

## 罗汉果内参基因筛选和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶时空表达分析

郭茜茜<sup>1,2</sup>, 马小军<sup>3</sup>, 白隆华<sup>2</sup>, 潘丽梅<sup>2</sup>, 冯世鑫<sup>2</sup>, 莫长明<sup>2,4\*</sup>

1. 东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030
2. 广西药用植物园, 广西 南宁 530023
3. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100094
4. 广西大学农学院, 广西 南宁 530004

**摘要:** 目的 筛选罗汉果 *Siraitia grosvenorii* 基因表达分析的内参基因, 研究昔 V 生物合成关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (*HMGR*) 时空表达特性。方法 克隆罗汉果看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*)、微管蛋白 ( $\alpha$ -*tubulin*)、肌动蛋白 ( $\beta$ -*actin*) 和泛素 (*UBQ5*) 的基因片段, 评价了 4 个基因在不同部位 (叶、茎和果) 及果实发育不同时期的稳定性, 筛选内参基因, 分析 *HMGR* 的时空表达特性。结果 *UBQ5* 表达最稳定, 适宜作为内参基因; 叶片的 *HMGR* 相对表达量较低, 茎和果实相对表达量较高; 果实不同发育时期, *HMGR* 的相对表达量呈现先升高再降低然后再升高再降低的波动式变化, 70 d 后 *HMGR* 的相对表达量最高, 然后依次是 5、30、10、50 d。结论 *UBQ5* 是适宜的内参基因。叶片、茎和果实中, *HMGR* 的相对表达量差异明显。果实发育不同时期, *HMGR* 的相对表达量呈波动式变化, 与昔 V 合成积累变化规律相似。

**关键词:** 罗汉果; 看家基因; 内参基因; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 时空表达特性; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 微管蛋白; 肌动蛋白; 泛素

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)15-2224-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.15.020

## Screening of reference genes in *Siraitia grosvenorii* and spatio-temporal expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

GUO Qian-qian<sup>1,2</sup>, MA Xiao-jun<sup>3</sup>, BAI Long-hua<sup>2</sup>, PAN Li-mei<sup>2</sup>, FENG Shi-xin<sup>2</sup>, MO Chang-ming<sup>2,4</sup>

1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China
2. Guangxi Medicinal Botanical Garden, Nanning 530023, China
3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China
4. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China

**Abstract: Objective** To screen the reference genes of *Siraitia grosvenorii* for gene expression analysis, and to study the spatio-temporal expression characteristics of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (*HMGR*) which was the key enzyme of mogroside V biosynthesis.

**Methods** In this study, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), microtubule associated protein ( $\alpha$ -*tubulin*), actin ( $\beta$ -*actin*), and ubiquitin (*UBQ5*) fragments of *S. grosvenorii* were cloned, and the stabilities of the four housekeeping genes were evaluated in different positions (leaves, stems, and fruits) and different periods of fruit development. In addition, the spatio-temporal expression of *HMGR* gene was analyzed. **Results** *UBQ5* was the most suitable reference gene for spatio-temporal expression analysis in *S. grosvenorii*; The relative expression of *HMGR* was low in leaves, and that in stems and fruits was higher; The relative expression quantity of *HMGR* in fruits showed the fluctuation changes that increased firstly and then decreased, then increased and decreased again; The highest expression of *HMGR* was at 70 d of fruit development period, followed by 5, 30, 10, and 50 d. **Conclusion** *UBQ5* is the most suitable reference gene in *S. grosvenorii*. The relative expression of *HMGR* changes significantly in leaves, stems, and fruits. The relative expression quantity of *HMGR* in fruits shows the fluctuation changes, which is similar to synthetic accumulation pattern of mogroside V.

