

皱皮木瓜中 *CsFPS* 基因的克隆及原核表达分析

方清影^{1,2}, 肖 波¹, 吴君贤¹, 徐 睿¹, 方 艳¹, 邓 斌¹, 胡朝玉¹, 查良平^{1,2*}
(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 中药研究与开发安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

摘要: **目的** 对皱皮木瓜三萜生物合成途径中法尼基焦磷酸合酶基因进行克隆及生物信息学、原核表达分析, 并考察其在皱皮木瓜果实中的表达规律。**方法** 通过 RT-PCR 法进行扩增, 从皱皮木瓜果实中克隆获得 *CsFPS1*、*CsFPS2* 基因。采用生物信息学软件预测编码蛋白的特征, 通过 DNAMAN 和 Mega 6 软件进行同源氨基酸比对和系统进化树的绘制, 构建原核表达载体并转化至大肠杆菌中诱导表达, 通过 qRT-PCR 法分析基因表达模式。**结果** *CsFPS1*、*CsFPS2* 基因的 ORF 长度分别为 1 182、1 029 bp, 分别编码 393、342 个氨基酸。两者均为稳定的酸性蛋白, 无跨膜结构, 二级结构显示其均由 α -螺旋结构占主导。皱皮木瓜的 *CsFPS1* 蛋白与苹果的 FPS 蛋白单独聚成一支, *CsFPS2* 蛋白与黄龙的 FPS 蛋白亲缘关系较高。荧光定量分析结果表明, 2 条 *CsFPS* 基因的表达都随果实发育而呈下降趋势, *CsFPS1* 基因具有更高表达。重组蛋白 pET-28a-*CsFPS1* 经 SDS-PAGE 电泳分析, 在 42 kDa 处出现蛋白条带。**结论** 本研究首次从皱皮木瓜中克隆 *CsFPS1*、*CsFPS2* 基因, 成功构建 *CsFPS1* 重组蛋白的大肠杆菌原核表达体系, 为皱皮木瓜三萜生物合成途径中 FPS 基因的功能验证奠定基础。

关键词: 皱皮木瓜; *CsFPS*; 法尼基焦磷酸合酶; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: R282 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0317-06
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.059

木瓜是蔷薇科植物皱皮木瓜 *Chenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实, 具有舒经活络、和胃化湿的功效^[1]。皱皮木瓜果实中含有黄酮、三萜、有机酸、多酚、多糖等成分^[2-4], 其中三萜类是皱皮木瓜的主要药效成分。木瓜三萜类成分具有抗炎、治疗胃癌、胃溃疡、腹泻、急性肝损伤、免疫性肝损伤, 抗病毒等作用^[5-8], 在临床中应用广泛。

植物三萜类化合物的生物合成主要有 3 个过程^[9-10], 起始阶段由甲羟戊酸和甲基赤藓糖醇磷酸化这 2 条独立途径组成, 分别形成异戊烯焦磷酸酯和二甲烯基丙基焦磷酸酯; 两者在牻牛儿基焦磷酸合酶作用下生成牻牛儿基焦磷酸, 所得产物在法尼基焦磷酸合酶 (FPS) 催化下经过两步缩合反应生成法尼基焦磷酸, 随后在鲨烯合酶、鲨烯环氧化酶的作用下经过一系列的氧化还原反应得到 2, 3-氧化鲨烯; 2, 3-氧化鲨烯是多数植物三萜成分的骨架结构, 再通过 P450、糖苷酶、氧化鲨烯环化酶等一系列结构修饰得到不同类型的三萜皂苷化合物^[11]。由此可知, FPS 是三萜代谢途径中重要的关键限速酶之一。

近年来, FPS 基因已经在刺五加^[12]、三七^[13]、洋甘菊^[14]、黄檀^[15]等药用植物中进行功能验证。但目前对皱皮木瓜的三萜类成分研究多集中在提取、鉴定、活性研究上, 而其代谢途径及相关限速酶基因的调控研究尚未见报道。课题组基于前期研究基础, 得到 *CsFPS1*、*CsFPS2* 萜

类合成途径关键酶基因^[16-18]。本研究以皱皮木瓜果实的 cDNA 为模板, 成功克隆 *CsFPS1*、*CsFPS2* 基因并进行生物信息学分析, 以 pET-28a 大肠杆菌为载体构建木瓜 *CsFPS1* 原核表达体系, 以期对皱皮木瓜法尼基焦磷酸合酶基因的功能验证奠定前期基础。

