

枇杷 Amyrin Synthase(AS) 基因的 5' 与 3' RACE 扩增及序列分析

李惠华, 刘小英 (福建省亚热带植物研究所, 福建厦门 361006)

摘要 以‘解放钟’枇杷(*Eriobotrya japonica* L.) 叶片为材料,在前期获得保守区的基础上,采用 RT-PCR 结合 RACE 技术,扩增得到枇杷三萜合成途径中关键酶香树脂醇合成酶基因的 5'和 3'序列,并进行序列分析。结果表明,AS 基因 5'非编码区长 96 bp;3'非编码区长 321 bp,在 GenBank 中更新的登录号为 JX173279.2。结合已发表保守区序列,通过拼接,得到 AS 基因全长 2 700 bp,含有一个 2 283 bp 的开放阅读框,编码 760 个氨基酸。生物信息学分析表明,该蛋白是定位于细胞核的蛋白,具有 29 个磷酸化位点,属于 ISOPREN_C2_like 超家族,含有 Camelliol C synthase、squalene/oxidosqualene cyclases、Squalene cyclase 多结构域,与苹果 AS 基因 98% 同源。
关键词 枇杷;香树脂醇合成酶基因;基因克隆;序列分析
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)25-08499-03

5'RACE and 3'RACE of Amyrin Synthase Gene and Sequence Analysis in *Eriobotrya japonica* L.

LI Hui-hua et al (Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen, Fujian 361006)

Abstract 5'cDNA and 3'cDNA of AS (Amyrin synthase Gene), which was an important enzyme of terpenes synthesis were cloned with RT-PCR and RACE from *Eriobotrya japonica* L. leaves on the basis of the gene conserved region we obtained. And then, the sequence was analyzed. The results showed that: the full length of ej-AS mRNA (Updated GenBank accession number, JX173279.2), about 1 775 bp, consisted of an Open Reading Frame of 1 239 bp, and 5'and 3'un-translated regions of 97 bp and 439 bp, respectively. The putative protein had 760 amino acids, and the identity to that of *Malus domestica* was 98%, and belonged to ISOPREN_C2_like super family, contained Camelliol C synthase, squalene/oxidosqualene cyclases, Squalene cyclase multiple domains.

Key words *Eriobotrya japonica* L.; Amyrin Synthase gene; Gene cloning; Sequence analysis

枇杷(*Eriobotrya japonica* L.)是蔷薇科枇杷属常绿小乔木,原产我国,是兼具观赏性、药用和食用价值的植物种类^[1]。枇杷的果实、花、叶、树皮、根等含有多种有效生物活性组分,其中最重要的是五环三萜类化合物——熊果酸(ur-solic acid,UA)、齐墩果酸(oleanolic acid,OA)、委陵菜酸(tor-mentic acid,TA)、科罗素酸(corosolic acid,CA)、山楂酸(maslinic acid,MA),它们拥有相似的化学结构及大部分相同的生物合成途径,可用于治疗伤风感冒、咳嗽、慢性支气管炎、糖尿病、高血脂、癌症等^[2],具有重要的商业价值,市场前景广阔^[3]。目前对植物中五环三萜化合物的生物合成途径也有了一定的了解^[4-5],已发现的位于细胞质中的 PMD 途径以及位于质体中的 DXP 途径。

在药用植物西洋参^[6]、甘草^[7]、欧洲山芥^[8]等上已经克隆得到 mRNA 全长序列。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^[9-12]。另外,充分了解次生代谢产物的代谢途径,利用基因克隆技术,基因启动子等关键调控因子分离克隆技术,继而通过基因工程技术创造高产细胞系,成为生产植物次生代谢物最具潜力的研究领域^[13-15]。通过植物细胞悬浮培养技术获得的枇杷细胞培养物中含有丰富的五环三萜化合物,并经过体外小鼠试验表明对糖尿病、高血脂有抑制作用^[16-17]。笔者基于已获得的枇杷香树脂醇合成酶基因的保守区序列,进一步进行 5'RACE 与 3'RACE 扩增,以期获得完整的 mRNA 全长序列,为正在进行的枇杷细胞悬浮培养调控目标产物五环三萜化合物含量的试验提供基因源。

