

• 药材与资源 •

白木香倍半萜合成酶基因 *As-SesTPS* 的克隆及生物信息学与表达分析吴宏清^{1,2}, 王磊^{1*}, 何欣^{1,3}, 白玲², 高晓霞³, 严寒静³, 章卫民^{1*}

1. 广东省微生物研究所 省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070
2. 江西农业大学理学院, 江西 南昌 330045
3. 广东药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 从白木香 *Aquilaria sinensis* 总 RNA 中克隆倍半萜合成酶基因, 并对其进行生物信息学及表达分析。方法 对白木香总 RNA 进行反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)和 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE), 获得完整的开放阅读框(ORF)。运用生物信息学的方法对该序列进行相似性比较和同源性分析, 预测编码蛋白, 并对其进行各种理化性质分析。通过半定量 PCR 检测该基因在白木香树干中不同部位的表达情况。结果 获得 *As-SesTPS* 基因, ORF 长 1 629 bp, 编码 542 个氨基酸, 与葡萄 *Vitis vinifera* 的大根香叶烯-D 合成酶 [(-)-germacrene D synthase] 相似性最高, 且包含 RR_xW 和 DDxxD 的保守序列。*As-SesTPS* 蛋白无跨膜区域, 定位于细胞质中, 且仅在白木香结香部位表达。结论 首次从白木香中克隆得到可能编码大根香叶烯-D 合成酶的基因, 为白木香倍半萜生物合成代谢途径的研究提供参考。

关键词: 白木香; 倍半萜合成酶; 基因克隆; 生物信息学; 基因表达分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)01-0094-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.019

Cloning of sesquiterpene synthase gene *As-SesTPS* from *Aquilaria sinensis* and analysis its bioinformatics and expressionWU Hong-qing^{1,2}, WANG Lei¹, HE Xin^{1,3}, BAI Ling², GAO Xiao-xia³, YAN Han-jing³, ZHANG Wei-min¹

1. State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry-Province Joint Development), Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China
2. College of Science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China
3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To clone the sesquiterpene synthase gene *As-SesTPS* from total RNA of *Aquilaria sinensis* and to analyze the bioinformatics and gene expression. **Methods** The gene containing intact open reading frame (ORF) was cloned by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The similarity comparison and homology analysis of the sequence were carried out using bioinformatic method, the coding protein was predicted and the physicochemical properties were analyzed. The expression of the gene in different locations of *A. sinensis* trunk was determined by semiquantitative PCR using gene-specific primers. **Results** The *As-SesTPS* gene, containing a 1 629 bp ORF that encoded 542 amino acids, was cloned. The deduced protein sequence had the most similarity to the (-)-germacrene-D synthase in *Vitis vinifera* and exhibited two conserved motifs (RR_xW and DDxxD). Without transmembrane domain, *As-SesTPS* was located in cytoplasm and expressed only in the agarwood part. **Conclusion** The *As-SesTPS* gene probably encoding (-)-germacrene-D synthase of *A. sinensis* is successfully cloned for the first time, which would provide a reference for the study of sesquiterpene biosynthesis pathway in *A. sinensis*.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg; sesquiterpene synthase; gene cloning; bioinformatics; gene expression analysis

收稿日期: 2013-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31100496, 81102418); 广东省中国科学院全面战略合作项目 (2011B090300078); 广东省科技计划项目 (2012A030100014)

*通信作者 章卫民 Tel: (020)37656321 E-mail: wzmzhang58@qq.com

王磊 Tel: (020)87137598 E-mail: tuiliwang@gmail.com

网络出版时间: 2013-12-24 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.html>

沉香是我国传统名贵药材,而白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 是我国生产沉香的惟一植物资源^[1],外界刺激可诱导白木香产生沉香^[2],健康的白木香不产沉香,因此天然沉香资源稀少。沉香的化学成分主要包括倍半萜类、芳香族和 2-苯乙基色酮类化合物,其中倍半萜类 (sesquiterpenes) 是其主要药效成分,药理学实验证明该类化合物对神经系统有明显的生理活性^[3]。沉香倍半萜类成分复杂,种类繁多,目前已从沉香中分离出多种倍半萜类化合物^[4],但是分子水平上对沉香倍半萜类成分生物合成的研究不多,仅有 Kumeta 等^[5]和 Xu 等^[6]从沉香 cDNA 中克隆得到主产物为愈创木烷型倍半萜的合成酶基因。对沉香倍半萜合成酶的研究有助于阐明沉香倍半萜的生物合成途径,有利于揭示白木香产沉香的机制^[7]。

本课题组在前期工作中对白木香转录组进行了测序研究^[8],获得多条预测为倍半萜合成酶基因的编码序列 (coding sequence, CDS),根据其中一条序列设计引物,对诱导结香后的白木香总 RNA 进行反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 和 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE),经序列拼接获得全长开放阅读框 (ORF),并命名为 *As-SesTPS*,运用生物信息学的方法对该序列进行相似性比较和同源性分析,

