

赵春燕,晏国洪,姜 山. 小立碗藓 *CADI* 基因敲除载体的构建及酶切方法优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):59-63.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.014

小立碗藓 *CADI* 基因敲除载体的构建及酶切方法优化

赵春燕,晏国洪,姜 山

(贵州师范大学生命科学学院,贵州贵阳 550001)

摘要:苔藓植物能否合成木质素目前还存在一定的争议。肉桂醇脱氢酶(CAD)催化木质素单体合成的最后一步反应,Real-Time PCR 表达分析表明,小立碗藓 *CADI* 基因在接种灰霉菌后的第 2 天表达量迅速上升。本试验利用 PCR 技术,以小立碗藓基因组 DNA 为模板,使用 Primer 5-Cracked 设计的引物,扩增出小立碗藓 *CADI* 基因的上、下游同源臂基因片段。酶切 *CADI* 上游同源臂和 pTN182 原始质粒,经连接酶连接、转化至感受态大肠杆菌,筛选出阳性株。采用裂解液裂解、质粒 DNA 提取、质粒 PCR 以及酶切进行验证,得到 CAD11-pTN182。采用同样的方法把下游片段转入 CAD11-pTN182,即得 CAD11-pTN182-CAD12,最后进行测序分析。结果表明,已成功构建 CAD11-pTN182-CAD12 敲除载体,并将该重组质粒转入目的菌株大肠杆菌中保存备用,可为后续进行小立碗藓 *CADI* 基因敲除,验证小立碗藓 *CADI* 基因功能,进一步了解模式植物小立碗藓防卫反应机理研究奠定良好基础。

关键词:小立碗藓;*CADI* 基因;基因克隆;载体构建;酶切

中图分类号: Q782 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0059-05

苔藓植物是高等植物的低等类群,是陆生植物登陆早期的代表,含有一整套合成木质素的基因^[1],具备合成木质素的生理基础,但是苔藓植物能否合成木质素目前还存在一定的争议。小立碗藓(*Physcomitrella patens*)隶属葫芦藓目葫芦藓科(Funariaceae)小立碗藓属(*Physcomitrium*)。小立碗藓生活史中单倍体的配子体时期占优势,其整个基因序列已知,核基因组易于与有同源片段的外源 DNA 发生高频率的同源重组,这使得基因敲除成为可能,并且试验过程中得到的突变体即为纯合体,为基因功能的研究提供了良好的材料^[2],已经成为植物分子生物学研究的模式生物。

病原真菌和细菌感染维管束植物时,感染部位的细胞壁加厚并形成突起状结构——乳突。本试验室前期工作中发现灰霉菌感染非维管束植物小立碗藓后,小立碗藓细胞壁加厚或形成乳突结构。形成乳突是维管束植物常见的防卫反应,是限制病原体入侵的一道物理障碍,其主要成分之一为木质素,说明乳突是植物一个较为保守的抗病反应机制。木质素是一种复杂的酚类聚合物,广泛存在于高等植物中的维管束植物中^[3],苔藓植物中是否合成木质素目前还存在一定的争议。相关文献报道,苔藓植物不合成木质素,却合成木酯素或类木质素。用木质素的特异性染料高锰酸钾染色灰霉菌感染的小立碗藓样品并于电镜下观察发现,细胞壁加厚或乳突部位出现明显染色加深,说明小立碗藓在灰霉菌胁迫下可能合成了类木质素。木质素的生物合成是以苯丙酸起始,在一系列酶催化下逐步转化为木质素单体,最终聚合成木质素的过程,其中肉桂醇脱氢酶(CAD)是木质素代谢途径中第一个被

研究的酶,其催化木质素单体合成的最后一步反应,将 3 种肉桂醛还原生成相应的 3 种肉桂醇^[4]。本试验室前期使用 Real-Time PCR 表达分析表明,小立碗藓 *CADI* 基因在接种灰霉菌后的第 2 天表达量迅速上升,达到未接种对照组的 17 倍。综上所述,小立碗藓中可能合成了类木质素。

本试验构建小立碗藓 *CADI* 基因的敲除载体,为后续敲除小立碗藓 *CADI* 基因,获得 *CADI* 基因敲除突变株,验证小立碗藓 *CADI* 基因是否参与木质素的合成奠定基础,对揭示模式植物小立碗藓防卫反应机理有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

