

冯立娟,焦其庆,尹燕雷,等. 石榴果皮 *DHQ/SDH* 基因的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):26-29.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.008

# 石榴果皮 *DHQ/SDH* 基因的克隆及序列分析

冯立娟<sup>1</sup>, 焦其庆<sup>1</sup>, 尹燕雷<sup>1</sup>, 李甲梁<sup>2</sup>

(1. 山东省果树研究所, 山东泰安 271000; 2. 枣庄市农业科学研究院, 山东枣庄 277300)

**摘要:**以泰山红石榴果实为试验材料,利用逆转录 PCR (RT-PCR) 技术扩增出 980 bp 大小的中间片段,用 3'cDNA 末端快速扩增 PCR (RACE PCR) 获得 *DHQ/SDH* 基因的 3'端,拼接后获得 1 585 bp 的 cDNA 片段。结果表明,该基因含有 1 265 bp 编码序列 (CDS),编码 421 个氨基酸,其氨基酸序列与苹果 (注册号:XP\_008370537.1)、葡萄 (注册号:XP\_002270232.1)、白梨 (注册号:XP\_009335660.1) 的同源性分别为 82%、84%、82%;蛋白质理论分子质量为 133 682.2 u,等电点为 5.01,含量最丰富的氨基酸是丙氨酸 (Ala)、半胱氨酸 (Cys)、甘氨酸 (Gly)、苏氨酸 (Thr),具有 DHQase I、SDH (AroE) 2 个保守结构域,为亲水性蛋白;二级结构主要由无规则卷曲 (31.12%)、 $\alpha$ -螺旋 (30.17%)、伸展链 (24.94%) 和  $\beta$ -转角 (13.78%) 组成;GenBank 登录号为 KU133479。

**关键词:**石榴;*DHQ/SDH* 基因;克隆;序列分析

**中图分类号:** S665.401; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0026-04

石榴 (*Punica granatum* L.) 是一种重要的功能性水果,富含类黄酮、酚酸和鞣花单宁等可溶性酚类物质,市场发展前景广阔<sup>[1]</sup>。没食子酸是石榴果实中重要的酚类物质,具有抗肿瘤<sup>[2]</sup>、抗氧化<sup>[3]</sup>、抗炎抗菌<sup>[4-5]</sup> 等诸多功效,生物学效应广泛<sup>[6]</sup>。莽草酸途径在植物次生代谢途径中起到中心作用,可为其他次生代谢途径提供底物。研究表明,没食子酸主要通过莽草酸途径生成的 3-脱氢莽草酸代谢生成<sup>[7-8]</sup>。

脱氢奎尼酸脱氢酶 (3-dehydroquinate dehydratase, 简称 DHQ)、莽草酸脱氢酶 (shikimate dehydrogenase, 简称 SDH) 分别催化莽草酸途径中的第 3、第 4 步反应,在大多数微生物中,DHQ、SDH 是单功能的,但是在植物中,DHQ、SDH 可以融合,形成具有 2 种功能的酶<sup>[9]</sup>。3-脱氢奎尼酸脱氢酶 (EC4.2.1.10)/莽草酸脱氢酶 (EC1.1.1.25) 双功能酶 (bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydro-

genase, 简称 DHQ/SDH) 能催化 3-脱氢奎尼酸脱水生成 3-脱氢莽草酸,也能催化 3-脱氢莽草酸、莽草酸之间的可逆还原反应,是没食子酸代谢途径中的关键调控酶<sup>[10]</sup>。编码 SDH 结构基因 *aroE* 的克隆、表达分析和功能鉴定在结核杆菌<sup>[11-12]</sup>、谷氨酸棒杆菌<sup>[13]</sup> 中已有报道。*DHQ/SDH* 基因 cDNA 的片段或全长序列已在豌豆<sup>[14]</sup>、烟草<sup>[15]</sup>、番茄<sup>[16]</sup> 等植物中被克隆出来,通过全基因组测序推测苹果、葡萄、白梨、桃等果树 *DHQ/SDH* 基因的片段或全长已在 GenBank 上注册,但是关于石榴中 *DHQ/SDH* 基因的克隆及序列分析等方面的研究在国内外尚未见报道。因此,本研究以山东省主栽石榴品种泰山红为试验材料,利用逆转录 PCR (RT-PCR) 技术克隆 *DHQ/SDH* 基因,对其进行生物信息学分析,从而为揭示石榴果实中没食子酸代谢的分子机制提供理论依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2015 年 6—9 月在山东省果树研究所进行。以泰山红石榴果实为试验材料,将其定植于山东省果树研究所石榴种质资源圃。于幼果期 (果实直径 2~3 cm) 采集石榴果实,洗净擦干后,用削皮刀取果皮,在液氮中速冻后放入 -80 °C 冰箱保存备用。