1 材料与方法

1.1 材料 ‘解放钟’枇杷(*Eriobotrya japonica* L. cv. ‘Jie Fang Zhong’)刚长出的覆有绒毛、未见绿色、微卷的幼叶,于 2011 年 12 月采自福建省莆田县果树研究所。

1.2 方法

1.2.1 枇杷叶片 RNA 的提取。总 RNA 的提取采用北京天恩泽公司的柱式植物 RNAOUT 2.0,参考试剂盒说明书提取。

1.2.2 枇杷叶片 AS 基因的 RACE 克隆。3'RACE 采用 Fermentas 公司的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒,cDNA 第 1 链的合成逆转录引物采用接头引物 AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3')。以 3'RACE 的 cDNA 为模板进行第 1 轮 PCR 扩增,将扩增产物稀释 20 倍作为第 2 轮 PCR 扩增的模板。

5'RACE 采用 TaKaRa 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 的试剂盒,cDNA 第 1 链的合成逆转录引物采用接头引物 NUP-long (5'-CTAATACGACTCACTAT-AGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3')。以 5'RACE 的 cDNA 为模板进行第 1 轮 PCR 扩增,将扩增产物稀释 20 倍作为第 2 轮 PCR 扩增的模板。

1.2.3 目的片段的扩增。目的片段 PCR 反应体系为:2 μl cDNA,1 μl 上游引物(10 μmol/L),1 μl 下游引物(10 μmol/L),2.5 μl 10 × PCR Buffer(含 Mg²⁺),2 μl dNTP Mix (2.5 mmol/L),0.2 μl EX Taq(5 U/μl),补 H₂O 至总体积为 25 μl。PCR 扩增程序:94℃预变性 2 min,94℃变性 1 min、TM℃退火 1 min、72℃延伸 ts,共 35 个循环,最后 72℃10 min。PCR 扩增试剂由 TaKaRa 公司出品。引物合成及目的片段测序委托华大生物公司进行。各目的片段具体的引物、TM、t 值见表 1。

1.2.4 目的片段测序。阳性片段委托华大基因公司 TA 克隆测序。

基金项目 福建省自然科学基金项目(2012J05047);福建省公益类科研院所专项(2011R1012-1);厦门市科技计划项目(3502Z20132004)。
作者简介 李惠华(1980-),女,福建南平人,副研究员,博士,从事植物分子生物学及植物细胞悬浮培养。
收稿日期 2014-07-23

表 1 基因克隆的 PCR 反应条件

扩增的目的片段	引物	TM//℃	t//s
AS 基因的 3'RACE	第 1 轮 P1:5'-GGAATCAAGATGCAGAGTTTGAAGCC-3',AUAP:5'-GGCCACGCCGTCGACTAGTAC-3'	57.5	46.4
	第 2 轮 P2:5'- GTCGCTACATTACAATCGGATG-3',AUAP	51.3	45.5
AS 基因的 5'RACE	第 1 轮 P3:5'- GCGGTAAAAAGTAAGACATAGCTAGG-3',NUP-short:5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	53.9	44.0
	第 2 轮 P4:5'- GTAAGTCAAC CTACAGTAGC AGAACA -3',NUP-short	50.9	47.6
AS 基因的 ORF	P8:5'-TCA AAGAAGATGTGGAGG-3'	44.4	44.8
	P9:5'-GCTTGAGCCTTGGATCACA -3'	52.6	49.9

1.2.5 序列分析及生物信息学分析。引物设计、序列及分析采用 DNAMAN 软件,mRNA 核酸序列推导的氨基酸序列生物信息学分析采用 ExPASy ProtParam,NCBI-CDS,PSORT TMHMM2.0 SignalP,Jpred,Coils,NetPhos 2.0, Gene Ontology annotation 等在线软件,具体参考李惠华等^[18]方法。

