

• 药材与资源 •

竹节参 β -香树素合成酶基因克隆及生物信息学分析

袁 丁, 焦梦婷, 许 成, 张长城, 刘朝奇, 何毓敏, 袁成福

三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

摘要:目的 克隆三萜皂苷代谢关键酶竹节参 β -香树素合成酶 (β -AS) 基因, 采用生物信息学分析其序列及其结构与功能, 为竹节参合成及调控机制研究提供基础。方法 提取竹节参叶片 RNA, 扩增 β -AS 基因编码区序列, 将序列连接至 pMDTM18-T 载体进行克隆、测序, 并利用生物信息学分析比较移栽品和栽培品竹节参 β -AS 蛋白的特征, 构建竹节参 β -AS 蛋白的系统进化树。结果 克隆出移栽品和栽培品竹节参的 β -AS 基因编码区序列, 开放阅读框 (ORF) 均为 2 286 bp, 编码 761 个氨基酸。2 个品种 β -AS 蛋白在细胞中的基本结构和功能是一致的, 但两者之间存在 8 个氨基酸差异, 使两者的蛋白质二级结构、三级结构磷酸化位点以及理化性质存在差异, 可能会导致两者的催化活性存在差异。结论 克隆得到野生移栽品和栽培品竹节参的 β -AS 基因, 并对 2 个品种 β -AS 蛋白进行了生物信息学分析和比较, 为今后研究该酶的结构特征、功能以及其与皂苷含量的相关性提供参考, 也为竹节参合成生物学研究提供了生物基因元件。

关键词: 竹节参; β -香树素合成酶基因; 基因克隆; 生物信息学分析; 三萜皂苷

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-5028-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.022

Cloning and bioinformatic analysis of β -AS gene from *Panax japonicus*

YUAN Ding, JIAO Meng-ting, XIU Cheng, ZHANG Chang-cheng, LIU Zhao-qi, HE Yu-min, YUAN Cheng-fu

College of Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: Objective The key enzyme of triterpene saponin metabolism was cloned and its sequence, structure and function were analyzed by bioinformatics. **Methods** RNAs were extracted from the leaves of *Panax japonicus*. The full-length cDNA sequences of β -AS were cloned by utilizing RT-PCR method, and the sequence was connected to the pMDTM18-T for cloning and sequencing. β -AS protein characteristics in transplanted species and cultivated species of *P. japonicus* were predicted and compared by bioinformatics analysis and the phylogenetic tree of β -AS protein was constructed. **Results** The β -AS sequences in transplanted species and cultivated species of *P. japonicus* were obtained, which had 2 286 bp ORF and encoded 761 amino acids. There were little differences between the two varieties of β -AS proteins in physicochemical properties, secondary structure, tertiary structure, and phosphorylation sites, which may lead to show difference in catalytic activity. **Conclusion** This work also obtained the full-length of cDNA sequence of β -AS gene in transplanted and cultivated varieties of *P. japonicus*, and provided a systemic sequence analysis of β -AS proteins, which can provide the useful information for β -AS studies in the future.

Key words: *Panax japonicus*; β -amyrin synthase gene; gene cloning; bioinformatics analysis; triterpene saponin

竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 为五加科人参属中的一种多年生草本药用植物^[1]。国内外近年来对竹节参药理方面的研究证明, 竹节参在中枢神经系统、心血管系统、消化系统、免疫系统等多个系统中均有不同程度的药理活性^[2]。到目前为止, 已从竹节参的根、茎、叶等部位分离出大量化学成分, 其主要药效成分为皂苷类化合物^[3]。齐墩果烷型皂苷是竹节参主要的活性成分, 为三萜类皂苷, 生物体

主要通过甲羟戊酸途径合成, 其中 β -香树素合成酶 (β -AS) 是该合成途径中的一个关键限速酶^[4]。 β -AS 由 β -香树素合成酶基因调控, 现已从甘草、人参、黄花蒿、槲木等多种植物中克隆出 β -香树素合成酶基因的 cDNA 序列^[5]。有研究表明, β -AS 基因表达与皂苷含量之间存在相关性, 药用植物中 β -AS 基因的变异可导致其活性成分含量不同^[6]。本实验以野生移栽品和栽培品竹节参为材料, 其中宜昌五峰

