金钗石斛 β-石竹烯合酶基因 *DnCAS* 的克隆与功能鉴定

刘陈沁[1]，王建玲[1]，付思静[1]，周兴宇[1]，李丹丹[1, 2*]

1. 贵州大学农学院，贵州 贵阳 550025
2. 贵州省道地药材种质创新与资源高效利用全省重点实验室，贵州 贵阳 550025

摘 要：目的 基于金钗石斛 *Dendrobium nobile* 基因组和转录组数据筛选获得一个在花中高表达的候选倍半萜合酶基因 *DnCAS*（原候选编号 *DnTPS55*）。**方法** 采用萜类合酶基因 *DnCAS*，以其全长 CDS 序列为参考模板，使用 Oligo7 设计 PCR 引物。PCR 对阳性菌测序，对验证正确菌株摇菌提取质粒，获得 pclone007-T/*DnCAS* 重组质粒。采用 GC-MS 检测金钗石斛花样品和第一次大肠杆菌共培养产物；采用 GC-FID 检测，结合石竹烯标准品进一步鉴定 *DnCAS* 基因功能。**结果** 该基因 CDS 全长 1 662 bp，编码 553 个氨基酸；预测蛋白相对分子质量为 64 900，理论等电点为 5.48，平均疏水性为−0.261，且不含信号肽。克隆 *DnCAS* 并构建 pET28a 重组表达载体后，将其与高产反式法尼基二磷酸（farnesyl diphosphate，FPP）的 pMevT-MBIS 质粒共同转化至大肠杆菌 C41。GC-MS 分析及 β-石竹烯（caryophyllene）对照品保留时间比对表明，β-石竹烯是该异源表达体系中可鉴定的 DnCAS 催化产物。挥发性代谢物分析显示，β-石竹烯是金钗石斛花中的主要倍半萜成分之一；qRT-PCR 结果显示，*DnCAS* 在花中的相对表达量最高。基于 AlphaFold3 预测结构的分子对接显示，FPP 与 DnCAS 模型的最优对接得分为−6.75 kcal/mol，TYR523、ARG267、ASN448、ARG445、ASP304 和 ASP308 等残基可能参与底物结合。**结论** 鉴定了 *DnCAS* 的 β-石竹烯生成活性，为解析金钗石斛花挥发性倍半萜的生物合成提供了候选基因资源。

关键词：金钗石斛；β-石竹烯合酶；功能鉴定；基因表达；倍半萜合酶

中图分类号：R282.12 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2026)22 - 9091 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.22.022

Cloning and functional characterization of β-caryophyllene synthase gene *DnCAS* from *Dendrobium nobile*

LIU Chenqin[1], WANG Jianling[1], FU Sijing[1], ZHOU Xingyu[1], LI Dandan[1, 2]

1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China
2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Efficient Utilization of Dao-di Herbs Resources, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective A candidate sesquiterpene synthase gene, *DnCAS* (original candidate identifier *DnTPS55*), with high transcript abundance in flowers was identified from *Dendrobium nobile* genomic and transcriptomic data. **Methods** The terpene synthase gene *DnCAS* was cloned using its full-length CDS sequence as the reference template, with PCR primers designed using Oligo7 software. Positive bacteria were identified by PCR sequencing, and plasmids were extracted from verified strains via shaking culture to obtain the pclone007-T/DnCAS recombinant plasmid. GC-MS was employed to analyze samples from *D. nobile* flowers and the initial *Escherichia coli* co-culture products. Furthermore, GC-FID analysis, combined with caryophyllene standards, was conducted to further characterize the function of the *DnCAS* gene. **Results** The full length of the CDS of this gene is 1 662 bp, encoding 553 amino acids, with a predicted molecular mass of 64 900, a theoretical isoelectric point of 5.48, an average hydropathicity of −0.261, and no predicted signal peptide. After *DnCAS* was cloned into the pET28a recombinant expression vector, the resulting construct and the high-yield *trans* farnesyl diphosphate (FPP)-overproducing plasmid pMevT-MBIS were co-transformed into *E. coli* C41. GC-MS analysis and retention-time comparison with an authentic β-caryophyllene standard indicated that β-caryophyllene was an identifiable product of *DnCAS* in this heterologous expression system. Volatile metabolite profiling showed that β-caryophyllene was one of the major sesquiterpenes in *D. nobile* flowers, while qRT-PCR analysis revealed that the relative transcript abundance of *DnCAS* was highest in flowers. Molecular docking based on an AlphaFold3-predicted structure yielded a best docking score of −6.75 kcal/mol for FPP and the *DnCAS* model and suggested that TYR523, ARG267, ASN448, ARG445, ASP304, and ASP308 may participate in substrate binding. **Conclusions** This study identified the β-caryophyllene-forming activity of *DnCAS* and provides

收稿日期：2026-03-06

基金项目：国家重点研发计划项目（2021YFD1601001）；贵州大学大学生创新创业训练计划项目资助（gzugc2024031）；贵州省中药材现代农业产业技术体系项目（GZZYCCYJSTX01）

作者简介：刘陈沁，女，本科生，从事药用植物分子生物学研究。E-mail: 1245355736@qq.com

***通信作者：**李丹丹，女，博士，讲师，从事兰科药用植物次生代谢产物生物合成与调控研究。E-mail: ddli3@gzu.edu.cn

candidate gene resources for elucidating volatile sesquiterpene biosynthesis in *D. nobile* flowers.

