• 药材与资源 •

滇重楼环阿屯醇合酶基因的克隆及序列分析

袁梦求，丁春邦，陶　亮，陈泓翰，陈　惠，吴　琦*
四川农业大学生命科学与理学院，四川 雅安　625014

摘　要：目的　获取滇重楼甾体皂苷合成途径关键酶环阿屯醇合酶基因（PpCAS）的全长 cDNA 序列，并进行序列分析。**方法**　利用同源克隆和 RT-PCR 技术获得 PpCAS 基因保守片段，采用 RACE 技术获得 PpCAS 基因的 3’及 5’末端序列，并采用生物信息学方法进行序列分析。**结果**　PpCAS 基因全长 cDNA 为 2 309 bp，其开放阅读框（ORF）为 2 283 bp，可编码 760 个氨基酸的蛋白质；PpCAS 推导的蛋白质相对分子质量为 8.69×10^4，等电点（pI）为 6.54；其氨基酸序列与 GenBank 中其他植物 CAS 的同源性在 60%～83% PpCAS 蛋白。**结论**　从滇重楼中首次获得 PpCAS 基因 cDNA 全长序列，该基因具有 *CAS* 同源基因的典型特征。

关键词：滇重楼；环阿屯醇合酶；基因克隆；序列分析；开放阅读框（ORF）
中图分类号：R282.12　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2012)11 - 2250 - 07

Cloning and sequence analysis of cycloartenol synthase gene from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

YUAN Meng-qiu, DING Chun-bang, TAO Liang, CHEN Hong-han, CHEN Hui, WU Qi
College of Life and Basic Science, Sichuan Agricultural University, Ya’an 625014, China

Abstract: Objective　To clone and analyze the full-length cDNA sequences of cycloartenol synthase gene from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (PpCAS). **Methods**　Using homology cloning and RT-PCR techniques, conserved fragments of PpCAS gene were obtained. RACE technology was used to obtain 3’ and 5’ end sequences of PpCAS and sequence analysis was done by bioinformatics method. **Results**　The full-length cDNA of PpCAS was 2 309 bp, which contained an open reading frame (ORF) of 2 283 bp. Sequence analysis indicated that PpCAS could encod protein with 760 amino acids, with a predicted relative molecular weight of 8.69×10^4 and an isoelectric point (pI) of 6.54. Sequence analysis and homology modeling suggested that amino acid sequence of PpCAS showed high homology (60%—83%) with CAS of other plants. **Conclusion**　The full-length cDNA sequence of PpCAS is first obtained and it has the typical characteristics of the homologous genes.

Key words: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. - Mazz.; cycloartenol synthase (CAS); gene cloning; sequence analysis; open reading frame (ORF)

传统药材重楼 *Rhizoma Paridis* 来源于百合科重楼属多种植物，以蚤休之名首载于《神农本草经》。重楼属植物在全世界共有 24 种，分布于我国的重楼有 19 种[1-2]。《中国药典》2010 年版收载了滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 和华重楼 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara，以干燥根茎入药。《本草纲目》记载重楼味苦、性微寒、有小毒、归肝经，具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效[3]。现代研究发现，滇重楼的主要活性成分为甾体皂苷，其苷元主要为异螺甾烷醇类（isospirastanols）的薯蓣皂苷（dioscin）和偏诺皂苷（pennogenin）[4]。

植物中，甾醇皂苷由异戊二烯途径合成。鲨烯合酶（squalene synthase，SS）及鲨烯环氧酶（squalene

收稿日期：2012-06-17
作者简介：袁梦求（1991—），男，生物科学专业本科生。E-mail: yuanmq2007@163.com
*通讯作者　吴　琦　E-mail: wuqiwq@yahoo.cn
网络出版时间：2012-10-25　网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121025.1622.001.html

epoxidase，SE）分别催化法呢酯焦磷酸生成鲨烯并氧化生成 2, 3-氧鲨烯（2, 3-oxidosqualene），SE 是植物甾醇和三萜类物质生物合成的分支点，不同的氧鲨烯环化酶类（oxidosqalene cyclases，OSCs）将 SE 环化得到植物甾醇和三萜类骨架，其代谢流向取决于各种氧化鲨烯合成酶的活性强弱[5-7]。环阿屯醇合酶（cycloartenol synthase，CAS）所催化的反应正处于异戊二烯代谢途径的分支点，将 SE 催化成为环阿屯醇是进一步合成甾醇皂苷的必经步骤，在高等植物的固醇及三萜类合成途径中处于关键位置[8]。在动物及微生物中，该分支则是由羊毛甾醇合酶（lanosterol synthase，LAS）将 SE 催化生成羊毛甾醇（lanosterol）。

