

## 人工 microRNA 干扰拟南芥 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 基因表达的初步研究

赵臻, 邱凯, 蒯本科\*

复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室和植物科学研究所, 上海 200433

**摘要:** 以来源于拟南芥的 microRNA 序列为骨架, 构建抑制 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 基因的人工 microRNAs 载体, 研究其对目的基因表达的抑制效果。选择 *AtCDKCs* 基因的特异性序列, 通过重叠 PCR 的方法改造拟南芥 microRNA164a 骨架序列, 连接到双元载体 pPZPY122, 在农杆菌介导下转化拟南芥。RT-PCR 分析表明, 人工 microRNA 能够显著抑制目的基因的表达, 获得了抑制效果明显的转基因植株, 并且对 *AtCDKCs* 在拟南芥生长发育中的作用进行了初步的研究。

**关键词:** 周期蛋白依赖性激酶; 人工 microRNA; RNA 干扰; 基因表达; 拟南芥发育

## A Preliminary Analysis of Artificial MicroRNAs-Mediated Interference of *AtCDKC;1* and *AtCDKC;2* Expression in *Arabidopsis*

ZHAO Zhen, QIU Kai, KUAI Ben-Ke\*

State Key Laboratory of Genetic Engineering and Institute of Plant Biology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

**Abstract:** By using *Arabidopsis* endogenous microRNA sequences, artificial microRNAs (amiRNAs) were generated to knock down the expressions of *AtCDKCs*. To construct plasmids, oligonucleotide sequences targeting *AtCDKCs*-specific locus were used to engineer microRNA164a by overlapping PCR and the resultant sequence was inserted into the binary vector pPZPY122. *Arabidopsis* of wild type (Col-0) was transformed by the *Agrobacterium*-mediated approach. RT-PCR analysis showed that the target genes were both specifically and efficiently silenced in transgenic lines. The roles of *AtCDKCs* in the growth and development of *Arabidopsis* was analyzed based on the transgenic plants.

**Key words:** *AtCDKC*; artificial microRNA; RNA interference; gene expression; *Arabidopsis* development

转录循环(transcription cycle)是一个受到高度调控的动态过程, 多种调节因子在转录阶段起着重要作用。RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, RNAPII)是参与真核生物基因转录循环的重要分子之一。mRNA 前体分子的加帽、剪接、3' 端加工等多个步骤都与 RNAPII 转录延伸复合物(transcript elongation complex, TEC)密切相关(Sim 等 2004)。近年来的研究表明细胞周期蛋白依赖性激酶复合物不仅是细胞周期运转的重要调控因子, 而且可以通过磷酸化 RNAPII 及相关分子参与转录循环的正向调节和负向调节, 是动植物细胞基因表达调控中极其重要的分子。正向转录延伸因子 b (positive transcription elongation factor b, p-TEFb)是一类由周期蛋白依赖性激酶 CDK9 和周期蛋白组成的复合物, 调控基因转录的起始过程(Garriga 和 Grana 2004; Peterlin 和 Price 2006)。p-TEFb 通过磷酸化 RNAPII 大亚基 C 端结构域(C terminal domain, CTD)中的丝

氨酸残基, 激活 RNAPII 的转录活性。同时 p-TEFb 还可以使负向转录延伸因子(negative transcription elongation factor, NELF)从转录复合物上解离下来, 消除其对 RNAPII 的抑制作用, 从而使转录循环得以继续进行(Hirose 和 Ohkuma 2007)。

拟南芥 RNAPII 的 CTD 含有 42 次重复的 YSPTSPS 序列, 受到多种分子的调控。CDKD;2/ CYCH1 可以磷酸化 RNAPII CTD, 并且该过程依赖 CDKF;1 的激酶活性(Shimotomo 等 2003)。CDKE;1 在雄蕊和心皮的发育过程中起着重要作用, 推测与细胞分化有关(Wang 和 Chen 2004)。AtCDKC;1 和 AtCDKC;2 可以与 CYCT 结合形成 p-TEFb, 磷酸化 RNAPII CTD, 调控基因的转录循环。在番茄、紫花苜蓿、拟南芥和水稻中先后找到了 CDK9 的同源