预测编码蛋白,并对 *As-SesTPS* 编码的蛋白质进行各种理化性质分析,同时对该基因进行表达分析。

1 材料

实验样品采自广东省信宜市珍稀沉香发展有限公司白木香苗圃基地,参考王磊等^[9]方法进行结香实验后获得的已产沉香的白木香植株,经广东药学院中药学院严寒静副教授鉴定为白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg。除去树皮后用刨刀从树干上刨下沉香样品,立即用锡箔纸包裹置于液氮中保存。

改良异硫氰酸胍-CTAB 提取液 (38% 水饱和酚, 1 mol/L 异硫氰酸胍, 2% CTAB, 100 mmol/L NaAc-HAC pH 5.2, 2 mol/L NaCl, 2% PVP), 用前混匀; 抽提液 I (水饱和酚-氯仿-异戊醇 25:24:1); 抽提液 II (氯仿-异戊醇 24:1); 焦碳酸二乙酯 (DEPC); DEPC 处理水; DNase I, RNase-free (Thermo 公司); TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司]; *Ex Taq* DNA 聚合酶, *Ex Taq* HS DNA 聚合酶 (Takara 公司); SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 [生工生物工程 (上海) 有限公司]; pMDTM 19-T Vector (Takara 公司); dNTP (北京全式金生物技术有限公司); 主要化学试剂为国产分析纯,引物委托生工生物工程 (上海) 有限公司合成 (表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引 物	序列 (5'-3')
dT 锚定引物	GACCACGCGTATCGATGTGCGAC (T) ₁₆ V
上游引物 (C984.1)	ATAGCCTACTCTCCTGAAGCA
下游引物 (C984.2)	AAGATAAAAAGTAGCACACGCA
特异性外侧引物 (C984.3)	GCAGACACCGCCGTAGAATG
特异性内侧引物 (C984.4)	TACGGGGCAACGAAGCAGGA
锚定引物	GACCACGCGTATCGATGTGCGAC
<i>As-SesTPS</i> 基因上游引物 (HC1)	ATGGCAGAGACGAATCGTCCTC
<i>As-SesTPS</i> 基因下游引物 (HC2)	TTAATCGAGAGGGAGCTGGTGAACG
<i>GAPDH</i> 基因上游引物 (F1)	TTGGCATCGTTGAGGGTCT
<i>GAPDH</i> 基因下游引物 (R1)	CAGTGGGAACACGGAAAGC

2 方法

2.1 白木香总 RNA 的提取

取 600 μ L 改良异硫氰酸胍-CTAB 提取液加入 1.5 mL 离心管中,加 β -巯基乙醇至 8%,震荡混匀;取适量样品用液氮充分研磨后,迅速分装到提取液中,每管不超过 100 mg,剧烈震荡 20 s,室温静置

5 min;继续加入 600 μ L 抽提液 I,剧烈震荡 20 s,12 000 r/min 离心 10 min;取上清至新的 1.5 mL 离心管,加入等体积的抽提液 I 再抽提 1 次,12 000 r/min 离心 5 min;取上清至新的 1.5 mL 离心管中;加入等体积的抽提液 II,剧烈震荡 20 s,12 000 r/min 离心 8 min;取上清至新的 1.5 mL 离心管中,加入

1/2 体积的无水乙醇, 与上清等体积 4 mol/L LiCl, 加 β -巯基乙醇至终体积分数为 1%, 反复颠倒混匀, -30°C 静置 4 h 或过夜, 12 000 r/min 离心 10 min; 沉淀溶于适量 DEPC 处理水中, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc-HAc, 混匀后, 加入 3 倍体积无水乙醇, -30°C 静置 30 min, 12 000 r/min 4°C 离心 10 min; 弃上清, 用 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次; 沉淀溶于 30 μL DEPC 处理水中, 用 DNase I 处理降解残留 DNA, 非变性琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性, 紫外可见分光光度计测定纯度和浓度, -80°C 保存备用。

2.2 白木香 cDNA 第一条链的合成

在冰浴的无核酸酶离心管中加入 4 μg 总 RNA, 2 μL dT 锚定引物, 2 μL 2.5 mmol/L 超纯 dNTP, 补 DEPC 处理水至 14.5 μL ; 70°C 加热 5 min, 冰上冷却 2 min, 离心收集反应液; 加入 4 μL $5\times$ 第一链合成缓冲液, 5 μL RNA 酶抑制剂 (RNasin), 1 μL TIANScript M-MLV, 轻轻用移液器混匀; 42°C 温浴 50 min, 95°C 加热 5 min 终止反应, -20°C 保存备用。

2.3 白木香 As-SesTPS 长片段的获得

根据前期转录组测序获得的 1 966 bp 的 CL984. Contig1_B1 序列 (KF135951), 用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物, 上游引物 C984.1, 下游引物 C984.2。以反转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系 25 μL , 其中引物 C984.1 和 C984.2 各 1 μL , $10\times$ Ex Taq 缓冲液 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 2 μL , 模板 cDNA 1 μL , Ex Taq DNA 聚合酶 0.15 μL , 补 dddH₂O 至 25 μL 。反应条件为 94°C 预变性 2 min, 94°C 变性 45 s, 56°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min 30 s, 30 个循环后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收纯化, 克隆至 pMDTM 19-T Vector 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 菌落 PCR 验证阳性克隆, 送菌液测序, 测序工作由上海美吉生物广州分公司完成。对测序获得的长片段进行 ORF Finder 分析, 确定是否获得全长 ORF。

