

麻疯树鲨烯合酶基因 *SQS* 的克隆及生物信息学分析

侯嵘, 龚诺希, 刘法涛, 林娟*

(复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 植物科学研究所, 上海 200433)

摘要:以麻疯树(*Jatropha curcas* L.)总 RNA 为模板,根据已报道的鲨烯合酶基因序列设计简并引物,用 RACE 方法克隆得到麻疯树鲨烯合酶基因全长 cDNA,命名为 *JcSQS*。*JcSQS* 全长 1609 bp,包含 1 个 1242 bp 的开放阅读框,预测麻疯树鲨烯合酶基因编码的蛋白含有 413 个氨基酸。*JcSQS* 具有鲨烯合酶类的保守结构域,*JcSQS* 蛋白与蓖麻、柿、木榄等植物中 *SQS* 基因编码的氨基酸序列具有高度同源性。这为研究麻疯树萜烯类物质的生物合成和调控机制奠定了基础。

关键词:麻疯树; 鲨烯合酶基因 *SQS*; RACE; 生物信息分析

中图分类号:Q943.2

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2011)05-0391-09

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.05.001

Cloning and Bioinformatics Analysis of Squalene Synthase Gene (*SQS*) from *Jatropha curcas* L.

HOU Rong, GONG Nuo-xi, LIU Fa-tao, LIN Juan*

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Plant Biology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Using the total RNA extracted from *Jatropha curcas* L. leaves as the template, the degenerate primers were designed according to the reported sequence of squalene synthases gene in other plants, the full-length cDNA of squalene synthase gene in *Jatropha curcas* L. was cloned using RACE method, which was named *JcSQS* with 1609 bp in length including a 1242 bp-ORF, and *JcSQS* was predicted to encode the protein with 413 amino acids. The cloned *JcSQS* gene contained the typical conserved sequences and domains of *SQS* genes. The *JcSQS* protein had high homology with the amino acid sequences encoded by *SQS* gene in *Ricinus communis*, *Diospyros kaki* and *Bruguiera gymnorhiza*, so on. It laid the foundation for studying the biosynthesis and regulation of terpenoids and steroids in *J. curcas*.

Key words: *Jatropha curcas* L.; Squalene synthase gene (*SQS*); RACE; Bioinformatics analysis

麻疯树(*Jatropha curcas* L.),又名麻风树、小桐子等,为大戟科(Euphorbiaceae)麻疯树属植物,主要分布于热带与亚热带地区,在我国资源非常丰富,该植物在生物柴油的应用、新药开发、病虫害防治等多方面都表现出了广阔的开发前景和潜在的应用价值^[1]。麻疯树中含有蛋白质、萜类、甾醇、脂肪酸等多种物质,近年来,随着分子生物学技术的发展和不断深入研究,对麻疯树萜类物质,特别是麻疯树种子中的萜类物质——佛波醇酯

的研究取得了较多的进展。麻疯树种子中高浓度的佛波醇酯是其毒性的主要成分^[2],其含量是区别有毒和无毒品种的依据。麻疯树种子中的佛波醇酯有 70% ~ 75% 存在于油脂中,而其余 25% ~ 30% 存在于饼粕中^[3]。国内外有关麻疯树毒素(佛波醇酯)的研究主要集中在毒素的测定^[4]、结构研究^[5]、毒素的去除^[2-3]、毒素的作用^[6]以及代谢调控^[7-8]。

鲨烯合酶(Squalene Synthase, *SQS*)是萜烯类化

收稿日期: 2011-01-27 接受日期: 2011-06-01

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30771745)资助

作者简介:侯嵘,硕士,研究方向为植物生物技术, email: ronghou@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, email: linjuan@fudan.edu.cn

合物生物合成途径中的关键酶,定位于内质网膜,它催化两个分子的法呢酯焦磷酸 (Farnesyl diphosphate, FPP) 缩合产生鲨烯 (Squalene), 进而生成一系列三萜、甾醇、胆固醇等萜烯类物质^[9]。对鲨烯合酶基因的克隆是研究其代谢与调控的基础,目前青蒿 (*Artemisia annua*)^[10]、烟草 (*Nicotiana benthamiana*)^[11]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[12]、绿玉树 (*Euphorbia tirucalli*)^[13]、灵芝 (*Ganoderma lucidum*)^[14]、东北红豆杉 (*Taxus cuspidata*)^[15] 等植物中的鲨烯合酶基因已经被克隆,并通过转基因等多种方法研究了其在萜烯类化合物合成途径中的重要作用。为了深入研究麻疯树内萜烯类物质——佛波醇酯的生物合成,明确鲨烯合酶在萜烯类合成过程中的作用,本文以麻疯树总 RNA 为模板,通过 RACE 方法克隆了 *JcSQS* 基因,并分析其氨基酸结构、保守域及亲缘关系,为研究麻疯树萜烯类物质的生物合成提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料麻疯树 (*Jatropha curcas* L.) 由四川大学生命科学学院陈放教授惠赠。麻疯树种子种植于本实验室温室,取发芽后 4 周的叶片,用液氮速冻后于 -80℃ 保存备用。One-step RT-PCR kit 试剂盒、pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; SMART RACE kit 试剂盒购自 Clontech 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 引物由上海生工生物公司合成; 测序由上海美季生物技术有限公司完成; *Taq* DNA 聚合酶等其他药品、试剂等购于上海生工生物技术有限公司。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

取 0.1 g 叶片置于预冷的研钵中,加入液氮快速研磨成粉末,按照 RNA 两步裂解法^[16] 提取麻疯树总 RNA。以总 RNA 为模板,AP 为接头引物,按照 Clontech 3'-RACE 试剂盒要求合成第一链 3'-cDNA,置于 -20℃ 保存备用。

