

山茱萸萜类甲羟戊酸合成途径关键酶 *CoHMGS* 基因的克隆与分析

侯典云^{1,2}, 王瑶瑶^{1,2#}, 刘晓冉^{1,2}, 张佳琪^{1,2}, 马占强^{1,2}, 胥华伟^{1,2}, 王笑尘³

1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471023

2. 洛阳市道地药材繁育与创新利用工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023

3. 南阳市山茱萸研究所, 河南 南阳 474550

摘要: 目的 克隆得到山茱萸 *Cornus officinalis* 萜类合成途径的关键酶 *CoHMGS* 基因的 cDNA 序列, 并进行相应的生物信息学分析, 为深入研究 *CoHMGS* 基因的功能奠定基础。方法 以山茱萸转录组筛选出的 c102453_g2 序列为参考序列设计特异引物, 以山茱萸叶片总 RNA, 通过 RT-PCR 扩增获得 *CoHMGS* 基因序列, 序列纯化回收后连接到 pTOPO-T 载体上, 转化至大肠杆菌 DH10B, 选取阳性克隆测序。利用生物信息学软件预测 *CoHMGS* 基因及其编码蛋白质的功能。结果 克隆得到长度为 1645 bp 的 *CoHMGS* 序列, 包含 1413 bp 的完整开放阅读框, 编码 470 个氨基酸。蛋白整体带负电荷, 为不稳定亲水性蛋白, 定位于细胞质内, 不含跨膜结构。结论 首次克隆得到山茱萸 *CoHMGS* 基因, 对其编码蛋白质进行了初步的分析和预测, 为深入揭示 *CoHMGS* 基因在山茱萸萜类物质合成途径中的功能奠定了基础。

关键词: 山茱萸; 甲羟戊酸途径; *CoHMGS*; RT-PCR 扩增; 基因克隆

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5716-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.026

Cloning and analysis of a key enzyme of *CoHMGS* gene involved in mevalonate pathway of terpene biosynthesis in *Cornus officinalis*

HOU Dian-yun^{1,2}, WANG Yao-yao^{1,2}, LIU Xiao-ran^{1,2}, ZHANG Jia-qi^{1,2}, MA Zhan-qiang¹, XU Hua-wei^{1,2}, WANG Xiao-chen³

1. College of Tree Peony, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

2. The Luoyang Engineering Research Center of Breeding and Utilization of Dao-di Herbs, Luoyang 471023, China

3. Nan yang Institute of *Cornus officinalis*, Nanyang 474550, China

Abstract: Objective To clone the cDNA sequence of the key enzyme *CoHMGS* gene in the terpene synthesis pathway of *Cornus officinalis* and analyze its physical and chemical properties. **Methods** Specific primers were designed based on the >c102453_g2 sequence screened from the transcriptome. The template was the cDNA obtained by reverse transcription of the total RNA of leaves. The *CoHMGS* gene sequence was amplified by RT-PCR, and the amplified gene sequence was purified and recovered and then connected to the pTOPO-T vector, transforming into *E. coli* DH10B, and selecting positive clones for sequencing. The relevant bioinformatics software was used to predict the function of *CoHMGS* gene and its encoded protein. **Results** A 1645 bp *CoHMGS* sequence was cloned, containing a complete open reading frame of 1413 bp, encoding 470 amino acids. The protein was an unstable hydrophilic protein. It was predicted that its sub-cells were located in the cytoplasm, did not contain transmembrane structures, and were extra-membrane proteins. **Conclusion** The *HMGS* gene of *C. officinalis* was cloned for the first time, and a preliminary analysis and prediction of its encoded protein was made, which provided basic information for further revealing the synthesis pathway of terpenoids in *C. officinalis*.

