

一个麻疯树花羧酸酯酶基因的克隆、表达分析和原核表达

雷世康^{1,2}, 徐刚^{1,3,*}

¹贵州省森林资源与环境研究中心, 贵阳550025

²贵州大学生命科学学院, 贵阳550025

³贵州大学昆虫研究所, 贵阳550025

摘要: 基于麻疯树RNA-Seq数据, 利用RT-PCR技术成功从麻疯树花器官中克隆获得*JcCXE7*基因的开放阅读框, 长度为957 bp, 编码318个氨基酸, 预测该蛋白分子质量为35.55 kDa。对*JcCXE7*基因的时空表达进行分析, 结果表明, *JcCXE7*基因可能参与了麻疯树雌花大孢子母细胞发生和减数分裂; 且在雌花中的表达水平大大高于雄花。利用原核表达体系对*JcCXE7*基因进行诱导表达, 随后对获得的蛋白进行了LC-MS/MS鉴定, 并对*JcCXE7*蛋白的氨基酸序列与同源家族进行多重比对及其结构进行分析, 结果表明*JcCXE7*蛋白可能为GID1家族蛋白。

关键词: 麻疯树; 花发育; 羧酸酯酶; 表达分析

羧酸酯酶(carboxylesterases)是一类代谢酶类, 它们广泛存在于自然界的动物、植物及微生物中, 能催化各种外源性与内源性酯类的水解。羧酸酯酶主要的特征是含有一个催化三联体(包含GXSXG保守序列), 由一个丝氨酸、一个组氨酸及一个谷氨酸或天冬氨酸构成, 催化三联体会形成一个电荷中继网络来产生攻击羧酸酯基羰基碳的亲核丝氨酸, 从而形成一个酰化酶-基板中间体以完成水解(Gershater等2006; Ileperuma等2007)。羧酸酯酶分为3类, 其中I型羧酸酯酶与II型羧酸酯酶属于 α/β 水解酶折叠超家族蛋白。 α/β 水解酶折叠超家族的成员包含一个保守的核心结构, 这个结构包含一个由8条 β 折叠组成的中心单元, 它们由 α 螺旋环跨膜穿越连接(Ollis等1992)。III型羧酸酯酶则不含 α/β 水解酶折叠结构, 属于从细菌中发现的GDS脂肪酶家族(Mølgaard等2000)。

羧酸酯酶在动物中的功能有较为深入的研究(Redinbo和Potter 2005)。近年来, 植物羧酸酯酶也有较多的研究报道, Marshall等(2003)从模式植物拟南芥中成功克隆得到20个I型羧酸酯酶基因, 在该基因家族中除了*AtCXE3*与*AtCXE9*只在拟南芥的花与荚果中表达外, 其余18个成员在拟南芥植株的大部分组织中均有表达。Souleyre等(2011)克隆了多个I型苹果羧酸酯酶基因并发现*MdCXE1*可能通过水解相关的芳香酯对苹果的风味造成影响, 并且Goulet等(2012)也发现番茄*SICXE1*基因的高水平表达导致了乙酸酯含量的降低从而影响了番茄的风味。Chandrashekharaiiah等(2011)发现从刺

毛黎豆种子中纯化出的羧酸酯酶对短链萘酯具有较高活性; Subramani等(2012)也发现从麻疯树种子纯化出的羧酸酯酶对短链萘酯具有较高的活性, 特别是对于萘丁酸, 由此推断麻疯树羧酸酯酶可能是通过水解短链脂肪酸酯在植物的生长发育过程中发挥重要作用。番茄等茄科植物通过腺毛分泌出的糖酯混合物通常由以蔗糖或葡萄糖为主链, 2~5个酰基链被酯化到糖核的不同位置组成, Schillmiller等(2016)研究发现番茄中酰基糖水平的降低与2个羧酸酯酶基因*ASH1*和*ASH2*的高水平表达的活动相关, 然而ASH酶在特定的酰基糖底物中的功能及其是如何影响酰基糖水平仍是未知的。此外, 羧酸酯酶在植物激素信号转导过程中也发挥着重要作用, 许多信号分子在植物体内以不活跃的酯缀合物的形式积累, 依靠羧酸酯酶进行选择性地水解来调节活性, 以完成信号传递(Forouhar等2005; Stuhlfelder等2004; Ueguchi-Tanaka等2005)。

