

RNAi 介导珠子参 *PjCAS* 基因沉默 对皂苷合成的影响

江 敏, 姜 森, 曲 媛, 崔秀明, 刘迪秋, 葛 锋*

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南省三七资源可持续利用重点实验室, 昆明 650500)

摘 要: 该研究利用 Gateway 技术构建珠子参环阿屯醇合成酶基因 (*Panax japonicus* cycloartenol synthase, *PjCAS*) 的 RNAi 表达载体, 利用农杆菌介导转化在珠子参细胞中成功实现了 *PjCAS* 的 RNA 干扰, 采用实时荧光定量 PCR 分析珠子参皂苷生物合成途径中关键酶基因的表达情况, 同时检测转基因细胞中皂苷和植物甾醇含量的变化, 探讨 *PjCAS* 基因对珠子参皂苷合成的调控作用。结果表明: (1) 成功获得 *PjCAS* 基因的 RNAi 片段, 并成功构建了 *PjCAS* 基因 RNAi 载体 pHellsgate-*PjCAS*。(2) 经农杆菌遗传转化, 获得 6 株实现 *PjCAS* 基因 RNA 干扰的转基因阳性细胞系。(3) 与普通细胞系相比, 转基因细胞系中 *PjCAS* 基因的表达量大约下降了 85%, 同时与珠子参皂苷合成直接相关的关键酶基因 *PjDS*、*PjAS* 表达量最高分别上调了 90% 和 150%。(4) 转基因细胞系中 6 种单体皂苷的含量均显著高于对照组, 其中达玛烷型单体皂苷 Re、Rb1、Rd 和齐墩果烷型单体皂苷 R0、IV、IVa 的平均含量比普通珠子参细胞系分别提高了 28%、49%、40%、36%、59%、50%。说明珠子参皂苷含量的变化受 *PjCAS* 基因的间接调控。(5) 6 株转基因细胞系中植物甾醇含量较对照显著降低了 53%~73%。研究发现, 沉默 *PjCAS* 基因可促进珠子参皂苷合成的关键酶基因 *PjDS*、*PjAS* 显著上调表达, 并提高转 *PjCAS* 基因细胞系中单体皂苷的含量, 从而促进了珠子参皂苷合成量的显著增加, 证明通过抑制植物甾醇合成通路关键基因 *PjCAS* 的表达可以有效降低植物甾醇合成支路的代谢通量, 使更多的代谢流朝着珠子参皂苷合成方向流动, 最终促进了珠子参皂苷的生物合成。

关键词: 珠子参; 环阿屯醇合成酶; 三萜皂苷; RNA 干扰

中图分类号: Q785; Q786; Q789

文献标志码: A

RNAi-mediated Gene Silencing of *PjCAS* Affects the Biosynthesis of Saponins in *Panax japonicus*

JIANG Min, JIANG Sen, QU Yuan, CUI Xiuming, LIU Diqiu, GE Feng*

(Yunnan Key Laboratory of *Panax notoginseng* Resources Sustainable Development and Utilization, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: RNAi expression vector of cycloartenol synthase gene (*PjCAS*) from *Panax japonicus* was constructed by Gateway technology in this study, and *Agrobacterium*-mediated transformation was used to realize RNAi of *PjCAS* in *P. japonicus* cells successfully. Real-time quantitative PCR was used to analyze the expression of key enzyme genes involved in the biosynthetic pathway of *P. japonicus* saponins (PJS), the changes of saponins and phytosterols in transgenic cells were also determined, and the regulation effect

收稿日期: 2020-08-18; 修改稿收到日期: 2020-10-28

基金项目: 国家自然科学基金(31260070); 云南省重大科技计划(2019ZF011-2); 云南省万人计划(YNWR-QNBJ-2018-059)

作者简介: 江 敏(1993—), 女, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究。E-mail: jiangmin0914@163.com

* 通信作者: 葛 锋, 教授, 博士生导师, 主要从事生物资源开发研究。E-mail: panaxcordyceps@163.com

of *PjCAS* on the synthesis of PJS was discussed. The results showed that: (1) the RNAi fragment of *PjCAS* was amplified, and the *PjCAS* RNAi vector pHellsgate-*PjCAS* was successfully constructed. (2) Six positive transgenic cell lines with *PjCAS* interference were obtained by *Agrobacterium* transformation. (3) Compared with the ordinary cell line, the expression of *PjCAS* in transgenic cell lines was approximately decreased by 85%, and the highest expression levels of key enzyme genes *PjDS* and *PjAS* directly related to saponins synthesis were up-regulated by 90% and 150%, respectively. (4) The contents of six monomeric saponin in the transgenic cell lines were significantly higher than that of control, among them, the average contents of dammarane-type monomeric saponin Re, Rb1, Rd and oleanane-type monomeric saponin R0, IV, IVa were higher than that of the normal *P. japonicus* cells, increased by 28%, 49%, 40%, 36%, 59%, and 50%, respectively. The results indicated that the change of PJS content is indirectly regulated by *PjCAS* gene. (5) The phytosterol content in six transgenic cell lines decreased by 53%—73% than that in control group. Studies have found that silencing *PjCAS* gene can significantly up-regulate the expression of key enzyme genes *PjDS* and *PjAS* related to the synthesis of PJS, and increase the content of monomeric saponin in the cell lines with *PjCAS*, thus promote the significant increase in the synthesis of PJS. The results prove that the metabolic flux of the branch of phytosterol synthesis could be decreased by inhibiting the expression of *PjCAS*, the key gene in the biosynthetic pathway of phytosterols. As a result of it, more metabolic flux flowed towards the synthesis of PJS and the biosynthesis of PJS was promoted.

