

• 药材与资源 •

天山雪莲鲨烯合酶 SiSQS1 和 SiSQS2 调控 β -谷甾醇合成机制研究刘爽^{1,2}, 查良平², 杨健², 赵玉洋², 袁媛^{2*}, 黄璐琦², 刘勇^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中国中医科学院中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

摘要: 目的 通过比较天山雪莲 *Saussurea involucrata* 细胞中鲨烯合酶 SiSQS1 和 SiSQS2 的位点变异、蛋白原核表达及表达水平差异以及下游产物 β -谷甾醇量的高低, 探索天山雪莲细胞 SiSQS1 和 SiSQS2 催化 β -谷甾醇合成的机制。方法 从天山雪莲细胞中克隆出 β -谷甾醇生物合成途径上关键酶 SiSQS1 与 SiSQS2 基因, 并对其进行生物信息学分析; 分别对 SiSQS1 和 SiSQS2 进行原核表达与条件优化, 比较二者在天山雪莲细胞中的蛋白原核表达差异; 采用 RT-PCR 技术对二者在天山雪莲三色系细胞中的表达水平进行比较, 采用 GC-MS 对雪莲三色系细胞中 β -谷甾醇进行定量分析, 并对 β -谷甾醇量与 SiSQS1、SiSQS2 表达水平做相关性分析。结果 SiSQS1 和 SiSQS2 在 242E/D 存在残基变异, 原核表达及条件优化实验表明二者都有目的蛋白条带出现, 但二者之间的原核表达最适体系不同; 化学定量与基因表达水平的相关性分析表明 β -谷甾醇量与 SiSQS1、SiSQS2 基因表达水平呈正相关, 相关系数分别为 0.92 和 0.89。结论 SiSQS1 与 SiSQS2 二者 242E/D 残基变异可能影响 SiSQS 蛋白的表达, 二者在催化活性以及对 β -谷甾醇积累调控作用上可能存在一定的功能差异, 为研究鲨烯合酶 SQS 调控天山雪莲细胞 β -谷甾醇积累的机制提供了技术支持和奠定了理论基础。

关键词: 天山雪莲; 鲨烯合酶; 原核表达; RT-PCR; β -谷甾醇

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)17-3079-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.17.020

Study on mechanism of regulating synthesis of β -sitosterol by SiSQS1 and SiSQS2 in *Saussurea involucrata* cells

LIU Shuang^{1,2}, ZHA Liang-ping², YANG Jian², ZHAO Yu-yang², YUAN Yuan², HUANG Lu-qi², LIU Yong¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To explore the synthetic mechanism of β -sitosterol by comparing the locus mutation, prokaryotic expression, expression level of SiSQS1 and SiSQS2, and the content of β -sitosterol in three color types of cells. **Methods** Firstly, we performed the cloning and bioinformatic analysis of SiSQS1 and SiSQS2 which were key enzymes involved in the biosynthesis of β -sitosterol in *Saussurea involucrata* cells. Secondly, we compared the differences of prokaryotic expression between SiSQS1 and SiSQS2, then optimized the expression conditions. Finally, we compared the expression levels of SiSQS1 and SiSQS2 by Real-time PCR and the content of β -sitosterol by GC-MS in three color types of cells, and made the correlative analysis on the expression level and the content of β -sitosterol. **Results** There was a locus mutation of amino acid residues in 242E/D between SiSQS1 and SiSQS2. The results of prokaryotic expression analysis and conditions optimization showed that both target proteins had been expressed successfully, but the optimal prokaryotic expression system was different. The results of expression level and quantitative analysis showed a positive correlation to the expression levels of SiSQS1 and SiSQS2 and the content of β -sitosterol, the correlation coefficients were 0.92 and 0.89, respectively. **Conclusion** A locus mutation of amino acid residues in 242E/D between SiSQS1 and SiSQS2 may influence the expression of SiSQS, and there may exist the functional differences in catalytic activity and the accumulation of β -sitosterol. The study will provide technical support and lay a theoretical foundation for studying the accumulated mechanism of β -sitosterol regulated by SQS in *S. involucrata* cells.

Key words: *Saussurea involucrata* (Kar. et Kir.) Sch.-Bip.; squalene synthase; prokaryotic expression; real-time PCR; β -sitosterol

收稿日期: 2016-04-07

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (SS2014AA022201)

作者简介: 刘爽, 硕士研究生。E-mail: scarlett0706@163.com

*通信作者 袁媛 E-mail: y_yuan0732@163.com

刘勇 E-mail: yliu0126@yahoo.com.cn

雪莲 *Saussureae cum Flore Herba* 为菊科 (Compositae) 凤毛菊属 *Saussurea* DC. 植物, 全世界共有 40 余种及 3 个变种, 药用雪莲共有 12 种和 1 个变种^[1], 其中天山雪莲 *Saussurea involucrata* (Kar. et Kir.) Sch. -Bip. 是我国珍稀的名贵中药^[2], 主要生长在我国西南和西北高寒地区, 有着长期的药用历史以及丰富的民间用药经验^[3], 在抗风湿、镇痛、调节心血管系统、抗癌、抗缺氧、延缓衰老、终止妊娠、防辐射等多方面具有很大的开发利用价值^[4-8]。随着雪莲药用价值的发现, 其用量增大, 资源大大减少, 目前雪莲已濒危, 资源贮量下降, 乱采滥挖野生雪莲现象十分严重, 加之人工栽培困难, 已被列为国家三级濒危物种而受到保护^[9]。因此利用雪莲细胞生产活性成分是缓解野生雪莲资源短缺的有效途径之一。

