

药用植物 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶基因研究进展

童宇茹¹, 李桂桂², 程琪庆¹, 高伟^{1*}

1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

2. 国家食品药品监督管理局 信息中心, 北京 100053

摘要: 药用植物萜类成分是一类重要的天然产物。随着一些具有重要经济价值的萜类化合物需求扩大, 其生物合成中的关键酶也备受关注。5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR)是2-甲基-*D*-赤藻糖醇-4-磷酸(MEP)途径上的第2个关键酶。综述了DXR生物学意义、基因结构及其催化机制、药用植物DXR基因克隆及进化情况, 并且介绍了紫杉醇、银杏、丹参等重要药用植物中DXR基因的研究进展, 旨在为其他药用植物DXR基因的克隆和深入研究提供参考。

关键词: 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶; 克隆; 催化机制; 萜类化合物; 药用植物

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)04-0488-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.04.023

Advances in studies on 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene in medicinal plants

TONG Yu-ru¹, LI Gui-gui², CHENG Qi-qing¹, GAO Wei¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

2. Information Center, State Food and Drug Administration, Beijing 100053, China

Key words: 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; clone; catalytic mechanism; terpenoids; medicinal plants

萜类化合物广泛存在于自然界中, 是药用植物中一类重要的次生代谢物。其不仅是许多中药和中药复方的药效物质基础, 而且已广泛用于临床并具有很好的疗效。黄花蒿中分离的倍半萜内酯青蒿素是治疗恶性疟原虫所引发的疟疾的特效药^[1]; 来源于红豆杉的紫杉醇广泛用于癌症的治疗^[2]; 丹参的脂溶性有效成分丹参酮类化合物具有很好的扩张冠状动脉作用, 且有一定的抗肿瘤活性^[3]。萜类化合物除了以萜的形式存在, 许多是以含氧衍生物, 如酮、酯、醛的形式存在; 另外还有含氮衍生物, 构成了结构各异、较为复杂的分子形态, 由于其化学多样性已发现超过40 000个不同的结构^[4]。

近年来, 国内外学者对萜类化合物生物合成途径中关键酶的研究日益增多, 遗传修饰植物、基因工程更是备受关注。5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase,

DXR)是2-甲基-*D*-赤藻糖醇-4-磷酸(MEP)途径上的第2个关键酶。目前关于药用植物萜类成分合成途径中DXR基因研究尚无全面系统的总结, 因此本文对近年来DXR的生物学意义、结构特征、催化机制、药用植物DXR基因克隆等相关研究进行了全面的综述。

1 萜类化合物生物合成途径及DXR基因的生物学意义

1.1 萜类生物合成途径

植物中的萜类化合物有2条合成途径: 第1条途径是位于细胞质的甲羟戊酸(MVA)途径, 主要是存在于动物、真菌及一些古细菌中^[5]; 第2条途径是位于质体的2-甲基-*D*-赤藻糖醇-4-磷酸(MEP)途径, 广泛存在于自然界中, 如大多数真核细菌、藻类、地衣等。这两条途径起始物、发生部位、相关酶是不同的, 但重要中间产物都是异戊烯基焦磷

收稿日期: 2012-10-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901965); 全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(201188); 北京市自然科学基金资助项目(5102009); 北京市优秀人才培养资助个人项目(2011D005018000002)

作者简介: 童宇茹(1991—), 中药学专业。E-mail: tongyuru13@126.com

*通信作者 高伟, 副教授, 研究方向为分子生药学。Tel: (010)83911671 E-mail: weigao@ccmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-01-21 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120121.1345.002.html>

酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP, C₅) 及其异构物二甲丙烯焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP, C₅)。因此, 认为这两个化合物 (C₅) 是生物体中萜类成分合成的最基本单位^[6-7]。1958年, Bloch 和 Lynen 首次在动物和酵母中发现 MVA 途径, 主要用于合成甾醇、倍半萜、三萜等。20世纪90年代初, Rohmer 和 Arigoni 首先发现了 MEP 途径, 主要合成单萜、二萜等。MEP 途径初始物丙酮酸 (pyruvate) 和 3-磷酸甘油醛 (D-GAP) 在维生素 B₁ 及 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS) 作用下脱去一分子 CO₂ 形成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (DXP)。接着, DXP 在 DXR 及还原型辅酶 II (NADPH) 的催化下分子重排形成 MEP, 这是萜类生物合成重要的调控位点^[8]。MEP 依次经 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸脱氨酰转移酶 (MCT)、4-(5-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶 (CMK)、2-C-甲基赤藓醇-2, 4-环焦磷酸合酶 (MCS)、羟甲基丁烯基-4-磷酸合酶 (HDS)、4-羟基-3-甲基-2-丁烯基-4-磷酸还原酶 (HDR) 5 个限速酶催化生成 IPP 和 DMAPP, 二者在 IPPI 作用下相互转化。IPP 分子叠加后形成的牻牛儿基焦磷酸 (geranyl diphosphate, GPP, C₁₀)、法呢基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP, C₁₅) 等作为萜类的前体, 在对应的萜类合成酶作用下生成萜类骨架。最后经过结构修饰, 生成功能各异的萜类化合物。

