

• 药材与资源 •

刺五加环阿屯醇合酶基因的克隆及其表达分析

邢朝斌, 龙月红, 吴 鹏, 何 闪, 朱金丽, 李宝财

河北联合大学生命科学学院, 河北 唐山 063000

摘要: 目的 克隆刺五加的环阿屯醇合酶(cycloartenol synthase, CAS)基因, 并对其进行生物信息学和表达分析。方法 采用cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆刺五加CAS基因的全长cDNA序列。运用生物信息学方法对该基因进行分析, 预测其编码蛋白的结构与功能, 并通过RT-PCR法检测CAS在不同生长发育时期和不同器官中的表达情况。结果 刺五加CAS基因的cDNA全长为2 758 bp, 开放阅读框长2 277 bp, 编码758个氨基酸的蛋白, 包含三萜合成酶的标志性序列。CAS蛋白无跨膜区域, 定位于细胞质中。RT-PCR的结果显示, 刺五加CAS基因在各时期和器官中均有表达, 但表达量具有显著差异($P < 0.05$)。其中果实基本成熟期的表达量最高, 是最低量萌芽期的1.56倍, 各器官中, 叶片的表达量最高, 是最低量叶柄的1.37倍。结论 首次分离并报道了刺五加的CAS cDNA克隆, 并证实其在不同生长发育时期和不同器官中的表达量不同, 为进一步研究CAS对刺五加皂苷量的影响和表达调控奠定基础。

关键词: 刺五加; 环阿屯醇合酶; 克隆; 表达分析; cDNA末端快速扩增

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1387-06

Cloning of cycloartenol synthase gene from *Eleutherococcus senticosus* and its expression analysis

XING Zhao-bin, LONG Yue-hong, WU Peng, HE Shan, ZHU Jin-li, LI Bao-cai

College of Life Science, Hebei United University, Tangshan 063000, China

Abstract: Objective To clone cycloartenol synthase (CAS) gene from *Eleutherococcus senticosus* and analyze its bioinformatics and expression. **Methods** CAS gene full length cDNA was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). CAS gene was analyzed by bioinformatics method, and the structure and function of CAS gene were deduced. The expression of CAS in different organs of *E. senticosus* at various growing periods was detected by RT-PCR. **Results** The full length of CAS gene cDNA was 2 758 bp containing a 2 277 bp open reading frame (ORF) that encoded a protein of 758 amino acids including triterpene synthase signature sequence. Without transmembrane domain, CAS gene was located in cytoplasm. RT-PCR result showed that CAS gene expressed in different organs of *E. senticosus* at various growing periods showed significant difference ($P < 0.05$). The highest content of the expression showed up when the fruit almost matured, which was 1.56 times as much as that in the lowest as plant sprouts. The highest content of the expression was in the leaves which was 1.37 times as much as that of the lowest in petiole. **Conclusion** The CAS gene of *E. senticosus* is successfully cloned and reported for the first time which proves that the expression in different organs of *E. senticosus* at various growing periods is different. The cloning of CAS gene provides a stable foundation for its effect on saponins amount of *E. senticosus* and expression regulation.

Key words: *Eleutherococcus senticosus* Harms; cycloartenol synthase (CAS); clone; expression analysis; rapid amplification of cDNA ends (RACE)

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* Harms 根、茎、叶均可入药, 是我国传统的珍贵药用植物^[1], 具有多种生理活性及药理作用, 三萜皂苷是其主要

活性成分之一^[2]。在植物体内, 三萜类化合物均需通过依赖甲羟戊酸的类异戊二烯途径合成, 该途径中, 2, 3-氧化鲨烯可在 β -香树酯醇合成酶(β -amyrin

收稿日期: 2012-02-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30701086); 河北省自然科学基金资助项目(C2009001252); 河北省自然科学基金-石药集团医药联合研究基金(H2012401006)

