

## 药用植物甾体皂苷生物合成途径研究进展

张雪, 王希付, 赵荣华, 俞捷, 顾雯, 付兴情, 曹冠华\*, 贺森\*  
(云南中医药大学 中药学院, 昆明 650500)

**[摘要]** 甾体皂苷是药用植物中普遍存在的一类功效物质,由糖基和甾体皂苷元缩合而成,甾体皂苷的生物合成途径主要包括细胞质甲羟戊酸(MVA)途径和质体2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(MEP)两条途径,并以MVA途径为主。在生物合成途径中涉及一系列关键酶,包括3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR),1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合酶(DXS),1-脱氧-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR),法尼基焦磷酸合酶(FPS),鲨烯合酶(SS),鲨烯环氧酶(SE),环阿屯醇合酶(CAS),细胞色素P450酶(CYP450),糖基转移酶(SGTase)等。在综合前人研究的基础上,该文对甾体皂苷生物合成途径路线图进行了补充和细化,而对近5年来有关药用植物甾体皂苷生物合成关键酶(基因)生物学信息研究报道整理发现,药用植物中HMGR,SS,CYP450,UGT基因研究相对较多,而对FPS,SE,CAS的报道则较少。整体来看,目前对甾体皂苷生物合成途径研究尚处于初级阶段,对于关键酶功能研究缺乏强有力的直接证据。可为甾体皂苷的后续研究提供参考和理论支撑。

**[关键词]** 药用植物; 甾体皂苷; 生物合成; 关键酶; 关键基因; 细胞质甲羟戊酸(MVA)途径

**[中图分类号]** R22;R289;R2-031;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)14-0225-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200812

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200102.1628.007.html>

**[网络出版日期]** 2020-1-3 10:17

### Biosynthesis of Steroidal Saponins in Herbs

ZHANG Xue, WANG Xi-fu, ZHAO Rong-hua, YU Jie, GU Wen, FU Xing-qing,  
CAO Guan-hua\*, HE Sen\*

(School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**[Abstract]** Steroidal saponins are efficacious substances widely existed in the herbs, and consist of glycosyl and steroid sapogenin. The biosynthesis pathways of steroidal saponins mainly include the cytosolic mevalonate (MVA) pathway and the plastidial methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway, with the MVA pathway as the main pathway. The key enzymes are involved in the biosynthetic pathway, including 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase (HMGR), 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatereductoisomerase (DXR), farnesyl pyrophosphate synthase (FPS), squalene synthase (SS), squalene epoxidase (SE), cycloartenol synthase (CAS), cytochrome P450 (CYP450), and steroidalglycosyltransferase (SGTase). In the paper, the biosynthesis roadmap of steroidal saponins was optimized based on previous studies. According to a comprehensive analysis on studies of key enzymes for the past five years, genes, like HMGR, SS, CYP450 and UGT, were studied more, while other genes, like FPS, SE,

**[收稿日期]** 20191101 (fj20191101005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81560612);国家重点研发计划项目(2017YFC1700704);南药协同创新研究中心项目(30270100500);中央本级重大增减支项目(2060302);云南省科学技术厅-云南中医学院应用基础研究联合专项[2017FF116(-019),2017FF117(-014)];省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题项目(2017KF006);云南省应用基础研究计划面上项目(2019FB122)

**[第一作者]** 张雪,在读硕士,从事中药资源的研究,Tel:0871-65918127,E-mail:zhangxue618107@163.com

**[通信作者]** \*曹冠华,博士,高级实验师,硕士生导师,从事中药资源与菌根微生物的研究,Tel:0871-65918127,E-mail:cgh20031695@163.com;\*贺森,博士,副教授,硕士生导师,从事中药资源与分子生物学的研究,Tel:0871-65918127,E-mail:sunbelt123@163.com

CAS, were known less. In conclusion, current studies still focus on the primary stage, but lack direct evidence for the roles of key enzymes. This paper would provide a reference and theoretical support for subsequent studies.

**[Key words]** herbs; steroidal saponins; biosynthesis; key enzymes; key gene; cytosolic mevalonate (MVA) pathway

甾体皂苷(steroidal saponins)在植物中分布广泛,主要存在于百合科、石蒜科、薯蓣科、菝葜科、玄参科、龙舌兰科、葱科、天门冬科等植物中,且在十字花科、豆科、茄科中也有发现<sup>[1]</sup>。甾体皂苷主要来自植物的地下部分,包括根及根茎,而叶、茎、果实、种子中甾体皂苷则相对较少,目前已经从近200种植物中发现甾体皂苷<sup>[2]</sup>。甾体皂苷是由糖基和甾体皂苷元缩合而成的糖基皂苷。甾体皂苷的糖基种类众多,主要有葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、木糖、呋糖和阿拉伯糖等,糖链通常连接在螺甾烷型皂苷的C-3位,呋甾烷型皂苷的C-3和C-6位,亦有连接在甾体皂苷的C-1, C-6, C-12和C-24等位置<sup>[3]</sup>。甾体皂苷元的骨架由27个碳原子构成,母核为环戊烷多氢菲。根据螺甾烷结构中C-25位的构型和环的环合状态,可将其分为螺甾烷醇类(spirostanols),异螺甾烷醇类(isospirostanols),变形螺甾烷醇类(pseudospirostanols)和呋甾烷醇类(furostanols)皂苷<sup>[4]</sup>,其中以螺甾烷型的皂苷最为常见,其结构的多样性也造就了其广泛的药理活性,甾体皂苷具有抗肿瘤、抗炎、抗真菌、抗病毒、抗氧化、抗抑郁、保肝、降血糖、镇静催眠等多种药理活性<sup>[5]</sup>。

