

## 刺五加 GAPDH 基因组 DNA 的克隆与分析

杨 果, 尤鹏升, 国红玉, 李志栋, 龙月红, 邢朝斌\*

华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063000

**摘要:** 目的 克隆刺五加 GAPDH 基因的 DNA 及启动子序列, 并进行生物信息学分析。方法 以刺五加的基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 和 TAIL-PCR 技术克隆 GAPDH 基因的全长 DNA 序列及 5' 端上游启动子序列, 并对其进行生物信息学分析。结果 克隆到长 4 103 bp 的刺五加 GAPDH 基因全长 DNA 及启动子序列。该基因共包含 12 个外显子和 11 个内含子, 其剪切均符合 GT-AG 原则。刺五加 GAPDH 的启动子片段长 1 304 bp, 转录起始位点 A 位于起始密码子 ATG 上游 61 bp 处。启动子除含有 TATA-box、CAAT-box 等基本元件外, 还有诸多与激素应答、光响应和胁迫信号等有关的顺式作用调控元件。结论 首次克隆到刺五加 GAPDH 基因的全长 DNA 及启动子序列, 为深入研究 GAPDH 基因结构特征与功能奠定基础。

**关键词:** 刺五加; GAPDH 基因; 内含子; 启动子; 生物信息学分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)15-2721-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.021

## Cloning and analysis on GAPDH genomic DNA from *Eleutherococcus senticosus*

YANG Guo, YOU Peng-sheng, GUO Hong-yu, LI Zhi-dong, LONG Yue-hong, XING Zhao-bin

College of Biology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

**Abstract: Objective** To clone and analyze the full length DNA and promoter sequence of GAPDH gene from *Eleutherococcus senticosus*. **Methods** PCR and TAIL-PCR techniques were used to clone the full length DNA sequence and promoter sequence of GAPDH gene of *E. senticosus*, then these two sequences were analyzed by bioinformatics methods. **Results** Length of 4 103 bp of *E. senticosus* GAPDH gene DNA and promoter sequence was cloned. Gene structure analysis showed that it contained 12 exons and 11 introns, and the splicing principles of its exon and intron were consistent with GT-AG; The promoter sequence length was 1 304 bp, and the transcription start site located 61 bp upstream of the initiation codon ATG; The promoter elements such as TATA-box, CAAT-box, as well as many cis-regulatory elements were related to hormone signal response, light response and stress signals. **Conclusion** The full length DNA and promoter sequence of GAPDH gene in *E. senticosus* is successfully cloned and reported for the first time, and it provides a stable foundation for further study of GAPDH gene structure and function of *E. senticosus*.

**Key words:** *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.; GAPDH gene; intron; promoter; bioinformatic analysis

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. 为五加科五加属植物, 是我国传统的珍贵药用植物<sup>[1]</sup>。在临床上刺五加被称之为“适应原”样药物<sup>[2]</sup>, 具有抗衰老、抗辐射、抗病毒、抗肿瘤等药理作用<sup>[1]</sup>。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 由 4 个 30~40 000 的亚基组成, 相对分子质量为  $1.64 \times 10^5$ , 是糖酵解过程中的关键酶。GAPDH 具有高度保守性、稳定表达的管家基因特点, 因此作为内参基因广泛

用于功能基因表达量的研究<sup>[3]</sup>。在刺五加中 GAPDH 也被广泛作为研究刺五加三萜皂苷类化合物生物合成关键酶基因的内参基因<sup>[1]</sup>。在真核生物的基因中, 内含子一度被视为是无基因功能的垃圾序列, 然而现有研究表明, 内含子在基因的表达调控中起着重要作用<sup>[4]</sup>, 在基因表达调控方面, 扮演着不可或缺的重要角色<sup>[5-6]</sup>。同时, 启动子也是位于基因 5' 端上游区的一段能与 RNA 聚合酶和转录因子特异结合的 DNA 序列, 决定基因转录、表达及调控的重要

收稿日期: 2015-12-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31570683); 河北省教育厅资助科研项目 (QN2014102); 华北理工大学培育基金 (SP201508); 华北理工大学大学生创新创业训练计划 (X2015171)

