西北农业学报 2009,18(4):144-148
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

NtSKP1-GFP植物表达载体的构建及亚细胞定位

张付云[1,2],陈士云[3],赵小明[1],白雪芳[1],杜昱光[1]
(1.中国科学院 大连化学物理研究所,大连 116023;2.大连水产学院,大连 116023;
3.中国科学院 武汉病毒研究所,武汉 430071)

摘 要:用PCR技术扩增*NtSKP1*基因的编码区,定向克隆至表达载体pCAMBIA1302上构建用于瞬时表达*NtSKP1*蛋白的重组质粒。重组质粒经PCR和测序鉴定后用冻融法转入农杆菌LBA4404,进而经农杆菌LBA4404介导转入烟草悬浮细胞,激光共聚焦显微镜观察确定其亚细胞定位。测序结果表明,插入片段与预期序列完全一致,与载体形成了一个完整的基因表达盒;亚细胞定位结果表明*NtSKP1*蛋白在胞浆和核部位均有分布。

关键词:*NtSKP1*基因,植物表达载体,亚细胞定位
中图分类号:Q812 **文献标识码**:A **文章编号**:1004-1389(2009)04-0144-05

Construction of NtSKP1-GFP Plant Expression Vector and Subcellular Location

ZHANG Fuyun[1,2], CHEN Shiyun[3], ZHAO Xiaoming[1],
BAI Xuefang[1] and DU Yuguang[1]
(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian Liaoning 116023, China;
2. Dalian Fisheries University, Dalian Liaoning 116023, China; 3. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan Hubei 430071 China)

Abstract: To construction plant expression vector of *NtSKP1*, the open reading frame of *NtSKP1* was amplified by PCR, and was inserted to plasmid pCAMBIA1302. DNA sequencing showed that the sequence of the recombinant plasmid was correct. Then the recombinant plasmid was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 through freeze-thaw method. To subcellular location the *NtSKP1*, the recombinant plasmid was transformed into the tobacco suspension cells mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, and the location of *NtSKP1* was detected in both cytoplasm and nucleus.

Key words: Gene of *NtSKP1*; Plant expression vector; Subcellular location

S期激酶相关蛋白1(S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1, SKP1)是真核生物中普遍存在的一类蛋白,通常与CDC53P/Cul1 F-box形成SCF复合体参与泛素蛋白降解途径调控细胞循环,生物节律,生物抗逆性以及雄性不育等许多重要反应[1]。如拟南芥*Atskp1*基因在茎尖、花序、根的分生组织及叶原基和花原基等分裂旺盛的组织中呈现高水平表达,在这些分裂活性高的部位*Atskp1*基因的mRNA高度累积,因此*Atskp1*基因可能是植物细胞维持分裂活性所必不可少的[2];另研究表明拟南芥中*SKP1*参与的SCF复合体在生长素响应途径中也起着重要作用[3];西红柿的*SKP1*对于西红柿抵抗枯萎病的发作至关重要[4];大豆包囊线虫侵染大豆可诱

收稿日期:2009-02-20 修回日期:2009-04-20
基金项目:国家高技术研究发展计划"863"(2001AA620501)、(2002AA245131)资助。
作者简介:张付云(1969-),女,河北磁县人,副教授,研究方向:壳寡糖诱导的植物抗性基因的筛选鉴定。E-mail:zhangfuyun2002@yahoo.com.cn

