

• 药材与资源 •

洋常春藤鲨烯合成酶基因 HhSS 的克隆与表达分析

孙化鹏¹, 钟晓红², 乔 飞^{1*}

1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室, 海南 儋州 571737

2. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128

摘要:目的 克隆获得洋常春藤 *Hedera helix* 鲨烯合成酶基因 (HhSS) cDNA 全长序列并进行生物信息学分析及表达分析。方法 根据洋常春藤转录组数据信息设计引物, 通过 RACE 克隆方法获得 HhSS 基因序列; 采用 DNAMAN、PROTPARAM、TMHMM、PSORT、ScanProsite、SOPMA、SWISS-MODEL 等生物信息学工具分析序列信息及编码蛋白的理化特性、结构域等特征; 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术进行 HhSS 基因的检测分析。结果 RACE 克隆获得 HhSS (GenBank 登录号 KX056078) 基因 cDNA 序列全长 1 889 bp, 包含一个从 248~1 477 bp 的完整开放阅读框 (ORF) 以及 247 bp 的 5' 非编码区 (5'UTR) 和 412 bp 的 3'非编码区 (3'UTR)。该基因编码 409 个氨基酸, 相对分子质量为 46 800, 等电点为 5.68。HhSS 蛋白具有植物 SS 蛋白的特征结构域和跨膜区, 与刺五加、人参等同科植物亲缘关系较近。qRT-PCR 结果表明洋常春藤叶片中 HhSS 基因的相对表达量与常春藤皂苷含量存在正相关性。结论 洋常春藤 HhSS 基因的成功克隆及表达分析研究, 为阐明 HhSS 基因在常春藤皂苷生物合成途径中的作用及代谢调控研究提供理论依据和技术基础。

关键词: 洋常春藤; 鲨烯合成酶; RACE 克隆; 实时荧光定量 PCR; 相对表达量**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)09-2127-06**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.023Cloning and expression analysis of squalene synthase gene in *Hedera helix*SUN Hua-peng¹, ZHONG Xiao-hong², QIAO Fei¹

1. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China

2. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: Objective To obtain a full-length cDNA of squalene synthase gene from *Hedera helix* (HhSS) by cloning technique, and to carry out bioinformatics analysis and expression analysis. **Methods** Primers were designed based on *H. helix* transcriptome data, and HhSS was cloned by using RACE technologies. DNAMAN, PROTPARAM, TMHMM, PSORT, ScanProsite, SOPMA, and SWISS-MODEL were used for analysis of sequence and physical and chemical properties and domain of encoded protein. The relative expression of HhSS was detected by qRT-PCR. **Results** The cDNA sequence of HhSS (GenBank accession number: KX056078) was 1 889 bp which obtained by RACE cloning. It contained an ORF from 248 bp to 1 477 bp and a 5'UTR with 247 bp and a 3'UTR with 412 bp. It encoded a 409-amino-acid protein with a molecular weight of 46 800 and an isoelectric point (pI) of 5.68. The HhSS protein had the characteristic domain and transmembrane region of plant SS protein and closer relationship with *Eleutherococcus senticosus*, *Panax ginseng* et al. The qRT-PCR results indicated that it had positive correlation between relative expressing level of HhSS gene and contents of saponins in *H. helix* leaves. **Conclusion** The cloning and expression analysis results of HhSS provide a theoretical and technical basis for elucidating the role of HhSS in saponins biosynthetic pathway and metabolic regulation.

