

人参 CAS 基因家族的鉴定及 *PgCAS04-5* 基因的功能分析

马莹^{1,2}, 李宸玮^{1,2}, 金戈^{1,2}, 于双^{1,2}, 王爱民^{1,2}, 于靖辉^{1,2}, 赵明珠^{1,2}, 王康宇^{1,2}, 王义^{1,2*}, 张美萍^{1,2*}

1. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学, 吉林省人参基因资源开发与利用工程研究中心, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 基于人参转录组数据库鉴定环阿屯醇合酶基因 (cycloartenol synthase, CAS) 家族成员 (*PgCAS*), 并分析 *PgCAS04-5* 在过表达及 RNAi 阳性发根材料中基因的表达模式及人参皂苷生物合成中的功能。方法 利用生物信息学分析了 *PgCASs* 的染色体定位、保守基序、进化关系、表达模式、与皂苷合成关键酶基因表达及单体皂苷含量的相关性; 预测 *PgCAS04-5* 的蛋白结构与亚细胞定位, 同时检测 *PgCAS04-5* 在过表达及 RNAi 阳性发根中关键酶基因的表达情况及皂苷含量变化。结果 在人参转录组数据库中鉴定出 20 条 *PgCAS* 转录本, 染色体定位结果表明 *PgCASs* 不均匀地分布在人参 5 条染色体上, 构建进化树将 *PgCASs* 分为 3 个亚型, *PgCASs* 主要分布在第 II 和第 III 个亚型中。 *PgCASs* 在不同品种、生长年限及组织中的表达模式存在时空特异性, 且该家族与皂苷合成关键酶基因形成互作网络并与单体皂苷含量显著相关。 *PgCAS04-5* 的亚细胞定位为叶绿体, 同时该基因的过表达与 RNAi 阳性材料中 *PgCAS04-5*、*PgDS-1*、*PgSE2-4*、*PgCYP137* 这 4 个基因的表达呈反向调控, 差异显著。结论 鉴定出 20 个 *PgCAS* 家族成员, *PgCAS* 家族成员功能存在分化, *PgCAS04-5* 基因正向调控人参皂苷 Rg₂ 和人参皂苷 Rf 的合成, 同时负向调控人参皂苷 Rb₂ 和人参皂苷 Rd 的生物合成, 为进一步研究 *PgCAS* 基因家族提供参考。

关键词: 人参; 环阿屯醇合酶; 基因家族; 生物信息学分析; 功能分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)13-5215-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.023

Identification of CAS gene family in *Panax ginseng* and functional analysis of *PgCAS04-5*

MA Ying^{1,2}, LI Chengwei^{1,2}, JIN Ge^{1,2}, YU Shuang^{1,2}, WANG Aimin^{1,2}, YU Jinghui^{1,2}, ZHAO Mingzhu^{1,2}, WANG Kangyu^{1,2}, WANG Yi^{1,2}, ZHANG Meiping^{1,2}

1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Jilin Engineering Research Center for Ginseng Gene Resource Development and Utilization, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To identify members of the cycloartenol synthase (CAS) gene family (*PgCAS*) using the *Panax ginseng* transcriptome database, and analyze the expression patterns of *PgCAS04-5* in overexpressed and RNAi-positive hair root materials), as well as explore the function of this gene in ginsenoside biosynthesis. **Methods** Bioinformatics approaches were adopted to characterize the chromosomal localization, conserved motifs, phylogenetic relationships and expression profiles, and the correlations with the gene expression of key saponin synthesis enzymes and the content of monomer saponin of *PgCASs*. The protein structure and subcellular localization of *PgCAS04-5* were predicted. Meanwhile, the expression levels of key enzyme genes and variations in ginsenoside contents were detected in overexpression and RNAi-positive hairy root lines. **Results** A total of 20 *PgCAS* transcripts were identified from the *P. ginseng* transcriptome database. Chromosomal mapping showed that *PgCAS* genes were unevenly distributed on five chromosomes of *P. ginseng*. Phylogenetic tree analysis divided the *PgCAS* family into three subfamilies, and most

收稿日期: 2026-01-02

基金项目: 人参基因育种技术的建立及优良农家品种选育 (20250205032GH)

作者简介: 马莹, 女, 硕士研究生, 研究方向为生物工程。E-mail: 1076900427@qq.com

*通信作者: 王义, 博士生导师, 研究方向为人参系统基因组学与分子设计育种。E-mail: yi.wang@jlau.edu.cn

张美萍, 博士生导师, 研究方向为人参功能基因组学与分子设计育种。E-mail: meiping.zhang@jlau.edu.cn

PgCAS members belonged to subfamily II and subfamily III. The *PgCAS* genes displayed obvious spatiotemporal specificity in expression across different cultivars, growth years and tissues. Additionally, the *PgCAS* family formed an interaction network with key genes involved in ginsenoside biosynthesis, and their content was significantly correlated with the accumulation of monomeric ginsenosides. Subcellular localization prediction demonstrated that *PgCAS04-5* was localized to chloroplasts. Moreover, the overexpression of this gene was inversely regulated with the expression of four genes including *PgCAS04-5*, *PgDS-1*, *PgSE2-4* and *PgCYP137* in RNAi positive materials, with significant differences. **Conclusion** A total of 20 members of the *PgCAS* gene family were identified in this study, and functional differentiation exists among *PgCAS* family members. *PgCAS04-5* positively regulates the biosynthesis of ginsenosides Rg₂ and Rf, and negatively modulates the synthesis of ginsenosides Rb₂ and Rd. The results provide a valuable reference for further research on the *PgCAS* gene fami

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey; cycloartenol synthase; gene family; bioinformatics analysis; functional analysis

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 为五加科人参属多年生传统名贵中药材, 被誉为“百草之王”, 其药用历史可追溯至千年前^[1]。人参的活性成分主要包括人参皂苷、多肽及多糖等, 其中人参皂苷作为核心活性成分, 已被证实具有多种药理活性, 在医药、保健品领域具有极高应用价值。随着全球健康产业蓬勃发展, 市场对高品质人参及其深加工产品的需求持续增长^[2]。然而, 人参生长周期长, 对生态环境要求苛刻, 且皂苷含量易受品种、年生、栽培管理等多因素影响, 导致高品质人参产能不稳定, 难以满足市场需求^[3]。因此, 利用现代分子生物学技术解析人参皂苷生物合成的分子机制, 进而通过遗传改良定向提高皂苷产量, 对保障优质人参药材的稳定供应具有重要理论与应用价值。

环阿屯醇合酶 (cycloartenol synthase, CAS) 是植物甾醇及甾体类物质生物合成途径中的首个环化酶^[4], 同时也是调控环阿屯醇合成的关键限速酶^[5]。在人参次级代谢网络中, 人参皂苷与甾醇的合成共享前体物质 2,3-氧化角鲨烯, CAS 调控的分支走向甾醇合成, 而其他氧化鲨烯环化酶 (如达马烷二醇合酶) 调控的分支则走向皂苷合成^[6]。因此 CAS 是调控 2 条代谢通路分配的核心节点之一。CAS 基因家族属于氧化鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclase, OSC) 超家族的亚家族, 在植物中高度保守^[7]。其编码的蛋白含 DCTAE、QxxxxxW、MWCHCR 3 种保守基序: DCTAE 基序参与底物 2,3-氧化角鲨烯的结合并启动环化反应^[8], QxxxxxW 基序维持环化过程的结构稳定性^[9]; MWCHCR 基序调控产物特异性。3 种保守基序是 CAS 区别于其他 OSC 家族成员的核心特征^[10], 三者协同作用, 保障酶催化活性与产物专一性。然而, 当前关于人参 CAS 基因家族 (*PgCASs*) 的系统鉴定、进化关系、时空表达模式及功能分化尚

