

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.06.024

周长富, 姚小华, 林萍, 等. 基于转录组测序对油茶角鲨烯合酶基因的克隆及分析[J]. 广西植物, 2013, 33(6):852—858

Zhou CF, Yao XH, Lin P, *et al.* Squalene synthase gene cloning and analysis of *Camellia oleifera* based on RNA-Seq[J]. *Guihaia*, 2013, 33(6): 852—858

基于转录组测序对油茶角鲨烯合酶基因的克隆及分析

周长富, 姚小华*, 林萍, 王开良, 常君

(中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 油茶是中国重要的木本油料树种, 而角鲨烯在茶籽油中含量多少是茶油品质的重要指标, 为提高油茶角鲨烯含量, 以油茶种子转录组测序为基础, 根据 Unigene 设计 SQS 基因 RACE 引物, 克隆出基因全长共 1 490 bp, 开放阅读框 1 266 bp, 编码 422 个氨基酸, 将氨基酸序列与其他植物 SQS 进行比对, 构建进化树, 分析物种间进化关系, 进行蛋白质的生物信息学分析, 包括蛋白质结构特点、理化性质、氨基酸组成及稳定性分析; 跨膜区域分析; 信号肽识别位点; 磷酸化位点; 二级结构及功能; 结构域分析。通过转录组测序和荧光实时定量分析了 SQS 基因在油茶种子发育各时期表达量变化规律, 并提取各时期油脂, 测定角鲨烯含量, 发现两种基因表达量分析的结果有一致的变化趋势, 且与各月份间角鲨烯含量有相同的变化规律。证明了转录组测序的有效性, 并推测油茶角鲨烯合酶基因的表达量变化与角鲨烯含量的多少有直接关系, 为后续从分子手段提高茶籽油中角鲨烯含量提供了理论基础。

关键词: 油茶; 角鲨烯合酶; 转录组测序; 生物信息学分析; 基因表达; 角鲨烯含量

中图分类号: Q751 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013)06-0852-07

Squalene synthase gene cloning and analysis of *Camellia oleifera* based on RNA-Seq

ZHOU Chang-Fu, YAO Xiao-Hua*, LIN Ping, WANG Kai-Liang, CHANG Jun

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China)

Abstract: *Camellia oleifera* is a very important woody oil tree, the content of squalene is one of most important factor to evaluate quality of in the *C. oleifera* oil, to increase the content of squalene from molecular biology method. Changes of SQS related Unigene among seeds development were analyzed based on RNA-Seq, changes of the squalene content in *C. oleifera* oil among seed development also tested. The result showed the same variation law. So SQS gene RACE primers were designed according to Unigene, and the full length SQS of *C. oleifera* was cloned, including 1 490 bp nucleotide, and the ORF is 1 266 bp long, encoding 422 amino acids sequence, which was blasted with that of other plants, the phylogenetic tree were mapped and analyzed. Then bio-informatics of SQS were studied, including structure, physicochemical properties, amino acid composition, and trans-membrane domain, signal peptide recognition, phosphorylation sites, function of secondary structure and domain analysis. The gene expression changes from August to October were similar to those of squalene content in seeds. It is concluded that the gene sequence encodes to be SQS of *C. oleifera* theoretically, which was a basis for the further study of functional verification and improving squalene content in *C. oleifera* seed oil.

收稿日期: 2013-03-03 修回日期: 2013-06-04

基金项目: 国家科技支撑课题(2009BADB1B01); 国家科技支撑项目(2009BADB1B00)

作者简介: 周长富(1983-), 男, 湖南浏阳人, 在读博士研究生, 从事经济林育种研究, (E-mail) zhouchangfu55@126.com。

*通讯作者: 姚小华, 研究员, 博士生导师, 从事经济林研究, (E-mail) yaoxh168@163.com。

Key words: *Camellia oleifera*; SQS; RNA-Seq; bioinformatics analysis; gene expression; squalene contents

普通油茶 (*Camellia oleifera*) 隶属于山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*), 中国南方重要的木本食用油料树种。茶油营养成分丰富, 脂肪酸结构合理, 不饱和脂肪酸含量达 90% 以上, 优于橄榄油, 是一种健康型高级食用油 (庄瑞林, 2008)。油茶一年种植, 多年收获, 且耐贫瘠, 广泛分布在目前在中国南方 11 个省市, 是一种重要的木本油料作物, 为有效破解我国食用油供应紧张、保障粮油安全起到了积极作用, 同时也是南方广阔干旱、贫瘠、板结、强酸性红壤地区的良好生态树种 (何方等, 2002)。

