

利用酿酒酵母表达氯化钠胁迫下旱柳全长 cDNA 文库

杨 晔^{1,2}, 蒋 晶², 乔桂荣², 周 婧², 陈 银², 何正权¹, 李海营², 卓仁英²

(1. 三峡大学 生物技术研究中心/天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 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: 为了研究旱柳 *Salix matsudana* 高耐盐无性系 I-32 的耐盐机制, 分离其耐盐相关基因, 实验以筛选出的高耐盐旱柳无性系 I-32 为材料, 盐胁迫后提取总核糖核酸(RNA), 纯化 mRNA, 利用改良 SMART(switching mechanism at 5' end of RNA transcript)技术合成了全长 cDNA, 回收 500 bp 以上 cDNA 大片段克隆到大肠杆菌 *Escherichia coli* 和酵母穿梭载体 *pYES2.1* 中, 建成旱柳全长 cDNA 文库, 对随机挑取的阳性克隆进行聚合酶链式反应(PCR)鉴定, 插入片断平均值为 1 000 bp 左右, 说明所构建的文库达到了用于目的基因分离筛选和表达的建库要求。通过尿嘧啶缺陷型培养基添加 80~130 g·L⁻¹ 氯化钠筛选文库, 与野生型酵母菌株相比, 转化子的耐盐能力提高。研究结果为克隆与旱柳抗旱相关基因奠定了基础。图 6 参 17

关键词: 植物学; 旱柳; cDNA 文库; 耐盐性; 酵母; 抗旱相关基因

中图分类号: S718.43; Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)04-0473-06

Expressed salt stress induced full length-cDNA library of *Salix matsudana* using yeast Invsc1

YANG Ye^{1,2}, JIANG Jing², QIAO Gui-rong², ZHOU Jing², CHEN Yin², HE Zheng-quan¹,
LI Hai-ying², 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. Research Institute of Subtropical Forestry, The Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: The studies of *Salix matsudana* on salt-resistance molecular mechanism and searching new salt-tolerant relation genes are limited at present. It is necessary to develop drought-tolerant gene using this valuable tree resource, so a salt stress induced full-length cDNA Library of *Salix matsudana* was constructed using Clontech Laboratories, Inc. SMART cDNA Library Construction Protocol. Total RNA was extracted from *S. matsudana* under 100 mmol·L⁻¹ NaCl stress for 24 h. After synthesizing the first-strand cDNA, the double-strand cDNA was amplified with the long-distance Polymerase Chain Reaction (LD-PCR). The result showed that insertion fragment was about 1 000 bp length in the library by PCR. The full-length cDNA fragment was linked to yeast vector *pYES2.1* by *pYES2.1* TOPO TA Expression Kit; then the linked product was transferred into yeast Invsc1. Finally, clones were selected by SC-U medium containing 80 - 130 g·L⁻¹ NaCl. The experiment shows that the salt-tolerance of transformants yeast improved greatly compared with the wild-type yeast. The results provide an important tool for the study of cloning new salt-tolerance relation genes and the salt tolerance mechanisms of the *S. matsudana*. [Ch, 6 fig. 17 ref.]

Key words: botany; *Salix matsudana*; cDNA library; salt tolerance; yeast; drought tolerance related genes

收稿日期: 2008-09-16; 修回日期: 2009-02-25

基金项目: 非盈利性科研院所基金资助项目(RISF060702)

作者简介: 杨晔, 从事林木分子遗传育种研究。E-mail: 0717yangye@163.com。通信作者: 卓仁英, 副研究员, 从事林木抗逆分子生物学研究。E-mail: zhuory@gmail.com

