

• 药材与资源 •

氮离子注入介导麻黄基因组 DNA 转化酵母菌

吕杰^{1,2}, 金湘¹, 毛培宏^{1*}, 凌海秋¹, 樊永红¹, 武宝山¹, 欧阳平凯²

(1. 新疆大学物理科学与技术学院 离子束生物技术中心, 新疆 乌鲁木齐 830008;

2. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 以麻黄碱为目标产物,探讨氮离子(N^+)注入介导麻黄基因组 DNA 在酵母菌中的转化。方法 通过 N^+ 注入介导麻黄基因组 DNA 分别在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和异常汉逊酵母 *Hansenula anomala* 中随机转化,转化后的酵母菌经 BTB 指示性辅助筛选、斜面传代和液体培养后,用铜铬盐定性检识和 RP-HPLC 方法,检测重组酵母菌胞外和胞内麻黄碱的量。结果 获得了遗传稳定的以葡萄糖为碳源、 $NaNO_3$ 为氮源生物合成麻黄碱和(或)伪麻黄碱的重组酵母菌 9 株。液体培养 72 h,RP-HPLC 测试胞外麻黄碱和伪麻黄碱的最高量分别为 18.85 和 2.88 mg/L;胞内麻黄碱和伪麻黄碱最高量分别为 4.29 和 22.16 mg/g 干细胞。结论 采用离子注入介导麻黄基因组 DNA 大分子转化技术,通过适当的筛选方法,可获得易于人工培养的产生麻黄碱等次生代谢产物的微生物工程菌株。

关键词:氮离子注入;麻黄基因组 DNA;重组酵母;麻黄碱

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)08-1227-04

Nitrogen ion implantation mediated *Ephedra* genomic DNA transformation into yeastsLÜ Jie^{1,2}, JIN Xiang¹, MAO Pei-hong¹, LING Hai-qi¹, FAN Yong-hong¹,
WU Bao-shan¹, OUYANG Ping-kai²

(1. Institute of Ion Beam Biotechnology, College of Physics Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830008, China; 2. College of Pharmacy and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To investigate *Ephedra* genomic DNA transformation into yeasts by nitrogen ion implantation with the sole object of ephedrine products. **Methods** The genomic DNA from *Ephedra glauca* was randomly transferred in *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomala*, respectively by nitrogen ion bombardment. The recombined yeasts were screened and the content of ephedrine in ecto- and endo-recombined yeasts was determined by the methods of bromothymol blue (BTB) indicator selection, slant cultivation, liquid culture, copper chromic salt qualitative test, and RP-HPLC determination. **Results** Nine recombined yeast strains that produce *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine were obtained, which could use glucose as a carbon source, $NaNO_3$ as nitrogen source and be genetically stable. After cultivated in liquid medium for 72 h and analyzed by RP-HPLC, the recombined strains could produce extracellular *l*-ephedrine 18.85 mg/L and *d*-pseudoephedrine 2.88 mg/L, intracellular *l*-ephedrine 4.29 mg/g and *d*-pseudoephedrine 22.16 mg/g dry cell. **Conclusion** The results show that the ion implantation mediated *Ephedra* genomic DNA transformation into yeast could be used and the recombined yeast strains could be obtained by appropriate screening methods.

Key words: nitrogen ion implantation; *Ephedra* genome DNA; recombined yeast; ephedrine

麻黄碱(*l*-ephedrine)和伪麻黄碱(*d*-pseudoephedrine)是干旱半干旱荒漠地区药用植物麻黄的主要生物碱类次生代谢产物,具有重要的药用价值^[1]。若能构建产麻黄碱和伪麻黄碱的微生物工程菌株,最终实现麻黄碱和伪麻黄碱的微生物发

酵生产,就将对我国干旱半干旱荒漠地区生态环境的保护产生深远的影响。但是,药用植物的次生代谢产物一般由多基因控制^[2],麻黄碱和伪麻黄碱的生物合成途径复杂^[3~5],且受环境影响较大,加之目前还没有与麻黄碱生物合成相关的基因的任何信息,