鲨烯合酶 (squalene synthase, SQS) 是三萜类生物合成途径中的关键酶之一, 使法呢基焦磷酸 (geranyl pyrophosphate, FPP) 缩合生成鲨烯 (squalene, SQ)^[10-11], 再经过化学结构修饰成为三萜类化合物。目前已经从拟南芥^[12]、烟草^[13]、水稻^[14]、青蒿^[15]、人参^[16]、三七^[17]、乌拉尔甘草^[18]、东北红豆杉^[19]、丹参^[20]、大豆^[21]、灵芝^[22]、酵母^[23]、刺五加^[24] 等中克隆出不同的 SQS 基因, 通过对这些 SQS 基因进行研究, 得出如下结论: (1) 不同的物种含有 SQS 基因的数目不同; (2) 不同的 SQS 基因存在着不同的拷贝形式; (3) 并不是所有的 SQS 基因都具有鲨烯合酶活性; (4) SQS 基因表达的最适条件各不相同。由于 SQS 基因存在特性与多态性^[25-26], 因而对不同 SQS 的研究就显得十分必要。

雪莲中所含的甾醇类化合物主要为 β -谷甾醇^[27] 等, 由于其本身无毒性, 且具有乳化性与稳定性, 还有降低胆固醇、消炎解热、抗氧化、抗肿瘤和抗癌等药理作用, 因此在医药、化妆品、饲料、化工等领域都得到广泛应用^[28-33]。根据甾醇类与三萜类化合物的生物合成途径可知, 其都以 SQS 为关键酶, 催化生成前体物质鲨烯, 再经过不同化学结构修饰而成^[34]。因此研究 SQS 在天山雪莲细胞中的蛋白特性和表达水平对于提高下游 β -谷甾醇的量至关重要。

本实验拟利用天山雪莲红色系、绿色系、粉色系细胞, 克隆其 SQS 基因, 并初步比较不同细胞系 SQS 蛋白特性和表达水平, 且通过结合 β -谷甾醇的化学定量分析结果, 研究 SQS 基因结构和蛋白特性

对天山雪莲细胞 β -谷甾醇积累的影响, 为进一步研究 SQS 催化 β -谷甾醇合成机制提供理论依据。

1 材料与试剂

天山雪莲红色系、绿色系、粉色系细胞由大连普瑞康生物技术有限公司提供; Trace 1310 TSQ 8000 气相质谱仪 (美国 Thermo ScientificTM 公司); 对照品 β -谷甾醇 (质量分数 $\geq 95\%$) 和 5 α -胆甾烷均购自美国 Sigma 公司; BSTFA [双三氟乙酰胺, 含 1% TMCS (三甲基氯硅烷)] 购自 Supelco 公司; 二氯甲烷、正己烷、95%乙醇、浓盐酸、氢氧化钾 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯)。pGEM-T3 载体购自 Promega 公司; 原核表达载体 pGEX-4T-1 为本实验室保存; Trizol 试剂购自 Invitrogen 生物技术有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 、Transetta (DE3) 感受态购自全氏金有限公司; DNA 测序由北京睿博生物科技有限公司完成; 寡核苷酸引物由上海生工生物工程公司合成; T4 DNA 聚合酶购自上海生工生物工程公司; BamH I 和 Sma I 限制性内切酶购自 NEB 有限公司; 氨苄青霉素、 β -巯基乙醇、IPTG 等化学试剂购于 Sigma 公司; 反转录试剂盒 (Takara Prime ScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 购自 TaKaRa 公司; 其他生化试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

冰冷的 PBS 液 5~10 mL 洗涤天山雪莲细胞 2 次, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 1.5%的琼脂糖凝胶电泳用于评价 RNA 的质量。ND2000 测定总 RNA 的吸光度 (A_{260} 、 A_{280}) 值, 选择 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0 的总 RNA 反转录成 cDNA。

2.2 SiSQS1 和 SiSQS2 基因 cDNA 的克隆

天山雪莲 SiSQS1 和 SiSQS2 来源于天山雪莲细胞转录组数据。用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物。SiSQS-F: 5'-ATGGGGAGTTTAAAAGCAGTGTTGA-3'; SiSQS-R: 5'-TTACAACGTAAGCTTGATTTTATTT-3'。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 取阳性样品与 pEASY-T3 Cloning Kit 进行连接, 并导入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞进行转化, 并均匀涂在含氨苄青霉素抗性的 LB 培养板上, 取阳性 PCR 样品进行测序, 将测序结果与天山雪莲细胞转录组数据进行比对, 判断目的片段是否与克隆载体 pEASY-T3 Cloning Kit 连接成功。

2.3 SiSQS1 和 SiSQS2 基因的生物信息学分析

将测序获得的序列结果使用 ORF Finder

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找开放阅读框 (ORF)。利用在线工具 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 预测基因编码蛋白的相对分子质量、氨基酸数目、等电点、不稳定系数、脂肪指数、亲水性/疏水性和编码区全长等理化性质; 采用 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质结构域分析; 采用 CFSSP (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质二级结构分析; 利用 Swiss Model 程序 (<http://swissmodel.expasy.org/>), 根据基因氨基酸序列进行建模, 预测蛋白质的三级结构。用 DNAMAN 软件对序列进行多重比对以及限制性酶切位点的预测, 用 ClustalW 软件与其他物种的氨基酸序列进行比较 (表 1), 并用 MEGA 6.06 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1 000 次。

2.4 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达载体的构建

对测序后的序列进行分析, 设计带有酶切位点

表 1 系统进化树中不同物种来源的 SQS 氨基酸序列
Table 1 SQS amino acid sequence in source of different species in phylogenetic tree

