

野三七鲨烯环氧酶基因的克隆及原核表达

王宝婕, 朱灵英, 周青青, 张帅, 马晓惠*, 徐福荣*
(云南中医药大学 中药学院, 昆明 650500)

[摘要] **目的:** 对野三七中可能参与三萜皂苷合成的关键酶鲨烯环氧酶基因 (*PvfSE*) 进行克隆, 并对其进行生物信息学分析和原核表达。**方法:** 采用 Trizol 法提取野三七根的总 RNA 并反转录为 cDNA 第一链, 基于野三七的转录组数据, 设计 *PvfSE* 基因序列特异性引物, 克隆基因全长, 利用相关软件对该基因进行生物信息学分析, 构建 pMal-c2X-*PvfSE* 原核表达载体, 在大肠埃希菌中诱导表达重组蛋白。**结果:** *PvfSE* 开放阅读框为 1 887 bp, 编码 628 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 68.8 kDa, 理论等电点为 9.28, 脂肪系数为 95.18, 亲水性系数为 -0.060, 不稳定指数为 40.36, 属于不稳定蛋白。生物信息学分析表明, *PvfSE* 具有 2 个跨膜结构域, 无信号肽, 可能定位在叶绿体或细胞质膜上, 具有 FAD/NAD(P) 结合域和鲨烯环氧酶结构域, 属于混合型蛋白。*PvfSE* 与西葫芦和芒果柄花中参与三萜皂苷合成的鲨烯环化酶 (*CpSE1*, *CpSE3*, *OsSE1*, *OsSE2*) 亲缘关系较近。此外, 在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中成功表达 *PvfSE* 的重组蛋白。**结论:** 克隆得到 *PvfSE* 基因, 并在大肠埃希菌中成功表达其重组蛋白, 为进一步研究 *PvfSE* 的功能和解析野三七中三萜皂苷生物合成途径奠定了基础。

[关键词] 野三七; 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] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0147-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192212

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190808.1102.004.html>

[网络出版时间] 2019-08-08 11:22

Cloning and Prokaryotic Expression of Squalene Epoxidase Gene from *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*

WANG Bao-jie, ZHU Ling-ying, ZHOU Qing-qing, ZHANG Shuai, MA Xiao-hui*, XU Fu-rong*
(College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To clone the squalene epoxidase genes of *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* (*PvfSE*), and perform bioinformatics analysis and prokaryotic expression. **Method:** Total RNA was extracted from root of *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus* by trizol method, and reverse-transcribed into first stand of cDNA. Specific primers for *PvfSE* cloning were designed according to the transcriptome data of *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*, and the cDNA sequence of *PvfSE* gene was isolated. Bioinformatics of *PvfSE* was analyzed by relevant software. The prokaryotic expression vector pMal-c2X-*PvfSE* was built to express recombinant protein in *Escherichia coli* cells. **Result:** The *PvfSE* gene contained a 1 887 bp open reading frame, encoding a predicted protein of 628 amino acids. The calculated molecular weight was 68.8 kDa, the theoretical isoelectric point was 9.28, the aliphatic index was 95.18, the grand average of hydropathicity was -0.060, and the instability index was 40.36. The protein was unstable. Bioinformatics analysis showed that *PvfSE* had two transmembrane domains and no signal peptide. *PvfSE* was most likely to be located in chloroplast or cytoplasmic membrane. *PvfSE* was a mixed protein

[收稿日期] 20190324(009)

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(81760690,81460581);云南省科技厅科技计划项目(2018FB144);云南省教育厅科学研究基金项目(2017ZZX288)

[第一作者] 王宝婕,在读硕士,从事分子生药学研究,E-mail:wangbaojie1994@126.com

[通信作者] * 马晓惠,博士,讲师,从事分子生药学研究,E-mail:maxiaohui1988@126.com;

* 徐福荣,博士,研究员,从事中药资源质量与开发研究,E-mail:xfrong99@163.com

with FAD/NAD (P) binding domain and squalene epoxidase domain. Sequence alignment and phylogenetic analysis demonstrated that PvfSE had a relatively close relationship with CpSE1, CpSE3, OsSE1 and OsSE2, which was involved in the biosynthesis of triterpene saponins in *Cucurbita pepo* and *Ononis spinosa*. In addition, PvfSE protein was expressed in *E. coli*. **Conclusion:** In this study, *PvfSE* gene was cloned and expressed in BL21 (DE3), which lays a foundation for the further study on the gene functions of PvfSE and the biosynthetic pathway of triterpenoid saponins in *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*.

