

• 药材与资源 •

川西獐牙菜牻牛儿苗基焦磷酸合成酶基因的克隆及表达分析

向蓓蓓¹, 李晓雪², 王 勇², 田晓轩³, 杨 琳⁴, 马 琳^{1*}

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071

3. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193

4. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387

摘 要: 目的 从川西獐牙菜 *Swertia mussotii* 中克隆牻牛儿苗基焦磷酸合成酶 (SmGPPS) 编码基因, 并进行生物信息分析及该基因的表达研究。方法 根据川西獐牙菜转录组 SmGPPS 基因序列, 设计特异性引物, 通过 RT-PCR 扩增得到 cDNA 序列, 通过生物信息对该序列进行分析; 构建原核表达载体 pET-28a-SmGPPS, 转入大肠杆菌 BL-21 (DE3) 中, 在 37 °C、1 mmol/L IPTG 诱导下进行表达。采用半定量 RT-PCR 方法检测 SmGPPS 基因在川西獐牙菜不同组织中的表达强度。结果 SmGPPS cDNA 全长 1 119 bp, 编码 372 个氨基酸。并对其蛋白二级、三级结构进行了分析和预测。SmGPPS 蛋白与其他植物中 GPPS 蛋白具有高度的相似性。SDS-PAGE 结果表明所表达蛋白与预期蛋白大小一致。半定量 RT-PCR 结果表明 SmGPPS 在叶中表达量最高。结论 为进一步研究该基因的功能和利用基因工程手段提高川西獐牙菜中环烯醚萜类化合物产量提供了基础。

关键词: 川西獐牙菜; 牻牛儿苗基焦磷酸合成酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 原核表达; 半定量 RT-PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)05-0962-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.021

Cloning and expression of geranyl pyrophosphate synthase gene in *Swertia mussotii*XIANG Bei-bei¹, LI Xiao-xue², WANG Yong², TIAN Xiao-xuan³, YANG Lin⁴, MA Lin¹

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

4. College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China

Abstract: Objective To clone the geranyl pyrophosphate synthase gene from *Swertia mussotii* (SmGPPS), analyze the bioinformation of SmGPPS, and perform the gene expression. **Methods** According to the SmGPPS gene sequence of transcriptome of *S. mussotii*, the specific primers were designed, the cDNA complete sequences was obtained by RT-PCR and the sequence was analyzed using bioinformatics. Prokaryotic expression vector pET-28a-SmGPPS was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL-21 (DE3) for expression under 37 °C and induced by 1 mmol/L IPTG. The relative expression of gene SmGPPS in the leaf, stem, and flower of *S. mussotii* was also studied. **Results** The results showed that SmGPPS cDNA complete sequences had a length of 1 119 bp encoding 372 amino acid residues. And the protein secondary and tertiary structures were analyzed and forecasted. The SmGPPS protein shared high identity with other GPPS proteins of plants. The SDS-PAGE results showed that the expressed proteins were consistent with the anticipated size. Relative RT-PCR analysis indicated that SmGPPS showed the highest transcript abundance in the leaf. **Conclusion** This work will provide a foundation for further functional research of SmGPPS protein and increasing the product of iridoid compound by genetic engineering in *S. mussotii*.

Key words: *Swertia mussotii* Franch; geranyl pyrophosphate synthase; gene cloning; bioinformations analysis; prokaryotic expression; semi-quantitative RT-PCR

收稿日期: 2016-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81303303); 天津市高等学校科技发展基金计划项目 (20130203)

作者简介: 向蓓蓓 (1983—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为药用植物生理与分子生物学。E-mail: xiangbeibei03230@163.com

*通信作者 马 琳, 女, 教授, 研究方向为中药资源与开发。E-mail: malin7983@163.com

藏药川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch 为龙胆科 (Gentianaceae) 獐牙菜属 *Swertia* L. 植物, 为青藏高原特有种, 分布于西藏、青海海拔 3 800~5 000 m 的高寒地区, 为藏族民间常用的一种草药, 称为“藏茵陈”。藏茵陈是中华民族药中的瑰宝, 是青藏高原中藏药八珍之一, 是藏医学经典著作《四部医典》中所记载的藏药獐牙菜, 全草入药, 性寒、味苦, 具有清热解毒、清肝利胆之功效^[1], 主治黄疸型肝炎、肝硬化、肝腹水^[2]等症。现开发出的“藏茵陈胶囊”是治疗肝中毒、肝炎的最佳药物之一, 其主要有效成分獐牙菜苦苷及龙胆苦苷为环烯醚萜类化合物, 它们具有肝损伤修复、抗肝炎、减轻胆细胞坏死、抗溃疡、抗虫、抑制中枢神经系统、抗癌等作用^[3-8]。环烯醚萜类化合物属于单萜类化合物, 都是通过细胞质中的甲羟戊酸途径(MVA 途径)和质体中的 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(plastidic 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP)途径形成异戊烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP), IPP 经硫氢酶(sulphyhydryl)及 IPP 异构酶(IPP isomerase)转化为焦磷酸 r,r-二甲基烯丙酯(r,r-dimethyl pyrophosphate, DMAPP)。然后 IPP 和 DMAPP 在细胞质或质体中由牻牛儿基焦磷酸合酶(GPP synthase, GPPS)催化合成牻牛儿基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP), GPP 经过多步酶学催化过程最后形成獐牙菜苦苷及龙胆苦苷^[9-10], GPPS 是环烯醚萜类化合物合成途径中的关键酶。然而, 目前仅在长春花、薄荷、丹参、胡黄连、滇龙胆等少数药用植物中对 GPPS 蛋白的编码基因进行克隆和功能研究^[11-13]。本研究根据川西獐牙菜转录组 SmGPPS 基因序列, 设计特异性引物, 通过 RT-PCR 扩增得到 cDNA 序列, 并进行克隆、测序及生物信息学分析; 构建原核表达载体 pET-28a-SmGPPS, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 在 37 °C、1 mmol/L IPTG 诱导下进行表达。并采用半定量 RT-PCR 方法检测了 GPPS 基因在川西獐牙菜不同组织中的表达强度, 为进一步研究该基因的功能和利用基因工程手段提高川西獐牙菜中环烯醚萜类化合物产量提供了基础。