未见深入报道, 其在人参皂苷合成调控中的具体作用机制未见深入报道。鉴于 CAS 基因是连接植物甾醇合成与调控皂苷合成的关键节点, 解析其功能对阐明人参皂苷代谢调控网络、定向改良人参皂苷含量具有重要理论意义与应用价值。

本研究通过生物信息学方法系统鉴定分析人参 CAS (*PgCASs*) 基因家族成员, 分析其基因结构、染色体定位, 进化关系及保守基序特征, 解析该基因及皂苷合成关键酶基因表达的相关性, 同时对 *PgCAS04-5* 过表达及 RNAi 的阳性材料进行基因表达量分析及皂苷含量测定。本研究为 *PgCAS* 基因的克隆、功能验证及后续探究其在人参皂苷合成通路中的调控机制提供理论基础, 也为通过基因工程手段改良人参品质提供候选基因资源。

1 材料

1.1 材料及数据库

本研究所使用的植物材料经吉林农业大学王义教授鉴定的 4 个年生 (5、12、18、25 年) 吉林人参 *P. ginseng* C. A. Mey。本研究所使用数据库为实验室前期构建获得^[11]。

1.2 仪器及试剂

RNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司 (批号 ET101); All-in-RT MasterMix for qPCR 反转录试剂盒购自雅礼 (江苏) 生物科技有限公司 (批号 YPM51341), UR SYBR Green qPCR MasterMix 荧光定量试剂盒购自雅礼 (江苏) 生物科技有限公司 (批号 YQ51001); 人参皂苷 Rb₂ (批号 B21051)、人参皂苷 Rg₂ (批号 B21058)、人参皂苷 Rd (批号 B21054)、人参皂苷 Rf (批号 B21056) 均购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%。ABI7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); e2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 PgCASs 基因家族的鉴定

由于人参 CAS 亚家族与 OSC 基因家族共享相同的保守域, 文献中常用的的隐马尔科夫 (Hidden Markov Model, HMM) 模型 PF13243, PF13249 不能作为有效筛选条件^[12], 因此通过文献检索确定以下序列作为问询序列: (1) 韩国人参 CAS 基因的 CDS 序列及对应的蛋白序列; (2) 其他物种中克隆的 CAS 基因序列。将以上问询序列与 Blast 本地化的吉林人参转录组数据库以及蛋白质数据库进行比对, 设定阈值为 1×10^{-6} ; 将比对获得的序列上传 NCBI Conserved Domain search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cg>) 网站进行筛选, 随后剔除不含 ISOPREN_C2_like Superfamily (cl08267), Prenyltrans_1 (Pfam13243), Prenyltrans_2 (Pfam13249), SQCY_1 (cd02802) 4 种保守结构域^[13]的序列, 进一步在 SMART 网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对筛选后序列的保守结构域进行 2 次验证, 剔除无保守结构域的序列。最后, 利用 NCBI ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 进行分析, 删除不含完整保守域的序列, 选取长度最长的序列作为其开放阅读框, 并对最终获得的序列进行统一重命名, 材料信息见表 1。

表 1 用于鉴定人参 CAS 基因家族的外源物种信息

Table 1 Exogenous species for identification of CAS gene family in *P. ginseng*

物种名称	Gene Bank ID
朝鲜人参 <i>Panax ginseng</i> y ^[14]	AB009029.1 BAA33460.1
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> ^[15]	U02555.1
白桦 <i>Betula platyphylla</i> ^[16]	AB055509.1
光果甘草 <i>Glycyrrhiza glabra</i> ^[17]	AB025968.1
蓖麻 <i>Ricinus communis</i> ^[18]	DQ268870.1
刺五加 <i>Eleutherococcus senticosus</i> ^[19]	JQ400139
越南油茶 <i>Camellia vietna-mensis</i> ^[20]	MZ497517
葫芦巴 <i>Trigonella foenum-graecum</i> ^[21]	KX148475.1
罗汉果 <i>Siraitia grosvenorii</i> ^[22]	HQ128566.1
黄芪 <i>Astragalus mongholicus</i> ^[23]	OM913798.1

2.2 PgCASs 染色体定位及共线性分析

使用本地 BLASTN 将 PgCASs 与人参基因组数据库进行比对, 确定各基因在人参染色体上的定位和分布, 利用在线网站 MG2C (<http://mg2c.iask.in/mg2c%5Fv2.1/>) 绘制 PgCASs 在染色体上的分布

图, 同时使用 R 语言绘制 PgCASs 家族成员在吉林人参中的共线性, 以确定该家族在人参基因组中的基因复制现象。

2.3 PgCASs 的系统发育及保守基序分析

从 NCBI 网站下载模式植物拟南、烟草、玉米、番茄以及人参近缘物种的 CAS 蛋白序列 (表 2), 使用 MEGA-X 软件将上述蛋白序列与吉林人参 CAS 基因编码的蛋白序列进行多重序列比对并构建系统发育树, 方法为邻近连接算法 (neighbor-joining, NJ), 重复值为 1 000, 其他为默认设置。使用在线网站 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 对家族成员进行保守基序分析, 基序数量设置为 10, 保守基序的最小宽度和最大宽度分别设置为 10 和 50, 其他为默认设置。

表 2 用于系统进化分析的外源物种的蛋白序列号

Table 2 Sequence number of exogenous species used for phylogenetic analysis

物种名称	Gene Bank ID
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001325220.1 NP_178722.1 ^[24]
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	XP_010320043.1
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	BBE00759.1 ^[25] AIY33888.1 ^[26] NP_001168389.1 ^[27]
玉米 <i>Zea mays</i>	XP_008679954.1 XP_008655662.1 XP_023156693.1
小麦 <i>Triticum aestivum</i>	XP_044407891.1
三七 <i>Panax notoginseng</i>	ABY60426.1
刺五加 <i>Eleutherococcus senticosus</i>	AFC67276.1
西洋参 <i>Panax quinquefolius</i>	AGK62447.1
竹节参 <i>Panax japonicus</i>	ALB38665.1

2.4 PgCASs 的 GO 功能注释

使用 Blast2GO 对所得的 PgCASs 序列进行 GO 功能注释分析。在预测了 PgCASs 的功能分化后, 绘制 PgCASs 序列在生物过程、分子功能和细胞组分 3 大功能类别分布的韦恩图。同时统计 PgCASs 序列在 Level 2 水平上的功能注释结果, 并绘制桑葚流量图表示基因注释的结果及注释到各功能的成员数目。

2.5 PgCASs 的表达模式分析

使用 R 语言从吉林人参转录组数据库中提取 PgCASs 在 42 个农家品种, 14 个组织部位及 4 个年生 (5、12、18、25 年) 的表达量, 使用 TBtools-II

(v2.210) 软件分别绘制 *PgCASs* 在 3 个数据库中的表达量热图, 研究 *PgCASs* 表达的时空特异性和组织特异性。

2.6 *PgCASs* 与人参皂苷含量的相关性分析

使用 IBM SPSS Statistics (Version 25.0) 计算 *PgCASs* 在 42 个农家品种中的表达量与人参中 9 种单体皂苷含量之间的 Pearson 相关系数。使用在线网站 ChiPlot (<https://www.chiplot.online>) 绘制热图并筛选与人参皂苷含量显著相关的基因。

2.7 *PgCASs* 与人参皂苷合成关键酶基因表达的互作网络分析

使用 R 语言提取 *PgCASs* 以及 16 种人参皂苷合成关键酶基因在 42 个农家品种的表达量并计算两者的 Spearman 相关系数, 分析 *PgCASs* 和皂苷合成关键酶的互作关系, 使用软件 BioLayout Express 3D (Version 3.3) 绘制候选基因与关键酶互作网络分析图。

