

桑黄肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析

邹莉, 孙婷婷, 于洋, 李丹蕾, 张国权, 谭昀, 郭静
东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 对桑黄肌动蛋白(Actin)基因进行克隆及序列分析。**方法** 搜索网上已知数据库中 Actin 基因, 与本实验室测得的桑黄转录组数据进行生物信息学比对, 找到转录组数据中与 Actin 相似性最高的片段, 并根据其设计引物, 提取桑黄菌丝体总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 的方法扩增 Actin 基因片段并对 PCR 产物进行测序。**结果** 得到一段 839 bp 的序列, 序列分析表明, 该片段编码 279 个氨基酸, 与其他物种 Actin 基因核苷酸序列同源性在 87% 以上。**结论** 首次从桑黄中克隆出了 Actin 基因, 为有效利用该基因奠定了基础。

关键词: 桑黄; 肌动蛋白; 基因克隆; RT-PCR; 序列分析

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)09-1176-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.09.021

Cloning and sequence analysis of Actin gene fragment from *Phellinus baummi*

ZOU Li, SUN Ting-ting, YU Yang, LI Dan-lei, ZHANG Guo-quan, TAN Yun, GUO Jing
Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To clone and analyze the cDNA fragment encoding Actin gene of *Phellinus baummi*. **Methods** A pair of primers were designed based on the transcriptome data of *P. baummi* after comparing with Actin gene of other species. Taking total RNA from *P. baummi* as template, Actin gene fragment was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the PCR products were sequenced. **Results** The Actin gene fragment from *P. baummi* contained 839 bp, encoding 279 amino acids. The sequence analysis suggested that the nucleotide sequence shared over 87% of homology with Actin gene from other species. **Conclusion** It is first reported that a novel Actin gene is cloned from *P. baummi*. This work lays a base for the effective utilization of Actin gene.

Key words: *Phellinus baummi* Pilat; Actin; gene cloning; RT-PCR; sequence analysis

肌动蛋白(Actin)是真核生物中普遍存在的一种古老的蛋白质, 是构成细胞骨架的主要成分, 执行着重要的生理功能, 如参与细胞分裂、胞质环流、延长生长等^[1]。单体肌动蛋白为球蛋白, 一般由 375~377 个氨基酸残基组成, 相对分子质量约为 4.2×10^4 ^[2]。由于部分肌动蛋白基因表达量较高且稳定, 因此常被用作基因表达分析中的内参^[3]。迄今为止, 已有很多药用植物肌动蛋白基因被克隆和分析, 如霸王 *Zygophyllum xanthoxylum* Bunge^[4]、地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey.^[5]、党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.^[6] 和当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels^[7]等。然而有关药用真菌肌动蛋白基因的研究还鲜有报道。

桑黄为锈革孔菌科 Hymenochaetaceae、针层孔

菌属 *Phellinus* Quel. 中的鲍氏层孔菌 *Phellinus baummi* Pilat、裂蹄木层孔菌 *Phellinus linteus* (Berk. et Cart.) Teng、火木层孔菌 *Phellinus igniarius* (L.: Fr.) Quél. 的统称, 又称桑耳, 因通生长长在桑属植物上, 子实体颜色鲜黄而得名, 是多年生的珍稀药用真菌^[8]。我国古代就有桑黄药用价值的记载。《神农本草经》描述为“久服轻身不老延年”; 《中药大辞典》叙述可治内科多种疾病, 其子实体入药, 味微苦, 能利五脏宣肠气等; 《本草纲目》记载桑黄能治血崩、血淋、经闭等症。目前, 桑黄凭借其显著抑制肿瘤生长并能提高机体免疫能力的独特优势, 已成为国际公认的生物抗癌领域中有效率最高的一种药用真菌, 并迅速引起国内外医药界与保健行业的广泛关注, 具有十分广阔的研究与开发前景^[9-11],

收稿日期: 2013-01-11

基金项目: 黑龙江省博士后科研启动基金(LBH-Q11178)