1.3 *SQS* 基因的克隆

用 Blast 分析已报道的植物 *SQS* 基因全长 cDNA 的编码区序列 (Coding sequence, CDS), 设计简并引物 *JcSQS*-F1 (5'-GTTGAGGATGA(C/T)AC-(A/T)AGCATA(C/G)(C/A)(A/T)AC-3'), *JcSQS*-F2 (5'-TA(T/C)TG(T/C)CACTATGT(T/G)GC(T/A)GG-

(A/G)CT(T/A/G)GTTGG-3'), *JcSQS*-R (5'-CCAAT-(C/T)G(A/C)CAT(T/G/A)ATCTG(A/G/T)GG(T/G/A)AT(A/T/G)GCACA-3'), 以麻疯树 3' 端 cDNA 为模板,采用三轮 PCR 扩增 *JcSQS* 基因核心片段,为 RACE 获得全长目的基因提供信息。第一轮 PCR 为梯度 PCR,以 *JcSQS*-F1 与 AP (5'-GGCCACG-CGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') 为引物,第二轮 PCR 以 *JcSQS*-F2 与 AP 为引物,第三轮 PCR 以 *JcSQS*-F2 与 *JcSQS*-R 为引物。

采用 Clontech 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒,根据已获得的 *JcSQS* 基因的核心片段,设计 2 条引物 *JcSQS*5-1 (5'-AGCA-TCGCACTGCCTTGAGCGAGTT-3') 和 *JcSQS*5-2 (5'-AGGACATCTGGTGCCAAATCTTCC-3'), 分别与 UPM (Long: 5'-CTAATACGACTCACTATA-GGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'; Short: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') 和 NUP (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') 配对,用于 *JcSQS* 的 5'-RACE 巢式扩增。PCR 反应按照 Clontech 建议程序进行。

根据克隆得到的 *SQS* 基因核心片段及 5' 端序列设计扩增 *JcSQS* 全长序列的 3 条引物 *JcSQS*3-1 (5'-ACAACTCATCCGTCATCTCCATCTCT-3'), *JcSQS*3-2 (5'-ATGGGGAGTTTAGGTGCGATTT-TGAA-3') 和 *JcSQS*3-3 (5'-CTAGATACTTGGTCG-ATTTGCAGAA-3'), 结合引物 AP, 以麻疯树 3'-cDNA 为模板,采用巢式 PCR 扩增 *SQS* 基因全长序列。第一轮 PCR 以 *JcSQS*3-1 及 AP 为引物,巢式 PCR 以第一轮 PCR 产物为模板,采用 *JcSQS*3-2 与 *JcSQS*3-3 为引物。以上 PCR 产物均经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析纯化后,连接至 pMD18-T 载体,并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,通过氨苄青霉素 Amp 培养基筛选阳性克隆测序。

1.4 *SQS* 基因 cDNA 的生物信息学分析

序列比对、蛋白质基本性质预测等在 Vector NTI Suite 9.0 软件上进行, ORF (Open reading frame) 查找和 ORF 翻译在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> 完成, GenBank BLAST 和蛋白序列的搜索在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上进行,蛋白质二级结构分析在 www.expasy.org 进行,基于 Hierarchical Neural Network Analysis。蛋白质同源性建模在 www.expasy.org (swiss-model) 等网站提供链接的各生物信息学软件网站上

进行。叶绿体前导肽的预测在 <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/> 上进行。分子系统进化树使用 ClustalX 软件对序列进行多重比对后,使用 NJ 法完成系统树的构建,并使用 MEGA3 对系统树进行测试和编辑。

1.5 组织特异性表达分析

分别采集正常生长的麻疯树根、茎、叶、幼果、成果组织按上述方法提取 RNA。采用 TaKaRa 公司的 One-Step RT-PCR Kit 试剂盒。*JcSQS* 表达分析的引物为 *JcSQS*-RT-F (5'-GAGAAGCAGAT-CCCACCCGAACC-3') 和 *JcSQS*-RT-R (5'-CCACG-CCTCATCTTGACAACACC-3')。用 18S rRNA 基因作为内标,引物为 18S-F (5'-ATGATAACTCGA-CGGATCGC-3'), 18S-R (5'-CTTGGATGTGGTA-GCCGTTT-3');反应中的 RNA 用分光光度计定量到 400 ng。PCR 反应条件为:50℃ 30 min, 94℃ 2 min, 共 25 个循环(18S);94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 28 个循环(*JcSQS* 基因)。反应结束后取 15 μ L 进行电泳检测。

2 结果和分析

2.1 *JcSQS* 基因的克隆

根据 GenBank 中已有的植物 *SQS* 基因的保守区设计了 3 条简并引物,结合引物 AP,以麻疯树总 RNA 逆转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得 1 条约 350 bp 的特异条带 *JcSQS*-1。根据麻疯树 *SQS* 保守区序列设计两条反向引物 *JcSQS*5-1 和 *JcSQS*5-2,结合试剂盒提供的引物 UPM 和 NUP,以麻疯树 5'-cDNA 为模板进行 PCR 扩增,得到两个分别约为 700 bp (*JcSQS*-2) 和 350 bp (*JcSQS*-3) 的片段;根据拼接的 *JcSQS*-1 和 *JcSQS*-2 序列,设计了 3 条引物进行全长序列扩增,获得 1 条大约 1700 bp 的条带(*JcSQS*-4)。经与 *JcSQS*-1 和 *JcSQS*-2 进行比对,获得 *JcSQS* 全长 cDNA 序列约 1609 bp,包括 1 个 1242 bp 的开放阅读框(ORF)(114 ~ 1355 bp),1 个长 113 bp 的 5'非翻译区序列和 1 个长 254 bp 的 3'非翻译区,后面带着 1 个长 14 bp 的 poly(A)尾(图 1)。通过 Vector NTI 软件推测出 *JcSQS* 蛋白含有 413 个氨基酸,不含叶绿体前导肽。应用 Computer pI/Mw Tool 软件 (<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测, *SQS* 蛋白的等电点和分子量大小分别为 7.16 和 47.24 kD。

