北柴胡 β-香树脂醇合酶基因家族成员鉴定及功能验证

毛艳萍[1, 2]，李玉婵[1]，杨玉萍[1, 3]，李　欢[1, 3]，张翼冠[4]，侯大斌[1, 3*]

1. 西南科技大学生命科学与工程学院，四川 绵阳　621000
2. 绵阳师范学院生命科学与技术学院，四川 绵阳　621000
3. 阿坝州西科道地中药材产业技术创新中心，四川 阿坝　624000
4. 四川省中医院转化研究医学中心，四川 成都　610041

摘　要：目的　从转录组层面对北柴胡 *Bupleurum chinense* β-香树脂醇合酶（β-amyrin synthase，*β-AS*）基因家族成员进行鉴定，并对其表达及功能进行分析验证，以期为解析柴胡皂苷的合成和调控提供基础。**方法**　基于全长转录组数据挖掘北柴胡 *β-AS* 基因家族成员（BcBASs），利用在线软件对各基因进行生物信息学分析，利用大肠杆菌和烟草验证关键基因的功能。**结果**　从北柴胡转录组数据中挖掘到不冗余的 *β-AS* 基因 6 个，可分为 3 个亚家族，它们都具有典型保守区域 DCTAE、MWCYCR 和 QW。进化分析表明，*BcBAS1*、*BcBAS2*、*BcBAS4*、*BcBAS5*、*BcBAS6* 可能为单功能 *β-AS* 基因，*BcBAS3* 可能为多功能 *β-AS* 基因，表达分析表明各基因在根和叶中的表达模式有差异。在大肠杆菌中成功表达了 *BcBAS1* 可溶性重组蛋白，相对分子质量约 87 000，烟草瞬时表达表明 *BcBAS1* 编码蛋白具有 β-AS 功能，能促进 β-香树脂醇的积累。**结论**　对北柴胡中 6 个不冗余的 *β-AS* 基因家族成员进行了鉴定和生物信息学分析，获得了 BcBAS1 可溶性重组蛋白，在烟草中验证了 *BcBAS1* 为有功能的 β-AS，为柴胡皂苷合成调控机制和生物合成研究奠定了基础。

关键词：北柴胡；β-香树脂醇合酶；基因家族；表达分析；功能验证

中图分类号：R286.12　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)11 - 3647 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.026

Identification and functional characterization of β-amyrin synthase gene family in *Bupleurum chinense*

MAO Yan-ping[1, 2], LI Yu-chan[1], YANG Yu-ping[1, 3], LI Huan[1, 3], ZHANG Yi-guan[4], HOU Da-bin[1, 3]

1. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China
2. College of Life Science and Biotechnology, Mianyang Teachers' College, Mianyang 621000, China
3. Aba Prefecture Xike Technology Innovation Center for Daodi Medicinal Materials, Aba 624000, China
4. Sichuan Institute for Translational Chinese Medicine, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective　To conduct identification analysis of the β-amyrin synthase (β-AS) gene family in *Bupleurum chinense* from the transcription level, and evaluate its expression and function for elucidating the biosynthetic pathways and regulatory mechanisms of saikosaponins (SSs). **Methods**　Based on the transcriptomics data of *B. chinense*, the β-AS genes family (BcBASs) in *B. chinense* were mined, a series of tools were used for bioinformatics analysis and expression analysis of each gene, the key genes were transformed into *Escherichia coli* and tobacco for the functional validation. **Results**　A total of six BcBASs members (*BcBAS1*—*BcBAS6*) were identified in this study, they were divided into three groups, all of them contained conserved regions including DCTAE, MWCYCR and QW. Evolutionary analyses indicated that *BcBAS1*, *BcBAS2*, *BcBAS4*, *BcBAS5* and *BcBAS6* may be monofunctional β-AS, *BcBAS3* may be a multifunctional β-AS. Analysis of gene expression patterns showed that BcBASs were specifically expressed in different tissues. *BcBAS1* was successfully expressed as solubl recombinant proteins in *E. coli* BL21(DE3), approximately 8.7×10^4. The tobacco transient expression assay showed that *BcBAS1* coded as β-AS, which affected the accumulation level of β-amyrin. **Conclusion**　The members of β-AS gene family in *B. chinense* were identified, analyzed and

