

铁皮石斛磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆及表达分析

曾淑华¹, 文国松^{1*}, 徐绍忠¹, 查应红², 杨生超¹, 段承俐^{1,3}

1. 云南农业大学中药材研究所/云南省中药材规范化种植技术指导中心, 云南 昆明 650201

2. 云南红河群鑫石斛种植有限公司, 云南 屏边 661200

3. 浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300

摘要: 目的 克隆铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (*pepc*) 基因, 并对其在 F 型和 H 型铁皮石斛中的表达进行分析, 为研究铁皮石斛 *pepc* 基因的结构、功能提供依据。方法 基于 GenBank 上已知的 *pepc* 基因的同源序列设计引物, 应用 RT-PCR 和 RACE 等方法, 克隆铁皮石斛 *pepc* 基因全长。采用荧光定量 PCR 方法研究 *pepc* 基因在 2 种铁皮石斛中的表达。结果 成功克隆了铁皮石斛 *pepc* 基因, 登录号为 JF423930, 该基因全长为 3 560 bp, 其中 cds 序列为 2 895 bp, 与兰科植物的同源性为 80% 左右, 与其他科属植物的同源性达到 70% 以上, 编码 964 个氨基酸。*pepc* 基因在 F 型铁皮石斛中的表达量为 H 型的 5.55 倍。结论 成功克隆了铁皮石斛 *pepc* 基因, 且 F 型铁皮石斛 *pepc* 基因的表达量高于 H 型。

关键词: 铁皮石斛; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 基因克隆; 同源性分析; RT-PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0766-06

Cloning and expression analysis on phosphoenolpyruvate carboxylase gene in *Dendrobium officinale*

ZENG Shu-hua¹, WEN Guo-song¹, XU Shao-zhong¹, ZHA Ying-hong², YANG Sheng-chao¹, DUAN Cheng-li^{1,3}

1. Institute of Chinese Medical Materials, Yunnan Agricultural University / Yunnan Provincial Good Agricultural Practice Center of Chinese Medical Materials, Kunming 650201, China

2. Yunnan honghe Dendrobium planting Co., Ltd., Pingbian 661200, China

3. Faculty of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China

Abstract: Objective To study the structure and function of phosphoenolpyruvate carboxylase (*pepc*) gene in *Dendrobium officinale*, *pepc* was cloned and gene sequence was analyzed. Expression of *pepc* gene in H and F type of *D. officinale* was analyzed. **Methods** Primers were designed by analyzing the homologous sequence of *pepc* gene in GenBank, and complete *pepc* sequence in *D. officinale* was cloned by RT-PCR and RACE. Expression of *pepc* gene was detected by fluorescent quantitative PCR in two kinds of *D. officinale*. **Results** The complete sequence (3 560 bp) of *pepc* gene in *D. officinale* was cloned (Genebank accession number: JF423930), including 2 895 bp cds sequence, and shared 80% identity with orchid plants and 70% identity with other plants. The *pepc* cDNA encoded a precursor protein of 964 amino acids. Expression of *pepc* gene of F type *D. officinale* was 5.55 times as that of H type. **Conclusion** The complete sequence of *pepc* gene in *D. officinale* is cloned, and expression of *pepc* in F type *D. officinale* is higher than H type.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; phosphoenolpyruvate carboxylase (*pepc*); gene cloning; homologous analysis; RT-PCR

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生草本植物, 主要分布于云南、四川、贵州、西藏、广西、安徽、浙江、福建等地^[1-2]。铁皮石斛含石斛

多糖、石斛碱、双苄酚类、菲酚类等多种药效成分, 现代医学研究显示, 铁皮石斛具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力等功效^[3-7]。铁皮石斛分为 H 型和 F 型 2 种, 其中 F 型铁皮石斛含丰富的黏性多糖成分,

收稿日期: 2011-10-23

基金项目: 云南省重大产业项目 (云发改高技[2007]1718 号); 云南省科技计划项目重点产业创新工程 (2008IF027); 国家科技支撑计划项目 (2011BAI13B02-5)

