

北柴胡达玛烯二醇合成酶基因克隆及表达分析

冯飞雪¹, 吕瑞华³, 李依民^{2*}, 高静², 梁伟伟¹, 王战争^{1,3}, 颜永刚², 张岗^{2*}

1. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000

2. 陕西中医药大学药学院/陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 西安 712046

3. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西 咸阳 712046

摘要: 目的 克隆北柴胡 *Bupleurem chinense* 达玛烯二醇合成酶 (dammarenediol synthase, DS) 基因 *BcDS*, 并进行生物信息学及表达模式分析。方法 通过搜索转录组数据库, 利用 RT-PCR 克隆开放阅读框 (open reading frame, ORF) 和启动子区。通过生物信息在线工具预测基因编码蛋白的理化性质、结构域、信号肽、三级结构等分子特征, 利用 Jalview 软件进行氨基酸多序列比对, 采用 MEGA 11.0 软件进行分子进化分析。运用实时荧光定量 PCR 检测基因表达模式。结果 *BcDS* ORF 长 2115 bp, 编码的蛋白包涵 704 个氨基酸, 相对分子质量为 80 770, 为酸不稳定的亲水蛋白, 无跨膜结构域或信号肽。*BcDS* 与人参、西洋参等植物 DS 的相似性高, 具有达玛烯二醇合成酶特征结构域, 且 *BcDS* 与人参、西洋参、三七等 DS 聚为一支。*BcDS* 启动子区域含有响应环境及植物激素的顺式作用元件。*BcDS* 在根中的表达量最高, 分别为茎、叶和花中 *BcDS* 表达量的 5.81、10.44 和 7.86 倍, 并受茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 和水杨酸 (salicylic acid, SA) 的显著诱导。结论 获得北柴胡 *BcDS* 基因序列特征, 明确了 *BcDS* 根中高表达且受 MeJA 和 SA 诱导表达, 为进一步研究基因在柴胡皂苷合成中的分子作用奠定基础。

关键词: 北柴胡; 表达模式; 基因克隆; 生物信息学分析; 茉莉酸甲酯; 水杨酸

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7815-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.024

Cloning and expression analysis of dammarenediol synthase gene in *Bupleurum chinense*

FENG Fei-xue¹, LYU Rui-hua³, LI Yi-min², GAO Jing², LIANG Wei-wei¹, WANG Zhan-zheng^{1,3}, YAN Yong-gang², ZHANG Gang²

1. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese medicine, Xianyang 712000, China

2. Key Laboratory for Research and Development of “Qin Medicine” of Shaanxi Administration of Chinese Medicine, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi’an 712046, China

3. College of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To clone dammarenediol synthase (DS) gene from Beicaihu (*Bupleurum chinense*) (*BcDS*) and carry out bioinformatics and expression pattern analysis. **Methods** By searching the transcriptome database, the open reading frame (ORF) and upstream promoter sequence of *BcDS* was cloned by PCR. The physicochemical properties, conserved domains, signal peptides, tertiary structure and other molecular characteristics of *BcDS* proteins were analyzed by bioinformatics online tools, and Jalview software was used for multiple sequences alignment of amino acid, and MEGA 11.0 software was used for evolutionary analysis. Quantitative PCR was employed for gene expression analyses. **Results** The ORF of *BcDS* was 2115 bp in length, encoding a 704 aa protein with a molecular weight of 80 770, which was an acid-labile protein with a certain hydrophilicity, no transmembrane domain

收稿日期: 2023-04-10

基金项目: 陕西省重点产业创新链项目 (2022ZDLSF05-03); 陕西省重点研发计划项目 (2022SF-542); 陕西省科技计划一般项目 (青年项目) (2023-JC-QN-0944); 陕西省中医药管理局专项 (2021-QYZL-02); 咸阳市创新科技领军人才项目 (L2022CXNLR009); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-QN01)

作者简介: 冯飞雪, 女, 博士, 讲师, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: feixue0422@126.com

*通信作者: 李依民, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源评价与利用。E-mail: 2051058@sntcm.edu.cn

张岗, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

and signal peptide, and BcDS had a characteristic domain of dammarediol synthase. BcDS was highly consistent with dammarediol synthase of *Panax ginseng*, *Panax quiquefolium*, and *Panax notoginseng*, and they were clustered in a branch in phylogenetic tree. BcDS's promoter region contained *cis*-acting elements that respond to the environment and plant hormones. The results of qRT-PCR showed that the expression of *BcDS* was the highest in roots, which was 5.81, 10.44 and 7.86 folds of that in stems, leaves and flowers and was significantly induced by methyl jasmonate and salicylic acid. **Conclusion** The sequence and expression characteristics of *BcDS* gene were obtained, and the high expression of *BcDS* in roots was identified, which lay a foundation for further research on the gene in the synthesis pathway of saikosaponin of *B. chinense*.

