

刺五加 GPS 基因克隆及表达特征与皂苷含量相关性研究

张佳桢¹, 邢可心¹, 冯文昭¹, 国红玉², 王卓², 邢朝斌^{2*}

1. 北京景山学校曹妃甸分校, 河北 唐山 063210

2. 华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210

摘要: 目的 克隆刺五加香叶基焦磷酸合成酶 (geranyl pyrophosphate synthase, GPS) 基因的 cDNA 序列并分析基因序列特征、不同器官中基因表达水平及其与皂苷含量的相关性。方法 提取刺五加的 RNA, 逆转录为 cDNA。根据转录组测序结果中编码 GPS 的 unigene (c37362.graph_c0), 设计特异性引物, 经过 PCR 扩增 GPS 基因的 cDNA 全长。利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 GPS 基因在不同器官中的表达水平, 并通过分光光度法检测刺五加总皂苷含量。结果 克隆得到长 1 260 bp、编码 419 个氨基酸的刺五加 GPS 基因 cDNA。GPS 蛋白定位于线粒体内且不存在跨膜区域。GPS 基因在各个器官中均有表达, 在叶片中的表达量最高, 是根中表达量的 5.26 倍。GPS 基因的相对表达量与皂苷量呈现出同升同降的变化趋势, 表现为显著正相关关系 ($r=0.851$, $P<0.05$)。结论 首次克隆获得刺五加 GPS 基因的 cDNA 全长序列, 明确了刺五加 GPS 基因的表达量与皂苷含量之间存在正相关关系。

关键词: 刺五加; 香叶基焦磷酸合成酶; 克隆; 实时荧光定量 PCR; 皂苷

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1227-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.029

Cloning and expressive characteristics of GPS gene and its correlation with saponins content in *Eleutherococcus senticosus*

ZHANG Jia-zhen¹, XING Ke-xin¹, FENG Wen-zhao¹, GUO Hong-yu², WANG Zhuo², XING Zhao-bin²

1. Beijing Jingshan School Caofeidian Branch, Tangshan 063210, China

2. College of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective To clone cDNA sequence of geranyl pyrophosphate synthase (GPS) gene from *Eleutherococcus senticosus* and analyze genetic characteristics, gene expression level in different organs and the correlation between GPS gene expression and saponins content. **Methods** RNA was extracted from *E. senticosus* and reverse transcribed into cDNA. Gene specific primers were designed according to the unigene (c37362.graph_c0) of GPS from transcriptome sequencing data. The full length of the GPS gene cDNA was amplified by PCR. The expression level of GPS gene in different organs was analyzed by qRT-PCR. The content of *E. senticosus* saponins was detected by spectrophotometry method. **Results** GPS gene cDNA was cloned from *E. senticosus* and encodes 419 amino acids with full length of 1 260 bp. GPS protein located in mitochondria does not have transmembrane region. The GPS gene was expressed in each organ and had the highest expression in blade, which is 5.26 times in root. The relative expression of GPS gene and content of saponin showed the same trend and significant positive correlation ($r = 0.851$, $P < 0.05$). **Conclusion** The whole length of cDNA sequence of GPS gene is cloned for the first time, and there is a positive correlation between the expression level of GPS gene and the saponin content of *E. senticosus*.

Key words: *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim; geranyl pyrophosphate synthetase; clone; qRT-PCR; saponin

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim 属五加科五加属植物, 是中国传统的药用植物之一, 与人参、三七同属五加科^[1]。刺

五加的根部、茎部以及叶片均可入药并具有诸多药理作用, 其中三萜皂苷是重要的药用活性成分^[2]。三萜皂苷存在于多数的药用植物中, 具有抗肿瘤、治

收稿日期: 2018-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31570683); 华北理工大学培育基金资助 (SP201508)

