

# 凹叶厚朴低温胁迫 SSH 文库的构建及差异基因的表达分析

陆宁<sup>1</sup>, 陈剑成<sup>1</sup>, 郑郁善<sup>2\*</sup>

(1. 福建农林大学林学院, 福建福州 350002; 2. 福建农林大学艺术园林学院, 福建福州 350002)

**摘要** [目的]通过凹叶厚朴差减文库的构建及序列分析,找出其主要抗寒相关功能基因。[方法]随机挑选单克隆菌落进行 PCR 检测,对 837 个阳性克隆测序后进行拼接得到 97 个 unigenes,将 97 个 unigenes 在 NCBI 进行 BLAST 比对,后进行 BLAST2GO 功能分类,推定出 11 个相关基因进行荧光定量 PCR。[结果] *CHS*、*APX*、*TRX*、*ERF*、*DREB*、*LHCB*、*WRKY*、*HSP*、*PP2C*、*GAPDH* 10 个基因在凹叶厚朴受到低温侵害时出现差异表达,推断这 10 个基因在低温时可能表现出防御机制。[结论]该研究为与凹叶厚朴亲缘关系相近的植物抗低温特性遗传育种提供理论基础。

**关键词** 凹叶厚朴;低温胁迫;SSH 文库;基因表达量

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)14-141-05

## Construction of *Magnolia officinalis* Low Temperature Stress SSH Library and Differential Gene Expression Analysis

LU Ning<sup>1</sup>, CHEN Jian-cheng<sup>1</sup>, ZHENG Yu-shan<sup>2\*</sup> (1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. College of Art and Landscape, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

**Abstract** [Objective] The aim was to obtain cold resistance relevant genes through construction of *Magnolia officinalis* subtractive library and sequence analysis. [Method] PCR detection was conducted on randomly selected monoclonal colony, after 837 positive clone sequencing, 97 unigenes were obtained, BLAST comparison was conducted on NCBI, then BLAST2GO functional classification was carried out. [Result] Fluorescence quantitative PCR was conducted on 11 relevant genes. *CHS*, *APX*, *TRX*, *ERF*, *DREB*, *LHCB*, *WRKY*, *HSP*, *PP2C*, *GAPDH* exhibited the defense mechanism when *Magnolia officinalis* was damaged by low temperature. [Conclusion] The study can provide theoretical basis for cold resistance genetic breeding of plants with similar affinities to *Magnolia officinalis*.

**Key words** *Magnolia officinalis*; Low temperature stress; SSH library; Gene expression

温度是影响凹叶厚朴生长发育的关键因素,探寻低温胁迫对凹叶厚朴分子机理的影响具有重要的理论和实践意义。植物为了应对寒冷气候进化形成了具有抗低温能力的遗传特性<sup>[1]</sup>。当受到低温伤害时植物的抗寒基因才能被诱导表达启动。植物在抵御低温过程中是由多个基因共同参与代谢调控,单个基因无法增加植物的抗寒性<sup>[2]</sup>。根据抗寒过程中代谢产物的作用归为两类:调控基因和保护基因<sup>[3]</sup>。调控基因是编码能与操纵序列结合的调控蛋白的基因,能够起到调节保护基因的表达。保护基因转录翻译而成的蛋白及其他代谢产物可以直接起到抗低温的作用<sup>[4]</sup>。

目前,对凹叶厚朴及其亲缘相近植物有关抗寒基因的研究鲜见报道。笔者通过凹叶厚朴差减文库的构建及序列分析,找出其主要抗寒相关功能基因,分析代谢途径,以期为与凹叶厚朴亲缘关系相近的植物抗低温特性遗传育种提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 选取 11 月份生长健壮、粗细接近的 2 年生凹叶厚朴,来源于三明明溪。

**1.2 试剂** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 Trizol 试剂均购自诺普生物有限公司。逆转录试剂盒和载体 pMD18-T vector 均购自宝生物工程(中国)有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

## 1.3 方法

**1.3.1 植物半致死温度的测定。** 幼苗低温锻炼后,选取适量材料分别置于 -2、-4、-6、-8、-10、-12、-14、-16  $^{\circ}\text{C}$

的低温冰箱中低温胁迫 24 h,将顶芽取下,加入 ddH<sub>2</sub>O 后用电导率仪测定第 1 次内含物渗透值(*C<sub>i</sub>*);然后将其置于沸水中水浴 10 min 后 25  $^{\circ}\text{C}$  下放置 12 h,漩涡振荡后测定第 2 次电解质渗透值(*C<sub>t</sub>*),按  $Y = (C_i - C_w) / (C_t - C_w)$  计算试样的电解质渗透率,每处理重复 3 次。

对测定后的结果用 Logistic 方程对温度与电解质渗透值关系进行拟合,用坐标曲线的拐点温度作为试样的临界温度。Logistic 方程:  $Y = K / (1 + ae^{bt})$ 。

