

滇重楼鲨烯环氧酶基因的克隆及原核表达研究

许燕, 赵爽*, 董栩, 叶鑫

云南中医学院药学院, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 克隆滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* 三萜皂苷生物合成途径中的关键酶鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SE) 基因, 并进行原核表达。并用 Real-time PCR 法检测 cDNA 样本中 SE1 基因和 SE2 基因的相对量。方法 以滇重楼根为材料提取总 RNA 并反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 根据转录组数据中的 2 组 SE 基因全长序列设计特异性引物, 对 SE 基因进行克隆后转入到 pEASY-T1 Simple Cloning Vector 中, 经测序鉴定正确后, 构建 pEASY-E1-SE 表达载体, 利用 ArtMedia protein Expression/Amp+培养基自动诱导表达。Real-time PCR 法检测 cDNA 样本中 SE1 和 SE2 基因的相对量。结果 获得了 2 条滇重楼 SE 基因, 命名为 ppSE1 和 ppSE2。ppSE1 的全长为 1 932 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1 578 bp, 编码 525 个 AA; ppSE2 的全长为 1 828 bp, ORF 长为 1 548 bp, 编码 515 个氨基酸。荧光定量 PCR 结果显示 ppSE1 基因和 ppSE2 基因在茎和叶中的表达具有显著差异, ppSE1 的表达在叶中最为显著。酶切和测序结果表明, 原核表达载体 pEASY-E1-SE 构建成功; SDS-PAGE 分析显示, 在 BL21 (DE3) 表达感受态细胞中成功诱导表达了 SE 基因的 2 种融合蛋白。结论 克隆了滇重楼的 SE 基因, 获得了在体外具有生物学活性的 SE 蛋白。ppSE1 基因和 ppSE2 基因在滇重楼中具有不同的表达模式, 在滇重楼次生代谢产物的合成中起着不同的作用。

关键词: 滇重楼; 鲨烯环氧酶; 基因克隆; 原核表达; 荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)09-1839-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.022

Cloning and expression of squalene epoxidase from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

XU Yan, ZHAO Shuang, DONG Xu, YE Xin

School of Pharmacy, Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To clone and express a full-length cDNA encoding squalene epoxidase which is key to the biosynthetic pathway of triterpenoid saponins in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. Using real-time PCR method to detect the relative content of SE1 gene and SE2 gene from the cDNA sample. **Methods** Total RNA was extracted from the roots of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* and transcription was reversed. Using the reversed transcription of cDNA as template, specific primer was designed according to the transcriptome data about two groups of SE gene sequence from the HiSeq2500 sequencing platform, and then SE gene was cloned. The production was inserted to pEASY-T1 Simple Cloning Vector, and pEASY-E1-SE expression vector was built after sequencing appraisal right. The ArtMedia protein Expression/Amp+ medium was used to induce expression automatically. Using real-time PCR method to detect the relative contents of SE1 gene and SE2 gene from the cDNA sample. **Results** Two SE genes of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were obtained, which were named as ppSE1 and ppSE2, respectively. cDNA was 1 598 bp of ppSE1 and 1 509 bp of ppSE2, respectively. The full length for ppSE1 was 1 932 bp, length of ORF was 1 578 bp, coding 525 AA; The full length for ppSE2 was 1 828 bp, length of ORF was 1 548 bp, coding 515 AA. Fluorescence quantitative PCR results showed that the expression of ppSE1 and ppSE2 genes had significant differences in stem and leaf, and the expression of ppSE1 was most pronounced in the leaf. Enzyme digestion and sequencing results showed that the prokaryotic expression vector pEASY-E1-SE was built successfully. SDS-PAGE analysis showed that two fusion proteins of SE genes were induced expression successfully in BL21 (DE3) express competent cells. **Conclusion** The SE gene of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* has been cloned, and the SE protein with biological activity *in vitro* has been obtained. The ppSE1 and ppSE2 genes have different expression patterns in *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, and play a different role in the synthesis of secondary metabolites.

