

研究报告

A Letter

利用 SMART 法构建花生果针全长 cDNA 文库

姜宝杰✉ 陈华✉ 邓烨✉ 曾建斌✉ 张冲✉ 贺小彦✉ 庄伟建✉

福建农林大学福建省作物分子与细胞生物学重点实验室, 福州, 350002

✉通讯作者: weijianz1@163.com; ✉作者

基因组学与应用生物学, 2011 年, 第 30 卷, 第 24 篇 DOI: 10.5376/gab.cn.2011.30.0024

收稿日期: 2011 年 3 月 17 日

接受日期: 2011 年 5 月 5 日

发表日期: 2011 年 5 月 13 日

这是一篇开放获取的论文, 其论文发布和传播接受《Creative Commons Attribution License》所有条款。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许和同意第三方无条件的使用、传播以及任何媒介的复制或再制作。

建议的引用格式如下:

姜宝杰等, 2011, 利用 SMART 法构建花生果针全长 cDNA 文库, 基因组学与应用生物学, Vol.30 No.24 (DOI: 10.5376/gab.cn.2011.30.0024)

摘要 果针是花生实现地上开花、地下结果的关键器官, 果针的研究历来受到植物学家的重视。为进一步筛选、克隆和分析果针特异基因及研究花生果针发育的分子机理, 我们以花生果针为材料, 利用改良的 CTAB 法提取总 RNA, 根据 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒所示方法合成 cDNA, 限制性酶切消化后连接到质粒载体 pDNR-LIB, 构建花生果针全长 cDNA 文库。经鉴定, 原始文库的滴度为 1.3×10^6 cfu, 重组率达 100%, 60% 的插入片段在 1.0~2.0 kb 之间, 插入片段平均大小在 1.0 kb 左右, 扩增文库滴度达到了 3.82×10^9 cfu。说明所构建的花生果针文库属高质量的全长 cDNA, 为筛选和克隆花生果皮特异表达基因和研究花生果针发育的分子机理提供了基础。

关键词 果针; 花生; SMART; 全长 cDNA 文库

Construction of Peanut Gynophore Full-length cDNA Library with SMART Method

Jiang Baojie✉ Chen Hua✉ Deng Ye✉ Zeng Jianbin✉ Zhang Chong✉ He Xiaoyan✉ Zhuang Weijian✉

Fujian Key Lab of Plant Molecular and Cell Biology, Fuzhou, 350002

✉ Corresponding author: weijianz1@163.com; ✉ Authors

Abstract Gynophore is the key organ for fruit formation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and is always paid much attention to by peanut community. In order to study gynophore-special gene expression and molecular mechanism underlined its development, we extracted gynophores' total RNA with modified CTAB method, then ds cDNA was synthesized according to SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technology, and was ligated with the pDNR-LIB vector to construct a peanut gynophore full-length cDNA library. The results showed that we constructed a good library. The titer of primary cDNA library was 1.3×10^6 cfu. The recombination percentage was 100% with 60% inserted fragment size being 1.0~2.0 kb in length and the average length of inserted fragment being about 1.0 kb. The amplified library capacity was 3.82×10^9 cfu. The results showed that we constructed a good library. It will be useful for screening and cloning gynophore special expression genes and studying gynophore growth molecular mechanism.

Keywords Gynophore; Peanut; SMART; cDNA library

研究背景

花生(*Arachis hypogaea* L.)是我国重要的油料和经济作物, 果针是花生特有的组织结构, 是实现花生地上开花、地下结荚的器官, 果针能否入土, 关系到花生能否正常结果。因此, 果针生长发育的生物

