

箬竹 *CBF1* 基因的原核表达和多克隆抗体的制备

肖 艳¹, 林 华², 杨丽娟¹, 陈世界², 熊泽平³, 陈其兵^{1,*}

(¹四川农业大学风景园林学院, 成都 611130; ²四川出入境检验检疫局技术中心, 成都 610041; ³望江楼公园, 成都 610021)

摘 要: 以箬竹 (*Qiongzhusa tumidinoda* Hsueh et Yi) 叶片为试材, 采用 RT-PCR 方法克隆其 *CBF1* 基因, 并将 *CBF1* 连接到原核表达载体 pET32a (+) 上, 经克隆测序确定所构建的重组载体 pET32-QZ 开放阅读框正确。将重组载体 pET32-QZ 转化大肠杆菌 Rosetta2 (DE3) 菌株, 经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色, 证明 CBF1 蛋白得到了高效表达, 所表达蛋白是大小约为 45 kD 的融合蛋白。经镍柱纯化后作为抗原免疫家兔, 制备 CBF1 蛋白特异性抗血清。所制备的多克隆抗体能够与融合蛋白和经冷诱导的箬竹叶片总蛋白在 25 kD 处出现杂交条带。上述结果表明, 表达的目的蛋白可用于免疫组织化学、蛋白质印迹检测。

关键词: 箬竹; *CBF1*; 原核表达; 抗血清制备

中图分类号: S 687

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 02-0375-07

Prokaryotic Expression of *Qiongzhusa tumidinoda CBF1* Gene and Preparation of Its Polyclonal Antibody

XIAO Yan¹, LIN Hua², YANG Li-juan¹, CHEN Shi-jie², XIONG Ze-ping³, and CHEN Qi-bing^{1,*}

(¹College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ²Technology Center, Sichuan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Chengdu 610041, China; ³Wangjianglou Park, Chengdu 610021, China)

Abstract: C-repeat binding factor 1 gene (*CBF1*) was amplified by RT-PCR from *Qiongzhusa tumidinoda* Hsueh leaves and cloned into prokaryotic expression vector pET32a (+). After identification by enzyme digestion and sequencing, the expression of recombinant plasmid carried *CBF1* gene was transformed into Rosetta2 (DE3) *E. coli*. Through induced with IPTG, the expression of recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE. The results showed that the protein was highly expression in *E. coli*, and the molecular weight of the recombinant protein was 45 kD. After purification with Ni²⁺-NTA affinity chromatography, the immune reactivity of recombinant CBF1 protein was identified with positive antiserum against nature CBF1 protein specifically by Western-blotting analysis. Antibodies against recombinant CBF1 protein was obtained by subcutaneous injection of rabbit with purified CBF1 recombinant protein, which is specific to the total protein of *Qiongzhusa tumidinoda* Hsueh leaves induced by low temperature. Our results indicate that the recombinant protein can be used for immunohistochemistry and western blot detection.

收稿日期: 2013-09-06; 修回日期: 2013-12-20

基金项目: 四川省科技厅产学研创新联盟合作项目 (2012ZZ0037)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: cqbsicau.edu.cn)

Key words: *Qiongzhusua tumidinoda* Hsueh; *CBF1*; prokaryotic expression; antiserum preparation

低温作为一种重要的环境胁迫因子,很大程度上影响着植物的生长发育和分布范围。一旦低温超过植物本身的耐受范围,就会扰乱植物正常的生理代谢过程,影响营养生长和生殖生长(Nordborg et al., 1999),严重时甚至会引起植株的死亡(郭子武 等, 2004)。为了更好地适应环境,求得生存,植物经过长期的进化,形成了一系列应对低温的抗逆机制。

箬竹(*Qiongzhusua tumidinoda* Hsueh et Yi)为禾本科(Poaceae)竹亚科(Bambusoideae)箬竹属植物,单轴散生,是被列入《中国珍稀濒危保护植物目录》中仅有的两个二类保护竹种之一(傅立国和金鉴明, 1992),具有很高的生态、经济和观赏价值。箬竹为中国西南地区特有竹种,原产四川,现主要分布于云南和四川高海拔中山湿性常绿阔叶林地区,资源量稀少,引种也一直未收到显著成效(袁金玲 等, 2009)。箬竹抗寒力强,能耐短时 - 20 ℃ 的绝对低温,是进行竹类抗寒性研究的宝贵资源,具有重要的科研价值。目前关于箬竹的研究多集中于资源调查、引种育苗、种群遗传多样性分析等方面(茹广欣 等, 2010),对于抗寒性研究尚未见报道。

