

# 拟南芥 NPR1 基因的克隆与表达载体的构建

秦新民, 李文兰, 张丽珍, 李惠敏, 覃屏生

(广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

**摘要:** NPR1 基因为植物抗病基因表达和系统获得性抗性中的一个关键基因。该文以 DNA-PCR 扩增的方法, 从拟南芥基因组 DNA 中克隆出 NPR1 基因, 通过序列分析, 所克隆的 NPR1 基因与报道的基因序列完全一致。将其构建成植物表达载体, 为今后植物抗病基因工程的开展奠定了基础。

**关键词:** 拟南芥; NPR1; 克隆; 基因序列分析; 系统获得性抗性

**中图分类号:** Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)01-0058-04

## Cloning and expression vector construction of *Arabidopsis* NPR1 gene

QIN Xin-min, LI Wen-lan, ZHANG Li-zhen,  
LI Hui-min, QIN Ping-sheng

(College of life science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

**Abstract:** The *Arabidopsis* NPR1 gene plays an important role in activating various plant defense responses, including expression of the pathogenesis-related genes and systemic acquired resistance. The NPR1 gene was amplified from *Arabidopsis thaliana* genome DNA by DNA-PCR method. The DNA sequenced analysis showed that the sequence of amplified NPR1 gene was the same as the published sequence. Therefore, the plant expression vector pCaMVNPR containing NPR1 gene was constructed. The experiment will provide avenues for NPR1 gene application in plant disease resistant genetic engineering.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; nonexpresser of PR genes; cloning; gene sequence analysis; systemic acquired resistance

作物病害是引起农作物减产的主要因素之一, 对农业生产会造成巨大的影响。长期以来人们为了防治病害, 在生产上大量使用化学农药, 其结果导致菌物病原体抗药性的形成, 对环境和食物造成积累性污染。通过基因工程方法培育抗病新品种则可避免上述弊病。

近年来, 在植物抗病基因克隆方面, 人们通过转座子标签技术、定位克隆以及染色体步行等方法分离克隆到了一些抗病基因, 如玉米的 Hm1、番茄的 cf-9、Pto、拟南芥的 RPS2、RPM1、NPR1、水稻的

Xa1、Xa2 基因等(贾建航等, 2000), 其中 NPR1 基因由于可调控植物的广谱性抗性的发生, 在植物系统性抗性(Systemic acquired resistance, SAR)中起着关键作用, 因此人们对它的结构(Cao 等, 1997; Zhang 等, 1996)作用机理(Cao 等, 1998; Després 等, 2000)以及与植物抗病性的关系(Chern 等, 2001; Zhou 等, 2000)等方面进行了研究, 结果表明 NPR1 基因在植物抗病基因工程中具有广泛的应用前景。目前, 国内对 NPR1 基因的研究尚未见报道。本文采用 DNA-PCR 的方法(龙立如等, 1995;

收稿日期: 2003-11-10 修订日期: 2004-06-15

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0228019-2)

作者简介: 秦新民(1956-), 男, 广西灵川人, 博士, 研究员, 主要从事植物分子生物学研究。

刘春明等,1995;秦新民等,2002),从拟南芥中克隆出了 NPR1 基因,并将其构建成植物表达载体,为今后进行农作物抗病基因工程打下了坚实基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

植物材料为拟南芥,质粒为 pUC19, pBlue-script 和 pCaMV, 菌种 Top10 感受态细胞, LBA4404 和 RK2013。主要的酶为 pfuDNA 聚合酶(Stragene 产品), BamHI, BglII, HindIII, SmaI, SalI, T4 DNA 连接酶(均为 NEB 产品)。