[Key words] *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*; squalene epoxidase; gene cloning; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

野三七 (*Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus*), 为五加科人参属植物, 是越南人参 (*P. vietnamensis*) 的一个变种, ZHU 等^[1] 在云南省金平县境内发现并命名, 主要分布于云南省南部的红河州及老挝等地^[2]。野三七的根及根茎被广泛用于肿痛、月经不调及心血管疾病等的治疗, 效果显著, 是我国少数民族珍贵的药用植物资源, 具有重要的药用价值。野三七的主要活性成分为人参皂苷类成分 (ginsenosides)。研究表明, 人参皂苷具有抗癌、抗炎、调节免疫、调节血压和血糖等多重药理活性, 并对神经系统具有一定保护作用^[3-10]。野三七中含有大量而多样的人参皂苷, 其皂苷总含量甚至超过三七、人参和西洋参中总皂苷的含量, 在野三七中, 除检测到了三七中含有的原人参二醇型和原人参三醇型皂苷外, 还检测到了以珠子参苷 R₂ 为代表的奥克梯隆型皂苷^[11], 野三七是研究人参皂苷生物合成途径的理想材料。

萜类化合物是自然界广泛存在的一大类异戊二烯衍生物, 具有高度多样化的功能^[12]。人参皂苷是一类主要存在于人参属植物中的三萜皂苷类成分, 其在生物体内的合成是一个涉及多个酶作用的复杂反应。鲨烯是三萜的通用前体, 其被鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SE) 氧化为 2,3-氧鲨烯或者 2,3:22,23-双环氧鲨烯, 随后在环氧角鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclase, OCS) 催化下, 生成不同类型的三萜化合物骨架, 最后在细胞色素 P450 (cytochromes P450s, P450s) 和糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferases, UGTs) 的作用下生成复杂多样的人参皂苷^[13-16]。其中, 鲨烯环氧酶被认为是三萜生物合成途径中的一个关键调控酶^[17]。鲨烯环氧酶在分子氧 (O₂) 和还原辅酶 II (NADPH) 的共同作用下在鲨烯 C=C 双键中插入 1 个或 2 个 O, 在强光和紫外线作用下生成 2,3-氧鲨烯或 2,3:22,23-双环氧鲨烯^[18]。鲨烯环氧酶的活性决定 2,3-氧鲨烯或 2,3:22,23-双环氧鲨烯的生物合成效率, 进而影响

三萜皂苷的合成速率及含量。

目前, 已从西葫芦^[19]、拟南芥^[16,20]、人参^[21]、芒柄花^[22] 等多种植物中克隆得到 SE 基因。MA 等^[23] 从野三七中克隆得到 3 个 SE 基因, 但尚未对其进行功能验证。课题组前期构建了野三七的转录组, 从中筛选出 1 个可能与野三七中三萜皂苷生物合成相关的 SE 基因 (*PvfSE*), 本文对该基因进行克隆、生物信息学分析及体外表达等研究, 为研究野三七鲨烯环化酶基因的功能及进一步解析野三七中三萜皂苷合成途径奠定基础。

1 材料

三年生野三七 (*P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*), 采自云南省红河州金平县, 利用 DNA 条形码技术检测 18S rRNA 基因和叶绿体 *matK* 基因, 确定其为野三七 (越南人参的变种)。清洗干净经液氮速冻后于 -80 °C 冰箱保存备用。

Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell, Trans 5 α Chemically Competent Cell, BL21 (DE3) Chemically Competent Cell, pEASY-Blunt Simple Cloning Kit (北京全式金生物技术有限公司, 批号分别为 M180117, M890416, N360223, M30816); Trizol (Invitrogen 公司, 批号 162701); PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, Quick Cut BamH I, Quick Cut Sal I, DL 2000 DNA Marker, Premixed Protein Marker (Low) (宝生物工程有限公 司, 批号分别为 AI20624A, AI60978A, AHE4067A, AI21246A, AI11798A); Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, GeneJET Gel Extraction Kit, 聚合酶链式反应 (PCR) Master Mix (2 \times), T4 DNA Ligase (Thermo Scientific 公司, 批号分别为 00534713, 00452266, 00528778, 00549547); IPTG (北京索莱宝 科技有限公司, 批号 1229K054); 原核表达载体 pMal-c2X 为本实验保存, 其他化学试剂为国产分析 纯。引物合成及测序由生工生物工程 (上海) 股份 有限公司完成。

2 方法

2.1 野三七总 RNA 提取及 cDNA 合成 采用 Trizol 法提取野三七根的总 RNA,用超微量紫外-可见分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性。利用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将野三七总 RNA 反转录成 cDNA, -20 °C 保存备用。

2.2 PvfSE 基因克隆 分析野三七的转录组数据,筛选获得具有完整开放阅读框(open reading frame, ORF)的 SE 基因,根据 ORF 设计 SE 基因全长引物(表 1)。以野三七根 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系:5 × PrimeSTAR Buffer 5 μL, dNTP Mixture 2 μL, SE-F (10 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, SE-R (10 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, cDNA 1 μL, Prime STAR HS DNA Polymerase 0.25 μL, ddH₂O 补足到 25 μL。反应程序:94 °C 预变性 5 min;98 °C 变性 10 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,进行 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,对目的片段进行切胶回收。回收的 PCR 产物连接载体 pEASY-Blunt 后转化 Trans-T1 感受态细胞,于含氨苄(100 mg · L⁻¹)的 LB 平板上 37 °C 培养 12 ~ 16 h。挑取单克隆进行菌落 PCR 验证,阳性结果送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将阳性且测序无误的重组质粒命名为 pEASY-Blunt-PvfSE。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

类型	引物名称	引物序列(5'-3')
基因克隆	SE-F	ATGTTGTTGGGATTGGCGTAAGAT
	SE-R	TCAGAATTTGATGTCATCTGCAGGA
截短引物	PvfSE-F	CGGGATCCAAGGATGGACGGCGAGTTC
	PvfSE-R	ACGCCTGACGAATTTGATGTCATCTGCAG

2.3 PvfSE 基因的生物信息学分析 利用 ExPASy-ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 PvfSE 基因编码蛋白的理化性质;利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线分析蛋白质的疏水性;利用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析跨膜区;利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽分析;用 TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测亚细胞定位;使用 InterPro

(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 分析结构功能域;利用 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 预测蛋白质二级结构;利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测 PvfSE 蛋白三级结构;利用 BioEdit, DNAMAN 软件进行氨基酸序列多重序列比对;利用 NCBI 的蛋白质序列数据库搜索同源序列,通过 MEGA 6.0 构建系统进化树,bootstrap 为 1 000。

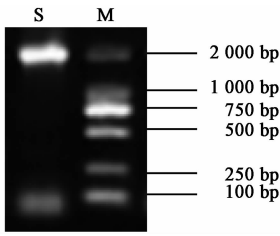
2.4 SE 基因的原核表达载体构建及表达 选择原核表达载体 pMal-c2X,利用 DNAMAN 软件分析 PvfSE 基因序列的限制性酶切位点,选取 BamH I 和 Sal I 作为载体构建的连接位点,设计带有酶切位点的截短引物(表 1),以 pEASY-Blunt-PvfSE 为模板进行 PCR 扩增。分别双酶切 PCR 产物和 pMal-c2X 后回收 PCR 产物和 pMal-c2X 载体片段。将回收的 PCR 产物和载体片段用 T4 DNA Ligase 于 22 °C 连接 20 min。连接产物转化大肠埃希菌 Trans 5α 感受态细胞后涂布在含有氨苄的 LB 固体培养基上过夜培养,选取单克隆进行菌液 PCR 验证,阳性结果送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果正确的菌液扩大培养,提取质粒,测序正确的重组质粒命名为 pMal-c2X-PvfSE。将 pMal-c2X-PvfSE 转化至大肠埃希菌 Trans BL21 (DE3) 感受态细胞,挑选阳性克隆于含氨苄的 LB 液体培养基中,37 °C 250 r · min⁻¹ 振荡培养至吸光度 A 为 0.6 ~ 1.0,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.4 mmol · L⁻¹,在 16 °C 诱导目的蛋白表达 12 h。收集菌体,加入 PBS 缓冲液复溶,4 s/8 s 超声 30 min,4 °C 离心分别收集上清和沉淀进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳检测。转化 pMal-c2X 的 BL21 (DE3) 进行随行实验作为对照。

