

鲨烯环氧酶基因(*SQEs*)的克隆及其在温度胁迫下与枇杷悬浮培养细胞中熊果酸(UA)含量的相关性

李惠华* 徐剑 刘小英 王伟 常强 苏明华

福建省亚热带植物研究所, 厦门 361006

*通讯作者, Huihua80@aliyun.com

摘 要 熊果酸(ursolic acid, UA)是枇杷(*Eriobotrya japonica* L.)中重要的生物活性成份, 鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, *SQE*)是UA等五环三帖生物合成途径中的限速酶之一。为了克隆*SQEs*基因, 寻找枇杷细胞悬浮培养获取UA合适的胁迫温度, 建立此胁迫温度下*SQEs*的差异表达及其与UA含量的联系, 本研究以枇杷悬浮培养细胞为材料, 在对数生长期中后期设置低温15℃和高温35℃处理, 研究收获时(12 d)细胞生长与目标产物UA的相互关系。同时, 采用同源克隆方法分离*SQEs*, 研究15℃处理中, 两个枇杷鲨烯环氧酶基因(*ejSQE1*和*ejSQE2*)的差异性表达。结果表明, *ejSQE1*(GenBank 登录号: JQ294053.2)与*ejSQE2*(GenBank 登录号: JQ294054.2)氨基酸序列的相似度为69.89%, 序列的两末端差异最大; 15℃下, 距离收获48 h的处理中UA总含量最高; *ejSQE1*和*ejSQE2*的表达量均出现峰值。*ejSQE1*和*ejSQE2*的表达量均出现峰值。15℃下, 距离收获24 h的处理, 两者表达量显著下降($P < 0.05$); 距离收获长于24 h的处理, 枇杷悬浮细胞中*ejSQE1*和*ejSQE2*两个基因的表达量之和以及*ejSQE2*基因与UA的含量呈现出显著正相关($P < 0.05$)。本研究获得了*SQEs*基因序列及胁迫温度下的表达特征, 为枇杷细胞悬浮培养UA调控机制的研究提供基因源及参考资料。

关键词 枇杷悬浮细胞, 熊果酸(UA), 鲨烯环氧酶基因(*SQEs*), 温度胁迫

Cloning of Squalene Epoxidase Genes (*SQEs*) and Correlation Analysis Between Their Expression and Ursolic Acid (UA) Content in Suspension Cells of Loquat (*Eriobotrya japonica* L.) Under Temperature Stress

LI Hui-Hua* XU Jian LIU Xiao-Ying WANG Wei CHANG Qiang SU Ming-Hua

Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006, China

*Corresponding author, Huihua80@aliyun.com

Abstract Ursolic acid (UA) is an important active component in loquat (*Eriobotrya japonica* L.), and squalene epoxidase (*SQE*) is one of the key rate-limiting enzyme in pentacyclic triterpenoids biosynthesis, such as UA. To clone *SQEs* gene, find the suitable stress temperature in loquat suspension cultured cells, and further to find out the correlation between the different expression of *SQEs* and the content of UA under suitable stress temperature, cells of *Eriobotrya japonica* L. in the late logarithmic growth phase of cell suspension had been chose. Both the cell growth and the accumulation of UA were investigated at the low temperature of 15℃ and the high temperature of 35℃ treatments. At the same time, the homology-based cloning method was employed to determine the different transcription levels of two genes (*ejSQE1* and

基金项目: 福建省自然科学基金(No. 2012J05047)、福建省公益类科研院所专项(No. 2011R1012-1)和厦门市科技计划项目(No. 3502Z20132004)

收稿日期: 2014-09-12 接受日期: 2014-10-24

ejSQE2) at 15 °C treatment. The amino acid sequence similarity between *ejSQE1* (GenBank accession No. JQ294053.2) and *ejSQE2* (GenBank accession No. JQ294054.2) was 69.89%, and the significant differences between sequences were in the heads and tails. The results indicated that the total UA production of the 48 h at 15 °C treatment was the highest of all. Moreover, the expression of *ejSQE1* and *ejSQE2* peaked in 48 h treatment, and expressions of both genes declined significantly in 24 h treatment at 15 °C ($P < 0.05$). The results revealed that there was significantly positive correlation between expressions of *ejSQE1* and *ejSQE2*, as well as expression of *ejSQE2* and accumulation of UA with any treatment longer than 24 h at 15 °C. This study reveals the gene sequences and expression characteristics of *SQEs* under stress temperature, and provides the foundations for the further researches on UA regulatory mechanisms in loquat cell suspension cultures.

Keywords Cell suspension of *Eriobotrya japonica* L., Ursolic acid (UA), Squalene epoxidase genes (*SQEs*), Temperature stress

熊果酸(ursolic acid, UA)是一种五环三萜类化合物,具有消炎、抗菌、抗癌(Yu et al., 2010)、抗抑郁(Machado et al., 2009)、抗氧化(Tsai, Yin, 2008)、治疗糖尿病(赵云生等, 2009)、保护神经(Lu et al., 2007)等广泛的生物活性,是高价值的天然药物,主要存在于枇杷叶,女贞(*Ligustrum lucidum* L.)叶,夏枯草(*Prunella vulgaris* L.)等植物中(相延英, 杨光, 2004)。目前对 UA 等五环三萜类化合物的生物合成途径有一定的了解,整个代谢途径涉及众多酶促反应,其中鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, *SQE*, (E.C.)1.14.99.7)是五环三萜生物合成途径中的限速酶之一,催化鲨烯(squalene, SQ)在 C=C 之间插入一个氧原子形成 2,3-环氧鲨烯,其是三萜类、固醇类和甾醇类等萜类的共同前体(赵云生等, 2009; 陈建, 赵德刚, 2005)。*SQE* 是一种细胞膜结合酶,在植物中的 *SQE* 是一个小的多基因家族,苜蓿(*Medicago sativa* L.)中已报道 2 个(Suzuki et al., 2002),人参(*Panax ginseng* L.)中有 3 个(Choi et al., 2005),家族各成员表达具有时空差异性,且在苜蓿三萜类化合物及人参皂苷合成途径中起着极其重要的作用。鉴于 *SQE* 的表达以及 *SQE* 含量活性对萜类化合物产量的重要性,在其他药用植物,如刺五加(*Acanthopanax senticosus*)(邢朝斌等, 2012)、三七(*Panax notoginseng*)(牛云云等, 2013)、绞股兰(*Gynostemma pentaphyllum*)(蒋军富等, 2010)也有关于 *SQE* 基因的克隆及表达分析,但是枇杷中有关 *SQE* 基因的研究未见报道。

UA 在生产上多以成熟枇杷叶为原料(用有机溶剂提取),存在费时、费力、成本高等局限性,难以满足市场需求,利用栽培措施大幅度提高产量难度很大。通过植物细胞悬浮培养生产次生代谢产物

是目前天然产物生产中重要的技术路线(Georgiev et al., 2009; Jang et al., 2009; Mustafa et al., 2011)。研究表明,优化后的温度处理对悬浮培养的生物量及次生物质的累积是经济有效的(赵微等, 2013; 周权男等, 2013)。

