三七细胞中 *SS*、*DS* 共超表达对皂苷合成的影响

杨延，刘迪秋，葛锋，于钢

（昆明理工大学生命科学与技术学院，云南昆明 650500）

摘要：为研究三七细胞中 *SS*、*DS* 共超表达对皂苷合成的影响，构建了三七 *SS* 超表达载体，并以已超表达了 *DS* 的愈伤组织为侵染材料，借助农杆菌 LBA4404 将 *SS* 导入并整合到三七基因组中，采用 QRT-PCR 法检测转基因株系中 *SS*、*DS* 的表达水平，香草醛-冰醋酸-高氯酸显色法检测皂苷含量。结果显示：三株同时转 *SS*、*DS* 细胞系（T-4、T-5、T-9）中，SS 的相对表达量分别为仅转 *DS* 株系的 5.66、7.37、7.46 倍；*DS* 的相对表达量分别为仅转 *DS* 株系的 1.39、2、1.41 倍；总皂苷含量为仅转 DS 株系的 1.7 倍，普通细胞的 2.4 倍；5 种单体皂苷：R1、Rg1、Re、Rb1、Rd 含量总和分别为仅转 *DS* 株系的 1.33、1.61、1.71 倍，普通细胞的 5.62、6.81、7.26 倍；此外，Re 含量出现大幅增加，达到三七药材的 5~6 倍。表明 *SS*、*DS* 在皂苷生物合成途径中均起正调控作用，双基因共超表达能进一步提高皂苷含量，揭示途径中两个甚至更多基因间可能存在正协同调控效应。

关键词：三七；鲨烯合酶；达玛烯二醇合酶；三七总皂苷；超表达

文章篇号：1673-9078(2015)2-7-13 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.002

Effects of Co-overexpression of Squalene Synthase and Dammarenediol-Ⅱ Synthase in *Panax notoginseng* Cells on Saponin Synthesis

YANG Yan, LIU Di-qiu, GE Feng, YU Gang

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: To study the effects of the co-overexpression of the squalene synthase (*SS*) and dammarenediol-II synthase (*DS*) genes in *Panax notoginseng* cells on saponin synthesis, an overexpression vector of *SS* derived from *P. notoginseng* was constructed and integrated into the *P. notoginseng* genome by culturing with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Expression levels of *SS* and *DS* in transgenic cell lines were detected using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR), and the saponin contents were determined by the vanillin-glacial acetic acid-perchloric acid colorimetric method. The results showed that for the three strains (T-4, T-5, T-9) in which *SS* and *DS* were overexpressed simultaneously, the relative *SS* expression levels were 5.66, 7.37, and 7.46 times greater than that of the strain with only *DS* overexpression, and the relative *DS* expression levels were 1.39, 2.00, and 1.41 times greater than that of the strain overexpressing only *DS*. The total saponin content of *P. notoginseng* (PNS) in the three strains was 1.7 times that in the strain overexpressing only *DS*, and 2.4 times of that observed in normal cells. The total monomer saponin content, including R1, Rg1, Re, Rb1, and Rd, in the three strains was 1.33, 1.61, and 1.71 times greater than that in the strain overexpressing only *DS*, and 5.62, 6.81, and 7.26 times greater than that in normal cells. In addition, the Re content was significantly higher and reached 5–6 times that observed in *P. notoginseng* medicinal materials. The results indicated that both *SS* and *DS* genes played positive regulatory roles in the saponin biosynthetic pathway, and overexpression of these two genes could further enhance the saponin content, demonstrating that synergistic regulatory effects might exist for two or more genes in the biosynthetic pathway.

Key words: *Panax notoginseng*; squalene synthase; dammarenediol-II synthase; total saponin; overexpression

三七，别名田七、山漆、三七参等，是我国特有名贵中药材，同时也是药食同源的植物之一。三七中的三七总皂苷是其主要有效成分，目前，从其根、茎、叶、花等部位分离并鉴定出的单体皂苷已多达 70 余种，这些单体皂苷大部分属于达玛烷 20（S）原人参二醇和 20（S）原人参三醇型四环三萜皂苷，但未检测到齐墩果酸型皂苷，这与同属的人参和西洋参有显著差别[1]。药理学研究结果显示，三七总皂苷具有较好的抗动脉粥样硬化、抗炎、抗肿瘤、抗氧化和降血压、血糖等药理活性[2~4]，基于三七总皂苷为原料的药品和保健食品开发前景较好。

