

• 药材与资源 •

竹节参鲨烯环氧酶基因的克隆及生物信息学分析

李鹏飞^{1,2}, 黄朝康^{1,2}, 杨小林^{1,2,4}, 牛腾飞^{1,2,4}, 陈军峰^{1,2,4}, 赵淑娟^{1,2,3,4}, 王峥涛^{1,2,3,4}, 王如锋^{1,2,3,4*}

1. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203

2. 上海中医药大学 中药新资源与品质评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201203

3. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203

4. 上海中医药大学 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203

摘要: 目的 克隆竹节参 *Panax japonicus* 鲨烯环氧酶基因 (squalene epoxidase, *PjSE*) 的全长 cDNA 序列, 进行生物信息学分析和原核表达。方法 设计特异性引物, 从竹节参中克隆得到 *PjSE* 序列; 以 *PjSE* 基因序列作为输入数据, 利用多序列同源比对等生物信息学分析工具进行序列分析; 构建重组原核表达载体 pCold-*PjSE*, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行蛋白诱导表达; 采用实时荧光定量 PCR 技术分析该基因在竹节参不同组织中的相对表达量。结果 *PjSE* 基因开放阅读框长度为 1884 bp, 编码 627 个氨基酸, *PjSE* 蛋白相对分子质量为 68 639.49, 初步预测其具有跨膜结构域, 可能定位在叶绿体上; 聚丙烯凝胶电泳结果显示诱导表达蛋白的相对分子质量大小与预期结果一致; 该基因在竹节参叶中表达量最高, 须根次之, 根中表达量最低。结论 *PjSE* 基因的克隆、生信分析及原核表达研究, 不仅有助于丰富竹节参中该类功能蛋白的种类和数量, 完善竹节参皂苷类成分的生物合成途径, 也为后期开展竹节参皂苷的异源合成提供了可供选择的关键基因元件。

关键词: 竹节参; 鲨烯环氧酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 原核表达

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)06-1917-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.024

Cloning and bioinformatics analysis of *PjSE* from *Panax japonicus*LI Peng-fei^{1,2}, HUANG Chao-kang^{1,2}, YANG Xiao-lin^{1,2,4}, Niu Teng-fei^{1,2,4}, CHEN Jun-feng^{1,2,4}, ZHAO Shu-juan^{1,2,3,4}, WANG Zheng-tao^{1,2,3,4}, WANG Ru-feng^{1,2,3,4}

1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. The NATCM Key Laboratory for New Resources & Quality Evaluation of Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Shanghai R&D Center for Standardization of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201203, China

4. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA sequence (squalene epoxidase, *PjSE*) of Zhujiashen (*Panax japonicus*), and perform bioinformatics analysis and prokaryotic expression. **Methods** Specific primers were designed to clone the cDNA sequence of *PjSE* from *P. japonicus*. Using the *PjSE* gene sequence as input data, sequence analysis was performed using bioinformatics analysis tools such as multiple sequence homology alignment. The prokaryotic expression vector of pCold-*PjSE* was constructed and transformed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells to express recombinant protein. The relative expression of *PjSE* in different tissues of *P. japonicus* were further determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** The open reading frame of *PjSE* was 1884 bp, encoding 627 amino acids. The relative molecular mass of *PjSE* was 68639.49. *PjSE* was predicted to have a transmembrane domain that was most likely to be located in chloroplast. SDS-PAGE showed the relative molecular mass of induced expression protein was consistent with expected protein size. Furthermore, the expression level of *PjSE* was completely

收稿日期: 2022-08-09

基金项目: 上海市自然科学基金项目 (20ZR1458200); 上海市“科技创新行动计划”启明星项目 (20QA1408800); 上海中医药大学预算内项目 (2020LK015)

作者简介: 李鹏飞, 硕士研究生, 主要从事天然产物生物合成与转化研究。Tel: 18817338926 E-mail: 13984532089@163.com

*通信作者: 王如锋, 副研究员, 主要从事中药资源与生物技术研究。Tel: (021)51322495 E-mail: wrffrw0801@163.com

different in various parts of *P. japonicus*. The associated results were as follows: the highest in leaves, the second in fibrous root, and the lowest in root. **Conclusion** The cloning, bioinformatics analysis and prokaryotic expression of *PjSE* will be helpful to enrich the variety and quantity of related functional proteins from *P. japonicus*, supplement to the biosynthetic pathways of chikusetsusaponins, and provide useful functional gene modules for heterologous biosynthesis in the future.

