

南方红豆杉紫杉烷7 β -羟基化酶 基因全长序列的克隆和进化分析*

燕丽娜¹, 苏应娟², 王 艇¹

(1. 中国科学院武汉植物园, 湖北 武汉 430074; 2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 从南方红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *mairei* 的新鲜嫩叶中提取基因组 DNA 作为模板, 利用三组特异引物进行 PCR 扩增, 然后克隆测序得到紫杉烷 7 β -羟基化酶的基因全长。该基因编码区起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, 全长 1 692 bp; 碱基组成为 490 A (29.0%), 351 C (20.7%), 362 G (21.4%) 和 489 T (28.9%)。将紫杉烷 7 β -羟基化酶基因全长序列与细胞色素 P450 基因家族的其它三个成员进行比对, 发现它与紫杉烷 2 α -羟基化酶基因、紫杉烷 10 β -羟基化酶基因及紫杉烷 13 α -羟基化酶基因的一致性分别为 74%、68% 及 76%。它们的外显子和内含子的连接区均具保守的 GT-AG 结构, 内含子区的变异性明显高于外显子区。进一步以红豆杉属的 13 个紫杉烷羟基化酶基因家族成员为对象, 利用位点间可变 ω (非同义替换率 dN 和同义替换率 dS 的比值) 模型对该基因家族的适应性进化进行分析。分支模型、位点模型以及分支-位点模型的分析表明: 紫杉烷羟基化酶基因家族的少数分支处于正选择压力下 ($\omega > 1$), 但未检测到正选择位点; 而绝大部分位点受强烈的负选择作用 ($\omega < 1$)。

关键词: 南方红豆杉; 紫杉烷 7 β -羟基化酶基因; 正选择; 负选择

中图分类号: Q349 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 05-0120-06

Molecular Cloning and Evolutionary Analysis of the Full-length Sequence of the *Taxus wallichiana* var. *mairei* Taxoid 7-beta-hydroxylase Gene

YAN Lina¹, SU Yingjuan², WANG Ting¹

(1. Wuhan Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: By using PCR and cloning approaches, a full-length sequence (1 692 bp) of taxoid 7 β -hydroxylase gene was obtained from *Taxus wallichiana* var. *mairei* genomic DNA. The gene sequence contains 490 adenine (29.0%), 351 cytosine (20.7%), 362 guanine (21.4%) and 489 thymine (28.9%), using ATG and TGA as start and stop codons. Sequence comparisons reveal that the *T. wallichiana* var. *mairei* taxoid 7 β -hydroxylase gene is highly similar to other P450 gene family members. It shows a identity of 74% with taxoid 2 α -hydroxylase, 68% with taxoid 10 β -hydroxylase, and 76% with taxoid 13 α -hydroxylase. The joint region between introns and exons possess the conserved GT-AG, and introns exhibit higher variability than exons. An evolutionary analysis was further performed on the P450 gene family members under models allowing ω (nonsynonymous/synonymous rate ratio) to vary among sites. Under the branch model, the site model and the branch-site model developed by Yang et al, the results show that although several lineages are under positive selection with $\omega > 1$, no positively se-

* 收稿日期: 2009-02-25

基金项目: 中国科学院“百人计划”引进国外杰出人才资助项目 (0729281F02); 国家自然科学基金资助项目 (30771763); 广东省科技计划资助项目 (2005B10401035)

作者简介: 燕丽娜 (1984 年生), 女, 硕士生; 通讯作者: 王艇, 苏应娟; E-mail: tingwang@wbgcas.cn, suyj@mail.sysu.edu.cn

lected sites are identified; and most of the sites in this gene family are under negative selection with $\omega < 1$.

