

低温胁迫下人参愈伤组织中 氧化鲨烯环化酶基因家族的表达特性分析

刘佳^{1,2}, 付爽¹, 王萌¹, 王景然¹, 全雪丽¹, 吴松权^{1,2}

(1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002)

摘要:以培养3周的新鲜人参愈伤组织为试材,分别进行5℃持续低温处理与25℃/5℃培养12 h/12 h间歇低温处理,取材时间为0、1、2、3、4 d,分别设为CK、D1、D2、D3、D4处理,通过实时荧光定量PCR检测5种氧化鲨烯环化酶(OSC)基因在不同处理中的表达。结果表明:*PgDAS*的表达在持续式低温胁迫D4处理和间歇式低温胁迫D3处理中被显著诱导并达到峰值,分别为对照组的2.15、2.12倍;而*PgβAS1*与*PgβAS2*的表达仅在持续式低温胁迫D2处理中被诱导,分别为对照组的1.27、1.71倍;*PgCAS*与*PgLOS*的表达在2种低温胁迫中均未被诱导。表明*PgDAS*可能在响应不同低温胁迫时起到关键作用,而其它氧化鲨烯环化酶基因协同表达。

关键词:人参;愈伤组织;低温胁迫;氧化鲨烯环化酶;表达特性

中图分类号:S 567.5⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)17-0164-05

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)属五加科人参属多年生药用草本植物,被誉为“草药之王”,在我国主要分布在辽宁、吉林和黑龙江的部分地区^[1]。《中国药典》2010版规定正品人参为五加科植物人参的干燥根和根茎^[2]。人参根具有多种生物活性,包括抗癌、抗氧化和抗疲劳等,同时也具有改善记忆力和抗心血管疾病作用^[3]。人参皂苷属于三萜类皂苷,是人参中主要的活性物质^[4]。研究表明三萜类皂苷的生物合成经甲羟戊酸途径(MVA)合成前体物质2,3-氧化鲨烯,随后经不同氧化鲨烯环化酶(OSC)的作用形成各种不同结构的三萜类化合物^[5]。目前已在人参中发现了5种不同类型的OSC,分别为β-香树素合成酶(beta-

amyrin synthase, β-AS)^[6], 达玛烷型合成酶(Dammarenediol synthase, DAS)^[7], 环阿屯醇合成酶(Cycloartenol synthase, CAS)^[8-9], 羽扇豆醇合成酶(Lupeol synthase, LUS)^[10], 羊毛甾醇合成酶(Lanosterol synthase, LS)^[11]。

在生长和发育过程中,植物经常遭受各种各样的生物和非生物胁迫。东北是我国人参的主产区,其中低温是主要的非生物胁迫因子之一^[12]。适当的低温可诱导植物中多种基因的表达和次生代谢物的积累,包括三萜类化合物^[13]。谢彩香等^[14]推测在一定温度范围内,降低温度会引起人参皂苷含量的增加,对人参皂苷有效成分的积累起到促进作用。JIANG等^[15]通过试验证实持续与间歇式低温分别诱导了愈伤组织中PPT型和PPD型人参皂苷的积累。虽然学者们对于人参OSC基因家族的研究已经取得了一定进展,但低温胁迫下人参OSC基因家族表达的变化仍未见报道。因此该研究以人参愈伤组织为试材,研究了持续和间歇式低温胁迫对人参中5种氧化鲨烯环化酶基因(*PgDAS*、*PgβAS1*、*PgβAS2*、

第一作者简介:刘佳(1993-),女,硕士研究生,研究方向为植物生物技术。E-mail:1977674738@qq.com.

责任作者:吴松权(1972-),男,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事植物种质等研究工作。E-mail:arswsq@ybu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21462044)。

收稿日期:2017-03-31

PgLOS、*PgCAS*)表达特性的影响。比较了不同低温处理前后基因表达差异,以探索低温胁迫与氧化鲨烯环化酶基因表达调控的关系,以期阐明低温胁迫下人参皂苷的生物合成机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试人参由延边大学农学院植物学教研室石铁源教授鉴定为人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer, 源自吉林省汪清县。人参愈伤组织的诱导和培养参照刘佳等^[16]方法。人参愈伤组织的诱导和继代培养基为 1%琼脂,3%蔗糖和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 二氯苯氧乙酸(2,4-D)的 67-V 培养基,pH 5.8,培养条件为 25 °C 暗培养。

供试药品与试剂:Trizol 试剂购自 Life Technology 公司(美国);反转录试剂盒购自 Toyobo 公司(中国);SYBR Green 试剂盒购自 TaKaRa 公司(中国);其它试剂均为国产分析纯。