三七总皂苷在三七中的含量较低，加之三七是一

收稿日期：2014-06-25

基金项目：国家自然科学基金资助（31260070；31060044）

作者简介：杨延（1989-），女，硕士研究生，研究方向：药用植物生物技术

通讯作者：葛锋（1979-），男，博士，教授，研究方向：药用植物生物技术

种多年生植物，从播种到收获，一般需要 3 年以上时间，此外还面临农药残留及品种退化等问题，极大制约了三七药用价值的推广，有必要加强三七相关生物技术研究，尤其是三七皂苷合成途径的探讨。近年来，有学者利用分子生物学技术从基因分子层面对三七皂苷的生物合成途径及其中的关键酶进行探索，并取得了一些成果。研究发现三七总皂苷属于达玛烷型四环三萜皂苷，通过 MVA（Mevalonic acid）途径合成[5~6]。途径中的鲨烯合酶（Squalene synthase，SS）催化两分子的法呢基焦磷酸形成鲨烯，鲨烯是植物甾醇和三七总皂苷的共同前体；达玛烯二醇合酶（Dammarenediol-Ⅱ synthase，DS）催化氧化鲨烯形成达玛烯二醇，达玛烯二醇是三七总皂苷的最直接前体[7~8]。因此，这两个酶被认为是该代谢途径中的两个关键酶。但关于这两个酶在三七总皂苷生物合成途径中的联合调控作用则知之甚少。

本研究构建了 SS 基因超表达载体，并以已实现超表达 DS 基因的三七愈伤组织为材料，利用农杆菌介导法将 SS 基因导入并整合到三七基因组中，利用 QRT-PCR 技术检测转基因三七细胞系中 SS 和 DS 基因的表达情况，同时检测皂苷含量变化，以明确 SS 和 DS 基因在三七皂苷生物合成途径中的协同调控作用，为未来构建三七总皂苷的高效同源或异源表达系统提供了理论及技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料、菌株及载体

植物材料：本实验室保存的普通三七愈伤组织，超表达了 *DS* 基因的三七愈伤组织。

菌株：根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）LBA4404 由本实验室保存，大肠杆菌（*Escherichia coli*）DH 5α 感受态细胞购自 Trangen。

载体：T-A 克隆载体 pGEM-T Easy Vector 购自 Promega，植物表达载体 pCAMBIA1300S 由中国科学院昆明植物研究所惠赠。

1.1.2 主要试剂

酶：M-MVL Reverse Transcriptase 购自 Promega，Taq DNA 聚合酶、Ex Taq 高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA Ligase 均购自 TaKaRa，限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ及 *Xba* Ⅰ购自 Fermentas。

抗生素：氨苄青霉素（Ampicillin）、卡那霉素（Kanamycin）和头孢霉素（Cefotaxime Na Salt）均购自 Biosharp，潮霉素 B（Hygromycin B）购自上海生工，利福平（Rifampicin）购自 Sigma。

试剂盒：SanPrep 柱式质粒提取试剂盒、SanPrep 柱式胶回收试剂盒均购自上海生工，GoTaq® 2-Step RT-qPCR System 试剂盒购自 Promega。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 三七总 RNA 的提取及逆转录

取一定量生长状态良好的普通三七愈伤组织，加液氮研磨成粉，采用改良的异硫氰酸胍法[9]提取并纯化三七总 RNA，-70 ℃保存备用。以三七总 RNA 为模板，以 Oligo (dT)为引物，逆转录合成第一链 cDNA。

1.2.2 *SS* 基因的克隆

根据 Genbank 数据库中报道的三七 *SS* 基因全长序列（登录号：DQ186630）设计带酶切序列（酶切序列为小写部分）的引物。*SS* 基因上游引物（*Kpn* Ⅰ-*SS*）：5’-ggtaccGAGAAAATGGGAAGTTTGGG-3’，*SS* 基因下游引物（*SS-Xba* Ⅰ）：5’-tctagaAGGAACTGGGGTTCTCACTG-3’。以逆转录合成的第一链 cDNA 为模板，采用 20 μL 体系，在 Taq DNA 聚合酶作用下进行普通 PCR 检测；采用 50 μL 反应体系，在 Ex Taq 高保真 DNA 聚合酶作用下进行 PCR 扩增获得 *SS* 基因全长序列。50 μL 反应体系如下：

cDNA 模板，2.5 μL；10×Buffer，5.0 μL；2.5mM dNTPs，4.0 μL；*Kpn* Ⅰ-*SS* (10 μM)，0.6 μL；*SS-Xba* Ⅰ (10 μM)，0.6 μL；Ex Taq (5 U)，0.5 μL；dd$H_2$0 补齐至，50.0 μL。

