

沙冬青细胞与分子生物学研究进展

林清芳, 王茅雁, 刘佳杰, 赵欢欢, 王存芳

(内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 沙冬青是我国西北荒漠区唯一的常绿阔叶灌木, 具有极强的抗逆性和特殊的医疗保健作用。本文从细胞学与遗传多样性、抗逆性分子基础与基因克隆和药用成分及作用机制方面对沙冬青的研究进展进行了综述, 并提出了今后的重点研究方向。

关键词: 沙冬青; 细胞学与遗传多样性; 抗逆基因; 药用成分

Research Progress of Cell and Molecular Biology of *Ammopiptanthus*

L N Qing-fang, WANG Mao-yan, L U Jia-jie, ZHAO Huan-huan, WANG Cun-fang

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

Abstract: As an only evergreen broad-leaf shrub in the northwest desert of China, *Ammopiptanthus mongolicus* shows very strong resistance to environmental stresses and special medical and health care functions. In this review, research progress in the cytology and genetic diversity, the stress resistance molecular bases and gene cloning, the medicinal components and their functional mechanisms of the plant were reviewed, and the further research aspects were suggested.

Key words: *Ammopiptanthus*; Cytology and genetic diversity; Stress resistance gene; Medicinal components

沙冬青 [*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim) Cheng f.] 是豆科蝶形花亚科沙冬青属 (*Ammopiptanthus*) 旱生植物, 为古老的残遗、濒危物种。沙冬青属仅有蒙古沙冬青 (*A. mongolicus*) (又称沙冬青、蒙古黄花木) 和新疆沙冬青 (*A. nanus*) (又称小沙冬青、矮沙冬青) 两个种, 主要分布在我国西北地区的沙漠、荒漠区, 是该区唯一的常绿阔叶灌木^[1-2]。由于生境地严酷的自然条件, 沙冬青在漫长的进化历程中形成了很强的抗寒、抗旱和耐盐碱等特性, 成为研究植物抗逆机理和发掘抗逆基因的好材料。沙冬青还是防风固沙、治疗多种疾病的宝贵药用植物资源, 具有重要的生态和药用价值^[1,3]。从 20 世纪 80 年代初开始, 众多学者从种群生态学、保护生物学、抗逆性的形态结构特征和生理生化特性、组织培养以及遗传学等方面对其进行了较广泛的研究, 近年来逐步深入到从分子水平揭示其抗逆机理, 不仅分

离到抗冻蛋白 (antifreeze proteins, AFPs), 还克隆到一些抗冷冻相关基因并进行了功能鉴定。关于沙冬青种群生态学、保护生物学和抗逆性的形态结构特征及生理生化特性等研究进展已有较多综述文章, 本文就其染色体组型与遗传多样性、抗逆性分子基础与基因克隆和药用成分及其作用机制方面的研究进展综述如下。

1 沙冬青细胞学研究与遗传多样性

了解物种的遗传基础是深入开展其分子生物学和基因组学及遗传工程研究的重要前提。早在 20 世纪 60 年代末, 人们就开始对沙冬青的染色体数及其核型进行观察, 但所得结果曾一度存在争议。个别报道认为新疆沙冬青染色体数为 $2n = 20^{[4-5]}$, 蒙古沙冬青染色体数为 $2n = 16^{[6]}$, 而多数学者发现两种沙冬青的染色体数均为 $2n = 18^{[7-13]}$ 。后来, 一些

收稿日期: 2010-01-20 修回日期: 2010-07-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30960158); 内蒙古自然科学基金项目 (K32227); 国家转基因专项 (2009zx08009-019B)

作者简介: 林清芳, 在读硕士。E-mail: wokeyil234@163.com

通讯作者: 王茅雁, 教授, 研究方向为植物分子遗传学。E-mail: wangmaoyan@163.com

研究者通过对减数分裂过程中染色体行为的观察,确认两种沙冬青的染色体基数均为 $X=9$,体细胞染色体数均为 $2n=2x=18$,均属于二倍体植物^[14-15]。这样的染色体背景可能便于从分子水平对沙冬青进行研究和遗传操作。