供试仪器:电子天平(上海精密科学仪器有限公司);DW-86L828 超低温保存箱(中国 Haier 公司);TC-412PCR 仪(英国 Techne 公司);Mx3005P 荧光定量 PCR(美国 Agilent 公司);CR22GⅢ高速离心机(日本 Hitachi 公司);Nano-drop 2000 超微量紫外分光光度计(美国 Nano-drop 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 取材方法

选取 25 °C 培养 3 周的新鲜人参愈伤组织,分别进行 5 °C 持续低温处理与 25 °C/5 °C,培养 12 h/12 h 间歇低温处理,取材时间为 0、1、2、3、4 d,分别设为 CK(对照)、D1、D2、D3、D4 处理。所得样品用液氮速冻并在 -80 °C 超低温保存。

1.2.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第一条链的合成

称取 0.5 g 人参愈伤组织,严格按照 Trizol 说明书所提供的方法提取总 RNA。将所得的总 RNA 浓度稀释至 $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 后,参照 Toyobo 公司 ReverTra AceR qPCR RT Kit 反转录试剂盒要求进行反转录合成 cDNA 第一条链,保存在 -20 °C 冰箱待备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 以所得 cDNA 为模板,采用 SYBR 染料法,PCR 循环条件设置如下:95 °C,10 min;95 °C,10 s;60 °C,10 s;72 °C,20 s,共 40 个循环,特异引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量(*Actin* 为对照),其中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{基因}} - C_{tPgActin})_{\text{处理}} - (C_{t\text{基因}} - C_{tPgActin})_{\text{对照}}$,具体方法参照 LIVAK 等^[17]的方法。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers for real-time PCR

目的基因 Target genes	引物序列 Primers name	基因登录号 Primer sequences
<i>PgActin</i>	正向引物:GGAAAAGATTTGGCATCACACCT 反向引物:TCGGCTTGAATAGCAACATACAT	AY907207
<i>PgDAS</i>	正向引物:AATGAGTTGGTGGCAGAAGAT 反向引物:GGTGGCGATAATTGCTTGAGTAG	AB122080
<i>PgβAS1</i>	正向引物:CCGCCTCCGATACTCTGCTA 反向引物:GACCCAACACCTCTTCACCGT	AB014057
<i>PgβAS2</i>	正向引物:GACCAAGGGTGAAGGAAAA 反向引物:CCCCAAGTGAAGGTGGAGGAT	AB009031
<i>PgCAS</i>	正向引物:TGCTGAAGAATACGGTCCAACCTC 反向引物:CCTTTTGAAACATGGCGATACC	JN604536
<i>PgLOS</i>	正向引物:ACGAGGAGATGAGGAGGAGGA 反向引物:CCCCAGGAGGAATGTAGGT	JX036031

1.3 数据分析

利用 IBM SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。

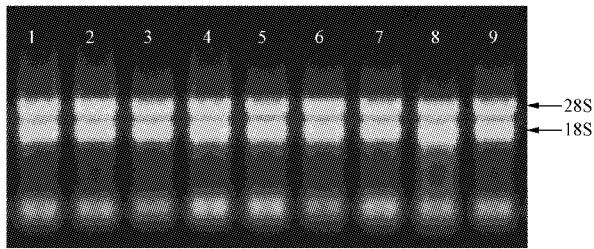
2 结果与分析

2.1 人参愈伤组织总 RNA 的获得

将人参愈伤组织中提纯分离的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳后显示出 18S、28S 共 2 条明亮清晰的条带(图 1)。利用紫外可见分光光度计检测总 RNA 样品质量,其 OD_{260}/OD_{280} 均在 1.8 ~ 2.1。说明所提取的 RNA 样品完整性与纯度良好,可用于后续试验。

2.2 持续式低温胁迫对人参愈伤组织中氧化鲨烯环化酶(OSC)基因家族表达的影响

利用实时荧光定量 PCR 评估了持续式低温胁迫下 5 种氧化鲨烯环化酶(OSC)基因的表达水平。由图 2 可知,*PgDAS* 在持续式低温 D1、D3 处理显著下降,但在 D2、D4 处理显著增加到对照



注:1. CK;2~5. 持续式低温胁迫 D1、D2、D3、D4;6~9. 间歇式低温胁迫 D1、D2、D3、D4。

Note: 1. CK; 2~5. D1, D2, D3, D4 of continuous chilling stress treatment; 6~9. D1, D2, D3, D4 of intermittent chilling stress treatment.