近年来，重楼的药用价值日益受到重视，重楼的使用显著增加，造成野生重楼资源缺乏[9]。重楼块根生长缓慢，种植周期长和种苗繁育存在问题等原因[10]，很大程度上影响了重楼的商业化种植和品质的提高。因此，基于植物组培技术的快速繁育，成为提高重楼产量的重要途径。近年来在滇重楼组培上取得了一定的突破，利用次生代谢工程的方法，提高重楼有效成分的量，对重楼资源进行开发具有了可行性[11]。本研究拟以滇重楼为材料，克隆其皂苷合成代谢途径中的滇重楼环阿屯醇合酶（PpCAS）基因，并对其进行序列分析，为进一步研究重楼皂苷合成代谢机制和利用次生代谢工程的手段提高重楼品质奠定基础。

1 材料

滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 种植于四川农业大学实验田，于 2010 年 8 月采样，由四川农业大学植物学教研室丁春邦教授鉴定。大肠杆菌 *Escherichia-coli*DH5α 由本实验室保存。

RNA 提取试剂植物 RNA_{out} 试剂盒购自绵阳高新区天泽基因工程有限公司；逆转录试剂盒 RevertAid^{TM} First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司；胶回收试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒 t 购自 Fermentas 公司；pMD 19-T Simple Vector 克隆载体、*Taq* DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶购自 Takara 公司；其他化学药品为进口或国产分析纯试剂。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成

采用植物 RNA_{out} 试剂盒提取重楼新鲜叶片总 RNA，并以其为模板使用 RevertAid^{TM} First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒，以 Oligo-dT 为引物通过 RT-PCR 逆转录制备 cDNA 第 1 链。

2.2 保守区的克隆

根据浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq.、盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright、二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv、黑升麻 *Actaea racemosa* (Roxb.) Buch. -Ham 及高粱 *Sorghum bicolor* (L.) Moench 的 CAS 基因保守区域，设计一对兼并引物（表 1），以 cDNA 为模板进行 PCR，反应参数为：94 ℃、50 s，53 ℃、45 s，72 ℃、1 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测、回收纯化后连接 pMD19-T 克隆载体，挑选阳性克隆测序。

2.3 CAS 基因全长 cDNA 的克隆

根据“2.2”项获得的 PpCAS 基因保守片段的测序结果，采用 Takara 公司的 3’-Full RACE Core Set Ver. 2.0 设计 3 条特异性引物以 cDNA 为模板进行

表 1 引物序列及用途

Table 1 Primer sequences and application

引物名称	引物序列	引物用途
Cdf	5’-GG(G/T/A)GATTATGG(A/T/G)GG(T/C)CC(T/C/A)ATGTT-3’	保守片段扩增
Cdr	5’-AT(G/T)CCATCTTC(A/T)GC(A/T)A(C/A/T/G)CCA-3’	
C3-1	5’-AGATTCGCCGATACCTCTACAACC-3’	3’RACE
C3-2	5’-CTTGGAGTATTTGACTGGTCTGGCA-3’	
C3-3	5’-GAGAAGGCTCTGACTACTGCCATACA-3’	
C5-1	5’-AAGCCAGGCATAAGGAACATAGGACCCC-3’	5’RACE
C5-2	5’-AATCCACTTCCGCCCTTTCTGCATAGCC-3’	
C5-3	5’-CCACGATGTTATAGCAGTTGCCCCACCA-3’	
Cf	5’-GCTATCCCTCTTGGCTGGTAATGTG-3’	全长扩增
Cr	5’-GCGAGCTCACTGTTTGTGGGAAGGG-3’	

PCR。第 1 轮反应参数：94 ℃、50 s，55 ℃、45 s，72 ℃、2 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。第 2 轮：94 ℃、50 s，58 ℃、45 s，72 ℃、2 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。第 3 轮：94 ℃、50 s，60 ℃、45 s，72 ℃、2 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测、回收纯化后连接 pMD19-T 克隆载体，挑选阳性克隆测序完成。