Key words: *Dendrobium nobile* L.; β-caryophyllene synthase; functional characterization; gene expression; sesquiterpene synthase

金钗石斛 *Dendrobium nobile* L.是历版《中国药典》收载的中药石斛基源植物之一，为兰科石斛属的传统名贵中药材。金钗石斛味苦、微咸且无毒，研究表明，金钗石斛主要活性成分有生物碱、倍半萜、菲和联苄类等，具有抗肿瘤、降血糖以及对神经系统保护等重要药理活性[1-3]。

萜类合酶（terpene synthase，TPS）催化不同异戊二烯基二磷酸底物形成结构多样的萜类骨架。植物 TPS 可根据底物与产物类型分为单萜、倍半萜和二萜等合酶；其中，倍半萜合酶（sesquiterpene synthase，STPS）通常定位于细胞质，以法尼基二磷酸（farnesyl diphosphate，FPP）为直接底物[4]。β-石竹烯合酶（β-caryophyllene synthase，CAS）属于 STPS，其产物特异性取决于活性口袋中 FPP 的构象及后续碳正离子环化过程。STPS 多属于 Class I TPS，含有参与金属离子和底物结合的 DDXXD 及 NSE/DTE 保守基序[5-7]。序列聚类和保守基序可用于判断候选蛋白的 TPS/STPS 属性，但不能单独证明其具体产物，仍需通过产物质谱、标准品保留时间及酶学证据完成鉴定。对不同物种 STPS 的挖掘与功能鉴定不仅有助于理解萜类代谢途径，也可为萜类化合物的生物制造提供基因资源，例如青蒿紫穗槐二烯合酶的功能研究促进了青蒿素前体的发酵生产[8]。

金钗石斛含有结构多样的倍半萜及倍半萜生物碱，但其相关代谢途径和 *TPS* 基因尚缺乏系统研究。本研究从金钗石斛基因组和转录组数据中筛选花中高表达的候选 *TPS* 基因 *DnCAS*（原候选编号 *DnTPS55*），完成基因克隆并利用 qRT-PCR 分析其组织表达模式；随后开展蛋白理化性质、系统发育和保守结构域分析，构建重组表达载体并在大肠杆菌 C41 异源体系中鉴定催化产物；最后基于预测结构开展 DnCAS 与 FPP 的分子对接。本研究旨在鉴定金钗石斛 β-石竹烯生物合成相关酶，并为后续催化机制和花香形成研究提供基础。

1 材料

样品采集自贵州赤水，是当地的主要推广品种“赤钗 1 号”，经贵州大学农学院李金玲教授鉴定为金钗石斛 *D. nobile* L.。采集后，于贵州大学石斛研究院栽种 3 年以上，取金钗石斛种子、原球茎、5 个月大组培幼苗及盆栽一年生茎、叶片、花 5 个组织于液氮中速冻后，并保存在−80 ℃备用。

2 方法

2.1 RNA 提取与反转录 PCR

参照诺唯赞公司（Vazyme）的 FastPure®Plant Total RNA isolation Kit RNA 提取试剂盒，对金钗石斛不同组织材料进行 RNA 提取，采用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测提取 RNA 的完整性，采用 Nanodrop 2000 分光光度计检测纯度和浓度，将提取的完整性和纯度较好的 RNA 用诺唯赞公司（Vazyme）的 the HiScript®II SuperMix for qPCR（gDNA wiper）cDNA 反转录试剂盒反转录，获得金钗石斛不同组织的 cDNA 模板。

2.2 基因克隆

课题组前期基于基因组和转录组信息筛选获得一个花中高表达的候选萜类合酶基因 *DnCAS*（原候选编号 *DnTPS55*），以其全长 CDS 序列为参考模板，使用 Oligo7 设计 PCR 引物（表 1）。PCR 反应体系为：2× High Fidelity master mix 8 μL；上游引物 0.3 μL；下游引物 0.3 μL；模板 0.5 μL；灭菌水（ddH_2O）补足至 20 μL，PCR 反应程序为：预变性 95 ℃，5 min；变性 95 ℃，15 s；退火 57 ℃，45 s；延伸 72 ℃，2 min，循环 32 次；终延伸 72 ℃，10 min。使用 1%的琼脂糖凝胶检测扩增产物，切胶回收目的条带，采用擎科公司 pclone007 Versatile Simple Vector Kit 连接 T 载体，菌落 PCR 后，对阳性菌测序，对验证正确菌株摇菌并提取质粒，获得 pclone007-T/*DnCAS* 重组质粒。

表 1 金钗石斛 *DnCAS* 基因序列扩增 PCR 中引物名称、序列及用途

Table 1 Primers names, sequences and uses in *DnCAS* gene sequence amplification PCR of *D. nobile*

