

研究报告

Research Report

白皮黄瓜鲨烯合酶基因 cDNA 克隆及生物信息学分析

马成通^{1,2}, 钱洁颖^{1,2}, 刘镛³, 陶晨陈^{1,2}, 苏荷玲^{2,4}, 晁耐霞^{1,2}, 吴耀生^{1,2}

1 广西医科大学生物化学与分子生物学教研室, 南宁, 530021

2 广西高校生物分子医学研究重点实验室, 南宁, 530021

3 广东医学院药学院, 东莞, 523808

4 桂林医学院, 桂林, 541004

✉ 通讯作者, wuyaosheng03@sina.com; ✉ 作者

计算分子生物学, 2016 年, 第 5 卷, 第 1 篇 doi: 10.5376/cmb.cn.2015.05.0001

本文首次发表在《基因组学与医学生物学》(2016 年第 35 卷第 1 期 183-189 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

马成通等, 2016, 白皮黄瓜鲨烯合酶基因 cDNA 克隆及生物信息学分析, 计算分子生物学(online), 5(1): 1-7 (doi: 10.5376/cmb.cn.2016.05.0001)

引用格式(英文):

Ma et al., 2016, Cloning and Bioinformatic Analysis of Squalene Synthase Gene from White Cucumber, Computational Molecular Biology (online), 5(1): 1-7 (doi: 10.5376/cmb.cn.2016.05.0001)

摘要 为认识葫芦科植物中葫芦素生物合成途径所需鲨烯合酶基因结构特征, 克隆白皮黄瓜鲨烯合酶(squalene synthase, SS)基因 cDNA 并进行生物信息学分析。根据葫芦科植物绞股蓝、罗汉果、红花栝楼等的鲨烯合酶基因 cDNA 序列, 设计白皮黄瓜鲨烯合酶引物, 分别采用 3'RACE 和 5'RACE 技术扩增鲨烯合酶基因 3'端和 5'端。获得白皮黄瓜鲨烯合酶基因的两个 cDNA 克隆, 命名为 CsSS1 和 CsSS2, 其 cDNA 序列全长分别为 1 627 bp 和 1 534 bp, 都编码 417 个氨基酸残基, 分子质量为 47.6 kD。成功克隆得到白皮黄瓜鲨烯合酶基因全长 cDNA 序列并对其进行序列分析, 后续可用于葫芦素生物合成途径所需鲨烯合酶基因正选择位点功能分析。

关键词 白皮黄瓜; 鲨烯合酶; RACE; 基因克隆; 生物信息学分析

Cloning and Bioinformatic Analysis of Squalene Synthase Gene from White Cucumber

Ma Chengtong^{1,2}, Qian Jieying^{1,2}, Liu Yong³, Tao Chenchen^{1,2}, Su Heling^{2,4}, Chao Naixia^{1,2}, Wu Yaosheng^{1,2}

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning, 530021

2 Key Laboratory of Biological Molecular Medicine Research of Guangxi High Education, Nanning, 530021

3 School of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan, 523808

4 Guilin Medical University, Guilin, 541004

✉ Corresponding author, wuyaosheng2012@gxmu.edu.cn; ✉ 作者

Abstract We cloned the full length cDNA encoding squalene synthase (SS) from white cucumber and did bioinformatic analysis, in order to get more insight into the structural characteristics of SS involved in cucurbitacine biosynthesis pathway of Cucurbitaceae. According to the cDNA sequence of SS gene from Cucurbitaceae including *Gynostemma pentaphyllum*, *Siraitia grosvenorii*, *Trichosanthes rubriflos* and so on, primers of squalene synthase of white Cucumber were designed to amplify 3'-terminal and 5'-terminal sequence of SS by 3'-RACE and 5'-RACE respectively. Two cDNAs of SS of white cucumber were obtained, named CsSS1 (1 627 bp) and CsSS2 (1 534 bp) respectively, all coding a polypeptide containing 417 amino acid residues with molecular weight of 47.6 kD. We successfully cloned the full length cDNA sequence of white cucumber squalene synthase gene and did bioinformatic analysis. Furthermore, these two cDNA clones will be utilized for the analysis of the positive selection site of squalene synthase involved in cucurbitacine biosynthesis pathway.

Keywords White cucumber; Squalene synthase; RACE; Gene cloning; Bioinformatic analysis

收稿日期: 2016 年 02 月 10 日

接受日期: 2016 年 02 月 10 日

发表日期: 2016 年 02 月 10 日

基金项目: 本研究由国家自然科学基金(No.31260069)和广西高等学校科研项目(No.201203YB038)共同资助。

鲨烯合酶(squalene synthase, SS, EC2.5.1.21)是植物甾醇和三萜生物合成过程中的一个关键酶, 催化两分子法呢酯焦磷酸缩合生成鲨烯, 在 2,3-氧化鲨烯环化酶催化下, 鲨烯转化为 2,3-环氧化鲨烯(Beytia et al., 1973)。三萜皂苷是一类重

