

· 药材与资源 ·

龙骨马尾杉 PcFPS1 基因克隆及序列分析

张鑫¹, 罗红梅¹, 殷秀梅², 宋经元^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193

2. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716

摘要: 目的 对龙骨马尾杉 *Phlegmariurus carinatus* 法呢二磷酸合成酶 (Farnesyl diphosphate synthase, FPS) 基因 PcFPS1 编码区进行克隆及序列分析。方法 根据已获得的龙骨马尾杉转录组数据, 从中获得 1 条编码 FPS 的转录本, 采用 RT-PCR 方法获得 PcFPS1 的编码区序列, 并对 PcFPS1 蛋白进行理化性质、蛋白二级结构及三维结构预测分析。结果 序列分析表明, 所克隆的 PcFPS1 基因编码区长为 1 119 bp, 编码 372 个氨基酸残基, PcFPS1 与挪威云杉 *Picea abies* 的 FPS 具有 70% 的序列相似性。生物信息学预测 PcFPS1 蛋白基本不含跨膜区, 具有萜类合酶保守结构域, 不含信号肽。结论 首次获得龙骨马尾杉 PcFPS1 基因的编码区序列, 为进一步研究 PcFPS1 在石杉科植物萜类及甾醇类化合物生物合成途径中的功能及鉴定酶活性位点奠定基础。

关键词: 法呢二磷酸合成酶; 龙骨马尾杉; 次生代谢; 三萜; 克隆

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)18-2587-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.020

Cloning and sequence analysis of PcFPS1 gene in *Phlegmariurus carinatus*ZHANG Xin¹, LUO Hong-mei¹, YIN Xiu-mei², SONG Jing-yuan¹

1. National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Objective To clone and analyze the coding region of Farnesyl diphosphate synthase (FPS) gene PcFPS1 from *Phlegmariurus carinatus*. **Methods** According to the acquired transcriptome dataset of *P. carinatus*, one transcript coding FPS was obtained. The coding region sequence was obtained using RT-PCR method, and the physicochemical properties, protein secondary structure, and three-dimensional structure of PcFPS1 protein were predictively analyzed. **Results** The cloned PcFPS1 gene contained a 1 119-bp coding region for encoding a predicted protein of 372 amino acids with high homology (70%) to FPS gene in *Picea abies*. PcFPS1 contained almost no transmembrane region and had the conserved domain of terpenoid cyclases, without signal peptide. **Conclusion** This study clones and analyzes the FPS gene from *P. carinatus* which is obtained for the first time. The results will provide a foundation for exploring the function of PcFPS1 in terpene and sterol biosynthesis of plants in Huperziaceae.

Key words: farnesyl diphosphate synthase; *Phlegmariurus carinatus* (Desv.) Ching; secondary metabolism; triterpenoid; cloning

龙骨马尾杉 *Phlegmariurus carinatus* (Desv.) Ching 为石杉科 (Huperziaceae) 马尾杉属 *Phlegmariurus* Holub. 植物, 又称龙骨石松、大千金草、大伸筋草、裤带藤等, 始载于《云南植物研究》, 主要分布于热带地区, 多年生常绿草本, 丛生, 外

形犹如马尾。龙骨马尾杉营养叶与孢子叶异型, 附生植物, 叶无主肋、全缘, 孢子叶类似营养叶, 叶线性或披针形, 叶紧贴于茎, 披针形^[1]。其化学成分主要为石松生物碱及萜类, 全草入药。从其同科植物蛇足石杉中分离得到的石杉碱甲 (HupA) 被临

收稿日期: 2013-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目“基于宏量 ESTs 的蛇足石杉转录组分析及石杉碱甲合成酶 (HAS) 的鉴定研究” (30900113); 2011 年度教育部“长江学者和创新团队发展计划” (IRT1150)

作者简介: 张鑫 (1990—), 男, 浙江温州人, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学的研究。E-mail: 370573624@qq.com

*通信作者 宋经元, 教授, 博士, 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所药用植物鉴定研究中心副主任, 主要研究方向为中药资源学。E-mail: jysong@implad.ac.cn

