

东方山羊豆盐诱导抑制差减杂交文库构建 及其表达序列标签分析

宋清晓¹, 王学敏¹, 高洪文¹, Dzyubenko Nikolay², Chapurin Vladimir², 韩永增¹, 杨冬梅¹, 李玉坤¹

(¹ 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; ² 俄罗斯瓦维洛夫全俄植物栽培研究所, 圣彼得堡 190000)

摘要:为筛选东方山羊豆盐诱导差异性基因,以 250 mmol/L NaCl 处理的东方山羊豆 cDNA 为实验组,未经诱导刺激的为驱动组,利用抑制性消减杂交技术(SSH)构建消减文库并对其部分阳性克隆进行了 ESTs 序列分析。该消减文库克隆的重组率为 92%,插入片段大部分集中在 0.2~1kb 之间。随机挑取 500 个克隆进行测序及同源性分析,获得 258 个 cleanESTs,经聚类、拼接,去除冗余序列,共获得 132 个 Unigene,其中含有 32 个 contigs 和 100 个 singlets,该文库的冗余度为 24%。对其进行功能预测及分类,得到大量参与信号转导、转录调控、渗透和代谢调节、机体防御以及光合作用等过程的相关基因。随机选择非重复的 4 个差异表达的序列设计引物,以半定量 PCR 方法验证其消减效率,结果显示,诱导组的表达量显著高于非诱导组,表明该文库有较高质量,且所采用的技术手段有助于快速发现东方山羊豆新功能基因。

关键词:东方山羊豆;盐诱导;抑制消减杂交;ESTs;RT-PCR

Construction of cDNA SSH library Induced by Salt Treated and Analysis of Expressed Sequence Tags in *Galega orientalis*

SONG Qing-xiao¹, WANG Xue-min¹, GAO Hong-wen¹, Dzyubenko Nikolay², Chapurin Vladimir²,
HAN Yong-zeng¹, YANG Dong-mei¹, LI Yu-kun¹

(¹ Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100193;

² N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry, St. Petersburg 190000, Russia)

Abstract: Subtractive cDNA library was constructed by suppression subtractive hybridization (SSH) using cDNA from *Galega orientalis* treated with (tester) or without (driver) 250 mmol/L NaCl. The library contained 92% recombinants with insert sizes ranging from 0.2 to 1 kb. Five hundred positive clones were randomly sequenced and analyzed, and 258 cleanESTs were obtained. By the aid of cluster and phrap software, 132 Unigene were identified which consisted of 32 contigs and 100 singlets. The redundancy rate of the library was 24%. Function prediction analysis classified them into several sections, such as signal transduction, transcription regulation, osmotic and metabolic regulation, host defense, and the photosynthesis. The subtraction efficiency of the SSH cDNA library was confirmed by randomly testing 4 independent sequences using semi-quantitative RT-PCR, of which differential expression was detected. These results suggest that SSH is an effective technique to identify novel genes in *Galega orientalis*.

Key words: *Galega orientalis*; Salt treatment; Suppression subtractive hybridization (SSH); Expressed sequence tags (ESTs); RT-PCR

耐盐性是目前抗性研究中的一个重要方面,但多集中在耐盐植物和模式植物上^[1-2]。Takahashi 等^[3]从耐盐的芦苇中克隆了高亲和 K⁺ 转运子 (*PhaHKT1*),并将其转入参与 Na⁺ 外排的钾转运子

收稿日期:2010-01-27 修回日期:2010-07-12

基金项目:“十一五”科技支撑(2008BADB3B01);现代农业产业技术体系建设专项资金

作者简介:宋清晓,硕士,研究方向为牧草抗性资源发掘。E-mail:songqingxiao_3714@163.com

通讯作者:高洪文,研究员,主要从事牧草种质资源研究。E-mail:gaohongwen@263.net

缺失及 P 类 ATP 酶缺失的酵母中,其转化子可以在 100 mmol/L 的 NaCl 条件下生长。Xiang 等^[4]将水稻钙调 B 类蛋白互作激酶 OsCIPK15 转入水稻中过量表达,提高了水稻的耐盐性。

抑制性消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH) 是依据消减杂交和抑制 PCR 发展的一种分离差异基因的新方法,可有效地分离不同细胞系、不同组织间或同一细胞系、同一组织在不同条件下有差别表达的基因。应用 SSH 技术建立抑制性差减文库,已经获得了大量与非生物胁迫相关的差异表达基因,如与渗透胁迫^[5]、极端温度胁迫冷^[6]、热^[7]、水分胁迫^[8]、激素刺激^[9-10]等胁迫条件相关的基因,这些结果大大丰富了抗性基因资源^[11]。

东方山羊豆 (*Galega orientalis*) 作为一种多年生的豆科牧草,品质好、产量高、抗病抗逆性强、使用年限长,反刍家畜青饲食用不得臃胀病,并具有促进奶牛泌乳等功能,广泛种植于俄罗斯、白俄罗斯等国^[12]。近年来我国将其引进,并在天山草甸草原区、阿尔泰山山前地带以及平原井灌区种植,生长发育良好^[13]。东方山羊豆在我国主要种植在西北地区,而这一地区不少地方土壤盐碱化问题严重,使其推广应用受到了很大的限制。