收稿 2010-04-20 修定 2010-05-14

\* 通讯作者(E-mail: bkkuai@fudan.edu.cn; Tel: 021-65642648)。

物,在转录过程中起着与p-TEFb相似的功能(Joubes等2001; Fulop等2005; Cui等2007; Huang等2008)。

人工microRNA技术利用内源性microRNA前体产生21 bp miRNA引起基因沉默。除了改变miRNA-miRNA\*的序列,amiRNA保留了原有序列的结构特征,在CaMV 35S启动子的驱使下可以在植物体内得到较高水平的表达。基因表达分析表明amiRNA可以像内源性microRNA一样特异地抑制目的基因的表达(Alvarez等2006; Schwab等2006)。拟南芥microRNA164家族由microRNA-164a、microRNA164b和microRNA164c组成,是最早被发现和研究的微小RNA之一,也是能够应用于人工microRNA技术的候选分子之一。它们主要作用于具有NAC结构域的转录因子,在植物胚胎的发育、叶片和花器官边界的形成过程中起着重要作用。研究发现microRNA164a通过调节CUC2基因的表达参与叶片边缘形态的建成过程(Krisztina等2006)。

本研究针对双子叶模式植物——拟南芥基因组中高度同源的CDKC;1和CDKC;2基因T-DNA插入突变体较难筛选得到纯合体的情况,利用基因沉默技术——人工microRNA,选择microRNA164a前体分子作为骨架,改变miRNA序列,构建相应载体单独抑制和共同抑制AtCDKC;1和AtCDKC;2,旨在揭示两者在拟南芥生长发育过程中各自所起的作用,以便探讨两者在物种进化过程中发生基因重复的意义。

## 材料与方法

### 1 材料与试剂

**1.1 菌株和质粒** 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404、GV3101和大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10由本实验室保存。二元载体pPZPY122由本实验室保存。中间载体pART7和二元载体pART27 simpler由以色列Weizmann研究院Eshed教授惠赠。

**1.2 酶和主要试剂** 限制性内切酶BamHI、NotI、HindIII、SalI、XbaI、碱性磷酸酶和T4 DNA连接酶均购于TaKaRa公司。PCR试剂(Pfu聚合酶、Taq聚合酶)、胶回收试剂盒和cDNA第一链合成试剂盒均购自上海捷瑞公司。引物由上海塞百盛

公司合成。氨基青霉素、氯霉素、壮观霉素、链霉素、利福平、庆大霉素和卡那霉素均购于上海生工公司。序列测定主要在北京华大和上海联合基因公司。

**1.3 植物、培养基及培养条件** 生态型Columbia (Col-0)拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)置于长日照光周期为16 h光照/8 h黑暗、光照强度为130  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、相对湿度为70% (白天)~85% (夜间)和温度为(22±2) °C的培养室内生长。播种和开花时各浇一次PNS营养液。

## 2 方法

### 2.1 人工microRNA表达载体的构建

**2.1.1 人工microRNA骨架的构建与改造** 选择拟南芥miRNA164a序列,针对序列两端上下游46 bp和63 bp的位置设计引物,引入酶切位点XbaI和SalI。将扩增获得的PCR产物克隆到pMD19-T质粒,得到重组质粒pMD19-T-miRNA164a。PCR法鉴定,选取酶切片段大小正确的质粒送去测序。

以测序正确的pMD19-T-miRNA164a质粒为模板,根据特异抑制CDKC;1和CDKC;2及共同抑制CDKC;1和CDKC;2的21 bp的小片段序列设计各2对引物(表1)。通过重叠PCR (overlapping PCR)反应,置换掉miRNA164a骨架中的相应序列(图1)。用胶回收试剂盒回收扩增片段,连接pMD19-T载体,转化感受态*E. coli* Top10。挑取阳性克隆送去测序,分别命名为pMD19-T-miRNA-164a-C1 (C2, Cb)。

### 2.1.2 植物表达载体pPZPY122-miRNA的构建

BamHI和SalI双酶切经测序正确质粒和pPZPY122载体,回收目的片段,用T4 DNA连接酶连接,转化感受态*E. coli* Top10,挑选阳性克隆,酶切鉴定,分别命名为pPZPY122-miRNA164a-C1 (C2, Cb)。

### 2.2 拟南芥转基因植株的获得

**2.2.1 感受态农杆菌LBA4404的转化** 采用液氮冻融法将pPZPY122-miRNA164a-C1 (C2, Cb)质粒转入农杆菌LBA4404,在含(Rif 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , Str 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , Chl 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )抗性的YEB固体培养基上筛选阳性克隆,并用PCR法鉴定。

