

本文引用:刘湘丹,陈 勋,龙雨青,王志辉,刘芙蓉,王朝晖,童巧珍,周日宝. 灰毡毛忍冬与忍冬 *HQT2* 基因的克隆及表达分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(7): 1215-1224.

灰毡毛忍冬与忍冬 *HQT2* 基因的克隆及表达分析

刘湘丹^{1,2,3}, 陈 勋⁴, 龙雨青¹, 王志辉^{1,2}, 刘芙蓉^{1,2}, 王朝晖^{1,2}, 童巧珍^{1,2,3}, 周日宝^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208; 2. 湘产大宗地道药材种质资源及规范化种植重点研究室, 湖南 长沙 410208;
3. 湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室, 湖南 长沙 410208; 4. 南华大学附属南华医院, 湖南 衡阳 421002

[摘要] 目的 分别克隆灰毡毛忍冬与忍冬 *HQT2* 基因全长序列, 并进行生物信息学和表达量分析, 以揭示 *HQT2* 在灰毡毛忍冬与忍冬绿原酸生物合成中的可能功能。方法 多糖多酚试剂盒法分别提取灰毡毛忍冬与忍冬花总 RNA, 通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆 *HQT2* 基因的全长 cDNA 序列, 运用相关软件对该基因序列进行生物信息学分析; 利用实时荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 分别测定灰毡毛忍冬与忍冬茎、叶及不同花期花中相关基因的相对表达量; 采用 HPLC 测定绿原酸含量并结合表达量做相关性分析。结果 克隆得到 *LmHQT2* (MH196564) 和 *LjHQT2* (MK294639), 其开放阅读框长度均为 1 296 bp, 编码 431 个氨基酸, 生物信息学分析预测为亲水性蛋白, 可能定位于细胞质中, 属于氯霉素乙酰转移酶样结构域超家族; qRT-PCR 结果显示, *HQT2* 基因具有组织特异性, 在灰毡毛忍冬与忍冬茎、叶及不同花期花器官中表达存在差异; 绿原酸含量与基因相对表达量之间呈现一定的相关性。结论 本研究成功克隆了灰毡毛忍冬与忍冬 *HQT2* 基因并探索其在不同器官中的表达模式, 推测 *HQT2* 基因在灰毡毛忍冬与忍冬的绿原酸生物合成途径中发挥不同功能, 为进一步研究该基因的功能及探究灰毡毛忍冬和忍冬绿原酸生物合成调节机制提供了研究基础。

[关键词] 灰毡毛忍冬; 忍冬; *HQT2*; 基因克隆; 生物信息学分析; 表达分析

[中图分类号] R282.2

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.07.010

Cloning and expressions of *HQT2* genes in *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. and *Lonicera japonica* Thunb.

LIU Xiangdan^{1,2,3}, CHEN Xun⁴, LONG Yuqing¹, WANG Zhihui^{1,2}, LIU Xiaorong^{1,2},

WANG Zhaohui^{1,2}, TONG Qiaozhen^{1,2,3}, ZHOU Ribao^{1,2,3*}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Laboratory for the Germplasm Resources and Standardized Planting of Hunan's Bulk Authentic Medicinal Materials, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Chinese Medicinal Modernization, Changsha, Hunan 410208, China;
4. Nanhua Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China

[Abstract] **Objective** To reveal the possible functions of *HQT2* gene in the chlorogenic acid biosynthesis of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. (*L. macranthoides*) and *Lonicera japonica* Thunb. (*L. japonica*) by cloning the full-length sequences of *HQT2* genes from *L. macranthoides* and *L. japonica* respectively for bioinformatics and expression analysis. **Methods** The total RNAs of *L. macranthoides* and *L. japonica* were extracted respectively using Biospin Polysaccharide Polyphenol Plant Total RNA Extraction Kit. The full-length cDNA sequences of *HQT2* genes were cloned by RT-PCR and RACE, and bioinformatics analysis was performed on them with relevant softwares. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to determine the relative expression

[收稿日期] 2022-12-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81673546, 81203007); 湖南省自然科学基金项目 (2021JJ30497, 2021JJ30515); 国家现代农业产业技术体系建设专项项目 (CARS-21); 湖南省现代农业产业技术体系建设专项项目; 湖南省大学生创新训练项目 (202104080117); 湖南中医药大学研究生创新训练项目 (2021CX80, 2022CX79); 2020 年湖南省一流专业建设点: 中药资源与开发。

[第一作者] 刘湘丹, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药资源与品质评价研究。

[通信作者] * 周日宝, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 1057323510@qq.com。

levels of the genes in the stems and leaves, as well as the flowers at different flowering stages of *L. macranthoides* and *L. japonica* respectively. The content of chlorogenic acid was determined by HPLC and the correlation between it and the relative expression level of *HQT2* gene was analyzed. **Results** The full-length cDNA sequences of *LmHQT2* gene (MH196564) and *LjHQT2* gene (MK294639) were cloned successfully, each of which contained a 1296 bp open reading frame (ORF) and encoded 431 amino acids. Bioinformatics predictive analysis indicated that the proteins encoded by the two genes were hydrophili, possibly located in the cytoplasm, belonging to the chloramphenicol acetyltransferase-like domain superfamily. qRT-PCR showed that *HQT2* gene was tissue-specific, and its expression levels were different in the stems and leaves, as well as the floral organs at different flowering stages of *L. macranthoides* and *L. japonica*. There was a certain correlation between chlorogenic acid content and the relative expression level of this gene. **Conclusion** This study cloned *HQT2* genes of *L. macranthoides* and *L. japonica* successfully and analyzed their expressions in the different plant organs. It is speculated that *HQT2* gene plays different functions in the chlorogenic acid biosynthesis pathways of *L. macranthoides* and *L. japonica*, which provided a research basis for further study of the function of this gene and the regulation mechanism of chlorogenic acid biosynthesis in *L. macranthoides* and *L. japonica*.

