

## 当归咖啡酸-*O*-甲基转移酶基因克隆和序列分析

雒 军, 王引权\*, 温随超, 夏 琦, 荔淑楠, 王振恒

甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

**摘要:** 目的 克隆当归 *Angelica sinensis* 咖啡酸-*O*-甲基转移酶 (caffeic acid *O*-methyltransferases, COMT) 编码基因全长 cDNA, 并对序列进行生物信息学分析。方法 提取当归叶片总 RNA 为 cDNA 合成模板, 利用同源克隆结合 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆当归 COMT 全长 cDNA, 并利用 NCBI、ExPASy 网站上的 Blast N、Blast P、ORF Finder、Compute *PI/Mw*、ProtScale、PROSITE、SWISS-MODEL 等序列在线分析工具和 MEGA、DNAMAN 生物信息学软件对序列进行分析。结果 获得 COMT 全长 cDNA 序列, 并在 GenBank 注册 (登录号 KP188587)。序列分析表明, 克隆的 cDNA 全长为 1 436 bp, 其中包括 5'-UTR (76 bp) 和 3'-UTR (362 bp), 含有 1 个 1 098 bp 的完整开放阅读框 (opening reading frame, ORF), 编码 365 个氨基酸的多肽链; 预测蛋白质相对分子质量为 40 230, 理论等电点 (pI) 为 5.43; 无信号肽, 具有典型的 II 型氧甲基转移酶结构域 SAM\_OMT\_II。结论 首次克隆当归 COMT 基因全长 cDNA, 为当归 COMT 基因功能研究和当归阿魏酸生物合成与调控的机制研究奠定基础。

**关键词:** 当归; 咖啡酸-*O*-甲基转移酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 信号肽

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)07-1180-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.020

## Gene cloning and sequence analysis of caffeic acid *O*-methyltransferase in *Angelica sinensis*

LUO Jun, WANG Yin-quan, WEN Sui-chao, XIA Qi, LI Shu-nan, WANG Zhen-heng

Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

**Abstract: Objective** To clone the full-length cDNA of caffeic acid *O*-methyltransferase (COMT) encoding gene from *Angelica sinensis* and to perform bioinformatic analysis for the cDNA sequence. **Methods** Extracting the total RNA from the leaves of *A. sinensis* as cDNA synthesis template, the full length COMT cDNA of *A. sinensis* was cloned through homology-based cloning and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. The bioinformatics of the cDNA sequence was analyzed by Blast N, Blast P, ORF Finder, Compute *PI/Mw*, ProtScale, PROSITE, and SWISS-MODEL sequences online analysis tools on NCBI, ExPASy, DNAMAN, and MEGA softwares. **Results** The full-length of COMT cDNA (1 436 bp) was obtained (GenBank accession number: KP188587). It included 5'-UTR (76 bp) and 3'-UTR (362 bp), with an open reading frame (ORF) of 1 098 bp, encoding 365 amino acid polypeptides. The relative molecular mass of COMT calculated was 40 230, theoretical isoelectric point (PI) was 5.43, and there was no signal peptide in COMT. The protein sequence contained typical class II *O*-methyltransferases domain: SAM\_OMT\_II. **Conclusion** A novel cDNA encoding COMT from *A. sinensis* is cloned. This work might establish an experimental basis for exploring COMT gene function and the biosynthetic and regulation of ferulic acid (FA) in *A. sinensis*.

**Key words:** *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; caffeic acid *O*-methyltransferase; gene cloning; bioinformatics analysis; peptide

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 是我国传统常用中药, 味甘、辛, 性温, 归肝、心、脾经; 具有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效<sup>[1]</sup>。近年来由于当归引种区域扩大, 栽培面积和产量持续增

加以及全球气候变化等自然和人为因素的影响, 当归药材品质面临着巨大挑战, 开展品质形成相关功能基因及机制研究成为当归栽培学和育种学的新热点<sup>[2]</sup>。阿魏酸 (ferulic acid, FA) 是当归的有效成

收稿日期: 2015-09-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260616, 81060327)

