

3种瞬时表达体系研究1个白木香倍半萜合酶的亚细胞定位

赵文婷^{1,2}, 魏建和^{1,4}, 孟冬³, 刘晓东², 高志晖^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

3. 中国农业大学, 北京 100193

4. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海南 万宁 571533

摘要: **目的** 研究1个白木香倍半萜合酶(ASS)的亚细胞定位, 确定其功能区域, 并比较3种瞬时表达体系在亚细胞定位研究中的优劣。 **方法** 从白木香愈伤组织中提取总RNA, 采用特异引物RT-PCR方法克隆倍半萜合酶ASS基因, 并连接于pEVS-NL载体和pFGC5941GFP改造载体上, 分别构建pFGC5941-GFP-ASS、pEVS-NL-ASS-GFP 2种植物表达载体, 分别利用根癌农杆菌侵染烟草叶片、基因枪轰击洋葱表皮细胞、PEG转化白木香原生质体3种技术进行瞬时转化表达, 激光共聚焦显微镜下观察表达出的绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白的亚细胞定位。 **结果** 在烟草叶片表皮细胞、洋葱表皮细胞及白木香原生质体中, 融合蛋白绿色荧光均能被观察到。ASS基因与GFP的融合蛋白产物在烟草叶片中定位于胞质, 在洋葱表皮中定位于胞质和细胞核, 白木香原生质体中定位于胞质和质体。 **结论** ASS基因在白木香原生质体胞质及质体定位; 对3种体系的结果比较表明, 应用不同体系研究蛋白的亚细胞定位可能出现不同的结果, 这可能与同源或异源表达的植物细胞的特性有关。

关键词: 白木香; 倍半萜合酶; 亚细胞定位; 瞬时表达技术; RT-PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)23-3379-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.022

Subcellular localization of a sesquiterpene synthase from *Aquilaria sinensis* utilizing three transient expression systems

ZHAO Wen-ting^{1,2}, WEI Jian-he^{1,4}, MENG Dong³, LIU Xiao-dong², GAO Zhi-hui¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

3. China Agricultural University, Beijing 100193, China

4. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Hainan Branch, Institute of Medicinal Plant Development Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Wanning 571533, China

Abstract: Objective To investigate the subcellular localization of a sesquiterpene synthase from *Aquilaria sinensis* (ASS) and compare three transient expression systems in the subcellular localization study. **Methods** An ASS gene was amplified by RT-PCR using specific primers and cloned into the pEVS-NL and pFGC5941GFP to generate two plant expression vectors: pEVS-NL-ASS-GFP and p5941-GFP-ASS. Three transient expression systems, agroinfiltration of tobacco leaves, particle bombardment of onion epidermal cells, and PEG transformation of protoplasts isolated from ASS calli were adopted and compared. The expression of the GFP fusion proteins were observed by a confocal laser scanning microscopy. **Results** The green fluorescence could be observed in all the three systems. However, the results were comparatively different. The cytoplasm and plastid localization of the GFP fusion protein observed in protoplasts was comparatively clear and was consistent with the studies in other plant species. **Conclusion** The results

收稿日期: 2013-07-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001607, 81173481); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(2008); 协和学者特聘教授计划(医科人发[2012]282号)

作者简介: 赵文婷(1987—), 女, 硕士研究生。E-mail: pingting19870911@126.com

*通信作者 高志晖 E-mail: zhgao@implad.ac.cn

demonstrate that the ASS is located in the cytoplasm and plastid in the ASS protoplasts and the different locations in three systems might be caused by the distinct characters of the heterologous or homologous cells.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour.); sesquiterpene synthase; subcellular localization; transient expression technology; RT-PCR

沉香是中国、日本、印度以及其他东南亚国家的传统名贵药材和天然香料^[1],因独有一种龙涎香与檀香混合的香味,这种混合香味目前仍无法人工合成,因而更显得其稀有珍贵,在世界上已有几百年的应用及文化史。沉香属植物具有受到外界伤害才结香的特点,导致沉香资源急剧减少。沉香形成分子机制的研究对于保护沉香资源、促进沉香产品的可持续供应意义重大,本课题组前期已经进行了部分探索性研究^[2-3]。沉香的主要成分之一是倍半萜^[4-5],它在植物体内的生物合成途径属于类异戊二烯代谢途径中的倍半萜类分支途径。倍半萜合酶是合成倍半萜类次生代谢最终产物的关键酶,催化前体底物法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)形成倍半萜^[6]。Kumeta等^[4]从沉香属 *Aquilaria* Lam. 的越南沉香 *Aquilaria crassna* Pierre. cDNA 文库中筛选并鉴定了4个倍半萜合酶,但并未揭示其在细胞中的功能区域。