将获得的 *JcSQS* 基因全长 cDNA 序列及其编

码的氨基酸序列进行 BLAST 分析检索,结果表明, *JcSQS* 推导的氨基酸序列与蓖麻、柿(ACN69082)和木榄(ADD54645)的同源性分别为 89%、87% 和 86%。与麻疯树 *SQS* 同源性较高的植物 *SQS* 氨基酸序列比对见图 2,结果表明,在 *SQS* 序列中含有 6 个比较保守的区域^[17],其中 3 个区域(Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ)为高度保守的,通常认为与活性位点相关,在动物、植物和真菌中基本没有变化,分别位于第 168 ~ 186、202 ~ 217 和 285 ~ 298 位。区域Ⅱ的保守性较低,但在此区域中含着高度保守的 1 ~ 2 个天冬氨酸残基,被认为是 Mg^{2+} 结合的位点。区域Ⅵ的保守性也较低,但含有 1 个高度疏水序列(又称疏水区域),被认为与酶和内质网膜的结合有关。一般认为区域Ⅰ保守性最低。每个保守区域的氨基酸残基一般为 14 ~ 23 个^[18]。

2.2 同源性分析及聚类分析

采用 ClustalX 软件,对目前已经克隆的包括人、小鼠、藻类、真菌等物种的 *SQS* 氨基酸序列进行了分析比对,并构建了 *SQS* 蛋白的系统进化树,在 MEGA3 软件上进行 UPGMA 法的 phylogeny 的 Bootstrap 测试。结果表明(图 3), *JcSQS* 在进化树中归到了双子叶植物大戟科的分支上,与同是大戟科的蓖麻、绿玉树等非常接近。这与实验预期符合,也在一定程度上证明了克隆所得基因为 *SQS* 的可靠性。

2.3 *JcSQS* 蛋白结构分析

通过网站 Hierarchical Neural Network 对 *JcSQS* 蛋白的二级结构进行了预测。结果表明, *JcSQS* 蛋白由 67.55% 的 α -螺旋、4.36% 的延伸主链和 28.09% 的随机卷曲组成。纵观蛋白的整体结构, α -螺旋和随机卷曲是 *JcSQS* 蛋白最大量的结构元件,而 β 转角和延伸链则散布于整个蛋白质中。

借助生物学软件 SWISS MODEL web server 的帮助,对 *JcSQS* 蛋白的三级结构进行了在线分析,并用 3-D Molecular Viewer 和 WEBLAB VIEWERLITE 进行编辑。预测的 *JcSQS* 蛋白三维结构(<http://cn.expasy.org>)见图 4。可见, *JcSQS* 蛋白结构基本均由 α -螺旋组成,按照结构层次,这些 α -螺旋可以分为 3 层,第一层由 A、B 和 K 螺旋构成,第二层包含 E、C、J 和 L 螺旋,而第三层则由 D、F、G、H、I 和 M 组成,这与目前已知结构的人鲨烯合酶的晶体结构非常类似(图 4)^[19]。

