

张涛, 韩梅, 刘翠晶. 人参 *CYP716A53v2* 基因的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 53–56.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.012

人参 *CYP716A53v2* 基因的克隆与序列分析

张涛, 韩梅, 刘翠晶

(吉林农业大学中药材学院, 吉林长春 130118)

摘要: 研究人参皂苷生物合成途径中的影响因子。以五年生人参根组织为试验材料, 提取总 RNA, 反转录合成 cDNA 的第 1 条链, 利用 PCR 法对人参中的原人参三醇合成酶 (*CYP716A53v2*) 基因的 cDNA 进行克隆及序列分析。获得 *CYP716A53v2* 基因全长片段为 1 506 bp, 开放阅读框长 1 410 bp, 编码 470 个氨基酸多肽。生物信息学分析显示, *CYP716A53v2* 基因编码蛋白质不含跨膜区域。说明 *CYP716A53v2* 基因与其他植物氨基酸序列具有较高同源性, 其中与人参、西洋参、三七同源性分别为 99%、98%、98%。

关键词: 人参皂苷; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S567.5⁺10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0053-04

人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 为五加科人参属名贵药材, 自古以来是中国重要药用植物, 有“百草之王”的美誉。现代药理学研究表明, 人参皂苷为人参主要药效成分, 按苷元基本骨架可分为齐墩果烷型和达玛烷型, 属于三萜类化合物。目前, 已从人参中分离得到约 90 种人参皂苷单体^[1-3]。抗癌活性成分人参皂苷 Rg3 已经于 2000 年批准为一类新药^[4]; 随着老龄化人口增加和疾病的改变, 如心血管疾病和肿瘤人口的增加, 人参皂苷 Rg 和 Re 被命名为血管生长因子。人参皂苷含量和组成是人参质量的重要指标, 人参皂苷的含量较低, 人工合成次生代谢产物人参皂苷尚未实现, 对于一些含量甚

微的单体皂苷的新药开发还较为困难。人参皂苷的生物合成途径与功能基因的表达量之间的关系仍处于探究阶段。深入了解人参皂苷生物合成途径及其调控机理, 在分子水平上实现人参皂苷的人工合成, 这将是利用生物技术手段大量生产人参皂苷的必然前提。

原人参三醇合成酶 (*CYP716A53v2*) 是达玛烷型人参皂苷合成的重要调控酶, 原人参三醇合成酶催化原人参二醇到原人参三醇的过程, 相关试验研究认为, 细胞色素 P450 *CYP716A53v2* 基因 mRNA 表达量与三萜皂苷的生成量呈正相关^[5]。本试验对人参皂苷生物合成途径中的细胞色素 P450 *CYP716A53* 基因进行了克隆与序列分析, 目的在于从基因水平研究人参皂苷生物合成途径的调控机制, 实现三萜皂苷基因的高效表达, 增加人参药材的药效成分含量, 提高人参药材质量和经济价值, 为实现未来药材质量安全、可控、稳定、有效的发展目标提供理论依据。

收稿日期: 2015-05-05

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31270371); 国家科技支撑计划 (编号: 2011BAI03B01-02)。

作者简介: 张涛 (1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生态学。E-mail: 251073371@qq.com。

通信作者: 韩梅, 教授, 主要从事药用植物资源与药材质量评价。E-mail: hanmei77@sohu.com。

[4] 张增艳, 陈孝, 张超, 等. 分子标记选择小麦抗白粉病基因 *Pm4b*、*Pm13* 和 *Pm21* 聚合体[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 789–793.

[5] 徐如宏, 任明见, 黄世全, 等. 小麦抗病种质贵农 775 中抗白粉病基因的 RAPD 标记[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 243–247.

[6] 徐如宏, 张庆勤. 贵农系列高产, 多抗小麦新材料中 HMW-GS 的组成研究[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003: 193–197.

[7] 孙辉, 刘志勇, 李保云, 等. 利用 PCR 技术鉴定普通小麦 Glu-1 位点的某些等位基因[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 734–737.

[8] Smith R L, Schweder M C, Bamett R D. Identification of glutenin alleles in wheat and triticale using PCR-generated DNA markers[J]. Crop Science, 1994, 34(5): 1373–1378.