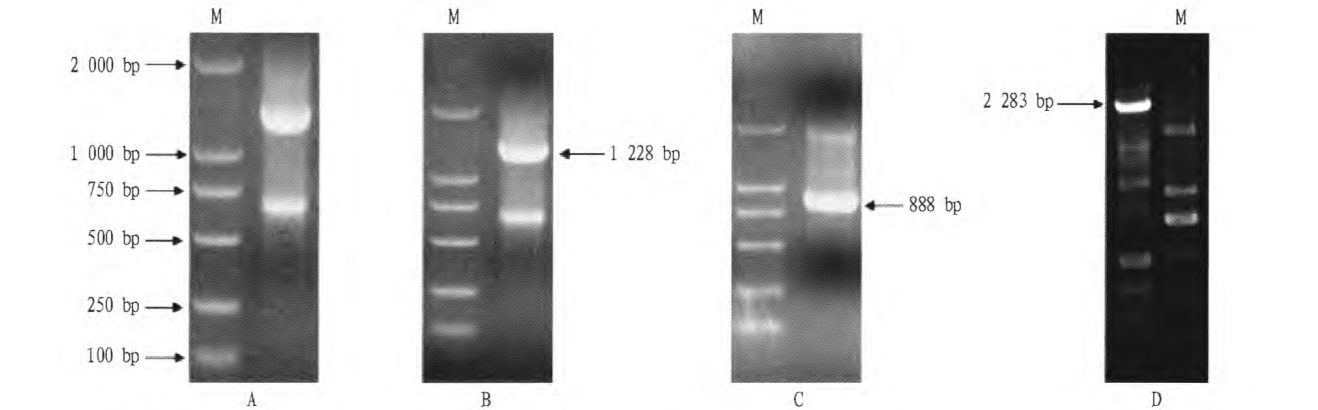
2 结果与分析

2.1 枇杷 AS 基因的 RACE 扩增结果 提取的枇杷叶片总 RNA 电泳显示条带清晰完整(图 1-A),OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 2.02,可以用于后续试验。

在已获得的保守区^[19]基础上,以 5'RACE 的 cDNA 为模板,巢式 PCR 电泳结果显示,经 2 轮 PCR 之后扩增出大小约 900 bp 的单一 DNA 片段(图 1-C)。经过测序、软件分析,确认此片段大小为 888 bp,与保守区序列有 272 bp 的重叠片段(黑色区域见图 2),表明此片段是龙眼胚性愈伤组织 AS 的 mRNA 5'端序列。

以 3'RACE 的 cDNA 为模板,巢式 PCR 电泳结果显示,经过 2 轮 PCR 后扩增出与预期目标片段相符约 1 200 bp 的单一一条带(图 1-B),经克隆测序以及结合保守区已有序列分析,与保守区序列有 162 bp 的重叠片段(灰色区域见图 2),确认此片段大小为 1 228 bp,是枇杷 AS 的 mRNA 3'端序列。

将 3'RACE 和 5'RACE 的产物进行序列拼接,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 2 700 bp 左右得到单一一条带,且条带清晰完整(图 1-D)。阳性克隆送北京六合华大生物公司进行测序。利用生物软件 DNAMAN5.0 对测序结果进行序列比对得到枇杷 AS 基因全长序列。该基因命名为 ejAS 基因,全长 2700bp,包含 2 283 个开放阅读框,共编码 760 个氨基酸,5'端非编码区序列 96 bp,3'端非编码区序列 321 bp,3'poly(A)尾长 18 bp。将该 3'端序列和 5'端序列在 GenBank 数据库保守区登录序列(登录号为 JX173279.1)中补充输入,登录号更新为 JX173279.2。序列见图 2。



注:A.总 RNA;B.3'RACE 2 轮结果;C.5'RACE 二轮结果;D. ORF 2 283 bp;M. DNA ladder marker 2000。

图 1 ejAS 基因 PCR 扩增的琼脂糖电泳结果

2.2 枇杷 AS 基因的生物信息学分析 ejAS 基因全长 2 700 bp,包含一个完整的开放阅读框(97~2 379 bp)2 283 bp,共编码 760 个氨基酸,分子量 87.308 2×10³ Da,等电点 5.72。其中带正电荷的氨基酸残基 73 个,带负电荷的氨基酸残基 90 个,亲水酸性蛋白,属不稳定蛋白。该蛋白属于膜外蛋白,亚细胞定位在细胞核中的可能性最大,属于 ISOPREN_C2_like 超家族,含有 Camelliol C synthase,squalene/oxidosqualene cyclases、Squalene cyclase 多结构域,有 29 个磷酸化位点。

ejAS 基因核酸序列推导的氨基酸序列(GenBank: AFP95334.2)与高氏柴胡 *Bupleurum kanoi*(AAS83468.1),绿玉树 *Euphorbia tirucalli*(BAE43642.1),苹果 *Malus domestica*(ACM89977.1),番茄 *Solanum lycopersicum*(NP_001234604.1),可可 *Theobroma cacao*(XP_007023608.1),麦蓝菜 *Vaccaria*

hispanica(ABK76265.1)进行多重比对(图 3),结果显示包含 HQNEDGGWGLHI,IHYEDENSRY,HGWQVSDCTAE 高度保守的区域。

