

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.004

拟南芥 AtVQ29 基因的克隆与植物表达载体构建*

刘清 唐蛟 曾娟 黄明亮 童建华 黄志刚[△]

(湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室 湖南长沙 410128)

摘要 目的: VQ 模序蛋白是植物中所特有的一类具有高度保守序列的蛋白质,广泛参与植物的生长发育与逆境反应,本研究拟克隆拟南芥的 AtVQ29 基因并进一步构建由组成型启动子 CaMV 35S 驱动的植物表达载体 pSN1301-AtVQ29。**方法:** 采用 CTAB 法提取拟南芥基因组 DNA,根据已报道的 AtVQ29 基因序列设计并合成引物,通过 PCR 技术扩增获得拟南芥 AtVQ29 基因,经 T 载体克隆后测序。利用生物信息学软件对序列进行初步分析,同时基于基因重组技术构建植物表达载体。**结果:** 序列分析表明已成功克隆 AtVQ29 基因,该基因编码区全长为 372bp,共编码 123 个氨基酸残基,具有保守的 VQ 模序。并进一步构建了由组成型启动子 CaMV 35S 驱动的 AtVQ29 基因植物表达载体 pSN1301-AtVQ29。**结论:** 本研究所构建的 AtVQ29 基因植物表达载体能够在转基因植株中过量表达 AtVQ29 基因,为后期开展基因功能研究与植物基因改良奠定了基础。

关键词: AtVQ29; VQ 模序蛋白; 基因克隆; 植物表达载体

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)35-6814-04

Cloning of Arabidopsis AtVQ29 and Construction of its Plant Expression Vector*

LIU Qing, TANG Jiao, ZENG Juan, HUANG Ming-liang, TONG Jian-hua, HUANG Zhi-gang[△]

(Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan, 410128, China)

ABSTRACT Objective: VQ-motif proteins are found exclusively in plants and have a broad range of roles in plant growth, development and defense response. The study was aimed to clone AtVQ29 and construct plant expression vector pSN1301-AtVQ29 driven by CaMV 35S promoter. **Methods:** The genome DNA of Arabidopsis thaliana was extracted with CTAB method. Based on the reported AtVQ29 sequence, primers were designed to amplify AtVQ29. After T-vector cloning and sequencing, preliminarily bioinformatics analysis was made. Plant expression vector pSN1301-AtVQ29 was further constructed by the method of Recombinant DNA Technology. **Results:** The sequence has an open reading frame (ORF) of 372 bp long and encoded a polypeptide of 123 amino acids with conserved VQ motif. Plant expression vector pSN1301-AtVQ29 driven by CaMV 35S promoter was successfully constructed. **Conclusions:** The construction of plant expression vector pSN1301-AtVQ29 which can lead to the over-expression of AtVQ29 in transgenic plants provides the foundation for identification of gene function and genetic modification of plant.

Key words: AtVQ29; VQ motif protein; Gene cloning; Plant expression vector

Chinese Library Classification (CLC): Q785 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6814-04

前言

VQ 模序蛋白是一类编码含缬氨酸(Valine, V)和谷氨酰胺(Glutamine, Q)的植物特有蛋白质,该类蛋白质都有一个保守的 VQ 模序: FxxxVQxLTG(x 为任意氨基酸)^[1,2]。近年来, VQ 模序蛋白已陆续在拟南芥、水稻和大豆等植物中被鉴定,其家族成员数目较多,在拟南芥中有 34 个^[3],水稻中有 39 个^[4],而在大豆中多达 74 个^[5]。目前对 VQ 模序蛋白家族成员功能的研究主要集中在拟南芥中,水稻和大豆中还只有逆境胁迫下的表达分析等零星报道。在拟南芥中, MKS1 (AtVQ21) 可作为拟南芥

MAPK4 的酶底物,参与水杨酸(SA)依赖的防御机制的信号途径^[6]; SIB1(AtVQ23)也参与病害防御,该基因的过量表达可引起植物对病原菌侵染的高效响应,并通过 SA 和茉莉酸(JA)信号途径参与这一响应过程^[6]。对部分 VQ 模序蛋白家族成员作用机理的研究表明其通过与 WRKY 转录因子相互作用参与植物的防御反应^[3,7-10]。如 AtVQ23 能识别 WRKY 结构域的 C 端进而激活 WRKY33 与 DNA 结合的活性^[7]。AtVQ15 也能与 WRKY25 和 WRKY51 相互作用^[9]。