收稿日期:2015-11-17

基金项目:山东省自然科学基金 (编号:ZR2014YL022、ZR2015YL056);山东省果树研究所所长基金 (编号:2013KY04)。

作者简介:冯立娟 (1982—),女,山东聊城人,博士,助理研究员,主要从事果树遗传资源与育种研究。E-mail:flj\_19820227@163.com。  
通信作者:尹燕雷,硕士,副研究员,主要从事果树遗传资源与育种研究。E-mail:yylei66@sina.com。

[7] 唐耀平,刘 鹰,方显明. 山绿茶治疗老年单纯收缩期高血压 80 例分析[J]. 中医药学刊,2004,22(8):1502-1503.

[8] 解军波,李 萍. 冬青属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2002,33(1):85-88.

[9] 程齐来,李洪亮,彭金年. 山绿茶化学成分的研究[J]. 光谱实验室,2010,27(1):131-134.

[10] 张 蕊,王秀花,章建红,等. 3 种冬青属种子休眠过程中的生理变化[J]. 浙江林学院学报,2010,27(4):524-528.

[11] 徐本美,史晓华,孙涛涛,等. 大果冬青种子的休眠与萌发初探[J]. 种子,2002(3):1-2,5.

[12] 何彦峰. 狭叶冬青种子休眠与萌发的研究[J]. 浙江林业科技,

2008,28(3):63-65.

[13] 朱丽芳,史 俊,朱再标,等. 老鸦瓣芽茎组织培养初步研究[J]. 中草药,2014,45(4):563-568.

[14] 王慧瑜,张晓申,赵海红,等. 大叶冬青组培快繁技术研究[J]. 农业科技通讯,2012(10):69-70.

[15] 杨 灿,陈丽洁,黄小辉,等. 红果冬青组培快繁技术研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2014,34(4):356-359.

[16] 李林轩,吴庆华,蔡锦源,等. 五指毛桃组织培养获得再生植株的研究[J]. 中草药,2014,45(17):2547-2551.

[17] 叶祖云,阮少江,杨卓飞. 四倍体太子参种苗繁育技术体系的建立[J]. 中药材,2011,34(3):340-342.

## 1.2 试验方法

1.2.1 总RNA提取和cDNA第1链的合成 采用RNA Prep Pure Plant Kit[DP441,天根生化科技(北京)有限公司]提取石榴果皮的总RNA,用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,用NanoDrop紫外分光光度计测量吸光度,计算RNA纯度,即 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值。

以RNA溶液为模板, Oligo(dT)<sub>18</sub>为引物, 根据cDNA第1链合成试剂盒说明书反转录成cDNA第1链(K1622, Thermo Scientific)。

1.2.2 基因中间片段的克隆 根据已知物种同源序列的保守片段设计兼并引物, 进行PCR扩增。预计扩增片段大小为1 000 bp, 上游引物DHQ/SDH 1; 5' - GCVATGGAGYTVG-GRGCTGATT - 3'; 下游引物DHQ/SDH 2; 5' - GTTGTRTTB-GCRAGDAYCATVCC - 3'。50  $\mu$ L PCR反应体系: 25  $\mu$ L 2  $\times$  Ex Taq buffer, 1  $\mu$ L dNTP(10 mmol/L), 各1.5  $\mu$ L上、下游引物, 5  $\mu$ L cDNA, 1.0  $\mu$ L Ex Taq酶, 15  $\mu$ L灭菌蒸馏水。反应步骤: 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的片段克隆至pMD18-T载体后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 获得中间片段序列。