### 1.2 方 法

1.2.1 植物 DNA 的提取 参照王关林等(2002)的方法略加改进,取拟南芥叶片 100 mg 于液氮中研磨,将叶片粉末装入 1.5 mL 离心管中,加入 500  $\mu$ L 提取液(50mM EDTA, 100mM Tris. HCl, 500mM NaCl, pH8.0),再加 30  $\mu$ L 巯基乙醇,20  $\mu$ L 20% SDS,混匀,65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min。随后,加入 3M 醋酸钾 100  $\mu$ L,震荡,水浴 10 min,12 000 rpm 离心 10 min。取上清,用等体积的酚/氯仿抽提 1 次,再用异丙醇沉淀 DNA,用 70%乙醇清洗 2 次,凉干,加入 20  $\mu$ L T10E1 溶解 DNA,-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 聚合酶链式反应 参照 Ryals 等(1997)发表的拟南芥 NPR1 基因序列,分别于转录起始位点上游 40bp 及终止密码子下游 35bp 处设计引物。上游引物为:5'-AGTTGATAAGGTCTC TTC GTT GATTAGCAG-3',下游引物为:5'-GGTACAG-CAAAAATTACTAAGAGGCAAG-3'。在灭菌后的新 0.5 mL 离心管中依次加入模板 DNA 2  $\mu$ L,10 $\times$ PCR buffer 3  $\mu$ L,dNTP 0.2  $\mu$ L,上游引物 50pmol,下游引物 50 pmol, pfu DNA 聚合酶 5 U,以双蒸水补足至 30  $\mu$ L。反应条件:98  $^{\circ}$ C,5 min;94  $^{\circ}$ C,30 s,55  $^{\circ}$ C,30 s,72  $^{\circ}$ C,3 min(35 个循环);72  $^{\circ}$ C,10 min。PCR 扩增产物的纯化与回收,按 PCR 产物回收试剂盒的说明进行。

1.2.3 DNA 序列分析 将 PCR 扩增产物克隆到 pUC19 质粒 SmaI 位点上,转化 Top10 感受态细胞,通过筛选和限制性内切酶酶切鉴定,得到重组质粒 pUCNPR。采用双脱氧链终止法进行双向自动测序,由上海申能博彩生物科技有限公司完成。

1.2.4 表达载体的构建 以 SalI + EcoRI 消化 pUCNPR1 质粒,回收约 2.2kb NPR1 片段,质粒

pBluescript 同样用 SalI 和 EcoRI 消化,将回收的 2.2kb NPR1 片段克隆到质粒 pBluescript 上,获得重组质粒 pBINPR,使 NPR1 片段两端都有一个 BamHI 位点。然后以 BamHI 将重组质粒上的 NPR1 片段切下,以 BamHI 和 BglII 双切载体质粒 pCaMV,电泳回收质粒 pCaMV 10kb DNA 片段和 2.2kb NPR1 基因片段。然后将回收的两个 DNA 片段用 T4DNA 连接酶连接,产物转化 Top10 感受态细胞。

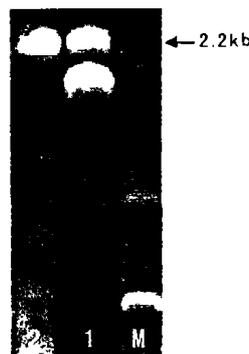


图 1 拟南芥 DNA PCR 扩增及重组质粒 pUCNPR1 的酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification of *Arabidopsis* and identification recombinant plasmid pUCNPR1 by digestion  
M:DNA 分子量标准; 1:重组质粒 pUCNPR1 经 EcoR I + BamH I 消化; 2:拟南芥 DNA PCR 扩增。  
M:DNA marker(lamda DNA/EcoR I + HindIII); 1:Digestion of recombinant plasmid by EcoR I + BamH I ;  
2:PCR amplification of *Arabidopsis* DNA.