[9] 胡云, 徐如宏. 小麦高蛋白质含量基因 *GPC-B1* 的分子标记研究[J]. 天津农业科学, 2014, 20(9): 6–10.

[10] Joppa LR, Cantrell R G. Chromosomal location of genes for grain protein content in wild tetraploid wheat[J]. Crop Science, 1994, 30(5): 1059–1064.

[11] Joppa LR, Du C, Hart G E, et al. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines[J]. Crop Science, 1997, 37(5): 1586–1589.

[12] Mesfin A, Froberg R C, Anderson J A. RFLP markers associated with high grain protein from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides* introgressed into hard red spring wheat[J]. Crop Science, 1999, 39(2): 508–513.

[13] Dubcovsky J, Fahima T. Positional cloning of a gene responsible for high grain protein content in tetraploid wheat[R]. BARD Final Scientific Report, 2004.

[14] Avivi L. High protein content in wild tetraploid *Triticum dicoccoides* Korn[C]. Proceedings of the 5th International Wheat Genetics Symposium, 1978: 372–380.

[15] 梁荣奇, 张义荣, 尤明山, 等. 利用高分子量谷蛋白亚基的特异 PCR 标记辅助选育优质面包小麦[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(4): 322–325, 409.

1 材料与方法

1.1 材料

五年生鲜人参取自吉林省抚松县抚南林场,位于42°03′06″N、127°33′21″E,海拔903 m,用刀将根部切成小块放入冻存管迅速用液氮冷冻于-80℃保存待用,试验所用部位为人参根组织。

1.2 主要试剂和仪器

植物总RNA提取试剂盒,2×Power Taq PCR Mastermix,凝胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒,DNA连接试剂盒等均购自北京百泰克生物科技有限公司;PrimeScript Reverse Transcriptase 反转录试剂盒,LB培养基,JM109感受态菌株均购自大连宝生物工程有限公司。Eppendorf Mastercycler nexus PCR仪,德国;DYY-8C琼脂糖凝胶电泳仪,北京六一;GIS-2010凝胶成像系统,上海Tanon;HC-2518R高速冷冻离心机,MDF-382E超低温冰箱,日本SANYO等。

1.3 方法

1.3.1 人参根部组织总RNA的提取及反转录成cDNA的第1条链 按照植物总RNA提取试剂盒的提取步骤对人参根组织总RNA进行提取,RNA质量的检测用1%琼脂糖凝胶电泳。以提取的总RNA为模板,以Oligo-dT为引物,将RNA反转录合成cDNA,-20℃保存。

1.3.2 PCR扩增 根据GenBank上已报道的人参细胞色素P450 *CYP716A53v2* 基因cDNA(登录号为JX036031)序列设计引物,上游引物为53F:5′-GGGCAAAATCAGAAATTCT-TG,下游引物为53R:5′-TTAAAGCGTACAAGGTGAT-AGACG。以五年生人参根cDNA为模板,进行PCR扩增,PCR反应体系:去离子水7.4 μL,2倍Power Taq PCR Mastermix 10 μL,上、下游引物各0.8 μL,反转录产物1 μL。反应程序:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸2 min,35个循环;最后72℃延伸10 min。取5 μL扩增产物在1%琼脂糖凝胶电泳上检测。

1.3.3 细胞色素P450 *CYP716A53* 基因的克隆与序列分析

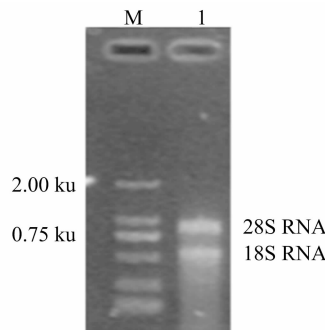
PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,放入紫外分析仪内切下目的片段,用凝胶回收试剂盒纯化回收,再将纯化回收目的片段与pMD20-T载体连接成重组质粒pMD20-T/*CYP716A53v2*,再转化到感受态细胞中进行克隆,涂布在X-gal、IPTG和Amp的LB平板上,在气候箱中37℃培养14~16 h,随机挑取10个白色菌落,摇菌培养12~14 h,通过质粒提取试剂盒提取质粒和菌落PCR进行快速鉴定,将阳性克隆菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。将测序获得的序列用DNAMAN 6.0整理翻译成氨基酸,通过ExPasy ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam/>.html)分析推测蛋白质的理化性质;采用TMHMM 2.0进行跨膜结构域预测;利用Blast搜索NCBI上的核苷酸数据库和氨基酸数据库中近缘物种的CYP序列信息,通过MEGA 5.0构建Neighbor-Joining系统进化树,Bootstrap重复次数为1 000。

