

根癌农杆菌介导籼稻 93-11 遗传转化体系的建立

肖媛^{1,2}, 李落叶¹, 徐孟亮^{1,2,3}, 夏新界^{1*}(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 中国长沙 410125; 2. 中国科学院研究生院, 中国北京 100049;
3. 湖南师范大学生命科学院, 中国长沙 410081)

摘要 为建立水稻基因功能研究技术平台并通过生物技术改良优良恢复系, 选用 93-11 成熟胚为外植体, 通过优化培养基, 建立了适合转化的高效再生系统; 首次通过农杆菌介导将大肠杆菌基因 *C1* 成功转化 93-11, 构建了根癌农杆菌介导籼稻 93-11 遗传转化体系. 结果表明, NBA_1D_3 为合适的愈伤诱导培养基, 诱导率达 87.0%; 愈伤经 3 次继代培养转入分化培养基, 分化率为 47.0%. 获得 213 株潮霉素抗性植株, 随机挑选 89 株经 PCR 检测, 65 株检测到目的条带, 阳性植株占 73.0%; 实时 PCR 检测 *C1* 基因能在转基因植株表达.

关键词 93-11; 成熟胚; 根癌农杆菌; 转化体系; 组织培养

中图分类号 Q342+.1

文献标识码 A

文章编号 1000-2537(2008)03-0077-06

Establishment of *Agrobacterium*-mediated Transformation System of *Indica* Rice 93-11XIAO Yuan^{1,2}, LI Luo-ye¹, XU Meng-liang^{1,2,3}, XIA Xin-jie^{1*}(1. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Science, Changsha 410125, China;
2. Graduate University of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China;
3. Life Science College, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract In order to establish a transformation system for gene function analysis of *indica* rice and improve characters of elite restorer by biotechnology, mature embryos of *indica* rice 93-11 were chosen as explants. A high efficient regeneration system of rice plants for genetic transformation was developed through optimizing culture media. *C1* gene cloned from *E. coli* was successfully delivered into 93-11 through the *Agrobacterium*-mediated method, and stable transgenic plants were obtained. Results showed that the rate of calli induction reached 87.0% using NBA_1D_3 as the induction medium. After three times of subcultures, calli were moved into the differentiation medium, and the rate of differentiation was 47.0%. Through the *Agrobacterium*-mediated method developed a total of 213 hygromycin resistant plants were obtained. A group of 89 of them were chosen randomly for PCR analysis, and 65 were positive for the gene insertion (73.0%). Quantitative RT-PCR analysis showed the expression of exogenous *C1* gene in the transgenic rice.

Key words 93-11; mature embryo; *Agrobacterium tumefaciens*; transformation system; tissue culture

水稻是我国种植面积最大的粮食作物, 以中籼品种“93-11”(又名“扬稻 6 号”)为父本配制的两系杂交

收稿日期: 2008-05-11

基金项目: 中国科学院“百人计划”基金资助项目(02200420062903), 中国科学院亚热带农业生态研究所青年人才领域前沿基金资助项目(ISACX-LYQY-QN-0706)

作者简介: 肖媛(1985-), 女, 汉族, 湖南郴州人, 中科院硕士研究生. * 通讯作者: 夏新界, E-mail: jxxia@isa.ac.cn, Tel: 0731-4619769

稻“两优培九”、“广两优 6 号”等优质、高产、抗病组合已在广大中籼稻区推广应用^[1]. 93-11 不仅在生产上有重要意义,在水稻功能基因组学研究中也是一个重要的模式品种,其全基因组序列已测定^[2],突变体库已在构建中^[3]. 以籼稻为受体进行根癌农杆菌介导转化近年来已有相关报道^[4-6],但转化率低、重复性差、受基因型限制仍是主要问题,目前未见关于 93-11 根癌农杆菌介导转化的报道.

幼胚作为实验材料虽然能高效诱导愈伤,但受时间和季节的限制,成熟胚是合适的转基因外植体材料. 93-11 成熟胚诱导的愈伤易褐化、不耐继代、分化率低^[7-9],这成为 93-11 转基因工作的一个重要限制因子. 本文通过对诱导、继代、分化培养基的研究建立了 93-11 高效再生系统,并从共培养、筛选培养、预分化等步骤建立 93-11 成熟胚根癌农杆菌介导转化体系,为开展水稻功能基因组学研究和获得高产、高抗品种奠定基础.