## 2 结 果

### 2.1 NPR1 基因的 PCR 扩增

以拟南芥 DNA 为模板,在 PCR 反应体系中,用高保真 pfuDNA 聚合酶进行扩增,35 个循环后,取 10 $\mu$ L 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测,以 DNA Marker(lamda DNA/EcoR I + Hind III)为分子量标准,结果在约 2.2kb 处出现了清晰的扩增带(图 1)。然后用 PCR 产物试剂盒将 2.2kb 的 DNA 扩增带进行回收。

### 2.2 DNA 扩增片段的序列分析

将所扩增出的 2.2kb 片段克隆到 pUC19 质粒上进行序列分析,结果表明扩增的 DNA 序列与发表的 NPR1 序列完全相同(图 2)。

### 2.3 NPR1 基因表达载体的构建

含 NPR1 基因重组质粒 pUCNPR 经 EcoR I + BamH I 双酶消化,可见 2.2kb 的 NPR1 片段和

2.7kb 的 pUC19 载体(图 1)。以 Sal I + EcoR I 消化重组质粒 pUCNPR 和质粒 Bluescript, 回收 2.2kb 的 NPR1 片段, 并与质粒 pBluescript 连接, 获得重组质粒 pBINPR。以 BamH I 将重组质粒 pBINPR 上的 NPR1 片段切下, 以 BamH I 和 Bgl II

双切载体质粒 pCaMV, 电泳分别回收质粒 pCaMV 10kb DNA 片段和 2.2kb NPR1 基因片段。然后将回收的两个 DNA 片段用 T4DNA 连接酶连接, 构建成表达载体质粒 pCaMVNPR(图 3)。pCaMVNPR 质粒经 PCR 扩增检测, 出现了 2.2kb 的特异带

