

三七细胞中过表达 *FPS* 基因对皂苷合成的影响

杨延, 刘迪秋, 葛锋, 陈朝银

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500)

摘要: 为研究三七细胞中过表达法呢基焦磷酸合酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, *FPS*) 基因对皂苷合成的影响, 构建了 *FPS* 过表达载体, 借助农杆菌将 *FPS* 整合到三七细胞基因组中, 利用 qRT-PCR 检测阳性细胞系中 *FPS* 的相对表达量, 香草醛-高氯酸-冰乙酸显色法测定总皂苷含量, HPLC 法测定单体皂苷含量。结果显示: 四株转 *FPS* 阳性细胞系中, *FPS* 的相对表达量高于未转基因对照, 最高为对照的 3.01 倍; 总皂苷含量高于未转基因对照, 最高为对照的 2.09 倍; 四种重要单体皂苷 (Rh1、Rg1、Re 和 Rd) 含量均高于未转基因对照, 其中, Re 含量的增加幅度最为明显, 最高为对照的 4.35 倍; Rh1、Rd 和 Rg1 含量也有一定幅度增加, 最高分别为对照的 2.66 倍、2.90 倍和 1.76 倍。结果表明: *FPS* 是三七皂苷合成途径中的一个限速酶, 在三七细胞中过表达 *FPS* 可提高皂苷含量, 为进一步利用代谢工程手段实现三七皂苷的同源或异源高效表达奠定基础。

关键词: 三七; 法呢基焦磷酸合酶; 三七总皂苷; 过表达

文章编号: 1673-9078(2015)8-59-64

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.011

Effect of Over-expressing Farnesyl Pyrophosphate Synthase (*FPS*) Gene of *Panax notoginseng* Cell on Saponin Synthesis

YANG Yan, LIU Di-qi, GE Feng, CHEN Chao-yin

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

Abstract: To study the effect of over-expressing farnesyl pyrophosphate synthase (*FPS*) in *Panax notoginseng* (*P. notoginseng*) cells on saponin synthesis, an *FPS* over-expression vector was constructed and integrated into the genome of *P. notoginseng* cells via *Agrobacterium tumefaciens*. Relative expression levels of *FPS* in the positive cell lines were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The contents of *Panax notoginseng* saponins (PNSs) and monomer ginsenosides were estimated by vanillin-perchloric acid-glacial acetic acid colorimetric method and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively. The results showed that the relative *FPS* expression levels and PNS content were both higher in the four transgenic *FPS*-positive cell lines, than those in non-transgenic control, with highest levels at 3.01-times and 2.09-times higher, respectively. Additionally, the content of important monomer ginsenosides (Rh1, Rg1, Re, and Rd) were all higher in the four transgenic *FPS*-positive cell lines than those in the non-transgenic control. Among these, the increase in Re content was the most significant, with highest level was up to 4.35 times as much as that of control. Moreover, the content of Rh1, Rd, and Rg1 were increased to some extent as well, with highest levels at 2.66-, 2.90-, 1.76-times that of the control, respectively. These results suggest that *FPS* is one of the rate-limiting enzymes in the PNS biosynthetic pathway. Thus, over-expressing *FPS* in *P. notoginseng* cells could enhance PNS content, which has potential applications in metabolic engineering to realize homologous or heterologous expression of PNS.

Key words: *Panax notoginseng*; farnesyl pyrophosphate synthase; *Panax notoginseng* saponins; overexpression

三七 [*Panax notoginseng* (Burk) F.H.Chen], 别名山漆、三七参、田七等, 是我国特有药用植物, 其主要活性成分为三七总皂苷。药理学研究表明, 三七总皂苷在抗炎、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、降血糖、降血脂以及抗氧化等方面具有良好药理活性^[1-4], 以三七为原料的药品及保健食品具有广阔开发前景。然而, 三

收稿日期: 2014-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31260070; 31060044)

作者简介: 杨延 (1989-), 女, 硕士, 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

七中总皂苷含量较低, 如何提高三七中总皂苷含量已成为当前研究热点。三七皂苷属四环三萜类皂苷, 其生物合成主要依赖甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径^[5]。MVA 途径涉及到一系列酶促反应步骤, 其中的一些步骤对整个代谢途径具有重要影响, 是代谢流流动的瓶颈, 这样的酶促反应步骤被称为限速步骤, 打破限速步骤往往能强化代谢向三萜皂苷合成方向流动。打破限速步骤的有效方法是找出途径中的限速酶, 并对编码限速酶的基因进行定位、克隆及过量表达, 从而使限速酶基因始终保持较高表达水平, 推动代谢