[**Keywords**] *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.; *Lonicera japonica* Thunb.; *HQT2*; gene cloning; bioinformatics analysis; expression analysis

灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. 和忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 均来源于为忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属 (*Lonicera* Linn.) 植物, 其干燥花蕾或带初开的花分别作为山银花和金银花入药, 在 2005 版《中华人民共和国药典》开始分列, 均具有清热解毒、疏散风热功效^[1]。绿原酸是灰毡毛忍冬和忍冬共有活性成分之一, 现代研究表明其具抗氧化、抗高血压、抗菌、抗肿瘤、抗辐射、降血糖、降血脂、抗炎、补肾、保肝等多种药理作用^[2], 其为金银花、山银花清热解毒的潜在功效标志物^[3]。医药、化工和食品等领域对绿原酸均有广泛需求^[4], 其应用前景广泛。研究发现灰毡毛忍冬花蕾中的绿原酸含量较忍冬花蕾明显高^[5], 进行两者绿原酸生源合成途径关键基因比较研究, 探究两者绿原酸含量差异分子机制具有重要意义。

绿原酸是由咖啡酸的 1 位羧基和奎尼酸的 3 位羟基缩合成酯的天然产物^[6], 是重要的植物苯丙素类次生代谢产物之一, 最初由 L-苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonialyase) 生成反式肉桂酸, 然后在肉桂酸-4 羟化酶 (cinnamate 4-hydroxylase) 和 4-香豆酸连接酶 (4-coumarate CoA ligase) 作用下生成对-香豆酰辅酶 A, 最后在羟基肉桂酰辅酶 A 奎尼酸羟基肉桂酰转移酶 (hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase)

作用下生成绿原酸^[6]。目前, 有研究者对烟草^[7-8]、番茄^[7]、咖啡^[9]、朝鲜蓟^[10-11]、忍冬^[12]、灰毡毛忍冬^[13]、白花虎眼万年青^[14]、番薯^[15]等植物进行 *HQT* 基因克隆、生物信息学以及表达模式分析的相关研究, 从而证明 *HQT* 与绿原酸合成有直接关系^[16]。

课题组前期构建了灰毡毛忍冬转录组, 通过分析挖掘到注释为 *HQT* 的片段 (Unigene9130), 与 NCBI 中已收录的忍冬与灰毡毛忍冬的 *HQT* 序列不同。因此, 本研究以灰毡毛忍冬与忍冬花为材料, 根据转录组数据中 Unigene9130 序列设计引物, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 克隆两者中 *HQT* 基因的全长 cDNA 序列, 并进行生物信息学分析, 运用 qRT-PCR 和 HPLC 技术进行表达模式与绿原酸含量的相关性分析, 为进一步通过分子水平探究两者绿原酸含量差异提供实验依据, 同时也为完善绿原酸生物合成途径和调节机制研究奠定基础。

1 材料

1.1 药材来源

采收种于湖南中医药大学药植园的灰毡毛忍冬与忍冬的当年生新鲜茎、叶及不同花期花样品 (见图 1), 用装有液氮的泡沫盒运回实验室, 经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为灰毡毛忍冬与忍冬的茎、叶、花, 保存于 -80 °C 超低温冰箱。

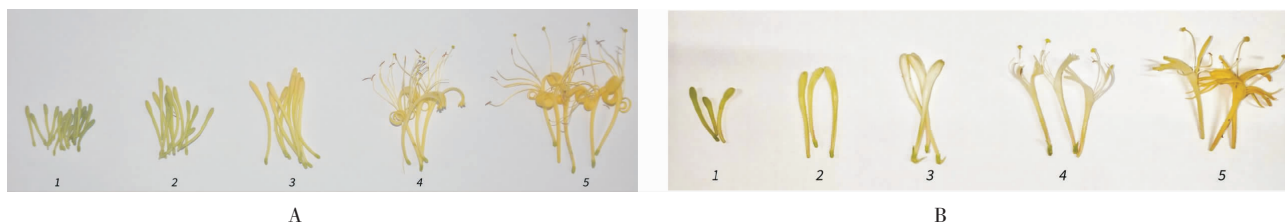


图 1 灰毡毛忍冬和忍冬 5 个花期花样品图

注: A. 灰毡毛忍冬; B. 忍冬; 1. 幼蕾期; 2. 青蕾期; 3. 白蕾期; 4. 银花期; 5. 金花期。

1.2 试剂

多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (Biospin, BSC65S1, 杭州博日科技有限公司); 反转录试剂盒 (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, K1622, Thermo); 快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, CW2302、2×Taq MasterMix (Dye)、CW0682、2×Pfu MasterMix (Dye)、CW0682 (康为世纪生物科技有限公司); *pEASY*[®]-T1 Cloning Vector, CT101、*pEASY*[®]-Blunt Cloning Vector, CB101、*TranStart*[®] Green qPCR SuperMix UDG, AQ111 (北京全式金生物科技有限公司); RACE 试剂盒 (SMARTer[®] RACE5'/3' Kit, 634858, Clontech)。引物序列见表 1, 由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物浓度均为 10 μmol/L。

2 方法

2.1 *HQT2* 基因的克隆

2.1.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 取适量灰毡毛忍冬与忍冬白蕾期花, 按照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA^[17], 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 核酸蛋白分析仪检测 RNA 的纯度。将质量较好的 RNA, 参照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书, 逆转录合成 cDNA 的第一链。

2.1.2 *HQT2* 基因核心片段扩增 根据本课题组前期转录组测序结果, 选取注释为 *HQT* 的序列 (Uni-gene9130), 应用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 *HQT2*-F 和 *HQT2*-R (见表 1), 以逆转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 25 μL: ddH₂O 9.5 μL, 2×Taq MasterMix (Dye) 12.5 μL,

cDNA 1 μL, *HQT2*-F 和 *HQT2*-R 各 1 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 °C 终延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 切下目的条带, 快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收, 以 *pEASY*[®]-T1 Cloning Vector 为载体, 与目的基因连接, 转化至 Trans1-T1 感受态细胞中, 通过含有 20 mg/L 的 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚 β-D-半乳糖苷)、500 mmol/L 的 IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)、100 mg/L 的 Amp (氨苄西林) 的 LB 固体培养基进行蓝白斑筛选, 挑选白斑进行菌落 PCR, 将阳性克隆接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中过夜培养, 委托铂尚生物技术有限公司对菌液进行测序。

2.1.3 *HQT2* 基因 3' 和 5' 端 RACE 扩增 根据“2.1.2”项核心片段测序结果, 设计 RACE 特异性引物 (见表 1), 按 Clontech 公司 SMARTer[®] RACE5'/3' Kit 试剂盒说明书, 获得 5' 和 3'-RACE-Ready cDNA, 用 Tricine-EDTA Buffer 稀释。

灰毡毛忍冬 *HQT2* PCR 反应体系 50 μL: PCR-Grade H₂O 15.5 μL, 2×SeqAmp Buffer 25 μL, SeqAmp DNA Polymerase 1.0 μL, 5' 或 3'-RACE-Ready cDNA 25 μL, 10×UPM 5 μL, 5' 或 3' 引物 1 μL。PCR 反应条件: 94 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min, 3' 端 25 个循环, 5' 端 30 个循环。

