



优化 TAIL-PCR 方法克隆棉花抗逆相关 转录因子编码基因

梁成真,张 锐,孙国清,孟志刚,周 焘,丁忠涛,郭三堆*

(中国农业科学院生物技术研究所 / 国家农作物基因资源与基因改良重大科学与工程,北京 100081)

摘要: ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子属于碱性亮氨酸类蛋白,在依赖 ABA 的逆境信号传导途径中起重要的作用。本研究结合该类转录因子的结构特点,利用 3' RACE 技术和优化的 TAIL-PCR 技术成功获得棉花中三个该家族成员编码基因。进一步验证结果表明两步 PCR 成功获得基因完整的 ORF,3' UTR 以及部分 5' UTR 序列。本研究所获基因为棉花抗逆基因工程提供了候选基因源,优化后的 TAIL-PCR 技术为克隆棉花中目的基因提供了一种简便高效的方法。

关键词: 棉花;ABF/AREB/ABI5/DPBF;转录因子;TAIL-PCR;抗逆相关基因

中图分类号: S562.035.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2010)03-0195-07

Cloning of Stress-related Transcription Factors Gene from Cotton by Optimized TAIL-PCR

LIANG Cheng-zhen, ZHANG Rui, SUN Guo-qing, MENG Zhi-gang, ZHOU Tao, DING Zhong-tao, GUO San-dui*

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China)

Abstract: ABF/AREB/ABI5/DPBF transcription factors belong to basic leucine zipper protein, this kind of transcription factors plays an important role in the signal transduction pathways of ABA-dependent abiotic stress. In this study, taking structure characteristics of ABF/AREB/ABI5/DPBF as the research object, we cloned three bZIP encoding genes by 3' RACE successfully from cotton and also optimized the TAIL-PCR conditions. The further experiment results showed that we had got the integrated sequences of the ORF, 3' UTR, as well as part of 5' UTR sequence. The genes we cloned will provide candidate genes for resistance genetic engineering of cotton. Furthermore, the optimized methodology of TAIL-PCR will provide an easy and efficient technology for cloning of target genes.

Key words: cotton; ABF/AREB/ABI5/DPBF; transcription factor; TAIL-PCR; stress-related genes

ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子属于 bZIP 类蛋白,该类转录因子 C 端包含一个高度保守的碱性亮氨酸拉链结构,N 端含有三个保守的结构域^[1-4]。研究发现该类蛋白能够特异结合 ABRE (pyACGTGGC,ABA responsive element) 基序,在依赖 ABA 的逆境信号传导过程中扮演着重要的角色^[5-6]。干旱、高盐等逆境条件将诱导植物体内 ABA 的生物合成和积累,激活 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子与 ABRE 相

结合^[7],从而调节下游大量抗旱、耐盐碱等相关功能基因的表达^[8],提高植物抵御非生物逆境的能力^[9-13]。

随着 GenBank 数据库的不断积累及生物信息学的快速发展,越来越多的蛋白得到了聚类,为同源克隆提供了重要的信息源。然而同一聚类的蛋白往往只有有限的区域是保守的,仅仅依靠同源克隆很难获得基因的全长。在利用同源克隆或 EST 库轻松获得目的基因的部分编码序列后,

收稿日期:2009-05-31

作者简介:梁成真(1983-),男,硕士研究生,liang1983tian@163.com;* 通讯作者,gsdui@mail.caas.net.cn

基金项目:农业部国家转基因重大专项:“转基因抗旱耐盐碱棉花新品种培育”,2008ZX005-004

如何快速分离到全长基因,尤其是 ORF(Open reading frame)序列,是基因功能研究中首要解决的问题。目前,用于分离基因 cDNA 序列最常见的方法是通过 5' RACE 获得基因的 5' 端完整序列和 3' RACE 获得基因的 3' 端完整序列,由于基因 3' 端具有保守的 Ploy(A)结构,3' RACE 通过合成 Olig(dT)引物进行 RT-PCR 可以快速获得基因的 3' 端完整序列。5' RACE 在基因克隆中得到广泛的应用,然而其操作步骤复杂,对 mRNA 的纯度要求高、总量需求大,因此费时费力;而且 mRNA 在实验过程中容易降解,增加了操作的难度;另外,一般的实验室都难以满足 5' RACE 中所需要的试剂要求,因此需要购买价格昂贵的 5' RACEK Kit 来完成实验,极大地增加了实验成本。热不对称交错 PCR(Thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)技术^[14]因快速、简单、高效等优点而备受研究者所青睐,目前为止已有大量成功的报道^[15-18],本文利用改良的 TAIL-PCR 取代 5' RACE 技术首次从棉花 cDNA 中快速分离到基因的 5' 端核苷酸序列,并详细地阐述 TAIL-PCR 的优化设计及其在棉花 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子编码基因克隆中的应用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料。棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品系 Y18R 种于大田,采集干旱处理的幼叶,立即冻存于液氮中备用。

