

## 蛇苔过氧化物酶基因的序列分析与功能预测

李茹兰<sup>1,2</sup>, 边春象<sup>2</sup>, 阮期平<sup>2\*</sup>, 彭正松<sup>1</sup>, 姜立春<sup>2</sup>, 刘美<sup>2</sup>

(1. 西华师范大学生命科学学院, 南充 637000; 2. 绵阳师范学院分子生物学与生物制药重点实验室, 绵阳 621000)

**摘要:** 过氧化物酶在生物界分布极广, 在细胞代谢的氧化还原过程中起重要的作用。为深入研究蛇苔过氧化物酶的理化性质及功能, 对其同源性, 亚细胞定位, 结构和功能等进行了生物信息学预测和分析。结果表明: 该序列有 1 050 bp 长的开放阅读框, 编码 349 个氨基酸, 与拟南芥等的 POD 相似性较高(相似性为 71%)。预测 R68、F71、H72、P170、H200 和 D276 为该酶的活性位点, C41 与 C122、C74 与 C79、C128 与 C328、C207 与 C239 形成四对二硫键, 对蛋白质的功能、天然构象和稳定性有重要作用, 为研究苔类植物过氧化物酶的作用机制和功能等奠定了基础。

**关键词:** 过氧化物酶; 蛇苔; 序列分析; 功能预测

**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)06-0806-07

## Sequence analysis and function predication of peroxidase from *Conocephalum conicum*

LI Ru-Lan<sup>1,2</sup>, BIAN Chun-Xiang<sup>2</sup>, RUAN Qi-Ping<sup>2\*</sup>,  
PENG Zheng-Song<sup>1</sup>, JIANG Li-Chun<sup>2</sup>, LIU Mei<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Key Laboratory for Molecular Biology and Biopharmaceuticals, Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China)

**Abstract:** Peroxidases is widespread in biological world. It plays an important role in the cell redox metabolism. In order to further study the characteristics and functions of *Conocephalum conicum* peroxidase, we performed bioinformatics analysis of its homology, subcellular location, tertiary structure, function and so on. The results showed that the sequence had a complete open read frame of about 1 050 bp and encodes 349 amino acids, and the sequence had similar POD with that of *Arabidopsis thaliana* (the similarity between them is 71%). This sequence was predicated to be *C. conicum* peroxidase which belonged to the peroxidase super family, and R68、F71、H72、P170、H200 and D276 to be the *C. conicum* POD's active sites in which the four groups of disulfide bonds: C4 and C122、C74 and C79、C128 and C328、C207 and C239 played a very important role in maintaining the protein's function, natural conformation and stability. This study would set an important foundation for the study of the interaction mechanisms and functions of the *C. conicum* peroxidase.

**Key words:** peroxidases; *Conocephalum conicum*; sequence analysis; function predication

过氧化物酶(Peroxidase, POD)是一类普遍存在于植物、动物、微生物中的氧化还原酶, 参与生物体内的生理代谢(Rodriguez-Lopez JN 等, 2000)。

在有机体的新陈代谢过程中, 过氧化物酶主要催化由过氧化氢参与的各种还原剂的氧化反应, 分解生物体内的氧化物或过氧化物及其它毒素(罗勇军等,

收稿日期: 2011-01-20 修回日期: 2011-07-19

基金项目: 绵阳师范学院校级科研基金(2011A05)[Supported by Foundation of Mianyang Normal University(2011A05)]

作者简介: 李茹兰(1985-), 女, 四川内江人, 硕士研究生, 主要研究方向为分子生物学, (E-mail) lilanstudy@163.com.

\* 通讯作者: 阮期平, 男, 博士, 教授, 分子生物学与生化药理学, (E-mail) rqp2200070@yahoo.com.cn.

2004)。由于其成分和结构的复杂性,同功酶的多样性,以及多基因编码特点,造成对其功能的认识尚不全面。迄今已肯定的主要有两方面功能:一方面与植物正常的形态发生和形态建成有关,在植物的生长、发育过程中起作用;另一方面与植物的抗逆性有关,包括抗旱、抗寒、抗盐、抗病等,是植物保护酶系的重要保护酶之一(蒋选利等,2001;刘应笛等,2001)。

Stefan 等报道首个苔类植物 (*Physcomitrella*) 的基因组序列 (Stefan 等,2008),从而为苔类植物作为一种模式生物来研究陆生植物的进化提供有力的支持,并引起了对苔类植物的研究热潮。蛋白质的一级结构包含了蛋白质的很多信息,本文以蛇苔过氧化物酶为对象,依赖蛋白质的一级结构,采用生物信息学的方法,对该蛋白质的氨基酸序列组成、理化性质、亚细胞定位、翻译后修饰和结构功能等进行预测和分析,进而为研究苔类植物过氧化物酶的作用机制等奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

