

利用酵母建立植物抗逆基因快速筛选体系

宋红改^{1,2}, 蒋晶², 乔桂荣², 杨晔^{1,2}, 周婧², 潘鑫银², 卓仁英²

(1. 三峡大学 生物技术研究中心 湖北省天然产物研究与利用重点实验室, 湖北 宜昌 443002; 2. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 以早柳 *Salix matsudana* 及东南景天 *Sedum alfredii* 为实验材料, 利用改进的 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术分别构建了早柳盐胁迫和东南景天氯化镉胁迫后的全长 cDNA 文库, 把文库包装到酵母表达载体中, 转化酿酒酵母感受态细胞, 通过在尿嘧啶缺陷型培养基上添加不同浓度梯度的筛选压来筛选酵母高抗转化子, 并对其基因进行鉴定。结果从早柳盐胁迫全长 cDNA 文库中得到了 2 个能耐受 $1.709 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠的阳性转化子, 从东南景天氯化镉胁迫全长 cDNA 文库中得到了 2 个能耐受 $0.123 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镉的阳性转化子。分别测定对照菌 (转空载体重组菌 INV/pYES2.1) 和转 cDNA 重组菌在无胁迫、高盐 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠) 和高氯化镉 ($150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 胁迫下的生长曲线。结果表明高耐盐/耐镉相关基因的表达对酵母正常生长没有影响。在含高盐或者高镉的培养基里, 2 个转基因重组菌的延滞期短于对照菌。这表明高耐盐/耐镉相关基因的表达可以提高酵母细胞的耐盐/耐镉能力。对 6 号耐盐转化子序列进行生物信息学和表达模式分析, 发现该基因为一盐胁迫应答相关基因 *SMpla6* (暂定名)。用酿酒酵母建立了一个高效快速筛选植物抗逆基因的体系, 研究结果为快速克隆植物抗逆相关基因奠定基础。图 9 参 12

关键词: 林木育种学; 早柳; 东南景天; cDNA 文库; 酵母; 耐盐性; 耐镉性; 生长曲线

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2010)06-0890-06

Plant stress-resistant gene cloning for Na and Cd using an INVSc1 yeast

SONG Hong-gai^{1,2}, JIANG Jing², QIAO Gui-rong², YANG Ye^{1,2}, ZHOU Jing²,
PAN Luan-yin², ZHUO Ren-ying²

(1. Biotechnology Research Center/Hubei Province Key Laboratory of Natural Products Research and Development, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China; 2. The Research Institute of Subtropical Forestry, The Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: To provide a basis for studying a new stress-related gene of *Salix matsudana* and *Sedum alfredii*, the salt-stress induced full-length cDNA Library of *Salix matsudana* and the cadmium-stress induced, full-length cDNA Library of *Sedum alfredii* were constructed using an improved switching mechanism at 5' end of RNA transcript (SMART) method. The full-length cDNA fragment was linked to the yeast vector pYES2.1, and then the linked product was transferred onto the yeast INVSc1. Concentrations of NaCl and cadmium stress were utilized to construct yeast transformants library. Growth performance of yeast recombinants and their control with an empty vector were tested under the control (0), high salinity ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl), or high cadmium ($150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cadmium) conditions. Also, a bioinformatics analysis and real-time polymerase chain reaction (PCR) were conducted. Results for the yeast transformants library revealed two positive transformants with a tolerance of $1.709 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl and two positive transformants with a tolerance of $0.123 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ cadmium. Growth rates of the recombinants with cDNA protein under the non-stress condition indicated that the expression of cDNA was not deleterious to yeast growth. Compared to the control,

收稿日期: 2009-12-15; 修回日期: 2010-04-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972340); 浙江省自然科学基金杰出青年团队项目(R3090070)

作者简介: 宋红改, 从事植物分子生物学研究。E-mail: shijizhimeng256@126.com。通信作者: 卓仁英, 副研究员, 博士, 从事林木抗逆分子生物学研究。E-mail: zhuory@gmail.com

yeast cells expressing cDNA showed a shorter lag period when transferred to a medium containing high salinity and high cadmium. The results of a bioinformatics analysis and real-time PCR showed that the No. 6 salt-tolerant transformant gene was a salt-resistant related gene. This study showed that the expression of cDNA could confer salt and cadmium tolerance in yeast and provided an important tool for establishing an efficient system of stress-resistant gene cloning using the yeast INVSc1. [Ch, 9 fig. 12 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Salix matsudana*; *Sedum alfredii*; cDNA library; yeast; salt tolerance; cadmium tolerance; growth curves