作者简介: 曾淑华 (1977—), 女, 土家族, 湖北利川人, 讲师, 博士, 从事药用植物研究。E-mail: zshgsp@163.com

*通讯作者 文国松 E-mail: wengs@163.com

适合加工枫斗, H型铁皮石斛只含有少量多糖成分, 不适合加工枫斗^[1]。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, *pepc*)是C₄植物(在光合作用中固定CO₂的最初产物为含4个碳的二羧酸, 故称为C₄-二羧酸途径, 简称C₄途径, 这些植物被称为C₄植物)和兼性景天酸代谢途径(CAM)植物光合碳代谢的源头关键酶, 在C₄和CAM植物的光合作用中催化大气CO₂固定的第一步反应^[8]。1984年, 首次从已克隆到的大肠杆菌*pepc*基因推测出PEP羧化酶基因的一级结构^[9]。目前约有60种植物和细菌PEP羧化酶基因的全长序列被推测出来^[10]。铁皮石斛为CAM植物, 随着环境条件的变化, 其光合作用在CAM与C₃途径间变化, 特别是晴天CAM途径更加明显^[11]。通过登录NCBI检索, 发现还没有石斛*pepc*基因的全序列, 本实验克隆铁皮石斛的*pepc*基因并对其在F型和H型铁皮石斛中的表达进行分析, 为进一步了解铁皮石斛*pepc*基因的结构、功能及其定位奠定基础, 同时为探索铁皮石斛多糖代谢途径提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 种植于红河州群鑫石斛种植有限公司铁皮石斛种植园, 样本经云南农业大学植物和中药材系郭凤根教授鉴定。*pepc*基因克隆的铁皮石斛叶片为F型铁皮石斛1年生幼嫩叶片, *pepc*基因表达分析的F型和H型铁皮石斛叶片于8月采摘, 均为2年生, 且采相同叶位的叶片, 保存于-80℃冰箱, 用于RNA提取。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取 采用百泰克通用植物RNA提取试剂盒提取铁皮石斛的RNA, 并用Fermentas公司的DNA消化试剂盒消化DNA, 用Fermentas公司的反转录试剂盒对RNA进行反转录。

1.2.2 *pepc*基因部分片段的克隆 根据GenBank *pepc*基因的保守区域, 利用Primer 5软件设计一对特异性扩增引物, F1: TGGGCGAGGTGGAAGTGT, R1: GATGCCTGTGCTGCCTTT, 以铁皮石斛的cDNA为模板进行PCR扩增, PCR反应条件如下: 94℃、5 min, 94℃、30 s, 54℃、45 s, 72℃、1 min, 35个循环; 72℃、10 min。获得一条DNA片段, 将片段克隆到PMD19-T上, 选取2个克隆测序。

1.2.3 *pepc*基因的3'端和5'端扩增 根据3'RACE

试剂盒(购自大连宝生物公司)要求及已知的*pepc*部分序列, 设计两条特异性引物(F2: GCCTTCC-AACCTTCGCCACAGT; F3: CGGCATTAAACACGTCATCGAA)。根据试剂盒原理, 进行巢式PCR反应, 以引物F2及试剂盒中的outer primer进行第1轮PCR, 反应程序如下: 94℃、5 min, 94℃、30 s, 55℃、30 s, 72℃、2 min, 30个循环; 72℃、10 min。取第1次PCR产物1 μL为第2轮PCR反应的模板, 以F3及inner primer为引物, 反应程序如下: 94℃、5 min; 94℃、30 s, 55℃、30 s, 72℃、2 min, 30个循环; 72℃、10 min。获得一条目的DNA片段, 进行克隆, 测序。

根据莫氏兰的*pepc*基因序列, 采用Primer 5软件设计特异引物(R2: CGGCATTAAACACGTCATCGAA; R3: ATGTTCAAGAGTAGCAGCAGTA), 并根据已获得的*pepc*基因序列设计一条正向引物(F4: TTGTCTCAGCCACCAGATACCAT), 以cDNA为模板进行巢式PCR反应, 反应程序如下: 94℃、5 min, 94℃、30 s, 55℃、30 s, 72℃、2 min, 30个循环; 72℃、10 min。获得一条目的DNA片段, 进行克隆, 测序。

