

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.02.019

张志平,仇键,杨文凤,等. 巴西橡胶树鲨烯合酶基因的克隆与序列分析[J]. 广西植物,2014,34(2):235—241

Zhang ZP, Qiu J, Yang WF, et al. Cloning and bioinformatics analysis of squalene synthase gene (SQS) from *Hevea brasiliensis*[J]. Guihaia, 2014, 34(2):235—241

巴西橡胶树鲨烯合酶基因的克隆与序列分析

张志平^{1,2}, 仇 键², 杨文凤², 魏 芳², 校现周^{2*}

(1. 海南大学 园艺园林学院, 海南 儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院 橡胶研究所, 海南 儋州 571737)

摘 要: 鲨烯合酶(SQS)是植物甾醇和三萜化合物生物合成途径中的关键酶。以巴西橡胶树为试验材料,提取胶乳总 RNA,利用 RT-PCR 以及 RACE 的方法克隆橡胶树鲨烯合酶 cDNA 编码区片段,并进行序列分析。结果表明:橡胶树鲨烯合酶 cDNA 编码区为 1 239 bp,编码 413 个氨基酸,命名为 *HbSQS*。荧光定量分析表明鲨烯合酶基因在不同组织里表达水平存在明显差异,且受乙烯调控。

关键词: 橡胶树; 鲨烯合酶; 序列分析

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)02-0235-07

Cloning and bioinformatics analysis of squalene synthase gene (SQS) from *Hevea brasiliensis*

ZHANG Zhi-Ping^{1,2}, Qiu Jian², YANG Wen-Feng²,
WEI Fang², XIAO Xian-Zhou^{2*}

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Danzhou 571737, China;

2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: Squalene synthase (SQS) is a key enzyme in plant terpenoid biosynthetic pathway. The total RNA were extracted from *Hevea brasiliensis* latex, and the cDNA of squalene synthase was cloned using RT-PCR and RACE strategy. The results showed that the cDNA (named as *HbSQS*) contained a 1 239 bp open reading frame and encoded a predicted protein of 413 amino acids. SYBR Green I Real Time RT-PCR analysis indicated that the *HbSQS* was more highly expressed in bark than in leaf. The transcription of *HbSQS* in latex was induced by ethylene.

Key words: *Hevea brasiliensis*; squalene synthase; sequence analysis

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)作为天然橡胶的主要来源,在世界经济发展中一直占有重要地位,是一种非常重要的热带经济及能源作物。核磁共振分析表明法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)是天然橡胶合成的起始物,同时它也是植物倍半萜、三萜的前体,在植物类萜代谢途径中占据非常重要的位置。鲨烯合酶(squalene synthase, SQS)是三萜合成代谢关键酶,定位于内质网膜上,它能催

化两分子的法尼基焦磷酸缩合生成甾醇、胆固醇和三萜等萜烯类化合物的第 1 个前体—鲨烯(Pandit et al., 2000; 李季伦等, 1993)。正向调节刺五加, 人参, 甘草, 猫掌树鲨烯合酶的活性, 其体内甾醇及萜烯类物质含量上升(Seo et al., 2005; Lee et al., 2004; Lu et al., 2009; Flores et al., 2002)。而反向调节鲨烯合酶的活性时, 可抑制法尼基焦磷酸向鲨烯转化, 促进植物中倍半萜如青蒿素, 二萜如赤霉素

收稿日期: 2013-06-14 修回日期: 2013-09-21

基金项目: 中国热带农业科学院橡胶研究所基本业务费专项(1630022011021)

作者简介: 张志平(1987), 男, 湖北黄冈人, 在读硕士, 植物学专业, (E-mail) zzp19521225@163.com。

*通讯作者: 校现周, 研究员, 研究方向为植物生理学, (E-mail) xz_xiao@21cn.com。

及类萜如类胡萝卜素的积累(Woerdenbag *et al.*, 1993; HU *et al.*, 2004; Buchanan *et al.*, 2004)。鉴于此酶在萜烯生物合成以及相关的橡胶合成代谢中的重要作用,本研究首次克隆到了巴西橡胶树的 SQS 的完整编码序列,并进行了序列生物信息学和表达模式分析,为进一步研究其对天然橡胶生物合成的影响以及巴西橡胶树萜烯代谢奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

橡胶树胶乳和幼叶均采自种植于中国热带农业科学院试验农场巴西橡胶树无性系热研 7-33-97。选取 18 棵树形及生长状态相近的巴西橡胶树,采用 1/2 割线,每株涂抹质量分数为 0.5% 乙烯利糊剂,每株 2 g,处理时间为 6、12、24、48、72 h。每个处理时间及对照均有 3 个重复,剩余 3 棵不做任何处理,作为其处理对照(CK),每个处理组重复 1 次。收集不同处理时间的橡胶树胶乳,冰盒带回实验室提取 RNA。同时选取 3 棵长势及生理状态相近的巴西橡胶树,分别采集每棵树上古铜期、淡绿期、成熟期叶片及树皮,重复采集 1 次,液氮处理后带回实验室提取 RNA。