收稿日期:2007-11-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10365001)。

作者简介:吕杰(1978—),男,新疆乌鲁木齐人,硕士,讲师,博士研究生,主要从事微生物基因工程制药、离子束生物技术和分子生物学相关领域研究。E-mail: lvjie@xju.edu.cn

* 通讯作者 毛培宏 Tel: (0991) 4543656 E-mail: phmao@china.com phmao@xju.edu.cn

因此,至今无人按照常规的基因工程方法构建工程菌。在此背景下,进行药用植物麻黄基因组 DNA 的遗传转化构建产麻黄碱和伪麻黄碱转基因工程菌的研究具有重要的理论和现实意义。

离子注入生命体的独特机制,使其成为一种新的转基因手段^[6],研究证明,注入离子对受体细胞具有极强的刻蚀作用,致使细胞表面形成可使外源 DNA 进去的“通道”;由于注入正离子的积累,大大降低了受体细胞表面的负电性,从而减少了受体细胞对溶液中带负电的外源 DNA 的静电斥力,有利于外源 DNA 的导入;加之“通道”局部区域也由于带正电,便于吸引带负电性的外源 DNA 主动进入受体细胞;离子注入在真空环境中进行,真空造成的负压使受体细胞内部的部分水分蒸发,当干燥的受体细胞进入含有外源 DNA 的缓冲液中时,由于吸胀作用加强,也增加了外源 DNA 进入受体细胞的机会;特别是离子注入会对受体细胞内染色体造成直接损伤(如断裂)和间接损伤(如自由基作用),大大增加了外源 DNA 与受体细胞 DNA 重组和整合的机会。离子束介导外源 DNA 的遗传转化为远缘、超远缘物种间的基因交流提供了一种新途径。在药用植物基因组 DNA 的遗传转化方面,宋道军等^[7]利用离子注入介导法将药用植物银杏总 DNA 导入 3-16 和 SR2-14-2 两种西瓜,在转化的西瓜当代叶片中检测出了银杏内酯的量分别为 17.075 6、45.999 8 $\mu\text{g/g}$,这表明外源 DNA 供体植物银杏中与银杏内酯生物合成相关的多个基因在受体植物西瓜中得到了表达。基于离子注入介导 DNA 大分子遗传转化的原理^[8],开展了 N^+ 注入介导蓝麻黄基因组 DNA 在酿酒酵母和异常汉逊酵母菌中的随机转化研究,以期获得产麻黄碱和伪黄碱的重组酵母工程菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种:酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 2.1882 和异常汉逊酵母 *Hansenula anomala* 2.340,来源于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 主要试剂和仪器:葡萄糖· H_2O , NaNO_3 , 酵母膏粉, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 琼脂粉, 溴百里香酚蓝 (BTB), CuSO_4 , NaOH , 乙腈(色谱纯), 石英砂, 变色硅胶, CTAB 及基因组 DNA 提取用试剂(包括 RNase) 等从 ABI 公司购买;麻黄碱和伪麻黄碱对照品由新疆国际实业股份有限公司麻黄素事业部提供,符合 FDA 标准。IBB Device 1 多功能离子注入机由中国科学院等离子体物理研究所

研制并赠送, Sigma 3—18K 离心机购自 Sigma 公司, Waters 1525 反相高压液相色谱仪 (RP-HPLC) 购自 Waters 公司。

1.3 培养基:YPD 培养基^[9](酵母膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL); BTB 平板培养基(葡萄糖· H_2O 100 g, NaNO_3 10 g, 酵母膏粉 5 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 用 10% NaOH 调 pH 至 7.0 后, 再加入 BTB 0.2 g, 琼脂粉 10 g); 斜面培养基(葡萄糖· H_2O 100 g, NaNO_3 10 g, 酵母膏粉 5 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 用 10% NaOH 调 pH 至 7.0 后, 再加入琼脂粉 10 g); 液体培养基(葡萄糖· H_2O 100 g, NaNO_3 10 g, 酵母膏粉 5 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 用 10% 的 NaOH 调 pH 至 7.0)。

