

大果木姜子*LITPS11*基因克隆及生物信息学分析

孔德静[#], 梁进丽[#], 鞠志刚^{*}

贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2024年1月26日; 录用日期: 2024年3月12日; 发布日期: 2024年3月27日

摘要

大果木姜子为贵州十大苗药之一, 因其挥发油具有独特的香味及药用价值, 被广泛应用于食品、药品行业。萜类化合物是植物中重要的次级代谢产物, 可影响果实风味和花香, 并间接起预防虫害的作用。大果木姜子挥发油主要为萜类物质, 萜类合酶(TPS)是萜类物质的合成途径中关键基因。本文以大果木姜子为研究对象, 克隆出*LITPS11*的全长编码序列。利用生物信息学分析软件对*LITPS11*氨基酸序列进行分析, 结果表明, *LITPS11*编码区序列长1692 bp, 编码563个氨基酸, 分子质量为65.41 kDa, *LITPS11*属不稳定亲水性的酸性蛋白。不具有跨膜结构域及信号肽。该蛋白二级结构中主要含有 α -螺旋67.32%, 结果与三级结构预测结果一致。*LITPS11*具有植物萜烯环化酶催化活性位点, 与沉水樟萜类合酶CmTPS具有较高同源性。综上所述, 本文对大果木姜子萜类合酶基因进行初步研究, 为进一步研究萜类物质合成代谢途径及樟科植物中萜类物质提供理论依据。

关键词

大果木姜子, 萜类合酶, 基因克隆, 生物信息学分析

Cloning and Bioinformatics Analysis of *LITPS11* Gene in *Cinnamomum migao* H. W. Li

Dejing Kong[#], Jinli Liang[#], Zhigang Ju^{*}

Pharmacy School, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

Received: Jan. 26th, 2024; accepted: Mar. 12th, 2024; published: Mar. 27th, 2024

[#]第一作者。

^{*}通讯作者。

Abstract

Cinnamomum migao H. W. Li is one of the top 10 Miao medicines in Guizhou Province. Its volatile oil is widely used in food and medicine industry because of its unique flavor and medicinal value. Terpenes is an important Secondary metabolite in plants. It can affect fruit flavours and floral aroma and indirectly prevent pests. Terpenoid synthase (TPS) is a key gene in the synthetic pathway of terpenoids, and the main components of essential oil in the *Cinnamomum migao* H. W. Li are terpenoids. In this paper, the full-length coding sequence of *LITPS11* was cloned from *Cinnamomum migao* H. W. Li .Bioinformatics analysis of the protein encoded by *LITPS11* showed that the open reading frame of 1692 bp, encoding 563 amino acids residues, the molecular weight of the protein was 39.22 kDa. The *LITPS11* protein was an acidic protein with no signal peptide recognition function and no transmembrane region. *LITPS11* was an acidic protein with unstable hydrophilicity. The secondary structure of the protein mainly contains α -helix (67.32%), which is consistent with the prediction of the tertiary structure. *LITPS11* has the catalytic activity site of Terpene cyclase plant C1 and has high homology with CmTPS (*Cinnamomum micranthum*). To sum up, the article studied the *Cinnamomum migao* H. W. Li terpenoid synthase gene, which provides a theoretical basis for further study on the pathway of terpenoid biosynthesis and the terpenoids in Lauraceae plants.

Keywords

Cinnamomum migao H. W. Li, Terpenoid Synthase, Gene Cloning, Bioinformatics Analysis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

大果木姜子为米槁(*Cinnamomum migao* H. W. Li)的干燥成熟果实, 属樟科樟属植物, 主要分布于贵州、云南、广西等省[1]。大果木姜子作为药食两用植物具有温中散寒、理气止痛等功效, 临幊上主要用于冠心病、心绞痛等心血管疾病及胃肠道疾病的治疗, 且具有极好的抗氧化作用[2]。以大果木姜子为原料开发出米槁心乐滴丸、理气活血滴丸、米槁精油滴丸、心胃丹胶囊等制剂[3]。在体外抑菌实验中发现, 大果木姜子挥发油对幽门螺杆菌有较强的抑制作用。在民间, 大果木姜子常作为调味品使用, 起健脾开胃的效果。大果木姜子挥发油为其主要药效及食用部位, 主要含有单萜类, 倍半萜类物质, 如桉油精、香桧烯、(-) β -蒎烯、(+)- α -蒎烯、(-)- α -蒎烯、 β -石竹烯、 δ -杜松烯等。此外, 还有酮类、芳香烃类及环氧化合物[4]。目前, 大果木姜子野生资源日渐枯竭, 对其萜类物质合成途径中关键酶基因的挖掘研究具有重要意义。