收稿日期: 2016-11-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160502); 云南省自然科学基金资助项目 (2011FZ153); 云南省教育厅自然科学基金资助项目 (2013J040); 云南省教育厅自然科学基金资助项目 (2014J063)

作者简介: 许燕, 云南中医学院研究生。Tel: 15695513636 E-mail: axu1985@sina.com

*通信作者 赵爽, 副教授。Tel: 15911633836 E-mail: zm_zs@126.com

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.; squalene epoxidase; gene clone; prokaryotic expression; fluorescence quantitative PCR

滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 是百合目 (Liliflorae) 延龄草科 (Trilliaceae) 重楼属 *Paris* L. 植物, 是一种多年生草本植物, 别名独角莲, 入药部分为其干燥根茎, 主要分布于云南、贵州和四川等省区, 为云南省道地药材。《中国药典》2015 年版中规定以药用重楼的有效成分重楼皂苷 I、II、VI、VII 为对照品^[1]。滇重楼具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊等功效, 常用于痈肿、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌打伤痛、惊风抽搐等症, 是云南白药、宫血宁胶囊、季德胜蛇药片等著名中成药的主要原料之一^[2]。由于滇重楼一直靠野生采挖获取, 长期掠夺性采挖致使野生资源越来越少, 加之其自然生长缓慢, 从种植到收获需 8~10 年才可入药, 导致目前滇重楼供应紧缺, 价格居高不下。滇重楼主要有效成分为甾体皂苷 (steroidal saponins), 其结构复杂, 人工合成困难, 因此利用现代生物技术将是生产此类化合物的主要途径。同时, 通过对有效成分生物合成途径和相关酶基因调控的研究, 可以增加有效成分的量, 提高中药材的品质。

鲨烯环氧化酶 (squalene epoxidase, SE) 是三萜皂苷生物合成途径中形成三萜碳环之前的 1 个关键酶, 是甾醇生物合成途径中结合具氧化还原反应所需的重要辅助因子黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 的重要的结合位点^[3-6]。SE 将鲨烯催化生成单氧态氧化鲨烯, 单氧态氧化鲨烯在紫外线和强光刺激作用下生成 2,3-氧化鲨烯。2,3-氧化鲨烯再经过一系列生化反应后形成三萜皂苷元^[7]。SE 基因被茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 诱导而高表达时三萜的合成量增加; 而 SE 基因在细胞分裂素活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的作用下发生磷酸化时三萜合成量就会大幅度降低^[8]。调控 SE 的活性能够直接影响到环氧化鲨烯的生物合成, 继而以环氧化鲨烯作为前体的各类甾体皂苷、三萜皂苷、甾醇等化合物的生物合成也随之受到影响, 因此 SE 被认为是甾体皂苷生物合成途径中的 1 个非常重要的调控酶。所以, 对滇重楼的 SE 基因进行研究对提高其重楼皂苷的量有重要意义。

1 材料与仪器

滇重楼材料采自云南省昆明市梁王山, 由云南中医学院高级实验师游春鉴定为滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的根茎。

Trans1-T1 感受态细胞、BL21 (DE3) 表达感受态细胞、pEASY-T1 Simple Cloning Vector、pEASY-E1 Expression Vector、ArtMedia protein Expression/Amp⁺ 培养基、DNA Marker、Protein Marker 均购自 TransGen; RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、Ex Taq 聚合酶购自 TaKaRa; 质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 GENErays; SDS-PAGE 上样 Buffer、大肠杆菌总蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自贝博生物。

超净工作台 (中国哈东联公司); 超低温冷冻离心机 (日本 HITACHI 公司); 微量移液枪、温育仪、蛋白核酸测定分析仪 (德国 Eppendorf 公司); 微型离心机、PCR 仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像分析仪、Mini-PROTEAN Tetra System 电泳槽 (美国 BIO-RAD 公司)、SHA-C 恒温振荡器、LRH-250-Z 震荡培养箱 (中国国华公司); StepOne 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 滇重楼根的总 RNA 提取与 cDNA 合成

用 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取滇重楼根组织的总 RNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。再利用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 以提取的 RNA 为模板, 以 Oligo dT Primer 为引物, 将 RNA 反转录合成 cDNA。