旱柳 *Salix matsudana* 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^[1]。旱柳具有极强的耐寒、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。利用分子生物学技术研究旱柳耐盐的机制, 分离耐盐相关基因, 为进一步通过基因工程创造新的抗逆植物品种奠定基础。酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 不仅具有原核系统生长快、容易培养和易于遗传操作等优点, 而且具有典型真核系统的特性, 具有糖基化、二硫键形成以及蛋白质折叠等翻译后加工等过程, 其表达模式与植物表达模式更为接近, 所以用酵母筛选植物抗逆基因具有原核表达系统不可替代的优越性。采用酵母突变体筛选植物的不同 cDNA 文库来鉴定和挖掘新基因的方法已经广泛应用于植物功能基因的研究。利用钾离子(K^+)吸收的酵母缺陷型突变体, 在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中筛选到了 3 个可能的编码 K^+ 转运蛋白的基因 *AKT1*, *KAT1* 和 *HKT1*^[2-4]。用酵母的 2 种不同氨基酸转运缺陷突变体筛选拟南芥 cDNA 文库, Frommer 等^[5]和 Hsu 等^[6]成功地克隆到相应的编码相同氨基酸透过酶的基因 *NAT2/AAPI*^[5-6]。酵母表达系统还被广泛地应用到植物耐盐基因功能研究中, Yamada 等^[7]利用酵母表达体系验证了丙二烯环氧化酶(AOC)基因大大增强转化子的耐盐性, 从而表明 AOC 基因在真核表达系统中增强抗盐胁迫的功能。唐玉林等^[8]利用酵母表达系统研究大豆 SAL I3-2 蛋白功能, 将大豆 SAL I3-2 蛋白 cDNA 及其缺失片段构建到酵母表达载体 *pYES 2* 上, 并转化酵母菌 *Invsc 1*, 检测酵母重组子在胁迫条件下的生长状况, 结果表明, SAL I3-2 基因可明显提高酵母转化子的耐盐能力。本研究采用筛选出的高耐盐旱柳无性系 I-32 作为研究材料, 通过构建盐胁迫下旱柳的全长 cDNA 文库, 并包装到酵母通用表达载体 *pYES 2.1* 中, 结合氯化钠(NaCl)胁迫处理, 筛选出与盐胁迫相关的基因, 为今后农作物和林木耐盐基因奠定基础, 同时也为旱柳耐盐分子机制研究提供依据。

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, NaCl) 胁迫 12 h 处理。

主要试剂: 总核糖核酸(RNA)提取试剂盒购自天泽基因公司; SMART[™] cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* 和酵母穿梭载体 *pYES 2.1* 载体、酵母菌 *Invsc1* 购自 Invitrogen 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 旱柳总 RNA 提取 旱柳 100 mmol·L⁻¹ 氯化钠胁迫处理 12 h, 提取方法参照天泽 RNA 提取试剂盒手册进行, 提取出的总 RNA 由 12.0 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并经过紫外分光光度计测定其纯度和浓度, 使用 TE Buffer 按照 1/100 的比例稀释 RNA 样品, 然后测定其在 260, 280 和 320 下的吸光度值, 计算提取的总 RNA 纯度和含量。

1.2.2 文库构建 ①cDNA 合成和大片段回收。cDNA 合成同时采用标准和改良的 Smart[™] cDNA Library Construction Kit 进行^[2], 改进方法在于将引物分两步加入, 3'PCR Primer 在 42 ℃反应 1 h 后加入, 然后 42 ℃继续反应 1 h 合成第 1 链, 引物分 2 步加入主要是为了延长模板转换过程, 增加全长 cDNA 含量。再以第 1 链 cDNA 为模板合成双链 cDNA, 10.0 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳, 回收 500 bp 以上的大片段。②cDNA 与载体连接。cDNA 500 bp 以上的大片段回收产物与 *pYES 2.1* 载体连接, 连接反应按 *pYES 2.1* TOPO TA Expression Kit 手册进行。连接反应体系如下: cDNA 6.0 μL, *pYES 2.1* Vector 1.5 μL, T4 Buffer 1.5 μL, T4 ligase 1.0 μL, 23 ℃温浴 1 h, 由于我们要连接的聚合酶链式反应(PCR)产物是全长 cDNA, 将温浴时间延长到 3 h, 以增加连接效率。③酵母感受态的制备和电击转化。从 *Invsc1* 平板上挑单克隆到酵母膏腺葡萄糖(YPD)液体培养基中, 30 ℃, 200 r·min⁻¹ 培养过夜。将过夜培养物按 10.0 g·L⁻¹ 的量接种到 200 mL YPD 液体培养基中, 30 ℃, 200 r·min⁻¹ 培养到吸光度 $A_{600} = 1.3$ 制备酵母感受态。每管 80.0 μL 分装, 加体积分数为 15% 甘油, -80 ℃保存。研究表明, -80 ℃低温保存的 *Invsc1* 感受态细胞转化效率与新鲜制备的感受态细胞基本上没有区别^[9]。取一管感受态置于冰上, 加入 5.0 μL cDNA 与载体的连接产物, 冰浴 5 min, 转入预冷的电转杯中, 1 500

