

网络出版时间:2013-08-26 17:53

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130826.1753.024.html>

铁皮石斛鲨烯合酶基因的克隆及其组织表达模式分析

张 岗¹, 唐志书¹, 周莉英¹, 刘 清¹, 李依民¹, 张小飞¹, 吕 欣²

(1 陕西中医学院 药学院/陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046;

2 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**克隆珍稀濒危兰科药用植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)鲨烯合酶(Squalene synthase, SS)基因(*DoSS*), 并对其进行生物信息学与组织表达模式分析, 为其生物学功能提供参考。**【方法】**采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 获得 *DoSS* 基因全长序列; 利用生物信息学软件预测 *DoSS* 蛋白的理化性质、结构域及亚细胞定位等分子特性; 用 DNASTAR 6.0 和 MEGA 4.0 分别进行 *DoSS* 蛋白氨基酸多序列比对和进化关系分析; 借助 qPCR 检测 *DoSS* 基因的组织表达模式。**【结果】**成功克隆获得铁皮石斛鲨烯合酶基因, 命名为 *DoSS* (GenBank 注册号 JX272631), 其 cDNA 全长 1 735 bp, 编码一条由 410 个氨基酸组成的多肽, 分子质量 46.99 ku, 等电点 7.13; *DoSS* 蛋白含有鲨烯/八氢番茄红素合成酶保守结构域(44—315 位氨基酸); *DoSS* 与其他多种植物 SS 基因的编码蛋白同源性很高(61%~75%), 与水稻、玉米等单子叶植物的亲缘关系较近; *DoSS* 基因为组成型表达, 在根中的表达量最大, 为叶的 12.41 倍; 茎次之, 为叶的 1.87 倍。**【结论】**成功克隆得到 1 个鲨烯合酶基因(*DoSS*)全长 cDNA; *DoSS* 基因的(在根中高)表达特征暗示, 其可能在铁皮石斛根的生长发育中发挥重要的调控功能。

[关键词] 铁皮石斛; 鲨烯合酶; 基因克隆; 表达模式; 结构域; 萜类

[中图分类号] R931; S567.23

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)09-0151-08

Characterization of a squalene synthase gene in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

ZHANG Gang¹, TANG Zhi-shu¹, ZHOU Li-ying¹, LIU Qing¹,
LI Yi-min¹, ZHANG Xiao-fei¹, LÜ Xin²

(1 College of Pharmacy and Shaanxi Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Basis & New Drugs Research,

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China; 2 College of Food Science and Engineering,

Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**This study was carried out to clone a squalene synthase gene (*DoSS*) from a medicinally important endangered orchid species *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, followed by bioinformatics and expression analysis. **【Method】**RT-PCR and RACE approaches were used to isolate the full-length gene. Characteristics of the molecular weight, conserved domain and subcellular localization of the deduced *DoSS* protein were determined using a series of bioinformatics tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using DNASTAR 6.0 and MEGA 4.0, respectively. qPCR

[收稿日期] 2012-11-14

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(211177); 陕西省科技计划青年科技新星项目(2012KJXX-44); 陕西省自然科学基金研究计划项目(2011JQ4016); 陕西省教育厅专项科研计划项目(2013JK0829)

[作者简介] 张 岗(1981—), 男, 陕西兴平人, 副教授, 博士, 主要从事药用植物分子生物学研究。

E-mail: jay_gumling2003@yahoo.com.cn

[通信作者] 吕 欣(1975—), 男, 上海人, 副教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: xinlu@nwsuaf.edu.cn

was employed to examine the tissue specific expression patterns of DoSS.【Result】A full-length cDNA encoding squalene synthase, designated as DoSS (GenBank accession No. JX272631), was identified from *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. The gene comprised 1 735 bp encoding a 410 amino acid polypeptide with a calculated molecular weight of 46.99 ku and an isoelectric point (pI) of 7.13. The deduced DoSS protein contained the squalene/phytoene synthase conserved domain (44—315). DoSS was highly homologous (61%—75%) to a number of SS proteins from various plants, and was closely related to rice and maize monocots. DoSS constitutively expressed among the three studied tissues and the transcripts were the abundant in roots which were 12.41 times than in leaves, followed by stems (1.87 times than in leaves).【Conclusion】The full-length cDNA of *DoSS* gene was successfully cloned. The high expression level of *DoSS* in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo roots suggested that the gene might play a vital regulatory role in the roots.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; squalene synthase; gene cloning; expression pattern; domain; terpenoid

甲羟戊酸(Mevalonate, MVA)和丙酮酸(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP)途径介导植物细胞萜类物质的生物合成,其中,MVA 途径在萜类物质合成过程中发挥着十分重要的作用^[1]。MVA 途径以 3 分子乙酰辅酶 A 起始,经过一系列生化反应产生异戊二烯焦磷酸(Isopentenylallyl diphosphate, IPP),IPP 与其异构化产物二甲丙烯焦磷酸结合为牻牛儿基焦磷酸(Geranyl pyrophosphate, GPP),IPP 与 GPP 以头尾方式连接形成法呢基焦磷酸(Farnesyl pyrophosphate, FPP),FPP 由鲨烯合酶(Squalene synthase, SS)催化生成鲨烯(Squalene, SQ),SQ 在鲨烯环氧酶和鲨烯环化酶的作用下合成萜类、甾醇、胆固醇等多种重要的植物次级代谢产物^[1]。

