广西植物 Guihaia Apr. 2020, 40(4): 492-500 http://www.guihaia-journal.com

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201901005

李冰怡, 李谦谦, 宫世萌, 等. 地黄核苷二磷酸激酶基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2020, 40(4): 492-500

LI BY, LI QQ, GONG SM, et al. Cloning and bioinformatics analysis of nucleoside diphosphate kinase gene from *Rehmannia glutinosa* [J]. Guihaia, 2020, 40(4): 492-500

地黄核苷二磷酸激酶基因的克隆及生物信息学分析

李冰怡, 李谦谦, 宫世萌, 李娇娇, 郑 雪, 段红英*

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453000)

摘 要: 核苷二磷酸激酶(NDPK)是一种高度保守的多功能蛋白,具有催化底物磷酸化的作用,能够参与植物的生长发育、非生物胁迫、感病应激、光合作用和能量代谢等过程。为了解地黄核苷二磷酸激酶基因(*RgNDPK* Ⅰ)的结构、功能和性质,该研究利用地黄转录组学数据,通过电子克隆的方法获得了*RgNDPK* Ⅰ基因的全长 cDNA 序列,长度为 765 bp。生物信息学分析结果表明,*RgNDPK* Ⅰ基因的开放阅读框长度为 447 bp,编码 148 个氨基酸,具有典型的核苷二磷酸激酶活性结构域和其他磷酸化活性位点。*RgNDPK* Ⅰ基因编码的蛋白质定位于细胞质,是无跨膜区域的亲水性蛋白,该蛋白质与芝麻、紫花风铃的核苷二磷酸激酶相似性较高,分别为 97%和 96%。在多种生物中已经克隆得到了核苷二磷酸激酶基因,且不同植物核苷二磷酸激酶氨基酸序列中存在多个相似的保守结构域,推测*RgNDPK* Ⅰ基因所编码的蛋白质为核苷二磷酸激酶超家族成员。该研究结果为进一步探明*RgNDPK* Ⅰ的性质、结构、功能及表达机制提供了重要的理论依据。

关键词: 地黄, 核苷二磷酸激酶(NDPK), 电子克隆, 生物信息学

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-3142(2020)04-0492-09 **开放科学(资源服务)标识码(OSID):**

Cloning and bioinformatics analysis of nucleoside diphosphate kinase gene from *Rehmannia glutinosa*

LI Bingyi, LI Qianqian, GONG Shimeng, LI Jiaojiao, ZHENG Xue, DUAN Hongying*

(*College of Life Sciences*, *Henan Normal University*, Xinxiang 453000, Henan, China)

Abstract: Nucleoside diphosphate kinase (NDPK) is a highly conserved multifunctional protein, can catalyze substrate phosphorylation and participate in many metabolic processes, such as plant growth and development, abiotic stress, susceptible stress, photosynthesis and energy metabolism. In order to understand the structure, function and character of NDPK gene in *Rehmannia glutinosa* (*RgNDPK* Ⅰ), full length cDNA of *RgNDPK* Ⅰ was obtained by silico cloning from

收稿日期: 2019-04-09

基金项目: 国家自然科学基金(31870312,31500262);河南省高校科技创新人才支持计划项目(17HASTIT034) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870312, 31500262); Scientific and Technological Innovation Talent Program of College and University in Henan (17HASTIT034)]。

作者简介: 李冰怡(1997-),女,河南宜阳人,研究方向为植物遗传学,(E-mail)1622952925@qq.com。

*通信作者: 段红英,博士,教授,研究方向为植物遗传学,(E-mail)dxdhy@163.com。

the transcriptome data of *Rehmannia glutinosa*. The length of *RgNDPK* Ⅰ was 765 bp. According to bioinformatics analysis, with an open reading frame of 447 bp, *RgNDPK* Ⅰ encodes 148 amino acids, and has typical nucleoside diphosphate kinase domain and other phosphorylation active sites. The protein encoded by *RgNDPK* Ⅰ was located in the cytoplasm, and it was hydrophilic protein without transmembrane region. The protein was similar to nucleoside diphosphate kinase of *Sesamum indicum* and *Handroanthus impetiginosus*, 97% and 96% respectively. *NDPK* gene has been cloned in many organisms, and there are many similar conservative domains in the amino acid sequences of different plants, so it is presumed that *RgNDPK* Ⅰ is a member of the nucleoside diphosphate kinase superfamily. This study provides an important theoretical basis for further exploring the character, structure, function and expression mechanism of *RgNDPK* Ⅰ.

