

## 茶树 ATP 硫化酶和硒半胱氨酸甲基转移酶 基因植物表达载体的构建

朱林<sup>1,2</sup>, 江昌俊<sup>1\*</sup>, 叶爱华<sup>1</sup>, 李叶云<sup>1</sup>, 余梅<sup>1</sup>, 邓威威<sup>1</sup>, 房婉萍<sup>3</sup>

(1. 安徽农业大学农业部茶叶生物化学与生物技术重点开放实验室, 2. 安徽农业大学资源与环境学院, 安徽 合肥 230036; 3. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 采用能有效转化双子叶植物的表达载体 pBI121 构建植物硒营养代谢关键酶基因的表达载体, 将原载体中 GUS 基因用茶树 ATP 硫化酶基因 (*APSI* 和 *APS2*) 替换, 将硒半胱氨酸甲基转移酶基因 (*CsSMT*) 连接到 pBI121 载体上直接与 GUS 基因相连, 分别构建了目的基因植物表达载体 pBI-*APSI*、pBI-*APS2* 和 pBI-*CsSMT*。通过三亲杂交法将重组质粒导入根癌农杆菌 LBA4404 中, 获得转化工程菌, 为通过植物基因工程获得富硒农产品打下基础。

**关键词:** 茶树; ATP 硫化酶; 硒半胱氨酸甲基转移酶; 基因; 植物表达载体

中图分类号: S571.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 02-0121-05

## Construction of plant expressing vectors of ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase genes from *Camellia sinensis*

ZHU Lin<sup>1,2</sup>, JIANG Chang-jun<sup>1\*</sup>, YE Ai-hua<sup>1</sup>, LI Ye-yun<sup>1</sup>, YU Mei<sup>1</sup>, DENG Wei-wei<sup>1</sup>, FANG Wan-ping<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Ministry of Agriculture,  
2. College of Resources and Environmental Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;  
3. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Plant expressing vectors of key enzyme genes related to selenium metabolism were constructed by employing the vector pBI121, one of the most effective expressing vectors for dicotyledon in transformation process. In the construction the GUS in pBI121 was substituted by ATP sulfurylase genes (*APSI* and *APS2*) in tea plant, while the selenocysteine methyltransferase of *Camellia sinensis* (*CsSMT*) was directly attached to that of GUS, so that expressing vectors of pBI-*APSI*, pBI-*APS2* and pBI-*CsSMT* were obtained respectively. These engineering bacteria were acquired by introducing recombinant vectors into *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (pAL4404) through method of triparental-mating. This practice provides a fundamental investigation for producing enriched-selenium product by the way of the gene engineering.

**Key words:** *Camellia sinensis*; ATP sulfurylase; selenocysteine methyltransferase; gene; plant expressing vector

植物和微生物能同化无机硫形成有机含硫化合物, ATP 硫化酶 (ATP: sulfate adenylyltransferase, EC2.7.7.4) 在硫代谢过程中起关键作用。ATP 硫化酶催化硫酸盐形成腺苷磷硫酸然后进一步还原为硫化物<sup>[1]</sup>。硒的生物化学特性在许多方面与硫相似<sup>[2]</sup>, 因此 ATP 硫化酶也能活化硒酸盐, 是硒酸盐还原和硒积累的关键酶<sup>[3]</sup>。

硒半胱氨酸甲基转移酶 (selenocysteine methyltransferase, SMT) 使二沟黄芪 (*Astragalus bisulcatus*) 对硒产生耐性, SMT 专一催化硒半胱氨酸甲基化为非蛋白质组成的氨基酸——甲基硒代半胱氨酸 (Met-SeCys), 这样降低了细胞内硒半胱氨酸 (SeCys) 和硒甲硫氨酸 (SeMet) 的含量, 从而阻止了这些氨基酸错误地进入这些耐硒物种的蛋白质中, 在植物硒营养代谢过程中发挥关键作用<sup>[4-7]</sup>。

