

· 资源与鉴定 ·

茅苍术 DXS 基因的克隆与分析

邓娟, 万倩芸, 龚玲, 刘合刚, 余坤*

(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

[摘要] 目的:克隆茅苍术萜类化合物生物合成关键酶 1-脱氧木糖-5-磷酸合酶(DXS)基因,并进行序列特征分析和组织特异性表达分析。**方法:**根据转录组测序所得的 DXS 基因片段,克隆出全长 cDNA 序列。运用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),以 tublin 为内参基因,检测 DXS 基因在不同组织中的表达量。**结果:**克隆得到的 DXS 基因全长 cDNA 序列为 2 151 bp,编码 716 个氨基酸,并在 GenBank 注册(登录号 KY659208)。氨基酸序列系统发育分析表明,该序列与甜叶菊等菊科植物 DXS 基因有较高的同源性。Real-time PCR 法检测发现茅苍术 DXS 在叶片中表达量最高,其次为花,而在根茎和根中表达很低。**结论:**获得了茅苍术 DXS 基因的全长 cDNA 序列,对其进行了初步生物信息学分析,揭示了其组织差异性表达特征,为进一步阐述该基因在茅苍术萜类成分生物合成途径中的功能奠定了基础。

[关键词] 茅苍术; 1-脱氧木糖-5-磷酸合酶; 基因克隆; 序列分析; 萜类成分

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0039-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160039

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1007.028.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 10:07

Cloning and Analysis of DXS Gene from *Atractylodes lancea*

DENG Juan, WAN Qian-yun, GONG Ling, LIU He-gang, YU Kun*

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

[Abstract] **Objective:** This study is aimed to clone the key enzyme 1-deoxy-xylose-5-phosphate synthase (DXS) genes and analyze its tissue-specific expression in *Atractylodes lancea*. **Method:** The full-length cDNA sequence was cloned from the DXS gene fragment based on transcriptome sequencing data of *A. lancea* generated in our previous study. The expression levels of DXS gene in different tissues of *A. lancea* were detected by Real-time PCR, with tublin as the reference gene. **Result:** The full-length cDNA sequence of DXS gene is 2 151 bp, encoding 716 amino acids, which has been deposited in GenBank (accession number KY659208). Results of phylogenetic analysis showed that the sequence had high homology with DXS gene of other compositae plants, such as *Stevia rebaudiana*. Real-time PCR analysis showed that the DXS gene was mostly expressed in leaves, followed by flowers, rhizome and roots. **Conclusion:** Full-length cDNA sequence of DXS gene in *A. lancea* has been obtained for preliminary bioinformatics analysis, revealing differential expression in different tissues. The results will provide a groundwork for studying the function of DXS in terpenoid biosynthesis of *A. lancea*.

[Key words] *Atractylodes lancea*; 1-deoxy-xylose-5-phosphate synthase; gene cloning; sequence analysis; terpenoids

植物体中萜类生物合成由前体合成、萜类骨架 合成、骨架修饰 3 个阶段组成。前体合成有 2 条合

[收稿日期] 20170324(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31670341,31300277);湖北中医药大学校级项目(2015-182)

[第一作者] 邓娟,硕士,从事中药资源与品质研究,Tel: 027-68890106,E-mail: http_dengjuan@163.com

[通讯作者] *余坤,博士,副教授,从事中药品种、质量与开发研究,Tel: 027-68890106,E-mail: yukun_hbctm@163.com

成途径,一条是位于细胞质中的甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA),另一条是位于质体中甲基赤藓醇-4-磷酸途径 (methylerythritol-4-phosphate pathway, MEP)^[1]。1-脱氧木糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS) 是 MEP 途径中第一个关键酶,也是该途径的第一个限速酶^[2]。DXS 基因最先从大肠埃希菌中分离出来,后来其他物种 (如黄花蒿、烟草等) 的同源基因也陆续被发现,组成多基因家族^[3-4]。研究发现,拟南芥基因组中的 3 个 DXS 基因仅 1 个能编码有功能的蛋白^[3,5]。