Key words: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; MVA pathway; *CoHMGS*; RF-PCR amplification; gene cloning

收稿日期: 2021-04-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1404829); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302); 河南省自然科学基金项目 (202300410151); 河南省科技攻关项目 (202102110156)

作者简介: 侯典云, 教授, 硕士生导师。Tel: (0379)64282340 E-mail: dianyun518@163.com

#共同第一作者: 王瑶瑶, 硕士研究生, 主要从事中药资源评价与利用方面的研究。Tel: (0379)64282340 E-mail: 18438616133@163.com

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥果肉, 是我国传统名贵药材, 具有补益肝肾、收涩固脱等功效^[1]。山茱萸的主要成分有环烯醚萜类、鞣质类、黄酮类、三萜类、苯丙素类等, 还包含多种对人体有益的其他物质^[2]。现代药理学研究认为山茱萸具有抗肿瘤^[3]、抗氧化^[4]、抗炎症^[5]、护肝^[6]、降血糖^[7]等生物学活性, 具有较好的开发应用前景。

植物体内的萜类有 2 条合成途径: 1 条是甲羟戊酸途径, 在细胞质中发挥作用; 另 1 条是发现较晚的甲基-D-赤藓醇-4-磷酸途径, 定位在质体^[8]。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 (HMGS) 是甲羟戊酸途径的关键酶, 作用于该途径的第 2 步反应, 催化一分子乙酰乙酰辅酶 A 和一分子乙酰辅酶 A 缩合生成 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A^[9], 接着进行后续反应生成相应的萜类物质。HMGS 对萜类物质的生物合成至关重要, 备受关注, 近年来在银杏^[10]、牛樟芝^[11]、桑黄^[12]、陆英^[13]、灵芝^[14]和丹参^[15]等药用植物上均有研究, 但在山茱萸中未见报道。

在山茱萸转录组中, 通过分析目前只发现了 c102453_g2^[16] 这 1 个 HMGS 基因, 利用 primer premier 5.0 软件设计引物, 采用 RT-PCR 技术扩增 *CoHMGS* 基因, 通过生物信息学分析软件初步探讨 *CoHMGS* 编码蛋白质的特征信息, 为进一步研究山茱萸体内甲羟戊酸生物合成途径奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

植物材料经河南科技大学农学院侯典云教授鉴定为山茱萸 *C. officinalis* Sieb. et Zucc. 植株。采集山茱萸树上完整无病虫害且生长状态基本一致的叶片和果实若干, 摘下后立即用蒸馏水冲洗干净, 放进事先准备的 1.5 mL 离心管内, 置于液氮速冻, 最后转移到 -80 °C 冰箱保存。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒 (北京天根有限公司, 编号: DP441); cDNA 反转录试剂盒、2×Long Taq Master Mix、零背景 pTOPO-TA 克隆载体购自艾德莱生物科技有限公司; DNA 纯化回收试剂盒 (南京诺维赞有限公司); 感受态的大肠杆菌 DH10B (自制)。

2 方法

2.1 引物合成

根据 c102453_g2 序列设计山茱萸 *HMGS* 基因的扩增引物, 引物具体序列为 *CoHMGS*-F:

5'-GGAGCTAGTGACAGAAAGA-3' 和 *CoHMGS*-R: 5'-CTGGCAGAATGAGGAACA-3'。

2.2 山茱萸 RNA 的提取和 cDNA 的合成

山茱萸叶片用液氮研磨, 根据 RNA 提取试剂盒说明书操作, 获得山茱萸总 RNA。通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 检测 RNA 的提取质量和浓度。

2.3 *CoHMGS* 基因克隆与测序

以山茱萸总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 设置 25 μL PCR 扩增体系: 1 μL *CoHMGS*-F 引物、1 μL *CoHMGS*-R 引物、1.5 μL cDNA、12.5 μL 2×Long Taq Master Mix、9 μL ddH₂O; *CoHMGS* 基因 PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 2 min, 32 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。电泳观察扩增结果, 切胶纯化回收目的片段, 连接到 pTOPO-T 载体上形成重组质粒, 再通过热激法将重组质粒转化进大肠杆菌 DH10B 中, 加入无菌液体 LB (Luria-Bertani) 培养基振荡培养 60 min 左右, 浓缩菌液涂布于氨苄抗性的 LB 平板, 选取单菌落摇菌 6 h 以上, 菌液 PCR 挑选条带正确的菌液送公司测序。

