园　艺　学　报　2014，41（3）：521 – 528　　http: // www. ahs. ac. cn
Acta Horticulturae Sinica　　E-mail: yuanyixuebao@126.com

三七 RNase-like 基因的克隆及表达分析

唐美琼[1]，李　刚[1,*]，闵丹丹[2]，韦荣昌[1,3]

（[1]广西壮族自治区药用植物园，广西药用资源保护与遗传改良重点实验室，南宁 530023；[2]广西中医药大学，南宁 530000；[3]中国医学科学院 & 北京协和医学院药用植物研究所，北京 100193）

摘　要：采用同源序列克隆法，结合 RACE 技术，从三七[*Panax notoginseng*（Burk.）F.H]根茎总 RNA 中克隆次生代谢相关差异表达 RNase-like 贮藏蛋白的编码序列，并进一步以 DNA 为模板扩增全长基因，获得一条开放阅读框为 717 bp 的 cDNA 序列，命名为 *PMP*（GenBank，KC751542)，相应基因全长 1 074 bp。序列及其进化分析表明，该基因包含 3 个外显子和 2 个内含子，编码 238 个氨基酸，相应蛋白质的分子量为 27.47 kD，含有核苷酸结合的保守区域，属于 RNase-T2 超家族成员。三七 PMP 蛋白与人参 RNase-like 贮藏蛋白高度同源，序列相似性达 95%。实时荧光定量 PCR 研究表明，三七 *PMP* 基因在其根、茎、叶、花等器官中均有表达，且 3 年生根中表达量最高，暗示该基因可能参与三七皂苷次生代谢调控及其品质形成。

关键词：三七；RNase-like 基因；克隆；表达模式

中图分类号：S 576　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0513-353X（2014）03-0521-08

Isolation and Expression Analysis of RNase-like Gene from *Panax notoginseng*

TANG Mei-qiong[1]，LI Gang[1,*]，MIN Dan-dan[2]，and WEI Rong-chang[1,3]

（[1]*Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant*，*Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement*，*Nanning* 530023，*China*；[2]*Guangxi University of Chinese Medicine*，*Nanning* 530000，*China*；[3]*Institute of Medicinal Plant Development*，*Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College*，*Beijing* 100193，*China*）

Abstract：Combining homology cloning approaches with RACE（rapid amplification of cDNA ends）techniques，the coding sequence of RNase-like major storage protein with differential expression was cloned from the total RNA of roots and stems of *Panax notoginseng*，then the full gene sequence was amplified from the total DNA. As a result，a cDNA sequence containing a 717 bp ORF（open reading frame）was cloned and named as *PMP*（GenBank，KC751542），together with a full-length DNA sequence of 1 074 bp. Analysis of sequence and its phylogenetic tree showed that *PMP* gene consisted of 2 introns and 3 exons，encoding a protein of 238 amino acids. The deduced protein，with a predicted molecular mass of 27.47 kD，contained two conserved domains of RNases，which belonged to the RNase-T2 superfamily member. The sequence showed 95% identity with that of RNase-like major storage protein in *Panax*

收稿日期：2013 – 09 – 02；**修回日期：**2013 – 12 – 31

基金项目：广西自然科学基金项目（2013GXNSFBA019087）；广西科学研究与技术开发项目（桂科重 1298001-1-4）；广西药用植物园青年基金项目（桂药基 20）

* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：lggxu07@hotmail.com）

ginseng. Real-time quantitative PCR showed that the expression level of *PMP* in 3-year-old root was higher than the other organs. The expression pattern of *PMP* showed notable correlation with that of main active components in *P. notoginseng*，which suggested that it might be involved in the regulation of secondary metabolism of notoginsenoside and the quality formation.

Key words：*Panax notoginseng*；RNase-like gene；cloning；expression profile

三七[*Panax notoginseng*（Burk.）F.H]为五加科（Araliaceae）人参属（*Panax*）植物（Briskin，2000；鲍建才 等，2006），全球主要分布于中国、缅甸和尼泊尔，在中国主要分布于云南、广西及四川等地（Deborah et al.，2005；Wan et al.，2006）。三七含有皂苷、糖类、氨基酸等多种活性成分，具有止血、消肿定痛等功效。其中三七总皂苷是三七中主要的生理活性成分（Wu et al.，1995；Chen et al.，2001；Li & Fitzloff，2001），在血液系统、神经系统、心脑血管系统及抗炎、抗肿瘤等方面均有较好的生理活性（Ng，2006；雷燕 等，2012；Han et al.，2013）。研究表明，三七不同的部位含有不同的生理活性成分，3 年生三七的根部所含的药用有效成分高于 1 年生三七（崔秀明 等，2001）。蛋白质是基因表达的最终产物，它的浓度对于其功能的实现有着非常重要的作用（谢秀枝 等，2011）。研究三七皂苷次生代谢相关蛋白酶基因序列及其时空表达，对于揭示三七皂苷生物合成的分子机制、通过代谢工程手段进行三七品质的遗传改良，具有重要理论和应用价值。

