

• 药材与资源 •

滇龙胆 *GrCYP450-17* 基因的克隆、序列分析与原核表达张晓东¹, 李彩霞¹, 李泽君¹, 李 涛¹, 王元忠^{2*}

1. 玉溪师范学院 资源与环境学院, 云南 玉溪 653100

2. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南 昆明 650223

摘要: 目的 从滇龙胆幼叶中克隆萜类合成相关酶基因 *GrCYP450-17*, 进行序列分析和原核表达。方法 根据滇龙胆转录组中 *GrCYP450-17* 基因序列, 设计引物, 通过 RT-PCR 扩增得到 *GrCYP450-17* 开放阅读框 (ORF) 序列, 并进行 TA 克隆、测序和序列分析; 构建原核表达载体 pGEX-4T-1-*GrCYP450-17*, 转入大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中, 在异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导下进行表达。结果 *GrCYP450-17* ORF 全长 1 545 bp, 编码 514 个氨基酸。序列分析表明, *GrCYP450-17* 基因是 CYP714 家族成员; 蛋白质序列系统发育分析表明, *GrCYP450-17* 与番茄 *SICYP450* 亲缘关系最近。构建 pGEX-4T-1-*GrCYP450-17* 重组质粒, 获得稳定的原核表达体系。SDS-PAGE 结果表明所表达蛋白与预期蛋白大小一致。结论 克隆了 *GrCYP450-17* 基因, 建立其稳定的原核表达体系, 为进一步纯化 *GrCYP450-17* 蛋白、研究其结构和功能奠定基础。

关键词: 滇龙胆; *GrCYP450-17*; 基因克隆; 序列分析; 原核表达

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)18-2678-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.020

Cloning, sequence analysis, and prokaryotic expression of *GrCYP450-17* gene in *Gentiana rigescens*

ZHANG Xiao-dong¹, LI Cai-xia¹, LI Ze-jun¹, LI Tao¹, WANG Yuan-zhong²

1. College of Resources and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China

2. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: Objective To obtain the key enzyme gene *GrCYP450* involving in the terpenoid biosynthesis, a *CYP450-17* gene was cloned from young leaves of *Gentiana rigescens*, and its sequence analysis and prokaryotic expression were performed. **Methods** According to the *GrCYP450-17* gene sequence of transcriptome of triennial *G. rigescens*, a pair of primers were designed, and the ORF (Open reading frame) of cDNA sequences was obtained by RT-PCR. Then TA cloning, sequencing, and sequence analysis were performed. Prokaryotic expression vector pGEX-4T-1-*GrCYP450-17* was constructed and transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) for the expression under the induction of Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG). **Results** The ORF of *GrCYP450-17* has a length of 1 545 bp coding for 514 amino acids. Sequence analysis showed that *GrCYP450-17* was the member of CYP714 family. Results of phylogenetic analysis showed that *GrCYP450-17* was close to *SICYP450* of tomato. The SDS-PAGE results showed that the expressed proteins were consistent with the anticipated size. **Conclusion** The *GrCYP450-17* gene is successfully cloned, and the stable prokaryotic expression system is established. This study will provide a foundation for the further purification, structural and functional researches of *GrCYP450-17* protein.

Key words: *Gentiana rigescens* Franch; *GrCYP450-17*; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression

龙胆苦苷是滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch、龙胆 *Gentiana scabra* Bunge、三花龙胆 *Gentiana triflora* Pall. 和条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag. 等龙胆科植物中的主要有效成分^[1]。目前龙胆苦苷

生物合成途径及其调控机制还不清楚。龙胆苦苷属于裂环烯醚萜类化合物。萜类化合物的结构多样性取决于许多特异性化学基团的修饰、骨架结构的重组和后修饰反应, 催化这些反应的大部分后修饰酶

收稿日期: 2014-03-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260608); 云南省教育厅科学研究基金重点项目 (2013Z075); 科技部“十二五”国家科技支撑计划项目 (2011BAI13B02-04)

作者简介: 张晓东 (1980—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为植物代谢基因工程。Tel: 15925236961 E-mail: zxd95@126.com