1.2.3 3'cDNA末端快速扩增PCR(RACE PCR)获得基因的3'端序列 根据获得的中间片段序列设计2对特异引物, 使用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(634923, Clontech)试剂盒获得该基因的3'端序列。

基因特异引物: 3' DHQ/SDH1, 5' - TGGTAAACTGTTT-GTCGTCATGGGTGC - 3'; 3' DHQ/SDH2, 5' - GCCAATCGCA-CATATGACAAAGCCAAA - 3'。下游引物为通用引物(UPM): 5' - CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT-GGTATCAACGCAGACT - 3'。首先用引物3' DHQ/SDH1、UPM进行第1轮扩增, 以得到的PCR产物为模板, 再用引物3' DHQ/SDH2、UPM进行第2轮PCR扩增。50  $\mu$ L PCR反应体系: 25  $\mu$ L 2  $\times$  Ex Taq buffer, 1  $\mu$ L dNTP(10 mmol/L), 各1.5  $\mu$ L上、下游引物, 5  $\mu$ L cDNA, 1.0  $\mu$ L Ex Taq酶, 15  $\mu$ L灭菌蒸馏水。反应步骤: 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的片段克隆至pMD18-T载体上, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 获得基因的3'端序列。

1.2.4 DHQ/SDH基因的生物信息学分析 分别利用NCBI的BLASTn、BLASTp进行核苷酸、氨基酸序列相似性分析, 利用DNAMAN软件进行多序列比对, DHQ/SDH基因编码蛋白的理化性质采用ProtParam预测, 疏水性/亲水性采用ProtScale进行预测, 利用ExPASy工具中的SOPMA软件编码蛋白的二级结构。

## 2 结果与分析

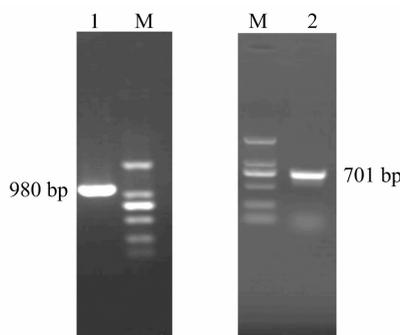
### 2.1 石榴果皮DHQ/SDH基因保守片段的克隆

用天根生化科技(北京)有限公司的RNA Prep Pure Plant Kit提取石榴果皮RNA, 以反转录cDNA为模板, 利用设计的兼并引物DHQ/SDH-1、DHQ/SDH-2进行PCR扩增, 获得980 bp大小的DHQ/SDH基因的中间片段(图1)。Blast比对分析表明, 该片段与苹果(*Malus domestica*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、白梨(*Pyrus bretschneideri*)、梅花(*Prunus mume*)等植物的DHQ/SDH基因有较高的同源性, 确认为石榴DHQ/SDH基因保守序列。

era)、白梨(*Pyrus bretschneideri*)、梅花(*Prunus mume*)等植物的DHQ/SDH基因有较高的同源性, 确认为石榴DHQ/SDH基因保守序列。

### 2.2 石榴果皮DHQ/SDH基因3'端序列的克隆

根据获得的保守序列设计2对特异引物, 3'RACE扩增得到701 bp的片段(图1)。根据测序结果将保守序列、3'端片段拼接后得到1 585 bp的cDNA片段, 该基因含有1 265 bp的编码序列(CDS), 编码421个氨基酸(图2), 编码的蛋白具有DHQase I、SDH(AroE)2个保守结构域(图3)。BLAST分析表明, 该基因片段的核苷酸序列与苹果、葡萄、白梨、桃(*Prunus persica*)和欧洲大叶杨(*Populus trichocarpa*)等植物的相似性达到了80%以上。



