

图6 水杨酸对毛百合试管鳞茎形成和膨大的影响

表1 试管鳞茎直径的大小对移栽成活率的影响

试管鳞茎直径 (mm)	成活率 (%)	生长状况
3 ~ <5	64	长势较弱, 叶片黄绿色
5 ~ <8	83	长势一般, 叶片绿色
≥8	96	长势较强, 叶片浓绿

## 参考文献:

- [1] 杨艳清. 野生花卉毛百合有性繁殖技术[J]. 北方园艺, 2006(5): 156-157.
- [2] 吉林省中医药研究所. 长白山自然保护区管理局, 东北师范大学生物学报. 长白山植物药志[M]. 长春: 吉林人民出版社, 1982.
- [3] 张教方, 张显国, 于海滨, 等. 毛百合繁殖生物学研究 I. 毛百合的自然生长与繁殖[J]. 植物研究, 1992, 12(3): 301-307.
- [4] 杨利平, 宋满珍, 张晶. 光照和温度对百合属6种植物种子萌发的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(4): 14-18.
- [5] 张教方, 刘晓东, 刘宏伟, 等. 毛百合繁殖生物学研究 II. 光照梯度上的形态性状差异与繁殖对策[J]. 植物研究, 1993, 13(3): 285-293.
- [6] 胡凤荣, 刘光欣, 席梦利, 等. 毛百合根尖染色体 Giemsa C-带分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(1): 87-90.
- [7] 唐翠. 毛百合的核型分析[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2008, 24(3): 85-88.
- [8] 苏彩霞, 霍秀文, 李惠芝, 等. 野生毛百合植株再生体系的建立[J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2013, 34(6): 23-26.
- [9] 岳桦, 朱虹, 张显峰, 等. 毛百合的切花保鲜技术[J]. 东北林业大学学报, 1999, 27(2): 68-71.
- [10] 朱官有, 倪立伟, 刘秀华, 等. 毛百合的栽培[J]. 北方园艺, 1993(3): 19.
- [11] 张赫方, 杨利平, 丁冰. 卫星搭载对毛百合的影响[J]. 空间科学学报, 1996, 16(S1): 165.
- [12] 纪莹, 雷家军, 李明艳. 毛百合与布鲁拉诺杂交后代的抗寒性研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(1): 109-113.
- [13] 张延龙, 梁建丽, 牛立新. 东方百合试管鳞茎膨大的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(6): 75-78.
- [14] Lim S, Seon J H, Paek K Y, et al. Development of pilot scale process for mass production of *Lilium* bulblets *in vitro* [J]. Acta Horticulturae, 1998, 461: 237-241.
- [15] 王晓丽, 韩立群, 刘杰, 等. 活性炭和多效唑对垂花百合试管鳞茎膨大的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(19): 11429-11430.
- [16] 王家福, 陈振光. 百合快速繁殖条件的优化[J]. 福建农业学报, 1999, 28(2): 152-156.
- [17] 席梦利, 胡凤荣, 刘光欣, 等. 宜兴百合组培快繁体系的建立[J]. 林业科技开发, 2006, 20(6): 69-70.
- [18] 谢杰, 余沛涛, 王全喜. 宜兴百合的组织培养和快速繁殖[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2006, 35(5): 76-82.
- [19] Raskin I. Role of salicylic acid in plant [J]. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 1992, 43: 439-463.
- [20] 张洁, 蔡宣梅, 林真, 等. 百合试管鳞茎诱导及膨大技术的研究[J]. 福建农业学报, 2010, 25(3): 328-331.
- [21] 刘芳, 周蕴薇. 水杨酸对两个品种百合鳞茎膨大的作用及其与内源激素含量的关系[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(11): 1085-1088.