3 结果与分析

3.1 PvfSE 基因的克隆 用特异引物以野三七根部 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 2 000 bp 附近有单一且明亮的条带(图 1),对扩增序列进行测序,测序结果表明,该序列长 1 887 bp,用 NCBI ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对该序列的 ORF 进行预测,该序列含有一个完整的 ORF,长 1 887 bp,推测编码 628 个氨基酸。将该基因命名为 PvfSE。

3.2 PvfSE 基因编码蛋白序列分析

3.2.1 PvfSE 蛋白质序列的基本性质 利用在线软件 ExPASy-ProtParam tool 对 PvfSE 基因编码蛋白的理化性质进行分析,结果显示 PvfSE 蛋白质由



M. DL 2000 DNA Marker; S. *PvfSE*

图 1 野三七鲨烯环氧酶(*PvfSE*)基因的 ORF 扩增

Fig.1 ORF amplification of *PvfSE*

628 个氨基酸组成,分子式为 $C_{3078}H_{4895}N_{849}O_{885}S_{28}$, 相对分子质量为 68.852 kDa,理论等电点(PI)为 9.28,带负电残基(Asp + Glu)为 52,带正电残基(Arg + Lys)为 70,不稳定系数为 40.70,属于不稳定蛋白。脂肪系数(AI)为 89.32,亲水性系数(GRAVY)为 -0.118。利用 ProtScale 在线软件对 *PvfSE* 蛋白质的疏水性进行分析(图 2),该蛋白质大约在 94 ~ 115 aa 和 159 ~ 175 aa 有 2 个典型的疏水区域。用 TMHMM2.0 预测跨膜区,结果显示(图 3),*PvfSE* 蛋白的 1 ~ 93 aa 位于膜表面,117 ~ 160 aa 位于膜内,94 ~ 116 aa 和 161 ~ 178 aa 形成两个典型的跨膜螺旋区,与该蛋白质的疏水性区域分析结果基本一致。信号肽分析表明无信号肽。用 TargetP 1.1 Server 进行亚细胞定位预测,结果显示 *PvfSE* 蛋白可能定位于叶绿体。WoLF PSORT 预测结果为 plas 5, chlo 3, vacu 2, E. R. 2, nucl 1, mito 1。因此,*PvfSE* 蛋白可能定位于细胞质膜及叶绿体。用 InterPro 预测 *PvfSE* 的结构域(表 2),*PvfSE* 蛋白在 310 ~ 582 aa 处含有鲨烯环氧酶结构域。

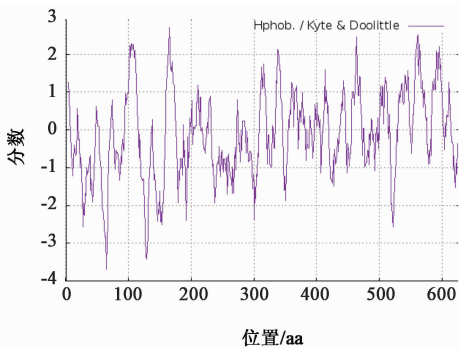


图 2 *PvfSE* 蛋白质的疏水性

Fig.2 Hydrophobic of *PvfSE*

3.2.2 *PvfSE* 蛋白的空间结构 利用 PredictProtein 预测 *PvfSE* 蛋白的二级结构,结果显示,*PvfSE* 蛋白二级结构中 α -螺旋占 37.42%, β -折叠占 17.20%,无规则卷曲占 45.38%,属于混合型蛋白。SWISS-