本研究从麻疯树花蕾转录组数据中筛选到了一个性别差异表达的羧酸酯酶基因的转录本序列, 利用RT-PCR技术克隆获得该基因的ORF, 分析了该基因在麻疯树花发育过程中的表达模式; 利用LC-MS/MS技术对该基因的原核表达产物进行了鉴定, 并且采用生物信息学手段对该蛋白的结构进行分析。

收稿 2017-08-14 修定 2018-01-18

资助 国家自然科学基金(31460184)。

* 通讯作者(xg335300@aliyun.com)。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料及处理

供试材料麻疯树(*Jatropha carcas* L.)花器官采集自贵州省黔西南州贞丰县种植的麻疯树,置于非冻型组织RNA保存液中,平衡48 h后按照表1的标准,对不同时期的花器官进行分类,随后保存于-80°C冰箱中备用。

1.2 总RNA提取及cDNA第一链的合成

样品总RNA采用Bio-Tek公司的OMEGA Plant RNA Mini Kit进行提取,提取方法参照说明书。使用Thermo超微量ND2000分光光度计对提取的总RNA进行定量及完整性检测。样品cDNA第一链采用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit进行合成,具体方法见试剂盒说明书。

1.3 麻疯树*JcCXE7*基因ORF的克隆

基于麻疯树RNA-Seq数据,筛选到了一个麻疯树CXE7转录本序列,利用在线工具ORF Finder获得该基因完整的开放阅读框(ORF),利用Primer

Premier 6软件设计PCR引物(表2)。PCR反应体系:0.25 μ L TaKaRa Ex Taq酶、5 μ L 10 \times Ex Taq Buffer、4 μ L dNTP Mixture、1 μ L cDNA、上下游引物各1 μ L,灭菌水补足至50 μ L。PCR反应程序:98°C 10 s,60°C 30 s,72°C 1 min,30个循环。之后对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,利用TaKaRa Mini Best Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0试剂盒对目的片段进行切胶回收。将目的片段与克隆载体pMD19-T 16°C过夜连接后转化至大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中,挑取阳性克隆送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序验证。

1.4 麻疯树*JcCXE7*基因在花发育过程中的表达分析

利用qRT-PCR对麻疯树雌雄花关键发育时期(雌花大孢子母细胞时期、大孢子母细胞分裂时期、雌花单核胚囊期、胚囊成熟期、雄花小孢子母细胞时期、雄花四分体时期、雄花单核花粉粒时期及雄花花粉粒成熟期)的*JcCXE7*基因表达情况进行分析,利用Primer Premier 6设计特异性引物(表2)。FX96TM real-time system作为荧光定量PCR平台,反应体系为:SYBR Green Supermix (BIO-RAD) 10 μ L、cDNA模板1 μ L、上下游引物各1 μ L,灭菌水补足至20 μ L。反应程序为:95°C 1 min;95°C 10 s,59°C 20 s,40个循环。每个样品设置3个技术重复与3个生物重复,以麻疯树花器官未分化时期为对照组,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量,实验SPSS 17.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。

1.5 原核表达载体构建及表达分析

选择pCold I DNA为框架构建原核表达载体,pCold I DNA是以冷休克基因CspA启动子设计的表达载体,在低温环境下能减少背景蛋白的表

表1 麻疯树花蕾关键发育时期参数

Table 1 Parameters of key developmental stages of *J. curcas* buds

发育时期	花器官	尺寸/mm
未分化时期	花蕾	0.15
♀大孢子母细胞时期	子房	0.80
♀大孢子母细胞分裂期	子房	1.20
♀单核胚囊期	子房	1.50
♀胚囊成熟期	子房	3.20
♂小孢子母细胞时期	花蕾	0.52
♂四分体时期	花蕾	1.10
♂单核花粉粒时期	花蕾	2.00
♂花粉粒成熟期	花蕾	3.00

表2 麻疯树*JcCXE7*基因ORF克隆及表达分析所用引物及其序列

Table 2 Primers sequences used for cloning and expression analysis of *JcCXE7*

引物名称	核苷酸序列(5'→3')	用途
<i>JcCXE7</i> -F	ATGGATTCATCTTCCTCCTC	ORF克隆
<i>JcCXE7</i> -R	TTAATTGGCTTGATTCAAGAAAG	ORF克隆
<i>QJcCXE7</i> -F	TGGCGGTGGCTTCTTCATCG	qRT-PCR
<i>QJcCXE7</i> -R	TGTTGGCACCAGCACTATCTCC	qRT-PCR
<i>QJcActin</i> -F	TGTGAAGTCCAGCGTGTGCGATA	qRT-PCR (内参)
<i>QJcActin</i> -R	GCGACGGAACATGGCTGTGAATT	qRT-PCR (内参)
<i>JcCXE7yb</i> -F	GCCGGGTACCATGGATTCATCTTCCTCCTC	原核表达载体构建
<i>JcCXE7yb</i> -R	GCCGAAGCTTTTAATTGGCTTGATTCAAGAAAG	原核表达载体构建

