

芍药肌动蛋白基因组 DNA 的克隆及分析

范丙友^{1*}, 张文婷¹, 徐杰¹, 骞光耀¹, 高水平², 郭丽丽¹, 侯小改¹

1. 河南科技大学农学院 河南省高校牡丹工程技术中心, 河南 洛阳 471003

2. 河南科技大学林学院, 河南 洛阳 471003

摘要: 目的 克隆芍药 *Paeonia lactiflora* 肌动蛋白 (*Actin*) 基因组 DNA 序列并解析基因结构, 分析 *Actin* 基因在芍药不同组织中的表达情况。方法 根据本课题组报道的芍药 *Actin* 基因 cDNA 序列 (JX310002) 设计特异性引物, 以芍药栽培品种“桃花飞雪”总 DNA 为模板, 用 KOD-Plus 高保真 DNA 聚合酶扩增芍药 *Actin* 基因组基因, 克隆 PCR 产物并进行测序。应用生物信息学软件预测芍药 *Actin* 基因的外显子及内含子, 基于 Blastn 程序分析芍药 *Actin* 基因在核苷酸水平上的同源性, 应用 MEGA5.0 软件构建分子系统进化树; 设计跨越内含子的半定量 RT-PCR 扩增引物, 分析芍药 *Actin* 基因在芍药根、茎、叶、花中的表达情况。结果 测序结果表明芍药 *Actin* 基因组 DNA 序列全长 1 405 bp, 含 4 个外显子和 3 个内含子, 3 个内含子中共 6 个剪接位点均遵循高等真核生物 5'端供位 GU 与 3'端受体 AG 模式; 共编码 377 个氨基酸, GenBank 登录号为 KF363830。设计了一对半定量 RT-PCR 扩增引物, 其中上游引物跨越了芍药 *Actin* 基因的第 1 个内含子, 可有效防止由 DNA 污染而造成 RT-PCR 扩增的假阳性; 半定量 RT-PCR 分析结果表明 *Actin* 基因在芍药根、茎、叶、花等不同组织中的表达量保持恒定。结论 首次克隆了芍药 *Actin* 基因组 DNA 序列并明确了其基因结构, 半定量 RT-PCR 分析结果表明 *Actin* 基因可以作为芍药功能基因表达分析的内标基因。

关键词: 芍药; 肌动蛋白; 基因组 DNA; 克隆; 基因结构; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)14-2069-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.021

Cloning and analysis of *Actin* from *Paeonia lactiflora*

FAN Bing-you¹, ZHANG Wen-ting¹, XU Jie¹, QIAN Guang-yao¹, GAO Shui-ping², GUO Li-li¹, HOU Xiao-gai¹

1. University Engineering Technology Research Center of Tree Peony of Henan Province, College of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

2. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

Abstract: Objective Genomic gene encoding *Actin* in *Paeonia lactiflora* was cloned in order to clarify the gene organization and its expression levels in different tissues in herbaceous peony. **Methods** Based on cDNA sequences of *Actin* genes isolated from *P. lactiflora* reported by our laboratory, one pair of PCR primers was designed. PCR products of *Actin* genomic gene were successfully amplified with total genomic DNA extracted from herbaceous peony cv. “Taohuafeixue” as template by high-fidelity DNA polymerase KOD-Plus, and then they were cloned to pMD18-T vector and be sequenced. The exons and introns of *Actin* gene were predicted with bioinformatic softwares. The homology was analyzed by Blastn at the nucleotide level and the molecular phylogenetic tree was constructed with MEGA5.0 software. Based on sequencing results, one pair of PCR primers was designed, and the expression levels of *Actin* gene in the roots, stems, flowers, and leaves in herbaceous peony were semi-quantified. **Results** The sequencing results showed that *Actin* gene of herbaceous peony was 1 405 bp length, which contained four exons and three introns. All the splicing sites in three introns were conservative at 5' donor with GU and 3' receptor with AG. It encoded 377 amino acids, and GenBank accession number was KF363830. A pair of PCR primers was designed and one of them was spanned the first intron, which could effectively prevent the false positive by genomic DNA contamination. The semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the expression levels of *Actin* gene in the roots, stems, leaves, and flowers of herbaceous peony were almost constant. **Conclusion** It is the first report on cloning and gene organization clarification of genomic gene encoding *Actin* in *P. lactiflora*. The semi-quantitative analyses indicate that *Actin* gene can be used as the internal standard gene for the expression analysis of the functional genes in herbaceous peony.

