

• 药材与资源 •

刺五加 β -香树酯醇合成酶基因的克隆及其表达与皂苷量的相关性

龙月红, 李非非, 杨 果, 邢朝斌*

华北理工大学生命科学院, 河北 唐山 063000

摘要: 目的 克隆刺五加的 β -香树酯醇合成酶 (β -amyrin synthase, bAS) 基因, 并分析其表达对皂苷量的影响。方法 利用同源克隆法克隆刺五加的 bAS 基因。利用 Real time PCR 技术, 分析刺五加 bAS 基因的表达规律, 分光光度法测定总皂苷量。结果 克隆到 cDNA 长度分别为 1 223、1 226 bp 的刺五加 bAS1、bAS2 基因。bAS1 和 bAS2 基因在各时期和器官中均有表达, 但表达量差异显著 ($P < 0.05$)。bAS1 基因在萌芽期的表达量最高, 之后迅速降低, 并基本维持恒定。在整个生长期中 bAS2 表现出低→高→低的表达特点。bAS1 基因在各器官中的表达量基本恒定, bAS2 基因在叶片中的表达量最高。茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理后, bAS1 基因的表达未发生显著变化, bAS2 的表达量显著上升。刺五加的皂苷量与 bAS2 呈极显著的正相关关系 ($P < 0.01$), bAS1 基因未达显著水平。结论 bAS2 可能是催化刺五加三萜皂苷生物合成的关键酶。

关键词: 刺五加; β -香树酯醇合成酶基因; 克隆; 表达; 三萜皂苷

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)09-1354-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.018

Gene cloning and expression level of bAS and their correlation with content of saponins in *Eleutherococcus senticosus*

LONG Yue-hong, LI Fei-fei, YANG Guo, XING Zhao-bin

College of Life Science, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective To clone β -amyrin synthase (bAS) gene from *Eleutherococcus senticosus* and analyze the effect of its expression on saponin contents. **Methods** The sequence of cDNA of *E. senticosus* bAS was cloned by homologous cloning strategy. Quantitative real time PCR was developed to analyze the expression pattern of *E. senticosus* bAS gene. And *E. senticosus* saponin contents were measured by spectrophotometry method. **Results** Length 1 223 and 1 226 bp of *E. senticosus* bAS1 and bAS2 genes were cloned. The results showed that bAS1 and bAS2 were expressed in the each growth period and every organ of *E. senticosus*, and the expression differed significantly ($P < 0.05$). bAS1 showed the highest expression when the plants were grown in germination stage, then rapidly depressed, and changed slightly in the end. The expression of bAS2 showed the characteristic of low-high-low. The expression of bAS1 in different organs of *E. senticosus* was constant, but the highest content of the expression of bAS2 was in the leaves. With the treatment of methyl jasmonate (MeJA), bAS2 expression has been significantly improved and bAS1 without a significant changing. There exists significantly positive correlation ($P < 0.01$) between the content of *E. senticosus* saponins and the expression levels of bAS2, and bAS1 without a significant difference. **Conclusion** bAS2 may be a key enzyme gene in the biosynthesis of triterpenoid saponins.

Key words: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.; β -amyrin synthase gene; cloning; expression; triterpenoid saponins

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. 是我国传统的珍贵药用植物, 具有增强免疫力、抗衰老等多种生物活性, 以齐墩果酸为配基或在齐墩果烷型配基上连有单糖链或双糖链

的三萜皂苷类化合物是其活性成分之一^[1]。在植物体中, 三萜类物质的生成需经过类异戊二烯途径形成氧化鲨烯后, 形成环化的碳链结构, 进而连接羟基、羧基等官能团, 最后经糖基化后形成各种

收稿日期: 2014-10-10

基金项目: 河北省自然科学基金——石药集团医药联合研究项目 (H2012401006); 河北省教育厅资助科研项目 (QN2014102); 华北理工大学培育基金 (GP201306)

