

蒙古沙冬青冷冻胁迫 SMART cDNA 文库的构建及序列分析

刘佳杰,林清芳,李连国,白 薇,王茅雁

(内蒙古农业大学生命科学学院,呼和浩特 010018)

摘要:以强抗逆植物蒙古沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus*) 为材料,用 SMART 技术构建了其在冷冻胁迫下的全长 cDNA 文库。原始文库滴度为 9.44×10^6 pfu/ml,重组率为 98.3%,插入片段长度在 0.5~2.5kb,平均达到 1kb。扩增文库滴度为 1.98×10^{10} pfu/ml。从原始文库中随机挑取 480 个阳性克隆进行序列分析,获得 348 个 Unigene,其中有些是逆境应答相关基因和新基因。此外,以扩增文库为模板,经 PCR 方法克隆到读码框为 1083bp 的沙冬青类 RD22 基因。结果表明所建文库质量较高,可以满足后续研究的要求。

关键词:沙冬青;冷冻胁迫;cDNA 文库

Construction of SMART cDNA Library of *Ammopiptanthus mongolicus* under Cold and Freezing Stresses and Its Sequence Analysis

LIU Jia-Jie, LIN Qing-Fang, LI Lian-Guo, BAI-Wei, WANG Mao-Yan

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018)

Abstract: A cold and freezing-induced full-length cDNA library of *Ammopiptanthus mongolicus*, a plant with remarkable resistance to severe environments, was constructed by using SMART (Switching mechanism at 5'-end of RNA transcript) cDNA library construction method. The titer of the unamplified library is 9.44×10^6 pfu/ml; the recombination percentage of the library is 98.3%; the sizes of the insert cDNA fragments ligated to λ TriplEx2 vector ranges from 0.5kb to 2.5kb and averagely reaches up to 1.0kb. The titer of the amplified library is 1.98×10^{10} pfu/ml. 480 positive clones selected from the unamplified library were sequenced and some stress responsive related genes and novel genes were found. Moreover, using the amplified library as template, a RD22-like gene with the complete coding region of 1083 base-pair was obtained by PCR method. All of the results indicated that the library quality is high and it can satisfy the demands of follow-up researches.

Key words: *Ammopiptanthus mongolicus*; Cold and freezing stresses; cDNA library

植物对低温冷冻的适应能力称为抗寒性。从分子水平阐明植物的抗寒机理,发掘其重要抗寒基因是进一步通过基因工程提高植物抗寒性的重要前提。在过去 20 多年中,国内外研究者从生物膜系统的稳定性、调渗物质和抗冷冻蛋白的积累、基因表达

模式和信号转导途径的变化等方面对植物的抗寒机理进行了广泛研究,在抗寒基因的分离与鉴定方面也取得了重要进展^[1-7]。但至今为止,从基因组水平探讨植物抗寒性的分子机理,高通量分离并发掘其重要抗寒基因的报导很少,而且多数研究是以拟

收稿日期:2010-12-10 修回日期:2011-05-21

基金项目:内蒙古科技计划项目(32227);国家自然科学基金(30960158)

作者简介:刘佳杰,在读硕士。研究方向:植物抗逆分子生物学。E-mail: jiajie19840919@126.com

通讯作者:王茅雁,博士,教授。研究方向:植物抗逆分子生物学。E-mail: wangmaoyan@163.com

南芥等非典型抗寒植物为材料,其研究结果缺乏足够的典型性和代表性。

沙冬青属 [*Ammopiptanthus* (Maxim.) Chengf.] 植物是豆科珍稀、濒危植物,有蒙古沙冬青 (*A. mongolicus*) 和新疆沙冬青 (*A. nanus*) 2 个物种,主要分布在内蒙古西部和宁夏、甘肃、新疆的部分沙漠、荒漠地带,是该区唯一的常绿阔叶灌木,有很强的抗寒、抗旱和耐盐碱等抗逆特性,特别是其抗寒性非常突出,可在 -30°C 的严冬季节保持绿色而不死,成为研究植物抗寒机理和发掘抗寒基因的好材料^[8-11]。近年来,人们利用 EST (expression sequence tags, 表达序列标签) 文库和 cDNA-AFLP 等技术从沙冬青中分离出一些逆境应答相关基因^[12-15],其中有些如 AmLEA (late embryogenesis abundant protein)、AmEBP1 (ErbB3 binding protein) 和 AmGolS (galactinol synthase) 的编码基因可以提高转基因植物的抗低温能力^[14-16]。然而,至今鲜见通过全长 cDNA 文库技术从沙冬青中高通量筛选抗寒相关基因的报道。本研究以来自不同冷冻胁迫处理的蒙古沙冬青 mRNA 为材料,构建了较高质量的 SMART (switching mechanism at 5'-end of RNA transcript) 全长 cDNA 文库,并从中随机挑取部分阳性克隆进行了序列测定,为进一步开展表达谱分析等后续工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