SS 是植物细胞萜类物质合成途径的关键调节酶。目前,已从拟南芥^[2]、烟草^[3]、水稻^[4]、马铃薯^[5]、辣椒^[6]、日本百脉根^[7]、猫掌树^[8]和绿玉树^[9],以及药用植物人参^[10]、青蒿^[11]、甘草^[12]、三七^[13]、金铁锁^[14]、北柴胡^[15]、积雪草^[16]、蛇足石杉^[17]和紫杉^[18]等中克隆到 SS 基因。SS 处于 MVA 途径中 FPP 到其他产物的分支点上,其表达调控直接影响下游或其他代谢支路上次级代谢产物的合成。用果胶处理猫掌树悬浮细胞系可使 SS 活性提高 3 倍以上,萜烯类产物含量也显著增多^[8]。在绿玉树愈伤组织中过表达 SS,甾醇含量显著提高^[9]。外源茉莉酸甲酯(MeJA)处理能诱导人参 SS 基因高效表达以及三萜皂苷的积累^[10],过表达 *PgSS1* 的转基因人参^[10]和刺五加^[19]中的甾醇、三萜皂苷的合成增强。此外,转青蒿反义 SS 基因的烟草中的甾醇合成降低,而以 FPP 为前体的其他代谢支路的物质如赤霉素的合成增强^[20]。Zhang 等^[21]利用 hairpin-

RNA 介导的基因沉默技术,获得了反义抑制 SS 的转基因青蒿,部分转基因植株甾醇合成量显著降低,青蒿素含量增加 3.5 倍。可见,SS 在 MVA 途径的各物质生物合成过程中起重要的调控作用。

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)多年生附生草本植物,其药用部位为新鲜或干燥茎,具有益胃生津、滋阴清热、润肺止咳、明目强身等功效,是石斛属药用植物中最为珍稀名贵的物种^[22]。石斛属植物普遍含有萜酮类、双苄酚类、菲酚类、倍半萜类、多糖以及生物碱等主要活性成分。生物碱是药用石斛最重要的有效成分之一,被作为评价石斛药材品质的重要指标。药理学证据表明,石斛生物碱具有止痛解热、抗肿瘤之功效,对心血管、胃肠道等疾病有一定疗效^[23]。石斛生物碱具有基本的倍半萜骨架结构^[24],萜类合成关键酶 SS 可能在石斛生物碱生物合成过程中起作用。本研究以珍稀濒危药用铁皮石斛为试材,运用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆其 SS 基因,并进行生物信息学分析、同源性比对、系统进化树构建及组织表达模式分析,以期揭示 SS 在石斛生物碱以及萜类物质合成途径中的分子调控作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

铁皮石斛采自云南西双版纳,取其根、茎、叶,投入液氮中速冻后置-80℃保存备用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

按照 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒(Aidlab, China)操作说明提取总 RNA, RQ1

Rnase-free DNaseI (Promega, USA)消解去除基因组DNA;采用NanoDrop™ 2000分光光度计(Thermo Fisher, USA)测定RNA质量和纯度,1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA完整性。使用M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega, USA)将RNA反转录合成cDNA第一链,−20℃保存备用。

1.3 铁皮石斛鲨烯合酶(DoSS)基因的克隆

1.3.1 核心序列的克隆 根据GenBank中已注册的植物SS基因序列保守区,设计1对兼并引物:SS-degF. 5′-CCATCGACGACTACGACGAGTAYTGY CAYT-3′, SS-degR. 5′-GCCGATGGCCATGAYYT GNGGDA-3′。以铁皮石斛各样品cDNA混合物为模板,用*Ex Taq*™ DNA聚合酶(Takara, China) RT-PCR扩增鲨烯合酶基因核心序列。PCR反应体系为:2.5 μL 10×*Ex Taq*™ buffer, 0.5 μL 10 mmol/L dNTPs, 10 μmol/L SS-degF/R各0.5 μL, 1.0 μL cDNA, 0.3 μL 5 U/μL *Ex Taq*™ Polymerase, 补ddH₂O至25 μL。PCR程序为:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 32个循环; 72℃ 延伸10 min; 4℃保温。反应产物经1.8%琼脂糖凝胶电泳, TianGen胶回收试剂盒(TianGen, China)纯化目标条带, 连接至pMD® 18-T vector (Takara, China)上后, 转化大肠杆菌JM109感受态细胞, 随机挑选5个阳性克隆, 扩大培养并提取质粒, 以M13通用引物进行测序反应, 并在ABI 3130xl遗传分析仪(Applied Biosystems, USA)上进行双向测序。

1.3.2 5′/3′末端cDNA序列的RACE-PCR克隆

以所获得的核心序列为模板, 设计2对特异引物, 按照SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Japan)说明书分别进行2次巢式RACE-PCR。5′-RACE引物为: SS-R1. 5′-CAAGCCCAT TGAATTGGAAAGAAAATCTG-3′, SS-R2-nest. 5′-TAGTCCCAAGCCAACTAAACCTGCC-3′; 3′-RACE引物为: SS-F1. 5′-TGAGGAGAACTCTGTAAA AGCAGTGCAAT-3′, SS-F2-nest. 5′-GAATGACATGGTAACCAATGCGTTAGTTC-3′。