2.8 *PgCAS04-5* 基因的生物信息学分析

上传 *PgCAS04-5* 基因的氨基酸序列至在线网站 ExpASy (<https://www.expasy.org/>) 后, 选择 ProtParam Tool 进行蛋白质的理化性质分析; 上传氨基酸序列至在线网站 SOPMA (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 及 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 以预测蛋白质的二级结构及三级结构; 上传氨基酸序列至 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 网站预测蛋白质的跨膜结构; 上传氨基酸序列至在线网站 Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 以预测蛋白质的亚细胞定位。

网站预测蛋白质的跨膜结构; 上传氨基酸序列至在线网站 Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 以预测蛋白质的亚细胞定位。

2.9 *PgCAS04-5* 阳性材料的表达分析

实验前期构建了 *PgCAS04-5* 的过表达载体以及 RNAi 载体, 以农杆菌介导法将 2 个载体转化至人参不定根中, 经培养和 PCR 验证后获得含有 *PgCAS04-5* 的过表达及 RNAi 阳性材料。

取 *PgCAS04-5* 过表达与 RNAi 的空载材料及阳性材料, 以人参 *PgCAS04-5* 过表达与 RNAi 的空载材料为对照 (CK), 进行 qRT-PCR 分析。使用 RNA 提取试剂盒提取不同材料中的 RNA, 使用 All-in-RT MasterMix for qPCR 试剂盒将其反转录成 cDNA 以用于基因表达水平的检测。内参基因设为人参 *CYP-N* 基因, 设计该基因过表达及 RNAi 的荧光定量 PCR 引物 (表 3, 由生工生物工程股份有限公司合成)。使用 UR SYBR Green qPCR MasterMix 试剂在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量, 反应体系为: SYBR Green qPCR MasterMix 10 μ L, 正向引物 0.4 μ L, 反向引物 0.4 μ L, ROX Reference Dye 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 6.8 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。每组样品重复 3 次技术实验, 统计数据后使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算最终结果。

表 3 用于 qRT-PCR 的引物序列
Table 3 Primer sequence for qRT-PCR

基因名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>PgCYP-N</i>	CAGGCAAAGAAAAAGTCAAGTG	AAAGAGACCCATTACAATACGC
<i>PgCYP-137</i>	CGTCCGCAATATCCATTTTCGC	TGGTGATAAAACAGAGGAGAAGTGA
<i>PgSE2-4</i>	TGTCCGACAGAGCAACAGTC	ACAGAAGCATGCCAGCTGAT
<i>PgDS-1</i>	AGTATCCACTTCCGGCCTCT	TCAGCGGAACGATTGACACT
<i>PgCAS04-5</i>	AGTACTCCAGGGGCCATCAT	TCGACCCAAGTAGGAGGAGG

2.10 *PgCAS04-5* 阳性材料的皂苷含量测定

采用 ODS (十八烷基硅烷键合硅胶, *ostadecylsilane*) 法^[28]提取 *PgCAS04-5* 过表达及 RNAi 阳性材料的人参皂苷; 按照 Yu 等^[29]的研究方法, 分别测定人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rg₂、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rf 的质量分数。

3 结果与分析

3.1 *PgCASs* 基因家族的筛选

将问询序列与吉林人参转录组数据库与蛋白

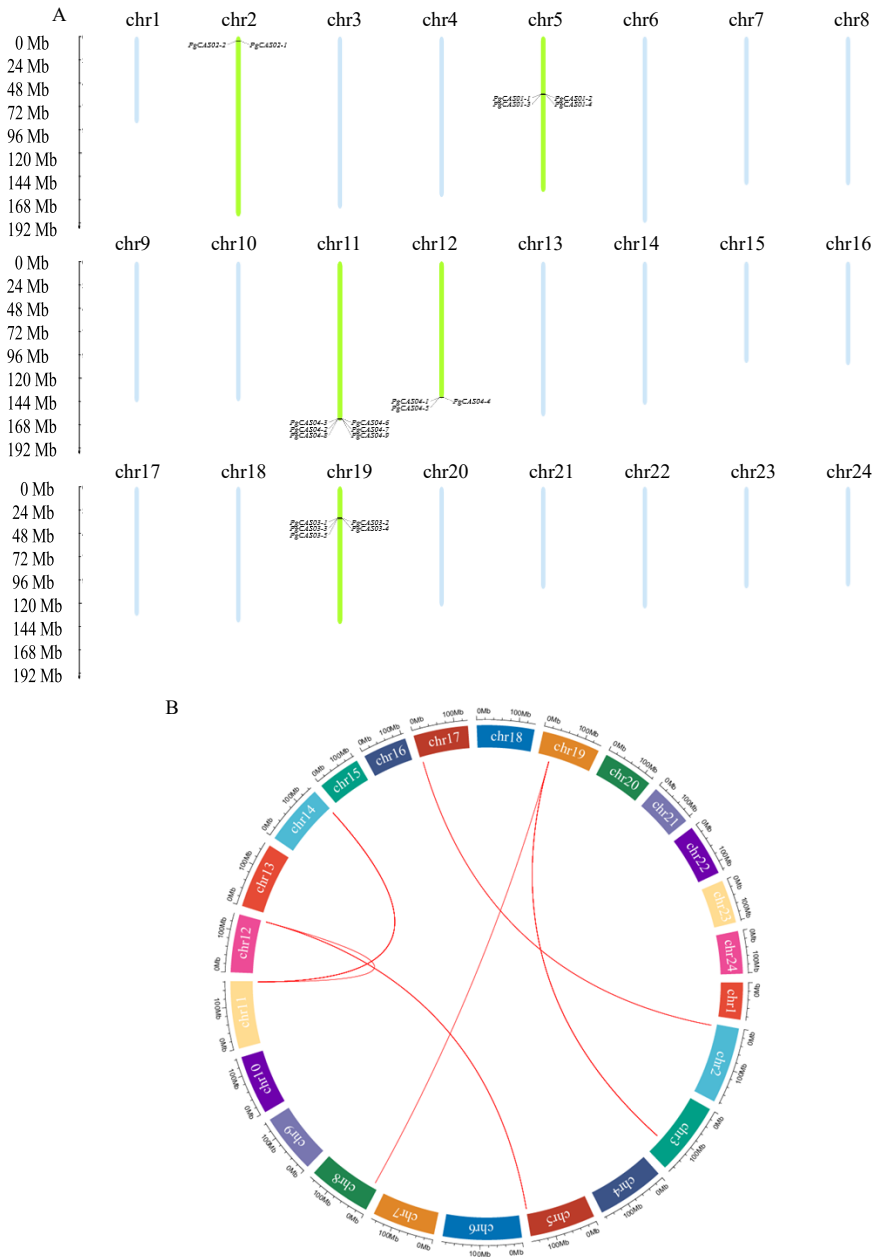
质数据库比对后, 鉴定出 163 条转录本序列。经过 NCBI CD-Search 确定转录本的结构域后筛选获得 23 条转录本序列, 再由 ORF finder 和 SMART 网站进行保守结构域的筛选后, 最终鉴定 20 个转录本中包含完整的保守结构域。因此将这 20 个转录本作为候选基因进行后续分析。在转录组数据库中, 不同基因编号不同, 同一基因的不同转录本序号不同, 因此对这 20 条基因进行重命名, 将其分为 4 个 *PgCAS* 基因, 命名为 *PgCAS01~04*, 同一基因的不

同转录本以后缀数字进行区分, 例如 *PgCAS01-1*。

3.2 *PgCASs* 染色体定位及共线性分析

为探究 *PgCASs* 在人参基因组中的位置, 对上述鉴定的 *PgCASs* 成员进行染色体定位和共线性分析。结果表明 *PgCASs* 成员不均匀地分布在吉林人参的 5 条染色体上。其中 *PgCAS01*、*PgCAS02*、*PgCAS03* 这 3 个基因的转录本分别位于人参的第 2、5、19 号染色体上, 而 *PgCAS04* 这条基因的 9 个

转录本不均匀的分布在相邻的第 11 及第 12 号染色体上(图 1-A)。有研究表明, 这种现象的发生与人参进化时期出现的 2 次独立的全基因组加倍事件相关。为阐述 *PgCASs* 的重复现象, 对其进行共线性分析, 结果表明 *PgCASs* 在进化过程中发生了多次重复事件, 存在 6 对共线性基因, 且这些同源基因的序列的相似性进一步证明他们具有相似的功能(图 1-B)。



A-*PgCASs* 在人参染色体上的分布, B-*PgCASs* 的共线性分析。

A-distribution of *PgCASs* on *P. ginseng* chromosomes, B-collinearity analysis of *PgCASs*.