Key words: *Paeonia lactiflora* Pall.; *Actin*; genomic DNA; cloning; gene organization; expression analysis

收稿日期: 2014-03-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1204323); 河南省科技厅国际合作项目 (134300510052)

*通信作者 范丙友 (1974—), 男, 教授。E-mail: fanbingyou2005@163.com

芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 为芍药科芍药属芍药组多年生宿根草本植物, 除具观赏价值外, 芍药还有重要的药用价值, 是我国传统常用中药材^[1]。根据加工方式的差别, 可将其分为赤芍和白芍, 赤芍 *Paeoniae Rubra Radix* 为芍药或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根, 白芍 *Paeoniae Alba Radix* 为芍药栽培品种去皮水煮后的干燥根^[2]。二者均含有芍药苷 (paeoniflorin)、芍药内酯苷 (albiflorin)、羟基芍药苷 (oxypaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷 (benzoylpaeoniflorin) 等双环单萜类蒾烯型化合物^[3]。芍药苷是赤芍和白芍中具药用价值的主要药效成分, 也是其质量指标成分^[2], 具有免疫调节、镇痛、镇静、解痉、保肝、扩张血管和抗炎等作用^[4]。芍药苷在芍药各部位分布差异明显, 在芍药根中富含芍药苷^[5], 根或根茎是《中国药典》2010 年版中规定的能够加工为赤芍或白芍的原料^[2]。研究表明芍药苷在芍药新鲜的叶和茎中已经存在, 推测芍药苷在叶中就已合成, 之后经茎运向根部^[5]。对芍药苷的量与采收时期及采收部位关系的研究已较为深入^[5-6], 但由于芍药背景复杂, 兼之其基础研究较为薄弱, 芍药苷的生物合成及其分子调控机制还知之甚少, 亟需应用现代分子生物学手段探明其机制。

肌动蛋白 (Actin) 是真核生物细胞中普遍存在的一种重要的蛋白质, 构成细胞骨架中的微丝系统, 参与真核生物细胞的许多重要的生命活动^[7]。迄今为止, 已相继从百合^[8]、桑树^[9]、刺五加^[10]、芍药^[11] 等高等植物中克隆出 *Actin* cDNA。Actin 表达量大且基本恒定, 因此在功能基因的表达分析时常作为内标基因, 已应用于茶树^[12]、黄瓜^[13]、猕猴桃^[14]、普通菜豆^[15] 等多种高等植物功能基因的表达分析研究中。尽管本课题组已经克隆了芍药 *Actin* cDNA, 但芍药 *Actin* 基因结构仍然未知, 无法设计出跨越内含子的半定量 RT-PCR 扩增引物, 从而避免由 DNA 污染而造成的 RT-PCR 扩增假阳性^[16-17]。鉴于此, 本研究克隆了芍药 *Actin* 基因组 DNA 序列并分析了基因结构, 设计了一对 RT-PCR 扩增引物, 其中上游引物跨越了芍药肌动蛋白第 1 个内含子序列, 对 *Actin* 基因在芍药不同组织中的表达进行了半定量分析, 评价了其作为内标基因的可行性, 从而为下一步研究芍药重要功能基因的表达奠定了基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

芍药栽培品种“桃花飞雪”根、茎、叶、花等

新鲜样品采自洛阳市土桥花木种苗有限公司, 由卫志鹏业务经理进行品种鉴定, 清洗后液氮保存带回实验室, 立即置于 -80°C 冰箱备用; 大肠杆菌 DH5 α 菌株由本实验室提供。

1.2 试剂

高保真 KOD-Plus DNA 聚合酶购自日本 TOYOBO 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、克隆载体 pMD18-T、质粒提取试剂盒、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 其余试剂均为进口或国产分析纯。

