

• 药材与资源 •

菘蓝中肉桂酸-4-羟基化酶基因克隆与表达分析

胡永胜¹, 张磊², 陈万生^{2*}

1. 解放军第118医院 药械科, 浙江 温州 325000

2. 第二军医大学附属长征医院 药学部, 上海 200003

摘要: 目的 克隆菘蓝中肉桂酸-4-羟基化酶(C4H)基因, 并进行生物信息学和表达分析。方法 采用cDNA末端快速扩增(RACE)技术克隆C4H基因全长cDNA序列, 进而获得其基因组DNA序列。通过RT-PCR法检测C4H蛋白在不同器官中及受到相应刺激因素下的表达情况。结果 菘蓝C4H基因全长cDNA为1 674 bp (GenBank 登录号: GU014562), 包含一个1 530 bp的开放阅读框(ORF), 编码509个氨基酸残基。对应的基因组分析表明, C4H基因含2个内含子, 3个外显子。在根、茎、叶各器官中均有表达, 其中根中最多。胁迫因素紫外照射(UV-B)、茉莉酸甲酯(MeJA)、脱落酸(ABA)和赤霉素(GA₃)在一定程度上能够诱导C4H的表达上调。结论 首次从菘蓝植物中克隆得到C4H基因的cDNA全长序列, 并证实其在根中表达量最高, 且在胁迫因素下表达量上调, 为进一步研究菘蓝中抗病毒活性成分木质素类成分的次生代谢工程奠定基础。

关键词: 菘蓝; 肉桂酸-4-羟基化酶; 克隆; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)01-0101-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.020

Molecular cloning and expression analysis of cinnamic acid 4-hydroxylase gene from *Isatis indigotica*

HU Yong-sheng¹, ZHANG Lei², CHEN Wan-sheng²

1. Department of Drug and Equipment, the 118th Hospital of PLA, Wenzhou 325000, China

2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Abstract: Objective To clone cinnamate 4-hydroxylase (C4H) gene from *Isatis indigotica* and to analyze its bioinformatics and expression. **Methods** The full-length cDNA of C4H was 1 674 bp (GenBank accession No. GU014562) long with an open reading frame (ORF) of 1 530 bp encoding a polypeptide of 509 amino acid residues. The comparison of C4H genomic DNA sequences and C4H cDNA sequence revealed that the C4H genomic DNA contained two introns. Southern-blotting analysis indicated that C4H was a multiple copy gene. C4H expression could be detected in all tissues at different expression levels, with the strongest expression in the roots. Further expression analysis revealed that the signaling components of defense/stress pathways, such as ultraviolet-B radiation (UV-B), methyl jasmonate (MeJA), abscisic acid (ABA), and Gibberellins (GA₃) could up-regulate the C4H transcript levels compared with the control. **Conclusion** We have first extracted the full length cDNA of C4H gene from *I. indigotica*, and its structural and bioinformatic analyses are carried out, which will help us to further illuminate this pathway. The research also provides a possibility to study the antiviral active constituents in *I. indigotica* by plant secondary metabolic engineering.

Key words: *Isatis indigotica* Fort.; cinnamic acid 4-hydroxylase; clone; bioinformatics; expression analysis

菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 为十字花科 (Cruciferae) 菘蓝属 *Isatis* L. 二年生草本植物。其根入药为板蓝根, 其叶入药为大青叶, 有清热解毒、凉血消斑、利咽止痛的功效^[1-2], 临床应用广泛。本

课题组前期研究表明, 木质素类成分落叶松脂素和落叶松脂素苷正是我国传统中药板蓝根发挥抗病毒功效的重要活性物质基础^[3], 且抗病毒活性与木质素生物合成途径中基因的高表达密切相关^[4]。然而菘

收稿日期: 2014-06-25

基金项目: 上海市科学技术委员会登山行动计划项目 (07DZ19721)

作者简介: 胡永胜(1982—), 男, 博士, 主管药师, 主要从事天然产物的生物合成与调控研究。Tel/Fax: (0577)56989639 E-mail: yshu@outlook.com

*通信作者 陈万生, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药配伍机制、药物相互作用及天然产物的生物合成与调控研究。