感受态细胞 *E. coli* (DH5 α) 来自上海 TIAN-GEN 公司。RevertAidTM cDNA 第一链合成试剂盒、Taq 酶、DNase I、pMD18-T 载体和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa);引物合成和测序工作均由上海英骏生物技术有限公司完成;其它生化试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 橡胶树总 RNA 的提取与 cDNA 第一链合成 橡胶树胶乳总 RNA 的提取采用 CTAB-LiCl 沉淀法(唐朝荣等,2007)。橡胶树树叶、树皮总 RNA 提取用 CTAB 法进行(邓柳红等,2005)。利用 DNase I 酶去除 RNA 中残留的微量 DNA, cDNA 第一链的合成按照试剂盒说明进行。

1.2.2 巴西橡胶树 SQS 基因部分片段的获取 根据报道的其他物种的 SQS 基因序列,发现 SQS 基因 5' 高度保守,用 Primer 5.0 软件设计引物,SS-F2 5'-AGGCCTGTCCAAACTTTTCC-3'; 和 SS-B: 5'-1 GGCTGATGGCTCATAAATGC-3', 以巴西橡胶树胶乳 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,产物切胶回

收后连接到 pMD18-T 载体上,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,送上海英骏生物技术有限公司测序。利用 BLAST 工具对所测序列进行同源性比对,确认该基因片段。

1.2.3 3' RACE 扩增和全长编码序列克隆 根据 SQS 基因片段测序结果设计 3' RACE 的基因特异引物 SS-F1: 5'-ATAATGGGAAGTTTGGGAGG-3'; SS-F3: 5'-GAGTCCATAGGCATGGAGTACA-3'; oligodT-M13: 5'-GTTTTCCCACTCACGACT-3' 进行 RACE 扩增,将扩增的条带经切胶回收后连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌后测序。

1.2.4 荧光定量 分别提取橡胶树古铜期、淡绿期、成熟期叶片,树皮总 RNA。分别采集乙烯利处理 6、12、24、48、72 h 后的胶乳并提取其总 RNA。取 2 μ L RNA 用 DEPC 水稀释至 0.5 mL 用紫外分光光度计检测, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值。调整 RNA 浓度,逆转录成 cDNA。设计荧光引物, SA1: 5'-GATTTGGCACCAGATGTCCT-3'; SB1: 5'-GCCAAAA-CATGCGTGACTION-3'; 以 18S 为内参基因(18s-F5'-GGTCGCAAGGCTGAACT-3'; 18s-R 5'-ACGGGCGGTGTGTACAAA-3'), 运用 LightCycler 4.05 软件对橡胶树的古铜期、淡绿期、成熟叶片及树皮进行 SQS 基因的组织表达分析,以及乙烯利诱导 SQS 基因表达分析。

1.2.5 生物信息学分析 利用在线软件 BESTORF (<http://www.softberry.com/all.htm>) 进行编码序列(Coding sequence, CDS) 和开放阅读框(Open reading frame, ORF) 预测; 利用在线 TMHMM2.0 工具对 SQS 进行跨膜螺旋区域预测; 通过 Prosite 数据库分析 SQS 蛋白质结合位点; 利用 mega 5.0 软件对橡胶树的 SQS 基因进行同源性比对及系统进化树的构建。

2 结果与分析

2.1 橡胶树 SQS 基因编码区序列的克隆与序列分析

CTAB-LiCl 沉淀法提取橡胶树胶乳 RNA, 甲醛凝胶电泳显示, 28S rRNA 与 18S rRNA 条带清晰明显, 说明所提取的总 RNA 的完整性良好, 没有降解。以保守区特异引物 SS-F2 和 SS-B 进行 PCR, 从橡胶树胶乳的 cDNA 中扩增出约 600 bp 的片段(图 1)。所得片段经测序和 BLAST 同源比对, 确定为橡胶树 SQS 基因保守区片段。根据测序结

果,设计 3'RACE 上游特异引物 SS-F3,以 SS-F2、SS-F3 与接头引物 oligo dT-M13 进行两轮 PCR 扩增,获得了约为 1 200 bp 的片段(图 1),经测序和序列分析表明该片段为橡胶树 SQS 基因,包含了完整的 3'编码区。不同植物 SQS 基因的 5'端编码区较保守,因此根据对其他物种 SQS 进行比较,设计含有起始密码子特异引物 SS-F1,与 SS-B 扩增获得了包含了完整 5'端编码区的橡胶树 SQS 基因。

