

• 药材与资源 •

刺五加鲨烯合酶和鲨烯环氧酶基因单核苷酸多态性及其与总皂苷量的相关性研究

邢朝斌¹, 劳风云², 龙月红¹, 梁能松¹, 陈 龙¹, 何 闪¹

1. 河北联合大学生命科学学院, 河北 唐山 063000

2. 河北联合大学药学院, 河北 唐山 063000

摘要: 目的 筛选刺五加鲨烯合酶(SS)和鲨烯环氧酶(SE)基因存在的单核苷酸多态性(SNP)位点, 分析各SNP位点与刺五加总皂苷量的相关性。方法 采用分光光度法测定刺五加总皂苷的量, 并划分为具有显著差异($P < 0.01$)的高、低量组; RT-PCR法扩增刺五加SS、SE基因, 根据测序结果筛选SNP位点, 利用 $R \times C$ 表的 χ^2 检验分析相关关系。结果 刺五加SS基因存在6处SNP, 其中704 bp位点为错义突变, 其他位点为同义突变, 各位点均不与刺五加总皂苷量显著相关。SE基因存在9处SNP, 其中导致错义突变的164、199、227、232 bp位点及同义突变的279、285 bp位点与刺五加总皂苷量显著相关($P < 0.05$), 其他位点为同义突变, 与刺五加总皂苷量间无显著相关性。结论 刺五加SS和SE基因存在SNP, SE基因164~285 bp位点的AGAACG与刺五加总皂苷高量组显著相关, TAGTTC与低量组显著相关。

关键词: 鲨烯合酶; 鲨烯环氧酶; 单核苷酸多态性; 刺五加总皂苷; 相关性

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)10-2020-05

Single nucleotide polymorphism of squalene synthase and squalene epoxidase genes and their correlation with content of saponins in *Eleutherococcus senticosus*XING Zhao-bin¹, LAO Feng-yun², LONG Yue-hong¹, LIANG Neng-song¹, CHEN Long¹, HE Shan¹

1. College of Life Science, Hebei United University, Tangshan 063000, China

2. College of Pharmacy, Hebei United University, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective To screen the single nucleotide polymorphism (SNP) sites of squalene synthase (SS) gene and squalene epoxidase (SE) gene in *Eleutherococcus senticosus* and to analyze the correlation between each SNP site of SS and SE genes and the content of the total saponins in *E. senticosus*. **Methods** The contents of the total saponins in *E. senticosus* were detected by spectrophotometric method and divided into high- and low-content groups with significant difference ($P < 0.01$). RT-PCR method was developed to amplify SS and SE genes. SNP sites were screened according to sequencing result. The correlation was observed by $R \times C$ χ^2 test and analysis. **Results** Six SNP sites existed in SS gene of *E. senticosus*, among which 704 bp site led to missense mutation and other SNP sites were synonymous mutations. No SNP site in SS had significant correlation with the content of the total saponins in *E. senticosus*. There were nine SNP sites in SE gene. Sites at 164, 199, 227, and 232 bp were missense mutation while at 279 and 285 bp were synonymous mutations, and all of them had the significant correlation with the content of the total saponins in *E. senticosus* ($P < 0.05$). Other SNP sites of SE gene were synonymous mutations and had no significant correlation with the content of the total saponins in *E. senticosus*. **Conclusion** There are SNP sites in SS and SE genes of *E. senticosus*. AGAACG located in 164—285 bp of SE gene could significantly correlate with the high-content group of the total saponins in *E. senticosus*. TAGTTC located in the same sites could significantly correlate with the low-content group of the total saponins in *E. senticosus*.

