

• 药材与资源 •

多花黄精环阿屯醇合酶 *PcCAS* 基因克隆及功能分析

蒋小刚, 王 华, 郭晓亮, 郭 杰*

湖北省农业科学院中药材研究所 农业农村部中药材生物学与栽培重点实验室, 湖北 恩施 445000

摘要: 目的 克隆多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* 的环阿屯醇合酶 (cycloartenol synthase, CAS) 基因 *PcCAS*, 对其进行生物信息学、重组蛋白表达以及亚细胞定位等分析, 为进一步研究多花黄精皂苷生物合成机制提供基础资源。方法 基于多花黄精转录组数据筛选并克隆 *PcCAS* 基因, 利用生物信息学方法分析其编码蛋白的理化性质、二级结构、三级结构等。利用 qRT-PCR 对 *PcCAS* 进行组织特异性表达分析。构建酵母表达载体转入毕赤酵母进行酵母表达分析。构建亚细胞定位表达载体并侵染烟草叶片, 对 *PcCAS* 蛋白进行烟草异源表达分析。结果 *PcCAS* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度为 2 286 bp, 编码 759 个氨基酸, 属于亲水蛋白, 无信号肽。根茎中总皂苷含量与 *PcCAS* 表达量显著高于茎、叶、花组织, *PcCAS* 表达量与总皂苷含量呈正相关。酵母表达得到的重组蛋白大小符合 86 400 的预期。烟草亚细胞定位显示 *PcCAS* 蛋白主要定位于内质网中。结论 *PcCAS* 蛋白属于氧化角鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclase, OSC) 超家族, 定位于内质网中, 正向调控总皂苷物质的合成。

关键词: 多花黄精; 环阿屯醇合酶; 基因克隆; 总皂苷; 亚细胞定位

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)12-4801-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.022

Cloning and preliminary functional exploration of *PcCAS* gene in *Polygonatum cyrtonema*

JIANG Xiaogang, WANG Hua, GUO Xiaoliang, GUO Jie

Key Laboratory of Biology and Cultivation of Herb Medicine, Ministry of Agricultural and Rural Affairs, Institute of Chinese Herbal Medicines, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Enshi 445000, China

Abstract: Objective To clone the cycloartenol synthase (CAS) gene *PcCAS* from *Polygonatum cyrtonema*, perform bioinformatic and recombinant protein expression analyses, and determine its subcellular localization etc, thereby providing essential resources for further elucidating the pivotal role of *PcCAS* in saponin biosynthesis. **Methods** Based on the transcriptome data of *P. cyrtonema*, the *PcCAS* gene was screened and cloned, and bioinformatics approaches were employed to analyze the physicochemical properties, secondary structure, and tertiary structure of its encoded protein. qRT-PCR was used to analyze the tissue-specific expression of *PcCAS*. A prokaryotic expression vector was constructed and transferred into *Escherichia coli* for prokaryotic expression analysis. Yeast expression vectors were constructed and transformed into *Pichia pastoris* for subsequent yeast expression analysis. A subcellular-localization vector was built and infiltrated into *Nicotiana benthamiana* leaves for the analysis of heterologous expression in tobacco. **Results** The open reading frame (ORF) of *PcCAS* is 2 286 bp in length and encodes 759 amino acids. The protein is hydrophilic and lacks a signal peptide. The total saponin content and *PcCAS* expression level in the rhizome are significantly higher than those in the stem, leaf, and flower, indicating the expression level of *PcCAS* is positively related with the total saponin content. Yeast-expressed recombinant protein matched the expected molecular weight of 86 400. Subcellular-localization assays in tobacco leaves demonstrated that the *PcCAS* protein is predominantly localized to the endoplasmic reticulum. **Conclusion** *PcCAS* protein belongs to the OSC superfamily of enzymes and is localized in the cytoplasm, positively regulating the total saponin biosynthesis.

Key words: *Polygonatum cyrtonema* Hua; cycloartenol synthase; gene clone; total saponin; subcellular-localization

收稿日期: 2025-11-03

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目 (2025AFD159); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-21); 中央财政林业科技推广示范项目 (鄂 [2024] TG25 号); 恩施州科技计划项目 (启航专项) (33)

作者简介: 蒋小刚, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为药用植物育种。E-mail: jxg154113@163.com

*通信作者: 郭 杰, 男, 研究员, 研究方向为中药材育种与栽培。E-mail: gjms91@126.com

多花黄精 *Polygonatum cyrtoneuma* Hua 为天门冬科黄精属多年生草本植物^[1], 具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的功效^[2], 因其具有药食两用特性, 在药用、保健品及食用方面具有较高的经济价值和开发潜力。皂苷作为其主要的药用成分, 主要包括甾体皂苷^[3]和三萜皂苷^[4], 具有抑菌^[5]、降血糖^[6]、抗病毒^[7]、抗肿瘤^[8-9]、抗炎^[10]等生理活性, 是传统中药的重要生物活性成分, 被广泛应用于医疗、食品、饲料等行业。皂苷生物合成下游的中间产物环阿屯醇也被报道具有抗炎、抗肿瘤、降胆固醇及神经保护等多种药理活性^[11]。

研究表明, 模式植物番茄的皂苷的生物合成起始于细胞质中的甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA) 及质体中的甘油醛磷酸/丙酮酸途径 (methylerythritol phosphate pathway, MEP)。这 2 个途径合成的异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (γ,γ -dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 在经过一系列酶促反应后, 形成了三萜物质的前体物质 2,3-氧化角鲨烯 (2,3-oxidosqualene), 随后经过氧化角鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclases, OSCs) 环化生成皂苷的萜类骨架, 如环阿屯醇、羊毛甾醇等, 再由细胞色素单加氧酶 (cytochrome P450, CYP450)、糖基转移酶 (UDP-dependent glycosyltransferases, UGTs) 进行各类氧化修饰和糖苷键连接形成皂苷^[12-13]。然而, 关于多花黄精的皂苷生物合成机制尚不清楚, 亟需针对多花黄精皂苷生物合成途径开展功能基因挖掘和分子机制解析。

OSCs 属于超家族酶, 主要包括甾醇类和三萜皂苷骨架的各种环化酶, 可产生 200 多种不同骨架的三萜化合物^[14]。OSC 成员的环阿屯醇合酶 (cycloartenol, CAS) 属于 II 类萜烯环化酶, 包含 2 个 α -桶结构域和 5 个 QW 基序 DCTAE, 催化阳离子环化级联反应, 可将角鲨烯中的 2,3-环氧基转化为甾醇分子的三萜前体环阿屯醇^[15-17]。环阿屯醇、羊毛甾醇等由“椅式-船式-椅式” (chair-boat-chair, C-B-C) 构象的前固醇阳离子型产生; 羽扇豆醇 (lupeol)、 α -香树素 (α -amyrin) 和 β -香树素 (β -amyrin) 等五环三萜则是由“椅式-椅式-椅式” (chair-chair-chair, C-C-C) 构象的达玛烷阳离子型产生^[18-20]。目前有关环阿屯醇合酶 CAS 的基因克隆研究已在丹参^[21]、罗汉果^[22]、北柴胡^[23]、滇重楼^[24]、蛇足石杉^[25]等药用植物中开展, 但未对 CAS 基因