蛇苔 (*Conocephalum conicum*); 蛇苔总 RNA 提取采用 LiCl 方法 (Li 等 2003); SMARTTM cDNA Library Construction 试剂盒购自于美国 Clontech 公司; DNA 序列的测定为上海 Invitrogen 公司完成。

### 1.2 方法

依据 ANTHPROT2000、DNASar、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/和 http://expasy.org/sprot/等网站提供的生物信息学软件对蛇苔过氧化物酶进行在线分析。核酸及氨基酸序列的同源性分析和多序列比对是用 Blast 和 Clustal 1.83 完成;用 ORF Finder 在线软件对蛇苔的核酸序列进行开放阅读框的预测分析;蛋白质的进化树的构建则是使用 Clustal 1.83 和 MEGA 3.1 软件进行的;利用 ExPASy 中的 ProtParam 在线软件和 ANTHPROT 2000 对蛋白质的理化性质和亲水性疏水性分别进行预测;亚细胞位点和 N 端信号肽分析是通过 EpiLoc 和 SignalP3.0 Server - prediction 软件完成;利用 SWISS-MODEL 和 TermiNator 等软件对翻译后 N 端信号肽的修饰预测和三级结构进行预测分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛇苔基因序列分析

通过氯化锂法,得到较高质量的 RNA,以构建 cDNA 文库,用 NCBI 中的 Specialized Blast 对测序结果进行分析得到一条长为 1 615 bp 的核酸序列。利用 NCBI 中的 ORF Finder 工具以及开放阅读框的识别原则得到一条长为 1 050 bp 开放阅读框,编码 349 个氨基酸。用 Primer 5.0 设计蛇苔引物如下:正向引物 F1(5'→3'):AGCCATGGGTGCTCT-TGCGCTCTGT;反向引物 R1(5'→3'):CGGAATTC-CAATCAATGGCATCAGATCCTC。通过 PCR 技术,用已构建好的文库载体 pTripEx2-POD 作为模板,以 F1 和 R1 为引物,得到一条片段长为 1 024 bp 的核酸序列(图 1)。并对其测序验证。

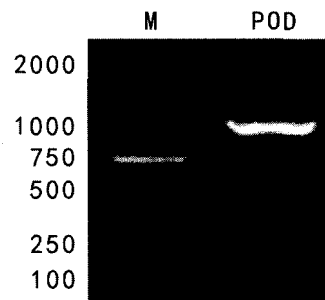


图 1 POD 核酸序列的琼脂糖凝胶分析  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of POD Nucleotide Sequence

该序列 ORF 框起始密码子 ATG 的 A 为第一位,在+4 位的核酸碱基为 G,在-3 位上的核苷酸碱基为 A,该序列(AAACAAGATGGTGA)符合 Kozak 序列(GCCXCC AUG G)(Kozak,1987),X 为一种嘌呤(A 或 G),根据研究表明,Kozak 序列在翻译的起始中起着显著的作用(De AngiolettiM 等,2004)。

利用 NCBI 的 Nucleotide Blast (Altschul 等,1997),对蛇苔过氧化物酶核酸序列进行同源性分析的所获取的结果为,蛇苔过氧化物酶的核酸序列与其他植物,如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NM\_117724.3)、香蕉 (*Musa acuminata*, DQ317320.1)、挪威云杉 (*Picea abies*, AM293548.1) 的相似性分别为 71%、72% 和 71%。

