

实时定量 PCR 的原理及其在植物病理学研究中的应用

吴 静, 吴茂森*, 何晨阳

(中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要 实时定量 PCR(Real-time quantitative)是一种利用荧光信号实时监测每个循环的扩增产物,从而实现对模板进行定量分析的新技术。它具有快速、灵敏、精确等优点。该技术在分子诊断、分子生物学研究、动植物检疫以及食品安全检测等方面有广泛的应用。本文综述了实时定量 PCR 的原理、影响因素及其在植物病理学研究中的应用。

关键词 实时定量 PCR; Ct 值; 定量分析; 应用

中图分类号 Q 7

Principles of real-time quantitative PCR and its application in plant pathology

Wu Jing, Wu Maosen, He Chenyang

(Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China)

Abstract Real-time quantitative PCR (polymerase chain reaction) is a new method used to analyze the template concentration by monitoring the fluorescent signal during each amplification cycles. Benefits of this technology over conventional ones include high sensitivity, large dynamic range and accurate quantification. It is widely used in molecular diagnostics, molecular biology research and animal and plant quarantine, etc. In this review, the principles, key factors of this method and its application in plant pathology were discussed.

Key words real-time quantitative PCR; Ct Value; quantitative analysis; application

20 世纪 80 年代出现的 PCR 技术是上世纪最伟大的发明之一,它的发明者凯利·穆利斯(Kary Mullis)因此获得了 1993 年度诺贝尔化学奖^[1]。在近 20 年的时间里,PCR 因其灵敏、特异的特点已成为分子生物学实验室和医院临床分子诊断的核酸分子定性检测技术。但是在进行病毒检测、基因表达量分析等试验中必须对目的核酸做出定量检测,这

是普通 PCR 不能胜任的。竞争性定量 PCR(competitive quantitative)是一种可以进行定量检测的技术。这种技术是通过在反应中加入已知量的竞争物(competitor),反应结束后通过比较目的产物与竞争物扩增产物的比值进行定量。但这种技术因受扩增后期反应组分消耗等因素影响而致定量精确度降低,仍不能满足定量、特异、快速地检测核酸分子的

要求^[2]。

实时定量 PCR 是 20 世纪 90 年代中期发展起来的核酸定量新技术。它通过检测 PCR 反应中荧光信号的变化来监测 PCR 扩增过程。与普通 PCR 相比,它具有诸多优点:(1)不需要 PCR 反应后的处理;(2)有很大的动力学范围,可以在很大浓度范围内($>10^7$ 倍)进行定量;(3)既可以做定量分析又可以做定性分析^[3-4]。目前,该技术在分子诊断、基因表达、动植物检疫、食品安全检测等方面得到了广泛应用^[5-6]。然而,利用实时定量 PCR 进行核酸定量时仍受模板的纯度及完整性、反转录、引物的特异性以及 PCR 反应体系等诸多因素的影响^[7]。本文对实时定量 PCR 的原理、影响因素以及在植物病理学中的应用等进行了综述。

1 实时荧光定量 PCR 的原理

实时荧光定量 PCR 是指在 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,最后通过标准曲线等手段对模板进行定量分析的方法。与普通 PCR 相比,实时荧光定量 PCR 可以利用荧光信号实时监测 PCR 反应过程中每一个循环扩增产物的变化,可以对初始模板量进行定量分析。简单地说,实时定量 PCR 包括 PCR 反应、荧光标记和监测系统三部分^[2]。

1.1 Ct 值

一般扩增的前 15 个循环为荧光本底信号(baseline),荧光阈值(threshold)的设置是 3~15 个循环的荧光信号的标准差的 10 倍。扩增过程中扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经历的扩增循环次数为 Ct(threshold cycle)值。这个点出现在扩增的指数期。初始模板量的对数与 Ct 值呈线性关系,即模板 DNA 量越多,荧光达到阈值的循环数越少,Ct 值越小^[8-9]。

1.2 荧光标记物

目前有 3 种最常用的利用不同荧光标记进行荧光定量的方法。这些方法都具有很好的灵敏性。其中一种是双链 DNA 结合荧光染料,另外 2 种是基于结合探针的荧光标记。

