

• 药材与资源 •

西洋参 β -香树脂合成酶基因的克隆和生物信息学分析吴琼¹, 孙超², 陈士林²

1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 克隆西洋参三萜皂苷生物合成途径关键酶 β -香树脂合成酶 (bAS) 全长 cDNA, 为研究西洋参皂苷生物合成与次生代谢调控奠定基础。方法 采用大规模 ESTs 测序和 cDNA 末端扩增 (RACE) 技术克隆西洋参 bAS 基因。结果 获得了西洋参 bAS 基因全长 cDNA, 命名为 PqbAS (GenBank 注册号: JX185490), 其核苷酸序列长度为 2 309 bp, 含有 1 个开放阅读框, 编码 631 个氨基酸多肽。保守结构域搜索显示 PqbAS 含有环氧角鲨烯环化酶 (OSCs) 共有的活性位点和保守基序。Signal P4.0 分析表明 PqbAS 属于非分泌型蛋白, Tmhmm 2.0 分析表明其为非跨膜蛋白。实时荧光定量 PCR 显示 PqbAS 基因在各个器官中均有表达, 在花和幼茎中高表达, 根和叶中表达量相对较低。结论 首次克隆了 PqbAS 基因全长序列, 为其表达特性以及在三萜皂苷生物合成中的功能奠定了基础。

关键词: 西洋参; β -香树脂合成酶; 分子克隆; 实时荧光定量 PCR; RACE

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)11-1476-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.022

Cloning of β -amyrin synthase gene from *Panax quinquefolius* and its bioinformatics analysisWU Qiong¹, SUN Chao², CHEN Shi-lin²

1. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China

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

Abstract: Objective To obtain the full-length cDNA of β -amyrin synthase (bAS) involved in triterpene saponin biosynthesis in *Panax quinquefolius* and provide the reference for saponin biosynthesis and the regulation of secondary metabolism in *P. quinquefolius*.

Methods Based on large-scale ESTs sequencing and RACE technology, the full-length cDNA of *P. quinquefolius* bAS (PqbAS) was obtained. **Results** The full-length cDNA of PqbAS (GenBank No. JX185490) was 2 309 bp which included an open reading frame (ORF) code of 631 amino acid peptide. Common conserved domains of oxidosqualene cyclases (OSCs) were found in PqbAS including active sites and conserved sequence. Signal P4.0 analysis showed that PqbAS was a non-secreted protein. Tmhmm 2.0 analysis showed that PqbAS was a non-transmembrane protein. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis showed PqbAS gene expressed in various organs, higher in flowers and stems while relatively lower in roots and leaves. **Conclusion** The full-length of bAS is first cloned, which could provide the foundation for the investigation on expression characteristics and its role in synthesis of saponin.

Key words: *Panax quinquefolius* L.; β -amyrin synthase; molecular cloning; real-time fluorescence quantitative PCR; RACE

三萜皂苷是与人类健康关系非常密切的一类天然产物, 也是人参、西洋参、柴胡、甘草等中药的主要活性成分。2, 3-氧化鲨烯环化是产生三萜皂苷的重要步骤, 由环氧角鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclases, OSCs) 基因家族所催化^[1-3]。OSCs 构成多基因家族, 可催化产生不同骨架的三萜化合物,

并且具有不同的立体构型^[2-3]。研究表明, 齐墩果酸合成的前体 β -香树脂 (β -amyrin) 是在 β -香树脂合成酶 (β -amyrin synthase, bAS) 的催化下由环氧角鲨烯 (2, 3-oxidosqualene) 环化而产生, 并最终生成 β -香树脂型三萜皂苷。bAS 是 OSCs 家族的一员, 是合成 β -香树脂及其下游产物齐墩果酸的关键酶, 也

收稿日期: 2012-09-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873459, 81260619); 广西教育厅高校科研项目 (201204LX256)

作者简介: 吴琼, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事药用植物分子生物学研究。Tel: (0773)5899905 E-mail: qwu9516@gmail.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.1115.003.html>

是产生三萜产物多样性的原因之一。在植物体中 OSCs 以多基因拷贝存在,如人参中已经发现有 5 个 OSCs 基因^[4]。由于 bAS 在三萜合成中的重要性,目前已经在拟南芥、蒺藜苜蓿、木榄、百脉根、甘草等植物中得到克隆^[2-3,5-7]。