1—DHQ/SDH保守片段PCR扩增结果; 2—DHQ/SDH 3'RACE PCR扩增结果; M—DNA标准分子质量DL2000

图1 石榴DHQ/SDH基因扩增电泳结果

经比对, 该基因编码的氨基酸序列与苹果(注册号: XP\_008370537.1)、葡萄(注册号: XP\_002270232.1)、白梨(注册号: XP\_009335660.1)、碧桃(注册号: XP\_007207367.1)、梅花(注册号: XP\_008246555.1)、胡杨(*Populus euphratica*, 注册号: XP\_011024056.1)、麻疯树(*Jatropha curcas*, 注册号: XP\_012089148.1)、可可(*Theobroma cacao*, 注册号: XP\_007030110.1)和巨桉(*Eucalyptus grandis*, 注册号: XP\_010025117.1)等物种的同源性在80%以上(图4), 表明克隆到的片段为石榴果皮DHQ/SDH基因, GenBank登录号为KU133479。

### 2.3 DHQ/SDH基因的生物信息学分析

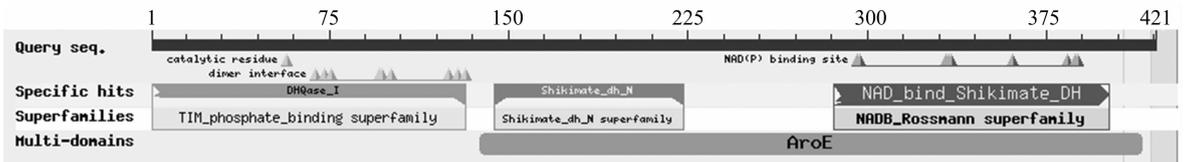
2.3.1 DHQ/SDH基因编码蛋白的理化性质、疏/亲水性分析 利用ExPASy Proteomics Server提供的在线工具ProtParam对DHQ/SDH基因编码蛋白的理化性质进行预测, 推测该蛋白的分子式为C<sub>4970</sub>H<sub>8326</sub>N<sub>1616</sub>O<sub>2088</sub>S<sub>298</sub>, 相对分子质量为133 682.2 u, 等电点(pI值)为5.01, 含量最丰富的氨基酸是丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr), 带正电荷(Asp + Glu)、负电荷(Arg + Lys)的氨基酸数均为0。该蛋白的不稳定系数为40.76, 脂肪系数为30.82, 亲水性系数为0.725。

利用在线分析软件ProtScale的Kyte andDoolittle算法对DHQ/SDH基因进行疏水/亲水性分析表明, DHQ/SDH蛋白存在明显的疏水区、亲水区, 其中第268位氨基酸疏水/亲水值最高, 为2.022, 第300位氨基酸最低, 为-2.556, 为亲水性蛋白。

