

落地生根S-腺苷高半胱氨酸水解酶基因的克隆及生物信息学分析

苏振声¹, 苏文锋¹, 杨秉建², 张利娟³, 李亚超⁴, 白宇清⁴, 闫纯⁴, 曾会明^{4*}, 钟天秀^{4*}

(1. 厦门日懋城建园林建设股份有限公司, 福建 厦门 361101; 2. 深圳市日昇园林绿化有限公司, 广东 深圳 518000; 3. 暨南大学深圳旅游学院, 广东 深圳 518053; 4. 北京林业大学林学院草坪研究所, 北京 100083)

摘要: 为了解落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)的 SAHH 基因功能, 采用 RACE 技术从其叶片克隆了 SAHH 的全长 cDNA 序列, 命名为 *KdSAHH*。结果表明, *KdSAHH* 全长为 1748 bp, 含 1458 bp 完整的开放阅读框(ORF), 推测编码 485 个氨基酸。预测落地生根 SAHH 蛋白分子量约为 53 kDa, 理论等电点为 5.59~5.682。Scanprosite 和 DNASTAR 预测表明, 落地生根 SAHH 蛋白在进化上非常保守, 与苜蓿的亲缘关系较近。以黄羽扇豆为模板, 利用 SWISS-MODEL 和 Phyre 程序模拟的落地生根 SAHH 蛋白亚基三维结构有一定差异。这些为落地生根 *KdSAHH* 的表达和功能研究奠定了基础。

关键词: 落地生根; S-腺苷高半胱氨酸水解酶; SAHH; 克隆; 生物信息学

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.03.001

Cloning and Bioinformatics Analysis of S-adenosylhomocysteine Hydrolase Gene from *Kalanchoe daigremontiana*

SU Zhen-sheng¹, SU Wen-feng¹, YANG Bing-jian², ZHANG Li-juan³, LI Ya-chao⁴, BAI Yu-qing⁴, YAN Chun⁴, ZENG Hui-ming^{4*}, ZHONG Tian-xiu^{4*}

(1. Xiamen Rimao Landscape Construction Company Limited, Xiamen 361101, China; 2. Shenzhen Risheng Landscape Company Limited, Shenzhen 51800, China; 3. Shenzhen Tourism College of Jinan University, Shenzhen 518053, China; 4. Turfgrass Research Institute, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to understand the function of SAHH in *Kalanchoe daigremontiana*, a cDNA sequence, named as *KdSAHH*, was cloned by RT-PCR and RACE-PCR. The results showed that the full-length of *KdSAHH* cDNA was 1748 bp, encoding 485 amino acids. The predicted molecular weight (MW) of *KdSAHH* was about 53 kDa with estimated pI of 5.59–5.682. The Scanprosite and DNASTAR prediction showed that *KdSAHH* protein with two conserved motifs was very conservative in evolution. There were high homology between *KdSAHH* and SAHHs in other species by amino acid alignment, and which had the closest relationship with that in *Medicago sativa*. *Lupinus luteus* used as template, there were differences in three-dimensional structure of *KdSAHH* simulated by SWISS-MODEL and Phyre. These would lay out basis for research in expression and function of *KdSAHH*.

Key words: *Kalanchoe daigremontiana*; S-adenosylhomocysteine hydrolase; SAHH; Clone; Bioinformatics

收稿日期: 2014-07-11

接受日期: 2014-12-03

基金项目: 深圳市科技计划项目(CXZZ20140418110342522)资助

作者简介: 苏振声(1986~), 男, 硕士研究生, 主要从事生物化学和分子生物学研究。E-mail: jacky_so@yeah.net

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: sciinfo@163.com; zhongxinbi@163.com

落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)又名花蝴蝶、倒吊莲、大还魂,为景天科(Crassulaceae)伽蓝菜属中极易栽培的观赏植物。原产马达加斯加,在我国主要分布在福建、台湾、广东、广西、云南等地,喜温暖潮湿的气候,宜种植在排水良好的肥沃砂质土壤上。落地生根是一种常见的药用植物,在我国很早就用于治疗烫伤、急性中耳炎、热性胃痛等疾病,最近的研究表明其叶片汁液提取物,对治疗糖尿病有一定作用^[1]。此外,落地生根具有特殊的器官发生和体胚发生共存的无性繁殖模式,是研究体胚发生或者器官发生(在其他细胞仍然未分化的情况下)的理想模型^[2-3]。

S-腺苷高半胱氨酸水解酶(S-adenosylhomocysteine hydrolase, SAHH)广泛存在于动物、植物、微生物细胞内,能催化 S-腺苷高半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)可逆水解生成腺苷(Adenosine, Ado)和高半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)。而 S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)通常作为甲基供体,SAH 就是 SAM 向甲基受体(如蛋白、DNA、RNA)转移甲基时形成的。SAH/SAM 比值控制着细胞内的甲基化反应,比值较低预示着细胞内甲基化能力的降低^[4-5]。大多数病毒在复制的过程中,mRNA 的 5' 端都需要一个“甲基帽”的结构,通过抑制 SAHH 的表达,可以降低细胞内的甲基化能力,从而抑制病毒的复制^[5]。因此,医学上 SAHH 被选择作为多种新药研发的重要潜在靶点。SAHH 抑制剂对麻疹、甲型流感、乙型流感、狂犬病毒、疱疹、艾滋病毒的复制有很强的抑制作用,临床上有很大的应用前景^[6]。

