

半夏的甲基化水平在50%以上,这可能与半夏的高倍性有直接关联。因为当几个基因组综合到一个核中,会发生超量表达的浪费现象,为减少这种过量的基因表达,多倍体半夏中许多结构基因可能发生了遗传二倍化,即多倍体中基因的表达水平被减少到与其二倍体祖先相近或相同。这种遗传二倍化是通过两种途径之一来实现的:基因沉默或基因剂量补偿。而迅速发生的可遗传胞嘧啶甲基化增加变异可能是遗传二倍化的一种有效途径^[12]。而不同倍性半夏间的甲基化程度差别不大(54.4% ~ 58.2%),提示半夏多倍化过程中还存在其他表观遗传作用途径,比如:组蛋白修饰、染色质重改构等,这些表观遗传所控制的基因程序化表达的结果就是保证多倍体植物能够正常生长发育。

本实验结果表明,不同倍性多倍体半夏之间存在大量的胞嘧啶甲基化变异。但由于至今未发现半夏的二倍体,还不能确定与二倍体祖先相比,多倍体半夏形成过程中胞嘧啶甲基化变异的水平以及这些基因组变异是否具有随机性和稳定性。异源多倍体物种的一个重要特性是基因分化,即基因在剂量上的重复使得部分复等位基因可以分化成具有不同功能的新基因。这些伴随异源多倍体物种形成所迅速产生的表观遗传变异无疑可作为自然选择及适应性进化的原材料,进而有助于多倍体物种在进化上的成功,这也许就是半夏多倍体复合体具有如此广泛分布区这一生态优势的主要原因。本研究结果为半夏多倍体复合体的地理分布演化趋势研究奠定了一

定的理论基础。

参考文献:

- [1] Jablonka E, Lamb M J. The changing concept of epigenetics [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 981: 82-96.
- [2] Rossi V, Motto M, Pellegrini L. Analysis of the methylation pattern of the maize Opaque-2 (O2) promoter and *in vitro* binding studies indicate that the O2 B-Zip protein and other end osperm factors can bind to methylated target sequences [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 13758-13771.
- [3] Gonzalgo M L, Jones P A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation [J]. *Mutat Res*, 1997, 386: 107-118.
- [4] Xiong L Z, Xu C G, Maroof M A S. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation sensitive amplification polymorphism technique [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 439-446.
- [5] 仪治本, 孙 毅, 牛天堂, 等. 高粱基因组 DNA 胞嘧啶甲基化在杂交种和亲本间差异研究 [J]. 作物学报, 2005, 9 (31): 1138-1143.
- [6] ReynaLopez G E, Simpson J, RuizHerres J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms [J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 253: 703-710.
- [7] McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 3640-3659.
- [8] 陈成彬, 马小军, 陈 力, 等. 半夏多倍体复合体及其细胞地理学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (17): 1405-1408.
- [9] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4231-4235.
- [10] Leutwiler L S, Hough-Evans B R, Meyerowitz E M. The DNA of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Gen Genet*, 1984, 194: 15-23.
- [11] 特怀曼 R M. 高级分子生物学要义 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [12] 刘 宝, 胡 波, 董玉柱, 等. 多倍体小麦物种形成可诱发稳定遗传的胞嘧啶甲基化变异 [J]. 自然科学进展, 2000, 10 (8): 710-715.

何首乌 cDNA 文库的构建及分析

谭雪梅¹, 申彦晶², 严 萍², 郑传进², 赵树进^{1*}

(1. 广州军区广州总医院, 广东 广州 510010; 2. 华南理工大学, 广东 广州 510640)

摘 要:目的 为进行药用植物次生代谢产物的生物合成基因调控研究, 构建了三年生何首乌叶 cDNA 文库。方法 以何首乌成熟叶片为材料提取其总 RNA; 纯化出 mRNA; 反转录合成双链 cDNA; 钝化 cDNA 末端; 连接上 *EcoR* I 接头; 经 *Xho* I 酶切后, 使用 Sepharose CL-2B 凝胶介质过滤, 收集 400 bp 以上的片段与 Uni-ZAP XR 载体连接, 经包装蛋白包装成 cDNA 文库。Uni-ZAP XR 载体可以在辅助噬菌体 ExAssist helper phage 的共感染下, 快速释放出 pBluescript SK-噬菌粒, 经转染 *E. coli* SOLR 后, 铺于氨苄青霉素抗性平板, 分别利用 PCR 和双酶切的方法鉴定插入片段的大小。结果 测定该初始文库的滴度为 1.07×10^6 pfu/mL, 含有 5.4×10^5 个重组子, 插入片断长度为 0.5~2.0 kb; 扩增文库的重组子为 4.25×10^{11} 个, 重组率为 98.5%。结论 经检测所构建的文库库容量满足基因筛选要求, 为进行中药材相关功能基因调控研究奠定基础。

