

太子参鲨烯环氧酶基因的克隆及其表达分析

陈观水, 林思妮, 柯兰兰, 苏彤彤, 朱 婧, 徐 阳, 潘大仁

福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

摘 要:目的 对太子参三萜类皂苷生物合成关键调控酶鲨烯环氧酶 1 (SQE1) 基因进行全长 cDNA 克隆和功能分析。方法 基于其他植物 SQE 基因的同源序列设计简并引物, 以太子参块根总 RNA 为模板, RT-PCR 结合 RACE 技术克隆太子参 SQE1 基因的全长 cDNA, 并进行生物信息学分析。利用农杆菌叶盘转化法将 SQE1 基因转化烟草, 研究其对烟草总三萜量的影响。结果 获得太子参 SQE1 基因全长 cDNA 序列 2 038 bp, 该序列包含 1 554 bp 的开放阅读框, 编码 517 个氨基酸, 相对分子质量为 5.67×10^4 , 等电点为 8.8, 与其他药用植物的 SQE 蛋白具有较高的同源性, 含有 FAD 结合结构域和 4 个跨膜区域, 转太子参 SQE1 基因的烟草的总三萜量明显高于非转基因植株。结论 首次克隆获得太子参 SQE1 基因的全长 cDNA, 该基因的异源表达可一定程度提高转基因植物的总三萜量, 为阐明与应用太子参三萜类成分生物合成途径提供科学依据。

关键词: 太子参; 三萜皂苷; 鲨烯环氧酶; 转基因烟草; 异源表达

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)13-2733-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.13.023

Cloning and ectopic expression analysis of squalene epoxidase 1 gene from *Pseudostellaria heterophylla*

CHEN Guan-shui, LIN Si-ni, Ke Lan-lan, SU Tong-tong, ZHU Jing, XU Yang, PAN Da-ren

College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: **Objective** To clone the full-length cDNA encoding squalene epoxidase 1 (SQE1), a key enzyme of triterpenes biosynthesis, from *Pseudostellaria heterophylla* and to perform functional analysis. **Methods** With the total RNA as template, the full-length cDNA of SQE1 in *P. heterophylla* was cloned via RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. The bioinformatics of the cloned SQE1 gene was performed. The target gene was transferred into tobacco by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Results** The full-length cDNA (2 038 bp) of SQE1 gene was obtained with an open reading frame of 1 554 bp, encoding 517 amino acid polypeptides, which had higher homology with the known SQEs in other medicinal species. The calculated relative molecular mass was 5.67×10^4 , the isoelectric point was 8.8. The deduced protein sequence exhibited FAD-binding domains and four transmembrane regions. The content of total triterpenes was increased in transgenic tobacco plants. **Conclusion** This is the first report that the full-length cDNA encoding SQE1 from *P. heterophylla* is cloned. The ectopic expression of SQE1 could promote to increase the content of total triterpenes in transgenic plant. This work provides a foundation for exploring the biosynthetic pathway of triterpenes in *P. heterophylla* and their applications in bioengineering.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax; triterpenoid saponin; squalene epoxidase; transgenic tobacco; ectopic expression

三萜皂苷 (triterpenoid saponin) 是一类重要的植物次生代谢物, 具有抗肿瘤、抗病毒、降血糖、调血脂等多种生物活性, 具有重要的药用商业价值。三萜皂苷的生物合成途径主要分为 3 个阶段: (1) 异戊二烯单位 3-异戊二烯焦磷酸 (IPP) 和二甲烯丙基焦磷酸 (DMAPP) 的生物合成; (2) 重要中间前体 2,3-角鲨烯氧化物的合成; (3) 氧化角鲨烯

的环化及环上复杂官能团的修饰^[1-3]。研究表明, 甲羟戊二酸 (MVA) 途径是植物三萜皂苷合成的主要经历途径。在该途径中, IPP 在牻牛儿基焦磷酸合成酶 (GPS) 作用下首先形成牻牛儿基焦磷酸 (GPP), 接着利用法呢基焦磷酸合成酶 (FPS) 转化成法呢基焦磷酸 (FPP), 又在鲨烯合成酶 (squalene synthase, SQS) 的作用下合成鲨烯^[3], 然

收稿日期: 2017-01-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30900915); 福建省教育厅资助高校重点项目 (JK2012012)