蛋白亚细胞定位研究是分析蛋白质正确行使其功能的前提,是系统理解植物形态建成、生长发育以及对逆境的耐受性和抵抗性不可缺少的环节,也是研究者初步推断蛋白质生物学功能的重要信息的重要措施之一,是确保应用该基因对植物进行遗传改造成功的不可或缺的研究基础。但是沉香属倍半萜合酶基因的亚细胞定位研究却未见报道。本研究从白木香中克隆了1个白木香倍半萜合成酶(ASS)基因,首次利用3种方法对该倍半萜合酶的亚细胞定位进行研究,以揭示其在细胞中的功能区域,为探讨白木香结香的分子机制和认识相关倍半萜合酶基因在白木香结香过程中的作用以及后续应用建立基础。

1 材料

1.1 植物材料

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) 由中国医学科学院药用植物研究所魏建和教授鉴定,愈伤组织为中国医学科学院药用植物研究所药用植物基因资源与分子育种实验室培养,烟草为人工气候箱培养,洋葱购自市场。

1.2 质粒、菌株和试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* Theodor Escherich 菌株 DH5 α 购自北京天根生化科技有限公司,根癌农

杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 EHA105 由 GRAMBL-80 °C 冰箱保存。瞬时表达载体 pEVS-NL 由中国农业大学果树系贾文锁教授惠赠, pFGC5941GFP 改造载体为 GRAMBL 保存。反转录酶 M-MLV、RNA 酶抑制剂购自 Promega (美国) 公司, 内切酶 Sac II、Avr II 购自 NEB (北京) 有限公司, 引物 Oligo dT、Prime STAR MAX Premix、SalI、SmaI、pMD18-T simple vector、dNTP、DNA Marker、T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司, E. Z. N. A.® Plant RNA Kit 购自美国 Omega 生物技术公司, 氨苄青霉素、卡那霉素、利福平和普通质粒小量提取试剂盒、无内毒素质粒大量提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, 所用引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

1.3 仪器

PDS1000/He 型基因枪 (Bio-Rad), 激光共聚焦显微镜 (OLYMPUS CONFOCAL FV1000), Olympus-BX51 显微镜, Thermo 公司的 NanoDrop 2000 紫外可见分光光度计。

2 方法

2.1 ASS 基因的克隆

根据 OMEGA 植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取白木香愈伤组织总 RNA。以 mRNA 为模板合成 cDNA, mRNA 1.0 μ g、引物 Oligo dT 1.0 μ g, 70 °C 温浴 5 min, 冰上冷却 2 min 后, 加入 5 $\times$ 缓冲液 5 μ L、Rnase Inhibitor 0.6 μ L、dNTP 1.25 μ L、M-MLV 1 μ L, 混匀后 70 °C 温浴 1 h; 参考引物^[3]扩增, 反应体系为 20 μ L: cDNA 2 μ L, 20 μ mol/L 的引物各 0.5 μ L、Prime STAR MAX Premix 10 μ L。反应参数为 98 °C 预变性 5 min, 98 °C、10 s, 53 °C、15 s, 72 °C、2 min, 35 个循环。琼脂糖凝胶电泳检测后回收产物进行加 A 程序 (30 μ L): Taq DNA Polymerase 0.75 μ L、10 $\times$ Taq 缓冲液 3 μ L、dATP 0.3 μ L、胶回收产物 26 μ L, 混匀后置于 72 °C 温浴 1 h, 琼脂糖凝胶电泳检测后回收目标片段, 连入 pMD18-T simple vector, 转化大肠杆菌后测序。

2.2 亚细胞定位载体的构建

将 ASS 基因使用加入酶切位点后的引物 (表 1)

扩增，并连入 pMD18-T simple vector，转化大肠杆菌后测序。酶切后连入 pEVS-NL 载体 SacII、SalI 酶切位点和 pFGC5941GFP 改造载体的 AvrII、SmaI 酶切位点，T4 DNA 连接酶分别连接到 pEVS-NL 和

pFGC5941GFP 改造载体，转入 DH5α，PCR、酶切筛选阳性克隆，并对阳性克隆进行测序验证，分别得到 GFP 与 GFP 和 ASS 基因融合蛋白的植物瞬时表达载体和双元表达载体（图 1）。