2 方法

2.1 芍药总 DNA 提取

采用改良 CTAB 法提取芍药根基因组总 DNA^[18], 将总 DNA 质量浓度调至 50 ng/ μL 。

2.2 引物合成

基于本实验室克隆的芍药肌动蛋白 cDNA 序列 (JX310002), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异性 PCR 扩增引物 5'-CGCGGATCCATGGCCGATGCTGAGGATATCC-3' 和 5'-CCCAAGCTTTTAAAA-GCACTTCCTGTGGACA-3', 上下游引物分别插入了 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 用于对克隆的阳性重组子进行双酶切鉴定, 引物序列由北京华大基因研究中心合成。

2.3 芍药 *Actin* 基因的 PCR 扩增

50 μL PCR 扩增体系中含 5 μL 10 \times 缓冲液、5 μL 2.0 mmol/L each dNTP、4 μL 25 mmol/L MgCl_2 、1.5 μL 10 pmol/ μL 上下游引物、2.5 μL DNA、1 μL KOD-Plus DNA 聚合酶、29.5 μL ddH $_2\text{O}$ 。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环。

2.4 芍药 *Actin* 基因 PCR 产物的回收、克隆

用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收芍药 *Actin* 基因 PCR 产物, 在对其 3' 末端加 A^[19] 后与克隆载体 pMD 18-T 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 过夜培养后进行菌落 PCR 初筛, 质粒 PCR 筛选和 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切进一步鉴定, 将阳性重组子送至北京华大基因研究中心测序。

2.5 芍药 *Actin* 基因结构分析

应用在线的 Augustus 软件^[20] (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) 对芍药 *Actin* 基因的外显子和内含子进行初步预测; 应用在线的 Blastn 双序列比对软件对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对芍药 *Actin* cDNA 序列 (JX310002) 和基因组 DNA 序列

(KF363830)进行双序列比对,人工分析剪接位点供位、受位与识别序列等信息,分析芍药 *Actin* 的基因结构。

2.6 序列同源性分析及分子进化树构建

利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)Blastn 程序在核苷酸水平上对芍药肌动蛋白进行序列同源性分析;使用 MEGA 5.0 软件构建分子系统进化树。

2.7 半定量 RT-PCR 表达分析

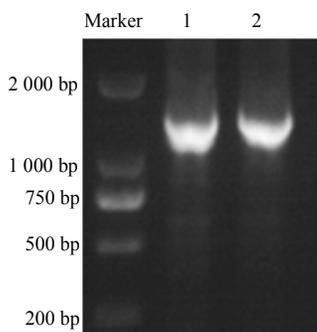
基于克隆的芍药肌动蛋白基因组 DNA 序列 (KF363830),设计一对特异性 PCR 扩增引物 5'-GGAATGGTCAAGGCTGGTTT-3'及 5'-TTCTC-TGTTGGCTTTGGGGT-3'用于半定量 RT-PCR 分析,其中上游引物跨越了芍药 *Actin* 基因的第 1 个内含子,引物序列由北京华大基因研究中心合成。

分别提取芍药“桃花飞雪”根、茎、叶、花等不同组织总 RNA^[21],以等量的 RNA 反转录为 cDNA,取等量 cDNA 进行半定量 RT-PCR 扩增。PCR 反应体系及 PCR 扩增程序参照本实验室的方法进行^[11]。

3 结果与分析

3.1 芍药 *Actin* 基因的 PCR 扩增

以芍药“桃花飞雪”芍药基因组总 DNA 为模板,成功扩增出了大小约 1 400 bp 的 PCR 产物(图 1)。



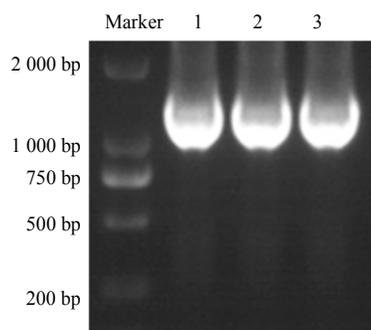
1, 2-*Actin* 基因 PCR 产物
1, 2-PCR products of *Actin* gene

图 1 芍药 *Actin* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products of *Actin* gene of *P. lactiflora*