茶籽油中含有丰富的活性物质, 如 α -生育酚、甾醇、维生素等对油茶籽油营养保健作用以及油脂的稳定性起着重要的作用。此外茶籽油中还含有较高的角鲨烯含量, 角鲨烯具有提高体内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、增强机体免疫能力、改善性功能、抗衰老、抗肿瘤等多种生理功能, 是一种无毒性的具有防病治病作用的生物活性物质, 目前在生物保健药的应用、化妆品生产得到很大的应用, 其机构如图 1 (赵振东等, 2004)。

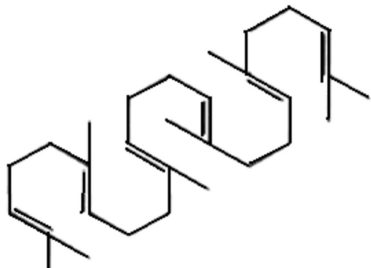


图 1 角鲨烯结构

Fig. 1 Structure of squalene

角鲨烯 (squalene) 为类固醇生物合成途径中重要的物质, 是在角鲨烯鲨烯合酶 (squalene synthetase, SQS) 的作用下催化两分子的法呢基二磷酸结合成角鲨烯, 然后在各种酶的作用下继续生成甾醇、三萜类化合物。法呢基二磷酸是很多代谢合成的底物, 如半萜、二萜、三萜、甾醇等, 因此鲨烯合酶处于由法呢基二磷酸形成甾醇、三萜等化合物的分支起点, 催化甾醇和三萜类化合物合成的起始步骤, 其含量和活性决定了后续产物的产量, 因此油茶中角鲨烯合酶代谢活性将最终关系到茶油中角鲨烯产量多少 (图 2)。目前对模式生物酵母 (Jennings *et al.*, 1991; Mookhtiar *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 1999)、拟南芥 (Nakashima *et al.*, 1995; Kribii *et*

al., 2004) SQS 基因有较深入的研究, 鲨烯合酶基因突变对于酵母是致死的, 必须依靠外源添加麦角固醇才能存活, 在烟草细胞培养物中加入真菌诱导子, 角鲨烯合酶的酶活性迅速降低, 甾醇的生物合成和积累受到抑制。目前已在多种植物中克隆并鉴定了 SQS 基因, 包括人参 (Kim *et al.*, 2011)、甘草 (卢虹玉等, 2007)、葡萄 (郑祥正, 2007)、三七 (吴耀生等, 2007)、北柴胡 (隋春等, 2010)、黄芪 (李振秋等, 2011)、青蒿 (Jing *et al.*, 2010) 等。

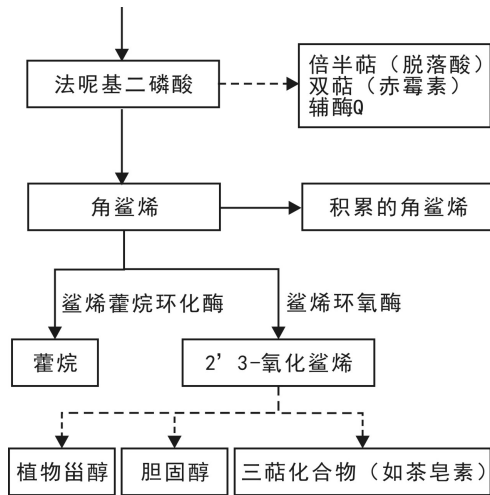


图 2 角鲨烯相关代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathway of squalene

当前油茶产业正以较快的速度发展, 油茶品种改良也更加受到科研工作者的重视, 但目前油茶品种培育主要侧重油茶产量和含油率的提高, 对油茶品质关注较少, 且油茶品种基本是通过选优, 进行无性系测定后, 选择出高产品种。然而良种选育受到资源和环境的限制, 目前已全国范围内进行多次的选优, 油茶良种选育基本进入了瓶颈期, 采用杂交、倍性育种和分子生物学手段不断提高油茶产量和品质是将来油茶品种改良的发展方向, 本研究以角鲨烯合成关键基因角鲨烯合酶基因为研究对象, 进行基因克隆及序列分析, 为今后进一步利用角鲨烯合酶改良油茶品质打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