流朝三萜皂苷合成方向流动^[6-7]。目前,我们课题组已完成三七 MVA 途径中 SS (squalene synthase, SS) 和 DS (dammaradiol-II synthase, DS) 基因的功能研究,证明 SS 和 DS 是三七皂苷生物合成途径中的两个限速酶。分别或同时在三七细胞中过表达 SS 和 DS 基因,转基因细胞中的皂苷含量均有大幅增加,且同时过表达两基因的细胞中皂苷含量增加幅度更为明显^[8],证明过表达 SS 和 DS 基因有利于强化三七皂苷合成代谢流。已有报道表明, MVA 途径中的 FPS 催化异戊烯基焦磷酸与二甲基烯丙基焦磷酸缩合形成法呢基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP), FPP 为倍半萜和三萜的生物合成前体。目前, FPS 已在青蒿等物种中被证明是萜类合成途径中的一个限速酶^[9],但关于 FPS 基因在三七皂苷生物合成途径中的调控作用及地位则知之甚少。

本研究采用基因过表达策略,在三七细胞中过表达 FPS,探讨 FPS 在三七皂苷合成途径中的调控作用及地位,为进一步利用组合生物合成技术实现同源或异源大规模合成三七皂苷奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料、载体及菌株

植物材料:实验中所用的未转基因三七细胞为本实验室保存,由三七子叶诱导而来。

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

菌株:根癌农杆菌 EHA105 由本实验室保存,感受态细胞 Trans1-T1 购自 Trangen。

1.1.2 主要试剂

抗生素:氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp)、头孢霉素 (Cefotaxime Na Salt, Cef)、卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 均购自 Biosharp, 利福平 (Rifampicin, Rif) 购自 Sigma, 潮霉素 B (Hygromycin B, Hyg B) 购自生工生物工程有限公司 (上海)。

酶: Ex Taq 高保真 DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Kpn* I 及 *Xba* I 均购自 TaKaRa。

试剂盒: SanPrep 柱式胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒提取试剂盒均购自生工生物工程有限公司 (上海), GoTaq® 2-Step RT-qPCR System 试剂盒购自 Promega。

1.2 实验方法

1.2.1 三七总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

取 0.2 g 长势较好的未转基因三七愈伤细胞,加液氮快速研磨成粉末,并采用异硫氰酸胍法提取三七总 RNA,将最终提取到的 RNA 于 -80 °C 保存备用。

以三七总 RNA 为模板,按照 GoTaq® 2-Step RT-qPCR System 试剂盒说明书进行逆转录合成第一链 cDNA。

1.2.2 FPS 基因编码区序列的克隆

根据 NCBI 中公布的三七 FPS 基因序列 (登录号: DQ059550.1) 设计带酶切序列引物 (酶切序列为下划线标识部分),上游引物 *FPS_f* (*Kpn* I -FPS): 5'-GGTACCAGAATGAGCGATCTGAAGACGAG-3', 下游引物 *FPS_r* (*FPS-Xba* I): 5'-TCTAGAACA GACAACAACCTCCCCCTCCAT-3'。

以第一链 cDNA 为模板,在普通 Taq DNA 聚合酶催化下采用 20 μL 反应体系进行 PCR 扩增,以检测 cDNA 质量及引物特异性,同时摸索引物最适温度;然后再在 EX Taq 高保真 DNA 聚合酶催化下采用 50 μL 体系进行 PCR 扩增获得 FPS 基因编码区序列。PCR 扩增体系 (50 μL) 如下:

第一链 cDNA	2.5 μL
10×EX Taq Buffer	5.0 μL
dNTP Mixture(2.5 mmol/L)	4.0 μL
<i>Kpn</i> I -FPS (10 μmol/L)	0.6 μL
<i>FPS-Xba</i> I (10 μmol/L)	0.6 μL
Ex Taq (5 U/μL)	0.25 μL
灭菌蒸馏水补齐至	50.0 μL

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 20 s, 扩增 32 个循环; 72 °C 加尾 10 min。