1 ACGCGGGGGTACAAACTCATCCGTCATCTCCATCTCTGTCTTCTGCAAAAAACCATTACCC
61 AAATTTGCATATAAACTCAAATTTTGGGTTGAAAATCAAAGGATCTGACAATAATGGGA M G S
121 GTTTAGGTGCGATTTTGAACATCCAGATGACTTATACCCACTTTTGAAGCTCAAAATGG
L G A I L K H P D D L Y P L L K L K M A
181 CTGCAAGGCATGCAGAGAAGCAGATCCCACCCGAACCTCATTGGGGTTTCTGTTACTCTA
A R H A E K Q I P P E P H W G F C Y S M
241 TGCITTCATAAGGTTTCTCATATCTTTGCTCTTGTATTCAACAGCTTGGCACTGAACTTC
L H K V S H I F A L V I Q Q L G T E L R
301 GAGATGCTGTATGCATATTTTATTTGGTTCTTCGAGCCCTTGACACAGTTGAGGATGATA
D A V C I F Y L V L R A L D T V E D D T
361 CAAGCATACCTACAGATGTCAAAGTGCCTATCCTGATAGCTTTTCACCGTCACATATATG
S I P T D V K V P I L I A F H R H I Y D
421 ATCAAGACTGGCATTTTTCATGTGGTGCTAAGGACTATAAAGTTCTCATGGATCAGTTTC
Q D W H F S C G A K D Y K V L M D Q F H
481 ACCATGTTTCAACAGCTTTTCTAGAGCTTGGGAAAAGTTATCAGGAGGCAATTGAGGATA
H V S T A F L E L G K S Y Q E A I E D I
541 TTACGAAAAGAATGGGTGCAGGAATGGCTAAATTCATATGCAAGGAGGTGGAAACAATTG
T K R M G A G M A K F I C K E V E T I D
601 ATGACTACGATGAATATTGCCATTATGTAGCAGGACTTGTGGACTAGGCCTGTCCAAGC
D Y D E Y C H Y V A G L V G L G L S K L
661 TTTTCCATGCCTCTGAATTGGAAGATTGGCACCAGATGTCCTTTCCAACCTCAATGGGTT
F H A S E L E D L A P D V L S N S M G L
721 TATTTCTTCAGAAAACAAACATTATTCGAGATTATCTGGAGGACATAAATGAGATACCCA
F L Q K T N I I R D Y L E D I N E I P K
781 AGTCACGCAIGTTTTGGCCTCGCCAGATCTGGAGTAAATATGTTGACAACTTGAGGACT
S R M F W P R Q I W S K Y V D K L E D L
841 TGAAATATGAAGAGAACTCGCTCAAGGCAGTGCATGCTTGAATGATATGGTGACAAATG
K Y E E N S L K A V R C L N D M V T N A
901 CTCTGATGCATGTGGATGACTGCTTGAAGTACATGTCTGCATTGCGTGATCCTGCTATAT
L M H V D D C L K Y M S A L R D P A I F
961 TTGATTTTGTGCAATCCCCCAGATAATGTCAATTGGAACACTAGCATTGTGCTACAACA
R F C A I P Q I M S I G T L A L C Y N N
1021 ACATCGAAGTATTCAGAGGTGTTGTCAAGATGAGGCGTGGTCTAACTGCTAAGGTCATTT
I E V F R G V V K M R R G L T A K V I Y
1081 ATCAAACAAAAAGTATGGCCGATGTATATGGTGCTTTCTTTGATTCTCCTGTATGCTCA
Q T K S M A D V Y G A F F D F S C M L K
1141 AGTCCAAGGTGCACATGAGTGATCCAAATGCAGAAAAGACATTAAGCAGGCTGGAAGGGA
S K V D M S D P N A E K T L S R L E G I
1201 TACAAAAAGCATGCCAGGAGTCTGGGCTTCTAAACAAAAGGAAATCATACATTAATAGGA
Q K A C Q E S G L L N K R K S Y I N R S
1261 GTAAGCCAAGATACAATTCTGCACTGATTGTCTTACTTTTTGTAATACTGTCCATCGTTT
K P R Y N S A L I V L L F V I L S I V F
1321 TCTCTTATCTTTCTGCAATCGACCAAGTATCTAGAGATTGTGACTCTGTTCAACTTTGT
S Y L S A N R P S I
1381 TCATGACTTGCTCCATCGAACTTCGCTTTTTACAATGTTTGACAGAAATATTGTAATGCC
1441 AGAAGTCTGTTCCCTGATATTTAAACAAAAAGGCCTATAAGTAAAGTTTGCACCCCTTA
1501 ACCCTGAAATCCCATTTAGTTAACTTATTGCTTGATTGTTGTTACTCTACTCTTAATTGT
1561 GGTGGTGGAGCAATAATATTAAGATTGTAAAGTGCAAAAAAAAAAAAAA

图 1 麻疯树 *JcSQS* 基因 cDNA 序列及其氨基酸序列
Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *JcSQS* in *Jatropha curcas*