CBF 转录激活因子属于 AP2/EREBP 类转录因子,是一个包含 *CBF1*、*CBF2*、*CBF3*、*CBF4* 的基因家族,这些基因在增强植物抗寒性上发挥着很大的作用(Xin et al., 2007; 张丽丽 等, 2008)。CBF 转录因子能够识别 CRT/DRE 元件,并能通过 AP2/EREBP 结合域与 CRT/DRE 顺式作用元件特异结合,从而激活 *COR* 等一系列含有 CRT/DRE 元件的抗逆基因的表达。在诱导 *COR* 基因表达前,*CBF* 基因会在感受冷信号后,先于 *COR* 基因进行表达,进而再诱导 *COR* 的表达。本试验中克隆了箬竹 *CBF1* 全长基因序列,构建原核表达载体,在大肠杆菌中诱导表达,并利用纯化的重组蛋白制备箬竹 *CBF1* 蛋白的多克隆抗体,为进一步分析箬竹 *CBF1* 基因的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料试剂

试验于 2012 年 3 月至 2013 年 6 月在四川出入境检验检疫局技术中心动植检实验室进行。3 年生箬竹(*Qiongzhusua tumidinoda* Hsueh et Yi)叶片,采自成都望江楼公园。质粒 pET32a (+)、*E. coli* Rosetta2 (DE3)、*E. coli* DH5α 为本实验室保存。2.5 kg 长耳大白兔购于四川大学动物实验中心。

pMD19-T simple 载体、LA DNA *Taq* 聚合酶、DNA 分子量标准购自 TaKaRa 公司;限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶购自英国 NEB 公司;胶回收试剂盒 *E. z. N. A.* Gel Extraction Kit 和质粒小提试剂盒 Plasmid Mini Kit 购自 OMEGA 公司;N2 - 十二烷基肌氨酸钠(SKL)、DTT、β - 巯基乙醇和牛血清白蛋白(BSA)购自北京天根生化科技有限公司;Ni-NTA 购自北京索来宝公司;碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG 购买自美国 EarthOx 公司;弗氏佐剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司;氧化型谷胱甘肽及还原型谷胱甘肽购买自 Sigma 公司。其余试剂药品均为国产 AR 分析纯。

1.2 箬竹 *CBF1* 基因的扩增

根据本实验室克隆得到的箬竹 *CBF1* 基因序列(GenBank 登录号: JN896707)运用 Oligo 6.0 设计箬竹 *CBF1* 原核表达基因全长扩增引物:(上游引物: 5'-CCCGAATTCATGGACGTTGCTGCGA TCAGC-3'和下游引物: 5'-CCCCTCGAGTTAGTAGCTCCATAGCCTGACGT-3'),并分别在引物 5' 端引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点。以提取的箬竹叶片总 RNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增。PCR 产物与 pMD19-T simple 载体连接,阳性质粒经酶切鉴定正确后送上海英骏生物技术有限公司测序,测

序正确的阳性克隆质粒命名为 pMD-QZ-Y。

1.3 原核表达载体的构建

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pMD-QZ-Y 质粒, 回收目的片段, 与经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切并回收的 pET32a (+) 载体进行连接, 构建原核表达载体 pET32-QZ, 转化感受态细胞 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 及酶切鉴定正确后转化 *E. coli* Rosetta2 (DE3) 表达菌株。

1.4 融合蛋白的诱导表达

挑取单个白色菌落, 接种于 LB 液体培养基中 (含 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp), $37\ ^\circ\text{C}$ 振荡过夜培养。然后按 1:50 接种量进行扩大培养, 至 OD₆₀₀ 值约 0.6 时加入 IPTG (终浓度为 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $37\ ^\circ\text{C}$ 诱导 4 h, 取 1.5 mL 菌液 $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 2 min 后, 沉淀用 200 μL 灭菌蒸馏水重悬后, 再加入等体积 $2\times$ SDS 上样 Buffer, 沸水浴 10 min, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 吸取上清液, SDS-PAGE 鉴定融合蛋白的表达。