作者简介: 张佳桢 (2001—), 男, 研究方向为生物信息在药用植物中的应用。

*通信作者 邢朝斌 (1975—), 男, 教授, 研究方向为分子生药学。Tel: (0315)8805590 E-mail: xzbheuu@126.com

疗高脂血症、保护心脏等作用^[3-5]。植物中三萜类化合物合成途径通常分为甲羟戊酸 (mevalonate pathway, MVA) 途径和 2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (methylerythritol 4-phosphate pathway, MEP) 途径。在 MVA 途径中, 甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶催化合成异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 后, IPP 在香叶基焦磷酸合成酶 (geranyl pyrophosphate synthase, GPS) 的催化下生成香叶基焦磷酸, 而后在多种酶的催化下生成三萜皂苷的前体物质鲨烯^[6]。GPS 基因的表达与经由其催化的产物量密切相关。使用花生四烯酸 (AA) 等诱导子对绿色杜氏藻 *Dunaliella viridis* Teodoresco 进行处理, 随着 AA 质量浓度的增高, 类胡萝卜素总量显著提高; 当 AA 质量浓度为 62.5 mg/L 时, GPS 基因表达量为最高, 类胡萝卜素含量也明显提高^[7]。来自胡椒薄荷 *Mentha × piperita* L. 的香叶基二磷酸合成酶小亚基可以增加转基因烟草植物中单萜类物质产量^[8]。川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch. GPS 基因 cDNA 序列被克隆后, 证明了 GPS 基因的表达可能导致环烯醚萜类化合物的变化^[9]。

目前已有刺五加中参与合成三萜皂苷关键酶基因的克隆和表达分析相关报道, 但尚未有关于刺五加 GPS 基因的相关研究。本研究首次针对刺五加香叶基焦磷酸合成酶进行克隆, 并使用生物信息手段对于 GPS 蛋白进行预测分析, 通过 qRT-PCR 技术探究 GPS 基因在不同器官中的表达情况以及 GPS 基因表达量与刺五加总皂苷量的相关性, 为后续进一步阐明刺五加关键酶基因催化三萜皂苷合成机制建立重要基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

刺五加样本采自辽宁省本溪市, 经华北理工大学邢朝斌教授鉴定为五加科植物刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. 选取刺五加的根、茎、叶片和叶柄, 清水洗净、滤纸吸干水分保存于-80℃, 用作后续提取刺五加总 RNA 和总皂苷的样本。

1.2 仪器

RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒、FastQuant RT Kit (with gDNase)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pLB 零背景快速克隆试剂盒、Talent qPCR PreMix (SYBR Green)、TOP-10 感受态细胞、2×Taq PCR MasterMix、DL2000 DNA Marker 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司。氨苄青霉素、

IPTG、X-gal 等购自北京拜尔迪生物技术有限公司。其余化学试剂均为国产分析纯。引物由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。

2 方法

2.1 总 RNA 的提取与逆转录

称取刺五加根、茎、叶和叶柄各 0.1 g, 作为提取刺五加 RNA 的材料, 依据 RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒的方法进行刺五加总 RNA 提取。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 并按照逆转录试剂盒以总 RNA 为模板逆转录为 cDNA, RNA 与 cDNA 保存于-80℃。

2.2 刺五加 GPS 基因的克隆

根据刺五加转录组测序的结果^[10], 筛选 GPS 的 unigenes (c37362.graph_c0) 设计 1 对特异性引物, 上游引物 CGPSS7: 5'-ATGTTATTCTTCCGG-GGATTATC-3'; 下游引物 CGPSX7: 5'-CGAGT-GCTCGCCTTGATCTTTG-3'。使用 cDNA 作为 PCR 扩增的模板, 反应体系为 25 μL, 其中模板 1 μL, 上下游引物各 1 μL, 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。反应条件: 预变性 94℃, 3 min; 变性 94℃, 30 s; 退火 50℃, 30 s; 延伸 72℃, 110 s, 共 40 个循环, 最后补充延伸 5 min。

使用 2% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测, 切下预期的 DNA 片段, 使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收、纯化 DNA 片段。将回收后的产物连接到 pLB 载体中, 并将重组载体转入 TOP-10 感受态细胞中, 37℃震荡培养后, 取 100 μL 涂布于含有氨苄青霉素的培养基中进行培养, 筛选 3~5 个阳性菌落进行验证。最后将菌液冻存后送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序分析。