Key words: *Hedera helix* L.; squalene synthase; RACE cloning; qRT-PCR; relative expression

洋常春藤 *Hedera helix* L. 为五加科常春藤属常绿藤本植物, 原产于欧洲, 是《欧洲药典》收录的为数不多的植物药^[1-2]。洋常春藤作为传统的药用植物, 有很高的药用价值, 主要用于咳嗽、哮喘、支

收稿日期: 2017-12-04

基金项目: 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金 (1630032018006); 湖南省教育厅科研项目 (15A089)

作者简介: 孙化鹏, 男, 助理研究员, 研究方向为药用植物资源工程。E-mail: Harper_sun@126.com

*通信作者 乔 飞, 男, 研究员, 研究方向为植物细胞分子生物学。E-mail: qiaofeixn@gmail.com

气管炎等呼吸道系统疾病的治疗^[1-4]。通过其药理活性和临床应用的相关研究表明,其主要活性成分是常春藤皂苷 C、 α -常春藤皂苷等齐墩果烷型三萜皂苷类化合物,且《欧洲药典》的收录标准是春季采收洋常春藤叶片且干燥后常春藤皂苷 C 的含量不低于 3%^[5-6]。

三萜皂苷作为植物中一种重要的次生代谢产物,其生物合成途径主要分为 3 个部分:上游的异戊烯基焦磷酸和二甲基烯丙基焦磷酸的合成途径;中游的三萜碳环系统生物合成途径;下游的三萜碳环上复杂官能团的修饰途径^[7-9]。其生物合成途径中的关键酶基因,如 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶(HMGS)^[10]、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)^[11]、法尼基焦磷酸合成酶(FPS)^[12]、鲨烯合成酶(SS)^[13]、鲨烯环氧酶(SE)^[14]、氧化鲨烯环化酶(OSCs)^[15]等在很多植物中都已成功克隆并进行了深入研究。

SS 的主要功能是催化法尼基二磷酸合成三萜皂苷的重要前体物质鲨烯,是三萜皂苷生物合成途径中的关键酶基因^[16-17]。因洋常春藤中 SS 基因的相关研究未见任何报道,本研究拟以洋常春藤转录组数据为依据,通过快速 cDNA 末端扩增法(RACE)克隆得到洋常春藤 SS 基因的 cDNA 全长序列并进行生物信息学分析。同时,结合洋常春藤中三萜皂苷类化合物代谢累积规律^[18],采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术进行 SS 基因的表达分析研究,为更深入的研究该基因的分子调控机制并阐明其在洋常春藤三萜皂苷类化合物生物合成途径中的重要作用提供理论依据。

1 材料

样品植株为一年生扦插苗,插穗采自湖南省藤本植物资源圃,经湖南农业大学钟晓红教授鉴定为五加科植物洋常春藤 *Hedera helix* L.。实验采集洋常春藤新鲜叶片,洗净、擦干后立即放入液氮冷冻,然后保存于-80℃冰箱中,RNA 提取备用。

2 方法

2.1 RNA 提取与 cDNA 合成

洋常春藤叶片总 RNA 使用 RNAprep Pure Kit(天根)试剂盒提取,提取方法依据说明书进行,并加入 RNase-free DNase I 消化基因组 DNA。通过微量分光光度计(Implen)检测样品总 RNA 浓度和纯度,并通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。RACE 克隆用 cDNA 的合成使用 SMARTer RACE 5'/3'试剂盒(Clontech),根据说明书操作

步骤完成,得到 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready cDNA, -20℃保存备用;qRT-PCR 表达分析用 cDNA 的合成使用 FastQuant RT Kit 试剂盒(天根有限公司)进行,精确吸取 0.1 μg 总 RNA,根据说明书操作步骤反转录合成 cDNA, -20℃保存备用。