目前对甾体皂苷的研究主要集中在药理活性、化学组成、含量测定等方面,尤其在药理活性方面其抗肿瘤活性受到了国内外学者的广泛关注与研究。研究表明虎眼万年青(*Ornithogalum saundersiae*)中的皂苷具有靶向抗癌作用,对多种肿瘤细胞增殖抑制作用极强,但对正常细胞毒性极小<sup>[6]</sup>。然而对于甾体皂苷生物合成的相关研究相对较少,且主要集中在关键酶基因的克隆和功能鉴定,对涉及具体催化过程、结构修饰和转录水平调控机制的研究尚处于初级阶段。本文主要对甾体皂苷合成途径及其合成关键酶(基因)生物学信息进行了综述,进一步明确甾体皂苷生物合成分子机制,解析其生物合成途径,可为甾体皂苷的后续研究提供参考和理论支撑。

### 1 甾体皂苷生物合成途径

甾体皂苷的生物合成途径包括细胞质甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径和质体2-C-甲基-D-赤藓

醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)两条途径,二者均会生成中间产物异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP),二者中MVA途径在甾体皂苷生物合成中起到主导作用<sup>[7]</sup>。

**1.1 MVA途径** MVA途径是指以2分子的乙酰辅酶A为底物,在乙酰乙酰辅酶A硫解酶(acetoacetyl-CoA thiolase, AACT),羟甲基戊二酰辅酶A合酶(hydroxy methylglutaryl-CoA synthase, HMGS)作用下催化生成3-羟基-3-甲基乙酰辅酶A(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA),之后经(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR)生成MVA。最后经过焦磷酸化、脱羧化和脱水作用生成异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)<sup>[8]</sup>。

**1.2 MEP途径** MEP途径是由1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS)催化丙酮酸(pyruvate)后,再与3-磷酸甘油醛(glyceraldehyde-3-phosphate, G3P)缩合生成1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸酯(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP);之后DXP在限速酶1-脱氧-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR)的催化下还原生成中间体MEP, MEP经过磷酸化、环化等反应后,最终生成IPP<sup>[9]</sup>。

**1.3 甾体皂苷生物合成途径** IPP通过法尼基焦磷酸合酶(farnesyl pyrophosphate synthase, FPS)的催化生成法尼基焦磷酸(FPP),之后通过鲨烯合酶(squalene synthase, SS或SQS)和鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE或SQE)的催化形成2,3-氧化角鲨烯(2,3-oxidosqualene, OS),2,3-氧化角鲨烯在环阿屯醇合酶(cycloartenol synthase, CAS)的催化下形成甾体类化合物的前体环阿屯醇(cycloartenol),该步骤是甾体与萜类代谢的重要分支,是甾体类化合物下游代谢总开关<sup>[10-11]</sup>。环阿屯醇经过一系列的氧化、还原等修饰,形成胆甾醇,胆甾醇侧链经过羟基化、羰基化等反应,环化为半缩酮,半缩酮C-26位羟基被葡萄糖基转移酶催化形成糖苷键,生成呋甾烷型甾体皂苷<sup>[12]</sup>。而呋甾烷型甾

体皂苷经26-β-糖苷酶(F26G)催化C-26糖苷键水解,形成螺甾烷型甾体皂苷<sup>[13]</sup>。合成途径见图1。

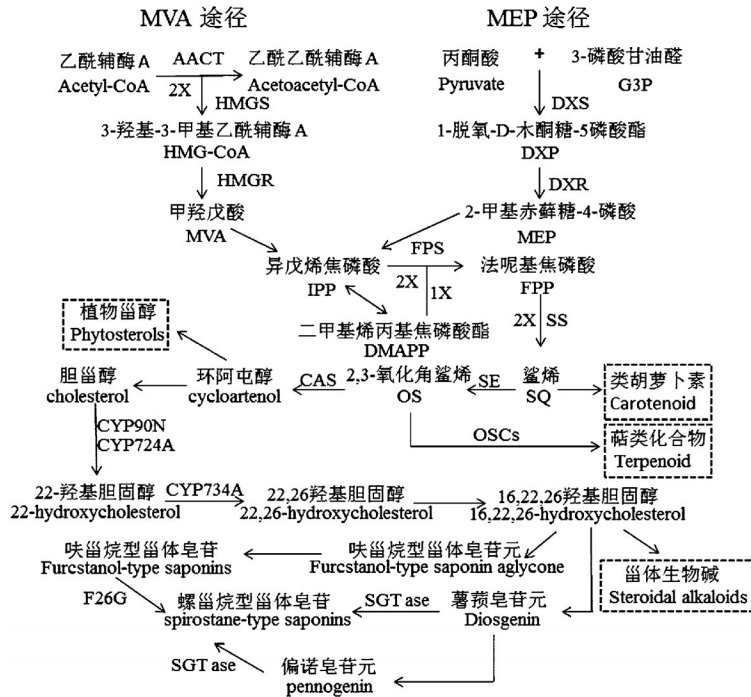


图1 植物甾体皂苷生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of steroidal saponins in plant

## 2 甾体皂苷生物合成中的关键酶及作用

甾体皂苷的合成关键酶根据其合成途径可以分成3个部分<sup>[14]</sup>,第一部分是IPP和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethyl allyl pyrophosphate, DMAPP)合成酶,为甾体皂苷与萜类生物合成共同途径的酶,包括了MVA途径中的限速酶HMGR,以及MEP途径中的酶

DXS,DXR;第二部分是催化IPP和DMAPP形成2,3-氧化鲨烯的各种环化酶,如FPS,SS,SE;第三部分是催化2,3-氧化鲨烯经过环化、氧化、还原、羟基化、糖基化等一系列修饰反应最终形成甾体类皂苷的合成酶,包括CAS,细胞色素P450酶(CYP450),糖基转移酶(SGTase)。关键酶的具体信息见表1。

表1 甾体皂苷生物合成关键酶及其作用

Table 1 Key enzymes in biosynthesis pathway of steroidal saponins and their functions