分别以SS-R1/F1与试剂盒中提供的UPM引物组合, 进行第1轮5′/3′-RACE。反应体系为: 2.5 μL 10× Advantage® 2 PCR buffer, 0.5 μL 10 mmol/L dNTPs, 10 μmol/L SS-R1/F1各0.5 μL, 0.5 μL 10 μmol/L UPM, 1.0 μL 5′/3′-RACE ready cDNA, 0.5 μL 5 U/μL 50× Advantage® 2 Polymerase Mix, 补ddH₂O至25 μL。PCR程序为: 94

℃ 3 min; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 2 min, 5个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 2 min, 24个循环; 72℃ 10 min, 4℃保温。反应结束后, 取1.0 μL产物作为模板, 以SS-R2/F2与UPM组合, 进行第2轮5′/3′-RACE。PCR程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 2 min, 32个循环; 72℃ 10 min, 4℃保温。PCR产物经1.8%琼脂糖凝胶电泳分析, 回收目标条带、克隆, 随机选取3个重组质粒, 在ABI 3130xl遗传分析仪上进行双向测序分析。

1.3.3 基因全长的获取和验证 利用CAP3将5′、3′端cDNA序列与核心序列拼接后, 进行BLASTX和ORF Finder分析, 设计跨ORF引物SS-orfF. 5′-GCAATGGGGATGGTCAAG-3′, SS-orfR. 5′-CTT TAGCTGTGACGAATCACC-3′, 进行全长基因的RT-PCR克隆验证。反应体系为: 2.0 μL 10× *Ex Taq*™ buffer, 0.4 μL 10 mmol/L dNTPs, 10 μmol/L SS-orfF/R各0.4 μL, 1.0 μL cDNA, 0.2 μL 5 U/μL *Ex Taq*™ Polymerase, 补ddH₂O至20 μL。PCR程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 32个循环; 72℃ 延伸10 min, 4℃保温。PCR反应产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的条带、克隆, 利用ABI 3130xl遗传分析仪进行双向测序分析。

1.4 DoSS基因及其编码蛋白的序列分析

使用BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)、CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>)、ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)等在线工具分析DoSS cDNA序列。用ExPASy Proteomics Server在线分析软件ProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>)进行DoSS基因编码蛋白的理化性质分析。用SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/sec-pred_sopma.pl)预测蛋白质二级结构。利用InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipr-scan/>)和PROSITE SCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html)预测DoSS蛋白质保守结构域和位点。借助PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>)进行蛋白的定位预测。用SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行分泌蛋白预测。用TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)预测蛋白跨膜区。用DNASTAR 6.0和MEGA 4.0软件分别进行氨基酸序列同源性比对

和进化树构建。

1.5 DoSS 基因组织表达模式的实时荧光定量 PCR 分析

分别以 2 μg 根、茎、叶总 RNA 反转录合成 cDNA,稀释 20 倍备用。以 EF1α 作为内参^[25] qPCR 分析 DoSS 基因的组织表达模式。qPCR 引物为 DoSS-qPCR-F, 5'-TGGCAGGTTTAGTTGGCTTG G-3', DoSS-qPCR-R, 5'-GATTTGCGGTATGGCAC AGAA-3'。用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)进行 PCR 扩增反应。反应体系为:12.5 μL 2×SYBR® Premix Ex Taq™ Master Mix (Takara, China), 正反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 0.5 μL Dye, 2 μL cDNA 模板, 9 μL ddH₂O。PCR 程序为:95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 1 min, 40 个循环, 同时绘制溶解曲线。每个反应重复 3 次, 设不加模板的对照。根据 ABI PRISM 7500 SDS 软件生成的 CT(Cycle threshold)值, 用 2^{-ΔΔCT} 法^[26] 计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 DoSS 基因的克隆与序列分析

用兼并引物 SS-degF/R 进行 RT-PCR 扩增, 克隆分析获得一条长度为 404 bp 的序列(图 1A), BLASTX 分析显示, 其与 GenBank 中已注册植物 SS 基因有很高的同源性(>85%)。在此基础上, 进行 RACE-PCR(图 1B,C), 获得 5'、3'末端 cDNA 序列, 长度分别为 685, 854 bp, 与长 404 bp 的序列拼接后获得一条长 1 735 bp 的 cDNA 序列, 暂命名为 DoSS, 提交 GenBank 获得注册号 JX272631。对 DoSS 进行 ORF Finder 分析发现, 其 ORF 长 1 233 bp, 5'-UTR 长 114 bp, 3'-UTR 长 368 bp, 含有真核生物特有的 polyA 尾巴结构; 起始密码子附近碱基序列 GCAATGG 遵循 KOZAK 规则, 即 A/GNNATGG^[27]。用 SS-orfF/R 进行 RT-PCR 扩增, 获得长 1.3 kb 的单一一条带(图 1D), 克隆、测序分析显示其含有完整的 ORF, 说明已成功获得 DoSS 基因的全长 cDNA。