反应条件为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s；57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min 30 s，32 个循环后 72 ℃延长孵育 PCR 产物 15 min，以确保 PCR 产物 3’端加 A 尾的反应效率达到较高水平。将纯化回收到的 PCR 产物克隆至 pGEM-T Easy Vector 上，并转化大肠杆菌 DH 5α 感受态细胞，在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体平板上筛选，挑取单克隆，菌液 PCR 检测，将 PCR 结果为阳性的单克隆进行进一步提质粒双酶切验证，最终将双酶切为阳性的单克隆送样测序确认。

1.2.3 pCAMBIA1300S-*SS* 超表达载体的构建

用 SanPrep 柱式质粒提取试剂盒提取 pGEM-*SS* 和 pCAMBIA1300S 质粒，分别用 *Kpn* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ两种限制性内切酶双酶切这两个质粒，纯化回收相应的 DNA 条带。*SS* 基因与线状 pCAMBIA1300S 之间通过 T4 DNA Ligase 连接，形成 pCAMBIA1300S-*SS*，将其转化大肠杆菌 DH 5α 感受态细胞，在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体平板上筛选，挑取单克隆，菌液 PCR 检测，将 PCR 结果为阳性的单克隆进行进一步提质粒

双酶切验证。

1.2.4 根癌农杆菌 LBA4404 介导的 pCAMBIA1300S-*SS* 遗传转化

采用 $CaCl_2$ 冻融法将 pCAMBIA1300S-*SS* 载体导入根癌农杆菌 LBA4404 感受态细胞中，用含 50 mg/L 卡那霉素和 20 mg/L 利福平的 LB 固体培养基筛选，挑取单克隆，菌液 PCR 检测目的载体是否成功转入 LBA4404 中。

将已超表达了 *DS* 基因的三七愈伤组织置于含 40 mg/L 乙酰丁香酮（Acetosyringone，AS）的 MS 基本培养基上预培养 3 天，之后将其转移到 OD_{600} 为 0.6~0.8 的农杆菌菌液中，28 ℃，110 r/min 侵染 20 min。侵染结束，倒掉菌液，用无菌滤纸吸干细胞表面菌液，后将其置于含 40 mg/L 乙酰丁香酮（Acetosyringone，AS）的 MS 基本培养基上共培养 3 d，目的是让外源导入的 *SS* 基因与三七基因组充分整合。将完成共培养的三七愈伤组织收集到三角瓶中，用加了 400 mg/L 头孢霉素的无菌水洗涤 5 次，使多余农杆菌从三七愈伤组织中游离出来，防止细胞因农杆菌包被而死亡。将完成洗涤后的愈伤组织置于含 400 mg/L 头孢霉素的 MS 培养基上进行为期 15 d 的除菌培养。最终将除菌培养后的三七愈伤组织置于含 50 mg/L 卡那霉素和 25 mg/L 潮霉素的筛选培养基上培养，筛选 5 轮，每轮筛选周期为 1 个月。

1.2.5 转 *SS* 和 *DS* 基因的三七愈伤组织的 PCR 检测

已超表达了 *DS* 基因的三七愈伤组织中含有 pCAMBIA2300S-*DS* 载体，此载体上带有 *NPT* Ⅱ标记基因。此外，pCAMBIA1300S-*SS* 载体带有 *HPT* Ⅱ标记基因。根据 *NPT* Ⅱ和 *HPT* Ⅱ基因序列设计两对引物，引物参数具体见表 1，利用这两对引物进行两轮 PCR，以此检测转双基因的阳性细胞系。

表 1 *NPT* Ⅱ和 *HPT* Ⅱ基因引物参数

Table 1 *NPT* Ⅱ and *HPT* Ⅱ gene primer sequences

基因	上游引物	下游引物	产物长度/bp
NPT Ⅱ	5’-CTCTGATGCCGCCGTGTT -3’	5’-CCCTGATGCTCTTCGTCCA-3’	450
HPT Ⅱ	5’-CAGCGTCTCCGACCTGAT -3’	5’-TCTGCGGGCGATTTGT-3’	842