**2.2.2 花苞浸染法转化拟南芥植株** 取2 mL菌液接种于加有相同抗性的YEB培养基中,相同培养条件下培养至OD<sub>600</sub>=1.2。离心后,去上清,重悬浮于

表1 引物序列

Table 1 The sequence of primers

引物名称	引物序列(5' → 3')
1-in-5	TTAGTGGGATGGTTTGGACCTAACCAACAAACACGAAATCC
1-in-3	TTTAGTGGGTAGGTATGGACCTAATAAGCAAATGAGACGGATT
1-out-f	AGGTCCAAACCATCCCCTAAACATGGAGATTCTCACCCGC
1-out-r	TTAGTCCATACCTACCCCTAAACATGAGCTCTTCACCCATTGA
2-in-5	TCTAGCACCCCATAGGGTTAACCAACAAACACGAAATCC
2-in-3	GTTCTAGCACTTCCCTTAGGGTTAATAAGCAAATGAGACGGATT
2-out-f	AACCCTATGGGTGGTGCTAGAACATGGAGATTCTCACCCGC
2-out-r	AACCCTAAGGAAGTGCTAGAACATGAGCTCTTCACCCATTGA
b-in-5	TCACATGACAATAGTGAAGCCAACCAACAAACACGAAATCC
b-in-3	GTTACATGATTATATTGAAGCCAATAAGCAAATGAGACGGATT
b-out-f	TTGGCTTCAATATAATCATGTGAACATGAGCTCTTCACCCATTGA
b-out-r	TTGGCTTCACTATTGTCATGTGAACATGGAGATTCTCACCCGC

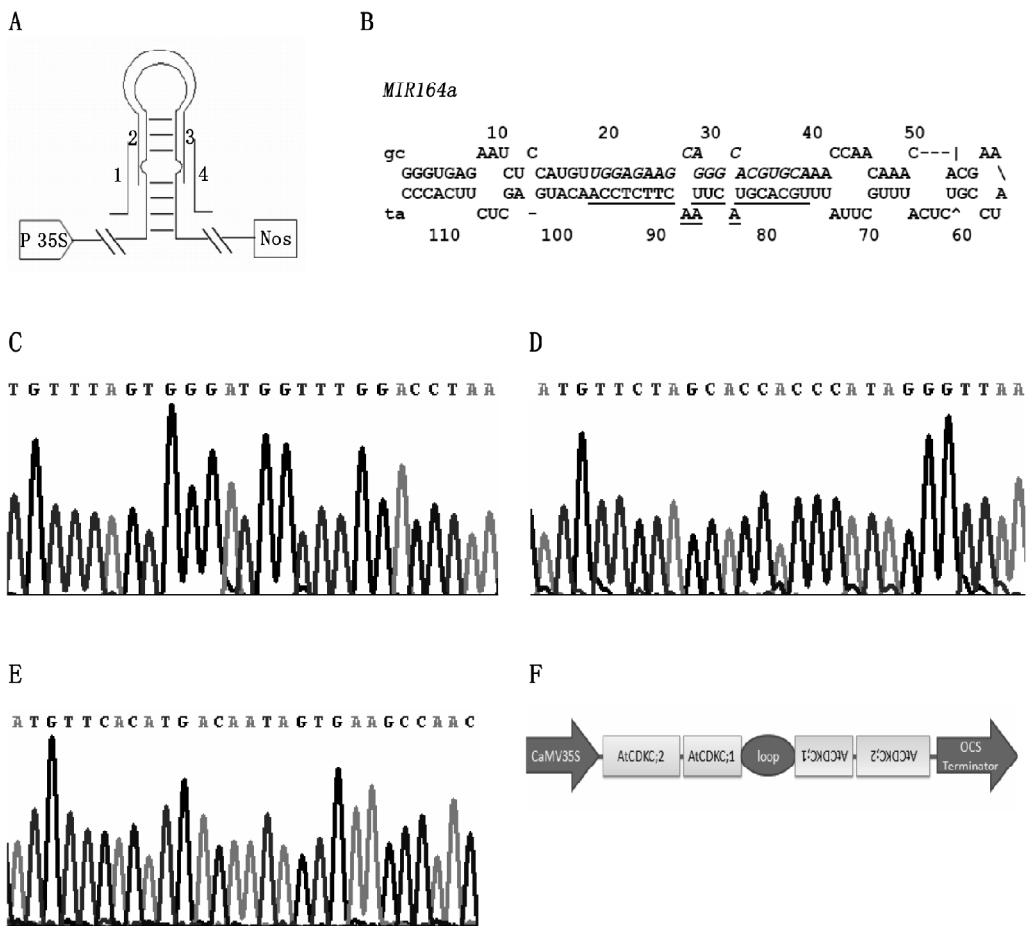


图1 人工 microRNA 和 RNA 干扰序列的构建策略和鉴定

Fig.1 Constructing strategies and sequencing confirmations of artificial microRNAs and RNA interference

