

药用植物次生代谢相关酶基因克隆方法综述

战晴晴^{1,2}, 隋春², 张杰^{1*}, 魏建和² (1. 东北林业大学生命科学院, 哈尔滨 150040; 2. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 目的 综述药用植物次生代谢酶基因克隆可采用方法策略, 为其基因克隆提供参考。方法 查阅相关文献进行总结和归纳。结果 阐述了用于克隆药用植物次生代谢酶基因的功能克隆方法、表型克隆方法(DD-PCR、cDNA-AFLP、SSH)、转座子标签克隆方法及图位克隆方法。结论 适用于药用植物次生代谢相关酶基因克隆的技术方法有很多种, 研究者可根据研究基础、目的和实验条件等进行选择。

关键词: 药用植物; 次生代谢; 基因克隆

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2009)10-0805-05

Review on Gene Cloning Methods Involved in Medicinal Plant Secondary Metabolism

ZHAN Qingqing^{1,2}, SUI Chun², ZHANG Jie^{1*}, WEI Jianhe² (1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Reviewing gene cloning methods and strategies that can be used in medicinal plant secondary metabolism, to provide selection references. **METHODS** Searching and summarizing literatures on gene cloning of plants, especially of medicinal plants. **RESULTS** Gene cloning methods used in medicinal plant secondary metabolism, such as functional cloning method, phenotype cloning methods, transposon tagging and map-based cloning method were elaborated. **CONCLUSION** There are many methods used to clone genes in medicinal plant secondary metabolism, researchers should choose the suitable one with different basis, purposes and experiment condition.

KEY WORDS: medicinal plants; secondary metabolism; gene cloning

次生代谢是存在于植物、动物和微生物中有别于初生代谢的一类特殊而又复杂的代谢类型。通常认为次生代谢是生物通过渐变或突变获得的一种适应生存的方式; 是生物体在长期进化中对生态环境适应的结果。植物次生代谢物不仅为人类提供了丰富的药物, 香料及工业原料, 而且一些次生代谢产物还是生物体自身抗性、信号传导、适应性调节、生长发育以及植物花色香味等所需要的。随着分子生物学及生理生化等学科的发展, 关于次生代谢的研究也越来越深入。鉴于青蒿素、紫杉醇及长春新碱等药用植物有效成分的突出疗效, 更显示出了药用植物次生代谢研究的重要性。药用植物次生代谢产物种类繁多, 结构各异。次生代谢途径也是多样而复杂的, 许多途径目前仍不清楚, 只有个别的主要是青蒿素、紫杉醇等代谢物的合成途径取得了一定研究进展, 但也仅仅是了解了合成途径的大致路

线^[1]。克隆相关酶基因是药用植物次生代谢研究的重要内容。

分子生物学发展至今, 用于植物基因克隆的方法有很多种。主要可分为三类:

一种类型是功能克隆, 即根据已知基因产物推断出其相应核苷酸序列, 再以此为基础从 cDNA 文库或基因组文库中调取目的基因; 第二种类型是表型克隆, 是近年来发展十分迅速的一类方法, 例如 mRNA 差别显示技术(DDRT-PCR)、抑制性差减杂交(SSH)、EST 文库筛选技术等; 第三类是无基因序列及表达功能信息, 但具有转座子标签或基因遗传图谱等条件, 常用转座子标签法克隆和图位克隆技术。下面主要针对三类基因克隆方法的基本原理及在药用植物次生代谢研究中的应用情况进行综述, 为药用植物次生代谢酶基因的克隆研究提供借鉴。

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目 (2006BAI09B01); 博士后科学基金资助 (20070410615); 中央级院所所长科研基金项目 (YZ-1-10)

作者简介: 战晴晴, 女, 硕士 Tel: (010)62895272 E-mail: zhanqq1984@163.com *通信作者: 张杰, 博士, 副教授

Tel: (0451)82911322 E-mail: 88530878@163.com

1 功能克隆方法

这类方法的主要步骤是首先通过生物化学等研究手段分离纯化出有关基因编码的蛋白产物,然后测定蛋白质氨基酸序列,推断出编码该蛋白质的部分基因序列,再通过抗体、寡聚核苷酸探针或PCR制备的探针杂交筛选基因组或cDNA文库最终克隆到目的基因。功能克隆是一种经典的基因克隆策略,关键是能够分离出纯度很高的单一蛋白质。很多基因尤其是没有任何核酸序列可利用的基因在首次克隆时常采用这种方法达到目的。