本研究拟在已有的枇杷细胞悬浮培养提取熊果酸的初步调控基础上(李惠华等, 2013),研究温度胁迫对其生物量及次生物质累积的影响;开展 UA 合成途径中 *SQEs* 的表达特性研究。通过 RT-PCR 结合 RACE 法分离克隆 *SQEs*,以优化好的枇杷细胞悬浮培养体系为材料,进行低温和高温胁迫处理,寻找 UA 含量高的胁迫处理;继而分析 *SQEs* 基因在最适胁迫温度处理下的差异表达,并将 *SQEs* 基因的表达量与 UA 的含量建立联系。以期对今后枇杷悬浮细胞 UA 的合成机制的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用的悬浮细胞系建立自枇杷(*Eriobotrya japonica* L.)品种早钟 6 号幼胚中诱导的愈伤组织,由福建省亚热带植物研究所诱导并长期保存。本研究以枇杷悬浮培养细胞为基因克隆的材料。

1.2 鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, *SQE*)基因全长克隆

基因克隆采用 RT-PCR 结合 RACE 的方法。总 RNA 提取采用北京天恩泽公司的柱式植物 RNAOUT 2.0,参考试剂盒说明书提取;保守区及 3'RACE 采用 Fermentas 公司(加拿大)RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit,保守区扩增的 cD-

NA模板采用Oligo(dt)18进行逆转录,3'RACE的cDNA模板以AP(表1)为逆转录引物,3'RACE巢式PCR两轮的接头引物采用AUAP(表1),具体方法参见说明书;5'RACE采用TaKaRa公司(日本)的SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit,以其中NUP-long(表1)为逆转录引物,巢式PCR两轮的接头引物采用NUP-short(表1),具体参见说明书。

检索GenBank上已登录的多种植物SQEmRNA或cDNA序列,采用DNAMAN6.0软件进行多重比对,在同源性最高的区域设计保守区正反向引物;根据保守区扩增目的片段的测序结果设计3'RACE巢式PCR的第一轮正向引物以及在其内侧设计PCR第二轮正向引物,分别与试剂盒反向引物AUAP组合进行巢式PCR扩增;根据保守区扩增目的片段的测序结果设计5'RACE巢式PCR的第一轮反向引物以及在其内侧设计PCR第二轮反向引物,分别与试剂盒正向引物NUP-short组合进行巢式PCR扩增,巢式PCR第一轮产物做10~100倍稀释作第二轮扩增的模板,具体步骤参见试剂盒说明书;根据保守区扩增测序、3'RACE扩增测序、5'RACE扩增测序结果,采用DNAMAN6.0软件进行序列拼接,在拼接获得的cDNA全长序列起始密码子处和终止密码子处设计一对引物,用于扩增SQE的开放阅读框(open reading frame, ORF)。引物均委托深圳华大基因科技服务有限公司合成,PCR反应中涉及的引物序列见表1。

PCR扩增体系(25 μL): 10×PCR Buffer(含Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP Mix(2.5 mmol/L) 2 μL, cDNA模板 2 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, EX Taq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, H₂O 16.3 μL。PCR扩增程序: 94℃预变性 2 min; 94℃变性 1 min、退火 1 min、72℃延伸, 35个循环; 72℃延伸 10 min; PCR扩增引物、退火温度、延伸时间具体见表2。PCR扩增后经琼脂糖电泳检测目的片段采用TaKaRa公司(日本)DNA快速纯化回收试剂盒回收,自制大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α感受态细胞,以TaKaRa公司(日本)的pMD-18T为载体对回收片段转化和克隆,阳性克隆子送深圳华大基因科技服务有限公司测序完成。

1.3 SQE基因序列分析

采用BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

进行SQEs基因片段的核酸序列和氨基酸序列在线比对,用DNAMAN6.0软件对克隆得到的SQEs序列进行ORF预测及氨基酸序列的推导,序列的拼接及比对。

1.4 枇杷细胞悬浮培养的温度胁迫处理

在25℃枇杷细胞悬浮培养的对数生长期中后期设置低温15℃及高温35℃处理,分别在距离第12天收获点96、72、48、24和12h取样放置于15或35℃处理,同等条件下25℃培养为对照。具体的培养环境及参数为:接种量6 g/100 mL Murashige and Skoog(MS)培养液, pH 6.0,蔗糖浓度30 g/L,温度25/15/35℃,白炽灯400 Lux,往复式摇床转速130 r/min,装液量100 mL/250 mL三角锥瓶,MS培养液中添加萘乙酸(α -naphthaleneacetic acid, NAA) 0.5 mg/L,培养时间为12 d,每个处理设3次生物学重复。培养条件及温度设计经预实验确定。培养起始材料在适合的灭菌容器中充分混匀,用枪头吸取适量体积的混合材料加入到培养液中,细胞状态和细胞鲜重是一致的。

统计鲜重干重并测量熊果酸(ursolic acid, UA)含量,设3次技术性重复。培养材料过滤收集,并

表1 PCR反应中涉及的引物序列

Table 1 Primers used in PCR assays

引物 Primer	序列(5'~3') Sequence
P1-F	AGTTAATTGAATTGGGACTTGAAGATTGT
P2-R	ACCAAGCTCAACGGACGGGGGTTTAAAG
P3-F	ATCATTCTACACACTTCGCAAGCCTG
P4-F	TCTATGGAGTAGGTCGCTTAATGATT
P5-R	CCGACGAAGCAAGAAGGATTG
P6-R	GCTGTAGCCCTTTCACGCAT
P7-F	ATGATCATCAACACCACTCTCAGCGG
P8-R	TCATTGAAGAGGAGGAGCTCTGTAATA
P9-F	GGCAACCTAAATGATCCATCTAC
P10-F	GGATTGGAGCCAGATTAATTCTA
P11-R	CAAAGGGCGAGGGTTCAATC
P12-R	TCAACCAGACAGCGAACCTCT
P13-F	ATGGCGATCAGTACTTGCTC
P14-R	TCAATTTACGCAATCTACGGTCT
NUP-long	CTAATACGACTCACTATAGGCAAGCAGTGGTATCAACGAGAGT
NUP-short	AAGCAGTGGTATCAACGAGAGT
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

用滤纸吸干水份,测定鲜重。测量完鲜重的细胞于 50 ℃烘箱干燥至恒重,测定干重。UA 含量的测定采用 95%的乙醇超声提取及高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测, UA 标样购自中国食品药品检定研究院,批号 110742-201220。

1.5 温度胁迫处理下枇杷 *SQEs* 基因的表达

枇杷细胞悬浮培养系中 *SQEs* 基因在 1.3 中筛选到的适宜胁迫温度处理下进行 qRT-PCR 反应,5 个取样点进行 3 次生物学重复取混合样,进行 3 次技术性重复。

采用 1.2 中试剂盒提取样本总 RNA,根据 Ta-kara 公司(日本)PrimerScript 逆转录酶说明书进行逆转录合成单链 cDNA,将单链 cDNA 稀释 10 倍,2 μL 为模板,以泛素酶基因(ubiquitin enzymes, *UBQ*)为内参基因,用于 qRT-PCR 分析,内参引物的设计参考苹果(*Malus domestica*)(GenBank 登录号:

MDU74358),目的基因引物设计选择两个基因差异最大的区域,引物序列见表 3,采用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 反应。qRT-PCR 反应体系(20 μL):2×SYBR Power Ex-*Taq* buffer 10 μL,正反引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, cDNA 0.5 μL,补 ddH₂O 到 20 μL。qRT-PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 30 s,40 个循环。反应结束后进行扩增曲线、溶解曲线(60~95 ℃)分析,检测其特异性,每个反应包括 3 个重复并且设置不加模板的阴性对照。

相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001)法计算。其中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{gene}}} - C_{t_{\text{UBQ}}})_{\text{处理}} - (C_{t_{\text{gene}}} - C_{t_{\text{UBQ}}})_{\text{对照}}$ 。

1.6 数据分析

采用 SPSS18 软件进行方差分析,实验数据采用邓肯新复极差法(Duncan's multiple-range method),表示为 3 次重复的平均值±标准差。采用 SPSS 18 软件进行双变量相关性分析。

表 2 PCR 反应条件
Table2 PCR condition

扩增的目的片段 Amplification of fragment	引物 Primer	Tm/℃	退火时间/s Annealing time
枇杷 <i>SQEs</i> 保守区 Conserved region of <i>SQEs</i> from loquat	P1-F, P2-R	52.0	72
枇杷 <i>SQE1</i> 的 3'RACE 3'RACE of <i>SQE1</i> from loquat	第一轮 P3-F 和 AUAP The first round of amplification P3-F and AUAP 第二轮 P4-F 和 AUAP The second round of amplification P4-F and AUAP	55.7 52.6	60 40
枇杷 <i>SQE1</i> 的 5'RACE 5'RACE of <i>SQE1</i> from loquat	第一轮 P5-R 和 NUP- short The first round of amplification P5-R and AUAP 第二轮 P6-R 和 NUP-short The second round of amplification P6-R and AUAP	52.8 52.5	60 50
枇杷 <i>SQE1</i> 的开放阅读框(ORF) Open reading frame(ORF) of <i>SQE1</i> from loquat	P7-F, P8-R	57.0	90
枇杷 <i>SQE2</i> 的 3'RACE 3'RACE of <i>SQE2</i> from loquat	第一轮 P9-F 和 AUAP The first round of amplification P9-F and AUAP 第二轮 P10-F 和 AUAP The second round of amplification P10-F and AUAP	56.5 56.5	60 40
枇杷 <i>SQE2</i> 的 5'RACE 5'RACE of <i>SQE2</i> from loquat	第一轮 P11-R 和 NUP- short The first round of amplification P11-R and AUAP 第二轮 P12-R 和 NUP-short The second round of amplification P12-R and AUAP	52.5 52.8	110 70
枇杷 <i>SQE2</i> 的 ORF ORF of <i>SQE2</i> from loquat	P13-F, P14-R	52.8	100

2 结果与分析

2.1 枇杷SQEs基因全长cDNA序列的获得

以提取的总RNA直接反转录获得的cDNA为模板,P1和P2为引物进行PCR扩增,获得约1200 bp的单一片段(图1),测序后得到两条不同的核酸序列(标记为片段1和片段2),片段1和片段2核酸序列间只有72%的同源性,片段1与杨树(*Populus trichocarpa*)SQE(GenBank 登录号: XM_006383488.1)核酸序列有83%的同源性,片段2与拟

南芥(*Arabidopsis thaliana*)SQE2(GenBank 登录号: NM_127848.3)核酸序列有72%的同源性,初步推断这两条序列分别是枇杷SQEs的不同家族成员的保守区。

在保守区序列的基础上,进行3'RACE,经过巢式PCR,分别获得约500 bp的单一片段,经克隆测序分析为SQE1 470 bp(图1),与保守区片段1重叠片段为194 bp,SQE2 466 bp(图1),与保守区片段2重叠片段为83 bp。

在保守区序列的基础上,进行5'RACE,经过巢式PCR,分别获得约750和1 000 bp的单一DNA片

表3 qRT-PCR反应中涉及的引物序列

Table 3 Primers used in qRT-PCR

引物 Primer	序列(5'~3') Sequence	用途 Purpose
Ej-SQE1 F	AGCATATTACAGAGCTCCTCCTC	qRT-PCR for <i>ejSQE1</i>
Ej-SQE1 R	TACAGCATTAACCACTCACCGTG	
Ej-SQE2 F	CTGTCTTAAGTGAGAAGCAGATG	qRT-PCR for <i>ejSQE2</i>
Ej-SQE2 R	CCTCAACTTCTAATGAGGAATG	
UBQ-F	CTCCGTGGTGGTTTTTAAGT	qRT-PCR for <i>UBQ</i> as reference gene
UBQ-R	GGAGGCAGAAACAGTACCAT	

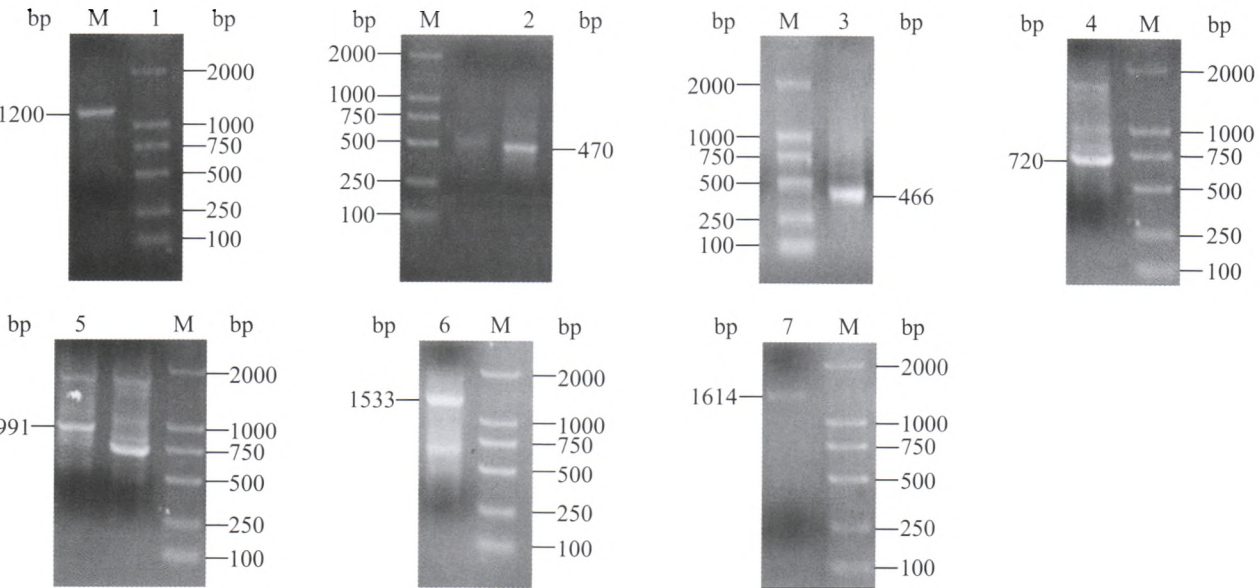


图1 *ejSQE1*和*ejSQE2*基因PCR扩增的琼脂糖电泳结果

Figure 1 PCR results of *ejSQE1* and *ejSQE2* gene with agarose gel electrophoresis

