

• 药材与资源 •

珊瑚菜 GIPS1、GIPS2 基因克隆及表达分析

宋洁洁¹, 罗红梅², 马小晶¹, 高 婷^{1,3*}

1. 青岛农业大学生命科学学院, 山东省高校植物重点实验室, 山东 青岛 266109

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

3. 上海市资源植物功能基因组学重点实验室 (上海辰山植物园), 上海 201602

摘要: 目的 克隆珊瑚菜 *Glehnia littoralis* 补骨脂素合成酶 (psoralen synthase, PS) 基因全长 cDNA 序列, 并进行生物信息学和表达量分析。方法 在前期珊瑚菜转录组测序的基础上, 筛选出表达量较高的 2 条 PS 基因 GIPS1 和 GIPS2 序列。利用 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 方法对 2 个基因 cDNA 序列 3' 端进行克隆, DNAMAN 拼接后得到基因全长 cDNA 序列, 并对其编码蛋白进行生物信息学分析。利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测 GIPS1 和 GIPS2 基因的组织特异性表达。结果 GIPS1 和 GIPS2 基因 cDNA 序列全长分别为 1 885 bp 和 1 971 bp, 编码 495 和 502 个氨基酸残基, 蛋白相对分子质量分别为 55 740.7 和 56 363.9, 等电点为 8.28 和 6.62, 均属于细胞色素 P450 超家族, 含有 1 个跨膜区, 为亲水性蛋白。系统进化分析表明, GIPS1 和 GIPS2 与伞形科欧防风 *Pastinaca sativa*、旱芹 *Apium graveolens*、大阿米芹 *Ammi majus* PS 蛋白亲缘关系较近。RT-qPCR 结果显示 GIPS1 基因在根中表达量较高, 在叶中表达量较低, 而 GIPS2 基因在花中表达量较高, 在根中表达量较低。结论 首次获得珊瑚菜 GIPS1 和 GIPS2 基因的全长 cDNA 序列并进行了表达分析, 为进一步开展珊瑚菜补骨脂素合成酶基因的功能和遗传调控机制研究奠定基础。

关键词: 珊瑚菜; 补骨脂素合成酶; RACE; 生物信息学分析; 组织特异性表达**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)05-1139-07**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.023Cloning and expression analysis of GIPS1, GIPS2 gene in *Glehnia littoralis*SONG Jie-jie¹, LUO Hong-mei², MA Xiao-jing¹, GAO Ting^{1,3}

1. Key Laboratory of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Shanghai Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Resources (Shanghai Chenshan Botanical Garden), Shanghai 201602, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA sequences of psoralen synthase (PS) genes from *Glehnia littoralis* so as to perform the bioinformatic and expression pattern analysis. **Methods** Based on our previous transcriptome sequencing data of *G. littoralis*, the gene sequences GIPS1 and GIPS2 with high expression level were screened. The 3' cDNA ends of GIPS1 and GIPS2 genes were cloned by the RACE (rapid amplification of cDNA ends) method and the full-length cDNA of genes were assembled by using DNAMAN software. And then encoded GIPS proteins were analyzed by the bioinformatics tools. The tissue specific expression of GIPS1 and GIPS2 genes were detected using qPCR. **Results** The full-length cDNA of GIPS1 gene was 1 885 bp, which encoding a protein of 495 amino acids with a predicted molecular weight of 55 740.7 and isoelectric point of 8.28; The full-length cDNA of GIPS2 gene was 1 971 bp, which encoding a protein of 502 amino acids with a predicted molecular weight of 56 363.9 and isoelectric point of 6.62. GIPS1 and GIPS2 proteins belong to the cytochrome P450 superfamily, which share one transmembrane zone acting as hydrophilic protein. Phylogenetic analysis showed GIPS1 and GIPS2 were genetically closely related to the PS of *Pastinaca sativa*,