2.2 5'RACE 和 3'RACE 的扩增以及 cDNA 全长克隆

根据洋常春藤转录组^[19]测序结果中注释为 SS 基因的 Unigene 序列,应用 Beacon Designer 8.0 分别设计 5'RACE 和 3'RACE 特异性引物 SS-5: 5'-GGCGTGGAGTAGCCTTGACAAACCT-3'和 SS-3: 5'-TGCCTAGTCATTACACAGCTCAGTCC-3',引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。5'RACE 以 5'-RACE-Ready cDNA 为模板,3'RACE 以 3'-RACE-Ready cDNA 为模板,按照 SMARTer RACE 5'/3'试剂盒(Clontech)说明书进行 Touchdown PCR 扩增,扩增程序:94℃变性 30 s, 72℃延伸 3 min,共 5 个循环;94℃变性 30 s, 70℃退火 30 s, 72℃延伸 3 min,共 5 个循环;94℃变性 30 s, 68℃退火 30 s, 72℃延伸 3 min,共 35 个循环;反应完成后 4℃保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,In-Fusion 克隆至 pRACE 载体中,转化至大肠杆菌 DH5 α 并进行蓝白斑筛选。菌落 PCR 验证单克隆,阳性菌落送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

根据 RACE 所得序列设计引物 SS-F: 5'-ATTCTAATACGACTCACTAT-3'和 SS-R: 5'-CTAGGAAGTCTGTCTATG-3',预期扩增获得洋常春藤 SS 基因的 cDNA 序列全长 2 000 bp,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以洋常春藤 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增程序:94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 60℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min;共 35 个循环;72℃延伸 10 min;反应完成后 4℃保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,T-A 克隆至 T 载体(天根有限公司)中,转化至大肠杆菌 DH5 α 并进行蓝白斑筛选。菌落 PCR 验证单克隆,阳性菌落送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.3 基因的生物信息学分析

所测序列通过 DNAMAN 比对拼接,组装得到目的基因的 cDNA 开放阅读框(ORF)全长以及 5'非编码区(5'UTR)和 3'非编码区(3'UTR),并通

过 NCBI 核苷酸数据库 BLAST 比对所得基因的序列信息及同源性; 采用序列处理在线工具包 (SMS) 的序列分析工具 (<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>) 将目的基因的 ORF 序列翻译成氨基酸序列, 并通过 NCBI 蛋白数据库 BLAST 比对所得氨基酸序列信息及同源性; 采用 MEGA 6.0 进行目的基因蛋白的系统进化分析; 通过在线工具 PROTPARAM (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 预测蛋白的基本理化性质; 通过在线工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白序列的跨膜区分析; 通过在线工具 PSORT (<http://www.genscript.com/psort.html>) 进行亚细胞定位分析; 通过在线工具 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) 预测蛋白二级结构; 通过在线工具 ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/>) 进行蛋白功能结构域分析; 通过在线工具 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白的三维结构预测。

2.4 HhSS 基因表达分析

根据前期研究得出的洋常春藤皂苷类化合物在叶片中的代谢累积规律^[18], 选择 2014-12-31、2015-01-31、2015-02-28、2015-03-31、2015-04-30 5 个时间点采集的洋常春藤叶片样品进行 HhSS 基因的表达分析研究, 每个样品设置 3 个生物学重复。以 *F-box* 作为内参基因^[19], 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行相对定量表达分析。

根据 RACE 克隆所得洋常春藤 SS 基因 cDNA 全长序列, 通过 Beacon Designer 8.0 设计 qRT-PCR 引物 RT-F: 5'-TAGAAGCAGTTACCGAGAG-3' 和 RT-R: 5'-CCTAATCCAACAAGTCCAG-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。qRT-PCR 分析通过 Bio-Rad CFX 96 Real-time PCR (Bio-Rad) 系统完成。反应体系终体积为 20 μ L, 详细组成如下: 模板 cDNA 2 μ L; SYBR Green Mix (Bio-Rad) 10 μ L; 上游引物 2.5 μ L (2.5 μ mol/L); 下游引物 2.5 μ L (2.5 μ mol/L; ddH₂O 3 μ L。反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环; 熔解曲线为 65 $^{\circ}$ C 升高到 95 $^{\circ}$ C, 每 5 s 增加 0.5 $^{\circ}$ C。