1 材料和试剂

1.1 材料

野生川西獐牙菜 *Swertia mussotii* French 种子, 采集于青海省玉树县, 由青岛大学董汇泽教授鉴定。实验材料为实验室种植的川西獐牙菜植株。

1.2 工程菌株、质粒载体

1.2.1 菌种 大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans 5α 和 BL21 (DE3) 菌种购于全式金生物有限公司。

1.2.2 载体 pET-28a 载体由南开大学植物生理与分子生物学实验室保存。

1.3 分子生物学试剂

Trans 2000 plus (2 K plus) DNA marker、Trans 15 K DNA marker、6×Loading Buffer、T4 连接酶、5×T4 Ligase Buffer、2×EasyTaq PCR SuperMix (+dye)、TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase 和 pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 均购买自北京全式金生物技术有限公司; Eastep Super 总 RNA 提取试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司; Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 试剂盒、Taq DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、Not I 限制性内切酶、Sal I 限制性内切酶、10×H Buffer、0.1% BSA 和 dNTP 均购买自大连宝生物公司(TAKARA); 异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside, IPTG)、卡那霉素购自北京鼎国昌盛生物科技有限公司; 快速琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒购自北京康为世纪; 引物合成和基因测序由华大基因有限公司完成。

2 方法

2.1 叶片总 RNA 提取及 SmGPPS 全长 cDNA 的克隆

按照 Eastep Super 总 RNA 提取试剂盒的说明书, 提取川西獐牙菜叶片的总 RNA; 并按照 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 试剂盒说明书合成 cDNA, -40 °C 保存备用。根据川西獐牙菜转录组 SmGPPS 基因序列和原核表达载体 pET-28a 多克隆酶切位点, 设计一对特异性引物: SmGPPS-UP 5'-GGAATTCATATGAGTTTGGTGAATTCCTACTGCTACAT-3'; SmGPPS-DP 5'-CGAGCTCAAACCTTAATTATCCCTGTAAGCAATATAAT-3' 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 50 μL PCR 反应体系为 SmGPPS-UP (10 μmol/L) 1 μL; SmGPPS-DP (10 μmol/L) 1 μL; dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL; 5×TransStart FastPfu Fly Buffer 10 μL; 双蒸馏水 32 μL; TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase (125 U/μL) 1 μL; 川西獐牙菜 cDNA 1 μL。阴性对照为将该体系中的模板替换为双蒸馏水。反应条件为 94 °C、5 min; 94 °C、30 s; 60 °C、30 s; 72 °C、90 s; 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

2.2 SmGPPS 基因的测序与分析

SmGPPS 基因 PCR 产物经过 0.8% 的琼脂糖凝

胶电泳检测, 用快速琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒对目的片段进行纯化。取 4 μL 纯化后的目的片段与 1 μL 的 pEASY-Blunt Cloning Vector 混匀在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min。取 5 μL 的连接产物转化 *Escherichia coli* Trans 5 α 感受态细胞, 涂布于添加卡那霉素 (50 mg/L) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后挑取阳性克隆。通过菌落 PCR 初步筛选阳性克隆, 20 μL 菌落 PCR 的体系为 SmGPPS-UP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ; SmGPPS-DP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ; dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL ; 10 $\times$ PCR Buffer 2 μL ; 双蒸馏水 13 μL ; Taq DNA 聚合酶 (50 U/ μL) 1 μL ; 用牙签蘸取的菌落作为模板。扩大培养阳性克隆后获得菌液, 利用康为世纪试剂公司的高纯度质粒小提试剂盒进行质粒的提取。通过质粒 PCR 和质粒双酶切进行鉴定, 其中 20 μL 质粒 PCR 的体系为 SmGPPS-UP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ; SmGPPS-DP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ; dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL ; 10 $\times$ PCR Buffer 2 μL ; 双蒸馏水 13 μL ; Taq DNA 聚合酶 (50 U/ μL) 1 μL ; 质粒 1 μL 。在该过程中菌落 PCR 与质粒 PCR 的反应条件均为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、90 s; 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。20 μL 质粒双酶切鉴定的体系为 *Not* I 限制性内切酶 (10 U/ μL) 1 μL 、*Sal* I 限制性内切酶 (10 U/ μL) 1 μL 、10 $\times$ H Buffer 2 μL 、0.1% BSA 2 μL 、双蒸馏水 9 μL ; 质粒 5 μL 。将双酶切体系混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h。选取质粒 PCR 和质粒双酶切鉴定正确的质粒进行测序, 获得重组载体 pEASY-Blunt Cloning Vector-SmGPPS (简称 B-SmGPPS)。

2.3 SmGPPS 的生物信息学分析

利用 NCBI 网站上的 BLAST 程序进行序列比对, 应用 DNAMAN 软件推测和比对氨基酸序列, 颜色利用 MEGA 7^[14] 将川西獐牙菜 SmGPPS 氨基酸序列与近缘植物同源基因序列进行比对, 并进行替代模型计算, 检测到最适模型为 LG+G。后利用 PHYML3^[15] 进行最大似然法系统发育分析, ML 树的初始树为 BioNJ, 以自展抽样分析 1 000 次以检测分支置信度, 分支处的数字表示改分支分析的可靠程度, 数值越大, 可信度越高。

