

冬凌草 *IrCYP71* 基因的克隆和功能

陈延清, 胡志刚, 黄必胜, 刘迪*
(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**克隆冬凌草二萜类化合物生物合成途径下游关键酶基因 *IrCYP71*, 进行序列特征分析, 对此基因编码的蛋白进行原核表达分析以及亚细胞定位, 并对蛋白在宿主细胞表达的条件进行了优化。**方法:**根据转录组测序所得的 *IrCYP71* 基因片段, 克隆出全长 cDNA 序列; 构建 pET28a(+) -*IrCYP71* 重组质粒, 转化到 Rosetta 感受态细胞, 小量表达和大量表达蛋白并鉴定, 进行包涵体蛋白的纯化与复性, 再对复性蛋白纯化鉴定分析。基于 gateway 克隆技术构建出 PCR8/GW/TOPO -*IrCYP71* 载体之后与改造 Pearleygate104 载体重组, 之后与农杆菌 GV3101 重组, 转入烟草中瞬时表达, 从而进行蛋白亚细胞定位。**结果:**克隆得到的 *IrCYP71* 基因全长 cDNA 为 1 593 bp, 编码 530 个氨基酸, 并在 GenBank 注册(登录号 MG800628)。经大肠埃希菌表达系统表达的重组蛋白相对分子质量正确, 在 62 kDa 左右, 纯化后的重组蛋白总量有 1 mg, 蛋白纯度为 85%。此蛋白亚细胞定位在细胞核。**结论:**对冬凌草 *IrCYP71* 基因进行了初步验证, 并对基因表达的蛋白进行原核表达和亚细胞定位, 使该基因在冬凌草二萜成分的生物合成过程中的作用得到了进一步的阐述。

[关键词] 冬凌草; 叶; 生物合成途径; 亚细胞定位; 原核表达; 功能基因研究

[中图分类号] R282.5; R927; R931.5; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0029-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181441

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180425.1134.003.html>

[网络出版时间] 2018-04-25 15:55

Gene Cloning and Functional Characterization of *IrCYP71* Gene in *Isodon rubescens* Leaves

CHEN Yan-qing, HU Zhi-gang, HUANG Bi-sheng, LIU Di*

(College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To clone the downstream key enzyme *IrCYP71* gene in diterpenoids biosynthesis of *Isodon rubescens* for sequence analysis, carry out prokaryotic expression analysis and subcellular localization for the protein encoded by this gene, and optimize the conditions for protein expression in host cells. **Method:** The full-length cDNA sequence was cloned according to the *IrCYP71* gene fragment obtained from transcriptome sequencing; the recombinant plasmid of pET28a(+) -*IrCYP71* was constructed and transformed into Rosetta receptive cells, small amount and large amount expressed proteins before identification. The inclusion body proteins were purified and renatured, and then the renatured proteins were purified, identified and analyzed. refolding of inclusion body protein, and analyzed the purification and identification of complex protein. The vector PCR8/GW/TOPO-*IrCYP71* was constructed by gateway cloning technology, recombined with transformed Pearleygate104 vector, and then introduced into tobacco epidermal cells by agrobacterium-mediated (GV3101) transformation for protein subcellular localization. **Result:** The full-length cDNA of cloned *IrCYP71* gene was 1 593 bp, encoding 530 amino acids, which was registered in GeBank (Accession No. MG800628). The recombinant protein expressed via *Escherichia coli* showed relatively correct molecular weight, about 62 kDa. The total amount of purified recombinant protein was 1 mg and the protein purity was 85%. Green fluorescence was tested and targeted to

[收稿日期] 20180308(019)

[基金项目] 湖北省教育厅科学技术研究项目(B2016077)

[第一作者] 陈延清, 从事中药资源与品质研究, Tel:027-68890106, E-mail:1192889692@qq.com

[通信作者] *刘迪, 博士, 助理研究员, 从事中药资源开发利用与品质评价研究, Tel:027-68890106, E-mail:liuditem@126.com

nucleus under a laser scanning confocal microscope. **Conclusion:** The preliminary validation of *IrCYP71* gene in *I. rubescens* revealed the prokaryotic expression and subcellular localization of the expressed proteins, laying foundation for further elucidating the function of the gene inditerpenoidsbiosynthesis.

