

山茱萸 CoDXR 基因的克隆与分析

徐静雅^{1,2}, 于红卫³, 李志红^{1,2}, 杨萌萌^{1,2}, 王瑶瑶^{1,2}, 侯小改^{1,2*}, 侯典云^{1,2*}

1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471023

2. 洛阳市道地药材繁育与创新利用工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023

3. 河南省农业厅中药材生产技术服务中心, 河南 郑州 450000

摘要:目的 克隆山茱萸关键酶基因 1-脱氧-D-核酮糖 5-磷酸还原酶 (CoDXR) 的全长 cDNA 序列, 为山茱萸的进一步研究提供依据。方法 以本实验室获得的山茱萸转录组数据中的转录本序列 c147202_g1 为模板, 通过 Primer Premier 5.0 设计特异性引物, 利用 RT-PCR 技术克隆 CoDXR 基因的全长 cDNA 序列, 并通过相关的生物信息学软件对其进行相关的生物信息学分析和功能预测。结果 CoDXR 基因长度为 1 505 bp, ORF 长度是 729 bp, 编码 242 个氨基酸。而通过 SignalP4.0Server 和 HMMTOP 对 CoDXR 蛋白预测分析结果可知, 该蛋白不具有信号肽和跨膜区, 为疏水性蛋白。系统进化树分析结果表明 CoDXR 蛋白与野茶树 (*Camellia sinensis*) 的 DXR 蛋白序列相似性最高。结论 在山茱萸果实和叶片转录组测序的基础上成功克隆了山茱萸萜类合成途径中的关键酶基因 CoDXR, 对其进行相关的生物信息学分析, 为深入研究 CoDXR 基因在山茱萸萜类合成途径中的功能奠定了基础。

关键词: 山茱萸; 1-脱氧-D-核酮糖 5-磷酸还原酶 (DXR); 代谢途径; 基因克隆; 氨基酸

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)14-3785-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.14.024

Cloning and analysis of CoDXR gene in *Cornus officinalis*

XU Jing-ya^{1,2}, YU Hong-wei³, LI Zhi-hong^{1,2}, YANG Meng-meng^{1,2}, WANG Yao-yao^{1,2}, HOU Xiao-gai^{1,2}, HOU Dian-yun^{1,2}

1. Agricultural College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

2. Luoyang Engineering Research Center of Breeding and Utilization of Dao-di Herbs, Luoyang 471023, China

3. Chinese Medicinal Materials Production Technology Service Center of Department of Agriculture of Henan Province, Zhengzhou, 450000, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA sequence of CoDXR, a key enzyme gene of *Cornus officinalis*, and provide a basis for further study of *C. officinalis*. **Methods** In this study, we used the transcript sequence c147202_g1 from the transcriptome data of *C. officinalis* obtained in our laboratory as template, designed specific primers through Primer Premier 5.0, cloned the full-length cDNA sequence of *C. officinalis* DXR gene by RT-PCR technology, and the bioinformatics analysis and function prediction were carried out through the relevant bioinformatics software. **Results** The results showed that the CoDXR gene was 1 505 bp in length and the ORF was 729 bp in length, encoding 242 amino acids. The results of predictive analysis of CoDXR protein by SignalP4.0Server and HMMTOP showed that the protein was a hydrophobic protein without signal peptide and transmembrane region. Phylogenetic tree analysis showed that the CoDXR protein had the highest similarity to the DXR protein sequence of *Camellia sinensis*. **Conclusion** In this study, the key enzyme gene CoDXR was successfully cloned based on the sequencing of the *C. officinalis* transcriptome, and related bioinformatics analysis was carried out. The results of this study laid the foundation for further study on the function of CoDXR gene in the terpenoid synthesis pathway of *C. officinalis*.