Key words: *Bupleurem chinense* DC.; expression pattern; gene cloning; bioinformatics analysis; methyl jasmonate; salicylic acid

北柴胡 *Bupleurem chinense* DC. 是伞形科柴胡属植物, 以其干燥根作“柴胡”入药, 为我国常用大宗药材, 其性辛、苦、微寒, 有疏散退热、疏肝解郁的功效^[1]。北柴胡主要药效成分为柴胡皂苷, 其中柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 的活性较强, 具有抗炎、抗癌、调血脂等药理活性^[2-3]。大量证据表明, 北柴胡品质形成与柴胡皂苷积累密切相关, 因此, 柴胡皂苷生源合成关键酶基因鉴定成为北柴胡生物技术领域的研究热点。

柴胡皂苷的生源合成经过甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway) 生成异戊烯焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 和其同分异构体二甲基丙烯基焦磷酸 (dimethylallylpyrophosphate, DMAPP), 二者缩合后生成牻牛儿基焦磷酸, 又经法尼基焦磷酸合酶 (farnesyl-pyrophosphate synthase, FPS)、鲨烯合成酶 (squalene synthase, SS)、鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SE) 等酶的催化, 转变为 2,3-氧化鲨烯, 而后经不同的氧化鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclase, OSC) 生成不同类型的三萜骨架, 之后再经过细胞色素 P450 单加氧酶和糖基转移酶的氧化、糖基化修饰后, 最终形成不同类型的柴胡皂苷^[4]。近年来, 柴胡皂苷合成途径中的甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, HMGR)^[5]、异戊烯基焦磷酸异构酶 (isopentenyl diphosphate isomerase, IPI)^[6]、SS^[7]、SE^[8]、环阿屯醇合酶 (cycloartenol synthase, CAS)^[9] 的基因已被克隆。参与柴胡皂苷合成途径调控的 *MYC2*、*bZIP179*、*WRKY70* 等转录调控基因也被报道^[10-12]。

作为合成植物三萜皂苷的关键酶, OSC 作用于 2,3-氧化鲨烯, 催化其环化生产甾醇和三萜类化合物的前体^[17]。目前已从不同植物中鉴定出羽扇醇合成酶 (lupeol synthase, LS)、 α -香树脂合酶 (α -amyrin synthase, α -AS)、 β -香树脂合酶 (β -amyrin synthase, β -AS)、达玛烯二醇合成酶 (dammarediol synthase,

DS)、CAS 等多种氧化鲨烯环化酶, 在三萜皂苷合成中至关重要。在北柴胡中, β -AS、CAS 已被克隆, 但其他类型的氧化鲨烯环化酶基因在北柴胡三萜皂苷合成中的作用尚不清楚。因此, 鉴定北柴胡 DS 酶基因并分析其在北柴胡三萜皂苷合成中的作用将为深入认识柴胡皂苷的生源合成途径奠定基础。

在分析北柴胡转录组数据^[13]时发现 1 条在根中高表达的 Unigene 序列, 比对分析显示其与人参达玛烯二醇合成酶 *PgDS* 基因同源性较高。本研究克隆该基因, 对其编码蛋白理化性质、结构、亚细胞定位、系统进化等进行生物信息学分析, 采用实时荧光定量 PCR 检测不同组织、不同激素处理下基因表达模式, 为后续深入分析该基因在柴胡皂苷生物合成中的分子功能提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

北柴胡种植于陕西中医药大学药用植物园, 由陕西中医药大学药学院王继涛高级实验师鉴定为伞形科植物北柴胡 *B. chinense* DC.。

1.2 仪器

K5800 自动检测超微量分光光度计 (北京凯奥科技发展有限公司); PCR 扩增仪、Gel DocTM XR 凝胶成像系统与荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); DYY-7C 型水平电泳槽与电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 样品的处理

北柴胡于 2020 年 4 月中旬播种, 于 2021 年 7 月 20 日花期时随机选取长势良好的北柴胡植株 (不少于 5 株), 收集根、茎、叶和花组织, 洗净泥土, 液氮速冻。将 2021 年 10 月采集的北柴胡种子清洗后, 浸种 24 h 后播种于穴盘中, 选用园土与细沙 1 : 1 混合基质育苗, 待萌发长出真叶后移至营养钵, 每钵 1 株, 共 50 株, 置于温室培养 [(25±2) °C, 湿度 60%]。配制 200 μ mol/L 茉莉酸甲酯 (methyl

jasmonate, MeJA)、0.06 g/L 水杨酸 (salicylic acid, SA) 溶液^[14-15], 喷施萌发 30 d 北柴胡幼苗叶片, 在处理 0、4、8、12 h 后收集叶片; 以喷施溶剂的幼苗叶片作为对照, 同样在喷施后 0、4、8、12 h 后收集样品; 液氮速冻、置于 -80 °C 冻存备用, 每组 5 个生物学重复。