学特性引起许多学者的重视。目前对于果针的研究主要集中于栽培(张海燕等, 2004)及生长发育方面(贺立红等, 2006)。花生果针分子生物学方面的研究报道甚少, 目前对于控制花生果针结构、生长发育以及其它特性的基因表达调控情况还是一片空白。

cDNA 文库的构建和筛选是基因克隆的重要方法之一, 是目前发现新基因和研究基因表达的基本工具(朱利军等, 2009, 海南大学学报自然科学版, 27(2): 185-190; 董志敏等, 2006, 作物杂志, (5): 1-4)。例如郭侯等(2010)人利用油鸡 cDNA 文库成功筛选并鉴定了 *purH* 基因的表达情况。全长 cDNA 文库的构建可以高效、大规模获得基因序列, 能大幅度地加快计算机分析蛋白质表达和功能的进程, 是进行基因组研究的一条重要途径(董志敏等, 2006)。目前, 全长文库构建方法已比较成熟, 报道的技术方法有 Oligo-Capping 法(Maruyama and Sugano, 1994)、CAPture 法(Edey et al., 1995)、CAP-trapper 法(Carninci et al., 1996)、SMART 法(Chenchik et al., 1996)、Cap-Select 法(Schmidt and Mueller, 1999)和 CAP-jumping 法(Fimove et al., 2001)等。近年来, 许多研究者致力于全长文库的构建, 拟南芥(Seki et al., 1998)、水稻(刘运华等, 2007)、花生(蔡宁波等, 2007)、甘蔗(许莉萍等, 2009)和鹿茸(郝丽等, 2009)等均有全长文库的报道, 获得了大量的数据, 完善了各种文库构建方法, 极大的促进了功能基因组学的研究。然而, 各种文库构建方法各有优缺点, 综合比较而言, SMART 法因其具有简单、快速的特点已广泛应用于一般质量 cDNA 文库的构建。Clontech 公司改进的“SMART”法使构建文库所需的 RNA 量减少, 大约只需 50 ng 总 RNA 即可构建完整的 cDNA 文库(储昭晖等, 2002, 科学通报, 47(21): 1656-1662)。

本文利用 SMART 技术成功构建了花生果针全长 cDNA 文库, 该文库可用于克隆和鉴定一批功能基因全长 cDNA 序列, 为开展果针重要基因的功能研究奠定了基础, 将有利于进一步从分子水平深入阐明果针生长发育的分子机理。

1 结果与分析

1.1 总 RNA 的提取结果

利用本实验室改良的 CTAB 法提取的花生果针总 RNA 经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)显示, 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 说明提取的总 RNA 质量较高。紫外分光光度计检测所提 RNA 纯度, 其 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.97, OD_{260}/OD_{230} 值为 2.32, 获得了高纯度的 RNA, 满足文库构建的要求。

1.2 ds cDNA 的合成

3 μ g 总 RNA 起始第一链合成后采用 LD-PCR 法合成的 ds cDNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示, ds cDNA 片段条带呈现分布在 0.2~3.0 kb (图 2)之间的弥散状条带, 主要集中于 750 bp 以上, 条带清晰、正常且产物的量足, 说明合成了较高质量的双链 cDNA, 可用于 cDNA 文库的构建。