作者简介: 陈观水 (1979—), 男, 博士, 副教授, 主要从事中草药生物技术研究。Tel: (0591)83789494 E-mail: gshchenfafu@163.com

后经鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SQE) 催化转变为 2,3-氧化鲨烯 (2,3-oxidosqualene)。最后, 2,3-氧化鲨烯经过 2,3-氧化鲨烯环化酶 (OSCs) 的环化作用得到植物甾醇和三萜类骨架^[3-5]。三萜类骨架依赖细胞色素 P450 单加氧酶、糖基转移酶和糖苷酶进行氧化、置换及糖基化等化学修饰, 最终获得不同种类的三萜类皂苷产物^[6-8]。在 MVA 途径中, SQE 的量及活性决定了后续产物的产量, 是三萜类物质合成一个关键限速酶^[9]。研究表明, SQE 基因表达量与三萜皂苷的生成量呈正相关。迄今为止, 已从人参、三七、拟南芥、葡萄和刺五加等植物中成功克隆到 SQE 基因, 并对其有较为深入的研究^[10-19]。

太子参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax 为多年生草本植物石竹科异叶假繁缕的块根, 又名孩儿参、童参, 系常用中药及滋补保健品, 具益气健脾、润肺生津之传统功效及保护心肌功能、促进免疫、抗应激、治疗糖尿病、止咳等药理作用, 主要分布于日本、朝鲜以及中国的福建、安徽、湖南、河南、河北、四川等地^[20]。据报道太子参含有皂苷类、环肽类、糖类等物质。其中, 太子参皂苷与人参皂苷结构类似, 为三萜类皂苷, 具有抗疲劳、抗缺氧、抗应激、抗衰老等药理作用^[20]。尽管太子参目前作为药用植物应用相关研究较多, 但关于太子参药效成分代谢途径及调控机制的相关研究还未见报道。

本研究利用逆转录 PCR (reverse transcription-

PCR, RT-PCR) 结合 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术, 对太子参三萜皂苷合成途径关键调控酶鲨烯环氧酶 1 (SQE1) 基因进行克隆与生物信息学分析, 并利用农杆菌转化法将获得的 SQE1 基因转化到模式植物烟草中, 研究太子参 SQE1 的异源表达对烟草总三萜量的影响, 研究结果有助于从分子水平上解析太子参三萜皂苷的生物合成机制, 并将为通过生物技术手段提高其产量奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

太子参拓参 1 号采集自拓荣县, 经福建农林大学生命科学学院潘大仁教授鉴定为石竹科植物异叶假繁缕 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax, 并种植于福建农林大学生命科学学院温室。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成

采用 Invitrogen 公司 RNA 提取试剂 TRIzol[®] 提取太子参块根总 RNA, 操作按照说明书进行, 经琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度法检测符合要求的 RNA 样品溶液, 保存于 -80 °C 冰箱备用。利用 TAKARA 公司 PrimeScript[™] 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行太子参 cDNA 第 1 链的合成。根据 Clontech 公司 SMART RACE cDNA Synthesis Kit 的操作步骤合成 RACE 扩增所用的 cDNA。

1.3 引物设计与合成

利用 DNAMAN 6.0 软件设计相关引物 (表 1), 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 实验所需引物

Table 1 List of primers

引物名称	序列	用途
SQEF	5'-AGCTTYCAYAAYGGNCGTTT-3'	扩增中间保守序列
SQER	5'-AARCABGCNTBRCGCATTTC-3'	扩增中间保守序列
SQEGSP-3	5'-CGCTACTCCTCAGCCTACACCAGGT-3'	3'-RACE 扩增
SQEGSP-5	5'-GATGTAAGTGTCCCTGCTCAAGCCGT-3'	5'-RACE 扩增
fSQEF	5'-CGGGATCCATGGATACGTTTGTGATTC-3'	全长扩增及载体构建
fSQER	5'-CGCTCGAGTTAGTAGTTATTTGCCGGT-3'	全长扩增及载体构建

R-A/G Y-C/T B-G/T/C N-A/T/G/C

1.4 太子参 SQE1 基因保守序列的克隆

根据 GenBank 中收录的人参、烟草等模式植物中 SQE 基因序列并结合 DNAMAN 比对分析, 设计 1 对简并引物 SQEF 和 SQA (约 100 ng/μL) 1 μL, 10×Buffer 2 μL, Taq DNA polymerase (5 U/μL) 0.2

μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, 正、反向引物各 1 μL, ddH₂O 14.3 μL。扩增反应程序: 94 °C 预变性 5 min 后, 按照 94 °C 变性 30 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 90 s, 进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 反应结束后于 4 °C 保存备用。PCR 产物在

1%的含 Goldview I 型核酸染料的琼脂糖凝胶电泳 45 min (110 V) 后, 用上海培清凝胶成像仪进行观察分析和拍照。利用北京百泰克生物技术有限公司的琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收纯化目的 DNA 片段, 纯化后的 DNA 连接到 pMD18-T 克隆载体 (TAKARA 公司), 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 筛选并酶切鉴定的阳性克隆送上海博尚生物技术有限公司测序。

1.5 太子参 SQE1 基因 5'-RACE 和 3'-RACE 的扩增

根据已获得的 SQE 保守序列设计 5' 和 3'-RACE 引物 SQEGSP-3 和 SQEGSP-5 (表 1), 利用 Clontech 公司 SMARTTRACE cDNA Amplification Kit 试剂盒分别获得该基因的 5' 和 3' 端序列, PCR 产物的克隆与测序方法同“1.4”项。

1.6 太子参 SQE1 基因 cDNA 全长和 DNA 全长的克隆

利用 DNAMAN6.0 软件对所得的中间保守序列、5'端序列以及 3'端序列进行拼接, 得到太子参 SQE 基因 cDNA 序列全长。同时, 根据拼接的序列推测的起始密码子上游和终止密码子下游设计 1 对引物 fSQEF 和 rSQER (表 1) 进行 RT-PCR 扩增验证全长 cDNA 序列, PCR 产物的克隆与测序方法同“1.4”项。

1.7 太子参 SQE1 基因生物信息学分析

利用 Blast 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 在线进行核苷酸和氨基酸序列比对和保守结构域分析, 利用 TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/SQErices/TMHMM-2.0>) 在线分析 SQE1 的跨膜区域, 利用 DNAMAN 6.0 软件预测编码蛋白质的等电点 (pI)、相对分子质量和多序列比对利用 ClusterW1.8 软件构建系统进化树。

1.8 太子参 SQE1 基因在烟草中的表达分析

以 pRI 101-AN (TaKaRa, 大连) 作为构建植物表达载体的基础载体, 构建太子参 SQE1 基因的植物表达载体导入根癌农杆菌菌株 GV3101 中, 利用叶盘转化法进行太子参 SQE1 基因遗传转化烟草 K326 品种。利用香草醛-冰醋酸法提取阳性转基因植株的总三萜并利用分光光度法进行测定。

2 结果与分析

2.1 太子参 SQE1 基因中间保守序列的获得

太子参块根的 cDNA 经引物 SQEF 和 SQER 扩增, 获得 1 个大小约为 800 bp 的特异条带, 经过克隆测序及 Blast 比对, 该片段与 GenBank 核酸数据库中登录的大麦 *Hordeum vulgare* L.、小麦 *Triticum*

aestivum L.、油菜 *Brassica napus* L. 等植物的 SQE 的编码基因具有较高的相似性, 分别为 75%、74% 和 72%, 推导的氨基酸序列也与已知的 SQE 蛋白具有较好的相似性, 由此可以初步认为获得 DNA 序列片段为太子参编码基因的部分序列。