Key words: squalene synthase (SS); squalene epoxidase (SE); single nucleotide polymorphism (SNP); total saponins in *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.; correlation

收稿日期: 2012-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30701086); 河北省自然科学基金资助项目(C2009001252, H2012401006)

作者简介: 邢朝斌(1975—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为分子生药学、药用植物细胞工程。

Tel: (0315)3726238 Fax: (0315)3726341 E-mail: xingzhaobin@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2012-09-06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120906.1617.004.html>

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. 根、茎、叶均可入药,是我国传统的珍贵药用植物^[1],具有增强免疫力、抗疲劳、抗衰老等药理活性^[2]。三萜皂苷是刺五加的主要药效成分之一,刺五加中三萜类化合物均以齐墩果酸为基础单位^[2-3]。生物体中形成三萜皂苷是一个非常复杂的过程,在这个过程中涉及许多酶^[4]。依赖甲羟戊酸的类异戊二烯途径是三萜皂苷生物合成的公认途径,在该途径中两分子的法呢酰基二磷酸在鲨烯合酶(squalene synthase, SS)的催化下缩合成为一分子鲨烯^[5],随后鲨烯在鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)的催化下合成2,3-氧化鲨烯^[6],进而经过一系列的反应最终生成包括以齐墩果酸为基础单位的皂苷在内的各种三萜类化合物^[7]。在这个过程中,SS基因的超表达可使三萜皂苷的量提高2倍以上^[8],SE基因经RNAi处理后三萜皂苷的量也随之降低^[9],因此SS基因和SE基因在调控碳流流向初级代谢或次级代谢中起到关键作用,是三萜类化合物生物合成的关键酶^[6,10],其微小的改变即可引起下游产物的大幅变化^[8-9]。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是生物基因组DNA中常见的一种遗传变异类型^[11]。近年来植物基因组中重要SNP的搜索也已成为一个研究热点。沈湛云等^[7]通过直接测序法发现甘草bAS基因编码区在94、254 bp处分别存在2个SNP位点,并找到与甘草酸量显著相关的基因型。赵婷等^[11]在烟草线粒体基因atp6中发现了6个SNP,其中第59 bp的SNP位点与烟草胞质雄性不育特性间存在显著地相关性。

目前关于刺五加SS和SE基因及用SNP方法分析两者与刺五加皂苷量相关性的研究尚未见报道,本实验通过对刺五加SS和SE基因的测序分析,筛选存在的SNP位点,调查其与刺五加总皂苷量的关系,以期阐明刺五加总皂苷量差异形成的分子机制和为刺五加的分子育种提供依据。

1 材料

刺五加分别为采自黑龙江鸡西,吉林穆棱、伊通满族自治县、梅河口、珲春,辽宁本溪和河北兴隆雾灵山国家级自然保护区的3年生野生植株,每个产地6株,共42株,经河北联合大学生命科学学院邢朝斌副教授鉴定为五加科五加属植物刺五加*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.。栽植于河北联合大学种植园,以相同条件

进行管理。次年取叶片为刺五加总RNA提取材料,并选取着生部位相同、发育状态相似的各样本叶片测定刺五加总皂苷量。

UV—9100 紫外-可见分光光度仪(北京瑞利分析仪器公司);KDC—16H 高速台式离心机;RE—52ZZ 旋转蒸发器(上海亚荣仪器厂);万分之一电子天平(上海亚荣仪器厂);KQ3200DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);0.45 μm 针筒式微孔滤膜过滤器;FW 100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

齐墩果酸对照品购自中国药品生物制品检定所,批号为110709-200505,香兰素、浓硫酸、甲醇、乙醇、石油醚均为国产分析纯,市售的娃哈哈纯净水。RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 为 Fermentas 公司产品, RNA 提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,LA Taq 酶和 dNTPs 均购自 Takara 公司。

2 方法

2.1 刺五加总皂苷量的测定和分组

参照文献方法^[12],改良后测定刺五加总皂苷量。

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品 10.45 mg,置 20 mL 量瓶中,加入甲醇溶解定容,储存于 4 °C 冰箱中备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 将刺五加叶于 70 °C 烘干,粉碎。精密称取刺五加叶粉末 0.5 g,置 100 mL 圆底烧瓶中并加入 25 mL 95%乙醇,超声 45 min,提取液滤过后,甲醇洗涤滤渣数次并入滤液,甲醇置干,残留物悬浮于 25 mL 水中,15 mL 石油醚脱脂 3 次,水溶液用水饱和正丁醇 15 mL 提取 4 次,合并正丁醇层,减压蒸干,残留物用甲醇溶解转移至 25 mL 量瓶中并定容至刻度,摇匀后过 0.45 μm 滤膜,滤液作为供试品溶液。