萜类化合物具有多种生理和生化活性, 在植物适应环境、抵御天敌、传递信号等方面发挥重要的作用, 可作为天然植物源农药的重要来源。青蒿素、紫杉醇、植物甾醇等萜类物质都对不同病症具有显著疗效[5]。萜类化合物由单个或多个异戊二烯单元组成, 其合成途径主要分为三步: 首先, 合成异戊烯基焦磷酸(IPP)及其异构体二甲基烯丙基二磷脂(DMAPP)前体物质; 而后, 合成牻牛儿基焦磷酸(GPP)、法尼基焦磷酸(FPP)和牻牛儿牻牛儿基焦磷酸(GGPP)等。最后, 通过不同的酶合成丰富多样的萜类化合物并进行修饰[6]。萜类合酶是萜类化合物合成的关键酶, 已在多种植物中被克隆出来, 如雷公藤 *TwMTS* 能

催化 GPP 生成 β -香茅醇, 结球甘蓝 *BoGES* 以 GGPP 为底物生成香叶基芳樟醇, 樟树中存在大量的 *TPS* 基因, 可催化 GPP 生成冰片基焦磷酸、芳樟醇和 1,8-桉叶油, 还可与 FPP 反应生成橙花叔醇[7][8][9]。本课题组前期测得大果木姜子转录组数据, 在此实验基础上, 从大果木姜子中克隆到一个萜类合酶基因 *LITPS11*, 对其进行生物信息学分析, 以期为解析大果木姜子中萜烯类物质的生物合成机制提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

大果木姜子采自贵州省罗甸县, Jm109 感受态由本实验室自行保存。植物 RNA 提取试剂盒购于康为世纪生物科技有限公司, pMD18-T、*BamH I*、*Hind III* 限制性核酸内切酶及 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购于宝日微生物技术(北京)有限公司, 琼脂糖、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司购于生工生物工程(上海)股份有限公司, 基因克隆引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

2.2. 方法

2.2.1. RNA 提取及 cDNA 合成

取约 50~100 mg 大果木姜子, 在液氮中将其研磨粉碎, 利用植物 RNA 提取试剂盒提取大果木姜子总 RNA, 用超微量紫外分光光度计检测其浓度。利用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将所提取的大果木姜子总 RNA 反转录成 cDNA, 测定浓度, -20℃冻存备用。

2.2.2. *LITPS11* 基因克隆

Table 1. Primers sequence used in this study

表 1. 引物序列

引物 Primer	引物序列(5'~3')Primer sequence
<i>LITPS11-F</i>	CGGGATCCATGGCTCTGTTTGGGC
<i>LITPS11-R</i>	CGGAATTCTAAATAGGAATGGGTTC

Table 2. PCR amplification program

表 2. PCR 扩增程序

步骤 Step	温度(℃) Temperature	时间 Time
1	95	5 min
2	95	30 s
3	58	30 s
4	72	2 min 40 s
5	× 33	
6	72	5 min
7	4	10 min

使用 Primer 5 软件对 *LITPS11* 基因序列分析, 设计基因特异性引物(表 1)。以反转录得到的 cDNA 为模板进行按表 2 中 PCR 程序扩增, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳初步判断目的基因条带, 利用 PCR 产物纯化试剂盒回收目的片段, 经 B500 超微量紫外分光光度计检测其浓度和纯度后, 与 pMD18-T 16℃连接 16 h,

次日转入 Jm109 感受态细胞中。挑取单克隆进行菌液 PCR 验证, 并进行 *BamH I*、*Hind III* 双酶切鉴定, 重组质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 运用 DNAMAN 将测序拼接结果与转录组数据进行比对。

2.2.3. *LITPS11* 生物信息学分析

利用表 3 中生物信息学软件对 *LITPS11* 蛋白序列的开放阅读框、相对分子质量、氨基酸序列、等电点、不稳定系数、亲水性等理化性质, 以及蛋白质二级、三级结构进行分析,

通过 NCBI 选择不同植物的 TPS 序列, 利用 DNAMAN 进行多序列分析, 并利用 MEGA7.0 软件采用邻接法(NJ)构建 *LITPS11* 的分子进化树。