1.5 融合蛋白的纯化与复性

收集表达融合蛋白产物的菌液, 离心, 用缓冲液 PBS ($137\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl; $2.7\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl; $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄; $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH₂PO₄, pH 7.4; $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇) 重悬, 加入溶菌酶作用 30 min, 在冰浴条件下超声波裂解菌体细胞, $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集包涵体。用 PBS 洗涤 2 到 3 次, 加入 $8\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 振荡混匀后 $4\ ^\circ\text{C}$ 溶解过夜。

将溶解液经 $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 上清液经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后, 按说明书操作步骤进行组氨酸镍柱亲和层析。用 10~15 倍填料体积的 NTA-0 缓冲液进行清洗; 以流速为 $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的上样 Buffer 洗柱至平衡; 以 $0.5\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速上样; 上样结束后, 以流速为 $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的上样 Buffer 洗脱未与 Ni-NTA 结合的杂蛋白, 至柱平衡为止; 以 $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速, 依次用 20、40、60、100、200 和 $500\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的咪唑洗脱 Buffer 进行洗脱, 收集洗脱峰的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析蛋白纯度; 将溶解的蛋白液与 PBS 缓冲液按 1:10 的比例加入到透析袋中, $4\ ^\circ\text{C}$ 透析。每 8 h 换 1 次透析液, 透析约 6 次后, 浸于 $4\ ^\circ\text{C}$ ddH₂O 中, 每 8 h 换液 1 次, 共透析 6 次。采用 Lowry 法测定纯化后的蛋白浓度, 用 $0.22\ \mu\text{L}$ 细菌滤器过滤除菌后, 置 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.6 多克隆抗体的制备及鉴定

取成年大白兔 (体重约 2.5 kg) 2 只, 进行 4 次免疫, 每次间隔 2 周。其中 1 只免疫纯化的笋竹 *CBF1* 融合蛋白, 1 只免疫 PBS 用作空白对照。初次免疫时, 取纯化的融合蛋白, 按 1:1 比例加入弗氏完全佐剂, 经过充分乳化后, 采用背部皮下多点注射 (约 8 点), 免疫剂量约为每只 1 mg。间隔 2 周进行加强免疫, 总共进行 3 次。加强免疫选用弗氏不完全佐剂。末次免疫 10 d 后, 进行心脏采血, 血清采用 Protein A-Plus Beads 纯化后分装, 每管 1 mL, 置 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。提取经 IPTG 诱导和未诱导的 pET32-QZ 重组菌的融合蛋白进行 Western blot, 以验证抗体的特异性。

1.7 笋竹 *CBF1* 蛋白表达分析

选取长势一致的笋竹枝条, 将其剪成 30 cm 长的枝段, 洗净擦干, 石蜡封口, 置于低温冰箱中 $-15\ ^\circ\text{C}$ 处理 12 h。处理后将叶片于液氮中速冻 30 min 后保存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中。将未处理的枝条叶片于液氮中速冻 30 min 后保存, 作为对照。分别将低温处理和未处理的叶片约 0.5 g, 加入 2 mL 蛋白提取液, 在研钵中匀浆, 转入 2 mL 离心管中, $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 5 min。收集上清液, 加入等体积的 $2\times$ SDS 上样 Buffer, 震荡混匀后, $100\ ^\circ\text{C}$ 10 min 后, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取 $10\ \mu\text{L}$ 处

理好的样品在 12% 分离胶上进行 SDS-PAGE。将上述蛋白质样品进行 12% SDS-PAGE 后转至硝酸纤维素膜 (NC) 上, 以 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, TBST 洗涤后, 加入 1:200 制备的多克隆抗体 4 °C 过夜, 洗涤 3 次后, 加入 1:1 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤后采用 DAB 显色。

