

哈维氏弧菌感染的杂色鲍全组织均一化 cDNA 文库的构建

姜敬哲¹, 张微², 王江勇¹, 王瑞旋¹, 刘广峰¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 中山大学, 广东 广州 510275)

摘要: 提取了哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染的杂色鲍 (*Haliotis diversicolor* Reeve) 总 RNA, 采用 SMART 方法合成双链 cDNA, 并用双链特异核酸酶进行均一化处理。割取 0.5~1.0 和 1.0~3.0 kb 的片段分别连接 pDNR-LIB 并转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 最终构建 2 种片段大小的杂色鲍全组织均一化 cDNA 文库。2 文库库容均在 $2.5 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右, PCR 检测阳性重组率为 100%。随机挑取 200 个克隆测序, 获得高质量 EST 序列 174 条。组装后得到 149 条 Unigenes, 冗余率为 14.37%。序列注释结果表明, 有 39 条 Unigene 序列与已知基因高度相似。综上所述, 文章所建 cDNA 文库质量良好, 可以满足后续研究工作的需要。

关键词: 杂色鲍; cDNA 文库; 哈维氏弧菌

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 1673 - 2227 - (2010) 05 - 0037 - 06

Construction of whole body normalized cDNA library of *Haliotis diversicolor* Reeve challenged by *Vibro harveyi*

JIANG Jingzhe¹, ZHANG Wei², WANG Jiangyong¹, WANG Ruixuan¹, LIU Guangfeng¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Department of Equipment and Laboratory Management, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: We extracted the total RNA of *Vibrio harveyi*-challenged abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve). First and second strand cDNA were synthetized by using Creator SMART cDNA Construction Kit and further homogenization of cDNA library was carried out with duplex-specific nuclease (DSN) treatment. Fragments at length of 0.5~1.0 kb and 1.0~3.0 kb were ligated to pDNR-LIB and transformed into *Escherichia coli* strain DH10B. Both two cDNA libraries have a capacity of $2.5 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, and all of the 30 randomly picked colonies are identified as positive recombinant plasmids by PCR. Furthermore, 200 randomly selected clones were sequenced and 174 high quality ESTs were acquired, which belong to 149 unigenes including 12 contigs and 137 singlets after assembling with a redundancy rate of 14.37%. The result indicates that 39 unigenes get high similarity with known genes. In conclusion, the cDNA library we have constructed has good quality and can facilitate further research work.

Key words: *Haliotis diversicolor* Reeve; cDNA library; *Vibro harveyi*

杂色鲍 (*Haliotis diversicolor* Reeve) 营养丰富、生长迅速, 是中国南方沿海海域广泛养殖的鲍品

种^[1]。由于近年来环境污染加剧、养殖密度增加以及鲍种质资源的退化等因素影响, 鲍的各种病害

收稿日期: 2010-05-05; 修回日期: 2010-06-03

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycytx-47); 广东省科技推广项目 (2006B40101003); 广东省重大科技兴海项目 (A2008899E01); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (中国水产科学研究院南海水产研究所) 资助项目 (2007ZD09)

作者简介: 姜敬哲 (1980-), 男, 博士, 助理研究员, 从事水生生物分子生物学与病害防治研究。E-mail: jingzhejiang@yahoo.cn

