

# 铁棍山药 *SUS* 基因 CDS 区克隆与生物信息学分析

刘苏伟<sup>1,2</sup>, 文艺<sup>2</sup>, 张璐琪<sup>1,2</sup>, 高素霞<sup>2</sup>, 刘玉霞<sup>2</sup>, 王飞<sup>2</sup>, 鲁传涛<sup>2\*</sup>, 刘红彦<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南中医药大学 药学院, 郑州 450046;

2. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 郑州 450002)

**[摘要]** **目的:**对铁棍山药蔗糖合成酶(sucrose synthase, *SUS*)基因的编码区域(coding sequence, CDS)进行克隆和蛋白质结构分析,为该基因的调控机制与山药多糖的合成机制提供理论依据。**方法:**提取铁棍山药总 RNA 并反转录为 cDNA 第一链,根据本实验室铁棍山药基因组数据经注释得到的 *SUS* 基因序列设计一对特异性引物,利用基因克隆技术获得 *SUS* 基因的编码区域并通过蛋白质预测分析软件分析蛋白质序列特征。**结果:**克隆得到一个长度 2 448 bp 的基因序列,具有一个完整的开放阅读框架(open reading frame, ORF),命名为 *DoSUS1*。*DoSUS1* 的分子式为  $C_{4209}H_{6534}N_{1115}O_{1205}S_{23}$ ,相对分子质量 9 788.32,共 815 个氨基酸,理论等电点(PI)6.10,消光系数为 110 505,脂溶性指数(AI)为 94.15,不稳定指数为 32.18,平均亲水指数(GRAVY)为 -0.225,属于稳定可溶性酸性蛋白质。*DoSUS1* 氨基酸序列存在多个磷酸化位点,不存在跨膜区与信号肽。蛋白质二级结构与三级结构结果显示 *DoSUS1* 属于全  $\alpha$  类蛋白质。功能域预测结果显示 *DoSUS1* 有蔗糖合成与糖基转移两个功能域。同源性比对结果显示 *DoSUS1* 的氨基酸序列与所比对单子叶植物的氨基酸序列相似性均 > 80%。系统进化树显示 *DoSUS1* 与单子叶植物的 *SUS* 进化关系较近。**结论:**首次从铁棍山药中克隆出 *SUS* 基因的编码序列,并对其蛋白质结构进行了分析,为进一步阐明 *SUS* 在山药生长发育和多糖合成机制中的作用奠定了基础。

**[关键词]** 铁棍山药; 蔗糖合成酶基因; 基因克隆; 编码区域; 生物信息学

**[中图分类号]** R284.1; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0136-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190917

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190118.0954.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-21 10:03

## Cloning and Bioinformatics Analysis on CDS of *SUS* Gene in *Dioscorea opposita*

LIU Su-wei<sup>1,2</sup>, WEN Yi<sup>2</sup>, ZHANG Luo-qi<sup>1,2</sup>, GAO Su-xia<sup>2</sup>, LIU Yu-xia<sup>2</sup>,

WANG Fei<sup>2</sup>, LU Chuan-tao<sup>2\*</sup>, LIU Hong-yan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou 450002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To clone CDS sequence of *Dioscorea opposita* *SUS* gene and analyze the protein structure, in order to provide a theoretical basis for the regulation mechanism of *SUS* gene and the synthesis mechanism of *D. opposita* polysaccharides. **Method:** Total RNA in *D. opposita* was extracted and reverse-transcribed into first strand of cDNA. Specific primers were designed according to an annotated *SUS* gene sequence obtained from the laboratory *D. opposita* genome database, and the coding region of the *SUS* gene was obtained by gene cloning technique and the protein sequence characteristics were analyzed by protein prediction analysis software. **Result:** A 2 448 bp gene sequence was cloned with a complete open reading frame (ORF). The gene was named *DoSUS1*. The formula of protein encoded by *DoSUS1* gene in *D. opposita* was  $C_{4209}H_{6534}N_{1115}O_{1205}S_{23}$ ,

**[收稿日期]** 20181126(013)

**[基金项目]** 国家中药材产业技术体系郑州综合实验站(CARS-21-12);河南省科技攻关计划项目(162102310054)

**[第一作者]** 刘苏伟,在读硕士,从事中药材规范化种植研究,E-mail:2207346588@qq.com

**[通信作者]** \*刘红彦,博士生导师,研究员,从事中药材规范化种植研究,Tel:0371-65730166,E-mail:liuhy1219@163.com;

\*鲁传涛,博士,研究员,从事中药材病虫害防治研究,Tel:0371-65717380,E-mail:chuantaolu@qq.com

and the molecular weight was 9 788.32, the total number of amino acids was 815, the theory isoelectric point (PI) was 6.10, the extinction coefficient was 110 505, the aliphatic index (AI) was 94.15, the instability index was 32.18, and the grand average of hydropathicity (GRAVY) was -0.225. It was a stable and soluble acidic protein. There were phosphorylation sites in the *DoSUS1* amino acid sequence, with no transmembrane region and signal peptide. The secondary structure and the tertiary structure showed that *DoSUS1* was an  $\alpha$  class protein. Functional domain predictions showed that *DoSUS1* had sucrose synthesis domain and glycosyl transfer domain. The homology alignment showed that the amino acid sequence of *DoSUS1* was more than 80% similar to the amino acid sequence of the aligned monocots. The phylogenetic tree showed that *DoSUS1* was closely related to *SUS* of monocotyledon evolution. **Conclusion:** The coding sequence of *SUS* gene was cloned from *D. opposita* for the first time, and its protein structure was analyzed to lay a foundation for further studying the roles of *SUS* in the growth and polysaccharide synthesis of *D. opposita*.