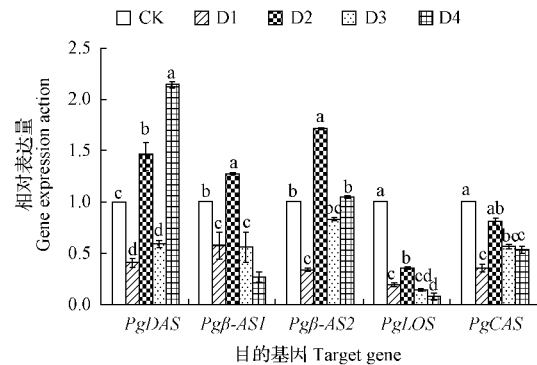
图1 不同低温处理下人参愈伤组织总RNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA in ginseng callus tissue by different chilling stress treatments

水平以上,并于D4处理达到峰值,为对照的2.15倍。 $Pg\beta AS1$ 与 $Pg\beta AS2$ 的表达量在处理初期均显著下降,且均在D2处理获得峰值,分别为对照的1.27、1.71倍;不同的是 $Pg\beta AS1$ 在D3、D4处理逐步下降,而 $Pg\beta AS2$ 在D4处理则呈现增加,并达到了对照水平。在整个持续低温处理过程中, $PgLOS$ 的表达水平均显著低于对照,并且都在正常水平的50%以下。 $PgCAS$ 在低温处理初期其表达量迅速下降,但于D2处理恢复到正常水平,随后在D3、D4处理显著下降。

2.3 间歇式低温胁迫对人参愈伤组织中氧化鲨烯环化酶(OSC)基因家族表达的影响

由图3可知, $PgDAS$ 表达量在D1处理显著降低,随后逐渐增加,于D3处理达到峰值,此时为对照的2.12倍。 $Pg\beta AS1$ 的表达在处理前期显著降低,但D1与D2处理无显著变化;在处理后期继续下降,其表达量在D4处理仅为对照25%左右。在 $Pg\beta AS2$ 观察到了类似的趋势。不同于 $Pg\beta AS1$ 与 $Pg\beta AS2$, $PgLOS$ 的表达在处理初期(D1处理)显著降低,但在随后的D2、D3、D4处理增加并恢复到对照水平,且在3个处理无显著变化。 $PgCAS$ 的表达水平在整个处理期间均以可以较低的水平检测,但D4处理的相对表达量仅为对照的26%左右。



注:不同小写字母代表 $P < 0.05$ 水平的显著性差异。下同。

Note: Different lowercase letters above the bars mean significant at $P < 0.05$, the same below.

图2 持续式低温胁迫对人参愈伤组织中氧化鲨烯环化酶(OSC)基因家族表达的影响

Fig. 2 Effects of continuous chilling on the expression of squalene cyclase (OSC) gene family in ginseng cells

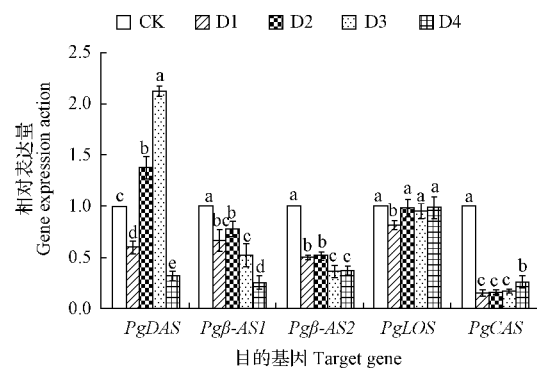


图3 间歇式低温胁迫对愈伤组织中氧化鲨烯环化酶(OSC)基因家族表达的影响

Fig. 3 Effects of intermittent chilling on the expression of squalene cyclase (OSC) gene family in ginseng cells

3 讨论与结论

人参皂苷的生物合成是由多种基因共同作用完成的,受多种因素调节、非常复杂的动态变化过程^[18]。我国栽培人参主要分布在东北地区,复杂的气候条件使其经常遭受各种非生物胁迫,而低温是我国北方最为重要的植物非生物胁迫因子之一^[12]。在分子水平上,植物主要通过改变基因的

表达来响应低温胁迫,通过调控不同代谢途径和信号转导途径,从而在转录和翻译水平上作出响应^[12]。氧化鲨烯环化酶(oxido squalene cyclase, OSC)催化 2,3-氧化鲨烯生成甾醇或三萜类化合物前体物质,通常是该反应的关键酶^[19-20]。