本课题组在前期研究中，根据三七皂苷含量的年变化规律，提取 1 年生、2 年生和 3 年生的三七根茎蛋白以及 3 年生地上茎中的蛋白质，采用 8 通道（8-plex）同重标签相对与绝对定量（iTRAQ）标记，通过二维液相色谱分离与串联质谱相结合的方法（2D LC-MS/MS），共鉴定到 278 个蛋白质，其中核酸类贮藏蛋白（RNase-like storage protein）含量较丰富，鉴定依赖的 95%以上置信度的肽段共有 66 条，该蛋白主要表达于 3 年生根中，且所有重复中的表达量均为 2 年生根中的 3 倍以上，为 3 年生地上茎中的 1.8 倍以上，因此推测该蛋白可能与三七皂苷次生代谢有相关性。核酸类贮藏蛋白是植物中广泛存在的适应自然环境的一类特殊核酸酶蛋白，具有贮藏氮素、防御病害、调节基因表达等丰富的生物学功能（Nicholson，2011）。但迄今尚无三七中该蛋白基因表达研究的报道。核酸类贮藏蛋白没有直接参与三七主要活性成分三七皂苷（萜类）次生代谢通路（http://www.genome.jp/kegg-bin/show；Luo et al.，2011）。那么，三七中该蛋白质的保守 RNase 活性位点是否具有核酸酶活性而参与三七皂苷次生代谢调控作用？本研究中基于蛋白质组定量研究结果，克隆 RNase-like 贮藏蛋白相应基因，分析其时空表达规律、分子和生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

以 1 年生三七根、茎、叶及 2 ~ 3 年生三七根、茎、叶、花蕾做 RNase-like 基因的克隆及表达分析材料。2011 年 10 月 8 日于广西靖西县禄洞乡三七种植基地采挖 1、2、3 年生植株各 5 株。立即用清水洗净粘附的泥土，用滤纸吸干水分，分离根、茎、叶等不同组织，并将其切成 0.1 cm 的块状，用锡箔纸包装后小袋分装，迅速冻存于液氮中，带回实验室 – 80 ℃冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 和基因组 DNA 的提取

采用 TRIZOL（Invitrogen）法提取三七各不同器官组织的总 RNA，操作流程按照 TRIZOL 试剂

说明书进行。利用 NanoDrop 分光光度计和 1%琼脂糖电泳检测所提取 RNA 的纯度和完整性。

采用 Murray 和 Thompson（1980）改良的 CTAB 法提取三七各不同器官组织的基因组 DNA，1%琼脂糖电泳检测所提取 DNA 的纯度和完整性。样品保存于－20 ℃备用。

1.2.2　*PMP* 的全长 cDNA 克隆

根据蛋白质差异结果获得的 RNase-like 贮藏蛋白的序列信息，在 NCBI 中进行 BLASTp 比对后，挑选其中几个双子叶植物的同源蛋白序列，并获得其相应的编码序列（CDS），在保守区设计简并引物对 PMPF /PMPR，扩增 cDNA 中间序列。

采用 SMART^{TM} RACE cDNA Amplification Kit（Clontech，USA）试剂盒进行 *PMP* 基因 3′和 5′末端序列扩增。根据 cDNA 中间序列分别设计 5′RACE 和 3′RACE 特异性引物 PMP5-1、PMP5-2、PMP3-1、PMP3-2，以 3 年生三七根的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。将经测序验证后的 5′RACE 和 3′RACE 片段与 cDNA 中间序列进行拼接，得到全长 cDNA 序列。根据拼接序列，设计全长扩增引物 PMPfullF 和 PMPfullR，扩增全长 cDNA 序列。

