

· 研究报告 ·

## 植物固醇合成途径关键基因CPI1的功能进化

马学敏<sup>1</sup>, 孙爽莉<sup>2</sup>, 杨海灵<sup>1</sup>, 门淑珍<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>北京林业大学生物科学与技术学院生物化学与分子生物学系, 北京 100083

<sup>2</sup>南开大学生命科学学院植物生物学和生态学系, 天津 300071

**摘要** 固醇是真核生物膜的重要组分, 在生长发育中具有重要作用。*CPI1 (CYCLOPROPYL STEROL ISOMERASE1)*基因是植物特有的固醇合成途径基因, 其编码产物为环丙基固醇异构酶。目前只有拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的*CPI1*基因被克隆并解析。研究发现, 从藻类到高等开花植物中均存在单一拷贝的*CPI1*基因。陆生植物*CPI1*的基因结构及其所编码的氨基酸序列均高度保守, 蛋白质序列相似性范围为48%–90%, 但陆生植物*CPI1*与绿藻*CPI1*的蛋白序列之间存在显著差异。蛋白质结构预测发现*CPI1*具有非常相似的拓扑结构, 均具有7个跨膜结构域和6个亲水环。组织表达模式分析显示, 陆生植物*CPI1*在不同组织中均表达, 是组成型表达基因。为了验证*CPI1*基因的功能, 克隆了二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)*BdCPI1*基因, 并转化拟南芥*cpi1-1*突变体。结果表明, *BdCPI1*能完全回补*cpi1-1*突变体的表型。基于单拷贝基因数目、保守的基因结构和蛋白质拓扑结构及基因表达模式, 推测*CPI1*基因的功能可能在陆生植物中高度保守。

**关键词** *CPI1*基因, 功能进化, 基因表达, 突变体, 植物固醇

马学敏, 孙爽莉, 杨海灵, 门淑珍 (2013). 植物固醇合成途径关键基因CPI1的功能进化. 植物学报 48, 398–410.

固醇(又称甾醇)是真核生物细胞膜的重要成分, 有调节细胞膜的通透性和流动性的作用, 而且还能间接影响细胞膜内蛋白质、离子通道等的分布和活性(Hartmann, 1998; Fischer et al., 2004; Boutté et al., 2010)。在高等植物、动物和昆虫中, 固醇还是甾醇类激素合成的前体。植物、真菌和动物中的固醇都是以乙酰辅酶A为前体, 在一系列酶的催化下合成的。三者的固醇合成途径从乙酰辅酶A到环氧鲨烯(2,3(S)-oxidosqualene)阶段是相同的。但是, 植物中下游的合成途径与真菌和动物中的不同。在动物和真菌中, 环氧鲨烯分子环化成羊毛脂甾醇(lanosterol), 此时固醇的骨架已形成。而在植物中则环化形成具有环丙烷环的环阿屯醇(cycloartenol), 然后在下游途径中再打开环丙烷环, 形成固醇的骨架(张喜春等, 2001; Rahier, 2011)。植物中催化环丙烷环打开的酶为环丙基固醇异构酶(CYCLOPROPYL STEROL ISOMERASE1, CPI1), 又称环桉油醇-钝叶鼠曲草醇异构酶(cycloeucalenol-obtusifoliol isomerase, COI)。该酶是植物特有的酶, 也是植物固醇合成途径的一个限速步骤(Men et al., 2008)。但是, 关于*CPI1*的研究

报道却相对较少, 目前只有拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的*CPI1*基因被克隆并进行了功能研究。Lovato等(2000)克隆了拟南芥的*CPI1*基因, 其编码一个分子量为36 kDa的蛋白质。在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达*CPI1*基因, 其表达产物能在体外将环桉油醇转变为钝叶鼠曲草醇。Men等(2008)筛选到拟南芥*CPI1*基因的转座子插入突变体, 将其命名为*cpi1-1*; RT-PCR检测结果表明该突变体中没有*CPI1*基因的转录。利用GC-MS对突变体的固醇成分进行分析, 结果表明该突变体中几种主要的植物固醇含量几乎降为零, 并且大量积累环丙基固醇类。*cpi1-1*突变体植株极其矮小, 几乎没有花序茎, 只有几朵不育的花; 另外, *cpi1-1*突变体根的向重力生长缺陷。该突变体的表型不能被外源施加油菜素甾醇(brassinosteroid, BR)回复, 表明其严重的缺陷表型不是由于BR缺陷引起的。进一步的研究发现, *cpi1-1*突变体中胞吞作用受到抑制, 造成生长素外输载体PIN2的极性定位不能正确建立, 从而导致根向重力缺陷的表型(Men et al., 2008)。这些结果表明*CPI1*在植物的发育中具有重要功能。Boutté等(2010)的研究

收稿日期: 2013-01-25; 接受日期: 2013-03-12

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(No. 2011ZX08004-004)和天津市自然科学基金(No.12JCZDJC23200)

\* 通讯作者。E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

发现, 胞质分裂特异的囊泡融合蛋白 KNOLLE 在 *cpi1-1* 突变体中的定位发生侧向扩散。在野生型拟南芥中, KNOLLE 定位在进行胞质分裂的细胞的细胞板及其周围的囊泡中; 而在 *cpi1-1* 突变体中, KNOLLE 除了定位于以上区域外, 还定位在侧向细胞膜上。进一步的研究发现, KNOLLE 的极性定位是靠胞吞作用维持的。目前关于 *CPI1* 基因突变后造成植株矮小的分子机理未见报道。*CPI1* 基因突变后, 根的分生区大小没有受到影响; 但是, 根伸长区明显缩短, 成熟根毛细胞的长度也显著缩短, 表明至少在根中, *CPI1* 基因突变主要影响细胞的伸长(Men et al., 2008)。

目前仅仅对拟南芥 *CPI1* 进行了比较详细的研究, 尚未见关于其它植物 *CPI1* 的报道。迄今除了裸子植物外, 大量代表不同植物类群的植物物种的基因组被测序。已测序的基因组信息有利于我们从早期的低等苔藓植物到高等开花植物探测 *CPI1* 的拷贝数目、基因结构等一系列信息。本研究选取了多个代表不同进化历史且已完成全基因组测序的植物物种为研究对象, 包括双子叶植物拟南芥、毛果杨(*Populus trichocarpa*), 单子叶植物水稻(*Oryza sativa*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*), 蕨类植物江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*), 苔藓植物小立碗藓(*Physcomitrella patens*)以及3种绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii*、*Volvox carteri* 和 *Coccomyxa subellipsoidea* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Goff et al., 2002; Tuskan et al., 2006; Merchant et al., 2007; Rensing et al., 2008; The International Brachypodium Initiative, 2010; Prochnik et al., 2010; Banks et al., 2011; Blanc et al., 2012)。利用TBLASTN方法从这些物种的基因组数据库中挖掘 *CPI1* 基因, 并系统性地研究 *CPI1* 基因在这些物种中的拷贝数目、基因结构、蛋白质拓扑结构以及基因表达模式, 从而揭示植物 *CPI1* 的功能进化特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料和生长条件