收稿日期：2022-10-09

基金项目：四川省“十四五”农作物育种攻关项目（2021YFYZ0012-13）；芸释医疗科技创新基金资助项目（20zh0234）

作者简介：毛艳萍，主要从事药用植物资源与分子生物学研究。E-mail: yanpingmao2021@126.com

***通信作者：**侯大斌，教授，博士生导师，主要从事药用植物资源、育种及代谢相关研究。E-mail: hdb@swust.edu.cn

validated. BcBAS1 soluble recombinant protein was obtained, and BcBAS1 was verified as a functional β-AS in tobacco. The results of this study will provide an important foundation for revealing the biosynthetic pathways and regulatory mechanisms of SSs.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; β-amyrin synthase; gene family; expression analysis; function verification

北柴胡 *Bupleurum chinens*e DC.又名韭叶柴胡，是柴胡的优质来源，其主根粗大且分支较多，表面棕褐色，质地较硬，主要分布于我国的东北、西北、华东和华中地区，多生于树林边缘或灌丛下，其根是我国大宗药材柴胡主要药材来源，具有解热镇痛、护肝利胆、抗病毒、抗肿瘤、抗抑郁、调节免疫等药理作用[1-2]。柴胡皂苷是柴胡的主要活性成分，其合成与其他三萜皂苷一样，需要先通过甲羟戊酸（mevalonate，MVA）途径以及 2-*C*-甲基-*D*-赤藓糖醇-4-磷酸（methylerythritol phosphate，MEP）途径产生 2,3-氧化鲨烯，2,3-氧化鲨烯再被不同的氧化鲨烯环化酶（oxidosqualene cyclase，OSC）环化形成构型和功能各异的三萜骨架，三萜骨架最后再经过细胞色素单加氧酶（cytochrome P450 enzyme，P450）和糖基转移酶（uridine diphosphate glycosyltransferase，UGT）的后修饰，形成不同的三萜皂苷[3]。OSC 是决定形成三萜皂苷骨架的重要节点，β-香树脂醇合酶（β-amyrin synthase，β-AS）为环化酶 OSC 的一员，可催化 MVA 及 MEP 途径产生的 2,3-氧化鲨烯形成柴胡皂苷的骨架 β-香树脂醇，是形成柴胡皂苷骨架的关键分支节点酶。目前，现已从不同的 21 个植物家族 37 个种中克隆出超过 60 个 *β-AS* 基因[4]，但北柴胡 *β-AS* 基因家族筛选及功能验证的研究报道甚少。

本研究基于北柴胡转录组测序，对北柴胡 *β-AS* 基因进行全面的鉴定，了解其结构预测其功能，进一步利用大肠杆菌对 *BcBAS1* 进行了原核表达，并利用烟草瞬时转化研究其功能。为进一步揭示柴胡皂苷合成路径和调控机制奠定基础，为实现柴胡皂苷的生物合成提供思路。

1 材料与试剂

1.1 材料

供试材料经西南科技大学侯大斌教授鉴定为北柴胡 *B. chinens*e DC.品种，种植于四川省绵阳市西南科技大学药用植物研究实验室的试验田。本氏烟草种植于四川省绵阳市西南科技大学药用植物研究实验室温室中。

1.2 试剂

同源重组试剂盒（ClonExpress II One Step Cloning Kit）购于诺唯赞生物科技有限公司，各种限制性内切酶及抗生素均购于全式金生物，β-香树脂醇标准品购于上海源叶生物科技有限公司。大肠杆菌原核表达载体为 pMALC5E，菌株为 BL21（DE3）。烟草瞬时表达载体为 pCAMBIA1300S，菌株为 GV3101。

2 方法

2.1 北柴胡 *β-AS* 基因家族鉴定

根据前期转录组 RNA-Seq 测序数据[5]，转录组获取的数据在 GO、KEGG、KOG、NR、NT、SwissProt、Pfam 共 7 个数据库（e-value≤1×10^{-5}）进行 Blast 比对初筛，利用 NCBI 保守域数据库和 Blast 比对，筛选具有保守结构域及完整 CDS 的数据。确保每个序列均具有保守结构域且具有完整的 CDS 区域，在此基础上剔除冗余，最终得到的序列被认定北柴胡 *β-AS* 基因家族成员。