要的植物次生代谢产物,有研究表明具有降低胆固醇、抗炎、抗凝血、保肝护肝等药理作用,同时具有抗菌和抗虫害的作用(许晓双等,2014)。SS在鲨烯后续生物合成支路中处于关键地位,其含量和活性决定了后续产物的合成,如诱导银柴胡(Kim et al., 2011b)、刺五加(Seo et al., 2005)、睡茄(Patel et al., 2015)等鲨烯合酶的表达,能够提高其三萜皂苷和植物甾醇的含量;抑制人参鲨烯合酶的表达则可降低其三萜皂苷的生成量(Han et al., 2010; 何闪等, 2013)。

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是葫芦科黄瓜属一年生草本蔓生攀缘植物,白皮黄瓜是它的一个品种。黄瓜果实中除含有丰富的维生素 A、C、E 和大量对人体有益的矿物质,还含有丙醇二酸,能抑制糖类转化为脂肪。葫芦素(cucurbitacins)为葫芦烷型四环三萜类化合物,近年来研究发现对急性肝损伤及酒精肝具有保护作用(昌友权, 2006),同时具有抗炎(乔静等, 2012)、抗肿瘤(张延亭等, 2012)等多种生物活性作用。葫芦素 C 是黄瓜植株中的苦味成分,在鲜嫩叶子中的含量最高,但是随着叶变枯萎而下降,而葫芦素 C 单体化合物在室温或者甲醇溶液中均能稳定存在(卿志星等, 2014)。黄瓜转录组研究表明,葫芦素 C 是由黄瓜的 9 种基因参与的 4 步催化反应生成而得。转录因子 BI 和 Bt 分别调节叶子和果实通路,基因组信号追踪提示在培育过程中加强 Bt 的选择可从苦味黄瓜亲代中产生无苦味黄瓜(Shang et al., 2014)。葫芦素 C 在自然界中很少被发现,目前仅发现存在于葫芦科黄瓜属植物黄瓜。葫芦素 C 与葫芦素 B 具有相似的结构,葫芦素 B 已经被开发成为抗肝癌药物——葫芦素片。因此,葫芦素 C 具有潜在的药用价值。鲨烯合酶作为催化萜烯类物质生物合成的第 1 个关键酶,因而,其研究倍受重视,目前很多物种的 SS 基因被克隆及功能分析,如甘草(荣齐仙等, 2011)、北柴胡(隋春等, 2010)、刺五加(龙月红等, 2012)、茯苓(Wang et al., 2014)、金铁锁(戴住波等, 2008),而 GenBank 记载的陆生植物 SS 基因已有 50 多种,但对白皮黄瓜 SS 基因的相关研究尚未见有报道。

作为三萜合成通路关键酶,鲨烯合酶 SS 基因的克隆使植物内萜类物质代谢调控机制和植物抗病机理研究深入到分子水平,为在分子水平上探讨三萜皂苷生物合成机理及其在药用植物中的应用具有重要意义。本研究采用 RACE 技术克隆白皮黄瓜 SS 基因的 cDNA 序列,并进行生物信息学分析,为揭示鲨烯合酶在白皮黄瓜三萜生物合成中的作用及生物工程中的应用奠定基础。

1 结果与分析

1.1 白皮黄瓜总 RNA 提取

1.5%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA, 28S 与 18S 的亮度比约为 2:1, 说明所提的白皮黄瓜总 RNA 较完整。经蛋白核酸分析仪检测, A_{260}/A_{280} 比值为 1.91, 说明所提取的 RNA 纯度高, 可用于下一步实验(图 1)。

1.2 白皮黄瓜 SS 基因 3'RACE 及 5'RACE 扩增

通过 3'RACE 扩增得到片段长度为 1 200 bp 左右的特异条带, 5'RACE 扩增得到片段长度为 500 bp 左右的特异条带(图 2)。

1.3 白皮黄瓜 SS 基因核苷酸序列分析

利用 Vector NTI Suite 6.0 软件拼接及人工校对后, 得到两条 CsSS 基因 cDNA 序列, 其长度分别为 1 627 bp 和 1 534 bp, 两者 ORF 完全相同, 差异位于编码区外的 3'UTR (CsSS1 比 CsSS2 多 82 个碱基)(图 3)。翻译起始点位于第 3 个碱基处, 终止密码子为 TGA, 位于第 1 253 个碱基处, 包含了一个 1 251 bp 的完整开放阅读框 ORF, 编码 417 个氨基酸残基。使用 NCBI Blast 比对, 与葫芦科植物绞股蓝、罗汉果等植物的核苷酸序列同源性分别达到 87% 和 92%; 氨基酸序列的同源性则为 88% 和 95%。

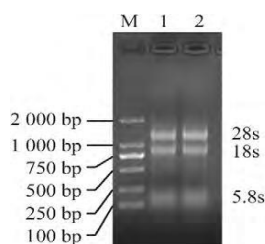


图1白皮黄瓜总RNA电泳检测

注: M: Marker; 1, 2: 总RNA

Figure 1 Electrophoresis detection of total RNA of white cucumber

Note: M: Marker; 1, 2: Total RNA

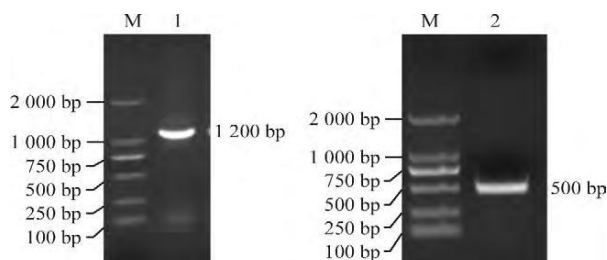


图2白皮黄瓜3'RACE和5'RACE的PCR产物凝胶电泳

注: M: Marker; 1: 3'RACE产物; 2: 5'RACE产物

Figure 2 Electrophoretogram of 3'RACE and 5'RACE PCR product of SS from white cucumber