1 实验部分

1.1 植物材料

籼稻 93-11 成熟种子,由湖南师范大学生命科学院馈赠.

1.2 根癌农杆菌菌株及质粒

根癌农杆菌菌株为 EHA105,为本实验室保存的. 质粒为 pCOsAc1300-C1,该质粒 T-DNA 区结构如图 1,其中含有潮霉素磷酸转移酶基因(*hpt*).

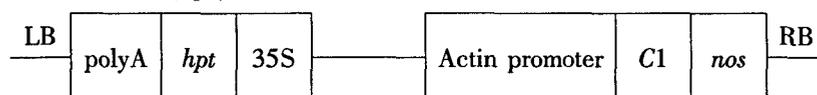


图 1 植物表达载体 pCOsAc1300-C1 的 T-DNA 区

1.3 培养基

在 93-11 组织培养和转化过程中使用的培养基如下:

诱导培养基 J₀: MS 盐分和维生素^[10] + 谷胺酰氨 0.5 g/L + 蔗糖 30.0 g/L + 琼脂粉 8.5 g/L, pH 6.0;
NB: N₆ 大量盐分^[11] + B₅ 微量盐分 + N₆ 铁盐 + B₅ 维生素 + 脯氨酸 0.5 g/L + 水解酪蛋白 0.3 g/L + BA 0.1 mg/L + 蔗糖 33.5 g/L + 琼脂粉 8.5 g/L, pH 6.0.

继代培养基 J₃: MS 大量盐分 + 10 倍 B₅ 微量盐分 + J₃ 铁盐 (FeSO₄ · 7H₂O 41.8 mg/L, Na₂EDTA 55.9 mg/L) + DL 维生素 (甘氨酸 2.0 mg/L, 盐酸硫胺素 1.0 mg/L, 盐酸吡哆醇 1.0 mg/L, 烟酸 1.0 mg/L, 肌醇 100.0 mg/L) + 谷胺酰氨 0.3 g/L + 脯氨酸 0.5 g/L + 2,4-D 2.5 mg/L + 麦芽糖 30.0 g/L + 琼脂粉 8.5 g/L, pH 6.0; NBD 2.5: NB + 2,4-D 2.5 mg/L, pH 6.0.

共培养基 NBM: N₆ 大量盐分 + B₅ 微量盐分 + N₆ 铁盐 + B₅ 维生素 + 水解酪蛋白 0.8 g/L + 2,4-D 2.5 mg/L + 麦芽糖 30.0 g/L + 琼脂粉 8.5 g/L + 乙酰丁香酮 0.1 mmol, pH 5.6.

筛选培养基 J₃S: J₃ + 头孢霉素 500 mg/L + 羧变青霉素 400 mg/L + 潮霉素 50 mg/L, pH 6.0.

预分化培养基 Y: N₆ 大量 + CuSO₄ 3.0 mg/L + N₆ 铁盐 + B₅ 维生素 + 谷胺酰氨 0.5 g/L + 脯氨酸 0.5 g/L + 水解酪蛋白 0.3 g/L + BA 3.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L + 蔗糖 30.0 g/L + 山梨醇 20.0 g/L + 琼脂粉 8.5 g/L + 头孢霉素 500 mg/L + 羧变青霉素 400 mg/L, pH 6.0.

分化培养基 D: N₆ 大量盐分 + 10 倍 B₅ 微量盐分 + D 铁盐 (FeSO₄ · 7H₂O 55.9 mg/L, Na₂EDTA 74.5 mg/L) + DL 维生素 + 谷胺酰氨 0.5 g/L + 脯氨酸 0.5 g/L + 水解酪蛋白 0.8 g/L + BA 2.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L + NAA 0.2 mg/L + KT 2.0 mg/L + 麦芽糖 30.0 g/L + 琼脂粉 8.5 g/L + 头孢霉素 500 mg/L + 羧变青霉素 400 mg/L, pH 6.0.

生根培养基 R: MS 盐分和维生素 + 蔗糖 20.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 琼脂粉 8.0 g/L, pH 6.0.