采用 5’-Full RACE Kit 试剂盒的方法，设计 3 条特异引物（表 1）以 cDNA 为模板进行 PCR，第 1 轮：94 ℃、50 s，68 ℃、45 s，72 ℃、1 min，5 个循环，94 ℃、50 s，66 ℃、45 s，72 ℃、1 min，5 个循环，94 ℃、50 s，64 ℃、45 s，72 ℃、1 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。第 2 轮：94 ℃、50 s，62 ℃、45 s，72 ℃、1 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。第 3 轮：94 ℃、50 s，60 ℃、45 s，72 ℃、1 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。

由以上实验扩增得到该基因 3’及 5’端获得 PpCAS 的全长 cDNA。拼接测序结果，设计特异引物（表 1），以 cDNA 为模版，扩增 PpCAS 基因开放阅读框架（open reading frame，ORF）序列，反应参数为：94 ℃、50 s，60 ℃、45 s，72 ℃、130 s，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。

2.4　序列分析

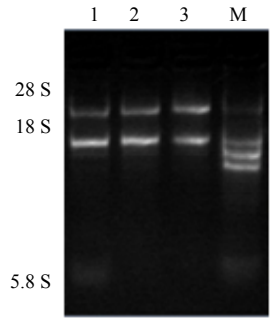
使用 NCBI 在线工具 BLAST 进行 CAS 核苷酸序列和蛋白质序列的同源性分析，利用 DNAMAN7 将所得 ORF 推导为氨基酸序列并进行多重序列比对。采用 Sompa 对 PpCAS 推导的氨基酸序列的二级结构进行预测，采用 Swiss-Model 进行蛋白质三维结构同源建模，采用 MEGA 5.0 软件构建其系统发育进化树。

3　结果与分析

3.1　滇重楼 RNA 提取及 PpCAS 保守片段克隆

滇重楼总 RNA 的电泳检测结果见图 1。各泳道可清晰观察到 28 S、18 S 和 5.8 S RNA 3 条区带，且 28 S 与 18 S 亮度比约为 2∶1，表明提取的 RNA 较为完整，质量较高，可用于 RT-PCR。

以 cDNA 第一链为模板，使用兼并引物 Cdf 及 Cdr 进行 PCR 扩增，得到 1 条约 800 bp 的特异条带，结果见图 2。测序结果表明，该片段长 869 bp，经 Blast 比对，该片段与小麦 CAS 基因有 78%的相似性，与糙伏毛燕麦有 77%的相似性，表明克隆到重楼 CAS 基因的保守片段。

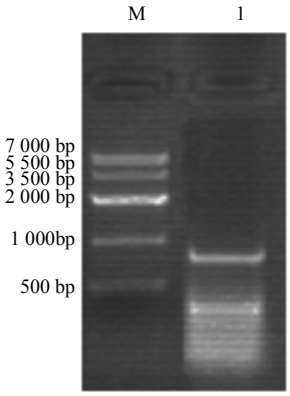


1～3-滇重楼总 RNA　M-Marker

1—3-total RNA extracted from *P. polyphylla* var. *yunnanensis*　M-Marker

图 1　滇重楼总 RNA 的电泳

Fig. 1　Electrophoresis of total RNA from *P. polyphylla* var. *yunnanensis*



1-CAS 保守片段 PCR 产物　M-Marker

1-conserved fragment PCR product of PpCAS　M-Marker

图 2　滇重楼 CAS 保守片段的扩增

Fig. 2　Amplification of PpCAS conserved fragments

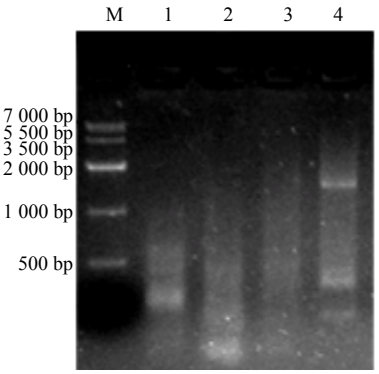
3.2　PpCAS 基因 cDNA 全长扩增

使用特异引物 C3-1、C3-2、C3-3 对 PpCAS 基因进行 3’RACE，第 3 轮后得到 1 条约 2 000 bp 的特异条带，见图 3。测序结果表明，该条带长 1 963 bp，并含有终止密码 TGA，含 208 bp 的 3’-UTR 及多聚 A 尾结构，其多聚 A 尾含有 17 个 A 残基。表明已获得该基因的 3’端。

