

• 药材与资源 •

山茱萸萜类合成途径关键酶 HMGR1 基因的克隆与分析

李志红^{1,2}, 段佩玲³, 徐静雅^{1,2}, 杨萌萌^{1,2}, 段珊珊^{1,2}, 侯小改^{1,2*}, 侯典云^{1,2*}

1. 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471023

2. 洛阳市道地药材繁育与创新利用工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023

3. 郑州铁路职业技术学院药学院 郑州 450000

摘要: 目的 克隆山茱萸 *Cornus officinalis* HMGR1 的 cDNA 序列并进行生物信息学分析。方法 以山茱萸转录组数据中 unigene c100572_g1 序列为参考, 在其开放阅读框两端设计特异引物, 经实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 扩增、连接 pTOPO-T 载体克隆并测序, 获得 CoHMGR1 基因的 cDNA 序列, 并利用生物信息学方法对该基因及其编码蛋白进行相关分析。结果 CoHMGR1 基因长 2 116 bp, 含长度为 1 338 bp 的完整开放阅读框 (ORF), 编码 445 个氨基酸, 为疏水性蛋白。多序列比对和亲缘关系分析显示, CoHMGR1 基因编码的氨基酸序列与喜树的序列相似性较高, 达 79.56%。结论 首次对山茱萸叶片和果实进行比较转录组测序的基础上, 成功克隆并分析了 CoHMGR1 基因, 为进一步研究 CoHMGR1 蛋白的功能及山茱萸萜类合成途径的分子机制奠定基础。

关键词: 山茱萸; 萜类; CoHMGR1; 克隆; 实时荧光定量 PCR; 序列分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4733-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.017

Cloning and analysis of a key enzyme of HMGR1 gene involved in terpene biosynthesis of *Cornus officinalis*LI Zhi-hong^{1,2}, DUAN Pei-ling³, XU Jing-ya^{1,2}, YANG Meng-meng^{1,2}, DUAN Shan-shan^{1,2}, HOU Xiao-gai^{1,2}, HOU Dian-yun^{1,2}

1. Agricultural College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

2. The Luoyang Engineering Research Center of Breeding and Utilization of Dao-di Herbs, Luoyang 471023, China

3. College of pharmacy, Zhengzhou Railway Vocational Technical College, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To clone and analyze the cDNA sequence of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-a reductase (HMGR1) of *Cornus officinalis*. **Methods** In this study, specific primers were designed at both ends of the open reading frame (ORF) based on the unigene (c100572_g1) in the transcriptome data from *C. officinalis*. Subsequently, the cDNA sequence of CoHMGR1 gene was amplified by RT-PCR, cloned into the pTOPO-T vector and sequenced. This gene and its encoded protein were analyzed using bioinformatics methods. **Results** The results suggested that CoHMGR1 was 2 116 bp in length and the ORF was 1 338 bp in length, which encodes 445 amino acids and is a hydrophobic protein. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that the amino acid sequence encoded by this gene has a high similarity with that of *Camptotheca acuminata*, reaching 79.56%. Based on the first comparison of transcriptome sequencing from leaves and fruits of *C. officinalis*, the CoHMGR1 gene was successfully cloned and analyzed. **Conclusion** This study laid a foundation for studying the function of CoHMGR1 protein and the molecular mechanism of terpene biosynthesis pathway of *C. officinalis*.

Key words: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; terpene; CoHMGR1; cloning; RT-PCR; sequence analysis

山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 是多年 补肝益肾的功效^[1], 在临床上应用广泛。山茱萸的 生的木本类药用植物, 其成熟干燥果肉入药, 具有 果实中含有环烯醚萜、三萜、鞣质和黄酮类等活性

收稿日期: 2020-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1404829); 中央本级重大增减支项目 “名贵中药资源可持续利用能力建设项目” (2060302); 河南省中药产业技术体系建设专项资金; 棉花生物学重点实验室开放课题资助 (CB2020A24)**作者简介:** 李志红 (1996—), 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: 1600356814@qq.com***通信作者:** 侯典云 (1975—), 副教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物资源评价与利用。Tel: (0379)64282340 E-mail: dianyun518@163.com
侯小改 (1966—), 教授, 博士生导师, 主要从事特色经济植物资源评价与利用。E-mail: hxg382@126.com