Key words: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; DXR; metabolic pathway; gene clone; amino acids

收稿日期: 2019-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1404829); 中央本级重大增减支项目 “名贵中药资源可持续利用能力建设项目” (2060302); 西藏自治区重点科技计划项目 (2015-ZD-NM-0); 河南省中药材产业技术体系岗位专家项目

作者简介: 徐静雅, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源评价与利用方面的研究。Tel: (0379)64282340 E-mail: 2052815864@qq.com

*通信作者 侯典云, 副教授, 硕士研究生导师。Tel: (0379)64282340 E-mail: dianyun518@163.com

山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 是落叶乔木或灌木, 为山茱萸科山茱萸属植物, 在我国河南、安徽、陕西等地均有分布, 是我国著名的传统中药材, 其果肉入药^[1], 具有补肝益肾、降低血糖、抗氧化及抗菌等功效^[2]。目前已报道山茱萸含有黄酮类化合物^[3]、鞣质、三萜类化合物、以及环烯醚萜苷类化合物^[4-5]和多糖^[6-7]等。其中, 环烯醚萜苷类化合物又包括了山茱萸新苷^[8]以及脱水莫诺苷^[9]等。据报道, 植物中萜类物质的合成一般都需要 IPP 和 DMAPP 两个前体物质。这 2 个前体物质的合成途径有 2 条, 分别是 MVA (甲羟戊酸) 与 MEP (非甲羟戊酸)^[10-14]途径。其中 1-脱氧-D-核酮糖 5-磷酸还原酶 (DXR) 是 MEP 途径中的第 2 个限速酶, 为细胞质体内类异戊二烯化合物代谢的重要调控位点^[15], 其作用是催化 1-脱氧木酮糖-5-磷酸 (DXP) 形成 MEP^[16]。DXR 在不同植物及其不同发育时期对 MEP 途径的调节会有差异, 对于萜类物质的合成具有重要的调控作用, 对于其研究备受关注^[17-19]。

该研究通过本实验室已获得的山茱萸转录组数据中的转录本序列, 设计 DXR 基因全长扩增引物, 用 RT-PCR 的方法, 进行 CoDXR 基因的克隆并对其进行相关的生物信息学分析, 为研究 DXR 在 MEP 代谢途径中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山茱萸叶片与果实采自河南省洛阳隋唐城遗址植物园, 采集的材料先用清水冲洗后迅速放进液氮速冻, 最后放置于-80 °C超低温冰箱保存备用。所用试剂盒和试剂包括 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (宝生物工程大连有限公司), TRUE script 1st Strand cDNA Synthesis Kit、2×LongTaq PCR MasterMix 和 Zero Background pTOPO-TA Cloning Kit (北京艾德莱生物科技有限公司)。

1.2 山茱萸总 RNA 的提取和反转录成 cDNA

选取保存在实验室-80 °C超低温冰箱中的山茱萸叶片以及去除果核的山茱萸果肉为材料, 在用液氮预冷过的研钵中进行快速研磨后, 按照 RNA 提取试剂盒的说明提取山茱萸总 RNA。利用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。通过 TRUE script 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒把 RNA 反转录成 cDNA 备用。

1.3 CoDXR 基因的 RT-PCR 扩增

以山茱萸转录组数据中的转录本序列

c147202_g1 为基础, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异引物 DXR-F (5'-CTCCTGTCC-TGTTTGAAT-3') 和 DXR-R (5'-ATCACCATTTC-ATTCCC-3'), 引物送北京赛百盛基因技术有限公司合成。以反转录的 cDNA 为模板, 设置如下反应体系对 CoDXR 基因进行扩增: cDNA 1.5 μL, 上下游引物各 1 μL, 2×Long Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 加超纯水补至 25 μL。RT-PCR 反应参数为: 94 °C 预变性 3 min; 35 个循环: 94 °C, 30 s; 55 °C, 50 s; 72 °C, 90 s; 最后 72 °C 延伸 10 min。1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切胶回收、纯化目的片段。

1.4 CoDXR 基因的克隆与测序

将纯化回收所得产物与 pTOPO-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 并在已加入氨苄 (Amp) 的具有抗性的 LB 固体平板培养基上 37 °C 过夜培养, 在平板上随机挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 挑取阳性克隆送公司测序。