根据5'RACE试剂盒(购自大连宝生物公司)要求及已知部分序列设计引物, R4: ATTGCCATC-ACGATCACCACCCA; R5: TGTATCAACCCGCCGCAGGAAGT。根据试剂盒原理, 进行巢式PCR反应, 以引物R4及试剂盒中的outer primer进行第1轮PCR, 反应程序如下: 94℃、5 min, 94℃、30 s, 60℃、30 s, 72℃、2 min, 30个循环; 72℃、10 min。取第1次PCR产物1 μL为第2轮PCR反应的模板, 以R5及inner primer为引物, 反应程序如下: 94℃、5 min, 94℃、30 s, 60℃、30 s, 72℃、2 min, 30个循环; 72℃、10 min。获得一条目的DNA片段, 进行克隆, 测序。

1.2.4 *pepc*在H型和F型铁皮石斛叶片中的表达分析 根据金钗石斛 *GAPDH* 基因的部分序列(GQ250049.1), 利用Primer 5软件设计特异引物(F6: TCTTGAATTCCTCACCGCAG, R6: ATTAAC-AGACCAGTGATTGCG), 以铁皮石斛的cDNA为模板进行PCR扩增, PCR反应条件如下: 94℃、5 min, 94℃、30 s, 52℃、45 s, 72℃、1 min, 35个循环; 72℃、10 min。获得一条DNA片段, 将片段克隆到PMD19-T上, 选取2个克隆测序。

根据铁皮石斛*pepc*和*GAPDH*基因的已知序

列, 采用 Primer 5 软件设计用于荧光定量的特异引物, *pepc* 基因的引物序列为 QF1: CCGGCCATCA-AAGAGGAAA, QR1: TTAAATGCCGCACCAAAT-CC; GAPDH 基因的引物序列为 QF2: TTGGA-GGGACACAGATTGCT, QR2: CACCGCCCTGT-TATTACATG。以铁皮石斛的 cDNA 为模板进行普通 PCR 扩增, PCR 反应条件如下: 94 °C、5 min, 94 °C、30 s, 55 °C、45 s, 72 °C、1 min, 35 个循环; 72 °C、10 min, 检测所设计引物的特异性。

采用荧光染料法进行荧光定量反应, 荧光染料 (SYBR Premix Ex Taq™ II) 购于宝生物工程 (大连) 有限公司, 反应在 BIO-RAD 荧光定量 PCR 仪上进行。空白对照采用 ddH₂O 代替 cDNA, 其他试剂不变, PCR 反应程序为 95 °C、3 min, 循环 1 次, 预变性; PCR 扩谱, 40 次循环, 95 °C、40 s, 55 °C、40 s, 72 °C、40 s, 77 °C、10 s, 95 °C、1 min, 循环 1 次; 55 °C、1 min, 循环 1 次; 55 °C、10 s, 循环 80 次。反应体系见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 反应体系

Table 1 Reaction system of fluorescent quantitative PCR

试剂	用量 / μL
cDNA 模板	2
SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 $\times$)	12.5
PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1
PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1
ROX Reference Dye II (50 $\times$) $\times$ 3	0.5
ddH ₂ O	8
总体积	25

2 结果与分析

2.1 *pepc* 基因全序列的克隆

2.1.1 铁皮石斛总 RNA 提取 采用北京百泰克通用植物 RNA 提取方法提取铁皮石斛 RNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, Image Quant 凝胶成像系统成像, 由图 1 可知, 提取的铁皮石斛 RNA 完整性较好, 28S 和 18S 两条带清晰, 没有发生降解, 用分光光度计测得 A_{280} 和 A_{260} , 计算其比值在 1.8~2.0, 可以用于后续研究。

2.1.2 *pepc* 基因部分序列克隆 获得的铁皮石斛 cDNA 第一链用引物 F1/R1 进行 PCR 扩增, 获得的片段大小为 600 bp (图 2), 与引物设计时目的片段大小吻合。所得序列进行 NCBI BLASTn 分析发现, 该序列与杓唇石斛 *D. moschatum* Sw.、流苏石斛 *D. fimbriatum* Hook.、美花石斛 *D. loddigesii* Rolfe、木石斛 *D. crumentatum* Sw. 部分 mRNA 序列的同源性

