

实时荧光定量 PCR (TaqMan) 法 测定外源基因的拷贝数

王爱民^{1,2}

(1. 徐州师范大学 生命科学学院, 江苏 徐州 221116; 2. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要: 实时荧光定量 PCR 是近年新兴的一项技术, 因其快速、方便、便宜, 需要 DNA 样品量少, 无需放射性检测等优点被广泛应用于基因的定量分析。该文就实时荧光定量 PCR (TaqMan) 技术的发展、基本原理及测定外源基因拷贝数的技术流程做一介绍。

关键词: 外源基因; 拷贝数; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)03-0408-05

Estimating copy number of transgenic gene by real-time fluorescent quantitative PCR (TaqMan)

WANG Ai-Min^{1,2}

(1. School of Life Science, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant, Xuzhou 221116, China)

Abstract: Real-time fluorescent quantitative PCR is a new technique which has been developed to be used in quantitative analysis of genes as well with the advantages of simpleness, quickness, short needs of target fragment DNA and none of hazardous radioisotopes in recent years. The development, the principle of real-time fluorescent quantitative PCR (TaqMan) and the technical flow of estimating copy number of transgenic gene are introduced in this paper.

Key words: transgenic gene; copy number; real-time fluorescent quantitative PCR

传统测定基因拷贝数的方法是 Southern Blotting。事实证明它确实是一个行之有效的、准确的方法, 但在实际操作过程中我们也不难发现, 它费时、费力, 同时还需大量的 DNA 样品, 甚至要使用放射性同位素 (Mason 等, 2003)。近年兴起的实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, real-time quantitative PCR) 技术弥补了以上的不足 (Ingham 等, 2001; Song 等, 2002; Mason 等, 2003)。实时荧光定量 PCR 技术是在 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出, 它通过在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。其主要优点是:

(1) 不需要进行 PCR 的后处理, 最大限度的减少了操作过程中可能导致的污染; (2) 快速, 便宜; (3) 避免使用具有危害的放射性同位素; (4) 仅需要少量的 DNA 样品; (5) 提供一个广泛的定量动力学范围, 能对拷贝数差异较大的不同样品进行精确定量。由于该技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 而且与常规 PCR 相比, 它具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点, 目前已得到广泛应用。

1 基本原理

实时荧光定量 PCR 的发明归功于两个重要的

收稿日期: 2008-02-02 修回日期: 2008-12-25

基金项目: 徐州师范大学科研基金 (05XLB13); 徐州市科技局基金 (XZ2006221) [Supported by the Scientific Research Foundation of Xuzhou Normal University (05XLB13); the Scientific Research Foundation of Xuzhou Science & Technology Bureau (XZ2006221)]

作者简介: 王爱民 (1970-), 女, 江苏徐州人, 硕士, 副教授, 主要从事植物生理学的教学与研究, (E-mail) aiminwang@xznz.edu.cn.

发现:一是发现 DNA Taq 聚合酶有 5'→3'外切酶活性且为双链特异性(Deborab,1999);二是利用荧光能量传递技术(fluorescence resonance energy transfer,FERT)(Heid 等,1996)构建了双标记寡核苷酸探针,即 TaqMan 探针。

Higuchi(1993)首次报导了实时定量 PCR 技术。在 PCR 反应过程中通过溴化乙锭的插入和一台改良的热循环仪,用 UV 射线照射样品,然后用 CCD 相机检测产生的荧光信号。以荧光信号和 PCR 循环数为轴作图。这一方法的主要缺陷在于特异性比较低,在检测到特异性荧光信号的同时,一些非特异性的 PCR 产物也被检测到。现在更多的是采用 5'核酸酶的方法,包括 TaqMan 探针(Gibson 等 1996,Heid 等 1996),分子标记(Tyagi & Kramer,1996),SYBR Green I 染料(Yin 等 2001,Schmittgen 等,2000)等。有关实时定量 PCR 的名词概念可参看相关文献(Ginzinger,2002)。

PCR 反应体系中,在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,5'端和 3'端分别标记一个报告荧光基团,如 FAM(6-羧基荧光素),TET(四氯-6-羧基荧光素),JOE(2,7-二甲基-4,5-二氯-6-羧基荧光素),HEX(六氯-6-甲基荧光素)和一个淬灭荧光基团,如 TAMRA(6-羧基四甲基诺丹明)。两者之间构成能量传递结构。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收,不出现荧光信号变化;PCR 扩增时,Taq 聚合酶的 5'-3'外切酶活性将与底物结合的探针酶切降解,报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,使淬灭基团的淬灭作用被解除,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