Key words: *Rehmannia glutinosa*, nucleoside diphosphate kinase(NDPK), silico cloning, bioinformatics

核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase,NDPK)广泛存在于生物界,1953 年 Burg 等人第一次发现了 NDPK 蛋白(Dumas et al., 1992),近年来人们对 NDPK 的研究兴趣愈发浓厚(Bominaar et al., 1993)。研究发现 NDPK 是一种进化上非常保守的酶(Hu et al., 2015),能够催化底物磷酸化、维持生物体内核苷酸的代谢平衡(刘孟等,2016),还可能参与细胞增殖与发育的过程(Hu et al., 2015),也有研究表明核苷二磷酸激酶 A 表达量和多种肿瘤转移呈负相关(熊盛等,2004)。植物核苷二磷酸激酶的研究开始较晚,自从 1971 年于豌豆中分离得到第一个 NDPK 后(Edlund,1971),已从拟南芥、芒果、水稻、芝麻等植物中分离出 NDPK。目前研究的植物核苷二磷酸激酶主要有 NDPK Ⅰ、NDPK Ⅱ 和 NDPK Ⅲ 三种,其中植物 NDPK Ⅰ 的含量最高(Manigbas et al., 2011),占 NDPKs 总活性的 70%以上(王文斌等,2011),且活性最强(Hetmann & Kowalczyk,2009),可对多种底物起催化作用,但对底物有一定的偏好性,优先选择利用 ATP(Zrenner et al., 2006)。一些研究发现核苷二磷酸激酶是一种高度保守的多功能蛋白,能够参与植物的多种代谢调节过程(孙小洁和王增兰,2012),包括植物生长发育、非生物胁迫、感病应激、光合作用和能量代谢等(朱馨妮等,2017)。

地黄(*Rehmannia glutinosa*)为玄参科(Scrophulariaceae)地黄属(*Rehmannia*)多年生草本植物,其新鲜或干燥根块茎可入药(药典委员会,2010)。全国各地都有种植地黄,尤其以怀地黄药效最佳,具有增强免疫、抗病毒、降血糖、抗氧化、滋阴清热、补血止血等多种效用(Duan et al., 2018)。本研究从地黄中克隆了核苷二磷酸激酶基因的全长 cDNA 序列,并对其进行了相关生物信息学分析(郑雪等,2018),以期进一步探明地黄核苷二磷酸激酶的性质、结构及功能,为研究植物核苷二磷酸激酶的功能及其机制提供理论依据。

1　材料与方法

1.1 材料

本研究以地黄 85-5 长势良好的块根为实验材料,其栽培于河南师范大学试验田。根据电子克隆法得到的地黄核苷二磷酸激酶基因全长 cDNA 序列,设计扩增目的基因的 PCR 引物,F:5′-ATGGAGCAGACTTTCATTATG-3′, R:5′-TCACTGATAGATCCAGGAGTGAA-3′,PCR 扩增引物由上海生物工程公司合成。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 菌种、T4 克隆载体购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 试剂

在本研究中,主要用到以下试剂:反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司),琼脂糖、溴化乙锭(四川维克奇生物科技有限公司),引物(Invitrogen 公司),胶回收试剂盒、DNA Marker(DL 2 000)(宝生物生物技术公司),上样缓冲液为 6× Loading Buffer、2×Tap Master Mix(北京康为世纪生物科技有限公司)等,其他常规试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 RNA 的提取及反转录　以地黄 85-5 的成熟块根为实验材料。首先,通过 Trizol 法提取总

RNA,用 DNase/RNase-free 处理,酚-氯仿抽提去除 DNase,乙醇沉淀回收 RNA(孙鹏等,2008)。然后,通过微量分光光度计检测 RNA 的 260 nm/280 nm 及其 RNA 的浓度,并采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

本实验利用 HiScript © Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒进行地黄 cDNA 的制备,按照说明书的操作进行实验以合成 cDNA 第一链。

1.3.2 目的基因的克隆 电子克隆是在已建立的核酸序列与蛋白质序列数据库的基础上,利用计算机技术与生物信息学工具进行快速比对、拼接及分析从而获得基因的部分乃至全长 cDNA 序列(葛春艳等,2018)。本研究以地黄 85-5 六个发育时期的组合块根所转录出的 RNA 总和为材料进行转录组测序,采用 HiSeq 2500 Illumina 测序平台进行测序,通过 blast 与其他公共数据库进行同源性比对,获得基因功能的注释(王向楠,2017)。利用电子克隆的方法得到目的基因 cDNA 全长,然后在 CDS 区设计引物,以地黄的 cDNA 为模板,采用 PCR 技术克隆得到核苷二磷酸激酶的全长 cDNA 序列。

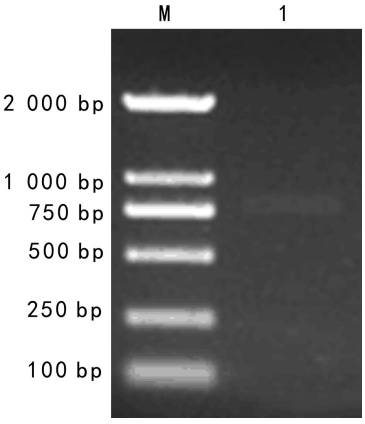
PCR 扩增反应条件如下:首先,95 ℃预变性 3 min;然后,95 ℃变性 30 s,47 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后,72 ℃总延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测,所得产物进行胶回收并连接到 pMDl9-T 载体上,然后转化 *E.coli* DH5α 感受态细胞,涂布于添加氨苄青霉素(100 mg·L^{-1})、IPTG、X-gal 的 LB 平板上,37 ℃培养 12~16 h 后进行蓝白斑筛选及菌落 PCR 检测,阳性克隆送至金唯智生物技术有限公司测序。