利用 ExPASy ProtParam tool 工具分析 SmGPPS 编码氨基酸的理化性质, 利用 PredictProtein 方法 (<https://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/>) 对 SmGPPS 进行二级结构分析。使用 SWISS-MODEL 服务器进行蛋白质三级结构预测。利 NCBI 网站上

CDD 分析 SmGPPS 蛋白保守域。

2.4 原核表达载体的构建

将 B-SmGPPS 重组载体和 pET-28a 载体分别进行 *Not* I 和 *Sal* I 双酶切, 40 μL 双酶切的体系为 *Not* I 限制性内切酶 (10 U/ μL) 2 μL 、*Sal* I 限制性内切酶 (10 U/ μL) 2 μL 、10 $\times$ H Buffer 4 μL 、0.1% BSA 4 μL 、质粒 28 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h。回收目的基因和载体片段, 经 T4 连接酶连接, 其中 11 μL 连接体系为目的片段 6 μL ; 载体片段 2 μL ; 5 $\times$ T4 Ligase Buffer 2 μL ; T4 连接酶 (1 000 U/ μL) 1 μL , 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布于添加卡那霉素 (50 mg/L) 的 LB 培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后挑取阳性克隆, 通过菌落 PCR 得到阳性克隆, 20 μL 菌落 PCR 的体系为 SmGPPS-UP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ; SmGPPS-DP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ; dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL ; 10 $\times$ PCR Buffer 2 μL ; 双蒸馏水 13 μL ; Taq DNA 聚合酶 1 μL ; 用牙签蘸取的菌落作为模板。进行扩大培养阳性克隆后获得菌液, 利用康为世纪试剂公司的高纯度质粒小提试剂盒进行质粒的提取。通过质粒 PCR 和质粒双酶切进行鉴定, 其中 20 μL 质粒 PCR 的体系为 SmGPPS-UP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ; SmGPPS-DP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ; 2.5 $\times$ dNTP 2 μL ; 10 $\times$ PCR Buffer 2 μL ; 双蒸馏水 12 μL ; Taq DNA 聚合酶 (50 U/ μL) 1 μL ; 质粒 1 μL 。在该过程中菌落 PCR 与质粒 PCR 的反应条件均为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、90 s; 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。20 μL 质粒双酶切鉴定的体系为 *Not* I 限制性内切酶 (10 U/ μL) 1 μL 、*Sal* I 限制性内切酶 (10 U/ μL) 1 μL 、10 $\times$ H Buffer 2 μL 、0.1% BSA 2 μL 、双蒸馏水 9 μL ; 质粒 5 μL 。将双酶切体系混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h。选取质粒 PCR 和质粒双酶切鉴定正确的质粒进行测序, 获得原核表达载体 pET-28a-SmGPPS。构建流程见图 1。

2.5 SmGPPS 在大肠杆菌中的原核表达

利用热激的方法将重组质粒 pET-28a-SmGPPS 和 pET-28a 空载质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 分别作为实验组与阴性对照组, 经过酶切鉴定和测序后, 得到转化成功并且测序正确的菌株。分别挑取单菌落进行液体培养, 将其接种于 5 mL 的 LB 液体培养基 (含有 50 mg/L 卡那霉素) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min 过夜培养。次日以 1:100 的比例转接到含有卡那霉素 50 mg/L 的 LB 液体培养基中, 培养至 600 nm 吸光度 (A_{600}) 值 0.6~0.8; 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、

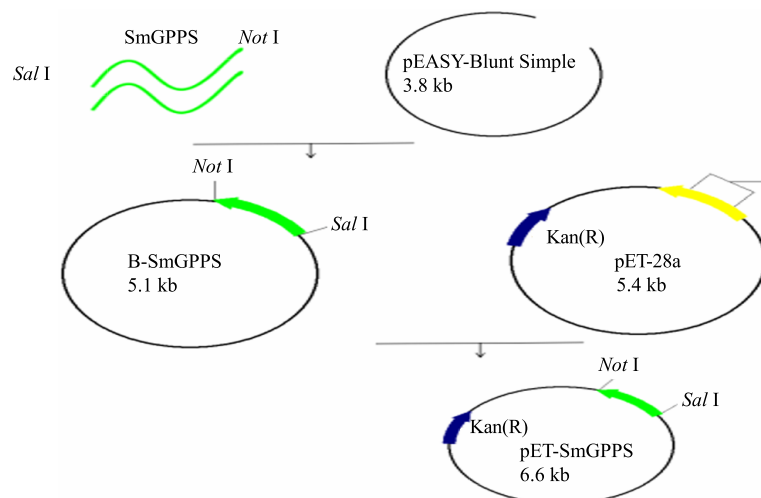


图 1 原核表达载体 pET-28a-SmGPPS 构建流程

Fig. 1 Construction of pET-28a-SmGPPS vector

150 r/min 条件下, 在对照组与实验组中分别加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 进行诱导。实验组诱导的时间分别为 4、7、18 h; 阴性对照组诱导 18 h。收集以上 4 组菌液 50 mL, 12 000 r/min 4 ℃离心 10 min 后, 弃去上清, 加入 250 μ L 的 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液 [1 mol/L Tris-HCl (pH 6.9)、10% SDS、0.5%溴酚蓝、50%甘油、5% β -巯基乙醇], 250 μ L 去离子水, 震荡涡旋混匀, 100 ℃煮沸 10 min。冰浴 5 min 后, 室温 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液进行稀释上样。取 8 μ L 上清液, 加入 6 μ L 的去离子水和 6 μ L 的 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液进行涡旋混匀, 后取 10 μ L 进行上样。进行 SDS-PAGE (5% 浓缩胶和 12% 分离胶) 电泳检测。