西洋参 *Panax quinquefolius* L. 系五加科草本,具有滋阴、泄火、补益等作用,其主要活性成分为三萜皂苷,bAS 是合成西洋参皂苷的一个关键酶。目前,西洋参 bAS (PqbAS) 基因的编码序列尚未见报道。本研究通过西洋参大规模 ESTs 测序,获得 bAS 核心片段,采用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆其全长序列,并利用实时荧光定量 PCR 研究该基因的组织表达情况并进行生物信息学分析,为了解该酶在西洋参中的基因表达与调控奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品采自北京怀柔西洋参种植基地,经笔者鉴定为西洋参 *Panax quinquefolius* L. 的根。挖取 4 年生西洋参后立即用液氮速冻,存放在 -80 °C 冰箱中,备用。

1.2 试剂

感受态细胞 DH5 α 购自 Invitrogen 公司,EcoR I Adaptor、T4 DNA Ligase、T4 PNK、pBluescript II SK (+) XR 购自 Stratagene 公司,总 RNA 提取试剂盒购自 BioTeke 公司,Oligotex mRNA Mini Kit 和 QIAEX II Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司,RNaseH、T4DNA Polymerase I 购自 Promega 公司,SMART RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司,PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自 TaKaRa 公司,Power SYBR Green PCR Master Mix 购自 Applied Biosystems 公司。

2 方法

2.1 总 RNA 提取和反转录合成一链 cDNA

西洋参根总 RNA 采用总 RNA 提取试剂盒提取。反转录合成采用 SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech),以起始总 RNA 2 μ g (质量浓度 ≥ 0.7 μ g/ μ L), SMART II A Oligonucleotide (12 μ mol/L) 为引物,进行 cDNA 逆转录,反应体系为 25 μ L。按照 SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) 操作说明,进行逆转录反应,合成 cDNA 第一链。

2.2 cDNA 末端快速扩增

通过西洋参大规模 ESTs 测序,获得 bAS 核心片段,设计 RACE 引物扩增 bAS 全长 cDNA,

5'-RACE 和 3'-RACE PCR 引物分别如下: GSP1 (5'-CTGCTGGGAACACTGTATCA-3') 和 GSP2 (5'-CGTTCTGGTTCCATCCTCTT-3')。5'-RACE 和 3'-RACE PCR 产物纯化回收,并连接到 pGEM-T Easy Vector(Promega),克隆至大肠杆菌菌株 DH5 α ,双向测序。

2.3 实时定量 PCR 的引物设计

采用 Primer Express 设计成对引物,目的基因 bAS 的引物设计如下: bASQs (5'-GTTGGCAA-GAGGATGGAACC-3') 和 bASQa (5'-TGCTAACCC-ACCATTTTTC-3')。3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) 基因作为实时定量 PCR 的内参,提前扩增其序列,测序后选取核心片段设计实时定量 PCR 引物。

2.4 实时定量 PCR

分别以 1 μ g 左右根、茎、叶、花为材料,采用 TaKaRa 公司 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit total RNA 合成一链 cDNA,用作扩增模板。采用 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 进行实时定量 PCR 反应,反应在 IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, USA) 上进行。反应体系 20 μ L,包括 1 $\times$ Power SYBR Green PCR Master mix,正向和反向引物,template cDNA。实时定量 PCR 反应循环条件如下: 50 °C、2 min, 95 °C、10 min, 50 个循环 (95 °C、15 s, 60 °C、1 min)。

