

枇杷鲨烯合酶(Squalene synthase)基因的克隆及序列分析

李惠华, 刘小英, 王伟, 常强, 苏明华*

福建省亚热带植物研究所, 福建厦门 361006

摘要 鲨烯合酶(SQS)是枇杷三萜酸生物合成过程中的关键酶。以枇杷(*Eriobotrya japonica* L.)悬浮培养细胞为材料, 采用 RT-PCR 和 RACE 方法分离得到枇杷鲨烯合酶 *Ej-SQS*(Squalene synthase)基因的 cDNA 全长序列(GenBank, JQ294055), 共 1 775 bp, 包含了 5'非编码区为 97 bp, 开放阅读框为 1 239 bp, 3'非编码区为 439 bp。该 cDNA 的开放阅读框推定的氨基酸序列(含 412 个氨基酸)与其它植物 SQS 具有 79%~94% 同源性, 包含 Trans_IPPS_HH 保守结构域, 可能属于 Isoprenoid Biosynthesis enzymes, Class 1 家族。为今后利用基因工程调控枇杷细胞悬浮培养物以提取目标产物奠定基础。

关键词 枇杷; 鲨烯合酶基因; 基因克隆; 序列分析

中图分类号 S667.2

文献标识码 A

Cloning and Sequence Analysis of Squalene Synthase Gene in *Eriobotrya japonica* L.

LI Huihua, LIU Xiaoying, WANG Wei, CHANG Qiang, SU Minghua*

Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen, Fujian 361006, China

Abstract The cDNA of SQS (Squalene Synthase Gene), which was an important enzyme of terpenes synthesis, was cloned with RT-PCR and RACE from cell suspension culture of *Eriobotrya japonica* L. The full length of *Ej-SQS* cDNA (GenBank, JQ294055), about 1 775 bp, consisted of an open reading frame of 1 239 bp, and 5' and 3' untranslated regions of 97 bp and 439 bp respectively. The putative protein had 412 amino acids, and the identity to the other polypeptides varied between 79%~94%, contained Trans_IPPS_HH conserved domains, and belonged to isoprenoid biosynthesis enzymes, class 1 family. It was the foundation of the further regulation of loquat cell suspension cultures to extract the desired product, using genetic engineering.

Key words *Eriobotrya japonica* L.; Squalene synthase gene; Gene cloning; Sequence analysis

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2014.06.009

枇杷(*Eriobotrya japonica* L.)属蔷薇科(Rosaceae)枇杷属, 是原产中国东南部的一种重要的小乔木, 果实在秋冬开花, 春夏成熟, 被称是“果木中独备四时之气者”, 除此之外, 叶、果、花都是传统的中药, 枇杷中三萜酸类成分具有抗炎、降血糖、抗病毒以及抗癌的活性, 其中熊果酸(Ursolic Acid, UA)、齐墩果酸、科罗素酸为主要的药用成分, 市场十分紧缺, 经济价值高^[1-4]。

目前对此类化合物的生物合成途径已有一定的了解。整个代谢途径涉及众多酶促反应, 其中鲨烯是三萜类、甾醇类、胆固醇类等萜类的共同前体, 鲨烯合酶(SQS, Squalene synthase, EC2.5.1.21)是生物体中催化类异戊烯代谢途径向甾醇和三萜生物合成转化的第一个关键酶, 其催化 2 分子的法尼基

焦磷酸(FPP)尾尾缩合, 形成鲨烯(SQ)^[5-8]。

在甘草^[9]、三七^[10]、人参^[11-12]等药用植物上已克隆到 SQS cDNA 全长序列, 但枇杷上还没有 SQS 克隆的相关报道。利用植物细胞悬浮培养技术生产次生代谢产物是目前中药生产中极具潜力的技术路线^[13-16]。本研究基于正在进行的枇杷细胞悬浮培养调控目标产物 UA 含量的试验, 克隆枇杷三萜酸合成途径中的关键酶 SQS 基因的 cDNA 全长序列, 为今后利用基因工程调控枇杷细胞悬浮培养物以提取目标产物奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