收稿日期: 2020-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673675)

作者简介: 袁 丁, 男, 教授。Tel/Fax: 15572799866 E-mail: xydyd@ctgu.edu.cn

深溪河移栽品竹节参样本为野生移栽品,恩施双河镇栽培品竹节参样本为大棚集中种植的栽培品,应用分子生物学技术克隆齐墩果烷型皂苷生物合成途径中一个关键限速酶 β -AS 基因,并用生物信息学的方法对 β -AS 蛋白的特征进行分析,为今后深入研究该酶的结构特征、功能以及其与皂苷含量的相关性提供参考,也为竹节参合成生物学研究提供了生物基因元件。

1 材料与方法

1.1 材料

2016 年 8 月 15 日,在湖北省宜昌市五峰县湾潭镇九门村深溪河(海拔 1 260 m)采集竹节参野生移栽品(SHX),2016 年 8 月 16 日,在湖北省恩施市双河镇长槽村 3 组(海拔 1 508 m)采集竹节参栽培品(SHZ)。经笔者鉴定为竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey.。

1.2 方法

1.2.1 竹节参 RNA 的提取和逆转录 使用 RNA 提取试剂盒提取竹节参叶片 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,用微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度根据 A_{260}/A_{280} 的比值判断纯度。按照反转录试剂盒说明书,以提取的竹节参叶片 RNA 为模板,反转录合成得到 cDNA。

1.2.2 竹节参 β -AS 基因的引物设计和 PCR 扩增 设计引物序列:正向 5'-GAAGATGTGGAGGCTA-ATG-3';反向 5'-GTTTCAGACGCTTTTAGGTG-3',以上述得到的 cDNA 为模板,扩增竹节参 β -AS 基因 cDNA,PCR 扩增的程序:94 °C 预变性 5 min,再进行 32 个循环:94 °C、1 min,51 °C、1 min,72 °C、2.5 min,最后 72 °C 延伸 10 min。使用琼脂糖凝胶电泳检测扩增获得 PCR 片段。

1.2.3 特异性片段克隆 纯化回收竹节参 β -AS 基因片段,按照试剂盒说明书将纯化产物与载体连接,将连接产物转化如大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,使用碱法小量提法提取质粒。用上述提取的质粒和载体通用引物 BcaBEST Sequencing Primers、M13 Primers 进行 PCR 检测目的基因,然后进行阳性重组质粒测序测通。

1.3 竹节参 β -AS 基因的生物信息学分析

依据 β -AS 基因测序结果,使用 NCBI 中 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线软件查找基因序列的开放阅读框(Open reading frame, ORF)并翻译出其所编码氨基酸序列;借助

ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam (web.expasy.org/protparam/) 对竹节参 β -AS 基因编码蛋白质的基本理化性质分析,以及提供的在线工具 ProScale (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) 对多肽链的亲水/疏水性进行分析;使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 在线预测蛋白质二级结构;采用在线工具 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 运用同源建模法进行蛋白质三维结构模拟;运用在线工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白质跨膜区结构域;蛋白质信号肽预测使用在线服务器 Signal P 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP/>);蛋白质亚细胞定位预测运用在线工具 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>);使用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测蛋白质的磷酸化位点;利用 NCBI 服务器上的 Conserved Domain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 工具对蛋白保守结构域进行预测;使用 NCBI 提供的在线工具 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将竹节参 β -AS 基因翻译的氨基酸序列与 NCBI 中已登录的其他物种进行序列比对,其中多序列比对由 Clustal W 软件完成以及系统进化树由 MEGA 5.0 软件构建。

2 结果与分析

2.1 竹节参 β -AS 基因克隆

提取竹节参 RNA 后,用微量核酸蛋白定量仪测定 RNA 溶液的浓度以及波长 260 nm 和 280 nm 处的吸光值(A),计算 A_{260}/A_{280} 的比值,结果显示 A_{260}/A_{280} 的比值均在 2.0~2.1。RNA 经琼脂糖凝胶电泳,可见清晰的 2 条带,且第 1 个条带是第 2 个条带的 2 倍亮(图 1)。由此可见所提取的竹节参 RNA 质量好,可用于后续实验。RNA 逆转录得到的 cDNA,经 PCR 扩增后,可以得到 2 000 bp 左右的产物,与预期片段大小一致(图 2),将 PCR 扩增产物纯化回收并克隆,挑选白色菌落摇菌后提取质粒,经载体通用引物扩增鉴定阳性重组质粒,将获取的阳性重组质粒进行双向测序测通,结果显示深溪河移栽品竹节参与双河镇栽培品竹节参的 β -AS 基因序列长度均为 2 292 bp,相似度为 99.21%,存在 18 个碱基的差异(表 1)。