2.5 序列分析

将所获得的全长序列结果检索 NCBI 的蛋白质和核苷酸数据库进行注释,通过 Dnaman 软件翻译成对应氨基酸序列,采用 Clustal W 软件进行比对,与其他植物的 OSC 氨基酸序列进行比较。所用序列检索号如下: 人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer (O82140)、椴木 *Aralia elata* (Miq.) Seem. (ADK12003)、桦木 *Betula platyphylla* Suk. (Q8W3Z1)、绿玉树 *Euphorbia tirucalli* L. (BAE43642)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (XP_002270934) 和高氏柴胡 *Bupleurum kanoi* Liu (AAS83468)。采用全局比对并利用 MEGA4 进行系统进化分析,建树方法采用 Neighbor-joining (NJ) 法,计算距离的替代模型 (substitution model) 采用泊松校正 (Poisson correction)。在自展分析 (bootstrap) 中,重复次数设定为 1 000 次,自展分析值标注在该分支近旁,自展分析值小于 50% 的没有显示。分析物种的检索号如下: 稻 *Oryza sativa* L. (AAF03375)、燕麦 *Avena*

strigosa L. (CAC84559)、三七 *Panax notoginseng* (Burkill) Hoo et Tseng (ABY60426)、豌豆 *Pisum sativum* L. (BAA23533、BAA97558、BAA97559)、油橄榄 *Olea europaea* L. (BAA86930)、槲木 (ADK12003)、人参 (BAA33461、O82146、BAF33291)、柴胡 (AAS83468)、紫菀 *Aster tataricus* L. F. (AAX14716)、青蒿 *Artemisia annua* L. (ACA13386)、葡萄 (XP_00227093)、落地生根 *Bryophyllum pinnatum* (L. f.) Oken (ADK35123)、桦木 (BAB83088)、红海榄 *Rhizophora stylosa* L. (BAF80441)、木榄 *Bruguiera gymnorhiza* (BAF80443)、绿玉树 (BAE43642)、麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke (ABK76265)、蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* L. (AAO33578)、百脉根 *Lotus corniculatus* L. (AAO33580)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (NP_176868、NP_178018、BAG82628)、蓖麻 *Ricinus communis* L. (ABB76766)、黑枯茗 *Nigella sativa* Freyn et Sint (ACH88048)、积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban (AAS01523), 西洋参用“PqbAS”表示。

3 结果与分析

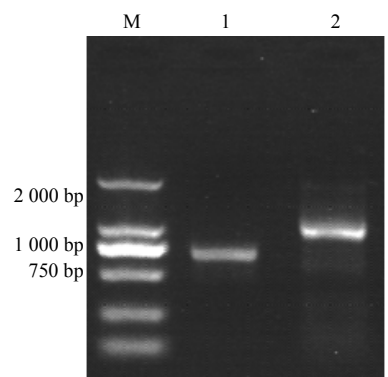
3.1 PqbAS 克隆与序列分析

经过 RACE 扩增, 获得了约 700 bp 的 5'-RACE 片段和约 1 000 bp 的 3'-RACE 片段。RACE 片段经过克隆测序与 bAS 核心片段拼接获得了 bAS 全长 cDNA, 序列长度为 2 309 bp, 包含一个完整开放阅读框 1 896 bp, 编码 631 个氨基酸的多肽。预测相对分子质量为 7.243×10^4 , 等电点 pI 为 6.36。二级结构预测显示, PqbAS 由 42.79% α -螺旋, 9.35% 延伸链, 6.02% β -转角和 41.84% 无规则卷曲构成, α -螺旋和无规则卷曲是主要二级结构。信号肽分析 (Signal P4.0) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 表明 PqbAS 很可能属于非分泌型蛋白 (图 1)。

采用 Tmhmm 2.0 对跨膜结构域进行预测, 发现它是非跨膜蛋白。ScanProsite 分析显示 PqbAS 蛋白具有 Terpene synthases signature 保守基序 DGSWyGnWGVcFtYG, 位于 D (474) 和 G (488) 之间。

3.2 PqbAS 与其他植物 OSCs 的比较分析

推测的 PqbAS 与其他植物的 OSCs 显示了很高的同源性。NCBI Blast 检索显示与近缘物种人参的 bAS 一致性为 91%, 与槲木、葡萄、落地生根、桦木、毛果杨、柴胡一致性分别为 92%、83%、



M-DNA Marker 1-5' RACE 2-3' RACE

图1 PqbAS 基因全长序列扩增

Fig. 1 Full-length amplification of PqbAS

82%、81%、81%、81%。PqbAS 与部分植物 bAS 序列的氨基酸比对见图 2。通过 NCBI 保守域在线查找, 发现了示 PqbAS 含有的保守域和催化位点。示 PqbAS 与植物 OSC 家族催化部位相似性很高, 共有保守域和活性位点。高度保守序列 DCTAE 与底物结合有关, 这些残基可能对打开氧环是必需的^[1,8-9]。