图 1 染色体定位及共线性分析

Fig. 1 Chromosome localisation and collinearity analysis

3.3 *PgCASs* 的系统发育及保守基序分析

为进一步研 *PgCASs* 的系统进化模式, 将选定的外源 CAS 蛋白序列与 20 条人参 CAS 蛋白序列进行多重序列比对后, 构建系统发育进化树(图 2)。拟南芥、烟草、玉米、三七、西洋参等外源物种的 15 条蛋白序列与 *PgCAS* 蛋白序列一起聚集成 3 个分支 (I、II、III), 玉米的 NP_001168389.1 及 NP_001152006.2 单独聚集成一个分支 (粉色), *PgCAS01*、*PgCAS02*、*PgCAS03* 等基因的蛋白序列聚集在分支 II (蓝色), *PgCAS04*、人参近缘植物三

七、西洋参及其他外源 CAS 等蛋白聚集在第 III 分支 (绿色), 这一结果表明 *PgCASs* 在进化中高度保守并出现一定程度的功能分化。*PgCASs* 的保守基序分析 (图 3) 结果表明 *PgCASs* 转录本包含的基序数为 8~10 个, 保守结构域为单一 PLN03012 superfamily, 进一步证明 *PgCASs* 的高度保守性。

3.4 *PgCASs* 的 GO 功能注释

利用 Blast2GO 对所得的 *PgCASs* 序列进行 GO 功能注释并绘制维恩图 (图 4-A), 结果表明这 20 条 *PgCAS* 基因全部注释到分子功能 (molecular

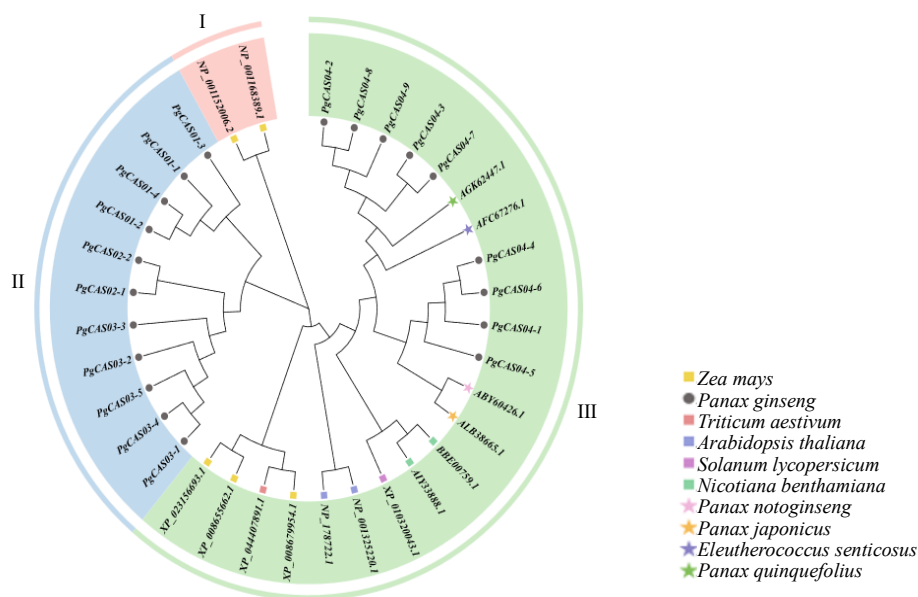


图 2 *PgCASs* 的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *PgCASs*

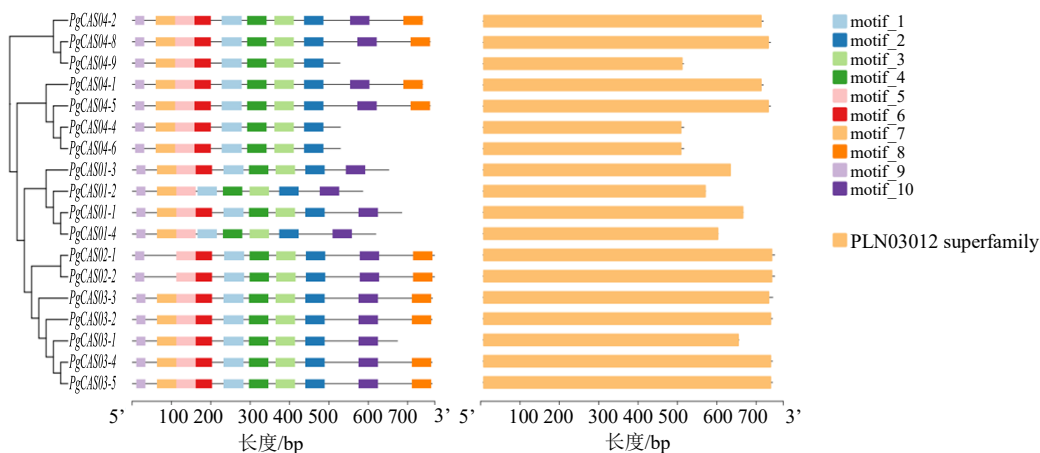
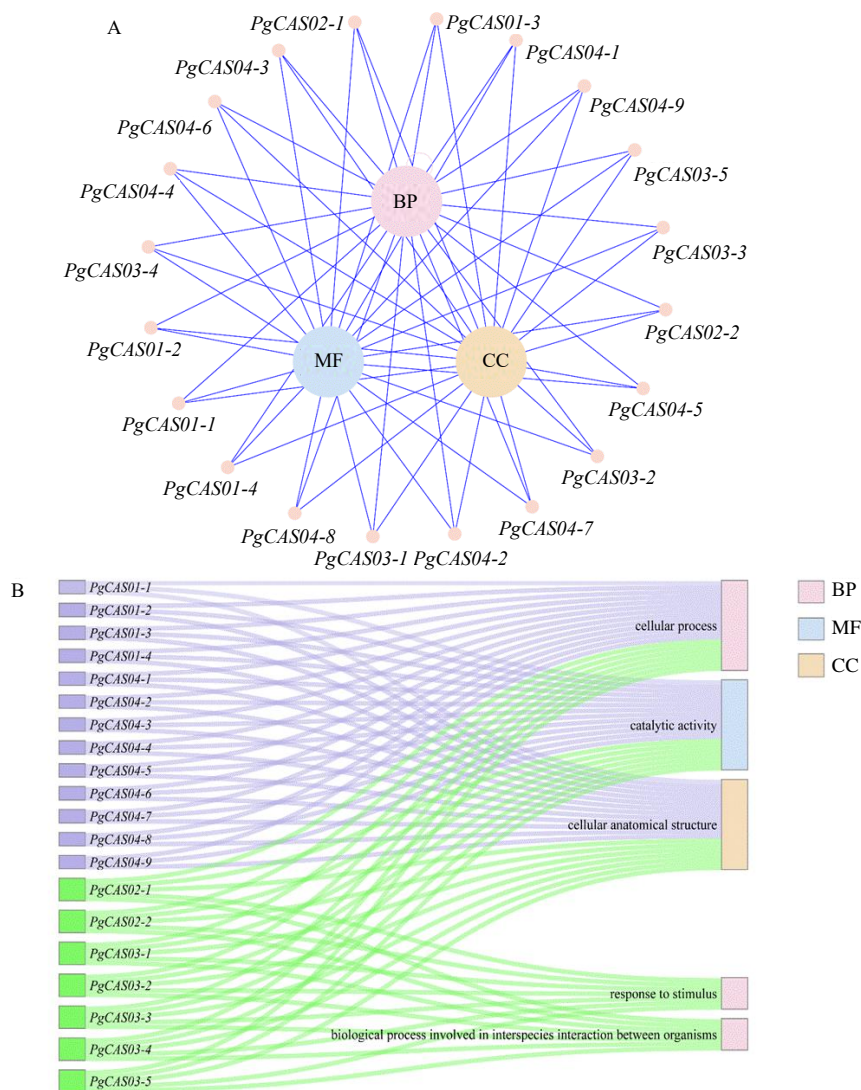