M: DNA ladder marker 2000; 1: 保守区扩增; 2: *ejSQE1* 基因的3'RACE第二轮扩增; 3: *ejSQE2* 基因的3'RACE第二轮扩增; 4: *ejSQE1* 基因的5'RACE第二轮扩增; 5: *ejSQE2* 基因的5'RACE第二轮扩增; 6: *ejSQE1* 基因的ORF扩增; 7: *ejSQE2* 基因的ORF扩增

M: DNA ladder marker 2000; 1: Amplification of conserved sequence; 2: The second PCR amplification of *ejSQE1* 3'RACE; 3: The second PCR amplification of *ejSQE2* 3'RACE; 4: The second PCR amplification of *ejSQE1* 5'RACE; 5: The second PCR amplification of *ejSQE2* 5'RACE; 6: PCR amplification of *ejSQE1* ORF; 7: PCR amplification of *ejSQE2* ORF

段,经克隆测序分析为*SQE1* 720 bp(图1),与保守区片段1重叠片段为133 bp,*SQE2* 991 bp(图1),与保守区片段2重叠片段为509 bp。

在以上基础上进行 ORF 的扩增, 利用引物 P7 和 P8 经 PCR 获得 1 500 bp 单一 DNA 片段, 利用引物 P13 和 P14 经 PCR 获得 1 600 bp 单一 DNA 片段, 测序序列分别为 1 533 和 1 614 bp(图 1), 均与相应拼接序列一致, 进一步验证了拼接序列的正确。

将3次扩增结果进行序列拼接,得到的基因分别命名为*ejSQE1*和*ejSQE2*,其中*ejSQE1*全长2 068 bp, GenBank 登录号为JQ294053.2, 5'非编码区为244 bp, 3'非编码区为290 bp, 3' poly(A)尾长17 bp, ORF为1 533 bp; *ejSQE2*全长2 065 bp, GenBank 登录号为JQ294054.2, 5'非编码区为149 bp, 3'非编码区为302 bp, 3' poly(A)尾长5 bp, ORF为1 614 bp。 *ejSQE1*和*ejSQE2*全长核酸序列的同源性只有58.58%。 *ejSQE1*和*ejSQE2*核酸序列的开放阅读框的同源性为66.52%, *ejSQE2*在起始密码子之后40 bp和终止密码子之前37 bp与*ejSQE1*序列差异最大。经DNAMAN6.0软件比对, *ejSQE1*和*ejSQE2*氨基酸序列的相似度为69.89%, 在序列的头尾相差最大, 其Clustal format结果见图2。

2.3 温度胁迫处理对枇杷细胞悬浮系的生长及UA累积的影响

在枇杷细胞悬浮培养的对数生长期中后期设置 35 ℃ 及 15 ℃ 温度胁迫, 25 ℃ 培养为对照。培养起始材料状态和重量是一致的, 枇杷细胞悬浮系中细胞的生长情况及 UA 的含量见表 4。15 和 35 ℃ 处理以及 25 ℃ 对照培养, 各时间点收获值均显著高于起始值 ($P < 0.05$)。15 及 35 ℃ 不同时间处理下, 细胞的鲜重及干重都低于对照 25 ℃, 但 UA 的含量均高于对照, 其中 15 ℃ 处理对 UA 累积的效果最佳, 是对照的 2.5~3.8 倍, 35 ℃ 处理下 UA 的含量是对照的 1.49~2.53 倍。15 ℃ 胁迫最佳处理时间是 48 h, 此时细胞的鲜重干重及 UA 含量都是 15 ℃ 处理中最高值, 35 ℃ 胁迫 UA 含量的峰值出现在 12 h 处理取样点, 但综合考虑细胞的生长及 UA 的含量, 35 ℃ 胁迫最佳处理时间是 48 h, 此时 UA 收获的总量更高(细胞干重×单位重量 UA 的含量)。25 ℃ 对照表明距离收获 96、72 和 48 h 的取样点处于对数生长期, 距离收获 24 及 12 h 处于平台期, 细胞的鲜重及干重逐渐降低, 15 及 35 ℃ 胁迫最佳处理时间(48 h)是处于对数生长期末期。

```
ejsQE1 -----MIINTLSGEKKVVEKSVSGNGVNVGYWMPSSQNGNFPQEIASG-----TDVVIVGAGVAGAALAYTLAKDGRR
ejsQE2 MADQYLLGWIFATVLGAVFLCRALARNCERGRALMEKERSECVKSMVMSGECRSTDGDVDVIIVGAGVAGAALHTLGKDGR
      * . * . . . . . * . ** ,***** ** *****
ejsQE1 VHVIERDLSEPDRIVGELLQPGGYLKLIELGLEDCANESIDAQKVFGYALKYDGNDTKLSYPLENYPSDIAGRSHFNGRFIQMR
ejsQE2 VHVIERDLTEPDRIVGELLQPGGYLKLIELGLEDCV-EQIDAQRVFGYALFKDGKNTRLSPLEKFHSDVSGRSFHNGRFIQMR
***** ,***** * **** ,**** ,** * ,***** , **, ***** ,**
ejsQE1 ERATALINVTLQGTVTNLIEEKGTVKGVMYKNKAGEEMRSYAPLTIVCDGCFSNLRRLSTPKVDNPSCFVGLILENCELPHAN
ejsQE2 EKAATLPNVQLQGTVTSLEEKGTIKGVQYKTGTEMTAYAPLTIVCDGCFSNLRSLCPKVDVPSCFVGLVLECNCLPHAN
*,*., * ***** *,**** ,*** **,*, **** ,***** ,*, **** ***** ,*** *****
ejsQE1 HGHVILGDPSPILFYPIISGTEVRCLVDVPGTKVPSVANGEMAKYLMTVALSDIVLLRDLRLPLTDLNADPALCEYLESFYTLRKP
ejsQE2 HGHVILADPSPILFYKISSTEVRCLVDVPGQKIPSISNGEMAKYLMTVALSDIVLLRNLLRPLGNLNDPSTLSKYLESFYTLRKP
***** ***** ** ***** *,*., ***** ,** ***** *** ,*, *****
ejsQE1 VSSTINTLAGALYKVFCA SPDPARKEMREACFDYLSLGGICARGPISLLSGLNRPRIHLFLHFFAVAVYGVRMLIPFTPKRWW
ejsQE2 VASTINTLAGALYKVFSSPDQARKEMRQACFGYLSLGGVFSTGPVSLLSGLNRPRLSLVLHFFAVAVYGVRLLLFPSPKRAW
*,***** ,** ***** ,*** ***** , **,***** , ***** ,*** ,** *
ejsQE1 LGTRLLLGASGIIFPIIKEGEVQMFFPATIPAYYRAPPLQ-----
ejsQE2 IGARLISSASGIIFPIIAEGVRQMFFPATVPAYYRAVLSEKQMKKTVDVCVN
*,* ,***** ***** *
```