1.4 野生蓝麻黄的采集及其基因组 DNA 的制备:野生蓝麻黄 *Ephedra glauca* Regel 的采集及应用 CTAB 法制备其基因组 DNA 的方法均按参考文献的方法进行^[10]。

1.5 酵母菌膜的制备

1.5.1 以保护液为载体的菌膜制备^[11]:将酵母菌斜面菌种接入 YPD 培养液中, 置摇床 230 r/min、28~30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h。用保护液对酵母菌培养液进行稀释。取浓度为 1.0×10^7 CFU/mL 的菌体稀释液 0.1 mL, 用无菌玻璃刮铲均匀涂布于直径为 90 mm 的无菌平皿中央, 无菌风吹干制成菌膜。

1.5.2 以基因组 DNA 的 TE 缓冲液为载体的菌膜制备:取 28~30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 的酵母菌的斜面菌种 2 环悬浮于质量浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的麻黄基因组 DNA 的 TE 缓冲液中, 使菌体浓度达到 1.0×10^8 CFU/mL, 轻摇使菌体分散, 取 0.1 mL 用无菌玻璃刮铲均匀涂布于直径为 90 mm 的无菌平皿中央, 无菌风吹干制成菌膜。

1.6 酵母菌膜的离子注入^[11]:将两种方法制备的菌膜分别置于离子注入机小真空靶室的无菌靶台上, 采用能量 15 keV、剂量 1.5×10^{16} ions/ cm^2 的 N^+ 在 1×10^{-3} Pa 真空状态下, 以 5 s 脉冲注入酵母菌菌膜。以真空条件下未注入 N^+ 的酵母菌膜为对照。

1.7 麻黄基因组 DNA 的导入及转化菌株的筛选:离子注入结束后, 立即用 2 mL 质量浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 的蓝麻黄基因组 DNA 的 TE 缓冲液浸泡离子注入后的菌膜, 28~30 $^{\circ}\text{C}$ 静止温育 2 h 后, 用无菌玻璃刮铲反复洗脱 2 min, 获得洗脱液。取 0.1 mL

洗脱液用无菌玻璃刮铲均匀涂布于 BTB 平板培养基,倒置,于 28~30 ℃ 培养 72 h。筛选产蓝色指示圈的菌落。未注入 N⁺ 的酵母菌膜也按相同方法处理,并以 2 mL 无菌水代替麻黄基因组 DNA TE 缓冲液,浸泡离子注入后的菌膜为对照。

1.8 重组酵母菌胞外和胞内麻黄碱的检测

将转化后在 BTB 指示性平板上生长的产生蓝色指示圈的酵母菌菌落分别接入斜面,28~30 ℃ 培养 72 h。从斜面分别转接入液体培养基,置摇床 230 r/min、28~30 ℃ 培养 72 h。

液体培养结束后,3 500 r/min 离心 10 min,收集上清液,用于测定重组酵母菌胞外麻黄碱和伪麻黄碱的量。收集菌体,蒸馏水洗涂离心 3 次,-20 ℃ 预冻 10 min,置于研钵中,加入液氮,与石英沙共研,蒸馏水洗至 10 mL 离心管,4 000 r/min 离心 15 min,弃细胞碎片,收集上清液,用于测定重组酵母菌的胞内麻黄碱和伪麻黄碱的量。同时,将平行实验收集的细胞于 105 ℃ 干燥至恒重,测定样品的细胞干质量。

1.8.1 麻黄碱和(或)伪麻黄碱的铜铬盐定性检识方法^[12]:分别取上述上清液 1 mL,依次加入 10.0% CuSO₄·5H₂O 试液 0.1 mL、40.0% NaOH 试液 0.1 mL、乙醚 1.0 mL,振摇后放置分层,记录乙醚层和水层的颜色。

1.8.2 麻黄碱和(或)伪麻黄碱的 RP-HPLC 定量检测方法:Waters 1525 pump 反相高压液相色谱仪,UV2487 双通道紫外检测器,检测波长(λ) 210 nm,Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm),Breeze 3.30 色谱工作站。流动相:0.02 mol/L KH₂PO₄-乙晴(95:5);体积流量:1.2 mL/min。每次进样量 10.0 μL。为了减少测试误差,在 RP-HPLC 测试过程中,每隔 3~5 个测试样品,进行 1~2 次标样测试。