表3 Mascot搜索参数
Table 3 Mascot search parameters

选项	参数
Search Engine	Mascot v2.3
Enzyme	Trypsin
Peptide Mass Tolerance	20 ppm
Fragment Mass Tolerance	0.05 Da
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications	Oxidation (M); Gln→pyro-Glu (N-term Q); Deamidated (NQ)
Max Missed Cleavages	1
Instrument type	ESI-FTICR
Database	Uniprot-jatropha-curcas_nr.fasta (27650 sequences)

达。使用Oligo 7软件对*JcCXE7*基因ORF与pCold I的限制性酶切位点进行分析, 并设计引物(表2)。以ORF克隆测序验证正确的质粒为模板扩增*JcCXE7*的ORF, PCR反应体系为: PrimeSTAR Max Premix 25 μ L、cDNA 1 μ L、上下游引物各1 μ L, 灭菌水补足至50 μ L。PCR反应程序为: 98°C 10 s, 60°C 15 s, 72°C 10 s, 30个循环。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后进行切胶回收, 随后进行双酶切处理, 双酶切体系为: *Kpn*I酶1 μ L、*Hind*III酶1 μ L、目的片段5 μ L, 灭菌水补足至20 μ L, 37°C孵育4 h后用TaKaRa Mini BEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0进行清洁回收。使用TaRaKa DNA Ligation Kit将目的片段与pCold I进行连接, 具体方法见说明书。将重组质粒转化至大肠杆菌*E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆测序验证。提取pCold I-*JcCXE7*质粒转化至大肠杆菌*E. coli* BL21感受态细胞中, 挑取单个菌落接种于含0.1 g·mL⁻¹氨苄青霉素的LB培养基中37°C过夜培养, 以1:100的接种量将过夜培养物于37°C培养至OD₆₀₀=0.4~0.6, 15°C放置30 min后, 加入终浓度为1 mmol·L⁻¹的IPTG, 15°C诱导24 h, 随后进行SDS-PAGE分析。

1.6 蛋白质质谱分析及鉴定

将SDS-PAGE凝胶的目的条带切下, 胶内酶解后再抽提出肽段, 采用LC-MS/MS方法进行检测, 将获得的原始质谱数据转换成质谱峰图, 使用Mascot 2.3软件MS/MS Ion Search功能进行搜索, 各参数选择见表3。

1.7 *JcCXE7*蛋白结构分析

在Uniport数据库中检索*JcCXE7*蛋白, 并Blast与*JcCXE7*蛋白同源的其他植物蛋白序列, 使用

MEGA 6.0软件, 运用Clustal W进行多重序列比对, 然后采用Neighbor-joining方法, Bootstrap分析重复数为1 000, 构建系统发育树。使用GOR4在线工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)对麻疯树*JcCXE7*蛋白的二级结构进行预测, 并利用NetPhos 3.1 Server工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)对*JcCXE7*蛋白磷酸化位点进行分析。蛋白质三级结构预测则采用SWISS-MODEL工具(<https://www.swiss-model.expasy.org/>)进行。

2 实验结果

2.1 麻疯树*JcCXE7*基因ORF的克隆

提取麻疯树花器官总RNA, 反转录成cDNA模板, 利用RT-PCR技术扩增麻疯树*JcCXE7*基因的ORF。琼脂糖凝胶电泳检测结果如图1所示, 目的条带大小与预期基本一致。测序验证结果表明成