2.1.3 线性关系考察 准确吸取 50、80、100、200、300 μL 齐墩果酸对照品溶液至试管中挥干,加 0.5 mL 8%香草醛乙醇溶液和 5 mL 72%硫酸,混匀。至 60 °C 水浴加热 10 min,取出试管置冰浴冷却 15 min,以溶剂为空白,分别测定 543 nm 处的吸光度值,绘制标准曲线,得测定刺五加总皂苷的回归方程为 $Y=121.26X+3.9494$, $r=0.9996$ ($n=5$),线性范围为 3.78~22.69 μg/mL。

2.1.4 精密度试验 将含 0.015 mg/mL 刺五加总皂

昔对照品的溶液分别测定吸光度值5次,计算吸光度值的RSD为0.98%。

2.1.5 重复性试验 精密称取0.5 g刺五加叶片粉末6份,按“2.1.2”项的方法制备供试品溶液并测定吸光度值,计算总皂苷质量分数,其RSD为2.5%。

2.1.6 稳定性试验 精密称取0.5 g刺五加叶片粉末,按“2.1.2”项方法制备供试品溶液,每隔30 min测定吸光度值,共测5次,其RSD为2.62%。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取0.5 g刺五加叶片粉末5份,分别加入一定量齐墩果酸对照品溶液,按“2.1.2”项方法制备供试品溶液并测定吸光度值,其平均回收率为97.4%,RSD为2.35%。

2.1.8 刺五加总皂苷量的测定与分组 根据测定的总皂苷量,应用SPSS 17.0软件将42株刺五加划分为具有显著差异的高、低量组。

2.2 刺五加SS和SE基因的扩增及SNP位点的分析

2.2.1 刺五加总RNA的提取与逆转录 称取0.1 g刺五加叶片,按照试剂盒的说明书提取刺五加总RNA。按照Revert Aid™ First strand cDNA synthesis Kit说明书的要求,取3 μL总RNA,逆转录为cDNA。

2.2.2 刺五加SS和SE基因的扩增 根据刺五加的SS和SE基因cDNA序列,设计2对引物,SS上游引物ES1: 5'-TAGAGAGAAAATGGGAAG-3',下游引物ES4: 5'-TCACAGGCTATTTGGTAG-3'; SE上游引物ESE-S: 5'-CCAACACCATGAATTCTTCTTC-3',下游引物ESE-X1: 5'-GAAGGCCATAATCACTT-TCTTAG-3'。反应体系25 μL,其中上下游引物各1 μL,10×缓冲液(含15 mmol/L MgCl₂) 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,模板cDNA 1.5 μL,LA Taq酶1 μL,补dd H₂O至25 μL。反应条件为预变性94℃、5 min;变性94℃、1 min;退火51.5℃、30 s;延伸72℃、1~2 min。35个循环后72℃延伸10 min。

2.2.3 PCR产物的回收与测序 取10 μL扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶上电泳鉴定,紫外光下切下目的片段,按照凝胶回收试剂盒说明书进行回收纯化后直接测序,测序引物与PCR扩增引物相同。测序工作由Takara公司完成。

2.2.4 SNP位点的分析 利用Clustal x 1.8软件,将测序得到的刺五加SS和SE序列进行比对分析,筛选SNP位点,同时通过DNAMAN 6.0软件将上述序列翻译为氨基酸序列进行比对。

2.2.5 统计学方法 各基因型在高、低量组中分布的

比较采用R×C表 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差别有显著性。

3 结果与分析

3.1 刺五加SS基因SNP焦点的分布

测序总长度为1 258 bp,共发现6个SNP位点,分别为起始密码子后第177 bp位点发生C/G颠换,704 bp位点发生A/T颠换,708、789、1 024、1 125 bp位点发生T/C转换,以704、708 bp位点为例,见图1。其中704 bp位点的突变导致该位点处的密码子发生AAA/ATA的变化,对应的氨基酸也出现赖氨酸/异亮氨酸的改变,为错义突变;其他位点均未导致合成氨基酸的改变,为同义突变。各序列已在GenBank注册,多态性位点组合CATTCT、CTCTTT、GTCTTT、CATTCC和CTTCCT的GenBank登录号分别为HQ456917、HQ456918、HQ456920、HQ456921和HQ456922。

