

油茶种仁鲨烯合酶基因的分子特性与表达分析

曾艳玲, 张党权, 曾晓峰, 刘美兰

(中南林业科技大学/经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室/经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 长沙 410004)

摘要:角鲨烯含量是高品质植物食用油评判标准的重要指标之一。鲨烯合酶是角鲨烯合成直接相关的上游调控关键酶。本研究在已构建的油茶种仁转录组数据库基础上,设计特异引物,采用 RACE 技术获得油茶鲨烯合酶基因的全长 cDNA 序列,命名为 *CoSQS* (GenBank 登录号为 JX914592)。生物信息学分析结果表明:该序列全长 1554 bp,其中含全长的开放阅读框为 1245 bp,编码 415 个氨基酸残基,*CoSQS* 蛋白为弱碱性非分泌型蛋白,具有 2 个明显的跨膜区和 2 个角鲨烯和番茄红素合成酶的特异信号区。与柿 *DkSQS* 同源蛋白亲缘关系最近,属于疏水性蛋白。亚细胞定位试验结果显示该基因定位于叶绿体。实时荧光定量 PCR 分析表明,5-10 月间,油茶种仁中 *CoSQS* 基因表达量呈现先上升后下降的趋势,转录最高峰在 9 月下旬。通过关联分析表明 *CoSQS* 基因表达量与角鲨烯含量密切相关。

关键词:油茶; 鲨烯合酶; 分子信息; 表达分析

Molecular Characterization and Expression Analysis of Squalene Synthetase Gene (*CoSQS*) from *Camellia oleifera*

ZENG Yan-ling, ZHANG Dang-quan, ZENG Xiao-feng, LIU Mei-lan

(Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Ministry of Education/Key Laboratory of Non-Wood Forest Product of State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004)

Abstract: Squalene content is one of the evaluation standards for high quality edible oil. Squalene synthase is the directly upstream regulation key enzyme for squalene synthesis. In this study, based on the transcriptome database of *Camellia oleifera* seed kernel, the specific primers were designed and full-length cDNA sequence was obtained by RACE method. The cDNA was named as *CoSQS* (GenBank accession No. JX914592). The results of bioinformatics analysis showed that the full-length cDNA was 1554 bp with a 1245 bp open reading frame. The gene encoded 415 amino acid residues. *CoSQS* protein was alkaline non-secreted protein with two transmembrane regions and two specific signal area of squalene and phytoene synthase. *CoSQS* protein had the closest relationship with *Diospyros kaki* *DkSQS* and belonged to a hydrophobic protein. Real time fluorescent quantitative PCR analysis showed that during May to October, the expression of *CoSQS* was firstly up-regulated and then down-regulated. The transcription peak was in late September. *CoSQS* gene expression was closely related with squalene content.

Key words: *Camellia oleifera*; squalene synthetase; molecular characterization; expression analysis

角鲨烯,又名鲨烯,是一种开链三萜有机物质,具有提高体内超氧歧化酶(SOD)活性、增强机体免疫能力、降低胆固醇、降低血脂、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤等多种生理功能,是一种无毒性的具有防病治

病作用的生物活性物质^[1]。20 世纪中叶,植物源角鲨烯被发现,研究表明玉米油含角鲨烯均值为 0.280 g/kg、橄榄油 3.830 g/kg、芝麻油 0.050 g/kg、葵花籽油 0.120 g/kg、花生油 0.123 g/kg、大豆油

收稿日期:2015-09-07 修回日期:2015-09-27 网络出版日期:2016-06-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160608.1428.012.html>

基金项目:国家自然科学基金项目(31500556);湖南省自然科学基金项目(14JJ2104)

第一作者主要从事经济林栽培育种及林业生物技术研究。E-mail: zengyanling110@126.com

0.120 g/kg^[2-3]。2014 年 11 月 18 日功能性油脂国际研讨会在上海召开,来自中国、美国、法国、澳大利亚、马来西亚等多国与会专家学者一致认为,富含微量生物活性物质是高品质植物食用油评判标准的重要指标,特别是绝大多数学术报告都将角鲨烯作为特征成分之一用于检测植物食用油的品质。油茶是近年来我国大力推广的本土特色油料树种之一,而茶油之所以被评为高品质植物食用油,不仅仅是因为其富含不饱和脂肪酸,更因为油茶种仁中富含角鲨烯^[4-7],油茶籽成熟过程中的角鲨烯含量高达 0.762 g/kg^[8]。然而,油茶种仁中角鲨烯富集的分子调控机理仍不清楚,不利于植物源角鲨烯产量提升的遗传改良。有研究表明,影响角鲨烯积累最关键的是鲨烯合酶(SQS,squalene synthetase)的调控作用^[9]。本实验室前期成功构建了不同发育时期油茶种仁转录组数据库,并在此基础上获得大量功能基因信息进行了相关分析^[10-11],因此,本研究结合转录组数据信息,采用 RACE 技术获得油茶种仁鲨烯合酶基因全长 cDNA 序列,并在此基础上开展生物信息学分析及表达特性研究,为进一步揭示 CoSQS 调控油茶种仁中角鲨烯富集的分子机理,培育角鲨烯高含量植物的分子设计育种奠定物质和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)优良品种华硕^[12]采自湖南省长沙市望城县东城镇油茶基地,取材时间分别为种子膨大期(5月5日、6月5日和7月4日)和油脂合成期(8月4日、9月4日、9月11日、9月26日和10月24日),华鑫、华金、衡东65、衡东17、茶陵78、茶陵二仙268、茶陵二仙343等品种采自湖南省株洲市马家河油茶基地,取材时间为10月24日,样品于-80℃超低温冰箱保存备用。FastPfu DNA Polymerase、2×Taq PCR MasterMix 和 pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司,QuantiFast SYBR Green PCR Kit 购自 QIAGEN 公司,DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司, RACE 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。载体 pEGAD、农杆菌菌株 GV3103 和本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)为湖南大学生物学院生物能源与材料研究中心惠赠,大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 为本实验室保藏。引物合成