1.1.1 仪器 电子天平,美国 Denver Instrument MXX-612,TP-214;PCR 仪,美国 Bio-Rad Engine;电泳仪,美国 Bio-Rad A101439;凝胶成像系统,美国 Bio-Rad Engine;微量冷冻离心机,日本 3500;超净工作台,上海博迅 VS-840-2;微电脑光照培养箱,上海博迅 SPX-250B-G;101A-3 型电热鼓风干燥箱,上海市实验仪器总厂;YXQ-LS-75 S II 型立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司;HHS 型电热恒温水浴锅,上海博讯实业有限公司;十万分之一分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;TGL-16G 型离心机,上海安亭科学仪器厂;85-2A 恒温磁力搅拌器,金坛市科析仪器有限公司;精密酸度计,上海大普仪器有限公司。

1.1.2 试剂 引物,限制性核酸内切酶(*Xho* I、*Eco*R V、*Xba* I、*Bam*H I)、Premix *Taq*TM、T₄-DNA 连接酶、DNA Marker DL15000,大连宝生物工程有限公司;Plasmid Mini Kit I 试剂盒,OMEGA biotek 公司;Kanamycin;测序由上海生工完成;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 材料 小立碗藓(提取其 DNA,用于扩增 *CADI* 基因上、下游同源臂)、质粒 pTN182(5 006 bp,用于构建 CAD11-NPT II-CAD12 敲除载体)由首都师范大学提供,*E. coli*

收稿日期:2015-09-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:30860158、31260426)。

作者简介:赵春燕(1989—),女,山东济宁人,硕士研究生,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:1220982962@qq.com。