1 材料

皱皮木瓜果实采自安徽宣城新田镇, 经安徽中医药大学彭华胜教授鉴定为正品, 切下果肉, 液氮速冻处理, 保存于-80℃冰箱中。

RNA simple 提取试剂盒购自北京华越洋生物科技有限公司; cDNA 反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; pEASY-Blunt Zero Cloning Kit 克隆载体试剂盒、TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase 热启动超高保真 DNA 聚合酶、EasyPure Quick Gel Extraction Kit 回收试剂盒、大肠杆菌 Trans T1 感受态细胞、原核表达感受态 BL21 (DE3) 细胞、无缝拼接试剂盒 pEASY Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 均购自北京全式金生物技术股份有限公司; 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) (纯度≥99.0%) 购自北京索莱宝科技有限公司; pET-28a 大肠杆菌表达载体购自武汉淼灵生物科技有限公司; BamH I 内切酶购自美国 NEB 公司。所有引物合成及测序服务技术均由上海生工生物有限公司提供。

2 方法

2.1 RNA 提取及 cDNA 合成 取皱皮木瓜果实适量, 严格

收稿日期: 2022-08-05
基金项目: 国家自然科学基金项目 (82073957); 中药研究与开发安徽省重点实验室开放基金资助项目 (AKLPDCM202001)
作者简介: 方清影 (1984—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药资源利用与质量评价。E-mail: itsfangqy@126.com
* 通信作者: 查良平 (1987—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为药用植物分子生药学。E-mail: zlp_ahtcm@126.com

按照相关试剂盒说明书操作提取总 RNA，采用 DNase I 酶清除 RNA 中残留的 DNA，1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带完整性。双链 cDNA 的合成以 RNA 为模板，严格按照反转录试剂盒说明书操作，制得的 cDNA 保存于 -20 ℃ 冰箱中。

2.2 皱皮木瓜 *CsFPS* 基因克隆 皱皮木瓜 *CsFPS* 的转录本源自课题组 *de novo* 从头组装的转录组数据。对比 NCBI 中其他物种中已知功能的法尼基焦磷酸合酶基因，共筛选出 2 条 FPS 基因序列，通过 Primer Premier 5.0 软件，设计特异性引物对。其中，*CsFPS1* 正向引物 5'-ATGGCATTAAAGACCCAACGCCTC-3'，反向引物 5'-TTACTTCTGCCTCTTGTATATCTTT-3'；*CsFPS2* 正向引物 5'-ATGGCGGATCTCAAGGCAAAAGTTTC-3'，反向引物 5'-CTATTTCTGCCTCTTGTAAATCTTG-3'。以反转录后的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。经琼脂糖凝胶电泳检测，将纯化产物连接 pEASY-Blunt Zero Cloning Kit 载体，转化至大肠杆菌 Trans T1 感受态细胞。在 37 ℃ 下过夜扩大培养后采用菌液 PCR 验证，将阳性菌液进行测序。

2.3 *CsFPS* 基因的序列及编码蛋白分析 通过 NCBI 在线工具进行蛋白质和核苷酸序列 BLAST 比对、分析和基因开放阅读框 (ORF) 的获取。*FPS* 基因编码蛋白的相对分子量、氨基酸数目、等电点等理化性质由专业蛋白质分析系统 (ExPASy) 预测评估。*CsFPS* 蛋白质的二、三级结构通过在线网站 SPOMA 和 Swiss Model 分析完成。采用 NCBI 的 Conserved Domain 预测 *CsFPS* 蛋白结构域，TMHMM 进行 *CsFPS* 蛋白序列的跨膜结构域分析，Clustal W 软件进行氨基酸多序列比对，Mega 6.0 软件邻接法 Neighbor-joining 建立系统进化树。

2.4 *CsFPS* 的表达量分析 以 *GAPDH* 基因为内参校正，采用目的基因相对表达量比较阈值法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)，对 3 个时期皱皮木瓜果实中 *CsFPS* 转录的 mRNA 丰度进行定量监测。利用 Primer Premier5.0 设计荧光定量引物，*CsFPS1* 正向引物 5'-GTTGCTAATGGCAGGCGAA-3'，反向引物 5'-GTCCCAACCTTCTCTATCACTTC-3'；*CsFPS2* 正向引物 5'-AATGTGCCTGGAGGGAAGC-3'，反向引物 5'-TCGATGCACCAACCGAGA-3'。qRT-PCR 反应体系为 2 × Realab Green PCR Fast Mixture 10 μL，上下游引物各 0.5 μL，模板 cDNA 1 μL，补充灭菌超纯水至 20 μL 体系。PCR 程序为 95 ℃ 预变性 300 s，95 ℃ 变性 15 s，60 ℃ 退火 60 s，72 ℃ 延伸 30 s，共 40 个循环，重复 3 次，计算 *CsFPS* 基因表达。