[Key words] *Isodon rubescens*; leaves; biosynthetic pathway; subcellular localization; prokaryotic expression; functional gene characterization

冬凌草主要分布在长江、黄河流域,河南省、山西省为其主要产地^[1-2]。大量研究表明,其中富含的贝壳杉烷二萜类化合物冬凌草甲素和冬凌草乙素具有清热解毒、活血止痛、抗菌消炎、抗肿瘤作用^[3-4]。萜类化合物大量地存在于自然界中,是植物次生代谢产出最多的物质之一。唇形科植物包含大量的萜类化合物,为研究二萜类化合物提供了有价值的模型系统^[5]。目前二萜类化合物的生物合成途径可分为三个阶段。第一阶段通过在质体中甲基赤藓醇 4-磷酸(MEP)途径,少量在细胞质和过氧化物酶体甲羟戊酸(MEV)途径,产生前体异戊烯焦磷酸(IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)^[6-7]。在第二阶段,由 IPP 转换成所有二萜化合物前体物香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)^[8]。第三阶段,GGPP 是用来通过逐级电离和环化反应产生的二萜双环,其中需要焦磷酸合成酶(CPS),贝壳杉烯合酶合成酶(KSL)以及依赖细胞色素 P450 单加氧酶(CYP450)的参与^[9]。目前冬凌草中的二萜类化合物冬凌草甲素、冬凌草乙素等生物合成途径研究最为火热^[10]。

然而,冬凌草的资源有限,并且其中具有重要活性的二萜化合物冬凌草甲素、冬凌草乙素含量较低,造成冬凌草的产量不能满足日益增长的临床需要。研究人员试图通过干预冬凌草生物合成过程达到提高冬凌草中冬凌草甲素、乙素含量的目的,为此,研究人员深入研究了冬凌草中二萜化合物生物合成过程中的关键酶^[2]。朱响昊等^[11-12]成功克隆甲羟戊酸(MVA)的起始酶乙酰辅酶 A 酰基转移酶 *AACT* 基因和 HMG-COA 还原酶 *HMGCR* 基因;尹磊等^[13]获得 MEP 途径中的限速酶 *DXR*, *IDI* 等基因的全长序列,为冬凌草二萜类物质合成途径中的功能奠定了基础;文献成功克隆下游合成途径 5 种 *CPS* 基因和 6 种 *KSL* 基因,并验证了这些基因在合成途径的相关功能^[14]。本研究基于前期对冬凌草转录组数据分析,得到一个参与冬凌草二萜化合物的合成的基因 *IrCYP71* 基因,克隆得到全长基因并进行生物信息学分析,并对此基因合成的蛋白进行原核表达,及亚细胞定位。使后续的冬凌草二萜化合物的下游合

成过程解析成为可能。

1 材料

PCR8/GW/TOPO 入门载体(美国英杰生命技术有限公司,批号 1875027); pET28a(+)载体, Rosetta 感受态,改造 Pearleygate104 载体和农杆菌 GV3101 由中国农业科学院油料作物研究所华玮研究员惠赠。试验于 2017 年在湖北中医药大学生药分子生物学实验室完成。试验使用冬凌草为唇形科香茶菜属植物碎米桠 *Isodon rubescens* 的叶片,由湖北中医药大学药学院刘大会研究员鉴定,植株种植于湖北中医药大学药用植物园。

RNA 小量提取试剂盒, DH5 α 和 Rosetta 感受态、反转录试剂盒 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit, Prime STARGXL DNA Polymerase, DNA 纯化试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为 AK1601, AK4301, N2602CA, AK1201]; DL2000 DNA Marker(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 50131), 质粒提取试剂盒(康宁生命科学有限公司,批号 22916KA1); *Taq* DNA 聚合酶和限制性内切酶 *EcoR* I, *Hind* III, FIB2-mCherry 染料, pEASY-T1 克隆载体(北京全式金生物技术有限公司,批号均为 L30720)。

2 方法

2.1 RNA 的提取与 cDNA 的合成 取冬凌草叶片加液氮研磨,依照植物 RNA 提取试剂盒步骤提取总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。按照 Revert Aid FirstStrand cDNA Synthesis Kit 说明书步骤进行 cDNA 的合成。