将 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测,随后按照 SanPrep 柱式胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物。将产物与 pGEM-T Easy Vector T-A 克隆载体连接,后转化 Trans1-T1 感受态细胞,在含 Amp (100 mg/L) 的 LB 平板上筛选培养。菌液 PCR 验证所挑单克隆是否为阳性,选取菌液 PCR 结果为阳性的克隆进行测序确认。

1.2.3 过表达载体 pCAMBIA1300S-FPS 的构建及鉴定

按照 SanPrep 柱式质粒提取试剂盒说明书分别提取 pCAMBIA1300S 和 pGEM-FPS 质粒,后用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xba* I 分别双酶切两质粒,并回收相

应 DNA 片段。利用 T4 DNA Ligase 将 *FPS* 片段与线性 pCAMBIA1300S 连接, 构建植物过表达载体 pCAMBIA1300S-*FPS*。将连接产物转化 Trans1-T1 感受态细胞, 在含 Kan (50 mg/L) 的 LB 平板上筛选培养, 菌液 PCR 验证所挑单克隆是否为阳性, 后再次对阳性克隆进行双酶切验证。

1.2.4 根癌农杆菌 EHA105 介导 pCAMBIA 1300S-*FPS* 转化三七细胞

利用 CaCl₂ 冻融法将植物过表达载体 pCAMBIA1300S-*FPS* 导入 EHA105 感受态细胞中, 在含 Kan (50 mg/L) 和 Rif (25 mg/L) 的 LB 平板上筛选培养, 菌液 PCR 检测 pCAMBIA1300S-*FPS* 是否成功转入 EHA105 中。

表 1 植物培养基一览表

Table 1 List of plant culture media

培养基类型	配方
预培养基/ 共培养基	MS+2.0 g/L 2, 4-D+1.0 g/L KT+3%蔗糖+7.5 g/L 琼脂+40 mg/L 乙酰丁香酮
除菌培养基	MS+2.0 g/L 2, 4-D+1.0 g/L KT+3%蔗糖+7.5 g/L 琼脂+400 mg/L Cef
筛选培养基	MS+2.0 g/L 2, 4-D+1.0 g/L KT+3%蔗糖+7.5 g/L 琼脂+50 mg/L Kan+25 mg/L Hyg B

将在预培养基上预培养 3 d 后的未转基因三七细胞置于 A₆₀₀ 为 0.6-0.8 的农杆菌菌液中 28 °C, 100 r/min 侵染 15 min。待菌液倒掉后, 用无菌滤纸吸干细胞表

表 2 *FPS* 和 *GAPDH* 基因引物参数

Table 2 Primer parameters of genes encoding *FPS* and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

基因	上游引物	下游引物
<i>FPS</i>	5'-CGGATGCTGGACTATAATGTG-3'	5'-ATTTACGGCAATCATACCAACC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CTACCAACTGTCTTGCTCCCCT-3'	5'-TGATGCAGCTCTCCACCTCTC-3'

提取转基因细胞系总 RNA, 根据 GoTaq® 2-Step RT-qPCR System 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 实验。

1.2.7 转 *FPS* 阳性细胞系中总皂苷和部分单体皂苷含量的测定

皂苷溶液的制备: 分别称取 0.1 g 烘干至恒重的未转基因和转 *FPS* 的三七细胞粉末, 加 10 mL 70% 甲醇溶液浸泡过夜, 后超声处理 90 min, 过滤, 滤液烘干。加 10 mL ddH₂O 溶解烘干后的滤液, 后用等体积水饱和和正丁醇萃取 3 次, 收集萃取液, 并将萃取液烘干。最后用甲醇溶解烘干后的萃取液, 并定容至 5 mL, 摇匀后, 过 0.45 μm 滤膜, 得到皂苷溶液。

采用香草醛-高氯酸-冰醋酸显色法^[10]测定未转基因和转 *FPS* 三七细胞中的总皂苷含量 (每个实验组设置三个重复)。通过 HPLC 法测定未转基因和转 *FPS* 三七细胞中 Rh1、Rg1、Re 和 Rd 4 种单体皂苷含量。

