

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

刘娟¹ 徐艳红¹ 杨勇² 梁良³ 高志晖¹ 杨云²
张争^{1 2} 隋春¹ 魏建和^{1 2 *}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 药用植物研究所 北京 100193 ; 2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 药用植物研究所海南分所 海南省南药资源保护与开发重点实验室 万宁 571533 ; 3. 山东中医药大学 济南 250355)

摘 要 以白木香(*Aquilaria sinensis*(Lour.) Gilg)茎 cDNA 为模板 采用反转录 PCR 及 RACE 技术分离得到 *HMGS* 基因 cDNA 全长。序列分析表明该基因序列全长 1 831 bp 共编码 465 个氨基酸 推导的蛋白质分子量为 51.4 kD , 理论等电点 6.25 命名为 *AsHMGS*。推导的 *AsHMGS* 蛋白质序列具有植物 HMGS 酶的典型结构 并预测出 HMGS 酶的活性中心。系统进化树分析表明 ,*AsHMGS* 蛋白与拟南芥、琴叶拟南芥、芥菜的相应蛋白相似度最高 其次为人参、喜树和野茶树。荧光定量 PCR 结果显示 茉莉酸甲酯能诱导白木香 *AsHMGS* 的表达。

关键词 白木香 *HMGS* 基因 序列分析 表达分析

中图分类号 Q949.761.1 文献标志码 A doi :10.7525/j.issn.1673-5102.2014.01.011

Cloning and Gene Expression of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase Gene(*AsHMGS*) from *Aquilaria sinensis*(Lour.) Gilg

LIU Juan¹ XU Yan-Hong¹ YANG Yong² LIANG Liang³ GAO Zhi-Hui¹ YANG Yun¹
ZHANG Zheng^{1 2} SUI Chun¹ WEI Jian-He^{1 2 *}

(1. Institute of Medicinal Plant Development ,Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College ,Beijing 100193 ; 2. Hainan Branch Institute of Medicinal Plant (Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine) ,Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College ,Wanning 571533 ; 3. Shangdong University of Traditional Chinese Medicine ,Jinan 250355)

Abstract Homologous *HMGS* gene cDNA was isolated from the stem of *Aquilaria sinensis*(Lour.) Gilg through reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique , and named as *AsHMGS*. The nucleotide sequence of *AsHMGS* gene was 1 831 bp and contained an open reading frame (ORF) of 1 398 bp encoding 465 amino acids with a molecular weight of 51.4 kD , and the theoretical isoelectric point was 6.25. Representative motifs of *AsHMGS* and active site were deduced in the amino acids sequence of *AsHMGS*. The results of phylogenetic analysis suggested that the protein sequence of *AsHMGS* had high similarity to that of *Arabidopsis thaliana* , *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* , and *Brassica juncea* , followed by *Camellia sinensis* , *Camptotheca acuminata* , and *Panax ginseng*. The results of real-time PCR showed that the transcription of *AsHMGS* could be induced by methyl jasmonate.

Key words *Aquilaria sinensis* *HMGS* gene ; sequence analysis ; gene expression analysis

国产沉香为瑞香科(*Thymelaeaceae*)植物白木香(*Aquilaria sinensis*(Lour.) Gilg)含树脂的木材 ,性微温 味辛、苦 归脾、胃、肾经 具有行气止痛、温中止呕、

纳气平喘的功效^[1]。沉香的活性成分主要有两类 倍半萜和色酮类化合物^[2~5] 前者是通过萜类合成途径中的脱氧木酮糖-5-磷酸(1-deoxy-D-xylulose- 5-phos-

基金项目 国家自然科学基金项目(81173481 31100220 31000136) ;北京协和医学院“ 新兴与交叉学科科研团队 ”项目(2012N07) ; 2013 年创新人才推动计划重点领域创新团队 2013 年北京协和医学院研究生创新基金项目(2013 - 1007 - 07)
第一作者简介 :刘娟(1987—) 女 博士研究生 主要从事诱导型药用植物的研究。

* 通信作者 E-mail :wjianh@263.net
收稿日期 2013 - 08 - 29

phate pathway ,DXP)途径和甲羟戊酸 (mevalonic acid pathway ,MVA)途径合成。多数研究表明 ,MVA 途径是倍半萜生物合成中 C5 单位的主要来

源^[6-8] 整个过程需要七个关键酶的催化反应(图1)。目前对于白木香 MVA 途径的关键酶研究仅限于 *HMGR* 基因^[9] ,对其他酶的研究尚未见报道。

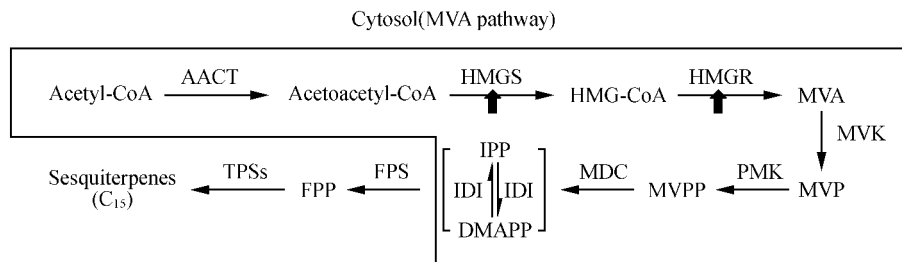


图1 萜类代谢途径中的 MVA 途径 Acetyl-CoA. 乙酰辅酶 A ;AACT. 乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶 ;Acetoacetyl-CoA. 乙酰乙酰辅酶 A ;HMGS. 羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 ;HMG-CoA. 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A ;HMGR. 羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 ;MVA. 甲羟戊酸 ;MVK. MVA 激酶 ;MVP. 甲羟戊酸-5-磷酸 ;PMK. 二氧磷基 MVA 激酶 ;MVPP. 甲羟戊酸-5-二磷酸 ;MDC. MVA 焦磷酸脱羧酶 ;IPP. 异戊二烯焦磷酸 ;DMAPP. 二甲丙烯焦磷酸 ;IDI. IPP 异构酶 ;FPS. FPP 合酶 ;FPP. 法呢基焦磷酸 ;TPSs. 萜类合酶 (框内为 MVA 途径)

Fig.1 MVA pathway of terpenoid biosynthesis AACT. Acetoacetyl-CoA thiolase ;HMGS. Hydroxyl methylglutaryl-CoA synthase ;HMG-CoA. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA ;HMGR. Hydroxyl methyl glutaryl-CoA reductase ;MVA. Mevalonate ;MVK. Mevalonate kinase ;MVP. Mevalonate-5-phosphate ;PMK. 5-phosphomevalonate kinase ;MVPP. Mevalonate-5-diphosphate ;MDC. Mevalonate pyrophosphate decarboxylase ;FPP. Farnesyl diphosphate ;FPS. Farnesyl diphosphate synthase ;IDI. Isopentenyl diphosphate isomerase ;IPP. Isopentenyl diphosphate ;MDC. Mevalonate pyrophosphate decarboxylase ;TPS. Terpene synthase (In the box was drew MVA pathway)