收稿日期: 2017-08-09**基金项目:** 国家自然科学基金青年项目 (31500230); 上海市资源植物功能基因组学重点实验室开放课题 (PFGR20170); 山东省青岛市青年教师成长计划经费资助项目**作者简介:** 宋洁洁 (1993—), 女, 在读硕士, 主要从事植物资源学和分子生物学研究。E-mail: sjj_green@163.com***通信作者** 高 婷 (1982—), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物资源学和分子生物学研究。E-mail: gt_kelly@163.com

Apium graveolens, *Ammi majus*. Higher expression of GIPS1 gene was observed in roots than leaves. However, GIPS2 gene was expressed at a relatively higher level in flowers than in roots. **Conclusion** The full-length cDNA of GIPS1 and GIPS2 genes were obtained and the expression patterns were explored in *G. littoralis* for the first time, which provided a foundation for further studies on gene function and genetic regulatory mechanism of GIPS.

Key words: *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.; psoralen synthase; RACE; bioinformatics analysis; tissue specific expression

珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq. 为伞形科珊瑚菜属多年生药用草本植物, 渐危种, 国家二级重点保护植物, 原野生于沿海地区, 现多为家种栽培。北沙参 *Glehniae Radix* 为珊瑚菜的干燥根^[1], 是我国传统中药材, 也是临床常用的滋阴药, 其味甘、微苦, 性微寒, 具有养阴清肺、益胃生津的功效, 用于肺热燥咳、劳嗽痰血、胃阴不足等^[2]。呋喃香豆素是珊瑚菜主要的活性成分, 补骨脂素是一种重要的呋喃香豆素, 具有较强的光敏化和镇静、解痉、止血等作用^[3-4], 是治疗白癜风、斑秃、牛皮癣以及瘤样皮肤病的有效药物。高浓度补骨脂素对不同细胞株 (HL-60、Raji、K562) 有显著杀伤作用。近来研究表明, 补骨脂素对多种动物及人的肿瘤生长有明显抑制作用^[5-6]。补骨脂素是衡量珊瑚菜内在质量优劣的重要标准, 增加珊瑚菜中补骨脂素的含量, 可有效提升珊瑚菜的药用价值, 具有重要的理论和实践意义。

补骨脂素来源于植物苯丙氨酸代谢途径, 苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶作用下生成肉桂酸, 然后经过羟化酶、连接酶和内酯化作用生成伞形花内酯, 在印度枸橼素合成酶催化下生成异紫花前胡内酯, 最终异紫花前胡内酯在补骨脂素合成酶作用下生成补骨脂素^[7-10]。补骨脂素合成酶 (psoralen synthase, PS) 是其生物合成途径的关键酶, 但目前补骨脂素合成酶的相关研究很少, 只在大阿米芹 *Ammi majus* L.、欧防风 *Pastinaca sativa* L. 和旱芹 *Apium graveolens* L. 中获得了该基因的克隆及部分功能分析^[7, 11]。

本研究在前期已完成的珊瑚菜转录组高通量测序数据 (GenBank NO. PRJNA387325) 的基础上, 对筛选获得的表达量较高的 2 条 GIPS 基因 GIPS1 和 GIPS2 进行分析, 利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术获得 2 条基因的全长 cDNA 序列, 并初步进行生物信息学和表达模式分析, 为揭示二者在珊瑚菜补骨脂素合成途径中的功能奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

在山东省莱阳市高格庄镇采集新鲜的 4 年生珊

瑚菜, 由青岛农业大学辛华教授鉴定为珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.。清洗干净后将根、叶和花放入液氮速冻, -80°C 保存。

1.2 试剂

SMARTer[®] RACE5'/3'Kit 试剂盒、TaKaRa Ex Taq 酶、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 定量试剂盒、凝胶回收试剂盒、DL5000 DNA Marker、质粒载体 pMD18-T 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 大肠杆菌 *DH5 α* 感受态购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取