物质^[2-3], 具有很高的食用价值、药用价值和经济价值。另外, 山茱萸在降血糖、抗衰老、抗炎等方面也有很好的效果^[4-5]。然而山茱萸的常规生产还存在一些限制因素, 例如活性成分含量较低、大规模种植的成活率等。因此, 尽管山茱萸的药用价值很高, 其常规生产仍满足不了市场需求。另一个原因是提高山茱萸中萜类物质的含量, 即可有效增加山茱萸的药用价值。因此运用分子生物学技术研究山茱萸中与萜类生物合成有关的基因极为必要。

萜类也被称为异戊二烯类化合物, 是以 C5 结构元件为前体的衍生物, 该前体是异戊烯基焦磷酸 (IPP) 和 IPP 的异构体, 二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP)^[6]。目前在植物体内发现了 2 条合成 IPP 及其异构体的途径, 即甲羟戊酸途径 (MVA) 和独立于 MVA 的非甲羟戊酸 (MEP) 途径^[7]。MEP 途径主要为单萜、二萜、光合色素等物质的合成提供前体物质^[8], 而 MVA 是合成倍半萜和三萜类物质的主要途径^[9]。MVA 普遍存在于真核及原核生物中的细胞质内, HMG-CoA 还原酶 (HMGR) 是 MVA 途径中的首个限速酶^[10-11], 在萜类物质生物合成中具有重要作用, 目前已在多种植物中成功克隆^[12-22], 但山茱萸中未见其报道。

本研究在课题组对山茱萸果实和叶片进行比较转录组测序的基础上, 筛选获得山茱萸 HMGR 基因的转录本, 以此为模板, 设计特异性引物, 通过 RT-PCR 技术获得山茱萸的 HMGR 基因, 命名为 CoHMGR1。为深入研究 CoHMGR1 的功能, 并最终解释山茱萸环烯醚萜苷合成途径的分子机制奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

材料采自河南省洛阳市隋唐城遗址植物园, 由河南科技大学农学院侯典云副教授鉴定为山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 植株。分别采集山茱萸植株上新鲜无病害的叶片和果实, 用蒸馏水轻轻冲洗干净, 擦干水分后立即将其放于液氮内速冻, 置于-80 °C 冰箱内保存。

1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 于 TaKaRa 公司购买, TRUEscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 2×long Taq PCR Master Mix 以及 Zero Background pTOPO-TA Cloning Kit 均购买自艾德莱生物科技有限公司, DH5α 感受态细胞购自上海

昂羽生物公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成

以山茱萸转录组序列获得的 HMGR 转录本 c100572_g1 序列为模板, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对特异引物, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。引物序列 CoHMGR1-F: 5'-CCAT-CTCCCTCCCACTTT-3'; CoHMGR1-R: 5'-AGCC-ACCTACTCTTCCTCAC-3'。

2.2 RNA 的提取和 cDNA 的合成

将采取的山茱萸叶片及果实放置在液氮中, 充分研磨。按照 TaKaRa 公司的 RNA 提取试剂盒操作, 提取山茱萸总 RNA。利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取的完整性, 并用酶标仪测定其纯度与浓度。得到完整的纯度较高的 RNA 后, 利用 TRUEscript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 提供的方法, 将总 RNA 反转录合成 cDNA。

2.3 CoHMGR1 基因的 RT-PCR 扩增及测序

以山茱萸的 cDNA 作模板, 构建 25 μL 反应体系扩增 CoHMGR1 基因, 依次是 2×long Taq Master Mix 12.5 μL, 2.5 μmol/L 正、反向引物各 1 μL, cDNA 1.5 μL, 最后用 ddH₂O 补至终体积。设定的 PCR 反应程序为 95 °C 预变性持续 5 min, 设置 35 个循环, 95 °C、30 s 变性, 52 °C、50 s 退火, 72 °C、2 min 延伸, 循环结束后, 72 °C 终延伸 10 min, 程序结束后 PCR 仪 16 °C 保温。用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 凝胶成像仪拍照记录结果, 对目的条带进行切胶回收纯化。