采用枇杷(*Eriobotrya japonica* L.)品种早钟 6

收稿日期 2014-01-03

修回日期 2014-05-09

基金项目 福建省自然科学基金(No. 2012J05047); 福建省公益类科研院所专项(No. 2011R1012-1); 厦门市科技计划项目(No. 3502Z20132004)。

作者简介 李惠华(1980年—), 女, 博士, 副研究员; 研究方向: 植物分子生物学及植物细胞悬浮培养。*通讯作者(Corresponder author):

苏明华(SU Minghua), E-mail: mhsu068@163.com。

号，其幼胚中诱导的愈伤组织经过多次继代后转液体培养，经人工调控后建立悬浮细胞系，以此为试验材料，由福建省亚热带植物研究所(厦门)细胞培养实验室保存，具体建立方法参见李惠华等^[17]。试验于 2011~2012 年开展完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及逆转录 采用北京天恩泽公司的柱式植物 RNA_{OUT} 2.0 参考试剂盒，按照说明书提取枇杷细胞悬浮培养物总 RNA；采用

Fermentas 公司 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit，以 Oligo(dT)₁₈ 为引物参照说明书进行逆转录。

1.2.2 引物设计 检索数据库中已有序列，设计保守区引物；继而参考保守区测序结果及其它物种的序列设计 3' RACE 以及 5' RACE 巢式 PCR 反应的基因特异性引物；经 3 次扩增测序拼接后获得 cDNA 全长序列，据此设计用于扩增 SQS 的 ORF (开放阅读框)序列的引物。PCR 反应中涉及的引物序列见表 1。

表1 PCR反应中涉及的引物序列
Table 1 Primers used in gene cloning reactions and PCR assays

引物	序列
P1	5'-ACGCCGAGAAGCAGATCCC-3'
P2	5'-CATAATGCCAGTGTCCAATTGCCAT-3'
P3	5'-GCAACAGATGTCAAAGTCCCTATC-3'
P4	5'-CATCATTCGGGATTATTTGGAGG-3'
P5	5'-CCAAATCTTCCTTTCCAGCAGC-3'
P6	5'-CCGATGAAATGCTAACAAGATAGGG-3'
P7	5'-ATGGGTGCCTTGTGACC-3'
P8	5'-CATTAGATTCTTGGGCTGGC-3'
NUP-long	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGACT-3'
NUP-short	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGACT-3'
AP	5'-GGCCACGGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
AUAP	5'-GGCCACGGTCGACTAGTAC-3'

1.2.3 PCR 扩增 反应体系(试剂购自 TaKaRa 公司): 10×PCR Buffer(含 Mg²⁺)2.5 μL, dNTPs Mix (2.5 mmol/L)2 μL, cDNA 2 μL, 上游引物(10 μmol/L) 1 μL, 下游引物(10 μmol/L)1 μL, 0.2 μL Ex *Taq* (5 U/μL), H₂O 16.3 μL, 总体积为 25 μL。程序: 94 °C 2 min, 94 °C 1 min、T_M °C(退火温度)1 min、72 °C t_s(延伸时间), 35 个循环, 72 °C 10 min。PCR 扩增。引物、T_M、t_s 具体值见表 2。

3'RACE 以 AP 为逆转录引物，其它同方法 1.2.1。5'RACE 参照 TaKaRa 公司的 SMARTer™

RACE cDNA Amplification Kit 的试剂盒说明书，以 NUP-long 为逆转录引物。巢式 PCR 第一轮产物做 10-100 倍稀释作第二轮扩增的模板。

1.2.4 TA 克隆及测序 回收目的片段 (Solarbio 公司琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒)，以 pGEM-T (PROMEGA 公司) 为载体进行 T/A 克隆，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，挑阳性克隆子测序，引物合成及测序均委托华大基因公司。