Key words: *Panax japonicus* C. A. Mey.; squalene epoxidase; gene cloning; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

竹节参是五加科植物 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥根茎^[1], 药用记载最早出现于清代《本草纲目拾遗》^[2]。竹节参具有滋补强壮、散瘀止痛、止血祛痰等传统功效, 被土家族和苗族等少数民族聚集区美誉为“草药之王”, 常用作人参和三七的替代品^[3]。竹节参与同科植物人参、西洋参、三七相似, 三萜皂苷类成分(以下统称为“人参皂苷”)是其主要的药效成分。研究表明, 人参皂苷具有显著的抗炎、抗肥胖、抗衰老、免疫调节和降血糖等药理作用^[4], 已广泛应用于临床研究与药物开发。

随着近年来对三七、人参、西洋参、竹节参等药用植物三萜代谢途径探究的不断深入^[5-6], 已基本阐明三萜皂苷的生物合成途径。三萜皂苷元母核是由法尼基焦磷酸(farnesyl-pyrophosphate, FPP)在鲨烯合成酶(squalene synthase, SQS)和鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)的逐步催化下环合而成^[7]。鲨烯环氧酶是三萜皂苷生物合成途径中的限速酶之一。大量研究表明, SE 的催化活性和表达量与药用植物三萜类活性成分的产量直接相关^[8]。近年来已经从人参、西洋参、三七等药用植物中成功克隆得到多条 SE 基因, 并开展了较为深入的研究^[9], 但有关竹节参 SE 的研究报道尚少。

本研究利用分子克隆技术获得了竹节参鲨烯环氧酶候选基因(squalene epoxidase, *PjSE*), 对其序列进行了生物信息学分析, 构建了重组原核表达载体并在大肠杆菌中实现了异源表达, 同时考察了 *PjSE* 在不同组织中的相对表达量。该研究为后续开展以三萜皂苷类活性成分为导向的竹节参药用植物生源合成途径解析、分子调控及异源合成奠定了相关基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

新鲜竹节参样品采自湖北恩施(30°02'45"N, 109°50'13"E), 经上海中医药大学王峥涛教授鉴定为五加科植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey.。标本保存于上海中医药大学中药新资源与品质评价国家中医药管理局重点实验室。

1.2 试剂

Takara Prime Script™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Ex Taq DNA Polymerase、Prime STAR Max DNA Polymerase、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司, 限制性核酸内切酶购于赛默飞世尔科技公司, 凝胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司, PCR 产物纯化试剂盒购于上海捷瑞生物工程有限公司, 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取约 50 mg 竹节参根, 在液氮中将其研磨粉碎, 转移至 1.5 mL 离心管中, 利用 RNA 提取试剂盒提取竹节参根总 RNA, 用超微量紫外分光光度计检测其浓度。利用反转录试剂盒将所提取的竹节参总 RNA 反转录成 cDNA, 测定浓度, -80 °C 冻存备用。

2.2 *PjSE* 基因克隆及重组质粒构建

根据实验室前期获得的 *PjSE* 基因序列, 选择 *Bam*HI 和 *Sal*I 作酶切位点, 设计基因特异性引物(上游引物: *PjSE*-F: 5'-CGCGGATCCATGTTG-TTGGGCTTGGGCGTAAGAT-3'; 下游引物: *PjSE*-R: 5'-CCGCTCGAGTCAGAAATTTGATGTC-ATCTGCAGGA-3')。以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增体系为: ddH₂O 8.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL (工作浓度 10 μmol/L), cDNA 模板 0.5 μL, PrimeSTAR Max DNA Polymerase 10 μL; 扩增程序为: 98 °C 预变性 3 min; 再进行 32 个循环: 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1.5 min; 最后 72 °C 延伸 10 min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳初步判断目的基因条带, 利用 PCR 产物纯化试剂盒回收目的片段, 经超微量紫外分光光度计检测其浓度和 A₂₆₀/A₂₈₀ 值后, 利用限制性核酸内切酶 *Bam*HI 和 *Sal*I 将目的片段连接至 pCold 表达载体, 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单克隆进行 PCR 验证和双酶切鉴定, 重组质粒送基因公司测序。