用沙培法将蒙古沙冬青培养至 4 个月,从起始温度 4°C 到结束温度 -8°C 之间进行梯度降温处理,分别取处理 0 (CK)、1、3、6、12、24、36 和 48h 的叶片和根系(用 4°C 预冷的自来水迅速洗净沙子),在液氮中速冻后保存于 -76°C 。另外取 12 月中旬(昼夜气温 $-14^{\circ}\text{C}/-3^{\circ}\text{C}$) 野外生长的蒙古沙冬青幼叶作为自然冷冻胁迫处理的样品,液氮中速冻后保存于 -76°C ,用于提取 RNA。

1.2 试剂

mRNA 分离试剂盒和 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 均购自 Clontech 公司; Packagene lambda DNA packaging system 购自 Promega 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 总 RNA 提取

用改进的热酚法,即在提取 buffer 中加入 2% 体积的 β -巯基乙醇和 pH6.5 的 5mol/LKAc,并将 RNA 提取液用氯仿抽提两次,其他参照文献[17]。取

万方数据

RNA 样品进行电泳并测定其在 230、260 和 280 nm 处的光密度值 (OD 值),以检测其完整性、浓度和纯度。

1.4 mRNA 分离

取不同样品总 RNA 各 200 μg 等量混合,按照试剂盒说明分离纯化 mRNA,用无水乙醇和 NaAc 浓缩后加适量 DEPC H_2O 溶解,然后进行电泳并测定 OD 值,以估测其分子量和浓度。

1.5 cDNA 文库构建

1.5.1 cDNA 合成 取 mRNA 模板 1.0 μg 合成 cDNA 第一链;用 LD-PCR (Long Distance-PCR) 方法合成 ds cDNA: 100 μl 反应体系中含 dd H_2O 80 μl , 10 \times Advantage 2 PCR Buffer 10 μl , 第一链 cDNA、50 \times dNTP 混合物、5'PCR 引物、CDS III / 3'PCR 引物和 50 \times Advantage 2 Polymerase mix 各 2 μl 。PCR 反应程序为: 95°C 1min; 95°C 15s, 68°C 6min, 19 个循环。反应结束后取 5 μl 产物电泳检测。

1.5.2 cDNA 纯化与分级回收 用蛋白酶 K 消化 LD-PCR 产物中残存的 Taq 酶;用 *Sfi*I 酶切,再用 Chroma Spin-400 层析柱分级分离,收集大于 0.5kb 的片断合并为一管,用 95% 乙醇和 NaAc 沉淀后加 7 μl 去离子水溶解。

1.5.3 cDNA 与载体连接和包装 取 1.0 μl ds cDNA 与 1 μl λ Triplex2 载体混合,用 T_4 DNA Ligase 于 16°C 连接过夜。取 50 μl 包装蛋白于冰上化冻,立即加入 5 μl 连接产物,于 22°C 包装 3h,然后加入 445 μl 噬菌体 buffer 和 25 μl 氯仿,混匀,离心,取上清即为原始文库。将少部分原始文库保存于 4°C 备用,其余加明胶和 DMSO 至终浓度分别为 0.01% 和 7%,长期保存于 -76°C 。

1.6 原始文库滴度和重组率测定

用稀释缓冲液以 1:5 和 1:15 的体积比稀释文库,各取 1 μl 转染宿主菌 XL1-Blue,与顶层琼脂 (加 IPTG 和 X-gal) 混匀后铺平板,于 37°C 倒置培养,记数噬菌斑,计算滴度 (pfu/ml) = 噬菌斑数 \times 稀释倍数 $\times 10^3$ $\mu\text{l}/\text{ml}$ 噬菌体铺板体积 (μl)。重组率 (%) = 白斑数 / (白斑数 + 蓝斑数) $\times 100$,库容量 = 文库滴度 \times 文库体积。

1.7 文库插入片断的检测

根据载体多克隆位点两侧序列设计引物:5'端引物为 5'-CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGCT-3';3'端引物为 5'-ATACGACTCACTATAGGCCGAATTGCC-3'。