Key words: *Panax japonicus*; cycloartenol synthase; triterpenoid saponins; RNAi

珠子参(*Panax japonicus*)为五加科人参属植物,其根茎入药,呈串珠状,为中国传统中药材,具有悠久的药用历史^[1]。中国的云南和陕西为珠子参药材的主要产地,其中以云南产珠子参品质较好^[2-3]。三萜皂苷为珠子参的主要活性成分,药理学研究表明珠子参皂苷在抗炎^[4]、抗肿瘤^[5]、镇静镇痛^[6]、保护肝脏^[7]和心脑血管系统^[8-9]等方面功效显著。

珠子参药材为多年生草本,一般需要生长 4~6 年,方能入药,较长的生长周期,导致其药用资源供需矛盾突出,价格较高。因此,有必要开展珠子参皂苷的生物合成及调控研究,为借助现代生物技术解决药用资源问题提供理论依据和技术策略。珠子参皂苷主要通过甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径合成^[10],如图 1 所示。该途径中的 2,3-氧化鲨烯(2,3-oxidosqualene)为植物甾醇和三萜皂苷合成的共同前体,2,3-氧化鲨烯经环阿屯醇合成酶(cycloartenol synthase, CAS)催化,进入植物甾醇合成途径,经达玛烯二醇合成酶(dammarenediol- II synthase, DS)和 β -香树脂合酶(β -amyrin synthase, β -AS)作用,分别进入达玛烷型皂苷和齐墩果烷型皂苷合成支路^[11]。因此,尽管 CAS 不参与三萜皂苷的生物合成,但其催化作用可直接导致 2,3-氧化鲨烯流向植物甾醇合成途径,间接降低了三萜皂苷的合成代谢流,表明 CAS 有可能间接负调控三萜皂苷的合成。

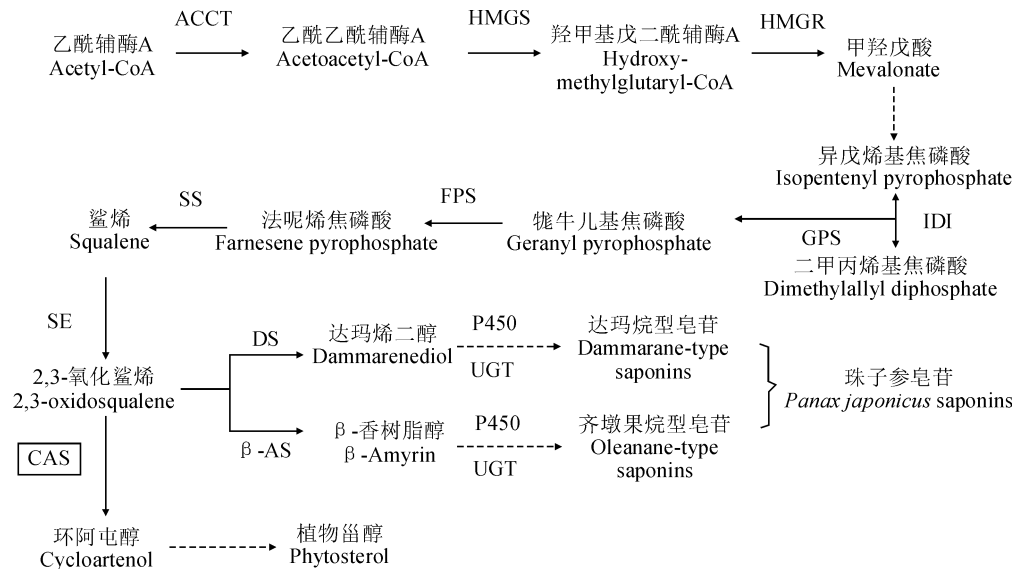
RNAi 技术能够诱导同源 mRNA 高效特异性

降解并使其转录后基因沉默^[12-14],抑制目标基因表达,可将其用于调控药用植物次生代谢物合成途径,成为调控天然代谢产物合成的有效手段。目前, RNAi 已被广泛应用到基因功能研究和代谢途径调控等方面^[15-17]。例如在雷公藤中沉默 *TwHMGR* 基因,使雷公藤甲素和碱的生物合成量显著减少^[18]。在棉花中构建细胞色素 P450 基因 *CYP82D109* 的 RNAi 载体,降低了转基因棉花中半纤维素和棉酚的合成^[19]。在谷物中, *SSIIIa*-RNAi 明显改变了谷物淀粉成分和支链淀粉分布,同时增强了谷物蛋白对高温的敏感性,但对谷物重量、淀粉含量和淀粉颗粒形态几乎没有影响^[20]。本研究通过构建珠子参 *PjCAS* 基因的 RNAi 载体,将其导入珠子参细胞中,探究抑制 *PjCAS* 基因表达对珠子参皂苷生物合成的影响,明确 *PjCAS* 基因在皂苷合成中的调控作用,丰富皂苷生物合成途径的调控手段和策略。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

珠子参细胞为本实验室已有培养物; RNAi 表达载体 pHellsgate 2 为本实验室所有; 荧光定量试剂盒 GoTaq[®] qPCR Master Mix 和反转录试剂盒 GoScript[™] Reverse Transcription System 购自美国 Promega 公司; Gateway[®] BP Clonase[™] II Enzyme Mix 购自美国 Thermo 公司; 各单体皂苷标准品均购于中国食品药品检定研究院。