2.3 *PjSE* 基因的生物信息学分析

以 *PjSE* 基因核酸序列作为输入数据, 利用开放

阅读框 (open reading frame, ORF) Finder 查找 ORF; 利用 ExPASy、NPS、PDBsum、Swiss-Model、TMHMM 等在线工具预测基因编码蛋白的相对分子质量、氨基酸序列、等电点、不稳定系数、卷曲螺旋等理化性质, 并对蛋白质二级、三级结构、磷酸化和 *N*-糖基化位点以及跨膜结构域等性质进行预测分析; 同时运用 ClustalW 软件结合 ESPript 3.x 在线网站将氨基酸序列与已鉴定功能的 SE 氨基酸序列进行比对, 利用 MEGA7.0 软件构建分子进化树。

2.4 *PjSE* 基因的原核表达

挑选测序结果正确的菌株, 转接至 LB 液体培养基 (含终质量浓度 50 mg/mL 氨苄霉素) 中, 在 37 °C, 220 r/min 条件下培养至 A_{600} 0.6~0.8; 加入终浓度为 0.25 mmol/L 的 IPTG, 在 16 °C, 180 r/min 条件下培养 20 h, 诱导产生 *PjSE* 重组蛋白。8000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 将菌体悬浮于缓冲液 (Tris-HCl, pH 7.4) 中, 采用超高压连续流细胞破碎仪破碎。细胞破碎液于 4 °C、13 000 r/min 离心 30 min, 含有可溶性蛋白的上清液转移至洁净离心管中; 取一定量缓冲液重悬沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min 后, 去除上清液, 再次加入一定量缓冲液重悬沉淀。分别取 10 μ L 上清液和沉淀重悬液装于 PCR 小管中, 各加入 2 μ L SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 煮沸 3 min, 制得蛋白电泳样品。采用 SDS-PAGE 方法检测蛋白表达情况。

2.5 *PjSE* 基因的组织特异性表达水平分析

利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *PjSE* 基因在竹节参根、叶、须根中的相对表达量。选用竹节参 β -actin 基因作为内参基因, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (*PjSE* 基因上游引物: 5'-CTCTTTCCATCCACCTTTCT-3'; 下游引物: 5'-ATCTTGCTGTTGCTGCCTTTT-3', β -actin 基因实时荧光定量 PCR 上游引物: 5'-GGCATCAC-ACTTTCTACAACG-3'; 下游引物: 5'-GGCAGG-AACATTAAAGGTTTC-3')。提取竹节参根、叶、须根中的总 RNA, 反转录合成 cDNA, 备用, 应用实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。反应体系 (10 μ L): TB Green Premix Ex Taq II (2 $\times$) 5 μ L、ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.2 μ L、*PjSE* 基因上游引物 0.2 μ L、*PjSE* 基因下游引物 0.2 μ L、cDNA 1 μ L、ddH₂O 3.4 μ L。PCR 程序: 95 °C、30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 次循环, 设置 3 个重复组别, 绘制标准曲线来确定反应性能, 运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来分析

PjSE 基因在不同组织中的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 *PjSE* 基因克隆与核苷酸序列分析

以反转录得到的竹节参 cDNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增得到目的片段, 电泳条带约为 1 884 bp, 与目的基因长度相符 (图 1)。利用 ORF Finder 对 *PjSE* 基因 cDNA 序列进行分析, *PjSE* 基因开放阅读框为 1 884 bp, 编码 627 个氨基酸。对 *PjSE* 蛋白序列在 NCBI 上进行序列比对, 结果显示 *PjSE* 基因与东方苔草 *Trema orientale* 同源相似性为 79.92%, 与猕猴桃 *Actinidia rufa* 同源相似性为 79.8%, 与河岸葡萄 *Vitis riparia* 同源相似性为 75.61%。比对结果表明所得基因属于 SE 家族。