本研究用抑制性差减杂交技术,构建了东方山羊豆盐胁迫 cDNA 文库,富集盐诱导差异表达基因,对揭示东方山羊豆耐盐分子机制,为牧草抗逆分子育种提供候选基因具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 材料

东方山羊豆为中国农业科学院北京畜牧兽医研究所牧草资源研究室收集保存。将东方山羊豆种子种皮磨破,氯气灭菌 24h。培养皿灭菌,将种子平铺在用无菌水浸湿的滤纸上,人工光照培养箱培养,温度 24℃,相对湿度 70%,光照强度 5000Lx,光照 12h/黑暗 12h,直至种子萌发。将萌发的种子转入装有蛭石和珍珠岩 (3:1) 的花盆中继续培养 30d。以浓度为 250mmol/L 的 NaCl 浸泡幼苗根部 2、6 和 10h,在各个时间点分别取等量的叶片混合作为处理,清水处理叶片为对照,置于 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.2 总 RNA 提取与 mRNA 的分离、纯化

采用 TRIzol Reagent 试剂盒 (Invitrogen) 提取东方山羊豆叶片总 RNA。琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性,紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度

及纯度。利用 Oligotex mRNA Spin-Column Kit (Qiagen) 从总 RNA 中分离 mRNA。纯化的 mRNA 分别用醋酸钠和异丙醇浓缩,作为构建 SSH 文库的起始材料。

1.3 文库构建与序列分析

利用 Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) 构建东方山羊豆盐胁迫与对照的 cDNA 抑制性差减文库,以盐处理为实验组 (tester),对照为驱动组 (driver)。具体操作方法见操作手册。

将获得的文库 PCR 产物利用 PCR 产物纯化试剂盒 (Promega) 进行纯化。得到的纯化产物连接 PMD-18T Vector 载体 (Takara),转化大肠杆菌 *E. coli* DH5α 感受态细胞 (天根公司),涂板,得到 SSH 文库。通过蓝白斑筛选,随机挑选阳性克隆,提取质粒。用套式 PCR 引物 1 和 2R 进行 PCR 扩增,鉴定文库插入片段,并进行测序。

人工校正不确定碱基并去除载体和引物序列后,用 cluster 和 phrap 软件进行聚类 and 拼接,得到非冗余序列。首先在 NCBI 的非冗余蛋白 (nr) 数据库进行 BLASTx 比对,然后对其进行 GO (Gene Ontology)、COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins) 等生物信息学分析。

1.4 文库质量分析

随机选择消减文库不重复的 4 个有效序列进行 RT-PCR 验证。PCR 引物序列见表 1,以 Actin 基因为对照。PCR 扩增程序如下:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,30 循环;最后 72℃ 延伸 10min。

表 1 半定量 PCR 扩增鉴定引物

Table 1 Primer used of RT-PCR

编号 No.	引物 Primer sequences
2	S,5'-CTAATGTTGTTGTGGGACTAAATG-3' AS,5'-TGTTACCAGGCTCATAGAGG-3'
Contig19	S,5'-TACAGTGTGCATCACCTGAATTAAC-3' AS,5'-ACCCATTATCCAAGAAACAACCAC-3'
S3-49	S,5'-GCTCCAAGGAGAAACCTCTACTCTAAG-3' AS,5'-CAACACCATAGATCAGATAGCCAC-3'
327	S,5'-GCCTCTGGGGAGCCTAAG-3' AS,5'-AGCTACCGTGCCTGGATTATG-3'
Actin	S,5'-CACATCTGTTGGAAGGCTGAGGG-3' AS,5'-TGACAGGATGAGCAAGGAGATTAC-3'

2 结果与分析

2.1 总 RNA 以及 mRNA 的质量

将提取的总 RNA 利用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳(图 1), 可看出 28 S 和 18 S 两条亮带, 亮度比约为 2: 1, 边缘清晰, 没有弥散现象, 表明提取的 RNA 未发生降解, 从而保证了 RNA 具有较好的完整性。纯化后 mRNA 用 ND-1000 紫外分光光度计 (Nanodrop) 检测其质量和浓度(图 2), tester 盐处理和 driver 对照 mRNA 浓度分别为 0.22 μg/μl 和 0.25 μg/μl, 两者浓度基本一致, 且都达到建库要求。