3.3 PqbAS 系统进化分析

采用全局比对并经自展分析运算 1 000 次, 构建了 30 种植物 OSCs 的系统进化树 (图 3)。从聚类结果可以看出, PqbAS 与同属植物人参和同科槲木属植物槲木的 bAS 处于同一分支, 亲缘关系最近, 并且得到 100% 的自展分析支持。其次, 与柴胡、葡萄、紫菀、青蒿的 bAS 关系较近, 属于植物 bAS 家族。本研究构建的是无根树, 其中环阿屯醇合成酶 (cycloartenol synthase, CAS) 聚成一个大的分支, 包括水稻、燕麦、三七和豌豆 CAS, 与 bAS 相距较远, 各自形成独立分支, 显示它们在结构和功能上的差别。

3.4 PqbAS 基因组织特异性表达

为了探讨 PqbAS 基因的空间表达情况, 以 4 年生西洋参的根、茎、叶、花为材料探讨 PqbAS 在转录水平上的相对表达量 (图 4)。结果发现, 四年生 PqbAS 基因在各个组织中均有表达, 在茎和花序中表达量远远高于其他部位, 根和叶片中表达量相近。考虑到茎的取材部位是花柄连接的一段幼嫩茎, 可能与组织细胞旺盛的生长活动有关。西洋参的主要药用部分是根和花, 有研究显示花中三萜总皂苷的量远远高于根中。PqbAS 基因在花中的高表达也显示其旺盛的代谢活动。关键酶基因的组织特异性表达影响代谢流的方向和皂苷的合成与累积。