3.2 芍药 *Actin* 基因克隆

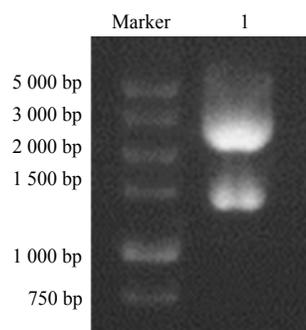
PCR 产物经纯化回收、加 A 后与克隆载体 pMD18-T 连接,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,菌落 PCR 初筛;挑取阳性重组子进行过夜培养,用 Takara 公司的小提质粒试剂盒提取质粒,质粒 PCR 鉴定结果表明扩增产物与预测大小相同(图 2), *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定结果表明酶切片段大小与预期结果一致(图 3),表明克隆成功,将鉴定的阳性重组子质粒送至北京华大基因研究中心进行测序。



1~3-质粒 PCR 产物
1~3-plasmid PCR products

图 2 质粒 PCR 鉴定重组子

Fig. 2 Characterization of recombinants by plasmid PCR



1-*Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切产物
1-Double digestion products by *Bam*H I and *Hind* III

图 3 双酶切鉴定重组子

Fig. 3 Characterization of recombinant by double enzyme digestion

3.3 芍药 *Actin* 基因结构分析

结果表明芍药 *Actin* 基因组 DNA 全长 1 405 bp, Augustus 在线分析及 Blastn 双序列分析结果表明芍药 *Actin* 基因共含 4 个外显子和 3 个内含子;4 个外显子的核苷酸序列与本实验分离的芍药 *Actin* cDNA 序列(JX310002)完全一致;3 个内含子中每个供位与受位共 6 个剪接位点均遵循高等真核生物 5'端供位 GU 与 3'端受位 AG 模式^[22];4 个外显子区域为 1~60、172~565、650~1 263 和 1 340~1 405,3 个内含子区域为 61~171、566~649 和 1 264~1 339;共编码 377 个氨基酸(图 4),GenBank 登录号为 KF363830。

3.4 同源性分析

Blastn 分析结果表明芍药 *Actin* 基因组 DNA 序列(KF363830)与多种高等植物的 *Actin* 基因具有很高的同源性,其中与“红艳争辉”芍药的 *Actin* 基