床证明是一种高效、高选择性的中枢乙酰胆碱酯酶抑制剂, 具有治疗多种神经退行性疾病的潜在作用^[2]。目前 HupA 已研制成新药用于临床治疗重症肌无力、轻度老年痴呆症等疾病^[2]。另有研究表明, 龙骨马尾杉中 HupA 的量高于包括蛇足石杉在内的石杉科其他植物^[3]。Luo 等^[4-5]报道了通过罗氏 454 高通量测序方法获得了野生龙骨马尾杉、蛇足石杉的转录组信息, 并对其中三萜、黄酮、生物碱合成相关基因及 SSR 进行了大量发掘。目前, 已分别从蛇足石杉、长柄石杉 *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. var. *longipetiolata* (Spring) H. M. Chang 中分离鉴定了 32 个石松三萜^[6-9], 7 个 serratene 型三萜^[10], 且此类三萜为结构特殊的五环三萜, 具有潜在药用价值。

萜类是自然界中种类最多、结构多样的一类天然产物^[11], 主要从植物中分离获得。萜类化合物不仅参与植物的生长发育、环境应答等生理过程, 而且还广泛应用于医药、化工等领域。目前, 萜类化合物的生物合成途径已基本阐明。在植物中, 萜类化合物与甾醇类化合物的生物合成共享甲羟戊酸代谢途径 (mevalonic acid metabolic pathway)^[12]。首先, 甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 生成的异戊烯二磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 在香草二磷酸合成酶 (geranyl pyrophosphate synthase, GPS) 作用下形成香叶二磷酸 (geranyl diphosphate, GPP), GPP 由法呢二磷酸合成酶 (FPPS) 催化形成法呢二磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP), FPP 又在鲨烯合成酶 (squalene synthase, SS) 的作用下合成鲨烯 (squalene), 后者经鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SE) 催化转变为 2, 3-氧化鲨烯 (2, 3-oxidosqualene)^[13]。2, 3-氧化鲨烯经环氧角鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclase, OSC) 催化后环化形成多种结构、功能各异的植物甾醇和三萜类骨架^[14]。其中, FPS 被认为是异戊二烯生物合成途径中的一个关键酶, 催化两分子 IPP 和二甲基烯丙基二磷酸三铵盐 (DMAPP) 头尾相接缩合为 FPP, 继而形成萜类化合物。FPS 基因已经在青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Hjinjskaja^[15]、三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen^[16]、柴胡 *Bupleurum chinense* DC.^[17] 等植物中得到克隆, 并得到功能验证。根据参与萜类生物合成的不同阶段, 可将相关酶分为前期、中期、后期酶, FPS 作为中期酶, 且作用机制相对简单, 对于研究萜类化合物的合成有重要的意义^[17-18]。

目前, 对于龙骨马尾杉中萜类、甾醇类生物合成关键酶的研究甚少, 未有文献对龙骨马尾杉中的

FPS 基因进行报道。本研究基于课题组前期得到的龙骨马尾杉大量的转录组数据^[4-5], 从中发掘了 FPS 的转录本, 利用 RT-PCR 方法扩增获得 FPS 基因 PcFPS1 的全长 cDNA 序列, 并运用相应的生物信息学方法预测了 PcFPS1 蛋白的结构及功能位点, 为鉴定 PcFPS1 蛋白功能、研究龙骨马尾杉萜类及甾醇类化合物的生物合成分子机制奠定基础。

1 材料、试剂及仪器

1.1 材料

龙骨马尾杉 *Phlegmariurus carinatus* (Desv.) Ching 全草, 采自海南省霸王岭自然保护区 (海拔 1 320 m, 109°10'E, 19°7'N); 株高为 10~12 cm, 由中国医学院药用植物研究所林余霖研究员鉴定为龙骨马尾杉。采集后用清水冲洗 5~8 次, 然后用吸水纸轻轻吸去水分, 立刻置于液氮速冻, -80 °C 保存备用。大肠杆菌 *trans5a* 感受态购于北京全式金生物科技有限公司。

1.2 试剂

植物多糖多酚核糖核酸 (RNA) 提取试剂盒购于百泰克生物公司。PrimeScript 反转录试剂盒、Pyrobest 高保真酶、pMD19-T vector 均为日本宝生物公司产品。多聚酶链式反应 (PCR) 产物胶回收试剂盒购于天根生物公司。本研究所用引物均由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器

