

大戟甲羟戊酸途径关键酶基因 *hmgr* 的克隆与分析

曹小迎¹, 蒋继宏^{1*}, 刘群¹, 戴传超², 陈凤美¹

(1. 徐州师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏徐州 221116; 2. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: 通过比较 6 种植物 8 条甲羟戊酸途径关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 基因同源区域, 设计简并引物, 利用 RT-PCR 技术成功地从大戟 (*Euphorbia pekinensis*) 叶中扩增出 458 bp 的基因片段。通过 BlastP 比较, 所推断的大戟 HMGR 蛋白序列与杜仲 *Eucommia ulmoides* (AAV54051)、穿心莲 *Andrographis paniculata* (AAP14352)、胡黄连 *Picrorhiza kurrooa* (ABC74565)、橡胶树 *Hevea brasiliensis* (AAU08214)、海岛棉 *Gossypium barbadense* (ABC71314)、龙胆草 *Gentiana lutea* (BAE92730) 的一致性分别达到 90%、86%、86%、92%、87% 和 88%。蛋白保守区、特征区以及进化树分析, 初步证实该基因为 *hmgr* 基因, 这是首次报道从药用植物大戟中克隆到甲羟戊酸途径关键酶 HMGR 的基因片段。

关键词: 大戟; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 基因克隆

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)02-0123-04

Cloning and Analysis of a cDNA Encoding Key Enzyme Gene (*hmgr*) of the MVA Pathway in Medicinal Plant *Euphorbia pekinensis*

CAO Xiao-Ying¹, JIANG Ji-Hong^{1*}, LIU Qun¹, DAI Chuan-Chao², CHEN Feng-Mei¹

(1. Xuzhou Normal University, Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant, Xuzhou, Jiangsu 221116, China;

2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Based on the design of degenerated oligonucleotides according to the conservative regions of eight 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases from six plants and total RNA extracted from *Euphorbia pekinensis*, a 458 bp fragment of *hmgr* was obtained using reverse transcription PCR strategy. Through sequence analysis by BlastP online, the resulting protein showed high homology to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, with 90% identification compared with *Eucommia ulmoides* (AAV54051), 86% with *Andrographis paniculata* (AAP14352), 86% with *Picrorhiza kurrooa* (ABC74565), 92% with *Hevea brasiliensis* (AAU08214), 87% with *Gossypium barbadense* (ABC71314) and 88% with *Gentiana lutea* (BAE92730). Deduced amino acid sequence were also analyzed by PROSITE, ClustalX and Phylogenetic tree, and data present evidence for the existence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in *E. pekinensis*, which is the first report of the *hmgr* gene isolated from *E. pekinensis*.

Key words: *Euphorbia pekinensis*; 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMGR); Gene cloning

许多植物萜类化合物(如抗肿瘤药物紫杉醇和抗疟药青蒿素)都具有很好的药理活性, 为解决当前西药毒副作用及治疗癌症、艾滋病等疑难疾病提供了一条新的药物来源, 因此植物萜类化合物引起了人们浓厚的兴趣。随着植物基因工程的飞速发展, 植物萜类代谢途径的研究取得了突破性的进展, 人们通过对关键酶基因的分离克隆, 表达调控进而对萜类次生代谢的合成途径和调控机制有了更为深入的了解^[1,2]。现代研究认为萜类在植物体中的合

成是分为两部分的, 一部分是甲羟戊酸途径, 在细胞质中进行, 产生倍半萜和三萜^[1]; 另一部分是非甲羟戊酸途径, 在细胞的质体中进行, 产生单萜、二萜和四萜^[2,3]。在甲羟戊酸途径中 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, HMGR)是主要的关键酶之一。目前, *hmgr* 基因已先后从苹果^[4]、红豆杉^[5]及甜瓜^[6]等植物中得到分离克隆。