1.1.2 菌株与质粒。*E.coli* DH5 α 由本实验室保藏;克隆载体 PMD19-T 购买自 TaKaRa 生物公司。

1.1.3 酶和试剂。LA Taq 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司;反转录试剂盒、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;各种限制性内切酶购自 MBI 公司,引物合成在上海生工生物工程公司。

1.2 实验方法

1.2.1 棉花基因组 DNA 提取。逆境处理的棉花幼嫩叶片基因组 DNA 提取采用改良的 CTAB 法,详见参考文献[6]。

1.2.2 棉花总 RNA 的提取及 cDNA 制备。棉花总 RNA 提取采用热硼酸/蛋白酶 K 法^[19];cDNA

第一链的合成按照 Promega 公司的反转录试剂盒进行。

1.2.3 RACE 方法克隆棉花 bZIP 类转录因子 3' 端 cDNA 序列及筛选。按 Clontech Smart RACE 试剂盒说明操作,采用 50 μ L 体系。循环参数为:94 $^{\circ}$ C 30 s,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,40 个循环,72 $^{\circ}$ C 4 min。将 3' RACE 所获得的扩增结果提交到 GenBank 中进行 BLAST 及 BLASTx,筛选出候选片段进行下一步染色体步移。

1.2.4 TAIL-PCR 方法克隆 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子编码基因 5' 端 cDNA 序列。根据已获得的 3' 端 cDNA 序列,设计 3 个反向的特异巢式引物 sp1、sp2、sp3,同时,根据文献等报道^[15-17]设计 11 条随机引物 AD1~AD11(表 1),分别以棉花基因组 DNA 和 cDNA 做模板进行 TAIL-PCR 扩增,反应条件见表 2,1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.2.5 TAIL-PCR 扩增产物鉴定及筛选。回收 TAIL-PCR 第二轮或第三轮 PCR 产物,与 T 载体 PMD19-T 连接后热激转化 *E.coli* DH 5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,将 PCR 和酶切鉴定正确的菌株进行测序。测序结果利用 Conting express、VectorIII 等生物软件进行分析,选取 3' 端与已知片段具有完全相同重叠区域的候选片段进行拼接,根据所获得的核苷酸序列继续向前步移,直到获得完整的基因序列。

2 结果与分析

2.1 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子结构分析及 3' RACE 简并引物设计

ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子家族成员 N 端一般包含 3 个保守的结构域 C1、C2、C3,其长度依次约为 40、25、35 个氨基酸残基,相似性依次为:31%~79%、64%~86%、95%~100%,其中高度一致连续片段长度依次约为 15、18、19 个氨基酸残基;C 端有一个保守的 bZIP 结构域,由约 80 个氨基酸残基组成,包括碱性区和亮氨酸拉链区。分析发现:碱性区含有一个约 37 个氨基酸残基的连续高度保守的区域,其序列为:
* EKV * ERRQRRMIKNRESAARSARKQAYT
* ELEAE * ,且这一高度保守的序列区靠近

表 1 本文涉及引物

Table 1 Primers used in this paper

Primer name	Primer No.	Primer sequence
AD Primers	AD Primer 1	5'-NTCGASTWTSWGTT-3'
	AD Primer 2	5'-NGTCGASWGANAWGAA-3'
	AD Primer 3	5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'
	AD Primer 4	5'-TGWGNAGWANCASAGA-3'
	AD Primer 5	5'-AGWGNAGWANCAWAGG-3'
	AD Primer 6	5'-CAWCGICNGAIASGA-3'
	AD Primer 7	5'-TCSTICGNACITWGGA-3'
	AD Primer 8	5'-STTGNTASTNCTNTGC-3'
	AD Primer 9	5'-WCAGNTGWTNGTNTCG-3'
	AD Primer 10	5'-TCTTICGNACITNGGA-3'
	AD Primer 11	5'-TTGIAGNACIANAGG-3'
RACE Primers	AMV Adaptor	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
	RACE rv1	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'
	RACE rv2	5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'
ORF Primers	GFORFfp	5'-ATGGGGTCTAATCTGAATTT-3'
	GFORFrv	5'-ATGGTGGTTGAGAACTCTGA-3'
Note		S:C or G;W:A or T;N:A or C or G or T