1.2.3　*PMP* 的全长 DNA 克隆

以 3 年生三七根的 DNA 为模板，PMPfullF 和 PMPfullR 为引物对进行全长 DNA 扩增。

1.2.4　序列分析

将推导的氨基酸序列于 NCBI 中在线分析其结构和功能。利用 Protparam 分析理化性质，使用 TMHMM2.0 分析其可能存在的跨膜区。

1.2.5　荧光定量 RT-PCR 分析

利用 TaKaRa 公司 PrimeScript RT kit with gDNA Erase 试剂盒分别反转录 2 μg 三七不同组织器官 RNA 合成第一链 cDNA，然后取 RT 反应液的 1/10 作为模板，引物对为 RtPMPF 和 RtPMPR，在 ABI7500 实时 PCR 检测系统上进行检测。

PCR 反应体系为：1 μL cDNA 模板，上、下游引物各 0.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$，0.5 μL 1× Rox Reference DyeⅡ，12.5 μL SYBR *premix Ex Taq*（TaKaRa）。反应程序为 95 ℃变性 30 s，95 ℃ 5 s，58 ℃ 30 s 和 72 ℃ 34 s，40 个循环后作溶解曲线。相对定量采用双标准曲线法，用 1 年生三七叶的 cDNA 为模板，稀释 5、5^2、5^3、5^4、5^5 倍，5 个浓度梯度，每个浓度做 3 个平行样，以模板稀释倍数的对数值为横轴，平行样的平均 CT 值为纵轴做标准曲线。三七的 18S 片段为内参（引物为 Rt18SF 和 Rt18SR）；组织表达以 1 年生叶中的表达量为对照，每个组织样本做 3 个平行样，内参和目的基因均做两个生物学重复。

表 1　本研究中所有引物序列

Table 1　List of primers used in this study

序号 No.	引物名称 Primer name	方向 Direction	序列 Sequence（5′－3′）
1	PMPF	Forward	GAYTAYCCRTGGGCVATGTTYGC
2	PMPR	Reverse	GGCADTCHACGAABCTTGTTGC
3	PMP5-1	Reverse	CCACTCGTGTTCCCAGAATTGT
4	PMP5-2	Reverse	AGGGATAAAGGCCGTGAATGGT
5	PMP3-1	Forward	ATGGAAGGTGTTCAGAAG
6	PMP3-2	Forward	TTCTGGGAACACGAGTGGAAGA
7	UPM	Forward/ Reverse	Long：CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT Short：CTAATACGACTCACTATAGGGC
8	NUP	Forward/ Reverse	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
9	PMPfullF	Forward	ATGAGGGCAATATATATTATCAGCG
10	PMPfullR	Reverse	CTATATTATAGAATTGGTCCTCGGA
11	RtPMPF	Forward	CAGGAAGGGATTTACCCGAATA
12	RtPMPR	Reverse	CTTGTTGCTTGTTGGTTCACAC
13	Rt18SF	Forward	GATGCGCTCCTGTCCTTAAC
14	Rt18SR	Reverse	CATCCTTGGCAAATGCTTTC