万方数据

导大豆 *SKP1* 基因的转录,*SKP1* 可能参与大豆抵御线虫的侵染[5];又 *SKP1* 基因与 *N*-基因介导的抗烟草花叶病毒(TMV)病相关[6]。综上所述,植物 *SKP1* 基因在植物的生长及抗病性等方面都起着重要的作用,而 *NtSKP1* 基因是本研究室在探讨壳寡糖对烟草基因表达水平的影响时检测到的一个可被壳寡糖诱导表达的基因,并对该基因进行了初步鉴定[7],但该基因的功能有待深入研究。本研究即利用 PCR 技术扩增出 *NtSKP1* 的全长编码序列,并定向克隆到携带有绿色荧光蛋白基因的双元载体 pCAMBIA1302,成功构建了能表达 NtSKP1-GFP 融合蛋白的重组质粒,并将其转化烟草悬浮细胞进行瞬时表达,从而得以通过激光共聚焦对 *NtSKP1* 进行亚细胞定位观察,为进一步研究 *NtSKP1* 基因的功能,探讨其在壳寡糖等信号途径中的作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*植物材料、菌种和质粒*　枯斑三生烟草(*Nicotiana tabacum* var. Samsun NN)悬浮细胞系本实验室传代培养。培养基为 MS 液体培养基,培养条件:温度 25℃,光照 12 h,光照强度 1 500 lx,摇床转速 110 r/min,每半个月继代培养一次,所用细胞培养 30 代以上;pMD18-*SKP1* 重组质粒由本室构建;大肠杆菌 TOP10 菌株由上海复旦大学顾建新教授惠赠;pCAMBIA1302 质粒由中国科学院武汉病毒研究所陈土云研究员惠赠;农杆菌 LBA4404 菌株为中国农业大学张宁博士惠赠;PMD 18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2　*实验试剂*　限制性内切酶、LA *Taq* DNA 聚合酶、DNA 回收纯化试剂盒和 T_4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA Marker Ⅲ 购自北京天为时代科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯;溴化乙啶(Ethidium bromide, EB)购自 Invitrogen 公司。

1.1.3　*引物设计与合成*　根据 *SKP1* 基因的序列,并参考 pCAMBIA1302 T-DNA fragment 的多克隆位点,设计 *SKP1* 基因在植物中过表达的引物 skp1SLs 和 skp1SLa,由宝生物工程(大连)有限公司合成。在引物 skp1SLs 和 skp1SLa 的 5′端分别引入了 *Bgl* Ⅱ 和 *Spe* Ⅰ 酶切位点(下划线部分),引物序列如下:

SKP1 上游表达引物(skp1SLs)-5′ CGGCCAGATCTATGTCCTCCTCAAAGATG 3′

SKP1 下游表达引物(skp1SLa)-5′ GCCGCACTAGTCTCAAATGCCCAAGCATT 3′

1.2　实验方法

1.2.1　*双元表达载体(pCAMBIA1302-SKP1)的构建*　以 pMD18-*SKP1* 质粒为模板,用引物 skp1SLs 和 skp1SLa 扩增待表达的 *SKP1* 基因编码区(去掉终止密码子)片段,PCR 扩增反应条件为 95℃ 2 min, 94℃ 15 s, 50℃ 30 s, 72℃ 2 min, 4 个循环;94℃ 15 s, 68℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环;72℃ 延伸 10 min。将 PCR 反应的产物在 1% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)中电泳,以 DNA Mark Ⅲ 做为分子量标准,电泳结束后在 302 nm 波长的紫外灯下观察结果拍照并回从胶中收目的片段。分别用 *Bgl* Ⅱ 和 *Spe* Ⅰ 酶双酶切回收纯化的 *SKP1* 基因目的片段和载体 pCAMBIA1302,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,回收纯化目的片段,用 T_4 DNA 连接酶将 *SKP1* 序列连接到双元载体 pCAMBIA1302 的花椰菜花叶病毒 35S 强启动子下游和 GFP 完全编码区的上游(流程图见图 1),连接产物转化大肠杆菌 TOP10 并用菌落 PCR 初步筛选阳性重组质粒,将 PCR 鉴定为阳性的克隆提取质粒并送宝生物工程(大连)有限公司进行测序。

1.2.2　*农杆菌感受态细胞的制备、转化及鉴定*　农杆菌 LBA4404 感受态细胞制备和表达载体转入农杆菌参照王关林等的方法进行[8];转化后在 YEB 固体选择培养基(附加 100 μg/mL 卡那霉素)表面培养 1～2 d,挑取 pCAMBIA1302-*SKP1* 质粒转化的农杆菌 LBA4404 单菌落用 skp1 SLs 和 skp1 SLa 为引物进行菌落 PCR 鉴定,同时用 35S 特异性引物检测 pCAMBIA1302 转化的农杆菌 LBA4404 单菌落。