1 ATT GAT GTT GAG CTT CAG GTA GCT CAT GAT TTC TAC AAA ACC ATT CAA GGG AAG AAA CCT  
 1 I D V E L Q V A H D F Y K T I Q G K K P  
 61 GAA AAG GTC AAA ATA ATT VTG TCT TCA CAC AAC TAT CAG AAT ACT CCA TCT CTT GAG GAA  
 21 E K V K A I T I V S S C H N Y Q N T P S L L E E  
 121 ATT GGC AAT CTC GTG GCA AGA ATA CAG GCT ACT GGA GCT GAT ATT GTG AAG GTT GCA ACA  
 41 I G N L V A R I C A T G A D I V K V A A T  
 181 ACT GCC GTA GAT ATC ACT GAC TCT GCA CGT ATA TTC CAA GGT CTT GTG CAT TCT CAA GTC  
 61 T C C V D I T D S A R I F Q V T L V G H S Q V  
 241 CCT ATG ATA GGA CTT GTG ATG GGT GAC AGG GGA TTC ATT TCA AGA ATT CTT AGT GCA AAA  
 81 P M I G L V M G D R G F I S R A I T S A K  
 301 TTT GGT GGG TTT CTC ACG TTT GGT TCG ATT GAG GCT GGG GTA GTA TCA GCT CCT GGG CAA  
 101 F G G F L T F G S I E A G V V S A P G G Q  
 361 CCA AGT ATA AAA GAT TTG TTG GAT TTA TAC AAT TTC AGA CTG CTA GGG CCT GAT ACC AAA  
 121 P S I K D L L D L Y N F R L L G G P D T C K  
 421 GTG CAT GGT GTT ATT GGG AAT CCT ATT GGA CAC AGC AAA AGT CCT CAT CTC TAC AAT CCC  
 141 V H G V I G N A T I G A C S K S P H L G Y N P  
 481 GCA TTC AAG TCC GTC AAT TTT AAT GGA ATT TAT CTG CCT CTG TTG GTT GAT AAT GTC GCA  
 161 A F K S V N F N G I Y L P L L V D N V A  
 541 AAT TTT CTC AAG ACT TAC TCA TCT CCT GAT TTT GTT GGA TAC AGT TAT CTG ATT CCT CAC  
 181 N F T C A G T T S P D F V G Y S Y T A C P C H  
 601 AAG GAA GCT GGG TTT AAT TGC TGC GAT GAG ATT GAT CCG ATT GCC AAG GAA ATA GGA GCT  
 201 K E A G F N C C D E I D P I A K E I G A  
 661 ATT AGT TGC ATG ATC AAG AGA CCT GAT GGG AAT CTA ATG GGC TAC AAT GTT GAC TAT CTT  
 221 I S C M I K R A P D G N L M G Y A N V D Y L  
 721 GGA GCC ATT GCA GCT ATC GAG GAA GGG CTT AGA GCA TCA AAT GGT GCA AGC CCC GTA TCT  
 241 G A I A A I E G A L F V V M G A G A S N G A S P V S  
 781 GGT TCT CCC TTG GCT GGT AAA CTG TTT GTC GTC ATG GGT GCT GGT GGT GCT GGA AAA GCA  
 261 G S P L A G K L F V V M G A G A G G A G K A  
 841 CTT GCT TTT GGT GGA AAA GAA AAG GGA GCA AGA GTC GTA GTT GCC AAT CGC ACA TAT GAC  
 281 L A F G G K E A G G A R V V V A N R T Y D  
 901 AAA GCC AAA CAA CTT GCC AAT AAA GTT GGA GGA GAA GCT ATA ACT CTT GCC GAA TTA GAA  
 301 K A A K Q L A N K V G G A E A I T T A E L E  
 961 AAT TTC CAT CCA GAA GAT GGG ATG ATT CTA GCA AAT ACT ACA TCT GTT GGA ATG AAA CCA  
 321 N F H P E D G M I L A N T T S V G M K P  
 1021 AAA ATT GAG GAC ACA CCC CTT TCG AAG AAA GCT CTG AAA CAC TAC TCT TTG GTT TTT GAT  
 341 K I E G D T P L S K K A A L K H Y S L V F D  
 1081 GCC ATT TAC ACA CCA AAA TTG ACC AGA CTC TTA AGA GAA GCA CAA GAG TCT GGA GCC ACA  
 361 A I Y T P K L T R L R E A Q E G A T G A T  
 1141 ATT GTT TAT GGG ACA GAA ATG TTC ATT AAC CAA GCA TTT GTA CAG TTT GAA AAG TTC AGT  
 381 I V Y G T E M F I N Q A F V Q F E K F S  
 1201 GGT CTG CCA GCA CCG AAG CAA CTG ATT AGG GAC ACT TTG GCA AGA AAC ACA AAA GAA GGA  
 401 G L P A P K Q L I R D T L A R N T K E A G  
 1261 ATA TAG CTG GTG ACT CTC ACT GCA GCA GCT GAA CCT ATG TTT CTC CAC TAG AGC TAT TTC  
 421 I \*  
 1321 ATT TCA ATT CTA AAA TGT GCC ATG ATC AGC TGT TGC ATT ATT CTG TTG AAA ACA ATA TAA  
 1381 TTT TCA TTT TTC TTT ATG GAG TGA CTT GTG ATC ATG AAT TTA ACA AGT TGT CAA GCT TGC  
 1441 CTT ATG CCG TGT ATA GGC AGC CAC AGA TAA CAG ATT ACG GCA GTT TCA CGA GAG AGG ATT  
 1501 CAT GTA GCC AAT TCT AAA TTT TTT GGA CAT GCT TTT GCA ATC AAG TTT AGA ATA GGA TGG  
 1561 GGT CAT TTG TCT CTC TTT TAT TCA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