研究材料采自浙江省金华市东方红试验林场 6

年生油茶林。分别于5~10月下旬采集“长林4号”品种的种子,及时剥取种仁,保存于液氮中备用。

1.2 RNA提取及cDNA的合成

采用trizol法分别提取6个时期植物材料的RNA,采用Nanodrop 2000及琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,保证RNA样品浓度 ≥ 400 ng/ μ L,28S:18S大于1.8;每个月份分别以RNA为模板,用in-vitrogen SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR进行一链反转录用于荧光实时定量。基于转录组测序分析,8月份角鲨烯合酶表达量最高,因此将8月份样品用clontech公司的SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit试剂进行一链反转录用于角鲨烯合酶基因的克隆。

1.3 角鲨烯合酶基因的克隆

将转录组测序结果的油茶角鲨烯合酶基因cDNA片段进行blastn,设计5' RACE引物为5'-GACCACGCCTCATTTTTACAACACCTC-3',巢式引物为5'-TACCACATGAAA AATGCCAGT-CACGGT-3'; 3' RACE为5'-CAGAGGTGTTG-TAAAAATGAGGCGTGG-3',巢式引物5'-CT-GCTTTTTTCGGAGCTTGGGAGAGGTT-3'。

第一轮PCR以反转录的cDNA为模板,采用touchdown程序进行反应:①5 cycles:94 °C 30 s,72 °C 3 min;②5 cycles:70 °C 30 s,72 °C 3 min;③27 cycles:94 °C 30 s,68 °C 30 s,72 °C 3 min。第二轮巢式PCR以第一轮PCR产物为模板,用巢式引物进行反应,程序与第一轮一样。

1.4 同源性分析及聚类分析

将克隆的油茶SQS基因编码区翻译成氨基酸序列,采用ClustalX软件,对目前已经克隆SQS的植物进行氨基酸序列进行了比对,并构建了SQS蛋白的系统进化树,分析各物种SQS进行相似度大小。

1.5 角鲨烯合酶基因生物信息学分析

选择生物学软件或网络服务器有针对性地进行分析。用ProtParam对基因编码的蛋白质结构特点、理化性质、氨基酸组成及稳定性分析;用TM-pred工具分析跨膜区域分析;用signalP分析信号肽识别位点;采用NetPhos 2.0软件磷酸化位点;根据PredictProtein工具二级结构及功能;inter-ProScan为分析工具结构域分析。

1.6 基因表达量分析及油茶角鲨烯含量相关分析

以Tublin alpha-3 (TUB α -3) (引物:FP:5'-CCATGCC TTGGATCACATTT-3'; RP:5'-

TGGGGCCATTAATGTAGACG-3')和 cellulose synthetase A (CESA) (引物:FP:5'-AAGGAC-CGCTGATACTCGAA-3'; RP:5'-ACACCATG-GCCTGGAAATAA-3')为内参,设计SQS的实时定量引物(FP:5'-TTTCGCCCTCGTAATTCAAC-3'; RP:5'-CATGAAAAATGCCAGTCACG),在ABI 7300 Real Time PCR System(Applied Biosystems,Foster City .CA, USA)进行荧光实时定量,反应体积为20 μ L,(10 μ L 2 \times SYBR®Premix Ex Taq™ (Takara,Tokyo,Japan),0.4 μ L 50 \times RO \times reference dye,2 μ L 稀释15倍的一链cDNA,10 μ mol/L上下游引物各0.4 μ L和6.8 μ L超纯水)。反应程序为:at 95 °C,30 s;95 °C for 5 s and 60 °C for 34 s 40个循环,然后60~95 °C做溶解曲线,每0.3 °C读取一次。

对转录组测序结果进行分析,比较RPKM (Reads Per kb per Million reads)在月份间变化情况。

$$RPKM = \frac{10^6 C}{NL/10^3}$$

设RPKM(A)为Unigene A的表达量,则C为唯一比对到Unigene A的reads数,N为唯一比对到所有Unigene的总reads数,L为Unigene A的碱基数。RPKM法能消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响,计算得到的基因表达量可直接用于比较不同样品间的基因表达差异(Mortazavi *et al.*,2008)。

由于7月份之前果实很难提取出油脂,所欲将8~10月的油茶种子烘干后正己烷提取种仁粗脂肪,皂化油茶粗脂肪后,用气相色谱检测角鲨烯含量(钟冬连等,2011)。

2 结果与分析

2.1 角鲨烯合酶基因的克隆

以cDNA为模板进行5'和3'端RACE,结果如图3。3'端长556 bp,5'端长488 bp,然后重新设计SQS上下游引物(分别为FP:5'-TCTACATTCGT-GTCCGTCTC-3'; RP:5'-TGAGTTGAACTGC-CAATCAG-3'),最后连接成完整的油茶角鲨烯合酶基因cDNA全长1 490 bp (genbank 编号JX290207),5'非编码区165 bp,3'非编码区231 bp (不包括polyA),开放阅读框1 266 bp,编码422个