1.2.3　*烟草悬浮细胞的转化及观察*　农杆菌培养按 Clough 等(1998)方法进行[9]。

烟草细胞的侵染及目的蛋白瞬时表达:将等体积的农杆菌与处于对数生长期的烟草悬浮细胞混合黑暗条件下静置培养 24～48 h,用 Leica SP2 型激光共聚焦显微镜观察。观察条件为:以 488 nm 为激发光,激光强度为 30%。

万方数据

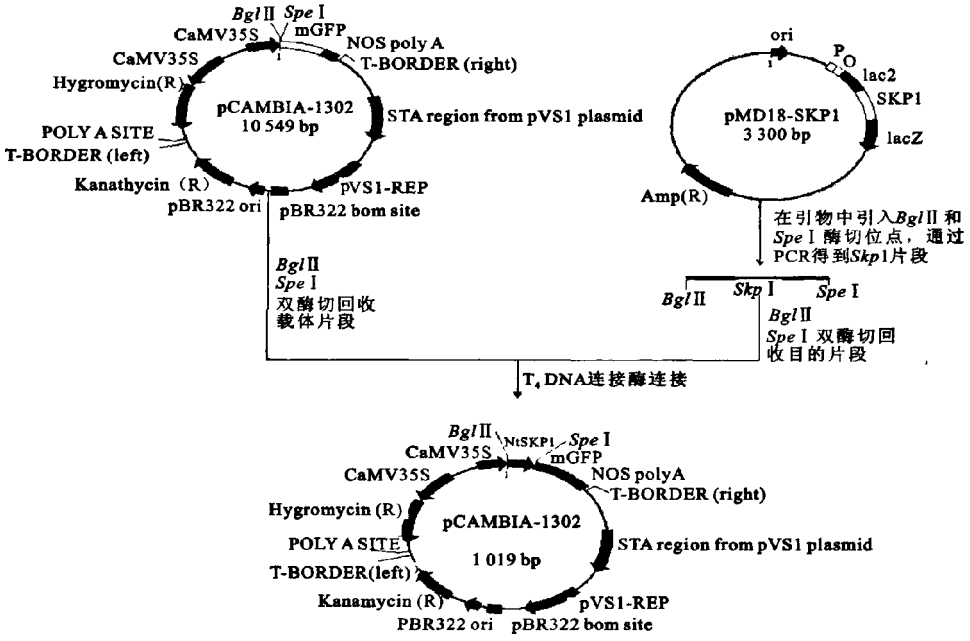


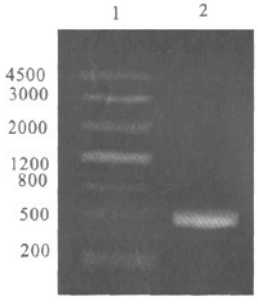
图 1 植物表达载体 pCABIA1302-SKP1 的构建

Fig. 1 Construction of the binary pCABIA1302-SKP1

2 结果与分析

2.1 *NtSKP1* 基因的 PCR 扩增

以质粒 pMD18-SKP1 为模板，用引物 skp1SLs 和 skp1SLa 扩增枯斑三生烟草 SKP1 基因的编码区序列，电泳检测结果(图 2)表明扩增产物为 470 bp，与预期结果相符。



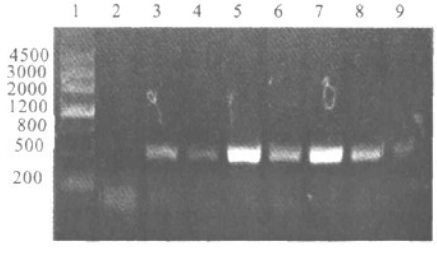
1. 分子量标准 DNA Marker Ⅲ DNA Marker Ⅲ；2. *Nt-SKP1* 基因的 PCR 结果 PCR products of *NtSKP1*