对两种沙冬青的核型分析结果也存在差异。早期曾报道二者的核型均为 2A 型^[12-13],但略有区别:蒙古沙冬青的核型公式为 $K_{(2n)}=18=10m+4m(SAT)+2sm+2st$,即有 7 对中部着丝点染色体、1 对次中部着丝点染色体和 1 对近端部着丝点染色体,而新疆沙冬青的核型公式为 $K_{(2n)}=18=8m+2m(SAT)+2sm+2sm(SAT)+4sm(SC)$,即有 5 对中部着丝点染色体和 4 对次中部着丝点染色体^[13]。后来又有人报道新疆沙冬青的核型公式为 $2n=2x=18=8m(4SAT)+8sm+2st$,属于 2A 型,即由 4 对中部、4 对近中部和 1 对近端部着丝点染色体组成;而蒙古沙冬青核型公式为 $2n=2x=18=6m(2SAT)+10sm(2SAT)+2st$,属于 3A 型,即由 3 对中部、5 对近中部和 1 对近端部着丝点染色体组成,前者的核型较后者对称^[14]。按照 Stebbins 核型越不对称越进化的观点^[16],新疆沙冬青要比蒙古沙冬青原始,这与其适应性较弱、地理分布范围较窄是一致的^[14]。

近 10 多年来,一些研究者从同工酶、等位酶和 DNA 水平对沙冬青的遗传多样性进行了分析。有人发现两种沙冬青的酯酶同工酶谱带有所不同,其中新疆沙冬青的酶带数比蒙古沙冬青少,但二者亲缘关系很近,遗传相似度较高,并发现新疆沙冬青酯酶的活性明显低于蒙古沙冬青^[14,17]。同工酶是植物进化的产物,根据属内同工酶谱带较多的种为较进化种的观点^[18],蒙古沙冬青要比新疆沙冬青进化一些,这与核型分析的结果一致。

陈国庆等^[19]对新疆沙冬青 6 个自然居群的 8 个酶系统(酸性磷酸酶、酯酶、半乳糖苷酶、异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、磷酸葡萄糖脱氢酶、过氧化物酶和莽草酸脱氢酶)的等位酶遗传多样性进行分析,表明该物种的遗传变异水平很低,缺少稀有、居群特有的等位基因,并且其有限的遗传变异主要存在于居群之内,而不同居群之间的遗传分化较小。

Ge 等^[20]利用 ISSR 标记对两种沙冬青之间及其每个种内的遗传变异进行了分析,发现尽管两个种在形态上相似,但却存在显著的遗传差异,种特异性的 DNA 标记带达到 63%。而在各自的居群水平和物种水平上,只检测到较低水平的遗传变异,尤其新疆沙冬青的遗传变异水平更低。这与前人用同工

酶和等位酶的研究结果基本一致。

一个物种的长期生存,依赖于其居群内和居群间足够的遗传变异,以适应不断变化的生境条件。目前对沙冬青属遗传多样性的研究虽然还很有限,但有关证据显示其总体遗传变异水平较低,遗传基础贫乏,尤其新疆沙冬青更是如此。所以,进一步加强沙冬青保护生物学研究具有重要意义。

2 沙冬青抗逆性分子基础与基因克隆

2.1 抗冻蛋白的分离与鉴定

低温对植物的伤害分为冷害和冻害。冷害是指 0 以上低温引起的植物生理机能障碍,冻害是指温度降至 0 以下时,由于植物体内结冰而导致细胞受伤甚至死亡的现象^[21-22]。起源和地理分布不同的植物抗冻性能存在遗传差异。沙冬青最重要的研究价值在于其超常的抗冻性。从 20 世纪 90 年代初以来,对其抗冻机理的研究逐步从形态结构特征和生理生化特性深入到分子水平,尤其在抗冻蛋白的研究上比其他植物积累了较多资料。