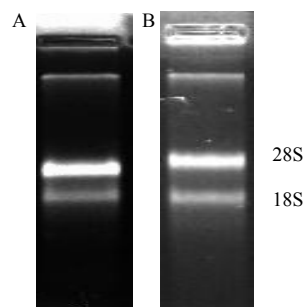


图 1 H 型 (A) 和 F 型 (B) 铁皮石斛的 RNA

Fig. 1 RNA of H (A) and F (B) types of *D. officinale*

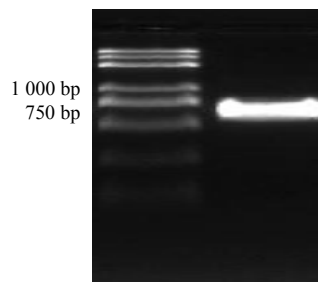


图 2 引物 F1/R1 扩增 cDNA 结果

Fig. 2 Amplification result of cDNA by Primer F1/R1

在 90% 以上。

2.1.3 铁皮石斛 *pepc* 基因的 3'端和 5'端扩增 通过 TaKaRa 公司的 3'RACE 试剂盒进行铁皮石斛 *pepc* 基因的 3'RACE 扩增, 套式 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, Image Quant 凝胶成像系统成像, 发现有 1 kb 左右的特异 DNA 片段 (图 3-A), 目的 DNA 片段进行胶回收, 连接和转化, 蓝白斑筛选, 挑选白斑液体培养后进行 PCR 检测, 选取具有重组子的菌液测序, 测序后结果进行 NCBI BLASTn 分析, 发现与其他植物 *pepc* 基因的同源性较高, 通过 DNAMAN 软件比对, 获得大小为 908 bp 的 DNA 序列。

根据莫氏兰的 *pepc* 基因序列 (AF530570.1) 设计特异引物, 套式 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, Image Quant 凝胶成像系统成像, 发现有 1.5 kb 左右的特异 DNA 片段 (图 3-B), 目的 DNA 进行胶回收, 连接和转化, 蓝白斑筛选, 挑选白斑液体培养后进行 PCR 检测, 选取具有重组子的菌液测序, 测序后结果进行 NCBI BLASTn 分析, 发现与莫氏兰、香子兰以及陆地棉、碱蓬、花生等 *pepc* 基因的同源性较高, 同源性达到 99% 甚至 100%。通过 DNAMAN 软件比对, 获得大小为 1 365 bp 的 DNA 序列。

采用 TaKaRa 公司的 5'RACE 试剂盒进行铁皮石斛

pepc 基因的 5'RACE 扩增, 套式 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, Image Quant 凝胶成像系统成像, 发现有 1 kb 左右的特异 DNA 片段 (图 3-C), 目的 DNA 片段进行胶回收, 连接和转化, 蓝白斑筛选, 挑选白斑液体培养后进行 PCR 检测, 选取具有重组子的菌液测序, 测序后结果进行 NCBI BLASTn 分析, 发现与莫氏兰、香子兰的 *pepc* 基因同源性较高, 分别达到 91% 和 71%。通过 DNAMAN 软件比对, 获得大小为 944 bp 的 DNA 片段。

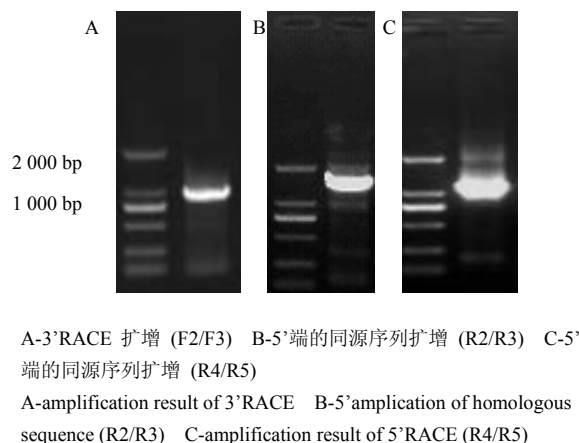


图 3 3'端和 5'端扩增结果

Fig. 3 Amplification results of 3' and 5' ends

2.2 H 型和 F 型铁皮石斛 *pepc* 基因荧光定量 PCR 检测

2.2.1 铁皮石斛 *GAPDH* 基因 (内参基因) 部分序列扩增 以铁皮石斛 cDNA 为模板, 以 F6/R6 为引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳, 获得 1 条 600 bp 左右的特异条带 (图 4)。将扩增的特异 DNA 条带进行胶回收, 连接和转化, 蓝白斑筛选, 挑选白斑液体培养后进行 PCR 检测, 选取具有重组子的菌液测序, 测序后结果进行 NCBI BLASTn 分析, 发现与金钗石斛 *GAPDH* 基因的部分序列 (GQ250049.1)