*通信作者 王元忠, 男, 助理研究员, 研究方向为药用植物资源评价与利用。Tel: 1388829994 E-mail: boletus@126.com

是细胞色素 P450 (CYP450) 单加氧酶, 因此发现和鉴定植物 CYP450 基因在萜类生物合成途径中起着重要作用^[2]。CYP450 因其与 CO 结合后的还原态酶在 450 nm 处有最大吸收而得名, 它几乎存在于所有生物的基因组中, 是酶蛋白大家族之一^[3]。CYP450 超家族成员具有相似的结构和属性, 但是具有不尽相同的生物学效应^[2]。研究表明同一生物不同发育时期, 其 CYP450 蛋白同工酶不尽相同^[2]。截至目前, 成千上万的 P450 基因被鉴定和研究^[4], 如在模式植物拟南芥中, 存在 287 个 CYP450 蛋白。尽管大量的 CYP450 基因序列被分离, 但在药用植物中, 该基因的研究仅限于如长春花^[5]、青蒿、红豆杉、黄连^[6]、甘草、苜蓿和丹参^[7]等个别药材^[2]。因此, 大量克隆和研究药用植物 CYP450 基因及其编码蛋白功能, 对于萜类生物合成途径的解析十分必要。

滇龙胆为传统中药龙胆的主要植物来源之一^[8]。目前, 国内外对龙胆的研究主要集中在种子萌发^[9-10]、DNA 条码^[11-12]、转录因子功能^[13-14]、育种^[15]等方面, 而对滇龙胆 CYP450 (*GrCYP450*) 基因克隆和功能分析尚未有报道。本研究根据滇龙胆转录组中 *GrCYP450-17* 基因序列, 设计特异性引物, 通过 RT-PCR 技术成功从滇龙胆幼叶中扩增到 *GrCYP450-17* 基因, 进行序列分析和原核表达。本研究旨在为 *GrCYP450-17* 蛋白的功能研究及通过在滇龙胆中过表达 *GrCYP450-17* 基因提高龙胆苦苷量的研究奠定基础。

1 材料

滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch 植株由云南省农业科学院药用植物研究所王元忠助理研究员鉴定和提供, 栽培于玉溪师范学院分子生物学实验室。试验材料为滇龙胆无菌苗的幼叶。大肠杆菌 DH5 α (CD201-02) 和 Rosetta 罗塞塔 (DE3) (CD801-02) 感受态菌种购买于北京全氏金公司。多糖植物组织提取试剂 RNAiso (9752A)、反转录试剂盒 (6111A)、pMD19-T 基因克隆试剂盒 (6013)、限制性内切酶 *Bam*HI (1605) 和 *Xho*I (1635)、IPTG (9030)、X-gal (9031) 等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒提取试剂盒 (DP1002) 和胶回收试剂盒 (DP1602) 购自北京百泰克生物技术有限公司; 原核表达载体 pGEX-4T-1 由玉溪师范学院分子生物学实验室保存; 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成; 测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

2 方法

2.1 叶片总 RNA 提取及 *GrCYP450-17* 基因全长 cDNA 的扩增

按照多糖植物组织提取试剂 RNAiso 试剂盒说明书提取滇龙胆幼叶总 RNA; 按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。根据原核表达载体 pGEX-4T-1 多克隆位点和转录组中 *GrCYP450-17* 基因序列, 设计一对特异引物 *GrCYP450-17* *Bam*HI-F: GGATCCATGGGATATCAAAGGGGAATATTTAC, *GrCYP450-17* *Xho*I-R: CTCGAGTCATTGATCTGAAATATCAAC-AGG。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 52 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、93 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

2.2 *GrCYP450-17* 基因克隆和测序

GrCYP450-17 基因 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 割胶后, 使用胶回收试剂盒对目的片段进行回收, 将其连接到 pMD19-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于添加 100 mg/L 氨苄青霉素 + IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) + X-Gal (5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷) 的 LB 固体平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 13 h 后挑取白斑, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 摇床培养后提取质粒, 经酶切鉴定正确后进行测序, 获得重组质粒 pMD19-*GrCYP450-17*。

2.3 *GrCYP450-17* 基因的原核表达载体构建

对质粒 pGEX-4T-1 和 pMD19-*GrCYP450-17* 分别进行 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切, 回收载体片段和目的基因, 按物质的量比 1:4 进行过夜连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于添加 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体平板, 13 h 后挑取阳性克隆, 摇菌后提取质粒, 经质粒大小和酶切检测正确后, 获得原核表达载体 pGEX-4T-1-*GrCYP450-17*。