Table 3. Bioinformatics analysis

表 3. 生物信息学分析

生物信息学分析 Bioinformatics analysis	软件名称 Software brand	网址 Website
开放阅读框	ORF	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
蛋白同源性检索	NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
蛋白理化性质分析	ExPASy-ProParam	https://web.expasy.org/protparam/
跨膜结构分析	TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
信号肽分析	SignalP 5.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/SignalP-5.0
结构域的预测	CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
亚细胞定位	Softberry	http://www.softberry.com/
二级结构	Predictprotein	https://predictprotein.org/visual_results?req_id=\$2y\$10\$IjbYqN7hgHwlPiuaQG9TuisPphbMBdn8ecnekbXq60HnEH6bW8mi
三级结构	SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/

3. 结果与分析

3.1. *LITPS11* 全长 CDS 序列克隆

以大果木姜子 cDNA 为模板, 用设计的引物进行扩增, 获得一条约为 1600 bp 大小的条带(如图 1)。将 PCR 产物通过琼脂糖凝胶回收试剂盒回收, 回收产物与 pMD18-T 连接, 而后转入 Jm109 感受态, 得到重组质粒。重组质粒进行酶切验证后送生工生物有限公司测序, 测序结果与转录组序列比对完全一致(如图 2)。NCBI OFR 分析表明 *LITPS11* 的全长开放阅读框为 1692 bp, 共编码 563 个氨基酸。

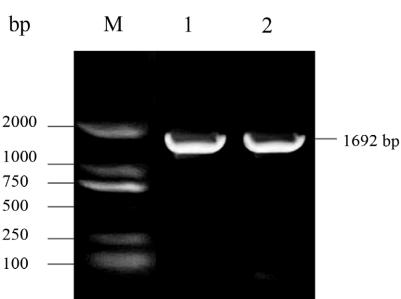


Figure 1. Gene cloning

图 1. 基因克隆

注: M: DL2000 DNA Maker; 1~2: PCR 产物

Figure 2. Alignment sequence
图 2. 比对序列

注: *LITPS11-1*: 拼接结果; *LITPS11-zhuan*: 转录组序列

3.2. *LITP**S11* 蛋白理化性质

使用 ExPasy 在线分析软件对 *LITPS11* 序列分析,结果显示该基因编码的蛋白质大小为 65.41 kDa,带负电荷的残基 85, 带正电荷的残基 65, 分子式为 $C_{2947}H_{4608}N_{770}O_{868}S_{22}$, 理论等电点为 5.29, 不稳定指数为 42.36, 属不稳定蛋白。脂肪指数为 96.32。ProtParam 结果显示 *LITPS11* 蛋白亲水性总平均值为-0.324, 亲水亲油平衡值最低为-3.0, 在 115 号位, 亲水亲油平衡值最高为 2.6, 在 424 号位, 为亲水性蛋白(图 3)。

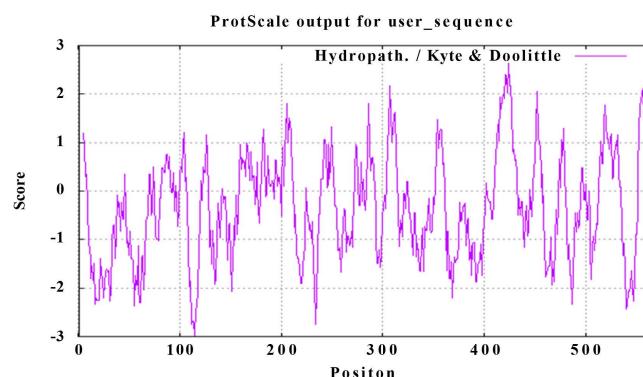


Figure 3. Prediction of hydrophilicity and hydrophobicity of *L/TPS11* amino acid
图 3. *L/TPS11* 氨基酸亲疏水预测