2.2 RNA 及基因组 DNA 提取

采用 RNA 提取试剂 RNAiso Plus 和反转录试剂盒 One step RT-PCR kit (Takara) 完成样品 RNA 提取及反转录, 获得的 cDNA 保存于 -20 °C 冰箱备用。采用改良的 CTAB 法^[16]提取北柴胡植物基因组 DNA, -20 °C 冰箱备用。

2.3 BcDS 基因克隆

根据北柴胡转录组数据库^[13]中一条在根表达显著较高的 Unigene (c86831_1), 设计特异性引物 (表 1), 以北柴胡 cDNA 为模板进行扩增。反应程序为 95 °C、3 min; 95 °C、30 s, 57 °C、30 s, 72 °C、90 s, 30 个循环; 72 °C、10 min。PCR 扩增产物经胶回收与 pMD19-T 载体连接转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 送北京擎科生物科技有限公司测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primers' sequences

名称	引物序列 (5'-3')	扩增大小/bp
BcDS-F/BcDS-R	ATCAACAATGGATATGGCAAT/ CGTACTAATGATGATCATG	2115
AP1/pDS-GSP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC/ GCATGAAGTAACTGTAGCAGAC	-
AP2/pDS-GSP2	AGTAGGATGGAGCCGTGGT/ GTAGATGTCATGTCGTTTCACA	1856
β -Actin-F/ β -Actin-R	TGCTGATGATGAAGATAGT/ GGATTGATGGAGCGTATTC	230
qDS-F/qDS-R	GGCATCACGTTACTTAGGATA/ CGTGACTGAGTACCCACGC	207

2.4 BcDS 启动子区克隆及序列分析

采用 GenomeWalkerTM Universal Kit (Clontech, PT3402) 构建北柴胡 gDNA 步移文库用 pDS-GSP1 和 pDS-GSP2 分别和接头引物 AP1、AP2 进行两轮巢式 PCR 反应。反应程序为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将 2 轮 PCR 反应结束后的扩增产物进行电泳检测、回收并测序。利用在线工具 PlantCARE^[17]分析北柴胡 *BcDS* 基因启动

子区的顺式作用元件。

2.5 BcDS 基因生物信息学分析

利用 DNAMAN 分析 *BcDS* 编码氨基酸序列的组成和理化性质。利用 Jalview 软件进行氨基酸的多序列比对; 蛋白的信号肽及跨膜结构域用 Signal P 和 TMHMM 进行分析; 利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 分析预测蛋白质的二级、三级结构。运用 MEGA 11.0 软件采用相邻连接法 (neighbour-joining, NJ) 构建植物 DS 蛋白进化树。

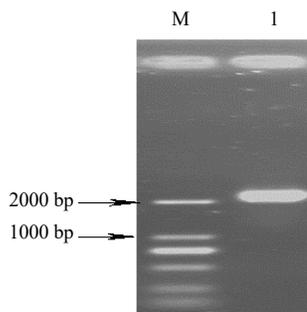
2.6 BcDS 基因的表达模式分析

以北柴胡根、叶、茎、花组织的 cDNA, 以及不同处理的 cDNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应 (qRT-PCR)。将 β -actin 基因设为内参, 检测不同样本中 *BcDS* 基因的表达量。使用伯乐荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, iQ5) 进行 qRT-PCR 反应。反应体系为 20 μ L, 包含 10 μ L SYBR Green II Premix Ex Taq, 5 μ L 稀释 50 倍的 cDNA 模板, 3 μ L H₂O, 以及待扩增基因上、下游引物各 1 μ L (10 mmol/L); 反应条件为 95 °C、10 min; 95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 循环 40 次。每个样品 3 个重复, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法^[18]对实验数据进行处理。

3 结果与分析

3.1 BcDS 基因的克隆

根据北柴胡转录组数据序列 Unigene (c86831_1), 采用特异性引物 BcDS-F/BcDS-R 对北柴胡 cDNA 模板进行 PCR 扩增。电泳检测可见 1 条大于 2000 bp 的条带 (图 1)。将其回收连接 T 载体并转化大肠杆菌后, 进行菌液 PCR, 选择阳性菌株进行测序, 结果显示该序列为北柴胡达玛烯二醇合成酶基因 ORF, 长 2115 bp, 编码 704 个氨基酸, 命名为 *BcDS* (GenBank 注册号 ON755157)。