2.5 *CsFPS1* 基因的原核表达 对测序成功后的序列进行分析，以 BamH I 限制性内切酶设计酶切位点，其中 BamH I-*CsFPS1* 正向引物 5'-GACAGCAAATGGGTCGCGGAATGCATTAAAGACCCAACGCCTC-3'，反向引物 5'-CGACGGAGCTCGAATTCGGATTACTTCTGCCTCTTGTATATCTTT-3'。重组质粒进行 PCR 扩大培养，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收，同时对表达载体 pET-28a 质粒进行 BamH I 酶切处理，连接目的基因片段和载体片段 (30 min，50 ℃)，

产物转化至大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞中。PCR 验证载体构建成功后，将质粒转化到表达宿主菌 BL21 (DE3) 表达感受态中，转化表达菌液按照 1 : 100 的比例加到 LB (含卡纳抗生素) 培养基中，37 ℃ 振荡 (200 r/min) 培养至 A_{600} 值为 0.4 ~ 0.6，以 IPTG (终浓度为 1 mmol/L，16 ℃) 低温诱导培养。取菌体，用 PBS 重悬、洗涤、离心，重组蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳分析检测表达情况，以空质粒 pET-28a 转化 BL21 (DE3) 表达菌作为对照。

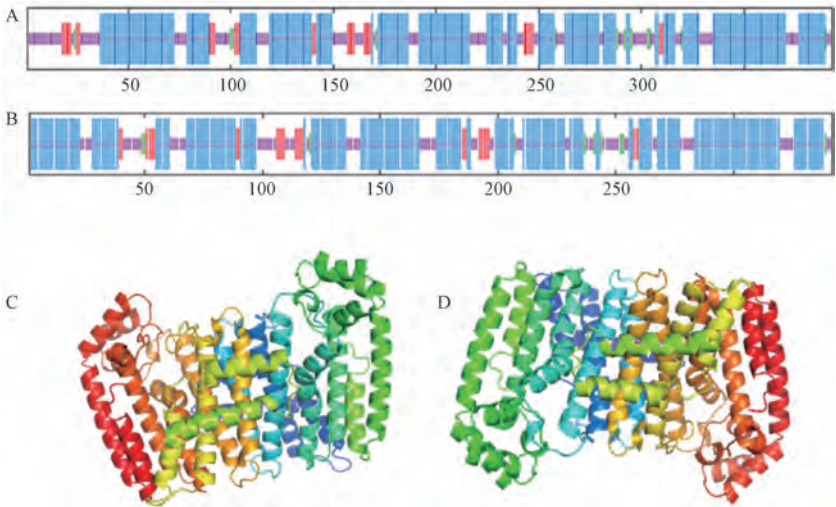
3 结果

3.1 *CsFPS* 基因的克隆 根据皱皮木瓜果实不同发育时期的转录组文库，通过 ORF Finder 对 2 条 *CsFPS* 基因序列进行分析，预测 2 个基因编码区分别有 1 182、1 029 bp，见图 1。利用特异性引物进行全长扩增，将产物构建入 pEASY-Blunt Zero Cloning Kit 载体中，对单菌落进行 PCR，选择阳性菌开展测序、比对，发现与转录组中预设的 2 个 *CsFPS* 序列结果相一致，说明克隆成功，分别命名为 *CsFPS1*、*CsFPS2* 基因。GenBank 网站 BLAST 结果显示，*CsFPS1*、*CsFPS2* 氨基酸序列与苹果 (XP_008344722.1) 的相似性分别为 95.60%、98.25%，与欧洲甜樱 (XP_021818008.1) 的相似性分别为 92.11%、92.98%，与桃 (XP_007205488.1) 的相似性分别为 90.94%、92.69%，表明所获得的基因属于法尼烯合酶基因家族。

图 1 *CsFPS1*、*CsFPS2* 基因克隆图

3.2 *CsFPS1*、*CsFPS2* 生物信息学分析

3.2.1 蛋白理化性质和二、三级结构 由 ExPASy 在线预测，*CsFPS1*、*CsFPS2* 分别编码氨基酸 393、342 个，蛋白理论等电点分别为 6.28、5.61，相对分子质量分别为 44 703.53、39 545.44，不稳定系数 (II) 分别为 36.04、39.7，可初步判断 2 个法尼基焦磷酸合酶为稳定的酸性蛋白。依据 *CsFPS1*、*CsFPS2* 的氨基酸序列预测皱皮木瓜 *CsFPS1*、*CsFPS2* 二级结构，见图 2A ~ 2B。由此可知，*CsFPS1* 的 α -螺旋在多肽链中共有 236 个 (占比 60.05%)， β -转角共有 12 个 (3.05%)，延伸链共有 32 个 (占比 8.14%)，无规则卷曲共有 113 个 (占比 28.75%)；*CsFPS2* 的 α -螺旋共有 223 个 (占比 65.2%)，延伸链共有 25 个 (占比 7.31%)， β -转角共有 10 个 (占比 2.92%)，无规则卷曲共有 84 个 (占比 24.56%)。2 个基因的二级结构元件