表 1 载体构建所用引物序列
Table 1 Primers used in vector construction

引物名称	序列 (5'-3')	大小 / bp	载体
ASSshunshi-f	<u>GTCGAC</u> ATGTCTTCGGCAAAAC	22	pEVS-NL
ASSshunshi-r	CCGCGGATTTCAATAGCAT	20	
ASS-5941l	<u>CCCGGG</u> ATTTCAATAGCAT	20	pFGC5941GFP
ASS-5941u	CCTAGGATGTCTTCGGCAAAACTA	24	

下划线为添加的酶切位点，GTCGAC 为 Sal I、CCGCGG 为 SacII、CCCGGG 为 SmaI、CCTAGG 为 Avr II
Underlined sequences are the enzyme digest sites. Sal I GTCGAC, Sac II CCGCGG, SmaI: CCCGGG Avr II: CCTAGG

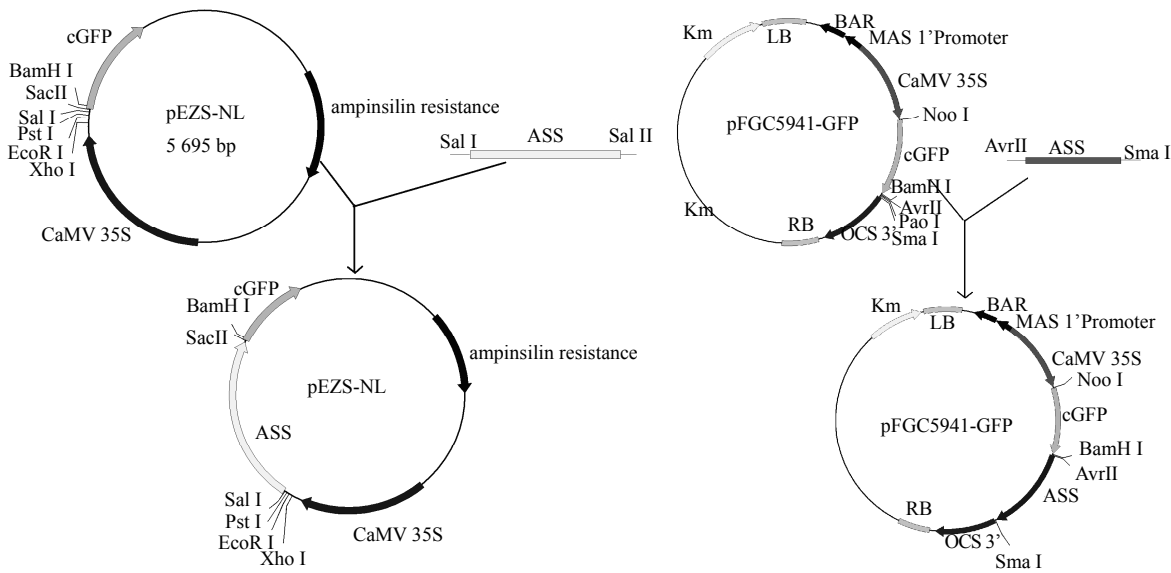


图 1 ASS 亚细胞定位研究载体构建方法
Fig. 1 Strategies of vector construction for subcellular localization study of ASS

2.3 农杆菌法转化烟草叶片

CaCl₂ 法制备农杆菌 EHA105 感受态细胞，把 1 μL pFGC5941-GFP 与 pFGC941-GFP-ASS 2 种质粒各加入 50 μL 农杆菌感受态菌液中，冻融法进行转化；挑取农杆菌单菌落分别置于含相应抗生素的 YEB 液体培养基中，于摇床中 28 ℃ 200 r/min 过夜摇培 24~36 h；取摇好的菌液进行 PCR 检测。取 PCR 验证的农杆菌单菌液培养至 A₆₀₀=0.8~1.0，10 000 r/min 离心 1 min，弃上清液收集菌体，用悬浊液（10 mmol/L MES-KOH，10 mmol/L MgCl₂，0.1 mmol/L；acetosyringone）重悬，调节 A₆₀₀=1.0，室温静置 4 h，农杆菌注射法侵染生长状态良好，健壮的烟草叶片；

重悬菌体，用没有针头的 1 mL 注射器吸取菌液；避开叶脉，用注射器针在叶片上开小孔后，用装有菌液的注射器压住小孔，慢慢用力，将菌液注射入叶片中，3~5 d 后观察。