2.2 太子参 SQE1 基因的全长 cDNA 的获得及生物信息学分析

根据已获得的太子参 SQE1 基因片段分别设计 5' 和 3' 末端 RACE-PCR 特异引物 SQEGSP-5 和 SQEGSP-3, 通过 RACE-PCR 及克隆、测序后分别获得 5' 端序列为 721 bp 和 3' 末端序列为 899 bp。利用 DNAMAN 6.0 软件将 5'-RACE、3'-RACE 和中间保守序列扩增片段克隆测序结果拼接得到全长 cDNA 为 2 038 bp 的 DNA 序列, 为了验证全长拼接结果, 根据所得的 SQE1 全长序列设计引物 fSQEF 和 rSQER, 以 cDNA 为模板, 扩增太子参 SQE1 基因全长序列并测序, 测序结果表明, 与拼接结果一致。分析表明, 该序列包含 1 554 bp 的开放阅读框 (ORF), 5' 非翻译区 (UTR) 为 188 bp, 3' 非翻译区为 296 bp, 终止密码子为 TGA (图 1)。利用 ExPASy Proteomics Server 在线软件 ProtParam 对 SQE1 基因编码蛋白的理化性质进行预测分析。推测太子参 SQE1 的分子式为 $C_{2559}H_{4080}N_{686}O_{721}S_{23}$, 相对分子质量为 5.67×10^4 , pI 为 8.8, 为疏水蛋白; 在线软件 SignalP4.0 Server 分析结果表明 SQE 无信号肽。使用 TMHMM Server v2.0 预测 SQE1 编码蛋白有 4 个跨膜区域, 分别位于 10~28、47~70、447~469、476~493 (图 2)。InterProScan 的保守结构域在线预测表明, SQE1 基因预测编码蛋白含有 2 个与 FAD/NAD (P) 结合的结构域和 1 个鲨烯环氧酶结构域, 显示出和其他 SQE 蛋白所共有特性。将推导的氨基酸序列利用在线软件 BLASTP 进行分析, 发现其与已知植物的 SQE 具有较高的相似性, 其中与三七 *Panax notoginseng* (Burll) F. H. Chen (AGI19257) 的相似性为 76.7%, 与葡萄 *Vitis vinifera* L. (XP_002285493) 的相似性 77.1%, 人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer (BAD15330) 的相似性为 76.5%。