恒温水浴槽 (北京精科华瑞仪器有限公司); 培养箱 (北京议嘉林科技有限公司); PCR 扩增仪 (ABI 9600); -80 °C 超低温冰箱 (Thermo); 3K30 高速冷冻离心机 (Sigma); 凝胶成像系统 (美国伯乐); 紫外可见分光光度计 (Nanodrop 2000, 美国); 制冰机 (Scotsman); Sigma-1-14 小型台式高速离心机 (Sigma); 移液器 (Gilson); 高压蒸汽灭菌锅 (Sanyo); DYY-8C 型电泳仪 (北京六一电泳厂)。

2 方法

2.1 RNA 的提取

取龙骨马尾杉样品, 用清水清洗干净并擦去表面水分, 迅速在液氮中研磨, 依据百泰克生物公司的植物多糖多酚 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取龙骨马尾杉总 RNA, 利用 Nanodrop 2000 进行测定以及 1% 的琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。

2.2 cDNA 的合成

利用无 RNA 酶的脱氧核糖核酸酶 (DNase I)

对提取的 RNA 进行处理，去除提取物中所含的 DNA 并进行纯化。再利用 TaKaRa 公司的 PrimeScript 反转录酶，按照该试剂盒提供的反应条件和步骤进行实验操作，将 RNA 反转录成第一链互补链 DNA (cDNA)，得到的 cDNA 溶液用于 PCR 扩增。

2.3 PcFPS1 基因的扩增及测序

以龙骨马尾杉的 cDNA 为模板，以 5'-ATGGGAACCTTTGCAGCATCAG-3' 为上游引物，5'-CTACTTATGTCGCTTGATGATT-3' 为下游引物。PCR 反应体系为 cDNA 1.0 μL; Pyrobest 酶 0.2 μL; 10 μmol 引物 (F/R) 1.0 μL; 2.5 mmol/L dNTP 1.5 μL; 10×Pyrobest 缓冲液 3.0 μL; ddH₂O 22.3 μL; 对龙骨马尾杉的 PcFPS1 基因进行扩增。反应程序：94 °C 预变性 3 min，然后进行 30 个循环，94 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 1.5 min，循环结束后 72 °C 7 min 延伸反应，10 °C 保温。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，对扩增所得目的片段进行切胶回收。

将回收产物与 pMD19-T 载体连接，转化 *trans5a* 菌株，在含有氨苄的 LB 平板上进行培养，挑取单克隆经菌落 PCR 扩增和电泳检测后选择阳性克隆送公司测序。

2.4 PcFPS1 生物信息学分析

按相关软件 (表 1) 对 PcFPS1 基因编码蛋白的理化性质、结构域、二级结构、分泌蛋白、定位信号、跨膜区和结构域进行预测和分析，并建立该蛋白的三维模型。氨基酸序列比对利用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的蛋白质序列数据库进行，再通过 MEGA 5 构建 Neighbor-joining 系统进化树。

表 1 生物信息学分析软件

Table 1 Bioinformatic analysis software

作用	软件	网址
理化性质	ExPASy Proteomics	http://www.expasy.ch/tools/pr
蛋白质结构域	ExPASy PROSITE 和 NCBI 在线工具	http://www.expasy.ch/prosite/
蛋白质二级结构	SWISS-MODEL	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
蛋白质三维建模	SWISS-MODEL	http://swissmodel.expasy.org/
分泌蛋白	Signal P4.0 Server	http://swissmodel.expasy.org/
蛋白定位信号	WOLF PSORT	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
跨膜区	TMHMM Server v.2.0	http://wolfsort.org/
氨基酸序列比对	MEGA 5	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

3 结果与分析

3.1 龙骨马尾杉 PcFPS1 基因的克隆

通过搜索龙骨马尾杉高通量转录组数据^[4-5]，从中发现一个转录本 (contig04059) 被注释为 FPS 基因。经分析，发现该转录本具有一个完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。根据该 ORF 的序列设计基因的全长扩增引物 (PcFPS1-F 和 PcFPS1-R)，以龙骨马尾杉全草 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板，利用 PCR 技术扩增获得一条长为 1 119 bp 的序列，对所扩增基因命名为 PcFPS1，并将核酸序列提交到 NCBI (GenBank 登录号为 JX027510)，见图 1。