我们已从富硒茶树中克隆出茶树 ATP 硫化酶基因和硒半胱氨酸甲基转移酶基因的 cDNA<sup>[8-9]</sup>。为了实现将茶树 ATP 硫化酶和硒半胱氨酸甲基转移酶基因转入到其他植物中, 以提高这些植物的耐硒能力和其体内有机硒的含量, 构建这些基因的植物表达载体就成为问题的关键。

本研究采用一个能有效转化双子叶植物的表达载体 pBI121, 构建出目的基因植物表达载体 pBI-

*APSI*、*pBI-APS2* 和 *pBI-CsSMT*。为进一步将茶树硒硫代谢关键酶的基因转移到其他植物中, 获得转基因植物打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

工具酶和生化试剂: Pyrobest™ DNA Polymerase、*T*<sub>4</sub> DNA Ligase 和各种限制性内切酶购自 Promega 公司及大连宝生物工程公司; 卡那霉素 (Kan)、利福平 (Rif)、羧苄青霉素 (Carb) 和氨苄青霉素 (Amp) 等抗生素均购自 Sigma 公司; 核酸凝胶纯化试剂盒 SK1131 购自上海生物工程公司; DNA Marker 购自 MBI 公司, PCR 引物由上海生物工程公司合成, DNA 序列测定由 Invitrogen 公司完成。

菌株和载体: 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌 LBA4404 (*pAL4404*)、二元表达载体 *pBI121* 和大肠杆菌 HB101 (*pRK2013*) 为本实验室购买和保存。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 RT-PCR 法克隆目的片段** 根据茶树 *APSI*、*APS2* 和 *CsSMT* 的 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号分别为: EF218618、EF218619 和 DQ480337) 设计引物 YP<sub>1</sub> 和 YP<sub>2</sub>、YP<sub>3</sub> 和 YP<sub>4</sub>、YP<sub>5</sub> 和 YP<sub>6</sub>, 扩增阅读框序列。其中上游引物 YP<sub>1</sub>、YP<sub>3</sub> 和 YP<sub>5</sub> 分别与 *APSI*、*APS2* 和 *CsSMT* 的 5' 端起始密码子前后序列相同, 下游引物 YP<sub>2</sub>、YP<sub>4</sub> 和 YP<sub>6</sub> 分别与 *APSI*、*APS2* 和 *CsSMT* 的 3' 端终止密码子前后序列反向互补。为了将 RT-PCR 产物定向克隆到载体 *pBI121* 中, 在引物 YP<sub>1</sub>、YP<sub>3</sub> 和 YP<sub>5</sub> 的 5' 端引入 *Bam*H I 酶切位点, YP<sub>2</sub>、YP<sub>4</sub> 的 3' 端引入 *Sac* I 酶切位点, YP<sub>6</sub> 的 3' 端引入 *Sma* I 酶切位点。引物序列分别为: YP<sub>1</sub>: 5'-GATGGATCCATGAGAGAGGATGAGTATTT-G-3'; YP<sub>2</sub>: 5'-GCAGAGCTCTTATGTCTGTGTGGATAAAAAC-3'; YP<sub>3</sub>: 5'-GATGGATCCATGGCGTCCATGGCCCTCCTT-3'; YP<sub>4</sub>: 5'-GCGGAGCTCTTAAGCTGGCACAG-GTTCAGG-3'; YP<sub>5</sub>: 5'-ACCGGATCCATGGGACTAAGCGTCGCTGAA-3'; YP<sub>6</sub>: 5'-GAACCCGGGTCATTT-GAGAGATGGAGCAGC-3' (下划线表示酶切位点)。PCR 反应体系为: 37.7  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 5.0  $\mu$ L 10  $\times$  Pyrobest Buffer, 1  $\mu$ L dNTP Mix (2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> each), 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 引物 YP<sub>1</sub>/YP<sub>2</sub>、YP<sub>3</sub>/YP<sub>4</sub> 和 YP<sub>5</sub>/YP<sub>6</sub> 各 1.0  $\mu$ L, cDNA 第 1 链 4.0  $\mu$ L。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 78  $^{\circ}$ C 时, 加 0.3  $\mu$ L Pyrobest™ DNA Polymerase; 95  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54  $^{\circ}$ C 退火 80 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环; 然后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测, 按照文献 [10] 方法将扩增产物克隆至 *pMD-T* 载体上, 获得重组子 *pMD-APSI*、*pMD-APS2* 和 *pMD-CsSMT*, 分别挑选其中 3 个阳性克隆进行测序。