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)*cpi1-1* 突变体为转座子Ds元件插入突变的Ler生态型。拟南芥、毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray)、二穗

短柄草(*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.)、江南卷柏(*Selaginella moellendorffii* Hieron.)和水稻(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* S. Kato)种植在盛有植物培养用土的方盆中并放置在温室, 光照周期为16小时光照/8小时黑暗, 光照强度为120–150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。其中拟南芥、毛果杨、二穗短柄草和江南卷柏的培养温度为23°C, 水稻的培养温度为30°C。小立碗藓(*Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp.)在BCDATG固体培养基上进行无菌培养, 温度为23°C, 16小时光照/8小时黑暗, 光照强度为120–150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。拟南芥无菌培养采用MS培养基, 附加0.05%MES、1%蔗糖和0.8%琼脂(pH5.8)。植物培养用土为德国Klasmann泥炭土(购自北京家美丽园艺科技有限公司)。

### 1.2 *CPI1* 基因的鉴定

以拟南芥 *CPI1* 蛋白序列为模板, 利用TBLASTN检索 Phytozome v9.0(<http://www.phytozome.net/>)中玉米(*Zea mays* L.)、小米(*Setaria italica* (L.) P. Beauv.)、猴面花(*Mimulus guttatus* Fisch. ex DC.)、菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)、盐芥(*Thellungiella halophila* (C.A. Mey.) O.E. Schulz)、毛果杨、二穗短柄草、水稻、江南卷柏、小立碗藓和3种绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard、*Volvox carteri* F. Stein和*Coccomyxa subellipsoidea* E. Acton的全基因组数据库, 获得的序列与拟南芥 *CPI1* 序列均具有较高相似性。

### 1.3 系统发生关系分析和蛋白拓扑结构的模拟

将各物种的 *CPI1* 蛋白序列通过 Bioedit 进行氨基酸序列比对, 然后进行手动校对。利用 MEGA v.4.0 软件的 neighbour-joining (NJ) 模型构建进化树, Bootstrap 值为 1 000。蛋白质拓扑结构的模拟参考 Barbez 等(2012)的方法。

### 1.4 *CPI1* 基因的组织表达谱

为了解 *CPI1* 基因的组织表达谱, 采用 Bio-Rad 公司总 RNA 提取试剂盒 Aurum Total RNA Kit 分别提取培养 1 个月的二穗短柄草和 2 个月的水稻的根、茎、成熟叶、幼叶和叶鞘的总 RNA, 培养 2 个月的杨树的根、茎、叶、芽和韧皮部的总 RNA, 以及培养 6 个月的小立碗

藓和培养2年的江南卷柏的根、茎和叶的总RNA。用DNase I (Promega)处理总RNA以去除基因组DNA，并以处理后的总RNA为模板，用Revert Aid First Strand cDNA试剂盒(TaKaRa)合成cDNA。分别根据*BdCPI1*、*OsCPI1*、*PtCPI1*、*SmCPI1*和*PpCPI1*的核苷酸序列设计引物BdCPI1-SP1/2、OsCPI1-SP1/2、PtCPI1-SP1/2、SmCPI1-SP1/2和PpCPI1-SP1/2(表1)，进行RT-PCR扩增。PCR反应体系为25 μL，其中含有1 μL cDNA、2.5 μL TaKaRa 10×PCR buffer、0.125 μL TaKaRa Ex Taq (5 U·μL<sup>-1</sup>)、2 μL dNTP(每种dNTP浓度为2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)以及浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup>的引物各1 μL，剩余体积以去离子水补足。以各物种*Actin*基因作为内标。PCR反应程序是：94°C预变性3分钟；94°C30秒，60°C40秒，72°C1分钟，35个循环；最后72°C延伸3分钟。PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，电泳上样量为2 μL。

### 1.5 CPI1基因的克隆、载体构建及拟南芥转化

以二穗短柄草cDNA为模板，利用*BdCPI1* cDNA的特异引物扩增得到目的片段。将*BdCPI1* cDNA片段克隆到植物表达载体pBA002(Kost et al., 1998)(由蔡南海教授惠赠)的Ascl和SpeI限制性内切酶位点之间，使*BdCPI1* cDNA片段位于35S启动子的下游，Nos终

止子的上游。将构建好的载体转化入农杆菌菌株C58C1中。由于纯合的*cpi1-1*突变体为苗期致死，不能收获种子，因此将上述农杆菌侵染杂合的*cpi1-1/+*突变体。获得转基因种子后播种到土中并喷洒Barstar进行筛选，然后对抗性苗进行目的基因鉴定和遗传背景分析。*cpi1-1*突变体的鉴定参考Men等(2008)的文章。所用引物序列见表1。

### 1.6 转基因拟南芥幼苗的表型分析

为了研究*BdCPI1*对拟南芥*cpi1-1*突变体表型回补的程度，将转基因种子消毒后播种在MS平板上，对拟南芥幼苗的表型进行分析。培养室温度设为22–25°C，在光照16小时/黑暗8小时、光照强度为120–150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>的条件下培养5天，取幼苗经扫描仪扫描后，利用ImageJ软件进行根长和下胚轴长度的测量。然后将幼苗移栽至土中，观察4周大植株的表型。

## 2 结果与讨论

### 2.1 植物CPI1基因的系统发生和序列分析

选取多个代表不同进化历史而且已完成全基因组测序的植物物种为研究对象，包括双子叶植物拟南芥、

**表1** 研究中所用的引物序列

**Table 1** Primers used in this paper

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Use
BdCPI1-SP1	GAGAGGTTCACGGAGTTGGACT	RT-PCR
BdCPI1-SP2	GTGAGCTGTGGAGTGACGTAATCT	RT-PCR
OsCPI1-SP1	CGGAGCTGGAGTACCTAGTTGTT	RT-PCR
OsCPI1-SP2	CCAGGTAAAGCTATGAAGTATGAGAGT	RT-PCR
PtCPI1-SP1	CCTTCTTCTTGATACCAATGATGT	RT-PCR
PtCPI1-SP2	GAATCAACAGCCACTTGGTAAC	RT-PCR
SmCPI1-SP1	GTGCTGTCTCGGAATCATAGT	RT-PCR
SmCPI1-SP2	GGCGTAGAATAGCGATCCAAT	RT-PCR
PpCPI1-SP1	GTCGTTGCCCTCTCAAACCTCTAT	RT-PCR
PpCPI1-SP2	CGGCATGGTACAGAACAGGAAGT	RT-PCR
Ds5-1	ACGGTCGGAAACTAGCTCTAC	Identify the Ds insertion in Arabidopsis
CPI1_LP	CTCGGCTCACTCACTCACACT	Identify if the <i>cpi1-1</i> mutants are homozygous
CPI1_RP	CTGCCGAGATAATGCTGTGCTT	Identify if the <i>cpi1-1</i> mutants are homozygous
BdCPI1_cF2	GCTTGGCGCGCCCGGAATCGGACAATGACAGCTG	Cloning of <i>BdCPI1</i> cDNA
BdCPI1_cR2	AGGTACTAGTTAGACGCTTCGTTCTGCAC	Cloning of <i>BdCPI1</i> cDNA