委托北京华大公司,序列测定委托上海博尚公司完成。

1.2 总 RNA 提取及单链 cDNA 合成

取油茶种仁,根据 RNA 提取和反转录试剂盒说明书提取总 RNA,检测总 RNA 的纯度与浓度后,逆转录合成单链 cDNA。

1.3 全长 cDNA 克隆及生物信息学分析

根据前期本实验室构建的油茶转录组数据库中油茶鲨烯合酶基因片段数据,设计特异引物 SQS1F: 5'-GT AGCAGGACTGGTTGGCTTAGGG-3' 和反向引物 SQS1R: 5'-ATGCGTGACTTTGGTATCTCGTTT-3',分别与 RACE 逆转录试剂盒中引物 10×Universal Primer A Mix(UPM) Long Primer (0.4 μ mol/L, 5'-CTAATACGAC TCACTATAG-GCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') 和 Short (2 μ mol/L, 5'-CTAATACGACTCACTATA GGC-3') 配对进行 3'/5' RACE PCR。PCR 反应体系(50 μ L): 5'×Fast Pfu Buffer(Mg²⁺ plus) 10.0 μ L、2.5 mM dNTPs 5.0 μ L、Fast Pfu DNA Polymerase 1.0 μ L、PCR-Grade Water 31.0 μ L、单链 cDNA 1.0 μ L、SQS1F(或 UPM)1.0 μ L、SQS1R(或 AUAP)1.0 μ L。循环条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 8 min;4℃保温。

利用在线软件 ProtParam、predictprotein、signal4.1 等预测油茶鲨烯合酶基因理化性质和结构特点,利用本地软件 MEGA 4.1、GENDOC 等构建系统发育树和分析聚类关系。

1.4 油茶鲨烯合酶基因亚细胞定位

根据载体 pEGAD 和油茶鲨烯合酶基因酶切位点,设计上游引物 CoSQSZF: 5'-CCGGAATTCAATGGGAAGTTTGGGGGCA-3'(5'端添加 EcoR I 酶切位点);下游引物 CoSQSZR: 5'-TCCCCCGGCTCATATTACTTGGTCT-3'(5'端添加 Sam I 酶切位点)。以含油茶鲨烯合酶基因全长 cDNA 的质粒为模板扩增,PCR 产物回收克隆测序正确后,采用 EcoR I 和 Sam I 双酶切连接插入载体 pEGAD 多克隆位点,构建包含 CoSQS 和 eGFP 基因的融合植物表达载体。

选择健康适用的本氏烟叶片,参照曾艳玲等^[13]农杆菌活体侵染方法,将含重组质粒的农杆菌注入烟草叶片,培养 48 h 后在激光共聚焦显微镜激发波长 488 nm 下观察 eGFP 的荧光信号^[14]。

1.5 油茶鲨烯合酶基因实时荧光定量 PCR

将 8 个不同发育时期华硕种仁 RNA 和 8 个不同品系油茶成熟种仁 RNA 调整为一致浓度, 逆转录 cDNA 后, 采用实时荧光 PCR (qPCR) 技术确定 *CoSQS* 基因的表达特征。qPCR 引物为 qSQSF: 5'-AGAGCGAACCAAGATACAACT-3' 和 qSQSR: 5'-CT-CAGGAAAGCCAATCACATA-3', 选用 *GAPDH* 基因为内参基因^[15], 引物为 GAPDHF: 5'-CTACTG-GAGTTTTACCGA-3' 和 GAPDHR: 5'-TAAGACCCT-CAACAATGCC-3'。每组做 3 个平行重复反应, 无菌水模板为阴性对照。qPCR 反应体系参见 QIAGEN 试剂盒说明书, 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环。采用 Bio-Rad CFX Manager 软件进行试验数据的分析。