2 结果与分析

2.1 人参总RNA质量检测

本试验采用试剂盒法将提取的人参总RNA经1%琼脂

糖凝胶电泳检测,结果见图1,所提取的总RNA呈现出28S rRNA和18S rRNA等2条条带,条带清晰完整,没有明显降解,说明总RNA提取成功。

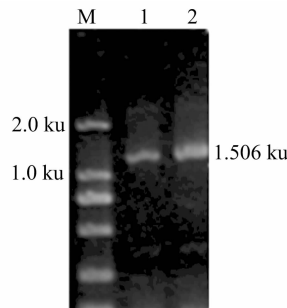


M—DL 2000 marker; 1—人参根部总RNA

图1 人参根组织总RNA

2.2 人参细胞色素P450 *CYP716A53v2* 基因PCR结果

以人参根组织cDNA为模板,用细胞色素P450 *CYP716A53v2* 基因的特异性引物进行PCR扩增,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,获得片段大小为1 506 bp(图2)。

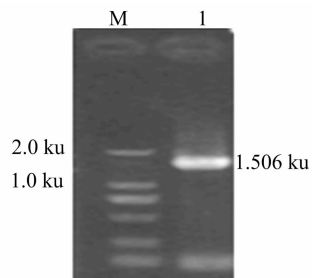


M—DL 2000 marker; 1~2—目的片段

图2 *CYP716A53v2* 基因的PCR结果

2.3 细胞色素P450 *CYP716A53v2* 基因的克隆与序列分析

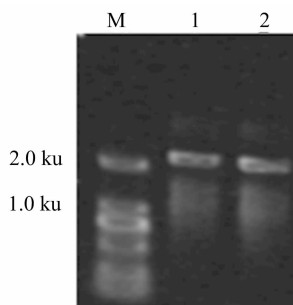
使用载体通用引物对阳性克隆菌液进行菌落PCR检测,获得大约1 506 bp片段(图3)。提取的质粒电泳结果显示(图4),质粒分子量较大,说明pMD20-T载体有外源基因片段插入,为阳性克隆。



M—DL 2000 marker; 1—菌落PCR产物

图3 菌落PCR的鉴定结果

对阳性克隆菌液进行测序,并利用DNAMAN软件进行序列拼接,得到1 506 bp碱基序列,翻译起始位点位于16 bp, PolyA位于1 423 bp,开放阅读框长1 410 bp,共编码470个氨基酸,与GenBank上发布的人参细胞色素P450 *CYP716A53v2* 基因的氨基酸(登录号为AF063031)序列完全相符,表明所得重组子是正确的(图5)。