作者简介: 邢朝斌(1975—), 男, 副教授, 研究方向为分子生药学、药用植物细胞工程。

Tel: (0315)3726238 Fax: (0315)3726341 E-mail: xingzhaobin@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2012-06-04 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120604.1104.006.html>

synthase, bAS)催化下合成各种以齐墩果烷为基本单位的三萜皂苷类化合物^[3],从而进入三萜皂苷代谢支流;但也可在环阿屯醇合酶(cycloartenol synthase, CAS)催化下环化生产环阿屯醇,而进入植物甾醇合成支流^[4]。因此,尽管CAS不是三萜皂苷生物合成途径中的关键酶,但它可与bAS竞争共同前体2,3-氧化鲨烯,间接影响三萜皂苷代谢支流。抑制CAS基因表达后,则可在减少植物甾醇合成的同时,使2,3-氧化鲨烯进入三萜皂苷代谢支流,从而显著提高三萜皂苷的量^[5]。这表明CAS既是植物甾醇合成的关键酶,也是调控三萜皂苷合成的重要调控点。

目前已经从20多种植物中克隆出编码CAS的cDNA序列^[6],但未见关于刺五加CAS的相关报道。本课题组在已克隆出刺五加法呢二磷酸合成酶、鲨烯合酶、鲨烯环氧酶、bAS 4个皂苷合成关键酶基因和可作为内参照基因的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因^[1]基础上,利用cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术首次克隆到刺五加CAS基因的cDNA全长序列,并对其在不同生长发育时期、不同器官中的表达进行了半定量RT-PCR分析,为研究该基因在刺五加皂苷合成中的作用机制和反义表达调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

刺五加采自河北省兴隆县雾灵山国家级自然保护区,经河北联合大学生命科学学院邢朝斌副教授鉴定为五加科植物刺五加 *Eleutherococcus senticosus* Harms。以清水冲洗杂质,滤纸吸干水分后的4~9月份采收的根和8月采收的幼茎、叶片、叶柄(编号为1~10)为刺五加总RNA提取材料。

TC-512 PCR仪(英国Technec公司);3K15台式高速冷冻离心机(德国Sigma公司);电子天平(上海亚荣仪器厂);IS2200凝胶成像系统(美国Alpha公司);JY1000C通用型电泳仪(北京市六一仪器厂);CHA-S型气浴摇床(金坛市精达仪器制造厂)。

植物RNA提取试剂盒,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,PGM-T克隆试剂盒,dCTP,dNTP, TOP-10感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit购自Fermentas公司;3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0, PrimeScript逆转录酶,TdT,RNase H, LA Taq DNA聚合酶购自Takara公司;IPTG, X-gal, 质粒提取

试剂盒购自北京拜尔迪生物技术有限公司;PCR产物纯化试剂盒,Taq DNA聚合酶购自Biomiga公司;其他试剂均为国产分析纯。引物委托上海生工生物工程有限公司合成,PAGE纯化。

1.2 刺五加总RNA的提取和CAS基因保守区的获得

按照植物RNA提取试剂盒说明书的要求,称取0.1 g刺五加根、幼茎、叶片和叶柄提取总RNA。

利用Dnaman 6.0软件分析人参(AB009029)、三七(EU342419)和积雪草(AY520819)CAS基因的核苷酸序列,在保守区域设计一对寡核苷酸简并引物。上游引物CASS-1: 5'-GG(G/A/T)GATTATGG(A/T/C)GGTCCTATG-3',下游引物CASX-1: 5'-TGACA(G/T)GA(A/G)AG(A/G)TAACCTCTCTC-C-3'。取总RNA 3 μL,以Oligo(dT)₁₈为引物,根据RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit的说明进行逆转录反应。以逆转录获得的cDNA为模板,使用CASS-1和CASX-1引物,PCR扩增刺五加CAS基因的保守片段。反应体系50 μL,其中上下游引物各2 μL,10×LA Taq缓冲液(含15 mmol/L MgCl₂) 5 μL,2.5 mmol/L dNTP 4 μL,模板cDNA 1 μL,LA Taq酶0.5 μL,补dd H₂O至50 μL。反应条件为:预变性94℃、3 min;变性94℃、30 s;退火56℃、30 s;延伸72℃、90 s。35个循环后72℃延伸10 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收纯化,克隆至PGM-T vector载体,转化大肠杆菌TOP10后提取重组质粒并送Invitrogen公司测序。