进行亚细胞定位等分析。此外国内外尚无对多花黄精开展 CAS 基因的克隆和功能研究。

课题组基于多花黄精转录组数据库, 挖掘了 1 个皂苷合成途径的关键酶基因 *PcCAS*, 并对该基因进行生物信息学分析、重组蛋白酵母表达、亚细胞定位、组织特异性表达分析等, 为进一步验证多花黄精 *PcCAS* 基因催化功能以及解析多花黄精皂苷生物合成机制奠定基础, 研究结果对于合成生物学生产黄精皂苷以及多花黄精良种选育研究具有重要现实意义。

1 材料与仪器

1.1 材料

供试材料来源于湖北省恩施市新塘乡多花黄精育种基地, 经湖北省农业科学院中药材研究所由金文高级农艺师鉴定为多花黄精 *P. cyrtoneuma* Hua。于花期选取 6 株长势一致、健康的多花黄精植株, 采收根茎、茎、叶、花组织, 并等分为 3 个重复, 经液氮速冻后, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用, 用于 RNA 提取和总皂苷含量检测。

1.2 试剂与仪器

Trizol 总 RNA 提取试剂盒、Thermo Scientific RevertAid cDNA 合成试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、限制性内切酶 BamH1、Xho1、PhusionTM 高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、氨苄青霉素 (ampicillin, AMP)、甲醇、毕赤酵母菌株 GS115、大肠杆菌菌株 DH5 α 、大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3)、克隆载体 pMDTM18-T、表达载体 pPICZ α 等试剂耗材购于武汉中恩科技有限公司。

JY-ZY5 型电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司)、NanoDrop 2000 型紫外可见分光光度计 (赛默飞世尔科技公司)、FV3000 型激光扫描共聚焦显微镜 (奥林巴斯有限公司)、CFX96 Touch 型实时荧光定量 PCR 仪 (伯乐生命医学产品有限公司)。

2 方法

2.1 RNA 提取和 cDNA 逆转录合成

分别取适量的多花黄精根茎、茎、叶、花的组织样品, 加入液氮迅速研磨成粉末, 用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。使用 Thermo Scientific RevertAid cDNA 合成试剂盒逆转录根茎、茎、叶、花的 cDNA, 将 cDNA 样品保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2 *PcCAS* 基因克隆与测序

根据课题组的多花黄精转录组测序结果, 筛选

出注释为 CAS 的 Unigene, 设计特异性引物(表 1)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 总反应体系为 50 μ L: 2 \times Taq Master Mix 25 μ L, *PcCAS*-F (10 μ mol/L) 2.5 μ L, *PcCAS*-R (10 μ mol/L) 2.5 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 18 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s,

循环 40 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将 PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收后与 pMD19-T 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆进行菌落 PCR 检测, 将阳性菌液送公司测序。测序结果用 DNAMAN v9.0.1.116 软件与 *PcCAS* 的 CDS 序列进行序列比对。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称	引物 (5'-3')	用途
PcCAS-F	ACGTAGGGAGGCAAGTTTGG	基因克隆
PcCAS-R	TGTCCAGCATCAATCAGCGT	
PcCAS-PcO1-F	GGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTATGTGGAAGCTGAAGATAGCGGAGGG	酵母表达载体构建
PcCAS-POD-R	ATGTTTCTGGGACGAGGGACATAGAA	
PcCAS-POC-F	ATGTCCCTCGTCCCAGAAACATtggagccatccgagtttgaaaaagcggtgtagtg	
PcCAS-TYZ α R-R	AGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCGAGAGATACCCCTTC	
PcCAS-GFP-F	caattactatttacaattacgagtcATGTGGAAGCTGAAGATAGC	亚细胞定位
PcCAS-GFP-R	aacagctcctcgcctctgctaccatAGATCCTCCTCCAGATCCTCCTCCATGTTTCTGGGACGAGGG	
PcCAS-q-F	TCAGATTGCACAGCAGAAGGAT	实时荧光定量PCR
PcCAS-q-R	TGCAACTATCGGATCACCAACA	
PcGAPDH-q-F	GAGGAAGAGAGAGACCCTCACT	
PcGAPDH-q-R	GTCTACATGGCAACTGTGAGGA	

序列中小写字母表示同源臂序列; 有下划线的小写字母表示内切酶位点; 有下划线的大写字母表示连接序列。

The lowercase letters are the homologous arm base sequences, the underlined lowercase letters represent the endonuclease recognition sites; and the underlined uppercase letters represent the linker sequence.

2.3 *PcCAS* 基因的生物信息学分析

使用在线网站 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *PcCAS* 蛋白分子式、相对分子质量、等电点等参数; 采用 TMHMM 2.0 对 *PcCAS* 蛋白的跨膜结构预测; 用 SignalP 4.1 Server 预测蛋白信号肽; 利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线预测 *PcCAS* 蛋白亲/疏水性; 使用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) CD-Search 功能预测 *PcCAS* 蛋白结构域; 用在线网站 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 分析 *PcCAS* 蛋白二级结构; 使用 SWISSMODEL-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线预测 *PcCAS* 蛋白的 3D 结构; 将 *PcCAS* 蛋白氨基酸序列上传至 NCBI 数据库进行比对筛选同源性较高的物种序列, 利用 DNAMAN v9.0.1.116 和 Clustal X2 软件进行序列比对, 用 MEGA 11 软件对比对序列构建系统发育树。

2.4 *PcCAS* 基因酵母表达载体构建和表达

按照同源重组法设计带有同源臂的扩增引物(表 1), 以克隆和测序正确的 cDNA 序列为模板, 取 2 μ g 线性化质粒转入表达菌株 GS115 (X33) 中,

电转后涂布至 YPD 抗性平板 (300 μ g/mL 博来霉素) 中培养 2~3 d (28 $^{\circ}$ C), 挑取单菌落进行扩大培养, 取一部分用终浓度为 20% 的甘油保存菌液, 剩余的再接种于 50 mL 的 BMGY 培养基中培养 24 h (28 $^{\circ}$ C) 左右, 离心收集菌体, 用 BMMY 培养基重悬菌体, 饥饿处理培养 2 h, 加入 1% 体积甲醇诱导培养, 之后每隔 24 h 补加 1 次 1% 体积甲醇, 诱导 48 h 后取 1 mL 菌液分别制作培养基上清以及破菌上清与沉淀蛋白样品, 加入 SDS Sample Buffer (5 \times) 混匀, 100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min, 离心后进行 SDS-PAGE 以及 Western blotting 检测蛋白表达情况。

2.5 总皂苷含量测定

多花黄精总皂苷含量测定方法参照管彦辉等^[26]的研究。对多花黄精根茎、茎、叶、花的样品用液氮研磨后, 分别称取约 0.1 g 样本, 加入 0.5 mL 80% 乙醇, 充分匀浆后超声 2 h, 8 000 \times g 常温离心 10 min, 取上清稀释后待测。取 25 μ L 样本待测液, 70 $^{\circ}$ C 挥发至干, 加入 10 μ L 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 40 μ L 高氯酸, 混匀后 60 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 然后吸取 35 μ L 至 1.5 mL 离心管中, 加入 175 μ L 冰醋酸, 混匀, 于 589 nm 下读取吸光值 (A)。以对照品齐墩果酸质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y),

绘制标准曲线 $Y=1.2391X+0.0957 (R^2=0.9986)$ ，根据 A 值和标准曲线计算样品总皂苷含量，用 Origin 81 绘制相对表达量图。采用单因素 (least significant difference, LSD) 检验进行显著性分析。