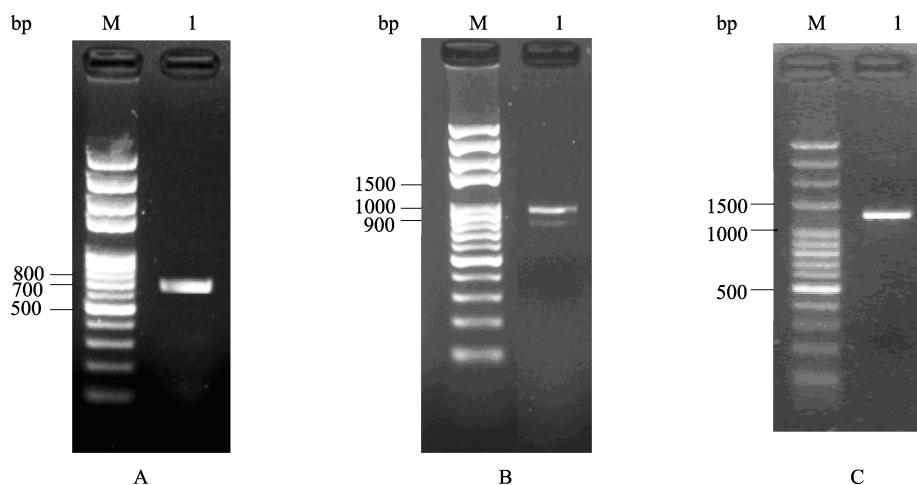
1.6 油茶角鲨烯含量检测

油脂提取采用索氏提取法^[16]。油茶种仁角鲨烯提取检测采用氢氧化钾-乙醇溶液皂化, 石油醚萃取净化, 气相色谱 (GC-FID) 检测方法^[17]。利用软件 SPSS Statistics 17.0 (<http://www.stathome.cn>) 进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 鲨烯合酶基因全长 cDNA 克隆

通过 RACE 技术, 获得全长 1554 bp 的目的片段 (3' RACE 948 bp, 5' RACE 770 bp, 重叠 164 bp) (图 1), 其中 5' UTR 和 3' UTR 分别为 93 bp 和 216 bp, 开放阅读框为 1245 bp, 该基因命名为 *CoSQS*, GenBank 登录号为 JX914592。



A: 5' RACE 扩增; B: 3' RACE 扩增; C: CDS 扩增

A: 5' RACE, B: 3' RACE, C: CDS

图 1 *CoSQS* 基因 cDNA 克隆

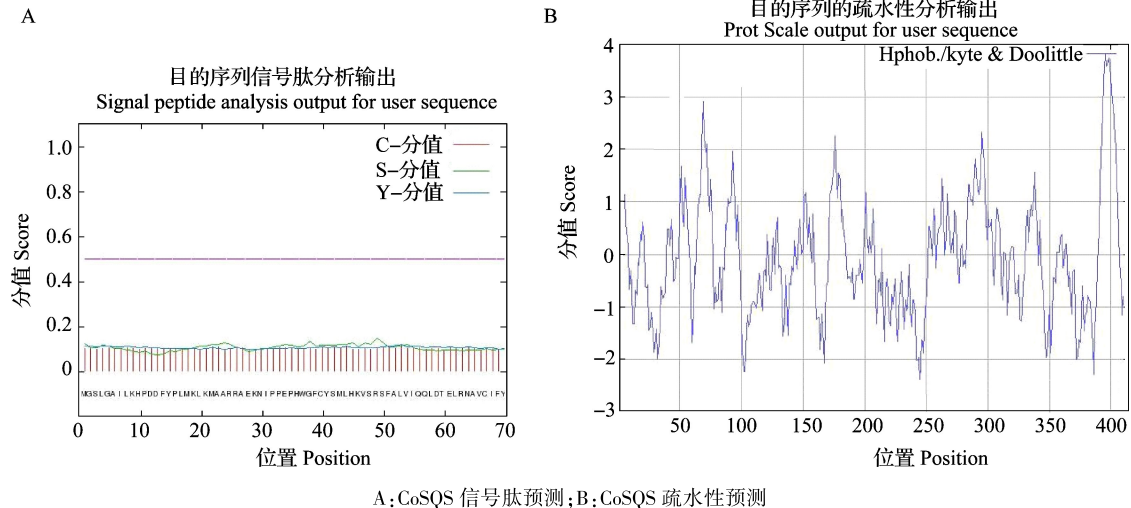
Fig. 1 Molecular cloning of *CoSQS* cDNA

2.2 油茶鲨烯合酶基因生物信息学分析

2.2.1 理化性质及结构特点预测 用 ProtParam 对 *CoSQS* 进行在线理化性质分析, 该基因编码 414 个氨基酸, 分子量为 47339.0 Da, pI 理论值为 7.93, 即生理条件下该蛋白为弱碱性。带负电荷残基 (Asp + Glu) 数为 50, 带正电荷残基 (Arg + Lys) 数 52, 分子式为 $C_{2121}H_{3340}N_{562}O_{604}S_{30}$, 不稳定指数 (II) 为 47.15, 属于典型的不稳定蛋白。在线软件 SignalP4.1^[18] 采用神经网络方法 (NN) 对 *CoSQS* 氨基酸序列进行信号肽分析, 根据预测的原始剪切位点分值 (C score)、综合剪切点分值 (Y score) 以及信号肽分值 (S score) 综合评定, 结果显示 1~52 个氨基酸平均信号肽与最大剪接位点分值的平均为