2.4 CoHMGR1 基因克隆

将凝胶回收的扩增产物连接到 pTOPO-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5α, 并在含氨苄青霉素的 LB 平板培养 12~14 h, 挑取单菌落若干用于菌落 PCR 鉴定, 验证后选取阳性菌落送至公司测序, 并用 80% 甘油保存菌种。

2.5 CoHMGR1 生物信息学分析

利用 NCBI 提供的 ORFfinder 和 Conserved Domains-search 在线分析其开放阅读框 (ORF) 及保守结构域; 使用 ProtParam tool 和 ProtScale 在线分析 CoHMGR1 的理化性质与亲/疏水性, 利用 SignalP 4.0 server 和 WOLF PSORT 工具分别来预测信号肽和定位信号, 以及 TMHMM Server 在线预测 CoHMGR1 的跨膜区; 利用 SOPMA 网站在线分析 CoHMGR1 的二级结构, 并利用 SWISS-MODEL 工

具构建其三维模型；使用 MEGA 7.0 构建 NJ 系统发生树。

3 结果与分析

3.1 CoHMGR1 基因克隆结果

利用 Primer Premier 5.0 软件，在转录本 c100572_g1 完整的 ORF 两侧设计引物 (CoHMGR1-F 和 CoHMGR1-R)。以山茱萸的 cDNA 为模板，经 RT-PCR 和 1.0% 的凝胶电泳检测，获得一条约 2 100 bp 的亮带。切胶回收该亮带，经与载体 pTOPO-T 连接，转化 DH5 α ，菌落 PCR 鉴定，挑取阳性克隆测序。测序结果切除载体污染序列，获得长度为 2 116 bp 的片段，命名为 CoHMGR1。

3.2 CoHMGR1 理化性质

利用 ORFfinder 在线预测，CoHMGR1 含有长度为 1 338 bp 的完整 ORF，编码 445 个氨基酸。经 ProtParam 在线分析工具的分析结果表明，CoHMGR1 蛋白分子式为 C₂₁₅₂H₃₄₁₄N₅₇₈O₆₃₆S₂₃，相对分子质量为 48 297.7。其一级结构中丙氨酸 (9.7%)、亮氨酸 (9.0%) 含量较高，而含量较低的有色氨酸 (1.3%)、组氨酸 (1.1%)，其中共 48 个带正电荷的氨基酸 (Asp+Glu)，45 个带负电荷的氨基酸 (Arg+Lys)，其理论等电点 (pI) 值 6.04。此编码蛋白的不稳定系数为 34.65，表明 CoHMGR1 蛋白相对稳定。

基于 ProtScale 工具提供的 Hphob/Kyte & Doolittle 算法来分析 CoHMGR1 蛋白的亲/疏水性，结果见图 1，CoHMGR1 蛋白的在第 6 个氨基酸位点得分最低，分值 -2.422，而最高得分 2.844 位于

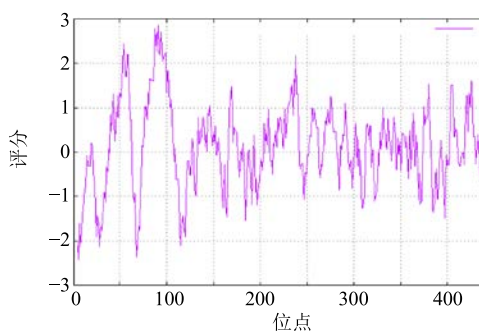


图 1 CoHMGR1 蛋白亲疏水性预测

Fig. 1 Hydrophobicity prediction of CoHMGR1 protein

第 91 个氨基酸处。总体来看，该蛋白整体的疏水性氨基酸含量要大于亲水性氨基酸，因此初步推定此蛋白为疏水性蛋白。

3.3 信号肽及亚细胞定位预测

利用 SignalP 4.0 server 和 WOLF PSORT 分别在线预测 CoHMGR1 蛋白的分泌信号和定位情况。SignalP 4.0 预测结果表明，CoHMGR1 蛋白没有信号肽，是非分泌蛋白。WOLF PSORT 分析结果显示，chlo: 7; mito: 4，表明该蛋白有可能于叶绿体或线粒体内存在。