1.2 DXR 生物学意义

1998年 Tomohisa 等^[9]揭示了 DXP 到 MEP 是个单一酶参与, 涉及异构、分子重排和还原的步骤。DXR 被首次成功表达, 是 MEP 途径上的重要限速酶^[10]。研究者发现 DXP 同时可作为硫胺素焦磷酸 (thiamine pyrophosphate, ThPP) 和磷酸吡哆醇 (维生素 B₆) 合成所需物质。在探索光合色素时发现 4-甲基-5-(β-羟乙基) 噻唑磷 [4-methyl-5-(β-hydroxyethyl) thiazole phosphate] 类物质的合成需要许多基因产物, 其中就包括 DXS 的产物 DXP^[11-12]。Soheil 等^[13]在研究薄荷精油产量和成分时发现野生型薄荷 (WT) 产油量约为 2.0 mg/g 鲜质量, 而选择性转化 DXR 植株可约达 2.5 mg/g 鲜质量。刘卉等^[14]证实阳春砂 DXR mRNA 积累量越高, 植株总类胡萝卜素量越高。因此, 在 MEP 合成途径上 MEP 的限流作用更突出, 是重要前体物质, 并且 DXR 催化的反应称作“碳流”的分支点,

是调控的有效靶点^[15]。

早在 2000 年, Kim 等^[16]将西红柿 DXR 基因导入 pTrc99A、pBluescript、pBAD24 3 种不同拷贝数的质粒, 表达后发现高拷贝数增加了代谢负担, 可能会导致较低细胞生长和番茄红素生产。这一现象与 1997 年 Ruther 等^[17]的研究结果相似。2012 年, 刘卉等^[14]研究推断烟草 DXR 作为外源基因可能是以单拷贝的形式整合到转基因植株中。DXR 基因在植物中的拷贝方式可能会影响转录过程中质粒的选择, 继而影响到外源基因的表达、萜类物质的产量。目前, 关于这方面的研究国内外均较少。

2 DXR 结构和催化机制

2.1 DXR 结构特征

植物 DXR 基因全长包括 5'、3' 非翻译区和一个开放阅读框, 起始密码子均为 ATG, 终止密码子为 TAA、TAG 或 TGA, 开放阅读框的碱基数及所编码的氨基酸残基数相差不大。植物 DXR 由 α-螺旋、延伸链、β-转角和不规则盘绕组成, 纵观蛋白的整体结构, α-螺旋和不规则盘绕是植物 DXR 最大量的结构元件, 而 β-转角和延伸链则散布于整个蛋白质中。不同植物 DXR 的相对分子质量、理论等电点、酸性和碱性氨基酸的比例、总氨基酸带电荷的比例、极性氨基酸的比例、疏水性氨基酸的比例基本一致; 量较丰富的氨基酸基本均为 Ala、Leu、Ser、Val、Gly; 除亚麻 DXR 属于不稳定类蛋白质外, 其余均属稳定类蛋白质^[18]。研究者发现植物 DXR 含有两个功能 NADPH 结合 motif 和两个功能 DXR 结合 motif, 在此功能结构域 motif 上氨基酸序列近乎一致, 且功能 NADPH 结合 motif 里都含有 2 个 Gly, 功能 DXR 结合 motif 里都含有 DSE 和 EVIE。此功能结构域在空间结构上折叠成“空间形”, 其两臂由 N-端与 C-端构成。两个功能 NADPH 结合 motif 藏于 N-端臂内, 而两个功能 DXR 结合 motif 藏于“t 形”的底部, 即 N-端臂与 C-端臂结合域内。两个功能 DXR 结合 motif 分别与 LPADSEHSAI、NKGLEVIEA-HY 和 GSTGS (I/V) GT、LAAGSN (V/I) 结合, 结合后的化合物在 DXR 催化中起着重要作用^[19-20]。N 末端有 1 个脯氨酸富集区 PPPAWPGR 和质体转移多肽, 特殊的是在万代兰的 DXR 中没有发现 N 末端质体转移多肽^[21]。以大肠杆菌为例, DXR 酶蛋白的活性位点靠近分子表面, 为氨基酸序列 206~216^[22]。DXR、NADPH 结合位点是非常有序的, 以隐藏酶的活性位点区域。