M: Marker; 1: PCR result of 3'RACE; 2: PCR result of 5'RACE

1.4 白皮黄瓜 SS 基因氨基酸序列分析及蛋白质结构预测

利用 Mega4.0 软件分析表明, 白皮黄瓜 SS 基因编码 417 个氨基酸残基, 经 NCBI Blast 比对, 白皮

黄瓜氨基酸序列与葫芦科植物绞股蓝、罗汉果的同源性分别达到88%和95%。通过ProtParam软件分析,得到白皮黄瓜氨基酸序列相对分子质量为47.6 kD,等电点为7.90,带正电残基(Arg+Lys)为51,负电残基(Asp+Glu)为49。其不稳定系数为40.87,脂肪系数为97.99,总平均亲水性(GRAVY)为-0.034。由此可知,初步预测白皮黄瓜SS蛋白为亲水性蛋白。

利用ProtScale对该蛋白质亲水性与疏水性进一步预测,结果显示,最小值为-2.300,最大值为3.422,数值大于0表示疏水性,小于0表示亲水性。介于0.5~-0.5之间的主要为两性氨基酸,其中Ile分值为4.5,疏水性最强,而Arg分值为-4.5,亲水性最强(图4)。

```

1      atATGGGGCAGTTGGGGGGCAGTTTGAACACCCAGATGACTTTTATCCACTTTTGAAC
1      M G S L G A I L K H P D D F Y P L L K
61     TGAAAATAGCCGCTAGACATGCGGAGAAGCAGATCCCACCTGAGCCTATTGGGGATTCT
20     L K I A A R H A E K Q I P P E P H W G F
121    GCTATACCATGCTGCATAAGGTTCTCAAGAAGTTTGCACCTGTTATTTCAGCAGCTTAAGC
40     C Y T M L H K V S R S F A L V I Q Q L K
181    CCGAGCTTCGCAATGCTGTGTGCATATTTATCTGTTCTGGGAGCCCTGCACACTGTTG
60     P E L R N A V C I F Y L V L R A L D T V
241    AGGATGATCAAGCATACAACAGACATTAAGTGCCACTTCTGAAAGTCTTCTACTGTC
80     E D D T S I Q T D I K V P I L K A F H C
301    ACATATATAACCGTATTGGCAGCTTTTCATGTGGCACAAGGACTATAAAGTTCTGATGG
100    H I Y N R D W H F S C G T K D Y K V L M
361    ATGAGTTTCATCAGTTTCAACTGGCTTCTAGAAGTTGGGAAAGGTTACCGAAGCGCA
120    D E F H H V S T A F L E L G K G Y Q E A
421    TTGAGGATATCAAAAAGAATGGGTGCAGGAATGGCTAAATTCATTGCGCAAGAGGTAG
140    I E D I T K R M G A G M A K F I C Q E V
481    AGACGGTTGATGATTATGATGAATTTGCCACTACGTAGCGGACTTGGGACTAGTGT
160    E T V D D Y D E Y C H Y V A G L V G L G
541    TATCTAAGCTGTTCCATGCTGGGGAGTTGGAGGATTTGGCAGCTGATCTCTTCAAAT
180    L S K L F H A A E L E D L A P D S L S N
601    CTATGGGATGTTTCTCCAGAAAACCAACATTAATCCGAGATTACTTGGAGGACATTAATG
200    S M G L F L Q K T N I I R D Y L E D I N
661    AGATTCCAAAGTCCCGGATGTTTGGCCCTCGTGAGATTGGGGCAAATATGCTGATAAAT
220    E I P K S R M F W P R E I W G K Y A D K
721    TAGAGGATTTAAATATGAGGAGAATTCAGTCAAGCCGCTGCAATGCCTCAATGATTGG
241    L E D F K Y E E N S V K A V Q C L N D L
781    TCACATGCTTTGAACCATGTGGAGGATTGCTGAAATACATGTCACCAATTAAGAGATC
260    V T N A L N H V E D C L K Y M S N L R D
861    TTTCCATATTTCCGGTTTGTGCTATCTCCTCAGATTATGGCAATTTGGAACCTACGATTAT
280    L S I F R F C A I P Q I M A I G T L A L
921    GCTACAATAACGTAGAAGTCTTCAGAGGGTGGTTAAATGGCCGGGGTCTTACTGCAA
300    C Y N N V E V F R G V V K M R R G L T A
961    AGGTCATTGATCGAAGCAAAAACATGGCTGAGCTCTATGGAGCTTCTTTGATTTTTCTG
320    K V I D R T K T M A D V Y G A F F D F S
1021   TTATGCTGAAGGCTAAGGTCACAGCAATGATCCTAATGCTTCTAAAACCTGAGCAGAA
340   V M L K A K V N S N D P N A S K T L S R
1081   TCGAGGCAATACAGAAAACCTGCAAGCAGTCGGGAATCTTGAACAGGAGAAATGTATG
360   I E A I Q K T C K Q S G I E L N R R K L Y
1141   TAGTCAGAAGTGAAGCAATGTTCAATCCAGCTGTGATTGTTACTTTTCAGCTTATTAT
380   V V R S E P M F N P A V I V I L F S L L
1201   GCATCTTCTGCTTATCTCTGCCAAGGATTACCAGCAACCAATCTGATGAAGcgt
400   C I I L A Y L S A K R L P A N Q S V *
1261   caaactctagtaggtaggttctctaccacggatcaaaagaaaacaatcaaacactgt
1321   ctactcaattcaatgcttcaacttctctcttggaaatcagtatataatccaacagaa
1381   cacacgcaaatgtgacagttatggttaagtcttctggctccattatcttcttagagctt
1441   tggtttaagtattacaatgggtgtagttactgttggtttagtacagagcaggaacaagt
1501   gaaactctgtaaccttcaatggtttagtaggagaatacatgaaataagcctgttatat
1561   tcatctttttcaactctataataaggaatgaagcttcttatttttttttttttttttttt
1621   aaaaaaa
    
```