ACCT. 乙酰辅酶 A 酰基转移酶; HMGS. 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶; HMGR. 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; IDI. 异戊烯基焦磷酸异构酶; GPS. 牻牛儿基焦磷酸合成酶; FPS. 法呢烯基焦磷酸合成酶; SS. 鲨烯合成酶; SE. 鲨烯环氧化酶; DS. 达玛烯二醇合成酶; β -AS. β -香树脂合成酶; CAS. 环阿屯醇合成酶; P450. 细胞色素 P450; UGT. 葡萄糖基转移酶

图 1 珠子参皂苷及植物甾醇生物合成途径

ACCT. Acetyl-CoA acyltransferase; HMGS. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; HMGR. 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase; IDI. Isopentenyl pyrophosphate isomerase; GPS. Geranyl pyrophosphate synthase; FPS. Farnesene pyrophosphate synthase; SS. Squalene synthase; SE. Squalene epoxidase; DS. Dammaradiol-II synthase; β -AS. β -Amyrin synthase; CAS. Cycloartenol synthase; P450. Cytochromes P450; UGT. Glucosyl transferase

Fig. 1 The biosynthetic pathway of saponins and phytosterols in *P. japonicas*

1.2 方法

1.2.1 珠子参总 RNA 提取和 cDNA 合成 取新鲜珠子参愈伤组织细胞,液氮研磨,利用优化的苯酚-氯仿抽提法提取组织细胞总 RNA^[21],紫外-可见分光光度计和琼脂糖凝胶电泳分别测定 RNA 浓度和完整性。按照反转录试剂盒 GoScript™ Reverse Transcription System 将其逆转录成 cDNA,放于 -20℃ 备用。

1.2.2 *PjCAS* 基因 RNAi 片段克隆 根据 GenBank 上公布的 *PjCAS* (KP890783.1) 基因全长序列,设计特异性引物 *PjCAS*-F (5'-GGCTCAATGATTTTTTGTGGCT-3') 和 *PjCAS*-R (5'-CCA-TGTGCCATAGGTGAAGC-3')。以珠子参 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,回收 PCR 产物。将回收的目的片段与 pMD18-T 载体连接后导入大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性菌液测序。提取测序正确的菌液质粒作模板,依据 Gateway™ 技术原理^[22],在 RNAi 片段两端加上 attB 重组位点,使目的片段与干扰载体以同源重组方式连接,设计引物 BP-CAS_F (5'-GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG-CTGGCTCAATGATTTTTTGTGGCT-3') 和 BP-CAS_R (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC-

TGGGTCTGTATTTCTTCTCTGCGGTGGT-3', 下划线为 attB 序列) 进行 attB-PCR 扩增,即得到引入 attB 重组位点的 *PjCAS* 片段。

1.2.3 *PjCAS* 基因 RNAi 表达载体的构建及阳性细胞系的抗性筛选 利用 Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix 试剂盒将 pHellsgate 2 载体与 attB-PCR 胶回收产物连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,挑取单克隆进行扩大培养后提取质粒,将重组质粒 pHellsgate-*PjCAS* 分别用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Xho* I 进行单酶切以检测 *PjCAS* 基因 RNAi 载体是否构建成功。采用 CaCl₂ 冻融法将获得的重组质粒导入农杆菌 EHA105 感受态细胞,将菌液 PCR 鉴定为阳性的农杆菌菌液侵染珠子参细胞,在含有卡那霉素的 MS 培养基上筛选数代以获得具有卡那霉素抗性的转基因细胞系。

采用 CTAB 法提取转基因珠子参细胞系基因组 DNA^[23],由于农杆菌介导的遗传转化法可以将含有目的基因的 T-DNA 片段转入珠子参细胞并整合到基因组 DNA 中,因此根据 T-DNA 上卡那霉素抗性基因 *npt* II 序列设计上下游引物 *npt*-F (CT-CTGATGCCGCCGTGTT) 和 *npt*-R (CCCTGAT-GCTCTTCGTCCA),以珠子参基因组 DNA 为模

板进行 PCR 检测,筛选具有 *PjCAS* 基因的珠子参细胞系。

1.2.4 珠子参皂苷生物合成途径关键酶基因的表达分析 提取普通珠子参细胞系和转基因珠子参细胞系的 RNA 并逆转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板,由珠子参中 *PjCAS*、*PjAS*、*PjDS* 关键酶基因的序列以及 18SrRNA 内参基因序列设计实时荧光定量 PCR(Real-time quantitative PCR,qRT-PCR)的特异性引物(表 1)。根据 qRT-PCR 试剂盒的要求使用体系为:cDNA 模板 4.0 μ L,10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L,2 $\times$ qRT-PCR Mix 10.0 μ L,无核酸水 5.0 μ L。混匀体系后进行扩增,反应程序设置为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法分析样品的 qRT-PCR 结果。

1.2.5 转基因珠子参细胞系中皂苷含量测定 采用高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography,HPLC)法测定普通珠子参细胞系和转基因珠子参细胞系中具有代表性的单体皂苷 Rd、Rb1、Re、R0、IV 和 IVa 的含量。实验使用 Waters XTerra MS C₁₈(5 μ m,4.6 mm $\times$ 250 mm),以乙腈和磷酸水作为流动相进行梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,检测波长 203 nm。最后通过各单体皂苷的标准曲线计算出每个样品中 6 种单体皂苷的含量^[24-25]。

1.2.6 转基因珠子参细胞系中植物甾醇含量测定 收集普通珠子参细胞系与转基因细胞系烘至恒重于研钵中研磨成粉末,称取 1.0 g 样品粉末放于索氏提取仪,以乙醚作为溶剂,经过氢氧化钾-乙醇的皂化反应,得到皂化液。然后用正己烷萃取,由无水硫酸钠干燥正己烷提取液,最后在旋转蒸发器中蒸干液体即得到植物甾醇粗提物。再经过乙醇纯化后,