2.2 北柴胡 *β-AS* 基因生物信息学分析

利用在线软件 ProtParam 对北柴胡 *β-AS* 基因的氨基酸数量、等电点、相对分子质量等理化性质进行分析计算。利用在线软件 WoLF PSORT 预测北柴胡 *β-AS* 基因编码蛋白的亚细胞定位。蛋白质的二级结构和三级结构域分别用在线软件 SOPMA 和 Phyre2 进行分析。蛋白质保守域基序利用在线软件 MEME 分析，参数设置：Motif 设置为 10 个，长度设置为 100 氨基酸，其他设置为默认值。SMART 分析得到序列的蛋白结构域，并利用 TBtools 软件将分析得到的结构域可视化。从 NCBI 中下载已验证功能的其他物种 β-AS 氨基酸序列，利用 MEGAx 软件，设置 bootstrap 法的值为 1000，用 Neighbor-Joining Tree 进行进化树构建。利用 DNAMAN 软件对 *β-AS* 基因序列进行多序列比对分析。

2.3 表达载体构建

以前期构建的 T-BcBAS1 质粒为模板[6]，扩增相关目的基因片段。原核表达载体构建基因片段扩增引物为 F：5’-AAGGTACCGCATATGTCCATGTGGAGATTGAAAATCGGTGA-3’，R：5’-ATTACCTGCAGGGAATTCTTAATGGTGATGGTGATGATGGATGGTTGAAGATGGAAGTG-3’。烟草表达扩增目的片段的引物 F：5’-GCTTTCGC-

GAGCTCGGTACCATGTGGAGATTGAAAATCGG-TG-3’及 R：5’-AGGTCGACTCTAGAGGATCCT-TAGATGGTTGAAGATGGAAGTGC-3’。*BamH*I 和 *EcoR*V 双酶切载体 pMALC5E，载体 pCAMBIA1300S 用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *BamH*I 双酶切处理，线性化载体并回收。利用同源重组试剂盒连接目的片段与线性化的载体，连接产物转化大肠杆菌 DH5α，通过菌落 PCR 确定阳性克隆并测序。

2.4 重组蛋白表达

测序正确的 pMALC5E-BcBAS1 质粒转化原核表达大肠杆菌 BL21（DE3），以空载转化作为对照。挑取含正确的单克隆接种于 Kana 抗性的 10 mL LB 液体培养基中，37 ℃振荡培养至 A_{600}＝0.6～0.8。加入异丙基-β-*D*-硫代半乳糖苷至终浓度为 0.5 mmol/L，16 ℃、160 r/min 震荡培养 16 h 诱导蛋白。培养结束，收集菌液，冰浴超声破碎仪 170 Hz 破碎，至菌液澄清，12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液。利用 Ni-NTA Resin 纯化蛋白，并用聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测蛋白纯化情况。

2.5 烟草过表达

烟草过表达载体 pC1300S-BcBAS1 转化农杆菌 GV3101，测序正确的农杆菌单克隆在 LB 液体培养基中培养 24 h，取 1 mL 农杆菌菌液至 20 mL 含有 15 μmol/L AS 的 LB 培养基中，28 ℃、200 r/min 震荡扩大培养，培养至农杆菌 A_{600}＝0.5～0.6。5000 r/min 离心 10 min 收集菌体，用浸染液（含 10 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L MES，150 μmol/L AS，pH 5.6）重悬菌体至 A_{600} 为 1.0，用注射器针头烟草叶片背面轻轻点开一个小口，去掉针头注射农杆菌侵染叶片。培养 2 d 后，取侵染区域的叶片进行代谢产物检测，以空载侵染及野生型叶片作为对照。

2.6 数据分析

用 FPKM 值表示 *β-AS* 基因表达量，均一化处理后使用 R 软件制作热图，将其表达量可视化。每个实验均设置 3 个生物学重复，使用 SPSS 20.0 软件进行数据分析及差异显著性分析（P＜0.05）。

3 结果与分析

3.1 北柴胡 *β-AS* 基因家族鉴定

根据 7 个数据库的初筛，通过进一步的完整性筛选，剔除重复序列后，共获得北柴胡 *β-AS* 基因家族成员 6 个，分别命名为 *BcBAS1*～*BcBAS6*。对北柴胡 β-AS 家族基因编码的蛋白进行理化性质分析（表 1）表明，北柴胡 *β-AS* 基因编码蛋白平均长度为 764.8 个氨基酸，最大的编码蛋白（*BcBAS5*）由 784 个氨基酸组成，最小的编码蛋白（*BcBAS4*）由 755 个氨基酸组成，蛋白相对分子质量范围 86 880～90 490，等电点均大于 5.89，*BcBAS*5 基因编码蛋白具有最大等电点 6.22，*BcBAS4* 基因编码蛋白具有最小等电点 5.89。亚细胞预测结果显示，所有北柴胡 β-AS 家族基因编码蛋白均预测在细胞质中。北柴胡 β-AS 家族基因的理化性质符合 β-AS 的特性。