**1.3.2 植物的低温胁迫处理。** 为使 driver 组和 tester 组除温度不同其他生长条件一致,采取如下方法进行试验:取 4 棵凹叶厚朴苗,分为 2 盆,放于 25  $^{\circ}\text{C}$  人工气候培养箱培养 7 d,7 d 后将一盆凹叶厚朴留于人工气候培养箱中,作为 driver 组;将另一盆凹叶厚朴于生长期转移至温度为半致死温度的人工气候培养箱中培养 3 d,作为 tester 组。3 d 后将 2 组顶芽采下除去最外层,保存备用。

**1.3.3 RNA 的提取和 cDNA 的合成。** 采用天根 RNAPrep-pure 植物总试剂盒法提取凹叶厚朴顶芽总 RNA,取得到的 2 管 driver 组(常温)总 RNA 提取液与 2 管 tester 组(低温)RNA 提取液各 5  $\mu\text{L}$  于 PCR 管中进行质量检测。

使用 clontech 公司 In-Fusion SMARTer Directional cDNA Library Construction Kit 合成 cDNA,操作步骤按照使用说明书进行。加入小于 1  $\mu\text{g}$  的起始模板总 RNA,当进行至 10 个循环后暂停程序,取出反应液 30  $\mu\text{L}$  至新的 PCR 管,作为探寻最佳循环数的试验液体,剩余 70  $\mu\text{L}$  反应液置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用,当进行至 13、16、19、22 个循环,取出反应液 5  $\mu\text{L}$  至新的 PCR 管,将上述各循环产物取出 5  $\mu\text{L}$  通过电泳得到的条带寻找最佳循环数。之后将剩下的第一链产物全部进行至最佳循环数。

**1.3.4 抑制 SSH 文库的构建。** 抑制 SSH 杂交具体操作按照

**基金项目** 国家科技支撑计划项目(2011BAI01B06);福建省科技重点项目(2009Y0003)。

**作者简介** 陆宁(1988-),男,福建漳州人,硕士研究生,研究方向:分子生物学与基因工程。\*通讯作者,教授,博士,博士生导师,从事药用植物分子生物学方面的研究。

**收稿日期** 2016-04-26

PCR Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech 公司) 的使用说明书进行。以低温条件下凹叶厚朴 cDNA 作为试验组 (tester), 25 ℃ 凹叶厚朴 cDNA 作为驱动组 (driver)。经 Rsa I 酶切消化、接头连接、2 次 SSH 杂交和 2 次 PCR 完成整个抑制 SSH 杂交过程。利用看家基因 *CBC18* 的特异引物: 上游引物 TGATACAGATGGAACCTAAC, 下游引物 GGAAGCTCTAT-ACGCTAAC。对 SSH 和未 SSH 的第 2 次 PCR 产物进行 PCR 扩增, 以检测 SSH 成功与否。

用分级柱对 SSH PCR 产物进行纯化回收, 与 pMD-18T Easy 载体 (TaKaRa 公司) 连接。利用电转化法将连接好的载体导入大肠杆菌菌株 DH5a (Tian 公司) 中, 取一些原始文库稀释不同倍数混匀后移至培养皿中涂板, 将培养皿放入 37 ℃ 恒温培养箱过夜培养后检查菌落形成与否。经蓝白斑筛选, 挑取所有白色克隆至含有 LB 液体培养基中, 37 ℃ 振荡过夜培养。第 2 天每管取 1 μL 采用质粒引物进行阳性克隆 PCR 检测。将阳性克隆送伯尚生物公司进行测序。

**1.3.5 序列分析和功能分类。**将测序的序列进行去载体、聚类拼接得到 unigenes 序列, 将序列在 NCBI 蛋白数据库中进行搜索, 得到序列相关的相似核酸序列和相似蛋白质。在 BLAST 比对结果中, 将对齐分 (Score) > 80, 同一性 (Ident) > 35% 的序列进行相关作用注释, 将对齐分值 (Score) < 80 的序列利用 BLASTN 进行同源性比对。将序列用 BLAST2GO 进行功能分类。

**1.3.6 荧光定量 PCR 分析候选基因的表达。**将供试幼苗分为 4 组放入培养箱, 温度分别设为 25、6、-2、-8 ℃。胁迫处理 24 h 后取各处理凹叶厚朴顶芽, 提取总 RNA, 取各样品 RNA 1 μg, 按 TaKaRa 公司 PrimerScript™ RT reagent Kit 说明书进行反转录。基因的特异引物设计按照荧光定量 PCR 引物原则使用 Primer 5.0 软件对选定的 11 个低温相关的候选基因设计特异引物, 内参基因选用 *UBC18* 基因。

反应在 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行, 循环数为 40。每个样品 3 个重复, 相对表达量的计算:  $\Delta\Delta Ct = (Ct, gene - Ct, UBC18)_{\text{低温处理}} - (Ct, gene - Ct, UBC18)_{\text{常温处理}}$ 。