M—DL 2000 marker; 1~2—阳性克隆

图4 重组质粒分子量鉴定结果

1	CAGAATCTT	GATC	ATGGA	TCTCTTATC	TTATCTCAAC	TACTTCTTCT	ACTAGTCTTT
61	TGCTTATTC	TCTTTTGAA	TTTCAAACCA	AGTAGCCAAA	ACAACTGCC	TCCGGGCAAA	
121	ACAGGATGG	CCATAATTGG	AGAAACACTA	GAATTCATCT	CCTGTGGCCA	AAAAGGCAAC	
181	CCTGAAAAGT	TCGTAACACA	AAGAATGAAC	AAATACTCCC	CTGATGTGCTT	CACAACATCC	
241	TTAGCAGCG	AGAAAATGGT	AGTTTCTGCG	GGTGCCTCGG	GGAACAAATT	CATTTCTCC	
301	AACGAAAACA	AGCTTGTGT	GTCTGGTGG	CCCCTGCCA	TATCCAAAAT	CCTAACTGCA	
361	ACAATACCTT	CGGTAGAGAA	AAGCAAAGCC	TGCGGAGTC	TAATGTGGA	ATTCTTAAAA	
421	CCCGAAGCG	CCCACAAGTT	TATTTCTGTC	ATGGATCGGA	CAACAGGCA	GCACTTGA	
481	GACAAATGGA	ACGGGAGTAC	AGAAGTGAAA	GCTTTCGCTA	TGTCAGAGTC	GCTGACTTTT	
541	GAGTTGGCCT	GTTGGCTGCT	CTTAGCATA	AATGATCCGG	TGCAGGTGCA	GAAGCTTCT	
601	CATCTTTTGG	AGAAGGTTAA	AGCGGGATTA	TGTCTTTAC	CTTTAAATTT	TCCGGGCACG	
661	GCTTTTAACC	GTGGGATCAA	GGCCGCCAAT	CTTATTAGAA	AAGAGCTTTC	GGTGGTGATA	
721	AAACAGAGGA	GAAGTGATAA	ATTACAGACT	CGAAAGGATC	TTTTGTCCCA	CGTTATGCTT	
781	TCCAATGGCG	AGGGCGAGAA	ATTTTTCAGC	GAAATGGATA	TGCGGACGT	TGTTCTTAAT	
841	TTACTGATTG	CTAGCCATGA	TACCACTAGC	AGTGCCATGG	GCTCTGTGGT	CTACTTCTCT	
901	GCAGATCATC	CTCACATCTA	TGCTAAAGTC	CTCACAGAAC	AAATGGAGAT	CGCAAAGTCG	
961	AAAGGGGCAG	GAGAACTTTT	GAGCTGGGAG	GACATAAAGA	GGATGAAGTA	TTCCCGCAAT	
1021	GTTATAAATG	AAGCTATGAG	ATTAGTACCT	CCTTCTCAAG	GAGGTTTAA	AGTAGTTACA	
1081	AGTAAATTC	GTTACGCAAA	CTTCATCATT	CCCAAAGGAT	GGAAGATCTT	TGGAGCGTA	
1141	TACTCGACAC	ATAAAGATCC	CAAATACTTT	AAAAATCCAG	AGGAGTTTGA	TCCTTCAAGA	
1201	TTTGAAGGAG	ATGGACCTAT	GCCATTACCA	TTTATACCAT	TGAGAGGAGG	ACCAAGGATG	
1261	TGCCCTGGGA	GTGAGTTTGC	TCGTCTGGAG	GTACTAATAT	TCATGCACCA	TTTGGTTACC	
1321	AATTTTAAAGT	GGGAGAAGGT	GTTTCCCAAT	GAAAAGATTA	TTTATACTCC	ATTTCCCTTC	
1381	CCGGAGAATG	GTCTTCCTAT	TCGTCTATCA	CCTGTACGCG	TTTAAATCC	ATATGACTAG	
1441	TAGATCCTCT	AGAGTCGACC	TGCAGGCATG	CAAGCTTTCC	CCTATAGTGT	CACCTAAATA	
1501	GCTGGC						

图5 克隆的人参细胞色素P450 CYP716A53v2基因核苷酸序列

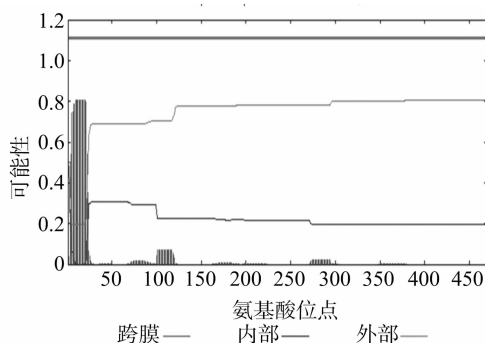


图6 人参P450 CYP716A53v2基因蛋白跨膜区域的预测

人参 CYP 基因与其他植物 CYP 基因具有较高的亲源性, 分别达到人参 (AF036031) 99%、西洋参 (AGC31652) 98%、三七 (AHK23636) 98%、西洋参 (AED99872) 97%、刺五加 (AHA50080) 84%。人参 CYP 基因与其他植物相关基因系统发育树见图 7。人参 CYP 基因与五加科植物三七 (AHK23636)、人参 (AF036031)、西洋参 (AGC31652)、刺五加 (AHA50080) 以及西洋参 (AED99872) 亲缘性较高, 与植物