利用 NAMAN 6.0 对推测的太子参 SQE1 基因的氨基酸序列和其他物种已鉴定的 SQE 基因的氨基酸序列进行多序列比对。结果表明 (图 3), 和其他植物中的 SQE 蛋白一样, 功能结构域 Motif I (FAD 结合结构域) 和 Motif II (底物结合结构域) 在太子参 SQE1 蛋白中极其保守。

```

1 AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGAATCTTCCCTTTACGAATCTACTCCACAAATTTAACTCCCTT
76 ATTAATAACACCAATTATTACCCCTCCATTATTATTATTATTATTATTAAATAATAACAAAAAATCATAT
151 TATTATATTTATATTATCAATAATAATAATATTTTATGATGATACGTTTGTGATTGACTACATTCTTCAGA
1 M D T F V I H D Y I L Q
226 TTTCCGTGGCCTCCATTCTAGGGCTTGTAAATATTATATTCTATTTTCCGCGGTGCGAAATCGAATTACAACCACG
13 I S V A S I L G L V I L Y S I F R G R K S N Y N H
301 TTATTCGGAGCTCCGAGAATGTTGATAATTTGTGGTCGGAATGACGTCATTGTTGTGCGGTGCTGGAGTGGCTG
38 V I R S S E N V D N L W S E N D V I V V G A G V A
376 GCGCCGCTCTTGCTCATACTCTTGCTAAGGACGGTCGACGAGTTTATGTGATTGAGAGAGACTTAACCGAACCCG
63 G A A L A H T L A K D G R R V H V I E R D L T E P
451 ACAGGATTGTCGGCGAACTGCTACAGCCTGGAGGTTATCTGAAATTGATTGAACTGGGCCTCAAAGACTGTGTTG
88 D R I V G E L L Q P G G Y L K L I E L G L K D C V
526 ATGATATCGATGCTCAGAGAGTGGTGGGTATGGTTTGTTCAAAGATGGGAAGAATATAAGACTGTCTTATCCCT
113 D D I D A Q R V V G Y G L F K D G K N I R L S Y P
601 TGGAGCAATTTACTGCAGACGTGGCCGGGCGTAGTTTTTACAAATGGACGTTTCATACAGAAGATGAGAGAAAAAG
138 L E Q F T A D V A G R S F H N G R F I Q K M R E K
676 CTGCATCTCTCCCTATGTACGGCTTGAGCAGGGAACAGTTTACATCTTTGCTTGAAGAAAAGGAGTTGTTAAGG
163 A A S L P Y V R L E Q G T V T S L L E E K G V V K
751 GAGTCCAGTATAAGACTAAGAATGGTGAAGAAATGAAAGCATATGCCCTCTTACTATTGTTTGTGATGGCTGTT
188 G V Q Y K T K N G E E M K A Y A P L T I V C D G C
826 TCTCGAATCTGAGACGATCTCTTTGTTCCAGGAGTTGAAGTACCCTCACATTTTGTGGGTTGATTCTGGAGA
213 F S N L R R S L C S P K V E V P S H F V G L I L E
901 ACTGCAAAATGCCATTTTCAAACCATGGACATGTTATCCTAGCAGATCCATCTCCAATTCTATTTTATCAAATTA
238 N C K L P F S N H G H V I L A D P S P I L F Y Q I
976 GTACAACAGAAGTCCGCTGTTTGGTTGATGTGCCAGAGGGCAGAAGCTGCCTTCTATAGTAATGGTGAATGG
263 S T T E V R C L V D V P A G Q K L P S I A N G E M
1 051 CAAAGTACTTGAAAACTGCGGTGGCTCCGACAGTTCTCTGAACTTTATGAGTCATTTGTAGCAGCTGTGGACA
288 A K Y L K T A V A P Q V P P E L Y E S F V A A V D
1 126 AGTGTAAACATTAGGACAATGCCCAACAGAAGCATGCCCGCTACTCTCAGCCTACACCAGGTGCCATACTAATGG
313 K C N I R T M P N R S M P A T P Q P T P G A I L M
1 201 GTGATGCTTTTAAACATGCGTCATCCTTTAACCAGGAGGAGGAATGACAGTGGCATTGTCAGATATTGTGATACTAC
338 G D A F N M R H P L T G G G M T V A L S D I V I L
1 276 GAGATCTTCTGAAGCCTTTGAAGAGCCTGAACAATTCAGAGGCATTATGCAAGTACCTGGAGTCCCTTTACACCT
363 R D L L K P L K S L N N S E A L C K Y L E S F Y T
1 351 TGCAGCAAGCCTGTGGCGTCCACTATAAACACTTTGGCAGGAGCCCTCTACAAGGTATTTTGGCGTTTCTATGATG
388 L R K P V A S T I N T L A G A L Y K V F C A S S D
1 426 ATGCTCACAGGAATGCGCGAGGCATGCTTTGACTATCTAAGCCTAGGTGGAGAATGCTCAAATGGTCCAGTTG
413 D A H K E M R E A C F D Y L S L G G E C S N G P V
1 501 CTTTACTTTCTGGTCTAAACCCTCGTCCACTGAGCTTAGTTATACACTTCTCGCTGTGGCTGTGATGGCGTTG
438 A L L S G L N P R P L S L V I H F F A V A V Y G V
1 576 GTCGACTGTTACTGCTTTTCCCTCTCCAAAACGCCCTCTGGCTTGGGTACGATTGCTGACGGGTGCTGCAGGCA
463 G R L L L P F P S P K R L W L G V R L L T G A A G
1 651 TCATCTTCCCAATTATGAAAGCAGAAGGACTCCGACAAATGTTTTCCAGCAACTGTTCCAGCATATTACAGAA
488 I I F P I M K A E G L R Q M F F P A T V P A Y Y R
1 726 GTCITCAAGTAAAGTGATGGTGGACACAACAGCAGCGTGTAGATCACTCCCACTATTGGCGACATACTTGCT
513 S L Q V K *
1 801 GTATATCTATCCCTGTAAAATACCGGGGATGTTAAATGTCTTAATTGGGTTATATGTATATTGTCACAGCTGCAG
1 876 CCATGATCAAACTGGTTGGTTGTTTATTGTTTCCACAAATTACAATAAACAATTAAACACTACTCTTATTCAT
1 951 ATCTTGTGTTGTTTCAGAAAAAAGTACTCTGCGTTGATACCACTGCTTGCCCTATAG
2 026 TGAGTCGTATTAG

```

图 1 太子参 SQE1 cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

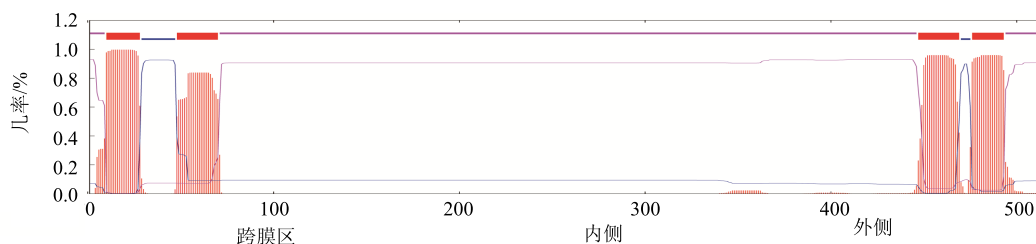
Fig. 1 Nucleic acid and deduced amino acid sequences of SE gene from *P. heterophylla*

