

王楠,周莹,姚丹,等.春大豆花芽 cDNA 文库的构建及质量分析[J].华南农业大学学报,2014,35(1):73-78.

春大豆花芽 cDNA 文库的构建及质量分析

王楠¹,周莹¹,姚丹²,尹俊琦¹,曲静¹,王丕武¹

(1 吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118; 2 吉林农业大学 生命科学学院,吉林 长春 130118)

摘要:【目的】为了解大豆多荚、多粒相关基因的调控机制,构建了大豆花芽 cDNA 文库,根据要求初步鉴定了所构建文库的质量。【方法】以大豆吉农 18 突变体的幼嫩花芽为材料提取总 RNA,采用 SMART 技术合成双链 cDNA。经蛋白酶 K 的消化及 *Sfi* I 酶切后,将所得 cDNA 克隆到 λTriplEx 质粒载体中,成功构建了大豆花芽全长 cDNA 文库。【结果和结论】将初始文库经扩增后保存,检测扩增文库滴度为 2.13×10^8 pfu/mL,重组率接近 95.3%,菌落 PCR 鉴定插入片段主要分布在 0.5~2.0 kb。插入片段平均大小在 1.0 kb 左右。表明本研究所构建的文库既满足了目的基因的分离筛选,又可保证全长 cDNA 文库的获得,该文库的构建为进一步开展相关基因的克隆及分子生物学研究奠定基础。

关键词:大豆;花芽;cDNA 文库构建;质量分析
中图分类号:Q785;S336 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)01-0073-06

Construction and quality analysis of cDNA library from flower buds of spring soybean cultivars

WANG Nan¹, ZHOU Ying¹, YAO Dan², YIN Junqi¹, QU Jing¹, WANG Piwu¹

(1 College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract:【Objective】To understand soybean pods and multigrain gene regulation mechanisms of improving soybean production, a soybean flower bud cDNA library was constructed. The quality of library construction was initially identified according to the requirements. 【Method】In order to study the novel genes from flower bud mutants of soybean, a full-length cDNA library from flower bud mutants of soybean Jinong 18 was constructed. Total RNA from young flower bud mutants of soybean was extracted. Double strand cDNA was synthesized by SMART method. After proteinase K digestion and *Sfi* I digestion, the ds cDNA fragments were ligated to the λTriplEx vector. A cDNA library of soybean was successfully constructed. 【Result and conclusion】With the unamplified library stored after amplification, the titer of the amplified library was estimated as 2.13×10^8 pfu/mL and the recombination rate was approximately 95.3%. PCR results showed that the inserts varied from 0.5 to 2.0 kb with an average size of 1.0 kb or so. It indicated that this library could be used for full-length genes screening and cloning of low abundance genes. The library will lay a foundation for the genes clon and molecular biological research.

Key words:soybean; flower bud; cDNA library construction; quality analysis

收稿日期:2013-01-24 优先出版时间:2013-11-07
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20131107.1610.014.html>
作者简介:王楠(1987—),女,硕士,E-mail:759774740qq.com;通信作者:王丕武(1958—),男,教授,博士,E-mail:peiwuw@yahoo.com.cn
基金项目:吉林省科技支撑重点项目(20090203);吉林省发改委科学技术研究项目(20090001)

cDNA 文库是高效、大规模获得基因序列信息的有效方法,为新基因的发现和功能基因的研究提供便捷、高效的途径.与其他基因组文库相比较,cDNA 文库中获得的基因组是已经经过剪切将内含子去除了的 cDNA,因此可以在 cDNA 文库中较便捷地获得基因序列的信息^[1],并且可以直接用于该基因完整的 mRNA 信息的表达^[2].通过构建 cDNA 表达文库不仅可保护濒危珍稀生物资源,而且可以提供构建分子标记连锁图谱所用的探针,更重要的是可以用于分离全长基因进而开展基因功能研究.