人参 bAS	MVKLKI AEGNKNDPLYSTNNFVGRQTFWFDPDYVASPGELEEVEQVRRQFVDRNYQVKPSGDLWRVQFLREKNFKQTI PQVKVGDEDA	90
槲木 bAS	MVKLKI AEGNKNDPLYSTNNFVGRQTFWFDPDYVASPGELEEVEQVRRQFVDRNYQVKPSGDLWRVQFLREKNFKQTI PQVKVGDEDA	90
白桦 bAS	MVKLKI AEGNKNDPLYSTNNFVGRQTFWFDPDYVASPGELEEVEQVRRQFVDRNYQVKPSGDLWRVQFLREKNFKQTI PPVKVEEGEE	88
绿玉树 bAS	MVKLKI AEGNKNDPLYSTNNFVGRQTFWFDPDYVASPGELEEVEQVRRQFVDRNYQVKPSGDLWRVQFLREKNFKQTI PQVKVEEGEE	88
葡萄 bAS	MVKLKI AEGNKNDPLYSTNNFVGRQTFWFDPDYVASPGELEEVEQVRRQFVDRNYQVKPSGDLWRVQFLREKNFKQTI PQVKVEEGEE	88
柴胡 bAS	MVKLKI AEGNKNDPLYSTNNFVGRQTFWFDPDYVASPGELEEVEQVRRQFVDRNYQVKPSGDLWRVQFLREKNFKQTI PQVKVEEGEE	89
PqbAS	MVKLKI AEGNKNDPLYSTNNFVGRQTFWFDPDYVASPGELEEVEQVRRQFVDRNYQVKPSGDLWRVQFLREKNFKQTI PQVKVEEGEE	0
人参 bAS	VTYEAATTTLRRAVHFFSALQASDGHWAENAGPLFFLPPLVNCVYI TGHLETVFAEHRKEI LRYI VCHCNEDGGVGLHI EGHSTNFCT	180
槲木 bAS	VTYEAATTTLRRAVHFFSALQASDGHWAENAGPLFFLPPLVNCVYI TGHLETVFAEHRKEI LRYI VCHCNEDGGVGLHI EGHSTNFCT	180
白桦 bAS	VTYEAATTTLRRAVHFFSALQASDGHWAENAGPLFFLPPLVNCVYI TGHLETVFAEHRKEI LRYI VCHCNEDGGVGLHI EGHSTNFCT	178
绿玉树 bAS	VTYEAATTTLRRAVHFFSALQASDGHWAENAGPLFFLPPLVNCVYI TGHLETVFAEHRKEI LRYI VCHCNEDGGVGLHI EGHSTNFCT	178
葡萄 bAS	VTYEAATTTLRRAVHFFSALQASDGHWAENAGPLFFLPPLVNCVYI TGHLETVFAEHRKEI LRYI VCHCNEDGGVGLHI EGHSTNFCT	178
柴胡 bAS	VTYEAATTTLRRAVHFFSALQASDGHWAENAGPLFFLPPLVNCVYI TGHLETVFAEHRKEI LRYI VCHCNEDGGVGLHI EGHSTNFCT	179
PqbAS	VTYEAATTTLRRAVHFFSALQASDGHWAENAGPLFFLPPLVNCVYI TGHLETVFAEHRKEI LRYI VCHCNEDGGVGLHI EGHSTNFCT	48
人参 bAS	TL*SYI CMRI LGEGLDGGVNNACARGKW L DHGCVSVAI PS VCKTWSI LGVYEITGS NPMPPEFVI LPSFLPNMHP AKMWCYCRNVYMPMS	270
槲木 bAS	TL*SYI CMRI LGEGLDGGVNNACARGKW L DHGCVSVAI PS VCKTWSI LGVYEITGS NPMPPEFVI LPSFLPNMHP AKMWCYCRNVYMPMS	270
白桦 bAS	TL*SYI CMRI LGEGLDGGVNNACARGKW L DHGCVSVAI PS VCKTWSI LGVYEITGS NPMPPEFVI LPSFLPNMHP AKMWCYCRNVYMPMS	268
绿玉树 bAS	TL*SYI CMRI LGEGLDGGVNNACARGKW L DHGCVSVAI PS VCKTWSI LGVYEITGS NPMPPEFVI LPSFLPNMHP AKMWCYCRNVYMPMS	268
葡萄 bAS	TL*SYI CMRI LGEGLDGGVNNACARGKW L DHGCVSVAI PS VCKTWSI LGVYEITGS NPMPPEFVI LPSFLPNMHP AKMWCYCRNVYMPMS	268
柴胡 bAS	TL*SYI CMRI LGEGLDGGVNNACARGKW L DHGCVSVAI PS VCKTWSI LGVYEITGS NPMPPEFVI LPSFLPNMHP AKMWCYCRNVYMPMS	269
