

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201404009

岑文,孔维维,郑鹏,等. 秦艽 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因(*GmHDR*)的克隆和表达分析[J]. 广西植物, 2015, 35(5):755—760
Cen W, Kong WW, Zheng P, et al. Cloning and expression analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene (*GmHDR*) from *Gentiana macrophylla*[J]. *Guihaia*, 2015, 35(5):755—760

秦艽 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因(*GmHDR*)的克隆和表达分析

岑 文¹, 孔维维¹, 郑 鹏¹, 化文平^{1,2*}

(1. 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室 西北濒危药材资源开发国家工程实验室 陕西师范大学 生命科学学院, 西安 710062; 2. 陕西学前师范学院 生物科学与技术系, 西安 710062)

摘 要: 龙胆苦苷(gentiopicroside)等裂环烯醚萜苷类化合物是中药秦艽中主要的有效成分,属于萜类化合物的衍生物,1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶(1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase, HDR)是植物萜类物质合成的关键酶之一。该研究在实验室高通量测序的基础上,采用 RT-PCR 方法克隆了秦艽 HDR 基因(即 *GmHDR* 基因),利用生物信息学的方法分析了 *GmHDR* 编码氨基酸序列的理化性质、信号肽、转运肽、亚细胞定位、保守结构域和高级结构等特征,并采用实时定量 PCR 分析了 HDR 的表达模式。结果表明:秦艽 *GmHDR* 基因包含一个完整的长 1 392 bp 的 ORF 框,编码 463 个氨基酸;*GmHDR* 与萝芙木、艾菊等植物 HDR 蛋白具有很高的一致性(≥84%),无跨膜结构域,有叶绿体转运肽等结构,主要定位于叶绿体中。实时定量 PCR 结果显示,*GmHDR* 基因在秦艽的花中进行表达量高,在叶、茎和根等部位表达较低。*GmHDR* 在序列上与其他植物的 HDR 蛋白序列特征上存在很大的相似性;*GmHDR* 基因主要在秦艽花中表达,可能主要参与花中萜类物质的合成。该研究结果可为今后研究秦艽环烯醚萜类化合物的生物合成机制提供依据。

关键词: 秦艽; *GmHDR*; 序列分析; 表达模式

中图分类号: Q943.2, S567.239 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)05-0755-06

Cloning and expression analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene (*GmHDR*) from *Gentiana macrophylla*

CEN Wen¹, KONG Wei-Wei¹, ZHENG Peng¹, HUA Wen-Ping^{1,2*}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Department of Life Sciences and Technology, Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710100, China)

Abstract: Secoiridoids, such as gentiopicroside, are the main active compounds in “Qinjiao”, a traditional Chinese herbal medicine derived from the dried roots of *Gentiana macrophylla*. These compounds have widely biological and pharmacological effects, such as stomachic, choleric, anti-hepatotoxic activities, anti-inflammatory, antifungal and antihistamine activities. Secoiridoids belonged to monoterpenoid, were biosynthesized *via* the secoiridoid pathway

收稿日期: 2014-08-28 修回日期: 2014-10-07

基金项目: 陕西省博士后基金; 陕西省科技计划项目(2014JQ3105, 2014JQ3112); 陕西学前师范学院科研基金(14QNKJ078)。

作者简介: 岑文(1987-), 女(布依族), 新疆额敏农九师人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究, (E-mail) cenwen@snnu.edu.cn。