氨基酸。

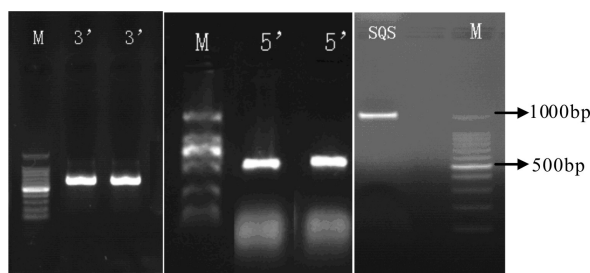


图3 油茶 SQS 基因 1%琼脂电泳图
(左到右分别为:3'端 RACE、5'端 RACE 和全长)

Fig. 3 1% Agar gel electrophoresis of SQS gene

2.2 氨基酸序列同源性和聚类分析

利用 DNASTAR 将油茶 SQS 基因核苷酸序列开放阅读框翻译为氨基酸序列,全长 421 个氨基酸序列(图 4)。

```

MGSLGAILKHPDDFYPLMKLKMAARRAEKNIPPEPHWGFYCYSMLHKVSRSFALVIQQL
DTELRNAVCIFYLVLRALDTVEDDTSIATEVKVPILMAFHRHIYDRDWHFSCGTKEYKVL
MDEFHHVSTAFSELGRGYQEAIEDITMRMGAGMAKFCICKEVETIDDYDEYCHYVAGLVG
LGLSKLFHASGSEDLASDLSNSMGLFLQVLLTCKIKTNIIRDYLEDINEIPKSRMFWRPQI
WSKYVNKLEDLKDKNENSVKAVECLNDMVTNALIHVEDCLTYMSALRDPSIFRFAIPQIM
AIGTLALCYNNIEVFRGVVKMRRGLTAKVIDRTKTMSDVYGGFFDFSCMLKSKVVKSDP
NAMKALSRLAEIQKICRESGTLNKRKSYIHKSEPRYNSTLVFVLFILAILFAYLSANRPSNM
  
```

图4 氨基酸序列

Fig. 4 Amino acid sequence

2.3 油茶角鲨烯合酶结构分析

2.3.1 蛋白质理化性质分析 利用 ProtParam 对油茶 SQS 进行理化性质分析,分析结果表明油茶 SQS 由 422 个氨基酸组成,50 个负电荷氨基酸,52 个正电荷氨基酸,其他 319 个氨基酸为中性,分子式为 $C_{2160}H_{3403}N_{569}O_{612}S_{31}$,分子量为 48 129.0,等电点是 7.9 (碱性氨基酸多于酸性氨基酸);其中亮氨酸 43 个含量最高,占总量的 10.2%,丝氨酸仅有 4 个,占总量的 0.9%;不稳定系数为 46.72,大于 40,较不稳定。

2.3.2 跨膜区分析 利用 TMpred 工具分析油茶角鲨烯合酶,发现该酶有两个跨膜区域,分别为 289~311 和 393~415 个氨基酸残基,中间的 312~392 个氨基酸残基位于膜内,其他氨基酸残基位于膜外(图 6)。

2.3.3 信号肽识别位点分析 利用 signalP 3.0 采用 neural networks(NN)方法对油茶 SQS 氨基酸序列进行信号肽可能性分析,原始剪切位点分值(C score)最高在第 53 个氨基酸位置,分值为 0.121,综合剪切点分值(Y score)在也第 53 个氨基酸处最

将油茶 SQS 氨基酸序列与其他植物序列进行比对,通过比对发现各物种 SQS 间有 85.46% 的一致性,其中 8 个长度大于 5 个氨基酸序列完全一致(阴影区),最长为 200~238 共 37 个氨基酸,从 381~422 为高度可变区(框格区),一致性非常低。图 5 是各物种 SQS 系统发育树,从结果可以发现油茶与柿的相似度最高,达到 88%,其次是葡萄和蓖麻,相似度为 87% 和 86%,与豆科的百脉根、大豆、黄芪、甘草、苜蓿相似度为 85%,与三七、人参、北柴胡、刺五加、葱木等五加科物种的相似度为 84%,与番茄、马铃薯、墨西哥辣椒、烟草、睡茄等茄科物种相似度为 82%、与远志科的远志相似度为 81%,与唇形科的丹参相似度 80%、与石竹科的金铁锁、锦葵科的陆地棉、菊科的黄花蒿和青蒿相似度为 79%,十字花科的拟南芥相似度为 77%。