**Key words:** *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey; housekeeping gene; reference gene; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; spatio-temporal expression characteristics; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; microtubule associated protein; actin; ubiquitin

收稿日期: 2014-01-23

基金项目: 广西自然科学基金青年基金项目 (2011GXNSFB018088)

作者简介: 郭茜茜 (1983—), 女, 博士研究生, 研究方向为作物生理学。Tel: (0771)2443056 E-mail: xxguo19850502@126.com

\*通信作者 莫长明 Tel: (0771)5610462 E-mail: mochming@126.com

罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey 是中国传统药材<sup>[1]</sup>。1995年,美国食品药品监督管理局(FDA)批准罗汉果甜苷用作食品添加剂。罗汉果的“甜味成分”实际上是葫芦烷三萜苷类化合物,它们拥有共同的苷元——葫芦烷型四环三萜骨架(罗汉果醇),除少数几种化合物外均具有甜味<sup>[2]</sup>。其中,苷V是主要甜味成分<sup>[3]</sup>,甜度相当于蔗糖的256~344倍<sup>[4-5]</sup>,作为食糖代用品受到广泛关注。植物体自然生产苷V的量很少,可以通过植物改良或工程菌生产等方式提高苷V的产量,满足其应用开发的需求。因此,对苷V的生物合成机制的研究意义重大。本课题组对罗汉果萜类物质生物合成机制有一定的研究,预测了苷V的生物合成路径<sup>[6]</sup>,并且正在进行相关的下游研究工作。MEP路径的产物异戊烯基焦磷酸(IPP)和二甲基丙烯焦磷酸(DMAPP)是罗汉果醇的合成前体<sup>[6-7]</sup>。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)是2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸代谢途径的第一个关键酶和限速酶。HMGR活性在一定程度上影响着罗汉果醇的合成及甜苷的积累。

定量PCR是基因表达分析的重要工具,具有灵敏度高、定量准确和速度快等优点。基因表达的时空特性分析通常使用相对定量分析(relative quantification, RQ)法。以一个稳定表达的看家基因作为内对照,即内参基因(reference gene),根据目标基因相对于内参基因的升高或降低表现,判断目标基因的表达特性<sup>[8-9]</sup>。植物研究中,常用的看家基因很多,需要根据不同的实验要求酌情筛选,因为在任何组织器官及各种处理下,都能够稳定表达的理想型内参基因是不存在的。选择适宜的内参基因是定量PCR研究的基础,也是定量PCR分析准确性的保障。

本研究克隆了罗汉果甘油醛-3-磷酸脱氢酶

(*GAPDH*)、微管蛋白( $\alpha$ -*tubulin*)、肌动蛋白( $\beta$ -*actin*)和泛素(*UBQ5*)基因的片段,分析比较了它们的稳定性,筛选罗汉果不同部位(叶、茎和果)及果实发育不同时期基因表达分析的内参基因,为罗汉果的基因表达研究奠定方法学基础。利用所选内参基因,分析苷V生物合成关键酶编码基因 *HMGR* 的时空表达特性,为其生物合成机制和合成路径的改造研究提供了依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey 采自广西药用植物园,经中国医学科学院药用植物研究所马小军研究员鉴定为“农院B6”品种。采集授粉后5d的叶片、茎及授粉后5、10、30、50、70d的青果,茎和叶片剪成小块,青果取果肉,液氮速冻,-80℃保存备用。

### 1.2 RNA分离

100mg冻鲜样液氮保护下研磨成粉末状,转移至预冷的1mL TRIzol (Invitrogen)试剂中裂解15min,0.2mL氯仿抽提蛋白质2次,1mL异丙醇沉淀RNA 10min,沉淀RNA溶解于30μL ddH<sub>2</sub>O中。1%琼脂糖凝胶电泳检验RNA的纯度和完整性。

### 1.3 看家基因片段的克隆

采用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, D6210s)试剂盒, Oligo dT 作为引物逆转录得到 cDNA。克隆看家基因的简并引物见表1。使用 Primix LA Taq 酶 (TaKaRa, D336A) 扩增 *GAPDH*、 $\alpha$ -*tubulin*、 $\beta$ -*actin* 和 *UBQ5* 的基因片段,纯化回收后连入克隆菌,进行蓝白斑筛选,挑取阳性菌,PCR扩增检测,再测序检测,通过NCBI BLAST比对确认序列的正确性。利用正确的看家基因片段设计定量PCR引物(表2),进行定量PCR反应。