*通讯作者: 化文平, 博士, 讲师, 主要研究药用植物次生代谢, (E-mail) huawenping@126.com。

(sometimes also called “iridoid pathway”) in high plant. 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase (HDR) is one of the key enzymes in the pathway of iridoid biosynthesis. In this paper, we cloned the gene sequence of HDR from *G. macrophylla*, and analyzed the characteristic of sequence and expression patterns in order to know its roles in secoiridoid biosynthesis. Based on our library generated by high-through sequencing of *G. macrophylla* transcriptome, we cloned HDR gene from *G. macrophylla* (named as *GmHDR*) by RT-PCR. And the *GmHDR* coding amino acid sequence characterization, such as physicochemical characteristics, signal peptide, transit peptide, subcellular localization, conserved domain and secondary structure, analyzed with bioinformatics methods. Then we also detected the expression patterns of *GmHDR* in different parts of *G. macrophylla* by real time PCR. One 1 630-bp length sequence of *GmHDR* gene was obtained from *G. macrophylla*. *GmHDR* contains a completed open reading frame (ORF) of 1 392 bp, which encoded a polypeptide with 463 amino acids. *GmHDR*, the encoding protein by *GmHDR*, has high homology (identities $\geq 84\%$) to HDR proteins from *Rauvolfia verticillata*, *Tanacetum parthenium* and other plants. One neighbor joining tree was constructed to show evolution ship between *GmHDR* and HDR proteins from other plants using MEGA5.2 soft. The phylogenetic tree also gave a same conclusion that *GmHDR* had a closed relation with HDR proteins from *Catharanthus roseus* and *Rauvolfia verticillata*. Further analysis with bioinformatics methods showed that *GmHDR* was one protein without transmembrane domain, and had one transit peptide with 36 amino acids predicted with ChloroP server. These indicated that *GmHDR* protein might be located in the chloroplast. Real time quantitative PCR results showed that *GmHDR* had a very high expression level in the flowers of *G. macrophylla*, and *GmHDR* gene expressed lower in roots, stems and leaves of *Gentiana macrophylla*. Conclusion: The sequence of *GmHDR* had a lot of similar features with HDR proteins from other plants, such as conserved four-cysteine sites, transit peptide in their N terminal. *GmHDR* mainly expressed in the flowers of *G. macrophylla*. These results indicated that *GmHDR* may be principal involved in terpenoid biosynthesis, which are accumulated in flowers of *G. macrophylla*. The research is not only very helpful for research on HDR roles in *G. macrophylla*, but also will lay the foundation for the further study on biosynthetic pathway of secoiridoid compounds in *G. macrophylla*.

Key words: *Gentiana macrophylla*; *GmHDR*; sequence analysis; expression pattern

秦艽(*Gentiana macrophylla*)是我国传统的常用中药,始载于《神农本草经》,列为中品。具有祛风湿,舒筋络,流利关节,清利湿热退黄疽等作用,临床用于治疗骨关节病、面神经炎、肛肠疾病等有较好的疗效(郭伟娜等,2008)。随着中药研究技术的发展,相继发现了秦艽的一些新的药理作用,如抗肿瘤、调节中枢神经系统及免疫系统、升血糖等(穆帧强等,2009)。近年来越来越重视对传统中药的研究、开发和利用,但由于人们随意采挖,野生秦艽资源面临枯竭,已严重供不应求。研究药物有效成分合成途径,利用分子育种来提高药材资源量是缓解中药资源危机的最佳选择之一。

龙胆苦苷(gentiopicroside)、獐牙菜苷(sweroside)、獐牙菜苦苷(swertiamarin)等多种裂环烯醚萜苷类化合物是中药秦艽中的主要有效成分,均属萜类化合物的衍生物(Wei *et al.*, 2012)。在高等植物中,类异戊二烯均来源于前体物质异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)。IPP

和 DMAPP 的合成依赖于两个独立的生物合成途径:甲羟戊酸途径(MVA)和 2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径(MEP)(Seetang-Nun *et al.*, 2008)。1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶(1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase, HDR)是 MEP 途径上最后一个关键酶,催化羟甲基丁烯基-4-焦磷酸(hydroxy methyl butenyl-4-diphosphate, HMBPP)生成 IPP 和 DMAPP(Wang *et al.*, 2008)。目前已从喜树(Wang *et al.*, 2008)、兰花(Huang *et al.*, 2009)、杜仲(刘攀峰等, 2013)、拟南芥(Hsieh *et al.*, 2005)、银杏(Lu *et al.*, 2008)等植物中相继克隆到 HDR 基因。Botella-Pavia *et al.* (2004)在拟南芥中证明 HDR 基因对紫杉醇的前体物质紫杉二烯合成起主要调控作用;张雯等(2008)在银杏中 HDR 基因的过表达可大幅提高银杏内酯的含量。HDR 基因已成为萜类代谢工程的理想潜在靶点,其基因结构、生物学功能与作用机理日益受到关注。在环烯醚萜类物质含量高达 10% 的药用植物秦艽中, HDR 基因