1.2.1 双链 DNA 结合染料(SYBR Green)

SYBR Green 在与双链 DNA 结合时发出的荧光可以被检测到,而溶液中没有结合的染料则不会发出荧光。因此在延伸阶段荧光信号会逐渐增强而在变性阶段没有荧光。这种方法不需要特异的荧光探针,使用成本相对较低;但是由于它能与任何双链 DNA 结合,因此特异性较差。在操作中可以通过设

计特异引物、融解曲线分析等方法保证扩增产物的特异性^[10-11]。

1.2.2 分子信标(molecular beacon)

分子信标是可以形成茎—环结构的 DNA 探针,其环部与目的 DNA 序列互补,为 13~35 bp。在探针的 5'端和 3'端分别标记荧光基团和淬灭基团。在游离状态时,分子信标由于荧光基团和淬灭基团紧密相邻,发出的荧光被淬灭。在复性阶段探针的环部序列与目的 DNA 序列稳定杂交结合,破坏了茎环结构,淬灭被解除。随着产物的积累,荧光强度增加。该探针特异性高,可循环利用,但标记复杂,成本高^[2,12]。

1.2.3 水解探针(TaqMan)

该探针的 5'端有一个发光基团,3'端有一个淬灭基团。当它游离在溶液中时发光基团发出的荧光被 3'端的淬灭基团淬灭。变性后探针与靶序列结合,但仍不能发出荧光。直至延伸过程中 DNA 聚合酶到达探针位置时起到 5'-3'的外切酶的作用,将荧光基团从探针的 5'端切下来,拉开了荧光基团和淬灭基团的距离,从而发出荧光。TaqMan 探针特异性好,应用广泛^[12-13]。

2 利用实时定量 PCR 进行定量的策略

2.1 绝对定量

在某些情况下,需要知道在单个细胞内或某一组织内的某个基因在特定时间表达的拷贝数。这时需要对目的基因进行绝对定量^[14-15]。绝对定量要用到标准曲线,在同样条件下目的基因测得的荧光信号同标准曲线进行比较,从而得出目的基因的量。标准曲线用一系列已知浓度(一般是进行梯度稀释,稀释 5~6 个梯度)的标准样品的扩增结果制成。标准品可以是经过精确定量的双链 DNA、体外转录的 RNA 或者是反转录得到的单链 cDNA 等^[12,16]。选择标准品制作标准曲线时,要使标准品同目的基因的同源性尽可能的高,以保证标准品与目的基因的扩增效率一致。确定好标准品,制作出标准曲线后,还要进行多次重复,以检验其可重复性^[17]。

2.2 相对定量

在研究基因的表达变化时,所关心的不是某个基因的表达变化了几个拷贝,更关心的是处理相对于对照基因表达变化了多少倍。这时应选择相对定量。相对定量比绝对定量应用更为广泛。在进行相对定量时需要选择内标基因(reference gene)作为参照。

相对定量数学公式的推导:

设 X_n 为第 n 个循环后目标分子数, 则 $X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n$; 达到 C_T 值时, $X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X \dots\dots\dots$ ①

$C_{T,X}$ 是目标分子扩增达到阈值时所经历的循环数, X_T 是达到 C_T 值时目标分子数。因此, 对于同一模板来说, K_X 是一个常数。

对于内标反应而言: $R_T = R_0 (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \dots\dots\dots$ ②, 对于同一内标基因, K_R 也是常数。

$$\text{①/②得: } \frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

假设目标序列与内参序列扩增效率相同: $E_X =$

$$E_R = E; K = \frac{X_0}{R_0} (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}}.$$

或者: 令 $X_N = \frac{X_0}{R_0}$, 则 $X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$ 。

X_N 是目标基因初始模板相对于内标基因初始模板的量, ΔC_T 表示目标基因和内标基因 C_t 值得差异。最后用任意处理 q 的 X_N 除以对照 cb (calibrator) 的 X_N 即为处理相对于对照的基因表达变化。

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K(1+E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K(1+E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1+E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

其中 $-\Delta \Delta C_T = -\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$; $\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} =$