拟南芥 VQ 模序蛋白基因 AtVQ29 编码区无内含子,亚细胞定位预测 AtVQ29 蛋白质位于质体或者线粒体,系统发育树

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30900099); 湖南省高校创新平台开放基金项目(12K060)

作者简介: 刘清(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物信息学研究, 电话: 15974292247, E-mail: houniaoqing123456261@163.com

[△] 通讯作者: 黄志刚, 副教授, 电话: 0731-84635260, E-mail: klphzg@163.com

(收稿日期: 2014-07-18 接受日期: 2014-08-14)

分析发现表明 AtVQ29 与 AtVQ12(AtARVQ1)进化距离最近,暗示它们可能具有相似的功能,而后者已被发现参与砷酸盐的抗性过程^[10]。同时有研究发现 AtVQ29 也参与调控幼苗的去黄化和植株的开花时间^[12]。这表明 AtVQ29 在植物生长发育过程中具有重要作用,其复杂的作用机理也还有待进一步研究。本研究以拟南芥为材料,克隆 AtVQ29 基因并进行分析,同时构建该基因的植物表达载体,旨在为进一步开展基因功能研究与植物基因改良奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要材料与试剂 供试材料拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L., Columbia ecotype)为本实验室保存;供试质粒 pSN1301 由中国科学院植物研究所提供;T4 DNA 连接酶与凝胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;DNA Marker DL2000 与 DL5000、核酸内切酶 *Xba*I 与 *Sac*I、Taq DNA 聚合酶和 pMD19-T simple Vector 等购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要仪器设备 三用恒温水箱(浙江金坛市医疗仪器厂 HH-W420);恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司 ZWYR-240);超低温冷冻储存箱(中科美菱低温科技有限公司 DW-HL388);梯度 PCR 仪(美国 Eppendorf Mastercycler pro);凝胶成像系统(美国 SYGENE GENE GENIUS);高速冷冻离心机(美国 Eppendorf 5415R)等。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥叶片总 DNA 提取 采用 CTAB 法进行基因组 DNA 提取^[13]。取 0.5 g 左右拟南芥幼叶于研钵中,加 500 μ L 的 CTAB 提取液进行研磨,倒入 1.5 mL Ep 管中;65 $^{\circ}$ C 水浴 30-50 min,冷却至室温;加入等量的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),震荡混匀,13000 rpm 离心 2 min;取上清,加入等体积的异丙醇,颠倒混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min;13000 rpm 离心 10 min,弃掉上清;70%乙醇清洗 2 次,待干至透明;加 30 μ L dd H₂O 溶解。

1.2.2 PCR 扩增 根据拟南芥 AtVQ29 (AT4G37710) 基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件分析其内部酶切位点情况。设计一对引物,并根据后续构建植物表达载体的需要,在上游引物和下游引物的 5' 端分别加入 *Xba*I 与 *Sac*I 的酶切位点。设计的 PCR 引物为 P1F: CAGTCTAGACCAATCT CATGGAAGC 和 P1R: CAAGAGCTCTACCATCTGGAAATATTT GCA;PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;循环参数为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 sec,59 $^{\circ}$ C 复性 30 sec,72 $^{\circ}$ C 延伸 35 sec,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 保持 5 min。

1.2.3 基因的克隆与测序 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离后,用 TransGen 凝胶回收试剂盒回收纯化目的条带。将符合目的大小的条带切下称重,加入 3 倍体积溶液 GSB,于 55 $^{\circ}$ C 水浴融胶 6-10 min,冷却至室温,加入离心柱中静置 1 min,10000 $\times$ g 离心 1 min,弃去流出液;加入 650 μ L 溶液 WB,10000 $\times$ g 离心 1 min,弃流出液;开盖静置 2 min 后在离心柱中心加入 30 μ L Elution Buffer,室温静置 1 min;10000 $\times$ g 离心 1 min 洗脱 DNA。将回收到的 DNA 片段连接到 pMD19-T simple Vector,并转化到 *E coli* DH5 α 感受态细胞,加 LB 液体培养