Inoue 等^[2]利用这一方法克隆了闭鞘姜(*Costus speciosus*)呋甾烷 26-O- β -葡萄糖苷酶基因。首先从闭鞘姜根茎提取酶蛋白,利用 HPLC 洗脱收集单一峰蛋白。纯化的蛋白用内肽酶 Lys-C 消化,消化后的肽段经 C₁₈ 柱分离,然后针对收集的不同肽段进行氨基酸序列分析。最后利用从氨基酸序列推测的核酸序列设计引物,结合巢式 PCR 和 RACE 方法得到多条片段,拼接成全长 cDNA 序列。Grothe 等^[3]从罂粟(*Papaver somniferum*)悬浮培养细胞系中纯化出 Salutaridinol 乙酰转移酶,然后经电泳、蛋白酶消化、肽段分离及序列测定程序,再根据氨基酸序列推测核酸序列,设计引物,RT-PCR 获得部分片段后,同样经 RACE 获得全长序列。

采用功能克隆方法虽然已经克隆了很多基因,但由于绝大多数基因的产物目前还不知道。所以对于药用植物次生代谢途径中的酶类,含量低且常常处于不稳定状态,所以更难以分离纯化。但当其它植物的同类基因已克隆到并且其核苷酸序列保守性较高时,一方面可设计简并引物,PCR 扩增得到目标植物中的目的基因片段,制备探针后杂交筛选目标植物基因组或cDNA文库,也可进一步利用RACE方法,克隆到未知新基因;另一方面也可直接利用其它植物同类基因序列制备探针在控制杂交条件下筛选目标植物基因组或cDNA文库。Wallaart等^[4]利用这类方法首先对比其它植物中相关基因序列后在保守区设计简并引物,然后将RT-PCR扩增产物作为探针与青蒿的一个cDNA文库进行杂交,从中筛选得到了青蒿素合成途径中的倍半萜环化酶即amorpho-4,11-diene合酶的全长cDNA。进而开展了后续的基因功能研究。Hotze等^[5]也是利用这种方法克隆到了长春花苯丙酸途径中的肉桂酸-4-羟化酶cDNA。肉桂酸-4-羟化酶是参与黄酮类化合物形成的一种P450酶类。Hayashi等^[6]是利用异源植物光果甘草(*Glycyrrhiza glabra*)相关基因序列制备了探针,在低

严谨度杂交条件下,筛选目标植物丝瓜的cDNA文库得到isomultiflorenol合成酶(丝瓜中形成拜俄尼酸的一种三萜合成酶)cDNA序列。

随着药用植物次生代谢酶基因获得数目的不断增长,会有更多不同植物种类中的相关基因通过这一方法得到克隆。比较这些同源基因的相似相异点及进行深入的功能分析,将为全面阐明重要药用植物的代谢途径和调控机理奠定基础。

2 表型克隆方法

药用植物次生代谢产物种类繁多、结构迥异,产生和分布通常有种属、器官、组织以及生长发育时期的特异性。研究表明一些诱导物如茉莉酸甲酯等的刺激也会导致药用植物次生代谢产物含量增加,代谢产物增长是代谢途径酶基因表达增加,酶活性增强的结果。目前一些药用植物种类已建立了细胞及组织器官离体培养体系,更便于次生代谢途径及调控机理的研究。其中一些次生代谢相关酶基因的克隆就是以代谢产物含量存在明显差异的材料为基础,利用表型差异克隆技术实现的。这类方法中有很多相类似的技术手段,包括差异显示技术(DD-PCR)^[7]、cDNA-AFLP法^[8]、差减扣除杂交(SSH)法^[9]及微阵列杂交(microarray)^[10]等。这些方法不仅可用来克隆基因,同时也是研究基因表达特性的重要手段。