药用植物大戟 (*Euphorbia pekinensis*) 又名龙虎

收稿日期: 2006-10-19, 修回日期: 2006-12-14。

基金项目: 徐州师范大学科研重点项目(04XLA14)资助。

作者简介: 曹小迎(1975-), 女, 江苏通州人, 博士研究生, 主要从事药用植物生物技术的研究工作。

* 通讯作者(E-mail: jhjiang@xznu.edu.cn)。

草、将军草、九头狮子等,在植物分类学上属大戟科,为多年生草本植物。全株含乳汁。现代医学研究发现,药用植物大戟的根具有多种药理作用,如致泻、利尿、降压等。临床一般用于治疗急、慢性肾炎水肿及晚期血吸虫病腹水或其他肝硬变腹水。研究发现,药用植物大戟根含三萜类成分大戟甙、生物碱、大戟色素体 A、B、C,另含树胶、树脂等^[7]。若能通过基因工程手段来调控萜类代谢途径的关键酶如 HMGR 等继而促进萜类活性代谢产物的合成积累将是一件十分有意义的事件。但迄今为止,国内外尚未见到有关大戟萜类物质代谢合成途径及其关键酶基因如 *hmgr* 等的研究报道。此外,从不同物种中分离克隆 *hmgr* 基因,从而进一步研究 *hmgr* 基因的结构特征、分子进化以其生物学功能都是非常有意义的。我们首次克隆了药用植物大戟 *hmgr* 基因的 cDNA 片段,并用生物信息学手段对其序列进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

大戟(*Euphorbia pekinensis*)原植物采自安徽省琅琊山森林公园,经安徽师范大学生命科学学院周守标教授鉴定。

1.2 总 RNA 的提取

大戟总 RNA 提取参照庄军平等^[8]报道的方法略加改动,可以概括为:取 1 g 大戟的幼嫩叶片,液氮速冻后研磨成粉末,移入 50 mL 离心管。加入 10 mL 65℃ 预热的抽提缓冲液[2% (W/V) CTAB(十六烷基三甲基溴化铵),100 mmol/L Tris/HCl (pH 7.4),2 mol/L NaCl,25 mmol/L EDTA(乙二胺四乙酸),2% (W/V) PVPP(交联聚乙烯吡咯烷酮)和 4% (V/V) β-巯基乙醇]。剧烈震荡 1 min 后 65℃ 温育 10 min。冷却至室温后加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),混匀后于 11 000 × g 4℃ 离心 15 min。取上清液,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),混匀后于 11 000 × g 4℃ 离心 15 min。取上清液,加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2),-80℃ 沉淀 1 h。取出后于 11 000 × g 4℃ 离心 15 min。沉淀用 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.6)淋洗后于 15 000 × g 4℃ 离心 10 min。沉淀溶于 500 μL DEPC 水中。继续再用氯仿/异戊醇抽提一次。取上清液,加入 2 倍体积的乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2),-80℃ 沉淀 1 h 后离心,用 70% 乙醇洗涤沉淀并溶于 500 μL DEPC(焦碳酸二乙酯)水中,然后再加入 2/3 体积的 8 mol/L 氯化

锂溶液,4℃ 存放过夜。第 2 天取出后 15 000 × g 4℃ 离心 30 min。沉淀再用 70% 乙醇洗 2 次后溶于 DEPC 水中,-80℃ 冰箱中保存,备用。

1.3 引物的设计与合成

引物的设计依据 6 种植物的 8 条 HMGRs 保守序列设计(Genbank 中的序列号为:CAU72145、CM-CHMCCOAR、AB021862、ATHHMG1、AY352338、AF429388、MAU43711)。上游引物序列为:5'-GG [G/C/T] GATGC [A/T/C] ATGGG [G/A] ATGAA [C/T] ATG, 下游引物序列为:5'-AC [A/T/C] GT [A/C/G] CC [A/C] ACCTCAATNGA [A/T/G] GGCAT-3'。由北京奥科生物技术有限公司合成。