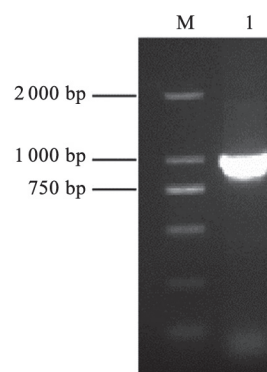


图1 麻疯树*JcCXE7*基因ORF的扩增

Fig.1 PCR amplification of *JcCXE7* gene ORF

M: 分子量标准DL2000; 1: 麻疯树*JcCXE7*基因ORF扩增产物。

功克隆获得麻疯树*JcCXE7*基因的ORF, 长度为957 bp, 预测编码318个氨基酸, 理论蛋白质大小约为35.5 kDa。

2.2 麻疯树*JcCXE7*基因在花发育过程的表达分析

以麻疯树花器官未分化时期为对照, 利用qRT-PCR对麻疯树*JcCXE7*基因在各个关键发育时期的相对表达量进行检测。结果(图2)表明, 麻疯树花蕾性别分化初期, 雌花中的*JcCXE7*表达水平明显提高, 在大孢子母细胞时期达到了最大值, 随后几个时期则呈现出一种下降趋势; 而在雄花中, 从未分化至小孢子母细胞时期, *JcCXE7*基因的表达水平大幅降低, 并且在四分体时期达到最低水平, 而在随后的单核花粉粒时期至花粉粒成熟时期, *JcCXE7*基因表达水平开始上升。在总体上, *JcCXE7*基因在雌花中表达水平明显高于雄花。

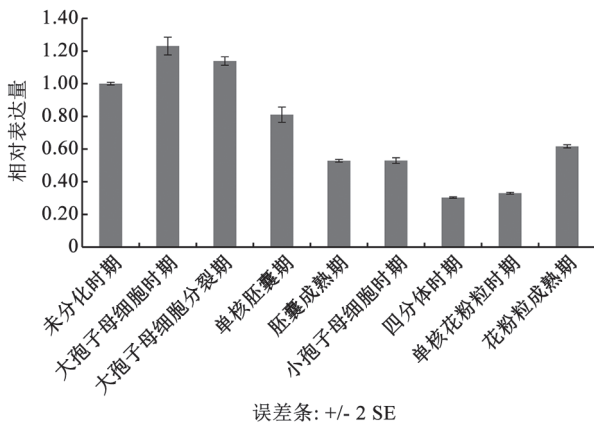


图2 *JcCXE7*基因在麻疯树花蕾关键发育阶段的表达差异
Fig.2 Differential expression of *JcCXE7* in key developmental stages of *J. curcas* buds

2.3 原核表达载体构建与表达分析

以pCold I质粒为框架, 构建了原核表达载体pCold-*JcCXE7*, 将pCold-*JcCXE7*转化至大肠杆菌*E. coli* BL21感受态细胞中, 15°C诱导24 h后收集菌体进行SDS-PAGE分析。结果如图3所示, 经15°C诱导后的重组菌有明显的目标蛋白表达的现象, 初步表明*JcCXE7*基因在大肠杆菌*E. coli* BL21中成功表达。

2.4 蛋白质质谱分析及鉴定

将SDS-PAGE胶中的目的条带切下, 进行质谱检测, 并将数据上传至Mascot 2.3软件进行鉴定。结果表明, 共有18条肽段与A0A067K102蛋白氨基酸序列匹配(A0A067K102蛋白氨基酸序列与根据*JcCXE7*编码框预测的氨基酸序列一致), 且序列覆

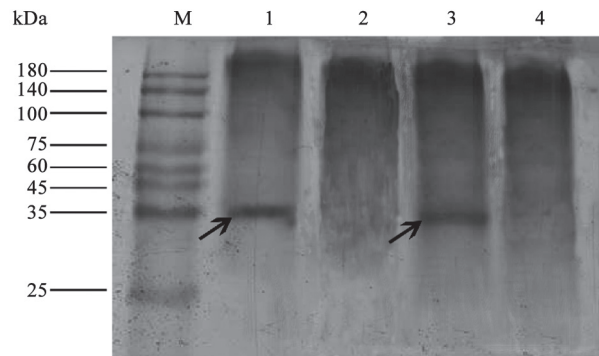


图3 pCold-*JcCXE7*表达产物的SDS-PAGE分析
Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expression product of pCold-*JcCXE7*