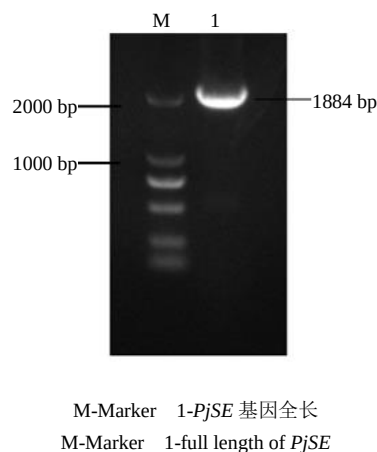


图 1 竹节参 *PjSE* 基因克隆

Fig. 1 Cloning of *PjSE* of *P. japonicus*

3.2 *PjSE* 基因编码蛋白理化性质分析

利用在线软件 ExPASy 对 *PjSE* 基因进行理化性质分析, 结果显示 *PjSE* 相对分子质量为 68 639.49, 理论等电点为 9.20, 氨基酸残基中带负电荷的残基总数 (Asp+Glu) 为 52, 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys) 为 68。蛋白不稳定指数为 41.85, 可初步判定为不稳定蛋白; 脂肪指数为 92.57, 亲水性总平均值为 -0.068, 疏水氨基酸的数量多于亲水氨基酸的数量, 可初步推断其为疏水蛋白 (图 2)。

3.3 *PjSE* 蛋白结构功能域和跨膜结构域预测

Conserved domains 在线工具分析表明, *PjSE* 在保守区含有 1 个 PLN02985 超家族保守结构域, 属于 SE 超家族, 推测具有催化鲨烯形成 2,3-氧化鲨烯的功能 (图 3-A)。HMMHMM 在线工具预测蛋白跨膜结构结果显示, *PjSE* 含有显著的跨膜螺旋区, 属于跨膜蛋白 (图 3-B)。

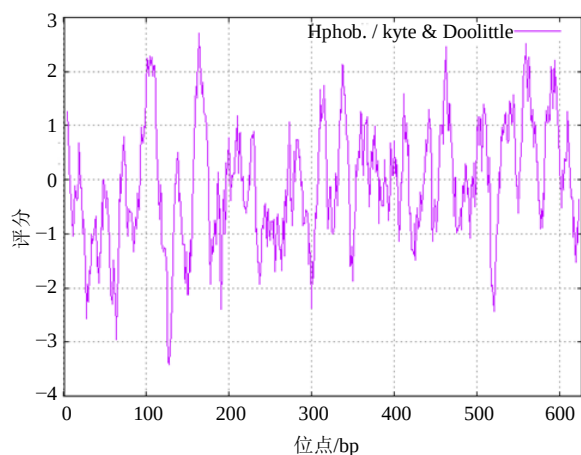


图2 PjSE 氨基酸序列的亲水/疏水性

Fig. 2 Hydrophilic/hydrophobic properties of PjSE amino acid sequence

3.4 PjSE 蛋白信号肽分析及亚细胞定位预测

SinalP5.0 预测分析 PjSE 信号肽结果显示, 预测存在信号肽的概率仅为 0.07%, PjSE 不存在信号肽, 属于非分泌蛋白, 推测该蛋白合成后不发生转运 (图 3-C)。Plant-mPLoc 亚细胞定位预测结果表明, 该蛋白可能定位于叶绿体上。

3.5 氨基酸翻译后磷酸化和糖基化修饰

利用在线工具 NetPhos 3.1 预测竹节参 PjSE 基因编码蛋白中 3 类氨基酸 (Ser、Thr、Tyr) 磷酸化位点, 结果显示 PjSE 蛋白中存在 62 个潜在的氨基酸磷酸化位点 (4 个酪氨酸磷酸化位点, 32 个可能的丝氨酸磷酸化位点, 26 个可能的苏氨酸磷酸化位点), 潜在的磷酸化位点在酶发挥功能过程中或可起到重要作用。通过 NetNGlyc-1.0 预测, 处于 47、55、118 和 289 位的天冬氨酸可能需要进行 N-糖基化修饰。

