

杜仲 2-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环焦磷酸合酶基因 全长 cDNA 克隆与序列分析

刘攀峰^{1,2}, 乌云塔娜^{1,2}, 杜兰英^{1,2}, 吴敏^{1,2}, 黄海燕^{1,2}, 杜红岩^{1,2}

(1. 中国林业科学研究院 经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003; 2. 国家林业局 杜仲工程技术研究中心, 河南 郑州 450003)

摘要: 2-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环焦磷酸合酶(MDS)基因曾被认为是调控植物 2-甲基-D-赤藓糖醇 4-磷酸(MEP)途径的一个关键节点。为解析杜仲 MDS 基因序列信息和预测基因功能, 以叶片 cDNA 为模板, 采用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)及 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术分离出杜仲 MDS 基因的 cDNA 克隆, 并通过一系列生物信息学方法进行序列分析。结果表明: *EuMDS* 基因 cDNA 全长 976 bp, 5'端非编码区长 119 bp, 3'端非编码区长 146 bp, 编码 236 个氨基酸。推导 *EuMDS* 氨基酸序列中包含转运肽序列(A₁~A₅₆)以及多个植物 MDS 蛋白保守的功能位点(A₈₄, A₈₇, A₈₉, A₁₂₁, A₂₁₃, A₂₁₇, A₂₂₁, A₂₂₃, A₂₂₈)。推导 *EuMDS* 蛋白二级结构中 α -螺旋占 40.3%, β -折叠占 13.6%, 螺环结构占 46.2%。推导 *EuMDS* 蛋白三级结构由 3 个亚单位组成, 并相互围绕形成 1 个分子内腔。系统进化分析表明 *EuMDS* 蛋白与啤酒花 MDS 蛋白亲缘关系最为接近。预测所克隆的 *EuMDS* 基因在杜仲萜类生物合成中发挥重要功能。图 8 参 23

关键词: 林木育种学; 杜仲; 2-甲基-D-赤藓醇-2,4-环焦磷酸合酶(MDS); 基因; 序列分析

中图分类号: S718.48

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2014)03-0410-07

Cloning and sequence of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase gene cDNA from *Eucommia ulmoides*

LIU Panfeng^{1,2}, Wuyuntana^{1,2}, DU Lanying^{1,2}, WU Min^{1,2}, HUANG Haiyan^{1,2}, DU Hongyan^{1,2}

(1. Non-timber Forest Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, Henan, China 2. The *Eucommia* Engineering Research Center, National Forestry Administration, Zhengzhou 450003, Henan, China)

Abstract: 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase (MDS) gene had been regarded as a key regulating plot in plant 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway. To dissect the MDS gene sequence information and predict the gene function of *Eucommia ulmoides*, the homologous MDS gene cDNA was isolated from leaves by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques, and the sequence analysis was also conducted by series of bioinformatic methods. Results showed that and the full-length cDNA of *EuMDS* was 976 bp, including a 5' non-coding region of 119 bp and a 3' non-coding region of 146 bp with 236 amino acids encoded. The transit peptide sequence (A₁~A₅₆) and multiple conserved functional sites (A₈₄, A₈₇, A₈₉, A₁₂₁, A₂₁₃, A₂₁₇, A₂₂₁, A₂₂₃, and A₂₂₈) of plant MDS enzyme were found in the deduced coding sequence of *EuMDS*. The secondary structure of the *EuMDS* protein was predicted with proportions of α -helix to 40.3%, β -sheet to 13.6%, and loop/coil to

收稿日期: 2013-05-28; 修回日期: 2013-09-09

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201004029)

作者简介: 刘攀峰, 助理研究员, 从事杜仲栽培与育种研究。E-mail: pfengliu@126.com。通信作者: 杜红岩, 研究员, 博士生导师, 从事杜仲育种、栽培与综合利用研究。E-mail: dhy515@126.com

46.2%。The calculated protein tertiary structure of EuMDS was exhibited as a molecular cavity formed by three subunits. Phylogenetic analysis revealed that the evolutionary relationship of EuMDS protein was closest to the *Humulus lupulus* MDS protein. It was suggested that the cloned *EuMDS* exert an important function in *Eucommia ulmoides* terpene biosynthesis. [Ch, 8 fig. 23 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Eucommia ulmoides*; MDS; gene; sequence analysis