2.1 差异显示技术

1992年,Liang和Pardee^[7]首次提出差异显示技术(mRNA Differential Display PCR, DD-PCR),该技术具有快速、灵敏、简单和可分析低丰度mRNA的优点,成为克隆新基因和研究植物基因表达的有力工具。差异显示技术方法是:利用一系列oligo(dT)引物,以不同处理植物的总mRNA为模板进行反转录得到cDNA,再用此引物和5'端随机引物对反转录产物进行PCR扩增,并利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,从中筛选出差异片段;回收差异片段后再进行第二次PCR,以扩增出的差异片段为探针进行Northern杂交,去掉假阳性片段并对目的片段进行测序;最后以克隆的目的片段为探针,从基因组文库中筛选出相应的全长基因。通常在获得目的基因片段基础上,也可采用5'及3'RACE的方法获得目的基因全序列。

Schoendorf等^[11]利用差异显示RT-PCR方法获得了13个相关的P450 cDNA全序列,随后在酵母体系中通过原位分光光度法和添加紫杉烷底物后测定体内氧化酶活性的方法进行了功能分析。首次克隆了紫杉醇生物合成途径中的P450基因。Cao等^[12]

也利用mRNA差异显示PCR和RACE方法结合获得了甘蓝(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino, syn. *B. rapa* L.)中的一个P450基因。

DD-PCR技术以其快速、灵敏、操作简单,不仅可以大规模地了解已知基因转录的差异,还可以发现新的基因片段等优点受到了药用植物基因克隆工作者的青睐。虽然它本身还有一些的局限性如假阳性高、得到的cDNA片段也比较短,但近年来随着对技术环节的不断改进,mRNA差异显示技术将深入到了有关基因差异表达研究的各个领域。

2.2 cDNA-AFLP法

1996年,Bachem^[8]将DD-PCR法与AFLP(Amplified fragment length polymorphism)结合,探索马铃薯块茎发育情况,并克隆了2个cDNA片段(TDF536和TDF531)。其方法步骤是:mRNA反转录形成cDNA双链,再用两种限制性内切酶消化,一种是常用内切酶EcoRI,一种是稀有内切酶MseI。然后在消化的cDNA片段上连上接头,再利用与接头相配对的引物进行预扩增。预扩增后,用有2个或3个选择性碱基的引物进行PCR扩增,扩增产物以聚丙烯酰胺凝胶电泳分离差异片段。与DD-PCR技术相比而言cDNA-AFLP技术更适合对转录组进行全面的分析^[13],结果假阳性低,并且获得的转录衍生片段(TDF)一般也集中在蛋白的编码区或者附近,可最大限度地提供基因编码区的信息。

药用植物的生长周期受到基因的严格调控,在不同生长期伴随着相应的次生代谢产物的合成。通过cDNA-AFLP研究技术,可以建立药用植物在不同生长期转录组学的RNA指纹图谱,阐明药用植物不同生长期的分子调控机制。Goossens等^[14]以茉莉酸甲酯处理和未处理的烟草细胞培养体系为材料,利用cDNA-AFLP分析了基因表达变化情况,从中可以得到与尼古丁生物碱合成相关的基因片段。以序列片段为标签,可进一步进行基因编码序列的分离与克隆。同时作者指出这一方法是进行植物次生代谢研究的有效手段。Rischer等^[15]也利用cDNA-AFLP方法并结合LC-MS色谱与质谱联用的化学分析方法研究了长春花(*Catharanthus roseus*)吲哚生物碱的次生代谢。结果不仅显示了一些已知与吲哚生物碱合成相关的基因的表达,还绘制了以往没有研究过的基因与基因及基因与代谢产物间相互作用的网络结构。为鉴定新基因,了解代谢途径网络和深入的代谢工程研究奠定了基础。

2.3 抑制性差减杂交

抑制性差减杂交技术(Suppression Subtractive

Hybridization, SSH)是Diatchenko等人^[9]于1996年建立的。Huang等^[16-18]对SSH这一技术及其在微生物及植物研究中的应用进行了综述。SSH技术是一种比较和分离不同细胞系、不同组织间或同一细胞系、同一组织间在不同条件下差别表达基因的方法。SSH技术是以抑制PCR作用为基础的cDNA差减杂交。在一个循环过程中完成单链cDNA丰度的均等化及目标群体和对照群体中相同cDNA序列的去除,从而富集差异表达的基因。整个过程既利用了差减杂交技术的差减富集又利用了抑制PCR技术的高效动力学富集。一个典型的SSH过程,可在一个差减杂交的过程中将稀有基因序列富集上千倍。其主要操作过程是提取需要检测的和对照的细胞及组织mRNA,合成cDNA,通过2次消减杂交将检测和对照细胞及组织共同具有的cDNA消减掉,然后利用2次抑制PCR特异性地扩增特异表达的cDNA。