图3白皮黄瓜SS cDNA序列及推导的氨基酸序列

注: 黑体ATG为起始密码子, 黑体加下划线TGA为终止密码子; 大写字母表示编码区, 小写字母表示5'和3'端非翻译区; 上行为核苷酸序列, 下行为氨基酸序列; 小写字母加下划线为两条序列不同之处

Figure 3 cDNA sequence and deduced amino acid sequence for SS gene from white cucumber

Note: ATG is initiation codon in bold, TGA is termination codon in bold and underlined; Capital letters represent encoding regions, lowercase letters represent 5' and 3' untranslated regions; Up rows indicate nucleotide sequence, down rows indicate amino acid sequence; Lowercase letters underlined is difference between the two sequences

在线网站
http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
 预测白皮黄瓜 SS 跨膜区域。结果表明,此蛋白包含 3 个跨膜区,其在氨基酸序列上分别位于 169~187、285~301 和 389~408 位之间,与葫芦科植物红花栝楼预测的结果一致性较高(图 5)。

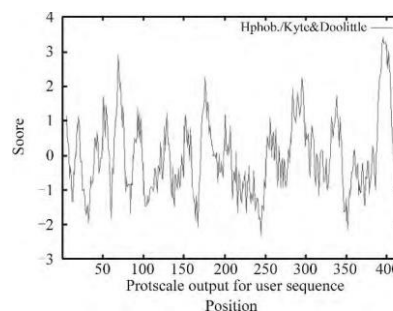


图4白皮黄瓜SS基因疏水性与亲水性预测
 Figure 4 Hydrophobicity and hydrophilicity prediction of SS from white cucumber

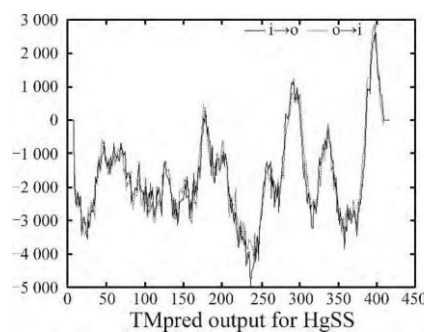


图5白皮黄瓜SS基因跨膜区预测
 Figure 5 Transmembrane segment prediction of SS gene from white cucumber

对白皮黄瓜 SS 基因的蛋白二级结构进行预测,结果显示其二级结构中含 α 螺旋(alpha helix) 65.71%, β 转角(beta turn) 6.71%, 扩展链(extended strand) 10.07%, 无规卷曲(random coil) 17.51%。由 SWISS-MODEL Workspace 在线分析软件建立 CsSS 三维结构模型(图 6)。利用在线软件 Signal P 4.0 Server 分析表明,白皮黄瓜鲨烯合酶 SS 蛋白结构中无信号肽,是一种非分泌蛋白,其亚细胞定位于质膜上。



图 6 白皮黄瓜 SS 基因三维结构预测
 Figure 6 Three dimensional models prediction of SS gene from white cucumber

1.5 SS基因序列比较及进化树分析

利用Vector NTI Suite 6.0将得到的白皮黄瓜SS与GenBank登载的植物SS的氨基酸序列进行多重比对,以藻类植物等的SS作为外类群构建系统发育进化树(图7)。结果显示,白皮黄瓜与葫芦科

植物罗汉果、红花栝楼、绞股蓝的亲缘关系最近。经NCBI Blast比对,白皮黄瓜SS基因的氨基酸序列与已知植物SS的同源性为80%~95%,核苷酸序列同源性为78%~92%。保守区域预测结果表明,白皮黄瓜SS保守序列位于N端和中间。

