

• 药材与资源 •

栽培远志 qRT-PCR 内参基因筛选与 P450s 基因的时空表达分析

李娟¹, 孔冉冉^{2,3}, 梅月菊², 张福生^{2*}, 田洪岭⁴, 秦雪梅², 杜晨晖⁵, 马存根^{5*}

1. 山西药科职业学院药学系, 山西 太原 030031

2. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

3. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

4. 山西省农业科学院经济作物研究所, 山西 汾阳 032200

5. 山西中医药大学, 山西 太原 030024

摘要: 目的 筛选适用于不同生长年限和不同部位的栽培远志实时荧光定量 PCR 分析 (quantitative real time PCR, qRT-PCR) 的稳定内参基因, 为远志体内各个基因表达分析提供合适内参基因。并对 4 个细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450 monooxygenase, P450s) 基因在上述远志样品中的差异表达进行分析, 明确 4 个 P450s 基因在栽培远志中的时空表达分布。方法 通过 qRT-PCR 获取 Tubulin 1、Tubulin 2、Elongation 1、Elongation 2、Actin 1、Actin 2、GAPDH 和 cdc-42 8 个候选内参基因在上述远志样品中的熔解曲线与 C_t 值; 利用软件 geNorm 和 NormFinder 对候选内参基因的表达稳定性进行评价; 通过 qRT-PCR 分析 4 个 P450s 基因 CYP709B2、CYP71AP39、CYP88A85、CYP714E38 在上述远志样品中的相对表达情况。结果 geNorm 分析结果表明, 在远志 (1~3 年生) 根、茎、叶、花中稳定表达的为 Tubulin 2 与 Elongation 1; NormFinder 结果显示, Elongation 1 是最稳定的内参。CYP709B2、CYP71AP39 基因在远志茎、叶 (1~3 年生) 中的 mRNA 表达量最高, 在根与花中的表达量则较少。而 CYP88A85、CYP714E38 基因则在远志根 (1~3 年生) 中的 mRNA 表达水平较高。结论 Elongation 1 适合作为栽培远志体内基因表达分析的内参基因。栽培远志中的 P450s 基因在远志根、茎、叶、花中的表达趋势不一致。

关键词: 远志; 实时荧光定量 PCR; 内参基因; 细胞色素 P450 单加氧酶; 时空表达

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)24-6084-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.024

Reference genes screening and spatio-temporal expression analyses of cytochrome P450 monooxygenase genes in *Polygala tenuifolia* by qRT-PCRLI Juan¹, KONG Ran-ran^{2,3}, MEI Yue-ju², ZHANG Fu-sheng², TIAN Hong-ling⁴, QIN Xue-mei², DU Chen-hui⁵, MA Cun-gen⁵

1. Pharmacy Department, Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030031, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

4. Research Institute of Economics Crop, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Fenyang 032200, China

5. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China

Abstract: Objective To provide a suitable expression analysis of *Polygala tenuifolia* in different growth years and tissues, so as to select the stable internal control genes. The spatial and temporal expression of four cytochrome P450 monooxygenase genes in the above-mentioned samples was analyzed. **Methods** The soluble curve and C_t value of eight candidate internal reference genes including Tubulin 1, Tubulin 2, Elongation 1, Elongation 2, Actin 1, Actin 2 and cdc-42 in different growth years (1—3 years old)

收稿日期: 2019-06-05

基金项目: 山西省重点研究开发计划 (201603D3111003); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JIN-34); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室项目 (201605D111004); 山西省科技创新重点团队 (201605D131045-18); 山西省中药现代化振东专项-远志品种选育及配套适应性高产栽培技术研究 (2016ZD0106)

作者简介: 李娟 (1979—), 硕士, 讲师, 从事药物分析研究。Tel: (0351)7820630 E-mail: 32568766@qq.com

***通信作者** 张福生, 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中草药资源评价及次生代谢产物研究。Tel: (0351)7019178 E-mail: ample1007@sxu.edu.cn
马存根, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为神经免疫学研究。Tel: (0351)3179809 E-mail: macungen2001@163.com