1.3.3 生物信息学分析 本研究通过 blastp 对 *RgNDPK* Ⅰ基因编码的氨基酸序列进行相似性搜索,并利用 MEGA7.0 和 blastn 构建其系统进化树。使用 DNAMAN 分析 *RgNDPK* Ⅰ编码蛋白的相对分子质量、等电点及其同源蛋白的多序列比对。通过 EXPASYPROTSCALE (http://web.expasy.org/protparam/)、TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)分别分析 *RgNDPK* Ⅰ编码蛋白的疏水性及其跨膜区,采用 EXPASYSignalP 4.0Serve (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 分析 *RgNDPK* Ⅰ编码蛋白的信号肽,并利用 CBS 数据库中的 TargetP 预测 *RgNDPK* Ⅰ编码蛋白的亚细胞定位。另外,通过 NCBI 的 CDD 分析 *RgNDPK* Ⅰ编码蛋白的结构域,利用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page=npsa_sopma.html)预测了 *RgNDPK* Ⅰ编码蛋白的二级结构,同时采用 SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php? func=modelling_simple1&userid=USERID &token=TOKEN)同源建模方法对 *RgNDPK* Ⅰ编码蛋白进行在线 3D 结构预测。

2 结果与分析

2.1 地黄 *RgNDPK* Ⅰ基因的克隆

本研究利用地黄的转录组学数据,通过电子克隆法得到地黄核苷二磷酸激酶基因的全长 cDNA 序列,然后在 CDS 区设计引物,以地黄的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测结果表明扩增片段长 750 bp 左右(图 1),与预期结果相符。



M. 2 000 marker; **1**. 目的片段。
M. 2 000 marker; **1**. Target fragment.

图 1 *RgNDPK* Ⅰ基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of *RgNDPK* Ⅰ gene

测序结果表明目的基因的全长 cDNA 序列为 765 bp,ORF Finder 分析得知其开放阅读框(ORF)位于第 125~571 个核苷酸,长度为 447 bp,编码 148 个氨基酸(图 2)。INTERPROSCAN 和 CDD

```
1    GGGTTTCTGGCCGTGCTGGGCAGCCACACATTTATATATATTGAGAGAGGGAGCCTCTGT 60
61   ATATCTCCGCCATTGCTTCATTGTCTGAAAACTGAAACCGATTAACCATATCCCCTCAGT 120
121  AGCAATGGAGCAGACTTTCATTATGATCAAACCTGATGGTGTTCAAAGAGGCCTGGTTGG 180
1         M  E  Q  T  F  I  M  I  K  P  D  G  V  Q  R  G  L  V  G
181  TGAGATCATTGGCAGATTTGAGAAGAAAGGTTTCACTTTGAAAGGTCTTAAGCTAATTAC 240
20     E  I  I  G  R  F  E  K  K  G  F  T  L  K  G  L  K  L  I  T
241  TGTGGACCGTGCTTTCGCTGAGAGGCACTATTCTGATTTGTCTGCAAAGCCCTTTTTCAA 300
40     V  D  R  A  F  A  E  R  H  Y  S  D  L  S  A  K  P  F  F  N
301  TGGGCTTGTTGAGTACATTATCTCTGGCCCAGTCGTTGCAATGGTTTGGGAGGGTAAGAA 360
60     G  L  V  E  Y  I  I  S  G  P  V  V  A  M  V  W  E  G  K  N
361  TGTGGTAACTACTGGTAGGAAGATCATCGGAGCCACCAACCCTGCTGACTCTGCTCCCGG 420
80     V  V  T  T  G  R  K  I  I  G  A  T  N  P  A  D  S  A  P  G
421  GACCATCCGTGGTGACTATGCCATTGACATTGGCAGGGATGTGATCCATGGTAGTGATGC 480
100    T  I  R  G  D  Y  A  I  D  I  G  R  D  V  I  H  G  S  D  A
481  AGTTGAGAGCGCGAGGAAGGAGATTGCACTGTGGTTCCCAGAAGGAATTGCAGAATGGAG 540
120    V  E  S  A  R  K  E  I  A  L  W  F  P  E  G  I  A  E  W  R
541  AAGCAGCCTTCACTCCTGGATCTATGAGTGAATTTATTGAAAGTCAGCCTATAGTTATAT 600
140    S  S  L  H  S  W  I  Y  E
601  GTATCGCCCTTAGCTACTATTTATATCAGCGAGTTGCGAGTTTTGGCTTTTCATATTTTG 660
661  AGTTTTTAGAACCTTGGATTTCGGAGTTTATTTGTCTTGTCATTGGCCGGAGCGCTTAGT 720
721  TTTCGCGAATATTATTGTTATTATATTGCTAAGTTTTCAGCTTTT                765
```