[Key words] *Dioscorea opposita*; *SUS*; gene clone; coding sequence; bioinformatics

蔗糖合成酶 (sucrose synthase, *SUS*, EC 2.4.1.13) 是植物体内促使蔗糖进入各个代谢途径的关键酶之一,多数存在于细胞质中,有些附着在细胞膜上,并以两种以上同工酶的形式存在于大多数植物体内<sup>[1]</sup>,通常具有较高的氨基酸序列同源性和相似的生化性质。蔗糖合成酶基因大小约 5.9 kb, mRNA 长度约 2.8 kb,是由相对分子质量 83~100 kD 的亚基构成的四聚体<sup>[2]</sup>。*SUS* 在植物生长发育过程中具有调节蔗糖的分解与合成<sup>[3]</sup>,调控尿苷二磷酸葡萄糖 (uridine diphosphoglucose, UDPG) 的生成<sup>[4]</sup>,参与细胞分化<sup>[5]</sup>,提高植物抗逆性的作用<sup>[6]</sup>,目前已在马铃薯<sup>[7]</sup>、小麦<sup>[8]</sup>、水稻<sup>[9]</sup>、拟南芥<sup>[10]</sup>等多个物种中被发现并被深入研究。

山药为薯蓣科植物薯蓣的干燥根茎,具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功效<sup>[11]</sup>。研究证明山药最主要的活性成分是山药多糖<sup>[12]</sup>,具有抗氧化<sup>[13]</sup>、抗肿瘤<sup>[14]</sup>、提高免疫力<sup>[15]</sup>等药理作用。山药多糖由葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖等单糖组成,这些单糖是由蔗糖代谢关键酶之一的蔗糖合成酶通过调节蔗糖的分解和转化衍生而来<sup>[16]</sup>,因此蔗糖合成酶相关功能的研究对山药多糖的代谢机制有着重要的推进作用。但目前国内外尚未有对山药 *SUS* 基因的研究报道。本研究通过基因克隆以及基因组数据比对从铁棍山药中克隆 *SUS* 基因的编码序列,并对其蛋白质结构分析,为蔗糖信号传导途径方面的调控研究、多糖的合成机制及代谢途径研究奠定分子基础。

## 1 材料

Veriti™ Dx 型热循环仪 (美国 Thermo Fisher 公司), DYY-12 型电泳仪 (北京市六一仪器厂), JS-780 型凝胶成像分析系统 (上海培清科技有限

公司);植物多糖多酚总 RNA 提取试剂盒 (批号 AI50313A),反转录试剂盒 (批号 AK3091),Premix Taq™ 酶 (批号 AI60209A),凝胶回收试剂盒 (批号 AI10972A),PMD™ 19-T 克隆载体试剂盒 (批号 AI52389A),JM109 化学感受态细胞 (批号 AI51727A),DL5000 Marker (批号 A1101B) 以上试剂均购自日本 TakaRa 公司;异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG,批号 717D051),5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-Gal,批号 120E038) 购自北京索莱宝科技有限公司;氨苄青霉素钠 (Amp,批号 B541011) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

铁棍山药样品来源于本实验室温室,取其新鲜根茎用无菌水冲洗干净,并用无菌纸吸干表面水分。经河南中医药大学药学科董诚明教授鉴定为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* 的根茎。

## 2 方法

**2.1 引物设计** 根据本实验室前期得到的铁棍山药基因组数据,经注释得到的 *SUS* 基因两端的编码区域设计一对特异性引物。引物序列,上游引物 5'-ATGGCGAACCTGCATTGTCTCAT-3' 下游引物 5'-CTAATTGCCTCCATTAAGCATTGATCA-3',退火温度 60 ℃。引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

**2.2 总 RNA 提取、反转录与聚合酶链式反应 (PCR) 扩增** 铁棍山药总 RNA 的提取按照试剂盒提供的步骤进行操作,提取的总 RNA 用核酸测定仪与 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测提取质量。按照反转录试剂盒提供的步骤将总 RNA 反转录为 cDNA 第一链,总 RNA 模板用量 536 ng,反转录体系共 20  $\mu$ L,反应完成后加入 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 80  $\mu$ L。之后通过 PCR 反应扩增出目的片段,PCR 反应体系

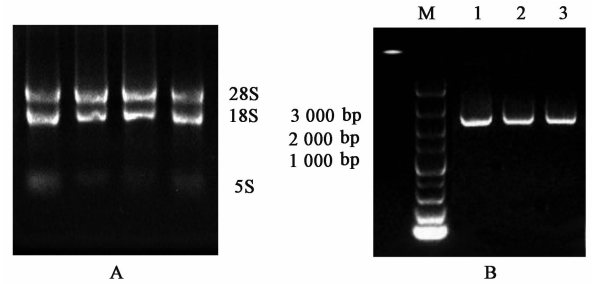
50  $\mu\text{L}$ ; Premix *Taq*<sup>TM</sup> 25  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 10  $\mu\text{L}$ , RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 13  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**2.3 克隆载体构建** 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物并用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段, 与 PMD19-T 克隆载体于 16  $^{\circ}\text{C}$  连接 5 h, 连接产物转化至 JM109 化学感受态细胞, 转化后加入 SOC 培养基 890  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  震荡培养 60 min, 将培养后的菌液涂布于含有 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Amp, 125  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG 及 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  X-gal 的 LB 平板培养皿表面, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光培养 16 h, 挑取白色阳性单克隆菌落, 用 LB (Amp<sup>+</sup>) 培养液 37  $^{\circ}\text{C}$  扩大培养, 待菌液混浊, 进行菌液 PCR 鉴定。PCR 反应体系 50  $\mu\text{L}$ : Premix *Taq*<sup>TM</sup> 25  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 菌液 1  $\mu\text{L}$ , RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测筛选出阳性菌液交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