and tissues (root, stem, leaf, and flower) of *P. tenuifolia* were obtained by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The expression stability of candidate reference genes was assessed by geNorm and NormFinder. Then, the qRT-PCR technique was also used to identify the temporal and spatial expression of four P450 genes including CYP709B2, CYP71AP39, CYP88A85 and CYP714E38 in *P. tenuifolia*. **Results** The geNorm results showed that the stable internal reference genes expressed in *P. tenuifolia* were Tubulin 2 and Elongation 1. The NormFinder results showed that the most stable and suitable internal reference gene for expression analysis was Elongation 1. The mRNA expression levels of CYP709B2 and CYP71AP39 genes in stems and leaves (1—3 years old) were higher than that in roots and flowers. The CYP88A85 and CYP714E38 genes had got a higher mRNA expression level in roots (1—3 years old). **Conclusion** Elongation 1 is suitable as an ideal internal control gene for qRT-PCR analysis of *P. tenuifolia*. The expression trend of P450s in roots, stems, leaves and flowers of cultivated *P. tenuifolia* is inconsistent.

Key words: *Polygala tenuifolia* Willd.; qRT-PCR; reference gene; cytochrome P450 monooxygenase; spatio-temporal expression

实时荧光定量 PCR 分析 (qRT-PCR) 技术具有定量准确、重复性好、灵敏度高特点, 已在基因表达分析方面得到广泛应用, 但 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法需要对照基因的标准化和校正, 但目前基因表达标准化的可靠程度仍存在很多争议, 尤其是内参基因的选择。内参基因的表达量越稳定, 越能更好地检测目的基因的特异性表达水平^[1-4]。因此, 筛选和评估内参基因表达的稳定性, 是提高 qRT-PCR 实验准确性的重要保证。

药用活性成分是中药的物质基础, 齐墩果烷型三萜皂苷因拥有良好的生物活性正受到广泛的关注。远志皂苷, 属齐墩果烷型的五环三萜类化合物。有研究发现, 远志皂苷通过胆碱能效应^[5]、抗神经细胞凋亡及抗氧化活性^[6]、抗 A β 神经毒性^[7]、改善海马区齿状回的长时效增强效应^[8]、阻遏炎症信号通路并减轻脾切除术术后认知障碍^[9]等机制, 发挥抗痴呆、改善记忆障碍及脑保护等作用^[10]。植物三萜的生物合成历经前体供应、骨架合成、萜类合成 3 个阶段, 起源于异戊二烯 (C5), 形成共同的底物 2,3-环氧角鲨烯 (C30), 经由氧化角鲨烯环化酶催化, 环化成不同的三萜骨架 (C30)^[11]。在三萜骨架糖基化之前, 细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450 monooxygenases, P450s) 会先行对该骨架进行许多结构修饰^[12]。P450s 是远志皂苷生物合成的关键酶, 因此, 本研究对远志 P450s 基因进行了时空表达分析。

本实验对远志不同生长年限 (1、2、3 年生) 与组织 (根、茎、叶、花) qRT-PCR 的内参基因进行筛选, 并对远志中的 4 条具有 CDS (coding sequence) 全长的 P450s 基因 (CYP714E38、CYP88A85、CYP71AP39、CYP709B2) 在上述远志样品中的差异表达水平进行分析, 为今后远志中

P450s 的基因克隆及功能验证奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

所用远志样品 (1~3 年生, 根、茎、叶、花) 于 2017 年 7 月采集于山西省新绛县阳王镇北池村。以铝箔纸包裹新鲜样品, 液氮速冻后转于 -80°C 保存。样品经山西大学中医药现代研究中心张福生副教授鉴定为远志 *Polygala tenuifolia* Willd.。

1.2 试剂与仪器

RNAiso Plus、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 、DNA Marker (DL 2000)、PrimeScrip RT Master Mix、SYBR Premix Ex TaqTMII, TaKaRa 公司; 2 $\times$ Easy Taq PCR SuperMix, TransGen 公司; MOPS, BIO BASIC INC 公司; 琼脂糖, 西班牙 Biowest 公司; DEPC, Solabio 公司; 硼酸 (分析纯)、NaOH (分析纯), 北京化工有限公司。qRT-PCR 仪, Heal Force 公司; 稳压稳流电泳仪, DYY-6B 型, 北京市六一公司; 凝胶成像仪, SynGene Ltd. Cambridge 公司; NanoDrop 2000, NanoDrop 公司。

2 方法

2.1 远志总 RNA 的提取、检验与 cDNA 合成

采用 RNAiso Plus 试剂盒, 分别提取远志不同生长年限/组织的总 RNA。分别取 4 μL 总 RNA, 加入 2 μL 体积的 RNA 加样缓冲液, 65°C 加热 10 min, 骤冷, 以消除 RNA 的二级结构, 琼脂糖凝胶点样, 并用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测总 RNA 的浓度, 计算 A_{230}/A_{280} 、 A_{260}/A_{280} 参数 (表 1)。

