

陈 英, 吴友根, 杨东梅, 等. 广藿香不同部位总 DNA 提取方法比较与 *PTS* 基因克隆[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 81–84.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.022

广藿香不同部位总 DNA 提取方法比较 与 *PTS* 基因克隆

陈 英, 吴友根, 杨东梅, 张军锋, 林尤奋

(热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学园艺园林学院, 海南海口 570228)

摘要:分别采用 PEX 法、CTAB 法和 SDS 法 3 种方法提取广藿香叶、茎、根的基因组总 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 DNA 提取效果。结果表明, SDS 法能高效一致地提取广藿香根、茎、叶的总 DNA。以叶总 DNA 为模板, 通过 PCR 技术扩增广藿香醇合成酶(*PTS*)基因, 测序得到 *PTS* 基因(中国广藿香)的全长序列, 长度为 3 058 bp, 包括 7 个外显子和 6 个内含子, 共编码 552 个氨基酸。该 *PTS* 基因所推导的氨基酸序列与 GenBank 中已登录的印度广藿香 *PTS* 氨基酸序列存在 4.7% 的差异。

关键词:广藿香; 总 DNA; 广藿香醇合成酶; 克隆

中图分类号: S567.21⁺9.01

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2016)02-0081-04

纯度高、质量好的 DNA 是开展分子生物学研究的基础, 是分子遗传学试验成功与否的关键因素之一^[1], 植物总 DNA 的纯度还是影响 PCR 反应的限制因素之一^[2]。由于不同植物、甚至同一植物的不同部位, 其代谢产物的种类和含量不同, 尤其是多糖、多酚和蛋白质等, 很难找到一种高质量 DNA 提取的通用方法^[3-4]。因此对植物总 DNA 提取方法进行比较分析、改进, 以获得高质量的植物总 DNA 提取方法极为重要。广藿香[*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 为唇形科刺蕊草属一年生草本植物, 以干燥的地上部分入药, 是我国常用的芳香化湿类中药之一, 常用于治疗湿浊中阻、脘痞呕吐、寒湿闭暑、暑湿倦怠、腹痛吐泻、鼻渊头痛、胸闷不舒等疾^[5]。百秋李醇(又名广藿香醇), 是一种存在于天然植物中的三环倍半萜化合物, 广泛应用于药品、食品及日用化妆品行业, 是广藿香挥发油的主要成分之一, 被历版《中华人民共和国药典》规定用作评价广藿香药材及广藿香油质量的指标成分。百秋李醇的生物合成途径类型与青蒿素的合成途径相同, 属于类异戊二烯代谢途径中的倍半萜类分支途径。广藿香醇合成酶(patchoulol synthase, *PTS*)被认为是百秋李醇合成调控的关键酶^[6]。2006 年, Deguerry 等从印度广藿香中克隆得到了 *PTS* 基因的 cDNA 及 DNA 序列^[6]; 2014 年, Hartwig 等从印度另一栽培居群的广藿香中克隆得到了 *PTS* 基因的 cDNA 序列, 其编码的氨基酸序列与之前报道的 cDNA 序列所编码的氨基酸序列存在 3.4% 的差异^[7]。中国广藿香作为一种独立栽培居群的广藿香, 其 *PTS* 基因序列与之前报道的印度广藿

香是否存在差异, 目前尚未见报道。因此, 本试验选用 3 种常用的 DNA 提取方法, 比较其对广藿香根、茎、叶 3 个部位的提取效果, 并以 DNA 为模板进行 *PTS* 基因的 PCR 扩展并克隆, 比较克隆得到的基因序列及其编码的氨基酸序列与之前报道的印度广藿香的异同, 为广藿香 *PTS* 基因的进一步利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试的广藿香植物材料采于海南大学园艺园林学院广藿香资源圃, 采集生长期为 5 个月的广藿香叶、茎、根, 采后用液氮冷冻处理, -80 ℃ 保存, 备用。

试验所用的主要试剂有 SDS(十二烷基磺酸钠)、CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)及 PEX(乙基磺原酸钾)(北京鼎国公司), *Taq* DNA 聚合酶、pMD19-T 载体、感受态细胞(上海生物工程有限公司), 其余试剂均为进口或国产分析纯, 引物合成及测序由北京诺赛基因组研究有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用 PEX 法、CTAB 法及 SDS 法^[8-10] 分别提取广藿香根、茎、叶的基因组总 DNA。