3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase ,HMGS)属于 MVA 途径中的一个关键酶 ,可以催化一个乙酰辅酶 A 与乙酰乙酰辅酶 A 缩合成 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA ,该化合物可以被 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^[10-12]。研究表明 ,HMGS 与 HMGR 可以相互协同共同来调节 MVA 代谢通路^[13-15]。目前 ,高等植物中有 20 余种植物的 HMGS 全长被克隆 ,如拟南芥^[16]、樟子松^[17]、巴西橡胶树^[18]、丹参^[19]、茶树^[20]等 ,仅有少数植物如拟南芥^[16]、丹参^[19]等对其功能和表达进行分析研究。本研究首次克隆了白木香 *HMGS* 基因的 cDNA 全长 ,也是沉香属植物中首次获得该基因全长 ,对其序列进行生物信息学分析 ,并通过荧光定量 PCR 对该基因与 *HMGR* 基因在化学伤害不同时间愈伤组织的表达和积累情况 ,为白木香萜类次生代谢产物合成机制及沉香形成的解析奠定基础 ,为沉香属其他植物研究提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

白木香(*Aquilaria sinensis*(Lour.) Gilg)的茎于

2013 年 2 月下旬采自中国医学科学院药用植物研究所的温室 ,经魏建和研究员鉴定 ,清洗干净后立即用液氮冷冻 ,存于 -80℃ 冰箱备用。

EASYspin Plus Plant RNA Kit 购于北京艾德莱生物科技有限公司 ;M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit ,pMD19-T 载体 ,LA Taq Polymerase ,DH 5α 感受态 ,SYBR Premix Ex Taq 均购于大连宝生物公司 ;琼脂糖凝胶回收试剂盒购于北京博迈德生物技术有限公司。本研究所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。基因测序由上海英潍捷基贸易有限公司完成。

PTC-200 型 PCR 扩增仪(Bio-Rad) ,NanoDrop 2000 核酸/蛋白定量仪(Thermo) ,台式高速离心机(Eppendorf) ,凝胶成像系统(Bio-Rad) ,制冰机(Sanyo) ,超低温冰箱(Sanyo) ,高压蒸汽灭菌锅(Sanyo)。

1.2 总 RNA 提取与单链 cDNA 的合成

取样品在液氮中研磨 ,根据 EASYspin Plus Plant RNA Kit 说明书提取总 RNA ,用 1% 琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 的完整性 ,用核酸/蛋白定量仪对 RNA 进行定量。cDNA 的合成按 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 说明书进行 ,合成的 cDNA 作为下游反应的模板。

1.3 *HMGS* 核心片段的扩增

根据白木香转录组高通量测序结果(由罗氏

公司应用 RNA 测序平台 454 GS FLX Titanium 完成 cDNA 文库测序),由一段已知的 *HMGS* unigene 序列(未注册)设计两对引物 *HMGS*-S 5'-TCTAACACAGCCAACACTCCTT-3', *HMGS*-A :5'-TGCCGTTCCTCGT CTCCTTAA-3',用于 *HMGS* 核心片段扩增;反应条件为在 0.2 mL 的 PCR 管中加入 0.5 μL 的 LA *Taq*(5 U · μL^{-1}) 5 μL 的 10 × LA PCR 缓冲液(Mg^{2+} Plus) 8 μL 的 dNTP Mixture(各 2.5 mmol · L^{-1}) 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物各 1.0 μL 2.5 μL 的 cDNA,ddH₂O 加至 50 μL 。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min (35 个循环) 72℃ 延伸 10 min。

1.4 3'RACE 及 5'RACE 扩增

根据已克隆到的 *HMGS* 核心片段,结合《分子克隆实验指南(第三版)》^[21]中 3'RACE 锚定引物序列 3' primer :5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3', 3' Nested primer :5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3',设计适合于 3'RACE 巢式 PCR 扩增的特异引物 3P1 :5'-GCCCTTCTACGATGCGAAGGTTCAACCA-3', 3P2 :5'-GAAGTTGAAGTCCAGGCACGAGTTCCC-3'。

根据已克隆到的 *HMGS* 核心片段,结合《分子克隆实验指南(第三版)》^[21]中 5'RACE 锚定引物序列 UPM Mix(UMP-L :5'-CTAATACGACTCATTATAGGGCAAGCAGTGCTATCAACGCAGAGT-3', UMP-S 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'以 1 :5 混合), NUP :5'-AAGCAGTGCTATCAACGCAGAGT-3',设计适合于 5'RACE 巢式 PCR 扩增的特异引物 5P1 5'-GGCTTCCTCGAATTTTGCTTTCA-3' 5P2 5'-GTCAGTGTTCCCGTATTTCTCAAA-3'。

反应条件为在 0.2 mL 的 PCR 管中加入 0.5 μL 的 LA *Taq*(5 U · μL^{-1}) 5 μL 的 10 × LA PCR 缓冲液(Mg^{2+} Plus) 8 μL 的 dNTP Mixture(各 2.5 mmol · L^{-1}) 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物各 1.0 μL 2.5 μL 的 cDNA,ddH₂O 加至 50 μL 。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min 94℃ 30 s、61℃ 30 s、72℃ 3 min (40 个循环) 72℃ 延伸 10 min。

1.5 白木香 *HMGS* 基因编码区 PCR 扩增

根据获得的 *HMGS* 的 3'端序列、5'端序列和中间保守区序列拼接结果设计引物:ORF-S 5'-CGT-TGCCGTTCTCCTCTCCTT-3';ORF-A :5'-TCCGATGCCTGCTCAACTACTT-3'。在 0.2 mL 的 PCR 管中加入 0.5 μL 的 LA *Taq*(5 U · μL^{-1}) 5 μL 的 10 × LA PCR 缓冲液(Mg^{2+} Plus) 8 μL 的 dNTP Mixture

(各 2.5 mmol · L^{-1}) 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物各 1.0 μL 2.5 μL 的 cDNA,ddH₂O 加至 50 μL ,进行 PCR 反应,条件为 94℃ 预变性 5 min 94℃ 30 s、57℃ 30 s、72℃ 3 min(40 个循环) 72℃ 10 min。

1.6 PCR 反应纯化及克隆测序

按琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段,连接到 pMD19T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,加入不含抗生素的 LB 培养基振荡培养 45 min,使菌体复苏。吸取 100 μL 已转化的感受态细胞,均匀涂布于含有 100 mg · L^{-1} 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37℃ 恒温过夜培养,挑取白斑单菌落,接种于含有 100 mg · L^{-1} 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 320 r · min^{-1} 振荡培养 10 h。菌液 PCR 鉴定为阳性的克隆送测序。