抗冻蛋白是生物体在遭受冻害时产生的一类抗冻功能蛋白,1969 年首次在南极的一种鱼血清中发现,后来在其他耐受冰冻的极地鱼类、昆虫、陆生节肢动物、细菌、真菌和植物中均有发现^[23]。不同来源的抗冻蛋白在分子量、氨基酸组成及序列上差别很大,有些还含有糖残基,特称为 AFGP(antifreeze glycoprotein)^[24]。它们具有多个亲水性缚冰域,能直接作用于冰晶,阻止冰晶形成和再结晶。目前将抗冻蛋白的抗冻机理主要归结为 4 个方面,即热滞效应、降低过冷点、抑制冰晶重结晶和修饰冰晶形态。所谓热滞(hysteresis)是指溶液的冰点低于熔点的现象。一般溶液的冰点是固、液两相蒸气压平衡时的温度,因而冰点应等于熔点。抗冻蛋白能够非依数性地降低水溶液的冰点,但对熔点影响甚微,从而产生热滞效应,抑制冰晶的形成和生长,减轻冰冻对细胞的伤害。所以,抗冻蛋白又称为热滞蛋白(thermal hysteresis proteins, THPs),其抗冻活性主要通过测定溶液的冰点和熔点之差,即热滞值或热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)来衡量^[24-26]。此外,观察冰晶的形态也是判断抗冻蛋白抗冻活性的一种常用方法^[27-29]。

植物抗冻蛋白最早于 1992 年在冬黑麦中发现^[27],后来在沙冬青、胡萝卜、珠芽蓼和雪莲等许多耐寒植物中均有报道^[29-31]。沙冬青作为一种强抗冻植物,其抗冻蛋白的研究受到重视并积累了较多资料。1994 年,费云标等^[29]率先从蒙古沙冬青中

分离到抗冻蛋白,其分子量包括 45.7KD 和 81.2KD 等,抗冻活性高于此前发现的鱼类或黑麦抗冻蛋白。将这些蛋白进一步纯化,得到热滞活性分别为 0.45 (10mg/ml)和 0.46 (8mg/ml)的 3 种非糖基化抗冻蛋白^[32]。该研究小组还从冬季蒙古沙冬青叶片中分离到 40 kD 和 50 kD 两种热稳定抗冻糖蛋白,其中前者热滞活性为 0.9 (20mg/ml),N 末端 20 个氨基酸残基序列 (SDDLSTFNKFVPCQT-DLF)与植物凝聚素有较高同源性^[33],后者热滞活性约为 0.35 (5mg/ml),二级结构与某些鱼类抗冻蛋白具有一定相似性^[34-35]。推测这些抗冻蛋白在蒙古沙冬青抵御冬季严寒中起重要作用。后来,又从蒙古沙冬青冬季叶片中分离纯化到几种抗冻蛋白,其热滞活性不同,都能够抑制冰晶生长、修饰冰晶形态^[36-39]。值得注意的是,蒙古沙冬青中还存在具有双峰热滞效应的抗冻蛋白,即在其熔融过程中出现高、低两个吸热叠加峰,其冻结峰也表现出双峰叠加的特征。推测这类抗冻蛋白分子与水与冰晶的相互作用极为复杂^[40]。最近,Fei等^[41]又从蒙古沙冬青叶片中分离到多种高活性抗冻蛋白,它们具有不同于鱼类和昆虫抗冻蛋白的特异结构,对冰晶生长有明显的抑制作用。

对新疆沙冬青抗冻蛋白的研究较少,但最近证实其叶片中也含有抗冻蛋白,已分离的 4 组抗冻蛋白热滞值在 0.15 ~ 0.48 (20mg/ml)^[42]。沙冬青抗冻蛋白中有许多为热稳定蛋白,如分子量为 28、40 和 50kD 等抗冻蛋白均具有热稳定性^[33,35,37],用加热的方法可以将它们和大部分其他蛋白质分开,已成为分离沙冬青抗冻蛋白的常用方法之一。

最近,在分离蒙古沙冬青抗冻蛋白时得到了动物乳铁传递蛋白的同源物。由于动物乳铁传递蛋白具有抑菌活性,据此推测这类蛋白在蒙古沙冬青中也可能具有抵抗病菌的作用,但其抗冻作用如何尚待鉴定^[43]。