1.2.5 生物信息学分析 目的基因引物设计、序列拼接及分析采用 DNAMAN 软件，cDNA 核酸序列推导的氨基酸序列采用 ExPASy ProtParam、NCBI-CDS、PSORT、TMHMM2.0、SignalP、Jpred、Coils、NetPhos 2.0、Gene Ontology annotation 等在线软件进行分析，具体参考李惠华等文献中方法^[17]；系统进化树建立使用 MEGA 5.0 软件(Neighbor-Joining, NJ 方法)。

表2 PCR反应条件
Table 2 PCR assays condition

扩增的目的片段	引物	TM/°C	t/s
枇杷SQE保守区	P1、P2	54.2	50
枇杷SQE的3'RACE	第一轮P3、AUAP	53.7	80
	第二轮P4、AUAP	51.6	60
枇杷SQE的5'RACE	第一轮P5、NUP-short	53.1	60
	第二轮P6、NUP-short	53.9	30
枇杷SQE的ORF	P7、P8	50.4	80

2 结果与分析

2.1 枇杷悬浮培养细胞总 RNA 的质量

采用 1.2.1 中试剂盒方法提取的枇杷悬浮培养

细胞总 RNA，总耗时为 1 h，紫外分光测定总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 为 2.012，经 1% 琼脂糖电泳检测为完整清晰的 3 条带(图 1-A-1)，并且 28 S 条带亮度约为 18 S 条带 2 倍，表明此方法提取的枇杷悬浮培养细胞总 RNA 的质量高，可以用于后续试验。

2.2 枇杷 SQS 基因的 cDNA 全长序列的克隆

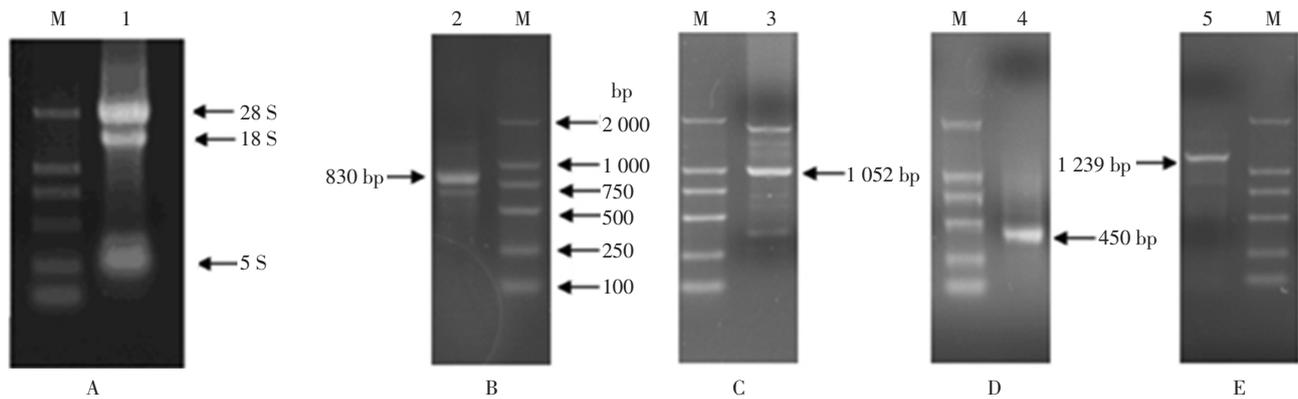
方法 1.2.1 中逆转录得到的 cDNA 第一链为模板，PCR 扩增得到一条约 830 bp 的 DNA 片段，测序表明此片段长度为 824 bp(图 1-B-2)，经 GenBank 上 blastn 和 blastp 表明，与苹果 SQS 的核酸及氨基酸序列(GenBank 登录号 KC895979, AGS78117)分别有 97% 及 95% 同源，初步推断此片段为枇杷 SQS 的 cDNA 部分序列。