图 3 *PgCASs* 保守基序和保守结构域分析

Fig. 3 Analysis of *PgCASs* conserved motifs and conserved structural domains

function, MF)、细胞组分 (cellular component, CC) 及生物过程 (biological process, BP) 3 大功能类别中。在 Level2 上进一步分析, *PgCASs* 成员注释到 5 个不同功能上 (图 4-B), BP 中包含细胞过程 (cellular process)、对刺激的反应 (response to stimulus)、生物间种间相互作用相关的生物学过程

(biological process involved in interspecies interaction between organisms), MF 包含催化活性 (catalytic activity), CC 包含细胞解剖结构 (cellular anatomical structure)。这些功能与前人的研究相吻合, 环阿屯醇合酶位于细胞的膜结构上, 是参与植物甾醇合成与催化的关键酶并且能响应外界刺激。



A-*PgCASs* 的 GO 功能注释的韦恩图; B-Level 2 上 GO 功能注释的桑基图。
A-Venn plot of GO functional annotations for *PgCASs*; B-sankey diagram of GO functional annotations at Level 2.

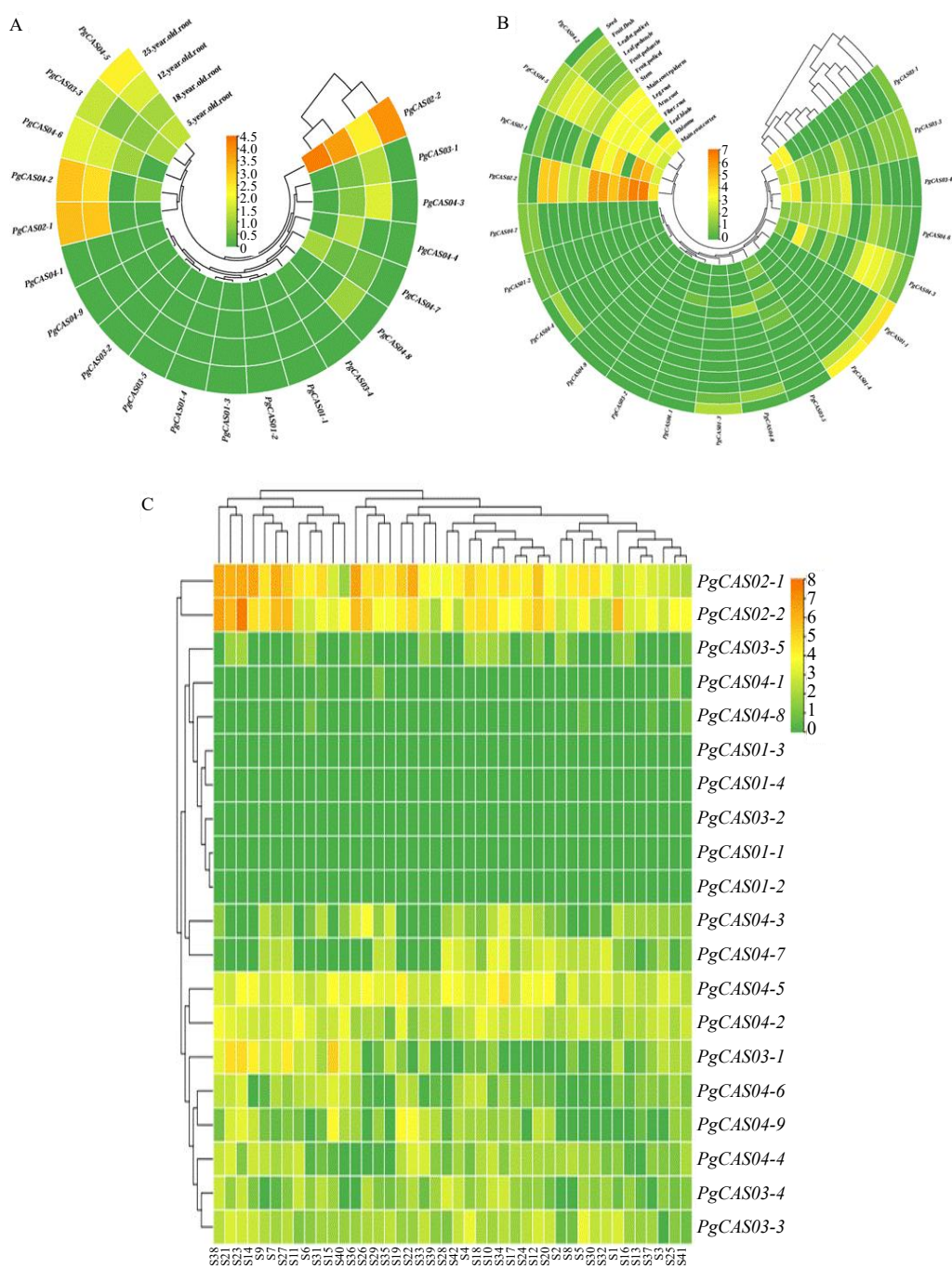
图 4 *PgCASs* 的 GO 功能注释分析

Fig. 4 GO functional annotation analysis of *PgCASs*

3.5 *PgCASs* 的表达模式分析

为解析 *PgCASs* 在吉林人参中的表达模式, 本研究利用 R 语言提取表达量数据并绘制热图。结果表明, *PgCASs* 表达具有显著时空特异性且表达量差异较大。在 4 个年生中 (图 5-A), *PgCAS02-2*、*PgCAS04-5* 基因均有表达, *PgCAS04-2* 基因在 12、25 年生中高表达, 9 条基因在 4 个年生中均不表达。在人参的 14

个组织部位中 (图 5-B), 多在根皮、支根、芦笋等部位表达, *PgCAS04-5* 等基因可在 10 个以上组织表达, 部分基因仅在特定部位高表达, 体现了基因家族成员的表达存在组织特异性。在 42 个农家品种 4 年生根中 (图 5-C), 4 条基因在所有农家品种中均表达, 15 条至少在 1 个品种中表达, 5 条均不表达, 提示 *PgCASs* 表达与品种生长环境密切相关。



A-PgCASs 在 4 个不同年生人参主根中的表达热图；B-PgCASs 在 14 个不同组织部位的表达热图；C-PgCASs 在 42 个农家品种的表达热图。
A-heatmap of *PgCASs* expression in four different annual *P. ginseng* primary roots; B-heatmap of *PgCASs* expression in 14 different tissue sites; C-heatmap of *PgCASs* expression in 42 agricultural cultivars.