3 讨论

拟南芥中已发现至少有 13 个 OSCs 基因存在^[20],苹果中已发现 3 个^[21],提示 OSCs 在植物中多以基因家族的形式存在。不同的 OSCs 参与不同种类的达玛烷型和齐墩果酸型萜类化合物合成,α-AS 参与达玛烷型,β-AS 参与齐墩果酸型。α-香树素和 β-香树素是熊果酸和齐墩酸的前体,分别是通过一个复杂的由角鲨烯环氧化的协同形成环化合成酶反应形成^[21]。从核酸序列和氨基酸序列很难分离克隆出来的序列是属于 α-/β-AS 或是两者混合型的,需要进一步的功能验证,在已有研究中发现的多混合型的 AS 及 β-AS,没有单

1 catagagact tagcatttgt gccaaagcaac tcaagcaaac tctttccttt ccttcctcat
61 catcggagcc agttttttgca atcgtgatca aagaagatgt ggaggattaa gtttggagaa
121 ggtgcaaacg accccttgtt gttcagcaca aacaacttcc acggaaggca gacatgggag
181 ttcgaccaccg atgcaggtag cgaggagaaa cgagcagaaag ttgaagctgc tcgtagcat
241 ttctacccaaa atcgcttcaa ggtcacgcct agcagtgacc tcttatggcg ttttcagatt
301 ttaagagaaa aaaacttcaa acaagaaatt cctccagtaa gaattggcga gggtagggag
361 attacatatg atcaagccac agctgcattc aggaggggctg ctaccttctg gaatgccittg
421 caatcacccc atggacattg gcctgctgaa aatgctggcc caaaccttta ctccctccc
481 ttggtcatgg ctgcatacat tccaggatat ctcaatgita ttttctccgc cgagcacaag
541 aaggaaatct tgcgttacac atacaacccat caaaatgaag atggtaggctg gggactccac
601 atagcggggc ctagta **atggttttactaca tggcttaact attttatgat gctattctc**
661 ggaatggttc gttatggttc gcttgcatac tgggagaaa gggcagaaa gttgattctt
721 gttggttggc gttggttggc gttggttggc gttggttggc gttggttggc gttggttggc
781 gttggttggc gttggttggc gttggttggc gttggttggc gttggttggc gttggttggc
841 gttggttggc gttggttggc gttggttggc gttggttggc gttggttggc gttggttggc
901 tactttttacg ccacaagatt tgttggcccg atcactcctc tagttgagga attgagacag
961 gaaattttact gtaaacctta caacgaaatt aactggccct aagtgcgcca ttggttgca
1021 ccggaggata actactatcc ccatggtcgt gtacaacgtt ttatgtggga tgggttttac
1081 aatatcgctg agcctctcct aaaacgctgg cccttaaaaga agatcagaga caatgccatt
1141 caattcacaa ttgacccaaat tcattacgaa gatgagaaca gtgctacat tacaatcgga
1201 tgtgtggaaa agccattaat gatgcttgc tgcctggccg aggtatctag ttggagaagct
1261 ttcaagaagc atattcctag agttactgat tatactctggc tcggagagga tggaaatcaag
1321 atgcagagtt ttggaagcca gtcatgggat tgtgctcttg tgattcaagc tttgcttgc
1381 ggcaattctaa atactgaaat ggcacctacc cttaagcaag cacacgaatt tctcaagata
1441 tctcaggtag ggttgaatat tcttgggtgac taccttagctc atttccgtca gtttctaa
1501 ggcgcattgga cattctctga ccgcgaccat ggatggcaag tgtcggattg tactgcagaa
1561 gcactgaggt gttgctgcat tttcgcacaa atgtccccag aacttgttgg tagcccaatg
1621 gatgctgagt gtatgtatga tgcgcgtcaa gtcatcttga ccttccagag tccaaatggt
1681 ggtgtatcag cctgggagcc aacaggagca ccaaaatggt tggagtggct caaccctgtg
1741 gagcttcttg aggacctagt catttgatag gagtacctgc aatgacctc atcttcgac
1801 caggccttaa cttgttttag gaagtgtgac cctggccata gaaggagga gatcaacaat
1861 ttcatcacga gaggcagcaga ctacattgaa gacatacagt accctgatgg ctcatggtat
1921 ggaaacttgg gaatctgctt tgtgtatggt acatgggttc caatcaagg gctggaggcc
1981 gctggttggc cgtacaacaa ctgcgagcca gtgcgcaagg gtgtcgactt ttgctcaaa
2041 acgcaaaggc cagatggttg ctggggagag cactacacct catgcacaaa caagaaatat
2101 acagctcaag acagtacaaa tttagtccaa actgcactcg gatlaattgg tctgattcac
2161 ggtcgacagg ctgagagaga tccaactctt attcaccggg ctgctgctgg ttaattgaac
2221 ggccaattgg atgacggcga tttcccccaa caggaaactga tggagattct ttgaggaa
2281 gctatgttgc actatgcagc atacagaaat atcttcccat tgtgggctct cggagaatac
2341 cgcacactgg tttcgttggc tatcaaaaag atcgtcttag ccttggatca caagcaaaa
2401 gaaatccatg gggccttgcca atacaaccag taccataaaa acctagtctt agttgtgcca
2461 tattttttgg tcttttcttc ttttgttct gttagagttga cgaacttcta actgctgaac
2521 aacgaataat ctatgcaaat gtgttctttt gtgatttcta accgctaaag aacgaataat
2581 ctatgaaaat gtatacatat ttatgttact catgcacaa atgtatcatg cattgcgaga
2641 tatcacatct catcaaatia aatgtgtatg agtcttgcct gcaaaaaaaa aaaaaaaa