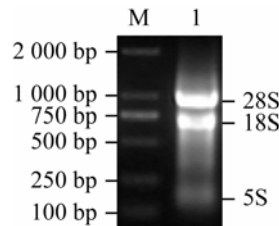


图 1 花生果针总 RNA 电泳图

注: 1: DL2000 DNA marker; 2: 花生果针总 RNA

Figure 1 Gel electrophoresis of total RNA isolated from peanut gynophore

Note: 1: DL2000 DNA marker; 2: Total RNA of peanut gynophore

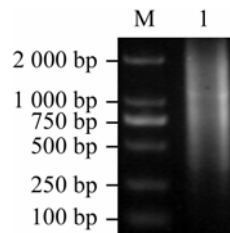


图 2 花生果针 dsDNA 电泳图

注: 1: DL2000 DNA marker; 2: 花生果针 dsDNA

Figure 2 Gel electrophoresis of peanut gynophore ds cDNA

Note: 1: DL2000 DNA marker; 2: dsDNA of peanut gynophore

1.3 文库质量的鉴定

双链经蛋白酶 K 消化、*Sfi* I 酶切、连接载体、电击转化后涂板, 计数培养板单克隆数, 经计算原始文库得到 1.23×10^6 个重组子。随机挑取 15 个单菌落摇菌, 进行菌液 PCR 扩增, 电泳结果显示(图 3), 其中含有两个双插入, 重组率达 100%。随机挑取 10 个单克隆过夜摇菌后提取质粒, 酶切后电泳(图 4)显示, 6 个单克隆的插入片段大小在 1.0~2.0 kb 之间, 所占比例为 60%, 插入片段平均大小在 1.0 kb 左右, 达到文库质量要求。扩增文库经不同稀释倍数稀释后涂板过夜培养, 经计算扩增文库滴度结果为 3.82×10^9 cfu。以上数据表明该文库为较高质量的 cDNA 文库, 可作为筛选和克隆果针特异表达基因

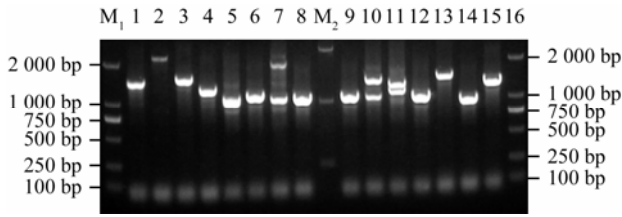


图 3 花生果针全长 cDNA 文库菌液 PCR 电泳图
 注: M₁: DL2000 DNA marker; M₂: DL15000 DNA marker;
 1~22: cDNA 插入片段

Figure 3 Gel electrophoresis of colonies by PCR method from peanut gynophore full-length cDNA Library

Note: M₁: DL2000 DNA marker; M₂: DL15000 DNA marker;
 1~22: The PCR product of colonies

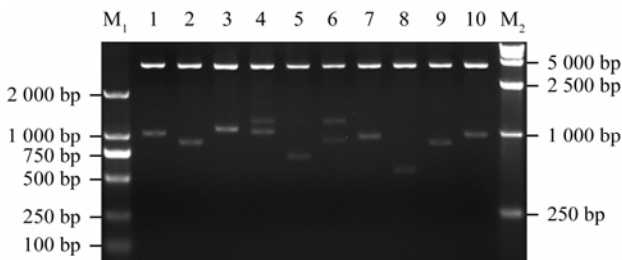


图 4 花生果针全长 cDNA 文库单菌落质粒酶切电泳图
 注: M₁: DL2000 DNA marker; M₂: DL15000 DNA marker;
 1~10: 酶切后的单克隆质粒

Figure 4 Gel electrophoresis of digested plasmids from peanut gynophore full-length cDNA Library

Note: M₁: DL2000 DNA marker; M₂: DL15000 DNA marker;
 1~10: The product of each digested plasmid

基因、研究果针发育分子机理的平台。

1.4 文库随机测序及生物信息学分析结果

随机挑选文库 30 个单克隆进行双向测序, 利用

表 1 文库随机测序序列生物信息学分析结果

Table 1 Bioinformatics analysis result of sequences picked randomly from library

名称	序列长度(bp)	最大 ORF (bp)	可能的功能	是否全长
Name	The length of sequence (bp)	The largest ORF (bp)	Possible function	Full length or not
No.1	963	360	放氧增强蛋白 2 Oxygen-increasing protein 2	否 No
No.2	550	417	功能未知 Unknown function	是 Yes
No.3	1 029	402	功能未知 Unknown function	否 No
No.4	882	261	异戊二烯基 CAAX 蛋白酶 Prenyl-based CAAX protease	否 No

DNA 序列常规分析软件 BioXM 2.6 分析测序结果, 共有 22 个基因测通, 且均具有开放阅读框结构。借助生物信息学技术判断序列是否为全长, 结果有 9 个为全长序列, 比率为 40.9%。利用 BLASTN 和 BLASTX 程序(<http://blas.tncbinlm.nih.gov/blas.tcgi>)进行同源性检索, 初步确定基因的功能, 所测序列包含结合类蛋白、氧化系统蛋白、结构蛋白、转录因子、抑制类蛋白、酶类蛋白和过敏原等基因(表 1)。