作者简介: 雒 军 (1981—), 男, 硕士, 研究方向为中医药分子生物学研究。

\*通信作者 王引权, 博士生导师, 教授, 研究方向为药用植物生理生态研究。Tel/Fax: (0931)8768293 E-mail: kjkfpp@163.com

分之一,常作为药材质量的控制指标<sup>[1]</sup>。FA 是一种植物来源的酚酸,在细胞壁中与多糖和蛋白质结合成为细胞壁的骨架<sup>[3]</sup>。FA 具有广泛的药理学作用,如抗肿瘤、抗氧化、解毒、保肝等,是一种多靶点的抗肿瘤天然药物,且性质稳定、毒性低<sup>[3-6]</sup>。在高等植物体内,FA 是木质素生物合成过程的重要中间代谢产物之一,其生物合成涉及到许多酶的参与。咖啡酸-O-甲基转移酶(caffeic acid O-methyltransferases, COMT)是木质素合成途径中的 1 个关键甲基化酶,其催化咖啡酸、5-羟基松柏醇和 5-羟基松柏醛甲基化分别生成阿魏酸、芥子醇和芥子醛,参与 S-木质素的合成<sup>[7]</sup>。目前,COMT 基因已在银合欢 *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit<sup>[8]</sup>、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge<sup>[9]</sup>、唐松草 *Thalictrum tuberosum* L.<sup>[10]</sup>、忽地笑 *Lycoris aurea* Herb.<sup>[11]</sup> 等药用植物中被克隆,并且对调控木质素及其他苯丙酸途径衍生物合成的分子机制进行了研究,但关于当归中 COMT 基因克隆和序列分析的研究未见报道。本研究成功克隆了当归 COMT 基因的 cDNA 全长序列,并对其编码蛋白质进行了生物信息学分析,可为当归 COMT 基因功能研究和当归阿魏酸生物合成与调控的机制研究提供基础。

## 1 材料

实验用当归植株采自于甘肃岷县茶埠镇实验基地(海拔 2 780 m,东经 104°06',北纬 34°29'),经甘肃中医药大学王引权教授鉴定为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels。田间采集当归全株,置于装有干冰的保温箱,于当天带至实验室后迅速用去离子水冲洗干净,将叶片分离后用液氮迅速冷冻,转移至-80 °C 超低温冰箱,用于总 RNA 提取材料。实验用大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  由本实验室保藏。

PCR 扩增仪(Bio-Rad icycler IQ, 美国),微量分光光度计(Thermo BioMate 3, 美国),高速冷冻离心机(Eppendorf 5427 R, 德国),生物安全柜(HFsafe-1200 B2, 上海),电泳系统(DYY-5, 北京)。所用分子生物学试剂主要包括:SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech, 北京)、Advantage<sup>®</sup> 2 PCR 试剂盒(Clontech, 北京)、cDNA 合成试剂盒(TaKaRa, 大连)、RNA 提取用试剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、聚乙烯吡咯烷酮 360 和 LiCl 均购自于美国 Sigma 公司, Taq DNA

Polymerase (TaKaRa, 大连)、PCR 产物克隆试剂盒(Promega, 美国)、PCR 产物回收试剂盒(TransGen, 北京), DNA Marker (TransGen, 北京), 其他生化试剂均为进口或国产分析纯产品。

## 2 方法

### 2.1 RNA 提取与 cDNA 合成

当归叶组织总 RNA 的提取参照文献中报道的 CTAB 法<sup>[12]</sup>进行,并略作修改<sup>[13]</sup>。总 RNA 的完整性采用非变性琼脂糖凝胶电泳检测,总 RNA 的纯度使用分光光度计测定, $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8~2.0,说明 RNA 无污染。以约 100 ng 总 RNA 作为模板,利用 RNA 反转录试剂盒合成总 cDNA。