0.113, 未达到阈值 0.45, 因此推断 *CoSQS* 蛋白没有信号肽, 不是分泌型蛋白 (图 2A)。<http://expasy.org/tools/protscale.html> 在线分析 *CoSQS* 蛋白亲水性, 亲水指数为 -2.478 ~ 3.822, 其中亲水残基占整个氨基酸残基的 44.93%, 是疏水性蛋白 (图 2B), 在线 www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/^[19] 预测 *CoSQS* 跨膜区, 具有 2 个比较明显的跨膜区, 分别为 282~304 和 386~408 位氨基酸残基, 中间 305~385 为氨基酸残基位于膜内, 两侧氨基酸残基位于膜外 (图 3)。

根据 <http://www.predictprotein.org/>^[20] 在线预测, 油茶鲨烯合酶 71.98% 为 α -螺旋结构, 0.97% 为 β -折叠, 27.05% 为无规则卷曲。CoSQS 蛋白存在



A:CoSQS 信号肽预测;B:CoSQS 疏水性预测
A:Signal peptide prediction of CoSQS,B:Hydrophobicity prediction of CoSQS

图2 CoSQS 蛋白信号肽预测和亲疏水性预测

Fig. 2 Signal peptide prediction and hydrophobicity prediction of CoSQS protein

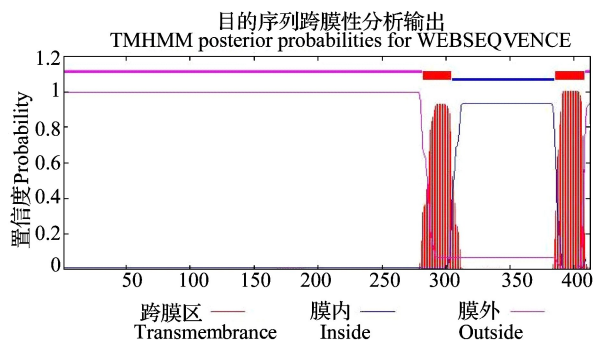


图3 CoSQS 推导氨基酸跨膜区分析

Fig. 3 Transmembrane domain prediction of CoSQS

7 种蛋白质功能位点,分别为 2 个 N-糖基化位点(347~350,388~391),1 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点(375~378),3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(144~146,249~251,318~320),5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(78~81,161~164,187~190,327~330,358~361),1 个酪氨酸激酶磷酸化位点(9~15),3 个 N-豆蔻酰化位点(2~7,

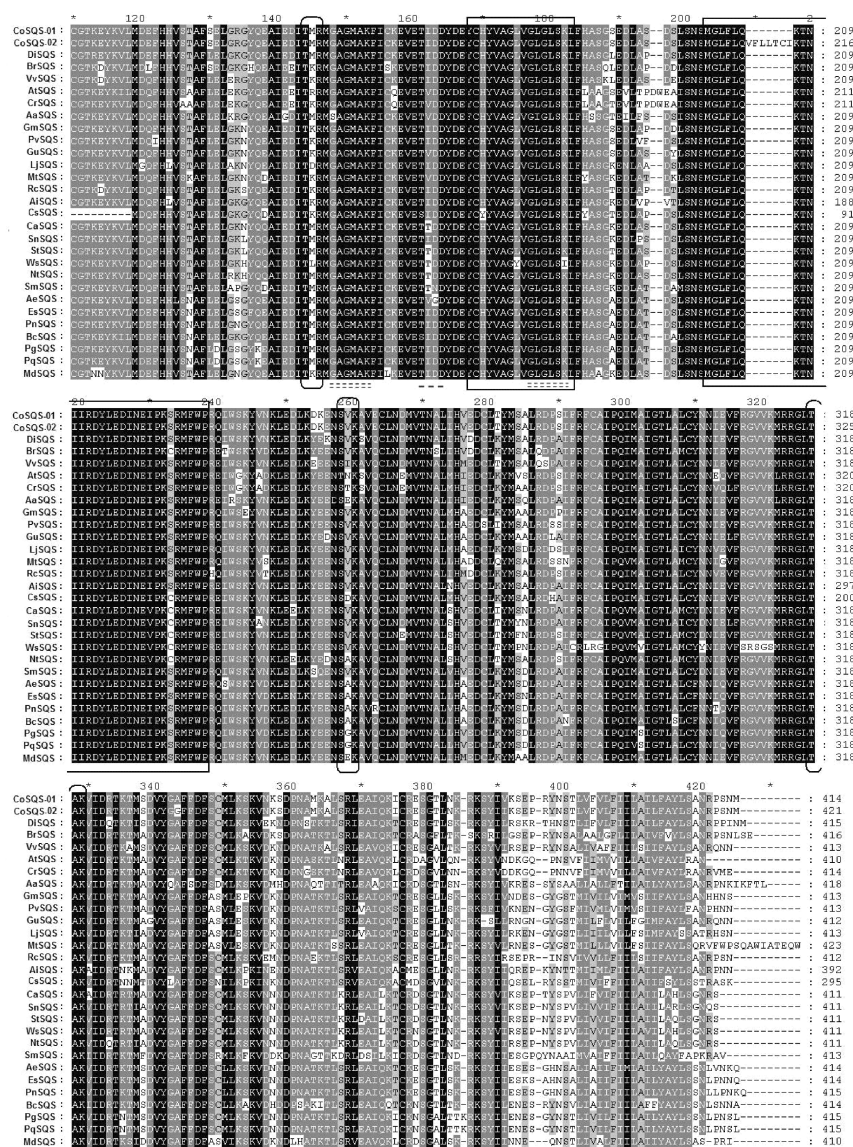
148~153,177~182),2 个角鲨烯和番茄红素合成酶的特异信号区(168~183,201~229)。结合其他 26 种植物 SQS 氨基酸序列结构分析,CoSQS 第 168~183 位的角鲨烯合成酶特异信号区相对保守且其中包含 1 个 N-豆蔻酰化位点,且该区域中仅柑橘 CsSQS 有 1 个氨基酸残基的置换和睡茄 WsSQS 有 2 个氨基酸残基的置换;CoSQS 第 201~229 位角鲨烯合成酶特异性号区保守性也较强,其他植物 SQS 氨基酸差异主要为 I 置换为 V 和 S 置换为 C,但该区域中其他油茶品种 CoSQS 有 7 个氨基酸残基的插入^[21](图 4)。