茅苍术为菊科多年生草本植物,是中药苍术的基原植物之一,以根茎入药 (南苍术),能燥湿健脾、祛风明目^[6]。一般认为茅苍术主要活性成分存在于挥发油中,主要有苍术素,苍术酮,茅术醇, β -桉叶醇等萜类化合物^[7]。目前茅苍术萜类生物合成途径功能基因研究较少,仅发现有转录组学和法呢基焦磷酸合酶 (FPPS) 基因报道^[8-9]。本研究基于课题组前期茅苍术转录组测序数据发现的一条与 DXS 基因高度同源的序列,克隆其全长 cDNA 序列、进行序列分析^[8],并分析其在不同组织的表达特性,为阐明茅苍术萜类生物合成机制提供帮助。

1 材料

茅苍术植株来自湖北省英山县茅苍术种植基地,经湖北中医药大学刘合刚教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea*。不同部位的试验材料是在田间先分离出叶和花、再挖取地下根茎分离出根茎和根后,迅速用清水清洗表面泥土,然后保存于 RNA 保存液 (TIANGEN) 中带回实验室,再转移至 -80 °C 冰箱备用。

多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (批号 0020160628) 购自中国北京百泰克生物技术有限公司;cDNA 第一链反转录试剂盒 (批号 AK3501), LA Taq 酶 (批号 KA6001UA), 克隆载体 PMD18-T (批号 K7401A), 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 反转录试剂 (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser) (批号 AK3302), SYBR Green 荧光定量试剂 (批号 AK7606) 均购自日本 TaKaRa 公司; DNA 回收试剂盒 (批号 P4524), RNA 保存液 (批号 20160512) 购自中国天根生化科技有限公司; 2 × Easy Taq SuperMi (批号 J30616), 大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞 (批号 K1440715) 均购自中国北京全式金生物技术有限公司。其他试剂均为分析纯,引物合成、测序由生工生物工程 (上海) 有限公司完成。

2 方法

2.1 叶片总 RNA 提取 按照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (百泰克) 提取嫩叶总 RNA, 具体步骤为取嫩叶 0.2 g 置于含液氮的研钵中充分研磨成粉末状后,加的裂解液 RL 1 mL 继续研磨,转移到 1.5 mL 离心管,置于 65 °C 水浴锅孵育 5 min; 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清转入新的离心管中,加入 70% 乙醇 1 倍体积,颠倒混匀,将混匀液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中,10 000 r·min⁻¹ 离心 60 s, 倒掉废液; 加去蛋白液 RE 500 μ L, 12 000 r·min⁻¹ 离心 60 s; 加入漂洗液 RW 500 μ L, 12 000 r·min⁻¹ 离心 60 s; 加入漂洗液 RW 700 μ L, 12 000 r·min⁻¹ 离心 60 s; 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 使乙醇完全挥发; 最后用 RNase free ddH₂O 50 μ L 洗脱吸附柱上的 RNA。将提取的 RNA 分管保存 -80 °C 备用。