引物名称	序列（5’-3’）	功能
DnCAS-F	ATGACATATGCTGGATCCTCCAACATTCATTCCCAAG	克隆
DnCAS-R	TTACTCCCATATGGACAAAATAGGTTCC	克隆
DnCAS-TY-F	tgggtcgcggatccgaattcATGACATATGCTGGATCCTCCAACATTCATTCCCAAG	重组
DnCAS-TY-R	tgcggccgcaagcttgtcgacTTACTCCCATATGGACAAAATAGGTTCC	重组
DnCAS-qPCR-F	AGAAGCAGCTCAGAGACGCA	qRT-PCR
DnCAS-qPCR-R	CCTTAAAAGTCGAAATCCCAACGCT	qRT-PCR

2.3 qRT-PCR 检测

qRT-PCR 引物见表 1，采用 KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix（2×）试剂盒，反应体系为 20 μL：Master Mix（2×）10 μL，上、下游引物各 0.4 μL，cDNA 1.0 μL、ddH_2O 8.2 μL。反应程序为 95 ℃预变性 3 min；95 ℃，5 s、56 ℃，30 s、72 ℃，5 s，40 个循环；随后进行 65 ℃、5 min 起始的熔解曲线分析。每个样品设置 3 个生物学重复，以种子为校准样品，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量，qRT-PCR 的内参基因选择 Li 等[9]筛选的最优内参 *DnActin* 和 *DnUBCE2*。

2.4 生物信息学分析

用 CLC Sequence Viewer 8.0 进行多序列比对分析；使用在线软件 WoLFPSORT（https://wolfpsort.hgc.jp）和 SignalP-4.1（https://services.healthtech.dtu.dk/）分别预测蛋白亚细胞定位和信号肽；采用 ExPASy Proteomics Server 在线工具 Protparam（https://web.expasy. org/protparam/）预测蛋白质分子量、等电点和平均疏水性；采用 MAFFT v7.526 对 19 条蛋白质序列进行多序列比对，并使用 ClipKIT 修剪低质量位点。随后基于 ModelFinder 筛选的最优模型（LG＋I＋G4），利用 IQ-TREE v2.4.0 构建最大似然树，分支支持度通过 1 000 次 SH-aLRT 和 1 000 次 UFBoot 评估，系统发育树采用中点定根方式展示。采用 AlphaFold3 预测 DnCAS 蛋白三维结构，并用 PyMOL 2.5.2 去除水分子、盐离子及非蛋白小分子。小分子化合物 2E，6E-FPP 的 3D 结构从 PubChem 数据库下载获取，并在 MMFF94 力场下进行能量最小化。采用 AutoDock Vina 1.2.3 软件进行分子对接工作，设置对接盒子，使之包裹整个蛋白，使用 PyMol 2.5.2 对接结果进行可视化分析，获得活性口袋附近的关键氨基酸残基位点。

2.5 表达载体构建

选择 pET28a 作为原核表达载体，以 EcoR I 和 Sal I 为酶切位点设计带载体同源臂的引物（表 1）。以 pclone007-T/*DnCAS* 重组质粒为模板扩增 *DnCAS*，回收目的片段；pET28a 空载体经 EcoR I 和 Sal I 双酶切后回收。载体与目的片段使用 2× Basic Assembly Mix 于 50 ℃连接 14 min，连接产物转化大肠杆菌 *DH5α* 感受态细胞，并涂布于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基。经菌落 PCR 和测序鉴定后，提取序列正确的 pET28a/*DnCAS* 重组质粒。

2.6 大肠杆菌体内诱导表达

将 pET28a 空载体和 pET28a/*DnCAS* 分别与高产 FPP 的前体质粒 pMevT-MBIS 共转大肠杆菌 C41 感受态细胞，涂布于含 50 mg/L 卡那霉素与 50 mg/L 氯霉素的 LB 培养基，37 ℃培养过夜，平均挑选平板上菌落到 2 mL 含抗生素液体培养基中，过夜培养。取 500 μL 种子液加入 50 mL LB 培养基，培养至 A_{600} 在 0.6～0.8 后，添加终浓度为 1 mol/L IPTG 和 1 mol/L $MgCl_2$，诱导培养 3 d；菌液中加等体积正己烷，于 200 r/min 振荡 30 min 后，超声处理 15 min，4 ℃条件静置过夜，取上层有机萃取相，用旋转蒸发仪浓缩样品，添加正己烷进行润洗并转移样品至 GC 样品瓶中，最终定容至 1.5 mL 用于 GC-MS 检测。

2.7 金钗石斛花中倍半萜萃取

取金钗石斛花约 1 g，于液氮中研碎至粉末，加入 50 mL 正己烷室温下振荡萃取 6 h，收集正己烷，使用旋转蒸发仪浓缩定容到 0.5 mL，用于 GC-MS 检测。