2.5 HPLC 测定常春藤皂苷含量^[18]

Unitary C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A) -0.2% 磷酸水溶液 (B); 二元高压梯度洗脱: 0~5 min, 10%~13% A; 5~10 min, 13%~20% A; 10~45 min, 20%~50% A; 45~50

min, 50%~60% A; 50~60 min, 60%~100% A; 检测波长 205 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 20 μ L; 柱温 25 $^{\circ}$ C。

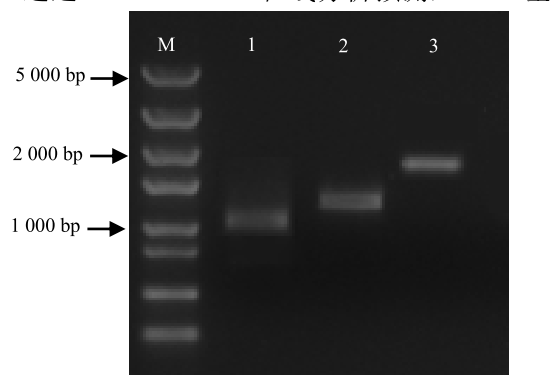
3 结果与分析

3.1 HhSS 基因的克隆

根据洋常春藤转录组数据中注释为 SS 基因的 Unigene 序列设计引物进行 5'RACE 和 3'RACE 扩增, 结果见图 1。通过 5'RACE 扩增得到 1 279 bp 序列, 通过 3'RACE 扩增得到 1 489 bp 序列, 其中包括 28 bp 的 Poly (A) 尾序列。利用 DNAMAN 比对拼接得到一条长 1 889 bp 的基因序列, 通过 NCBI 数据库 BLAST 比对分析, 结果显示该序列与人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. (EU502717.1)、刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms (JN714465.1) 的 SS 基因序列同源性高达 83% 和 84%, 因此可以初步判断该序列为洋常春藤 SS 基因序列, 命名为 HhSS。RACE 克隆得到的 HhSS 基因序列 1 889 bp, 通过在线序列处理工具分析查找, 得到一个从 248~1 477 bp 的 ORF 以及 247 bp 的 5'UTR 和 412 bp 的 3'UTR。cDNA 全长扩增结果见图 1, 结果表明在推断的 2 000 bp 位置可以获得一条清晰的扩增条带, 且该条带测序结果与 RACE 克隆拼接结果一致。将克隆所得 HhSS 基因序列上传 NCBI, 获得登录号为 KX056078。

3.2 HhSS 基因编码蛋白理化性质分析

通过 PROTPARAM 在线分析预测, HhSS 基因



M-Marker 1-5'RACE 扩增片段 2-3'RACE 扩增片段 3-cDNA 全长序列扩增片段

M-Marker 1-amplification of 5'RACE 2-amplification of 3'RACE 3-amplification of cDNA fragment

图 1 洋常春藤 HhSS 基因 5'RACE、3'RACE 和 cDNA 全长序列扩增结果

Fig. 1 Amplification of HhSS 5'RACE, 3'RACE, and cDNA fragment of *H. helix*

的编码蛋白分子式为 $C_{2111}H_{3300}N_{538}O_{607}S_{27}$, 含 409 个氨基酸, 相对分子质量 46 800, 理论等电点 (PI) 为 5.68; 该蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 为 41, 负电残基 (Asp+Glu) 为 51; 该蛋白的不稳定系数为 49.30,

脂肪系数为 99.17, 亲水性平均系数为 0.017。SOPMA 分析结果显示该蛋白二级结构中含有 277 个 α 螺旋 (67.73%), 37 个延伸链 (9.05%), 33 个 β 折叠 (8.07%), 62 个无规卷曲 (15.16%), 二级结构见图 2。