A: 重叠 PCR 法置换 miRNA 序列构建人工 microRNAs (通过两对引物 1-2、3-4 置换 microRNA 的 miRNA 序列以及与之不完全配对的 miRNA\* 序列); B: 拟南芥 microRNA164a 基因序列模拟的二级结构(斜体序列是 miRNA, 下划线标记序列是 miRNA\*); C~E: 单独抑制 AtCDK1、AtCDK2 和共抑制 AtCDKs 所用 miRNA 序列的测序结果; F: 共抑制 AtCDKs 基因 RNAi 发卡结构的构建策略。

5% 蔗糖溶液, 加入 Silwet L-77, 至终浓度 0.03%。将生长状况良好的拟南芥培养至茎高约 3 cm 时, 去顶生花序。在去顶后 4 d 进行转化。转化前使拟南芥吸足营养液, 去除开花的花苞和果荚。倒浸在菌液中 10 s。将材料用保鲜膜覆盖以保持湿度, 暗处隐蔽过夜。第 2 天放回培养室内正常条件下培养直到成熟收种。

**2.2.3 转基因拟南芥的筛选和鉴定** 用 70% 乙醇浸泡种子表面消毒 1 min。用 10% 次氯酸钠溶液消毒 8 min。用无菌水洗涤 4~6 次后, 均匀涂播于含有 75 mg·L<sup>-1</sup> 庆大霉素的 MS 固体培养基平板上。4 °C 春化 2~3 d, 移入培养室。两周后将平板上正常生长的幼苗移入土中, 覆膜保湿一周。CTAB 法抽提候选转基因植株 DNA, 以横跨载体的序列设计引物, PCR 法鉴定阳性转化子, 所得植株分别命名为 *miR-cdkc;1*、*miR-cdkc;2* 和 *miR-cb*。

TRIzol 法抽提转基因植株总 RNA, 溶解于 DEPC 处理过的无菌水中。紫外分光光度计测定 RNA 的浓度。用 cDNA 第一链合成试剂盒逆转录得到的 cDNA, 进行 PCR 反应扩增, 鉴定 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 的表达情况, 并以 UBQ-10 作为内参。PCR 反应程序为先 94 °C 5 min; 然后 94 °C 40 s, 57 °C 40 s, 72 °C 40 s 总共进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

**2.3 抑制 *AtCDKCs* 的 pART27-RNAi-b 转基因植株的获得** 选取 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* cDNA 序列上各 193 bp 和 353 bp 的短片段, 构建 35S 启动子驱动下的双插入反向重复序列的表达载体 pART27-RNAi (图 1)。选取蓖麻过氧化氢酶基因的内含子插入载体 pBlueScript KS<sup>+</sup>, 作为反向重复序列的环结构, 然后依次插入 *AtCDKC;2* 和 *AtCDKC;1* 的短序列。测序正确后, 将整个发卡结构插入载体 pART7。NotI 酶切后, 连接双元载体 pART27 simpler。按前述相同方法进行植物转化和鉴定, 所得植株命名为 *RNAi-cb*。

**2.4 *AtCDKCs* 序列的进化分析** 通过从 TAIR 和 NCBI 等公共数据库获得 *AtCDKCs* 基因和蛋白质序列, 搜索紫花苜蓿(CAA65979), 豌豆(CAA39904), 水稻(CAD92448, XP\_475182) 等多个物种中具有较高同源性的序列。应用 Mega4.0 软件, 采用 N-J 法和 M-P 法, 重复次数(replicate)分别为 500 和 1 000, 其

他均为软件默认设置, 构建系统发生树。

## 实验结果

### 1 人工 microRNA 的构建

从野生型拟南芥基因组 DNA 中克隆到包含 miRNA164a 序列的片断, 经过酶切和测序鉴定, 构建 pMD19-T-miRNA164a 质粒。通过重叠 PCR 的方法以 miRNA164a 为骨架构建特异抑制 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 以及共同抑制 *AtCDKCs* 的人工 microRNAs, 测序验证(图 1)。将测序正确的人工 microRNAs 片段插入双元载体 pPZPY122。

### 2 转基因植株及其表型的鉴定

将构建的 pPZPY122-miRNA164a-C1 (C2, Cb) 质粒转化农杆菌 LBA4404 (以 pPZPY122 空载体作为对照), 用花苞浸染法转化野生型拟南芥。通过抗性筛选, 分别得到单独抑制 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 的转基因植株。RT-PCR 检测抑制效果, 发现转基因植株中目的基因的表达水平降低(图 2)。