2.2 滇重楼 SE 基因的克隆与序列分析

根据 HiSeq2500 sequencing platform 得到的转录组数据设计 2 组 SE 基因的全长引物。引物序列如下: SE1-F: 5'-TCAATGGAAGCTTAGGAGGAGC-3'; SE1-R: 5'-ATGAAGATGCTGCTGCATTATC-3'; SE2-F: 5'-ATGCAGGCCGAGTATCTCTT-3'; SE2-R: 5'-TCAGTTGGTAGGAGGAGCTCT-3'。

以反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, SE1 基因引物最优扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 94

℃变性 1 min, 56 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 进行 35 个循环; 最后再 72 ℃延伸 10 min。SE2 基因引物最优扩增条件为 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 1 min, 60 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 进行 35 个循环; 最后再 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经电泳检测后用 DNA 凝胶回收试剂盒进行目的条带回收。将回收的条带与 pEASY-T1 Simple Cloning Vector 连接后转入 Trans1-T1 感受态细胞, 在 LB/Amp⁺固体培养基上进行克隆培养。37 ℃过夜培养后挑取单克隆菌落, 接种于 LB/Amp⁺液体培养基中, 200 r/min, 37 ℃培养 6 h 后, 用质粒提取试剂盒提取质粒。以提取的质粒为模板, 用通用引物 M13 进行 PCR 阳性克隆鉴定, 鉴定为阳性者送生工公司测序。

2.3 滇重楼 SE 基因原核表达载体的构建与鉴定

经测序后证明 PCR 产物为目的条带后, 根据 pEASY-E1 Expression Kit 说明要求将纯化后的 PCR 产物插入 pEASY-E1 Expression Vector, 加连接产物于 Trans1-T1 感受态细胞中, 在 LB/Amp⁺固体培养基上进行克隆培养。37 ℃过夜培养后, 挑取单克隆菌落溶于 10 μL 的无菌水中, 以菌液为模板, 用 T7 Promoter Primer 和目的基因的反向引物或目的基因的正向引物和 T7 Terminator Primer, 采用 PCR 来鉴定正确表达方向的阳性克隆。挑选正确表达方向的阳性克隆, 200 r/min, 37 ℃培养 6 h 后, 用质粒提取试剂盒提取质粒, pEASY-E1-SE 表达载体构建成功。

2.4 滇重楼 SE 基因原核表达载体的诱导表达

将 pEASY-E1-SE 表达载体质粒转化入 BL21 (DE3) 表达感受态细胞, 在 LB/Amp⁺液体培养基中 200 r/min 37 ℃培养 1 h 使细胞复苏, 再均匀涂布至 LB/Amp⁺固体培养基上 37 ℃过夜培养, 挑取若干克隆加入 ArtMedia protein Expression/Amp⁺培养基中, 250 r/min、37 ℃过夜培养。

2.5 原核表达后总蛋白的提取

根据贝博的大肠杆菌总蛋白提取试剂盒说明书, 准备提取液: 每 500 毫升提取液中加入 2 μL 蛋白酶抑制剂混合物、2 μL 磷酸酶抑制剂混合物和 5 μL 蛋白稳定液, 充分混匀后置于冰上备用。取诱导表达菌液在 4 ℃, 12 000 r/min 条件下离心, 样品加入 500 μL 蛋白提取液后混匀, 冰上放置 30 min, 期间每隔几分钟用移液枪吹打混匀。随后在 300 W, 10 s 超声/10 s 间隔条件下冰浴超声至菌液变清。将

菌液在 4 ℃, 12 000 r/min 条件下离心 5 min, 收集上清液至干净的离心管, 所得即为总蛋白样品。

2.6 荧光定量 PCR

提取滇重楼根茎叶中的 RNA 并转录为 cDNA, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 进行荧光定量 PCR。