随着世界范围内可利用耕地的日趋减少以及盐碱、干旱及重金属污染的日趋严重, 研究植物抗逆的分子机制, 寻找有效提高植物抗逆水平的方法, 已经引起广泛的关注。植物为了更好地适应环境, 在长期的进化过程中, 形成了相应的保护机制, 在形态上、生理上、基因水平上发生了一定的改变。克隆这些基因对于研究植物的抗逆机制具有重要意义。使用高效的实验技术来分离新基因, 一直为关注热点。如今已有多种从植物中分离目的基因的技术, 如聚合酶链式反应(PCR)技术、转座子示踪技术、差减杂交技术等, 而且日趋成熟^[1]。酵母是简单的真核细胞, 和植物细胞有着相似的代谢途径, 繁殖快, 操作简单, 是研究分子生物学的有力工具, 已被广泛用来研究基因的功能^[2-4]。在植物抗逆基因功能研究中, 利用酵母表达系统, Zhang 等^[5]发现大麦 *Hordeum vulgare* HVA1 基因的表达可以提高重组酵母耐氯化钠和氯化钾的能力。同时本实验室杨晔等^[6]将旱柳 *Salix matsudana* 盐胁迫后的 cDNA 构建到酵母表达载体 *pYES2.1* 上, 转化酵母菌 INVSc1, 通过筛选高耐盐转化子来克隆耐盐相关基因。本研究以旱柳和东南景天 *Sedum alfredii* 为实验材料, 利用酿酒酵母表达其受胁迫后的全长 cDNA 文库, 筛选抗逆相关基因, 从而建立了一个高效快速筛选植物抗逆相关基因的体系。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂

植物材料为高耐盐旱柳无性系 I-32, 100 mmol·L⁻¹ 氯化钠胁迫 12 h 处理。高耐镉植物东南景天, 100 μmol·L⁻¹ 氯化镉(CdCl₂·2.5H₂O)胁迫 12 h 处理。

主要试剂: 总核糖核酸(RNA)提取试剂盒购自 Norgen Biotek 公司; SMART™ cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司; 胶回收试剂盒购自 TIANDZ 基因公司; 酵母穿梭载体 *pYES2.1* 和酵母菌 INVSc1 购自 Invitrogen 公司; 酵母质粒提取试剂盒购自 TIANGEN 生化科技有限公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* 质粒提取试剂盒购自 AXYGEN 公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 全长 cDNA 文库的构建及检测 参照 NORGEN Total RNA Purification Kit 试剂盒方法, 分别提取经 100 mmol·L⁻¹ 氯化钠胁迫 12 h 后的旱柳和经 100 μmol·L⁻¹ 氯化镉胁迫 12 h 后的东南景天总 RNA, 按照杨晔等^[6]的方法, 采用改进的 SMART(switching mechanism at 5' end of RNA transcript)技术合成全长的 cDNA, 回收 500 bp 以上的大片段, 按 500 ~ 1 000, 1 000 ~ 2 000, 2 000 bp 以上 3 个分子量大小级别分级回收。将回收产物与 *pYES2.1* 载体连接, 用电转法将 cDNA 转化酿酒酵母感受态细胞, 利用尿嘧啶营养缺陷型培养基培养, 得到酵母转化子。