目前,SSH技术已开始应用于克隆药用植物次生代谢相关基因。通过选取不同生长时期、不同部位或不同处理的植物材料建立抑制性差减文库,已经克隆到了部分调控次生代谢物质合成的特异表达基因。罗志勇等^[19]利用这一技术构建了四年生和一年生人参根组织的差减cDNA文库,获得了6个可能与人参皂苷生物合成相关的基因。魏小勇^[20]也应用这一方法成功构建了四年生和一年生铁皮石斛叶片的差减cDNA文库,为克隆石斛碱生物合成相关功能基因奠定了基础。

2.4 EST文库筛选技术

表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)是指从不同组织来源的cDNA序列,这一概念首次由Adams等于1991年提出。EST文库构建在药用植物次生代谢相关基因克隆方面备受关注,已成为人参次生代谢途径研究的主要技术手段。Jung等^[21]构建了5个人参cDNA文库,分别以人参根、根茎、发芽的种、组织培养的幼苗及土壤中生长的幼苗茎为材料。共测序了12 126条序列,其中高质量序列11 694条,通过序列比对和不同酶基因特异结构域搜索获得了可能参与人参皂苷合成的4个氧化鲨烯环化酶、9个P450和12个糖基转移酶的cDNA序列。表明构建的cDNA文库不仅是发现基因的有效资源,也为研究不同组织器官,不同环境条件下基因的表达提供信息。因此将加速人参皂苷合成途径相关基因的克隆,促进人参皂苷遗传工程的发展。

通过比较分析同一植物不同组织、不同发育阶段及不同环境或处理条件下多个EST文库,不仅可以获得一些与特定生理现象相关的功能基因,而且

可以了解基因表达特性即所谓的*in silico*分析。Suzuki等^[22]利用苜蓿(*Medicago truncatula*)的基因公共数据资源包括10个EST文库的大量序列信息,进行了三萜皂苷生物合成途径上游相关基因的发掘与功能分析。具体分析了得到的三个酶:鲨烯合成酶、鲨烯环氧酶及 β -香树脂合成酶的全长cDNA。

2.5 微阵列(microarray)及芯片技术

微阵列及芯片技术首先发表于Science杂志上,被认为是当年最有影响的文章之一^[23]。荆志伟等^[24]就芯片技术与中药研究进行了论述,崔光红等^[25]将基因芯片技术引入了丹参功能基因研究。这一技术的主要原理是将核酸片段标记后以预先设计排列方式固定在载玻片或尼龙膜上组成生物集成膜片,然后利用核酸杂交原理检测未知分子,并利用荧光信号检测器及处理器根据杂交分子或未杂交分子所发出的不同波长的光检测杂交信号。杂交信号经电脑软件转换处理以测定核酸序列及其变化。芯片技术可用于发现新基因及分析基因表达特性。

Guterman等^[26]利用芯片分析了有香气和没有香气的玫瑰栽培品种的基因表达差异,结合两个品种挥发性成分的化学分析,发现了一些与香气相关的基因,其中包括大根香叶酮D合成酶,其生化功能通过大肠杆菌异源表达得到证实。表明功能基因组学高通量芯片技术有利于非模式植物品种特异性状的研究。

崔光红等^[25]构建了丹参的cDNA芯片,得到了含有4×12个点阵的芯片,为发掘丹参功能基因,研究丹参道地药材形成机制探索新的思路和方法。随后他们以不同培养时期的丹参毛状根为材料,利用构建的cDNA芯片,研究了基因表达谱。结果得到了一系列丹参次生代谢相关基因包括细胞色素P450和二萜合酶等基因片段,为深入开展丹参功能基因组学研究奠定了基础^[27]。