Tel/Fax: (021)81871345 E-mail: chenwanshengmmu@aliyun.com

蓝中落叶松脂素和落叶松脂素苷量相对较低,有必要进行相应地次生代谢调控。本研究采用 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术,首次从菘蓝中分离得到木脂素生物合成中关键酶肉桂酸-4-羟基化酶 (cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H) 基因,为后续开展菘蓝中木脂素类成分代谢调控研究奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

菘蓝种子采集自第二军医大学药学院植物园。菘蓝种子采用常规消毒法进行消毒处理,接种到 MS 培养基上获得无菌苗。幼苗生长在 25 °C 光照 16 h、18 °C 暗环境 8 h 的控温室中。收集生长 2 个月的菘蓝幼苗的根、茎和叶,用于菘蓝 RNA、DNA 的抽提。

1.2 试剂

大肠杆菌菌株 Trans5 α 、克隆载体 pEASY-T1 Cloning Vector、反转录试剂盒 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix、小量胶回收试剂盒 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 购自北京全式金生物技术有限公司;RNA 提取试剂盒、小量质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司;SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒购自 Clontech (美国)公司;Real-time PCR 试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit、TaKaRa LA Taq 酶购自 TaKaRa (日本)公司;限制性内切酶购自纽英伦生物技术(北京)有限公司。

2 方法

2.1 菘蓝核酸的提取和 RACE cDNA 文库的构建

按照 CTAB 法和 RNA 提取试剂盒操作说明分

别提取菘蓝 DNA 和 RNA,并进行相应的浓度和纯度检测。按反转录试剂盒 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 操作说明将 RNA 逆转录为 cDNA。按 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)的操作程序构建菘蓝 RACE cDNA 文库,构建好的 3'-ready 和 5'-ready RACE cDNA 文库被分装成小份保存于-20 °C 冰箱。

2.2 菘蓝 C4H 基因全长 cDNA 及对应的基因组序列的获得

首先根据 GenBank 上登录 C4H 的 cDNA 序列保守区设计一对简并引物 dC4HFP 和 dC4HRP 用于扩增 C4H 基因的保守片段。进而根据 C4H 基因保守区序列,分别设计 3'-RACE 引物 C4HF579 和 5'-RACE 引物 C4HR471,下游引物为试剂盒提供的 UPM (Universal Primer A Mix, Clontech, 美国),分别以 3'-ready 和 5'-ready RACE cDNA 文库为模板扩增获得 C4H 基因末端序列。将 3'-RACE 和 5'-RACE 的测序结果进行对接拼接后,设计菘蓝 C4H 基因全长引物 C4HQCF 和 C4HQCR,分别以菘蓝 cDNA 和 DNA 为模板利用高保真酶 LA Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增获得菘蓝 C4H 基因全长 cDNA 及对应的基因组序列。

PCR 扩增反应体系为 50 μ L,反应结束后电泳,目的片段回收纯化后与克隆载体 pEASY-T1 Cloning Vector 连接,后转入大肠杆菌菌株 Trans5 α ,经过 PCR 扩增筛选,挑选含有目的片段的菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序。PCR 扩增实验中所用的引物序列及退火条件见表 1。

表 1 菘蓝 C4H 基因克隆和表达分析所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in gene cloning and expression analyses of C4H

引物名称	引物序列 (5'→3')	处理	用途
dC4HFP	ACTGGCT(G/T/C)CAAGT(A/T/G/C)GG(A/T/C)GA(C/T)G	57 °C, 30 s	保守区扩增
dC4HRP	CATTGATGTTCTC(A/G)AC(A/G)ATGT		
C4HF579	GAATCCTGAAGCCGCCACGAAAG	58 °C, 30 s	3'-RACE 扩增
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	58 °C, 30 s	3'-RACE 扩增
		68 °C 每个循环降低 0.5 °C, 30 s	5'-RACE 扩增
C4HR471	CCTCCAGTGCTCACCGTAGACAG	68 °C 每个循环降低 0.5 °C, 30 s	5'-RACE 扩增
C4HQCF	CAGCTTCTCCTGCTTCTTCAT	56 °C, 30 s	基因全长 cDNA 扩增
C4HQCR	CATGACGATGGTTGAGTGGGT		
C4HF579	GAATCCTGAAGCCGCCACGAAAG	58.1 °C, 30 s	C4H 基因表达分析
C4HR862	TAGTCTTCGGTCTTTCACATC		
18SF	ATGATAACTCGACGGATCGC	58.1 °C, 30 s	C4H 基因表达分析
18SR	CTTGGATGTGGTAGCCG TTT		
C4HF579	GAATCCTGAAGCCGCCACGAAAG	58.3 °C, 30 s	Southern blotting 杂交
C4HR1154	CTGTGATTTGAACGCCTGGTC		

