

网络出版时间:2012-09-25 10:09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120925.1009.031.html>

人参鲨烯环氧酶基因的克隆与原核表达

胡 薇^a, 刘 宁^a, 田玉华^a, 李雨婷^a, 张连学^b

(吉林农业大学 a 生命科学学院, b 中药材学院, 吉林 长春 130118)

【摘 要】 【目的】克隆人参皂苷生物合成途径中的鲨烯环氧酶(SQE)基因,并进行原核表达与纯化,初步探讨 SQE 活性与人参皂苷生成量之间的关系。【方法】以 4 年生人参根组织须根为材料,提取其总 RNA,反转录为 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,对 SQE 基因进行克隆,再将其插入原核表达载体 pET-30a 中,构建 pET-30a-SQE 重组质粒,经酶切和测序鉴定后,转入 Rosetta 大肠杆菌,经 0.8 mmol/L IPTG 37 °C 诱导表达 4 h 后,进行 SDS-PAGE 电泳检测,采用 Ni-Agarose 亲和层析柱纯化目的蛋白,利用液相色谱-串联质谱联用技术(LC-MS)检测 SQE 的活性。【结果】获得了人参 SQE 基因 1 611 bp 的全长编码区 cDNA。酶切和测序结果表明,原核表达载体 pET-30a-SQE 构建成功;SDS-PAGE 分析显示,在 Rosetta 大肠杆菌中成功诱导表达了 SQE 融合蛋白,且纯化后的目的蛋白纯度较高;LC-MS 联用检测结果发现,随着 SQE 用量的增加,达玛烯二醇的生成量递增。【结论】克隆了人参 SQE 基因,获得了在体外具有生物学活性的 SQE 蛋白,并证实了其活性与人参皂苷生成量有很大的相关性。

【关键词】 人参;鲨烯环氧酶;cDNA 克隆;原核表达

【中图分类号】 Q786;S567.5⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)10-0207-06

Cloning, expression of squalene epoxidase from *Panax ginseng*

HU Wei^a, LIU Ning^a, TIAN Yu-hua^a, LI Yu-ting^a, ZHANG Lian-xue^b

(a College of Life Science, b College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agriculture University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】 The research was conducted to determine the relationships with enzyme activity of squalene epoxidase (SQE) and the accumulation of ginsenosides after cloning and expression a full-length cDNA encoding squalene epoxidase for the biosynthetic pathway of ginsenosides. 【Method】 Four-year ginseng root tissue fibrous was used as material. After extracting the total RNA and reversing transcription, primers were designed and then SQE gene cloned. And the production was inserted to expression vector pET-30a to obtain recombinant plasmid pET-30a-SQE and expressed (0.8 mmol/L IPTG for 4 h at 37 °C) in the host cells Rosetta. The results were analysed by SDS-PAGE. The recombinant protein was purified by affinity chromatograph. And the enzyme activity of SQE was determined with LC-MS. 【Result】 The results showed that complete encoding sequence of SQE in ginseng root was 1 611 bp, which encoded 537 amino acid residues. Restriction enzyme mapping and sequencing showed that pET-30a-SQE expression vector was constructed successfully. SDS-PAGE showed that fusion protein of SQE was induced in Rosetta host cells and the purity of interest protein was very high. The production of dammarendiol was increased gradually as the concentration of SQE enzyme increased after liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS) analysis. 【Conclusion】 SQE gene was cloned and expressed, and gained active enzyme of

【收稿日期】 2012-03-05

【基金项目】 国家自然科学基金项目(30570185, 31070316)

【作者简介】 胡 薇(1966—),女,吉林长春人,副教授,博士,主要从事分子遗传学和分子生物学研究。E-mail: huwei9002@126.com

【通信作者】 张连学(1955—),男,吉林吉林人,教授,博士,博士生导师,主要从事药用植物栽培和育种研究。

E-mail: zlxbooksea@163.com

SQE *in vitro*. The results indicated that there were significant correlations between the enzyme of SQE and the contents of total ginsenosides.