2.2 cDNA 模板合成和 PCR 扩增 以 2.1 项总 RNA 合成 cDNA, 用反转录试剂盒 (TaKaRa PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit) 合成 cDNA, -20 °C 保存备用。根据转录组测序所得数据中的 DXS 基因序列,在 NCBI 上比对,找出高度保守区段,设计一对特异性引物 (D1-F, D1-R) (表 1), 扩增片段长度为 734 bp。先进行序列验证,利用 DNAMAN 7 对 DXS 序列设计一对扩增全长的特异引物 (D2-F, D2-R) (表 1), 扩增片段长度 2 460 bp。PCR 反应体系总体积为 50 μ L: 10 × PCR 缓冲液 5 μ L, 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 5 μ L, 2 mmol·L⁻¹ dNTP 8 μ L, 10 mmol·L⁻¹ 正反向引物各 1 μ L, cDNA 3 μ L, 5 U· μ L⁻¹ LA Taq 酶 0.5 μ L, 无菌去离子水 26.5 μ L。PCR 反应条件为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 150 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 冷却。反应结束后,利用琼脂糖凝胶电泳进行分析,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名	引物序列 (5'-3')	引物长度 / bp
D1	上游 GATTACTCGTCTTCTTGC	20
	下游 AGCCTCTCTGTTTGCCCA	19
D2	上游 CTCTTTGATTTGGGTCTGGG	20
	下游 GTTATGGCACCATTTCAGTCT	21
D3	上游 TGCCTGTGAGATTTGCCT	18
	下游 CCTATCCCATTTCCTCGTG	19
T1	上游 GTGACGAAAGCCCTCTT	18
	下游 CGCACCATTTCAGTTTGTTG	19

DNA 回收试剂盒回收。

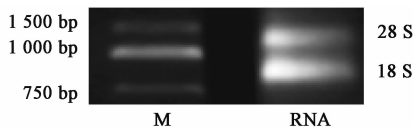
2.3 阳性克隆的筛选、鉴定及测序 将 DNA 片段与 pMD18-T Vector 连接,连接体系为 PMD-18T 连接缓冲液 5 μL ,PMD-18 Vector 0.5 μL ,纯化的 PCR 产物 4.5 μL ,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接反应 8 h。将连接产物全部转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞中,涂铺于 LB 固体培养基上(含氨苄青霉素),37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑选单菌落以进行 PCR 检测,选择阳性克隆接种于液体培养基(含氨苄青霉素),培养(温度 37 $^{\circ}\text{C}$,转速 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)过夜后测序。

2.4 生物信息学分析 用 Dnastar 6.0 的子程序 Seqman 进行序列拼接, DNAMAN 7.0 查找所获得基因序列的开放阅读框,Clustalx 1.81 软件对推导出的氨基酸序列与其他物种进行同源性比较分析,ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件系统对氨基酸序列进行基本理化性质的分析,在线分析工具 PBIL (<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web/home>) 和 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 对蛋白进行二级结构和三级结构的预测,Mega 6.0 软件建立系统进化树。

2.5 DXS 基因的组织特异性表达 用 DNAMAN 7.0 设计特异引物(D3)(表 1),以 tublin 片段序列作为内参基因设计引物(T1)(表 1),在 Real-time PCR 仪(Bio-Rad CFX96,美国)上进行测定,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析方法对 DXS 进行相对定量表达分析,具体方法参见课题组已发表的方法^[8]。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 的提取及检测 琼脂糖凝胶电泳检测叶片总 RNA 发现,28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带清晰,无杂质条带(图 1),说明提取的总 RNA 完整性较好;微量核酸测量仪检测发现, A_{260}/A_{280} 为 2.03, A_{260}/A_{230} 为 2.12,说明总 RNA 的纯度较高,可用于后续试验。



M. Marker; RNA. 叶片总 RNA
图 1 茅苍术总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA of *Atractylodes lancea*

3.2 DXS 基因全长克隆 以总 RNA 反转录所得到的第一链 cDNA 为模板,PCR 验证结果与已知的序列一致。用 DXS 特异引物 D2 上游和 D2 下游进

行全长扩增。琼脂糖凝胶电泳检测发现 2 500 bp 处有 1 条与目的片段大小基本一致的亮带(图 2)。

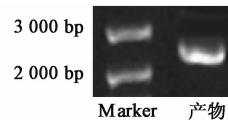


图 2 茅苍术 DXS 基因 Real-time PCR 产物
Fig. 2 Real-time PCR product of *Atractylodes lancea* DXS gene