图 2　*RgNDPK* Ⅰ基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2　cDNA sequence and amino acid sequence of *RgNDPK* Ⅰ gene

的预测结果显示*RgNDPK* Ⅰ基因编码蛋白的保守结构域为核苷二磷酸激酶结构域，且与 NDPK Ⅰ的保守结构域高度相似，表明该目的基因编码蛋白是核苷二磷酸激酶超家族成员，且属于 NDPK Ⅰ类，推测其功能与核苷三磷酸盐（NTPs）的合成有关。因此，本研究将克隆到的地黄核苷二磷酸激酶基因命名为*RgNDPK* Ⅰ，并把*RgNDPK* Ⅰ基因数据提交至 GenBank 数据库，其 GenBank 数据库登陆号为 MK248733。

2.2 地黄*RgNDPK* Ⅰ编码蛋白的理化性质

地黄*RgNDPK* Ⅰ基因编码蛋白的相对分子质量为 16 395.82，等电点为 6.30。在RgNDPK Ⅰ的氨基酸种类组成中，甘氨酸（Gly）和异亮氨酸（Ile）的含量最多。

蛋白疏水性预测结果表明地黄RgNDPK Ⅰ属于亲水蛋白（图 3），且不存在跨膜区。另外，蛋白亚细胞结构定位结果表明，地黄RgNDPK Ⅰ定位于细胞质，且可信度为 2（图 4）。

2.3 地黄*RgNDPK* Ⅰ编码蛋白的结构预测

二级结构预测结果表明，地黄RgNDPK Ⅰ主要由 α 螺旋、无规卷曲、延伸链和 β 折叠构成，其中 α 螺旋占 49.32%、无规卷曲占 23.66%、延伸链占 18.24%、β 折叠占 8.78%（图 5：A）。由此可知，该蛋白中 α 螺旋比例最高。RgNDPK Ⅰ的三级结构（图 5：B）与二级结构预测结果一致，推测地黄RgNDPK Ⅰ可能为 α 螺旋型蛋白。

2.4 地黄*RgNDPK* Ⅰ编码蛋白的同源序列分析

利用 blastp 程序对地黄 *RgNDPK* Ⅰ基因编码的氨基酸序列进行同源性分析，结果表明RgNDPK Ⅰ与芝麻、紫花风铃的核苷二磷酸激酶的相似性最高，分别为 97% 和 96%（表 1）。RgNDPK Ⅰ与紫花风铃（PIN18357.1）、芝麻（XP_

表 1 RgNDPK Ⅰ与其他植物核苷二磷酸激酶序列的相似性

Table 1 Similarity between RgNDPK Ⅰ and NDPK in other plants

物种 Species	相似性 Similarity (%)	登陆号 Accession number
紫花风铃 *Handroanthus impetiginosus*	96	PIN18357.1
芝麻 *Sesamum indicum*	97	XP_011093235.1
短毛猪笼草 *Nicotiana tomentosiformis*	94	XP_009595923.1
中粒咖啡 *Coffea canephora*	94	CDP09424.1
辣椒 *Capsicum annuum*	93	XP_016544489.1
金针草 *Genlisea aurea*	93	EPS65151.1
美花烟草 *Nicotiana sylvestris*	93	XP_009788779.1
黄胡萝卜 *Daucus carotasub* ssp. *sativus*	92	XP_017226359.1
向日葵 *Helianthus annuus*	91	XP_021994173.1
橡胶树 *Hevea brasiliensis*	93	XP_021679143.1
马铃薯 *Solanum tuberosum*	92	XP_006347985.1
烟草 *Nicotiana tabacum*	91	XP_016495271.1
麻风树 *Jatropha curcas*	92	NP_001295742.1
番茄 *Solanum lycopersicum*	91	NP_001234174.2
山茶 *Camellia sinensis*	89	AEC10975.1
莲 *Nelumbo nucifera*	91	XP_010258739.1
木薯 *Manihot esculenta*	91	XP_021614468.1
博落回 *Macleaya cordata*	89	OVA11298.1
酸枣 *Ziziphus jujuba*	89	XP_015886557.1
莴苣 *Lactuca sativa*	89	XP_023772781.1

011093235.1)等物种核苷二磷酸激酶的多序列比对分析结果如图 6 所示,序列相似性达 96.25%,表明核苷二磷酸激酶蛋白的氨基酸序列在不同物种之间较为保守。