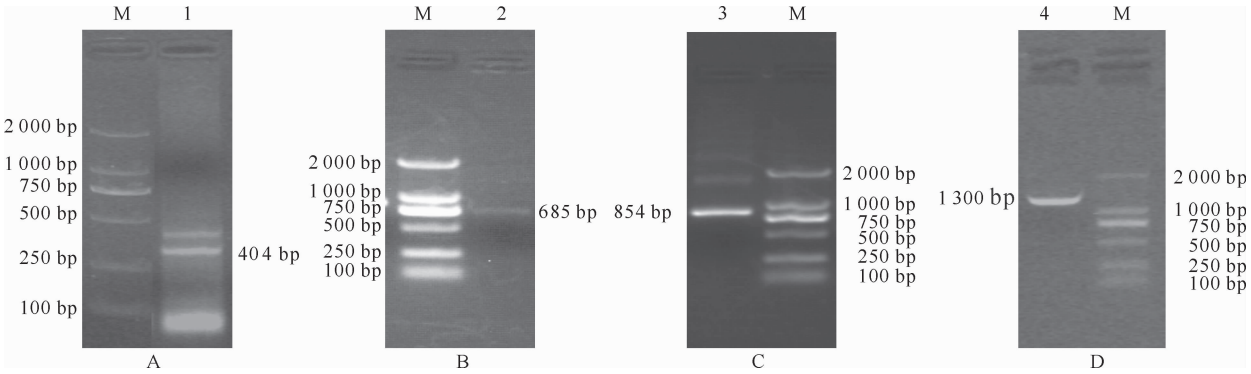


图 1 铁皮石斛鲨烯合酶基因(DoSS)的克隆

M. DL2000; 1. 核心序列; 2. 5'-RACE 产物; 3. 3'-RACE 产物; 4. 全长基因

Fig. 1 Clone of the squalene synthase gene in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo(DoSS)

M. DL2000; 1. Core fragment; 2. 5'-RACE product; 3. 3'-RACE product; 4. Full length gene

2.2 DoSS 基因编码蛋白的序列分析

Protparam 预测 DoSS 基因编码蛋白的分子式为 C_{2 132} H_{3 353} N₅₄₉ O₅₉₁ S₂₇, 包含 410 个氨基酸残基, 等电点 7.13, 分子质量 46.99 ku, 介于已知植物 SS 分子质量(46.9~52.5 ku)范围内^[17]; DoSS 蛋白带正电残基(Arg+Lys)为 49, 负电残基(Asp+Glu)为 49。该蛋白的不稳定系数为 39.25, 脂肪系数为 99.39, 亲水性系数为 0.049。SOPMA 分析表明, DoSS 蛋白二级结构主要由 α 螺旋(alpha helix, 72.20%)、随机卷曲(random coil, 18.78%)、少量的延伸链(extended strand, 5.37%)和 β 转角(beta turn, 3.66%)组成。

InterProScan 分析结果(图 2)显示, DoSS 蛋白

含有鲨烯/八氢番茄红素合成酶保守结构域(第44—315 位氨基酸)、以及法呢酰二磷酸酯法呢酰基转移酶和萜类合成酶的保守域(36—367, 35—367), 具备已报道植物 SS 的典型结构特征。PROSITE SCAN 分析表明, DoSS 蛋白含有数目不等的功能基元, 包括 4 个蛋白激酶 C(144—146, 249—251, 318—320, 356—358)、7 个酪蛋白激酶 II (78—81, 135—138, 161—164, 187—190, 327—330, 340—343, 344—347)和 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点(312—315), 1 个 ATP/GTP 结合位点(128—135)和 3 个 N-豆蔻酰化位点(2—7, 148—153, 177—182), 鲨烯/八氢番茄红素合成酶位点 1、2(163—183 和 201—229)等。PSORT 预测 DoSS 蛋白定位在内质网的可能性最

高为 85%，定位于叶绿体类囊体、微体和质膜的几
率分别为 50%，46.9%和 44%。SignalP 4.0 分析
DoSS 蛋白不含信号肽，TMPred 分析其具有 2 个跨