作者简介: 杨 果 (1994—), 男, 研究方向为药用植物分子生物学。

\*通信作者 邢朝斌 (1975—), 男, 教授, 研究方向为分子生药学。Tel: (0315)3725859 E-mail: xzbheuu@126.com

顺式作用元件<sup>[7-9]</sup>。但对刺五加 GAPDH 基因 DNA 序列中内含子及启动子的克隆分析研究尚未见报道。目前有关刺五加 GAPDH 基因内含子结构和启动子的研究尚未见报道。本研究首次克隆并分析了刺五加 GAPDH 基因的 DNA 及启动子序列,为进一步研究该基因的表达调控和功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

刺五加采自辽宁省本溪市桓仁满族自治县,经华北理工大学生命科学学院邢朝斌教授鉴定为五加科植物刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.。以新鲜嫩叶作为提取基因组 DNA 的试材。

*Ex Taq* DNA 聚合酶、*LA Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DL5000 DNA Marker 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司,新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pGM-T 克隆试剂盒、TOP-10 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司,琼脂糖购自 Sigma-Aldrich 公司,氨苄青霉素、IPTG、X-gal 购自北京拜尔迪生物技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯。引物由 Thermo Fisher 公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 刺五加 GAPDH 基因 DNA 序列的克隆** 按照试剂盒说明书的要求,称取 0.1 g 刺五加叶片,提取基因组 DNA。利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

根据刺五加 GAPDH 基因的 cDNA 序列<sup>[1]</sup>,应用 Primer premier 5.0 软件设计 2 对 PCR 扩增 DNA 序列的引物。引物分别为 GAPDHQS、GAPDHQX、GAP11S 和 GAPBY3 (表 1)。以提取的刺五加基因

组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 25  $\mu$ L: 模板 1  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, 10 $\times$ *Ex Taq* Buffer 2.5  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, *Ex Taq* DNA 酶 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15.3  $\mu$ L。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53  $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 共 40 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 补充延伸 15 min。

**1.2.2 PCR 产物回收、克隆及序列测定** PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后,切下目的条带,按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行回收纯化。将回收的 PCR 产物连接入 pGM-T Vector,转化入大肠杆菌 TOP-10 感受态细胞中,涂布于含氨苄青霉素、IPTG、X-gal 的 LB 平板上培养 13 h。随机挑选 20 个阳性克隆子送往 Invitrogen 公司进行测序。

**1.2.3 刺五加 GAPDH 基因启动子的克隆** 根据“1.2.1”项中获得的刺五加 GAPDH 基因的 DNA 序列,设计 3 个嵌套的反向特异下游引物 GAPBY2、GAPBY1、GAPBYN0 (表 1)。并利用交错式热不对称 PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR) 的上游随机简并引物 AD6 依次与 GAPBY2、GAPBY1、GAPBYN0 配对进行连续 3 轮的 TAIL-PCR 扩增。第 1 轮 TAIL-PCR 扩增的反应体系为 25  $\mu$ L: 刺五加基因组 DNA 1  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, 2 $\times$ GC Buffer I 12.5  $\mu$ L, 引物 GAPBY2 1  $\mu$ L, AD6 引物 2.5  $\mu$ L, *LA Taq* DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.75  $\mu$ L。反应结束后取第 1 轮 PCR 产物稀释 10 倍作为模板进行第 2 轮 PCR 扩增,反应体系为 25  $\mu$ L: 模板 DNA 1  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, 2 $\times$ GC Buffer I 12.5  $\mu$ L, GAPBY1 引物 1  $\mu$ L, AD6 引物 2.5  $\mu$ L, *LA Taq* DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.75  $\mu$ L。最后取第 2 轮 PCR 产物稀释 100 倍作为模板进行第 3 轮 PCR 扩增,反应体系为 25  $\mu$ L: 模板 1  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, 2 $\times$ GC Buffer I 12.5  $\mu$ L, GAPBYN0 引物 1  $\mu$ L, AD6 引物 2.5  $\mu$ L, *LA Taq* DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.75  $\mu$ L。3 轮 PCR 的反应条件见表 2。反应结束后将 TAIL-PCR 产物按照“1.2.2”项中的方法电泳、回收、克隆及测序。

**1.2.4 生物信息学分析** 利用 NCBI 的 Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>)工具分析 GAPDH 基因结构;利用 BDGP ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html))预测 5'端上游转录起始位点;利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析 GAPDH 基因启动子的顺式作用元件。