TAG为终止密码子；左侧数字对应右侧的氨基酸、碱基位点；氨基酸采用缩写表示；“\*”表示氨基酸序列终止

图2 石榴 DHQ/SDH cDNA 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列



数字表示氨基酸位置

图3 石榴 DHQ/SDH 基因编码蛋白的功能结构域

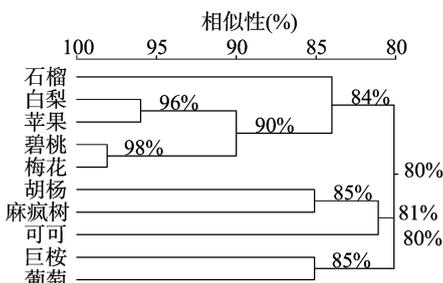


图4 不同植物 DHQ/SDH 基因氨基酸序列同源性比对

2.3.2 DHQ/SDH 基因编码蛋白的二级结构分析 利用 SOPMA 软件预测石榴 DHQ/SDH 基因编码蛋白二级结构表明,有 127 个氨基酸参与形成  $\alpha$ -螺旋(alpha helix), 占总氨基酸数的 30.17%; 有 58 个氨基酸参与形成  $\beta$ -转角(beta turn), 占总氨基酸数的 13.78%; 有 105 个氨基酸参与形成延伸链(extended strand), 占总氨基酸数的 24.94%; 有 131 个氨基酸参与形成无规则卷曲(random coil), 占总氨基酸数的 31.12%。结果表明, DHQ/SDH 基因编码蛋白的二级结构中含有丰富的  $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲结构。

### 3 讨论与结论

DHQ/SDH 双功能酶的优点就是在莽草酸途径中通过限制中间物在竞争途径中的质量而提高代谢物流通的效率<sup>[9]</sup>。苹果、白梨、葡萄等果树上 DHQ/SDH 基因序列主要通过全基因组测序预测得到,本研究首次利用 RT-PCR 技术从石榴果皮中分离得到 DHQ/SDH 基因 3'端 cDNA 序列,是国际上果树 DHQ/SDH 基因克隆的一大突破。

氨基酸序列分析表明,石榴 DHQ/SDH 基因与葡萄、苹果、白梨的同源性分别为 84%、82%、82%,推测石榴 DHQ/SDH 具有其他植物中 DHQ/SDH 的生物学功能,为进一步揭示 DHQ/SDH 的功能奠定了理论基础。DHQ/SDH 基因具有 DHQase I、SDH (AroE) 2 个保守结构域,DHQase I 具有 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白(T cell immunoglobulin domain and mucin domain,简称 TIM)磷酸结合超家族保守结构域,莽草酸脱氢酶基因 AroE 蛋白具有 shikimate\_dh\_N、NADB\_Rossmann 超家族保守结构域,这与 Han 等在异形水绵上的研究结果<sup>[17]</sup>一致。

拟南芥只有 1 种 DHQ/SDH 基因型<sup>[18]</sup>,烟草有 NiDHQ/SDH1、NiDHQ/SDH2 2 种基因型,二者中的任何 1 个受到 RNA 干扰(RNAi)的抑制,就能改变脱氢奎尼酸和莽草酸代谢途径的稳定水平<sup>[15]</sup>。本研究从泰山红石榴果皮中分离得到 1 种 DHQ/SDH 基因型,是否还有其他类型 DHQ/SDH 基因存在还须继续选择不同石榴品种进行深入研究。

