

金铁锁鲨烯合酶 cDNA 的克隆和功能鉴定

戴住波¹, 钱子刚^{2,3*}, 胡运乾², 黄璐琦¹

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650204;
3. 云南中医学院 中药学院, 云南 昆明 650200)

摘要: 濒危药用植物金铁锁 (*Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu.) 的有效成分三萜皂苷有显著的药理活性。为克隆和鉴定金铁锁三萜皂苷生物合成途径中的关键酶基因——鲨烯合酶的全长 cDNA, 本研究采用同源兼并引物 PCR 和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 等方法克隆了其全长 cDNA; 结合大肠杆菌异源表达、体外酶促反应及针对产物化学结构的 GC 和 GC-MS 分析等方法鉴定了其功能。研究表明: 金铁锁鲨烯合酶 cDNA 全长为 1 663 bp, 含有 1 245 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 414 个氨基酸 (计算分子质量为 47.69 kD), 5' 非编码区 (UTR) 和 3' UTR 分别为 260 bp 和 158 bp, GenBank 注册号为 EF585250, 与三七、人参和甘草的鲨烯合酶的氨基酸序列有较高的同源性, 分别为 83%、82% 和 82%, 而与裂变酵母、白色念珠菌和人的氨基酸序列的同源性分别只有 35%、39% 和 47%; 表达产物具有催化两分子法呢烯焦磷酸连接成鲨烯的活性。本研究克隆和鉴定了金铁锁鲨烯合酶的全长 cDNA, 为金铁锁次生代谢工程研究提供了重要基础。

关键词: 金铁锁; 三萜皂苷; RACE; GC-MS; 金铁锁鲨烯合酶

中图分类号: R915.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2008)12-1245-06

Cloning and characterization of cDNA encoding *Psammosilene tunicoides* squalene synthase

DAI Zhu-bo¹, QIAN Zi-gang^{2,3}, HU Yun-qian², HUANG Lu-qi¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Kunming Institute of Botany, CAS, Kunming 650204, China;

3. Department of Chinese Materia Medica, Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650200, China)

Abstract: The total triterpene saponins of *Psammosilene tunicoides* have significant pharmacologic activity. *Psammosilene tunicoides* squalene synthase (PSS) is a gateway enzyme to regulate the biosynthesis of total triterpene saponins extracted from the root of *Psammosilene tunicoides* which is an endangered species. In this paper, cDNA encoding of PSS was cloned by the degenerate primer PCR and rapid-amplification of cDNA ends (RACE). The full-length of cDNA of PSS is 1 663 bp, with an open reading frame (ORF) of 1 245 bp, encoding 414 amino acid polypeptide (calculated molecular mass, 47.69 kDa), 5'UTR (untranslated region) and 3'UTR are 260 bp and 158 bp, respectively. The deduced amino acid sequence of PSS has higher homology with the known squalene synthases of several species such as *Panax notoginseng* (83%), *Panax ginseng* (82%) and *Glycyrrhiza glabra* (82%) than that with *Schizosaccharomyces pombe* (35%), *Candida albicans* (39%) and *Homo sapiens* (47%). The characterization of PSS was done by a series of methods, such as prokaryotic expression, the activity of enzyme *in vitro*, capillary gas chromatography (GC) and capillary gas chromatography mass spectrometry

收稿日期: 2008-04-18.

基金项目: 云南省科技攻关及高新技术发展项目资助项目(2006SG17); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(06Y325C).

*通讯作者 Tel: 86-871-6212605, Fax: 86-871-6212608, E-mail: qianzig@yahoo.com.cn

(GC-MS). The results showed that the cell-free extract of *E. coli* transformed with the recombinant plasmid can effectively convert farnesyl diphosphate into squalene *in vitro*. GenBank accession number is EF585250. Our research provided important base for the study of *Psammosilene tunicoides* secondary metabolism and metabolic engineering.