齐小琼,胡晨熙,李大卫. 篦子三尖杉牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶基因的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):79-82.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.020

# 篦子三尖杉牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶基因的克隆与序列分析

齐小琼<sup>1</sup>, 胡晨熙<sup>1</sup>, 李大卫<sup>2</sup>

(1. 湖北第二师范学院化学与生命科学学院/植物抗癌活性物质提纯与应用湖北省重点实验室,湖北武汉 430205;

2. 中国科学院武汉植物园植物种质创新与特色农业重点实验室,湖北武汉 430074)

**摘要:**三尖杉是我国特有植物,主要含有生物碱、黄酮及萜类等生物活性物质。以篦子三尖杉为试验材料,根据同源克隆的方法扩增三尖杉牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶(GGPPS)基因,并通过生物信息的方法对该基因进行鉴定和分析。结果表明,篦子三尖杉 GGPPS 基因全长 1 217 bp,含有 1 个完整的 1 182 bp 开放阅读框(ORF),编码 393 个氨基酸的蛋白序列,GGPPS 蛋白相对分子量为 43.042 ku,理论等电点(pI)为 6.57,其二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲组成;蛋白质同源分析表明,三尖杉 GGPPS 含有多聚异戊二烯基合成酶家族中保守的 5 个特征性结构和 2 个富含天冬氨酸的区域;同源模建分析显示,三尖杉 GGPPS 具有 GGPPS 蛋白典型的三维结构,特别与薄荷 GGPPS 蛋白的三维结构及活性位点极其相似;系统进化分析表明,三尖杉 GGPPS 蛋白归属植物进化支,且与加拿大红豆杉、曼地亚红豆杉、海南粗榧的 GGPPS 蛋白归为同一分支。

**关键词:**篦子三尖杉;萜类化合物;牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶(GGPPS);克隆;序列分析;同源模建;系统进化  
**中图分类号:**S188;Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)04-0079-04

萜类化合物是植物代谢中数量最多的一类代谢物,以异戊二烯为结构单元,在植物的光合作用、呼吸作用、生长、发育、繁殖、信号转导和防御中发挥重要作用。植物中存在的某些萜类具有重要的经济价值和药用价值,如红豆杉(*Taxus*)中的二萜紫杉醇<sup>[1]</sup>、银杏(*Ginkgo biloba*)中的二萜银杏内酯和倍半萜白果内酯<sup>[2-3]</sup>、青蒿(*Artemisia annua*)中的倍半萜青蒿素<sup>[4]</sup>等。三尖杉属(*Cephalotaxus*)植物主要含有生物碱、黄酮类化学成分,其中的三尖杉酯类生物碱由于具有明显的抗癌活性得到了深入研究,关于黄酮类成分的研究较少。除此之外还含有一些萜类化合物,如二萜类的海松酸、柳杉酚等,初步研究表明,该类化合物对微生物有抑制作用<sup>[5]</sup>。牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)是包括紫杉醇、银杏内酯、海松酸、柳杉酚在内的所有二萜类化合物的共同前体,由牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶(geranylgeranyl pyrophosphate synthase, GGPPS)催化,通过类异戊二烯合成途径生成。在该反应途径中,GGPPS 催化 15 C 的法呢基焦磷酸(farnesylpyrophosphate, FPP)与 5 C 的异戊烯焦磷酸(isopentenylallyl diphosphate, IPP)缩合生成 GGPP<sup>[6-7]</sup>。因此,GGPPS 是红豆杉植物合成紫杉醇、银杏合成银杏内酯、三尖杉属植物合成海松酸和柳杉酚的关键酶之一。在三尖杉中克隆该基因并分析其序列的结构特征和进化模式,将为后续的功能研究和

基因工程、代谢工程等技术手段大量获得有用产物奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 篦子三尖杉(*Cephalotaxus oliveri*)摘采于中国科学院武汉植物园,取其嫩叶立即置于液氮中保存备用。

1.1.2 主要分子生物学试剂 普通 Taq DNA 聚合酶、高保真 LA Taq 酶、dNTP 等试剂,购自 TaKaRa;DNA 凝胶纯化回收试剂盒,购于 Axygen 生物技术有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 篦子三尖杉 GGPPS 基因的克隆

1.2.1.1 引物的设计 用加拿大红豆杉(*Taxus canadensis*) GGPPS 蛋白(登录号:AAD16018)作为查询序列,进行 Blastp 相似性搜索,在三尖杉属植物海南粗榧(*C. hainanensis*)中得到 1 条同目标序列相似性较高的序列(登录号:GBHQ10039.1)。根据这条序列设计 3 对特异引物(分别位于中部和左右端部),详见表 1。