DHQ/SDH 的结构与功能研究主要在拟南芥、烟草等模式植物上,随着分子生物学技术的发展,不同植物 DHQ/SDH 基因的功能研究将不断深入。由于石榴果皮富含酚类、鞣质、糖、酸等物质,提取高纯度、完整的 RNA 难度较大,本试验目前提取的 RNA 纯度不能满足 5'RACE 的需要,下一步将改进试验方案,克隆得到 DHQ/SDH 基因全长 cDNA 序列。本研究比较不同石榴品种发育期果实中 DHQ/SDH 基因的表达与没食子酸含量的相关关系,为从分子水平揭示石榴果实没食子酸的代谢机制提供了一定的理论依据。

### 参考文献:

[1] Zhao X E, Yuan Z H, Feng L J, et al. Cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in red and white pomegranate [J]. Journal of Plant Research, 2015, 128(4): 687-696.

[2] Schuck A G, Weisburg J H, Esan H, et al. Cytotoxic and proapoptotic activities of gallic acid to human oral cancer HSC-2 cells [J]. Oxidants and Antioxidants in Medical Science, 2013, 2(4): 265-274.

[3] Qiu X B, Takemura G, Koshiji M, et al. Gallic acid induces vascular smooth muscle cell death via hydroxyl radical production [J]. Heart and Vessels, 2000, 15(2): 90-99.

[4] Zaidi - Yahiaoui R, Zaidi F, Bessai A A. Influence of gallic and tannic acids on enzymatic activity and growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi* bv. *chrysanthemi*) [J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(4): 482-486.

[5] Khalil R S. Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(11): 2069-2079.

[6] 冯立娟,尹燕雷,招雪晴,等. 石榴没食子酸代谢与保健功能研究进展 [J]. 果树学报, 2014, 31(4): 710-716.

[7] Werner R A, Rossmann A, Schwarz C, et al. Biosynthesis of gallic acid in *Rhus typhina*; discrimination between alternative pathways from natural oxygen isotope abundance [J]. Phytochemistry, 2004, 65(20): 2809-2813.

[8] Ossipov V, Salminen J P, Ossipova S, et al. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, 31(1): 3-16.

[9] Singh S A, Christendat D. The DHQ - dehydroshikimate - SDH - shikimate - NADP(H) complex: insights into metabolite transfer in the shikimate pathway [J]. Crystal Growth & Design, 2007, 7(11): 2153-2160.

[10] Singh S A, Christendat D. Structure of arabidopsis dehydroquinase dehydratase - shikimate dehydrogenase and implications for metabolic channeling in the shikimate pathway [J]. Biochemistry, 2006, 45(25): 7787-7796.

[11] Magalhães M B, Pereira C P, Basso L A, et al. Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [J]. Protein Expression and Purification, 2002, 26(1): 59-64.

[12] Zhang X L, Zhang S B, Hao F, et al. Expression, purification and properties of shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38(5): 624-631.

[13] Kubota T, Tanaka Y, Hiraga K, et al. Characterization of shikimate dehydrogenase homologues of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(18): 8139-8149.

[14] Deka R K, Anton I A, Dunbar B, et al. The characterisation of the shikimate pathway enzyme dehydroquinase from *Pisum sativum* [J]. FEBS Letters, 1994, 349(3): 397-402.

[15] Ding L, Hofius D, Hajirezaei M R, et al. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3 - dehydroquinase dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(8): 2053-2067.

[16] Bischoff M, Schaller A, Bieri F, et al. Molecular characterization of tomato 3 - dehydroquinase dehydratase - shikimate: NADP oxidoreductase [J]. Plant Physiology, 2001, 125(4): 1891-1900.

[17] Han J W, Lee K P, Yoon M, et al. Cold stress regulation of a bifunctional 3 - dehydroquinase dehydratase/shikimate dehydrogenase (DHQ/SDH) - like gene in the freshwater green alga *Spirogyra varians* [J]. Botanica Marina, 2009, 52(2): 178-185.

[18] Tzin V, Galili G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants [J]. Molecular Plant, 2010, 3(6): 956-972.