膜结构(285—301,385—405)，说明其可能为膜相关
蛋白而非分泌蛋白。

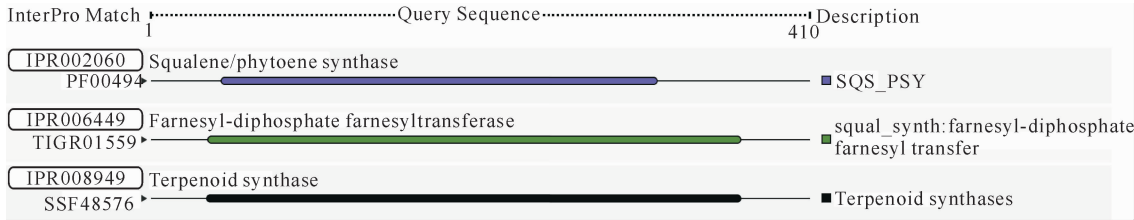


图 2 DoSS 蛋白的保守结构域分析

Fig. 2 Conserved domain analysis of the deduced DoSS protein

2.3 DoSS 蛋白的多序列比对和进化关系分析

DoSS 蛋白和已知植物 SS 基因编码蛋白进行多序
列比对分析，部分结果见图 3。

运用 DNASTAR 6.0 中的 MegAlign 程序对

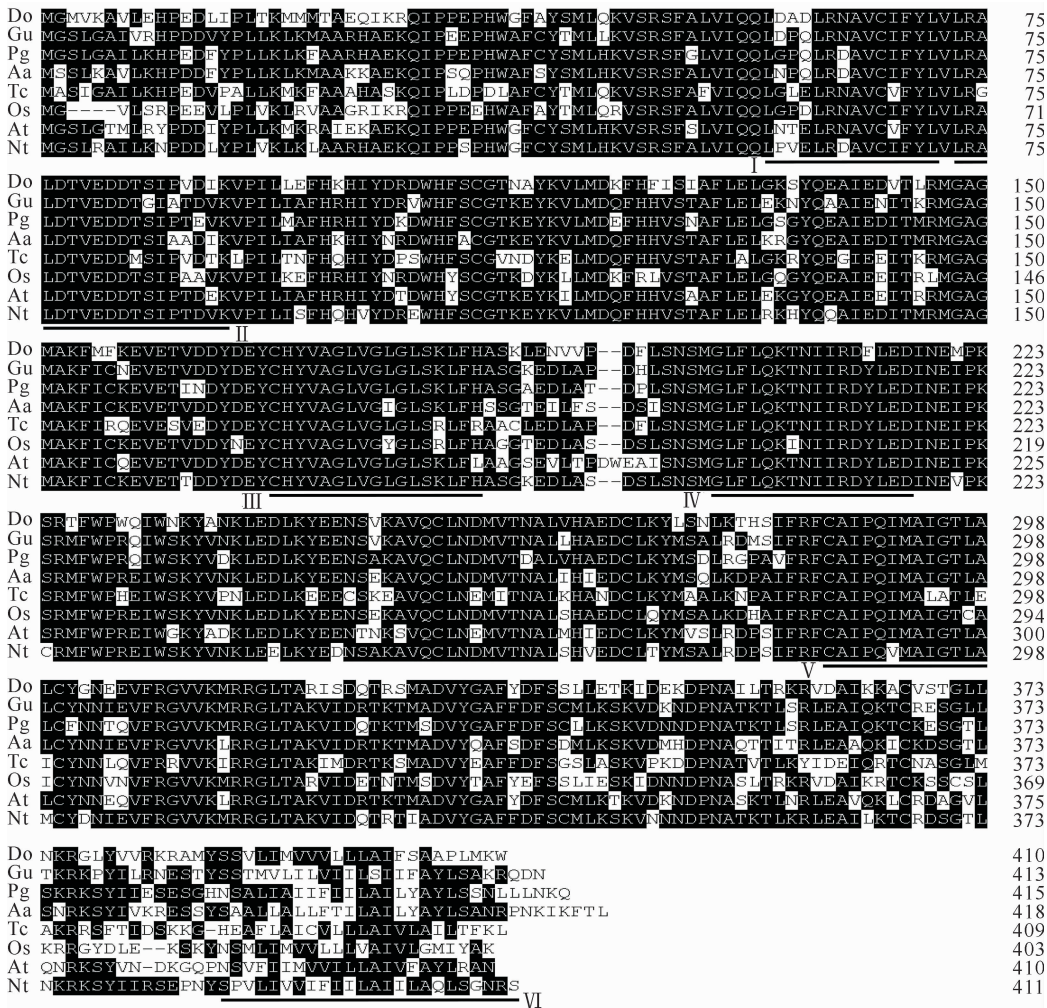


图 3 DoSS 基因编码蛋白与部分植物 SS 蛋白的多序列比对

下划线表示 6 个保守肽段(I—VI);Do. 铁皮石斛(JX272631);Gu. 甘草(ADG36707);Pg. 人参(ACA66014);

Aa. 青蒿(AAR20329);Tc. 紫杉(ABI14439);Os. 水稻(BAA22557);At. 拟南芥(AAD00296);Nt. 烟草(AAB08578)

Fig. 3 Multiple sequence alignments of DoSS and SS proteins from other plants

The underlines indicate the six conserved peptide domains (I—VI);Do. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (JX272631);

Gu. *Glycyrrhiza uralensis* (ADG36707);Pg. *Panax ginseng* (ACA66014);Aa. *Artemisia annua* (AAR20329);

Tc. *Taxus cuspidate* (ABI14439);Os. *Oryza sativa* (BAA22557);At. *Arabidopsis thaliana* (AAD00296);Nt. *Nicotiana tabacum* (AAB08578)

比对结果显示,DoSS 蛋白与 GenBank 中已注册植物 SS 蛋白有很高的同源性,其中,与水稻(BAA22557)、玉米(BAA22558)、烟草(AAB08578)和拟南芥(AAD00296/AAB61927)等模式植物 SS 的同源性分别为 75%,74%,72%和 71%/67%;与甘草(ADG36707)、人参(ACA66014)、三七(ABA29119)、金铁锁(ABQ96265)、积雪草(AAC58897)、青蒿(AAR20329)、北柴胡(ADG36707)、蛇足石杉(AEX58673)和紫杉(ABI14439)等药用植物 SS 蛋白的同源性依次为 74%,72%,72%,72%,71%,70%,70%,66%和