1.2.2 旱柳盐胁迫及东南景天镉胁迫应答相关基因的克隆 ①转空载体酵母盐/镉敏感性试验。将空载体 *pYES2.1* 电击转化酿酒酵母感受态细胞得到对照菌 INV/*pYES2.1*, 分别涂布于添加 0.171, 0.342, 0.513, 0.684 mol·L⁻¹ 氯化钠及 0, 0.044, 0.066, 0.088 mmol·L⁻¹ 氯化镉的 SC-U 平板上, 30 ℃培养 72 h, 以确定盐/镉筛选的起始浓度。②高耐盐/镉酵母转化子筛选。旱柳 cDNA 和东南景天 cDNA 电击转化酿酒酵母 INVSc1 感受态细胞, 山梨醇重悬涂布 SC-U 筛选平板, 旱柳 cDNA 转化酵母菌液涂布于分别添加 0.684, 0.855, 1.026, 1.197, 1.368 mol·L⁻¹ 氯化钠的 SC-U 筛选平板上, 东南景天 cDNA 转化酵母菌液涂布于分别添加 0.044, 0.066, 0.088, 0.096, 0.109 mmol·L⁻¹ 氯化镉的 SC-U 筛选平板上, 30 ℃培养 72 h 至长出单菌落。挑选在含 0.684 mol·L⁻¹ 氯化钠和 0.066 mmol·L⁻¹ 氯化镉的 SC-U

培养基上生长的转化子,然后再用一系列盐/镉浓度梯度进行逐级筛选,最后选取能在含 $1.709 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠和 $0.109 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉的 SC-U 培养基上生长的转化子,提取所含质粒进行聚合酶链式反应(PCR)鉴定,并对阳性转化子质粒进行测序及生物信息学分析。③阳性高耐盐/镉转化子的生长曲线测定。挑取对照菌 INV/*pYES2.1* 和高耐盐/镉酵母转化子单克隆,接种于 YPGal 液体培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 24 h,取扩大培养的菌液按照 1:100 的接种量接种于 YPGal,含 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠或含 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉的 YPGal 培养基中培养,以未接种的 YPGal 液体培养基校正 7200 型紫外可见分光光度计的 0 点,在波长 600 nm 处比色测定菌液的吸光度值。以各时间点菌液的吸光度值 $[D(\lambda)_{600}]$ 为纵坐标,以培养时间为横坐标,绘制生长曲线,实验重复 3 次。④抗逆相关基因的生物信息学分析和表达模式分析。运用 NCBI (The National Center for Biotechnology Information) 信息库的 BLAST 程序对 6 号耐盐相关基因 *SMpla6* 进行碱基同源性分析。

根据 6 号耐盐转化子的测序结果,从上游 160 ~ 183, 289 ~ 308 bp 设计引物,PCR 产物长度为 130 bp,因为旱柳的基因组序列没有在数据库中登陆,所以我们用与柳树亲缘关系较近的杨树 *Populus* 的管家基因的扩增引物作为内参引物。取 3 株生长状态良好的旱柳,从根部剪取约 $1 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1}$ 新鲜须根,迅速置于液氮中冷冻,分别提取核糖核酸(RNA),再将这 3 株旱柳置于 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠水溶液中胁迫处理,经过盐胁迫 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 后,分别提取 RNA,进行反转录和荧光定量 PCR 反应。

2 结果与分析

2.1 全长 cDNA 文库的构建及检测

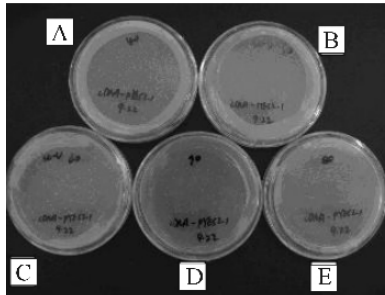
本实验采用改进的 SMART (switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) 技术合成 cDNA 第 1 链,具体实验结果见杨晔等^[6]研究结论,实验证实改进的方法合成了更好质量的 cDNA。

2.2 旱柳盐胁迫及东南景天镉胁迫应答相关基因的克隆

2.2.1 酵母盐/镉敏感性试验 将空载体 *pYES2.1* 电击转化酿酒酵母感受态细胞得到的对照菌 INV/*pYES2.1* 可以在添加 $0.171 \sim 0.513 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的 SC-U 平板上生长,从 $0.513 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始,生长明显受到抑制,酵母菌的生物量随盐浓度的增大而降低,当盐浓度达到 $0.684 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,基本不再生长。由此结果确定 $0.684 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠作为筛选耐盐转化子的起始浓度。对照菌可以在添加 $0 \sim 0.044 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉的 SC-U 平板上生长,从 $0.066 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始,生长受到明显抑制,由此确定 $0.066 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为筛选耐镉转化子的起始浓度。同时此实验结果说明用酵母筛选可以作为筛选耐盐/镉菌株的一种有效途径。