M: 蛋白质Marker; 1: 15°C诱导的pCold-*JcCXE7*表达产物; 2: 37°C诱导的pCold-*JcCXE7*表达产物; 3: 15°C+IPTG诱导的pCold-*JcCXE7*表达产物; 4: 15°C诱导的pCold I表达产物。

```

1 MDSSSSSKVALDLSPMLKIYEDGHVERLLGNETVPPSLDP
41 KTQVQSKDVLVYCPQHNLSSRLYLKPKSTPNKKLPLLVYFH
81 GGGFFIETAFSPTYHNYLNQLVAEANIIVVSVDYRRAPEH
121 HLPAAAYDDSWTALKWVASHFNGNGPETWLNAYADLGKVFLL
161 AGDSAGANIAHHMGI RYRGQDKIPGINILGIVLIHPYFWGK
201 EAVGDEPKILEMR SKVEGFWTFANPTSSGVDDPLINPCVD
241 QNLGKIGCRKVLVTVAENDILKSRGWYYEYK LKASGWEGE
281 AEIMEAKDENHVFHFLFNPSCENAFAMLLKKVSSFLNQAN
    
```

图4 肽段匹配结果
Fig.4 Peptide segment matching results
灰色部分为与A0A067K102蛋白匹配上的肽段。

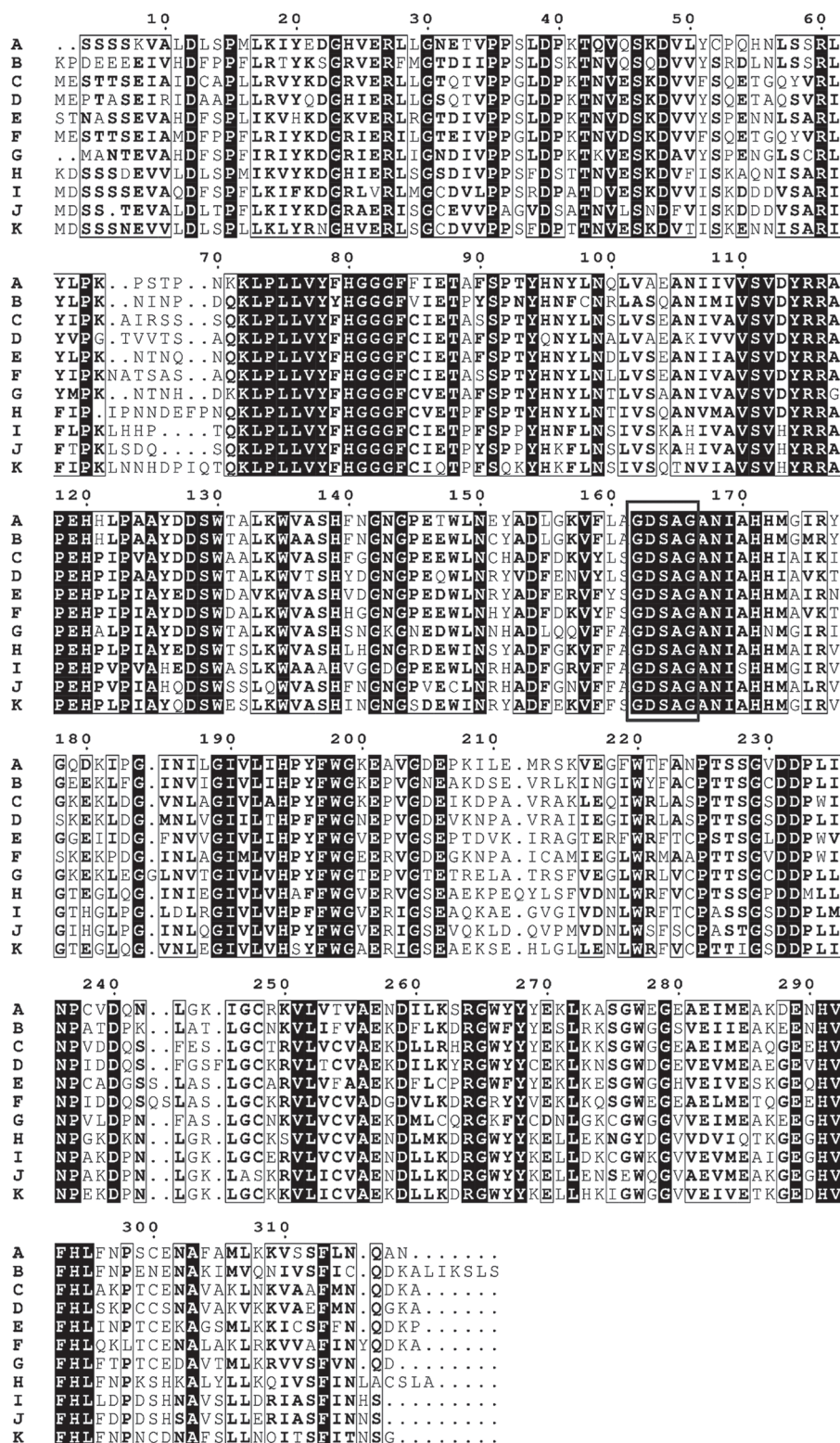


图5 同源JcCXE7蛋白氨基酸序列多重比对

Fig.5 Multiple alignments of amino acid sequences of homologous JcCXE7 proteins

A: 麻疯树JcCXE7蛋白; B: 蓖麻GID1蛋白; C: 可可 α/β 水解酶; D: 棉花CXE12蛋白; E: 柠檬CXE蛋白; F: 长蒴黄麻 α/β 水解酶3; G: 土瓶草 α/β 水解酶3; H: 蒺藜苜蓿CXE蛋白; I: 木豆GID1L3蛋白; J: 绿豆CXE12蛋白; K: 鹰嘴豆CXE12蛋白。黑色方框表示GXSXG保守结构。