2.3 刺五加 GPS 基因的生物信息学分析

根据“2.1”项中克隆获得 GPS 基因 cDNA 序列后, 使用 ExPASy 中 ProtParam 预测蛋白质氨基酸数量、相对分子质量、理论等电点 (PI) 在内的蛋白质基本性质。在 NCBI 中的 Conserved Domain Database (CDD) 在线软件中分析蛋白质结构功能域。通过 TMHMM Server v.2.0 软件对蛋白质跨膜情况进行预测。在 TargetP 1.1 Server 软件中分析蛋白质亚细胞定位, SignalP 3.0 Server 进行信号肽的预测, 使用 SOPMA 软件对蛋白质二级结构进行预测。之后通过 SWISS-MODEL 进行蛋白质三级结构的预测。最后, 在 MEGA 6.05 软件中使用邻位相连法 (neighbor-joining) 构建 GPS 蛋白的系统进化树。

2.4 刺五加 GPS 基因的表达量分析

以刺五加根、茎、叶和叶柄的 cDNA 作为 qRT-PCR 模板。按照“2.2”项测序结果,设计 qRT-PCR 引物,上游引物 CGPSrtS3: 5'-GCCTGAGAATGATGATGAGGATG-3'; 下游引物 CGPSrtX3: 5'-GAATGGAACACTGGAGGAA-CAAA-3', 预期扩增长度为 224 bp。参照文献的方法^[11], 以 GAPDH 基因作为内参基因, 并设计 qRT-PCR 引物, 上游引物 RGS: 5'-GATTTGGCA-TTGTGAGGG-3', 下游引物 RGX: 5'-TGCTATC-GCCTATGAAGTCC-3', 预计扩增长度为 134 bp。用上述 2 对引物, 进行 qRT-PCR 反应, 每个样本重复 3 次。总反应体系为 10 μ L, 上、下游引物各 0.3 μ L, cDNA 模板 0.5 μ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye 1 μ L, RNase-Free ddH₂O 2.9 μ L, 2 $\times$ Talent qPCR PreMix 5 μ L。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 3 min; 变性 95 $^{\circ}$ C, 5 s; 退火 55 $^{\circ}$ C, 10 s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 15 s, 共 40 个循环。参照文献的方法^[12]计算各样本中的 GPS 基因相对表达量。

2.5 刺五加总皂苷含量及相关性分析

参照文献的方法^[13], 测定刺五加根、茎、叶和叶柄的总皂苷量。同时利用该方法筛选出皂苷含量差异显著的高、低含量组, 每组 3 株, 进行皂苷含量和 GPS 基因表达量的分析。使用 SPSS 18.0 软件分析刺五加 6 个叶片样本的 GPS 基因表达量与皂苷含量间的相关性。

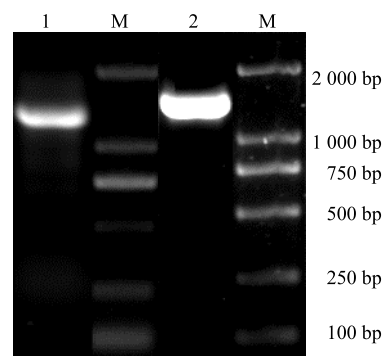
3 结果与分析

3.1 刺五加 GPS 基因的克隆与序列分析

以刺五加 cDNA 为模板, 设计 1 对特异性引物 CGPSS7、CGPSX7, 经过 PCR 扩增后得到约 1 200 bp 的 DNA 片段。连入 pLB 载体, 测序得到长度为 1 260 bp 的条带(图 1), 与预期扩增长度相符。经过 BLAST 软件比对, 确认该序列为刺五加 GPS 基因的 cDNA 全长, 通过 DNASTAR 和 BLAST 比对确认开放阅读框(ORF)长度为 1 260 bp, 编码 419 个氨基酸蛋白质, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA。

3.2 刺五加 GPS 基因生物信息学分析

通过 ExPASy 中 ProtParam 软件预测得到: 蛋白质相对分子质量为 46 329.16; PI 为 6.32; 亮氨酸在全部氨基酸中比例最高, 达到 12.6%, 带负电荷的氨基酸残基总数(Asp+Glu): 46 个; 带正电荷的氨基酸残基总数(Arg+Lys): 42 个。在体外哺



M-Marker 1-GPS 基因 cDNA 扩增产物 2-GPS 基因重组载体的 PCR 扩增产物

M-Marker 1-cDNA of the GPS gene amplification product
2-PCR amplification product of GPS gene recombinant vector

图 1 刺五加 GPS 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of DNA of GPS gene from *E. senticosus*