物种	Genbank 号
雪莲 <i>Saussurea involucrata</i> SQS1	KU057087
雪莲 <i>Saussurea involucrate</i> SQS2	KU057088
黄花蒿 <i>Artemisia annua</i> SQS	AAR20329.1
铁皮石斛 <i>Dendrobium catenatum</i> SQS	AGI56082.1
丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i> SQS	ACR57219.1
光果甘草 <i>Glycyrrhiza glabra</i> SQS	BAA13083.1
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> SQS	NP-195191.2
水稻 <i>Oryza sativa Japonica</i> SQS	BAA22557.1
玉米 <i>Zea mays</i> SQS	BAA22558.1
灵芝 <i>Ganoderma lucidum</i> SQS	ABF57213.1
桦褐孔菌 <i>Inonotus obliquus</i> SQS	AGA95493.1
嗜酸氧化亚铁硫杆菌 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> SQS	ACH84005.1
人 <i>Homo sapiens</i> SQS	NP_001274685.1
小家鼠 <i>Mus musculus</i> SQS	AAF00038.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> SQS	NP_001189454.1
家牛 <i>Bos taurus</i> SQS	NP_001013022.1
苏门答腊猩猩 <i>Pongo abelii</i> SQS	NP_001126476.1
布朗葡萄藻 <i>Botryococcus braunii</i> SQS	AAF20201.1

的引物。两条序列酶切位点引物一样, BamHI-F: 5'-CGCGGATCCATGGGGAGTTTGGGAGCGAT-3'; Sma I-R: 5'-TCCCCCGGGTCATTTAGTGGAGAG-AAATGCAAAC-3'。以重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 取琼脂糖凝胶电泳检测的阳性样品进行切胶回收。并与表达载体 pGEX-4T-1 分别进行 BamH I 和 Sma I 双酶切处理, 并进行切胶回收。将切胶回收后的目的片段与表达载体 pGEX-4T-1 用 T4 DNA 连接酶在 22 °C 连接 4 h, 将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞。将转化后的沉淀物均匀涂布在含 amp 抗性的 LB 培养板上, 挑取单克隆进行菌液 PCR 阳性检验、双酶切检验与测序。挑选阳性菌于含 amp 抗性的 LB 培养液中扩大培养并提取质粒, 将质粒转化到大肠杆菌 Transetta (DE3) 表达感受态中, 转化表达宿主菌。

2.5 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核诱导表达及条件优化

将转化产物均匀涂布在含 amp 抗性的 LB 平板上, 挑取单克隆抗体进行菌液 PCR 阳性检验, 取阳性样品于含 amp 抗性的 LB 培养液中摇菌 10 h 后, 并于 37 °C 250 r/min 振荡扩大培养至宿主菌的 A_{600} 值为 0.6 时, 加终浓度为 0.4 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 于 25 °C, 200 r/min 摇床中诱导表达, 诱导 12 h 后离心再重悬沉淀。同时对影响蛋白表达的 4 个关键因素进行条件优化, 包括诱导时间 (4、8、16、24 h), 诱导温度 (16、20、25、30、37 °C), IPTG 浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L) 诱导时宿主菌的 A_{600} 值 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0)。取 30 μ L 菌液加 20 μ L 的 2.5 \times 蛋白染色上样, 沸水浴 10 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行 SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝染色 2 h 后, 用洗脱液脱色至条带清晰, 扫描图片后并保存。

2.6 RT-PCR 分析 SiSQS1、SiSQS2 基因表达水平

利用 Primer Primer 5.0 设计雪莲 SiSQS1 与 SiSQS2 基因实时荧光定量引物, 扩增产物长度在 80~200 bp, 送由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 见表 2。体系按照 SYBR Premix Ex TaqTM Kit (Takara 公司) 说明书配制, cDNA 材料来源于雪莲红色系、绿色系和粉色系的悬浮细胞, 每个色系包括 3 个生物样本, 每个反应重复 3 次 (包括阴性对照), 在 LightCycler[®] 480 上进行, 结束后进行熔解曲线分析。各基因表达量以内参基因 GAPDH 作为标准进行相对定量, 相对定量方法采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法。

表 2 RT-PCR 引物
Table 2 Primers of RT-PCR

名称	引物序列 (5'-3')
SiSQS1-F	GAAGTTTTTCAGGGGCGTAGTC
SiSQS1-R	TTTGTAAGGGTGCCAGAGTCC
SiSQS2-F	ACGAAGAGAACTCCAAGAAGGC
SiSQS2-R	TGATCTGTGGTATGGCACAAAA
GAPDH-F	TTCAACATTATCCCAGCAGCAC
GAPDH-R	TAAGTAGCCTTCTTCTCAAGTCTCACA

2.7 雪莲三色系细胞中 β -谷甾醇分析

2.7.1 色谱条件 采用 TraceGOLD™ TG-5MS 气相色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μ m; Thermo Scientific™, 美国), 程序升温 (初始温度 80 $^{\circ}$ C, 保持 2 min; 以 20 $^{\circ}$ C/min 升温至 280 $^{\circ}$ C, 保持 15 min)。载气为氦气, 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 1 μ L, 分流比 25:1, 进样口温度 250 $^{\circ}$ C。

2.7.2 质谱条件: 电离方式为电子轰击离子源 (EI 离子源), 电离电压 70 eV, 质谱范围: 40~550 m/z ; 离子源温度 280 $^{\circ}$ C。