盖率达到了59.1%, 蛋白得分约为60.33, 蛋白分子量为35.5 kDa, 与预测的分子量相一致, 由此可以判断*JcCXE7*基因的表达产物为A0A067K102蛋白(图4)。

2.5 麻疯树*JcCXE7*蛋白结构分析

Uniport数据库检索A0A067K102, 结果表明该蛋白属于G-D-X-G家族脂肪酶, 可能存在的调节位点为丝氨酸活性位点, 其功能结构域位于第76~294位氨基酸, 为 α / β 水解酶超家族成员。将A0A067-K102蛋白和其他物种中与其同源性较高的蛋白序列进行比对分析。结果(图5)显示, *JcCXE7*与这10个同源蛋白均含GX SXG保守结构, 其中与*JcCXE7*蛋白氨基酸序列一致性最高的是蓖麻GID1蛋白, 达到了71.3%。将*JcCXE7*蛋白与20个拟南芥CXE家族蛋白进行系统进化分析, 结果(图6)表明, *JcCXE7*与AtCXE2亲缘关系最近归为一个分支, 与AtCXE1、AtCXE3、AtCXE4、AtCXE5、AtCXE7、AtCXE12及AtCXE13归为一支。

利用GOR4软件对麻疯树*JcCXE7*蛋白进行二级结构的预测分析, 发现该蛋白的二级结构中主要以无规则卷曲为主, α 螺旋与延伸链则散布在蛋白中, 无 β 折叠。其中无规则卷曲171个(53.77%)、 α 螺旋62个(19.50%)、延伸链则有85个(26.73%)。对麻疯树*JcCXE7*蛋白磷酸化位点分析显示(图7), 该蛋白含有20个磷酸化位点, 包括12个丝氨酸位点(4、5、6、7、14、67、91、111、214、228、275、311)、4个苏氨酸位点(68、147、226、254)和4个酪氨酸位点(94、114、152、177)。利用SWISS-MODEL工具预测*JcCXE7*蛋白的三级结构, 结果(图8)表明麻疯树*JcCXE7*蛋白在三级结构上与赤霉素受体蛋白GID1有较高的相似性。