**1.2.2 植物表达载体的构建** 使用 *Bam*H I 和 *Sac* I 对上述重组子 *pMD-APSI* 和 *pBI121* 质粒进行双酶切。在 2 个 0.5 mL eppendorf 管中分别依次加入: 2  $\mu$ L 10  $\times$  L Buffer, 1.0  $\mu$ g *pMD-APSI* 或 *pBI121*, 1.0  $\mu$ L *Sac* I, 加灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 20  $\mu$ L; 37  $^{\circ}$ C 3 h, 然后 65  $^{\circ}$ C 15 min, 4 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 15 s。再向反应体系依次加入 2.3  $\mu$ L 10  $\times$  K Buffer, 1.0  $\mu$ L *Bam*H I; 37  $^{\circ}$ C 3 h, 然后 65  $^{\circ}$ C 15 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果, 纯化 *pMD-APSI* 被酶切后产生的小片段和 *pBI121* 被酶切后产生的大片段。用相同的方法对 *pMD-APS2* 和 *pMD-CsSMT* 进行酶切、回收和纯化。

向 0.5 mL eppendorf 管中加入酶切回收后的 *pBI121* 大片段 200 ng 和 3 倍摩尔量 *pMD-APSI* 酶切回收产物, 1  $\mu$ L 10  $\times$  Ligation Buffer、1  $\mu$ L *T*<sub>4</sub> DNA Ligase, 加水至总体积 10  $\mu$ L, 混匀, 16  $^{\circ}$ C 过夜。同样的方法将 *pMD-APS2* 和 *pMD-CsSMT* 酶切产物分别与 *pBI121* 酶切产物进行连接反应。

按照文献 [10] 的方法, 将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 筛选阳性单菌落, 抽提重组质粒 DNA, 进行重组质粒的鉴定, 对初步鉴定正确的菌落用甘油保存并进行测序, 经测序确认将插入位点正确的重组质粒分别命名为 *pBI-APSI*、*pBI-APS2* 和 *pBI-CsSMT*。

**1.2.3 三亲杂交法将重组质粒导入根癌农杆菌** 参照王关林等<sup>[11]</sup>的方法, 用三亲杂交法将重组质粒导入根癌农杆菌 LBA4404 中, 构建转化工程菌。

**1.2.4 转化工程菌的鉴定** 挑取上述用抗生素二次筛选所产生的单菌落, 进行 PCR 扩增, 以 LBA4404 (*pAL4404*)、HB101 (*pRK2013*)、DH5 $\alpha$  (*pBI-APSI*)、DH5 $\alpha$  (*pBI-APS2*) 及 DH5 $\alpha$  (*pBI-CsSMT*) 为对照。然后分别从菌落 PCR 呈阳性的 3 种工程菌菌落中提取 Mini-Ti 质粒<sup>[10-11]</sup>, 分别以 3 种工程菌 Mini-Ti 质粒为模板进行质粒 PCR 鉴定<sup>[10]</sup>。对含有 *APSI* 和 *APS2* 的工程菌 Mini-Ti 质粒均用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行酶切验证, 对于含有 *CsSMT* 的工程菌 Mini-Ti 质粒用 *Bam*H I 和 *Sma* I 进行酶切验证<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 茶树硒硫代谢关键酶基因阅读框片段的扩增与转化

以茶叶叶片总 RNA 为模板, 合成 cDNA 第 1 链, 分别以 YP<sub>1</sub> 和 YP<sub>2</sub>、YP<sub>3</sub> 和 YP<sub>4</sub> 为引物进行 RT-PCR 反应, 扩增 *APS1*、*APS2* 的阅读框序列, 得到的 PCR 产物分别约为 1 000 和 1 400 bp (图 1-A)。以 YP<sub>5</sub> 和 YP<sub>6</sub> 为引物用同样方法扩增 *CsSMT* 的阅读框序列, 得到约 1 000 bp 的 PCR 产物 (图 1-B)。