表 1 3 对特异引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
F1-1	GTAGCCAGTTATAGGCAATAGA
R1-2	GAAGACCTTATGATTTGTGGG
F2-1	ATAAGGCACTAGATAAAGCAATCC
R2-2	ATCGTCTCTGTAGCACCACC
F3-1	CTGATAGGACTTTGAGGCTGA
R3-2	CATTGCTATTGAAGCCTTTGTA

1.2.1.2 篦子三尖杉 GGPPS 基因的分段扩增 以提取的篦子三尖杉总 DNA 为模板,分别以 F1-1、R1-2、F2-1、R2-2、F3-1、R3-2 为引物进行 PCR 扩增。扩增体系为 25  $\mu$ L,

收稿日期:2015-09-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201242);湖北省自然科学基金(编号:2015CFB508);植物抗癌活性物质提纯与应用湖北省重点实验室开放课题(编号:HLPAL2014004)。

作者简介:齐小琼(1981—),女,山东昌邑人,博士,讲师,主要从事分子进化研究。E-mail:108816564@qq.com。

包含 2.5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  plus), 2  $\mu\text{L}$  dNTP 混合物 (每种 2.5 mmol/L), 各 1  $\mu\text{L}$  引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  Ex - *Taq* (2 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  DNA 模板 (25 ng/ $\mu\text{L}$ ), 补加 17  $\mu\text{L}$  的水。反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 53  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 36 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min。

PCR 结束后, 进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳, 对扩增的 DNA 进行检测。

1.2.2 产物回收、测序 扩增片段的凝胶回收按照试剂盒说明书进行操作, 将回收的目的片段送华大基因测序。

### 1.3 数据分析方法

采用 BioEdit (North Carolina State University) 软件对克隆测序得到的片段进行拼接。采用 ORF finder 进行开放阅读框确定。运用 DNASTar 软件推测氨基酸序列, 运用分析蛋白质物理化学的 ExPASy ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/protparam>) 分析蛋白质的分子量、理论等电点、氨基酸组成。查询 Prosite 数据库查找蛋白质含有的序列模式和功能域, 使用在线软件 SOPMA 程序 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 预测蛋白质二级结构并计算各种二级结构所占百分比。使用 SWISS - MODEL 服务器<sup>[8-10]</sup> (<http://swissmodel.expasy.org/>), 基于同源建模的原理, 进行篮子三尖杉 GGPPS 三级结构的预测,