利用乙酸酐-浓硫酸的显色反应,在 650 nm 波长处测定溶液的吸光值,最后根据已获得的植物甾醇标准曲线计算出不同样品中的植物甾醇浓度^[26]。

2 结果与分析

2.1 *PjCAS* 基因 RNAi 载体的构建及检测

以珠子参 cDNA 为模板,*PjCAS*-F 和 *PjCAS*-R 为引物进行 PCR 扩增得到 *PjCAS* 基因的 RNAi 片段。PCR 产物经凝胶电泳后在 581 bp 处检测到一条明亮的特异性条带,其长度与预期目的基因大小一致(图 2)。

使用 BP 重组的方法,需要在 RNAi 片段两端加上大小为 29 bp 的 attB 重组位点才能使目的片段与干扰载体连接。本研究中以引物 BP-CAS_F 与 BP-CAS_R 进行 attB-PCR 扩增,扩增条带约为 640 bp,符合 attB 重组位点加入 RNAi 片段之后的大小。随后将 *PjCAS* 基因 RNAi 片段与载体 pHellsgate 2 进行连接转入 DH5 α ,筛选阳性单克隆,提取重组质粒 pHellsgate-*PjCAS*,根据重组质粒的结构特点(图 3),用限制性内切酶 *Xba* I 与 *Xho* I 分别进行酶切,酶切结果(图 4)显示两种酶酶切片段大小相同,其中大小约为 640 bp 的条带与目标条带大小一致,表明已成功构建 *PjCAS* 基因 RNAi 载体。

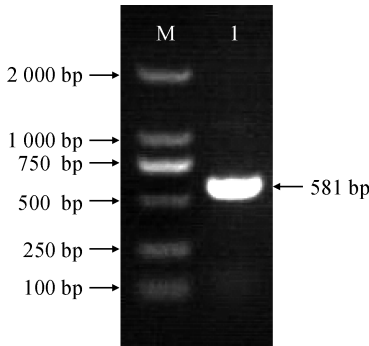
2.2 *PjCAS* 基因 RNAi 转基因珠子参细胞系的获得

利用农杆菌介导的遗传转化法将目的基因的 RNAi 片段转化到珠子参细胞基因组 DNA 中,卡那霉素抗性筛选 4~5 代,初步获得具有抗性的转基因珠子参细胞系。提取生长状况较好的 6 株转基因细胞系基因组 DNA,以此为模板,根据卡那霉素 *npt* II

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences of qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')
18SrRNA-F	AGCAAGCCTACGCTCTGGATAC
18SrRNA-R	TGACTATGAAATACGAATGCCCC
<i>PjCAS</i> -F	GAACAGAGATGGTGGGTGGGGT
<i>PjCAS</i> -R	CCAGAATCCATTGACGCCCT
<i>PjAS</i> -F	CGCTACATTTACTGTCATCAGAACG
<i>PjAS</i> -R	TGCTTCCTGACCAATCGAATAAG
<i>PjDS</i> -F	TGGGAGTTTCAGCCCGATG
<i>PjDS</i> -R	GGGGAGGTGTATAAAGTAAAGAGCC

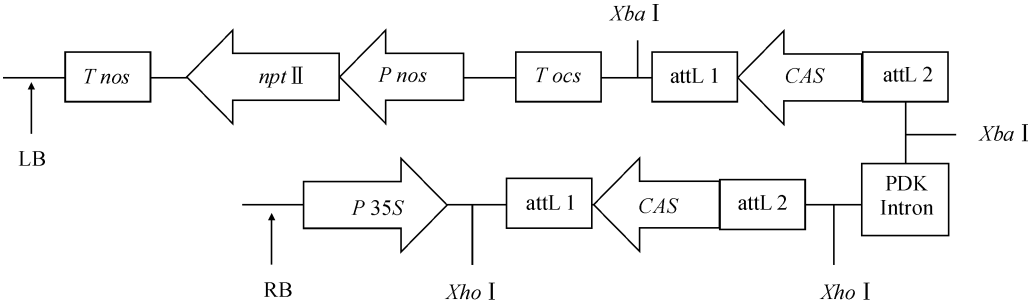


M. DL 2000; 1. RNAi 片段

图 2 *PjCAS* 基因 RNAi 片段扩增产物

M. DL 2000; 1. RNAi fragment

Fig. 2 RNAi amplification product of *PjCAS* gene

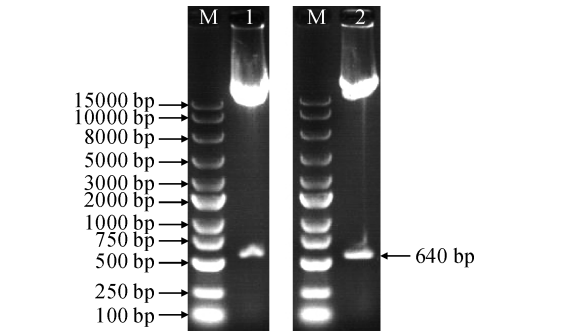


LB. 左边界; *T nos*. NOS 终止子; *P nos*. NOS 启动子; *T ocs*. OCS 终止子; *P 35S*. 35S 启动子; RB. 右边界;
将 CAS RNAi 片段通过反向重复插入 pHellsgate2 的 *Xba* I 位点和 *Xho* I 位点