2.6 SmGPPS 在不同组织中的半定量 RT-PCR 表达分析

取处于抽薹期川西獐牙菜的叶片, 茎和花苞, 按照 Eastep Super 总 RNA 提取试剂盒提供的说明书, 进行 RNA 的提取。利用 Nanodrop2000 和琼脂糖凝胶电泳对 RNA 进行浓度及质量检测, 取等量的 RNA 进行反转录。以反转录第一链 cDNA 为模板进行 PCR。反应中使用 actin 基因作为内参基因扩增长度为 200 bp, actin 基因上游引物为: 5'-ACTGGTGTATGGTTGGTATGG-3', actin 基因下游引物为 5'-TCGGTGAGAAGTATAGGGTGC-3'。利用川西獐牙菜中 SmGPPS 的特异性引物扩增长度为 252 bp 检测在叶片、茎和花苞中 SmGPPS 基因表达情况。SmGPPS 上游引物为 5'-ATTTGGTGGTGA-TGAATCTATTG-3', SmGPPS 下游引物为 5'-CCAAT-

CACTCTCACAATTCTATCTG-3'。在预实验中确定了最佳循环数, 使扩增产物处在平台期前的线性增长期, 最终扩增 actin 基因和 SmGPPS 基因选取了相同的 PCR 扩增体系和反应程序。PCR 扩增体系: 上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L; 下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L; 2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix (+dye) 25 μ L; 双蒸馏水 22 μ L; cDNA 1 μ L。负对照为将该体系中的模板替换为双蒸馏水。反应程序为 94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 27 个循环后, 72 ℃延伸 10 min。以 1% 的琼脂糖凝胶电泳来分析扩增产物, 将在各器官中 actin 基因扩增产物的亮度调成一致, 比较各个器官的 SmGPPS 基因扩增产物的亮度。

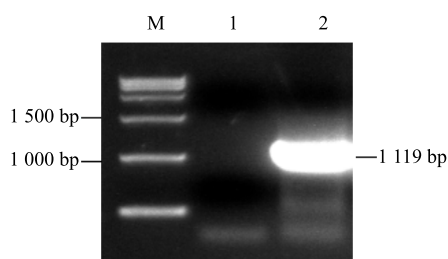
3 结果与分析

3.1 川西獐牙菜 SmGPPS 基因的开放阅读框 (ORF) 的克隆

根据之前得到的转录组信息, 获得的中间片段、5'端片段和 3'端片段拼接, 得到 SmGPPS 基因全长 cDNA 序列。RT-PCR 扩增 cDNA 编码区 ORF 后得到一条预期大小的 DNA 片段, 见图 2。连接 pEASY-Blunt Cloning vector 载体后, 转化, 筛选阳性克隆, 双酶切验证后 (图 3), 送华大基因公司测序。测序结果表明 SmGPPS (登录号为 KX372563) 全长 1 119 bp, 编码 372 个氨基酸 (图 4)。

3.2 川西獐牙菜 SmGPPS 基因的生物信息学分析

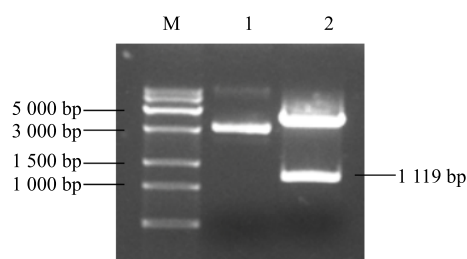
3.2.1 川西獐牙菜 SmGPPS 蛋白质序列分析 利用



M-DNA 相对分子质量标准 Trans2K plusII 1-阴性对照
2-SmGPPS 基因的 RT-PCR 产物
M-DNA Marker Trans2K plusII 1-control 2-RT-PCR product of
SmGPPS

图 2 SmGPPS 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 2 RT-PCR detection of SmGPPS gene



M-DNA 相对分子质量标准 Trans15K 1-B-SmGPPS 质粒 2-B-
SmGPPS 质粒经过 *SalI* 和 *NotI* 双酶切鉴定
M-DNA Marker Trans15K 1-plasmid of B-SmGPPS 2-digestion
result of plasmid B-SmGPPS digested by *SalI* and *NotI*