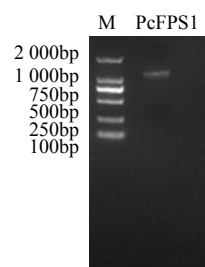


图 1 PcFPS1 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of PcFPS1 gene

3.2 PcFPS1 基因编码蛋白特性分析

3.2.1 理化性质分析 利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 对 PcFPS1 基因编码蛋白的理化性质进行预测，结果显示 PcFPS1 编码 372 个氨基酸，分子式为 C₁₉₁₆H₂₉₉₈N₄₉₈O₅₇₆S₁₃，相对分子质量 42 642.6。等电点 (pI) 5.31，带正电残基 (Arg+Lys) 为 45，带负电残基 (Asp+Glu) 为 55。该蛋白的不稳定系数 (instability coefficient) 为 41.72，说明 PcFPS1 不稳定。脂肪系数 (aliphatic coefficient) 为 92.23，亲水性系数 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.336。

3.2.2 PcFPS1 二级结构分析及结构域预测 采用 SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/) 进行蛋白质二级结构分析和结构域的三维建模。发现其二级结构中 α-螺旋占 60.75%，β-折叠占 2.42%，无规则卷曲占 36.83% (图 2)。InterProScan (http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/) 的保守结构域在线预测结果表明：PcFPS1 含有 2 种保守结构域，分别是聚戊烯基酶 (polyprenyl synthetase, IPR000092)、萜类合酶 (terpenoid synthase, IPR008949)。其中，在 PcFPS1 的 25~372 位氨基酸位点为萜类合酶结构域；在 63~334 位氨基酸位