## 2 结果与分析

**2.1 半致死温度** 在 4 个温度梯度下将凹叶厚朴幼苗胁迫 24 h 后, 电导率检测结果见图 1。从图 1 可以看出, 在 -8 ~ -10 ℃ 电导率直线上升, 在 -10 ℃ 时电导率为 65.35%, 膜透性几乎完全破坏。运用 SPSS 软件对内含物渗透值进行分析, 得回归方程:  $y = 0.7526 / (1 + 18.925e^{-0.372x})$ , 半致死温度为 -7.93, 与预测值相近, 可以代表凹叶厚朴顶芽的半致死温度。

### 2.2 cDNA 的合成结果

**2.2.1 RNA 提取结果。**提取的 4 组凹叶厚朴 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  均高于 2.0 且小于 2.2, 认为 RNA 中蛋白质或其他有机物的污染在许可范围内。  $OD_{260}/OD_{230}$  均大于 1.8, 表明 RNA 溶液中的盐类等无机物污染较小, 且充分去除了漂洗残留的乙醇。由图 2 可知, 4 组提取的凹叶厚朴 RNA 经电

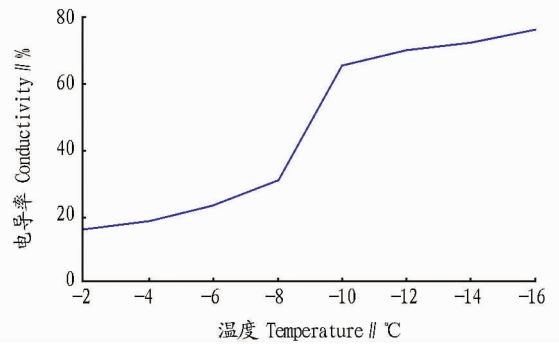


图 1 电导率随温度的变化规律

Fig. 1 The variation law of conductivity with temperature

泳检测 28S、18S 条带明亮, 且 28S 的亮度接近于 18S 的 2 倍, 说明 RNA 的完整度较高, 比例适当。试验中选取 tester1 与 driver1 进行下一步试验。

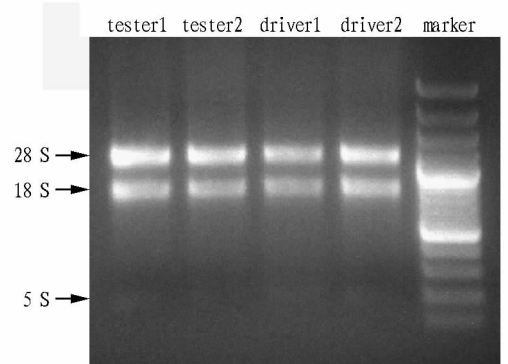


图 2 RNA 电泳检测图谱

Fig. 2 RNA electrophoresis detection

**2.2.2 双链 cDNA 的合成。**从图 3 可以看出, 随着扩增循环数的增加, dscDNA 的 300 ~ 3 000 bp 的亮度呈由浅到深到浅的变化, 且 dscDNA 的片段大小也呈向上集中的趋势。选取分布较集中、亮度最高、含量最多的 19 循环为最优循环数, 其产物集中分布在 0.3 ~ 3.0 kb, 可以满足下一步试验的需要, 将 tester 和 driver 剩余的 70 μL 反应液通过 PCR 进一步扩增到 19 循环, 再进行下一步的反应。

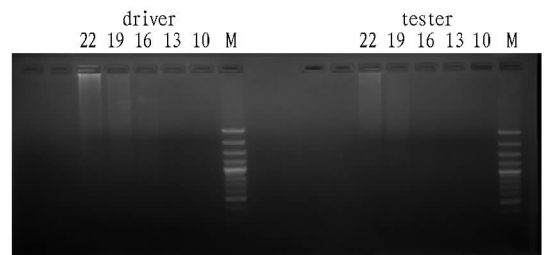


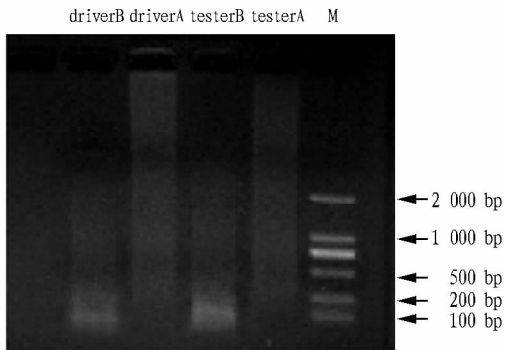
图 3 dscDNA 的电泳结果

Fig. 3 dscDNA electrophoresis results

### 2.3 SSH 文库的构建结果

**2.3.1 双链 cDNA (dscDNA) 的酶切。**由图 4 可知, 合成的 dscDNA 分布在 0.2 ~ 3.0 kb, 酶切后的 dscDNA 分布在 0.1 ~ 2.0 kb, 条带下移说明 dscDNA 的 *RsaI* 酶切比较完全。