注:黑色为5'端序列与保守区的重叠片段;灰色为3'端序列与保守区的重叠片段。

图2 序列分析

纯的 α -AS 报道,有人认为 α -AS 在自然界不存在^[22]。如苹果中发现的 MdOSC1 和 MdOSC3 氨基酸同源性高达 99%,瞬时表达发现 MdOSC1 属于 α - β -混合型的(且 α -amyrin: β -amyrin = 5:1),MdOSC3 则倾向于 β -AS^[21]。该研究中获得的 AS 基因氨基酸序列与同属蔷薇科的苹果属 β -AS 的相似性最高,达到 98%,从生物信息学并不能区分是 α - β -混合型的还是 β -AS,需要通过进一步的功能验证。同时,从氨基酸序列比对发现,AS 基因在各物种中较为保守,RT-PCR 结合 RACE 的方法较适合 AS 基因的分离克隆。

参考文献

[1] 吴锦程. 枇杷的生产与科研[J]. 莆田学院学报,2004,11(3):31-37.
[2] 鞠建华,周亮,林耕,等. 枇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,2004,38(10):752-757.
[3] 邢朝斌,王一曼,陈正恒,等. 三萜皂苷的生物合成[J]. 生命的化学,2006,25(5):420-422.
[4] 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.
[5] 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):757-764.
[6] 吴琼,孙超,陈士林. 西洋参 β -香树脂合成酶基因的克隆和生物信息学

分析[J]. 中草药,2013,44(11):1476-1480.
[7] 刘颖,陈宏昊,文浩,等. 甘草鲨烯合酶 1 基因多态性及其与 β -香树脂醇合成酶共表达对 β -香树脂醇积累的影响研究[J]. 中草药,2013,44(11):734-741.
[8] 魏小春,张晓辉,吴青君,等. 欧洲山芥皂苷合成关键酶基因 Bv-beta-AS 克隆及表达分析[J]. 园艺学报,2012,39(5):923-930.
[9] 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(4):22-23.
[10] 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.
[11] 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.
[12] VERPOORTE R, CONTIN A, MEMELINK J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites[J]. Phytochem Rev, 2002, 1:13-25.
[13] ZHANG C H, WU J Y. Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus* spp. cells [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32:71-77.
[14] 王巍杰,杨永强,吴尚卓. 细胞悬浮培养制备紫杉醇的研究进展[J]. 河北理工大学学报:自然科学版,2011,33(1):136-40.