最近,越来越多的研究证明 DNA 甲基化在调控基因表达和表观遗传学中有非常重要的作用,比如转录和转录后基因沉默^[7]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)完全突变体 *HOG1* 引起整个基因组的去甲基化,导致种子不育^[8]。SAHH 的错位突变或 RNAi 引起 SAHH 功能的部分缺失,则表现出生长缓慢、生殖能力减弱、弱小^[8-9]。同样,人体部分缺失 SAHH 将造成严重的缺陷,如缺乏中枢神经系统髓鞘。而调控 SAHH 功能可能是通过胞嘧啶甲基转移酶和组蛋白甲基转移酶来干扰 DAN 甲基化^[10]。

SAHH 虽然在生物体中普遍存在,但其在落地生根中的功能还没有见报道。我们从落地生根干旱诱导的胎生苗差减文库中,筛选出 1 个 SAHH cDNA 片段,Real-time PCR 检验表明该片段在胎

生苗样本中的表达量是无胎生苗的 4 倍^[11]。本研究采用 RACE 技术克隆出落地生根的 SAHH 全长序列,并通过 RT-PCR 方法扩增全长 ORF 序列,进一步采用生物信息学技术对其编码的蛋白进行预测分析,为 SAHH 的表达和功能研究奠定基础,也为研究落地生根产生胎生苗的分子机制提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 材料

落地生根(*Kalanchoe daigremontiana*)种植于北京林业大学草坪研究所温室,培养基质为腐叶土、蛭石和珍珠岩按 4:2:1 混合,在 16 h 光照/8 h 黑暗,光照强度为 $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,温度为 $(30 \pm 3)^\circ\text{C}$ 下培养。采集叶片后快速在液氮中固定,置于 -80°C 超低温冰箱保存。

1.2 总RNA的提取以及反转录

使用 TaKaRa MiniBEST universal RNA Extraction Kit 提取落地生根叶片的总 RNA,然后使用 Recombinant DNase I (RNase Free)进行 DNase I 处理,除去 gDNA,最终溶于 DEPC 处理水中。根据 3'-Full Race Core Set with PrimeScriptTM RTase 的操作说明合成第一链 cDNA,并在 -20°C 下保存。

1.3 SAHH基因的克隆和测序

根据差减文库的测序结果,分别设计上游引物 F1: 5'-AGGTACGGCTGCCGACACTCGC-TCC-3' 和下游引物 R1: 5'-AGGTACCTGTAGGCAGCCG-GCTTG-3'。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL ,包括 2 μL cDNA 模板,8 μL cDNA Dilution Buffer II,引物 F1 和 R1 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$)各 1 μL , $2 \times \text{GC Buffer I}$ 25 μL , TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , dH_2O 12.5 μL 。反应程序为: 94°C 预变性 3 min; 然后 98°C 10 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 回收,用 F1/R1 为特异引物对回收后的 DNA 测序。

根据获得的 SAHH 基因 cDNA 片段序列设计 5' RACE 特异引物 R3: 5'-CTGTCWGTYTGAGGCT-

TGATGGTG-3' 和 R5: 5'-AACATCYTCAAGGGTC-ARAAC-3'。采用 TaRaRa 5'-Full RACE Kit with TAP 对 5 µg 的总 RNA 进行 CIAP、TAP 处理, 并与 5' RACE Adaptor 连接后, 反转录合成 cDNA。Outer PCR 反应完成后, 立即取反应液 1 µL 进行 Inner PCR 反应。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 回收。接着用 TaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 2.1 中的连接酶, 将 PCR 产物与 T-Vector pMDTM 19 Simple 进行连接, 热转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 JM109 中, 涂布平板, 37℃ 过夜培养。挑选阳性菌落, 提取质粒, 用引物 pMD18 F/pMD18 R 分别对质粒测序。

根据获得的 *SAHH* 基因 cDNA 片段序列设计 3' RACE 特异引物, F3: 5'-ACAGATGGGTGTTCC-CYGAGAC-3'。以 2 µL 的 RNA 为模板, 进行 PCR 反应。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 回收。接着使用 TaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 2.1 中的连接酶, 将 PCR 产物与 T-Vector pMDTM 19 Simple 连接后, 热转化至 *E. coli* 感受态细胞 JM109 中, 涂布平板, 37℃ 过夜培养。挑选阳性菌落, 提取质粒, 用引物 pMD18 F/pMD18 R 分别对质粒测序。

对 *SAHH* 基因的 cDNA 片段、5' 端和 3' 端序列进行拼接, 获得 *SAHH* 基因的全长序列。并分别设计上游引物 F6: 5'-CGGTGTTCGCCTGGAAGG-GTGAGA-3' 和下游引物 R7: 5'-CCCGCAGAACT-CAAACACAAAAT-3', 以第一链 cDNA 为模板, 采用相同的反应体系及条件进行 PCR 反应。取 5 µL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 生物信息学分析

应用 NCBI 数据库中 ORF Finder 软件寻找 *KdSAHH* 序列中的 ORF, 推导编码的氨基酸序列。应用 Expasy 的 ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) 程序分析 *SAHH* 保守结构域。用 BLAST 程序检索相似蛋白, 通过 DNASTar 软件对不同物种的氨基酸序列进行多重比对, 并构建系统发育树。运用 DNASTar、DNAMAN、Expasy 的 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *SAHH* 蛋白的一级结构。根据 DNASTar 中 Gamier-Robson 和 Chou-Fasman 方法以及 Expasy 中 CFFSP 程序 (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>) 预测 *SAHH* 蛋白的二级结构。应用在线分析工具 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 和 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 分析 *SAHH* 蛋白三级结构。