单独抑制 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 的转基因植株在叶片形态、抽苔时间、果荚长度和种子数量等 4 个方面表现出明显差异(图 3)。*miR-cdkc;2* 转基因植株表现出莲座叶生长速度减慢, 失去部分极性, 抽苔时间延迟。在生命周期的后期, 莲座叶的长度和宽度明显大于野生型, 叶片呈深绿色, 开在茎干顶端的花朵往往出现 5 片花瓣, 表现出失去花器官特征的现象。*miR-cdkc;1* 转基因植株的叶片形态和抽苔时间正常, 但生成果荚的长度和种子的数量均有所下降, 这与 *miR-cdkc;2* 转基因植株的表型是相似的。共抑制 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 的转基因幼苗, 约有 80% (25/31) 在移入土中后 2 周内死亡, 存活下来的植株没有表现出明显的抑制效果, 形态与野生型植株相似。而获得的 24 株 RNAi 转基因植株都能够存活下来。有部分植株表现出类似于 *AtCDKC;2* 突变体的表型, 例如莲座叶变大, 晚花(图 4)。

### 3 *AtCDKCs* 生物信息学分析

*AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 的基因结构相似, 氨基酸序列的同源性高达 92%。在人、小鼠和酵母等动物基因组中只存在单拷贝的 *CDK9*, 而紫花苜蓿和番茄中也只有单个 *CDKC* 基因。通过蛋白序列同源性比对(BLASTP)分析 *AtCDKCs* 和芸苔的两

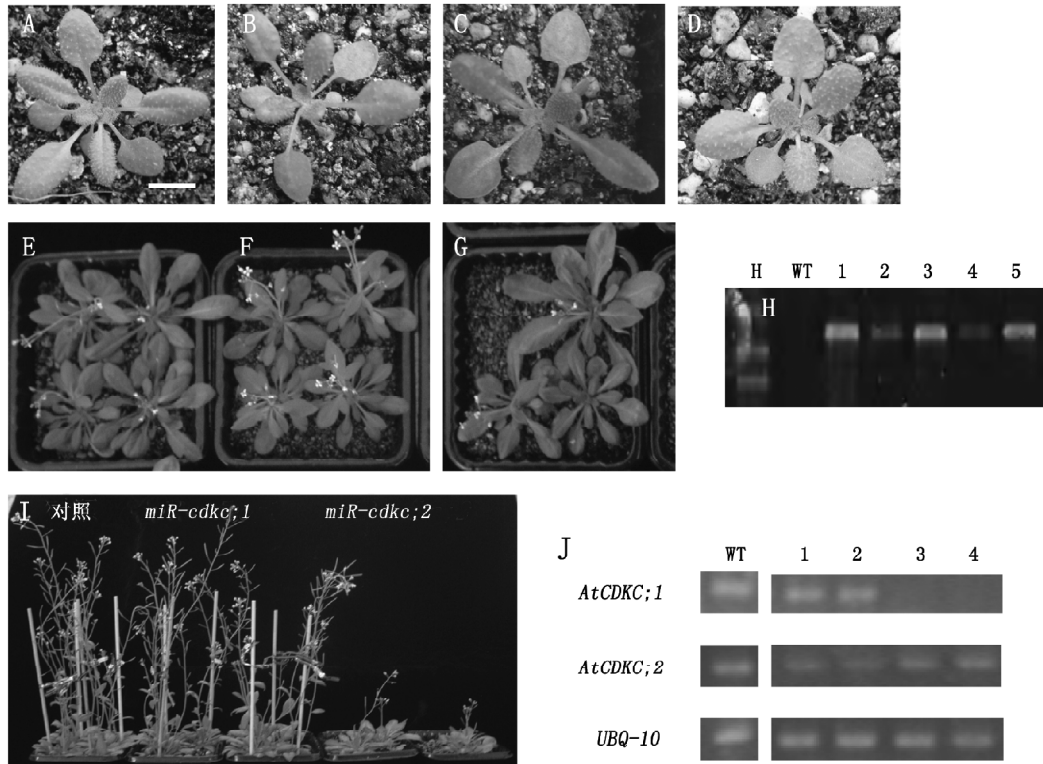


图2 *miR-cdck;1&2* 转基因植株的鉴定

Fig.2 Identification of *miR-cdck;1&2* transgenic lines

A~D: 对照、*miR-cdck;1*、*miR-cdck;2* 和 *cdck;2-2* (*CDKC;2* T-DNA 插入突变体)的植株表型(4周), bar=1 cm; E~G: 对照、*miR-cdck;1*、*miR-cdck;2* 的植株表型(6周); H: 特异引物扩增转基因株系的基因组 DNA (从左至右依次是 Marker、野生型(col-0) 阴性对照、转基因株系 1~5); I: 对照、*miR-cdck;1* 和 *miR-cdck;2* 的植株表型(8周); J: RT-PCR 检测转基因植株 *miR-cdck;2* (1 和 2 列)和 *miR-cdck;1* (3 和 4 列)中 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 的表达情况。UBQ-10 作为内参。