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

引物名称	引物序列 (5'→3')
GAPDHQS	ATCAAGATCGGGATCAACG
GAPDHQX	AAACGAACGGGAGACTCAA
GAP11S	TTCCTCTGTTTCCCAATACCAA
GAPBY3	AACTGGCCTCTACCAAAGAGAA
GAPBY2	CAACTCTAGCAACCAGACGACCG
GAPBY1	TCATTACCGTTGATCCCGATCT
GAPBYN0	GCTTTAGATCGATTGAACAGGG
AD6	CA(A/T)CG(A/T/G/C)C(A/T/G/C)GA(A/T/G/C)

表 2 TAIL-PCR 反应程序  
Table 2 TAIL-PCR reaction process

反应	循环次数	温度设定
第 1 轮 TAIL-PCR	1	94 °C、2 min
	5	94 °C、30 s, 62 °C、1 min, 72 °C、3 min
	1	94 °C、30 s, 25 °C、3 min, 72 °C、3 min
	15	94 °C、30 s, 62 °C、1 min, 72 °C、3 min
		94 °C、30 s, 62 °C、1 min, 72 °C、3 min
		94 °C、30 s, 44 °C、1 min, 72 °C、3 min
第 2 轮 TAIL-PCR	1	72 °C、10 min
	15	94 °C、30 s, 62 °C、1 min, 72 °C、3 min
		94 °C、30 s, 62 °C、1 min, 72 °C、3 min
		94 °C、30 s, 44 °C、1 min, 72 °C、3 min
第 3 轮 TAIL-PCR	1	72 °C、10 min
		与第 2 轮 PCR 的条件相同

## 2 结果与分析

### 2.1 刺五加 GAPDH 基因 DNA 序列的克隆

以刺五加基因组 DNA 为模板, 利用引物对 GAPDHQS-GAPDHQX 和 GAP11S-GAPBY3 进行 PCR 扩增, 分别获得长为 2 680、664 bp 的条带 (图 1), 与预期长度相符。利用 DNAMAN 6.0 软件将 2 条片段序列进行拼接, 获得长为 2 859 bp 的序列, 经 NCBI 的 BLAST 比对, 确定该序列为刺五加 GAPDH 基因 DNA 序列, 且其中包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA, 说明成功克隆得到了 GAPDH 基因的 DNA 全长序列。

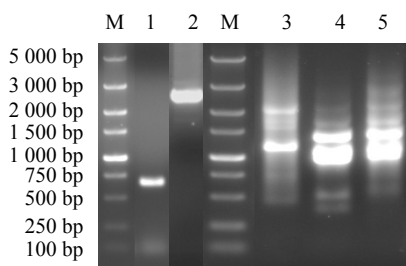


图 1 刺五加 GAPDH 基因及启动子的克隆  
M-Marker 1-引物 GAP11S 和 GAPBY3 的 PCR 扩增产物 2-引物 GAPDHQS 和 GAPDHQX 的 PCR 扩增产物 3-第 1 轮 TAIL-PCR 扩增产物 4-第 2 轮 TAIL-PCR 扩增产物 5-第 3 轮 TAIL-PCR 扩增产物  
M-Marker 1-PCR products amplified by GAP11S and GAPBY3 2-PCR products amplified by GAPDHQS and GAPDHQX 3-products of the primary TAIL-PCR 4-products of the secondary TAIL-PCR 5-products of the tertiary TAIL-PCR

Fig. 1 Cloning of GAPDH gene and promoter from *E. senticosus*

### 2.2 刺五加 GAPDH 基因 DNA 序列的分析

获得的刺五加 GAPDH 基因全长 DNA 序列中共含有 12 个外显子和 11 个内含子, 其中外显子的长度变化幅度为 33~277 bp, 内含子的长度变化幅度为 81~216 bp (图 2)。该基因在表达为成熟 mRNA 的过程中, 外显子与内含子的剪切都符合 GT-AG 原则, 即内含子的 5'端剪切位点为 GT, 3'端剪切位点为 AG。内含子中 (A+T) 的量为 60.78%~73.64%, (G+C) 的量为 26.36%~39.22%, (A+T) 的量显著高于 (G+C) 的量, 与非编码区中具有较高的 AT 量相符。