将上述 RT-PCR 产物插入到载体 pMD-18T 中, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞后, 提取质粒进行双酶切, 分别得到约为 1 000 和 1 400 bp 的片段 (图 1-C), 测序后将正确的重组质粒命名为 pMD-*APS1* 和 pMD-*APS2*。用同样的方法得到重组质粒 pMD-*CsSMT*。

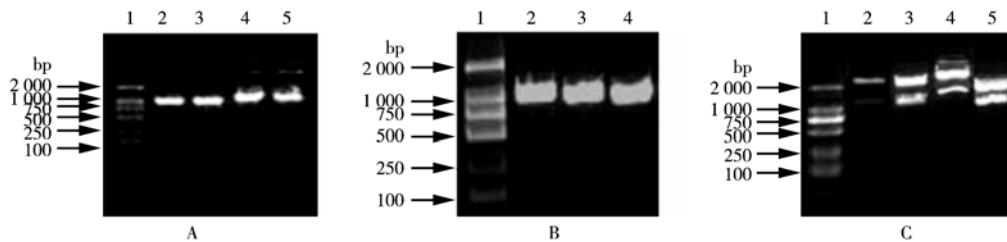


图 1 *APS1*、*APS2* (A) 和 *CsSMT* (B) cDNA 阅读框的 RT-PCR 产物及其重组质粒酶切鉴定 (C) 电泳图

Fig.1 Electrophoresis analysis of the RT-PCR products of *APS1*, *APS2* (A) and *CsSMT* (B) cDNA ORF and restriction digestion identification of recombinant plasmid (C)

A: 1. Marker; 2-3. *APS1*; 4-5. *APS2*. B: 1. Marker; 2-4. *CsSMT*. C: 1. Marker; 2. pMD-18T; 3. pMD-*APS1* (*Bam*H I + *Sac* I); 4. pMD-*APS2* (*Bam*H I + *Sac* I); 5. pMD-*CsSMT* (*Bam*H I + *Sma* I)

### 2.2 茶树硒硫代谢关键酶基因中间表达载体的构建

将质粒载体 pMD-*APS1* 和 pMD-*APS2* 分别用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 回收纯化小片段, 分别定向克隆到用同样酶双酶切的双元载体 pBI121 中, 替代其中的 GUS 基因。将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用双酶切法鉴定重组质粒 (图 2-A)。经测序确认将插入位点正确的重组质粒分别命名为 pBI-*APS1* 和 pBI-*APS2*。在这 2 个载体中茶树 ATP 硫化酶基因插入到 35S 启动子下游, 因而可以在其指导下进行正常的转录。

将质粒载体 pMD-*CsSMT* 用 *Bam*H I 和 *Sma* I 双酶切, 回收纯化小片段, 分别定向克隆到用同样酶双酶切的双元载体 pBI121 中, 双元载体 pBI121 酶切后保留了 GUS 基因。将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 用双酶切和质粒 PCR 法鉴定重组质粒 (图 2-B)。得到插入位点正确的重组质粒, 命名为 pBI-*CsSMT*。

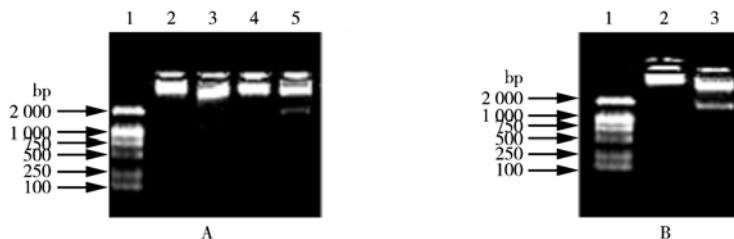


图 2 重组质粒 pBI-*APS1* 和 pBI-*APS2* (A) 及 pBI-*CsSMT* (B) 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction digestion identification of recombinant plasmid pBI-*APS1*, pBI-*APS2* (A) and pBI-*CsSMT* (B)

A: 1. Marker; 2. pBI-*APS1*; 3. pBI-*APS1* (*Bam*H I + *Sac* I); 4. pBI-*APS2*; 5. pBI-*APS2* (*Bam*H I + *Sac* I). B: 1. Marker; 2. pBI-*CsSMT*; 3. pBI-*CsSMT* (*Bam*H I + *Sma* I)