(下转第 8510 页)

- [15] 齐晓花, 许学文, 罗晶晶, 等. 黄瓜 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 *CsGAPDH* 的克隆及其胁迫响应分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(9): 1693-1698.
- [16] LI R, SHEN Y. An old method facing a new challenge: Re-visiting house-keeping proteins as internal reference control for neuroscience research [J]. Life Sciences, 2013, 92(13): 747-751.
- [17] SANCHEZ B P, EGEA I, SANCHEZ B T. Understanding the mechanisms of chilling injury in bell pepper fruits using the proteomic approach [J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(17): 5463-5478.
- [18] LIIV I, HALJASORG U, KISAND K. AIRE-induced apoptosis is associated with nuclear translocation of stress sensor protein GAPDH [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 423(1): 32-37.
- [19] 黎兴江. 中国苔藓志 第三卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 54-57.
- [20] 宋晓宏, 沙伟, 林琳, 等. 毛尖紫萼萼干旱胁迫 cDNA 文库的构建[J]. 植物研究, 2010, 30(6): 713-717.
- [21] 沙伟, 张梅娟, 刘博, 等. 毛尖紫萼萼抗旱相关基因 *Gp-LEA* 的克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2013, 33(9): 1724-1730.
- [22] 杨洋, 张智俊, 罗淑萍. 毛竹甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的克隆与序列分析[J]. 经济林研究, 2010, 28(3): 7-13.
- [23] 梁颖, 李玉花. 植物中磷酸甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 在氧化胁迫下的生理功能[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(10): 1027-1032.
- [24] BAEK D, JINA Y, JEONG J C, et al. Suppression of reactive oxygen species by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [J]. Phytochemistry, 2008, 69(2): 333-338.
- [25] ZIAF K, LOUKEHAICH R, GONG P J, et al. A Multiple stress-responsive gene *ERD15* from *Solanum pennellii* confers stress tolerance in tobacco [J]. Plant and Cell Physiology, 2011, 52(5): 1055-1067.
- [26] MEREWITZ E B, GIANFAGNA T, HUANG B R. Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an ipt gene for cytokinin synthesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 62(5): 5311-5333.

(上接第 8501 页)

1 <i>Bupleurum kaot</i> MWRLKIAEGS-GNDELYSTNNYVGRQWTFDPPQPTQELQAQQARLNFFNNRYHVKFS <i>Euphorbia tirucalli</i> MWRLKIFGGS-ANDMLFSTNNHGRQWTFDPPDAGTEERAEVEAEARQYQNRKVFQFS <i>Malus domestica</i> MWRLKIAEGS-QMGFYLSTNNYVGRQWTFDPPNGTTEERAKIEEARQQFNNRYHVKFS <i>Solanum lycopersicum</i> MWRLKIAEGS-VDFGFLSTNNYVGRQWTFDPPDAGTEERAEVEARQYQNRKVFQFS <i>Theobroma cacao</i> MWRLKIAEGS-ANDVLYSTNNYVGRQWTFDPPDAGTEERAEVEARQYQNRKVFQFS <i>Vaccaria hispanica</i> MWRLKIFGGS-ANDFLFSTNNHGRQWTFDPPDAGTEERAEVEAEARQYQNRKVFQFS <i>Euphorbia tirucalli</i> MWRLKIFGGS-ANDFLFSTNNHGRQWTFDPPDAGTEERAEVEAEARQYQNRKVFQFS	421 TGFGIQAALLATDLT-DELGFTLKRGREFVKAQVKNPDSQDFKSMYRHSKGSNTFSDQD TGFAIQAALLASNTL-EEIGQVLKRGHDFIKKSQVKNPDSQDFKSMYRHSKGSNTFSDQD CALVITQAALLAGNLN-AEMGFTLKKAHEFLKISQVRINTSGDVLSHFRHSKGSNTFSDQD TGFAIQAALLASEMN-DEIADTLKRGHDFIKKSQVKNPDSQDFKSMYRHSKGSNTFSDQD TGFAIQAALLASNTL-DEIGFVLKRGHDFIKKSQVKNPDSQDFKSMYRHSKGSNTFSDQD CGFAVQAALLASNTL-DEIGFVLKRGHDFIKKSQVKNPDSQDFKSMYRHSKGSNTFSDQD CALVITQAALLAGNLN-TENAFITKQAEFLKISQVRINTSGDVLSHFRHSKGSNTFSDQD
61 SDVLMQWQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN SDLLNRQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN SDLLNRQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN SDLLNRQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN SDLLNRQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN SDLLNRQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN SDLLNRQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN SDLLNRQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN SDLLNRQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN SDLLNRQFLREKGFQITIFQVWIEDGDISYEKASVTVKRAAHYFAALQASDGHWPAEN	481 HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG HGWQVSDCTAEGKCCLLFSMMPFEIVGKKEFERLYDSVNNLLSLQSKNGGLAWEFAG
121 AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA AGFLFPLPVLVCMYITGHLNVPFAPHREELRLYLCHQNEDEGGWGLHIEGHSMTMCTA	541 AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL AQEWLELLNTEFFQDIVIEHVECTASATQALVFLTKLYPAHRKKEINAFVNAKYL
181 LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF LSYICMRILGEGFDGNNACSRARWILDHGSVTHMPSWGTWLSILGVFVWGSNPMF	601 EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG
241 PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN PEFWILPFLPMFPAJQRCYCYRMVYMSYLYGKRFVGPITFLIQLREELYQDPYDHIN	661 EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDIQMFDGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG EDVQTADGSGWYNNGVCTFYTSWFLGGLAAGKTYNNCAVRKGVDFLLKQDGGWG
301 NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE NWKVRHCAPEDEYYPHPLVQDLINGSLYICTEPLLRWFFNK-IREKALATIMEHINYE	721 ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG ESYLSCPLEKYTIQEGSRNLVQTAWATVLEIHSQVTERDPTLHRAAKLIINSQEGGG
361 DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED DENSRYITIGCVKVLMLACNAEDPFGDYFKKHLARI PDYLVVAEDGMQSFQSGQWED	781 FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI- FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI- FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI- FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI- FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI- FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI- FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI- FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI- FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI- FFQKEITGVFMNCLHVAAYRDLVPLWALAEYRKRVPSTI-

