

米曲霉(*Aspergillus oryzae*) RIB40 全长 cDNA 文库的构建

常淑君¹ 祖永平¹ 陶波^{1*} 邱丽娟²

(1. 东北农业大学 农学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

(2. 中国农业科学院作物科学研究所 北京 100081)

摘要:【目的】构建米曲霉 RIB40 的全长 cDNA 表达文库, 为米曲霉功能基因的开发以及次生代谢产物合成途径相关基因的筛选与克隆奠定基础。【方法】采用 RNAiso 法从米曲霉 RIB40 菌体中提取总 RNA。选用 PolyAtract mRNA Isolation System III 试剂盒分离纯化 mRNA。以 5 μ g mRNA 为模板, 按照 ZAP-cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书要求合成单、双链 cDNA, 使用 CHROMA SPIN-400 柱离心层析纯化后连接于 Uni-ZAP XR 表达载体上, 体外包装后转染 *Escherichia coli* XL1-Blue 宿主菌。【结果】构建了米曲霉 RIB40 的全长 cDNA 文库, 初级文库滴度约为 2.96×10^6 CFU/mL, 重组率约为 97.8%, 插入片段平均长度大于 1.5 kb, 达到一个高质量 cDNA 文库的要求。文库扩增后, 滴度达到 3.4×10^{10} CFU/mL。【结论】米曲霉 RIB40 全长 cDNA 表达文库的成功构建, 将会对米曲霉基础生物学研究及相关基因的筛选与克隆奠定基础。

关键词: 米曲霉 RIB40, 表达载体 Uni-ZAP XR, 全长 cDNA 文库, 质量鉴定

Construction of a full-length cDNA library from the *Aspergillus oryzae* RIB40

CHANG Shu-Jun¹ ZU Yong-Ping¹ TAO Bo^{1*} QIU Li-Juan²

(1. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

(2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] To construct a full-length expression cDNA library from *Aspergillus oryzae* RIB40 for screening and cloning genes related to the synthesized pathway of secondary metabolites in *Aspergillus oryzae*. [Methods] Total RNA was isolated from *A. oryzae* RIB40 using the method of RNAiso and mRNA was purified by PolyAtract mRNA Isolation System III. Single-strand cDNA and double-strand cDNA were synthesized from about 5 μ g mRNA using ZAP-cDNA Synthesis Kit and the cDNA were fractionated by the CHROMA SPIN-400 column, then ligated into Uni-ZAP express vector and packaged. [Results] A high quality full-length expression cDNA library from the *A. oryzae* RIB40 was constructed. The titer of the primary library was 2.96×10^6 CFU/mL with a recombination rate of 97.8% and the average length of inserted fragments was more than 1.5 kb. Furthermore, the titer of the amplified library achieved to 3.4×10^{10} CFU/mL. [Conclusion] The

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项项目(No. 2011ZX08004-001)

*通讯作者: ✉: botaol@163.com

收稿日期: 2013-10-24; 接受日期: 2013-12-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-11

cDNA library which constructed in this study provides a basis for basic biological research and screening and cloning of the target gene of *Aspergillus oryzae*.

Keywords: *Aspergillus oryzae* RIB40, Expression vector Uni-ZAP XR, Full-length cDNA library, Quality identification

随着微生物食品生物工程技术的快速发展,发酵工业和食品加工工业的重要菌种米曲霉(*Aspergillus oryzae*)受到的关注日益增加。米曲霉是美国食品与药物管理局和美国饲料公司协会1989年公布的40余种安全微生物菌种之一^[1-2],也是世界保健组织公布的绝对安全性食品^[3]。其应用已具有上千年的历史,不但广泛应用于食品、饲料、生产曲酸和酿造等发酵工业,随着对其研究的加深与科技的进步,米曲霉在现代工业,如医药、造纸、化妆品等领域的应用也不断扩展^[4]。1999年,Hashimoto T.等报道米曲霉的菌丝由多细胞组成^[5],是一类产复合酶的菌株,具有强大的生物转化系统,能分泌多种酶类如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、果胶酶、植酸酶和糖化酶等^[6],不仅具有极高的经济价值,也是当前学术研究的焦点。