2.2 cDNA 全长的克隆及测序 由冬凌草转录组数据可获得 *IrCYP71* 基因全长 cDNA 序列信息,从两端非编码区设计一对特异性引物的上游引物 5'-GTGCATCAATGCATCAAGCC-3', 下游引物 5'-TTAGGGGGCGTTTGGTTCAA-3'。遵循 Prime-STARGXL DNA Polymerase 说明书操作流程,对反转录后冬凌草 *IrCYP71* 基因 cDNA 进行扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,把目的条带切胶回收后与 pEASY-T1 载体拼接起来,反应体系为 pEASY-Blunt zero cloning Vector 1 μ L, 纯化 PCR 产物 4 μ L。

室温连接 30 min。将连接产物全部转化到 Trans1-T1 感受态细胞中,菌落在含有卡那霉素的 LB 固体平板上进行抗性筛选,于摇床中 37 °C, 200 r·min⁻¹ 培养过夜。挑选单菌落以进行 PCR 检测,选择阳性克隆接种于液体培养基(含卡那霉素),于摇床中 37 °C 200 r·min⁻¹ 培养 5 h,利用质粒提取试剂盒提取重组质粒 pEASY-T1-IrCYP71 备用,用 M13 (M13F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 引物测序。测序由武汉生工测序部完成。

2.3 冬凌草 IrCYP71 基因的序列分析 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中的已得到序列通过 Blast 搜索蛋白质和核苷酸数据库中分析和比对序列,通过 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找开放阅读框(ORF)。使用 Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) 比对结构域,通过 ExPASyProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protParam/protParam>) 对蛋白的相关理化性质进行预测,运用 Signal P 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对蛋白的信号肽进行预测并通过 TRMHMMserver v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 分析跨膜域,使用 NPSA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_phd.pl) 在线分析软件预测蛋白的二级结构,三维同源建模在 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 中完成。最后通过 MEGA6.0 软件,以 NCBI 数据库中已被公布的模式植物物种的 IrCYP71 氨基酸序列和与二萜合成途径相似氨基酸序列为参照构建系统进化树,Bootsrap 1 000 次重复,进行聚类分析。

2.4 蛋白的原核表达 将 2.2 项下制备好的质粒用 PmeI/NotI (全式金试剂盒提供) 酶切后与同样经过酶切的质粒载体 pET28a (+) 连接,转化入 Trans1-T1 感受态细胞,挑选阳性克隆,由武汉生工测序部完成测序;挑选含 Pet28a (+) 重组质粒的菌落至 3 mL LB 液体培养基,用终浓度 IPTG 1 mmol·L⁻¹ 诱导菌液小量表达,菌体沉淀以 1 × loading buffer 40 μL 重悬裂解,SDS-PAGE 检测;用菌液 4 mL 接种于 400 mL LB 液体培养基中,使 IPTG 诱导剂至终浓度 0.5 mmol·L⁻¹ 大量表达目标蛋白,震荡培养过夜,重悬于 30 mL 预冷 NTA-0 缓冲液中,超声破碎菌体,收集上清液以及沉淀,取少量上清液及沉淀进行 SDS-PAGE 检测,剩余上清液

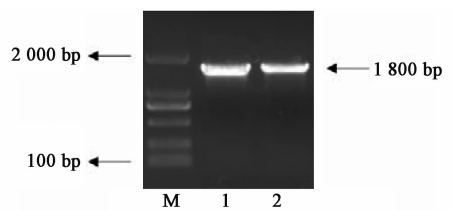
及沉淀至于 4 °C 备用;取蛋白溶液进行包涵体蛋白纯化,之后将上清蛋白溶液复性^[15],对收集的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

2.5 表达蛋白的亚细胞定位 亚细胞定位的载体构建基于 Gateway 技术^[16-17],将纯化 DNA 片段与入门载体构建 PCR8/GW/TOPO-IrCYP71 载体,转入 DH5α 感受态,挑取阳性克隆,在 10 mL 含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 °C 条件下 200 r·min⁻¹ 震荡培养,提取质粒酶切后与改造 Pearleygate104 载体重组,对阳性克隆测序验证。瞬时表达载体烟草植株 21 °C 土培 5 ~ 6 周,光周期为 14 h·d⁻¹。

在阳性载体加入农杆菌感受态菌液 50 μL,冻融法进行转化;挑取农杆菌阳性单菌落分别置于含相应抗生素的 YEB 液体培养基中,取经过鉴定的农杆菌(GV3101)的菌落震荡培养,收集菌体。加入渗透液重悬、静置。用注射器吸取菌液注射入烟草下表皮细胞,烟草注射菌液后继续在 21 °C 下,培养 3 d 后在激光扫描共聚焦显微镜下观察。