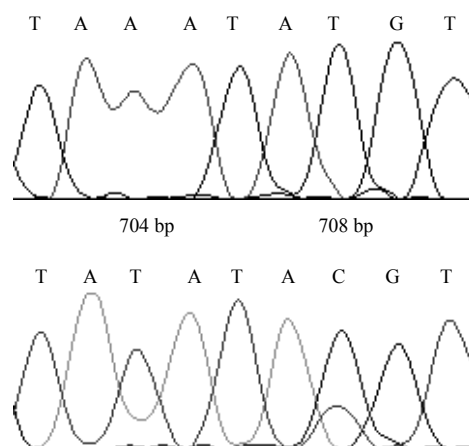


图1 测序确认刺五加SS基因SNP位点

Fig. 1 SNP sites of SS gene in *E. senticosus* by sequencing

3.2 刺五加SE基因SNP位点的筛选

测序总长度为1 684 bp,共发现9个SNP位点,分别为起始密码子后164 bp位点发生A/T颠换,199、227 bp位点发生A/G转换,232 bp位点发生A/T颠换,279 bp位点发生T/C转化,285 bp位点发生G/C颠换,1 083 bp位点发生A/T颠换,1 143 bp位点发生A/C颠换,1 347 bp位点发生A/G转换。其中164、199、227和232 bp位点的突变导致对应位点处的密码子分别发生ATC/AAC、GTT/ATT、TAC/TGC和AGC/TGC的变化,对应的氨基酸也分别出现异亮氨酸/天冬氨酸、缬氨酸/异亮氨酸、酪氨酸/半胱氨酸和丝氨酸/半胱氨酸的改变,为错义突变,其他位点均未导致合成氨基酸的改变,为同义突变。共分离到刺五加SE基因的SNP位点组合

3 个, 分别为 AGAACGAAA、TAGTTCAAA 和 AGAACGTCG, 各序列已在 GenBank 注册, 登录号分别为 JF818128.1、JF818127.1 和 JF818129.1。

3.3 刺五加总皂苷的测定结果

所测刺五加样本的总皂苷质量分数为 0.883%~3.366%。采用 SPSS 17.0 软件将 42 株刺五加划分为具有极显著差异 ($P<0.01$) 的高量组和低量组。其中低量组总皂苷质量分数为 0.883%~1.554%, 共 19 株, 其中产地伊通、珲春和梅河口各 6 株, 鸡西 1 株; 高量组总皂苷质量分数为 2.223%~3.366%, 共 23 株, 其中产地穆稜、本溪、兴隆各 6 株, 鸡西 5 株。高量组的总皂苷平均质量分数是低量组的 2.29 倍。

3.4 刺五加 SS 和 SE 基因 SNP 位点与刺五加总皂苷量的相关性

刺五加 SS 和 SE 基因 SNP 位点与刺五加总皂苷量的相关性分析结果见表 1。其中 SS 基因的 6 个 SNP 位点与刺五加总皂苷量间均无显著相关性。共分离到 SS 基因的 SNP 位点组合 5 个, 分别为 CATTCT、CTCTTT、CATTCG、CTTCCT 和 GTCTTT, 其中 CTTCCT 组合基因型个体的刺五加总皂苷量显著高于其他基因型个体 ($P<0.01$), GTCTTT 基因型个

表 1 刺五加 SS 和 SE 基因 SNP 位点与刺五加总皂苷量相关性的 χ^2 检验结果

Table 1 χ^2 test of correlation between SNP sites of SS and SE genes and content of total saponins in *E. senticosus*