注：A 为 CsFPS1 二级结构，B 为 CsFPS2 二级结构，C 为 CsFPS1 三级结构，D 为 CsFPS2 三级结构。

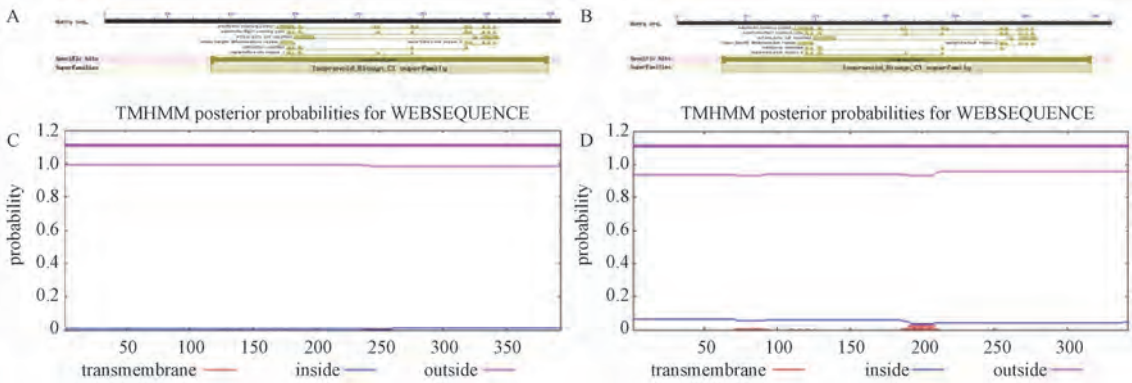
图 2 CsFPS1、CsFPS2 蛋白二级、三级结构

均是 α -螺旋结构占主导，其次是无规则卷曲、延伸链和 β -转角结构。

利用 SWISS-MODEL 构建 CsFPS 三维空间模型，见图 2C~2D，提示 2 个蛋白的三维结构较为类似。经过 ExPASy structure assessment 程序评测推导得出，CsFPS1 蛋白模型 4kk2.1. A 得分为 0.73，蛋白序列的相似性为 78.24%；CsFPS2 蛋白模型 4kk2.1. A 得分为 0.87，蛋白序列的相似性为 80.12%。

3.2.2 结构功能域与跨膜结构域分析 利用 NCBI 的

Conserved domains 功能预测 2 条 CsFPS 蛋白质的保守结构域，见图 3A~3B，表明蛋白含有底物结合位点、催化位点、天冬氨酸富集区 1、2 等 7 个结构域，2 个基因的保守功能域分别在 100~894、97~891 序列区间，特定匹配都为聚丙烯合成酶，属于 Isoprenoid-Biosyn-C1 超基因家族。利用 TMHMM2.0 在线工具对皱皮木瓜 CsFPS1、CsFPS2 进行跨膜结构区域预测，CsFPS1、CsFPS2 中各序列膜外概率均接近 1，无跨膜区，不属于跨膜蛋白，见图 3C~3D。



注：A 为 CsFPS1 结构功能阈，B 为 CsFPS2 结构功能阈，C 为 CsFPS1 跨膜结构域，D 为 CsFPS2 跨膜结构域。

图 3 CsFPS1、CsFPS2 的结构功能域和跨膜结构分析

3.3 CsFPS1、CsFPS2 的同源氨基酸序列比对 采用 DNAMAN 软件对 CsFPS 氨基酸序列与苹果 MdFPS (RXH85108.1)、白梨 PbFPS (XP_009367257.1)、扁桃 PdFPS (XP_034220806)、黄龙胆 GIFPS (BAA88844.1) 和日本樱花 PyFPS (PQQ20330.1) 序列进行同源性比对，见图 4。由此可知，它们的氨基酸序列同源性为 79.06%，都有 5 个保守结构域，分别在结构域 II 和 V 中含 2 个天冬氨酸富集区，即保守域中的 DDXXD (X 代表任意氨基酸)，这些氨基酸在参与酶与底物结合、催化中具有重要功能。