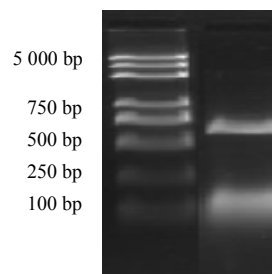


图 4 引物 F6/R6 扩增 cDNA 结果

Fig. 4 Amplification result of cDNA by Primer F6/R6

同源性高达 96%, 扩增序列长度为 528 bp。

2.2.2 荧光定量 PCR 溶解曲线分析 由图 5 可知, *pepc* 基因和 *GAPDH* 基因的溶解曲线都只有一个明显的主峰, 说明设计的荧光定量特异引物良好, 实验结果不受非特异性扩增和引物二聚体的干扰。

2.2.3 荧光定量 PCR 标准曲线分析 目的基因 (*pepc* 基因) 和内参基因 (*GAPDH* 基因) 荧光定量 PCR 的标准曲线分别为 $Y_1 = -3.268 X_1 + 43.249$, $r_1 = 0.999 8$ 和 $Y_2 = -3.398 X_2 + 44.092$, $r_2 = 0.999 7$; 其中 Y 为 C_t 值, X 为拷贝数。未知样品处于不同稀释倍数的对照品之间, 定量准确; *pepc* 基因和 *GAPDH* 基因的扩增效率分别 102.3% 和 96.9%, 说明 2 个基因荧光定量 PCR 引物设计合理, 反应条件适宜。

2.2.4 荧光定量 PCR 扩增曲线分析 *pepc* 和 *GAPDH* 的荧光定量 PCR 扩增曲线见图 6, 由图可知, 2 个基因的扩增曲线均为 S 形曲线, *pepc* 基因的 C_t 值均在 15~30, 而 *GAPDH* 基因的 C_t 在 15~32, 说明对照品的稀释倍数基本合理, 未知样品模板量适宜, 因此试验数据准确性高。

2.2.5 荧光定量 PCR 数据分析 根据未知样品的 C_t 值和荧光定量的标准曲线, 计算两种铁皮石斛

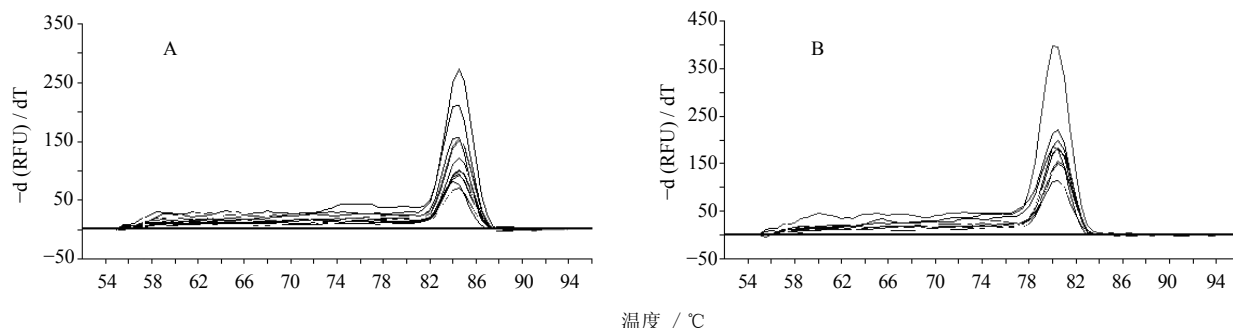
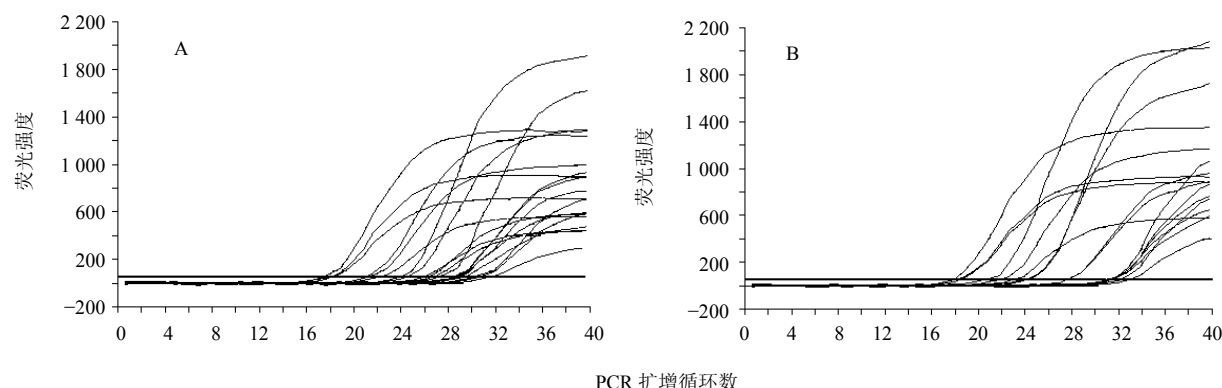