61%。此外,DoSS 蛋白包含 6 个保守肽段,除Ⅵ区保守性较低外,其余 5 个区的氨基酸均高度保守(图 3)。

进一步用 MEGA 4.0 软件邻接法(Neighbour-Joining)构建 DoSS 与 47 条 SS 基因的系统进化树,分析结果(图 4)显示,来源于不同物种 SS 基因的编码蛋白被聚成真菌、动物、植物和藻类 4 大类群,单子叶、双子叶和裸子植物 3 个分支构成植物类群;DoSS 与水稻、玉米 SS 基因聚在一起,表明其与单子叶植物亲缘关系较近,这与已报道的植物 SS 基因分子系统进化结果^[15]一致。

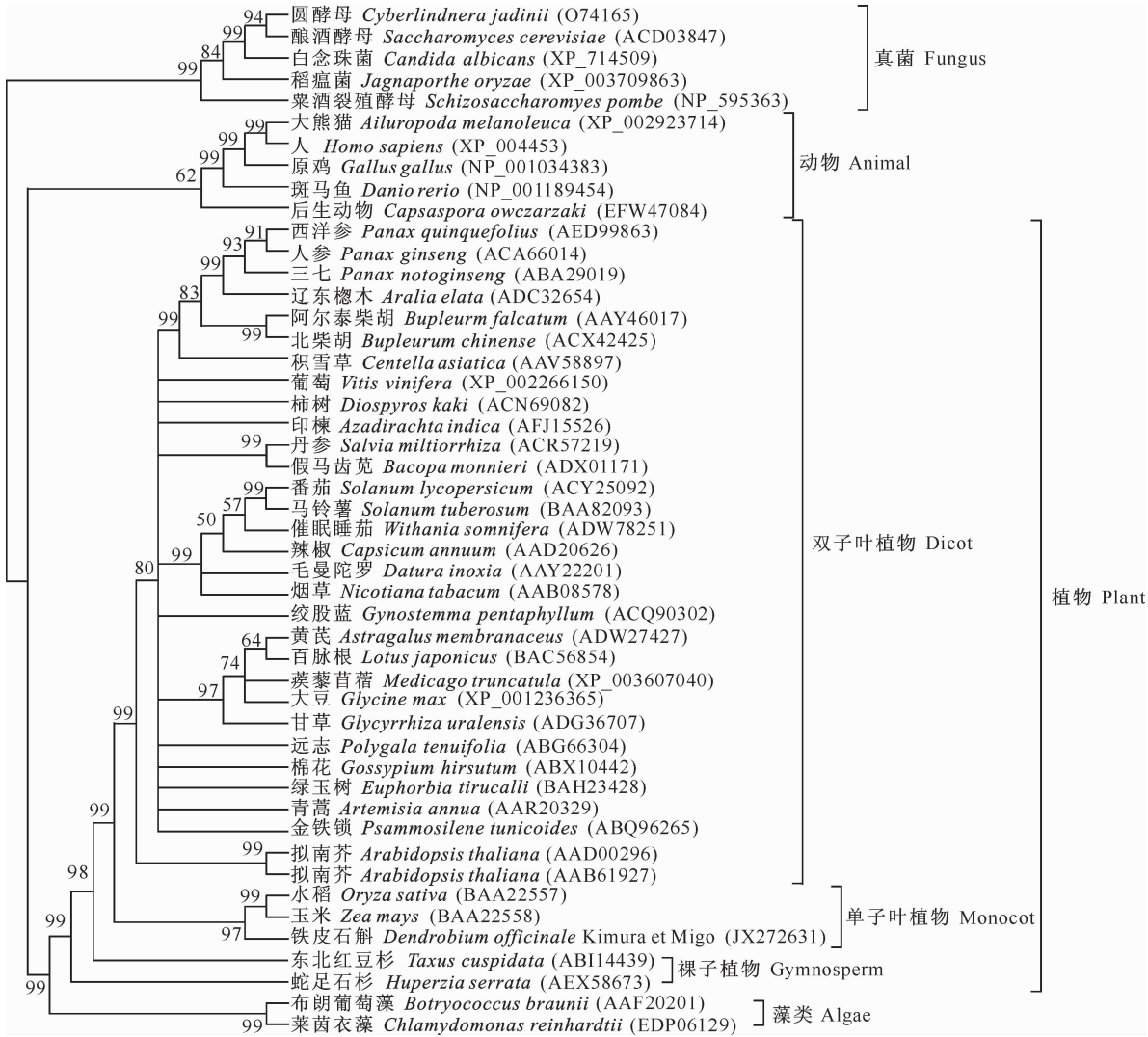


图 4 DoSS 与其他物种 SS 基因的系统进化树分析

各节点处数字表示重复 1 000 次分析的 bootstrap 值;括弧中为各物种 SS 基因的 GenBank 或 protein data-bank 注册号

Fig. 4 Phylogenetic tree of DoSS with SS genes from other species

The numbers on the branches indicate the bootstrap values for 1 000 replicate analysis;

The GenBank or protein data-bank accession number of each SS gene from diverse species is indicated in the bracket