2.2.2 油茶鲨烯合酶系统进化树分析 根据 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站 BLAST 收索结果,选取 27 种植物 SQS 氨基酸序列与油茶 CoSQS 氨基酸序列进行聚类分析。结果表明,它们的遗传距离均值为 0.193,其中 CoSQS 与柿(*Diospyros kaki* L. f.)的 SQS 同源蛋白遗传距离为 0.099,亲缘关系最近,与远志的(*Capsella rubella* Reut.)SQS 同源蛋白遗传距离为 0.266,

```

CoSQS.M: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
CoSQS.02: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
DISQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
BrSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
VsSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
AsSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
CrSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
AaSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
GmSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
PvSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
GuSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
LjSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
MsSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
RsSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
NiSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
CsSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
CaSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
SnSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
SiSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
WsSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
NiSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
SmSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
AeSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
EsSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
PnSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
BcSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
PgSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
PqSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109
MdsSQS: MGSLGAI LKHPDD FYLMKL KMAARRA EKN I PPEPMGFCYSMLHKVSRSFALV I QGLDT ELRNA VC I FY 109

```

单下划线标注为 N-糖基化位点;双下划线标注为 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点;弧角框标注为蛋白激酶 C 磷酸化位点;单虚线下划线标注为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点;虚线弧角框标注为酪氨酸激酶磷酸化位点;双虚线下划线标注为 N-豆蔻酰化位点;方框标注为角鲨烯和番茄红素合成酶的特异信号区。CoSQS-01 为本试验获得的油茶华硕角鲨烯基因推导氨基酸序列,CoSQS-02 为油茶长林 4 号角鲨烯基因推导氨基酸序列

N-glycosylation site were marked by single underline,cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site was marked by double underline,Protein kinase C phosphorylation site was marked by arc angle frame,Casein kinase II phosphorylation site were marked by single dotted line,Tyrosine kinase phosphorylation site were marked by arc angle frame with dashed line,N-myristoylation site were marked by double dotted underline,the specific signal region of squalene and phytoene synthase were marked by square frame. CoSQS-01 was the deduced amino acid sequence of huashuo,CoSQS-02 was the deduced amino acid sequence of Changlin No. 4

SQS GenBank accession number: *Diospyros kaki* (DkSQS, FJ687954.1) *Bruguiera gymnorhiza* (BgSQS, GU478981.1) *Arabidopsis thaliana* (AtSQS, BT003419.1) *Capsella rubella* (CrSQS, XM_006283766.1) *Artemisia annua* (AaSQS, AF302464.2) *Glycine max* (GmSQS, XM_006591857.1) *Phaseolus vulgaris* (PvSQS, KF569542.1) *Glycyrrhiza uralensis* (GuSQS, GQ266153.1) *Lotus japonicus* (LjSQS, AB102688.1) *Medicago truncatula* (MtSQS, XP_003607040.1) *Ricinus communis* (RcSQS, XM_002512936.1) *Azadirachta indica* (AiSQS, JQ327160.1) *Citrus sinensis* (CsSQS, XM_006487252.1) *Capsicum annuum* (CaSQS, AF124842.1) *Solanum nigrum* (SnSQS, JX984610.1) *Solanum tuberosum* (StSQS, JF802610.1) *Withania somnifera* (WsSQS, GU474427.1) *Nicotiana tabacum* (NtSQS, U60057.1) *Salvia miltiorrhiza* (SmSQS, FJ768961.1) *Aralia elata* (AeSQS, GU354513.1) *Eleutherococcus senticosus* (EsSQS, JN714465.1) *Panax notoginseng* (PnSQS, KC953032.1) *Bupleurum chinense* (BcSQS, GQ889266.1) *Panax ginseng* (PgSQS, G0468527.2) *Panax quinquefolius* (PqSQS, AM182456.1) *Malus domestica* (MdSQS, KC895980.1)