我国北方春大豆生长一般分为出苗期、开花期、结荚期、鼓粒期和成熟期 5 个生育阶段.根据以往的研究,春大豆花芽分化过程中干物质积累量会随着花芽分化迅速上升,单位面积干物质质量的增加可达到提高产量的目的^[3-5].春大豆花芽分化时主茎伸展 4~5 片复叶,此时是营养生长与生殖生长交错期,大豆植株生活力旺盛、生长发育快、营养器官与生殖器官同时建造,此时花芽部位所含基因丰富,为构建全长 cDNA 文库奠定基础.目前,对春大豆花芽的研究多限于生理及表观形态学的研究,如陈传梅等^[6]研究的大豆花芽分化和物候期的机理模型,吕薇等^[7]研究的大豆花芽分化和发育的扫描电子显微镜观察;另有对大豆成花诱导、花发育及开花逆转过程中的相关基因的研究,如马启斌^[8]关于 *GmNMH7* 基因在大豆成花诱导、花发育及开花逆转过程中的表达研究.但从分子水平揭示其与产量相关性的研究甚少,只有在柑橘^[9]、擎天凤梨^[10]等方面有相关报道.本试验选取大豆吉农 18 突变体为材料,构建突变体幼嫩花芽全长 cDNA 文库,以期从分子生物学角度研究调控大豆多荚、多粒相关机制,从而为大豆相关基因的克隆及增产的分子机理研究提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究选取大豆吉农 18 突变体为试验材料,该材料单株 4 粒荚结荚率为 30% 左右,与对照材料比,提高近 5 倍;突变体小区产量较对照材料提高 15% 左右.2012 年 7 月在大棚内试验田中取大豆吉农 18 突变体 6~7 叶期的幼嫩花芽,用锡箔纸包裹迅速置于液氮中速冻后,储存于 -80 °C 超低温冰箱备用.

1.1.2 引物序列 合成 cDNA 第 1 条链引物 CDS III/3' PCR Primer (12 μmol/L): 5'-ATTCTAGAGGC-CGAGGC GGCCGACATG-d(T)₃₀N₋₁N-3' (N = A, G, C 或 T; N₋₁ = A, G 或 C), SMART IVTM Oligo-nucleotide (12 μmol/L): 5'-AAGCAGTGGTATCAACG-

CAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3'; 合成 cDNA 第 2 条链引物 5' PCR Primer (12 μmol/L): 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGACT-3'.

1.1.3 试剂 RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒,购自 TaKaRa 公司;文库构建试剂盒 SMART cDNA Library construction kit,购自 Clontech 公司,其中包含宿主菌大肠埃希菌 XL1-Blue 菌株、BM25.8 菌株及 λ TripIEx2 载体;双链 cDNA 合成试剂盒 Advantage[®] 2 PCR Kit,购自 Clontech 公司;包装蛋白 MaxPlax[™] Lambda packaging extract,购自 EPICENTRE 公司.

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化 取 1 g 大豆叶片,按照 RNAiso Plus 试剂盒使用说明书的步骤提取大豆叶片总 RNA.取 3 μL 上样量,电压为 8~10 V/cm,经 φ 为 1% 甲醛变性凝胶电泳,检测提取 RNA 的质量及完整性.利用 DNaseI 消化,消除样品中可能含有的微量基因组 DNA,用微量分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度.

1.2.2 双链 cDNA 的合成 取 3.0 μL 纯化后的 mRNA,按照 SMART cDNA Library construction kit 试剂盒说明书中步骤,首先合成单链 cDNA,孵育结束后放在冰上终止反应.取 2.0 μL 单链 cDNA,按照 SMART cDNA Library construction kit 试剂盒说明书中步骤,进行以下反应:95 °C 5 min;95 °C 30 s,68 °C 6 min,30 个循环;最后 68 °C 6 min 结束反应.取 5 μL 产物进行 11 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,检测产物质量.

1.2.3 蛋白酶 K 的消化及 *Sfi* I 酶切 取 50.0 μL 双链 cDNA (2~3 μg) 于高温灭菌的 0.5 mL 离心管中,按照 SMART cDNA Library construction kit 试剂盒说明书步骤操作,所得沉淀干燥后加入 79 μL 去离子水回溶.向回溶的 cDNA 中加入下列试剂:10 × *Sfi* I 缓冲液 10 μL;*Sfi* I 酶 10 μL;100 × BSA 1 μL;混用后 50 °C 孵育 2 h,孵育后加入 2 μL φ 为 1% 二甲苯氰混匀.