收稿日期: 2008-01-20

基金项目: 广东省科技厅重点项目资助 (63108)

作者简介: 谭雪梅 (1982-), 女, 广东省江门市人, 在读研究生, 研究方向为生物制药。E-mail: txm1021@126.com

* 通讯作者 赵树进 E-mail: gzszjshs@pub.guangzhou.gd.cn

关键词: cDNA 文库; 何首乌; 次生代谢产物

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)11-1716-05

Construction and analysis of *Polygonum multiflorum* cDNA library

TAN Xue-mei¹, SHEN Yan-jing², YAN Ping², ZHENG Chuan-jin², ZHAO Shu-jin¹

(1. Department of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China;

2. South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Objective To construct a cDNA library of three-year old *Polygonum multiflorum* leaf tissues so as to further research the gene regulation of secondary metabolite biosynthesis of medicinal plants. **Methods** Total RNA from leaf tissues of *P. multiflorum* was extracted and mRNA was purified, which were synthesized to double strand cDNA through reverse transcription. After the cDNA termini was blunted, the 5' end of *EcoR* I adapters phosphorylated was conjoined, and then digested by *Xho* I, cDNA fragments were fractionated by Sepharose CL-2B spin column. The fragments longer than 400 bp were linked to Uni-ZAP XR vector. The primary cDNA library was established after the recombinants had been packaged. Uni-ZAP XR Vector might fleetly release pBluescript SK-phasmids at the presence of ExAssist helper phage of coinfection and inverted *E. coli* SOLR. Finally, PCR and double enzymes digestion were used to analyze the range of inserts, respectively. **Results** The titer of cDNA primary library was 1.07×10^6 pfu/mL and the length of exogenous insert was at about 0.5—2.0 kb with 5.4×10^5 recombinants, the recombinants of amplified library were 4.25×10^{11} and the rate of recombination was 98.5%. **Conclusion** The results indicate that the cDNA library of *P. multiflorum* leaf tissues has enough volume for screening the desired genes and sets up a basis for studying on gene regulation of secondary metabolite biosynthesis of medicinal plants besides.

Key words: cDNA library; *Polygonum multiflorum* Thunb.; secondary metabolite

近年来,中药功能基因的研究,特别是药用植物次生代谢产物的生物合成基因调控研究已成为中药现代化研究的热点。药用植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 为蓼科(Polygonaceae)的多年生落叶草本植物,始载于《开宝本草》,又名夜交藤、乌肝石、赤首乌石,根、茎、叶均可入药,主要成分为蒽醌类及二苯乙烯苷类化合物,具有抗衰老、补肝肾、益精血、乌须发之功效,是滋补肝肾常用中药之一^[1]。由于人工栽培的何首乌产量和品质的限制,难以满足临床上日益增长的需要,这在一定程度上加大了对野生何首乌资源的破坏。应用植物基因工程和组织细胞工程相结合的生物学方法有望成为生产这些具有重要药理作用的次生代谢产物的有效手段^[2]。何首乌作为一种广泛种植的中药材,次生代谢产物种类丰富,但目前对于何首乌有效成分的生物合成途径及基因调控的基础研究相对缺乏。本实验以 Uni-ZAP XR 为载体构建了何首乌叶 cDNA 文库,不仅保持了珍贵的野生种质资源,还为利用生物技术大量生产有价值的化学成分奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料:三年生何首乌采自广西壮族自治区靖西农业局,样品经华南植物园邢福武教授鉴定;成熟叶片用蒸馏水冲洗干净,75%乙醇消毒,并保存于

-70℃低温冰箱,备用。

1.2 生化试剂:DEPC 购于 Sigma 公司;CTAB 购于北京鼎国生物公司;cDNA synthesis 试剂盒/Uni-ZAP XR vector 及 DNA 包装蛋白均购于 Stratagen 公司;Oligotex mRNA isolation Kit 购于 Qiagen 公司;DNA Marker 及所需的限制性内切酶均购于宝生物公司(大连)。其他试剂为国产或进口分析纯产品。