2005年,米曲霉 RIB40 的基因组测序完成,其基因数量要超出曲霉属的另外两种真菌 *A. fumigatus* 及 *A. nidulans* 20%–30%。这些多出的基因大部分与特有的次生代谢物有关^[7-8]。已知 *A. fumigatu* 次生代谢物非常多,除了包含一些真菌毒素外,已经分离到上百种药理活性成分,抗肿瘤、抗凝血、抗真菌、免疫抑制、镇痛消炎及抑制胆固醇酰基转移酶等^[9]。目前,米曲霉中已经分离到少量药理活性物质,其中包括药理活性小分子和大分子成分^[10]。Yasuyo Seshime 等在米曲霉中发现编码 Phenyl-propanoid 生物合成关键酶的基因,该类物质大部分具有良好的心血管系统活性。可以预测,米曲霉还有许多具有潜在功能的次生代谢产物有待于发掘研究^[11]。

从1976年Hofstetter成功地构建了第一个cDNA文库以来,构建cDNA文库已成为研究功能基因组学的基本手段之一,在分离、克隆、筛选新基因以及基因功能研究等方面具有重要作用^[12-13]。本试

验首次利用Stratagene技术构建了米曲霉RIB40的全长cDNA表达文库,对米曲霉进行基础生物学研究,以及筛选次生代谢产物合成途径相关基因具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株

米曲霉 RIB40 菌种保存于东北农业大学农学院学科调研室。大肠埃希氏菌 XL1-Blue、SOLR 宿主菌、辅助噬菌体 Exassist™ 均为 Stratagene 公司产品。

1.2 试剂

焦碳酸二乙酯(DEPC)购自 Sigma 公司; PolyAtract mRNA Isolation System III 购自 Promega 公司; cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Gigapack® III Gold Cloning Kit 均购自 Stratagene 公司; CHROMA SPIN-400 柱购自 Clontech 公司; RNAiso Plus 试剂购自宝生物工程(TaKaRa)有限公司; DNA Marker 购自天根生化科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 米曲霉 RIB40 总 RNA 的提取: 分别接种米曲霉 RIB40 菌株于液体和固体察氏培养基中培养至孢子产生,收集菌体,处理后放入研钵中,加入液氮研磨充分。然后使用 RNAiso Plus 试剂,根据 TaKaRa 公司提供的说明书中的方法进行提取,提取米曲霉 RIB40 总 RNA。利用分光光度法测定其纯度与含量,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.3.2 mRNA 的分离提纯: 按照 PolyAtract mRNA Isolation System III 试剂盒提供的方法分离 mRNA,为使 mRNA 浓度达到建库要求,向 mRNA 中加入 0.1 体积的 3 mol/L NaAc 和等体积异丙醇,混匀,12 000×g 离心 10 min, -20 °C 过夜沉淀。

75%乙醇洗涤干燥后,将 mRNA 溶于无 RNase 的水中从而达到浓缩效果^[14]。检测方法同总 RNA 检测方法。

1.3.3 cDNA 的合成:按照 cDNA Synthesis Kit 手册要求进行操作,首先利用 Superscript II-RT 合成第一链:在 RNase-free 的 0.2 mL PCR 管中,依次加入 5 μ L 10 \times First-strand buffer、3 μ L First-strand methyl nucleotide (dNTP) mixture、2 μ L Linker-primer (1.4 g/L)、1 μ L RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ L)、12.5 μ L RNase-free DEPC water,混匀后加入 25 μ L mRNA,轻轻混匀,室温静置 10 min。加入 1.5 μ L Superscript II-RT (40 U/ μ L),42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,逆转录合成第一链 cDNA。取出立即放入冰中 5 min 终止反应。

将第二链反应试剂放在冰中(在加入 DNA Polymerase 时,所有试剂应低于 16 $^{\circ}$ C)。取 45 μ L 一链产物,然后顺序加入下列试剂:20 μ L 10 \times Second-strand buffer、6 μ L Second-strand dNTP mixture、116 μ L ddH₂O,混匀后,加入 2 μ L RNase H (1.5 U/ μ L)(将 mRNA 链切开产生缺口 3'OH 端)、11 μ L DNA Polymerase I (10 U/ μ L),总体系为 200 μ L,涡旋混匀后 16 $^{\circ}$ C 水浴 2.5 h,反应后立即放在冰中至少 5 min。