1.4 方法

1.4.1 93-11 成熟胚愈伤组织的诱导 挑选健康 93-11 籽粒剥去颖壳,置 37 °C 培养箱过夜,取出后放入灭菌三角瓶,先用 75% 的乙醇表面消毒 5 min,灭菌水冲洗 1 次,0.1% HgCl₂/L 消毒 12 min,灭菌水冲洗 5 次,再放入次氯酸钠 (NaClO) 原液消毒 40 min,灭菌水冲洗 5 次,于灭菌滤纸上晾干,然后接种到诱导培养基

($J_0D_3N_{0.5}$, J_0D_3 , NBD_3 , NBA_1D_3 , $NBA_1D_{2.5}$, $NBN_{0.5}D_3$, $NBN_{0.5}D_{2.5}$), 每皿 20 粒, 25 ~ 26 °C 暗培养. 15 d 后去除胚乳和芽, 30 d 后统计愈伤诱导率(愈伤诱导率 = 能诱导愈伤且愈伤不褐化的种子数 / 接入培养基的种子数 × 100%).

1.4.2 93-11 愈伤组织的继代 30 d 后将愈伤转入继代培养基, 每 20 d 继代 1 次, 连续继代 3 次, 观察愈伤状态.

1.4.3 93-11 愈伤组织得分化 挑选继代 3 次的愈伤转入分化培养基, 20 d 后统计分化率(分化率 = 能分化出植株的愈伤数 / 接入愈伤总数 × 100%).

1.4.4 农杆菌与愈伤组织的共培养 EHA105(含 pCOsAc1300-C1 质粒)划 LB 板(加 Kan 50 mg/L 和 CHL 34 mg/L), 28 °C 培养 2 d 后挑单菌落, 在 LB 板(加 Kan 50 mg/L 和 CHL 34 mg/L)划线至全培养皿, 28 °C 过夜培养, 用液体共培养基将菌洗下, 调 $OD_{600} = 0.5$. 挑选 1 ~ 2 mm 黄白色表面干爽结构致密的愈伤组织, 于灭菌滤纸风干至表面发白. 浸入上述准备好的菌液中, 浸泡 30 min, 每隔 5 min 摇一次. 灭菌水冲洗 5 次至液体不浑浊, 用灭菌滤纸吸干水分, 风干至愈伤表面发白. 将愈伤转移到固体共培养基, 在培养基表面铺一层用液体共培养基浸湿的灭菌滤纸, 25 ~ 26 °C 下暗培养 3 d.

1.4.5 抗性愈伤组织的筛选 3 d 后, 将共培养的愈伤组织转入灭菌三角瓶, 灭菌水冲洗 5 次至液体不浑浊, 再用加有 500 mg/L 头孢霉素和 400 mg/L 羧变青霉素的灭菌水浸泡 30 min, 每隔 5 min 摇一次. 用灭菌滤纸吸干水分, 风干至愈伤表面发白. 转移到筛选培养基 J_3S 中, 25 ~ 26 °C 暗培养, 20 d 后将抗性愈伤转入新的筛选培养基.

1.4.6 抗性愈伤组织的分化 两次筛选后, 将抗性愈伤转移至预分化培养基 Y, 置于光照培养箱中培养 3 d, 条件为: 25 ~ 26 °C, 14 h 光照培养, 光强 1 000 ~ 1 500 lx. 3 d 后将愈伤转至分化培养基 D, 置于光照培养箱中, 条件同预分化, 每 20 d 更换一次新培养基.

1.4.7 抗性植株的生根 绿苗高约 5 ~ 8 cm, 转移到生根培养基 R, 置光照培养箱中, 条件同预分化.

1.4.8 抗性植株的驯化移栽 3 ~ 4 周后, 挑根多而粗壮的抗性植株, 打开瓶盖加入蒸馏水于室内炼苗, 3 d 后用自来水将幼苗上的培养基冲洗干净, 移栽到装有泥土的盘子, 待幼苗成活移入实验田, 常规管理至成熟.