2 结果和分析

2.1 *SAHH* 基因的克隆与测序

以落地生根叶片第一链 cDNA 为模板, 并用引物 F1 和 R1 进行 PCR 扩增, 获得约 700 bp 的目的片段 (图 1: A)。根据获得的 *SAHH* 基因 cDNA 片段序列分别设计 5' RACE 和 3' RACE 特异引物, 获得约 1000 bp 和 500 bp 的目的片段 (图 1: B, C)。将获得的 cDNA 片段、5' 端和 3' 端序列进行拼接, 以落地生根叶片第一链 cDNA 为模板, 采用引物 F6 和 R7 进行 PCR 扩增, 获得约 1500 bp 的目的片段 (图 1: D)。因此, 落地生根 *SAHH* 基因的 cDNA 全长为 1748 bp (GenBank 登录号: KF953475), 命名

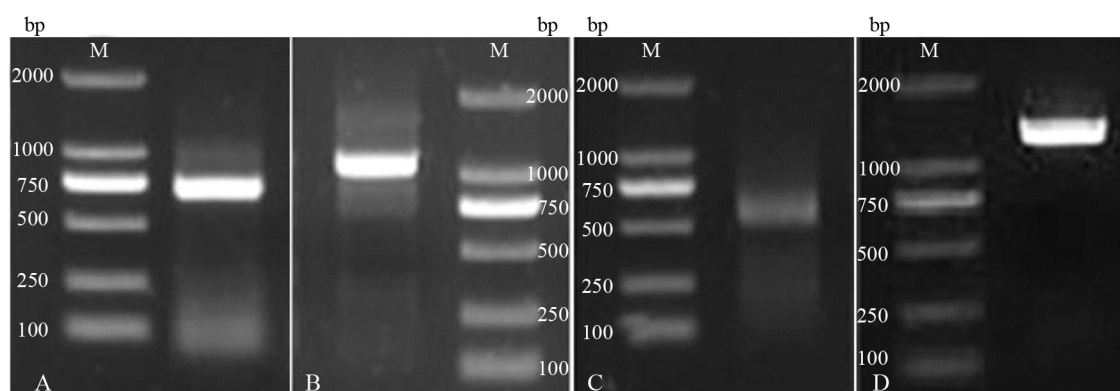


图 1 落地生根 *SAHH* 的 RT-PCR 扩增和 RACE 克隆。A: RT-PCR 扩增; B: 5' RACE; C: 3' RACE; D: RACE; M: 2000 bp DNA Marker。

Fig. 1 RT-PCR amplification and RACE clone of *SAHH* in *Kalanchoe daigremontiana*. A: RT-PCR amplification; B: 5' RACE; C: 3' RACE; D: RACE; M: 2000 bp DNA Marker.

为 *KdSAHH*, 含有 1458 bp 完整开放阅读框(ORF), 不包括 PolyA 长度为 1725 bp, 5' 非翻译区 77 bp, 3' 非翻译区 213 bp, AU 模体(ATTTA)位于第 1665 位碱基处(图 2)。

2.2 SAHH 蛋白分析

根据 *KdSAHH* 基因序列推导 *KdSAHH* 蛋白由 485 个氨基酸组成。经 ScanProsite 分析, *KdSAHH* 存在两个高度保守的结构域: SAHH1 (SCNIFSSQDHAAAAI) 和 SAHH2 (GKVAVVCGYGDVVGKCAA)。将落地生根与其他物种的 SAHH 蛋白进行比对, 表明 SAHH 蛋白在进化上非常保守(图 3), 落地生根的 *KdSAHH* 与苜蓿(*Medicago sativa*)的亲缘关系较近, 与非洲爪蛙(*Xenopus laevis*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)、

人类(*Homo sapiens*)的亲缘关系较远(图 4)。

2.3 KdSAHH 蛋白理化性质分析

利用 DNASTar、DNAMAN、ExPASy 中的 ProtParam 预测落地生根 *KdSAHH* 蛋白的理化性质。结果表明, 3 种预测的结果基本一致, 其中 DNAMAN 预测的分子量最小, 为 53.1683 kDa; DNASTar 预测的最大, 为 53.1782 kDa。ExPASy 预测的理论等电点最小, 为 5.59。DNAMAN 和 ExPASy 预测含量最多的氨基酸都是 Ala。ExPASy 预测蛋白质不稳定指数为 35.57, 说明 SAHH 是稳定的蛋白质。