表1 看家基因片段克隆的简并引物

Table 1 Degenerate primers of housekeeping genes cloning

名称	引物序列(5'-3')	目标片段长度 / bp
<i>GAPDH</i>	正向引物 TGTTTCGTGGTGGGCGTNAAYGARAA	461
	反向引物 GGACACCACGTCGTCCTCNGTRTANCC	
$\alpha$ - <i>tubulin</i>	正向引物 GGAGAAGATGACCCAGATCATGTTYGARACNTT	863
	反向引物 CCTTGGCGATCCACAICTGNTGRAANGT	
$\beta$ - <i>actin</i>	正向引物 CGGGCCGTGTTTCATGGAYYTNGARCC	731
	反向引物 AAGTTGGTGGGGCACCANTCNRYRAA	
<i>UBQ5</i>	正向引物 GGAGGTGGAGTCCCTCCGAYACNATHGA	408
	反向引物 TGGTACACGTAGGTCAGGCCRCAYTTNCC	

表 2 定量 PCR 引物序列  
Table 2 Primer sequence of quantitative PCR

名称	引物序列 (5'-3')	目标片段长度 / bp
HMGR	正向引物 TCTTCAATCGCAGCCAACAA	243
	反向引物 AGGACGCTATGAGGGAAACAAT	
$\beta$ -actin	正向引物 CTCAAAGACCAGCTCTTCAGTTGA	134
	反向引物 TACCAGCAGCCTCCATACCAA	
GAPDH	正向引物 TGTTCACTCAATCACTGCCACC	230
	反向引物 TTGCCTTCTTCTCCAACCTCA	
UBQ5	正向引物 ATAAAAGACCCAGCACCACATTC	234
	反向引物 CCCTTGCCGACTACAACATCC	
$\alpha$ -tubulin	正向引物 TTGTTCTGTTGCTATGCCTTCTC	264
	反向引物 ACTGATGTTGCTGTGCTCCTC	

逆转录采用 Random 6 mers 引物获得 cDNA。定量 PCR 反应使用 ABI7500 定量 PCR 仪, 相对标准曲线法进行基因表达量分析。SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TaKaRa, DRR820A) 试剂盒, 反应体系是 25  $\mu$ L, 引物终浓度为 0.2  $\mu$ mol/L, 模板 1.0  $\mu$ L, ROX Reference Dye II 0.5  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 补足体系, 设置 3 个重复。阴性对照用 1.0  $\mu$ L 水代替模板。反应条件: 95  $^{\circ}$ C、5 s 活化反应酶; 三步法 95  $^{\circ}$ C、5 s, 58  $^{\circ}$ C、30 s, 72  $^{\circ}$ C、34 s, 40 个循环; 溶解度曲线条件: 95  $^{\circ}$ C、15 s, 60  $^{\circ}$ C、1 min, 95  $^{\circ}$ C、30 s, 60  $^{\circ}$ C、15 s。制作标准曲线采用梯度稀释法, 原液作为最高浓度反应液 1, 1:3 依次稀释, 得到反应液 2、3、4 和 5。原液 1:20 稀释作为样品反应液。通过网站 <http://www.leonxie.com/referencegene.php> 分析筛选内参基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 克隆看家基因片段

GAPDH、 $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -actin 和 UBQ5 等常用作内参基因, 罗汉果中没有相应的序列报道。根据近缘物种基因序列设计简并引物, 克隆 GAPDH、 $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -actin 和 UBQ5 4 个基因的部分片段。克隆片段测序结果的 BLAST 比对见表 3。克隆片段与不同物种相应基因序列同源性高于 75%, 即所得克隆为目标基因。

### 2.2 优化定量 PCR 反应

用双标准曲线定量法, 分析罗汉果 GAPDH、 $\alpha$ -tubulin、 $\beta$ -actin 和 UBQ5 表达变化情况。反应体系优化, 选择适宜的模板浓度和引物浓度, 反应条件优化主要考虑退火温度和延伸时间。定量 PCR 反