2.4 白木香 As-SesTPS 3'末端序列的获得

根据“2.3”项获得的长片段设计一对 3'末端巢式引物进行 3'RACE 扩增。特异性外侧引物 C984.3, 内侧引物 C984.4。25 μL 反应体系扩增第一条链, 使用锚定引物和外侧引物 C984.3 各 1 μL , $10\times$ Ex Taq 缓冲液 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 2 μL , 模板 cDNA 1 μL , Ex Taq HS DNA 聚合酶 0.15 μL , 补 dddH₂O 至 25 μL , PCR 反应条件同“2.3”项方法。25 μL 反应体系扩增第 2 条链, 使用锚定引物和内侧引物 C984.4 各 1 μL ,

$10\times$ Ex Taq 缓冲液 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 2 μL , 模板为稀释 50 倍后的第一条链扩增产物, 取 1 μL , Ex Taq HS DNA 聚合酶 0.15 μL , 补 dddH₂O 至 25 μL , PCR 反应条件同上。巢式 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后, 参照“2.3”项切胶回收、克隆, 菌液送上海美吉生物广州分公司测序。

2.5 白木香 As-SesTPS 基因全长的拼接与验证

使用 Lasergene 7.1 的 SeqMan 软件对 As-SesTPS 长片段和 3'末端序列进行拼接, 将获得的 Contig 序列上传到 NCBI 的 ORF Finder 平台 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), 确定是否获得全长 ORF。将确定的 ORF 片段上传到 NCBI 的 CD-search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 对预测的氨基酸序列进行保守区域搜索, 验证该 ORF 片段是否完整。

2.6 白木香 As-SesTPS 基因的生物信息学分析

使用 Lasergene 7.1 的 EditSeq 软件将 As-SesTPS 基因翻译成氨基酸序列, 并用 NCBI 的 Nr 数据库进行 BLASTp 分析, 获得相似度最高的序列, 预测编码蛋白质; 使用 GENEDOC 软件对预测的氨基酸序列与相似度最高的 5 条序列进行保守序列分析; 使用 MEGA5 软件将预测的氨基酸序列与 GenBank 上的其他序列进行系统进化分析, Neighbor-Joining (邻位相连, NJ) 法构建系统进化树; ExPASy 在线服务器的 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白质的基本理化性质; PSORT 服务器 (<http://wolfsort.org/>) 预测蛋白质的亚细胞定位; SOPMA 软件 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page\]=/NPSA/npsa_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page]=/NPSA/npsa_sopma.html)) 进行蛋白质二级结构分析; 使用 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维结构预测。

2.7 白木香 As-SesTPS 基因的表达分析

根据全长 ORF 序列, 设计可扩增 As-SesTPS 基因全长的特异性引物 HC1 及 HC2, 预计扩增长度为 1 629 bp, 并合成 GAPDH 基因引物 F1 及 R1^[10] (表 1), 预计扩增长度为 206 bp。白木香结香后在树干由外到内依次刨下不同的木材样品, 外围未变色的白色木材为白木样品 (W), 向内与白木部分具明显界限的木材为过渡样品 (T), 再向内与 T 样品相邻的深棕色木材为结香样品 (A), 以及最内侧已腐烂的部分为腐木样品 (D) (图 1), 分别按“2.1”项及“2.2”项方法提取 RNA 后反转录为 cDNA。利用 HC1 及 HC2 扩增 As-SesTPS 基因, 利用 F1 及

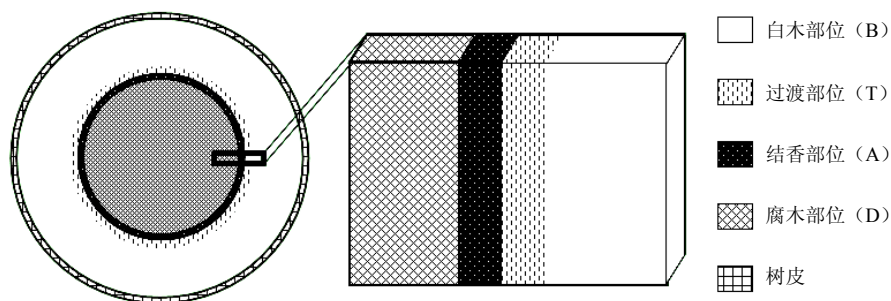


图 1 结香后白木香树干横切面及部分径切面示意图

Fig. 1 Schema of cross section and segmental radial section of *A. sinensis* trunk after agarwood formation

R1 扩增 GAPDH 基因, 反应条件同“2.3”项。取 5 μ L PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检查。

3 结果与分析

3.1 白木香总 RNA 的提取

使用改良异硫氰酸胍-CTAB 法提取同一批 7 份 (1~7) 沉香提取总 RNA, 非变性琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示, 28 S、18 S 条带清晰, 前者比后者亮, RNA 完整性较好, 经紫外分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 值为 2.09, A_{260}/A_{230} 值为 2.32, RNA 纯度较高。

