

• 药材与资源 •

卷叶贝母环阿屯醇合成酶基因的克隆及表达分析

陈晓仪, 张甜甜, 赵琦*

成都大学药学与生物工程学院, 四川 成都 610106

摘要:目的 对卷叶贝母 *Fritillaria cirrhosa* 中参与生物碱合成的关键酶环阿屯醇合成酶 (cycloartenol synthase, CAS) 基因进行克隆, 并对其生物信息学和表达分析。方法 基于转录组测序结果, 通过 PCR 技术克隆卷叶贝母 CAS 基因 (FcCAS) 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列, 并基于在线工具对 cDNA 序列进行生物信息学分析。通过荧光定量 (qRT-PCR) 手段检测 FcCAS 在野生鳞茎与愈伤组织 (通过激素组合刺激获得的组织培养物) 中的表达情况并测定总生物碱的含量。结果 FcCAS 编码区 ORF 长为 2 271 bp, 编码 756 个氨基酸, 并与 NCBI 上公布的天门冬、芭蕉、油棕等植物 CAS 蛋白的相似性达 80% 以上; qRT-PCR 与总生物碱含量测定实验表明 FcCAS 的表达水平与总生物碱含量的变化趋势一致, 都是愈伤组织高于野生鳞茎。结论 FcCAS 在不同组织状态下表达量差异较大, FcCAS 是一个有生物学功能的蛋白质, 受激素组合诱导表达, 为进一步研究 CAS 对卷叶贝母生物碱含量的影响和表达调控奠定基础。

关键词: 卷叶贝母; 环阿屯醇合成酶; 克隆; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)18-4380-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.024

Cloning and expression analysis of cycloartenol synthase gene in *Fritillaria cirrhosa*

CHEN Xiao-yi, ZHANG Tian-tian, ZHAO Qi

School of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: Objective To obtain the key enzyme gene involved in alkaloids biosynthesis pathway of *Fritillaria cirrhosa*, cycloartenol synthase (CAS) gene was cloned, and its bioinformatics analysis and gene expression pattern were also performed. **Methods** The open reading frame (ORF) of *F. cirrhosa* CAS (FcCAS) was amplified by PCR based on transcriptome sequencing. The bioinformatics analysis of FcCAS cDNA sequences was carried out by some online tools. Meanwhile, using real-time quantitative PCR (qRT-PCR) to analyze the gene expression patterns between wild and regeneration bulbs. Moreover, the content of total alkaloids in wild and regenerated bulbs were also investigated. **Results** The results showed that CAS had a length of 2 271 bp ORF, which encoding 756 amino acids. The phylogenetic tree analysis showed that FcCAS were highly similar to the corresponding proteins in *Asparagus officinalis*, *Musa acuminata*, and *Elaeis guineensis* from the NCBI website, and the similarities were more than 80%. The results of qRT-PCR and total alkaloids assay showed that the changing trend of the expression level of FcCAS was consistent with that of the content of total alkaloids, and higher alkaloid accumulation was in regeneration bulbs than wild bulbs. **Conclusion** The expression of FcCAS gene varied widely in different tissues. These findings suggested that FcCAS was a biological functional protein induced by hormone combination, which laid a theoretical foundation for the improvement of the alkaloid content by using the genetic engineering.

Key words: *Fritillaria cirrhosa* D. Don; cycloartenol synthase; cloning; bioinformatics; expression analysis

卷叶贝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don, 别名川贝母, 属百合科贝母属植物, 主产于川西、滇西北和藏东、藏南 3 200~4 200 m 的高海拔区域, 在《中国药典》2015 年版中被列为药材“川贝母”6 种来

源植物之一^[1], 通常被认为是其中药效最好、最为珍贵的来源植物。卷叶贝母干燥鳞茎中含有多种核苷^[2]和生物碱^[3]等药效物质, 具有清热润肺、化痰止咳功效, 近年研究发现其具有抗炎、降血压、抗肿瘤