图 3 B-SmGPPS 载体的双酶切检测图

Fig. 3 Digestive detection of B-SmGPPS plasmid

```

1 ATGAGTTTGGTGAATTCTACTGCTACATCATGGTTACAAGCACATACAATTTCCAATTAC
1 M S L V N S T A T S W L Q A H T I S N Y
61 TATGGTGGCAATGGATCCAATTTATCCCCTTATTATCTATGCCACACTTCAAGAACAAA
21 Y G G N G S N L S P Y Y L C H T F K N K
121 CTTGGCCCCCAATTCTCAAAAAGAATCCACCTTTCGTTATTCCTCTTTTCAATCTGT
41 L G P P I S Q K E S T F R Y S S F S I C
181 GCAATTCTCACTAAAGAAGAGAGTAAATCAAGAAAGCCCATGATTTTCTTCATTCAAT
61 A I L T K E E S K I K K A H D F S S F N
241 TTCGAGGACTACATGATTGAAAAGCCAATTCAGTGAACAAAGCTTTAGAATCAGCAGTT
81 F E D Y M I E K A N S V N K A L E S A V
301 TCGATTCTGAACCATTTGAAAATCCATGAATCAATGAGGTACTCACTTCTTGCTGGTGGC
101 S I R E P L K I H E S M R Y S L L A G G
361 AAAAGAATCCGCCCAATGCTCTGTATTGCTGCTGTGTAATATTGGTGGTGATGAATCT
121 K R I R P M L C I A A C E L F G G D E S
421 ATTGCAATGCCATCTGCTTGTGCTGTTGAGATGATTCACACCATGTCTTTAATGCATGAT
141 I A M P S A C A V E M I H T M S L M H D
481 GATCTTCCATGTATGGATAATGATGATTAAAGAAGAGGGAAGCCCAATCATAAAGTT
161 D L P C M D N D D L R R G K P T N H K V
541 TTTGGTGAAGATGTGGCTGTTTATAGCAGGTGATGCACTTCTTGCAATTTGCTTTTGGCAT
181 F G E D V A V L A G D A L L A F A F E H
601 ATTGCAACTTCAACCAAGGGGTTTCATCAGATAGAATTGTGAGAGTGATGGTGATTA
201 I A T S T K G V S S D R I V R V I G E L
661 GCAAGATTTGTTGGTTGAGAGGGCTAGTTGCAGGACAAATTTGTGATGTATGTTCTGAA
221 A R F V G S E G L V A G Q I V D V C S E
721 GGGAAATCTGATGTGGGCTTAAACATTTAGAATTCATTCACATTCACAAGACTGCAGCT
241 G K S D V G L K H L E F I H I H K T A A
781 TTATGGGAAGGATCAGTTGCTTTAGGTGCAATTTTAGGAGGTGCAAATGATGAACAAGTA
261 L L E G S V A L G A I L G G A N D E R V A
841 TTGAATTTGAAAAAGTTTCAAGAGGTATTGGATTGTTTCAAGTAGTGATGATATT
281 L K L K K F A R G I G L L F Q V V D D I
901 TTGGATGTAACAAAATCTTCAAAAGAGTTGGGAAAAGCTGCTGGGAAAGATTGTTAGCT
301 L D V T K S K E L G K T A G K D L V A
961 GATAAGGTCACTTATCCTAAACTTATTGGAATAGAAAAGCTAGAGAGTTTGTGATAAG
321 D K V T Y P K L I G I E K S R E F A D K
1021 TTGAATAGAGAAGCTCAAGAACAATTTCTGGATTGATCCTGAAAAGGCTGCTCCTTTG
341 L N R E A Q E Q L S G F D P E K A A P L
1081 ATTGCTCTGGCTAATTATATTGCTTACAGGGATAATTAA
361 I A L A N Y I A Y R D N *

```

图 4 SmGPPS 基因的 ORF 及预测的氨基酸序列

Fig. 4 ORF box of SmGPPS and predicted amino acid sequence

ExPASy ProtParam tool 工具分析 SmGPPS 编码氨基酸的理化性质, SmGPPS 相对分子质量为 40 583.53, 理论等电点 pI 为 6.28, 分子式为 $C_{1801}H_{2875}N_{487}O_{545}S_{16}$, 半衰期为 30 h。不稳定指数为 37.89, 脂肪族指数为 92.88, 总平均疏水性为 -0.093。利用 PredictProtein 方法 (<https://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/>) 对 SmGPPS 进行二级结构分析。结果表明该蛋白二级结构中 α -螺旋 (H) 占 53.76%, β -折叠 (E) 占

3.23%, 无规卷曲 (C) 占 43.01%。该蛋白含有 20 种氨基酸, 其中亮氨酸量最高, 为 10.22%; 其次是丙氨酸, 为 9.68%; 色氨酸量最低, 为 0.3%。利用 Swiss-Model Workspace 预测 SmGPPS 蛋白的三级结构, 结果如图 5 所示, 与二级结构预测结构一致。

利用推测的蛋白质序列检索 NCBI 的 CDD (Conserved Domain Database) 数据库, 发现 SmGPPS

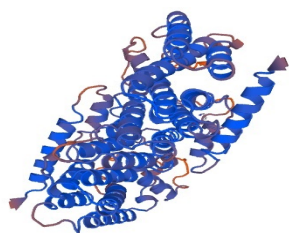


图 5 SmGPPS 蛋白质的三维结构预测

Fig. 5 Predicted three dimensional structure of SmGPPS protein

氨基酸序列中含有异戊二烯焦磷酸合酶保守区域 (Trans_IPPS_HT), 属于类异戊二烯合酶 (Isoprenoid_Biosyn_C1) 超家族成员 (图 6), 其功能可能与单萜类物质的合成有关。

3.2.2 氨基酸序列同源性分析 经 DNAMAN 比对分析, 川西獐牙菜 SmGPPS 的氨基酸序列与其他植物相似性较高 (图 7)。图 7 中不同颜色区域表示 SmGPPS 氨基酸与其他植物中 GPPS 氨基酸的同源程度, 黑色区域代表同源程度到达 100%。川西獐