基因	位置 / bp	碱基变异	χ^2 值
SS	177	C/G	2.917
	704	A/T	0.058
	708	T/C	0.630
	789	T/C	0.467
	1 024	T/C	0.630
	1 125	T/C	0.467
SE	164	A/T	7.000*
	199	A/G	7.000*
	227	A/G	7.000*
	232	A/T	7.000*
	279	T/C	7.000*
	285	G/C	7.000*
	1 083	A/T	0.194
	1 143	A/C	0.194
	1 347	A/G	0.194

与刺五加总皂苷量的相关性: * $P<0.05$

Correlation with content of total saponins in *E. senticosus*: * $P<0.05$

体的刺五加总皂苷量显著低于其他基因型个体 ($P<0.01$), CATTCT 基因型个体的总皂苷量变异幅度最大, 最大相差 3.41 倍。

SE 基因 164、199、227、232、279、285 bp 的 SNP 位点与刺五加总皂苷的量显著相关 ($P<0.05$), 这些位点的 TAGTTC 是刺五加总皂苷低量的标志性位点, AGAACG 为高量的标志性位点。其他 SNP 位点与刺五加总皂苷量间的相关均未达显著水平。就 SNP 位点组合而言, AGAACGAAA 和 AGAACGTCG 基因型个体的刺五加总皂苷量显著高于 TAGTTCAAA 基因型个体 ($P<0.05$)。但 AGAACGAAA 基因型个体中存在 21.4% 的低量组个体, 而 TAGTTCAAA 基因型个体中不存在高量组个体。

4 讨论

不同产地刺五加的药用分量间存在较大差异已被众多实验所证实^[13], 本研究中刺五加样品的刺五加总皂苷量间也存在显著差异。植物次生代谢产物量的高低是由其特定的次生物质形成与积累所引起的, 产生和积累的关键酶基因是其分子内因, 诱导这些基因表达的生态环境和栽培措施是其外因^[14]。本研究中为了能筛选到更多的 SNP 位点, 选取了地理跨度较大的 7 个产地的刺五加为研究试材, 但为了避免环境条件和发育程度对刺五加总皂苷量的影响, 在选取刺五加植株时全部选用了 3 年生、生长发育状况相似的植株, 加之所有植株栽植于相同条件下 1 年后在同一时间选择生长状况相似的叶片作为刺五加总皂苷量测定和 SNP 位点分析的材料, 从而最大限度地排除了环境条件和植株生理年龄等非遗传因素所造成的影响, 使实验结果能够准确地反映出生物合成皂苷的关键酶基因这一分子内因的作用。

本研究中筛选出的 6 个刺五加 SS 基因 SNP 位点中, 5 个同义突变位点和 1 个导致氨基酸发生赖氨酸/异亮氨酸错义突变的位点与刺五加总皂苷量间均不存在显著的相关性。一般认为 SS 是定位于内质网膜上的酶^[5,15], 蛋白质的跨膜分析表明, 无论第 235 位为赖氨酸还是异亮氨酸, 两者均具有 2 个跨膜区域, 且其跨膜方式相同。这说明 235 位的赖氨酸/异亮氨酸错义突变并未影响到 SS 蛋白的跨膜方式, 且该位点并非 SS 催化法呢酰基二磷酸缩合成鲨烯的活性位点。但筛选出的刺五加 SE 基因的 5 个同义突变位点中, 仅 1 083、1 143、1 347 bp 位点与刺五加皂苷量间无相关性, 而 279 bp 位点和

285 bp 位点与引起氨基酸发生错义突变的 164、199、227、232 bp 位点均与刺五加总皂苷量间存在显著的相关性。之所以出现这种现象,是因为在本实验所检测的样本中,SE 基因的 SNP 位点并非随机分布,在所检测到的 3 种 SNP 位点组合类型中,前 6 个 SNP 位点组合仅 AGAACG 和 TAGTTC 2 种。即 279 bp 和 285 bp 位点的 2 个同义突变与 164、199、227、232 bp 位点的错义突变呈连锁现象,与此相同,后 3 个 SNP 位点组合也仅 AAA 和 TCG 2 种,因此前 6 个和后 3 个 SNP 位点中的每个单一位点与刺五加总皂苷量的相关性分析结果分别一致。