1.3.4 cDNA 片段修饰和分级回收:按照 Clontech 说明书要求,摇匀 CHROMA SPIN-400 柱内基质,使柱内的贮存液流尽后加入 700 μ L 缓冲液洗柱,待缓冲液自然流干,将 100 μ L 经二甲苯腈蓝染色的 cDNA 加到基质表面中央。静置待样品完全吸收,用 100 μ L 柱缓冲液洗涤含有 cDNA 的 CHROMA SPIN-400 柱。当观察到二甲苯腈蓝渗透至柱子表面下几毫米处,加入 600 μ L 柱缓冲液,开始收集 cDNA,每管 1 滴。共收集 16 管,每管取 1 μ L 洗脱液用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,合并 cDNA 片段大于 400 bp 的 7-8 管。向其中加入 1/10 体积的 NaAc、1.3 μ L 糖原和 2.5 倍体积的 95%乙醇(-20 $^{\circ}$ C),混匀,-20 $^{\circ}$ C 过夜后,14 000 \times g 离心

20 min,去上清,自然风干后,加入 3.5 μ L 去离子水溶解沉淀^[15]。

1.3.5 cDNA 片段与载体连接及体外包装:取 2.5 μ L (约 100 ng) cDNA 与 1 μ g Uni-ZAP XR vector 在 T4 DNA ligase (4 U/L)作用下 4 $^{\circ}$ C 连接 2 d。用 λ 噬菌体包装蛋白 Gigapack III Gold packaging extract 对连接产物进行体外包装:从-80 $^{\circ}$ C 取出包装蛋白立刻置于冰上,待其刚开始融化时加入 2 μ L 连接产物,用枪头轻轻混匀,22 $^{\circ}$ C 水浴 2 h。然后加入 500 μ L SM buffer、20 μ L 氯仿,混匀后稍离心 1 min,取上清即为原始文库,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.6 文库滴度以及重组率的测定:取包装所得的菌体混合物以 SM 缓冲液进行连续稀释(10^{-1} , 10^{-2})后,分别取 1 μ L 加入到 200 μ L XL1-Blue 宿主菌中,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,加入 3 mL 48 $^{\circ}$ C NZY 顶层琼脂、15 μ L 0.5 mol/L 的 IPTG、50 μ L X-gal (250 g/L),迅速铺于 NZY 琼脂板上,风干后 37 $^{\circ}$ C 培养。次日计数噬菌斑数,根据公式计算文库滴度、库容及重组率。

文库滴度(CFU/mL)=噬菌斑的个数 \times 稀释倍数 \div 涂板菌液的体积

文库库容(CFU)=原始文库滴度 \times 原始文库体积

重组率=白斑个数 \div 菌斑总数 $\times 100\%$ ^[16]

1.3.7 插入片段长度测定及扩增:随机挑取 15 个白色噬菌斑,利用载体的特异性引物 T3、T7 进行 PCR 扩增 cDNA 插入片段。PCR 循环参数:94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,共 32 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,检测插入片段大小。

按照 Stratagene 说明书要求,将剩余的文库进行铺板扩增。按 5×10^4 个噬菌斑加入 600 μ L XL1-Blue MRF 宿主菌($OD_{600}=0.5$),加入 3 mL 48 $^{\circ}$ C NZY 顶层琼脂后迅速混匀倒入 NZY 琼脂平板,37 $^{\circ}$ C 培养 6-8 h,当噬菌体边缘相接但直径

不超过 1–2 mm 时,加入 10 mL SM Buffer 置于 4 °C、脱色摇床摇动 10 h,吸出洗脱液加入 5%的氯仿混匀,室温下孵育 15 min 后,4 °C、500 r/min 离心 10 min 去除杂质收集 SM 上清,加入终浓度 7%的 DMSO 后–80 °C 保存。

2 结果与分析

2.1 米曲霉 RIB40 总 RNA 的提取

提取的总 RNA 经分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 值在 1.8–2.0 左右,说明总 RNA 纯度较高。经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示,28S、18S、5S 条带清晰,28S/18S 亮度约为 2:1,5S 带较浅,无弥散带,加样孔和泳道无明显杂质,说明总 RNA 结构完整,无蛋白污染,质量较好。