采用 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H) 进行反转录。首先在 Microtube 管中配制以下混合液 (6 μL): 总 RNA、Oligo (dT) 12-18 primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、灭菌水 (RNase free dH_2O)。70 $^{\circ}\text{C}$

表 1 远志不同生长年限/组织的总 RNA 质量检测

Table 1 Total RNA quality of *P. tenuifolia* in different growth years/tissues

样品	A_{230}/A_{280}	A_{260}/A_{280}	质量浓度/(ng·μL ⁻¹)
1 年生 根	1.98	2.27	898.6
茎	2.00	2.12	758.7
叶	1.89	2.04	683.6
花	1.99	2.19	450.7
2 年生 根	2.02	2.16	868.5
茎	2.11	2.18	539.6
叶	1.97	2.15	448.9
花	2.09	2.09	392.9
3 年生 根	2.03	2.12	769.4
茎	1.99	2.14	672.3
叶	1.98	2.12	873.9
花	2.04	2.06	764.3

保温 10 min 后, 迅速在冰上急冷 2 min 以上, 离心数秒, 使变性溶液聚集在 Microtube 底部, 然后在上述 Microtube 中配制以下反转录反应液 (0.45 μL): 5×M-MLV Buffer 2 μL, dNTP Mixture 0.5 μL, RNase Inhibitor (40 U/μL) 0.25 μL, RTase M-MLV (RNase H-) (200 U/μL) 0.8 μL, RNase free dH₂O 0.45 μL。42 °C 保温 1 h, 70 °C 保温 15 min 后冰上冷却, 得到 cDNA 溶液。

2.2 引物的设计与合成

基于课题组前期的远志二代转录组测序结果^[13-14]以及 Genbank 数据库中远志 P450s 的基因信息, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计远志的内参基因和 P450s 基因的引物 (表 2), 引物合成由金斯瑞公司完成。

2.3 SYBR qRT-PCR 分析

采用 qRT-PCR 仪, 通过熔解曲线对所设计引物进行了特异性分析。将反转录得到的 cDNA 稀释 10 倍, 以稀释的反转录 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qRT-PCR 实验, 反应试剂盒选用 Takara 公司 SYBR Premix ex TaqTMII 型试剂盒, 反应体系 (20 μL): SYBR Premix ex TaqTMII (2×) 10 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.8 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.8 μL, cDNA 模板 2 μL, ddH₂O 6.4 μL。PCR 扩增程序: 95 °C、60 s; 变性 95 °C、15 s, 退火 60 °C、15 s, 延伸 72 °C、45 s, 40 个循环。

2.4 数据处理

GeNorm 软件是 Vandesompele 等于 2002 年编写的一个程序, 用于选择 qRT-PCR 的参考基因并确定内源性基因的最优数量。可以选择 2 个或 2 个以上的内参基因, geNorm 程序通过计算每个内部参考基因稳定性的平均稳定表达值 (M) 来筛选稳定的内部参考基因。M 值越小, 参考基因越稳定。

NormFinder 则被用于筛查参考基因的稳定性, 根据稳定值的大小选择最合适的参考基因。同时使用 V_n/V_{n+1} 的值来确定实验所需的最适的内参基因数目, 判断标准为当 $V_n/V_{n+1} < 0.15$ 时, 最适内参基因数目是 n 个; 当 $V_n/V_{n+1} > 0.15$ 时, 最适内参基因数目是 $n+1$ 个^[15]。

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析各基因的相对表达量; 再采用 geNorm 软件对基因的表达稳定性进行分析, 并用 NormFinder 软件选出最稳定的基因, 通过二者的结合最终确定最适内参基因。分析 4 个 P450s 基因在远志不同生长年限、不同部位中的差异表达数据, 根据标准曲线获得 qRT-PCR 的 C_t 值, 转化为相对定量数据, 用 GraphPad Prism 5.0 绘制柱状图并进行分析。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 的质量检验

NanoDrop 的核酸定量检测总 RNA 结果 (表 1) 显示, A_{260}/A_{280} 约为 2.0, 表明所提取的总 RNA 质量较高, 可用于后续 P450s 基因的差异表达分析研究。