基混匀后置于 37 $^{\circ}$ C,160 rpm 摇菌 50 min 使菌体复苏。取 200 μ L 已转化的感受态细胞均匀的涂到加氨苄抗生素的 LB 固体培养基上,倒置平板于 37 $^{\circ}$ C 培养 10-12 h,随机挑取菌落进行重组子鉴定。经鉴定呈阳性的克隆菌落送华大基因武汉分公司测序。

1.2.4 生物信息学分析 测序结果用 DNASTar 7.1 程序包进行序列分析;开放阅读框的预测用在线预测工具 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>);序列的检索在 GenBank 和 TAIR 中进行;相似性分析采用 Blast 程序。

1.2.5 AtVQ2 基因植物表达载体构建 采用裂解法提取 pSN1301 质粒与 pMD19-AtVQ29 重组质粒;利用限制性内切酶 *Xba*I 与 *Sac*I 对 pSN1301 质粒和重组质粒 pMD19-AtVQ29 进行双酶切,其反应体系:质粒 DNA 15 μ L,10 $\times$ M Buffer 5 μ L,*Xba*I 2 μ L,*Sac*I 2 μ L,ddH₂O 8 μ L,总体积为 30 μ L。反应条件为 37 $^{\circ}$ C 下 2 h;pSN1301 质粒双酶切后回收大片段,重组质粒 pMD19-AtVQ29 酶切后回收 400 bp 的小片段,将回收的大小片段进行连接,其反应体系为大片段 DNA 2 μ L,小片段 DNA 5.5 μ L,2 μ L 5 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer,0.5 μ L T4 DNA Ligase,总体积为 10 μ L,20 $^{\circ}$ C 条件下反应 2 h;将连接产物转化 *E coli* DH5 α 感受态细胞,加 LB 液体培养基置于 37 $^{\circ}$ C,160 rpm 恢复培养 50 min。取 200 μ L 已转化的感受态细胞均匀的涂至含卡那霉素的 LB 固体培养基上,倒置平板于 37 $^{\circ}$ C 培养 10-12 h,随机挑取菌落进行酶切鉴定和测序确证。

2 结果

2.1 基因的鉴定与 TA 克隆

将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,得到长约 400 bp 的目的片段,与预期结果相符(图 1)。回收 PCR 扩增产物,与 pMD19-T 载体连接后转化到 *E coli* DH5 α 感受态细胞,挑取经 PCR 鉴定为阳性的单菌摇菌后提取质粒,用 *Xba*I / *Sac*I 双酶切后得到约 400 bp 的目的片段(图 4 的泳道 1),说明该目的片段已成功地插入载体中,即得到重组质粒 pMD19-AtVQ29。