3.4 保守结构域与跨膜区预测

利用 NCBI 提供的 CD-search 在线分析 CoHMGR1 编码蛋白的保守结构域，结果见图 2，表明该编码蛋白属于 HMG-CoA 还原酶超家族。使用 TMHMM Server 工具在线分析 CoHMGR1 的跨膜区，如图 3 所示，此蛋白具有 2

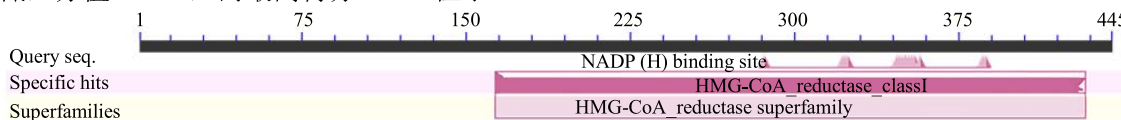


图 2 CoHMGR1 蛋白的保守结构域

Fig. 2 Conserved domain prediction of CoHMGR1-encoding protein

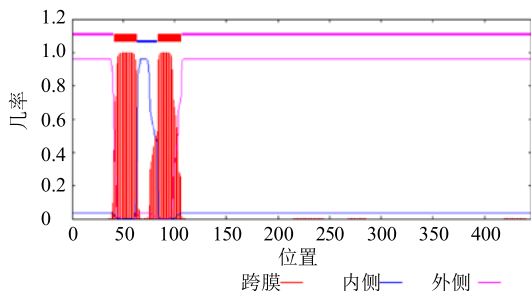


图 3 CoHMGR1 蛋白的跨膜区预测

Fig. 3 Predicted transmembrane regions of CoHMGR1 protein

个跨膜区，分别位于 41~63 位和 84~106 位氨基酸。

3.5 CoHMGR1 二、三级结构预测

使用 SOPMA 软件在线预测 CoHMGR1 蛋白的二级结构，结果见图 4。其中二级结构共有 4 种，以 α -螺旋 (蓝色，40.67%) 和无规卷曲 (紫色，40.45%) 为主要结构，还有少量的延伸链 (红色，13.26%) 与 β -转角 (绿色，5.62%)。利用 SWISS-MODEL 工具在线预测构建 CoHMGR1 蛋白的三维结构见图 5。结果表明，HMGR1 蛋白以 3cd0.1.C 蛋白作为模板，序列相似性为 51.08。

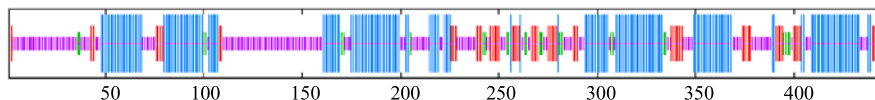


图 4 CoHMGR1 二级结构预测

Fig. 4 Secondary structure prediction of CoHMGR1 protein



图 5 CoHMGR1 三维结构预测

Fig. 5 Three-dimensional structure of deduced CoHMGR1

3.6 CoHMGR1 蛋白的同源性分析

将CoHMGR1的氨基酸序列进行BLSATp搜索相似序列,结果显示,CoHMGR1与喜树 *Camptotheca acuminata* L. 的HMGR (GeneBank号 AAB69727) 序列相似性高达79.56%。选取已在NCBI数据库报道过的植物HMGR氨基酸序列,使用MEGA 7.0软件,基于邻接法来预测系统(NJ)发生树。结果如图6所示,CoHMGR1与喜树和野茶的HMGR蛋白同源性较高,而与葡萄和莲的HMGR蛋白同源性较低。