2.4 基因枪法转化洋葱表皮细胞

取金粉悬液 8.5 μL（0.06 mg/L），加入 8.5 μL CaCl₂（2.5 mol/L）、3.5 μL 亚精胺（0.1 mol/L）和 5 μg 的 pEVS-NL-ASS-GFP 质粒振荡混匀，室温静置 10 min，10 000 r/min 离心 20 s，弃上清液，无水乙醇洗涤沉淀 2 次，重新悬浮沉淀于 10 μL 无水乙醇中。将幼嫩的洋葱表皮摆放在 1/2 MS 培养基上，选用 7.58 MPa 的压力膜，将 10 μL 金粉 DNA 混合物点在轰击

膜中央, 基因枪轰击, 轰击距离 6 cm, 真空度 0.083 mPa。后于 25 °C 暗培养 16~20 h, 激光共聚焦显微镜下观察。

2.5 PEG 法转化白木香原生质体

无内毒素质粒 DNA 提取: 将转化后的 pEVS-NL-ASS-GFP 菌液离心收集, 按照天根生化科技有限公司提供的无内毒素质粒大提试剂盒说明书进行质粒提取, 酶切, PCR 验证质粒, 并利用紫外分光光度计检测质粒浓度。

游离白木香原生质体: 取长势较好的白色松嫩的白木香愈伤组织置于酶液[(9%纤维素酶、2%离析酶、1.5%半纤维素酶、0.01%果胶酶、0.4 mol/L 甘露醇、0.02 mol/L KCl、0.02 mol/L 2-*N*-吗啡啉乙磺酸缓冲液 (MES)、0.1 mol/L CaCl₂、0.1% 牛血清蛋白)]中; 上下颠倒混匀离心管, 置于 30 °C、100 r/min 的摇床上进行酶解。6 h 后取出酶解液用 300 目的纱网过滤酶解液到新的 10 mL 离心管中, 每管各 3 mL。将过滤好的酶解液于离心机中 100×g 离心 3 min 后, 去掉少量上清液; 向离心管中加入 3 mL W5 漂洗液 (154 mmol/L NaCl, 125 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L MES), 上下混匀后, 于离心机中 200×g 离心 3 min, 去掉上清液, 重复 1 次。将 3 管合为 1 管后于离心机中 200×g 离心 3 min, 尽量去除上清液, 显微镜观察原生质体产量约 150~200 个/μL;

PEG 转化: 向原生质体中加入 200 μL Mg 溶液 [0.4 mol/L mannitol, 15 mmol/L MgCl₂, 4 mmol/L MES (pH 5.7)] 重悬。准备两个 2 mL 离心管, 向两管中各加入 150 μL 原生质体, 然后加 20 μL 重组载体 (pEVS-NL-ASS-GFP), 再各加入 170 μL 40%的 PEG 溶液 (40% PEG4000, 0.2 mol/L mannitol, 0.1 mol/L CaCl₂), 温和地上下颠倒混匀, 室温静置 20 min。向离心管中分别加入 680 μL W5 溶液, 温和地上下颠倒混匀, 之后 200×g 离心 3 min, 尽量吸除上清液, 去除 PEG。向管中各加入 1 mL W5 溶液, 重悬原生质体。将转化后的原生质体置于室温下暗处培养 15~20 h, 于激光共聚焦显微镜下观察。

3 结果及分析

3.1 ASS 基因的克隆与序列分析

参考研究选用的引物^[5], 采用逆转录 PCR (RT-PCR) 的方法克隆得到了白木香的一个倍半萜合酶基因 ASS, 测序结果表明, 其氨基酸序列与越南沉香中的倍半萜合酶 C1、C2、C3、C4 高度相似

(图 2), 可用于后续定位研究。对该 ASS 基因的序列应用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽分析, 未发现信号肽, 故未能预测其可能的亚细胞定位位点。

3.2 ASS 基因在烟草叶片细胞内的定位

利用根癌农杆菌 EHA105 将空载体 (pFGC5941-GFP) 与绿色荧光蛋白与 ASS 基因的融合表达载体 (pFGC5941-GFP-ASS) 转化到烟草叶片中, 获得高效瞬时表达。绿色荧光蛋白在 475 nm 蓝光激发下产生 509 nm 的绿色荧光。结果表明, ASS 与 GFP 的融合蛋白在胞质中产生绿色荧光 (图 3-A), 对照没有注射的烟草表皮细胞所呈现的显微图像没有明显的荧光, 只是一些微弱的自发荧光 (图 3-B), 对照 GFP 则可经过核孔复合物扩散进入细胞核, 从而在细胞核内和胞质中都可以观察到的 GFP 的绿色荧光信号 (图 3-C)。但由于烟草本身细胞结构比较模糊, 如胞质与细胞膜界限不清, 只能观察到一些粗略的结果, 不能够较清晰地分辨融合蛋白定位的细节, 需通过染色或其他进一步的实验来验证。