2 结果与分析

2.1 *CBF1* 基因片段的 RT-PCR 扩增及测序结果分析

经 PCR 扩增后得到长度约为 650 bp 的基因片段 (图 1), 片段大小与预期相符。将片段克隆到 pMD-T simple 载体上, 测序结果显示与原序列一致, 表明所得片段确为箬竹 *CBF1* 基因, 并且开放阅读框 (ORF) 及酶切位点均正确。

2.2 重组表达载体 pET32-QZ 的构建与鉴定

将测序正确的 pMD-QZ-Y 质粒经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切后, 将回收的箬竹 *CBF1* 基因片段插入同样经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切的 pET-32a (+) 原核表达载体上。对构建的重组质粒进行 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 酶切产物呈现清晰的两条泳带, 分别为 663 bp 和 5 900 bp [pET-32a (+)], 表明原核表达载体构建成功 (图 2)。

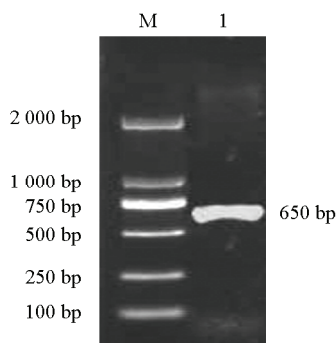


图 1 箬竹 *CBF1* 基因 PCR 产物的电泳

M. D2000 分子量标准; 1. 箬竹 *CBF1* 基因 PCR 扩增产物。

Fig. 1 PCR products of *CBF1* gene from *Qiongzhusua tumidinoda*

M. D2000 ladder; 1. PCR products of *Qiongzhusua tumidinoda* *CBF1* gene.

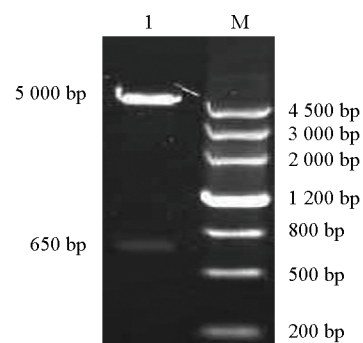


图 2 重组质粒 pET32-QZ 的鉴定

M. Marker III 分子量标准; 1. pET32-QZ 质粒 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切鉴定。

Fig. 2 Analysis of plasmids pET32-QZ by enzyme digestion

M. Marker III ladder; 1. *EcoR* I / *Xho* I enzyme digestion identification of pET32-QZ plasmids.

2.3 *CBF1* 融合蛋白的原核表达及纯化

将鉴定正确的阳性克隆质粒转化进 *E. coli* Rosetta 2 (DE3) 宿主菌, 加入 IPTG (终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导 4 h 后, 收集菌体, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结果显示: pET32-QZ 重组菌的泳道在约 45 kD 处可见一条明显的蛋白条带, *CBF1* 蛋白的大小理论约为 25 kD, 加上 pET32a Trx · Tag 标签蛋白大小约为 20 kD, 因此与作者预测的蛋白大小基本相符。对表达的宿主菌, 离心收集菌体, 进行超声波破碎后检测, 发现箬竹 *CBF1* 重组蛋白主要以包涵体形式存在, 通过 Bio-Rad Quantity One 软件分析表达产物约占菌体总蛋白的 48%。将包涵体蛋白经镍柱纯化后进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示: 纯化的蛋白纯度大于 90%, 达到了制备多克隆抗体的条件 (图 3)。纯化后得到的蛋白浓度经 Lowry 法测定, 并调节终浓度至约 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以备用作后续试验。

2.4 *CBF1* 多克隆抗体的制备及鉴定

将纯化后的筇竹 *CBF1* 融合蛋白作为抗原免疫家兔，得到抗血清，用 Protein A-Plus Beads 纯化后获得多克隆抗体。免疫血清能够识别经 IPTG 诱导的重组质粒菌体裂解产物，而未诱导的重组质粒的菌体裂解产物不识别（图 4），表明制备的抗体能够特异识别诱导表达的目标蛋白。