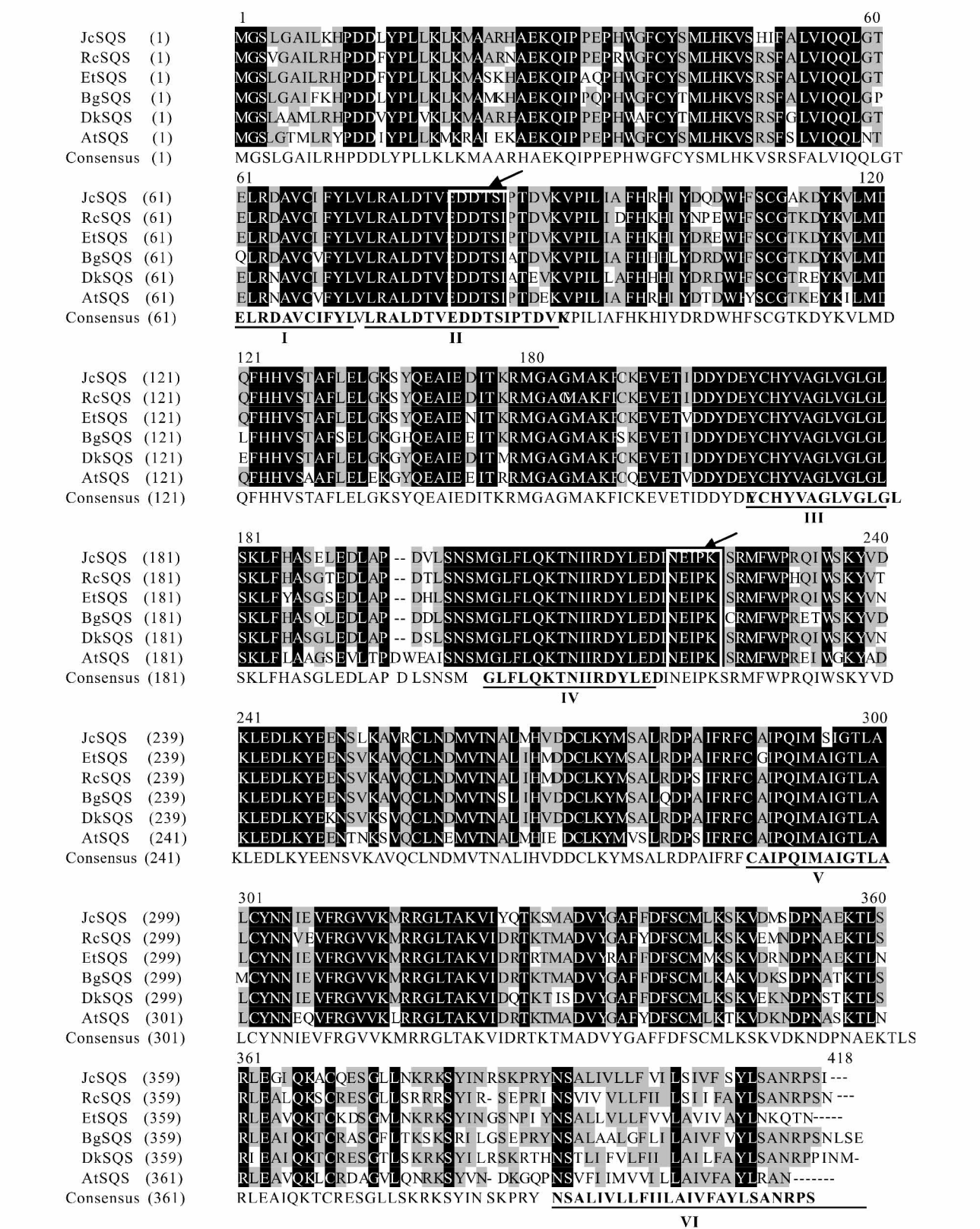


图 2 *SQS* 蛋白氨基酸序列的比较。AtSQS: 拟南芥(AAD00296); DkSQS: 柿(ACN69082.1); BgSQS: 木槿(ADD54645.1); EtSQS: 绿玉树(BAH23428); RcSQS: 蓖麻(XP002512982);箭头示保守序列。

Fig. 2 Comparison of the deduced amino acid sequence of some species. AtSQS: *Arabidopsis thaliana* (AAD00296); DkSQS: *Diospyros kaki* (ACN69082.1); BgSQS: *Bruguiera gymnorhiza* (ADD54645.1); EtSQS: *Euphorbia tirucalli* (BAH23428); RcSQS: *Ricinus communis* (XP002512982). Arrows show conserved sequences.