Key words: *Panax ginseng*; squalene epoxidase; cDNA cloning; prokaryotic expression

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)为五加科人参属植物。现代药理学研究表明,人参的主要有效成分为人参皂苷^[1],至今已从人参中分离出至少 60 种单体皂苷^[2],其中除 R0 外,其余均为达玛烷型三萜皂苷。不同的人参皂苷单体都有其独特的生理和药理活性,如抗炎解毒、抑制中枢神经、保护心血管、调节免疫功能、抗疲劳、改善记忆、抑制血小板凝集及抑制肿瘤血管生成和癌细胞增殖的抗肿瘤功效等^[3-9]。人参具有良好的应用前景和较高的经济价值,但人参的野生资源少,栽培周期长,且受地域环境等因素的影响,其产量较低^[10]。完全依赖从人参中获得人参皂苷这一途径很难满足市场需求,若能深入了解三萜皂苷生物合成途径,找出其中的关键酶,实现其基因的定位、克隆及高效表达,从而在分子水平上对人参皂苷的生物合成进行人工调控,则有望实现三萜皂苷的规模化生产。

鲨烯环氧酶(Squalene epoxidase, SQE)基因在三萜类皂苷的生物合成途径中起着重要的作用。SQE 通过在 C—C 之间插入 1 个氧原子催化角鲨烯生成中间体单氧态角鲨烯,这种中间体在强光和紫外线的作用下可生成 2,3-氧化角鲨烯。而 2,3-氧化角鲨烯是三萜类物质,如植物甾醇、达玛烯二醇、环阿乔醇的前体,其含量直接影响人参皂苷的含量,因此, SQE 被认为是三萜类化合物生物合成途径中的关键酶之一。相关试验结果表明,体外诱导增加 SQE 基因 mRNA 的表达,三萜皂苷的生成量随之增加,降低 SQE 基因 mRNA 的表达,三萜皂苷的合成将受到抑制^[11-12]。2,3-氧化鲨烯经过氧化鲨烯环化酶(OSCs)的环化,可以得到植物三萜类骨架^[13]。鉴于 SQE 在人参皂苷合成途径中的重要作用,本研究对 SQE 基因进行了克隆、原核表达和纯化,并利用液相色谱-串联质谱联用技术(LC-MS)测定达玛烯二醇的生成量,分析 SQE 的活性与达玛烯二醇生成量的相关性,进而研究 SQE 活性与人参皂苷含量的相关性,旨在为进一步研究人参皂苷生物合成途径的调控机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人 参 4 年生人参取自吉林农业大学药

用植物园,试验所用部位为人参根组织的须根。

1.1.2 菌株、载体与试剂 大肠杆菌菌株 Rosetta、DH5 α 和原核表达载体 pET-30a 由吉林农业大学生物化学与分子生物学实验室保存, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, 逆转录酶、dNTP、pMD-18T 载体、Ex Taq 聚合酶、限制性内切酶购自 TaKaRa, 质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术有限公司, T4 DNA 连接酶购自 BioLabs 公司, Ni-Agarose 蛋白纯化试剂盒购自北京康为世纪公司, 角鲨烯购自长春鼎国生物技术有限公司, 达玛烯二醇标准品购自云南西力生物技术有限公司, 达玛烯二醇合成酶由吉林农业大学生物化学与分子生物学实验室制备。

1.2 方 法

1.2.1 人参根组织总 RNA 的提取与 cDNA 合成

按照 Trizol 操作手册提取 4 年生人参根组织总 RNA, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光法检测总 RNA 的质量。以提取的总 RNA 为模板, 以 Oligo-dT 为引物, 用逆转录酶 AMV 将 RNA 反转录合成 cDNA。

1.2.2 人参 SQE 基因的克隆与序列分析 根据 GenBank 数据库中的相关序列(登录号: AB122078.1), 设计 SQE 引物, 上游引物: 5'-CG-GCCATGGATGAATTCATCTTCTTCT-3', 5' 端下划线部分为添加的 *Nco* I 酶切位点; 下游引物: 5'-GCGCGGCCGCATGAAGGCCATAATCACT-3', 5' 端下划线部分为添加的 *Not* I 酶切位点。以反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 52.6 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 进行 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 将回收片段和 pMD-18T 载体分别进行 *Xba* I 和 *Pst* I (*Xba* I 和 *Pst* I 是 pMD-18T 克隆载体本身的多克隆位点) 双酶切, 回收目的片段后连接, 将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 中, 涂布 LB 平板并于 37 ℃ 培养过夜。挑取转化菌落, 接种于 LB 液体培养基, 37 ℃ 振荡培养过夜, 利用质粒提取试剂盒提取质粒, 进行 *Xba* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定, 并将鉴定正确的重组质粒送 TaKaRa 公司测序, 测序正确者命名为 pMD-18T-SQE。