Key words: *Psammosilene tunicoides*; triterpene saponins; RACE; GC-MS; *Psammosilene tunicoides* squalene synthase

金铁锁 (*Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu) 系石竹科 (Caryophyllaceae) 单种属药用植物, 为中国西南特有濒危物种^[1], “云南白药”的处方药材。其有效部位金铁锁皂苷(主要以三萜为苷元)在抗类风湿性关节炎、镇痛、抗炎和提高免疫等方面有显著的药理活性^[2~5]。萜类基本骨架的合成是生物体内碳源在多种生物酶的催化下, 连接、环化而成。鲨烯合酶(squalene synthase, SS)能催化两分子的法呢烯焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)连接成30个碳的鲨烯, 是碳源流向三萜的关键调节酶^[6]。鲨烯通常经鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)氧化后, 在鲨烯环化酶(squalene cyclase, SC)的作用下, 环合成各种在医药工业中有重要开发前景的环合三萜类骨架的化合物, 如人参皂苷、三七皂苷、柴胡皂苷、甘草皂苷等^[7]。因此以金铁锁鲨烯合酶(*Psammosilene tunicoides* squalene synthase, PSS)及其基因为研究对象, 不但对高等植物中的三萜类的生物合成机制探讨有重要贡献, 而且能通过应用次生代谢工程技术提高金铁锁三萜皂苷的产量, 为濒危物种金铁锁的合理保护和综合利用提供基础。

材料与方 法

植物材料 新鲜金铁锁(*Psammosilene tunicoides*)根。

试剂 BD SMARTTM RACE cDNA amplification kit(Clontech), BD AdvantageTM 2 PCR kit(Clontech), bacterial protein extraction kit (Bio Basic Inc.), pMD19-T Vector (TaKaRa), DH5 α 菌株(中国科学院昆明植物研究所赠送), BL21 (DE3) 菌株(中国医学科学院医药生物技术研究所赠送), *Pyrob* DNA polymerase (TaKaRa), Xho I (TaKaRa), Nco I (TaKaRa), pET-32a(+) vector(Novagen), Sephadex G-25 (Pharmacia), FPP(95%, Sigma), 鲨烯(squalene, 98%, Sigma), 引物由上海生工合成, 其他试剂为分析纯。

总 RNA 的提取 CTAB 法: 改良 Zeng 和

Yang^[8]的方法和操作步骤进行提取。

RACE-ready first-strand cDNA 的合成 取总 RNA 样品 1.0 μ g, 按 BD SMARTTM RACE cDNA amplification kit 进行合成, 产物加 100 μ L Tricine-EDTA buffer 混合均匀, 72 $^{\circ}$ C, 7 min 后, 置于 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

PSS 核心基因片段的获得 根据鲨烯合酶的同源保守区设计兼并引物: Fp320: 5'-TTGAYACYGTTGAGGATGAYACNAGY-3'; Rp1022: 5'-AGACCTCGCCTCANTTTNACNACNCCYC-3'。按照 BD AdvantageTM 2 PCR kit 操作。模板为 5' RACE-ready first-strand cDNA; PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 1 cycle; 94 $^{\circ}$ C 30 sec; 55 $^{\circ}$ C 30 sec; 72 $^{\circ}$ C 2 min, 32 cycles; 72 $^{\circ}$ C 8 min, 1 cycle; 4 $^{\circ}$ C 终止。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 并切胶回收后, 测序得到 DNA 的序列信息。

5'和3'RACE 以 PSS 核心基因片段为模板, Primer 5.0 设计 5'和 3' RACE 反应引物, 5PSS: 5'-TGCCATTCCTGCACCCATCCTCTTG-3' 和 3PSS: 5'-AGGAGGTGGAAACAGTTGACGATTACG-3', 按照 BD SMARTTM RACE cDNA amplification kit 操作。5'和 3' RACE 的 PCR 条件相同: 94 $^{\circ}$ C 30 sec; 68 $^{\circ}$ C 30 sec; 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 cycles; 72 $^{\circ}$ C 8 min, 1 cycle; 4 $^{\circ}$ C 终止。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 并切胶回收后, 测序得到 DNA 的序列信息。

获得全长 PSS cDNA 用 DNASTAR 软件拼接出全长序列, 用 Primer 5.0 设计扩增全长 PSS cDNA PCR 引物: FPSS: 5'-GATTCCTACTAGGATTTTCCTGACACCAC-3' 和 RPSS: 5'-CTGCTATGGAATTCCTTCCCTGTG-3', 用 5' RACE-ready first-strand cDNA 为模板, 按照 BD AdvantageTM 2 PCR kit 操作。PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 sec; 59 $^{\circ}$ C 30 sec; 72 $^{\circ}$ C 2 min, 32 cycles; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 1 cycle; 4 $^{\circ}$ C 终止。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收后, 插入 pMD19-T 载体, 转入大肠杆菌 DH5 α 中。菌株在含 50 μ g \cdot mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选, 经菌落