3.4 CsFPS1 和 CsFPS2 的系统进化分析 用 Mega 软件的

Neighbor-joining 模式进行皱皮木瓜 CsFPS 等 18 种植物的 FPS 蛋白序列比对，见图 5。由此可知，2 个皱皮木瓜 FPS 蛋白都与其他双子叶植物法尼基焦磷酸合酶蛋白聚为一大类，其中皱皮木瓜的 CsFPS1 蛋白与苹果的 FPS 单独聚成一支，支持度 58，且与其他蔷薇科植物相接近；CsFPS2 基因与黄龙胆的 FPS 亲缘关系较高，证实两者与其他植物法尼基焦磷酸合酶的同源性。

3.5 皱皮木瓜 CsFPS 基因表达分析 为了解皱皮木瓜中不同发育阶段 2 条 CsFPS 基因的表达模式，以未成熟 (6 月)、成熟 (7 月)、过成熟 (8 月) 的果实 cDNA 为模板，

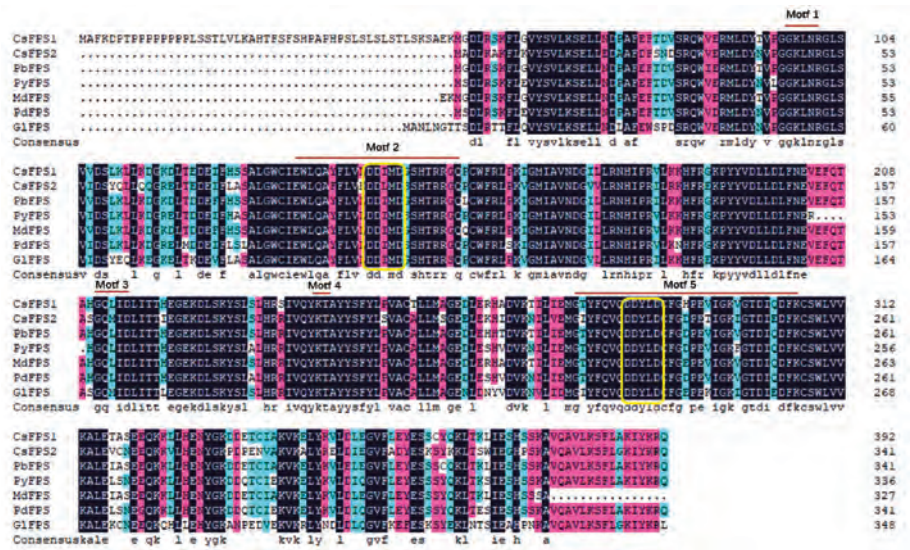


图 4 皱皮木瓜、苹果、日本樱花、白梨、黄龙胆、扁桃法尼基焦磷酸合酶氨基酸序列多源比对

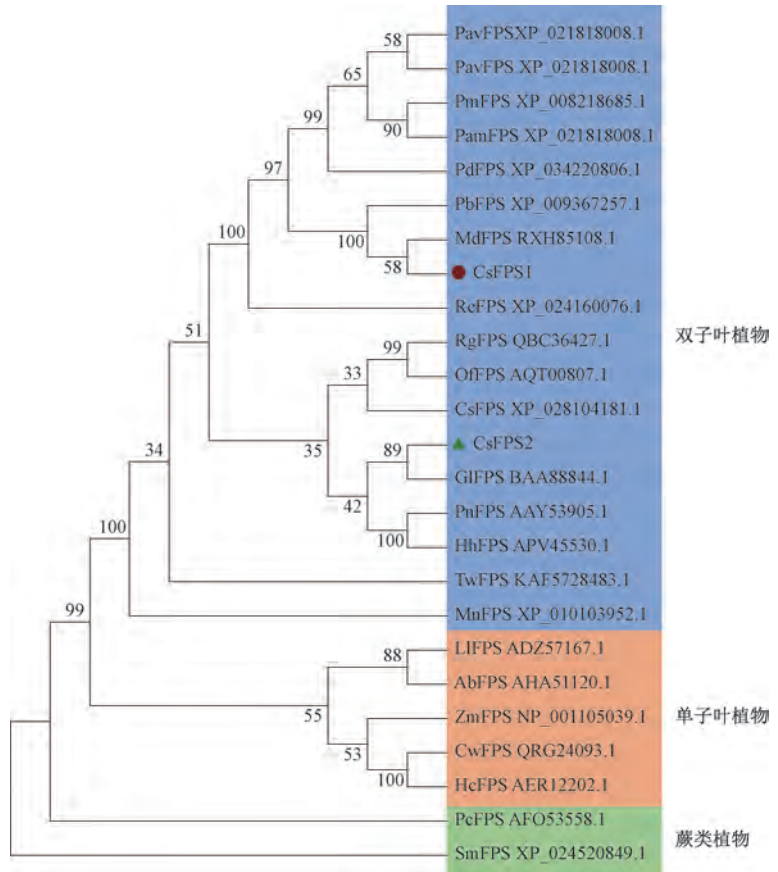


图 5 CsFPS1、CsFPS2 氨基酸序列的系统进化树分析

进行 qRT-PCR 实验，测定不同发育阶段 *CsFPS* 基因的表达差异，见图 6。由此可知，*CsFPS1*、*CsFPS2* 基因随着发育进程，均表现下降趋势，而在不同阶段样品中前者表达量更高。因此，本研究选择 *CsFPS1* 作为候选基因继续进行原核表达分析。

3.6 *CsFPS1* 基因的原核表达 分别用 BamH I 酶切基因编码区质粒和载体质粒，回收，连接，构建 pET-28a-CsFPS1

转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达感受态中，菌液 PCR 检验结果为阳性，比对测序结果表明成功构建 *CsFPS1* 基因的原核表达载体。将重组菌株接种于 LB 液体培养基扩大培养，经过 IPTG 诱导后，收集菌体并裂解，上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果发现，融合蛋白 pET-28a-CsFPS1 的全菌、上清液和沉淀均在 42 kDa 处出现目的蛋白条带，见图 7，其中 pET-28a-CsFPS1 的上清液有明显的表达，表明