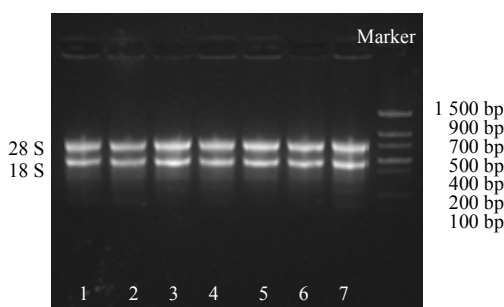


图 2 白木香总 RNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of total RNA in *A. sinensis*

3.2 白木香 As-SesTPS 基因的获得

前期转录组测序获得长 1 966 bp 的 CL984.Contig1_B1 序列 (KF135951), 经 BLAST 分析后发现其可能编码倍半萜合成酶, 根据该序列设计引物, 扩增得到 1 669 bp 的长片段, 经 NCBI 上的 BLASTx 分析, 发现该片段与多种植物倍半萜合成酶有较高的同源性。将该片段进行 ORF Finder 分析, 确定其第 35 位 ATG 作为该片段的起始密码子, 但是未找到其终止密码子。为确定其终止密码子, 对该基因进行了 3'RACE 末端扩增, 获得 453 bp 的短片段。然后使用 Lasergene 7.1 的 SeqMan 软件进行序列拼接, 获得长 1 905 bp 的 cDNA 序列, 对

该序列进行 ORF 查找, 确定了 1 629 bp 的完整 ORF 片段, 推导的氨基酸序列含 542 个氨基酸 (终止密码子不编码氨基酸), 并命名为 As-SesTPS (KF135950), 结果见图 3。

3.3 白木香 As-SesTPS 基因编码蛋白质的相似性分析

As-SesTPS 基因编码的氨基酸序列经 NCBI 的 CD-search 分析后, 发现该序列可比对上多个萜类合成酶的保守结构域, 初步认定该基因编码萜类合成酶类蛋白, 分析结果见图 4。

编码的氨基酸序列经 BLASTp 分析, 获得与其相似性较高的蛋白, 其中与葡萄 *Vitis vinifera* L. 的大根香叶烯-D 合成酶 [(-)-germacrene D synthase, Q6Q3H3] 相似性最高, 达 68%, 一致性达 50%。使用 GENEDOC 软件将该氨基酸序列与比对上的前 5 条不同物种的蛋白质序列进行比对, 结果如图 5 所示, 相似性由高到低分别是葡萄的大根香叶烯-D 合成酶、 β -石竹烯合成酶 [(E)- β -caryophyllene synthase, AEP17005], 箭叶橙 *Citrus hystrix* DC. 的大根香叶烯-D 合成酶 (germacrene D synthase, ADX01384), 杂交杨 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray $\times$ *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. 的大根香叶烯-D 合成酶 [(-)-germacrene D synthase, AAR99061], 毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray 的萜类合成酶 (terpene synthase 1, AEI52901.1), 分析发现 As-SesTPS 基因编码的氨基酸序列具有萜类合成酶特有的 RRx_8W 保守序列, 富含天冬氨酸 (Asp) 的 $DDxxD$ 保守序列, 可进一步确定其编码萜类合成酶类蛋白。

3.4 白木香 As-SesTPS 基因编码蛋白质的同源性分析

As-SesTPS 基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中其他物种的萜类合成酶序列 (共 48 条) 进行同源性分析, 构建系统进化树。结果如图 6 所示, 根据

萜类合成酶氨基酸序列的相关性与功能评价, 萜类合成酶家族被划分为 7 大亚家族: TPSa~TPSg^[11], 而 *As-SesTPS* 编码的蛋白质与其他被子植物的倍半萜合成酶被分在 TPSa 家族, 可确定该基因编码倍半萜合成酶类蛋白。