表 3 看家基因片段 BLAST 比对部分结果

Table 3 Partial BLAST results of housekeeping gene fragments

看家基因	编号	来源	覆盖率 / %	E 值	同源性 / %
GAPDH	HQ156465.1	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	97	$1.56 \times 10^{-4}$	91
	FQ394406.1	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	98	$1.28 \times 10^{-5}$	86
	JQ183068.1	辽东木 <i>Aralia elata</i>	97	0.126	86
$\alpha$ -tubulin	XM004156822.1	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	96	0	90
	X67162.1	扁桃 <i>Amygdalus communis</i>	96	0	88
	FJ228477.1	垂枝桦 <i>Betula pendula</i>	96	0	86
$\beta$ -actin	DQ115882.1	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	93	0	93
	JF737035.1	籼稻 <i>Manafiera indica</i>	99	0	86
	JF781303	桔梗 <i>Platycodon grandiflorum</i>	99	0	85
UBQ5	AY372537.1	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	99	1.330	90
	DQ839403.1	桑 <i>Morus bombycis</i>	99	0.125	88
	AF386524.1	西洋梨 <i>Pyrus communis</i>	99	0.125	88

应常用 2 步法。但是, 本研究的扩增片段设计较长, 95 °C、5 s 和 60 °C、34 s 扩增效果不是很好。改用 3 步法, 退火温度为 58 °C, 延伸时间为 34 s。热启动消除了热循环开始前非特异性产物的影响, 保证了定量 PCR 反应特异性。

*GAPDH*、*α-tubulin*、*β-actin* 和 *UBQ5* 的标准曲线参数、扩增效率和溶解温度见表 4。斜率为 $-(3.350 \pm 0.088)$ , 在 $-3 \sim -3.5$  内。相关系数均大于 0.99, 高于定量 PCR 反应要求的 0.98。扩增效率 $(98.991 \pm 3.609) \%$ , 大于 0.80 小于 1.20。*α-tubulin* 扩增效率 95.382% 距离理想扩增效率 100% 较大, 但仍处于合理范围内。*GAPDH* 和 *UBQ5* 的斜率、相关系数和扩增效率都很接近。

$C_t$  的大小反映了对应基因的表达丰度高低。叶片、茎和果实中, *β-actin* 的  $C_t$  平均值最大 (表 5), 即其表达丰度低于其他 3 个基因。同一个基因的  $C_t$  即使相差一两个循环, 在扩增量呈指数变化趋势的状态下, 不同样品间基因表达量的差异也是很大的。叶片中 *α-tubulin* 的  $C_t$  为 27.757, 高于茎/果实的 22.322/23.100 (5/4 个循环), 可知叶片与茎/果实中 *α-tubulin* 表达丰度相差很大。*GAPDH*、*β-actin* 和 *UBQ5* 基因 70 d 的  $C_t$  值大于 50 d 5 个循环以上, 表达丰度明显低于其他时期 (表 6)。溶解度曲线反映了 PCR 反应的特异性。*GAPDH*、*α-tubulin*、*β-actin* 和 *UBQ5* 峰值单一, 特异性较好 (表 5、6)。

表 4 看家基因标准曲线参数、扩增效率和溶解温度

Table 4 Standard curve parameters, amplification efficiency, and solution temperature of housekeeping genes

基因名称	斜率	相关系数	扩增效率 / %	溶解温度平均值 / °C
<i>GAPDH</i>	-3.262	0.999	102.599	84.624
<i>β-actin</i>	-3.298	0.996	101.021	83.568
<i>UBQ5</i>	-3.262	0.998	102.568	85.930
<i>α-tubulin</i>	-3.438	1.000	95.382	84.900

表 5 叶片、茎和果实看家基因  $C_t$  和溶解温度平均值

Table 5  $C_t$  and average melting temperature of housekeeping genes in leaves, stems, and fruits

基因名称	$C_t$ 平均值			溶解温度平均值 / °C		
	叶片	茎	果实	叶片	茎	果实
<i>GAPDH</i>	21.551	19.932	21.521	84.507	84.630	84.94
<i>β-actin</i>	28.766	27.862	27.665	83.830	83.703	83.83
<i>UBQ5</i>	23.346	21.771	21.659	85.860	85.670	86.04
<i>α-tubulin</i>	27.757	22.322	23.100	84.690	84.630	85.18