2.7.3 对照品溶液的制备 精密称取适量 β -谷甾醇对照品和 5 α -胆甾烷内标置 50 mL 棕色量瓶中, 正己烷溶解并定容到刻度, 摇匀, 即得对照品溶液和内标溶液。

2.7.4 供试品溶液的制备 分别称取 0.5 g 雪莲三色系细胞干燥样品于 20 mL 具塞试管中, 加入 1 mL 5 α -胆甾烷内标溶液及 3 mL 4 mol/L HCl 的 95% 乙醇溶液, 于 80 $^{\circ}$ C 水解 120 min, 水浴冷却至室温。

2.7.5 线性关系考察 精密移取适量 β -谷甾醇对照品溶液于 10 mL 棕色量瓶中, 配制成 1.0、5.0、10.0、20.0、25.0、50.0 μ g/mL 的对照品溶液, 各加入 0.10 mg/mL 的内标溶液 1 mL, 内标质量浓度均为 10 μ g/mL。上述不同质量浓度对照品溶液各取 1 mL, 氮气吹干后, 加入 200 μ L BSTFA (含 1% TMCS) 试剂, 80 $^{\circ}$ C 下衍生 60 min 后, 冷却加入 0.25 mL 正己烷, 按“2.7.1 和 2.7.2”项下条件进行 GC-MS 分析。以各对照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 相应对照品溶液与内标的峰面积之比为纵坐标 (Y) 进行回归分析, 得到回归方程为 $Y=0.023\ 9\ X-0.010\ 8$ ($r=0.999\ 7$), 线性范围 1.00~50.0 μ g/mL。

2.7.6 β -谷甾醇测定 取“2.7.3”项溶液, 酸水解液中加入 6 mL 4.0 mol/L KOH 的 95% 乙醇溶液, 于 80 $^{\circ}$ C 皂化 120 min, 水浴冷却至室温。取 2 mL 皂化液于 20 mL 具塞玻璃试管中, 加入 5 mL 正己烷、1 mL 去离子水, 室温下超声振荡 10 min。取 2.5 mL

正己烷萃取液于色谱瓶中, 用氮气吹干; 加入 200 μ L BSTFA (含 1% TMCS) 试剂 80 $^{\circ}$ C 下衍生 60 min 后, 冷却加入 0.25 mL 正己烷, 进行 GC-MS 分析, 进样量 1.0 μ L。按“2.7.1 和 2.7.2”项下条件进行 GC-MS 分析, 并分别计算雪莲三色系细胞中 β -谷甾醇的量。

2.8 β -谷甾醇量与 SiSQS1、SiSQS2 基因表达水平的相关性分析

参考 Liang 等^[35]报道的方法, 使用 SPSS 20.0 软件对雪莲细胞中 β -谷甾醇量与 SiSQS1、SiSQS2 基因表达水平做线性相关性分析。

3 结果与分析

3.1 SiSQS1 和 SiSQS2 基因的克隆

利用 DNAMAN 软件结合 ORF Finder 在线软件对雪莲转录组数据中 SiSQS1、SiSQS2 基因序列进行分析, 通过设计特异性引物克隆雪莲 cDNA SiSQS1、SiSQS2, 并将其重组入 T3 载体中, 菌液 PCR 后测序结果与预测结果相一致, 表明 pGEM-T3 载体已经插入 SiSQS1、SiSQS2 基因。通过 blast 在线比较, 推测 SiSQS1、SiSQS2 基因为鲨烯合酶基因, 分别命名为 SiSQS1 (GenBank 注册号 KU057087)、SiSQS2 (GenBank 注册号 KU057088)。

3.2 SiSQS1、SiSQS2 基因的生物信息学分析

利用在线工具 ProtParam 预测 SiSQS1 和 SiSQS2 都含 1 257 bp 完整的开放阅读框, 编码的氨基酸数目都为 418 aa; NCBI 的 Conserved domains 在线工具表明 38~320 aa 都为 Isoprenoid_Biosyn_C1 superfamily 家族; 跨膜域分析结果表明 386~408 aa 都有跨膜结构域。SiSQS1、SiSQS2 编码蛋白的理化性质如等电点都为 7.14, 脂肪指数都为 95.93, 但 SiSQS1 编码蛋白的相对分子质量为 47 691, SiSQS2 编码蛋白的相对分子质量为 47 677。

3.2.1 SiSQS1 与 SiSQS2 基因氨基酸序列比对 对雪莲 SiSQS1 与 SiSQS2 基因编码的氨基酸序列进行比对, 发现一致性为 99.76%, 氨基酸序列只在 242 aa 位点处发生了变异, 根据 NCBI 的 Conserved domains 分析结果可得知该变异位点处于 Isoprenoid_Biosyn_C1 superfamily 结构功能域中 (图 1)。

3.2.2 SiSQS1 与 SiSQS2 系统进化树分析 雪莲 SiSQS1、SiSQS2 与 GenBank 中 20 种不同物种来源的 SQS 氨基酸序列进行比对, 软件 MEGA 6.06 采用邻接法构建系统进化树进行聚类分析。从进化树物种可以明显地看到, 植物、藻类、动物、真菌、