关键酶缩写	酶类型	主要的功能和作用
HMGR	还原酶	催化HMG-CoA还原形成MVA
DXS	催化酶	催化Pyruvate与G3P缩合生成DXP
DXR	还原酶	催化DXP生成MEP
FPS	异戊烯基转移酶	催化IPP和DMPP以1~4头尾连续缩合,形成FPP
SS	位于内质网膜上的一种微粒体酶	催化2分子的FPP缩合生成1分子鲨烯
SE	单加氧酶	催化鲨烯合成2,3-氧化鲨烯
CAS	氧化鲨烯环化酶中的一种	催化2,3-氧化鲨烯环化生成环阿屯醇
CYP450	氧化还原酶	催化甾体侧链羟基化、氧化等生成甾体皂苷元
SGTase	糖基转移酶	催化多种甾体皂苷元和甾体生物碱的糖基化

2.1 HMGR在甾体皂苷合成中的表达调控 MVA途径是合成IPP的主要途径之一,而HMGR是该途径中的第一个关键酶,与NADPH催化HMG-CoA生成MVA,该反应是不可逆的反应,也是萜类合成

的一个重要的调控位点<sup>[15]</sup>。目前已经从16种药用植物中克隆出了该基因,由该基因编码的氨基酸序列长度在523~602 aa,长度在500 aa左右的药用植物居多,且相对分子质量约为60 kDa。从杜仲

(*Eucommia ulmoides*)中克隆出了*EuHMGR*基因,组织表达分析发现该基因在叶和茎中强烈表达,而在根中表达较弱,同时对该基因进行酵母互补实验验证,发现*EuHMGR*能够介导酵母中甲羟戊酸的生物合成<sup>[16]</sup>。GU等<sup>[15]</sup>从泽泻(*Alisma plantago*)中克隆

出了*AoHMGR*基因,并在大肠埃希菌细胞中进行异源表达,经体外酶促反应实验和GC-MS分析显示该产物能够催化HMG-CoA和NADPH形成MVA,并发现*AoHMGR*在块茎中的表达量最高。部分生物学信息见表2。

表2 部分药用植物甾体皂苷生物合成关键酶基因生物学信息(2015—2019年)

Table 2 Bioinformation of key enzyme genes for biosynthesis pathway of steroidal saponins in herbs from 2015 to 2019

关键酶	物种名	基因名	全长/bp	ORF/bp	相对分子质量/kDa	等电点(IP)	氨基酸/个	GenBank编号	参考文献
HMGR	球药隔重楼( <i>Paris fargesii</i> )	<i>Pf-HMGR</i>	1 973	1 728	62.13	8.47	575	JX508638	[16]
	假马齿( <i>Bacopa monnieri</i> )		1 770	1 770	62.61	8.32	589	HM222607	
	小木通( <i>Clematis arandii</i> )		1 874	1 737	62.13	8.47	578	JN830626	
	甘草( <i>Glycyrrhiza uralensis</i> )	<i>GuHMGR</i>	1 819	1 722	60.57	7.06	573	GQ845405	
	杜仲( <i>E. ulmoides</i> )	<i>EuHMGR</i>	2 281	1 733	63.31	6.83	590	AY796343	
	雷公藤( <i>T. wilfordii</i> )		1 867	1 740	61.68	6.98	579	KU246037	
	盾叶薯蓣( <i>Dioscorea zingiberensis</i> )		2 077	1 758	62.31	7.47	585	KC960674	
	秦艽( <i>Gentiana macrophylla</i> )	<i>GmHMGR2</i>	1 871	1 743	62.78	6.35	580	JQ995755	
	人参( <i>Panax ginseng</i> )		1 785	1 785	63.62	8.40	594	KM386695	
	龙胆草( <i>Gentiana lutea</i> )		1 972	1 650	58.92	5.85	549	AB027189	
	铁皮石斛( <i>Dendrobium catenatum</i> )		2 036	1 689	59.76	6.18	562	JX909333	
	刺五加( <i>E. senticosus</i> )		2 217	1 713	61.06	7.83	570	JQ905593	
	三七( <i>Panax notoginseng</i> )	<i>HMGR</i>	3 947	1 770	63.04	6.49	589	KJ804166	[17]
	三七( <i>P. notoginseng</i> )	<i>PnHMGR</i>	1 893	1 725	61.76	6.60	574	KJ578757	[18]
	泽泻( <i>A. plantago</i> )	<i>AoHMGR</i>	2 252	1 809	64.60	7.87	602	KP342318	[15]
滇龙胆( <i>Gentiana rigescens</i> )		<i>GRHMGR-1</i>	1 747	1 697	60.65	5.69	565		[19]
		<i>GRHMGR-2</i>	1 731	1 572	55.82	5.48	523		
		<i>HMGR</i>	1 716	1 641	58.0		546		[20-21]
FPS	虎眼万年青( <i>O. saundersiae</i> )	<i>OsaFPPS</i>	1 327	1 044	40.09	5.01	347	KF509889	[22-23]
	川贝母( <i>Fritillaria cirrhosa</i> )	<i>FPS</i>	1 059	1 059	40.10	5.10	352	MG674920	[24]
	雷公藤( <i>T. wilfordii</i> )	<i>TwFPS1</i>	1 345	1 029	39.54	5.54	342	KM058711	[25]
		<i>TwFPS2</i>	1 312	1 029	39.54	5.28	342	KM058712	
	杜仲( <i>E. ulmoide</i> )	<i>EuFPPs1</i>	1 047	1 047	40.04		348	KC468535	[26]
		<i>EuFPPs2</i>	1 029	1 029	39.55		342	KC468536	
	泽泻( <i>A. orientale</i> )	<i>FPPS</i>	1 541	1 032			343		[27-28]
金铁锁( <i>P. tunicoides</i> )	<i>FPS</i>	1 135	1 029	39		342		[20]	
SQS	虎眼万年青( <i>O. saundersiae</i> )	<i>OcSQS1</i>		1 230			409		[29]
	浙贝母( <i>Fritillaria thunbergii</i> )	<i>FtSQS</i>	1 230	1 122			374	KF551097	[30]
	人参( <i>P. ginseng</i> )	<i>SS</i>	1 390	1 248	47.02	6.36	415	EU502717	[31]
			1 329	1 248	47.12		415	GU183406	
			1 335	1 248	47.13		415	GQ468527	
			1 476	1 248	47.06		415	AB115496	
	1 434	1 248	47.06		415	AB010148			
三七( <i>P. notoginseng</i> )		1 270	1 248	47.17		415	DQ186630		