### 2.2 蛇苔 POD 核酸序列推导所得的氨基酸序列分析及结构预测

#### 2.2.1 氨基酸序列基础理化性质分析 通过使用

ORF Finder 和 ProtParam(Gasteiger 等 2005)等在线软件对蛇苔过氧化物酶的相对分子质量、氨基酸序列长度、理论等电点、氨基酸组成、原子组成、消光系数、半衰期、带正负电荷氨基酸的数量和稳定系数以及平均亲水性等进行分析。结果表明,该氨基酸序列中丙氨酸 Ala 个数最多,其次是精氨酸 Arg(图 2),这与玉米、陆地绵等八种植物的预测结果一样,说明植物 POD 在氨基酸组成上存在一定的保守保守性。蛇苔 POD 由 349 个氨基酸组成,相对分子量为 37 903.5,其中有 40 个正电荷氨基酸,36 个负电荷氨基酸,它的理论等电点是 8.53,另外该蛋白是

```

1 atggtgaaattatcaggagccatgggtgctcttgcgctctgtgca
M V K L S G A M G A L A L C A
46 gcatttgcgtgactctgaccatgctatctgttccagctaagcc
A F A V T L T M L S V P A N A
91 cagttgaggccagacttttacgagcagagtgtccgagttgccc
Q L R P D F Y E Q S C P R L P
136 atgatcgtacttcagaccggttgatgcagctatcaagaagatgct
M I V L Q T V D A A I K K D A
181 cgaatggcggcttcttctcgcgtcttcacttccagactgttcc
R M A A S L L R L H F H D C F
226 gtccagggatgcgatgcttctgctctgcttgatgacgattctaga
V Q G C D A S V L L D D D S R
271 ctccccctcggagaaaaaacatcaccaccaatcggaactctttg
L P L G E K T S P P N R N S L
316 aggggcttcgaagtgatcgacgaatcaaggccgctgttgagaaa
R G F E V I D A I K A A V E K
361 gaatgccccaaaaccgtctctctgtgoggacatcttgctctggt
E C P K T V S C A D I L A L A
406 tcttctcgggtgtgaaacagactggcgggtccgttctggttgtc
S F S G P A K T G G P F W F V
451 cctctcggaggcgtgacagttgactgcgaacttttcagctgct
P L G R R D S L T A N F S A A
496 ctggatttcttctgcttttacttcgaccgtggcagagctgaaa
L D F L P I D A I K A A V E K
541 aaaaattttcaagagttggtctcaacgtcagagacttggtttct
K N F A R V G L N V R D L V S
586 ctctctggtgggcacactcggactttcaacgctgctcctcagtc
L S G G H T L G L S R C S S I
631 gtttccagattgtacaaccacaacggaggtggtggggccgatccc
V S R L Y N H N G G G G A D P
676 acaatcgaacctcggttcctcctcgaagaacaaacctcctcct
T I E P R F L A S L K K T C P
721 aacggtggaatggcaacgtcaccacccattggatccgagcccc
N G G N G N V T T P L D P S P
766 aacacatttgacaatcgctacttcaagagctggaggtcttcaga
N T F D N R Y F K E L E V F R
811 ggagttctaactcggatgaggttctggtcaccagcggccgcgac
G V L N S D E V L F T Q A A D
856 accaaggacatcgtccagtcctacaccaaaagatcagaacaagttc
T K D I V Q S Y T K D Q N K F
901 tttgagaactttgcagctccatgatcaagatgggaaacatgagg
F E N F A A S M I K M G N M R
946 tctgcgaccggaaacaaaggagagattcgcggcaactgcaggaag
S A T G N K G E I R R N C R K
991 cccaactctctctattggagatctgatgccattgattgagctc
P N S L L L E D L M P L I E L
1036 cgatcggatgttga 1050
R S D V *

```

图 2 蛇苔 POD 的开放阅读框和氨基酸序列

Fig. 2 ORF sequence and deduced amino acids of POD from *Conocephalum conicum*

稳定性较强的蛋白质,其不稳定系数为 39.17。

2.2.2 氨基酸序列同源性分析 使用 NCBI 的 Basic BLAST 中 protein blast 对蛇苔 POD 所推导出的氨基酸序列进行蛋白质的同源性检索,结果显示蛋白质属于植物过氧化物酶超家族中的第三类酶过氧化物酶,该氨基酸序列与玉米 (*Zea mays*, ACG31784)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum*, AAL92037.1, AF488305\_1)、水稻 (*Oryza sativa* Indica Group, EAY73397.1) 和葡萄 (*Vitis vinifera*, XP\_002285642.1) 的过氧化物酶相似性分别为 53%、53%、49% 和 51%。

2.2.3 氨基酸序列多序列比对和进化树的构建与分析 对核酸和蛋白质进行系统发生分析,不仅可以分析不同物种之间的进化关系,还可以对一个序列家族进行分析(蒋彦等,2003)。按照构建进化树的操作要求,从 blastp 同源序列检索获得的 10 种物种 POD 氨基酸序列进行发育分析,通过 Clustal 1.83 在线软件中进行了多序列比对,再将多序列比对结果在 MEGA 3.1 中进行进化树的构建(图 3)。

结果显示,蛇苔 POD 氨基酸序列与紫花苜蓿 POD 的氨基酸序列进化距离最小,核苷酸同源性最高即它们之间存在着最小的进化差异,推测它们可能有相似的演化过程。而与玉米 POD 的进化距离差异最大。

2.2.4 蛇苔 POD 亚细胞定位预测 蛋白质的亚细胞定位信息对于深入了解该蛋白质的功能具有重要意义。利用基因的转运肽或 cDNA 与绿色荧光蛋白(GFP)融合研究蛋白质的亚细胞定位已有报。利用 Wolfpsort 在线软件对蛇苔 POD 亚细胞定位进行预测,得到蛇苔 POD 蛋白质亚细胞主要定位于细胞壁,其次是液泡。同样的方法去分析玉米、陆地绵和水稻时得出同样的结果。由此可以推断蛇苔 POD 与玉米、陆地绵、水稻的各自的 POD 在其细胞中行使相似的生理学功能。