### 2.3 三亲杂交法制备转化工程菌

挑选三亲杂交后经过卡那霉素、链霉素和利福平等抗生素二次筛选的单菌落, 进行 PCR 扩增。结果从工程菌 LBA4404 (内含 Help-Ti 质粒 pAL4404 和 Mini-Ti 质粒 pBI-*APS1* 或 pBI-*APS2* 或 pBI-*CsSMT*) 及大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (内含 pBI-*APS1* 或 pBI-*APS2* 或 pBI-*CsSMT*) 中可以扩增出相应的特异片段, 而受体菌 LBA4404 (内含质粒 pAL4404) 和辅助菌 HB101 (内含协助质粒 pRK2013) 中未能扩增出相应的条带 (图 3)。由此可以说明, 中间表达载体 pBI-*APS1*、pBI-*APS2* 和 pBI-*CsSMT* 分别在辅助质粒 pRK2013 的协助下进入受体菌 LBA4404 (含质粒 pAL4404) 并能正常复制。

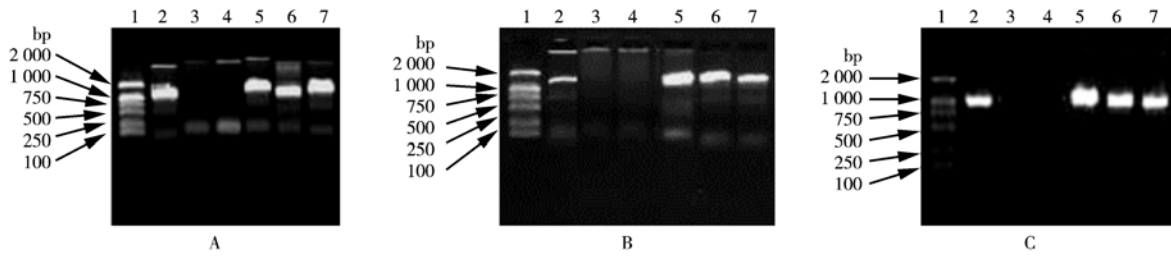


图 3 *APSI* (A) 和 *APS2* (B) 及 *CsSMT* (C) 的三亲杂交工程菌的菌落 PCR 验证

Fig. 3 Clony PCR analysis of triparental mating for purpose of transfer *APSI* (A), *APS2* (B) and *CsSMT* (C)

A: 1. Marker; 2. DH5 $\alpha$  (pBI-*APSI*); 3. HB101 (pRK2013); 4. LBA4404 (pAL4404); 5-7. LBA4404 (pAL4404 + pRK2013 + pBI-*APSI*). B: 1. Marker; 2. DH5 $\alpha$  (pBI-*APS2*); 3. HB101 (pRK2013); 4. LBA4404 (pAL4404); 5-7. LBA4404 (pAL4404 + pRK2013 + pBI-*APS2*). C: 1. Marker; 2. DH5 $\alpha$  (pBI-*CsSMT*); 3. HB101 (pRK2013); 4. LBA4404 (pAL4404); 5-7. LBA4404 (pAL4404 + pRK2013 + pBI-*CsSMT*)

用碱法从工程菌中分别少量提取 Mini-Ti 质粒 pBI-*APSI*、pBI-*APS2* 和 pBI-*CsSMT*，pBI-*APSI* 和 pBI-*APS2* 质粒均用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切，而 pBI-*CsSMT* 质粒用 *Bam*H I 和 *Sma* I 双酶切，酶切产物经过琼脂糖凝胶电泳后均获得载体和目标片段 2 条 DNA 条带 (图 4)。表明茶树硒硫代谢关键酶基因 *APSI*、*APS2* 和 *CsSMT* 的阅读框片段成功插入 pBI121 载体上。