实时荧光定量 PCR 一般使用 Ct 值(每个反应荧光信号达到设定域值所经的循环数)定量,由于 Ct 值与模板初始拷贝数的对数成线性关系,利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,只要获得未知样品的 Ct 值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数(Woo 等,1999)。一些与癌变有关的基因,如 *HER2/neu* (Millson 等,2003),*erbB2* (Bièche 等,1998),*MYCN* (De 等,2002;Raggi 等,1999)等基因拷贝数的变化均可通过这种方法得到检测。也利用该方法检测了番茄外源 *nptII*,*TSWV-N* 基因(Mason 等,2003)以及 *pmi*,*adh* 基因的拷贝数(Ingham 等,2001)。

目前市场上有许多种实时定量 PCR 仪可供选择;其中包括 ABI7700,BI7900,BI7000(Applied Biosystems),MX4000 (Stratagene, LaJolla, CA, USA),Lightcycler (Roche, Alameda, CA, USA),iCycler(Bio-Rad,Hercules,CA,USA),Smartcycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA),Robocycler (MJ Research, Incline Village, NV, USA)等。

2 测定外源基因拷贝数的技术流程

2.1 引物、探针的设计

与普通 PCR 相比,real-time PCR 对引物的要求较高。引物的优劣直接关系到是否能扩增出特异的目的基因,并且能够排除在扩增中形成引物二聚体。通常对引物设计的要求主要包括:3'端应无二级结构、重复序列、回文结构和高度的变异;两条引物之间不能发生互补,尤其是在 3'端;两条引物中的 GC 含量应保持大体一致,其含量应占引物碱基的 40%~70%,不应有 G/C 和 A/T 富集区的非平衡分布;引物的 T_m 值一般都设计在 59~60 °C,这主要是因为 60 °C Taq 酶的 5'-3'外切核酸酶的活性最强,并且引物位置要尽可能的靠近探针,扩增片段长度要小于 400 bp。

实时荧光定量 PCR 的灵敏之处其一就在于 PCR 反应体系中引入序列特异性的第三个寡核苷酸——探针。探针的优劣直接影响到荧光信号的接收效果。Taq 聚合酶的外切核酸酶的活性是双链特异性的,因此它只对和模板结合的探针起作用,而对游离的探针不起作用。在 real-time PCR 进程中,探针必须和模板紧紧结合才能保证 Taq 聚合酶从 5'端水解探针核苷酸。因此探针的熔链温度(T_m)一般都设计在 68~70 °C,这样,当 60 °C 变性和延伸时探针模板结合的是非常稳定的。对富含 AT 的序列,可在 3'端引入 MGB(minor groove binder)来增加探针和模板结合的稳定性(Kutyavin 等,2000)。同时还应注意:探针的长度必须小于 30 bp,否则荧光报告基团和荧光猝灭基团距离较远,荧光能量传递作用减弱,背景信号增加;探针 5'端第一个碱基一般不能是 G,否则会猝灭荧光。

目前,TaqMan real-time PCR 的引物和探针多是由公司专业人员设计的。

2.2 反应体系和反应参数的确定

实时定量 PCR 通常采用的反应体系见表 1。

如果扩增片段较短,在 100 bp 以内,可采用两步扩增法,即 95 °C 变性 20~30 s,60 °C 退火延伸 30 s,同时接收荧光信号;如果片段稍长则可采用三步法,即增加 72 °C 延伸 45 s,并在延伸阶段接收荧光信号。循环数一般为 45~55。

2.3 模板的浓度

如果研究者是进行首次实验,那么应选择一系列稀释浓度的模板来进行实验,以选择出最为合适的模板浓度。基因组 DNA 的模板浓度在 50pg~5ng 之间选择。一般而言,使 Ct 值位于 15~30 个循环比较合适,若大于 30 则应使用较高的模板浓度,如果 Ct 小于 15 则应选择较低的模板浓度。

表 1 实时荧光定量 PCR 反应体系
Table 1 The reaction system of real-time fluorescent quantitative PCR

成分 Composition	用量 Dosage
5×PCR Buffer;	5 μL
25 mM MgCl ₂ ;	5 μL
2 mM dNTP;	2.5 μL
25 pM Primer F;	优化浓度
25 pM Primer R;	优化浓度
10 pM TaqMan Probe;	优化浓度
1 U/μL Taq DNA Polymerase;	1.5 μL
模板 DNA;	5 ng
ddH ₂ O;	补至 25 μL