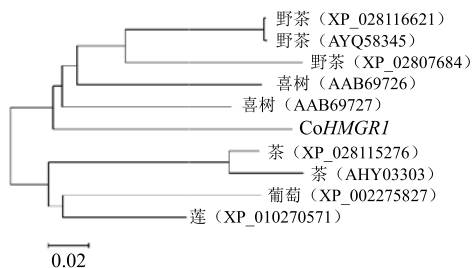


图 6 CoHMGR1 的 NJ 系统发生树

Fig. 6 Phylogenetic tree of CoHMGR1

4 讨论

山茱萸作为一种传统药材,不仅是许多中药的成分之一,也被用作很多保健品的原料。作为药用植物的一种,其特有的药用价值的最终来源便是植物次级代谢产生的萜类等具有活性的化学成分。但是该类物质含量极低,且野生资源匮乏,常规生产又不足以满足市场需要。因此,急需通过一些分子手

段来实现山茱萸等药用植物次生代谢物的大量生产。对于植物来说,特定组织中次生代谢物的合成主要是依赖于其合成基因在转录水平上的调控。

近年来,利用高通量测序技术对传统药用植物转录组的研究已经成为现代研究的重点,RNA-seq技术的发展极大的推动了转录组学的研究^[23-24],现已广泛应用于药学、生物学等领域。目前,已有多数药用植物进行了转录组的研究,并开展了活性成分合成途径关键酶基因的挖掘与分析^[25],为解析这些基因的功能奠定了基础。

甲羟戊酸途径合成 IPP 及其异构体,而 HMG-CoA 还原酶催化的过程是该途径中的首个限速步骤^[10-11]。HMG-CoA 还原酶催化 HMG-CoA 合成 MVA,该酶的活性与 MVA 的浓度相关,两者之间相互调控^[26]。Enjuto 等^[27]研究表明,在模式植物拟南芥中存在 2 个不同的基因都能编码 HMGR,由此证明了 HMGR 基因家族有多个成员。目前已经有多种药用植物均克隆出了 HMGR 基因^[28-30],但山茱萸中 HMGR 基因的相关研究还较为欠缺。

本研究基于高通量转录组测序技术,利用生物信息学的方法^[30-32]对山茱萸 HMGR1 基因及其编码蛋白的结构与功能进行预测。CoHMGR1 氨基酸序列的同源分析表明,该基因与其他药用植物 HMGR 序列的相似性较高。对 CoHMGR1 蛋白结构域的预测结果表明,CoHMGR1 蛋白属于 HMG-CoA 超家族。而 CoHMGR1 只是山茱萸 HMGR 基因家族中的一员,其生物学功能以及调控机制还需进一步验证。同时也需克隆山茱萸 HMGR 基因家族中的其他成员,分析每个成员的功能以及各成员之间有无协同作用等。本研究为深入解析山茱萸 HMGR 基因家族成员的功能及萜类物质的合成途径提供有效数据。

彻底解析药用植物中 HMGR 的基因序列及其作用机制,对明确萜类物质合成途径有很重要的作用,而了解萜类合成过程的分子机制,可以大批量生产有活性的萜类物质,也可以提高一些稀有或利用率低的药用植物的经济价值,极大的助力中药事业的发展。因此,以次生代谢途径为基础,利用基因工程技术,通过改进合成途径的调控元件,重构