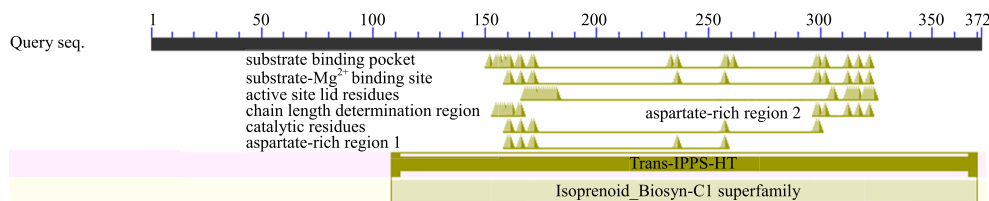


图 6 SmGPPS 蛋白保守域分析

Fig. 6 Conserved domain prediction of SmGPPS protein

滇龙胆 GPPS	.MALIYSTP..SNVQAHTSIYHG..NGSSFFFCYLS...XNKAPV..FLSNPCKKPNLGRSPISICAILTKE.....ESKIKKAHDFS....FNEDYD	81
川西獐牙菜 GPPS	.MSLVNSTAT.SNLQAHTISNYGGNGSNLSPFYLCITFNKLG...PIQ...KESTFRYSFISICAILTKE.....ESKIKKAHDFS....FNEDYD	85
金鱼草 GPPS	.MSLVNFIT..TNSITTSKSPKNVQTTTSSRSIILP...HKISL..FPSNP.KSKSKTLRFSSISILTEN..PQESSQTKSKDPTFT...LDEKTYM	85
长春花 GPPS	.MSFVNSIT..TNPFAQSIYCLEN.GRSSSMRSNLCHEPLNQLPISEFLSGTIRKPIFSCRLSISAILTKEQTQEESESKKEVAFSTSSDPRAYM	96
黄瓜 GPPS	...MSAMSLGTSTFQSCSIFSQASRSTG.....YPLRGLKS..FIIPKRLPTSSISSISICAVITKE.....ETLTE..EEGKPTFNHAYM	76
啤酒花 GPPS	...MSVNL..TWQTCMFNQAGRSRSTFNLLHYHELKVPFS..FQTPKRRPTSSFS..SISAVITKE.....EAVTED.EEKSTFNHAYM	82
芒果 GPPS	MSVNL..TWQTCMFNQAGRSRSTFNLLHYHELKVPFS..FQTPKRRPTSSFS..SISAVITKE.....EAVTED.EEKSTFNHAYM	41
辣薄荷 GPPS	MSALVNFVAK..WPQITGVKDVHGGRRRRSRSTLFQSHPLRTEMPSFLYFSSP..LKAPAT..FSVSAVITKEG.....SEIRKDPAPSTSPADPDGYM	90
胡黄连 GPPS	.MSLVNSIT..WSQISSILNIQSNISKKLTPFSILPHLNNLPIS..LFPNP..KSNISNIPLSAILTKEQ.....KQNP..PTTPTFNHAYM	84
丹参 GPPS	MSLVNFLA.....TTCVRDVHGGRRRRSRSG.....LLSTS..VKT.....RISAVITKE.....DKNP..TWAAEDKRYM	57
相同部分 GPPS		
滇龙胆 GPPS	LEBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	181
川西獐牙菜 GPPS	LEBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	185
金鱼草 GPPS	LEBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	185
长春花 GPPS	ICBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	196
黄瓜 GPPS	VQBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	176
啤酒花 GPPS	VQBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	182
芒果 GPPS	LOBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	141
辣薄荷 GPPS	LEBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	190
胡黄连 GPPS	LOBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	184
丹参 GPPS	VQBAISVNALEQAVSIREPHKHEPSMRYSLIAGGKRREVLQIACELGGESDAMPACAVEMHTMSLHDDLPCMDNDLLRGKFTNHVFGEDV	157
相同部分 GPPS		
滇龙胆 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	276
川西獐牙菜 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	280
金鱼草 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	280
长春花 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	291
黄瓜 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	276
啤酒花 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	277
芒果 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	236
辣薄荷 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	285
胡黄连 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	279
丹参 GPPS	AVLAGDALLAFEFHIVSTGVSIRIVRIGELAKVCEGLVAGQVVDVCEGSDVGLHLEHIEHKTAALEGS....VANGAILGGADDEEV	252
相同部分 GPPS		
滇龙胆 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	367
川西獐牙菜 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	371
金鱼草 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	371
长春花 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	382
黄瓜 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	367
啤酒花 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	368
芒果 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	327
辣薄荷 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	376
胡黄连 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	370
丹参 GPPS	SHRRFFARIGLDFQVDDILDVTKSSSELGKTAGKDLVADKTYPERLIGIKRSSEPERLNBAQEQICSGDFEFAAPLIALANYIAYRD	343
相同部分 GPPS		

图 7 SmGPPS 与其他植物中 GPPS 氨基酸序列的多序列比对结果

Fig. 7 Multiple sequence alignment of SmGPPS amino acid sequence with GPPS in other plants

牙菜(KX372563)与长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (AEI53622.1)、啤酒花 *Humulus lupulus* L. (ACQ90682.1)、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge (AEZ55681.1)、芒果 *Mangifera indica* L. (AFJ52722.1)、金鱼草 *Antirrhinum majus* L. (AAS82860.1)、胡黄连 *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell (AAW66658.1)、辣薄荷 *Mentha piperita* L. (AAF08793.1)、滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch (ALS54746.1)、黄瓜 *Cucumis sativus* L. (KGN62082.1) 的 GPPS 蛋白质分子的相似度分别为 74.8%、68.1%、65.6%、65.1%、72.1%、69.5%、67.2%、83.2% 和 67.3%。其保守性可能与其在植物体内的功能有关。最大似然法系统发育分析显示,川西獐牙菜与滇龙胆共聚于一个分支。物种间系统发育关系与已知的分类学地位相符合(图 8)。

3.3 川西獐牙菜 SmGPPS 蛋白的原核表达

3.3.1 SmGPPS 基因原核表达载体的构建 将已经克隆得到的 SmGPPS 基因片段与原核表达载体 pET-28a 载体连接,阳性克隆用 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切鉴定(图 9)并进行测序,测序结果无误后,将其转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。