通信作者:姜 山,博士,教授,主要从事植物病理学研究。E-mail:kyosan200312@hotmail.com。

DH5α(用于外源基因的转化)由贵阳医学院提供。pTN182 质粒模式见图 1,该质粒含有 *NPT II* 基因,在大肠杆菌中表现

为抗卡那霉素,此外,该质粒含有 2 个多酶切位点,可将小立碗藓 *CAD1* 基因上、下游同源臂先后 2 次转入该质粒。

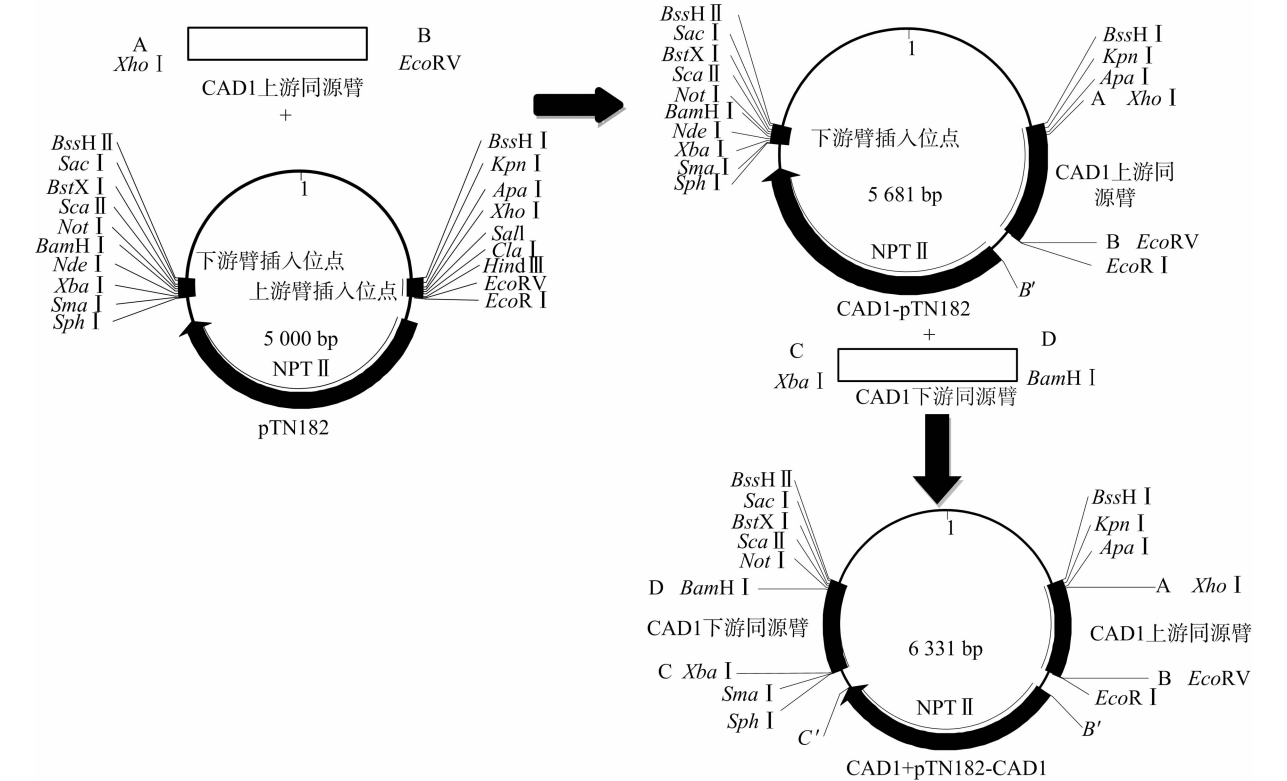


图1 重组质粒构建模式

1.2 方法

1.2.1 引物设计 (1)在 GenBank 中搜索出蓝桉树 *CAD1* 基因的蛋白质序列。(2)在 blast 中比对出相应的 mRNA 序列。(3)在 JGI Genome Portal(<http://genome.jgi-psf.org/>) 通过 mRNA 序列比对出小立碗藓 *CAD1* 基因的 DNA 序列(1 624 bp)。(4)将小立碗藓 *CAD1* 基因的 DNA 序列均分为上、下游片段。(5)根据小立碗藓 *CAD1* 上、下游片段的 DNA

序列使用引物设计软 Primer 5 - Cracked 分别设计 *CAD1* 基因上、下游片段的最佳引物与同源臂片段(上游同源臂 CAD11 - 681 bp,下游同源臂 CAD12 - 650 bp)。(6)在 DNAMAN 软件中根据比对的基因序列在引物前添加酶切位点。(7)根据 GC% 添加保护碱基。(8)大连宝生物工程有限公司合成引物^[5]。所合成的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

| 引物名称 | 引物序列 | 酶切位点 |
|---------------|---|----------------|
| 上游臂 CAD11 - F | 5' - ACA <u>CTCGAG</u> AGCGTCTTGCTGTTTGT - 3' | <i>Xho</i> I |
| 上游臂 CAD11 - R | 5' - CGC <u>GATATC</u> CAGGAAGTTCGGAGTTGTA - 3' | <i>EcoR</i> V |
| 下游臂 CAD12 - F | 5' - CGC <u>TCTAGAT</u> GCCAAATTCGGTGTCTGT - 3' | <i>Xba</i> I |
| 下游臂 CAD12 - R | 5' - ATA <u>GGATCCT</u> GAGGGTGTCACGCTCCA - 3' | <i>Bam</i> H I |

注:下划线部分为酶切位点碱基序列。

1.2.2 目的基因的获取 以改良的 CTAB 法提取的小立碗藓基因组 DNA 为模板^[6-7],以 CAD11 - F、CAD11 - R 为引物进行 PCR,扩增出 CAD1 上游同源臂 CAD11;以 CAD12 - F、CAD12 - R 为引物进行 PCR,扩增出 CAD1 下游同源臂 CAD12,反应体系见表 2。PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环,72 ℃终延伸 10 min,保存于 4 ℃。扩增出目的基因片段采用乙酸钠、乙醇洗脱法进行回收,溶于无菌去离子水中,置于 -20 ℃ 保存备用^[8-9]。

1.2.3 质粒的提取 将含有 pTN182 质粒的大肠杆菌置于 LB 固体培养基上 37 ℃活化培养 12~16 h,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中,37 ℃振荡过夜培养。将该培养基转移

| 表 2 PCR 反应体系 | |
|--------------|--------|
| 药品 | 体积(μL) |
| CAD11 - F | 1 |
| CAD11 - R | 1 |
| 小立碗藓基因组 DNA | 3 |
| Premix Taq™ | 25 |
| 无菌去离子水 | 20 |
| 总体积(μL) | 50 |

