

# 新疆一枝蒿 cDNA 文库构建方法研究<sup>Δ</sup>

刘冲\*,程波,何江,杨伟俊#,地力努尔·吐尔逊江,满尔哈巴·海如拉,薛桂蓬,魏梅梅,王雪(新疆维吾尔自治区药物研究所/新疆维吾尔药重点实验室,乌鲁木齐 830004)

中图分类号 R282.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1793-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.19

**摘要** 目的:建立构建新疆一枝蒿 cDNA 文库的方法。方法:采用改良 Trizol 法提取一枝蒿幼嫩叶片总 RNA,反转录成单链 cDNA,长距离聚合酶链反应法(LD-PCR)合成双链 cDNA;PCR 产物经蛋白酶 K 消化,采用 sfi I 酶切,酶切产物用 CHROMA SPIN-400 柱分级分离,回收 0.4 kb 以上的 cDNA,以 λTriplE×2 噬菌体连接并进行体外蛋白包装,利用 SMART 技术构建一枝蒿全长 cDNA 文库;随机挑取文库中 20 个单克隆,电泳法测定原始文库滴度、文库容量、cDNA 插入片段的重组阳性率与大小。结果:原始文库滴度为  $1.94 \times 10^7$  pfu/mL,库容量为  $0.97 \times 10^7$  pfu;cDNA 插入片段重组阳性率为 96%,大小为 0.5~2.0 kb,平均为 0.9 kb。结论:所构建的高库容、高质量的文库可为新疆一枝蒿 cDNA 文库的构建提供基础。

**关键词** 新疆;一枝蒿;cDNA 文库;构建;功能基因

的舒张支气管作用<sup>[1]</sup>。笔者前期预实验结果显示,氨茶碱质量浓度为 0.08 mg/mL 时解痉效果明显,故本研究以 0.08 mg/mL 氨茶碱为阳性对照。

影响支气管平滑肌张力的主要因素有神经反射、钾离子通道的开放状态、信号传递的通路以及支气管平滑肌上受体的状态等<sup>[2]</sup>。当哮喘患者哮喘发作时,支气管平滑肌上炎症细胞破裂,产生大量 ACh,从而激动气管平滑肌 M 受体;并且组胺 H<sub>1</sub> 受体数量增加,有 50% 的气管收缩是由 His 介导<sup>[13-14]</sup>。可见,ACh 和 His 是哮喘急性发作期导致气管痉挛收缩的 2 种主要介质。ACh 作用于 M 胆碱受体,His 作用于 H<sub>1</sub> 受体,从而致使支气管平滑肌收缩,引起支气管痉挛,最终导致呼吸困难,而拮抗 ACh、His 可以延缓哮喘的发病<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,神香草不同洗脱物均能不同程度地抑制 ACh 和 His 引起的豚鼠离体气管环收缩,且以神香草 60% 洗脱物作用效果最明显,当其质量浓度为 2.56 mg/mL 时,对气管收缩的抑制作用与阳性对照氨茶碱相当。

综上所述,神香草 60% 洗脱物能够显著抑制 ACh 和 His 导致的支气管平滑肌收缩,缓解支气管痉挛。本研究为后期考察神香草 60% 洗脱物是否通过拮抗 M 胆碱受体和 H<sub>1</sub> 受体进而抑制支气管痉挛的作用机制研究奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Torrego FA. Bronchial thermoplasty in the treatment of asthma[J]. *Arch Bronconeumol*, 2010, 46(2): 85-91.  
[2] 康小龙,姚明达,何承辉,等.香青兰总黄酮对支气管哮喘

Δ 基金项目:新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(No.KY2015121);新疆维吾尔自治区青年科技创新人才培养工程项目(No. 2013721034)

\* 副研究员,博士研究生。研究方向:药用植物资源与利用。E-mail:liu\_chong02@163.com

# 通信作者:研究员,博士。研究方向:维吾尔药资源。E-mail:wilfred3106@163.com

大鼠肺功能的影响[J].中国中医药信息杂志,2013,20(10):24-28.