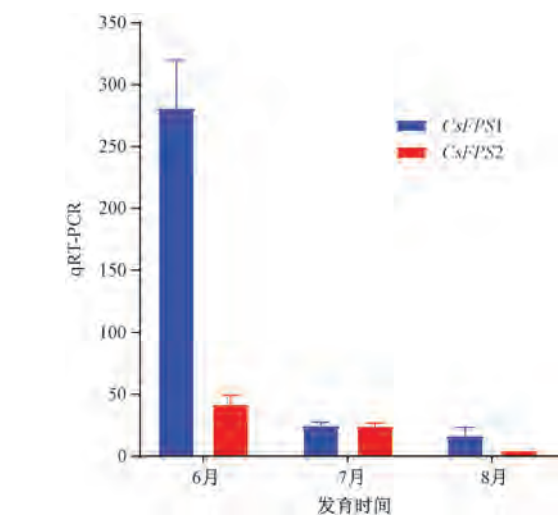
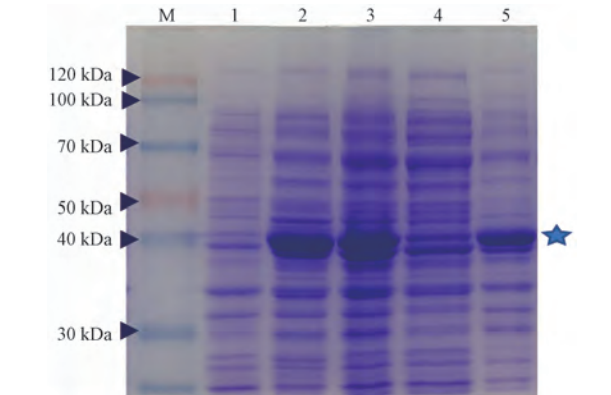


图 6 皱皮木瓜不同生长期果实中 2 条 *FPS* 基因表达

已获得可溶性蛋白。



注：M 为 Protein Marker，1 为空载 pET-28a，2 为未诱导的 *CsFPS* 全菌，3 为诱导的 *CsFPS* 全菌，4 为诱导的 *CsFPS* 上清液，5 为诱导的 *CsFPS* 沉淀。

图 7 *CsFPS1* 重组蛋白表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

4 讨论

三萜皂苷类化合物是皱皮木瓜重要的活性成分，其合成包括甲羟戊酸途径、甲基赤藓糖醇磷酸化途径及下游关键酶基因合成途径。其中，由异戊烯焦磷酸酯和 FPS 生成法尼基焦磷酸是三萜皂苷生物合成的关键步骤，FPS 是处于类异戊二烯代谢通路的首个分枝点，是萜类化合物生物合成通路过程中的关键酶，参与不同萜类化合物重要前体的产生，其变化直接影响下游产物的积累，目前已经从不同类型生物体^[19-21]中纯化出来。FPSs 在植物生长发育过程中呈现广泛保守性和多样性^[22]，研究表明，在 4 个大戟科的植物中发现了 10 种 FPS，它们具有相似的外显子/内含子结构^[23]。本研究首次从皱皮木瓜果实中克隆 2 条法尼基焦磷酸合酶 *CsFPS1*、*CsFPS2*，它们具有与其他植物 FPS 一样的 5 个保守结构域和具有 2 个天冬氨酸富集区^[24]，同源氨基酸比对显示，两者与蔷薇科植物苹果 MdFPS 和白梨 PbFPS 的相似性较高，表明法尼基焦磷酸合酶的同源性。皱皮木瓜的 2 条 *FPS* 基因存在 65 个变异位点，系统进化分