**2.3.2 接头连接效率分析。**由图 5 可知, 看家基因 *UBC18* 的 3'端引物与 primer1 的 5'端引物共同扩增的片段大于看家



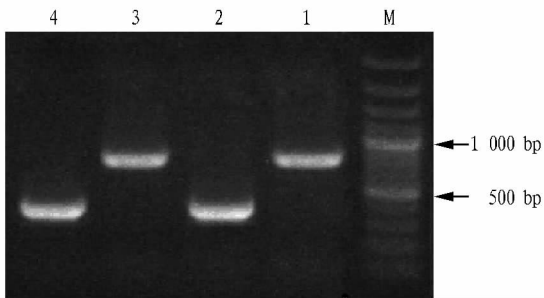
注: M 为 DNA 分子量标准; driverB 与 testerB 为 *RsaI* 酶切产物; driverA 与 testerA 为合成的试验组双链 cDNA。

Note: M. DNA molecular weight marker; driverB and testerB. *RsaI* enzyme products; driverA and testerA. Synthetic test group double-stranded cDNA.

图 4 driver 与 tester 组双链 cDNA 合成与酶切结果

Fig. 4 driver and tester group double-stranded cDNA synthesis and enzyme digestion

基因 UBC18 3'端、5'端引物扩增的片段,与预期结果一致。



注: M. DNA 分子量标准; 1, 2. 以 Tested - 1 与 Adaptor1 连接为模板 PCR 的产物; 3, 4. 以 Tested - 2 与 Adaptor2R 连接为模板 PCR 的产物; 1, 3. 以 PCRprimer1 与看家基因 3'引物 PCR 的产物; 2, 4. 以看家基因 3'与 5'引物 PCR 的产物。

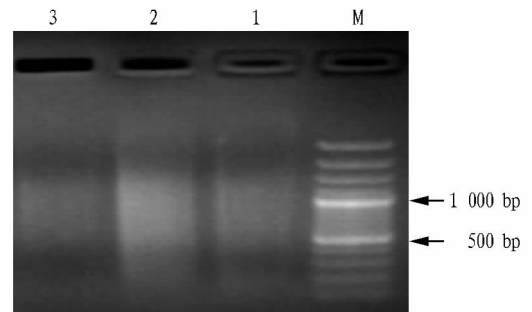
Note: M. DNA molecular weight marker; 1, 2. PCR products with Tested - 1 Adaptor1 connection as template; 3, 4. PCR products with Tested - 2 Adaptor2R connection as template; 1, 3. With PCRprimer1 and housekeeping gene 3' primer PCR products; 2, 4. With housekeeping gene 3' and 5' primer PCR product.

图 5 接头连接效率检测

Fig. 5 Joint connection detection efficiency

2.3.3 消减产物 2 次 PCR 结果。第 2 次 PCR 扩增结束后,取阳性对照扩增产物、未消减抑制性扩增产物、消减抑制性扩增产物进行电泳检测,结果见图 6。由图 6 可知,消减产物 2 次抑制性 PCR 扩增出的条带较亮且完整,由此可知,接头连接效率较高。因为没有两端连有接头的 DNA 是无法在特定引物下进行扩增。第 2 次 PCR 扩增产物主要分布在 0.3 ~ 1.0 kb,且分布均匀,未见明显的主带,与预期结果符合。

2.3.4 消减效率检测。以消减杂交的产物为模板 PCR 检测 UBC18 看家基因,28 个循环后才有条带出现,而以未经消减杂交的产物为模板扩增,在第 18 个循环处即有条带出现。UBC18 看家基因 18S 在消减 cDNA 和未消减 cDNA 中含量差



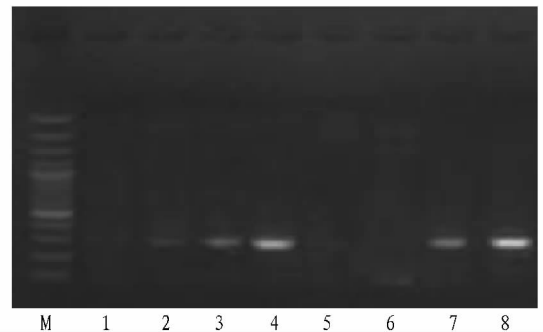
注: M. DNA 分子量标准; 1. 阳性对照扩增产物, 2. 未消减抑制性扩增产物, 3. 消减抑制性扩增产物。

Note: M. DNA molecular weight marker; 1. Positive contrast amplification products, 2. Not cutting inhibitory amplification products, 3. Cutting inhibitory amplification products.

图 6 消减产物 2 次 PCR 结果

Fig. 6 Reduction product twice PCR results

异显著,表明 tester 和 driver 中共有的 cDNA 已被有效消除,同时也表明低温组和常温组的特异性差异表达基因也相应得到富集(图 7)。



注: 1 ~ 4 分别为未经消减杂交产物的 18、23、28、33 循环, 5 ~ 8 分别为消减杂交产物的 18、23、28、33 循环。

Note: 1 - 4 are 18, 23, 33 and 28 cycles of not cutting hybrid products, and 5 - 8 are 18, 23, 28 and 33 cycles of cutting hybrid products.