3 结果

3.1 RNA 的提取与 IrCYP71 基因的克隆 RNA 电泳图表明没有降解及蛋白质等杂质污染,可满足后续试验的需求。IrCYP71 基因扩增电泳结果(图 1),在 1 800 bp 左右处有一条特异性条带。经 Dnaman8 软件拼接后的测序结果与转录组序列一致。经 ORF Finder 预测,序列的完整开放阅读框大小为 1 593 bp,编码 530 个氨基酸。开放阅读框位于 59 ~ 1 651 bp 区域,序列的 1 ~ 58 bp 为 5' 非编码框,1 652 ~ 1 804 bp 为 3' 非编码框。获得基因序列提交到 Genbank 数据库中,登录号为(MG800628)。



M. DL2000 marker; 1, 2. IrCYP71 基因扩增条带

图 1 IrCYP71 基因扩增电泳

Fig. 1 IrCYP71 gene amplification electrophoresis

3.2 IrCYP71 基因编码蛋白特性分析

3.2.1 理化性质分析 在线预测的结果显示, IrCYP71 蛋白质共有 530 个氨基酸,理论相对分子质量为 59 667.03 Da,等电点为 7.58,带负电的氨基酸有 60 个(Asp + Glu),带正电的氨基酸有 61 个

(Arg + Lys), 不稳定系数是 35.48, 推测该蛋白质稳定。预测的总平均亲水性为 -0.181, 推测冬凌草 IrCYP71 蛋白属于亲水性蛋白。对 IrCYP71 蛋白的跨膜结构域和信号肽进行预测, 结果表明该蛋白不存在跨膜区, 具有一个信号肽。

3.2.2 IrCYP71 蛋白的二级结构与三级结构的预测 运用在线 NPSA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_phd.pl) 对冬凌草 IrCYP71 蛋白进行二级结构预测。结果表明 IrCYP71 蛋白由 48.30% 的 α -螺旋, 9.25% 的延伸链, 42.45% 随机线圈组成。因此, α -螺旋和随机线圈是 IrCYP71 的主要结构元件, 而延伸链分布在整个蛋白质结构中。运用在线软件 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 对 IrCYP71 蛋白进行三级结构同源建模, 得到 IrCYP71 三级结构模型(图 2)。预测所得的模型与其他植物中的 IrCYP71 三级结构相似。

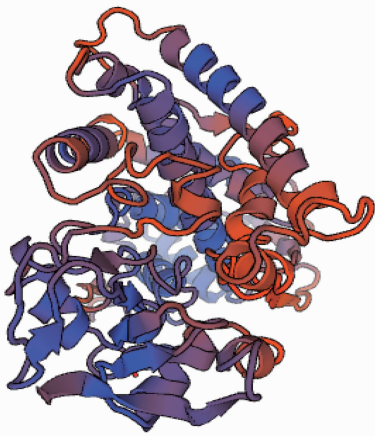


图 2 IrCYP71 蛋白三级结构预测

Fig. 2 Three-level structure prediction of IrCYP71 protein

3.3 IrCYP71 序列分析 在 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 中分析 IrCYP71 与丹参植物中 CYP701A40 蛋白同源性最高为 95%, 属于 CYP71 家族。其他比对蛋白同源性高(达到 94%) 的蛋白都可能与二萜类化合物的合成有关。应用 DNAMAN8 和 Mega5.0 软件对模式植物丹参、水稻、拟南芥等对 IrCYP71 蛋白氨基酸序列进行多重比对分析。并将上述序列建立系统发育树(图 3), 多序列比对发现表明此蛋白可能属于 CYP71 家族并与二萜类化合物的合成有关(图 4)。采用 Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) 进行结构域比对, 所编码的氨基酸序列包含两个保守的 P450 功能域结构。利用 DNAMAN8 将 IrCYP71 氨基酸序列与从 NCBI 中挑选的同源性较