2.6 *PcCAS* 基因组织特异性表达

设计 *PcCAS* 的 qPCR 引物，内参基因 *GAPDH* 基因序列见表 1。以根茎、茎、叶、花 RNA 反转后的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR，通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[27] 对 *PcCAS* 基因在多花黄精根茎、茎、叶、花的相对表达量进行计算，最后用 Origin 绘制相对表达量图。

2.7 烟草瞬时转化体系构建

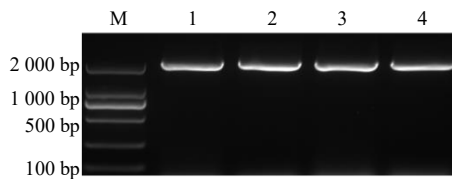
以 pMD19-T-*PcCAS* 质粒为模板设计 *PcCAS* 的同源重组引物 (表 1)，选择 BamH I 和 BsaI 作为双酶切位点，对 pBWA(V)H2STMVΩ-eGFP 载体进行双酶切，构建重组表达载体 pBWA(V)H2STMVΩ-eGFP-*PcCAS*，按照上述方法进行转化、菌落 PCR 及测序验证。选择测序正确的重组载体转入农杆菌 (GV3101)，25 °C 培养 2 d；用接种环将农杆菌从固体培养皿上刮下，接于 10 mL 对应抗性液体培养基 170 r/min 培养 1 h；4 000 r/min 离心 4 min，去上清；用 10 mmol/L MgCl₂ (含 120 μmol/L AS) 悬浮液重悬菌体，调 A_{600} 至 0.6 左右；挑选生长状况良好的烟草植株，用去枪头的 1 mL 注射器从烟草叶片下表皮注射，并做好标注；将注射完成的烟草植株弱光培养 2 d，即可观察；取标记的农杆菌注射的烟草叶片，制作成玻片，激光共聚焦显微镜下观察，并拍照。另一部分农杆菌注射的烟草叶片样品用于检测总皂苷含量，未做任何处理

的叶片样品为对照。

3 结果与分析

3.1 *PcCAS* 基因克隆与生物信息学分析

3.1.1 *PcCAS* 基因的克隆 以多花黄精 cDNA 为模板扩增得到约 2 200 bp 的条带 (图 1)，与目的基因序列大小基本一致，将目标基因片段与 pMD19-T 载体连接后转入大肠杆菌 DH5α 感受态，筛选得到阳性克隆，菌液 PCR 检测阳性后测序验证序列大小为 2 286 bp，经 DNAMAN 比对后与转录组模板序列匹配。通过 ORF-Finder 分析 *PcCAS* 为完整的 CDS 序列，长度为 2 286 bp。

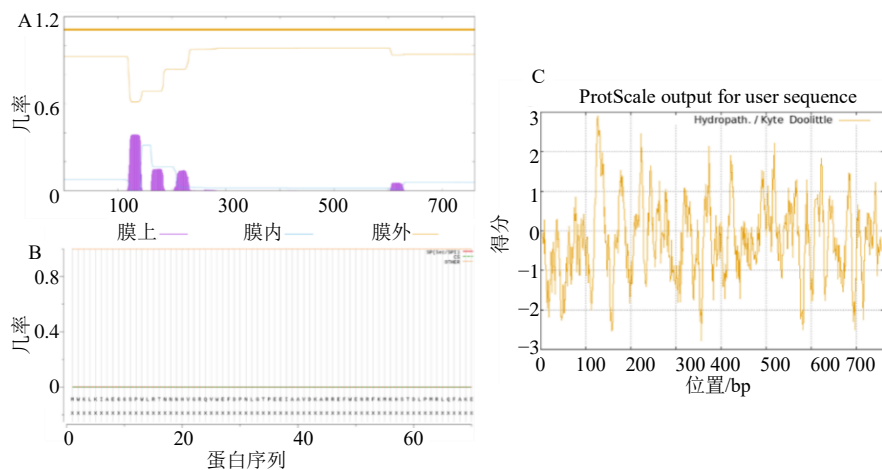


M-Marker; 1~4 表示 *PcCAS* 的 ORF 片段。
M-Marker; 1—4 ORF frame of *PcCAS*.

图 1 *PcCAS* 基因 PCR 扩增 ($n=4$)

Fig. 1 PCR amplification of *PcCAS* gene ($n=4$)

3.1.2 *PcCAS* 蛋白理化性质 ExPASy ProtParam 分析表明 *PcCAS* 编码 759 个氨基酸，蛋白相对分子质量约为 86 400，分子式为 C₃₉₁₄H₅₉₅₄N₁₀₄₀O₁₀₉₇S₄₁，理论等电点为 6.22，不稳定指数为 39.67，为稳定蛋白。TMHMM 2.0 对 *PcCAS* 蛋白的跨膜结构预测结果表明，*PcCAS* 编码蛋白不具备跨膜结构 (图 2-A)。Signal P 4.1 Server 对蛋白信号肽预测结果表明，



A-*PcCAS* 蛋白跨膜区; B-*PcCAS* 蛋白信号肽; C-*PcCAS* 蛋白亲水性/疏水性。

A-transmembrane region of *PcCAS* protein; B-signal peptide of *PcCAS* protein; C-hydrophilicity/hydrophobicity of *PcCAS* protein.

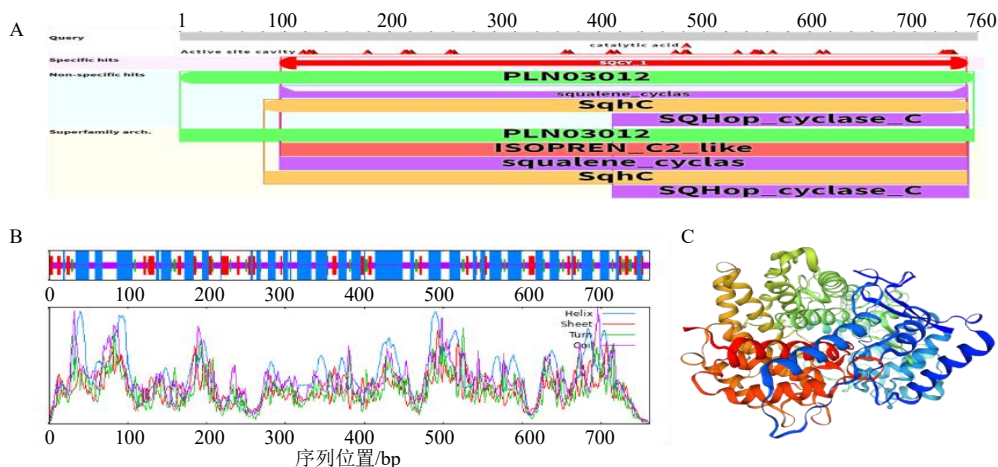
图 2 *PcCAS* 生物信息学分析

Fig. 2 Bioinformatics analysis of *PcCAS*

PcCAS 蛋白结构不存在信号肽序列, 为非分泌型蛋白 (图 2-B)。利用 ProtScale 在线预测 PcCAS 蛋白亲/疏水性, 总平均亲水性为-0.246, 属于亲水蛋白 (图 2-C)。

3.1.3 PcCAS 蛋白结构域和二级、三级结构预测 使用 NCBI 网站 CD-Search 功能预测 PcCAS 蛋白结构域, 由图 3-A 可知 PcCAS 蛋白属于氧化角鲨烯环化酶超家族, 具有鲨烯环化酶 SQCY 结构域和

氧化鲨烯环化酶 OSQCY 结构域。SOPMA 在线分析表明 (图 3-B), PcCAS 蛋白二级结构中 α 螺旋占比 44.94%, 延伸链占比 13.67%, β 转角为 6.96%, 无规则卷曲占比 34.43%。用 SWISSMODEL 对 PcCAS 蛋白的 3D 结构进行预测 (图 3-C), 全局模型质量评估得分 (global model quality estimation, GMQE) 为 0.96, 与小果野蕉的环阿屯醇合酶蛋白晶体结构相似性达到 84.17%。



A-PcCAS 蛋白结构域; B-PcCAS 蛋白二级结构; C-PcCAS 蛋白三级结构。
A-domain of PcCAS protein; B-secondary structure of PcCAS protein; C-tertiary structure of PcCAS protein.