2　结果与分析

2.1　三七 *PMP* 基因的发掘及全长 cDNA 克隆

通过对三七根茎的蛋白质差异定量分析，发现其中一个差异蛋白被注释为 RNase-like 贮藏蛋白，根据蛋白质组结果，采用同源序列比对，设计简并引物，首先扩增了该基因的中间片段。在得到中间片段序列的基础上采用 RACE 技术，扩增 5′和 3′末端序列。将所有得到的序列进行比对拼接，使用 NCBI 网站上的 NCBI ORF Finder 和生物信息学软件 DNAman 进行分析，该序列全长 1 040 bp，包含一个 717 bp 的开放阅读框（ORF），编码 238 个氨基酸，同时包括 90 bp 5′端非翻译区（5′site Untranslated Region，5′UTR）和 233 bp 的 3′UTR（图 1）。根据该 ORF 的序列设计该基因的全长引物，利用 RT-PCR 技术扩增得到目的基因的全长 cDNA 序列。测序比对结果表明，该全长 cDNA 序列与前述 5′和 3′RACE 片段拼接结果完全一致，对该扩增的基因命名为 *PMP*，GenBank 登录号为 KC751542。

```
1     GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGACAGAAAACACACACTTCATTTCTTA
61    AGAAAAAAGTTGTTGAAGTTTGAAGAGATCATGAGGGCAATATATATTATCAGCGTCATT
                                     M  R  A  I  Y  I  I  S  V  I
121   ATAGTGAGCTTGCGCATTTTCTCTTGTGGTGGAATGCTCGAACAGATTATCCATGGGCA
      I  V  S  L  R  I  F  S  C  G  G  N  A  R  T  D  Y  P  W  A
181   ATGTTTGCCCTAAGGCTTCAATGGCCAGCTGGATTTTGCGAGGTCAACAATGACTGTGAT
      M  F  A  L  R  L  Q  W  P  A  G  F  C  E  V  N  N  D  C  D
241   ACAAAGTCTCTCCTCAATACATTTACCATTCACGGCCTTTATCCCTATAACGCGAAGATG
      T  K  S  L  L  N  T  F  T  I  H  G  L  Y  P  Y  N  A  K  M
301   GCCCCAGGGTTATATTGTGACGGAACTGCCTTTGATGTTAACTCTGTATCGGACTTTCAA
      A  P  G  L  Y  C  D  G  T  A  F  D  V  N  S  V  S  D  F  Q
362   GCAGAAATGCATCTTGCATGGCCGAGTCATGAAACTAACACTGAGGACAAACAATTCTG
      A  E  M  H  L  A  W  P  S  H  E  T  N  T  E  D  K  Q  F  W
421   GGAACACGAGTGGAAGAAACATGGAAGGTGTTCAGAAGCTTTATTGAAGCAGACTGATT
      E  H  E  W  K  K  H  G  R  C  S  E  A  L  L  K  Q  T  D  Y
481   ATTTTAGAACGGCGCTTGCTTTTAGAAAAGCATTTGATATAATTGGGCTACTAAACCAGG
      F  R  T  A  L  A  F  R  K  A  F  D  I  I  G  L  L  N  Q  E
541   AAGGGATTTACCCGAATAACGACCTTTATCGTCCTAAAATGATAAAAGAAGCAATCAAAA
      G  I  Y  P  N  N  D  L  Y  R  P  K  M  I  K  E  A  I  K  K
601   AGCACTTGAATGCTGTGCCAGAAATCGATTTCACCAAAAACGAAAACTCGGAATATGTGC
      H  L  N  A  V  P  E  I  D  F  T  K  N  E  N  S  E  Y  V  L
661   TTACGGATATTAATCTATGTGTGAACCAACAAGCAACAAGGTTCGTAGATTGCCCTACCG
      T  D  I  N  L  C  V  N  Q  Q  A  T  R  F  V  D  C  P  T  D
721   ACGACGCTACTGATGACTACCGCCTCAAATTCGTAAGACTACCTTCTAAAATGAAAATTA