大,为 0.120,信号肽分值(S score)最大在第 49 个氨基酸位置,为 0.150,第 1~52 个氨基酸的平均 S score 为 0.108,1~52 个氨基酸平均信号肽与最大剪接位点分值的平均为 0.113,未达到阈值 0.45,因此推断油茶 SQS 蛋白没有信号肽,不是分泌型蛋白(图 7)。

2.3.4 磷酸化位点分析 采用 NetPhos 2.0 软件分析 SQS 氨基酸中的丝氨酸(Serine)、苏氨酸(Threonine)和酪氨酸(Tyrosine)翻译后一般磷酸化位点修饰。分析结果表明,油茶 SQS 蛋白丝氨酸磷酸化位点 11 个(第 48、187、196、198、256、288、336、356、365、377、385 位),苏氨酸磷酸化位点 5 个(第 78、83、161、325、334 位),酪氨酸磷酸化位点 5 个(第 15、165、243、280、394 位),序列中磷酸化位点见图 8。

2.3.5 二级结构及功能分析 根据 PredictProtein 工具,分析出油茶角鲨烯 71% 为螺旋结构,1.4% 为直链,27.6% 为 loop 环。共有 12 个可能的二硫键形成位点。

亚细胞定位于内质网膜上,参与甾醇生物合成、

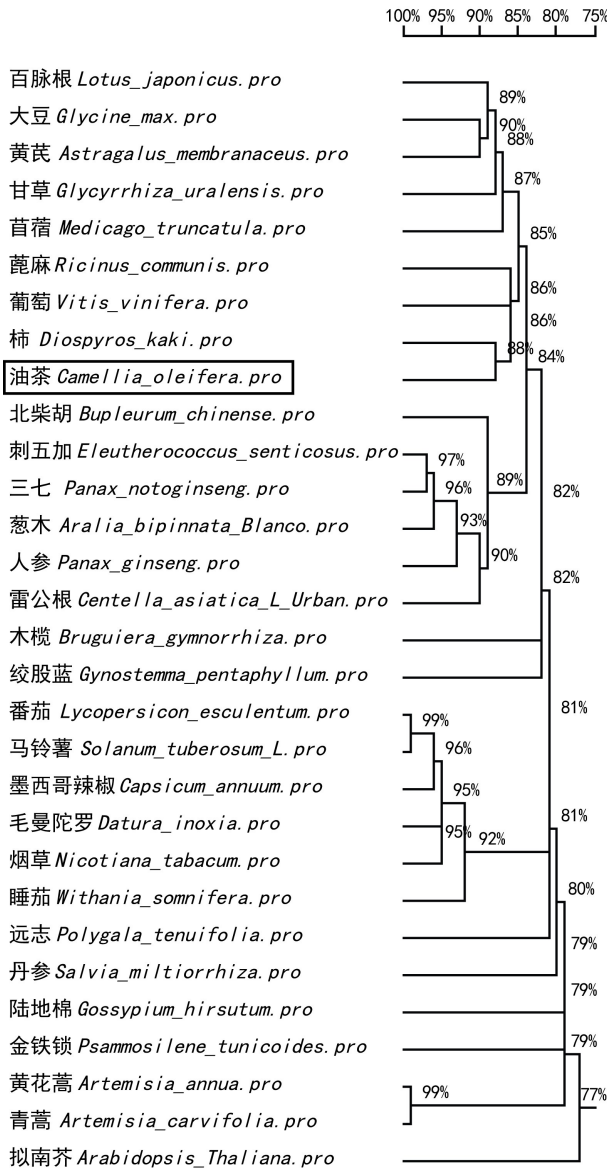


图 5 SQS 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of SQS

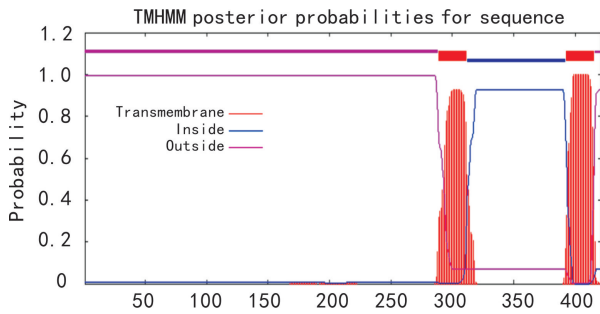


图 6 油茶 SQS 跨膜区分析

Fig. 6 Transmembrane region of SQS in *C. oleifer*

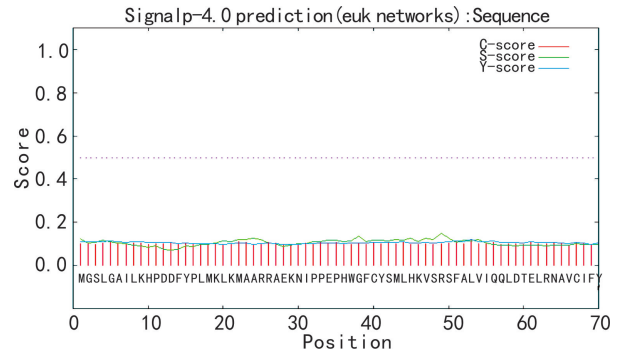


图 7 油茶 SQS 信号肽识别位点分析

Fig. 7 Signal peptide recognition sites of SQS in *C. oleifera*

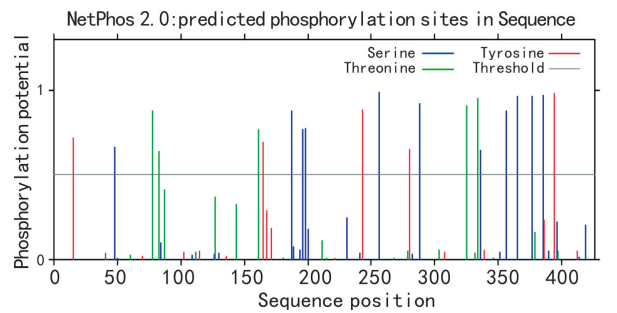


图 8 油茶 SQS 磷酸化位点分析

Fig. 8 Phosphorylation sites of SQS in *C. oleifera*