盐芥、毛果杨、菜豆和猴面花, 单子叶植物水稻、二穗短柄草、玉米和小米, 蕨类植物江南卷柏以及苔藓植物小立碗藓, 利用TBLASTN方法从这些物种的基因组数据库中挖掘*CPI1*基因。在拟南芥、盐芥、毛果杨、菜豆、猴面花、水稻、二穗短柄草、玉米、小米和小立碗藓基因组中仅仅发现1个*CPI1*基因。江南卷柏基因组包含2个*CPI1*拷贝, 但是序列分析发现其中1个拷贝含有多个终止密码子, 预示着这个基因可能是假基因。因此, 在后续的分析中, 不再分析这个假基因。另外, 从3种绿藻*Chlamydomonas reinhardtii*、*Volvox carteri*和*Coccomyxa subellipsoidea*基因组中分别鉴定出1个*CPI1*基因。这些结果说明*CPI1*基因的拷贝数目在进化上可能是非常保守的。利用这14个物种的*CPI1*基因构建系统进化树, 发现3个藻类*CPI1*基因(*CrCPI1*、*VcCPI1*和*CsCPI1*)单独聚成一支, 而其它陆地植物聚成另一支(图1)。

由于所有陆地植物聚成一支, 因此在接下来的分析中, 仅仅选取6个代表不同植物类群的陆地植物物种(拟南芥、毛果杨、水稻、二穗短柄草、江南卷柏和小立碗藓)和3个藻类植物的*CPI1*基因为研究对象。序列比对分析发现, *CPI1*蛋白的氨基酸序列相似性较高(图2), 6种陆生植物的*CPI1*蛋白序列相似性范围是48%–90%。其中水稻与二穗短柄草*CPI1*蛋白的序列相似性最高(90%), 小立碗藓与拟南芥*CPI1*蛋白的序列相似性最低(48%)。3种绿藻的*CPI1*蛋白序列相似性范围是55%–87%(表2)。然而6种陆生植物的*CPI1*蛋白与3种绿藻的*CPI1*蛋白的序列具有显著性差异(independent-sample *t*-test,  $P<0.0001$ )(图3)。

## 2.2 植物*CPI1*基因结构分析

拟南芥、毛果杨、水稻、二穗短柄草和江南卷柏的*CPI1*基因均包含8个外显子和7个内含子。这5个*CPI1*基因的外显子长度均高度保守, 但内含子的长度差别则比较大(图4)。如水稻*OsCPI1*基因的第5个内含子长度最长, 为1 866 bp。江南卷柏*SmCPI1*基因的内含子长度最小, 所有7个内含子的长度均小于92 bp。相比拟南芥、毛果杨、水稻、二穗短柄草和江南卷柏*CPI1*基因, 小立碗藓*PpCPI1*基因多了1个外显子, 具有9个外显子和8个内含子的基因结构。这个外显子可能是由于拟南芥、毛果杨、水稻、二穗短柄草和江南卷柏中的第6个外显子插入一段DNA而形成的。

绿藻*Chlamydomonas reinhardtii*和*Volvox carteri*的*CPI1*基因与拟南芥、毛果杨、水稻、二穗短柄草和江南卷柏的*CPI1*基因一样, 都包含8个外显子和7个内含子。但是这2个绿藻*CPI1*基因的外显子长度与拟南芥、毛果杨、水稻、二穗短柄草和江南卷柏*CPI1*基因显著不同。经序列比对发现, 拟南芥、毛果杨、水稻、二穗短柄草和江南卷柏*CPI1*基因的第3个外显子与*CrCPI1*和*VcCPI1*的第2个外显子相对应。这可能是由于*CrCPI1*和*VcCPI1*的第1个外显子中插入一段

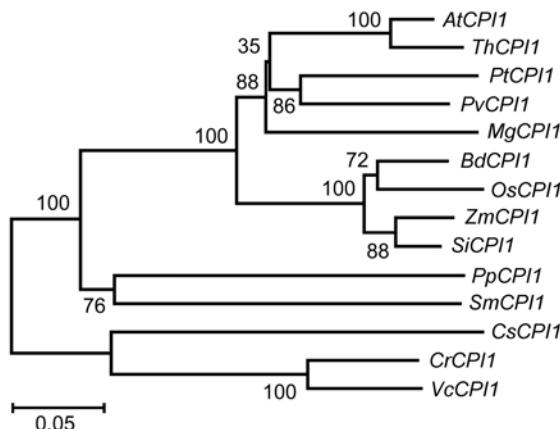
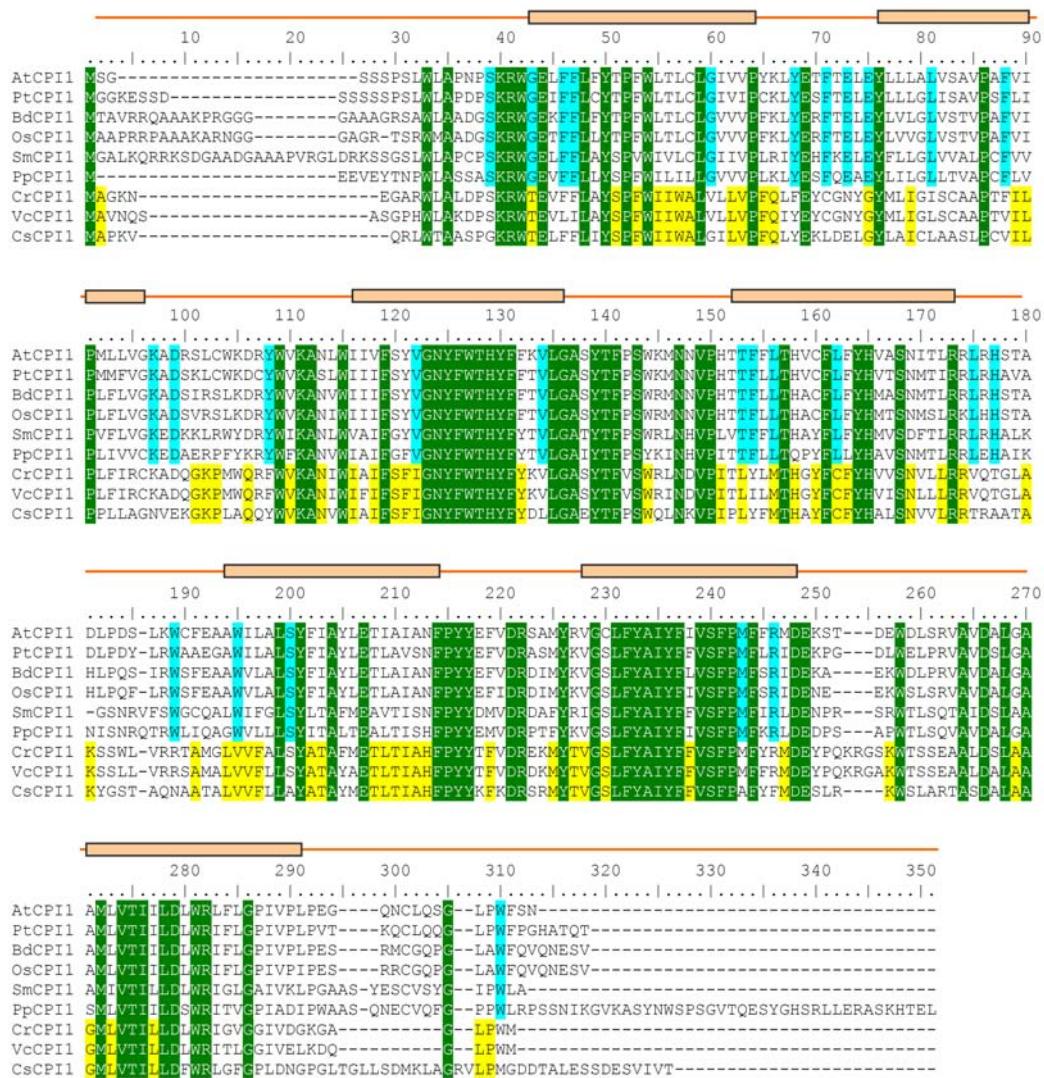