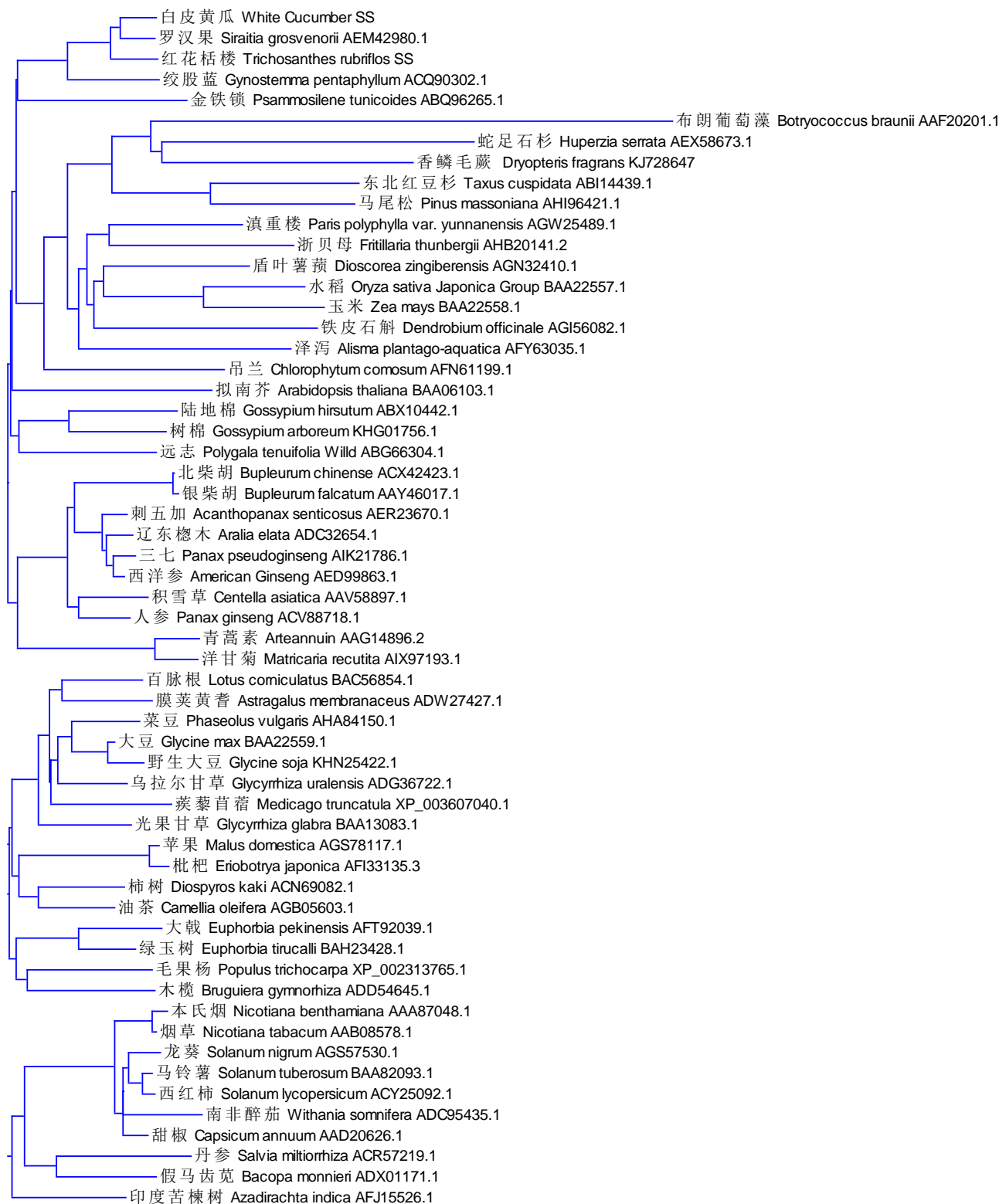


图7 不同植物SS氨基酸序列进化树

Figure 7 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of SS from different plants

2 讨论

本研究从白皮黄瓜中克隆得到萜类合成途径中的关键酶鲨烯合酶基因 *CsSS* 两个 cDNA 克隆, 并对其 cDNA 序列进行了生物信息学分析。目前 GenBank 登载葫芦科植物的 SS 基因序列只有罗汉果和绞股蓝及预测得到的黄瓜、香瓜等。而本研究克隆得到的白皮黄瓜及前期得到的红花栝楼(陶晨陈等, 2015) SS 基因序列, 有助于在分子水平上对葫芦科三萜皂苷生物合成途径关键酶基因功能研究的深入, 有利于进一步了解葫芦科植物的生物特性, 并为 SS 的正选择位点与功能的关联性分析奠定基础。

本研究利用 3'RACE 技术和简并引物扩增技术, 首次从白皮黄瓜中克隆获得长度为 1 627 bp 和 1 534 bp 的两条 cDNA 序列, 都编码 417 个氨基酸。由于 5'端采用简并引物扩增的方法, 根据葫芦科罗汉果的序列预测白皮黄瓜 SS 基因的 5'末端大约有 350 bp 尚未扩增出来, 但所得到的 cDNA 序列包含了白皮黄瓜 SS 基因完整的读码框和主要的功能区域; 并且得到的两条序列中, 其编码序列相同, 并没有影响其编码鲨烯合酶蛋白。今后将进一步研究得到白皮黄瓜 5'末端序列, 并进行原核表达分析其功能区域是否与预测一致。