至 5 mL EP 管中,室温离心(12 000 r/min,1 min),去上清。采用 Plasmid Mini Kit I 试剂盒(按试剂盒说明)抽提 pTN182 质粒,将提取的质粒溶于无菌去离子水中保存于 4 ℃冰箱。

1.2.4 CAD1 - pTN182 克隆载体的构建 使用 *Xho* I、*EcoR* V 2 种酶,分别使用同步双酶切、分步酶切方法酶切 *CAD1* 上游目

的基因和 pTN182 原始质粒,经乙醇洗脱后使用 *EcoRV* 继续酶切,酶切体系为 2 μL 酶、4 μL 对应 buffer、12 μL 目的基因,使用无菌去离子水补齐至 40 μL ,酶切反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、3 h。取目的基因片段 9 μL 、质粒 3 μL 、连接液 12 μL 于 EP 管中混匀,封口膜密封 EP 管 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接^[10-15]。

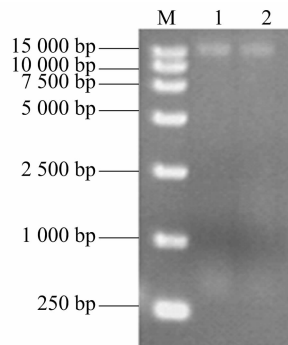
1.2.5 克隆载体的转化 采用 CaCl_2 方法制作感受态大肠杆菌^[16],保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。取 1 μL 过夜连接产物,加入到感受态大肠杆菌(感受态 12~24 h 转化效率最高),轻旋,冰浴 30 min,放入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅热激 90 s,立即冰浴 3 min,加入 LB 液体培养基 1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 h。取 800 μL 转化液于含有卡那霉素(10 mg/mL)的 LB 固体平板培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min,待菌液完全被吸收后倒置过夜培养。

1.2.6 转化菌株的鉴定 挑取长出的单菌落,转移到新的含卡那霉素的 LB 固体平板培养基上并编号做进一步筛选。(1)挑取第 2 次在含卡那霉素的 LB 固体培养基上长出的单菌落将于裂解液中 65 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 1.5 h,裂解产物用琼脂糖凝胶电泳与 pTN182 原始质粒对比验证。(2)将筛选出的菌落用 LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜培养,使用质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒,琼脂糖凝胶电泳与 pTN182 原始质粒对比验证,筛选出比原始质粒条带略高的菌落。(3)以筛选出的质粒为模板进行 PCR 验证,琼脂糖凝胶电泳验证是否可以得到目的条带。(4)用 *Xho*I、*Eco*R V 分步酶切验证。以插入了上游片段的 pTN182 重组质粒(CAD11-pTN182)为载体,采用插入上游臂方法构建插入下游片段的重组质粒(CAD11-pTN182-CAD12)。CAD1 敲除载体构建过程模式见图 1,以 CAD11-pTN182-CAD12 重组质粒为模板,使用 CAD11-F、CAD12-R 为引物 PCR 出总目的基因条带(CAD11-NPT II-CAD12),送至上海生工测序。

2 结果与分析

2.1 提取出的小立碗藓基因组 DNA 的检测

采用改良的 CTAB 法提取小立碗藓基因组 DNA,最后用 70% 的乙醇洗脱,溶于蒸馏水中于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。琼脂糖凝胶电泳验证提取出的 DNA。从图 2 可以看出,经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳可看出预期的 DNA 条带。



M—marker 15 000 bp; 1~2—小立碗藓基因组DNA

图2 小立碗藓基因组 DNA 电泳

2.2 PCR 扩增小立碗藓 *CAD1* 基因上、下游目的基因

使用设计好的引物,以提取的小立碗藓基因组 DNA 为模板,PCR 扩增同源臂基因片段出现了模糊的弥散条带(图 3),没有出现目的基因条带。将提取的小立碗藓基因组 DNA 用高盐 TE 溶液和无水乙醇沉淀,再用 70% 的乙醇洗脱 3 遍,以此 DNA 为模板进行 PCR 扩增,从图 4、图 5 可以看出,PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,可以获得 1 条清晰明亮的特异性条带,条带大小与引物设计时设计的上、下游同源臂长度 681、650 bp 相符。