### 2.2 COMT 保守序列克隆

通过对 GenBank 中注册的中国辣椒 *Capsicum chinense* L. (AF081214)、柳枝稷 *Panicum virgatum* L. (HQ645965)、美国枫香 *Liquidambar styraciflua* L. (AF139533)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (NM\_124796)、挪威云杉 *Picea abies* (L.) H. Karst. (AJ868575)、山字草 *Clarkia breweri* Greene (AF006009) 等植物 COMT 基因的 CDS 序列进行同源比对,以高度保守区段序列为模板,利用 Primer 6.0 生物软件设计一对扩增引物 P1 和 P2,见表 1。以当归叶片总 cDNA 为模板,扩增当归 COMT 保守区片段,推测目的片段长度为 415 bp。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,包含下列组分:10 $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu$ L、dNTP (2 mmol/L) 1.2  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 5  $\mu$ L、上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L、cDNA 0.5  $\mu$ L、DNA 聚合酶 (5 U/mL) 0.5  $\mu$ L 和无菌去离子水 35.8  $\mu$ L。反应程序:95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 60 s, 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min, PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。目的片段回收和纯化按照 DNA 凝胶纯化试剂盒说明书进行。纯化回收的 DNA 连接至 pGEM-T Easy 克隆载体, CaCl<sub>2</sub> 法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 随机挑取克隆用菌落 PCR 验证,阳性克隆接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基培养 (37 °C, 150 r/min) 过夜,委托生工生物工程(上海)有限公司测序。

### 2.3 5'RACE 和 3'RACE 扩增

以测序的核心片段设计一条用于 5'RACE 的基因特异性引物 P3,一条用于 3'RACE 的基因特异性引物 P4 (表 1), P3 与 P4 分别与 SMARTer<sup>®</sup> RACE 试剂盒自带通用引物 UPM 组对分别用于 5'端片段

表 1 引物名称和序列  
Table 1 Names and sequences of primers

引物名称	序列
P1	5'-GTM(CTG)M(CT)TM(CG)ATGGAM(GAC)AGCTGGTA-3'
P2	5'-CTCCAM(GA)TCM(AG)TGM(AGC)M(CA)M(AG)M(ATG)ATCCAC-3'
P3	5'-CGTGCTCCACACCAGGATAAGACGG-3'
P4	5'-CCGTCTTATCCTGGTGTGGAGCACG-3'
P5	5'-ACATGGGGATTGCATCACCC-3'
P6	5'-CAACGATGAATAGTTACAACCTCG-3'
UMP	Long (0.4 μmol/L): 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' Short (2 μmol/L): 5'-CAACGATGAATAGTTACAACCTCG-3'

和 3'端片段的扩增。5'RACE 以 5'RACE-ready first-strand cDNA 为模板,按 Advantage2 PCR kit 操作说明建立反应体系,反应条件:94 °C、30 s,72 °C、3 min,5 个循环;94 °C、30 s,70 °C、30 s,72 °C、3 min,5 个循环;94 °C、30 s,68 °C、30 s,72 °C、3 min,27 个循环。3'RACE 以 3'RACE-ready first-strand cDNA 为模板,依据 Advantage2 PCR kit 操作说明建立反应体系,反应条件:94 °C、30 s,72 °C、3min,5 个循环;94 °C、30 s,70 °C、30 s,72 °C、3 min,5 个循环;94 °C、30 s,68 °C、30 s,72 °C、3 min,27 个循环。PCR 产物的克隆和测序方法同“2.2”项。

#### 2.4 COMT 基因全长 cDNA 的克隆

用 DNAMAN 对 5'RACE、3'RACE 所得序列和核心序列进行拼接得到 cDNA 全长电子拼接序列,以其为模板设计 COMT 基因全长 cDNA 扩增引物 P5 和 P6(表 1)。以 5'RACE-ready first-strand cDNA 为模板,依据 Advantage2 PCR kit 操作说明建立扩增体系,反应条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2.5 min,30 个循环;72 °C、10 min 终止反应。PCR 产物克隆及测序等过程同“2.2”项,将测序的全长序列在 NCBI 网站的 GenBank 数据库注册。