图 2 太子参 SQE1 蛋白跨膜区域的预测

Fig. 2 Prediction of transmembrane regions of SQE1 protein from *P. heterophylla*

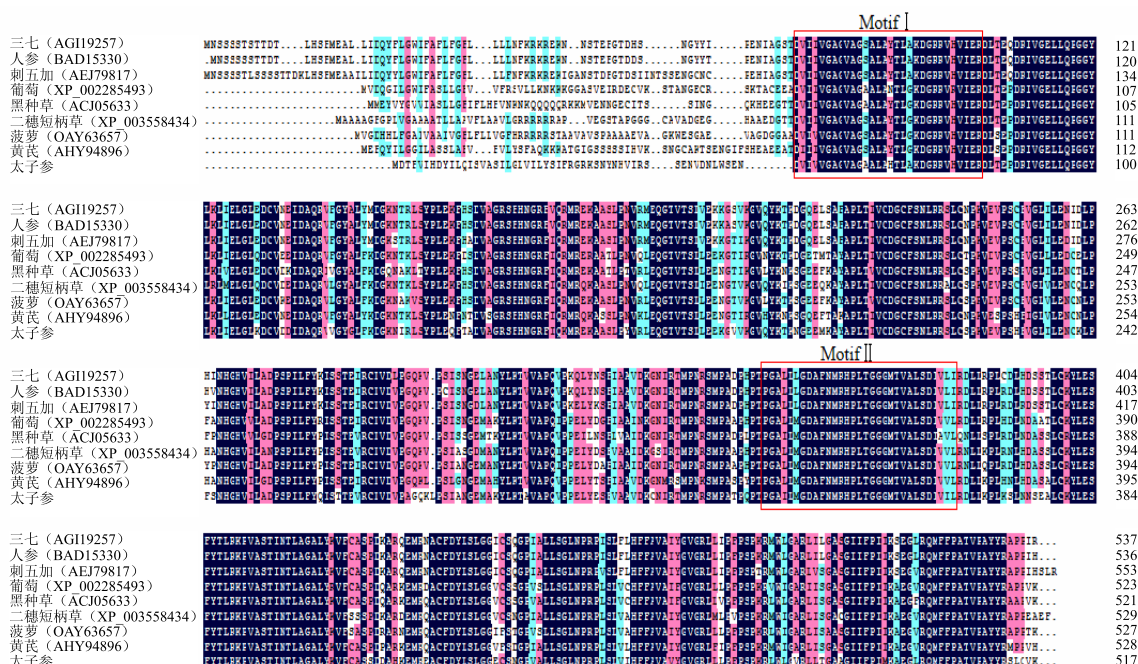


图 3 太子参 SQE1 氨基酸序列与其他物种 SQEs 氨基酸序列多重比较

Fig. 3 Multiple comparison on amino acid sequence of SQEs from *P. heterophylla* and other species

利用 Clustalw1.8 构建太子参 SQE1 基因推测的氨基酸序列与 GenBank 中其他植物如人参、三七、刺五加等 8 种植物的 SQE 氨基酸序列的系统发育树 (图 4)。结果表明, 太子参与黑种草聚在一类, 说明其亲缘关系较近, 与其他植物亲缘关系较远。

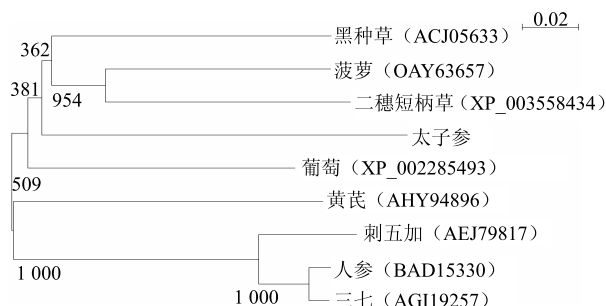


图 4 太子参 SQE1 与其他物种 SQEs 的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of deduced amino acid sequences of SQE1 in *P. heterophylla* and other SQEs