萜(terpenoid)是以异戊二烯(isoprene)为基本单元的生物大分子,在人们日常生活、食品、医疗保健、化工材料及军事等领域蕴藏着巨大的商业价值。甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA pathway)和 2-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸途径(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP pathway)是生物中萜类物质合成的 2 条基本途径,前者存在于几乎所有古生菌和真核生物,也存在于一些革兰氏阳性菌中;后者存在于大多数细菌和植物体内^[1-2]。2-甲基-D-赤藓醇-2,4-环焦磷酸合酶(2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase, MDS)是 MEP 途径第 5 个作用酶,催化 4-(5'-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇-2-磷酸(4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphate, CDP-MEP)生成 2-甲基-D-赤藓醇-2,4-环焦磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate, MEcPP),该反应需要镁离子(Mg^{2+})或锰离子(Mn^{2+})协助,并释放出 1 分子胞苷磷酸^[3-4]。一些研究认为 MDS 是 MEP 途径关键酶,在异戊烯焦磷酸(IPP)生物合成过程中起重要的调节作用。在悬浮培养长春花细胞中发现上调 MDS 基因可提高单萜类物质吲哚胆碱的含量,也有利于 MEP 途径代谢流向更下游的方向^[5]。半定量 RT-PCR 结果显示红豆杉 *Taxus chinensis* 和银杏 *Ginkgo biloba* MDS 基因具有组织特异性,并都以叶中表达量最高^[6-7]。杜仲 *Eucommia ulmoides* 是中国名贵的中药材和工业橡胶原料树种,适生于华中、华西、西南及西北各地,现广泛栽培^[8]。以杜仲胶和环烯醚萜类为典型的杜仲萜类次生产物具有重要的应用与经济价值,其中杜仲胶属多萜化合物,具有优良的共混和加工性能,是材料领域重要的新型战略物质^[9-10];杜仲环烯醚萜类属单萜化合物,具有利胆、镇痛、保肝、抗癌、抗炎、抗氧化以及抗骨质疏松等功能,是保健及医药领域重要的天然活性成分^[11-12]。目前对杜仲萜类生物合成特别是 MEP 途径相关作用基因开展的研究不多,对杜仲 MDS 基因的克隆及序列分析尚无报道。本研究以杜仲叶片为材料,分离 MDS 同源基因全长 cDNA,通过生物信息学方法对基因序列及推导的氨基酸序列进行分析,以期研究杜仲 MDS 基因功能,阐释杜仲萜类生物合成机制和分子育种提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2011 年 4 月下旬于中国林业科学研究院经济林研究开发中心院内采集杜仲良种‘华仲 6 号’叶片,清洗干净后投入液氮带回室内 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 试 剂

焦碳酸二乙酯(DEPC)(Sigma,德国),聚乙烯吡咯烷酮(PVP)(Amresco,美国),十二烷基磺酸钠(SDS)(上海生工,中国),氯化锂(Amresco,美国),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)(Amresco,美国),MightyAmp DNA Polymerase Ver. 2 (Takara,中国大连),琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根,中国北京),3'-Full RACE Core Set(Takara,中国大连),5'-Full RACE Kit(Takara,中国大连),M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit(Takara,中国大连),pEASY-T1 Cloning Kit(全式金,中国北京),DH5 α 感受态细胞(天根,中国北京)。

1.3 试 验 方 法

1.3.1 总核糖核酸(RNA)提取与单链 cDNA 的合成 采用改良的 CTAB-LiCl 法提取杜仲叶片 RNA^[13-14],对满足实验要求的 RNA 样品保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。按 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 说明书进行单链 cDNA 的合成。

1.3.2 引物设计 根据一段已知杜仲 MDS unigene 序列,结合试剂盒锚定引物序列,设计适于 3'RACE 的巢式扩增的引物 3P1: 5'-CGTACTCGGTTCTCGTT-3', 3P2: 5'-CTCGACTCCGTCGAAGTCGCTC-3' 以及 5'RACE 巢式扩增引物 5P1: 5'-TGGATCGGAATCTGGAAATATC-3', 5P2: 5'-AGCAATACATCGC-CGTCGGAGT-3'。

1.3.3 基因全长 cDNA 末端扩增 3'RACE 及 5'RACE 的聚合酶链式反应(PCR) 反应体系与反应条件参照 Takara 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 与 Takara 5'-Full RACE Kit 说明书操作。

1.3.4 目的片段回收与测序 按 TIANGEN 通用型 DNA 回收试剂盒说明进行目的 PCR 产物的回收; 按 pEZY-T 克隆试剂盒说明将扩增片段连接到克隆载体, 鉴定后将阳性克隆送至南京金斯瑞公司测序。