1.7 白木香 *HMGS* 基因 cDNA 序列的生物信息学分析

采用生物信息学方法对白木香 *HMGS* 基因的核苷酸及氨基酸序列进行分析,对其信号肽、跨膜拓扑结构域、疏水性/亲水性、蛋白二级和三级结构等进行预测和推断。利用 NCBI BLAST 程序对核酸及氨基酸序列进行相似性检索,用 ORF Finder 程序查找基因 *HMGS* 开放阅读框架;蛋白质信号肽的预测、跨膜结构及亲水性/疏水性的分析利用在线工具 SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、Prot Scale(<http://web.expasy.org/protscal>)、TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)完成;蛋白质二级结构、三级结构的预测利用 SOPMA(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl)和 CPH-models-3.2 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>)在线工具完成;利用 DNASTar 和 DNAMAN 软件对序列进行分析比对,并用 MEGA5.0 软件对序列进行系统进化树分析。

1.8 白木香 *HMGS* 与 *HMGR* 基因的表达分析

白木香的愈伤组织用浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的茉莉酸甲酯(MeJA)进行喷洒处理,利用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR, qRT-PCR)的方法检测白木香愈伤组织中 *HMGS* 和 *HMGR* 基因在不同伤害处理时间(未处理 CK 2 h 4 h 6 h 8 h 12 h 24 h 2 d)的表达情况。选取白木香 *GADPH* 为内参基因^[22],引物序列见表 1。每个样品设 3 个重复。反应体系为 12.5 μL SYBR Premix Ex *Taq* 酶,上下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL 模板(50 mg · L^{-1}) 2 μL ddH₂O 9.5 μL ,总体积 25 μL 。反应程序:

95℃ 预变性 3 min ,95℃ 变性 5 s ,55℃ 退火 30 s , 72℃ 延伸 30 s(每次循环后采集荧光信号) 40 个 循环 95℃ 变性 10 s 65 ~95℃ 做熔解曲线分析 每个

温度以每步 0.5℃ 上升 ,每个温度停留 5 s。数据通 过 Excel 进行分析 ,获得白木香 *HMGS* 与 *HMGR* 基 因(GenBank 注册号 JQ990217.1)的相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 设计与使用的引物
Table 1 Primers designed and used in real-time PCR

正向引物 Forward primer	序列 Sequence(5'-3')	反向引物 Reverse primer	序列 Sequence(5'-3')
GADPH-F	CTGGTATGGCATTCCGTGTA	GADPH-R	AACCACATCCTCTTCGGTGTA
HMGS-F	GTTGAAGTCCAGGCACGACTTCC	HMGS-R	CCGTGTTCACAGGCACTGTTCTC
HMGR-F	CGTTCTATTGAGAGATGGGATGAC	HMGR-R	ATGGCATCACCACTGTCTACAAG

2 结果与分析

2.1 白木香 *HMGS* 基因 cDNA 全长的克隆

利用引物 HMGS-S/A 在单链 cDNA 模板扩增 出 1 条长为 1 000 bp 的特异条带(图 2 :I 第 3 泳 道) ,通过 BLAST 程序检索 ,该扩增片段与毛果杨 (*Populus trichocarpa* ,Accession No. :XM_002304422.1 , XM_002304423.1) 、二穗短柄草(*Linum usitatissimum* , Accession NO. :FJ461258.1) 的 *HMGS* 核苷酸序列同 源性达到 80% 以上 确定该片段为白木香 *HMGS* 基因 片段。据此段序列分别设计用于基因 3'-RACE 和 5'- RACE 序列扩增的特异引物 ,通过 PCR 扩增分别 得到 1 条约 500 bp 和 1 条约 500 bp 的条带(图 2 : II ,III)。3 条基因片段序列拼接后得到 1 条长 1 831 bp 的基因序列 ,该序列与巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* ,Accession No. :AF429389.1 ,AF396829. 1) 、毛果杨(*Populus trichocarpa* ,Accession No. :XM _002304422.1 ,XM_002298040.1) 、蓖麻(*Ricinus communis* ,Accession No. :XM_002509646.1) 、茶树 (*Camellia sinensis* ,Accession No. :JQ390224.1) 、人

参(*Panax ginseng* ,Accession No. :GU565098.1) 的 *HMGS* 相似性分别为 82% 82% 82% 81% 80%。 通过 NCBI 中 ORF finder 工具查找到该序列包含 一个长 1 398 bp 的开放阅读框 ,共编码 465 个氨基 酸 ,编码序列与蓖麻(*Ricinus communis* ,Accession No. :XP_002509692.1) 巴西橡胶树(*Hevea brasilien- sis* ,Accession No. :BAF98279.1 ,AAL18930.1) 大豆 (*Glycine max* ,Accession No. :XP_003549866.1) 、茶 树(*Camellia sinensis* ,Accession No. :AFC34137.1) 、 罗 汉 果 (*Siraitia grosvenorii* , Accession No. : AEM42970.1) *HMGS* 全长基因序列相似性分别为 87%、86%、86%、85%、85%。此外还有 157 bp 的 5'非编码区 ,276 bp 的 3'端非编码区 ,且在 3'端非 编码区存在 20 个碱基组成的 polyA 尾(图 3)。为 了验证拼接序列的正确性 ,根据拼接好的序列设计 引物对白木香的 *HMGS* 编码区进行扩增 ,得到一 条约 1 800 bp 左右的特异条带 ,序列测定结果与拼接 结果序列一致。因此可确定该序列为白木香 *HMGS* 基因的 cDNA 全长序列 ,将其命名为 AsH- MGS(GenBank 注册号 KF134541)。

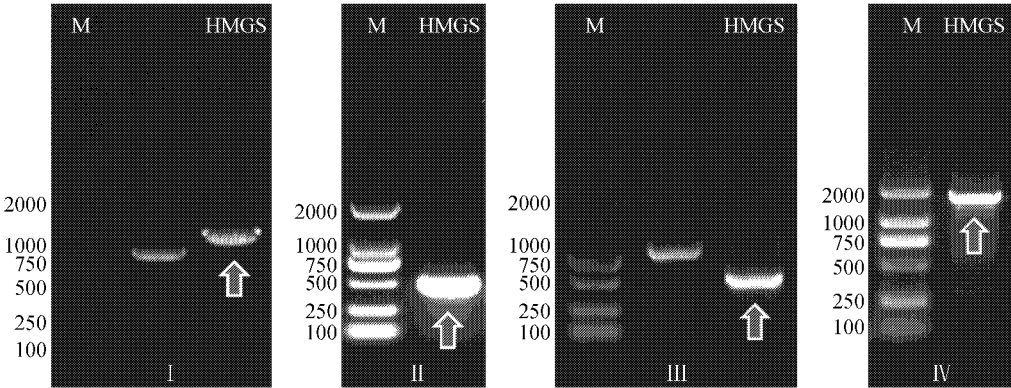


图 2 *AsHMGS* 基因 RT-PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳图 I . 核心片段扩增 ; II . 3' 末端序列扩增 ; III . 5' 末端序列扩增 ; IV . *HMGS* 编码区扩增(箭头标注为 *HMGS* 基因)
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification of *AsHMGS* I . Core fragment ; II . 3' end fragment ; III . 5' end fragment ; IV . *AsHMGS*-full sequence