2.8 GC-MS 检测

金钗石斛花样品和第一次大肠杆菌共培养产物初步鉴定采用 GC-MS 检测。色谱分离采用 Agilent 19091S-436 HP-5MS 色谱柱（60 m×0.25 mm，0.25 μm），以氦气为载气，恒定体积流量为 1.0 ml/min，进样口采用不分流模式。程序升温条件为初始温度 40 ℃，平衡 1.00 min，3.50 ℃/min 升温至 180 ℃，随后 10.00 ℃/min 升温至 310 ℃。电子轰击离子源（EI），电子碰撞能量 70 eV，质谱传输线、离子源和四极杆的温度分别设定为 240、230、150 ℃。采集方式为全扫描模式（full scan），扫描范围 *m*/*z* 29～500。溶剂延迟时间为 3 min。将获得的质谱图与 NIST 质谱数据库（NIST23）进行比对，对化合物进行初步注释。

2.9 GC-FID 检测

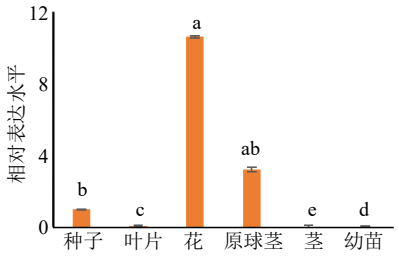
采用 GC-FID 检测，结合石竹烯标准品进一步鉴定 *DnCAS* 基因功能。采用安捷伦 7890 气相色谱仪进行分析，色谱分离采用 Agilent 19091S-436 HP-5MS 色谱柱（60 m×0.25 mm，0.25 μm）。以氦气为载气，恒定体积流量为 1.0 ml/min。采用不分流进样模式。柱温程序如下：初始温度设定为 100 ℃，保持 3 min；随后以 10 ℃/min 的速率升至 240 ℃；再以 20 ℃/min 的速率升至 300 ℃，并在 300 ℃下保持 3 min，总运行时间为 23 min。FID 检测器温度

设定为 320 ℃，氢气和空气的体积流量分别为 40 mL/min 和 450 mL/min。采用氮气作为尾吹气，体积流量设定为 25 mL/min。

3　结果与分析

3.1　基因克隆与组织表达模式分析

课题组前期基于金钗石斛基因组和转录组数据鉴定到一个花中高表达的萜类合酶基因，原编号为 *DnTPS55*，以花 cDNA 为模板扩增获得约 1 600 bp 的目的条带，T 载体克隆测序显示其 CDS 全长为 1 662 bp，与候选序列一致。根据后续异源体系中的产物鉴定结果，将该基因命名为 *DnCAS*；转录组数据提示 *DnCAS* 在花中的转录水平高于叶片和茎。为验证该表达模式，采用 qRT-PCR 检测 *DnCAS* 在种子、叶片、花、原球茎、茎和幼苗中的相对表达量。以种子为校准样品，*DnCAS* 在花中的相对表达量最高，在原球茎中次之，而在叶片、茎和幼苗中较低（图 1），该表达趋势与转录组筛选结果一致。



不同小写字母表示组间差异显著（$P<0.05$）。

Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

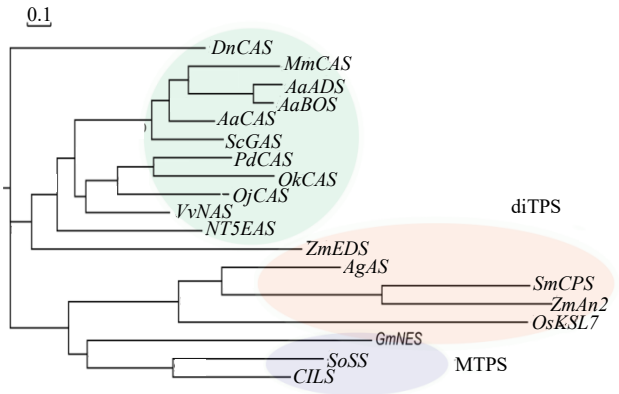
图 1　*DnCAS* 在金钗石斛不同组织中的相对表达量

Fig. 1　Relative expression levels of *DnCAS* in different tissues of *D. nobile*

3.2　*DnCAS* 的生物信息学、系统发育与保守结构域分析

DnCAS 的 CDS 全长为 1 662 bp，编码 553 个氨基酸；预测蛋白相对分子质量为 64 900，理论等电点为 5.48，平均疏水性为−0.261，不含信号肽，预测定位于细胞质。通过构建系统进化树进行亲缘关系分析，发现 DnCAS 与倍半萜合酶聚成一簇，与单萜和二萜合酶的遗传关系较远，值得注意的是，相较于其他 CAS，DnCAS 与其聚类为不同分支（图 2）。

进一步比较已知 CAS 的氨基酸序列发现，这些蛋白均含有 Class I TPS 典型的富天冬氨酸基序 DDXXD 及相对不保守的 NSE/DTE 相关基序（图 3）。DnCAS 与 OjCAS、OkCAS 和 PdCAS 在第一保守区域均含 DDIYD，而 MmCAS 和 AaCAS 分别含 DDTFD 和 DDTYD；第二保守区域中，DnCAS 和 MmCAS 呈 NDE 保守，OjCAS、OkCAS、AaCAS 和 PdCAS 则为 DDE 保守。上述保守基序支持 DnCAS 具备 Class I TPS 的结构基础，但具体残基功能仍需验证。