2.4 SAHH 蛋白二级结构的预测

采用 DNASTar、ExPASy 分别预测落地生根 *KdSAHH* 蛋白的二级结构。按照 DNASTar 中的

| | | |
|------|--|------|
| 1 | GTCTCAAAGGTCTCATTATACCTTCTTCGCTTGTTCCTCGATCTCTGCGAAACCCTAAATCAGAGATCTCATCAATG | 80 |
| 81 | GCGCTTATCGTCGAGAAAACCACCTCCGGCCGCGAGTACAAGGTCAAAGACATGTCTCAGGCTGACTTCGGTAGACTCGA | 160 |
| 161 | GATCGAGCTTGCCGAGGTGCGAAATGCCTGGGCTCATGTCTTGCAGGTCCGAATTCGGCCCTTCCCAGCCTCTGAAGGGCG | 240 |
| 241 | CCAGAATCACCGGATCTCTTCACATGACCATCCAGACCGCTGTCTCATCGAGACCCTCACGGCTCTGGGCGCCGAGGTG | 320 |
| 321 | CGTTGGTGCTCCTGCAACATTTTCTCCTCGCAGGACCACGCCGCTGCCGCTATTGCTCGCGACAGCGCTGCGGTGTTTCGC | 400 |
| 401 | CTGGAAGGGTGAGACTCTGCAAGAGTACTGGTGGTGCACTGAGAGGGCTCTGGACTGGGGTCCCAGTGAGGACCTGATC | 480 |
| 481 | TGATCTTTGATGACGGCGCGATGCATCTATGCTGATCCATGAAGGAGTAAAGGCCGAGGAGAGTTTGCCAAGAACGGG | 560 |
| 561 | ACGGTGCCGGATCCCCACTCCACCACCAATCCTGATTTCCAGATCGTGTTGACCATTATCAGGGATGGTTTGAAGACAGA | 640 |
| 641 | TCCACAGAGGTACCACAAGATAAAGGACAGATTGGTCGGTGTTTCGGAGGAGACCACCTGGAGTGAAAAGGTTGTATC | 720 |
| 721 | AGATGCAGGAGAATGGAACCTTGTCTTTCCCTGCAATTAACGTCAATGACTCTGTTACCAAGAGCAAGTTTGACAACTTG | 800 |
| 801 | TATGGTTGCCGACACTCACTCCCTGATGGTCTCATGAGGGCCACTGATGTCATGATTGCTGGGAAGGTTGCTGTTGTTTG | 880 |
| 881 | CGGATACGGAGATGTTGGAAGGGTTGTGCGGCTGCTCTTAAGCAAGCTGGTGCCCGTGTGATTGTCACCGAGATTGACC | 960 |
| 961 | CAATCTGCGCCCTTCAGGCAACCATGGAAGGACTTCAAGTTTGGACCCTTGAAGATGTTGTCTCTGTTGCAGATATTTTT | 1040 |
| 1041 | GTCACCACCACTGGAAACAAGGACGTTATAATGGTTAGTGACATGAAGAGGATGAAGAACAATGCCATTGTTTGCAACAT | 1120 |
| 1121 | TGGTCACTTTGACAATGAGATTGACATGTTGGGTCTGGAGACTTACCCTGGAGTGAAGCGGATCACCATCAAGCCTCAAA | 1200 |
| 1201 | CAGACAGATGGGTGTTCCCCGAGACCACTCCGGCATCATTTGTTTTGGCTGAGGGCCGTCTCATGAACCTGGGTGTGCC | 1280 |
| 1281 | ACGGGTACCCAGCTTTGTGATGTCATGTTCTTACCAACCAAGTCATTGCCAGCTGGAGCTCTGGAATGAGAAAAGC | 1360 |
| 1361 | CTCTGGGAAGTATGAGAAGAAGGTGTATGTCCTGCCGAAGCACCTTGATGAGAAGGTTGCTGCACTTCATCTCAGCAAGC | 1440 |
| 1441 | TTGGAGCCAAGCTTACTAAGCTCACAAAGGAGCAGGCTGACTACATCAGTGTTCGAATTGAGGGTCCATACAAGCCTGCT | 1520 |
| 1521 | GCCTACAGGTACTGAAGAATCAGGTGAGCGGAGAAATGCCAGTTTTTTATTTTTTGATAAGCAAAAAGAGCGGAGTCCTT | 1600 |
| 1601 | TTTAATGTACGATCACAATTTTCAGTTTATTTTGTGTTTGTGTTTCTGCGGGCTATTCGGTGCCGCATTATATAGATGGATG | 1680 |
| 1681 | TTTTATTGGGTATGAACATGAATGATGTGATGTTTTTTGTGTTTTMAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA | 1748 |

图 2 落地生根 SAHH 基因序列。ATG: 起始密码子; TGA: 终止密码子; 阴影区域(ATTTA): AU 模体。

Fig. 2 SAHH sequence of *Kalanchoe daigremontiana*. ATG: Start codon; TGA: Stop codon; Shaded area (ATTTA): AU motif.