PgDAS 一直以来被认为是人参皂苷生物合成的关键基因^[21]。在持续和间歇式低温处理中, *PgDAS* 的表达均被显著诱导。JIANG 等^[15]报道了在人参愈伤组织中,持续式和间歇式低温胁迫刺激了 PPT 型与 PPD 型人参皂苷的积累,表明 *PgDAS* 在不同低温处理中可能起到关键作用。HUANG 等^[22]也报道了在人参愈伤组织中,二环己基碳二亚胺(DCCD)诱导的 *PgDAS* 转录水平的快速增加可能是 PPT 型(Rg1 和 Re)和 PPD 型(Rb1、Rc 和 Rd)人参皂苷产量增加的原因。此外,达玛烷二醇由超量表达 *PgDAS* 积累^[23],而且 *PgDAS* 表达使不能自然合成达玛烷二醇的微生物比如酵母中也能合成达玛烷二醇^[24]。由此推测 *PgDAS* 可能是人参愈伤组织响应不同低温胁迫时人参皂苷生物合成的关键基因,同时也是快速响应低温的基因。

PgβAS1 和 *PgβAS2* 的转录水平在间歇式低温处理时无显著增加(图 3),而在持续低温处理时的 D2 处理均被显著诱导(图 2)。LIU 等^[25]报道了 β AS 在使用 MJ 处理时,其表达量显著增加,并且伴随着齐墩果酸的显著增加。表明了 β AS 可能未参与人参皂苷的生物合成。同为氧化鲨烯环化酶的 *PgCAS* 的转录水平在整个间歇式低温处理时期均显著低于对照,仅在持续式低温处理的 D3 处理恢复到了对照水平, HAN 等^[26]研究表明 *PgCAS* 主要负责甾醇的生物合成。*PgLOS* 在 2 种低温胁迫处理中均未被显著诱导,甚至在持续式低温胁迫中仅以较低的水平检测到。有研究表明,植物中的 *LOS* 主要负责羊毛甾醇的生物合成^[27]。人参中的氧化鲨烯环化酶基因(*PgDAS*、*PgβAS1*、*PgβAS2*、*PgCAS*、*PgLOS*)竞争同一前体物质 2,3-氧化鲨烯,因此推测 *PgDAS* 表达量的显著增加并伴随着人参皂苷含量的提高,可能使前体物质减少,导致其它氧化鲨烯环化酶的表达量受到影响。有趣的是,在 2 种低温胁迫处理中,基因的表达多在 D1、D4 处理呈现较低水平。植物对低温的响应可分为应激

阶段和增强耐受阶段,因此在处理初期(D1)的应激阶段,基因表达水平往往较低;随后植物逐渐适应低温,基因表达升高(D2、D3);而到处理后期(D4),随着前体物质的逐渐消耗和植物体内活性氧的增加,基因的表达往往被再次抑制^[28]。

综上所述,该研究首次分析了不同低温胁迫对人参愈伤组织中氧化鲨烯环化酶(OSC)表达特性的影响,发现了 *PgDAS* 在响应不同低温胁迫时起到关键作用。而目前对于 *PgDAS* 在低温下的响应机制与催化调控机制尚不明确,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 黄立兰,程文胜,陈耀娣,等. 人参指纹图谱的研究进展[J]. 中草药,2013,44(2):241-246.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1 部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [3] XIAO D, YUE H, XIU Y, et al. Accumulation characteristics and correlation analysis of five ginsenosides with different cultivation ages from different regions[J]. Journal of Ginseng Research, 2015, 39(4): 338-344.
- [4] 杨金玲,高丽丽,朱平. 人参皂苷生物合成研究进展[J]. 药学报,2013,48(2):170-178.
- [5] 罗红梅,宋经元,李雪莹,等. 人参皂苷合成生物学关键元件 HMGR 基因克隆与表达分析[J]. 药学报,2013,35(2):219-227.
- [6] KUSHIRO T, SHIBUYA M, EBIZUKA Y. Beta-Amyrin synthase; Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 256(1): 238-244.
- [7] SHIBUYA M, KATSUBE Y, OTSUKA M, et al. Identification of a product specific β -amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47(1): 26-30.
- [8] BASYUNI M, OKU H, TSUJIMOTO E, et al. Cloning and functional expression of cycloartenol synthases from mangrove species *Rhizophora stylosa* Griff. and *Kandelia candel* (L.) Druce. [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(7): 1788-1792.
- [9] 陈迪,陈永勤,肖柳青,等. 盾叶薯蓣环阿屯醇合酶基因克隆与表达[J]. 西北植物学报,2009,29(2):221-228.
- [10] HUSSELSTEIN-MULLER T, SCHALLER H, BEN-VENISTE P. Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene triterpene cyclases from *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology, 2001, 45(1): 75-92.
- [11] ABE I, PRESTWICH G D. Squalene epoxidase and oxidosqualene; Lanosterol cyclase-key enzymes in cholesterol biosynthesis[C]//CANE D E. Comprehensive natural products chemistry. New York: Elsevier, 1999: 267-298.
- [12] RUELLAND E, VAULTIER M N, ZACHOWSKI A, et al.