1.5 抗性植株的 PCR 检测

1.5.1 DNA 提取 取抗性水稻植株幼嫩叶片 0.2 ~ 1.0 g, 按 CTAB 法^[12]提取基因组 DNA.

1.5.2 PCR 扩增 PCR 引物为: C1-F: 5'-GAGATCCATGGCAAAGATTAAGGTCAG-3', C1-R: 5'-GAACTG-CAGCTAGATAGCTGTTACGTTAAC-3'. 扩增产物为 205 bp 的基因片段. PCR 扩增体系(20 μ L): MBI 公司 Taq DNA 聚合酶(5 mmol/ μ L)0.2 μ L, 10 × Buffer(KCl)缓冲液 2.0 μ L, $MgCl_2$ 1.6 μ L, dNTP Mixture 2.0 μ L, C1-F (20 μ mol/L)0.4 μ L, C1-R(20 μ mol/L)0.4 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 12.4 μ L.

PCR 反应程序为: 94 °C 变性 4 min 后运行下循环, 94 °C 45 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 7 min. 取 PCR 产物 10 μ L 进行常规琼脂糖(1.0%)凝胶电泳分离并照相.

1.6 转基因植株的荧光定量实时 PCR 检测

1.6.1 RNA 提取 植物叶片取后迅速在液氮中研磨成粉末, 取约 100 mg 置于装有 1.0 mL TRIzol (Invitrogen) 的 1.5 mL 离心管中, 置 -80 °C 保存备用. 采用 TRIzol 试剂提取法: 将 -80 °C 保存的样品取出, 冰上解冻后, 加入 200 μ L 氯仿, 振荡混匀, 离心后小心取出上层水相, 转入另一离心管中, 加入 500 μ L 异丙醇, 沉淀、离心分离出 RNA, 再经 75% 酒精洗涤, 室温微干后, 加入适当体积的 RNase-free 的水, 充分溶解. 所提 RNA 经 DNA 酶(Fermentas)处理.

1.6.2 荧光定量实时 RT-PCR 荧光定量实时 RT-PCR 引物为: C1-RT-S: 5'-AAGGTCAGGTTAAGTGTTCAACG-3' 和 C1-RT-A: 5'-AGTGTACGAACACATCTTTGCTGC-3'. 采用 QIAGEN 公司的 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit 及 Rotor Gene 3000 荧光定量 PCR 仪进行检测. 内参基因为 18s 核糖体 RNA 基因, 引物为 18s-F: 5'-CGTCCCTGCCCTTTGTACAC-3' 和 18s-R: 5'-CGAACACTTCACCGGATCAT T-3'. 一步法扩增程序: 48 °C 保温 30 min, 一个循环; 95 °C 预变性 10 min, 一个循环; 95 °C 15 s, 58 °C 40 s, 72 °C 20 s, 共 40 个循环. 按相对定量法进行定量计算, 目的基因相对表达量计算公式为 $Rel. Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = (\text{未知样品 } \Delta Ct) - (\text{Calibrator } \Delta Ct)$, 未知样品 $\Delta Ct = (\text{内参基因 } Ct) - (\text{目的基因 } Ct)$, $\text{Calibrator } \Delta Ct = (\text{参比样内参基因 } Ct) - (\text{参比样目的基因 } Ct)$.