表 2 *SS*、*DS* 和 *GAPDH* 基因引物参数

Table 2 *SS*, *DS*, and *GAPDH* gene primer sequences

基因	上游引物	下游引物	产物长度/bp
SS	5’-GCAGGACTTGTTGGATTAGGGT-3’	5’-AACATGCGTGACTTTGGTATCTC-3’	160
DS	5’-CTAGCATAGCCCATGATGTTTGT-3’	5’-TGAAGCAGTTCGTAAGGGTGTT-3’	150
GAPDH	5’-CTACCAACTGTCTTGCTCCCCT-3’	5’-TGATGCAGCTCTTCCACCTCTC-3’	152

1.2.6 转双基因阳性细胞系的荧光定量 PCR 检测

选取 *NPT* Ⅱ和 *HPT* Ⅱ PCR 均为阳性且生长较快的三七细胞系，对其进行半定量 RT-PCR 检测，以观察转基因三七细胞中的 *SS* 和 *DS* 基因表达水平。以 *GAPDH* 为内参基因进行分析，分别根据这 3 个基因序列设计特异性引物，引物参数具体如表 2。按照 1.2.1 方法提取转基因三七细胞的总 RNA 并将其逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板，荧光定量 PCR 按照 GoTaq® 2-Step RT-qPCR System 试剂盒说明操作。

1.2.7 转双基因阳性细胞系中三七总皂苷和单体皂苷含量的检测

用 HPD100 大孔树脂吸附柱分离三七总皂苷，再采用香草醛-冰醋酸-高氯酸显色法[10]测定未转化的三七细胞、转 *DS* 基因的三七细胞和转 *SS*、*DS* 双基因的三七细胞中总皂苷含量（每类细胞系设置 3 次重复实验）。再用 HPLC 测定上述三类三七细胞中 5 种主要单体皂苷：R1、Rg1、Re、Rb1、Rd 的含量。色谱条件：进样量 20 μL，流速 1.0 mL/min，乙腈(A):水(B)线性梯度洗脱(*V/V*)过程见表 3，检测柱温 35 ℃，检测波长 203 nm，检测时间 80 min。

表 3 流动相梯度（*V/V*）

Table 3 Mobile phase gradients

时间	0~30 min	30~60 min	60~78 min	78~80 min	80 min
乙腈(A/%)	20	20→45	45→75	75→100	20
水(B/%)	80	80→55	55→25	25→0	80

1.2.8 数据分析

文中荧光定量 PCR 及总皂苷和单体皂苷含量检测试验均重复 3 次，实验结果均以平均值±标准偏差表示，采用 Excel 2003 和 Origin 7.5 进行数据统计分析及作图。

2 结果与分析

2.1 *SS* 基因 RT-PCR

采用改良的异硫氰酸胍法提取并纯化三七总 RNA，电泳结果显示所提三七总 RNA 其 28S、18S 和 5S rRNA 三条带带型清晰且完整（见图 1），说明 RNA 未降解；经紫外分光光度计检测确认 RNA 无蛋白、糖类和有机溶剂污染，纯度较高，将所提 RNA 用于逆转录合成第一链 cDNA。

以 cDNA 为模板，利用 Ex Tag 高保真 DNA 聚合酶催化进行 *SS* 全长序列扩增的 PCR 反应，得到长度约为 1.3 kb 的目的条带（见图 2）。