续表 2

关键酶	物种名	基因名	全长/bp	ORF/bp	相对分子质量/kDa	等电点(IP)	氨基酸/个	GenBank编号	参考文献
	丹参( <i>S. miltiorrhiza</i> )	<i>SmSQS2</i>	1 597	1 245			414	KM244731	[32]
		<i>SmSQS2</i>	1 597	1 245	47.16	7.16	414	KM408605	[33]
		<i>SmSQS1</i>	6 279	1 242	47.35	6.60	413	JQ763409	[34]
		<i>SmSQS2</i>	7 200	1 245	47.16	7.16	414	JQ763410	
	雷公藤( <i>T. wilfordii</i> )	<i>TwSQS</i>	1 800	1 242	47.20	7.94	413	KR401220	[35]
		<i>TwSQS</i>		1 242	49.41		413		[36]
	厚朴( <i>M. officinalis</i> )	<i>MoSQS</i>		1 240	46.68	7.93	409	KT223496	[37]
	盾叶薯蓣( <i>D. zingiberensis</i> )	<i>DzSQS</i>	1 453	1 230	46.0	6.20	409	KC960673	[38]
	泽泻( <i>A. orientale</i> )	<i>AoS</i>	1 577	1 230	46.0		409	JX866770	[39]
	红花栝楼( <i>Trichosanthes rubriflos</i> )	<i>SS</i>	1 466	1 254	47.59	7.90	417		[40]
	黄芪( <i>Astragalus membranaceus</i> )		1 899	1 242			413	KP890854	[41-42]
SE	绞股蓝( <i>G. pentaphyllum</i> )	<i>GpSE1</i>	1 578	1 578			525	KX427578	[43]
			1 818	1 578			525	FJ906798	
	雷公藤( <i>T. wilfordii</i> )	<i>TwSE1</i>	1 578	1 578	57.42	8.65	525	MF989106	[44]
		<i>TwSE2</i>	1 584	1 584	57.59	8.84	527	MH593246	
		<i>TwSE3</i>	1 581	1 581	57.10	8.88	526	MH593247	
		<i>TwSE4</i>	1 584	1 584	57.35	8.98	527	MH593248	
		<i>TwSE5</i>	1 101	1 101	40.91	9.48	366	MH593249	
	三七( <i>P. notoginseng</i> )		2 054	1 623			540	KJ804171	[45]
			1 635	1 635			544	KJ946468	
	远志( <i>Polygala tenuifolia</i> )	<i>SE</i>	1 652	1 587	57.88	8.77	528	MG917041	
	太子参( <i>Pseudostellaria heterophylla</i> )	<i>SQE1</i>	2 038	1 554	56.70	8.80	517		[46]
	雷公藤( <i>T. wilfordii</i> )	<i>TwSE1</i>	1 578	1 578	57.34	8.74	525	MG717395	[47]
		<i>TwSE2</i>	1 584	1 584	57.54	8.97	527	MG717396	
	滇重楼( <i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> )	<i>ppSE1</i>	1 932	1 578	56.88	9.19	525		[48]
		<i>ppSE1</i>	1 828	1 548	55.35	8.74	515		
	金龙胆草( <i>Conyza blinii</i> H.Lév)			1 575	57.00	7.55	525		[49]
	金铁锁( <i>P. tunicoides</i> )	<i>SE-1</i>	1 642	1 578			525		[50]
		<i>SE-2</i>	1 552	1 446			481		
	桑黄( <i>Sanghuangporus lonicericola</i> )	<i>IbSE1</i>	1 856	1 452	55.12	8.41	483		[51-52]
CAS	葫芦巴( <i>T. foenum-graecum</i> )	<i>TfCAS</i>	2 271	2 271			756	KX148475	[53-54]
	吊兰( <i>C. borivilianum</i> )		2 277	2 277	86.19	5.89	758	KM245581	[55-56]
CYP450	重楼( <i>P. polyphylla</i> )	<i>PpCYP90B27</i>	1 455	1 455	54.89	8.36	484	KX904822	[57-58]
	吊兰( <i>C. borivilianum</i> )	<i>CYP450</i>	1 695	1 458	55.44	8.70	485	KM245583	[55]
	川贝母( <i>Fritillaria cirrhosa</i> )	<i>CYP90B1</i>	1 476	1 476			491	KX168703	[59]
		<i>CYP71D55</i>	1 644	1 644			547	KX168698	
		<i>CYP94A1</i>	1 356	1 356			451	KX168699	
		<i>CYP71A1</i>	1 536	1 536			511	KX168706	
		<i>CYP51</i>	1 467	1 467			488	KX168705	
		<i>CYP734A6</i>	1 548	1 548			515	KX168707	
		<i>CYP74B2</i>	1 446	1 446			481	KX168708	

续表 2

关键酶	物种名	基因名	全长/bp	ORF/bp	相对分子质量/kDa	等电点 (IP)	氨基酸 /个	GenBank 编号	参考文献
	滇重楼( <i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> )		870	870	31.53	5.63	289		[60]
	金铁锁( <i>P. tunicoides</i> )	<i>PtCYP450</i>	1 612	1 560	60.00	6.58	519		[61]
	刺五加( <i>E. senticosus</i> )	<i>CYP716A244</i>	1 721	1 446	54.01		481		[62-63]
SGTase	吊兰( <i>C. borivilianum</i> )	<i>CbS3GT</i>		1 695	62.02	6.14	564		[55]
	霍山石斛( <i>Dendrobium huoshanense</i> )	<i>IRX9</i>	1 553	1 047	39.35	7.26	348	MH507317	[64]
	丹参( <i>S. miltiorrhiza</i> )	<i>SmUF3GT</i>	1 390	1 353	49.25	6.50	450		[65]
	金银花( <i>Lonicera japonica</i> )	<i>LjUGT71E1</i>		1 503	55.58	5.09	501		[66]
	小叶女贞( <i>Ligustrum quihoui</i> )	<i>xynzUGT</i>	1 598	1 440	54.83	5.82	480	MF669124	[67]
	金铁锁( <i>P. tunicoides</i> )	<i>PtT1</i>	1 529	1 377	51.25	5.80	458		[68]
		<i>UGT71G1</i>	1 402	1 107	41.05	6.03	368		[69]
		<i>UGT</i>	1 581	1 335	49.76	6.25	444		[70]
	鱼腥草( <i>Houttuynia cordata</i> )	<i>UGT75C1</i>	1 787	1 461	53.18	5.22	486		[71]
	益母草( <i>Leonurus heterophyllus</i> )	<i>LhsUGT</i>	1 562	1 368	50.47	5.52	455		[72]
	高山红景天( <i>Rhodiola sachalinensis</i> )	<i>UGT72B14-2</i>	1 422	1 422	51.49	6.30	473	KX262844	[73]