高的部分已知序列进行多序列比对分析, IrCYP71 蛋白与已知蛋白序列相似。

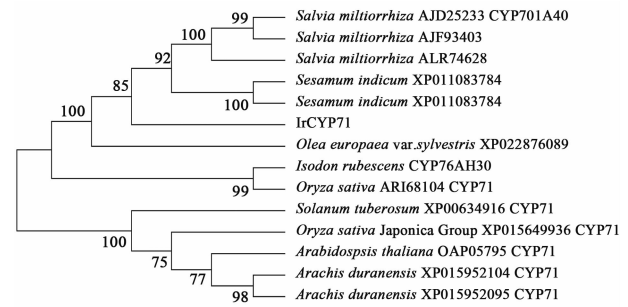


图 3 蛋白 IrCYP71 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of IrCYP71

3.4 IrCYP71 蛋白原核表达分析 原核表达中阳性克隆用质粒测序, 目的蛋白基因序列与原基因序列一致; 阳性克隆经小量表达后进行 SDS-PAGE 检测可见差异条带(图 5), 说明重组蛋白基因经 IPTG 诱导后可在大肠埃希菌表达系统中进行表达。筛选到的重组阳性克隆经放大培养、超声破菌获得的重组蛋白包含 His tag 标签 (~4 kDa), 经 SDS-PAGE 检测(图 6), 重组蛋白相对分子质量在 62 kDa 左右, 大小符合目的蛋白相对分子质量预期。经纯化后的包涵体蛋白经过滴定法复性后进行 SDS-PAGE 检测(图 7), 结果显示融合蛋白的大小及纯度可以进行后续的纯化。大量表达(图 8) 获得的重组蛋白包涵体经复性及 Ni-NTA 纯化技术纯化得到重组蛋白 1 mg, 重组蛋白纯度为 85%。原核表达分析结果表明 IrCYP71 在大肠埃希菌体系中能够表达与预测蛋白大小相当的目标蛋白。

3.5 IrCYP71 蛋白亚细胞定位分析 将转化后烟草叶片下表面切去 1~2 cm² 制作水装片, 用激光扫描共聚焦显微镜观察, 使用 FIB2-mCherry 作为核标记染料^[26-27]。在 475 nm 蓝光激发下绿色荧光蛋白(GFP, green fluorescent protein) 产生绿色荧光, 核标记染料产生红色荧光, 两者同层叠加为黄色^[27]。结果表明 GFP 融合蛋白在细胞核处产生黄色荧光(图 9), 由此可以得出 IrCYP71 蛋白定位在细胞核。

4 讨论

冬凌草内含有丰富的贝壳杉烷类二萜化合物, 大量研究表明其具有较好的抗肿瘤、抗菌等药理功效, 具有巨大开发抗癌药物的潜能^[18-19]。目前对于冬凌草化学物质的分离和活性机制的研究已经比较成熟^[20-21], 但对冬凌草内的二萜化合物的生物合成途径研究较少, 特别是对下游合成途径关键基因的挖掘较少。本研究, 通过对冬凌草转录组的深度发