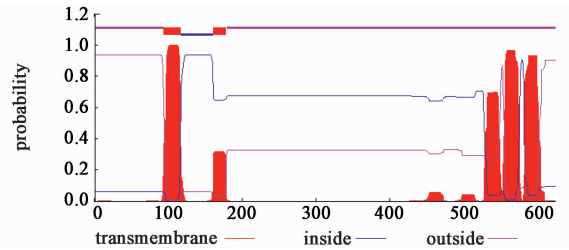


图 3 *PvfSE* 跨膜区预测

Fig.3 Transmembrane region of *PvfSE* predicted by TMHMM

表 2 鲨烯环氧酶蛋白功能结构域预测

Table 2 Functional domain of *PvfSE* predicted by InterPro

Accession	Description	区域
IPR008949	Isoprenoid synthase domain superfamily	27 ~ 367
IPR033904	Trans-Isoprenyl Diphosphate Synthases, head-to-head	38 ~ 320
IPR013698	Squalene epoxidase	310 ~ 582

MODEL 预测 *PvfSE* 蛋白的三级结构(图 4),该模型以 6c6n.1.A 蛋白为模板,用于建立该模型的氨基酸残基范围为 157 ~ 605 位,两者序列一致性为 47.76%。

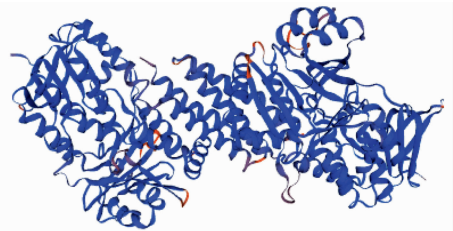


图 4 *PvfSE* 基因编码蛋白质三级结构预测

Fig.4 Deduced three-dimensional structure of *PvfSE*

3.2.3 氨基酸序列比对及进化分析 在线 blast 比对结果显示,野三七 *PvfSE* 蛋白与来自山茶科油茶 *Camellia oleifera* 中的 SE (AGH32908.1) 相似性最高,为 84%。利用 DNAMAN 将 *PvfSE* 氨基酸序列与野三七中已报道的 3 条鲨烯环氧酶 (*PvfSQE1*, *PvfSQE2* 和 *PvfSQE3*) 氨基酸序列进行比对,发现 *PvfSE* 与 *PvfSQE1* 相似度最高,为 69.11%。将 *PvfSE* 蛋白与人参 (*PgSE1*, BAD15330.1 和 *PgSE2*, ACJ24907.2),西葫芦 (*CpSE1*, AXK50227.1 和 *CpSE2*, AXK50228.1) 的鲨烯环氧酶氨基酸序列进行多序列比对,结果表明 *PvfSE* 与人参和西葫芦的鲨烯环氧酶具有较高同源性,均具有 NAD(P) 结合区和底物结合区(图 5)。

通过文献查阅,选取其他植物中已鉴定具有鲨

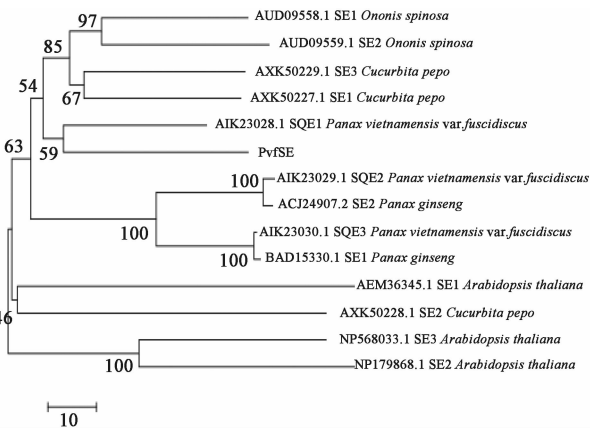
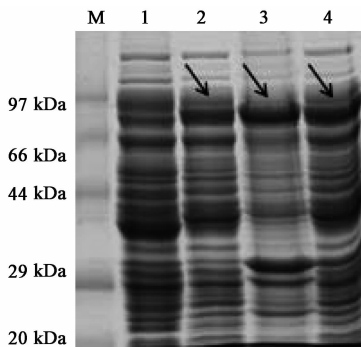