2 讨论

要成功构建一个全长 cDNA 文库, 获得高质量的 RNA 是前提。而影响总 RNA 质量的因素主要有 3 个: 一是否有降解; 二是否有污染(DNA、蛋白质和小分子物质); 三是否完整, 即包括生命体所有基因的转录产物。花生富含酚和多糖等物质, 使用 RNA 提取试剂盒或者其它通用 RNA 提取技术都很难获得高质量的 RNA, 本实验室改良的 CTAB 法提取花生 RNA 虽然耗时较长, 但提取的 RNA 纯度较高。本实验所提取的果针 RNA 28S、18S、5.8S 3 条条带清晰, 经紫外分光光度计检测, OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.97, OD₂₆₀/OD₂₃₀=2.32 说明所提取的 RNA 较纯, 没有降解, 没有蛋白质等分子污染, 可成功应用于该文库的构建。

构建高质量的全长 cDNA 文库要求获得高质量的全长 cDNA。本实验应用 SMART 方法, 以 3 μg 总

续表 1

Continuing table 1

名称	序列长度(bp)	最大 ORF (bp)	可能的功能	是否全长
Name	The length of sequence (bp)	The largest ORF (bp)	Possible function	Full length or not
No.5	1 212	636	真核生物翻译抑制因子 3f Eukaryotic translation inhibitor 3f	是 Yes
No.6	872	606	类成束蛋白阿拉伯半乳聚糖蛋白 6 Fasciclin-like arabinogalactan proteins 6	否 No
No.7	931	657	40S 核糖体蛋白 S8 40S ribosomal protein S8	否 No
No.8	1 028	615	假定蛋白 Hypothetical protein	是 Yes
No.9	839	462	花生过敏原 8 异构体 Isomers of peanut allergens 8	是 Yes
No.10	754	552	功能未知 Unknown function	否 No
No.11	716	426	功能未知 Unknown function	是 Yes
No.12	878	621	遍在蛋白激活酶 E1 Ubiquitin activating enzyme E1	否 No
No.13	1 073	411	甘露糖/葡萄糖结合凝集素前体 Binding lectin precursor of mannose/ glucose	否 No
No.14	1 024	750	管腔结合蛋白 Luminal binding protein	是 Yes
No.15	887	429	脱水应答因子结合蛋白 Dehydration response factor binding protein	否 No
No.16	893	621	60S 核糖体蛋白 L13a 60S ribosomal protein L13a	是 Yes
No.17	981	447	Kunitz 型胰蛋白酶蛋白酶抑制剂 Kunitz trypsin inhibitor	否 No
No.18	966	870	质膜内嵌蛋白 1 Embedded membrane protein 1	是 Yes
No.19	743	165	转录因子 bZIP11 Transcription factor bZIP11	否 No
No.20	832	420	高速泳动蛋白 1 High mobility protein 1	是 Yes
No.21	909	546	60S 核糖体蛋白 L10 60S ribosomal protein L10	否 No
No.22	903	309	双链 DNA 结合蛋白 Double-stranded DNA binding protein	是 Yes

RNA 为模板起始第一链的合成, 采用 LD-PCR 法合成双链可保证获得的 cDNA 序列的完整性。王淑红等经过大量测序证实了 SMART 法对 cDNA 序列的完整性的保证(王淑红等, 2008, 台湾海峡, 27(3): 278-285)。

cDNA 文库的质量具体反映在两个方面: 文库的库容量和插入 cDNA 片段的大小(易朝辉, 2010)。本实验所构建的原始 cDNA 文库具有的独立克隆数为 1.3×10^6 个, 包括了大部分稀有的 mRNA, 可以满足大规模测序和筛选所用; 插入片段均大于 750 bp, 60% 的插入片段高于 1 000 bp, 平均长度为 1.0 kb, 保证了高比例全长 cDNA 的获得。