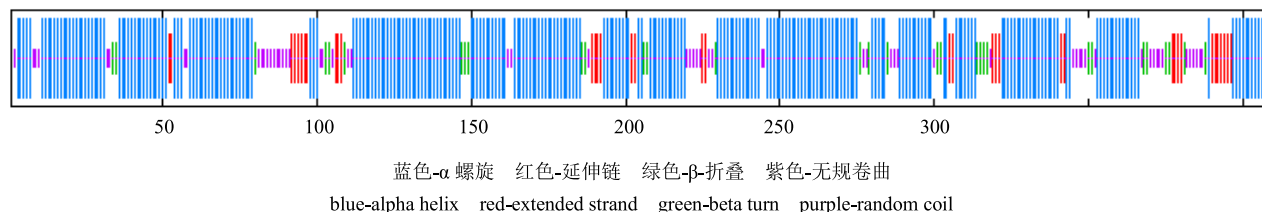


图 2 洋常春藤 HhSS 蛋白二级结构预测

Fig. 2 Secondary structure prediction map of HhSS protein of *H. helix*

3.3 HhSS 基因编码蛋白保守结构域分析

运用 DNAMAN 推导翻译氨基酸序列, HhSS 基因的 ORF 可以编码 409 个氨基酸, 将该氨基酸序列输入 NCBI 蛋白数据库中进行 BLAST 分析, 结果显示与已报道的其他物种 SS 蛋白序列具有较高的同源性, 其中与刺五加 (AEA41712.1)、人参 (ACV88718.1)、三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen (ABA29019.1)、辽东槲木 *Aralia elata* (Miq.) Seem. (ADC32654.1) 等的 SS 氨基酸序列一致性均高达 78%。通过 DNAMAN

进行多序列比对, 结果发现 HhSS 蛋白与其他 SS 蛋白存在明显的保守区域 (图 3), 进一步通过 NCBI 的 conserved domain search 功能分析发现 HhSS 蛋白序列拥有 SS 蛋白的特征区域, 编码的蛋白属于类异戊二烯合成 C1 超级家族, 因此能确定该序列就是洋常春藤 SS 基因编码的蛋白序列。