表 2 TAIL-PCR 反应条件

Table 2 Cycling conditions used for TAIL-PCR

Reaction File	No	Thermal cycling condition	Cycle No.
Primary	1	94°C 5 min, 95°C 10 min	1
	2	95°C 15 s, 61°C 15 s, 72°C 30 s	5
	3	95°C 15 s, 25°C 3 min, ramping to 72°C over 3min, 72°C 2 min	1
	4	95°C 15 s, 44°C 15 s, 72°C 30 s	3
	5	95°C 10 s, 61°C 15 s, 72°C 2 min	
		95°C 10 s, 61°C 15 s, 72°C 2 min	12
		95°C 10 s, 44°C 15 s, 72°C 2 min	
Secondary	6	72°C 10 min	
	7	95°C 10 s, 63°C 15 s, 72°C 2 min	
		95°C 10 s, 63°C 15 s, 72°C 2 min	15
Tertiary		95°C 10 s, 44°C 15 s, 72°C 2 min	
	6	72°C 10 min	1
	8	95°C 10 s, 65°C 15 s, 72°C 2 min	
		95°C 10 s, 65°C 15 s, 72°C 2 min	15
		95°C 10 s, 44°C 15 s, 72°C 2 min	
	6	72°C 10 min	1

ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子的 C 末端, 因此该区域是简并引物设计的最佳选择 (图 1)。结合棉花密码子偏爱性的特点, 根据高度保守的碱性区域设计两条巢式简并引物 bZIPfp1 和 bZIPfp2:

bZIPfp1:5' -AWGATHAARAAYMGVGAR-

TCHGCDGCDMGDTCHMGVGC-3';

ZIPfp2:5' -GARTCHGCDGCDMGDTCHM-GVGCHMGVARRCARGCWYAH-3'。

(M:AorC;K:GorT;W:AorT;R:AorG;Y:CorT;S:CorG;D:AorGorT;H:AorCorT;N:AorCorGorT)

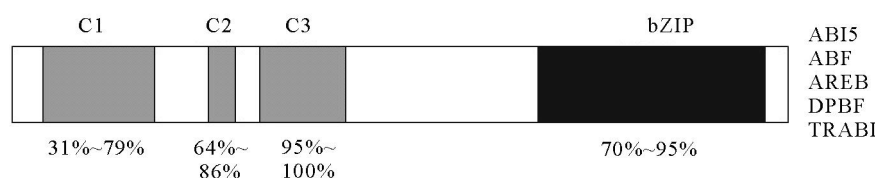


图1 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子结构特点 (Ruth R,2002)

Fig.1 Structural characteristics of ABF/AREB/ABI5/DPBF transcription factors(Ruth R,2002)

2.2 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子编码基因 3'端 cDNA 序列扩增及筛选

本实验参考 TaKaRa 生物公司 3'-Full RACE 原理,自行设计反转录引物 AMV Adaptor(表 1),利用 AMV Adaptor 作为反转录引物进行 cDNA 第一链的合成。由于植物体内存在庞大的 bZIP 类转录因子,为尽可能减少非特异扩增的影响,使用上游外侧的巢式简并引物 bZIPfp1、bZIPfp2 和根据 AMV Adaptor 设计的 RACE 巢式引物 RACerv1、RACerv2 进行嵌套式 PCR 扩增,以反转录 cDNA 做模板,通过巢式 PCR 扩增共获得棉花中 13 个阳性克隆(图 2 为部分扩增结果),将这些片段回收后与 T 载体 PMD19-T 连接,对