3.3 阳性克隆的筛选、鉴定及测序 将回收纯化的目的片段连接到 PMD-18T 克隆载体上,转化到大肠埃希菌 DH5 α ,然后随机挑取 24 个单菌落,划线过夜培养后进行菌落 PCR 扩增,挑选 7,12,20 号阳性克隆进行菌液培养并测序,测得一段长度为 2 460 bp 的序列,与茅苍术转录组测序所得 DXS 基因片段序列一致(图 3)。将序列提交到 NCBI GenBank 注册,登陆号为 KY659208。

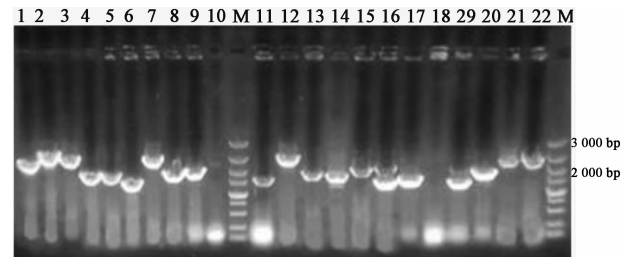


图 3 DXS 基因菌落 PCR
Fig. 3 Colony PCR of DXS gene

3.4 序列分析 利用 DNAMAN 7.0 分析所得 DXS 基因序列后发现,开放阅读框(ORF)长 2 151 bp,编码 716 个氨基酸(图 4)。利用 NCBI 数据库中的 Blastp 程序进行氨基酸序列比对,表明 DXS 基因保守性较高,与蒲公英 DXS 基因的相似性最高(达 94%)(表 2)。

表 2 茅苍术与蒲公英等 9 种植物 DXS 氨基酸序列比对

Table 2 Similarity comparison of DXS amino acid sequences between *Atractylodes lancea* and other plant species

植物名	拉丁名	登录号	相似性/%
蒲公英	<i>Taraxacum kok-saghyz</i>	AMB19705.1	94
甜叶菊	<i>Stevia rebaudiana</i>	ALJ30086.1	92
青蒿	<i>Artemisia annua</i>	AAD56390.2	93
常春藤	<i>Hedera helix</i>	APY22341.1	86
木犀	<i>Osmanthus fragrans</i>	AOT86855.1	86
丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	ACF21004.1	86
南非醉茄	<i>Withania somnifera</i>	AOX15279.1	85
蒺藜状苜蓿	<i>Medicago truncatula</i>	CAD22530.1	87
土沉香	<i>Aquilaria sinensis</i>	AFU75321.1	84