2.2 mRNA 的检测

使用 PolyATract mRNA Isolation System III 试剂盒分离的 mRNA,电泳检测,结果如图 2 所示,

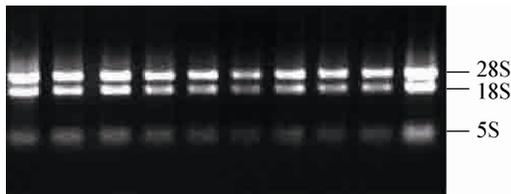


图 1 米曲霉总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测
Figure 1 Electrophoresis of total RNA from *Aspergillus oryzae* RIB40

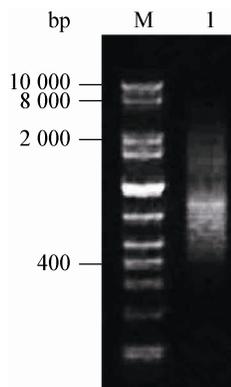


图 2 米曲霉 mRNA 琼脂糖凝胶电泳检测
Figure 2 Electrophoresis of mRNA from *Aspergillus oryzae* RIB40
Note: M: 1 kb plus DNA ladder; 1: mRNA.

谱带较清晰,并弥散分布在 0.4–4 kb 之间,主要集中在 1 kb 左右。浓缩后经分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 值均在 2.0 左右,浓度达到 3 109.29 mg/L, mRNA 的纯度和完整性都较好^[17],满足 cDNA 文库的构建要求。

2.3 cDNA 的合成

以 5 μ g 的 mRNA 为模板,经过反转录与置换反应合成了 cDNA 一链、二链,电泳检测,结果如图 3 所示,条带明亮且均呈弥散性正态分布,大小约在 300 bp–10 kb 之间甚至更大,二链电泳条带要比一链暗一些,说明 cDNA 质量符合全长 cDNA 文库构建要求。

2.4 cDNA 分级分离

合成的双链 cDNA 与 *EcoR* I 连接后,将二甲苯腈蓝染色的 cDNA 样品通过 CHROMA SPIN-400 柱。用 1.5 mL 离心管收集洗脱液,每管 1 滴,共收集 16 管。琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 片段大小。通过图 4 可知,第 7–16 管中 cDNA 可见,其中第 7–13 管 cDNA 片段大于 400 bp,因此只将 7–13 管中的 cDNA 片段合并到一管中浓缩抽提,进行与载体的连接反应。

2.5 文库质量鉴定

连接产物经过体外包装,稀释 10^{-1} 和 10^{-10} 后,转染 *E. coli* XL1-Blue MRF 细胞过夜培养,分别产

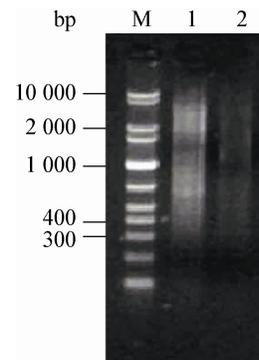


图 3 一链、二链 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳检测
Figure 3 Electrophoresis of 1st and 2nd strand cDNA
注: M: DNA 分子质量标准; 1: 单链 cDNA; 2: 双链 cDNA.
Note: M: 1 kb plus DNA ladder; 1: Single-strand cDNA; 2: Double-strand cDNA.

生噬菌斑 282 个和 31 个, 可计算文库滴度为 2.96×10^6 PFU/mL, 文库容量为 2.96×10^6 , 根据白斑比率计算文库重组率为 97.8%。在原始文库进行蓝白斑筛选后的平板上随机挑取 15 个白色噬菌斑进行 PCR 检测片段大小, 平均长度在 1.5 kb 以上(图 5)。初级文库扩增后, 滴度达到 6.20×10^9 PFU/mL, 文库的各项指标均超过基本要求^[18]。



图 4 cDNA 分级分离产物的电泳检测

Figure 4 Electrophoresis of cDNA fractionated by the CHROMA SPIN-400 column

注: M: DNA 分子质量标准; 1-16: cDNA 片段。

Note: M: 1 kb plus DNA ladder; 1-16: cDNA fragment.