1.4 cDNA 克隆及序列分析

以大戟总 RNA 为模板,用 RACE 试剂盒(Clontech)并按试剂盒操作步骤反转录合成 5' RACE cDNA,以合成的 5' RACE cDNA 为模板,用两个上下游引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为:50 μL 体系中含 2 μL 5' RACE cDNA,兼并引物各 25 pmol,dNTPs 10 μmol,Ex PCR buffer 5 μL,Ex Taq Polymerase 5 U。PCR 反应条件为 94℃ 3 min,1 个循环;94℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 10 min,1 个循环。用 1% 琼脂糖电泳分离 PCR 产物,回收目的条带并纯化,pGEM-T Easy 载体连接,转化 DH5α 大肠杆菌。在 LB/AMP/IPTG/X-Gal 平板上筛选阳性克隆,然后随机挑选经 PCR 和 EcoR I 酶切确认的重组质粒并测序,测序工作由北京奥科生物技术有限公司完成。将所测定的序列结果通过 BLASTP 或 BLASTX 搜索 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的核苷酸和蛋白质数据库,将所测序列通过 Dnaman 软件翻译成氨基酸序列并寻找最大读码框,用 Prosite 软件在线分析该蛋白的基本结构域,并通过 ClustalX 分析软件与其它植物 *hmgr* 的氨基酸序列进行多重比较,用 MEGA 方法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

大戟总 RNA 的甲醛变性凝胶的电泳结果见图 1,从图 1 中可以清晰地看出 rRNA 的 2 条条带(18S rRNA、28S rRNA),其中 28S rRNA 条带的亮度大约为 18S rRNA 的 2 倍,说明总 RNA 有良好的完整性。在紫外分光光度计上测得吸光值,A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.996,说明所提取的 RNA 质量较好,酚类、蛋白质和无机盐等杂质已基本排除。此 RNA 提取方法适

合于药用植物大戟总 RNA 的抽提。

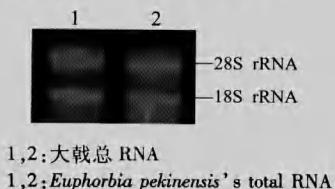


图 1 总 RNA 电泳
Fig. 1 Total RNA gel electrophoresis

2.2 大戟 *hmgr* 基因克隆与序列分析

用 RT-PCR 方法,以大戟总 RNA 为模板成功地扩增到一条约 500 bp 的条带(图2),与预期的片段大小符合。目的条带纯化后,克隆到 pGEMT_easy 载体,经蓝白斑筛选获得阳性转化子,抽提质粒,验证转化子大小,然后将分子量明显增大的重组质粒作为模板,用原引物进行 PCR 扩增,验证重组质粒插入的片段的大小,并进一步用酶切鉴定,表明重组质粒中插入的片段为 RT-PCR 克隆得到的片段。测序结果

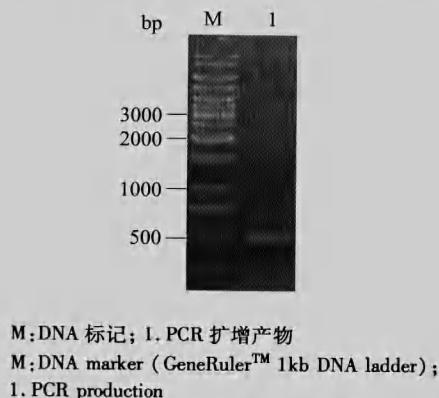


图 2 保守区片段扩增产物
Fig. 2 Product of conservation fragment



图 3 HMGR 蛋白 Prosise 分析结果
Fig. 3 Analysis of HMGR deduced protein by prosise

3 讨论

相对大戟属植物而言,药用植物大戟化学成分及分子生物学研究明显滞后。大戟属许多植物都具有抗癌、抗细菌、抗病毒等活性,并且从这些植物中

表明目标片段为 458 bp,基于该序列在 NCBI 网站上通过 BLASTN 比较,结果显示这条序列与橡胶树、南京椴、喜树等的 *hmgr* 基因有很高的同源性,说明扩增到的序列就是药用植物大戟的 *hmgr* 基因序列。