图3 几种植物的 AS 基因氨基酸序列对比

- [15] 陈永勤, 吴蕴祺, 胡秋, 等. 苯丙氨酸、蔗糖和甘油醇对杂种红豆杉细胞的生长及形成紫杉醇、巴卡亭Ⅲ和 10-去乙酰巴卡亭Ⅲ的影响[J]. 药理学, 1998, 33(2): 132-137.
- [16] HO H Y, LIANG K Y, LIN W C, et al. Regulation and improvement of triterpene formation in plant cultured cells of *Eriobotrya japonica* Lindl [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(5): 588-592.
- [17] SHIH C C, CIOU J L, LIN C H, et al. Cell Suspension Culture of *Eriobotrya japonica* Regulates the Diabetic and Hyperlipidemic Sign of High-Fat-Fed Mice[J]. Molecules, 2013, 18: 2726-2753.
- [18] 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): 3798-3808.
- [19] 刘小英, 苏明华, 吴少华, 等. ‘解放钟’枇杷香树脂醇合成酶基因 *eJAS* 保守区的克隆[J]. 亚热带植物科学, 2013, 42(1): 1-4.
- [20] SHIBUYA M, KATSUBE Y, OTSUKA M, et al. Identification of a product specific β -amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol Biochem, 2009, 47: 26-30.
- [21] BRENDOLISE C, YAU K Y, EBERHARD E D, et al. An unusual plant terpenoid synthase with predominant α -amyrin-producing activity identified by characterizing oxidosqualene cyclases from *Malus x domestica* [J]. FEBS Journal, 2011, 272: 2485-2499.
- [22] SAIMARU H, ORIHARA Y, TANSKUL P, et al. Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea* [J]. Chem Pharm Bull, 2007, 55: 784-788.

枇杷Amyrin Synthase (AS) 基因的5' RACE与3' RACE扩增及序列分析



作者：[李惠华](#)，[刘小英](#)
作者单位：[福建省亚热带植物研究所, 福建厦门, 361006](#)
刊名：[安徽农业科学](#) 
英文刊名：[Journal of Anhui Agricultural Sciences](#)
年，卷(期)：2014(25)

引用本文格式：[李惠华](#), [刘小英](#) 枇杷Amyrin Synthase (AS) 基因的5' RACE与3' RACE扩增及序列分析[期刊论文]-[安徽农业科学](#)
2014(25)