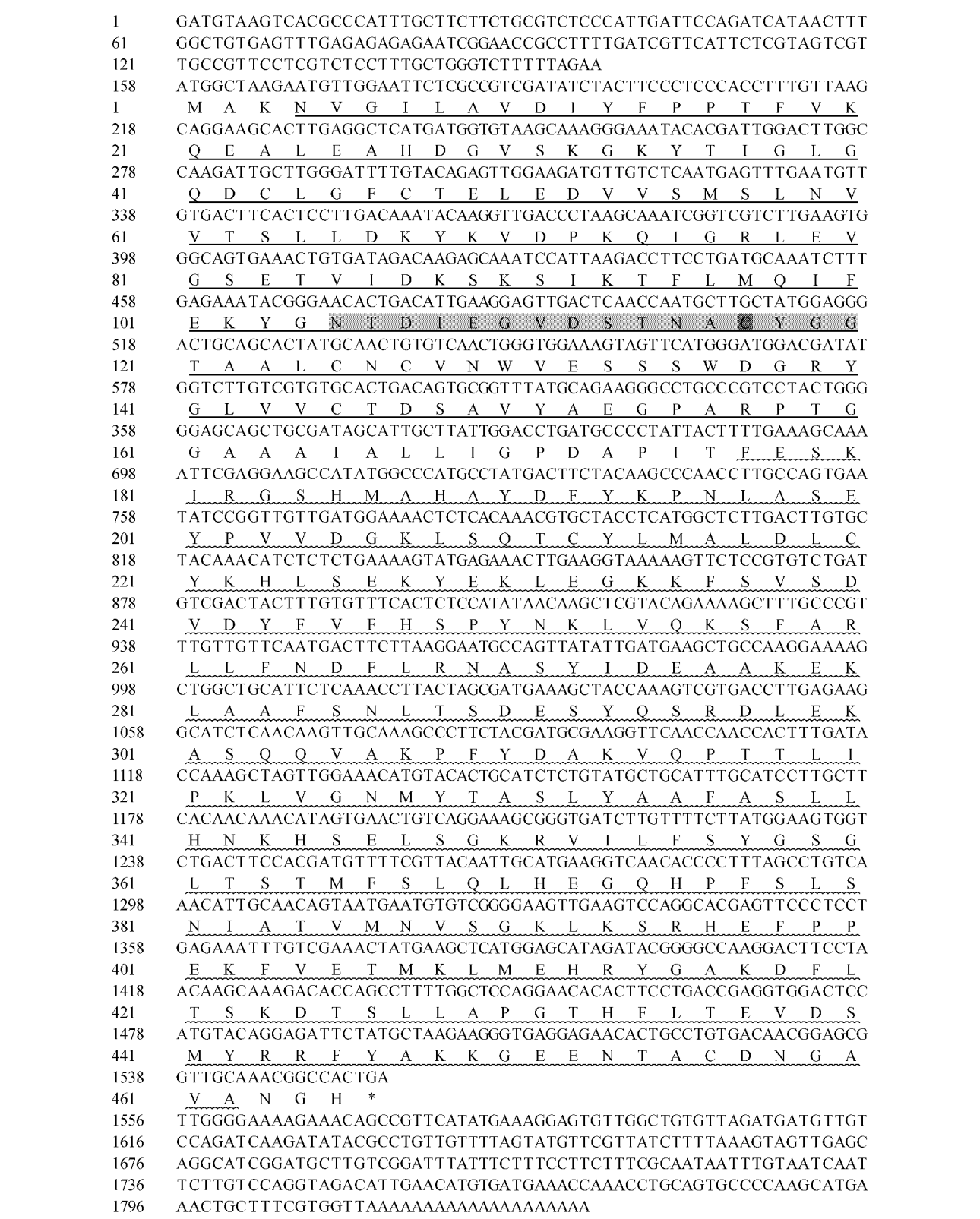


图 3 白木香 *AsHMGS* 全长 cDNA 序列及推导的 *HMGS* 氨基酸序列 —表示 *HMGS* 预测蛋白的 N 端 ~表示 *HMGS* 预测蛋白的 C 端; 表示 *HMGS* 蛋白的活性中心 表示活性中心的关键氨基酸残基

Fig. 3 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *AsHMGS* —N terminal of *AsHMGS* ~C terminal of *AsHMGS* ; Active site of *AsHMGS* Key amino acid residue of *AsHMGS*

2.2 白木香 HMGS 蛋白质序列分析

2.2.1 理化性质

使用 ExPaSy ProtParam 程序预测 *AsHMGS* 编码蛋白的分子量为 51.4 kD ,分子式为 $C_{2306}H_{3568}N_{596}O_{696}S_{20}$,理论等电点为 6.25 ,蛋白不稳定系数为 33.84 ,属于稳定蛋白质。白木香 *HMGS* 基因编码的蛋白质共有 20 种氨基酸 ,其中含量最高的是 Leu ,为 9.7% ;Ser、Ala、Lys、Gly 也较多 ,分别为 9.0%、8.4%、8.0%、6.9% ;而含量最低的是 Try ,只有 0.4%。使用 NCBI 的 Conserved Domains 数据库对序列进行分析 ,发现从氨基酸残基的第 4 个位点到第 159 个位点为 *HMGS* 蛋白的 N 端 ,第 177 个位点到 449 位点处为 *HMGS* 蛋白的 C 端(图 3)。由 Prosite 在线软件分析 ,显示白木香 *HMGS* 基因翻译的蛋白质在第 105~120 位点处是 *HMGS* 酶的活性中心 ,其中 117 位的 C 氨基酸残基就是 *HMGS* 酶的活性中心最关键的氨基酸残基(图 3)。

2.2.2 白木香 HMGS 蛋白信号肽及跨膜结构预测分析

运用 SignalP 4.1 Server 对白木香 *HMGS* 氨基酸序列的信号肽进行预测 ,第 22 号氨基酸残基具有最高的原始剪切位点分值 0.135 ,第 19 号氨基酸残基具有最高的信号肽分值 0.327 ,第 22 号氨基酸残基具有最高的综合剪切位点分值 0.150。由此可见 ,白木香 *HMGS* 不存在信号肽酶切位点 ,不具有信号肽 ,与其他植物的 *HMGS* 蛋白预测结果一致。萜类代谢的 *MVA* 途径存在于细胞质中 ,可以推断 ,白木香的 *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。

利用 TMHMM Server. v. 2.0 对白木香 *HMGS*

氨基酸序列的跨膜结构域进行预测 ,结果显示 ,整条肽链不存在跨膜结构域 ,这与其他植物的 *HMGS* 蛋白预测结果一致。结合亚细胞定位预测软件分析 ,白木香的 *HMGS* 蛋白主要存在于细胞质。因此可推断 ,白木香 *HMGS* 蛋白主要在细胞质中合成 ,不进行跨膜运转 ,保留在细胞质基质中行使催化功能。