2.4 DoSS 基因的组织表达模式分析

分别提取铁皮石斛根、茎、叶等样品的总 RNA,

利用 qPCR 技术检测 DoSS 基因的组织表达模式,

结果见图 5。图 5 表明,DoSS 基因为组成型表达,

其转录本在 3 种组织中的相对表达量存在较大差异。以叶为校正样本, *DoSS* 基因在根中的表达量为叶的 12.41 倍;茎次之,为叶的 1.87 倍。

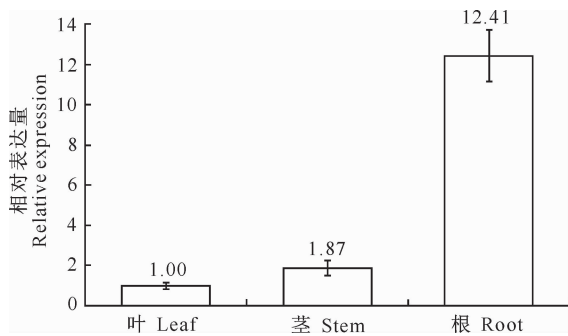


图 5 *DoSS* 基因的组织表达模式分析

Fig. 5 Tissue-specific expression pattern of *DoSS* gene

3 讨 论

鲨烯合酶在萜类物质的生物合成过程中发挥着重要作用。本研究从珍稀濒危兰科药用铁皮石斛中克隆得到 1 个鲨烯合酶基因 (*DoSS*) 全长 cDNA, 经比对发现, *DoSS* 与多种植物 SS 编码蛋白的同源性较高 (61%~75%); *DoSS* 蛋白具有鲨烯合酶典型的鲨烯/八氢番茄红素合成酶保守结构域、6 个肽段以及蛋白激酶 C 磷酸化、N-豆蔻酰化和 ATP/GTP 结合位点等多个基元; 进化关系分析显示, *DoSS* 基因隶属于植物类群的单子叶分支, 与水稻、玉米等单子叶植物的亲缘关系较近。说明 *DoSS* 是编码铁皮石斛鲨烯合酶的全长 cDNA 新基因。

结构域和基元是决定蛋白质生物学功能的重要基础。Robinson 等^[28] 最早研究发现, 鲨烯合酶包含 6 个由 14~23 个氨基酸组成的保守肽段。其中, II 区肽段也属于 FPP 合酶等萜类合酶的典型结构之一, 该区富含天冬氨酸残基, 以 Mg^{2+} 依赖方式辅助酶分子结合 FPP, 实现酶的催化活性^[18]。 *DoSS* 蛋白 II 区肽段序列特征与已报道的 SS 蛋白^[6,9-11,16,18] 一致, 可能发挥着类似的生化作用。SS 通常以羧基端疏水作用锚定于内质网膜, 游离于胞质中的氨基端包含酶活性位点^[29]。羧基端 VI 区肽段缺失会导致可溶性活性酶分子在植物细胞中累积, 表明 VI 区对鲨烯合酶的膜定位是必需的^[2,6,18]。TMpred 分析显示, *DoSS* 蛋白羧基端含有 1 个跨膜区 (385—405 位氨基酸), 分布在保守肽段 VI 区, 印证了 PSORT 关于 *DoSS* 蛋白膜定位的分析结果。这些序列和结构特征为 *DoSS* 的生化功能研究提供了参考。

基因表达分析是研究基因功能的重要前提。研究表明, 植物 SS 基因具有组织表达特异性, 且受外源激发子和激素处理诱导表达^[7,9-10,13,17-18,30]。本研究的 qPCR 分析结果表明, *DoSS* 基因为组成型表达, 表达量存在显著差异, 依次为根>茎>叶, 与日本百脉根^[7]、人参^[10]、蛇足石杉^[17]和紫杉^[18]等植物 SS 基因的表达模式相似, 说明 *DoSS* 基因通过特异的分子调控方式参与植物组织的生长发育。蒋世翠等^[30] 研究发现, 西洋参 14 个组织中的 SS 基因表达量差异显著, 且与人参皂苷等三萜成分含量之间有显著的正相关关系。 *DoSS* 基因在根中的高表达特征暗示该基因很可能在石斛根中执行重要的调控功能, 对于其过表达特征和蛋白表达分析等有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Laule O, F rholz A, Chang H S, et al. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (11): 6866-6871.

[2] Kribil R, Arro M, Delarco A, et al. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SOS1 gene encoding squalene synthase involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway [J]. Eur J Bio Chem, 1997, 249: 61-69.

[3] Threfall D R, Whitehead I M. Coordinated inhibition of squalene synthase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum* [J]. Phytochemistry, 1988, 27: 2567-2580.

[4] Heta S, Sanmiya K, Kouchi H, et al. cDNA cloning of squalene synthase genes from mono- and dicotyledonous plants, and expression of the gene in rice [J]. Plant Cell Physiol, 1997, 38 (12): 1409-1413.

[5] Hirofumi Y, Naofumi Y, Noriyuki D. cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans* [J]. Plant Cell Physiol, 1999, 40(9): 993-998.

[6] Lee J H, Yoon Y H, Kim H Y, et al. Cloning and expression of squalene synthase cDNA from hot pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Mol Cells, 2002, 13(3): 436-443.

[7] Akamine S, Nakamori K, Chechetka S A, et al. cDNA cloning, mRNA expression, and mutational analysis of the squalene synthase gene of *Lotus japonicas* [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1626: 97-101.

[8] Flores-Sánchez I J, Ortega-López J, Montes-Horcasitas M del C, et al. Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa* [J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43(12): 1502-1509.