图 3 PcCAS 蛋白结构域、蛋白二级结构及蛋白三级结构预测

Fig. 3 Domain, secondary structure and tertiary structure prediction of PcCAS protein

3.1.4 PcCAS 蛋白序列的系统进化分析 利用 NCBI-blast 分析将 PcCAS 蛋白序列进行同源序列比对, 图 4 结果发现比对率高的 7 个代表物种序列, 分别为长刺天门冬 *Asparagus racemosus* Willd.、石刁柏 *Asparagus officinalis* L.、知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge、芦荟 *Aloe vera* (L.) Burm. f.、滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.、重楼 *Paris polyphylla* Sm.、小果野蕉 *Musa acuminata* Colla, 序列相似性达到了 84.45% 以上。进一步采用 MEGA 软件将 PcCAS 蛋白与同源蛋白比对序列构建系统发育树 (图 5), 多花黄精与长刺天门冬、石刁柏、知母聚为一类, 亲缘关系最近, 而与参薯、小兰屿蝴蝶兰亲缘关系最远。

3.2 烟草异源表达叶片中总皂苷含量的测定

通过瞬时表达技术在烟草叶片中异源表达 PcCAS, 验证 PcCAS 能调控多花黄精皂苷的合成。由图 6 可知, 与对照相比, 增加烟草叶片中 PcCAS 基因的外源表达显著提高了叶片中总皂苷含量, 表明 PcCAS 在调控多花黄精皂苷合成通路中发挥重要作用。

3.3 PcCAS 组织特异性表达和皂苷含量比较分析

为分析 PcCAS 在不同组织中基因表达水平和皂苷含量相关性, 对花期多花黄精的根茎、茎、叶、花的总皂苷含量及 PcCAS 在各组织中相对表达量进行单因素方差分析。图 7 结果表明, 根茎中总皂苷含量显著高于茎、叶、花组织, 且 PcCAS 在根茎中的相对表达量显著高于茎、叶、花组织, 表明 PcCAS 表达量与总皂苷含量存在一定的正相关性。

3.4 PcCAS 蛋白的酵母表达

为了验证 PcCAS 基因能编码目标蛋白以及蛋白可溶性, 构建酵母重组表达载体, 转化表达菌株 GS115 (X33) 中进行甲醇诱导表达, 将甲醇诱导的菌液分泌上清、破菌上清及其破菌沉淀, 进行 Western blotting 蛋白电泳, 见图 8。由结果可见, 分泌上清以及破菌沉淀中未发现目的蛋白条带, 重组菌甲醇诱导沉淀中有少量的目的蛋白表达, 1% 体积甲醇诱导培养的重组菌破菌上清中表达了目的蛋白, 大小与预期 86 444.1 相符, 表明 PcCAS 蛋白为可溶性蛋白。