利用 blastn 和 MEGA7.0 将RgNDPK Ⅰ氨基酸序列与同源性较高的其他物种的核苷二磷酸激酶序列进行系统进化分析,选择参数 Test of Phylogeny 为 Bootstrap method,设置 No. of Bootstrap Replications 为 100,其他参数均为默认值,分析发现地黄与芝麻和紫花风铃的核苷二磷酸激酶进化距离近,表明其亲缘关系较近;而与向日葵、黄胡萝卜核苷二磷酸激酶的亲缘关系较远(图 7)。

3 讨论

核苷二磷酸激酶属于核苷二磷酸激酶超家族,具有催化底物磷酸化的作用(刘孟等,2016),在植物的种子萌发、非生物胁迫、感病应激、光合作用、防御保护相关基因的诱导表达、能量代谢和信号传递等过程具有调控作用(Yang et al., 2003;王文斌等,2011;孙小洁和王增兰,2012;朱馨妮等, 2017)。目前, 植物中研究的核苷二磷酸激酶

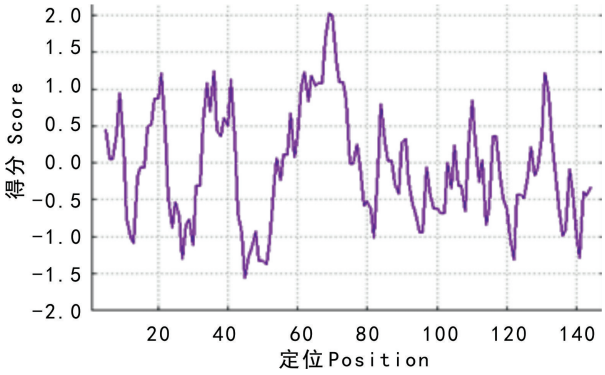


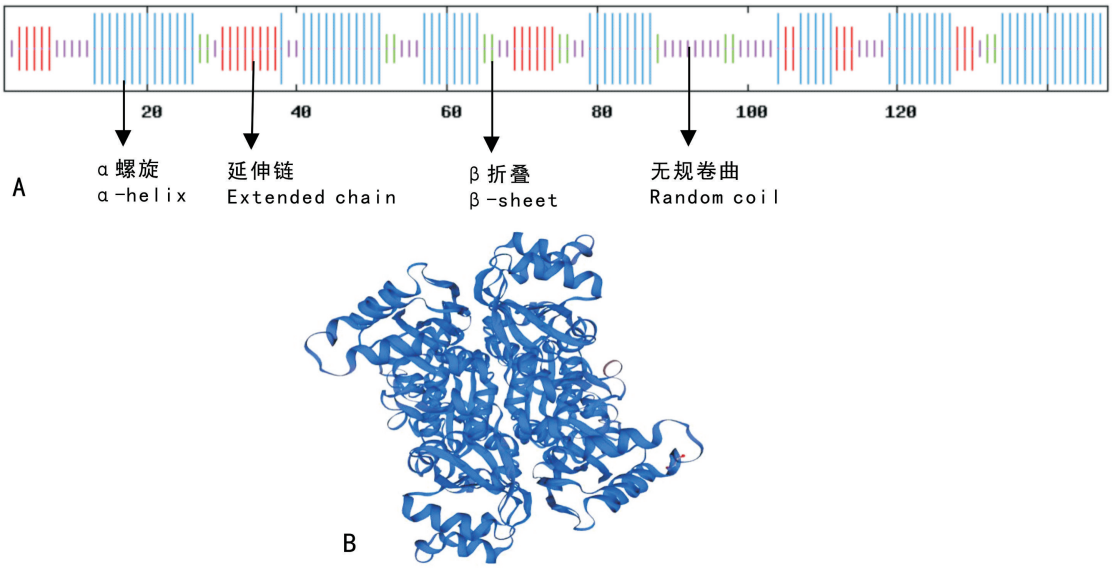
图 3　RgNDPK Ⅰ蛋白的疏水性预测

Fig. 3　Hydrophobicity prediction of RgNDPK Ⅰ protein

名称 Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
结果 Sequence	148	0.059	0.127	0.091	0.922	_	2	-
截断点 Cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