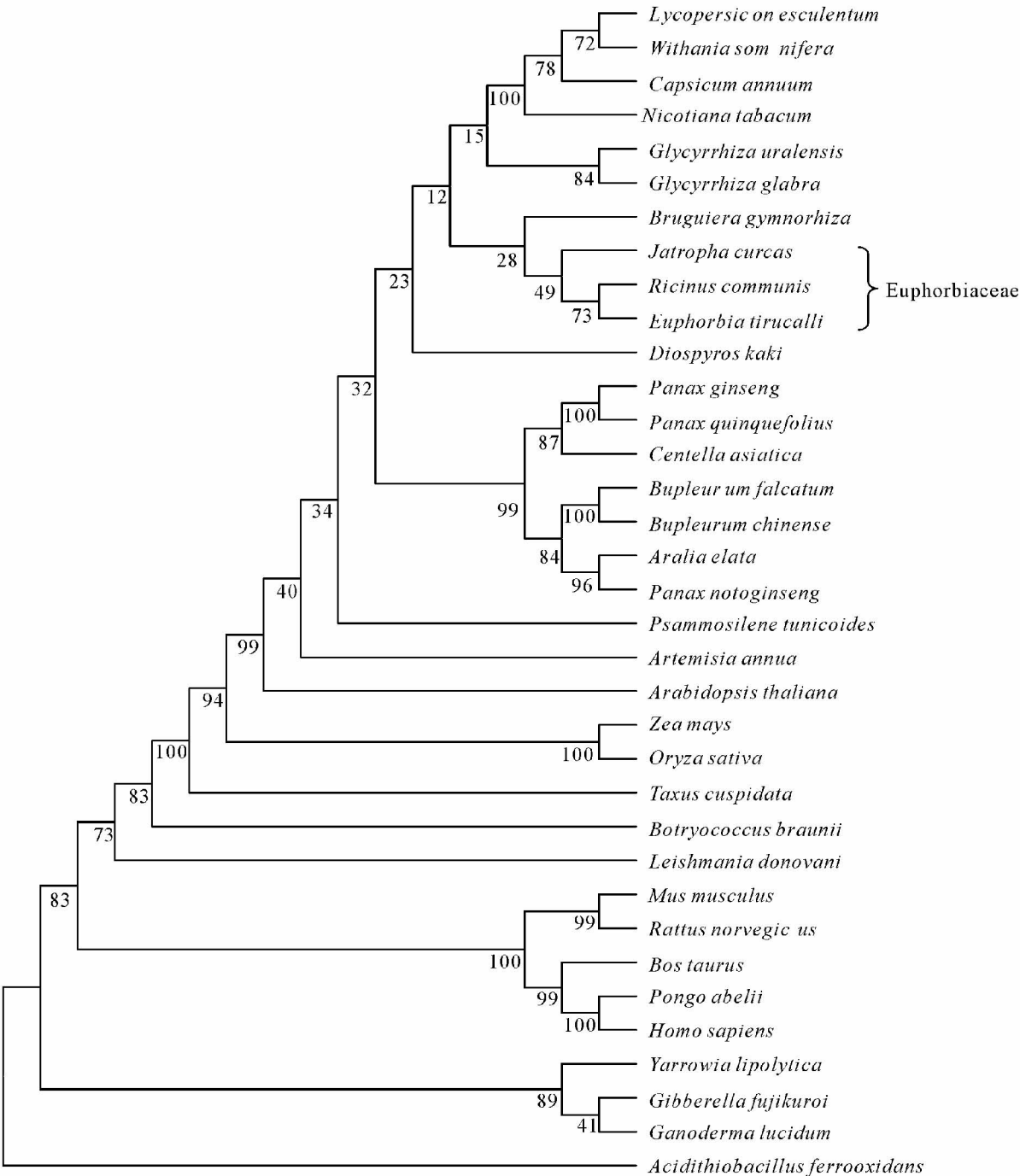


图 3 SQS 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of SQSs

Acidithiobacillus ferrooxidans: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌, YP002220212.1; *Arabidopsis thaliana*: 拟南芥, AAD00296; *Aralia elata*: 楸木, ADC32654; *Artemisia annua*: 黄花蒿, AAR20329; *Bos taurus*: 黄牛, NP001013022; *Botryococcus braunii*: 布朗葡萄藻, AAF20201; *Bruguiera gymnorhiza*: 木榄, ADD54645; *Bupleurum chinense*: 北柴胡, ACX42426; *Bupleurum falcatum*: 三岛柴胡, AAY46017; *Capsicum annuum*: 辣椒, AAD20626; *Centella asiatica*: 积雪草, AAV58897; *Diospyros kaki*: 柿, ACN69082; *Euphorbia tirucalli*: 绿玉树, BAH23428; *Ganoderma lucidum*: 灵芝, ABF57213; *Gibberella fujikuroi*: 藤仓赤霉菌, ABX64425; *Glycyrrhiza glabra*: 洋甘草, BAA13084; *Glycyrrhiza uralensis*: 甘草, ACS66750; *Homo sapiens*: 人, NP004453; *Leishmania donovani*: 杜氏利什曼原虫, CAJ76132; *Mus musculus*: 小鼠, NP034321; *Nicotiana tabacum*: 烟草, AAB08578; *Oryza sativa*: 水稻, AAS07223; *Panax ginseng*: 人参, ACZ71037; *Panax notoginseng*: 三七, ABA29019; *Panax quinquefolius*: 西洋参, CAJ58419; *Pongo abelii*: 苏门达腊猩猩, NP001126476; *Psammosilene tunicoides*: 金铁锁, ABQ96265; *Rattus norvegicus*: 大鼠, NP062111; *Ricinus communis*: 蓖麻, XP002512982; *Lycopersicon esculentum*: 番茄, ACY25092; *Taxus cuspidata*: 东北红豆杉, ABI14439; *Withania somnifera*: 睡茄, ADC95435; *Yarrowia lipolytica*: 酵母, AAD22408; *Zea mays*: 玉米, BAA22558.

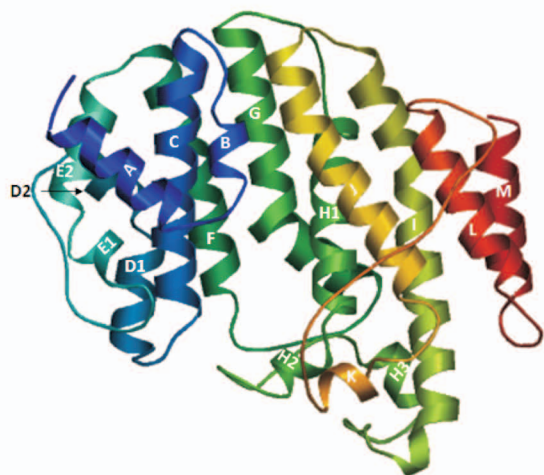


图 4 麻疯树鲨烯合酶蛋白三级结构
Fig. 4 Three-dimensional structure of deduced JcSQS

据报道,鲨烯合酶的晶体核心结构与已知晶体结构的禽类法呢酯焦磷酸合酶(Farnesyl pyrophosphate synthase,FPS)(图 5b)^[20]、链霉菌(*Streptomyces*)的 PLS (Pentalene synthase)(图 5c)^[21]和烟草的 EAS(5-epi-aristolochene synthase)(图 5d)^[22] 3 种酶的非常相似。它们的氨基酸序列并没有明显的同源性,但它们的晶体结构均是由 1 个 α 螺旋核心围绕着 1 个

中央激活位点空穴,其中一端为疏水性,另一端为亲水性,并包含 1 个特征性的“富-天冬氨酸序列”。在麻疯树的 SQS 氨基酸序列中,我们也发现了这一结构,其中 C、F、G、H 和 J 螺旋构成了这一核心结构,在该结构的一侧还存在着两个保守区域,分别为 DTVED 和 DYLED (图 4)。

在 NCBI 网站保守结构域软件的帮助下,我们分析了 JcSQS 蛋白的保守结构域,分析表明,JcSQS 蛋白具有两个富含天冬氨酸的保守结构域,而这个结构域正是萜类合成酶的保守位点。分析结果表明,JcSQS 氨基酸序列中存在异戊烯基焦磷酸合成酶(Trans-isoprenyl diphosphate synthases, Trans_IPPS)催化位点,属于异戊二烯生物合成 C1 超家族(Isoprenoid biosyn_C1 superfamily)。

为了进一步分析 JcSQS 蛋白性质,我们通过 TMHMM 对其进行了跨膜结构分析,结果表明,JcSQS 具有两个跨膜结构域,分别位于第 281 ~ 303 位和第 386 ~ 408 位氨基酸区域。