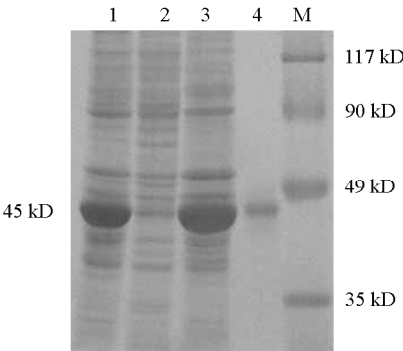


图 3 筇竹 *CBF1* 基因原核表达的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白质分子量标准；1. IPTG 诱导后转化子表达的总蛋白；2. 转化子诱导后裂解上清液；3. 包涵体蛋白；4. 纯化后的融合蛋白。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of *Qiongzhusua tumidinoda CBF1* gene expression in *E. coli*

M. Protein molecular weight marker; 1. Total proteins of induced *E. coli* transformed with pET32-QZ; 2. Lysis supernatant of induced *E. coli* transformed with pET32-QZ; 3. Bacterial body of fusion protein; 4. The purified fusion protein.

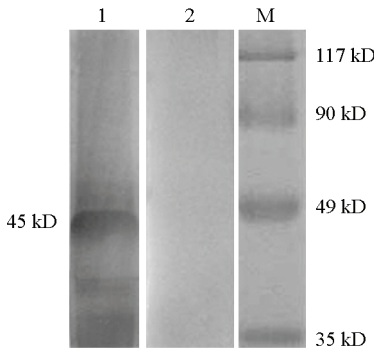


图 4 多克隆抗体 Western-blot 分析

M. 蛋白质分子量标准；1. 多克隆抗体与融合蛋白的 Western blot 结果；2. 阴性血清与融合蛋白的 Western blot 结果。

Fig. 4 Western-blot analysis of the Polyclonal antibody

M. Protein molecular weight marker; 1. Western blot with polyclonal antibody; 2. Western blot with negative serum.

2.5 筇竹 *CBF1* 蛋白 Western blot 检测

Western blot 的结果表明，在筇竹经低温诱导的叶片提取物泳道均可见明显的目的杂交条带，且没有出现其他杂带。分子量大约为 25 kD。而未诱导的叶片未见有条带出现。上述结果说明低温可以诱导 *CBF1* 蛋白在筇竹叶片中表达，同时也证明作者制备的筇竹血清能够识别 *CBF1* 蛋白，具有较高的特异性（图 5）。

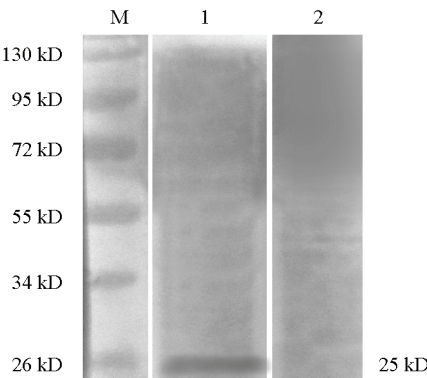


图 5 Western blot 检测筇竹 *CBF1* 蛋白

M. 蛋白质分子量标准；1. 低温诱导后的筇竹叶片总蛋白的 Western blot 结果；2. 未低温诱导筇竹叶片总蛋白的 Western blot 结果。

Fig. 5 Western blot analysis *Qiongzhusua tumidinoda CBF1* protein

M. Protein molecular weight marker; 1. Western blot with low temperature treatment of the total extract protein of leaf; 2. Western blot with Normal leaf extract protein.

3 讨论

长期以来抗寒研究都是植物界关注的热点,在已取得的研究成果中,CBF类转录因子的发现和功能鉴定无疑具有十分重要的意义(郭惠明等,2011)。CBF转录因子属于目前已发现的AP2/EREBP家族中的EREBP型转录因子,含有AP2/EREBP结构域,能与核心序列DRE元件结合,因而具有对低温逆境胁迫因素很强的调节作用。大量研究证明,CBF转录因子转入植物中可以明显提高植物的抗干旱、低温、盐渍等逆境胁迫的能力(王渭霞等,2005; Agarwal et al., 2006)。当逆境来临时,CBF转录因子能够识别含有核心序列CCGAC的CRT/DRE元件,与之特异相结合,且激活启动子含有CRT/DRE元件下游基因的表达以抵御不良环境(王洋等,2007)。CBF基因家族是一个包括CBF1、CBF2、CBF3、CBF4、CBF5、CBF6的小基因家族(Medina et al., 1999; Haake et al., 2002),其中CBF1和CBF3已被证明与拟南芥等多种植物的抗寒性呈显著正相关。