随着人们对鲨烯合酶基因研究的深入, 越来越多植物鲨烯合酶发现有两个或两个以上的拷贝数, 例如人参(Kim et al., 2011a)、拟南芥(Busquets et al., 2008)、丹参(马艺沔等, 2014)等, 这些植物中三萜量较为丰富, 具有多个不同表达模式的鲨烯合酶基因。本研究得到的白皮黄瓜 2 个鲨烯合酶克隆, 进一步证明了一个基因具有多个拷贝的事实。根据基因序列结构比较分析, 这 2 个基因编码的蛋白相同, 很可能是通过基因平行复制而来的平行同源基因。由于鲨烯合酶是以 FPP 作为底物来合成三萜, 诱导 SS 的表达能增加植物甾醇及三萜类化合物的生成量, 而抑制 SS 的表达则促进倍半萜、类胡萝卜素等的生物合成, 因而通过调节鲨烯合酶的含量和活性可以提高相关物质的产量(蒋东等, 2014; 张萍等, 2014)。

如人参的 3 个鲨烯合酶基因都能够编码有活性的鲨烯合酶(Kim et al., 2011a), 而拟南芥 2 个鲨烯合酶基因中, 只有一个基因能够编码有活性的鲨烯合酶(Busquets et al., 2008), 因此有利于人参特异的三萜皂苷的生成。本研究中克隆的 2 个白皮黄瓜鲨烯合酶基因也可能在黄瓜甾醇和三萜生物合成中具有不同调节作用, 而这两个平行同源基因之间是如何相互配合调节? 是否和人参 SS 一样也具有多种不同表达模式? 在黄瓜的基因组

中, 这两个 SS 的分布有什么特征? 还有待于进一步研究。

3 材料与方法

3.1 植物材料

白皮黄瓜种子购于柳州市兴旺蔬菜良种经营部, 于 2015 年 3 月中旬种植于广西医科大学校园内, 6 月份采集生长旺盛植株的新鲜叶子, 清洗干净, 立即放入液氮, 做好记录, 转存于 -80℃ 超低温冰箱贮存, 作为样本材料。

3.2 试剂

Total RNA 提取试剂盒、3'-Full RACE Core Set with Prime ScriptTM RTase、柱式胶回收试剂盒、LA Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶等购买于 TaKaRa 公司; pEASY-T1 Cloning Kit、Transl-T1 感受态细胞为全式金公司产品; 质粒提取试剂盒为天根公司产品, 其他试剂均为国产分析纯产品。

3.3 白皮黄瓜总 RNA 提取

按照 TaKaRa 公司的 Total RNA 提取试剂盒方法提取白皮黄瓜总 RNA, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 并用 DNA/Protein Analyzer 检测总 RNA 的质量和浓度。

3.4 白皮黄瓜 cDNA 第一链的合成与 3'RACE 扩增

根据 GenBank 登载的绞股蓝、罗汉果等 SS 基因 cDNA 序列以及本课题组前期克隆的红花栝楼 SS cDNA 序列, 设计引物 hgss01 和 hgss02 (表 2) 扩增 3'端序列, 引物由上海生工合成。以白皮黄瓜总 RNA 为模板, 按试剂盒 3'-Full RACE Core Set with Prime ScriptTM RTase 说明书操作反转录合成 cDNA 第一链。

以白皮黄瓜反转录产物得到的 cDNA 第一链为模板, 分别以 Hgss01、Hgss02 与试剂盒中的 3'RACE Outer Primer、3'RACE Inner Primer 为引物, 采用巢式 PCR 的方法扩增。第 1 轮 PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s、55℃~52℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 90 s, 退火温度每降 1℃ 运行 5 个循环, 总共 20 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。以第 1 轮 PCR 产物为模板进行第 2 轮巢式 PCR。第 2 轮 PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 然后以 94℃ 变性 30 s、54℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 90 s 运行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min (陶晨陈等, 2015)。

琼脂糖凝胶电泳检测并对目的片段进行胶回收, 连接到 pEASY-T1 载体, 转化到 Transl-T1 感受态细胞中, 挑取单一阳性克隆扩大培养, 菌落

PCR 鉴定及提取质粒并进行双酶切鉴定, 将阳性克隆送到上海生工测序。

3.5 5'RACE 扩增

根据白皮黄瓜 3'端克隆测序的结果, 设计下游特异引物 Hgss03 和 Hgss04。上游引物则是根据 Genbank 已有的鲨烯合酶序列, 设计简并引物 ssjbf2 和 ssjbf5 (表 2)。PCR 扩增方法与 3'RACE 相同。以 cDNA 第一链为模板, 进行巢式 PCR, 扩增产物回收后连接到 pEASY-T1 载体, 转化到 Transl-T1 感受态细胞中, 挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定并提取质粒双酶切鉴定, 将阳性克隆送