2.4 *GrCYP450-17* 基因的生物信息学分析

使用 NCBI 网站上的 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行序列比对, 应用 Genetyx 进行翻译, 并预测蛋白质相对分子质量和等电点等, 使用 DNAMAN 7 进行多序列比对; 使用 Clustal X2.1 进行比对, 然后使用 MEGA 6.0 软件内置的 NJ 法构建系统进化树, 设置 Bootstrap=1 000; 利用在线数据库 (http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_11.html) 进行稀有密码子分析。使用 SignalP 4.1 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 信号肽进行预测。使用 NCBI 在线软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>)

cdd/docs/cdd_search.html) 进行保守结构域预测。使用 GOR4 方法 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 对二级结构预测, 使用 SWISS-MODEL 服务器 (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>) 对三级结构预测。利用 Expasy 中的 TMHMM 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 预测 GrCYP450-17 蛋白的跨膜螺旋区。利用在线工具 WOLF PSORT (<http://www.wolfpsort.org>) 预测 GrCYP450-17 的亚细胞定位情况。

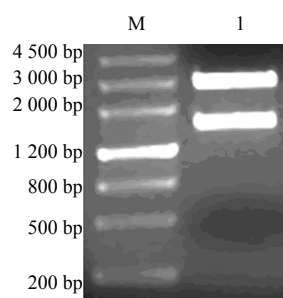
2.5 重组质粒 pGEX-4T-1-GrCYP450-17 在大肠杆菌中的表达

利用热激法将重组质粒 pGEX-4T-1-GrCYP450-17 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落接种于 3 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素 LB 液体培养基中, 37 °C、250 r/min 培养 12 h。然后以 1:100 比例转接到无抗生素的 LB 液体培养基中, 37 °C、250 r/min 培养 3 h ($A_{600} \approx 0.8$), 在 37 °C、终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导下进行表达, 分别诱导 0、2、4、6 h 后收集菌液 2 mL。同时以相同条件的 pGEX-4T-1 转化菌作为对照。4 °C、10 000 r/min 离心 1 min 集菌, 弃上清, 加入 100 μ L ddH₂O、25 μ L 的 5 $\times$ SDS-PAGE 载样缓冲液, 震荡悬菌, 沸水煮 10 min。4 °C、13 000 r/min 离心 5 min。取 20 μ L 上清上样, 进行 SDS-PAGE (5%浓缩胶和 10%分离胶) 电泳检测。

3 结果与分析

3.1 滇龙胆 GrCYP450-17 基因开放阅读框 (ORF) 序列的克隆

以滇龙胆组培苗幼叶 cDNA 为模板, 扩增出 1 500 bp 左右的片段。通过 TA 克隆获得重组质粒 pMD19-GrCYP450-17, 酶切检测结果表明双酶切能获得基因片段和 pMD19 载体 (图 1)。



M-Marker 1-BamHI 和 XhoI 双酶切结果

M-Marker 1-double digestion result by BamHI and XhoI

图 1 pMD19-GrCYP450-17 质粒的双酶切结果

Fig. 1 Double digestion of pMD19-GrCYP450-17 plasmid

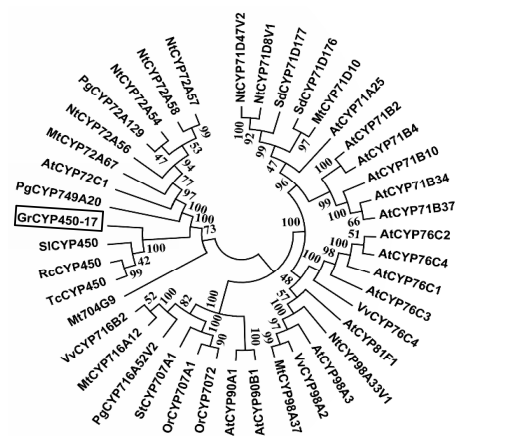
3.2 GrCYP450-17 基因的生物信息学分析

利用 Genetyx 软件对 GrCYP450-17 的序列进行分析, 结果显示 GrCYP450-17 基因的 ORF 为 1 545 bp, 编码 514 个氨基酸, 将该序列上传至 GenBank 数据库, 获得登录号 KF941188; Genetyx 推测 GrCYP450-17 蛋白相对分子质量为 57 730, 理论等电点值 (pI) 为 9.06。