3.2 内参基因的引物特异性验证

通过课题组前期远志转录组数据分析^[13-14], 分别设计出 8 个候选内参基因、4 个 P450s 基因的引物, 引物序列和 PCR 扩增条带大小, 见表 2。CYP709B2、CYP71AP39、CYP88A85 和 CYP714E38 在 1 年生远志根、茎、叶、花中的 PCR 产物, 见图 1。图 1 中 1、5、14、15 的条带较弱, 提示相应基因在该部位的表达量较低, 与 qRT-PCR 的结果一致。引物的熔解曲线见图 2。图 2 中各基因引物的熔接曲线只有 1 个主峰, 无其余杂峰, 表示无引物二聚体与非特异性条带产生。以上结果表明, 本实验所设计引物的特异性良好, 均得到了特异性扩增, 能用于后续的 qRT-PCR 分析。

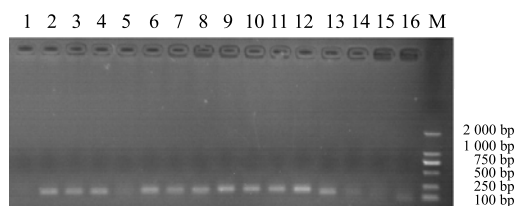
3.3 候选内参基因的表达分析

3.3.1 geNorm 软件分析 本实验选取了 8 个常用内参基因作为候选内参基因, 包括 Tubulin 1、Tubulin 2、

表 2 远志候选内参基因/P450s 基因的引物及 PCR 产物片段

Table 2 Primers and PCR product fragments of candidate reference genes/P450s genes in *P. tenuifolia*

基因名称	注释/Genbank/转录组测序编号	引物序列 (5'→3')	$T_m/^\circ\text{C}$	片段/bp
TUB 1	Tubulin 1	正向: GAGGAAGTTGGAGCCGAAGG 反向: GTGCCAGGAGCAACGACAAG	85.5	169
TUB 2	Tubulin 2	正向: TCATTTGTCTGCTGTGCTGCTA 反向: ACGTATTGAGGCTCCGTTTGTTAA	82.0	176
ELO 1	Elongation 1	正向: TCGTAATGCTGGGTGGGG 反向: CAGCAGGAAACATCAACCGA	85.2	112
ELO 2	Elongation 2	正向: CTCTAAAGGGGTATCTATGCCGTGT 反向: CCTTTGCTTGGACCACTGCTA	84.1	123
ACT1	Actin 1	正向: CCACCCGAAAACCAGACCA 反向: ACAATCCATCACGGCGTAGAA	85.9	183
ACT2	Actin 2	正向: AAATCTGAAAGCGAGCAAAGC 反向: ACCCAGCAAGCGACCAAG	85.2	129
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	正向: ACAGCAACGTGCTTCTCACC 反向: CCCTTCATCACCACCGACTA	83.7	128
cdc-42	cell division control protein	正向: CTGCTGGACAGGAAGATTACG 反向: CTCGGACATTCTCGAATGAAG	85.0	115
CYP71AP39	KY385 296.1	正向: GCATCCACCAGTTCCAGTTTT 反向: TTCCCAAGTTTCAGAATCCCT	82.8	133
CYP709B2-like	c92439 g2 il	正向: TGGCAGCAACCAAGAGT 反向: CTGTGCTTCACCCAGTCCA	84.1	162
CYP714E38	KY385 301.1	正向: GTGGGCTTACCAGAGGAAAATG 反向: CCCCACCCCTTTTGTTTTATC	82.6	139
CYP88A85	KY385 299.1	正向: ACGCTGTCAATCTTGGGTTC 反向: TTTCTCGTCCTCGGTGTC	86.7	176



1~4-CYP709B2 在 1 年生远志根、茎、叶、花中的 PCR 产物 5~8-CYP71AP39 在 1 年生远志根、茎、叶、花中的 PCR 产物 9~12-CYP88A85 在 1 年生远志根、茎、叶、花中的 PCR 产物 13~16-CYP714E38 在 1 年生远志根、茎、叶、花中的 PCR 产物 M-Marker

1—4-CYP709B2 in roots, stems, leaves, and flowers of 1-year-old *P. tenuifolia* 5—8-CYP71AP39 in roots, stems, leaves, and flowers of 1-year-old *P. tenuifolia* 9—12-CYP88A85 in roots, stems, leaves, and flowers of 1-year-old *P. tenuifolia* 13—16-CYP714E38 in roots, stems, leaves, and flowers of 1-year-old *P. tenuifolia* M-Marker