**2.2 FPS在甾体皂苷合成中的表达调控** FPS是一种异戊烯基转移酶,是类异戊二烯途径的一个关键酶。其催化5碳原子的IPP和DMAPP以1~4头尾连续缩合反应后形成15碳的FPP<sup>[21]</sup>。典型的FPS有2个富含天冬氨酸的模序,每个亚基均有底物丙烯基焦磷酸(APP)及IPP结合位点<sup>[22]</sup>。目前已经从6种药用植物中获得了FPS氨基酸序列,其长度在342~352 aa,相对分子质量约为40 kDa,相对保守,部分内容见表2。目前对药用植物FPS酶的研究,多集中在百合科。GUO等<sup>[23]</sup>从虎眼万年青中分离到*OsaFPPS*基因,并以IPP和DMAPP作为底物对纯化后的*OsaFPPS*蛋白进行功能分析,且通过GC-MS确定了其产物为FPP。ZHAO等<sup>[25]</sup>从雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)中克隆出了2条FPS酶基因*TwFPS1*和*TwFPS2*,发现其在根中高度表达,在茉莉酸甲酯(MeJA)处理时上调,并获得了该基因的重组蛋白,通过体外酶促实验对其功能进行了验证。

**2.3 SS在甾体皂苷合成中的表达调控** SS又称为角鲨烯合酶,可以催化两分子FPP首尾聚合生成鲨烯,是三萜皂苷、甾醇、胆固醇等萜烯类重要物质的共同前体<sup>[28]</sup>。目前已经从10种药用植物中克隆出该基因,含有374~417 aa,相对分子质量约为47 kDa。LIU等<sup>[29]</sup>从虎眼万年青中克隆出了SS基因*OcSQS1*,并通过大肠埃希菌异源表达获得了可溶性截短的*OcSQS1*突变体,研究发现该突变体能够折叠并催化FPP转化为角鲨烯。RONG等<sup>[33]</sup>,ZHANG

等<sup>[36]</sup>,ZHA等<sup>[37]</sup>分别从丹参(*Salvia miltiorrhiza*),雷公藤,厚朴(*Magnolia officinalis*)中克隆出了相应SS基因*SmSQS2*,*TwSQS*,*MoSQS*,并将这些基因进行了重组表达和初步酶活性鉴定,经与FPP和NADPH一起温育,通过GC-MS检测发现在体外反应混合物中都检测到角鲨烯;此外,雷公藤*TwSQS*基因在根中高度表达,其次是茎和叶,并且该基因在MeJA处理后出现显著上调表达。见表2。

**2.4 SE在甾体皂苷合成中的表达调控** SE存在于内质网的微粒体中,是催化鲨烯(角鲨烯)转变为环氧化鲨烯反应的生物催化剂。环氧化鲨烯是从鲨烯生成羊毛甾醇、环阿屯醇、香树素等过程中的重要中间产物,因此鲨烯环氧化酶被认为是甾体皂苷生物合成途径中的一个非常重要的调控酶<sup>[42]</sup>。目前已经从9种药用植物中克隆出该基因,由366~544 aa编码而成,其中在500 aa左右的药用植物居多,相对分子质量约为40~60 kDa,见表2。GUO等<sup>[43]</sup>从绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum*)中获得了一条*GpSE1*基因,通过免疫荧光发现,幼叶中*GpSE1*的荧光信号明显强于成熟叶和根茎,这与该基因的组织特异性表达相一致,且发现幼叶和成熟叶中的*GpSE1*基因在MeJA处理后都出现显著上调表达,尤以幼叶更为显著,但随着MeJA浓度的升高,*GpSE1*的表达不会持续增强,表明MeJA对*GpSE1*表达发挥着浓度依赖性作用。ZHOU等<sup>[44]</sup>从雷公藤中克隆出了5条SE基因*TwSEs1~5*,*TwSEs1~*

4 采用 MeJA 诱导后与其组织特异性表达相一致,而 *TwSE5* 用 MeJA 诱导后,显示出不同的组织表达模式,认为该基因不响应 MeJA 的诱导;同时使用 CRISPR-Cas9 工具通过基因敲除来构建 ERG1 突变酵母鉴定 *TwSE* 的功能,发现只有 *TwSEs1~4* 可以在功能上互补 ERG1 突变酵母。

**2.5 CAS在甾体皂苷合成中的表达调控** CAS 能够催化 2,3-氧化角鲨烯向合成甾体先导化合物环阿屯醇转化,是合成环阿屯醇的关键调控酶,也是很多植物甾醇及甾体类物质生物合成途径中的重要环化酶<sup>[52]</sup>。与达玛烷合酶(DS)竞争 2,3-氧化角鲨烯这一共同前体物质流向甾醇及甾体类物质合成途径,而非三萜支流,因此 CAS 会间接影响三萜皂苷的生物合成<sup>[53]</sup>。目前已经从药用植物葫芦巴 (*Trigonella foenum-graecum*) 和吊兰 (*Chlorophytum borivilianum*) 中克隆了该基因,且该基因氨基酸序列长度分别为 756 aa 和 758 aa,其相对分子质量约 80 kD,见表 2。刘梦迪等<sup>[54]</sup>利用酵母表达系统对 TfcAS 蛋白进行了功能验证,结果表明该蛋白能够催化环阿屯醇的合成,并利用葫芦巴发根遗传转化体系在葫芦巴中过量表达 *TfcAS* 基因,发现该基因的表达大幅提高,且促进了葫芦巴中  $\beta$ -谷甾醇和薯蓣皂素的生物合成。