PqbAS	TL*SYI CMRI LGEGLDGGVNNACARGKW L DHGCVSVAI PS VCKTWSI LGVYEITGS NPMPPEFVI LPSFLPNMHP AKMWCYCRNVYMPMS	138
人参 bAS	YLYGKRFVGP I TPLI LQREELTYQPYNEI NWRKTRHVCACHEDI YYPHPI QDLWDSLYVLTEPLLRWPFNK LREKALQTTNKHI HY	359
槲木 bAS	YLYGKRFVGP I TPLI LQREELTYQPYNEI NWRKTRHVCACHEDI YYPHPI QDLWDSLYVLTEPLLRWPFNK LREKALQTTNKHI HY	359
白桦 bAS	YLYGKRFVGP I TPLI LQREELTYQPYNEI NWRKTRHVCACHEDI YYPHPI QDLWDSLYVLTEPLLRWPFNK LREKALQTTNKHI HY	358
绿玉树 bAS	YLYGKRFVGP I TPLI LQREELTYQPYNEI NWRKTRHVCACHEDI YYPHPI QDLWDSLYVLTEPLLRWPFNK LREKALQTTNKHI HY	358
葡萄 bAS	YLYGKRFVGP I TPLI LQREELTYQPYNEI NWRKTRHVCACHEDI YYPHPI QDLWDSLYVLTEPLLRWPFNK LREKALQTTNKHI HY	357
柴胡 bAS	YLYGKRFVGP I TPLI LQREELTYQPYNEI NWRKTRHVCACHEDI YYPHPI QDLWDSLYVLTEPLLRWPFNK LREKALQTTNKHI HY	358
PqbAS	YLYGKRFVGP I TPLI LQREELTYQPYNEI NWRKTRHVCACHEDI YYPHPI QDLWDSLYVLTEPLLRWPFNK LREKALQTTNKHI HY	227
人参 bAS	EDENSRYI TI GVEKVLCLVLCVVEDPNCYDFKHLARI PDYI WVAEDGCMKCSFGS QEWDTGFSI QALLDSDLTHEI GPTMKGHDFI K	449
槲木 bAS	EDENSRYI TI GVEKVLCLVLCVVEDPNCYDFKHLARI PDYI WVAEDGCMKCSFGS QEWDTGFSI QALLDSDLTHEI GPTMKGHDFI K	449
白桦 bAS	EDENSRYI TI GVEKVLCLVLCVVEDPNCYDFKHLARI PDYI WVAEDGCMKCSFGS QEWDTGFSI QALLDSDLTHEI GPTMKGHDFI K	448
绿玉树 bAS	EDENSRYI TI GVEKVLCLVLCVVEDPNCYDFKHLARI PDYI WVAEDGCMKCSFGS QEWDTGFSI QALLDSDLTHEI GPTMKGHDFI K	448
葡萄 bAS	EDENSRYI TI GVEKVLCLVLCVVEDPNCYDFKHLARI PDYI WVAEDGCMKCSFGS QEWDTGFSI QALLDSDLTHEI GPTMKGHDFI K	447
柴胡 bAS	EDENSRYI TI GVEKVLCLVLCVVEDPNCYDFKHLARI PDYI WVAEDGCMKCSFGS QEWDTGFSI QALLDSDLTHEI GPTMKGHDFI K	448
PqbAS	EDENSRYI TI GVEKVLCLVLCVVEDPNCYDFKHLARI PDYI WVAEDGCMKCSFGS QEWDTGFSI QALLDSDLTHEI GPTMKGHDFI K	317
人参 bAS	KSQVKNDPNSGDFKSNYRHI SKGSWTFSDQDHCVCSVSDCTAEGKLCCLIFSTNPEEI VGKKI KPERLYDSVNVLSLQSKNGGLAAWEPAG	539
槲木 bAS	KSQVKNDPNSGDFKSNYRHI SKGSWTFSDQDHCVCSVSDCTAEGKLCCLIFSTNPEEI VGKKI KPERLYDSVNVLSLQSKNGGLAAWEPAG	539
白桦 bAS	KSQVKNDPNSGDFKSNYRHI SKGSWTFSDQDHCVCSVSDCTAEGKLCCLIFSTNPEEI VGKKI KPERLYDSVNVLSLQSKNGGLAAWEPAG	538
绿玉树 bAS	KSQVKNDPNSGDFKSNYRHI SKGSWTFSDQDHCVCSVSDCTAEGKLCCLIFSTNPEEI VGKKI KPERLYDSVNVLSLQSKNGGLAAWEPAG	538
葡萄 bAS	KSQVKNDPNSGDFKSNYRHI SKGSWTFSDQDHCVCSVSDCTAEGKLCCLIFSTNPEEI VGKKI KPERLYDSVNVLSLQSKNGGLAAWEPAG	537