1.5 CoDXR 基因的生物信息学分析

本次研究通过 ExPASy Proteomics Server 的在线分析工具 ProtParam 以及 ProtScale 预测 CoDXR 蛋白的理化性质; SOPMA、SWISS-MODEL 分别在线预测 CoDXR 的二级结构和三维模型; 在线工具 SignalP4.0Server 预测 CoDXR 基因编码蛋白的信号肽; WOLF PSORT 和 HMMTOP 分别预测蛋白定位信号及跨膜区; 利用 DANMAN 软件进行多重序列比对, 通过 MEGA 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 CoDXR 基因的克隆与测序

根据实验室已获得的山茱萸转录组数据, 发现转录本 c147202_g1 被注释为 DXR 基因。根据该基因的开放阅读框 (ORF) 序列设计引物, 经 RT-PCR 扩增和 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 得到了一条长度大约在 1 500 bp 位置的条带 (图 1)。电泳条带经回收, 克隆连接载体, 转化后, 挑取阳性单克隆送公司测序。将测序结果进行比对并对其拼接后可知该基因长度是 1 505 bp, 命名为 CoDXR。

2.2 CoDXR 蛋白质的理化性质预测

通过 ExPASy Proteomics Server 的在线分析工具 ProtParam 以及 ProtScale 对 CoDXR 基因所编码蛋白进行理化性质预测。由预测结果分析可知: 该基因 ORF 长度为 729 bp, 编码 242 个氨基酸, 相对分子质量为 25 584.53, 分子式为 C₁₁₄₂H₁₈₅₃N₃₂₁O₃₃₄S₅,

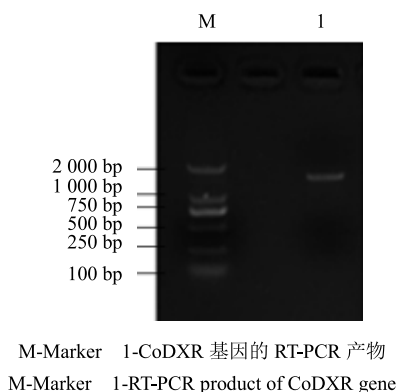


图 1 CoDXR 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of CoDXR gene

带负电荷残基 (Asp+Glu) 是 24, 带正电荷残基为 (Arg+Lys) 是 27, 理论等电点是 8.66, 该基因编码蛋白的不稳定系数为 36.80, 脂肪系数为 98.35, 总平均亲水性为-0.017, 由氨基酸亲/疏水性曲线能够了解到: 氨基酸在第 172 位时疏水性最强, 此时氨基酸的分值达到最大为 2.367, 而在第 73 位时亲水性最强, 此时氨基酸的分值是最低的为-2.333 (图 2), 由此推测该基因编码的蛋白为疏水性蛋白。

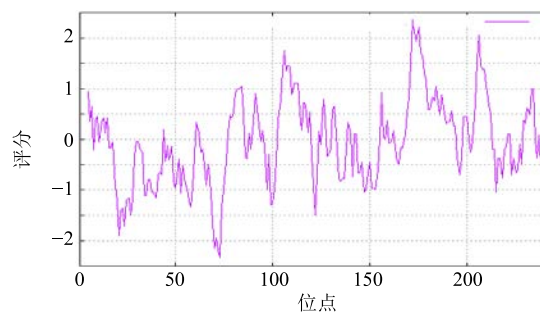


图 2 CoDXR 蛋白的亲水性/疏水性曲线

Fig. 2 Hydrophilicity/hydrophobicity curve of CoDXR protein

2.3 CoDXR 蛋白的结构分析

利用在线工具 SOPMA 预测 CoDXR 的二级结构。由图 3 可以看出, 在 CoDXR 的二级结构中 α -螺旋(蓝色)占比 30.58%, β -转角(绿色)占比 9.09%, 延伸链(红色)占比 23.97%, 无规卷曲(紫色)占比 36.36%。在 CoDXR 的二级结构中 α -螺旋与无规卷曲为其主要结构。