SoSS-鼠尾草（O81193.1）；ClLS-柠檬（AF514287.1）；MmCAS-小花蔓泽兰（FJ767894.1）；PdCAS-甜舌草（JQ731634.1）；OjCAS-水芹（OP593324.1）；OkCAS-樟脑罗勒（KP226502.1）；AaCAS-黄花蒿 CAS（AF472361.1）；GmNES-大豆（Glyma13g32380）；Nt5EAS-烟草（5EAU_A）；VvNAS-葡萄（Q6Q3H2.1）；AaADS-黄花蒿 ADS（Q9AR04.2）；AaBOS-黄花蒿 BOS（AFV40969.1）；ScGAS-加拿大一枝黄花（CAC36896.1）；ZmEDS-玉米（GRMZM2G010356）；SmCPS-丹参（ABV57835.1）；ZmAn2-玉米（NP_001105257.2）；AgAS-大果冷杉（Q38710.1）；OsKSL7-水稻（ABH10734.1）。

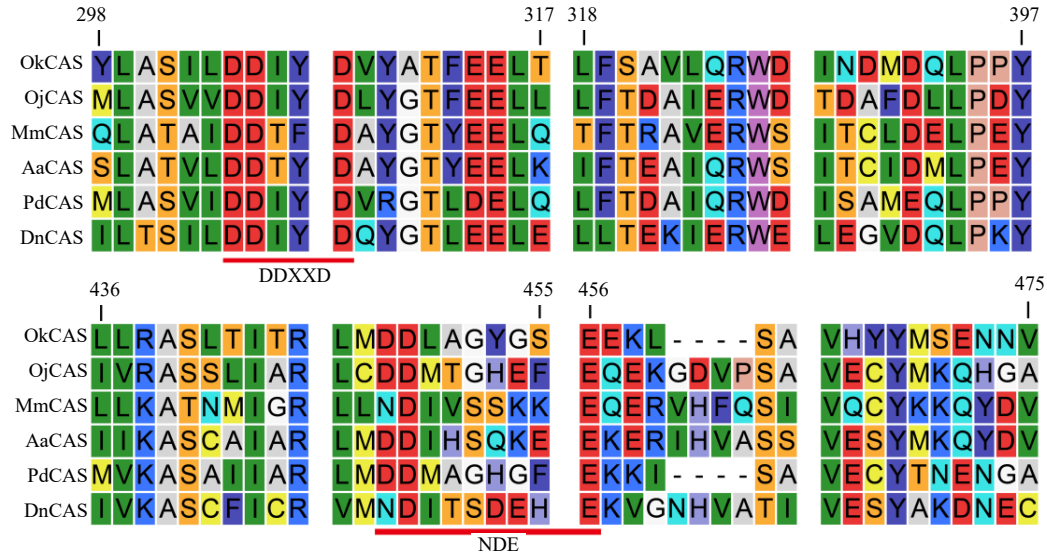
SoSS-*Salvia officinalis* L.（O81193.1）；ClLS-*Citrus* × *limon* (Linnaeus) Osbeck（AF514287.1）；MmCAS-*Mikania micrantha* Kunth in Humb. & al.（FJ767894.1）；PdCAS-*Phyla dulcis*（JQ731634.1）；OjCAS-*Oenanthe javanica* (Blume) DC.（OP593324.1）；OkCAS-*Ocimum kilimandscharicum*（KP226502.1）；AaCAS-*Artemisia annua* L. CAS（AF472361.1）；GmNES-*Glycine max* (L.) Merr.（Glyma13g32380）；Nt5EAS-*Nicotiana tabacum* L.（5EAU_A）；VvNAS-葡萄（Q6Q3H2.1）；AaADS-*Artemisia annua* L.ADS（Q9AR04.2）；AaBOS-*Artemisia annua* L. BOS（AFV40969.1）；ScGAS-*Solidago canadensis* L.（CAC36896.1）；ZmEDS-*Zea mays* L.（GRMZM2G010356）；SmCPS-*Salvia miltiorrhiza* Bunge（ABV57835.1）；ZmAn2-*Z. mays*（NP_001105257.2）；AgAS-*Abies grandis* (Douglas ex D. Don) Lindl.（Q38710.1）；OsKSL7-*Oryza sativa* L.（ABH10734.1）.

图 2　不同植物物种已鉴定 TPS 蛋白的系统发育分析

Fig. 2　Phylogenetic analysis of characterized TPS proteins from different plant species

3.3　原核表达载体构建及 DnCAS 在大肠杆菌中的功能鉴定

以 pclone007-T/DnCAS 为模板扩增获得约 1 600 bp 的 *DnCAS* 片段（图 4-a）；pET28a 经 EcoR I 和 Sal I 双酶切后获得线性化载体（图 4-b）。重组产物转化 DH5α 后，菌落 PCR 获得与预期大小一致的条带，测序结果与 *DnCAS* 序列一致，表明 pET28a/*DnCAS* 表达载体构建成功（图 4-c）。