PCR 和酶切鉴定正确的重组质粒进行测序。测序结果可归为两类:含有 Ploy(A)结构的序列和不含 Ploy(A)结构的序列。对于不含 Ploy(A)结构的序列一般认为是简并引物自身的非特异扩增,可直接排除掉;含有 Ploy(A)结构的序列提交到 GenBank 库中进行 BLAST 及 pBLAST,根据比对结果筛选出目的克隆。本实验从获得的 13 个克隆中分离到 3 个属于 ABF/ AREB/ABI5/DPBF 家族的编码基因片段。本文选择白色箭头标出的片段为例进行后面的阐述,经分析标记片段和拟南芥中已报道的 ABF3/DPBF5 相似性最高,因此将其命名为 *GhABF3*(尚未发表)。

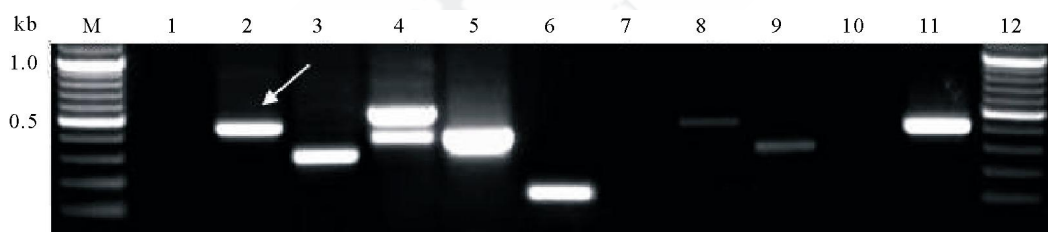


图2 3' RACE 巢式 PCR 扩增结果

Fig.2 Amplification results of 3' RACE-nested PCR

2.3 TAIL-PCR 随机引物筛选及特异引物设计

TAIL-PCR 成功的关键在于随机引物的选择及特异引物的设计,为了保证 TAIL-PCR 在棉花 cDNA 扩增中具有较高的特异性和成功率,本文对引物的选择及设计做了如下两点改进:

2.3.1 随机引物筛选。利用目前已报道的 11 条 TAIL-PCR 随机引物 AD1~AD11(表 1)与棉花中特异引物进行组合扩增,通过比较分析筛选获得 4 条棉花中扩增效果较为理想的随机引物:AD1、AD2、AD10、AD11,其中 AD10 和 AD11 在棉花 cDNA 扩增中的效果优于其他随机引物(图 3 为随机引物 AD1、AD2、AD10、AD11 在棉花 cDNA 中的扩增结果图)。推测其原因是 AD10 和 AD11 两条随机引物长度较短且简并性较高,因此结合

位点较多且退火温度较低,在利用 TAIL-PCR 超级循环程序进行扩增时,较多的结合位点保证了相对较短的 cDNA 做模板时的结合率,较低的退火温度极大地减少了随机引物自身的非特异扩增,从而提高了扩增成功率。

2.3.2 特异引物设计。特异引物设计基本遵循一般 PCR 引物设计原则^[20],为了提高 TAIL-PCR 扩增的特异性,本实验进行了两处重要改进:①三条特异引物退火温度均高于 60℃,低于 72℃,且三条特异引物 sp1、sp2、sp3 退火温度依次升高,使第一轮及第二轮 TAIL-PCR 中的非特异扩增片段得不到进一步有效扩增,提高终产物扩增的特异性;②特异引物 3' 末端 5~10 个碱基中适当提高 G、C 含量,尤其是 3' 末端 5 个碱基设计时

不要出现二联体或三联体的 A 或 T,同时增加 G 或 C 碱基的个数(最好 ≥ 3 个),这样可以很大程度地减少特异引物的自身非特异扩增。以 *GhABF3* 基因克隆为例,根据 2.2 中所获得核苷酸序列信息,设计三条反向嵌套的 TAIL-PCR 特异引物 GFSP1、GFSP2、GFSP3,序列如下:GFSP1: 5'-ACCACTCTGCAGGCCACTAGACCTG-3'; GFSP2: 5'-GCTGTTGTCTCTGCTGTGAATGTGAGTG-3'; GFSP3: 5'-CACCAACCGGTGTGCA TATCTTCCCTCAC-3'。GFSP1、GFSP2、GFSP3 的

退火温度依次为 63℃、66℃、68℃,GFSP1 和 GFSP2、GFSP2 和 GFSP3 引物间序列间隔依次为 168 bp、90 bp,与随机引物 AD10 配对 TAIL-PCR 扩增,结果如图 3 所示(Line8、Line9、Line10),从扩增片段 2、3、4 可以看出,第一轮和第二轮、第二轮和第三轮扩增产物之间的大小差异与特异引物 GFSP1 和 GFSP2、GFSP2 和 GFSP3 之间的序列间隔基本一致,经测序分析扩增片段 3 来自于 2,扩增片段 4 来自于 3,因此,经过三轮 TAIL-PCR 扩增获得了一致的结果。