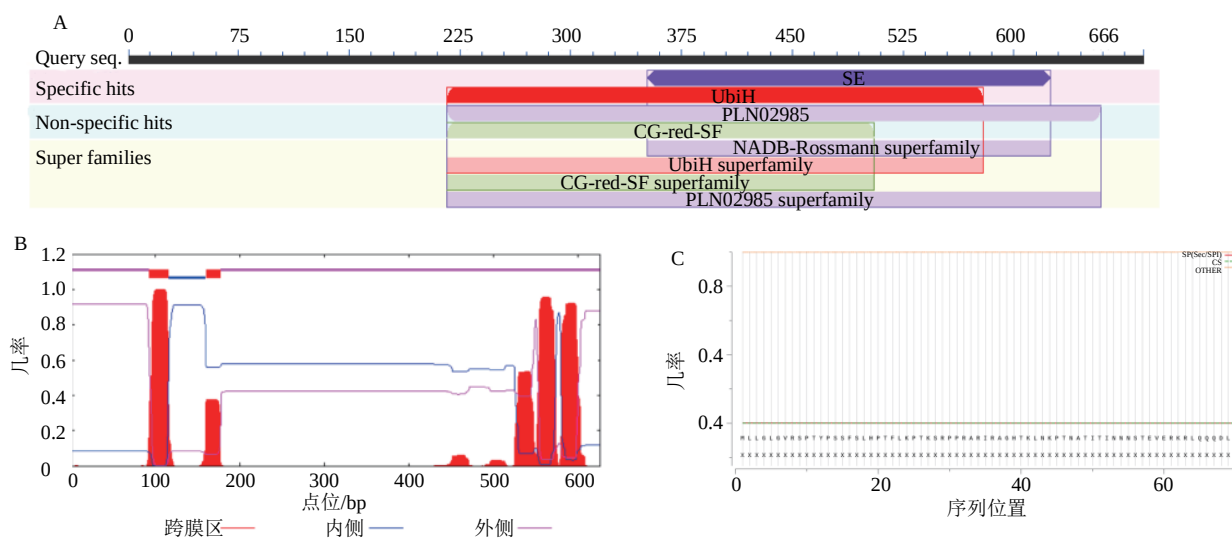


图3 PjSE 的结构功能域 (A) 与跨膜结构域 (B) 以及信号肽预测 (C)

Fig. 3 Structural functional domains (A) and transmembrane domains (B) of PjSE and signal peptide prediction (C)

3.6 PjSE 蛋白二级和三级结构分析

如图 4 所示, PjSE 蛋白的二级结构元件中无规则卷曲所占的比例最高, 有 254 个氨基酸, 占 40.51%; α -螺旋包含 218 个氨基酸, 占 34.77%; 延伸链占据 114 个氨基酸, 为 18.18%; β 折叠所占比例最低, 为 6.54%, 包含 41 个氨基酸 (图 4-A)。

利用 SWISS-MODEL 在线工具结合 PyMOL 软件预测得到 PjSE 蛋白的三维空间模型及活性中心 (红色球形结构示意图酶的活性中心氨基酸), 以人的 SE (Human squalene epoxidase, PDB: 6c6n.1.A) 作为同源模板, 氨基酸相似性为 47.77%, 全球性模

型质量评分为 0.6 (图 4-B、4-C)。

利用 autodock 4.2.6 对 PjSE 与其主要底物角鲨烯进行分子对接模拟实验。如图 4-D 和图 4-E 显示, 鲨烯与 PjSE 中的 Asp216、Glu220 残基通过氢键连接, 且氢键键程均在 0.22 nm 以内, 推测这 2 个氨基酸可能为 PjSE 蛋白识别底物小分子并结合的关键氨基酸残基。

3.7 PjSE 的氨基酸序列同源比对和系统进化树构建

EScript 3.0 在线工具序列同源比对显示, PjSE 氨基酸序列与来源于五加科植物的人参 SE

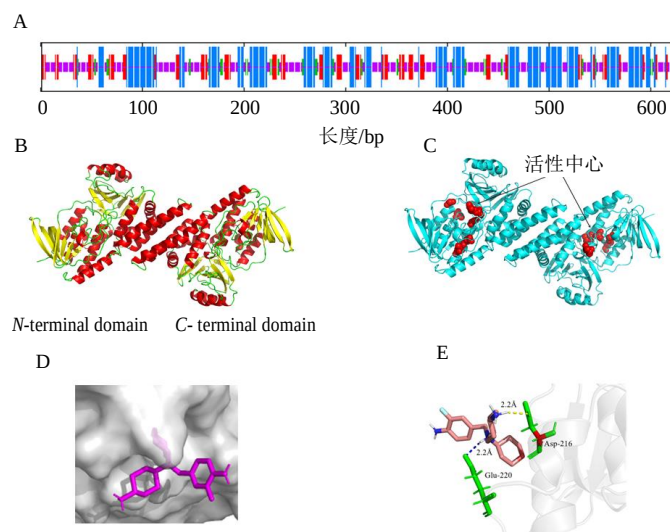


图 4 PjSE 的二级结构 (A)、三级结构 (B, C) 和角鲨烯与 PjSE 分子对接结果 (D, E)