使用特异引物 C5-1、C5-2、C5-3 进行 5’RACE，第 3 轮 PCR 后得到一条约 600 bp 的特异条带，见图 4。测序结果表明，该条带长 615 bp，含有起码 ATG 以及含 145 bp 的 5’-UTR。表明获得了该基因 5’端。

3.3　PpCAS 基因 ORF 序列扩增

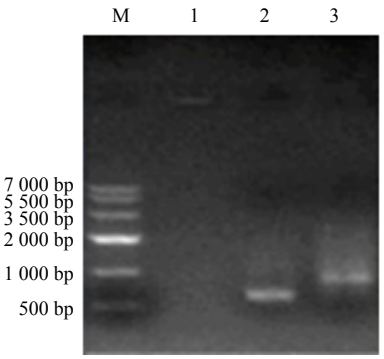
使用一对特异引物 Cf 和 Cr 扩增 PpCAS 的 ORF 序列，经 PCR 后获得 1 条长约 2 500 bp 的特异条带，见图 5。结果表明，该片段长 2 309 bp，包含 1 个



1-3’ RACE 第 1 轮产物 2、3-3’ RACE 第 2 轮产物
4-3’ RACE 第 3 轮产物 M-Marker
1-first-round product of 3’ RACE 2 and 3-second-round product of 3’ RACE 4-third-round product of 3’ RACE M-Marker

图 3 PpCAS 基因的 3’ RACE

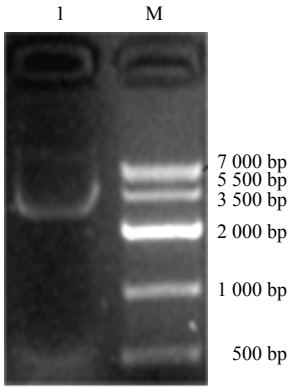
Fig. 3 3’ RACE of PpCAS gene



1-5’RACE 第 1 轮产物 2-5’RACE 第 3 轮产物 3-5’RACE 第 2 轮产物 M-Marker
1-first-round product of 5’ RACE 2-third-round product of 5’ RACE 3-second-round product of 5’ RACE M-Marker

图 4 PpCAS 基因的 5’ RACE

Fig. 4 5’ RACE of PpCAS gene



1-PpCAS 全长 PCR 产物 M-Marker
1-PpCAS full-length PCR product M-Marker

图 5 PpCAS 基因全长扩增产物

Fig. 5 Amplification of full-length of PpCAS gene

2 283 bp 的完整 ORF。BLAST 比对表明该基因属 CAS 基因。

3.4 PpCAS 基因序列分析及结构预测

3.4.1 PpCAS 基因进化树分析 利用 MEGA5.05 软件将 CAS 基因对应的氨基酸序列进行比对，并采用邻接法构建系统发育进化树（图 6）。结果表明，滇重楼与其他植物 CAS 的氨基酸序列同源在 60%～83%，与同为百合科的浙贝母同源最高为 83%，与其他单子叶植物纲同位于进化树的簇 II。而蒺藜苜和蓿拟南芥等双子叶植物的 CAS 则归于进化树的簇 I。可见，CAS 在进化上与经典植物分类学相一致。