M-Marker 1-*BcDS* 基因开放读码框扩增产物
M-Marker 1-the PCR products of *BcDS* ORF

图 1 北柴胡 *BcDS* 基因扩增产物电泳

Fig. 1 Electrophoresis of amplified *BcDS* products

3.2 BcDS 编码蛋白理化性质分析

BcDS 开放读码框区域 2115 bp, 编码 704 个氨基酸, 预测编码蛋白相对分子质量为 80 770, 等电点为 6.61。蛋白的稳定指数[stability index (II)]为 42.46, 在细胞内属于不稳定蛋白, 并且表现出一定的亲水性。另外, 跨膜结构域分析结果显示该蛋白不具有跨膜结构域; SignalP 4.1 Serve 预测发现 *BcDS* 蛋白不存在信号肽结构, 属于非分泌蛋白。BUSCA 预测显示 *BcDS* 蛋白定位于细胞质膜上。该蛋白质共有 76 个氨基酸带负电荷, 出现频率最高的氨基酸为亮氨酸 (10.1%)、谷氨酸 (7.5%) 和甘氨酸 (7.2%)。

二级结构分析显示 *BcDS* 主要由 α -螺旋、延伸链、无规卷曲和 β 转角构成, 其占比分别为 42.61%、13.64%、36.93%和 6.82%。根据 SIWSS-Model 以伪枝藻属植物达玛烯二醇合成酶 (1w6j.1.A) [19] 作为模板进行同源建模, 结果显示北柴胡 DS 蛋白由螺旋、无规卷曲结构组成, 与二级结构吻合, 预测结果见图 2。

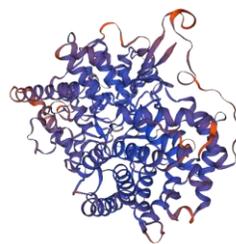


图 2 北柴胡 *BcDS* 蛋白质三级结构预测

Fig. 2 Prediction of tertiary structure of *BcDS* protein

3.3 BcDS 基因多序列比对与进化树分析

进一步运用 Jalview 软件进行 *BcDS* 与其他达玛烯二醇合成酶蛋白的多序列比对。结果显示 (图 3), *BcDS* 与西洋参 *Panax quinquefolius* L.、人参 *P. ginseng* C. A. Mey.、三七 *P. notoginseng* (Burkill) F. H. Chen ex C. H. Chow 的 DS 蛋白相似性分别为 85.19%、84.97%、78.95%, 并且具有萜烯合成酶功能结构域和角鲨烯环化酶家族的功能结构域 (图 3), 同时含有高度保守的 DCTAE 序列特征 (495~499 位)。

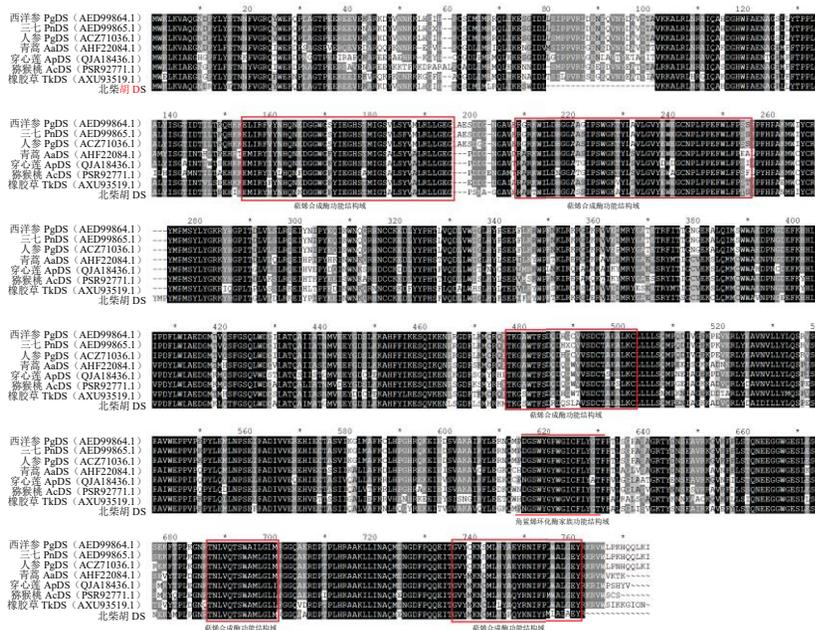


图 3 北柴胡与其他植物 DS 基因编码蛋白多序列比对分析

Fig. 3 Alignment analysis of *BcDS* with counterparts from other plant species

利用 MEGA 11.0 软件, 选用邻接法构建 *BcDS* 与 17 条其他植物 DS 蛋白的分子进化树。结果显示, *BcDS* 与五加科植物西洋参、人参、三七的 DS 蛋白聚为一支, 表明北柴胡达玛烯二醇合成酶与五加科植物达玛烯二醇合成酶基因的亲缘关系近 (图 4)。