3.3 ASS 基因在洋葱表皮细胞内的分布

将 ASS 基因 ORF 分别插入到 35 S 启动子和绿色荧光蛋白基因之间, 获得融合表达载体 (pEVS-NL-ASS-GFP)。利用基因枪法将该载体转化到洋葱表皮细胞中, 由于洋葱细胞结构较清晰, 可观察到融合蛋白在胞质和细胞核中均发出绿色荧光 (图 4-A)。而对照没有注射的洋葱表皮细胞所呈现的显微图像没有明显的荧光, 只能观察到细胞壁所发微弱的自发荧光 (图 4-B)。

3.4 ASS 基因在白木香原生质体内的分布

通过 PEG 转化法将融合表达载体 (pEVS-NL-ASS-GFP) 转化到白木香原生质体中。融合蛋白在白木香原生质体中的胞质及质体定位, 且较清晰 (图 5-A)。对照没有进行 PEG 转化的白木香原生质体中没有明显的荧光, 只能观察到一些特别微弱的自发荧光 (图 5-B)。

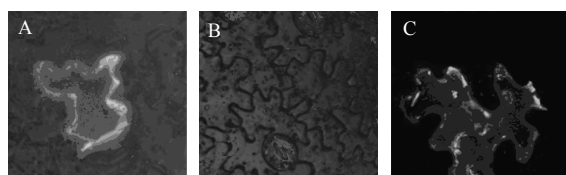
4 讨论

在植物细胞中, 各种萜类合成高度区隔化, 各种萜类合酶的亚细胞定位与其底物的分布关系密切, 且与其能否充分发挥催化功能密切相关^[7]。传统的观点认为, 倍半萜合酶催化 FPP 合成各种倍半萜, 倍半萜在胞质中合成, 相应的倍半萜合酶也定位于胞质中^[8]。且对植物中的倍半萜合酶的序列分