- [3] 肖斌.黄芩苷对动物过敏性哮喘的治疗作用及作用机制研究[D].石家庄:河北医科大学,2013.  
[4] 张理科,陈宇.沙美特罗替卡松治疗中重度支气管哮喘的临床观察[J].中国药房,2016,27(23):3270-3272.  
[5] 刘勇民.维吾尔药志:上册[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:423-429.  
[6] 顾政一.维吾尔药现代化研究与应用[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,2015:350-358.  
[7] 戎晓娟,严欢,韩阳,等.神香草水提物的主要成分分析及含量测定[J].中国药房,2015,26(6):808-810.  
[8] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册[S].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:78.  
[9] 张洪平,李茜,牛兴隆,等.维药神香草的药理研究进展[J].中国民族民间医药,2015,24(6):33-34.  
[10] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2001:1368-1369.  
[11] 周清武.氨茶碱在药理学指导下的合理应用[J].中国药房,2010,21(40):3781-3782.  
[12] 王海静,赵卉,刘宇,等.牛磺酸对大鼠立体气管平滑肌舒张作用及机制的研究[J].中国现代医生,2012,50(10):11-13.  
[13] Harada M, Nakashima K, Hirota T, et al. Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(4): 491-496.  
[14] Iwabe T, Harada T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis-associated infertility[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2002, 53(Suppl 1): 19-25.  
[15] 蒋建敏,许实波,江润祥.苦丁茶对豚鼠离体气管平滑肌收缩功能的影响[J].中国中药杂志,2001,26(12):853-856.

(收稿日期:2016-08-23 修回日期:2016-12-15)  
(编辑:林静)

# Study on the cDNA Library Construction Method for Xinjiang *Artemisia rupestris*

LIU Chong, CHENG Bo, HE Jiang, YANG Weijun, DILINUER · Tuerxunjiang, MERHABA · Heyrulla, XUE Guipeng, WEI Meimei, WANG Xue (Xinjiang Institute of Materia Medica/Key Laboratory of Xinjiang Uighur Medicine, Urumqi 830004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for full-length cDNA library of Xinjiang *Artemisia rupestris*. METHODS: Modified Trizol method was adopted to extract total RNA in young leaves of *A. rupestris*, it was transcribed into single-strand cDNA, and then synthesized into double-strand cDNA by long-distance polymerase chain reaction (LD-PCR) method. PCR product was digested by proteinase K and *sfi* I, and then fractionated by CHROMA SPIN-400 columns. The cDNA longer than 0.4 kb were collected and ligated to phage  $\lambda$ TriplE $\times$ 2, and then protein packaging was performed. Full-length cDNA library was established by SMART technology. 20 monoclonal were randomly selected from the library, and electrophoresis was used to determine the primary library titer, library capacity, recombinant positive rate and length of insert cDNA. RESULTS: The primary library titer was  $1.94 \times 10^7$  pfu/mL, library capacity was  $0.97 \times 10^7$  pfu; recombinant positive rate of insert cDNA was 96% and length was 0.5-2.0 kb with an average of 0.9 kb. CONCLUSIONS: The established library is high in capacity and quality, which can provide basis for establishing cDNA library of Xinjiang *A. rupestris*.

**KEYWORDS** Xinjiang; *Artemisia rupestris*; cDNA library; Construction; Functional gene

新疆一枝蒿(*Artemisia rupestris* L.)为菊科蒿属多年生草本植物,主要分布于我国新疆,其地上全草是新疆哈萨克医学常用药材。一枝蒿疗效确切、应用广泛,具有清热解暑、消食健胃、祛风凉血之功效,常用于治疗感冒、过敏、食积、蛇伤、疮疖<sup>[1]</sup>。民间谚语中记载着“家有一枝蒿,不怕被蛇咬;家有一枝蒿,百病都除掉”<sup>[2]</sup>。

目前,一枝蒿主要依靠自然繁殖生长,加上无计划地采挖和过度放牧,其野生资源面临枯竭。而且一枝蒿有效成分酚酸类化合物结构复杂,人工合成困难。如何使该药用资源可持续发展具有现实意义,而构建cDNA文库是探索药材相关功能基因组学的重要手段。文献报道已经成功构建了人参<sup>[3]</sup>、丹参<sup>[4]</sup>、铁皮石斛<sup>[5]</sup>、甘草<sup>[6]</sup>、滇重楼<sup>[7]</sup>等药用植物的cDNA文库。因此,在本研究中,笔者以野生一枝蒿幼嫩叶片组织为材料,利用SMART (Switching Mechanism At 5' end of the RNA Transcript)技术,首次构建其幼嫩叶片组织cDNA文库,为进一步克隆一枝蒿相关功能基因及代谢途径研究奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