本实验利用 SMART 技术成功构建了高质量的花生果针全长 cDNA 文库, 滴度测定、重组率、PCR 鉴定结果均符合 cDNA 文库的质量要求。随机测序序列生物信息学分析表明本文库包含各类基因, 全长率较高, 可用于花生果针功能基因的筛选和测序。本文库的构建为下一步果针功能基因的研究以及筛选、克隆果针次生代谢产物合成途径相关基因奠定了基础。

3 材料与方法

3.1 材料

本研究选用福建农林大学油料作物所选育的优良花生品种闽花 6 号在大田种植入土前果针为材料, -70°C 冰箱保存备用。

文库构建试剂盒 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech 公司。Primer Script Reverse Transcriptase、Ex Taq, dNTP, DL2000 分子标准、DL15000 分子标准和大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞均购自大连宝生物公司(TAKARA)。胶回收试剂盒购自杭州博日科技有限公司(BIOER)。其它试剂采用国产分析纯。

3.2 花生果针总 RNA 的提取

取 5 g 花生果针于液氮预冷的研钵中研磨成粉状, 转移至 65°C 含预热 CTAB 的离心管中, 水浴 20-30 min, 氯仿/异戊醇抽提 2 次后, 上层水相加入 LiCl 沉淀总 RNA。 4°C 12 000 g 离心 30 min, 将沉淀物溶于 50 μL DEPC 水即获得总 RNA。总 RNA 经紫外分光

光度计检测浓度及纯度, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

3.3 cDNA 单链和双链的合成

单链 cDNA 的合成: 取 3 μg 总 RNA 于 DEPC 处理离心管中, 按照 SMART 文库构建试剂盒说明加入相应的引物和试剂合成 cDNA 第一链。采用 LD-PCR 法合成双链 cDNA。按照 SMART 文库构建试剂盒说明添加单链模板、酶、引物及 dNTP 后用双蒸水补足至 25 μL 。反应在已预热到 95°C 的 PCR 仪上进行。反应程序: 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 15 s, 68°C 复性 30 s, 72°C 延伸 5 min, 共 8 个循环; 72°C 延伸 10 min。取 2 μL 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

3.4 蛋白酶 K 与 Sfi I 限制性酶切消化及文库构建

50 μL 双链 cDNA 的 PCR 产物经蛋白酶 K 消化后抽提两次, 用 80% 乙醇室温沉淀。沉淀溶于 79 μL 去离子水中, 加入 15 μL Sfi I 酶于 50°C 水浴酶切。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后回收 750 bp 以上片段。回收产物经乙醇、糖原 -20°C 共沉淀后溶于 7 μL 去离子水, -70°C 保存备用。

回收产物在 T4 DNA 连接酶作用下, 与质粒载体 pDNR-LIB(经 Sfi I 酶处理)连接, 电击转化入感受态细胞(大肠杆菌 DH5 α)后迅速转移至 LB 培养基中, 37°C 225 r/min 震荡培养 1 h 获得原始文库。大肠杆菌感受态细胞的制备和连接转化等操作参考分子克隆实验指南(萨姆布鲁克和拉塞尔, 2002)。

3.5 原始文库质量的鉴定

取 1 μL 原始文库菌液至 99 μL 液体 LB 培养基中混匀, 均匀地涂在含 30 mg/L 氯霉素的 LB 培养板上。计数过夜培养板单克隆数, 原始文库库容(pfu)=生长克隆数 $\times 10^3$ 。

随机挑取 15 个单菌落, 过夜摇菌后做菌液 PCR 鉴定文库重组率。随机挑取 11 个单菌落过夜摇菌后提取质粒, 质粒经 Sfi I 酶切后在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳检测文库 cDNA 插入片段的大小。随机挑取 30 个单菌落做穿刺 stock 并送上海国家人类基因组南方研究中心进行双向测序。

3.6 文库的扩增及滴度的检测

依据原始文库库容, 将原始文库菌液均匀地涂在几个含 30mg/L 氯霉素的 LB 培养板, 37°C 过夜培养。每个培养板用 10 μ L 液体 LB 培养基洗脱后混匀, 即为扩增文库。加入等量 50% 甘油混匀后分装, -80°C 保存。