3.3. *LITPS11* 蛋白的信号肽、蛋白结构域预测

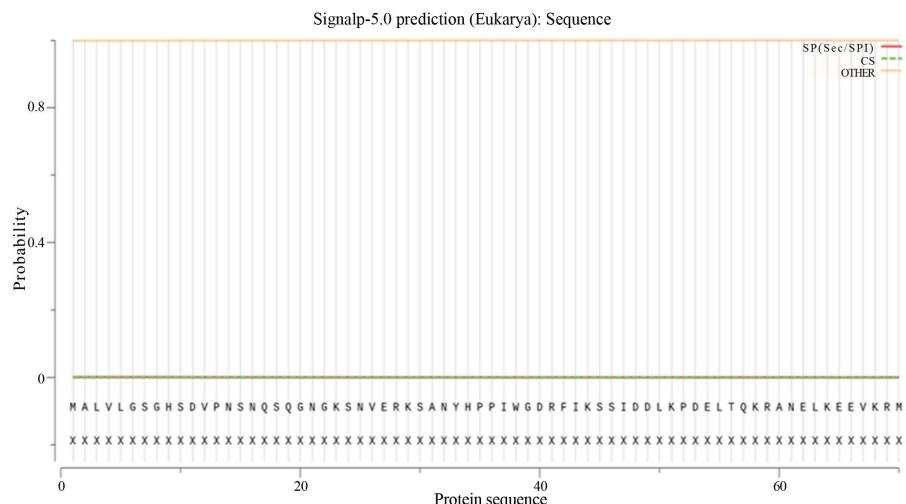


Figure 4. Signal peptide prediction of *LITPS11* protein

图 4. *LITPS11* 蛋白的信号肽预测

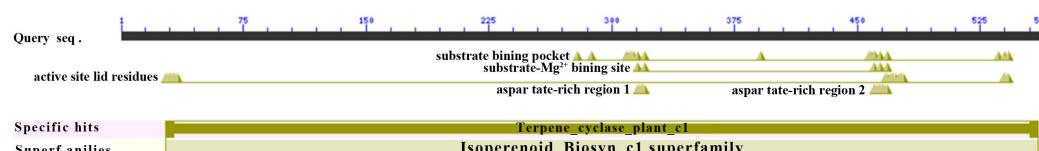


Figure 5. Domain analysis of *LITPS11* protein

图 5. *LITPS11* 结构域分析

信号肽是蛋白质 N-末端一段编码长度为 5~30 的疏水性氨基酸序列, 存在于分泌蛋白、跨膜蛋白和真核生物细胞器内的蛋白中。使用 SignalP-5.0 预测 *LITPS11* 的信号肽位置, 分析结果显示, 有信号肽的概率为 0.077%, 没有信号肽结构, 属于非分泌蛋白(图 4)。使用在线工具 NCBI CD-Search 预测 *LITPS11* 蛋白结构域, 结果显示其含有 Terpene_cyclase_plant_C1 保守结构域, 属于 Isoprenoid_Biosyn_C1 超家族(图 5)。

3.4. *LITPS11* 跨膜结构及亚细胞定位预测

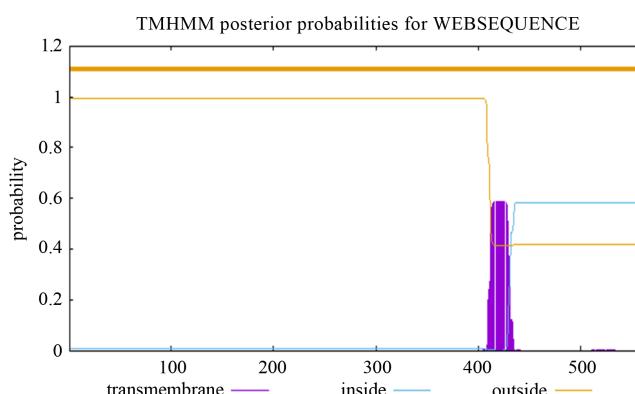


Figure 6. Transmembrane domain prediction of *LITPS11* protein

图 6. *LITPS11* 跨膜区域预测

用 TMHMM 在线软件分析预测 *LITPS11* 的跨膜结构域, 结果显示该蛋白肽链上无跨膜结构域, 表明该蛋白属于非跨膜蛋白(图 6)。利用 Softberry 分析预测 StGID1 的亚细胞定位(图 7), 结果显示, 该蛋白质有较大可能位于细胞质、叶绿体内。