TC-512 聚合酶链反应(PCR)仪(英国 Techne 公司);DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳仪(北京市六一仪器厂);DOC2000 凝胶成像仪(美国 Bio-rad 公司);1200 紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);BS110S 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

### 1.2 药材

一枝蒿叶片于2014年5月采自新疆伊犁哈萨克自治州伊宁县(E80°33' 31.230 0", N44°10' 12.666 0", 当一枝蒿的枝条长出5~10片真叶时开始采集),由新疆维吾尔自治区药物研究所何江副研究员鉴定为新疆一枝蒿(*Artemisia rupestris* L.)全草,双蒸水清洁后用滤纸吸干水分,迅速放入液氮中,于-80℃冰箱贮存,备用。

### 1.3 试剂与其他

Trizol 试剂、琼脂糖(美国赛默飞世尔科技公司,批号:15596026、2014101121);SMART™ cDNA 文库构建试剂盒(cDNA Library Construction Kit)、蛋白测试试剂盒(Advantage2 PCR Kit,美国 Clontech 公司,批号:2014101121、639206);核酸分子量标准品 DL2000(分子量:750 bp)、T<sub>4</sub> DNA 连接酶均购自大连 TaKaRa 公司;蛋白酶K、牛血清白蛋白(BSA)均购自上海雅心生物技术有限公司;焦碳酸二乙酯(DEPC)、乙二胺四乙酸(EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、水饱和酚、 $\beta$ -巯基乙醇(BME)均购自北京鼎国生物技术有限公司;氯仿、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、冰乙酸等均为分析纯;水为双蒸水。

## 2 方法

采用改良 Trizol 法提取一枝蒿幼嫩叶片总 RNA,反转录成单链 cDNA,长距离聚合酶链反应法(LD-PCR)合成双链 cDNA;PCR 产物经蛋白酶 K 消化,采用 *sfi* I 酶切;酶切产物用 CHROMA SPIN-400 柱分级分离,回收 0.4 kb 以上的 cDNA,以  $\lambda$ TriplE $\times$ 2 噬菌体连接并进行体外蛋白包装;利用 SMART 技术构建一枝蒿全长 cDNA 文库并进行质量评价,详细操作如下。

### 2.1 总 RNA 提取

称取一枝蒿叶片组织约 100 mg,放入经预冷的研钵里,在液氮中充分研磨。用改良 Trizol 法<sup>[9]</sup>提取一枝蒿叶片总 RNA,加入经 DEPC 处理的水 20  $\mu$ L 以溶解 RNA,电泳检测总 RNA 纯度,-80℃保存,备用。

### 2.2 单链与双链 cDNA 合成

cDNA 双链合成参考 cDNA 文库构建试剂盒说明书操作。吸取 3  $\mu$ L 总 RNA 溶液作模板,以 SMART IV 寡核苷酸(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCAT-TACGGCCGGG-3')和 CDS III/3' PCR 引物[5'-ATTCT-AGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)30(N-1)N-3'; N=A, G, C, or T; N-1=A, G, or C]作为反应体系引物,

在 SMART 反转录酶的作用下合成单链 cDNA。吸取 2  $\mu\text{L}$  单链 cDNA 产物作为合成双链 cDNA 的模板,采用 LD-PCR 法合成双链 cDNA,即以 5' PCR 引物(5' - AA-GCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') 和 CDS III/3' PCR 引物作为体系引物。采用蛋白测试试剂盒合成双链 cDNA,反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  20 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s;68  $^{\circ}\text{C}$  6 min,25 个循环。吸取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物,采用 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测双链 cDNA 分布情况。

### 2.3 蛋白酶 K 消化及 sfi I 酶切

吸取 50  $\mu\text{L}$  双链 cDNA (约 2~3 g),加入 2  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K,45  $^{\circ}\text{C}$  水浴 20 min,用酚/氯仿抽提,进一步纯化产物,加入水溶解沉淀。然后依次加入 10 倍 sfi I 缓冲液 10  $\mu\text{L}$ 、sfi I 酶 10  $\mu\text{L}$ 、100 $\times$ BSA 1  $\mu\text{L}$ ,充分混合后于 50  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h,孵育后加入 1% 二甲苯青 2  $\mu\text{L}$ ,混匀。