1.3 总 RNA 提取及 mRNA 的分离

1.3.1 对常规的 CTAB 法进行改良,用于提取何首乌成熟叶组织的总 RNA。①将 65℃ 预热的提取缓冲液 [100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 2% CTAB, 2% PVP] 加入到 2 mL EP 管中,并加入终体积分数 2% β -巯基乙醇;②在预冷的研钵中加入 PVP 粉末,迅速将组织研磨成粉末,转到温浴过的缓冲液中,剧烈振荡混匀。温浴 1 h 左右,期间漩涡几次,使裂解液与细胞充分接触;③取出离心管,置于冰上,向每管中加入无水乙醇和 5 mol/L KAc (pH 4.8),混匀后添加等体积氯仿-异戊醇 (24:1),冰上静置 10 min,4℃,12 000 r/min 离心 20 min;④取上清,通过调整水饱和酚/氯仿的体积比,可以有效降低基因组 DNA 的污染,漩涡振荡 2 min,4℃,12 000

r/min 离心10 min;⑤重复氯仿-异戊醇(24:1)抽提至界面干净;⑥小心吸取上层液体,使用10 mmol/L LiCl 于-20 ℃沉淀RNA 2 h以上,4 ℃,12 000 r/min 离心20 min 收集沉淀;⑦沉淀经适量的2% SDS 溶解,离心取上清液,用氯仿-异戊醇(24:1)抽提;⑧使用3 mol/L NaAc(pH 5.2)和无水乙醇沉淀过夜,4 ℃,12 000 r/min 离心20 min,去上清;⑨沉淀用75%乙醇漂洗,吹干后,溶于适量的DEPC 处理水。RNA 样品,用紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 及其产率,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.3.2 用Oligotex mRNA isolation Kit 从总RNA 中纯化出含poly(A)+mRNA。各取5 μ L 分别进行mRNA 的完整性和纯度检测。

1.4 cDNA 的合成

1.4.1 合成cDNA 第一链:在0.5 mL 微量管中加入5 μ g mRNA;5 μ L 10 $\times$ 第1条链缓冲液;3 μ L dNTP 混合物;2 μ L 带有Xho I 酶切位点的Oligo(dT)₁₈引物(1.4 μ g/ μ L);1 μ L RNase 抑制剂(40 U/ μ L);1.5 μ L strataScript RT 反转录酶(50 U/ μ L),混合均匀后42 ℃孵育1 h,冰上终止第1链反应。

1.4.2 双链cDNA 的合成:借助RNaseH 及DNA 聚合酶的作用合成双链cDNA:20 μ L 10 $\times$ 第2条链缓冲液;7 μ L 第2条链dNTP 混合物;115 μ L 灭菌去离子水;2 μ L RNase H(1.5 U/ μ L);1 μ L DNA 多聚酶(9 U/ μ L);16 ℃孵育2.5 h(不要超过16 ℃,否则容易产生二级结构),反应结束后立即置于冰上。

1.5 pfuDNA 多聚酶削平cDNA 末端及EcoR I 接头连接:向加样管中加入23 μ L dNTP 混合物;2 μ L pfuDNA 多聚酶(9 U/ μ L),72 ℃温育3 h(不要超过3 h);经酚-氯仿抽提,取上清,-20 ℃沉淀过夜。沉淀物用9 μ L EcoR I adapters 重悬,4 ℃孵育至少

30 min;1 μ L 10 $\times$ 连接缓冲液;1 μ L 10 mmol/L rATP;1 μ L T4 DNA Ligase(4 U/ μ L);8 ℃连接过夜;放入70 ℃水浴中,孵育30 min 灭活连接酶。

1.6 T4 多聚核苷酸激酶磷酸化连接子5'末端及Xho I 消化

1.6.1 磷酸化连接子:1 μ L 10 $\times$ 连接缓冲液;2 μ L 10 mmol/L rATP;5 μ L 灭菌去离子水;2 μ L T4 pNKinase(5 U/ μ L);37 ℃孵育30 min;70 ℃水浴灭活 pNKinase。室温平衡后向反应液中加入28 μ L Xho I 缓冲液和2 μ L Xho I (5 U/ μ L),37 ℃孵育反应1.5 h。