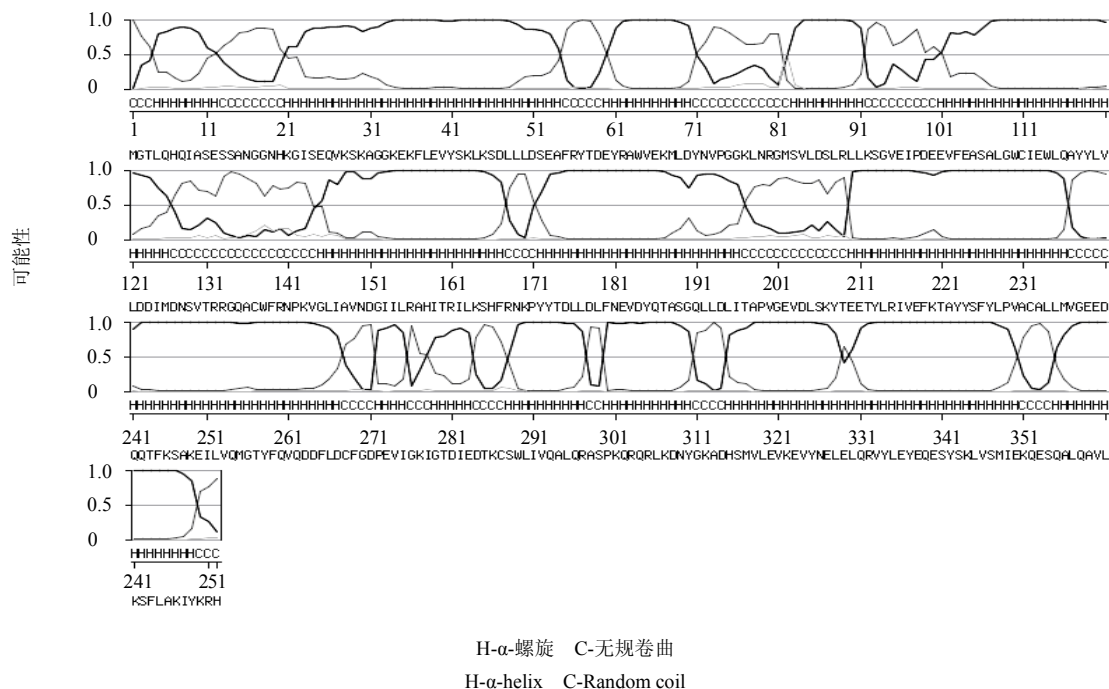


图2 通过 SWISS-MODEL 预测 PcFPS1 蛋白的二级结构

Fig. 2 Secondary structure prediction of PcFPS1 protein using SWISS-MODEL

点为聚戊烯基酶结构域。但是，对于聚戊烯基酶的研究不多，认为牻牛儿基焦磷酸合酶在结构上和聚戊烯基酶具有相似性。从萜类合酶的结构域分布位点来看，其基本囊括了该酶的所有氨基酸位点，这说明不同植物来源的 FPS 同源性较高。

3.2.3 PcFPS1 蛋白三维结构建模 在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中，对 PcFPS1 蛋白的保守结构域的三维结构建模，结果见图 3。

3.2.4 PcFPS1 信号肽、亚细胞定位预测分析 利用 SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测 PcFPS1 蛋白不具有信号肽。在线工具 WOLF PSORT (<http://wolffpsort.org/>) 预测该蛋

白的亚细胞定位情况，结果显示：细胞质的定位系数为 6.0(cyto: 6.0); 细胞核的定位系数为 4.0(nucl: 4.0); 细胞骨架的定位系数为 2.0 (cysk: 2.0); 叶绿体的定位系数为 1.0 (chlo: 1.0)。因此，HsCAS1 最可能定位于细胞质中。

3.2.5 PcFPS1 跨膜区预测分析 利用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-M/>) 预测 PcFPS1 的跨膜区，结果显示该蛋白不具有跨膜区 (图 4)。

3.2.6 PcFPS1 的氨基酸序列比对及进化分析 将 PcFPS1 的氨基酸序列提交到 NCBI 的蛋白质序列数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进

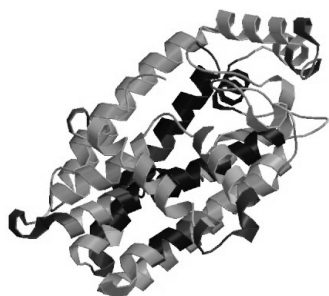


图3 PcFPS1 蛋白的三维模型

Fig. 3 Three-dimensional model for PcFPS1 protein

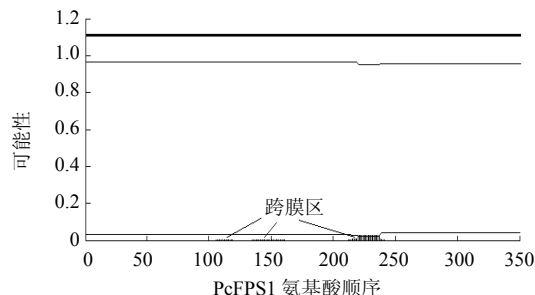


图4 预测的 PcFPS1 蛋白的跨膜区

Fig. 4 Predicted transmembrane region of PcFPS1 protein

行 BLASTP 搜索相似性序列, 结果显示, PcFPS1 与挪威云杉 *Picea Abies* (Linn.) Karst. 的 FPS 序列相似性最高, 达 70%。

为了分析 PcFPS1 的进化情况, 从 NCBI 的 Nr 数据库中选取了 10 个物种 10 条 FPS 序列绘制进化树。这些序列包括挪威云杉 *Picea abies* Karst 的 FPS (gi|168203179|), 银杏 *Ginkgo biloba* L. 的 FPS (gi|38684029|), 麝香百合 *Lilium longiflorum* Thumb 的 FPS (gi|326375390|), 小果野蕉 *Musa acuminata* Colla 的 FPS (gi|18958450|), 青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinsk 的 FPS (gi|267847005|), 雷公根 *Centella asiatica* (L.) Urban 的 FPS (gi|55710092|), 刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Ruprecht & Maximowicz) 的 FPS (gi|373842322|), 辽东槲木 *Aralia elata* (Miq.) Seem. 的 FPS (gi|300431229|), 三七 *Panax notoginseng* (Burk) f. H. Chen 的 FPS (gi|66735446|) 和人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的 FPS (gi|68165941|)。进化树如图 5 所示, PcFPS1 与挪威云杉和银杏的 FPS 亲缘关系较近, 这与序列 BLAST 的分析结果一致。