#### 2.5 cDNA 序列的生物信息学分析

将测序的 cDNA 序列用 DNAMAN 软件翻译成氨基酸序列,用 DNAMAN 和 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上的 Blast N 和 Blast P 进行核苷酸序列和氨基酸序列比对,使用 ORF Finder 查找开放阅读框(ORF)。生物信息学分析采用一些网上软件包进行分析,采用 ExPASy 在线服务器的 Compute *PI/Mw* 和

ProtScale 对蛋白质的理论等电点(*pI*)、相对分子量及亲水性/疏水性进行分析,用 SignalP 4.1 Serve 进行信号肽分析,TargetP1.1 Serve 分析亚细胞定位,TMHMM server v2.0 进行跨膜结构分析;用在线工具 SOPMA (<https://www.prabi.ibcp.fr/htm/index.php>) 和 ExPASy 在线服务器的 PROSITE 进行二级结构预测,SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行结构域的三维同源建模;用 Clustal W 软件和 MEGA 5.1 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树。

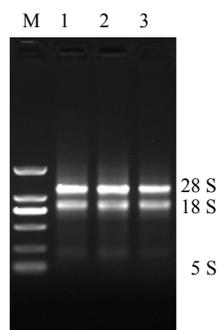
### 3 结果与分析

#### 3.1 总 RNA 的提取及检测

非变性琼脂糖凝胶电泳结果显示,28 S rRNA 和 18 S rRNA 凝胶条带清晰,无杂质条带(图 1),表明总 RNA 的完整性较好, $A_{260}/A_{280}$  平均值为 1.96,表明总 RNA 的纯度较高,适用于 cDNA 制备和 PCR 扩增。

#### 3.2 COMT 保守区片段扩增结果

用引物 P1 和 P2 进行 COMT 保守区序列的 PCR 扩增,非变性琼脂糖凝胶结果显示在 400 bp 处有 1 条亮带(图 2-A),与目的片段大小基本一致,推测



M-Marker 1~3-叶片总 RNA  
M-Marker 1~3-total RNA from leaves

图 1 叶片总 RNA 非变性琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Nondenaturing agarose gel electrophoresis of total RNA from leaves

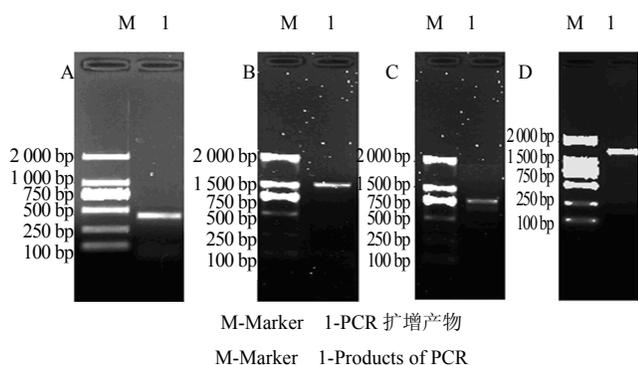


图2 核心区 (A)、5'RACE (B)、3'RACE (C) 和全长 cDNA (D) 扩增产物电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of amplification products for conserved region (A), 5'RACE (B), 3'RACE (C), and full-length cDNA (D)

为当归 COMT 片段，测序长度为 375 bp。

### 3.3 5'RACE、3'RACE 和全长 cDNA 扩增结果

5'RACE 扩增产物长度约为 1 500 bp (图 2-B)，3'RACE 扩增产物长度约为 750 bp (图 2-C)，经纯化回收后转化连接至 pGEM-T Easy 载体，CaCl<sub>2</sub> 法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ，随机选取克隆进行菌落 PCR，阳性克隆委托生工生物工程(上海)有限公司测序。用 DNAMAN 对 5'RACE、3'RACE 所得序列和核心序列进行拼接得到 cDNA 全长电子拼接序列，以其为模板设计引物扩增 COMT 基因全长 cDNA 序列，结果显示扩增产物的长度约为 1 600 bp，进一步对其进行了克隆测序。