图 4 CoSQS 蛋白质功能位点预测

Fig. 4 Function sites prediction of CoSQS

亲缘关系最远,草本药用植物 SQS 与木本植物 SQS 明显归为不同分支,说明它们序列区别较大,亲缘关系相对较远,但是它们的遗传距离均处于 0.003 ~ 0.298 区间之内,说明鲨烯合酶在进化过程中保守性较强,在不同植物体内行使的功能基本相同(图 5)。

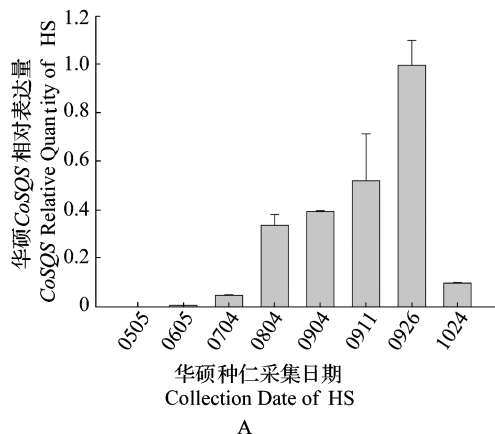


图 5 *CoSQS* 基因 CDS 推导氨基酸与其他植物 SQS 氨基酸序列聚类分析

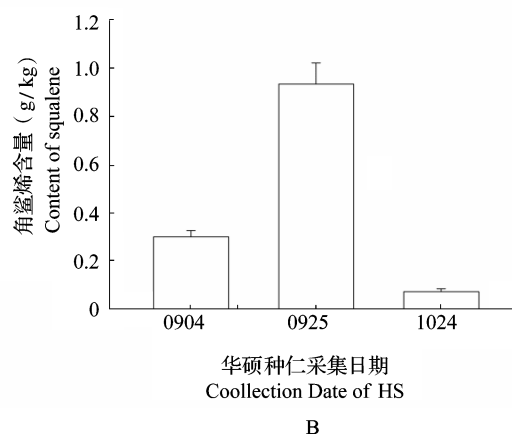
Fig. 5 Cluster analysis of the deduced amino acid from *CoSQS* CDS sequence with homologs of other plants SQS sequences

2.3 亚细胞定位观察

通过注射烟草法将融合表达载体转化烟草叶片,培养 48 h 后 *CoSQS* 在注射区域附近高效瞬时表达,在激光共聚焦显微镜下观察烟草叶片中的 eGFP 荧光信号,结果显示 eGFP 荧光信号与叶绿体在 543 nm 激发光下自发荧光信号完全重叠(图 6),说明 *CoSQS* 可能定位于叶绿体。



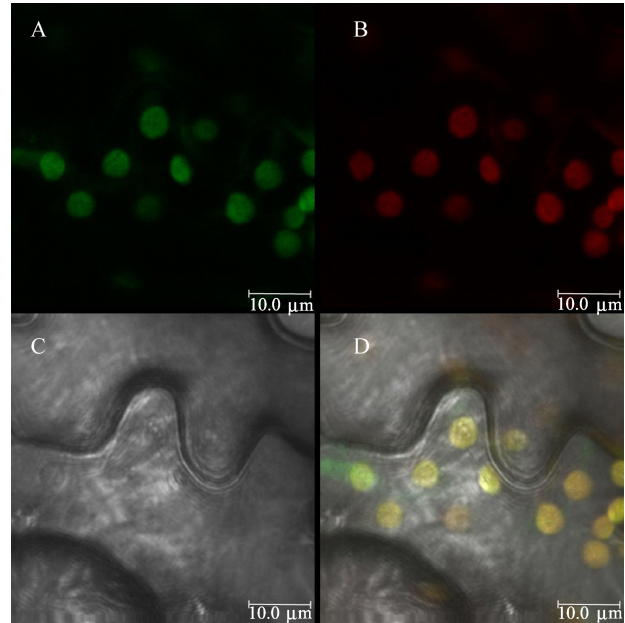
A



B

图 7 不同发育时期种仁中 *CoSQS* 相对表达量(A)及角鲨烯含量(B)

Fig. 7 *CoSQS* relative expression abundance(A) and squalene content of different developmental period(B)