2.2.3 白木香 HMGS 蛋白亲水性/疏水性分析

运用 Prot Scale 软件对白木香 *HMGS* 氨基酸序列的疏水性/亲水性进行预测 ,结果显示 ,多肽链 293 位为亲水性最强的位点 ,分值为 -2.467 ,多肽链 165 与 166 疏水性最强 ,分值为 2.600。整个多肽链中疏水性氨基酸只含 37.9% ,整个蛋白表现为亲水性 ,表明该基因编码的蛋白为亲水性蛋白。

2.2.4 白木香 HMGS 蛋白二级结构、三级结构的预测

蛋白质高级结构的预测和分析可以较好了解结构与功能的相关性。用 SOPMA 对白木香 *HMGS* 氨基酸序列的二维结构进行预测 ,结果如图 4 所示 ,白木香 *HMGS* 由 43.44% 的 α -螺旋 ,15.48% 的延伸链 ,5.59% 的 β 折叠和 35.48% 的不规则卷曲组成。 α -螺旋是白木香 *HMGS* 中最多的结构元件 ,以不规则卷曲散布于整个蛋白质中。

运用 CPHmodels-3.2 Server 在线软件对 *AsH-MGS* 氨基酸序列进行蛋白质三维结构同源性建模分析 ,结果图 5 所示 ,在 *AsHMGS* 蛋白三维模型中可以直观显示出其 N 端结构域、C 端结构域和 11 个主要的 α -螺旋二级结构域的立体结构组成。整体蛋白呈一个椭球形 ,在 N 端与 C 端中部形成一个结构较为疏松的地带 ,与一级结构预测的活性中心比较接近。

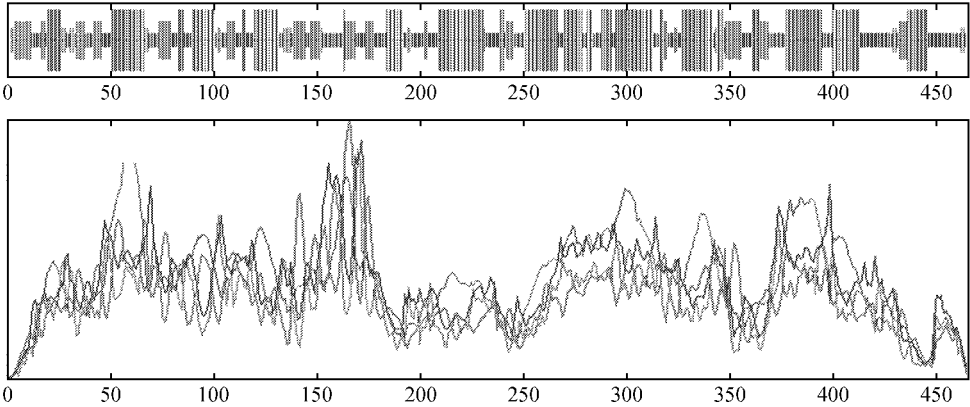


图 4 白木香 *AsHMGS* 蛋白二级结构的预测 α -螺旋(蓝线)延伸链(红线) β -转角(绿线)不规则盘绕(黄线)

Fig. 4 Deduced secondary structure of *AsHMGS* protein Helix. Blue line ;Extended strand. Red line ;Beta turn. Green line ;Random Coil. Yellow line

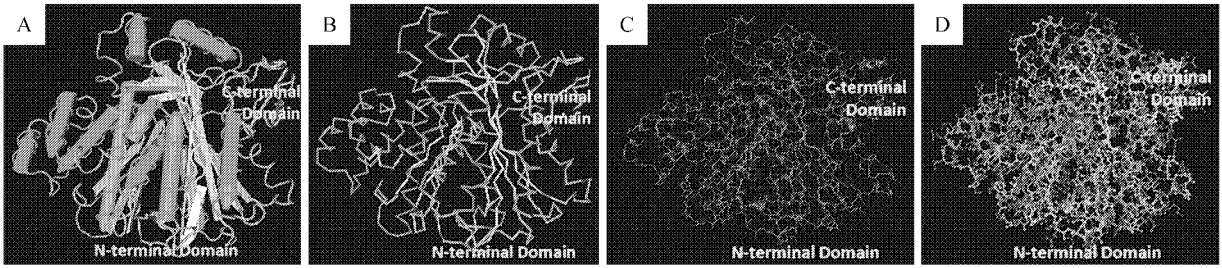


图 5 白木香 AsHMGS 蛋白三级结构的预测 A. Worms 型图 ;B. Tubes 型图 ;C. Wire 型图 ;D. Ball and Stick 型图

Fig.5 Deduced three-dimensional structure of AsHMGS protein A. Worms ;B. Tubes ;C. Wire ;D. Ball and Stick