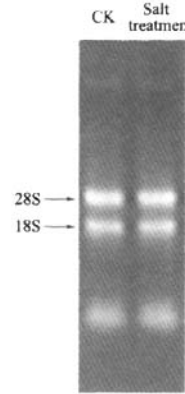


图 1 对照和盐处理总 RNA 电泳图
Fig.1 Electrophoresis of control and the treated total RNA

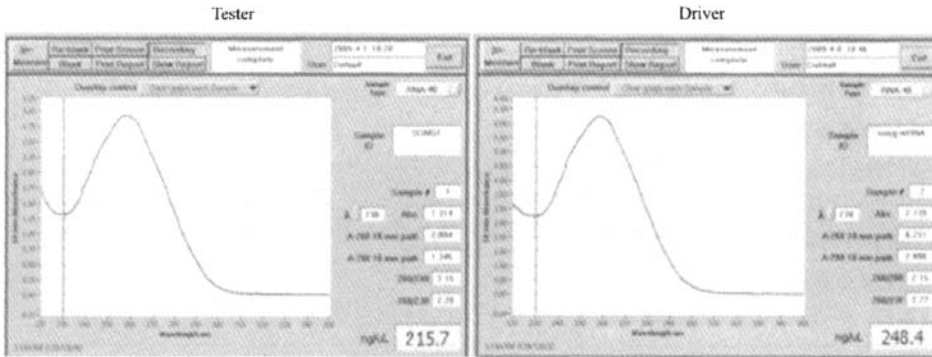


图 2 紫外分光光度计检测和纯化后的 mRNA
Fig.2 Tester and driver mRNA was investigated by UV

2.2 消减产物第二次 PCR 结果

消减产物两次选择性 PCR 扩增反应检测结果条带清晰, 扩增片段主要分布在 0.2 ~ 1.0 kb 之间, 呈比较均匀的弥散状, 与试剂盒所要求的预期大小符合, 表明接头连接效率较高(图 3)。

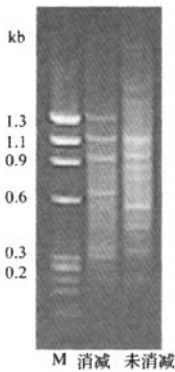


图 3 消减产物第二次 PCR 扩增结果
Fig.3 The secondary PCR products of subtracted
M: ΦX174-Hae III digest

2.3 Actin 检测消减效率

通过 PCR 方法检测消减与未消减第 2 次 PCR 产物中管家基因 *Actin* 表达丰度的变化来判断消减效率, 结果显示, 未消减产物中 *Actin* 基因的表达在 18 个循环时已出现, 而消减产物中 *Actin* 基因的表达在 33 个循环时才出现, 要比对照晚 15 个循环, 而且 33 个循环时未消减产物 *Actin* 表达分度远高于消减产物。由此可见, 消减产物中管家基因表达丰度已大大下降(图 4), 消减杂交已有效完成。

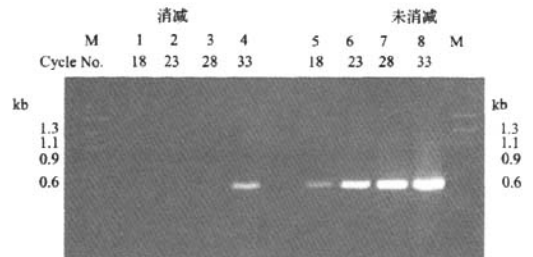


图 4 PCR 分析消减效率
Fig.4 PCR analysis of subtraction efficiency
M: ΦX174-Hae III digest; 1-8; PCR products of *Actin*;
Subtracted cDNA (1-4), unsubtracted cDNA (5-8)

2.4 抑制消减 cDNA 文库的扩增及初步鉴定

从文库中随机挑取 24 个阳性克隆,利用套式 PCR 引物 1 和 2R 进行阳性克隆的 PCR 鉴定,22 条

克隆扩增出相应的片段,文库的重组率高达 92%,插入片段的大小分布在 0.2~1.0kb 范围内(图 5)。

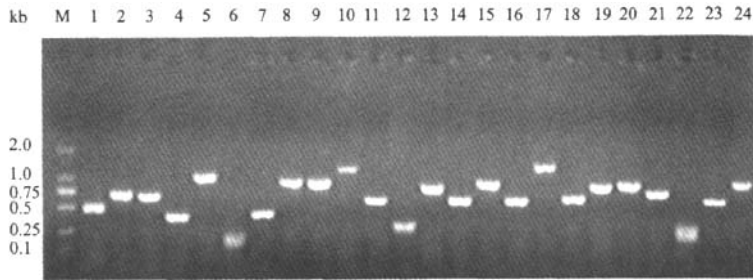


图 5 PCR 检测消减 cDNA 文库阳性克隆插入片段大小

Fig. 5 Identification of the inserted cDNA fragments in subtractive cDNA library by PCR

M:DNA Ladder DL 2000;1-24;24 randomly picked clones from the subtractive cDNA library

2.5 测序及序列分析

2.5.1 cDNA 文库测序 随机挑取 500 个阳性克隆,用套式 PCR 引物 1 和 2R 进行 PCR 扩增,选择插入片段大小 >0.2kb 的克隆进行测序,对所测序列经 DNASTAR 软件查找 PCR 引物 1 和引物 2,去除载体和引物序列,以及低质量序列后,获得 258 个

cleanESTs;经聚类、拼接,去除冗余序列,共获得 141 个 Unigene,其中含有 32 个 contigs、100 个 singlets,该库的冗余度为 24%。