3.5 白木香 *As-SesTPS* 基因编码的蛋白质结构与功能预测

通过 ExPASy 平台对 *As-SesTPS* 编码蛋白质进行理化性质分析, 预测其相对分子质量为 6.280×10^4 , 等电点为 5.26, 为酸性蛋白质, 总负电荷残基

```

ATAGCCTACTCTCCTGAAGCATGGATGATAGCTATGCGAGAGACGAATCGTCTCTTGCGCATTTCCAGGCCAACATCTGGGAGGAACA 90
TTTCATATCATCCCCTCTTCTTCATCTGGAACCGGAGCAAGCATCGAAGCACCAAAAGCTGAAGGAACAGGTGAGGGAACCTTTATTAGC 180
TGGACTGGACAGCCTTGGGAACAACCTGGACTTGTATCGACTCGATCCAGCGCTCAGGTGTAGCTTACCATTTTCGAGGATGAATTCGAAAN 270
G L L S L H E A K C M R L H G E D V L E O A F D F T T T V L N
CCTCTTGCAGAGAAATTCACAAGAATCTCGATACTTGCCTTGAAGAAAACGACAACCTCCATTTTATTCGCTGTTGTTTCTGCTTGTAG 360
L L O R I H K N L D T T C L E N D N L H F I S L L F R L L R
GCAATCAAGCCTAACTGTTTCATGCGACGTTTTTAACAAGTTTAAGGATGACAGTGGGAAGTTGAAGGAATCTCTGATTGAAGATGTTAT 450
Q S S L T V S C D V F N K F K D D S G K L K E S L I E D V I
AGGGCTGTGAGCTTGCATGAGGCTGCATGCATGAGGCTACATGAGGAAGATATACCTTGAAACAGGCATTTGATTTACCCACGACCTACCT 540
G L L S L H E A K C M R L H G E D V L E O A F D F T T T V L N
CAATCCATTGTAGAGGACACATCTTCAAGCTCGAACTCGCAGCACAAAGCAAGTCAGGCGTTGAAGTACCTGTTCGGAAGAACATCCC 630
K S I V E D T S S S S K L A O A S G A L K Y F V R K N I P
AAGACTGGAGGCTAAGTACTATCTCTGTGTATCCTTTGCTCAACAATCCTGTTGTAATGACTTTCGCTAAGTTGGACTTCAATATCTT 720
R L E A K Y Y I S V Y P L L N N P V V L T F A K L D F A N I L
ACAAAAGTTGCACCAAAACGAGCTAAGAGAGATAGTAAGGTGGTGAAGATTTGGATATTCCAAGGAGACTACCATATGCAAGGATAG 810
O A K L H Q N E L R E I V R W W K D L D I P R R L P Y A R D R
AATAACGGAAATATTCTTTTGGGCAATAGGGGTGTATTATGAGCCTTGTACGCACTGGGTAGGAAGATATTGACCAAAAGTTTGTCTCT 900
I T E L F F W A I G V Y Y E P C Y A L G R K I L T K V F A L A
TACTTCTTTTCTTGACGACATGTACGATGCTTATGGGACAATTGAAGAACTGGAGCTTCTTACACAAGCCATTCAAAGGTGGGATAGAAA 990
T S F L D D M Y D A Y G T I E E L E L T O A I O R W D R N
TGCAATGGATGGTTGAATAATAAGTGCAGCAAGAGTTATATCAGATTTTGTGGATGTGTATGATGAAATGGAGAGGACATGGCCAA 1 080
A M D G L N N K C S K E L Y Q I L L D V Y D E I G E D M A K
ACTTGGGAAATCCTATCGCCTCACTACGCTGTAGAAATGATGAAGAACTTACTTGACAGAAGCTAGATGTTTCAGGCA 1 170
L G K S Y R L N Y A V E M M K G O A R T Y L T E A R W F S Q
AAACTATACACCTACATTCGAGGAGTACCTTAAGCGGGGAATCAACACTAGCGCTTGCCTCTACTCACACTGTCGCTTTGCTTGGGAT 1 260
N Y T P T F E E Y L K R G I N T S A C P L L T C T A C T A A C C G G A A G A C T C G C A G A
AGGAGACGATATAAGCAGAGATGCTTTTGTGAGTGGATCTTGTCCACCCCAAGAGTCTCATTGCTTCTTCACTAACCAGGAGACCTCGCAG 1 350
G D D I S R D A F E W I L S T P K S L A T I A S A A A G A G T A C G G G C A A C G A A G C A
TGACATAATGAGCCATGAGTTTGAGAAGAAGAGGGGACGACGAGACACCGCGTAGAATGTTACATGAAAGAGTACGGGGCAACGAAGCA 1 440
D I M S H E F E K K R G H A D A V E C Y M K E Y G A T T K O
GGAAACAGTGAAGGAGTTGTACAAGCAATTGAAAGTGATGGAAGGACATGAATGAAAGCTTTTGCACCAACAGAGGTTCCCAAGGC 1 530
E T V K E L Y K R D E S A W K D M N E L O P V E V P A K A
AGTGCTCATGCGAGTGCTCACTTCAACCGCTGTAAAGGTCGTGTATGCCGATGCCGATGCCTACACCTTTCCTGATTATCTCAAGGA 1 620
V L M R V L N F T R C N Q V V Y A D A D A Y T F P D Y L K D
CTTTGTGGCTGTCTTGTCTGCTTACCAGCTCCCTCTCGATTAATCACTACCTCTCTCTCCCTCCCTGTCGCTGTGCTACTTTTATCTTTT 1 710
F V A A L L V H Q A L P L D
TGTGCTGTGTGAGAATAATTAGCCTGTGAAGAGCCGATTGATATATATAGGTTTCTTATTACCCAGGCAGAAAGTTGTGTGCTAAATTT 1 800
TCAATGTAATATATATACCTACATGCATGTTTATATATGTGGAATAATAAATGAAGCTTATGTATGATATAGCTTACTTTGGAAGAGGC 1 890
AAAAAAAAAAAAAA 1 905

```

图 3 *As-SesTPS* 基因核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequences of *As-SesTPS* gene