图 7 PCR 检测看家基因 cDNA 的消减效率

Fig. 7 PCR detection of housekeeping gene cDNA abatement efficiency

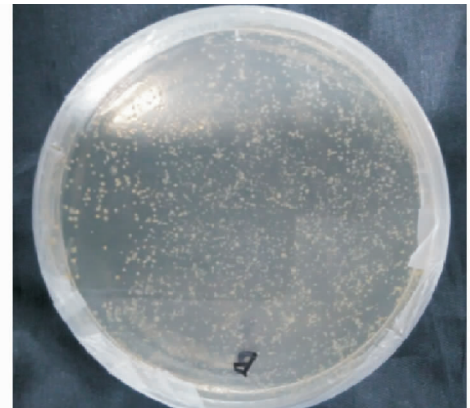


图 8 差减原始文库菌落

Fig. 8 Differential reduced original library colony plate

**2.3.5 文库质量评价。**通过 IPTG 诱导,经 X-Gal 染色测定原始文库的重组率,统计蓝白斑比例,结果表明文库重组率为99.3%(图8),随机挑选的23个阳性克隆插入片段在

0.2~1.0 kb,平均值约为0.65 kb,菌液 PCR 检测得到的阳性克隆重组率为100%(图9)。

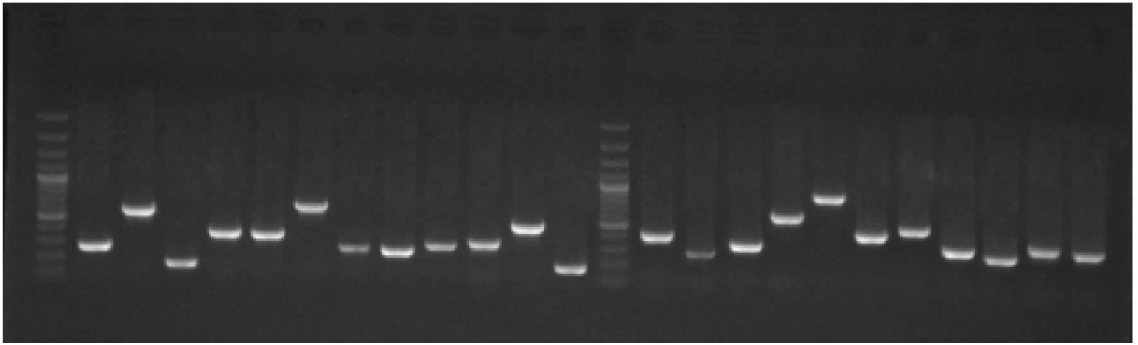


图9 差减 cDNA 文库部分随机插入片段电泳图谱

Fig.9 Subtraction cDNA library partial random insertion fragment electrophoresis

## 2.4 测序结果

**2.4.1 片段长度。**消减文库共测序900个阳性克隆,通过 SEQMAN 软件分析,去除低质量及污染序列,共得到高质量序列837个。

经聚类拼接共得到126个 contig。经 SEQMAN 软件组装,最后得到97个 unigenes(包括病毒或污染的 unigenes)。其中,unigenes 最长的序列为5849 bp,最短的为523 bp,序列长度集中在1000~3000 bp,79%的序列长度大于1000 bp,43%的序列长度大于2000 bp,22%的序列长度大于3000 bp。由此可知,消减文库中的序列分布全面。

**2.4.2 NCBI 蛋白数据库注释。**从 GenBank 中对编码区进行注释,通过与 NCBI 蛋白数据库进行比对注释,得到与 unigenes 序列编码源性相近的蛋白信息。将97个拼接完成的 unigenes 与 NCBI 蛋白数据库进行 BLAST 比对注释,有76条 unigenes 在数据库中得到注释。其中,来自于莲的基因有

29条、葡萄12条、可可7、海枣5、油棕4,表明凹叶厚朴抗寒基因具有与上述植物较高的同源性。

**2.4.3 GO 功能分类。**将具有已知或推定功能蛋白的98条 unigenes 在 BLAST2GO 进行功能分类,成功对58条 unigenes 进行了分类,共获得114个 GO terms。其中,生物学过程最多(67),占46.52%,其次是分子功能(42)和细胞组件(35),分别占29.17%和24.31%。

分类结果显示,凹叶厚朴抗寒抵御机制主要靠生物学过程的调控方式进行,而细胞组件的调控相对较少。测序的 ESTs 涵盖的功能较齐全,且能反映特定时期细胞表达信息(低温胁迫),表明文库构建成功,可用于后续抗寒相关基因的筛选。