利用 GenBank 数据库中的 BLASTp 程序对 GrCYP450-17 的氨基酸进行同源性分析, 结果表明滇龙胆 GrCYP450-17 与番茄 SlCYP450 蛋白的相似性最高 (66.86%), 与野甘草 SdCYP450 (SdCYP71D176 和 SdCYP71D177) 蛋白序列的相似性较低 (16.88% 和 13.96%)。将 GrCYP450-17 蛋白比对拟南芥蛋白质数据库, 结果表明其与 AtCYP714A1 相似性最高, 达 44.36%, 说明 GrCYP450-17 属于 CYP714 家族。

利用 Mega6.0 将 GrCYP450-17 氨基酸序列与从 NCBI 中挑选的同源性较高的部分已知序列进行系统进化分析, 结果表明 GrCYP450-17 与番茄 SlCYP450、蓖麻 RcCYP450、可可 TcCYP450 的亲缘关系较近 (图 2); 与野甘草 SdCYP450 亲缘关系较远 (图 2)。

利用 DNAMAN 将 GrCYP450-17 氨基酸序列与从 NCBI 中挑选的同源性较高的部分已知序列进行多序列比对分析, 结果表明 GrCYP450-17 蛋白与已知蛋白序列较为保守 (图 3)。



Gr-Gentiana rigescens Nt-Nicotiana tabacum Pg-Panax ginseng
Mt-Medicago truncatula Vv-Vitis vinifera Sd-Scoparia dulcis
Or-Orobancha ramose St-Solanum tuberosum Sl-Solanum
lycopersicum Rc-Ricinus communis

图 2 GrCYP450-17 蛋白与其他植物 CYP450 蛋白的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic relationship of GrCYP450-17 and CYP450 proteins in other plants