取 1 μ L 扩增文库菌液, 稀释 10^3 、 10^4 和 10^5 倍后吸取 100 μ L 均匀地涂在含 30 mg/L 氯霉素的 LB 培养板, 37°C 过夜培养。文库的滴度公式(cfu)=(平均每个培养板中单菌落数 \times 1 000 μ L/mL)/涂布稀释的菌体体积(μ L)。

3.7 序列分析

30 个随机挑取的单克隆测序后, 依据引物序列去除载体序列, 利用 DNA 序列常规分析软件 BioXM 2.6 进行拼接, 分析其开放阅读框(open reading frame, ORF)和非编码区(untranslated regions, UTRs), 最后利用 BLASTN 和 BLASTX 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源性检索, 初步确定基因的功能。

作者贡献

姜宝杰为本文主要完成人, 该文章所涉及的实验及文章写作是在在庄伟建老师的指导下完成的, 同时陈华、邓焜、曾建斌、张冲及贺小彦等同学为实验提供了技术和操作上的帮助, 在此一并表示感谢。

致谢

本实验得到了福建省科技厅: 基因工程改良花生油亚比(O/L)的研究(2008I0002)的资金支持, 再次表示感谢。同时感谢两位匿名同行评审人的评审意见和修改建议。

参考文献

- Cai N.B., Huang X.W., and Zhuang W.J., 2007, Construction and identification of a full-length cDNA library from peanut seeds, *Huasheng Xuebao (Journal of Peanut Science)*, 36(2): 1-5 (蔡宁波, 黄湘文, 庄伟建, 2007, 花生种子全长 cDNA 文库的构建和鉴定, *花生学报*, 36(2): 1-5)
- Carninci P., Kvan C., Kitamura A., Ohsumi T., Okazaki Y., Itoh M., Kamiya M., Shibata K., Sasaki N., Izawa M., Muramatsu M., Hayashizaki Y., and Schneider C., 1996, High efficiency full length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper, *Genomics*, 37(3): 327-336 [doi:10.1006/geno.1996.0567](https://doi.org/10.1006/geno.1996.0567) PMID:8938445
- Chenchik A., Moqadam F., and Siebert P., 1996, A new method for full-length cDNA cloning by PCR, In: Krieg P.A. (ed.),

A laboratory guide to RNA: Isolation, analysis, and synthesis, New York, pp.273-321

- Dong Z.M., Zhang B.S., Guan R.X., Chang R.Z., and Qiu L.J., 2006, The methods of constructing the full length cDNA library, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 22(2): 51-55 (董志敏, 张宝石, 关荣霞, 常汝镇, 邱丽娟, 2006, 全长 cDNA 文库的构建方法, *中国农学通报*, 22(2): 51-55)
- Ederly I., Chu L.L., Sonenberg N., and Pelletier J., 1995, An efficient strategy to isolate full-length cDNAs based on an mRNA cap retention procedure (CAPture), *Molecular Cell Biology*, 15(6): 3363-3371
- Fimove V.A., Chakhmakcheva O.G., Archdeacon J., Fernandez J.M., Fedorkin O.N., Dorokhov Y.L., and Atabekov J.G., 2001, Detection of the 5'-cap structure of messenger RNAs with the use of the CAP-jumping approach, *Nucleic Acids Research*, 29(22): 4751-4759 [doi:10.1093/nar/29.22.4751](https://doi.org/10.1093/nar/29.22.4751) PMID: 11713326 PMCID:92527
- Guo Y., Liu C.Q., Lu T.F., Tong C.L., Xiu X.N., Guan W.J., and Ma Y.H., 2010, Construction and characterization of a cDNA library from Beijing fatty chicken and expression analysis of *purH* gene, *Nanjing Nongye Daxue Xuebao (Journal of Nanjing Agricultural University)*, 33(4): 93-99 (郭侯, 刘长青, 陆涛峰, 佟春玲, 修晓娜, 关伟军, 马月辉, 2010, 北京油鸡 cDNA 文库的构建及 *purH* 基因的表达, *南京农业大学学报*, 33(4): 93-99)
- Hao L., Li H.P., and Yan L., 2009, Construction of full-length cDNA library for antler tip tissue of sika deer, *Dongbei Linye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Forestry University)*, 37(11): 120-122 (郝丽, 李和平, 严厉, 2009, 东北梅花鹿鹿茸尖端组织全长 cDNA 文库的构建, *东北林业大学学报*, 37(11): 120-122)
- He L.H., Cai M., He S.G., Lan X., Zheng Y.X., Xiong X.C., and Lan S.W., 2006, Effects of relevant enzymes on lignification of *Arachis hypogaea* gynophore, *Huanan Nongye Daxue Xuebao (Journal of South China Agricultural University)*, 27(1): 76-78 (贺立红, 蔡马, 何生根, 兰霞, 郑奕雄, 熊兴嫦, 蓝石维, 2006, 相关酶对花生果针木质化的影响, *华南农业大学学报*, 27(1): 76-78)
- Liu Y.H., Liu Z.C., Zhou L.G., Yu S.W., Liu H.Y., and Luo L.J., 2007, Construction of full length cDNA library from drought-tolerant rice cv. Zhonghan No.3 cultivated under drought stress, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 5(3): 367-370 (刘运华, 刘灶长, 周立国, 余舜武, 刘鸿艳, 罗利军, 2007, 干旱胁迫下耐旱稻中旱 3 号全长 cDNA 文库的构建, *分子植物育种*, 5(3): 367-370)
- Maruyama K., and Sugano S., 1994, Oligo-capping: A simple