2 结果和分析

2.1 BTB 平板培养基初步筛选:麻黄碱和伪麻黄碱分子结构中的氮原子在侧链上,因此碱性较强,其 pKa 值分别为 9.58 和 9.74。指示剂 BTB 由黄色→蓝色的 pH 范围为 5.8~7.6。在 BTB 平板培养基上,若重组酵母菌落周围出现黄色指示圈,意味着该菌株可能具有麻黄碱和(或)伪麻黄碱的生物合成能力,但不能分泌到胞外。若重组酵母菌落周围出现蓝色指示圈,意味着该菌株能将胞内合成的麻黄碱和(或)伪麻黄碱分泌到胞外。通过 BTB 指示性平板初步筛选,共获得菌落周围呈蓝色的阳性转化子

463 个(表 1),分别编号后,全部移接入斜面培养基。真空条件下未注入 N⁺ 的酵母菌,在导入麻黄基因组 DNA 处理中,未获得阳性转化子。以 2 mL 无菌水代替麻黄基因组 DNA TE 缓冲液,浸泡离子注入后的菌膜为对照的处理中,也未获得阳性转化子。

表 1 不同制膜方法获得的转化子统计表

Table 1 Statistics of positive yeast clones obtained using different methods of cell film preparation

菌株	转化子/个	
	保护液制膜	蓝麻黄基因组 DNA 的 TE 缓冲液制膜
酿酒酵母 2.1882	53	34
异常汉逊酵母 2.340	216	160

2.2 重组酵母菌产麻黄碱和(或)伪麻黄碱的定性检识:根据各菌株培养液的铜铬盐定性检识结果,获得了铜铬盐阳性反应的在转接培养 6 次后还稳定的 T₆ 代重组酵母菌株 9 株,其中以酿酒酵母 2.188 2 为蓝麻黄基因组 DNA 大分子受体菌的 1 株(编号 0806),以异常汉逊酵母 2.340 为受体菌的 8 株(编号 1016、1025、1159、1179、2010、3101、3140、3161)。

2.3 重组酵母菌产麻黄碱和(或)伪麻黄碱的定量检测:9 株 T₆ 代重组酵母菌培养液的 RP-HPLC 测试结果表明,编号 0806、1016、2010 和 3161 的 4 个菌株只产生胞外麻黄碱,菌株 1025 和 1179 具有同时产生胞外麻黄碱和伪麻黄碱的性能,而菌株 3140 只产生胞外和胞内伪麻黄碱(表 2)。重组酵母菌 1179 T₆ 代液体培养 72 h 胞外 RP-HPLC 的色谱图见图 1。

表 2 重组酵母菌 T₆ 代 72 h 胞外及胞内麻黄碱和伪麻黄碱的产量

Table 2 Yields of *l*-ephedrine or *d*-pseudoephedrine produced in exccellular medium and intracellular solution of T₆ generation recombinant yeasts cultured for 72 h

菌株编号	胞外/(mg·L ⁻¹)		胞内/(mg·g ⁻¹)	
	<i>l</i> -麻黄碱	<i>d</i> -伪麻黄碱	<i>l</i> -麻黄碱	<i>d</i> -伪麻黄碱
0806	4.06	—	—	—
1016	3.46	—	—	—
1025	8.35	1.32	—	—
1159	2.44	—	3.57	—
1179	18.85	1.47	—	22.16
2010	0.21	—	—	—
3101	5.02	—	4.29	—
3140	—	2.88	—	5.00
3161	3.47	—	—	—
对照菌株酿酒酵母 2.188 2	—	—	—	—
对照菌株异常汉逊酵母 2.340	—	—	—	—
液体培养基	—	—	—	—