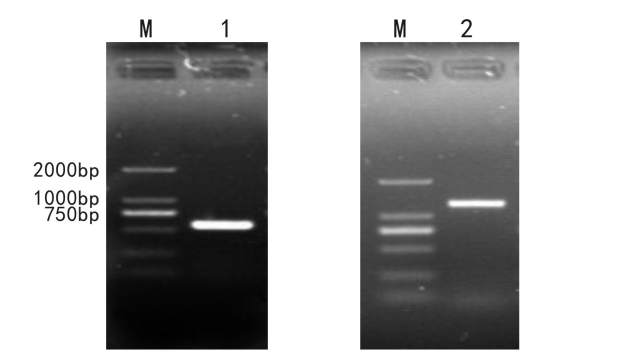


图 1 SQS 保守区片段扩增和 3'RACE 扩增
M. DL 2000; 1. 保守区 PCR 产物; 2. 3'RACE 扩增产物。
Fig.1 PCR amplification of conserved regions and 3' regions M. Maker 2000; 1. conserved regions; 2. 3' regions.

拼接上述基因片段,获得含有完整编码区的橡胶树 SQS 基因 cDNA 序列,全长 1 464 bp。包含 1 239 bp 的编码区序列,编码 413 个氨基酸,命名为 *HbSQS*(图 2)。预测其蛋白质分子量为 46 967.54,理论等电点为 7.95,分子式为 $C_{2114}H_{3323}N_{561}O_{598}S_{25}$ 。

2.2 橡胶树 SQS 蛋白亲水性及疏水性分析

通过 ProtScale 工具计算橡胶树 SQS 蛋白的疏水性图谱(图 3),整体而言,疏水氨基酸(Score 为正值)的数量小于亲水氨基酸(Score 为负值)的数目,推断 SQS 编码的蛋白质为亲水性蛋白质。氨基酸残基构成方面,橡胶树 SQS 蛋白的 20 种氨基酸含量依次为 L 占 9.9%、I 占 7.5%、A 和 K 各占 7.0%、D 和 V 各占 6.8%、S 占 6.3%、R 占 5.1%、E 和 F 各占 4.8%、G 占 4.6%、T 和 Y 各占 4.1%、N 和 P 各占 3.9%、M 占 3.4%、Q 占 3.1%、C 和 H 各占 2.9%、W 占 1.0%。

2.3 橡胶树 SQS 基因的跨膜区预测

利用在线 TMHMM2.0 工具对 SQS 进行跨膜螺旋区域预测(图 4),结果表明 SQS 氨基酸中存在两个跨膜螺旋结构,分别位于 I287 和 V305、Y387 和 Y405 之间,说明该蛋白具有跨膜转运信号。

2.4 橡胶树 SQS 结构分析

SQS 的氨基酸序列中,有 6 个区域是比较保守的(Robinson *et al.*,1993)。其中有 3 个(III、IV、V)高度保守,它们在氨基酸序列上分别位于第 168~186、202~217 和 285~298 位,这些结构域中氨基酸是该酶催化反应所必需;区域 II 虽然保守性较低,但在此区域中含有两个高度保守的天冬氨酸残基,被认为是 Mg^{2+} 结合的位点;区域 VI 保守性也较低,但含有一个高度疏水序列(又称疏水区域),被认为与酶和内质网膜的结合有关;区域 I 的保守性则较低。用在线软件 EXPASY 分析了橡胶树 SQS 基因结构域,发现该基因编码氨基酸序列含有 Trans_IPPS_HH 的保守区域,且该蛋白的 168~183 和 201~229 位氨基酸为鲨烯合酶和八氢番茄红素合成酶特异性识别区域(图 5)。利用 predict protein 在线软件对 SQS 蛋白的二级结构进行了预测。结果表明:SQS 蛋白由 69.2%的 α -螺旋、1.9%的延伸主链及 28.9%的随机卷曲组成。整体分析 SQS 蛋白的结构, α -螺旋和随机卷曲是 SQS 蛋白大量的结构元件,而 β -转角和延伸链分散于整个蛋白质中。

2.5 不同物种的 SQS 基因同源性分析

利用 DNAMAN 软件对橡胶树的 SQS 基因的氨基酸序列与蓖麻 *Ricinus communis* (XP_002512982.1)、毛果杨 *Buxus hebecarpa* (XP_002305455.1)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (NP_195190.1)、水稻 *Oryza sativa* (NP_001051625.1)、烟草 *Nicotiana tabacum* (AAB08578.1)相比,它们的同源性在 69%~97%之间(图 5),反映了植物 SQS 基因在进化上的多样性。其中,单子叶植物水稻 SQS 氨基酸序列与橡胶树同源性明显低于其他双子叶植物,同为大戟科的蓖麻与橡胶树同源性则达到了 96.37%,与传统分类结果保持一致。