Key words: *Taxus wallichiana* var. *mairei*; taxoid 7-beta-hydroxylase gene; positive selection; negative selection

紫杉醇是从红豆杉属 *Taxus* L. 植物中分离得到的一种次生代谢物, 因它能与微管蛋白作用抑制细胞有丝分裂, 故被用作抗癌药。因为紫杉醇在红豆杉中的含量极低, 且红豆杉属植物生长缓慢, 这就导致紫杉醇的生产原料供应短缺, 无法满足临床治疗需求。现在在技术上尽管已可通过化学合成法或细胞组织培养法来制备紫杉醇, 但这些方法的成本过高, 产量也很低, 未能得到广泛应用^[1-2]。近来, 利用生物技术手段提高紫杉醇产量一直是颇受关注的课题。深入了解紫杉醇合成途径, 特别是参与各合成反应的酶及其编码基因的功能和调控, 可为通过基因工程途径调节紫杉醇的合成代谢奠定基础^[3]。

紫杉醇合成反应从最初的共同前体 GGPP (牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸) 到合成出紫杉醇共经历约 19 步酶促反应^[4-5], 其中有 8 次反应是由细胞色素 P450 基因家族成员参与催化的紫杉烷核心骨架 C 的羟基化。根据作用在各个功能位点的紫杉烷代谢物的相对丰度, 预测出的紫杉烷核心骨架上 C 的羟基化顺序依次是 C5、C10、C2、C9、C13、C7 及 C1^[3]。在细胞色素 P450 基因家族成员中, 目前已被克隆的有紫杉烷 2 α -、5 α -、13 α -、7 β -及 10 β -羟基化酶基因, 它们的 cDNA 序列具高度一致性^[6]。

C7 β -羟基是紫杉烷核心骨架上最易反应和最易受影响的羟基, 此功能基已被用来开发生物活性光合性探针和可解离的水溶性衍生物。另外, C7-methylthiomethyl 类似物还被用作第二代紫杉烷药物^[7-12]。Chau 等^[3]从东北红豆杉 *Taxus cuspidata* Sied. et Zucc. 中克隆到紫杉烷 7 β -羟基化酶的 cDNA 序列, 长度为 1 503 bp, 编码 501 个氨基酸, 并计算出相对分子质量为 56 000。将含有此基因的载体导入酵母中进行功能鉴定, 发现其编码产物能将 taxa - (20), 11 (12) - dien - 5 α , 9 α , 10 β , 13 α -tetraol tetraacetate 转变成相应的羟化物^[3]。

虽然对紫杉醇合成酶的 cDNA 克隆已有一些报道, 但对相关基因的全长、外显子和内含子构成以及它们所属的细胞色素 P450 基因家族的分子进化研究得却很少。为此, 本文首先从南方红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *mairei* (Pilg.) Florin 克隆得到紫杉烷 7 β -羟基化酶基因的全长序列, 随后分

析了该基因的外显子和内含子区域, 并同 P450 家族其它成员的同源序列进行了比对。在此基础上, 又利用已知的 P450 基因家族成员编码区序列重建出基因树、展开进化分析, 以检测它们在进化过程中所受的选择作用, 确定是否存在正选择或负选择位点。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 材料 南方红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *mairei* 的嫩叶采自中国科学院武汉植物园。

1.1.2 试剂 *Taq* DNA 聚合酶, dNTP 和 Mg^{2+} 购自上海申能博彩生物公司, PMD19-T 载体购自大连 TaKaRa 公司, 胶回收试剂盒购自北京天根生物公司, 引物由上海英骏公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取南方红豆杉的幼嫩叶片液氮速冻后研磨成粉末。用改良的 CTAB 法提取总 DNA, 然后进行紫外分光光度计检测, 选取 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 的样品于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 南方红豆杉的紫杉烷 7 β -羟基化酶基因的 PCR 扩增 参照已发表的东北红豆杉紫杉烷 7 β -羟基化酶的 cDNA 序列 (AY307951), 用软件 Primer 设计一对引物 (A1/A2) 扩增基因的中间序列, 然后再设计两对引物 (B1/B2、C1/C2) 分别扩增基因的两端序列。引物序列如下:

A1: 5'-GTGCTCCTCGTCATCACTTCTA-3' 和

A2: 5'-TTCCACTTTTTCGGTATTTCCCAT-3',

B1: 5'-ATGGATGCCCTTTCTCTTGTA-3' 和

B2: 5'-GAACTCTAAAGTCTCGCCAATG-3',

C1: 5'-TCAGGATCTGGCGATAAGTTTT-3' 和

C2: 5'-AGAGGAAGATGGGCATTTGGAT-3'