以 3'RACE 逆转录得到的 cDNA 为模板，利用基因特异性引物 P3 和 P4 进行巢式 PCR，琼脂糖(1%)电泳显示：1 条约 1 000 bp 单一条带(图 1-C-3)，

与预期相符，测序后确认此片段大小为 1 052 bp，与保守区序列比对有 44 bp 的重叠片段，表明此片段是枇杷 SQS 的 cDNA 的 3'末端。

以 5'RACE 逆转录得到的 cDNA 为模板，利用基因特异性引物 P5 和 P6 进行巢式 PCR，电泳显示：长度约 450 bp 的单一条带(图 1-D-4)，测序后确认此片段大小为 394 bp，与保守区序列比对有 157 bp 的重叠片段，表明此片段是枇杷胚性愈伤组织 SQS 的 cDNA 5'端序列。

基于保守区、3'RACE 和 5'RACE 扩增测序结果，拼接得到的枇杷 SQS 的 cDNA 全长序列，采用引物 P7 和 P8(表2)进行了 ORF 的扩增，电泳表明获得长度约 1.2 kb 1 条清晰的 DNA 条带(图 1-E-5)，克隆测序后确定此片段为 1 239 bp，包含 1 个完整的编码框，与拼接的 cDNA 全长序列的相应部分(软件预测的 ORF)重叠，与拼接序列相互印证。



M: DNA ladder marker 2000; A-1: 总RNA; B-2: 保守区扩增产物; C-3: 3'RACE扩增产物; D-4: 5'RACE的扩增产物; E-5: ORF的扩增产物。

M: DNA ladder marker 2000; A-1: Total RNA; B-2: The PCR result of conserved sequence amplification; C-3: The PCR result of 3' RACE; D-4: The PCR result of 5' RACE; E-5: The result of ORF amplification.

图1 枇杷SQS基因的PCR扩增结果琼脂糖(1%)电泳检测图

Fig. 1 The PCR results of agarose gel (1%) electrophoresis of SQS gene in *Eriobotrya japonica* L.

2.3 枇杷 SQS 基因的序列分析

枇杷愈伤组织 SQS 的 cDNA 序列，命名为 *Ej-SQS* (GenBank 登录号为 JQ294055)，全长为 1 775 bp，5'末端非编码区为 97 bp，3'末端非编码区为 439 bp，3'poly(A)尾长 14 bp，开放阅读框为 1 239 bp。

2.4 枇杷 SQS 的生物信息学分析

生物信息学分析表明：*Ej-SQS* 编码 412 个氨基酸(其中带负电的氨基酸占 50.51%，带正电的氨基酸占 49.49%)，分子量为 46.9 ku，pI 6.80，属亲水蛋白；此蛋白包含 Trans_IPPS_HH 保守结构域，可能属 Isoprenoid Biosynthesis enzymes, Class 1 家族成员；亚细胞定位在质膜中的可能性最大；

在第 281~303 位氨基酸，由外到内，以及第 386~408 位，方向是由内到外，共有 2 个跨膜螺旋；该蛋白不是分泌蛋白，无信号肽；其主要的二级结构是 α 螺旋；形成卷曲螺旋的可能性低；其磷酸化位点有 33 个，在整条多肽链中分布非均匀。其功能为：参与脂质生物合成，为膜的组分，具有法尼基二磷酸法尼基转移酶活性及鲨烯合酶活性。

Ej-SQS 的 cDNA 核酸序列推导的氨基酸序列 (*Eriobotrya japonica*, GenBank AFI33135.3, 蔷薇科)与百脉根 (*Lotus japonicus*, GenBank BAC56854.1, 豆科)，黄芪 (*Astragalus membranaceus*, GenBank ADW27427, 豆科)，大豆 (*Glycine max*, GenBank