**2.4.4 可能在逆境环境中响应的基因。**在对97条 unigenes 信息处理后,最终推定出有可能参与抗寒应激防御的11个基因(表1)。

表1 推定出的11条抗寒基因  
Table 1 11 cold resistance genes

Unigene 编号 Unigen No.	基因名称 Gene name	相关蛋白 Relevant proteins	NCBI ID	E
527_g4	FLS 基因	黄酮醇合成酶	AIY60790.1	1.47E-177
745_g1	CHS 基因	查尔酮合酶	AHJ60259.1	0
564_g1	LHCB1 基因	捕光叶绿素 a/b 结合蛋白	XP_010243713.1	1.23E-178
776_g1	WRKY 基因	锌指家族蛋白家族	XP_010921056.1	9.98E-146
523_g1	HSP70 基因	热激蛋白70	ABF61868.1	1.12E-56
922_g1	APX 基因	过氧化物酶	XP_010261239.1	2.82E-73
317_g1	PP2C 基因	蛋白磷酸酶	XP_010264593.1	1.53E-136
470_g1	Trx 基因	硫氧还蛋白	XP_010276450.1	1.31E-96
091_g1	ERF 基因	乙烯应答转录因子	XP_010276450.1	2.62E-40
601_g1	DREB 基因	脱水应答元件结合蛋白	XP_012858875.1	9.80E-67
746_g1	GAPDH 基因	3-磷酸甘油醛脱氢酶	XP_008776392.1	0

**2.5 荧光定量 PCR 结果** 由图10可知,除 FLS 基因外,其他基因均比常温表达量较高。其中,CHS、APX、TRX、DREB 等基因均随温度的降低表达量不断增加,LHCB、WRKY、HSP、PP2C 等基因在-8℃时由于温度过低代谢受到抑制,从而

使表达量有所下降。ERF、GAPDH 基因表达量随温度的降低而升高,这2个基因与温度的相关性较强。但在温度过低时植物代谢受到阻碍,基因的表达受到抑制,这是由于低温破坏了基因正常的代谢途径。因而判定 CHS、APX、TRX、ERF、

*DREB*、*LHCB*、*WRKY*、*HSP*、*PP2C*、*GAPDH* 10 个基因在凹叶厚朴受到低温侵害时出现差异表达,由此推断这 10 个基因在

低温时可能表现出防御机制。

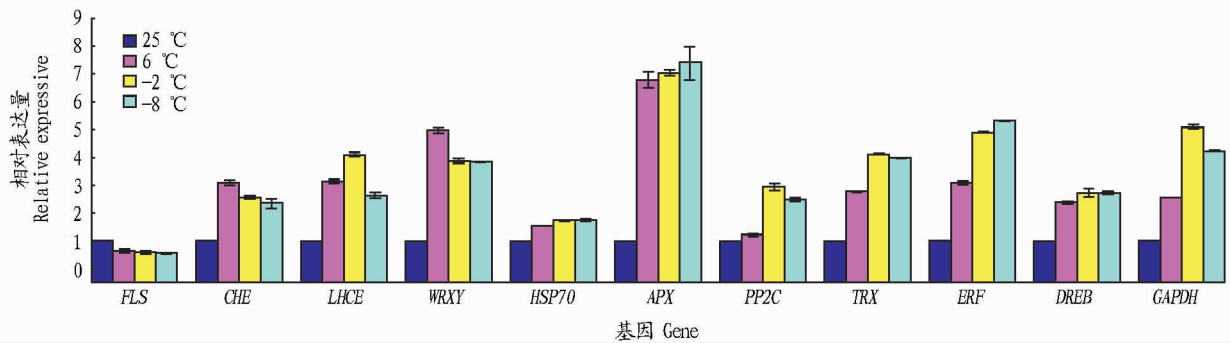


图 10 荧光定量 PCR 测定基因表达量

Fig. 10 Gene expression measured by fluorescence quantitative PCR

### 3 讨论

**3.1 文库构建注意事项** cDNA 文库是生物在某一时期基因所表达的文库,即 DNA 所转录出的 RNA 序列,因此,文库中大部分为相同的高峰度序列,对于寻找低峰度的功能基因较为困难。差减 cDNA 文库可以有效较少文库中的高峰基因,保留低峰度差异基因,有利于筛选出目的基因,是较为理想的基因筛选方法。但差减文库相比全长文库试验步骤多而复杂,因此需要注意以下几点:①植物的低温胁迫临界值受季节气候的影响较大,在测定胁迫临界值后应尽快开始差减文库的构建过程。此外,植物抗寒基因的表达量也会随季节气候的变化而变化,因此,为了能准确反映凹叶厚朴 11 月份抗寒基因的表达情况,在进行荧光定量 PCR 验证基因表达量时宜选择与 11 月份温度相近的冬季进行为宜。②植物取材。为了减少原始 tester 组和 driver 组在遗传背景和基因表达上的差异,在植株取材上应选择相同年份、同一种源且生长环境相同的植株。挑取形态外观相近的植株,取同一部位作为试验材料。取材部位以嫩叶或嫩芽为宜。凹叶厚朴为落叶植物,受到低温侵害时植物叶片自然掉落,叶片中的抗寒基因较少。顶芽在低温下可存活,证明顶芽具有较多的抗寒基因表达,因此,顶芽为凹叶厚朴构建差减文库较好的取材。③RNA 的提取和 cDNA 的合成。在操作过程中 RNA 与 DNA 的降解都会造成差减文库假阳性的产生,加大数据分析难度。因此,在试验过程中应尽量保持样品的低温以避免外界污染,可以选择在冰上对试剂进行添加,且保持周围环境洁净,在超净工作台上操作可以减少外界环境的干扰,所有与样品有直接或间接接触的仪器和试剂都应消毒杀菌。