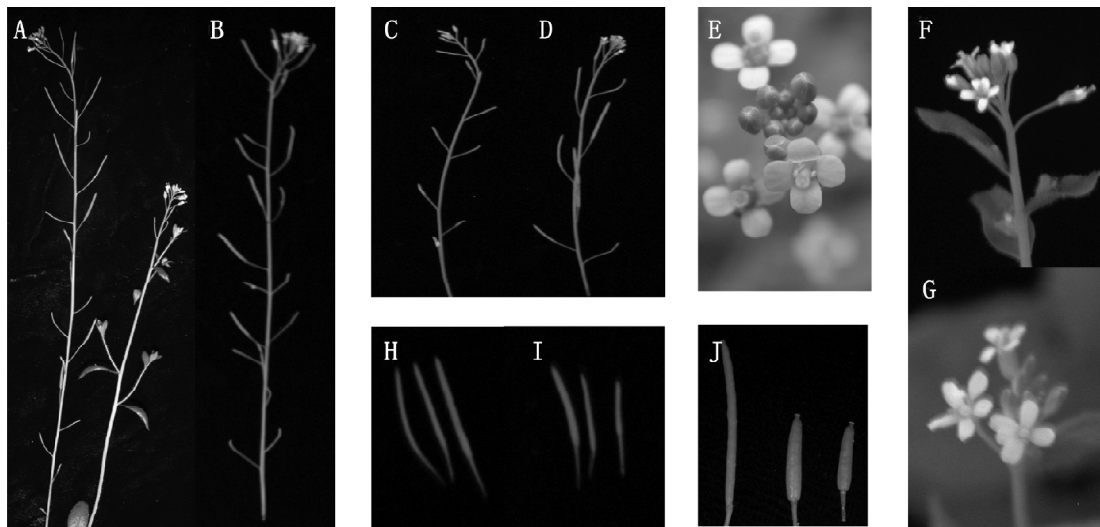
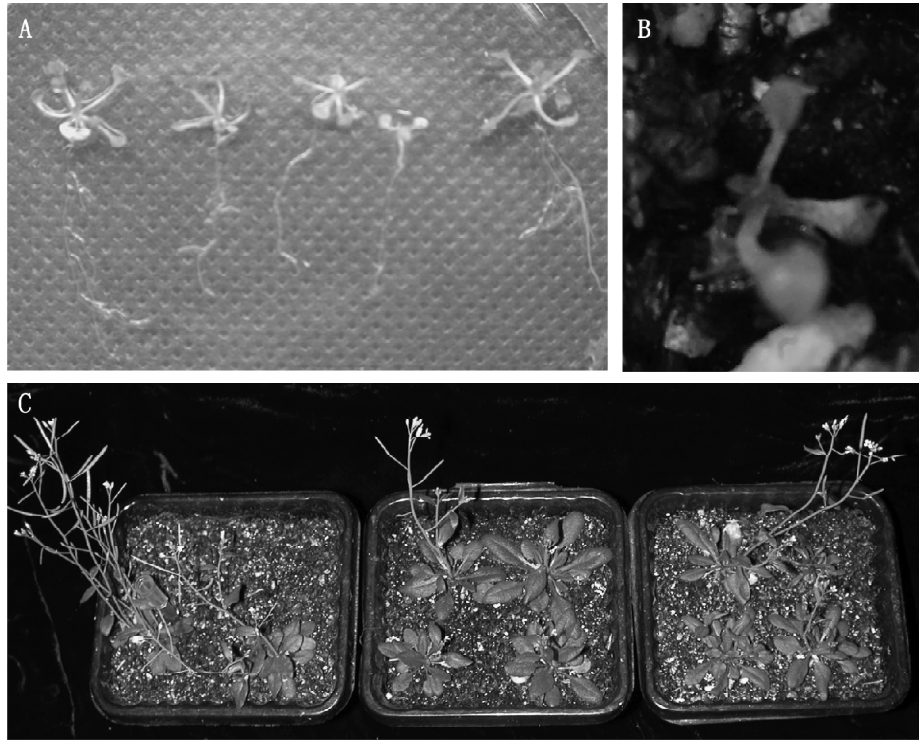


图3 *miR-cdck;1&2* 转基因植株的表型鉴定

Fig.3 Phenotypes of reproductive organs of *miR-cdck;1&2* transgenic lines

A~D: *miR-cdck;1*、*cdck;2-2*、*miR-cdck;2* 和对照的主茎; E~G: 对照、*miR-cdck;2* 和 *cdck;2-2* 的花器官; H、I: 对照和 *miR-cdck;1* 的果荚; J: 对照(左)和 *miR-cdck;2* 的果荚。