      D  A  T  D  D  Y  R  L  K  F  V  R  L  P  S  K  M  K  I  T
781   CGGATCCGAGGACCAATTCTATAATATAGCACAAATGGTACGGCTACAAAATGGACTACT
       D  P  R  T  N  S  I  I  *
841   ATCTTGTTTAATTAATGCTTTTGGGAGTATTATCTATGTAAATTAGTTATGAGTGCTAGG
901   GTTGGCTAATTAGTACTATGAGGCCAGCCTTTAGTATCTTGAATAATGTCCATGTAGCAA
961   AAGTTTATTGCATTCTGGCCTTGGTGTGTATGAATAATTATAGTAAATAACTACTTTTAT
1021   CTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 1　*PMP* 基因的核苷酸序列及所推导的氨基酸序列

起始密码（ATG）和终止密码（TAG）用灰色阴影表示。

Fig. 1　*PMP* cDNA sequence and its deduced amino acid sequence

The start codon（ATG）and the stop codon（TAG）were gray shaded.

2.2　三七 *PMP* 基因编码蛋白特性分析

将 *PMP* 基因编码蛋白的氨基酸序列在 Blastp 里搜索，发现与人参中的 RNase-like 贮藏蛋白具有高度同源性，达 95%，并检索到其与 RNase-T2 具有相同的保守序列（图 2，A）。由图 2，A 可知，PMP 属于 RNase-T2 超家族成员。利用在线软件 Protparam 对 *PMP* 基因编码蛋白的理化性质进行预

测，结果显示，该基因编码蛋白的分子量为 27.47 kD，等电点为 6.08。利用 SignalP3.0 软件预测该蛋白不具有信号肽；利用 TMHMM2.0 预测到存在一个跨膜结构，位于 A_3～G_{21} 残基位点。通过查阅文献，从 NCBI 上下载 5 条来自不同植物的具有 RNases 贮藏蛋白功能的蛋白序列，分别为人参（*Panax ginseng*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、蒺藜苜蓿（*Medicago truncatula*）、蓖麻（*Ricinus communis*）、荷花（*Nelumbo nucifera*），通过比对发现，*PMP* 基因编码的蛋白具有与其相似的 RNases 活性位点（图 2，B）。

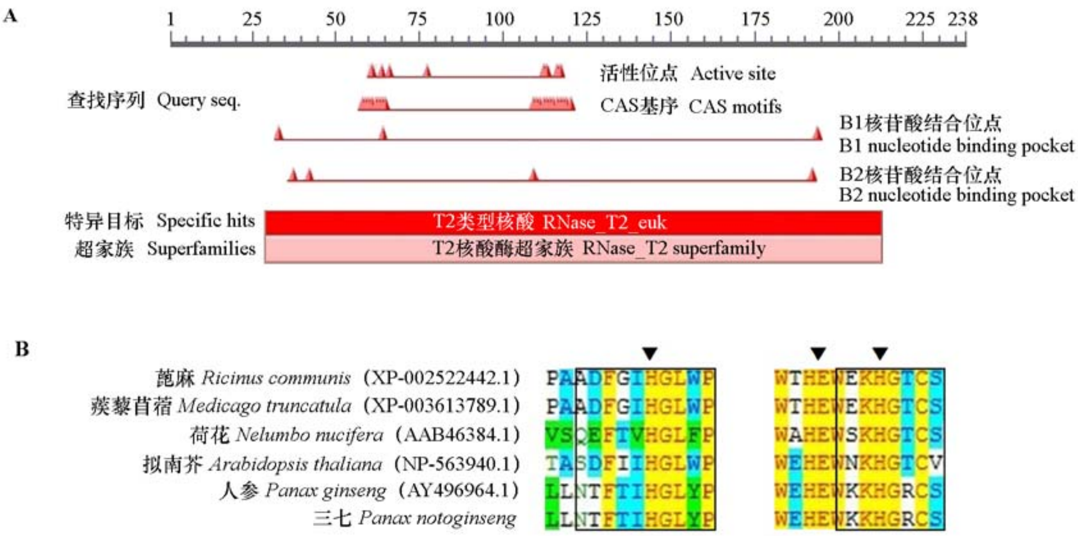

图 2　*PMP* 基因编码的氨基酸序列分析

A：PMP 的保守域；B：RNase 的活性位点，框中为活性区域，▼代表酶活性相关主要氨基酸。

Fig. 2　The deduced amino acid sequence analysis of *PMP*

A：Conserved domains of the PMP；B：The activity of RNases，the sequence are boxed and amino acids（His and Glu）essential to the activity of RNases are indicated by ▼.

2.3　三七 *PMP* 基因全长 DNA 克隆及基因结构分析

根据所得到的三七 *PMP* 基因全长 cDNA 序列设计引物扩增该基因 DNA 序列，以 3 年生三七根为模板，扩增得到 1 kb 左右的单一片段，测序分析结果表明，该片段长 1 074 bp，与 cDNA 序列相比，多了 357 bp。利用 spidy（http：//www.ncbi.nlm.nih.gov/spidy）工具分析 *PMP* 基因 DNA 序列显示，该基因包含 3 个外显子和 2 个内含子（图 3）。*PMP* 基因 DNA 序列在表达形成成熟的 mRNA 过程中，外显子和内含子的剪切符合 GT-AG 的原则，两个内含子的 AT 含量比较高，对应的序列见图 4。

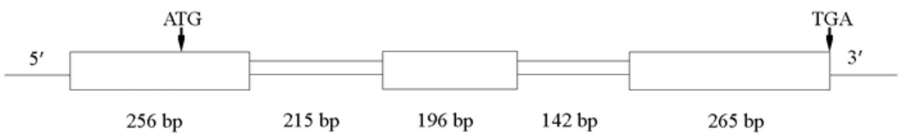

图 3　三七 *PMP* 基因的结构

宽框表示外显子，窄框表示内含子，开放阅读框起始密码子和终止子密码子分别为 ATG 和 TGA。

Fig. 3　The genomic structure of *PMP* from *Panax notoginseng*

Exons are indicated by wide boxes，introns are indicated by narrow boxes，the begin code and stop code are ATG and TGA.

内含子 1 Intron1