2 结果与分析

2.1 诱导培养基对 93-11 成熟胚愈伤诱导率的影响

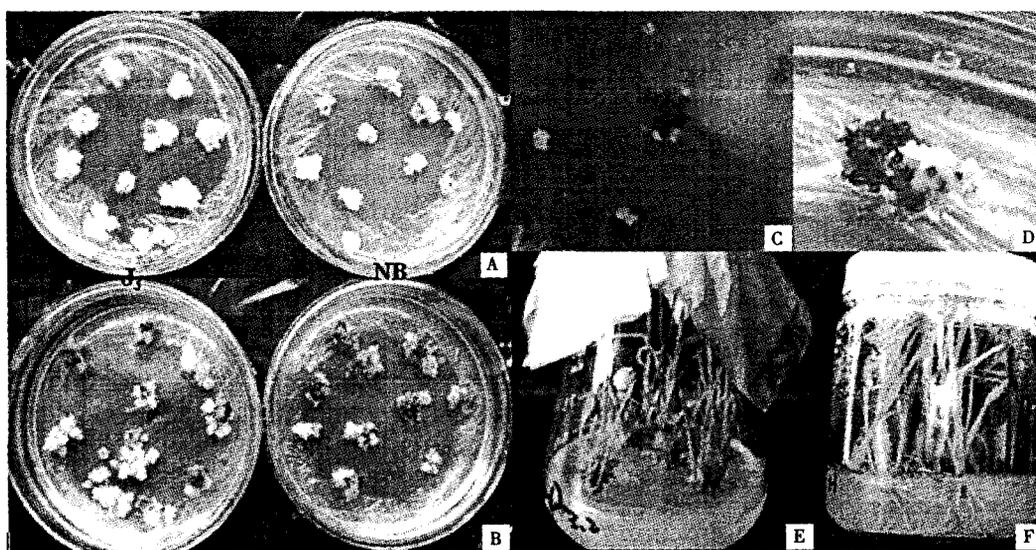
如表 1 所示, J_0D_3 和 $J_0N_{0.5}D_3$ 诱导率分别为 29.6%、25.6%, NBD_3 、 NBA_1D_3 、 $NBA_1D_{2.5}$ 、 $NBN_{0.5}D_3$ 、 $NBN_{0.5}D_{2.5}$ 分别为 53.1%、84.4%、87.0%、71.7%、62.7%, NB 培养基愈伤诱导率高于 J_0 , NAA 0.5 mg/L 和 ABA 1 mg/L 能增加愈伤诱导率, 2,4-D 2.5 mg/L 和 3.0 mg/L 对愈伤诱导率的影响差异不大, 93-11 愈伤诱导率最高的培养基为 NB + ABA 1.0 mg/L + 2,4-D 3.0 mg/L, 诱导率为 87%. 本实验统计的愈伤诱导率比前人^[8]在诱导初期统计的愈伤诱导率低, 因为本实验中统计的愈伤诱导率是 30 d 后能诱导愈伤且愈伤不褐化的种子数与接入培养基的种子总数的比值, 这既能反映培养基对愈伤诱导的影响, 也能反映其对愈伤褐化的影响. 种子接入诱导培养基 15 d 后去除胚乳和芽, 有利于愈伤生长, 防止愈伤组织褐化.

表 1 诱导培养基对 93-11 愈伤诱导率的影响

培养基	NAA/mg · L ⁻¹	ABA/mg · L ⁻¹	2,4-D/mg · L ⁻¹	接入种子数	诱导出愈伤且不褐化种子数	诱导率/%
J_0D_3	0	0	3.0	179	53	29.6
$J_0N_{0.5}D_3$	0.5	0	3.0	156	40	25.6
NBD_3	0	0	3.0	143	76	53.1
$NBA_1D_{2.5}$	0	1.0	2.5	377	318	84.4
NBA_1D_3	0	1.0	3.0	353	307	87.0
$NBN_{0.5}D_{2.5}$	0.5	0	2.5	508	364	71.7
$NBN_{0.5}D_3$	0.5	0	3.0	228	143	62.7

2.2 继代培养基对 93-11 愈伤组织的影响

如图 2-A 所示经过 1 次继代培养, J_3 和 NB 培养基中愈伤组织保持淡黄色, 基本没有褐化, 两者差异不明显; 经过 3 次继代培养(图 2-B), NB 培养基中愈伤组织褐化严重, J_3 培养基愈伤变为深黄, 有新的球状愈伤生长, 接入分化培养基, 新生长出的愈伤组织能够分化成苗, 分化率为 47.0%, 与以前^[8]不经过多次继代的愈伤组织分化率接近. J_3 和 D 培养基中微量盐分为 10 倍 B₅ 微量盐分, 糖源为麦芽糖, 推测这可能是 93-11 愈伤组织在此培养基中能保持较高活性的重要原因.



A. 继代 1 次不同培养基对 93-11 愈伤的影响; B. 继代 3 次不同培养基对 93-11 愈伤的影响; C. 经过两次筛选培养产生的潮霉素抗性愈伤; D. 分化培养基上变绿的抗性愈伤; E. 分化的抗性植株; F. 生根的抗性植株