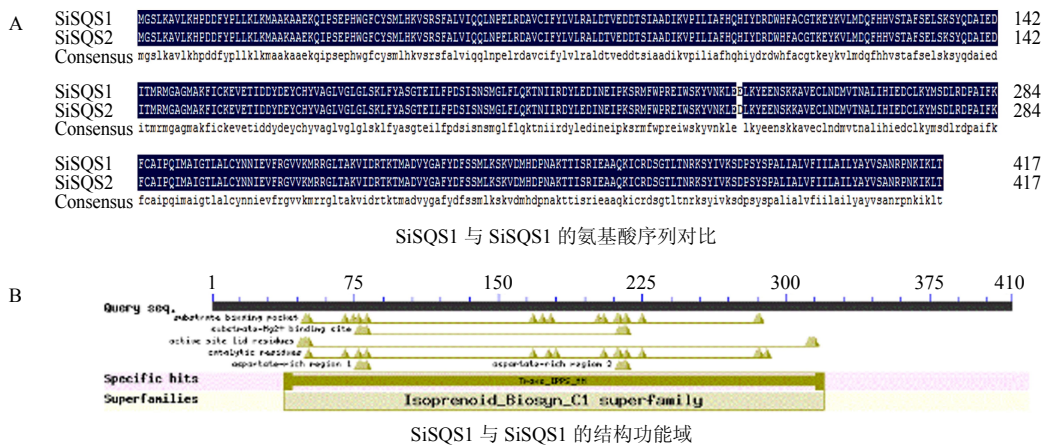


图 1 SiSQS1 和 SiSQS2 基因的氨基酸序列对比 (A) 与结构功能域 (B)

Fig. 1 Comparison on amino acid sequences (A) and structure function domain (B) of SiSQS1 and SiSQS2

细菌分别聚为一支，在进化树上的远近与其所属类别的亲缘关系一致。且雪莲 SiSQS1 与 SiSQS2 明显聚为一支，亲缘关系最近，与这 2 条基因来源于同一植物雪莲的事实相符；与同为菊科植物青蒿的亲缘较近，与植物进化的亲缘关系也相符合 (图 2)。

3.3 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达载体构建与原核表达

将 pGEX-4T-1-SiSQS1 和 pGEX-4T-1-SiSQS2 转化至大肠杆菌 transetta (DE3) 中，挑取若干单克隆抗体，进行菌液 PCR 检验，并挑取阳性单克隆菌液进行测序，重组质粒测序结果表明目的基因成功插入表达载体中，可进行下一步原核表达。同时将构建好的原核表达载体于大肠杆菌 transetta (DE3) 进行原核表达，SDS-PAGE 电泳结果表明与

空载 pGEX-4T-1 相比，pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 在 68 000 处出现目的蛋白条带 (图 3)，表明 pGEX-4T-1-SiSQS1 和 pGEX-4T-1-SiSQS2 在大肠杆菌中成功表达。

3.4 诱导温度对 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达的影响

保持诱导时间 16 h，IPTG 浓度为 0.4 mmol/L，诱导时宿主菌 A_{600} 值为 0.6 这 3 个因素不变，探讨 5 个诱导温度 (16、20、25、30、37 °C) 对 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达的影响 (图 4)，结果表明 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 最适表达温度不同，pGEX-4T-1-SiSQS1 蛋白最适表达温度为 25 °C，pGEX-4T-1-SiSQS2 蛋白最适表达温度为 16 °C。

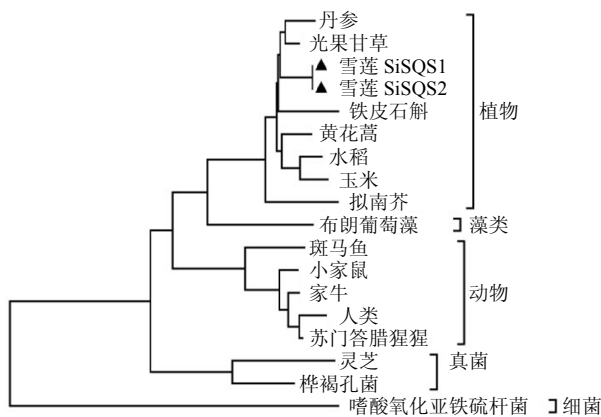


图 2 SiSQS1、SiSQS2 与其他物种 SQS 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of SQS amino acid sequences encoded by SiSQS1 and SiSQS2 with other species

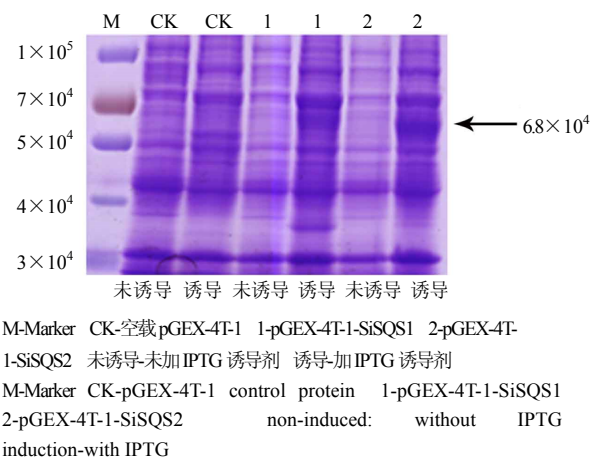
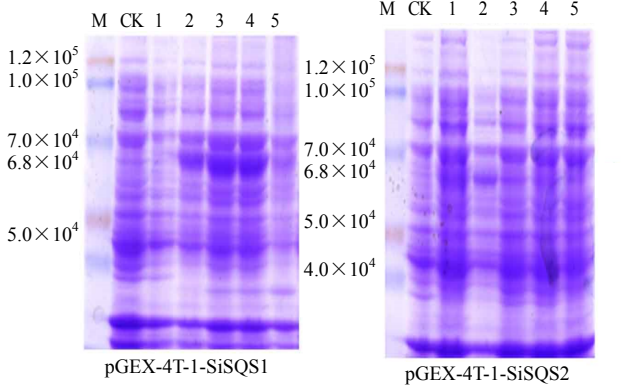