图 6 鲨烯环氧酶蛋白的系统进化树
Fig. 6 Phylogenetic tree of PvfSE proteins

性的可溶性蛋白。由于 PvfSE 蛋白有 2 个跨膜结构域,属于膜蛋白,不易在常规的体外表达系统中表达。因此,去掉该蛋白 2 个跨膜结构域,将截短序列(179 ~ 628 aa)与 pMal-c2X 重新构建原核表达质粒 pMal-c2X-PvfSE 进行蛋白表达。扫描结果(图 7)表明,含有重组质粒 pMal-c2X-PvfSE 的菌株在约 91 kDa(融合蛋白理论相对分子质量为 PvfSE 理论相对分子质量 49 kDa 与 42 kDa 的 MBP 标签之和)处有特异蛋白条带出现,与预期的融合蛋白相对分子质量较为一致。融合蛋白的特异条带不仅出现在诱导菌液的沉淀中,在上清中也观察到明显的条带,说明 PvfSE 的截短序列在大肠埃希菌 BL21(DE3)中成功表达。



M. Premixed Protein Marker(Low);1. pMal-c2X 空载体;2. IPTG 诱导后 pMal-c2X-PvfSE 上清;3. IPTG 诱导后 pMal-c2X-PvfSE 沉淀;4. IPTG 诱导后 pMal-c2X-PvfSE 总蛋白

图 7 野三七 PvfSE 蛋白的原核表达
Fig. 7 Prokaryotic expression of PvfSE

4 讨论

鲨烯环氧酶多存在于内质网的微粒体中,利用 TargetP 1.1 Server 和 WoLF PSORT 预测 PvfSE 亚细胞定位,TargetP 1.1 Server 预测结果显示 PvfSE 蛋

白可能定位于叶绿体。WoLF PSORT 预测 PvfSE 在细胞质膜的定位系数为 5,在叶绿体的定位系数为 3,在内质网的定位系数为 2,不同软件预测结果存在差异,可能是不同数据库中的数据差异造成的。软件预测功能基于数据库已有数据,存在一定偏差,为提高预测结果的准确性,可同时运用多种软件分析对结果进行验证。利用软件预测蛋白亚细胞定位有助于更好地进行后续研究,但 PvfSE 是否定位于内质网仍需进一步用亚细胞定位实验验证。

将 PvfSE 的 ORF 与原核表达载体 pMal-c2X 构建重组表达质粒,在 BL21(DE3)中诱导表达,PvfSE 存在沉淀中,未形成有活性的可溶性蛋白。PvfSE 属于膜蛋白,推测包涵体的形成可能与跨膜区域有关,去掉 N 端的跨膜区域后重新构建重组质粒,截短的 PvfSE 诱导后在上清和沉淀中均有表达,PvfSE 可溶性蛋白的获得为其功能研究奠定了基础。大肠埃希菌是高效表达异源蛋白最常用的原核表达系统,但并非每一种基因都能在其中进行高效的表达^[24]。原核表达蛋白的溶解性不仅与基因序列有关,还与表达载体、表达菌株及诱导条件等相关,pMal-c2X 原核表达载体带有麦芽糖结合蛋白(MBP)标签,MBP 融合标签在可溶性蛋白表达上更具有优势,它能够引导重组蛋白的正确折叠,在一定程度上增加所表达蛋白的可溶性^[25]。DONG 等^[19]将西葫芦 SE 基因在酵母和烟草中进行表达,成功验证了其催化鲨烯生成 2,3-氧鲨烯和 2,3:22,23-双环氧鲨烯的功能。此外,拟南芥、芒柄花等多种植物中 SE 的功能研究均采用了酵母系统^[16,22]。因此,还可尝试在酵母或植物体内验证 PvfSE 的功能。

鲨烯环氧酶是三萜皂苷、甾体皂苷和甾醇等化合物生物合成途径中的重要调控酶,其催化活性会影响产物的合成速率和产量。三萜皂苷是野三七的重要活性成分,野三七中鲨烯环氧酶与三萜皂苷生物合成密切相关。本研究为 PvfSE 的功能验证提供依据,为进一步阐明野三七中三萜皂苷生物合成途径奠定基础。

[参考文献]

[1] ZHU S, Fushimmi H, CAI S Q, et al. A new variety of the genus *Panax* from southern Yunnan, China and its nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA gene and *matK* gene[J]. *Jap J Bot*, 2003, 78(2): 86-94.
[2] 李翠婷,张广辉,马春花,等.野三七转录组中 SSR 位点信息分析及其多态性研究[J]. *中草药*, 2014, 45(10): 1468-1472.