Fig. 4 Secondary (A), tertiary structure of PjSE (B, C) and molecular docking result with squalene (D, E)

(BAD15330.1)、三七 SE (ABE73759.1)、西洋参 SE (AGK62448.1) 的同源性分别为 57.04%、56.23%、56.32%；与黄芪 SE (AKO83630.1) 的同源性为 58.76%。图 5 所示，与其他植物中的 SE 一样，PjSE 也具有保守的 NAD(P) 结合结构域和底物结合结构域。为预测竹节参 SE

蛋白的进化关系，在 NCBI 数据库中选择了来源于不同植物的 SE 的序列，利用 MEGA 7.0 软件在 bootstrap 重复次数为 1000 次的参数下构建 Neighbor-joining 系统进化树，结果表明竹节参 PjSE 和烟草 SE 蛋白序列关系更为亲近 (图 6)。

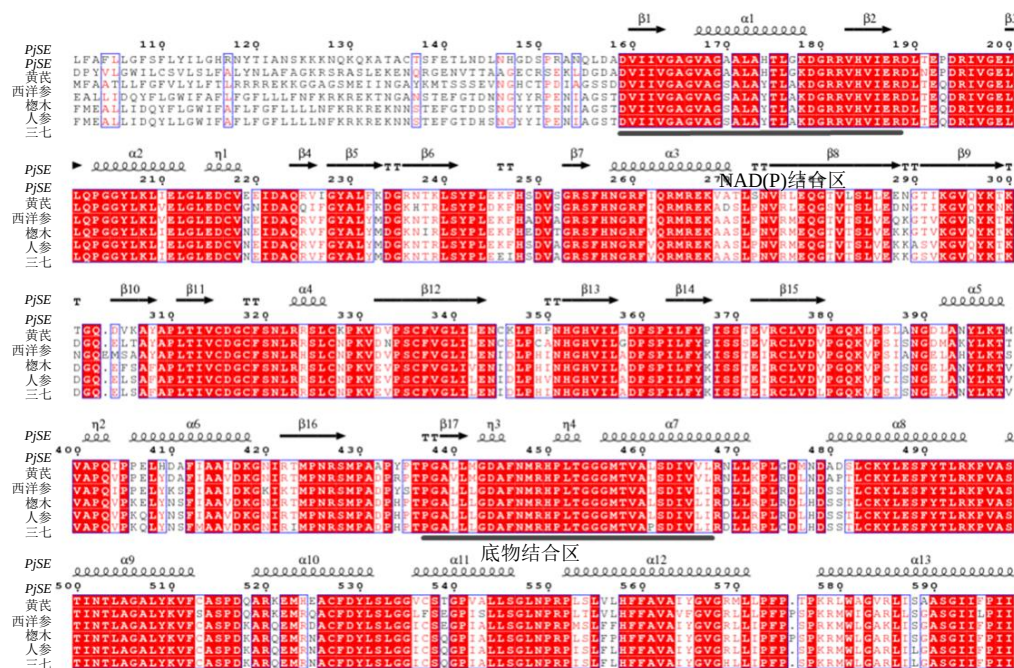
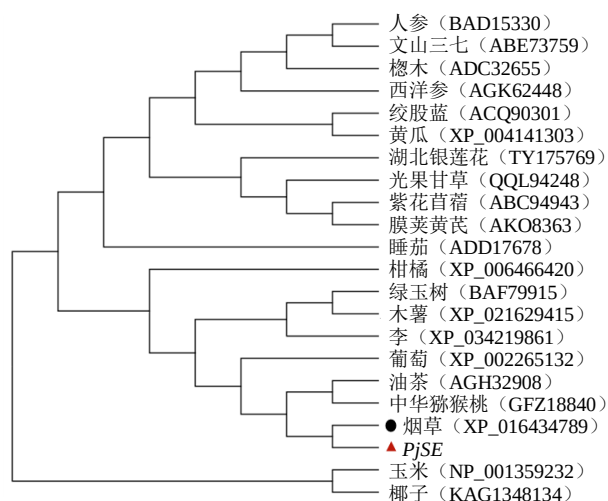