图 4　RgNDPK Ⅰ蛋白的亚细胞定位预测

Fig. 4　Subcellular localization prediction of RgNDPK Ⅰ protein



A. 二级结构预测；**B**. 三级结构预测。

A. Secondary structure prediction; **B.** Tertiary structure prediction.

图 5　RgNDPK Ⅰ蛋白的结构预测

Fig. 5　Structure prediction of RgNDPK Ⅰ protein

主要有 NDPK Ⅰ、NDPK Ⅱ、NDPK Ⅲ三种。一些研究发现植物 NDPK Ⅰ、NDPK Ⅱ、NDPK Ⅲ具有不同的亚细胞定位，其中 NDPK Ⅰ通常定位于细胞质、细胞核，NDPK Ⅲ定位于叶绿体、线粒体，而 NDPK Ⅱ可能定位于叶绿体（王文斌等，2011）。本研究利用地黄的转录组学数据，通过电子克隆法（高兴春等，2005）首次从地黄中克隆得到的核苷二磷酸激酶基因*RgNDPK* Ⅰ的 cDNA 序列，开放阅读框长度为 447 bp，共编码 148 个氨基酸，*RgNDPK* Ⅰ基因编码蛋白含有保守的核苷二磷酸激酶结构域和其他磷酸化活性位点，其结构域与 NDPK Ⅰ的保守结构域高度相似，而且亚细胞定位于细胞质，表明RgNDPK Ⅰ是核苷二磷酸激酶超家族成员，且属于 NDPK Ⅰ类。因此，推测 *RgNDPK* Ⅰ基因可能在植物生长发育和感病应激等信息传递、非生物胁迫、淀粉和纤维素的合成等方面发挥作用（朱馨妮等，2017）。