作者简介: 龙月红 (1974—), 女, 实验师, 研究方向为分子生药学。

*通信作者 邢朝斌 (1975—), 男, 教授, 研究方向为分子生药学、药用植物细胞工程。

Tel: (0315)3725859 Fax: (0315)3726341 E-mail: xzbheuu@126.com

以齐墩果烷型配基为基础单位的三萜皂苷类化合物的生物合成过程^[2]。这一过程中, 氧化鲨烯环化酶(oxidosqualene cyclases, OSC)催化2,3-氧化鲨烯的环化反应^[2-3]。同属OSC超家族的β-香树酯醇合成酶(β-amyrin synthase, bAS)与环阿屯醇合酶(cycloartenol synthase, CAS)竞争2,3-氧化鲨烯, 其中,bAS催化2,3-氧化鲨烯环化形成β-香树酯醇, 进而进入三萜皂苷合成支流^[2,4], 而CAS则使2,3-氧化鲨烯环化成为环阿屯醇, 从而进入甾醇等物质的合成支流^[4-5]。人参*Panax ginseng* C. A. Mey^[3]、黑种草*Nigella sativa* L.^[6]的bAS表达量上升后, 可减少甾醇的合成, 使2,3-氧化鲨烯进入三萜皂苷合成支流, 从而提高三萜皂苷的量。这说明, bAS是三萜皂苷生物合成过程中的一个关键限速酶。

目前已从人参^[3]、远志*Polygala tenuifolia* Willd^[2]、黑种草^[6]等多个物种中先后克隆出编码bAS的cDNA序列, 但尚未见关于刺五加bAS的相关报道。本实验室在已经克隆出刺五加鲨烯合酶、鲨烯环氧酶等多个参与刺五加皂苷生物合成的关键酶基因基础上^[7-8], 利用RT-PCR法首次克隆到刺五加bAS基因家族的2条cDNA序列, 并对其表达与皂苷量的相关性进行了分析, 为阐明bAS基因家族对皂苷合成的机制奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

刺五加采自河北省兴隆县, 辽宁省本溪市、吉林省穆棱市、伊通满族自治县、梅河口市、珲春市和黑龙江省鸡西市, 经华北理工大学生命科学学院邢朝斌教授鉴定为五加科植物刺五加*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. Et Maxim.) Maxim.。为了便于对结果进行比较, 参照文献方法^[9-10], 分别以萌芽期(4月26日)、叶片完全展开期(5月26日)、盛花期(6月26日)、果实快速生长期(7月26日)、果实基本成熟期(8月26日)、叶片衰老期(9月26日)的叶片和8月16日的茎、叶片、叶柄和根为提取RNA和测定皂苷量的试材。

1.2 试剂

Taq DNA聚合酶、SYBR Premix Ex TaqTM II、LA Taq DNA聚合酶和琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自Takara公司。植物总RNA提取试剂盒、质粒小提试剂盒和PGM-T克隆试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。RevertAidTM First strand cDNA synthesis Kit购自Thermo公司。琼脂

糖凝胶DNA回收试剂盒购自Biomiga公司。齐墩果酸对照品(批号110709-200505)购自中国食品药品检定研究院; 其他均为国产分析纯。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, PAGE纯化。

2 方法

2.1 茉莉酸甲酯(MeJA)处理

以产地吉林省伊通满族自治县的刺五加为试材, 分别于2013年4月26日、5月1日和5月6日连续喷施5 mmol/L MeJA至滴水为止, 共3次。以蒸馏水为对照, 进行平行处理。

2.2 RNA的提取、逆转录与引物

根据天根公司植物总RNA提取试剂盒的说明, 分别提取各样本中的总RNA, 并按照Takara公司RevertAidTM First strand cDNA synthesis Kit的要求, 加入2 μL总RNA, 逆转录为cDNA。

根据辽东槲木*Aralia elata* (Miq.) Seem (HM219225.1)、积雪草*Centella asiatica* (L.) Urban. (AY520818.1)和人参(AB009030.1)bAS基因的cDNA序列, 设计RT-PCR扩增刺五加bAS基因的简并引物bASS1和bASX1(表1)。根据测序得到的刺五加bAS1、bAS2和已经克隆得到的actin基因(KC469585)^[11]的cDNA序列, 利用Primer premier 5.0软件分别设计Real time PCR扩增bAS1、bAS2及actin基因的特异性引物bAS1rts、bAS1rtx、bAS2rts、bAS2rtx, ACTrts、ACTrtx(表1), 预计扩增长度分别为: 104、117和128 bp^[11]。