通过 SWISS-MODEL 预测 CoDXR 蛋白的三维结构并构建其三维结构模型 (图 4)。结果显示, 该

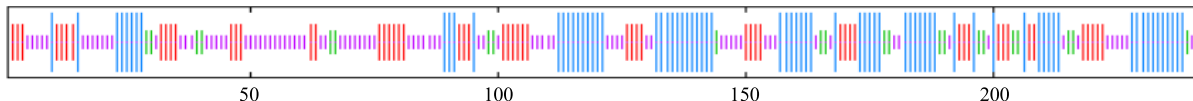


图 3 CoDXR 蛋白二级结构预测

Fig. 3 Secondary structure prediction of CoDXR proteins



图 4 CoDXR 蛋白的三维建模

Fig. 4 Three-dimensional model of CoDXR protein

蛋白建模以 1q0h.1.A 为模板, 与目标蛋白序列的一致性为 41.72%, 而目标模型质量为-1.02, 证明此蛋白序列与模板序列一致度极高, 超过 80%。

2.4 CoDXR 蛋白的信号肽、亚细胞定位及跨膜区预测分析

通过在线工具 SignalP4.0Server 预测该基因编码蛋白不具有信号肽。通过在线工具 WOLF PSORT

预测该基因编码蛋白在亚细胞中的定位, 结果显示, 该蛋白最有可能定位在细胞质中 (cyto: 8; cysk: 3; chlo: 2; plas: 1)。在线工具 HMMTOP 预测该基因编码蛋白没有跨膜区。

2.5 CoDXR 蛋白的多重序列比对及系统进化树的构建

将 CoDXR 基因编码的蛋白序列提交至 NCBI 数据库进行序列比对, 利用 DANMAN 软件进行多重序列比对 (图 5)。

由图 5 可知, CoDXR 与野茶树 *Camellia sinensis* 的 DXR (AKE33276.1)、软枣猕猴桃 *Actinidia arguta* 的 DXR (AID55340.1)、萝芙木 *Rauvolfia verticillata* 的 DXR (AAY87151.2)、桂花 *Osmanthus fragrans* 的 DXR (AOT86857.1)、风铃木 *Handroanthus impetiginosus* 的 DXR (PIN15525.1)、阿米糙果芹 *Trachyspermum ammi* 的 DXR (AUZ98410.1)、地黄