图2 ejSOE1和ejSQE2序列比对分析

Figure 2 Analysis of ejSQE1 and ejSQE2 sequence

*: 残基相同; •: 残基是保守的

*: The same residues; •: Conserved residues

表4 不同温度下枇杷悬浮细胞的生长情况及 UA 含量

Table 4 UA content and cells growth in cell suspending-culture of loquat at different temperatures

<i>T</i> /℃	取样时间/h Sampling time	UA 含量/(mg·g ⁻¹ DW) UA content	鲜重(FW)/g Fresh weight	干重(DW)/g Dry weight
15	起始值 Starting value	6.78±0.0200 o	6.03±0.1500 k	0.53±0.0200 k
	96	25.16±0.2100 c	12.30±0.0960 h	1.15±0.0320 gh
	72	25.65±0.1800 b	13.05±0.1500 e	1.18±0.0056 fg
	48	26.45±0.0250 a	13.36±0.0320 d	1.20±0.0100 ef
	24	21.45±0.0450 d	12.78±0.0100 f	1.16±0.0100 gh
	12	19.44±0.0100 g	12.10±0.0100 h	1.08±0.0100 i
35	起始值 Starting value	6.78±0.0200 o	6.03±0.1500 k	0.53±0.0200 k
	96	18.18±0.0150 i	11.07±0.0150 i	1.02±0.0100 j
	72	15.26±0.0200 j	12.27±0.0150 h	1.14±0.0100 h
	48	19.93±0.0058 f	13.75±0.0100 c	1.27±0.0250 c
	24	18.72±0.0120 h	11.12±0.0100 i	1.16±0.0210 gh
	12	20.73±0.0150 e	10.53±0.0057 j	1.05±0.0100 ij
25	起始值 Starting value	6.78±0.0200 o	6.03±0.1500 k	0.53±0.0200 k
	96	12.27±0.1000 k	12.44±0.0510 g	1.23±0.0260 cde
	72	6.95±0.0250 n	13.30±0.1100 d	1.32±0.0210 b
	48	7.86±0.0100 m	15.30±0.1000 a	1.44±0.0150 a
	24	7.86±0.0860 m	14.21±0.1300 b	1.25±0.0500 cd
	12	9.27±0.0550 l	14.12±0.1600 b	1.23±0.0060 de

取样时间是距离最后收获点(第12天)的时间。同列标有不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。对照: 25 ℃
Sampling time was from the last harvest time(The 12th day). Different lowercase letters in the same columns indicate significant difference between groups ($P<0.05$). Control: 25 ℃

另外, 12 d 收获时, 35 ℃ 处理细胞均呈现出深褐色, 25 ℃ 处理细胞呈现出灰色, 15 ℃ 处理的细胞呈现浅灰色, 从细胞状态外观上表明 15 ℃ 处理并未对细胞造成很大的伤害, 而 35 ℃ 处理对细胞有较大伤害。综上, 枇杷悬浮细胞培养体系在距离收获时间 48 h 进行 15 ℃ 温度胁迫处理有利于目标产物 UA 的生成。

2.4 在 15 ℃ 胁迫处理下枇杷悬浮细胞中 *ejSQE1* 与 *ejSQE2* 基因的差异表达

15 ℃ 胁迫处理逐渐接近收获时间, 伴随着枇杷悬浮细胞进入到对数生长期的后末期及细胞生长的平台期, 以 5 个取样点两个基因共 10 组数据进行差异显著性分析, 结果如图 3 所示。枇杷悬浮细胞中 *ejSQE1* 与 *ejSQE2* 基因呈现出差异表达, 在距离收获 72、24 和 12 h, 两个基因的表达量差异不显著, 在距离收获 96 和 48 h, 两个基因的表达量有显著性差异($P<0.05$); 距离收获较长时的处理(96 h), *ejSQE2* 基因表达量是 *ejSQE1* 基因的 1.31 倍。

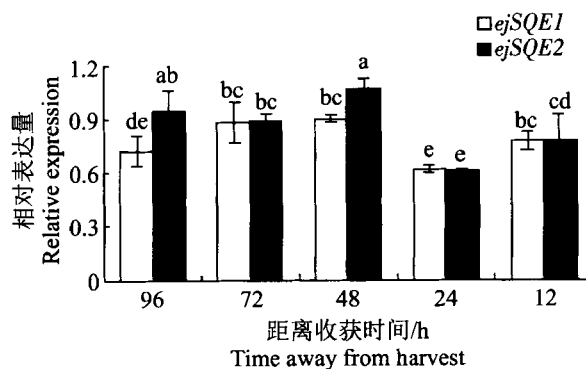


图3 15 ℃ 处理枇杷悬浮细胞 *ejSQE1* 与 *ejSQE2* 基因的表达水平

Figure 3 *ejSQE1* and *ejSQE2* expressions in cell suspending culture of loquat under 15 ℃

不同小写字母表示同一基因组间差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters indicated significant differences between different groups of the same genes ($P<0.05$)

ejSQE2 基因相对于 *ejSQE1* 基因表达变化更为剧烈, 总体呈现下降上升下降上升的波形变化, 其峰值出现在枇杷悬浮细胞生长对数期的末期(距离收

获48 h);*ejSQE1* 基因表达变化较为缓和,总体呈现上升下降再上升的变化。在距离收获72、48和12 h,*ejSQE1* 基因表达量无显著性差异。*ejSQE1* 与*ejSQE2* 基因的谷值均出现在枇杷悬浮细胞生长的平台期初期(24 h)。

2.5 15℃胁迫处理下枇杷悬浮细胞中*ejSQEs* 基因表达与UA含量的相关性

15℃胁迫处理逐渐接近收获时间伴随着枇杷悬浮细胞进入到对数生长期的后末期及细胞生长的平台期,枇杷UA合成途径中*SQEs*与目标产物UA含量的相互联系如图4所示。15℃胁迫下,在最佳距离收获48 h时(枇杷悬浮细胞生长对数期的末期),*SQEs*(*ejSQE1*和*ejSQE2*基因表达量之和)和*ejSQE2* 基因的表达量以及UA累积均出现峰值;在距离收获24 h,三者均出现最大降幅,此时是枇杷

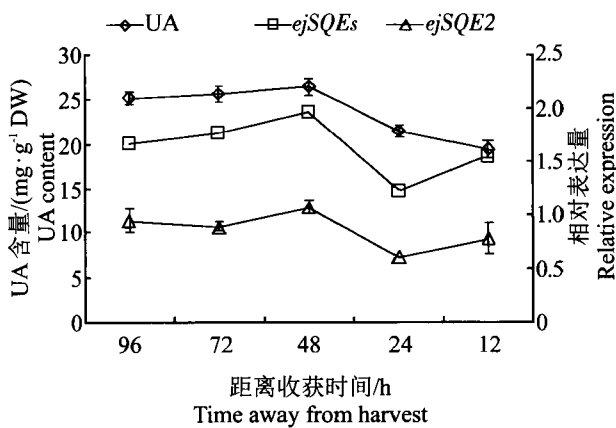


图4 15℃胁迫处理下枇杷悬浮细胞中*ejSQEs* 基因表达与UA含量的动态变化

Figure 4 Dynamic change of *ejSQEs* expressions and UA content in loquant cell suspending culture under 15℃