图 3 pGEX-4T-1-SiSQS1 和 pGEX-4T-1-SiSQS2 的原核表达

Fig. 3 Prokaryotic expression of pGEX-4T-1-SiSQS1 and pGEX-4T-1-SiSQS2



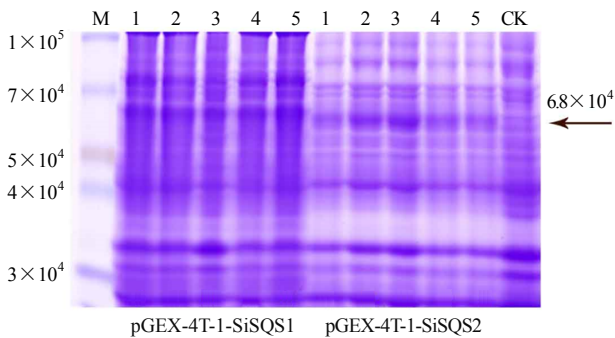
M-Marker CK-空载 pGEX-4T-1 1~5-诱导温度为 16、20、25、30、37 °C
M-Markers CK-pGEX-4T-1 control protein 1—5-induced temperature: 16、20、25、30、37 °C

图 4 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 在不同诱导温度处理下的原核表达

Fig. 4 Prokaryotic expression of pGEX-4T-1-SiSQS1 and pGEX-4T-1-SiSQS2 under different temperature

3.5 IPTG 浓度对 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达的影响

保持诱导温度 20 °C，诱导时间 16 h，宿主菌 A_{600} 值为 0.6 不变，考察 5 个 IPTG 浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L) 对 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达的影响 (图 5)。结果表明 IPTG 浓度对 pGEX-4T-1-SiSQS1 表达量几乎没有影响；对于 pGEX-4T-1-SiSQS2 来说，IPTG 浓度为 0.6 mmol/L 时，表达量最大。



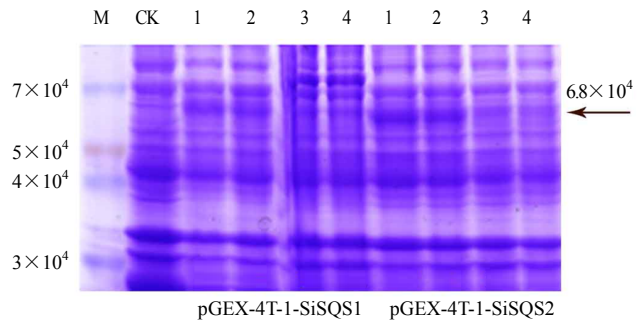
M-Marker CK-空载 pGEX-4T-1 1~5-IPTG 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L
M-Marker CK-pGEX-4T-1 control protein 1—5-IPTG concentration 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L

图 5 pGEX-4T-1-SiSQS1 和 pGEX-4T-1-SiSQS2 在不同 IPTG 浓度处理下的原核表达

Fig. 5 Prokaryotic expression of pGEX-4T-1-SiSQS1 and pGEX-4T-1-SiSQS2 under different IPTG concentration

3.6 诱导时间对 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达的影响

保持诱导温度 20 °C，IPTG 浓度 0.6 mmol/L，诱导时宿主菌 A_{600} 值 3 个因素不变，考察诱导时间 (4、8、16、24 h) 对 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达的影响 (图 6)。实验结果表明 pGEX-4T-1-SiSQS1 在诱导 8 h 时表达量最大，pGEX-4T-1-SiSQS2 在诱导 4 h 时表达量最大；同时说明随着诱导时间的延长，并不利于目的蛋白的表达。



M-Marker CK-空载 pGEX-4T-1 1~4-诱导时间-4、8、16、24 h
M-Marker CK-pGEX-4T-1 control protein 1—4-induction time-4、8、16、24 h

图 6 pGEX-4T-1-SiSQS1 和 pGEX-4T-1-SiSQS2 在不同诱导时间处理下的原核表达

Fig. 6 Prokaryotic expression of pGEX-4T-1-SiSQS1 and pGEX-4T-1-SiSQS2 under different induction time

3.7 宿主菌密度对 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达的影响

保持诱导温度 20 °C，诱导时间 16 h，IPTG 浓度 0.6 mmol/L 不变，考察不同密度宿主菌 (A_{600} 值为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0) 对 pGEX-4T-1-SiSQS1 与 pGEX-4T-1-SiSQS2 原核表达的影响 (图 7)。实验结果表明宿主菌 A_{600} 值在 0.2 ~ 0.4，pGEX-4T-1-SiSQS1 和 pGEX-4T-1-SiSQS2 表达量在不断增加，超过 0.4 后，表达量都下降。说明 2 条基因在宿主菌 A_{600} 值为 0.4 时表达量最大，高密度的宿主菌反而不利于蛋白表达。

3.8 雪莲三色系细胞中 β -谷甾醇的化学定量分析

GC-MS 分析雪莲三色系细胞中 β -谷甾醇量，结果表明绿色系细胞中 β -谷甾醇量最高，粉色系细胞中 β -谷甾醇量最低。绿色系、红色系与粉色系细胞样品中 β -谷甾醇量分别为 (374.54 ± 2.20)、(279.71 ± 3.74)、(155.19 ± 0.06) $\mu\text{g/g}$ ($n=3$)。