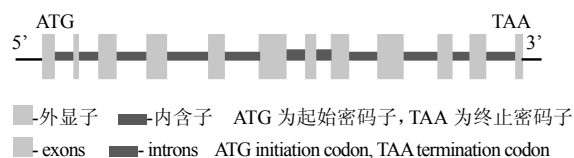


图 2 刺五加 GAPDH 基因的结构

Fig. 2 Genomic structure of GAPDH gene in *E. senticosus*

### 2.3 刺五加 GAPDH 基因启动子的克隆与生物信息学分析

利用 3 条嵌套式引物, 经过连续 3 轮 TAIL-PCR 扩增获得长 1 344 bp 的片段 (图 1)。比对发现, 该片段的 3'端序列与“2.2”项中 GAPDH 基因的 5'端序列完全重合, 与预期相符, 因此确定成功克隆得到刺五加 GAPDH 基因的启动子序列。

刺五加 GAPDH 基因的转录起始位点为 A (标记为+1), 位于起始密码子 ATG 上游 61 bp 处, 与多数基因的转录起始位点多为 A 的特点相符 (图 3)。利

```

-1 242 CATTTACCGT TGATCCCGAT CTCAACTCTA GCAACCAGAC GACCGCGCGA TATGTTAGAT GCATATCCAT
-1 172 CTGGGAGATT CAAACCACCTA ACCCACTTGC ACAGCTCCTC AACTTGTTGC ATAGTAAGGC AAAATTGAGC
-1 102 TTTAGGTTTC GTATTGTTAG GGCGAAGCCA CAATTCTGGC CCTATGTTCA TTGCCTCCAA ATCTTTTCGT
-1 032 GCATTGTCAT TGTCTTTGGT TTTACCCTT GCATCTAACA CAGTGAAAA CAAGTTCTCG AATACATTCT
-962 TTTCTGTATG CATGACATCT ATACAATGAT GAACTAAAAG TGTGACCCAA TACGGCAACT CAAACCATAT
-892 GGGCGAGTGT GAGTCTTCCC GTACCCGACC GCTCTCAATT TATTGTGCTC CTCTCCGGC CTCTCCGGC
-822 GGTGGAAATG TCTGATCGTT CAGCCAGCCC AAGACCTCAC TGCCCGACAG TCGAGCAACA ACCCCCTTCT
-752 TCTCTGTCTT TCTGTTGAAC TGTACAGACA TCTTCTGTGA ATTGTGATGA ACATGCAAGA ATCTATGAGT
-682 TGTTCCAAAG AAACCTACATT TCCGCCTATG CTGCAACTGA TTGCATTGCA CATCCCCCAT ACGCACTGGA
-612 CAAGACAACCT TTCCTGAGT TGACCAACCA CTGACCTTCC CAAGAGTCGG AAAGTCGGTG ATAGTCCATA
-542 ACAAGGCTGC CTTTATCACA AAATTCTCCC CGATCGTGGT ATCATACTGA TGGACCCCG TCTCCACAA
-472 CATATTTAGT TCATCGACTA ACGGTCTCAG GTACACGTTA ATGCCCTTTG TAGGACTCTT ATCCCCGGT
-402 ATGAGTAAAG TCAAGAACAA ATACGGTTCC CTCATGCACA TTGACGATAG AAGATTATAA GCTACCATAA
-332 TGACTGGCCA AACAGAGTAA GGCTGACTAA TGCTATTAAA AGGGTAAAAG CCATCCATAG CCATGTCGAG
-262 CCTCACACTC CCGACTTCTT TGGCAAACAG TGGAAAATTT TCATCAAATC TCTTCCATTC ATCTCCATCT
-192 GTTGGGTGAG TCAGTTGACC AGGCACGACA TCCCCTGTTT TGTGCCAACT CATATGCTGA GCCACGTGGG
-122 ACGACATGAA TAGTCGTTGA AGCCTCGATG CGTGAGGAAA GTAATGTAAG ATCTTCTTCG GCACATGTTT
-52 CTCCTTCCCC CCACGTTCCG TCACCACATA CGTAATTCCT CTGTTTCCA ATATTCTCT GTTTCCCAAT
+19 ACCAACATTT TCTCCCTCCC TCCCTCCTAA TTAATCTAA ACCATG
    
```