V, 5 ms 电击, 快速加入 1.0 mL 预冷的山梨醇, 30 ℃静置 2 h, 涂布于筛选培养基上, 30 ℃培养 2 ~ 3 d。

1.2.3 文库鉴定 ①文库的聚合酶链式反应(PCR)鉴定。从筛选培养基上随机挑取单克隆, 30 ℃, 250 r·min⁻¹ 震荡培养过夜, 取过夜培养物, 沸水浴 5 min, 冰上放置 5 min 破碎细胞, 以细胞破碎液作为模板进行菌液 PCR, 分别依次加入 PCR Buffer, dNTP, 5'PCR Primer, 3'PCR Primer, 进行 PCR 扩增, 共 30 个循环。用 12.0 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测。②转化大肠杆菌检测。提取酵母转化子质粒 DNA, 转化 DH5 α , 于含 Ampicillin 的 LB(lysogeny broth or lurai-bertani)平板上 37 ℃培养 16 h, 挑取单菌落, 37 ℃, 200 r·min⁻¹ 培养过夜, 提取质粒, 用 12.0 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 耐盐筛选 ①盐敏感性试验。在进行氯化钠胁迫筛选前, 先进行了 Invsc1 耐盐本底测试。宿主菌 Invsc1 分别于添加 0.342, 0.427, 0.513, 0.598, 0.684, 0.855, 1.026, 1.368 mol·L⁻¹ 氯化钠的 YPD 平板上 30 ℃培养 72 h, 以不添加氯化钠的 YPD 培养基作对照, 以确定盐筛选的起始浓度。②筛选盐抗性的阳性菌株。cDNA 与 pYES 2.1 载体的连接产物电击转化酵母感受态细胞后, 取 300 mL 涂布于分别添加 0.684, 1.026, 1.368, 1.709 和 2.051 mol·L⁻¹ 氯化钠的 SC-U 筛选培养基上, 筛选阳性耐盐转化子。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取结果分析

取 5.0 μ L 所提总 RNA 在 80 V 电压下经琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭(EB)染色后紫外灯下可以观察到 28 S 和 18 S 2 条明显的带(图 1), 28 S rRNA 条带的亮度与 18 S rRNA 的亮度接近接近 2 : 1, 吸光度测定结果显示: A_{260} / A_{280} 为 1.84, 根据 RNA 质量浓度(g·L⁻¹) = $(A_{260} - A_{320}) \times \text{稀释倍数} \times 0.04$, 我们所提的旱柳总 RNA 质量浓度为 40 mg·L⁻¹。上述结果说明提取的 RNA 质量较好, 基本无降解, 分子结构完整, 符合建库要求。

2.2 长距离聚合酶链式反应(LD-PCR)产物

取 5.0 μ L 经 LD-PCR 合成的双链 cDNA PCR 产物进行琼脂糖电泳分析, 结果如图 2。图 2 显示 200 ~ 5 000 bp 呈弥散状条带, 中间有高丰度亮带, 说明合成的双链 cDNA 是成功的, 符合建库要求。真核生物的 mRNA 大多集中在 500 ~ 3 000 bp 范围, 500 bp 以下不具备编码意义, 除去 500 bp 以下片断, 可以增加大片段与载体连接的几率, 保证了文库的质量, 同时也方便了后续的筛库工作。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, 结果显示, 标准方法合成的 cDNA 大小为 100 ~ 1 000 bp, 高丰度亮带在 500 bp 左右, 改进方法合成的 cDNA 大小为 200 ~ 2 000 bp, 高丰度亮带为 750 bp 左右, 比标准方法提高了 250 bp, 有力证实了我们的改进方法合成了更好质量的 cDNA。