1.2.4 cDNA 的分级分离 按试剂盒说明书要求准备好 16 个 1.5 mL 离心管及 CHROMA SPIN-400 分级分离柱.将柱内基质摇匀,消除柱内气泡,移除底盖使柱内缓冲液流尽.加入过柱缓冲液 700 μL 使其自然流尽.将混有二甲苯氰的 cDNA 加入到柱中,待 cDNA 渗入基质后加入过柱缓冲液 100 μL.待自然流尽后加入过柱缓冲液 600 μL,将制备好的 16 个离心管迅速放在柱下方,每管 1 滴,直到缓冲液流尽为止.每管取 3 μL 进行 11 g/L 琼脂糖凝胶电泳,150 V 电泳 10 min.选择符合试验要求的 3~4 管,收集到新的离心管中.加入醋酸钠 (3 mol/L; pH 4.8) 1.6 μL,糖原 (20 mg/mL) 1.3 μL,φ 为 95% 乙醇溶液 (-20 °C) 408 μL, -20 °C 冰浴过夜.14 000 r/min 离心 20 min,

小心移除上清后用去离子水 7 μL 重悬沉淀。

1.2.5 cDNA 克隆入 λ TriplEx2 载体 为保证目的片段与载体更好地连接,本试验设立 3 个连接反应梯度(表 1),以建立最优的连接效率。

表 1 梯度连接反应

Tab.1 Ligations using three different ratios of cDNA to phage vector

成分	V/ μL		
	连接 I	连接 II	连接 III
cDNA	0.5	1.0	1.5
Vector (500 ng/ μL)	1.0	1.0	1.0
10 $\times$ 连接缓冲液	0.5	0.5	0.5
ATP (10 mmol/L)	0.5	0.5	0.5
T4 DNA 连接酶	0.5	0.5	0.5
去离子水	2.0	1.5	1.0
总体积	5.0	5.0	5.0

1.2.6 包装反应 3 个连接产物分别用 EPICENTR 公司的 MaxPlax™ Lambda packaging extracts 包装,体外包装方法按试剂盒说明书执行,所得混合液即为原始 cDNA 文库。

1.2.7 文库质量的鉴定 1) 文库滴度的检测:取 1 μL 包装好的连接产物,用 1 $\times$ Lambda dilution buffer 按 1:100 稀释。取稀释产物 10 μL ,加入过夜培养的 XL1-Blue 200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件培养 15 min。之后加入 3 mL 熔化的 LB/ MgSO_4 顶层琼脂培养基,快速混匀并倒在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 90 mm LB/ MgSO_4 平板上,快速旋转平板使顶层琼脂培养基均匀分布在平板上。37 $^{\circ}\text{C}$ 条件培养 6~18 h,每 2 h 观察 1 次噬菌斑生长情况。

文库滴度 = $\frac{\text{噬菌斑数} \times \text{稀释倍数} \times 10^3}{\text{涂平板的噬菌体的体积}}$ 。

2) 文库重组率的检测:应用蓝白斑筛选鉴定文库重组率,在 3 mL 熔化的 LB/ MgSO_4 顶层琼脂培养基中加入 IPTG (0.1 mol/L) 50 μL , X-Gal (0.1 mol/L) 50 μL ,根据噬菌斑数量计算文库滴度及重组率。

重组率 = $\frac{\text{白斑数}}{\text{白斑数} + \text{蓝斑数}} \times 100\%$ 。

3) 文库插入片段大小的检测:随机挑取培养皿中的噬菌斑进行菌液 PCR。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。反应结束后取 5 μL 进行 11 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。通过电泳筛选阳性克隆,送北京三博远志公司测序。

1.2.8 序列分析 利用 NCBI 的 VecScreen 程序对所测序列进行识别,去除载体,利用 DNASTar 软件 SeqMan 程序做多序列聚类比对,将获得的 EST 序列在 GenBank 上进行 BLAST 比对分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

本研究利用 RNAiso Plus 试剂盒提取大豆花芽总 RNA,经 φ 为 1% 甲醛变性凝胶电泳检测,结果(图 1)表明:本研究提取的吉农 18 突变体材料总 RNA 中 28.0 s、18.0 s 和 5.8 s 条带清晰,28.0 s 条带亮度基本上是 18.0 s 条带亮度的 2 倍,并且条带清晰,说明所提取的 RNA 完整性较好,质量较高。经 NanoDrop (ND-1000) Spectrophotometer 测定其在 230、260 及 280 nm 处的吸收值 (D),结果显示其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均在 1.8~2.0 之间, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 均在 2.2~2.6 之间,RNA 质量浓度为 219~324 ng/ μL ,说明蛋白质及盐类等污染较小,所提 RNA 纯度较高,达到反转录所需 RNA 浓度,符合构建 cDNA 文库的要求。