图 1 4 个 P450s 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of four P450s genes

Elongation 1、Elongation 2、Actin 1、Actin 2、GAPDH、cdc-42 以进一步减少内参基因筛选过程中人为造成的误差。

如图 3-A 所示, 8 个内参基因的表达 C_t 值在 22~30。在图 3-B 中, Tubulin 2 和 Elongaion 1 的

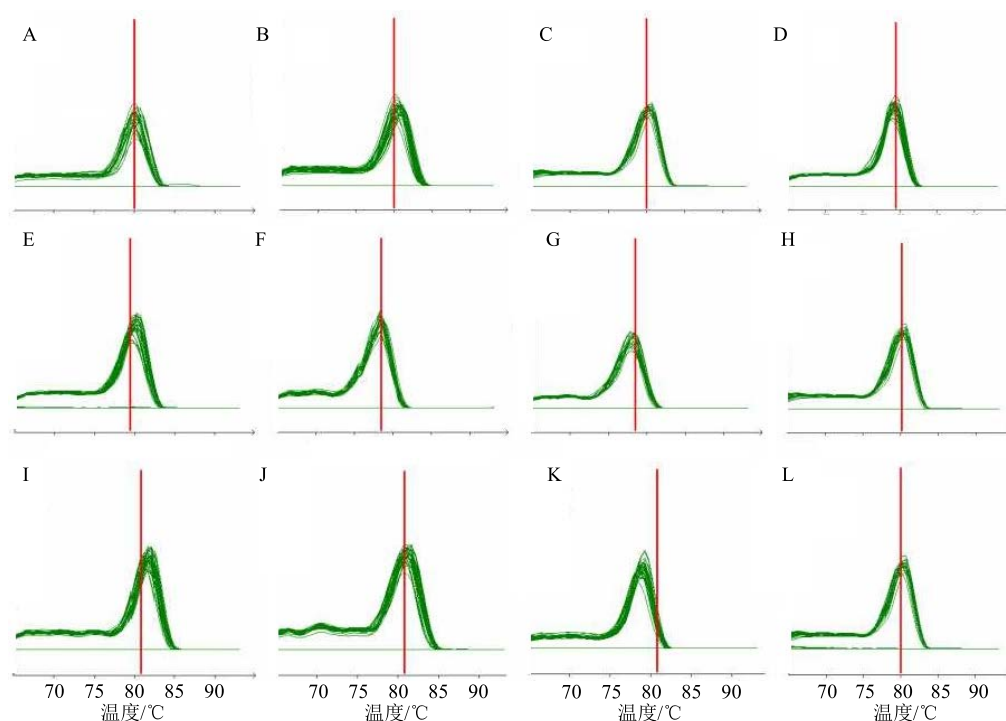
M 值最小 (<0.3), 而 cdc-42 的 M 值最大 (>1)。按 M 值大小顺序排列, 依次为 cdc-42>Actin 1>Actin 2>GAPDH>Tubulin 1>Elongation 2>Tubulin 2 和 Elongaion 1, 并由此确定 Tubulin 2、Elongaion 1 是最稳定的 2 个内参。

3.3.2 NormFinder 软件分析 在图 3-C 中, 由于本实验中 $V2/V3=0.134<0.15$, 故该实验条件下的最适内参基因数目是 2 个, 即 Tubulin 2 和 Elongation 1 是最稳定的 2 个内参。从表 3 中可知, Tubulin 1、Tubulin 2、Actin 1、Actin 2、Elongation 1、Elongation 2、GAPDH、cdc-42 的稳定表达值分别为 0.349、0.179、0.832、0.743、0.099、0.381、0.472、0.990。根据本软件给出的最终结果, Elongation 1 是最稳定的内参。

综合二者分析, 最终选用 ELO 1 进行后续 P450 基因表达分析。

3.4 远志不同生长年限/组织中 P450s 基因的差异表达分析

CYP709B2 在远志 1、2、3 年生的茎、叶 mRNA 表达量最高, 在根系和花中表达量较少。CYP71AP39 的 mRNA 表达水平与 CYP709B2 基因相似。CYP88A85



A-Tubulin 1 B-Tubulin 2 C-Elongation 1 D-Elongation 2 E-Actin 1 F-Actin 2 G-cdc-42 H-CYP902B2-like I-CYP71A39 J-CYP88A85 K-CYP714E38 L-GAPDH