图 5 *PgCASs* 的表达模式分析

Fig. 5 Expression pattern analysis of *PgCASs*

3.6 *PgCASs* 与人参皂苷含量的相关性分析

将 *PgCASs* 与在 42 个农家品种根中的 9 种单体皂苷含量进行相关性分析 (图 6), 结果表明, 当 $P \leq 1 \times 10^{-4}$, *PgCAS02-2*、*PgCAS02-1*、*PgCAS03-1*、*PgCAS04-6* 与人参皂苷 Rb₂、Rb₁、Rd 等多种单体皂苷呈高显著

性正相关, 这些基因可能参与对应皂苷的生物合成调控; *PgCAS04-5* 仅与人参皂苷 Rg₂ 呈高显著性正相关, *PgCAS04-8* 仅与人参皂苷 Rb₃ 呈显著性正相关, 与其他单体皂苷存在弱负相关, 这表明 *PgCASs* 可能具有功能上的差异, 且能够参与皂苷的调控过程。

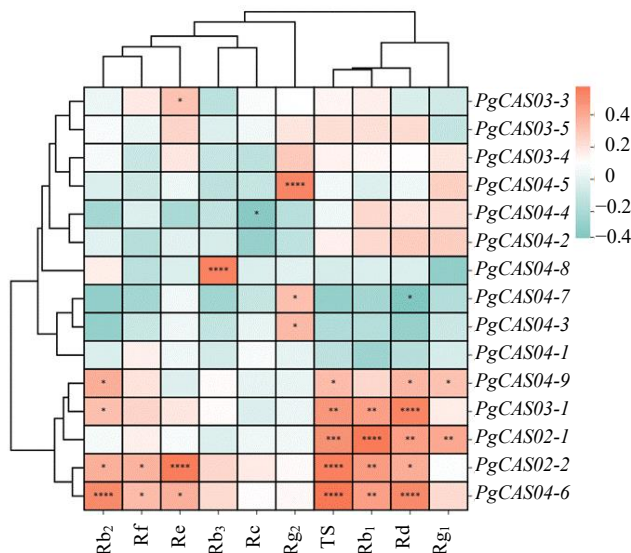


图6 PgCASs 与人参皂苷含量的相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis of PgCASs and ginsenoside content

3.7 PgCASs 与人参皂苷合成关键酶基因表达的互作网络分析

在现有的研究中已经明确指出,甾醇及皂苷的合成享有共同的前体物质 2,3-氧化角鲨烯,环阿屯醇合酶是甾醇合成的关键酶,而达马烷二醇合酶 (dammarenediol-II synthase, DS)、β-香树素合酶 (β-amyrin synthase, β-AS) 则是皂苷合成的关键酶,因此 CAS 可能与皂苷合成关键酶基因具有互作关系。为探究 PgCASs 与关键酶基因的关系,本研究将上述筛选出的 PgCASs 与人参生物合成途径关键酶基因 (PgCYP137、PgCYP311、PgCYP339、PgDS-1、PgDS-3、PgSS-1、PgSE2-1、PgSE2-4、PgFPS-22、UGTPg74AE-2) 进行了互作网络分析 (图 7)。结果表明,当 $P \leq 1 \times 10^{-4}$ 时, PgCAS04-5 仍能与关键酶基因形成紧密的互作网络。通常认为具有相似功能的基因,其表达更倾向形成紧密的互作网络。因此,该结果表明 PgCAS 基因不仅是甾醇合成的关键限速酶,也可能参与调控人参皂苷合成,因此将 PgCAS04-5 选定为候选基因。

3.8 PgCAS04-5 基因的生物信息学分析

ProtParam 预测 PgCAS04-5 的蛋白质一级结构及理化性质,结果显示, PgCAS04-5 由 758 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 86 127.48,理论等电点 (pI) 为 6.44,平均亲水系数 -0.291 表明是亲水蛋白。二级结构预测表明 (图 8-A),该蛋白质的主要构成原件是 α-螺旋和无规卷曲。跨膜结构域预测结果表明 (图 8-B), PgCAS04-5 为单通道跨膜蛋白。

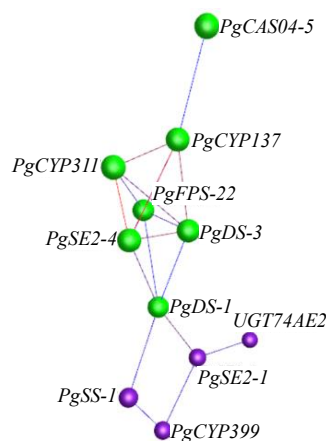


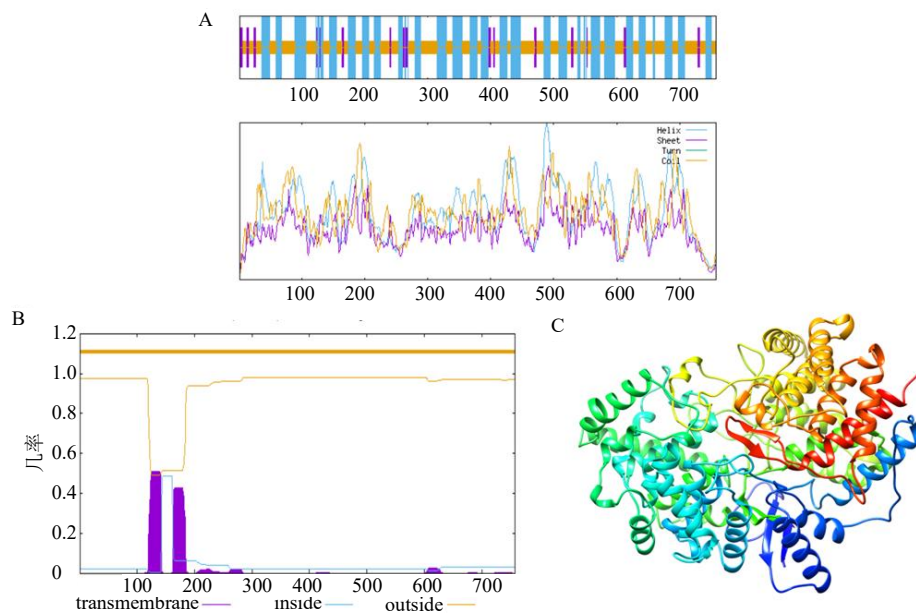
图7 PgCASs 与皂苷合成关键酶的互作网络分析

Fig. 7 Interaction network analysis of PgCASs and key enzymes involved in saponin biosynthesis

上传蛋白序列至 SWISS-MODEL,选择相似度最高的模型进行同源建模 (图 8-C),该蛋白质功能注释为氧化鲨烯环化酶,可将 2,3-氧化角鲨烯催化为环阿屯醇。在线网站 Plant-mPLo 预测 PgCAS04-5 的亚细胞定位为叶绿体。

3.9 PgCAS04-5 阳性材料基因的表达量分析

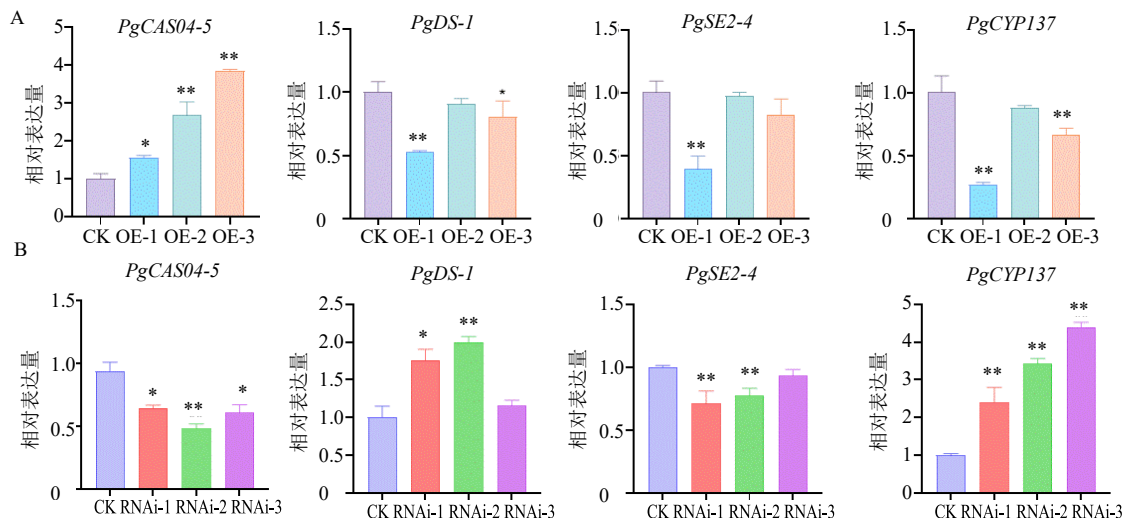
为了进一步研究 PgCAS04-5 基因在过表达和 RNAi 过程中与人参皂苷关键酶基因的表达变化情况,选取皂苷合成路径的上游关键酶基因 PgSE2-4,合成皂苷的关键酶基因 PgDS-1 及调控皂苷合成的关键酶基因 PgCYP137 进行 qRT-PCR 分析。结果表明,过表达 PgCAS04-5 发状根无性系中 (图 9-A), PgCAS04-5 的相对表达量显著上调,同时 PgDS-1