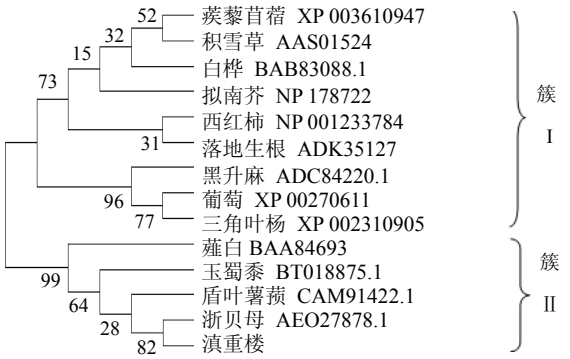


图 6 基于氨基酸序列的植物 CAS 进化树

Fig. 6 CAS phylogenetic tree based on amino acid sequences

3.4.2 PpCAS 基因序列分析及二级结构预测 利用 DNAman 软件分析 PpCAS 基因编码的蛋白表明，PpCAS 由 760 个氨基酸组成，相对分子质量 8.69×10^4，等电点（pI）为 6.54，不含信号肽，为膜蛋白。它和其他植物的 CAS 均含有 4 个 QW-基序，该基序可使肽链在二级结构上形成转角结构，对蛋白质空间结构有一定的重要性。此外，PpCAS 含有 Tyr^{118}、His^{257}、Cys^{258}、Tyr^{262}、Phe^{472}、Asp^{483}、Cys^{484}、Tyr^{532}、Ile^{553}、Cys^{562}、Trp^{610} 和 Phe^{726} 等保守氨基酸，其中 Asp^{483}、Cys^{484}、Cys^{562}、Tyr^{118}、His^{257} 和 Tyr^{532} 可能与该酶催化活性有关[12-13]。SOMPA 二级结构预测表明（图 7），PpCAS 中 α 螺旋为 42.24%，无规则卷曲为 39.34%，β 折叠为 11.71%，β 转角为 6.71%。