利用 ExPasy ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam/>) 在线工具分析人参 P450 CYP716A53v2 基因编码蛋白的理化性质。推测其蛋白相对分子质量为 53.297, 分子式为 $C_{2458}H_{3793}N_{619}O_{665}S_{20}$, 总原子数为 7 555。理论等电点为 9.12, 带正电残基 (精氨酸 + 赖氨酸) 为 56, 带负电残基 (天冬氨酸 + 谷氨酸) 为 46。该蛋白的不稳定系数为 38.57, 表明人参 P450 CYP716A53v2 基因编码的蛋白不稳定。脂肪系数为 85.82, 亲水性系数为 -0.081, 表明其为亲水蛋白。利用 TMHMM2.0 进行蛋白跨膜分析, 人参 P450 CYP716A53v2 基因编码的蛋白质没有跨膜区域 (图 6)。

种属之间的进化相符。

3 结论与讨论

人参皂苷的成分及总皂苷的含量是评价人参药材质量的重要指标, 三萜皂苷作为人参药材的次生代谢产物, 其中, Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re、Rg1 等是主要成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、降血糖、保肝护肝等功效^[6-8], 尤其是 Rg1 对心血管系统、免疫系统、神经系统起到一定的调节作用, 还具有抑制细胞凋亡、扩张血管、抗衰老、运动疲劳的恢复等作用^[9]。目前, 有关人参皂苷积累和形成规律的研究尚不充分, 制约了人参药材质量调控机制的研究, 已成为进一步提升人参药材质量的制约因素^[10]。

人参细胞色素 P450 CYP716A53v2 催化原人参二醇到原人参三醇, 四环三萜皂苷从达玛烷二醇羟基化之后是由 CYP (P450) 和糖基转移酶的糖基化进行合成的, 原人参二醇合成酶 (CYP716A47) 催化达玛烷二醇 C-12 位置羟基化, 得到原人参二醇, 原人参三醇合成酶 (CYP716A53v2) 催化原人参二醇得到原人参三醇^[4], 再经由糖基化得到单体皂苷 Rg1。本