**2.4 生物学信息分析** 开放阅读框分析使用 NCBI 在线程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orfFinder/>)。磷酸化位点分析使用在线软件 KinasePhos 系统 HMM 模型 (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>), 并使用离线软件 DENEDOC 对比对序列进行修饰。蛋白质的一级理化性质分析使用软件 DNAMAN 与在线软件 ExpASy (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>), 二级结构分析使用在线软件 SOMPA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)), 三级结构预测使用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), 跨膜区预测使用在线软件 TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), 信号肽预测使用在线软件 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/Ser-vices/SignalP/>)。蛋白质功能注释使用在线软件 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) 与 NCBI Structure 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 蛋白质亚细胞定位分析使用在线软件 PSORT (<https://www.genscript.com/psort.html>)。使用离线软件 DNAMAN 与 MEGA7.0 进行同源性分析及构建系统进化树。

### 3 结果

**3.1 铁棍山药总 RNA 检测** 铁棍山药总 RNA 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测到 28 S, 18 S 和 5 S rRNA 3 条带, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 经测定为 1.9~2.1, 说明 RNA 完整性良好, 无蛋白质与 DNA 污染, 测得质量浓度为 134  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 适合进行反转录与 PCR 扩增反应。见图 1。



M. DL5000Marker; 1~3. PCR 产物

图 1 铁棍山药总 RNA (A) 及 PCR 扩增产物 (B) 琼脂糖凝胶电泳  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA (A) and PCR amplification products (B) of *Dioscorea opposita*

**3.2 目的片段扩增与 TA 克隆** 提取的铁棍山药总 RNA 反转录后经 PCR 扩增, 产物经 1.0% 凝胶电泳检测, 出现 2 500 bp 左右的单一性条带, 条带大小符合预期, 可用于后续克隆, 见图 1。将克隆测序结果与铁棍山药基因组数据比对, 结果显示克隆序列与 *SUS* 基因序列一致, 从而验证了该克隆基因的正确性。使用 NCBI 网站 ORF 在线预测, 预测结果显示该克隆基因具有一个完整的开放阅读框, 将其命名为 *DoSUS1*。见图 2。

**3.3 理化性质分析** 通过一级理化性质分析, *DoSUS1* 编码序列全长 2 448 bp, G + C 含量 45.10%, 编码 815 个氨基酸, 分子式 C<sub>4209</sub>H<sub>6534</sub>N<sub>1115</sub>O<sub>1205</sub>S<sub>23</sub>, 相对分子质量 92 788.32, 其中带负电荷残基总数占 12.76%, 带正电荷的残基总数占 11.29%, 见表 1。在哺乳动物网织红细胞体内的半衰期为 30 h, 消光系数 ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) 为 110 505  $\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , 不稳定指数为 32.18, 属于稳定类蛋白; 脂溶性指数 (AI) 为 94.15, 说明其稳定性好, 平均亲水指数 (GRAVY) 为 -0.225, 属于可溶性蛋白; 理论等电点 (PI) 6.10, 为酸性蛋白质, 说明在偏酸性的亚细胞环境中较稳定。信号肽与跨膜域预测显示, *DoSUS1* 蛋白既不具有跨膜域, 也不具有信号肽, 提示 *DoSUS1* 为非分泌蛋白, 因此 *DoSUS1* 蛋白在细胞中合成后可能不执行蛋白质转运的功能, 而是在细胞质基质中发挥作用, 这与其他物种的