1.3 5'RACE技术获取刺五加CAS基因cDNA 5'末端序列

根据“1.2”项中所获得的刺五加CAS cDNA的保守片段,应用Primer Premier 5.0设计5'RACE特异性引物CAS52: 5'-TCTATTTCGTGATAAGGGACAG-3'和CAS51: 5'-GCTCCTTCGCCAAGCAACCTCA-3'。参照罗聪等^[7]的方法进行5'RACE扩增。取总RNA 3 μL,以AUP1为引物,逆转录合成cDNA第1链。逆转录产物用RNase H处理1 h后,纯化。纯化产物以50 μL体系进行TdT末端加尾,加尾2 h后,纯化获得加尾的cDNA。应用巢式PCR和降落PCR技术进行RACE扩增。第1轮PCR的引物为AP长和CAS52,第2轮PCR的引物为AP短和CAS51,利用LA Taq DNA聚合酶PCR扩增CAS基因5'末端cDNA序列。其他反应体系和反应条件与文献的方法相同。按“1.2”项中的方法进行回收、克隆,并测序。

1.4 3'RACE 技术获取刺五加 *CAS* 基因 cDNA 3' 末端序列

根据“1.2”项所获得的刺五加 *CAS* cDNA 的部分序列,应用 Primer Premier 5.0 设计 3'RACE 特异性外侧引物 CAS32: 5'-ATGCCAAGCGGCTGTATGAT-3'和内侧引物 CAS31: 5'-TTTGGTAGCTGCTGGGAGGA-3'。取 3 μ L 总 RNA,以 3'RACE Adaptor 为引物,参照 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 逆转录部分的说明进行逆转录反应。并利用引物 CAS32 和 CAS31 进行 2 轮巢式 PCR 反应,反应体系中模板量为 3 μ L,第 2 轮 PCR 的退火温度均为 56 $^{\circ}$ C,延伸均为 90 s,其他按照说明书进行。参照“1.2”项中的方法进行回收、克隆,并测序。

1.5 刺五加 *CAS* 基因全长的拼接与 PCR 验证

利用 Dnaman 6.0 软件将“1.2”项中获得的保守序列和“1.3”项中获得的 5'末端序列、“1.4”项中获得 3'末端序列进行拼接,获得刺五加 *CAS* 基因的全长 cDNA 序列。根据拼接的序列设计扩增刺五加 *CAS* 基因 cDNA 全长序列的上游引物 ECASAS: 5'-AGTCCAACGAGCAAAATACA-3'和下游引物 ECASAX: 5'-GCAATAGTGCCGATAAGGT-3'。以 1.2 中逆转录的 cDNA 为模板,PCR 扩增 *CAS* cDNA 的全长序列。PCR 反应体系为 25 μ L,其中引物 ECASAS 和 ECASAX 各 1 μ L,10 $\times$ LA *Taq* Buffer (含 15 mmol/L MgCl₂) 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,模板 cDNA 1 μ L,LA *Taq* 酶 0.3 μ L,补 dd H₂O 至 25 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C、5 min; 94 $^{\circ}$ C、1 min; 53 $^{\circ}$ C、30 s; 72 $^{\circ}$ C、3 min 20 s,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶后,参照“1.2”项中的方法回收、克隆,并测序。

1.6 刺五加 *CAS* 基因的生物信息学分析

通过 Dnaman 6.0 软件将刺五加 *CAS* 基因 cDNA 全长序列翻译成氨基酸序列;应用 Dnastar 5.0 软件确定开放阅读框(ORF);利用 ExPASy 的 ProtParam 预测蛋白质的基本理化性质;通过 PROSITE 进行蛋白质功能结构域分析;利用 PSORT 进行蛋白的亚细胞定位进行蛋白质二级结构分析;使用 MEGA 5.05 软件中的邻位相连法(Neighbor-Joining, NJ)法构建系统发育树。