1	AGTTGATAAG	GTCTCTTCGT	TGATTAGCAG	AGATCTCTTT	AATTTGTGAA	TTTCAATTCA
61	TCGGAACCTG	TTGATGGACA	CCACCATTGA	TGGATTTCGCC	GATTCTTATG	AAATCAGCAG
121	CACTAGTTTC	GTCGCTACCG	ATAACACCGA	CTCCTCTATT	GTTTATCTGG	CCGCCGAACA
181	AGTACTACC	GGACCTGATG	TATCTGCTCT	GCAATTGCTC	TCCAACAGCT	TCCAATCCGT
241	CTTTGACTCG	CCGATGATT	TCTACAGCGA	CGCTAAGCTT	GTTCTCTCCG	ACGGCCGGGA
301	AGTTTCTTTC	CACCGTGCG	TTTTGTGTCAGC	GAGAAGCTCT	TTCTTCAAGA	GCGCTTTAGC
361	CGCCGCTAAG	AAGGAGAAAG	ACTCCAACAA	CACCGCCGCC	GTGAAGCTCG	AGCTTAAGGA
421	GATTGCCAAG	GATTACGAAG	TCGGTTTCGA	TTCCGGTTGTG	ACTGTTTTGG	CTTATGTTAT
481	CAGCAGCAGA	GTGAGACCGC	CGCTAAAGG	AGTTTCTGAA	TGCGCAGACG	AGAATTGCTG
541	CACGTGGCTT	GCCGGCCGGC	GGTGGATTC	ATGTTGGAGG	TTCTCTATTT	GGCTTTCATC
601	TTCAAGATCC	CTGAATTAAT	TACTCTCTAT	CAGgtaaac	accatctgca	ttaagctatg
661	gttacacatt	catgaataag	ttcttacttg	agtacttgta	tttgatttcc	agAGGCACTT
721	ATTGGACGTT	GTAGACAAAG	TTGTTATAGA	GGACACATTG	GTTATACTCA	AGCTTGCTAA
781	TATATGTGGT	AAAGCTTGTA	TGAAGCTATT	GGATAGATGT	AAAGAGATTA	TTGTCAAGTC
841	TAATGTAGAT	ATGGTTAGTC	TTGAAAAGTC	ATTGCCGGAA	GAGCTTGTTA	AAGAGATAAT
901	TGATAGACGT	AAAGAGCTTG	GTTTGGAGGT	ACCTAAAGTA	AAGAAACATG	TCTCGAATGT
961	ACATAAGGCA	CTTGACTCGG	ATGATATTGA	GTTAGTCAAG	TTGCTTTTGA	AAGAGGATCA
1021	CACCAATCTA	GATGATGCGT	GTGCTCTTCA	TTTCGCTGTT	GCATATTGCA	ATGTGAAGAC
1081	CGCACAGATC	TTTTAAACTT	GATCTTGCCG	ATGTCAACCA	TAGGAATCCG	AGGGGATATA
1141	CGGTGCTTCA	TGTTGCTGCG	ATGCCGAAGG	AGCCACAATT	GATACTATCT	CTATTGGAAA
1201	AAGGTGCAAG	TGCATCAGAA	GCAACTTTGG	AAGGTAGAAC	CGCACTCATG	ATCGCAAAC
1261	AAGCCACTAT	GGCGTTGAA	TGTAATAATA	TCCCGGAGCA	ATGCAAGCAT	TCTCTCAAAG
1321	GCCGACTATG	TGTAGAAATA	CTAGAGCAAG	AAGACAAACG	AGAACAATT	CCTAGAGATG
1381	TTCTCCCTC	TTTTGCAGTG	GCGGCCGATG	AATTGAAGAT	GACCCTGCTC	GATCTTGAAA
1441	ATAGAGgtat	ctctatcaag	tattatttct	tattgtttg	aattaaattt	atgctctctc
1501	tattaggaag	ctgagtgaac	taatgataac	tatttcttgt	gtctgcccact	gtttagGCAC
1561	TTGCTCAACG	TCTTTTTCCA	ACGGAAGCAC	AAGCTGCAAT	GGAGATCGCC	GAAATGAAGG
1621	GAACATGTGA	GTTTCATAGTG	ACTAGCCTCG	AGCCTGACCG	TCTCACTGGT	ACGAAGAGAA
1681	CATCACCGGG	TGTAAAGATA	GCACCTTTCA	GAATCCTAGA	AGAGCATCAA	AGTAGACTAA
1741	AAGCGCTTTC	TAAAACCGgt	atggattctc	accacitca	tcggactcct	tatcacaaaa
1801	aacaaaacta	aatgaicttt	aaacatggtt	ttgttacttg	ctgtctgacc	ttgttttttt
1861	atcatcagTG	GAACTCGGGA	AACGATTCTT	CCCGCGTGT	TCCGCAGTGC	TCGACCAGAT
1921	TATGAACGTG	GACCACTTGA	CTCAACTGGC	TTGCCGGAGAA	GACGCACTG	CTGAGAAACG
1981	ACTACAAAAG	AAGCAAAGGT	ACATGGAAAT	ACAAGAGACA	CTAAAGAAGG	CCTTTAGTGA
2041	GGACAATTTG	GAATTAGGAA	ATTCTGTCCT	GACAGATTCTG	ACTTCTTCCA	CATCGAAATC
2101	AACCGGTGGA	AAGAGGTCTA	ACCGTAAACT	CTCTCATCGT	CGTCGGTGAG	ACTCTTGCTT
2161	CTTAGTGTA	TTTTTGCTGT	ACC			

图 2 NPR1 基因的 DNA 序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of the NPR1 gene

(图 4), 与预期结果一致。证实 NPR1 基因已克隆到 pCaMV 质粒上, 获得 NPR1 基因表达载体 pCaMVNPR(图 4)。

### 3 讨论

SAR 是植物在与病原物长期斗争中逐步获得的一种自身防御机制, 表现为以发病相关蛋白基因(Pathogenesis-Related gene, PR)的表达为特征的广谱抗病性。Cao 等(1994)在分析植物 SAR 的信号传导途径时分离到 *npr1* 突变体, 由于该突变株的 NPR1 基因突变而导致了 PR 基因的表达性表达被彻底破坏, 不能应答各种 SAR 诱导物, PR 基因也几乎不表达, 表现为对病原微生物的敏感性