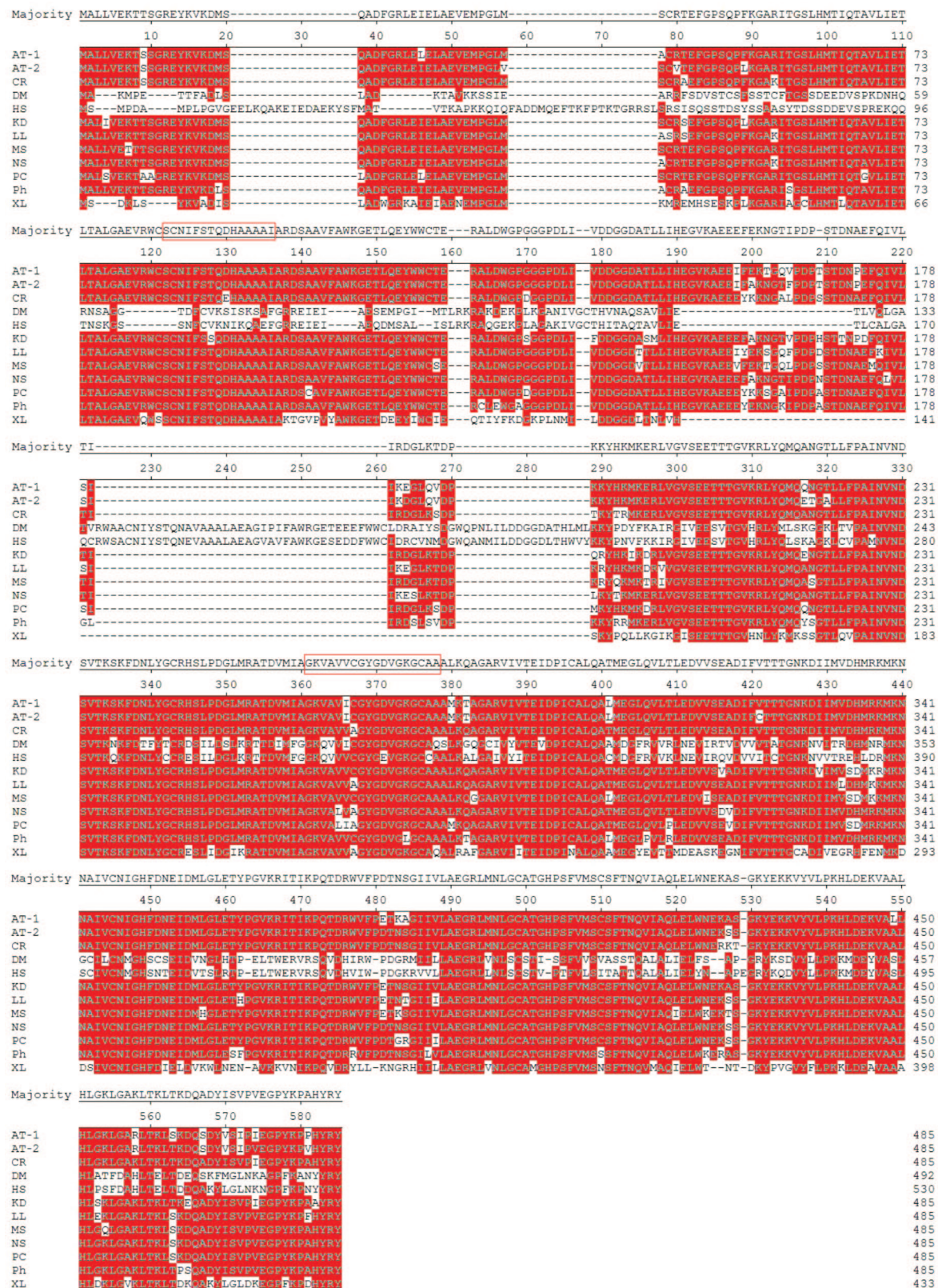


图3 落地生根和其他物种的SAHH氨基酸序列比对。□: 保守基序; AT-1: 拟南芥 SAHH-1; AT-2: 拟南芥 SAHH-2; CR: 长春花; DM: 黑腹果蝇; HS: 智人; KD: 落地生根; LL: 黄花羽扇豆; MS: 紫花苜蓿; NS: 樟子松烟草; PC: 欧芹; Ph: 蝴蝶兰; XL: 非洲爪蛙。

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of SAHH in *Kalanchoe daigremontiana* and other species. □: Conserve motif; AT-1: SAHH1 in *Arabidopsis thaliana*; AT-2: SAHH2 in *A. thaliana*; CR: *Catharanthus roseus*; DM: *Drosophila melanogaster*; HS: *Homo sapiens*; KD: *K. daigremontiana*; LL: *Lupinus luteus*; MS: *Medicago sativa*; NS: *Nicotiana sylvestris*; PC: *Petroselinum crispum*; Ph: *Phalaenopsis sp.*; XL: *Xenopus laevis*.

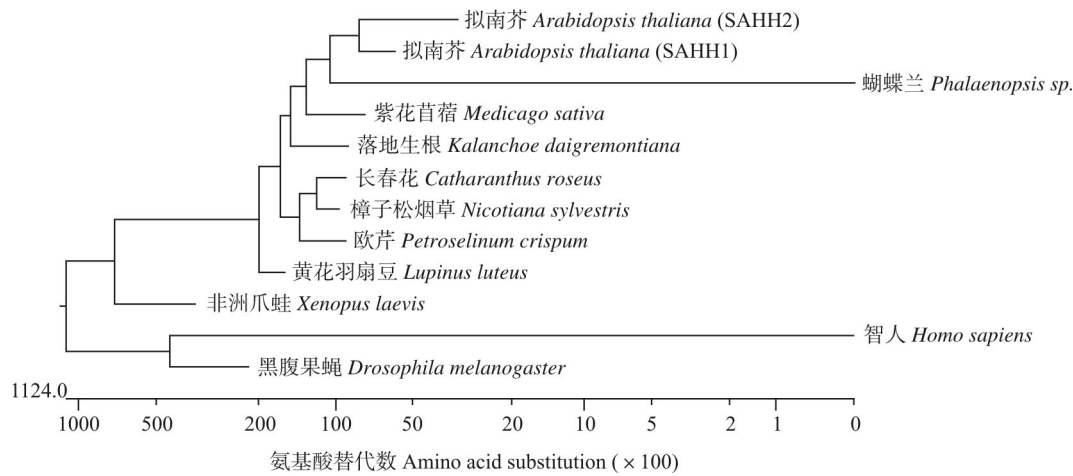


图 4 不同物种 SAHH 蛋白的聚类分析
Fig. 4 Cluster analysis of SAHH protein in different species

Garnier-Robson 方法, KdSAHH 蛋白主要含有 α 螺旋和 β 折叠,其中 α 螺旋 20 个, β 折叠 33 个,两者交替分布,转角和无规则卷曲分别有 29 个和 27 个(图 5: A)。而按照 DNASTar 中的 Chou-Fasman 方法, KdSAHH 蛋白共有 19 个 α 螺旋, 15 个 β 折叠和 33 个 β 转角(图 5: B)。