进一步分析发现地黄RgNDPK Ⅰ与芝麻、紫花风铃的核苷二磷酸激酶相似性较高，分别为 97%和 96%，而且不同植物的核苷二磷酸激酶存

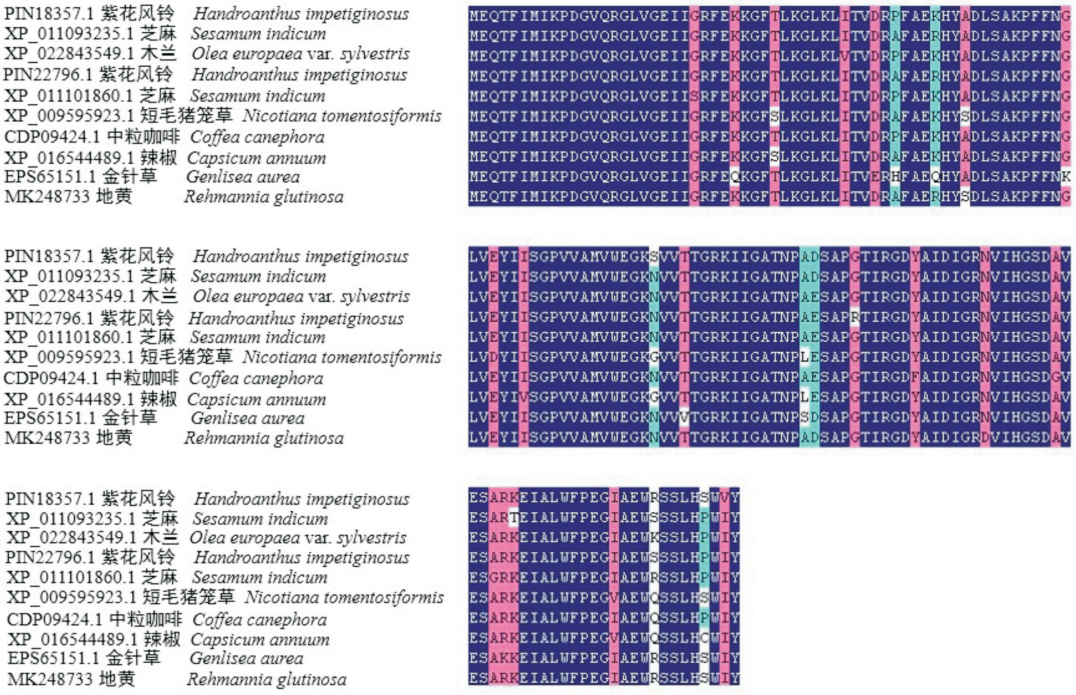


图 6 RgNDPK Ⅰ及其他植物核苷二磷酸激酶的多序列比对

Fig. 6 Multiple sequences alignment of RgNDPK Ⅰ and NDPK in other plants

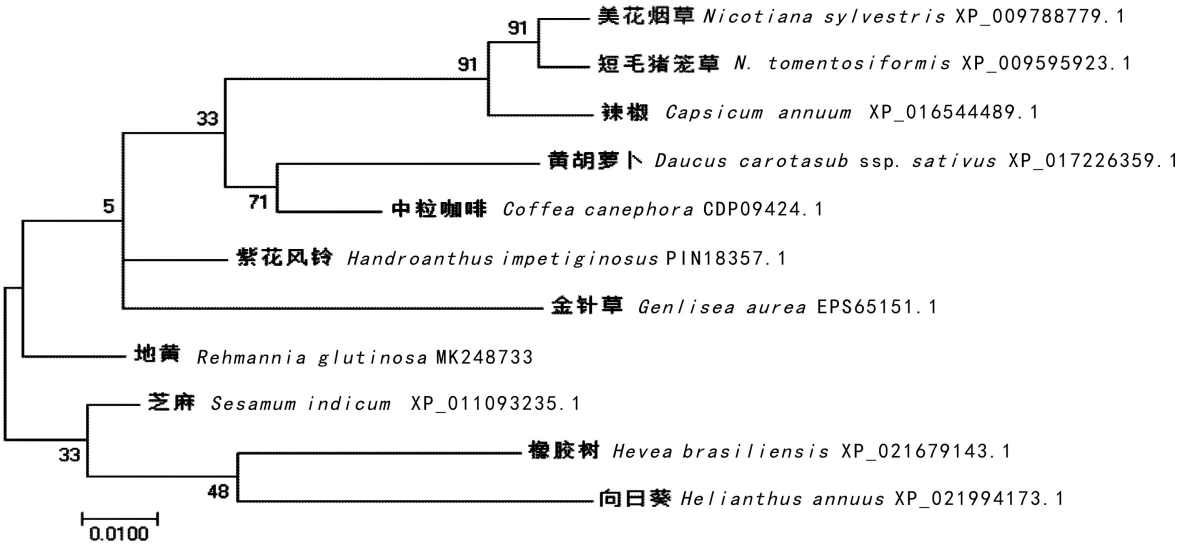


图 7 RgNDPK Ⅰ同源序列的分子系统进化树

Fig. 7 Molecular phylogenetic tree of homologous sequences of RgNDPK Ⅰ

在多个相似的保守结构域,这与前人的研究结果相似(罗睿雄等, 2016),进一步证明地黄 RgNDPK Ⅰ为核苷二磷酸激酶超家族成员。目前,植物核苷二磷酸激酶已从多种植物中被分离

出来，其研究也取得了较大的进展。刘孟(2016)研究发现核苷二磷酸激酶具有催化磷酸基团转移的作用，罗睿雄等(2016)研究发现芒果 NDPK 具有重要的化学反应催化功能和调控植物响应逆境胁迫的作用，谭龙(2011)研究表明 NDPKⅢ通过调节植物的氧化胁迫参与了响应多环芳烃菲的应答，梁潘霞等(2012)也对甘蔗核苷二磷酸激酶基因进行了克隆和功能验证。另外，NDPKⅠ在不同植物中功能表现存在差异，在一些植物中发挥特殊功能作用，如马铃薯 NDPKⅠ参与了淀粉和纤维素的合成，玉米中存在 G4 结构的 NDPKI 可以与 DNA 结合(朱馨妮等，2017)。虽然本研究对地黄 *RgNDPK* Ⅰ基因进行了克隆及生物信息学分析，但是关于地黄*RgNDPK* Ⅰ基因的具体功能及其作用机制仍需要进一步深入研究。

参考文献：

BOMINAAR AA, MOLIJN AC, PESTEL M, et al., 1993. Activation of g-proteins by receptor-stimulated nucleoside diphosphate kinase in dictyostelium [J]. EMBO J, 12(6): 2275-2279.

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2010. Pharmacopoeia of people's republic of China (1st ed) [M]. Beijing: China Medical Science Press: 115. [药典委员会, 2010. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社:115.]

DUAN HY, LI JJ, WANG HN, et al., 2018. Effects of DNA methylation on growth and development of *Rehmannia glutinosa* [J]. Int J Agric Biol, 20(10): 2161-2168.

DUMAS C, LSACU I, MORERA S, et al., 1992. X-ray structure of nucleoside diphosphate kinase [J]. EMBO J, 11(9): 3203-3208.

EDLUND B, 1971. Purification of a nucleoside diphosphate kinase from peaseed and phosphorylation of the enzyme with adenosine (32P) triphosphate [J]. Acta Chem Scand, 25(4): 1370-1376.

GAO XC, GU XF, HAN J, et al., 2005. Clone full-length cDNA for chicken MIBP by silico cloning [J]. Bioinformatics, 3(2): 58-61. [高兴春, 顾雪峰, 韩俊, 等, 2005. 基于电子克隆方法获得鸡 MIBP 全长 cDNA [J]. 生物信息学, 3(2):58-61.]

GE CY, LI XT, LIU FP, et al., 2018. In silico cloning and bioinformatics analysis of AG gene in *Rhodiola rosea* (*RrAG*) [J]. Jiangsu Agric Sci, 21(12): 1002-1302. [葛春艳, 李雪彤, 刘福鹏, 等, 2018. 红景天 AG 基因 (*RrAG*)的电子克隆及生物信息学分析 [J]. 江苏农业科学, 21(12): 1002-1302.]

HETMANN A, KOWALCZYKS, 2009. Nucleoside diphosphate kinase isoforms regulated by phytochrome A isolated from oat coleoptiles [J]. Acta Biochim Polon, 56 (1): 143-153.

HU YS, FENG F, LIU YF, 2015. Structural and functional characterization of *Acinetobacter baumannii* nucleoside diphosphate kinase [J]. Prog Biochem Biophys, 42(3): 260-267.