1.2.3 SQE 基因原核表达载体的构建与鉴定 利用 *Nco* I 和 *Not* I 限制性内切酶双酶切重组质粒 pMD-18T-SQE 和原核表达载体 pET-30a, 分别回收后, 用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜, 获得重组质粒, 将其转化进大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞后涂布 LB 平板, 37 °C 培养过夜。挑选阳性克隆进行 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切鉴定, 鉴定正确者送 TaKaRa 公司测序, 测序正确的克隆命名为 pET-30a-SQE。

1.2.4 pET-30a-SQE 的诱导表达与融合蛋白的纯化 将鉴定正确的 pET-30a-SQE 克隆接种 LB 培养基, 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 时, 用浓度为 0.8 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 分别在诱导不同时间(1,2,3,4,5,6,7 h)收集菌液, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 以未诱导的重组 Rosetta 为对照, 确定最佳 IPTG 诱导时间。

将重组表达菌接种于 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 时, 用 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h。取诱导表达菌液, 4 °C 12 000 g 离心 1 min, 收集菌体, 超声波破碎 2 min, 沉淀用 Soluble Binding Buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl) 溶液冲洗 2 次, 12 000 g 离心 20 min, 收集沉淀即为包涵体。将包涵体溶于 Soluble Binding Buffer 溶液, 于冰水浴中溶解包涵体 1 h, 10 000 g 离心 20 min, 取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤, 收集滤液, 用平衡后的 Ni-Agarose 柱亲和层析, 用 Soluble Binding Buffer 溶液洗脱, 根据 280 nm 处的紫外吸收值收集洗脱峰。

1.2.5 融合蛋白的活性检测 用制备的 SQE 融合蛋白催化角鲨烯生成 2,3-氧化鲨烯, 再转化成达玛烯二醇, 通过测定达玛烯二醇的总量来检测 SQE 融合蛋白的活性。试验分 3 个 SQE 反应体系。将底物角鲨烯(20 μL)加入装有 Tris-HCl 缓冲液(pH 6.0)的离心管中, 分别加入 5, 10, 15 μL SQE 融合蛋白溶液(SQE 融合蛋白质量浓度为 35 mg/mL)及 15 μL DS 酶, 37 °C 反应 1 h, 再 100 °C 反应 10 min 后终止酶促反应, 用 LC-MS 法检测达玛烯二醇的生成量。色谱条件: Zorbax Extend-C18 柱(美国 Agilent 公司产品), 5 μm 粒径, 150 mm×4.6 mm; 流动相: 水, 乙腈, 甲酸; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 25 μL。质谱条件: 电喷雾离子化源(ESI); 离子喷射电压: 5 500 V; 温度: 550 °C; 源内气体 1(GS₁, N₂) 压力: 482 650 Pa; 源内气体 2(GS₂, N₂) 压力: 413 700 Pa; 空气压缩机压力: 400

Pa; 扫描方式为正离子监测; DP 电压: 70 V; EP 电压: 10 V; CXP: 4.0 V; 碎裂能量: 40 V。定性分析离子对为 391.0/93.1; 定量分析离子对为 391.0/149.0。达玛烯二醇的生成量通过样品与标准品峰面积的比率来计算。

2 结果与分析

2.1 人参根组织总 RNA 的质量检测

人参根组织总 RNA 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后可清晰看到 28S、18S 和 5S rRNA 条带各一条(图 1); 总 RNA 的吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.96, 表明本试验所提取的人参根组织总 RNA 基本完整, 未发生 RNA 降解。