忍冬 *HQT2* 第 1 次 PCR 反应体系 50 μL: PCR-Grade H₂O 15.5 μL, 2×SeqAmp Buffer 25 μL,

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途	目标长度/bp
<i>HQT2</i> -F	CGGACGGTTAGGTTTGTATGCT	核心片段克隆	790
<i>HQT2</i> -R	TACCCGTTGTCCATCTGCCGTTA	核心片段克隆	790
<i>Lm-HQT2</i> -3'	GATTACGCCAAGCTTATGAACACCGCACCCAGCCCAATCAAGTC	3' 端 RACE 克隆	953
<i>Lm-HQT2</i> -5'	GATTACGCCAAGCTTGGCGGTGAAACAGCCTTGGGACTTGAT	5' 端 RACE 扩增	836
<i>Lj-HQT2</i> -3'	GAGTGTGTTTGTGTAAGCGGAATCGGA	3' 端 RACE 扩增(外引物)	953
<i>Lj-HQT2</i> -3'N	ATGAACACCGCAACAGCCCAATCAAGTC	3' 端 RACE 扩增(内引物)	908
<i>Lj-HQT2</i> -5'	TCGTCCATCTGCGTTAGGGCACTGTGAA	5' 端 RACE 扩增(外引物)	1068
<i>Lj-HQT2</i> -5'N	TGAAGACCACATTCGCCAGGTAGCCAAA	5' 端 RACE 扩增(内引物)	1023
<i>V-HQT2</i> -F	ATTTCAACTCAAAAAGTTTCTCCCTGTC	全长验证	1621
<i>V-HQT2</i> -R	CCCAGGTTCAACGTCATTGATCCATAC	全长验证	1621
<i>Q-HQT2</i> -F	TTTCCACCGCCATCCTAAAG	实时荧光定量 PCR	102
<i>Q-HQT2</i> -R	GGACCTCGTATGTGCTGTAATC	实时荧光定量 PCR	102
18S-F	CTTCGGGATCGGAGTAATGA	内参基因	
18S-R	GCGGAGTCTAGAAGCAACA	内参基因	

SeqAmp DNA Polymerase 1.0 μL , 5' 或 3'-RACE-Ready cDNA 2.5 μL , 10 \times UPM 5 μL , 5' 或 3' 外引物 1 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35 个循环。第 2 次巢式 PCR, 取第 1 次 PCR 产物 1 μL , 加入 24 μL Tricine-EDTA Buffer 稀释后作为模板, 反应体系 50 μL : PCR-Grade H_2O 17 μL , 2 \times SeqAmp Buffer 25 μL , SeqAmp DNA Polymerase 1 μL , 第 1 次 PCR 产物稀释液 5 μL , UPS 1 μL , 5' 或 3' 内引物 1 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 25 个循环。

扩增目的条带回收和测序等过程同“2.1.2”项, 其中载体使用 *pEASY*[®]-Blunt Cloning Vector。

2.1.4 *HQT2* 基因 cDNA 全长序列验证 利用 ContingExpress 对 3' 端和 5' 端进行序列拼接, 得到 *HQT2* 基因的 cDNA 全长, 根据拼接全长设计 cDNA 全长验证引物 V-*HQT2*-F 和 V-*HQT2*-R (见表 1), 以“2.1.1”项下 cDNA 为模板进行全长验证。反应体系 25 μL : ddH₂O 9.5 μL , 2 \times Pfu MasterMix(Dye) 12.5 μL , cDNA 1 μL , V-*HQT2*-F 和 V-*HQT2*-R 各 1 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增目的条带回收和测序等过程同“2.1.2”项, 其中载体使用 *pEASY*[®]-Blunt Cloning Vector。

2.2 生物信息学分析

采用 NCBI 在线软件“ORF finder”查找 *HQT2* 的开放阅读框 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), 通过在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/prot-param/>) 预测蛋白质结构, 分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点及稳定性等参数; 采用 ProtScale 软件 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 测定蛋白质亲水性/疏水性; WOLF-PSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 在线预测蛋白质亚细胞定位情况; TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白质跨膜结构分析; SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 分析蛋白质结构域; SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-

MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 软件分别预测蛋白质的二级结构和三级结构; 通过 NCBI 的蛋白质序列数据库进行 BLAST, 筛选出同源性较高的物种, 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸多重序列比对, MEGA 7 软件构建系统进化树。

2.3 *HQT2* 基因的组织表达水平分析

根据 *HQT2* 基因全长序列, 设计 qRT-PCR 的特异性引物 Q-*HQT2*-R 和 Q-*HQT2*-F (见表 1), 以 18S rRNA 做为内参基因^[18-19]。按照“2.1.1”项方法提取灰毡毛忍冬与忍冬茎、叶和 5 个不同花期花的总 RNA, 将 RNA 定量后, 反转录成 cDNA, 进行实时荧光定量分析。反应体系 20 μL : *TranStart*[®] Green qPCR SuperMix UDG 10 μL , cDNA 1 μL , Q-*HQT2*-R 和 Q-*HQT2*-F 各 0.4 μL , ddH₂O 8.2 μL 。反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 40 个循环, 做溶解曲线分析, 每个样品重复 3 次, 实验在 Bio-Rad CFX96 上进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算基因的相对表达量。

2.4 灰毡毛忍冬和忍冬茎、叶及不同花期花绿原酸含量测定

利用 Agilent Technologies 1260 Infinity 高效液相色谱仪, 采用 Supersil ODS-B 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 参照 2020 年版《中华人民共和国药典》山银花项下绿原酸含量测定方法^[1], 对灰毡毛忍冬和忍冬茎、叶及不同花期花样品进行 HPLC 分析。

3 结果

3.1 *HQT2* 基因全长获得

3.1.1 总 RNA 的提取 灰毡毛忍冬和忍冬花的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳见图 2, 可见 28S 和 18S 条带明显, 其中 28S 处的亮度是 18S 的两倍, 说明 RNA 完整性较好, $A_{260/280}$ 值为 1.8~2.0, $A_{260/230}$ 值 >2.0, RNA 质量符合后续实验要求。

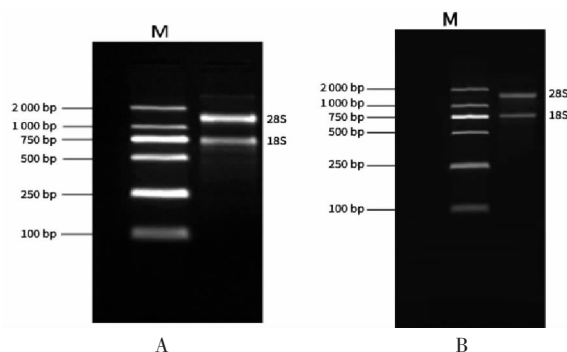


图 2 总 RNA 琼脂糖电泳图

注: A. 灰毡毛忍冬; B. 忍冬。

3.1.2 *HQT2* 核心片段扩增 通过转录组 Unigene 序列设计引物,利用 RT-PCR 均扩增得到目标条带,大约为 790 bp,见图 3;经过回收、纯化、克隆、测序后,获得灰毡毛忍冬和忍冬该片段序列均为 792 bp,通过 DNAMAN 比对,与转录组测序结果基本一致。