ATGCCGATGCTGAGGATATCCAGCCCCTTGCTGTGACAATGGAACGGTCAAGGtttagtccaatattcttttaaaattgtct	90
M A D A E D I Q P L V C D N G T G M V K	20
gtcttgattttttgttttttttgggtgcaagtacttcagttattatcaatggaactaaagcaatggctctgtattttgtagGCTGGTTTT	180
A G F	23
GCTGGTATGATGCTCCAGAGCAGTGTCCCCAGTATTGTTGGTGCAGCCAGACACTGGAGTCATGGTTGGAATGGCCAAAAGGAT	270
A G D D A P R A V F P S I V G R P R H T G V M V G M G Q K D	53
GCCTATGTAGTGATGAAGCACAATCAAAAAGAGGTATTCTTACCTTGAATATCCTATTGAGCATGGTATAGTCAGCAACTGGGATGAC	360
A Y V G D E A Q S K R G I L T L K Y P I E H G I V S N W D D	83
ATGGAAAAGATCTGGCATCATACGTTCTACAATGAGCTTCGTGTTGCTCCTGAAGAGCACCCAGTGCCTCACAGAGGCACCCCTAAC	450
M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N	113
CCCAAAGCAACAGAAAAGATGACTCAGATCATGTTTGAGACCTTCAATGTGCCTGCAATGTACGTTGCCATCCAGGCCGTGTCT	540
P K A N R E K M T Q I M F E T F N V P A M Y V A I Q A V L S	143
CTATATGCCAGTGGTCGTACAACGttctgtatatttcccatatattatctaaaatttgataccccattttattattctgtttgagact	630
L Y A S G R T T	151
gattgaattattttgacagGTATTGTGCTGGATTCTGGTGTGGTGTGAGTCACACTGTACCTATCTATGAAGGTTATGCCCTTCTCAC	720
G I V L D S G D G V S H T V P I Y E G Y A L P H	175
GCTATCTCCGCTTGTGACCTTGCTGGTGTGATCTCAGAGTTCCTTGTGAAGATCTTGACTGAAAGAGGTTACATGTTACCACCACT	810
A I L R L D L A G R D L T D S L M K I L T E R G Y M F T T T	205
GCTGAACGGGAAATGTCGCTGACATGAAGGAGAAGCTAGCATACTGTCCTGATTACGAGCAGGAAGTGGAGACTTCCAAAAGCAGC	900
A E R E I V R D M K E K L A Y V A L D Y E Q E L E T S K S S	235
TCATCGTTGAGAAGAATAACGAATGCTGATGGACAAGTCATTACCATCGGAGTGAGAGATTCGCTGCCAGAAGTCCTGTCCAG	990
S S V E K N Y E L P D G Q V I T I G A E R F R C P E V L F Q	265
CCATCACTAATCGGAATGGAAGCTGCTGGAATTCACGAGACTACTACAATTCATCATGAAGTGTGATGTGGATATCAGAAAAGGATTA	1080
P S L I G M E A A G I H E T T Y N S I M K C D V D I R K D L	295
TATGGAACATTGTTCTCAGTGGTGGATCGACTATGTTCCCTGGTATTGCAGACAGAATGAGCAAGGAAATCACTGCTTGTGCCAGC	1170
Y G N I V L S G G S T M F P G I A D R M S K E I T A L A P S	325
AGCATGAAGATTAAGTTGTGACCCGCTGAGAGAAAATACAGTGTCTGGATTGGAGGGTCTATTCTTCTCCCTCAGTACCTCCAG	1260
S M K I K V V A P P E R K Y S V W I G G S I L A S L S T F Q	355
CAGgtgaacattactttcattttttctcttggtttttttactcattttctgacatggttttttgttaccttcagATGTGGATTTC	1350
Q	360
CAAGGGTGAATACGATGAATCTGGTCCATCCATTGTCCACAGGAAGTGTCTTTTAA	1405
M W I S	377
K G E Y D E S G P S I V H R K C F *	377

图 4 芍药 *Actin* 基因结构及编码的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequences of *Actin* gene and its encoded amino acids in *P. lactiflora*

因 (JN225878) 同源性高达 99%，二者外显子核苷酸序列仅有 3 个碱基的差异，但后者仅含有 2 个内含子，而缺失了长度为 111 bp 的第 1 个内含子；与来自拟南芥、桑、毛果杨、大豆、葡萄及棉属多种植物的 *Actin* 相似性达 83% 以上，表明高等植物的 *Actin* 在 DNA 水平上具有较高的保守性。应用 MEGA5.0 软件对同源性较高的近缘植物的肌动蛋白跨越起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 的编码区进行多序列比对并构建分子系统进化树 (图 5)，结果表明“桃花飞雪”芍药 *Actin* 基因与“红艳争辉”芍药 *Actin* 基因 (JN225878) 亲缘关系最近，与桑 (*Morus alba* L., HM623866)、葡萄 (*Vitis vinifera* L., AM465189)、大豆 [*Glycine max* (L.) Merrill, V00450] *Actin* 基因具有相对较近的亲缘关系，与毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray, EF418792)、小果白刺 (*Nitraria sibirica* Pall., AB636284)、拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, ATU41998、ATU42007] *Actin* 基因组成的小进化群体亲缘关系较远，但是由棉属多个物种包括黄褐棉 (*Gossypium mustelinum* Miers ex Watt, JF722026、JF722027)、