□-TATA-box   □-CAAT-box   ATG-起始密码子   +1-转录起始位点 A  
 □-TATA-box   □-CAAT-box   ATG -the initiation codon   +1- the transcription start site A

图 3 刺五加 GAPDH 基因启动子序列

Fig. 3 Promoter sequence of GAPDH gene from *E. senticosus*

用 PlantCARE 分析的结果表明, GAPDH 的启动子中存在典型核心启动元件 TATA-box 11 个、CAAT-box 25 个。其中 TATA-box 位于-349、-943、-1 013 bp 等处, CAAT-box 位于+14、-5、-150、-385、-847、-1 045 bp 等处。另外, 其中还含有多种与激素应答、逆境胁迫和光响应等元件相关(表 3), 如脱落酸响应顺式作用元件 (ABRE)、水杨酸响应顺式作用元件 (TCA-element)、赤霉素响应元件 (GARE-motif、P-box)、生长素响应元件 (AuxRR-core, TGA-element)、应答光响应顺式作用元件 (AE-box、ATCT-motif、Box II、G-Box、GAG-motif、I-box、Sp1、TCCC-motif 等)、厌氧诱导必要的顺式作用元件 (ARE)、涉及缺氧诱导的增强子功能元件 (GC-motif)、干旱诱导相关的 MYB 结合位点 (MBS)、MYBh1 结合位点 (CCAAT-box)、茉莉酸甲酯响应顺式作用元件 (CGTCA-motif, TGACG-motif)、真菌诱导子响应元件 (Box-W1)、胚乳表达相关元件 (GCN4\_motif, Skn-1\_motif)、醇溶蛋白代谢有关的顺式作用元件 (O2-site)、防卫和胁迫响应顺式作用元件 (TC-rich repeats)、昼夜节律顺式作用调控元件 (circadian) 等。以上诸多顺式作用元件存在于 GAPDH 基因启

动子中, 说明刺五加 GAPDH 基因的转录表达调控与多种因素有关。

### 3 讨论

本研究通过 PCR 和 TAIL-PCR 技术成功克隆得到了长为 4 103 bp 的刺五加 GAPDH 基因 DNA 及启动子序列, 其中启动子序列长 1 304 bp。编码区中存在 12 个外显子, 11 个内含子, 内含子的长度变化幅度在 81~216 bp, 与已报道的其他物种 GAPDH 基因相比, 刺五加的 GAPDH 中内含子数量偏多、长度偏长, 而外显子与内含子的剪切均符合 GT-AG 原则, 这与其他物种内含子剪切的特征相符<sup>[10]</sup>。刺五加 GAPDH 基因内含子中 (A+T) 量为 60.78%~73.64%, 推测刺五加 GAPDH 基因内含子可能在转录表达方面起重要作用<sup>[11]</sup>。

刺五加 GAPDH 基因的启动子除存在基本的调控元件外, 还含有多种与激素应答、逆境胁迫和光响应等元件等, 推测刺五加 GAPDH 基因的转录表达受到多种环境因素和生理条件的调控。研究表明, GAPDH 基因在逆境胁迫下转录表达水平会出现明显变化<sup>[12]</sup>, 如水稻在水分胁迫下 GAPDH 基因转录表达会增强<sup>[13]</sup>, 推测刺五加的 GAPDH 基因可能参与逆境胁迫应答, 在抵抗逆境胁迫方面或许存在着重要的作用。

表 3 刺五加 GAPDH 基因启动子顺式作用元件分析

Table 3 Cis-acting regulatory element analysis of GAPDH gene promoter from *E. senticosus*