A: 紫外激发的 eGFP 荧光信号; B: 紫外激发的叶绿体荧光信号; C: 可见光的信号; D: A、B 和 C 叠加

A: UV excited eGFP fluorescence signal, B: UV excited chloroplast fluorescence signal, C: Visible light, D: A, B and C

图 6 *CoSQS* 基因亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of *CoSQS* gene

2.4 鲨烯合酶基因表达与产物关系

2.4.1 油茶种仁鲨烯合酶基因表达规律及与角鲨烯含量关联性分析 实时荧光定量 PCR 表明, *CoSQS* 相对表达量整体趋势为先上调后下调。7-8 月 *CoSQS* 表达量迅猛增加, 出现第 1 个表达高峰期, 之后平稳上升, 9 月下旬出现第 2 个表达高峰, 10 月表达量迅速下降。根据 9 月初至 10 月底角鲨烯含量与 *CoSQS* 相对表达量(图 7), 采用双变量相关性统计分析结果显示, Pearson 相关性为 0.997, 显著性为

0.045, 不仅说明二者差异有统计学意义, 而且表现为 *CoSQS* 基因表达丰度与角鲨烯含量呈正相关关系。

2.4.2 不同品系油茶种仁鲨烯合酶基因表达差异

根据同一时期采收的不同品系油茶种仁鲨烯合酶基因表达量分析(图8), 表达量高低顺序依次为茶陵二仙343 > 茶陵78 > 茶陵二仙268 > 华硕 > 华金 > 衡东65 > 衡东17 > 华鑫。

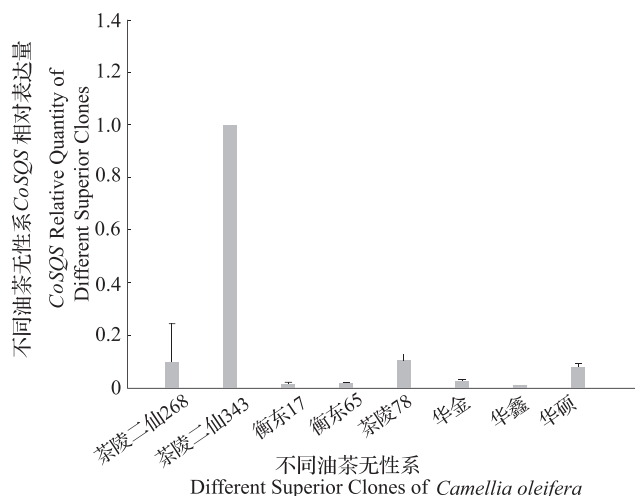


图8 油茶无性系种仁 *CoSQS* 基因表达丰度

Fig. 8 Expression abundance of *CoSQS* gene from different superior clones of *C. oleifera*

3 讨论

角鲨烯具有多方面保健药理功能, 服用外源性角鲨烯, 可以通过抑制 β -羟基- β -甲基戊二酰辅酶A (HMG-CoA) 还原酶活性而阻止体内胆固醇的生物合成, 甚至可以通过胆固醇的反馈抑制作用加速机体中过剩的胆固醇排泄, 从而降低胆固醇和三油甘脂的水平, 使血液中胆固醇浓度维持正常水平; 还可降低致癌基因片段的戊烯化作用, 对肺癌、胰腺癌等肿瘤疾病有治疗作用; 能改善心脑血管功能与增强机体耐力; 增加细胞免疫和非特异性免疫功能等^[22]。在传统原材料深海鲨鱼肝脏极其匮乏的情况下, 植物源角鲨烯的开发前景广阔。代谢途径显示, 乙酰辅酶A和乙酰乙酰辅酶A在体内经过多步生化反应形成三甲十二碳三烯焦磷酸, 在NADPH和鲨烯合酶(SQS)的作用下, 形成角鲨烯^[23], 因此鲨烯合酶基因是调控植物体内角鲨烯含量的关键基因。本研究以油茶品种华硕为材料, 克隆获得*CoSQS*基因, 并对其表达特征进行了较为详细的分析。通过生物信息学分析确定*CoSQS*基因全长 cD-