**2.6 CYP450在甾体皂苷合成中的表达调控** CYP450 是广泛存在于动物、植物、细菌及真菌等细胞内的血红素-铁硫蛋白<sup>[56]</sup>,由血红素蛋白、黄素蛋白及磷脂组成,相对分子质量约 50 kDa,含有 1 个保守的血红素结构域,其标签序列为“F×G×R×C×G”,该序列标签是鉴定 CYP450 的主要特征。CYP450 是一种末端加氧酶,从 NAD(P)H 获得电子后,催化单加氧反应<sup>[57]</sup>。目前已从 6 种药用植物中克隆出了该基因,由 289~547 aa 编码而成,相对分子质量约为 30~60 kDa,见表 2。YIN 等<sup>[58]</sup>从重楼 (*Paris polyphylla*) 中获得了 CYP450 基因 *PpCYP90B27*,并通过酿酒酵母的异源表达证明该基因编码催化胆固醇形成 22(R)-羟基胆固醇的酶。董栩<sup>[60]</sup>从滇重楼 (*P. polyphylla* var. *yunnanensis*) 中克隆得到了 1 条 CYP450 基因,并构建了该基因的原核表达系统,通过 SDS-PAGE 电泳验证蛋白表达结果,同时通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 发现该基因在根茎中的表达量最高,超过在茎和叶中的表达量的 2 倍,但茎和叶中的表达量相差不大。JO 等<sup>[62]</sup>从刺五加 (*Eleutherococcus senticosus*) 中克隆获得了 *CYP716A244* 基因,并在酵母和烟草共表

达体系中证实该蛋白参与齐墩果酸的合成。

### 2.7 SGTase 在甾体皂苷合成中的表达调控

SGTase 是生物体内一个种类繁多、具有高度专一性的超基因家族,具有相似的结构域,但没有明显的同源性。糖基转移酶能催化分子的糖基化修饰反应,可将活性糖基从尿嘧啶核苷二磷酸-葡萄糖转移至植物小分子化合物受体中,如次级代谢物及植物内外源毒性物质等<sup>[63]</sup>。目前已经从 9 种药用植物中克隆出该基因,由 348~564 aa 编码而成,相对分子质量约为 30~60 kDa,见表 2。李红艳等<sup>[65]</sup>对丹参中的 *SmUF3GT* 基因研究发现,其在紫花丹参中表达量为花萼>花瓣>茎>叶>雌蕊>雄蕊>根,在白花丹参中表达量为雄蕊>叶>花萼>茎>雌蕊>花瓣>根,且推断该基因可能定位于细胞质膜、细胞核以及细胞基质中的过氧化物酶体、高尔基体上。

### 3 结语与展望

甾体皂苷作为植物中的一类重要次生代谢产物,在部分药用植物中含量丰富,本文针对近 5 年药用植物甾体皂苷生物合成途径及其关键酶基因的相关研究进行了整理分析,发现相关研究主要集中在关键酶基因的克隆和功能鉴定,涉及具体催化过程、结构修饰和转录水平的调控机制研究较少,缺乏一个系统性和完整性的认知。而甾体皂苷由于其结构多样性,造就了其广泛药用活性和生物学性质,因此具有极大的药用开发潜力和广阔的应用前景,但由于产生甾体皂苷代谢物的植物生命周期通常较长,含量较低,无法满足商业需求,因此找出甾体皂苷的新植物来源并鉴定已知药用植物中新甾体皂苷的存在,研究其生物合成途径,采用合成生物技术以及体外培养等方法来生产皂苷已成为现代研究的热点。

随着现代分子生物学、合成生物学、蛋白组学和生物信息学在各个领域的广泛应用与渗透,在后续研究中,可利用 CRISPR-Cas9 合成生物技术工具,采用基因组编辑技术,建立用于基因功能分析的突变体并与发根农杆菌介导的转化相结合,深入了解生物合成途径的关键步骤,明确甾体皂苷生物合成的调控机制和对外界因子刺激的响应机制。此外,还可利用次生代谢工程技术,联合转录组测序,全面了解不同药用植物甾体皂苷代谢途径的差异,并筛选出其中的关键酶基因,完成克隆、定位和功能验证;并可通过沉默竞争途径关键酶基因的表达,来增强甾体皂苷的生物合成。同时,亦可通过体外培养技术,采用植物细胞培养、组织培养、根培

养、体细胞胚胎发生、添加激素或生物和非生物生长调节剂等方法对甾体皂苷的生物合成进行调控,从而实现药用植物活性物质的大量生产,有效解决药用植物资源匮乏的问题。

[参考文献]