1.3.5 生物信息学分析 利用美国生物技术信息中心 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)Blast 程序进行序列相似性检索, 并用 ORF Finder 程序查找基因 cDNA 开放阅读框架; 利用 ExPASy(http://cn.expasy.org) ProtParam 程序与 ScanProsite 程序分析氨基酸残基数目与组成、蛋白质相对分子量、理论等电点以及功能位点等; 利用 Predict Protein(http://www.predictprotein.org/)以及 PSIPRED 方法(http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred)预测蛋白质的细胞定位及二级结构^[15]; 利用 ChloroP 1. 1 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/)进行转运肽的预测^[16]; 利用 SWISS-MODEL 程序(http://swissmodel. expasy. org/)进行蛋白质的同源建模^[17]; 利用 Lasergene 软件进行蛋白质序列的多重比对并通过 MEGA 5 软件构建基因的系统进化树^[18]。

2 结果与分析

2.1 杜仲 MDS 基因全长 cDNA 的分离及序列特征

分别利用 3'RACE 引物和 5'RACE 引物在逆转录的 cDNA 模板上扩增出 1 条约 650 bp 和 1 条约 500 bp 的特异条带(图 1a,图 1b), 测序拼接后得到 1 条长 976 bp 的基因序列, 与紫茎泽兰 *Ageratina adenophora*(GU828010.1), 甜菊 *Stevia rebaudiana*(DQ631427.3), 长春花 *Catharanthus roseus*(EU034700.1)、葡萄 *Vitis vinifera*(XM_002278370.1), 芜菁 *Brassica rapa*(AB300309. 1)MDS 序列的相似性分别为

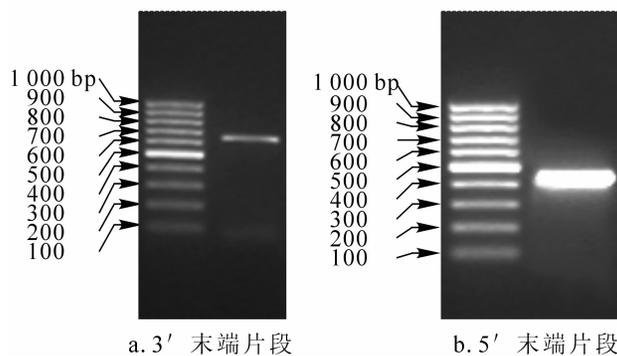


图 1 *EuMDS* 基因 RT-PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳图
Figure 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification of *EuMDS*

79%, 78%, 79%, 77%, 79%。通过 ORF finder 工具查找到 1 个长 711 bp 的开放阅读框, 5'-UTR 长 119 bp, 3'-UTR 长 146 bp, 共编码 236 个氨基酸残基(图 2)。推导氨基酸序列与毛果杨 *Populus trichocarpa*(XP_002304519.1), 橡胶 *Hevea brasiliensis*(AAS94122.1), 啤酒花 *Humulus lupulus*(AEV89963.1), 丹参 *Salvia miltiorrhiza*(AEZ55667.1), 萝芙木 *Rauwolfia verticillata*(ABV89583.1)MDS 蛋白序列相似性分别为 73%, 73%, 76%, 74%, 76%, 确定取得杜仲 MDS 基因 cDNA 全长序列, 将其命名为 *EuMDS*。

```
1 ttctccttctgacctcagcttctctagcctttctctttagaaactgaacctgtaaatagcgttaaagtcaaacgaacccacaggccacagctctctctctctcct
106 ctctctctctgcaaatggctatggctgcttctccactctactgcctctccaatctgtagaagagctataaataagcaattatttctctctcctcctctcgtac
1 M A M A A S P L Y C A S P I C R R A I N K Q L F L S P P S V H
211 actcggttctctctctcctcctcagtttctctccggtccgcccgaaggccgccgacctgggtgctggtatctgcccagccaccaccgccggtgaaattg
32 S V L V P T P S S V S L R S A P R P P L V L V S A A A T T A V E I E
316 agcctgagatcaccgctcgaactccgctgaagtcgctcccgctccgagtcggccacggatcgatctccaccgattggaaccaggttaccgctaatcctggcg
67 P E I T A S T P S K S L P F R V G H G F D L H R L E P G Y P L I I G G
421 gaattaacataccacacgagaaaggctgcgagctcactccgacggcgaatgattgcttactgtgtggtgatggatgttggggctttaggctaccggaca
102 I N I P H E K G C E A H S D G D V L L H C V V D A I L G A L G L P D I
526 tcggccagatatttccagattccgatccaaagtggaaaggggcgcctctctgttttcattaaagaagctgtgagctgatgcaaggccgggtatgaactg
137 G Q I F P D S D P K W K G A A S S V F I K E A V R L M H E A G Y E L G
631 gaaacttggatgcgacattgatacttcaaaagaccgaagctaaagcctcataagagagaatattaggcacaatttaccagcccttgggagccgatcctcgttg
172 N L D A T L I L Q R P K L S P H K E N I R A N L S A L L G A D P S V V
736 tgaattaaagcgaacacacgaaaaagtcgatagctctcgagaaaaatagaagtattgctgcacatcacagttgttctctctcagggaaataggttctctctc
207 N L K A K T H E K V D S L G E N R S I A A H T V V L L M R K *
841 tctcctccatataatgtatgtgtgtgtgagttgtttgtacctagaaaaatcctatgatccaaaattgtatgatagacttgatggtttttatactctc
946 ttggaagtgcttatggtctataaggtgccg
```