1.7 刺五加 *CAS* 基因在不同生长发育时期及不同器官中的表达分析

利用 Primer Premier 5.0 软件,设计半定量 RT-PCR 扩增刺五加 *CAS* 基因的上游引物

RCASAS: 5'-TGTATGGGAAGAGGTTTGT-3'和下游引物 RCASAX: 5'-TCTATTTCGTGATAAGGGAC-3',预计扩增长度 88 bp;扩增刺五加 *GAPDH* 基因的上游引物 RGS: 5'-GCAAGGACTGGAGAGGTGGA-3'和下游引物 RGX: 5'-AGTGGGAAGGACA-3',预计扩增长度 134 bp。参照文献的方法^[8],以“1.2”项中逆转录的 1~10 号刺五加 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 25 μ L: 上下游引物(10 mmol/L)各 1 μ L,10 $\times$ 缓冲液(含 15 mmol/L MgCl₂) 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,模板 cDNA 1 μ L,*Taq* 酶 1 μ L,补 dd H₂O 至 25 μ L。PCR 条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C、5 min;变性 95 $^{\circ}$ C、30 s;退火 30 s,温度分别为 55 $^{\circ}$ C (*GAPDH*) 和 52 $^{\circ}$ C (*CAS*);延伸 72 $^{\circ}$ C、10 s。35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。将 5 μ L PCR 产物加样至 1.2% 琼脂糖凝胶样品孔中,在 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液中电泳鉴定 PCR 产物,紫外灯下照相,并进行光密度值和统计学分析。

2 结果与分析

2.1 刺五加 *CAS* 基因的克隆

利用简并引物 CASS-1 和 CASX-1 对刺五加的 cDNA 进行 PCR 扩增,获得一条约为 1 650 bp 的条带(图 1),测序得到 1 643 bp 的片段,经 NCBI 的 BLAST1 比对,确定该片段为刺五加 *CAS* 基因 cDNA 的部分片段。以 cDNA 的加尾产物为模板,利用引物对 AP 长-CAS52 和 AP 短-CAS51 进行巢式 PCR 和降落 PCR 技术相结合的 5'RACE 扩增,获得长 702 bp 的片段(图 1)。以 3'RACE Adaptor 引物逆转录的 cDNA 为模板,利用 3'RACE Outer

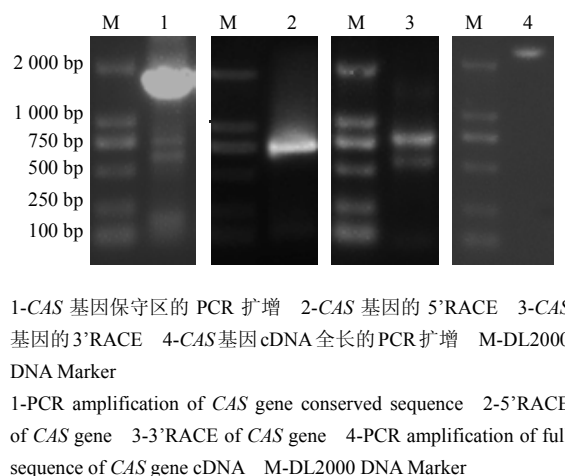


图 1 刺五加 *CAS* 基因的克隆

Fig. 1 Clone of *CAS* gene from *E. senticosus*

Primer-CAS32 和 3'RACE Inner Primer-CAS31 引物对, 应用 3'RACE 获得 758 bp 的片段 (图 1)。

应用 Dnaman 6.0 软件将所获得的 5'端、3'端 cDNA 序列和保守区段进行拼接, 应用 Dnastar 5.0 软件对该 cDNA 序列进行 ORF 分析, 发现该序列包含刺五加 CAS 基因的完整 ORF。以刺五加的 cDNA 为模板, 利用引物 ECASAS 和 ECASAX 扩增获得 2 709 bp 的一条带, 与预期大小相符。将该片段回收、克隆和测序后, 与 5'端、3'端 cDNA 序列和保守区段拼接获得的序列比对, 两者序列完全相同。