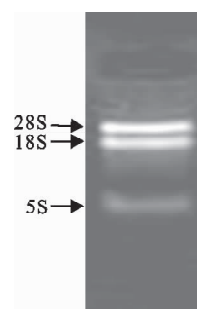


图 1 4 年生人参根组织总 RNA 的电泳结果

Fig. 1 A gel electrophoresis analysis of total RNA isolation from *Panax ginseng* root tissues of 4 years

2.2 人参 SQE 基因的克隆与序列分析

以人参根组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见长度为 1 611 bp 特异性核苷酸扩增片段, 与预期片段长度相符(图 2)。提取重组质粒 pMD-18T-SQE, 用 *Xba* I 和 *Pst* I 双酶切后, 可获得与目的条带长度(1 611 bp)相符的电泳条带(图 3), 表明 pMD-18T-SQE 载体构建成功。

2.3 重组表达载体 pET-30a-SQE 的构建与鉴定

用 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切原核表达载体 pET-30a-SQE, 获得长度约为 1 611 bp 的特异性条带(图 4), 与预期片段长度一致, 表明 SQE 基因已成功插入 pET-30a 载体, 原核表达载体 pET-30a-SQE 构建成功。

2.4 pET-30a-SQE 的诱导表达

用 pET-30a-SQE 质粒转化大肠杆菌 Rosetta 表达菌株, 诱导表达后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果(图 5)显示, 在约 63.0 ku 处有特异蛋白条带出现, 与预期的融合蛋白分子质量大小相符; IPTG 诱导 1,2,3,4,5,6,7 h 时, 蛋白的表达量差异不显著。

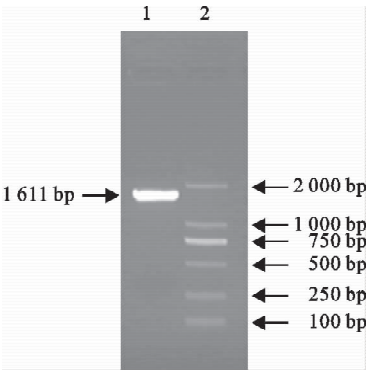


图 2 人参 SQE 基因的 PCR 扩增结果
1. PCR 扩增产物;2. DNA Marker DL2000

Fig. 2 Result of PCR amplification of *Panax ginseng* SQE

1. The PCR product of SQE;2. DNA Marker DL2000

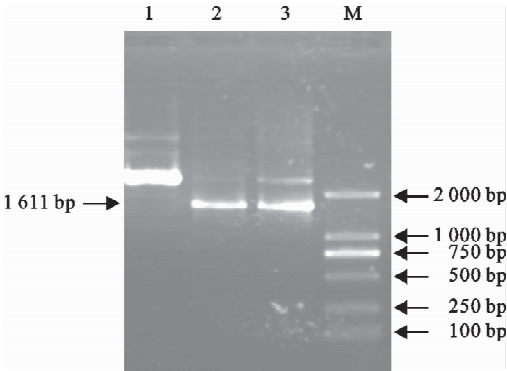


图 3 重组质粒 pMD-18T-SQE 的双酶切鉴定结果
1. pMD-18T-SQE;2,3. pMD18-T-SQE 双酶切结果(*Xba* I / *Pst* I);
M. DNA Marker DL2000

Fig. 3 Restriction analysis map of pMD-18T-SQE
1. Product of pMD-18T-SQE;2,3. Product of pMD-18T-SQE
digested by enzyme *Xba* I and *Pst* I; M. DNA Marker DL2000

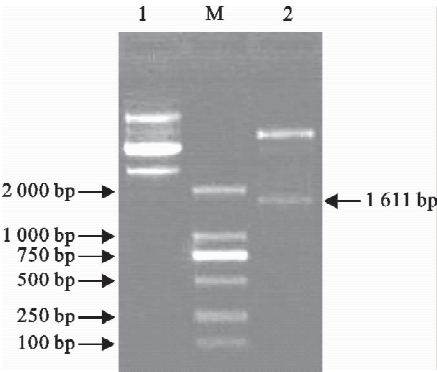


图 4 pET-30a-SQE 重组质粒的双酶切鉴定结果
1. pET-30a-SQE;M. DNA Marker DL2000;2. *Nco* I 和 *Not* I
双酶切后的 pET-30a-SQE