面多余菌液, 后将三七细胞置于共培养基上共培养 3 d, 外源 *FPS* 与未转基因三七基因组在此阶段充分整合。收集共培养结束后的三七细胞于三角瓶中, 用添加有 Cef (400 mg/L) 的无菌水洗涤 3~5 次, 以去除细胞中多余农杆菌。将洗涤之后的三七细胞置于除菌培养基上除菌培养 15 d。最终将完成除菌培养后的三七细胞置于筛选培养基上培养, 筛选 6 轮, 每轮周期为 35~40 d。

1.2.5 转 *FPS* 阳性细胞系的筛选

过表达载体 pCAMBIA1300S-*FPS* 带有 *HPTII* 筛选标记基因, 根据 *HPTII* 序列设计特异引物, 上游引物 *HPTII*₁: 5'-GAAGTGCTTGACATTGGGGAAT-3', 下游引物 *HPTII*₂: 5'-AGATGTTGGCGACCTCGTATT-3'。

采用 CTAB 法提取转基因三七细胞的基因组 DNA, 并以其为模板, 以 *HPTII*₁ 和 *HPTII*₂ 为引物进行 PCR 扩增, 检测 *HPTII* 筛选标记基因, 以此初步筛选出转 *FPS* 阳性细胞系。

1.2.6 转 *FPS* 阳性细胞系中 *FPS* 基因相对表达量的检测

采用 qRT-PCR 检测生长速度较快的转 *FPS* 阳性细胞系中 *FPS* 基因的相对表达量。检测以 *GAPDH* 作为内参基因, *GAPDH* 和 *FPS* 的 qRT-PCR 引物序列见表 2。

色谱条件: 进样量 20 μL, 流速 1.0 mL/min, 检测波长: 203 nm, 柱温: 30 °C, 乙腈 (A) -水 (B) 梯度洗脱 (V/V) 顺序见表 3。

表 3 乙腈 (A) : 水 (B) 流动相梯度表 (v/v)

Table 3 Gradient conditions of acetonitrile and water in the mobile phase

时间/min	0~30	30~60	60~78	78~80	80
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

文章中 qRT-PCR、三七总皂苷和单体皂苷含量测定实验均采用 3 个平行重复, 所得实验数据通过 Excel 2007, SPSS 和 Origin 7.5 进行分析及作图。

2 结果与分析

2.1 *FPS* 基因编码区序列的克隆

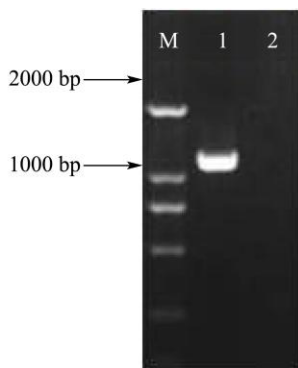


图1 *FPS*的 RT-PCR 产物

Fig.1 RT-PCR product of *FPS*

注: M: *Trans2K*[®] DNAMark; 1: *FPS*的 RT-PCR 产物; 2: 阴性对照。

提取未转基因三七细胞的 RNA, 逆转录合成 cDNA, 并以其为模板, 以 *FPS*_f和 *FPS*_r为引物, 同时在 Ex Taq 高保真 DNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增, 电泳结果显示有约 1200 bp 的特异扩增条带 (图 1), 与预期大小一致。切胶回收 PCR 产物, 后将其与 pGEM-T Easy Vector 连接转化 *Trans1-T1* 并测序, 测序结果显示克隆到的 *FPS* 基因编码区序列正确, 不存在碱基突变和移码突变。

2.2 过表达载体 pCAMBIA1300S-*FPS* 的构建

及鉴定

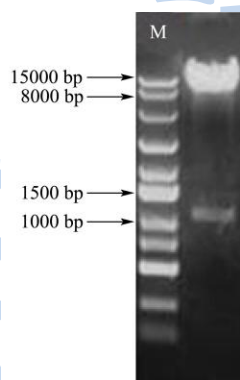


图2 pCAMBIA1300S-*FPS*双酶切检测

Fig.2 Identification of pCAMBIA1300S-*FPS* with two restriction enzymes

注: M: DL2504 DNAMark.