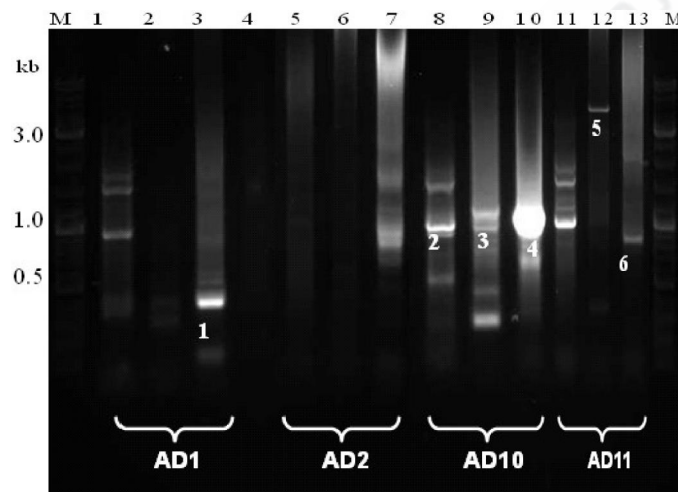


图 3 *GhABF3* 基因 5' 端 TAIL-PCR 电泳分析

Fig.3 Electrophoresis analysis of TAIL-PCR amplified products

2.4 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子编码基因 5' 端 cDNA 序列 TAIL-PCR 分离及筛选

GhABF3 基因 5' 端 TAIL-PCR 共回收 4 个特异扩增片段(图 3 中 1、4、5、6),测序结果分析发现 1、4 和 6 三个片段之间除了有个别的碱基差异外其他序列基本一致,而且三个片段的 3' 端序列与已知的基因片段完全一致,说明随机引物 AD1、AD10、AD11 参与的扩增获得了目的结果,即 *GhABF3* 基因的 5' 端序列部分。这三个基因之间个别碱基的差异可能是测序误差或 PCR 过程中碱基突变所致,通过后期验证可以将这一问题解决。因此,改良后的 TAIL-PCR 技术可以很好地从棉花 cDNA 中克隆 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类蛋白编码基因。在 1% 的琼脂糖凝胶上各取适量 TAIL-PCR 第一轮、第二轮及第三轮扩增产物电泳,回收与理论相符的第二轮及第三轮 TAIL-PCR 扩增片段,即第一轮和第二轮、

第二轮和第三轮扩增产物之间的大小差距与特异引物 sp1 和 sp2、sp2 和 sp3 之间的大小差别相当的扩增产物,回收产物与 T 载体 pMD19-T 连接,对 PCR 及酶切鉴定正确的重组质粒进行测序,利用 Conting express、VectorIII 等生物软件对测序结果进行分析,筛选获得目的基因扩增片段。对于序列较大的基因,一次 TAIL-PCR 不一定能够获得完整的基因序列,因此需要以新获得的核苷酸序列为基础,继续向 5' 端进行步移,直到获得基因 5' UTR 区的序列。

2.5 所获基因 cDNA 序列的验证

ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子家族成员之间存在保守的结构域,因此,对通过改良 TAIL-PCR 及 3' RACE 技术两步法获得的全长基因编码序列进行验证是非常必要的。利用生物信息学预测拼接后的 *GhABF3* 基因转译起始位点及终止位点,并依据起始及终止端序列设计引

物 GFORFfp 和 GFORFrv, 分别以棉花基因组 DNA 及 cDNA 为模板进行 PCR 扩增(图 4)。在棉花基因组及 cDNA 中均扩增出单一的目的条带,且 cDNA 中获得的扩增结果与理论预测值大小一致,表明 TAIL-PCR 获得的 5' 端核苷酸序列

与 3' RACE 获得的 3' 端核苷酸序列来自同一个编码基因。经回收、克隆、测序,结果与两步法获得的 cDNA 拼接序列完全一致,说明本实验成功获得了 GhABF3 基因完整 ORF 序列、3'UTR 序列及部分 5' UTR 序列。