随机挑取 22 个噬菌斑进行 PCR,产物用 1.4%

琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.8 文库的环化和序列分析

取 20 μ l 原始文库转染大肠杆菌环化菌株 BM25.8, 使 λ TriplEx2 重组噬菌体环化为质粒形式。将部分环化菌液铺平板, 经菌液 PCR 鉴定(引物及反应程序等同 1.8)获得阳性克隆, 送北京华大基因研究中心用 megabace 1000 测序仪进行 5'端序列测定。

序列分析由北京华大基因研究中心代理: 用 cross-match 等程序去除载体、短序列和 rRNA 等污染, 获得 CleanEST 序列; 用 phrap 软件对 Clean EST 序列进行组装, 获取 Unigene 数据; 将 Unigene 与 NT、NR、swissport 等数据库进行 blast 比对, 对其进行功能注释。

1.9 文库的扩增及基因克隆

取 25 μ l 原始文库按照试剂盒说明扩增文库并计算滴度, 加 DMSO 至终浓度为 7%, 等量分装, 保存于 -76 $^{\circ}$ C。同时以扩增文库为模板, 用蒙古沙冬青类 RD22 (Dehydration-responsive protein-like) 基因全长 cDNA 序列设计引物进行 PCR 扩增。引物序列为: 正向: 5'-AAAGATCTACCTCTACCACCAC-CAAG-3'; 反向: 5'-GTGGTCACCTAAATCTACTTGG-GAAC-3'。

50 μ l 反应体系中含 ddH₂O 20.5 μ l、2 \times GC buffer 25 μ l、dNTP mix (10mmol/L) 和正反向引物及模板各 1 μ l、LA Tag (5U/ μ l) 0.5 μ l。PCR 反应程序是 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 30s、65 $^{\circ}$ C 45s、72 $^{\circ}$ C 2min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物经电泳检测回收后与 pMD19-T 载体连接, 再转化大肠杆菌, 挑阳性克隆送北京华大基因研究中心测序。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及 mRNA 分离

将冷冻胁迫处理的 9 个样品用改进的热酚法分别提取总 RNA。经电泳检测其 28S 和 18S rRNA 条带清晰, 完整性好, 图 1 为其中 5 个样品的电泳图谱。不同样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.81 ~ 2.06、OD₂₆₀/OD₂₃₀ 在 2.01 ~ 2.16, 表明蛋白质、酚类、盐分和糖类等杂质基本去除干净, 所提总 RNA 纯度较高。从每个样品中各取 200 μ g 等量混合分离 mRNA。将 0.5 μ l 分离产物进行电泳检测, 在 0.5 ~ 2.5kb 可见明显的弥散状谱带(图 2), 表明 mRNA 质量较高, 符合建库要求。

万方数据

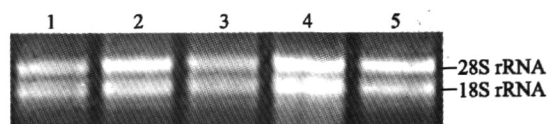


图 1 总 RNA 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of total RNA

1 ~ 5: 处理 1、3、6、12、24h 的样品

1 ~ 5: samples

which are treated by 1、3、6、12、24h

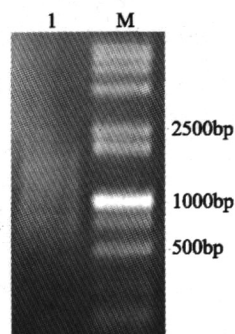


图 2 mRNA 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis pattern of mRNA

1: mRNA, M: D15000 + 2000 DNA Marker

2.2 文库的构建及其质量检测

取 1 μ g mRNA 作模板合成 cDNA 第一链, 再经 LD-PCR 扩增合成 ds cDNA。其分子量大小主要在 0.5 ~ 5kb (图 3), 比 mRNA 分子量有所增加, 表明 cDNA 合成和 PCR 扩增反应正常。

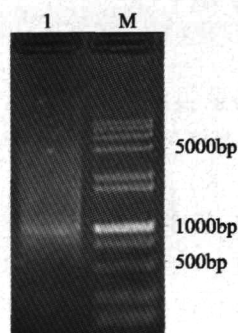


图 3 LD-PCR 产物电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis pattern of LD-PCR products