鲨烯环氧酶均含有一个黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)结合区域,该区域涉及到与 FAD 结合的很多酶,这些酶以 FAD 为辅助因子参与多种催化反应^[6],是甾醇、三萜类化合物生物合成中的关键位点^[17],刺五加 SE 基因的 3 个 SNP 基因型中均包含与 FAD 结合的模式序列,且在该序列范围内 279 bp 和 285 bp 位点的 SNP 未引发氨基酸的改变。与 SS 相似,SE 也是定位于内质网膜上的酶^[6],本研究分离到的 3 个基因型的刺五加 SE 的推测蛋白都存在 2 个跨膜螺旋。且各 SNP 位点均不存在于跨膜螺旋部分,这说明 3 个 SNP 基因型刺五加的 SE 均具有基本的催化能力和相同的跨膜结构。但蛋白质的二级结构分析表明,SE 前 4 位为异亮氨酸、缬氨酸、酪氨酸和丝氨酸的个体与天冬氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸和半胱氨酸的个体相比较而言,延伸链(extended strand)减少 1 个,β 折叠(β turn)增加 1 个,同时在该位点附近蛋白质的亲水性也产生一定变化。这些变化必然导致对应蛋白表达效率和酶的空间存在方式的改变,进而影响到中间产物 2,3-氧化鲨烯和终产物三萜皂苷的产量。

药用植物的次生代谢产物是特定的基因型和特定的生境共同作用的产物^[14]。与其他药用植物相似,刺五加的遗传背景信息较少,难以分析其作为分子内因的关键酶基因,导致仅能就生境等外因进行探讨^[12-13,18]。本实验在筛选出刺五加 SS 和 SE 基因存在的 SNP 位点基础上,分析了各 SNP 位点与刺五加总皂苷量的相关关系,为揭示刺五加总皂苷量差异的分子机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 邢朝斌,劳风云,田春迎,等. 刺五加叶柄的体细胞胚胎发生研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1302-1305.
- [2] 涂正伟,周渭渭,单 淇,等. 刺五加的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [3] 张宝香,姜 英,张雅凤. 刺五加叶研究新进展 [J]. 特产研究, 2009, 31(4): 69-70.
- [4] 蒋世翠,刘伟灿,王 义,等. 西洋参不同器官中皂苷量与鲨烯合成酶和鲨烯环氧酶基因表达的相关性 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 579-584.
- [5] Kim T D, Han J Y, Huh G H, *et al.* Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(1): 125-137.
- [6] Ryder N S. Squalene epoxidase as a target for the allylamines [J]. *Biochem Soc Trans*, 1991, 19(3): 774-777.
- [7] 沈湛云,刘春生,王学勇,等. 甘草 β-香树脂醇合成酶编码区 SNP 与甘草酸量的相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 813-816.
- [8] Seo J W, Jeong J H, Shin C G, *et al.* Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(8): 869-877.
- [9] 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.
- [10] Shechter I. The road to squalene synthase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(5): 1261-1266.
- [11] 赵 婷,朱滕义,刘齐元,等. 烟草线粒体基因 *atp6* 的 SNP 及其与 CMS 的相关性 [J]. 作物学报, 2009, 35(9): 1655-1661.
- [12] 孟祥才,颜丙鹏,孙 晖,等. 不同性别类型刺五加叶有效成分量季节积累规律研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 88-90.
- [13] 吴少杰,邢朝斌,劳风云,等. 不同产地刺五加中刺五加苷 E 量的高效液相色谱测定 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 1854-1855.
- [14] 杨生超,赵昶灵,文国松,等. 植物药材道地性的分子机制研究与应用 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1738-1741.
- [15] Kim Y S, Cho J H, Park S, *et al.* Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum* [J]. *Planta*, 2011, 233(2): 343-355.
- [16] Gomelsky M, Klug G. BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms [J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(10): 497-500.
- [17] Favre B, Ryder N S. Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(2): 443-447.
- [18] 曹建国,祖元刚,杨逢建,等. 不同生境下刺五加金丝桃甙量的季节变化 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(6): 1007-1010.