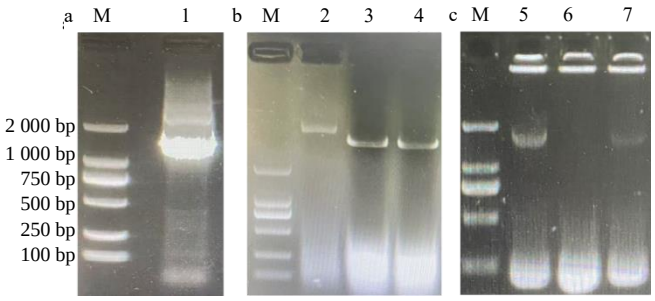


OkCAS-樟脑罗勒（KP226502.1）；OjCAS-水芹（OP593324.1）；MmCAS-小花蔓泽兰（FJ767894.1）；AaCAS-黄花蒿（AF472361.1）；PdCAS-甜舌草（JQ731634.1）；DnCAS-金钗石斛。

OkCAS-*O. kilimandscharicum* (KP226502.1); OjCAS-*O. javanica* (OP593324.1); MmCAS-*M. micrantha* (FJ767894.1); AaCAS-*A. annua* (AF472361.1); PdCAS-*P. dulcis* (JQ731634.1); DnCAS-*D. nobile*.

图 3　不同物种已知 CAS 酶的保守结构域分析

Fig. 3　Conserved-domain analysis of characterized CAS enzymes from different plant species



a-*DnCAS* 基因克隆；b-pET28a 载体双酶切鉴定；c-菌落 PCR 鉴定；M-Marker；1-扩增后产物；2-pET28a 空质粒电泳；3，4-酶切后电泳；5～7-阳性菌落 PCR 条带。

a-*DnCAS* gene cloning; b-double-enzyme digestion analysis of pET28a vector: c-colony PCR identification; M-Marker; 1-amplified product. 2-electrophoresis of pET28a empty plasmid; 3, 4-electrophoresis after double-enzyme digestion; 5—7-positive colony PCR bands.

图 4　*DnCAS* 基因原核表达载体构建

Fig. 4　Construction of prokaryotic expression vector carrying *DnCAS*

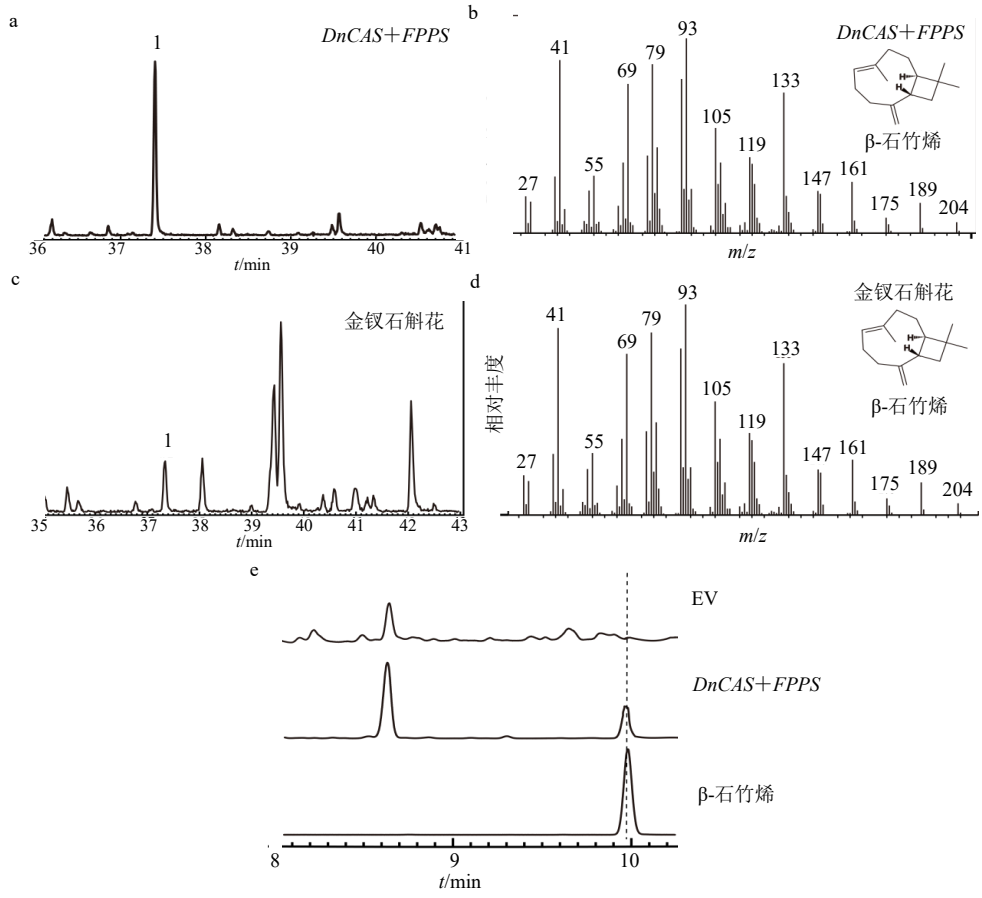
将 FPP 前体高产质粒 pMevT-MBIS 和 pET28a/*DnCAS* 在大肠杆菌 C41 中共表达，以 pMevT-MBIS 和 pET28a 空载体共转的 C41 菌株为对照，诱导后对有机萃取物进行 GC-MS 分析。结果揭示，在 37.4 min 产生一个特征峰（1 号峰）（图 5-a），其质谱图与 NIST 库中 β-石竹烯的匹配度为 98%（图 5-b）。金钗石斛花提取物中也检测到具有相同质谱特征的峰（1 号峰）（图 5-c、d）；在相同检测条件下，该峰与 β-石竹烯对照品具有一致的保留时间（图 5-e），证实 DnCAS 催化产物确为 β-石竹烯。