分别提取测序正确的 pGEM-*FPS* 和 pCAMBIA1300S 质粒, 同时用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xba* I 对两质粒进行双酶切, 回收相应的 DNA 片段, 将 *FPS* 与线性 pCAMBIA1300S 载体连接, 构建 pCAMBIA1300S-*FPS*。再次用 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切

pCAMBIA1300S-*FPS* 质粒, 电泳结果显示酶切得到一条约 1200 bp 的条带 (图 2), 与目的片段大小一致, 表明 pCAMBIA1300S-*FPS* 过表达载体构建成功。

2.3 转 *FPS* 阳性细胞系的筛选

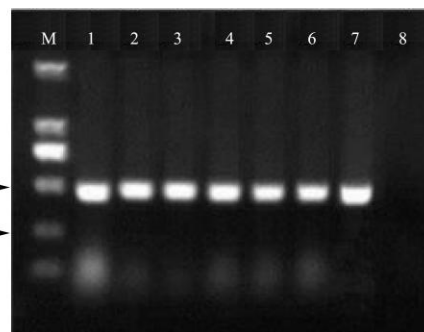


图3 转基因三七细胞系中 *HPTII* 基因 PCR 检测

Fig.3 PCR detection of *HPTII* gene in transgenic *P. notoginseng* cell lines

注: M: *Trans2K*[®] DNAMark; 1-6: 转基因三七细胞系; 7: 阳性对照; 8: 阴性对照。

以三七细胞基因组 DNA 为模板, 以 *HPTII*_f和 *HPTII*_r为引物进行 PCR 扩增, 电泳结果显示有约 450 bp 的特异扩增条带 (图 3), 与预期大小一致, 初步确定鉴定的转基因三七细胞系全为阳性株系。

2.4 转 *FPS* 阳性细胞系中 *FPS* 基因相对表达量的检测

从六株转 *FPS* 阳性细胞系中挑取四株生长速度较快的株系, 分别编号为: T-1、T-2、T-3、T-4, 其余两株细胞系因生长速度较慢且状态较差而被淘汰。分别提取 T-1、T-2、T-3、T-4 细胞系的 RNA, 并逆转录合成 cDNA, 后通过 qRT-PCR 检测 *FPS* 基因的相对表达量 (以 *GAPDH* 为内参基因)。结果显示, *FPS* 和 *GAPDH* 基因的扩增效率均在 90%~105% 的有效统计范围内; 标准曲线的线性相关系数 > 0.98, 结合溶解曲线及电泳检测结果, 证明 qRT-PCR 无非特异扩增干扰。

在四株转 *FPS* 阳性细胞系中, *FPS* 基因的相对表达量均比未转基因对照中的相对表达量高, 表明 pCAMBIA1300S-*FPS* 载体已在转基因细胞系中成功实现过表达。然而, 不同转基因细胞系中, *FPS* 基因的表达水平有高低差异: 与未转基因对照相比, T-2 细胞系中 *FPS* 基因的相对表达量最高, 为对照的 3.01 倍; T-3 中 *FPS* 基因的相对表达量最低, 为对照的 1.78 倍 (图 4)。不同转基因细胞系中 *FPS* 基因的相对表达量之间存在差异, 这与外源 *FPS* 基因在三七细胞基因

组上的整合位点有关。外源 *FPS* 基因以随机方式插入到三七细胞基因组中，不同细胞系之间存在整合位点差异性，进而导致 *FPS* 的表达水平也存在差异；此外，细胞状态也是导致 *FPS* 基因表达差异的一个因素。