1 ATGGCGAACCTGCATTGCTCGTGTCCACAGCGTTTCGGCAACGTTTGGTGCATAACCTCTCTGCTCATCGGAATGAATTGGTGGCCGTC  
 1 M A E P A L S R V H S V R E R L V D N L S A H R N E L V A V  
 91 TTCTCAAGGTTTGTAAATCAAGGAAAAGGGAATGCTACTGCCACTCAGTTGCAAGCTGAGTACAAAAGCTGTGATATCCCTGCTGACAGA  
 31 F S R F V N Q G K G M L L P H Q L Q A E Y K A V I S P A D R  
 181 GAGGCACTCAAGGATGGTATCTTTGAAAGTGTATCAATGCTGCGCAGGACGATCGTTATCCCTCCATGGGTTGCTCTTGCTATTCCG  
 61 E A L K D G I F E D V I N A A Q E A I V I P P W V A L A I R  
 271 CCAAGGCGGGGAGTTTGGGAATATGTTAGAGTGAATGTTAATGAECTTGCTGTTGAGGACTTAACTGTGCTGATCACTGCAATTTAAG  
 91 P R P G V W E Y V R V N V N L E L A V E D L T V P D P E Y L Q F K  
 361 GAGGACTTGTGGAGGATGGAATTCGTAGCAACTTGTGTTGGAACCTGATTTTGAGCCACTCAGTGCCTTCTTTCCTGCCCTTCCTTG  
 121 E D L V E D G I R S N F V L E L D F E P F S A S F P R P S L  
 451 TCGAAATCAATTGGTAATGGTGTGCAATTCCTTAATCGTCATCTTTCATCAAACCTATTCCAGGACAAGGAAAAGCCTGTATCCTTTGCTT  
 151 S K S I G N G V Q F L N R H L S S K L F Q D K E S L Y P L L  
 541 AATTTCCTGAGAGATCATAACTCAAGGGGACATCTATGATGCTGAACGATCTGAAGCTTAAATGCACTCCGGGCTGCTGAGG  
 181 N F L R D H N Y K G G T S M M L N D R I L S L N A L R A S L R  
 631 AAGCAGAGGAATATCTGCTGAGCATCCCAAGGATACACCATACTCCGAATTCACACACAGATTCGAAGAATTTGGTCTGGAGAAGGGA  
 211 K A E E Y L L S I P K D T P Y S E F T H R F Q E L G L E K G  
 721 TGGGGTGACAC CGTGCACGTTTCATGAGAAATGCCATCTCTCTCTGATCTTCTGAAGCACCTGATCCATGCACCTTGGAGAAAGTTC  
 241 W G D T A E N V R N V N L E L A P D L V P D P E Y L Q F K  
 811 CTCAGCATAATTCATGGTGTCAATGTTGCCATCTTCCACCGATGTTACTTTGCTCAAGCTAACGCTTCTGGGGTATCCTGACACC  
 271 L S I I P M V F N V A I L S P H G Y F A Q N V L G Y F A Q N V L G Y P D T  
 901 GGTGGCCAAATCGTTTACATCTTGGATCAAGTTCGTGCATTGGGAATGAGATGCTTCTTAGGATAAAGCAACAAGGCTTGTATTTACT  
 301 G G Q I V Y A I L D Q V R A L E N E M L L R I K Q Q G L D I T  
 991 CCTAAATTCGTATGTGACTGGTGTGCTGCCGATGCTGCGGAACCTGTTGGTTCAGAGACTGAGAAAGCTTGGAAAGCAAGAAC  
 331 P K I L I V T R L L P D A V G T T C G Q R L E K V L G T E H  
 1081 ACACACATTCCTCGGGTCCATTCCAGAACGAAAAGGGGATCTTAGGAAGTGGATCTCGTTCGAAGTTTGGCCTTATTGGAGACT  
 361 T H I L R V P F R N E K G I L R K W I S R F E V W P Y L E T  
 1171 TATGCTGATGATGTTGCAAAATGAGTTGGCTGGAGAATCGAGCCAAACCCGGACTTGGTAATTTGGAAACTACAGTGTGGAAATCTAGTT  
 391 Y A D D V A N E L A G E L Q A N P D L V I G N S D G N A L V  
 1261 GCATCTCTGCTGGCACATAAATTTGGGAGTCACTCAGTGTACCATGCTCATGCCCTGGAGAAAACAAAGTACCCAAATTCGATATTAC  
 421 A S L L A H K L G V T Q C T I A H A L E K T K Y P N S D I Y  
 1351 TGGAAAAGTTTGGAGAAACAGTACCATTCTCTTCTCAACTCTGCTGATTTGATGCGCCATGAACCCAGCCGCTTTCATCAATCCAGT  
 451 W K K F E K Q Y H F S S Q F T A D L I A M N H A D F I I T S  
 1441 ACATTCGAAGAGATCGCGGGAAGCAAGGACACTGTGGGACAATACGAGTCTCATACTGCCCTTCACTTCCCGGCTGTGACCCGGTGGIC  
 481 T F Q E I A G S K D T V G Q Y E S H T A F T L P G L Y R V V  
 1531 CATGGAATGATGCTTTGATCCTAAGTCAACATTTGCTCTCCCTGGTGTGATGTCGATCTACTTCCCTTACTGATCACAAAC  
 511 H G I D V F D P K F N I V S P G A D M S I Y F P Y T D H N N  
 1621 CCGCTACTGCTTTTCACTCCTGAAATAGAGGAGCTGATTTACAGTCTGTTGAGAACTCAGTGCACAAGTTTGTCTGAAAGGACCGAAAC  
 541 R L T A F H P E I E E L I Y S P V E N S L H K F V L K D R N  
 1711 AAGCCATCATATTTCCATGGCAAGACTAGATCGAGTAAAGAATCACTGACTGTTGAGTCTTATGGCAAGAATGCTCGTCTTAGA  
 571 K P I I F S M A R L D R V K N I T G L V E F Y G K N A R L R  
 1801 GAGCTTGCCCACTTGTGGTAGTGGGTGGAGACATGGAAGAATCCAAGGACCTTGAAGGACCGCCGAGATGAAGAAGATGTACAAG  
 601 E L A N L V V V G G D H G K E S K D L E E Q A E M K K M Y K  
 1891 TACATAGAGGAGTACAAATGAAAGGCATATTCGCTGGATTTCGCGCAATGAACCGTGTAGGAAACCGGAGAGCTTACCCTGCAATT  
 631 Y I E E Y K L K G H I R W I S A Q M N R V R N G E L Y R C I  
 1981 TGTGATCCAAAGGGGTTTTTGTTCAGCTGCCTTGTATGAGGCTTTCGGCTTGACTGTTATCGAAGCCATGACCTGGGGTCTTCTTACA  
 661 C D S K G V F V Q P A L Y E A F G L T V I E A M T C G L P T  
 2071 TTTGTAACGGCTACGAGGAGGCTGCGGAGATCATAGTGGATGTTGTTCCGGCTTCCATATCGACATCCTTATCAGGGTGCACAAAGCTGCT  
 691 F V T A H G G P A E I I V D G V S G F H I D P Y Q G D K A A  
 2161 GAAACTCTCGTGAACCTTTTTGAAAATGCAAGGAAGATCTACTTACTGGGACAAAATTCACAAGGCGGGCTTAAGCGAATCTATGAC  
 721 E T L V N F F E K C K E D P T Y W D K I S Q G G L K R I Y D  
 2251 AAGTACCTTGGAAAGCTTTCGGAAGGTTGATGACTTTTATCTGCTGTTTATGGATTCTGGAAGTATGTTTCTAATCTCGACAGGCGC  
 751 K Y T W K L Y S E R L M T L S A V Y G F W K Y V S N L D R R  
 2341 GAAACCAAGCGATATCTCGAGATGTTCTATGCTCTGAAATATCGCAATTTGGCAAAAATCAGTGCCTTTAGCTGTTGATGCTGATCAAATG  
 781 E T K R Y L E M F Y A L K Y R N L A K S V P L A V D A D A Q M  
 2431 CTTAATGGAGGCAATT\*  
 811 L N G G N \*