1.2.2 DNA 质量与浓度检测 取 5 μL 提取的广藿香各部位总 DNA 溶液于 0.8% 琼脂糖凝胶在 1 × TAE 缓冲液中电泳, 检测 DNA 的完整性。并取 1 μL DNA 样品, 用无菌水稀释 50 倍, 用紫外分光光度计检测 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$, 并计算 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$, 以确定其纯度及得率。

1.2.3 *PTS* 基因 PCR 扩增 根据 Genbank 中登录的 *PTS* 基因的 DNA 序列, 设计全长引物用于广藿香 *PTS* 基因的扩增, 引物序列如下: 正向引物 5' - ATGGAGTTGTATGCCCAAAG - 3'; 反向引物 5' - TTAATATGGAACAGGGTGAA - 3'。PCR 反应程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 3 min, 35 个循环; 72 ℃ 终延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

1.2.4 基因克隆和测序 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产

收稿日期: 2015-01-30

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81360618); 海南省中药现代化专项(编号: 2012ZY015)。

作者简介: 陈 英(1990—), 女, 贵州遵义人, 硕士研究生, 从事南药种质资源与活性成分研究。E-mail: 814006138@qq.com。

通信作者: 吴友根, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事南药种质资源与活性成分研究。E-mail: ceyycii@163.com。

物,利用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化目的条带,将纯化后的 PCR 产物与 pMD19 - T 载体连接,并转化至感受态细胞 DH5 α ,经蓝白斑筛选和 PCR 扩增鉴定获得阳性克隆。测序由北京诺赛基因组研究有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 的光吸收比值和 DNA 得率

通常将光吸收比值作为衡量总 DNA 纯度的一个重要指标, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.7 ~ 1.9 之间说明 DNA 纯度较高,低于 1.7 说明存在蛋白质、多糖等杂质污染,高于 2.0 说明有 RNA

污染^[10]。由表 1 可知,CTAB 法所提取的叶总 DNA 及 PEX 法提取的根总 DNA,其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 分别为 1.69 和 1.46,说明含有杂质,而 CTAB 法未能从根中提取到 DNA。PEX 法和 SDS 法提取的叶总 DNA,3 种方法提取的茎总 DNA 及 SDS 法提取的根总 DNA,其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 界于 1.78 ~ 1.86,说明纯度较高。PEX 法提取的叶总 DNA 得率最高,为 229.17 $\mu\text{g/g}$,其次是 CTAB 法,SDS 法得率最低。3 种方法提取的茎总 DNA 得率相差不大,从 122.69 $\mu\text{g/g}$ 到 131.88 $\mu\text{g/g}$,而 PEX 法提取的根总 DNA 得率较 SDS 法高,约为其 2 倍。

表 1 不同方法提取的广藿香叶、茎、根总 DNA 的纯度及得率

提取方法	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$			总 DNA 得率($\mu\text{g/g}$)		
	叶	茎	根	叶	茎	根
PEX 法	1.81 \pm 0.052	1.86 \pm 0.047	1.46 \pm 0.068	229.17 \pm 5.742	122.69 \pm 4.964	134.00 \pm 5.892
CATB 法	1.69 \pm 0.098	1.84 \pm 0.035	—	194.48 \pm 8.699	131.88 \pm 2.676	—
SDS 法	1.84 \pm 0.024	1.78 \pm 0.026	1.81 \pm 0.039	176.52 \pm 3.400	129.70 \pm 2.114	69.99 \pm 1.495

注:“—”表示未得到 DNA,此法不适宜。

2.2 广藿香 3 个不同部位基因组总 DNA 完整性的检测

由图 1 可知,不同部位的样品其总 DNA 得率存在一定差异,广藿香叶在 3 种不同的提取方法中均能得到较多的总 DNA,其次是茎,而根提取的总 DNA 量则较少。CTAB 法在广藿香根中未提取出 DNA,在叶中虽提取出了 DNA,但出现轻微降解现象,说明此方法不能有效提取广藿香基因组 DNA,特别是提取其根中的 DNA。PEX 法和 SDS 法均能从广藿香根、茎、叶中提取到总 DNA,但 PEX 法提取的根总 DNA