表 6 果实不同发育时期看家基因  $C_t$  和溶解温度的平均值

Table 6  $C_t$  and average melting temperature of housekeeping genes in different development periods of fruits

基因名称	$C_t$ 平均值					溶解温度平均值 / °C				
	5 d	10 d	30 d	50 d	70 d	5 d	10 d	30 d	50 d	70 d
<i>GAPDH</i>	21.035	24.079	24.633	25.337	32.821	84.640	84.520	84.333	84.640	84.333
<i>β-actin</i>	27.144	29.735	33.684	34.480	36.653	83.450	83.480	83.390	83.540	82.900
<i>UBQ5</i>	20.922	23.105	24.943	26.286	33.309	85.920	86.040	85.737	85.980	85.737

### 2.3 看家基因稳定性评价

利用网站 [http://www.leonxie.com/reference\\_gene.php](http://www.leonxie.com/reference_gene.php) 的 Delta CT、BestKeeper、Normfinder 和 Genorm 4 种方法综合分析看家基因的稳定性, 简化了内参基因的分析过程。罗汉果叶、茎及果中 *GAPDH*、*α-tubulin*、*β-actin* 和 *UBQ5* 表达稳定性分析结果见图 1。Delta

CT、Normfinder 和 Genorm 的基因稳定性 M 值排序是相同的, *UBQ5* 的稳定性最高, *α-tubulin* 的稳定性最低。BestKeeper 数据分析显示 *β-actin* 和 *GAPDH* 的 M 值相同, *UBQ5* 稳定性最高, *α-tubulin* 的稳定性最低。看家基因稳定性的综合分析见图 2-A。*UBQ5* 的稳定性最高, 适合用作内参基因, *β-actin*

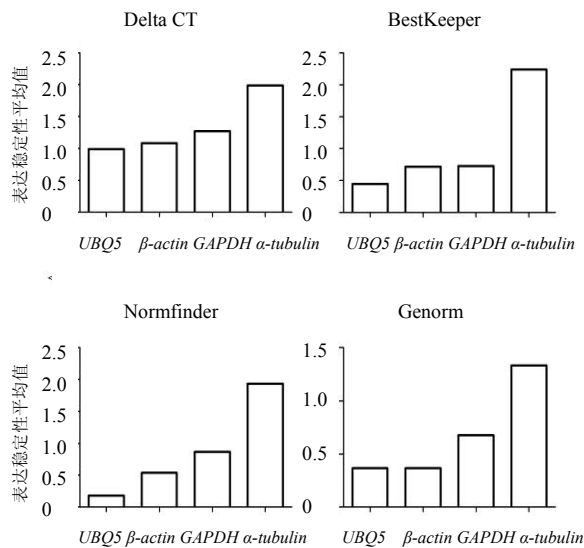


图 1 4 个看家基因稳定性分析

Fig. 1 Stability analysis of four housekeeping genes

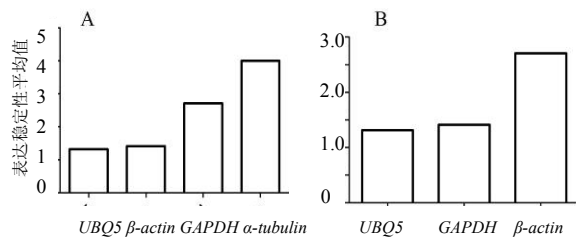


图 2 4 个 (A) / 3 个 (B) 看家基因稳定性综合分析

Fig. 2 Stability analysis of four (A) / three (B) housekeeping genes

稳定性其次，之后是 *GAPDH* 和  *$\alpha$ -tubulin*。本研究旨在选择一个适用于罗汉果叶、茎和果实生长发育过程中的内参基因，鉴于  *$\alpha$ -tubulin* 的稳定性很低，就不再用于果实发育过程的表达分析了。3 个看家基因的综合分析显示 *UBQ5* 稳定性最高， *$\beta$ -actin* 的稳定性最低（图 2-B）。