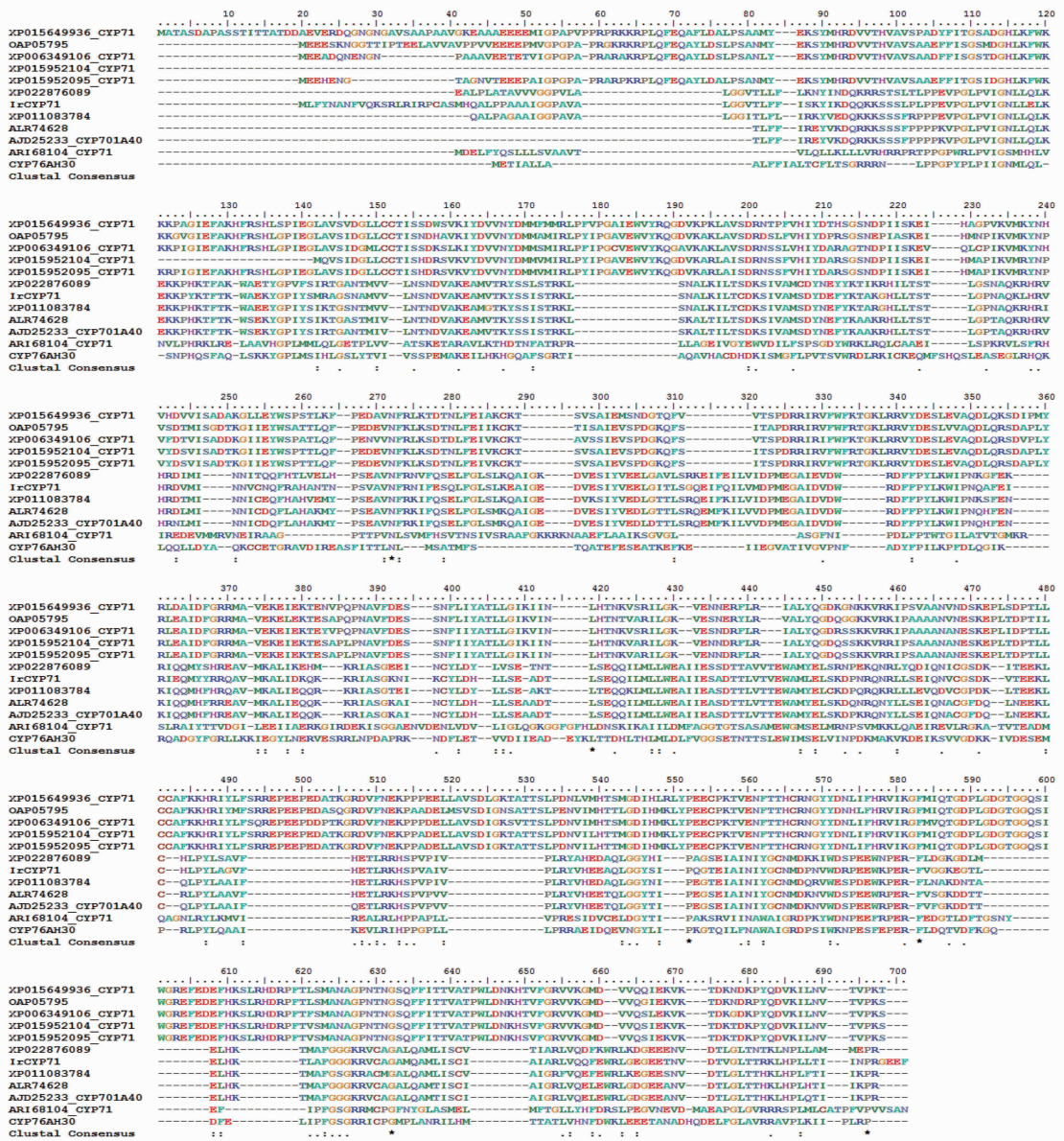
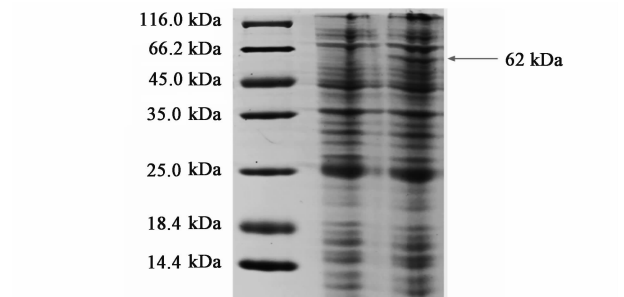


图 4 IrCYP71 氨基酸同源性分析

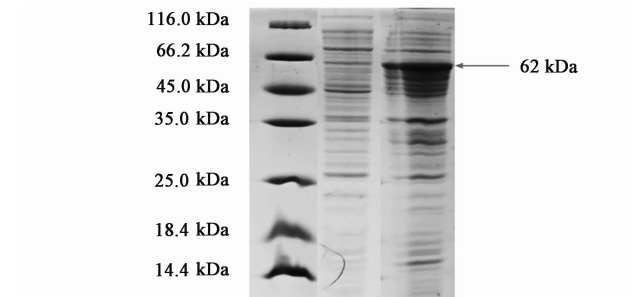
Fig.4 Homology analysis of IrCYP71 amino acids sequence



M. marker; 1. 宿主菌全菌蛋白; 2. IPTG 诱导全菌蛋白 (箭头所指为重组蛋白)

图 5 阳性菌株全菌蛋白 SDS-PAGE 电泳

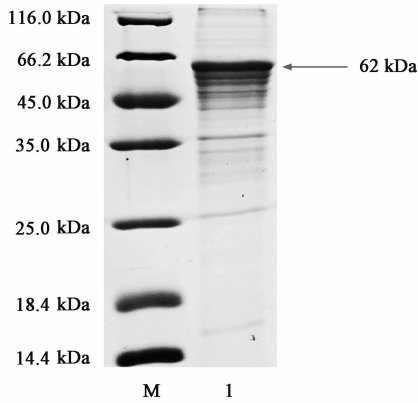
Fig.5 SDS-PAGE electrophoretic map of positive bacterial strain