```
1    GTGAGTTCGATCTCTCAGTCTGCATTTAATTTACTTCTTAAAATCCTTGC
51   TCTATTGTCTATTAAATATGTTTTTTTGTGGTAACATTTATACATATCTT
101  GAAGAGTTGGATATGTTTGTTTGATAAAAAAAATGAAATTGTACATGCAA
151  TATATCCATACATACTCACATATGTTAAACTAATTTCTCTCCTCCTTTAT
201  TTTGAAAATTAACAG
```

内含子 2 Intron2

```
1    GTAAACATACCCATTGATATATAATTAAATAGTCTTTAATTTGGTTCATT
51   GCTTCCTAAGGGGACTACGTACTTAATTTAGATTTTGTGGATGATTAAAT
101  GATAATGTAAGTTTGATGAGATTACTATTCAAAATGTGTAG
```

图 4 三七 *PMP* 基因内含子核苷酸序列

Fig. 4 Introns sequence of *PMP* from *Panax notoginseng*

2.4 *PMP* 基因的组织特异性表达分析

为明确 *PMP* 基因在 1 ~ 3 年生三七的根、茎、叶及 2 ~ 3 年生三七花蕾组织中的时空表达情况，采用荧光定量 PCR 的方法分析了该基因的表达情况。以一年生三七叶 cDNA 稀释 5 个梯度，进行双标准曲线制作。*PMP* 和 *18S* 基因均得到一条平滑的、倾斜度较大的标准曲线（图 5），扩增效率分别是 106.675 和 98.452；决定系数（R^2）分别为 0.987 和 0.992；斜率分别为 – 3.172 和 – 3.360，各样品均分布在标准曲线范围以内，说明标准曲线的线性关系强，可信度高。溶解曲线扩增结果显示，各样品的溶解曲线分别在 79.58 ~ 80.11 和 84.02 ~ 84.56 时有一个单一的峰。分析结果表明，该基因在 1 ~ 3 年生三七的不同组织中均有表达，但在 3 年生根中的表达量最高（图 6），与对照（1 年生叶组织）相比提高了 19.87 倍。

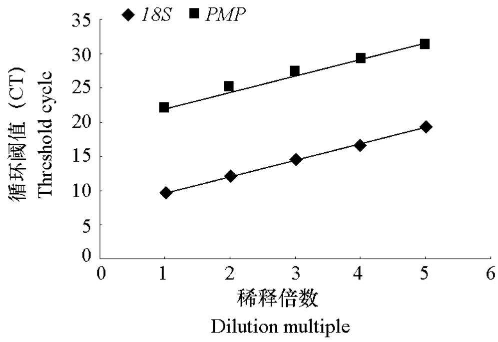

图 5 *PMP* 和 *18S* 基因的标准曲线

Fig. 5 The standard curve of *PMP* and *18S*

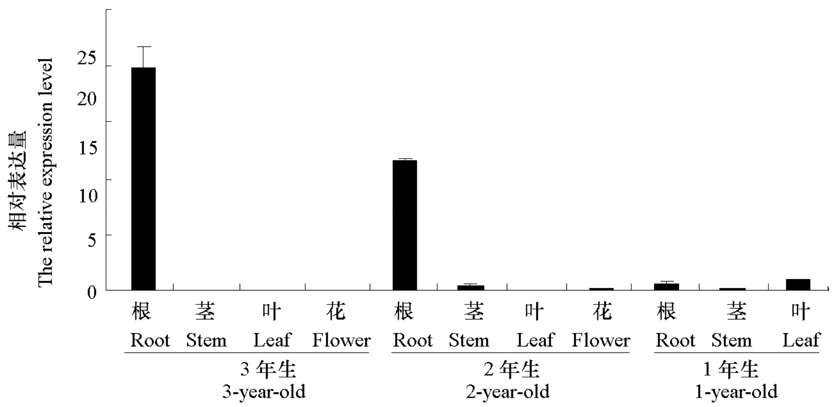

图 6 *PMP* 基因在 1 ~ 3 年生三七不同组织中的表达情况

Fig. 6 *PMP* gene expressing in different tissues of 1 – 3-year-old plant of *Panax notoginseng*

3 讨论

由结果分析可知，三七核酸酶类贮藏蛋白（RNase-like storage proteins）属于核酸酶 T2（RNase T2）家族核酸内切酶。T2 核酸酶通常具有保守的活性位点（CAS）区域——CASⅠ和 CASⅡ，表现一致性的氨基酸序列特征：F/WTL/IHGLWP 和 FWXHEWXKHGTC（Irie，1999）。但在人参和三七核酸酶类贮藏蛋白中，CASⅠ区倒数第 2 个保守的色氨酸残基（W）被替代为酪氨酸残基（Y），CASⅡ区倒数第 2 个保守的苏氨酸残基（T）被替代为精氨酸残基（R）。由于所有核酸酶 T2 蛋白晶体结构中 CASⅠ和 CASⅡ区的氨基酸残基均位于保守的 β2 折叠和 αC 螺旋中，46 位组氨酸、49 位色氨酸、104 组氨酸、105 位谷氨酸、108 位赖氨酸和 109 位组氨酸（按 RNase Rh 氨基酸序列编号）构成了酶的活性位点（Kurihara et al.，1996；Tanaka et al.，2000）。CASⅠ中 49 位色氨酸突变根据替代氨基酸和底物的不同其活性将减少为野生型的 84% ~ 99%（Ohgi et al.，1996，1997）；49 位色氨酸也参与底物识别（Nicholson，2011）。三七和人参核酸酶类贮藏蛋白中，由于 CASⅠ区和 CASⅡ区两个重要氨酸残基发生替代，不仅其活性会受到影响，其 β 折叠或 α 螺旋结构也可能会发生变化。

植物 T2 核酸酶在叶衰老过程中表达，与清除核酸中磷酸有关；也因受伤或病原入侵应激表达（Nicholson，2011）。人参核酸类贮藏蛋白特异表达于在主根中，虽然具有保守核酸酶必须的活性位点，但其根部表达量随季节性变化而波动，表现出适应自然环境需要的营养贮藏作用（Seung et al.，2004）。旋花休眠根中 S 类核酸酶营养贮藏蛋白（S-like RNase vegetative storage protein）原本应该有的酶活性的丧失与其中 CASⅡ中组氨酸残基被赖氨酸替代有关（Nicholson，2011）。大豆中营养贮藏蛋白 VSPα 中 106 位的丝氨酸替代为天冬氨酸时，其酸性磷酸酶的活性提高了 20 倍（Leelapon et al.，2004）。上述人参核酸酶类贮藏蛋白 CASⅠ和 CASⅡ区的保守氨基酸残基的改变或许是其核酸酶活性丧失的分子基础。三七核酸酶类贮藏蛋白定量试验结果及其相应基因的荧光定量结果均表明，其表达与和三七皂苷的含量变化具有一致的规律，在三七不同组织器官中均有表达，但在 3 年生三七根部强表达（崔秀明 等，2001）；该蛋白是否类似于上述人参蛋白而缺乏核酸酶活性，基于保守氨基酸的回复突变试验或许可以为其分子功能、进化以及生物学功能研究提供证据。