图 2 *NtSKP1* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose electrophoresis of PCR products of *SKP1*

2.2 重组质粒 pCAMBIA1302-SKP1 的筛选鉴定

用 Bg Ⅰ Ⅱ 和 Spe Ⅰ 分别双酶切从凝胶中回收纯化的 *SKP1* 基因的片段和双元表达载体 pCAMBIA11302，经琼脂糖凝胶电泳并回收纯化后，用 T_4 DNA 连接酶连接，将连接产物转化大肠杆菌，菌落 PCR 筛选阳性克隆，结果(图 3)显示只有 1 号克隆没有目的片段的扩增，2-8 号克隆均扩出目的片段为阳性克隆，提取阳性克隆的质粒并将 4 号克隆的质粒送宝生物工程(大连)有限公司测序，序列分析表明插入片段与预期序列完全一致，并且与载体形成了一个完整的基因表达盒(图 4)。



1. 分子量标准 DNA Marker Ⅲ DNA Marker Ⅲ；2-9. 可能含重组质粒 pCAMBIA1302-SKP1 的菌落 1-8 Colonies 1-8 containing pCAMBIA1302-SKP1 possible

图 3 菌落 PCR 鉴定重组质粒 pCAMBIA1302-SKP1

Fig. 3 PCR analysis of recombinant plasmid pCAMBIA1302-SKP1

2.3 农杆菌阳性克隆的筛选鉴定

将测序正确的大肠杆菌单克隆扩大培养提取

万方数据

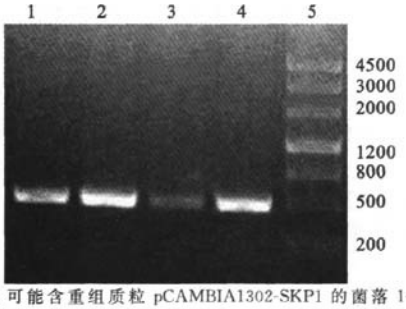
质粒,并转化农杆菌 LBA4404 后,随机挑取 4 个抗性菌落进行菌落 PCR 验证,同时将双元载体 pCAMBIA 1302 转化农杆菌并进行 PCR 检测,结果显示(图 5 和图 6)被检测的菌落均扩增出了预期大小的目的片段,为阳性克隆,可用于植物组织的转化。

TATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTTGACCATGGTAGATCT

ATGTCCTCCTCAAAGATGATCGTATTGAAGAGCTCGGACGGCGAGACTTTCGAGGTGG
AGGAAGCGGTGGCTTTGGAATCTCAGACGATAAAGCATATGATTGAAGATGATTGCGC
CGACACCAGCATCCCCCTTCCTAATGTGACCAGCAAAATCTTGGCTAAGGTTATCGAGT
ACTGCAAGCGCCATGTTGATGCTACCAAAACTGAGGATAAGGCTTCTGAGGATGAGCT
TAAGGGCTTTGATTCTGATTTCGTTAAAGTTGACCAGGCCACCCTATTCGATCTCATCTT
GGCTGCCAACTACTTGAACATCAAGAGCCTGCTTGATCTCACATGTCAAACTGTGGCT
GACATGATTAAAGGGAAGACACCAGAGGAGATCCGGAAGACCTTTAACATCAAGAAT
CACTTCACTCCAGAGGAAGAAGAGGAGGTTAGGAGGGAGAATGCTTGGGCATTTGAG
ACTAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATT
AGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTEATGCA
ACATACGGAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCGTGG

图 4　重组质粒 pCAMBIA1302-SKP1 测序结果

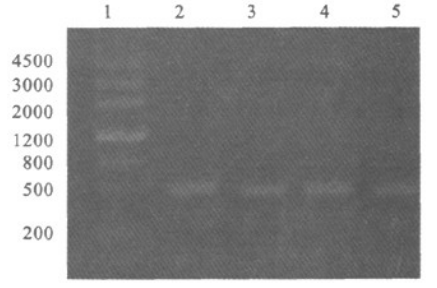
Fig. 4　Sequencing result of recombinant plasmid pCAMBIA1302-SKP1