图 1 是大肠杆菌单体 ISPC 的晶体结构，橙色标识的 NADAPH 与蓝色标识的 DXP 在品红色标识的活性位点发生两步反应，生成 MEP^[23]。

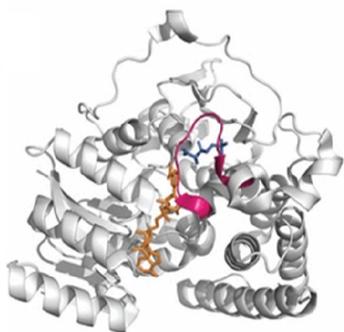


图 1 大肠杆菌 DXR 结构

Fig. 1 Structure of DXR in *Escherichia coli*

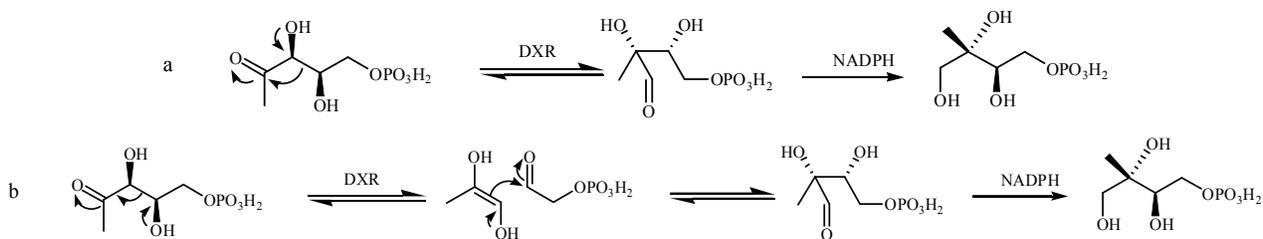


图 2 重排机制

Fig. 2 Rearrangement mechanism

为关键，其催化反应是 MEP 途径的关键环节^[26]。到目前为止，DXR 基因已分别从葛、银杏、丹参等 25 种药用植物中全部分离克隆出来，枇杷^[27]、毛喉鞘蕊花^[28]已部分克隆得到（表 1）。

本文选取了从低等生物细菌、藻类到高等植物 41 种 DXR 蛋白序列（其中高等植物主要选自表中的药用植物）：大肠杆菌 (*Escherichia coli*, YP488475.1)；克雷伯氏菌 (*Klebsiella variicola*, YP-003441104.1)；假诺卡氏菌 (*Pseudonocardia*, ZP_08122973.1)；放线菌 (*Nocardioideae*, ZP_08199867.1)；假单胞菌 (*Pseudomonas*, EIK97839.1)；雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*, AEY80027.1)；条斑紫菜 (*Pyropia yezoensis*, ABI96275.1)；三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*, XP_002176954.1)；银杏 (*Ginkgo biloba*, AAR95700.1)；火炬松 (*Pinus taeda*, ACJ67022.1)；赤松 (*P. densiflora*, ACC54558.1)；东北红豆杉 (*Taxus cuspidate*, AAT47184.1)；曼地亚红豆杉 (*T. x media*,

2.2 DXR 催化机制

MEP 生成涉及 DXP 的异构化，含醛基的中间体，再经 NADPH 依赖性重排生成 MEP。但是异构化的作用机制目前尚不明确，目前主要有两种观点^[24]。一种认为是邻羟基酮 (α -ketol rearrangement) 重排反应，属分子内重排过程 (图 2-a)；而另一种认为是逆向羟醛缩合-羟醛缩合反应 (retro-aldol/aldol rearrangement) (图 2-b)。在 NADP⁺ 存在下，可发生 MEP 到 DXP 的转换，可见此反应是可逆的，植物体内尚需要 Mg²⁺ 或 Mn²⁺ 离子^[23]。

3 DXR 基因克隆及其进化

1998 年，DXR 基因首次于大肠杆菌中克隆得到^[25]。克隆 DXR 基因能更好地研究其生物合成机制、生理功能、在生物合成途径上的贡献度等。研究表明，DXR 比 MEP 途径上的第 1 个基因 DXS 更