杂质较多,且条带弥散,说明存在降解。虽然 SDS 法提取的叶总 DNA 浓度不如 PEX 法高,用其提取的茎总 DNA 效果与另外 2 种方法差异不明显,但 3 种方法中只有 SDS 法可以从根中提取出条带清晰、完整性好的总 DNA。因此,SDS 法能高效一致地提取广藿香各部位的基因组总 DNA,以此方法提取的 DNA 条带亮、清晰完整、纯度高。电泳检测的结果和紫外分光光度计检测的结果一致。

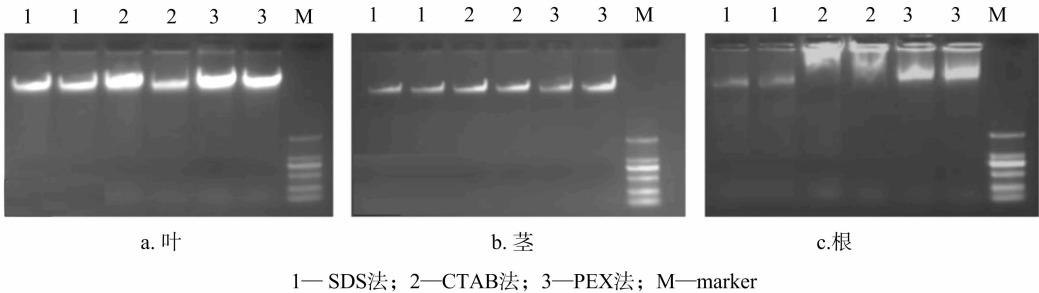


图1 广藿香叶、茎、根用 3 种提取方法所得 DNA 的电泳图谱

2.3 藿香醇合成酶(PTS)基因的 PCR 扩增及测序

以广藿香叶总 DNA 为模板,进行 PTS 基因 DNA 序列的全长扩增,获得 3 000 bp 左右的特异条带(图 2),片段大小与预期相符。测序得到 3 058 bp 的序列,将序列在 GenBank 上经 Blast 分析,发现与已登记的 PTS 基因序列 DQ355151 有较高的相似性,证明获得的序列为 PTS 基因序列。

2.4 生物信息学分析

将所得的 PTS 基因序列与已登记的 PTS 基因 cDNA 序列进行比对,发现 PTS 基因序列包含了完整的 7 个外显子和 6 个内含子,7 个外显子的大小分别为 115、264、376、221、137、252、294 bp,6 个内含子大小分别为 144、455、79、119、79、523 bp。共编码 552 个氨基酸,等电点为 5.46,将其命名为 PTS - 1。在氨基酸组成中,酸性氨基酸(D、E)占 15.40%,碱性氨基酸(K、R)占 12.14%,极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y)占 22.28%,疏水氨基酸(A、I、L、F、W、V)占 36.97%。由图 3 可知,蛋白质疏

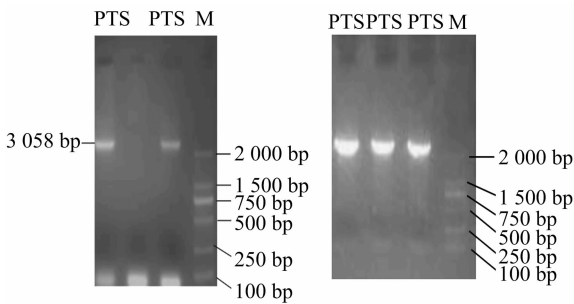


图2 PTS基因 PCR(A)及菌液 PCR(B)电泳图谱

水性预测结果表明,PTS - 1 疏水性平均值(GRAVY)为 -0.323,表明该蛋白为亲水性蛋白。利用在线分析软件 TMHMM 对 PTS - 1 氨基酸序列进行跨膜结果预测,发现该蛋白为非跨膜蛋白。由图 4 可知,蛋白质二级结构预测结果表

明该氨基酸序列含有 4 种二级结构,有 363 个氨基酸参与 α -螺旋,占 65.76%;54 个参与延伸链,占 9.78%;42 个参与 β -转角,占 7.61%;93 个参与无规则卷曲,占 16.85%。本试验所得 *PTS* 基因序列与 GenBank 中已登记的该基因序列

DQ355151 相比,有 53 个核酸差异,所编码的氨基酸序列与已登记的广藿香 *PTS* 氨基酸序列 ABC87816 相比,有 26 个氨基酸差异,差异率为 4.7% (图 3)。