PcCAS	MWRLKTAEGGSPWLRNNNNHGRQVWFEDFNLCPEETAIAVDKARREWFENRFKMKHSSDLPMRLQFAKFNPLELNLPHIRLAEBHVAVTEBAVSTLKRRA	100
ArCAS	MWRLKTAEGGSPWLRNNNNHGRQVWFEDFNHCTPEETAIEARARNRWFENRFKMKHSSDLPMRFQFAKFNPLELNLPHIRLSEBQAVTEBAVSTLKRRA	100
AoCAS	MWRLKTAEGGSPWLRNNNNHGRQVWFEDFNHCTPEETAIEAKARRIWFENRFKMKHSSDLPMRFQFAKFNPLELNLPHIRLSEEBQAVTEBAVSTLKRRA	100
AaCAS	MWRREKTAEGSPWLRNNNNHGRQVWFEDFNLCPEETAIAVDEKARREYFENRFKMKHSSDLPMRLQFAKFNPLELNLPHIRLSEEBQAVTEBAVSTLKRRA	100
AVCAS	MWRLKTAEGGSPWLRNNNNHGRQVWFEDFNLCPEETAIAVDEKARREYFENRFKMKHSSDLPMRLQFAKFNPLELNLPHIRLSEEBQAVTEBAVSTLKRRA	100
PpyCAS	MWRLKTAGGSSQWLRNNNNHGRQVWFEDFNLCPEETAIEAVEKARRETEERREKMKHSSDLPMRQFAKFNPLELNLPHIRLSEEBQAVTEBAVSTLKRRA	100
PpCAS	MWRLKTAGGSSQWLRNNNNHGRQVWFEDFNLCPEETAIEAVEKARRETEERREKMKHSSDLPMRQFAKFNPLELNLPHIRLSEEBQAVTEBAVSTLKRRA	100
MaCAS	MWRLKTAGGSPWLRNNNNHGRQVWFEDFNLCPEETAIEAVEKARRETEERREKMKHSSDLPMRQFAKFNPLELNLPHIRLSEEBQAVTEBAVSTLKRRA	100
Consensus	mw lkia wlr nn h grq we p g eei r r khs d mr qf ke p e p i l e vte a l	
PcCAS	ISRYSTLQAHGDHWPQDYGGMFLPGLIIVLVTGALNIVLSABRQHEIRRYLYNHQNEGGWGLHIEGSTMFGSVLTYVTLRLLGEGADGGGAMK	200
ArCAS	ISRHSTLQAHGDHWPQDYGGMFLPGLIITLVTGALNIVLSABRQHEIRRYLYNHQNEGGWGLHIEGSTMFGSVLTYVTLRLLGEBANGDGGAMK	200
AoCAS	ISRHSTLQAHGDHWPQDYGGMFLPGLIITLVTGALNIVLSABRQHEIRRYLYNHQNEGGWGLHIEGSTMFGSVLTYVTLRLLGEBANGDGGAMK	200
AaCAS	ISRHSTLQAHGDHWPQDYGGMFLPGLIITLVTGALNIVLSABRQHEIRRYLYNHQNEGGWGLHIEGSTMFGSVLTYVTLRLLGEBANGDGGAMK	200
AVCAS	ISRHSTLQAHGDHWPQDYGGMFLPGLIITLVTGALNIVLSABRQHEIRRYLYNHQNEGGWGLHIEGSTMFGSVLTYVTLRLLGEBANGDGGAMK	200
PpyCAS	ITRHSTLQAHGDHWPQDYGGMFLPGLIITLVTGALNIVLSABRQHEIRRYLYNHQNEGGWGLHIEGSTMFGSVLTYVTLRLLGEBANGDGGAMK	200
PpCAS	ITRHSTLQAHGDHWPQDYGGMFLPGLIITLVTGALNIVLSABRQHEIRRYLYNHQNEGGWGLHIEGSTMFGSVLTYVTLRLLGEBANGDGGAMK	200
MaCAS	ISRHSTLQAHGDHWPQDYGGMFLPGLIITLVTGALNIVLSABRQHEIRRYLYNHQNEGGWGLHIEGSTMFGSVLTYVTLRLLGEBANGDGGAMK	200
Consensus	i r stlqahgdhwpqdyggmfl pgl i l vtga n vl h e rylynhn dggwglhie g stmf g s l y t l r l l g e g a d g g a m k	
PcCAS	GRKWILDHGSATITSWGKFWLSVLGVFDWGNPNLPEMMLLPYLVPVHPRMWCRCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITFTLRLRKELENYVYQIDWNM	300
ArCAS	GRKWILDHGSATITSWGKFWLSVLGVFDWGNPNLPEMMLLPYLVPVHPRMWCRCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITFTLRLRKELENYVYQIDWNM	300
AoCAS	GRKWILDHGSATITSWGKFWLSVLGVFDWGNPNLPEMMLLPYLVPVHPRMWCRCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITFTLRLRKELENYVYQIDWNM	300
AaCAS	GRKWILDHGSATITSWGKFWLSVLGVFDWGNPNLPEMMLLPYLVPVHPRMWCRCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITFTLRLRKELENYVYQIDWNM	300
AVCAS	GRKWILDHGSATITSWGKFWLSVLGVFDWGNPNLPEMMLLPYLVPVHPRMWCRCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITFTLRLRKELENYVYQIDWNM	300
PpyCAS	GRKWILDHGSATITSWGKFWLSVLGVFDWGNPNLPEMMLLPYLVPVHPRMWCRCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITFTLRLRKELENYVYQIDWNM	300
PpCAS	GRKWILDHGSATITSWGKFWLSVLGVFDWGNPNLPEMMLLPYLVPVHPRMWCRCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITFTLRLRKELENYVYQIDWNM	300
MaCAS	GRKWILDHGSATITSWGKFWLSVLGVFDWGNPNLPEMMLLPYLVPVHPRMWCRCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITFTLRLRKELENYVYQIDWNM	300
Consensus	g wildhg at itswgk wl vlgvfdw gnpnl pemllpy lpvhpgrmwrc crmvylpmsy lygkrfvgp it t l r l r k e l e n y v y q i d w n m	
PcCAS	ARNECAKEDLYYPHPIDQILWASLHKVAEPIELMHWPQSKLRKALKTAMBIHIHYEDENTRYICIGPVNKVINMLCCWEDPNSEAFKHLPRINDYLWV	400
ArCAS	ARNECAKEDLYYPHPVQDILWASLHKVVEPIELMRWPGTKLRKALKTAMBIHIHYEDENTRYICIGPVNKVINMLCCWEDPNSEAFKHLPRINDYLWV	400
AoCAS	ARNECAKEDLYYPHPVQDILWASLHKVVEPIELMRWPGTKLRKALKTAMBIHIHYEDENTRYICIGPVNKVINMLCCWEDPNSEAFKHLPRINDYLWV	400
AaCAS	ARNECAKEDLYYPHPVQDILWASLHKVVEPIELMRWPGTKLRKALKTAMBIHIHYEDENTRYICIGPVNKVINMLCCWEDPNSEAFKHLPRINDYLWV	400
AVCAS	ARNECAKEDLYYPHPIDQILWASLHKVAEPIELMHWPQSKLRKALKTAMBIHIHYEDENTRYICIGPVNKVINMLCCWEDPNSEAFKHLPRINDYLWV	400
PpyCAS	ARNECAKEDLYYPHPIDQILWASLHKVAEPIELMHWPQSKLRKALKTAMBIHIHYEDENTRYICIGPVNKVINMLCCWEDPNSEAFKHLPRINDYLWV	400
PpCAS	ARNECAKEDLYYPHPIDQILWASLHKVAEPIELMHWPQSKLRKALKTAMBIHIHYEDENTRYICIGPVNKVINMLCCWEDPNSEAFKHLPRINDYLWV	400
MaCAS	ARNECAKEDLYYPHPIDQILWASLHKVAEPIELMHWPQSKLRKALKTAMBIHIHYEDENTRYICIGPVNKVINMLCCWEDPNSEAFKHLPRINDYLWV	400
Consensus	ar cakedlyypph idilwas lhk va e p i e l m h w p q s k l r k a l k t a m b i h i y e d e n t r y i c i g p v n k v i n m l c c w e d p n s e a f k h l p r i n d y l w v	
PcCAS	AEDGMKMGYNGSQLWDTAFVQAIISTGFSEEFGLTKKAHKYKRVKDTQVLEDCGDLSEFYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTEGLKAALLLSRISF	500
ArCAS	AEDGMKMGYNGSQLWDTAFVQAIISTGFSEEFGLTKKAHKYKRVKDTQVLEDCGDLSEFYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTEGLKAALLLSRISF	500
AoCAS	AEDGMKMGYNGSQLWDTAFVQAIISTGFSEEFGLTKKAHKYKRVKDTQVLEDCGDLSEFYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTEGLKAALLLSRISF	500
AaCAS	AEDGMKMGYNGSQLWDTAFVQAIISTGFSEEFGLTKKAHKYKRVKDTQVLEDCGDLSEFYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTEGLKAALLLSRISF	500
AVCAS	AEDGMKMGYNGSQLWDTAFVQAIISTGFSEEFGLTKKAHKYKRVKDTQVLEDCGDLSEFYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTEGLKAALLLSRISF	500
PpyCAS	AEDGMKMGYNGSQLWDTAFVQAIISTGFSEEFGLTKKAHKYKRVKDTQVLEDCGDLSEFYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTEGLKAALLLSRISF	500
PpCAS	AEDGMKMGYNGSQLWDTAFVQAIISTGFSEEFGLTKKAHKYKRVKDTQVLEDCGDLSEFYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTEGLKAALLLSRISF	500
MaCAS	AEDGMKMGYNGSQLWDTAFVQAIISTGFSEEFGLTKKAHKYKRVKDTQVLEDCGDLSEFYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTEGLKAALLLSRISF	500
Consensus	aedgmkmgyngsqldwtaf vqai istgfseefg ltkka hkykrvkd tqvle d c g d l s e f y r h s k g a w p f s t a d h g w p i s d c t e g l k a a l l s r i s f	
PcCAS	EIVGDPVIANRMLDQAVNVLSLMNPDGGFATYELTRSYAMLEINPAETFGDIVIDYFYVECTSAIQALTSFKLYPGHRRREIEICIKKAVFIEKIQ	600
ArCAS	EIVGDPVIANRMLDQAVNVLSLMNPDGGFATYELTRSYAMLEINPAETFGDIVIDYFYVECTSAIQALTSFKLYPGHRRREIEICIKKAVFIEKIQ	600
AoCAS	EIVGDPVIANRMLDQAVNVLSLMNPDGGFATYELTRSYAMLEINPAETFGDIVIDYFYVECTSAIQALTSFKLYPGHRRREIEICIKKAVFIEKIQ	600
AaCAS	EIVGDPVIANRMLDQAVNVLSLMNPDGGFATYELTRSYAMLEINPAETFGDIVIDYFYVECTSAIQALTSFKLYPGHRRREIEICIKKAVFIEKIQ	600
AVCAS	EIVGDPVIANRMLDQAVNVLSLMNPDGGFATYELTRSYAMLEINPAETFGDIVIDYFYVECTSAIQALTSFKLYPGHRRREIEICIKKAVFIEKIQ	600
PpyCAS	KSVGDPIDAKWLYEAVNVLSLMNPDGGFATYELTRSYAMLEINPAETFGDIVIDYFYVECTSAIQALTSFKLYPGHRRREIEICIKKAVFIEKIQ	600
PpCAS	KSVGDPIDAKWLYEAVNVLSLMNPDGGFATYELTRSYAMLEINPAETFGDIVIDYFYVECTSAIQALTSFKLYPGHRRREIEICIKKAVFIEKIQ	600
MaCAS	EIVGQIDGRKMLDQAVNVLSLMNPDGGFATYELTRSYAMLEINPAETFGDIVIDYFYVECTSAIQALTSFKLYPGHRRREIEICIKKAVFIEKIQ	600
Consensus	vg y avnv lslmn pdggfatyeltrsy amle inpaet fgdividy fyvectsa iqal sf klypghr ree ic i k k a v f i e k i q	
PcCAS	EPDGSWYGSWAVCFYTGWFVGRGLAAGKRYQNSCVRKACDFLLSKQLASGGWGESYLSQCKKYVYTNLEGNRAHAVNTGWALLLIDAGQABRDPKPL	700
ArCAS	EPDGSWYGSWAVCFYTGWFVGRGLAAGKRYQNSCVRKACDFLLSKQLASGGWGESYLSQCKKYVYTNLEGNRAHAVNTGWALLLIDAGQABRDPKPL	700
AoCAS	EPDGSWYGSWAVCFYTGWFVGRGLAAGKRYQNSCVRKACDFLLSKQLASGGWGESYLSQCKKYVYTNLEGNRAHAVNTGWALLLIDAGQABRDPKPL	700
AaCAS	EPDGSWYGSWAVCFYTGWFVGRGLAAGKRYQNSCVRKACDFLLSKQLASGGWGESYLSQCKKYVYTNLEGNRAHAVNTGWALLLIDAGQABRDPKPL	700
AVCAS	EPDGSWYGSWAVCFYTGWFVGRGLAAGKRYQNSCVRKACDFLLSKQLASGGWGESYLSQCKKYVYTNLEGNRAHAVNTGWALLLIDAGQABRDPKPL	700
PpyCAS	EPDGSWYGSWAVCFYTGWFVGRGLAAGKRYQNSCVRKACDFLLSKQLASGGWGESYLSQCKKYVYTNLEGNRAHAVNTGWALLLIDAGQABRDPKPL	700
PpCAS	EPDGSWYGSWAVCFYTGWFVGRGLAAGKRYQNSCVRKACDFLLSKQLASGGWGESYLSQCKKYVYTNLEGNRAHAVNTGWALLLIDAGQABRDPKPL	700
MaCAS	EPDGSWYGSWAVCFYTGWFVGRGLAAGKRYQNSCVRKACDFLLSKQLASGGWGESYLSQCKKYVYTNLEGNRAHAVNTGWALLLIDAGQABRDPKPL	700
Consensus	dgsygs wv c f t y g w f v g r g l a a g k r y q n s c v r k a c d f l l s k q l a s g g w g e s y l s c q c k y v y t n l e g n r a h a v n t g w a l l l i d a g q a b r d p k p l	
PcCAS	HRAAKLINQMENGEPQOEIMGVFNRCMISYSAYRNIFFIWAIGEYRNRVLCPSQ	759
ArCAS	HRAAKLINQMENGEPQOEIMGVFNRCMISYSAYRNIFFIWAIGEYRNRVLCPSQ	759
AoCAS	HRAAKLINQMENGEPQOEIMGVFNRCMISYSAYRNIFFIWAIGEYRNRVLCPSQ	759
AaCAS	HRAAKLINQMENGEPQOEIMGVFNRCMISYSAYRNIFFIWAIGEYRNRVLCPSQ	759
AVCAS	HRAAKLINQMENGEPQOEIMGVFNRCMISYSAYRNIFFIWAIGEYRNRVLCPSQ	759
PpyCAS	HRAAKLINQMENGEPQOEIMGVFNRCMISYSAYRNIFFIWAIGEYRNRVLCPSQ	759
PpCAS	HRAAKLINQMENGEPQOEIMGVFNRCMISYSAYRNIFFIWAIGEYRNRVLCPSQ	759
MaCAS	HRAAKLINQMENGEPQOEIMGVFNRCMISYSAYRNIFFIWAIGEYRNRVLCPSQ	759
Consensus	h ak lin q enge pqoeimgvfnrcm isys ayrniffiwalgeyr nrvlc psq	