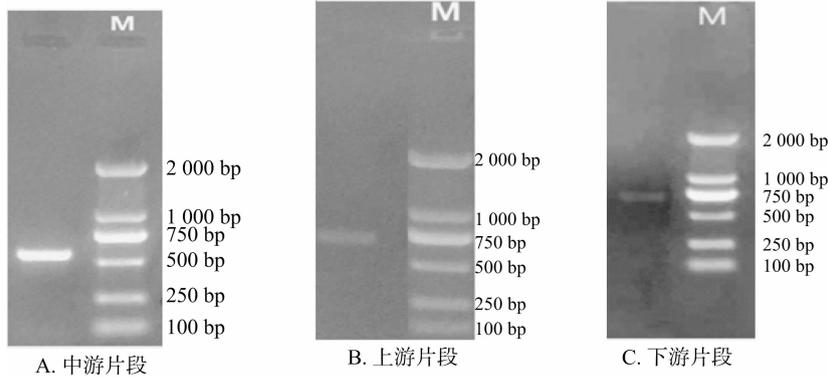


图1 篮子三尖杉 GGPPS 基因扩增产物电泳结果

### 2.2 篮子三尖杉 GGPPS 蛋白质序列结构特征分析

篮子三尖杉 GGPPS 基因完整的开放阅读框 (ORF) 长为 1 182 bp, 编码 393 个氨基酸 (图 2), 相对分子质量约为 43.042 ku, 理论等电点为 6.57。在氨基酸序列中, 含量最高的为丙氨酸 (Ala, 39 个)、亮氨酸 (Leu, 39 个), 均占 9.92%; 其次是赖氨酸 (Lys, 33 个, 占 8.40%)、天门冬氨酸 (Asp, 29 个, 占 7.28%)、苏氨酸 (Thr, 27 个, 占 6.87%)、缬氨酸 (Val, 27 个, 占 6.87%)。酸性氨基酸 [天门冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)] 总数 52 个, 碱性氨基酸 [精氨酸 (Arg)、赖氨酸 (Lys)] 50 个; 总亲水性平均系数为 -0.147。Prosite 数据库比对发现, 三尖杉 GGPPS 蛋白序列的 177 ~ 193 氨基酸位 (氨基酸序列: LlhDDlpcmDnddRRG) 和 311 ~ 323 氨基酸位 (氨基酸序列: VGllhFQvDDIId) 分别是 2 个多聚异戊二烯基合成酶的特异序列 (图 3)。

SOPMA 分析表明,  $\alpha$  - 螺旋 (alpha helix, Hh)、无规则卷曲 (random coil, Cc) 是三尖杉 GGPPS 蛋白质二级结构的主要成分, 组成  $\alpha$  - 螺旋、无规则卷曲、延伸链氨基酸比例分别为 45.80%、41.48%、12.72%, 不含其他结构。蛋白质三级结构

预测结果用 PyMOL 软件展示和编辑。

以篮子三尖杉 GGPPS 蛋白作为查询序列, 运用 Blast 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列相似性搜索, 并选取相似性较高的序列用 MEGA 6 软件<sup>[11]</sup> 中的邻接算法进行进化树的构建, 其中多重序列比对使用 Clustalx 软件进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 篮子三尖杉 GGPPS 序列的获得与分析

采用改良的 CTAB 法获取篮子三尖杉总 DNA, 并通过电泳进行纯度检测, 结果见图 1。用引物 F2 - 1、R2 - 2 进行 PCR 扩增, 最终获得 560 bp 左右的三尖杉 GGPPS 的中间片段 (图 1 - A)。分别以引物 F1 - 1、R1 - 2、F3 - 1、R3 - 2 进行 PCR 扩增, 最终分别获得 700、750 bp 左右的上、下游片段 (图 1 - B、1 - C)。产物经回收纯化和测序, 用 BioEditor 软件进行拼接, 获得 1 条总长为 1 217 bp 的 GGPPS DNA 序列。用 ORF Finder 软件预测开放阅读框 (ORF), 结果显示: 该 DNA 序列包含 1 段 1 182 bp 的完整编码区, 编码 393 个氨基酸。将获得的基因组 DNA 序列与已报道的海南粗榧 mRNA 进行比对发现, 篮子三尖杉 GGPPS 基因不含有内含子, 与大多数植物一样, 在外显子 - 内含子的进化上是保守的。

是在二级结构的基础上进一步盘绕、折叠形成的, 决定了蛋白质的功能。在 SWISS - MODEL 服务器上预测篮子三尖杉 GGPPS 蛋白的三维结构, 结果显示, 与薄荷 (*Mentha piperita*) GGPPS 蛋白同源性最高 (PDB ID: 3krp. 2. A), 为 68.37%。以此结构为模型构建篮子三尖杉的三级结构, 发现该蛋白具有植物 GGPPS 蛋白典型的三维结构, 说明功能也非常类似, 该蛋白在进化上很保守 (图 4)。