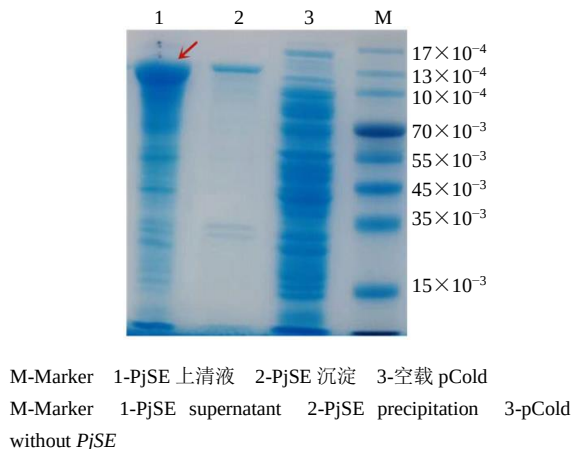
图 5 竹节参、黄芪、西洋参、槲木、人参与三七 SEs 氨基酸序列同源性比对

Fig. 5 Amino acid sequence homology alignment of squalene epoxidase from *P. japonicus*, *Astragalus membranaceus*, *P. quinquefolium*, *Aralia chinensis*, *P. ginseng*, and *P. notoginseng*

图 6 *PjSE* 的系统进化树Fig. 6 Phylogenetic tree of *PjSE*

3.8 *PjSE* 基因的异源表达

重组菌株表达后收集菌体并进行破碎裂解, 取上清液和沉淀重悬液进行 SDS-PAGE 电泳, 结果(图 7)显示, 经 IPTG 诱导后的重组表达菌株上清液中出现明显的目的蛋白条带, 表明蛋白原核表达成功, 且为可溶性蛋白。

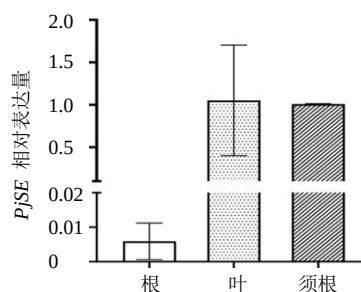
图 7 *PjSE* 蛋白表达分析Fig. 7 Prokaryotic expression of *PjSE*

3.9 竹节参不同部位的 *PjSE* 基因表达差异分析

运用 qRT-PCR 检测竹节参根、叶、须根的 *PjSE* 基因表达差异。结果显示, *PjSE* 基因在竹节参各个组织中均有表达, *PjSE* 基因在叶中表达量最高, 须根中其次, 在根中的表达量最低(图 8)。

4 讨论

竹节参中主要药效成分为人参皂苷类成分, 该成分主要是通过相关酶对前体物质 2,3-氧化鲨

图 8 *PjSE* 在竹节参不同组织中的相对表达水平Fig. 8 Relative expression level of *PjSE* in different tissues of *P. japonicus*

烯进行环化、羟基化和糖基化等催化反应而最终合成^[11-12]。SE 处于人参皂苷生物合成途径的关键节点, SE 催化生成的 2,3-环氧鲨烯是合成人参皂苷的重要底物, 因此在人参皂苷合成途径中发挥重要作用。目前已经从人参、三七等多种药用植物中成功克隆出 SE 基因的 cDNA 序列, 并对其调控机制做了大量研究^[13]。SE 的表达和皂苷含量直接相关, Choi 等^[14]在对人参基因组的研究中揭示了鲨烯环氧酶基因的表达式与皂苷产量直接相关; Xu 等^[15]和 Han 等^[16]分别利用化学分离和 RNA 干扰技术抑制了 SE 的转录、表达后, 证实 SE 基因在一定程度上调控了人参皂苷的生物合成。上述研究证实鲨烯环氧酶在皂苷生物合成途径中占据十分重要的地位。