表 1 北柴胡 *β-AS* 基因基本信息

Table 1 Basic information of *β-AS* from *B. chinense*

基因名	氨基酸数	相对分子质量	分子式	等电点	亲水系数	亚细胞定位预测
BcBAS1	762	87.22	$C_{3952}H_{5945}N_{1035}O_{1114}S_{45}$	5.92	0.335	细胞质
BcBAS2	764	87.76	$C_{3958}H_{5972}N_{1042}O_{1127}S_{49}$	6.02	0.366	细胞质
BcBAS3	760	86.88	$C_{3944}H_{5975}N_{1031}O_{1114}S_{38}$	5.90	0.323	细胞质
BcBAS4	755	87.24	$C_{3963}H_{5953}N_{1027}O_{1105}S_{49}$	5.89	0.281	细胞质
BcBAS5	784	90.49	$C_{4109}H_{6186}N_{1072}O_{1145}S_{49}$	6.22	0.279	细胞质
BcBAS6	764	87.71	$C_{3957}H_{5971}N_{1041}O_{1128}S_{48}$	6.02	0.359	细胞质

3.2 北柴胡 β-AS 同源进化分析及序列比对

为了评估北柴胡 β-AS 同源进化关系，本课题组加入了拟南芥、水稻、人参、甘草、燕麦等 42 个已验证功能的 β-AS 的氨基酸序列，与本研究鉴定的 6 个北柴胡 β-AS 氨基酸序列，构建了进化树并对进行蛋白质序列进行了分析（图 1）。进化树结果表明，所有的 β-AS 基因可分为 4 个亚家族 *BcBAS1*、*BcBAS2*、*BcBAS4*、*BcBAS5*、*BcBAS6* 均位于 Class I，*BcBAS3* 位于 Class III。从进化距离来看，*BcBAS2*、*BcBAS*4 与 *BcBAS6* 在同一个分支上，与岗梅 *β-AS* 基因 *IaAS2* 关系最近；*BcBAS1* 和 *BcBAS5* 在一个分支上，与番茄 *β-AS* 基因有最近的亲缘关系；*BcBAS3* 与其他北柴胡 *β-AS* 基因关系较远，与秋茄树的 *β-AS* 基因最接近。

从各亚家族的功能来看，Class I 包含了 27 个 *β-AS* 基因，主要为单功能 β-AS，其产物仅有 β-香树脂醇，或以 β-香树脂醇为主，仅有少量的其他产物，由此推测 *BcBAS1*、*BcBAS2*、*BcBAS4*、*BcBAS5*、*BcBAS6* 有可能为单功能 β-AS。Class II 和 Class III

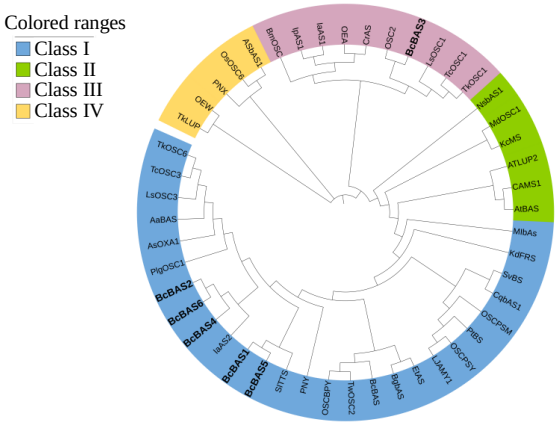


图 1　北柴胡 *β-AS* 和其他物种编码蛋白的进化关系

Fig. 1　Evolution relationship of *β-AS* with other β-AS proteins

分别包含了 6、10 个 *β-AS* 基因，均为多功能 β-AS，功能验证实验显示均能催化底物产生 2 种以上产物，推测 *BcBAS3* 可能为多功能 β-AS。Class IV 包含了 5 个 *β-AS* 基因，所包含基因的催化产物既有单一的 β-香树脂醇，也有同时催化产生了其他产物。北柴胡 *β-AS* 基因同源进化分析表明，北柴胡 *β-AS* 基因大多在同一亚家族，进化距离较近，在进化的过程中变异可能不大。

将北柴胡 *β-AS* 基因的保守区域序列与拟南芥[7]、北柴胡[8]、甘草[9]、人参[10]的氨基酸序列在 DNAMAN 中进行多序列比对。结果表明（图 2），