收稿日期: 2018-04-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31600261); 2016 成都市产业升级牵引工程-农业技术研发项目 (2015-NY02-00366-NC)

作者简介: 陈晓仪 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物天然产物及食品加工与安全。

Tel: 15184414343 E-mail: xiaoyichen.cdu@foxmail.com

*通信作者 赵琦 (1981—), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物天然产物等研究工作。E-mail: zhaoqi@cdu.edu.cn

和治疗心血管疾病的效果^[4]。

作为中国传统珍贵药材之一，卷叶贝母药用价值极高，甾类生物碱是其主要药效成分^[5]。近年来由于环境不断遭到破坏，加之卷叶贝母对生长环境要求苛刻，栽培上耗时费力，致使目前卷叶贝母产量和品质都急剧下降^[6]。甾醇和萜类是广泛存在于高等植物中的天然活性物质^[7]，环阿屯醇(cycloartenol, CA)为植物甾醇类化合物，更是贝母甾类生物碱合成的重要前体^[8]。孙雪等^[6]推测在贝母甾类化合物的衍生过程中，环阿屯醇合成酶(CAS)首先将 2,3-氧化鲨烯环化形成环阿屯醇，再经过一系列复杂反应最终形成各类贝母生物碱，所以 CAS 被认为是合成贝母生物碱这一重要分支代谢途径的第一个关键酶，其活性的强弱与其生物合成直接相关联。针对植物次生代谢途径的研究，关键酶基因的克隆与功能分析一直是研究的热点。目前已经从包括人参^[9]、滇重楼^[10]等 20 多种植物中克隆出编码 CAS 的 cDNA 序列^[11]，但未见卷叶贝母 CAS 的相关报道。为了研究 CAS 是否参与卷叶贝母甾类生物碱合成，本研究首先运用分子生物学技术克隆了卷叶贝母 CAS 基因，并运用生物信息学手段对其序列进行分析以预测其所具有的生物学功能，并检测了野生鳞茎和经野生鳞茎诱导的愈伤组织基因表达和总生物碱含量的变化趋势。为深入研究卷叶贝母 CAS 基因的结构与功能，从而提高卷叶贝母中生物碱的含量提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 卷叶贝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don 野生材料采自其原产地康定折多山川贝母野生抚育基地，由成都大学药学与生物工程学院副教授赵琦鉴定。经组织培养技术快速繁殖得到大量供试植株。愈伤组织以野生鳞茎为外植体，诱导采用

MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 在 20 °C 的光照培养 [40 μmol/(m²·s) 光照 12 h] 条件下培养 2 个月获得。

1.1.2 试剂与仪器 大肠杆菌菌株 Top10 由本实验室保存；反转录试剂盒 (Prime-Script RT reagent Kit)；pfu 高保真酶、pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司；琼脂糖凝胶回收试剂盒、总 RNA 提取试剂盒购自天根生化(北京)科技有限公司；荧光定量试剂盒 (SsoFastTM EvaGreen[®] Sapermix) 购自 BIO-RAD 公司；PCR 引物合成和基因测序由北京六合华大基因有限公司完成。UV-210A 型紫外分光光度计(日本岛津公司)；BS-6KH 型电子天平(上海友声衡器有限公司)；DHG-9141 型电热恒温干燥箱(上海沪粤明科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成 用天根公司的植物总 RNA 提取试剂盒提取卷叶贝母野生鳞茎的总 RNA，并按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第 1 链，反转录产物保存于-80 °C 备用。

1.2.2 FcCAS 基因的克隆与序列分析 根据本实验室测得的卷叶贝母转录组测序数据库，用 primer primier 5.0 软件设计基因特异性引物，见表 1。以反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。所得产物经胶回收后克隆到 pMD19-T 载体上，转化 *E. coli* Top10 感受态细胞。菌落经 PCR 验证后，挑取阳性菌落送往北京六合华大基因有限公司进行测序分析。将克隆的 FcCAS 基因编码区翻译成氨基酸序列，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；采用 DNAMAN 6.0 软件，将所得 ORF 推导为氨基酸序列并进行多重序列比对；用 MEGA 5.1 软件构建其系统发育进化树；Predictprotein 在线预测蛋白的功能位点 (<https://www.predictprotein.org>)；用 ExPASy 在线服务器的