通讯作者: 王江勇, E-mail: wjy104@163.com

频发, 严重制约了鲍养殖业的健康发展^[1-5]。目前发现的鲍病原多种多样, 其中由哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 引起的弧菌病是常见的鲍传染病之一^[6-7]。近年来中国南方杂色鲍养殖场频繁受到这种病害的威胁, 在感染后的1~2月内, 杂色鲍死亡率高达80%以上, 至使许多养殖场面临关闭^[5]。由于人们对鲍等贝类的免疫机理了解相对较少, 尤其是从分子水平上对其先天免疫系统以及免疫因子的研究还十分有限。因此, 广泛而深入地开展鲍分子生物学水平的免疫相关研究, 对鲍病害的防控、诊治, 以及促进鲍养殖业的健康发展具有重要意义。该研究采用哈维氏弧菌人工感染杂色鲍, 提取不同组织 mRNA 构建均一化全长 cDNA 文库, 以期获得高质量的基因文库, 为寻找鲍免疫相关基因及其免疫机理研究打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康杂色鲍采自汕尾某鲍养殖场, 壳长(40±5) mm, 运回后暂养于水族箱供人工感染试验用。哈维氏弧菌菌株 B2D 从患病杂色鲍中自行纯化、鉴定, 并经人工感染验证(相关数据待发表)。

1.2 主要试剂

弧菌选择性培养基(TCBS) 购自北京路桥生物技术有限公司; Trizol 总 RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司; Creator SMART cDNA Construction Kit 购自 Clontech 公司; Trimmer-Director kit 购自 Evrogen 公司; Ex TaqDNA 聚合酶、dNTP、DL2000 Marker、pDNR-LIB 载体连接试剂盒等购自 TaKaRa 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 处理与采样 杂色鲍暂养于水温(24±1)℃、盐度30的过滤海水中, 观察3 d后用于试验。取哈维氏弧菌 B2D 接种至营养琼脂培养基, 28℃培养24 h后, 接种于TCBS培养基, 28℃培养24 h, 用灭菌生理盐水稀释至 $5\times10^5\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 取暂养的雌、雄各5只杂色鲍, 分别注射100 μL 菌液, 24 h后分别取肌肉和内脏团(包括鳃、肝胰腺、外套膜、性腺等)组织、提取总RNA。

1.3.2 cDNA 文库的构建 按照 Trizol 操作手册提取杂色鲍肌肉和内脏团总 RNA, 1.5% 琼脂糖凝

胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 完整性和含量, 等质量混合2种RNA。按照 Creator SMART cDNA Construction Kit 的操作手册将混合后的总 RNA 合成一、二链, 用 LD-PCR 方法扩增二链。根据 Trimmer-Director Kit (Evrogen, Cat. No. NK002) 操作, 去除高拷贝基因, 并对双链特异核酸酶 (duplex-specific nuclease, DSN) 处理的样品进行第二次 PCR 扩增。将2次 PCR 产物纯化后进行酶切和胶回收, 并与 pDNR-LIB 载体连接转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B 感受态。取适量菌液按比例稀释后涂于氯霉素平板上, 37℃培养过夜, 统计克隆数并计算文库滴度。

1.3.3 菌落鉴定 挑取平板上15个菌落克隆, 进行菌落 PCR 鉴定。PCR 反应程序: 94℃预变性4 min, 35个循环; 94℃变性40 s, 53.6℃退火40 s, 72℃延伸4 min; 72℃充分延伸10 min。取适量 PCR 产物电泳检测并估算片段长度。

1.3.4 随机克隆测序及分析 随机挑取200个克隆送北京华大基因研究中心测序, 使用 phrap 软件对 EST 序列进行拼接, 并在 NCBI 网站上进行 Blast 比对分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取

杂色鲍肌肉和内脏团组织总 RNA 提取结果见图1, 箭头所示的上方条带为28S rRNA, 下方为18S rRNA, OD_{260nm/280nm} 比值分别为2.02和2.05, 介于1.9~2.2之间, 符合 RNA 纯度要求。

2.2 cDNA 一、二链的合成与均一化

取5 μL 产物, 于1.1% 含 EB 的胶上电泳检测 cDNA 合成结果(图2-a)。可见 cDNA 长度大于5 000 bp, smear 条带主要位于0.5~5.0 kb 之间, 尤其在0.75~2.0 kb 处有明显的高拷贝基因带, 说明需要对产物做均一化处理。