图 4 PcCAS 蛋白与多种植物 CAS 蛋白序列比对

Fig. 4 Sequence comparison of PcCAS protein with CAS proteins from various plants

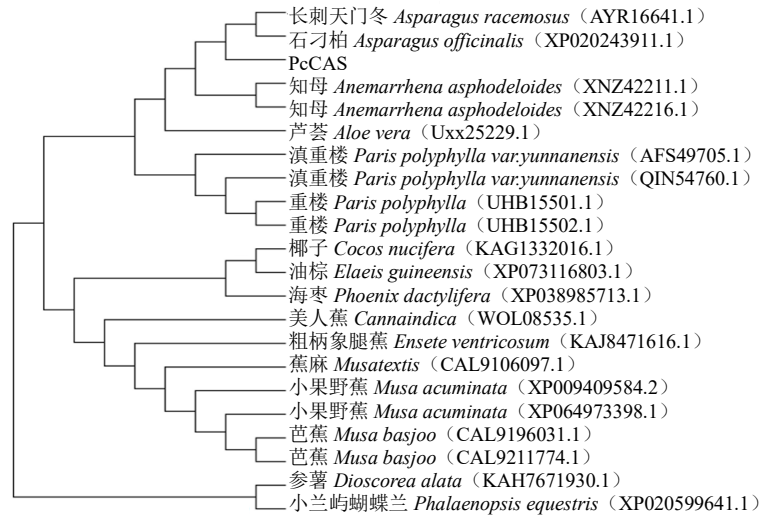
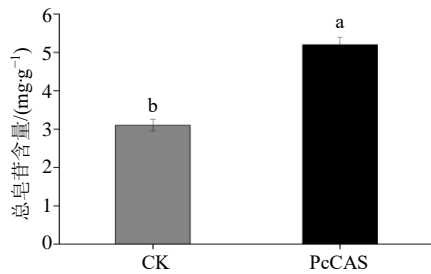


图5 PcCAS 蛋白与多种植物 CAS 蛋白系统发育分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of PcCAS protein and CAS proteins from various plants

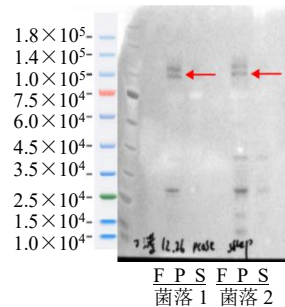


不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著, $P < 0.05$.

Different letters denote significant differences among values at $P < 0.05$.