图4 *miR-cb* 和 *RNAi-cb* 转基因植株的鉴定Fig.4 Identification of *miR-cb* and *RNAi-cb* transgenic lines

A: 从抗性平板上移出的 *miR-cb* 转基因植株(从左至右, 1~4 均为转基因植株(抑制效果依次增强), 5 为空载体对照); B: 移入土壤 1 周后 *miR-cb* 转基因植株的表型(3 周); C: 从抗性平板上移出的空载体(左)和 *RNAi-cb* 转基因植株(5 周)。

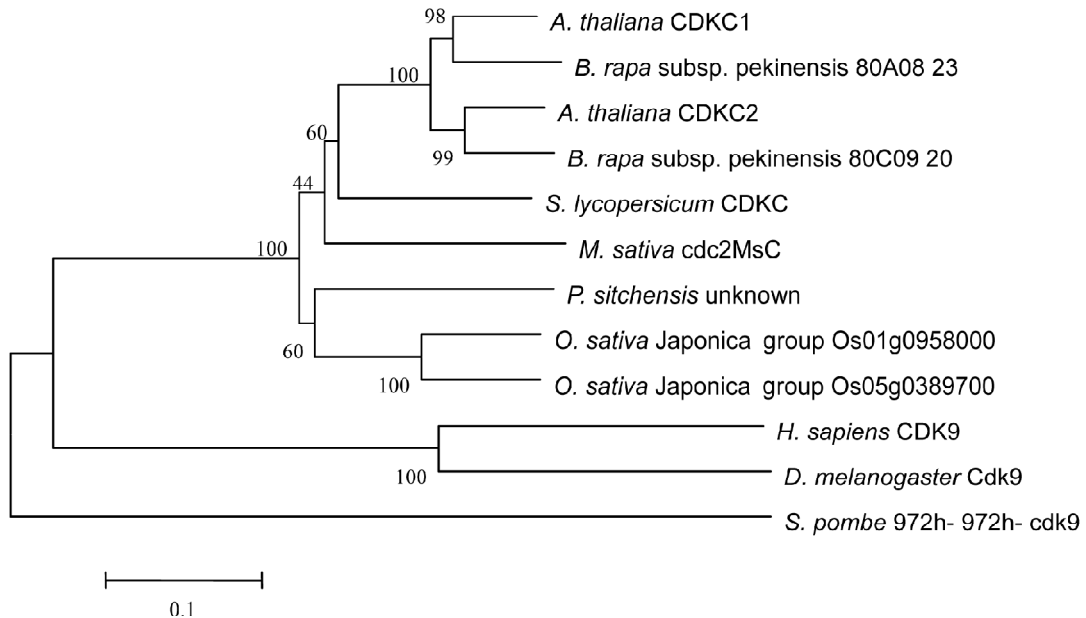


图5 AtCDKCs 及其同源序列的系统发生树

Fig.5 Phylogenetic tree of AtCDKCs and homologous sequences

所用序列的 GenBank 登录号(按从上向下顺序): *Arabidopsis*, NP\_196589; *Brassica*, AAZ67608; *Arabidopsis*, NP\_201301; *Brassica*, AAZ41831; *Tomato*, CAC5139; *Alfalfa*, CAA65980; *Pea*, CAA39904; *Rice*, NP\_001045450, NP\_001055436; *Human*, AAF72183; *Drosophila*, NP\_477226; *Yeast*, NP\_595616。

条序列(*Brassica*, AAZ67608, AAZ41831)在进化上非常接近, 暗示了它们功能上的相似性, 可能是拟南芥和芸苔分化之前基因重复的结果(图5)。

## 讨 论

基因沉默是生物界广泛存在的一种现象, 已经发展成为基础研究和应用研究的主流技术之一(Zhou等2006)。siRNA和miRNA是动植物体内执行基因沉默过程的主要分子, 由RNA外切酶切割完全互补或不完全互补的发卡结构而产生的一类小片段分子。RNAi技术通过导入与目的基因互补的双链分子产生多个siRNAs, 作用于目的基因而抑制其表达。这种技术的主要不足在于导入的分子较长, 抑制具有较高同源性的序列十分困难。同时, 导入双链分子对于编码在同一基因座正链和负链上的基因没有特异的抑制作用, 无法避免会产生非特异的抑制效果。