1: ds cDNA, M: D15000 + 2000 DNA Mark

将 ds cDNA 经蛋白酶 K 消化、Sfi I 酶切后经 Chroma Spin-400 柱分级分离。合并大于 500bp 的产物, 与载体以 1:1 比例连接并进行体外包装, 共得到 500 μ l 原始文库。其滴度为 9.44×10^6 pfu/ml, 重组率为 98.3%, 库容量为 4.72×10^6 , 插入片段在 0.7 ~ 2.0kb 之间, 其中约半数 ≥ 1 kb (图 4)。检测结果表明, 所构建的文库质量较高。

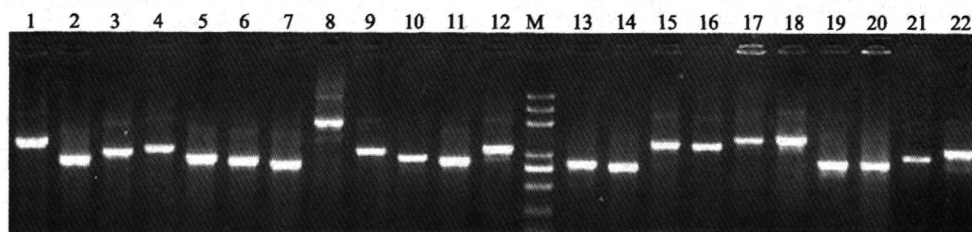


图 4 22 个随机克隆 PCR 产物电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis pattern of PCR products

1~22: 22 个单克隆; M: Trans 2k plas DNA Marker, 从上到下依次是 5000、3000、2000、1000、750、500 和 250bp

1~22: 22 random clones; M: Trans 2k plas DNA Marker, from up to down, are 5000、3000、2000、1000、750、500 and 250bp

2.3 文库测序及序列分析

为进行规模化测序,将 20 μ l 原始文库转染大肠杆菌 BM25.8,使 λ TriplEx2 重组噬菌体环化为质粒形式。随机挑取近 3200 个单克隆进行菌液 PCR 检测,共得到 3000 个阳性克隆,阳性率为 93.8%,插入片段大小在 0.5~2.5kb,与环化前相近,表明文库环化成功。将其中 480 个阳性克隆进行 5'端序列测定,得到 438 条 EST 序列,经组装获得 46 个 Contig 和 302 个 Singlet,合计 348 个 Unigene。将它们进行功能注释,发现其中有些与逆境应答相关,其推测的编码产物包括 PsAD2 等冷诱导蛋白、类甜蛋白、金属硫蛋白、脱水素、查尔酮合成酶、蛋白酶抑制剂、干旱诱导蛋白、肌醇-3-磷酸合成酶、转录因子和 ABA 诱导蛋白等。一些基因如 PsAD2、脱水素和蛋白酶抑制剂等基因有完整的 5'端。有大约 40% 的 Unigene 尚未得到具体的功能注释。这些初步的序列信息进一步显示所建文库质量较高。

2.4 文库的扩增及 *AmRD22* 基因的克隆

为了长期保存文库,将部分原始文库进行了扩增,得到滴度为 1.98×10^{10} pfu/ml 的扩增文库。同时以蒙古沙冬青类 RD22 基因 (*AmRD22*) 为例,对文库的质量进行了进一步验证。该基因的全长序列是在以往通过 RACE 方法获得,其完整编码框为 1.083kb。以扩增文库为模板对其进行了 PCR 扩增,获得预期 1.152kb 的片段(图 5)并经测序验证其序列正确,再次表明所构建的文库符合后续研究的要求。

3 讨论

构建全长 cDNA 文库是高通量获得基因的全长 cDNA、开展基因功能研究和正确进行基因功能注释及发现新基因的重要前提。在建库时首先需要考虑的是如何取材才能最大限度地获取有用的基因信息,

图 5 *AmRD22* 基因的 PCR 扩增图谱Fig. 5 PCR Amplification pattern of *AmRD22* gene

1: 扩增产物; M: Trans 2k plas DNA Marker

1: amplification product; M: Trans 2k plas DNA Marker

即文库包含所需表达基因的全面性和代表性,然后才是建库的具体技术问题。已有研究表明,参与植物对低温等逆境胁迫应答的基因大致可分为调节基因和功能基因两类,前者主要包括与第二信使生成有关的酶、胁迫信号传感蛋白和转录因子等,它们在胁迫信号转导和功能基因的表达中起调节作用;后者主要包括渗透调节物质合成酶、脱水保护蛋白、抗氧化酶类和抗冻蛋白等,可在植物的各种抗逆机制中直接发挥作用。当植物感受到低温胁迫信号时,通常先是抗性调节基因被迅速诱导表达,然后通过一系列复杂的信号转导机制将胁迫信号向下游传递,最终激活抗性功能基因表达,使植物对逆境胁迫产生适应或抗性^[4,18]。