蓝色框为 DCTAE 基序，绿色框为 QW 基序，红色框为 MWCYCR 基序

The highly conserved DCTAE is shown in the blue box, QW motifs are boxed in green, and the MWCYCR motif is boxed in red

图 2　北柴胡 *β-AS* 基因与其他物种的 *β-AS* 基因多序列比对

Fig. 2　Comparison of deduced amino acid sequences of *β-AS* from *B. chinense* with *β-AS* from other plants

北柴胡 *β-AS* 基因家族显示包含 OSC 的典型保守区域，含 1 个基质结合基序真核 OSC 中高度保守的 DCTAE 基序，含有 1 个 *β-AS* 基因标志性基序 MWCYCR，含多个加强酶的结构并稳定其碳阳离子中间体的基序 QW[11-12]。北柴胡 *β-AS* 与其他近源物种一样，在漫长进化的过程保留了必要的功能区域。

3.3 北柴胡 β-AS 蛋白结构分析

为了进一步了解北柴胡 β-AS 蛋白的特征，利用在线软件 SMART 和 MEME 对北柴胡 β-AS 蛋白分析。结果显示，北柴胡 β-AS 蛋白所含保守结构的数量和位置大多相似（图 3）。*BcBAS3* 含有最多的基序，*BcBAS5* 基序最少。所有北柴胡 β-AS 蛋白都含有 OSC 的保守 *N*-末端结构域和 C-末端结构域，以及 OSC 特定的氨基酸重复序列[13-14]。对北柴胡 β-AS 蛋白进行二级结构和三级结构预测。二级结构分析表明（表 2），北柴胡 β-AS 蛋白 α-螺旋所占比例最大，其次是无规则的卷曲，所占比例最低的是 β-折叠，北柴胡 β-AS 的序列相似。三级结构表明（图 4），二级结构进一步折叠较规律，形成的结构也相似，说明北柴胡 β-AS 编码蛋白可能具有相似的功能。

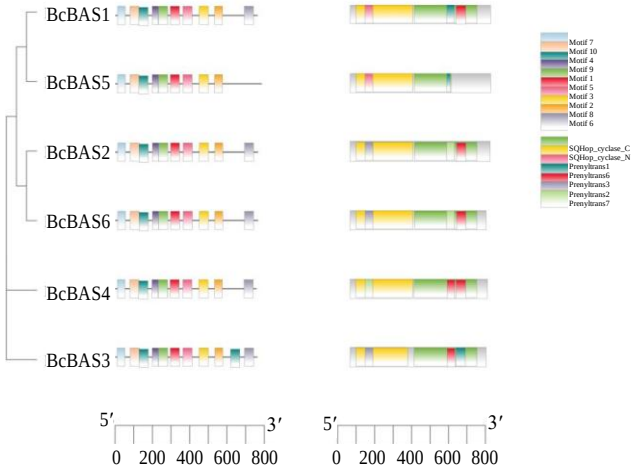


图 3 北柴胡 β-AS 蛋白保守结构域和 motif 分析

Fig. 3 Conserved putative motif analysis of β-AS domain proteins in *B. chinense*

表 2 北柴胡 β-AS 蛋白二级结构信息

Table 2 Secondary structures of β-AS proteins

基因	α-螺旋/%	β-折叠/%	无规则卷曲/%	二级结构预测
BcBAS1	45.41	7.61	33.86	
BcBAS2	44.63	7.46	34.82	
BcBAS3	43.82	6.97	36.84	
BcBAS4	45.30	7.55	34.44	
BcBAS5	42.98	6.51	35.97	
BcBAS6	43.59	6.94	35.73	