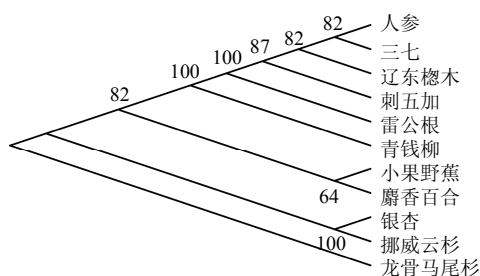


图 5 PcFPS1 的进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of PcFPS1

4 讨论

次生代谢产物是植物在长期进化中与环境相互作用的结果, 在植物生命活动的许多方面起着重要的作用, 且部分是植物生命活动所必需的。同时, 次生代谢产物在医药、食品、轻化工等领域被广泛应用, 但是其常有种属、器官组织和生长发育的特异性, 且往往含量较低。这就可能导致在对植物的开发利用过程中造成资源和生态问题。针对这个难题, 可以尝试利用植物条形码 (ITS2 序列) [19] 建立多个植物的系统发育树, 确定亲缘关系, 对近缘植物进行研究, 从中寻求目标化合物。ITS2 的鉴定效率已经在蔓藓科 [20]、豆科 [21] 等植物中得到肯定。目前, 萜类化合物除了考虑在基因水平上对其

形成机制进行调控 [22] 外, 还利用全基因组测序技术对三萜类物质相关合成基因进行全面阐释, 这已经在灵芝 [23] 和黄瓜 [24] 中取得成功。相关基因的发掘与研究还能通过转录组测序进行, Sun 等 [25] 在对西洋参转录组的研究中发掘了大量细胞色素 P450、糖基转移酶相关基因。

本研究结果不仅为验证 PcFPS1 的分子功能提供依据, 为阐明石杉科植物甾醇的生物合成途径奠定基础, 而且为将来合成生物学标准元件库的建立提供较完整的信息和条件。同时, 此次实验克隆所得的基因具有完整的 ORF, 而之前在柴胡 [12] 中仅得到 FPS 的基因片段。这得益于罗氏 454 高通量测序方法在本课题中的应用, 因其读长较长, 在识别同源区段时较 Solexa/Illumina 技术有优势, 更适合做转录组研究。其次, PcFPS1 基因编码 372 个氨基酸残基, 与之前报道的三七 [16]、青钱柳 [15]、青蒿 [26] 中 FPS 编码 342~343 个氨基酸残基有一定差别, 这可能是由于龙骨马尾杉属于低等蕨类植物, 与这些植物亲缘关系较远所致。文献报道, FPS 基因的功能已经在杜仲 [27]、烟草 [28] 中通过构建表达载体的方式得到验证。本研究在后续实验中, 将进行 PcFPS1 表达载体的构建, 并对 PcFPS1 的结构及功能进行研究。

致谢: 中国医学科学院药用植物研究所海南分所李榕涛、王德立老师在样品采集过程中给予帮助。

参考文献

- [1] 杨纯瑜. 国产石杉科, 石松科药用植物的分类、分布和药用价值 [J]. 植物分类学报, 1982, 20(4): 445-452.
- [2] Liu J S, Zhu Y L, Yu C M, et al. The structure of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anti-cholinesterase activity [J]. *Can J Chem*, 1986, 64(4): 837-839.
- [3] Ma X Q, Tan C H, Zhu D Y, et al. Is there a better source of huperzine a than *Huperzia serrata*? Huperzine a content of Huperziaceae species in China [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(5): 1393-1398.
- [4] Luo H M, Sun C, Li Y, et al. Analysis of expressed sequence tags from the *Huperzia serrata* leaf for gene discovery in the areas of secondary metabolite biosynthesis and developmental regulation [J]. *Physiol Plant*, 2010, 139(1): 1-12.
- [5] Luo H M, Li Y, Sun C, et al. Comparison of 454-ESTs from *Huperzia serrata* and *Phlegmariurus carinatus*