### 2.4 cDNA 片段分级分离

将混有 1% 二甲苯青的 cDNA 加入到 cDNA 文库构建试剂盒中的 CHROMA SPIN-400 分离柱中,待渗入基质后加入过柱缓冲液 100  $\mu\text{L}$ ,待自然渗尽后,再加入过柱缓冲液 600  $\mu\text{L}$ 。将预先准备好的 16 个离心管迅速放在柱下方,每管 1 滴直到缓冲液滴尽为止。每管取 3  $\mu\text{L}$  上 1.1% 琼脂糖凝胶电泳。另取 DL2000 为对照,于 150 V 电泳 10 min,记录电泳图。选择分子量大于 0.4 kb 的 3~4 管,收集到新的离心管中,依次加入 1/10 倍体积(BV) 醋酸钠(3 mol/L,pH 4.8)、糖原(20 mg/mL) 1.3  $\mu\text{L}$ 、2.5 BV 95% 乙醇(-20  $^{\circ}\text{C}$ ),于 -20  $^{\circ}\text{C}$  静置过夜后,离心(离心半径为 6.5 cm,下同,14 000 r/min)20 min,弃去上清液,加入 7  $\mu\text{L}$  水溶解沉淀。

### 2.5 cDNA 片段与 $\lambda$ TriplE $\times$ 2 噬菌体的连接与包装

取灭菌的 0.5 mL 离心管,加入“2.4”项处理后的 cDNA 1.0  $\mu\text{L}$ ,依次加入 cDNA 文库构建试剂盒中的 500 ng/ $\mu\text{L}$   $\lambda$ TriplE $\times$ 2 噬菌体(Vector) 1.0  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$ 连接缓冲液(Ligation buffer)0.5  $\mu\text{L}$ 、腺苷三磷酸(ATP,10 mmol/L) 0.5  $\mu\text{L}$ 、T<sub>4</sub> DNA 连接酶 0.5  $\mu\text{L}$ ,轻柔混匀,16  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。将噬菌体包装提取物置于冰上解冻,取 25  $\mu\text{L}$  包装提取物加入到 5  $\mu\text{L}$  连接产物中,30  $^{\circ}\text{C}$  温育 90 min,再加入 25  $\mu\text{L}$  溶解后的包装提取物,30  $^{\circ}\text{C}$  温育 90 min 后,加入 500  $\mu\text{L}$  噬菌体稀释缓冲液,轻柔涡旋混匀;加入 25  $\mu\text{L}$  氯仿,轻柔涡旋混匀;离心(10 000 r/min)30 s,取上清液,即得包装混合物,4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱贮存。

### 2.6 原始 cDNA 文库质量评价

从 cDNA 文库构建试剂盒中挑取一个复活的蓝色单菌落,接种于 15 mL 普通培养基(LB)/硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>) /麦芽糖液体培养基中,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 振荡培养过夜,离心(5 000 r/min)5 min,弃上清,用 7.5 mL 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 重悬沉淀。准备适量 90 mm LB/MgSO<sub>4</sub> 琼脂平板,37  $^{\circ}\text{C}$  预热,分别取“2.5”项下包装混合物 2  $\mu\text{L}$ ,共 3 份,用 1 $\times$ Ligation buffer 稀释,体积比分别为 1:50、1:500、1:1 000。取各梯度稀释液 10  $\mu\text{L}$ ,分别加入

200  $\mu\text{L}$  重悬菌液,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$  浸染 20 min。将上述培养物加入到 3 mL 45  $^{\circ}\text{C}$  LB/MgSO<sub>4</sub>/顶层琼脂(soft)培养基中,迅速混匀,立即倒入 37  $^{\circ}\text{C}$  预热的平板上,晃动平板使琼脂分散均匀,室温放置 10 min 以冷却上层胶。37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 6~18 h,定期记录噬菌斑生长情况并计算文库滴度。文库滴度(pfu/mL) = 噬菌斑数 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 10<sup>3</sup>( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )/稀释噬菌体的铺板体积( $\mu\text{L}$ );原始库容量(pfu) = 文库滴度(pfu/mL) $\times$ 连接产物总体积(mL)。培养基中加入异丙基硫代半乳糖苷(100 mmol/L)50  $\mu\text{L}$ 、5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷(100 mmol/L)50  $\mu\text{L}$  过夜培养后,随机挑取 20 个噬菌斑单克隆,以 F(5' -CTC-GGGAAGCGGCCATTGTGTTGGT-3') 和 R(5' -ATAC-GACTCACTATAGGGCGAATTGGCC-3') 为正反引物,PCR 检测其重组阳性率(%),嵌入载体的数量/总数量 $\times$ 100%)与 cDNA 片段大小。