图 5 部分克隆的 cDNA 插入片段电泳图

Figure 5 The electromorph of inserted cDNAs in some clones

注: M: DNA 分子质量标准; 1-15: 随机克隆 PCR 产物。

Note: M: 500 bp DNA marker; 1-15: PCR product of random clones.

3 讨论

全长 cDNA 文库是研究真菌基因表达图谱、功能和结构的重要资源。cDNA 的优势在于具有保守的蛋白编码区, 可从亲缘关系较近的种类中找到一些相似度, 有助于基因的鉴定和分析, 并直接用于表达。从理论上讲, 研究者可以从一个合格的基因文库中调取任何目的基因。据报道, 当一个 cDNA 文库的容量为 4.16×10^4 — 4.16×10^5 时, 得到

所需克隆的概率为 99%, 从而可筛选出低丰度的 cDNA^[19]。本文构建的初始 cDNA 文库滴度为 2.96×10^6 CFU/mL, 可进行翻译的 mRNA 及相对应的 cDNA 长度远超出 0.3 kb, 按此标准, 我们构建的文库较为理想。

cDNA 文库构建的前提是获得高质量的 mRNA, 然而 mRNA 极易降解, 并且含量低, 只占总 RNA 的 1%—5%^[20]。本实验采用的试剂盒要求总 RNA 量不少于 1 μ g, 分离过程中使用了包裹着抗生素链霉素蛋白的顺磁颗粒(SA-PMPs)结合以生物素标记的 Oligo (dT)-mRNA 分子, 避免了离心、过柱等操作, 短时间内便可完成试验, 获得的 mRNA 产量高, 完整性好, 这种方法只适用于 Poly (A)⁺ mRNA 的富集^[21]。

一个具有代表性和覆盖度的文库, 反转录的过程是必不可少的^[22], 本研究以多于 5 μ g 的 Poly (A)⁺ mRNA 为模板, 依赖于反转录酶合成单链 cDNA, 二链合成采用的是置换合成法, 未经 PCR 扩增从而确保低丰度 mRNA 在文库中出现的频率。cDNA 插入片段的大小也是衡量文库质量的重要标准, 小片段 cDNA 会与载体优先连接, 从而降低文库的应用价值^[23]。本文将酶切后的 cDNA 通过 CHROMA SPIN-400 柱, 分子量大的片段将首先通过柱子被洗脱, 从而剔除小片段 cDNA, 本文库插入片的平均长度在 1.5 kb 左右, 全长性好。另外我们采用定向克隆的方法使 cDNA 片段定向插入载体 Uni-ZAP 的 *lac Z* 基因下游, 提高了 cDNA 的表达几率。双酶切的方式减少了 cDNA 和载体的自身环化, 并且插入序列均为正向插入载体的 *lac Z* 基因下游, 筛选到假阳性的概率大大降低^[24]。噬菌体载体使真核生物的基因得以在原核生物中表达, 通过对宿主细胞的表型鉴定, 可比较简单地反映出文库中含有插入片段的实际情况, 便于功能基因的筛选, 且文库以噬菌粒的形式存在, 易于长期保存^[25]。