2.2.5 蛇苔 POD 氨基酸亲水性/疏水性分析 蛋白质的疏水性分析是蛋白质二级结构以及三级结构预测中一个必要的过程。亲水性/疏水性是氨基酸的重要特性,这对预测蛋白质的三维结构和蛋白质与蛋白质之间的相互作用起着重要影响(Urry, 2004)。通过分析得到蛋白质的亲/疏水区域,不仅为二级结构预测结果提供参考,而却为结构域以及功能域的划分提供依据,因此,亲水性/疏水性的预测和蛋白质结构的预测与功能分析均可提供参考。

采用 ANTHPROT 2000 软件(Bairoch, 1991)对蛇苔过氧化物酶的亲/疏水性进行预测(图 4)。

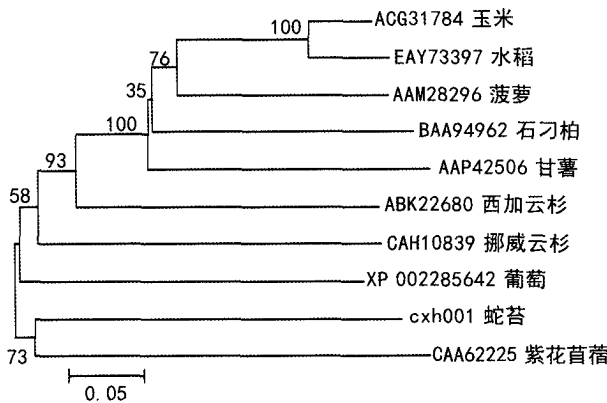


图 3 根据多序列比对结果构建的进化树  
Fig. 3 Alignment phylogenetic tree constructed according to the results of multiple sequence

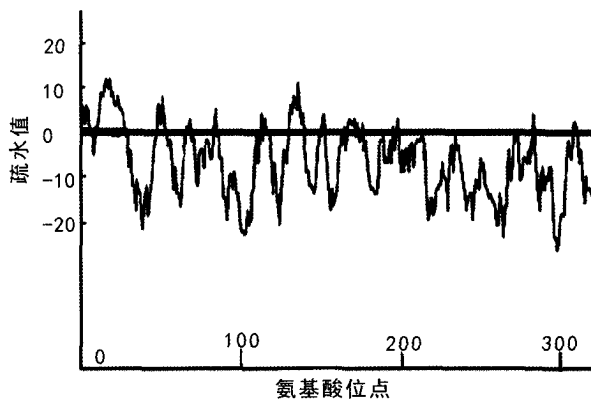


图 4 根据蛇苔 POD 的氨基酸序列预测的亲水性和疏水性  
Fig. 4 Prediction of hydrophilicity/hydrophobicity of the amino acids deduced by POD gene in *Conocephalum conicum*

从图 4 可以看出,整个蛋白质中疏水性最强分别是处于 16 位点和 18 位点的半胱氨酸(Cys,C)和丙氨酸(Ala,A),两者的疏水值都是 12.000;而疏水性最弱的是第 298 位点上的天冬酰胺(Asp,D),分值为-27.00,由图表看出,在总体水平上大部分的氨基酸属于亲水性氨基酸(疏水分值为负),故可以推测蛇苔过氧化物酶是亲水蛋白。

2.2.6 蛇苔 POD 信号肽分析 预测蛋白质结构同时对其进行信号肽分析有助于蛋白质功能域的区分及蛋白质细胞定位。信号肽序列通常在转运多肽链的 N 端,这些序列在 10~40 个氨基酸残基范围,氨基端至少含有一个带正电荷的氨基酸,在中部有