调控元件	拷贝数	序列	元件功能
5UTR Py-rich stretch	1	TTTCTTCTCT	提高转录水平
ABRE	2	ACGTGGC	脱落酸响应顺式作用元件
AE-box	1	AGAAACAT	部分光响应组件
ARE	4	TGGTTT	厌氧诱导必要的顺式作用元件
ATCT-motif	1	AATCTAATCC	光响应保守 DNA 的部分元件
AuxRR-core	1	GGTCCAT	生长素响应顺式作用调控元件
Box II	1	CCACGTGGC	部分光响应元件
Box-W1	2	TTGACC	真菌诱导子响应元件
CAAT-box	25	CAATT	启动子和增强子区的一般顺式作用元件
CCAAT-box	1	CAACGG	MYBHv1 结合位点
CGTCA-motif	2	CGTCA	茉莉酸甲酯响应顺式作用元件
G-box	10	CACGTT	光响应顺式作用调控元件
GAG-motif	1	GGAGATG	部分光响应元件
GARE-motif	5	TCTGTTG	赤霉素响应元件
GC-motif	2	CCCCCG	涉及缺氧诱导的增强子功能元件
GCN4_motif	1	TGAGTCA	胚乳表达相关顺式调控元件
I-box	1	CTCTTATGCT	部分光响应元件
LAMP-element	1	CTTTATCA	部分光响应元件
MBS	2	CAACTG	干旱诱导相关的 MYB 结合位点
MRE	1	AACCTAA	光响应 MYB 结合位点
O2-site	1	GATGACATGA	醇溶蛋白代谢有关的顺式作用调控元件
P-box	2	CAACAAACCCCTT	赤霉素响应元件
Skn-1_motif	3	GTCAT	胚乳表达相关元件
Sp1	3	CC(G/A)CCC	光响应元件
TATA-box	11	TTTTA	据转录起始位点 30 个碱基的启动子中心元件
TC-rich repeats	2	ATTTTCTTCA	防卫和胁迫响应顺式作用元件
TCA-element	1	CAGAAAAGGA	水杨酸响应顺式作用元件
TCCC-motif	1	TCTCCCT	部分光响应元件
TCT-motif	1	TCTTAC	部分光响应元件
TGA-element	1	AACGAC	生长素响应元件
TGACG-motif	2	TGACG	茉莉酸甲酯响应顺式作用元件
box II	1	TCCACGTGGC	部分光响应元件
circadian	1	CAANNNNATC	昼夜节律顺式作用调控元件
TATCCAT/C-motif	1	TATCCAT	协同 G-box 作用参加糖抑制应答的顺式作用元件
W-box	2	TTGACC	补充诱导子, 受伤及病原体应答

目前有关刺五加 GAPDH 基因内含子结构和启动子的研究尚未见报道。本研究首次克隆并分析了刺五加 GAPDH 基因的 DNA 及启动子序列, 为进一步研究该基因的表达调控和功能奠定基础。

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] 中国药典 [S]. 一部. 2015.  
 [3] Morgante C V, Guimaraes P M, Martins A C, et al.

- Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut [J]. *BMC Res Notes*, 2011, doi: 10.1186/1756-0500-4-339.
- [4] Jungerius B J, van Laere A S, Te Pas M F, *et al.* The IGF2-intron3-G3072A substitution explains a major imprinted QTL effect on back fat thickness in a *Meishan* × *European white pig* intercross [J]. *Genet Res*, 2004, 84(2): 95-101.
- [5] Lev-Maor G, Sorek R, Shomron N, *et al.* The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in *Alu* exons [J]. *Science*, 2003, 300(5623): 1288-1291.
- [6] Salgueiro S, Piguocchi C, Parry M A. Intron-mediated gusA expression in tritordeum and wheat resulting from particle bombardment [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(4): 615-622.
- [7] 张伟, 刘勋成, 赵金会, 等. 水稻组蛋白脱乙酰化酶基因 HDA705 启动子的克隆与表达特性分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2014, 22(1): 77-82.
- [8] 陈迪新, 李艳梅, 郭国宁, 等. 桃 *PG* 基因启动子克隆及序列分析 [J]. *华北农学报*, 2014, 29(6): 52-57.
- [9] 邢朝斌, 吴鹏, 修乐山, 等. 刺五加功能基因密码子偏好性的分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(5): 598-603.
- [10] 张津京, 陈辉, 冯志勇, 等. 斑玉蕈甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因克隆与序列分析 [J]. *食用菌学报*, 2011, 18(2): 5-9.
- [11] 杨寅桂, 娄群峰, 陈劲枫, 等. 黄瓜 CSHSP70 基因内含子结构分析 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(12): 2915-2919.
- [12] Park S J, Huh J W, Kim Y H, *et al.* Selection of internal reference genes for normalization of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis in the canine brain and other organs [J]. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(1): 47-57.
- [13] Arumugam P M, Lihuang Z, Akiyama T. Molecular cloning, characterization, expression and chromosomal location of OsGAPDH, a submergence responsive gene in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(1): 34-42.