3.4 HhSS 基因编码蛋白亚细胞定位、跨膜结构和信号肽分析

PSORT 在线分析结果表明 HhSS 蛋白定位于细

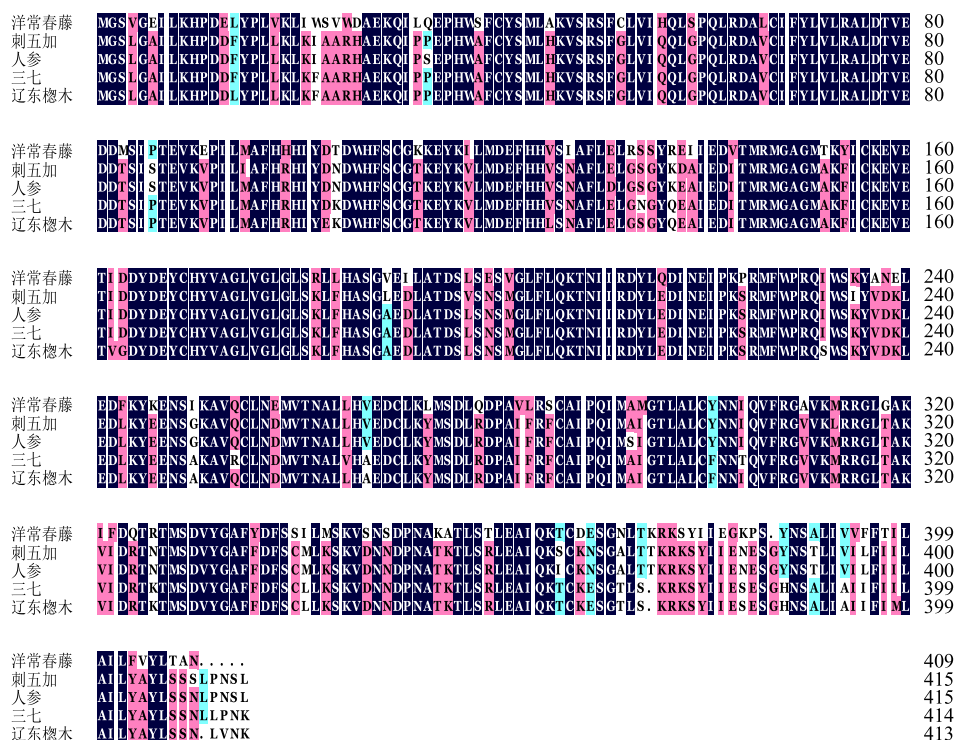


图 3 HhSS 与其他植物 SS 蛋白的多序列比对分析

Fig. 3 Analysis of multiple sequence alignment of HhSS and other plant SS proteins

胞质中。TMHMM 在线分析结果显示该蛋白在氨基酸序列的第 386~408 位有一个跨膜区域。SignalP 4.1 在线预测结果显示该蛋白无信号肽。ScanProsite 数据库分析结果表明该蛋白有 2 个角鲨烯合成酶特征区域, 分别位于该序列的 168~183 和 201~229 位置处, 分别为 YChyVAGLVGlgLsrL 和 VGIfIQkt-NiRDYlqDineipkpRmFwP; SWISS-MODEL 预测得到该蛋白的三维结构模型(图 4), 模型覆盖范围为 32~366, 与其他同源模型的一致性为 44.58%, 模型样本是 3vj8.1.A。

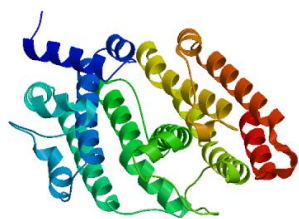


图 4 洋常春藤 HhSS 蛋白三维结构预测
Fig. 4 3D structure prediction map of HhSS protein

3.5 HhSS 基因编码蛋白的系统进化树分析

为分析 HhSS 基因编码蛋白的系统进化关系, 从 NCBI 蛋白数据库中选取其他 14 种植物的 SS 蛋白序列, 通过 MEGA 6.0 采用相邻连接法构建系统进化树, 进行聚类分析。结果如图 5 所示, HhSS 蛋白与同为五加科的植物亲缘关系较近, 而与其他植物品种亲缘关系相对较远。

3.6 HhSS 基因的表达分析

本研究通过设置 2015-01-31 采集的洋常春藤叶片样品中 HhSS 基因的 C_t 值为“1”, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公

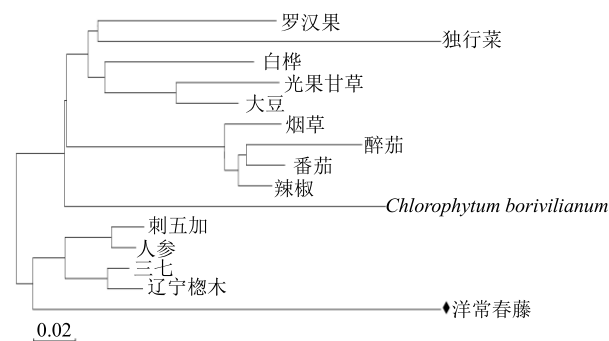


图 5 洋常春藤 HhSS 蛋白与其他 14 个物种 HMGS 蛋白的系统发生进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree based on SS proteins of *H. helix* and other 14 plant species

式计算其他样品中 HhSS 基因的相对表达量, 并通过差异倍数进行分析。结果如图 6 所示, 在 5 个不同采样时间点的洋常春藤叶片样品中, HhSS 基因呈现出的相对表达量变化趋势为由正常水平先下降至最低值后迅速上升至最高值, 然后又迅速下降到正常水平。该结果与常春藤皂苷含量变化趋势一致, 即在常春藤皂苷含量总和最低的 2015-01-31 样品中相对表达量出现最低值, 然后迅速上升, 在常春藤皂苷含量总和最高的 2015-03-31 样品中出现最高值。综合分析, HhSS 基因的相对表达量与叶片中常春藤皂苷含量的代谢累积变化存在着比较明显的相关性。