图 2 *EuMDS* 全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Figure 2 Full-length sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of *EuMDS*

2.2 *EuMDS* 编码蛋白的结构特征

2.2.1 *EuMDS* 蛋白一级结构分析 ExPASy ProtParam 程序预测 *EuMDS* 编码蛋白分子量为 25. 14 kD, 理论等电点为 7. 77; 氨基酸组成中以亮氨酸(12. 3%), 丙氨酸(10. 6%), 脯氨酸(9. 3%), 丝氨酸(9. 3%)

含量较高，蛋白不稳定系数 50.02，属不稳定蛋白质。TargetP 1.1 Server 预测 EuMDS 亚细胞定位于叶绿体上，预测分值为 0.943，可靠性 I 级。ExPASy protscale 程序推断 EuMDS 为疏水性蛋白。Vector NTI Advance 10 多重比对显示 EuMDS 蛋白具有植物 MDS 蛋白典型的保守位点(图 3)，包括构成蛋白分子内腔所需的天冬氨酸位点(A87)和 2 个组氨酸位点(A₈₉, A₁₂₁)，以及其他保守的活性位点(A₈₄, A₂₁₃, A₂₁₇, A₂₁₈, A₂₂₁, A₂₂₃, A₂₂₈)。5 种同源 MDS 序列多重比对后相同的氨基酸位点达 70 个，几种植物 MDS 蛋白 N 端比大肠埃希菌 *Escherichia coli* 多出 1 段约 80~90 个氨基酸残基的蛋白序列，说明此段区域可能存在转运肽，ChloroP 1.1 Server 程序推导 EuMDS 蛋白转运肽序列长为 56 个氨基酸残基，在去除转运肽序列后 EuMDS 成熟蛋白分子量为 19.24 kD。

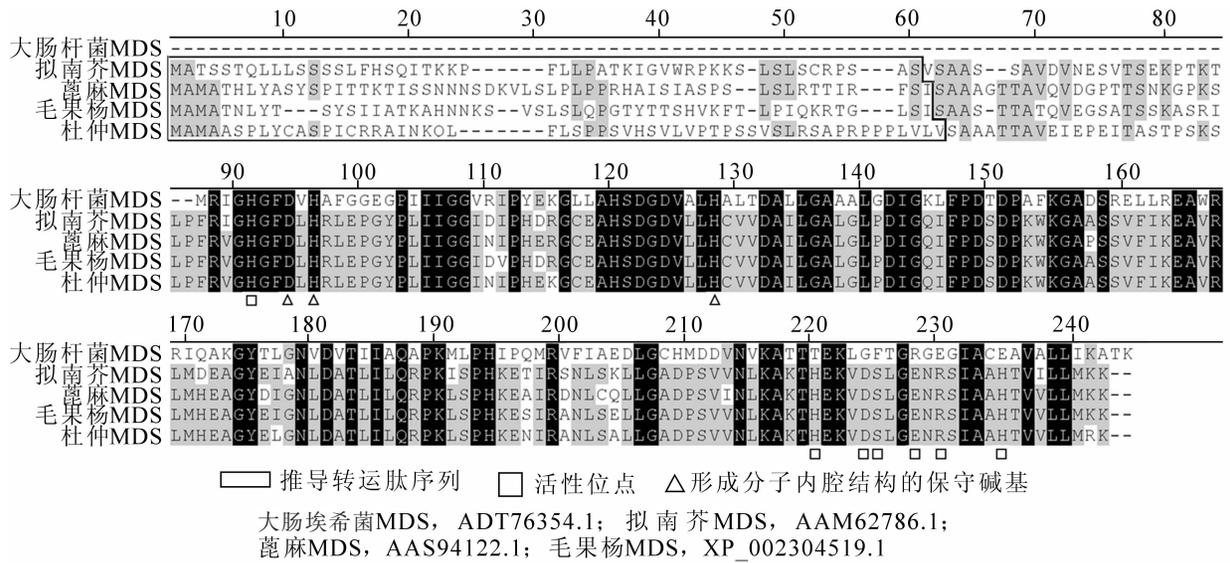


图 3 EuMDS 氨基酸序列与同源序列的多重比对

Figure 3 Multi-alignment in deduced EuMDS amino acid sequence and homologous sequence