2.4 生物信息学分析

在 NCBI 数据库对 *CoHMGS* 基因进行 Blast 和保守结构域分析, 通过 Cell-Ploc 2.0 在线预测 *CoHMGS* 基因编码蛋白质在细胞内的具体位置, 利用 ExPASy analysis 分析 *CoHMGS* 基因编码氨基酸的特征, 使用 TMHMM Server 推测蛋白质的跨膜结构信息, 用 MEGA 5.0 软件对山茱萸 HMGS 编码的蛋白质进行聚类分析, 构建系统发育树。

3 结果与分析

3.1 *CoHMGS* 基因克隆与测序

CoHMGS 基因的 PCR 反应产物电泳检测结果表明: PCR 扩增获得一条单一亮带 (图 1)。回收纯

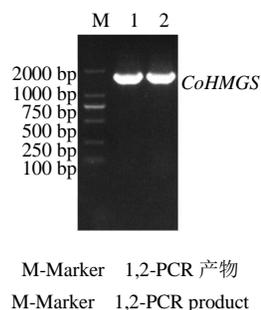


图 1 *CoHMGS* 的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of *CoHMGS*

化,然后连接到克隆载体 pTOPO-T 上,转化感受态细胞 DH10B,经菌落 PCR 鉴定,挑选阳性菌液送公司测序,获得长度为 1645 bp 的序列,经比对确认为 *CoHMGS* 的 cDNA 序列。

3.2 *CoHMGS* 保守结构域分析

对测序得到的 DNA 序列在 NCBI 数据库进行 Blast 分析,结果显示山茱萸 *CoHMGS* 基因序列和喜树、人参、三七和杜仲等植物的 *HMGS* 基因序列

相似程度均在 90% 以上。结果表明,山茱萸 *CoHMGS* 蛋白属于 PLN02577 超家族,是羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶(图 2)。

3.3 *CoHMGS* 亚细胞定位预测

利用相应工具确定 *CoHMGS* 的开放阅读框和编码的氨基酸序列。通过 Cell-PLoc 2.0 在线软件进行亚细胞定位预测结果显示:*CoHMGS* 基因编码蛋白质定位于细胞质内(图 3)。