2.6 SQS 系统进化分析

采用 mega 5.0 软件,构建 SQS 系统进化树(图 6)。选择玉米(*Zea mays*, NP_001104839.1)、水稻(*Oryza sativa*, NP_001051625.1)、马铃薯(*Solanum tuberosum*, BAA82093.1)、西红柿(*Solanum lycopersicum*, NP_001234716.1)、烟草(*Nicotiana tabacum*, AAB08578.1)、蓖麻(*Ricinus communis*, XP_002512982.1)、柿(*Diospyros kaki*, ACN69082.1)、大豆(*Glycine max*, XP_003537842.1)、毛果杨(*Buxus hebecarpa*, XP_002305455.1)、人参(*Panax ginseng*,

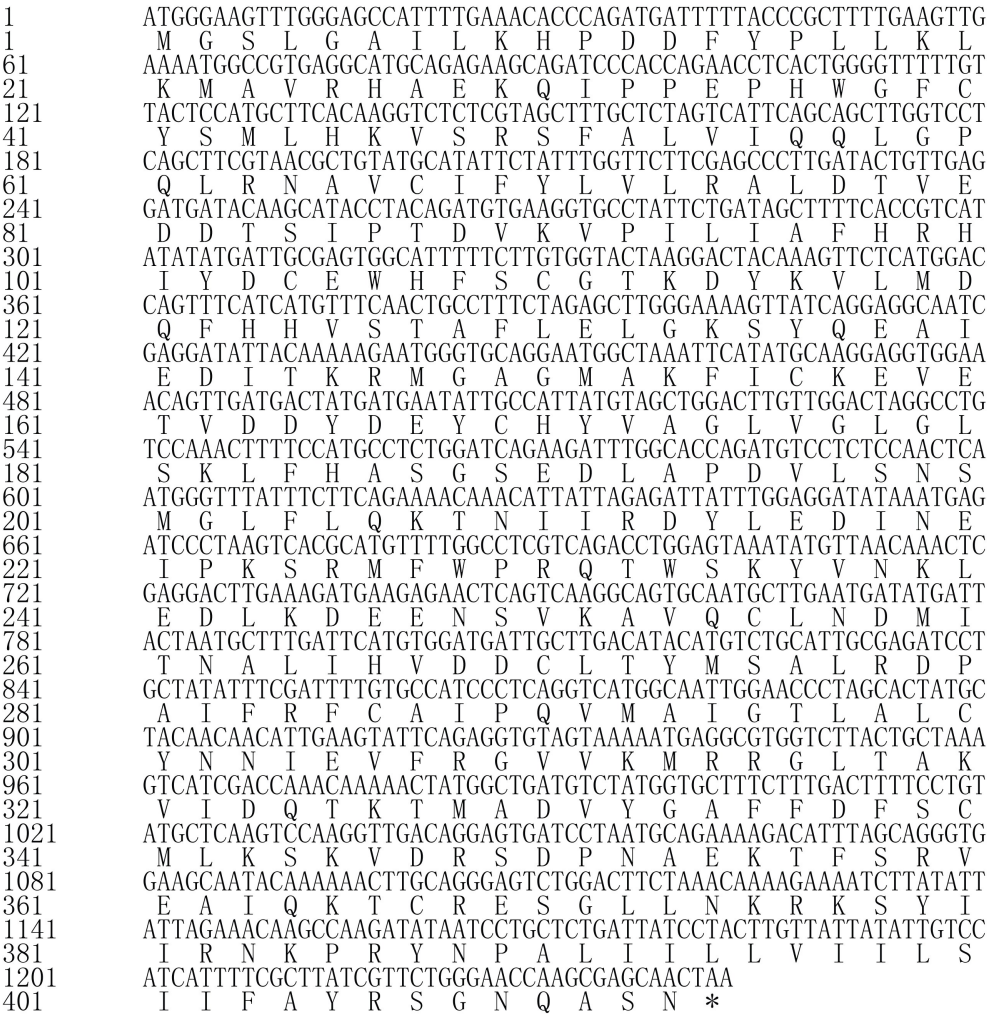


图 2 鲨烯合酶 cDNA 基因序列及推导的氨基酸序列
Fig. 2 cDNA sequence and deduced amino acids sequence of *HbSQS*

ACV88718.1)、西洋参 (*Panax quinquefolius*, CAJ58418.1)、葡萄(*Vitis vinifera*, XP_002266150.1)、黄芪(*Leguminosae*, ADW27427.1)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_195190.1)的 *SQS* 氨基酸序列进行进化分析。系统进化分析发现:巴西橡胶树与同为大戟科的蓖麻亲缘关系最近,而与玉米,水稻单子叶植物亲缘关系较远,这也符合植物自然进化规律。