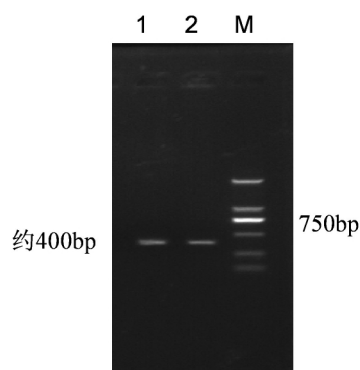


图 1 AtVQ29 的 PCR 克隆鉴定图

1,2: PCR 扩增产物; M: DL2000 Marker

Fig. 1 PCR Cloning of AtVQ29

1,2: PCR products; M: DL2000 Marker

2.2 序列测定及分析

将经鉴定的阳性菌送至华大基因武汉分公司测序,对测序

结果进行 Blast 分析,表明得到的目的区域序列与数据库中的序列一致,酶切位点正确,可以用于后续的植物表达载体构建。利用 ORF Finder 进行分析表明该序列的开放阅读框长度为 372 bp,无内含子,共编码 123 个氨基酸残基。其氨基酸分子式为 C₆₀₉H₉₄₆N₁₇₄O₁₈₈S₃,等电点 pI 为 9.75,脂脂族指数为 53.98,稳定系数计算结果为 64.22,为不稳定的蛋白质。对其蛋白质序列结构进行分析,结果表明 AtVQ29 中含有植物特有的 VQ 模序,与预期相符。

```

1  CAGTCTAGACTCAAGTCTCAATGGAAGCAACATCACACAATTTATGTCT
      M E A T S Q Q F M S
51  CAGAGTTACCTTAACGCTCAAGAAACCAACCAAGGCAACGAAAAATTAC
      Q S Y L N A Q E T T T R A T K N Y
101 CTAAGTTCGCTCCATTCGACACGTAACCAACCTTCAAAGCCCTTGAAGAGG
      L T S L H S T R K Q P S K P L K R
151 CCTGCAATATCATCACCTTTGAATGCAATGCATCCTCATGTCTACCGAGTC
      P A I S S P L N P M H P H V Y R V
201 GAGCCAGTAAATCTCAAAGTGTTGGTTCAGAGGCTAACCGGTGCACCTGAG
      E P V N [ F K V L V Q R L T G ] A P E
251 CACGAGACTGTGCAGGCTAAACCGCTCAAGACTTCGGATGATGCAGCAAAG
      H E T V Q A K P L K T S D D A A K
301 CAGAGTTCTTCGTCATTGCGTTTGATCCATCATCTTGGGGAGATTTC
      Q S S S S F A F D P S S S W G D F
351 TCATTCCAAAATCTGCAAAATATTTCCAGATGGTAGAGCTCTTG
      S F Q N P P A N I S R *

```

图 2 AtVQ29 基因序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 The gene sequence and amino acid sequences of AtVQ29

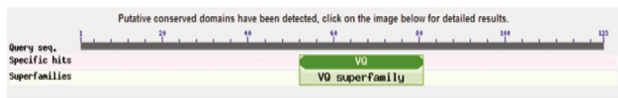


图 3 AtVQ29 蛋白质保守结构域

Fig. 3 The conserved domain of AtVQ29 protein

2.3 AtVQ29 植物表达载体的构建及鉴定

将 pSN1301 与重组质粒 pMD19-AtVQ2 用 *Xba*I / *Sac*I 酶切,均得到了符合预期大小的片段(图 4),对其进行回收后连接并转化感受态细胞,随机挑选单菌落进行重组子鉴定。酶切鉴定结果如图 5 所示,经 *Xba*I / *Sac*I 酶切后得到约为 400 bp 的目的片段,与预期结果一致,并进一步进行了测序验证,表明成功构建了植物表达载体 pSN1301-AtVQ29。