用 Mega 6.0 将进行系统进化分析,结果表明

```

1 ATGGCCCTTCTCTGTTTGCATTACCTGGACAGCTGAATCAACGGTCACTACTTCCACATCTCTCTGTTTCAA
2 M A L S S F A L P G Q L N Q R S L T S H S P L F Q
76 CATTCCTATTGGACGGGATCTACACATCTCCAACTTCCACACAAACCTTCAATCAGGCAAGTAAAAGGCA
26 H C L F G T D L Q H P Q S S H K P F N Q A S K R A
151 AGTGGGTTCCGAGCGACCTGGGAGAGAGTGAGCATTACTCGCAGAGACCTCTACTCTCTTTTGGACACT
51 S G V R A T L S E R G E H Y S Q R P P T P L L D T
226 ATCACTACCCAAATCCAGATGAAAATCTCTCAATTAAGGAATTGAAGCACTAGCTGATGAATTCGATCTGAT
76 I N Y P I H N K N L S E E L K Q L A D E L R S D
301 GTGATCTCAATGTTTCTAAGCGCGTGGCCATTTGGTTCGACCTTGGCTTGTGTGTGGAGCTCAGCGTGGCTCT
101 V I F N V S K S G G H L G S N L G V V E L T V A L
376 CATTATGCTTCAACACTCTCAGATAAGACTTTGGGACGCTGGTTCATGCTTACCACATATAAACTTG
126 H Y V F N T P Q D K I L W D V G H Q S Y P H K I L
451 ACTGGAAAGAGACCAAGTGGACCAATTAGACAGACAAAACGGTGGCGGTTTCCCAAAAGCTGGAAGT
126 T G R R D R M D T I R Q T N L G A G F T K R S E S
526 GAGCATGATTCCTGGCAGCGACAGCTCCACACATTTGACGAGGTTGGGGATGGCTGGGAAAGGAT
176 E H D C F G T G H S S T I S A G L G M A V G R D
601 TTAAGGGAGGACAGCAGTGTAGTTGCTTATATAGTGGAGCTGCTACTCGGCTCAAGCTTATGAAAGCC
176 L K E G T N D V V A I T G D C A H T A G Q A E I A
676 ATGAACTGCTGCTGTTATTAGATTCAGATATGATGTGATCTTAAAGACANATAAAGACTCTCTACTACT
226 M N N A G Y L D S D N I V I L N D N K Q V G S L P T
751 GCCACACTCGATGGTCTATACTCTGTTGGCGTTTGGACGCTCTTATAGTGTGGAGTGGACGCAAGCACT
251 A T L D L G P I P P V G A L S S A L S R L Q S N R P
826 CTCAGGAAATACGTGAAGTCCCAAGGAATACCAAAACAGATCGGTCGCTATGCATGAATGTGCTAAG
126 L R E L R E V A K E V T K Q I G G C P M H E I A A K
901 GTGACAGTATGCTGCTGGTATGATGGTGTCTGACTACTTGAAGAATCTGCTTATTATCAAT
301 V D E Y A R G M I S G S S L F E E L G L Y Y I
976 GGCTGTGCTGATGTCACAGCATTTGATGATCTTGGCCATCTCAAGAGGTTAAGATCAAAAACCCGGT
326 G P V D S G H N I D D L V A E L K E V K S T K T G
1051 CACTGCTGATTCATGTCATACCGAGAAAGCAGAGGATACCCGTTGCGAAGAGCTCCGCAAGTACCAT
351 P V L I H V I T E K G R G Y P Y A E R A A D K V H
1126 GGTGGCCAACTTGTATGGCCGACAGGAAAGCAATCAAGCTCAGTCTCAACTCAGTCTTACAGCACTAC
376 G V A K F D P A T G K Q F K S S A P T Q S Y T T Y
1201 TTTCCGAGGCAATGATTCGTCAGCGGAGTGGATAAAAAGATCCGCTATCCATCCATGCTGGATGGTGGGA
401 F A E A L I A E A E V D K R I V G C I H A A M G G G
1276 ACTGATTAATCTATTCCTGCTGCTTCCCTAGTGGCTTGTATGTTGGATGGCAGCAACAGCATCACT
426 T G L N L F L R R F P S R C F D V G I A E Q H A V
1351 ACATTTGCTGCTGATGGCATGTAAGCCCTTAAACCTTTTTCGCGATTACTCGCTGTTCTGCGAGGGGT
451 T F A A G L A C E G L K P F C A I Y S S F L Q R G
1426 TATCATGAGTACTCATGATGATAGATTGCAAGCTGCTGGAGTATTCGTTGGACAGCAGGACTGCT
476 Y D Q V V H D V D L Q K L P V R F A L D R A G L V
1501 GGGCAGCGCTCCACACATTCGGGCTGTTGATGTCACCTATGCGTCCCGAATCCCGAATGCTGGTGAATG
501 G A D G P T H S G S F D V T Y M A C L P N M V V M
1576 GCTCTCCGATGAGGCTGAGCTTTTACATGGTGGCACTGCTGCTGCAATGAGCAGACAGTACTGCTTTC
526 A P S D E A E L F H M V A T A A A I D D R P S C F
1651 CGTACCAGGAGAAATGGATAGCATGCCCTGCCACCCGCAACAAAGCAATTCCTCTGAGATTGAAA
551 R Y P R G N G I G M P L P P G N K I P L E I G K
1726 GGTGAAATATGATTGAAGGCAACAGTATGCACTCTTGGCTATGGAAGCGGCTTCAAAGTGTCTGGCTGCA
576 G R I M I E G Q R V A L L G Y G T A V Q S C L A A
1801 CCTGCTTGTAGTACACAGCGGGCTTAAACATACTTTGCGATGCGCGTTCGCAACACTTGGATCAT
601 A G L V Q Q R G L N I T V A D A R F C K P L D H T
1876 CTCATCCGAACCTTGAAGCTCAGTGGCTTCTGATCCGCTTGAAGAGCATCAATAGAGGGTGTGGCTCT
626 L I R T L A K S H E V L I T V E E G S I G G F G S
1951 CACCTGCCACATTTCAAGCGCTTGGCTCTTGTGGAACCTTAAAGTGGACACACTGCTGCTCCAGAT
651 H V A H F M A L D G L L D G N L K W R P L V L P D
2026 CBTACATAGAGCATGGAGCGCTGCCACCAATAGCGGAAGCTGGCTGACTCCATCCATAGTGCACACT
676 R Y I E H G A P A D Q L A E A G L T P S H I A A T
2101 GTGTTCAATGACTGGGCAACAGAGAGGCTTGGAGGTTATGTCATAG
701 V F N V L G Q T R E A L E V M S *