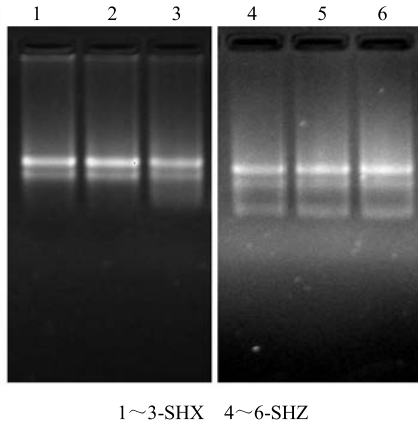


图 1 竹节参总 RNA 电泳图
Fig. 1 Total RNA electrophoresis of *Panax japonicus*

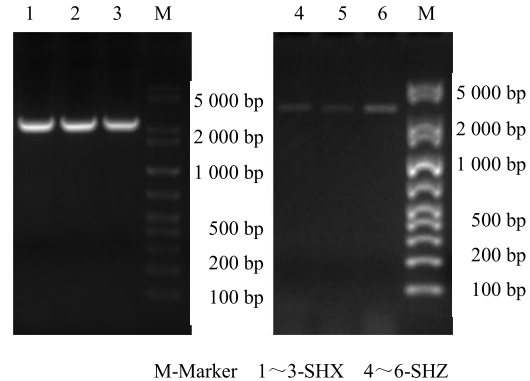


图 2 竹节参 β -AS 基因全长序列电泳结果
Fig. 2 Electrophoresis results of full-length sequence of β -AS gene of *P. japonicus*

表 1 竹节参 β -AS 基因碱基差异位点

Table 1 Base differences of β -AS gene of *P. japonicus*

品种	115 位	162 位	300 位	355 位	367 位	493 位	580 位	787 位	808 位
SXH	G	T	A	C	G	T	C	A	A
SHZ	A	G	G	A	C	C	A	G	C
品种	874 位	878 位	1 200 位	1 202 位	1 368 位	1 412 位	1 555 位	1 828 位	1 958 位
SXH	T	G	A	A	C	T	C	T	A
SHZ	A	C	G	G	A	C	T	C	C

2.2 竹节参 β -AS 基因编码蛋白生物信息学分析

2.2.1 理化性质分析 深溪河移栽品竹节参 β -AS 基因编码 761 个氨基酸，相对分子质量为 87 742.28，分子式为 $C_{3972}H_{5978}N_{1040}O_{1121}S_{47}$ ，总原子数为 12 158。理论等电点 (pI) 为 5.87，负电荷残基 (Asp+Glu) 数为 91，正电荷残基 (Arg+Lys) 数为 74。该蛋白不稳定指数为 47.89，属于不稳定性蛋白。脂肪系数为 75.65，总平均亲水性为 -0.362。双河镇栽培品竹节参 β -AS 基因编码 761 个氨基酸，相对分子质量为 87 884.46，分子式为 $C_{3973}H_{5984}N_{1050}O_{1118}S_{48}$ ，总原子数为 12 173。pI 为 6.00，负电荷残基 (Asp+Glu) 数为 91，正电荷残基 (Arg+Lys) 数为 76。该蛋白不稳定指数为 48.41，属于不稳定性蛋白。脂肪系数为 74.88，总平均亲水性为 -0.381。用 ProScale 对竹节参 β -AS 基因编码蛋白的亲疏水性进行分析，结果显示这 2 个品种竹节参的 β -AS 蛋白均为亲水性蛋白。

2.2.2 保守结构域预测 使用 NCBI 提供的 Conserved Domain 工具预测竹节参 β -AS 基因编码蛋白保守结构域，结果显示深溪河移栽品和双河镇栽培品竹节参 β -AS 蛋白均具有氧化鲨烯环化酶 (oxido squalene cyclase, OSC) 保守区 SQCY_1