图 2 候选内参基因与 P450s 基因的引物熔解曲线

Fig. 2 Primer melting curve of candidate reference genes and P450 genes

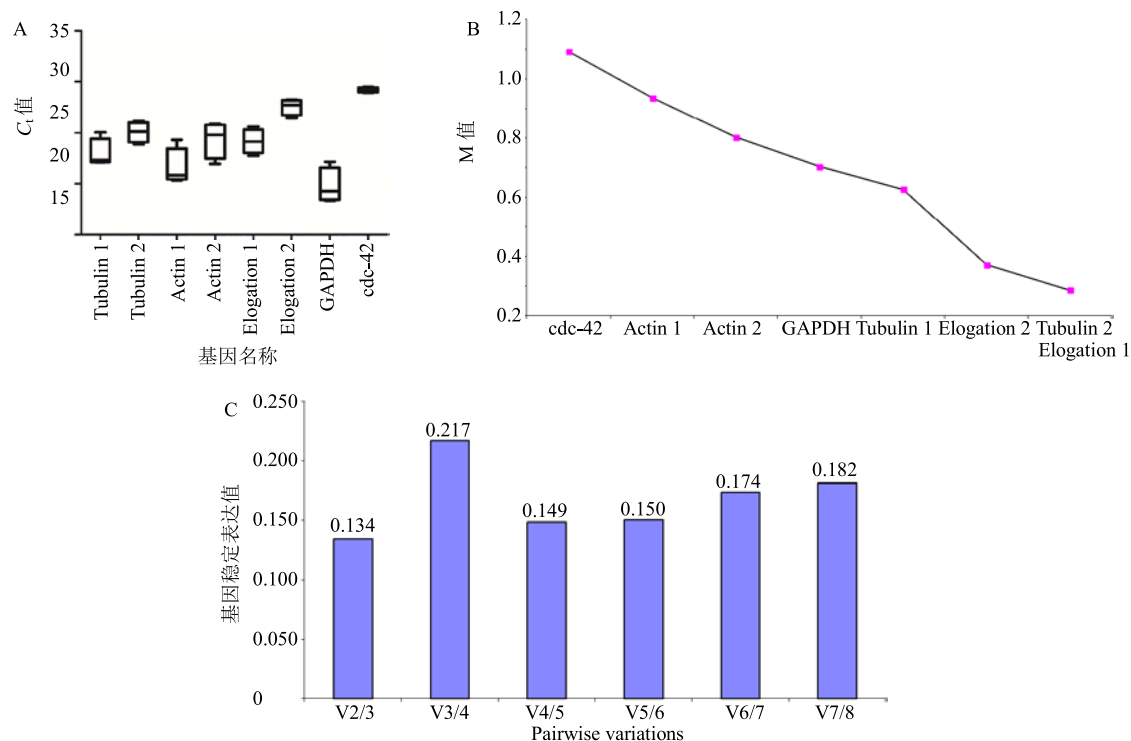


图 3 候选内参基因在远志 (1~3 年生) 根、茎、叶、花中的表达水平 (A)、geNorm 软件计算所得平均稳定表达值 (B) 和 NormFinder 软件计算所得基因稳定表达值 (C)

Fig. 3 Expression levels of candidate reference genes in roots, stems, leaves, and flowers of *P. tenuifolia* (1—3 years old) (A), mean stability values calculated by geNorm software (B) and calculated by NormFinder software (C)

表 3 NormFinder 软件分析候选内参基因的稳定性表达值
Table 3 Stability values of candidate reference genes analyzed by NormFinder software

基因名称	稳定表达值
Tubulin 1	0.349
Tubulin 2	0.179
Actin 1	0.832
Actin 2	0.743
Elongation1	0.099
Elongation2	0.381
GAPDH	0.472
cdc-42	0.990