## 3 结果

### 3.1 总 RNA 分析

利用改良 Trizol 法提取一枝蒿叶片总 RNA,经电泳检测表明,28 S 和 18 S 的 2 个条带清晰,提示总 RNA 在提取过程中未发生降解,离散程度较低。这表明提取总 RNA 的纯度较高,符合构建 cDNA 文库的要求,电泳图见图 1。

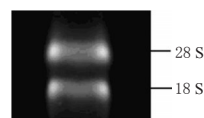


图 1 总 RNA 电泳结果

Fig 1 Electrophoresis results of total RNA

### 3.2 双链 cDNA 的合成分析

双链 cDNA 经电泳检测分析表明,双链 cDNA 经电泳后形成一条弥散状条带,长度在 0.1~5 kb 范围内,进一步提示 mRNA 反转录成功,扩增产物的分子量范围符合构建 cDNA 文库的要求。

### 3.3 双链 cDNA 经 sfi I 酶切及其分级分离分析

双链 cDNA 片段经过 CHROMA SPIN-400 分离柱分级分离,共收集到 16 管分离产物。经电泳检测分析表明,第 8~10 管 cDNA 产物片段大小均明显大于 0.4 kb。合并这 3 管用于进一步试验,除去其余小分子 cDNA 片段。分级分离检验结果见图 2。

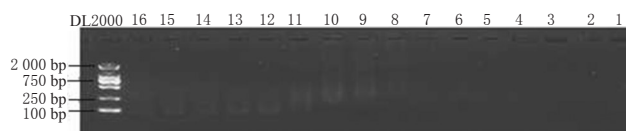


图 2 分级分离检验结果

Fig 2 Classification and fractionation test results

### 3.4 原始 cDNA 文库质量评价结果

原始文库滴度为  $1.94 \times 10^7$  pfu/mL,原始库容量为  $0.97 \times 10^7$  pfu。20 个噬菌斑单克隆进行菌落 PCR 检测,详见图 3。

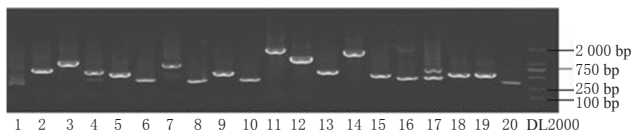


图3 PCR检测结果

Fig 3 PCR test results

结果,除1、20单克隆未检测出条带,17出现双目的条带外,其余均得到了有效扩增。cDNA插入片段重组阳性率为96%,其中最大的cDNA片段约2 kb,最小的约为0.4 kb,cDNA片段大小主要分布在0.5~2.0 kb,0.75 kb片段超过50%,平均长度为0.9 kb左右,表明试验基本符合构建一枝蒿cDNA文库的要求。

#### 4 讨论

在构建植物cDNA文库过程中,RNA纯度及其质量是试验中较为重要的环节,直接决定着后续试验的成功与否。由于同种或异种植物的不同组织中的组分与含量差异较大,因此,提取植物总RNA尚无统一通用的方法。必须针对不同植物材料的特点对提取方法进行选择优化,才能得到高质量核酸<sup>[8]</sup>。本试验曾用Trizol法提取一枝蒿叶片总RNA,结果不理想,故需在原有Trizol法基础上进一步改良优化。因此,笔者采用巯基乙醇作为还原剂,分别用氯仿和水饱和酚抽提,用高浓度盐溶液进一步沉淀,以去除蛋白质、多糖、多酚等杂质,最后用无水乙醇沉淀总RNA。最后,获得的总RNA完整性较好、纯度较高,且操作简单、快速,符合进一步试验的要求。