图 3 重组质粒 pHellsgate-*PjCAS* 的结构

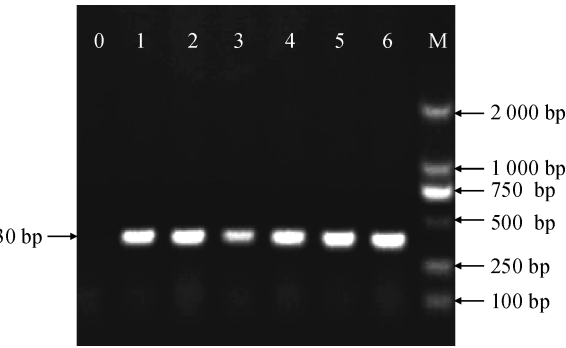
LB. Left border; *T nos*. NOS terminator; *P nos*. NOS promoter; *T ocs*. OCS terminator; *P 35S*. 35S promoter; B. Right border;
The CAS RNAi fragment was inserted into the *Xba* I sites and the *Xho* I sites of the pHellsgate2 by means of inverted repeats

Fig. 3 Structure of recombinant plasmid pHellsgate-*PjCAS*



M. DL15000; 1. *Xba* I 单酶切; 2. *Xho* I 单酶切
图 4 重组载体 pHellsgate-*PjCAS* 酶切验证
M. DL15000; 1. Single *Xba* I enzyme digestion; 2. Single *Xho* I enzyme digestion

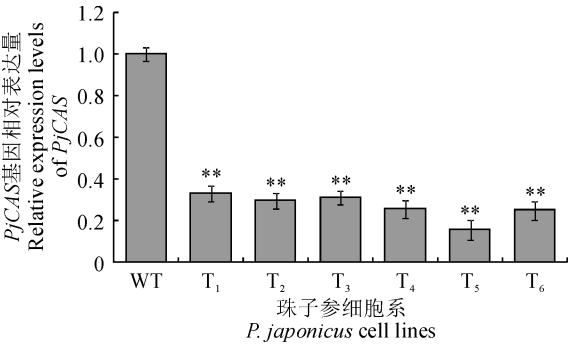
Fig. 4 Enzyme digestion verification of recombinant vector pHellsgate-*PjCAS*



0. 普通细胞系; 1~6. 转基因细胞系; M. DL2000
图 5 转基因珠子参 *npt* II 基因 PCR 检测
0. Common cell lines; 1~6. Transgenic cell lines; M. DL 2000

Fig. 5 PCR detection of *npt* II gene in transgenic *P. japonicus*

基因序列设计引物进行 PCR 检测。结果如图 5 所示,与普通细胞系相比,6 株转基因细胞系中均扩增出一条大小为 430 bp 的特异性条带,测序结果与卡那霉素 *npt* II 基因序列比对一致,表明 *PjCAS* 基因



WT. 普通细胞系; $T_1 \sim T_6$. 转基因细胞系; * * 表示转基因株系与 WT 间存在显著差异 ($P < 0.01$);下同

图 6 珠子参细胞系中 *PjCAS* 基因相对表达量
WT. Common cell line; $T_1 \sim T_6$. Transgenic cell lines;
* * indicated significant difference between transgenic line and WT ($P < 0.01$). The same as below

Fig. 6 Relative expression level of *PjCAS* in *P. japonicus* cell lines

RNAi 片段已经导入这 6 株细胞系中。 2.3 *PjCAS* 基因 RNAi 细胞系中珠子参皂苷合成途径重要酶基因的表达分析

将 6 株阳性细胞系编号为 $T_1 \sim T_6$,普通细胞系为 WT。通过 qRT-PCR 检测 *PjCAS* 基因的表达情况(图 6),与对照组(WT)相比,6 株转基因细胞系中 *PjCAS* 基因的表达都受到不同程度抑制,其中 T_5 组 *PjCAS* 基因表达量较低,与对照组相比,表达量下降了 85%。而表达量最高的 T_1 组,其 *PjCAS* 表达量也下降了 67%。说明 *PjCAS* 基因 RNAi 片段已经成功整合到珠子参基因组中且对 *PjCAS* 基因的表达具有明显的抑制作用。

为进一步明确在珠子参皂苷合成过程中,抑制 *PjCAS* 基因表达是否会对皂苷合成关键酶基因 *PjDS* 和 *PjAS* 的表达产生影响,故进一步对上述 2

个关键酶基因进行了 qRT-PCR 检测(图 7)。结果表明,6 株 RNAi 细胞系中,*PjDS* 和 *PjAS* 基因表达量均高于对照组,其中 T_5 组关键酶基因表达量最高,*PjDS* 和 *PjAS* 基因表达量分别比普通细胞系上调了约 90%和 150%。表明珠子参细胞中 *PjCAS* 基因的沉默间接促进了达玛烷型皂苷合成关键酶基因 *PjDS* 以及齐墩果烷型皂苷合成关键酶基因 *PjAS* 的表达。初步说明当抑制 *PjCAS* 基因表达时,合成植物甾醇与皂苷的共同前体 2,3-氧化鲨烯的代谢流可能更多地流向皂苷合成途径,进而促进了珠子参三萜皂苷的合成。接下来,将进一步分析皂苷和植物甾醇的合成情况,明确 *PjCAS* 基因的 RNAi 对皂苷以及甾醇合成代谢流的影响。

2.4 *PjCAS* 基因 RNAi 对皂苷和植物甾醇生物合成的影响

为明确 *PjCAS* 基因 RNAi 是否影响珠子参皂苷的生物合成,本研究检测了各个细胞系中重要单体皂苷(Rd、Rb1、Re、R0、IV 和 IVa)的含量,结果如图 8 所示。转基因细胞系中 6 种单体皂苷的含量均