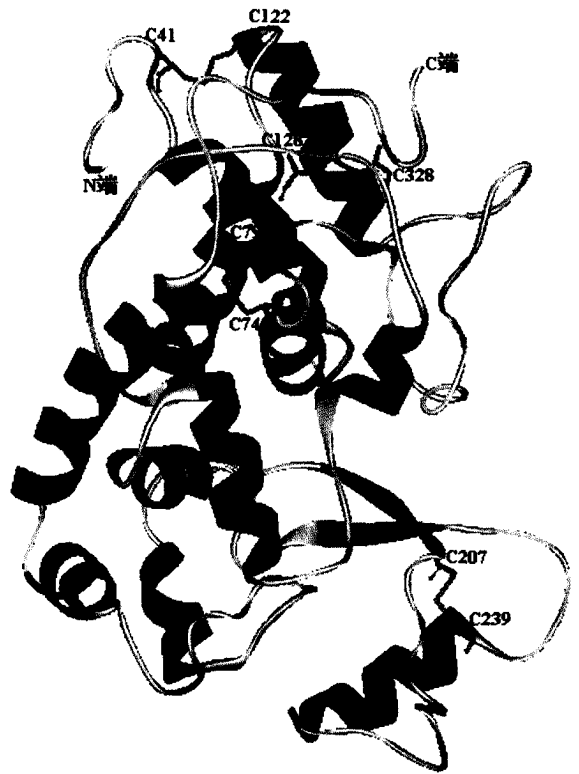


图 5 蛇苔 POD 二硫键形成的空间结构图  
Fig. 5 Spatial structure for disulfide bonds of *Conocephalum conicum* POD

一段长度为 10~15 个氨基酸残基的由高度疏水性的氨基酸组成的肽链(王镜岩等,2002)。使用 SignalP3.0 Server-prediction 软件预测,信号肽切割位点预测用 Y-score maximum 来判断,对是否为分泌蛋白用 mean S-score 来判断。分析结果得出蛇苔 POD 序列存在信号肽,信号肽的切割预测位点为氨基酸第 30 位与第 31 位之间,即 ANA-QL,信号肽切割位点的-3 和-1 位分别为丙氨酸 Ala 和亮氨酸 Leu 都为小而中性氨基酸,在该 N 端氨基酸序列有一个带正电荷的赖氨酸。并预测出玉米也存在类似的信号肽。

2.2.7 N 端信号肽修饰 蛋白质的翻译后修饰是一个重要的细胞调控机制,蛋白质的理化性质、折叠、构造、稳定性甚至功能会因此而发生改变(Diella 等,2004;Farriol-Mathis 等,2004)。用 TerminoNator(Farriol-Mathis 等,2004)对蛇苔 POD 的 N 端修饰进行预测。发现蛇苔 POD 与玉米、陆地绵、水稻、葡萄一样,都是去除了第一位的甲硫氨酸 Met,起始于第二位的氨基酸。

2.2.8 蛋白质三级结构及功能位点预测 蛋白质的

结构决定着蛋白质的生物学功能,生物信息学发展到现在,可以对一个未知结构的蛋白质序列做出一定的预测,得到其三级结构模型。蛋白质的三级结构预测方法常通过同源建模进行,即通过比较已知结构的蛋白质序列与未知结构的蛋白质序列来预测蛋白质的三级结构。

使用 ClustalW2(Mackey 等,2002)对蛇苔 POD 氨基酸序列与大豆 POD 氨基酸序列进行序列的双重比对(图 7)。由图 5 及图 7 得到 8 个半胱氨酸残基 C41 与 C122、C74 与 C79、C128 与 C328、C207 与 C239 形成四个紧密相连的二硫键桥,在蛋白质三级结构的形成及稳定性起重要作用(Duroux 等,2003)。

为进一步了解蛇苔 POD 蛋白的特征,通过使用 SWISS MODEL(Arnold 等,2006)在线软件,对蛇

苔 POD 三级结构进行预测分析(图 6)。其单体是以大豆 POD 的三维结构为模板构建。由图 4 可以看到,成熟蛇苔 POD 蛋白质三级结构具有至少 10 个  $\alpha$ -螺旋、两个折叠和一些转角,其中 R68、F71、H72、P170、H200 和 D276 为该酶的活性位点,P170 和 H200 是血红素的  $Fe^{3+}$  相互作用位点,该 POD 蛋白以正铁血红素 III 为辅基,并且在血红素周围以疏水性氨基酸残基为主,形成空穴,为铁原子与氧结合创造了结构环境(Welinder 等,2002)。

由图 7 可以看出,蛇苔 POD 和大豆 POD 的氨基酸序列具有相似的数目,功能性位点及二硫键形式高度一致,表明两不同来源的 POD 同属于一个有相似作用的蛋白质家族。该结果与使用 SWISS MODEL 在线软件预测结果相符,肯定了三级空间结构预测结果的可取性。