大大提高。从而引发了人们对 NPR1 基因的抗病分子机理的研究。现 NPR1 基因已被证实是植物产生系统获得性抗性的关键调节基因(Zhou 等, 2000), 它的表达可导致下游抗病基因的一系列反应, 从而赋予植物对病原物的抗性。NPR1 基因调控 PR 基因的表达是通过与转录调节因子形成核蛋白复合物来进行的, Zhang 等(1999)证实 NPR1 与含有碱性区域的亮氨酸拉练转录子的 TGA 亚类家族成员(AHBP-1b 和 TGA6)发生物理相互作用, NPR1 上的四点突变中的每一点突变都会完全阻塞 NPR1 与 TGA 之间的相互作用。同时还发现这些 TGA 因子可以结合到 PR-1 基因启动子应答性水杨酸(SA)的 *as-1* 元件上, *npr1* 突变前的特征也揭示了 NPR1 基因是在 AS 信号分子的下游发挥功能

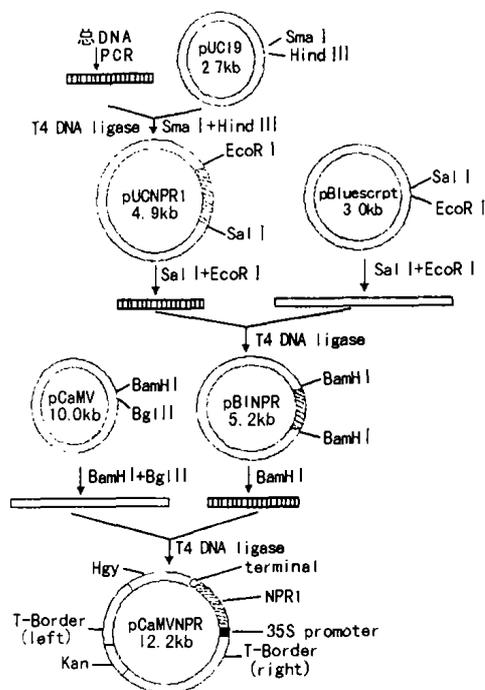


图 3 NPR1 植物表达载体 pCaMVNPR 的构建  
Fig. 3 construction of plant expression vector pCaMVNPR of NPR1 gene

(Lebel 等, 1998)。在蛋白质结构方面, 人们通过对定位克隆到的 NPR1 基因的研究, 推测由 NPR1 基因编码的是一种新型蛋白质, 其相对分子量约为 18ku, 而且包含一个锚蛋白重复序列结构和一个 BTB/POZ 结构域。这两个都涉及蛋白质与蛋白质之间的相互作用, 这些重复序列对 NPR1 基因发挥其功能是极为重要的。同时 NPR1 的核定位对 PR 基因的激活也必不可少的 (Mark 等, 2000)。

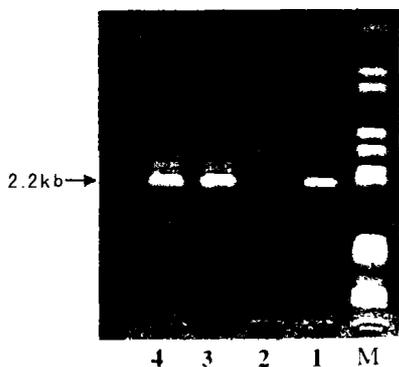


图 4 重组质粒 pCaMVNPR 的 PCR 扩增  
Fig. 4 PCR amplification of plasmid pCaMVNPR  
M: DNA 分子标准量; 1, 3, 4: 重组质粒 pCaMVNPR; 2: 对照。  
M: DNA marker ( $\lambda$  DNA/EcoRI + HindIII); 1, 3, 4: Recombinant plasmid pCaMVNPR; 2: control.