图 2 DoSUS1 基因 CDS 区核苷酸及编码氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and amino acid sequence in CDS region of DoSUS1 gene

SUS 成员特点一致。利用 KinasePhos 软件预测磷酸化位点并通过 GENEDOC 软件对序列进行修饰,所比对 10 个物种的单子叶植物 SUS 氨基酸序列均存在磷酸化位点苏氨酸(Thr),但其余磷酸化的氨基酸种类和位置有所不同,见图 3。

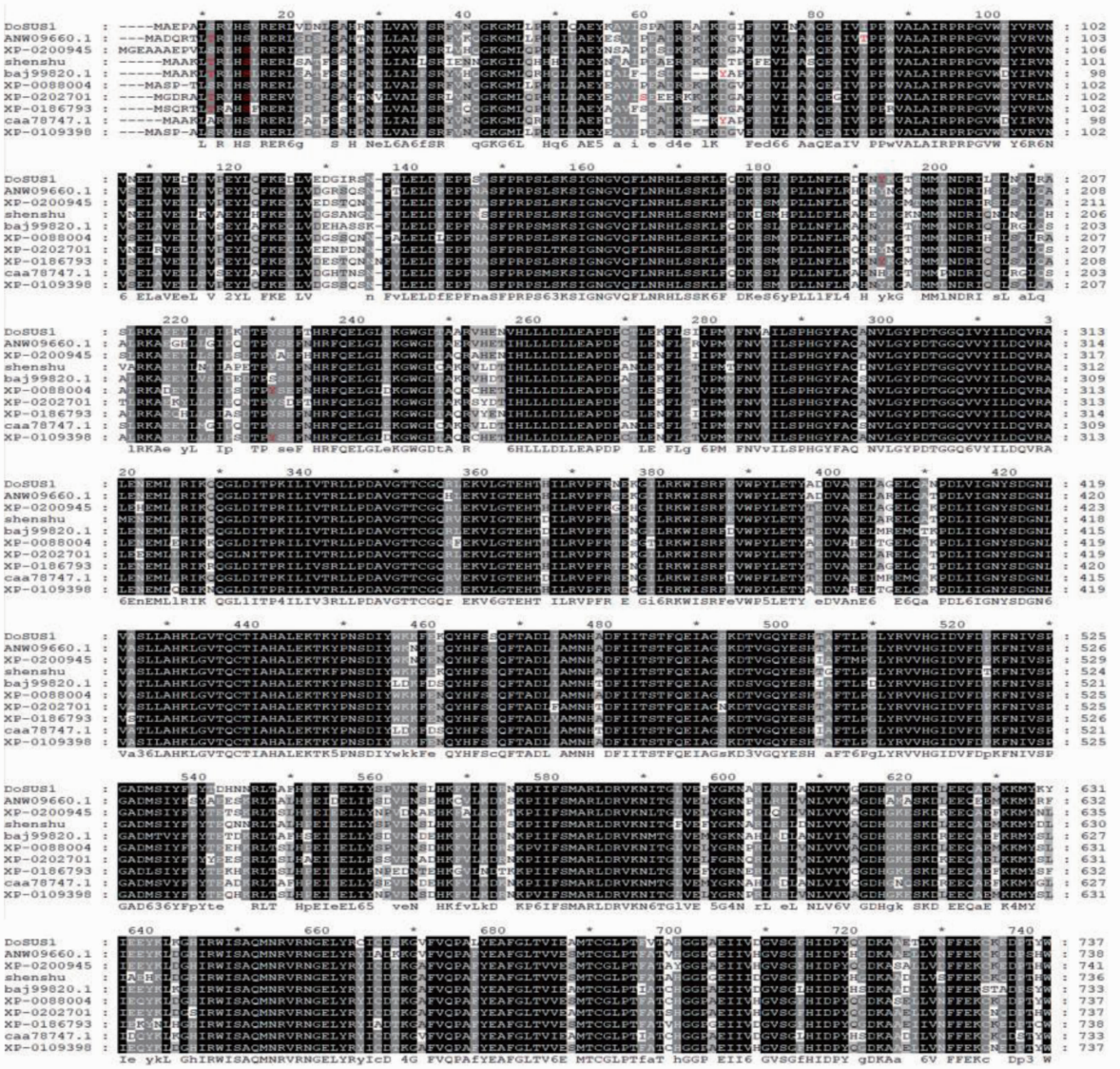
**3.4 二级结构及三级结构预测分析** 蛋白质二级结构分析结果显示 DoSUS1 氨基酸序列以  $\alpha$  螺旋为主,占 55.71%,无规则卷曲占 24.79%,延伸链占 12.02%, $\beta$  转角占 7.48%,见图 4,通过 SWISU-MODEL 三维建模,DoSUS1 蛋白以拟南芥(3S27.1.B)为参考,预测位点起始于第 25 个氨基酸,终止于第 806 个氨基酸,预测结果 GMQE 值 0.84,QMEAN 值 1.85,证明预测结果准确可靠,见图 5,预测结果显示 DoSUS1 以  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲为主,这与二级结构预测结果一致,从二级结构与