柴胡 bAS	KSQVKNDPNSGDFKSNYRHI SKGSWTFSDQDHCVCSVSDCTAEGKLCCLIFSTNPEEI VGKKI KPERLYDSVNVLSLQSKNGGLAAWEPAG	538
PqbAS	KSQVKNDPNSGDFKSNYRHI SKGSWTFSDQDHCVCSVSDCTAEGKLCCLIFSTNPEEI VGKKI KPERLYDSVNVLSLQSKNGGLAAWEPAG	407
人参 bAS	ACEWLELLNPTEFADI VI EHEYVECTSSAI QALVLEKLYP GHRKKEI ENFI TNVRYLEDITCNPEDGSWYCNWGVCF TYCSWFALCGLA	629
槲木 bAS	ACEWLELLNPTEFADI VI EHEYVECTSSAI QALVLEKLYP GHRKKEI ENFI TNVRYLEDITCNPEDGSWYCNWGVCF TYCSWFALCGLA	629
白桦 bAS	ACEWLELLNPTEFADI VI EHEYVECTSSAI QALVLEKLYP GHRKKEI ENFI TNVRYLEDITCNPEDGSWYCNWGVCF TYCSWFALCGLA	628
绿玉树 bAS	ACEWLELLNPTEFADI VI EHEYVECTSSAI QALVLEKLYP GHRKKEI ENFI TNVRYLEDITCNPEDGSWYCNWGVCF TYCSWFALCGLA	628
葡萄 bAS	ACEWLELLNPTEFADI VI EHEYVECTSSAI QALVLEKLYP GHRKKEI ENFI TNVRYLEDITCNPEDGSWYCNWGVCF TYCSWFALCGLA	627
柴胡 bAS	ACEWLELLNPTEFADI VI EHEYVECTSSAI QALVLEKLYP GHRKKEI ENFI TNVRYLEDITCNPEDGSWYCNWGVCF TYCSWFALCGLA	628
PqbAS	ACEWLELLNPTEFADI VI EHEYVECTSSAI QALVLEKLYP GHRKKEI ENFI TNVRYLEDITCNPEDGSWYCNWGVCF TYCSWFALCGLA	497
人参 bAS	AAGKTYNCAAVRKAVDFLLKSKQMDGCGVGSYLSCKKVVVPLP ENGRS NLVHTGVALMGLI HSECAERDPTPLHRAAKLLI NSQMEDGD	719
槲木 bAS	AAGKTYNCAAVRKAVDFLLKSKQMDGCGVGSYLSCKKVVVPLP ENGRS NLVHTGVALMGLI HSECAERDPTPLHRAAKLLI NSQMEDGD	719
白桦 bAS	AAGKTYNCAAVRKAVDFLLKSKQMDGCGVGSYLSCKKVVVPLP ENGRS NLVHTGVALMGLI HSECAERDPTPLHRAAKLLI NSQMEDGD	718
绿玉树 bAS	AAGKTYNCAAVRKAVDFLLKSKQMDGCGVGSYLSCKKVVVPLP ENGRS NLVHTGVALMGLI HSECAERDPTPLHRAAKLLI NSQMEDGD	718
葡萄 bAS	AAGKTYNCAAVRKAVDFLLKSKQMDGCGVGSYLSCKKVVVPLP ENGRS NLVHTGVALMGLI HSECAERDPTPLHRAAKLLI NSQMEDGD	717
柴胡 bAS	AAGKTYNCAAVRKAVDFLLKSKQMDGCGVGSYLSCKKVVVPLP ENGRS NLVHTGVALMGLI HSECAERDPTPLHRAAKLLI NSQMEDGD	718
PqbAS	AAGKTYNCAAVRKAVDFLLKSKQMDGCGVGSYLSCKKVVVPLP ENGRS NLVHTGVALMGLI HSECAERDPTPLHRAAKLLI NSQMEDGD	587
人参 bAS	FPQCEI SGVFMKNCMLHYAAYRNI YPLWALAEYRRRVP LPSLGT	763
槲木 bAS	FPQCEI SGVFMKNCMLHYAAYRNI YPLWALAEYRRRVP LPSLGT	763
白桦 bAS	FPQCEI SGVFMKNCMLHYAAYRNI YPLWALAEYRRRVP LPSLGT	778
绿玉树 bAS	FPQCEI SGVFMKNCMLHYAAYRNI YPLWALAEYRRRVP LPSLGT	762
葡萄 bAS	FPQCEI SGVFMKNCMLHYAAYRNI YPLWALAEYRRRVP LPSLGT	757
柴胡 bAS	FPQCEI SGVFMKNCMLHYAAYRNI YPLWALAEYRRRVP LPSLGT	762
PqbAS	FPQCEI SGVFMKNCMLHYAAYRNI YPLWALAEYRRRVP LPSLGT	631