本研究参照前人对拟南芥等植物的低温处理方法,将蒙古沙冬青幼苗从 4 $^{\circ}$ C 到 -8 $^{\circ}$ C 之间进行梯度降温胁迫处理(每隔 6~8h 降温 2 $^{\circ}$ C),分别用处理不同时间和冬季野外自然冷冻条件下存活的蒙古沙冬青幼叶分离 mRNA 作为建库的起始材料,从而保证了文库包含各类低温胁迫应答基因的可能性。事实上,通过对文库部分克隆进行测序和序列分析,证

明其中的确含有调节基因(如肌醇-3-磷酸合成酶和转录因子基因)和功能基因(如脱水素和类甜蛋白基因),文库的代表性较好。

文库质量的好坏主要通过滴度、插入片段长度或全长率和重组率等指标来衡量。在建库过程中的一些关键技术包括 RNA 的提取、cDNA 的合成和分级回收及其与载体的连接等都会对文库质量产生重大影响。本研究首先遇到多糖和酚类等内含物对总 RNA 提取的干扰问题,经过对提取方法的改进得以解决。对于其他关键步骤本研究均按照试剂盒说明严格操作,以尽量避免大片段 cDNA 在合成、分级回收及其与载体的连接中丢失。通常一个理想的 cDNA 文库滴度应大于 1×10^6 pfu/ml,重组率应不低于 80%,插入片段大小平均应在 1kb 以上^[19-20]。本研究所构建的文库滴度和重组率分别高达 9.44×10^6 pfu/ml 和 98.3%,插入片段大小平均达到 1kb,符合高质量 cDNA 文库的标准。

对于文库的全长率,除可以用插入片段大小衡量外,最直接的指标就是通过测序来分析全长基因的比例。本研究只对文库中的 480 个随机克隆进行了 5'端测序,得到 348 个 Unigene,虽然可以统计其中 5'端完整者的大致比例,但尚不足以说明文库的全貌。作为佐证,本研究选择编码区长度为 1.083kb 的 *AmRD22* 基因作为目标基因,用 PCR 方法从文库中成功对其进行了克隆,说明文库的全长率基本可以满足克隆基因全长等要求。

参考文献

- [1] Lee D H, Lee C B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays [J]. Plant Sci, 2000, 159(1): 75-85
- [2] Lin S Z, Zhang Z Y, Lin Y Z. Antifreeze proteins and molecular genetic improvement in freezing resistance of plants [J]. Plant Physiol Molec Biol, 2004, 30(3): 251-260
- [3] Seki M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray [J]. Plant Cell, 2001, 13: 61-72
- [4] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses [J]. Curr Opin Plant Biol, 2003, 6: 410-417
- [5] Winfield M O, Lu C, Wilson I D, et al. Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat [J]. Plant Biotechnol, 2010, 8(7): 749-771
- [6] Xiong L, Schumaker K S, Zhu J K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress [J]. Plant Cell, 2002(5): 165-183
- [7] Zhou M Q, Shen C, Wu L H, et al. CBF-dependent signaling pathway: A key responder to low temperature stress in plants [J]. Crit Rev Biotechnol, 2011, 31(2): 186-192
- [8] 林清芳, 王茅雁, 刘佳杰, 等. 沙冬青细胞与分子生物学研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 793-797
- [9] 刘美芹, 卢存福, 尹伟伦. 珍稀濒危植物沙冬青生物学特性及抗逆性研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(3): 384-388
- [10] 林清芳, 王存芳, 赵欢欢, 等. 蒙古沙冬青总 RNA 提取与 mRNA 分离方法的研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 460-463
- [11] 陶玲, 李新荣, 刘新民, 等. 中国珍稀濒危荒漠植物保护等级的定量研究 [J]. 林业科学, 2001, 37(1): 52-57
- [12] 郭九峰, 孙国琴, 沈传进, 等. 沙冬青 cDNA 文库的构建和 EST 分析 [J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 37-41
- [13] 刘美芹, 沈昕, 卢存福, 等. 一种改进的固相扣除杂交法直接克隆全长差异表达基因 [J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(5): 67-72
- [14] 宋健. 沙冬青耐寒基因 AmGolS 的克隆和遗传转化研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2007
- [15] Cao P, Song J, Zhou C, et al. Characterization of multiple cold induced genes from *Ammopiptanthus mongolicus* and functional analyses of gene AmEBP1 [J]. Plant Mol Biol, 2009, 69(5): 529-539
- [16] 陈奕吟. 沙冬青低温诱导基因转化烟草及转基因植物的抗寒性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2007
- [17] 王茅雁. 玉米钙调磷酸酶 B 类蛋白 ZmCBL1 与 ZmCBL4 基因的克隆与功能分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [18] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low Temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways [J]. Curr Opin plant Biol, 2007, 3: 217-223
- [19] 贾晋平. 玉米全长 cDNA 文库的构建及生物信息学分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005
- [20] Clontech Company. SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual (Version No. PR7Y2399). Clontech Laboratories, Inc, 2007