Advances in botanical research; Chapter 2 cold signalling and cold acclimation in plants[M]. New York; Elsevier, 2009.

[13] OH J Y, KIM Y J, JANG M G, et al. Investigation of ginsenosides in different tissues after elicitor treatment in *Panax ginseng*[J]. Journal of Ginseng Research, 2014, 38(4): 270-277.

[14] 谢彩香, 索凤梅, 贾光林, 等. 人参皂苷与生态因子的相关性[J]. 生态学报, 2011, 31(24): 7551-7563.

[15] JIANG M L, LIU J, QUAN X L, et al. Different chilling stresses stimulated the accumulation of different types of ginsenosides in *Panax ginseng* cells[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2016, 38(8): 1-8.

[16] 刘佳, 全雪丽, 姜明亮, 等. 低温胁迫对人参皂苷生物合成途径基因家族表达特性的影响研究[J]. 中草药, 2016, 47(11): 1956-1961.

[17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[18] 明乾良, 韩婷, 黄芳, 等. 人参皂苷生物合成途径及其相关酶的研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(11): 1913-1917.

[19] HARALAMPIDIS K, TROJANOWSKA M, OSBOURN A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2002, 75(75): 31-49.

[20] SHIBUYA M, ZHANG H, ENDO A, et al. Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases[J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 266(1): 302-307.

[21] KIM Y J, ZHANG D, YANG D C. Biosynthesis and biotechnological production of ginsenosides[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 717-735.

[22] HUANG C, QIAN Z G, ZHONG J J. Enhancement of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax ginseng* by N, N'-dicyclohexylcarbodiimide elicitation[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 165(1): 30-36.

[23] HAN J Y, WANG H Y, CHOI Y E. Production of dam-marene diol-II triterpene in a cell suspension culture of transgenic tobacco[J]. Plant Cell Reports, 2013, 33(2): 225-233.

[24] JUNG S C, KIM W, PARK S C, et al. Two ginseng UDP-Glycosyl transferases synthesize ginsenoside Rg3 and Rd[J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55(12): 2177-2188.

[25] LIU Y L, CAI Y F, ZHAO Z J, et al. Cloning and functional analysis of a β -amyrin synthase gene associated with oleanolic acid biosynthesis in *Gentiana straminea* maxim[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2009, 32(5): 818-824.

[26] HAN J Y, IN J G, KWON Y S, et al. Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*[J]. Phytochemistry, 2010, 71(1): 36-46.

[27] SUZUKI M, XIANG T, OHYAMA K, et al. Lanosterol synthase in dicotyledonous plants[J]. Plant and Cell Physiology, 2006, 47(5): 565-571.

[28] 林源秀, 顾欣昕, 于定群, 等. 不同低温胁迫下草莓叶片FaGr基因表达分析[J]. 广西植物, 2015, 35(1): 99-104.

Effect of Chilling Stress on Expression Characteristic of Oxidosqualene Cyclase (OSC) in Callus of *Panax ginseng*

LIU Jia^{1,2}, FU Shuang¹, WANG Meng¹, WANG Jingran¹, QUAN Xueli¹, WU Songquan^{1,2}

(1. Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002; 2. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain & Functional Molecules of Ministry of Education, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract: The continuous (5 °C) and intermittent (25 °C/5 °C, 12 h/12 h) chilling treatments were performed by three weeks fresh callus, which were harvested after 0, 1, 2, 3 and 4 days treatment and recorded as CK, D1, D2, D3 and D4, respectively, the expressions of five kinds of oxidosqualene cyclase (OSC) genes in different treatments were detected by real-time quantitative PCR. The results showed that the expression of *PgDAS* was significantly induced in the D4 of continuous chilling treatment and D3 of intermittent chilling treatment, which were 2.15 times and 2.12 times of the control group, respectively; whereas *Pg β AS1* and *Pg β AS2* expression were only induced in the D2 of continuous chilling stress treatment, which were 1.27 times and 1.71 times of the control group, respectively; *PgCAS* and *PgLOS* expression were not induced in both two kinds of chilling stress treatments. It indicated that the *PgDAS* might play a key role in response to different chilling stress treatments, and the other OSC genes might be synergistic expression with *PgDAS*.

Keywords: *Panax ginseng*; callus; chilling stress; oxidosqualene cyclase; expression characteristic