2.3 推断的 HMGR 蛋白的同源比较、功能域及结构分析

通过 BlastP 在线比较,结果显示推断的大戟 HMGR 蛋白与杜仲 *Eucommia ulmoides* (AAV54051)、穿心莲 *Andrographis paniculata* (AAP14352)、胡黄连 *Picrorhiza kurrooa* (ABC74565)、橡胶树 *Hevea brasiliensis* (AAU08214)、海岛棉 *Gossypium barbadense* (ABC71314)、龙胆草 *Gentiana lutea* (BAE92730) 的一致性分别达到 90%、86%、86%、92%、87% 和 88%。

用 Prosite 软件在线分析(<http://us.expasy.org/prosite/>),发现所推断的大戟 HMGR 蛋白具有 HMGR 家族中的保守区域,并发现了下列特征位点:一个蛋白激酶 C 磷酸化位点,两个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,六个 N 端豆蔻酰化位点(图 3)。同时分析了上面提到的不同来源 HMGR 蛋白质序列的结构特点,发现它们同样拥有这些结构特点。

2.4 推断的 HMGR 蛋白的进化分析

从 GenBank 上选取包括动物、植物、昆虫、真菌等 20 个来源不同的 HMGR 蛋白序列,与本研究所推断的大戟 HMGR 蛋白序列分析。用 MEGA3.1 软件按自展法 (bootstrap) 运算 1000 次,结果表明, HMGR 蛋白具有明显的种族特异性,大戟的 HMGR 蛋白属于植物的分支中(图 4),从图 4 中还可以看到植物、动物、昆虫与真菌在进化上有共同的起源,说明它们来源于共同的祖先。

分离出了二萜、三萜类化合物,研究发现很多大戟属植物的活性成分为萜类物质。大戟为多年生草本,干燥根入药。孔令义等^[9]从大戟根中获得 9 个化合物,其中 2 个为三萜类化合物。Wang Jue 等^[10]研究发现大戟地上部分醇提物浓度在 100 μg/mL 时对