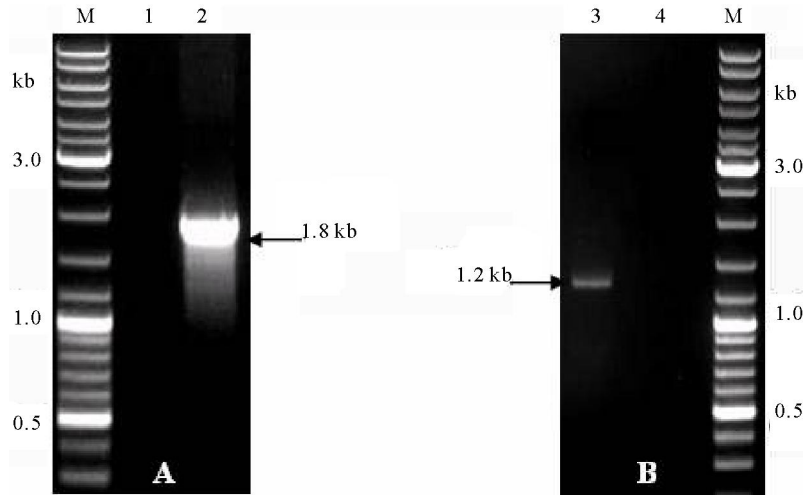


图 4 A:GhABF3 基因 ORF 以基因组做模板扩增结果;B:GhABF3 基因 ORF 以 cDNA 做模板扩增结果

Fig.4 A:Electrophoresis analysis of GhABF3 Gene ORF from Genome chromosome;
B:Electrophoresis analysis of GhABF3 Gene ORF from cDNA

3 讨论

当前,尽管有很多物种已经完成了基因组测序,如人、小鼠、线虫、水稻、拟南芥等,可以从数据库中轻松地找到已知片段的侧翼序列,然后通过 RT-PCR 获得基因的 cDNA 序列,但是,自然界中绝大多数生物基因组 DNA 序列仍然未知,如何利用 EST(Expression Sequence Tag)或同源克隆片段快速简单地分离基因的 cDNA 序列尤其是 ORF 序列,仍是研究基因功能的关键步骤。真核生物中除了 degraded mRNA、rRNA、tRNA 外,其它 mRNA 的 3' 末端均含有固定的 Poly(A)结构,利用这一结构特点,可以通过 3' RACE 技术分离获得基因的 3' 端序列。目前,5' 端序列分离的主要方法是 5' RACE,该方法能够获得基因的全长 cDNA 序列,而且特异性较好,灵敏度较高,在很多实验室中都取得了成功。然而该方法操作步骤复杂,需要进行如下操作:(1) 去掉 Total RNA 中 5' 裸露的磷酸基团;(2) 去掉 mRNA 的 5' 帽子结构;(3) 连接 5' RACE Adaptor;(4) 反转录合成 cDNA;(5) 基因克隆。其中,1~3 步骤均是在 RNA 水平的操作,步骤繁琐、耗时较

长,而 mRNA 又极易降解,因此对操作者的要求极高;5' RACE 对 Total RNA 需求的量较大、纯度较高,一般需要高纯度的总 mRNA 的量为 2~5 μg ,尽管如此,对于丰度较低的基因仍很难分离;并且,5' RACE 技术需要的试剂多、纯度要求高,目前几乎所有实验室均是利用公司购买的 5' RACE 试剂盒进行基因的克隆,极大地增加了实验成本。本实验采用改良的 TAIL-PCR 法取代 5' RACE 方法分离基因的 5' 端序列,为全长基因克隆提供了一种新选择。改良后的 TAIL-PCR 技术很大程度地弥补了原 TAIL-PCR 技术非特异扩增高、成功率低的缺陷,通过随机引物的筛选及特异引物设计的改进,极大地提高了 TAIL 超级循环中特异扩增的效率,操作简单,3 轮超级循环在一天内就可完成,而且模板需求量仅为 20~200 ng,因此省时省力、快速高效。改良后的 TAIL-PCR 技术对试剂、仪器等的要求相对较低,一般实验室均可满足要求,因此是进行全长基因克隆的理想选择,具有较广泛的应用空间。