ASS	MSSAKLGSASEDVSRRDANYHPTVWGDFFLTHSSNFLENNDSSILEKHEELKQEVNLLVVETSDLPSKIQLTDEIIRLGV	80
C1	MSSAKLGSASEDVSRRDANYHPTVWGDFFLTHSSNFLENNDSSILEKHEELKQEVNLLVVETSDLPSKIQLTDEIIRLGV	80
C2	MSSAKLGSASEDVSRRDANYHPTVWGDFFLTHSSNFLENNDSSILEKHEELKQEVNLLVVETSDLPSKIQLTDEIIRLGV	80
C3	MSSAKLGSASEDVSRRDANYHPTVWGDFFLTHSSNFLENNDSSILEKHEELKQEVNLLVVETSDLPSKIQLTDEIIRLGV	80
C4	MSSAKLGSASEDVSRRDANYHPTVWGDFFLTHSSNFLENNDSSILEKHEELKQEVNLLVVETSDLPSKIQLTDEIIRLGV	80
Consen	mssaklgsasedv srrdanyhptvwgdfllthssn flennndssilekheelkqevrnllvvetsdpskiqltd iirlgv	80
ASS	GYHFETEIKAQLEKLHDHQLHLNFDLLTTSVWFRLLRGHGFSISSDVFKRFKNTKGEEFKTEDARTLWCLYEATHLRVDGE	160
C1	GYHFETEIKAQLEKLHDHQLHLNFDLLTTSVWFRLLRGHGFSISSDVFKRFKNTKGEEFKTEDARTLWCLYEATHLRVDGE	160
C2	GYHFETEIKAQLEKLHDHQLHLNFDLLTTSVWFRLLRGHGFSISSDVFKRFKNTKGEEFKTEDARTLWCLYEATHLRVDGE	160
C3	GYHFETEIKAQLEKLHDHQLHLNFDLLTTSVWFRLLRGHGFSISSDVFKRFKNTKGEEFKTEDARTLWCLYEATHLRVDGE	160
C4	GYHFETEIKAQLEKLHDHQLHLNFDLLTTSVWFRLLRGHGFSISSDVFKRFKNTKGEEFKTEDARTLWCLYEATHLRVDGE	160
Consen	gyhfeteikaqleklhdhqlhlnfdlltt svwfrllrghgfsi sdvfkrfkntkgef tedartlwclyeathlrvdge	160
ASS	DYLEEAIQFSRKKLEALLPELSFPLNECVRDALHIPYHRNVQRLAARQYIPQYDAEPTKIESLSLFAKIDFNMLQALHQS	240
C1	DYLEEAIQFSRKKLEALLPELSFPLNECVRDALHIPYHRNVQRLAARQYIPQYDAEPTKIESLSLFAKIDFNMLQALHQS	240
C2	DYLEEAIQFSRKKLEALLPELSFPLNECVRDALHIPYHRNVQRLAARQYIPQYDAEPTKIESLSLFAKIDFNMLQALHQS	240
C3	DYLEEAIQFSRKKLEALLPELSFPLNECVRDALHIPYHRNVQRLAARQYIPQYDAEPTKIESLSLFAKIDFNMLQALHQS	240
C4	DYLEEAIQFSRKKLEALLPELSFPLNECVRDALHIPYHRNVQRLAARQYIPQYDAEPTKIESLSLFAKIDFNMLQALHQS	240
Consen	duleeaiqfsrk leallp lsfpl necvrdalhipyhrnvqrlaaraqyipqydae tkieslslfakidfnmlqalhqs	240
ASS	ELREASRWKKEFDFPSKLPYARDRIAEGYWMMAHFEKPKFSLSRKFLNRIIGITSLIDDTYDVYGTLEEVTLFTEAVER	320
C1	ELREASRWKKEFDFPSKLPYARDRIAEGYWMMAHFEKPKFSLSRKFLNRIIGITSLIDDTYDVYGTLEEVTLFTEAVER	320
C2	ELREASRWKKEFDFPSKLPYARDRIAEGYWMMAHFEKPKFSLSRKFLNRIIGITSLIDDTYDVYGTLEEVTLFTEAVER	320
C3	ELREASRWKKEFDFPSKLPYARDRIAEGYWMMAHFEKPKFSLSRKFLNRIIGITSLIDDTYDVYGTLEEVTLFTEAVER	320
C4	ELREASRWKKEFDFPSKLPYARDRIAEGYWMMAHFEKPKFSLSRKFLNRIIGITSLIDDTYDVYGTLEEVTLFTEAVER	320
Consen	elreasrwkkefdfpsklpyardriaeggywmmaahfepkfslsrkflnri git slidddydvvygtleevtlfteaver	320
ASS	WDIEAVKDI PKYMQVIYTGMLGIFEDFKDNLINARGKDYCIDYAEVFKIIVRSYQREAEYFHTGYVPSYDEYMENSIIS	400
C1	WDIEAVKDI PKYMQVIYTGMLGIFEDFKDNLINARGKDYCIDYAEVFKIIVRSYQREAEYFHTGYVPSYDEYMENSIIS	400
C2	WDIEAVKDI PKYMQVIYTGMLGIFEDFKDNLINARGKDYCIDYAEVFKIIVRSYQREAEYFHTGYVPSYDEYMENSIIS	400
C3	WDIEAVKDI PKYMQVIYTGMLGIFEDFKDNLINARGKDYCIDYAEVFKIIVRSYQREAEYFHTGYVPSYDEYMENSIIS	400
C4	WDIEAVKDI PKYMQVIYTGMLGIFEDFKDNLINARGKDYCIDYAEVFKIIVRSYQREAEYFHTGYVPSYDEYMENSIIS	400
Consen	wdieavkdipkymqvi tgmigifedfkdnlarginargkdycidyaievfk iivrsyqreaeyfhtgyvpsydeymensiis	400
ASS	GGYKMFII LMLIGRGEFELKETLDWASTIPEMVKASSLIARYIDDLQTYKAEEERGETVSAVRCYMRFCVSEEEACKKM	480
C1	GGYKMFII LMLIGRGEFELKETLDWASTIPEMVKASSLIARYIDDLQTYKAEEERGETVSAVRCYMRFCVSEEEACKKM	480
C2	GGYKMFII LMLIGRGEFELKETLDWASTIPEMVKASSLIARYIDDLQTYKAEEERGETVSAVRCYMRFCVSEEEACKKM	480
C3	GGYKMFII LMLIGRGEFELKETLDWASTIPEMVKASSLIARYIDDLQTYKAEEERGETVSAVRCYMRFCVSEEEACKKM	480
C4	GGYKMFII LMLIGRGEFELKETLDWASTIPEMVKASSLIARYIDDLQTYKAEEERGETVSAVRCYMRFCVSEEEACKKM	480
Consen	ggykmfiilmligrgefelfketldwastipemv assliaryiddlqtykaee rgetvsavrcymr fcvseeackkm	480
ASS	REMIEIEWKRLNKTLEADEISSSVVPSLNFTRVLEVMYDKGDGYSQSGVTKDRIAALLRHAIE	546
C1	REMIEIEWKRLNKTLEADEISSSVVPSLNFTRVLEVMYDKGDGYSQSGVTKDRIAALLRHAIE	546
C2	REMIEIEWKRLNKTLEADEISSSVVPSLNFTRVLEVMYDKGDGYSQSGVTKDRIAALLRHAIE	546
C3	REMIEIEWKRLNKTLEADEISSSVVPSLNFTRVLEVMYDKGDGYSQSGVTKDRIAALLRHAIE	546
C4	REMIEIEWKRLNKTLEADEISSSVVPSLNFTRVLEVMYDKGDGYSQSGVTKDRIAALLRHAIE	546
Consen	semieiewkrlnktleade ssssvvpslnftrvlevm ydkgdgysdsqsgvtkdriaallrhaie	546