2.3 太子参 SQE1 基因在烟草中的表达分析

利用农杆菌转化法将太子参 SQE1 基因转化烟草 K326, 并分别随机选取 3 株阳性转基因烟草和非转基因烟草进行总三萜量的测定。测定结果显示, 转入太子参 SQE1 基因的烟草植株总三萜量约为非转基因烟草植株的 3.5 倍 ($n=3$) (图 5)。结果表明, 太子参 SQE1 基因在烟草中的异源表达可以在一定程度上提高转基因植株的总三萜量。

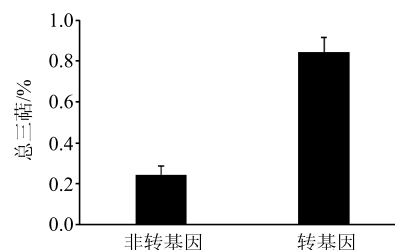


图 5 转基因烟草及非转基因烟草总三萜量比较

Fig. 5 Comparison of total triterpenes content between transgenic and non-transgenic tobacco

3 讨论

药用植物中的次生代谢产物是中药的主要活性成分, 是新药和新先导化合物的重要来源^[8]。植物次生代谢产物的低产量一直是一个需要解决的重要问题, 通过对次生代谢生物合成途径进行研究, 以寻找提高植物次生代谢物产量的方法, 是解决次生代谢产物产量低的有效方法。三萜类皂苷是植物次生代谢产物中一类重要化合物, 具有重要的药用价值, 其量和组分主要取决于生物合成途径中的关键酶以及在细胞中的表达水平^[1,3]。研究表明, SQE 是三萜皂苷合成途径中的第一步氧化反应, 催化反式鲨烯在 C=C 双键之间插入 1 个氧原子形成环氧化物, 即 2,3-氧化鲨烯^[3,5-7]。2,3-氧化鲨烯再经过一系列的质子化作用、环化、重排和去质子化作用形成

三萜皂苷^[5-9,11-18]。增大 SQE 的表达量能提高三萜类化合物和植物甾醇的产量。因此,该酶被认为是皂苷合成中关键限速酶之一,对三萜皂苷产量的影响起到关键作用。

本研究首次通过 RT-PCR 结合 RACE 技术成功分离到太子参的限速酶-SQE 基因的全长 cDNA 序列。前人研究表明,Motif I 和 Motif II 是 SQE 蛋白发挥功能必不可少的 2 个功能结构域。其中 Motif I 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,是甾醇、三萜类化合物生物合成中的关键位点^[21-22];蛋白质保守结构预测及多序列分析表明,太子参 SQE1 蛋白中也包含 Motif I 和 Motif II 保守结构域,显示出 SQEs 家族的共有特性^[23-24]。BLAST 在线分析也表明,太子参 SQE1 推测的氨基酸序列与其他生物中的 SQEs 具有较高的相似性,其中与人参、刺五加、三七等药用植物相似性均在 75% 以上,验证了该基因与已克隆的鲨烯环氧酶相关基因亲缘关系越近,代谢产物越趋同的观点。一般认为 SQE 是定位于内质网膜上的酶^[16,25],本研究分离获得的太子参 SQE1 都包含 4 个跨膜结构域,与人参、刺五加等植物中的 SQE 类似^[11]。SQE 为 MVA 途径中三萜皂苷的关键限速酶,表达水平的高低直接影响下游目标次生代谢产物的量,利用 RNAi 技术抑制人参 SQE1 转录、表达后,人参皂苷的产量显著下降^[24]。本研究将太子参 SQE1 利用农杆菌介导法导入烟草植株中,使转基因烟草的总三萜量提高 3.5 倍。结果表明,所分离的太子参 SQE1 基因为潜在的功能性 SQE 编码基因,可能参与了烟草三萜的合成。

本研究经过 RT-PCR 与 RACE 技术相结合首次克隆了太子参 SQE1 基因的全长 cDNA 序列,将有助于阐明太子参三萜生物合成的分子基础,探索提高太子参三萜量的有效方法,为进一步提高太子参药材质量和药用价值奠定基础。