取 -80°C 保存的珊瑚菜的根、叶和花, 用 Trizol 法提取总 RNA。经核酸测定仪和琼脂糖凝胶电泳检测浓度和纯度后, -80°C 保存备用。

2.2 RACE 基因克隆

根据转录组的高通量测序获得 GIPS1 和 GIPS2 基因的部分序列 (已有 5' 末端), 通过 Primer Premier 5.0 软件设计 3' RACE 特异性引物 GIPS1-3'RACE 和 GIPS2-3'RACE (表 1), 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。参照 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit User Manual 方法进行反转录, 生成第 1 链 cDNA。反应体系参照 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit User Manual, 利用 Touchdown PCR 程序扩增 3' 末端序列: 第 1 步, 94°C , 30 s; 72°C , 1 min; 5 个循环; 第 2 步, 94°C , 30 s; 70°C , 30 s; 72°C , 1 min; 5 个循环; 第 3 步, 94°C , 30 s; 68°C , 30 s; 72°C , 1 min; 25 个循环。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的条带。回收产物与 pMD18-T 载体连接, 连接产物转化 *DH5 α* 感受态细胞, 在含有氨苄的 LB 固体培养基平板上进行培养, 经菌落 PCR 检验后, 选取 3 个阳性克隆送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

2.3 基因 ORF 的克隆

使用 DNAMAN 软件将转录组中已知序列片段和测序得到的序列片段进行拼接, 得到 GIPS1

A

B

1 GTGGCGGTTGGTGCATGCCGAGATCCGACAGCATGATATATATAAATCTGTGAAGCATGAGGCTTTTAA
6 CGCGTTGTGTGAAGTTTGTACCTGACCGCAGCTAGCTTTGCTCGTTTGTATGCGGCCGCGACGCA
11 AACCAATAGTTTGGCCAGCTCTACTTGCTATATATATATATAGTGTAGCTTTGTAGCTTTGTGAAGAAACAAAGC
226 AATGCA
231 ATGAAATGATCGAGGAACAAAATCCCCGTGACCTAATTTTTCCTTCATGCTTGTCTGACCAATTTTCTTCTACAA
232 M K M Q E Q N P L V L Y F F T S L S F V T I F L Y K
308 TGGTTATACATATAAAAAAACCATCAAAAAATCTGCCACCTTCTGCGGCCCAAAAATCCCATATACGGAACAAAT
26 W L T H K T P S K N L P S P F P Q I I G N
383 CATCAAAATGGTCTTCGACCGCAGGTTTCTTACGAGGACTTGGCTAAAAGATGGTTCCTAAATGCTACTTAAAG
51 H O I G P D P Q V S L R D L A K K Y G S L M L L K
485 TTGGAAGATGTACTCTTGCTGGTGTCTTCAAGCTATGCGGCTGGGAGGGTTGTGAAGAACCCATCATGTGGTT
76 F G S G V P V L L T A A D A A R E V A A G T T H D L V
73 TFCGACGACGCACTTATCAAGTGTGCCAATAAGATATCTTATACAAAGGAAGGAGATGGTGTCTTGCTGTAT
101 F A D R P Y S S V A N R I F T S I N G R D M V F A R Y
608 ACTGAAATTTGGAGACAAGTAAGACGACATGGTGTAACTACAGCTCTCAAGTAACAAGGAGTTTTCGTGTTCAC
126 T E Y W R V G K T C T C T A A T T A Q T Q L L S N K R V L S F H
483 AATGTACAGGAAGAAAGAGTGTCTTTTAATCAAAAATGGAATCTTCGTGTCAAAAGTAGTAAGATTTAAAGC
151 N V R E E E A V A L L I Q K I E N S R K S V N L S
758 GAACATCTAGTCACTAACCCGCGAATGATGAGTCTGACGGGCTGCTACTAAGGAAGGGTCTATGAAGGGATCATAC