3.1.3 *HQT2* 基因全长 cDNA 的获得 根据核心片段序列设计 RACE 特异性引物,分别进行 5' 端和 3' 端扩增。灰毡毛忍冬 3' 端在 953 bp 左右出现一条亮带,5' 端在 836 bp 左右出现一条亮带。忍冬 3' 端在 953 bp 左右出现一条亮带,5' 端在 1 068 bp 左右出现一条亮带。将亮带切下回收,转化至载体上,挑选阳性克隆测序,将 3' 端、5' 端和核心片段序列进行拼接,两者 *HQT2* 基因 cDNA 全长序列均为 1 651 bp。设计全长验证引物,以“2.1.1”项下的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,在 1 600 bp 左右有明显单一亮带,将亮带回收、纯化、克隆、测序,测序结果与拼接全长序列一致,说明成功克隆出 *HQT2* 基因的 cDNA 全长。灰毡毛忍冬 *HQT2* 相关结果见图 4,忍冬 *HQT2* 相关结果见图 5。

3.2 *HQT2* 基因生物信息学分析

3.2.1 *HQT2* 蛋白理化特性 灰毡毛忍冬与忍冬 *HQT2* 基因全长均为 1651 bp,3' 端非编码区 236 bp,带有 30 bp 的 ployA 尾,5' 端非编码区 119 bp,中间具有完整的开放阅读框 1 296 bp,该序列编码氨基酸

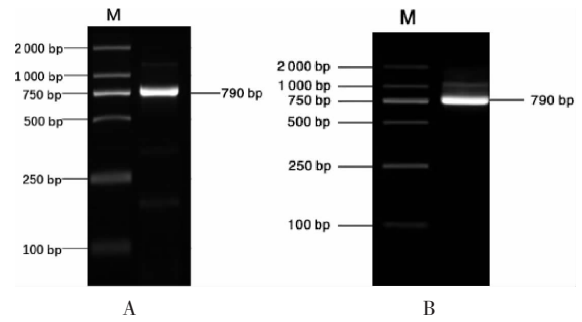


图 3 *HQT2* 基因核心片段扩增产物

注:A.灰毡毛忍冬;B.忍冬。

431 个,将其上传至 NCBI 数据库分别命名为 *LmHQT2* 和 *LjHQT2*,GenBank 登录号分别为 MH196564 和 MK294639。两者编码氨基酸比对见图 6。

利用 ExPASyProtParam 在线软件对灰毡毛忍冬与忍冬 *HQT2* 基因编码蛋白的理化性质进行预测分析,结果见表 2,两者的蛋白理化性质差异不大,不稳定系数均 <40,预测两者为稳定蛋白;两者的平均疏水系数 <0,且通过 ProtScale 进行蛋白质亲水性/疏水性分析(图 7),预测其为亲水性蛋白质。WOLF PSORT 预测 *HQT2* 蛋白可能定位于细胞质中。运用在线软件 TMHMM 分析,发现该基因编码的氨基酸 1-431 全部在膜外,不具有跨膜区域。SignalP 4.1 Server 进行信号肽预测分析,发现 *HQT2* 不具有信号肽序列,推测其不是分泌蛋白。