3.4 BcDS 基因启动子区顺式作用元件分析

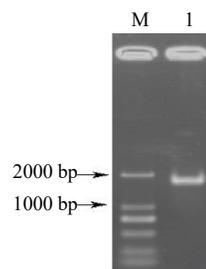
为明确哪些因素调控 *BcDS* 基因的表达, 克

隆了长约 1800 bp 的 *BcDS* 启动子区片段 (图 5)。序列分析结果显示, *BcDS* 启动子区含有 TATA box 等转录相关、应答环境与植物激素的元件 (表 2), 例如, 低温响应元件 LTR、低温和干旱应答元件 CRT, 厌氧诱导相关作用元件 ARE, 防御和环境胁迫元件 TC-rich repeat, 防卫和胁迫响应元件 H-box; 还有 MeJA 响应元件 TGACG-motif、CGTCA-



图4 北柴胡 *BcDS* 蛋白质进化树分析

Fig. 4 A neighbor-joining phylogenetic tree analysis of *BcDS* with various proteins



M-Marker 1-*BcDS* 基因启动子区扩增产物
M-Marker 1-PCR products of *BcDS* promoter

图5 北柴胡 *BcDS* 启动子区扩增产物电泳

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of the amplified *BcDS* gene promoter region

表2 北柴胡 *DS* 基因启动子区顺式作用元件

Table 2 *Cis-elements* analyses in *BcDS* promoter region

元件名称	位点	序列特征	功能
TATA-box	56	TATATA	RNA 聚合酶结合
ARE	147	AAACCA	厌氧诱导
LTR	1216	CCGAAA	低温反应
TC-rich repeats	1365	GTTTTCTTAC	防御和环境胁迫
H-box	-712	CCTACG	防卫和胁迫响应
CRT	1430	TGGCCGAC	低温和干旱应答
TGACG-motif	-877	TGACG	MeJA 响应
CGTCA-motif	-720	CGTCA	MeJA 响应
TCA	-1082	AAAATGATGG	SA 响应
W-box	-781	TTGAC	SA 响应
TATC-box	322	TATCCA	生长素响应
TGA-element	-1012	AACGAC	生长素响应
Chs-CMA2b	-1019	GAACCTACACAC	光响应
I-box	-332	AGATAAGG	光响应
Chs-CMA1a	244	TTACTTAA	光响应
Box II	947	TCCACGTGGC	光响应
G-box	431	TACGTG	光响应
Box III	883	ATCATTTCACT	蛋白结合
Circadian	-1052	CAANNNNATC	昼夜节律调控

motif, SA 响应元件 TCA、W-box, 及生长素响应元件 TATC-box 和 TGA-element; 这些元件显示 *BcDS* 的表达可能受环境因子和植物激素的调控。

3.5 *BcDS* 基因表达模式分析

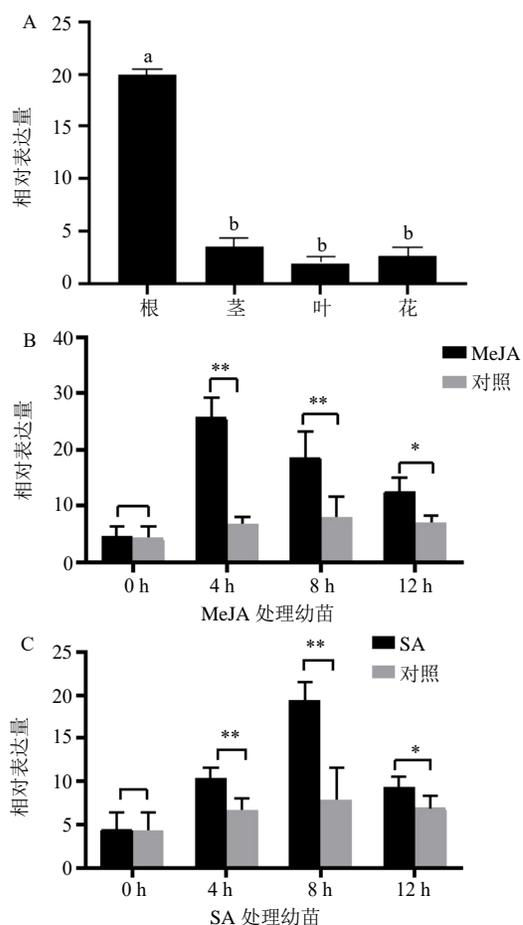
运用 qRT-PCR 检测 *BcDS* 基因在不同组织部位的表达模式。图 6-A 结果显示, *BcDS* 基因在北柴胡根、茎、叶和花中均有表达, 但在根中表达最高, 分别为茎、叶和花中 *BcDS* 表达量的 5.81、10.44 和 7.86 倍, 显著差异。