3.4　DnCAS 酶与 FPP 分子对接模拟分析

将基于 Alphafold3 预测的 DnCAS 酶蛋白三维结构为受体，FPP 为配体进行分子对接，结果揭示 DnCAS 酶与 FPP 低对接得分为−6.75 kcal/mol。候选结合构象显示，FPP 的二磷酸基团可能与蛋白残基 TYR523、ARG267、ASN448、ARG445、ASP304、ASP308 形成氢键或静电相互作用，其中蛋白残基 ASN448、ASP304、ASP308 位于 NSE 和 DDXXD 相关保守区域；残基 PHE23 和残基 VAL462 可能参与形成容纳 FPP 疏水链的局部环境；FPP 的焦磷酸基团带负电荷，与蛋白残基 ARG-445 和 ARG267 所带正电荷可能存在电荷吸引相互作用，使得 DnCAS 酶与 FPP 结合更加稳定。

4　讨论

植物倍半萜合酶通过控制 FPP 的离子化与环化过程产生多样的碳骨架，是挥发性信号、防御反应和植物-昆虫互作相关倍半萜形成的关键酶[10-11]。与保守基序相对稳定不同，产物特异性往往由活性口袋中少数残基及底物构象共同决定，因此功能相同的倍半萜合酶未必在系统树上

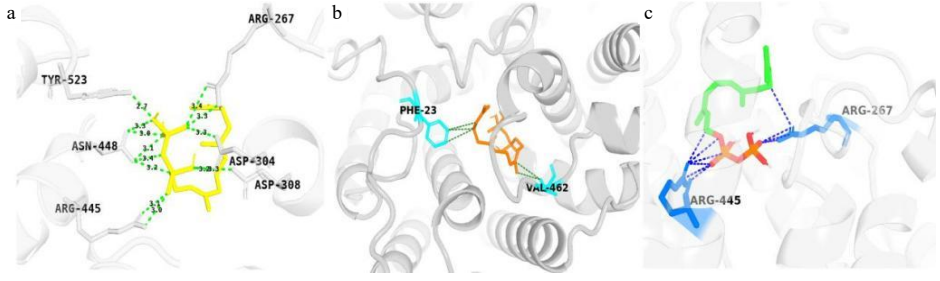


a-*DnCAS* 与 FPP 前体共表达后的产物色谱图；b-1 号峰的质谱图；c-金钗石斛花提取物的倍半萜色谱图；d-花提取物中 1 号峰的质谱图；e-*DnCAS* 异源体系产物与 β-石竹烯对照品的 GC-FID 色谱图。

a-GC chromatogram of products from the *DnCAS*/FPP-precursor coexpression system; b-mass spectrum of peak 1; c-GC chromatogram of sesquiterpenes detected in *D. nobile* flowers; d-mass spectrum of peak 1 from flower extract; e-GC-FID chromatograms comparing heterologous *DnCAS* product with an authentic β-caryophyllene standard.

图 5　*DnCAS* 在大肠杆菌 C41 中的功能鉴定

Fig. 5　Functional characterization of *DnCAS* in *Escherichia coli* C41



a-氢键作用力分析，绿色虚线表示氢键作用力，黄色为 FPP；b-疏水性作用分析，橙色为 FPP，青色表示参与疏水作用氨基酸残基；c-电荷吸引作用力分析，橙红色表示 FPP 带负电基团，蓝色表示带正电氨基酸残基，蓝色虚线表示电荷吸引作用力。

a-analysis of hydrogen-bond interactions, green dashed lines indicate hydrogen bonds, and FPP is shown in yellow. b-analysis of hydrophobic interactions, FPP is shown in orange, and amino acid residues involved in hydrophobic interactions are shown in cyan. c-analysis of electrostatic attractive interactions, negatively charged groups of FPP are shown in orange-red, positively charged amino acid residues are shown in blue, and blue dashed lines indicate electrostatic attractive interactions.