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物名称	引物序列 (5'→3')
FcCAS 基因克隆	FcCASF	ATGTGGAAGCTCAAGATCGCCGAGGG
	FcCASR	TTAACAGAGTAGAACACGGG
FcCAS 基因 qPCR	qFcCASF	CAGAGCGATGCCTTTAGTCCT
	qFcCASR	CTTTTTCAACCGCAGACCAC
Fc18 S 内参基因	Fc18SF	TACGACTCTCGGCAACGGA
	Fc18SR	CAAAGGGGCAATGGGAACA

ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 FcCAS 蛋白质结构特点进行基本理化性质分析; 分别采用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODE (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线分析软件对 FcCAS 蛋白二级、三级结构进行预测分析。

1.2.3 卷叶贝母基因表达量及总生物碱含量分析 以卷叶贝母 18 S 基因 (AY616727.1) 为内参, 利用 primer premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 扩增引物, 如表 1 所示。以“1.2.1”项中合成的各样品 cDNA 稀释 50 倍为模板, 采用 SsoFastTM EvaGreen[®] Sapermix 试剂盒进行 qRT-PCR 检测, 每个样品平行做 3 次, 所得数据按 Bubner 等^[12]的 $C_t (2^{-\Delta\Delta C_t})$ 法计算目的基因的相对表达量。卷叶贝母鳞茎总生物碱含量测定, 参照王跃华等^[13]的煎煮法利用紫外分光光度仪进行测试。

2 结果与分析

2.1 FcCAS 基因的克隆

依据卷叶贝母转录组测序数据设计引物, 以野生鳞茎 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增获得 1 个 2 200 bp 左右的开放阅读框 (ORF) (图 1), 扩增基因命名为 FcCAS, 推测编码蛋白含有 756 个氨基酸残基。

2.2 FcCAS 基因编码蛋白特性分析

2.2.1 理化性质 利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 对 FcCAS 编码蛋白的理化性质进行预测, 推测该蛋白的分子式为 $C_{3860}H_{5866}N_{1026}O_{1097}S_{41}$, 理论相对分子质量为 85 511.71, 理论等电点 (pI) 为 5.91, 带正电残基 (Arg+Lys) 为 69, 负电残基 (Asp+Glu) 为 84。该蛋白的不稳定系数 (instability index) 为 36.39, 说明 FcCAS 不稳定。脂肪系数 (aliphatic index) 为 83.39, 亲水性