Stratagene 技术也存在一些弊端, 如 cDNA 合

成过程中需要多次进行电泳检测,从而使建库过程中的 cDNA 损失相对较多,所以,增加模板 mRNA 用量能够增加文库滴度^[26]。

近年来全球众多学者一直在有计划、大规模地进行一些重要模式生物的全长 cDNA 文库的构建及研究,如拟南芥、水稻、小鼠、猪以及果蝇等^[27]。这些生物全长 cDNA 文库构建的完成,得到大量有重要价值的数据库。本研究首次采用 Stratagene 技术构建了高质量的米曲霉 RIB40 全长 cDNA 表达文库,一方面可以长久保存米曲霉基因资源,另一方面可以利用免疫学筛选、功能筛选、EST 序列测定等现代分子生物学技术对其进行功能基因组学研究,以及筛选、克隆次生代谢产物合成途径相关基因,为后续对米曲霉基础生物学研究与实际应用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 姜文侠, 史连生. 饲用微生态制剂-益生菌[J]. 动物科学与动物医学, 2000, 17(2): 57-59.
- [2] 纪凤娣, 鲁绯, 程永强. 中国传统酱油生产用米曲霉菌种研究进展[J]. 生物学杂志, 2013, 30(4): 40-43.
- [3] Machida M. Progress of *Aspergillus oryzae* genomics[J]. Advances in Applied Microbiology, 2002, 51: 81-98.
- [4] Lee YS, Park JH, Kim MH, et al. Synthesis of tyrosinase inhibitory Kojic acid derivative[J]. Archivder Pharmazie, 2006, 339(3): 111-114.
- [5] Hashimoto T, Morishita M, Iwashita K, et al. Production and some properties of salt-tolerant β -xylosidases from a Shoyu Koji Mold, *Aspergillus oryzae* in solid and liquid cultures[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88(5): 479-483.
- [6] 赵龙飞, 徐亚军. 米曲霉的应用研究进展[J]. 中国酿造, 2006, 156(3): 8-10.
- [7] Dorner JW. Recent advances in analytical methodology for cyclopiazonic acid[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2002, 504: 107-116.
- [8] 聂丽娟. 米曲霉菌次生代谢产物研究[D]. 湖北: 华中科技大学博士学位论文, 2009.
- [9] Widiastuti R, Maryani R, Blane YB, et al. Cyclopiazonic acid in combination with aflatoxin zeamlenone and ochretocxin A in Indonesian corn[J]. Mycopathologia, 1988, 104(3): 153-156.
- [10] Suganuma T, Fujita K, Kitahara K. Some distinguishable properties between acid-stable and neutral types of α -amylases from acid-producing koji[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(5): 353-362.
- [11] Seshime Y, Juvvadi PR, Fujii I, et al. Genomic evidences for the existence of a phenylpropanoid metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 337(3): 747-751.
- [12] Weissensteiner T, Lanchbury JS. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing[J]. Biotechniques, 1996, 21(6): 1102-1108.
- [13] 王美玲, 吴茜茜, 蔡敬民. 基因组文库的研究进展[J]. 生物学杂志, 2013, 30(4): 70-75.
- [14] 陈曦, 周艳菊, 王东. 中华大蟾蜍耳后腺全长 cDNA 文库的构建[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(12): 974-980.
- [15] 赵桂媛, 魏志刚, 刘关君, 等. SMART 策略构建小黑杨茎形成层全长 cDNA 文库[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(1): 50-57.
- [16] 于海涛, 金龙国, 陶波, 等. 抗草甘膦真菌(*Candida palmiophila*)分离鉴定及其 cDNA 文库构建[J]. 作物杂志, 2012(5): 48-53.
- [17] 赖卫华, 熊勇华, 许杨. 红曲霉总 RNA 和 mRNA 的提取与测定[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 32-35.
- [18] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- [19] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [20] 庞昕, 周冬生, 杨瑞馥. 细菌 mRNA 的提取方法[J]. 生物技术通报, 2003(1): 30-34.
- [21] Qing T, Yu Y, Du TT, et al. mRNA enrichment protocols determine the quantification characteristics of external RNA spike-in controls in RNA-Seq studies[J]. Science China (Life Sciences), 2013, 56(2): 134-142.
- [22] Belyavsky A, Vinogradova T, Rajewsky K. PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17: 2919-2932.
- [23] 张静. 海带“单倍体十号”cDNA 文库构建及 EST 序列分析[D]. 北京: 中国海洋大学硕士学位论文, 2008.
- [24] 郝宏兴, 徐文岳, 段建华, 等. 大劣按蚊成蚊 cDNA 文库的构建与质量鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(11): 971-975.
- [25] 李宝珠, 高炳森, 吴勇, 等. 利用 SMART 技术构建疣螭芋螺毒管 cDNA 噬菌体文库及芋螺毒素新基因的克隆[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(5): 483-489.
- [26] 叶春艳. 华支睾吸虫 cDNA 文库的构建及其免疫学筛选和 EST 测序[D]. 吉林: 吉林大学博士学位论文, 2009.
- [27] Kim TH, Kim NS, Lim D, et al. Generation and analysis of large-scale expressed sequence tags (ESTs) from a full-length enriched cDNA library of porcine backfat tissue[J]. BMC Genomics, 2006, 7(36): 463-475.