作者简介: 邹莉(1966—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 主要从事资源微生物研究。Tel: (0451)82190384 E-mail: zouli6616@yahoo.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.1121.011.html>

但是从分子水平对其研究尚未见报道。鉴于此,本研究采用 RT-PCR 方法克隆到桑黄 Actin 基因片段,并进行了一系列序列分析,为研究其他重要功能基因在桑黄中的表达和调控机制奠定基础。

1 材料

1.1 菌株

桑黄采摘自大兴安岭,由东北林业大学林学院潘学仁教授、邹莉教授鉴定为鲍氏层孔菌 *Phellinus baummi* Pilat, 分离纯化后保存于东北林业大学森林保护实验室。

1.2 试剂

TRIZOL (Invitrogen, 美国)、cDNA 合成试剂盒 (TaKaRa, 大连)、Taq DNA Polymerase (TaKaRa, 大连)、DL2000 DNA marker (TaKaRa 公司, 大连), 其他生化试剂均为进口或国产分析纯产品。

2 方法

2.1 引物设计与合成

在 NCBI 上搜索相近物种 Actin 序列,与所测桑黄转录组数据进行 BLAST 比对,找到与 Actin 相似性最高的序列暂定为目的序列,根据目的序列利用 Primer 5.0 生物软件设计一对引物 P1、P2,用于扩增桑黄 Actin 基因片段,推测目的片段的长度为 800 bp。引物由哈尔滨博仕公司合成, P1: 5'-TGCTTACTGAGGCACCCTTGAAC-3'; P2: 5'-CAGACCGAGTATTTGCGTTCCG-3'。

2.2 菌种的活化与菌丝体培养

将保存在冰箱里的桑黄菌种用 PDA 培养基活化,放置于 25 °C 温箱里避光培养 7~9 d,待菌丝几乎长满平板还未出现老化时,转移到液体 PA 培

养基中, 120 r/min, 25 °C 避光振荡培养 5~7 d, 收集菌丝体,置于-70 °C 保存,备用。

2.3 总 RNA 的提取

将-70 °C 冷冻保藏的桑黄菌丝体取出,采用 Trizol 法提取总 RNA,按照试剂盒说明书进行。将提取到的总 RNA 在使用和保存之前进行检测,使用德国 Eppendorf 核酸检测仪,根据吸光度值鉴定所提 RNA 的纯度(若 A_{260}/A_{280} 的值在 1.8~2.0,则说明 RNA 无污染)及浓度;并根据测定出的 RNA 产量来计算下一步实验中合成 cDNA 第一链所需模板的用量。

2.4 RT-PCR 扩增

cDNA 第一链合成按照试剂盒说明书进行。PCR 反应体系:在 200 μ L PCR 管中依次加入下列组分: Sterilized ddH₂O 35.75 μ L、10 \times PCR 缓冲液 5 μ L、dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L、P1 (10 μ mol/L) 2 μ L、P2 (10 μ mol/L) 2 μ L、cDNA 1 μ L 和 Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.25 μ L,总体积为 50 μ L。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 40 s, 30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 结束,PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析系统 (Tanon 2500R) 检测,PCR 产物送去上海生工公司测序,结果命名为 PbACT。

2.5 序列的生物信息学分析

序列的处理、翻译使用序列处理在线工具包进行。用 BlastP 预测保守区和寻找相似性序列,选择与 PbACT 氨基酸序列相似性高的 11 种不同 Actin 氨基酸序列,基因来源见表 1,利用 ClustalW 软件对 11 个氨基酸序列进行多序列比对。