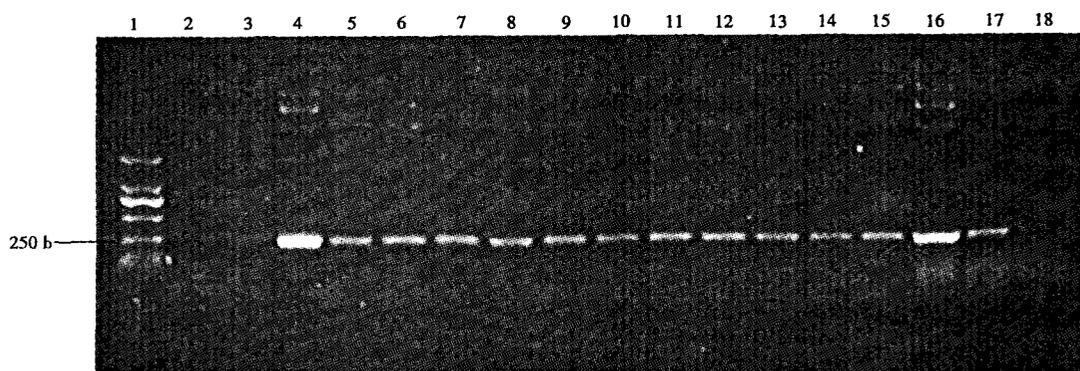
图 2 93-11 愈伤继代培养和农杆菌介导转化 C1 基因

2.3 抗性愈伤的分化

在分化培养之前增加预分化即山梨醇高渗处理过程,抗性愈伤组织(图 2-C)经预分化 3 d 后,转入分化培养基后光下变绿(图 2-D),可迅速出苗.将抗性苗(图 2-E)转入壮根培养基上,可迅速生根并长成完整植株(图 2-F).分化阶段抗性愈伤分化成植株比率为 43.0%.在转移愈伤时,不要将新生长出的抗性愈伤从母体中分离,以减少对愈伤组织的伤害.

2.4 抗性植株的 PCR 检测

经过转化获得 213 株潮霉素抗性植株,随机选取其中 89 株提取基因组 DNA,进行 PCR 扩增,结果 65 株为阳性植株,阳性植株率为 73.0%.如图 3 为 14 株抗性植株 PCR 检测结果,205 bp 大小为目的条带,结果显示抗性植株中 13 株的扩增片段大小与阳性对照的条带一致,而阴性对照(水和非转基因 93-11 植株)没有目的条带,证明 *C1* 基因已整合到转化 93-11 的基因组中.



1, DL2000; 2, 无模板阴性对照; 3, 未转化的 9311 植株; 4, 质粒阳性对照; 5~18, 抗性植株

图 3 潮霉素抗性植株的 PCR 检测

2.5 荧光定量实时 RT-PCR 检测转基因植株

挑选 7 株经 PCR 鉴定为阳性转基因 93-11 植株进行荧光定量实时 RT-PCR,以 *C1* 基因在 T10-1 植株中的表达量为 1,表达量最高的 T22 为 T10-1 的 3 380.4 倍,最低的 T4-4 为 0.125. *C1* 在转基因植株内表达存在差异,这可能和插入的拷贝数和插入的位点有关系.

3 讨论

农杆菌介导转化法是一个细菌和愈伤组织共同作用的复杂过程.凡是涉及到细菌活性或愈伤组织状态的因素都可能影响转化效果.对 93-11 而言,一方面是成熟胚愈伤诱导、再生的频率不高,另一方面可能是农杆菌侵染和潮霉素筛选对愈伤组织造成伤害,使愈伤容易褐化、分化率低.因此未见农杆菌介导 93-11 转化的报道.以前的研究主要集中在构建 93-11 高效再生系统^[8,18].本研究通过诱导培养基研究,找到合适的诱导培养基既能高效诱导愈伤,又能保持愈伤状态,能为农杆菌介导转基因提供合适的愈伤组织;继代培养时间的长短对于转化系统有重要的意义,愈伤组织在 J_3 培养基中能连续继代 3 次保持较高分化率,选择其作为筛选培养基有利于抗性愈伤的生长.另一方面,本研究从转化前农杆菌活化、共培养时间、干燥处理、转化后抑制农杆菌生长和高渗处理促进分化等方面来探讨农杆菌转化过程对转化率的影响,取得了较为理想的效果,本实验选用了成熟胚为外植体,首次采用农杆菌法成功转化 93-11,为通过转基因研究水稻功能基因和优良品种的培育奠定基础.