悬浮细胞生长的平台期初期,细胞由生长迅速的对数生长期转入到生长放缓的平台期,*SQEs* 基因的表达量及UA的含量也明显出现转折点。

采用SPSS18软件对15℃胁迫处理下*ejSQEs* 基因表达与UA含量的相关性进行分析,结果见表5。如表5所示,在n=5时(所有的处理),*ejSQE1*、*ejSQE2* 以及*ejSQEs* 表达量与UA含量均没有显著相关性,且*ejSQE2* 表达量与UA含量的相关系数>*ejSQEs* 表达量与UA含量的相关系数>*ejSQE1* 表达量与UA含量的相关系数。但当n=4时(前4个处理点,即15℃下距离收获大于等于24 h的处理),4组数据中相关性为:UA的含量与*ejSQE2* 的表达量显著正相关($P<0.05$),相关系数为0.960;UA的含量与*ejSQEs* 的表达量极显著正相关($P<0.01$),相关系数为0.992。因此,枇杷细胞悬浮系中三萜类化合物UA的含量与*SQEs* 基因的表达量关系密切。

3 讨论

3.1 枇杷细胞悬浮系是枇杷基因克隆良好的实验材料

本研究采用枇杷细胞悬浮培养物作为基因克隆的实验材料,采用普通试剂盒操作,在核酸提取上及分子生物学操作上较枇杷植株其他材料更加便捷高效,这在龙眼的胚性愈伤组织中也有相似的报告(李惠华等,2010)。并且以同源克隆的方法分离得到了*ejSQE1*与*ejSQE2* 全长mRNA序列,两者在氨基酸序列的相似度仅为69.89%,说明在模板中*SQEs* 基因的表达具有一定的丰度和完整度。枇杷细胞悬浮培养系可能可以作为枇杷基因工程良好的研究体系。

表5 *ejSQEs* 基因表达量与UA含量的相关性

Table 5 Correlation analysis between expression of *ejSQEs* gene and UA content

不同处理 Different treatments	与UA含量的相关系数 Correlation coefficient with UA Content		
	<i>ejSQE1</i> 表达量 Expression of <i>ejSQE1</i>	<i>ejSQE2</i> 表达量 Expression of <i>ejSQE2</i>	<i>ejSQEs</i> 表达量 Expression of <i>ejSQEs</i>
n=5, 所有处理 n=5, All treatments	0.228	0.753	0.586
n=4, 距离收获大于等于24 h的处理 n=4, Treatment time away from harvest≥24 h	0.925	0.960*	0.992**

*: 在 $P<0.05$ 水平(双侧)上显著相关, **: 在 $P<0.01$ 水平(双侧)上极显著相关。

*: Significant correlation at $P<0.05$ (bilateral), **: Extremely significant correlation at $P<0.01$ (bilateral)

3.2 枇杷悬浮细胞中 *ejSQEs* 基因的差异性表达及其与 UA 含量的相互关系

Suzuki 等(2002)分离出苜蓿 *SQE1* 和 *SQE2*, 两者的氨基酸序列的同源性为 82.1%, 基因功能研究表明两者均参与了甾醇生物合成, 但茉莉酸甲酯处理苜蓿悬浮细胞后, 其 *SQE1* 和 *SQE2* mRNA 差异表达, *SQE1* 未被诱导, *SQE2* 表达显著上调, 两者可能行使不同的功能。在本研究中, 15 °C 胁迫不同处理时间的枇杷悬浮细胞中的 *ejSQE1* 与 *ejSQE2* 基因同样呈现出差异表达, 距离收获较长的处理时间(96, 72 和 48 h), 15 与 25 °C 对照细胞的鲜重处于上升趋势, 此时细胞仍处于对数生长期的后末期, *ejSQE2* 的表达占主导地位, 距离收获较短的处理时间(24 和 12 h), 15 与 25 °C 对照细胞的鲜重处于下降趋势, 此时细胞处于平台期, *ejSQE1* 的表达占主导地位。 *ejSQE1* 与 *ejSQE2* 的氨基酸序列同源性较低, 仅为 69.89%, 两者在枇杷细胞悬浮培养 UA 调控中可能存在不同的分工, *ejSQE2* 基因可能与较长时间的胁迫以及细胞的生长关系更密切, *ejSQE1* 与较短时间的胁迫及细胞的衰老凋亡关系更密切。这为今后的枇杷悬浮细胞中 *ejSQEs* 不同功能研究提供参考资料。

Suzuki 等(2002)研究表明茉莉酸甲酯处理后, 三萜类化合物合成途径中鲨烯合酶基因(squalene synthase, *SQS*)(位于 *SQE* 基因的上游)、*SQE2*、 β -香树脂醇合成酶基因(β -amyrin synthase, β -AS)(位于 *SQE* 基因的下游)的显著上调表达与三萜类化合物的含量呈正相关, 但 *SQEs* 家族的另一成员——*SQE1* 并不与之有相关性。蒋世翠等(2011)也发现人参皂苷合成途径中 *SQS* 和 *SQE* 基因在 14 个组织器官中的表达量具有显著差异并与人参皂苷 Re、Rg1、Rb1、Rd 和总皂苷量之间有显著正相关关系。*SQS* 和 *SQE* 基因在人参皂苷合成途径中起着极其重要的作用。本研究中 15 °C 下距离收获大于等于 24 h 的处理中, *SQEs* 基因的动态表达趋势以及 *ejSQE2* 基因的表达量与 UA 累积的变化趋势基本一致, 呈现出显著正相关。由此可见, 枇杷 *SQEs* 与三萜类化合物 UA 的关系密切。但在距离收获 12 h, 此时细胞处于生长的平台期, *SQEs* 基因的动态表达趋势与 UA 累积的变化趋势并不一致, *SQEs* 基因表达量是前一个处理点距离收获 24 h 的 1.36 倍, 而 UA 是前一个处理点距离收获 24 h 的 0.89 倍。

SQEs 是五环三萜化合物 UA 合成途径中限速酶之一, 催化 SQ 形成的产物 2,3-环氧鲨烯是三萜类、胆固醇类、甾醇类等烯萜类的共同前体, 有可能是处于合成途径上游的 *SQEs* 表达后用于非三萜类的分支——胆固醇类、甾醇类的合成, 或者 *SQEs* 表达后用于非 UA 的三萜类的分支——齐墩果酸、科罗索酸、山楂酸等(具有相似结构的其他三萜化合物)。另外, UA 在植物中主要以游离态或者以糖苷化合物存在(陈武等, 2001), 也有可能此时处于细胞生长的平台期, 细胞进入衰老状态, 合成的一部分 UA 以化合态形式进行储存。综上, 枇杷中 UA 的合成途径涉及多个酶促反应, 需要从更多关键性基因入手, 寻找合成途径中上下游基因表达的相互关联性, 才能更清晰地揭示其调控机理。