以南方红豆杉 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系含: 模板 DNA 100 ng, 10 $\times$ 缓冲液 2 μ L, Mg^{2+} 37.5 μ mol, 引物各 5 nmol, dNTP 1 μ mol, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, ddH₂O 12.9 μ L, 总计 20 μ L。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 引物 B1 和 B2 60℃ 复性 35 s 而引物 C1 和 C2 56℃ 复性 30 s, 引物 B1 和 B2 72℃ 延伸 1 min 30 s, 但引物 C1 和 C2 延伸 2 min, 共 36 个循环; 最后 72℃ 延伸 8 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 扩增片段的回收与克隆 将含有目的片段的条带切出,用凝胶回收试剂盒对PCR产物进行回收和纯化。纯化的DNA片段连接到PMD19-T载体,连接产物转化大肠杆菌。在含有AMP⁺的LB琼脂平板上筛选阳性克隆。先接菌培养8h,然后提取质粒,送上海英骏公司用ABI-3730XL测序仪测序。

1.2.4 基因全长的拼接及序列分析 将测得的部分中间序列和两端序列使用DNASTAR拼接成完整的基因全长序列,然后用DNAMAN软件分析全长序列的碱基含量和相对分子质量,通过<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>在线分析紫杉烷7 β -羟基化酶基因全长序列的内含子、外显子区域,预测其编码的氨基酸残基。使用PROSITE软件(<http://us.expasy.org/prosite/>)预测氨基酸序列中的保守结构域。用SOPMA软件预测蛋白质二级结构。通过<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>网站的BLAST分析得出紫杉烷7 β -羟基化酶氨基酸之间的同源性。

1.2.5 序列比对 利用ClustalX软件比对紫杉烷羟基化酶基因家族成员的全长序列,分析其内含子和外显子区域的碱基相似性和差异性。

1.2.6 分子进化分析 由于红豆杉属细胞色素P450家族成员基因全长序列的缺乏,为了进一步验证南方红豆杉紫杉烷7 β -羟基化酶与其它家族成员之间的进化关系,我们截取南方红豆杉紫杉烷7 β -羟基化酶基因的编码区,然后又选取中国红豆杉 *T. chinensis* (Pilg.) Rehd., 东北红豆杉 *T. cuspidata*, 加拿大红豆杉 *T. canadensis* Marsh. 及曼地亚红豆杉 *T. × media* Rehd. 羟基化酶基因的共计13个编码区序列。使用Clustal W软件^[13]进行序列比对,然后对结果施行手工校正,得到每条序列包含1440碱基的数据矩阵。运行Modeltest3.7软件^[14]选取核苷酸进化模型。采用Mr-Bayes3.1.2软件^[15]经贝叶斯途径构建基因树。采用PAML4软件的分支模型、位点模型及分支-位点模型进行分子进化分析^[16]。

2 结果

2.1 南方红豆杉紫杉烷7 β -羟基化酶基因的分段扩增

以南方红豆杉基因组DNA为模板,用A1/A2引物进行PCR扩增,在 $w=1\%$ 的琼脂糖凝胶中电泳,经EB染色,在1500bp处观察到一条亮带,测序确定该DNA片段长度为1443bp。再用B1/

B2及C1/C2引物分别扩增南方红豆杉基因组DNA;电泳检测发现,在250bp附近各有一条亮带,测序知道它们的长度分别为207bp和230bp。

2.2 南方红豆杉紫杉烷7 β -羟基化酶基因全长序列的分析

将扩增出的目的片段测序、拼接获得南方红豆杉紫杉烷7 β -羟基化酶基因的全长序列,序列递交GenBank,登录号为FJ469576。该基因从起始密码子ATG到终止密码子TGA全长1692bp,相应的碱基组成为490A(29.0%)、351C(20.7%)、362G(21.4%)和489T(28.9%)。单链DNA(ssDNA)相对分子质量522560,双链DNA(dsDNA)相对分子质量1042990。三个外显子区域分别为:1-1006,1099-1286和1384-1692。外显子和内含子在连接区具有典型的保守GT-AG组成。所编码的酶含500个氨基酸残基,与东北红豆杉的紫杉烷7 β -羟基化酶氨基酸的同源性高达99%。同时还发现,在氨基酸水平上,位置439-448处存在一段保守序列FGGRRTC PG。预测的蛋白质二级结构显示: α -螺旋(α -helix)占52.00%,延伸主链(Extended strand)占10.40%,而随机卷曲(Random coil)为37.60%。