2.2.2 EuMDS 蛋白二级结构及保守结构域分析 Predict Protein 在线预测 EuMDS 蛋白二级结构中 α-螺旋占 40.25%，β-折叠占 13.56%；螺环结构占 46.19%，属于混合型结构(图 4)。保守结构域分析 EuMDS 结构域属 MECDP 合成酶蛋白家族，并包含锌离子(Zn²⁺)结合位点、CDP 结合位点以及三聚体接触面等功能域(图 5)。

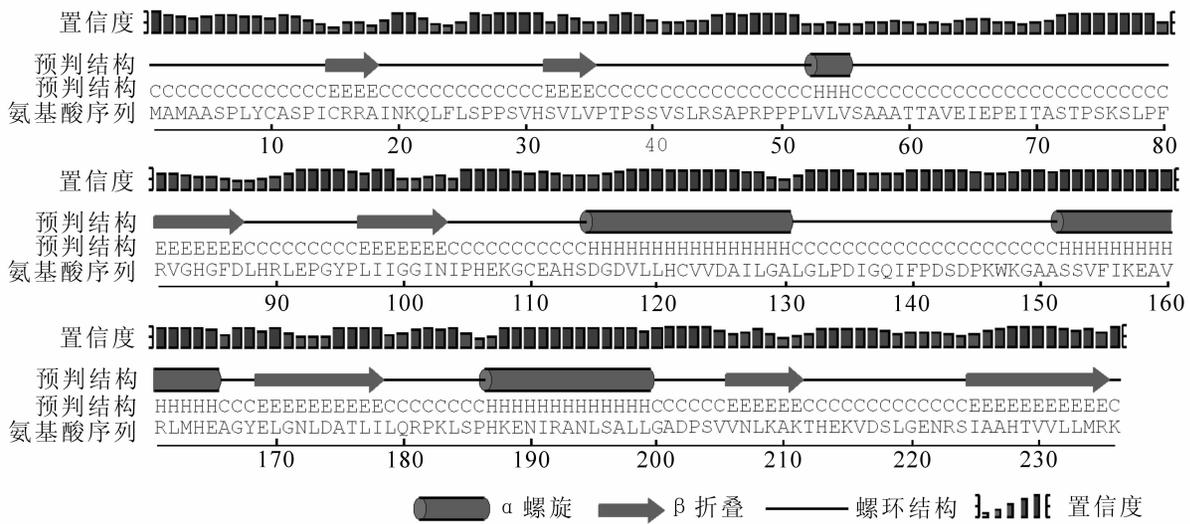


图 4 EuMDS 蛋白二级结构预测

Figure 4 Predicted secondary structure of the deduced protein of EuMDS

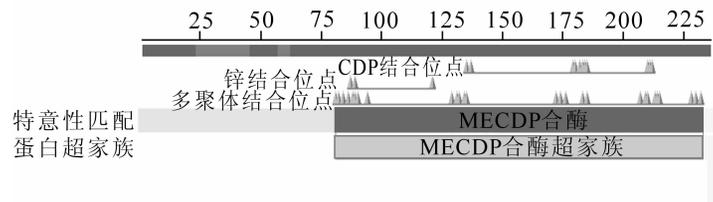


图5 EuMDS蛋白保守结构域预测

Figure 5 Predicted conserved domains of deduced EuMDS protein

2.2.3 EuMDS蛋白功能位点与翻译后磷酸化修饰预测 ExPaSy ScanProsite 程序分析 EuMDS 基序类型分为5种, 含有9个潜在的功能位点, 包括1个蛋白激酶C磷酸化位点(SIR, 42-44); 3个酪蛋白激酶II磷酸化位点(TavE, 61-64; SdgD, 114-117; SlgE, 148-151); 2个N端糖基化位点(NRSI, 152-155; NLSA, 189-192); 2个N端豆蔻酰化位点(GAdpSV, 195-200; GAasSV, 214-219); 1个酪氨酸激酶磷酸化位点(RlmhEag. Y, 226-233)。NetPhos 2.0 server 共预测出11个磷酸化位点, 包括6个丝氨酸磷酸化位点(A₄₂, A₄₅, A₇₅, A₁₁₄, A₁₈₅, A₂₁₈), 3个苏氨酸磷酸化位点(A₆₀, A₆₁, A₇₃)以及2个酪氨酸磷酸化位点(A₉, A₁₆₈)(图6)。