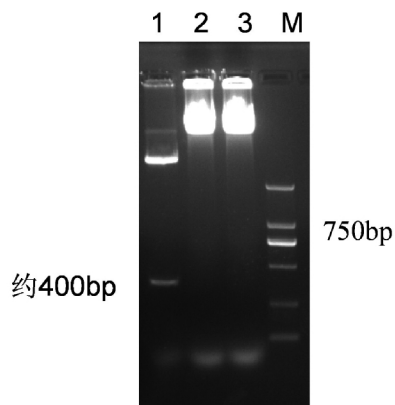


图 4 pMD19-AtVQ2 和 pSN1301 的 *Xba*I / *Sac*I 双酶切分析

1: pMD19-AtVQ2; 2,3: pSN1301; M: DL2000 Marker

Fig. 4 *Xba*I / *Sac*I digestion of pMD19-AtVQ2 and pSN1301

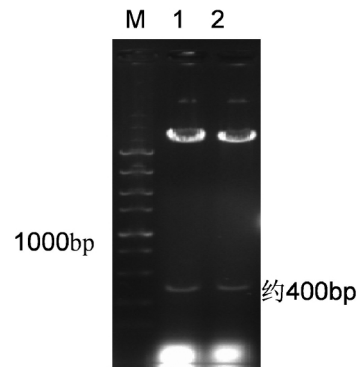


图 5 pSN1301-AtVQ29 的 *Xba*I / *Sac*I 双酶切鉴定

1,2: pSN1301-AtVQ29 M: DL5000 Marker

Fig. 5 *Xba*I / *Sac*I digestion of pSN1301-AtVQ29

3 讨论

模式植物拟南芥中已鉴定出 34 个 VQ 模序蛋白^[9],其中多达 29 个 VQ 模序蛋白的氨基酸残基数目少于 300 个,28 个 VQ 模序蛋白的编码基因没有内含子。AtVQ1、AtVQ10、AtVQ12、AtVQ16、AtVQ29 等 5 个 VQ 模序蛋白氨基酸残基数目更是少于 150 个,编码基因也没有内含子,可能在进化和功能的相关性上具有一定的特殊性,值得深入研究。Cheng 等^[9]对拟南芥 VQ 模序蛋白进行全基因组分析发现 AtVQ29 含有 117 个氨基酸残基。但本研究通过检索 TAIR 数据库发现 AtVQ29 的开放阅读框长度为 372bp,应编码长度为 123 的蛋白质序列。我们通过设计引物对 AtVQ29 进行克隆后测序的结果表明 AtVQ29 确实应该含有 123 个氨基酸残基,这与数据库中登记的相符。

尽管拟南芥中 VQ 模序蛋白功能的研究陆续有报道,但大多集中在氨基酸残基数目超过 150 个的成员中,如 AtVQ21 (AT3G18690)^[9]、AtVQ14(AT2G35230)^[14]、AtVQ15(AT2G41010)^[15]、AtVQ23 (AT3G56710)和 AtVQ16(AT2G41180)^[6,7]等。拟南芥 AtVQ29 与 AtVQ12 进化距离最近,而后者已被发现参与硝酸盐的抗性过程^[11],我们的初步研究发现 AtVQ12 还可能参与耐旱和耐盐过程,这表明 AtVQ29 可能在逆境防御反应中也具有重要功能。AtVQ29 也参与调控植株的开花时间^[9]。最近的研究还发现 AtVQ29 的表达受光调节,能与 P1F1 相互作用,参与幼苗的去黄化过程,证实了 AtVQ29 为光形态建成的一个新调节因子^[12]。尽管如此,AtVQ29 可能存在的多种功能以及其是否与 WRKY 转录因子相互作用等作用机制还有待揭示。本研究克隆得到 AtVQ29 基因并进而基于基因重组技术成功构建了植物表达载体 pSN1301-AtVQ29,为深入开展基因功能研究与基因改良应用研究奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, et al. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses[J]. EMBO J, 2005,24(14):2579-2589
- [2] Morikawa K, Shiina T, Murakami S, et al. Novel nuclear-encoded proteins interacting with a plastid sigma factor, Sig1, in Arabidopsis