2.2.2 耐盐/镉转化子筛选 基于转空载体酵母细胞在含 $0.684 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的培养基上不能生长,首先用氯化钠浓度为 $0.684 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基进行了初筛,获得了约 800 个酵母转化子(图 1)。在此基础上,用不同浓度梯度的氯化钠进行筛选,结果获得了 19 个能在含 $1.709 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的培养基上生长的转化子(图 3)。转空载体酵母细胞在含 $0.066 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉的培养基上不能生长,首先用浓度为 $0.066 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化镉培养基进行初筛,获得约 200 个酵母转化子(图 2)。在此基础上,用不同浓度梯度的氯化镉进行筛选,结果获得了 8 个可以在 $0.109 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉的培养基上生长的转化子(图 4)。提取这些高耐盐/镉转化子的质粒并进行 PCR 鉴定,得到 2 个阳性耐盐转化子和 2 个阳性耐镉转化子(图 5 ~ 6)。为了排除这些酵母克隆耐盐/镉性的提高是由于自身基因发生了突变,从这些酵母中提取重组质粒再次转化了原始菌株,同时以野生型酵母菌 INVSc1 及转化空载体的酵母菌 INV/*pYES2.1* 作对照,结果 2 个阳性耐盐转化子仍然能够在含 $1.709 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的培养基上生长,2 个阳性耐镉转化子仍然能够在含 $0.123 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉的培养基上生长,而野生型酵母菌 INVSc1 及 INV/*pYES2.1* 菌没有生长。说明酵母细胞耐盐/镉性的增强确实是转化重组质粒的结果。

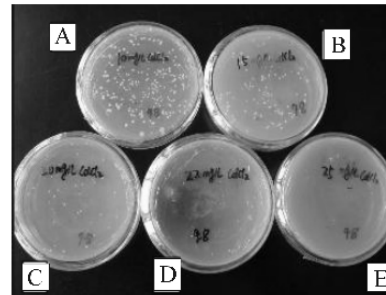
2.2.3 酵母耐盐/镉转化子的生长曲线测定 本实验检测了对照菌和高耐盐/镉酵母转化子在无胁迫、高盐($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠)或高镉($150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉)条件下的生长状况。实验发现对照菌 INV/*pYES2.1* 和 4 种酵母转化子无胁迫液体培养基里的生长速率一致,即经 10 h 的生长迟滞期后,菌的生长均



A. 0.684 mol · L⁻¹氯化钠;
B. 0.855 mol · L⁻¹氯化钠;
C. 1.026 mol · L⁻¹氯化钠;
D. 1.197 mol · L⁻¹氯化钠;
E. 1.368 mol · L⁻¹氯化钠

图 1 转化子在添加不同氯化钠浓度的 SC-U 筛选培养基上生长情况

Figure 1 Transformants with the cDNA on SC-U medium containing 0.684 to 1.368 mol · L⁻¹ NaCl



A. 0.044 mol · L⁻¹CdCl₂ · 2.5H₂O;
B. 0.066 mol · L⁻¹CdCl₂ · 2.5H₂O;
C. 0.088 mol · L⁻¹CdCl₂ · 2.5H₂O;
D. 0.096 mol · L⁻¹CdCl₂ · 2.5H₂O;
E. 0.109 mol · L⁻¹CdCl₂ · 2.5H₂O

图 2 转化子在添加不同浓度氯化镉的 SC-U 筛选培养基上生长情况

Figure 2 Transformants with the cDNA on SC-U medium containing 0.044 to 0.109 mmol · L⁻¹ cadmium

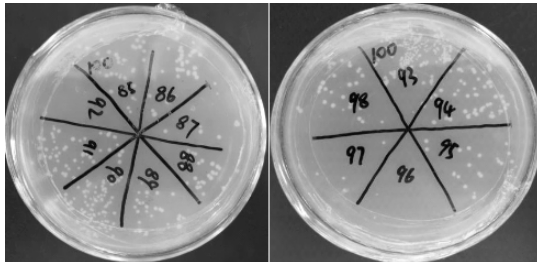


图 3 转化子在添加高盐浓度培养基上的生长
Figure 3 Transformants with the cDNA on SC-U medium containing 1.709 mol · L⁻¹ NaCl