2.2.4 EuMDS蛋白三级结构分析 以拟南芥 *Arabidopsis thaliana* MDS蛋白(2 pmp)为模板对 EuMDS蛋白同源建模, 并利用 Swiss Pdb Viewer 4.0.4 对相应功能域进行标注, 如图7所示, EuMDS蛋白空间上由3个亚单位组成, 三者相互围绕形成1个分子内腔结构, 且结构内部有多个高度保守的氨基酸残基。ExPaSy structure assessment 程序评测推导的 EuMDS蛋白模型 QMEAN 6 得分为0.950, 与模板蛋白序列的相似性为91.88%。

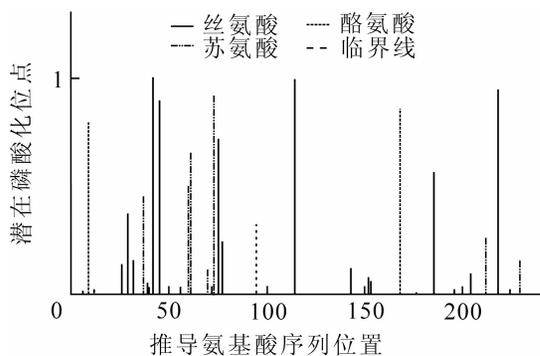


图6 EuMDS蛋白翻译后磷酸化位点预测

Figure 6 Predicted phosphorylation sites of deduced protein of EuMDS

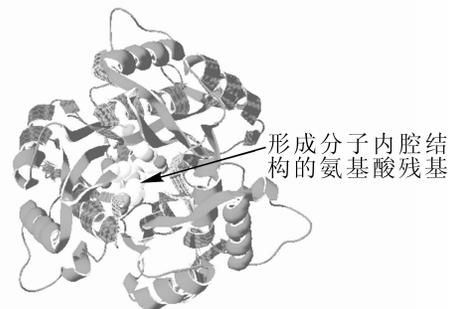


图7 EuMDS蛋白三级结构预测

Figure 7 Predicted tertiary structure of the deduced protein of EuMDS

2.3 EuMDS同源蛋白系统进化树的构建

利用 MEGA5 中 Clustal W 法对 20 个物种 MDS 氨基酸序列进行比对, 并用 Neighbor-joining 法构建了系统进化树(图8)。结果表明: 不同来源的 MDS 蛋白序列在进化上分属不同的分类群, 植物 MDS 蛋白之间分类界限较为模糊, 说明其进化关系较为复杂。EuMDS 蛋白与啤酒花 MDS 蛋白间的亲缘关系最为接近, 距离为 0.032, 其次为紫茎泽兰(0.039), 美丽帽柱木 *Mitragyna speciosa*(0.052), 毛果杨(0.052), 葡萄(0.052)和橡胶(0.066)。

3 讨论

从杜仲皮、叶中分离出十几种环烯醚萜类化合物, 包括京尼平苷、京尼平昔酸、桃叶珊瑚苷、杜仲苷、筋骨草苷和车叶草酸等。这些活性物质具有丰富且独特的药理药效和保健功能^[19-20], 而高分子材料杜仲胶在海底电缆、器件装饰、绿色轮胎、医疗器械、消音减震、密封堵漏等领域发挥独特作用^[21]。自杜仲萜类化合物开发利用以来, 研究者们不断尝试各种方法以期提高产量。但是基于化学合成法需经一系列繁杂的催化反应, 且成本高、得率低、毒性大, 随基因工程方法不断发展, 于分子水平上进行萜类

合成的人工调控, 对目的化合物定向生产和树种定向培育具有重要意义。MEP 合成途径相对于 MVA 途径更广泛地存在于自然界中, MEP 途径相关基因对萜类合成的生物调节机制日益引起萜类研究关注。基于生物信息学分析的结果表明 EuMDS 蛋白具有植物 MDS 典型功能位点、基序及结构域, 意味着所克隆 *EuMDS* 是高等植物 MDS 基因家族新成员, 可为杜仲萜类代谢工程候选基因筛选提供基础信息, 但其基因功能的判定有待深入研究。