AAU87836.1)；二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*, XP_003569639.1)；高良姜 (*Alpinia officinarum*, AEK69520.1)；玉米 (*Zea mays*, ACG33012.1)；库洛胡黄连 (*Picrorhiza kurrooa*, ABC74566.1)；萝芙木 (*Rauvolfia verticillata*, AAY87151.2)；砂仁 (*Amomum villosum*, ACS26204.1)；菊花 (*Chrysanthemum x morifolium*, BAE79548.1)；葛 (*Pueraria montana var. lobata*, AAQ84168.1)；水仙 (*Narcissus tazetta var. chinensis*, ADD82536.1)；喜树 (*Camptotheca acuminata*, ABC86579.1)；拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, AED97657.1, NP_201085.1, AED97658.1, NP_001190600.1, AAF73140.1, AAM10015.1, AAK96873.1, BAB10848.1)；丹参 (*Salvia miltiorrhiza*, ABJ80680.1, ACK57535.1, ACR57217.1)；大豆 (*Glycine max*, XP_003525386.1, NP_001240062.1, XP_003549624.1, XP_003547784.1, AEB91529.1, AEB91528.1)；青蒿 (*Artemisia annua*, AAD56391.2)。

表1 已克隆的药用植物 DXR 全长基因
Table 1 DXR full length gene cloned from medicinal plants

药用植物	mRNA 长度 / bp	GenBank 注册号	文献
印度人参 <i>Withania somnifera</i>	1 653	JQ710679	
卡痛叶 <i>Mitragyna speciosa</i>	1 567	JQ038374	
玫瑰 <i>Rosa rugosa</i>	1 850	JN675704	
条斑紫菜 <i>Porphyra yezoensis</i>	1 582	DQ863281	29
	1 582	FJ175681	30
大豆 <i>Glycine max</i>	1 425	NM_001253133	
	2 026	XM_003549576	
	1 740	XM_003547736	
	1 398	HQ340242	
	1 425	HQ340241	
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	1 650	AF250235	31
短舌匹菊 <i>Tanacetum parthenium</i>	1 419	JN005888	
高良姜 <i>Alpinia officinarum</i>	1 681	HQ874658	
水仙 <i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i>	1 606	GU574805	
银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	1 434	AY494186	32
	2 217	AY494185	
东北红豆杉 <i>Taxus cuspidata</i>	1 554	AY575140	33
曼地亚红豆杉 <i>Taxus x media</i>	1 807	AY588482	
丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	1 665	DQ991431	34
	1 425	FJ476255	35
	1 425	FJ768959	
砂仁 <i>Amomum villosum</i>	1 749	FJ459894	
赤松 <i>Pinus densiflora</i>	1 765	EU439294	36
甜菊 <i>Stevia rebaudiana</i>	1 681	FJ214108	
	1 422	AJ429233	
葛 <i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i>	1 788	AY315651	37
海岛棉 <i>Gossypium barbadense</i>	1 930	EF051345	
辣薄荷 <i>Mentha x piperit</i>	1 809	AF116825	38
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	1 700	XM_002511353	
喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>	1 823	DQ355159	39
萝芙木 <i>Rauvolfia verticillata</i>	1 804	DQ779286	40
软紫草 <i>Arnebia euchroma</i>	300	DQ631832	
菊花 <i>Chrysanthemum x morifolium</i>	1 595	AB205045	
胡黄连 <i>Picrorhiza kurrooa</i>	1 737	DQ347963	
亚麻 <i>Linum usitatissimum</i>	1 695	AJ623266	

先通过 Clustal W 对氨基酸序列 (41 个) 进行比对, 再利用 MEGA5 进行处理, 获得图 3 所示环状系统进化树图。系统进化树的分支结构与传统分类学一