(cd02892) 和超家族保守区 ISOPREN_C2_like superfamily (cl08267) (这个保守区属于第 II 类萜类环化酶家族，其中包括氧化鲨烯环化酶)，由此说明，在植物生物体内，该蛋白属于 OSC 家族，具有催化 2,3-氧化角鲨烯形成皂苷骨架的功能。

2.2.3 跨膜结构、信号肽和亚细胞定位预测 根据 HMM Server 预测 β -AS 蛋白的跨膜结构，结果显示深溪河移栽品竹节参和双河镇栽培品竹节参的 β -AS 蛋白属于非跨膜蛋白。根据 SignalP 预测竹节参 β -AS 蛋白氨基酸序列中潜在的信号肽剪切位点，结果显示该蛋白没有信号肽序列，因此可推测其合成后没有发生转运。使用 WOLF PSORT 工具基于竹节参 β -AS 蛋白的氨基酸序列进行亚细胞定位预测，深溪河移栽品竹节参和双河镇栽培品竹节参 β -AS 蛋白结果一致。

2.2.4 磷酸化位点预测 蛋白质磷酸化是调节和控制蛋白质活力和功能的重要机制，其中丝氨酸 (Serine, Ser)、苏氨酸 (Threonine, Thr) 和酪氨酸 (Tyrosine, Tyr) 残基侧链的羟基为真核细胞的蛋白质磷酸化主要发生位点。运用 NetPhos 在线分析程序预测竹节参 β -AS 基因编码蛋白中以上 3 种氨基酸磷酸化位点，结果显示，当阈值取 0.5 时，深溪

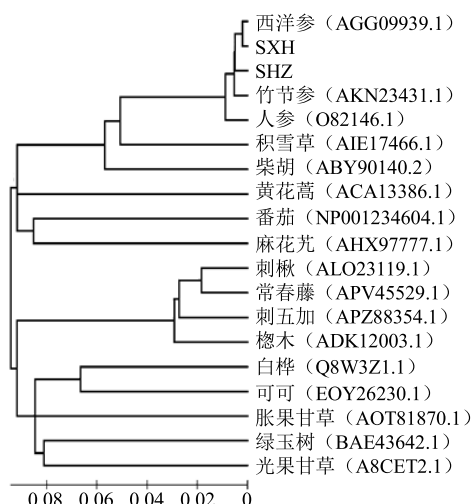
Blastp 比对,发现竹节参 β -AS 蛋白在氨基酸水平上与 50 多种植物的 β -AS 蛋白相似,相似序列多达 156 条,相似度均在 80% 以上。从中筛选出与 2 个品种竹节参 β -AS 蛋白均具有较高相似度的 17 种植物的 β -AS 氨基酸序列,由 ClustalW 进行多序列比对,发现这些 β -AS 均具有 OSC 超基因家族特征保守模体(Motif),包括 1 个 MWCRCY 模体、1 个 DCTAE 模体和 4 个 QW (QXXXXXW) 模体,模体碱基位点如表 2 所示。MWCYCR 模体在 β -AS 蛋白中较为保守,有研究认为,该序列中的色氨酸(W)可能对三萜类物质碳骨架的生物合成有重要作用;

DCTAE 保守序列与底物结合相关; QW (QXXXXXW) 特征序列是一段带有负电性的芳香族区域,在催化底物 2,3-氧化鲨烯环化过程中起到稳定蛋白结构的作用。进一步证实了从深溪河移栽品竹节参和双河镇栽培品竹节参中克隆得到的基因为 β -AS 基因,该基因编码的 β -AS 蛋白属于 OSC 超家族。

2.2.8 系统进化树构建 为了解竹节参 β -AS 蛋白与具有相似氨基酸序列的物种间的亲缘关系,基于上述相似氨基酸序列,通过 MEGA 5.0 软件采用 NJ 法构建进化树,结果(图 5)显示,竹节参 β -AS