的研究尚未见相关报道,本研究通过对秦艽 *GmHDR* 基因的克隆、相关的生物信息学分析,及借助 real-time PCR 技术对秦艽不同器官 *GmHDR* 表达量的检测,初步了解 *GmHDR* 的表达规律,以期秦艽萜类次生产物的生物合成机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

2011 年 7 月于陕西省太白县中药驯化园内采集花期的秦艽(*Gentiana macrophylla*)样品及标本。标本由陕西师范大学生命科学学院田先华教授进行鉴定。1 年龄样品移栽于陕西师范大学试验田中。按照秦艽根、茎、叶、花四个不同器官部位采集样品后,用于基因器官特异性表达检测。收集的样品立即于液氮中速冻,保存至超低温冰箱(-80 ℃)内以用于总 RNA 提取。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司;SYBR Green II Premix Ex Taq 和反转录试剂盒均购自 TaKaRa 生物公司。

1.3 方法

1.3.1 秦艽总 RNA 的提取 用 OMGEA 公司的 RNA 提取试剂盒分别提取秦艽根茎叶的总 RNA,并以其为模板严格按照反转录试剂盒 PrimeScript® RT reagent Kit (TaKaRa) 说明书合成秦艽 cDNA 第一条链。

1.3.2 *GmHDR* 基因的克隆 依据实验室高通量数据库中 Unigene5559 基因序列,采用 Premier Premier 5.0 软件在完整 ORF 框两端设计引物(*GmHDR*-S: 5'-CTTTCGTGACTGTTTCTGGT-TCC-3' 和 *GmHDR*-R: 5'-CACACTCCCACCTTTT TTCCGTAA-3'),以反转合成的 cDNA 为模板,经 RT-PCR 扩增,从秦艽 cDNA 文库中扩增得到了 1 条 *HDR* 基因(命名为 *GmHDR*)。

1.3.3 *GmHDR* 蛋白的生物信息学分析 采用生物信息学软件(<http://web.expasy.org/protparam/>; <http://www.cbs.dtu.dk/>; <http://psort.hgc.jp/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对 *GmHDR* 基因编码氨基酸序列进行在线分析。分别采用 ExPASy ProtParam、SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、ChloroP 1.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)、

TMHMM 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、Predict Protein(<https://www.predictprotein.org/home>)和 NCBI-CDS 等工具预测蛋白质的理化性质、信号肽、转运肽、跨膜结构、亚细胞定位及保守结构域;用在线工具 SOPMA 及 SWISS-MODEL 完成蛋白质二级结构和三维结构的分析。用 BlastX 和 Clustal W 完成氨基酸序列的同源性比对和多序列比对。以 MEGA5.2 构建植物 HDR 蛋白序列的分子进化树。

1.3.4 *GmHDR* 基因的表达分析 以 1.3.1 中合成的样品 cDNA 稀释 50 倍后为模板进行 real-time PCR 反应。以持家基因 β -actin 为内参(β -actinS: 5'-CATCTGAAACGCTCGGCACC-3' 和 β -actinR: 5'-TGAAAGAAAACTGGCTTACATCGC-3'),检测 *GmHDR* 基因的表达量。采用 Primer Premier 5.0 设计 real-time PCR 扩增引物(*GmHDR*-S: 5'-AATACATCTACCACCCACCA-CGAACT-3' 和 *GmHDR*-R: 5'-GCAACTGGCA-TAAACGATTCTAAACC-3')。PCR 反应程序为 95 ℃ 3 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,50 个循环。每个样品重复 3 次。采用“比较 Ct 法的相对定量”法对数据进行分析,并用 SPSS13.0 中 one-way ANOVA 方法进行单因素方差分析,利用 Tukey test 分析各样品间基因表达的显著性($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 *GmHDR* 基因全长序列的克隆及分析

根据高通量的测序数据,采用 PCR 扩增得到 1 条 1 600 bp 左右的基因片段。经过测序验证,获得了 *GmHDR* 基因片段长 1 630 bp(GenBank 注册号为 KM046992),包含 1 个 1 392 bp 的完整开放读码框(Open Reading Frame, ORF),编码 463 个氨基酸残基。