176 E H L I E T T G T G N V C R A A L G S G H E V D S Y
833 AAGTGTACTTTTGGAAATAATGATGATTTAGGCTATCCCGCAGCATAGAGGATGTTTTCACATGCTCGGT
201 K L L L L L E I M D M G L A A G S S I E D F F P M L G
908 TGGGTTGTATGGCTCATCGGTTGTGAAGGAAGGTTGTGAAGAAAGCAAGGGGTCGATCATCTTCTGGAAGGT
226 W V D W L T G T L G K G V E K A A K G V D T F L E G
833 GTTCTTAGAGATCTGCTGATCAATAGATGGTTCTGCACAAACAGGATCTTGATTCATTTTGTCTGAGGTCAA
251 V L R D H P A S N S G S A T G C A T D F V S I L L E I
056 GAOGCGGCTGTGCTTTTCTATTGATAAAAGATGATCAATCTCTATCTGGGATAGTTGGGTGCTGGAACCT
176 E A D A G F S I D K E C I K S L W D M G C C A T
213 GAAACAATATGACAGCTTTGGAGTGGACATATAGACGCGCTATAAAAGCTCCAGACGGCATGTCAATGTGAGC
301 E T A G T A T A L T A A L I K S P D A M A C K L Q
208 AATGAGTACAGAAATAAGCAAAAGCAAAATAAAGATCTCAGAGGGTGATAGTCAATAGTCACTGAAAG
326 N E V R E I G K G S C K S I E G D L V N M H Y L
2183 CAGATAATGAAGAAGATGATCGATGTGATCTTACAGCCCACTTGTAGTTCTAGNAGAAACAGAGCAGCTG
351 A V M K S E M R L Y F T A P L L V P R E T R Q D V
358 AAAATCTGGGTTATGACATAAAGAACAGGAACAAGATGATTAATATCATGCAAGCAATTCGAAAGAGCCCTTCA
373 K F M Y G I D I K A G T Q V L I N A W A I A A R D S
437 TGTGGGACAACCCAGGAGGATTCGGCGCTGAGAGGTTCTGTAATGTCGTATGATGACAAAGGGTTTCACTAT
401 L W D N E P E E R F E R F L S R I D Y K G H Y
508 GAGTATGTTCCCTTTGGAGCGGTGGAGGGGTTGCCCTGGGATCTAGTTTGCATAGCATGTGTATAAGGCTTGCA
456 E Y L P F G A G R R G S G P Q I G A I A V N E L A
583 GTACCAAGATGTGTGCACAAGTTTAATTTCGAATGCCCGATGGGAAAGAGTAGAGGATTTGGACATAGCATGTGGT
451 V A N V H H K N F E L P D G K R L E D L D M T G
658 TCCACTGGCATCTACTCTATCAAAAATCTCTCTTTGGTGGTGGCACCACATGTTGA 1720
476 S T G I T L H K S P L L V A T P H V
721 TCTTTATGTTCTTTGATGTGCTTTTGTGGATGCTGACCAATAAGACTGTGTGTGGCTCACTCAACAACTGT
796 TGATTACTCAAACTACTCTAGCCTATAATAAATGTAAATAAGGCGCACCTTCTATGCACAAAAAAATAA
1871 AAAAAAATAAATAA 1885

[illegible]

图 2 GIPS1 (A) 和 GIPS2 (B) 基因全长 cDNA 序列

Fig. 2 Full-length cDNA sequences of GIPS1 (A) and GIPS2 (B) genes

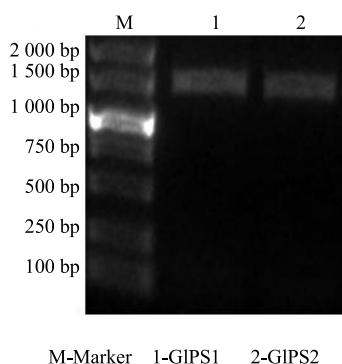


图3 GIPS1和GIPS2基因ORF的PCR扩增

Fig. 3 PCR amplification products of ORF of GIPS1 and GIPS2 genes

阿米芹 *Ammi majus* L. (AKJ23346) 的蛋白序列相似性分别为 89%、92%、90%。对 GIPS1 和 GIPS2 蛋白保守结构域进行分析, 结果表明 2 个蛋白均属于细胞色素 P450 超家族 (p450 superfamily) (图 4)。