2.7 橡胶树 *SQS* 表达模式分析

实验结果表明:在叶片中,随着叶片成熟度的增加,*SQS* 表达量逐步上升,树皮中表达量远大于在叶片中的表达量,说明树皮作为天然橡胶合成及贮存的场所,是橡胶生物合成代谢的中心,故 *SQS* 在树皮中表达量远高于叶片(图 7)。乙烯刺激对 *SQS* 表达影响显示:刺激 6 h, *SQS* 表达量迅速上升,在 6 h 时达到高峰,此后显著下降,在 12 h 时达到最

小,然后又呈现出随着刺激时间的增加表达量增加的态势,SAS 分析表明在乙烯利处理 6、12、24、48、72 h 后的胶乳中的 *SQS* 表达均与 ck 差异显著,说明 *SQS* 基因的表达受到乙烯利的调控(图 8)。

3 结论与讨论

本试验成功克隆了巴西橡胶树萜类代谢途径中的关键酶鲨烯合酶基因,并进行生物信息学分析。同源性分析发现该基因与蓖麻、葡萄等植物的鲨烯合酶基因具有高度同源性,他们均属于三萜类和植物甾醇类化合物合成代谢的重要调控酶——鲨烯合酶家族。跟其他植物、动物、真菌的鲨烯合酶基因相比,具有三个高度保守的区域,这些保守区域中的氨基酸与鲨烯合酶的催化活性紧密相关(Robinson

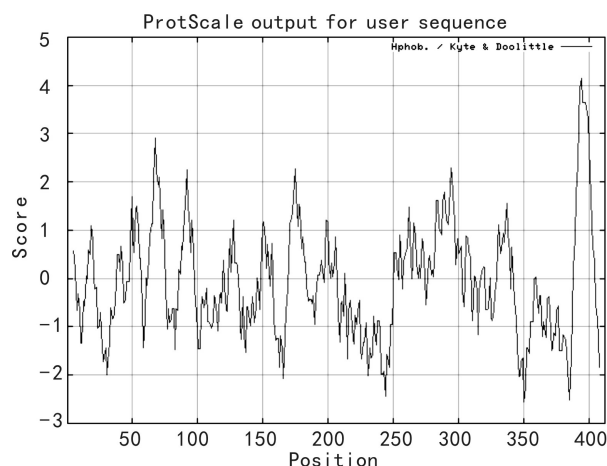


图 3 SQS 基因编码蛋白亲水性及疏水性预测
Fig. 3 Predicted hydrophobicity and drophilicity of the deduced amino acid sequence of SQS

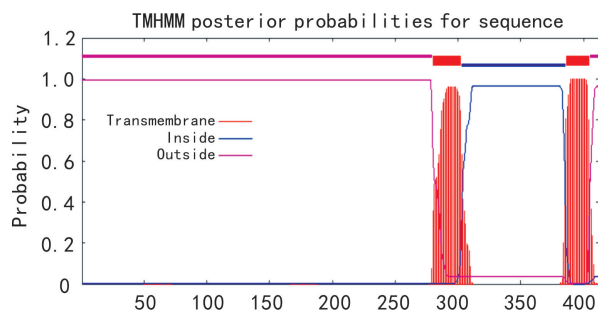


图 4 巴西橡胶树 SQS 基因跨膜区预测
Fig. 4 Predicted transmembrane helix of *HbSQS* protein

et al., 1993; Kim *et al.*, 2011)。其中第 V 个保守结构域上有个别碱基与其他来源的 SQS 存在差异。龙月红等(2012)推测了的刺五加和人参在该区域个别位点氨基酸不一致,可能导致催化活性的差异。巴西橡胶树 SQS 氨基酸序列虽然跟蓖麻的一致性最高,但巴西橡胶树 SQS 第 289 位点氨基酸为缬氨酸,但蓖麻的却是异亮氨酸。这些保守位点上存在的差异与其催化活性之间的关系有待进一步研究。

不同物种的植物鲨烯合酶基因在表达的组织特性存在较大差异,如三七 SQS 基因在根中表达水平远高于茎及芦头(吴耀生等, 2007),蛇足石杉 SQS 基因在根中表达量是在叶片中表达量的 6 倍(殷秀梅等, 2012),西洋参 SQS 基因在根、叶柄、种皮种仁等 14 个组织中表达量存在明显差异,根结构及叶结构中的表达量显著高于在叶柄及果肉中表达量(蒋世翠等, 2011)。这些可能与不同物种 SQS 基因拷贝数不同有关(Uchida *et al.*, 2009)。本试验结果

显示,巴西橡胶树叶片在不同生长时期表达量存在明显差异,这些可能与鲨烯合酶位于内质网膜上(Kathleen *et al.*, 1992),随着叶片逐渐生长发育,细胞器功能的逐步完善,使得其表达量增加。