但近来从人参中分离到一些新的糖脂蛋白（gintonin），具有能够经 G 蛋白偶联受体（GPCR）信号途径诱导细胞内钙离子浓度暂时变化、也能刺激在人脐带内皮细胞中细胞增殖和迁移、刺激细胞外调节蛋白激酶 ERK1/2 的磷酸化、诱导 PC12 细胞的形态学变化等，既表现出细胞调节作用，也展现出药物应用前景，核酸类贮藏蛋白（RNase-like storage proteins）和乳胶类蛋白（major latex-like protein）是这些人参糖脂蛋白（gintonin）复合物中的蛋白质组成成分（Pyo et al.，2011；Nah，2012）。因此，人参核酸类蛋白也可能具有通过与糖类形成复合物而发挥调节作用的生物学功能。

总之，本研究中克隆到三七核酸酶类贮藏蛋白的基因，分析了其基因结构、在三七中的时空表达规律，为进一步的遗传转化和功能的深入分析奠定了基础，但三七核酸酶类贮藏蛋白的分子功能、生物学作用，以及三七核酸酶类贮藏蛋白与三七皂苷次生代谢的关联性还有待进一步的试验验证。

References

Briskin D P. 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant Physiol，124 (2)：507 – 514.

Bao Jian-cai，Liu Gang，Cong Deng-li，Zhang Cong-xi. 2006. The advancement in the chemical constituents study of *Panax notoginseng*. Chinese Traditional Patent Medicine，26 (2)：246 – 253. (in Chinese)

鲍建才，刘　刚，丛登立，张崇禧. 2006. 三七的化学成分研究进展. 中成药，26 (2)：246 – 253.

Chen J C，Chen L D，Tsauer W，Tsai C C，Chen B C，Chen Y J. 2001. Effects of Ginsenoside Rb2 and Rc on inferior human sperm motility *in vitro*.

Am J Chinese Med，29 (1)：155－160.

Cui Xiu-ming，Chen Zhong-jian，Wang Chao-liang，Zeng Jiang. 2001. Studies on saponin accumulative in regularities *Panax notoginseng*（Burk）F. H. Chen. China J Chin Mater Med，26：27－28. (in Chinese)

崔秀明，陈中坚，王朝梁，曾　江. 2001. 三七皂苷积累规律的研究. 中国中药杂志，26：27－28.

Deborah Y Q H，Lau A J，Yeo C L，Liu X K，Yang C R，Koh H L，Hong Y. 2005. Genetic diversity and variation of saponin contents in *Panax.notoginseng* roots from a single farm. Agric Food Chem，53：8465－8467

Han S Y，Li H X，Ma X，Zhang K，Ma Z Z，Jiang Y，Tu P F. 2013. Evaluation of the anti-myocardial ischemia effect of individual and combined extracts of *Panax notoginseng* and *Carthamus tinctorius* in rats. J Ethnopharmacol，145 (3)：722－727.

Irie M. 1999. Structure-function relationships of acid ribonucleases：Iysosomal，vacuolar，and periplasmic enzymes. Pharmacol Ther，81：77－89.

Kurihara H，Nonaka T，Mitsui Y，Ohgi K，Irie M，Nakamura K T. 1996. The crystal structure of ribonuclease Rh from *Rhizopus niveus* at 2.0 angstrom resolution. J Mol Biol，255：310－320.

Li W，Fitzloff J F. 2001. A validated method for quantitative determination of saponins in notoginseng（*Panax notoginseng*）using high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. J Pharm Pharmacol，53 (12)：1637－1643.