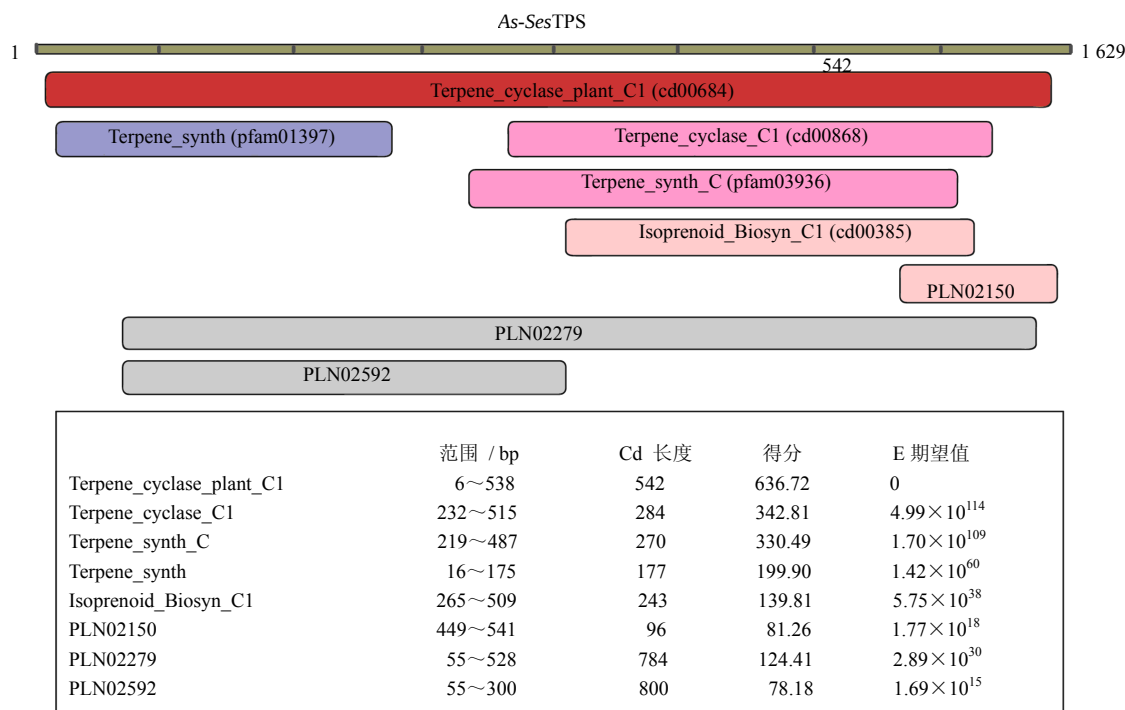
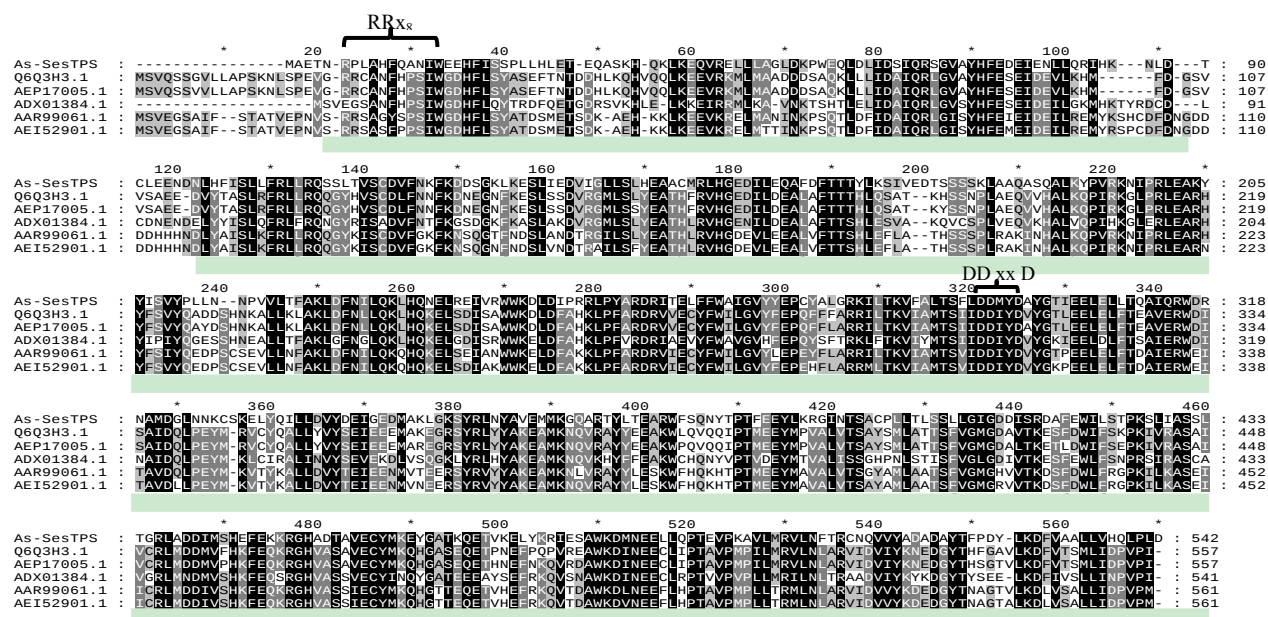


图 4 *As-SesTPS* 基因的 CD-search 结果

Fig. 4 CD-search results of *As-SesTPS* gene



黑色阴影表示完全相同，灰色阴影表示部分相同

Black shadow means completely consistent, gray shadow means partial consistent

图 5 As-SesTPS 编码蛋白与其他物种倍半萜合成酶蛋白的相似性分析

Fig. 5 Similarity analysis of As-SesTPS-coding protein and other sesquiterpene synthase proteins