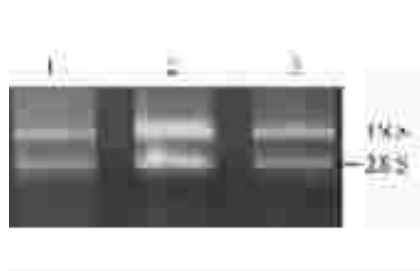
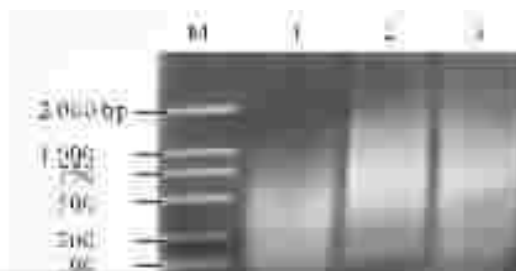


图 1 旱柳总 RNA 电泳

Figure 1 *Salix matsudana* total RNA



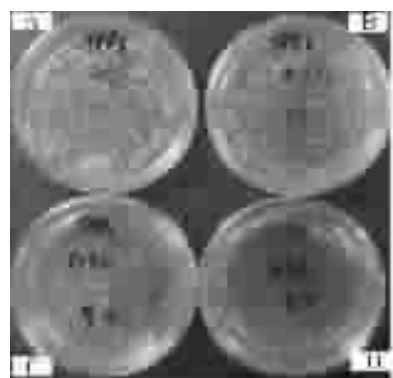
M. marker 2000; 1. SMART cDNA 合成方法, 高丰度条带为 500 bp 左右; 2, 3.改进方法合成 cDNA, 条带亮度和大小明显增大

图 2 cDNA 双链合成

Figure 2 Electrophoresis of ds cDNA

2.3 耐盐筛选

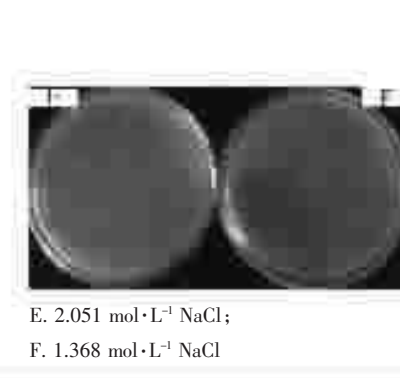
酵母菌株 *Invsc1* 可以在 $0 \sim 0.684 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠平板上生长, 从 $0.855 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始, 生长明显受到抑制, 生物量随盐浓度的增大而降低, 当盐浓度达到 $1.368 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 该野生型酵母基本不再生长(图 3)。转化的酵母耐盐性明显增强, 转化子在尿嘧啶缺陷型筛选的基础上可以耐受 $1.368 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠, 少数转化子可以耐受 $2.051 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠(图 4)。



A. $0.342 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$; B. $0.684 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$;
C. $0.855 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$; D. $1.368 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$

图 3 酵母菌株 *Invsc1* 在添加不同盐浓度培养基上的生长情况

Figure 3 Growth of *Invsc1* in different salt contents



E. $2.051 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$;
F. $1.368 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$

图 4 转化子在尿嘧啶缺陷型+不同盐浓度培养基上的生长情况

Figure 4 Selection of transformants in SC-U and different salt contents

2.4 文库质量鉴定

酵母转化子提取质粒, 由于拷贝数太低, 提取的质粒 DNA 一般不足 $1 \mu\text{g}$, 琼脂糖凝胶电泳很难检测到, 但足够转化用量。所以用提取的酵母质粒 DNA 转化大肠杆菌, 通过大肠杆菌大大增加克隆数和质粒拷贝数。我们转化大肠杆菌检测结果显示, 提取的重组质粒大小分布为 $6\ 000 \sim 7\ 500 \text{ bp}$ (图 5)。

2.5 文库的 PCR 鉴定

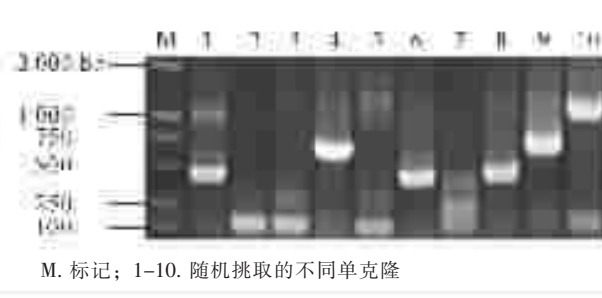
根据载体克隆位点两端的引物进行 PCR 鉴定, 结果显示, 所选重组子均含有重组的 cDNA, 并且均为 $500 \sim 2\ 000 \text{ bp}$, 平均长度为 $1\ 000 \text{ bp}$, 说明文库质量较高。图 6 为 10 个大肠杆菌 PCR 扩增结果, 其中第 2, 3, 5 泳道的 PCR 产物为 200 bp 。根据载体序列说明, 判断该样是一个空载体, 未插入目的片段; 其余 PCR 产物基本大于 500 bp , 说明载体中已插入大小不同的目的片段。