1-4. 可能含重组质粒 pCAMBIA1302-SKP1 的菌落 1-4 Colonies 1-4 containing pCAMBIA1302-SKP1 possible;5. 分子量标准 DNA Marker Ⅲ　DNA Marker Ⅲ

图 5　菌落 PCR 鉴定含 pCAMBIA1302-SKP1 的农杆菌 LBA4404 阳性克隆

Fig. 5　Screening positive colonies of LBA4404 containing pCAMBIA1302-SKP1 by PCR



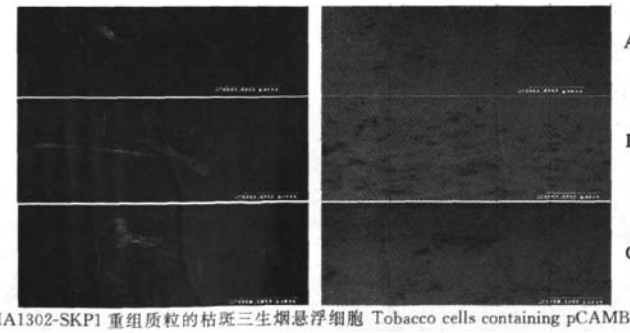
1:分子量标准 DNA Marker Ⅲ, DNA Marker Ⅲ;2-5:可能含重组质粒 pCAMBIA1302 的菌落 1-4, colonies 1-4 containing pCAMBIA1302 possible

图 6　菌落 PCR 鉴定含 pCAMBIA11302 的农杆菌 LBA4404 阳性克隆

Fig. 6　Screening positive colonies of LBA4404 containing pCAMBIA1302 by PCR

2.4　目的基因在烟草悬浮细胞中的表达及观察

按照方法 1.2.3 用农杆菌侵染枯斑三生烟悬浮细胞,静置培养 24～48 h,在 Leica SP2 型激光共聚焦显微镜下观察,结果表明(图 7)枯斑三生烟的 SKP1 蛋白在胞质和细胞核部位均有分布。



A 和 B. 转 pCAMBIA1302-SKP1 重组质粒的枯斑三生烟悬浮细胞 Tobacco cells containing pCAMBIA1302-SKP1;C. 转 pCAMBIA 1302 质粒的枯斑三生烟悬浮细胞 Tobacco cells containing pCAMBIA1302

图 7　转基因烟草悬浮细胞的激光共聚焦图像

Fig. 7　Transgenic tobacco cells detected by confocal microscope

万方数据

3 讨 论

由于在生命活动中真正起作用的是基因的表达产物-蛋白质，而蛋白质的功能与其在细胞中的亚细胞定位密切相关，尤其是对于真核细胞，蛋白质位于细胞的不同部位所行使的功能也不同，因此对蛋白质进行亚细胞定位是研究其功能必不可少的环节之一。因此，为了确定 *NtSKP1* 蛋白在细胞中的存在位置，本实验利用 GFP 标记方法研究了 *NtSKP1* 亚细胞定位特性。