人工microRNA技术利用内源性microRNA前体产生21 bp miRNA, 作用于靶序列的特定位点, 引起目的基因沉默。该技术的优势之一, 在于其作用的特异性, 这表现在植物miRNA与mRNA序列是完全互补或者几乎完全互补。通过改变miRNA序列, 可以非常容易地抑制任意单个基因或者高度同源的多个基因的表达。本研究根据*AtCDKCs*序列5'端同源性较高和3'端序列略有差异的特点, 在设计特异性抑制单个基因的miRNA序列时, 除了考虑miRNA自身的序列特点之外, 还要选择两者差异较大的区域作为候选序列。在设计共同抑制上述基因表达的miRNA序列和RNAi的目标序列时, 需要选择同源性较高的区域作为候选, 尽可能选择完全相同的序列。

从双抑制*AtCDKCs*的实验结果来看, amiRNA的抑制效果比RNAi更为强烈。本研究采用的双元载体pPZPY122和pART27均为CaMV 35S启动子控制下的过量表达体系。有研究表明, p-TEFb与CaMV等病毒在拟南芥体内表达有着密切的联系, 抑制*AtCDKCs*会极大降低CaMV 35S启动子的转录效率(Cui等2007)。相对于amiRNA, 在本研究中RNAi受到的影响更为明显一些。从miRNA和siRNA的生物发生过程来看, RNA干扰更依赖转录这个过程, 不仅需要RNAPII转录产生双链RNA, 而

且需要RNA依赖的RNA聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRP)来放大RNA干扰的作用。miRNA执行基因沉默的过程主要通过RNAPII的转录调控, 而不需要RdRP。

基因重复是物种进化的主要动力, 也是基因功能多样化的前提。随着基因组研究的不断深入, 多个物种基因组测序项目相继完成, 人们发现重复基因普遍存在于原核生物和真核生物中。大部分重复基因会在进化过程中丢失, 只有小部分基因能被保留下来。通过进化选择, 保留下来的基因可能被假基因化、亚功能化和新功能化。双抑制*AtCDKCs*导致致死的结果表明, 它们对于拟南芥的生长发育是必不可少的, 推测*AtCDKC;1*和*AtCDKC;2*保留了与母基因相似的功能。Cui等(2007)利用*AtCDKC;1*和*AtCDKC;2*的启动子连接GUS系统, 检测它们在拟南芥各个组织中的表达情况, 发现它们在花器官中存在差异性表达, *AtCDKC;1*在雄蕊和花粉囊中有高表达, 而*AtCDKC;2*在柱头和心皮中表达较强烈。本研究中*miR-cdkc;2*转基因植株表现出开花时间延迟, 叶片变大, 而*miR-cdkc;1*转基因植株几乎没有明显的表型, 这表现出*AtCDKCs*功能分化的趋势, *AtCDKC;2*保留了更多母基因的功能, 而*AtCDKC;1*的功能有了更多的分化。*AtCDKCs*这种功能部分冗余、部分分化的现象显示了重复基因在物种进化上的演变过程。

## 参考文献

- Alvarez JP, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Eshed Y (2006). Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell*, 18: 1134~1151
- Cui XF, Fan BF, Scholz J, Chen ZX (2007). Roles of *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase C complexes in cauliflower mosaic virus infection, plant growth, and development. *Plant Cell*, 19: 1388~1402
- Fulop K, Pettko-Szandtner A, Magyar Z, Miskolczi P, Kondorosi E, Dudits D, Bako L (2005). The *Medicago* CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J*, 42: 810~820
- Garriga J, Grana X (2004). Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene*, 337: 15~23
- Hirose Y, Ohkuma Y (2007). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J Biochem*, 141: 601~608

- Huang YW, Tsay WS, Chen CC, Lin CW, Huang HJ (2008). Increased expression of the rice C-type cyclin-dependent protein kinase gene, *Oryza*;CDKC;1, in response to salt stress. *Plant Physiol Biochem*, 46: 71~81
- Joubes J, Lemaire-Chamley M, Delmas F, Walter J, Hernould M, Mouras A, Raymond P, Chevalier C (2001). A new C-type cyclin-dependent kinase from tomato expressed in dividing tissues does not interact with mitotic and G1 cyclins. *Plant Physiol*, 126: 1403~1415
- Krisztina N, Thomas B, Alexis P, Tetsuya I, Halima M, Mitsuhiro A, Patrick L (2006). The balance between the *MIR164A* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 2929~2945
- Peterlin BM, Price DH (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell*, 23: 297~305
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 1121~1133
- Shimotohno A, Matsubayashi S, Yamaguchi M, Uchimiya H, Umeda M (2003). Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 534: 69~74
- Sim RJ, Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Gene Dev*, 18: 2437~2468
- Wang WM, Chen XM (2004). HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in *Arabidopsis*. *Development*, 131: 3147~3156
- Zhou DM, He QCS, Wang CY, Zhang J, Wong-Staal F (2006). RNA interference and potential applications. *Curr Topic Med Chem*, 6: 901~911