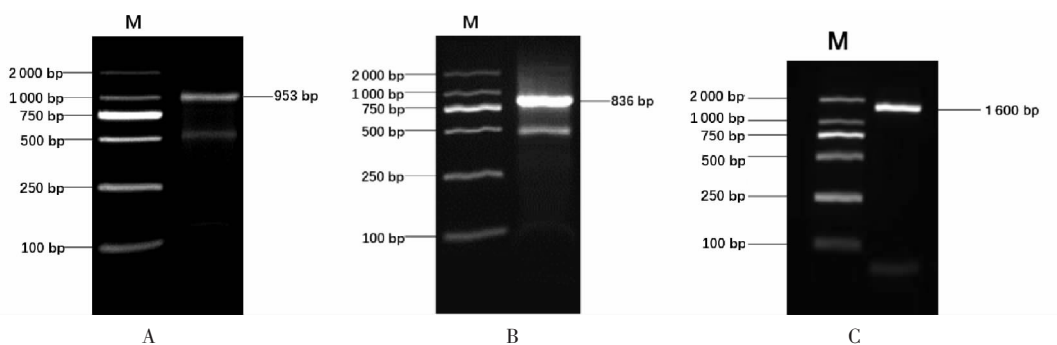


图 4 *LmHQT2* 基因全长 cDNA 的扩增

注:M.Marker;A.3'RACE 扩增产物;B.5'RACE 扩增产物;C.全长 cDNA 扩增产物。

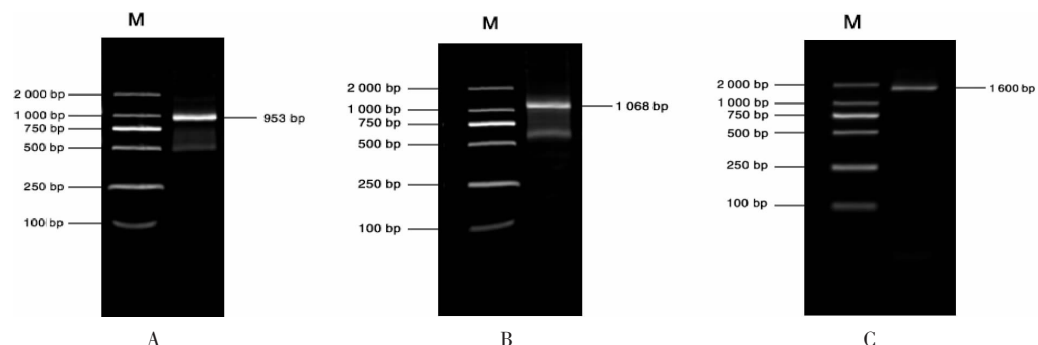


图 5 *LjHQT2* 基因全长 cDNA 的扩增

注:M.Marker;A.3'RACE 扩增产物;B.5'RACE 扩增产物;C.全长 cDNA 扩增产物。

忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	MKINVKETT V IKPAKETPNKKLWNSNLDILVGRIHILTVY	40
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	MKINVKETT V IKPAKETPNKKLWNSNLDILVGRIHILTVY	40
Consensus	mkinvkett ikpaketpnkklwnsnldilvgrihiltvy	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	FYKSNNGSNFFEARVLKQALSNVLVSFFPMAGRLGFDG D G	80
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	FYKSNNGSNFFEARVLKQALSNVLVSFFPMAGRLGFDG D G	80
Consensus	fykngsnngfearvlkqalsnvlvsffpmagrlgfdgdg	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	RVDINCNGEGVLFVEAESDSVVDFEGDFT P SP E MKSLT P E	120
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	RVDINCNGEGVLFVEAESDSVVDFEGDFT P SP E MKSLT P E	120
Consensus	rvdincngegvlfveaesdsvvdfegdfpspemksltpe	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	VDYSGEIDSYPLVVIQV T FKCGGVSLGVGVHHTLS D GV S	160
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	VDYSGEIDSYPLVVIQV T FKCGGVSLGVGVHHTLS D GV S	160
Consensus	vdysgeidsyplvviqvt fkcggvslgvghhtlsdgvsv	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	SLHFINTWSDTAR S LSIAVPPFIDRTLLRART P PT P FD H	200
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	SLHFINTWSDTAR S LSIAVPPFIDRTLLRART P PT P FD H	200
Consensus	slhfintwstar lsiavppfidrtllrartpptptfdh	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	VEYHPPPSMNTA T AQSSPKAVSTAI L KL T L D LN N LK S T A	240
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	VEYHPPPSMNTA T AQSSPKAVSTAI L KL T L D LN N LK S T A	240
Consensus	veyhppsmnta aqsspkavstailkltldlnnlksta	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	KNDGTTKDYSTYEVLA A HLWRCACKARG L AKDQMS K LY I A	280
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	KNDGTTKDYSTYEVLA A HLWRCACKARG L AKDQMS K LY I A	280
Consensus	kndgttkdystyevlaahlwrcackarglakdqmsklyia	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	TDGRARLC P PL F FGYLG N VVFTAT P M V SGDLVA E PI D S	320
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	TDGRARLC P PL F FGYLG N VVFTAT P M V SGDLVA E PI D S	320
Consensus	tdgrarlcplpffgylgnvvftatpmvsgdlvaepiids	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	SRRIHSALTQ M D D GYLRSALDY L ELL P DLKALVRG P HY F A	360
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	SRRIHSALTQ M D D GYLRSALDY L ELL P DLKALVRG P HY F A	360
Consensus	srrihsaltqmd dgylsaldylellpdlkalvrgphyfa	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	SPNLNIN S WSRLPVYD A DFG W GR P IFMG P AS I LY E GT I Y I	400
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	SPNLNIN S WSRLPVYD A DFG W GR P IFMG P AS I LY E GT I Y I	400
Consensus	spnlninswsrlpvydadfgwgrpifmgpasilyegtyiyi	
忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	P SP T ND R SL S LA V CL D V G H M PL F KK Y LY E	430
灰毡毛忍冬 HQT 氨基酸序列 .seq	P SP T ND R SL S LA V CL D V G H M PL F KK Y LY E	430

图 6 *LmHQT2* 和 *LjHQT2* 氨基酸序列比对图

表 2 HQT2 蛋白理化特性分析

理化性质	<i>LmHQT2</i>	<i>LjHQT2</i>
分子式	C ₂₁₄₉ H ₃₃₃₆ N ₅₆₂ O ₆₂₆ S ₁₇	C ₂₁₄₇ H ₃₃₃₆ N ₅₆₃ O ₆₂₇ S ₁₅
相对分子质量	47 606.54	47 534.40
理论等电点 pI	6.56	6.26
不稳定系数	39.30	36.10
带正电残基(Arg+Lys)	40	40
带负电残基(Asp+Glu)	42	44
脂肪系数	88.45	90.46
平均疏水系数	-0.084	-0.068

3.2.2 HQT2 蛋白结构域和二级、三级结构 应用 InterPro 对 *LmHQT2* 和 *LjHQT2* 蛋白结构域进行预

测,结果见图 8。其同源超家族为氯霉素乙酰转移酶样结构域超家族(chloramphenicol acetyltransferase-like domain superfamily,注释为 3.30.559.10,位点 1-205 aa 和 209-431 aa),家族属于转移酶(transferase,注释 PF02458,位点 1-428 aa)。

利用 SOPMA 软件对 HQT2 蛋白的二级结构进行预测,结果见表 3 和图 9;两者的二级结构元件相差不大,其中 α-螺旋和随机卷曲为该蛋白二级结构的主要元件。运用 SWISS-MODEL 建模工具在线预测 HQT2 蛋白的三级结构,如图 10 所示,用于建立三级结构模型的氨基酸残基为 1-429 位,以[5kjt.1.A]

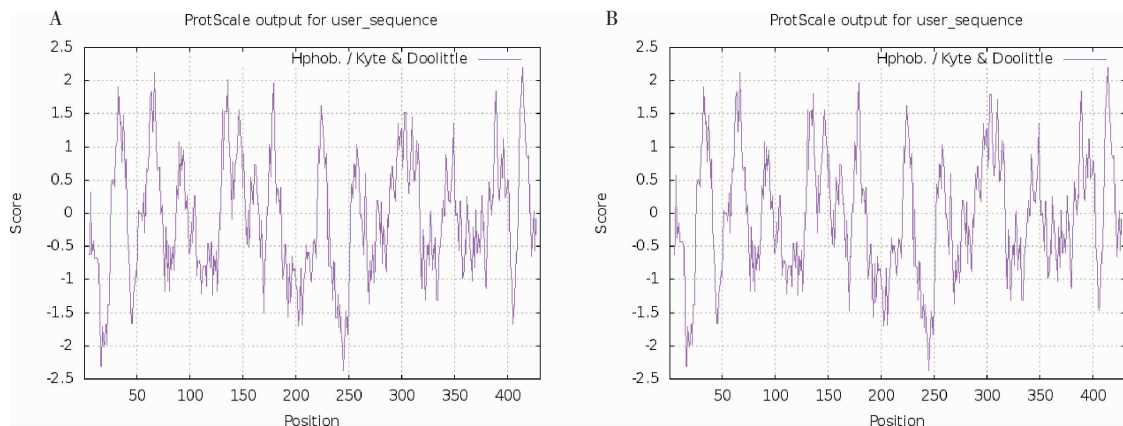
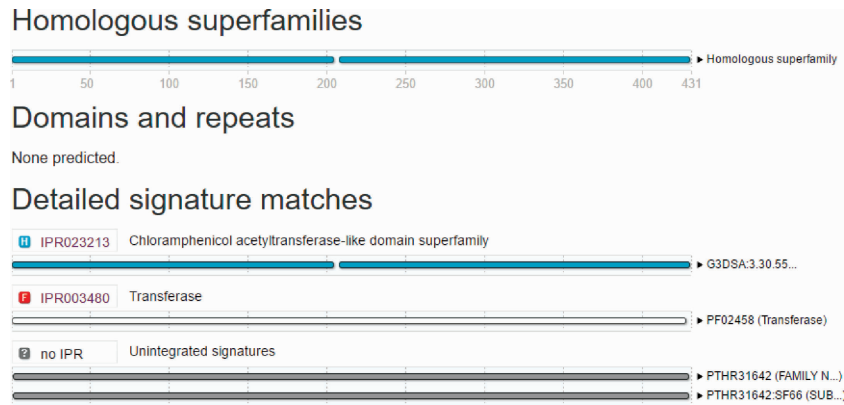