图 6　DnCAS 酶与 FPP 分子对接模拟分析

Fig. 6　Molecular docking analysis of DnCAS enzyme with FPP

形成单系分支。

本研究基于金钗石斛基因组和转录组数据筛选获得 1 个花中特异高表达的萜类合酶基因 DnCAS。生物信息学分析表明，DnCAS 编码 553 个氨基酸，定位于细胞质且不含信号肽，符合典型植物倍半萜合酶的结构特征[12]。进一步的系统发育分析显示，DnCAS 与已报道的倍半萜合酶聚为一类，但与其它来源的石竹烯合酶并未聚为完全一致的分支，提示兰科植物中的石竹烯合酶可能具有相对独特的进化特征。已有研究表明，不同物种中的倍半萜合酶虽然能够催化生成相同产物，但其氨基酸序列与进化来源可能存在明显差异，这种现象可能与倍半萜合酶长期趋同进化有关[13]。

DnCAS 含有 Class ITPS 典型的 DDXXD 和 NSE 保守结构域，为 FPP 离子化所需的金属依赖催化提供了结构基础[14]。已报道的 Class I TPS 中，DDXXD 和 NSE/DTE 区域共同参与二价金属离子及底物二磷酸基团的定位[14-15]。因此，DDXXD 与 NSE 结构域被认为是决定倍半萜合酶催化活性的关键区域。不过，保守基序的存在主要支持酶家族和催化类型判断，并不能解释 DnCAS 为何形成 β-石竹烯。

分子对接为候选残基筛选提供了结构假设。ASP304、ASP308 和 ASN448 等保守残基可能参与 FPP 二磷酸基团的定位，ARG267 和 ARG445 可能提供电荷互补，PHE23 和 VAL462 可能参与构成疏水环境，DnCAS 活性中心形成了由氢键、静电作用和疏水作用共同构成的复合催化体系，这些预测与 Class I TPS 的一般结合特征相符[16]，但对接得分不能直接等同于真实结合亲和力，也不能证明相关残基的催化作用。本研究尚未对这些位点进行定点突变或酶学验证，这是当前机制解释的主要局限；后续可比较突变体与野生型的酶活、动力学参数及产物谱，以验证各残基的具体作用。

DnCAS 在花中的相对表达量最高，且 β-石竹烯在花提取物中被检出，这一共现关系支持 *DnCAS* 可能参与花部挥发性倍半萜形成。β-石竹烯作为植物中广泛存在的挥发性倍半萜化合物，已被报道参与植物抗虫、防御响应以及吸引传粉昆虫等多种生态过程[17-18]。因此，*DnCAS* 可能在金钗石斛花香形成及植物生态适应过程中发挥重要作用，但其具体生物学功能仍有待进一步研究。

综上，本研究鉴定了金钗石斛 *DnCAS* 在异源体系中的 β-石竹烯生成活性，描述了其组织表达特征，并通过序列和结构分析提出了候选底物结合残基。该基因可作为进一步研究金钗石斛花挥发性倍半萜合成的候选对象，为后续开展 DnCAS 关键氨基酸定点突变、催化机制解析以及金钗石斛倍半萜代谢工程研究奠定了重要基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 杨梦, 郝志友, 刘志霞, 等. 赤水金钗石斛化学成分研究 [J]. 中药材, 2025, 48(4): 889-892.

[2] 令狐楚, 谷荣辉, 秦礼康. 金钗石斛的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7693-7708.

[3] 张静, 韩伟, 杨长福, 等. 金钗石斛化学成分和药理作用研究进展与质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(8): 1914-1928.

[4] 谌琴琴, 王丽平, 梁瑾, 等. 千里光橙花叔醇合酶 SsNES 的功能鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1334-1340.

[5] Peters R J, Carter O A, Zhang Y, *et al*. Bifunctional abietadiene synthase: Mutual structural dependence of the active sites for protonation-initiated and ionization-initiated cyclizations [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(9): 2700-2707.

[6] Köksal M, Hu H Y, Coates R M, *et al*. Structure and mechanism of the diterpene cyclase ent-copalyl diphosphate synthase [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(7): 431-433.

[7] Zhou K, Peters R J. Investigating the conservation pattern of a putative second terpene synthase divalent metal binding motif in plants [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(3): 366-369.

[8] Martin V J J, Pitera D J, Withers S T, *et al*. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796-802.

[9] Li K J, Deng X F, Wu Y, *et al*. Identification and validation of reference genes for qRT-PCR analyses under different experimental conditions in *Dendrobium nobile* [J]. *Med Plant Biol*. 2025, 4: e001.

[10] Arimura G I, Matsui K, Takabayashi J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: Proximate factors and their ultimate functions [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(5): 911-923.

[11] Karunanithi P S, Zerbe P. Terpene synthases as metabolic gatekeepers in the evolution of plant terpenoid chemical

diversity [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1166.

[12] Chen F, Tholl D, Bohlmann J, *et al*. The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the Kingdom [J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 212-229.

[13] Pichersky E, Lewinsohn E. Convergent evolution in plant specialized metabolism [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 549-566.

[14] Starks C M, Back K, Chappell J, *et al*. Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase [J]. *Science*, 1997, 277(5333): 1815-1820.

[15] 赵文婷, 魏建和, 孟 冬, 等. 3 种瞬时表达体系研究 1 个白木香倍半萜合酶的亚细胞定位 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3379-3385.

[16] 岳跃冲, 范燕萍. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展 [J]. 园艺学报, 2011, 38(2): 379-388.

[17] Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(7): 408-414.

[18] Knudsen J T, Eriksson R, Gershenzon J, *et al*. Diversity and distribution of floral scent [J]. *Bot Rev*, 2006, 72(1): 1.

[责任编辑 时圣明]