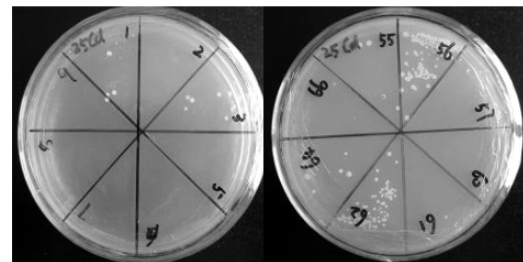
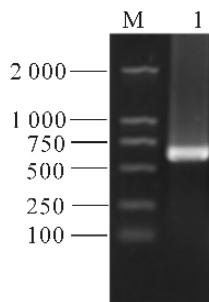


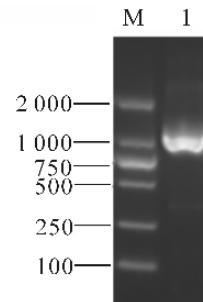
图 4 转化子在添加高镉浓度培养基上的生长
Figure 4 Transformants with the cDNA on SC-U medium containing 0.109mmol · L⁻¹ cadmium



6 号耐盐转化子 PCR 扩增

图 5 高耐盐酵母转化子 PCR 鉴定

Figure 5 PCR amplification of high-salt-tolerant yeast transformants



54 号耐镉转化子 PCR 扩增

图 6 高耐镉酵母转化子 PCR 鉴定

Figure 6 PCR amplification of high-cadmium-tolerant yeast transformants

进入对数生长期。约 20 h 进入平台期。表明 cDNA 的表达对酵母细胞生长无抑制作用。但在高盐或高镉胁迫下，对照菌 INV/pYES2.1 经 60 h 迟滞期后才进入对数生长期，而表达 cDNA 的转化子生长状况明显好于对照菌，表达 cDNA 的酵母转化子经过约 40 h 迟滞期进入对数生长期。与对照菌相比，4 个转化子在受到高盐/镉胁迫后表现出较好的恢复能力(图 7 ~ 8)。以上结果表明，外源 cDNA 的表达可提高酵母的耐盐/镉能力。

2.2.4 抗逆相关基因的生物信息学分析和表达模式分析 运用 NCBI 信息库的 BLAST 程序对 6 号耐盐相关基因 *SMpla6* 进行碱基同源性分析。由分析结果可知，cDNA 序列和杨树的干旱胁迫相关基因的 1

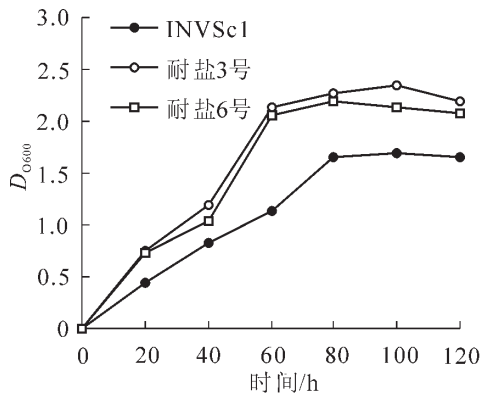


图7 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠培养基中对照菌 INV/*pYES2.1* 和重组菌的生长曲线

Figure 7 Growth curves of INV/*pYES2.1* and transformants in media plus $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl

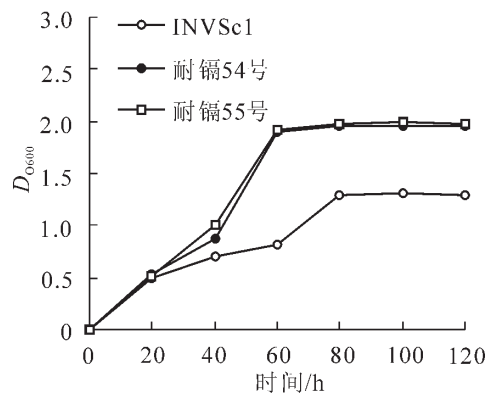


图8 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镉培养基中对照菌 INV/*pYES2.1* 和转化子的生长曲线

Figure 8 Growth curves of INV/*pYES2.1* and transformants in media plus $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ cadmium