3.9 SiSQS1 与 SiSQS2 基因表达分析

RT-PCR 分析 SiSQS1 与 SiSQS2 基因在雪莲红

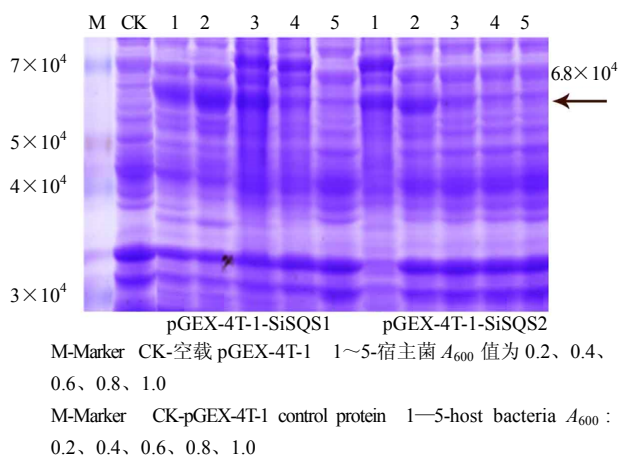


图 7 pGEX-4T-1-SiSQS1 和 pGEX-4T-1-SiSQS2 在不同密度宿主菌的原核表达

Fig. 7 Prokaryotic expression of pGEX-4T-1-SiSQS1 and pGEX-4T-1-SiSQS2 in different densities of host bacteria

色系、绿色系和粉色系细胞中的表达水平，结果表明 SiSQS1 在雪莲绿色系、红色系与粉色系细胞中表达水平依次是 0.88 ± 0.05 、 0.37 ± 0.06 、 0.28 ± 0.02 ($n=3$)；SiSQS2 在雪莲绿色系、红色系与粉色系细胞中表达水平依次是 1.15 ± 0.03 、 0.64 ± 0.04 、 0.50 ± 0.03 ($n=3$)。可以看出 SiSQS1 与 SiSQS2 在雪莲绿色系细胞中的表达水平都是最高的，其次是红色系细胞，再次是粉色系细胞。并对细胞中 β -谷甾醇量与 SiSQS1、SiSQS2 基因的表达水平做相关性分析，发现 β -谷甾醇量与 SiSQS1 基因表达水平相关性系数为 0.92，与 SiSQS2 相关性系数为 0.89。

4 讨论

一般认为活性分量差异与其生物合成途径上关键酶基因的表达是有直接关系的。本研究通过比较天山雪莲细胞中 2 条鲨烯合酶 SiSQS1 和 SiSQS2 的位点变异、蛋白原核表达特性与表达水平差异来推测 SiSQS1 和 SiSQS2 的表达可能会影响 β -谷甾醇前体物质的合成，进而影响 β -谷甾醇的积累。因此，本实验对天山雪莲三色系细胞中 β -谷甾醇进行定量分析比较，发现 β -谷甾醇量由高到低依次是绿色系、红色系与粉色系细胞；同时对 β -谷甾醇生物合成途径上关键酶 SiSQS1 和 SiSQS2 在天山雪莲三色系细胞中的转录水平进行了比较，结果表明 SiSQS1 与 SiSQS2 在天山雪莲绿色系细胞中表达水平最高，其次是红色系细胞，最后是粉色系细胞，这与天山雪莲细胞中 β -谷甾醇量呈正相关，相关性系数分别为 0.92 和 0.89。从 β -谷甾醇量与基因表达水平相关性分析结果可推测 SiSQS1 和 SiSQS2 调控 β -谷甾醇积

累可能存在功能差异。

对 SiSQS1 和 SiSQS2 蛋白特性进行了初步比较，发现二者存在一个氨基酸位点突变，且位于结构功能域中。进一步蛋白原核表达实验结果表明，在温度 25 °C、IPTG 浓度为 0.6 mmol/L、宿主菌 A_{600} 值为 0.6、诱导时间为 16 h 时 SiSQS1 和 SiSQS2 都有表达，但诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度和诱导时宿主菌密度对上述两个蛋白表达特性的影响存在差异，暗示 242E/D 残基变异可能影响 SiSQS 蛋白的表达，且二者在催化活性以及对 β -谷甾醇积累调控作用上也可能存在着一定的差异，都有待于进一步深入研究。因此，SiSQS1 和 SiSQS2 可用来研究调控 β -谷甾醇积累的机制，为以 β -谷甾醇为目的的成分，以 SQS 为核心，以二者之间相关性分析为桥梁的天山雪莲细胞研究体系提供技术支撑，同时利用天山雪莲细胞生产活性成分也是缓解野生天山雪莲资源短缺的有效途径之一。

参考文献

- [1] 王 瑛, 张本印, 陶燕铎, 等. 雪莲的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 光谱实验室, 2013, 30 (2): 530-535.
- [2] Kuo C L, Agrawal D C, Chang H C, *et al.* *In vitro* culture and production of syringin and rutin in *Saussurea involucrata* (Kar. et Kir.)-an endangered medicinal plant [J]. *Bot Studies*, 2015, 56(12): 1-8.
- [3] Ning H, Liu M, Kang X, *et al.* Biological characteristics of vegetative growth of cultivated *Saussurea involucrata* in a low altitude region [J]. *Med Plant*, 2014, 5(6): 1-6.
- [4] Qiu H, Zhang L, Liu C, *et al.* Cloning and characterization of a novel dehydrin gene, SiDhn2, from *Saussurea involucrata* Kar. et Kir [J]. *Plant Mol Biol*, 2014, 84(6): 707-718.
- [5] 翟科峰, 段 红, 邢建国, 等. 天山雪莲提取物纯化前后各部位抗炎镇痛作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(5): 374-377.
- [6] 韦善君, 武运芳, 罗云燕, 等. 濒危药用植物新疆雪莲资源的研究进展 [J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2014, 23(2): 10-15.
- [7] Li M, Li H, Hu X, *et al.* Genetic transformation and overexpression of a rice Hd3a induces early flowering in *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. ex Maxim [J]. *Plant Cell, Tiss Org Cult (PCTOC)*, 2011, 106(3): 363-371.
- [8] 范文霞, 张 献, 曹 坦. 雪莲培养物的总抗氧化能力与抗黑色素能力研究 [J]. 生物技术世界, 2014, (11): 86-87.
- [9] 肖 皖, 波拉提, 王歆君, 等. 雪莲化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 344-348.
- [10] 陶晨陈, 马成通, 吴耀生, 等. 红花栝楼鲨烯合酶基因