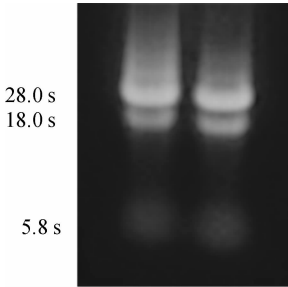
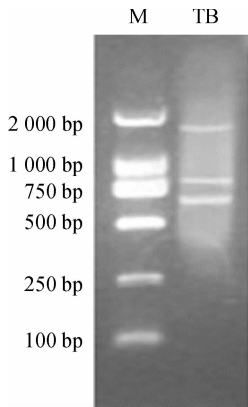


图 1 吉农 18 大豆花芽突变体总 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoresis of total RNA from flower bud mutants of soybean Jinong 18

2.2 双链 cDNA 的合成

取 5 μL 双链 cDNA 经 11 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,从图 2 中可以看出,cDNA 条带基本在 0.5~2.0 kb 间弥散,且集中在 0.75~1.00 kb 之间,中间有几条与组织特异性高丰度 mRNA 相对应的亮带,结果表明双链 cDNA 合成符合文库构建标准。



M:2 kb Marker;TB:花芽突变体。

图 2 吉农 18 大豆花芽突变体双链 cDNA 电泳图

Fig.2 Electrophoresis of ds cDNA from flower bud mutants of soybean Jinong 18

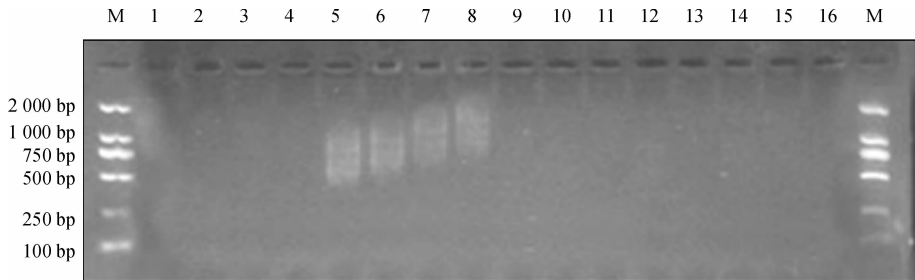
2.3 cDNA 的分级分离

双链 cDNA 合成后通过蛋白酶 K 的消化和 *Sfi* I 酶切后,用 CHROMA SPIN-400 柱分级分离,将引物及小片段 cDNA(<0.5 kb)过滤掉.经 11 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,结果(图 3)表明:16 管中 1~4 号管、9~16 号管没有条带,5~8 号管有清晰的、大小为 500~2 000 bp 的条带,根据文库构建的标准,收集大小在 500~2 000 bp 之间的条带,因此,本研究收集

5~8 号的离心管用于后续文库构建.

2.4 cDNA 文库质量的检测

2.4.1 cDNA 克隆入 λ TriplEx2 载体和库容量的检测 按照不同比例,设置 3 个 cDNA 与载体的连接反应,包装后侵染 *E. coli* XL1-Blue 菌株,观察噬菌斑的数量,并计算噬菌体滴度,选择最佳的连接效率.未扩增文库滴度测试结果见表 2.



M:2 kb Marker;1~16:连续的分级分离 ds cDNA.

图 3 吉农 18 大豆花芽突变体 cDNA 片段分级分离电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of cDNA size of fractionation from flower bud mutants of soybean Jinong 18

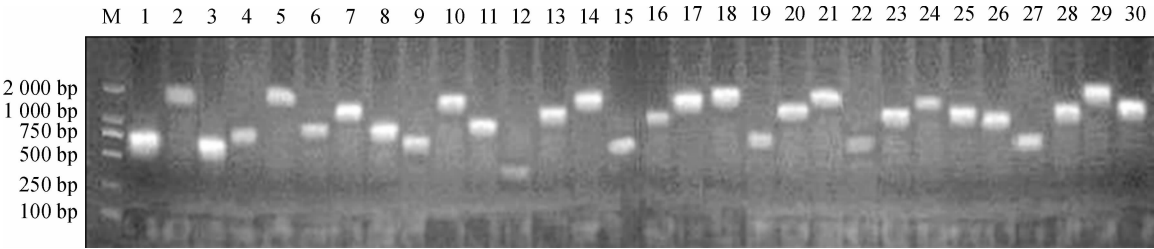
表 2 未扩增文库滴度测试结果

Tab. 2 Results of an unamplified library titer test

包装产物 稀释倍数	噬菌斑数量/个		
	连接 I	连接 II	连接 III
10 ⁻¹	47	不可数	16
10 ⁻²	3	473	2
10 ⁻³	无	52	无