2.3 菘蓝 C4H 基因的生物信息学分析

本实验中的序列比对均使用 Vector NTI Advance 11 软件和 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行分析, 开放阅读框 (ORF) 的查找和核苷酸的翻译在 NCBI 的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 上完成。蛋白质基本性质的分析用 <http://www.expasy.org> 网站提供的相关生物信息学分析软件进行 C4H 蛋白系统进化分析, 使用 CLUSTAL X (1.80) 软件对序列进行多重比对, 并用 MEGA 2.0 软件, 采用相邻节点 (NJ) 算法构建进化树^[5-7]。进化树的可靠性采用自展分析法 (bootstrap analysis) 进行 1 000 次重复。C4H 蛋白的相对分子质量、等电点和结构使用 Vector NTI Advance 11 软件进行预测分析。C4H 蛋白二级结构使用 GOR IV^[8] (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 预测分析。根据 Swiss-Model^[9-11] (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源建模 (homology modeling), 用 Web Lab View Lite 4.0 软件绘制蛋白的三维结构。多重比对和系统发生树构建中使用到的 C4H 蛋白的相关信息见表 2。

2.4 菘蓝 C4H 基因的器官及胁迫表达分析

采用 RNA 提取试剂盒提取菘蓝根、茎、叶, 以及各种胁迫刺激, 即紫外 (UV-B) 照射、茉莉酸

甲酯 (MeJA)、脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA₃) 处理后的菘蓝叶片的总 RNA, 按照 TaKaRa 公司 Dnase I 的操作程序, 在 37 °C 下温浴 30 min 以去除 RNA 样品中的 DNA。根据 TransGen 操作手册指导用 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 合成第一链 cDNA。Real Time PCR 反应采用试剂盒 SYBR Premix ex Taq™ (TaKaRa), 具体操作按试剂盒说明书。所用的特异引物是 C4HF579 和 C4HR862; 菘蓝 18 S rRNA 基因作为对照, 所用的特异引物是 18SF 和 18SR; 反应程序见表 1。

2.5 菘蓝 C4H 的 Southern blotting 分析

以菘蓝 cDNA 为模板, C4HF579 和 C4HR1154 为引物, 扩增 Southern blotting 杂交探针。每份 20 μg 的菘蓝基因组 DNA 样品分别用 *EcoRI* 和 *XbaI* 在 37 °C、*BstEII* 在 60 °C 酶切过夜, *EcoRI*、*XbaI* 和 *BstEII* 在 C4H 全长区域均没有识别位点。过夜酶切之后样品用 1% 的凝胶 80 V 电泳, 凝胶电泳中的 DNA 经脱嘌呤、变性和中和之后用 10×SSC 转移到带正电荷的尼龙膜上, 80 °C 固定 2 h 之后用于杂交。探针标记、杂交、洗膜和杂交信号检测均按 Amersham Pharmacia 公司的随机引物标记试剂盒和 CDP-Star 检测试剂盒的标准操作进行, 杂交膜用 X 光片检测, 在室温显影 2 h 后显影、定影。