### 3.4 COMT 全长 cDNA 的生物信息学分析

结果显示克隆的 cDNA 全长为 1 436 bp，将其在 GenBank 注册(登录号 KP188587)，命名为 AsCOMT。序列分析表明，cDNA 序列包括 5'-UTR (76 bp) 和 3'-UTR (362 bp)，含有 1 个 1 098 bp 的 ORF，编码 365 个氨基酸的多肽链(图 3)。氨基酸同源性比对显示 AsCOMT 与峨参 *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.、大阿米芹 *Ammi majus* L.、长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don、野茶树 *Camellia sinensis* (L.) Kuntze、罗勒 *Ocimum basilicum* L. 等植物 COMT 的序列相似性较高，分别为 94.5%、91.5%、80.8%、80.6% 和 80.7% (图 4)。ExPASy 在线服务器的 Compute *PI/Mw* 预测蛋白质相对分子质量为 40 230，pI 为 5.43；ProtScale 蛋白亲/疏水性预测结果显示，多肽链第 319 位的天冬氨酸 (Asp) 分值最高，为 2.322，第 332 位的精氨酸 (Arg) 分值最低，为 -2.700，亲水性氨基酸均匀分

布于整个多肽链且略多于疏水性氨基酸，整体看来多肽链表现为亲水性，无明显的疏水区域，可认为 AsCOMT 为亲水性蛋白(图 5)；TMHMM server v2.0 预测 AsCOMT 跨膜区，结果显示无跨膜区。SignalP 4.1 Serve 分析结果显示 C 值为 0.118，S 值为 0.124，Y 值为 0.291，得分均较低，表明 AsCOMT 无信号肽(图 6)；TargetP1.1 Serve 亚细胞定位分析结果显示，AsCOMT 无叶绿体转运肽和线粒体转运肽。

利用 SOPMA 程序对 AsCOMT 的二级结构预测，结果显示该蛋白的二级结构由 37.26% 的  $\alpha$ -螺旋、20% 的延伸链、10.96% 的  $\beta$ -转角和 31.78% 的不规则卷曲组成，其中  $\alpha$ -螺旋和不规则卷曲为主要成分。用 PROSITE 工具分析 AsCOMT 的二级结构域，分析结果显示该蛋白具有典型的 II 型氧甲基转移酶结构域 SAM\_OMT\_II (26~355 aa)，S-腺苷-L-甲硫氨酸结合位点为 233 位的天冬氨酸，酶活性位点(质子受体)为 271 位的组氨酸。将 ASCOMT 氨基酸序列在 NCBI 的蛋白质数据库 (pdb) 中进行同源比对，其与紫花苜蓿 *Medicago satival* COMT (登录号 KYW\_A) 的同源性最高，同源性为 73.55%，在 SWISS-MODEL 选用同源比对模式 (Aligment Mode) 以 MsCOMT 为模板对 AsCOMT 进行结构域的三维同源建模(图 7)，结果显示预测的 AsCOMT 三级结构与 PDB 在线软件对 MsCOMT X 射线晶体衍射结构鉴定结果一致<sup>[14]</sup>。

利用 MEGA 5.0 软件进行系统进化分析，采用 Neighbor-joining 方法，对 AsCOMT 与 GenBank 中与其同源性较高的 18 种植物 COMT 蛋白的氨基酸序列构建系统进化树，进行聚类分析(图 8)，结果显示 AsCOMT 与峨参、大阿米芹、芝麻、罗勒和丹参等物种 COMT 的亲缘关系最近，聚为一类，与同科植物峨参的 COMT 亲缘关系最近；与蓖麻 *Ricinus communis* L.、梅花 *Prunus mume* Sieb.、绒毛烟草 *Nicotiana tomentosiformis* L. 和灯笼椒 *Napsicum annum* L. 等物种 COMT 的亲缘关系较远。

## 4 讨论

COMT 属于氧甲基转移酶 (*O*-methyltransferase, OMTs) 中重要的一类，与植物很多次生代谢产物的合成相关<sup>[8]</sup>。COMT 在许多植物中以基因家族形式存在，各成员基因的结构具有一定的保守性<sup>[15]</sup>。通过同源克隆结合 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆了与当归阿魏酸生物合成相关的 COMT