条 EST 序列相似性最高, 相似性均达到 78%。从荧光定量 PCR 结果来看, 没有经过盐胁迫及经过不同时间盐胁迫的早柳耐盐基因相对表达量见图 9。从实验结果可见, 不经过盐胁迫处理时 *SMpla6* 基因也有一定表达, 并且恒定表达量略高于内参基因。盐胁迫下, *SMpla6* 基因表达量均增加, 即表达水平上调, 上调比率分别为 1.059 92, 1.910 00, 20.820 00, 5.730 00, 1.300 00, 盐胁迫 2 h 后, *SMpla6* 基因的表达水平发生变化, 随着胁迫时间的增长, 表达量相对增加, 达到一个高峰后, 表达量开始呈下降趋势。实时荧光 PCR 定量检测结果表明, 我们从早柳中克隆到的基因是在盐胁迫下诱导表达, 进一步表明了该基因是耐盐相关基因。

3 讨论

早柳为多年生落叶乔木, 生长迅速, 在生态环境建设中起着很重要作用, 同时也是良好的园林绿化材料, 而且它具有极强的耐寒, 耐干旱, 耐重金属等特性, 决定了它具有许多优良的抗逆基因, 是很好的研究植物耐盐机制的树种。矿山生态型东南景天有很强的忍耐和吸收土壤镉的能力, 证明其作为一种镉超积累植物。从植物修复重金属污染土壤的实践来看, 这种植物是一种良好的克隆植物耐镉相关基因候选材料^[7-9]。两者均是进行抗逆研究的理想材料, 因此在分子水平上研究早柳和东南景天的抗逆机制, 阐明它们的抗逆分子途径并发现重要的抗逆基因, 为成功建立筛选抗逆相关基因平台奠定了重要的物质基础。

本研究采用改进的 SMART 技术构建了早柳盐胁迫及东南景天镉胁迫的全长 cDNA 文库, 这一技术有利于提高文库中全长 cDNA 的比列, 可构建高质量的 cDNA 文库。我们的实验结果与这一研究相符, 使用改进方法得到了更高质量的 cDNA。使得该 cDNA 克隆最大程度上包含了相应 mRNA 分子完整的 5' 非编码区序列, 为研究目的基因在翻译水平上调控机制奠定了重要基础。

酵母菌是最简单的真核模式生物。酿酒酵母在基因工程上的应用成为人们用来表达外源基因的新途径, 并在基础研究、应用研究中发挥重要作用。酿酒酵母基因工程菌不仅具有原核系统的优点, 而且具有典型真核系统的特性, 被认为是表达外源蛋白的合适寄主。与原核表达系统相比, 用酵母表达植物外源基因更具优势, 因为酵母表达系统与植物表达系统更为接近, 也具有糖基化、二硫键形成以

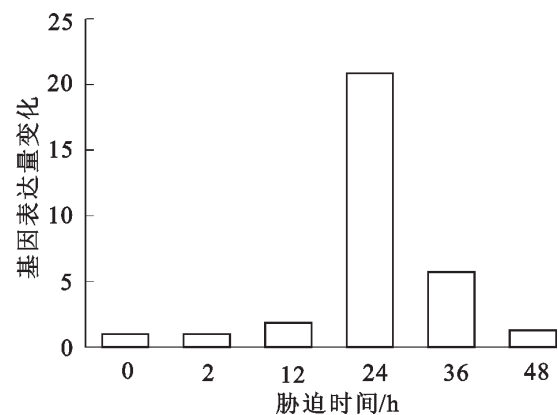


图9 不同盐胁迫时间下基因的表达量比较

Figure 9 Expression levels of new genes in different salt stress

及蛋白质折叠等翻译后加工等过程。与植物表达系统如拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和烟草 *Nicotiana tabacum* 相比, 具有生长快, 容易培养, 易于遗传操作, 易于转化后筛选的优点, 同时成本更为廉价, 周期更短, 更高效^[10-12]。酵母表达系统有利于构建文库后的筛库工作, 其表达载体上有有效的转化子筛选的标记基因即营养缺陷型的互补基因, 同时添加不同浓度的筛选压进行筛选, 抗逆基因转入酵母细胞中表达后, 转化子抗逆性提高而且能表达营养缺陷互补基因, 筛库效率也得到大大提高。