经检测,原始文库滴度为 1.3×10⁶ pfu/mL,重组率为 93.6%. 扩增文库的滴度为 2.13×10⁸ pfu/mL,重组率为 95.3%. 重组率大于 80%,文库滴度大于 1.0×10⁶ pfu/mL 的文库即为合格文库,因此本研究所构建的文库为合格的 cDNA 文库.

2.4.2 文库插入片段大小的检测 从文库中随机挑取 30 个单克隆,进行菌落 PCR 检测.检测结果(图 4)表明,挑取的 30 个克隆均出现清晰条带,条带的分布主要集中在 0.75~2.00 kb 之间.其中,0.20~0.50 kb 间有 1 个克隆,占总克隆数的 3.3%;0.50~0.75 kb 间有 7 个克隆,占总克隆数的 23.3%,0.75~1.00 kb 间有 12 个克隆,占总克隆数的 40.0%;1.00~2.00 kb 间有 10 个克隆,占总克隆数的 33.3%;平均长度为 1.0 kb 左右.进一步检测结果证明,本研究构建的大豆花芽 cDNA 文库完全满足 cDNA 文库构建的库容要求.



M:2 kb Marker;1~30:随机克隆 PCR 产物.

图 4 吉农 18 大豆花芽突变体 cDNA 文库中插入片段大小凝胶电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of inserts in the library from flower bud mutants of soybean Jinong 18 by PCR

2.5 测序及 EST 分析

从 cDNA 原始文库中随机挑取 53 个克隆进行测序,利用 NCBI 的 VecScreen 程序对所测序列进行识别,去除载体序列、短序列和低相对分子质量序列后共获得有效序列 42 条,有效序列大小在 117~523 bp 之间,其中序列大小为 100~200 bp 的有 9 条,占总数的

21.4%;200~300 bp 的有 16 条,占总数的 38.1%;300~400 bp 的有 13 条,占总数的 31.0%;400~500 bp 的有 3 条,占总数的 7.1%;500~600 bp 的有 1 条,占总数的 2.4%. 利用 Phrap 程序进行多序列聚类拼接,获得 23 个非重复序列,将获得的 EST 序列利用 NCBI 的 BlastX 进行相似性的比对分析,结果如表 3.

表 3 功能已知 ESTs 的比对结果 (BlastX)

Tab.3 The results (BlastX) for a comparison between homology and function genes deposited in GenBank				
序列编号	序列长度/bp	已知 ESTs	GenBank 编号	相似性/%
W-1	339	蓖麻氢转运 ATP 合成酶	XM 002514116.1	79.3(96/121)
W-2	478	大豆未知功能蛋白	NM 001254190.1	54.0(96/121)
W-3	399	葡萄翻译控制肿瘤蛋白异构体	XM 002283806.1	77.6(132/170)
W-4	444	脂质转移蛋白	JN634575.1	83.0(96/116)
W-5	217	果蝇未知功能蛋白	XM 002014024.1	27.0(20/75)
W-6	196	葡萄未知功能蛋白	XM 002265113.2	73.7(14/19)
W-7	416	苜蓿未知功能蛋白	BT138169.1	88.9(64/72)
W-8	412	大豆部分疏基蛋白酶 B 亚型	U71379.1	75.0(84/112)
W-9	336	苜蓿诱导蛋白	NM 001250161.2	53.0(61/115)
W-10	278	苜蓿未知功能蛋白	XM 003601449.1	31.5(29/92)
W-11	313	黄瓜一种假定蛋白	XM 004152339.1	47.7(31/65)
W-12	301	苜蓿蛋白酶抑制剂	XM 003617266.1	70.0(49/70)
W-13	211	大豆慢板蛋白	XM 003546361.1	87.1(61/70)
W-14	383	未知功能蛋白	BABT02000005.1	67.9(36/53)
W-15	561	大豆胰蛋白酶抑制剂	XM 003548239.1	70.1(131/187)
W-16	227	烟草热休克蛋白	AB112814.1	90.3(28/31)
W-17	366	小盐芥未命名蛋白	AK353520.1	71.1(32/45)
W-18	476	棉花水通道蛋白	GU998831.1	86.3(69/80)
W-19	210	苜蓿假设蛋白	XM 003611881.1	20.7(12/58)
W-20	242	大豆慢板蛋白	XM 003546361.1	94.3(66/70)
W-21	308	大豆钙依赖蛋白激酶	XM 003529585.1	87.3(62/71)
W-22	172	大豆未知蛋白	NM 001248240.2	90.2(37/41)
W-23	218	毛白杨花粉外壳蛋白	JQ616773.1	53.8(14/26)