参考文献

- [1] Augustin J M, Kuzina V B, Andersen S, *et al.* Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(6): 435-457.
- [2] 牛云云,朱孝轩,罗红梅,等. 三萜皂苷合成生物学元件的初步开发: 三七鲨烯环氧酶编码基因克隆及表达模式分析 [J]. *药学学报*, 2013, 48(2): 211-218.
- [3] 陶韵文,徐洁森,孙 晶,等. 植物皂苷生物合成中 UGT 功能研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2013, 20(1): 85-90.
- [4] Nguyen H T, Neelakadan A K, Quach T N, *et al.* Molecular characterization of Glycine max squalene synthase genes in seed phytosterol biosynthesis [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2013, 73(12): 23-32.
- [5] Moses T, Pollier J, Faizal A, *et al.* Unraveling the triterpenoid saponin biosynthesis of the African Shrub *Maesa lanceolata* [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 122-135.
- [6] Cammareri M, Consiglio M F, Pecchia P, *et al.* Molecular characterization of b-amyrin synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis [J]. *Plant Sci*, 2008, 175(3): 255-261.
- [7] Phillips D R, Rasbery J M, Bartel B, *et al.* Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization [J]. *Cur Opin Biol*, 2006, 9(3): 305-314.
- [8] Zhao Y J, Cheng, Q Q, Su P, *et al.* Research progress relating to the role of cytochrome P450 in the biosynthesis of terpenoids in medicinal plants [J]. *Appl Micro Biot*, 2014, 98(6): 2371-2383.
- [9] Niu Y Y, Luo H M, Sun C, *et al.* Expression profiling of the triterpene saponin biosynthesis genes FPS, SS, SE, and DS in the medicinal plant *Panax notoginseng* [J]. *Gene*, 2014, 533(1): 295-303.
- [10] He F, Zhu Y, He M, *et al.* Molecular cloning and characterization of the gene encoding squalene epoxidase in *Panax notoginseng* [J]. *DNA Sequence*, 2008, 19(3): 270-273.
- [11] 邢朝斌,劳风云,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.
- [12] 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.
- [13] Razdan S, Bhat W W, Rana S, *et al.* Molecular characterization and promoter analysis of squalene epoxidase gene from *Withania somnifera* (L.) Dunal [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(2): 905-916.
- [14] Zhang M, Wang S, Yin J, *et al.* Molecular cloning and promoter analysis of squalene synthase and squalene epoxidase genes from *Betula platyphylla* [J]. *Protoplasma*, 2016, 253(5): 1347-1363.
- [15] Kalra S, Kumar S, Singh K. Molecular analysis of squalene epoxidase gene from *Chlorophytum borivilianum* (Sant. and Fernand.) [J]. *J Plant Bioch Biot*, 2015, 24(4): 417-424.
- [16] 李宝财,修乐山,周 秘,等. 刺五加鲨烯环氧酶基因的表达及其与刺五加皂苷含量的相关性分析 [J]. *中药材*, 2013, 36(7): 1063-1066.
- [17] 申修源,谷 巍,周娟娟,等. 建泽泻鲨烯合酶基因克隆及其生物信息学分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(5):

- 604-609.
- [18] 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.
- [19] Guo H, Li R, Liu S, *et al.* Molecular characterization, expression, and regulation of *Gynostemma pentaphyllum* squalene epoxidase gene 1 [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2016, 109(12): 230-239.
- [20] 刘训红, 陈彬, 王玉玺. 太子参总皂苷药理作用的初步研究 [J]. 江苏药学临床研究, 2000, 8(3): 6-8.
- [21] Uchida H, Sugiyama R, Nakayachi O, *et al.* Expression of the gene for sterol-biosynthesis enzyme squalene epoxidase in parenchyma cells of the oil plant, *Euphorbia tirucalli* [J]. *Planta*, 2007, 226(5): 1109-1115.
- [22] Ruckenstein C, Eidenberger A, Lang S, *et al.* Single amino acid exchanges in FAD-binding domains of squalene epoxidase of *Saccharomyces cerevisiae* lead to either loss of functionality or terbinafine sensitivity [J]. *Bioch Society Trans*, 2005, 33(5): 1197-1201.
- [23] Gomelsky M, Klug G. BLUF: A novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms [J]. *Trends Bioch Sci*, 2002, 27(10): 497-500.
- [24] Han J Y, In J, 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(11): 36-46.
- [25] Ryder N S. Squalene epoxidase as a target for the antifungal allylamines [J]. *Pest Management Sci*, 1987, 21(4): 281-288.