析表明，*CsFPS1* 蛋白与苹果的 FPS 单独聚成一支，*CsFPS2* 蛋白与黄龙胆的 FPS 亲缘关系更近，这也说明法尼基焦磷酸合酶在进化过程中存在突变。

研究表明，白桦树 FPS 的表达能够促进白桦酸、齐墩果酸、白桦素的含量增加^[25]；通过农杆菌介导法将重组子 pCambia2300-35S-TKFPS 转化至野生橡胶草叶盘中，并对不同生长期橡胶草转基因植物和野生植株中 *FPS* 基因的表达进行比较，结果表明转基因体系的产胶量和基因表达较野生型明显提高^[26]。同时，FPS 已在三七^[13]、浙贝母^[27]、千里光^[28]、灵芝^[29]等药用植物中进行深入的研究，这可为 *CsFPS* 的进一步研究提供借鉴。

皱皮木瓜是药食同源的常用中药，关于其种质资源^[30-33]、栽培种植^[34]、采收加工^[35]、质量评价^[36]等方面已有广泛研究，但对三萜代谢生物合成途径的挖掘尚未开展。本研究从皱皮木瓜果实中克隆了 2 条 *FPS* 基因，并成功构建了 pET-28a-*CsFPS1* 原核表达载体，为皱皮木瓜的 *CsFPS* 基因功能验证奠定了基础，也弥补了蔷薇科皱皮木瓜 FPS 基因研究的空缺。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：62.

[2] 陈亚楠，毛运芝，冉 慧，等. 不同地方品种皱皮木瓜有机酸检测与差异分析 [J]. 果树学报，2019，36(9)：1171-1184.

[3] 顾正位，冯 帅，孙 慧，等. HPLC 与色差法对光皮木瓜与不同产地皱皮木瓜药材的质量评价研究 [J]. 山东中医杂志，2020，39(1)：65-70.

[4] 郑 璇. 不同产地皱皮木瓜主要化学成分及生物活性的研究 [D]. 北京：中国农业科学院，2019.

[5] 石孟琼，贺君宇，王 晓，等. 木瓜总三萜对幽门螺杆菌诱导小鼠胃炎的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志，2021，46(18)：4782-4792.

[6] 冯旻璐，许海燕，贺海波，等. 木瓜总三萜通过调节 miR-10a 和 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 信号通路诱导胃癌细胞凋亡 [J]. 中药材，2019，42(12)：2929-2935.

[7] He H B, Feng M L, Xu H Y, et al. Total triterpenoids from the fruits of *Chaenomeles speciosa* exerted gastroprotective activities on indomethacin-induced gastric damage via modulating microRNA-423-5p-mediated TFF/NAG-1 and apoptotic pathways [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 662-679.

[8] Wang Z J, Jin D N, Zhou Y, et al. Bioactivity ingredients of *Chaenomeles speciosa* against microbes: characterization by LC-MS and activity evaluation [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(16): 4686-4696.

[9] 罗祖良，张凯伦，马小军，等. 三萜皂苷的合成生物学研究进展 [J]. 中草药，2016，47(10)：1806-1814.

[10] Sawai S, Saito K. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants [J]. *Front Plant Sci*, 2011, 2: 25.

[11] 徐圆圆，陈 仲，贾黎明，等. 植物三萜皂苷生物合成途

径及调控机制研究进展[J]. 中国科学 (生命科学), 2021, 51(5): 525-555.

[12] Wang Z, Guo H Y, Zhang Y T, *et al.* DNA methylation of farnesyl pyrophosphate synthase, squalene synthase, and squalene epoxidase gene promoters and effect on the saponin content of *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Forests*, 2019, 10 (12): 1053.

[13] Yang Y, Ge F, Sun Y, *et al.* Strengthening triterpene saponins biosynthesis by over-expression of farnesyl pyrophosphate synthase gene and RNA interference of cycloartenol synthase gene in *Panax notoginseng* cells [J]. *Molecules*, 2017, 22(4): 581.