3.2.2 蛋白理化性质分析 DNAMAN 软件对 GIPS1 和 GIPS2 蛋白氨基酸序列进行分析: GIPS1 蛋白相对分子质量为 55 740.7, 等电点为 8.28; GIPS2 蛋白相对分子质量为 56 363.9, 等电点为 6.62。使用 ExPASy 的 Protscale 在线工具预测 GIPS1 和 GIPS2 蛋白亲疏水性 (图 5), GIPS1 蛋白在第 408 个氨基酸位点, 最低峰值是-2.600, 在第 80 个氨基酸位点, 最高峰值是 2.289, 总平均亲水性-0.102; GIPS2 蛋

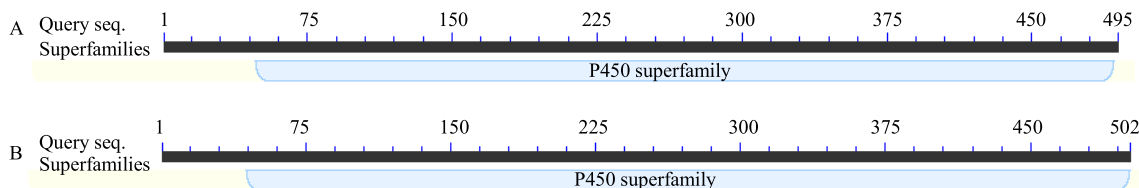


图 4 GIPS1 (A) 和 GIPS2 (B) 蛋白的保守结构域预测

Fig. 4 Prediction of conserved domains of GIPS1 (A) and GIPS2 (B) proteins

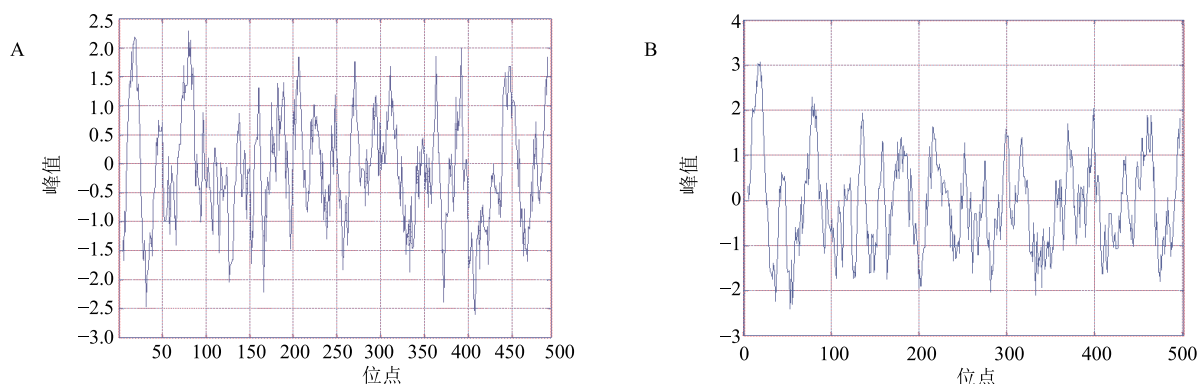


图 5 GIPS1 (A) 和 GIPS2 (B) 蛋白亲疏水性预测

Fig. 5 Hydrophobicity analysis on GIPS1 (A) and GIPS2 (B) proteins

白在第 53 个氨基酸位点, 最低峰值是-2.411, 在第 19 个氨基酸位点, 最高峰值是 3.067, 总平均亲水性 -0.089。2 个蛋白均具有一个明显的跨膜区, 为一次跨膜亲水性蛋白。