PCR 验证后再测序验证。用阳性单克隆菌株提取质粒, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

表达载体构建

含 Xho I 和 Nco I 酶切位点的 F-A DNA 制备以含全长 PSS cDNA 的质粒为模板, FNco: 5'-CGCC ATGGGGAGTTTAGGTGCAATA-3' 和 RXho: 5'-GCC CTCGAGTTAGTAGTTATTTTGGCCG-3' 为引物, 用 Pyrobest DNA polymerase 高保真酶进行 PCR, 得到目标 F-A DNA。PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 min, 1 cycle; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 sec; $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 sec; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 32 cycles; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 8 min, 1 cycle; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终止。产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 并切胶回收后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

酶切和连接反应 将 F-A DNA 和 pET-32a (+) vector 分别用 Xho I, Nco I 双酶切, 并回收。双酶切反应体系: Xho I, $1\text{ }\mu\text{L}$; Nco I, $1\text{ }\mu\text{L}$; $10\times\text{K}$ buffer, $2\text{ }\mu\text{L}$; BSA (0.01%), $2\text{ }\mu\text{L}$; F-A or pET-32a (+), $1\text{ }\mu\text{g}$; 加去离子水至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。混合均匀后, 瞬时离心, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 3 h, 1% 琼脂糖凝胶分离后, 切胶回收。将酶切和回收后的 F-A DNA 与 pET-32a (+) DNA 经 T4 连接酶连接, 获得 F-A-vector。将 F-A-vector 转入大肠杆菌 DH5 α 中, 菌株在含 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选, 经菌落 PCR 验证后再测序验证。用阳性单克隆菌株提取质粒, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

IPTG 诱发原核表达和粗蛋白的提取 将 pET-32a (+) vector (空载体) 和 F-A-vector 分别转入表达菌株 BL21 (DE3) 中, 挑取阳性菌株 (测序验证) 转接于 50 mL 含 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至对数生长期 ($A_{600} = 0.3\sim 0.5$), 约 2.5 h。再向 LB 培养基中加入 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 至终浓度为 $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续培养 3.5 h, 离心收集表达菌体后, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。粗蛋白的提取参考 bacterial protein extraction kit 进行操作。提取的可溶性粗蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分析后, 将含目标蛋白的提取液过 Sephadex G-25 小柱, 用 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液洗脱, 去除小分子后作酶液使用。

体外酶功能验证 以 FPP 为反应底物进行体外酶功能研究^[9], 反应体系为: $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPHN₄; $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5); $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂; $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT; 2% glycerin; $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酶液; $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ FPP。混匀, 水浴

$32\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 h。直接加入 1 倍体积 *n*-hexane, vortex 提取 3 次 ($1\text{ mL}\times 3$ 次), 合并提取液, 用 MgSO₄ 脱水 30 min。真空浓缩至干, 加 $15\text{ }\mu\text{L}$ *n*-hexane 复溶, 取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 进样, 以鲨烯作为标准品, 结合 GC 和 GC-MS (Agilent Technologies Corp. HP6890C/5973 MS, wiley7n.1 谱库检索) 对产物定性^[10]。

结果

1 全长 PSS cDNA 及 PSS 同源性分析

PSS cDNA 全长 1 663 bp, ORF 长 1 245 bp, 编码 414 个氨基酸, 5'UTR 和 3'UTR 分别为 260 bp 和 158 bp, GenBank 注册号为 EF585250。经 Vector NTI 9.0 软件分析: PSS 蛋白质分子质量为 47.69 kD, 等电点为 7.67。经 BLAST 分析, 它与其他鲨烯合酶的 E-value 最低达 $2e^{-79}$ 。将 PSS 和 GenBank 中有代表性物种的鲨烯合酶氨基酸序列用 Vector NTI 9.0 软件中的 AlignX 进行分析, 表明金铁锁与三七、人参、甘草、烟草的鲨烯合酶的氨基酸序列有较高的同源性, 分别为 83%、82%、82% 和 82%; 而与裂变酵母、白色念珠菌和人分别只有 35%、39% 和 47% 的同源性。在用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 建立的鲨烯合酶氨基酸序列的系统进化树中可以看到①来源于植物、动物和真菌的鲨烯合酶分为 3 个明显的类群; ② 单子叶植物纲与双子叶植物纲分支明显, 支持率为 100%; ③ 各科间、科内聚类分支也有较高的支持率; ④ 石竹科的金铁锁鲨烯合酶氨基酸序列的系统进化关系较独立于真双子叶植物类, 与单子叶植物纲的植物关系较近 (图 1)。