3 结果与分析

3.1 菘蓝基因全长 cDNA 的克隆及其特征分析

利用简并引物 dC4HFP 和 dC4HRP 扩增得到 C4H 基因的 783 bp 大小的保守片段。依据此保守片段设计特异引物, 采用 RACE 技术, 分别获得 C4H 基因的 1 066 bp 的 3' 末端和 493 bp 的 5' 末端, 通过 BLAST 序列比对初步确定为目标基因片段, 在 Vector NTI Advance 11 软件中将 3 个片段连接成基因全长, 根据该全长序列, 设计全长特异引物, 以菘蓝 cDNA 反转录库为模板得到基因的全长序列。C4H 全长 cDNA 为 1 674 bp (GenBank 登录号: GU014562), 包含一个 1 530 bp 的 ORF, 编码 509 个氨基酸残基。经过 BLAST 进行基因比对, 发现得到的 cDNA 序列与芜菁 *Brassica rapa* L. ssp. *rapifera* Matzg 中的 C4H 基因具有 91% 的相似性, 与拟南芥 *Ammi thaliana* (L.) Heynh 中 C4H 基因具有 88% 的相似性。C4H 对应的基因组序列 1 946 bp 进行分析, C4H 基因含有 2 个内含子, 3 个外显子。相关的电泳图见图 1。

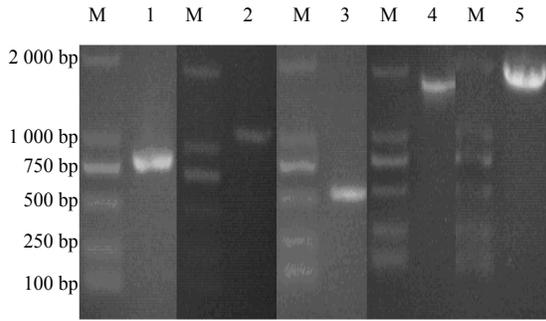
3.2 菘蓝 C4H 蛋白结构的预测和特征分析

使用 Vector NTI Advance 11 软件进行预测和分

表 2 C4H 蛋白相关信息

Table 2 Information of C4H proteins

片段名称	GenBank 号	样本
RgC4H	AAN63028.1	芸香 <i>Ruta graveolens</i>
LlC4H	ACZ54906.1	银合欢 <i>Leucaena leucocephala</i>
AmC4H	AAO62904.1	大阿米芹 <i>Ammi majus</i>
AtC4H	AAC99993.1	拟南芥 <i>Ammi thaliana</i>
SmC4H	ABN48717.1	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>
BrC4H	ABE68874.1	大白菜 <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>
PhC4H	ACA25599.1	花叶地锦 <i>Parthenocissus henryana</i>
CsC4H	CAK95273.1	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>
GaC4H	AAG10196.1	树棉 <i>Gossypium arboreum</i>
CaC4H	AAT39513.1	喜树 <i>Camptotheca acuminata</i>
CaC4H	ACR10242.1	橄榄 <i>Canarium album</i>
PtC4H	ACE95171.1	毛白杨 <i>Populus tomentosa</i>
RcC4H	EEF38439.1	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>
OsC4H	BAF45113.1	水稻 <i>Oryza sativa</i> Group
SbC4H	AAK54447.1	高粱 <i>Sorghum bicolor</i>
liC4H	GU014562	菘蓝 <i>I. indigotica</i>



1-C4H 基因保守区的 PCR 扩增 2-C4H 基因的 3'-RACE 3-C4H 基因的 5'-RACE 4-C4H 基因 cDNA 全长的 PCR 扩增 5-C4H 对应的基因组全长的 PCR 扩增 M-Marker
1-PCR amplification of C4H gene conserved sequence 2-3'RACE of C4H gene 3-5'RACE of C4H gene 4-PCR amplification of full sequence of C4H gene cDNA 5-PCR amplification of full sequence of C4H genomic DNA M-Marker

图 1 菘蓝 C4H 基因的克隆

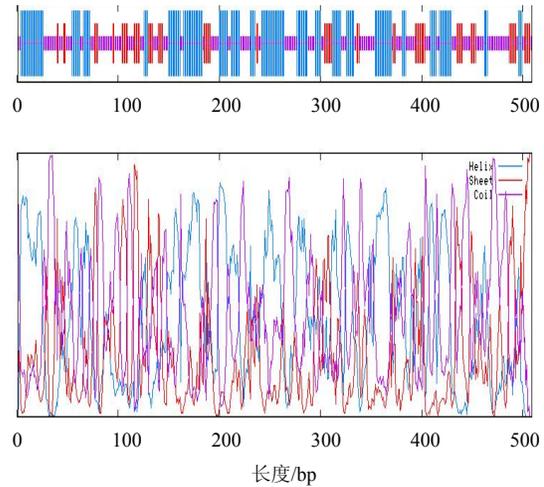
Fig. 1 Clone of C4H gene from *I. indigotica*