位置权重	Location weights:	LocDB /	PotLocDB /	Neural Nets /	Pentamers /	Integral
细胞核	Nuclear	0.0 /	0.0 /	0.00 /	0.00 /	0.01
细胞膜	Plasma membrane	0.0 /	0.0 /	0.95 /	0.00 /	0.21
细胞外	Extracellular	0.0 /	0.0 /	0.95 /	0.15 /	0.00
细胞质	Cytoplasmic	5.3 /	1.7 /	0.00 /	1.89 /	4.81
线粒体	Mitochondrial	0.0 /	0.0 /	0.00 /	2.69 /	0.00
内质网	Endoplasm. retic.	0.0 /	0.0 /	0.00 /	0.21 /	0.00
溶酶体	Peroxisomal	0.0 /	0.0 /	0.95 /	0.00 /	0.01
高尔基体	Golgi	0.0 /	0.0 /	0.15 /	0.39 /	0.00
叶绿体	Chloroplast	4.7 /	1.3 /	0.00 /	0.32 /	4.96
液泡	Vacuolar	0.0 /	0.0 /	0.00 /	0.00 /	0.00

Figure 7. Prediction of *LITPS11* subcellular location

图 7. *LITPS11* 亚细胞定位预测

3.5. *LITPS11* 蛋白的二级、三级结构预测

SOPMA 在线网站显示 *LITPS11* 蛋白的二级结构包含 67.32% α -螺旋、4.97% 延伸链、3.20% β 转角、24.51% 无规卷曲(图 8(A))。利用在线软件 SWISS-MODEL 对其三级结构进行预测, 结果显示 *LITPS11* 与沉水樟 CmTPS (*Cinnamomum micranthum* f. *kanehirae*)相似度达 70.59%, GMQE 为 0.91(图 8(B)), 与二级结构预测结果一致。

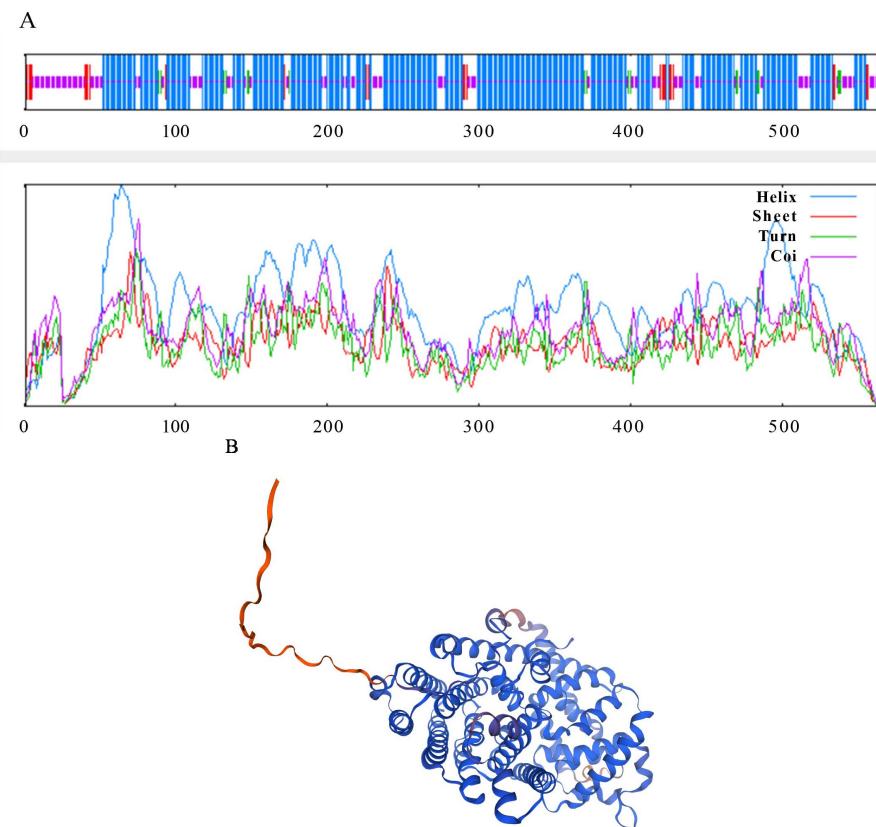


Figure 8. Prediction of the structure of *LITPS11* protein

图 8. *LITPS11* 蛋白结构预测

3.6. *LITPS11* 多序列比对及系统进化树构建

将 *LITPS11* 与已报道的大豆(*Glycine max*, XP_04086321.1, XP_014617595.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_001190374.1)、樟树(*Cinnamomum micranthum*, RWR94587.1)、玉兰(*Magnolia sinica*, XP_058104887.1)中 TPS 家族蛋白序列进行多序列比对, 发现 *LITPS11* 及其同源蛋白序列 N 端均具有保守结构域, 富含天冬氨酸的 DDxx D 基序和 NSE/DTE 基序(红色方框), 表明 *LITPS11* 为 I 类 TPS 家族成员(图 9)。