2.5.2 BLASTx 结果 对 Unigene 进行 BLASTx 比对分析,其中功能已知的基因 93 个,功能未知基因 48 个,部分已知功能盐诱导相关基因见表 2。

表 2 部分盐胁迫相关基因

Table 2 Part of the stress relative genes

编号 Clone No.	长度 Length (bp)	登录号 Accession No.	同源性 Identity	预测功能 Putative gene function	同源植物 Plant specie
Contig4	590	gb AAO89238.1	96	腺苷高半胱氨酸酶	截型苜蓿
Contig6	382	gb AAF61434.1	90	发病相关	豌豆
Contig9	771	emb CAA43779.1	86	天冬氨酸转氨酶	紫花苜蓿
Contig11	212	gb ACG69484.1	78	萌蛋白	大豆
Contig14	619	emb CAA53078.1	82	乙酰辅酶 A 转乙酰(基)酶	芒果
Contig17	758	gb ABB30163.1	71	蔗糖运输蛋白	豌豆
Contig19	718	gb ACX46987.1	100	泛素相关	果子蔓
Contig22	883	ref XP_002513951.1	94	醛缩酶	蓖麻
Contig24	564	gb AAZ32865.1	88	硫氧还蛋白	紫花苜蓿
Contig28	935	gb ABR25685.1	87	结合蛋白家族	水稻
Contig31	362	gb ABO20851.1	97	衰老联合蛋白	百合
2	498	gb ACH87553.1	97	2 肌醇-1-磷酸合成酶	鹰嘴豆
42	272	emb CAC44505.1	89	聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白	豌豆
124	497	gb AAQ23176.1	81	枯草杆菌蛋白酶	大豆
137	390	gb AAB24398.1	95	β -1,3-葡萄糖聚合酶	豌豆
139	443	ref XP_002316182.1	71	氨基酸转运体	杨树
142	364	emb CAB43505.1	83	细胞色素 P450	鹰嘴豆
158	489	dbj BAE71240.1	98	细胞质乌头酸水合酶	三叶草
197	451	gb AAR10812.1	97	超氧化物歧化酶	三叶草
212	596	ref XP_002529385.1	81	离子通道相关	蓖麻
214	376	gi 255537884	70	受体蛋白激酶	蓖麻
259	698	emb CAR82238.1	93	脱镁叶绿酸盐加氧酶	豌豆
327	525	gb ACX37460.1	81	钙调蛋白	陆地棉

续表

编号 Clone No.	长度 Length (bp)	登录号 Accession No.	同源性 Identity	预测功能 Putative gene function	同源植物 Plant specie
331	448	reflXP_002534122.11	80	泛素相关	蓖麻
S2-5	711	gbIAAB86380.11	99	水通道蛋白	紫花苜蓿
S2-9	510	reflXP_002510007.11	83	受体蛋白激酶	蓖麻
S3-28	361	gbIAAW51884.11	70	硝酸盐转运体	大豆
S3-47	452	gbIAAL29212.11	84	酰(基)辅酶 A 合成酶	川椒
S3-49	807	gbIAAK66766.11	97	水通道蛋白	截形苜蓿
S3-87	404	dbjIBAG09367.11	87	过氧化物酶	大豆
S3-108	574	dbjIBAA97559.11	88	香树素合成酶	豌豆
S3-113	707	tpeICAP64325.11	86	赤霉素受体	截形苜蓿
S3-139	214	gbIAAP02957.11	74	醛脱氢酶家族	大豆
T3-14	479	gbIABD32628.11	84	颗粒体蛋白	截形苜蓿
T3-109	705	embICAB61739.11	75	结合蛋白	鹰嘴豆
T3-164	673	dbjIBAA76422.11	96	GTP-结合蛋白	鹰嘴豆

2.5.3 GO 分类 GO (Gene Ontology) 在细胞定位 (cellular location)、分子功能 (molecular function) 和生物学途径 (biological process) 三大类中对 ESTs 进行注释。

注释结果由图可知, 该库 ESTs 在功能分类中占

比例较大的为与盐胁迫相关功能物结合以及催化活性, 这说明在盐胁迫下, 相关功能基因通过催化和结合耐盐活性物质来调节生物过程, 以对其逆境做出反应。

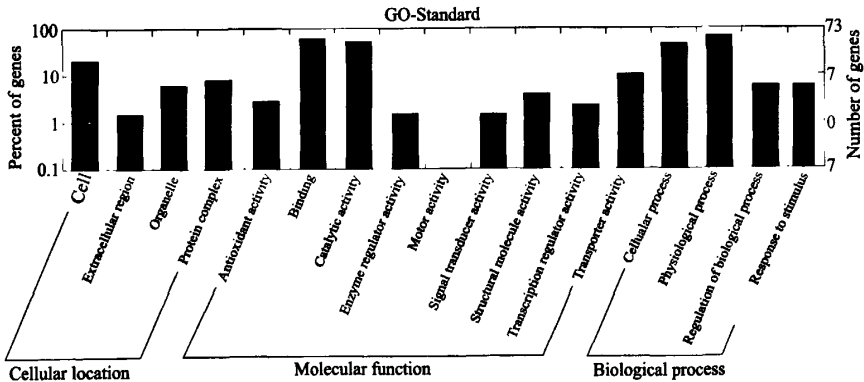


图 6 GO 分类

Fig. 6 GO classification

2.5.4 COG 分析 通过与所有 COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins) 中的蛋白质进行对比, 可以把它归入适当的 COG 家族。明确了它们在信号存储与加工、细胞生理过程和各类代谢中的作用。将对比结果阈值低于 $1e-05$ 的 79 个 EST 进行功能分类 (图 7), 其中东方山羊豆盐胁迫表达基因涉及氨基酸 (10%)、碳水化合物 (8%)、脂肪 (8%) 等物质的代谢过程, 以及无机离子转运和代谢 (8%)、辅酶转运和代谢 (3%)、信号转导 (4%) 等多种生理生化过程。物质和能量代谢类基因所占比例最大为 33%, 说明能量代谢和物质代谢对于植物抵御盐胁迫具有重要意义。物质代