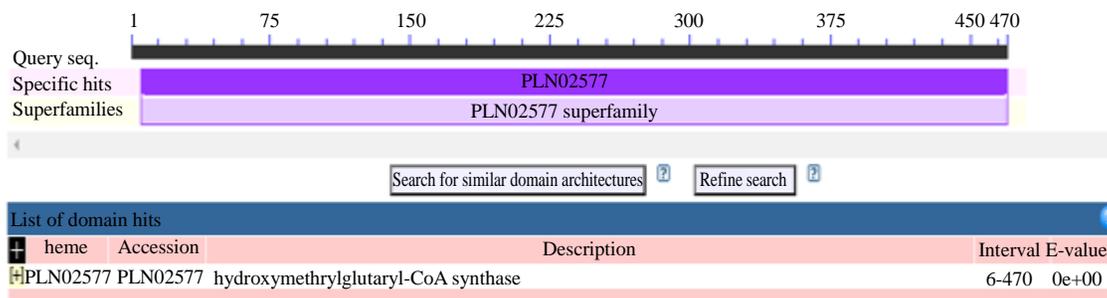


图 2 *CoHMGS* 蛋白的保守结构域

Fig. 2 Conserved domains of *CoHMGS* protein

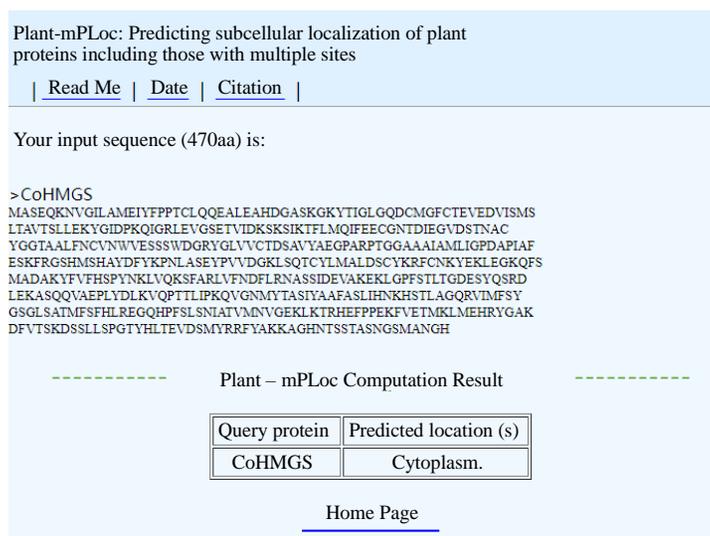


图 3 *CoHMGS* 蛋白亚细胞定位预测

Fig. 3 Prediction of *CoHMGS* protein subcellular location

3.4 山茱萸 *CoHMGS* 编码蛋白的特性分析

ExPASy 在线分析结果表明 *CoHMGS* 编码蛋白的相对分子质量为 51 875.8, 分子式为 $C_{2304}H_{3555}N_{605}O_{705}S_{27}$, 理论等电点 6.13; 丝氨酸数量最多, 占比 9.8%, 负电荷氨基酸共 52 个, 正电荷氨基酸共 46 个, 蛋白整体带负电荷; 预测是不稳定亲水性蛋白。TMHMM Server 在线分析结果显示: 山茱萸 *CoHMGS* 蛋白没有跨膜结构, 是一个膜外蛋白(图 4)。

3.5 山茱萸 *CoHMGS* 蛋白的结构预测

通过 SOPMA 在线预测山茱萸 *CoHMGS* 蛋白

的二级结构(图 5), 包括 α -螺旋占 43.62%, 无规则卷曲占 40.64%, 自由延伸占 12.55%, β -转角占 3.19%。由 SWISS-MODEL 预测得到该蛋白的三级结构模型(图 6)。

3.6 山茱萸 *CoHMGS* 氨基酸序列同源分析

多序列比对分析结果表明山茱萸 *CoHMGS* 序列与山梨猕猴桃 *Actinidia rufa* Planch. 的 *HMGS* 序列一致性为 90.45%、中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch. 为 90.02%、三七 *Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen ex C. H. 为 90.43%、茶 *Camellia sinensis*

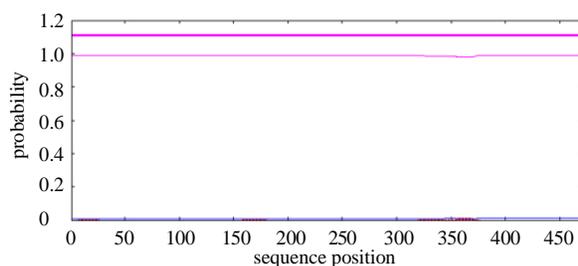
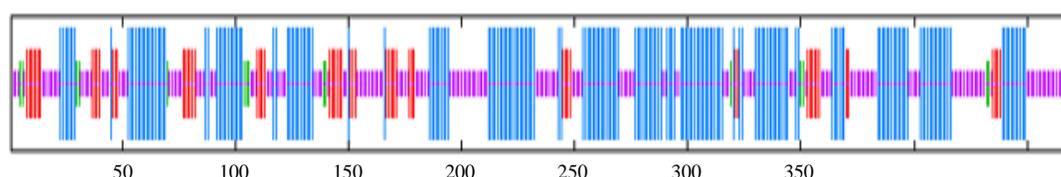


图4 CoHMGS 蛋白跨膜结构域预测

Fig. 4 CoHMGS protein transmembrane domain prediction



蓝色为 α -螺旋; 紫色为无规则卷曲; 红色为自由延伸; 绿色为 β -转角
Blue: α -helix; purple: random curl; red: free extension; green: β -turn