管家基因(actin)引物序列: actin1n-F: 5'-CAGCAGATGTGGATCTCAAAGG-3'; actin1n-R: 5'-GCCGACAATCATAACCAAGCA-3'。目的基因引物序列: qSE1-F: 5'-ACTATTTGAAGACAGTGG-TGGCA-3'; qSE1-R: 5'-GCTCTTATTTGGCATCGTCCT-3'; qSE2-F: 5'-TGGCACCTCAGATTCCAAGT-3'; qSE2-R: 5'-CGGTCATTCTCCACCAGTTA-3'。

3 结果与分析

3.1 滇重楼根组织总 RNA 质量检测

提取得到的滇重楼根组织总 RNA 经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外荧光成像仪下可以清晰地看到 28 S 和 18 S rRNA 条带各 1 条 (图 1), 且 28 S 亚基的条带亮度约是 18 S 亚基条带的 2 倍, 表明所提的滇重楼根组织总 RNA 基本完整, 未被降解, 可用于下一步实验。

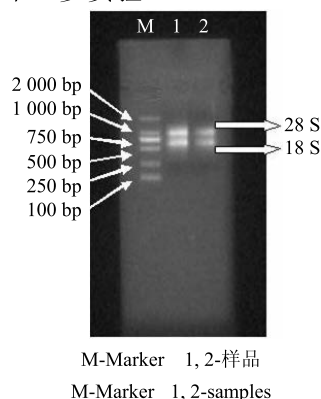


图 1 滇重楼根组织总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Total RNA electrophoresis of root tissue of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

3.2 滇重楼 SE 基因的克隆与序列分析

以滇重楼根组织提取的 RNA 合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测, 可见长度将近 2 000 bp 的特异性核苷酸扩增片段 (图 2), 经测序, SE1 为 1 932 bp, SE2 为 1 828 bp。

测序结果用 DNASTar 进行拼接比对, 与目的条带一致。测序结果经 MEGA 软件比对, 所得 2 条 SE 基因的序列为 2 条单独基因, 命名为 ppSE1 和

ppSE2。将测序结果在 NCBI 上利用网页工具 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 进行开放阅读框 (ORF) 预测。ppSE1 基因的 ORF 为 1 578 bp, 编码 525 个氨基酸; ppSE2 基因的 ORF

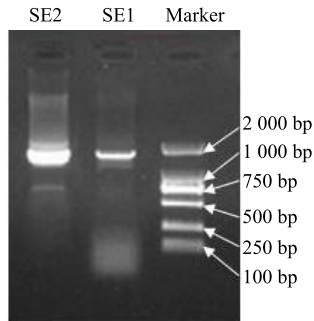


图 2 滇重楼 SE 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of ppSE gene

表 1 ppSE1 同源性比对结果

Table 1 Homology comparison of ppSE1

物种	最大分值	总分	覆盖度/%	E 值	相似度/%	查询号
马来西亚野生香蕉	877	877	99	0.0	81	XP_009419 470.1
油棕	865	865	90	0.0	87	XP_010936 193.1
玉米	862	862	89	0.0	88	ACL54 675.1
大豆	821	821	99	0.0	76	XP_003529 275.1
拟南芥	791	791	95	0.0	76	NP_564 734.1

表 2 ppSE2 同源性比对结果

Table 2 Homology comparison of ppSE2

物种	最大分值	总分	覆盖度/%	E 值	相似度/%	查询号
吊兰	891	891	99	0.0	84	AFN61 200.1
海枣	889	889	99	0.0	84	XP_008790 270.1
玉米	870	870	91	0.0	89	ACL54 675.1
大豆	824	824	100	0.0	76	XP_003529 275.1
拟南芥	801	801	90	0.0	80	NP_564 734.1

分析, 利用 MEGA 软件选择相似性较高的 21 个物种与 ppSE 基因构建系统进化树 (图 3)。与 NCBI 给出的系统发生关系树一致, ppSE1 和 ppSE2 在系统发生上存在分支点, 进一步可以认定这 2 个基因虽同为 SE 基因, 但两者之间存在差异, 可能在生物体内担任着不同的催化角色。在系统进化树中, 与 2 个 SE 基因同源性最高的几个物种均来自于单子叶植物纲。