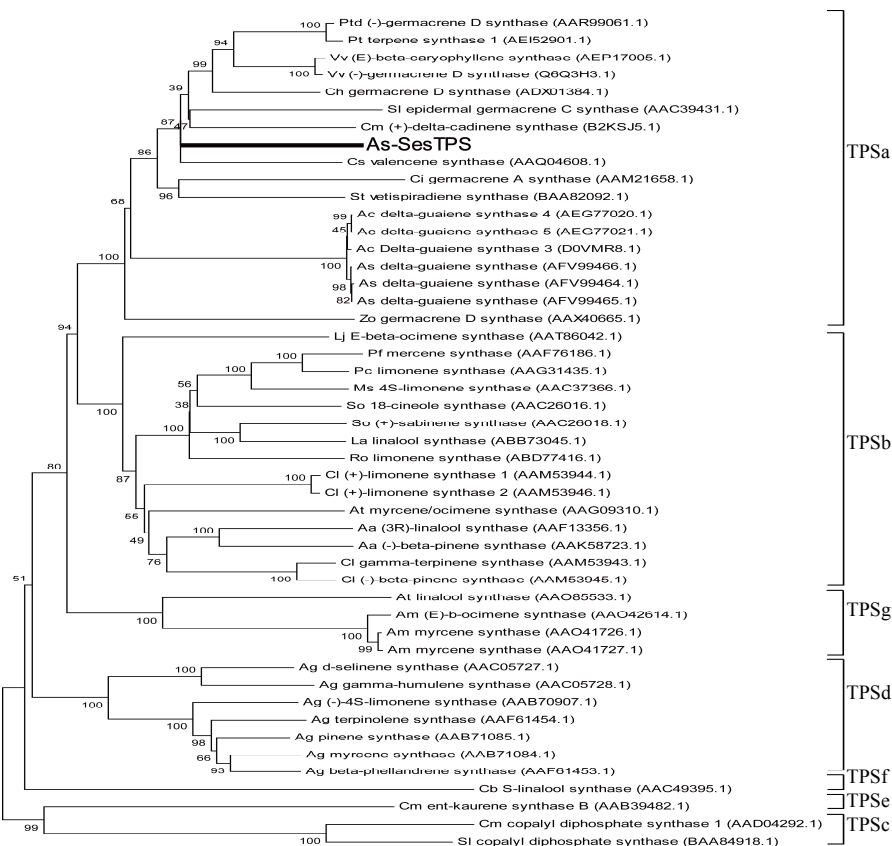


图 6 植物萜类合成酶基因家族系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of plant terpene synthase gene family

(Asp+Glu) 数为 82, 总正电荷残基 (Arg+Lys) 数为 63。其半衰期在体外哺乳动物网织红细胞为 30 h, 在酵母体内大于 20 h, 在大肠杆菌体内大于 10 h。不稳定系数为 47.14, 为不稳定蛋白。对该氨基酸序列进行亲疏水性分析, 结果如图 7 所示, 横坐标表示氨基酸残基的序号, 纵坐标表示残基的疏水、亲水特性, 正值疏水, 负值为亲水。总平均疏水指数 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.303, 预测其为亲水性蛋白。通过 TMHMM 软件分析得知, 该编码蛋白无跨膜区域, 全部位于膜外。通过 PSORT 服务器的分析, 初步判断 As-SesTPS 蛋白定位于细胞质中。运用 SOPMA 软件预测 As-SesTPS 蛋白的二级结构, 表明该蛋白含有 385 个 α 螺旋, 占 71.03%; 27 个延伸链, 占 4.98%; 16 个 β 折叠, 占 2.95%; 114 个无规卷曲, 占 21.03%。As-SesTPS 基因编码蛋白质的三维结构见图 8。

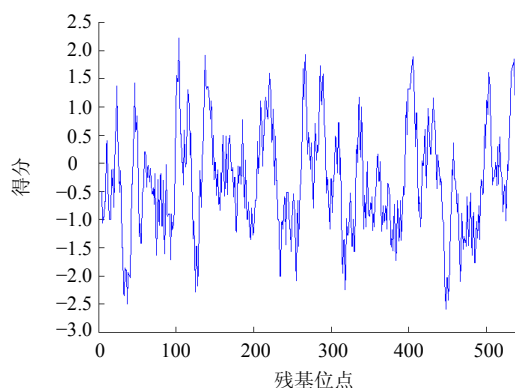


图 7 As-SesTPS 编码蛋白的亲水性分析

Fig. 7 Hydrophilicity analysis of As-SesTPS-coding protein

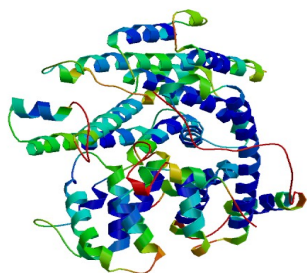


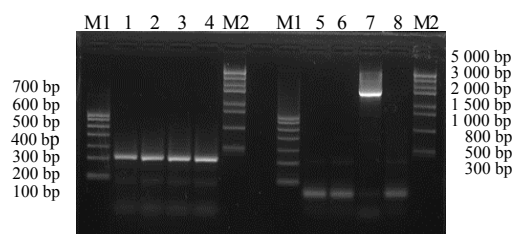
图 8 白木香 As-SesTPS 蛋白三级结构同源建模

Fig. 8 3D structure of As-SesTPS protein in *A. sinensis* predicted by Swiss-model