目前,原核表达仍然是大量获取目的基因蛋白最经济有效的方法,特别是对于植物体内含量稀少,且不易分离得到的蛋白,将其在原核细胞中进行大量表达后,进行免疫原性、空间结构等方面的研究,是目前比较常用的一种研究方法。笋竹CBF1蛋白不含有能够极大影响原核表达效率的信号肽、跨膜区等高级结构,为其在原核细胞中实现高效表达提供了可能。本研究中通过将笋竹CBF1克隆进pET32a(+)原核表达载体,经IPTG诱导后实现了融合蛋白的高效表达,经镍柱纯化后的融合蛋白,成功制备了抗笋竹CBF1蛋白的多克隆抗体。所制备的CBF1蛋白多克隆抗体可用于笋竹CBF1蛋白的检测。

对基因表达情况的研究,大多是通过基因表达中间产物mRNA的转录水平来间接证明基因的表达情况,如RT-PCR和实时荧光RT-PCR方法对基因转录情况进行半定量和定量分析。部分学者采用这一方法对于植物CBF基因诱导前后表达量进行过较为深入的研究。平榛CBF基因在低温诱导和未诱导情况下表达量相差2500倍(陈新等,2012),月季CBF基因低温处理后表达量相差12.3倍(翟俊峰等,2012)。但是直接检测基因表达蛋白的研究,在竹类基因表达研究方面并不多见。本研究中利用所制备的多克隆抗体对低温诱导和未诱导的笋竹叶片总蛋白进行Western blot检测,首次在低温诱导后的笋竹叶片中检测有CBF1蛋白的存在,而未经诱导的笋竹叶片中的CBF1蛋白未能通过Western-blot检出。这显示在正常笋竹叶片中CBF1蛋白的表达量极低,而经过低温诱导后,CBF1蛋白得到了极大的表达。这一结果与国内其他学者在其他植物CBF基因mRNA的转录变化情况相同,显示笋竹CBF1基因在低温逆境胁迫下可能与其他植物CBF基因存在相似的分子表达调控机制。本试验结果为进一步研究CBF1基因的功能奠定了基础,同时也为研究竹子基因表达的研究摸索了新的途径。

References

- Agarwal P K, Agarwal P, Reddy M K, Sopory S K. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep*, 25: 1263 - 1274.
- Chen Xin, Wang Gui-xi, Liang Li-song, Ma Qing-hua. 2012. Cloning and temporal-spatial expression of a CBF homolog associated with cold acclimation from *Corylus heterophylla*. *Scientia Silvae Sinicae*, 48 (1): 167 - 172. (in Chinese)
- 陈 新, 王贵禧, 梁丽松, 马庆华. 2012. 平榛冷适应相关基因 CBF 的克隆及时空表达特性分析. *林业科学*, 48 (1): 167 - 172.
- Fu Li-guo, Jin Jian-ming. 1992. China plant red data book—Rare and endangered plants. Section 1. Beijing: Science Press: 312 - 319. (in Chinese)
- 傅立国, 金鉴明. 1992. 中国植物红皮书——稀有濒危植物. 第 1 册. 北京: 科学出版社: 312 - 319.
- Guo Hui-ming, Li Zhao-chun, Zhang Han, Xin Yue-zhi, Cheng Hong-mei. 2011. Cloning of cotton CBF gene and its cold tolerance expression in transgenic tobacco. *Acta Agronomica Sinica*, 37 (2): 286 - 293. (in Chinese)