3.3 重组表达载体 pEASY-E1-SE 构建与鉴定结果

构建的 pEASY-E1-SE 表达载体, 经培养后, 挑取若干单克隆菌落, 分别用 T7 Promoter Primer 和目的基因的反向引物或目的基因的正向引物和 T7 Terminator Primer, 用 PCR 来鉴定正确表达方向的阳性克隆 (图 4), 获得与目的条带长度相符的条带, 证明 pEASY-E1-SE 表达载体构建成功。

为 1 548 bp, 编码 515 个氨基酸。利用在线软件 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将翻译得到的 2 组氨基酸序列分别进行同源性比对, NCBI 系统基在系统发育关系基础上多序列比对和保守的蛋白质结构域建立的系统发育树, 与 ppSE1 基因的同源性得分依次是马来西亚野生香蕉 *Musa paradisiaca* L. var. *sapientum* O. Ktze. 为 877、油棕 *Elaeis guineensis* Jacquem. 为 865、玉米 *Zea mays* L. 为 862、大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr. 为 821、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 为 791; 与 ppSE2 基因的同源性得分依次是吊兰 *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Baker. 为 891、海枣 *Phoenix dactylifera* L. 为 889、玉米为 870、大豆为 824、拟南芥为 801。同源性比对结果见表 1 和 2。

用 ppSE1 和 ppSE2 基因的氨基酸序列做同源性

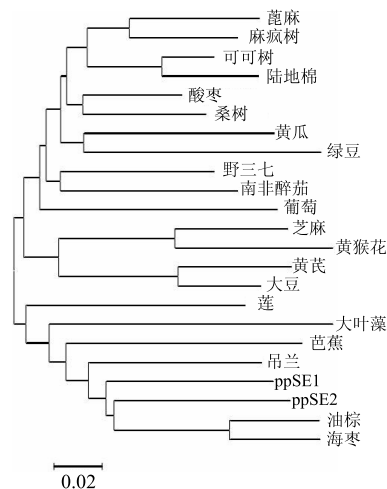


图 3 NCBI 中已知的 SE 氨基酸序列系统发生关系 (NJ 法)
Fig. 3 Phylogenetic relationships of known SE amino acid sequences in NCBI (NJ)

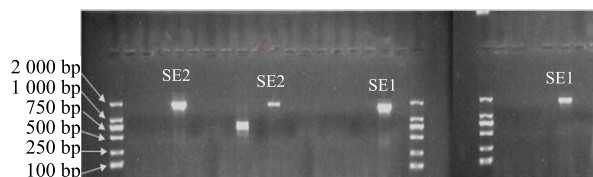


图 4 pEASY-E1-SE 表达载体正确表达方向的阳性克隆筛选结果

Fig. 4 Screening results of positive clones of pEASY-E1-SE expression vector with correct expression

3.4 重组表达载体 pEASY-E1-SE 的诱导表达

利用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线预测软件将翻译得到的氨基酸序列进行蛋白质一级结构预测, 再结合 BioEdit 软件对其进行生物信息学分析。用 SMART 在线分析软件分析 2 个基因各自的跨膜结构, 见图 5、6。再利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对其蛋白质的三维立体结构做一个模拟, 见图 7、8。

根据软件分析结果推测, ppSE1 蛋白质由 525 个氨基酸组成, 其中的基本碱基组成为 559A、485C、422G、466T, 相对分子质量为 56 880, 等电点理论值为 9.19, 带负电荷的残基总数 (Asp+Glu):

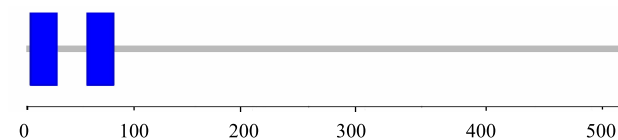


图 5 ppSE1 蛋白质结构分析 (跨膜区域: 4~26, 54~76)

Fig. 5 ppSE1 protein structure analysis (transmembrane region: 4—26, 54—76)

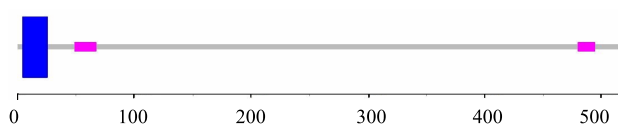


图 6 ppSE2 蛋白质结构分析 (跨膜区域: 5~24; 低复杂度区域: 49~66, 480~493)