1.6.2 酶切生成的cDNA 分子一端带有EcoR I 黏性末端,另一端带有Xho I 黏性末端。用Xho I 酶切的产物经氯仿抽提和无水乙醇沉淀后,收集的沉淀物可用于随后的分级分离。

1.7 cDNA 的分级分离与回收:将酶切后的cDNA 片段过Sepharose CL-2B 凝胶柱子,每管收集液取5 μ L 电泳检测,回收大于500 bp 的片段。

1.8 cDNA 片段的连接及体外包装

1.8.1 连接:将分离纯化的双链cDNA 定向克隆到经EcoR I 和Xho I 双酶切并去磷酸化的Uni-ZAP XR 载体上,在载体浓度不变的情况下,设计3个连接反应(表1)。取0.01~0.1 μ g cDNA 分别与1 μ L Uni-ZAP XR 载体连接,12 ℃孵育过夜。

1.8.2 体外包装:连接产物用Gigapack $\blacksquare$ Gold Packaging 进行包装,22 ℃孵育2 h(90~120 min 连接效果最高);产物经氯仿抽提的上清液可用作滴度测定。另取空载体Uni-ZAP XR 1 μ L,其他的用去离子水代替,补足至5 μ L,同样使用Gigapack $\blacksquare$ Gold Packaging 进行包装并进行滴度检测,作为阴性对照实验。

1.9 原始文库和扩增文库滴度及重组率的测定:将

表1 cDNA 与载体连接反应体系

Table 1 Reaction system of ligating cDNA into vector

	cDNA/ μ L	10 $\times$ 连接酶缓冲液/ μ L	10 mmol/L ATP/ μ L	Uni-ZAP XR 载体/ μ L	T4 DNA 连接酶/ μ L	去离子水/ μ L
连接反应1	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	2.0
连接反应2	1.0	0.5	0.5	1.0	0.5	1.5
连接反应3	1.5	0.5	0.5	1.0	0.5	1.0

包装产物取1 μ L 作10 倍稀释,以对数生长期的E. coli XL1-Blue MRF' 株为受体菌进行滴度测定,90 mm 培养平板加入3 mL 顶层琼脂,15 μ L 0.5 mol/L IPTG 和50 μ L 250 mg/mL X-gal,37 ℃恒温培养过夜;次日统计噬菌斑数目,并计算文库的滴度及蓝白斑比较[文库滴度公式 $P(\text{pfu/mL}) = \text{噬菌斑}$

数 $\times$ 稀释倍数 $\times 10^3$ /噬菌体铺平板的体积]。按照原始文库的滴度,继续感染宿主菌以扩增文库。最后向扩增的文库中加入终体积分数为7%的DMSO,分成小管,于-70 ℃长期保存。

1.10 噬菌体切割实验:取一定体积的扩增文库、ExAssist helper phage 和E. coli XL1-Blue MRF' 宿

主菌按比例将3者混合,Uni-ZAP XR载体在辅助噬菌体ExAssist helper phage的共感染作用下,释放出pBluescript SK-噬菌粒,转染*E. coli* SOLR后,铺于含有氨苄青霉素抗性的LB平板中培养。

1.11 cDNA文库的质量鉴定

1.11.1 PCR鉴定:随机挑取15个噬菌斑进行PCR扩增,根据载体多克隆位点两端的序列设计引物,上游引物5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3',下游引物5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3',PCR反应条件为94℃、3 min,94℃、40 s,54℃、30 s,72℃、40 s,72℃、10 min,30个循环。PCR产物用1.0%凝胶电泳检测。

1.11.2 双酶切鉴定:从噬菌粒抗性平板中随机挑取12个阳性克隆子接种于LB液体培养基,37℃震荡过夜,收集菌体,用碱裂解法^[3]提取pBluescript SK-噬菌粒,经*EcoR* I和*Xho* I双酶切的产物用1.0%凝胶电泳检测插入片段的大小。

2 结果

2.1 RNA与mRNA的提取和纯化:通过改良的CTAB法提取的总RNA,取2 μL样品稀释50倍后进行紫外分光光度检测, $A_{260}/A_{280}=1.982$,表明所得RNA纯度较高;1.0%琼脂糖凝胶电泳结果显示,28 S和18 S rRNA两条特征条带清晰,亮度比接近2:1,说明总RNA较完整,没有明显的降解和基因组DNA污染现象,多糖多酚等次生代谢物基本去除干净(图1)。分离纯化出的mRNA, $A_{260}/A_{280}=2.010$,总得率为12.02 μg,mRNA的量满足下一步cDNA合成要求。