**3.2 2 种 cDNA 合成方法的比较** 差减文库所用的 cDNA 是用 Oligo d 法合成的 cDNA,因为 Oligo d(T)15 和基因特异性引物(GSP)比随机引物的特异性低。随机引物在转录过程中会有多个退火位点,产物短且只有部分长度的 cDNA。但 Oligo d 法的起始模板是 mRNA,加大了试验难度。

该试验最终采用 clontech 公司的 in-fusion SMARTer cDNA Construction Kit 合成差减文库构建所需要的 cDNA,这是由于:①在总 RNA 中仅含有 2% 左右的 poly(A) RNA,即

mRNA,且在 mRNA 提取过程中会有大量 mRNA 的损耗。因此,需要 100  $\mu\text{g}$  左右总 RNA 才可以满足后续试验的需求,而 10 株左右的凹叶厚朴幼苗顶芽可提取出 100  $\mu\text{g}$  总 RNA。②用 Oligo d 法合成的 cDNA 未进行扩增,产物总量较少,在进行纯化后又会有部分损失。下一步进行酶切后需要进行纯化,还会损失一部分。最终因量少在进行琼脂糖凝胶电泳后无法显示出明显条带,不利于后续试验操作。③使用磁珠提取 mRNA 步骤繁琐,且成功率较低,而过柱法提取 mRNA 较为简单高效,但价格相对较高。

**3.3 抗寒基因评价** 通过对所得到的 97 条基因比对,结果表明,凹叶厚朴的低温胁迫信号途径为不依赖 ABA 的信号途径,研究表明有 CBF/DRE 参与的信号途径不依赖 ABA。该试验通过对差减文库序列片段的深入分析得到 10 个有关胁迫响应的基因,并通过荧光定量 PCR 验证了基因的差异表达,包括:①WRKY 基因属于锌指家族蛋白家族<sup>[5]</sup>,在多种植物的抗性基因中均有发现,是抵御逆境的重要基因,但尚未有关于 WRKY 基因分子机制的相关资料<sup>[6]</sup>。②DREB/CBF 转录因子<sup>[7]</sup>通过调控凹叶厚朴的磷酸肌醇代谢、膜运输、细胞新陈代谢、胁迫信号转导等来抵御低温<sup>[8]</sup>伤害。③ERF 基因是 AP2/ERF<sup>[9]</sup>蛋白基因家族的其中一员<sup>[10]</sup>,AP2/ERF 蛋白基因与植物抗逆有关,其通过蜡质合成、激素合成以及 ROS 清除来抵御低温<sup>[11]</sup>。④HSP 基因转录<sup>[12]</sup>得到的热激蛋白在植物受到低温侵害时可以减少溶质渗漏保护植物细胞膜的完整性,减少细胞的脱水进而保护植物在低温下不受侵害。⑤LHCB1 基因转录得到的捕光叶绿素结合蛋白与光能的吸收和多余能量的消耗有关<sup>[13]</sup>,可以提高植物在低温下细胞膜的稳定性,且减少因低温产生的过氧化物的积累。⑥APX 可以在植物受到逆境伤害时减少过氧化物<sup>[14]</sup>和羟基自由基的积累,保护植物叶绿体和其他细胞组分,是植物抗逆过程中重要的酶<sup>[15]</sup>。⑦Trx 硫氧<sup>[16]</sup>还蛋白可以调控酶活性,并使可逆的二硫键及硫醇变化起氧化还原载体的功能,是维持细胞膜内环境稳定的重要因子。⑧GAPDH 基因<sup>[17]</sup>是与细胞膜抗渗透胁迫及稳定性有关的基因。

(下转第 174 页)

得到的各种保健品,这无法满足人们对赶黄草功效的需求,所以需要进一步研究开发赶黄草。

### 3 推广建议

**3.1 加大赶黄草产品的研发力度** 目前市场上所销售的赶黄草品种十分单一,且产品制作过程技术含量不高。市面上常见的赶黄草产品是经过清洗、干燥、切断和简单包装的赶黄草茎干,以及经过炒制成茶的赶黄草叶子等粗加工的保健品,少有更进一步的提取物制成的产品。市场上与赶黄草相关的产品大多为保健品,少有赶黄草为原料的药品销售。因此,应采用现代技术手段,对赶黄草的来源、品质、成分等作出系统有效的质量评价,对赶黄草的化学成分、药理作用以及相关机制做进一步研究,为赶黄草成方制剂奠定基础,争取研发出更多产品。

**3.2 打造赶黄草产品的经典品牌** 赶黄草产品目前有自己的品牌,但较杂乱,通过进一步走访调查发现,目前的生产厂家也很重视品牌的建立与品牌知名度的提高。因此,目前更应塑造属于赶黄草的经典品牌,这就需要厂家加大对赶黄草品牌的宣传力度,让原有的品牌在现在的基础上更进一步,提高品牌知名度,使赶黄草被更多的人所熟知,建立赶黄草的经典品牌。