pCAMBIA1302 是一个能同时在大肠杆菌和农杆菌中复制的双元载体。在其 T-DNA 区，含有潮霉素筛选标记和 mGFP5 报告基因，可以很方便的筛选转基因植株和快速鉴定外源基因的定位和表达情况；在其 T-DNA 区外含有 rep 和 sta 区，可以保证质粒即使在非选择性条件下也可以在农杆菌中稳定存在[10]。在本实验中即将 *NtSKP1* 的编码区插入 pCAMBIA1302 载体的 35S 启动子下游，并将 *NtSKP1* 的终止密码子去掉，以表达出 *NtSKP1*-GFP 融合蛋白，实验及测序结果（图 3、图 4）证明构建的重组质粒 pCAMBIA1302-SKP1 序列正确且形成一个完整的基因表达盒可用于转化农杆菌及烟草。转化时用 pCAMBIA1302 空质粒作为阳性对照，由于 pCAMBIA1302 中的 GFP 是在 35S 强启动子下控制表达的，因此在 pCAMBIA1302 转化的枯斑三生烟的悬浮细胞中有 GFP 表达且均匀分布在整个细胞中（图 7，C）；而在 pCAMBIA1302-SKP1 转化的枯斑三生烟的悬浮细胞中 SKP1-GFP 呈现不同的分布形式，有的细胞中分布在整个细胞中但强度较弱（图 7，B），而在有的细胞中虽然在胞浆也有分布，但细胞的核区荧光强度更大（图 7，A），这与其他物种 SKP1 的分布[11-12]和与其互作的蛋白酶体分布[13-16]趋势一致，因此推断 *NtSKP1* 也是均匀分布在细胞中，可能在细胞分裂或细胞核修复等特殊状态时更趋于进入核区。这些结果为 *NtSKP1* 基因的鉴定和功能的推测提供了一定的依据，但是该蛋白在细胞中的分布和功能以及二者之间的关系有待深入研究。

参考文献：

[1] Craig KL, Tyers M. The F-box: a new motif for ubiquitin-dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction [J]. Prog Biol, 1999, 72: 299-328.

[2] Porat R, Lu P, O'Neill S D. Arabidopsis SKP1, a homologue of a cell cycle regulator gene, is predominantly expressed in meristematic cells [J]. Planta, 1998, 204 (3): 345-351.

[3] Gray W M, Estelle I. Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response [J]. Trend Biochem Sci, 2000, 25 (3): 133-138.

[4] Duyvesteijn R G, van Wijk R, Boer Y, *et al*. Frp1 is a Fusarium oxysporum F-box protein required for pathogenicity on tomato [J]. Mol Microbiol, 2005, 57 (4): 1051-1063.

[5] Alkharouf N W, Klink V P, Chouikha I B, *et al*. Time-course microarray analyses reveal global changes in gene expression of susceptible Glycine max (soybean) roots during infection by Heterodera glycines (soybean cyst nematode) [J]. Planta, 2006, 224 (4): 838-852.

[6] Liu Y, Schiff M, Serino G, *et al*. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 Signalosome in the N gene-mediated resistance to Tobacco mosaic virus [J]. The plant cell, 2002, 14 (7): 1483-1496.

[7] 张付云，白雪芳，杜昱光，等. 烟草 *SKP1* 基因 cDNA 的克隆分析及原核表达[J]. 作物学报，2007，33(4)：693-696.

[8] 王关林，方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京：科学出版社，2002，698-700.

[9] Clough, Bent. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana[J]. The Plant Journal, 1998, 16 (6): 735-743.

[10] Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P. The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 25(6): 989-994.

[11] Rosa F, Alejandro F, Ján J, *et al*. SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase [J]. The EMBO Journal. 2001, 20 (11): 2742-2756.

[12] Connelly C, Hieter P. Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression [J]. Cell, 1996, 86: 275-285.

[13] Reits EAJ, Benham AM, Plougastel B, *et al*. Dynamics of proteasome distribution in living cells [J]. EMBO. J., 1997, 16: 6087-6094.

[14] Amsterdam A, Pitzer F & Baumeister W. Changes in intracellular localization of proteasomes in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90: 99-103.

[15] Klein U, Gernold M & Kloetzel P M. Cell-specific accumulation of Drosophila proteasomes (MCP) during early development [J]. J. Cell Biol, 1990, 111: 2275-2282.

[16] Gray W M, Del pozo J C, Walker L, *et al*. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana[J]. Genes Dev., 1999, 13: 1678-1691.