3 讨论

3.1 大豆花芽 cDNA 文库质量评价

评价 cDNA 文库的质量主要包括 2 个方面:一是 cDNA 文库的代表性,即 mRNA 的种类,它可以用一个量化的标准来衡量,就是 cDNA 文库的库容量^[11]. 本试验构建的原始 cDNA 文库的滴度为 1.3×10^6 pfu/mL,一般文库滴度要求不小于 1.0×10^6 pfu/mL. 与目前已经构建的全长 cDNA 文库相比较,董志敏等^[12]构建的大豆叶片全长 cDNA 文库原始滴度为 2.13×10^8 pfu/mL;房学爽等^[13]构建的珙桐叶片 cDNA 文库原始滴度为 6.3×10^6 pfu/mL. 由此可证明本试验所构建的 cDNA 文库可以满足大规模测序所需. 二是重组 cDNA 片段序列的完整性,即重组的 cDNA 片段足够长,可以反映出基因的天然结构. 本试验所构建的 cDNA 文库的插入片段在 0.5 kb 以上的占 96.6%,平均长度在 1.0 kb 左右,表明本试验

获得了较高比率的全长 cDNA.

3.2 SMART 法全长 cDNA 文库的构建

cDNA 文库的建立,可以获得更多拥有优良性状的基因,cDNA 文库的质量决定了是否能获得全长的 cDNA 克隆^[14-15]. 构建高质量的 cDNA 文库的先决条件是高质量、高纯度的 RNA. 以往常用的 cDNA 合成方法中,都要有足够的试验材料来提取高纯度的 mRNA,而 SMART 技术弥补了这一缺点,可以直接利用总 RNA 来合成 cDNA^[16-17],并且起始材料用量较少,使用 0.05 ~ 1.00 μ g 的总 RNA 就可以利用 LD-PCR 技术构建双链 cDNA,获得一个大于 106 pfu 的全长 cDNA 文库,对于稀有材料而言具有较高的应用价值^[12,18]. 通过 LD-PCR 的方法,避免了当 mRNA 内部存在二级结构,或是 mRNA 长度过长时不能反转录完全的现象发生. LD-PCR 扩增中使用的聚合酶混合物包含 N-末端缺失突变的 Taq 酶、具有 3',5'端矫正功能的聚合酶以及特有的用于自然热启动的

抗体,使合成的 cDNA 提高了精确度和高效性. cDNA 通过分级分离后,过滤掉了较小的 cDNA 片段和酶切反应后 DNA 片段的残留物,不仅保证了大片段 cDNA 的富集,还减少了后期筛选的工作量^[19]. SMART 技术中提供的 *Sfi* I 酶含有 2 个不同的酶切位点,可保证 cDNA 以正确的方向连接到载体中,提高了表达的机率.在进行 *Sfi* I 酶切反应时,要注意控制酶的用量,酶的浓度过大可能使酶产生信号活性,酶的体积过低会明显抑制酶的活性^[20]. 本试验构建文库试剂盒中所提供的载体为 λ 噬菌体,利用该载体构建的 cDNA 文库库容量大,可以筛选出低丰度的 mRNA,而通过质粒载体构建的 cDNA 文库包含的克隆数较少,只能筛选出高丰度的 mRNA,因此考虑到大豆中可能含有低丰度的 mRNA 的情况,因此选择 λ 噬菌体为载体进行连接反应可保证构建文库的质量.将制备好的 cDNA 克隆到载体中,通过平行试验决定插入片段和载体的最佳比例,一般推荐的二者之比在 2~5 之间,如果比值较大会直接降低连接效率,比值过小容易使 DNA 造成自连.此外,SMART 技术提供的噬菌体臂中包含 *LacZ* 和 *Amp^r* 2 个筛选基因,以不同的读码框架通过插入区,从而增加了插入区基因的表达概率,并且可以进行蓝白斑筛选,提高了产生高滴度文库的机率^[21].