Fig. 6 ppSE2 protein structure analysis (transmembrane region: 5—24; low complexity region: 49—66, 480—493)

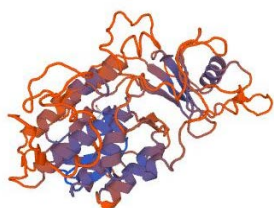


图 7 ppSE1 基因蛋白质三维结构

Fig. 7 3D structure of ppSE1 gene protein

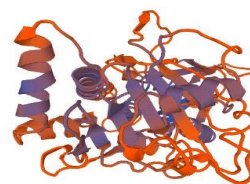


图 8 ppSE2 基因蛋白质三维结构

Fig. 8 3D structure of ppSE2 gene protein

46, 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys): 59, 化学式为 $C_{2560}H_{4084}N_{698}O_{721}S_{22}$, 原子总数为 8 085 个, 脂肪指数为 96.97, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 0.062, 为疏水性蛋白; ppSE1 蛋白质由 515 个氨基酸组成, 其中的基本碱基组成为 527A、449C、415G、437T, 相对分子质量为 55 350, 等电点理论值为 8.74, 带负电荷的残基总数为 (Asp+Glu): 43, 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys): 50, 化学式为 $C_{2490}H_{3993}N_{669}O_{709}S_{22}$, 原子总数为 7 883 个, 脂肪指数为 103.40, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 0.174, 为疏水性蛋白。从氨基酸组成成分图表中可以看出, ppSE1 和 ppSE2 基因的氨基酸组成基本相似, 但是从跨膜结构位点以及蛋白质功能区域分析的图表可以看出, 两者的蛋白质结构完全不一样, 蛋白质结构的功能区域差距较大, 进一步推断 ppSE1 基因和 ppSE2 基因在生物体内参与不同的新陈代谢途径, 发挥着不同的生物活性。

将 pEASY-E1-SE 表达载体质粒转化入 BL21 (DE3) 表达感受态细胞, 经 ArtMedia protein Expression/Amp⁺培养基自动诱导表达, 将所获得的蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果 (图 9) 显示, 在 5.5×10^4 和 6.0×10^4 附近有特异蛋白条带出现, 与预期的 ppSE1 融合蛋白分子质量 56 870 及 ppSE2 融合蛋白相对分子质量 55 360 大小相符。

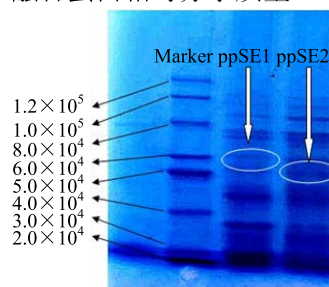


图 9 ppSE1 和 ppSE2 原核表达 SDS-PAGE 电泳检测结果

Fig. 9 Prokaryotic expression of ppSE1 and ppSE2 by SDS-PAGE electrophoresis

3.5 荧光定量 PCR 结果

经过荧光定量 PCR 反应后得到 ppSE1 和 ppSE2 的基因表达量相对定量结果分别见图 10、11, 可以看出 ppSE1 在叶中的表达量极高, 在茎中的表达量相对于 ppSE2 也较高, 二者在根中的表达量相似。