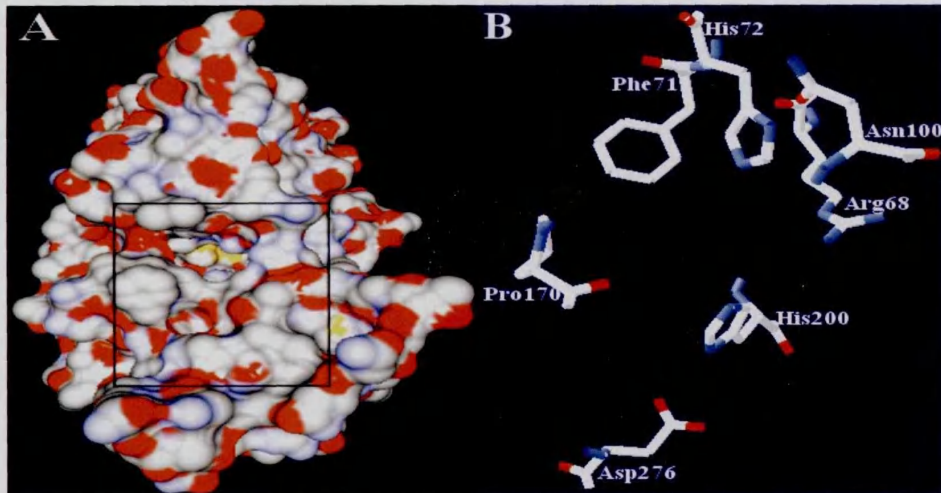


图 6 (A)与蛇苔 POD 最类似的大豆 POD 三级结构,矩形框为 POD 活性区(B)POD 的活性位点  
Fig. 6 (A)Three-D structure of soybean POD which is the most similar to *Conocephalum conicum* POD, the rectangular box indicates active site (B)The active site of POD

### 3 讨论

为深入研究蛇苔植物,本实验室构建了蛇苔 cDNA 文库,通过各种生物信息学软件对该文库中的 POD 序列进行分析,并确定蛇苔 POD 属于植物 POD 超家族。植物过氧化物酶超家族,由细菌过氧化物酶、真菌胞外型过氧化物酶、植物分泌型酶三类组成(Welinder,2002),其中蛇苔 POD 为植物分泌型过氧化物酶。由于 POD 存在大量的异构体,能催化反应底物超过 200 种,还具有多种过氧化物和辅

助因子,因此其在植物的生长发育过程中有重要的生理作用。目前已有多种植物(银杏,小麦,玉米,大豆,葡萄等)的过氧化物酶已得到研究,包括从裸子植物到被子植物的研究,但对苔类植物 POD 基因的具体功能、定位、理化性质等的研究鲜有报道。苔类植物是最古老的陆生植物,它在研究水生植物向陆生植物的演化过程中起关键性作用,通过对这一关键而特殊类群 POD 的研究,为生物进化论物种由简单到复杂、从低级到高级的观点提供理论依据,也同时丰富了植物 POD 的基因资源,为寻找特异性 POD 及进一步改造 POD 提供材料。

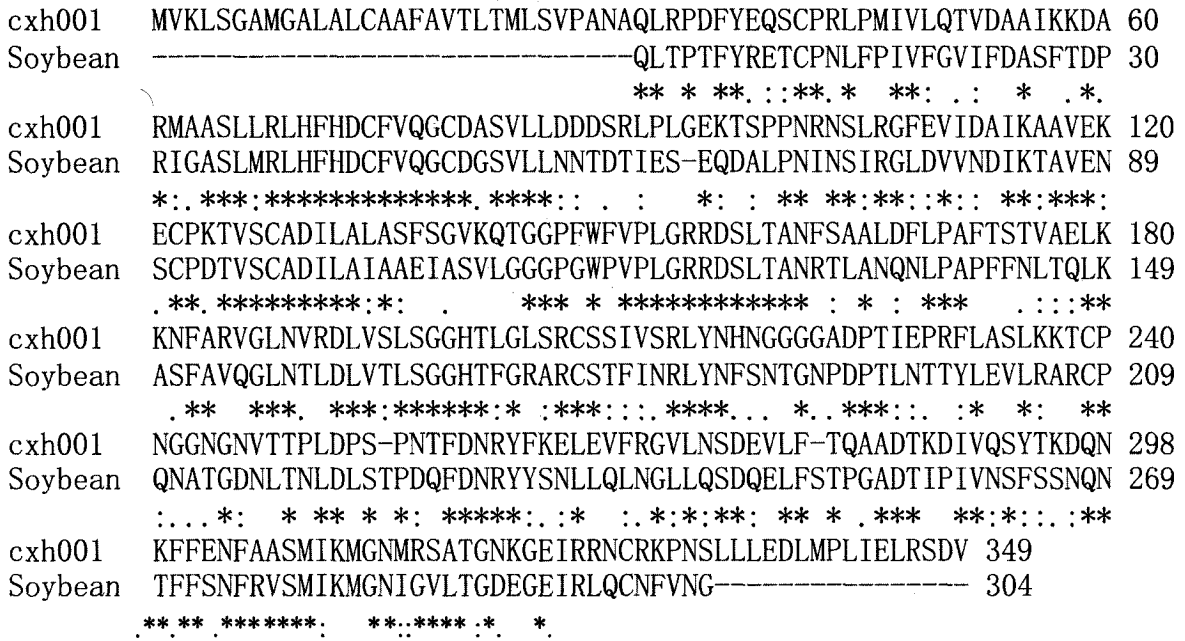


图 7 蛇苔和大豆双重序列比对

Fig. 7 The results of a double sequence alignment of *Conocephalum conicum* and soybean