2.2 *GmHDR* 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 不同物种之间 *HDR* 基因所编码蛋白质的同源性分析 采用 NCBI 网站 BLAST X 程序进行蛋白序列的比对分析,结果显示 *GmHDR* 与其他植物中的 HDR 蛋白具有很高的同源性,属于 LYTb 超蛋白家族成员。其中,*GmHDR* 与长春花(*Catharanthus roseus*, ABI30631.1)、萝芙木(*Rauvolfia verticillata*, ABV89582.1)、艾菊(*Tanacetum parthenium*, AER00471.1)、甘薯(*Ipomoea*

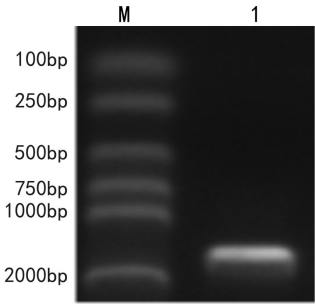


图 1 秦艽 *GmHDR* 基因扩增产物凝胶电泳。

M. DNA marker D2000; 1. PCR 产物。

Fig. 1 Agarose gel electrophoretic analysis of PCR products of *GmHDR* M. DNA marker D2000; 1. PCR products.

batatas, ADZ29096.1)、青蒿 (*Artemisia annua*, ADC84348.1)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*, AGJ03149.1) 和落叶松 (*Larix kaempferi*, AHA44832.1)等植物 HDR 蛋白的一致性分别达到 84%、84%、82%、82%、79%、79% 和 76%。ClustalW 多序列比对结果显示 *GmHDR* 蛋白序列和其余植物 HDR 蛋白一样拥有 4 个保守的半胱氨酸残基(图 2),有研究预测其可能与铁硫桥的协调及酶催化作用有关(Huang *et al.*,2009)。利用软件 MEGA5.2,选用 Neighbor-Joining 方法,以最适算法模型 JTT+G+I+f,构建不同物种 HDR 蛋白的系统进化树(图 3)。对不同物种的分子系统进化进行分析,结果显示 *GmHDR* 与长春花和萝芙木的 HDR 最接近。

2.2.2 *GmHDR* 蛋白的特性分析 ProtParam 软件预测结果显示 *GmHDR* 蛋白的理论等电点为 5.44,分子质量为 52.22 kDa,蛋白不稳定系数(instability index II)为 31.14,属于稳定类蛋白。利用 SOPMA 程序对 *GmHDR* 氨基酸序列的二维结构进行预测,结果显示 *GmHDR* 的蛋白二级结构组成为 α -螺旋占 45.14%、 β -转角占 6.26%、无规卷曲占 34.34%和延伸链占 14.25%。用 TMHMM 2.0 Server 对 *GmHDR* 蛋白进行跨膜结构域的预测,结果显示 *GmHDR* 蛋白没有跨膜螺旋。利用 SignalP 4.1 Server-prediction 对 *GmHDR* 蛋白进行信号肽的预测,结果显示 *GmHDR* 蛋白没有信号肽,非分泌蛋白。利用 ChloroP 1.1 Server 对 *GmHDR* 蛋白进行转运肽的预测,结果显示 *GmHDR* 蛋白含有转运肽序列为 36 个氨基酸残基。结合 Predict Protein 对 *GmHDR* 蛋白的亚细胞定位,显示该蛋白主要定位

于叶绿体(可信度 7.0)。

2.3 *GmHDR* 基因的表达分析

植物次生代谢产物的分布往往具有很强的器官特异性,其相关基因的表达同样也有器官特异性。以秦艽的根、茎、叶、花为材料,选择秦艽 actin 为内参,对秦艽不同器官中 *GmHDR* 基因表达水平进行实时荧光定量检测。结果显示,*GmHDR* 在秦艽的所有被测组织中均有表达,但表达水平不同,在花中表达水平最高,显著高于其他组织;而根、茎、叶间的表达差异不显著(图 4)。