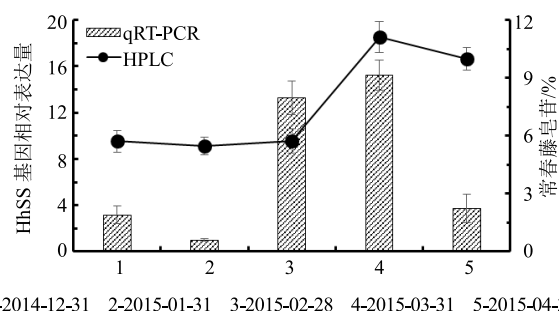


图 6 洋常春藤叶片中 HhSS 基因相对表达量和常春藤皂苷含量
Fig. 6 Analysis of relative expression of HhSS gene and saponins contents in *H. helix* leaves

4 讨论

SS 基因作为三萜皂苷生物合成途径中的关键基因, 现已从人参^[20]、三七^[21]、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.^[22]、绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino^[13]、雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook.^[23]等多种药用植物中成功克隆。而洋常春藤作为欧洲传统的药用植物, Genbank 上却没有其 SS 基因的任何记录。本研究成功克隆了洋常春藤中 SS 基因, 获得了 1 889 bp 的 cDNA 序列, 包括 1 230 bp 的 ORF, 能够编码 409 个氨基酸; 并通过生物信息学分析方法, 全方位分析验证了该基因属于 SS 基因家族, 其编码的氨基酸序列与其他植物的 SS 蛋白具有较高的同源性, 并且包含明显的保守结构域。本研究克隆得到的 HhSS 基因序列为首次从洋常春藤中报道的全长序列, 该基因的成功克隆为深入研究洋常春藤中 SS 基因的基因功能及生物调控机制奠定基础。

药用植物功能基因组学相关研究表明, 次生代谢

产物含量的变化主要受其生物合成途径中关键酶基因表达调控的影响^[24]。SS 基因调控合成的鲨烯是三萜皂苷生物合成的前体化合物,研究表明,SS 基因的表达对三萜皂苷的含量有着直接的影响。孙颖等^[21]通过构建三七中 SS 基因的超表达载体,验证了 SS 基因的过表达能够提高三七皂苷的含量;Seo 等^[25]将人参 PgSS1 基因通过农杆菌介导转入刺五加中,能显著提高转基因植株中 SS 基因的表达活性,同时能将刺五加三萜皂苷的含量提高 2~2.5 倍。常春藤皂苷作为洋常春藤中的主要药用活性成分,本研究结合洋常春藤叶片中常春藤皂苷代谢累积规律,通过 qRT-PCR 法分析比较了不同采样时间 HhSS 基因的相对表达量,结果显示 HhSS 基因的相对表达量与常春藤皂苷含量之间存在明显的正相关性,表明 HhSS 基因在常春藤皂苷类化合物生物合成途径中具有重要的作用,为进一步阐明洋常春藤中常春藤皂苷的生物合成及代谢调控奠定理论基础,同时也为通过基因工程或细胞工程生产常春藤皂苷提供理论依据和技术基础。