C1~C4 为越南沉香中鉴定到的 4 个倍半萜合酶^[5]C1—C4 are four sesquiterpene synthases identified from *A. crassna*^[5]

图2 白木香倍半萜合酶与越南沉香倍半萜合酶氨基酸序列比对

Fig. 2 Comparison on amino acid sequences of ASS and other sesquiterpene synthases from *A. crassna*

A-转化 pFGC5941-GFP-ASS 载体后的烟草表皮细胞

B-未转任何载体的烟草表皮细胞

C-转化 pFGC5941-GFP 载体后的烟草表皮细胞

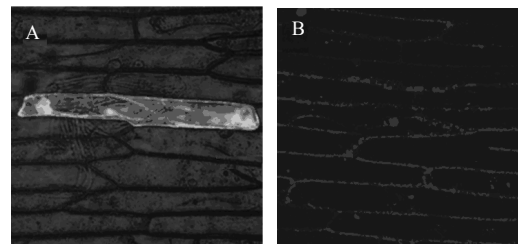
A-tobacco cell transformed with pFGC5941-GFP-ASS

B-control cell without transformation

C-tobacco cell transformed with pFGC5941-GFP

图3 ASS 基因在烟草表皮细胞中的瞬时表达

Fig. 3 Transient expression of ASS gene in tobacco epidermal cells



A-转化 pEVS-NL-ASS-GFP 载体后的洋葱表皮细胞

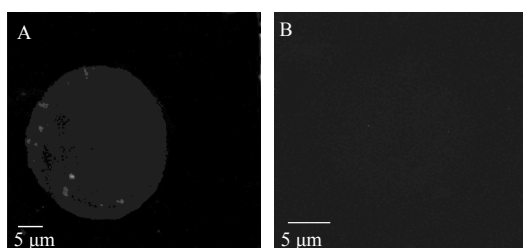
B-未转任何载体的洋葱表皮细胞

A-onion epidermal cell transformed with pEVS-NL-ASS-GFP

B-onion epidermal cells without transformation

图4 ASS 基因在洋葱表皮细胞中的瞬时表达

Fig. 4 Transient expression of ASS gene in onion epidermal cells



A-转化 pEVS-NL-ASS-GFP 载体后的白木香愈伤原生质体

B-未转任何载体的白木香愈伤原生质体

A-protoplast of ASS transformed with pEVS-NL-ASS-GFP

B-protoplast without transformation

图5 *ASS* 基因在白木香愈伤原生质体中的瞬时表达

Fig. 5 Transient expression of *ASS* gene in protoplasts isolated from *ASS* calli

析发现它们普遍缺乏 N 端信号肽,所以早期观点认为倍半萜合酶定位于胞质,但 Shen 等^[9]通过突变体鉴定到一个玉米倍半萜合酶,蛋白序列分析表明该酶含一个 N 端信号肽,并可能定位于叶绿体。*ASS* 同大多数倍半萜合酶一样,不含信号肽。近年来,开展了对于倍半萜合酶亚细胞定位的实验,利用烟草或拟南芥系统的研究显示金鱼草、草莓、猕猴桃中的倍半萜合酶定位在胞质中^[10-12]。但也有例外,如最近利用烟草原生质体瞬时转化表明野生型番茄中分离出的倍半萜合酶定位于质体中^[13]。本实验结果显示 *ASS* 在白木香原生质体中定位于胞质和质体,由于该 *ASS* 不含亚细胞定位信号肽,所以其亚细胞定位可能受到其底物库位置的影响,即反映出在白木香愈伤组织原生质体中,倍半萜前体 (FPP) 库可能主要分布在胞质和质体中。