BcDS 基因能响应 MeJA 和 SA 处理 (图 6-B、C)。当 MeJA 处理幼苗 4 h 时, *BcDS* 表达量是 0 h 的 5.65 倍, 达到模拟对照的 3.80 倍, 二者具有极显

著差异; 同样, 在处理 8 h 时, *BcDS* 的表达量是模拟对照的 2.34 倍, 且具有极显著差异。当 SA 处理北柴胡幼苗时, *BcDS* 基因在处理 8 h 达到峰值, 是 0 h 的 4.25 倍, 是模拟对照的 2.43 倍, 且具有极显著性差异。

4 讨论

近年来药用植物基因组学发展迅速, 国内外已经开展人参、丹参、甘草、三七、黄芩等多种药用植物的转录组与基因组测序研究^[20], 为药用植物药效成分合成途径解析及分子辅助育种提供重要基础。通过对北柴胡进行转录组测序以及多组学联合分析技术, 初步鉴定了与柴胡皂苷合成相关的基



不同字母代表差异显著* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
Different letters means difference significantly* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

图 6 北柴胡 *BcDS* 基因表达模式分析
Fig. 6 Expression patterns of *BcDS* gene

因，为北柴胡柴胡皂苷合成的代谢通路解析奠定了基础^[13,21-23]。2022 年，北柴胡染色体级基因组被解析^[24]，并结合转录组数据揭示了 *P450* 和 *UGT* 基因在柴胡皂苷合成过程中的潜在作用。这些组学数据的公布，为进一步挖掘关键基因及功能验证，进而揭示北柴胡药材品质形成的分子机制及生理生态适应机制提供支撑。北柴胡 *SE*、*CAS*、 β -*AS* 等基因相继克隆^[8,25-26]，为其分子功能研究和柴胡皂苷的体外合成奠定基础。此外，在北柴胡毛状根中过表达 *ERF* 转录因子家族成员 *BcERF3* 显著增加了柴胡皂苷 A、C 和 D 的产量^[27]。而在北柴胡中过表达 *BcbZIP134*，抑制了柴胡皂苷 A、C 和 D 的生成，表明该转录因子负调控柴胡皂苷的生物合成^[28]。这些调控基因功能的研究，也为柴胡皂苷合成及代谢调控提供了理论依据。

氧化鲨烯环化酶是三萜皂苷生物合成的关键步

骤，也是齐墩果型和达玛烷型三萜骨架的分支点，是调控代谢流向的重要调控位点。因此，研究北柴胡中不同类型的氧化鲨烯环化酶基因具有非常重要的意义。目前已有超过 80 种氧化鲨烯环化酶在植物中进行了功能表征^[29]。例如，番茄果皮中表达的两种氧化鲨烯环化酶能够催化生成番茄表皮的三萜类化合物^[30]；过表达 *PgDS* 的人参毛状根中，*P450* 基因 *PqDI2H* 转录增加的同时也伴随着人参皂苷的增加^[31]，并且在 MeJA 处理下显著上调的转录因子 MYB2 可以正向调节人参达玛烯二醇合酶基因的表达^[32]。本研究基于北柴胡转录组序列分析，利用 RT-PCR 克隆得到北柴胡 *BcDS* 基因，与三七、人参、西洋参等植物中的达玛烯二醇合酶基因序列高度相似，其编码蛋白包含萜烯合成酶和角鲨烯环化酶的功能结构域，同时含有高度保守的 DCTAE 序列特征，该特征与底物特异性结合相关^[33]。系统进化分析显示，*BcDS* 与五加科植物达玛烯二醇合酶的亲缘关系近，推测他们可能发挥相似的催化功能。过表达 *DS* 的三七转基因植株的三七总皂苷含量显著提高^[34]；通过比较一年生和三年生三七根的转录组数据揭示，*DS* 与 *CYP716A47-like* 基因和三七皂苷积累具有显著相关性，其功能在烟草中得到了验证^[35]。而运用 RNAi 技术沉默人参中的达玛烯二醇合酶基因，则会引起人参皂苷产量降低 84.5%^[36]。这些研究揭示了达玛烯二醇合酶在三萜皂苷合成中的正调控作用，也提示 *BcDS* 基因可能也在北柴胡三萜皂苷生物合成过程中具有重要作用，有待于进一步功能验证。