- 的克隆及其序列分析 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1034-1041.
- [11] Singh A K, Dwivedi V, Rai A, *et al.* Virus-induced gene silencing of *Withania somnifera* squalene synthase negatively regulates sterol and defence-related genes resulting in reduced withanolides and biotic stress tolerance [J]. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(9): 1287-1299.
- [12] Mirjalili M H, Moyano E, Bonfill M, *et al.* Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* squalene synthase gene in *Withania coagulans* hairy root cultures [J]. *Biol Planta*, 2011, 55(2): 357-360.
- [13] 张毅, 刘彦, 王红, 等. 转青蒿反义鲨烯合酶基因对烟草鲨烯合酶基因表达的影响 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(4): 416-422.
- [14] 彭梅芳, 甘凤, 潘春梅, 等. 鲨烯合酶 RNAi 载体构建及对水稻的遗传转化研究 [J]. 西南农业学报, 2015, 28(4): 1413-1418.
- [15] Yang R Y, Feng L L, Yang X Q, *et al.* Quantitative transcript profiling reveals down-regulation of a sterol pathway relevant gene and overexpression of artemisinin biogenetic genes in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. *Planta Med*, 2008, 74(12): 1510-1516.
- [16] 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.
- [17] 孙颖, 赵恒伟, 葛锋, 等. 三七中 SS 基因超表达载体的构建及其遗传转化 [J]. 药学学报, 2013, 48(1): 138-143.
- [18] Yang R, Yuan B, Ma Y, *et al.* HMGR, SQS, -AS, and Cytochrome P450 monooxygenase genes in *glycyrrhiza uralensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(4): 290-295.
- [19] Huang Z, Jiang K, Pi Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of the yew gene encoding squalene synthase from *Taxus cuspidata* [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40(5): 625-635.
- [20] 马艺沔, 袁丽钗, 张林甦, 等. 2 个丹参鲨烯合酶基因的克隆和鉴定 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1307-1312.
- [21] Nguyen H T M, Neelakadan A K, Quach T N, *et al.* Molecular characterization of Glycine max squalene synthase genes in seed phytosterol biosynthesis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 73(2): 23-32.
- [22] Zhao M, Liang W, Zhang D, *et al.* Cloning and characterization of squalene synthase (SQS) gene from *Ganoderma lucidum* [J]. *J Micro Biotech*, 2007, 17(7): 1106-1112.
- [23] 朱明, 王彩霞, 李春. 工程化酿酒酵母合成植物三萜类化合物 [J]. 化工学报, 2015, 66(9): 3350-3356.
- [24] 邢朝斌, 劳凤云, 龙月红, 等. 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 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2020-2024.
- [25] 刘春生, 刘颖. 药用植物功能基因的研究思路与展望—以甘草为例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 1-6.
- [26] 刘颖, 陈宏昊, 文浩, 等. 甘草鲨烯合酶 1 基因多态性及其与 β -香树脂醇合成酶共表达对 β -香树脂醇积累的影响研究 [J]. 药学学报, 2014, 49(5): 734-741.
- [27] 景临林, 何蕾, 樊鹏程, 等. 天山雪莲抗缺氧活性成分研究 [J]. 中药材, 2015, 38(1): 89-92.
- [28] 袁金伟, 王帆, 买文鹏, 等. β -谷甾醇的结构修饰研究进展 [J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2015, 36(2): 107-112.
- [29] Ramadan M F. Oxidation of β -sitosterol and campesterol in sunflower oil upon deep-and pan-frying of French fries [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(10): 6301-6311.
- [30] Wang X, Huang W, Lei L, *et al.* Blockage of hydroxyl group partially abolishes the cholesterol-lowering activity of β -sitosterol [J]. *J Funct Foods*, 2015, 12: 199-207.
- [31] Bin Sayeed M S, Ameen S S. Beta-Sitosterol: A promising but orphan nutraceutical to fight against cancer [J]. *Nutrit Cancer*, 2015, 67(8): 1216-1222.
- [32] Mahmood T, Bibi Y, Zafar R, *et al.* Complexation of β -sitosterol with tris (dibenzylideneacetone) dipalladium and its anti-microbial activity [J]. *Pakistan J Pharm Sci*, 2015, 28(2): 631-634.
- [33] Sriraman S, Ramanujam G M, Ramasamy M K, *et al.* Identification of beta-sitosterol and stigmasterol in *Bambusa bambos* (L.) Voss leaf extract using HPLC and its estrogenic effect in vitro [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 115: 55-61.
- [34] Vishwakarma R K, Patel K, Sonawane P, *et al.* Squalene synthase gene from medicinal herb bacopa monniera: molecular characterization, differential expression, comparative modeling, and docking studies [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2015, 33(6): 1675-1685.
- [35] Liang J, Jiang C, Peng H, *et al.* Analysis of the age of *Panax ginseng* based on telomere length and telomerase activity [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 126-135.