[9] Uchida H, Yamashita H, Kajikawa M, et al. Cloning and char-

- acterization of a squalene synthase gene from a petroleum plant, *Euphorbia tirucalli* L. [J]. *Planta*, 2009, 229: 1243-1252.
- [10] Lee M H, Jeong J H, Seo J W, et al. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(8): 976-984.
- [11] 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 Botanica Sinica*, 2003, 45(5): 608-613.
- [12] 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. Lu H Y, Liu J M, Yang W L, et al. Isolation of squalene synthase genes of *Glycyrrhiza uralensis* and construction of plant expression vector [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology*, 2007, 14(4): 255-258. (in Chinese)
- [13] 吴耀生, 朱 华, 李 坤, 等. 三七鲨烯合酶基因在三七根、茎、芦头中的转录表达与三萜皂苷合成 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(12): 1000-1005. Wu Y S, Zhu H, Li K, et al. Transcription expression of squalene synthase gene in root, stem and rootstock of *Panax notoginseng* and synthesis of triterpenoids [J]. *Chinese Journal of Biochemistry Molecular Biology*, 2007, 23(12): 1000-1005. (in Chinese)
- [14] 戴住波, 钱子刚, 胡运乾, 等. 金铁锁鲨烯合酶 cDNA 的克隆和功能鉴定 [J]. *药学报*, 2008, 43(12): 1245-1250. Dai Z B, Qian Z G, Hu Y Q, et al. Cloning and characterization of cDNA encoding *Psammosilene tunicoides* squalene synthase [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2008, 43(12): 1245-1250. (in Chinese)
- [15] 隋 春, 魏建和, 战晴晴, 等. 北柴胡鲨烯合酶基因及其编码区 cDNA 克隆与序列分析 [J]. *园艺学报*, 2010, 37(2): 283-290. Sui C, Wei J H, Zhan Q Q, et al. Cloning and sequence analysis of squalene synthase gene and cDNA in *Bupleurum chinense* DC [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37(2): 283-290. (in Chinese)
- [16] Kim O T, Seong N S, Kim M Y, et al. Isolation and characterization of squalene synthase cDNA from *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *J Plant Biol*, 2005, 48(3): 263-269.
- [17] 殷秀梅, 白志川, 牛云云, 等. 蛇足石杉鲨烯合酶 HsSQS1 基因克隆和序列分析 [J]. *药学报*, 2012, 47(8): 1079-1084. Yin X M, Bai Z C, Niu Y Y, et al. Cloning and analysis of squalene synthase (HsSQS1) in *Huperzia serrata* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47(8): 1079-1084. (in Chinese)
- [18] Huang Z S, Jiang K J, Pi Y, et al. Molecular cloning and characterization of the Yew gene encoding squalene synthase from *Taxus cuspidate* [J]. *J Biochem Mole Biol*, 2007, 40(5): 625-635.
- [19] Seo J W, Jeong J H, Shin C G. Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66: 869-877.
- [20] 张 毅, 刘 彦, 王 红, 等. 转青蒿反义鲨烯合酶基因对烟草鲨烯合酶基因表达的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(4): 416-422. Zhang Y, Liu Y, Wang H, et al. Regulation of squalene synthase gene expression in tobacco by antisense transformation with an *Artemisia annua* squalene synthase gene [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13(4): 416-422. (in Chinese)
- [21] Zhang L, Jing F Y, Li F P, et al. Development of transgenic *Artemisia annua* (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin, an effective anti-malarial drug, by hairpin-RNA-mediated gene silencing [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2009, 52: 199-207.
- [22] 张 岗, 赵明明, 李 标, 等. 一个受菌根真菌诱导的铁皮石斛钙依赖蛋白激酶基因的克隆及表达分析 [J]. *药学报*, 2012, 47(11): 1548-1554. Zhang G, Zhao M M, Li B, et al. Cloning and expression analysis of a calcium-dependent protein kinase gene in *Dendrobium officinale* in response to mycorrhizal fungal infection [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47(11): 1548-1554. (in Chinese)
- [23] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物的化学成分与药理作用的研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2001, 13(1): 70-75. Chen X M, Guo S X. Study progress of the *Dendrobium* plants in chemical constituents and pharmaceutical activity [J]. *Natural Product Research and Development*, 2001, 13(1): 70-75. (in Chinese)
- [24] Onaka T, Kameta S, Maeda T. The structure of dendrobine [J]. *Chem Pharm Bull*, 1964, 12(4): 506.
- [25] Zhang G, Song C, Zhao M M, et al. Characterization of an A-type cyclin-dependent kinase gene from *Dendrobium candidum* [J]. *Biologia*, 2012, 67(2): 360-368.
- [26] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: e45.
- [27] Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15: 8125-8132.
- [28] 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: 2706-2717.
- [29] Stamellos K D, Shackelford J E, Shechter I, et al. Subcellular localization of squalene synthase in rat hepatic cells: Biochemical and immunochemical evidence [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 12825-12836.
- [30] 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, 42(3): 579-584. Jiang S C, Liu W C, Wang Y, et al. Correlation between ginsenoside accumulation and SQS and SQE gene expression in different organs of *Panax quinquefolius* [J]. *Chinese Traditional Herb Drugs*, 2011, 42(3): 579-584. (in Chinese)