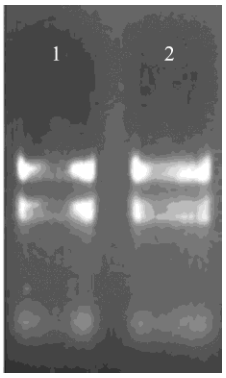


图 1 三七总 RNA

Fig.1 Total RNA of *Panax notoginseng*

注：1: 细胞系 1 总 RNA；2: 细胞系 2 总 RNA。

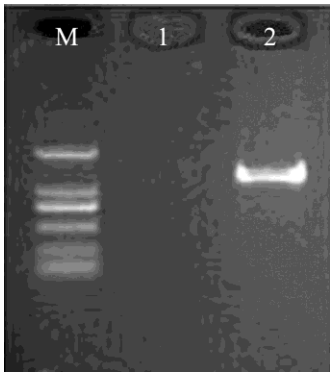


图 2 *SS* 的 RT-PCR 产物

Fig.2 RT-PCR product of *SS*

注: M: DL2,000 DNA Mark; 1: 空白对照; 2: *SS* 的 RT-PCR 产物。

2.2 pCAMBIA1300S-*SS* 超表达载体的构建

pCAMBIA1300S 空载体上有 11 个多克隆位点（见图 3），排除 *SS* 基因序列中含有的酶切位点，同时考虑选用的两种酶是否共用 Buffer 等因素，最终选择 *Kpn* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ进行双酶切。然而 *Kpn* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ在 pCAMBIA1300S 空载体上仅相差 11 bp，双酶切效率不是很高，因此先用 *Kpn* Ⅰ单酶切 pCAMBIA1300S 质粒，乙醇沉淀回收后再用 *Xba* Ⅰ继续单酶切。对测序结果正确的 pGEM-T-*SS* 质粒则直接用 *Kpn* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ对其进行双酶切。利用 T4 DNA Ligase 将具有相同粘性末端的 *SS* 片段和 pCAMBIA1300S 线性质粒的胶回收产物连接，构建 pCAMBIA1300S-*SS*。将其转化大肠杆菌 DH 5α 感受态细胞，在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体平板上筛选，挑取单克隆，菌液 PCR 检测，对构建成功的 pCAMBIA1300S-*SS* 进行双酶切检测，结果见图 4。

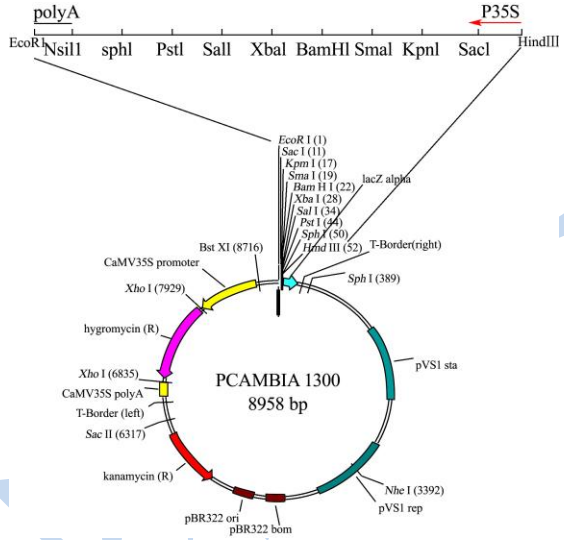


图 3 pCAMBIA1300S 载体结构图

Fig.3 Diagram illustrating the structure of pCAMBIA1300S vector



图 4 pCAMBIA1300S-*SS* 双酶切检测

Fig.4 Identification of pCAMBIA1300S-*SS* with two restriction enzymes

注：M：DL2,000 DNA Mark。

2.3 转 *SS* 和 *DS* 基因的三七愈伤组织的 PCR 检测

选取 9 株经过 5 轮筛选后仍存活下来的转基因三七细胞系进行 PCR 检测。采用 CTAB 法提取这 9 株转基因三七细胞系的基因组 DNA，并以此为模板，采用 *NPT* Ⅱ和 *HPT* Ⅱ特异性引物，同时分别以 pCAMBIA2300S 和 pCAMBIA1300S 空载体质粒为阳性对照进行 PCR 检测，检测结果见图 5、6。

以 *NPT* Ⅱ部分片段特异性引物进行 PCR，9 株转基因三七细胞系均能扩出大小为450 bp左右的*NPT* Ⅱ基因片段，也与阳性对照大小一致；以 *NPT* Ⅱ部分片段特异性引物进行 PCR，9 株中有 5 株转基因三七细胞可扩出大小为850 bp左右的*HPT* Ⅱ基因片段。初步确定有 5 株转基因三七细胞同时成功转入 pCAMBIA1300S-*SS* 和 pCAMBIA2300S-*DS* 载体，并分别编号 T-1、T-4、T-5、T-7、T-9。