$2^{\Delta \Delta C_T [8-9]}$, 也就是说目标基因的量相对于对照就等于 $2^{-\Delta \Delta C_T}$ 。

3 实时定量 PCR 试验结果的影响因素

从 DNA 出发进行定量相对比较简单, 一般在保证引物及探针的特异性、PCR 反应体系的合理性以及 DNA 模板的纯度和完整性的情况下, 可以保证试验的顺利进行。从 RNA 出发对 mRNA 进行定量时, 操作比较复杂, 影响试验结果的因素也比较多。

3.1 RNA 的完整性

RNA 降解是进行 mRNA 定量中至关重要的问题。因为 RNA 一旦降解所定量的结果就不能正确反映样品中 mRNA 的量, 所得的结果也是错误的。所以在 RNA 提取过程中要严格遵守操作规范, 避免 RNA 酶 (RNase) 的污染。提取的 RNA 在反转录前还要进行电泳检测, 以确信没有降解^[12,15]。

3.2 RNA 样品中的基因组 DNA 污染

提取的 RNA 样品中不可避免地混有少量的基因组 DNA。基因组 DNA 对试验有两个影响: 一是影响对 RNA 的精确定量; 二是影响 PCR 扩增的特

异性。因此, 避免基因组 DNA 影响试验结果非常重要。目前有 3 种方法可以解决这个问题。(1) DNase 处理。利用无 RNA 酶污染的 (RNase-free) DNA 酶 (DNase) 处理可以去除 RNA 样品中的 DNA。处理要及时去除 DNA 酶, 否则会降解反转录后的 cDNA。但这样增加了操作步骤, 也增加了 RNA 降解的机会; (2) 提取 mRNA。利用这种方法可以提取出 mRNA, 从而避免 DNA 污染对试验的影响。缺点是 mRNA 提取试剂盒价格比较昂贵, 而且在提取过程中会有降解、样品损失等情况的发生; (3) 对于真核生物, 设计跨外显子的引物也可以解决这一问题, 但这种方法只适用于已知内含子和外显子的基因^[2,12]。

3.3 反转录

反转录所得 cDNA 的量必须精确地等于相应的 mRNA 的量。因此, 反转录对于实时定量 PCR 来说是非常关键的一步。目前常用的反转录酶有 2 种: AMV-RT 和 MMLV-RT。AMV-RT 的酶活性要比 MMLV-RT 的强, 但 MMLV-RT 可以得到更长的 cDNA 分子^[11]。反转录常用的引物有随机引物、Oligo-dT 和特异引物。相比之下 Oligo-dT 和特异性引物更适合实时定量 PCR。其中利用 Oligo-dT 为引物反转录可以得到总 cDNA, 但只适用于真核生物; 使用特异性引物可以反转录出特异的 cDNA, 缺点是每次反应只能反转录出一种目标 mRNA^[11-12]。

3.4 PCR 扩增

PCR 扩增过程必须保证扩增产物只有特异的目标产物。为此, 首先要保证 PCR 反应体系达到最优。目前许多公司都有用于实时定量 PCR 反应的试剂盒, 可以方便 PCR 反应的操作。另外用于扩增的引物要有很高的特异性。除此之外用于实时定量 PCR 的 DNA 聚合酶应该是热启动的聚合酶, 这种酶具有高保真性, 可以保证特异性扩增^[12]。

3.5 内标基因的选择

利用实时定量 PCR 研究基因表达时, 一般用相对定量的方法。相对定量必须用到内标基因 (internal standard)。可靠的内标基因应是在不同细胞类型、不同试验条件下都稳定表达的持家基因。常用的内标基因有 β -tubulin、actin、GAPDH、18sRNA、efla 和 Cyclophilin 等^[18]。尽管在大多数情况下这些

持家基因的表达非常稳定,但是最近有报道认为这些持家基因的表达在某些情况下会发生变化。Thellin 等^[19]和 Vandesompele 等^[20]认为应该选择 2~3 个持家基因作为内标以降低误差。Kim Bo-Ra 等认为在水稻中 18sRNA 是最稳定的持家基因^[21]。也就是说并不是任何内标基因都适合任何试验。在选择内标基因时,应仔细考虑各种因素,选择合适的内标基因或内标基因组合。