表 1 Actin 基因的来源

Table 1 Origins of Actin genes

基因名称	物种	基因登录号
AdACT	皱木耳 <i>Auricularia delicata</i>	EJD35981
AmACT	毒蝇鹅膏菌 <i>Amanita muscaria</i>	ABQ17974
LbACT	双色蜡蘑 <i>Laccaria bicolor</i>	XP_001884444
PiACT	卷缘桩菇 <i>Paxillus involutus</i>	AAT91242
TvACT	云芝 <i>Trametes versicolor</i>	EIW62276
DsACT	污叉丝孔菌 <i>Dichomitus squalens</i>	EJF55774
PcACT	黄孢原毛平革菌 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	BAC79388
SoACT	乌贼 <i>Sepia officinalis</i>	CCG28026
CgACT	长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	BAB84579
FcACT	中国角菊珊瑚 <i>Favites chinensis</i>	BAC44869
GtACT	隐藻 <i>Guillardia theta</i>	BAJ13478

3 结果与分析

3.1 总 RNA 的提取及检测

以桑黄菌丝体为材料提取的总 RNA，琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示。图中 5.8 s、18 s、28 s 3 条带都较清晰，且 28 s 的亮度大约是 18 s 的 2 倍，说明所提取的 RNA 完整性较好；经德国 Eppendorf 核酸蛋白检测仪测得 A_{280}/A_{260} 平均值为 1.96，表明 RNA 纯度较高，可以用于接下来的 RT-PCR 扩增。

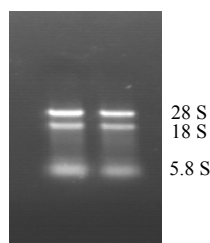


图 1 桑黄总 RNA 凝胶电泳图谱

Fig. 1 Gel electrophoresis of total RNA from *P. baummi*

3.2 RT-PCR 扩增

以总 RNA 反转录得到的 cDNA 第一链为模板，用所设计的引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。扩增产物经检测发现约在 800 bp 处有一条亮带（图 2），与推测的目的片段大小一致，可能是 Actin 基因片段，将 PCR 产物送去上海生工测序。

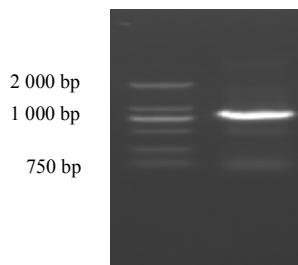


图 2 RT-PCR 产物凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

3.3 序列分析

PCR 产物经上海生工测序后，得到一段长度为 839 bp 的序列，编码 279 个氨基酸（图 3），通过 BlastP 进行保守区预测，属于 NBD_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily 家族，如图 4 所示。比对结果显示，该片段与其他物种的 Actin 基因核苷酸序列的同源性在 87% 以上，表明所克隆到的片段为 Actin 基因片段。将推测的桑黄的 Actin 基因的氨基酸序列片段和其他物种 Actin 基因的氨基酸序列进行多重比较（图 5），结果发现其保守氨基酸多达 225 个，而非保守氨基酸仅有 54 个。这表明克隆的片段为 Actin 基因的高度保守区域。

```

1  R A R K I P Y S D E A Q A K R G I L T L
1  CGGGCCAGAAAGATTCCCTTATAGTGATGAGGCTCAAGCCAAGCGCGGAATTCTTACACTC
21  K Y P I E H G I V A N W D D M E K I W H
61  AAGTATCCGATCGAGCACGGAATTGTCGCCAATTGGGATGATATGGAGAAGATCTGGCAT
41  H T F Y N E L R V A P E E H P V M L T E
121  CATACATTCTACAACGAGCTGCGCGTCGCACCGGAAGAGCATCCGGTGATGCTTACTGAG
61  A P L N P K M N R E K M T Q V M F E T F
181  GCACCCTTGAACCCGAAGATGAACAGAGAGAAGATGACTCAGGTCATGTTTCGAGACGTTC
81  N A P A F Y V Q V Q A V L S L Y A S G R
241  AATGCTCCGGCCTTTTACGTACAAGTCCAGGCTGTGCTTCTCTGTACGCATCCGGTCGC
101  T T G I V L D S G D G V S H T V P I Y E
301  ACCACTGGTATCGTTCTCGATTCCGGCGATGGCGTCTCTCATACGGTCCCAATTTACGAA
121  G F S L P H A I L R M D L A G R D L T D
361  GGTCTTCCCTTCCGCATGCGATTCTGCGTATGGACCTGGCGGGAAGAGATCTGACAGAT
141  Y M M K V L T E R G Y S F A T S A E R E
421  TACATGATGAAGGTATTGACTGAACGCGGTTACTCGTTCGCCACCTCCGCAGAACGTGAG
161  I V R D I K E R L C Y V A L D F G Q E L
481  ATTGTGCGTGACATAAAGGAAAGGCTCTGCTATGTGCGATTAGACTTTGGGCAGGAGCTA
181  E T A A R S S Q L E K S Y E L P D G Q V
541  GAGACTGCTGCGGTTCTTCGCAGCTCGAGAAGAGTTACGAGTTGCCGATGGACAAGTT
201  I T I G N E R F R T P E A L F Q P S F L
601  ATCACTATCGGTAACGAGCGTTCCGTACTCCTGAAGCCCTGTTCCAGCCATCCTTCCTC
221  G R E A A G I H E T T Y N S I Y K C D L
661  GGTCCGAGGCAGCGGTATTCATGAGACAACATACTCGATCTACAAGTGCGACCTC
241  D I R R D L Y S N I V L S G G T T M F P
721  GACATCCGTGCGGACCTTACAGCAATATCGTGCTCTCCGGTGGCACCACAATGTTCCCC
261  G I A D R M Q K E L T A L A P S S M K
781  GGCATCGCCGACCGGATGCAGAAGGAACCTCACTGCACTGGCGCCGAGCTCGATGAAAGT
    
```