山茱萸 DXR	A N L S E A I S E S S . . F H N L H L Q G V S L R R R	38
野茶树 DXR (AKE33276.1)	A N L S E E A I L D S S S . . H Q L L L Q G F A L K R	38
软枣猕猴桃 DXR (AID55340.1)	A N L S E R I L E S S P . S Q H L L L Q G F A L K R	39
罗美木 DXR (AAY87151.2)	A N L S E T I L D S S S N Y L N L L L Q G F A F I K K	40
桂花 DXR (AOT86857.1)	A N L S D S S L D I S S N H L N L L F Q G F A L K K	40
风铃木 DXR (PIN15525.1)	A N L S E T L L D S N S N Y R N S L F Q G F A L K R	40
阿米糙果芹 DXR (AUZ98410.1)	G S L A D A I M D S S . . F H S L V L K A V G Y K K	38
地黄 DXR (ANW06222.1)	A N M S E T L L D S S S N Y L N L L S Q G F A L K R	40
中华猕猴桃变种 DXR (PSR89583.1)	A N L F E N I L A S S P . S Q H L L L Q G F A L K R	39
consensus	m l l p t i k s f k n k g k	
山茱萸 DXR	D C A T F G K R I H . S A P P P P R A V G R T D P	77
野茶树 DXR (AKE33276.1)	D Y A T F G K R I H . S A Q P P P R A V D R S D P	77
软枣猕猴桃 DXR (AID55340.1)	D C S T F G R I H . S A Q P P P R A V D R T D P	78
罗美木 DXR (AAY87151.2)	D C A T V G K K I Q . S V P P P P R A A G Y T E Q	79
桂花 DXR (AOT86857.1)	D C R T A A K R V Q . L A P P P P R S A G R S D P	79
风铃木 DXR (PIN15525.1)	E N C T A A K R I H . S A P P P P R A V G R T D P	79
阿米糙果芹 DXR (AUZ98410.1)	D F V A F G K R I H S A A T P P P T A V G R T D P	78
地黄 DXR (ANW06222.1)	E N C T A I K R V H . S A P I S P R A V G R T E P	79
中华猕猴桃变种 DXR (PSR89583.1)	D Y S T F R K R I H . S A Q P P L R A V D R T D P	78
consensus	g c q p a w g v e p k w g k p	
山茱萸 DXR	V	117
野茶树 DXR (AKE33276.1)	I	117
软枣猕猴桃 DXR (AID55340.1)	V	118
罗美木 DXR (AAY87151.2)	I	119
桂花 DXR (AOT86857.1)	I	119
风铃木 DXR (PIN15525.1)	I	119
阿米糙果芹 DXR (AUZ98410.1)	I	118
地黄 DXR (ANW06222.1)	I	119
中华猕猴桃变种 DXR (PSR89583.1)	V	118
consensus	i s v g s t g s i g t q t l d i v a e n p k f v a l a a g s n v t l l a	
山茱萸 DXR	K T K A V D K A V E H I P Q	157
野茶树 DXR (AKE33276.1)	K T K A V D K A V E D I P Q	157
软枣猕猴桃 DXR (AID55340.1)	K R K A V S T A V E D I P Q	158
罗美木 DXR (AAY87151.2)	K T K A V D K S V E D I P Q	159
桂花 DXR (AOT86857.1)	K Q K A V G K A V E E I P Q	159
风铃木 DXR (PIN15525.1)	K T K S L N K A V E D I P E	159
阿米糙果芹 DXR (AUZ98410.1)	K T R A I H K A A D Y V A Q	158
地黄 DXR (ANW06222.1)	R T K S L E K A I E D I P Q	159
中华猕猴桃变种 DXR (PSR89583.1)	R T K A V G K A V E D I P Q	158
consensus	d q v f p q l v v r n e s l e l e a l d k p e i g e	
山茱萸 DXR	V I R D A	197
野茶树 DXR (AKE33276.1)	V I R D A	197
软枣猕猴桃 DXR (AID55340.1)	V I R E A	198
罗美木 DXR (AAY87151.2)	V V R D A	199
桂花 DXR (AOT86857.1)	V I R D A	199
风铃木 DXR (PIN15525.1)	I V R D A	199
阿米糙果芹 DXR (AUZ98410.1)	V I R D C	198
地黄 DXR (ANW06222.1)	M R D A	199
中华猕猴桃变种 DXR (PSR89583.1)	V S C D A	198
consensus	g e v a h p v t v v t g i v g c a g l k p t v a a i e a g k i l a	
山茱萸 DXR	H N K P V Y S R	237
野茶树 DXR (AKE33276.1)	H K K Q C I Q G	237
软枣猕猴桃 DXR (AID55340.1)	H K K K Q C I Q G	238
罗美木 DXR (AAY87151.2)	H K K K Q C I Q G	239
桂花 DXR (AOT86857.1)	H K K K Q C I Q G	239
风铃木 DXR (PIN15525.1)	Q K K K Q C I Q G	239
阿米糙果芹 DXR (AUZ98410.1)	H K K K Q C I Q G	238
地黄 DXR (ANW06222.1)	H K K K Q C I Q G	239
中华猕猴桃变种 DXR (PSR89583.1)	H K N Q C I Q G	238
consensus	n k e t l i a g g p f v l p l a k h v i l p a d s e h s a i f l	
山茱萸 DXR	A R C S .	242
野茶树 DXR (AKE33276.1)	P E A L R R	244
软枣猕猴桃 DXR (AID55340.1)	P E A L R R	245
罗美木 DXR (AAY87151.2)	P E A L R R	246
桂花 DXR (AOT86857.1)	S E A L R R	246
风铃木 DXR (PIN15525.1)	P E A L R R	246
阿米糙果芹 DXR (AUZ98410.1)	P E A L R R	245
地黄 DXR (ANW06222.1)	P E A L R R	246
中华猕猴桃变种 DXR (PSR89583.1)	P E A L R R	245
consensus	g	