万方数据

NtSKP1-GFP植物表达载体的构建及亚细胞定位

万方数据 WANFANG DATA 文献链接

刊名: 西北农业学报 ISTIC PKU
英文刊名: ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OCCIDENTALIS SINICA
年，卷(期): 2009,18(4)
被引用次数: 6次

参考文献(16条)

1. Craig KL;Tyers M The F-box..a new motif for ubiquitindependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction[外文期刊] 1999(3)

2. Porat R;Lu P;O'Neill S D Arabidopsis SKP1,a homologue of a cell cycle regulator gene,is predominantly expressed in meristematie cells[外文期刊] 1998(03)

3. Gray W M;Estelle I Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response 2000(03)

4. Duyvesteijn R G;van Wijk R;Boer Y Frpl is a Fusarium oxysporum F-box protein required for pathogenicity on tomato[外文期刊] 2005(04)

5. Alkharouf N W;Klink V P;Chouikha I B Timecourse microarray analyses reveal global changes in gene expression of susceptible Glycine max (soybean) roots during infection by Heterodera glycines (soybean cyst nematode)[外文期刊] 2006(04)

6. Liu Y;Schiff M;Serino G Role of SCF ubiquitinligase and the COP9 Signalosome in the N gene-mediated resistance to Tobacco mosaic virus[外文期刊] 2002(07)

7. 张付云;白雪芳;杜昱光 烟草SKP1基因cDNA的克隆分析及原核表达[期刊论文]-作物学报 2007(04)

8. 王关林;方宏筠 植物基因工程 2002

9. Clough;Bent Floral dip:a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana[外文期刊] 1998(06)

10. Hajdukiewicz P;Svab Z;Maliga P The small,versatile Ppzp family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation 1994(06)

11. Rosa F;Alejandro F;Jan J SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase 2001(11)

12. Connelly C;Hieter P Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression 1996

13. Reits EAJ;Benham AM;Plougastel B Dynamics of proteasome distribution in living cells 1997

14. Amsterdam A;Pitzer F;Baumeister W Changes in intracellular localization of proteasomes in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control 1993

15. Klein U;Gernold M;Kloetzel P M Cell-specific accumulation of Drosophila proteasomes (MCP) during early development 1990

16. Gray W M;Del pozo J C;Walker L Identification of an SCF uhiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana 1999

本文读者也读过(4条)

1. 宁文彬. 贾彩红. 张建斌. 刘菊华. 胡伟. 徐碧玉. 金志强 香蕉Maasr1基因GFP植物表达载体构建及亚细胞定位[会议

论文]-2008

2. 夏玉凤.Xia Yufeng 以gfp为报告基因研究蛋白亚细胞定位[期刊论文]-生物技术通报2006(2)

3. 彭威风.梁卫红.Peng Weifeng.Liang Weihong 水稻OsRhoGDI2蛋白生物信息学分析及亚细胞定位研究[期刊论文]-生物技术通报2010(5)

4. 邵军丽 烟草小GTP结合蛋白NtRab5b的亚细胞定位及其功能分析[学位论文]2009

引证文献(6条)

1.段瑞军.符少萍.郭建春 海马齿SRTG152-1基因表达产物的亚细胞定位[期刊论文]-热带作物学报 2011(4)

2.田英.赵彩平.韩明玉 桃脂氧合酶基因(PpLOX-3)在洋葱表皮细胞中的定位表达[期刊论文]-西北农业学报 2011(9)

3.姜志昂.孙建设.彭建营.邵建柱 苹果MdGA20ox1基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[期刊论文]-园艺学报 2013(12)

4.韩键.王化坤.宋长年.上官林飞.冷翔朋 一个新的枳NAC基因cDNA全长的克隆及其亚细胞定位分析[期刊论文]-江西农业学报 2012(3)

5.王西成.任国慧.房经贵.李阿英.刘洪.吴伟民.赵密珍 葡萄赤霉素合成相关基因克隆、亚细胞定位和表达分析[期刊论文]-中国农业科学 2012(11)

6.杨光.曹雪.房经贵.黄振喜.陶建敏.王晨 葡萄花发育基因的亚细胞定位和表达分析[期刊论文]-中国农业科学 2011(3)

引用本文格式：NtSKP1-GFP植物表达载体的构建及亚细胞定位[期刊论文]-西北农业学报 2009(4)