2.3 红豆杉属羟基化酶基因序列的一致性及外显子和内含子的分布

从GenBank获得红豆杉属植物细胞色素P450基因家族已知成员的序列信息,然后对其全长序列进行比对,注意到它们彼此间存在较高相似性。紫杉烷7 β -羟基化酶基因与紫杉烷13 α -羟基化酶基因、紫杉烷2 α -羟基化酶基因及紫杉烷10 β -羟基化酶基因的一致性分别为76%、74%和68%。这四个基因都以ATG为起始密码子,外显子和内含子的连接区均具保守的GT-AG组成。内含子和外显子在基因中的分布十分相似,而且第二、第三外显子区的长度均同为188bp和309bp。但在两个内含子区四个基因的差异却很显著,紫杉烷13 α -羟基化酶基因的内含子长度更是明显长于其它三个家族成员。

2.4 红豆杉属细胞色素P450基因家族成员的进化分析

利用贝叶斯法基于红豆杉属细胞色素P450基因家族成员编码区序列数据构建了基因树(图1),并计算出不同分子进化模型相应的对数似然值和参数估计值(表1)。

单比率模型假定所有的分支都有同样 ω 值,涉及参数25个。在该模型下,似然值 $\ell_0 = -7749.98$,

估测的 $\omega_0 = 0.34679$ (表1); 分支模型中, 自由比率模型假定每个分支都有独立的 ω 值, 包括参数 47 个, 似然值 $\ell_1 = -7730.07$ 。因为自由比率模型比单比率模型多了 22 个参数, 所以 $2\Delta\ell = 2(\ell_1 - \ell_0) = 39.82$ 进行自由度 $df = 22$ 的 χ^2 比较, 结果显示自由比率模型显著优于单比率模型 ($P < 0.05$)。在该模型中, 分支 A, B, C, D (图1) 的 ω 值均 > 1 ($\omega_A = 999.0000$, $\omega_B = 1.3340$, $\omega_C = 1.4027$, $\omega_D = 1.5774$), 提示这些分支有正选择发生; 而其它分支 ω 值均 < 1 。

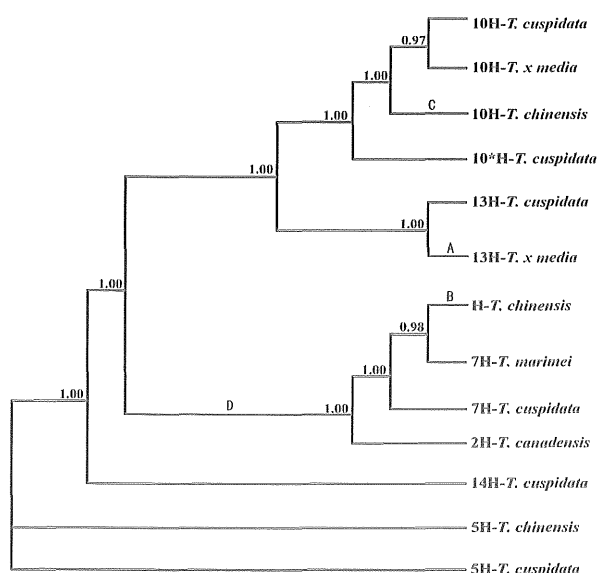


图1 基于红豆杉属植物 P450 基因家族成员的 cDNA 序列利用贝叶斯法构建的基因树

Fig. 1 Bayesian tree constructed from the cDNA sequences of P450 family members in the *Taxus* plants (分支上给出的为后验概率值; 加粗的分支表示 $\omega > 1$ 的分支 A、B、C、D)