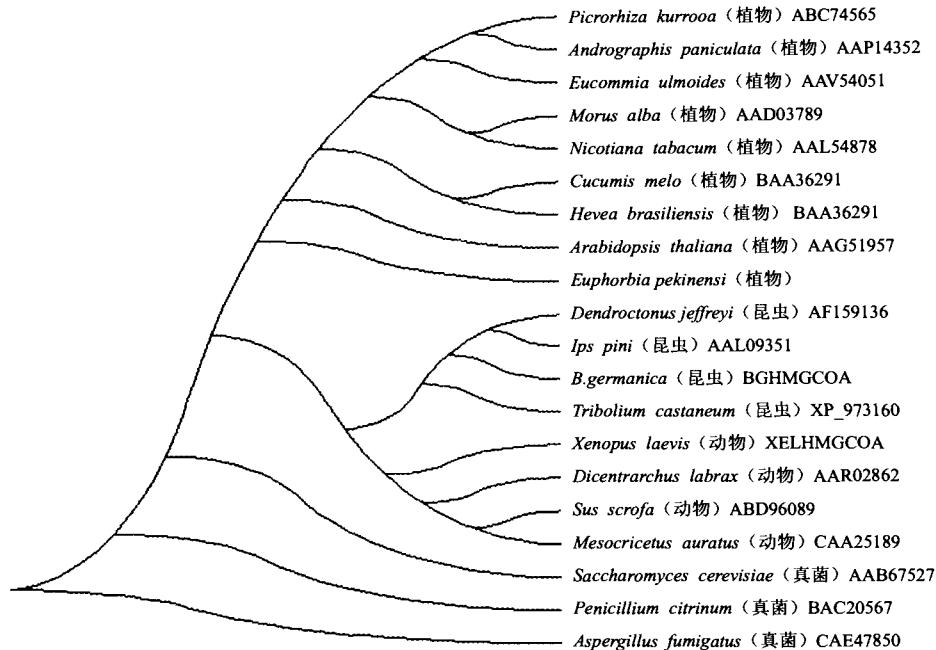


图4 20个物种HMGR蛋白在进化上的关系

Fig. 4 Phylogenetic relationship among HMGR proteins in 20 different species

杆细胞中组胺释放的抑制率为 87.3%，对拟巨噬细胞株 RAW264.7 中 NO 产生的抑制率为 50.7%。除此之外对大戟的萜类化学成分及活性成分的研究几乎未见报道。对大戟萜类化合物的生物合成及其分子调控更是知之甚少。

近年来，研究发现 HMGR 是甲羟戊酸途径中的一个关键酶。3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 在 HMGR 的作用下生成甲羟戊酸(MVA)。由于该反应是一个不可逆过程，因此 HMGR 被认为是该合成途径中第一个最关键的限速酶^[11]。HMGR 对细胞质中萜类物质的代谢起重要调控作用，作为早期酶类，它决定“碳流”的流向。利用转基因技术将 *hmgr* 基因导入目标植物来提高有效成分的含量有许多成功的报道^[12]。本文实验结果首次成功地从大戟中扩增出甲羟戊酸途径的关键酶基因 *hmgr*，通过同源性比较、保守性区域比较以及蛋白特征性位点分析，发现与前人所报道的 HMGR 蛋白特性非常相似，因此可以推断克隆得到的片段就是药用植物大戟 HMGR 的 cDNA 片段。为从大戟中克隆 HMGR 的全长基因进而通过基因工程手段提高大戟中的萜类化合物的研究和应用作了必要的前期准备。

参考文献：

- [1] Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34:95.
- [2] Eisenreich W, Schwarz M, Cartayrade A, Arigoni D, Zenk M H, Bacher A. The deoxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms [J]. *Chem Biol*, 1998, 5: R221.
- [3] Lichtenhaler H K. The 1-deoxyxylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50:47.
- [4] Rupasinghe H P V, Almqvist K C, Palivath G, Murr D P. Cloning of *hmgl* and *hmgl2* cDNAs encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and their expression and activity in relation to α -farnesene synthesis in apple [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39:933–947.
- [5] Liao Z H, Tan Q M, Chai Y R, et al. Cloning and characterization of the gene encoding HMG-CoA reductase from *Taxus media* and its functional identification in yeast [J]. *Functional Plant Biology*, 2004, 31:73–81.
- [6] Kato-Emori S, Higashi K, Hosoya K, Higashi K, Ezura H. Cloning and characterization of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in melon (*Cucumis melo* L. *reticulatus*) [J]. *Mol Genet Genomics*, 2001, 265:135–142.
- [7] 中国药材公司. 药用植物资源志要 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [8] 庄军平, 苏菁, 陈维信. 一种从香蕉果实提取高质量 RNA 的方法 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(1):143–146.
- [9] 孔令义, 闵知大. 大戟根化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1996, 31(7):524–529.
- [10] Wang J, Wang N, Yao X S, Ishii R, Kitanaka S. Inhibitory activity of Chinese herbal medicines toward histamine release from mast cells and nitric oxide production by macrophage-like cell line, RAW 264.7 [J]. *Journal of Natural Medicines*, 2006, 60(1): 73–77.
- [11] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthesis pathway in plants [J]. *Ann Rev Plant Physio Plant Mol*, 1995, 46:521–547.
- [12] Shimada H, Kondo K, Fraser P D, Miura Y, Saito T, Missawa N. Increased carotenoid production by the food yeast *candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(7):2676–2680.