3.3 EST 分析

目前,大豆花芽的遗传规律研究较少,本研究经初步测序获得了一些关于初级代谢、蛋白质合成的相关基因.后期研究将通过双向测序、Primer walking 测序等手段,完成部分基因的全长 cDNA 的获得,在后续的研究中,如果通过上述方法还是不能获得全长 cDNA 的少数基因,可通过文库杂交等方法获得.

致谢:感谢吉林农业大学生物技术中心对本研究的支持和帮助!

参考文献:

- [1] CARNINCI P, SHIBATA Y, HAYATSU N, et al. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes[J]. *Genome Res*, 2000, 10(10):1617-1630.
- [2] 晏慧君,黄兴奇,程在全. cDNA 文库构建策略及其分析研究进展[J]. *云南农业大学学报*, 2006, 21(1):1-6.
- [3] 王四清,高聚林,刘克礼,等. 大豆花荚形成与花荚脱落的研究[J]. *内蒙古农业科技*, 2006(2):8-10.
- [4] 郑丽娜,周明兵. 毛竹快速拔节过程节间组织 cDNA 文库的构建与分析[J]. *福建林业科技*, 2012, 39(3):19-23.
- [5] 何德,李翠新. 重金属胁迫后旱柳全长 cDNA 文库的构建[J]. *广西林业科学*, 2012, 41(3):221-224.
- [6] 陈传梅,赵达,李志刚,等. 大豆花芽分化和物候期的机理模型[J]. *中国油料作物学报*, 2012, 34(5):502-507.
- [7] 吕薇,崔琳,王学东. 大豆花芽分化和发育的扫描电子显微镜观察[J]. *电子显微学报*, 2009, 28(6):585-590.
- [8] 马启彬. *GmNMH7* 基因在大豆成花诱导、花发育及开花逆转过程中的表达[D]. 北京:中国农业科学院, 2003.
- [9] 郑铁庚. 椴柑花器官和幼果的 cDNA 文库构建及 EST 分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2008.
- [10] 刘建新,沈福泉,田丹青,等. 擎天凤梨花器官全长 cDNA 文库的构建及 EST 分析[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(6):1137-1143.
- [11] 龚达平,解敏敏,孙玉合. 烟草叶片全长 cDNA 文库构建及 EST 序列分析[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(9):1696-1702.
- [12] 董志敏,李英慧,张宝石,等. 大豆叶片全长 cDNA 文库的构建与鉴定[J]. *作物杂志*, 2006(5):1-4.
- [13] 房学爽. 珙桐叶片 cDNA 文库构建[D]. 长沙:中南林业科技大学, 2008.
- [14] 钟肖芬,卫剑文,赵贵军,等. 平颞海蛇毒腺 cDNA 表达文库的构建[J]. *中山大学学报:自然科学版*, 2001, 40(3):66-69.
- [15] 刘文华,王义良,陈慧萍,等. 玫瑰红绿海葵触手 cDNA 表达文库的构建和初步分析[J]. *生物工程学报*, 2002, 18(6):749-753.
- [16] 涂艳阳,徐如祥,杨志林,等. 人脑瘤组织全长 cDNA 文库的构建[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(9):916-920.
- [17] CHENCHIK A, ZHU Y Y, DIATCHENKO L, et al. Generation and use of high-quality cDNA from small amount of total RNA by SMART PCR [M] // SIEBER P D, LARRICK J W. RT-PCR methods for gene cloning and analysis. Natick, MA: Eaton Publishing, 1998:305-319.
- [18] 毛新国,景蕊莲,孔秀英,等. 几种全长 cDNA 文库构建方法比较[J]. *遗传*, 2006, 28(7):865-873.
- [19] WELLENREU T R, SCHUPP I, POUSTKA A, et al. The Germ an cDNA Consortium1 SMART Amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones1BMC[J]. *Genomics*, 2004, 5(36):1-8.
- [20] 王敏,刘萍,石明旺,等. 野生大豆种子 cDNA 文库的构建与分析[J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(5):509-511.
- [21] 朱利军,长孙东亭,罗素兰. 全长 cDNA 文库构建方法及应用研究[J]. *海南大学学报:自然科学版*, 2009, 27(2):185-190.

【责任编辑 周志红】