到上海生工测序。

3.6 信息学分析

将 3'RACE 和 5'RACE 扩增得到的序列用 Vector NTI 6.0 软件进行人工拼接得到白皮黄瓜 SS 基因全长 cDNA 序列。利用 Mega4.0 软件分析白皮黄瓜 SS 基因 cDNA 全长序列性质, 利用在线软件对其二级结构、三维结构进行预测分析。用 Vector NTI Suite 6.0 软件对白皮黄瓜与 Genbank 登载的植物 SS 氨基酸序列进行相似性比对, 构建 SS 基因系统进化树。

表1 SS基因克隆引物

Table 1 Primers designed for SS gene cloning

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	碱基数(bp) base number (bp)
Hgss01	GGAAAGGGTATCAGGAGGC	19
Hgss02	TCATTTGCCAAGAGGTAGAGAC	22
3'RACE Outer Primer	TACCGTCGTTCCTACTAGTGATTT	23
3'RACE Inner Primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	32
Hgss03	TCGTCAACTGTCTCTACCTCT	21
Hgss04	ATTCCAGCACCCATTCGT	18
ssjbf2	ATATWKAGAGVSAGAAATGGGCA	23
ssjbf5	ATATGGGCAGTTTGGGGGCGAT	22

作者贡献

马成通是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 参与论文撰写; 钱洁颖完成实验数据收集及处理, 刘镛指导生物信息学数据的分析; 陶晨陈负责实验指导、序列审核; 苏荷玲参与实验数据辅助分析, 晁耐霞参与实验的设计及实验结果分析; 吴耀生是项目负责人, 指导实验设计和数据分析及论文写作与修改。

致谢

本研究由国家自然科学基金(No.31260069)和广西高等学校科研项目(No.201203YB038)共同资助。

参考文献

Beytia E., Qureshi A.A., and Porter J.W., 1973, Squalene synthesise: III mechanism of the reaction, Journal of Biological Chemistry, 248(5): 1856-1867
Busquets A., Keim V., Closa M., del Arco A., Boronat A., Arró M., and Ferrer A., 2008, Arabidopsis thaliana contains a single gene encoding squalene synthase, Plant Molecular Biology, 67(1-2): 25-36
Chang Y.Q., 2006, Studies of protective effect and mechanisms of cucurbitacine B on hepatocytes, Dissertation for Ph.D., Jilin University, Supervisor: Cao S.G., and Yang S.J., pp.26-45 (昌友权, 2006, 葫芦素 B 的保肝作用及其机制的研究, 博士学位论文, 吉林大学, 导师: 曹淑桂, 杨世杰, pp.26-45)
Dai Z.B., Qian Z.G., Hu Y.Q., and Huang L.Q., 2008, Cloning and characterization of cDNA encoding *Psammosilene tunicoides* squalene synthase, Yaouxue

Xuebao (Acta Pharmaceutica Sinica), 43(12): 1245-1250 (戴住波, 钱子刚, 胡运乾, 黄璐琦, 2008, 金铁锁鲨烯合酶 cDNA 的克隆和功能鉴定, 药学报, 43(12): 1245-1250)
Han J.Y., In J.G., Kwon Y.S., and Choi Y.E., 2010, Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*, Phytochemistry, 71(1): 36-46
He S., Zhang S.J., Xiu L.S., and Xing Z.B., 2013, Codon usage analysis in squalene synthase gene, Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 32(2): 232-239 (何闪, 张淑杰, 修乐山, 邢朝斌, 2013, 鲨烯合酶基因的密码子偏性分析, 基因组学与应用生物学, 32(2): 232-239)
Jiang D., Tang Y.L., Tao C.C., and Wu Y.S., 2014, Cloning and sequence analysis of farnesyl pyrophosphate synthase from *Gynostemma pentaphyllum*, Shengwu Jishu Tongxun (Letters In Biotechnology), 25(2): 198-202 (蒋东, 唐银琳, 陶晨陈, 吴耀生, 2014, 绞股蓝法呢基焦磷酸合酶基因的克隆及其序列分析, 生物技术通讯, 25(2): 198-202)
Kim T.D., Han J.Y., Huh G.H., and Choi Y.E., 2011a, Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng*, Plant and Cell Physiology, 52(1): 125-137
Kim Y.S., Cho J.H., Park S., Han J.Y., Back K., and Choi Y.E., 2011b, Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum*, Planta, 233(2): 343-355
Long Y.H., Xing Z.B., Wang M.Y., Wu P., Chen L., Liang N.S., and He S., 2012, Cloning and sequence analysis of squalene synthase gene in *Eleutherococcus senticosus*, Shengwu Jishu Tongxun (Biotechnology Bulletin), (2):