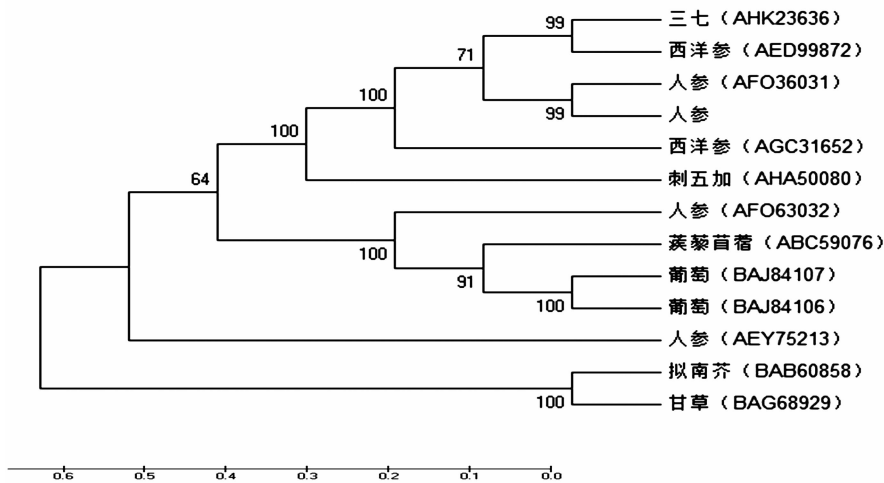


图7 人参CYP716A53v2基因系统发育树

试验所克隆的人参细胞色素 P450 *CYP716A53v2* 基因与三七、西洋参、刺五加等植物细胞色素 CYP (P450) 基因序列同源性都很高, 它们均属于植物三萜类化合物积累和形成的重要调控限速酶——细胞色素氧化酶家族, 同时该试验也验证了种属亲缘关系越近, 代谢产物越趋同的观点。笔者认为, 可以从人参属其他植物的次级代谢产物中寻找人参皂苷的替代产物。Han 等对 *CYP716A* 的 2 个亚族基因 (*CYP716A52v2* 和 *CYP716A53v2*) 进行了判定, 经过过茉莉酸甲酯的处理, 重组 WAT21 酵母的异位表达转接到培养基中培养, 体外酶活性测定以及液体色谱和大气压化学电离质谱的确定^[4-5], 结果表明, *CYP716A53v2* 基因的产物是原人参二醇 6 羟化酶, 它是达玛烷型三萜苷元在人参皂苷生物合成中的重要步骤, 而 *CYP716A52v2* 基因的产物是 β -香树素 C28 位羟基化酶, 其催化 β -香树素生成齐墩果酸, 再经由糖基化生成单体皂苷 Ro。因此, 人参细胞色素 P450 *CYP716A53v2* 基因在一定程度上可以决定人参皂苷生物合成的方向, 可以在分子水平上用于调节人参皂苷的生物合成, 对于进一步提高人参药材质量具有重要指导意义。

通常情况下次生代谢产物是药用植物的主要药效成分, 是药材质量的重要标志^[11], 即含量及药效成分是药用植物的表现型, 表现型是由基因型和环境条件共同作用的^[12]。所以, 清晰地认识以次生代谢产物为主体的药效成分的形成积累规律及其生态学和分子生物学机制, 是实现药材质量控制的重要前提, 也是目前药材质量控制技术研究的瓶颈^[13-14]。从生态学与分子生物学角度, 开展人参皂苷形成与积累规律的研究, 阐明其影响主导生态因子和调控机制, 对进一步实现人参药材质量调控具有重要指导意义, 进而实现人参药材质量“安全、稳定、可控、有效”的目标。

参考文献:

[1] 黎 阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-166.

- [2] Dong H J, Jiang B H, Han Y, et al. Transformation of compound K from saponins in leaves of *Panax ginseng* by immobilized β -glucanase[J]. Chin Herb Med, 2010, 2(1): 41-47.
- [3] Christensen L P. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2009, 55: 1-99.
- [4] 薛 蛟, 王英平, 肖盛元. 人参皂苷生物合成及调控功能基因研究进展(1)[J]. 特产研究, 2014, 36(3): 72-78.
- [5] Han J Y, Hwang H S, Choi S W, et al. Cytochrome P450 *CYP716A53v2* catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(9): 1535-1545.
- [6] Wang C Z, Yuan C S. Potential role of ginseng in the treatment of colorectal cancer[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2008, 36(6): 1019-1028.
- [7] Kim S J, Yuan H D, Chung S H. Ginsenoside Rg1 suppresses hepatic glucose production via AMP-activated protein kinase in HepG2 cells [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2010, 33(2): 325-328.
- [8] Park J D, Rhee D K, Lee Y H. Biological activities and chemistry of saponins from *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. Phytochemistry Reviews, 2005, 4(2/3): 159-175.
- [9] 黄海英. 人参皂苷 Rg1 药理作用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(7): 608-609.
- [10] 侯双利, 刘翠晶, 杨利民, 等. 人参鲨烯环氧酶基因的克隆与序列分析[J]. 吉林农业大学学报, 2014(2): 149-152, 170.
- [11] 黄璐琦, 郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 277-280.
- [12] 林红梅, 杨利民, 韩 梅, 等. 人参药效成分合成与调控机制研究进展[J]. 人参研究, 2013, 25(4): 42-46.
- [13] 徐 雷, 张 群, 刘常丽, 等. 茯苓菌核不同药用部位有效成分含量[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(6): 289-290.
- [14] 成明超, 李丹霞, 王康才, 等. 5 个药用菊花品种类型主要化学成分的动态累积[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 213-215.