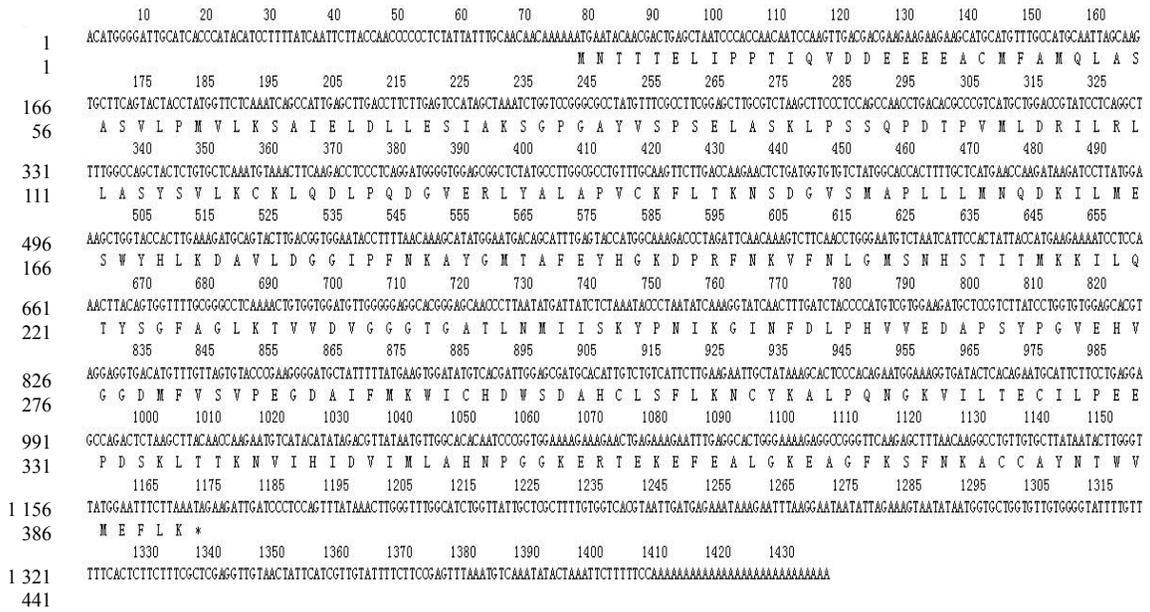


图 3 AsCOMT 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleic acid sequence and deduced amino acid sequence of AsCOMT