乳动物网织红细胞中, 预测半衰期为 30 h; 不稳定指数为 37.44, 属于稳定蛋白。亲水性平均值为 -0.040, 属于亲水蛋白。

将氨基酸序列上传至 SOPMA 在线软件中, 结果显示 GPS 蛋白具有 233 个 α -螺旋(alpha helix), 占比 55.61%; 30 个延伸链(extended strand), 占比 7.16%; 22 个 β -转角(beta turn), 占比 5.25%; 134 个无规卷曲(random coil), 占比 31.98%。

蛋白质结构功能域的结果显示, GPS 蛋白是类异戊二烯合酶(Isoprenoid_Biosyn_C1)超家族成员之一。GPS 蛋白具有 Trans_IPPS_HT(位于第 102~417 位氨基酸)、IspA(80~419)、polyprenyl_synt(104~364)、prenyl_cyano(82~417) 4 个结构域, 其中在 Trans_IPPS_HT 结构域中含有底物结合口袋、底物-Mg²⁺结合位点、链长决定区、催化残基、天冬氨酸富集区域 I 等 7 个保守位点。在已报道的绿色杜氏藻^[7]、川西獐牙菜^[9]中也含有 Trans_IPPS_HT 结构域, 说明刺五加的 GPS 蛋白属于类异戊二烯合酶超家族。

经过 TMHMM Server v.2.0 软件预测结果显示 GPS 蛋白质不存在跨膜区域; TargetP 1.1 Server 结果显示 GPS 蛋白定位于线粒体内, 可信度为 1, 可靠度高。在 SignalP 3.0 Server 软件预测得到 GPS 蛋白质中含有信号肽, 位置可能在第 13~14 个氨基酸。刺五加 GPS 蛋白质三级结构预测结果见图 2。

3.3 刺五加 GPS 蛋白系统进化树分析

根据 BLAST 氨基酸序列比对结果, 将 18 个物种与刺五加 GPS 氨基酸序列进行系统进化树的构建

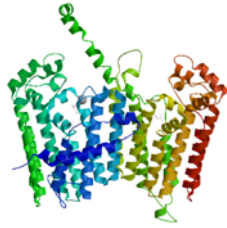


图 2 刺五加 GPS 蛋白三维结构

Fig. 2 Tertiary structure of GPS protein from *E. senticosus*

(图 3), 这些物种包括可可 *Theobroma cacao* L.、芒果 *Mangifera indica* L.、夏栎 *Quercus robur* L.、印楝 *Azadirachta indica* A. Juss.、罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey、芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.、番茄 *Solanum lycopersicum* Mill.、南非醉茄 *Withania somnifera* Dunal.、洋常春藤 *Hedera helix* L.、阿育魏实 *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague、苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.、黄花蒿 *Artemisia annua* Linn.、茶树 *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.、喜树 *Camptotheca acuminata* Decne.、长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don、广藿香 *Pogostemon cablin* Benth.、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.、鼠尾草 *Salvia officinalis* L.。刺五加 GPS 蛋白序列先与伞形目下的洋常春藤、阿育魏实聚为一支, 可信度为 100%; 之后又与合瓣花亚纲、原始花被亚纲等双子叶植物纲的物种聚为一个大的分支, 这与传统分类结果一致。

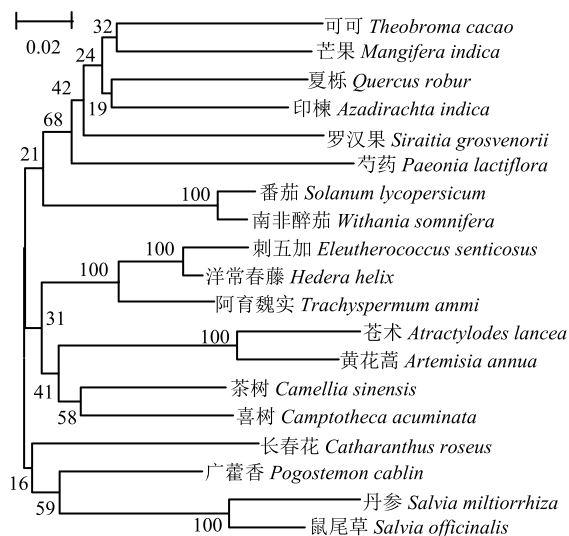


图 3 GPS 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of GPS protein

3.4 不同器官中刺五加 GPS 基因的表达分析

刺五加 GPS 基因在叶片、叶柄、茎、根中都有表达, 相对表达量差异显著 ($P < 0.05$, 图 4)。GPS 基因在叶片中的表达量显著高于其他器官, 其表达量是根的 5.26 倍, 其次叶柄和茎中的表达量也高于根, 分别是根的 2.65 倍和 1.25 倍。4 个不同器官中, 根的表达量最低。