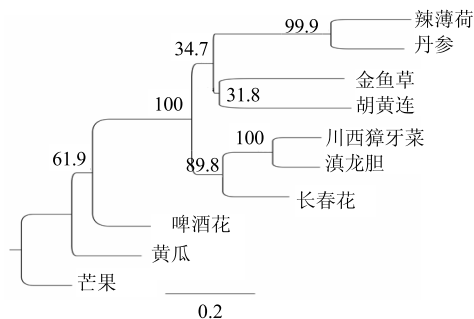
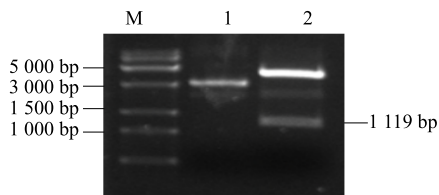


图 8 SmGPPS 与相关物种 GPPS 蛋白的系统发育分析

Fig. 8 Phylogenetic relationship of SmGPPS and some other GPPS proteins

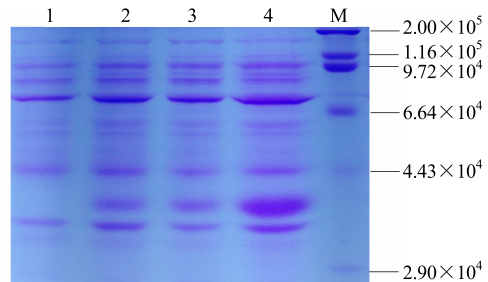


M-DNA 相对分子质量标准 Trans15K 1-pET-28a-SmGPPS 质粒 2-pET-28a-SmGPPS 质粒经过 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切鉴定
M-DNA Marker Trans15K 1-plasmid of pET-28a-SmGPPS 2-digestion result of plasmid pET-28a-SmGPPS digested by *Sal* I and *Not* I

图 9 pET-28a-SmGPPS 载体的双酶切电泳

Fig. 9 Digestive detection of pET-28a-SmGPPS plasmid

3.3.2 将 pET-28a-SmGPPS 转入表达菌株 BL21 (DE3) 中进行原核表达 将 pET-28a-SmGPPS 转入表达菌株 BL21 (DE3) 后,经酶切及测序鉴定后,均证明得到了正确的转化菌株。而后进行蛋白表达条件的摸索与优化,一般优化原核蛋白表达条件的方法包括改变 IPTG 的浓度、诱导温度及时间。本研究原核表达的诱导条件参考文献报道^[12-13],直接选择 IPTG 1 mmol/L,温度为 37 °C 进行诱导,故本研究主要是通过改变诱导时间进行优化。最终,通过条件摸索,选择 IPTG 1 mmol/L,温度为 37 °C,进行了 4、7、18 h 的诱导后获得了该蛋白的包涵体。将转入 pET-28a 载体的 BL21 菌株作为阴性对照,SDS-PAGE 电泳检测诱导 18 h 的蛋白量与诱导 4 h 和 7 h 的相比明显增多,其在相对分子质量 4.1×10^4 大小处有明显的条带,该位置与根据软件预测的 SmGPPS 蛋白的相对分子质量大小一致(图 10)。



M-TaKaRa 蛋白质分子量相对分子质量标准 Marker 1-转入 pET-28a 载体的 BL21 菌株 2~4-分别为转入 pET-28a-SmGPPS 表达载体的 BL21 菌株诱导 4、7、18 h 的总蛋白

M-TaKaRa protein Marker 1-the expressed product of pET-28a with 1 mmol/L of IPTG induction for 18 h at 37 °C 2~4-the expressed product of pET-28a-SmGPPS with 1 mmol/L of IPTG induction for 4, 7, and 18 h separately at 37 °C

图 10 原核表达 SmGPPS 的 SDS-PAGE 电泳检测

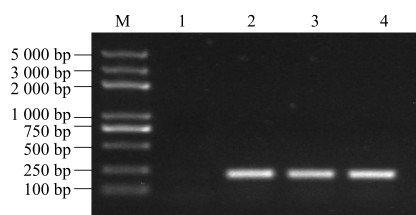
Fig. 10 Prokaryotic expression detection of SmGPPS gene by SDS-PAGE

3.4 川西獐牙菜 SmGPPS 基因在不同组织的表达分析

利用半定量 RT-PCR 检测 SmGPPS 的组织差异表达,检测了该基因在川西獐牙菜叶茎、花中的表达量。首先将不同组织中 *actin* 基因扩增产物(200 bp)的电泳亮度调成一致(图 11),在同样条件下分析 SmGPPS 基因(252 bp)在不同组织的表达差异(图 12)。结果表明该基因在叶中的表达量最高。

4 讨论

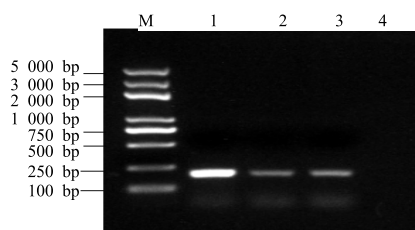
牻牛儿基焦磷酸合成酶(GPPS)是单萜化合物合成的关键酶,催化 1 分子的 IPP 与 DMAPP 形成



M-DNA 相对分子质量 Trans2k plus 1-阴性对照 2~4-叶、花中的 actin 基因的 RT-PCR 扩增

M-DNA Marker Trans2K plusII 1-control 2~4-RT-PCR product of actin in leaf, stem or flower, respectively

图 11 半定量 RT-PCR 检测 actin 基因在不同组织的表达
Fig. 11 Actin expression in various plant organs by semi-quantitative RT-PCR