M. marker; 1. 诱导表达破碎后的上清蛋白; 2. 诱导表达破碎后的不溶蛋白 (箭头所指为重组蛋白)

图 6 大量表达的菌体破碎上清及沉淀 SDS-PAGE 电泳

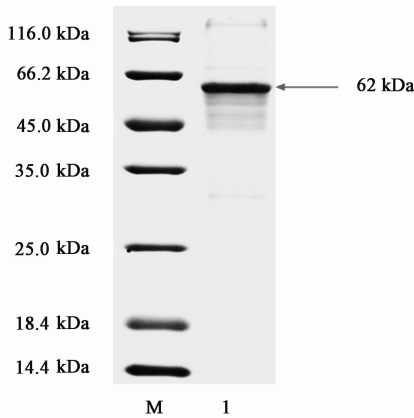
Fig.6 A large number of SDS-PAGE electrophoretic maps



M. marker; 1. 复性包涵体蛋白(箭头所指为重组蛋白)

图 7 复性包涵体蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 7 SDS-PAGE electrophoretic diagram of complex inclusion body protein

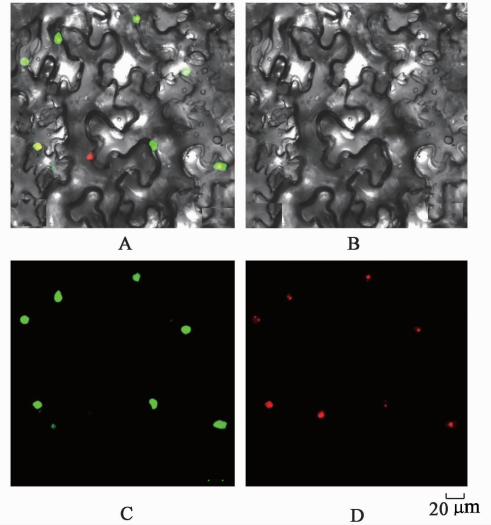


M. marker; 1. 洗脱蛋白(箭头所指为重组蛋白)

图 8 洗脱蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 8 SDS-PAGE electrophoretic diagram of eluent protein

掘,发现一个下游可能参与二萜下游合成途径 *IrCYP71* 基因,成功克隆全长基因。在确定基因表达蛋白亚细胞定位时,基于 Gateway 技术首先构建 topo-*IrCYP71* 入门载体,使载体一旦获得入门克隆后,能够将目的 DNA 以正确的方向克隆到与 Gateway 技术符合的目标载体上,很大程度上简化了基因克隆的步骤^[22-23]。亚细胞定位时使外源基因在烟草叶片中瞬时表达,使得实验不需要酶解制备原生质体,简便快捷。本研究中的蛋白亚细胞定位结果显示 *IrCYP71* 定位于细胞核中,因此笔者认为初步得出 *IrCYP71* 蛋白定位于细胞核,但并没有检测到预期中的在细胞质中的定位,可能是由于瞬时表达的模拟方式与冬凌草体内蛋白表达存在差异,并且融合蛋白的过强或者过弱表达都可能会使定位结果不清,尤其对质膜等膜类蛋白的定位可能产生较大影响;另外可能是异源植物细胞表达系统



A. 蓝光激发下烟草下表皮细胞 GFP 融合蛋白,叠加后在细胞核处产生黄色荧光;B. 白光下烟草下表皮细胞亚细胞定位;C. 蓝光激发下烟草下表皮细胞 GFP 融合蛋白在细胞核处产生绿色荧光;D. 蓝光激发下烟草下表皮细胞使用核标记染料 FIB2-mCherry 产生红色荧光

图 9 *IrCYP71* 烟草瞬时表达

Fig. 9 Transient expression of *IrCYP71* in tobacco

产生差异的结果,因冬凌草和烟草的次生代谢物质和途径还是存在差异,因此后续实验需要通过多个表达系统的定位研究以及动态变化实验进一步确证^[24-27]。此外,通过不断的实验,最终确定了原核表达体系中优化的条件,并成功在大肠埃希菌体系中表达出纯化蛋白。为今后继续探索精确定位诱导活性高二萜类化合物的产生和其他冬凌草的功能基因奠定了基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:115.
 [2] 李静一. 野生冬凌草资源分布调查、开发与保护[J]. 河南林业科技,2004,24(3):48-50.
 [3] Ikezoe T, CHEN S S, TONG X J, et al. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells[J]. Int J Oncol,2003,23(4):1187-1193.
 [4] WU H Y, WANG W G, JIANG H Y, et al. Cytotoxic and anti-inflammatory ent -kaurane diterpenoids from *Isodon wikstroemioides* [J]. Fitoterapia, 2014, 98 (5): 192-198.
 [5] 魏恬恬,臧姝,曾雨倩,等. 植物单萜类化合物的代谢调控[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2017,38(2):122-126.
 [6] MA Y, YUAN L, WU B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*