3 讨论

羧酸酯酶在植物的生长发育过程以及生物胁迫响应中发挥着重要作用, 即使目前有很多关于植物羧酸酯酶的研究报道(Gershater和Edwards

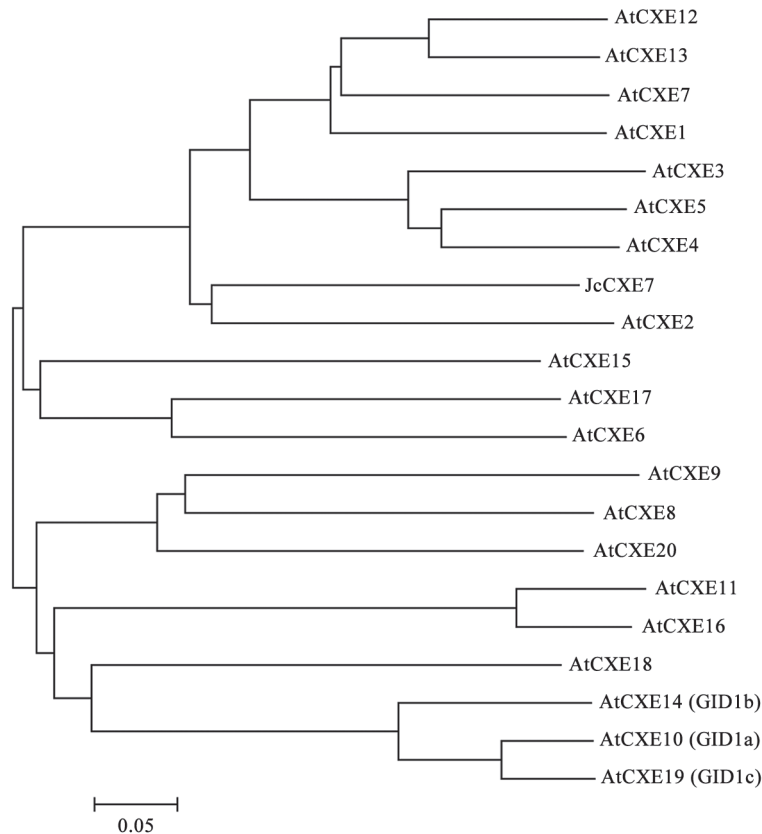


图6 *JcCXE7*与拟南芥CXE家族蛋白系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of *JcCXE7* and *Arabidopsis* CXE family proteins

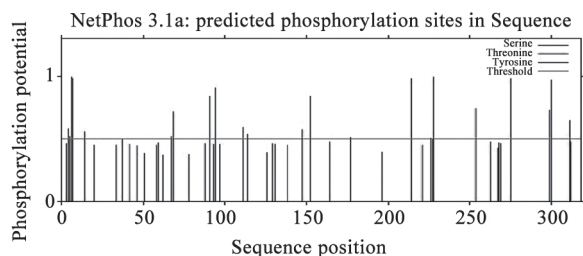


图7 JcCXE7磷酸化位点预测

Fig.7 Prediction of JcCXE7 phosphorylation site

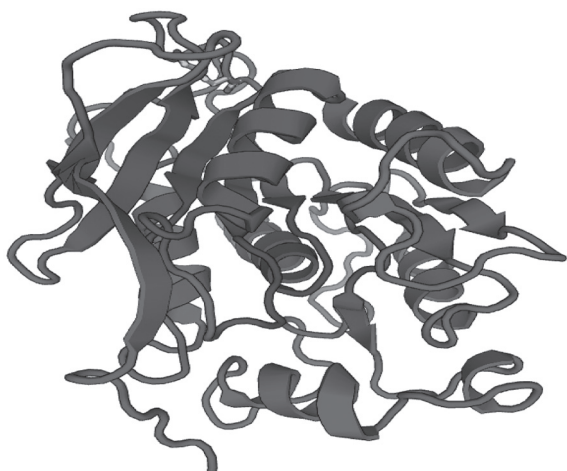


图8 麻疯树JcCXE7蛋白的三级结构预测

Fig.8 Prediction of tertiary structure of JcCXE7 protein

2007), 但是其具体的作用机制还不清楚。羧酸酯酶有许多独特的特点, 如底物专一性、区域专一性及手性特异性(Jung等2003), 对于大多数羧酸酯酶来说, 它们的天然底物仍是未知的。酯化反应能保护羧酸避免受不良反应的影响, 在植物中羧酸酯酶往往是通过酯类化合物的选择性水解来参与植物生长发育的调控过程。

本研究结果表明, *JcCXE7*基因可能参与了麻疯树雌花胚珠的发育初期, 即大孢子母细胞的发生和减数分裂; 同时, *JcCXE7*基因在雌花中的表达量要显著高于在雄花的, 不过该基因很可能参与了雄花花粉粒发育的后期, 即花粉粒成熟期。此外我们通过氨基酸序列的多重比对及蛋白质结构的分析发现, 麻疯树JcCXE7蛋白在序列和结构上与蓖麻GID1相似度较高, 可能为GID1家族蛋白成员。虽然有报道认为雄花的生殖发育离不开脂肪酸衍生物的合成(Li和Zhang 2010), 但有关与脂肪

代谢在雌花生殖发育中的作用还不见有报道, 不过本研究结果表明脂肪代谢很可能参与了麻疯树雌花的生殖发育。至于JcCXE7是不是赤霉素受体GID1, 及其在麻疯树雌花发育中的功能尚需开展进一步研究。

参考文献(References)