谢能为细胞内提供大量的渗透调节剂, 维护细胞内的渗透平衡; 而能量代谢能够为抗盐过程中离子的主动运输提供能量。

2.6 消减文库质量鉴定分析

采用半定量 PCR 对随机选择的消减文库不重复的 4 个有效序列在实验组和对照组中的转录丰度进行检测 (图 8)。结果显示, 管家基因 *Actin* 在实验组和对照组中表达量一致。其他 4 个基因在实验组中的表达量均高出对照组 2 倍多, 属于诱导性差异表达基因。由此说明所构建消减文库质量较高, 达到了克隆和发现差异表达功能分子的目的。

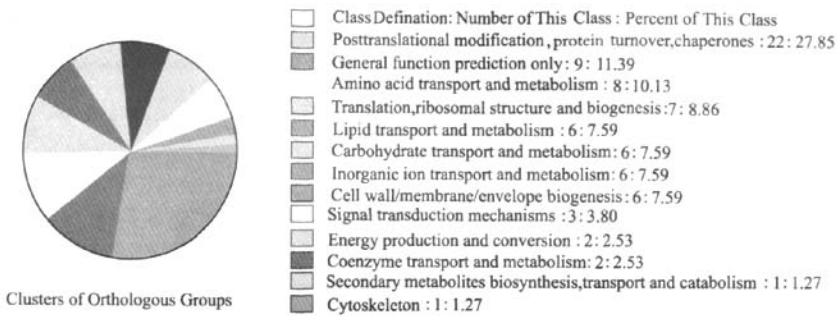


图7 COG 功能分类

Fig.7 COG function classification

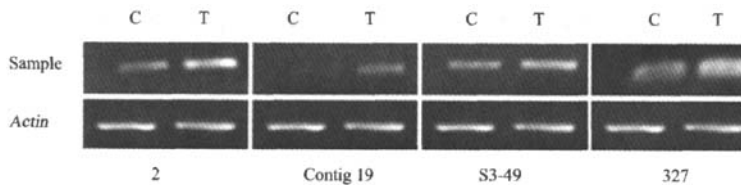


图8 RT-PCR 检测消减文库的消减效率

Fig.8 Detection of subtractive efficiency by RT-PCR

C:对照;T:处理

C:control;T:treatment

3 讨论

核酸和蛋白质序列进行对库检索所提示的结果是否具有生物学上的意义是一个很重要的问题。由于DNA编码的冗余特点,编码区的DNA序列在进行对齐之前可以先被翻译成蛋白质分析。当分析的核酸序列不是编码区时,序列一致性的结果是否具有生物学意义上的显著性则很难给出明确的结论。经验提示,DNA序列具有75%以上的同源性才可能具有潜在的生物学意义。而蛋白质对齐分析的标准就要低得多,一般的结论是:如果蛋白质序列之间在至少80%左右的区域中具有25%或更高的同源性,那么它们一般具有相类似的生物学性质。低于这个标准,两条序列可能具有相似的功能,也可能是性质完全不同的蛋白质。因此为了得到更确切的基因功能分析,我们对蛋白质数据库进行了BLASTx比对,结合GO和COG分析结果,将获得的功能基因分为以下4类。

第1类,与代谢及渗透调节物质合成相关基因。如肌醇-1-磷酸合成酶(Myoinositol-1-phosphate(MIP) synthase)、2-磷酸-3-脱氧庚酮糖醛缩酶(Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase)等。其中,Myo-肌醇是肌醇八种异构体中最普遍的一种。

肌醇在生物代谢的几乎所有的生物系统中扮演非常重要的角色,肌醇的衍生物在生长调控、质膜生物发生、渗透抗性、信号转导中发挥重要作用^[14]。当然,肌醇及其衍生物在质膜转移以及信号通路中也发挥重要作用^[15]。

第2类,转录调控及信号转导相关基因。 Ca^{2+}/H^+ 逆转运蛋白(Ca^{2+}/H^+ antiporter)^[16]、受体蛋白激酶(Receptor protein kinase)^[17]、钙依赖钙调素不依赖的蛋白激酶(Calcium dependent protein kinase)^[18]在胞内调节和细胞信号传导中扮演了重要角色。

第3类,光合作用相关基因。叶绿体色素a/b(Chloroplast chlorophyll a/b, CAB)结合蛋白是叶绿体类囊体中光合系统I和II的光捕获复合体(LH-Cs)的主要成分。有报道表明CAB结合蛋白在冷胁迫中上调表达^[19]。