NP 001236365, 豆科), 光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra*, GenBank BAA13084, 豆科), 大戟(*Euphorbia pekinensis*, GenBank AFT92039, 大戟科), 远志 (*Polygala tenuifolia*, GenBank ABG66304, 远志科), 苹果 (*Malus domestica*, GenBank AGS78118, 蔷薇科), 油茶(*Camellia oleifera*, GenBank AGB0560, 茶科), 青蒿(*Artemisia annua*, GenBank AAR20329.1, 菊科), 人参(*Panax ginseng*, GenBank ACV88718, 五加科), 紫胡(*Bupleurum chinense*, GenBank ACX42423.1, 伞形科), 刺五加 (*Eleutherococcus*

senticosus, GenBank AER23670.1, 五加科)的氨基酸序列的同源性分别为 81%、81%、85%、83%、80%、79%、94%、83%、79%、83%、79%、82%。共 13 条氨基酸序列构建成的系统进化树(图 2), 枇杷与同为蔷薇科的苹果首先聚类, 同为豆科的百脉根、黄芪、大豆、光果甘草, 同为五加科的人参、刺五加也处于进化树的同一个分枝或邻枝, 其有着很近的进化距离, 与油茶、紫胡等有着相对较近的进化关系。同时可以看出 SQS 基因在各物种中是很保守的。