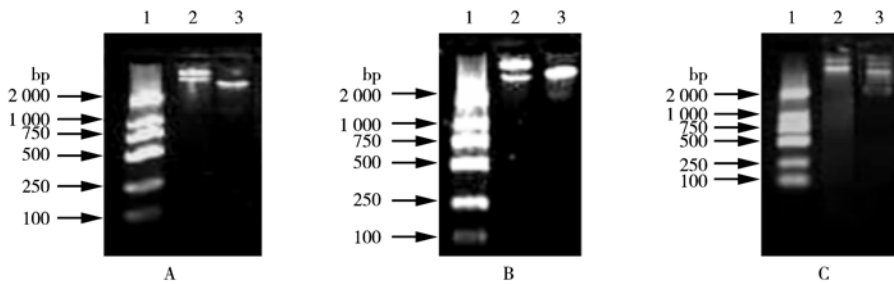


图 4 *APSI* (A) 和 *APS2* (B) 及 *CsSMT* (C) 的三亲杂交工程菌 Mini-Ti 质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Restriction digestion of Mini-Ti plasmid of triparental mating bacteria about *APSI* (A), *APS2* (B) and *CsSMT* (C)

A: 1. Marker; 2. Mini-Ti plasmid; 3. Mini-Ti plasmid (*Bam*H I + *Sac* I). B: 1. Marker; 2. Mini-Ti plasmid; 3. Mini-Ti plasmid (*Bam*H I + *Sac* I). C: 1. Marker; 2. Mini-Ti plasmid; 3. Mini-Ti plasmid (*Bam*H I + *Sma* I)

质粒 PCR 结果如图 5 所示，以 3 种工程菌 Mini-Ti 质粒为模板的质粒 PCR 分别得到约 1 000、1 400 和 1 000 bp 的扩增产物，经过测序插入片段的碱基序列与茶树 *APSI*、*APS2* 和 *CsSMT* 基因 cDNA 全长序列中相关序列完全一致。以上结果表明，质粒 pBI-*APSI*、pBI-*APS2* 和 pBI-*CsSMT* 均已转入农杆菌 LBA4404 中，成功构建了这些茶树硒硫代谢关键酶基因的工程菌。

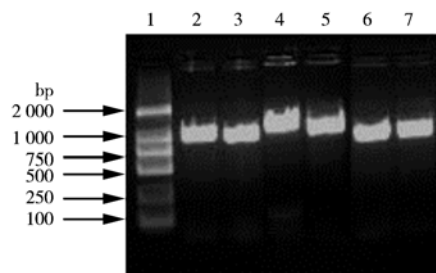


图 5 三亲杂交工程菌的质粒 PCR 验证

Fig. 5 Plasmid PCR analysis of triparental mating bacteria

1. Marker; 2-3. PCR of LBA4404 plasmid (pAL4404 + pRK2013 + pBI-*APSI*); 4-5. PCR of LBA4404 plasmid (pAL4404 + pRK2013 + pBI-*APS2*); 6-7. LBA4404 plasmid (pAL4404 + pRK2013 + pBI-*CsSMT*)

### 3 讨论

在本试验中，为了将 RT-PCR 产物定向克隆到载体 pBI121 中，在引物 YP<sub>1</sub>、YP<sub>3</sub> 和 YP<sub>5</sub> 的 5'端引入 *Bam*H I 酶切位点，YP<sub>2</sub>、YP<sub>4</sub> 的 3'端引入 *Sac* I 酶切位点，YP<sub>6</sub> 的 3'端引入 *Sma* I 酶切位点。将 RT-PCR 产物先连接到 pMD-18T 载体上，酶切鉴定后回收，定向插入到载体 pBI121 上，能保证得到正确的重组质粒<sup>[10-12]</sup>。

植物基因工程常用的中间表达载体有共整合载体系统和双元载体系统两种<sup>[11]</sup>，本试验中选用双元载体 pBI121。在载体 pBI121 中有 1 个 GUS 基因，该基因两侧由适用于植物基因表达的强启动子 35S 和 NOS 终止子构成的一个完整的表达框架，用 *APSI* (或 *APS2*) 基因取代 GUS，从而可以利用 GUS 基因两侧的表达框架使 *APSI* (或 *APS2*) 基因在其他植物体内得到高效表达，而 *CsSMT* 直接与 GUS 基因相