表 1 DoSUS1 氨基酸序列组成

Table 1 Composition of amino acid in DoSUS1

氨基酸	数量 /个	Mol /%	W /%	氨基酸	数量 /个	Mol /%	W /%
Ala(A)	58	7.12	4.81	Met(M)	16	1.96	2.22
Cys(C)	7	0.86	0.79	Asn(N)	39	4.79	4.80
Asp(D)	45	5.52	5.57	Pro(P)	38	4.66	4.07
Glu(E)	59	7.24	8.08	Gln(Q)	26	3.19	3.54
Phe(F)	39	4.79	6.00	Arg(R)	43	5.28	6.97
Gly(G)	49	6.01	3.42	Ser(S)	44	5.40	4.30
His(H)	24	2.94	3.47	Thr(T)	35	4.29	3.88
Tle(I)	47	5.77	5.74	Val(V)	59	7.24	6.43
Lys(K)	49	6.01	6.67	Trp(W)	10	1.23	1.90
Leu(L)	91	11.17	11.11	Tyr(Y)	37	4.54	6.24

三级结构预测结果来看,DoSUS1 蛋白的  $\alpha$  螺旋 > 45%, $\beta$  折叠 < 5%<sup>[18]</sup>,因此可将 DoSUS1 归为全  $\alpha$  类蛋白质。



XP-020094531. 1. 菠萝; XP-018679387. 1. 香蕉; XP-008800466. 海枣; XP-010939862. 油棕; ANW09660. 1. 白及; XP-020270187. 芦笋; shenshu. 参薯<sup>[17]</sup>; ba399820. 1. 大麦; caa78747. 1. 水稻; 红色字体表示用于磷酸化的保守氨基酸残基

图 3 不同物种 SUS 氨基酸序列多重比对

Fig.3 Results of multiple amino acid sequences alignment of SUS in different plant species

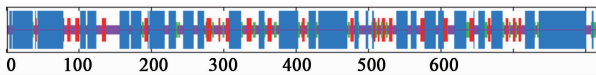


图 4 DoSUS1 二级结构预测

Fig.4 Secondary structure prediction of DoSUS1

3.5 亚细胞定位和功能域预测分析 亚细胞定位结果显示 DoSUS1 蛋白在细胞膜和细胞核中分别占

11.50%, 10.91%, 其余均集中在细胞质中, 其中线粒体占 13.17%。功能域预测结果显示 DoSUS1 被归为 PLN00142 家族, 属于蔗糖合成酶超级家族, 并具有蔗糖合成和糖基转移两个功能域, 其中 1~548 aa 为蔗糖合成功能域, 557~743 aa 为糖基转移功能域, 同时匹配结果也表明 DoSUS1 与香蕉、海枣、菠萝、芦笋等单子叶植物的 SUS 氨基酸序列均具有较高的相似度。通过进一步分析后, 在上述所比物种的蔗糖合成酶基因中均具有完整的蔗糖合成