LIANG PX, LI YR, YANG LT, 2012. Molecular cloning of sugarcane *NDPK*1 gene and its expression analysis [J]. Chin J Trop Crop, 33(12): 2199-2205. [梁潘霞, 李杨瑞, 杨丽涛, 2012. 甘蔗核苷二磷酸激酶(*NDPK*1)基因克隆及表达分析 [J]. 热带作物学报, 33(12): 2199-2205.]

LIU M, NIE LC, WANG SS, et al., 2016. Expression analysis of differential proteins in three kinds of flower buds with sex differentiation of *Asparagus* [J]. Sci Agric Sin, 49(21): 4192-4202. [刘孟, 乜兰春, 王珊珊, 等, 2016. 芦笋三种花蕾性别分化相关差异蛋白表达分析 [J]. 中国农业科学, 49(21):4192-4202.]

LUO RX, ZHAO ZC, HUANG JF, et al., 2016. Molecular cloning of mango *NDPK*1 gene and its expression analysis [J]. Chin J Trop Crop, 37(11): 2183-2190. [罗睿雄, 赵志常, 黄建峰, 等, 2016. 芒果核苷二磷酸激酶(NDPK)基因克隆及表达分析 [J]. 热带作物学报, 37(11): 2183-2190.]

MANIGBAS NL, PARK DS, PARK SK, et al., 2011. Enhanced tolerance of transgenic rice overexpressing *Arabidopsis thaliana* nucleoside diphosphate kinase (At NDPK2) against various environmental stresses [J]. Philipp Agric Sci, 94 (1): 29-37.

SUN P, GUO YH, QI JJ, et al., 2008. One kind of RNA extraction method suitable for different tissues of *Rehmannia glutinosa* [J]. Chin Agric Sci Bull, 24(4): 29-32. [孙鹏, 郭玉海, 祈建军, 等, 2008. 一种适用于地黄不同组织器官的 RNA 提取方法 [J]. 中国农学通报, 24(4):29-32.]

SUN XJ, WANG ZL, 2012. Bioinformations analysis of a nucleoside diphosphate kinase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Henan Agric Sci, 41(4): 38-44. [孙小洁, 王增兰, 2012. 拟南芥核苷二磷酸激酶基因家族的生物信息学比较与分析 [J]. 河南农业科学, 41(4): 38-44.]

TAN L, 2012. Function analysis of nucleoside diphosphate kinase in response to the stress of phenanthrene [D]. Fuzhou: Fujian Agricultural Forestry University: 7-10. [谭龙, 2011. 核苷二磷酸激酶在响应菲胁迫中的功能分析

[D]. 福州: 福建农林大学: 7-10.]

WANG WB, WANG JS, DENG XP, et al., 2011. Research advances on nucleoside diphosphate kinases (NDPKs) of Plants [J]. J Agric, 1(6): 1-5. [王文斌, 王金胜, 邓西平, 等, 2011. 植物核苷二磷酸激酶(NDPKs)研究进展[J]. 农学学报, 1(6):1-5.]

WANG XN, 2017. Ming and identification of verbascoside biosynthesis associated genes based on transcriptome sequencing of *Rehamannia glutinosa* [D]. Xinxiang: Henan Normal University: 27-45. [王向楠, 2017. 基于转录组测序的地黄毛蕊花糖苷生物合成相关酶基因的发掘与鉴定[D]. 新乡:河南师范大学:27-45.]

XIONG S, LI XL, WANG YF, et al., 2004. Determination of serum NDPK-A and its climical significance [J]. Chin J Health Laborat Technol, (5): 522-523. [熊盛, 李雪玲, 王一飞, 等, 2004. 血清核苷二磷酸激酶 A(NDPK-A)含量测定及其临床意义初探 [J]. 中国卫生检验杂志, (5):522-523.]

YANG KA, MOON HJ, KIM GT, et al., 2003. NDP kinase 2 regulates expression of antioxidant genes in *Arabidopsis* [J]. Proc Jpn Acad Ser B, 79(1): 86-91.

ZHENG X, WANG HN, ZHU YQ, et al., 2018. Bioinformatics analysis of *GPPS* gene of *Picrorrhiza royle* [J]. Henan Agric Sci, 47(6): 104-110. [郑雪, 王慧娜, 朱彦秋, 等, 2018. 胡黄连 *GPPS* 基因的生物信息学分析 [J]. 河南农业科学, 47(6):104-110.]

ZHU XN, WANG SS, ZHOU JQ, et al., 2017. Research advances of NDPKs in plants [J]. Biotechnol Bull, 33(11): 19-28. [朱馨妮, 汪珊珊, 周佳琴, 等, 2017. 植物核苷二磷酸激酶研究进展 [J]. 生物技术通报, 33(11):19-28.]

ZRENNER R, STITT M, SONNEWALD U, et al., 2006. Pyrimidine and purinebiosynthesis and degradation in plants [J]. Ann Rev Plant Biol, 57 (1): 805-836.

(责任编辑 周翠鸣)