NA序列, 通过推导氨基酸预测其理化性质及跨膜特点均与前人研究的结果一致, 而且其亲缘关系也与柿鲨烯合酶最近^[21], 但经与其他品种油茶鲨烯合酶基因序列比较发现, *CoSQS*基因不仅存在寡核苷酸多态性, 而且在角鲨烯合成酶特异信号区有较大差别, 这可能是导致不同油茶品种角鲨烯含量差异的原因之一。亚细胞定位试验结果显示 *CoSQS* 定位于叶绿体, 在幼苗能够进行光合自养之前, 叶绿体是以原质体的形式存在^[24], 因此推断油茶种仁中的 *CoSQS* 定位于原质体。荧光定量分析表明, 该基因表达量在9月下旬时达到最高峰, 随后下调, 这与油茶种仁角鲨烯含量变化一致, 且通过统计分析证实二者呈显著正相关关系。因此, 根据油茶鲨烯合酶表达量与角鲨烯含量的辩证关系, 通过对采收时油茶鲨烯合酶基因表达丰度的分析基本可以判断不同油茶品种角鲨烯含量的差异。本研究前期曾对受试品种进行过含油率的研究, 结果为华金 > 华硕 > 茶陵二仙343 > 华鑫 > 衡东17 > 茶陵78 > 茶陵二仙343 > 衡东65^[13], 采用双变量相关性统计分析含油率与鲨烯合酶基因表达量的关系, 结果显示显著性为-0.487, 说明二者差异无统计学意义。由于脂肪酸与角鲨烯代谢途径分属于糖酵解代谢途径下游2条不同的分支, 所以二者无明显相关性是符合科学常理的。根据高品质植物食用油最新要求, 可以综合考虑角鲨烯和脂肪酸含量以筛选改良油茶种质。这些研究结果为今后深入开展油茶种仁中角鲨烯富集的分子调控机理研究, 通过分子设计育种提高油茶种仁角鲨烯含量奠定理论基础, 为以脂肪酸和功能成分含量为指标筛选油茶优良品种提供科学依据。

参考文献

- [1] Kim S K, Karadeniz F. Biological importance and applications of squalene and squalane [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2012, 65: 223-233
- [2] Sonntag N O V. Structure and composition of fats and oils [M]// Swern. *Bailey's industrial oil and fat products*. John Wiley & Sons, 1979: 67
- [3] Boskou D. Frying temperature and minor constituents of oils and fats [J]. *Grasas Y Aceites*, 1998, 49(34): 326-330
- [4] Zeng Y L, Zhang D Q, Peng K. Bioactive components determination of acetone extractives from oil-tea cake by 600 °C-based Pyrolysis-GC/MS [J]. *Key Eng Mater*, 2011, 480-481: 490-495
- [5] Zeng Y L, Zhang D Q, PENG W X. Pyrolysis-GC/MS of bioactive components of acetone extractives of oil-tea cake under 300 °C [J]. *Adv Mater Res*, 2011, 230-232: 847-851
- [6] 张东生, 薛雅琳, 金青哲, 等. 油茶籽油中角鲨烯含量的测定 [J]. *中国油脂*, 2013, 38(11): 85-88
- [7] 王亚萍, 费学谦, 王开良, 等. 油茶果采后处理方式对油茶籽油品质的影响 [J]. *中国油脂*, 2013, 38(9): 14-16

- [8] 李好,方学智,钟海雁,等.油茶籽成熟过程中油脂及营养物质变化的研究[J].林业科学研究,2014,27(1):86-91
- [9] Pirronen V, Lindsay D G, Miettinen T A. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition [J]. J Sci Food Agric, 2000, 80: 939-966
- [10] 谭晓风,王建勇,龙洪旭,等.油茶脂酰辅酶 A 硫酯酶基因的克隆与表达分析[J].植物生理学报,2014,50(12):1845-1856
- [11] 周俊琴,谭晓风,袁军,等.油茶 *Phl1;1* 基因克隆及其表达分析[J].植物遗传资源学报,2013,14(3):156-161
- [12] 谭晓风,袁德义,袁军,等.大果油茶良种‘华硕’[J].林业科学,2011,47(12):184
- [13] 曾艳玲,谭晓风,蒋瑶,等.油茶果糖 1,6-二磷酸醛缩酶基因 (*CoFBA4*) 的分析特征与表达分析[J].林业科学,2013,49(11):164-170
- [14] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant J, 1994, 6(2): 271-282
- [15] Zeng Y L, Tan X F, Zhang L, et al. A fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene from *Camellia oleifera*; molecular characterization and impact on salt stress tolerance [J]. Mol Breeding, 2015, 35:17
- [16] 谢鹏,谭晓风,王渊,等. DTOPSIS 法在油茶优良无性系综合评价中的应用研究[J].广东农业科学,2010,37(6):10-11
- [17] 钟冬莲,汤富彬,沈丹玉,等.油茶籽油中角鲨烯的气相色谱法测定[J].分析试验室,2011,30(11):104-106
- [18] Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions Petersen TN [J]. Nat Med, 2011, 8: 785-786
- [19] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes [J]. J Mol Biol, 2001, 305: 567-580
- [20] Yachdav G, Kloppmann E, Kajan L, et al. PredictProtein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(1): 337-343
- [21] 周长富,姚小华,林萍,等.基于转录组测序对油茶角鲨烯合酶基因的克隆及分析[J].广西植物,2013,33(6):852-858
- [22] Kelly G C. Squalene and its potential clinical uses [J]. Altern Med Rev, 1999, 4(1): 29-36
- [23] Dai Z B, Wang B B, Liu Y, et al. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast [J]. Sci Rep, 2014, 1: 1-6
- [24] 李保珠,赵孝亮,彭雷.植物叶绿体发育与调控研究进展[J].植物学报,2014,49(3):337-345