- [3] TANG Y C, ZHANG Y, ZHOU J, et al. Ginsenoside Rg₃ targets cancer stem cells and tumor angiogenesis to inhibit colorectal cancer progression *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(1) : 127-138.
- [4] YU S, ZHOU X, LI F, et al. Microbial transformation of ginsenoside Rb₁, Re and Rg₃ and its contribution to the improved anti-inflammatory activity of ginseng [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1) : 138.
- [5] 王蔚, 王旭, 余苏云, 等. 人参皂苷 Rg₃ 调节免疫检查点 PD-L1 抑制肺癌 Lewis 细胞增殖的作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(1) : 166-171.
- [6] PAN C, HUO Y, AN X, et al. *Panax notoginseng* and its components decreased hypertension via stimulation of endothelial-dependent vessel dilatation [J]. *Vascul Pharmacol*, 2012, 56(3/4) : 150-158.
- [7] JIANG S, REN D, LI J, et al. Effects of compound K on hyperglycemia and insulin resistance in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *Fitoterapia*, 2014, 95 : 58-64.
- [8] Kim M S, YU J M, Kim H J, et al. Ginsenoside Re and Rd enhance the expression of cholinergic markers and neuronal differentiation in Neuro-2a cells [J]. *Biological*, 2014, 37(5) : 826-833.
- [9] 李龙飞, 马增春, 王宇光, 等. 人参皂苷 Rb₁ 减轻阿霉素诱导心肌细胞自噬的保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(7) : 1365-1369.
- [10] 唐艳隆, 周玥, 张成桂, 等. 人参皂苷 Rg₃ 通过 SIRT1-TSC₂ 信号通路诱导白血病干细胞衰老的作用 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(11) : 2348-2352.
- [11] ZHU S, ZOU K, Fushimi H, et al. Comparative study on triterpene saponins of Ginseng drugs [J]. *Planta Med*, 2004, 70(7) : 666-677.
- [12] 孙欢欢, 高红, 孙海峰, 等. 基于二代测序技术的黄芪萜类合成酶基因挖掘与生物信息学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(24) : 14-18.
- [13] ZHANG G H, MA C H, ZHANG J J, et al. Transcriptome analysis of *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus* discovers putative ocotillo-type ginsenosides biosynthesis genes and genetic markers [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16 : 159.
- [14] Augustin J M, Kuzina V, Andersen S B, et al. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(6) : 435-457.
- [15] Osbourn A, Goss R J, Field R A. The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(7) : 1261-1268.
- [16] 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.
- [17] 许燕, 赵爽, 邸亮, 等. 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.
- [18] 赵欢, 郭娟, 唐其, 等. 罗汉果角鲨烯环氧酶基因的克隆及表达分析 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(16) : 3255-3262.
- [19] DONG L, Pollier J, Bassard J E, et al. Co-expression of squalene epoxidases with triterpene cyclases boosts production of triterpenoids in plants and yeast [J]. *Metab Eng*, 2018, 49 : 1-12.
- [20] Laranjeira S, Amorim-Silva V, Esteban A, et al. *Arabidopsis* squalene epoxidase 3 (SQE3) complements SQE1 and is important for embryo development and bulk squalene epoxidase activity [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(7) : 1090-1102.
- [21] 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.
- [22] Almeida A, DONG L, Khakimov B, et al. A single oxidosqualene cyclase produces the *seco*-triterpenoid α -onocerin [J]. *Plant Physio*, 2018, 176(2) : 146.
- [23] MA C H, JIANG N H, DENG M H, et al. Cloning and characterization of three squalene epoxidase genes in *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus*, a rare medicinal plant with high content of ocotillo-type ginsenosides [J]. *Pak J Bot*, 2016, 48(6) : 2453-2465.
- [24] 靳保龙, 崔光红, 党伯岳, 等. 丹参二萜合酶基因 CPS4 的原核表达体系优化及活性蛋白纯化 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(10) : 94-98.
- [25] 师聪, 师环环, 刘恩岐, 等. 茶树 CsASMT 基因的克隆和表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2018, 38(10) : 1794-1800.

[责任编辑 顾雪竹]