3.4.3 PpCAS 基因三级结构预测 Swiss-Model 三维建模表明，PpCAS 蛋白含有 2 个由多个外周 α-螺旋构成的结构域，以及一个中央活性口袋结构（图 8-A）。结构域 1 中 α-螺旋每 6 个为一组，构成

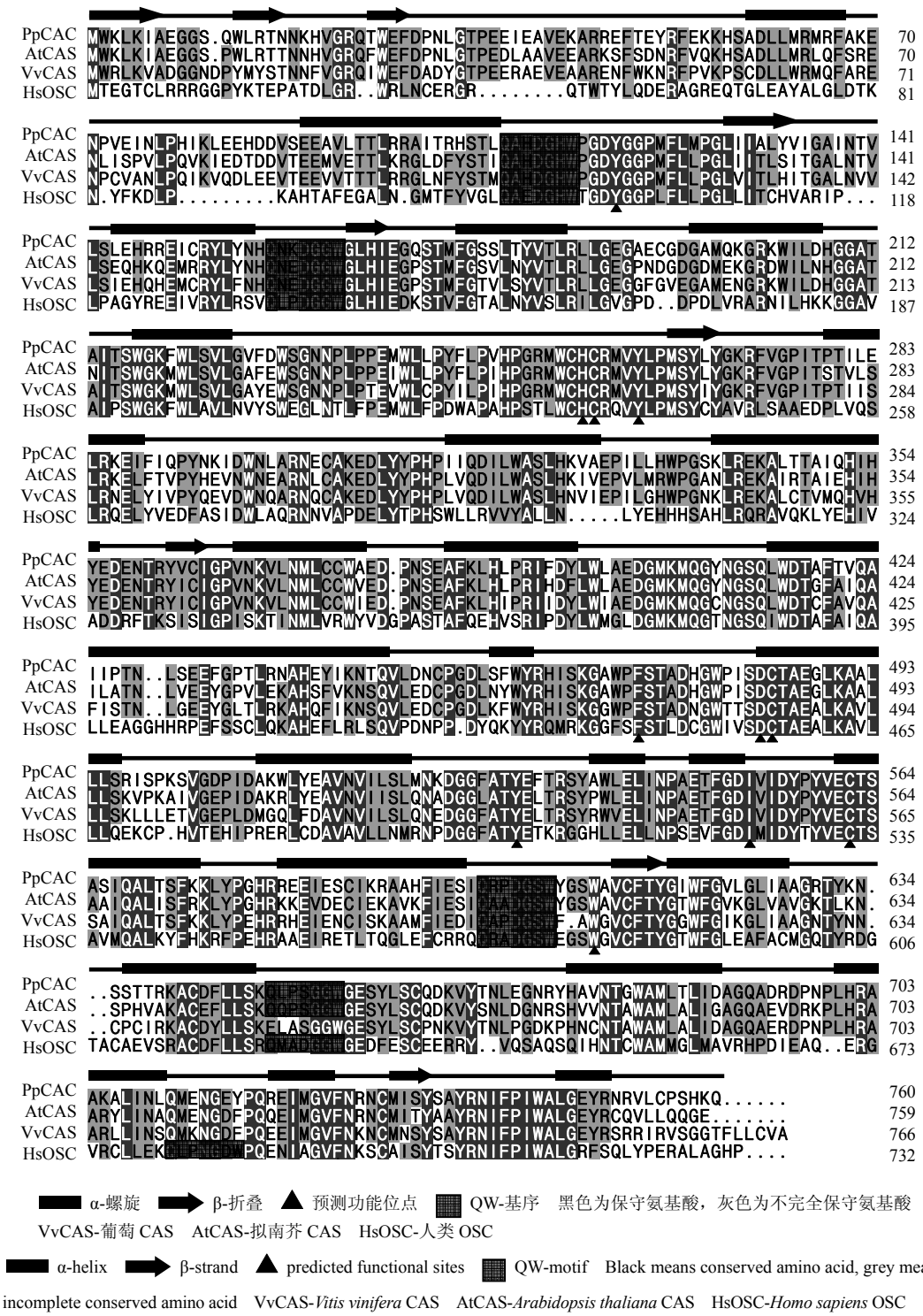


图 7　PpCAS 与其他 CAS 和 OSC 氨基酸序列比对及二级结构预测

Fig. 7　Comparison on amino acid sequences of PpCAS and other CAS with OSC and prediction of secondary structure

两个同心圆状的 α_6-α_6 筒状结构，而结构域 2 中的 α 螺旋则构成一个 α-α 筒状结构[14]。位于两结构域之间的 N 端 β-折叠结构可能与两结构域方向维持有关[12]。两结构域间的活性口袋入口处周围氨基酸具有一定的疏水性，形成一个表面非极性区。有研究表明，在其他物种中，该类蛋白的活性口袋入口处非极性区域可与膜结合，并从膜中获取底物[12-13]。其中，Asp^{483}、Cys^{484} 和 Cys^{562} 等催化活性位点位于活性口袋顶部，而 His^{257} 和 Tyr^{532} 则位于活性口袋底部（图 8-B）。此外，His^{257}、Phe^{472}、Tyr^{532}、

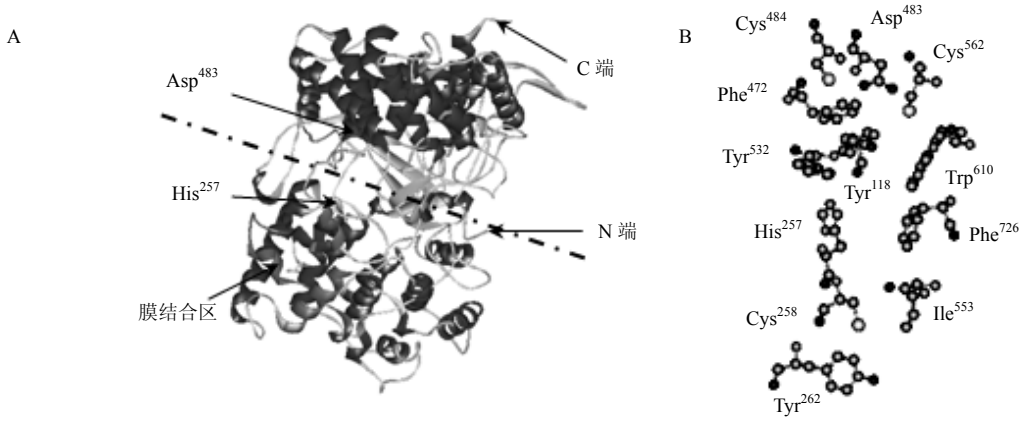


图 8 PpCAS 蛋白三级结构 (A) 及其功能位点相对位置 (B)

Fig. 8 Tertiary structure of PpCAS protein (A) and relative location of functional sites (B)

Trp^{610} 和 Phe^{726} 等保守氨基酸残基分布于活性口袋内壁，Cys^{258}、Tyr^{262} 和 Ile^{553} 等则位于进入活性口袋的通道处（图 8-B）[12]。以上特征与 Wendt 等[13]对同属异戊烯转移酶的酸热脂环酸芽孢杆菌（*Alicyclobacillus acidocaldarius*）鲨烯-藿烯环化酶（squalene-hopene cyclase）和 Thoma 等[12]对人类 OSC 蛋白的研究结果相似。