双半乳糖二酰基甘油合成酶(Digalactosyl diacylglycerol synthase, DGDG)是光合膜中惟一的双半乳糖脂类,在光合膜的不同膜区均有分布,DGDG在维持光系统II捕光色素蛋白复合体的寡聚体结构、调控光系统II和光系统II核心复合物的放氧活性等方面起着重要作用^[20]。

第4类,机体保护相关基因。谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase)是一个同工酶家族,通

过还原型谷胱甘肽催化 H_2O_2 以及脂质过氧化物还原, 以此达到防止氧化损伤对有机体造成的伤害。大部分的非生物胁迫如干旱、寒冷、高盐等胁迫都会引起活性氧的产生, 所以氧化胁迫是这些非生物胁迫引起的次级胁迫^[21]。非生物胁迫能增加来自光合作用、呼吸作用以及 NADPH 氧化过程中产生的活性氧, 从而对植物造成伤害^[22]。

水通道蛋白 (Aquaporin, AQP) 除了作为水通道以外还有其他转运功能^[23]。它能够高效地有选择地转运水分。拟南芥的 *rd28* 基因编码的水通道蛋白在一些胁迫下表达, 通过增加水从质体膜的透水性来行驶功能^[24]。

过氧化物歧化酶基因 (Superoxide dismutase) 能有效地清除代谢过程中产生的活性氧, 使生物体活性氧维持在一个低水平上, 从而防止活性氧引起的膜脂过氧化及其他伤害过程^[25]。

综上所述, 东方山羊豆对盐胁迫存在着一个复杂的抗逆信号应答和代谢调控网络。东方山羊豆在盐胁迫下, 启动了防御反应机制, 加强防御蛋白基因表达, 一方面合成多种抗逆蛋白抵御逆境, 增强其耐盐能力, 另一方面防御蛋白的合成又进一步加强植物体内信号的转导以及代谢的调节作用, 使植物体内光合作用、呼吸作用等多种代谢活动增强, 为东方山羊豆在盐胁迫下生长提供了必不可少的代谢流和能量, 同时也反映了东方山羊豆对盐胁迫的代谢适应。下一步可以通过大规模测序以及获得基因全长, 转基因等研究获得更多的关于东方山羊豆盐诱导基因的信息。

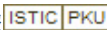
参考文献

- [1] Qiu Q S, Guo Y, Francisco J Q, et al. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly sensitive (SOS) pathway [J]. *Biol Chem*, 2004, 279: 207-215
- [2] 曾幼玲, 辛婷, 蔡志贞, 等. 盐生植物盐爪爪甜菜碱醇脱氢酶基因的克隆及在盐胁迫下的 BADH 基因的表达 [J]. *云南植物研究*, 2007, 29 (1): 79-84
- [3] Takahashi R, Liu S, Takano T. Cloning and functional comparison of a high-affinity K^+ transporter gene *PhaHKT1* of salt-tolerant and salt-sensitive reed plants [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58: 4387-4395
- [4] Xiang Y, Huang Y, Xiong L. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1416-1428
- [5] 郭新红, 姜孝成, 潘晓玲, 等. 用抑制差减杂交法分离和克隆梭梭幼苗受渗透胁迫诱导相关基因的 cDNA 片段 [J]. *植物生理学报*, 2001, 27 (5): 401-406
- [6] 孙洪波, 孙振元, 古润洋, 等. 应用抑制差减杂交法分离粗枝大叶黄杨幼苗的冷诱导表达基因 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38 (1): 135-139
- [7] Zhang Y, Mian M A R, Chekhovskiy K, et al. Differential gene expression in *Festuca* under heat stress conditions [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56 (413): 897-907
- [8] 上转, 贾晋平, 景蕊莲. 用抑制差减杂交法分离小麦幼苗水分胁迫诱导表达的 cDNA [J]. *生物技术通报*, 2003 (5): 36-39
- [9] 曾口中, 段翠芳, 黎瑜, 等. 茉莉酸刺激的橡胶树乳胶 cDNA 消减文库的构建及其序列分析 [J]. *热带作物学报*, 2003, 24 (3): 29-36
- [10] 赵惠芳, 马中华, 鞠本科. 用抑制差减杂交技术分离烯丙异咪吩诱导水稻特异表达的基 [J]. *复旦学报 (自然科学版)*, 2004, 43 (2): 225-229
- [11] 黄鑫, 戴思兰, 孟丽, 等. 抑制性差减杂交 (SSH) 技术在分离植物差异表达基因中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4 (5): 735-746
- [12] 张自和. 东方山羊豆的生物学特性与栽培技术 [J]. *草原与草坪*, 2002, 96 (1): 19-21
- [13] 张清斌, 杨志忠, 贾纳提, 等. 东方山羊豆引种研究初报 [J]. *中国草地*, 2001, 23 (4): 17-20
- [14] Loewus F A, Murthy P P N. Myo-inositol metabolism in plants [J]. *Plant Sci*, 2000, 150: 1-19
- [15] 钮旭光, 陈其军, 王学臣. 植物体内肌醇磷脂代谢与渗透胁迫信号转导 [J]. *中国农学通报*, 2006, 22 (2): 199-202
- [16] 韩宁, 邵群, 王宝山. 盐地碱蓬液泡膜 Ca^{2+}/H^+ 逆转运蛋白 *SsCAX1* N 末端原核表达和多克隆抗体的制备 [J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42 (4): 717-720
- [17] 同峰, 祝传书, 庞保平. 植物类受体蛋白激酶的研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2009, 29 (4): 851-858
- [18] Hong S W, Jon J H, Kwak J M, et al. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt and cold treatments in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113 (4): 1203-1212
- [19] Jung S H, Lee J Y, Lee D H. Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* leaves undergoing cold stress [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 553-567
- [20] 董建松, 阳振乐, 李良碧, 等. 光合膜脂双半乳糖二酰基甘油的研究进展 [J]. *植物学通讯*, 2003, 20 (5): 531-538
- [21] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Mizoguchi T, et al. Molecular responses to water stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Res*, 1998, 111: 345-351
- [22] Dooki A D, Mayer-Posner F J, Askari H, et al. Proteomic responses of rice young panicles to salinity [J]. *Proteomics*, 2006, 6: 6498-6507
- [23] Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, et al. Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein [J]. *Science*, 1992, 256: 385-387
- [24] Takahashi S, Seki M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in *Arabidopsis* cell culture using a full-length cDNA microarray [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56: 29-55
- [25] 李筠, 邓西平, 郭尚洙. 转铜/锌超氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶基因甘薯的耐旱性 [J]. *植物生理和分子生物学学报*, 2006, 32 (4): 451-457