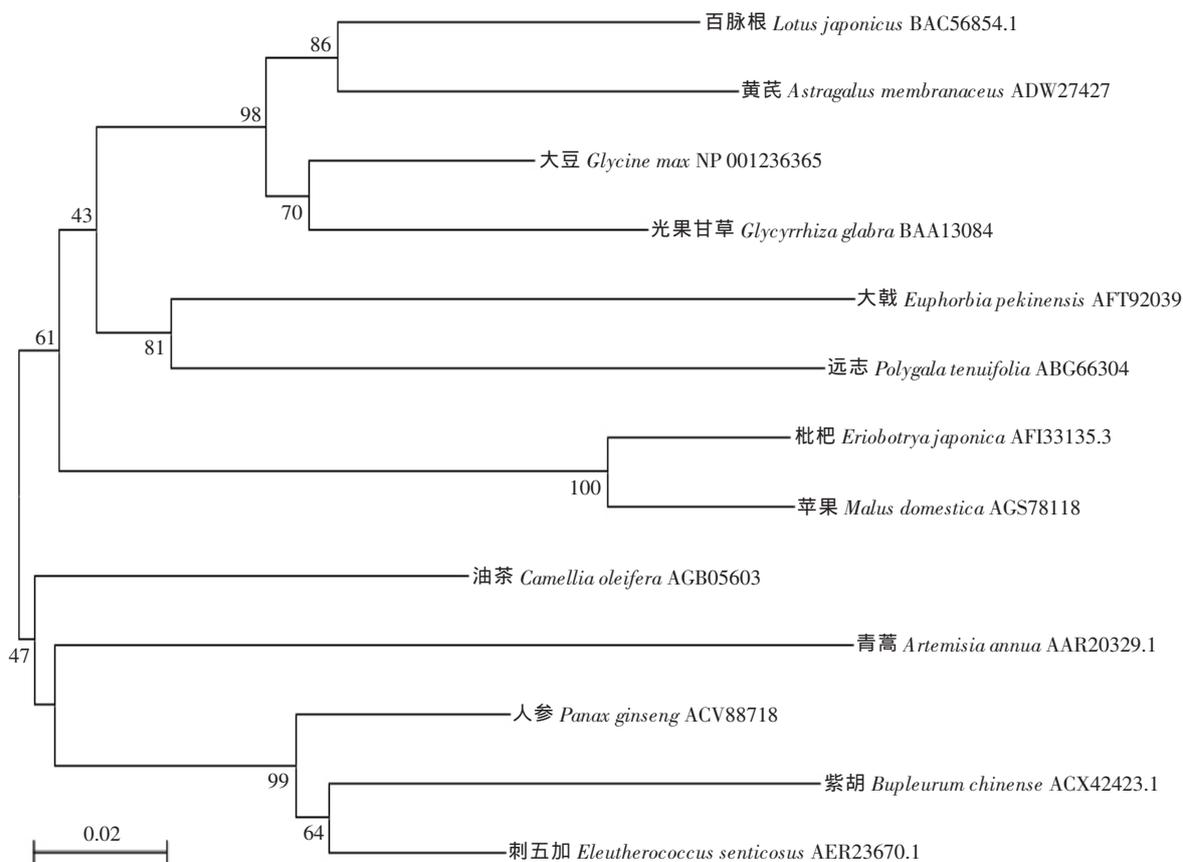


图2 Ej-SQS系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree for Ej-SQS

3 讨论与结论

3.1 枇杷悬浮培养细胞在分子生物学试验中的优越性

一般来说, 木本植物的 RNA 提取较草本植物难, 枇杷材料通常采用传统 SDS 或 CTAB 法提取 RNA^[18]。用于 RT-PCR 及 RACE 的 RNA 应完整无降解, 否则会导致 PCR 扩增特别是 5'RACE 的失败。本试验采用的是枇杷幼胚中诱导的愈伤组织建立的悬浮系的细胞培养物作为试验材料, 因其可能少含或不含脂类、树脂类、叶绿素等成分, 在核酸

提取上更加简便、快捷, 可以采用市面上普通的 RNA 快速提取试剂盒, 且提取的总 RNA 质量高, 可以直接用于后续试验。在分子生物学试验操作中, 枇杷细胞悬浮培养物较其它材料有程序简化、快速、得率高的优点。这与龙眼中结果相似。以龙眼胚性愈伤组织或栽培品种龙眼为基因克隆材料得到的 ACO 基因的编码序列完全一致^[19]。至于枇杷细胞悬浮培养物为材料克隆得到的基因与栽培的枇杷序列是否有不同, 是否是枇杷目的基因分离的替代体系, 需要进一步试验。

3.2 RT-PCR 结合 RACE 的同源克隆方法较适合于枇杷 SQS 基因

SQS 基因的克隆主要采用：①功能互补；② RT-PCR 与 RACE 相结合；③RT-PCR 与筛库相结合。已报道的各植物之间 SQS 的序列同源性较高^[20]，这为进行同源克隆提供了有利条件。通过试验，结果表明枇杷 SQS 序列与其它植物 SQS 具有 79%~94%同源性，再次证明植物之间氨基酸序列的相似性很高。在本试验中，枇杷 SQS 基因的保守区、3' 序列和 5' 序列均一次获得，目的条带均单一清晰明亮。SQS 基因的同源克隆总体较为顺利，这可能与 SQS 的高度保守性有关，也可能与在枇杷悬浮培养细胞中的高丰度的表达有关。今后其它植物中 SQS 基因的克隆可以首先考虑 RT-PCR 与 RACE 相结合的方法。

3.3 今后枇杷 SQS 基因的若干研究方向

SQS 在多种植物中超表达能够明显提高植物甾醇和三萜类物质的含量。例如：人参中鲨烯合成酶的过量表达可以提高其药用成份三萜皂苷的含量^[21]。蒋世翠^[22]研究也发现西洋参中 SQS 和 SQE 基因的表达具组织特异性，并且基因的表达量与人参皂苷 Re、Rg1、Rb1、Rd 以及总皂苷的含量之间呈现出正相关。灵芝中灵芝三萜的产量多少与鲨烯合酶基因的表达以及酶活性密切相关，变化相符^[23]。

本试验克隆分离枇杷三萜类化合物的合成途径中的关键酶 SQS 基因的 cDNA 序列，今后在此基础上可以研究 SQS 基因的表达情况与三萜类化合物合成的相互关系，开展 SQS 基因功能研究，为今后通过人工调控枇杷细胞工程规模化生产枇杷五环三萜化合物奠定基础，同时也为枇杷基因改良提供基因源。

参考文献

[1] 鞠建华, 周 亮, 林 耕. 杷叶中三萜酸类成分及其抗炎、镇咳活性研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38: 752-755.