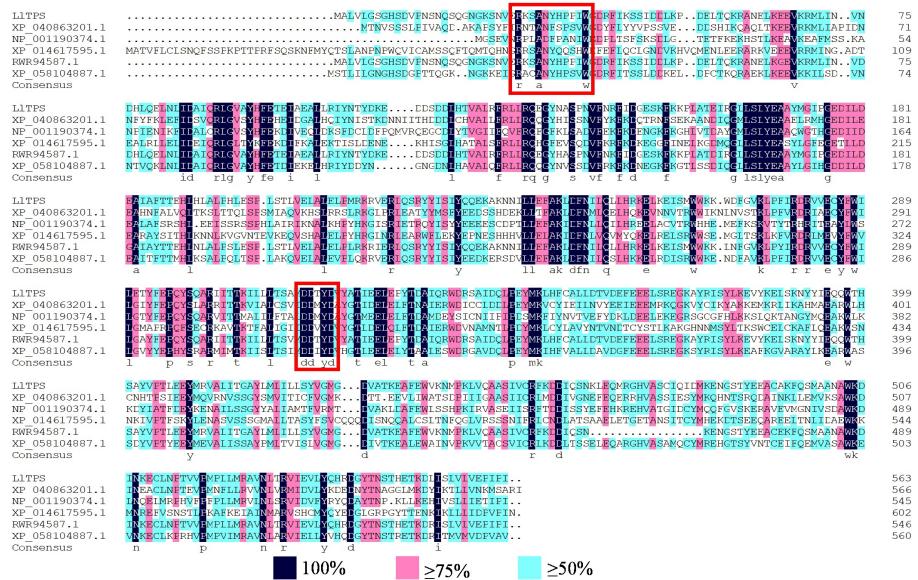


Figure 9. Comparison of TPS amino acid sequences of plants
图 9. 多种植物 TPS 氨基酸序列对比

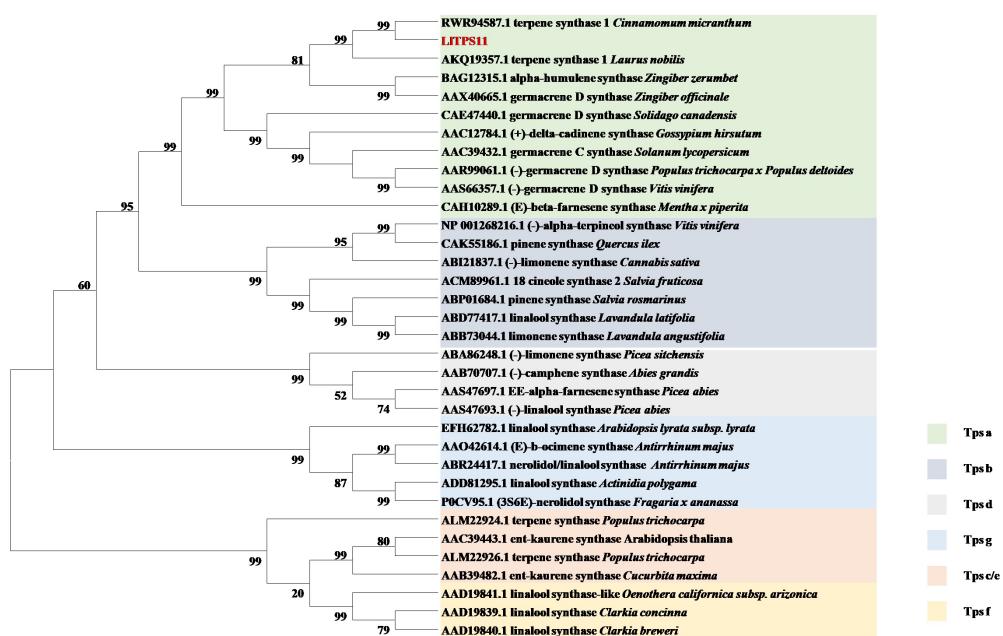


Figure 10. Phylogenetic analysis
图 10. 系统进化分析

将 *LITPS11* 与其他植物中已报道的不同亚型的 TPS 蛋白构建系统进化树, 结果表明, *LITPS11* 与沉水樟(*Cinnamomum micranthum*)、月桂(*Laurus nobilis L.*)、红球姜(*Zingiber zerumbet*)及姜(*Zingiber officinale*)聚为一支, 且与沉水樟关系最近, 属 TPS_a 亚家族(图 10)。