东方山羊豆盐诱导抑制差减杂交文库构建及其表达序列标签分析

作者: [宋清晓](#), [王学敏](#), [高洪文](#), [Dzyubenko Nikolay](#), [Chapurin Vladimir](#), [韩永增](#), [杨冬梅](#), [李玉坤](#), [SONG Qing-xiao](#), [WANG Xue-min](#), [GAO Hong-wen](#), [Dzyubenko Nikolay](#), [Chapurin Vladimir](#), [HAN Yong-zeng](#), [YANG Dong-mei](#), [LI Yu-kun](#)

作者单位: [宋清晓](#), [王学敏](#), [Chapurin Vladimir](#), [韩永增](#), [杨冬梅](#), [李玉坤](#), [SONG Qing-xiao](#), [Dzyubenko Nikolay](#), [Chapurin Vladimir](#), [HAN Yong-zeng](#), [YANG Dong-mei](#), [LI Yu-kun](#) (中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京, 100193), [高洪文](#), [Dzyubenko Nikolay](#), [WANG Xue-min](#), [GAO Hong-wen](#) (俄罗斯斯瓦维洛夫全俄植物栽培研究所, 圣彼得堡, 190000)

刊名: [植物遗传资源学报](#) 

英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)

年, 卷(期): 2010, 11(6)

参考文献(25条)

- [Dooki A D;Mayer-Posner F J;Askari H Proteomic responses of rice young panicles to salinity](#)[外文期刊] 2006(24)
- [Shinozaki K;Yamaguchi-Shinozaki K;Mizoguchi T Molecular responses to water stress in Arabidopsis thaliana](#) 1998
- [童建松;阳振乐;李良碧 光合膜脂双半乳糖二酰基甘油的研究进展](#)[期刊论文]-[植物学通报](#) 2003(05)
- [Qiu Q S;Guo Y;Francisco J Q Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺exchange in Arabidopsis thaliana by the salt-overly sensitive\(SOS\)pathway](#) 2004
- [曾日中;段翠芳;黎瑜 茉莉酸刺激的橡胶树乳胶cDNA消减文库的构建及其序列分析](#) 2003(03)
- [王转;贾普平;景蕊莲 用抑制差减杂交法分离小麦幼苗水分胁迫诱导表达的cDNA](#)[期刊论文]-[生物技术通报](#) 2003(05)
- [Zhang Y;Mian M A R;Chekhovskiy K Differential gene expression in Fesluca under heat stress conditions](#)[外文期刊] 2005(413)
- [孙洪波;孙振元;古润泽 应用抑制差减杂交法分离粗枝大叶黄杨幼苗的冷诱导表达基因](#)[期刊论文]-[中国农业科学](#) 2005(01)
- [郭新红;姜孝成;潘晓玲 用抑制差减杂交法分离和克隆梭梭幼苗受渗透胁迫诱导相关基因的cDNA片段](#)[期刊论文]-[植物生理学报](#) 2001(05)
- [Xiang Y;Huang Y;Xiong L Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement](#)[外文期刊] 2007(3)
- [Takahashi R;Liu S;Takano T Cloning and functional comparison of a high-affinity K⁺transporter gene PhaHKT1 of salt-tolerant and salt-sensitive reed plants](#)[外文期刊] 2007(15/16)
- [李筠;邓西平;郭尚洪 转铜/锌超氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶基因甘薯的耐旱性](#)[期刊论文]-[植物生理与分子生物学学报](#) 2006(04)
- [Takahashi S;Seki M;Ishida J Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a full-length cDNA microarray](#)[外文期刊] 2004(1)
- [Preston G M;Carroll T P;Guggino W B Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein](#)[外文期刊] 1992
- [Jung S H;Lee J Y;Lee D H Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in](#)

