蛋白的不稳定系数 (instability index) 为 42.48,属于不稳定蛋白质。脂肪系数 (aliphatic index) 为 95.38,亲水性系数 (grand average of hydropathicity) 为 0.189,该蛋白不含信号肽,但含 2 个跨膜区 (图 3)。

2.2.2 鱼腥草 HMGR 的二级结构及三级结构预测 预测 HMGR 蛋白的二级结构如图 4 所示,该蛋白的二级结构中 α -螺旋占 46.21%、 β -折叠占 6.65%、无规

卷曲占 32.72%、自由延伸 14.42%。由 SWISS-MODEL 预测 HMGR 的三级结构如图 5 所示。

2.3 鱼腥草 HMGR 氨基酸序列的同源性及亲缘关系分析

推导氨基酸序列比较结果表明,鱼腥草 HMGR 与橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg (BAF98282)、罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex Lu et Z. Y. Zhang (AEM42971)、马铃薯 (AAA93498)、龙虎草 *Euphorbia pekinensis* Rupr. (ABK56831)、长春花 (AAA33108)、球药隔重楼 *Paris fargesii* Franch

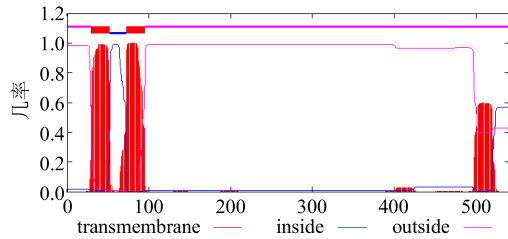


图 3 鱼腥草 HMGR 跨膜预测

Fig. 3 Prediction of transmembrane regions of HMGR protein

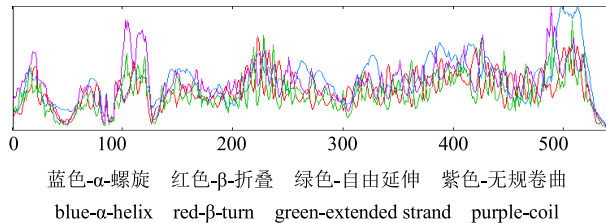


图 4 HMGR 蛋白二级结构预测

Fig. 4 Two-dimensional structure prediction of HMGR protein

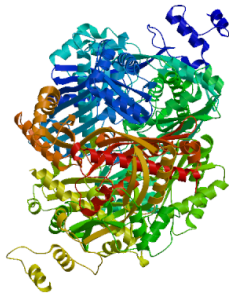


图 5 HMGR 蛋白三级结构预测

Fig. 5 Three-dimensional model prediction of HMGR protein

(AGC13078)、蒲公英 (AEA92686)、青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljin. (ABX82838) 和红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd (AAQ82685) 的 HMGR 蛋白质分子的相似度分别为 77.3%、75.6%、75.2%、75.0%、74.1%、73.4%、70.2%、70.2%、67.5%，表明 HMGR 氨基酸序列同源性比较高，进化过程中比较保守性。UPMAG 聚类分析表明，鱼腥草与红豆杉亲缘关系最远，见图 6。

2.4 鱼腥草 HMGR 基因的表达分析

利用 RT-PCR 检测 HMGR 基因在地下茎、地上茎、叶、花等器官中的表达特异性，3 次实验重复得到了相似结果。结果表明该基因主要在花中表达为 2.152，在叶和地上茎中的表达相对较低，分别为 0.311 和 0.279，地下茎的表达量最低为 0.065 (图 7)。

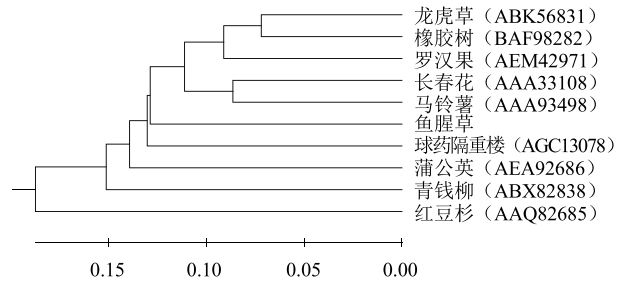


图 6 鱼腥草与其他植物 HMGR 的 UPGMA 进化树

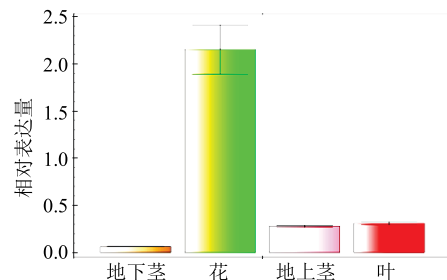
Fig. 6 UPGMA cladogram of HMGR of *H. cordata* and other plants