3.3 15 °C 适时处理是枇杷悬浮细胞生产 UA 有效经济方式之一

自然条件下, 植物体内很多次生代谢产物含量很低, 但在外界环境胁迫下能大量积累(蒋妮等, 2012; 王丹等, 2008)。在外界环境中, 枇杷的种植温度条件一般为高于 15 °C 和低于 35 °C(许丽群, 2013; 叶丽珣, 夏起洲, 1980)。本研究利用最高和最低的临界温度胁迫处理枇杷悬浮细胞, 以期有可能促进某些代谢产物的合成。在枇杷悬浮细胞的对数生长期的末期进行 15 °C 低温处理 48 h, 此时细胞的生长量与 UA 的累积量都到达处理的峰值, 虽 15 °C 低温处理细胞的生长量低于 25 °C 对照, 但此时收获的 UA 的总含量最高。与其他理化措施相比, 15 °C 适时处理易操作、环保, 对于今后利用生物发酵罐大规模生产枇杷悬浮细胞以提取 UA 也是有效经济的方式之一。

4 结论

本研究采用 RT-PCR 结合 RACE 的方法, 首次在枇杷中克隆得到鲨烯环氧酶基因的两个成员——*ejSQE1* 和 *ejSQE2* 基因, 两者氨基酸序列的相似性为 69.89%, 在低温 15 °C 处理下呈差异性表达。低温 15 °C 及高温 35 °C 能增加枇杷悬浮细胞系 UA 产量, 15 °C 处理距离收获 48 h 的总目标产物 UA 含量最高。15 °C 处理下距离收获 ≥ 24 h 的处理, 枇杷悬浮细胞中 *SQEs* 基因以及 *ejSQE2* 基因与 UA 的含量呈现出显著正相关。研究结果为进一步研究枇杷悬浮细胞熊果酸的合成调控机制提供基础资料。

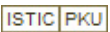
参考文献

- 陈武,熊筱娟,李开泉,等. 2001. 乌索酸治疗急性病毒性肝炎的临床研究[J]. 宜春医学学报, 13(1): 1-3. (Chen W, Xiong X J, Li K Q, et al. 2001. The clinical research on the treatment of acute virus hepatitis with ursolic acid [J]. Journal of Yichun Medical College, 13(1): 1-3.)
- 蒋军富,李雄英,吴耀生,等. 2010. 绞股蓝鲨烯环氧酶基因的克隆与序列分析[J]. 西北植物学报, 30(8): 1520-1526. (Jiang J F, Li X Y, Wu Y S, et al. 2010. Cloning and sequence analysis of squalene epoxidase gene from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica. 30(8): 1520-1526.)
- 蒋妮,覃柳燕,李力,等. 2012. 环境胁迫对药用植物次生代谢产物的影响[J]. 湖北农业科学, 51(8): 1528-1532. (Jiang N, Qin L Y, Li L, et al. 2012. Influence of environmental stress on medicinal plant secondary metabolites [J]. Hubei Agricultural Sciences, 51(8): 1528-1532.)
- 蒋世翠,刘伟灿,王义,等. 2011. 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, 42(03): 579-584. (Jiang S C, Liu W C, Wang Y, et al. 2011. Correlation between ginsenoside accumulation and SQS and SQE gene expression in different organs of panax quinquefolius [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 42(03): 579-584.)
- 李惠华,刘小英,王伟,等. 2013. 适合于悬浮培养的枇杷愈伤组织诱导及状态调控[J]. 亚热带植物科学, 42(4): 309-313. (Li H H, Liu X Y, Wang W, et al. 2013. Callus induction and state regulation in *Eriobotrya japonica* for suspension culture [J]. Subtropical Plant Science, 42(4): 309-313.)
- 李惠华,赖钟雄,林玉玲,等. 2010. 龙眼胚性愈伤组织ACC氧化酶基因的克隆及其在龙眼体胚发生过程中的表达分析[J]. 中国农业科学, 43(18): 3798-3808. (Li H H, Lai Z X, Lin Y L, et al. 2010. Cloning of ACC gene from embryogenic calli of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) and its expression during longan somatic embryogenesis [J]. Scientia Agricultura Sinica, 43(18): 3798-3808.)
- 陈建,赵德刚. 2005. 植物萜类生物合成相关酶类及其编码基因的研究进展[J]. 分子植物育种, 2 (6): 757-764. (Chen J, Zhao D G. 2005. Research advances on the enzymes and their coding gene involved in plant terpene biosynthesis [J]. Molecular Plant Breeding, 2(6): 757-764.)
- 牛云云,朱孝轩,罗红梅,等. 2013. 三萜皂苷合成生物学元件的初步开发: 三七鲨烯环氧酶编码基因克隆及表达模式分析[J]. 药学报, 48(2): 211-218. (Niu Y Y, Zhu X X, Luo H M, et al. 2013. Development of the devices for synthetic biology of triterpene saponins at an early stage: cloning and expression profiling of squalene epoxidase genes in *Panax notoginseng* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica. 48(2): 211-218.)
- 王丹,王振月,王宗权,等. 2008. 药用植物次生代谢产物生产途径的研究概述[J]. 中医药信息, 25(1): 29-32. (Wang D, Wang Z Y, Wang Z Q, et al. 2008. Brief on the progress of productive ways of the secondary metabolites in medicinal plants [J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 25(1): 29-32.)
- 相延英,杨光. 2004. 常用中药中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 24(5): 316-318. (Xiang Y Y, Yang G. 2004. Determination of the content of oleanolic acid and ursolic acid in chinese traditional drugs [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 24(5): 316-318.)
- 邢朝斌,曹蕾,陈龙,等. 2012. 刺五加鲨烯环氧酶基因cDNA的克隆及序列分析[J]. 中国中药杂志, 37(2): 172-175. (Xing Z B, Cao L, Chen L, et al. 2012. Cloning and sequence analysis on cDNA of squalene epoxidase gene in *Eleutherococcus senticosus* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 37(2): 172-175.)
- 许丽群. 2013. 枇杷栽培管理技术[J]. 北京农业, 11(33): 171-172. (Xu L Q. 2013. Cultivation and management techniques of loquat [J]. Beijing Agriculture, 11(33): 171-172.)
- 叶丽珣,夏起洲. 1980. 国内外枇杷栽培研究概况[J]. 中国果树, 12(4): 52-55. (Ye L X, Xia Q Z. 1980. Domestic and foreign loquat cultivation research survey [J]. China Fruits, 12(4): 52-55.)
- 赵微,尹静,詹亚光,等. 2013. 温度胁迫对白桦悬浮细胞中三萜积累及防御酶活性的影响[J]. 中国生物工程杂志, 33(2): 34-40. (Zhao W, Yin J, Zhan Y G, Ren C L, et al. 2013. Effects of temperature stress on the accumulating of triterpenes and defense enzyme activity in suspension cells of birch [J]. China Biotechnology, 33(2): 34-40.)
- 赵云生,万德光,陈新,等. 2009. 五环三萜皂苷生物合成与调控的研究进展[J]. 中草药, 40(2): 327-330. (Zhao Y S, Wan D G, Chen X, et al. 2009. Advances in studies on biosynthesis and regulation of pentacyclic triterpenoid saponin [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 40(2): 327-330.)
- 周权男,谢黎黎,黄天带,等. 2013. 温度和pH对农杆菌介导转化橡胶树悬浮细胞的影响[J]. 西北林学院学报, 28