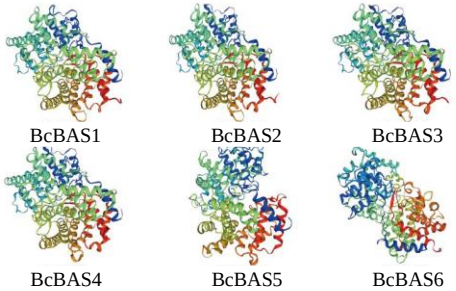


图 4 北柴胡 β-AS 蛋白三级结构预测

Fig. 4 Prediction of tertiary structures of β-AS proteins

3.4　北柴胡 *β-AS* 基因表达分析

为了了解北柴胡 *β-AS* 基因表达差异，从北柴胡茉莉酸甲酯（methyl jasmonate，MeJA）处理转录组数据筛选出 *β-AS* 基因表达数据绘制热图（图 5）。数根据热图分析，北柴胡 *β-AS* 基因在根和叶中的表达模式，可将北柴胡 *β-AS* 基因分为 3 个亚组。*BcBAS5* 单独为一个亚组，在叶中的表达水平更高，表达量最高出现在 24 h。*BcBAS3*、*BcBAS6* 一个亚组，在根中的表达水平显著高于在叶中的表达水平，且在根中持续高表达，有一定的组织表达特异性。*BcBAS1*、*BcBAS2* 和 *BcBAS4* 为一个亚组，该亚组也主要在根中表达，受 MeJA 处理的响应更显著。结果表明，*BcBAS1*、*BcBAS2*、*BcBAS3*、*BcBAS4* 和 *BcBAS6* 基因在根中的表达受到 MeJA 处理显著的诱导，*BcBAS5* 则表现出在叶中的表达受到 MeJA 处理影响更显著。

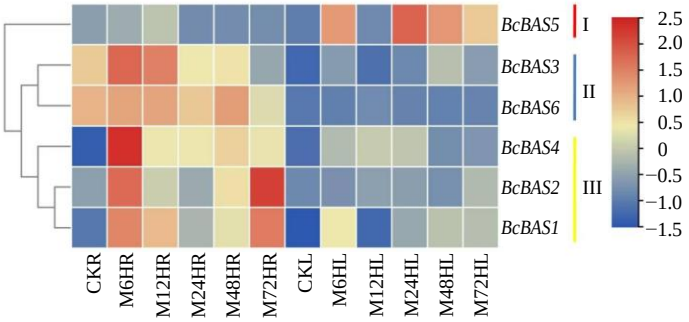
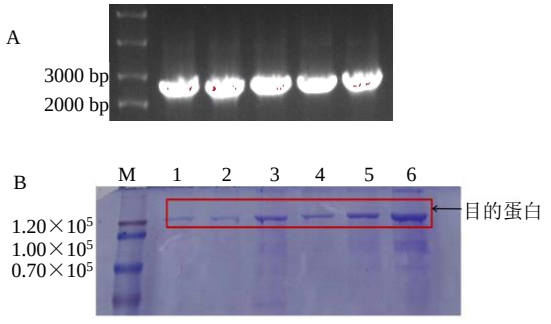


图 5　北柴胡 *β-AS* 基因表达分析

Fig. 5　Expression analyses of *β-AS* gene in *B. chinense*

3.5　北柴胡 BcBAS1 重组蛋白表达

本研究成功构建原核表达载体 pMALC5E-BcBAS1（图 6-A），SDS-PAGE 结果显示在 120 000 附近有明显的蛋白条带（图 6-B），蛋白条带大小约为 119 000（MBP 标签 42 000+目的蛋白 87 000），为可溶性蛋白，目的蛋白大小与预期的一致。结果表明，在大肠杆菌 BL21（DE3）中成功表达了 *BcBAS1* 可溶性蛋白。



A-原核表达载体菌液 PCR 鉴定结果　B-纯化可溶性蛋白的 SDS-PAGE

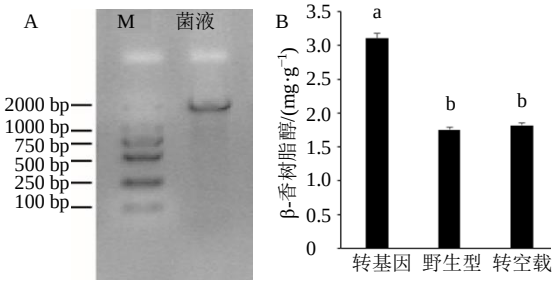
A-Bacterial colony PCR identification of the prokaryotic expression vector for *BcBAS1*　B-SDS-PAGE of BcBAS1 protein purification analysis

图 6　*BcBAS1* 基因原核蛋白表达分析

Fig. 6　SDS–PAGE analysis of expressed recombinant protein of BcBAS1

3.6　北柴胡 *BcBAS1* 基因在烟草过表达

测序无误的烟草过表达载体 pC1300S-BcBAS1 转入农杆菌 GV3101，菌落 PCR 显示载体转入成功（图 7-A）。将 pC1300S-BcBAS1 在烟草叶片中瞬时表达，以空载 pCAMBIA1300S 转入烟草和野生型烟草作为对照，对 β-香树脂醇含量进行测定。结果表明（图 7-B），与对照的烟草叶片和野生烟草叶片相比，转入 pC1300S-BcBAS1 载体的转基因烟草叶片中 β-香树脂醇含量显著增