图1 植物*CPI1*基因的系统发生分析

构建系统发生树的基因如下: *CsCPI1* (Locus name: estExt\_Genemark1.C\_50307)、*VcCPI1* (Locus name: Vocar20010-586m.g)、*CrCPI1* (Locus name: Cre16.g657300)、*PpCPI1* (Locus name: Pp1s34\_401V6)、*SmCPI1* (Locus name: 135190)、*OsCPI1* (Locus name: LOC\_Os11g19700)、*BdCPI1* (Locus name: Bradi4g20160)、*ZmCPI1* (Locus name: GRMZM2G053397)、*SiCPI1* (Locus name: Si022820m.g.)、*MgCPI1* (Locus name: mgv1a011213m.g)、*ThCPI1* (Locus name: Thhalv10014300m.g)、*AtCPI1* (Locus name: AT5G-50375)、*PtCPI1* (Locus name: Potri.015G093500)和*PvCPI1* (Locus name: Phvul.009G167500)。

Figure 1 Phylogenetic tree of plant *CPI1* genes

The genes used to construct the phylogenetic tree are as the followings: *CsCPI1* (Locus name: estExt\_Genemark1.C\_50307), *VcCPI1* (Locus name: Vocar20010586m.g), *CrCPI1* (Locus name: Cre16.g657300), *PpCPI1* (Locus name: Pp1s34\_401V6), *SmCPI1* (Locus name: 135190), *OsCPI1* (Locus name: LOC\_Os11g19700), *BdCPI1* (Locus name: Bradi4g20160), *ZmCPI1* (Locus name: GRMZM2G053397), *SiCPI1* (Locus name: Si022820m.g.), *MgCPI1* (Locus name: mgv1a011213m.g), *ThCPI1* (Locus name: Thhalv10014-300m.g), *AtCPI1* (Locus name: AT5G50375), *PtCPI1* (Locus name: Potri.015G093500) and *PvCPI1* (Locus name: Phvul.009G167500).



**图2** 植物CPI1蛋白的序列比对

绿色阴影部分表示所有CPI1蛋白均保守的序列，蓝色阴影部分表示陆生植物CPI1蛋白的保守序列，黄色阴影部分表示藻类CPI1蛋白的保守序列，棕色方框表示跨膜结构域。

**Figure 2** Sequence alignment of plant CPI1 proteins

Conserved residues in all CPI1 proteins are marked in green. Residues marked in blue and yellow indicate conserved residues in terrestrial and green alga CPI1 proteins, respectively. Brown boxes indicate plasma membrane domains.

DNA而形成的。绿藻*Coccomyxa subellipsoidea*的CPI1基因具有6个外显子和5个内含子的基因结构(图4)。

### 2.3 植物CPI1蛋白的结构模拟

对拟南芥CPI1蛋白的定位研究发现，其定位于细胞的内质网，因此CPI1蛋白很可能是膜蛋白。利用Barbez等(2012)的方法，预测了9个CPI1蛋白的拓扑

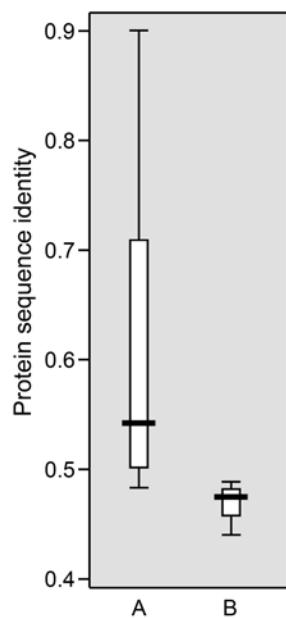
结构。发现9个CPI1蛋白具有非常相似的拓扑结构，均具有7个跨膜结构域和6个亲水环(图5)。但是N-端和C-末端亲水结构域的长度有较大差异。

### 2.4 植物CPI1基因的表达模式分析

为了检测毛果杨、水稻、二穗短柄草、江南卷柏和小立碗藓中CPI1基因的表达情况，选取不同组织进行

**表2** 植物CPI1蛋白的序列相似性分析**Table 2** Protein sequence identity of plant CPI1 proteins

	AtCPI1	PtCPI1	BdCPI1	OsCPI1	SmCPI1	PpCPI1	CrCPI1	VcCPI1	CsCPI1
AtCPI1									
PtCPI1	0.77								
BdCPI1	0.73	0.71							
OsCPI1	0.70	0.69	0.90						
SmCPI1	0.56	0.54	0.53	0.51					
PpCPI1	0.48	0.49	0.50	0.49	0.50				
CrCPI1	0.48	0.48	0.47	0.47	0.48	0.44			
VcCPI1	0.49	0.48	0.48	0.48	0.46	0.44	0.87		
CsCPI1	0.47	0.44	0.45	0.45	0.44	0.41	0.57	0.55	

**图3** CPI1蛋白的序列相似性统计

(A) 6种陆生植物CPI1蛋白的序列相似性; (B) 6种陆生植物CPI1蛋白与3个绿藻CPI1蛋白的序列相似性

**Figure 3** Protein sequence identity of plant CPI1 proteins  
(A) Protein sequence identity of AtCPI1, PtCPI1, BdCPI1, OsCPI1, SmCPI1 and PpCPI1; (B) Protein sequence identity between terrestrial and green alga CPI1 proteins