图 5 *pepc* 基因 (A) 和 *GAPDH* 基因 (B) 溶解曲线

Fig. 5 Melting curves of *pepc* (A) and *GAPDH* (B) genes

图6 *pepc* 基因 (A) 和 *GAPDH* 基因 (B) 扩增曲线Fig. 6 Amplification curves of *pepc* (A) and *GAPDH* (B) genes

pepc 基因和 *GAPDH* 基因的 Ct 值和起始拷贝数。F 型和 H 型铁皮石斛 *pepc* 基因的 Ct 值分别为 26.49、28.95, 拷贝数分别为 1.36×10^5 、 2.45×10^4 ; F 型和 H 型铁皮石斛 *GAPDH* 基因的 Ct 值分别为 31.22、31.25, 拷贝数分别为 6.14×10^3 、 6.00×10^3 。*pepc* 基因在两种铁皮石斛叶片中的表达存在差异, F 型铁皮石斛 *pepc* 的表达量明显高于 H 型, 前者为后者的 5.55 倍。而 *GAPDH* 基因在两种铁皮石斛叶片中的表达量相当。

3 讨论

3.1 铁皮石斛 *pepc* 基因核苷酸与其他植物 *pepc* 基因有较高的同源性

本研究克隆了铁皮石斛的 *pepc* 基因, 全长为 3 560 bp, 其中 cds 序列为 2 895 bp, A/T 量为 56.3%, G/C 量为 43.7%, 与兰科植物的同源性为 85%, 与其他科属植物的同源性也达到 70% 以上。

3.2 铁皮石斛 *pepc* 基因与其他植物 *pepc* 基因的生物信息学基本一致

铁皮石斛 *pepc* 基因 cds 序列编码 964 个氨基酸, 其中编码的亮氨酸和谷氨酸较多, 而半胱氨酸较少, 氨基酸序列与兰科植物的同源性为 89%, 多肽的分子质量为 109 990, 理论等电点为 5.995。对多肽进一步分析表明存在信号肽的可能性为 0.000, 进行结构域分析发现, 只有 *pepc* 结构域, 数据库编号为 COG235, 与蔡小宁等^[12]对 C3 和 C4 植物 *pepc* 基因的生物信息学分析结果一致。

3.3 *pepc* 基因在 F 型铁皮石斛中的表达量高于 H 型

PEPC 催化 C4 和 CAM 代谢途径中的第一步反应, 是光合作用源头关键酶, 因此 *pepc* 基因表达量的高低对光合速率有着至关重要的作用, 也必定会对光合产物的积累起促进作用。在转 *pepc* 基因的植