致, 细菌、藻类、高等植物形成三大分支: 第一、第二大分支包括克雷伯氏菌、假诺卡氏菌、三角褐指藻等; 第三大分支包括银杏、红豆等裸子植物和拟

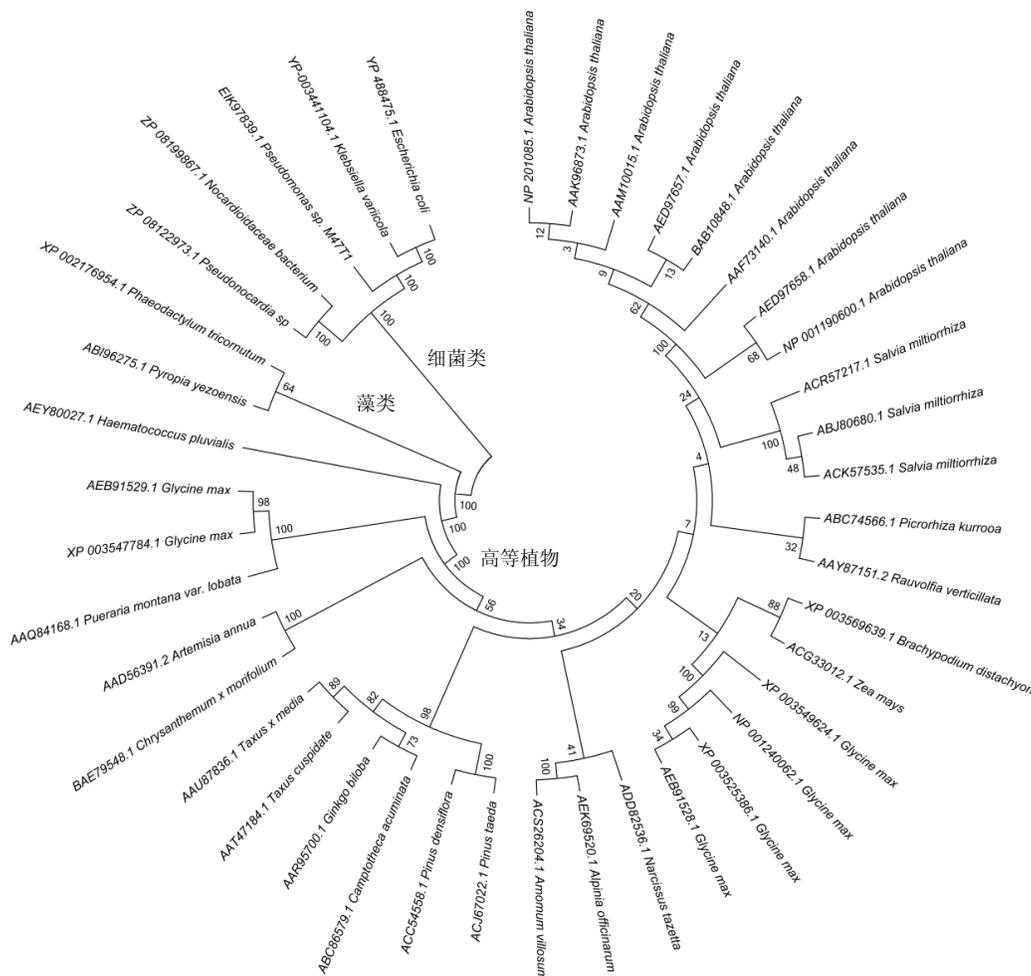


图 3 DXR 氨基酸序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of DXR amino acid sequences

南芥、水仙、丹参等被子植物。

4 药用植物 DXR 基因的研究

4.1 红豆杉

红豆杉属植物含有丰富的二萜类化合物，东北红豆杉、曼地亚红豆杉等均含有数 10 种紫杉烷二萜类化合物^[41-43]。Eisenreich 等^[44]利用 ¹³C 标记生产紫杉烯的红豆杉培养细胞，在紫杉烷中发现了 ¹³C 标记，进而发现了萜类合成的另一途径即 MEP 途径。Soliman 等^[45]研究发现紫杉醇内生真菌合成紫杉醇的过程中需要 DXR。Zheng 等^[46]将红豆杉 DXR 与其他动植物、细菌、真菌等来源的 DXR 蛋白序列进行系统树分析，发现 DXR 蛋白质序列在进化上革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、裸子植物、被子植物等分属不同类群；并通过对不同来源的非甲羟戊酸途径关键酶 DXR 基因同源区域进行比对，发现与已证实存在非甲羟戊酸途径的拟南芥和薄荷的

蛋白质序列相似度高达 95%和 94%，从基因的角度证实了裸子植物红豆杉具有非甲羟戊酸合成途径。刘智等^[47]研究了紫杉醇及其前体物质合成的区域化现象，发现 DXR 基因等合成途径的上游基因在枝叶中相对表达水平很高。

4.2 银杏

银杏叶主要含黄酮类和萜类成分，萜类成分包括银杏内酯和白果内酯，可拮抗血小板活化因子，广泛用于心脑血管疾病。Gong 等^[48]从银杏中克隆了 GbDXR，生物信息学分析表明 GbDXR 广泛同源并且 N 端含一个高度保守的核苷酸结合位点，GbDXR 比其他植物的 DXR 更古老；随后的研究表明，GbDXR 表达水平有区域性，根远高于叶^[32]。冯国庆等^[49]通过对比发现携带 pCAMBIA1304⁺-GbDXR 的 EHA105 农杆菌感染银杏胚的能力最强。此外，许锋等^[50]从 DXS、DXR、GGPPS、LPS 4 个