[14] Su S S, Zhang H M, Liu X Y, *et al.* Cloning and characterization of a farnesyl pyrophosphate synthase from *Matricaria recutita* L. and its upregulation by methyl jasmonate [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(1): 349-361.

[15] Guo L, Kong J Q. cDNA cloning and expression analysis of farnesyl pyrophosphate synthase from *Ornithogalum saundersiae* [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2014, 69(5-6): 259-270.

[16] 刘梦丽, 余函纹, 单婷玉, 等. 天麻中糖基转移酶基因 GeGT1 的克隆及原核表达分析 [J]. 中草药, 2021, 52 (14): 4327-4333.

[17] 徐 睿, 单婷玉, 吴君贤, 等. 茅苍术硫解酶 AIKAT 基因的克隆及原核表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (19): 4950-4958.

[18] 单婷玉, 于大庆, 韩晓静, 等. 山楂鲨烯合酶 CpSQS1, CpSQS2 的基因克隆及原核表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1334-1341.

[19] 原晓龙, 李云琴, 王 毅. 牛樟芝 AcFPS 基因的克隆及最佳表达培养基筛选 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39 (11): 5240-5246.

[20] Wang X T, Sun T T, Sun J, *et al.* Molecular cloning, characterisation, and heterologous expression of farnesyl diphosphate synthase from *Sanghuangporus baumii* [J]. *Mol Biotechnol*, 2020, 62(2): 132-141.

[21] Zhao Y J, Chen X, Zhang M, *et al.* Molecular cloning and characterisation of farnesyl pyrophosphate synthase from *Tripterygium wilfordii* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125415.

[22] Yuan K J, Huang L X, Ai C X, *et al.* Genomic organization and sequence polymorphism of a farnesyl diphosphate synthase gene in apples (*Malus domestica* Borkh.) [J]. *Front Agric China*, 2011, 5(2): 209-214.

[23] Guo D, Li H L, Peng S Q. Structure conservation and differential expression of farnesyl diphosphate synthase genes in *Euphorbiaceous* plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (9): 22402-22414.

[24] Szkopińska A, Płochocka D. Farnesyl diphosphate synthase: regulation of product specificity [J]. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52(1): 45-55.

[25] Yin J, Li Y, Li C X, *et al.* Cloning, expression characteristics of a new FPS gene from birch (*Betula platyphylla* suk.) and functional identification in triterpenoid synthesis [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 154: 112591.

[26] 曹新文, 王秀珍, 李永梅, 等. 橡胶草法尼基焦磷酸合酶基因的克隆与功能分析 [J]. 中国农业科学, 2016, 49 (6): 1034-1046.

[27] 吴秋丽, 嵇元烨, 董莉莉, 等. 不同产地浙贝母生物碱含量及其合成相关基因表达研究 [J]. 广西植物, 2020, 40 (12): 1755-1763.

[28] 王丽平, 湛琴琴, 梁 瑾, 等. 千里光法尼基焦磷酸合酶基因的克隆及功能鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (23): 5677-5685.

[29] Fei Y, Li N, Zhang D H, *et al.* Increased production of ganoderic acids by overexpression of homologous farnesyl diphosphate synthase and kinetic modeling of ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum* [J]. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 115.

[30] 李 慧, 徐瑞瑞, 刘东超, 等. 皱皮木瓜品种的遗传多样性和 SSR 指纹图谱分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 19 (22): 7519-7529.

[31] 马凯旋, 沈汝波, 丰 震, 等. 皱皮木瓜种质药用成分含量及性状变异研究 [J]. 山东农业大学学报 (自然科学版), 2020, 51(4): 593-597.

[32] 陈亚楠, 毛运芝, 冉 慧, 等. 不同地方品种皱皮木瓜有机酸检测与差异分析 [J]. 果树学报, 2019, 36 (9): 1171-1184.

[33] 马凯旋. 皱皮木瓜种质药用成分对遮荫和套袋技术的响应及转录组学分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.

[34] 岳华峰, 王玉忠, 张 宁, 等. 中国果用木瓜栽培育种技术研究及其综合开发利用新进展 [J]. 世界林业研究, 2020, 33(4): 88-93.

[35] Fang Q Y, Yin M Z, Chu S S, *et al.* Comprehensive analysis of agronomic characters, chemical compounds, and antioxidant activity in *Chaenomeles* fruits at different developmental stages [J]. *Pharmacogn Mag*, 2021, 17(76): 657-665.

[36] 张靖年, 毕晓黎, 李养学, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合多元统计分析的木瓜鉴别研究 [J]. 中药材, 2021, 44 (9): 2137-2141.