采用 CFSSP 软件预测 KdSAHH 蛋白的二级结构(图 6), α 螺旋和 β 折叠是 KdSAHH 最主要的二级结构元件, α 螺旋和 β 折叠呈间隔分布,而 β 转角和无规则卷曲则散布于整个蛋白质中,其中可能形成 α 螺旋的氨基酸残基有 352 个,占氨基酸总数的 72.6%;可能形成 β 折叠的残基有 321 个,占 66.2%;

可能形成 β 转角的氨基酸残基有 58 个,占 12%。

2.5 SAHH蛋白三级结构的预测

利用同源建模的方法,采用 SWISS-MODEL 对 KdSAHH 蛋白的三级结构进行预测。结果表明, KdSAHH 蛋白与黄羽扇豆(*Lupinus luteus*, 3ondA) 的同源性为 90.52%,建模残基为 1~485,建模相对准确(图 7)。

将 KdSAHH 的氨基酸序列提交到 Phyre 网站,并通过 PSI-BLAST 方法寻找同源性较高的序列进行建模。结果表明落地生根的 KdSAHH 与黄羽扇豆(c3oneA)的同源性最高,达到 91% (图 8)。

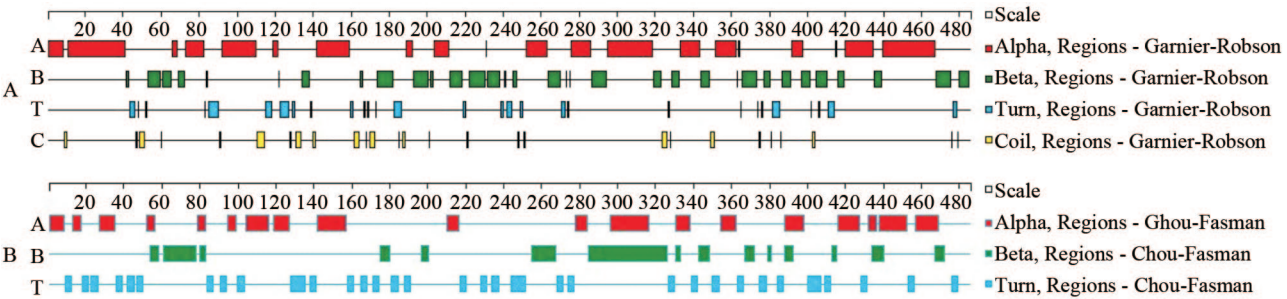


图 5 Garnier-Robson (A)和 Chou-Fasman (B)预测 KdSAHH 蛋白的二级结构
Fig. 5 Secondary structure of KdSAHH predicted by Garnier Robson (A) and Chou-Fasman (B)

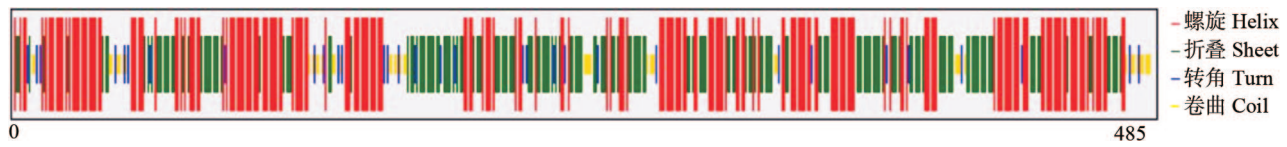


图 6 CFSSP 预测 KdSAHH 蛋白的二级结构
Fig. 6 Secondary structure of KdSAHH predicted by CFSSP

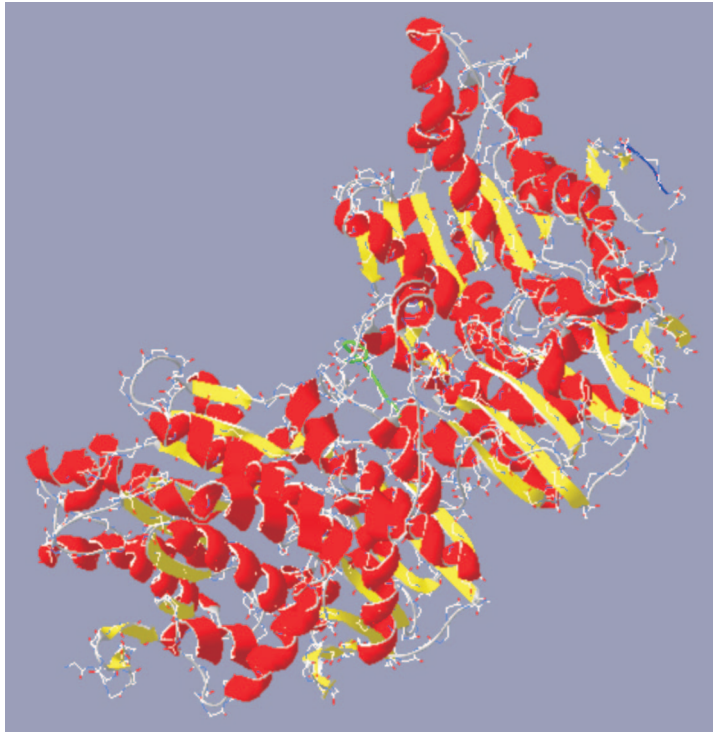


图 7 SWISS-MODLE 预测的 SAHH 三级结构。红色: α 螺旋; 黄色: β 折叠; 蓝色: C 末端; 绿色: N 末端。
Fig. 7 Three-dimensional structure of SAHH predicted by SWISS-MODLE. Red: α Helices; Yellow: β sheets; Blue: C terminal; Green: N terminal.