关键基因角度分析矮壮素可通过上调上述基因表达从而提高萜内酯的生物合成。

4.3 丹参

丹参中的脂溶性成分主要为二萜丹参酮类化合物,广泛用于心脑血管疾病。严向明^[51]研究发现丹参 SmDXR 与番茄 DXR 的亲缘关系最近,其表达具有区域性:叶中最强,根次之,茎中最少。SmDXR 是易受环境因素影响的基因,其受水杨酸诱导而不受甲基茉莉酸的诱导。在丹参的研究中,更多是通过培养毛状根,获取二萜合成途径上的相关基因的 cDNA,载入有缺陷的大肠杆菌质体中,达到验证基因功能活性的目的。此外,诱导因子对 DXR 表达影响愈来愈受到关注。相关研究表明高渗应激和酵母诱导子影响下,丹参毛状根 DXR 基因的转录水平上调,使得丹参酮类化合物的量增加^[34]。外源茉莉酸甲酯(MJ)和 NO 可提高丹参毛状根中丹参酮产量,进一步研究发现,两条途径的关键酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)和 DXR 表达均有增加^[52]。最新研究显示,脱落酸(ABA)、聚乙二醇(PEG)可提高丹参毛状根的丹参酮量, HMGR、DXR 和 DXS 的 mRNA 表达均有增加。另一方面,PEG 和 ABA 对丹参酮量的影响可被钨和布洛芬完全抵消;而 MJ 对丹参酮量的影响可被 MEP 途径抑制剂膦胺霉素(FOS)完全消除,被 MVA 途径抑制剂洛伐他汀(MEV)部分消除^[53]。

4.4 喜树

喜树碱是一种具有抗肿瘤活性的萜类吲哚生物碱,最早是从我国特有植物喜树的木质部中分离得到^[54]。Yao 等^[39]从喜树中克隆了 CaDXR,其表达具有区域性,在茎中表达强烈,根、叶中则表达水平低;此外,CaDXR 是一个易受环境因素影响的基因,能够被外源 MJ 诱导。

4.5 萝芙木

萝芙木根中含有利血平、阿吗碱和利血胺等多种萜类吲哚生物碱,其中利血平广泛作为抗高血压药使用。Liao 等^[40]从萝芙木中克隆了 RvDXR, RvDXR 在各个组织中均可表达,根中表达稍大于茎。RvDXR mRNA 转录是在萝芙木的果实里。

4.6 青蒿

青蒿素是从青蒿中发现的,对疟疾疗效显著。由于青蒿中青蒿素量很低,因此,青蒿素生物合成及基因工程研究备受关注^[55]。最新研究表明,DXR 等上游基因在青蒿的花中表达量更高,且 DXR 对于青蒿

素的产量贡献突出^[56]。此外,DXR 基因的表达也随发育时期变化而改变:6月份表达低,7、8月份(开花前)开始快速增长并达到高峰^[57]。研究发现,青蒿中 MEP 和 MVA 途径存在物质交流,更进一步地为上游碳流分支点调控青蒿素合成提供依据^[58]。

5 展望

萜类化合物作为一种重要的天然化合物,生物活性非常广泛。许多实验证明,在药用植物(长春花^[59]、丹参^[60])毛状根中加强 DXR 基因或酶的表达,能够有效地控制萜类物质的合成,提高萜类活性成分的合成量;在大肠杆菌中导入 DXR 基因,可协同菌内已有的萜类合成酶系统提高萜类化合物的产量^[61]。对 DXR 基因的研究,为代谢工程遗传转化药用植物,提高萜类成分合成量提供了功能基因和作用靶点。然而,目前对药用植物 DXR 基因的研究不多,芍药、栀子、地黄、苍术、穿心莲、雷公藤、茯苓等含萜类活性成分的药用植物 DXR 基因尚未克隆。考虑到中药资源日益不足和环境保护、经济效益等方面因素,基因工程、发酵工程、生物工程等手段会成为未来生产中药、复方制剂不可缺少的技术工艺。随着分子生物学、酶蛋白组学、代谢组学的发展,萜类活性成分生物合成途径的各类酶、基因信息将不断完善,药用植物代谢工程的资源替代作用和经济效益将不断提高。

参考文献

- [1] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China [J]. *Science*, 1985, 228(4703): 1049-1055.
- [2] Wang H M, Wei J, Yang C B, et al. The inhibition of tumor growth and metastasis by self-assembled nanofibers of taxol [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(24): 5848-5853.
- [3] 刘娟,刘颖.丹参药理活性成分研究进展[J].*辽宁中医药大学学报*, 2010, 12(7): 15-17.
- [4] Susan C R. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 387-395.
- [5] Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants [J]. *Nat Prod Rep*, 1999, 16(5): 565-574.
- [6] Zhang C B, Sun H X, Gong Z J, et al. Plant terpenoid natural metabolism pathways and their synthesis [J]. *Plant Physiol Comm*, 2007, 43: 779-786.
- [7] 李恒.萜类化合物 MEP 生物合成途径中 dxr 基因的克隆表达及酶活性分析 [D].西安:西北大学,2009.