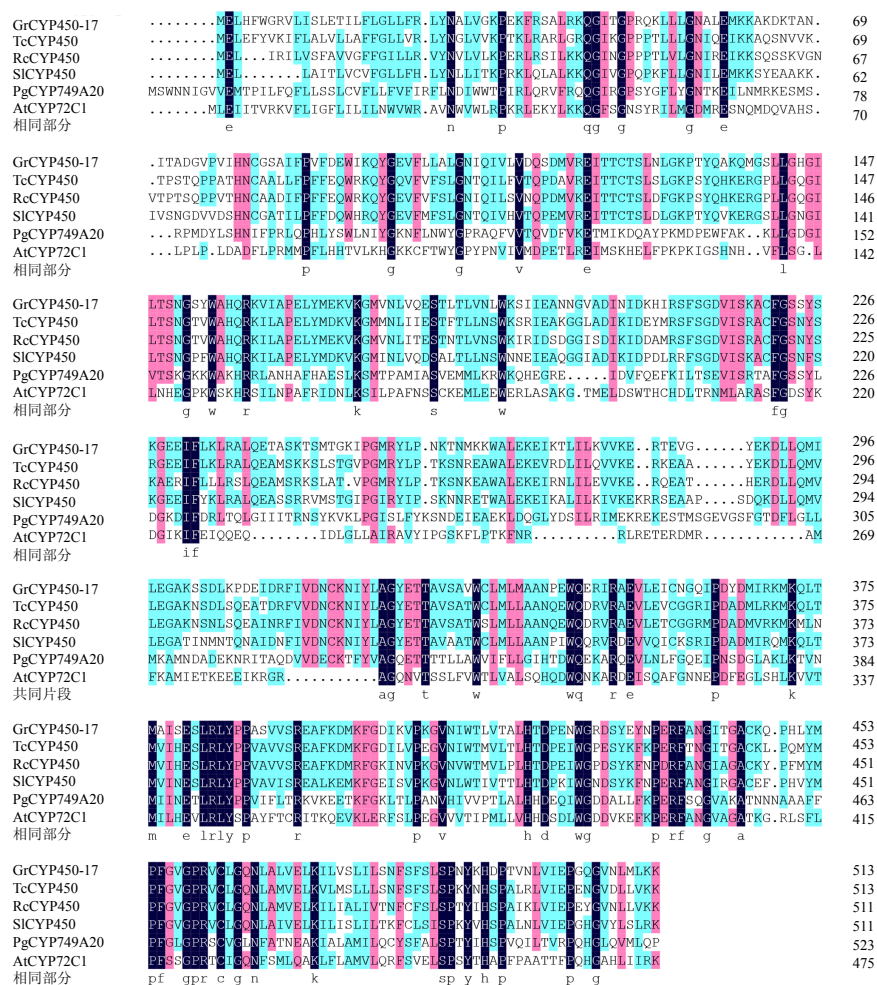


图3 GrCYP450-17与其他植物中CYP450序列的多序列比对结果

Fig. 3 Multiple sequence alignment of GrCYP450-17 amino acid sequence with CYP450 sequence in other plants

通过使用 ExPASy ProtParam tool 进行分析, GrCYP450-17 蛋白的相对分子质量为 57 730, pI 为 8.98, 化学式为 $C_{2605}H_{4172}N_{686}O_{737}S_{26}$ 。不稳定指数为 33.64, 属于稳定蛋白; 脂肪族指数为 100.14, 总平均疏水性 (GRAVY) 为 0.08。蛋白质的疏水性通常依据蛋白的 GRAVY 值来预测, GRAVY 值在 2~-2, 若为正值, 则此蛋白为疏水蛋白, 反之则为亲水性蛋白。因此, GrCYP450-17 为疏水蛋白。GrCYP450-17 蛋白含有 20 种氨基酸, 其中亮氨酸量最高, 为 11.90%; 其次是赖氨酸和异亮氨酸, 分别为 8.40% 和 7.20%; 组氨酸和半胱氨酸量最低, 为 1.60%。

对 GrCYP450-17 进行稀有密码子分析, 结果表明 GrCYP450-17 基因中稀有密码子占 1.17%, 无二联或三联稀有密码子连续出现的情况, 因此可选用 BL21 或 Rosetta (DE3) 进行原核表达。

对 GrCYP450-17 蛋白进行信号肽分析结果表

明该蛋白不含信号肽, 为非分泌蛋白。利用 GOR4 方法对 GrCYP450-17 进行二级结构分析。结果表明该蛋白二级结构中 α -螺旋 (H) 占 36.77%, β -折叠 (E) 占 20.62%, 无规则卷曲 (C) 占 42.61%。利用 TMHMM 工具预测 GrCYP450-17 蛋白的跨膜螺旋区, 结果表明 GrCYP450-17 蛋白为非膜蛋白。采用 NCBI 在线工具预测 GrCYP450-17 蛋白的保守结构域, 结果表明 GrCYP450-17 蛋白具有 P450 超家族结构域 (图 4)。

利用 Swiss-Model Workspace 预测 GrCYP450-17 蛋白的三级结构, 从图 5 中可以看到 GrCYP450-17 的三级结构主要由 α -螺旋结构和无规则卷曲组成, 与二级结构预测结果一致。

3.3 GrCYP450-17 基因原核表达载体构建

使用 BamHI 和 XhoI 双酶切质粒 pGEX-4T-1-GrCYP450-17, 可切出目的片段和 4T 载体, 且二者大小之和与单切产物大小相同 (图 6), 表明

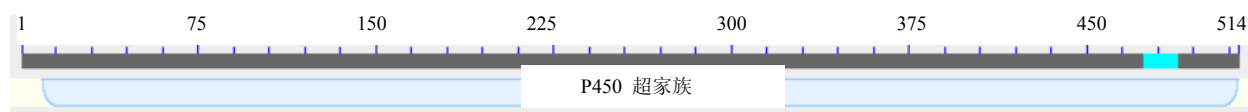


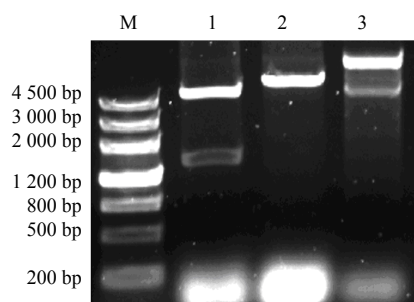
图4 GrCYP450-17 蛋白保守结构域的预测

Fig. 4 Prediction of conserved domains of GrCYP450-17 protein



图5 GrCYP450-17 的三维结构预测

Fig. 5 Predicted three dimensional structure of GrCYP450-17 protein



M-Marker 1~2-质粒 pGEX-4T-1-GrCYP450-17 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切、*Xho*I 单酶切结果 3-质粒对照