缩写: 5H-T. *chinensis* (*Taxus chinensis* taxadiene 5- α -hydroxylase), 5H-T. *cuspidata* (*Taxus cuspidata* taxadiene 5- α -hydroxylase), 14H-T. *cuspidata* (*Taxus cuspidata* taxane 14 β -hydroxylase), 10H-T. *cuspidata* (*Taxus cuspidata* 5- α -taxadienol-10- β -hydroxylase), 10H-T. *chinensis* (*Taxus chinensis* 5- α -taxadienol-10- β -hydroxylase), 10^{*}H-T. *cuspidata* (*Taxus cuspidata* taxoid 10- β hydroxylase), 10H-T. *x media* (*Taxus x media* 5- α -taxadienol-10- β -hydroxylase), 13H-T. *cuspidata* (*Taxus cuspidata* taxane 13- α -hydroxylase), 13H-T. *x media* (*Taxus x media* taxane 13- α -hydroxylase), 2H-T. *canadensis* (*Taxus canadensis* taxoid 2- α -hydroxylase), H-T. *chinensis* (*Taxus chinensis* hydroxylase), 7H-T. *cuspidata* (*Taxus cuspidata* taxoid 7- β -hydroxylase), and 7H-T. *mairi* (*Taxus wallichiana* var. *mairi* taxoid 7- β -hydroxylase)

位点模型的结果表明, 不同位点之间所受的选择压力不同, 但 M2a 和 M8 模型均未检测到正向选择位点 (表1)。在该基因家族成员的 450 个氨基酸位点中, 有 136 个位点的后验平均 ω 值小于 0.2, 说明大多数位点都处于负选择压力下。虽然利用分支模型在分支 A、B、C 及 D 中发现正选择, 但应用分支一位点模型未能进一步检测到正选择位点。

3 讨论

本研究以南方红豆杉为材料, 获得了其紫杉烷 7 β -羟基化酶基因的全长序列。该基因编码的氨基酸序列在 C 末端存在着一段保守序列 FGgGRRTC PG; 这同细胞色素 P450 典型的高度保守结构域 FxxGxRxCxG 相一致, 是鉴别细胞色素 P450 的主要特征^[17-18]。将紫杉烷 7 β -羟基化酶基因与其它已知的三个家族成员进行比对, 发现它们之间的相似性较高, 但内含子的变异性明显高于外显子。

基因家族的形成通常是基因复制的结果^[19]。推测红豆杉类细胞色素 P450 基因家族的各成员起源于一个共同前体, 通过基因复制和分化进而进化出各种作用于紫杉烷核心骨架、对底物具有区域和空间选择性的羟基化酶^[6]。对红豆杉属细胞色素 P450 基因家族成员作进化分析后发现, 该家族的成员所受选择压力各异; 并且多数分支 $\omega < 1$, 提示在进化过程中负选择起主导作用。利用 M8 模型鉴定出 136 个受到强烈负选择的位点 ($\omega < 0.2$), 它们当中包括细胞色素 P450 基因中保守的 PERF 元件^[17], 高度保守的血红素结合元件 PFG^[17] 以及保守的能提供血红素铁配体的半胱氨酸位点^[17]。这些负选择位点对维持羟基化酶的正常功能至关重要, 一旦发生突变即被清除。对于功能尚不明确的负选择位点, 分子进化的分析结果有着更加重要的意义, 提示以后的实验验证应该优先针对它们展开。

另外, 在红豆杉类细胞色素 P450 基因家族成员的少数分支上也检测到正选择 ($\omega > 1$) (图1), 显示有适应性进化发生; 但在接下来的分支一位点模型中未能检测到正选择位点。由于细胞色素 P450 基因家族是一个古老的基因超家族^[20], 所以对于红豆杉类, 该基因家族的适应性进化可能发生在早期并早已被固定下来或是被掩盖于其他替换中, 仅靠目前的模型还不能准确鉴定出相关的正选择位点。

表 1 红豆杉属细胞色素 P450 基因家族成员在不同模型下的参数估计值和对数似然值
Table 1 Parameter estimates and log-likelihood values for P450 family members of *Taxus* under different models