白木香 <i>Aquilaria sinensis</i>	MAKNVGI LAMDIYFPPTFCVQOEAL EAH D GSKGKYIT IGLGQDC LGECTELEDVYSMSLNWVTSLLDKYKVDKQIGRLEV	80
芥菜 <i>Brassica juncea</i> , AAG32923.1	MAENVGILAMDIYFPPTCVQOEAL EAH D GSKGKYIT IGLGQDC LAFCTELEDVYSMSFNNAVTSLLDKYKIDPMOIGRLEV	80
大豆 <i>Glycine max</i> , XP_003549866.1	MAKNVGI LAMDIYFPPTCIGQELL EAH D GSKGKYIT IGLGQDC MAFCTELEDVYSMSLTWVSSLLDKYKIDPMOIGRLEV	80
巴西橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> , BAF98279.1	MAKNVGI LAMDIYFPPTIYQOEAL EAH D GSKGKYIT IGLGQDC MAFCTELEDVYSMSLTAVTSLLDKYKIDPMOIGRLEV	80
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> , AEE83053.1	MAKNVGI LAMDIYFPPTCVQOEAL EAH D GSKGKYIT IGLGQDC LAFCTELEDVYSMSFNNAVTSLLDKYKIDPMOIGRLEV	80
蓖麻 <i>Ricinus communis</i> , XP_002509692.1	MAKNVGI LAMDIYFPPTCVQOEAL EAH D GSKGKYIT IGLGQDC MAFCTELEDVYSMSLTAVTSLLDNYNIDPMOIGRLEV	80
Consensus	ma nvgila diyfptt qe leahdg skgkyitiglqdc fcte edv sms v sl y dp qigrlev	
白木香 <i>Aquilaria sinensis</i>	GSSETVIDKSKSIKTFEMQIF EKGNTDIEGVDSINACYGGTAALCITVSEGGSSSWDGRYGLVYCTDSAVYAEGPARPTG	160
芥菜 <i>Brassica juncea</i> , AAG32923.1	GSSETVIDKSKSIKTFEMQIF EKGNTDIEGVDSINACYGGTAALLNCVNWVESNSWDGRYGLVYCTDSAVYAEGPARPTG	160
大豆 <i>Glycine max</i> , XP_003549866.1	GSSETVIDKSKSIKTFEMQIF EKGNTDIEGVDSINACYGGTAALLNCVNWVESNSWDGRYGLVYCTDSAVYAEGPARPTG	160
巴西橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> , BAF98279.1	GSSETVIDKSKSIKTFEMQIF EKGNTDIEGVDSINACYGGTAALLNCVNWVESNSWDGRYGLVYCTDSAVYAEGPARPTG	160
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> , AEE83053.1	GSSETVIDKSKSIKTFEMQIF EKGNTDIEGVDSINACYGGTAALLNCVNWVESNSWDGRYGLVYCTDSAVYAEGPARPTG	160
蓖麻 <i>Ricinus communis</i> , XP_002509692.1	GSSETVIDKSKSIKTFEMQIF EKGNTDIEGVDSINACYGGTAALLNCVNWVESNSWDGRYGLVYCTDSAVYAEGPARPTG	160
Consensus	gsetvidksksiktf mq fek gntd egvds nacyggtaal v s swdgrylv ctdsavyaegparptg	
白木香 <i>Aquilaria sinensis</i>	GAAAIAMLLIGPDAPITFESEKLRGSHMAHYDFYKPNLASEYPPVDGKLSQTCYLMALDSCYKHLCKNFKLEGKEFSIND	240
芥菜 <i>Brassica juncea</i> , AAG32923.1	GAAAIAMLLIGPDAPITFESEKLRGSHMAHYDFYKPNLASEYPPVDGKLSQTCYLMALDSCYKHLCKNFKLEGKEFSIND	240
大豆 <i>Glycine max</i> , XP_003549866.1	GAAAVAMLLIGPDAPITFESEKLRGSHMAHYDFYKPNLASEYPPVDGKLSQTCYLMALDSCYNELSHKYEKQEGKQFSIND	240
巴西橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> , BAF98279.1	GAAAIAMLLIGPDAPITFESEKLRGSHMAHYDFYKPNLASEYPPVDGKLSQTCYLMALDSCYKHLCKNFKLEGKEFSIND	240
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> , AEE83053.1	GAAAIAMLLIGPDAPITFESEKLRGSHMAHYDFYKPNLASEYPPVDGKLSQTCYLMALDSCYKHLCKNFKLEGKEFSIND	240
蓖麻 <i>Ricinus communis</i> , XP_002509692.1	GAAAIAMLLIGPDAPITFESEKLRGSHMAHYDFYKPNLASEYPPVDGKLSQTCYLMALDSCYKHLCKNFKLEGKEFSIND	240
Consensus	gaaa a ligp api fesk r shm h ydfykpnlaseyppvdgklsqtcylmald cy h k ek egk fs d	
白木香 <i>Aquilaria sinensis</i>	VDYEFVHSPYKNLVQKSFARLLYNDFLRNASSIDEAAKEKLEPSTLTDGSEYQNRDLEKVSQQAQKPYDAKVQPTTLT	320
芥菜 <i>Brassica juncea</i> , AAG32923.1	ADYEFVHSPYKNLVQKSFARLLYNDFLRNASSIDEAAKEKLEPSTLTDGSEYQNRDLEKVSQQAQKPYDAKVQPTTLT	320
大豆 <i>Glycine max</i> , XP_003549866.1	ABYEFVHSPYKNLVQKSFARLLYNDFLRNASSIDEAAKEKLEPSTLTDGSEYQNRDLEKVSQQAQKPYDAKVQPTTLT	320
巴西橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> , BAF98279.1	ABYEFVHSPYKNLVQKSFARLLYNDFLRNASSIDEAAKEKLEPSTLTDGSEYQNRDLEKVSQQAQKPYDAKVQPTTLT	320
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> , AEE83053.1	ADYEFVHSPYKNLVQKSFARLLYNDFLRNASSIDEAAKEKLEPSTLTDGSEYQNRDLEKVSQQAQKPYDAKVQPTTLT	320
蓖麻 <i>Ricinus communis</i> , XP_002509692.1	ABYEFVHSPYKNLVQKSFARLLYNDFLRNASSIDEAAKEKLEPSTLTDGSEYQNRDLEKVSQQAQKPYDAKVQPTTLT	320
Consensus	y vfhsypynklvqksfaryl ndf nas d aakek l desyq rdlek sqq ak yd kvqpttl	
白木香 <i>Aquilaria sinensis</i>	PKLVGNMYTASLYAAASLLHKNHSELGKRVILFSYSGSLTSMFSLRLHREGOHPFSLSNIAATVMNVACKLKRSRHEFP	400
芥菜 <i>Brassica juncea</i> , AAG32923.1	PKLVGNMYTASLYAAASLLHKNHSDLAGKRVVVFYSYSGSLTSMFSLRLCKNKSPPFSLSNIASVMDIGCKLKARHEYAP	400
大豆 <i>Glycine max</i> , XP_003549866.1	PKLVGNMYTASLYAAASLLHKNHSTLDGKRVILFSYSGSLTSMFSLRLREGOHPFSLSNIDKMMVDVACKLKRSRHEFP	400
巴西橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> , BAF98279.1	PKLVGNMYTASLYAAASLLHKNHTELAKGRVILFSYSGSLTSMFSLRLHREGOHPFSLSNIAATVMNVACKLKRSRHEFP	400
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> , AEE83053.1	PKLVGNMYTASLYAAASLLHKNHNDLAGKRVVVFYSYSGSLTSMFSLRLDNKPPFSLSNIASVMDVGCKLKARHEYAP	400
蓖麻 <i>Ricinus communis</i> , XP_002509692.1	PKLVGNMYTASLYAAASLLHKNHSLGKRVILFSYSGSLTSMFSLRLHREGOHPFSLSNIAATVMNVACKLKRSRHEFP	400
Consensus	pk vgnmytaslyaa f sl h k l gkrv fsygs g t m fsl l pfs sni m k l k r h e p	
白木香 <i>Aquilaria sinensis</i>	EKFVEIMKLMEHRYGAKDFVTSKSD...TSLLAPGTIYLLTEVDIMYRRFYAKNGEENTACDNGAVANG	464
芥菜 <i>Brassica juncea</i> , AAG32923.1	EKFVEIMKLMEHRYGAKDFVTSKEGILELLAPGTIYLLTEVDIMYRRFYAKNGEENTACDNGAVANG	460
大豆 <i>Glycine max</i> , XP_003549866.1	EKFVEIMKLMEHRYGAKDFVTSKSD...TSLLAPGTIYLLTEVDIMYRRFYAKNGEENTACDNGAVANG	463
巴西橡胶树 <i>Hevea brasiliensis</i> , BAF98279.1	EKFVEIMKLMEHRYGAKDFVTSKSD...TSLLAPGTIYLLTEVDIMYRRFYAKNGEENTACDNGAVANG	459
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> , AEE83053.1	EKFVEIMKLMEHRYGAKDFVTSKSD...TSLLAPGTIYLLTEVDIMYRRFYAKNGEENTACDNGAVANG	460
蓖麻 <i>Ricinus communis</i> , XP_002509692.1	EKFVEIMKLMEHRYGAKDFVTSKSD...TSLLAPGTIYLLTEVDIMYRRFYAKNGEENTACDNGAVANG	463
Consensus	ekf mklmehryg k f t l p t l evd yrrfy k g g	