共检测出 7 种蛋白质功能位点,分别为 354 位 (NKSD)和 395 (NSTL)位起始的 4 个氨基酸为 N 糖基化位点(N-glycosylation site),382(KRKS)位起始 4 个氨基酸的 cAMP、cGMP 依赖的蛋白磷酸激酶位点(cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site),144(TMR)、256(SVK)和 325(TAK)位 3 个氨基酸起始的蛋白激酶 C 磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site),78(TVED)、161(TIDD)、187(SGSE)、334(TMSD)和 365(SRLE)位起始 4 个氨基酸的络蛋白激酶 II 磷酸化位点,第 9(KHPDDF)位起 7 个氨基酸始的络氨酸激酶磷酸化位点,2(GSLGAI)、148 (GAGMAK)、177 (GLGLSK)位起始 6 个的氨基酸 N 酰基化位点,最显著的功能位点是 168(YCHYVAGLVGLGLSKL)为起始的 16 个氨基酸鲨烯、番茄红素合成酶位点。

2.3.6 结构域分析 结构域是蛋白序列的功能、结构和进化单元,本文以 interProScan 为分析工具,进行序列比对方法分析油茶角鲨烯合酶结构域。

通过结构域分析,油茶 SQS 氨基酸序列有两个主要功能结构域,45~321 号氨基酸序列的鲨烯/茄

异戊二烯生物合成、类固醇生物合成和脂类生物合成的过程,也定位于细胞外参与分泌途径。

红素合成酶结构域,其中 168~183 具有极高的保守性;394~414 号氨基酸序列为跨膜结构域(图 9)。

2.4 角鲨烯合酶基因表达量变化分析

对油茶种子 7~10 月份转录组测序分析,共检测出两条角鲨烯合酶相关 unigene,分别是 unigene29947 和 unigene63559。表达量情况如图 10,两个 unigene 各月份表达量变化趋势完全一致,从 7~8 月份逐渐升高,从 8~10 月一直下降。以 CESA 和 TUB α -3 为内参对 SQS 进行荧光实时定

量的两个结果基本一致,结果表明,5~6 月份稍微降低,然后一直上升,到 8 月份达到最高峰,再逐步下降,直到 10 月种子成熟。结果表明荧光实时定量和转录组测序从 7 月开始,变化趋势基本一致。

提取 8~10 月份油茶籽种仁的油脂,并检测油脂中角鲨烯含量,分析结果如图 11。从图 11 中可以看出,8 月份角鲨烯含量为 2 591 $\mu\text{g/g}$,9 月为 1 239 $\mu\text{g/g}$,10 月份成熟时为 326 $\mu\text{g/g}$ 。随着种子成熟,角鲨烯含量呈下降趋势。