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid
pET-30a-SQE with restriction enzyme

1. pET-30a-SQE;M. DNA Marker DL2000;
2. pET-30a-SQE (*Nco* I / *Not* I)

2.5 SQE 融合蛋白的纯化

重组蛋白纯化后经 SDS-PAGE 电泳检测,在约 63.0 ku 处有蛋白条带出现,与 SQE 融合蛋白的分子质量一致,且纯度较高(图 6)。

2.6 SQE 融合蛋白活性的检测

LC-MS 联用技术检测结果(表 1)显示,在底物角鲨烯用量相同的条件下,随着 SQE 用量的增加,达玛烯二醇的生成量逐渐增大,说明 SQE 融合蛋白在体外具有一定的活性,能将角鲨烯转化成达玛烯二醇;SQE 用量与达玛烯二醇的生成量呈正相关关系。由此推测 SQE 用量与人参皂苷的生成量有很大的相关性。

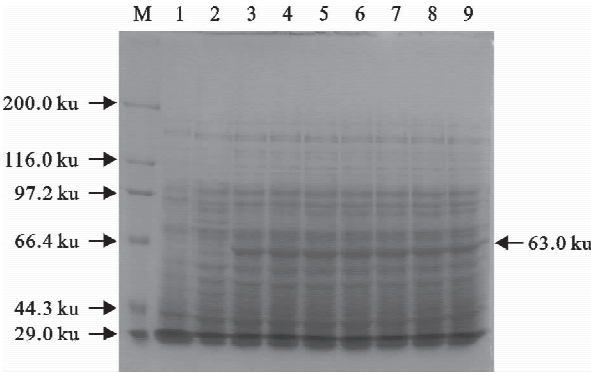


图 5 SQE 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳检测
M. 低分子质量标准蛋白;1. 对照;2. 未经 IPTG 诱导的表达产物;
3~9. 分别为 IPTG 诱导 1,2,3,4,5,6,7 h 的表达产物
Fig. 5 SDS-PAGE of SQE expression in *E. coli*
M. Standard proteins of low molecular weight;1. Control;
2. Protein expression induced without IPTG;
3~9. Protein expression induced by IPTG for 1,2,3,4,5,6,7 hours

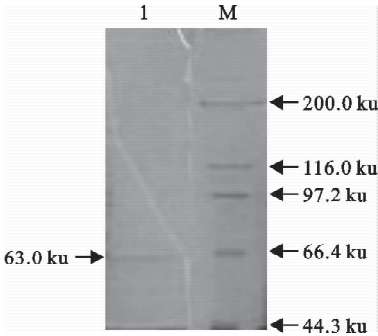


图 6 SQE 重组蛋白的纯化
1. 纯化后的重组蛋白;M. 低分子质量标准蛋白
Fig. 6 Purification result of recombinant protein
1. The purified protein of SQE;M. Protein MW Marker

表 1 不同 SQE 用量反应体系下达玛烯二醇的生成量
Table 1 Production of dammarendiol from different enzyme reaction system of squalene epoxidase

SQE 用量/ μ L Quantity of squalene epoxidase	峰面积值 Peak area value	达玛烯二醇生成量/ μ g Production of dammarendiol
0 (标准品 Standard)	1.184 3e ⁵	—
5	3.232e ⁴	0.272 9
10	5.375 6e ⁴	0.453 9
15	1.062 5e ⁵	0.897 1