在橡胶合成代谢过程中,乙烯能够通过促进蔗糖代谢,从而导致橡胶合成代谢所必需的碳源如乙酰辅酶 A 含量增加,从而加速橡胶合成(段翠芳等, 2004)。Northern 杂交及 RT-PCR 分析证明,许多与蔗糖代谢及橡胶生物合成相关的基因受到乙烯利的诱导,如蔗糖转运蛋白(Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2009)、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(Chye *et al.*, 1992)及 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 合成酶(Suwanmanee *et al.*, 2004)。乙烯调控响应机制复杂,目前尚无外源乙烯对橡胶萜类物质代谢影响的文献报导,推测乙烯刺激促进蔗糖代谢,导致碳源的含量增加必将提高 FPP 的含量,从而为鲨烯合成代谢提供了充足的原料,间接加速鲨烯的合成。

以往橡胶树类萜代谢研究多集中于胶乳中天然橡胶生物合成方面,对萜烯类次生代谢物研究较少。萜烯类物质作为一种具有极大应用价值和开发潜力的天然化合物越来越受到人们的青睐,成为天然产物的研究热点。近年来,人们先后分离提纯出一系列的具有重要生理功能和药用价值的萜烯类物质,比如鲨烯,人参皂苷、北柴胡皂苷、甘草皂苷等等。此外,梅志刚等(2011)也采用 GC-MS 分析了胶乳中各种萜类代谢物的种类及含量,发现胶乳中含有丰富的萜类物质,如鲨烯、T-杜松醇、 β -甾甾醇、 γ -谷甾醇、24-亚甲基环木菠萝醇等,其中鲨烯含量最高,可见鲨烯合酶在胶乳萜类代谢中发挥了重要作用。因此,本研究成功克隆鲨烯合酶基因,将为进一步了解橡胶树萜类代谢,综合利用胶乳奠定基础。

参考文献:

- Buchanan B, Gruissem W, Jones R. 2004. Plant Biochemistry and Molecular Biology: Chinese Version(植物生物化学与分子生物学·中文版)[M]. Beijing(北京): Science Press(科技出版社): 1 026-1 026
- Chye ML, Tan CT, Chua NH. 1992. Three genes encode 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed[J]. *Plant Mol Biol*, **19**: 473-484
- Deng LH(邓柳红), Xiao SS(肖苏生), Luo MW(罗明武), *et al.* 2005. Cloning and identification of a cDNA encoding putative microtubule-associated proteins from *Hevea brasiliensis*(巴西橡胶树微管相关蛋白全长 cDNA 克隆及表达分析)[J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), **13**(6): 481-481