3.2.3 蛋白二维、三维结构预测 利用在线软件 SOPMA 预测 GIPS1 和 GIPS2 的二级结构(图 6)。GIPS1 二级结构中 α -螺旋(蓝色)占 43.03%、延伸链(红色)占 20.20%、 β -折叠(绿色)占 6.87%、无规卷曲(紫色)占 29.90%。GIPS2 二级结构中 α -螺旋(蓝色)占 46.41%、延伸链(红色)占 17.73%、 β -折叠(绿色)占 8.17%、无规卷曲(紫

色)占 27.69%。GIPS1 和 GIPS2 中主要结构均为 α -螺旋和无规卷曲, α -螺旋是最为稳定的蛋白质空间结构, 二者中 α -螺旋的比例均在 40%以上, α -螺旋是最为稳定的蛋白质空间结构, 因此推测两者蛋白相对稳定。

通过在线软件 SWISS-MODEL 分别对 GIPS1 和 GIPS2 蛋白进行三维模型构建(图 7)。GIPS1、GIPS2 均以 5tfu.4.A 蛋白作为模体, 相似性分别为 26.28%和 25.88%, 三维结构均包括 8 个 β -折叠, GIPS1 具有 18 个 α -螺旋, GIPS2 包括 19 个 α -螺旋。由图 7 可以看出 2 个蛋白三维结构较为相似但又有所区别。

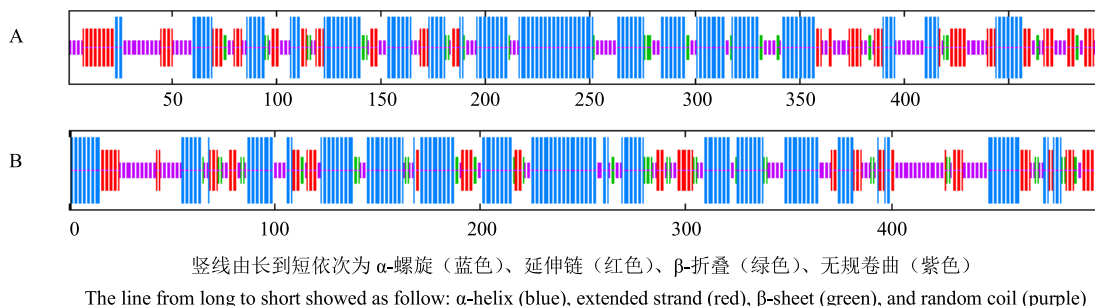


图 6 GIPS1 (A) 和 GIPS2 (B) 蛋白的二级结构预测

Fig. 6 Secondary structure prediction of GIPS1 (A) and GIPS2 (B) proteins

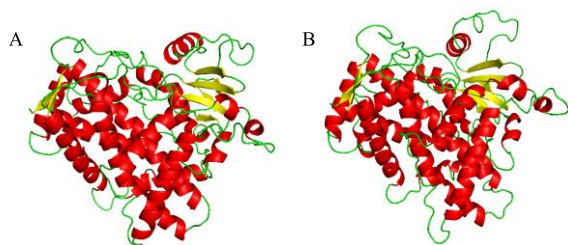


图 7 GIPS1 (A) 和 GIPS2 (B) 蛋白三维结构预测

Fig. 7 Tertiary structure prediction of GIPS1 (A) and GIPS2 (B) proteins

3.2.4 系统进化分析 从 NCBI 数据库选取已发表植物的 PS 蛋白序列, 利用 MEGA5.0 软件, 利用 NJ 法构建系统进化树(图 8)。结果表明, GIPS1 和 GIPS2 与伞形科植物欧防风 *Pastinaca sativa* L.、旱芹 *Apium graveolens* L.、大阿米芹 *Ammi majus* L. 的 PS 蛋白亲缘关系较近, 而二者与川桑 *Morus notabilis* Schneid.、紫花风铃木 *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos、浆果状辣椒 *Capsicum baccatum* L. 的 PS 蛋白亲缘关系较远。