A-烟草过表达载体菌液 PCR 鉴定结果　B-过表达 *BcBAS1* 基因的烟草叶片 β-香树脂醇含量　M-Marker　不同小写字母表示差异显著，$P<0.05$

A-Bacterial colony PCR identification of the tobacco overexpression vector for *BcBAS1*　B-The content of β-amyrin in tobacco leaves　M-Marker　different letters means $P < 0.05$

图 7　*BcBAS1* 基因在烟草过表达分析

Fig. 7　Overexpression analysis of *BcBAS1* gene in tobacco

加，分别是空载对照和野生型的 1.77 和 1.70 倍。说明 β-香树脂醇含量的增加是由 *BcBAS1* 基因调控产生，*BcBAS1* 在异源烟草叶片中有效的行使 β-AS 的催化功能，促进 β-香树脂醇的积累，*BcBAS1* 基因为编码 *β-AS* 基因。

4 讨论

三萜化合物是一类重要的次生代谢物广泛存在于植物中，其合成调控过程复杂，涉及到多途径多个酶的参与。β-AS 负责齐墩果烷型三萜化合物的骨架构建，对植物三萜的合成类型具有决定性的重要作用，深入研究 β-AS 可以帮助人们深入分析三萜化合物的生物合成途径以提高三萜化合物的积累，对 β-AS 家族进行鉴定具有重要意义。北柴胡作为亚洲地区重要的中药资源植物，其 *β-AS* 基因家族研究仍是空白。本研究共筛选出 6 条非冗余的编码区完整的北柴胡 *β-AS* 基因，根据已有报道其他植物中 β-AS 约有 760 个氨基酸，蛋白相对分子质量约为 87 000，等电点范围 5.70～6.30[4]，本研究筛选的 6 条编码 *β-AS* 基因的相关理化性质与之前报道其他的 *β-AS* 基因一致。多序列比对表明，北柴胡 β-AS 均包含了 1 个 DCTAE、1 个 MWCYCR 和多个 QW 基序，这个结果与已验证功能的北柴胡 *β-AS* 基因 *BcBAS*（GenBank 登录号：MN186093）[8]在基序的种类和数量上极为相似，且在进化分析中与 *BcBAS* 亲缘关系较近，预测本研究筛选出的北柴胡 *β-AS* 也具有与 *BcBAS* 相似的功能。

不同植物的 *β-AS* 基因在不同组织中的表达存在差异性，苜蓿 *β-AS* 基因在不同组织中的表达分析表明其在芽分生组织和茎的转录水平最高[15]；藤茶 *β-AS* 基因在叶片中表达量最高，茎次之，根中表达量最少[16]；北柴胡 *β-AS* 基因在根、茎、叶、花、果中均有表达，大多数北柴胡 *β-AS* 基因在根中表达量显著高于其他组织[17-18]。本研究筛选的 6 条 *β-AS* 基因中的 5 条 *β-AS* 基因在根中的表达量显著高于在叶中的表达量，与之前北柴胡研究中 *β-AS* 基因的表达部位一致。柴胡皂苷主要产生的部位是根，*β-AS* 基因是柴胡皂苷合成通路基因，主要在根中显著表达，显示了其在根中旺盛的表达可能影响柴胡皂苷的合成。

已有研究表明，植物界很多物种的 *β-AS* 基因已被成功克隆并诱导了蛋白表达，如辽东楤木[19]、秦艽[20]、竹节人参[21]等，蛋白大小 87 000～90 000。北柴胡 *β-AS* 基因 *BcBAS1* 主要在根中表达且对 MeJA 响应显著，*BcBAS1* 也是课题组前期北柴胡比较转录组研究中筛选出的唯一一个北柴胡 *β-AS* 差异基因，具有进一步研究价值。本研究成功对 *BcBAS1* 进行了原核蛋白表达，蛋白相对分子质量约 87 000，与其他物种 *β-AS* 基因表达蛋白大小一致。利用本氏烟草通过烟草瞬时表达 *BcBAS1*，转基因型烟草叶片中 β-香树脂醇产量显著高于野生型和空载转化烟草叶片，进一步表明 *BcBAS1* 基因具有 β-AS 的功能和活性，能促进异源烟草中 β-香树脂醇的积累。由于烟草有丰富的代谢途径，能提供的代谢产物种类丰富，不仅能为基因验证提供前体，通过检测催化产物验证基因的功能，还能将烟草作为植物底盘进行次生代谢物的合成。人参皂苷、紫杉醇等三萜化合物的前体已在烟草中成功合成，这为其他三萜化合物以烟草为底盘进行路径解析及异源合成提供了可能[22-23]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Zhao W, Li J J, Yue S Q, *et al*. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of a polysaccharide from Bei Chaihu (*Bupleurum chinense* DC.) [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89(2): 448-452.