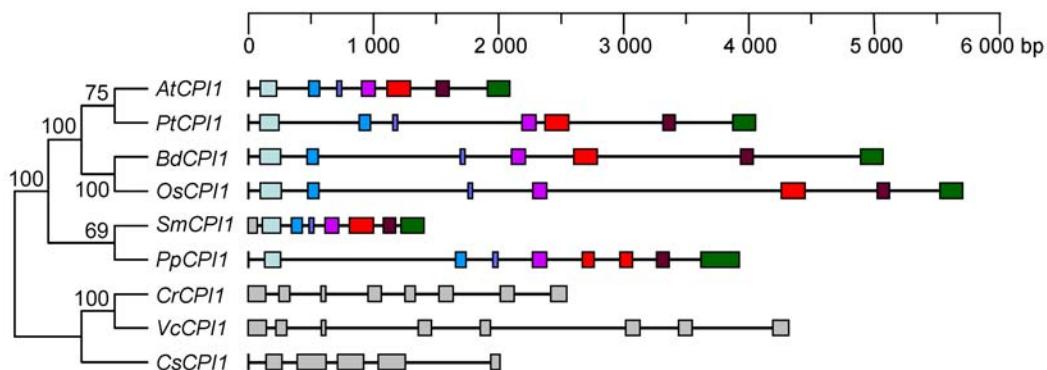
定性RT-PCR检测。RT-PCR扩增后对PCR产物进行测序验证。结果表明,这些植物的*CPI1*基因在不同组织部位均表达(图6A)。对于拟南芥*AtCPI1*基因,利用拟南芥在线数据库Arabidopsis eFP Browser中的数据进行作图分析(<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>),发现拟南芥*AtCPI1*基因在根中的表达

水平最高,其次是茎尖生长点,在果荚中的转录水平也较高(图6B)。这些结果表明植物*CPI1*基因可能是组型表达的基因,而且植物*CPI1*基因的功能可能很保守。

## 2.5 二穗短柄草*BdCPI1*基因的功能研究

在不同的植物中*CPI1*基因均只有1个拷贝,而且*CPI1*的基因结构、蛋白质拓扑结构以及基因表达模式均高度保守,预示着植物*CPI1*基因的功能可能也高度保守。为了验证这个假说,以二穗短柄草*BdCPI1*基因为例来探讨*CPI1*基因的功能。我们克隆了*BdCPI1*的CDS片段,并将其构建到植物表达载体pBA002中,使其位于组型强表达的35S启动子的下游及Nos终止子的上游(图7A)。由于*BdCPI1*和*AtCPI1*的序列相似性非常高,因此为了验证所克隆的*BdCPI1*基因是否具有环丙基固醇异构酶的功能,我们将其转化拟南芥的*cpi1-1*突变体,研究其能否回补该突变体的表型。由于纯合的*cpi1-1*突变体为苗期致死,不能收获种子,因此将上述构建转化*cpi1-1/+*杂合突变体。共获得了112个分子鉴定结果为阳性的T<sub>1</sub>代转基因株系(图7B)。这些株系表型均与野生型相似,暗示*BdCPI1*基因能够回补拟南芥*cpi1-1*突变体的表型(图7C-F)。对这些植株的遗传背景进行分析,结果表明其中有24个株系的遗传背景为*cpi1-1*纯合,70个株系的遗传背景为*cpi1-1/+*杂合,18个株系的遗传背景为*CPI1*野生型(表3)(图7B)。这表明*BdCPI1*基因确实能回补拟南芥*cpi1-1*突变体的表型,其编码蛋白具有环丙基固醇异构酶的功能。

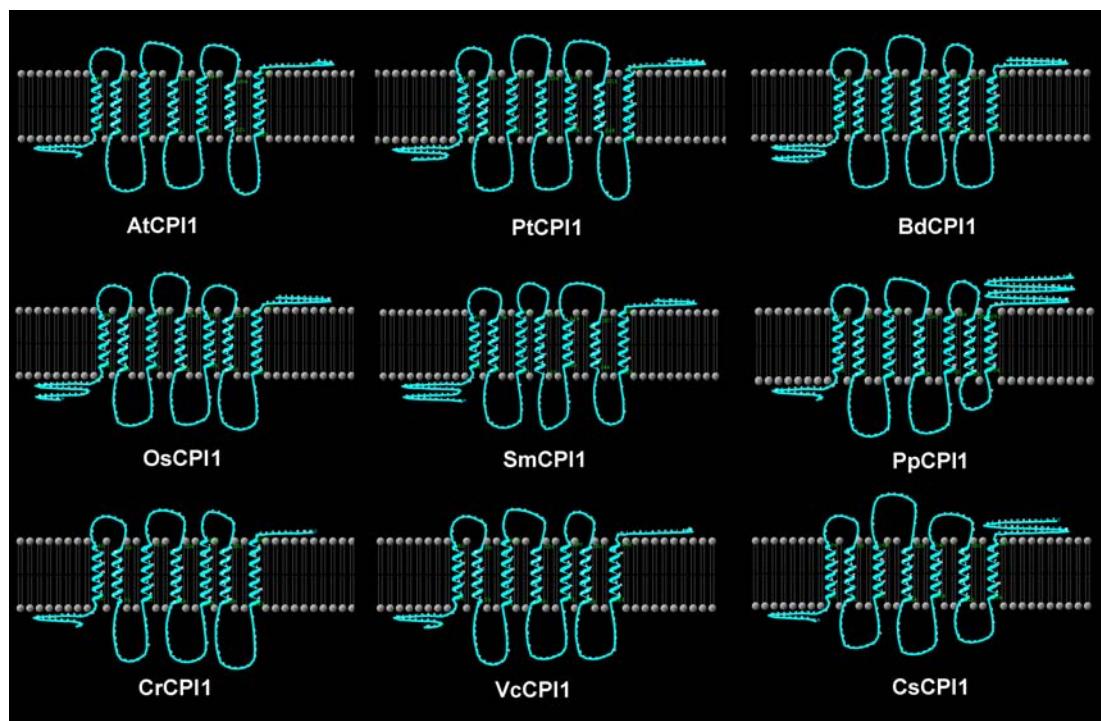
为了进一步分析*BdCPI1*基因能在多大程度上回补拟南芥*cpi1-1*突变体的表型,对6个*cpi1-1*纯合背景