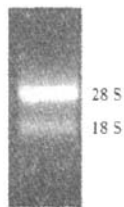
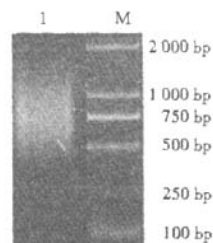


图1 总RNA电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of total RNA

2.2 分析合成cDNA及体外连接:取cDNA第2链反应产物,1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,图2中显示合成的cDNA为弥散状条带,分布在0.5~2.0 kb。双链cDNA经柱色谱分离,共收集12管,每管取5 μL进行电泳检测,确定回收大于500 bp片段用于连接反应。文库构建过程中cDNA与载体的连接比例对连接效率影响较大。设计3种连接反应,分别包装,滴度检测表明cDNA与载体最佳连接比为1:1。



1-双链cDNA M-DL-2 000 Marker

Lane 1-Double strand cDNA;

M-DL-2 000 Marker

图2 双链cDNA电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of double strand cDNA

2.3 文库的滴度及重组率:按照载体与cDNA的最适连接比进行放大培养检测,结果显示原始文库滴度为 1.07×10^6 pfu/mL,含有 5.0×10^5 重组子,插入片段长度为0.5~2.0 kb;扩增后的滴度为 4.25×10^{11} pfu/mL重组子,蓝白筛选鉴定文库的重组率为98.5%,而阴性对照的蓝白筛选实验,涂布平板,观察平板中生长的几乎全为蓝斑,说明无明显外源片段的插入,白斑数近乎为零(图3)。

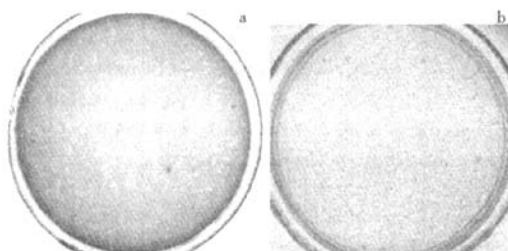


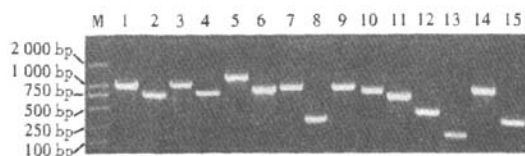
图3 蓝白筛选原始文库(a)和蓝白筛选阴性对照(b)

Fig. 3 Primary library of blue and white dot screening (a) and negative control of blue and white dot screening (b)

2.4 插入片段的分析:(1)随机挑取15个噬菌斑,PCR鉴定插入片段的大小,电泳显示片段长度大部分在0.4~2.0 kb,平均大小在1 kb左右(图4)。(2)随机挑取12个在氨苄青霉素抗性平板中生长的单菌落,过夜摇菌后,提取pBluescript SK-噬菌粒,经*EcoR* I和*Xho* I双酶切,电泳测定酶切产物的插入片段大小集中在0.4~2.0 kb(图5)。

3 讨论

cDNA文库的筛选和植物表达序列标签(expressed sequence tag, EST)等分子生物学技术可应用于药用次生代谢调控机制的研究以及功能基因的克隆及表达鉴定^[3]。构建cDNA文库是研究功能基因的有效方法,目前,已广泛用于目的基因的分

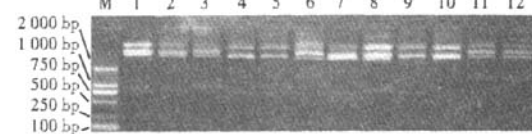


泳道1~15-随机克隆PCR产物 M-DL-2000 Marker

Lane 1-15-PCR Product of random clones M-DL-2000 Marker

图4 随机挑取15个克隆的PCR产物检测

Fig. 4 PCR Examination of random selected fifteen clones



泳道1~12-随机噬菌粒 M-DL-2000 Marker

Lane 1-12-random plasmid M-DL-2000 Marker

图5 pBluescript SK-噬菌粒双酶切检测

Fig. 5 Examination of digestion with *Xho* I, *Eco*R I of fragments contained in pBluescript SK-phasmids

离。为了进行中药何首乌次生代谢物的生物合成基因调控的基础研究,笔者构建了何首乌叶cDNA文库,在构建文库的过程中,特别注意了以下几点:

(1)mRNA的质量是文库构建成功的最重要的因素,低质量mRNA(如部分降解)建立的文库容易丢失大分子mRNA的全长拷贝,以及稀有的转录本^[4]。因此,在取材上选用新鲜的何首乌叶片为材料,这时提取出的mRNA较丰富,质量也相对较高。

(2)cDNA合成的质量除了保证在总RNA和mRNA提取过程中无RNase污染外,逆转录酶的选择也很重要。采用了Stratagene公司的基因工程逆转录酶StrataScript,它是一种新型的无RNase H活性的莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶(MMLV-RT),在RNase H位点的高度保守区发生的点突变导致RNase H活性丧失而并不影响其逆转录功能,这种无核酸酶活性的突变体使其较野生型MMLV-RT能转录出较高比例的全长cDNA转录本,使cDNA合成的长度和效率明显增加,这对于一个高质量的cDNA文库是必需的。

(上接第1636页)

G-1),74.17(G-2),79.29(G-3),71.16(G-4),78.91(G-5),62.57(G-6)。以上数据与文献对比^[7]鉴定化合物为3-O-β-D-吡喃葡萄糖基(1-3)-α-L-吡喃鼠李糖基(1-2)-α-L-吡喃阿拉伯糖基-常春藤皂苷元-28-O-β-D-吡喃葡萄糖酯苷。

参考文献:

- [1] 谢韬,刘净,梁敬钰,等. 滨蒿化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(2):86-89.
- [2] 羊晓东,赵静峰,郭洁,等. 云南兔耳草中的黄酮类成分

(3)双链cDNA分级分离也是一个不可忽略的环节。cDNA经*Xho* I酶切后形成大小不等的片段,若将这些片段都与载体连接,那些小片段会优先跟载体相连,使得文库中小片段占有较高的比例,大大降低了文库的质量^[5]。通过Sephacrose CL-2B凝胶柱去掉绝大部分小于400 bp的cDNA及酶切反应残留的DNA小片段,保证了文库中含有较大的cDNA分子,有利于文库的后续筛选工作^[6]。

(4)载体与cDNA连接效率的高低会直接关系到文库构建是否成功。文库连接与一般的片段克隆的连接不一样,一般的片段克隆连接是固定长度的载体与固定长度的目的DNA连接,而文库连接是固定长度的载体与非固定长度的目的DNA连接,目的基因cDNA长的有10 kb以上,短的只有400 bp或更短。因此,须对两者的连接比例进行摸索。在实验中,建立了几个平行反应,得出两者的连接比为1时,文库滴度最高。

cDNA文库的质量一般包括文库滴度、重组率及插入片段大小。实验表明,所构建的何首乌cDNA文库初始滴度为 1.07×10^6 pfu/mL,重组率为98.5%,插入片段在0.5~2.0 kb,文库的质量满足随后的EST测序及文库筛选要求,目前,本实验室正在进行噬菌粒的大量提取及核苷酸测序鉴定。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑部委员会. 植物志[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] 黄璐琳,胡尚秋,杨晓. 药用植物生物工程研究进展Ⅰ. 分子标记、遗传转化及功能基因研究[J]. 中草药,2006,37(5):647-651.
- [3] 奥斯伯FM,金斯顿RE,塞德曼JG,等. 精编分子生物实验指南[M]. 第3版. 北京:科学出版社,2005.
- [4] 毛新国,景蕊莲,孔秀英,等. 几种全长cDNA文库构建方法比较[J]. 遗传,2006,28(7):865-873.
- [5] Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A, et al. The German cDNA Consortium SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones[J]. BMC Genomics, 2004,5(1):36.
- [6] 祝骥,马文丽,李凌,等. 一种限制性cDNA文库的构建[J]. 遗传,2002,24(2):174-176.

[J]. 中草药,2004,35(3):257-259.

- [3] 陈龙,杜力军,丁怡,等. 罗布麻花化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(17):1340-1342.
- [4] 丁丽,王敏,赵俊,等. 荔枝核化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(6):45-47.
- [5] 柴兴云,窦静,贺清辉,等. 山银花中酚酸类成分研究[J]. 中国天然药物,2004,2(6):339-340.
- [6] 凌云,鲍燕燕,张永林,等. 兴安蒲公英化学成分的研究[J]. 中草药,2000,31(1):10-11.
- [7] Braca A, Autore G, De S, et al. Cytotoxic saponins from *Schefflera rotundifolia* [J]. Planta Med, 2004,70(10):960-966.