2.4 优化探针、引物的量

探针、引物相对量是实时荧光定量 PCR 反应非常重要的影响因素。引物浓度太低,会致使反应不完全;若引物太多,则发生错配以及产生非特异产物的可能性大大增加。探针浓度太低,荧光信号较弱;若浓度太高,则会影响到信噪比。一般在首次实验过程中,必须先通过一系列梯度浓度的探针和引物的正交预实验来确定两者的相对量。最基本的原则是获得在 15~30 之间最小的 Ct 值和最大的信号/背景比值。

2.5 内源参照基因及标准品的选择

测定基因的拷贝数多数是通过相对定量的方法,即同一 DNA 模板两个完全独立的扩增反应,一个是内源参照基因,通过标准曲线可知其起始量;一个是目的基因,通过标准曲线也可以得到其起始量。目的基因起始量与内源参照基因起始量的比值即为目的基因的拷贝数。

内源参照基因(Endogenous reference gene)多数是选取生物体内源的低拷贝基因,如玉米的乙醇

脱氢酶基因 alcohol dehydrogenase (Ingham 等, 2001;Shou 等,2004);大豆的凝集素基因 soybean lectin(Schmidt& Parrott,2001);番茄的液泡蔗糖酶基因 tomato vacuolar invertase (German 等, 2003),及抗坏血酸过氧化物酶基因 ascorbate peroxidase(Mason 等,2003);烟草的谷氨酰胺合成酶基因 plastidic glutamine synthetase (Bubner 等, 2004);油菜的高移动组蛋白基因 high-mobile-group protein I/Y 基因(Weng 等,2004);水稻的蔗糖磷酸合酶基因 sucrose phosphate synthase(Ding 等,2004)及一些内源性管家基因(house keeping gene)如 β-肌动蛋白、β2-微球蛋白和 18s rRNA(Livak & Schmittgen,2001)等。

标准品可以是纯化的质粒 DNA,体外转录的 RNA,或者是体外合成的 ssDNA。但 Song 等(2002)等认为,理想的标准品应该是已插入外源基因的植物基因组 DNA,并且用 Southern Blotting 已准确测得插入外源基因拷贝数。在相同的扩增条件下目的基因测得的荧光信号量同标准曲线进行比较,从而得到目的基因的量。

2.6 定量校正曲线的建立

转基因和内源参照基因的定量 PCR 校正曲线的建立是用定量 PCR 的方法分析转基因外源基因拷贝数的关键步骤。在应用校正曲线计算外源基因或内源参照基因的拷贝数前,首先确定建立的定量校正曲线的可靠性和合理性。即所有基因 PCR 反应的效率要相似,并且最好大于或者等于 90%。这能够通过将正控制模板 10 倍连续稀释,以模板浓度值的 log[10]对数值绘制 Ct 曲线;曲线的斜率可以看作 PCR 反应的效率。斜率为-3.32 表示 PCR 反应效率为 100%。关于这方面的细节和其他的计算方法请看有关文献(Nigro 等,2001;Ginzinger 等, 2000;Meijerink 等,2001)。

2.7 外源基因拷贝数的计算

在定量 PCR 反应中,C_T 是扩增目的基因的量达到固定域值(threshold)时的循环数,描述定量 PCR 反应的公式是:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,x}} = K_x, \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

这里 X_T 扩增目的基因分子达到域值时的量, X₀ 是起始目的基因分子的量, E_x 是 PCR 反应效率, C_{T,x} 是目的基因分子的量达到域值时的循环数, K_x 在公式中表示它是一个常数。

对于参照基因来说,PCR 反应公式为:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R, \dots\dots\dots \textcircled{2}$$

这里, R_T 扩增内源参照基因分子达到域值时的量, R_0 是起始内源参照基因分子的量, E_R 是 PCR 反应效率, $C_{T,R}$ 是内源参照基因分子的量达到域值时的循环数, K_R 为常数。从 PCR 扩增公式可看出, 达到域值时的循环数(Ct 值)与起始模板(X_0 或 R_0) 的对数成线性关系。因此, 通过梯度稀释目的基因或内源参照基因模板 DNA 量, 其浓度的对数与相应的 Ct 值可以做一条直线, 称为标准曲线(Standard curve)。通过标准曲线, PCR 反应效率与常数 K 可以求得。

$$1 + E = 10^{-1/S}, \dots\dots\dots \textcircled{3}$$

$$K = 10^{-I/S}, \dots\dots\dots \textcircled{4}$$

这里 S(slope)是标准曲线的斜率, I 是截距(intercept), 代入由标准曲线得到的值③、④。两基因起始浓度的比— X_0/R_0 可以由最终公式⑤得到:

$$X_0/R_0 = 10^{[(C_{T,X} - I_X)/S_X] - [(C_{T,R} - I_R)/S_R]} \dots\dots\dots \textcircled{5}$$