目前, NPR1 基因的应用研究也取得了一些进展。当野生型 NPR1 基因导入拟南芥 npr1 突变体

后, 不仅弥补了突变, 恢复了系统获得性抗性 (SAR) 诱导物对 PR 基因的表达和抗感染性的应答, 而且转基因植株在 SAR 诱导物缺乏的情况下抵抗 *P. syringae* 和 *P. parasitica* 两种细菌的能力也得到增强 (Cao 等, 1997)。此外, 转基因植株中 NPR1 基因的过量可提高植株的抗病性, 而无其他不良影响 (Cao 等, 1998; Chen 等, 2001)。鉴于 NPR1 基因在转基因拟南芥中过量表达只是提高植株的抗性而无其他有害影响, Chern 等 (2001) 通过让水稻过量表达 NPR1 来确定 NPR1 基因在单子叶植物中所扮演的角色时, 发现转基因水稻植株表现出对 Xoo (一种水稻细菌性枯萎病原体) 的抗性提高, 而且 RNA 点杂交也表明抗病性的提高需要 NPR1 基因的高表达。从而证实了 NPR1 基因也可以提高单子叶植物的抗病性。

相信随着 NPR1 基因调控信号和转导途径研究的不断深入, NPR1 基因在农作物抗病基因工程中将有广阔的应用前景。

参考文献:

王关林, 方宏筠. 2002. 植物基因工程 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 742-744.  
Cao H, Bowling SA, Gordon AS, et al. 1994. Characterization of an *Arabidopsis mutant* that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance [J]. *Plant Cell*, 6: 1583-1592.  
Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, et al. 1997. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats [J]. *Cell*, 88: 57-63.  
Cao H, Li X, Dong X. 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance [J]. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 95: 6531-6536.  
Chern MS, Fitzgerald HA, Yadav RC, et al. 2001. A disease resistance pathway in rice similar to the mediated pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 27(2): 101-113.  
Després C, Delong C, Glaze S, et al. 2000. The *Arabidopsis* NPR1/MIN1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors [J]. *Plant Cell*, 12: 279-290.  
Jia JH (贾建航), wang B (王斌). 2000. Recent advances in cloning of plant disease resistant gene (植物抗病基因克隆研究进展) [J]. *Progress in Biotechnology (生物工程进展)*, 20(1): 21-26.  
Lebel E, Heifetz P, Thornel L, et al. 1998. Functional analysis of regulatory sequence controlling PR-1 gene expression (下转第 65 页 Continue on page 65)

大,这说明恢复基因纯合与否、显性恢复基因的多少等因素对育性有很大影响。此结果与前人的研究(赵寅槐等,1996;黄铁城,1985,1990;陈庆富等,

1994,1998;McIntosh,1987;Murai,2002;Nettevich等,1970)是类似的。因此,要获得高度而且稳定恢复的杂交种,要求恢复系具有更多的显性恢复基因。

表 7 几种恢复系对不同不育系的恢复能力(杂种花粉粒碘染率  $x$ )比较

Table 7 Comparison of the rate( $x$ )of dyed pollen grains among hybrids of three A-lines with five R-lines

恢复系 R-line	不育系 A-line			$x_1-x_3$	$x_2-x_3$	$x_1-x_2$
	QA92-8( $x_1$ )	AL93-7( $x_2$ )	TA93-7( $x_3$ )			
QR835-1	0.286 9	—	0.817 0	-0.530 1	—	—
QR3	0.627 0	0.863 2	—	—	—	-0.236 2
QR666	0.577 9	0.744 2	0.801 0	-0.223 1	-0.056 8	0.166 3
QR2-143	—	0.786 2	0.871 0	—	-0.084 8	—
QR30206	0.774 7	0.894 7	0.693 0	0.081 7	0.201 7	-0.120 0
Mean	—	—	—	-0.223 8	0.020 0	-0.189 9
t value	—	—	—	-1.267 3	0.219 3	-1.587 8
$t_{0.05,2}$	—	—	—	4.303 0	4.303 0	4.303 0