3 讨论

MEP 途径是高等植物萜类合成的一条重要途径,对于植物生存必不可少。HDR 作为 MEP 途径上最后一个限速酶,对萜类物质合成起重要调控作用。如在黄花蒿中过表达 HDR 和 ADS 可以提高青蒿素的产量(龙世平,2013);而拟南芥的 HDR 无义突变株中因类胡萝卜素合成缺陷表现出白化(Huang *et al.*,2009)。*HDR* 基因在喜树、兰花等植物的不同器官部位中的表达量存在很大差异,而在同一植物不同器官部位的萜类代谢物的类型和含量也存在类似差异(Wang *et al.*,2008;Huang *et al.*,2009)。因此,在药用植物秦艽中其主要有效成分在根中富集,研究 *GmHDR* 在药用植物秦艽不同器官中的表达模式对进一步了解龙胆苦苷等萜类代谢物的生物合成具有重要意义。

本研究中秦艽 *GmHDR* 在所有被测组织中均有所表达,从一定程度上反应了 MEP 途径中产生的异戊烯基焦磷酸用于合成叶绿素等异戊二烯类物质对植物生长发育的重要性。另外其表达模式与喜树 *CaHDR*、拟南芥 *AtHDR* 和兰花 *OncHDR* 的表达模式类似,均为在花中的表达水平最高,显著高于在根、茎、叶中的表达量。但兰花和拟南芥中 HDR 在叶中的表达量要高于根中的表达量,与秦艽和喜树中 HDR 在根中的表达水平略高于叶的表达特征不同(Wang *et al.*,2008;Hsieh *et al.*,2005;Huang *et al.*,2009)。这与不同器官组织中的类胡萝卜素等萜类物质的含量相关(Huang *et al.*,2009)。

植物 MEP 途径中的基因都具有 N 端的转运肽序列,这对蛋白质从细胞质基质到叶绿体至关重要(Rodríguez-Concepción *et al.*,2002)。本研究进一步证明了此观点,秦艽 HDR 蛋白 N 端具有转运肽