4 讨论

CAS 是氧化鲨烯环化酶的一种，将 SE 催化成为环阿屯醇，是甾醇及甾体类物质生物合成的第一个关键酶。该蛋白具有多个由 QW-基序相连接的表面 α-螺旋结构，可吸收大量反应放能，起到防止蛋白结构被破坏的作用，该特征也是该类蛋白所共有的[12]。位于活性口袋顶部的 Asp^{483}、Cys^{484} 和 Cys^{562} 等氨基酸负责反应起始时的底物 SE，而位于活性口袋底部的 His^{257} 和 Tyr^{532} 则通过对底物去质子化来终止反应，最终形成环阿屯醇。此外，活性口袋内壁存在大量芳香族氨基酸，其侧链的 π 电子参与维持中间产物的稳定，而位于入口通道中的 Cys^{258}、Tyr^{262} 及 Ile^{553} 则可能参与了对底物、产物进出活性位点的控制[15-16]。值得一提的是，CAS 蛋白通过活性口袋入口处的疏水区域固定于膜上，且其开口亦埋于膜中，故该酶可能从膜中获取底物 SE。

CAS 蛋白所属 OSC 类蛋白处于皂苷合成的分支处，不同的 OSC 蛋白参与同种类的皂苷合成。若其中一种分支酶出现缺陷，则可能导致 SE 的积累及各下游产物比例的变化[6]。OSC 参与合成的各类皂苷是生物膜的重要组成成分且可能承担重要的生物学功能。有研究表明植物 CAS 与植物中叶绿体类囊体膜形成及内质网膜各组分平衡有关[15]，而如果植物中 CAS 基因发生变异，导致 CAS 缺陷，则可能使植物出现白化等现象，在缺陷较为严重时可能致死[14-15]。

由于环阿屯醇在植物次生代谢中的重要性，其基因克隆受到了重视。现有 20 多种植物的 CAS cDNA 序列已登录到 GenBank，有的植物的 CAS cDNA 功能还得到了验证。如拟南芥的 CAS 已被克隆且在酵母 LAS 缺陷种中得到表达[16]，对拟南芥 CAS 缺陷种进行了研究分析[14-15]。

本研究以富含皂苷类化合物的滇重楼为材料，克隆其 CAS 基因，为进一步研究滇重楼的皂苷合成代谢途径奠定基础。

参考文献

[1] 胡光万, 雷立公. 出自深山的良药——重楼 [J]. 植物杂志, 2002(3): 16.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会. 中华本草精选本 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1998.

[3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[4] 黄端华, 王凤英, 童 萍, 等. 气相色谱法测定重楼中薯蓣皂苷的水解产物 [J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2009, 37(1): 133-136.

[5] Ikuro A, Michel R, Glenn D P. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes [J]. *Chem Rev*, 1993, 93(6): 2189-2206.

[6] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002(75): 31-49.

[7] 刘 强, 丛丽娜, 张宗申. 植物甾醇与三萜类皂苷生物

合成基因调控的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19): 4844-4846.

[8] 陈 迪, 陈永勤, 杨之帆, 等. 盾叶薯蓣环阿屯醇合酶基因克隆与表达 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(2): 221-228.

[9] 陆 辉, 许继宏, 陈锐平. 云南重楼属植物资源现状与保护对策 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2006, 28(S1): 307-310.

[10] 李绍平, 杨 斌. 滇重楼驯化栽培研究初报 [J]. 云南农业科技, 2005(2): 21.

[11] 熊海浪, 易继财, 张宗申. 滇重楼种子萌发及组织培养研究 [J]. 广东农业科学, 2011, 38(21): 47-49.

[12] Thoma R, Schulz-Gasch T, D'Arcy B, *et al*. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase [J]. *Nature*, 2004, 432(7013): 118-122.

[13] Wendt K U, Poralla K, Schulz G E. Structure and function of a squalene cyclase [J]. *Science*, 1997, 277(5333): 1811-1815.

[14] Babiychuk E, Bouvier-Navé P, Compagnon V, *et al*. Allelic mutant series reveal distinct functions for *Arabidopsis* cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 3163-3168.

[15] Babiychuk E, Bouvier-Navé P, Compagnon V, *et al*. Albinism and cell viability in cycloartenol synthase deficient *Arabidopsis* [J]. *Plant Signal Behav*, 2008, 3(11): 978-980.

[16] Corey E J, Matsuda S P, Bartel B. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(24): 11628-11632.