2 SDS-PAGE 分析结果

把 pET-32a (+) vector 和 F-A-vector 载体, 分别转入菌株 BL21 (DE3), 作为对照品 (control) 和样品 (A-3), 表达产物中的目标蛋白记为 A-1 和 K-1。用 Vector NTI 9.0 软件预测 A-1 分子质量为 64.713 kD, 等电点为 6.63、K-1 蛋白分子质量为 17.145 kD, 等电点为 5.64。经 SDS-PAGE 分析, 表明 IPTG 诱导下的 pET-32a (+) vector 和 F-A-vector 均能表达出相应的蛋白 (图 2)。

3 GC 和 GC-MS 鉴定

对照品 (control) 和样品 (A-3) 的表达产物进行体外酶反应, 产物分别用 GC 进行检测 (以鲨烯作为标准品)。结果表明: 鲨烯标准品 (standard) 在 GC 中保留时间 (RT) 为 18.925 min, 样品 A-3 的产物在保留时间 (RT) 为 18.825 min 存在特征峰, 而对照样品中没有检测到相应的特征峰, 再对样品 A-3 产

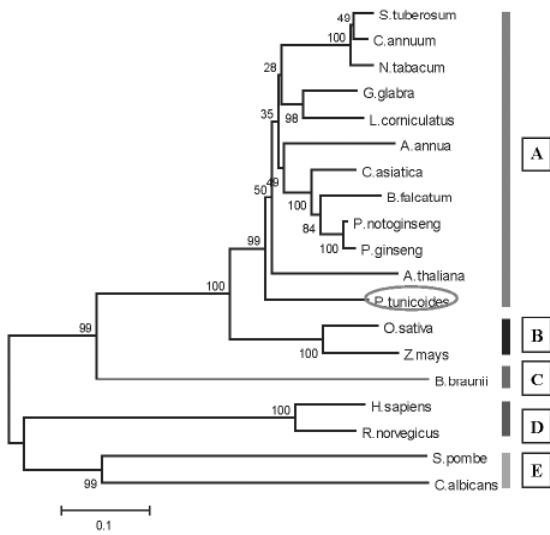


Figure 1 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of squalene synthase by Neighbor-joining method (NJ). A: Endicots; B: Monocots; C: Algae; D: Animal; E: Fungi; *S. tuberosum* (*Solanum tuberosum*, No. AB022599), *C. annua* (*Capsicum annuum*, No. AF124842), *N. tabacum* (*Nicotiana tabacum*, No. U60057), *G. glabra* (*Glycyrrhiza glabra*, No. D86409), *L. corniculatus* (*Lotus corniculatus* var. japonicus, No. AB102688), *A. annua* (*Artemisia annua*, No. AF302464), *C. asiatica* (*Centella asiatica*, No. AY787628), *B. falcatum* (*Bupleurum falcatum*, No. AY964186), *P. notoginseng* (*Panax notoginseng*, No. DQ186630), *P. ginseng* (*Panax ginseng*, No. AB010148), *A. thaliana* (*Arabidopsis thaliana*, No. D29017), *P. tunicoides* (*Psammosilene tunicoides*, No. EF585250), *O. sativa* (*Oryza sativa*, No. AB007501), *Z. mays* (*Zea mays*, No. AB007502), *B. braunii* (*Botryococcus braunii*, No. AF205791), *H. sapiens* (*Homo sapiens*, No. X69141), *R. norvegicus* (*Rattus norvegicus*, No. Q02769), *S. pombe* (*Schizosaccharomyces pombe*, No. NM_001021271), *C. albicans* (*Candida albicans*, No. XM_709416)

物中的特征峰进行 GC-MS 分析 (RT 范围 17.0 ~ 20.5 min 的特征峰的 MS 数据在 wiley7n.1 中检索分析) 定性为鲨烯 (squalene), 同时有 m/z : 410 [M]⁺、69 [CH₃(CH₃) = CHCH₂-]⁺ 等特征离子峰, 因此可以认定 F-A DNA 可表达出有催化 FPP 合成鲨烯活性的蛋白酶 (图 3)。