图 6 推导的白木香 AsHMGS 蛋白序列与 HMGS 同源蛋白序列的多重比对 红框中所框的氨基酸残基是白木香 HMGS 蛋白的活性中心

Fig.6 Multi-alignment of amino acid sequences in deduced AsHMGS protein sequence and HMGS homologous protein sequence Active site of AsHMGS was framed by red line

2.3 HMGS 基因编码蛋白的多重比对分析、保守区预测及系统进化树的构建

用 DNAMAN 软件比较了白木香与拟南芥、蓖

麻、芥菜、巴西橡胶树、大豆 HMGS 基因编码的氨基酸序列,从图 6 中可以看出,白木香 HMGS 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,保守性较强。在 NCBI 的蛋白保守结构域数据库(Conserved Domain Database, CDD)中对白木香 HMGS 预测蛋白的保守区分析,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(HMGS)。整个蛋白基本都属于保守区。

利用 MEGA5 软件中 Clustal W 法对包括白木香在内的 26 个不同物种 HMGS 蛋白序列比对,采用 Neighbor-joining 法构建了系统进化树(图 7)。

发现高等植物、藻类、真菌以及软体动物的 HMGS 蛋白序列在进化上分别属于不同的分类群,其中高等植物与藻类的 HMGS 蛋白序列在进化树上比较接近,而真菌可能与软体动物,而不是植物的 HMGS 蛋白进化上更为接近。白木香的 AsHMGS 蛋白序列与琴叶拟南芥、芥菜的亲缘关系最为接近,其次为人参、喜树和野茶树,在植物界的几个序列中与单子叶植物粗山羊草、乌拉尔图小麦的亲缘关系最远,而与藻类及微生物关系较远,与传统的形态学分类一致。

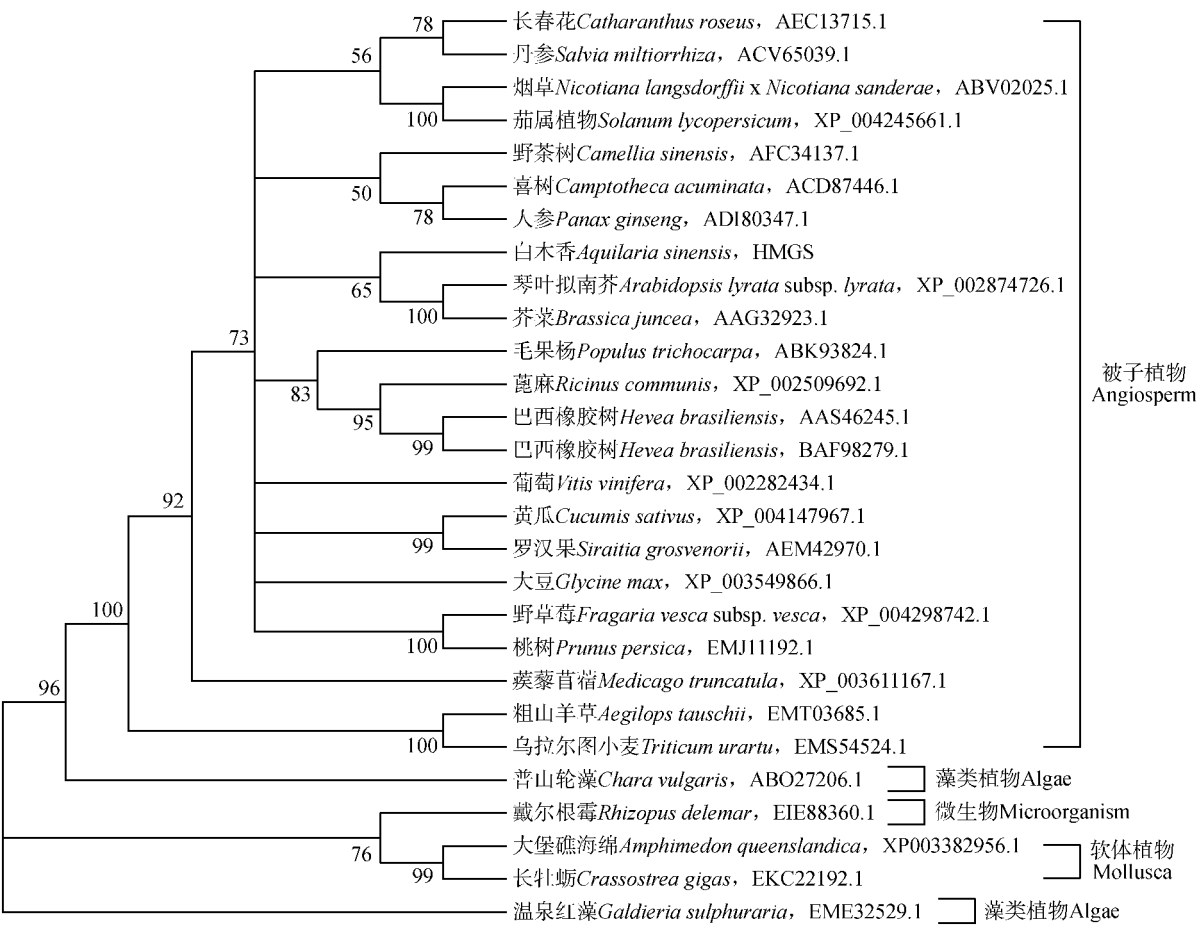


图 7 HMGS 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic analysis of HMGS amino acid sequence

2.4 白木香 HMGS 和 HMGR 基因在不同伤害处理时间的表达分析

本研究采用 qRT-PCR 分别检测未处理组 CK 及 100 μmol · L⁻¹茉莉酸甲酯伤害处理后(2 h 4 h , 6 h 8 h ,12 h 24 h 2 d)HMGS 和 HMGR 基因的表达情况,结果显示 HMGS 和 HMGR 基因在新鲜愈伤组织中表达量较低,而在伤害后表达水平显

著升高, HMGS 基因在 6 h 处基因表达量最高,是对照组的 7.63 倍, HMGR 基因在 24 h 处基因表达量最高,是对照组的 4.34 倍(图 8)。从图中可以看出,白木香的 HMGS 比 HMGR 基因更容易被茉莉酸甲酯所诱导,且诱导的趋势类似,暗示白木香 HMGS 和 HMGR 基因可能存在协同调控的作用。

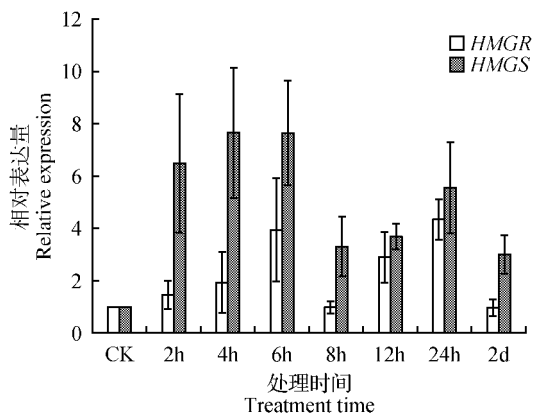


图 8 荧光定量 PCR 检测不同伤害处理时间白木香 *HMGS* 和 *HMGR* 基因的表达 ($n=3$)