**3.3 拓宽赶黄草产品的宣传广度** 目前针对赶黄草的宣传相当局限,包括泸州本地的报纸、电视、电台等,都很难看到对赶黄草的宣传,相反的,网络上关于赶黄草的介绍、资料比

较齐全。所以作为泸州的道地药材,应充分运用各种媒体对赶黄草进行推广。特别是泸州本地人士,更应该对赶黄草有更多更全面的了解,这样才便于向外推广。同时,零售药店还可以运用促销手段,通过营业推广手段和公共关系活动,直观有效地宣传赶黄草,使人们在购买赶黄草产品的同时对赶黄草知识了解得更多,在增加赶黄草销售量的同时提升赶黄草的知名度。

**3.4 争取政府部门的更多支持** 作为泸州市的道地药材,无论是赶黄草的研究开发,还是赶黄草的销售,都离不开政府部门的支持。政府部门对科研方面的支持,可以使赶黄草的研究更加顺利,如科研课题的批准与课题项目科研经费的支持。近年来,因为政府部门的支持,赶黄草的研究开发得到了很大发展,研究成果也相当可观。政府部门对赶黄草生产与销售上的支持,使得赶黄草的销售不再局限于泸州市本地,开始逐渐走出泸州分布全国各地,甚至国外都开始涉及。因此,赶黄草产业在以后的发展中,更要争取获得政府部门更大的支持。这不仅有利于推动泸州地方经济的发展,更有利于推动医学上关于肝病治疗的进展并造福人类。

### 参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大词典:上册[M]. 上海:上海人民出版社,1997.
- [2] 四川中药志写作编写组. 四川中药志:第一卷[M]. 成都:四川人民出版社,1979.
- [3] 胡杨洋,王胜鹏,陈锐娥,等. 赶黄草的药理学研究和应用[J]. 中药药理与临床,2012,28(3):136-140.
- [4] 吴华玲,倪中福,姚颖垠,等. 15个普通小麦 WRKY 基因的克隆与表达分析[J]. 自然科学进展,2008(4):378-388.
- [5] 齐妍,徐兆师,李盼松,等. 植物热激蛋白 70 的分子作用机理及其利用研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2013(3):507-511.
- [6] 许声涛,孙文香,田进平,等. 植物热激蛋白 HSP100/ClpB 及其在提高植物抗热性和抗寒性中的应用[J]. 植物生理学通讯,2008(4):804-810.
- [7] 刘武,戴良英. 植物抗逆相关 ERF 转录因子研究综述[J]. 中国农学通报,2007(4):78-81.
- [8] 杜晓华,黄伶俐,刘会超. 植物热激蛋白 70(HSP70)研究进展[J]. 河南科技学院学报(自然科学版),2014(3):16-20.
- [9] 莫纪波,李大勇,张慧娟,等. ERF 转录因子在植物对生物和非生物胁迫反应中的作用[J]. 植物生理学报,2011(12):1145-1154.
- [10] 季爱加,罗红梅,徐志超,等. 药用植物转录因子 AP2/ERF 研究与展望[J]. 科学通报,2015(14):1272-1284.
- [11] 彭浩. 植物响应逆境过程中类囊体膜差异表达蛋白的研究[D]. 厦门:厦门大学,2008.
- [12] 马宇光,杨帆,杨卫军. 硫氧还蛋白的结构及在生物抗氧化中的功能[J]. 生命的化学,2011(3):429-433.

(上接第 145 页)

### 参考文献

- [1] 陆秋恒,罗志勇. 抑制消减杂交(SSH)技术及在克隆基因方面的最新进展[J]. 国外医学(分子生物学分)册,2001,23(6):380-383.
- [2] 罗志勇,陆秋恒,刘水平,等. 人参植物皂苷生物合成相关新基因的筛选与鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报,2003,35(6):554-567.
- [3] 王转,贾晋平,景蕊莲,等. 用抑制差减杂交法分离小麦幼苗水分胁迫诱导表达的 cDNA[J]. 生物技术通报,2003(5):36-39.
- [4] 骆蒙,孔秀英,刘越,等. 小麦抗病基因表达谱中的文库构建与筛选方法研究[J]. 遗传学报,2002,29(9):814-819.
- [5] 张冰. 大米及米制品转基因成分检测准确性的若干影响因素研究[D]. 福州:福建农林大学,2013.
- [6] 江腾,林勇祥,刘雪,等. 苜蓿全基因组 WRKY 转录因子基因的分析[J]. 草业学报,2011(3):211-218.
- [7] 谷彦冰,冀志蕊,迟福梅. 苹果 WRKY 基因家族生物信息学及表达分析[J]. 中国农业科学,2015(16):3221-3238.
- [8] 宋钰,荆邵娟,余迪求. 水稻 WRKY 转录调控因子基因功能研究进展[J]. 中国水稻科学,2009(5):447-455.