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

名称	序列(5'-3')
bASS1	CCAGCTAAAATGTGGTG(T/C)TA(T/C)TG
bASX1	TAGCT(T/C)TCTCCCAACC(G/A)CC(C/A)TC
bAS1rts	GCTCTGAAGACTACCATGAAACACA
bAS1rtx	ACCCAACAAGCAAGCATACAGA
bAS2rts	TTCCCGAATGCCAACAGAA
bAS2rtx	TCCCAAATAGCAAAACCACCA
ACTrts	GCAAGAGCTTGAAACAGCAAAG
ACTrtx	TCAAAGATGGCTGGAAAAGGA

2.3 刺五加bAS基因的扩增与生物信息学分析

以“2.2”项中逆转录获得的刺五加cDNA为模板, RT-PCR扩增刺五加bAS基因的cDNA序列。反应体系25 μL, 其中引物bASS1和bASX1各1 μL,

cDNA 1 μL , 2.5 mmol/L dNTP 2 μL , LA *Taq* 酶 0.3 μL , 10 \times LA *Taq* 缓冲液 2.5 μL , 补 dd H₂O 至 25 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min; 56 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min 30 s。35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 补充延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳、回收后, 克隆入 PGM-T 质粒载体, 转化大肠杆菌 TOP10。将验证转化成功的菌株随机选取 5 株, 提取质粒, 送 Takara 公司测序。参照文献的方法^[9]进行生物信息学分析。

2.4 Real time PCR 与定量分析

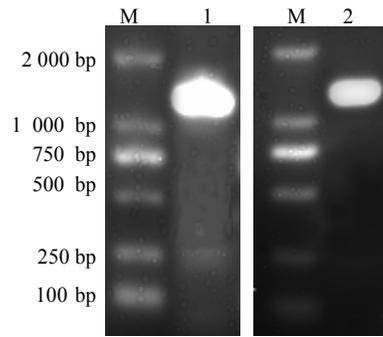
以“2.2”项中各样本的 cDNA 为模板, 分别利用扩增 bAS1、bAS2 和 actin 基因的引物进行特异性 PCR 扩增, 产物经电泳后切胶回收, 获得含高浓度各基因的 DNA 溶液。以其为标准品, 10 倍梯度稀释, 共 5 个梯度, 制作标准曲线。利用 ABI 7900 HT real-time PCR system, 按照 Takara 公司 SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] II 的说明进行 real time PCR 反应。总反应体系中上、下游引物各 0.3 μL , SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] II 5 μL , 各样本的 cDNA 或回收的高浓度 DNA 模板 0.2 μL , 50 \times ROX reverse 0.2 μL , ddH₂O 4 μL , 共 10 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。反应结束后, 进行熔解曲线分析, 鉴定产物的特异性。每个反应重复 3 次。利用 SDS2.4 软件进行数据收集, 根据标准曲线以及荧光曲线的 C_t 值, 参照文献的方法^[12]计算 bAS1 和 bAS2 的相对表达量。

参照文献的方法^[7]测定刺五加不同生长期叶片和不同器官中的总皂苷量。应用 SPSS 17.0 软件分析 bAS1 和 bAS2 基因表达量与刺五加皂苷量间的相关性。

3 结果与分析

3.1 刺五加 bAS 基因的克隆

利用简并引物 bASS1 和 bASX1, 以刺五加的 cDNA 为模板, RT-PCR 扩增获得长度约 1 300 bp 的片段 (图 1)。将该片段重组入 PGM-T 质粒后的测序结果表明, RT-PCR 获得 2 条刺五加 bAS 基因的 cDNA 序列, 分别命名为 bAS1 (GenBank 登录号: JF818130) 和 bAS2 (GenBank 登录号: JF818131)。bAS1 基因 cDNA 的长度为 1 223 bp, 推测其编码 407 个氨基酸残基组成的多肽。bAS2 基因 cDNA 的长度为 1 226 bp, 推测其编码 408 个氨基酸残基组成的多肽。bAS1 的核苷酸序列与辽东槲木 (HM219225.1)、人参 (AB009030.1) 的 bAS 核苷酸序列一致性分别为 95.42%、94.28%, 氨基酸序列的一致性分别为



M-Marker 1-bAS 基因的 RT-PCR 扩增 2-bAS 基因重组质粒的 PCR 扩增
M-Marker 1-RT-PCR amplification of bAS gene 2-PCR amplification of bAS recombinant plasmid

图 1 刺五加 bAS 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of bAS gene from *E. senticosus*