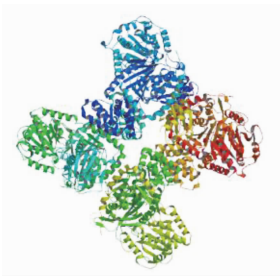


图 5 DoSUS1 三级结构预测

Fig. 5 Putativetertiary structure of DoSUS1

功能域与部分糖基转移功能域,这说明 SUS 在不同物种之间执行着类似的生理功能。见图 6。



蓝色. 蔗糖合成功能域;褐色. 糖基转移功能域

图 6 DoSUS1 功能域预测

Fig. 6 Functional domain prediction of DoSUS1

表 2 不同物种间 SUS 氨基酸序列同源性比较

Table 2 Homology comparing of amino acid sequences of SUS between species

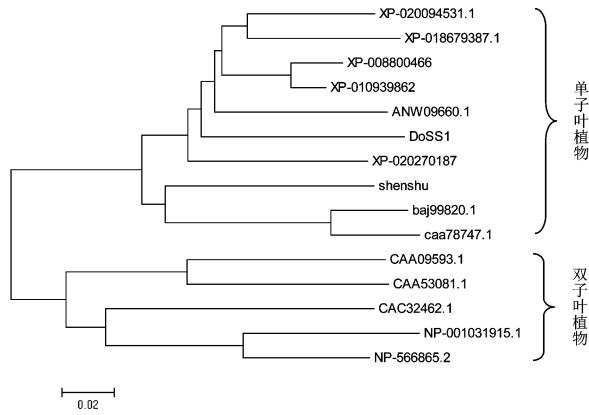
物种	菠萝	香蕉	海枣	油棕	白及	芦笋	参薯	大麦	水稻	DoSUS1	%
菠萝	100										
香蕉	88.66	100									
海枣	89.38	88.24	100								
油棕	89.62	89.09	96.69	100							
白及	86.32	86.41	89.22	89.22	100						
芦笋	87.06	85.91	87.12	87.73	85.29	100					
参薯	81.68	82.11	83.68	84.17	82.35	82.33	100				
大麦	81.20	81.50	81.72	82.70	79.78	81.47	82.80	100			
水稻	80.34	80.39	81.35	82.33	79.29	80.37	83.17	93.56	100		
DoSUS1	85.23	84.31	86.50	87.24	84.93	84.66	81.84	80.74	80.49	100	

#### 4 讨论

蔗糖合成酶最早从小麦中被发现<sup>[18-19]</sup>,该酶可催化果糖和葡糖基二磷酸核苷之间的可逆转换(蔗糖 + NDP ↔ UDPG + 果糖),在果实品质以及产量调控方面<sup>[20-22]</sup>具有重要的意义;严亮<sup>[23]</sup>通过对铁皮石斛的研究发现 SUS 基因在其主要活性成分石斛多糖的合成过程中产生了大规模复制,推测该基因在多糖合成途径中也起着重要的作用,因此获取山药 SUS 基因序列是研究其多糖合成机制的重要前提。本研究通过基因克隆以及基因组数据比对首次从铁棍山药中克隆出 SUS 基因的编码序列并进行了蛋白质结构分析。从理化性质分析结果显示 DoSUS1 共编码 815 个氨基酸序列,通过对比所选物种的

3.6 同源性及系统发育分析 利用 DNAMAN 对所选物种的 SUS 氨基酸序列同源分析,见表 2,该序列在所比对的物种间具有较高的保守性,序列相似性在 79.29% ~ 96.69%。DoSUS1 与棕榈科油棕、海枣序列相似性分别为 87.24% ,86.50% ;与凤梨科菠萝、芭蕉科香蕉、兰科白及、天门冬科芦笋的相似性分别为 85.23% ,84.31% ,84.93% ,84.66% ;与同属植物参薯的相似性为 81.84% ;与禾本科植物大麦、水稻的相似性分别为 80.74% ,80.49% 。这说明该基因在不同科属之间的演化过程中产生了不同程度的分化。使用 MEGA7.0 软件采用邻位连接法,并用 Bootstrap 方法检验拓扑结构,构建系统进化树。从系统发育树来看,DoSUS1 与油棕、海枣、白及、芦笋、香蕉、菠萝、参薯等单子叶植物共聚为一支,接着又与番茄、胡萝卜、豌豆、拟南芥等双子叶植物聚为一支。见图 7。

氨基酸序列发现 SUS 蛋白皆不存在跨膜区,也不存在信号肽,均属于非分泌蛋白。通过隐马尔可夫(HMM)模型预测,不同物种的单子叶植物 SUS 氨基酸序列均存在磷酸化位点苏氨酸(Thr)。对 DoSUS1 进行功能分析发现该氨基酸序列具有蔗糖合成与葡糖基转移两类功能,这与一些物种的分类结果相同,但一些物种在功能分类中除了具有上述 2 种功能外,还具有蔗糖磷酸合成酶的功能<sup>[24]</sup>,这是 DoSUS1 所不具备的功能。对不同物种的 SUS 进行进化分析<sup>[25]</sup>可知 SUS 由 3 个大的家族(Class1, Class2, Class3)组成,依次为单子叶植物 SUS 族、双子叶植物 SUS1 族和双子叶 SUSA 族,因此根据进化树分类结果可推测 DoSUS1 应为 Class1 家族,即



XP-020094531.1. 菠萝; XP-018679387.1. 香蕉; XP-008800466. 海枣; XP-010939862. 油棕; ANW09660.1. 白及; XP-020270187. 芦笋; shenshu. 参薯; baj99820.1. 大麦; caa78747.1. 水稻; CAA09593.1. 番茄; CAA53081.1. 胡萝卜; CAC32462.1. 豌豆; NP-001031915.1, NP-566865.2. 拟南芥,

图 7 DoSUS1 氨基酸序列系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of amino acid sequences of DoSUS1

单子叶SUS族。

蔗糖作为光合作用的主要产物,蔗糖合成酶能将蔗糖分解,为多糖合成提供原料,从而调整淀粉和蔗糖的分配<sup>[26]</sup>。由于同源关系越近的蛋白执行的生理功能越相近,与铁棍山药 DoSUS1 具有较高同源关系的菠萝在果实发育过程中蔗糖含量与 SUS 表达量相关性显著<sup>[27]</sup>,周生茂<sup>[17]</sup>在对同属植物参薯 SUS 的研究中发现该基因在其非光合作用器官中表达,其中在其地下根茎中的表达量异常显著,而在光合作用器官中未检测到表达,由此可推测铁棍山药中该基因在同为淀粉和多糖贮藏器官的根茎中也显著表达。