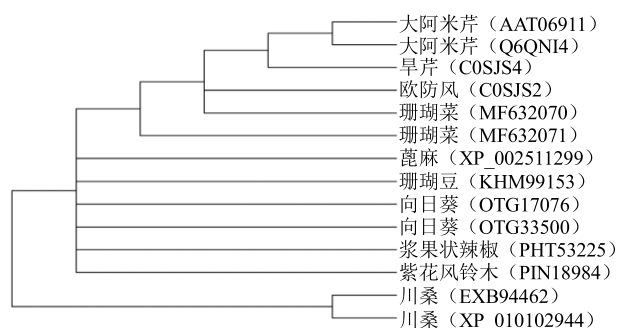


图 8 PS 蛋白的 NJ 系统进化树

Fig. 8 Neighbor-joining phylogenetic tree of PS proteins

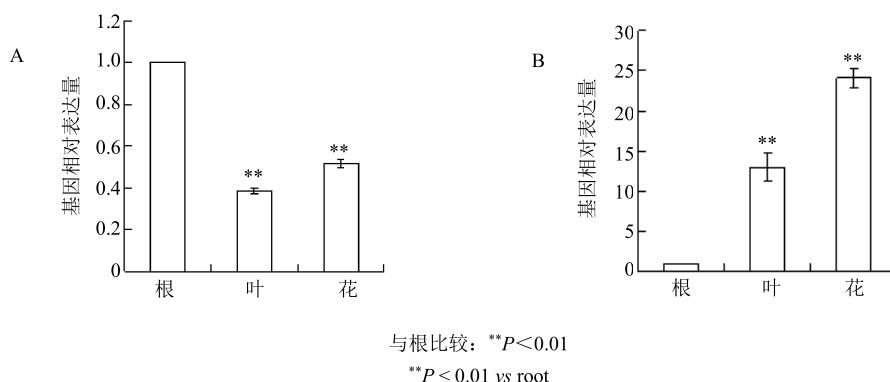


图 9 GIPS1 (A) 和 GIPS2 (B) 基因的组织特异性表达

Fig. 9 Tissue specific expression of GIPS1 (A) and GIPS2 (B) genes

分别命名为 GIPS1 和 GIPS2。同源分析结果显示这 2 个基因与其他植物 PS 基因的同源性最高分别为 90% 和 94%。补骨脂素合成酶属于细胞色素 P450 超家族, GIPS1 和 GIPS2 蛋白具有 P450 超家族保守结构域, 因此推测 2 个基因都属于 PS 基因家族的成员。

细胞色素 P450 为一类亚铁血红素-硫醇盐蛋白 (即 b 型血红蛋白) 的超家族, 它参与内源性物质和包括药物、环境化合物在内的外源性物质的代谢, 催化许多内源性底物和外源性化学物质的单加氧化反应^[12], 在动物、植物、微生物中均有存在^[13]。在苯丙烷代谢途径中, CYP71、CYP73、CYP75、CYP81、CYP84、CYP93、CYP98 等家族在黄酮、类黄酮、木脂素中间体、呋喃香豆素合成中发挥重要作用, 主要参与脂肪族、芳香族碳羟基化反应以及芳基转移反应、亚甲基二氧桥生成等^[14]。补骨脂素合成酶属于 CYP71 家族, 基因家族各成员表达可能具有组织器官特异性, 从而担负不同的功能。本实验中 GIPS1 和 GIPS2 基因表达结果显示, GIPS1 基因在根中表达量较高, 在叶中表达量较低; 而