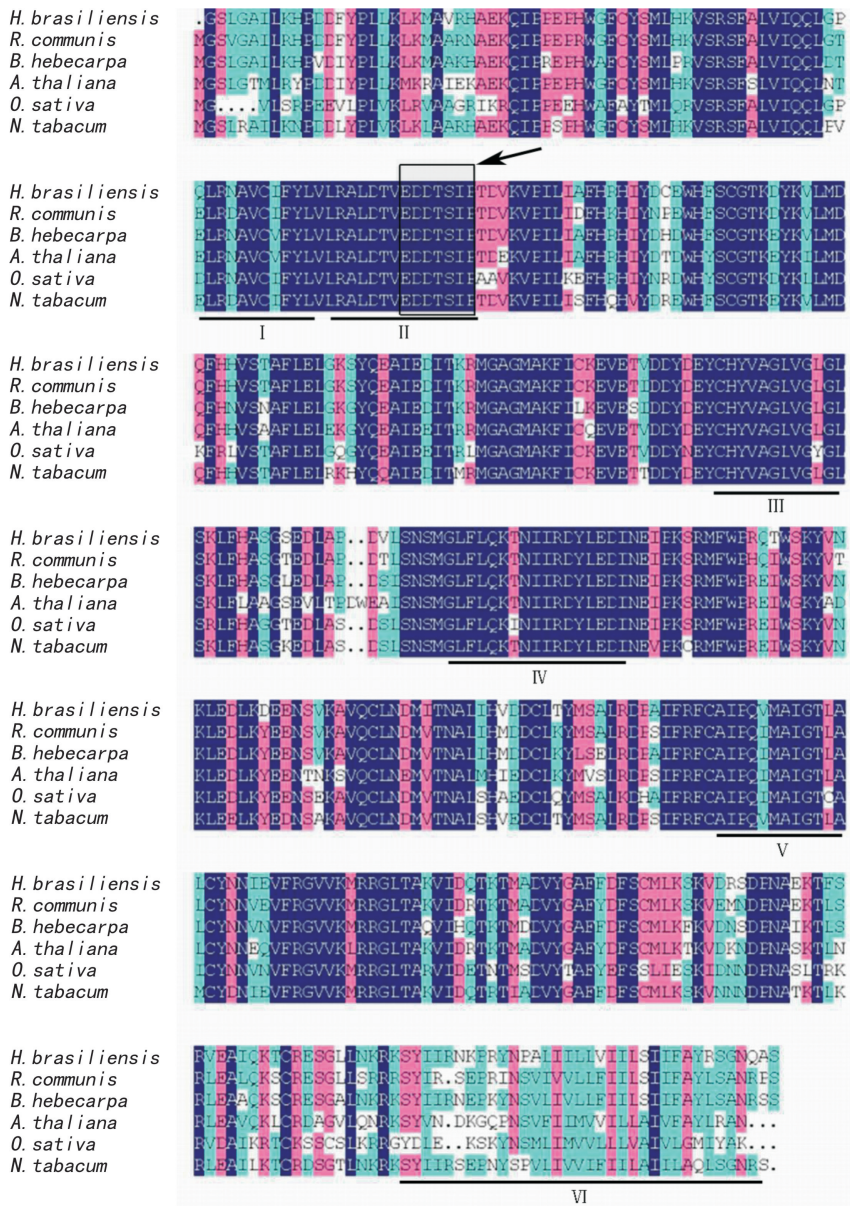


图 5 SQS 蛋白氨基酸序列比较 黑框区域为 Mg^{2+} 结合位点

Fig. 5 Comparison of deduced amino acid sequence of SQS among *H. brasiliensis* and other species Black box area is Mg^{2+} binding site

Duan CF(段翠芳),Ceng RZ(曾日中),Li Y(黎瑜). 2004. Regulation of plant hormones on biosynthesis of natural rubber in *Hevea brasiliensis*(激素对巴西橡胶树橡胶生物合成的调控)[J]. *Chin J Trop Agric*(热带农业科学),**24**: 61—68

Dusotoit-Coucaud A, Brunel N, Kongsawadworakul P, et al. 2009. Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production[J]. *Ann Bot*,**104**:635—647

Flores-Sánchez I, Ortega-López J, Montes-Horcasitas M, et al. 2002. Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension culture of *Uncaria tomentosa* [J]. *Plant Cell Physiol*,**43**(12):1 502—1 509

Hu XY(胡襄阳), Neill SJ(史蒂芬 J 奥尼尔), Fang JY(方建英), Cai WM(蔡委鸣), et al. 2004. Mitogen-activated protein

kinases mediate the oxidative burst and saponin synthesis induced by chitosan in cell cultures of *Panax ginseng* (丝裂原活化蛋白激酶介导的氧化突发和几丁聚糖在细胞培养中的人参皂甙合成中的作用)[J]. *Sci Chin Life Sci* (中国科学: 生命科学),**47**(4):303—312

Jiang SC(蒋世翠), Liu WC(刘伟灿), Wang Y(王义), et al. 2011. Correlation between ginsenoside accumulation and SQS and SQE gene expression in different organs of *Panax quinquefolius* (西洋参不同器官皂苷量与鲨烯合成酶和鲨烯环氧化酶基因表达的相关性)[J]. *Chin Trad & Herb Drug* (中草药),**42**(3):579—584

Kathleen H, Joseph C. 1992. Solubilization, partial purification, and immune detection of squalene synthase from tobacco cell suspension cultures[J]. *Plant Physiol*,**98**:215—220

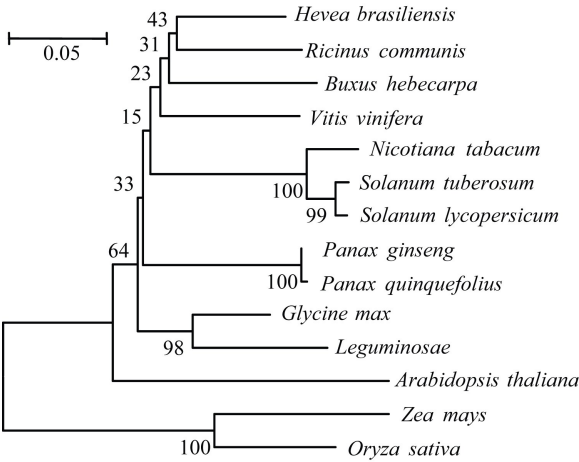


图 6 不同物种 SQS 分子系统发生树
Fig. 6 Phylogenetic tree of SQS from various species

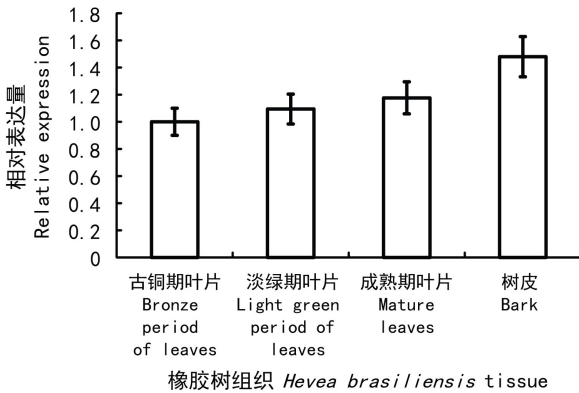


图 7 橡胶树 SQS 基因的组织荧光定量表达分析
Fig. 7 Quantitative analysis of SQS expression from *H. brasiliensis* tissue