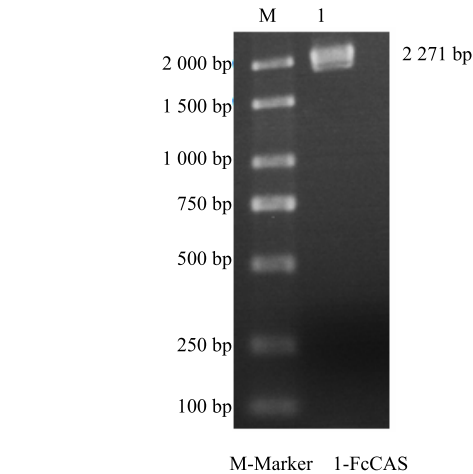


图 1 FcCAS ORF 扩增琼脂糖凝胶电泳图

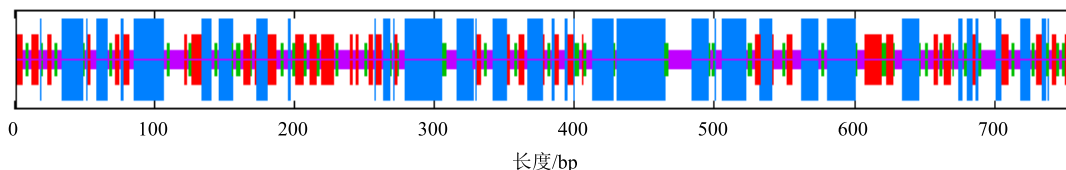
Fig. 1 ORF amplification of FcCAS

系数 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.204。

2.2.2 二级结构分析及结构域预测 二级结构在线预测结果显示 (图 2), FcCAS 蛋白的二级、三级结构中含有大量的 α -螺旋 (alpha helix) 占 40.74%, β -折叠 (beta turn) 占 11.64%, 延伸链 (extended strand) 占 20.37% 和无规卷曲 (random coil) 占 27.25%, 表明 α -螺旋及无规卷曲是其整体蛋白质结构中的主要组成结构元件, 此外, β -折叠和延伸链散布于整个蛋白质中。

2.3 氨基酸序列比对和基因进化分析

将 FcCAS 基因推测的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blastp 搜索发现, FcCAS 推测蛋白与油棕 *Elaeis gwineensis* Jacq. (XP_010906067.1), 芭蕉 *Musa acuminata* Siebold. (XP_009409584.1), 盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. (CBD47302.1), 天门冬 *Asparagus officinalis* Lour. (XP_020243911.1) 等植物的 CAS 蛋白相似性达 80% 以上。



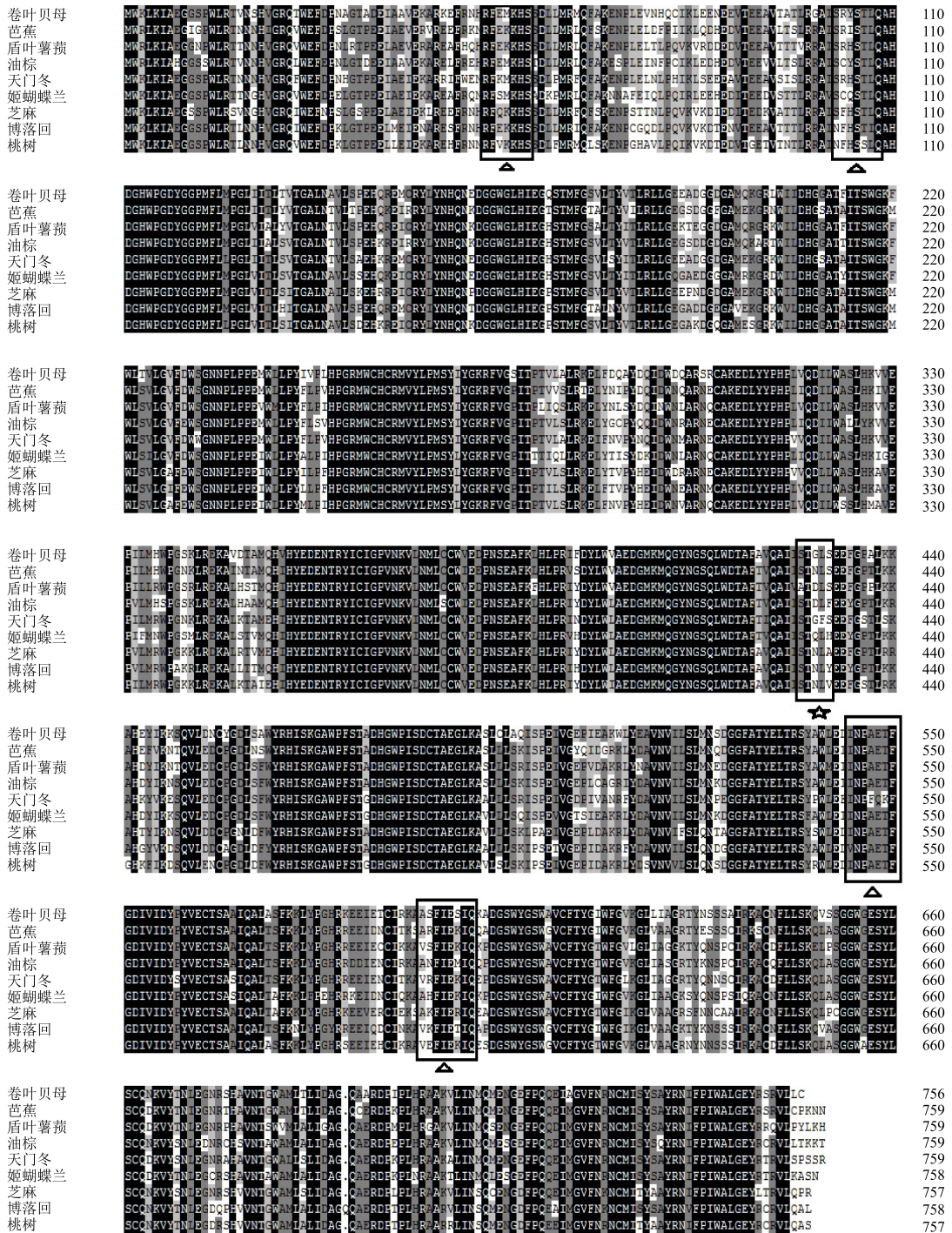
蓝色代表 α -螺旋; 绿色代表 β -折叠; 红色代表延伸链; 橙色代表无规卷曲
Blue for alpha-helix; green for beta-turn; red for extended strand; orange for random coil