A-PgCAS04-5 蛋白的二级结构; B-PgCAS04-5 的跨膜结构域; C-PgCAS04-5 蛋白建模。
A-secondary structure of PgCAS04-5; B-transmembrane domain of PgCAS04-5; C-protein modeling of PgCAS04-5.

图 8 *PgCAS04-5* 基因的生物学信息

Fig. 8 Biological information of *PgCAS04-5*



与 CK 组比较: * $P \leq 0.05$ ** $P \leq 0.01$ *** $P \leq 0.001$; CK-阳性对照; OE-1~3-过表达阳性材料; RNAi-1~3-RNAi 阳性材料, 下同。
* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ vs CK group; CK-positive control; OE-1—3-overexpression positive materials; RNAi-1—3-RNAi positive materials, same as below.

图 9 *PgCAS04-5* 过表达 (A) 和 RNAi (B) 阳性材料的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of *PgCAS04-5* overexpression (A) and RNAi (B) positive materials

及 *PgSE2-4* 的相对表达量下调, *PgCYP137* 的相对表达量显著下调。在 RNAi *PgCAS04-5* 发状根无性系中 (图 9-B), *PgCAS04-5* 的相对表达量显著下调, *PgDS-1* 及 *PgCYP137* 的相对表达量显著上调, *PgSE2-4* 的相对表达量下调。 *PgCAS04-5* 及 *PgDS-1* 基因竞争同样的底物, 因此相对表达量相反; *PgCYP137* 的表达量变化则与 *PgDS-1* 高度同步, 提示二者存在协

同调控; *PgSE2-4* 的表达量在 2 种处理中均下调, 推测与皂苷合成通路的负反馈抑制相关。

3.10 *PgCAS04-5* 阳性材料的皂苷含量测定

为进一步探究 *PgCAS04-5* 基因在皂苷生物合成中的功能, 测定了 *PgCAS04-5* 阳性材料中 4 种人参皂苷的含量。结果显示, 在 *PgCAS04-5* 过表达 OE 株系中 (图 10-A), 人参皂苷 Rb₂ 和人参皂苷 Rd 的

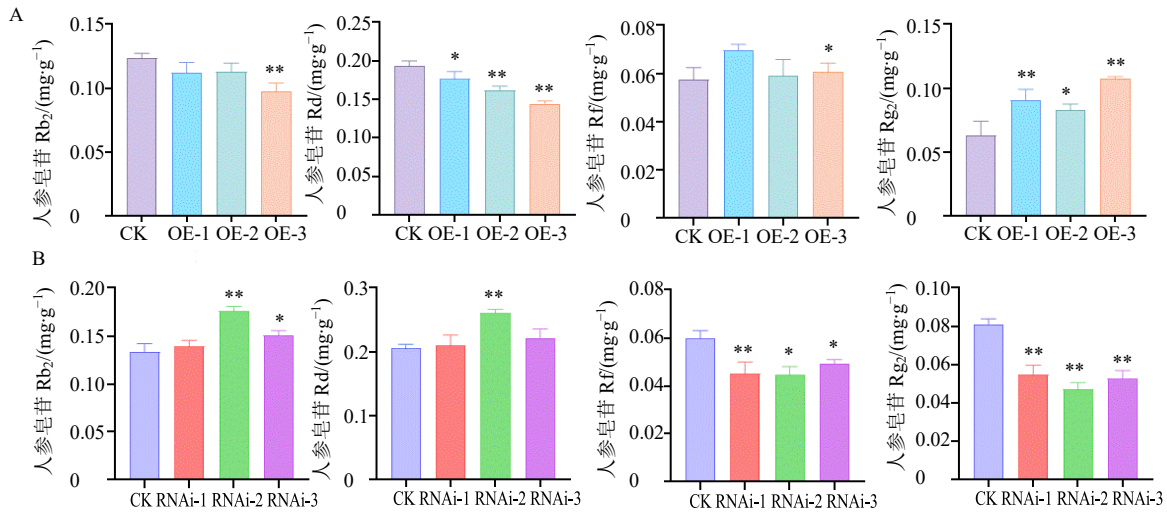


图 10 *PgCAS04-5* 过表达 (A) 和 RNAi (B) 阳性材料的皂苷含量

Fig. 10 Saponin content in *PgCAS04-5* overexpression (A) and RNAi (B) positive materials

含量相较于 CK 呈下降趋势；其中 OE-3 株系的人参皂苷 Rb₂ 含量以及 3 个 OE 株系的人参皂苷 Rd 含量均显著低于 CK。同时过表达该基因显著促进了人参皂苷 Rg₂ 的积累，3 个 OE 株系中的人参皂苷 Rg₂ 含量均显著高于 CK。此外，人参皂苷 Rf 的含量也在 OE-3 株系中显著上升。为了反向验证这一结果，检测了 *PgCAS04-5* RNAi 株系中的皂苷含量变化（图 10-B），结果与过表达株系呈现相反的趋势。与 CK 相比，RNAi-2 株系中人参皂苷 Rb₂ 和人参皂苷 Rd 的含量显著上升；3 个 RNAi 株系中人参皂苷 Rg₂ 和人参皂苷 Rf 的含量均显著下降。这些结果表明 *PgCAS04-5* 在皂苷的生物合成代谢中发挥着关键的调控作用，其正向调控人参皂苷 Rg₂ 和人参皂苷 Rf 的合成，同时负向调控人参皂苷 Rb₂ 和人参皂苷 Rd 的合成。

4 讨论

本研究基于吉林人参转录组数据库，系统鉴定出人参 *CAS* 基因家族 (*PgCASs*) 的 20 条转录本，明确了 *PgCASs* 的核心成员构成。染色体定位与共线性分析显示，*PgCASs* 不均匀分布于人参 5 条染色体上，且存在 6 对共线性基因，这与人参进化过程中发生的 2 次独立全基因组加倍事件密切相关^[30]。全基因组加倍是植物基因家族扩张的重要驱动力，加倍后的基因通过亚功能化、新功能化适应环境选择压力^[31]。本研究中 *PgCASs* 共线性基因序列相似性较高，推测其可能在人参甾醇与皂苷合成的协同调控中发挥冗余或互补功能。

基因结构的改变可影响家族成员的表达水平与功能^[32-33]，同时基因结构的细微分化差异，也会造成

其编码蛋白的结构发生相应改变并影响蛋白功能^[34]。表达模式分析表明，*PgCAS04-5* 在 4 个年生、14 个组织部位及多数农家品种中广泛表达，而其他 *PgCASs* 仅在特定条件下表达，这与水稻 *CAS* 基因的表达模式一致^[35]。此外，42 个农家品种中 *PgCASs* 表达的差异可能与品种间遗传多样性及生长环境适应性相关，这为筛选高皂苷含量的人参品种提供了分子标记候选。*CAS* 的亚细胞定位具有物种特异性，本研究中 *PgCAS04-5* 是位于叶绿体的跨膜亲水蛋白，不同于先前研究中的脂质颗粒^[36]及微体^[37]，揭示了 *PgCASs* 进化过程中可能出现了功能的分化。