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，植物组织部位的区域化分隔对中间代谢物和终产物积累有很大的影响。研究表明，三七、西洋参等植物三萜皂苷合成酶，例如 *DS*、*SS*、*SE* 等基因均在花中高表达^[37-38]；而珠子参的 *CAS*、*DS* 等酶基因则在叶中高表达^[39]；表明不同植物中皂苷合成酶基因具有不同的表达模式。而本研究中北柴胡 *BcDS* 基因在根中表达高，且与其他组织部位有显著差异，这与北柴胡 *HMGR*、 β -*AS* 基因在根中特异高表达的模式相似，表明北柴胡根中与皂苷合成相关的酶基因表达量高，推测根是北柴胡皂苷合成与积累的部位。

前人研究表明，MeJA 和 SA 能诱导北柴胡不定根中皂苷含量的显著提高^[14-15]。本研究克隆获得 *BcDS* 基因启动子区片段，序列分析结果显示其包含

MeJA 和 SA 响应元件,表明 *BcDS* 基因可能受 MeJA 和 SA 的调控。同样,北柴胡 *HMGR*、*FPS*、*IPPI*、*UGT*、*MYC2*、*WRKY70* 等基因也受到 MeJA 和 SA 诱导表达^[4-6, 10, 12]。这些基因与 *BcDS* 基因具有类似的表达模式,表明 *BcDS* 基因可能与这些结构基因或调控基因共同参与柴胡皂苷合成。qRT-PCR 结果显示, *BcDS* 基因在 MeJA、SA 诱导 4h 即显著上调,这与其顺时作用元件分析结果吻合,也说明 *BcDS* 是诱导子调控北柴胡皂苷积累的潜在调控靶点。

综上所述,本研究克隆得到北柴胡达玛烯二醇合成酶基因 *BcDS*, 并对其进行了序列结构特征分析、启动子作用元件与表达模式分析,为后续深入研究 *BcDS* 基因功能提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 293-294.
- [2] 王鹏, 高晓霞, 高耀, 等. 基于整合药理学的柴胡不同部位抗癫痫作用研究 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 2024-2038.
- [3] Sun K J, Du Y Y, Hou Y Z, *et al.* Saikosaponin D exhibits anti-leukemic activity by targeting FTO/m⁶A signaling [J]. *Theranostics*, 2021, 11(12): 5831-5846.
- [4] 陶韵文, 徐洁森, 魏建和, 等. 北柴胡糖基转移酶基因 *BcUGT1* 的表达分析及其原核表达与蛋白纯化 [J]. 药学学报, 2013, 48(8): 1345-1352.
- [5] 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.
- [6] 隋春, 战晴晴, 魏建和, 等. 北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 *IPPI* 的全长 cDNA 克隆及其序列分析 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1178-1184.
- [7] 隋春, 魏建和, 战晴晴, 等. 北柴胡鲨烯合酶基因及其编码区 cDNA 克隆与序列分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 283-290.
- [8] Gao K, Xu J S, Sun J, *et al.* Molecular cloning and expression of squalene epoxidase from a medicinal plant, *Bupleurum chinense* [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(1): 67-74.
- [9] 李剑超, 戚文涛, 王晨, 等. 北柴胡环阿屯醇合酶基因的全长克隆与表达分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(9): 2899-2905.
- [10] 王晨, 安立成, 李剑超, 等. 北柴胡 *MYC2* 转录因子的克隆及茉莉酸诱导的调控分析 [J]. 植物生理学报, 2021, 57(2): 439-450.
- [11] 韩文静, 徐娇, 朱楚然, 等. 北柴胡转录因子 *BcbZIP179* 的基因克隆及原核表达 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(9): 3116-3121.
- [12] 冯飞雪, 吕瑞华, 李依民, 等. 北柴胡转录因子 *BcWRKY70* 基因鉴定与表达分析 [J]. 药学学报, 2021, 56(11): 3184-3189.
- [13] Sui C, Zhang J, Wei J H, *et al.* Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins [J]. *BMC Genom*, 2011, 12(1): 539.
- [14] 王梅, 郝建平, 赵瑒, 等. 乙酸钠、水杨酸和 Cu^{2+} 对北柴胡不定根培养合成皂苷的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(S1): 87-91.
- [15] 战晴晴, 金钺, 魏建和, 等. 北柴胡不定根培养及茉莉酸甲酯处理对柴胡皂苷含量的影响 [J]. 生物技术通讯, 2011, 22(1): 57-60.
- [16] 李金璐, 王硕, 于婧, 等. 一种改良的植物 DNA 提取方法 [J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72-78.
- [17] Lescot M, Déhais P, Thijs G, *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 325-327.
- [18] 程波, 满尔哈巴·海如拉, 何江. 新塔花查耳酮合成酶基因克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3134-3141.
- [19] Moosmann P, Ecker F, Leopold-Messer S, *et al.* A monodomain class II terpene cyclase assembles complex isoprenoid scaffolds [J]. *Nat Chem*, 2020, 12(10): 968-972.
- [20] 祁增兴, 黎俊伶, 何其邹洪, 等. 药用植物的基因组测序及其生物活性物质合成途径的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(2): 381-390.
- [21] 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.
- [22] Yang B, Liu S K, He Y L, *et al.* Integration of transcriptomics and metabolomics to identify key coumarin biosynthetic genes in *Bupleurum chinense* [J]. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2021, 35: 1858-1868.
- [23] Wang H, Zhang G X, Gao Z H, *et al.* Transcriptome profiling of *Bupleurum chinense* DC. root provides new insights into the continuous inflorescence removal induced improvements to root growth and saikosaponin biosynthesis [J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 160: 113085.
- [24] Zhang Q F, Li M, Chen X Y, *et al.* Chromosome-level genome assembly of *Bupleurum chinense* DC. provides insights into the saikosaponin biosynthesis [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 878431.
- [25] Gao K, Xu J S, Sun J, *et al.* Molecular cloning and