**图4** *CPI1*基因的基因结构

相同颜色方框表示在6种陆生植物*CPI1*基因中保守的外显子。

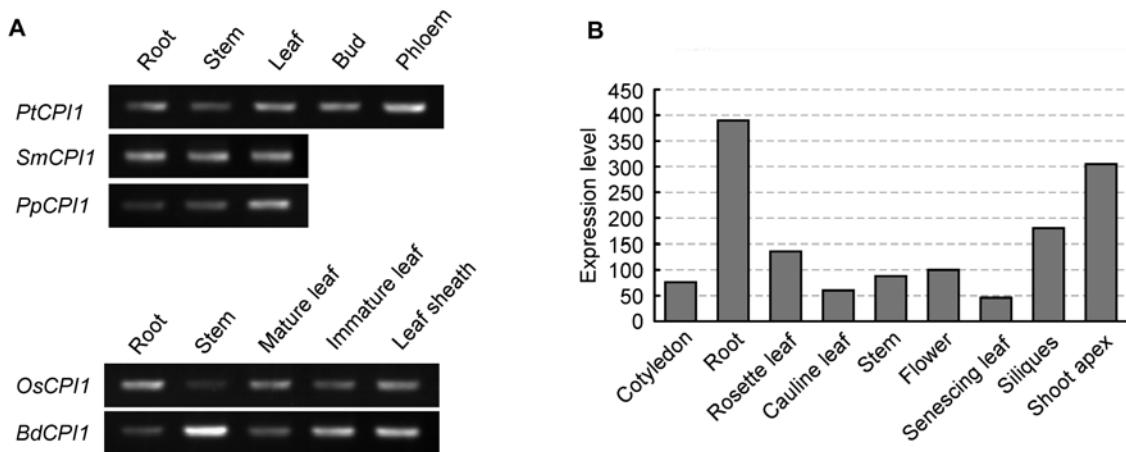
**Figure 4** Gene structures of the *CPI1* genes

Conserved exons of *CPI1* genes in six terrestrial plant species are indicated by the same color boxes.

**图5** 预测的CPI1蛋白拓扑结构示意图**Figure 5** The predicted topology of *CPI1* proteins

的*BdCPI1*转基因株系幼苗的表型进行了统计分析(分别为L7、L22、L29、L77、L102和L104)。对5日龄幼苗的根长和下胚轴长度进行测量,由图7C和图7G可见, *cpi1-1*突变体的根长显著短于野生型( $P<0.01$ ),

大约为野生型根长的30%,而6个转基因株系的根长与野生型相比均没有显著差异( $P>0.05$ )。由图7C和图7H可见, *cpi1-1*突变体的下胚轴长度也显著短于野生型( $P<0.01$ ),大约为野生型下胚轴长的70%,而6个

**图6** 植物CPI1基因的表达模式

(A) RT-PCR检测CPI1基因在毛果杨、江南卷柏、小立碗藓、水稻和二穗短柄草中的表达; (B) *AtCPI1*基因在拟南芥各组织中的转录情况

**Figure 6** Transcription patterns of plant *CPI1* genes

(A) Transcription of *CPI1* genes in *Populus trichocarpa*, *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrella patens*, *Oryza sativa* and *Brachypodium distachyon*; (B) Transcription of *AtCPI1* gene in different tissues of *Arabidopsis thaliana*

**表3** *BdCPI1*转化拟南芥cpi1-1/+突变体T<sub>1</sub>代转基因株系遗传背景鉴定结果**Table 3** The genotype of *BdCPI1* transgenic T<sub>1</sub> lines of *Arabidopsis thaliana*

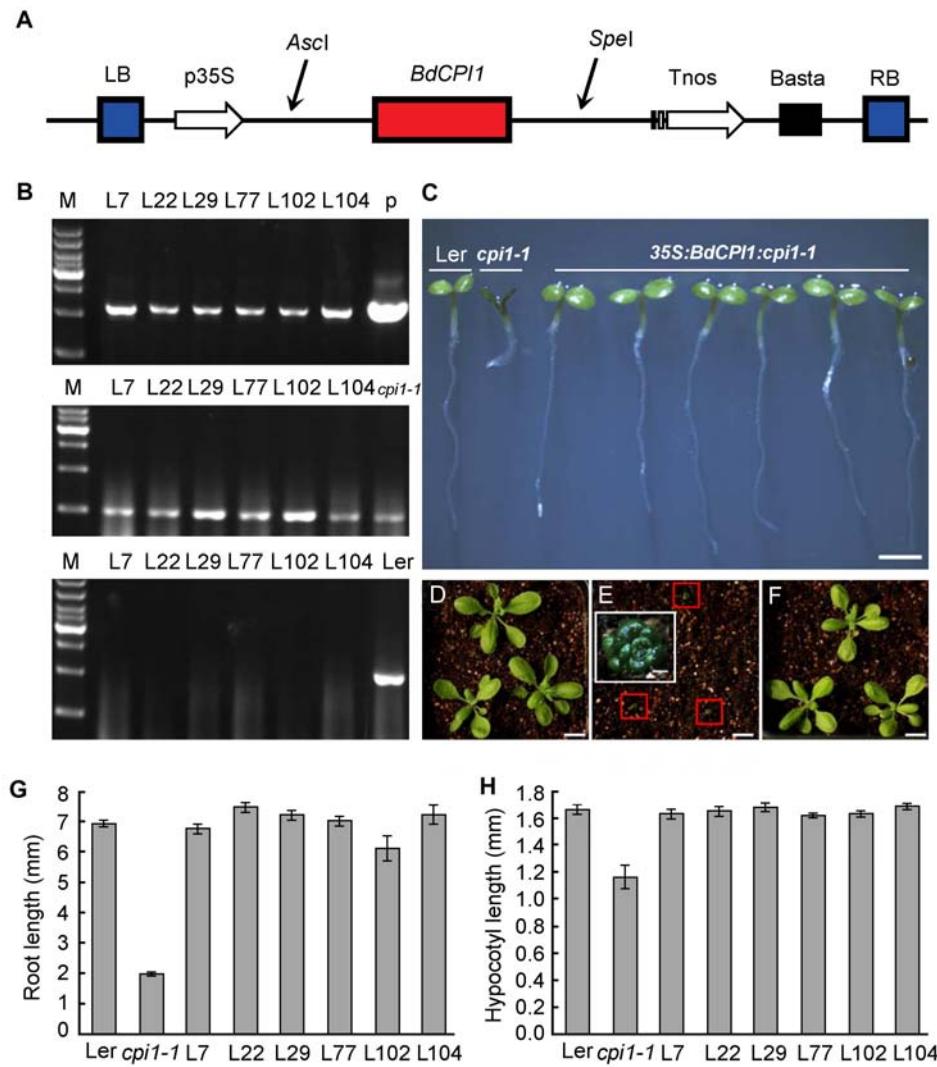
Back ground of transgenic lines	Number of transgenic lines
<i>cpi1-1</i>	24
<i>cpi1-1/+</i>	70
<i>CPI1</i>	18
Total	112

转基因株系的下胚轴长与野生型相比均没有显著差异( $P>0.05$ )。这些结果表明, *BdCPI1*基因能够回补拟南芥*cpi1-1*突变体的表型至野生型的水平。

## 2.6 讨论

拟南芥中植物固醇合成途径多数步骤的催化酶只有一个编码基因。**CPI1**是植物固醇合成途径的关键酶,也是植物固醇合成途径特有的酶。在单细胞的藻类(例如小球藻和莱因衣藻)中就已经存在**CPI1**的同源基因,这说明植物固醇合成途径和动物固醇合成途径在进化的早期就发生了分离。