3 转座子标签克隆方法

转座子(transposon)最早在1951年由美国遗传学家McClintock^[28]在研究玉米籽粒色斑不稳定现象时提出来的。转座子标签法是将一株携带有功能性转座系统的植物与遗传上有差异的同种植物杂交,因转座因子插入到某一特定的基因序列而破坏了该基因编码的蛋白,进而导致可见表性的破坏或改变,这样就可以在产生后代中筛选出新型的突变体。其克隆植物基因的主要步骤是:①构建含转座子的质粒载体;②将含转座子的质粒载体通过农杆菌介导或其他适当的转化方法导入目标植物中;③转座子插入突变的鉴定与分离;④转座子在目标植

物体内的活动性能检测;⑤利用转座子序列作探针,与突变体基因组文库杂交,获得部分基因序列;⑥用部分基因序列作探针,与野生型基因组文库杂交,克隆到完整的目的基因。

1999年Sato等利用Hirchick建立的水稻逆座子Tos17基因敲除体系克隆了6个水稻knl-型同源异型框基因,发现了引起水稻植株矮化的突变基因OSH15^[29]。胡英考^[30]就转座子标签法克隆植物基因的研究进展进行了综述,列出了利用这一方法获得的植物基因,包括拟南芥、番茄、矮牵牛、烟草和亚麻植物中与发育和抗性相关的基因。转座子标签法是克隆产物未知基因的有效手段之一,在微生物基因克隆方面也有所应用。目前虽然还未在药用植物上发现建立成熟的转座体系,但可以通过导入异源转座子进行基因克隆,这对于那些已有成熟的转化体系的药用植物种类来说,将是加快功能基因克隆的有效手段。

4 图位克隆

图位克隆也称为定位克隆,是以图谱为基础进行定位克隆的技术。该方法首先利用SSR等分子标记技术进行基因定位,然后以紧密连锁的分子标记为起点,筛选DNA YAC文库,构建目的基因区域的物理图谱,通过染色体步移逐步向目标基因靠近,最终克隆到目的基因并通过遗传转化和功能互补实验证实基因功能。操作前提是具有一个根据目的基因的有无而建立起来的遗传分离群体;构建精细的遗传连锁图谱,能够将目的基因定位到染色体的特定位置;还需要构建含有大插入片段的基因组文库以备以连锁的分子标记筛选目的基因用。图位克隆在一些农作物和经济作物,如水稻、玉米、小麦、甘蓝等的研究中应用广泛。常常用来分离克隆与质量性状如抗病性,数量性状如产量等相关的基因。景润春等^[31]和丁效华^[32]都对图位克隆技术在分离植物基因中的应用及方法学问题进行了综述。图位克隆需要有很好的前期研究基础和积累,在药用植物基因研究中报道较少。

5 结语

分子生物学发展至今,可用于药用植物关键酶基因克隆的技术方法有很多种,研究者可根据自身研究目的及研究条件等实际情况,选择适宜的研究手段,以取得更好的研究结果。本文尽可能涉及到了目前在基因克隆方面得到应用的技术方法种类,这些方法在药用植物次生代谢酶基因克隆中都有应用。相信随着这些技术的不断成熟,并与其它相关技术相融合,将极大地促进人们对药用植物次生