析, C4H 预测计算的等电点 (pI) 为 9.07, 相对分子质量约为 58 220。

使用 protein-protein BLAST 分析表明, C4H 与其他植物 C4H 蛋白具有极高的相似性。如与芜菁中 C4H (蛋白登录号: BAI77480.1) 具有 98% 的相似性; 与拟南芥中 C4H (蛋白登陆号: CAP08828.1) 具有 98% 的相似性。通过 Clustal X 软件, 全长序列比对的结果显示, 都具有 P450 蛋白特有的保守位点^[12], 如位于第 439~449 位氨基酸残基 (PFGVGRRCSPG) 组成血红素结合位点 (heme binding region), 位于第 363~366 位氨基酸残基 (ETLR) 组成 K 螺旋 (K helix), 位于第 306~311 位氨基酸残基 (AAIETT) 组成 I 螺旋 (I helix), 位于 N 端从 34 到 43 位置的 10 个氨基酸残基 (PPGPMPPIPIF) 组成脯氨酸铰链 (proline hinge)。

利用程序 GOR IV 预测了 C4H 蛋白的二级结构 (图 2), 结果显示具有 39.29% α 螺旋、17.68% 延伸主链和 43.03% 无规卷曲, α 螺旋主要位于 N 端和蛋白中间位置, 延伸主链主要位于 N 端和 C 端, 无规卷曲分布于蛋白整个区域。

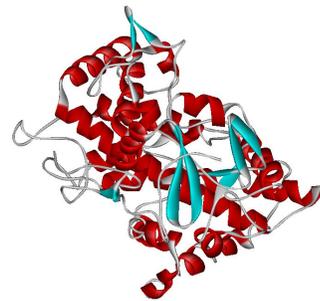
通过 SWISS-MODEL, 以 CYP P450 超家族蛋白 (PDB id: 2nnjA) 为参比模板, 构建了 C4H 蛋白的三维结构模型 (图 3), 更好地阐述 C4H 蛋白的特征, 蛋白三维结构分析软件采用三维分子 Weblab viewerlite 呈现。



最长线、次长线、最短线依次表示 α 螺旋、延伸主链和无规卷曲
Alpha helix, extended strand and random coil were represented by the longest, the second longest, and the shortest vertical bars, respectively

图 2 C4H 蛋白的二级结构

Fig. 2 Secondary structure of deduced C4H protein



红色代表 α -螺旋, 蓝色代表 β -折叠, 灰色代表转角和单环
The α -helix and β -sheet were indicated in red and blue, respectively
Turns and loops were indicated in silver

图 3 C4H 蛋白三维结构模型

Fig. 3 Three-dimensional structure of deduced of C4H protein

3.3 菘蓝 C4H 蛋白的系统进化树分析

为了考察 C4H 蛋白与其他物种 C4H 蛋白之间的进化关系, 根据研究推导的 C4H 蛋白和表 2 中所示的其他物种 C4H 蛋白构建了一个系统进化树 (图 4)。构建系统进化树包括 16 个物种 C4H 蛋白, 包括单子叶植物和双子叶植物。C4H 与同科十字花科的中国大白菜 *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* var. *laxa* (M. Tsen et S. H. Lee) Hanelt 具有最大的相似性, 同属一簇。与此同时, 特定来源的 C4H 蛋白形成特定的簇, 例如所有的单子叶植物类 C4H 聚成一簇, 双子叶植物聚成一簇。