表 2 β -AS 蛋白的 OSC 模体碱基位点Table 2 OSC motif base site of β -AS protein

植物	MWCRCY 模体位点	DCTAE 模体位点	QW (QXXXXXW) 模体位点
西洋参 <i>Panax quinquefolius</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
竹节参 <i>Panax japonicus</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
人参 <i>Panax ginseng</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
积雪草 <i>Centella asiatica</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
柴胡 <i>Bupleurum chinense</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
楤木 <i>Aralia elata</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
白桦 <i>Betula platyphylla</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
刺楸 <i>Kalopanax septemlobus</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
常春藤 <i>Hedera helix</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
刺五加 <i>Eleutherococcus senticosus</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
麻花苣 <i>Gentiana straminea</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
绿玉树 <i>Euphorbia tirucalli</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
黄花蒿 <i>Artemisia annua</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
可可 <i>Theobroma cacao</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
光果甘草 <i>Glycyrrhiza glabra</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位
胀果甘草 <i>Glycyrrhiza inflata</i>	260~265 位	489~493 位	113~119 位、163~169 位、606~612 位

图 5 β -AS 蛋白氨基酸序列的系统发育树Fig. 5 Phylogenetic tree of amino acid sequence of β -AS protein

蛋白与五加科人参属植物西洋参、竹节参、人参亲缘关系最近,划归为同一分支,其中与西洋参(AGG09939.1)同源性最高,深溪河移栽品竹节参与西洋参亲缘关系更近,而与同种的双河镇栽培品竹节参稍远,可能是由于二者培育环境的差异。

3 讨论

竹节参具有重要的药理价值,由于野生竹节参被过度采挖,导致野生资源匮乏,而竹节参生长周期长,人工种植耗时长,品质差异较大,难以满足市场需求,因此,如何提高竹节参总皂苷产量已成为竹节参应用和发展的关键问题之一。竹节参总皂苷由于产地和栽培年限的不同含量会有所差异。湖北恩施、四川峨眉、云南昭通等地产竹节参总皂苷含量较高,而四川雅安、湖北五峰、神农架地区所产竹节参总皂苷含量相对偏低。

竹节参皂苷属于三萜类皂苷,在生物体内主要依赖甲羟戊酸(MVA)途径合成。MVA 途径中的酶促反应对代谢途径具有重要影响,改变这些关键性的酶促反应,能提高生物体内三萜皂苷的合成。酶促反应主要是受酶的调控,现已发现 MVA 途径中多种关键性限速酶,其中氧化鲨烯环化酶家族处于三萜皂苷合成途径的重要位置^[7],是催化前体物 2,3-氧化鲨烯环化形成甾醇和各种三萜皂苷骨架的关键酶^[8]。

竹节参总皂苷在含量上以齐墩果烷型皂苷为主,调控其皂苷合成的 OSC 家族成员主要是 β -AS,它是 OSC 家族中目前唯一发现调控齐墩果烷型皂苷合成的限速酶^[9]。 β -AS 处于形成齐墩果烷型皂苷或达玛烷型皂苷的重要分支点。 β -AS 由 β -香树酯醇合成酶基因调控,现已从甘草、人参、黄花蒿、楤木等多种植物中克隆出 β -香树酯醇合成酶基因的 cDNA 序列。有研究表明, β -AS 基因表达与皂苷含量之间存在相关性,药用植物中 β -AS 基因的变异可导致其活性成分含量不同。研究人员发现,药用植物有效成分的生物合成相关基因变异,可能会导致其表达的酶蛋白结构的改变,引起酶活性存在差异性,使催化产物的含量不同。因此获取皂苷含量高表达的关键酶基因型是极其重要的^[10]。

对比深溪河野生移栽品竹节参和双河镇栽培品竹节参 β -AS 基因 cDNA 序列发现,两者 ORF 序列相似度为 99.21%,存在 18 个碱基的差异,第 111、351、363、489、576、783、804、870、1 551、1 824 位碱基不同而翻译的氨基酸没有发生变化,第 158、296、874、1 196、1 198、1 364、1 408、1 954 位碱基不同导致翻译的氨基酸有所不同^[11]。对比深溪河移栽品竹节参和双河镇栽培品竹节参 β -AS 蛋白,发现 2 个品种 β -AS 蛋白在细胞中的定位以及在生物体中发挥的功能是一致的,有 OSC 家族特征模体序列 MWCYCR、DCTAE 和 QXXXXXW,在 MVA 途径中发挥催化 2,3-氧化角鲨烯形成皂苷骨架的功能。研究人员发现, β -AS 基因编码序列的变异与皂苷合成量相关^[12]。由此提示深溪河移栽品竹节参和双河镇栽培品竹节参 β -AS 蛋白功能基本一致,但催化活性可能存在差异。