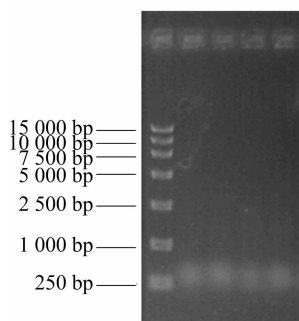


图3 CAD1上、下游基因 PCR 电泳

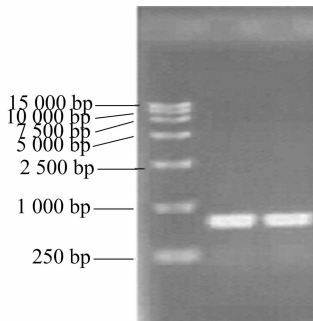


图4 CAD1上游基因 PCR 电泳

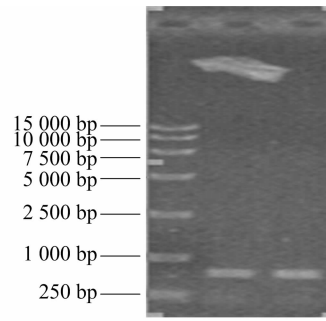
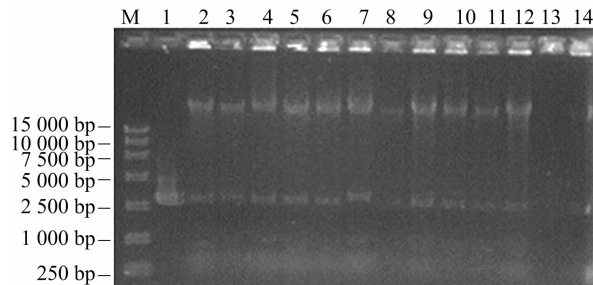


图5 CAD1下游基因 PCR 电泳

2.3 *CAD1* 上游同源臂插入结果鉴定

采用裂解液裂解转化的大肠杆菌进行验证。利用裂解液裂解转化后在含卡那霉素的 LB 固体平板培养基上生长的大肠杆菌,裂解产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,可以对比出比原始质粒条带高的为插入了上游片段的质粒,进而可以筛选出对应的插入了含上游同源臂质粒的大肠杆菌。从图 6 可以看出,第 7 道的质粒比原始质粒条带略高,第 7 道的质粒可能已经插入了 *CAD1* 上游臂。

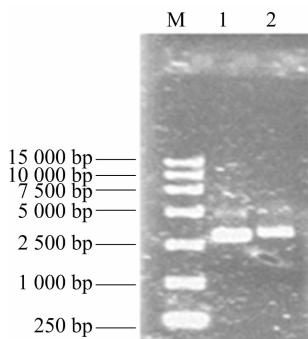
提取质粒验证。挑取上述第 7 道菌落于含卡那霉素的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜培养,用质粒 DNA 提取试剂盒抽提,提取出的质粒经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,与原始质粒对比,可以比对出可能插入了目的片段的菌落。从图 7 可以看出,第 7 道菌落提取出的质粒条带比原始质粒条带略高,表明



M—marker DL 15 000; 1—原始质粒;
1~14—转化CAD1上游臂的质粒

图6 裂解液裂解转化的 *CAD1* 上游臂基因电泳图

第 7 道大肠杆菌中提取出的质粒可能已插入了小立碗藓 *CAD1* 上游臂基因。



1—原始质粒; 2—第7道菌落

图7 提取的第7道的质粒电泳

质粒 PCR 验证。以上述 7 质粒为模板,进行 PCR 扩增,PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,获得预期上游目的基因条带则该质粒可能已经插入了 CAD1 上游臂。以图 6 中第 7 道菌提取的质粒为模板,以 CAD11 - F、CAD11 - R 作引物进行 PCR 验证,PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳验证,结果(图 8)表明,产生的 1 条特异性条带与预期上游臂片段 681 bp 相符。可能成功构建了 CAD11 - pTN182 重组质粒。