PTS-1	MELYAQSVGVGAASRPLANFHCQVWGDKFIVYNPQSSQAGEREQAEELKVELKRELKEAS	60
ABC87816	.MELYAQSVGVGAASRPLANFHCQVWGDKFIVYNPQSCQAGEREQAEELKVELKRELKEAS	60

PTS-1	DNYMRQLKMVDIAIQRGLIDYLFVEDVDDEALKNLFEMFADFCKNNHDMHATLSFRLLRQH	120
ABC87816	DNYMRQLKMVDIAIQRGLIDYLFVEDVDDEALKNLFEMFADFCKNNHDMHATLSFRLLRQH	120

PTS-1	GYRVSCEVFEEKFDGKGHGKVPNDGDPVEDLEFFEATHLRVHGEDVLDNAFVTRNYLES	180
ABC87816	GYRVSCEVFEEKFDGKGHGKVPNEDGAVAVLEFFEATHLRVHGEDVLDNAFDFTRNYLES	180

PTS-1	VYATLNDPTAKQVHNALNEFSFRGLPRVEARKYISIEQYASHHKGLLKLAKLDFNLVQ	240
ABC87816	VYATLNDPTAKQVHNALNEFSFRGLPRVEARKYISIEQYASHHKGLLKLAKLDFNLVQ	240

PTS-1	ALHRRLESDSRWVKTLQVPTLSFVRDLVESYFWASGSYFEPNYSVARMILAKGLAVL	300
ABC87816	ALHRRLESDSRWVKTLQVPTKLSFVRDLVESYFWASGSYFEPNYSVARMILAKGLAVL	300

PTS-1	SLMDDVYDAYGLFEELQVFTDAIERWDASCLDKLPEYMKIVYKALLDVFEEDVEEVIKLG	360
ABC87816	SLMDDVYDAYGTFEELQMFTDAIERWDASCLDKLPDYMKIVYKALLDVFEEDVEEVIKLG	360

PTS-1	APYRVYGYGKEAMKYAARAYMEQAHWREQKHKPTTKEYMKLATKTCGYITLIILSFLGVVEE	420
ABC87816	APYRAYGYGKEAMKYAARAYMEEAQWREQKHKPTTKEYMKLATKTCGYITLIILSCLGVVEE	420

PTS-1	GIVTKEAFDWFVSRPPFVEATLIIARLINDITGCEFNKREHVRTAVECYMEEHKVGKQE	480
ABC87816	GIVTKEAFDWFVSRPPFIEATLIIARLVNDITGHEFEKKREHVRTAVECYMEEHKVGKQE	480

PTS-1	VVSEFYNQMESAWKDINECLLRPAEFPIPLLNLILNSVRTLEVIYKEGDSYTHVGPAMQN	540
ABC87816	VVSEFYNQMESAWKDINEGLRPFVEFPIPLLILILNSVRTLEVIYKEGDSYTHVGPAMQN	540

PTS-1	IIKQLYLHPVPY	552
ABC87816	IIKQLYLHPVPY	552

图3 *PTS* 基因所编码的氨基酸序列及与已登记序列 ABC87816 的比对情况

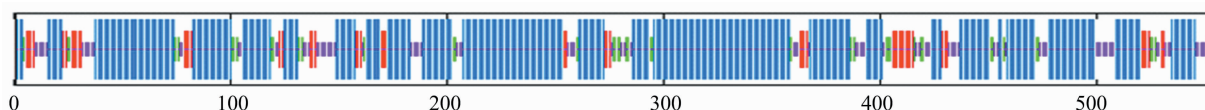


图4 *PTS*-1 氨基酸的二级结构预测(蓝色、红色、绿色和紫色分别表示 α -螺旋、延伸链、 β -转角和无规则卷曲)