育种上,可将不同恢复系进行杂交,从其后代选出积聚更多恢复基因的恢复系。本研究还发现一些 Q 型恢复系可同时对 Q 型、AL 型、T 型等不育系有相似的恢复能力。这些恢复系可能具有广泛恢复特性,能同时对多种不同不育系恢复育性。这对杂交小麦的研制有一定的意义。在杂交小麦研究中,可以通过选育广泛恢复系,以提高恢复系的利用价值。

感谢四川农业大学蒋华仁教授为本研究提供了部分小麦材料和多方面的支持。

#### 参考文献:

- 赵寅槐,周明烈,王 苏,等. 1996. T 型恢复系选育和半矮秆杂种小麦[A]. 见:庄巧生,杜振华. 中国小麦育种研究进展[M]. 中国北京:中国农业出版社,421-427.
- 黄铁城. 1990. 杂种小麦研究——进展、问题与展望[M]. 北京:北京农业大学出版社,118-122.
- 黄铁城,张爱民,王明理,等. 1985. 杂种小麦的研究[J]. 北京农业大学学报, 11(4): 215-227.
- Chen QF. 2003. Improving male fertility restoration of common wheat for *Triticum timopheevii* cytoplasm[J]. *Plant*

*Breeding*, 122(5): 401-404.

Chen QF(陈庆富), Zhang QQ(张庆勤). 1994. Breeding and improvement of Q-type male sterile lines and their restoring lines(Q 型小麦雄性不育系和恢复系的改良)[J]. *Seeds*(种子), (1): 3-5.

Chen QF(陈庆富), Zhou YH(周永红), Peng ZS(彭正松), et al. 1998. Studies on the distribution of hybrid chlorosis Ch1 gene and the T-type cytoplasm fertility restoring genes in Chinese endemic wheat(中国特有小麦中杂种黄化基因 Ch1 和提型胞质育性恢复基因的分布研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 18(4): 325-330.

McIntosh RA, Cusick JE. 1987. Linkage map of hexaploid wheat, wheat and wheat improvement-agronomy monograph No. 13[M]. Second edition, E. G. Heyne(editor), Wisconsin, USA, ASA-CSSA-SSSA, 289-297.

Murai K. 2002. Comparison of two fertility restoration systems against photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility in wheat[J]. *Plant Breeding*, 121(4): 363-365.

Nettevich ED, Naumov AA. 1970. The genetic characteristics of fertility restoration in wheat forms with cytoplasmic male sterility[C]. Nauch-tr-NII-s-kh-tsentr-r-nov-nechernozemny, 25(1): 77-85.

(上接第 61 页 Continue from page 61)

- in *Arabidopsis*[J]. *Plant*, 16: 223-233.
- Liu CM(刘春明), Yu ZY(于占洋), Zhu Z(朱 祯), et al. 1995. Cloning and sequence of the pea lectin gene(豌豆外源凝集素基因的克隆及序列分析)[J]. *Acta Gene Sin*(遗传学报), 4: 302-306.
- Mark Kinkema, Weihua Fan, Xinnian Dong. 2000. Nuclear location of NPR1 is required for activation of PR gene expression[J]. *Plant Cell*, 12: 2 339-2 350.
- Qin XM(秦新民), Deng ZN(邓智年). 2002. A simple and rapid method for separation and cloning of cowpea trypsin inhibitor gene(一种简便、快捷的胰蛋白酶抑制剂基因的分离与克隆方法)[J]. *Guihaia*(广西植物), 22(5): 420-424.
- You LR(龙立如), Xie M(谢 明), Qu LJ(翟礼嘉), et al.

1995. Molecular cloning and sequence analysis of a gene encoding rice 10 Kdprolamin(水稻富硫 10 KD 醇溶蛋白基因的克隆和序列分析比较)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 7: 507-513.

Zhang Y, Fan W, Kinkema M, et al. 1996. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 6 523-6 528.

Zhou JM, Trifa Y, Silva H, et al. 2000. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 13(2): 191-202.