M. 标记; 1-10. 重组质粒

图 5 随机挑取单克隆提质粒

Figure 5 Plasmid DNA of randomly single clone in cDNA library



M. 标记; 1-10. 随机挑取的不同单克隆

图 6 随机插入片段 PCR 扩增

Figure 6 PCR analysis of randomly inserted fragments in cDNA library

3 讨论

构建 cDNA 的步骤大致包括细胞总 RNA 的提取, cDNA 第 1 链的合成, cDNA 第 2 链的合成, cDNAs 的克隆^[10]。在这些步骤中, RNA 质量是影响 cDNA 文库的关键因素, 因此必须要保证 RNA 纯度高且无降解。实验表明, 树种的不同, RNA 提取的难易程度不同, 取材时间也会影响到所提取 RNA 的质量和纯度。本实验提取的总 RNA 无蛋白和其他杂质污染, 纯度和完整性较高, 完全符合建库的要求。

本实验采用 SMART 技术构建盐胁迫下旱柳的全长 cDNA 文库。第 1 链 cDNA 合成用一个经修饰的 olig(dT)引物, SMARTⅢ寡核苷酸作为 mRNA5'端延伸出去的模板, 当逆转录达 mRNA5'端时, 逆转录具有模板不依赖性的在第 1 链 cDNA3'端加上几个 C, 与 SMARTⅢ寡核苷酸 3'端的几个 G 配对, 从而使寡核苷酸连接到 mRNA5'端。逆转录酶跳移并以 SMARTⅢ寡核苷酸为模板, 反转录至 SMARTⅢ寡核苷酸的末端, 而这种跳移常常发生在真核生物的 mRNA 帽子结构-m⁷GpppX, 这样反转录出的 cDNA 包含 mRNA 完整的 5'及 SMARTⅢ寡核苷酸的互补序列, 再用 PCR 合成 cDNA 第 2 链^[11]。SMART 方法合成 cDNA 虽然巧妙, 然而, 该方法存在内部模板转换问题, 即第 1 链未合成完毕就进行模板转换, 而导致反转录成熟前终止, 产生非全长 cDNA 分子。倪万松等^[12]的研究中报道, 采用改进的方法前 1 h 的反应只含有 1 个引物, 其后再加入模板转换引物, 这样就可以避免由于内部模板转换产生的 cDNA 第 1 链合成的错误起始。我们的实验结果与这一研究相符, 使用改进方法得到了更多高质量的 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。

大肠杆菌和酵母穿梭载体以大肠杆菌质粒为基本骨架, 具有酵母的 DNA 复制起始区, 选择标记, 有丝分裂稳定区和外源 DNA 插入位点, 它能独立于酵母染色体之外复制, 有很高的转化效率^[13-15]。穿梭载体 *pYES 2.1* 既可以在大肠杆菌复制与扩增, 又可以在酵母系统中复制与扩增, 它在大肠杆菌中以 Ampicillin 为选择标记, 在酿酒酵母中则利用 *pYES 2.1* 上的选择标记 URA 3 对 *Invsc1* 突变株的尿嘧啶缺陷型的互补作用, 发生 DNA 转化的酵母细胞方可在缺乏尿嘧啶营养成分的选择性培养基 SC-U 上生长, 从而有效选择阳性克隆^[16]。酵母转化子检测中, 酵母质粒得率与酵母菌株、质粒拷贝数和培养条件等因素有关。通常酵母质粒拷贝数都很低, 一般通过电泳或分光光度法都很难检测, 可通过 PCR 或转化大肠杆菌来检测^[17]。我们通过菌落 PCR 和质粒转化 DH5 α , 低拷贝的质粒通过大肠杆菌大量克隆获得高拷贝数的质粒, 从而有效检测文库质量。