3.6 白木香 As-SesTPS 基因的表达

PCR 结果显示结香后白木香树干中的不同部位, 均能检测到符合预期大小的 GAPDH 基因片段, 亮度基本一致, 说明用于模板的 cDNA 量基本一致,

而 As-SesTPS 基因仅能在结香样品 (A) 中检测到明显的符合预期大小的目的条带, 而在其他部位均无明显符合预期的目的条带, 说明 As-SesTPS 基因主要在结香部位表达 (图 9)。



M1-Trans DNA Marker I M2-Trans DNA Marker III GAPDH 扩增结果: 1-W 样品 2-T 样品 3-A 样品 4-D 样品; As-SesTPS 扩增结果: 5-W 样品 6-T 样品 7-A 样品 8-D 样品
M1-Trans DNA Marker I M2-Trans DNA Marker III
Amplification results of GAPDH: 1-W sample 2-T sample 3-A sample 4-D sample; Amplification results of As-SesTPS: 5-W sample 6-T sample 7-A sample 8-D sample

图 9 结香后白木香树干不同部位中 GAPDH 和 As-SesTPS 基因的表达

Fig. 9 Expression of GAPDH and As-SesTPS genes in different parts of *A. sinensis* trunk after agarwood formation

4 讨论

根据合成产物的不同, 萜类合成酶 (terpene synthase, TPS) 可分为单萜合成酶、倍半萜合成酶和双萜合成酶等, 它们分别以香叶基二磷酸 (geranyl diphosphate, GPP) 或橙花基二磷酸 (neryl diphosphate, NPP)、法尼基二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 和香叶基香叶基二磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 为底物合成相应的单萜、倍半萜和二萜^[12]。萜类合成酶在空间结构上有很高的相似性, 含有 C-末端结构域和 N-末端结构域, C-末端结构域是酶的活性中心, 含有 1 个由 6 个 α -螺旋组成的疏水区域, N-末端结构域没有特殊功能, 该区域对 C-末端活性区域起到正确折叠的作用^[13]。另外, 几乎所有的萜类合成酶都有富含 Asp 的基序 DDxxD 和 RRx₈W 保守序列^[14]。本研究获得的 As-SesTPS 编码蛋白也含有该保守序列, 且经 NCBI 的 CD-search 分析后可发现其 C-末端含有多个活性位点, 与一般的萜类合成酶结构类似, 初步判定其编码萜类合成酶基因。有研究发现萜类合成酶家族 (TPS 家族) 分为 7 个亚家族 (TPSa~TPSg), 本研究的 As-SesTPS 基因编码的蛋白质与其他物种的倍半萜合成酶一起被分在了

TPSa 家族中,说明其可能编码倍半萜合成酶类蛋白, Blast 分析后确定与葡萄的大根香叶烯-D 合成酶相似性达 68%,一致性达 50%,可能编码同类型的蛋白质。根据结香后白木香树干中不同部位的表达情况及数字基因表达谱结果,该基因在同一株白木香的结香部位与非结香部位中的表达量差异明显,几乎仅在结香部位表达,这与该基因合成倍半萜的功能相符。

目前白木香中倍半萜生物合成功能基因的研究较少,本研究首次从白木香中克隆了可能编码大根香叶烯-D 合成酶的基因,生物信息学分析结果表明该基因具有倍半萜合成酶活性所必需的多肽位点,进一步确定其编码倍半萜合成酶基因,为国产沉香倍半萜生物合成代谢途径的研究提供参考。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 156-159.
- [3] 杨峻山. 沉香化学成分的研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1998, 10(1): 99-103.
- [4] 刘军民, 徐鸿华. 国产沉香研究进展 [J]. 中药材, 2005, 28(7): 627-632.
- [5] Kumeta Y, Ito M. Characterization of δ -guaiene synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(4): 1998-2007.
- [6] Xu Y, Zhang Z, Wang M, et al. Identification of genes related to agarwood formation: transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 227.
- [7] Xu Y H, Yang X, Wei J H, et al. Cloning and expression analysis on 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase from *Aquilaria sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(3): 182-188.
- [8] 吴宏清, 王磊, 陶美华, 等. 化学诱导后白木香转录组文库的构建与测序 [J]. 生物技术通报, 2013(8): 63-67.
- [9] 王磊, 章卫民, 高晓霞, 等. 一种人工诱导白木香产生沉香的方法: 中国, CN102302041A [P]. 2012-01-04.
- [10] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 植物学报, 2010, 45(5): 579-587.
- [11] Dudareva N, Martin D, Kish C M, et al. (E)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(5): 1227-1241.
- [12] Schilmiller A L, Schauvinhold I, Larson M, et al. Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(26): 10865-10870.
- [13] Degenhardt J, Köllner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(15): 1621-1637.
- [14] Martin D M, Fäldt J, Bohlmann J. Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(4): 1908-1927.