图 3 桑黄 Actin 基因片段的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleic acid and deduced amino acid sequences of Actin gene fragment from *P. baummi*

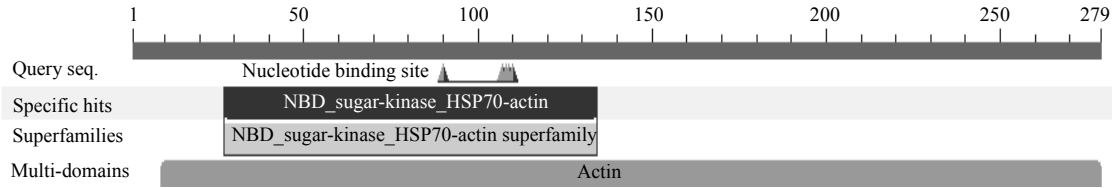


图 4 桑黄 Actin 保守区结构域

Fig. 4 Conserved domains of Actin from *P. baummi*

AdACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGILTLKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT	
AmACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGILTLKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT	
LbACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGILTLKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT	
PiACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGILTLKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT	
TvACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGVLT	LKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT
DsACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGVLT	LKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT
PcACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGILTLKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT	
SoACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGILTLKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT	
CgACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGILTLKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT	
FcACT	----	DSYVGD	EAQSKRGILTLKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT
GtACT	MGQKDSYVGD	EAQSKRGILTLKYP	IEHGIVINWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	LT	
PbACT	RARKIPYS-	DEAQA	KRGILTLKYP	IEHGIVANWDDMEKI	WHHTFYNELRV	APEEHPV	MLT
AdACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VTHVPIY		120
AmACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VTHVPIY		120
LbACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VTHVPIY		120
PiACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VTHVPIY		120
TvACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VTHVPIY		120
DsACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VTHVPIY		120
PcACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VTHVPIY		120
SpACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VTHVPIY		120
CgACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VTHVPIY		120
FcACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VSHVPIY		116
GtACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VSHVPIY		120
PbACT	EAPLNPKANREK	MTQMFETFNAPAFYVAIQAVLSLY	ASGR	TTGIVLDSGDG	VSHVPIY		120