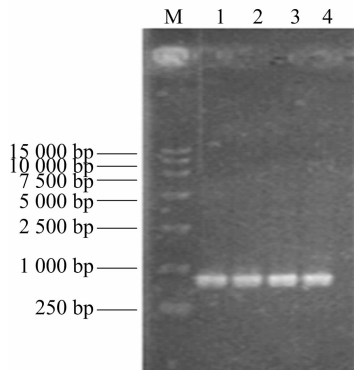


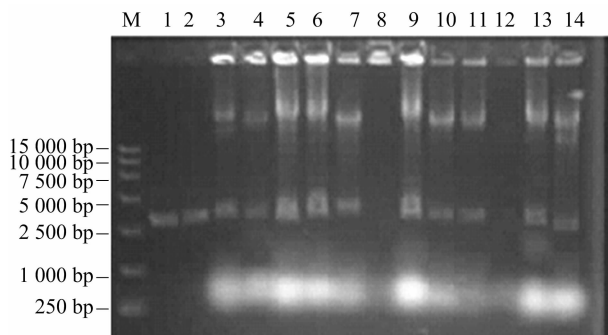
图8 插入上游的质粒PCR

2.4 CAD1 下游同源臂插入结果鉴定

CAD1 下游同源臂插入 CAD11 - pTN182 重组质粒即得 CAD11 - pTN182 - CAD12 重组质粒。验证方法同上。

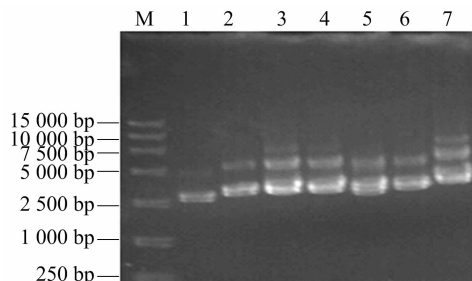
裂解法验证。由图 9 可知,第 3、4、6、7、9 道的质粒比 CAD11 - pTN182 重组质粒条带略高,有可能第 3、4、6、7、9 道的质粒已经插入了 CAD1 下游同源臂。

提取质粒验证。挑取第 3、4、6、7、9 道的菌落于含卡那霉素的 LB 液体培养基 37 °C 振荡过夜培养,进一步提取质粒验证。从图 10 可以看出,第 9 道菌落提取出的质粒条带比



M—marker DL 15 000 bp; 1—原始质粒; 2—CAD11-pTN182 重组质粒; 3~14—转化CAD1下游臂的质粒

图9 裂解液裂解转化的 CAD1 下游臂基因电泳



1—原始质粒; 2—CAD11-pTN182; 2~7 依次为第 3、4、6、7、9 菌提取出的质粒

图10 质粒电泳

CAD11 - pTN182 重组质粒条带略高,表明第 9 道大肠杆菌中提取出的质粒可能已插入了小立碗蕨 CAD1 下游臂。

质粒 PCR 验证。以图 7 中第 9 道菌提取的质粒为模板见图 11,以 CAD12 - F、CAD12 - R 作引物进行 PCR 验证,出来 1 条特异性条带,与预期下游臂片段 650 bp 相符。可能成功构建了 CAD11 - pTN182 - CAD12 重组质粒。

2.5 CAD11 - pTN182 - CAD12 重组质粒鉴定

质粒 PCR 验证。以第 9 道菌提取出的质粒为模板, CAD11 - F、CAD12 - R 为引物,PCR 出总目的基因条带(上游臂 681 bp,下游臂 650 bp, *NPTII* 基因约 2 000 bp,总目的基因条带约 3 300 bp)(图 12)。经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,可以看到 3 300 bp 左右的特异性条带,与预期的 3 300 bp 条带相符。

酶切验证。图 1 中构建好的 CAD11 - pTN182 - CAD12 重组质粒,AB(681 bp)为插入的 CAD1 上游臂,CD(650 bp)为插入的 CAD1 下游臂,B'C'(2 114 bp)为选择标记基因 *NPTII* 基因,BB'、CC'为酶切位点与 *NPTII* 基因连接片段。酶切