显著高于对照组,其中 T_5 组中的竹节参皂苷 IV 含量高达 19.08 mg/g。达玛烷型单体皂苷 Re、Rb1、Rd 和齐墩果烷型单体皂苷 R0、IV、IVa 的平均含量比普通珠子参细胞系分别提高了 28%、49%、40%、36%、59%、50%。说明珠子参皂苷含量的变化受 *PjCAS* 基因的间接调控,沉默 *PjCAS* 基因可以促进珠子参皂苷的合成量。

进一步研究表明,*PjCAS* 基因 RNAi 直接弱化了植物甾醇合成代谢流,导致转基因珠子参细胞中植物甾醇含量与对照组相比明显降低(图 9),其中 T_5 细胞系中的植物甾醇含量下降了 73%。研究结果证明干扰 *PjCAS* 基因表达,确实可以抑制植物甾醇的合成,从而使代谢流更多地流向皂苷合成支路,达到间接促进珠子参皂苷合成的目的。

3 讨 论

RNA 沉默的效率与启动子的强弱和目的片段的大小有直接关系^[27-28],本研究克隆到的 *PjCAS* 基因干扰片段长度为 581 bp,研究表明 RNAi 片段在 98~853 bp 是基因沉默效率较高的区间^[29]。从珠子参皂苷的合成途径可知,以 2,3-氧化鲨烯为共同

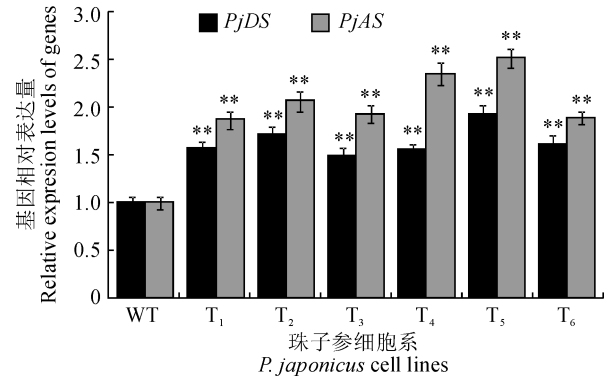


图 7 珠子参细胞系中关键酶基因 *PjDS* 和 *PjAS* 相对表达量
Fig. 7 Relative expression levels of *PjDS* and *PjAS* in *P. japonicus* cell lines

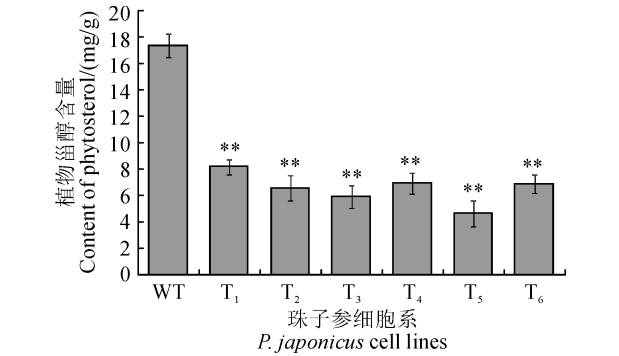


图 9 珠子参细胞系中植物甾醇含量
Fig. 9 Content of phytosterol in *P. japonicus* cell lines

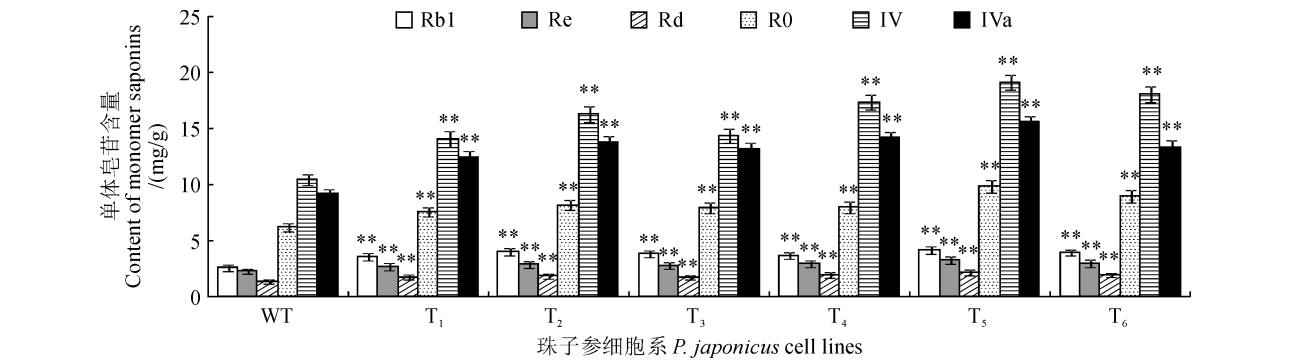


图 8 珠子参细胞系中单体皂苷含量
Fig. 8 Contents of monomer saponins in *P. japonicus* cell lines

前体出现了 3 条合成支路:植物甾醇合成支路、齐墩果烷型皂苷合成支路、达玛烷型皂苷合成支路。进入以上 3 条支路的关键酶分别为 *PjCAS*、*PjAS*、*PjDS*, 3 个关键酶竞争性催化同一前体物质 2,3-氧化鲨烯,从而进入各自的合成支路。在珠子参皂苷的合成过程中,植物甾醇属于副产物,甾醇的合成分流了皂苷合成的前体 2,3-氧化鲨烯,本研究通过抑制甾醇合成途径的第一个关键酶基因 *PjCAS* 的表达,成功弱化了植物甾醇合成分支的代谢流,进而促进了珠子参皂苷的生物合成。