2.2 刺五加 CAS 基因的生物信息学分析

刺五加 CAS 基因全长 2 758 bp (GenBank 登录号: JQ400139), 其中 5'端非翻译区 (5'UTR) 长 130 bp, 3'端非翻译区 (3'UTR) 长 351 bp, 终止密码子为 TGA, ORF 长 2 277 bp, 编码 758 个氨基酸, 3'端具有 poly A 尾。预测的蛋白质相对分子质量为 85.991, 理论等电

点 (pI) 为 6.61。氨基酸序列与三七 *Panax notoginseng* (Burkill) Hoo et Tseng、人参 *P. ginseng* C. A. Meyer、积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 和高氏柴胡 *Bupleurum kanoi* Liu, Chaos et Chuang 的同源性分别达到 93.8%、91.1%、90.0% 和 85.1%。

通过 NCBI 的 BLAST 比对发现, 刺五加 CAS 蛋白与已知的蛋白质结构功能数据库中其他物种的 CAS 具有相似的结构功能域。刺五加 CAS 的 603~617 (DGSWYGSWGVCFYTG) 氨基酸残基处为三萜合成酶的标志性序列。通过 Tmhmm 软件分析得知, 刺五加 CAS 蛋白无跨膜区域, 全部存在于膜外, Psort 服务器的亚细胞定位分析表明, 刺五加的 CAS 定位于细胞质中。运用 Sopma 软件预测刺五加 CAS 蛋白的二级结构的结果表明, 该蛋白含有 320 个 α 螺旋, 占 42.22%; 87 个延伸链, 占 11.48%; 45 个 β 折叠, 占 5.94%; 306 个无规则蜷曲, 占 40.37% (图 2)。

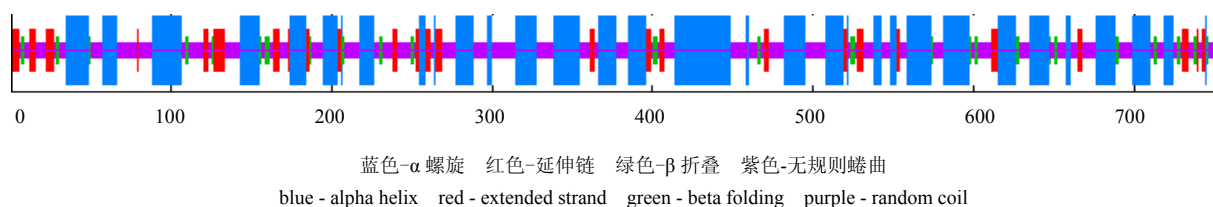


图 2 刺五加 CAS 蛋白二级结构的预测

Fig. 2 Predicted secondary structure for CAS protein from *E. senticosus*

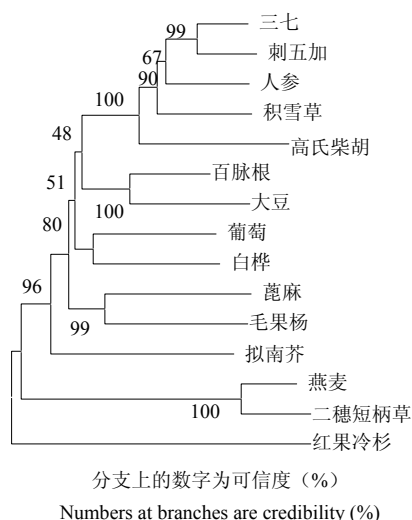
2.3 CAS 蛋白的分子系统进化分析

将刺五加 CAS 的编码蛋白与 GenBank 中登载的 14 种植物的 CAS 蛋白进行聚类分析, 构建 CAS 系统进化树, 结果如图 3 所示。刺五加与同为五加科的三