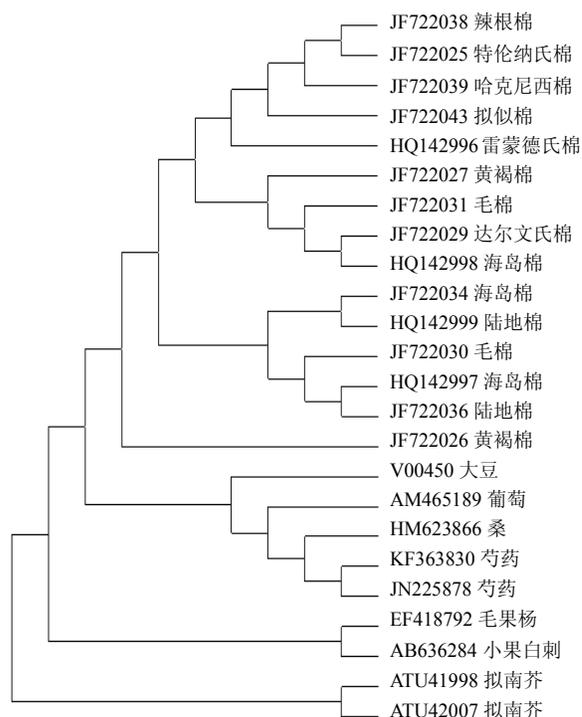


图 5 *Actin* 基因的分子系统进化树

Fig. 5 Molecular phylogenetic tree of *Actin* gene

陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L., JF722036、HQ142999)、海岛棉 (*Gossypium darwinii* Watt, JF722029)、雷蒙德氏棉 (*Gossypium raimondii* Ulbrich, HQ142996)、拟似棉 (*Gossypium barbadense* L., JF722034、HQ142997、HQ142998)、毛棉 (*Gossypium tomentosum* Nuttall ex Seemann, JF722030、JF722031)、达尔文氏棉 [*Gossypium gossypoides* (Ulbrich) Standley, JF722043]、哈克尼西棉 [*Gossypium harknessii* Brandegee, JF722039]、辣根棉 [*Gossypium armourianum* Kearns, JF722038] 的 *Actin* 基因都相对集中地分布在小进化群中, 说明棉属植物 *Actin* 基因之间的进化可能只是在少数核苷酸产生了突变。由于生理功能的重要性, *Actin* 在自然选择过程中承受着巨大选择压力, 因而核苷酸序列表现出高度保守^[8]。

3.5 半定量 RT-PCR 分析

基于克隆的芍药肌动蛋白基因组 DNA 序列 (KF363830) 设计了一对半定量 RT-PCR 扩增引物, PCR 扩增产物大小约为 309 个碱基; 其中上游引物跨越了第 1 个内含子, 可以有效防止由 DNA 污染而造成的 RT-PCR 扩增结果的假阳性。半定量 RT-PCR 分析表明, *Actin* 基因在芍药根、茎、叶、花中的表达量一致 (图 6); 因此 *Actin* 基因能够作为芍药功能基因半定量 RT-PCR 或荧光定量 PCR 分析的内参基因。

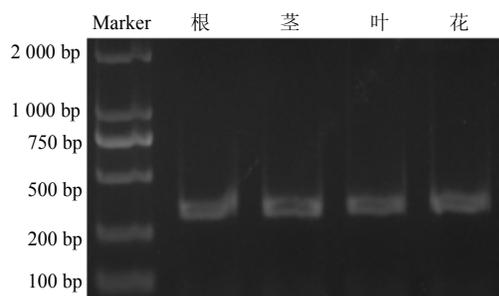


图 6 *Actin* 基因在芍药不同组织中的表达

Fig. 6 Expression levels of *Actin* in different organs

4 讨论

芍药苷属于单萜糖苷, 其生物合成通过位于细胞质中的甲羟戊酸 (mevalonate pathway, MVA) 途径^[23]和位于质体中的脱氧木酮糖-5-磷酸途径 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway, DXP)^[24]或甲基赤藓醇-4-磷酸途径 (methylerythritol-4-phosphate pathway, MEP) 两个代谢途径独立合成。其

代谢过程可分为中间体异戊烯基焦磷酸 (isopentenylpyrophosphate, IPP, C5) 及其双键异构体二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP, C5) 的生成、直接前体物质的生成和萜类生成及修饰共 3 个阶段^[25]。高等植物体内 IPP 形成后, 即与其异构体 DMAPP 各 1 分子在牻牛儿基二磷酸合酶 (geranyl diphosphate synthase, GPPS) 的作用下经头尾缩合生成具 C10 骨架的牻牛儿基二磷酸 (geranyl diphosphate, GPP); GPP 在单萜烯合酶 (monoterpene synthase) 作用下生成单萜烯 (monoterpene, C10)^[26-27], 进一步在修饰酶的作用下生成芍药苷。在本研究中, 本实验克隆了芍药 *Actin* 基因的基因组序列, 分析了其基因结构, 设计了跨越内含子的半定量 RT-PCR 引物, 可以有效防止由 DNA 污染而造成的 RT-PCR 假阳性; 半定量 RT-PCR 分析结果表明 *Actin* 基因可以作为芍药功能基因表达分析的内标基因。下一步本课题组将基于课题组已完成的芍药转录组测序数据, 对参与芍药苷代谢的候选基因进行半定量和定量表达分析, 以期阐明芍药苷的代谢及分子调控奠定基础。