[Arabidopsis leaves undergoing cold stress](#)[外文期刊] 2003(3)

16. [Hong S W;Jon J H;Kwak J M](#) [Identification of a receptorlike protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt and cold treatments in Arabidopsis thaliana](#)[外文期刊] 1997(04)
17. [闫峰;祝传书;庞保平](#) [植物类受体蛋白激酶的研究进展](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#) 2009(04)
18. [韩宁;邵群;王宝山](#) [盐地碱蓬液泡膜Ca⁺/H⁺逆转运蛋白SsCAX1 N末端原核表达和多克隆抗体的制备](#)[期刊论文]-[植物生理学通讯](#) 2006(04)
19. [钮旭光;陈其军;王学臣](#) [植物体内肌醇磷脂代谢与渗透胁迫信号转导](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#) 2006(02)
20. [Loewus F A;Murthy P P N](#) [Myo-inositol metabolism in plants](#)[外文期刊] 2000
21. [张清斌;杨志忠;贾纳提](#) [东方山羊豆引种研究初报](#)[期刊论文]-[中国草地](#) 2001(04)
22. [张自和](#) [东方山羊豆的生物学特性与栽培技术](#)[期刊论文]-[草原与草坪](#) 2002(01)
23. [黄鑫;戴思兰;孟丽](#) [抑制性差减杂交\(SSH\)技术在分离植物差异表达基因中的应用](#)[期刊论文]-[分子植物育种](#) 2006(05)
24. [赵惠芳;马中华;蒯本科](#) [用抑制差减杂交技术分离烯丙异咪吟诱导水稻特异表达的基](#)[期刊论文]-[复旦学报\(自然科学版\)](#) 2004(02)
25. [曾幼玲;幸婷;蔡忠贞](#) [盐生植物盐爪爪甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及在盐胁迫下的BADH基因的表达](#)[期刊论文]-[云南植物研究](#) 2007(01)

本文读者也读过(10条)

1. [斜纹夜蛾取食诱导棉花抑制性消减文库的初步构建及生物信息学分析](#)[期刊论文]-[棉花学报](#)2009, 21(6)
2. [王远志. 陈创夫. 曹旭东. 盛金良. 张辉. 任艳. 高剑峰. 王端明. WANG Yuan-zhi. CHEN Chuang-fu. CAO Xu-dong. SHENG Jin-liang. ZHANG Hui. REN Yan. GAO Jian-feng. WANG Duan-ming](#) [羊种布鲁菌05/43株侵袭绵羊肺泡巨噬细胞cDNA文库的构建](#)[期刊论文]-[中国医药生物技术](#)2008, 3(1)
3. [张丽](#) [高粱品种“河农16”抗高粱蚜生化机理的研究](#)[学位论文]2005
4. [李金梅. 赵威军. 张福耀. 程庆军. 常玉卉. 张晓娟. LI Jin-mei. ZHAO Wei-jun. ZHANG Fu-yao. CHENG Qing-jun. CHANG Yu-hui. ZHANG Xiao-juan](#) [高粱抗蚜虫研究综述](#)[期刊论文]-[杂粮作物](#)2006, 26(5)
5. [常金华. 张丽. 申书兴. 马峙英. CHANG Jin-hua. ZHANG Li. SHEN Shu-xing. MA Zhi-ying](#) [不同基因型高粱的理化特性与抗蚜性的相关性研究](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#)2008, 9(1)
6. [杜立新. 柳淑芳. 李宏滨. 王爱华](#) [小尾寒羊卵巢组织cDNA文库的构建和mRNA差异显示](#)[会议论文]-2005
7. [夏雪岩. 常金华. 罗耀武. 李荣改. 刘国庆](#) [高粱抗蚜虫SSR体系的建立](#)[期刊论文]-[河北农业大学学报](#)2004, 27(3)
8. [赫晓燕. 范瑞文. 张俊珍. 程志学. 李鹏飞. 白瑞. 董常生. HE Xiao-yan. FAN Rui-wen. ZHANG Jun-zhen. CHENG Zhi-xue. LI Peng-fei. BAI Rui. DONG Chang-sheng](#) [利用SMART技术构建羊驼皮肤全长cDNA文库](#)[期刊论文]-[畜牧兽医杂志](#)2008, 27(6)
9. [李鑫. 邹毅辉. 杨晓亮. 李桂芳. 李峰. 陈芳. 石国庆. 高剑峰. LI Xin. ZOU Yihui. YANG Xiaoliang. LI Guifang. LI Feng. CHEN Fang. SHI Guoqing. GAO Jianfeng](#) [中国美利奴羊外周免疫器官cDNA文库的构建及鉴定](#)[期刊论文]-[石河子大学学报\(自然科学版\)](#) 2010, 28(5)
10. [吕炳建. 崔晶. 徐静. 张昊. 罗敏捷. 朱益民. 来茂德. L\(U\) Bing-Jian. CUI Jing. XU Jing. ZHANG Hao. LUO Min-Jie. ZHU Yi-Min. LAI Mao-De](#) [结肠腺瘤-正常文库的生物信息学分析](#)[期刊论文]-[遗传](#)2006, 28(4)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201006020.aspx