4. 讨论

现代药理研究表明, 大果木姜子挥发油具有抗氧化[10]、抗病毒[11]、抗炎镇痛[10]、抑菌[12]等作用, 且对心血管系统有一定影响[13]。中草药萜烯类化合物多被应用于医药、化妆品、香料、生物燃料及杀虫剂等领域[14]。大果木姜子研究主要集中于化学成分、药理药效以及产业化发展等方面, 而关于大果木姜子萜类合酶研究鲜有报道[15]。

萜类化合物是一类生物自身产生的种类丰富、结构复杂的天然产物家族[16]。大果木姜子的风味及功效是由其挥发性萜类化合物决定的, 萜类化合物具有多种生理和生化活性, 主要为单萜、倍半萜及衍生物, 如 1,8-桉叶素、 α -水芹烯、龙脑、D-柠檬烯和 α -松油醇等。单萜类化包含两个异戊二烯单元, 根据化学结构可分为环状单萜以及非环形或线形单萜, 经不同的单萜合成酶催化香叶基二磷酸酯可生成不同的单萜。倍半萜是则是由倍半萜合成酶催化法尼基二磷酸酯环化反应而成, 紫穗槐-4, 11-二烯合成酶(ADS)是倍半萜物质青蒿素生物合成途径中关键限速酶[17]。萜类化合物的多样性主要是因为萜类合酶(Terpenoid synthetase, TPS)催化前体物质的环化模式不同, 其中催化单萜和倍半萜类生物合成关键酶主要为 TPS-a、TPS-b、TPS-g 亚家族。目前已从紫丁香[18]、温郁金[19]、深纹核桃[20]等植物中克隆出了 TPS 基因。

本文克隆得到大果木姜子萜类合酶基因(*LITPS11*), 并对 *LITPS11* 蛋白序列的理化性质、信号肽、亚细胞定位和亲疏水性等进行分析。分析表明, 大果木姜子的 *LITPS11* 基因完整开放阅读框全长 1698 bp, 共编码 563 个氨基酸, 蛋白分子质量为 65.41 kDa, 理论等电点 5.29。此外, *LITPS11* 脂肪系数为 96.32, 不稳定指数为 42.36, 大于 40, 则 *LITPS11* 为不稳定蛋白。疏水性预测显示, *LITPS11* 平均疏水性为 -0.324, 亲水的蛋白。结合信号肽和跨膜结构域预测分析, 该蛋白是一种不稳定的、非跨膜的蛋白。亚细胞定位可将某种蛋白或者表达产物定位于细胞中的具体位置, 如细胞核内、各种细胞器以及质膜上, 从而为理解基因的作用机制提供研究方向。亚细胞定位分析表明, *LITPS11* 蛋白最有可能存在于细胞质或叶绿体中。因此, 可推断该蛋白在细胞质和叶绿体上发挥作用, 进一步调控萜类化合物的合成与积累。结果显示其含有植物萜烯环化酶保守结构域, 属于类异戊二烯生物合成酶超家族。蛋白比对显示, *LITPS11* 肽链 N 端富含天冬氨酸 DDxxD 基序和 NSE/DTE 基序。同时, 对大果木姜子的 *LITPS11* 进行系统进化树的构建, 发现其 TPS-a 亚家族聚在一起, 与沉水樟 CmTPS 亲缘关系较近高。然而, 它是否具有合成单萜和倍半萜功能还需进一步研究。

综上所述, 本研究可加强对大果木姜子萜类物质调控机制的认识, 特别是萜类合酶的调控, 进而为从分子水平增加萜类化合物的种类和含量, 并达到改善大果木姜子香味或预功效目的。后期将通过转基因及体外酶活实验对 *LITPS11* 蛋白在体内、体外功能上进行深入研究。