### 2.3 GGPPS 蛋白质同源性分析与系统进化树构建

Blast 比对结果显示, 三尖杉 GGPPS 蛋白质序列与已报道的海南粗榧 (*C. hainanensis*)、加拿大红豆杉 (*T. Canadensis*)、曼地亚红豆杉 (*Taxus xmedia*)、挪威云杉 (*Picea abies*)、银杏 (*Ginkgo biloba*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、北美冷杉 (*Abies grandis*)、马尾松 (*Pinus massoniana*)、橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)、巴豆 (*Croton sublyratus*)、大豆 (*Glycine max*)、美花烟草 (*Nicotiana glauca*) 等 12 种高等植物 GGPPS 蛋白质的一致性分别为 98.9%、89.5%、88.8%、70.4%、70.1%、54.3%、69.4%、67.6%、54.0%、54.5%、54.4%、54.5%。多序列同源比对分析结果表明, 不同植物来源的 GGPPS 蛋白质

```

1 TTATAGGCAATAGAAGATGGCTTACATGGCAATGACCGCAAATACCCAGAGCCGGCAT
   M A Y M A M T A N T Q S R H
59 CTCTCTACTGTTGCTTCTTATCAAGATTGCAATAGTATGAAGACTTGTTTAAATTC
   L S T V A S Y Q D C N S M K T C F K F T
117 CACCCTGTAAAAGTTCTCATCGAGTGAATTTGAATTTCCCTTTGTGTGTTGCTTCTAA
   P C K S S H R V N L N F P F V V A S N
175 TGGTGAGATAATGGGTCACCTGAGACTCGGGTCATFGCCATATAAACAAATATTCAGTG
   G E I M G H L R L G S L P Y K Q Y S V
233 TCGTCTAAGCGACAAAACAATGGCCAGTTGGCTGATTGGCTAAAACAGAGAGAAG
   S S K R T T K T M A Q L A D L A K T E K E
291 AGAAGGAGAAGGATATTGGATTTGATTTCAAAGAGTACATGAAGTCCAAGGCTGTGGC
   K E K D I G F D F K E Y M K S K A V A
349 AGTGATAAGGCACTAGATAAAGCAATCCCAGTTGAATATCCTGAAAAATACATGAA
   V D K A L D K A I P V E Y P E K I H E
407 TCAATGAGGTATTCACTTTTAGCAGGAGGTAAGCGCGTTAGGCCCTGCTCTGTGCATTG
   S M R Y S L L A G G K R V R P A L C I A
465 CAGCATGTGAACCTTGTAGGAGGGACTCAGGATCTGGCGATGCCAACTGCCTGTGCAAT
   A C E L V G G T Q D L A M P T A C A M
523 GGAGATGATTCATACCATGCTCTGATTCATGATGACTTGCCTTGCATGGACAATGAC
   E M I H T M S L I H D D L P C M D N D C
581 GATTTCAGAAGAGGGAAGCCACAAATCATAAGGTCTTTGGAGAGGACACTGCTGTTC
   D F R R G K P T N H K V F G E D T A V L
639 TTGAGGGGATGCTCTGCTTTCATTTGCATTTGAGCATATTGCAGTGGCTACAAGCAA
   A G D A L L S F A F E H I A V A T S K
697 GACTGTGCTACTGATAGGACTTTGAGGGTGATATCTGAATTGGTAAAGACAATAGGC
   T V P T D R T L R V I S E L G K T I G
755 TCTCAAGGCTTGTAGGGGACAGGTTGTTGATATTACATCTGAGGGGATGCTACTG
   S Q G L V G G Q V V D I T S E G D A T V
813 TTGACCTTAAAACCTGGAATGGATTCATATACACAAGACTGCCGTCTCTTGAATG
   D L K T L E W I H I H K T A V L V L E C
871 TTCAGTTGTGAGTGGAGGGATCCTTGGTGGTCTACAGAGGACGATATTGATAGAATT
   S V V S G G I L G G A T E D D I D R I
929 CGGAGGTACGCCCGGTGTGTGGGCTTCTGTTTCAGGTTTGGATGACATACTTGTATG
   R R Y A R C V G L L F Q V V D D I L D V
987 TCACTAAATCTTCTGAAGAACTGGGGAAGACTGCGAGGAAGATTGCTAATCTGATAA
   T K S S E E L G K T A G K D L L T D K
1045 GGCTACTTATCCCAAGTTAATGGGTCTGGAGAAAGCAAAGAATTTGCGCGGATTTG
   A T Y P K L M G L E K A K E F A A D L
1103 GTGAAGAGAGCCAAGGAAGAGCTGTCTTCTCTTGTATCCAATAAAGGCTGCACCTTGT
   V K R A K E E L S S F D P I K A A P L L
1161 TGGTCTTGCAGATTACATTGCATTCAGGCCAAAACGAAATCAAAGCTATAAAGCTAT
   G L A D Y I A F R Q N
1219 TTTTATTTTTTACATATGCACACTGTTTTTTTTTCACATCTGTTGAAAATTAGAAAAA
    
```