上述资料表明,沙冬青抗冻蛋白的种类复杂多样,推测这些蛋白可能有着不同的作用机制,它们彼此之间以及与其他抗冻因子间协同作用,可能是构成沙冬青强抗冻性的物质基础所在。进一步从基因水平揭示抗冻蛋白的作用机制是今后的研究重点之一,但由于其种类多样,彼此间序列相似性很低,所以给克隆其基因造成了困难,这也是目前沙冬青乃至其他生物抗冻蛋白基因研究中的难点之一。

2.2 抗冷冻相关基因的克隆与功能分析

近几年来,Liu等^[44-46]利用改进的固相扣除杂

交等技术,从低温驯化后的蒙古沙冬青幼苗中克隆到多个低温诱导表达基因,包括脱水素、胚胎发生晚期丰富蛋白 (late embryogenesis abundant protein, LEA)、冷诱导蛋白、光合作用相关蛋白、蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor, PI)、ATPase 和 14-3-3 相关蛋白的编码基因,推测它们与低温下维持膜的稳定性、渗透调节、能量代谢、光合作用及信号传递等有关。将 *AmLEA* 和 *AmPI* 基因分别转化烟草,转基因植株比对照植株的抗寒性明显提高,但 *AmPI* 转基因烟草同时变得生长缓慢,植株矮小^[47]。

Cao等^[48]利用 cDNA-AFLP 结合 Reverse-Northern 技术,从蒙古沙冬青中鉴定出一批冷诱导表达基因,其编码产物包括运输蛋白、细胞周期相关蛋白、细胞壁结合激酶、脱水素类、亚精胺合成酶、肌醇半乳糖苷合成酶、硫氧还蛋白等已知蛋白和功能未知的蛋白。其中细胞周期相关蛋白基因 *AmEBP1* 的启动子中含有几个胁迫相关转录因子的结合位点。将该基因转化大肠杆菌和拟南芥,二者的抗寒性均有所提高,推测其作用机理可能是促进了核糖体的生物发生,进而增强了低温诱导转录因子和保护性蛋白的合成。在肌醇半乳糖苷合成酶基因 *AmGoS* 的上游调控序列中也含有几种胁迫诱导转录因子的结合元件,推测其表达可能受相关转录因子的调控。进一步分析发现,*AmGoS* 基因的表达受冷冻、干旱和盐胁迫及外源 ABA 的诱导而上调。将该基因转化大肠杆菌和拟南芥,转基因株系的抗寒性均高于对照^[49]。由于肌醇半乳糖苷合成酶催化蜜三糖家族中低聚糖合成的限速步骤,因此认为转基因株系抗寒性增强的原因可能是 *AmGoS* 基因的表达使细胞中低聚糖含量增加,从而对细胞起到渗透保护作用^[49]。

CBFs (C-repeat binding factors) 是植物中一类重要的冷诱导转录因子,通过调节功能基因的表达而增强植物的抗低温能力。抗冻肽则是沙冬青抵御严寒的重要功能蛋白。最近有人从蒙古沙冬青中克隆到 *CBF* 基因和抗冻肽调节基因 *AmGS*,并将它们分别转化烟草和石楠,目前对于转基因植株的表型鉴定尚在进行之中^[50-51]。

2.3 其他抗逆相关基因的克隆与鉴定

CBLs (calcineurin B-like proteins) 是近年来在植物中发现的一类 Ca^{2+} 结合蛋白,在植物响应高盐、干旱和低温等非生物胁迫中起重要调节作用^[52]。孙燕^[53]利用 RACE 方法,首次从蒙古沙冬青中克隆到 *AmCBL1* 基因,并发现其转录水平受干旱和盐

胁迫诱导而变化。将该基因在烟草中表达,转基因植株对干旱、高盐和低温的耐受性高于对照,表明 *AmCBL1* 在应答这些环境胁迫中起正向调节作用^[54]。

郭九峰等^[55]构建了蒙古沙冬青越冬叶片的 EST文库,并对文库的部分克隆进行了 5'端测序,共得到 360 个 unEST,其中 313 个为已知基因,与抗逆性相关的有 48 条,包括脱水素、泛素、蛋白酶抑制剂、热激蛋白、转录因子、超氧化物歧化酶、蛋白激酶和其他抗逆相关蛋白的编码序列。目前已构建脱水素基因的植物表达载体,为进一步通过转基因植物研究其抗逆功能奠定了基础^[56]。