[2] Hao X, Liu J Y, Ge S S, *et al*. Saikosaponin A inhibits breast cancer by regulating Th1/Th2 balance [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 624.

[3] Biswas T, Dwivedi U N. Plant triterpenoid saponins: Biosynthesis, *in vitro* production, and pharmacological relevance [J]. *Protoplasma*, 2019, 256(6): 1463-1486.

[4] Ma Y S, Yang R, Zhou S, *et al*. B-Amyrin synthase, one of the most important key enzymes for triterpene skeleton formation in higher plants [J]. *Pak J Bot*, 2018, 50(1): 231-243.

[5] Mao Y P, Yang Y P, Li Y C, *et al*. Comparative transcriptome analysis provides insights into the molecular mechanism underlying the effect of MeJA treatment on the biosynthesis of saikosaponins in *Bupleurum chinense* DC. [J]. *Life* (*Basel*), 2023, 13(2): 563.

[6] Mao Y P, Chen H, Zhao J, *et al*. Molecular cloning, functional characterization and expression of the β-amyrin synthase gene involved in saikosaponin biosynthesis in *Bupleurum chinense* DC. [J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 2022, 36: 1-12.

[7] Kolesnikova M D, Wilson W K, Lynch D A, *et al*. *Arabidopsis* camelliol C synthase evolved from enzymes

that make pentacycles [J]. *Org Lett*, 2007, 9(25): 5223-5226.

[8] Li J C, Wang C, Qi W T, *et al*. Cloning and functional characterization of the β-amyrin synthase genefrom *Bupleurum chinense* [J]. *Biol Plant*, 2020, 64: 314-319.

[9] Hayashi H, Huang P, Kirakosyan A, *et al*. Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(8): 912-916.

[10] Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. Beta-Amyrin synthase. Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 256(1): 238-244.

[11] Vishwakarma R K, Sonawane P, Singh S, *et al*. Molecular characterization and differential expression studies of an oxidosqualene cyclase (*OSC*) gene of Brahmi (*Bacopa monniera*) [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2013, 19(4): 547-553.

[12] Poralla K, Hewelt A, Prestwich G D, *et al*. A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases [J]. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(4): 157-158.

[13] Milla P, Viola F, Oliaro Bosso S, *et al*. Subcellular localization of oxidosqualene cyclases from *Arabidopsis thaliana*, *Trypanosoma cruzi*, and *Pneumocystis carinii* expressed in yeast [J]. *Lipids*, 2002, 37(12): 1171-1176.

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

[15] Iturbe-Ormaetxe I, 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(5): 731-743.

[16] 张玉文, 伊恒杰, 赵帅, 等. 藤茶香树脂醇合成酶基因编码区克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(3): 428-435.

[17] He Y L, Chen H, Zhao J, *et al*. Transcriptome and metabolome analysis to reveal major genes of saikosaponin biosynthesis in *Bupleurum chinense* [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 839.

[18] 赵钰, 杨林林, 韩梅, 等. 北柴胡不同部位柴胡皂苷含量与其关键酶基因表达量的相关性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2433-2441.

[19] Wu Y, Zou H D, Cheng H, *et al*. Cloning and characterization of a β-amyrin synthase gene from the medicinal tree *Aralia elata* (Araliaceae) [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(3): 2301-2314.

[20] Liu Y L, Cai Y F, Zhao Z J, *et al*. Cloning and Functional Analysis of a beta-amyrin synthase gene associated with oleanolic acid biosynthesis in *Gentiana straminea* Maxim [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(5): 818-824.

[21] Huang Z, Wang L, Guo M, *et al*. Cloning, characterization and bacterial expression of the β-amyrin synthase gene from *Panax* japonicus C. A. Mey [J]. *Bangl J Bot*, 2015, 32(7): 56-59.

[22] Li J H, Mutanda I, Wang K B, *et al*. Chloroplastic metabolic engineering coupled with isoprenoid pool enhancement for committed taxanes biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4850.

[23] Qin C, Di Q L, Yuan Q, *et al*. Construction of plant cell factory for biosynthesis of ginsenoside Rh_2 in tobacco [J]. *Ind Crops Prod*, 2023, 192: 26.

[责任编辑　时圣明]