拟南芥**CPI1**基因突变产生显著的表型变异,突变体表现为植株矮小,叶片小而圆,叶色深绿,根向重力生长缺陷(Men et al., 2008)。目前,只有关于拟南芥**CPI1**基因及其突变体的研究报道,在其它植物中还没有相关研究。本研究发现藻类、小立碗藓、水稻、短柄草、玉米、小米、杨树、菜豆、猴面花、盐芥和拟南芥中均存在单一拷贝的**CPI1**基因,在江南卷柏中虽然有2个拷贝,但有1个拷贝是内部产生终止密码子而不能正常翻译的假基因,因此我们的研究预示从藻类到陆生植物**CPI1**基因的拷贝数目均保守,为单拷贝基因。在植物中,大量基因以多拷贝的基因家族的形式存在,基因家族成员之间经常发生功能分化,导致重复基因产生新的功能(吕山花和孟征,2007)。然而对于单拷贝基因,其功能在整个真核生物中经常是保守的(De Smet et al., 2013)。**CPI1**基因在整个陆生植物中的单拷贝状态预示其功能在陆生植物中可能是保守的。陆生植物**CPI1**基因的基因结构高度保守,除了小立碗藓的**CPI1**有8个内含子,其它陆生植物的**CPI1**基因均含有7个内含子,且内含子的位置也非常保守。**CPI1**所编码的氨基酸序列也高度保守,蛋白序列相似性范围是48%–90%。蛋白质结构

**图7** *BdCPI1*基因能够回补拟南芥*cpi1-1*突变体的表型

(A) 35S:*BdCPI1*植物表达载体示意图; (B) *BdCPI1*转基因植株的PCR鉴定, p为含有*BdCPI1*基因的质粒正对照, Ler为野生型对照; (C) 5日龄拟南芥幼苗; (D-F) 4周龄拟南芥植株, D图为野生型拟南芥, E图红色框中的为*cpi1-1*突变体, 白色框中显示该突变体的放大, F图示过量表达*BdCPI1*基因的纯合*cpi1-1*突变体; (G) 5日龄拟南芥幼苗根长的测定结果; (H) 5日龄拟南芥幼苗下胚轴长度的测定结果。C图及E图的放大图中比例尺为0.5 mm, D、E和F图中右下角的比例尺为1 cm。

**Figure 7** *BdCPI1* gene can rescue the *Arabidopsis cpi1-1* mutant

(A) Schematic of 35S:*BdCPI1* construct; (B) Genotyping results of *BdCPI1* transgenic plants, p is the plasmid containing *BdCPI1* gene, and Ler is the wild-type *Arabidopsis* control; (C) 5-day-old *Arabidopsis* seedlings; (D-F) 4-week-old *Arabidopsis* plants, figure D is the wild-type *Arabidopsis*, the red boxes in figure E show the *cpi1-1* mutant, the white box shows *cpi1-1* mutant in a higher magnification, and figure F is homozygous *cpi1-1* mutant overexpressing *BdCPI1* gene; (G) Quantification of root length of 5-day-old *Arabidopsis* seedlings; (H) Quantification of hypocotyl length of 5-day-old *Arabidopsis* seedlings. Scale bars in figure C and the inset in figure E are 0.5 mm, and the scale bars at the lower right corner in figures D, E and F are 1 cm.

预测发现, CPI1蛋白具有非常相似的拓扑结构, 均具有7个跨膜结构域和6个亲水环。组织表达模式分析发现, 陆生植物CPI1基因的表达模式非常相似, 在不同

组织中均表达, 是组成型表达基因, 预示其在植物体的各个部位均发挥重要作用。互补实验证明*BdCPI1*基因能完全回补拟南芥*cpi1-1*突变体的表型。因此,

基于保守的单基因拷贝数目、基因结构、蛋白质拓扑结构和基因表达模式, *CPI1*基因的功能可能在陆生植物中高度保守。

我们发现在江南卷柏中除了1个能够正常翻译的*CPI1*基因外, 还存在1个由于内部产生终止密码子而不能正常翻译的*CPI1*假基因。这个假基因产生的原因可能是: 基因重复之后额外拷贝的产生导致发生功能冗余, 使其中1个拷贝由于没有受到选择压力而逐渐积累了有害突变而产生(孙红正和葛颂, 2010)。另外, 也有可能是由于剂量效应, 额外拷贝的产生导致植物产生过多的*CPI1*蛋白, 从而对植物产生危害, 因此在江南卷柏进化过程中使其中1个拷贝以假基因的方式丢失功能。

由于植物固醇与胆固醇的结构类似, 膳食中的植物固醇能抑制小肠对胆固醇的吸收, 从而降低血清中胆固醇的含量(Andersson et al., 2004)。研究发现, 膳食中含较多天然植物固醇的男性血清中的胆固醇含量比膳食中植物固醇含量少的男性降低2.6%, 低密度脂蛋白的含量降低3.1%; 对女性的测试结果也显示两指标分别降低3.5%和3.2%(Klingberg et al., 2008)。摄入富含植物固醇的食物是低度和中度高胆固醇患者控制血液胆固醇含量的一种非常方便的非药物疗法, 并且植物固醇具有抑制癌细胞增殖的作用(Bradford and Awad, 2007; Laverias et al., 2012; Maki et al., 2013)。因此, 通过基因工程手段提高粮食作物中植物固醇的含量具有重要的应用价值。*CPI1*基因是植物固醇合成途径的关键基因, 利用*CPI1*基因的高度保守性, 克隆重要粮食作物的*CPI1*同源基因, 验证其过表达是否能提高植物的固醇含量, 将为提高农作物的植物固醇含量提供候选基因。