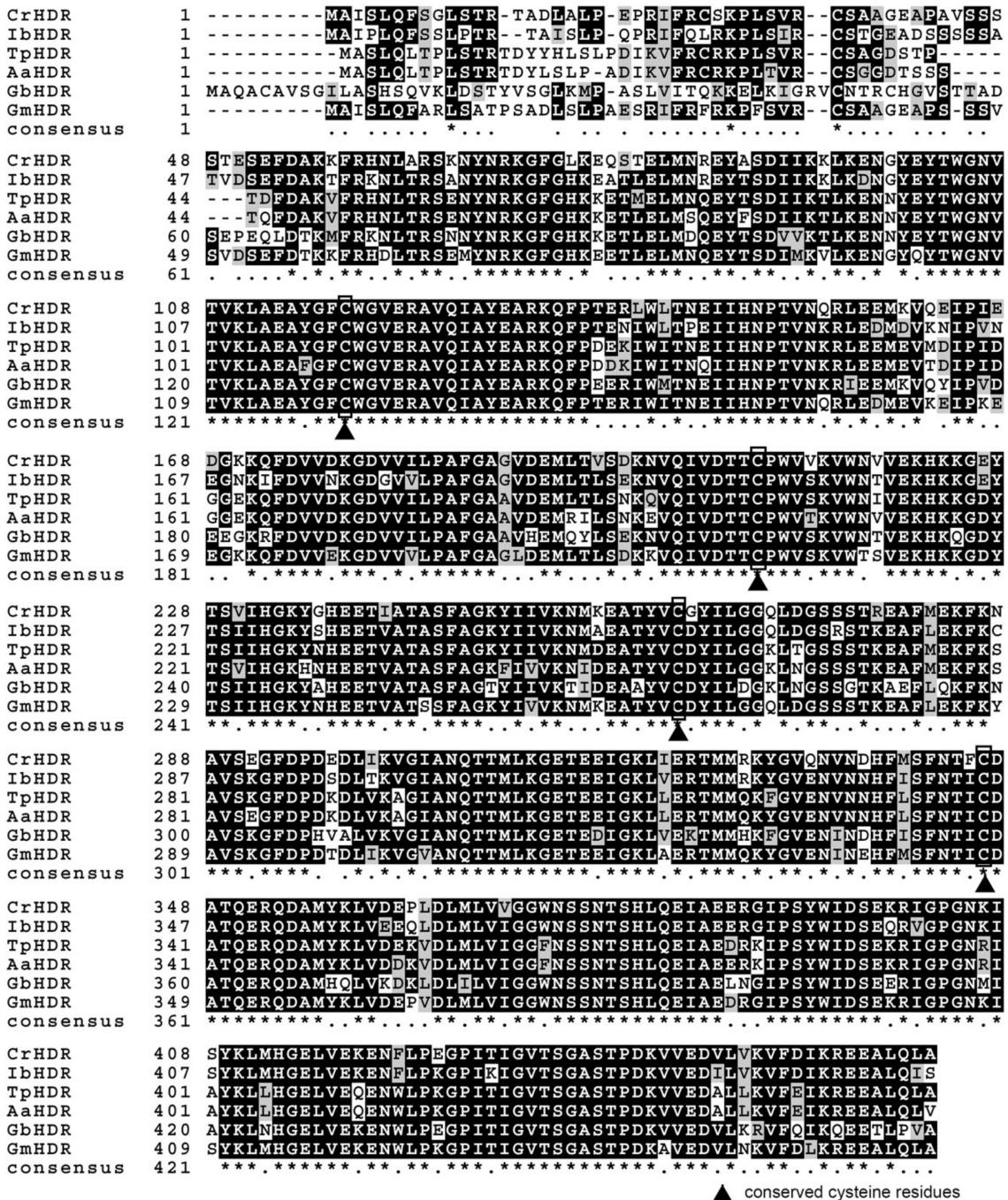


图 2 *GmHDR* 氨基酸序列与其它物种 HDR 氨基酸序列的系统进化树 ▲ 表示 cysteine 残基位点

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *GmHDR* protein with other related proteins CrHDR(ABI30631.1); IbHDR(ADZ29096.1); TpHDR(AER00471.1); AaHDR(ADC84348.1); GbHDR(ABC84344.1); ▲ showed sites of cysteine.

序列,定位于叶绿体,这与赤松、拟南芥、银杏和火距松等中 HDR 蛋白的亚细胞定位结果一致(Kim *et al.*,2008,2009)。同时也符合 MEP 途径的细胞定位。因而可以推断 *GmHDR* 蛋白参与了秦艽 MEP 途径的萜类合成过程。

参考文献:

Botella-Pavia P,Besumbes O,Phillips MA,*et al.* 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants:evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors[J]. *Plant J*, **40**(2): 188–199

Guo WN(郭伟娜),Wei SN(魏朔南). 2008. Biological research on

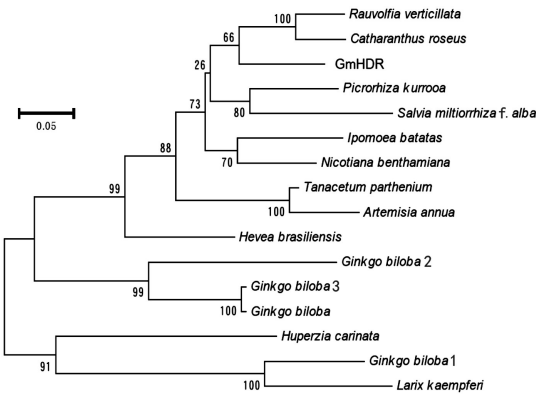


图 3 秦艽 GmHDR 与不同植物中的 HDR 的序列比对

Fig. 3 Multiple alignment of GmHDR of *Gentiana macrophylla* with HDRs in other plants *Rauvolfia verticillata* (ABV89582.1), *Picrorhiza kurrooa* (ABM89226.1), *Hevea brasiliensis* (BAF98297.1), *Catharanthus roseus* (ABI30631.1), *Ipomoea batatas* (ADZ29096.1), *Tanacetum parthenium* (AER00471.1), *Nicotiana benthamiana* (ADM83430.1), *Artemisia annua* (ADC84348.1), *Salvia miltiorrhiza* (AGJ03149.1), *Huperzia carinata* (AFN02125.1), *Ginkgo biloba*3 (ABB78090.1), *G. biloba* (ABC84344.1), *G. biloba*1 (ABB78088.1), *G. biloba*2 (ABB78089.1), *Larix kaempferi* (AHA44832.1).