PgCAS04-5 作为人参皂苷合成通路中的关键代谢阀门，其调控机制可能是通过竞争共有合成前体，实现代谢分流并维持次生代谢稳态。在次级代谢网络中，*PgCAS04-5* 与 *PgDS-1* 共同竞争前体 2,3-氧化角鲨烯^[38-39]，过表达 *PgCAS04-5* 会使其在竞争中占优，导致 *PgDS-1* 及其协同调控下游修饰的 *PgCYP137* 表达同步下调，从而抑制原人参二醇型如人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rd 的合成，并将截留的前体定向至原人参三醇型支路，促使 Rf 以及 Rg₂ 含量显著升高；RNAi *PgCAS04-5* 则释放了竞争压力，促使代谢流重新回流至 PPD 途径。

综上所述，本研究系统阐明了人参 *PgCAS* 基因家族的进化与表达特征，并明确了 *PgCAS04-5* 作为关键代谢阀门，通过前体竞争调控不同皂苷比例的功能。未来可借助基因编辑技术进一步验证其体内功能，并探究 *PgCAS04-5* 与其他皂苷合成关键酶的互作机制，为通过分子育种改良人参品质提供理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jia L, Zhao Y Q. Current evaluation of the millennium phytomedicine- ginseng (I): Etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(19): 2475-2484.
- [2] 赵春丽, 李成国, 夏昉, 等. 中国人参产业发展现状及对策 [J]. *应用化学*, 2025, 42(9): 1282-1288.
- [3] Zhang H, Abid S, Ahn J C, *et al.* Characteristics of *Panax ginseng* cultivars in Korea and China [J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2635.
- [4] Du Y L, Fu X Z, Chu Y Y, *et al.* Biosynthesis and the roles of plant sterols in development and stress responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2332.
- [5] 尹艳, 关红雨, 张夏楠. 甾体皂苷生物合成相关酶及基因研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(8): 1332-1336.
- [6] Hou M Q, Wang R F, Zhao S J, *et al.* Ginsenosides in *Panax* genus and their biosynthesis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 1813-1834.
- [7] Guo C F, Xu S, Guo X Y. Genome-wide analysis of oxidosqualene cyclase genes in *Artemisia annua*: Evolution, expression, and potential roles in triterpenoid biosynthesis [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2025, 47(7): 545.
- [8] Gas-Pascual E, Berna A, Bach T J, *et al.* Plant oxidosqualene metabolism: Cycloartenol synthase-dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109156.
- [9] 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.
- [10] Hakim S E, Liu S Y, Herzog R, *et al.* Expansion of the stereochemical space of triterpenes by mining noncanonical oxidosqualene cyclases across the diversity of green plants [J]. *J Am Chem Soc*, 2025, 147(12): 10320-10330.
- [11] Wang K Y, Jiang S C, Sun C Y, *et al.* The spatial and temporal transcriptomic landscapes of ginseng, *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Sci Rep*, 2016, 5: 18283.
- [12] Liu Z H, Suarez Duran H G, Harnvanichvech Y, *et al.* Drivers of metabolic diversification: How dynamic genomic neighbourhoods generate new biosynthetic pathways in the Brassicaceae [J]. *New Phytol*, 2020, 227(4): 1109-1123.
- [13] 焉雅涛. 吉林人参 OSC 基因家族系统演化、功能分化及表达活动分析 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [14] Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. β -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.
- [15] Corey E J, Matsuda S P, Bartel B. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(24): 11628-11632.
- [16] Zhang H, Shibuya M, Yokota S, *et al.* Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*: Molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(5): 642-650.
- [17] Hayashi H, Hiraoka N, Ikeshiro Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of a cDNA for *Glycyrrhiza glabra* cycloartenol synthase [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(2): 231-234.
- [18] Guhling O, Hobl B, Yeats T, *et al.* Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 448(1/2): 60-72.
- [19] 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.
- [20] 郑蔚, 代佳妮, 严和琴, 等. 越南油茶 HMGCR 基因的克隆及表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2022, 20(13): 4296-4304.
- [21] 刘梦迪, 李长福, 章焰生. 葫芦巴环阿屯醇合酶基因的分离及其对薯蓣皂素合成的影响 [J]. *植物科学学报*, 2019, 37(1): 87-92.
- [22] Zhao H, Tang Q, Mo C, *et al.* Cloning and characterization of squalene synthase and cycloartenol synthase from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2017, 7(2): 215-222.
- [23] Duan Y Y, Du W Y, Song Z J, *et al.* Functional characterization of a cycloartenol synthase and four glycosyltransferases in the biosynthesis of cycloastragenol-type astragalosides from *Astragalus membranaceus* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(1): 271-283.
- [24] Lin X Y, Kaul S, Rounsley S, *et al.* Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 1999, 402(6763): 761-768.
- [25] Atsumi G, Kagaya U, Tabayashi N, *et al.* Analysis of the mechanisms regulating the expression of isoprenoid biosynthesis genes in hydroponically-grown *Nicotiana*

- benthamiana* plants using virus-induced gene silencing [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 14804.
- [26] Gas-Pascual E, Berna A, Bach T J, et al. Plant oxidosqualene metabolism: Cycloartenol synthase-dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109156.
- [27] Schnable P S, Ware D, Fulton R S, et al. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics [J]. *Science*, 2009, 326(5956): 1112-1115.
- [28] 于靖辉. 人参内生菌广泛靶向代谢组学分析及其对人参不定根的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2023
- [29] Yu J, Wang D, Zhao T, et al. Potential participants and regulatory factors in ginsenoside biosynthesis of *Panax ginseng* C.A. Meyer: The role of endophytic fungus PBF-08[J]. *Plant Science*, 2025, 358: 112553.
- [30] Jiang Z Q, Tu L C, Yang W F, et al. The chromosome-level reference genome assembly for *Panax notoginseng* and insights into ginsenoside biosynthesis [J]. *Plant Commun*, 2021, 2(1): 100113.
- [31] Van de Peer Y, Mizrahi E, Marchal K. The evolutionary significance of polyploidy [J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(7): 411-424.
- [32] Heidari P, Puresmaeli F, Mora-Poblete F. Genome-wide identification and molecular evolution of the magnesium transporter (MGT) gene family in *Citrullus lanatus* and *Cucumis sativus* [J]. *Agronomy*, 2022, 12(10): 2253.
- [33] Faraji S, Heidari P, Amouei H, et al. Investigation and computational analysis of the sulfotransferase (SOT) gene family in potato (*Solanum tuberosum*): Insights into sulfur adjustment for proper development and stimuli responses [J]. *Plants*, 2021, 10(12): 2597.
- [34] Almeida de Jesus D, Batista D M, Monteiro E F, et al. Structural changes and adaptative evolutionary constraints in flowering locus t and TERMINAL FLOWER1-like genes of flowering plants [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 954015.
- [35] 赵昕, 高雅, 胡英考, 等. 水稻CAS基因的克隆及分析 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(28): 13488-13489.
- [36] Milla P, Viola F, Bosso S O, 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.
- [37] 许勇, 李静, 蔡标, 等. 贝母中环阿屯醇合成酶的生物信息学分析 [J]. 生物技术通讯, 2018, 29(4): 481-485.
- [38] Rodriguez-Concepcion M, Lim S, Ha S H. Family alliances feeding the carotenoid pathway in tomato [J]. *J Exp Bot*, 2025, 76(21): 6327-6334.
- [39] 李月, 庞亚如, 成旭, 等. 酿酒酵母中胆固醇生物合成与优化的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4869-4885.

[责任编辑 时圣明]