5. 结论

本文克隆到大果木姜子 *LITPS11* 基因, 开放阅读框全长 1698 bp, 共编码 563 个氨基酸, 生物信息学分析表明 *LITPS11* 为不稳定的、亲水性的、非跨膜的蛋白, 可能定位于细胞质、叶绿体内。*LITPS11* 肽链 N 端富含天冬氨酸 DDxxD 基序和 NSE/DTE 基序, 属于类异戊二烯生物合成酶家族。大果木姜子 *LITPS11* 进行系统进化树的构建, 发现其 TPS-a 亚家族聚在一起, 与沉水樟 CmTPS 亲缘关系较近高。

基金项目

本研究由贵中医大创合字(2021) 36 号、贵州省科技厅基础研究项目(黔科合基础[2019]1019 号)和贵

州省“千层次”人才项目(贵中医[ZQ2018004])共同资助。

参考文献

- [1] 李锡文. 中国樟科植物志资料(一) [J]. 植物分类学报, 1978, 16(2): 90-92.
- [2] 郑亚玉, 邱德文, 梁光义, 等. 贵州苗药大果木姜子的研究及产业化[J]. 世界科学技术, 2005, 7(2): 112-114.
- [3] 邱德文, 杜茂端. 贵州苗药大果木姜子研究及产业化[J]. 贵阳中医学报, 2003, 25(1): 48-51.
- [4] Huang, X., Chen, J., Liu, J., et al. (2019) Autotoxicity Hinders the Natural Regeneration of Migao H.W. Li in Southwest China. *Forests*, **10**, 919. <https://doi.org/10.3390/f10100919>
- [5] 黄凯, 刘杰, 黄彩河, 等. 不同来源大果木姜子挥发油及脂肪油成分的比较分析[J]. 中国药房, 2020, 31(16): 1961-1966.
- [6] Jia, Q., Brown, R., Köllner, T.G., et al. (2022) Origin and Early Evolution of the Plant Terpene Synthase Family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**, e2100361119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100361119>
- [7] 尹艳, 郭思远, 向安娅, 等. 雷公藤中一个合成香茅醇的单萜合酶基因的克隆与表征[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3588-3593.
- [8] 汪一萍, 葛洋, 张译心, 等. 结球甘蓝香叶基芳樟醇合酶基因的克隆及功能分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2022, 48(5): 583-593.
- [9] 马青, 马蕊, 苏平, 等. 樟树化学型形成关键萜类合酶的系统鉴定[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(9): 2307-2315.
- [10] 郭江涛, 张永萍, 刘杰, 等. 大果木姜子不同部位挥发油成分及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 306-315.
- [11] 胡万福, 张永萍, 邱德文. 复方大果木姜子软胶囊抗流感病毒作用的体外实验研究[J]. 时珍国医国药, 2006(10): 2121-2122.
- [12] 吴碧清, 吴贤倩, 陈丽玄, 等. 苗药大果木姜子挥发油对幽门螺杆菌的体外抑菌实验研究[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(24): 7-11.
- [13] 李亚辉, 杨欣. 贵州大果木姜子对急性心肌缺血损伤的保护作用[J]. 中医药信息, 2020, 37(3): 4-8.
- [14] 苗轶男, 李敬知, 王帅, 等. 萜烯生物合成中关键酶的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(6): 60-70.
- [15] 孙恒灿, 李军, 周智宦, 等. 大果木姜子化学成分、药理作用与产业化研究进展[J]. 中南药学, 2022, 20(3): 668-671.
- [16] Abdallah, I.I., van Merkerk, R., Klumperhaar, E., et al. (2018) Catalysis of Amorpha-4,11-diene Synthase Unraveled and Improved by Mutability Landscape Guided Engineering. *Scientific Reports*, **8**, Article No. 9961. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28177-4>
- [17] Ajikumar, P.K., Tyo, K., Carlsen, S., et al. (2008) Terpenoids: Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms. *Molecular Pharmaceutics*, **5**, 167-190. <https://doi.org/10.1021/mp700151b>
- [18] 吴静, 邹吉睿, 汪进萱, 等. 紫丁香花香成分鉴定及关键 TPS 基因的功能分析[J]. 植物遗传资源学报, 2024: 1-13.
- [19] 张玉秀, 卢丽兰, 王慧针, 等. 温郁金萜类合酶基因 CwTPS4 的克隆和表达特征[J]. 生物资源, 2021, 43(4): 419-425.
- [20] 徐令文, 王毅, 郝佳波, 等. 深纹核桃与防御相关的萜烯合成酶基因鉴定分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2021, 50(6): 789-797.