次级代谢途径是实现大批量合成活性物质的有效方法,而改造其途径的关键工作是对关键酶基因进行克隆和转录调控等。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Ma W, Wang K J, Cheng C S, *et al.* Bioactive compounds from *Cornus officinalis* fruits and their effects on diabetic nephropathy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 840-845.
- [3] Park J Y, Han A R, Kil Y S, *et al.* A new secoiridoid glycoside from the fruits of *Cornus officinalis* (Cornaceae) [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(13): 1504-1510.
- [4] 皮文霞, 封晓鹏, 蔡宝昌, 等. 山茱萸-山药对糖尿病小鼠心肌的保护作用 [J]. *中药材*, 2017, 40(7): 1699-1703.
- [5] 周瑞, 唐志书, 武婧, 等. 基于抗类风湿关节炎作用评价膜分离技术富集山茱萸抗炎组分的适用性 [J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1182-1188.
- [6] Chen F, Tholl D, Bohlmann J, *et al.* The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom [J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 212-229.
- [7] Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants [J]. *Nat Prod Rep*, 1999, 16(5): 565-574.
- [8] Dudareva N, Andersson S, Orlova I, *et al.* From the cover: The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3): 933-938.
- [9] Fangyuan Z, Wanhong L, Jing X, *et al.* Molecular characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene family in *Artemisia annua* [J]. *Fron Plant Sci*, 2018, 9: 952-959.
- [10] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 521-547.
- [11] Darvishi Z D, Jalali J M, Dehghani H, *et al.* An investigation of the HMGR gene and IPI gene expression in black caraway (*Bunium persicum*) [J]. *Biotech*, 2018, 8(9): 405-409.
- [12] Dai Z, Cui G, Zhou S F, *et al.* Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoid tanshinone accumulation [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168(2): 148-157.
- [13] 李清, 李标, 郭顺星. 金钗石斛 HMGR 基因克隆及菌根真菌诱导表达分析 [J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(22): 1976-1982.
- [14] Shen G, Pang Y, Wu W, *et al.* Cloning and characterization of a root-specific expressing gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Ginkgo biloba* [J]. *Mol Biol Rep*, 2006, 33(2): 117-127.
- [15] Shang C H, Zhu F, Li N, *et al.* Cloning and characterization of a gene encoding HMG-CoA reductase from *Ganoderma lucidum* and its functional identification in yeast [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(5): 1333-1339.
- [16] 刘美佳, 于怡琳, 姜森, 等. 珠子参中 HMGR 基因对皂苷生物合成的影响 [J]. *西北植物学报*, 2018, 38(4): 624-630.
- [17] 刘佳, 全雪丽, 姜明亮, 等. 低温胁迫对人参皂苷生物合成途径基因家族表达特性的影响研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(11): 1956-1961.
- [18] 张亚敏, 孙凤灵, 卢雪花, 等. 泽泻中三萜类成分累积与基因表达的相关性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(5): 942-947.
- [19] 张萍, 刘迪秋, 葛锋, 等. 三七 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶基因的克隆和生物信息学分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(18): 2684-2690.
- [20] 魏麟, 黎晓英, 刘胜贵, 等. 鱼腥草 HMGR 基因 cDNA 克隆、差异表达及蛋白质结构分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3815-3819.
- [21] Kalita R, Modi M K, Sen P. RNAi mediated silencing of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases (HMGR) in *Centella asiatica* [J]. *Gene Rep*, 2018, 11: 52-57.
- [22] Ponciano G, Dong N, Chen G, *et al.* A bicistronic transgene system for genetic modification of *Parthenium argentatum* [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2018, 12(2): 149-155.
- [23] 曹丹, 金孝芳, 马林龙, 等. 基于 RNA-seq 技术的茶树 CsbHLH62 生物信息学分析 [J]. *西南农业学报*, 2019, 32(1): 36-41.
- [24] Yao W, Zhou B, Zhang X, *et al.* Transcriptome analysis of transcription factor genes under multiple abiotic stresses in *Populus simonii* P. *nigra* [J]. *Gene*, 2019, 707: 189-197.
- [25] 王尧龙, 黄璐琦, 袁媛, 等. 药用植物转录组研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(11): 2055-2061.
- [26] Nakanishi M, Goldstein J L, Brown M S. Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme [J]. *J*

- Biol Chem*, 1988, 263(18): 8929-8937.
- [27] Enjuto M, Balcells L, Campos N, *et al.* Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(3): 927-931.
- [28] 陈小保, 李帅广, 易善泽, 等. 阳春砂 HMGR 基因 cDNA 克隆及生物信息学分析 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2016, 37(4): 285-292.
- [29] 荆 腾, 王 淋, 乌云塔娜, 等. 杜仲橡胶合成相关酶基因 HMGR 的克隆与表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(4): 726-731.
- [30] 孙宇峰, 厉 姐, 黄 颖, 等. 甘草中新 NADPH 细胞色素 P450 还原酶基因的克隆与相关生物信息学分析 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1676-1681.
- [31] 丘日光, 张天缘, 杨仕梅, 等. 百脉根 TALE 转录因子家族的鉴定与生物信息学分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(2): 466-475.
- [32] Hu W, Wu X, Tang J, *et al.* Anti-cancer targets of formononetin and molecular mechanisms in osteosarcoma: Findings of bioinformatic and experimental assays [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3505-3511.