农杆菌注射烟草叶片、基因枪转化洋葱表皮、PEG 法转化原生质体为植物中常用的 3 种瞬时转化方法,但其在蛋白亚细胞定位研究中的应用的比较尚未有报道。本研究利用这 3 种体系对白木香结香的关键酶倍半萜合酶的亚细胞定位的研究结果表明,*ASS* 基因与 GFP 的融合蛋白产物在烟草叶片中定位于胞质,在洋葱表皮中定位于胞质和细胞核,白木香原生质体中定位于胞质和质体。3 种体系的比较表明,农杆菌注射烟草叶片转化效率最高,常可获得大片的阳性细胞,但烟草细胞结构模糊,不宜进行定位研究,更适于开展蛋白互作等需要高转化率的实验。洋葱表皮细胞结构清晰,是常用的进行植物蛋白亚细胞定位的材料,但在本研究中出现了理论推测与前人研究未出现的结果,有可能是应用异源植物细胞产生的偏差结果。由于不含信号肽的

萜类合酶的分布受到其底物的影响^[7],故具体原因即这 3 种植物细胞中倍半萜合酶底物 FPP 的量与分布可能不同。如在萜类合酶转基因研究中,由于其成熟的转基因技术,烟草是一个常用的植物载体,用于研究目标萜类物质的生产,而烟草细胞 FPP 量不稳定,单一转化倍半萜合酶难以获得高水平目标倍半萜^[14-16]。本研究中,*ASS* 在烟草细胞中定位于胞质,可能由于烟草细胞不同区域中 FPP 量均低,故蛋白仅在其合成部位表达。

通过研究 *ASS* 的亚细胞定位,可以使沉香的结香机制逐步走向可视化,为通过精确定位诱导 *ASS* 的产生最终达到高效结香的目的奠定了基础。

参考文献

- [1] Chen H Q, Wei J H, Yang J S, *et al.* Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. *Chem Biodivers*, 2012(9): 236-250.
- [2] Gao Z H, Wei J H, Yang Y, *et al.* Identification of conserved and novel microRNAs in *Aquilaria sinensis* based on small RNA sequencing and transcriptome sequence data [J]. *Gene*, 2012, 505(1): 167-175.
- [3] Gao Z H, Wei J H, Yang Y, *et al.* Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012b, 31(9): 1759-1768.
- [4] Pojanagaroon S, Kaewrak C. Mechanical methods to stimulate aloes wood formation in *Aquilaria crassna* Pierre ex H. Lec. (Kritsana) trees [J]. *WOCMAP III: Conservation, Cultivation and Sustainable Use of Medicinal and Aromatic Plants*, 2005, 676: 161-166.
- [5] Kumeta Y, Ito M. Characterization of δ -guaiane synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154: 1998-2007.
- [6] Nagegowda D A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584: 9.
- [7] Lange B M, Ahkami A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities [J]. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11(2): 169-196.
- [8] Gershenzon J, Kreis W. *Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes, Sterols, Cardiac Glycosides and Steroid Saponins in: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism* (Wink, M., Ed.) [M]. Boca Raton: CRC Press, 1999.

- [9] Shen B Z, Zheng Z W, Dooner H K. A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: Characterization of wild-type and mutant alleles [J]. *PNAS*, 2000, 97(26): 14807-14812.
- [10] Nagegowda D A, Gutensohn M, Wilkerson C G, *et al.* Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers [J]. *Plant J*, 2008, 55: 224-239.
- [11] Aharoni A, Giri A P, Verstappen F W, *et al.* Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 3110-3131.
- [12] Nieuwenhuizen N J, Wang M Y, Matich A J, *et al.* Two terpene synthases are responsible for the major sesquiterpenes emitted from the flowers of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60: 3203-3219.
- [13] Sallaud C, Rontein D, Onillon S, *et al.* A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 301-317.
- [14] Hohn T M, Ohlrogge J B. Expression of a fungal sesquiterpene cyclase gene in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol*, 1991, 97: 460-462.
- [15] Wallaart T E, Bouwmeester H J, Hille J, *et al.* Amorpho-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin [J]. *Planta*, 2001, 212: 460-465.
- [16] Wu S, Schalk M, Clark A, *et al.* Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1441-1447.