参考文献

- [1] Landgrebe H, Matusch R, Marburg F R, *et al.* Effectiveness and use of an old medicinal plant [J]. *Pharm Zeitung*, 1999, 35: 11-15.
- [2] Lutsenko Y, Bylka W, Matlawska I, *et al.* *Hedera helix* as a medicinal plant [J]. *Herba Polon*, 2010, 56(1): 83-96.
- [3] Fazio S, Pouso J, Dolinsky D, *et al.* Tolerance, safety and efficacy of *Hedera helix* extract in inflammatory bronchial diseases under clinical practice conditions: A prospective, open, multicentre postmarketing study in 9657 patients [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(1): 17-24.
- [4] Ute C, Bertram O, Petr A. Acute bronchitis therapy with ivy leaves extracts in a two-arm study. A double-blind, randomised study vs another ivy leaves extract [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(13): 1105-1109.
- [5] Demirci B, Goppel M, Demirci F, *et al.* HPLC profiling and quantification of active principles in leaves of *Hedera helix* L. [J]. *Pharmazie*, 2004, 59(10): 770-774.
- [6] European Pharmacopoeia [S]. 2012.
- [7] 陈大华, 叶和春, 李国凤, 等. 植物类异戊二烯代谢途径的分子生物学研究进展 [J]. *植物学报*, 2000, 42(6): 551-558.
- [8] 陈莉, 吴耀生. 三萜皂苷生物合成途径及相关酶 [J]. *国外医药: 植物药分册*, 2004, 19(4): 156-161.
- [9] 陈颖, 孙海燕, 曹银萍. 三萜皂苷生物合成途径研究进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2012(6): 15-17.
- [10] 姚元枝, 黎晓英, 郭文博, 等. 陆英 HMGS 基因 cDNA 克隆、不同器官中的差异表达及生物信息学分析 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1578-1582.
- [11] 刘雨佳, 张夏楠, 程琪庆, 等. 药用植物萜类生物合成 HMGR 基因研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(19): 3226-3233.
- [12] Kim O, Bang K, Jung S, *et al.* Molecular characterization of ginseng farnesyl diphosphate synthase gene and its up-regulation by methyl jasmonate [J]. *Biol Plantarum*, 2010, 54(1): 47-53.
- [13] 李茹芳, 刘世彪, 赵娜, 等. 绞股蓝鲨烯合成酶基因 *GpSS1* 的克隆、序列与表达分析及 MeJA 对其表达的影响 [J]. *中草药*, 2016, 47(15): 2713-2720.
- [14] 赵灿, 郭丽娜, 彭玉帅, 等. 三七总皂苷生物合成的关键酶及其调控研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(19): 2954-2965.
- [15] 焉雅涛, 王义, 王康宇, 等. 氧化鲨烯环化酶 (OSC) 基因家族研究进展 [J]. *人参研究*, 2015(2): 49-53.
- [16] 张风侠, 梁新华, 王俊. 植物三萜皂苷生物合成及关键酶鲨烯合酶的研究进展 [J]. *农业科学研究*, 2009, 30(3): 64-68.
- [17] 荣齐仙, 刘春生, 黄璐琦, 等. 甘草鲨烯合酶基因及 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(11): 1416-1420.
- [18] 孙化鹏, 阮琴妹, 曹雄军, 等. 洋常春藤皂苷类化合物代谢累积规律研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(16): 2916-2920.
- [19] Sun H P, Li F, Xu Z J, *et al.* *De novo* leaf and root transcriptome analysis to identify putative genes involved in triterpenoid saponins biosynthesis in *Hedera helix* L. [J]. *PLoS One*, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0182243.
- [20] 毛乐心, 赵昶灵, 支伟特, 等. 人参属植物鲨烯合酶编码基因及其氨基酸序列的生物信息学分析 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(31): 220-226.
- [21] 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]. *药学报*, 2013, 48(1): 138-143.
- [22] Rong Q X, Jiang D, Chen Y J, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of squalene synthase 2 (*SQS2*) in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Front Plant Sci*, 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.01274.
- [23] 刘雨佳, 苏平, 王秀娟, 等. 雷公藤鲨烯合酶基因全长 cDNA 克隆及诱导表达分析 [J]. *药学报*, 2016, 51(4): 657-661.
- [24] 王勇波, 刘忠, 赵爱华, 等. 功能基因组学方法在药用植物次生代谢物研究中的应用 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(1): 6-10.
- [25] 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.