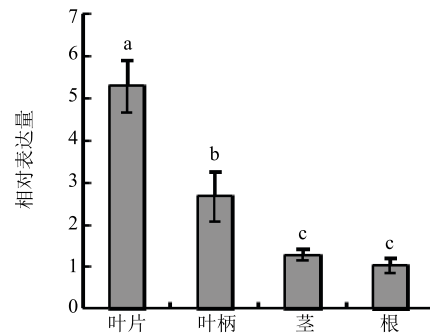
不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)Different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$)

图 4 刺五加 GPS 基因在不同器官中的表达

Fig. 4 Expression level of GPS gene in different organs of *E. senticosus*

3.5 刺五加总皂苷含量分析及其与 GPS 基因表达的相关性

在刺五加的根、茎和叶柄中并未检测到皂苷存在。根据刺五加叶片中的皂苷量将刺五加划分为皂苷量显著差异的高含量与低含量组。刺五加叶片的总平均总皂苷量为 18.4 g/kg, 高含量组刺五加叶片皂苷量分别为 27.8、29.0、27.1 g/kg; 平均值为 (28.0 ± 1.0) g/kg, 对应的样本叶片中 GPS 基因的相对表达量分别为 3.99、5.17、2.03。低含量组刺五加皂苷量分别为 8.0、8.9、9.3 g/kg; 平均值为 (8.7 ± 0.6) g/kg, 对应的样本叶片中 GPS 基因相对表达量分别为 1.11、1.12、1.00。最高的基因表达量与最低之间相差 5.17 倍。6 个刺五加样本 GPS 基因的相对表达量和皂苷量同升同降, 两者之间为显著的正相关关系 ($r = 0.851$, $P < 0.05$)。

4 讨论

GPS 基因在刺五加根、茎、叶片和叶柄中都有表达, 在叶片中的表达量达到最高, 这与川西獐牙菜中的表达情况相同^[9]。关键酶基因的表达对次生代谢产物的合成有着重要的影响, GPS 作为合成类胡萝卜素、三萜皂苷等重要代谢物的关键酶, 对植物的次生代谢具有重要作用。以烟蚜 *Myzus persicae* Sulz. 中

GPPS 基因 cDNA 序列、拟南芥质体转运肽序列和短的人流感血凝素序列合成为 sMpGPPS-HA 序列, sMpGPPS-HA 的非质体表达程度能够增加烟草生物量^[14]。同样地,使用 3 种类型的 GPS cDNA 序列,合成长度为 1 353 bp 的 cDNA,即 PTP-MpGPPS,将其导入亚麻荠 *Camelina sativa* L. 转基因植物中后,后代显示出比野生型发育快,开花早等特征以及甜菜碱和菜籽甾醇水平也高与野生型^[15]。GPS 的调控表达对植物的生长、次生代谢物的合成有一定调节作用。刺五加 GPS 基因表达量与皂苷含量之间呈现正相关关系,这有助于进一步研究 GPS 影响植物的生长情况以及刺五加三萜皂苷生成的机制。

已有研究报道了胡椒薄荷中香叶基焦磷酸合成酶(GPPS)的晶体结构,但为了探究胡椒薄荷中 GPPS 中底物结合的结构基序,有学者模拟了分子动力学、分子力学和混合量子力学、分子力学、分子动力学,结果显示小亚基(SSU)能够改变催化袋的大小进而起到保护作用,最后组装成不同大小的萜烯前体并揭示了不同底物的结合模式^[16]。刺五加 GPS 蛋白二级结构预测的结果与川西獐牙菜^[9]和绿色杜氏藻^[7]中的 α -螺旋都占据很高的比例,但两者都不存在无规则卷曲结构并且仅在绿色杜氏藻中预测出具有 loop 区结构。绿色杜氏藻中 GPS 蛋白与刺五加 GPS 蛋白具有类似的理化性质,两者都属于亲水蛋白且不存在跨膜结构^[7]。GPS 蛋白系统进化分析仅匹配到被子植物门,这与川西獐牙菜进化关系类似,两者都与芒果、丹参、长春花具有同源关系^[9]。有学者在云杉中新分离出一个基因 PaIDS1,该基因与香叶基二磷酸和香叶基香叶基二磷酸合成酶的系统发育关系很接近,并且具有相似的蛋白质理化性质,同时 PaIDS1 也可促进萜类化合物的生成,也进一步阐明了萜类物质前体的生成途径^[17],可以推测刺五加中也还有类似酶的存在。在大肠杆菌中,GPS 的优化表达可以增加香叶醇的产量,也可以使用相同的方法通过微生物生产其他的单萜化合物^[18]。通过多种生物学方法影响 GPS 的表达进而影响植物中萜类化合物的生成以及植株生长情况,也为后续研究刺五加次生代谢物的体外合成提供可能。