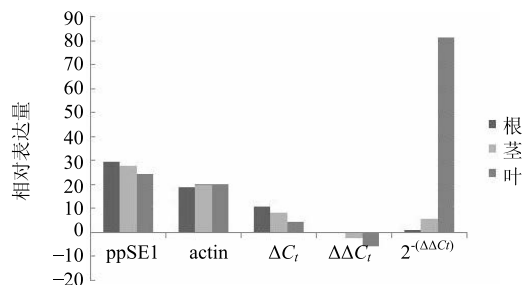


图 10 ppSE1 基因表达相对定量结果

Fig. 10 Relative quantitative results of ppSE1 gene expression

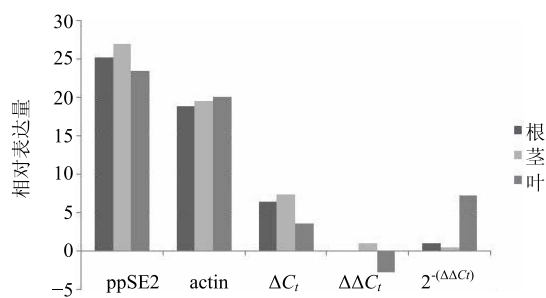


图 11 ppSE2 基因表达相对定量结果

Fig. 11 Relative quantitative results of ppSE2 gene expression

4 讨论

滇重楼的主要有效成分是甾体皂苷, 通过有效成分生物合成途径和相关酶基因调控的研究, 可以增加有效成分的量, 提高中药材的品质^[9]。而 SE 被认为是甾体皂苷生物合成途径中的 1 个非常重要的调控酶。已在多种植物中如人参、远志、绞股蓝等克隆出 SE 基因并进行了初步功能鉴定^[10-14]。本实验以滇重楼的根为实验材料, 根据转录组数据设计引物, 克隆获得了 1 598 bp 和 1 509 bp 的 2 组 SE 基因全长编码区序列, 为后续实验奠定了基础。通过荧光定量 PCR 实验结果显示, ppSE1 基因和 ppSE2 基因在茎和叶中的表达具有显著差异, ppSE1 的表达在叶中最为显著。结果表明 ppSE1 基因和 ppSE2 基因在滇重楼中具有不同的表达模式, 在滇重楼次生代谢产物的合成中起着不同的作用。

pET 系列载体是目前原核表达中运用比较广泛的载体, pEASY-E1 Expression Vector 与 pET 载体骨架相似, 利用 5 min 快速 TA 克隆技术克隆 PCR 产物, 利用 T7lac 启动子调控并高效表达目的基因, 并提供

氨苄青霉素筛选标记。本实验利用 pEASY-E1 表达载体成功表达了含有生物学活性的 SE 蛋白。

因此, 利用现代生物技术使重楼皂苷合成途径中的关键酶高表达, 极有可能是大量获取重楼皂苷的一个有效手段。本实验为后续研究 SE 基因与滇重楼有效成分甾体皂苷量的相关性奠定基础, 并可利用组合生物学的方法来分析滇重楼甾体皂苷生物合成途径的关键步骤, 为次生代谢工程技术应用于滇重楼提供理论依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李 恒. 滇重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] Laden B P, Tang Y, Porter T D. Cloning, heterologous expression and enzymological characterization of human squalene monooxygenase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 374(2): 381-388.
- [4] Bai M, Prestwich G D. Inhibition and activation of porcine squalene epoxidase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 293(2): 305-313.
- [5] Sakakibara J, Watanabe R, Kanai Y, *et al.* Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(1): 17-20.
- [6] 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.
- [7] 许晓双, 张福生, 秦雪梅. 三萜皂苷生物合成途径及关键酶的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(11): 2440-2448.
- [8] Hu X, Neill S, Fang J, *et al.* Mitogen-activated protein kinases mediate the oxidative burst and saponin synthesis induced by chitosan in cell cultures of *Panax ginseng* [J]. *Sci China C Life Sci*, 2004, 47(4): 303-312.
- [9] 黄璐琦. 分子生物学 [M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000.
- [10] 刘 欢, 何忠俊, 梁社往, 等. 滇重楼高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1846-1851.
- [11] 胡 薇, 刘 宁, 田玉华, 等. 人参鲨烯环氧酶基因的克隆与原核表达 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(10): 207-212.
- [12] 赵云生. 远志高产途径、种质资源与鲨烯环氧酶基因克隆研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.
- [13] 孙婷婷, 邹 莉, 张林芳, 等. 桑黄鲨烯环氧酶基因克隆与序列分析 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2768-2773.
- [14] 蒋军富, 李雄英, 吴耀生, 等. 绞股蓝鲨烯环氧酶基因的克隆与序列分析 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(8): 1520-1526.