3.4 菘蓝 C4H 基因的表达分析

为了研究 C4H 基因在菘蓝不同组织部位的表

达情况,取 6 份菘蓝幼苗,分别从菘蓝根、茎、叶中提取总 RNA。用引物 C4HF579 和 C4HR862 进行了实时定量 PCR,并使用菘蓝 18 S rRNA 基因作为内对照。采用随机区组方差分析方法处理实验数据,及采用 SNK 检验两两比较根、茎、叶中表达差异,结果显示 C4H 在所有的组织里都有表达,3 个器官基因表达量有差别 ($P < 0.05$),最高的是根,其次是茎,叶中表达量最少(图 5)。

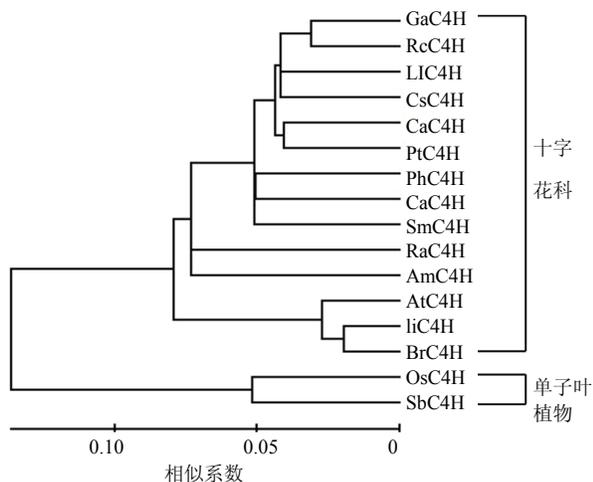


图 4 构建的 C4H 和其他 C4H 蛋白的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic relationships of C4H proteins from different species

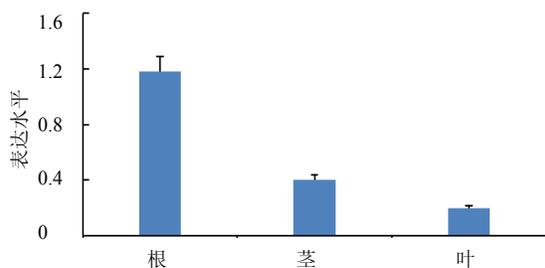


图 5 C4H 在不同器官中的表达

Fig. 5 Expression of C4H in different tissues of *I. indigotica*

植物的次生代谢产物很多都是植物为了对抗昆虫、食草动物和病原菌的侵袭或是对抗其他生物或非生物的外界刺激而产生的,苯丙素类化合物的代谢可以在环境因素的刺激下上调^[13]。本实验考察在各种处理因素的影响下 C4H 的表达情况。如图 6 所示,UV-B、MeJA、ABA 和 GA₃ 在一定程度上能诱导 C4H 的表达上调。其中 UV-B 照射 30 min,能在 24 h 内持续上调 C4H 的表达,24 h 后 C4H 表达达到高峰;MeJA 处理后 C4H 轻微上调,16 h 表达达到高峰;与 UV-B 处理相似,ABA 处理后能够在

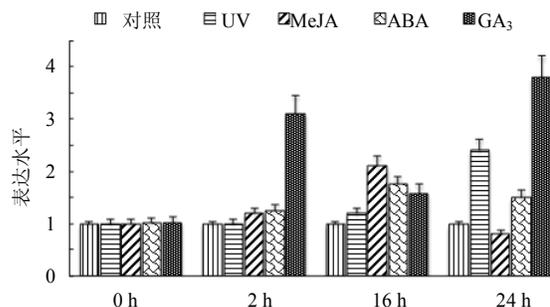


图 6 C4H 在各种刺激下的表达

Fig. 6 Expression of C4H under various treatments

24 h 内持续上调 C4H 的表达;GA₃ 处理后,能够迅速上调 C4H 的表达。

3.5 菘蓝 C4H 的 Southern blotting 分析

为了分析 C4H 基因的拷贝情况,菘蓝基因组 DNA 样品分别用 *EcoRI*、*XbaI* 和 *BstEII* 酶切过夜,*EcoRI*、*XbaI* 和 *BstEII* 在 C4H 全长区域均没有识别位点。然后在高度严谨的条件下进行基因组杂交实验。用于标记生物素探针的模板是来自 C4H 基因 cDNA 一段 575 bp 序列。实验结果(图 7)显示,在 *EcoRI* 泳道有 2 条清晰的条带和 1 条微淡的条带,在 *XbaI* 泳道有 6 条清晰的条带,在 *BstEII* 泳道有 7 条清晰的条带,表明 C4H 在基因组中属于多拷贝基因。