3 讨 论

人参皂苷是人参的主要有效成分,具有良好的药用价值和经济价值。近年来,有关药用次生代谢产物生物合成基因调控的研究已成前沿研究领域^[14]。SQE 是三萜类化合物合成途径的限速酶之一^[15],目前已从多种植物中分离得到了 SQE 的编码基因^[12,16]。本研究以生长代谢旺盛季节的人参根为试验材料,克隆获得了 SQE 基因 1 611 bp 的全长编码区序列,为后续试验奠定了基础。

pET 系列载体是目前原核表达中应用比较广泛的表达系统。该系列载体中连有 T7 噬菌体转录系统,其 mRNA 的合成速度是大肠杆菌的 5 倍,可以实现目的基因的高效表达。此外,该载体中还含有组氨酸标签,能够特异地与镍等金属离子结合,提高蛋白的纯化效率^[17]。目前,在人参皂苷生物合成基因调控研究领域中,利用原核表达载体获得有生物学活性的关键酶蛋白的研究较少。本试验利用 pET-30a 成功表达纯化了人参 SQE 蛋白,经 SDS-PAGE 电泳检测,其纯度较高。同时,由于 SQE 基因序列中含有较多的稀有密码子,在 Origami B (DE3)菌中的表达量较低,本研究采用 Rosetta 系列表达菌使表达量有较大提高,其原因在于,Rosetta 系列表达菌中携带的 PRARE2 质粒,可以补充大肠杆菌缺乏的 7 种稀有密码子对应的 tRNA,与 Origami B(DE3)相比,更适合表达含有稀有密码子的蛋白质。

LC-MS 方法具有很高的专属性、准确性,灵敏性可达 2.0 ng/mL^[18-19]。本研究利用 LC-MS 技术分析了不同 SQE 用量反应体系中达玛烯二醇的生成量,结果显示,在底物用量相同的条件下,随 SQE 用量的增加,达玛烯二醇的生成量逐渐增大,说明利用大肠杆菌表达的 SQE 在体外具有活性,进一步证明 SQE 活性与皂苷生成量有很大的关系,但具体的催化活性尚不清楚,有待于更深入的研究。明乾良

等^[20]和 Han 等^[21]对 SQE 基因的研究发现,利用 RNAi 技术沉默 SQE 基因后,人参中的三萜皂苷生成量急剧下降。蒋世翠等^[22]利用荧光定量技术研究了 SQE 基因在西洋参 14 个组织器官中的表达量,结果发现,SQE 基因的表达水平与西洋参的皂苷生成量有很大的相关性,这与本研究结果相似,说明 SQE 在人参皂苷的生物合成中起着关键性的作用,在一定程度上可以决定三萜皂苷生物合成的走向,是控制人参皂苷合成的关键酶之一。因此,运用相应的基因工程技术提高人参 SQE 基因的表达,极有可能是一个提高人参皂苷生成量的有效手段。本试验结果为后续深入研究 SQE 的功能及其在人参皂苷生物合成途径中的调控机制提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 王铁生. 中国人参 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2001: 630.
Wang T S. Chinese ginseng [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House, 2001: 630. (in Chinese)

[2] 徐立新. MeJA 对人参 DS 基因表达的影响及 DS 在酵母中的表达 [D]. 吉林长春: 吉林大学, 2011.
Xu L X. Effect of MeJA on DS gene expression in *Panax ginseng* and study on *Saccharomyces cerevisiae* expressing DS gene [D]. Changchun, Jilin: Jilin University, 2011. (in Chinese)

[3] Chang Y S, Seo E K, Gyllenhaal C, et al. *Panax ginseng*: A role incancer therapy [J]. Integrated Cancer Therapy, 2003, 2(1): 13-33.

[4] Kiefer D, Pantuso T. Aaian ginseng improves psychological and immune function [J]. American Family Physician, 2003, 68 (8): 1539-1542.

[5] 李玉倩, 王 芳, 陈建国. 人参皂苷 Rb1 抗抑郁作用的动物行为学研究 [J]. 河南医学研究, 2011, 20(3): 257-263.
Li Y Q, Wang F, Chen J G. Antidepressant-like effect of ginsenoside Rb1 on behavior of animals [J]. Henan Medical Research, 2011, 20(3): 257-263. (in Chinese)

[6] 张 琛, 赵 钢. 人参皂苷 Rd 的药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(11): 953-958.
Zhang C, Zhao G. Advances in the research of pharmacological effects of ginsenoside Rd [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2011, 20(11): 953-958. (in Chinese)

[7] 张均田. 人参皂苷 Rg1 的促智作用机制: 对神经可塑性和神经发生的影响 [J]. 药学报, 2005, 40(5): 385-388.
Zhang J T. Nootropic mechanisms of ginsenoside Rg1: Influence on neuronalplasticity and neurogenesis [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2005, 40(5): 385-388. (in Chinese)

[8] Kim S J, Yuan H D, Chung S H. Ginsenoside Rg1 suppresses hepatic glucose eproduction via AMP-activated protein kinase in HepG2 cells [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(2): 325-328.