图 9 油茶 SQS 结构域功能分析
Fig. 9 Domains of SQS in *C. oleifera*

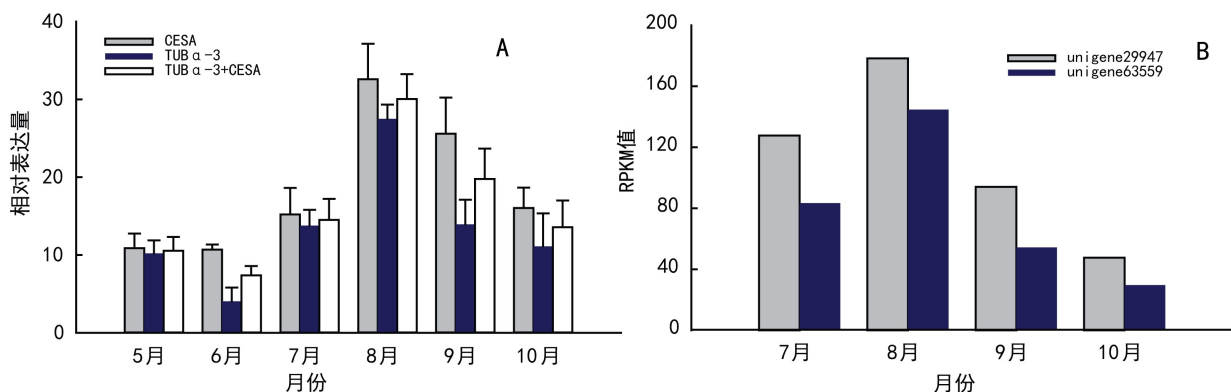


图 10 油茶种子各月份 SQS 表达变化图 A.以 CESA、TUB α -3 及两个内参平均后的 SQS 荧光实时定量相对表达量; B.转录组测序结果中两个 unigenes RPKM 值。

Fig. 10 SQS expression of *C. oleifera* seeds from May to October

3 结论与讨论

油茶 SQS 基因克隆是基于油茶种子各生长期转录组测序结果为基础,转录组测序出两条 SQS 相关的 unigene,通过比对,两者具有重叠部分,且克隆出全长 SQS 后发现,两条 unigene 都能完全比对到 SQS 上,说明提取 RNA 过程中,可能存在 RNA 断裂,或测序不完全、拼接不对等原因,导致转录组测序结果中不同的 unigene 其实为只是 cDNA 中不完全的一部分。

通过氨基酸序列比对,发现 8 个长度大于 5 个氨基酸序列的完全保守区域,这也与功能位点和结构域分析得到印证,大部分功能位点都定位在高度保守的区域,其中典型的功能位点鲨烯、番茄红素合

成酶位点长度为 16 个氨基酸,比对的 30 个物种中这 16 个氨基酸序列完全一致。

对分属五桠果、蔷薇、石竹和菊亚纲的 15 个科 30 个物种 SQS 进行系统进化树分析,按科分类,SQS 进化树与形态分类学中物种亲缘关系结果基本吻合,以 87.5%相似度为分割点,可将 30 个物种划分为 14 类,除油茶与柿外,其他 13 类各为一个科,油茶和柿同属于五桠果亚纲,且在分类系统中,柿科为山茶科有很近的亲缘关系,因此油茶 SQS 与柿 SQS 同源性也最高,划为一类。按照亚纲来分类,SQS 与形态学分类有较大的分歧,油茶所属的五桠果亚纲与蔷薇亚纲葡萄、豆科和五加科物种的 SQS 相似度很高,但与五桠果亚纲的绞股蓝、陆地棉和拟南芥却相似度相对较低。推测 SQS 在进化过程中速度与形态上不完全一致,但同属科的物种 SQS 保守性很高,进化极慢。

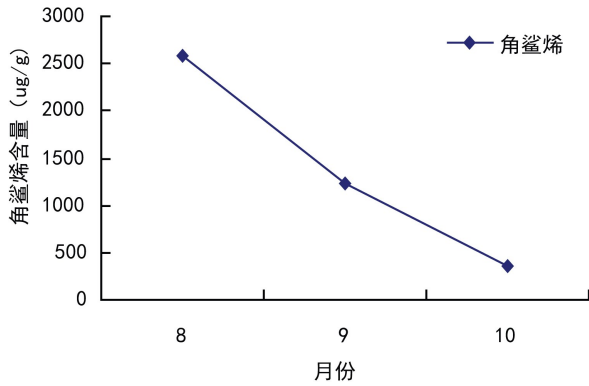


图 11 8~10 月油茶油脂中角鲨烯含量

Fig. 11 Squalene contents from August to October in *C. oleifera* seeds oil

通过对油茶 SQS 生物信息学分析,发现油茶 SQS 是一种中性偏酸性的蛋白质,稳定性不高,C 端有一段跨膜区域,附着与膜上,主要的功能位点和结构域都在膜外起作用,功能蛋白,N 端没有信号肽识别位点,不属于分泌性蛋白,共有 21 个可能的磷酸化修饰位点,从而敏感可逆调节油茶 SQS 在不同组织,不同时期发挥功能大小。