图5 CoHMGS 蛋白二级结构

Fig. 5 Secondary structure of CoHMGS protein

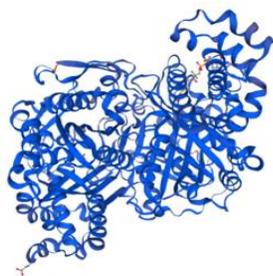


图6 CoHMGS 蛋白三级结构

Fig. 6 Tertiary structure of CoHMGS protein

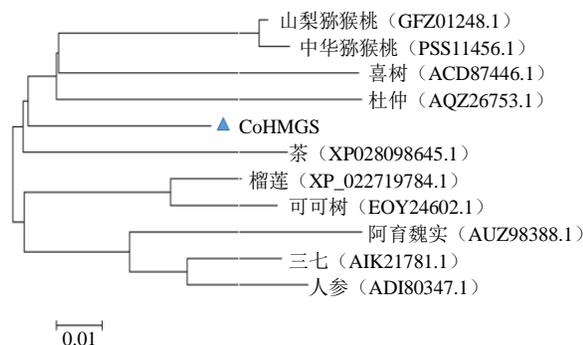


图7 CoHMGS 蛋白的 NJ 系统进化树

Fig. 7 NJ phylogenetic tree of CoHMGS protein

(L.) O. Ktze. 为 90.23%、喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 为 88.75%、人参 *Panax ginseng* C. A. Meye. 为 90.21%、榴莲 *Durio zibethinus* Murr. 为 90.32%、可可树 *Theobroma cacao* L. 为 89.46%、阿育魏实 *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. 为 88.82%、杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliver. 为 90.39%。使用 MEGA 5.0 软件构建山茱萸 CoHMGS 与其近缘物种的系统进化树(图7),说明山茱萸 HMGS 与喜树、杜仲、山梨猕猴桃和中华猕猴桃的同源性较近,三七、人参等植物的 HMGS 与山茱萸同源性较远。

4 讨论

近年来,随着研究的深入,许多萜类物质及其

衍生物的活性被解析,成为治疗诸多疾病的关键成分之一,如能够有效治疗肿瘤的紫杉醇,被誉为天然抗癌药物,是一种二萜生物碱类化合物^[17];可以抑制疟疾的青蒿素,是目前为止发现的治疗疟疾耐药性最好的药物,属于倍半萜内酯化合物^[18];明显减轻心绞痛,长期服用无明显不良反应,有效缓解冠心病症状的丹参酮^[19]等。这些天然的中药活性物质成分安全,对人体危害性小,是不可多得的健康药物,但是植物的次生代谢产物往往具有种类丰富、产量偏低的特点。因此,通过解析萜类物质的生物合成途径,从分子水平定向改造植物来提高特定次生代谢产物含量是十分必要的。

甲羟戊酸途径(MVA pathway)是植物生成萜类物质的重要途径,主要生成倍半萜和三萜类物质^[20]。HMGS广泛存在于高等植物体内,是MVA途径中的第2种酶,在有些植物体内HMGS有多个家族成员,Alex等^[21]于2000年发现了存在于芥菜中的4个HMGS基因,随后有研究者发现在巴西橡胶树内存在2个HMGS基因^[22]。研究表明,HMGS基因在植物的不同部位以及发育的不同时期的表达具有明显的差异性,并且作为MVA途径中的关键酶,影响多种植物发育模式的改变和次生代谢产物的生成^[23]。将HMGS在雷公藤悬浮细胞中的差异表达,结果表明:过表达 $TmHMGS$ 可提高MVA途径和MEP途径下游基因的表达量和二萜类化合物雷公藤甲素的含量,RNA干扰会降低MVA途径和MEP途径下游的基因表达量^[24]。外源激素处理银杏叶片,发现在合适的激素浓度和处理时间下水杨酸、茉莉酸甲酯、乙烯都能不同程度地提高 $GbHMGS$ 的表达量,同时也提高了银杏叶片中萜烯三内酯的总含量^[10]。通过在番茄幼苗中过表达芥菜HMGS基因($BjHMGS1$),可以明显地提高萜类物质合成途径MVA途径中HMGS上下游基因的表达量,并且也会影响MEP途径中相关基因的表达,从而提高转基因番茄果实中萜类物质(类胡萝卜素、角鲨烯)、 α -生育酚以及一些植物甾醇的含量^[25]。上述研究均表明HMGS基因在植物体内合成萜类物质的重要性。