- (3): 131-133.(Zhou Q N, Xie L L, Huang T D, et al. 2013. Effects of Co-culture medium pH and temperature on *Agrobacterium*-mediated transformation of hevea brasiliensis embryogenic cell suspension[J]. Journal of Northwest Forestry University. 28(3): 131-133.)
- Choi D W, Jung J, Im Ha Y, et al. 2005. 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 Reports, 23(8): 557-566.
- Georgiev M I, Weber J, Maciuk A. 2009. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 83(5): 809-823.
- Jang S M, Yee S T, Choi J, et al. 2009. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β -cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet[J]. International Immunopharmacology, 9(1): 113-119.
- Lu J, Zheng Y L, Wu D M, et al. 2007. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose [J]. Biochemical Pharmacology, 74(7): 1078-1090.
- Machado D G, Bettio L E, Cunha M P, et al. 2009. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 33(4): 642-650.
- Mustafa N R, de Winter W, van Iren F, et al. 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures[J]. Nature Protocols, 6(6): 715-742.
- Suzuki H, Achnine L, Xu R, et al. 2002. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*[J]. The Plant Journal, 32(6): 1033-1048.
- Tsai S J, Yin M C. 2008. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells[J]. Journal of Food Science, 73(7): 174-178.
- Yu Y X, Gu Z L, Yin J L, et al. 2010. Ursolic acid induces human hepatoma cell line SMMC-7721 apoptosis via p53-dependent pathway[J]. Chinese Medical Journal (English Edition), 123(14): 15-19.

(责任编辑 靳晓霞)

熊果酸(UA)含量的相关性

作者: [李惠华](#), [徐剑](#), [刘小英](#), [王伟](#), [常强](#), [苏明华](#), [LI Hui-Hua](#), [XU Jian](#), [LIU Xiao-Ying](#), [WANG Wei](#), [CHANG Qiang](#), [SU Ming-Hua](#)
作者单位: [福建省亚热带植物研究所, 厦门, 361006](#)
刊名: [农业生物技术学报](#) 
英文刊名: [Journal of Agricultural Biotechnology](#)
年, 卷(期): 2015, 23(4)

参考文献(25条)

1. [陈武;熊筱娟;李开泉](#) 乌索酸治疗急性病毒性肝炎的临床研究 2001(01)
2. [蒋军富,李雄英,吴耀生,罗育,周娟,赵瑞强](#) 绞股蓝鲨烯环氧酶基因的克隆与序列分析[期刊论文]-[西北植物学报](#) 2010(8)
3. [蒋妮,覃柳燕,李力,缪剑华](#) 环境胁迫对药用植物次生代谢产物的影响[期刊论文]-[湖北农业科学](#) 2012(8)
4. [蒋世翠,刘伟灿,王义,孙春玉,李校堃,张美萍](#) 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[期刊论文]-[中草药](#) 2011(3)
5. [李惠华,刘小英,王伟,常强,苏明华](#) 适合于悬浮培养的枇杷愈伤组织诱导及状态调控[期刊论文]-[亚热带植物科学](#) 2013(4)
6. [李惠华,赖钟雄,林玉玲,苏明华](#) 龙眼胚性愈伤组织ACC氧化酶基因的克隆及其在龙眼体胚发生过程中的表达分析[期刊论文]-[中国农业科学](#) 2010(18)
7. [陈建,赵德刚](#) 植物萜类生物合成相关酶类及其编码基因的研究进展[期刊论文]-[分子植物育种](#) 2004(6)
8. [牛云云,朱孝轩,罗红梅,孙超,黄林芳,陈士林](#) 三萜皂苷合成生物学元件的初步开发:三七鲨烯环氧酶编码基因克隆及表达模式分析[期刊论文]-[药学学报](#) 2013(2)
9. [王丹,王振月,王宗权,陈金铭](#) 药用植物次生代谢产物生产途径的研究概述[期刊论文]-[中医药信息](#) 2008(1)
10. [相延英,杨光](#) 常用中药中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[期刊论文]-[中国医院药学杂志](#) 2004(5)
11. [邢朝斌,曹蕾,陈龙,何闪,李宝财,朱金丽](#) 刺五加鲨烯环氧酶基因cDNA的克隆及序列分析[期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2012(2)
12. [许丽群](#) 枇杷栽培管理技术[期刊论文]-[北京农业](#) 2013(33)
13. [叶丽珣;夏起洲](#) 国内外枇杷栽培研究概况 1980(04)
14. [赵微,尹静,詹亚光,任春林,王艳,马泓思,苏欣](#) 温度胁迫对白桦悬浮细胞中三萜积累及防御酶活性的影响[期刊论文]-[中国生物工程杂志](#) 2013(2)
15. [赵云生,万德光,陈新,李占林,田洪岭](#) 五环三萜皂苷生物合成与调控的研究进展[期刊论文]-[中草药](#) 2009(2)
16. [周权男,谢黎黎,黄天带,华玉伟,孙爱花,黄华孙](#) 温度和pH对农杆菌介导转化橡胶树悬浮细胞的影响[期刊论文]-[西北林学院学报](#) 2013(3)
17. [Choi D W;Jung J;Im Ha Y](#) Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites 2005(08)
18. [Georgiev M I;Weber J;Maciuk A](#) Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds 2009(05)
19. [Jang S M;Yee S T;Choi J](#) Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β -cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a highfat diet 2009(01)
20. [Jun Lu;Yuan-Lin Zheng;Dong-Mei Wu;Lan Luo](#) Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose[外文期刊] 2007(7)
21. [Machado D G;Bettio L E;Cunha M P](#) Antidepressant-like effect of the extract of Rosmarinus officinalis in mice:Involvement of the monoaminergic system 2009(04)
22. [Mustafa N R;de Winter W;van Iren F](#) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures 2011(06)
23. [Suzuki H;Achnine L;Xu R;Matsuda SPT;Dixon RA](#) A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in Medicago truncatula[外文期刊] 2002(6)

24. [Tsai S J;Yin M C Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells](#)
2008(07)
25. [YU Yan-xia, GU Zhen-lun, YIN Jiang-lin, CHOU Wen-hsien, KWOK Chi-yi, QIN Zheng-hong, LIANG Zhong-qin Ursolic acid induces human hepatoma cell line SMMC-7721 apoptosis via p53-dependent pathway\[期刊论文\]-中华医学杂志（英文版）](#)
2010(14)

引用本文格式: [李惠华, 徐剑, 刘小英, 王伟, 常强, 苏明华, LI Hui-Hua, XU Jian, LIU Xiao-Ying, WANG Wei, CHANG Qiang, SU Ming-Hua 鲨烯环氧酶基因\(SQEs\)的克隆及其在温度胁迫下与枇杷悬浮培养细胞中熊果酸\(UA\)含量的相关性\[期刊论文\]-农业生物技术学报](#)
2015(4)