七亲缘关系最近, 首先聚为 1 支, 可信度 99%, 之后与五加科的人参和伞形科的积雪草聚在一起, 随后和其他双子叶植物聚为 1 个大的分支, 单子叶植物、裸子植物分别聚为 1 个分支, 这与传统的分类结果相一致。

2.4 不同生长发育时期 CAS 基因的表达分析

不同时间刺五加 CAS 基因的表达量变化如图 4 所示。自萌芽开始的整个生长期中, CAS 基因均有表达。在整个生长期中, CAS 的表达呈现低-高-低-高-低的变化趋势。其中萌芽期 (4 月) 的表达量最低, 至盛花期 (6 月) 时, CAS 的表达量显著提高 ($P < 0.05$), 进入第 1 个表达高峰, 达萌芽期的 1.45 倍。之后随着果实体积的增长 (7 月 26 日), 表达量降至盛花期的 85.01%。至果实基本成熟 (8 月) 时表达量又显著提高 ($P < 0.05$), 达到最大值, 为萌芽期的 1.56 倍。叶片大部分衰老时 (9 月), CAS 的表达量小幅回落, 但仍显著高于萌芽期的表达量, 而与叶片完全展开和盛花期的表达量相当。



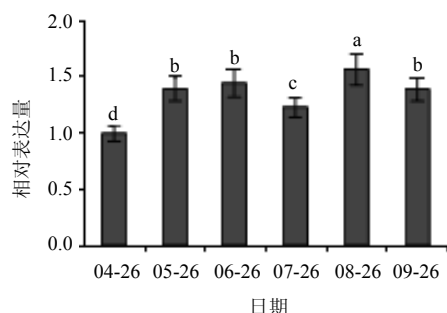
分支上的数字为可信度 (%)
Numbers at branches are credibility (%)

图 3 CAS 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of CAS protein

2.5 不同器官 CAS 基因的表达分析

刺五加 CAS 基因在叶片、叶柄、幼茎和根中的表达量具有显著差异 ($P < 0.05$), 见图 5。最大表达量出现在叶中, 为最低表达量(叶柄)的 1.37 倍, 根次之, 两者的表达量显著高于叶柄和幼茎中的表达量 ($P < 0.05$)。



不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 下同
Different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$), same as below

图 4 不同刺五加发育时期 CAS 基因表达量的变化

Fig. 4 Expression variations of CAS gene from *E. senticosus* during different growing periods

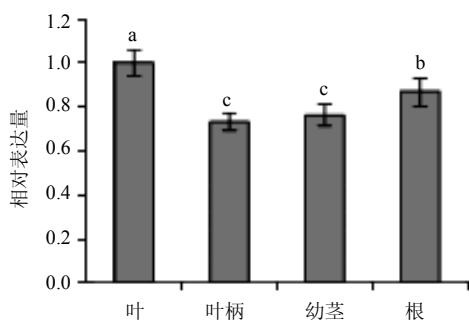


图 5 刺五加不同器官中 CAS 基因表达量的变化

Fig. 5 Expression variations of CAS gene in different organs from *E. senticosus*

3 讨论

本实验所克隆的刺五加 CAS 基因与三七、人参等五加科植物的 CAS 基因序列一致性在 90% 以上, 他们均属于鲨烯环化酶基因家族。序列和结构上的较高一致性说明植物 CAS 基因是一个比较保守的基因, 这可能是因为植物甾醇是生物膜的重要组分, 而 CAS 是植物甾醇生物合成途径中关键酶的缘故^[9]。目前已经从不同植物中分离得到了 5 种类型的鲨烯环化酶, 即达玛烷二醇合成酶 (dammarenediol synthase, DS)、bAS、羽扇豆醇合成酶 (lupeol synthase, LUS)、羊毛甾醇合成酶 (lanosterol synthase, LS) 和 CAS, 其中 CAS 主要催化甾醇和