模型	参数个数 P	ℓ 值	参数估计值	正选择位点
M0: 单比率	25	-7 749.98	$\omega_0 = 0.346\ 79$	None
自由比值	47	-7 730.07	$\omega_A = 999.000\ 0$, $\omega_B = 1.334\ 0$, $\omega_C = 1.402\ 7$, $\omega_D = 1.577\ 4$	None
M1a: 近中性	26	-7 688.44	$p_0 = 0.739\ 38$, $p_1 = 0.260\ 62$	Not allowed
M2a: 选择	28	-7 688.44	$p_0 = 0.739\ 38$, $p_1 = 0.190\ 65$, $p_2 = 0.069\ 97$, $\omega_2 = 1$	None
M3: 离散	29	-7 669.00	$p_0 = 0.213\ 97$, $p_1 = 0.697\ 29$, $p_2 = 0.088\ 74$, $w_1 = 0.000\ 00$, $w_2 = 0.383\ 80$, $w_3 = 1.375\ 43$	195 S 206 G 230 E
M7: (beta)	26	-7 676.45	$p = 0.708\ 11$, $q = 1.163\ 47$	Not allowed
M8: (beta 和 ω)	28	-7 674.28	$p_0 = 0.973\ 61$, $p_1 = 0.026\ 39$, $p = 0.82990$, $q = 1.50789$, $w = 1.91516$	None
A	28	-7 687.96	$p_0 = 0.000\ 02$, $p_1 = 0.000\ 01$, $p_{2A} + p_{2B} = 0.999\ 97$, $\omega = 11.189\ 49$	None
B	28	-7 687.97	$p_0 = 0.675\ 05$, $p_1 = 0.240\ 73$, $p_{2A} + p_{2B} = 0.084\ 48$, $\omega = 6.432\ 57$	None
C	28	-7 686.81	$p_0 = 0.000\ 00$, $p_1 = 0.000\ 00$, $p_{2A} + p_{2B} = 1$, $\omega = 1$	None
D	28	-7 688.33	$p_0 = 0.533\ 55$, $p_1 = 0.188\ 69$, $p_{2A} + p_{2B} = 0.277\ 76$, $\omega = 1$	None

参考文献:

- [1] HEFNER J, KETCHUM R E, CROTEAU R. Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production [J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 360: 62-74.
- [2] WALKER K, CROTEAU R. Taxol biosynthetic genes [J]. Phytochemistry, 2001, 58: 1-7.
- [3] CHAU M, JENNEWEIN S, WALKER K, et al. Taxol biosynthesis: Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7 beta-hydroxylase [J]. Chem Biol, 2004, 11: 663-672.
- [4] KOEPP A E, HEZARI M, ZAJICEK J, et al. Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to taxa-4(5), 11(12)-diene is the committed step of taxol biosynthesis in Pacific yew [J]. J Biol Chem, 1995, 270: 8686-8690.
- [5] HEZARI M, LEWIS N G, CROTEAU R. Purification and characterization of taxa-4(5), 11(12)-diene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis [J]. Arch Biochem Biophys, 1995, 322: 437-444.
- [6] JENNEWEIN S, WILDUNG M R, CHAU M, et al. Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101: 9149-9154.
- [7] GEORG G I, HARRIMAN G B. Taxol photoaffinity label: 7-(p)-azidobenzoyl taxol synthesis and biological evaluation [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1992, 2: 735-738.
- [8] RIMOLDI J M, KINGSTON D G, CHAUDHARY A G, et al. Modified taxols, 9. Synthesis and biological evaluation of 7-substituted photoaffinity analogues of taxol [J]. J Nat Prod, 1993, 56: 1313-1330.
- [9] WU Q, BOUNAUD P Y, KUDUK S D, et al. Identification of the domains of photoincorporation of the 3'- and 7'-benzophenone analogues of taxol in the carboxyl-terminal half of murine mdrlb P-glycoprotein [J]. Biochemistry, 1998, 37: 11272-11279.
- [10] VYAS D M, UEDA Y, WONG H, et al. Phosphatase-activated prodrugs of paclitaxel [J]. ACS Symp Ser, 1995, 583: 124-137.
- [11] UEDA Y, MIKKILINENI A B, KNIPE J O, et al. Novel water soluble phosphate prodrugs of Taxol possessing in vivo antitumor activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1993, 3: 1761-1766.