通常构建cDNA文库的载体主要以质粒和噬菌体为主,质粒文库多适于表达丰度较高的mRNA,其低丰度cDNA克隆数量相对较少;而噬菌体文库多适用于表达丰度较低的mRNA,可大大提高低丰度cDNA的克隆数量。考虑到一枝蒿的某些功能基因可能为低丰度的表达,因此本试验选择λTriplE×2噬菌体作为本次构建一枝蒿cDNA文库的载体。一般评价cDNA文库的质量的标准主要是看其原始滴度、重组阳性率以及载体插入cDNA片段的长度<sup>[9-10]</sup>,原始文库滴度一般要求不低于 $10^6$  pfu/mL,重组阳性率>85%以上方为有效文库。双链cDNA片段经过CHROMA SPIN-400柱分级分离,除去0.4 kb以下的小片段,避免了小片段优先与载体相连接,大大提高了其相关基因的完整性。在本试验中,一枝蒿cDNA文库原始文库滴度已达到 $1.94 \times 10^7$  pfu/mL,PCR结果表明重组阳性率为96%,表明本试验所构建的文库是一个高库容、高质量的文库。

一枝蒿主要为新疆哈萨克族民间习用药材,随着新疆民族医药被越来越多的人认识和了解,一枝蒿的开发近年来急剧增长,野生资源已日益枯竭。一枝蒿适宜于中高海拔山地气候条件,人工栽培多因生态环境不适,加之资金、技术等因素制约,至今未成功实现规模化种植。另外,随着一枝蒿的药理作用被逐步证实,对其化学成分的研究日益受到重视。自本单位最早从一枝蒿

中分离得到萜类成分一枝蒿酮酸和异一枝蒿酮酸以来<sup>[11-12]</sup>,其结构与活性已逐渐受到国内外的重视<sup>[13]</sup>。本研究通过构建新疆一枝蒿cDNA文库,进一步为其克隆、保护相关功能基因及开发有效次生代谢产物生物合成途径奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 安争西,魏岩.新疆植物志:第五卷[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:153-178.
- [2] 盛萍.新疆一枝蒿体外抗肿瘤物质基础及制备工艺研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2008.
- [3] 王颖.人参叶和根cDNA文库构建及表达序列标签分析[D].长春:东北师范大学,2007.
- [4] Cui GH, Huang LQ, Tang XJ, et al. Functional genomics studies of salvia miltiorrhiza I establish cDNA microarray of S. miltiorrhiza[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007, 32(12): 1137-1140.
- [5] Jiang M, Wang J, Wen GS, et al. Construction and sequence analysis of a normalized full-length cDNA library of Dendrobium officinal[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2013, 38(4): 504-509.
- [6] Yang Q, Zhang H, Wang WQ, et al. Construction and analysis of root cDNA library in Glycyrrhiza uralensis[J]. *China Journal of Materia Medica*, 2008, 33(12): 1386-1389.
- [7] Zhao S, Dong X, Ma T. Construction and preliminary analysis of a full-length cDNA library for paris polyphylla var. yunnanensis[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2014, 37(1): 22-25.
- [8] 吴林.半夏高温倒苗过程中总RNA及基因差异表达片段的研究[D].武汉:华中农业大学, 2008.
- [9] 秦子茹,贺金华,顾政一,等.一枝蒿不同溶剂提取物抗病毒作用的谱效关系研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(7): 889-893.
- [10] Yang Y, Gu D, Yi LA, et al. One step separation and purification of rupestonic acid and chrysosptertin B from artemisia rupestris L. by high speed counter current chromatography[J]. *Phytochem Anal*, 2010, 21(2): 205-209.
- [11] Gu ZY, He JH, Yang X, et al. Quantitative determination of rupestonic acid in rat plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study[J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(5): 563-567.
- [12] He YW, Dong CZ, Zhao JY, et al. 1, 2, 3-Triazole-containing derivatives of rupestonic acid: click-chemical synthesis and antiviral activities against influenza viruses[J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 76: 245-255.
- [13] Yong J, Lu C, Aisa HA. Advances in studies on the rupestonic acid derivatives as anti-influenza agents[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2013, 13(2): 310-315.

(收稿日期:2016-08-10 修回日期:2017-01-03)

(编辑:刘明伟)