图2 篮子三尖杉GGPPS全长DNA序列及其编码的氨基酸



图3 篮子三尖杉GGPPS蛋白质序列的特征性结构



图4 篮子三尖杉GGPPS蛋白的三维结构

的N末端差异很大,C末端保守性强。GGPPS蛋白在结构和功能上属于多聚异戊二烯合成酶家族,该家族具有5个保守功能域(I~V),5个保守区域中包含2个富含天冬氨酸区

域:DDXXXD、DDXXD。在篮子三尖杉GGPPS氨基酸序列中存在这样的5个保守结构域,结构域II、结构域V中也分别发现富含天冬氨酸的基序DDLPCMD、DDILD(图5)。

采用Neighbor-joining算法,在MEGA6软件平台上构建植物GGPPS的分子系统进化树(图6)。对比植物GGPPS分子系统进化树,三尖杉GGPPS蛋白归属于裸子植物进化支,且与海南粗榧、加拿大红豆杉、挪威云杉、北美冷杉、马尾松的GGPPS蛋白归为同一小分支(图6)。被子植物、裸子植物GGPPS各形成独立的分支,两者形成姊妹关系,说明这两大分支从同一祖先平行分化而来;该基因树与物种树基本吻合,说明该基因的进化与物种的分化基本一致。

### 3 结论

通过PCR技术克隆获得的篮子三尖杉GGPPS DNA序列长度为1217 bp,含有1182 bp的完整开放阅读框。三维结构模拟表明:该蛋白具有GGPPS蛋白典型的三维结构;多重序列比对显示,三尖杉GGPPS蛋白与其他物种来源的GGPPS蛋白相似性较高,尤其是与海南粗榧、加拿大红豆杉、曼地亚