Fig. 8 Expression analysis of *HMGS* and *HMGR* of *A. sinensis* in different wound treatment time by qRT-PCR ($n=3$)

3 讨论

白木香(*A. sinensis*(Lour.) Gilg)为我国特有的珍稀濒危药用植物 ,1998 年就被列为《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录 II^[23]。由于伐树取香 ,目前野生资源几乎破坏殆尽 ,为满足国内外市场对优质沉香的需求 本课题组提出白木香防御诱导结香机制假说^[2,24] ,发明了通体结香技术^[25~26]。课题组已获得 *HMGR*^[9,27]、*DXP*(待发表 注册号 :JX860326. 1 ,JX860325. 1)、*ASS*(注册号 :JQ712682. 1 ,JQ712683. 1 ,JQ712684. 1)^[24] 及 *FPS*(注册号 :ADH95185)^[24] 关键基因 ,本研究首次克隆获得了白木香 *HMGS* 基因全长并进行了生物信息学分析。结果发现 ,该基因编码的氨基酸具有典型的 *HMGS* 酶的作用位点、模序及结构域 ,这些结构是 *HMGS* 行使功能时不可缺少的组成单位 ,因此说明克隆得到的 *AsHMGS* 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白木香 MVA 萜类合成途径。在与其它植物的 *HMGS* 蛋白的同源性分析和分子进化分析表明 ,推导的 *AsHMGS* 与拟南芥等十字花科植物的 *HMGS* 蛋白相似度高 ,拟南芥为传统模式植物 ,可为后期功能验证及转基因研究提供依据。另外 ,*HMGR* 基因对甲羟戊酸代谢“碳硫”的调控起重要作用^[28] ,研究表明白木香的 *HMGR* 基因很可能与沉香的形成有关^[27] ,而本实验荧光定量 PCR 结果显示 ,*AsHMGS* 表达受茉莉酸甲酯的诱导 ,表达趋势与白木香 *HMGR* 基因有一定程度的类似 ,暗示可能与白

木香 *HMGR* 基因共同协同调控整个 MVA 途径 ,后期可考虑用酵母双杂交、免疫共沉淀等方法对二者关系进行深入探索。本研究为进一步鉴定 *AsHMGS* 基因在沉香倍半萜合成中的功能及沉香形成机制的探索奠定基础。

参 考 文 献

1. 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [S]. 北京 : 中国医药科技出版社 , 2010 : 172 - 173.
2. 张争 , 杨云 , 魏建和 , 等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说 [J]. 中草药 , 2010 , 41 (1) : 156 - 159.
3. Chen H Q , Yang Y , Xue J , et al. Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood , wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis*(Lour.) Gilg trees [J]. Molecules , 2011 , 16 : 4884 - 4896.
4. Chen H Q , Wei J H , Yang J S , et al. Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. Chem Biodivers , 2012 , 9 (2) : 236 - 250.
5. Regula Naef. The volatile and semi-volatile constituents of agarwood , the infected heartwood of *Aquilaria* species : A review [J]. Flavour Fragr J , 2011 , 26 : 73 - 89.
6. Laule O , Fürholz A , Chang H S , et al. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA , 2003 , 100 : 6866 - 6871.
7. Dudareva N , Andersson S , Orlova I , et al. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers [J]. Proc Natl Acad Sci USA , 2005 , 102 : 933 - 938.
8. Schuhr C A , Radykewicz T , Sagner S , et al. Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy [J]. Phytochem Rev , 2003 , 2 : 3 - 16.
9. Xu Y H , Yang X , Wei J H , et al. Cloning and expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Aquilaria sinensis*(Lour.) Gilg [J]. Chin Herb Med , 2013 , in press.
10. Rohmer M , Knani Mh , Simonin P , et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria : a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [J]. Biochem J , 1993 , 295 : 517 - 524.
11. Newman J D , Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants : carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology , 1999 , 34 (2) : 11.
12. Yu F , Utsumi R. Diversity , regulation , and genetic manipu-

- lation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis[J]. Cell Mol Life Sci 2009 ,66 :3043 – 3052.
13. Stermer B A ,Bostock B M. Involvement of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase in the Regulation of Sesquiterpenoid Phytoalexin synthesis in Potato[J]. Plant Physiol ,1987 ,84 :404 – 408.
 14. Gil G ,Goldstein J L ,Slaughter C A ,et al. Multiple genes encode nuclear factor 1-like proteins that bind to the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. Proc Natl Acad Sci USA ,1988 ,85 :8963 – 8967.
 15. Mehrabian M ,Callaway K A ,Clarke C F ,et al. Regulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and the chromosomal localization of the human gene[J]. J Biol Chem ,1986 ,261 :16249 – 16255.
 16. 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 ,197 – 201.
 17. Wegener A ,Gimbel W ,Werner T ,et al. Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestria* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase[J]. Biochimica et Biophysica Acta ,1997 ,1350 :247 – 252.
 18. Suwanmanee P ,Sirinupong N ,Suvachittanont W. Regulation of the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene in *Hevea brasiliensis*(B. H. K) Mull Arg[J]. Plant Science 2004 ,166 :531 – 537.
 19. 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.
 20. 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.
 21. J · 莎姆布鲁克. 分子克隆实验指南 :第 3 版[M]. 北京 : 科学出版社 2005 :644 – 650.
 22. Gao Z H ,Wei J H ,Yang Y ,et al. Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis*[J]. Plant Cell Rep ,2012 ,31 : 1759 – 1768.
 23. <http://www.cites.org/> [accessed 7 August 2012]
 24. Xu Y ,Zhang Z ,Wang M ,et al. Identification of genes related to agarwood formation :transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis*[J]. BMC Genomics 2013 ,14 :227.
 25. Liu Y Y ,Chen H Q ,Yang Y ,et al. Whole-tree Agarwood-inducing Technique :An Efficient Novel Technique for Producing High-Quality Agarwood in Cultivated *Aquilaria sinensis* Trees[J]. Molecules 2013 ,18 :3086 – 3106.
 26. Zhang X L ,Liu Y Y ,Wei J H ,et al. Production of high-quality agarwood in *Aquilaria sinensis* trees via whole-tree agarwood-induction technology[J]. Chinese Chemical Letters 2012 ,23(6) :727.
 27. 徐艳红 ,杨欣 ,张争 ,等. 白木香 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因 *AsHMGR2* 的克隆及表达分析[J]. 药学报 2013 ,48(6) :953 – 959.
 28. Chen D H ,Ye H C ,Li G F ,et al. Advances in molecular biology of plant isoprenoid metabolic pathway[J]. Acta Bot Sin 2000 ,42 :551 – 558.