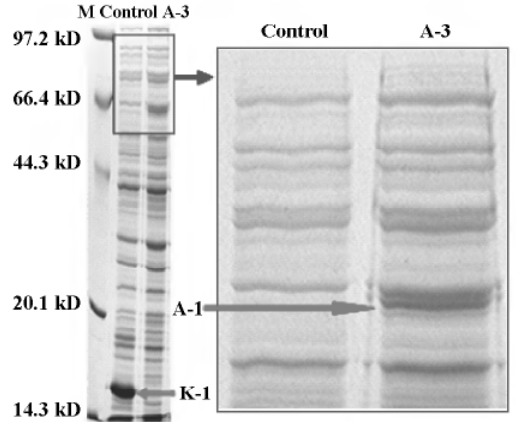


Figure 2 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins expressed in *E. coli* and visualized by Coomassie staining. M: Molecular mass markers; Control: Bacterial extract expressing empty vector; A-3: Crude bacterial extracts expressing F-A-vector; K-1: Protein expressing pET-32a (+) vector; A-1: Recombinant protein expressing F-A-vector

讨论

本研究中, 作者选择了金铁锁新鲜根提取总 RNA, 主要考虑到金铁锁有效成分的生物合成集中在根部, 这样能提高克隆到与其药用价值有关的功能基因的相对概率。对金铁锁鲨烯合酶氨基酸序列进行生物信息学分析时, 发现该序列与其他双子叶植物 (如三七、人参和甘草) 的鲨烯合酶有较高的同源性, 且发现与 Mg²⁺ 结合有关的活性中心——富含天冬氨酸的区域 (DXXDD), 其为萜类合酶典型的结构^[11,12]。

在原核表达方面, 曾报道植物鲨烯合酶定位在内质网膜上, 其 C-端的疏水区可能为膜结合区^[11,12], 这个疏水的膜结合区的存在, 会影响它在大肠杆菌中成功表达^[13], 因此大多采取截短 C-端的疏水区后进行表达^[14]。本研究中, 作者使用融合表达载体 pET-32a (+) 和 BL21 (DE3) 菌株的优势组合, 得到了可溶并完整的 PSS 蛋白。这可能是 pET-32a (+) 载体带有 N-端硫氧还原蛋白 (trxA-Tag) 编码序列的融合表达载体, 它能使在 *E. coli* 中以不溶形式存在的蛋白与 trxA-Tag 序列融合, 增加表达蛋白的溶解性^[15]; 同时利用大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达菌株的 T7 RNA 聚合酶基因可受 IPTG 诱导表达及菌株缺乏 lon 蛋白酶和 ompT 外膜蛋白酶, 可以防止表达的融合蛋白质分解等特征^[16]。

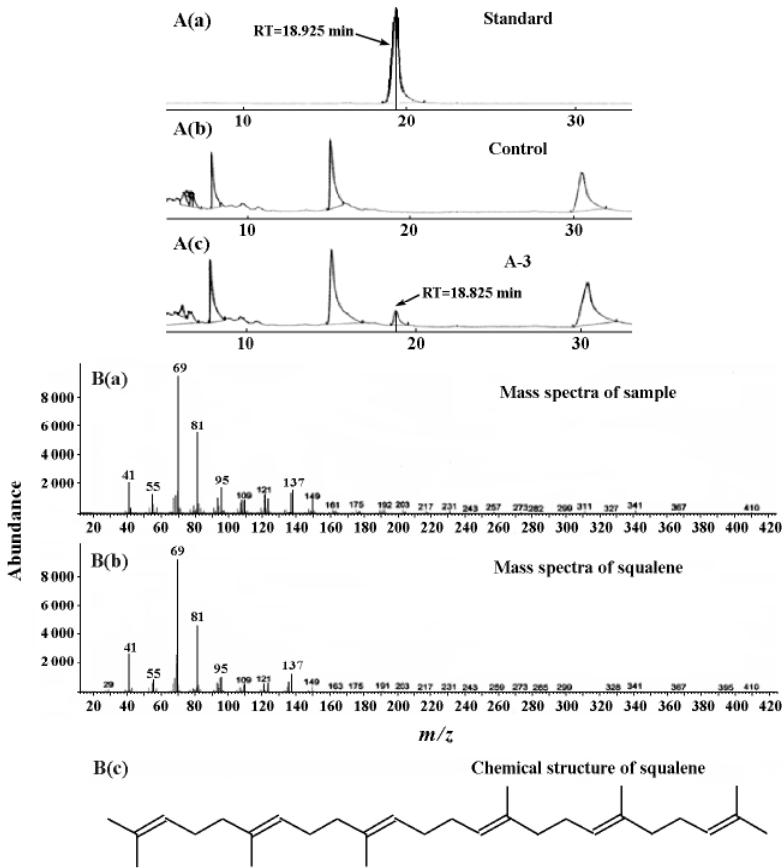


Figure 3 GC and GC-MS analysis of the product of enzyme reactivity *in vitro*. A (a): Standard, squalene (98%), RT = 18.925 min; A (b): Empty vector (pET-32a (+) vector) as a control; A (c): The product of enzyme reactivity *in vitro* (F-A-vector), RT = 18.825 min; B (a): Mass spectra of the product of enzyme (F-A-vector), RT = 18.825 min; B (b): Mass spectra of squalene from the library of wiley7n. 1; B (c): Chemical structure of squalene from the library of wiley7n. 1