何首乌cDNA文库的构建及分析

作者: [谭雪梅](#), [申彦晶](#), [严萍](#), [郑传进](#), [赵树进](#), [TAN Xue-mei](#), [SHEN Yan-jing](#), [YAN Ping](#), [ZHENG Chuan-jin](#), [ZHAO Shu-jin](#)

作者单位: [谭雪梅, 郑传进, 赵树进, TAN Xue-mei, ZHENG Chuan-jin, ZHAO Shu-jin\(广州军区广州总医院, 广东, 广州, 510010\)](#), [申彦晶, 严萍, SHEN Yan-jing, YAN Ping\(华南理工大学, 广东, 广州, 510640\)](#)

刊名: [中草药](#)  

英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)

年, 卷(期): 2008, 39(11)

参考文献(6条)

1. 中国科学院《中国植物志》编辑委员会 [植物志](#) 1998
2. [黄璐琳](#); [胡尚钦](#); [杨晓](#) [药用植物生物工程研究进展 I . 分子标记、遗传转化及功能基因研究](#) [期刊论文]-[中草药](#) 2006(05)
3. [奥斯伯F M](#); [金斯頓R E](#); [塞德曼J G](#) [精编分子生物实验指南](#) 2005
4. [毛新国](#); [景蕊莲](#); [孔秀英](#) [几种全长cDNA文库构建方法比较](#) [期刊论文]-[遗传](#) 2006(07)
5. [Wellenreuther R](#); [Schupp I](#); [Poustka A](#) [The German cDNA Consortium SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones](#) 2004(01)
6. [祝骥](#); [马文丽](#); [李凌](#) [一种限制性cDNA文库的构建](#) [期刊论文]-[遗传](#) 2002(02)

本文读者也读过(10条)

1. [严萍](#), [焦旭雯](#), [庞启华](#), [赵树进](#), [ZHAO Shu-Jin](#), [YAN Ping](#), [JIAO Xu-Wen](#), [PANG Qi-Hua](#), [SHEN Yan-Jing](#), [ZHAO Shu-Jin](#) [何首乌叶绿体matK基因序列分析](#) [期刊论文]-[现代食品科技](#)2007, 23(8)
2. [祝钦洸](#), [李艳冬](#), [刘光德](#), [郭余龙](#), [眭顺照](#), [李名扬](#), [Zhu Qinlong](#), [Li Yandong](#), [Liu Guangde](#), [Guo Yulong](#), [Sui Shunzhao](#), [Li Mingyang](#) [彩叶草叶片cDNA文库的构建与分析](#) [期刊论文]-[中国农学通报](#)2007, 23(2)
3. [金治平](#), [赵德修](#), [乔传令](#), [付春祥](#) [水母雪莲愈伤组织cDNA文库的构建](#) [期刊论文]-[植物学通报](#)2004, 21(1)
4. [洪澍](#) [抗生素新药如何研制](#) [期刊论文]-[企业标准化](#)2006(5)
5. [于荣敏](#), [任胜芳](#), [张章](#), [赵昱](#) [转基因何首乌毛状根生物转化熊果苷的初步研究](#) [期刊论文]-[中药材](#)2006, 29(5)
6. [谭颖然](#) [何首乌的抗衰老作用机制探讨](#) [期刊论文]-[湖南中医药导报](#)2004, 10(3)
7. [胡裕清](#), [赵树进](#) [何首乌基因组DNA提取及RAPD反应体系正交设计优化](#) [期刊论文]-[时珍国医国药](#)2010, 21(9)
8. [王莉](#), [于荣敏](#), [张辉](#), [朱江](#), [程克](#) [何首乌毛状根的诱导及其培养](#) [期刊论文]-[药物生物技术](#)2002, 9(2)
9. [侯大斌](#), [任正隆](#), [舒光明](#), [HOU Da-Bin](#), [REN Zheng-Long](#), [SHU Guang-Ming](#) [附子野生资源群体遗传多样性的RAPD分析](#) [期刊论文]-[生态学报](#)2006, 26(6)
10. [杨朝辉](#), [雷建军](#), [宋明](#), [王亚培](#), [王进](#) [花色素苷基因研究进展](#) [期刊论文]-[西南农业学报](#)2002, 15(2)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200811038.aspx