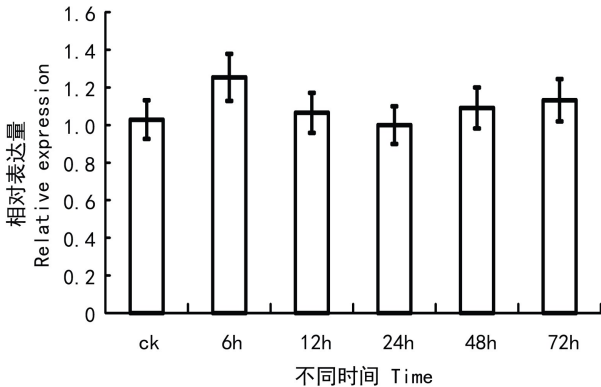


图 8 橡胶树 SQS 基因不同乙烯刺激时间荧光定量表达分析
Fig. 8 Quantitative analysis of *HbSQS* gene expression in latex under ethylene stimulation

Kim YS, Han JY, Huh GH *et al.* 2011. Expression and functional characterization of three squalene synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, **52**(1):125–137

Lee MH, Jedlg JH, Seo JW, *et al.* 2004. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, **45**(8):976–984

Li JL(李季伦), Zhang WX(张伟心), Yang QR(杨启瑞), *et al.* Microbial Physiology(微生物生理学) [M]. Beijing(北京): Beijing Agricultural University Press(北京农业大学出版社): 227–231

Lu HY(卢虹玉), Liu JM(刘敬梅), Zhang HC(张海超), *et al.* 2009. Culture of transgenic *Glycyrrhiza uralensis* hairy root with licorice squalene synthase(SQS) gene(乌拉尔甘草转鲨烯合成酶基因毛状根系研究) [J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **4**(15):1 890–1 893

Mei ZG(梅志刚), Liu SZ(刘实忠), Xiao XZ(校现周), *et al.* 2011. Analysis of chemical components of the latex from *Hevea brasiliensis* by GC-MS(巴西橡胶树胶乳化学成分的 GC-MS 分析) [J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), **32**(2):315–319

Pandit J, Danley DE, Schulte GK, *et al.* 2000. Crystal structure of human squalene synthase, a key enzyme in cholesterol biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, **275**(39):30 610–30 617

Robinson GW, Tsay YH, Kienle BK, *et al.* 1993. Conservation between human and fungal squalene synthetases: similarities in structure, function and regulation [J]. *Mol Cell Biol*, **13**(5): 2 706–2 717

Seo JW, Jeong JH, Shin CG, *et al.* 2005. Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation [J]. *Phytochemistry*, **66**(8):869–877

Suwanmanee P, Sirinupong N, Suvachittanont W. 2004. Regulation of the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene in *Hevea brasiliensis* [J]. *Mull Arg Plant Sci*, **166**:531–537

Tang CR(唐朝荣), Qi JY(戚继艳), Li HP(李和平), *et al.* 2007. A convenient and efficient protocol for isolating high quality RNA from latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree)(一种方便快捷的从巴西橡胶树胶乳中提取高品质 RNA 方法的研究) [J]. *J Biochem Biophys Methods*(生物化学和生物物理方法), **70**(5):749–754

Uchida H, Yamashita H, Kajikawa M, *et al.* 2009. Cloning and characterization of a squalene synthase gene from a petroleum plant, *Euphorbia tirucalli* [J]. *Planta*, **229**(6):1 243–1 252

Woerdenbag HJ, Lüers JF, Uden W, *et al.* 1993. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **32**(2):247–257

Wu YS(吴耀生), Zhu H(朱华), Li K(李坤), *et al.* 2007. Transcription expression of squalene synthase gene in root, stem and rootstock of *Panax notoginseng* and synthesis of triterpenoids(三七鲨烯合酶基因在三七根、茎、芦头中的转录表达与三萜皂苷合成) [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), **23**(12):1 000–1 005

Yin XM(殷秀梅), Bai ZC(白志川), Niu YY(牛云云), *et al.* 2012. Cloning and analysis of squalene synthase (*HsSQS1*) gene in *Huperzia serrata*(蛇足石杉鲨烯合酶基因 SQS 的克隆和序列分析) [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), **47**(8):1 079–1 084