96.07%、94.84%。bAS2 的核苷酸序列与积雪草 (AY520818.1)、三七 (KC953035.1) 的 bAS 核苷酸序列一致性分别为 82.31%、81.04%, 氨基酸序列的一致性分别为 90.69%、88.48%。刺五加 bAS1 蛋白 336~378 和 385~407 位的氨基酸残基处和 bAS2 蛋白 339~379 和 387~408 位的氨基酸残基处为 OSC 家族的重要特征序列 (图 2)。

3.2 bAS1 和 bAS2 在不同生长发育时期的表达变化

刺五加的 bAS1 和 bAS2 在整个生长发育期中均有表达 (图 3), 但表达量差异显著 ($P < 0.05$)。在萌芽期 (4 月 26 日) 和叶片衰老期 (9 月 26 日) bAS1 的表达量显著高于 bAS2 的表达量, 其中萌芽期两者的表达量差异最大, bAS1 的表达量达 bAS2 的 35.78 倍。叶片完全展开期 (5 月 26 日) 至果实基本成熟期 (8 月 26 日), bAS1 的表达量显著低于 bAS2。其中, 盛花期 (6 月 26 日) 两者的表达量差异最大, bAS2 的表达量达 bAS1 的 3.92 倍。bAS1 在萌芽期的表达量最高, 之后急速下降, 并维持恒定。bAS2 则呈现低-高-低的变化趋势, 其中盛花期的表达量最高, 为最低表达量 (叶片衰老期) 的 20.49 倍。

3.3 bAS1 和 bAS2 基因在不同器官中的表达变化

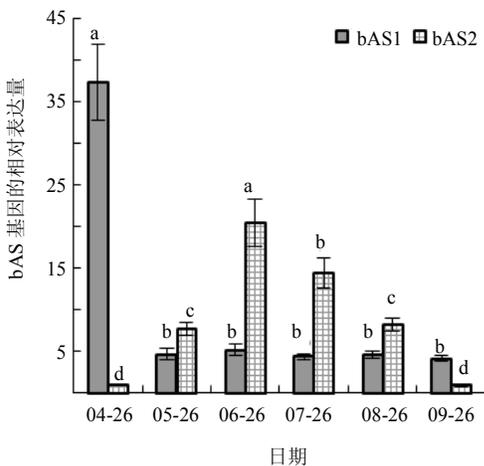
bAS1 和 bAS2 在刺五加的叶片、叶柄、茎和根器官中均有表达 (图 4), 但 bAS2 的表达量均显著高于 bAS1 的表达量 ($P < 0.05$)。其中, 叶片中两者的表达量差异最大, bAS2 达 bAS1 的 6.38 倍, 根中两者表达的差异最小, bAS2 的表达量为 bAS1 的 2.34 倍。bAS1 在叶片、叶柄、茎和根中的表达基本恒定。bAS2 在叶片和叶柄中的表达量显著高于茎和根中的表达量, bAS2 在叶片中的表达量最



1-辽东槲木 bAS 2-人参 bAS 3-刺五加 bAS1 4-刺五加 bAS2 5-积雪草 bAS *代表保守氨基酸
1-*A. elata* bAS 2-*P. ginseng* bAS 3-*E. senticosus* bAS1 4-*E. senticosus* bAS2 5-*C. asiatica* bAS *stand for conservative amino acid

图 2 刺五加与辽东槲木、人参、积雪草 bAS 氨基酸序列比对

Fig. 2 Comparison on amino acid sequence alignment of bAS in *E. senticosus* with those in *P. ginseng*, *A. elata*, and *C. asiatica*



不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 下同
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$), same as below

图 3 不同生长发育时期刺五加 bAS 基因家族的表达
Fig. 3 Expression changes of bAS gene family at different growth and development stages of *E. senticosus*

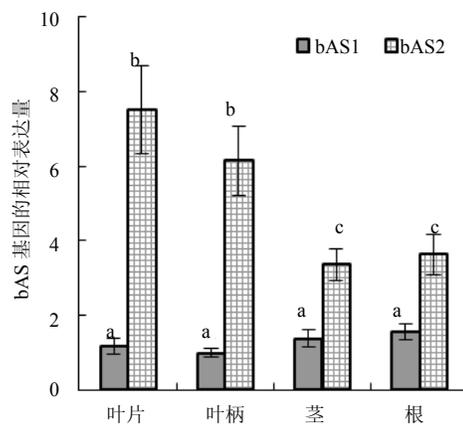


图 4 刺五加不同器官中 bAS 基因家族的表达

Fig. 4 Expression quantity of bAS gene family in different organs of *E. senticosus*