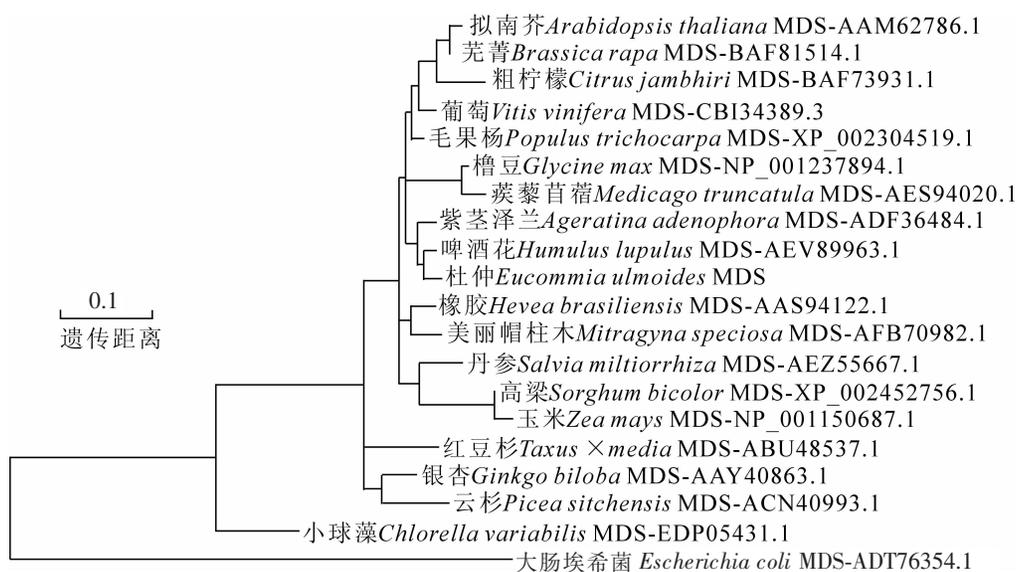


图 8 MDS 同源蛋白的系统进化树分析

Figure 8 Phylogenetic analysis in MDS homologous protein

植物 MDS 蛋白晶体结构首先从拟南芥中得到解析, 发现与细菌类存在一定差别, 主要在于由 3 个 MDS 分子亚单位相互围绕形成的分子内腔 (molecular cavity) 结构不同, 细菌 MDS 蛋白分子内腔适合与 IPP 结合, 并被推测发挥着负反馈调节功能, 而拟南芥分子内腔中几个高度保守的氨基酸残基阻碍与二磷酸键结合, 两者效应位点的差异意味着细菌和植物 MDS 蛋白在 MEP 合成途径中具有不同的调节机制。但也有一些实验推断与之相悖, 缺失 MDS 的大肠埃希菌突变体转入拟南芥 MDS 会使其致死表形得到转变, 因而推断细菌与植物 MDS 催化机制类似^[22-23]。目前 PDB 数据库已注册 53 种 MDS 蛋白晶体模型, 包括类鼻疽杆菌 *Burkholderia pseudomallei*, 栖热菌 *Thermus thermophilu*, 大肠埃希菌等 51 种细菌类型和 2 种真核生物类型。本研究通过 Swiss-model 同源建模法预测 EuMDS 蛋白三维结构与已解析拟南芥 MDS 蛋白空间特征吻合度很高, 为蛋白功能预测以及进一步解析杜仲 MDS 催化机制提供初步参考。

参考文献:

- [1] MICHEL R. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants[J]. *Nat Prod Rep*, 1999, **16**: 565 – 574.
- [2] HENRY M M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, **505**(2): 131 – 143.
- [3] LAURIS E K, CHARLES S B, WILLIAM N H. Structure of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase: An essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development [J]. *PNAS*, 2002, **99** (10): 6591 – 6596.
- [4] STEFAN S, JOHANNES K, JURAITHIP W, et al. Structure of 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate independent biosynthesis of isoprenoids [J]. *J Mol Biol*, 2002, **316**: 79 – 88.
- [5] BERTRAND V, MARTINE C, AUDREY O, et al. Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2000, **1517**(1): 159 – 163.
- [6] 刘万宏. 紫杉醇前体合成途径 2 个关键酶基因克隆和分析[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
LIU Wanhong. *Cloning and Characterization of Two Key Enzyme Genes Involved in the Biosynthesis Pathway of Taxol*