3.3 GIPS1 和 GIPS2 基因的组织特异性表达

利用 qPCR 技术和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法分析 GIPS1 和 GIPS2 基因在珊瑚菜根、叶、花中的相对表达量。结果表明, GIPS1 和 GIPS2 基因的转录本在根、叶、花均能检测到, 但在不同组织中的表达量存在极显著差异 (t 检验)。GIPS1 基因在根中表达量最高, 其次为花, 在叶中表达量最低; 而 GIPS2 基因在花中表达量最高, 其次为叶, 在根中表达量最低 (图 9)。

4 讨论

本研究通过 RACE 技术克隆得到珊瑚菜 2 条 PS 基因的 cDNA 序列全长, 对其编码序列进行验证后,

GIPS2 基因在花中表达量较高, 在根中表达量较低, 2 条基因在根中的表达情况相反。刘玉函等^[15]研究发现, 补骨脂素在珊瑚菜的不同组织含量存在显著差异, 且在根中补骨脂素含量显著高于叶中。由此推测二者的基因功能有所区别, GIPS1 可能在补骨脂素合成中起主要作用, 有待进一步实验验证。

本研究克隆获得了珊瑚菜 GIPS1 和 GIPS2 基因的全长 cDNA 序列并分析了其表达模式, 为阐明其在珊瑚菜补骨脂素生物合成途径中的功能奠定了研究基础, 同时也对未来通过生物技术手段调控珊瑚菜补骨脂素含量提供可能。本研究为今后利用基因工程方法提高 GIPS1 和 GIPS2 基因在珊瑚菜中各器官的表达量, 最终获得高产植株做好准备。预期可以通过改良单个或多个关键酶促步骤, 实现人工调控珊瑚菜补骨脂素在植物细胞中的产量, 从分子水平提高补骨脂素的生产率是北沙参产业发展的新途径。

参考文献

- [1] 王爱兰, 王贵琳, 李维卫. 濒危物种珊瑚菜遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报, 2015, 35(8): 1541-1546.

- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 朱兆荣, 李玉强, 刘娟, 等. 补骨脂总黄酮抗氧化作用研究 [J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(2): 18-20.
- [4] Herrmann G, Brenneisen P, Wlaschek M, *et al.* Psoralen photoactivation promotes morphological and functional changes in fibroblasts *in vitro* reminiscent of cellular senescence [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111(6): 759-767.
- [5] Fisher G J, Wang Z Q, Datfa S C, *et al.* Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light [J]. *New England J Med*, 1997, 337(20): 1419-1429.
- [6] 李祝, 宋宝安. 补骨脂素抗肿瘤机理及其应用研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(3): 255-260.
- [7] Larbat R, Hehn A, Hans J, *et al.* Isolation and functional characterization of CYP71A14 encoding for the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(8): 4776-4785.
- [8] Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, *et al.* Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5(2): 293-308.
- [9] Karamat F, Olry A, Munakata R, *et al.* A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2014, 77(4): 627-638.
- [10] Munakata R, Olry A, Karamat F, *et al.* Molecular evolution of parsnip (*Pastinaca sativa*) membrane-bound prenyltransferases for linear and/or angular furanocoumarin biosynthesis [J]. *New Phytol*, 2016, 211(1): 332-344.
- [11] Larbat R, Kellner S, Specker S, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(1): 542-554.
- [12] 李泽莉. *Bacillus* sp.C3 细胞色素 P450: CYP102A16 基因的克隆、优化表达及其酶性质研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [13] 许华夏, 李培军, 刘宛, 等. 生物细胞色素 P450 的研究进展 [J]. 农业环境科学学报, 2002, 21(2): 188-191.
- [14] 解敏敏, 龚达平, 李凤霞, 等. 烟草细胞色素 P450 的基因组学分析 [J]. 遗传, 2013, 35(3): 379-387.
- [15] 刘玉函, 刘汉柱, 辛华. 珊瑚菜不同部位香豆素含量的研究 [J]. 植物科学学报, 2010, 28(1): 114-117.