M-DNA 相对分子质量 Trans2k plus 1~3-叶、茎、花中的 SmGPPS 基因的 RT-PCR 扩增 4-阴性对照

M-DNA Marker Trans2K plusII 1~3-RT-PCR product of SmGPPS in leaf, stem or flower, respectively 4-control

图 12 半定量 RT-PCR 检测 SmGPPS 基因在不同组织的表达
Fig. 12 SmGPPS expression in various plant organs by semi-quantitative RT-PCR

GPP, 为单萜化合物的合成提供碳骨架。本研究首次在川西獐牙菜中克隆了 SmGPPS 基因的 ORF 序列, 经比对分析, 川西獐牙菜 SmGPPS 的氨基酸序列与其他植物的相似性较高, 川西獐牙菜与滇龙胆共聚于一个分支。物种间系统发育关系与已知的分类学地位相符合。

利用相关软件预测了 SmGPPS 的三维结构, 多为 α -螺旋和无规卷曲, 形成了一个孔穴结构, 推测这可能是与底物结合的重要部位。Coscia 等^[9]第 1 次从薄荷属植物椒样薄荷中分离出由 2 个亚基组成的异型二聚体 GPPS 蛋白, 即 GPPS 蛋白包括大亚基和小亚基。Coscia 等^[10]从长春花中克隆到 CrGPPS 基因, 发现 CrGPPS 在长春花中以杂聚肽和同聚肽 2 种形式存在。推测目前克隆的序列有可能是 GPPS 蛋白的大亚基, 在植物中 GPPS 大亚基的氨基酸序列比小亚基序列更为保守。至于川西獐牙菜中 SmGPPS 蛋白是杂聚肽还是同聚肽, 还需要深入开展实验来证明。

SmGPPS 在川西獐牙菜不同组织中的表达有明显差异, 叶片中表达量最高, 此结果与叶中环烯醚萜化合物较高的结论是一致的^[16]。证明了 GPPS 可能是川西獐牙菜中环烯醚萜化合物合成途径中的关键酶。本研究组正在通过过表达或敲减表达 SmGPPS 来验证该基因在川西獐牙菜中的功能。

川西獐牙菜野生资源匮乏, 加上缺乏环境保护、人工大量采挖, 野生资源逐年减少。随着藏药产品开发的进一步升温, 对藏药材的需求量越来越大, 藏药材的价格越来越高, 藏药资源短缺越来越明显^[17]。近年利用分子生物学手段来提高川西獐牙菜有效成分的研究较少, 因此, 本研究将对獐牙菜苦昔及龙胆苦昔生物合成关键酶基因 SmGPPS 进行克隆和蛋白质功能预测, 将为构建其过表达载体和遗传转化体系, 进一步实现环烯醚萜成分在植株中高效表达提供理论基础, 并为开展川西獐牙菜及类似以环烯醚萜化合物为主要活性成分植物的遗传改良、提高药材品质具有十分重要的理论意义和实践价值。

参考文献

- [1] 舒光明. 川西獐牙菜的化学成分、药理作用和临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(2): 176-179.
- [2] 纪兰菊, 保怡, 陈桂琛, 等. 15 种獐牙菜属植物中主要药用成分的高效液相色谱测定 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1298-1302.
- [3] Medda S, Mukhopadhyay S, Basu M K. Evaluation of the in-vivo activity and toxicity of amarogentin, an antileishmanial agent, in both liposomal and niosomal forms [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1999, 44(6): 791-794.
- [4] 刘占文, 陈长勤, 金若敏, 等. 龙胆苦昔的保肝作用研究 [J]. 中草药, 2002, 33(1): 47-50.
- [5] 严永清. 中药辞海 [M]. 北京: 中国医科技出版社, 1996.
- [6] 乔伟, 张彦文, 吴寿金, 等. 天然环烯醚萜类化合物的生物活性 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2001, 16(2): 65-67.
- [7] 王海霞, 黄慧明, 苑祥, 等. 川西獐牙菜不同部位对人胃癌细胞 MGC-803 增殖抑制作用和细胞周期的影响 [J]. 药物评价研究, 2016, 37(5): 735-740.
- [8] 赵军胜, 蔡云飞, 李子东, 等. 胡萝卜与川西獐牙菜不对称体细胞杂交研究 [J]. 山东大学学报, 2004, 39(6): 108-111.
- [9] Coscia C J, Guarnaccia R. Natural occurrence and biosynthesis of a cyclopentanoid monoterpene carboxylic acid [J]. *Chem Commun*, 1968, 3: 138-140.

- [10] Coscia C J, Botta L, Guarnaccia R. On the mechanism of iridoid and secoiridoid monoterpene biosynthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1970, 136(2): 498-506.
- [11] Burke C C, Wildung M R, Croteau R. Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(23): 13062-13067.
- [12] Rai A, Smita S S, Singh A K, *et al.* Heteromeric and homomeric geranyl diphosphate synthases from *Catharanthus Roseus* and their role in monoterpene indole alkaloid biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2013, 6(5): 1531-1549.
- [13] 王彩云, 李富生, 李 涛, 等. 滇龙胆 GrGPPS 基因的克隆及其序列分析与原核表达 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2060-2068.
- [14] Kumar S G, Stecher, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis Version 7. 0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [15] Guindon S J F, Dufayard V, Lefort M, *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0 [J]. *Syst Biol*, 2010, 59(3): 307-321.
- [16] 陈 刚, 张元忠, 田华咏, 等. 獐牙菜植物器官獐牙菜苦苷含量分布规律研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2010, 16(1): 58-59.
- [17] 杨慧玲, 刘建全. 重要藏药川西獐牙菜种子萌发的研究 [J]. 云南植物研究, 2005, 27(3): 295-300.