- [8] Hsieh M H, Goodman H M. The arabidopsis isPH homolog is involved in the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(2): 641-653.
- [9] Tomohisa K, Shun J T, Hiroyuki W. Direct formation of 2-C-methyl-*D*-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate [J]. *Tetrahedron Lett*, 1998, 39(25): 4509-4512.
- [10] 罗永明, 黄璐琦, 刘爱华, 等. 植物萜类化合物的生物合成途径及其关键酶的研究进展 [J]. 江西中医学院学报, 2003, 15(2): 46-49.
- [11] Hill R E, Himmeldirk K, Kennedy I A, *et al*. The biogenetic anatomy of vitamin B6: A ¹³C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 30426-30435.
- [12] Godoi P H, Galhardo R S, Luche D D, *et al*. Structure of the thiazole biosynthetic enzyme THI1 from *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(41): 30957-30966.
- [13] Soheil S, Mahmoud S S, Croteau R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8915-8920.
- [14] 刘 卉, 杨锦芬, 詹若挺, 等. 阳春砂 DXR 超表达提高转基因烟草 DXR 活性及光合色素含量 [J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(1): 92-97.
- [15] Jullard J H. Biosynthesis of the pyridoxal ring (vitamin B6) in higher plant chloroplasts and its relationship with the biosynthesis of the thiazole ring (vitamin B1) [J]. *Acad Sci Series*, 1992, 314: 385-390.
- [16] Kim S W, Keasling J D. Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in *Escherichia coli* enhances lycopene production [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72(4): 408-415.
- [17] Ruther A, Misawa N, Boger P, *et al*. Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48: 162-167.
- [18] Reuter K, Sanderbrand S, Jomaa H, *et al*. Crystal structure of 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, a crucial enzyme in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(7): 5378-5384.
- [19] Chan W S, Abdullah J O, Namasivayam P, *et al*. Molecular characterization of a new 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) ranscript from *Vanda mimi* Palmer [J]. *Sci Horticult*, 2009, 121: 378-382.
- [20] 李 嵘, 王喆之. 植物萜类合成酶 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸还原异构酶的分子结构特征与功能预测分析 [J]. 植物研究, 2007, 27(1): 59-67.
- [21] Dudarevan N, Andersson S, Orlova I, *et al*. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3): 933-938.
- [22] Yajima S, Hara K, Iino D, *et al*. Structure of 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in a quaternary complex with a magnesium ion, NADPH and the antimalarial drug fosmidomycin [J]. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun*, 2007, 63: 466-470.
- [23] Susan L, Victoria I, Adelbert B, *et al*. Biosynthesis of isoprenoids-studies on the mechanism of 2C-methyl-*D*-erythritol-4-phosphate synthase [J]. *FEBS J*, 2008, 275(16): 4060-4073.
- [24] Hoeffler J F, Tritsch D, Grosdemange-Billiard C, *et al*. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. Mechanistic investigations of the 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 4446-4457.
- [25] Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, *et al*. A 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-*D*-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17): 9879-9884.
- [26] Xing S, Miao J, Li S, *et al*. Disruption of the 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in *Arabidopsis* [J]. *Cell Res*, 2010, 20(6): 688-700.
- [27] Fu X, Kong W, Peng G. Plastid structure and carotenogenic gene expression in red- and white-fleshed loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(1): 341-354.
- [28] Engpraser S, Shoyama Y, Taura F. Molecular cloning, expression and characterization of recombinant 1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Coleus forskohlii* Brig. [J]. *Plant Sci*, 2005, 169(2): 287-294.
- [29] Grauvogel C, Reece K S, Brinkmann H, *et al*. Plastid isoprenoid metabolism in the oyster parasite *Perkinsus marinus* connects dinoflagellates and malaria pathogens-new impetus for studying alveolates [J]. *J Mol Evol*,