—,未检出
—,undetected

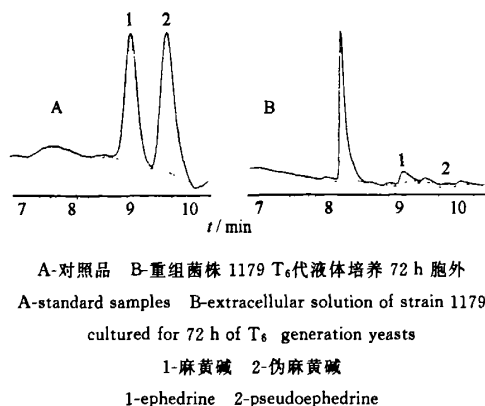


图1 1179 菌株 T₆代胞外 RP-HPLC 色谱图

Fig. 1 RP-HPLC Analysis of *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine produced in extracellular solution of strain 1179 of T₆ generation recombined yeasts

2.4 氮离子注入介导麻黄基因组 DNA 在酵母菌中的遗传转化效率和稳定性:9 株 T₆ 代重组酵母菌(表2)继续转代培养到 T₁₁ 代,RP-HPLC 定量检测其产生麻黄碱和伪麻黄碱的性能仍然稳定。以麻黄碱或伪麻黄碱为目标产物,计算得知 N⁺ 注入介导蓝麻黄基因组 DNA 在酿酒酵母 2.188 2 中的遗传转化率为 1.15%,在异常汉逊酵母 2.346 中的遗传转化率为 2.13%。由于注入离子的质量沉积效应^[6],具有生物活性的 N⁺ 注入受体细胞后,是否参与了外源 DNA 受体菌中含氮物质(包括麻黄碱、伪麻黄碱及其生物合成前体芳香簇氨基酸)的生物合成,尚有待进一步研究。

2.5 麻黄基因组 DNA 大分子的完整性对其在酵母菌中遗传转化的影响:本研究中,采用蓝麻黄基因组 DNA 的 TE 缓冲液为载体制备菌膜,再进行 N⁺ 注入,这种方式仅获得 1 株编号为 2010 的遗传稳定的产麻黄碱重组酵母菌,且胞外麻黄碱产量仅为 0.21 mg/mL (表2)。这说明, N⁺ 注入使 DNA 大分子随机断裂^[13],而这些 DNA 片段并未提高外源 DNA 的转化率,由此推测控制麻黄碱生物合成的多个基因是紧密连锁或成簇。因此,对于多基因或基因簇控制的次生代谢产物或数量性状,在离子注入介导转基因中,以结构完整的 DNA 大分子作为外源基因供体,可获得较高的转化率。

3 讨论

人们很难想象比微生物基因组大许多倍的药用植物基因组 DNA 如何能在微生物中遗传转化? 实际上,人们只是期望药用植物基因组 DNA 中,与天然药物或次生代谢产物生物合成相关的多个基因能

在微生物中遗传转化^[2,14]。但当植物的某一次生代谢产物或天然药物的生物合成途径及其相关基因均为未知时,又如何能获得产生植物次生代谢产物的微生物工程菌株? 本研究为回答这个问题提供了一条新的有效的途径。

作为一种新的外源 DNA 遗传转化手段,离子注入介导转基因的最大特点是不需要事先知道或克隆出目的 DNA 片段;而且转入的外源 DNA 是直接整合入宿主总 DNA 中,具有较好的遗传稳定性。因此,从理论上讲,无论人们是否清楚植物的某一次生代谢产物或天然药物的生物合成途径,也无论是否清楚相关的基因,都可采用离子注入介导外源 DNA 大分子遗传转化技术,通过适当的筛选方法,从而获得易于人工培养的产生植物次生代谢产物的微生物工程菌株。

致谢:中国科学院离子束生物工程重点实验室余增亮、吴李君研究员对本项工作的帮助;乔坤云、周俊和冯婷进行 RP-HPLC 的分析测试工作;新疆国际实业股份有限公司麻黄素事业部提供 RP-HPLC 测试用麻黄碱和伪麻黄碱对照品。

参考文献:

- [1] 查丽杭, 苏志国, 张国政, 等. 麻黄资源的利用与研究开发进展 [J]. 植物学通报, 2002, 19(4): 396-405.
- [2] Croteau R, Kutchan T M, Lewis N G. *Natural Products (Secondary Metabolites)* [M]. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- [3] Yamazaki K, Tamaki T, Uzawa S, *et al.* Participation of C₆-C₁ unit in the biosynthesis of ephedrine in *Ephedra* [J]. *Phytochemistry*, 1973, 12: 2877-2882.
- [4] Gunnar G S, Spenser I D. Biosynthesis of ephedrine [J]. *J Am Chem Soc*, 1988, 110(11): 3714-3715.
- [5] Schmidt H L, Werner R A, Eisenreich W. Systematics of ²H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways [J]. *Phytochemistry*, 2003, 2: 61-85.
- [6] Yu Z L. *Introduction to Ion Beam Biotechnology* [M]. New York: Springer Publishing House, 2006.
- [7] Song D J, Chen R L, Jun R C, *et al.* Super-distant molecular hybridization of plant seeds by ion beam-mediated gene cluster [J]. *Prog Nat Sci*, 2001, 11(7): 557-560.
- [8] 樊永红, 毛培宏, 金 湘. 离子束介导 DNA 大分子遗传转化的研究 [J]. 生物技术, 2004, 14(3): 65-67.
- [9] Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics* [M]. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2000.
- [10] 邵鹏柱, 曹 晖. 中药分子鉴定 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004.
- [11] 陆新红, 金 湘, 毛培宏. 转基因受体酵母菌的低能氮离子注入 [J]. 生物技术, 2005, 15(2): 37-39.
- [12] 吴剑峰. 天然药物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [13] 虞 龙, 余增亮. 低能离子注入介导 Vc 前体 (2-KLG) 产生菌 DNA 的转导 [J]. 核技术, 2004, 27(4): 264-268.
- [14] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440: 940-943.

氮离子注入介导麻黄基因组DNA转化酵母菌

作者：[吕杰](#)，[金湘](#)，[毛培宏](#)，[凌海秋](#)，[樊永红](#)，[武宝山](#)，[欧阳平凯](#)
作者单位：[吕杰\(新疆大学物理科学与技术学院离子束生物技术中心, 新疆乌鲁木齐, 830008; 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京, 210009\)](#)，[金湘, 毛培宏, 凌海秋, 樊永红, 武宝山\(新疆大学物理科学与技术学院离子束生物技术中心, 新疆乌鲁木齐, 830008\)](#)，[欧阳平凯\(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京, 210009\)](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(8)
被引用次数：5次

参考文献(14条)

1. [查丽杭; 苏志国; 张国政](#) [麻黄资源的利用与研究开发进展](#) [期刊论文] - [植物学通报](#) 2002 (04)
2. [Croteau R; Kutchan T M; Lewis N G](#) [Natural Products \(Secondary Metabolites\)](#) 2000
3. [Yamazaki K; Tamaki T; Uzawa S](#) [Participation of C6-C1 unit in the biosynthesis of ephedrine in Ephedra](#) 1973
4. [Gunnar G S; Spenser I D](#) [Biosynthesis of ephedrine](#) 1988(11)
5. [Schmidt H L; Werner R A; Eisenreich W](#) [Systematics of 2H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways](#) 2003
6. [Yu Z L](#) [Introduction to Ion Beam Biotechnology](#) 2006
7. [Song D J; Chen R L; Jun R C](#) [Super-distant molecular hybridization of plant seeds by ion beam-mediated gene cluster](#) [外文期刊] 2001(07)
8. [樊永红; 毛培宏; 金湘](#) [离子束介导DNA大分子遗传转化的研究](#) [期刊论文] - [生物技术](#) 2004(03)
9. [Burke D; Dawson D; Stearns T](#) [Methods in Yeast Genetics](#) 2000
10. [邵鹏柱; 曹晖](#) [中药分子鉴定](#) 2004
11. [陆新红; 金湘; 毛培宏](#) [转基因受体酵母菌的低能氮离子注入](#) [期刊论文] - [生物技术](#) 2005(02)
12. [吴剑峰](#) [天然药物化学](#) 2003
13. [虞龙; 余增亮](#) [低能离子注入介导Vc前体\(2-KLG\)产生菌DNA的转导](#) [期刊论文] - [核技术](#) 2004(04)
14. [Ro D K; Paradise E M; Ouellet M](#) [Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast](#) [外文期刊] 2005