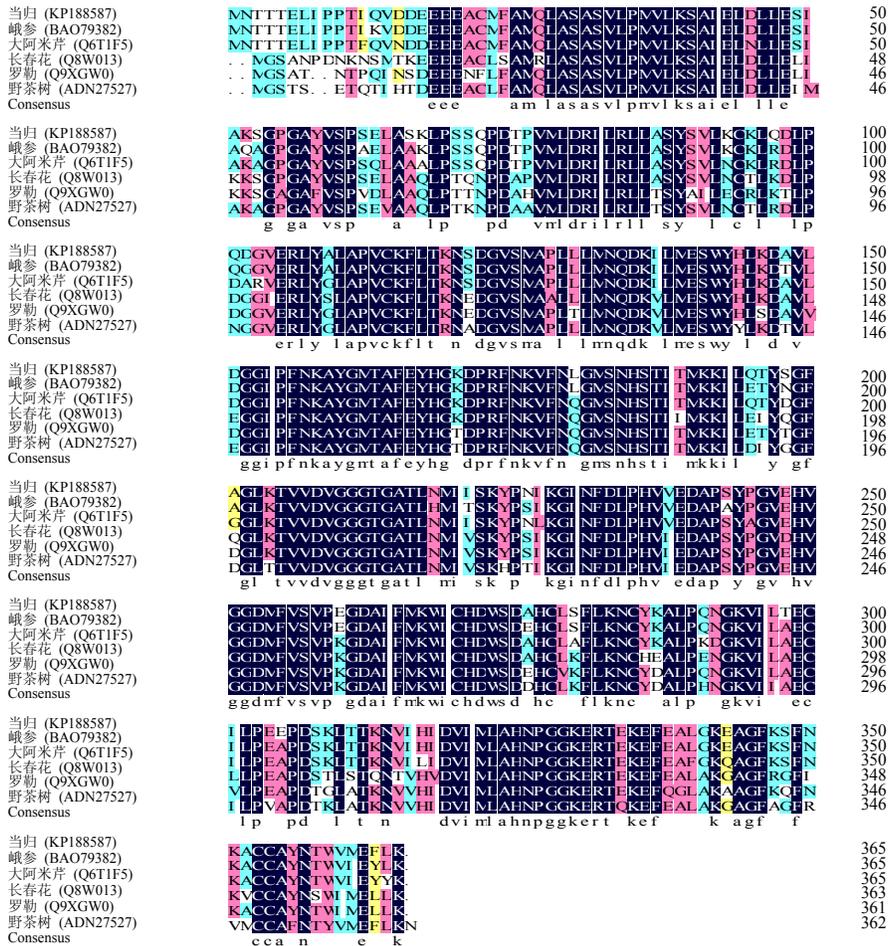


图 4 AsCOMT 与部分植物 COMT 氨基酸序列相似性多重比较

Fig. 4 Multiple comparison on amino acid sequence between AsCOMT and COMTs of other plant species

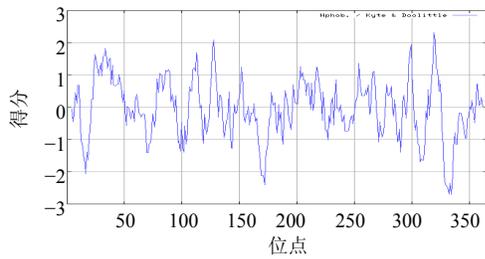


图 5 AsCOMT 疏水/亲水预测

Fig. 5 Predicted hydrophobicity/hydrophilic for AsCOMT

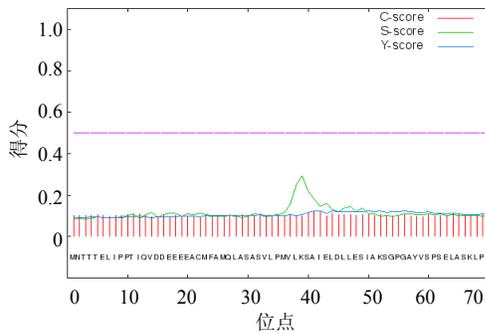


图 6 AsCOMT 信号肽剪切位点预测

Fig. 6 Predicted signal peptide cleavage sites for AsCOMT

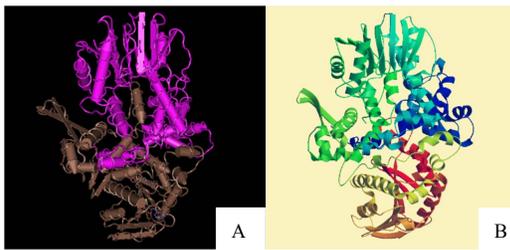


图 7 MsCOMT (A) 与 AsCOMT (B) 三维结构对比

Fig. 7 Blast of 3D structure between MsCOMT (A) and AsCOMT (B)