高, 为最低表达量 (茎) 中的 2.23 倍。

3.4 MeJA 处理对刺五加 bAS1 和 bAS2 表达的影响

MeJA 处理刺五加后 bAS1 和 bAS2 的表达变化

规律与对照组基本相符(图 5), 但 MeJA 处理显著提高了刺五加 bAS2 的表达水平($P < 0.05$), 而 bAS1 的表达量则无显著变化。在 MeJA 处理的早期(4 月 26 日), bAS2 的表达量显著提升至对照组的 6.30 倍, 之后基本维持在 2 倍左右, 其中果实基本成熟期(9 月 26 日)的提升幅度最小, 为对照组的 1.51 倍。

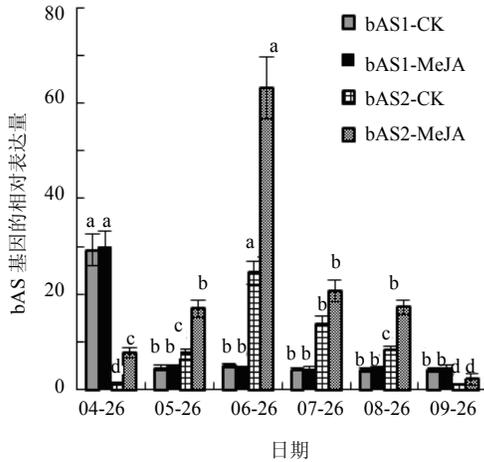


图 5 MeJA 处理对刺五加 bAS 基因家族表达的影响

Fig. 5 Effect of MeJA treatment on expression of bAS gene family in *E. senticosus*

3.5 bAS1 和 bAS2 基因的表达与皂苷量的相关性

刺五加叶片中的皂苷平均量为 25.5 mg/g, 叶柄、茎和根中未检测到皂苷的存在。刺五加叶片各生长发育时期的皂苷量如图 6 所示, 其中盛花期(6 月 26 日)的皂苷量为叶片衰老期的 4.28 倍。刺五加的皂苷量与 bAS2 的表达量同升同降, 两者间的相关系数高 ($r = 0.964$), 呈极显著的正相关关系 ($P < 0.01$)。而 bAS1 的表达量与皂苷量间的相关系数低 ($r = -0.276$), 未达显著水平。

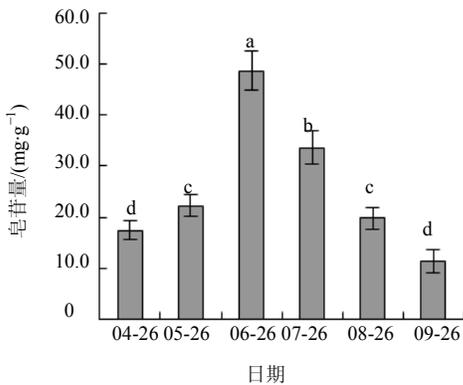


图 6 刺五加不同生长发育时期的皂苷量

Fig. 6 Saponin contents of *E. senticosus* at different growth and development stages

4 讨论

OSC 家族成员的氨基酸具有较高的同源性, 所有的成员均具备 2 个高度保守的序列, 即 DDTAEA 序列和谷氨酰胺和色氨酸 (QW) 特征序列^[13]。其中 QW 序列的作用是在 2,3-氧化鲨烯环化反应中稳定碳阳离子, 而 DDTAEA 序列的作用则是参与底物的结合。QW 区域通常带有负电荷, 而且常出现 4~8 次重复的芳香族氨基酸。研究推测该重复序列可能与蛋白质结构的稳定性有关, 在进行环化的过程中可以与中间阳离子相互作用^[13-15]。这些特征同样也存在于刺五加的 2 个 bAS 中。系统发育的分析表明, 刺五加 bAS1 和 bAS2 同源性很低, 前者与人参 bAS1 相近, 而后者与积雪草的 bAS 相近, 这也与人参、积雪草中的主要皂苷类型相符^[3]。