- 2007, 65(6): 725-729.
- [30] Frommolt R, Werner S, Paulsen H, *et al.* Ancient recruitment by chromists of green algal genes encoding enzymes for carotenoid biosynthesis [J]. *Mol Biol Evol*, 2008, 25(12): 2653-2667.
- [31] Veau B, Courtois M, Oudin A, *et al.* Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1517(1): 159-163.
- [32] Kim S M, Kuzuyama T, Chang Y J, *et al.* Identification of class 2 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis [J]. *Planta Med*, 2006, 72(3): 234-240.
- [33] Jennewein S, Wildung M R, Chau M, *et al.* Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in taxol biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad*, 2004, 101(24): 9149-9154.
- [34] Wu S J, Shi M, Wu J Y. Cloning and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene for diterpenoid tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage) hairy roots [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52(1): 89-95.
- [35] Yan X, Zhang L, Wang J, *et al.* Molecular characterization and expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31(5): 1015-1022.
- [36] Kim Y B, Kim S M, *et al.* Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase genes [J]. *Tree Physiol*, 2009, 29(5): 737-749.
- [37] Sharkey T D, Yeh S, Wiberley A E, *et al.* Evolution of the isoprene biosynthetic pathway in kudzu [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137(2): 700-712.
- [38] Lange B M, Croteau R. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 365(1): 170-174.
- [39] Yao H, Gong Y, Zuo K, *et al.* Molecular cloning, expression profiling and functional analysis of a DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Camptotheca acuminata* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(2): 203-213.
- [40] Liao Z, Chen R, Chen M, *et al.* A new 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene encoding the committed-step enzyme in the MEP pathway from *Rauvolfia verticillata* [J]. *Z Naturforsch C*, 2007, 62(3/4): 296-304.
- [41] 李力更, 霍长虹, 董 玫, 等. 美丽红豆杉树皮中化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 355-361.
- [42] 李力更, 张嫚丽, 赵永明, 等. 加拿大产东北红豆杉化学成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 18-23.
- [43] 张 娜, 潘 英, 韩 凌, 等. 曼地亚红豆杉针叶中紫杉烷二萜类化学成分 [J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(1): 53-56.
- [44] Eisenreich W, Menhard B, Hylands P J, *et al.* Studies on the biosynthesis of taxol: the carbon skeleton is not of mevalonodiorigin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 93: 6431-6436.
- [45] Soliman S S M, Tsao R, Raizada M N, *et al.* Chemical inhibitors suggest endophytic fungal paclitaxel is derived from both mevalonate and non-mevalonate-like pathways [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(12): 2497-2504.
- [46] Zheng Q P, Yu L J, Liu Z, *et al.* Cloning and analysis of cDNA encoding key enzyme gene(dxr) of the non-MVA pathway in *Taxus chinensis* cells [J]. *Chin J Biotechnol*, 2004, 20(4): 548-553.
- [47] 刘 智, 余龙江, 栗茂腾, 等. 紫杉醇及其前体在中国红豆杉植株中合成和积累部位探讨 [J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(3): 313-317.
- [48] Gong Y, Liao Z, Chen M, *et al.* Molecular cloning and characterization of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *DNA Seq*, 2005, 16(2): 111-120.
- [49] 冯国庆, 杨颖舫, 李郑娜, 等. 农杆菌介导银杏遗传转化体系的建立及Gb-DXR基因表达载体的构建 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(10): 4992-4995.
- [50] 许 锋, 张威威, 孙楠楠, 等. 矮壮素对银杏叶片光合代谢与萜内酯生物合成的影响 [J]. 园艺学报, 2011, 38(12): 2253-2260.
- [51] 严向明. 丹参酮代谢途径 DXR 基因的克隆、特性分析及功能初步验证和 DXSI 基因启动子的克隆 [D]. 上海: 上海师范大学, 2008.
- [52] Liang Z S, Yang D F, Liang X. Roles of reactive oxygen species in methyl jasmonate and nitric oxide-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 31: 873-883.
- [53] Yang D, Ma P, Liang X, *et al.* PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP

- pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Physiol Plant*, 2012, 146(2): 173-183.
- [54] 沈少华, 刘姬艳, 胡江琴, 等. 喜树碱生物合成途径及其相关酶的研究进展 [J]. *中草药*, 2011, 42(9): 1862-1868.
- [55] 刘万宏, 黄 玺, 张巧卓. 青蒿素生物合成与基因工程研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44(1): 101-107.
- [56] 向礼恩, 严铮辉, 王贵君, 等. 青蒿素生物合成途径基因组织表达分析与青蒿素积累研究 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(9): 1169-1173.
- [57] 杨瑞仪, 杨雪芹, 冯丽玲. 青蒿素生物合成基因的转录谱分析 [J]. *广州中医药大学学报*, 2010, 27(4): 393-398.
- [58] 杨瑞仪, 杨雪芹, 冯丽玲, 等. 青蒿萜类合成途径的交流模式 (英文) [J]. *广州中医药大学学报*, 2010, 27(5): 535-543.
- [59] 周美亮. 大豆 MYBZ2 转录因子与外源次级信号分子 (NO 与 MeJA) 对长春花毛状根长春质生物合成的分子调控机理研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2009.
- [60] Yan X M, Zhang L, Wang J, *et al.* Molecular characterization and expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31(5): 1015-1022.
- [61] 李燕飞, 黄 磊, 王 普, 等. 重组大肠杆菌产番茄红素的研究进展 [J]. *齐鲁药事*, 2012, 31(4): 231-234.