*活性位点和保守序列

*means active sites and conserved sequence

图2 7种植物 OSCs 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of OSCs amino acid sequences from seven plants

4 讨论

环氧角鲨烯的环化是三萜生物合成的第一个关键步骤，不仅是植物甾醇和三萜的分支点，也是达玛烷型和齐敦果酸型人参皂苷的分支点。因此，克

隆和鉴定西洋参 OSCs 基因具有十分重要的意义。

本研究中，首次得到了西洋参根中 bAS 的全长序列（GenBank 注册号：JX185490）。GenBank 检索表明这是目前唯一的 PqbAS 序列。

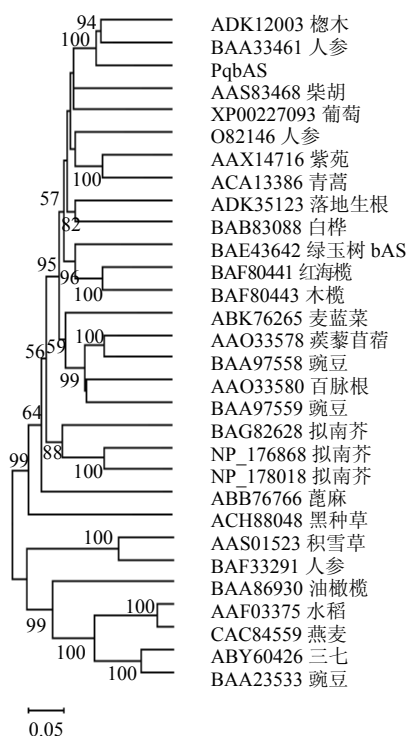


图3 30种植物 OSCs 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of OSCs from 30 plants

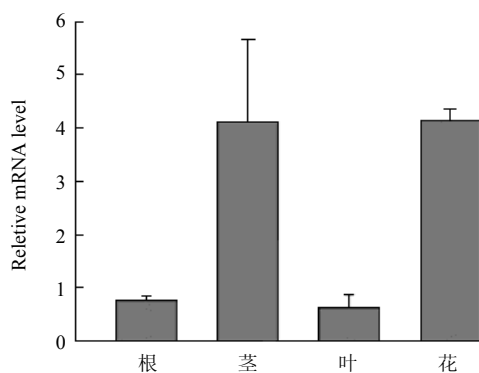


图4 PqbAS 组织特异性表达

Fig. 4 Specific expression of PqbAS in different tissues

通过 PqbAS 与部分植物 bAS 序列的氨基酸比对, 不同来源的 OSCs 蛋白质序列具有相似的保守序列, 例如 DCTAE 底物结合位点。

同时蛋白质序列依然具有较大差异。OSCs 在植物中以基因家族的形式存在, 例如拟南芥中已发现至少有 13 个 OSCs 基因存在。OSCs 对于合成种

类各异、分子结构变化多样的三萜皂苷具有重要作用, 参与不同种类的达玛烷型和齐墩果酸型皂苷合成。因此, 氨基酸序列差异位点可能反映了功能上的区别, 其确切功能还有待于进一步验证。

植物次生代谢途径中关键酶的空间表达特性是代谢产物积累的重要影响因素。PqbAS 在花和茎中高表达, 表明 bAS 在生长旺盛的幼嫩器官中表达活跃, 在衰老组织中表达量下降。这也与西洋参三萜皂苷的最终积累一致, 本研究为进一步研究和在栽培中的利用提供了依据。

参考文献

- [1] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 75: 31-49.
- [2] Suzuki H, Achnine L, Xu R, *et al*. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2002, 32: 1033-1048.
- [3] Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, *et al*. Triterpene synthases from the *Okinawan mangrove* tribe, Rhizophoraceae [J]. *FEBS J*, 2007, 274: 5028-5042.
- [4] Tansakul P, Shibuya M, Kushihiro T, *et al*. Dammarenydiol-II synthase, the first dedicated enzyme for ginsenoside biosynthesis, in *Panax ginseng* [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 5143-5149.
- [5] Ormaetxe II, Haralampidis K, Papadopoulou K, *et al*. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51: 731-743.
- [6] Hayashi H, Huang P, Kirakosyan A, *et al*. Cloning and characterization of a cDNA encoding β -amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(8): 912-916.
- [7] Shibuya M, Katsube Y, Otsuka M, *et al*. Identification of a product specific β -amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47: 26-30.
- [8] Dang T, Prestwich G D. Site-directed mutagenesis of squalene-hopene cyclase: altered substrate specificity and product distribution [J]. *Chem Biol*, 2000, 7(8): 643-649.
- [9] Shibuya M, Zhang H, Endo A, *et al*. Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 266(1): 302-307.