图6 烟草异源表达前后叶片总皂苷含量 ($n = 3$)

Fig. 6 Total saponin content in tobacco leaves before and after heterologous expression ($n = 3$)

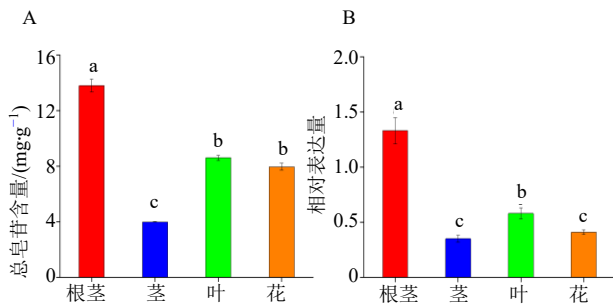


F-重组菌分泌上清; P-重组菌破菌上清; S-重组菌破菌沉淀。

F-recombinant strain culture supernatant, P-recombinant strain lysate supernatant; S-recombinant strain lysate pellet.

图8 PcCAS 酵母表达电泳图

Fig. 8 Electrophoretic analysis of recombinant PcCAS protein expressed in yeast



不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著, $P < 0.05$.

Different letters denote significant differences among values at $P < 0.05$.

图7 多花黄精的不同组织总皂苷含量 (A) 及 PcCAS 基因相对表达量 (B)

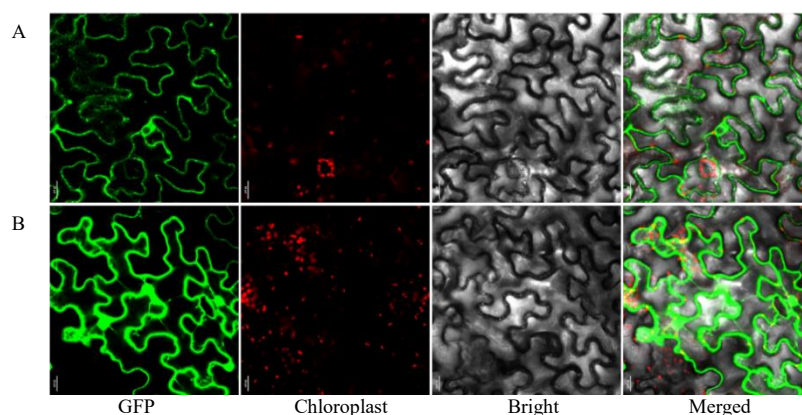
Fig. 7 Total saponin content (A) and relative expression level (B) of PcCAS gene in different tissues of *Cyrtoneima*

3.5 PcCAS 亚细胞定位

为确定 PcCAS 在细胞中哪个细胞器发挥功能, 构建 pBWA(V)H2STMV Ω -eGFP-PcCAS 及其空载体, 利用烟草瞬时表达体系将 pBWA(V)H2STMV Ω -eGFP-PcCAS 载体转化到烟草叶片, 通过激光共聚焦显微镜进行观察。图9 荧光观察检测结果中绿色为 GFP 蛋白激发的荧光, 红色为叶绿体自发荧光, 空载体荧光分布在整个细胞中, 而 GFP-PcCAS 重组蛋白主要分布在内质网中, 表明 PcCAS 蛋白主要在内质网中发挥功能。

4 讨论

OSC 超家族基因, 主要包括甾醇类和三萜皂苷骨架的各种环化酶基因, 其中环阿屯醇合酶 CAS 可催化 2,3 氧化角鲨烯生成环阿屯醇^[14,23]。环阿屯醇



A-pBWA(V)H2STMVΩ-eGFP-*PcCAS* 重组载体; B-pBWA(V)H2STMVΩ-eGFP 空载。
A-pBWA(V)H2STMVΩ-eGFP-*PcCAS* recombinant vector; B-pBWA(V)H2STMVΩ-eGFP empty vector.

图9 *PcCAS* 蛋白的亚细胞定位

Fig. 9 Subcellular localization of *PcCAS* protein

是皂苷合成途径中重要的甾醇类前体物质,开展环阿屯醇合酶基因 *PcCAS* 的基因结构以及基因功能研究有助于深入了解黄精甾醇类物质形成和皂苷合成通路的生物学意义,为黄精药材标志性成分确定、优异种质资源筛选及合成生物学研究提供重要基因资源。本研究基于多花黄精转录组数据库筛选了 *PcCAS* 基因,通过基因克隆和生物信息学鉴定发现该基因注释为环阿屯醇合酶,催化核心是由 DCTAE 和 QW2 个保守基序组成的结构域,参与黄精皂苷下游关键化合物环阿屯醇的合成。本研究通过对 *PcCAS* 蛋白同源序列比较分析,发现多花黄精 *PcCAS* 氨基酸序列与天门冬科长刺天门冬、石刁柏、知母等相似度较高,均编码 757~759 个氨基酸,其中与长刺天门冬序列相似性最高(90.92%),进化分析发现多花黄精与天门冬科长刺天门冬、石刁柏、知母聚为一类,表明多花黄精与天门冬科物种亲缘关系最近。APG(2016)系统及中国植物志均正式把黄精属从传统“百合科”移至天门冬科黄精族^[1,28],本研究结果也为多花黄精科属变更分类提供科学依据。此外,天门冬科多花黄精与阿福花科芦荟亲缘关系也较近,原因是两者都属于天门冬目,表明多花黄精与芦荟在 CAS 蛋白序列和功能方面的潜在相似性,为近源物种药效物质基础研究和资源利用开发提供科学依据。

在植物甾体皂苷合成通路中,氧化角鲨烯经 CAS 环化生成环阿屯醇,再经 CYP450、糖基转移酶等修饰成薯蓣皂素、呋甾烷或螺甾烷型皂苷^[29]。文献中记载,过表达葫芦毛状根中 *LsCAS*, β-谷甾

醇和薯蓣皂素含量同步提高^[30],本研究发现,多花黄精根茎中 *PcCAS* 表达量与总皂苷含量显著正相关,表明 *PcCAS* 在皂苷合成的下游调控途径中发挥关键作用,根茎中较高的 *PcCAS* 表达量可能促进了皂苷的大量合成。研究表明植物体内 CAS 基因与生长发育有着密切联系,通过对番茄环阿屯醇合酶基因 *SICASI* 进行 VIGS 沉默后,植株根长、株高被抑制,叶片出现黄化的现象^[31]。在烟草中的研究也证实 CAS 缺失可造成“甾醇缺陷”表型:鲨烯-2,3-氧化物积累,膜流动性改变,根毛与侧根数量显著减少^[32]。表明通过提高 *PcCAS* 基因的表达量,可正向调控多花黄精皂苷生物合成,促进植物生长发育。本研究通过瞬时转化体系发现 *PcCAS* 组叶片中总皂苷含量显著高于对照组,过表达 *PcCAS* 显著提高了烟草叶片中总皂苷含量,表明 *PcCAS* 在黄精皂苷合成途径中发挥正向调控作用,研究也为 *PcCAS* 基因的功能利用如合成生物学生产黄精皂苷以及良种选育研究提供了潜在有效途径。

植物蛋白质亚细胞定位是了解蛋白质功能、基因调控和蛋白质-蛋白质相互作用的关键^[33]。本研究通过亚细胞定位预测 *PcCAS* 在内质网中表达,通过烟草瞬时表达验证 *PcCAS* 定位在内质网中,与预测结果一致。这与拟南芥环阿屯醇合酶基因 *AtCAS* 定位于内质网的结论一致,已有研究表明甾醇合成是一个多酶催化级联反应,关键合成酶系锚定于内质网,如参与环阿屯醇、羊毛甾醇等植物甾醇等的绝大多数中间步骤的酶定位于内质网膜^[34-35],本研究结果验证了甾醇合成相关酶如 *PcCAS* 在内质网