总之,近年来对于沙冬青抗冷冻基因的克隆及其功能研究报道较多,而对其抗旱、耐盐碱等基因的分离和研究报道甚少。笔者所在实验室最近利用 SMART 技术构建了蒙古沙冬青在干旱胁迫下的全长 cDNA 文库,并对文库进行了规模化测序和序列分析,目前正在用转基因方法对其中一些候选抗旱基因进行功能验证,期望能得到关键抗旱基因。

3 沙冬青药用化学成分及其作用机理

沙冬青是一种宝贵的药物资源植物,其枝、叶入药可祛风、活血、止痛,外用可治疗冻伤和慢性风湿性关节炎^[3]。近几年来,对于其药用化学成分及其作用机理的研究受到重视。一些研究者应用现代化学和物理学分析技术,对沙冬青地上部枝叶的药用成分和抗氧化活性等进行了较详尽的分析,发现其中不仅含有大量的生物碱,还含有多种异黄酮类以及一些苯丙素类化合物^[3,57]。特别是在其地上部高抗氧化活性组分中分离到大量白藜芦醇^[58],为揭示其药效机理提供了重要线索。白藜芦醇是一种植物源多酚类化合物和强抗氧化剂,具有抗肿瘤、抗炎、保护神经和心血管等多种药理活性及植物雌激素等作用^[58-59],国内外已将其广泛应用于医药、美容、保健和食品等领域^[58]。

最近发现,沙冬青地上部分的提取物可以延长果蝇(衰老研究的模型动物)的寿限,并初步证明这与其主要活性成分白藜芦醇的强抗氧化能力及其对细胞凋亡的抑制作用有关^[58]。沙冬青提取物 JA1 可使人肝癌细胞株 HepG2 的细胞周期运转停滞在 G1 期,进而引起细胞凋亡,抑制癌细胞的增殖,故可用于治疗肝癌^[60],推测其抗癌作用与白藜芦醇等成分有关。

上述研究不仅为揭示沙冬青的医疗保健功效提

供了理论依据,而且为进一步开发利用这一宝贵资源开拓了新的视野。从沙冬青自身抵御恶劣环境而言,上述次生代谢产物的积累也有裨益,如在一些异黄酮分子中都有较大的电子共轭系统,这对于沙冬青抵御高原紫外辐射大有作用,还有些化合物具有抗真菌活性^[57-58],而白藜芦醇作为一种强抗氧化剂,可能在清除活性氧自由基方面起着重要作用,推测它可能是沙冬青抗冻、抗旱的功能物质之一。

总之,沙冬青是我国珍贵的抗逆和药用资源植物,具有重要的研究和开发利用价值。从细胞和分子生物学角度而言,目前只对其染色体组型、遗传多样性、抗冻蛋白与抗冻基因以及药理成份等进行了初步研究,而对其抗旱、耐盐碱和耐热等特性的分子机理及其药理活性成分的代谢调控机制所知甚少。因此,从细胞和分子水平深入研究沙冬青的抗逆机理,分离并鉴定其抗逆基因,阐明其重要药理活性成分的代谢调控机制是摆在我们面前的艰巨任务,开展这些工作不仅具有重要的学术意义,而且有着广阔的开发应用前景。