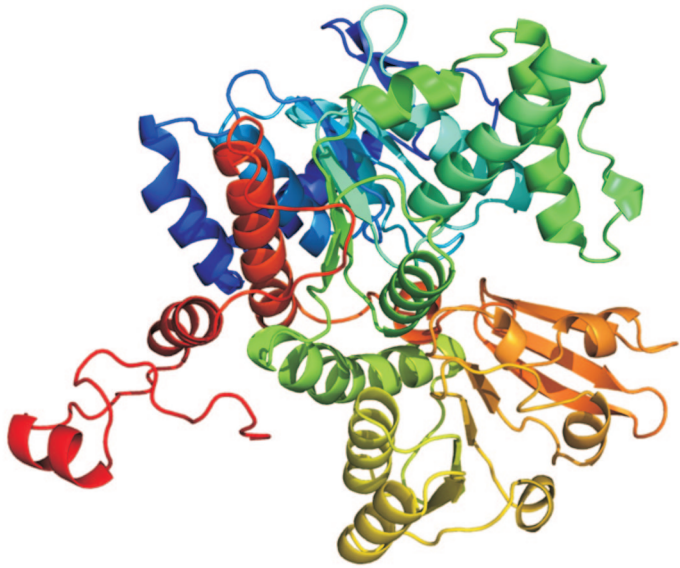


图 8 Phyre 预测的 SAHH 三级结构
Fig. 8 Three-dimensional structure of SAHH predicted by Phyre

3 讨论

SAHH 广泛存在于各种生物和组织中。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术成功克隆了落地生根 *KdSAHH* 的全长 cDNA 序列, *KdSAHH* 基因全

长 1748 bp, 编码 485 个氨基酸, 预测 *KdSAHH* 蛋白分子量约为 53 kDa, 与其它生物的 SAHH 蛋白相似^[12-13]。 *KdSAHH* 的等电点为 5.59~5.682, 与 SAHH 作为酸性蛋白酶的功能相符。

氨基酸序列比对表明, 虽然不同来源的 SAHH

在氨基酸序列上存在差异,但 SAHH 在进化过程中还是非常保守的,均存在两个 SAHH 标志序列 (SCNIFSSQDHAAAAI 和 GK VAVVCGYGDVGK-GCAA)。KdSAHH 的二级结构以 α 螺旋和 β 折叠为主, β 转角和无规则卷曲含量相对较低。 α 螺旋是一种稳定结构,在多数膜结构中处于脂双层中,起到跨膜传递作用。而均匀分布在整个蛋白质中的无规则卷曲可能使 KdSAHH 具有热稳定性,因为无规则卷曲可以使空间结构中的自由能达到最大化而利于结构稳定^[14]。

蛋白质的二级结构预测为三级结构模型的构建建立了起始点^[15],目前对蛋白质天然结构的预测方法有同源建模法、折叠识别法、从头预测法^[16]。一般情况下,待预测蛋白与模板蛋白的同源性大于 30%,得到的结构才相对准确。本研究采用 Expasy 预测的 KdSAHH 蛋白与黄羽扇豆 (3ondA) 同源性为 90.52%;同样,利用 Phyre 预测的 KdSAHH 与黄羽扇豆 (c3oneA) 同源性为 91%。尽管两种预测方法与选用的模板同源性都非常高,但是预测的三维结构仍有一定差异。通过预测蛋白质的三维结构有助于了解其性质,但还不能完全判断其功能,这是因为蛋白质的某些氨基酸在生物体内能被酶催化,生成一些新的氨基酸,从而改变特定蛋白的空间结构,导致其功能变化^[17]。

SAHH 基因在 DNA 甲基化过程中起着重要作用。根据这一原理,SAHH 作为药物设计靶点已生产出的多种抑制剂,在抗病毒、抗癌、抗关节炎等方面都有非常良好的药理作用^[18]。此外,SAHH 在抵御各种逆境胁迫中也起到了至关重要的作用。早在 1995 年, Masuta 就报道了翻译表达 SAHH 可以提高烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的抗病毒能力^[5];遏蓝菜 (*Thlaspi arvense*) 和草菇 (*Volvariella volvacea*) 中 SAHH 参与了低温胁迫的响应^[19-21]。SAHH 还在植物的生长发育过程起重要作用,余义斌报道 SAHH 与棉花 (*Gossypium hirsutum*) 纤维细胞的发育有关^[13]。金晓霞等报道 SAHH 可能与黄瓜 (*Cucumis sativus*) 性别分化有关^[22]。Tanaka 等^[23]的研究表明烟草体外花芽形成诱导了 SAHH 基因的表达。目前我们正在构建 KdSAHH 基因的植物过表达载体和干扰载体, KdSAHH 基因在胎生苗发育过程中的作用和落地生根胎生苗发育的分子机制还有待于深入研究。