系统发生学分析是研究相似性序列之间同源性关系的一个非常有效的工具。利用 MEGA 5.0

绘制的系统进化树可以看出深溪河移栽品竹节参和双河镇栽培品竹节参均与五加科人参属植物的 β -AS 蛋白聚为一大枝上,表明其来源于同一祖先,具有较高的亲缘关系^[13]。本实验所进行的生物信息学分析,使人们对 2 个品种的竹节参 β -AS 基因及其编码的蛋白质功能有所了解,为进一步的研究提供理论依据。因此,可得出结论,应用分子生物学技术克隆得到深溪河野生移栽品和双河镇栽培品竹节参的 β -AS 基因全长,两者均为 2 292 bp,均包含 1 个 2 286 bp 的完整 ORF,编码 761 个氨基酸组成的蛋白^[14]。生物信息学分析 2 个品种 β -AS 蛋白两者在细胞中的定位和在生物体中发挥的功能一致,但由于两者存在 8 个氨基酸差异,使深溪河野生移栽品竹节参和双河镇栽培品竹节参的理化性质、蛋白质二级、三级结构以及磷酸化位点存在差异,可能导致竹节参三萜皂苷含量的差异。

参考文献

- [1] 左 锐,袁 丁.竹节参化学成分和药理活性研究进展 [J].时珍国医国药,2005,16(9):838-841.
- [2] Choi D W, Jung J, Ha Yi, et al. Analysis of transcripts in methyljasmonate treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 557-566.
- [3] 邢朝斌,龙月红,李菲菲,等.刺五加鲨烯合酶基因家族两成员的表达及其与皂苷含量的关系 [J].西南农业学报,2014,27(3):1252-1255.
- [4] 罗红梅,宋经元,李雪莹,等.人参皂苷合成生物学关键元件 HMGR 基因克隆与表达分析 [J].药学学报,2013,48(2):219-227.
- [5] 席培宇,刘 颖,陈宏昊,等.基于 β -AS 基因的甘草道地性形成机制研究 [J].中国实验方剂学杂志,2013,19(8):153-158.
- [6] 曹豪杰.人参 β -AS 基因的表达调控与功能分析 [D].长春:吉林大学,2013.
- [7] Lee M H, Jeong J H, Seo J W, et al. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* over expressing squalenesynthase gene [J]. *Plant Cell Physio*, 2004, 45(8): 976-984.
- [8] Hesselstein-Muller T, Schaller H, Benveniste P. Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 45(1): 75-92.
- [9] 龙月红,李菲菲,杨 果,等.刺五加 β -香树酯醇合成

- 酶基因的克隆及其表达与皂苷量的相关性 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1354-1359.
- [10] Chen S, Yao H, Han J, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): 8613-8621.
- [11] Tehen N, Parveen I, Pan Z, *et al.* DNA barcoding of medicinal plant material for identification [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25: 103-110.
- [12] Papadopoulou K, Melton R E, Leggett M, *et al.* Compromised disease resistance in saponin-deficient plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12923-12928.
- [13] 李尚伟, 杜娟. 关于分子生物学中同源性分析 [J]. 教育教学论坛, 2014, 51: 184-185.
- [14] 王可鉴, 贺林, 杨仑. 生物信息学在药物研究和开发中的应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(1): 118-125.

更 正

钟文蔚, 郭立玮, 袁海, 陈顺权. 以“材料化学工程”理念构建“基于膜过程的中药绿色制造工程理论、技术体系”的探索 [J]. 中草药, 2020, 51(14): 3609-3616. 由于作者的工作疏忽, 在论文撰写、修改、发表过程中忘记对该论文的图 1 和图 2 标注引用文献。现经作者申请, 作者单位同意, 对该论文的图 1 和图 2 加注文献出处, 图 1 和图 2 补充引用文献: 郭立玮, 朱华旭. 基于膜过程的中药制药分离技术: 基础与应用 [M]. 上海: 科学出版社, 2019.

特此更正

《中草药》杂志编辑部