干旱、高盐等非生物胁迫是棉花产量和品质的重要限制因子,严重地限制了我国棉花产业的稳步发展。本文利用 3' RACE 及改良 TAIL-PCR

结合的方法从棉花 cDNA 中克隆获得了 3 个 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子编码基因,对其它物种的研究发现 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类蛋白在响应干旱、高盐等外界环境胁迫的信号传导过程中起着重要的作用^[4,6,13-14,21]。因此,利用转录因子来改良棉花的抗逆性,将能够获得较为理想的综合效果,而本文中分离获得的 ABF/AREB/ABI5/DPBF 类转录因子编码基因为开展棉花抗逆基因工程提供了优良的候选基因源。

参考文献:

- [1] JAKOBY M, Weisshaar B, Droge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7: 106-111.
- [2] CHOI H, Hong J, Ha J, et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 1723-1730.
- [3] CHOI H in, Park H J, Park J H, et al. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity[J]. Plant Physiol, 2005, 139: 1750-1761.
- [4] YASUNARI F, Mi K F, Rie S, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2005, 17: 3470-3488.
- [5] LIU Y G, Robert F W. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragment from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. Genomics, 1995, 25: 674-681.
- [6] HUANG J, Ge X, Sun M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA [J]. Biotechnology, 2000, 28: 432-434.
- [7] NARUSAKA Y, Nakashima K, Shinwari Z K, et al. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses[J]. Plant J, 2003, 34: 137-148.
- [8] NIJHAWAN A, Jain, Tyagi A K, et al. A genomic survey and gene expression analysis of basic leucine zipper (bZIP) transcription factor family in rice[J]. Plant Physiol, 2008, 146(2): 333-350.
- [9] OH S J, Song S I, Kim Y S, et al. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth[J]. Plant Physiol, 2005, 138: 341-351.
- [10] SEHLOGL P S, Nogueira F T, Drummond R, et al. Identification of new ABA- and MEJA-activated sugarcane bZIP genes by data mining in the SUCEST database[J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 335-345.
- [11] ZOU M, Guan Y, Ren H, et al. Characterization of alternative splicing products of bZIP transcription factors OsABI5[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 360: 307-313.
- [12] ZHOU Qing, Wu Hong-ye, Wu Xiao-xuan, et al. Tetragonal distortions of some tetragonal Cr³⁺ centers in fluoroperovskite ABF3 crystals[J]. Spectrochim Acta A: Mol Biomol Spectrosc, 2006, 64: 945-948.
- [13] MARY E G, Tim L, Julian P, et al. A small plant-specific protein family of ABI five binding protein (AFPs) regulates stress response in germinating *Arabidopsis* seeds and seedling[J]. Plant Mol Biol, 2008, 67: 643-658.
- [14] KIM S, Kang J Y, Cho D I, et al. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its over-expression affects multiple stress tolerance[J]. Plant J, 2004, 40: 75-87.
- [15] 许锋, 称水源, 王燕, 等. TAIL-PCR 方法快速克隆银杏查尔酮合成酶基因及序列分析[J]. 果树学报, 2007, 24(2): 237-243. XU Feng, Cheng Shui-yuan, Wang Yan, et al. Efficient amplification and sequence analysis of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba* by thermal asymmetric interlaced PCR[J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(2): 237-243.
- [16] 应革, 武威, 何朝族. TAIL-PCR 方法快速分离 Xcc 致病相关基因序列[J]. 生物工程学报, 2002, 28(2): 182-186. YING Ge, Wu Wei, He Chao-zu. Cloning of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathogenicity related gene sequences by TAIL-PCR[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2002, 28(2): 182-186.
- [17] 刘召华, 郭洪年, 郑光宇, 等. ACA 基因启动子的克隆及功能初探[J]. 生物工程学报, 2005, 21(1): 139-143. LIU Zhao-hua, Guo Hong-nian, Zheng Guang-yu, et al. Cloning of ACA gene promoter and preliminary study of its function[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(1): 139-143.
- [18] CALKHOVEN C F, Ab G. Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity[J]. Biochem J, 1996, 317: 329-342.
- [19] WAN C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Analytical Biochemistry, 1994, 223: 7-12.
- [20] 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): 15-19. ZHANG Xin-yu, Gao Yan-ning. To design PCR primers with Oligo 6 and Primer Premier 5[J]. China Journal of Bioinformatics, 2004, 2(4): 15-19.
- [21] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salinity stress[J]. Plant Cell, 1994, 6: 251-264. ●