“\*”表示该列的氨基酸残基完全相同;“:”表示可发生保守性替换;“.”表示可发生半保守性替换;“-----”为二硫键间形成键;矩形框为活性氨基酸残基。

(“\*” residues in that colum are identical in all sequences in the alignment;“:” conserved substitutions are observed;“.” semi-observed substitutions are observed;“-----” disulfide bonds; the rectangular box indicates active amino acid residues.

在细胞中,分泌型 POD 具有不同的亚细胞定位,大部分分泌型 POD 定位于细胞壁上,少数分布于质膜和液泡中(Hiraga 等,2001)。通过预测蛇苔 POD 定位于细胞壁和液泡中,该 POD 与已报道的 POD 蛋白很相似,都为亲水性,有信号肽和 N 端信号肽序列修饰,因此可推断克隆得到的片段就是分泌型蛇苔 POD 的 cDNA 片段。蛇苔 POD 二硫键连接方式主要为 1-4,2-3,5-8,6-7 型,和银杏等植物分泌型过氧化物酶一致(Cheng,2010),该二硫键在保持蛋白质三级结构稳定性和生理活性方面具有重要作用,但二硫键的类型复杂、多样,在错误配对时会影响蛋白质多肽链的正确折叠,因此天然蛋白质二硫键存在的类型还需要通过实验证明。

分泌型 POD 多数是以血红素为辅基的酶类(Jacek 等,2002),血红素为电子传递反应的载体,蛇苔 POD 的 R68、F71、H72、P170、H200 和 D276 活性位点被隐藏在疏水的区域内,并且它不能直接氧化生物大分子,而是依靠低分子的中介物从其血红素基团传递等效的氧化作用到其要修饰的靶点。目前本实验室已经着手对该蛇苔 POD 在毕赤酵母中进行表达,从实验上对其功能进行验证。这些分

析和实验工作不仅丰富了过氧化物酶的基因资源,而且为进一步研究苔类植物过氧化物酶的生理功能、作用机制、分子进化与功能活性改造等奠定了基础。

参考文献:

王镜岩,朱圣庚,徐长发. 2002. 生物化学(下册)[M]. 第 3 版. 北京:高等教育出版社:533

蒋彦,王小行,曹毅,等. 2003. 基础生物信息学及应用[M]. 北京:清华大学出版社

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Res*, **25**:3 389-3 402

Arnold K, Bordoli L, Kopp J. 2006. The SWISS-MODEL Workspace; A web-based environment for protein structure homology modelling[J]. *Bioinformatics*, **22**, 195-201

Bairoch A. 1991. PROSITE; a dictionary of sites and patterns in proteins[J]. *Nucleic Acids Res*, **19**:2 241-2 245

Cheng H(程华), Li LL(李琳玲), Wang Y(王燕), et al. 2010. Molecular cloning, characterization and expression of POD1 gene from *Ginkgo biloba* (银杏过氧化物酶基因 POD1 的克隆及表达分析) [J]. *Acta Agric Boreal-Sin*(华北农学报), **25**(6): 44-51

Duroux L, Welinder KG, et al. 2003. The peroxidase gene family in plants; a phylogenetic overview[J]. *JEM*, **57**: 397-407

De Angioletti M, Lacerra G, Sabato V, et al. 2004. [Beta]<sub>2</sub>+45 G22>C: a novel silent beta2thalassaemia mutation, the first in