4 实时定量 PCR 在植物病理学研究中的应用

4.1 病原菌的检测

传统的病原菌检测方法依赖于症状观察、孢子或菌落计数等手段。与传统方法相比,实时定量 PCR 技术具有快速、灵敏、特异等优点,不受植物症状的限制,能区分细微差异。目前该技术在植物病原菌检测中得到越来越广泛的应用。

4.1.1 在病原真菌研究中的应用

有些病原真菌根据形态特征和寄主范围等特征来区分比较困难。PCR 技术,特别是实时定量 PCR 技术是解决这一问题的可靠手段。Böhm J 等报道了用实时定量 PCR(TaqManTM)检测马铃薯晚疫病病菌(*Phytophthora infestans*)和柑橘生疫霉病菌(*Phytophthora citricola*)的方法^[22];A. K. Lees 等报道了实时定量 PCR 技术是检测立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) AG-3 的灵敏而又特异的方法^[23];Min Qi 和 Yinong Yang 用实时定量 PCR(SYBR)检测了稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)在侵染水稻不同时期的生物量,证明了该方法是一种可用于分析真菌病原菌致病性和寄主抗性的很好的工具^[24]。另外,实时定量 PCR 还可以用来检测食品中的真菌毒素。利用该技术,Zsuzsanna Mayer 等对食品中的黄曲霉(*Aspergillus flavus*)毒素进行了检测^[25],Helge Schnerr 等检测了小麦中镰刀菌(*Fusarium*)产生的单端孢菌毒素,结果证明该技术是检测食品中真菌毒素的灵敏方法^[26]。此外,该技术在研究真菌病害的侵染规律、防止真菌病原物传播等方面也有应用^[27-29]。

4.1.2 在植物病毒检测中的应用

由于病毒本身核酸序列较为简单,而且大量病毒的核酸序列已经报道,所以用 PCR 技术来检测植物病毒非常方便。目前,实时定量 PCR 在病毒检测

中应用非常广泛^[6]。利用 TaqMan 探针实时定量 PCR 技术,Roberts 等检测到了 500fg 水平的番茄斑萎病毒(TSWV)^[30];Eun 等同时检测出 5fg 水平的建兰花叶病毒(CyMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)^[31]。

4.1.3 在病原细菌检测中的应用

在病原细菌检测方面,更多的是利用实时定量 PCR 与培养分离相结合的方法,称之为 Real-time Bio-PCR。这一技术已经在检测种子的菜豆晕疫病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)和马铃薯块茎中的马铃薯环腐病菌(*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*)中得到应用^[6]。

4.2 致病相关基因的表达分析

用作基因表达研究的常用技术有半定量 PCR、Northern 杂交等。与这些方法相比,实时定量 PCR 更为灵敏、操作更为方便,成为检测低丰度 mRNA 最灵敏的方法,广泛用于基因表达分析^[12,32-36]。在植物病理学研究方面,可以利用实时定量 PCR 对致病相关基因的表达情况进行实时分析,是研究特定的致病相关基因表达的理想工具^[37]。

5 结语

实时定量 PCR 技术由于具有定量、特异、灵敏和快速等特点,是目前检测目的核酸拷贝数的可靠方法,在植物病理学研究中也得到广泛的应用。但是在操作过程中仍然会受到各种不确定因素的影响,这就需要操作者熟练掌握试验各个环节,使试验条件达到最优。随着科技的发展,功能更强大、操作更方便的实时定量 PCR 仪不断推出,更特异、更灵敏的荧光标记材料的不断出现,数据分析软件的不断改进更新,使得实时定量 PCR 技术的应用前景更加广泛,将成为生物定量分析的强有力手段。

参考文献

- [1] 王虹. 封面人物[J]. 遗传, 2006, 28(6): 639-640.
- [2] EDWARDS K, LOGAN J, SAUNDER N. Real-time PCR: an essential guide[M]. London: Horizon Bioscience, 2004.
- [3] BUSTIN S A, BENES V, NOLAN T, et al. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005, 34:597-601.
- [4] GINZINGER D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream[J].