- thaliana[J]. FEBS Letters,2002,514 (2- 3):300-304
- [3] Cheng Yuan, Zhou Yuan, Yang Yan, et al. Structural and Functional Analysis of VQ Motif-Containing Proteins in Arabidopsis as Interacting Proteins of WRKY Transcription Factors [J]. Plant Physiology,2012,159(2):810-825
- [4] Kim DY, Kwon SI, Choi C, et al. Expression analysis of rice VQ genes in response to biotic and abiotic stresses [J]. Gene,2013,529 (2): 208-214
- [5] Wang X, Zhang H, Sun G, et al. Identification of active VQ motif-containing genes and the expression patterns under low nitrogen treatment in soybean[J]. Gene, 2014,543(2):237-243
- [6] Xie YD, Li W, Guo D, et al. The Arabidopsis gene SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 plays a role in the salicylate- and jasmonate-mediated defence responses [J]. Plant Cell Environ,2010, 33(5):828-839
- [7] Lai Z, Li Y, Wang F, et al. Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense[J]. Plant Cell, 2011,23(10):3824-3841
- [8] 苏琦, 尚宇航, 杜密英, 等. 植物 WRKY 转录因子研究进展[J]. 中国农学通报,2007,23(5):94-98
Su Qi, Shang Yu-hang, Du Mi-ying, et al. Process on plant WRKY transcription factor [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(5): 94-98
- [9] 高银. 植物抗逆机制与基因工程研究进展 [J]. 内蒙古农业科技, 2007(5):75-78
Gao Yin. Research progress of gene engineering in plant stress tolerance mechanism [J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2007(5):75-78
- [10] 林渊源, 余迪求. 拟南芥 VQ 基因家族响应抗性相关激素表达谱分析[J]. 植物分类与资源学报, 2012,34(5):509-518
Lin Yuan-yuan, Yu Di-qiu. Expression profiles of Arabidopsis thaliana VQ gene family in defense-related hormones treatments[J]. Plant Diversity and Resources,2012,34(5):509-518
- [11] 刘安娜, 腾瑶, 徐文忠, 等. 一个编码含 VQ 模序蛋白的基因 AtARVQ1 参与拟南芥对砷酸盐的响应调控 [J]. 科学通报, 2011, 56(21):1891-1898
Liu An-na, Teng Yao, Xu Wen-zhong, et al. AtARVQ1 encodes a novel VQ motif-containing protein involved in arsenate stress response regulation in Arabidopsis [J]. Chinese Sci Bull,2011,56(21): 1891-1898
- [12] Li YL, Jing YJ, Li JJ, et al. Arabidopsis VQ MOTIF-CONTAINING PROTEIN29 represses seedling deetiolation by interacting with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 [J]. Plant Physiology, 2014,164(4):2068-2080
- [13] Yan ZH, Wan YF, Liu KF, et al. Identification of a novel HMW glutenin subunit and comparison of its amino acid sequence with those of homologous subunits [J]. Chinese Science Bulletin, 2002,47 (3):220-225
- [14] Wang A, Garcia D, Zhang H, et al. The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in Arabidopsis [J]. Plant J, 2010,63(4):670-679
- [15] Perruc E, Charpentreau M, Ramirez B C, et al. A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in Arabidopsis thaliana seedlings [J]. The Plant Journal,2004,38(3):410-420
-
- (上接第 6809 页)
- [13] Krause KH, Lambeth D, Krönke M. NOX enzymes as drug targets[J]. Cell Mol Life Sci, 2012,69(14):2279-2282
- [14] Liu W, Chen Q, Liu J, et al. Normobaric hyperoxia protects the blood brain barrier through inhibiting Nox2 containing NADPH oxidase in ischemic stroke[J]. Med Gas Res, 2011,1(1):22
- [15] Hur J, Lee P, Kim MJ, et al. Ischemia-activated microglia induces neuronal injury via activation of gp^{91phox} NADPH oxidase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,391(3):1526-1530
- [16] Shen J, Bai XY, Qin Y, et al. Interrupted reperfusion reduces the activation of NADPH oxidase after cerebral I/R injury [J]. Free Radical Bio Med, 2011,50(12):1780-1786
- [17] 王珊, 玛娜璐璐, 高永红, 等. 小胶质细胞缺氧再复氧模型的建立方法[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014,12(1):74-75
Wang Shan, Mana Lu-lu, Gao Yong-hong, et al. Method to establish an Ischemic/Reperfusion Model of microglia BV2 model in vitro[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine of Cardio/cerebrovascular Disease,2014,12(1):74-75
- [18] Mana L, Wang S, Zhu H, et al. Qingkailing Suppresses the Activation of BV2 Microglial Cells by Inhibiting Hypoxia/Reoxygenation-Induced Inflammatory Responses [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, [Epub ahead of print].
- [19] 李澎涛, 王永炎, 黄启福. “毒损脑络”病机假说的形成及其理论与实践意义[J]. 北京中医药大学学报,2001,24(1):1-6
Li Peng-tao, Wang Yong-yan, Huang Qi-fu. The Hypothesis of the Injury of Brain Collaterals by Toxins and Its Theoretical and Practical Significance [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2001, 24(1):1-6
- [20] 王永炎. 关于提高脑血管疾病疗效难点的思考[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(2):195-196
Wang Yong-yan. Ideas of improving therapeutic effects on cerebrovascular diseases difficulties[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 1997,17(2):195-196
- [21] 张允岭, 白文, 韩振蕴, 等. 9601 颗粒对急性多发性脑梗塞大鼠海马层 MARCKS 磷酸化调节作用的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2005,28(1):45-48
Zhang Yun-ling, Bai Wen, Han Zhen-yun. Study on regulating effects of 9601-Granules on phosphorylation of MARCKS in hippocampal cortex in the rats with multiple acute cerebral infarct [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine,2005,28(1):45-48
- [22] 雷燕, 黄启福, 王永炎. 论瘀毒阻络是络病形成的病理基础 [J]. 北京中医药大学学报,1999,22(2):8-10
Lei Yan, Huang Qi-fu, Wang Yong-yan. Pathologic Basis of Collateral Disease Formation [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine,1999, 22(2):8-10