参考文献:

- [1] 白和盛,詹存钰,王宝和,等.中籼扬稻 6 号及其在杂交稻育种中的应用[J].杂交水稻,2001,16(6):13-15.
- [2] YU J, HU S N, WANGG J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica)[J]. Science, 2002, 296(5565):79-92.
- [3] 叶俊,吴建国,石春海,等.水稻“9311”突变体筛选和突变体库构建[J].作物学报,2006,32(10):1 525-1 529.

- [4] ALDEMITA R R, HODGES T K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties [J]. *Plant*, 1999, 199(4):612-615.
- [5] 王莉江, 明小天, 安成才, 等. 籼稻明恢 63 成熟种子愈伤组织诱导及转基因水稻的抗性检测[J]. *植物生理学报*, 2002, 28(3):323-326.
- [6] 李双成, 王世全, 李平, 等. 提高农杆菌介导转化水稻效率的因素[J]. *中国水稻科学*, 2005, 19(3):231-237.
- [7] 曾晓珊, 戴良英, 刘雄伦, 等. 籼梗稻对农杆菌遗传转化反应的差异及提高转化率的研究[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2007, 33(4):386-390.
- [8] 余建明, 张保龙, 倪万潮. 影响“扬稻 6 号”成熟胚愈伤组织再生植株的因子[J]. *江苏农业学报*, 2002, 18(4):199-202.
- [9] 刘元凤, 刘彦卓, 李晓方, 等. 几种影响籼稻成熟胚愈伤组织诱导及再生的因素[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(3):319-322.
- [10] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures[J]. *Plant Physiol*, 1962, 15:473-493.
- [11] CHU C C, WANG C C, SUN C S, *et al.* Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources[J]. *Sci Sin*, 1975, 18:659-668.
- [12] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucl Acid Res*, 1980, 8:4321-4325.
- [13] 周永国, 尹中明, 沈忠伟, 等. 籼稻 9311 成熟胚再生体系[J]. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 36(4):71-77.

(上接第 76 页)

3 结论

采用共沉淀法制备了 CuO-CeO₂ 复合氧化物催化剂, 该复合氧化物为纳米片状晶体, 且催化剂的形态、催化活性等与催化剂组成及其制备时的焙烧温度有关, 当焙烧温度为 250 °C, CeO₂ 含量为 10% 时, 有最好的 CO 催化氧化活性. 该催化剂具有制备方法简单、成本较低的优点, 在卷烟烟气降害、汽车废气处理等领域有一定的应用前景.

参考文献:

- [1] JUNWU ZHU, DAN LI, HAIQUN CHEN, *et al.* Highly dispersed CuO nanoparticle prepared by a novel quick-precipitation method[J]. *Materials Letters*, 2004, 58:3324-3327.
- [2] KUMAR R V, DIAMANT Y, GEDANKEN A. Sonochemical synthesis and characterization of nanometer-size transition metal oxides from metal acetates[J]. *Chem Mater*, 2000, 12:2301-2304.
- [3] HONG Z S, CAO Y, DENG J F. A convenient alcoholthermal approach for low temperature synthesis of CuO nanoparticles[J]. *Mater Lett*, 2002, 52:34-36.
- [4] 崔宝臣, 马丽景, 白守礼, 等. 纳米 CuO 的制备、表征及其应用[J]. *化工进展*, 2004, 23(5):541-544.
- [5] 宋宇鹏, 王向宇, 何军, 等. 纳米 Ce_{0.9}Cu_{0.1}O₂- δ 固溶体的制备、表征和 CO 低温氧化性能[J]. *工业催化*, 2007, 15(1):55-58.
- [6] 刘源, 孙海龙. 氧化铈气凝胶负载氧化铜催化剂上的一氧化碳氧化反应[J]. *催化学报*, 2001, 22(5):453-456.
- [7] 郑修成, 韩东战, 王淑萍, 等. Preparation, Characterization of CuO/CeO₂ and Cu/CeO₂ catalysts and their applications in low-temperature CO oxidation[J]. *中国稀土学报(英文版)*, 2005, 23(1):47-51.
- [8] 钟依均, 林瑞, 罗孟飞, 等. Characterization and CO catalytic oxidation of CuO/Ce-Zr-La-O catalyst[J]. *中国稀土学报(英文版)*, 2003, 21(3):324-327.