参考文献

- [1] 李慧卿,马文元,李慧勇. 沙冬青抗逆性研究进展 [J]. 世界林业研究, 2000, 13 (5): 67-71
- [2] 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
- [3] 田晓明,陈世忠,屠鹏飞,等. 沙冬青地上部分的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (19): 2204-2206
- [4] Goldblatt P. Index to plant chromosome numbers for 1975-1978 [J]. Missouri Bot Gard, 1981: 220
- [5] Goldblatt P. Index to plant chromosome numbers for 1982-1983 [J]. Missouri Bot Gard, 1985: 173
- [6] 冯显逵,宋玉霞. 沙冬青核型研究 [J]. 宁夏农林科技, 1988 (3): 29
- [7] Fedorov A A. Chromosome numbers of flowering plant [J]. Leningrad: Acad Sci U S S R, Komarov Botanical Institute, 1969: 314
- [8] Boczantseva V V. Chromosome numbers of two shrubs from the family Leguminosae [J]. Bot Zh, 1976, 61: 1441
- [9] 冯显逵,宋玉霞. 宁夏部分乔灌木树种染色体数目初报 [J]. 宁夏农林科技, 1987 (1): 28-29
- [10] 袁永明,彭泽祥,任廷国. 兰州及其邻近地区几种植物的染色体 [J]. 西北师范学院学报, 1988 (专辑 1号): 58-63
- [11] 张寿洲,曹瑞. 沙冬青染色体数与核型研究 [J]. 植物分类学报, 1990, 28 (2): 133-135
- [12] Chen C J, Zhu X Y, Yuan Y M. Cytological studies on the tribe Thermopsideae (Fabaceae) [C] // Report on karyotypes of eleven species of four genera Cathaya, 1992, 4: 103-116
- [13] 潘伯荣,黄少甫. 沙冬青属的细胞学研究 [J]. 植物学报, 1993, 35 (4): 314-317
- [14] 刘玉红,王善敏,王荷生. 试论沙冬青属的染色体地理 [J]. 地理研究, 1996, 15 (4): 40-47
- [15] 宋娟娟,唐源江,廖景平,等. 濒危植物矮沙冬青减数分裂期染色体行为的观察 [J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11 (2): 166-168
- [16] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plants [M].