山茱萸作为重要的中药材,其经济价值、生长习性和活性因子等方面得到了很大程度的开发,以山茱萸作为主要成分的中成药和保健品种类丰富,然而从分子水平上探究山茱萸活性成分生物合成途径的研究较少。本研究在高通量转录组测序的基础上,首次克隆出山茱萸HMGS基因的全长cDNA序列,并对山茱萸HMGS蛋白的基本特征和功能分析预测,为进一步揭示山茱萸萜类物质生物合成途径的分子机制奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020:28.
- [2] Dong Y, Feng Z L, Chen H B, et al. *Corni Fructus*: a review of chemical constituents and pharmacological activities [J]. *Chin Med*, 2018, 13: 34.
- [3] 贾羲, 苏成福, 董诚明. 山茱萸提取物抗肿瘤作用及机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(20): 117-121.
- [4] 冀麟麟, 王欣, 钟祥健, 等. 山茱萸的化学成分及其抗氧化活性 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(5): 137-143.
- [5] 侯祥平, 匡威, 陈克芳, 等. 山茱萸总苷及多糖对心肌梗死大鼠心肌炎症因子IL-6及IL-10的影响 [J]. 中国中医药科技, 2016, 23(5): 548-550.
- [6] 马艳霞, 吴勉华, 姜泽群, 等. 山茱萸环烯醚萜苷对D-GalN/TNF- α 损伤肝细胞的保护作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 118-122.
- [7] 范思思, 朱晶晶, 徐登球, 等. 山茱萸总苷的降糖作用途径研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(7): 1014-1019.
- [8] Yu F N, Utsumi R. Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(18): 3043-3052.
- [9] 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(18): 10271-10277.
- [10] Meng X X, Song Q L, Ye J B, et al. Characterization, function, and transcriptional profiling analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene ($GbHMGS1$) towards stresses and exogenous hormone treatments in *Ginkgo biloba* [J]. *Molecules*, 2017, 22(10): E1706.
- [11] 罗娅娜, 郑元, 原晓龙, 等. 牛樟芝1个 $AcHMGS$ 基因的克隆与表达分析 [J]. 西部林业科学, 2020, 49(4): 176-181.
- [12] 孙婷婷, 刘增才, 王世新, 等. 桑黄HMGS基因克隆、分子特性及差异表达分析 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5823-5829.
- [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] 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.
- [15] Zhang L, Yan X M, Wang J, et al. Molecular cloning and expression analysis of a new putative gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33(3): 953-961.
- [16] Hou D Y, Shi L C, Yang M M, et al. De novo transcriptomic analysis of leaf and fruit tissue of *Cornus officinalis* using Illumina platform [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192610.
- [17] 李先登, 张黎. 紫杉醇的合成研究进展 [J]. 化工设计

- 通讯, 2021, 47(1): 163-164.
- [18] 邸天男, 曹慧君, 葛春蕾. 青蒿素及其衍生物逆转抗肿瘤药物耐药性的研究现状 [J]. 肿瘤药学, 2020, 10(6): 649-653.
- [19] Luo Z, Liu Y, Zhao Z, *et al.* Effects of *Astragalus* injection and *Salvia Miltiorrhiza* injection on serum inflammatory markers in patients with stable coronary heart disease: A randomized controlled trial protocol [J]. *Trials*, 2020, 21(1): 267.
- [20] 陈瑶, 谢琴鼎, 唐亚琴, 等. 植物萜类合成代谢途径及限速酶的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(7): 2371-2379.
- [21] Alex D, Bach T J, Chye M L. Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally regulated and stress-responsive [J]. *Plant J*, 2000, 22(5): 415-426.
- [22] Sirinupong N, Suwanmanee P, Doolittle R F, *et al.* Molecular cloning of a new cDNA and expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene from *Hevea brasiliensis* [J]. *Planta*, 2005, 221(4): 502-512.
- [23] Liao P, Wang H, Hemmerlin A, *et al.* 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.
- [24] Tong Y R, Zhang Y F, Zhao Y J, *et al.* Differential expression of the *TwHMGS* gene and its effect on triptolide biosynthesis in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(8): 575-584.
- [25] Liao P, Chen X J, Wang M F, *et al.* Improved fruit α -tocopherol, carotenoid, squalene and phytosterol contents through manipulation of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa synthase1 in transgenic tomato [J]. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(3): 784-796.

[责任编辑 时圣明]