果实不同发育时期，*GAPDH*、 *$\beta$ -actin* 和 *UBQ5* 表达稳定性分析结果见图 3。与其他 3 个程序不同，BestKeeper 的分析结果显示，*GAPDH* 稳定性最高，*UBQ5* 稳定性最低， *$\beta$ -actin* 的稳定性介于二者之间。Delta CT、Normfinder 和 Genorm 分析显示 *UBQ5* 稳定性最高，其次是 *GAPDH*，稳定性最低的是  *$\beta$ -actin*。

#### 2.4 HMGR 的时空表达分析

*HMGR* 基因定量 PCR 扩增标准曲线的斜率是 -3.097，相关系数 0.998，均处于合理范围内。扩增效率 109.321，与 *GAPDH* 和 *UBQ5* 的扩增效率较为

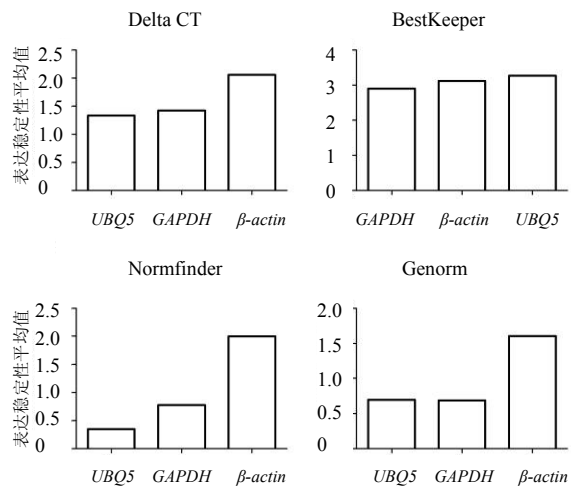


图 3 3 个看家基因稳定性分析

Fig. 3 Stability analysis of three housekeeping genes

为接近。相同的反应体系中，*HMGR* 扩增效率高于所有看家基因，可能是 *HMGR* 本身的扩增活性较高的原因。茎和果实的  $C_t$  值分别为 26.645 和 26.465，小于叶片（32.633），二者中 *HMGR* 的表达丰度较高。70 d 的  $C_t$  值（36.936）最大，与看家基因相似，*HMGR* 70 d 的  $C_t$  值大于果实其他发育时期。果实发育后期，*HMGR* 的表达丰度明显降低。

*HMGR* 的溶解度曲线为单峰，叶片、茎和果实不同发育时期（5、10、30、50、70 d）的峰值均接近于 85 °C，PCR 扩增特异性较好。*HMGR* 产物溶解度与 *UBQ5* 的溶解度最接近。

本研究采用 *UBQ5* 作为内参基因，分析 *HMGR* 的表达情况（图 4）。*HMGR* 在叶片中相对表达量最低，茎中最高，果实中次之。茎和果实中 *HMGR* 的相对表达量明显高于叶片中表达量。果实发育过程

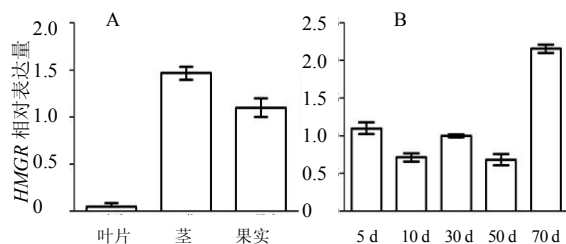


图 4 叶、茎、果 (A) 和果实不同发育时期 (B) *HMGR* 表达的变化

Fig. 4 Expression change of *HMGR* gene in leaves, stems, fruits (A) and different fruit development periods (B)

中, 5~50 d *HMGR* 的相对表达量较稳定, 70 d 明显升高。70 d *HMGR* 的相对表达量较高, 可能是由于果实发育后期受物质动员过程影响, *HMGR* 参与的代谢过程活跃或者 *UBQ5* 降解更严重的原因。

### 3 讨论

罗汉果是药用植物, 富含次生代谢物和糖类, 分离高质量的 RNA 较困难<sup>[10]</sup>。为减少杂质对 PCR 体系的影响, 需要降低 RNA 的溶解浓度, 同时也降低了基因的起始浓度, 稀释的倍数不能太大, 否则最小浓度无法检出。罗汉果的果肉很少, 随着果实成熟, 果肉的糖化程度升高, 分离 RNA 也更困难。70 d 是能分离可用 RNA 的最后时期, 80 d 和 90 d (成熟期) 的 RNA 不能用于实验分析。