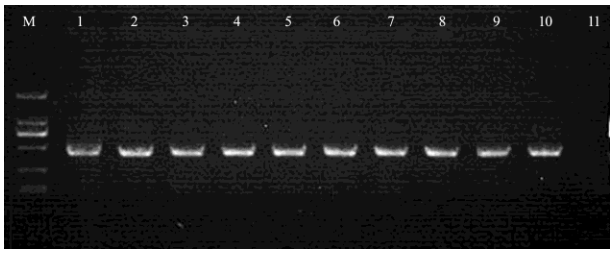


图 5 转基因三七细胞系 *NPT* Ⅱ基因 PCR 检测

Fig.5 *NPT* Ⅱ PCR detection for transgenic *Panax notoginseng* cell lines

注：M：DL2,000 DNA Mark；1-9：转基因三七细胞系；10：阳性对照；11：阴性对照。

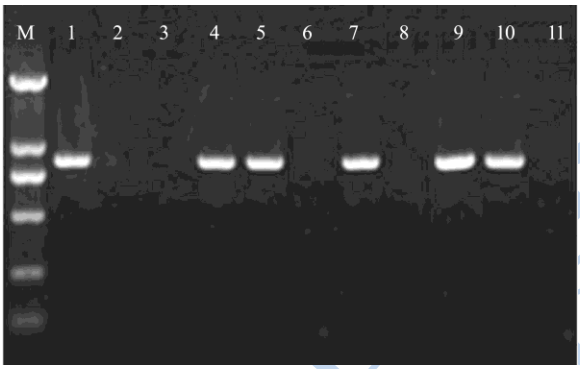


图 6 转基因三七细胞系 *HPT* Ⅱ基因 PCR 检测

Fig. 6 *HPT* Ⅱ PCR detection for transgenic *Panax notoginseng* cell lines

注：M：DL2,000 DNA Mark；1-9：转基因三七细胞系；10：阳性对照；11：阴性对照。

2.4 转双基因阳性细胞系的荧光定量 PCR 检测

同时成功转入 pCAMBIA1300S-*SS* 和 pCAMBIA2300S-*DS* 载体的 5 个株系中 T-4、T-5、T-9 生长速度较快且状态良好，而 T-1、T-7 则长速较慢，因此选择 T-4、T-5、T-9 三个株系进行荧光定量 PCR 检测。

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[11]计算 T-4、T-5、T-9 中的 *SS* 和 *DS* 基因相较于对照组（已超表达了 *DS* 基因的三七细胞）的表达差异。各基因的 Ct 值和相对表达量见表 4。

由表 4 可知，T-4、T-5、T-9 中的 *SS* 基因相对表达量显著高于对照组，分别为 5.66、7.37 和 7.46 倍，表明外源导入的 *SS* 基因已成功整合到三七基因组中，且表达量出现大幅增加，揭示第一个基因（*DS*）的超表达对第二个基因（*SS*）的超表达具有明显促进作用，两基因在三七皂苷生物合成途径中可能存在正协同调控效应。此外，T-4、T-5、T-9 中的 *DS* 基因相对表达量略高于对照组，分别为 1.39、2 和 1.41 倍，可认为第二个基因（*SS*）的超表达对 *DS* 基因的超表达可能有微弱促进作用，鉴于荧光定量 PCR 的灵敏性特征，其 *DS* 的表达变化可基本忽略。

不同转基因株系中的 *SS* 和 *DS* 基因相对表达量之间存在差异的重要原因之一是由于外源基因是随机插入到转基因植物的基因组中的，整合位点不同导致表达也存在差异。此外，当转两个或更多的基因于实验材料中时，也可能发生因同源序列存在而引起的基因沉默[12]。

表 4 *SS*、*DS* 基因的荧光定量结果

Table 4 Results of real-time fluorescence quantitative PCR for *SS* and *DS* genes

样品	*SS* 平均 Ct 值	*DS* 平均 Ct 值	*GAPDH* 平均 Ct 值	*SS* 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	*DS* 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
C_{DS}	20.21±0.03	17.74±0.03	15.51±0.02	1	1
T-4	17.55±0.02	17.01±0.04	15.36±0.02	5.66	1.39
T-5	17.24±0.03	16.88±0.04	15.42±0.02	7.37	2
T-9	17.33±0.03	17.27±0.02	15.54±0.03	7.46	1.41