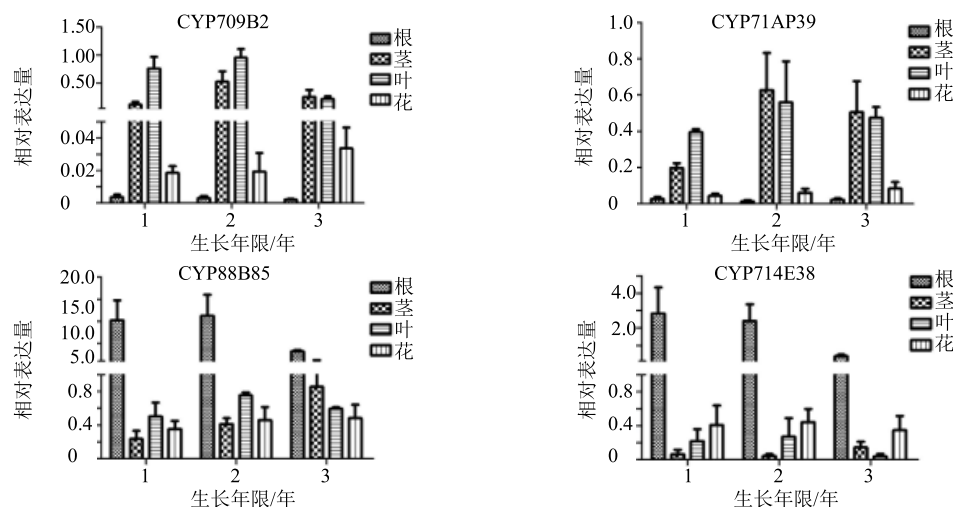


图 4 远志不同生长年限/组织中 P450s 基因的时空表达分析

Fig. 4 Spatial and temporal expression analysis of P450 genes in different growth years/tissues of *P. tenuifolia*

qRT-PCR 技术能检测低丰度的 mRNA，且具有灵敏度高、重复的动态定量范围、特异性强和高通量等优点，使之成为进行植物基因表达和转录分析最常用的技术手段之一^[17]。qRT-PCR 其分析的结果则与内参基因的选择密切相关，不恰当的内参基因将使分析结果产生偏差，甚至得出错误的结论^[18-20]。因此，需要选择合适的内参基因进行校正和标准化，从而减小样本之间的差异^[21-22]。

本实验筛选了远志不同生长年限（1~3 年）/组织（根、茎、叶、花）qRT-PCR 的内参基因，并对 P450s 基因在上述样品中的 mRNA 表达分布情况进行了分析，实验结果与 2017 年高立志小组在三七中所发现的结果^[22]相似，提示 P450s 除了部分在远志根中表达/合成外，还应有少量先在茎、叶、花中表达与合成，之后才转运并储存于根部。该结果可为后续与远志皂苷生物合成相关 P450s 的基因克隆与功能验证提供依据。

在 1、2、3 年生的根的 mRNA 表达水平较高，3 年生的根、茎、叶、花 mRNA 表达整体高于 1、2 年生的根、茎、叶、花，CYP714E38 在 1、2、3 年生的根的 mRNA 表达水平较高（图 4）。

4 讨论

生命活动中的各个进程总伴随着不同基因的选择性开启与关闭，在某特定的发育阶段，细胞中大概只有 15% 的基因表达；这种在不同组织/器官中或者个体在不同阶段中，按照特定空间/时间，进行基因有序表达的方式称为基因的差别表达^[16]。

P450s 的催化作用对三萜的结构多样性与功能性至关重要。迄今为止，在 70 个不同种属植物中，共发现了 271 个参与三萜生物合成的酶^[23]，包括分属于 37 个不同种属植物的 87 个已知功能的 P450s^[23-24]。CYP88A85 与 CYP88D6，CYP709B2-like、CYP714E38 分别与 CYP72A63，CYP71AP39 与 CYP93E1、CYP93E9 等，在氨基酸序列组成上有较大的相似性。把上述 P450s 输入到 TriForC Database（publicly available pathway database of known and novel high-value triterpenes，<http://bioinformatics.psb.ugent.be/triforc/#/home>）^[23]，查询上述 P450s 与三萜的生物合成是否有关。查询结果显示，CYP88D6（Genbank: AB433179）具有 oleanane C-11-oxidase 功能，可分别催化 β -amyrin，30-hydroxy- β -amyrin，11 α -hydroxy- β -amyrin，进而生成 11-oxo- β -amyrin，30-hydroxy-11-oxo- β -amyrin，11 α -hydroxy- β -amyrin，11 α ,30-dihydroxy- β -amyrin。

因此, 本实验预测 CYP88A85 可能也具有 oleanane C-11-oxidase 类似功能。

CYP72A63 (Genbank: AB558146) 具有 β -amyrin C30-oxidase 功能, 可分别催化 β -amyrin、30-hydroxy- β -amyrin, 进而生成 30-hydroxy- β -amyrin、11-deoxoglycyrrhetic acid。因此, 本实验预测 CYP709B2-like、CYP714E38 可能也具有 oleanane 24-oxidase 类似功能。另外, CYP93E1 (Genbank: AF135485) 具有 oleanane 24-oxidase 功能, 可分别催化 β -amyrin、24-hydroxy- β -amyrin、sophoradiol, 进而生成 24-hydroxy- β -amyrin、soyasapogenol B、24-carboxy- β -amyrin。因此, 本实验预测 CYP71AP39 可能也具有 oleanane 24-oxidase 类似功能。当然, 上述预测功能还有待进一步验证。