[2] 相延英, 杨 光. 常用中药中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(5): 316-318.

[3] 陈 武, 熊筱娟, 李开泉, 等. 乌索酸的化学、药理及临床研究[J]. 宜春医学学报, 2001, 13(2): 123-126.

[4] 黄 镜, 孙 燕. 熊果酸的抗肿瘤活性[J]. 中国新药杂志, 1997, 6(2): 101-104.

[5] 赵云生, 万德光, 陈 新, 等. 五环三萜皂苷生物合成与调控的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(2): 327-330.

[6] 杨 涛, 曾 英. 植物萜类合酶研究进展[J]. 云南植物研究, 2005, 27: 1-10.

[7] 占爱瑶, 由香玲, 詹亚光. 植物萜类化合物的生物合成及应用[J]. 生物技术通讯, 2010: 131-135.

[8] 陈 建, 赵德刚. 植物萜类生物合成相关酶类及其编码基因的研究进展[J]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 3 757-3 764.

[9] 卢虹玉, 刘敬梅, 阳文龙, 等. 甘草鲨烯合成酶基因的分离及植物表达载体的构建[J]. 药物生物技术, 2007, 14(4): 255-258.

[10] 石 磊, 葛 锋, 刘迪秋, 等. 三七总皂苷生物合成与关键酶调控的研究进展[J]. 西北植物学报, 2010, 30(11): 2 358-2 364.

[11] 黄志伟, 郑亚风, 许 朗, 等. 竹节人参角鲨烯合成酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(1): 216-218.

[12] 张明哲, 王真慧, 张美萍, 等. 人参 SQS 和 SE 酶基因的克隆及其表达载体的构建[J]. 现代农业科技, 2010, 4: 20-22.

[13] 李冬杰, 魏景芳, 刘淑清, 等. 药用植物细胞悬浮培养研究进展[J]. 河北林业科技, 2003: 22-23.

[14] Sivanandhan G, Kapil Dev G, Jeyaraj M, et al. A promising approach on biomass accumulation and withanolides production in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) [J]. Dunal Protoplasma, 2013, 250(4): 885-898. (in Chinese)

[15] Georgiev M I, Weber J, Maciuk A. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83: 809-823.

[16] Verpoorte R, Contin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites[J]. Phytochem Rev, 2002, 1: 13-25.

[17] 李惠华, 刘小英, 王 伟, 等. 适合于悬浮培养的枇杷愈伤组织诱导及状态调控[J]. 亚热带植物科学, 2013, 42(04): 309-313.

[18] 陈义挺, 赖钟雄, 陈菁瑛, 等. 65 份枇杷种质资源的 RAPD 分析[J]. 热带作物学报, 2007, 28(1): 65-71.

[19] 李惠华, 赖钟雄, 林玉玲, 等. 龙眼胚性愈伤组织 ACC 氧化酶基因的克隆及其在龙眼体胚发生过程中的表达分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(18): 3 798-3 808.

[20] 赵明文, 钟家禹, 王 南, 等. 鲨烯合酶的研究进展[J]. 微生物学报, 2003, 43(5): 676-680.

[21] 吴 琼, 周应群, 孙 超. 人参皂苷生物合成和次生代谢工程[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(10): 102-108.

[22] 蒋世翠, 刘伟灿, 王 义, 等. 西洋参不同器官中皂苷量与鲨烯合成酶和鲨烯环氧酶基因表达的相关性[J]. 中草药, 2011, 3(42): 579-584.

[23] 赵明文, 鲍 鹏, 王 南, 等. 不同灵芝菌株体中三萜与多糖含量的比较[J]. 中国食用菌, 2003, 22(2): 43-46.

责任编辑：叶庆亮