旱柳是抗逆性很强的种质资源, 高质量全长 cDNA 文库的成功构建, 不仅为旱柳抗逆基因的克隆利用奠定了坚实的基础, 而且亦为进一步研究该品种高抗逆性能的分子机制提供了有力的保障。目前, 该 cDNA 文库的筛库工作正在进展中, 随着筛库工作的不断深入, 我们期待能获得拥有自主知识产权的高耐盐新基因。

致谢: 杨晔、蒋晶、乔桂荣等对本文贡献相同, 实验材料由中国林业科学研究院亚热带林业研究所抗逆育种研究组陈益泰研究员提供, 特此致谢!

参考文献:

- [1] 陈嵘. 中国树木分类学[M]. 修订版. 南京: 中国图书发行公司南京分公司, 1953.
- [2] SENTENAC H, BONNEAUD N, MINET M, *et al.* Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system [J]. *Science*, 1992, **256**: 663-665.
- [3] ANDERSON J A, HUPRIKAR S S, KOCHIAN L V, *et al.* Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (9): 3736 - 3740.
- [4] SCHACHTMAN D P, SCHROEDER J I. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants [J]. *Nature*, 1994, **370** (6491): 655 - 658.

- [5] FROMMER W B, HUMMEL S, RIESMEIER J W. Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (13): 5944 – 5948.
- [6] HSU L C, CHIOU T J, CHEN L, *et al.* Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (16): 7441 – 7445.
- [7] 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.
- [8] 唐玉林, 李小杰, 钟昀廷, 等. 利用酵母表达体系研究大豆 SALI3-2 蛋白功能[J]. 深圳大学学报: 理工版, 2007, **24** (3): 324 – 330.
- TANG Yulin, LI Xiaojie, ZHONG Yunting, *et al.* Functional analysis of soybean SALI3-2 in yeast [J]. *J Shenzhen Univ Sci Eng*, 2007, **24** (3): 324 – 330.
- [9] 叶玲, 刘建伟, 刘静. 酿酒酵母感受态细胞的低温保存及酵母菌落 PCR-快速筛选鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (6): 956 – 958.
- YE Ling, LIU Jianwei, LIU Jing. Frozen storage of competent yeast cells and simple procedure for PCR screening yeast recombinant clones[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (6): 956 – 958.
- [10] SAMBROOK J, FRITSH E F, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] 王博, 李芳, 王志方, 等. 新疆雪莲全长 cDNA 文库构建及表达序列标签 (ESTs) 特性分析[J]. 新疆农业科学, 2008, **45** (1): 56 – 60.
- WANG Bo, LI Fang, WANG Zhifang, *et al.* cDNA library construction and EST analysis of *Saussurea involucrata* Kar. et Kit [J]. *Xinjiang Agric Sci*, 2008, **45** (1): 56 – 60.
- [12] 倪万松. 一种不依赖限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶的盐芥 cDNA 文库的构建及其在耐盐资源基因挖掘中的应用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2006.
- NI Wansong. *Construction of a Plant Transformation-ready Expression cDNA Library for Mining Salt Tolerance Genes from Thellungiella halophila Using a Restriction Endonuclease-and DNA Ligase-free Approach* [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2006.
- [13] ESPOSITO M S. Evidence that spontaneous mitotic recombination occurs at the two-strand stage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75** (9): 4436 – 4440.
- [14] GOLIN J E, ESPOSITO M S. Coincident gene conversion during mitosis in *Saccharomyces* [J]. *Genetics*, 1984, **107** (3): 355 – 365.
- [15] GOLIN J E, TAMPE H. Coincident recombination during mitosis in *Saccharomyces*: distance-dependent and independent components [J]. *Genetics*, 1988, **119** (3): 541 – 547.
- [16] De PLESSIS A, DUJON B. Multiple tandem integrations of transforming DNA sequences in yeast chromosomes suggest a mechanism for integrative transformation by homologous recombination [J]. *Gene*, 1993, **134** (1): 41 – 50.
- [17] De MORAES L M P, ASTOLFI-FILHO S, OLIVER S G. Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that express alpha-amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **43** (6): 1067 – 1076.