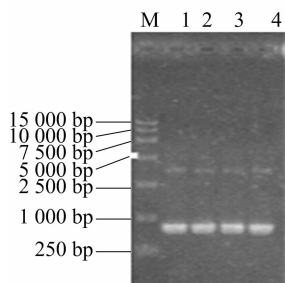


图11 质粒PCR

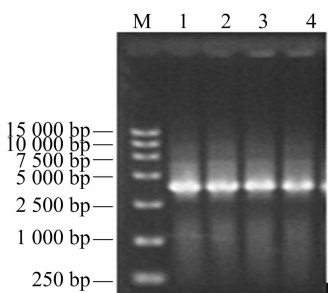
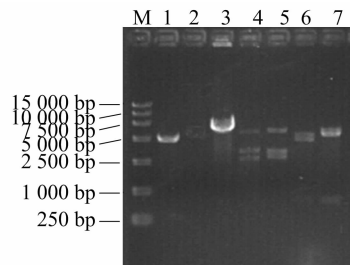


图12 PCR 扩增总目的基因条带



M—marker DL 15 000 bp; 1—单酶切原始质粒; 2—单酶切含上游臂质粒; 3—单酶切含上下游臂质粒; 4—AC; 5—AD; 6—AB; 7—CD

图13 酶切验证电泳

验证电泳见图 13, 单酶切原始质粒、CAD11 - pTN182 重组质粒、CAD11 - pTN182 - CAD12 重组质粒(1、2、3), 条带依次略高。用 *Xho* I、*Xba* I 酶切可能含有上下游片段的质粒(4), 可得到 2 条约为 2 700、3 700 bp 的条带。用 *Xho* I、*Bam* H I 酶切可能含有上下游臂的质粒(5)可得到 2 条约 3 000、3 300 bp 的条带。用 *Xho* I、*Eco* R V 酶切可能含有上游臂的质粒(6)可能含有上下游臂的质粒可得到 2 条约 681、5 000 bp 的条带。用 *Xba* I、*Bam* H I 酶切可能含有上下游臂的质粒(7)可得到 2 条约 650、5 700 bp 的条带。从图 13 可以看出, 酶切得到的条带与预期结果相符, 说明原始质粒中插入了 CAD1 上、下游同源臂。

测序验证。取 PCR 出的总目的基因拿到大连宝生物工程有限公司进行测序, 测序出来的结果用 DNAMAN 软件与设计的目的片段比对, 比对结果见图 14。比对结果显示 99.05% 互补配对, 可能在 BB'、CC' 接口处会出现一些小的误差, 测序结果表明, 插入了 CAD1 上下游同源臂, 敲除载体构建成功。

Upper line: DNAMAN4.seq, from 86 to 3640
Lower line: WH05050033-4(3)拼接结果, SEQ, from 21 to 3373
DNAMAN4.seq:WH05050033-4(3)拼接结果, SEQ identity= 99.05%(3346/3378)
gap=5.75%(206/3584)

图14 DNAMAN比对结果

3 讨论及结论

本试验将 *CAD1* 基因的上、下游同源臂分别插入到含 2 个多酶切位点的 pTN182 质粒。以改良的 CTAB 法提取的小立碗藓基因组 DNA 为模板, 使用引物设计软件设计的小立碗藓 *CAD1* 基因上、下游同源臂的引物, 利用 PCR 技术扩增出小立碗藓 *CAD1* 基因的上、下游同源臂。使用 *Xho* I、*Eco* R V 2 种酶, 酶切 CAD1 上游同源臂和 pTN182 原始质粒, T4DNA 连接酶过夜连接, 连接产物转化至感受态大肠杆菌, 用含卡那霉素的 LB 固体平板培养基筛选阳性株, 之后采用裂解液裂解、质粒 DNA 提取、质粒 PCR 以及酶切进行验证。下游同源臂的构建采用同样的方法, 最后进行测序分析。结果表明, 已成功构建了 *CAD1* 基因敲除载体。