根据 Trimmer-Director Kit 操作说明, 进行均一化处理。从图2-b可以看出, 1倍 DSN 处理(泳道5)后, 高拷贝基因条带已全部消除、smear 带很均匀。取1倍 DSN 处理的样品进行第2次 PCR 扩增, 12个循环后取5 μL 产物电泳检测(图2-c)。由第6泳道的结果可见, cDNA 片段长度比图2-b 中的结果提高明显, 达到了预期效果。

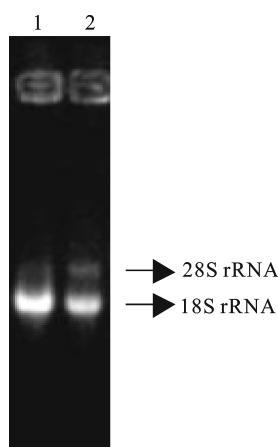


图1 肌肉和内脏团总 RNA 电泳

1. 肌肉总 RNA; 2. 内脏团总 RNA

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA in muscle

and visceral mass

1. muscle total RNA; 2. visceral mass total RNA

2.3 连接产物的转化和文库鉴定

对2次PCR产物进行纯化后, *Sfi*I酶切, 分别割胶回收0.5~1.0和1.0~3.0 kb之间的片段, 与载体连接并转化大肠杆菌涂板。37℃培养过夜后, 根据平板的菌落数计算菌液滴度, 2个文库库

容均为 $2.5 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。从2个平板中分别挑取15个克隆进行菌落PCR鉴定(图3), 由图3-a可见插入片段长度基本在0.5~1.0 kb之间, 图3-b中插入片段基本在1.0~3.0 kb之间, 并且PCR阳性率均达到了100%。

2.4 序列分析及比对

对随机挑取的200个克隆进行测序, 结果表明有187个获得了测序结果, 其中高质量ESTs(长度大于100 bp)有174条。进一步对这些序列进行拼接, 发现37条EST序列分属12条Contigs, 其余137条EST序列均为Singlets, Unigenes数(=Contigs+Singlets)为149条, 冗余率(Redundancy)只有14.37%。对149条Unigene序列Blastx比对NCBI的非冗余蛋白质序列库(NR), 结果显示有39条(26.2%)序列获得了可靠的比对结果(Identity > 80%) (表1)。在这些已知基因序列中, 核糖体蛋白(ribosomal protein)亚基的cDNA序列最多(9条), 分析可能与核糖体本身含量很高有关; 另外有2个Unigene属于钙调蛋白(calmodulin); 其他基因还包括组织蛋白酶(cathepsin)、胶转蛋白(transgelin)、动力蛋白(dynein)、ATP合成酶等。值得注意的是, 这些Unigene中有18