- [1] MOSES T, PAPADOPOULOU K K, OSBOURN A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014, 49(6):439-462.
- [2] UPADHYAY S, JEENA G S, SHIKHA, et al. Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and in vitro production[J]. Planta, 2018, 248(3):519-544.
- [3] 周文斌. 知母皂苷BⅡ的生物转化及其糖基化酶的研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2010.
- [4] ZHAO Y Z, ZHANG Y Y, HAN H, et al. Advances in the antitumor activities and mechanisms of action of steroidal saponins[J]. Chin J Nat Med, 2018, 16(10):732-748.
- [5] 罗林明, 覃丽, 裴刚, 等. 百合属植物甾体皂苷成分及其药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(7):1416-1426.
- [6] 梁景超, 金吉春, 千昌石, 等. 虎眼万年青皂苷类提取物对肝癌细胞的基因表达及信号传导通路的影响[J]. 延边大学医学学报, 2018, 41(4):238-242.
- [7] WANG X, CHEN D J, WANG Y Q, et al. De novo transcriptome assembly and the putative biosynthetic pathway of steroidal saponins of *Dioscorea composita*[J]. PLoS One, 2015, 10:e0124560.
- [8] 谢琴鼎, 陈瑶, 唐亚琴, 等. 植物三萜代谢途径中角鲨烯合成酶研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(9):2997-3005.
- [9] 张松涛, 陈红丽, 崔红, 等. 植物MEP途径的代谢调控机制[J]. 西北植物学报, 2012, 32(7):1500-1504.
- [10] GHOSH S. Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: the role of oxidosqualene cyclases[J]. Proc Indian Natl Sci Acad, 2016, 82(4):1189-1210.
- [11] GARAIÓVÁ M, ZAMBOJOVÁ V, SIMOVÁ Z, et al. Squalene epoxidase as a target for manipulation of squalene levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Res, 2014, 14(2):310-323.
- [12] CÁRDENAS P D, SONAWANE P D, HEINIG U et al. The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in Solanaceae steroidal alkaloid metabolism[J]. Phytochem, 2015, 113:24-32.
- [13] 林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 植物甾体皂苷生物合成与生理活性[J]. 福建农业科技, 2017(10):57-59.
- [14] 李泽东, 赵荣华, 张兆传, 等. 三七皂苷合成及调控机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14):207-213.
- [15] GU W, GENG C, XUE W D, et al. Characterization and function of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene in *Alisma orientale*(Sam.) Juz. and its relationship with protostane triterpene production[J]. Plant Physiol Biochem, 2015, 97:378-389.
- [16] 郝爱平, 国会艳, 薛巨坤. 31种药用植物HMGR蛋白的生物信息学分析[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(14):2761-2767.
- [17] LIU M H, YANG B R, CHEUNG W F, et al. Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in ginsenoside and alkaloid biosynthesis [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1):265.
- [18] 张萍, 刘迪秋, 葛锋, 等. 三七3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶基因的克隆和生物信息学分析[J]. 中草药, 2014, 45(18):2684-2690.
- [19] 周伟, 吴昕怡, 张琳, 等. 滇龙胆3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶基因克隆、表达及分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22):50-55.
- [20] 韩丽君. 金铁锁HMGR、FPS、SE和P450基因克隆、生物信息学及表达分析[D]. 昆明:云南中医学院, 2016.
- [21] CAO X Y, YIN T, MIAO Q, et al. Molecular characterization and expression analysis of a gene encoding for farnesyl diphosphate synthase from *Euphorbia pekinensis* Rupr[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2):1487-1492.
- [22] 李建华. 乌拉尔甘草黄酮异戊烯基转移酶研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2014.
- [23] GUO L, KONG J Q. cDNA cloning and expression analysis of farnesyl pyrophosphate synthase from *Ornithogalum saundersiae* [J]. Z Naturforsch C J Biosci, 2014, 69(5/6):259-270.
- [24] ZHAO Q, LI R, ZHANG Y, et al. Transcriptome analysis reveals in vitro-cultured regeneration bulbs as a promising source for targeted *Fritillaria cirrhosa* steroidal alkaloid biosynthesis[J]. 3 Biotech, 2018, 8(4):191.
- [25] ZHAO Y J, CHEN X, ZHANG M, et al. Molecular cloning and characterisation of farnesyl pyrophosphate synthase from *Tripterygium wilfordii* [J]. PLoS One, 2015, 10(5):e0125415.
- [26] 杜次, 李菁, 彭清忠, 等. 杜仲法尼烯基焦磷酸合酶基

- 因cDNA全长的克隆与序列分析[J]. 生命科学研究, 2015, 19(2): 100-105.
- [27] 李清. 泽泻FPPS基因克隆及提高其药用成分含量的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
- [28] 李丽霞, 付羽萍, 湛琴琴, 等. 川泽泻鲨烯合酶基因的原核表达研究[J]. 中药材, 2016, 39(12): 2706-2710.
- [29] LIU M, LI L N, PAN Y T, et al. cDNA isolation and functional characterization of squalene synthase gene from *Ornithogalum caudatum* [J]. Protein Expr Purif, 2017, 130: 63-72.
- [30] 朱振洪, 沈静炎, 周利萍, 等. 浙贝母鲨烯合酶核心功能区基因克隆与序列分析[J]. 生物技术, 2014, 24(3): 1-5.
- [31] DING C, ZHAO C L, CHEN Z J, et al. Bioinformatics analysis of the squalene synthase gene and the amino acid sequence in ginseng species [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 12818-12825.
- [32] 荣齐仙, 姜丹, 查良平, 等. 白花丹参鲨烯合酶SQS2的克隆与原核表达分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1259-1265.
- [33] 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, 24(7): 1274.
- [34] 马艺沔, 袁丽钗, 张林魁, 等. 2个丹参鲨烯合酶基因的克隆和鉴定[J]. 中草药, 2014, 45(9): 1307-1312.
- [35] 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]. 药学学报, 2016, 51(4): 657-661.
- [36] ZHANG B, LIU Y, CHEN M, et al. Cloning, expression analysis and functional characterization of squalene synthase (SQS) from *Tripterygium wilfordii* [J]. Molecules, 2018, 23(2): 269.
- [37] ZHA L, LIU S, SU P, et al. Cloning, prokaryotic expression and functional analysis of squalene synthase (SQS) in *Magnolia officinalis* [J]. Protein Expr Purif, 2016, 120: 28-34.
- [38] YE Y, WANG R, JIN L, et al. Molecular cloning and differential expression analysis of a squalene synthase gene from *Dioscorea zingiberensis*, an important pharmaceutical plant [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(9): 6097-6104.
- [39] 刘青芝, 谷巍, 吴启南, 等. 建泽泻鲨烯合酶原核表达、功能验证及其免疫检测研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3733-3738.
- [40] 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.
- [41] 郎红, 全雪丽, 吴松权. 膜荚黄芪鲨烯合酶基因SS密码子偏爱性分析[J]. 广东农业科学, 2015, 42(18): 115-121.
- [42] 许燕, 赵爽, 邸亮. 药用植物中鲨烯环氧酶基因的研究进展[J]. 安徽医药, 2016, 20(3): 417-420.
- [43] GUO H H, LI R F, LIU S B, et al. Molecular characterization, expression and regulation of *Gynostemma pentaphyllum* squalene epoxidase gene 1 [J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 109: 230-239.
- [44] ZHOU J W, ZHANG Y, HU T Y, et al. Functional characterization of squalene epoxidase genes in the medicinal plant *Tripterygium wilfordii* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 120(PtA): 203-212.
- [45] 赵志新, 王凡. 药用植物中鲨烯环氧酶的生物信息学分析[J]. 商洛学院学报, 2017, 31(6): 51-55.
- [46] 陈观水, 林思妮, 柯兰兰, 等. 太子参鲨烯环氧酶基因的克隆及其表达分析[J]. 中草药, 2017, 48(13): 2733-2739.
- [47] 祝传书, 刘艳, 陈蒙蒙, 等. 雷公藤鲨烯环氧酶基因克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(5): 785-791.
- [48] 许燕, 赵爽, 董栩, 等. 滇重楼鲨烯环氧酶基因的克隆及原核表达研究[J]. 中草药, 2017, 48(9): 1839-1844.
- [49] 孙蓉, 罗吉, 刘姗, 等. 金龙胆草鲨烯环氧酶基因的克隆及原核表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(11): 3141-3146.
- [50] 李国栋, 韩丽君, 刘小莉, 等. 金铁锁鲨烯环氧酶基因的克隆与表达[J]. 中药材, 2016, 39(10): 2210-2216.
- [51] 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.
- [52] 张忠廉, 罗祖良, 石宏武, 等. 植物药活性成分环阿屯醇药理、生理活性及其研究展望[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 433-437.
- [53] 刘天巍. 人参SQS、CAS基因干扰载体的构建及转化人参研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [54] 刘梦迪, 李长福, 章焰生. 葫芦巴环阿屯醇合酶基因的分离及其对薯蓣皂素合成的影响[J]. 植物科学学报, 2019, 37(1): 87-92.
- [55] KUMAR S, KALRA S, SINGH B, et al. RNA-Seq mediated root transcriptome analysis of *Chlorophytum borivilianum* for identification of genes involved in saponin biosynthesis [J]. Funct Integr Genomics, 2016, 16(1): 37-55.
- [56] RENAULT H, BASSARD J E, HAMBERGER B, et al. Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: Current progress and future challenges [J]. Curr Opin Plant Biol, 2014, 19: 27-34.