定位的有效性。目前关于 OSC 超基因家族中 CAS 基因的亚细胞定位研究还未见报道, 仅有研究对该基因进行亚细胞预测, 黄芪环阿屯醇合酶 AmCAS 预测的亚细胞在细胞核、叶绿体^[36], 滇重楼 PpCAS 预测定位于细胞膜^[23], 而丹参中 SmCAS 预测定位于胞质中^[21]。预测结果存在差异可能是因为 CAS 基因的亚细胞定位结果与物种的种类和基因序列功能特性不同有关。

本研究克隆了多花黄精 PcCAS 基因, 并进行生物信息学分析, 通过蛋白同源序列进化分析验证了多花黄精划分为天门冬科的科学依据。通过酵母表达验证了 PcCAS 蛋白的可溶性, 进一步通过亚细胞定位分析验证 PcCAS 蛋白定位于内质网。此外, 瞬时过表达 PcCAS 显著提高了叶片总皂苷含量, 相对表达量分析也验证了高表达的 PcCAS 促进环阿屯醇的合成, 进而可能促进皂苷大量积累。后续将结合体外酶活实验和分子对接技术验证 PcCAS 催化活性。此外, PcCAS 如何通过调控皂苷下游合成途径进而促进黄精皂苷的大量积累还有待研究。本研究结果为深入研究多花黄精皂苷生物合成机制、合成生物学研究以及优异种质高效利用提供重要基因资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Angiosperm Phylogeny Group. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV [J]. *Bot J Linn Soc*, 2016, 181: 1-20.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 328.
- [3] Xu C F, Xia B H, Zhang Z M, *et al.* Research progress in steroidal saponins from the genus *Polygonatum*: Chemical components, biosynthetic pathways and pharmacological effects [J]. *Phytochemistry*, 2023, 213: 113731.
- [4] Yao L, Lu J, Wang J, *et al.* Advances in biosynthesis of triterpenoid saponins in medicinal plants [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(6): 417-424.
- [5] 卿崑, 范民霞, 陈桂林, 等. 黄精多糖及皂苷化学成分与药理活性研究进展 [J]. *药学前沿*, 2025, 29(4): 681-697.
- [6] 丁涵, 李子业, 王倩, 等. 黄精皂苷类成分药理作用及机制研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2026, 42(3): 401-406.
- [7] 叶钱, 蒋燕锋, 冯家骏, 等. 多花黄精有效成分与主要环境因子的相关性 [J]. *浙江农林大学学报*, 2017, 34(1): 192-196.
- [8] Xia Q L, Hao B Q, Liu C X, *et al.* Inhibitory effect and

mechanism of purified saponin from *Polygonatum cyrtonema* Hua on human ovarian cancer cell A2780 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2025, 200: 115368.

- [9] Amraei S, Ahmadi S. Recent studies on antimicrobial and anticancer activities of saponins: A mini-review [J]. *Nano Micro Biosystems*, 2022, 1(1): 22-26.
- [10] Xiao J D, Xie L M, Zheng B, *et al.* Integrated microbiomic and metabolomics insight into the ameliorating mechanisms of dietary *Polygonatum cyrtonema* saponin on ulcerative colitis [J]. *Food Biosci*, 2024, 59: 103871.
- [11] 张忠廉, 罗祖良, 石宏武, 等. 植物药活性成分环阿屯醇药理、生理活性及其研究展望 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(3): 433-437.
- [12] Biswas T, Dwivedi U N. Plant triterpenoid saponins: Biosynthesis, *in vitro* production, and pharmacological relevance [J]. *Protoplasma*, 2019, 256(6): 1463-1486.
- [13] Chen Y Y, Wu J K, Yu D, *et al.* Advances in steroidal saponins biosynthesis [J]. *Planta*, 2021, 254(5): 91.
- [14] Wang J, Guo Y H, Yin X, *et al.* Diverse triterpene skeletons are derived from the expansion and divergent evolution of 2,3-oxidosqualene cyclases in plants [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2022, 57(2): 113-132.
- [15] 张斌, 梁苗苗, 谭政委, 等. 植物 2,3-氧化鲨烯环化酶的研究进展 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2022, 24(5): 1751-1759.
- [16] Parveen I, Wang M, Lee J, *et al.* Identification and functional characterization of oxidosqualene cyclases from medicinal plant *Hoodia gordonii* [J]. *Plants*, 2024, 13(2): 231.
- [17] 陈翠玉, 庞亚如, 陈泉冰, 等. 环氧角鲨烯环化酶在三萜化合物生物合成中的进展 [J]. *生物工程学报*, 2022, 38(2): 443-459.
- [18] Nguyen T. Plant triterpenoid scaffolding: A tale of two cyclases [J]. *Plant Physiol*, 2022, 188: 1408-1409.
- [19] Dinday S, Ghosh S. Recent advances in triterpenoid pathway elucidation and engineering [J]. *Biotechnol Adv*, 2023, 68: 108214.
- [20] Wang P, Wei G, Feng L. Research advances in oxidosqualene cyclase in plants [J]. *Forests*, 2022, 13(9): 1382.
- [21] 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.
- [22] 乔晶, 崔晟榕, 石宏武, 等. 罗汉果环阿屯醇合酶的同源建模、分子对接及催化环化的机理推测 [J]. *生物技术通报*, 2019, 35(2): 101-108.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 罗红梅, 张鑫, 牛云云, 等. 蛇足石杉 *HsCASI* 基因克隆及序列分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(1): 1159-1165.
- [26] 管彦辉, 梁正维, 施扬, 等. 滇黄精炮制前后化学成分变化研究 [J]. 中草药, 2024, 55(11): 3647-3658.
- [27] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [28] Floden A, Schilling E E. Using phylogenomics to reconstruct phylogenetic relationships within tribe *Polygonateae* (Asparagaceae), with a special focus on *Polygonatum* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2018, 129: 202-213.
- [29] 单春苗, 王晨凯, 施圆圆, 等. 多花黄精甾体皂苷生物合成途径分析及关键酶基因研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2847-2857.
- [30] 张雪, 王希付, 赵荣华, 等. 药用植物甾体皂苷生物合成途径研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 25-36.
- [31] Guerrieri A, Abedini D, White F, *et al.* Cycloartenol-derived triterpenoid pathway genes alter the root metabolome and microbiome in tomato [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2025, 229: 110584.
- [32] 闫宁, 龚达平, 张忠锋. 烟草甾醇合成代谢分子调控研究进展 [J]. 中国烟草科学, 2015, 36(2): 110-117.
- [33] 未丽, 刘建利. 植物蛋白质亚细胞定位相关研究概述 [J]. 植物科学学报, 2021, 39(1): 93-101.
- [34] 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.
- [35] Xue Z Y, Duan L X, Liu D, *et al.* Divergent evolution of oxidosqualene cyclases in plants [J]. *New Phytol*, 2012, 193(4): 1022-1038.
- [36] 王宝慧, 宋诗娟, 郭旭, 等. 黄芪 OSC 超基因家族的鉴定及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2025, 23(5): 1666-1674.

[责任编辑 时圣明]