通过油茶种子转录组测序 SQS unigene 的 RP-KM 值及荧光实时定量相对表达量的变化趋势基本吻合,间接说明油茶种子转录组测序有效性。与角鲨烯浓度变化规律比较表明,从 8~10 月份基因表达量与角鲨烯浓度变化完全一致,说明角鲨烯含量的大小很大程度上由 SQS 基因表达来决定,后期应人工构建油茶 SQS 基因不同的表达载体,转化到模式生物中,以超表达和干扰的形式控制基因表达,进一步确定油茶 SQS 基因的功能及表达模式。

参考文献:

庄瑞林. 2008. 中国油茶第二版[M]. 北京:中国林业出版社:1-8
 郑祥正. 2007. 葡萄鲨烯合酶基因的克隆与原核表达[D]. 福州:福建农林大学
 Devarenne TP, Shin DH, Back K, et al. 1998. Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor[J]. *Arch Biochem Biophys*, **349**(2): 205-215
 He F(何方), He B(何柏). 2002. Cultural distribution and site classification for *Camellia Oleifera* (油茶栽培分布与立地分类的研究)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), **5**: 36-37
 Jennings SM, Tsay YH, Fisch TM, et al. 1991. Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase[J]. *Proc Natl Acad Sci*, **88**(14): 6 038-6 042

Jing C, Chun HG, Yong ZY, et al. 2010. cDNA cloning and sequencing of squalene synthase of *Artemisa apiacea* [J]. *Agric Sci & Technol Hunan*, **11**(2): 80-83, 86
 Kennedy MA, Barbuch R, Bard M. 1999. Transcriptional regulation of the squalene synthase gene (ERG9) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Bioch Biophys Acta (BBA)-Gene Struct Expr*, **1 445**(1): 110-122
 Kim TD, 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
 Kribii R, Arró M, Arco A, et al. 2004. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase[J]. *Eur J Biochem*, **249**(1): 61-69
 Li ZQ(李振秋), Wang XM(王晓明), Jin YM(金亚明), et al. 2011. cDNA cloning and sequence analysis of squalene synthase from *Astragalus membranaceus* (黄芪鲨烯合酶基因的克隆和序列分析)[J]. *Hebei J For Orch Res* (河北林果研究), **126**(11): 16-191:6
 Lu HY(卢虹玉), Liu JH(刘敬梅), Yang WL(阳文龙), et al. 2007. Isolation of squalene synthase genes of *glycyrrhiza uralensis* and construction of plant expression vector(甘草鲨烯合酶基因的分离及植物表达载体的构建)[J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), **14**(4): 255-258
 Mookhtiar KA, Kalinowski SS, Zhang D, et al. 1994. Yeast squalene synthase. A mechanism for addition of substrates and activation by NADPH[J]. *J Biol Chem*, **269**(15): 11 201-11 207
 Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nat Meth*, **5**(7): 621-628
 Nakashima T, Inoue T, Oka A, et al. 1995. Cloning, expression, and characterization of cDNAs encoding *Arabidopsis thaliana* squalene synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci*, **92**(6): 2 328-2 332
 Sui C(隋春), Wei JH(魏建和), Zhan QQ(战晴晴), et al. 2010. Cloning and sequence analysis of squalene synthase gene and cDNA in *Bupleurum chinense* DC(北柴胡鲨烯合酶基因及其编码区 cDNA 克隆与序列分析)[J]. *Acta Horti Sin*(园艺学报), **37**(2): 283-290
 Wu YS(吴耀生), Zhu H(朱华), Li S(李绅), 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
 Zhao Z(赵振东), Sun Z(孙震). 2004. Research progress on natural resources and application of the bioactive substance-squalene 生物活性物质角鲨烯的资源及其应用研究进展[J]. *Chem & Ind For Prod* (林产化学与工业), **24**(3): 107-112
 Zhong DL(钟冬连), Tang FB(汤富斌), Shen DY(沈丹玉), et al. 2011. Determination of squalene in camellia seed oil by gas chromatography(油茶籽油中角鲨烯含量的气相色谱法测定)[J]. *Chin J Analy Lab*(分析实验室), **11**: 30