- London: Edward Arnold Ltd, 1971
- [17] 魏岩,石庆华. 子遗植物沙冬青属的酯酶同工酶谱分析[J]. 干旱区研究, 1995, 12(1): 53-54
- [18] 杨自湘,奚声珂,胡桃属十种植物的过氧化物同工酶分析[J]. 植物分类学报, 1989, 27(1): 53-57
- [19] 陈国庆,黄宏文,葛学军. 濒危植物矮沙冬青的等位酶多样性及居群分化[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(2): 131-137
- [20] Ge X J, Yu Y, Yuan Y M, et al Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis[J]. Ann Bot, 2005, 95(5): 843-851
- [21] Burke M J, Gusta L V, Quamme H A. Freezing and injury in plants[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1976, 27: 507-528
- [22] 梁秋霞,曹刚强,押辉远. 抗冻蛋白在园艺植物遗传改良中的研究进展[J]. 北方园艺, 2006(6): 50-52
- [23] 吴建民,幸华,赵志光,等. 植物抗冻蛋白的研究进展及其应用[J]. 冰川冻土, 2004, 26(4): 482-487
- [24] De Vries A L. Antifreeze glycopeptides and peptides: interaction with ice and water[J]. Methods in Enzymology, 1986, 127: 293-303
- [25] Knight C A, Duman A G. Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role[J]. Cryobiology, 1986, 23: 256-262
- [26] 江勇,贾士荣,费云标,等. 抗冻蛋白及其在抗冻生理中的作用[J]. 植物学报, 1999, 41(7): 677-683
- [27] Griffith M, Ala P, Yang D S C, et al Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves[J]. Plant Physiol, 1992, 100: 593-596
- [28] Davies P L, Hew C L. Biochemistry of fish antifreeze proteins[J]. FASEB J, 1990, 4: 2460-2468
- [29] 费云标,孙龙华,黄涛,等. 沙冬青高活性抗冻蛋白的发现[J]. 植物学报, 1994, 36(8): 649-650
- [30] Worrall D, Elias L, Ashford D, et al A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization[J]. Science, 1998, 282(2): 115-117
- [31] 祭美菊,安黎哲,陈拓,等. 天山寒区冰缘植物珠芽蓼叶片抗冻蛋白的发现[J]. 冰川冻土, 2001, 23(4): 342-345
- [32] 江勇,魏令波,费云标,等. 分离和鉴定沙冬青抗冻蛋白质[J]. 植物学报, 1999, 41(9): 967-971
- [33] 魏令波,江勇,舒念红,等. 沙冬青叶片热稳定抗冻蛋白特性分析[J]. 植物学报, 1999, 41(8): 837-841
- [34] 费云标,魏令波,高素琴,等. 沙冬青抗冻蛋白的分离、纯化及其理化特性分析[J]. 科学通报, 2000, 45(20): 2185-2189
- [35] 舒念红,魏令波,高素琴,等. 植物抗冻蛋白纯化、活性与二级结构测定[J]. 中国医学研究与临床, 2003, 1(12): 45-45
- [36] Wang W, Wei L. Purification of boiling-soluble antifreeze protein from the legume *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. Prep Biochem Biotech, 2003 33(1): 67-80
- [37] Wang W, Wei L, Wang G. Multistep purification of an antifreeze protein from *Ammopiptanthus mongolicus* by chromatographic and electrophoretic methods[J]. J Chromatogr Sci, 2003, 41(9): 489-93
- [38] 王维香. 沙冬青抗冻蛋白的分离纯化及特性鉴定[D]. 大连:大连理工大学, 2004
- [39] 王维香,魏令波,张虎. 沙冬青热稳定抗冻蛋白的分离纯化及其部分性质研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2007, 44(4): 912-917
- [40] 周晓蕾,陈滔滔,王保怀,等. 沙冬青抗冻蛋白热滞活性的DSC研究[J]. 物理化学学报, 2001, 17(1): 66-69
- [41] Fei Y B, Cao P X, Gao S Q, et al Purification and structure analysis of antifreeze proteins from *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2008, 38(2): 172-183
- [42] 鲁春芳,尹林克,牟书勇,等. 新疆沙冬青叶片氨基酸和蛋白质的测试与分离以及抗冻蛋白的鉴定结果分析[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 531-534
- [43] Yun B F, Peng X C, Su Q G, et al Discovery of a Homolog of Siderophilin in a Plant[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005, 47(12): 1409-1411
- [44] Liu M Q, Shen X, Yin W, et al Functional analysis of cold-inducible cDNA clones in the legume *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. Cryletters, 2005, 26(4): 213-222
- [45] Liu M Q, Lu C F, Shen X, et al Characterization and function analysis of a cold-induced *AmCIP* gene encoding a dehydrin-like protein in *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. DNA Sequence, 2006, 17(5): 342-349
- [46] 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
- [47] 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
- [48] 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): 529-39
- [49] 宋健. 沙冬青耐寒基因 *AmGos* 的克隆和遗传转化研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2007
- [50] 张晗. 棉花 CBF调控因子在逆境条件下的表达调控及沙冬青 CBF基因的克隆[D]. 北京:中国农业科学院, 2008
- [51] 刘静,王长宪,王斌,等. 抗寒基因 *AmGS* 高效转化体系的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2009, 40(2): 191-194
- [52] Batistic O, Kudla J. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network[J]. Planta, 2004, 219: 915-924
- [53] 孙燕. 沙冬青 *CBL1* 基因的克隆及表达特性研究[D]. 北京:北京林业大学, 2005
- [54] 孙芳. 沙冬青 *CBL1* 基因的功能研究[D]. 北京:北京林业大学, 2009
- [55] 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
- [56] 乔慧蕾,王瑞刚,郭九峰,等. 沙冬青脱水素基因的克隆及表达载体的构建[J]. 华北农学报, 2009(4): 89-90
- [57] 邵志宇. 西部六种植物的天然产物研究[D]. 复旦大学博士后出站报告(第一部分), 2004
- [58] 王维. 分布于沙漠和戈壁的沙冬青和四合木活性物质的超量积累及对衰老进程调控的分析研究[D]. 上海:复旦大学, 2006
- [59] 赵克森. 白藜芦醇的一般生物学作用[J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 29(6): 374-376
- [60] Jia L, An L Z. Effects of the extract of *Ammopiptanthus mongolicus* cheng f (JA1) on induction of apoptosis of HepG2 *in vitro* and its molecular mechanisms[J]. Biomed Environ Sci, 2006, 19(2): 118-123