2.4 JcSQS 基因的表达

用 RT-PCR 的方法分析了 JcSQS 基因在不同组织中的表达谱。分析结果表明,在根、茎叶中 JcSQS

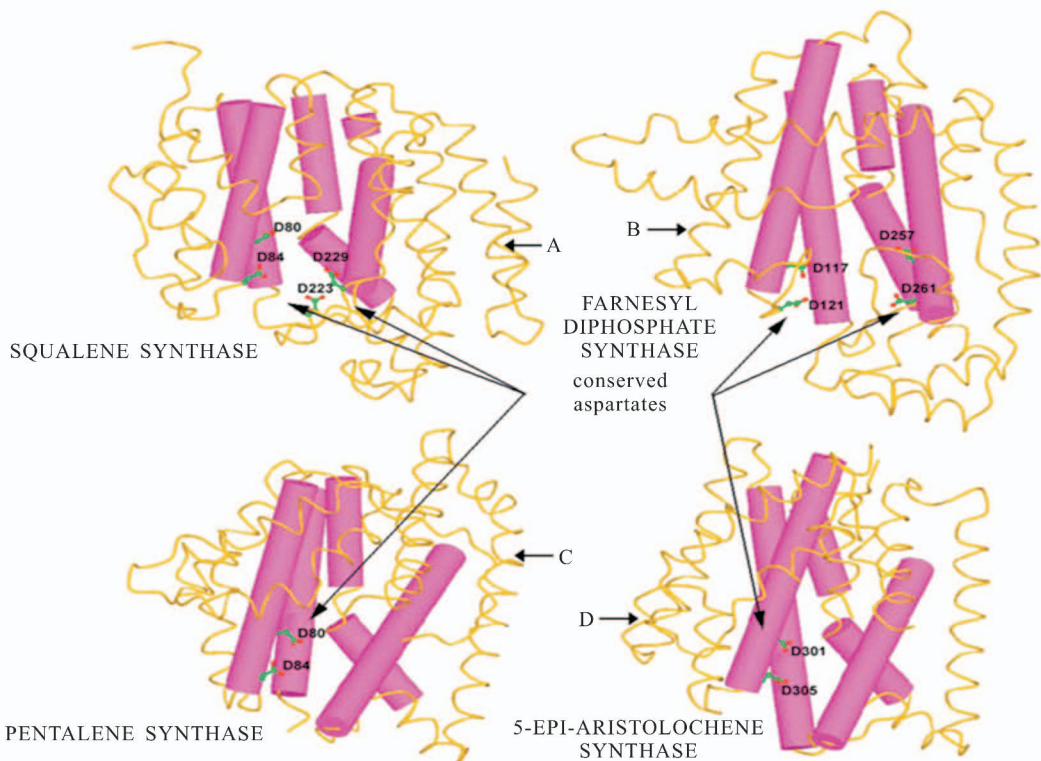


图 5 萜类合酶 C1 超家族蛋白结构一致性分析^[19]。A: 鲨烯合酶; B: 法呢酯焦磷酸合酶; C: 鲨烯合酶; D: 5-epiaristolochene synthase。
Fig. 5 Homogeneous central structure of isoprenoid biosyn_C1 superfamily^[19]. A: Squalene Synthase, SQS; B: Farnesyl pyrophosphate synthase, FPS; C: Pentalene synthase, PLS; D: 5-epi-aristolochene synthase, EAS.

基因的表达量都较高,而在幼果和成熟果实中的表达量较少(图 6)。

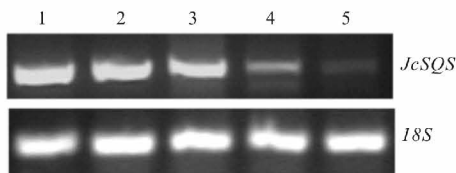


图 6 麻疯树 *SQS* 基因的表达。1. 根; 2. 茎; 3. 叶; 4. 幼果; 5. 果实。

Fig. 6 *SQS* gene expression in different parts of *Jatropha curcas*. 1. Root; 2. Stem; 3. Leaf; 4. Young fruit; 5. Fruit.

3 讨论

本实验成功克隆了麻疯树萜类合成途径中的关键酶鲨烯合酶基因 *JcSQS*, 并进行了全长 cDNA 测序与生物信息学分析。同源性分析显示, 该基因与蓖麻、绿玉树、木榄等植物中的鲨烯合酶基因具有高度的同源性, 属于异戊二烯生物合成 C1 超家族。目前已知的植物鲨烯合酶相似性较高, 基本的氨基酸残基为 410 ~ 461 个, 分子量介于 46.9 ~ 52.5 kDa, 麻疯树的鲨烯合酶正处在这一范围内。在鲨烯合酶的 6 个保守区域中, III、IV 及 V 区域高度保守, 在动物、植物以及真菌中基本类似, 这些保守区域与鲨烯合酶的活性位点相关; 区域 II 和 VI 的保守性较低, 一般认为, 区域 II 中的天冬氨酸残基是鲨烯合酶与 Mg^{2+} 的结合位点, 而区域 VI 与内质网膜的结合有关; 区域 I 的保守性很差。通过对鲨烯合酶蛋白结构的分析发现, 麻疯树鲨烯合酶蛋白结构与之前已经得到晶体结构的人鲨烯合酶、禽类法呢酯焦磷酸合酶链霉菌的 PLS 和烟草的 EAS 核心结构极为相似, 这些都证明了所克隆基因确实为编码麻疯树鲨烯合酶蛋白的基因。

由于鲨烯合酶处于类异戊二烯途径中的关键地位, 许多研究表明, 对 *SQS* 进行的基因操作, 会对甾醇以及其他类异戊二烯代谢支路代谢产物的含量产生重要的影响。Seo 等以根瘤农杆菌介导在刺五加(*Eleutherococcus senticosus*)中过量表达人参 *SQS* 基因, 结果表明 β -谷甾醇和豆甾醇含量均有明显增加, 刺五加皂苷含量比野生型提高了 2 ~ 2.5 倍^[23]; Woerdenbag 等向培养基中加入鲨烯合酶抑制剂剂奈替芬(natifine)之后, 青蒿细胞培养物中的青蒿素含量得到提高^[24]。在麻疯树中, 除了丰富的麻疯树油资源外, 还存在着多种三萜、甾醇类物质,