本试验过程当中, 采用改良的 CTAB 方法提取小立碗藓基因组 DNA, 用 70% 乙醇洗脱 1 遍。以此 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 没有出现预期的 681、650 bp 目的基因条带, 而是在 300 bp 左右出现弥散带^[17]。改变 DNA 模板与引物的比例, 仍出现同样的弥散带。在试验过程中发现提取的 DNA 溶于水后, 该溶液略微发黄并有黏稠感, 分析可能是以下原因影响了后续 PCR 反应^[18]: (1) 提取的 DNA 的纯度不够, 其中可能含有蛋白质、多糖和酚类等杂质。(2) DNA 在溶解前可能有乙醇残留, 乙醇抑制后续反应。(3) 提取的 DNA 中可能有残留的金属离子。为排除以上因素, 将提取的小立碗藓基因组 DNA 用高盐 TE 溶液和无水乙醇沉淀, 于 -20℃ 沉淀 1 h 后离心, 再用 70% 的乙醇洗脱 3 遍, 从而去除混在 DNA 中的杂质, 于超净工作台吹风晾干, 让乙醇充分挥发(不要过分干燥, 以免 DNA 断裂)后再加水溶解 DNA。以此 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 可以得到目的基因。因此, 在提取 DNA 时, 应将蛋白质、多糖和酚类杂质洗脱完全, 以免影响后续反应。试验前期过程中采用

同步双酶切的方法酶切 CAD1 上游目的基因和 pTN182 原始质粒, 经连接、转化至大肠杆菌等过程, 一直未筛选出插入上游目的片段的阳性株, 后改用分步酶切的方法酶切, 成功筛选出插入目的基因的阳性株。说明同步双酶切没有分步酶切效率高。可能是由于每一种酶都有随酶提供的相应的最佳 buffer, 以保证 100% 的酶活性。buffer 的组成及内切酶在不同缓冲液中的活性不同。在设计引物时, 虽然选择了能在最大程度上保证 2 种酶活性的缓冲液, 但由于 2 种酶均在非最佳缓冲液条件下进行酶切, 其效率会降低, 从而影响后续的连接及转化效率。因此, 在同步双酶切不成功时, 可以考虑采用分步酶切的方法, 提高酶切效率, 为后续转化、筛选等过程奠定良好的基础。

参考文献:

- [1] Xu Z Y, Zhang D D, Hu J, et al. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom [J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10 (Suppl 11): S3.
- [2] 赵 旻, 赵晓刚, 何奕昆, 等. 植物分子生物学研究极具前景的模式系统——小立碗藓 [J]. 植物学通报, 2004, 21 (2): 129 - 138.
- [3] 蒋挺大. 木质素 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 7 - 9, 98.
- [4] Mansell R L, Gross C G, Stockigt J, et al. Purification and properties of cinnamyl alcohol dehydrogenase from higher plants involved in lignin biosynthesis [J]. Phytochemistry, 1974, 13: 2427 - 2435.
- [5] 张新宇, 高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧 [J]. 生物信息学, 2004, 2 (4): 15 - 18, 46.
- [6] 金东雁, 黎孟枫, 侯云德, 等. 分子克隆实验指导 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [7] Sambrook J, Russell D W, . Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2002.
- [8] 林万明. PCR 技术操作与应用指南 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1993.
- [9] 艾得希 H A. PCR 技术: DNA 扩增的原理与应用 [M]. 田 丁, 译. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991.
- [10] Gavit P, Better M. Production of antifungal recombinant peptides in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biotechnology, 2000, 79 (2): 127 - 136.
- [11] von Arnim A G, Deng X W, Stacey M G. Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants [J]. Gene, 1998, 221 (1): 35 - 43.
- [12] 李 晶, 朱延明, 李 杰. 转录因子 *DREB1A* 基因的克隆与植物表达载体的构建 [J]. 植物研究, 2004, 24 (2): 211 - 214.
- [13] 张 莉, 苏曼琳. 植物抗旱基因 HDG1 的克隆和表达载体的构建 [J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32 (6): 115 - 117.
- [14] Zhang Y, Wang X, Cheng C, et al. Molecular cloning and characterization of GhNPR1, a gene implicated in pathogen responses from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Bioscience Reports, 2008, 28 (1): 7 - 14.
- [15] 王 娟, 韩科厅, 戴思兰. 玉米 *LC* 基因植物表达载体构建及菊花转化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28 (2): 229 - 236.
- [16] 罗 婵, 汤刚彬, 谢体三, 等. 感受态细胞制备与保存方法的比较研究 [J]. 生物技术, 2005, 15 (1): 52 - 54.
- [17] 张维铭. 现代分子生物学实验手册 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2007: 219 - 229.
- [18] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法 [J]. 实验室研究与探索, 2009, 28 (9): 14 - 16.