- Experimental Hematology, 2002, 30:503–512.
- [5] GACHON C, MINGARM A, CHARRIER B. Real-time PCR; what relevance to plant studies[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(402):1445–1454.
- [6] NORMAN W S, REID D, FREDERICK et al. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues[J]. Annu Rev Phytopathol, 2003, 41:305–24.
- [7] BUSTIN S A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2002, 29: 23–39.
- [8] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25:402–408.
- [9] MICHAEL W P. A new mathematical model for relative quantitative real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29: 2003–2007.
- [10] MACKAY I M, ARDEN K J, NITSCHKE A. Real-time PCR in virology[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(6): 1292–1305.
- [11] LEKANNE DEPREZ R H, FIJNVANDRAAT A C, RUIJTER J M, et al. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions [J]. Analytical Biochemistry, 2002, 307: 63–69.
- [12] BUSTIN S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2000, 25:169–193.
- [13] HOLLAND P M, ABRAMSON R D, WATSON R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' $\rightarrow$ 3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase[J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88:7276–7280.
- [14] HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations[J]. Genes and Immunity, 2005, 6: 279–284.
- [15] FREEMAN W M, WALKE S J, VRANA K E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential[J]. BioTechniques, 1999, 26: 112–125.
- [16] PFAFFI M W, HAGELEIT M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23:275–282.
- [17] RUTLEDGE R G, CÔTÉ C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(16):e93.
- [18] RADONIĆ A, THULKE S, MACKAY I M, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 313:856–862.
- [19] THELLIN O, ZIRZI W, LAKAYE B, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 75:291–295.
- [20] VANDESOMPELE J, De PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. Genome Biology, 2002, 3(7): research0034. 1–0034. 11.
- [21] KIM B R, NAM H Y, KIM S U, et al. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25:1869–1872.
- [22] BÖHM J, HANG A, SCHUBERT R, et al. Real-time quantitative PCR; DNA determination in isolated spores of the Mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants[J]. J phytopathology, 1999, 147:409–416.
- [23] LEES A K, CULLEN D W, SULLIVAN L, et al. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil[J]. Plant Pathology, 2002, 51:293–302.
- [24] MIN QI, YINONG YANG. Quantification of *Magnaporthe grisea* during infection of rice plants using real-time polymerase chain reaction and northern blot/phosphoimaging analyses[J]. Phytopathology, 2002, 92:870–876.
- [25] MAYER Z, BAGNARA A, FÄRBER P, et al. Quantification of the copy number of nor-1, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 82:143–151.
- [26] SCHNERR H, NIESSEN L, RUDI F, et al. Real time detection of the tri5 gene in *Fusarium* species by LightCycler™-PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71: 56–61.
- [27] SCHWEIGKOFER W O, DONNELL K, GARBELLOTTO M, et al. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70:3512–3520.
- [28] GACHON C, SAINDRENAN P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42: 367–371.
- [29] BROUWER M, LIEVENS B, VAN HEMELRIJCK W, et al. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 228: 241–248.

- [30] ROBERTS C A, DIETZGEN R G, HEELAN L A, et al. Real-time RT-PCR fluorescent detection of *Tomato spotted wilt virus*[J]. J Virol Methods, 2000, 88(1):1 - 8.
- [31] EUN A J, SEOH M, WONG S. Simultaneous quantification of two orchid viruses by the TaqMan real-time RT-PCR[J]. J Virol Methods, 2000, 87:151 - 160.
- [32] 孙淑斌,李宝珍,胡江,等. 水稻低丰度表达基因 OsAMT1; 3 实时荧光定量 PCR 方法的建立及其应用[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(1):8 - 12.
- [33] NICOT N, HAUSMAN J F, HOFFMANN L, et al. House-keeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56:2907 - 2914.
- [34] VOLKOV R A, PANCHUK I I, SCHÖFFL F. Heat-stress dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54:2343 - 2349.
- [35] LISS B. Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(17):e89.
- [36] OHDAN T, FRANCISCO P B Jr, SAWADA T, et al. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56:3229 - 3244.
- [37] 吴茂森,田峰,齐放军,等. 水稻与白叶枯病菌互作的基因表达谱分析与差异性表达基因的识别[J]. 中国农业科学, 2007, 40(2):277 - 282.