```

图 4 茅苍术 DXS 基因序列及预测的氨基酸序列
Fig. 4 Sequence of DXS gene and its deduced amino acid from *Atractylodes lancea*

茅苍术 DXS 与甜叶菊 DXS 在同一进化枝上(图 5), 表明其亲缘关系较近, 与传统分类系统一致。

利用 Clustalx 1.81 软件进行多序列比对发现, 茅苍术 DXS 蛋白在 N 端含有异戊烯基结构域, 且与蒲公英等其他植物蛋白序列高度相似(图 6), 说明该 DXS 蛋白为类异戊烯基超家族成员。

利用 ExPASy 在线软件系统的工具进行基本理化性质分析发现, 茅苍术 DXS 蛋白质共编码 716 个氨基酸, 理论相对分子质量为 77 065.84, 等电点为 6.53, 分子式为 C₃₄₀₉H₅₄₀₂N₉₆₂O₁₀₂₁S₂₇, 总原子数为 10 821 个, 带负电的氨基酸有 73 个(Asp + Glu), 带正电的氨基酸有 67 个(Arg + Lys), 半衰期为 30 h。不稳定系数 42.16, 脂肪族指数为 88.59, 总平均疏水性(GRAVY)为 -0.120。

利用在线分析工具 PBIL 进行二级结构预测, 结果表明茅苍术 DXS 蛋白由 α 螺旋 33.66%, 19.55% 的延伸链, 11.03% 的 β 转角和 35.75% 的不规则卷曲组成。不规则卷曲是茅苍术 DXS 中最多的结构元件, 主要以 α 螺旋存在于整个蛋白质中。使用 SWISS-MODEL 程序进行三级结构同源建模, 在 PDB 蛋白质数据库中选择与茅苍术 DXS 序列一致性最高(42.95%)的 2olx.1.B 蛋白为模板进行同源建模, 得到茅苍术 DXS 结构模型(图 7)。

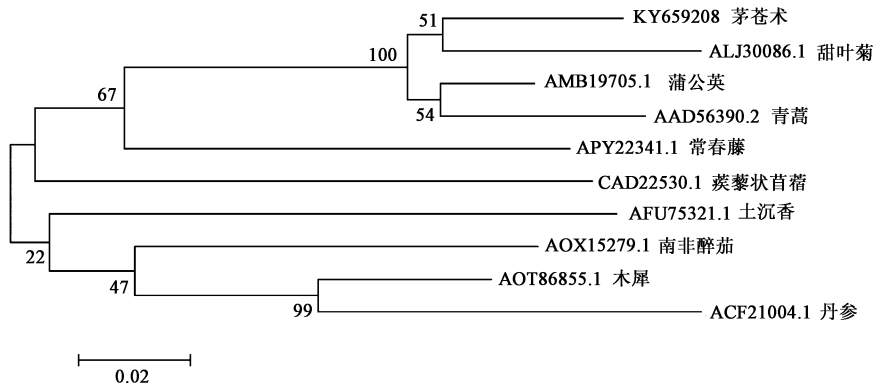


图 5 茅苍术 DXS 氨基酸的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of DXS protein from *Atractylodes lancea* and other plants