随着新 P450s 陆续被发现, 本研究对于不同种属植物中的三萜类物质, 尤其是齐墩果烷型三萜的生物合成途径有了更深入的认识。同时, 也应意识到这些已知功能的 P450s 不仅可作为开展三萜类物质合成生物研究的理想工具, 也可作为完成新 P450s 功能鉴定的潜在基因资源。

参考文献

- [1] 袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择 [J]. 植物学报, 2012, 47(4): 427-436.
- [2] 胡瑞波, 范成明, 傅永福. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(6): 30-36.
- [3] 张艳君, 朱志峰, 陆融, 等. 基因表达转录分析中内参基因的选择 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(5): 546-550.
- [4] 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用 [J]. 植物生理学报, 2014, 50(8): 1119-1125.
- [5] 陈庆林, 陈勤, 金蓓蓓. 远志皂苷对 AD 小鼠学习记忆能力及中枢胆碱能系统标志酶活性的影响 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(3): 33-36.
- [6] Chen Y J, Huang X B, Li Z X, *et al.* Tenuigenin protects cultured hippocampal neurons against methylglyoxal-induced neurotoxicity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 645: 1-8.
- [7] Li X, Cui J, Yu Y, *et al.* Traditional Chinese nootropic medicine *Radix Polygalae* and its active constituent onjisaponin B reduce β -amyloid production and improve cognitive impairments [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151147.
- [8] Sun F, Sun J D, Han N, *et al.* *Polygala* saponin F induces long-term potentiation in adult rat hippocampus via NMDA receptor activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33: 431-437.
- [9] Yu L Y, Sun L, Chen S L. Protective effect of senegenin on splenectomy-induced postoperative cognitive dysfunction in elderly rats [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7: 821-826.
- [10] 莫微, 林志宏. 中药远志改善记忆障碍研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(4): 1913-1916.
- [11] 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.
- [12] Buchanan B, Gruissem W, Jones R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* [M]. Beijing: Science Press, 2000.
- [13] 李晓伟. 基于高通量转录组测序与植物代谢组学技术研究远志皂苷生物合成途径 [D]. 太原: 山西大学, 2014.
- [14] 许晓双. 远志皂苷生物合成中 CYP450s、UGTs 的筛选及远志对 hDDC 酶抑制作用初探 [D]. 太原: 山西大学, 2016.
- [15] 吴建阳, 何冰, 杜玉洁, 等. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法 [J]. 现代农业科技, 2017(5): 278-281.
- [16] Ono K, Hirohata M, Yamada M. Alpha-synuclein assembly as a therapeutic target of Parkinson's disease and related disorders [J]. *Curr Pharm Design*, 2008, 14(30): 3247-3266.
- [17] Taylor S, Wakem M, Dijkman G, *et al.* Nguyen M (2010) A practical approach to qRT-PCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines [J]. *Methods*, 2010, 50(4): S1-S5.
- [18] Albershardt T C, Iritani B M, Ruddell A. Evaluation of reference genes for quantitative PCR analysis of mouse lymphocytes [J]. *J Immunol Methods*, 2012, 384(1/2): 196-199.
- [19] Luo H, Luo K, Luo L, *et al.* Evaluation of candidate reference genes for gene expression studies in *Cymbidium kanran* [J]. *Sci Horticult*, 2014, 167(3): 43-48.
- [20] Mohelnikova duchonova B, Oliverius M, Honsova E, *et al.* Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma [J]. *Dis Mark*, 2012, 32(3): 203-210.
- [21] 李龙云, 于雯雯, 翟红红, 等. 棉花纤维发育相关基因表达谱的比较分析 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(8): 488-496.
- [22] 李建平, 何轩, 姜蓉, 等. 人参多糖对 K562 细胞基因表达谱的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 940-943.
- [23] Miettinen K, Sabrina Iñigo, Kreft L, *et al.* The TriForC database: A comprehensive up-to-date resource of plant triterpene biosynthesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 46: 586-594.
- [24] Ghosh S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1886-1892.