本研究对 *PjCAS* 基因进行了 RNAi, 未对 *PjDS* 和 *PjAS* 两个基因的表达进行人为干预,但结果表明, *PjCAS* 表达下降,伴随着 *PjDS* 和 *PjAS* 的表达增强,这可能是由于甾醇合成支路被抑制后,有更多的代谢流导入皂苷合成的 2 条支路,为了催化处理增加的代谢流,由此引起达玛烷型、齐墩果烷型皂苷合成支路的第一个关键酶基因 *PjDS* 和 *PjAS* 表达上调。进一步的研究证明了上述假设, *PjCAS* 基因的表达被 RNAi 后,植物甾醇的合成显著降低,同时,珠子参中主要的三萜皂苷合成量均出现增加。我们的前期研究表明,过表达珠子参皂苷生物合成途径的关键酶基因可以有效增加皂苷的生物合成^[30-31], 这样的调控方式属于正向调控; 本研究采用反向思维,通过抑制副产物支路的代谢流,间接增加目标代谢流,也成功实现了提高皂苷合

成量的目的。

植物转基因过程由于载体的导入,抗性筛选等操作,有可能影响植物的正常生理状态。我们曾经把未携带目的基因的植物表达载体导入珠子参细胞中,观察转基因操作对细胞的影响。结果表明,无论从细胞形态、生长状况,还是皂苷合成,与野生型相比,均未出现明显变化。类似情况,同样出现在三七细胞的转基因操作中,转空载体的细胞与野生型无异^[32]。出现这种情况的原因在于,阳性细胞系筛选过程中,那些可能影响细胞正常生理生化状态的基因插入,通常表现出较差的细胞生长情况,进而被淘汰,通过几轮筛选,最终用于基因表达分析和生化分析的阳性株系均为生长情况与野生型无明显差异的细胞,由此基本避免了转基因操作对研究结果的影响。

植物次生代谢调控方式,大致分为 3 个层面:一是影响合成目标代谢物的关键酶基因表达(正向调控);二是通过调控副产物支路的代谢流,间接增加目标产物的合成流量(反向调控);三是对控制生物合成途径关键酶基因表达的转录因子进行调控,从更高的层面影响代谢物的合成(全面调控)。本研究采用了反向调控方式影响珠子参皂苷的合成,未来的研究工作可将两种或多种调控方式结合起来,建立更加高效的珠子参皂苷调控策略,为最终通过合成生物学技术规模化获取天然皂苷提供技术参考。

参考文献:

[1] ZHANG S P, WANG R F, ZENG W Y, *et al.* Resource investigation of traditional medicinal plant *Panax japonicus* (T. Nees) C. A. Mey and its varieties in China[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, **166**: 79-85.

[2] 张海元, 李小辉, 梅双喜, 等. 珠子参化学成分研究进展[J]. *中草药*, 2017, **48**(14): 2 997-3 004.

ZHANG H Y, LI X H, MEI S X, *et al.* Research progress on chemical constituents of *Panax Majoris Rhizoma* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, **48**(14): 2 997-3 004.

[3] 赵海霞, 何毓敏, 袁 丁, 等. 土家族药竹节参及其近似品种的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2010, **38**(6): 2 940-2 942.

ZHAO H X, HE Y M, YUAN D, *et al.* Research advances on *Panax japonicus* and its approximation varieties in Tujia nationality[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, **38**(6): 2 940-2 942.

[4] DENG L L, YUAN D, ZHOU Z Y, *et al.* Saponins from *Panax japonicus* attenuate age-related neuroinflammation via regulation of the mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa B signaling pathways[J]. *Neural Regeneration Research*, 2017, **12**(11): 1 877-1 884.

[5] SHU G W, JIANG S Q, MU J, *et al.* Antitumor immunos-

timulatory activity of polysaccharides from *Panax japonicus* C. A. Mey: Roles of their effects on CD4+ T cells and tumor associated macrophages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, **111**: 430-439.

[6] 杨 延, 张 翔, 姜 森, 等. 珠子参中皂苷成分及其药理活性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, **40**(2): 347-356.

YANG Y, ZHANG X, JIANG S, *et al.* Research progress on saponins and pharmacological activities of *Panax japonicus* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, **40**(2): 347-356.

[7] YUAN D, XIANG T T, HUO Y X, *et al.* Preventive effects of total saponins of *Panax japonicus* on fatty liver fibrosis in mice [J]. *Archives of Medical Science*, 2018, **14**(2): 396-406.

[8] WAN J Z, WANG R, ZHOU Z Y, *et al.* Saponins of *Panax japonicus* confer neuroprotection against brain aging through mitochondrial related oxidative stress and autophagy in rats[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2020, **21**(8): 667-680.

[9] HE H B, XU J, XU Y Q, *et al.* Cardioprotective effects of saponins from *Panax japonicus* on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, **140**(1): 73-82.