目前, 有关竹节参中 SE 基因报道甚少, 仍有待进一步拓展挖掘。本研究通过对竹节参 SE 基因的克隆及生物信息学分析, 挖掘得到一个未经报道的 *PjSE* 基因, *PjSE* 蛋白具有 SE 所特有的保守结构域结合位点, 可与多种酶结合反应, 证实 *PjSE* 属于 SEs 家族^[17-18]。序列分析发现 *PjSE* 与其他物种的 SE 基因具有较高的相似性, 相似度均在 50% 以上, 其中与烟草的亲缘关系最高。本研究进一步丰富了药用植物竹节参的基因库, 也为竹节参中人参皂苷类成分的生物合成途径解析提供了一定参考。同时本研究还探讨了该基因的原核异源表达体系, 构建了重组质粒 pCold-*PjSE*, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中存在可溶性蛋白表达, 这为进一步研究 *PjSE* 基因的分子机制和蛋白功能验证奠定基础。此外, 在拟南芥等多种植物中 SE 的功能研究均采用了酵母系统^[19], 后续亦可尝试在酵母或植物体内验证 *PjSE* 的功能。

近年来,研究人员已经从三七、滇重楼、远志、雷公藤等药用植物中利用 qRT-PCR 技术证实了 SE 基因在不同器官中具有不同表达模式^[20]。基于以上研究,本实验选取竹节参根、叶和须根 3 个不同组织作为研究对象,探究了 *PjSE* 基因的组织特异性表达情况,实验发现 *PjSE* 基因在叶中表达量最高,不同组织中表达量存在较明显的差异,这为后续考察基因空间表达情况与对应次生代谢产物含量之间的相关关系研究奠定了一定基础,为深入揭示竹节参药用植物中 SE 在三萜皂苷生物合成途径中的时空分布规律与关键作用机制提供有利线索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 126.
- [2] 清·赵学敏. 本草纲目拾遗: 十卷 [M]. 影印本. 北京: 人民卫生出版社, 1957: 7475.
- [3] 马玲, 谭德福. 竹节参的研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(12): 1306-1307.
- [4] 向婷婷, 张长城, 刘朝奇, 等. 竹节参总皂苷干预自然衰老大鼠肝脏炎症的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(6): 848-853.
- [5] 罗祖良, 张凯伦, 马小军, 等. 三萜皂苷的合成生物学研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1806-1814.
- [6] 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, 31(6): 15-17.
- [7] Devarenne T P, Ghosh A, Chappell J. Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(3): 1095-1106.
- [8] 吴君贤, 徐睿, 尹旻臻, 等. 山楂果实转录组分析及三萜合成关键酶基因 *SQE* 的克隆与生信分析 [J]. 药学报, 2021, 56(12): 3313-3324.
- [9] He F, Zhu Y, He M, *et al.* Molecular cloning and characterization of the gene encoding squalene epoxidase in *Panax notoginseng* [J]. *DNA Seq*, 2008, 19(3): 270-273.
- [10] Paek K Y, Chakrabarty D, Hahn E J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2005, 81(3): 287-300.
- [11] Yao L, Lu J, Wang J, *et al.* Advances in biosynthesis of triterpenoid saponins in medicinal plants [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(6): 417-424.
- [12] Yan X, Fan Y, Wei W, *et al.* Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast [J]. *Cell Res*, 2014, 24(6): 770-773.
- [13] 明乾良, 韩婷, 黄芳, 等. 人参皂苷生物合成途径及其相关酶的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1913-1917.
- [14] Choi D W, Jung J, Ha Y I, *et al.* Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 557-566.
- [15] Xu X J, Hu X Y, Neill S J, *et al.* Fungal elicitor induces singlet oxygen generation, ethylene release and saponin synthesis in cultured cells of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(6): 947-954.
- [16] Han J Y, In J G, 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(1):36-46.
- [17] 陈观水, 林思妮, 柯兰兰, 等. 太子参鲨烯环氧化酶基因的克隆及其表达分析 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2733-2739.
- [18] Gomelsky M, Klug G. BLUF: A novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms [J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(10): 497-500.
- [19] Rasbery J M, Shan H, LeClair R J, *et al.* *Arabidopsis thaliana* squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(23): 17002-17013.
- [20] 梁娥. 竹节参内生细菌多样性与鲨烯环氧化酶基因 (SE) 克隆及生物信息学分析 [D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2020.

[责任编辑 时圣明]