如 β -香树素(β -amyrin)、蒲公英醇(taraxerol)、 β -谷甾醇(β -sitosterol)、胡萝卜甾醇(daucosterol)、豆甾醇(sterols stigmasterol)及类甾醇(steroid sapogenins)等, 可以作为麻疯树生物柴油资源利用的副产品。对鲨烯合酶进行基因操作一方面有可能调控麻疯树中三萜及甾醇类物质的含量; 另一方面, 对于鲨烯合酶基因的过量或抑制表达有助于调节麻疯树中佛波醇酯途径的基因表达量, 起到控制麻疯树毒素含量, 达到培育佛波醇酯含量可控的麻疯树品种的目的。

GenBank 序列查询表明, 之前还没有关于麻疯树鲨烯合酶基因序列的报道, 本试验首次克隆了麻疯树鲨烯合酶 cDNA 并对其进行了相关的生物信息学分析, 为后续麻疯树 *SQS* 基因表达研究, 以及探讨与佛波醇酯、三萜及甾醇类物质生物合成的相互关系与调控措施研究奠定了基础。

参考文献

[1] Lin J(林娟), Zhou X W(周选围), Tang K X(唐克轩), et al. A survey of the studies on the resources of *Jatropha curcas* L. [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2004, 12(3): 285-290. (in Chinese)

[2] Devappa R K, Makkar H P, Becker K. *Jatropha* toxicity: A review [J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2010, 13(6): 476-507.

[3] Makkar H P S, Martinez-Herrera J, Becker K. Variations in seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil, protein and phorbol ester in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas* [J]. J Plant Sci, 2008, 3(3): 260-265.

[4] Liang H(梁慧), Peng T(彭彤), Yan F(颜钊), et al. Oil content in kernel and phorbol ester content in defatted kernel of *Jatropha curcas* from different origins [J]. Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报), 2009, 15(4): 546-548. (in Chinese)

[5] Goel G, Makkar H P, Francis G, et al. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals [J]. Int J Toxicol, 2007, 26(4): 279-288.

[6] Li C Y, Devappa R K, Liu J X, et al. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(2): 620-625.

[7] Lin J, Jin Y J, Zhou M Q, et al. Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Jatropha curcas* [J]. Afr J Biotechnol, 2009, 8(15): 3455-3462.

[8] Lin J, Jin Y J, Zhou X, et al. Molecular cloning and functional expression of geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Jatropha curcas* [J]. Afr J Biotechnol, 2010, 9(23): 3342-3351.

[9] Beytia E, Qureshi A, Porter J. Squalene synthesis: III Mechanism of the reaction [J]. J Biol Chem, 1973, 248(5): 1856-1867.

[10] Liu Y, Ye H C, Wang H, et al. Molecular cloning, *Escherichia*

- coli* expression and genomic organization of squalene synthase gene from *Artemisia annua* [J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(5): 608–613.
- [11] Hanley K M, Nicolas O, Donaldson T B, et al. Molecular cloning, *in vitro* expression and characterization of a plant squalene synthetase cDNA [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 30(6): 1139–1151.
- [12] Busquets A, Keim V, Closa M, et al. *Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67(1/2): 25–36.
- [13] Uchida H, Yamashita H, Kajikawa M, et al. Cloning and characterization of a squalene synthase gene from a petroleum plant, *Euphorbia tirucalli* L. [J]. *Planta*, 2009, 229(6): 1243–1252.
- [14] Zhao M W, Liang W Q, Zhang D B, et al. Cloning and characterization of squalene synthase (*SQS*) gene from *Ganoderma lucidum* [J]. *J Microbiol Biotechn*, 2007, 17(7): 1106–1112.
- [15] Huang Z, Jiang K, Pi Y, et al. Molecular cloning and characterization of the yew gene encoding squalene synthase from *Taxus cuspidata* [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40(5): 625–635.
- [16] Lin S(林莎), Luo S Y(罗绍银), Lin Y(林颖), et al. A simple method for extracting total RNAs from endosperm of *Jatropha curcas* L. [J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 2008, 14(5): 692–694.(in Chinese)
- [17] Robinson G W, Tsay Y H, Kienzle B K, et al. Conservation between human and fungal squalene synthetases: Similarities in structure, function and regulation [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(5): 2706–2717.
- [18] Zhao M W(赵明文), Zhong J Y(钟家禹), Wang N(王南), et al. Research progress on the squalene synthase [J]. *Acta Microbial Sin*(微生物学报), 2003, 43(5): 676–680.(in Chinese)
- [19] Jayvardhan P, Dennis E D, Gayle K S, et al. Crystal structure of human squalene synthase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(39): 30610–30617.
- [20] Tarshis L C, Yan M, Poulter C D, et al. Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution [J]. *Biochemistry*, 1994, 33(36): 10871–10877.
- [21] Lesburg C A, Zhai G, Cane D E, et al. Crystal structure of pentalenene synthase: Mechanistic insights of terpenoid cyclization reactions [J]. *Science*, 1997, 277(5333): 1820–1824.
- [22] Starks C M, Back K, Chappell J, et al. Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-*epi*-aristolochene synthase [J]. *Science*, 1997, 277(5333): 1815–1820.
- [23] Seo J W, Jeong J H, Shin C G, et al. Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(8): 869–877.
- [24] Woerdenbag H J, Lüers J F, Uden W, et al. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1993, 32(2): 247–257.