AdACT	EGFALPHAILRDL	LAGRDLTDYLIKIL	MERGYPFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
AmACT	EGFALPHAILRDL	LAGRDLTDYLIKIL	MERGYPFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
LbACT	EGFALPHAILRDL	LAGRDLTDYLIKIL	MERGYPFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
PiACT	EGFALPHAILRDL	LAGRDLTEYLIKIL	MERGYAFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
TvACT	EGFSLPHAILRDL	LAGRDLTEFLIKIL	MERGYPFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
DsACT	EGFSLPHAILRDL	LAGRDLTEFLIKIL	MERGYPFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
PcACT	EGFALPHAILRDL	LAGRDLTDLVKIL	MERGYPFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
SoACT	EGYALPHAILRDL	LAGRDLTDYLMKIL	TERGYSFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
CgACT	EGYALPHAILRDL	LAGRDLTDYLMKIL	TERGYSFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
FcACT	EGYALPHAILRDL	LAGRDLTDYLMKIL	TERGYSFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		176
GtACT	EGYALPHAILRDL	LAGRDLTDYMMKIL	TERGYSFTT	AEREIVRDIKEKLCYV	ALDFEQE		180
PbACT	EGFSLPHAILRDL	LAGRDLTDYMMKIL	TERGYSFATS	AEREIVRDIKERLCYV	ALDFEQE		180
AdACT	MQTA	AQSSALEKSYELPDGQVITIGNERFRAPEALFOPAF	FLGLEAAGIHETTYNSIFKCD				240
AmACT	LQTA	AQSSALEKSYELPDGQVITIGNERFRAPEALFOPAF	FLGLEAAGIHETTYNSIFKCD				240
LbACT	LQTA	AQSSALEKSYELPDGQVITIGNERFRAPEALFOPAF	FLGLEAAGIHETTYNSIFKCD				240
PiACT	LQTA	AHSSALEKSYELPDGQVITIGNERFRAPEALFOPAF	FLGLEAAGIHETTYNSIFKCD				240
TvACT	LQTA	AHSSALEKSYELPDGQVITIGNERFRAPEALFOPAF	FLGLEAAGIHETTYNSIFKCD				240
DsACT	LQTA	AHSSALEKSYELPDGQVITIGNERFRAPEALFOPAF	FLGLEAAGIHETTYNSIFKCD				240
PcACT	LQTA	AHSSALEKSYELPDGQVITIGNERFRAPEALFOPAF	FLGLEAAGIHETTYNSIFKCD				240
SoACT	MATA	ASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPESLFOPAF	FLGMESAGIHETTYNSIMKCD				240
CgACT	MATA	ASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPESLFOPAF	FLGMESAGIHETTYNSIMKCD				240
FcACT	MQTA	AASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFOPAF	FLGMESAGIHETTYNSIMKCD				236
GrACT	MQTA	AQSSSIEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEVLFOPAF	FLGLESAGIHETTYNSIMKCD				240
PbACT	LETA	ARSSQLEKSYELPDGQVITIGNERFRTPALFOPAF	FLGREAAGIHETTYNSIFKCD				239
AdCT	LDIRRDLYGNV	WLSGGTTMIFGIADRMOKELTSLSPSSVK					280
AmACT	LDIRRDLYGNV	WLSGGTTMIFGIADRMOKELTSLSPSSVK					280
LbACT	LDIRRDLYGNV	WLSGGTTMIFGISDRMOKELTSLSPSSVK					280
PiACT	LDIRRDLYGNV	WLSGGTTMIFGIADRMOKELTSLSPSSVK					280

图 5 桑黄 Actin 氨基酸序列与其他物种 Actin 氨基酸序列多重比较

Fig. 5 Multiple comparison on amino acid sequences of Actin from *P. baummi* and other species