REFERENCES

- [1] YANG Z R, MAO X, LI R Z. Research progress in genetic engineering of plant secondary metabolism [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*(植物生理与分子生物学学报), 2005, 31(1): 11-18.
- [2] INOUE K, SHIBUYAMA Y, AMAMOTO K, et al. Molecular cloning and bacterial expression of a cDNA encoding furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase of *Costus speciosus* [J]. *FEBS Lett*, 1996, 389(3): 273-276.
- [3] GROTHE T, LENZ R, KUTCHAN T M. Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *papaver somniferum*[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(33): 30717-30721.
- [4] WALLAART T E, BOUWMEEST H J, HILLE J. Amorpho-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemi sinin [J]. *Planta*, 2001, 21(5): 460-465.
- [5] HOTZE M, SCHRODER G, SCHRODER J. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett*, 1995, 374(3): 345-349.
- [6] HAYASHI H, HUANG P, INOUE K, et al. Molecular cloning and characterization of isomultiflorenol synthase, a new triterpene synthase from *Luffa cylindrica*, involved in biosynthesis of bryonolic acid [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(23): 6311- 6316.
- [7] LIANG P, PARDEE A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257(5072): 967-970.
- [8] BACHEMC W B, HOEVENVANDER R S, BRUIJN S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *Plant J*, 1996, 9(5): 745-749.
- [9] DIATCHENKO L, LAU Y F, CAMPBELL A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6025-6028.
- [10] CHEE M, YANG R, HUBBELL E, et al. Accessing genetic information with high-density DNA arrays [J]. *Science*, 1996, 274(5287): 610-614.
- [11] SCHOENDORF A, RITHNER C D, WILLAMS R M. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 beta-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1501-1506.
- [12] CAO J S, YU X L, YE W Z, et al. Functional analysis of a novel male fertility CYP86MF gene in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* makino) [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(12): 715-723.
- [13] BREYNE P, DRESEN R, CANOOT B, et al. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies [J]. *Mol Genet Genomics*, 2003, 269(2): 173-179.
- [14] GOOSSENS A, HAKKINEN S T, LAAKSO I, et al. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8595-8600.
- [15] RISCHER H, ORESIC M, SEOANEN-LAAKSO T, et al. Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(14): 5614-5619.
- [16] HUANG X W, LI Y X, NIU Q H, et al. Suppression subtractive hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(4): 753-760.
- [17] LIU W R, ZHANG M Q. Application of suppression subtractive hybridization to plant gene cloning [J]. *Subtropical Agriculture Research*(亚热带农业研究), 2006, 2(2): 66-71.
- [18] JIANG S M, LV X M, HU Z M. Application of suppression subtractive hybridization in plant research [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2005, 22(51): 91-98.
- [19] LUO Z Y, LIU S P, LU Q H, et al. Construction of subtractive cDNA library and mRNA differential expression analysis involved in ginsenoside biosynthesis from *Panax ginseng* root [J]. *Life Sci Res* (生命科学研究), 2003, 7(4): 324-324.
- [20] WEI X Y. Construction of subtractive cDNA library from the leaves of *dendrobium candidum* wall, ex Lindl. by suppression subtractive hybridization technology [J]. *Guangzhou Univ Tradit Chin Med J*(广州中医药大学学报), 2005, 22(4): 320-322.
- [21] JUNG J D, PARK H W, HAHN Y, et al. Discovery of genes for ginsenoside biosynthesis by analysis of ginseng expressed sequence tags [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22(3): 224-230.
- [22] SUZUKI H, ACHNINE L, XU R, et al. A genomic approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2002, 32(6): 1033-1048.
- [23] SCHENA M, SHSLON D, DAVIS R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, 270(5235): 467-470.
- [24] JING Z W, WANG Z, GAO S H, et al. Microarray and research of Chinese medications:pharmacogenomics of Chinese medications [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(4): 289-292.
- [25] CUI G H, HUANG L Q, TANG X J, et al. Functional genomics studies of *Salvia miltiorrhiza* Establish cDNA microarray of *S.miltiorrhiza* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(12): 1137-1141.
- [26] GUTERMAN I, SHALIT M, MENDA N, et al. Rose scent: Genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(10): 2325-2338.
- [27] CUI G H, HUANG L Q, QIU D Y, et al. Functional genomics studies of *Salvia miltiorrhiza* II—gene expression profiling of different stage of hairy root [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32(13): 1267-1272.
- [28] MCCINTOCK B. Chromosome organization and gene expression [J]. *Cold Spring Harbor Symp*, 1951, 16(3): 131-135.
- [29] SATO Y, SENTOKU N, MIURA Y, et al. Loss-of-function mutations in the rice homeobox gene OSH15 affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants [J]. *EMBO J*, 1999, 18(4): 992-997.
- [30] HU Y K. Progress of plant genes cloning and isolation by transposon tagging [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2003, 2(2): 18-21.
- [31] JING R C, HUANG Q Y, ZHU Y G. The application of map-based gene cloning method on isolating genes of plants [J]. *Hereditas*(遗传), 2000, 22(3): 180-185.
- [32] DING X H. Advances in map-based cloning for crop quantitative trait loci [J]. *J Plant Gen Resour* (植物遗传资源学报), 2005, 6(4): 464-468.

收稿日期: 2008-11-26