- [J]. *J Experimental Botany*, 2012, 63(7):2809-2823.
- [7] Reumann S, Babujee L, MA C, et al. Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(10):3170-3193.
- [8] CHEN F, Tholl D, Bohlmann J, et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. [J]. *Plant J*, 2011, 66(1):212-229.
- [9] Zerbe P, Hamberger B, Yuen M M S, et al. Gene discovery of modular diterpene metabolism in nonmodel systems. [J]. *Plant Physiol*, 2013, 162(2):1073-1091.
- [10] 陈川川, 刘越, 郭凤仙, 等. 冬凌草生物学研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(19):4901-4906, 4955.
- [11] 朱响昊, 昝梦航, 苏秀红, 等. 冬凌草 HMGS 基因的克隆与表达分析[J]. *作物杂志*, 2016(5):25-30.
- [12] 朱响昊, 苏秀红, 董诚明, 等. 冬凌草 AACT 基因的克隆与表达分析[J]. *中药材*, 2016, 39(1):37-41.
- [13] 尹磊. 冬凌草二萜类物质合成途径中相关功能基因分析[D]. 郑州:河南中医药大学, 2016.
- [14] JIN B, CUI G, GUO J, et al. Functional diversification of kaurene synthase-like genes in *isodon rubescens* [J]. *Plant Physiol*, 2017, 174(2):943-955.
- [15] 陈瑞婷. 家蚕细胞及丝腺退化和凋亡的程序性细胞信号通路中 BmDredd 基因的功能[D]. 杭州:浙江大学, 2017.
- [16] Hartley J L, Temple G F, Brasch M A, et al. DNA cloning using in vitro site-specific recombination [J]. *Genome Res*, 2000, 10(11):1788-1795.
- [17] Bracken C P, Whitelaw M L, Peet D J. Activity of hypoxia-inducible factor 2 α is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator. [J]. *J Biological Chem*, 2005, 280(14):14240-14251.
- [18] 余祖胤. 对映贝壳杉烷类二萜化合物抗肿瘤作用及其分子机制研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2007.
- [19] 钱平利. 37种二萜化合物抗肿瘤作用的初步研究[D]. 上海:第二军医大学, 2006.
- [20] 刘建群, 高俊博. 迈克尔加成反应预测冬凌草活性成分及其乙酰化产物抗肿瘤活性[J]. *林产化学与工业*, 2016, 36(1):27-34.
- [21] 高世勇, 王珑. 冬凌草的化学和药理作用研究[J]. *哈尔滨商业大学学报:自然科学版*, 2014, 30(1):1-6.
- [22] Suzuki Y, Yoshitomonakagawa K, Maruyama K, et al. Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library [J]. *Gene*, 1997, 200(1):149-156.
- [23] Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination [J]. *Annu Rev Biochem*, 1989, 58(1):913.
- [24] Wallaart T E, Bouwmeester H J, Hille J, et al. Amorphadiene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin [J]. *Planta*, 2001, 212(3):460-465.
- [25] 赵文婷, 魏建和, 孟冬, 等. 3种瞬时表达体系研究1个白木香倍半萜合酶的亚细胞定位[J]. *中草药*, 2013, 44(23):3379-3385.
- [26] Degenhardt R F, Bonham-Smith P C. Transcript profiling demonstrates absence of dosage compensation in Arabidopsis following loss of a single RPL23a paralog [J]. *Planta*, 2008, 228(4):627-640.
- [27] ZHENG M, WANG Y, LIU X, et al. The *RICEMINUTE-LIKE1. RML1*. gene, encoding a ribosomal large subunit protein L3B, regulates leaf morphology and plant architecture in rice [J]. *J Experimental Botany*, 2016, 67(11):3457-3469.

[责任编辑 顾雪竹]