筛选内参基因是基因差异表达分析的基础工作。通常分析多个看家基因的稳定性, 再选择稳定性最好的作为内参基因。以内参基因表达量作为分母, *HMGR* 与之比较, 用比值的变化趋势来表示目标基因的表达量变化规律。内参基因的使用具有局限性, 不同的实验条件 and 处理背景都会影响内参基因的稳定性及表达量分析的结果<sup>[11]</sup>。本研究中的 *GAPDH* 在叶片、茎和果实中表达稳定性不高, 但是在果实的不同发育时期, 表达稳定性和所选用的内参基因一样高。可见, 适宜的内参基因需要根据具体情况选择。

许多研究指出 *HMGR* 是组成性表达基因。本研究中, 叶片、茎和果实 (5 d) *HMGR* 相对表达量具有一定的差异, 可能与罗汉果的叶片、茎和果实 (5 d) 代谢产物萜、固醇和苷等物质质量不同有关。有报道指出, 罗汉果不同部位成分存在着显著差异, 瓜瓢中标志物是苷 V、苷 III、苷 IIE 和苷 IE, 叶片中是芦丁、槲皮苷-3, 7-O-二吡喃鼠李糖苷和罗汉果黄素, 茎中是槲皮苷-3, 7-O-二吡喃鼠李糖苷、罗汉果黄素和山柰酚-3-O-吡喃鼠李糖苷<sup>[12]</sup>。罗汉果不同发育时期 (15~40 d, 40~80 d), 苷 V 量增加时, 苷 IIE 逐渐减少, 苷 V 在 40 d 是达到高峰, 之后减少直至果实成熟<sup>[13]</sup>。50~70 d 的果实中, *HMGR* 相对表达量明显升高, 这个阶段苷 V 也在迅速积累<sup>[6]</sup>。可见, *HMGR* 的活性变化和苷 V 积累变化方向是一

致的。可以尝试通过提高 *HMGR* 活性, 达到提高苷 V 产量的目的。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李 锋, 李典鹏, 蒋水元, 等. 罗汉果栽培与开发利用 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [3] Makapugay H C, Dhammika N N P, Soejarto D D, *et al.* High-performance liquid chromatographic analysis of the major sweet principle of Luo Han Kuo fruits [J]. *J Agric Food Chem*, 1985, 33: 348-350.
- [4] Takemoto T, Arihara S, Nakajima T, *et al.* Studies on the constituents of *fructus Momordicae*. II. Structure of sapogenin [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1983, 103(11): 55-66.
- [5] Matsumoto K, Kasai R, Ohtani K, *et al.* Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Momordica grosvenori* (Cucurbitaceae) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38: 2030-2032.
- [6] Tang Q, Ma X J, Mo C M, *et al.* An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 343-346.
- [7] Jung J D, Park H W, Hahn Y, *et al.* Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(3): 224-230.
- [8] Zhang X, Ding L, Sandford A J. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR [J]. *BMC Mol Biol*, 2005, doi: 10.1186/1471-2199-6-4.
- [9] 孙 蓉, 高静雷, 刘 珊, 等. 金龙胆草 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的克隆及序列分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(19): 2732-2735.
- [10] Guo Q Q, Ma X J, Wei S G, *et al.* Isolation of RNA from *uncaria* with medicinal plant [J]. *Crops*, 2013, 5: 80-83.
- [11] Eisenberg E, Levanon E Y. Human housekeeping genes, revisited [J]. *Trends Genet*. 2013, 29(10): 569-574.
- [12] 章弘扬, 杨辉华, 张 敏, 等. UPLC-MS 结合模式识别用于罗汉果不同部位化学成分的比较分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(1): 19-23.
- [13] Zhang H Y, Yang H H, Zhang M, *et al.* Identification of flavonol and triterpene glycosides in Luo-Han-Guo extract using ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Food Compos Anal*, 2012, 25: 142-148.