- precursors [D]. Chongqing: Southwest University, 2008.
- [7] 彭梅芳, 阳义健, 杨春贤, 等. 银杏 *IspF* 基因的克隆与功能分析[J]. 林业科学, 2008, **44**(10): 49 – 54.
PENG Meifang, YANG Yijian, YANG Chunxian, *et al.* Cloning and functional analysis of a new *IspF* gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Sci Silv Sin*, 2008, **44**(10): 49 – 54.
- [8] 李芳东, 杜红岩. 杜仲[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001.
- [9] 朱峰, 岳红, 祖恩峰, 等. 新型功能材料杜仲胶的研究与应用[J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 2005, **29**(3): 89 – 93.
ZHU Feng, YUE Hong, ZHU Enfeng, *et al.* The study and application of *Eucommia ulmoides* gum [J]. *J Anhui Univ Nat Sci Ed*, 2005, **29**(3): 89 – 93.
- [10] 李清泉, 李志刚. 杜仲胶与沥青共混性能试验[J]. 解放军理工大学学报: 自然科学版, 2007, **8**(2): 176 – 179.
LI Qingquan, LI Zhigang. Research on blending asphalt with *Eucommia ulmoides* gum [J]. *J PLA Univ Sci & Technol*, 2007, **8**(2): 176 – 179.
- [11] 董娟娥, 张靖. 植物中环烯醚萜类化合物研究进展[J]. 西北林学院学报, 2004, **19**(3): 131 – 135.
DONG Juan'e, ZHANG Jing. Advances in the research of iridoids occurring in plants [J]. *J Northwest For Univ*, 2004, **19**(3): 131 – 135.
- [12] TAKAMURA C, HIRATA T, YAMAGUCHI Y, *et al.* Studies on the chemical constituents of green leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *J Nat Med*, 2007, **61**: 220 – 221.
- [13] 陈建. 几种提取杜仲 RNA 方法的比较[J]. 林业科技开发, 2007, **21**(5): 19 – 21.
CHEN Jian. Comparison of methods of RNA extraction with *Eucommia ulmoides* [J]. *China For Sci Technol*, 2007, **21**(5): 19 – 21.
- [14] 周明兵, 王红珍, 赵德刚. 杜仲叶和树皮总 RNA 的快速提取法[J]. 山地农业生物学报, 2003, **22**(5): 430 – 431.
ZHOU Mingbing, WANG Hongzhen, ZHAO Degang. Fast extraction of RNA in barks and leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. *J Mountain Agric Biol*, 2003, **22**(5): 430 – 431.
- [15] JONES D T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices [J]. *J Mol Biol*, 1999, **292**(2): 195 – 202.
- [16] EMANUELSSON O, NIELSEN H, von HEIJNE G. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites [J]. *Protein Sci*, 1999, **8**: 978 – 984.
- [17] 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**: 195 – 201.
- [18] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28**: 2731 – 2739.
- [19] 王文明, 庞晓萍, 成军, 等. 杜仲化学成分研究概况(II) [J]. 西北药学杂志, 1998, **13**(2): 60 – 62.
WANG Wenming, PANG Xiaoping, CHENG Jun, *et al.* Studies on the lignans from *Eucommia ulmoides* (II) [J]. *Northwest Pharm J*, 1998, **13**(2): 60 – 62.
- [20] 刘慧, 刘仲华, 张盛. 杜仲中活性成分的研究进展[J]. 农产品加工学刊, 2011(8): 12 – 18.
LIU Hui, LIU Zhonghua, ZHANG Sheng. Active composition of *Eucommiae ulmoides* Oliv. [J]. *Acad Period Farm Prod Process*, 2011(8): 12 – 18.
- [21] 张继川, 薛兆弘, 严瑞芳, 等. 天然高分子材料——杜仲胶的研究进展[J]. 高分子学报, 2011(10): 1105 – 1117.
ZHANG Jichuan, XUE Zhaohong, YAN Ruifang, *et al.* Natural polymer material—recent studies on *Eucommia ulmoides* gum [J]. *Acta Polym Sin*, 2011(10): 1105 – 1117.
- [22] HSIEH M H, HOWARD M G. Functional evidence for the involvement of *Arabidopsis* *IspF* homolog in the nonmevalonate pathway of plastid isoprenoid biosynthesis [J]. *Planta*, 2006, **223**: 779 – 784.
- [23] BARBARA M C, JORDI P G, MARIA B, *et al.* Biosynthesis of Isoprenoids in plants: Structure of the 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana* comparison with the bacterial enzymes [J]. *Protein Sci*, 2007, **16**: 2082 – 2088.