作为与人体胆固醇合成有关的关键酶, 早期对鲨烯合酶的研究主要集中在医学领域中。目前在植物三萜生物合成途径研究中, 由于鲨烯合酶是竞争利用 FPP 来合成三萜, 会影响倍半萜类、二萜类等物质合成的关键酶, 因此鲨烯合酶的含量和活性决定了相关物质的产量^[17,18]。如将人参鲨烯合酶基因在刺五加中过表达, 转化株的植物甾醇及刺五加三萜皂苷类成分增加 2 ~ 2.5 倍^[19]; 相反, 在生产青蒿酸的酵母工程菌中抑制酵母鲨烯合酶活性时, 将有利于青蒿酸(倍半萜类)的合成^[20]。因此, 金铁锁鲨烯合酶的成功克隆和验证, 为利用基因工程手段提高其有效部位的含量提供重要基础。

References

- [1] Lu DQ, Liden M, Oxeman B. Flora of China; Vol 6 [M]. Beijing: Science Press, 2001:108.
- [2] Song LC. Study on the pharmacology of total saponins of *Psammosilene tunicoides* [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 1981, 3:289.
- [3] Zheng WF, Shi F. Immunomodulatory effects of total glycosides of *Psammosilene tunicoides* on cell immunity [J]. Med J Chin PAPF (武警医学), 2003, 14:598 - 602.
- [4] Wang XY, Zhang Y, Huang LQ. Effects and mechanism of total saponins of *Psammosilene tunicoides* against rheumatoid arthritis [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31:419 - 421.

- [5] Wang XY, Xu JY, Qiu DW, et al. Study on the anti-inflammatory effects and possible mechanism of total saponins of *Psammosilene tunicoides* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2006, 12: 56-58.
- [6] Bob BB, Wilhelm G, Russell LJ. Biochemistry and Molecular Biology of Plants (植物生物化学与分子生物学) [M]. Beijing: Science Press, 2004:1026-1041.
- [7] Wu LJ. Natural Medicinal Chemistry (天然药物化学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001:257-258.
- [8] Zeng Y, Yang T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides [J]. Plant Mol Biol Rep, 2002, 20:417a-417e.
- [9] Nakashima T, Inoue T. Cloning, expression, and characterization of cDNA encoding *A. thaliana* squalene synthase [J]. PNAS, 1995, 92:2328-2332.
- [10] Fu S, Xiang SX. The quantitative analysis of squalene in the health food by GC-MS [J]. Chin J Health Lab Technol (中国卫生检验杂志), 2003, 13:717.
- [11] Robinson GW, Tsay YH, Kienzle BK, et al. Conservation between human and fungal squalene synthetases; similarities in structure, function, and regulation [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13:2706-2717.
- [12] Lee JH, Yoon YH, Kim HY, et al. Cloning and expression of squalene synthase cDNA from hot pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Mol Cells, 2002, 13: 436-443.
- [13] Yasukawa T, Kanei IC, Maekawa T, et al. Increase of solubility of foreign proteins in *Escheichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin [J]. J Biol Chem, 1995, 270:25328-25331.
- [14] Devarme TP, Shin DH, Back K, et al. Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor [J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 349:205-215.
- [15] LI ZQ, Wang HH, Ye HC, et al. *Escherichia coli* expression, purification and functional identification of squalene synthase from *Artemisia annua* L. [J]. Chin J Appl Environ Bio (应用与环境生物学报), 2007, 13: 309-312.
- [16] Jennifer G, John JD. *OmpT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification [J]. J Bacteriol, 1988, 170:1245-1253.
- [17] Shechter I. The road to squalene synthase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 202:1261-1266.
- [18] Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway [J]. Nature, 1990, 343:425-430.
- [19] Seo JW, Jeong JH, Shin CG. Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation [J]. Phytochemistry, 2005, 66:869-877.
- [20] Ro DK, Paradise EM, Keasling JD, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. Nature, 2006, 440:940-943.