4 讨论

随着高等植物肌动蛋白及其基因的深入研究和资料积累,为药用真菌肌动蛋白的研究提供了理论基础和实践经验。研究表明,Actin 基因不论在核苷酸还是氨基酸水平上都具有高度的保守性和同源性,这暗示了 Actin 作为看家基因在生命活动过程中起着非常重要的作用^[6]。本实验中桑黄 Actin 基因片段序列与其他物种 Actin 序列相似性高达 87%以上,也证实了 Actin 是高度保守的看家基因这一点。桑黄作为一种重要的药用真菌,近年来,关于其研究主要集中在多糖的提取^[12-14]和发酵工艺^[15-17]上,而桑黄相关功能基因的研究目前仍是空白。关于功能基因的研究往往需要内标参照,Actin 基因由于其表达比较稳定,常作为生物重要的内标基因^[18]。但是在网上各大数据库中均未能搜索到有关桑黄的肌动蛋白基因序列,因此本研究结果填补了这方面的空白,为研究其他功能基因的表达和调控机制奠定基础。

参考文献

- [1] Staiger C J, Schliwa M. Actin localization and function in higher plants [J]. *Protoplasm*, 1987, 141: 1-12.
- [2] 胡松年, 阎隆飞. 肌动蛋白与真核生物的进化 [J]. *动物学报*, 1999, 45(4): 440-447.
- [3] Thomas C, Meyer D, Wollf M, et al. Molecular characterization and spatial expression of the sun-flower ABP1 gene [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 1025-1036.
- [4] 伍国强, 席杰军, 包爱科, 等. 多浆旱生植物霸王 Actin 基因片段的克隆及序列分析 [J]. *生物技术通报*, 2008(2): 101-104.
- [5] 孙 鹏, 郭玉海, 祁 建, 等. 地黄肌动蛋白基因片段的克隆与序列分析 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(20): 8470-8471.
- [6] 吴永娜, 李 剑, 许 瑞, 等. 党参肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2518-2522.
- [7] 吴永娜, 胡 静, 王引权, 等. 当归肌动蛋白基因片段的克隆及序列分析 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2485-2489.
- [8] 潘学仁, 邹 利, 户岩岩, 等. 东亚地区“桑黄”物种问题讨论 [J]. *中国食用菌*, 2008(1): 63-64.
- [9] Bae J S, Jang K H, Yim H, et al. Inhibitory effects of polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* on benzo (a) pyrene-in-duced forestomach carcinogenesis in mice [J]. *World J Gastroen-terol*, 2005, 11(4): 577.
- [10] Han S B, Lee C W, Kang J S, et al. Acidic polysaccharide from *Phellinus linteus* inhibits melanoma a cell metastasis by blocking cell adhesion and invasion [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(4): 697.
- [11] 吕英华, 王建芳, 李玉平, 等. 药用真菌桑黄的研究进展 [J]. *蚕业科学*, 2009, 35(1): 204.
- [12] 谢丽源, 张 勇, 郭 勇, 等. 桑黄菌丝体多糖的分离纯化及理化性质分析 [J]. *食品科学*, 2011, 32(5): 143-147.
- [13] 游庆红, 尹秀莲. 响应面法优化桑黄多糖提取工艺研究 [J]. *中国酿造*, 2010(5): 67-69.
- [14] 窦茜茜, 丁建新, 张东娜, 等. 桑黄多糖提取工艺研究 [J]. *解放军药学学报*, 2007, 23(6): 423-425.
- [15] 傅海庆, 周 阳, 傅华英, 等. 药用真菌桑黄的液体发酵培养基的配方优化筛选研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2012, 34(5): 1039-1042.
- [16] 丁兴红, 温成平, 丁志山, 等. 桑黄液体发酵生产多糖工艺研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(5): 906-909.
- [17] 张文隽, 吴亚召, 雷 萍, 等. 桦树桑黄液体发酵培养基优化研究 [J]. *中国食用菌*, 2010, 29(6): 24-25.
- [18] Clément T, Denise M, Michel W, et al. Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 gene [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 1025-1036.