- [10] DENG B, ZHANG P, GE F, *et al.* Enhancement of triterpenoid saponins biosynthesis in *Panax notoginseng* cells by co-overexpressions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and squalene synthase genes[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, **122**: 38-46.
- [11] XU R, ZHANG J, YOU J M, *et al.* Full-length transcriptome sequencing and modular organization analysis of oleanolic acid-and dammarane-type saponins related gene expression patterns in *Panax japonicus*[J]. *Genomics*, 2020, **112**(6): 4 137-4 147.
- [12] CHAUDHARY S, DUTTA T K, SHIVAKUMARA T N, *et al.* RNAi of esophageal gland-specific gene *Mi-msp-1* alters early stage infection behaviour of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2019, **85**(3): 232-242.
- [13] ZOU L N, WU D, ZANG X, *et al.* Construction of a germ-line-specific RNAi tool in *C. elegans*[J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**(1): 2 354.
- [14] IPSARO J J, JOSHUA-TOR L. From guide to target: Molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, **22**(1): 20-28.
- [15] KARMAKAR A, BHATTACHARYA S, SENGUPTA S, *et al.* RNAi-mediated silencing of *ITPK* gene reduces phytic acid content, alters transcripts of phytic acid biosynthetic genes, and modulates mineral distribution in rice seeds[J]. *Rice Science*, 2020, **27**(4): 315-328.
- [16] 曲子越, 李 影, 李林夕, 等. RNAi 载体构建新方法及其在植物次生代谢调控中的应用[J]. *中草药*, 2017, **48**(7): 1 458-1 465.
- QU Z Y, LI Y, LI L X, *et al.* A new method of RNAi vector construction and its application of secondary metabolism regulation of plants[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, **48**(7): 1 458-1 465.
- [17] 张守路, 饶力群, 汪启明. 基于 RNAi 的转基因作物研发进展[J]. *现代农业科技*, 2018, (21): 3-4, 6.
- ZHANG S L, RAO L Q, WANG Q M. Advances in research and development of genetically modified crops based on RNAi[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018, (21): 3-4, 6.
- [18] ZHANG B, HUO Y B, ZHANG J, *et al.* *Agrobacterium rhizogenes*-mediated RNAi of *Tripterygium wilfordii* and application for functional study of terpenoid biosynthesis pathway genes[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, **139**: 111 509.
- [19] WAGNER T A, LIU J G, PUCKHABER L S, *et al.* RNAi construct of a cytochrome P450 gene *CYP82D109* blocks an early step in the biosynthesis of hemigossypolone and gossypol in transgenic cotton plants[J]. *Phytochemistry*, 2015, **115**: 59-69.
- [20] ZHAO Q, YE Y, HAN Z Y, *et al.* *SSIIIa*-RNAi suppression associated changes in rice grain quality and starch biosynthesis metabolism in response to high temperature[J]. *Plant Science*, 2020, **294**: 110443.
- [21] TONI L S, GARCIA A M, JEFFREY D A, *et al.* Optimization of phenol-chloroform RNA extraction[J]. *MethodsX*, 2018, **5**: 599-608.
- [22] KARIMI M, INZÉ D, LIJSEBETTENS M V, *et al.* Gateway vectors for transformation of cereals[J]. *Trends in Plant Science*, 2013, **18**(1): 1-4.
- [23] 彭 婵, 樊孝萍, 苏晓华, 等. 基于 SSR 分子标记构建南方型美洲黑杨初级核心种质[J]. *西北植物学报*, 2019, **39**(2): 250-257.
- PENG C, FAN X P, SU X H, *et al.* Construction of core collection in southern type of *Populus deltoides* using SSR markers[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, **39**(2): 250-257.
- [24] ZHANG X, YU Y L, JIANG S, *et al.* Oleanane-type saponins biosynthesis in *Panax notoginseng* via transformation of β -amyrin synthase gene from *Panax japonicus*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, **67**(7): 1 982-1 989.
- [25] 姜 森, 于怡琳, 姜 利, 等. 三七转录因子 *PnWRKY1* 对三七皂苷生物合成的影响[J]. *西北植物学报*, 2019, **39**(3): 430-438.
- JIANG S, YU Y L, JIANG L, *et al.* Effect of transcription factor *PnWRKY1* on the biosynthesis of *Panax notoginseng* saponins[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, **39**(3): 430-438.
- [26] YANG Y, GE F, SUN Y, *et al.* Strengthening triterpene saponins biosynthesis by over-expression of farnesyl pyrophosphate synthase gene and RNA interference of cycloartenol synthase gene in *Panax notoginseng* cells[J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2017, **22**(4): E581.
- [27] WESLEY S V, HELLIWELL C A, SMITH N A, *et al.* Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. *The Plant Journal*, 2001, **27**(6): 581-590.
- [28] 刘 颖, 刘国选, 黄川腾, 等. 麻疯树 *JcFATA* 基因干涉表达载体构建和功能初步分析[J]. *农业生物技术学报*, 2018, **26**(5): 899-910.
- LIU Y, LIU G X, HUANG C T, *et al.* Construction of interference expression vector and primary function analysis of *JcFATA* gene in *Jatropha curcas*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, **26**(5): 899-910.
- [29] HELLIWELL C, WATERHOUSE P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants[J]. *Methods*, 2003, **30**(4): 289-295.
- [30] 刘美佳, 于怡琳, 姜 森, 等. 珠子参中法尼基焦磷酸合酶 (FPS) 对皂苷生物合成的影响研究[J]. *植物研究*, 2018, **38**(4): 611-618.
- LIU M J, YU Y L, JIANG S, *et al.* Effect of farnesyl-pyrophosphate synthase (FPS) on the biosynthesis of saponins in *Panax japonicus*[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2018, **38**(4): 611-618.
- [31] 刘美佳, 于怡琳, 姜 森, 等. 珠子参中 HMGR 基因对皂苷生物合成的影响[J]. *西北植物学报*, 2018, **38**(4): 624-630.
- LIU M J, YU Y L, JIANG S, *et al.* Effect of *HMGR* gene on the biosynthesis of saponins in *Panax japonicus*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, **38**(4): 624-630.
- [32] DENG B, HUANG Z J, GE F, *et al.* An AP2/ERF family transcription factor *PnERF1* raised the biosynthesis of saponins in *Panax notoginseng* [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2017, **36**(3): 691-701.