- [57] 杨杰,詹亚光,肖佳雷,等. 细胞色素P450在植物三萜和甾醇骨架修饰中的功能研究进展[J]. 中国科学:生命科学,2018,48(10):1065-1083.
- [58] YIN Y, GAO L H, ZHANG X A, et al. A cytochrome P450 monooxygenase responsible for the C-22 hydroxylation step in the *Paris polyphylla* steroidal saponin biosynthesis pathway [J]. *Phytochemistry*, 2018, 156: 116-123.
- [59] 李滢,匡雪君,孙超,等. 川贝母转录组密码子使用偏好性分析[J]. 中国中药杂志,2016,41(11):2055-2060.
- [60] 董栩. 滇重楼糖基转移酶基因及细胞色素P450基因的表达研究[D]. 昆明:云南中医学院,2016.
- [61] 李国栋,韩丽君,刘小莉,等. 金铁锁*PtCYP450*基因的克隆及原核表达[J]. 中国现代中药,2016,18(6):758-761.
- [62] JO H J, HAN J Y, HWANG H S, et al.  $\beta$ -Amyrin synthase (*EsBAS*) and  $\beta$ -amyrin 28-oxidase (*CYP716A244*) in oleanane-type triterpene saponin biosynthesis in *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Phytochemistry*, 2017, 135: 53-63.
- [63] 邢爱佳,马小军,莫长明,等. 罗汉果葡萄糖基转移酶基因的克隆及原核表达[J]. 园艺学报,2013,40(6):1195-1204.
- [64] 周佩娜,李阳,蒲天珍,等. 霍山石斛 $\beta$ -1,4-木糖基转移酶(*IRX9*)基因克隆及生物信息学分析[J]. 中草药,2019,50(5):1212-1219.
- [65] 李红艳,刘景玲,金伟波,等. 丹参类黄酮3-O糖基转移酶基因*SmUF3GT*的克隆、亚细胞定位及时空表达分析[J]. 中国中药杂志,2019,44(10):2038-2045.
- [66] 徐道华,亓希武,陈吟,等. 金银花糖基转移酶基因*LjUGT71E1*的克隆及原核表达[J]. 分子植物育种,2018,16(5):1409-1416.
- [67] 王碧霞,徐德宏,谭朝阳,等. 小叶女贞糖基转移酶基因的克隆和原核表达研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(4):704-711.
- [68] 李媛,李国栋,张爱丽,等. 金铁锁糖基转移酶*PtT1*的克隆与生物信息学分析[J]. 中国民族民间医药,2017,26(4):23-26.
- [69] 李媛,李国栋,张爱丽,等. 金铁锁糖基转移酶*UGT71G1*的克隆与生物信息学分析[J]. 时珍国医国药,2017,28(7):1751-1753.
- [70] 江舟. 金铁锁糖基转移酶的克隆与生物信息学分析[D]. 昆明:云南中医学院,2016.
- [71] 黎晓英,伍贤进,姚元枝,等. 鱼腥草糖基转移酶基因*UGT75C1*的克隆及原核表达[J]. 园艺学报,2015,42(11):2299-2305.
- [72] XU D H, TAN C Y. Gene cloning and prokaryotic expression of glycosyltransferase from *Leonurus heterophyllus* sweet [J]. *Plant Sci J*, 2016, 34 (3) : 397-405.
- [73] 胡滢滢,薛飞燕,杨明峰,等. 高山红景天*UGT72B14-2*基因克隆及其原核表达[J]. 北京农学院学报,2016,31(4):7-11.

[责任编辑 顾雪竹]