图 7 鱼腥草不同组织中 HMGR 基因的相对表达量

Fig. 7 Relative quantity of HMGR expression in different organs

3 讨论

HMGR 是植物萜类化合物合成途径中的关键酶之一，在合成途径中起着重要的调控作用，众多学者对其生物学功能进行了研究，Enfissi 等^[17]、Schaller 等^[18]及 Wang 等^[19]分别发现番茄、烟草及拟南芥 HMGR 基因表达控制甾醇量，该基因表达上调，甾醇量明显增加；武莹^[4]证明雷公藤萜类物质的合成代谢与 HMGR 基因的表达有关；Alam 等^[20]发现青蒿素量与 HMGR 的活性相关。HMGR 作为萜类化合物合成途径中的关键酶，其活性高低与量的多少决定着许多有效药用活性成分产量的多少。如何利用 HMGR 的过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之一。

本研究利用 RT-PCR 技术首次克隆了鱼腥草 HMGR 基因的全长 cDNA 序列，对其推导的氨基酸序列的结构和功能进行生物信息学分析，发现 HMGR 蛋白特有的 4 个保守的活性位点，2 个 HMGR-CoA 结合位 (EMPVGIVQIP 与 TTEGCLVA) (图 2 中划实线部分) 和 2 个 NADP (H) 结合位点 (DAMGMNM 与 GTVGGGT)^[21] (图 2 中划虚线部分)，这提示克隆结果可靠，同时说明鱼腥草 HMGR 蛋白质结构与其他植物的结构

相类似, HMGR 蛋白质在不同植物中行使相似的功能, 从鱼腥草 HMGR 氨基酸序列与其他植物的 HMGR 同源性比较得到的结果, 发现其氨基酸序列长短与其他植物相近, 该蛋白在不同物种进化过程中具有较高的保守性, 也提示 HMGR 蛋白质在不同植物生命活动过程中所发挥的作用基本相似。

鉴于 HMGR 基因大都以基因家族的形式存在, 实验克隆得到的 HMGR 基因属于该基因家族的哪个成员以及该基因具有什么样的功能有待下一步深入研究。实验结果直接为构建鱼腥草 HMGR 基因过表达载体和遗传转化体系奠定基础, 有利于实现重要药用活性成分在植株中高效表达, 有利于进一步开展鱼腥草及类似以萜类化合物为主要药用活性成分植物药的药材品质改善。

参考文献

- [1] Joseph C, Fred W, Jeanne P, *et al.* Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plant [J]. *Plant Physiol J*, 1995, 109(4): 1337-1343.
- [2] Ge X, Wu J. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhizahairy* roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor [J]. *Plant Sci*, 2005, 168(2): 487.
- [3] Luskey K L, Stevens B. Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol regulated degradation [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260: 10271-10277.
- [4] 武莹, 雷公藤 HMGR 基因克隆、表达及调控萜类次生代谢的初步探究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012.
- [5] 刘卉, 阳春砂 HMGR 和 DXR 基因在烟草萜类化合物生物合成中的功能研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [6] 刘颖, 刘东吉, 刘春生. 甘草 HMGR, SQS1, β -AS 合酶基因 CNVs 检测体系的建立 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(3): 283-287.
- [7] 郑鹏, 化文平, 王喆之. 秦艽 HMGR 基因家族的克隆及序列分析 [J]. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 2012, 40(6): 67-72.
- [8] Friesen J A, Rodwell V W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(11): 248.
- [9] Maldonado-Mendoza I E, Burnett R J, Nessler C L. Nucleotide Sequence of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase from *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100(3): 1613-1614.
- [10] Choi D, Ward B L, Bostock R M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(10): 1333-1344.
- [11] Cao X, Zong Z, Ju X, *et al.* Molecular cloning, characterization and function analysis of the gene encoding HMG-CoA reductase from *Euphorbia Pekinensis* Rupr [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(3): 1559-1567.
- [12] 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.
- [13] Koichiro T, Glen S, Daniel P, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [14] 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(2): 195-201.
- [15] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 3381-3385.
- [16] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714-2723.
- [17] Enfissi E M A, Fraser P D, Lois L M, *et al.* Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato [J]. *Plant Biotech J*, 2005, 3(1): 17-27.
- [18] Schaller H, Grausem B, Benveniste P, *et al.* Expression of the *Hevea brasiliensis* (H. B. K.) Mull. arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109(3): 761-770.
- [19] Wang H, 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 Biot J*, 2012, 10(1): 31-42.
- [20] Alam P, Abdin M Z. Over-expression of HMG-CoA reductase and amorpha-4, 11-diene synthase genes in *Artemisia annua* L. and its influence on artemisinin content [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(10): 1919-1928.
- [21] Caelles C, Ferrer A, Balcells L, *et al.* Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, 13(6): 627-638.