M-Marker 1—2-digestion result of plasmid pGEX-4T-1-GrCYP450-17 by *Bam*HI and *Xho*I, *Xho*I 3-plasmid control

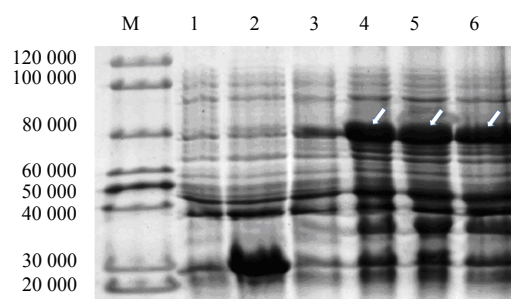
图6 质粒 pGEX-4T-1-GrCYP450-17 酶切检测

Fig. 6 Digestion of pGEX-4T-1-GrCYP450-17 plasmid

GrCYP450-17 基因已成功插入载体 pGEX-4T-1 中。然后, 对重组表达质粒 pGEX-4T-1-GrCYP450-17 进行测序。结果表明, 目的基因与原序列一致, 且未出现碱基突变及移码现象。这些结果表明已获得正确的重组质粒 pGEX-4T-1-GrCYP450-17。

3.4 GrCYP450-17 蛋白的表达

将重组质粒 pGEX-4T-1-GrCYP450-17 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 后进行 IPTG 诱导表达。在 37 °C、终浓度为 1 mmol/L IPTG 下, 分别诱导表达 0、2、4、6 h 后, 提取总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。结果(图 7)表明, 与对照相比, pGEX-4T-1-GrCYP-450-17 工程菌经 IPTG 诱导后, 在相对分子质量 78 000 (含 GST 蛋白) 左右有 1 条蛋白条带, 表明重组质粒 pGEX-4T-1-GrCYP450-17 在大肠杆菌 Rosetta 中诱导



M-Marker 1~2-CK 37 °C、IPTG 终浓度为 1 mmol/L 下 pGEX-4T-1 空载体转化子诱导 0、6 h 的总蛋白 3~6-相同条件下融合表达工程菌诱导 0、2、4、6 h 的总蛋白

M-Marker 1—2-CK is the expressed product of pGEX-4T-1 with 1 mmol/L of IPTG induction for 0 and 6 h at 37 °C 3~6-The expressed product of pGEX-4T-1-GrCYP450-17 with 1 mmol/L of IPTG induction for 0, 2, 4 and 6 h separately at 37 °C

图7 37 °C 下不同诱导时间对 GrCYP450-17 蛋白表达量的影响

Fig. 7 Effect of different time on expression of GrCYP450-17 protein at 37 °C

表达了 GrCYP450-17 蛋白。当温度为 37 °C、诱导时间为 6 h 时, 蛋白表达量最大, 可直接用于下一步的蛋白纯化。

4 讨论

在萜类生物合成过程中, CYP450 家族成员起着不可或缺的作用^[2]。CYP450 的分类是基于氨基酸的相似性: 若新发现的 CYP450 蛋白与已知的 CYP450 蛋白相似性大于 40%, 那么该蛋白与那个已知蛋白为同一家族成员, 否则该蛋白属于新的家族成员; 若相似性大于 40% 而小于 55%, 则该蛋白属于同一家族的两个不同亚家族成员; 若相似性大于 55%, 则二者属于同一亚家族^[16]。使用本研究中的 GrCYP450-17 蛋白序列比对拟南芥蛋白质数据库, 结果表明其与 AtCYP714A1 相似性最高 (44.36%), 说明 GrCYP450-17 属于 CYP714 家族, 但不属于亚家族 A 成员。在植物中, 几乎所有 CYP450 都具有相似的拓扑结构和三维折叠构象, 但是它们之间的氨基酸序列相似性可能小于 20%^[17]。笔者尝试过将 GrCYP450-17 蛋白与拟南芥 287 个 CYP450 进行系统发育树的构建, 但因为序列差异太大而无法使用