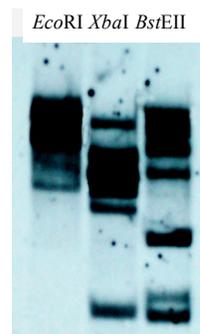


图 7 菘蓝 C4H 基因的 Southern blotting 杂交分析

Fig. 7 Southern blotting analysis of C4H in *I. indigotica* genome

4 讨论

C4H 是木脂素生物合成途径上关键酶基因^[14],对木脂素类成分次生代谢物的量积累有重要作用。器官特异性表达分析显示 C4H 在根中表达量最高,佐证了以菘蓝的根作为中药板蓝根入药。

植物的次生代谢产物很多都是植物为了对抗昆虫、食草动物和病原菌的侵袭或是对抗其他生物或非生物的外界刺激而产生的^[15]。利用植物的这种特性对植物施加适当的刺激来产生大量的目标

次生代谢产物, 很多实验证明通过各种各样的信号诱导和刺激可以有效地促进植物次生代谢产物的产生^[16-17]。本研究证实, 胁迫因素 UV-B、MeJA、ABA、GA₃ 在一定程度上能够诱导 C4H 表达的上调。由于 C4H 处于苯丙素代谢的上游位置^[16], 诱导其表达上调, 对于下游的木脂素类成分的生物合成具有促进作用, 提示可以利用基因调控技术来提高菘蓝中具有抗病毒活性木脂素类化合物的量。

总之, 对菘蓝中木脂素生物合成途径开展研究, 克隆该途径上关键酶基因^[18-19], 尝试采用植物次生代谢工程的方法提高其具有抗病毒活性的木脂素类化合物的量, 对提高菘蓝药材品质, 具有重要的研究意义和现实价值。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 杨 飞, 徐延浩. 四倍体菘蓝基因组 DNA 甲基化的甲基化敏感扩增多态性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 344-348.
- [3] 李 彬. 板蓝根活性成分及品质评价 [D]. 上海: 第二军医大学, 2003.
- [4] Lu B, Pan X, Zhang L, *et al.* A genome-wide comparison of genes responsive to autopolyploidy in *Isatis indigotica* using Arabidopsis thaliana affymetrix genechips [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2006, 24(2): 197-204.
- [5] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22(22): 4673-4680.
- [6] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425.
- [7] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1244-1245.
- [8] Combet C, Blanchet C, Geourjon C, *et al.* NPS@: network protein sequence analysis [J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(3): 147-150.
- [9] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [10] Guex N, Peitsch M. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714-2723.
- [11] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195-201.
- [12] Gravot A, Larbat R, Hehn A, *et al.* Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant-Ruta graveolens-exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 422(1): 71-80.
- [13] Dixon R A, Paiva N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1085-1097.
- [14] 胡永胜, 肖 莹, 邸 鹏, 等. 木质素次生代谢工程的研究概况和进展 [J]. 药实践杂志, 2011, 29(4): 256-259.
- [15] Baucher M, Monties B, Montagu M, *et al.* Biosynthesis and genetic engineering of lignin [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1998, 17(2): 125-197.
- [16] Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, *et al.* Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(9): 1129-1132.
- [17] Zhang C, Yan Q, Cheuk W K, *et al.* Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ elicitation and nutrient feeding [J]. *Planta Med*, 2004, 70(2): 147-151.
- [18] Hu Y, Di P, Chen J, *et al.* Isolation and characterization of a gene encoding cinnamoyl-CoA reductase from *Isatis indigotica* Fort. [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(3): 2075-2083.
- [19] Di P, Hu Y, Xuan H, *et al.* Characterization and the expression profile of 4-coumarate: CoA ligase (Ii4CL) from hairy roots of *Isatis indigotica* [J]. *Afr J Pharm Pharm*, 2012, 28(6): 2166-2175.