- expression of squalene epoxidase from a medicinal plant, *Bupleurum chinense* [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(1): 67-74.
- [26] Li J C, Wang C, Qi W T, *et al.* Cloning and functional characterization of the β -amyrin synthase gene from *Bupleurum chinense* [J]. *Biol Plant*, 2020, 64: 314-319.
- [27] Han W J, Xu J A, Wan H F, *et al.* Overexpression of *BcERF3* increases the biosynthesis of saikosaponins in *Bupleurum chinense* [J]. *FEBS Open Bio*, 2022, 12(7): 1344-1352.
- [28] Xu J, Wu S R, Xu Y H, *et al.* Overexpression of *BcbZIP134* negatively regulates the biosynthesis of saikosaponins [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2019, 137(2): 297-308.
- [29] Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, *et al.* Triterpene biosynthesis in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65: 225-257.
- [30] Wang Z H, Guhling O, Yao R N, *et al.* Two oxidosqualene cyclases responsible for biosynthesis of tomato fruit cuticular triterpenoids [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(1): 540-552.
- [31] Wang L, Zhao S J, Cao H J, *et al.* The isolation and characterization of dammarediol synthase gene from *Panax quinquefolius* and its heterologous co-expression with cytochrome P450 gene *PqD12H* in yeast [J]. *Funct Integr Genomics*, 2014, 14(3): 545-557.
- [32] Liu T, Luo T A, Guo X Q, *et al.* PgMYB2, a MeJA-responsive transcription factor, positively regulates the dammarediol synthase gene expression in *Panax ginseng* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2219.
- [33] Abe I, Prestwich G D. Molecular cloning, characterization, and functional expression of rat oxidosqualene cyclase cDNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(20): 9274-9278.
- [34] 杨延, 刘迪秋, 葛锋, 等. 三七细胞中 SS、DS 共超表达对皂苷合成的影响 [J]. *现代食品科技*, 2015, 31(2): 7-13.
- [35] Li J, Ma L, Zhang S T, *et al.* Transcriptome analysis of 1- and 3-year-old *Panax notoginseng* roots and functional characterization of saponin biosynthetic genes *DS* and *CYP716A47-like* [J]. *Planta*, 2019, 249(4): 1229-1237.
- [36] Han J Y, Kwon Y S, Yang D C, *et al.* Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarediol synthase gene in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(12): 1653-1662.
- [37] Xia P G, Zheng Y J, Liang Z S. Structure and location studies on key enzymes in saponins biosynthesis of *Panax notoginseng* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6121.
- [38] Liu M H, Yang B R, Cheung W F, *et al.* Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in ginsenoside and alkaloid biosynthesis [J]. *BMC Genom*, 2015, 16(1): 1-12.
- [39] 黄文静, 谢培, 杨洁, 等. 珠子参皂苷合成途径 3 个关键酶基因 CAS、DS 和 β -AS 时空表达分析 [J]. *中国农学通报*, 2018, 34(7): 31-35.

[责任编辑 时圣明]