欢迎订阅 2012 年《北方园艺》

《北方园艺》是全国自然科学(中文)核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊、中国北方优秀期刊、黑龙江省优秀科技期刊。设有试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、贮藏保鲜加工、食用菌、中草药、新品种选育、产业论坛、专题综述、经验交流、农业经纬等栏目。内容涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉、植保等研究的新成果、新技术、新品种、新经验。

半月刊, 每月 15、30 日出版, 邮发代号 14-150, 定价 7 元, 全年 168 元, 全国各地邮局均可订阅。

地址: (150086) 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号 《北方园艺》编辑部

电话: 0451-86674276 E-mail: bfybjb@163.com

作者: 刘佳杰, 林清芳, 李连国, 白薇, 王茅雁, LIU Jia-Jie, LIN Qing-Fang, LI Lian-Guo, BAI-Wei, WANG Mao-Yan
作者单位: 内蒙古农业大学生命科学院, 呼和浩特, 010018
刊名: 植物遗传资源学报 
英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources
年, 卷(期): 2011(5)

参考文献(20条)

1. Clontech Company SMARTTM cDNA Library Construction Kit User Manual (Version No. PR7Y2399) 2007
2. 贾晋平 玉米全长cDNA文库的构建及生物信息学分析 2005
3. Shinozaki K; Yamaguchi-Shinozaki K Molecular responses to dehydration and low Temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways 2007
4. 王茅雁 玉米钙调磷酸酶B类蛋白ZmCBL1与ZmCBL4基因的克隆与功能分析 2004
5. 陈奕吟 沙冬青低温诱导基因转化烟草及转基因植物的抗寒性研究 2007
6. 郭九峰; 孙国琴; 沈传进 沙冬青cDNA文库的构建和EST分析 2007(04)
7. 陶玲; 李新荣; 刘新民 中国珍稀濒危荒漠植物保护等级的定量研究 2001(01)
8. 刘美芹; 卢存福; 尹伟伦 珍稀濒危植物沙冬青生物学特性及抗逆性研究进展 2004(03)
9. 林清芳; 王茅雁; 刘佳杰 沙冬青细胞与分子生物学研究进展 2010(06)
10. Zhou M Q; Shen C; Wu L H CBF-dependent signaling pathway: A key responder to low temperature stress in plants [外文期刊] 2011(02)
11. Xiong L; Schumaker K S; Zhu J K Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress 2002(S)
12. Winfield M O; Lu C; Wilson I D Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat [外文期刊] 2010(07)
13. 林清芳; 王存芳; 赵欢欢 蒙古沙冬青总RNA提取与mRNA分离方法的研究 2011(03)
14. Cao P; Song J; Zhou C Characterization of multiple cold induced genes from Ammopiptanthus mongolicus and functional analyses of gene AmEBP1 2009(05)
15. 宋健 沙冬青耐寒基因AmGo1S的克隆和遗传转化研究 2007
16. 刘美芹; 沈昕; 卢存福 一种改进的固相扣除杂交法直接克隆全长差异表达基因 2007(05)
17. Shinozaki K; Yamaguchi-Shinozaki K; Seki M Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses 2003
18. Seki M; Narusaka M; Abe H Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray [外文期刊] 2001
19. Lin S Z; Zhang Z Y; Lin Y Z Antifreeze proteins and molecular genetic improvement in freezing resistance of plants 2004(03)
20. Lee D H; Lee C B Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays [外文期刊] 2000(01)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201105017.aspx