3 讨论与结论

DNA 是最重要的生物信息分子,是遗传信息的载体,能快速、经济地从植物样品中提取高产量、高纯度的基因组 DNA 在当前分子生物学研究中极为重要。1961 年,十二烷基磺酸钠(SDS)和氯仿从细胞中分离提取 DNA 样品的方法被首次报道,自此,国内外学者对不同样品的 DNA 提取方法进行了深入的研究,至今国内外已报道了多种从植物细胞中提取 DNA 的方法。不同植物、甚至同种植物的不同器官,其化学成分及含量各不相同,导致 DNA 提取难易程度及所提出 DNA 的质量存在明显差异^[11-15]。广藿香化学成分主要有挥发性成分和非挥发性成分 2 类,其中挥发性成分主要有酮类、萜类、单萜类、倍半萜烯类、醇类、烷酸类及醛类化合物等^[16-17]。非挥发性成分主要为黄酮类、植物甾醇类、生物碱、三萜类、苯丙素苷类及烷酸类化合物等次生代谢产物及植物多糖^[18-19]。在提取 DNA 的过程中,这些物质会与 DNA 共沉淀,形成黏稠的胶状物,这些胶状物难以溶解或产生褐变,致使提取出来的 DNA 质量降低甚至提取不出 DNA,进而抑制

了 PCR 扩增反应。我们在提取过程中发现,从广藿香根中提取的总 DNA 颜色为褐色,较难溶解,而从叶和茎中提取的总 DNA 为白色,溶解较易。

DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.7 ~ 1.9 之间通常被认为纯度较高、质量较好,纯的双链 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.8。如果总 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 低于 1.7 或高于 2.0 则被认为是含有一定的杂质,影响了 DNA 分子的光吸收值而导致的^[10],这些杂质包括蛋白质、多糖、多酚和单宁类物质、RNA 等。本研究所用的 3 种 DNA 提取方法中,SDS 法所得总 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.78 ~ 1.84,说明纯度较高,不会影响到下游 PCR 反应。此外,DNA 得率也是衡量提取方法优劣的重要参数之一。植物总 DNA 得率与植物种类和来源存在一定的关系,不同物种的 DNA 得率不同,同一物种的不同部位,其 DNA 得率也存在差异,如侯艳霞等以一串红的叶片、茎段、花为材料,比较 5 种方法对其 DNA 提取效果的影响,结果表明叶片较容易得到高质量的 DNA,茎段次之,花最差^[9]。本研究选用的 3 个部位的植物材料中,叶的总 DNA 得率最高,为 176.52 ~ 229.17 $\mu\text{g/g}$,茎次之,根最低。此外,植物材料的保

存时间是影响总 DNA 得率的主要因素之一,保存的时间越长,DNA 降解越严重,得率越低。郭红媛等在棉花的总 DNA 提取过程中发现,老化或储存时间较长的材料中,棉酚、多糖、单宁等次生代谢物质含量较高,在提取过程中易与 DNA 结合,并且难以去除,严重影响了 DNA 的得率和质量^[20]。

本研究得到的广藿香醇合成酶基因与已登录的该基因存在一定的差异,不仅体现在有 26 个氨基酸序列不同,还体现在蛋白质的结构上。PTS-1 的二级结构中,有 363 个氨基酸参与 α -螺旋,占 65.76%,54 个参与延伸链,占 9.78%,42 个参与 β -转角,占 7.61%,93 个参与无规则卷曲,占 16.85%。而已登录的广藿香醇合成酶蛋白序列 ABC87816 的 4 种二级结构中,有 359 个氨基酸参与 α -螺旋,占 65.04%,50 个参与延伸链,占 9.06%,46 个参与 β -转角,占 8.33%,97 个参与无规则卷曲,占 16.85%。造成同一物种的同一基因序列和结构差异的因素有很多。首先,同一物种不同部位的同一类型基因可能存在差异,如 Vasiliki 等在对番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 不同器官的同一功能酶进行研究时发现,在番茄中可以催化 GPP 形成芳樟醇的酶 TPS37 和 TPS39,在序列上存在较大差异,前者在叶片、茎、花中都表达,而后者只在嫩叶和花中表达^[21]。其次,同一物种不同品种的同一种酶基因序列也可能存在差异,如 Naoko 等通过比较 3 种不同紫苏 (*Perilla frutescens*) 品种合成的香叶醇合酶基因,发现不同紫苏品种合成的香叶醇合酶蛋白序列存在 2%~3.2% 的差异^[22]。再者,同一物种不同生长环境,同一类型基因也可能存在差异,如王海波等通过对芦苇 (*Phragmites Australis*) Rubisco 蛋白分子的研究发现,不同生态型的 2 种芦苇(沙芦和水芦)的 Rubisco 蛋白的一级结构发生了变化,反映了该酶有基因表达的环境适应^[23]。本研究选用的材料为中国广藿香,而 NCBI 已登录的 PTS 基因序列是从印度广藿香中克隆得到的,生长环境的不同可能是广藿香 PTS 基因存在差异的主要原因。然而,PTS 基因序列和结构是否还存在其他影响因素,如不同取材部位等,还有待进一步研究。