- the Kozak sequence[J]. *Br J Haematol*, **124**(2):224-231
- Diella F, Cameron S, Gemund C, et al. 2004. ELM: a database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins BMC[J]. *Bioinformatics*, **5**:79
- Farriol-Mathis N, Garavelli JS, Boeckmann B, et al. 2004. Annotation of post-translational modifications in the Swiss-Prot knowledge base[J]. *Proteomics*, **4**(6):1 537-1 550
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server[M]//John M, Walker(ed). The Proteomics Protocols Handbook. New York: Humana Press:571-607
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, et al. 2001. A large family of class III plant peroxidases[J]. *Plant Cell Physiol*, **42**(5):462-468
- Jacek S, Loewen PC. 2002. Diversity of properties among catalases [J]. *Arch Biochem Biophys*, **401**(2):145-154
- Jiang XL(蒋选利), Li ZC(李振歧), Kang ZS(康振生). 2001. The recent progress of research on peroxidase in plant disease resistance(过氧化物酶与植物抗病性研究进展)[J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agric Fore*(西北农林科技大学学报), **29**:124-129
- Kozak M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs[J]. *Nucleic Acids Res* **15**(20):8 125-8 148
- Li YX, Chen L. 2003. Isolation of total RNA from dry seeds of *Davidia involucrata*[J]. *J Southwest Chin Norm Univ*(Nat Sci *Edi*), **28**:108-111
- Liu YD(刘应迪), Cao T(曹同), Xiang F(向芬), et al. 2001. Effect of high temperature stress on the activity of peroxidase of two species of mosses(高温胁迫下两种藓类植物过氧化物酶活性的变化)[J]. *Guihaia*(广西植物), **21**(3):255-258
- Luo YJ(罗勇军), Luo GF(罗光富), Huang YP(黄应平). 2004. Advances on the simulation of peroxidase and its applications(过氧化物酶模拟及应用研究进展)[J]. *J Instr Analysis*(分析测试学报), **23**:36-142
- Mackey AJ, Haystead TA, Pearson WR. 2002. Getting more from less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences[J]. *MCP*, **1**(2):139-147
- Rodriguez-Lopez JN, Espin JC, Del Amor F, et al. 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon(*Cucumis melo*) cultivated under different salinity conditions[J]. *J Agric Food Chem*, **48**:1 537-1 541
- Stefan AR, Daniel L, Andreas DZ, et al. 2008. The physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants[J]. *Science*, **319**(5 859):64-69
- Urry DW. 2004. The change in Gibbs free energy for hydrophobic association - Derivation and evaluation by means of inverse temperature transitions[J]. *Chem Phys Lett*, **399**(1-3):177-183
- Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgard IV. 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*[J]. *FEBS J*, **269**:6 063-6 081

(上接第 794 页 Continue from page 794)

- small quantities of fresh leaf material[J]. *Phytochem Bull*, **19**:11-15
- Escuder A, Iriond JM, Torres ME. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation[J]. *Biol Conserv*, **113**:351-365
- Excoffier L, Lischer H. 2009. Arlequin Ver3. 5: An integrated software package for population genetics data analysis. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
- Ge S, Hong DY, Wang HQ, et al. 1998. Population genetic structure and conservation of an endangered conifer, *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae)[J]. *Int J Plant Sci*, **159**:351-357
- Gong W, Chen C, Dobeš C, et al. 2008. Phylogeography of a living fossil: pleistocene glaciations forced *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) into two refuge areas in China with limited subsequent postglacial expansion[J]. *Mol Phylogenet Evol*, **48**:1 094-1 105
- Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, **41**:95-98
- Hanski I. 1999. Metapopulation ecology[M]. Oxford University Press, Oxford.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, **25**:1 451-1 452
- Lin MZ(林媚珍), Zhou ZD(卓正大). 1996. Basic features of the flora in Mt. Nankun of Guangdong Province(广东南昆山植物区系的基本特征)[J]. *J South Chin Norm Univ*(华南师范大学学报), **2**:74-79
- Peng SL(彭少麟), Wang BS(王伯荪). 1983. Analysis on the forest communities of Dinghushan. I. species diversity[J]. *Ecol Sci*(生态科学), **1**:11-17
- Petit RJ, Duménil J, Fineschi S, et al. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant population[J]. *Mol Ecol*, **14**:689-701
- Qu Z X, Liu ZW, Zhu K G. 1952. An analytical study of the Spirit Valley, Nanjing. *Acta Bot Sin*, **1**(1):18-19
- Saeki I, Murakami N. 2009. Chloroplast DNA phylogeography of the endangered Japanese Red Maple (*Acer pycnanthum*): the spacial configuration of wetlands shapes genetic diversity[J]. *Divers Distrib*, **15**:917-927
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*[J]. *Genetics*, **140**:767-82
- Wang J, Gao P, Huang HW. 2009. Refugia within refugia: the case study of a canopy tree (*Eurycorymbus cavaleriei*) in subtropical China[J]. *J Biogeogr*, **36**:2 156-2 164
- Yang QJ(杨琴军), Chen GF(陈光富), Liu XQ(刘秀群), et al. 2009. Analysis of genetic diversity of *Taiwania cryptomerioides* in Xingdoushan, Hubei province(湖北星斗山台湾杉居群的遗传多样性研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **29**(4):450-454
- Zhang RB(张仁波), Dou QL(窦全丽), He P(何平), Deng HP(邓洪平). 2007. Analysis of genetic diversity in *Thuja sutchuenensis* populations as revealed by morphological and molecular data(濒危植物崖柏遗传多样性研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(5):687-691