连可充分利用其表达系统。在载体中还有一个新霉素磷酸转移酶 II 基因 (*Npt-II* 基因), 它编码的产物对某些氨基葡萄糖类抗生素 (如卡那霉素、新霉素和 G418) 具有抗性。利用这个特性, 可以用卡那霉素等抗生素对转化体进行筛选。在培养基中添加合适浓度的抗生素, 未转化的细胞由于不能表达 *Npt-II*, 因而不能产生相应的抗性, 而那些能存活下来的细胞, 基本上可以初步判断为转化体, 因此可以在转基因过程中用卡那霉素选择转基因阳性工程菌。

在经过抗生素二次筛选基础上, 首先对通过三亲杂交获得的工程菌进行菌落 PCR 验证, 然后提取工程菌 Mini-Ti 质粒, 进行质粒酶切验证和质粒 PCR 鉴定, 从而避免产生假阳性, 确保这些基因植物表达载体构建的正确性。

为了保证含有植物表达载体 pBI-*APS1*、pBI-*APS2* 和 pBI-*CsSMT* 的转基因工程菌具有相关功能, 我们在构建植物表达载体之前, 对相应的茶树 *APS1*、*APS2* 和 *CsSMT* 基因阅读框进行了原核表达, 相关表达产物具有很高的酶活性<sup>[8-9]</sup>; 而以 3 种工程菌 Mini-Ti 质粒为模板的质粒 PCR 产物经过测序, 插入片段的碱基序列与茶树 *APS1*、*APS2* 和 *CsSMT* 基因 cDNA 全长序列中相关序列完全一致, 表明通过构建植物表达载体和三亲杂交后所获得的工程菌含有茶树 ATP 硫化酶和硒半胱氨酸甲基转移酶基因序列。这些工程菌的功能活性有待通过植物转基因工程, 如利用农杆菌介导的叶盘转化法获得转基因植株, 对转基因植株的粗酶液进行体外酶学反应和分析转基因植株的富硒能力而进一步认定。

本试验应用 RT-PCR 从茶树中克隆出硒硫代谢关键酶基因 *APS1*、*APS2* 和 *CsSMT* 阅读框片段, 构建了表达这些基因的植物表达载体 pBI-*APS1*、pBI-*APS2* 和 pBI-*CsSMT*, 成功地将这些植物表达载体导入根癌农杆菌中, 从而获得含有茶树硒硫代谢关键酶基因 *APS1*、*APS2* 和 *CsSMT* 的工程菌, 为进一步探明茶树富硒的分子生物学机理、进行植物基因工程、生产富硒农产品打下基础。

#### 参考文献:

- [1] Pickering I J, Wright C, Bubner B, et al. Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131: 1460-1467
- [2] Pilon-Smits E A H, Hwang S, Lytle C M, et al. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119: 123-132
- [3] Terry N, Zayed A M, de Souza M P, et al. Selenium in higher plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 401-432
- [4] Neuhierl B, Böck A. On the mechanism of selenium tolerance in selenium-accumulating plants purification and characterization of a specific selenocysteine methyltransferase from cultured cells of *Astragalus bisulcatus* [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 239: 235-238
- [5] Neuhierl B, Thanbichler M, Lottspeich F, et al. A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases: role in selenium tolerance and evolutionary relation [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 5407-5414
- [6] Lyi S M, Heller L I, Rutzke M, et al. Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in broccoli [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138: 409-420
- [7] LeDuc D L, Tarun A S, Montes-Bayon M, et al. Overexpression of selenocysteine methyltransferase in Arabidopsis and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135: 377-383
- [8] Zhu L, Deng W W, Ye A H, et al. Cloning of two cDNAs encoding a family of ATP sulfurylase from *Camellia sinensis* related to selenium or sulfur metabolism and functional expression in *Escherichia coli* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2007, doi: 10.1016/j.plaphy.2007.03.029
- [9] Zhu L, Jiang C J, Deng W W, et al. Cloning and expression of selenocysteine methyltransferase cDNA from *Camellia sinensis* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2008, 30: 167-174
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002
- [12] 王朝霞. 茶树巯基蛋白酶抑制剂基因的克隆及表达分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2006