参考文献

- [1] 涂正伟,周渭渭,单 淇,等.刺五加的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(3):213-216.
- [2] 黄晓巍,刘玥欣,张啸环.刺五加叶化学成分、药理作用及现代临床应用研究进展[J].吉林中医药,2017,37(6):611-613.

- [3] Wang P, Cui J, Du X, et al. *Panax notoginseng* saponins (PNS) inhibits breast cancer metastasis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(3): 663-671.
- [4] 陈永斌,董玉华.三七总皂苷治疗高脂血症的临床效果及药理作用分析[J].中国医药科学,2016,6(1):51-53.
- [5] Zhang W, Wang X, Tang H, et al. Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica* and their cardioprotective activities [J]. *Fitoterapia*, 2013, 84(1): 326-331.
- [6] Choi D W, Jung J, Ha Y I, et al. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 557-566.
- [7] 马颖瑞,龚一富,周 静,等.绿色杜氏藻香叶基焦磷酸合成酶基因(GPS)生物信息学与诱导表达分析[J].核农学报,2017,31(2):248-254.
- [8] Yin J L, Wong W S, Jang I C, et al. Co-expression of peppermint geranyl diphosphate synthases small subunit enhances monoterpene production in transgenic tobacco plants [J]. *New Phytol*, 2017, 213(3): 1133-1144.
- [9] 向蓓蓓,李晓雪,王 勇,等.川西獐牙菜牻牛儿苗基焦磷酸合成酶基因的克隆及表达分析[J].中草药,2017,48(5):962-970.
- [10] 宋 菊,国红玉,李志栋,等.刺五加转录组和差异性表达分析[J].中草药,2016,47(22):4049-4053.
- [11] 邢朝斌,龙月红,何 闪,等.刺五加法尼基焦磷酸合成酶基因的克隆、生物信息学及表达分析[J].中国中药杂志,2012,37(12):1725-1730.
- [12] 邢朝斌,龙月红,劳凤云,等.内生真菌对刺五加皂苷合成关键酶基因表达及皂苷含量的影响[J].中国中药杂志,2012,37(14):2041-2045.
- [13] 邢朝斌,劳凤云,龙月红,等.刺五加鲨烯合酶和鲨烯环氧酶基因单核苷酸多态性及其与总皂苷量的相关性研究[J].中草药,2012,43(10):2020-2024.
- [14] Li G, Xi J, Ji X, et al. Non-plastidial expression of a synthetic insect geranyl pyrophosphate synthase effectively increases tobacco plant biomass [J]. *J Plant Physiol*, 2018, 221: 144-155.
- [15] Xi J, Rossi L, Lin X, et al. Overexpression of a synthetic insect-plant geranyl pyrophosphate synthase gene in *Camelina sativa* alters plant growth and terpene biosynthesis [J]. *Planta*, 2016, 244(1): 215-230.
- [16] Liu Z, Zhou J, Wu R, et al. Mechanism of assembling isoprenoid building blocks 1. elucidation of the structural motifs for substrate binding in geranyl pyrophosphate synthase [J]. *J Chem Theory Comput*, 2014, 10(11): 5057-5067.
- [17] Schmidt A, Wächter B, Temp U, et al. A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2): 639-655.
- [18] Zhou J, Wang C, Yang L, et al. Geranyl diphosphate synthase: An important regulation point in balancing a recombinant monoterpene pathway in *Escherichia coli* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 68: 50-55.