图 7 *HQT2* 基因所编码蛋白质亲水性/疏水性分析

注:A. *LmHQT2*;B. *LjHQT2*。

图8 *LmHQT2* 和 *LjHQT2* 结构域表3 *HQT2* 二级结构预测

二级结构元件	<i>LmHQT2</i>	<i>LjHQT2</i>
α螺旋	137处(31.79%)	136处(31.55%)
随机卷曲	193处(44.78%)	202处(46.87%)
延伸链	83处(19.26%)	78处(18.10%)
β转角	18处(4.18%)	15处(3.48%)

蛋白为模板,相似度达60%,描述为 shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase。

3.2.3 *HQT2* 氨基酸序列同源性比对和系统进化树分析 应用 NCBI 中的 BlastP 在线软件,对 *LmHQT2* 氨基酸序列进行同源性搜索,用 DNAMAN 进行比对,其与 *LjHQT2* 同源性最高,达 98.14%,与桔梗 *Platycodon grandiflorus* (AEM63676.1)、烟草 *Nicotiana tabacum* (NP_001312079.1)、番茄 *Solanum lycopersicum* (NP_001234850.2)、野胡萝卜 *Daucus carota subsp. carota* (ANO53925.1)、番薯 *Ipomoea batatas* (BAJ14794.1) 同源性分别为:74.04%、68.71%、67.81%、63.43%、61.72%。运用 DNAMAN 对 *LmHQT2* 及 *LjHQT2* 和上述植物 *HQT2* 蛋白进行多序列比对,结果如图11。文献研究发现以上烟草、番茄和番薯的 *HQT* 基因被证实在绿原酸的合成中发挥重要作用^[7-8,15],因以上物种 *HQT* 基因都具有 PLN02663 羟基肉桂酰辅酶 A 结构域,故具有相似的功能。从图 11 编码蛋白结构比对来看,N 端差异较大,这可能与

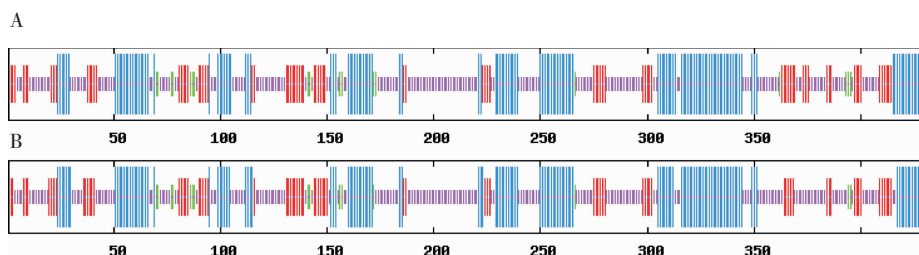
N 端多为物种特异性信号肽有关。

为研究 *HQT2* 氨基酸序列与其他植物的进化关系,在 NCBI 的 BlastP 选取与其氨基酸相似的 11 条氨基酸序列,运用 MEGA7 构建 NJ 进化树,结果见图 12。系统进化树主要分为 3 个大的分支,灰毡毛忍冬 (MH196564)与忍冬(MK294639)、毛白杨(AFZ78609.1)、番薯 (BAJ14794.1)、中粒咖啡 (ABO77957.1)、野胡萝卜 (ANO53925.1)、矮牵牛 (AVA30527.1) 聚为一个 大类,与同科同属的忍冬亲缘关系最近。

3.3 *HQT2* 基因组织特异性表达

灰毡毛忍冬和忍冬茎、叶、花样品表达量结果见图 13。灰毡毛忍冬不同花期花样品中青蕾期相对表达量最高,幼蕾期次之,与其他花期存在显著差异 ($P < 0.01$),白蕾期最低。不同器官中,以白蕾期花为参照,相对表达量为叶 > 茎 > 白蕾期,其中在叶的相对表达量最高,是茎的 1.96 倍,是白蕾期的 4.97 倍。忍冬不同花期花样品中幼蕾期相对表达量最高,白蕾期次之,与其他花期表达量存在显著差异 ($P < 0.01$),银花期最低。不同器官中,以白蕾期花为参照,相对表达量为白蕾期 > 叶 > 茎,其在白蕾期的相对表达量最高,是叶的 2.59 倍,是茎的 6.68 倍。

由图 13 可见,*HQT2* 基因在忍冬与灰毡毛忍冬的不同花期和不同器官中,具有不同的相对表达量与变化规律。不同花期中,灰毡毛忍冬的幼蕾期与青

图9 *HQT2* 的二级结构预测

注:蓝色代表α螺旋,红色代表延伸链,绿色代表β转角,紫色代表随机卷曲;A. *LmHQT2*;B. *LjHQT2*。

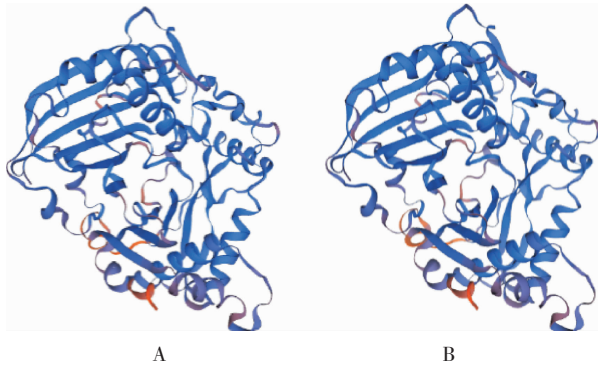


图 10 HQT2 的三级结构预测
注:A. *LmHQT2*;B. *LjHQT2*。

蕾期相对表达量较高,而忍冬为幼蕾期与白蕾期较高,两者的银花期与金花期相对量差异较小;不同器官中,两者的花茎叶相对表达均有差异,但茎与叶走势一致。

3.4 灰毡毛忍冬、忍冬茎、叶及不同花期花的绿原酸含量

灰毡毛忍冬和忍冬茎、叶及不同花期花样品绿原酸含量结果见图 14。灰毡毛忍冬中绿原酸含量各个花期、茎和叶均高于忍冬。灰毡毛忍冬和忍冬茎

中绿原酸含量均为最低,银花期是灰毡毛忍冬绿原酸含量最高期,而青蕾期是忍冬绿原酸含量最高期。绿原酸含量的总体趋势为灰毡毛忍冬中先降后升再降,忍冬中则表现为先升后降。

4 讨论

绿原酸为忍冬与灰毡毛忍冬共有活性成分之一。*HQT* 为绿原酸生物合成途径中最后一步的关键酶,能催化咖啡酰辅酶 A 和奎尼酸进行酯交换生成绿原酸^[18]。

本研究成功克隆灰毡毛忍冬与忍冬 *HQT2* 基因,并分别命名为 *LmHQT2* 和 *LjHQT2*;两者基因全长均为 1 651 bp,有 22 个碱基位点存在差异,具有完整的开放阅读框 1296 bp,氨基酸 431 个,有 8 个氨基酸位点存在差异;预测其为亲水性蛋白,不是分泌蛋白,可能定位于细胞质中。该蛋白质结构域从第 1 位到第 431 位氨基酸结束,预测属于转移酶超家族。两者的二级结构中元件相差不大, α 螺旋和随机卷曲为该蛋白二级结构的主要元件,三级结构基本一致。同源性对比,两者氨基酸相似度达 98.14%,系