物中发现, *pepc* 基因高表达的植株确实能提高光合效率, 如迟伟等^[13]研究了转 *pepc* 基因水稻的光合生理特性, 结果表明转 *pepc* 基因水稻 PEPC 活性比原种提高 20 倍, 饱和光合速率比原种高 55%, 测定光合日变化看出在 1 d 中不同时间, 转 *pepc* 基因水稻的光合速率均高于原种。铁皮石斛为 CAM 植物, 特别是晴天 CAM 途径更加明显, 而光合产物 (多糖类物质) 又是铁皮石斛的主要药效成分, 要提高铁皮石斛的多糖量, 提高其叶片 *pepc* 基因的表达量是一条重要的途径。对 F 型和 H 型铁皮石斛叶片的糖代谢源头关键酶 *pepc* 基因进行荧光定量分析结果表明, *pepc* 基因在 F 型铁皮石斛中的表达量为 H 型的 5.55 倍, 这一结果可能说明 F 型铁皮石斛源 (铁皮石斛叶片) 的同化能力较强, 以产生更多的同化产物 (包括多糖类物质) 向库器官 (铁皮石斛茎) 输出。但是对于铁皮石斛 *pepc* 基因的作用机制、定位以及功能还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 张治国, 俞巧仙, 叶智根. 名贵中药-铁皮石斛 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2006.
- [2] Hua Y F, Zhang M, Fu C X, et al. Structural characterization of a 2-O-acetylglucomannan from *Dendrobium officinale* stem [J]. *Carbohydr Res*, 2004, 339(13): 2219-2224.
- [3] 苑 鹤, 林二培, 朱 波, 等. 铁皮石斛人工栽培居群的遗传多样性研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(3): 566-569.
- [4] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCPPI a-1 的理化性质及抗肿瘤活性 [J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(4): 578-583.
- [5] 管惠娟, 张 雪, 屠凤娟, 等. 铁皮石斛化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(12): 1873-1876.

- [6] 何铁光, 杨丽涛, 李杨瑞, 等. 铁皮石斛原球茎多糖 DCP3c-1 的分离纯化及结构初步分析 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(2): 143-147.
- [7] 邵 华, 张玲琪, 李俊梅, 等. 铁皮石斛研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 109-113.
- [8] Hatch M D. C4 photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 895: 81-106.
- [9] Fujita N, Miwa T, Ishijima S, *et al.* The primary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the *ppc* gene and deduced amino acid sequence [J]. *J Biochem*, 1984, 95(4): 909-916.
- [10] Lepiniec L, Vidal J, Chollet R, *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution [J]. *Plant Sci*, 1994, 99: 111-124.
- [11] 苏文华, 张光飞. 铁皮石斛叶片光合作用的碳代谢途径 [J]. 植物生态学报, 2003, 27(5): 631-637.
- [12] 蔡小宁, 陈 茜, 杨 平, 等. 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的生物信息学分析 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(3): 914-916.
- [13] 迟 伟, 焦德茂, 黄雪清, 等. 转 PEPC 基因水稻的光合生理特性 [J]. 植物学报, 2001, 43(6): 657-660.

天津中草药杂志社售过刊信息

天津中草药杂志社是经国家新闻出版总署批准于2009年8月在天津滨海新区注册成立。编辑出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicines*、《现代药物与临床》(2009年由《国外医药·植物药分册》改刊)、《药物评价研究》(2009年由《中文科技资料目录·中草药》改刊)。欢迎投稿, 欢迎订阅。

《中草药》杂志合订本: 1974—1975年、1976年、1979年、1988—1993年(80元/年), 1996、1997年(110元/年), 1998年(120元/年), 1999年(135元/年), 2000年(180元/年), 2001—2003年(200元/年), 2004年(220元/年), 2005年(260元/年), 2006—2008年(280元/年), 2009年(400元/年), 2010年(400元/年), 2011年(550元/年)。

《中草药》增刊: 1996年(50元), 1997年(45元), 1998年(55元), 1999年(70元), 2000、2001年(70元), 2002—2007年(65元/年), 2008、2009年(55元/年)。凡订阅《中草药》杂志且提供订阅凭证者, 购买增刊7折优惠, 款到寄刊。

Chinese Herbal Medicines 合订本: 2010年(150元/年), 2011年(150元/年)。

《现代药物与临床》合订本: 2009年(120元/年), 2010年(120元/年), 2011年(120元/年)。

《国外医药·植物药分册》合订本: 1996—2008年(80元/年), 2006—2008年(90元/年)。

《药物评价研究》2009年单行本每册15元, 2010年合订本(120元/年), 2011年(120元/年)。

《中文科技资料目录·中草药》: 1993—2006年合订本(全套2040元), 2007—2008年单行本, 每册定价30元, 全年订价210元(6期十年索引)。

天津中草药杂志社

地 址: 天津市南开区鞍山西道308号

邮 编: 300193

电 话: (022) 27474913 23006821

传 真: (022) 23006821

电子邮箱: zcy@tiprpress.com

网 址: www.中草药杂志社.中国

www.tiprpress.com (在线投稿)

开户银行: 兴业银行天津南开支行

账 号: 44114010010081504

户 名: 天津中草药杂志社