这里 I_X 和 I_R 分别是目的基因和内源参照基因相对标准曲线的截距, S_X 和 S_R 分别是两基因的斜率, $C_{T,X}$ 和 $C_{T,R}$ 是每一个被检测样品中目的基因与内源参照基因达到域值时的循环数。如果内源参照基因(R_0)的拷贝数确定, 则目的基因的拷贝数(X_0)可计算出来。

如果转基因植物都为 T_0 代, 对于外源转基因来说是杂合子; 而对于内源参照基因来说是纯合子, 因此, 得到的 X_0/R_0 值必须翻倍($\times 2$)。

如果标准品是已插入外源基因的植物基因组 DNA, 并且用 Southern Blotting 准确测得插入外源基因拷贝数的话, 一种快速方便的计算外源转基因的拷贝数的方法是采用相对定量的方法, 即分别根据同一 DNA 模板构建的外源转基因和内源参照基因的定量校正曲线得知各基因的起始量, 那么外源基因与内源参照基因起始量的比值, 就是外源基因的拷贝数。

3 展望

该技术借助于荧光信号来检测 PCR 产物, 一方面提高了灵敏度, 另一方面还可以做到 PCR 每循环一次就收集一个数据, 建立实时扩增曲线, 准确地确定 Ct 值, 从而根据 Ct 值确定起始 DNA 拷贝数, 做到了真正意义上的 DNA 定量, 这是 DNA 定量技术的一次飞跃。实时荧光定量 PCR(TaqMan)法测定

外源基因拷贝数, 具有高的特异性和高信噪比的优势, 并且方法简单、快捷, 需要 DNA 量少, 不需进行放射性检测, 再加之其高通量和低成本, 已在许多领域得到广泛应用。但是应该看到, 这种检测方法对低拷贝的准确性较高, 而对多拷贝的检测的准确性还有待提高(Bubner 等, 2004), 因此这种方法并不能完全的替代传统的 Southern Blotting, 而应该是传统方法的补充, 尤其是在大批量的转基因株系的初筛中。

参考文献:

Bièche I, Olivi M, Champème MH, et al. 1998. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer [J]. *Int J Cancer*, **78**(5):661-666

Bubner B, Gase K, Baldwin IT. 2004. Two-fold differences are the detection limit for determining transgene copy number in plants by real-time PCR[J]. *BMC Biotechnol*, **4**:14-24

De Preter K, Speleman F, Combaret V, et al. 2002. Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay[J]. *Mod Pathol*, **15**(2):159-166

Deborab SG. 1999. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer-PApplied biosystems division 7700 sequence detector[J]. *J Biomol Tech*, **10**(1):11-16

Ding J, Jia J, Yang L, et al. 2004. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes[J]. *J Agric Food Chem*, **52**(11):3 372-3 377

German MA, Kandel-Kfir M, Swarzburg D, et al. 2003. A rapid method for the analysis of zygosity in transgenic plants[J]. *Plant Sci*, **164**:183-187

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR[J]. *Genome Res*, **6**(10):995-1 001

Ginzinger DG, Godfrey TE, Nigro J, et al. 2000. Measurement of DNA copy number at microsatellite loci using quantitative PCR analysis[J]. *Cancer Res*, **60**(19):5 405-5 409

Ginzinger DG. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream[J]. *Exp Hematol*, **30**(6):503-512

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. 1996. Real-time quantitative PCR[J]. *Genome Res*. **6**(10):986-994

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions[J]. *Biotechnology(NY)*, **11**(9):1 026-1 030

Ingham DJ, Beer S, Money S, et al. 2001. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants [J]. *Biotechniques*, **31**(1):132-140

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, et al. 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures[J]. *Nucleic Acids Res*, **28**(2):655-661