(下转第 130 页)

- 273.
- YAN Denghua, WANG Hao, WANG Fang, et al. Frame of research work on ecological water demand and key topics[J]. Journal of Hydraulic Engineering, 2007, 38(3): 267-273.
- [6] 马广慧, 夏自强, 郭利丹, 等. 黄河干流不同断面生态径流量计算[J]. 河海大学学报: 自然科学版, 2007, 35(5): 496-500.
- MA Guanghui, XIA Ziqiang, GUO Lidan, et al. Ecological runoff of different cross-sections of the mainstream of Yellow River[J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences), 2007, 35(5): 496-500.
- [7] 陈敏建, 王浩. 中国分区域生态需水研究[J]. 中国水利, 2007, 9: 31-37.
- CHEN Minjian, WANG Hao. The Divisional standard of ecological water use in China[J]. China Water Resources, 2007, 9: 31-37.
- [8] 陈敏建, 丰华丽, 王立群, 等. 适宜生态流量计算方法研究[J]. 水科学进展, 2007, 8(5): 745-750.
- CHEN Minjian, FENG Huali, WANG Liqun, et al. Calculation methods for appropriate ecological flow[J]. Advances in Water Science, 2007, 8(5): 745-750.
- [9] 苏飞, 陈敏建, 董增川, 等. 辽河河道最小生态流量研究[J]. 河海大学学报: 自然科学版, 2006, 34(2): 136-139.
- SU Fei, CHEN Minjian, DONG Zengchuan, et al. Minimum ecological discharge of Liaohe River[J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences), 2006, 34(2): 136-139.
- [10] 黄锦辉, 史晓新, 张 蓓, 等. 黄河生态系统特征及生态保护目标识别[J]. 中国水土保持, 2006, 12: 14-18.
- HUANG Jinhui, SHI Xiaoxin, ZHANG Qiang, et al. Characteristics of ecological system and target identification of ecological protection of the Yellow River[J]. Soil and Water Conservation in China, 2006, 12: 14-18.
- [11] 刘建康, 何碧梧. 中国淡水鱼类养殖学[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [12] LEOPOLD L B, ORTH D J. Use of habitat guilds of fish to determine instream flow requirements[J]. North Am J Fish Manage, 1998, 8: 399-409.
- [13] 刘成, 王兆印, 隋觉义. 黄河干流沿程水沙变化及其影响因素分析[J]. 水利水电科技进展, 2008, 28(3): 1-7.
- LIU Cheng, WANG Zhaoyin, SUI Jueyi. Variation of flow and sediment of the Yellow River and their influential factors[J]. Advances in Science and Technology of Water Resources, 2008, 28(3): 1-7.

(上接第124页)

- [12] ALTSTADT T J, FAIRCHILD C R, GOLIK J, et al. Synthesis and antitumor activity of novel C-7 paclitaxel ethers: discovery of BMS-184476[J]. J Med Chem, 2001, 44: 4577-4583.
- [13] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucl Acids Res, 1994, 22: 4673-4680.
- [14] POSADA D, CRANDALL K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution[J]. Bioinformatics, 1998, 14: 817-818.
- [15] HUELSENBECK J P, RONQUIST F, NIELSEN R, et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology[J]. Science, 2001, 294: 2310-2314.
- [16] YANG, Z. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. Comput Appl Biosci, 1997, 13: 555-556.
- [17] VON WACHENFELDT C, JOHNSON E F. Structures of Eukaryotic Cytochrome P450 Enzymes in Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry[M]. New York: Plenum Press, 1995: 183-223.
- [18] SCHULER M A. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions[J]. Plant Physiol, 1996, 112: 1411-1419.
- [19] ELEMENTO O, GASCUEL O, LEFRANC M P. Reconstructing the duplication history of tandemly repeated genes[J]. Mol Biol Evol, 2002, 19: 278-288.
- [20] NELSON D R, KAMATAKI T, WAXMAN D J, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature[J]. DNA Cell Biol, 1993, 12: 1-51.