图 2 FcCAS 氨基酸序列中二级结构预测

Fig. 2 Secondary structure prediction in FcCAS amino acid sequence

用 DNAMAN 6.0 软件进行同源比对, FcCAS 编码的蛋白有 1 个 DCTAE 结构域和 4 个 QW 结构域 (图 3)。在 Blastp 分析的基础上, 根据 8 种植物 FcCAS 的氨基酸序列同源性, 利用 MEGA 5.1 软件将 FcCAS

对应的氨基酸序列进行比对, 并构建系统发育进化树 (图 4)。结果表明, 进化树聚为单子叶和双子叶两类, 卷叶贝母与同为被子植物门单子叶植物纲百合亚目的天门冬 CAS 蛋白亲缘关系较近。



△代表 DCTAE 结构域 ☆代表 QW[QXXXGXW] 结构域
△ Indicates DCTAE motif ☆ indicates QW[QXXXGXW] motif

图 3 FcCAS 与其他植物 CAS 氨基酸序列比对分析

Fig. 3 Comparative analysis of amino acid sequence between FcCAS and CAS from other plants

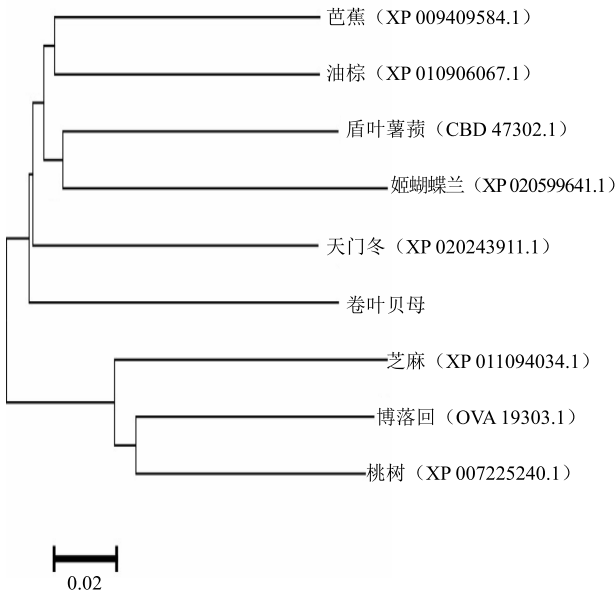


图 4 卷叶贝母 FcCAS 蛋白与其他植物中 CAS 蛋白氨基酸序列的进化分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequence of FcCAS protein of *F. cirrhosa* and CAS protein from other plants