## 参考文献

- 吕山花, 孟征 (2007). MADS-box基因家族基因重复及其功能的多样性. 植物学通报 **24**, 60–70.
- 孙红正, 葛颂 (2010). 重复基因的进化——回顾与进展. 植物学报 **45**, 13–22.
- 张喜春, 韩振海, Ходжайова ЛТ, Лутова ЛА (2001). 植物体内外甾醇的合成和生理作用. 植物生理学通讯 **37**, 452–457.
- Andersson SW, Skinner J, Ellegård L, Welch AA, Birmingham S, Mulligan A, Andersson H, Khaw KT (2004). In-  
take of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur J Clin Nutr* **58**, 1378–1385.
- Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman JL, Gribkov M, dePamphilis C, Albert VA, Aono N, Aoyama T, Ambrose BA, Ashton NW, Axtell MJ, Barker E, Barker MS, Bennetzen JL, Bonawitz ND, Chapple C, Cheng C, Correa LG, Dacre M, DeBarry J, Dreyer I, Elias M, Engstrom EM, Estelle M, Feng L, Finet C, Floyd SK, Frommer WB, Fujita T, Gramzow L, Gutensohn M, Harholt J, Hattori M, Heyl A, Hirai T, Hiwatashi Y, Ishikawa M, Iwata M, Karol KG, Koehler B, Kulkisoglu U, Kubo M, Kurata T, Lalonde S, Li K, Li Y, Litt A, Lyons E, Manning G, Maruyama T, Michael TP, Mikami K, Miyazaki S, Morinaga S, Murata T, Mueller-Roeber B, Nelson DR, Obara M, Oguri Y, Olmstead RG, Onodera N, Petersen BL, Pils B, Prigge M, Rensing SA, Riano-Pachon DM, Roberts AW, Sato Y, Scheller HV, Schulz B, Schulz C, Shakirov EV, Shibaagaki N, Shinohara N, Shippen DE, Sorensen I, Stotoka R, Sugimoto N, Sugita M, Sumikawa N, Tanurdzic M, Theissen G, Ulvskov P, Wakazuki S, Weng JK, Willats WW, Wipf D, Wolf PG, Yang L, Zimmer AD, Zhu Q, Mitros T, Hellsten U, Loque D, Ottillar R, Salamov A, Schmutz J, Shapiro H, Lindquist E, Lucas S, Rokhsar D, Grigoriev IV (2011). The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* **332**, 960–963.
- Barbez E, Kubeš M, Rolčík J, Béziat C, Pěnčík A, Wang B, Rosquete MR, Zhu J, Dobrev PI, Lee Y, Zažímalová E, Petrášek J, Geisler M, Friml J, Kleine-Vehn J (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* **485**, 119–122.
- Blanc G, Agarkova I, Grimwood J, Kuo A, Brueggeman A, Dunigan DD, Gurnon J, Ladunga I, Lindquist E, Lucas S, Pangilinan J, Proschold T, Salamov A, Schmutz J, Weeks D, Yamada T, Lomsadze A, Borodovsky M, Claverie JM, Grigoriev IV, Van Etten JL (2012). The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome Biol* **13**, R39.
- Boulté Y, Frescatada-Rosa M, Men SZ, Chow CM, Ebine K, Gustavsson A, Johansson L, Ueda T, Moore I, Jürgens G, Grebe M (2010). Endocytosis restricts Arabidopsis KNOLLE syntaxin to the cell division plane during late cytokinesis. *EMBO J* **29**, 546–558.

- Bradford PG, Awad AB** (2007). Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res* **51**, 161–170.
- De Smet R, Adams KL, Vandepoele K, Van Montagu MC, Maere S, Van de Peer Y** (2013). Convergent gene loss following gene and genome duplications creates single-copy families in flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 2898–2903.
- Fischer U, Men SZ, Grebe M** (2004). Lipid function in plant cell polarity. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 670–676.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S** (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**, 92–100.
- Hartmann MA** (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci* **3**, 170–175.
- Klingberg S, Ellegård L, Johansson I, Hallmans G, Weinshall L, Andersson H, Winkvist A** (2008). Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden. *Am J Clin Nutr* **87**, 993–1001.
- Kost B, Spielhofer P, Chua NH** (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vivo* and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J* **16**, 393–401.
- Laverias G, Escolà-Gil JC, Lerma E, Julve J, Pons C, Cabré A, Cofán M, Ros E, Sánchez-Quesada JL, Blanco-Vaca F** (2012). Phytosterols inhibit the tumor growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer. *J Nutr Biochem* **24**, 39–48.
- Lovato MA, Hart EA, Segura MJR, Giner JL, Matsuda SPT** (2000). Functional cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cycloecalenol cycloisomerase. *J Biol Chem* **275**, 13394–13397.
- Maki KC, Lawless AL, Reeves MS, Kelley KM, Dicklin MR, Jenks BH, Shneyvas E, Brooks JR** (2013). Lipid effects of a dietary supplement softgel capsule containing plant sterols/stanols in primary hypercholesterolemia. *Nutrition* **29**, 96–100.
- Men SZ, Boutté Y, Ikeda Y, Li XG, Palme K, Stierhof YD, Hartmann MA, Moritz T, Grebe M** (2008). Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol* **10**, 237–244.
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Marechal-Drouard L, Marshall WF, Qu LH, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen CL, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernandez E, Fukuzawa H, Gonzalez-Ballester D, Gonzalez-Halphen D, Hallmann A, Hannikene M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riano-Pachón DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martinez D, Ngau WC, Ottillar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR** (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245–250.
- Prochnik SE, Umen J, Nedelcu AM, Hallmann A, Miller SM, Nishii I, Ferris P, Kuo A, Mitros T, Fritz-Laylin LK, Hellsten U, Chapman J, Simakov O, Rensing SA, Terry A, Pangilinan J, Kapitonov V, Jurka J, Salamov A, Shapiro H, Schmutz J, Grimwood J, Lindquist E, Lucas S, Grigoriev IV, Schmitt R, Kirk D, Rokhsar DS** (2010). Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science* **329**, 223–226.
- Rahier A** (2011). Dissecting the sterol C-4 demethylation process in higher plants. From structures and genes to catalytic mechanism. *Steroids* **76**, 340–352.

- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin IT, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**, 64–69.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815.
- The International Brachypodium Initiative (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* **463**, 763–768.
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Dejardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Grabskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjarvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leppla JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouze P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**, 1596–1604.

## Functional Evolution of Plant CYCLOPROPYL STEROL ISOMERASE1 Gene

Xuemin Ma<sup>1</sup>, Shuangli Sun<sup>2</sup>, Hailing Yang<sup>1</sup>, Shuzhen Men<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; <sup>2</sup>Department of Plant Biology and Ecology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

**Abstract** Sterols are major components of the eukaryotic membrane and play important roles in development processes. CYCLOPROPYL STEROL ISOMERASE1 (*CPI1*) encodes a plant-specific key enzyme in the plant sterol biosynthesis pathway. Only the *CPI1* from *Arabidopsis* has been cloned and characterized. In this study, we identified single-copy *CPI1* genes from algae to flowering plants. All *CPI1* genes from land plants have a conserved gene structure and high protein sequence similarity ranging from 48% to 90%, with low protein sequence similarity between land plants and algae. Protein structure prediction revealed that all *CPI1* proteins have a similar protein structure, with 7 transmembrane domains and 6 hydrophilic loops. RT-PCR revealed that the land plant *CPI1* genes were constitutive expression genes. To investigate the function of *CPI1* genes, *CPI1* from *Brachypodium distachyon* was cloned and transformed into the *Arabidopsis cpi1-1* mutant. The *BdCPI1* gene could completely complement the function of *AtCPI1*. Thus, our data for single copy number, conserved gene structures, protein structures, and gene expression patterns suggest that the functions of land plant *CPI1* genes are highly conserved.

**Key words** *CPI1* gene, functional evolution, gene expression, mutant, plant sterol

**Ma XM, Sun SL, Yang HL, Men SZ** (2013). Functional evolution of plant CYCLOPROPYL STEROL ISOMERASE1 gene. *Chin Bull Bot* **48**, 398–410.

---

\* Author for correspondence. E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

(责任编辑: 刘慧君)