本文读者也读过(10条)

1. [朱长纯. 史永胜. 李琰](#) [基于半导体工艺制备碳纳米管阴极图形阵列](#) [期刊论文] - [半导体光电](#) 2003, 24(6)
2. [叶燕锐. 唐语谦. 陈宏运. 郑穗平. 潘力. 林影](#) [酿酒酵母对数生长后期代谢重构的全基因组表达谱芯片分析](#) [会议论文] - 2008
3. [毛培宏. 马向东. 金湘. 杨红梅. 娄恺. 凌海秋. 柯涛. 武宝山](#) [氮离子注入介导麻黄基因组DNA转化获得产麻黄碱重组酵母菌](#) [期刊论文] - [微生物学报](#) 2007, 47(5)
4. [王芳平. 李宏. 李永香. WANG Fang-ping. LI Hong. LI Yong-xiang](#) [大肠杆菌与酵母基因组中密码对使用的比较](#) [期刊论文] - [内蒙古大学学报 \(自然科学版\)](#) 2006, 37(1)
5. [金湘. 张建军. 毛培宏. 徐建辉. JIN Xiang. ZHANG Jian-jun. MAO Pei-hong. XU Jian-hui](#) [离子注入介导麻黄和甘草总DNA转化苜蓿的初步研究](#) [期刊论文] - [生物技术](#) 2007, 17(4)
6. [毛培宏. 金湘. 吕杰. 凌海秋. 武宝山. 马向东. 樊永红](#) [离子注入介导甘草基因组DNA转化酵母菌](#) [会议论文] - 2008
7. [魏惠永. 江丽芳. 薛耀华. 郭辉玉](#) [登革2型病毒E蛋白在酵母菌中的分泌表达](#) [期刊论文] - [中国病毒学](#) 2002, 17(3)

8. [王俊杰](#), [饶志明](#), [沈微](#), [方慧英](#), [诸葛健](#), [WANG Jun-jie](#), [RAO Zhi-ming](#), [SHEN Wei](#), [FANG Hui-ying](#), [ZHUGE Jian](#)
[PScgpdl启动子融合GUS基因在酿酒酵母中的瞬时表达](#)[期刊论文]-[食品与生物技术学报](#)2008, 27 (5)
9. [刘莉扬](#), [马文丽](#), [马建岗](#), [郑文岭](#) [DNA芯片在研究酵母基因组中的应用](#)[期刊论文]-[医学综述](#)2002, 8 (4)
10. [曹丹燕](#), [李艳](#), [张清](#), [许琳](#), [严明](#), [CAO Dan-yan](#), [LI Yan](#), [ZHANG Qing](#), [XU Lin](#), [YAN Ming](#) [酿酒酵母CICC1747醛糖还原酶基因的克隆及表达](#)[期刊论文]-[生物加工过程](#)2006, 4 (2)

引证文献(5条)

1. [吕杰](#), [金湘](#), [毛培宏](#) [重组酵母菌乙醇脱氢酶基因的克隆及序列分析](#)[期刊论文]-[生物技术](#) 2011 (4)
2. [凌海秋](#), [金湘](#), [毛培宏](#), [吕杰](#), [武宝山](#) [重组酵母菌生物合成麻黄碱的特性及L-Phe对其合成的影响](#)[期刊论文]-[生物技术](#) 2010 (4)
3. [金湘](#), [毛培宏](#), [吕杰](#) [离子注入介导甘草基因组DNA转化酵母菌](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2010 (3)
4. [凌海秋](#), [毛培宏](#), [金湘](#), [吕杰](#), [武宝山](#) [微生物方法生产麻黄碱和伪麻黄碱的研究](#)[期刊论文]-[生物技术](#) 2009 (4)
5. [吕杰](#), [金湘](#), [毛培宏](#) [生物技术在薯蓣皂苷及其苷元生物合成中的应用](#)[期刊论文]-[生物技术](#) 2009 (4)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200808037.aspx