3.5 DXS 在茅苍术组织中的特异性表达 Real-time PCR 扩增曲线良好, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析各组织的相对表达量, 结果显示茅苍术不同组织中 DXS 基因特异性表达的差异较显著, DXS 在茅苍术叶中表达量最高相对值达到 60.4; 花中表达量约为叶中表达量的一半, 相对值为 33.4; 相比于叶和花, 在根茎和根中表达较低分别为 0.5 和 1。

4 讨论

目前编码 DXS 的基因已经从包括拟南芥(A.

thediana), 玫瑰天竺葵 (*Pelargonium* spp), 南非醉茄 (*W. somnifera*), 番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 等物种中克隆得到^[10-11]。植物体中 DXS 的含量相对较低, 因此直接分离存在较大困难^[12]。生物信息学分析发现 DXS 氨基酸序列同源性较高, 且均具有 2 个高度保守的氨基酸序列 WDVGHN 和 IAENHA^[13]。本研究所得茅苍术 DXS 基因具有上述 2 个保守序列, 且与其他物种的 DXS 基因同源性较高, 与文献报道相似。

- [3] Wright L P, Rohwer J M, Ghirardo A, et al. Deoxyxylulose 5-phosphate synthase controls flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2014, 165(4):1488-1504.
- [4] Walter M H, Hans J, Strack D. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots[J]. *Plant J*, 2002, 31(3):243-254.
- [5] Rodr-Guezconcepción M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(3):1079-1089.
- [6] 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: 161.
- [7] 张磊, 欧阳臻, 赵明, 等. 茅苍术中苍术酮、茅术醇、 β -桉叶醇和苍术素的同时含量测定及其聚类分析[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(6):725-728.
- [8] HUANG Q, HUANG X, DENG J, et al. Differential gene expression between leaf and rhizome in *Atractylodes lancea*: a comparative transcriptome analysis[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 30(7):348-355.
- [9] 蒋玲, 谷巍, 巢建国, 等. 濒危药用植物茅苍术法呢基焦磷酸合酶基因克隆及其表达分析[J]. *中草药*, 2017, 42(4): 760-766.
- [10] Jadaun J S, Sangwan N S, Narnoliya L K, et al. Over-expression of DXS gene enhances terpenoidal secondary metabolite accumulation in geranium and *Withania somnifera*: active involvement of plastid isoprenogenic pathway in their biosynthesis[J]. *Physiol Plant*, 2017, 159(4): 381-400.
- [11] Totté N, Ende W V D, Damme E J V, et al. Cloning and heterologous expression of early genes in gibberellin and steviol biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana* [J]. *Can J Bot*, 2003, 81(5): 517-522.
- [12] Wright L P, Phillips M A. Measuring the activity of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first enzyme in the MEP pathway, in plant extracts [J]. *Plant Isoprenoids*, 2014, 1153(31): 9-20.
- [13] 金蓉, 朱长青, 徐昌杰. 1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)及其编码基因[J]. *中国细胞生物学学报*, 2007, 29(5):706-712.
- [14] 李尊强, 王春军, 杨爱国, 等. 烟草 DXS 基因的克隆及其亚细胞定位分析[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(30):11957-11960.
- [15] 田洁. O-18 标记 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸的合成研究[D]. 西安:西北大学, 2010.

[责任编辑 邹晓翠]