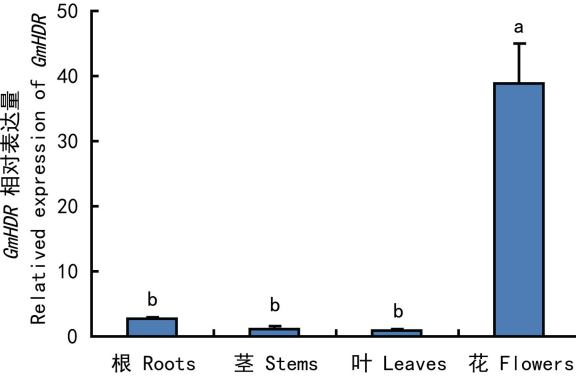


图 4 GmHDR 在秦艽不同部位中的表达
Fig.4 GmHDR gene expression in different organs of *Gentiana macrophylla*

Gentiana macrophylla Pall. (秦艽的生物学研究)[J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), **27**(4):1-6
Huang JZ, Cheng TC, Wen PJ, et al. 2009. Molecular characterization of the *Oncidium orchid* HDR gene encoding 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase, the last step of the methylerythritol phosphate pathway[J]. *Plant Cell Rep*, **28**(10):1 475-1 486

Hsieh MH, Goodman HM. 2005. The *Arabidopsis* IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis[J]. *Plant Physiol*, **138**(2):641-653
Kim SM, Kuzuyama T, Kobayashi A, et al. 2008. 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (IDS) is encoded by multicopy genes in gymnosperms *Ginkgo biloba* and *Pinus taeda*[J]. *Planta*, **227**(2):287-298
Kim YB, Kim SM, Kang MK, et al. 2009. Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase genes[J]. *Tree Physiol*, **29**(5):737-749
Liu PF(刘攀峰), Du HY(杜红岩), Wuyun TN(乌云塔娜), et al. 2013. Cloning and sequence analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-e-butenyl-4-diphosphate reductase gene cDNA from *Eucommia ulmoides* (杜仲 HDR 基因全长 cDNA 克隆与序列分析)[J]. *For Res* (林业科学研究), **26**(4):447-453
Long SP(龙世平). 2013. Influence of Artemisinin production in transgenic plants of *Artemisia annua* by overexpressing *ads* and *hdr* gene(过表达 *ads* 和 *hdr* 基因对青蒿素生物合成的影响)[D]. Chongqing(重庆):Southwest University(西南大学)
Lu J, Wu WS, Cao SW, et al. 2008. Molecular cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene from *Ginkgo biloba*[J]. *Mol Biol Rep*, **35**(3):413-420
Mu ZQ(穆祯强), Yu Y(于洋), Gao H(高昊), et al. 2009. Chemical and pharmacological research for *Sect Apter* (*Gentiana*) (龙胆属秦艽组植物的化学成分和药理作用研究进展)[J]. *Chin J Chin Mat Med* (中国中药杂志), **34**(16):2 012-2 017
Rodriguez-Concepción M, Boronat A. 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics[J]. *Plant Physiol*, **130**(3):1 079-1 089
Seetang-Nun Y, Sharkey TD, Suvachittanont W. 2008. Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis* [J]. *J Plant Physiol*, **165**(9):991-1 002
Wang Q, Pi Y, Hou R, et al. 2008. Molecular cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (*CaHDR*) from *Camptotheca acuminata* and its functional identification in *Escherichia coli* [J]. *Bmb Rep*, **41**(2):112-118
Wei S, Zhang P, Feng X, et al. 2012. Qualitative and quantitative determination of ten iridoids and secoiridoids in *Gentiana straminea* Maxim. by LC-UV-ESI-MS[J]. *J Nat Med*, **66**(1):102-108
Zhang W(张雯), Wang YL(王玉亮), Lin J(林娟), et al. 2008. Transformation of *Ginkgo biloba* with 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase gene(银杏 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因(*hdr*)转化银杏的研究)[J]. *J Fudan Univ: Nat Sci Ed* (复旦学报·自然科学版), **47**(5):598-603