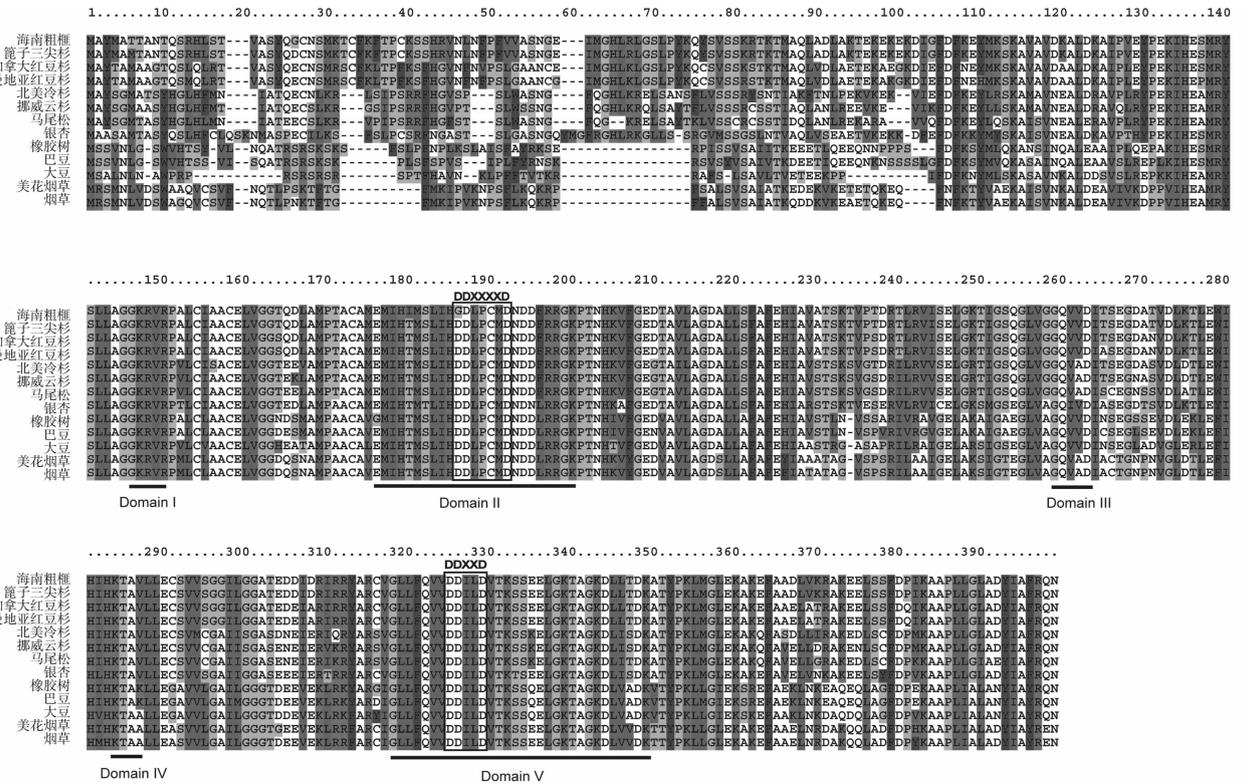


图5 不同物种 GGPPS 氨基酸序列比对结果

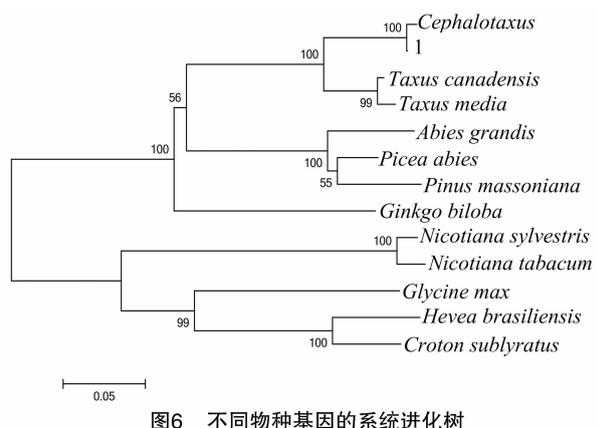


图6 不同物种基因的系统进化树

红豆杉的 GGPPS 相似性高达 88% 以上, 它们都包含多聚异戊二烯合成酶家族的 5 个保守性结构域(图 5)。在三尖杉 GGPPS 蛋白的氨基酸序列的 177 ~ 193、311 ~ 323 位分别是 2 个多聚异戊二烯基合成酶的特异序列 LhDDLpcmDnddRRG、VGIHFQVvDDIID(图 3), 这 2 个保守的富含天冬氨酸的区域位于酶的催化活性位点, 与 IPP 烯丙基底物的结合有关。从结构到功能预测都显示, 克隆的基因具有典型的 GGPPS 特征, 因此克隆的篮子三尖杉 GGPPS 编码蛋白很可能参与或调节了三尖杉二萜类物质的生物合成, 但完全阐明三尖杉萜类化合物的生物合成和调控机制还需要进行进一步试验验证。

参考文献:

[1] 占爱瑶, 由香玲, 詹亚光. 植物萜类化合物的生物合成及应用[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(1): 131 - 135.

[2] 朱俊, 许锋, 廖咏玲. 银杏萜内酯调控研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 301 - 305.

[3] 张洪娟, 谭碧娟, 曹福亮. 银杏 GbGGPS 基因的克隆及序列分析[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2013, 37(4): 8 - 12.

[4] 陈大华, 叶和春, 李国风, 等. 植物类异戊二烯代谢途径的分子生物学研究进展[J]. 植物学报, 2000, 42(6): 551 - 558.

[5] Politi M, Braca A, de Tommasi N, et al. Antimicrobial diterpenes from the seeds of *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* [J]. *Planta Medica*, 2003, 69(5): 468 - 470.

[6] Lange B M, Rujan T, Martin W, et al. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(24): 13172 - 13177.

[7] Rodríguez - Concepción M, Boronati A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(3): 1079 - 1089.

[8] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS - MODEL: modeling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W252 - W258.

[9] 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.

[10] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 343 - 350.

[11] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725 - 2729.