一般认为, 大多数植物的三萜皂苷类化合物都是由齐墩果烷和达玛烷衍化而来的^[16], 而 bAS 的作用位点存在于三萜皂苷生物合成途径的下游阶段, 是生物合成三萜皂苷的关键步骤, 主要完成对官能团进一步的环化反应, 将 2,3-氧化鲨烯催化合成 β -香树酯醇^[2]。因此, 研究 bAS 的表达与皂苷量的相关关系对阐明三萜类化合物的生物合成途径及其作用机制具有非常重要的意义。OSC 家族的成员极其多样, 其中的 bAS 负责催化形成齐墩果烷型三萜皂苷, 而达玛烷型合成酶催化达玛烷型三萜皂苷的生物合成, 两者各自形成一个代谢通路^[14]。达玛烷型三萜皂苷是人参的主要活性物质, 而刺五加的皂苷为齐墩果烷型三萜皂苷, 因此刺五加皂苷的主要合成途径应为 bAS 介导的齐墩果烷型三萜皂苷代谢途径。对刺五加 bAS1 和 bAS2 基因的表达分析结果表明, 与人参 bAS 相近的刺五加 bAS1 在各器官及除萌芽期外的所有生长期中基本恒定表达, 与皂苷量相关性不显著, 而与积雪草 bAS 相近的 bAS2 则在皂苷分布丰富的叶片及盛花期表达量升高, 两者同升同降, 相关系数高达 0.964, 呈现出显著的正相关关系。这与龙牙楸木 bAS 在盛花期的叶中高表达的特点完全相符^[15], 也与远志 bAS 在皂苷量器官中高表达的特点相似。同时 MeJA 处理后, 刺五加 bAS2 的表达量显著提高, 这与 MeJA 长时间处理可显著提高积雪草 bAS 的表达水平, 进而显著提高其齐墩果烷型皂苷产量的结果相似^[5], 说明刺五加 bAS 基因家族中的 bAS2 为调控刺五加皂苷生物合成的类型, 可能是刺五加中三萜皂苷生物合成中的关键酶。

参考文献

- [1] 涂正伟, 周渭渭, 单 淇, 等. 刺五加的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [2] Jin M L, Lee D Y, Um Y, *et al.* Isolation and characterization of an oxidosqualene cyclase gene encoding a beta-amyrin synthase involved in *Polygala tenuifolia* Willd. saponin biosynthesis [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(3): 511-519.
- [3] Kim O T, Bang K H, Kim Y C, *et al.* Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 2009, 98: 25-33.
- [4] 邢朝斌, 龙月红, 吴 鹏, 等. 刺五加环阿屯醇合酶基因的克隆及其表达分析 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1387-1392.
- [5] Kim O T, Kim M Y, Hwang S J, *et al.* Cloning and molecular analysis of cDNA encoding cycloartenol synthase from *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2005, 10(1): 16-22.
- [6] Scholz M, Lipinski M, Leupold M, *et al.* Methyl jasmonate induced accumulation of kalopanax saponin I in *Nigella sativa* [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(4): 517-522.
- [7] 邢朝斌, 劳风云, 龙月红, 等. 刺五加鲨烯合酶和鲨烯环氧酶基因单核苷酸多态性及其与总皂苷量的相关性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2020-2024.
- [8] 邢朝斌, 吴 鹏, 修乐山, 等. 刺五加功能基因密码子偏好性的分析 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 598-603.
- [9] 邢朝斌, 刘 岩, 周 秘, 等. 刺五加液泡膜内在蛋白基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 250-254.
- [10] 邢朝斌, 龙月红, 吴 鹏, 等. 刺五加皂苷合成关键酶基因表达的半定量 RT-PCR 分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(6): 691-696.
- [11] 邢朝斌, 龙月红, 修乐山, 等. 刺五加肌动蛋白基因的克隆和表达稳定性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1819-1822.
- [12] 李宝财, 修乐山, 周 秘, 等. 刺五加鲨烯环氧酶基因的表达及其与刺五加皂苷量的相关分析 [J]. 中药材, 2013, 36(7): 1063-1066.
- [13] 陈 莉, 吴耀生. 三萜皂苷生物合成途径及相关酶 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2004, 19(4): 156-161.
- [14] Yu F, Thamm A M, Reed D, *et al.* Functional characterization of amyrin synthase involved in ursolic acid biosynthesis in *Catharanthus roseus* leaf epidermis [J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 122-127.
- [15] Wu Y, Zou H D, Cheng H, *et al.* Cloning and characterization of a beta-amyrin synthase gene from the medicinal tree *Aralia elata* (Araliaceae) [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(3): 2301-2314.
- [16] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 75: 31-49.