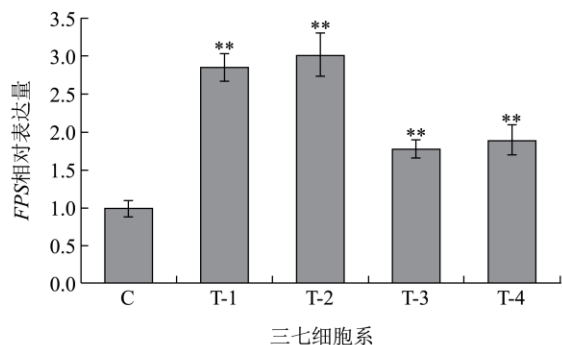


图4 三七细胞系中 *FPS* 的相对表达量

Fig.4 Relative expression levels of *FPS* in *P. notoginseng* cell lines

注：C：未转基因三七细胞系对照；**：与对照相比 $P < 0.01$ ，差异高度显著。

2.5 转 *FPS* 基因阳性细胞系中三七总皂苷和单体皂苷含量的测定

以未转基因三七细胞作为对照，对四株转 *FPS* 阳性细胞系中的总皂苷和部分单体皂苷含量进行分析。结果显示，四株转基因细胞系中的总皂苷含量均有不同程度提高，其中 T-1 和 T-2 两株细胞系中总皂苷含量提高的倍数较为显著：T-2 细胞系中的总皂苷含量达到 54.34 mg/g 干重，为对照的 2.09 倍；T-1 细胞系中的总皂苷含量达到 48.62 mg/g 干重，为对照的 1.87 倍（图 5）。结合 qRT-PCR 结果（在四株转 *FPS* 细胞系中，T-2 中 *FPS* 基因的相对表达量最高，其次为 T-1 中 *FPS* 基因的相对表达量）可知：*FPS* 是三七总皂苷生物合成途径中的又一个限速酶，过表达 *FPS* 基因有利于打破途径中由 *FPS* 催化的限速反应，为三七总皂苷的生物合成提供充足的前体物质 FPP，从而促进三七总皂苷合成。

Re、Rg1、Rh1、和 Rd 是三七总皂苷中药用价值颇广的四种单体皂苷，研究发现 Re 具有有效降低血液中葡萄糖、甘油三酯和胆固醇浓度以及促进记忆等多重药理活性^[11]；对 Rg1 报道较多的是其对中枢神经系统及心血管的药理作用，也有研究发现 Rg1 在免疫调节方面也发挥重要作用^[12]；Rh1 在抗肿瘤及抗神经衰退过程中发挥重要作用^[13]；Rd 对神经系统、免疫系统、心脑血管具有独特保护作用^[14]，目前，已对 Rd 进行 III 期临床试验，未来有望成为治疗脑卒、心血管疾病的药物。在四株转基因阳性细胞系中均检测到

Rh1、Rg1、Re 和 Rd 四种单体皂苷。与未转基因对照相比，转基因细胞系中的四种单体皂苷含量均有不同程度提高，其中，Re 含量的提高幅度最为明显，T-1、T-2 和 T-4 中的 Re 含量分别达到对照的 3.19 倍、4.35 倍和 3.51 倍。推测外源 *FPS* 基因在 T-1、T-2 和 T-4 基因组上的整合位点对催化 Re 合成的后修饰酶基因表达具有激活作用，下一步需要对这一推测进行进一步验证；而 T-3 细胞系中的 Re 含量与对照比较，无显著差异，推测可能是转基因沉默引起的。此外，Rh1、Rd 和 Rg1 含量也有一定幅度增加，最高分别达到对照的 2.66 倍、2.90 倍和 1.76 倍（图 6）。以上结果进一步证明提高 *FPS* 的转录水平有利于皂苷的积累，表明 *FPS* 在三七皂苷的合成途径中发挥着重要调控作用。