2.5 转双基因阳性细胞系中三七总皂苷和单体皂苷含量的检测

三七总皂苷主要通过 MVA 途径生物合成，具体过程见图 7。*SS* 和 *DS* 被认为是此途径中的两个关键酶，但关于两基因在三七总皂苷生物合成途径中的调控作用缺乏直接证据，同时对 *SS* 和 *DS* 间联合调控作用也知之甚少。

本研究采用香草醛-冰醋酸-高氯酸显色法检测转双基因阳性细胞系中的总皂苷含量，检测结果见图 8。从图可知，T-4、T-5、T-9 细胞系中的三七总皂苷含量约为普通细胞的 2.4 倍，为转 *DS* 基因三七细胞的 1.7 倍。表明 *SS* 和 *DS* 基因在三七皂苷生物合成途径中均

起正调控作用，且双基因共超表达能进一步提高三七总皂苷含量，揭示了在三七皂苷生物合成途径中双基因甚至更多基因可能具有正协同调控作用特性。

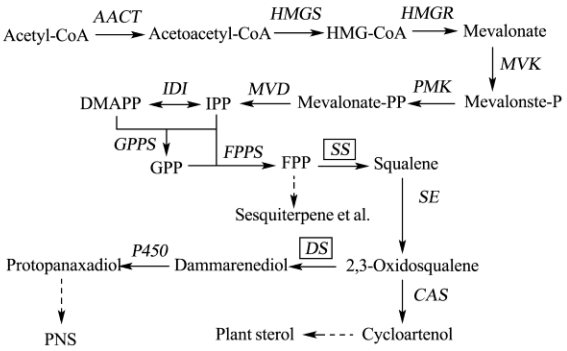


图 7 三七总皂苷的生物合成途径

Fig.7 Biosynthetic pathway of PNS

注：图中虚线部分表示多步酶促反应。

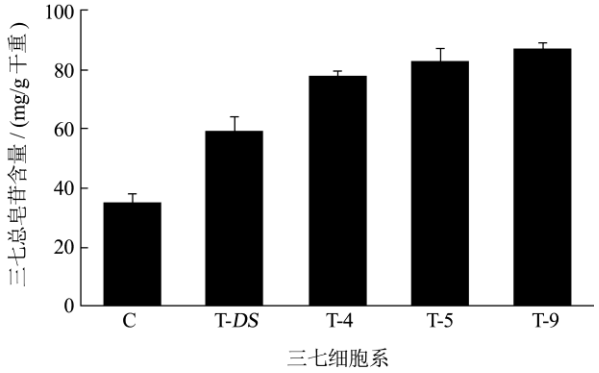


图 8 三七细胞系中总皂苷含量

Fig.8 Total saponin content in *Panax notoginseng* cell lines

注：C：普通细胞；T-*DS*：转 *DS* 三七细胞。

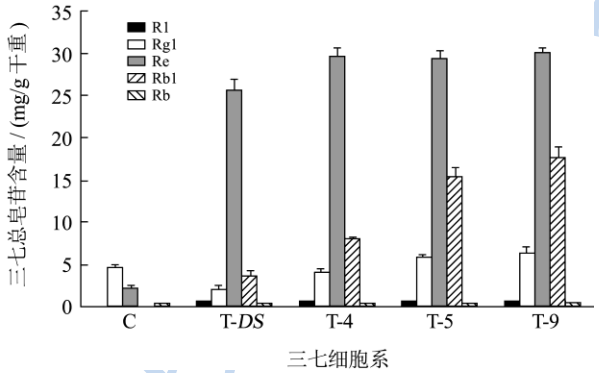


图 9 三七细胞系中部分单体皂苷含量

Fig.9 Monomer saponin content in *Panax notoginseng* cell lines

注：C：普通细胞；T-*DS*：转 *DS* 三七细胞。

利用 HPLC 法测定 T-4、T-5、T-9 细胞系中 5 种主要单体皂苷：R1、Rg1、Re、Rb1、Rd 的含量，检测结果见图 9。从结果可知，转 *DS* 基因的三七细胞中，5 种单体皂苷含量总和为普通细胞的 4.23 倍，而 T-4、T-5、T-9 细胞系中的 5 种单体皂苷含量总和分别为普通细胞的 5.62 倍、6.81 倍和 7.26 倍，同时分别为转 *DS* 三七细胞的 1.33、1.61 和 1.71 倍，进一步验证 *SS* 和 *DS* 基因在三七皂苷生物合成途径中的重要调控作用，*SS* 和 *DS* 基因共超表达更有利于三七皂苷的生物合成。此外，T-4、T-5、T-9 细胞中的 Re 出现较大幅增加，已达到三七药材的 5~6 倍。Re 是 PNS 中的有效成分之一，具有降血压、镇痛、抗氧化和抗疲劳等功效，此外还能显著降低血液中的葡萄糖、胆固醇和甘油三酯浓度及促进记忆[13]，双基因共超表达显著提高 Re 含量将有利于三七药学价值的进一步提高。T-4、T-5、T-9 细胞系中的 Rg1、Rb1 和 R1 皂苷含量也有一定幅度增加，但 Rd 皂苷含量却有所降低，这可能是因为超表达载体的 T-DNA 区随机整合到三七基因组中，影响了合成 Rd 相关酶基因的表达，导致 Rd 的合成受阻。

3 结论

本研究针对三七 *SS* 基因构建了 pCAMBIA1300S-*SS* 超表达载体，并借助农杆菌 LBA4404 将其倒入已超表达了 *DS* 基因的转基因三七基因组中，以普通 PCR 及荧光定量 PCR 为检测手段，同时对转基因株系中的总皂苷和部分单体皂苷含量加以检测，最终得出结论：*SS* 和 *DS* 基因在三七皂苷生物合成途径中均起正调控作用，且双基因共超表达能进一步提高三七总皂苷含量，揭示了在三七皂苷生物合成途径中双基因甚至更多基因可能具有正协同调控作用特性。这一发现深化了对三七皂苷生物合成途径及其调控的认识，同时为通过代谢工程手段强化三七总皂苷生物合成提供了新思路。

参考文献

[1] Li Wen-kui, Fitzloff J F. A validated method for quantitative determination of saponins in notoginseng (*Panax notoginseng*) using high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001, 53(12): 1637-1643

[2] Ng T B. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax* notoginseng) [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2006, 58(8): 1007-1019