MEGA6.0 进行构建。植物 CYP450 结构和功能之间的关系并不十分清楚,但通过系统发育分析来预测新的 CYP450 蛋白功能是很好的方法^[17]。在本研究中,系统发育分析表明 GrCYP450-17 与番茄 SlCYP450、蓖麻 RcCYP450 和可可 TcCYP450 的亲缘关系较近,因此它们可能具有相同或相类似的功能。

尽管成千上万的 CYP450 基因已被分离,但是在植物中仅有几百个 CYP450 蛋白在分子水平上是清楚的^[2]。本课题组通过转录组测序技术获得了一批 GrCYP450 基因,本研究是从滇龙胆幼叶中克隆了 GrCYP450-17 基因,序列分析表明其为非膜蛋白,不存在信号肽和跨膜螺旋,其可能在胞质中发挥作用。二级结构和三级结构预测表明其主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成。酶基因的功能体现在蛋白质上,本研究构建了原核表达载体 pGEX-4T-1-GrCYP450-17,转入大肠杆菌 Rosetta (DE3),并成功诱导表达出 GrCYP450-17 蛋白。该研究为 GrCYP450-17 蛋白结构和功能研究奠定基础,也为萜类代谢工程提供候选基因。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局 《中华本草》编辑委员会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [2] Zhao Y J, Cheng Q Q, Su P, *et al.* Research progress relating to the role of cytochrome P450 in the biosynthesis of terpenoids in medicinal plants [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2014; (98): 2371-2383.
- [3] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: A success story [J]. *Genome Biol*, 2000, 1(6): 3003.
- [4] Nelson D R. A world of cytochrome P450s [J]. *Philos T R Soc B*, 2013, 368: 1-5.
- [5] Burlat V, Oudin A, Courtois M, *et al.* Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites [J]. *Plant J*, 2004, 38(1): 131-141.
- [6] Ikezawa N, Tanaka M, Nagayoshi M, *et al.* Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38557-38565.
- [7] Yang L, Ding G, Lin H, *et al.* Transcriptome analysis of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* and identification of genes related to tanshinone biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80464.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [9] Zhang J, Zhang J, Wang Y, *et al.* Effects of tree species on seed germination and seedlings growth of Chinese medicinal herb *Gentiana rigescens* [J]. *Allelopathy J*, 2012, 29(2): 325-332.
- [10] Zhang J, Wang Y, Yang T, *et al.* Use of gibberellic acid to overcome the allelopathic effect of a range of species on the germination of seeds of *Gentiana rigescens*, a medicinal herb [J]. *Seed Sci Technol*, 2012, 40(3): 443-447.
- [11] Wong K L, But P P, Shaw P C. Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal *Gentiana* species and their adulterants [J]. *Chin Med*, 2013, 8(1): 16.
- [12] Nakatsuka T, Saito M, Sato-Ushiku Y, *et al.* Development of DNA markers that discriminate between white-and blue-flowers in Japanese gentian plants [J]. *Euphytica*, 2012, 184(3): 335-344.
- [13] Nakatsuka T, Yamada E, Saito M, *et al.* Heterologous expression of gentian MYB1R transcription factors suppresses anthocyanin pigmentation in tobacco flowers [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(12): 1925-1937.
- [14] Nakatsuka T, Saito M, Yamada E, *et al.* Isolation and characterization of GtMYBP3 and GtMYBP4, orthologues of R2R3-MYB transcription factors that regulate early flavonoid biosynthesis, in gentian flowers [J]. *J Exp Bot*, 2012, 3(18): 6505-6517.
- [15] Gu Y H. The gentian returned after travelling by spacecraft Shenzhou-10 which suggested that space breeding project has been started in Yunnan Province. [J/OL]. Beijing: Chinanews, (2013-7-12) [2014-3-11]. Available from <http://www.chinanews.com/gn/2013/07-12/5037538.shtml>.
- [16] Nelson D R. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450 [J]. *BBA-Prot Proteom*, 2011, 1814(1): 14-18.
- [17] Weitzel C, Simonsen H T. Cytochrome P450-enzymes involved in the biosynthesis of mono-and sesquiterpenes [J]. *Phytochem Rev*, 2013, doi: 10.1007/s11101-013-9280-x.