- reveals putative genes involved in lycopodium alkaloid biosynthesis and developmental regulation [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 209.
- [6] Zhou H, Tan C H, Jiang S H, *et al.* Serratene-type triterpenoids from *Huperzia serrata* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 1328-1332.
- [7] 李 军, 韩燕艺, 刘嘉森. 千层塔中三萜成分的研究 [J]. *药学学报*, 1988, 23(7): 549-552.
- [8] Zhou H, Li Y S, Tong X T, *et al.* Serratane-type triterpenoids from *Huperzia serrata* [J]. *Nat Prod Res*, 2004, 18(5): 453-459.
- [9] Zhou H, Jiang S H, Tan C H, *et al.* New epoxy-serratanes from *Huperzia serrata* [J]. *Planta Med*, 2003, 69: 91-94.
- [10] 裴 栋, 张敬杰, 李奇激, 等. 长柄石杉中 Serratene 三萜成分的研究 [J]. *时珍国医医药*, 2011, 22(9): 2233-2234.
- [11] Christianson D W. Unearthing the roots of the terpenome [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12(2): 141-150.
- [12] 秦玉芝, 赵小英, 邓克勤, 等. 甾醇生物合成中的关键酶——环氧角鲨烯环化酶的分子生物学研究 [J]. *生命科学*, 2007, 11(1): 10-15.
- [13] Jung J D, Park H W, Hahn Y, *et al.* Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(3): 224-230.
- [14] 岳跃冲, 范燕萍. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(2): 379-388.
- [15] 缪 倩, 曹小迎, 李长根, 等. 青钱柳法呢基焦磷酸合成酶基因的克隆及功能研究 [J]. *植物研究*, 2011, 31(3): 323-329.
- [16] 陈 莉, 蓝秀万, 李 坤, 等. 三七法呢基焦磷酸合酶的基因克隆及序列分析 [J]. *中草药*, 2006, 37(7): 1080-1083.
- [17] 董乐萌, 刘玉军, 魏建和. 柴胡皂苷合成途径中三个关键酶基因片段的克隆与序列分析 [J]. *世界科学技术—中药现代化*, 2008, 10(5): 56-61.
- [18] 罗永明, 刘爱华, 李 琴, 等. 植物萜类化合物的生物合成途径及相关酶的研究进展 [J]. *江西中医学院学报*, 2003, 15(1): 45-51.
- [19] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(1): e8613.
- [20] 赵丽嘉, 贾 渝, 周世良, 等. 蕨类植物 DNA 条码的初步研究——以蔓蕨科部分属为例 [J]. *植物分类与资源学报*, 2010, 32(3): 239-249.
- [21] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al.* Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1): 116-121.
- [22] 郭 冬, 李辉亮, 彭世清. 巴西橡胶树法呢基焦磷酸合酶基因 5' 调控序列的克隆及功能初步鉴定 [J]. *热带农业工程*, 2010, 34(6): 31-36.
- [23] Chen S L, Xu J, Liu C, *et al.* Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Nat Commun*, doi: 10.1038/ncomms1923, 2012, 3: 913.
- [24] Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, *et al.* The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L [J]. *Nat Genet*, 2009, 41, 1275-1281.
- [25] Sun C, Li Y, Wu Q, Luo H M, *et al.* De novo sequencing and analysis of the American ginseng root transcriptome using a GS FLX Titanium platform to discover putative genes involved in ginsenoside biosynthesis [J]. *BMC Genom*, 2010, 11: 262.
- [26] 韩军丽, 李振秋, 叶和春, 等. 青蒿高产株系 001 法呢基焦磷酸合酶基因的克隆、原核表达及酶活性测定 [J]. *河北农业大学学报*, 2008, 31(4): 71-75.
- [27] 赵 丹, 赵德刚, 李 岩. *EuFPS* 基因表达载体构建及对杜仲遗传转化的研究 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(1): 27-33.
- [28] 王冰莹, 杨永霞, 闫 鼎, 等. *fps* 基因过量表达对烟叶类胡萝卜素生物合成的影响 [J]. *中国烟草学报*, 2012, 18(2): 44-48.