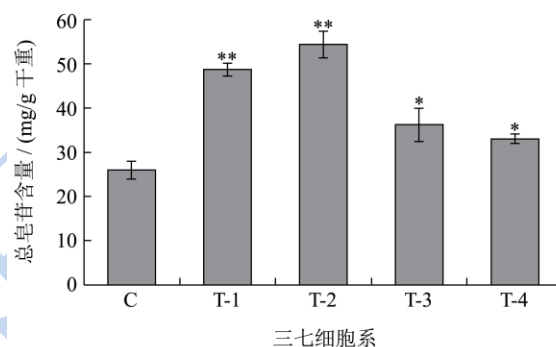


图5 三七细胞系中总皂苷含量

Fig.5 Content of PNS in *P. notoginseng* cell lines

注：C：未转基因三七细胞系对照；*：与对照相比 $P < 0.05$ ，差异显著；**：与对照相比 $P < 0.01$ ，差异高度显著。

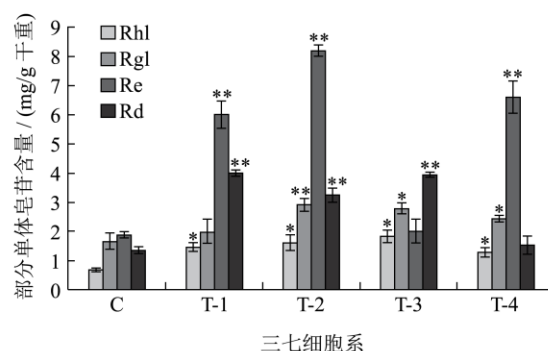


图6 三七细胞系中部分单体皂苷含量

Fig.6 Content of monomer ginsenosides in *P. notoginseng* cell lines

注：C：未转基因三七细胞对照；*：与对照相比 $P < 0.05$ ，差异显著；**：与对照相比 $P < 0.01$ ，差异高度显著。

然而，与过表达 *SS* 基因或同时过表达 *SS*、*DS* 基因而引起的三七皂苷含量增高幅度相比，过表达 *FPS* 基因引起的三七皂苷含量增加幅度要小一些^[8]。分析原因为：*SS* 和 *DS* 处于 MVA 途径的较下游，由 *SS* 和 *DS* 催化形成的中间产物能为三七皂苷的生物合成

提供更为直接的前体; FPS 处于 MVA 途径中游位置, 由 FPS 催化形成的 FPP 同时为三七皂苷和倍半萜的合成提供前体, 由于 FPP 前体被合成倍半萜的代谢流分走一部分, 从而导致过表达 FPS 基因引起皂苷含量增加的幅度小于过表达 SS 基因或同时过表达 SS、DS 基因所引起的增加幅度。

3 结论

本研究构建了 FPS 基因超表达载体, 并借助农杆菌将 FPS 整合到未转基因三七细胞基因组中, 最终筛选获得四株转 FPS 阳性三七细胞系。四株转基因细胞系中总皂苷和部分单体皂苷含量与未转基因株系中的皂苷含量相比均有不同程度提高, 表明 FPS 催化的酶促反应是三七皂苷生物合成途径中的又一个限速步骤, 采用过表达方式提高 FPS 的转录水平有利于强化代谢流朝三七皂苷合成方向流动, 促进三七总皂苷积累。本研究首次证明了 FPS 基因在三七皂苷生物合成途径中的关键调控作用, 为未来通过将三七皂苷合成途径中的多个关键酶基因整合并实现同源或异源合成三七总皂苷奠定基础。

参考文献

- [1] He NW, Zhao Y, Guo L, et al. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic activities of a saponin extract derived from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2012, 15(4): 350-359
- [2] Mao Q, Li Y, Li SL, et al. Chemical profiles and anticancer effects of saponin fractions of different polarity from the leaves of *Panax notoginseng* [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2014, 12(1): 30-37
- [3] Yang CY, Wang J, Zhao Y, et al. Anti-diabetic effects of *Panax notoginseng* saponins and its major anti-hyperglycemic components [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 130(2): 231-236
- [4] Xia W, Sun CH, Zhao Y, 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
- [5] Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, 66(8): 1619-1627
- [6] Niu YY, Luo HM, Sun C, 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
- [7] Luo HM, Sun C, Sun YZ, 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
- [8] 孙颖,赵恒伟,葛锋,等.三七中 SS 基因超表达载体的构建及其遗传转化[J].*药学学报*,2013,48(1):138-143
SUN Ying, ZHAO Heng-wei, GE Feng, et al. The construction of over-expression vector for *Panax notoginseng* SS gene and its transformation [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013, 48(1): 138-143.
- [9] 赵玉军,叶和春,李国风,等.优系青蒿法呢基焦磷酸合酶基因的克隆和酶学分析[J].*科学通报*,2003,48(2):162-166
ZHAO Yu-jun, YE He-chun, LI Guo-feng, et al. Cloning and enzymatic analysis of excellent clones of *Artemisia annua* farnesyl diphosphate synthase gene [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(2): 162-166
- [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] Cho WCS, Chung WS, Lee SKW, et al. Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 550(1-3): 173-179
- [12] Qu DF, Yu HJ, Liu Z, et al. Ginsenoside Rg1 enhances immune response induced by recombinant *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen [J]. *Veterinary Parasitology*, 2011, 179(1-3): 28-34
- [13] Ruan CC, Zhang H, Zhang LX, et al. Biotransformation of ginsenoside Rf to Rh1 by recombinant β -glucosidase [J]. *Molecules*, 2009, 14(6): 2043-2048
- [14] 周超群,周珮.人参皂苷 Rd 的研究进展[J].*中草药*,2009, 40(5):832-836
ZHOU Chao-qun, ZHOU Pei. Advances in studies on ginsenoside Rd [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2009, 40(5): 832-836