参考文献

- [1] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 李玉东, 刁勇, 王立强. 芍药及其有效成分抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 海峡药学, 2009, 21(12): 27-32.
- [4] 康晓飞, 郭先锋, 许世磊, 等. 三个观赏芍药芍药苷含量的动态变化研究 [J]. 北方园艺, 2011(5): 85-87.
- [5] 简在友, 俞敬波, 王文全. 芍药不同部位和不同采收期 6 个化学活性成分含量的比较 [J]. 药学学报, 2010, 45(4): 489-493.
- [6] 李越峰, 严兴科. 赤芍和白芍不同部位芍药苷和苯甲酸的含量分析研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 519-520.
- [7] 陈颖, 王刚, 赵俊霞. 高等植物体内的肌动蛋白 [J]. 生物学通报, 2003, 38(1): 13-15.
- [8] 梁云, 袁素霞, 冯慧颖, 等. 百合肌动蛋白基因 lilyActin 的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2013, 40(7): 1318-1326.
- [9] 李军, 赵爱春, 王茜龄, 等. 三个桑树肌动蛋白基因的克隆与组织表达分析 [J]. 作物学报, 2011, 37(4): 641-649.
- [10] 邢朝斌, 龙月红, 修乐山, 等. 刺五加肌动蛋白基因的克隆和表达稳定性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(13):

- 1819-1822.
- [11] 范丙友, 李 芳, 张文婷, 等. 芍药肌动蛋白基因的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2136-2142.
- [12] 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 等. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. 植物学报, 2010, 45(5): 579-587.
- [13] 张婧妹, 茆振川, 刘 峰, 等. 黄瓜根结 RDR 酶基因的分离与表达分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(10): 1911-1920.
- [14] 张 波, 徐昌杰, 陈昆松. 猕猴桃6个 *LOX* 基因家族成员实时定量 PCR 引物特异性的检测与应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(3): 262-267.
- [15] 陈吉宝, 景蕊莲, 毛新国, 等. 普通菜豆 *PvP5CS2* 基因对逆境胁迫的应答 [J]. 作物学报, 2008, 34(7): 1121-1127.
- [16] 焦莎莎, 刘 卡, 李 刚, 等. 绵羊 MHC 区段 3 个预测基因的验证与表达分析 [J]. 遗传, 2011, 33(12): 1353-1358.
- [17] 李凤娥, 熊远著, 雷明刚, 等. 猪 ESR mRNA 在不同组织表达的定量研究 [J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(5): 492-494.
- [18] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [19] 范丙友, 高水平, 侯小改, 等. Col生态型拟南芥 *AP3* 基因启动子克隆及植物表达载体构建 [J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 21-16.
- [20] Stanke M, Morgenstern B. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: W465-W467.
- [21] Gasic K, Hernandez A, Korban S S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, 22: 437a-437g.
- [22] Reddy A. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 267-294.
- [23] Chappell J, Wolf F, Proulx J, *et al.* Is the reaction catalysed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? [J] *Plant Physiol*, 1995, 109(4): 1337-1343.
- [24] Rohmer M, Knani M, Simonin P, *et al.* Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [J]. *Biochem J*, 1993, 295: 517-524.
- [25] Yuan Y, Yu J, Jiang C, *et al.* Functional diversity of genes for the biosynthesis of paeoniflorin and its derivatives in *Paeonia* [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 18502-18519.
- [26] 张长波, 孙红霞, 巩中军, 等. 植物萜类化合物的天然合成途径及其相关合酶 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 779-786.
- [27] 王 莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508.