- Chandrashekharaiah KS, Swamy NR, Murthy KR (2011). Carboxylesterases from the seeds of an underutilized legume, *Mucuna pruriens*; isolation, purification and characterization. *Phytochemistry*, 72 (18): 2267–2274
- Forouhar F, Yang Y, Kumar D, et al (2005). Structural and biochemical studies identify tobacco Sabp2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 1773–1778
- Gershater M, Sharples K, Edwards R (2006). Carboxylesterase activities toward pesticide esters in crops and weeds. *Phytochemistry*, 67 (23): 2561–2567
- Gershater MC, Edwards R (2007). Regulating biological activity in plants with carboxylesterases. *Plant Sci*, 173 (6): 579–588
- Goulet C, Mageroy MH, Lam NB, et al (2012). Role of an esterase in flavor volatile variation within the tomato clade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 19009–19014
- Ileperuma NR, Marshall SD, Squire CJ, et al (2007). High-resolution crystal structure of plant carboxylesterase AeCXE1, from *Actinidia eriantha*, and its complex with a high-affinity inhibitor paraoxon. *Biochemistry*, 46 (7): 1851–1859
- Jung YJ, Lee JK, Sung CG, et al (2003). Nonionic detergent induced activation of an esterase from *Bacillus megaterium* 20-1. *J Mol Catalysis B Enzymatic*, 26: 223–229
- Li H, Zhang DB (2010). Biosynthesis of anther cuticle and pollen exine in rice. *Plant Signal Behav*, 5: 1121–1123
- Marshall SD, Putterill JJ, Plummer KM (2003). The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Evol*, 57 (5): 487–500
- Mølgaard A, Kauppinen S, Larsen S (2000). Rhamnoglacturonan acetylsterase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure*, 8 (4): 373–383
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, et al (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, 5 (3): 197–211
- Raju AJS, Ezradanam V (2002). Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Current Science*, 83 (11): 1395–1398
- Redinbo MR, Potter PM (2005). Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug Discov Today*, 10 (5): 313–325
- Schillmiller AL, Gilgallon K, Ghosh B, et al (2016). Acylsugar

- acylhydrolases: carboxylesterase catalyzed hydrolysis of acylsugars in tomato trichomes. *Plant Physiol*, 170 (3): 1331–1344
- Souleyre EJF, Marshall SDG, Oakeshott JG (2011). Biochemical characterisation of MdCXE1, a carboxylesterase from apple that is expressed during fruit ripening. *Phytochemistry*, 72 (7): 564–571
- Stuhlfelder C, Mueller MJ, Warzecha H (2004). Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *Eur J Biochem*, 271 (14): 2976–2983
- Subramani T, Chandrashekharaiiah KS, Swamy NR (2012). Purification and characterization of carboxylesterase from the seeds of *Jatropha curcas*. *Protein J*, 31 (2): 120–128
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, et al (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437 (7059): 693–698

Gene cloning, expression pattern analysis and prokaryotic expression of a carboxylesterase in flower of *Jatropha curcas*

LEI Shi-Kang^{1,2}, XU Gang^{1,3,*}

¹Institute for Forest Resources and Environment of Guizhou, Guizhou University, Guiyang 550025, China

²College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

³Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: A sex differently expressed carboxylesterase gene named as carboxylesterase 7 (*JcCXE7*) was screened out from transcriptome of flower buds in *Jatropha curcas*. The open reading frame (ORF) of *JcCXE7* was obtained using RT-PCR. Sequencing result showed that the ORF of *JcCXE7* was 957 bp long, and predicted to encode a ptiptide of 318 amino acids with a molecular mass of 35.55 kDa. Expression pattern analysis of *JcCXE7* gene during flower development was analysis using qRT-PCR. After sex differentiation, *JcCXE7* was firstly up-regulated in the stage of macrospore mother cell in female, followed by a gradually down-regulation; while it was greatly down-regulated in the stage of microspore mother cell in male with a moderate up-regulation at the stage of pollen maturation. Overall, the expression level of *JcCXE7* was higher in female than that in male during the flower development. The prokaryotic expression production of *JcCXE7* was identified and analyzed by LC-MS/MS. The multiple sequence alignment and supersecondary structure analysis of *JcCXE7* protein suggested that it would be GID1 family protein.

Key words: *Jatropha curcas*; flower development; carboxylesterase; expression analysis

Received 2017-08-14 Accepted 2018-01-18

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31460184).

*Corresponding author (xg335300@aliyun.com).