[参考文献]

[ 1 ] Moricuchi T, Yamaki S. Purification and characterization of sucrose synthase from peach (*Prunus pirisica*) fruit [J]. *Plant Cell Physiol*, 1988, 29(8) : 1361-1366.  
 [ 2 ] Elling L. Effect of metal ions on sucrose synthase from rice grains-a study on enzyme inhibition and enzyme topography[J]. *Glycobiology*, 1995, 5(2) : 201-206.  
 [ 3 ] ZHOU L, Paull R E. Sucrose metabolism during Papaya (*Corica papaya*) fruit growth and ripening[J]. *J Am Soc Hort Sci*, 2001, 126(3) : 351-357.  
 [ 4 ] Geigenberger P, Stitt M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in developing potato tuber and other plant tissues[J]. *Planta*, 1993, 189(3) : 329-339.  
 [ 5 ] RUAN Y L, Churey P S. A fiberless seed mutation in

cotton is associated with lack of fiber initiation in ovule epidermis and alterations in sucrose synthase expression and carbon partitioning in developing seeds [ J ]. *Plant Physiol*, 1998, 118(2) : 399-406.  
 [ 6 ] Jha A B, Dubey R S. Carbohydrate metabolism in growing rice seedlings under arsenic toxicity [ J ]. *J Plant Physiol*, 2004, 161(7) : 886-872.  
 [ 7 ] Sluginina M A, Boris K V, Kakimzhanova A A, et al. Intraspecific polymorphism of the sucrose synthase genes in Russian and Kazakhstan potato cultivars [ J ]. *Genetika*, 2014, 50(6) : 677-682.  
 [ 8 ] JIANG Q, HOU J, HAO C, et al. The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (*TaSUS2*) active in endosperm development is associated with yield traits [ J ]. *Funct Integr Genomics*, 2010, 11(1) : 49-61.  
 [ 9 ] Horst I, Welham T, Kelly S, et al. TILLING mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase [ J ]. *Plant Physiol*, 2007, 144(2) : 806-820.  
 [ 10 ] Iwona C, Leszek A, Kleczkowski. Expression of several genes involved in sucrose/starch metabolism as affected by different strategies to induce phosphate deficiency in *Arabidopsis* [ J ]. *Acta Physiol Plant*, 2005, 27(20) : 147-155.  
 [ 11 ] 王海平, 沈镒. 山药种质资源描述规范和数据标准 [ M ]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2014: 1-6.  
 [ 12 ] Afoakwa E O, Sefa-Dedeh S. Chemical composition and quality changes occurring in *Dioscorea dumetorum* pax tubers after harvest [ J ]. *Food Chem*, 2001, 75(1) : 85-91.  
 [ 13 ] ZHANG Z S, WANG X M, LIU C B, et al. The degradation, antioxidant and antimutagenic activity of the mucilage polysaccharide from *Dioscorea opposita* [ J ]. *Carbohydr Polym*, 2016, 150(20) : 227-231.  
 [ 14 ] LIU Y X, LI H F, FAN Y Y, et al. Antioxidant and antitumor activities of the extracts from Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) flesh and peel and the effective compounds [ J ]. *Food Sci*, 2016, 81(6) : 1553-1564.  
 [ 15 ] NIU X, HE Z, LI W, et al. Immunomodulatory activity of the glycoprotein isolated from the Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb) [ J ]. *Phytother Res*, 2017, 31(10) : 1557-1563.  
 [ 16 ] Vaughn M W, Harrington G N, Bush D R. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the Phloem [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(16) : 10876-10870.

- [17] 周生茂. 山药不同基因型地下块茎糖类和酚类物质形成、调控及相关基因分离的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2009.
- [18] Rost B, Sander C. Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure[J]. *Protein Sci*, 1994, 19(1):55-72.
- [19] Schmöler K, Gutmann A, Diricks M, et al. Sucrose synthase: A unique glycosyltransferase for biocatalytic glycosylation process development[J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(2):88-111.
- [20] HU L, LIU S. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of the ERF gene family in cucumbers[J]. *Genet Mol Biol*, 2011, 34(4):624-634.
- [21] Hardin S C, Winter H, Huber S C. Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4):1427-1438.
- [22] Anguenot R, Nguyen-Quoc B, Yelle S, et al. Protein phosphorylation and membrane association of sucrose synthase in developing tomato fruit[J]. *Plant Physiol Bioch*, 2006, 44(5/6):294-300.
- [23] 严亮. 中国传统兰科药用植物铁皮石斛基因组及其生物学特性研究[D]. 长春:吉林大学, 2014.
- [24] 王凌云, 郭明, 赵艳, 等. 谷子蔗糖合成酶基因家族鉴定及生物信息学分析[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(15):30-34.
- [25] LI C R, ZHANG X B, HUANG C H, et al. Cloning, characterization and tissue specific expression of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic CAM Orchid *Mokara yellow* [J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161(1):87-94.
- [26] Verma A K, Upadhyay S K, Verma P C, et al. Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SUS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars[J]. *Plant Biol*, 2011, 13(2):325-332.
- [27] 张秀梅, 杜丽清, 孙光明, 等. 菠萝果实发育过程中糖积累与其代谢酶的关系[J]. *热带作物学报*, 2008, 29(1):10-13.

[责任编辑 顾雪竹]