图 5 CoDXR 的多重序列比对

Fig. 5 Multiple sequence alignment of CoDXR

Rehmannia glutinosa 的 DXR (ANW06222.1)、中华猕猴桃变种 *Actinidia chinensis* var. *chinensis* 的 DXR (PSR89583.1) 具有较高的序列相似性。通过 MEGA 软件构建的系统进化树见图 6。结果表明, CoDXR 基因所编码的蛋白质与野茶树的 DXR 基因编码的蛋白的亲缘关系较近, 而与风铃木的 DXR 基因和地黄的 DXR 基因编码的蛋白的亲缘关系较远。

3 讨论

天然药物的主要来源一般都是药用植物经过次级代谢产生的次生代谢物质。山茱萸是中国传统药材, 其中的黄酮类化合物以及环烯醚萜类化合物在

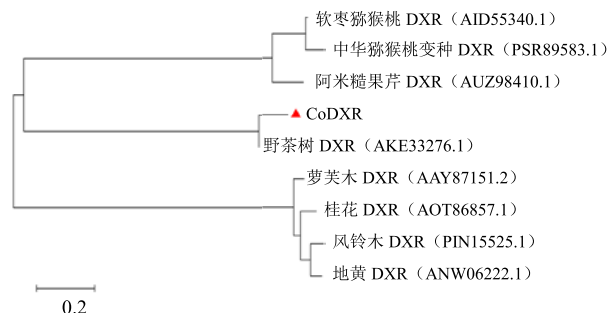


图 6 CoDXR 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Neighbor-joining phylogenetic tree of CoDXR protein

其药理活性方面发挥了巨大作用。以往对于次生代谢产物研究主要集中在其结构与功能方面^[20-22]。近年来,对于其合成途径关键基因的克隆及其分子机制的解析研究报道较多^[23-26]。在植物的次生代谢途径中,MEP途径的主要作用是提供合成环烯醚萜或单萜、二萜、胡萝卜素的生物合成前体^[27],而在MEP途径中的DXR既是此途径中的第二个限速酶,又是此途径中的上游关键基因^[15],因此DXR基因编码的蛋白在萜类物质的合成中具有不可忽视的作用^[28-29]。

本研究首次在转录组测序的基础上,成功克隆山茱萸MEP代谢途径中的DXR基因并进行了相关的生物信息学分析和功能预测,在红豆杉^[30]、地黄^[31]、杜果^[32]、冬凌草^[33]、银杏^[34]等植物中也有类似报道。Carretero-Paulet等^[29]通过实验研究证明DXR基因在拟南芥中可以在不影响上游基因活性的情况下过表达来增加转基因植物中萜类物质的合成量。Mahmoud等^[35]在对胡椒薄荷的研究中发现DXR基因的过量表达是促使薄荷叶片中的薄荷精油量提高的直接原因。