综上所述,通过本研究可以得出如下 3 个结论:其一,在所选用的 3 种方法中,SDS 法可以高效一致地提取广藿香根、茎、叶的基因组总 DNA,而 CTAB 法不能从根中提取到 DNA,且该法提取的叶总 DNA 存在降解,PEX 法提取的根总 DNA 杂质较多,降解严重。其二,广藿香叶总 DNA 得率最高,其次是茎,根得率最低。其三,中国广藿香 PTS 基因的 DNA 序列与印度广藿香相比,有 53 个核酸存在差异,二者编码的氨基酸序列有 4.7% 的差异,引起基因差异的具体原因,还需进一步研究确定。

参考文献:

- [1] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8 (19): 4321 - 4325.
- [2] Xin Z, Velten J P, Oliver M J, et al. High - throughput DNA extraction method suitable for PCR [J]. BioTechniques, 2003, 34 (4): 820 - 824, 826.
- [3] 刘遵春, 廖明安. 金花梨基因组 DNA 提取方法及部位的比较研究 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33 (11): 2062 - 2063.
- [4] 黄晓丹, 张云贵, 应铁进. 高质量植物基因组 DNA 的提取 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42 (2): 311 - 314.
- [5] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 42 - 43.
- [6] Deguerry F, Pastore L, Wu S, et al. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2006, 454 (2): 123 - 136.
- [7] Hartwig S, Frister T, Alemdar S, et al. Expression, purification and activity assay of a patchoulol synthase cDNA variant fused to thioredoxin in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2014, 97: 61 - 71.
- [8] 雷海英, 孙毅, 仪治本, 等. PEX 法提取植物组织 DNA [J]. 广东农业科学, 2010 (5): 178 - 180.
- [9] 侯艳霞, 汤浩茹, 张勇, 等. DNA 提取方法对一串红不同部位 DNA 提取的比较 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28 (1): 94 - 100.
- [10] 刘杰, 高连明. 红豆杉属植物三种不同总 DNA 提取方法的分析比较 [J]. 广西植物, 2011, 31 (2): 244 - 249, 159.
- [11] 陆敏佳, 莫秀芳, 王勤, 等. 藜麦基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (4): 42 - 45.
- [12] Couch J A, Fritz P J. Isolation of DNA from plant high in polyphenolics [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1990, 8 (1): 8 - 12.
- [13] 白雪嵩, 赵昶灵, 陈中坚, 等. 5 种提取三七基因组 DNA 方法的比较 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (5): 54 - 56.
- [14] 刘塔斯, 林丽美, 龚力民, 等. 分子标记中植物 DNA 提取方法的研究进展 [J]. 中南药学, 2005, 3 (6): 370 - 373.
- [15] 张晓波, 许沛东, 赵艳. 野牛草基因组 DNA 提取方法的筛选 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (8): 26 - 28.
- [16] Zhang L G, Zhang C, Ni L J, et al. Rectification extraction of Chinese herbs' volatile oils and comparison with conventional steam distillation [J]. Separation and Purification Technology, 2011, 77 (2): 261 - 268.
- [17] Li F, Li C J, Ma J, et al. Four new sesquiterpenes from the stems of *Pogostemon cablin* [J]. Fitoterapia, 2013, 86: 183 - 187.
- [18] 黄烈军. 中药广藿香化学及生物活性成分研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2008: 15 - 23.
- [19] 张岗. 广藿香非挥发性成分研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2007: 21 - 23.
- [20] 郭红媛, 余茂云. 一种改良的棉花总 DNA 提取方法 [J]. 山西农业科学, 2009, 37 (2): 3 - 5.
- [21] Falara V, Akhtar T A, Nguyen T T, et al. The tomato terpene synthase gene family [J]. Plant Physiology, 2011, 157 (2): 770 - 789.
- [22] Masumoto N, Korin M, Ito M. Geraniol and linalool synthases from wild species of *Perilla* [J]. Phytochemistry, 2010, 71 (10): 1068 - 1075.
- [23] 王海波. 不同生境两种生态型芦苇 Rubisco 蛋白分子的差异分析 [D]. 兰州: 兰州大学, 2006: 33 - 45.