类甾醇的合成^[10]。氨基酸序列同源性比较发现, CAS 类氨基酸序列的相似性达到 80% 以上, 所有 CAS 的氨基酸序列中都存在高度保守的 DCTAE 和 QW 区域^[11-12], 其中 DCTAE 与底物的结合有关, 将鲨烯合酶的 DDTAV 定点突变成 DCTAE 后, 导致该酶的底物由鲨烯变成 2, 3-氧化鲨烯^[11]; QW 为芳香族氨基酸区域, 在 CAS 中重复出现 4~8 次, QW 区域是负电性的, 在环化过程中与中间正离子相互作用, 这些重复序列可能与蛋白质结构的稳定性和功能相关^[12]。这些区域同样也存在于刺五加的 CAS 中。

CAS 被认为是引导类异戊二烯代谢途径流向甾醇和三萜化合物的关键所在^[4], 那么分析其表达量的变化就可探明甾醇合成对三萜类化合物的影响。相对定量的 RT-PCR 的分析结果表明, 刺五加的 CAS 在不同生长发育时期、叶、叶柄、幼茎和根等器官中均有表达, 这与盾叶薯蓣 CAS 的表达特点相似^[13], 具有组成型表达的特点。CAS 和 bAS 共同竞争底物 2, 3-氧化鲨烯, 使其进入不同的合成途径, 刺五加 CAS 在整个生长期中表达量增减幅度相对较小, 最大值仅为最小值的 1.56 倍, 而 bAS 表达量增减幅度较大, 最大值可达最小值的 7.51 倍^[8]。

目前刺五加 CAS 基因的研究尚未见报道。本实验首次克隆了刺五加的 CAS 基因 cDNA 全长序列, 生物信息学分析结果表明该基因具有鲨烯环化酶基因家族的典型特征, 并证实 CAS 基因在不同生长发育时期和不同器官中均有表达, 但表达量间存在显著差异。研究结果为分析 CAS 基因表达对刺五加皂苷含量的影响, 及对刺五加的 CAS 基因进行表达调控, 提高皂苷量奠定了基础。

参考文献

- [1] 邢朝斌, 吴 鹏, 陈 龙, 等. 刺五加 GAPDH 基因的克隆及序列分析 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 155-158.
- [2] 涂正伟, 周渭渭, 单 淇, 等. 刺五加的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [3] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 75: 31-49.
- [4] Kim O T, Kim M Y, Hwang S J, et al. Cloning and molecular analysis of cDNA encoding cycloartenol synthase from *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2005, 10(1): 16-22.
- [5] Liang Y L, Zhao S J, Zhang X. Antisense suppression of cycloartenol synthase results in elevated ginsenoside

- levels in *Panax ginseng* hairy roots [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27(3): 298-304.
- [6] 涂碧梦, 陈永勤, 杨之帆. 盾叶薯蓣环阿屯醇合酶全长基因的克隆与分析 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(1): 8-13.
- [7] 罗 聪, 何新华, 陈 虎, 等. 一种高效获取基因5'末端的 RACE 方法 [J]. 植物生理学报, 2011, 47(4): 409-414.
- [8] 邢朝斌, 龙月红, 吴 鹏, 等. 刺五加皂苷合成关键酶基因表达的半定量 RT-PCR 分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(6): 691-696.
- [9] Bradford P G, Awad A B. Phytosterols as anticancer compounds [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(2): 161-170.
- [10] 明乾良, 韩 婷, 黄 芳, 等. 人参皂苷生物合成途径及其相关酶的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1913-1917.
- [11] Dang T, Prestwich G D. Site-directed mutagenesis of squalene-hopene cyclase: altered substrate specificity and product distribution [J]. *Chem Biol*, 2000, 7(8): 643-649.
- [12] Poralla K, Hewelt A, Prestwich G D, *et al*. A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases [J]. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(4): 157-158.
- [13] 陈 迪, 陈永勤, 杨之帆, 等. 盾叶薯蓣环阿屯醇合酶基因克隆与表达 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(2): 221-228.

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

电子信箱: 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