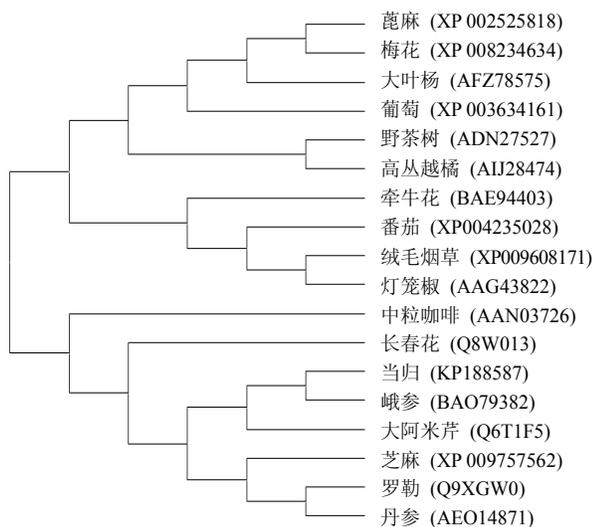


图 8 AsCOMT 系统发育树分析

Fig. 8 Phylogenetic tree analysis of AsCOMT

cDNA 序列, 并命名为 AsCOMT。生物信息学分析表明, 其编码蛋白质相对分子质量约为 40 230, 属 II 类 OMTs, 为  $Mg^{2+}$  依赖型, 以咖啡酸作为催化底物参与阿魏酸生物合成<sup>[16]</sup>。预测 AsCOMT 氨基酸序列信号肽及亚细胞定位, 其不存在信号肽酶切位点, 不具有信号肽, 且未显示出明确的叶绿体、线粒体定位信号, 提示 AsCOMT 在细胞质中合成后直接与基质中的底物结合, 而不进行蛋白转运。

今后研究工作需进一步通过蛋白瞬时表达和蛋白异源表达系统明确亚细胞定位及其催化功能, 利用反义核酸技术揭示对阿魏酸生物合成途径的调控机制。本研究结果为深入研究 AsCOMT 蛋白功能, 探明当归阿魏酸生物合成途径的基因调控、通过生物技术提高当归药材质量奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 刘敬, 李文建, 王春明, 等. 当归中有效成分阿魏酸的生物合成及调控 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1909-1912.
- [3] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展 [J]. 中成药, 2006, 28(2): 253-255.
- [4] Hou Y Z, Zhao G R, Yuan Y J, et al. Inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation by extract of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 100: 140-144.
- [5] Chao W W, Lin B F. Bioactivities of major constituents isolated from *Angelica sinensis* (Danggui) [J]. *Chin Med*, 2011, 6(29): 73-79.
- [6] 汤浩, 高庆剑, 陆铖, 等. 阿魏酸和异阿魏酸对 HepG2 细胞增殖及其细胞色素 P450 酶的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1726-1730.
- [7] Anderson N A, Chapple C. Perturbing lignin biosynthesis: metabolic changes in response to manipulation of the phenylpropanoid pathway [J]. *Rec Adv Pol Res*, 2014, 16(4): 39-59.
- [8] Dwivedi U N, Gupta P, Pandey V P, et al. Caffeic acid *O*-methyltransferase from *Leucaena leucocephala*: cloning, expression, characterization and molecular docking analyses [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2014, 106: 63-70.
- [9] 宋银, 王东浩, 吴锦斌, 等. 丹参咖啡酸-*O*-甲基转移酶基因 (SmCOMT1) 的克隆及其分析 [J]. 植物研究, 2012, 32(4): 437-443.
- [10] Yang H J, Ahn J H, Jeong K J, et al. The

- homodimerization of *Thalictrum tuberosum* O-methyl transferases by homology-based Modelling [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2003, 24(9): 1256-1260.
- [11] 桂柳姿, 崔培梧, 潘清平, 等. 忽地笑加兰他敏生物合成代谢途径中 COMT 酶基因克隆及序列分析 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(3): 35-40.
- [12] Pandit S S, Mitra S S, Giri A P, *et al.* A quick method for isolating RNA from raw and ripe fleshy fruits as well as for co-isolating DNA and RNA from polysaccharide and polyphenol-rich leaf tissues [J]. *J Plant Biol*, 2007, 50(1): 60-64.
- [13] 雒 军, 王引权, 温随超, 等. 当归 DXR 基因保守区克隆和组织特异性表达分析 [J]. 中草药, 2014, 45(13): 1907-1913.
- [14] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information [J]. *Nucl Acids Res*, 2014, 42: 252-258.
- [15] 倪志勇, 吕 萌, 李 波, 等. 棉花咖啡酸-O-甲基转移酶基因的克隆及特征分析 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(6): 1117-1126.
- [16] Joshi C P. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases [J]. *PM Biol*, 1998, 37(4): 663-674.