- method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides, *Gene*, 138(1-2): 171-174 [doi:10.1016/0378-1119\(94\)90802-8](#)
- Sambrook J., and Russell D.W., eds., Huang P.T., trans., 2002, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd, China Science Press, Beijing, China, pp.93-96 (萨姆布鲁克, 拉塞尔, 主编, 黄培堂, 主译, 2002, 分子克隆实验指南, 第三版, 科学出版社, 中国, 北京, pp.93-96)
- Schmidt W.M., and Mueller M.W., 1999, CapSelect: A highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs, *Nucleic Acids Research*, 27(21): e31 [doi:10.1093/nar/27.21.e31](#)
- Seki M., Carninci P., Nishiyama Y., Hayashizaki Y., and Shinozaki K., 1998, High-efficiency cloning of Arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper, *The Plant Journal*, 15(5): 707-720 [doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00237.x](#) PMID:9778851
- Xu L.P., Que Y.X., Liu J.X., Guo J.L., Zheng Y.F., Xu J.S., Yuan Z.N., Chen P.H., and Chen R.K., 2009, Construction of full-length cDNA library from sugarcane leaves and the corresponding EST analysis, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 17(5): 843-850 (许莉萍, 阙友雄, 刘金仙, 郭晋隆, 郑益凤, 徐景升, 袁照年, 陈平华, 陈如凯, 2009, 甘蔗叶片全长cDNA文库构建及EST序列分析, 农业生物技术学报, 17(5): 843-850)
- Yi Z.H., 2010, Construction and identification of cDNA library of heart tissue from Yunan pig, *Xumu Yu Siliao Kexue (Animal Husbandry and Feed Science)*, 31(5): 1-2 (易朝辉, 2010, 豫南黑猪心脏cDNA文库的构建与鉴定, 畜牧与饲料科学, 31(5): 1-2)
- Zhang H.Y., Wang M.L., Liu Z.M., and Liang Q.S., 2004, Effects of AnM cultivate technique on bud differentiation and gynophore elongation of peanut, *Laiyang Nongxueyuan Xuebao (Journal of Laiyang Agricultural College)*, 21(3): 203-205 (张海燕, 王铭伦, 刘赞谟, 梁全松, 2004, 花生控制下针(AnM)栽培法对花芽分化及果针生长的影响, 莱阳农学院学报, 21(3): 203-205)



BioPublisher是一个致力于发表生物科学研究论文、开放取阅的出版平台

在BioPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://chinese.sophiapublisher.com>