[3] Xia Wei, Sun Cai-hong, Zhao Yan, et al. Hypolipidemic and antioxidant activities of Sanchi (Radix notoginseng) in rats fed with a high fat diet [J]. Phytomedicine, 2011, 18(6): 516-520

[4] Yang Chang-yong, Wang Jing, Zhao Yuan, et al. Anti-diabetic effects of Panax notoginseng saponins and its major anti-hyperglycemic components [J]. Journal of

Ethnopharmacology, 2010, 130(2): 231-236

[5] Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(8): 1619-1627

[6] Kim Y S, Han J Y, Lim S, et al. Ginseng metabolic engineering: regulation of genes related to ginsenoside biosynthesis [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2009, 3(13): 1270-1276

[7] Niu Yun-yun, Luo Hong-mei, Sun Chao, et al. Expression profiling of the triterpene saponin biosynthesis genes FPS, SS, SE, and DS in the medicinal plant *Panax* notoginseng [J]. Gene, 2014, 533(1): 295-303

[8] Luo Hong-mei, Sun Chao, Sun Yong-zhen, et al. Analysis of the transcriptome of *Panax* notoginseng root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers [J]. BMC Genomics, 2011, 12(5): S5

[9] 刘迪秋.陆地棉纤维特异表达基因的克隆与表达研究[D].武汉:华中农业大学植物科学技术学院,2007
LIU Di-qiu. Molecular cloning and expression analysis of the genes specifically expressed in fiber of Gossypium Hirsutum [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University Plant Science and Technology Faculty, 2007

[10] 秦枫,刘靖,陈玉勇,等.三七总皂苷含量测定方法及超声提取工艺研究[J].安徽农业科学,2008,36(8):3062-3063,3231
QIN Feng, LIU Jing, CHEN Yu-yong, et al. Study on the transonic extraction and content determination methods of total saponins of *Panax* notoginseng (PNS) [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2008, 36(8): 3062-3063, 3231

[11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408

[12] Qi Yi-jun, Hannon G J. Uncovering RNAi mechanisms in plants: biochemistry enters the foray [J]. FEBS Letters, 2005, 579(26): 5899-5903

[13] Jang S E, Jung I H, Joh E H, et al. Antibiotics attenuate anti-scratching behavioral effect of ginsenoside Re in mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 142(1): 105-112

现代食品科技