在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中, 由于目前已经解析结构的 CAS 蛋白信息有限, 而在植物中还没有成功获得 CAS 蛋白的三维鉴定, 以已解析的人类的 CAS 蛋白为模板预测了卷叶贝母 FcCAS 蛋白的三维结构 (图 5)。通过 SWISS-MODEL 进行三级结构的同源建模, 找到 FcCAS 的同源模型 PDB: 1dce.1.B, 其三维结构通过 X 射线被测定出来。经过比对, FcCAS 和 1w6j.1.A 的氨基酸序列一致性高达 48.07%。

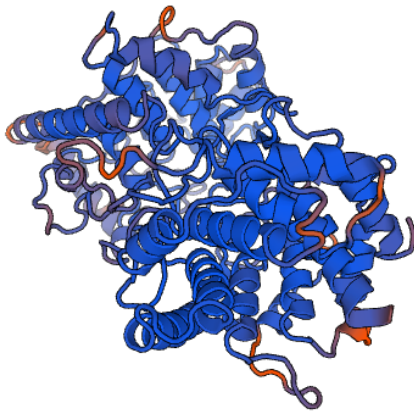


图 5 FcCAS 蛋白的三级结构预测

Fig. 5 Tertiary structure prediction of FcCAS protein

2.4 FcCAS 的表达及总生物碱含量分析

利用 qRT-PCR 技术检测该基因在野生鳞茎与愈伤组织间的表达情况。结果显示, FcCAS 在愈伤组织中表达量较高 (图 6-A), 以野生鳞茎作为对照, BA+NAA 激素诱导的愈伤组织可以使 FcCAS 表达量提高到接近 9 倍。

随后采用煎煮法提取卷叶贝母野生鳞茎和愈伤组织的总生物碱并测定其含量, 分析结果如图 6-B 显示。可以看出通过激素诱导获得的愈伤组织总生物碱含量为 0.57%, 而野生鳞茎总生物碱含量为 0.25%。野生鳞茎与愈伤组织相比, 其总生物碱含量增高, 说明激素组合对 FcCAS 和总生物碱具有一定的正调控效应。

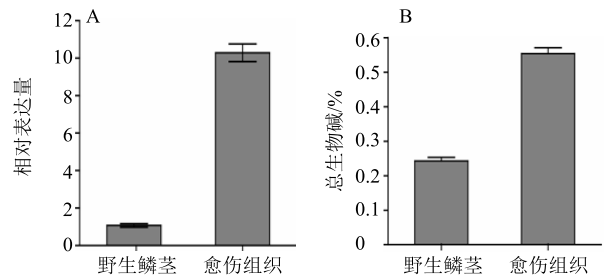


图 6 野生鳞茎和愈伤组织中 FcCAS 相对表达量 (A) 及总生物碱含量 (B) 变化

Fig. 6 Expression variations of FcCAS (A) and total alkaloid contents (B) in wild and callus bulbs

3 讨论

CAS 被认为是合成贝母生物碱这一重要分支代谢途径的第一个关键酶, 其活性的强弱与甾醇和众多三萜类合成直接相关^[8,14]。作为甾体生物碱合成的重要前体, 克隆得到 CAS 基因, 对于研究甾体生物碱生物合成途径十分有用。CAS 的 cDNA 序列的在其他植物中已有报道, 但卷叶贝母 CAS 未见有相关研究^[9,15-16]。本研究利用高通量测序技术获得的卷叶贝母转录组数据库, 成功克隆到 FcCAS 并对其进行一系列的研究。不同组织状态下 FcCAS 的表达量分析, 结果表明以野生鳞茎作为对照, BA+NAA 激素诱导的愈伤组织可以使 FcCAS 表达量提高到接近 9 倍。本研究愈伤组织是添加了植物激素诱导分化形成的, FcCAS 在愈伤组织中的显著表达可能是 BA+NAA 激素组合诱导所致, 说明该激素组合对 FcCAS 具有一定的正调控效应。此外, 测定了野生鳞茎和愈伤组织的总生物碱含量, 数据显示愈伤组织中总生物碱含量是野生鳞茎含量的 2.28 倍。结果说明激素组合对 FcCAS 和总生物碱具