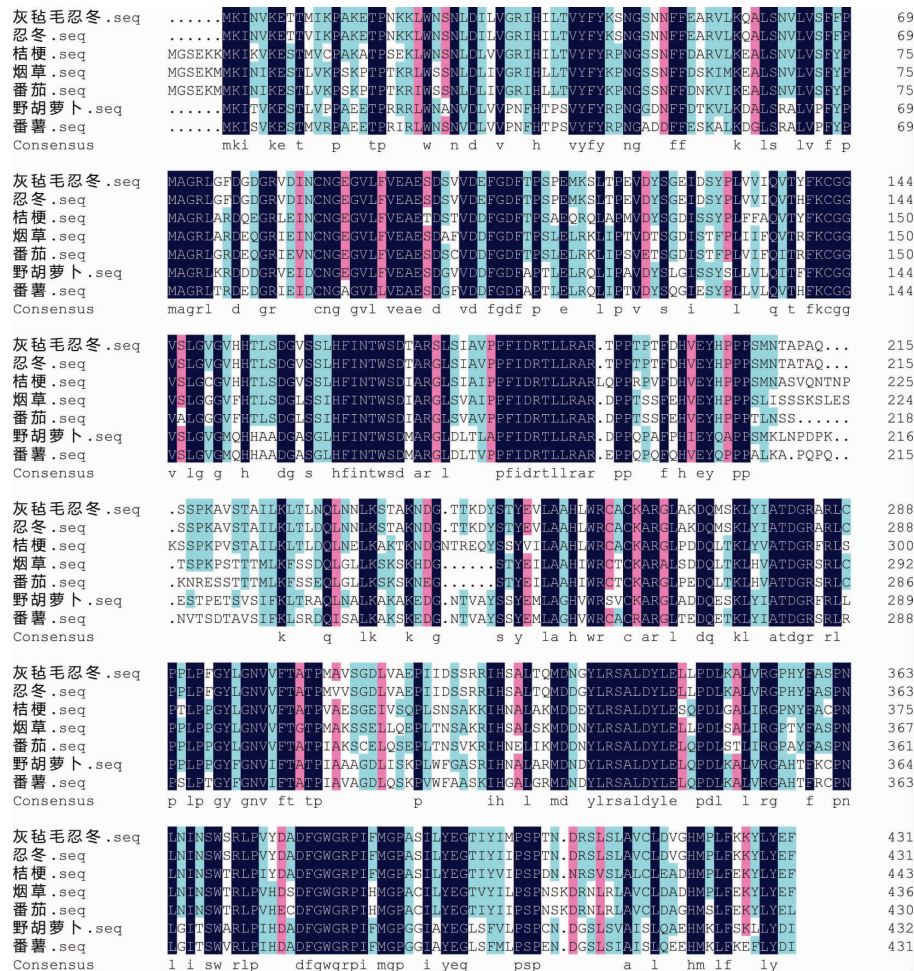


图 11 *LmHQT2*、*LjHQT2* 与其他植物 HQT 蛋白的多序列比对分析

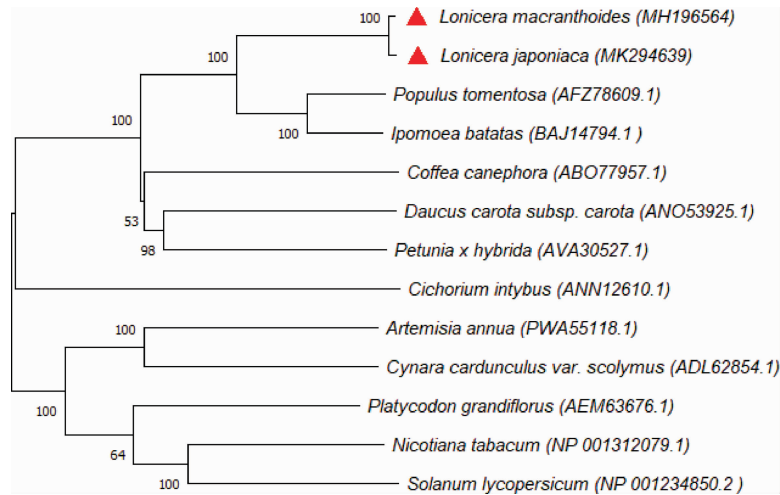
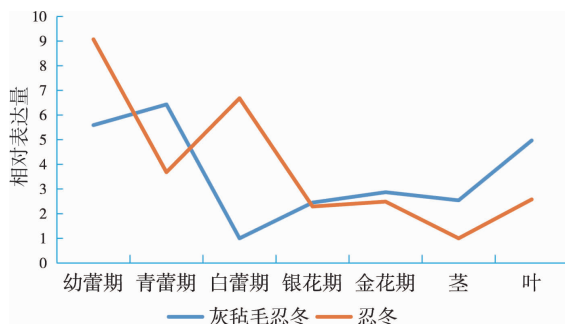
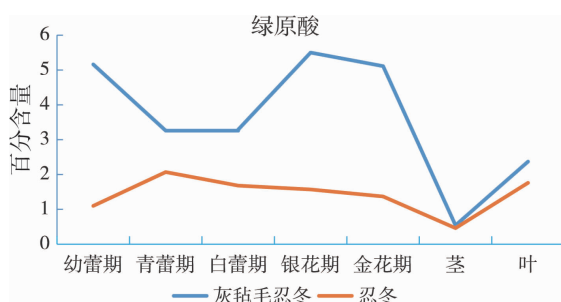
图 12 *LmHQT2* 和 *LjHQT2* 蛋白的 NJ 系统进化树图 13 *LmHQT2* 和 *LjHQT2* 基因相对表达量

图 14 灰毡毛忍冬和忍冬花、茎、叶绿原酸含量

统进化树分析两者的亲缘关系最近。

文献研究表明,灰毡毛忍冬花较忍冬花中绿原酸含量高^[19-20],两品种不同花期花中绿原酸含量存在差异。为探究两品种不同花期花的绿原酸含量与 *HQT2* 表达量相关性,本研究运用 qRT-PCR 对不同花期花进行表达模式分析,发现 *HQT2* 在两者的不同花期花中表达量均存在差异,在灰毡毛忍冬中呈现先低再高后再低的趋势,忍冬中先高后低再高再低的趋势。同时文献研究表明灰毡毛忍冬与忍冬的不同器官绿原酸含量也存在差异^[21-22],本研究对比了 *HQT2* 在不同器官中相对表达量,灰毡毛忍冬为叶>茎>白蕾期花,忍冬为白蕾期花>叶>茎,说明该基因在不同物种不同部位基因的表达量具有组织