Leelapon O，Sarath G，Staswick P. 2004. A single amino acid substitution in soybean VSPα increases its acid phosphatase activity nearly 20-fold. Planta，219 (6)：1071－1079.

Lei Yan，Tao Li-li，Wang Guo-li，Wang Yang. 2012. Effect of extracts from *Panax ginseng*，*Panax notoginseng*，and *Ligusticum chuanxiong* on vascular smooth muscle cells of aging and hypertension rats. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine，32 (10)：1374－1379. (in Chinese)

雷　燕，陶丽丽，王国利，王　洋. 2012. 人参三七川芎提取物对增龄和高血压大鼠血管平滑肌细胞的影响. 中国中西医结合杂志，32 (10)：1374－1379.

Luo H M，Sun Ch，Sun Y Zh，Wu Q，Li Y，Song J Y，Niu Y Y，Cheng X L，Xu H X，Li Ch Y，Steinmetz A，Chen S L . 2011. Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers. BMC Genomics，12 (5)：1－15.

Murray H C，Thompson W F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research，8：4321－4325.

Nah S Y. 2012. Gintonin：A novel ginseng-derived ligand that targets G protein- coupled lysophosphatidic acid receptors. Current Drug Targets，13 (13)：1659－1664.

Ng T B. 2006. Pharmacological activity of sanchi ginseng（*Panax notoginseng*）. J Pharm Pharmacol，58 (8)：1007－1019.

Nicholson A W.2011. Ribonucleases. Heidelberg/Dordrecht/London/New York：Springer.

Ohgi K，Takeuchi M，Iwama M，Irie M.1996. Enzymatic properties of mutant enzymes at Trp49 and Tyr57 of RNase Rh from *Rhizopus niveus*. J Biochem，119：9－15.

Ohgi K，Takeuchi M，Iwama M，Irie M. 1997. Enzymatic properties of double mutant enzymes at Asp51 and Trp49 and Asp51 and Tyr57 of RNase Rh from *Rhizopus niveus*. Biosci Biotechnol Biochem，61：1913－1918.

Tanaka N，Arai J，Inokuchi N，Koyama T，Ohgi K，Irie M，Nakamura K T. 2000. Crystal structure of a plant ribonuclease，RNase LE. J Mol Biol，298：859－873.

Wan J B，Yang F Q，Li S P，Wang Y T，Cui X M. 2006 .Chemical characteristics for different parts of *Panax notoginseng* using pressurized liquid extraction and HPLC-ELSD. J Pharm Biomed Anal，41：1596－601.

Wu W，Zhang X M，Liu P M，Li J M，Wang J F. 1995. Effects of *Panax notoginseng* saponin Rg1 on cardiac electrophysiological properties and ventricular fibrillation threshold in dogs. Acta Pharmacol Sin，16 (5)：459－463.

Xie Xiu-zhi，Wang Xin，Liu Li-hua，Dong Shi-lei，Pi Xiong-e，Liu Wei. 2011. ITRAQ technology and its application in proteomics. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology，27 (7)：616－621. (in Chinese)

谢秀枝，王　欣，刘丽华，董世雷，皮雄娥，刘　伟. 2011. iTRAQ 技术及其在蛋白质组学中的应用. 中国生物化学与分子生物学报，27 (7)：616－621.