[9] Park E, Choo M, Kim E. Antiallergic activity of ginsenosid-Rh2

- [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(11): 1581-1584.
- [10] Lee Y J, Jin Y R, Lim W C, et al. Ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activate estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells [J]. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2003, 84(4): 463-468.
- [11] Devarenne T P, Ghosh A, Chappel J. Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis [J]. Plant Physiology, 2002, 129(3): 1095-1106.
- [12] 李 坤. 三七三萜皂苷合成途径鲨烯环氧酶基因的克隆及初步表达 [D]. 广西南宁: 广西医科大学, 2003.
- Li S. Molecular cloning and expression of squalene epoxidase in panax notoginseng [D]. Nanning, Guangxi: Guangxi Medical University, 2003. (in Chinese)
- [13] Jung J D, Park H W, Hahny, et al. Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence- tags [J]. Plant Cell Rep, 2003, 22(3): 224-230.
- [14] 罗志勇, 陆秋恒, 刘水平, 等. 人参植物皂苷生物合成相关新基因的筛选与鉴定 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(6): 554-560.
- Luo Z Y, Lu Q H, Liu S P, et al. Screening and identification of novel genes involved in biosynthesis of ginsenoside in *Panax ginseng* plant [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2003, 35(6): 554-560. (in Chinese)
- [15] 于彦婷, 任 丽, 孙春玉, 等. 人参 *SQE* 基因干扰载体的构建及转化 [J]. 中国医药生物技术, 2011, 6(2): 121-126.
- Yu Y T, Ren L, Sun C Y, et al. The construction and transformation of ginseng *SQE* gene interference vector [J]. Chin Med Biotechnol, 2011, 6(2): 121-126. (in Chinese)
- [16] 成 慧, 杨 光, 刘雅靖, 等. 龙牙木 *SE* 基因克隆与植物表达载体构建 [J]. 吉林农业大学学报, 2011, 33(1): 47-50.
- Cheng H, Yang G, Liu Y J, et al. Cloning of squalene epoxidase gene in *Aralia elata* and construction of its plant expression vector [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2011, 33(1): 47-50. (in Chinese)
- [17] Michae L N, Pollak, Eva S, et al. Insulin-like growth factors and neoplasia [J]. Nature Review, 2004, 4(7): 505-518.
- [18] 尤珠双, 徐晓燕, 郭 成, 等. 液质联用技术快速识别喜树叶提取物中的微量活性成分 [J]. 云南民族大学学报: 自然科学版, 2011, 20(5): 340-347.
- You Z S, Xu X Y, Guo C, et al. Rapid identification of minor active constituents of leaves of *Camptotheca* by HPLC/ESI-MS [J]. Journal of Yunnan University of Nationalities: Natural Sciences Edition, 2011, 20(5): 340-347. (in Chinese)
- [19] 刘永福, 贾小芳, 滕珍林, 等. 液质联用多反应监测法定量目标多肽或蛋白质 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(1): 86-92.
- Liu Y F, Jia X F, Teng Z L, et al. Quantification of target peptides or proteins by liquid chromatography-mass spectrometry with multiple reaction monitoring [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 28(1): 86-92. (in Chinese)
- [20] 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.
- Ming Q L, Han T, Huang F, et al. Advances in studies on ginsenoside biosynthesis and its related enzymes [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 41(11): 1913-1917. (in Chinese)
- [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] 蒋世翠, 刘伟灿, 王 义, 等. 西洋参不同器官中皂苷量与鲨烯合成酶和鲨烯环氧酶基因表达的相关性 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 579-584.
- Jiang S C, Liu W C, Wang Y, et al. Correlation between ginsenoside accumulation and *SQS* and *SQE* gene expression in different organs of *Panax quinquefolius* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(3): 579-584. (in Chinese)