特异性。

结合分析灰毡毛忍冬和忍冬不同花期花及茎、叶绿原酸含量结果可知,灰毡毛忍冬和忍冬绿原酸含量和基因表达模式有一定的相关性。忍冬前三个花期中 *HQT2* 的相对表达量与绿原酸含量呈相反趋势,而在后两个花期和茎、叶呈相似趋势,而灰毡毛忍冬中并不存在显著相关性,仅在茎和叶中有相同趋势,这表明 *HQT2* 在忍冬和灰毡毛忍冬中参与绿原酸的合成中发挥的功能可能不一致。

NIGGEWEG 等^[7]在烟草中分离了 *HQT* 的 cDNA,在番茄中 *HQT* 超表达可导致叶片中绿原酸含量增加 85%,而 *HQT* 沉默则导致叶片中绿原酸含量降低 98%。CLÉ 等^[23]研究也发现,*HQT* 基因过表达的番茄叶绿原酸含量提高,是野生型的 2.5 倍,基因沉默的番茄叶绿原酸含量降低。SONNANTE 等^[11]发现朝鲜蓟中 *HQT1*、*HQT2* 与绿原酸的合成显著相关。PENG^[12]与张静茹^[24]等从忍冬中克隆 *HQT1* 基因,将 *HQT1* 基因转入 Rosetta(DE3)大肠埃希菌与忍冬愈伤组织中,过表达后绿原酸的含量明显提高。CHEN 等^[25]克隆了灰毡毛忍冬 *HQT1* 基因的 CDS 序列,构建超表达体系,转基因植株叶中的绿原酸含量提高了大约 60%。上述研究表明,*HQT* 在不同物种绿原酸生物合成中均起了关键的作用。笔者比较了 *LmHQT1*^[25]与本研究克隆的 *LmHQT2* 氨基酸序列,两者相似度达 79%,蛋白理化特性与结构相似度高;同时利用 BlastP 进行其他植物 *HQT* 与 *LmHQT2*/*LjHQT2* 比对,其相似度较高,可预测本研究克隆得到的 *HQT2* 基因可能为灰毡毛忍冬/忍冬 *HQT* 中的一员。后期项目组将构建 *HQT2* 基因的灰毡毛忍冬与忍冬过表达载体,进行 *HQT2* 基因功能验证,为

灰毡毛忍冬和忍冬次生代谢产物绿原酸积累的分子调控机制提供依据。

本研究为灰毡毛忍冬和忍冬 *HQT2* 基因的功能预测奠定了基础,丰富了 NCBI 中 *HQT* 基因序列,同时对完善灰毡毛忍冬和忍冬绿原酸生物合成和调节机制具有重要意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 32, 230.
- [2] 张浩超, 郝宝燕, 孙皓熠, 等. 绿原酸研究进展[J]. 食品与药品, 2017, 19(3): 222–227.
- [3] 彭莎, 霍晓乾, 霍梦琪, 等. 基于系统中药学的金银花清热解毒功效标志物研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(14): 3275–3281.
- [4] 王玲娜, 姚佳欢, 马超美. 绿原酸的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(11): 1121–1130.
- [5] 周日宝, 童巧珍. 灰毡毛忍冬与正品金银花的绿原酸含量比较[J]. 中药材, 2003, 26(6): 399–400.
- [6] YUAN Y, WANG Z Y, JIANG C, et al. Exploiting genes and functional diversity of chlorogenic acid and luteolin biosyntheses in *Lonicera japonica* and their substitutes[J]. *Gene*, 2014, 534(2): 408–416.
- [7] NIGGEWEG R, MICHAEL A J, MARTIN C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(6): 746–754.
- [8] CARDENAS C L, COSTA M A, LASKAR D D, et al. RNA imodulation of chlorogenic acid and lignin deposition in *Nicotiana tabacum* and insufficient compensatory metabolic cross-talk[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(3): 694–706.
- [9] LEPELLEY M, CHEMINADE G, TREMILLON N, et al. Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in *C. canephora*[J]. *Plant Science*, 2007, 172(5): 978–996.
- [10] COMINO C, HEHN A, MOGLIA A, et al. The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9: 30.
- [11] SONNANTE G, D'AMORE R, BLANCO E, et al. Novel hydroxycinnamoyl-coenzyme A quinate transferase genes from artichoke are involved in the synthesis of chlorogenic acid[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 1224–1238.
- [12] PENG X X, LI W D, WANG W Q, et al. Cloning and characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase involved in chlorogenic acid biosynthesis in *Lonicera japonica*[J]. *Planta Medica*, 2010, 76(16): 1921–1926.
- [13] 陈泽雄. 灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz)中绿原酸生物合成途径及调控技术研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
- [14] 姜福星, 廖宇嘉, 吴生, 等. 白花虎眼万年青绿原酸合成酶基因 *QtHQT* 的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2016, 14(12): 3325–3333.
- [15] XU J, ZHU J H, LIN Y H, et al. Comparative transcriptome and weighted correlation network analyses reveal candidate genes involved in chlorogenic acid biosynthesis in sweet potato[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 2770.
- [16] 何柳, 陈士林. 植物中绿原酸合成途径研究进展[J]. 药物生物技术, 2013, 20(5): 463–466.
- [17] 刘湘丹, 徐玉琴, 王珊, 等. 适用于基因全长克隆的灰毡毛忍冬不同器官总 RNA 提取方法筛选[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(12): 60–63.
- [18] 杨银菊, 陈爱国, 刘光亮, 等. 烟草绿原酸生物合成途径关键酶基因的研究进展[J]. 现代农业科技, 2018(13): 5–8, 10.
- [19] 李隆云, 张应, 马鹏, 等. 山银花(灰毡毛忍冬)适宜采收期研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3060–3064.
- [20] 杨欣欣, 包永睿, 王帅, 等. 不同采收期金银花药材质量评价研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1466–1468.
- [21] 邓玲姣, 周晓舟, 黄素梅, 等. 忻城县金银花及其茎、叶中绿原酸含量测定[J]. 广西农学报, 2007, 22(5): 34–36.
- [22] 吴飞燕, 卿志星, 曾建国. HPLC 测定灰毡毛忍冬不同部位中绿原酸和木犀草苷的含量[J]. 中国现代中药, 2014, 16(8): 614–617.
- [23] CLÉ C, HILL L M, NIGGEWEG R, et al. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(11): 2149–2156.
- [24] 张静茹, 吴敏琳, 李卫东, 等. 金银花 *HQT* 基因在真核植物细胞中对绿原酸生物合成的调控[J]. 中草药, 2016, 47(20): 3683–3687.
- [25] CHEN Z X, LIU G H, LIU Y Q, et al. Overexpression of the *LmHQT1* gene increases chlorogenic acid production in *Lonicera macranthoides* Hand-Mazz [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017, 39(1): 27.

(本文编辑 苏维)