有一定的正调控效应,推测卷叶贝母的愈伤组织(组织培养物)表现出的高生物碱含量与激素刺激有关,这些因子可能通过某些激素信号通路及基因调控网络控制生物碱的合成。因此, FcCAS 在愈伤组织中的高表达和总生物碱含量是受 NAA+BA 激素的正诱导,说明植物甾醇合成途径可能通过激素组合的方式提高愈伤组织鳞茎中生物碱的含量,这也进一步证实激素会刺激卷叶贝母基因的表达^[17-19]。

本实验对卷叶贝母 FcCAS 进行了克隆表达及相关结构的预测和表达分析,显示 CAS 基因在提高植物次生代谢产物含量方面发挥着关键作用。该基因的克隆不仅增加了对卷叶贝母 CAS 的了解,也为提高卷叶贝母甾醇、甾体类物质和萜类成分的含量提供理论基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S] 一部. 2015.
- [2] Duan B, Wang L, Dai X, *et al.* Identification and quantitative analysis of nucleosides and nucleobases in aqueous extracts of *Fritillaria cirrhosa* D. Don. using HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS [J]. *Anal Lett*, 2011, 44(15): 2491-2502.
- [3] 王晓静. 川贝母生物碱成分与品质研究 [D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [4] Wang D, Zhu J, Wang S, *et al.* Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from *Bulbus Fritillariae Cirrhosae* [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8): 1290-1294.
- [5] 王 强, 兰利琼, 傅华龙. 秋水仙素诱导川贝母 (*Fritillaria cirrhosa* D. Don) 愈伤组织多倍体的研究 [J]. *植物科学学报*, 2002, 20(6): 449-452.
- [6] 孙 雪. 平贝母 CAS 基因干扰载体的构建及遗传转化体系的建立 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [7] Ghosh A, Misra S, Dutta A K, *et al.* Pentacyclic triterpenoids and sterols from seven species of mangrove [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(8): 1725-1727.
- [8] 左 玉. 植物甾醇研究与应用 [J]. *粮食与油脂*, 2012(7): 1-4.
- [9] 李 珍, 王东浩, 姚 伟, 等. 丹参环阿屯醇合酶基因克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2013, 33(7): 1285-1291.
- [10] 袁梦求, 丁春邦, 陶 亮, 等. 滇重楼环阿屯醇合酶基因的克隆及序列分析 [J]. *中草药*, 2012, 43(11): 2250-2256.
- [11] 涂碧梦, 陈永勤, 杨之帆. 盾叶薯蓣环阿屯醇合酶全长基因的克隆与分析 [J]. *西北植物学报*, 2010, 30(1): 8-13.
- [12] Bubner B, Baldwin I T. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 23(5): 263-271.
- [13] 王跃华, 徐恩琴, 郭翠平, 等. 煎煮法提取卷叶贝母组培物总生物碱研究 [J]. *成都大学学报: 自然科学版*, 2015, 34(2): 108-110.
- [14] 朱振洪, 葛立军, 王丽丽, 等. 浙贝母环阿屯醇合酶基因 5-RACE 快速扩增及序列分析 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2012, 36(5): 558-562.
- [15] 张顺仓, 夏鹏国, 王幼平, 等. 丹参中转录因子基因 SmMYB-like 1 的克隆和表达分析 [J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2017, 38(3): 32-38.
- [16] 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.
- [17] 朱丹妮, 高山林. 组织培养川贝母化学成分和药理作用的研究 [J]. *中国药科大学学报*, 1992, 23(2): 118-121.
- [18] 陈 敏, 陈和荣. 川贝母组织培养的研究 [J]. *中国中药杂志*, 1995, 20(8): 461-462.
- [19] 杨 杨. 野生和组培川贝母的总生物碱含量测定和定位研究 [D]. 成都: 四川大学, 2007.