参考文献

- [1] Ojewole J A O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 99(1): 13–19.
- [2] Garcês H, Sinha N. The ‘mother of thousands’ (*Kalanchoë daigremontiana*): A plant model for asexual reproduction and CAM studies [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009, 2009(10): pdb.emo133.
- [3] Garcês H M P, Champagne C E M, Townsley B T, et al. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(39): 15578–15583.
- [4] Wang C H, Leffler S, Thompson D H, et al. A general fluorescence-based coupled assay for S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(1): 351–356.
- [5] Masuta C, Tanaka H, Uehara K, et al. Broad resistance to plant viruses in transgenic plants conferred by antisense inhibition of a host gene essential in S-adenosylmethionine-dependent transmethylation reactions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(13): 6117–6121.
- [6] Steere J A, Honek J F. Synthesis and biological activity of novel S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11(15): 3229–3236.
- [7] Li C H, Yu N, Jiang S M, et al. Down-regulation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase reveals a role of cytokinin in promoting transmethylation reactions [J]. *Planta*, 2008, 228(1): 125–136.
- [8] Rocha P S C F, Sheikh M, Melchiorre R, et al. The *Arabidopsis* *HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING1* gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(2): 404–417.
- [9] Tanaka H, Masuta C, Uehara K, et al. Morphological changes and hypomethylation of DNA in transgenic tobacco expressing antisense RNA of the S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35(6): 981–986.
- [10] Mull L, Ebbs M L, Bender J. A histone methylation-dependent DNA methylation pathway is uniquely impaired by deficiency in *Arabidopsis* S-adenosylhomocysteine hydrolase [J]. *Genetics*, 2006, 174(3): 1161–1171.
- [11] Zhong T X, Zhu C, Zeng H M, et al. Analysis of gene expression in *Kalanchoe daigremontiana* leaves during plantlet formation under drought stress [J/OL]. *Electr J Biotechn*, 2013, 16(6): 4. doi: 10.2225/vol16-issue6-fulltext-14
- [12] Wang J H, Ding Y, Jian J C, et al. Molecular cloning and bioinformatics analysis of the S-adenosyl homocysteine hydrolase (SAHH) gene in the Antarctic ice alga *Chlamydomonas* sp. ICE-L (*Chlamydomonadales*, *Chlamydomonas*) [J]. *J Fish Sci China*, 2011, 18(6): 1234–1242.

王金慧, 丁燊, 简纪常, 等. 南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L

- S-腺苷同型半胱氨酸水解酶基因的克隆及其生物信息学分析 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1234–1242.
- [13] She Y B, Zhu Y C, Zhang T Z, et al. Cloning, expression, and mapping of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (GhSAHH) cDNA in cotton [J]. Acta Agron Sin, 2008, 34(6): 958–964.
余义斌, 朱一超, 张天真, 等. 棉花腺苷高半胱氨酸水解酶 cDNA 的克隆、表达及染色体定位 [J]. 作物学报, 2008, 34(6): 958–964.
- [14] He X, Wang B Y, Zhang X L, et al. Structure prediction of carbonic anhydrase from triticale (*Triticosecale* Wittmack) [J]. Biotechn Bull, 2012(2): 151–158.
何宣, 王白羽, 张晓磊, 等. 小黑麦碳酸酐酶蛋白质三维结构预测 [J]. 生物技术通报, 2012(2): 151–158.
- [15] Wang X J, Yu J J, Sreekumar A, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer [J]. New Engl J Med, 2005, 353(12): 1224–1235.
- [16] Xu J P, Fang H S, Xiang B R. A method for fast comparison between prediction models of protein structure [J]. J China Pharm Univ, 2006, 37(3): 281–283.
徐建平, 方慧生, 相秉仁. 一种快速比较蛋白质结构预测模型相似性的方法 [J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(3): 281–283.
- [17] Huang Y S, Zhang G Y. Biochemistry and Molecular Biology [M]. Beijing: Science Press, 2003: 1–545.
黄诒森, 张光毅. 生物化学与分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 1–545.
- [18] Ji Y, Li Z T, Zhu Q, et al. Current status in research of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its inhibitors [J]. Progr Pharm Sci, 2005, 29(11): 481–486.
纪宇, 李振涛, 朱奇, 等. S-腺苷高半胱氨酸水解酶及其抑制剂的研究近况 [J]. 药学进展, 2005, 29(11): 481–486.
- [19] Wang H, Chen M J, Feng A P, et al. Expression of a low temperature induced S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene (*Cor3*) in a low temperature sensitive strain and a cold tolerant mutant of *Volvariella volvacea* [J]. Acta Edul Fungi, 2010, 17(1): 14–16.
汪虹, 陈明杰, 冯爱萍, 等. 草菇S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶同源基因*Cor3*低温条件下的表达变化 [J]. 食用菌学报, 2010, 17(1): 14–16.
- [20] Sun X H, Feng A P, Chen M J, et al. Cloning and sequence analysis of cold induced genes in Chinese straw mushroom, *Volvariella volvacea* [J]. Mycosystema, 2006, 25(1): 88–93.
孙晓红, 冯爱萍, 陈明杰, 等. 草菇冷诱导相关基因的克隆及序列分析 [J]. 菌物学报, 2006, 25(1): 88–93.
- [21] Sharma N, Cram D, Huebert T, et al. Exploiting the wild crucifer *Thlaspi arvense* to identify conserved and novel genes expressed during a plant's response to cold stress [J]. Plant Mol Biol, 2007, 63(2): 171–184.
- [22] Jin X X, Qin Z W, Zhou X Y, et al. Cloning and expression analysis of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in cucumber (*Cucumis stavius* L.) [J]. Sci Agri Sin, 2012, 45(7): 1338–1346.
金晓霞, 秦智伟, 周秀艳, 等. 黄瓜S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶全长cDNA的克隆及表达分析 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1338–1346.
- [23] Tanaka H, Masuta C, Kataoka J, et al. Inducible expression by plant hormones of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene from *Nicotiana tabacum* during early flower bud formation *in vitro* [J]. Plant Sci, 1996, 113(2): 167–174.