由于DXR基因在MEP途径中的重要作用,所以通过借助对DXR基因及其编码蛋白的研究并对其进行相关的功能预测分析,在对MEP途径的研究中起到了极为重要的作用,并为此后研究该基因在山茱萸中是否调控萜类物质的合成以及研究山茱萸中其他次生代谢物质的合成奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 胡文光, 胡琳贞, 宋滋圃, 等. 中国植物志. 第五十六卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] 陈延惠, 冯建灿, 郑先波, 等. 山茱萸研究现状与展望 [J]. 经济林研究, 2012, 30(1): 143-150.
- [3] 黄梅桂, 徐云巧, 张忠明, 等. 薰衣草残渣中黄酮的超声辅助提取工艺及其抗氧化活性 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 214-220.
- [4] 张程荣, 曹岗, 张云, 等. 山茱萸的化学、药理与炮制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(9): 2002-2005.
- [5] 周京华, 李春生, 李电东. 山茱萸有效化学成分的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11): 808-812.
- [6] Chen L, Zhang Y, Jin L, et al. Preparation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Fallopia multiflora* (Thunb.) Haralld [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 108: 259-262.
- [7] Liu Y, Sun Y Y, Huang G L. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 780-786.
- [8] Hatano T, Yasuhara T, Abe R, et al. A galloylated monoterpene glucoside and a dimeric hydrolysable tannin from *Cornus officinalis* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(9): 2975-2978.
- [9] 徐丽珍, 李慧颖, 田磊, 等. 山茱萸化学成分的研究 [J]. 中草药, 1995, 26(2): 62-65.
- [10] Eisenreich W, Menhard B, Hylands P J, et al. Studies on the biosynthesis of taxol: The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(13): 6431-6436.
- [11] Rohmer M, Knani M, Simonin P, et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [J]. *Biochem J*, 1993, 295(2): 517-524.
- [12] Lange B M, Croteau R. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: Cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 365(1): 170-174.
- [13] Lange B M, Wildung M R, Stauber E J, et al. Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(6): 2934-2939.
- [14] Schwender J, Gemunden C, Lichtenthaler H K. Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids [J]. *Planta*, 2001, 212(3): 416-423.
- [15] 郑汉, 荆礼, 姚娜, 等. 香樟 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因 *CcDXR1* 的克隆与表达分析 [J]. 药学学报, 2016, 51(9): 1494-1501.
- [16] 张松涛, 陈红丽, 崔红, 等. 植物MEP途径的代谢调控机制 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(7): 1500-1504.
- [17] 章莹, 宗红英, 何立, 等. 刚地弓形虫DXR基因的克隆表达与生物学特性分析 [J]. 中国人兽患病学报, 2016, 32(12): 1091-1095.
- [18] 魏麟, 黎晓英, 刘胜贵, 等. 鱼腥草HMGR基因cDNA克隆、差异表达及蛋白质结构分析 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3815-3819.
- [19] 王浩君, 蒲祥, 梅抗抗, 等. 油橄榄转录组数据库中HMGR基因的挖掘及生物信息学分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(8): 3011-3024.
- [20] Liu X Y, Yu H N, Gao S, et al. The isolation and functional characterization of three liverwort genes encoding cinnamate 4-hydroxylase [J]. *Plant Physiol*

- Biochem*, 2017, 117: 42-50.
- [21] Govindan B, Johnson A J, Viswanathan G, *et al.* Secondary metabolites from the unique bamboo, *Melocanna baccifera* [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(1): 122-125.
- [22] Hautbergue T, Jamin E L, Debrauwer L, *et al.* From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2018, 35(2): 147-173.
- [23] 李清, 李标, 郭顺星. 金钗石斛焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶基因的克隆及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(2): 850-858.
- [24] Xu Z C, Ji A J, Zhang X, *et al.* Biosynthesis and regulation of active compounds in medicinal model plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(1): 3-11.
- [25] 方芳, 王凤忠. 植物黄酮醇生物合成关键基因研究进展 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(14): 335-340.
- [26] 梁焯, 邹才华, 李近都, 等. 石斛药用次生代谢产物及其基因克隆研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5511-5514.
- [27] Vranova E, Coman D, Gruissem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64(1): 665-700.
- [28] Brown A C, Parish T. Dxr is essential in *Mycobacterium tuberculosis* and fosmidomycin resistance is due to a lack of uptake [J]. *BMC Microbiol*, 2008, 20(8): 78.
- [29] Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, *et al.* Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 62(4/5): 683-695.
- [30] 郑清平, 余龙江, 刘智, 等. 红豆杉细胞非甲羟戊酸途径关键酶基因 *dxr* 的克隆与分析 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(4): 548-552.
- [31] 朱昀昊, 董诚明, 俎梦航, 等. 地黄 *RgDXR* 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2017, 53(4): 563-571.
- [32] 盖江涛, 白蓓蓓, 叶秀旭, 等. 杠果中 *DXR* 基因的鉴定及与其他果树的比较分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(21): 6938-6944.
- [33] 苏秀红, 尹磊, 陈随清. 冬凌草 1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)基因克隆与分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(12): 37-41.
- [34] Kim S M, Kuzuyama T, Chang Y J, *et al.* Identification of class 2 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate synthase and 1-deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate reductoisomerase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis [J]. *Planta Med*, 2006, 72(3): 234-240.
- [35] Mahmoud S S, Croteau R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8915-8920.