- 112-116 (龙月红, 邢朝斌, 王明艳, 吴鹏, 陈龙, 梁能松, 何闪, 2012, 刺五加鲨烯合酶基因 cDNA 的克隆与序列分析, 生物技术通报, (2): 112-116)
- Ma Y.M., Yuan L.C., Zhang L.S., Hou X.M., and Lu S.F., 2014, Cloning and identification of two squalene synthase genes from *Salvia miltiorrhiza*, *Zhongcaoyao* (Chinese Traditional and Herbal Drugs), 45(9): 1307-1312 (马艺沔, 袁丽钗, 张林甦, 侯学敏, 卢善发, 2014, 2 个丹参鲨烯合酶基因的克隆和鉴定, 中草药, 45(9): 1307-1312)
- Patel N., Patel P., Kendurkar S.V., Thulasiram H.V., and Khan B.M., 2015, Overexpression of squalene synthase in *Withania somnifera* leads to enhanced withanolide biosynthesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(2): 409-420
- Qiao J., Xu L.H., He J., OuYang D.Y., and He X.H., 2012, The effects of cucurbitacin E on inflammatory responses of RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharides and the underlying mechanism, *Xiandai Mianyixue* (Current Immunology), 32(4): 327-332 (乔静, 徐丽慧, 何健, 欧阳东云, 何贤辉, 2012, 葫芦素 E 对脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响及作用机制, 现代免疫学, 32(4): 327-332)
- Qing Z.X., Cheng P., Zhou Y., Liu X.B., and Zeng J.G., 2014, Metabolic distribution and stability of cucurbitacin C in *Cucumber sativus*, *Zhongcaoyao* (Chinese Traditional and Herbal Drugs), 45(14): 2080-2083 (卿志星, 程辟, 周渊, 刘秀斌, 曾建国, 2014, 葫芦素 C 在黄瓜植株中的代谢分布及其稳定性研究, 中草药, 45(14): 2080-2083)
- Rong Q.X., Liu C.S., Huang L.Q., Zhang N., Nan B., and Guo W., 2011, Cloning and sequence analysis of squalene synthase gene and cDNA in *Glycyrrhiza uralensis*, *Zhongguo Zhongyao Zazhi* (China Journal of Chinese Materia Medica), 36(11): 1416-1420 (荣齐仙, 刘春生, 黄璐琦, 张宁, 南博, 芮未, 2011, 甘草鲨烯合酶基因及 cDNA 的克隆与序列分析, 中国中药杂志, 36(11): 1416-1420)
- Seo J.W., Jeong J.H., Shin C.G., Lo S.C., Han S.S., Yu K.W., Harada E., Han J.Y., and Choi Y.E., 2005, Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation, *Phytochemistry*, 66(8): 869-877
- Shang Y., Ma Y.S., Zhou Y., Zhang H.M., Duan L.X., Chen H.M., Zeng J.G., Zhou Q., Wang S.H., Gu W.J., Liu M., Ren J., Gu X., Zhang S., Wang Y., Yasukawa K., Bouwmeester H.J., Qi X., Zhang Z., Lucas W.J., and Huang S., 2014, Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber, *Plant Science*, 346(6213): 1084-1088
- Sui C., Wei J.H., Zhan Q.Q., and Yang C.M., 2010, Cloning and sequence analysis of squalene synthase gene and cDNA in *Bupleurum chinense* DC, *Yuanyi Xuebao* (Acta Horticulturae Sinica), 37(2): 283-290 (隋春, 魏建和, 战晴晴, 杨成民, 2010, 北柴胡鲨烯合酶基因及其编码区 cDNA 克隆与序列分析, 园艺学报, 37(2): 283-290)
- Tao C.C., Ma C.T., Wu Y.S., Zhou Q.N., Su H.L., Chao N.X., and Luo Y., 2015, Cloning and sequence analysis of squalene synthase gene from *Trichosanthes rubriflos*, *Zhongcaoyao* (Chinese Traditional and Herbal Drugs), 46(7): 1034-1401 (陶晨陈, 马成通, 吴耀生, 周青鸟, 苏荷玲, 晁耐霞, 罗育, 2015, 红花栝楼鲨烯合酶基因的克隆及其序列分析, 中草药, 46(7): 1034-1401)
- Wang J.R., Lin J.F., Guo L.Q., You L.F., Zeng X.L., and Wen J.M., 2014, Cloning and characterization of squalene synthase gene from *Poria cocos* and its up-regulation by methyl jasmonate, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2): 613-620
- Xu X.S., Zhang F.S., and Qin X.M., 2014, Research advances on triterpenoid saponins biosynthesis and its key enzymes, *Shijie Kexue Jishu-Zhongyiyao Xiandaihua* (Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology), 16(11): 2440-2448 (许晓双, 张福生, 秦雪梅, 2014, 三萜皂苷生物合成途径及关键酶的研究进展, 世界科学技术-中医药现代化, 16(11): 2440-2448)
- Zhang P., Liu D.Q., Ge F., and Zhao H.W., 2014, Cloning and bioinformatic analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase gene from *Panax notoginseng*, *Zhongcaoyao* (Chinese Traditional and Herbal Drugs), 45(18): 2684-2690 (张萍, 刘迪秋, 葛锋, 赵恒伟, 2014, 三七 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶基因的克隆和生物信息学分析, 中草药, 45(18): 2684-2690)
- Zhang Y.T., OuYang D.Y., and He X.H., 2012, Progress in antitumor effect of cucurbitacin B and its mechanism, *Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi* (Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology), 26(1): 112-115 (张延亭, 欧阳东云, 何贤辉, 2012, 葫芦素 B 抗肿瘤作用及其机制研究进展, 中国药理学与毒理学杂志, 26(1): 112-115)