- 郭惠明, 李召春, 张 晗, 信月芝, 程红梅. 2011. 棉花 CBF 基因的克隆及转基因烟草的抗寒性分析. 作物学报, 37 (2): 286 - 293.
- Guo Zi-wu, Li Xian-li, Gao Dong-sheng, Duan cheng-guo. 2004. Advance in the mechanism of biochemistry and molecular biology in response to cold stress of plant. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 12: 54 - 57. (in Chinese)
- 郭子武, 李宪利, 高东升, 段成国. 2004. 植物低温胁迫响应的生化与分子生物学机制研究进展. 中国生态农业学报, 12: 54 - 57.
- Haake V, Cook D, Riechmann J L, Pineda O, Thomashow M F, Zhang J Z. 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 130 (10): 639 - 648.
- Medina Joaquín, Bargues Mónica, Terol Javier, Pérez-Alonso Manuel, Salinas Julio. 1999. The *Arabidopsis CBF* gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. Plant Physiol, 119: 463 - 470.
- Nordborg M, Bergelson J. 1999. The effect of seed and rosette cold treatment on germination and flowering time in some *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ecotypes. Am J Bot, 86 (4): 470 - 475.
- Ru Guang-xin, Yuan Jin-ling, Zhang Duo, Guo Guang-ping. 2010. Analysis of populations genetic diversity of *Qiongzhu tumidinoda* using AFLP markers. Forest Research, 23 (6): 850 - 855. (in Chinese)
- 茹广欣, 袁金玲, 张 朵, 郭广平. 2010. 运用 AFLP 技术分析箬竹种群遗传多样性. 林业科学研究, 23 (6): 850 - 855.
- Wang Yang, Hu Ji-ji, Wang Chong-ying. 2007. Advances of *Arabidopsis thaliana CBF* pathway and its implication in plant gene engineering. Acta Biophysica Sinica, 23 (2): 101 - 108. (in Chinese)
- 王 洋, 胡吉吉, 王崇英. 2007. 拟南芥 CBF/DREB 途径的研究进展及其在植物基因工程中的应用. 生物物理学报, 23 (2): 101 - 108.
- Wang Wei-xia, Zhu Ting-heng, Hu Zhang-hua, Chen Jin-qing, Xuan Song-nan. 2005. *Agrobacterium*-mediated *CBF1* gene transformation of Songnan *Zoysia* grass. Acta Horticulturae Sinica, 32 (5): 953. (in Chinese)
- 王渭霞, 朱廷恒, 胡张华, 陈锦清, 玄松南. 2005. 农杆菌介导的 *CBF1* 基因对松南结缕草的遗传转化. 园艺学报, 32 (5): 953.
- Xin Zhanguo, Mandaoker Ajin, Last Robert L, Browse John. 2007. Arabidopsis ESK1 encodes a novel regulator of freezing tolerance. The Plant Journal, 49 (5): 786 - 799.
- Yuan Jin-ling, Xiong Deng-gao, Jin Guang, Zhong Zhi-qi, Huang Liang-jiang, Zhang Wen-yan. 2009. Seedling maintenance for introduction of *Qiongzhu tumidinoda*: A rare and protected bamboo species. Forest Research, 22 (2): 166 - 170. (in Chinese).
- 袁金玲, 熊登高, 金 光, 钟志淇, 黄良江, 张文燕. 2009. 珍稀保护竹种箬竹引种育苗研究. 林业科学研究, 22 (2): 166 - 170.
- Zhai Jun-feng, Wang Fa-wei, Wang Nan, Zhong Jun-mei, Li Hai-yan. 2012. Cloning and expression profiling of the transcription factor *CBF* gene from *Rosa hybrida*. Acta Horticulturae Sinica, 39 (8): 1596 - 1602. (in Chinese)
- 翟俊峰, 王法微, 王 南, 宗俊梅, 李海燕. 2012. 月季 CBF 转录因子基因的克隆及表达分析. 园艺学报, 39 (8): 1596 - 1602.
- Zhang Li-li, Li Jing-fu, Wang Ao-xue. 2008. The role of the transcription factor *CBF* genes in cold-responsive molecular mechanism. Acta Horticulturae Sinica, 35 (5): 765 - 771. (in Chinese)
- 张丽丽, 李景富, 王傲雪. 2008. 转录激活因子 *CBF* 基因在植物抗冷分子机制中的角色. 园艺学报, 35 (5): 765 - 771.