本研究利用酵母表达系统构建了早柳盐胁迫和东南景天氯化镉胁迫下全长 cDNA 文库, 并通过在培养基上添加不同的抗性标记筛选酵母高抗转化子, 获得抗性基因。利用这个方法, 初步从早柳和东南景天中各克隆出了 2 个耐盐/镉相关基因, 下一步我们要构建植物表达载体, 转化模式植物拟南芥, 检测该新基因是否赋予转基因植株抗逆性。同时将对新基因的亚细胞定位、时空表达模式以及该基因在植物抗逆基因工程中的应用等方面进行深入研究。该方法与其他克隆目的基因的方法相比, 周期更短, 成本更低, 建立这样一个快速稳定的克隆抗逆相关基因及筛选体系, 可以从其他抗逆物种资源中快速有效地克隆抗逆相关基因。

参考文献:

- [1] 朱玉贤. 植物基因的克隆与转化研究进展[J]. 河北科技大学学报, 1999, **20** (2): 5 - 9.
ZHU Yuxian. Progress and perspectives of molecular cloning and plant genetic engineering [J]. *J Hebei Univ Sci Technol*, 1999, **20** (2): 5 - 9.
- [2] YAMADA A, TSUTSUMI K, TANIMOTO S, *et al.* Plant RelA/SpoT homolog confers salt tolerance in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, **44** (1): 3 - 9.
- [3] YAMADA A, SAITOH T, MIMURA T, *et al.* Expression of mangrove allene oxide cyclase enhances salt tolerance in *Escherichia coli*, yeast and tobacco cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, **43** (8): 903 - 910.
- [4] LEE J H, VAN MONTAGU M, VERBRUGGEN N. A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells [J]. *Plant Biol*, 1999, **96**: 5873 - 5877.
- [5] ZHANG L, OHTA A, TAKAGI M, *et al.* Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins [J]. *J Biol Chem*, 2000, **127**: 611 - 616.
- [6] 杨晔, 蒋晶, 乔桂荣, 等. 利用酿酒酵母表达氯化钠胁迫下早柳全长 cDNA 文库[J]. 浙江林学院学报, 2009, **26** (4): 473 - 478.
YANG Ye, JIANG Jing, QIAO Guirong, *et al.* Expressed salt stress induced full length-cDNA library of *Salix matsudana* using yeast Invsc1 [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2009, **26** (4): 473 - 478.
- [7] 熊愈辉, 杨肖娥, 叶正钱, 等. 东南景天对镉、铅的生长反应与积累特性比较[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, **32** (6): 101 - 106.
XIONG Yuhui, YANG Xiaoe, YE Zhengqian, *et al.* Comparing the characteristics of growth response and accumulation of cadmium and lead by *Sedum alfredii* Hance [J]. *J Northwest A & F Univ Nat Sci Ed*, 2004, **32** (6): 101 - 106.
- [8] 龙新宪, 王艳红, 刘洪彦. 不同生态型东南景天对土壤中镉的生长反应及吸收积累的差异性 [J]. 植物生态学报, 2008, **32** (1): 168 - 175.
LONG Xinxian, WANG Yanhong, LIU Hongyan. Growth response and uptake differences between two ecotypes of *Sedum alfredii* to soils Cd [J]. *J Plant Ecol*, 2008, **32** (1): 168 - 175.
- [9] 熊愈辉. 东南景天对镉的耐性生理机制及其对土壤镉的提取与修复作用的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
XIONG Yuhui. *Physiological Mechanisms of Cadmium Tolerance and Phytoextraction in Sedum Alfredii Hance* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [10] 李艳, 王正祥, 诸葛健. 酵母作为外源基因表达系统的研究进展[J]. 生物工程进展, 2001, **21** (2): 10 - 14.
LI Yan, WANG Zhengxiang, ZHU Gejian. Advances in the studies of yeast as foreign genes expression system [J]. *China Biotechnol*, 2001, **21** (2): 10 - 14.
- [11] MOMCILOVIC M, HONG S P, CARLSON M, *et al.* Mammalian TAK1 activates snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 25336 - 25343.
- [12] TYSHENKO MG, D'ANJOU M, DAVIES P L, *et al.* Challenges in the expression of disulfide bonded, threonine-rich antifreeze proteins in bacteria and yeast [J]. *Prot Exp Purific*, 2006, **47** (1): 152 - 161.