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta

- C(T)) Method[J]. *Methods*, **25**(4):402—408
- Mason G, Provero P, Vaira AM, et al. 2003. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR[J]. *BMC Biotechnol*, **2**:20—29
- Meijerink J, Mandigers C, van de Loch L, et al. 2001. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR[J]. *J Mol Diagn*, **3**(2):55—61
- Millson A, Suli A, Hartung L, et al. 2003. Comparison of two quantitative polymerase chain reaction methods for detecting HER2/neu amplification[J]. *J Mol Diagn*, **5**(3):184—190
- Montgomery RA, Dallman MJ. 1997. Semi-quantitative polymerase chain reaction analysis of cytokine and cytokine receptor gene expression during thymic ontogeny[J]. *Cytokine*, **9**(10):717—726
- Nigro JM, Takahashi MA, Ginzinger DG, et al. 2001. Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative PCR assay [J]. *Am J Pathol*, **4**:1 253—1 262
- Raggi CC, Bagnoni ML, Tonini GP, et al. 1999. Real-time quantitative PCR for the measurement of MYCN amplification in human neuroblastoma with TaqMan detection system [J]. *Clin Chem*, **45**(11):1 918—1 924
- Schmidt MA, Parrott WA. 2001. Quantitative detection of transgenes in soybean [*Glycine max* Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea*) by real-time polymerase chain reaction [J]. *Plant Cell Rep*, **20**:422—428
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, et al. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods [J]. *Anal Biochem*, **285**(2):194—204
- Shou HX, Frame BR, Whitham SA, et al. 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or Agrobacterium-mediated transformation [J]. *Mol Breed*, **13**:201—208
- Song P, Cai CQ, Skokut M, et al. 2002. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERSTM-derived transgenic maize [J]. *Plant Cell Rep*, **20**:948—954
- Tyagi S, Kramer FR. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization [J]. *Nat Biotechnol*, **14**(3):303—308
- Weng HB, Pan AH, Yang LT, et al. 2004. Estimating number of transgene copies in transgenic rapessed by real-time PCR assay with HMG I/Y as an endogenous reference gene [J]. *Plant Mol Biol Rep*, **22**:1—12
- Woo TH, Patel BK, Cinco M, et al. 1999. Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product [J]. *J Microbiol Methods*, **35**(1):23—30
- Yang L, Zhao Z, Ding J, et al. 2005. Estimating copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR [J]. *Chin J Food Hygiene*, **17**(2):140—144 (in chinese)
- Yin JL, Shackel NA, Zekry A, et al. 2001. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I [J]. *Immunol Cell Biol*, **79**(3):213—221

(上接第 376 页 Continue from page 376)

- teome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins [J]. *Proteomics*, **6**:6 509—6 527
- Rakwal R, Komatsu S. 2000. Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa*) self-defense mechanism using proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, **21**:2 492—2 500
- Ramagopal S. 1987. Salinity stress induces tissue-specific proteins in barley seedlings [J]. *Plant Physiol*, **84**:324—331
- Ramani S, Apte SK. 1997. Transient expression of multiple gene in salinity-stressed young seedling of rice (*Oryza sativa*) cv. Buraq Rata [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **223**:663—667
- Rep M, Dekker HL, Vossen JH, et al. 2002. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato [J]. *Plant Physiology*, **130**:904—917
- Rossignol M, Peltier JB, Mock HP, et al. 2006. Plant proteome analysis: A 2004—2006 update [J]. *Proteomics*, **6**:5 529—5 548
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, et al. 2002a. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery [J]. *Proteomics*, **2**:1 131—1 145
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, et al. 2002. A proteomic approach to analyzing drought and salt-responsiveness in rice [J]. *Crop Res*, **76**:199—219
- Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, et al. 2006. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses [J]. *Proteomics*, **6**:2 180—2 198
- Shahollari B, Peskan-Berghofer T, Oelmüller R. 2004. Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants [J]. *Physiol Plant*, **122**:397—403
- Slymaker DH, Keen NT. 2004. Syringolide elicitor-induced oxidative burst and protein phosphorylation in soybean cells, and tentative identification of two affected phosphoproteins [J]. *Plant Sci*, **166**:387—396
- Vincent D, Lapierre C, Pollet B, et al. 2005. Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation [J]. *Plant Physiol*, **137**:949—960
- Vincent D, Zivy M. 2007. Plant Proteome Responses to Abiotic Stress [M] // J Thelen (eds). Plant proteomics. Berlin Heidelberg: Springer, 346—364
- Wu DH, Laidman DL. 1997. Isolation of six low molecular weight heat shock proteins and partial characterization of heat shock protein 29 from mung bean hypocotyls [J]. *Phytochemistry*, **44**:985—989
- Yan S, Tang Z, Su W, et al. 2005. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root [J]. *Proteomics*, **5**:235—244