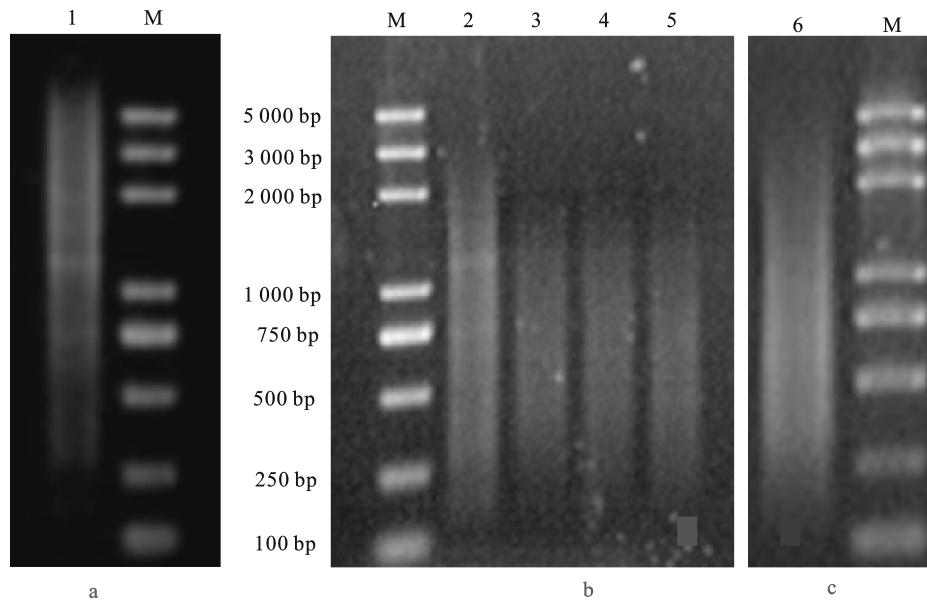


图2 cDNA一、二链的合成与均一化电泳图

M. DL2000 plus; 池道1. LD-PCR扩增cDNA双链结果; 2~5. 分别为11个循环的Control, 1/4倍DSN酶处理, 1/2倍DSN酶处理和1倍的DSN酶处理; 6. 1倍DSN处理的样品再次PCR扩增12个循环

Fig. 2 Electrophoresis of first and second strand cDNA synthesis and homogenization

M. DL2000 plus marker; Lane 1. double strand cDNA amplified by LD-PCR; 2. 11 cycles without DSN treatment; 3. 1/4 × DSN treatment; 4. 1/2 × DSN treatment; 5. 1 × DSN treatment; 6. 12 plus PCR cycles after 1 × DSN treatment

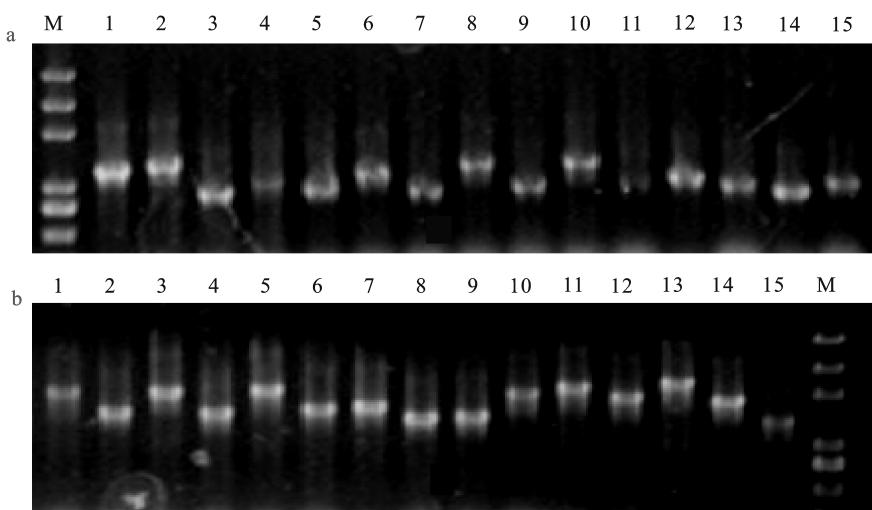


图3 菌落 PCR 鉴定插入片段电泳图

a. 插入片段为 0.5~1.0 kb 的文库克隆；b. 插入片段为 1.0~3.0 kb 的文库克隆；M. DL2000 plus

Fig. 3 Electrophoresis of colony PCR for inserted fragments

a. library clones with 0.5~1.0 kb inserted fragments; b. library clones with 1.0~3.0 kb inserted fragments; M. DL2000 plus marker

条 (12.1%) 序列与鲍属 (*Haliotis*) 的已知基因相似性最高, 其中 10 个来自皱纹盘鲍 (*H. discus*)、7 个来自杂色鲍、1 个来自耳鲍 (*H. asinina*) , 这说明文章构建的 cDNA 文库来源可靠。

3 讨论

迄今国内有关鲍 cDNA 文库的报道主要以皱纹盘鲍和杂色鲍为主, 其中皱纹盘鲍文库包括不同壳色杂交家系文库^[8]、胚胎文库^[9]、肝和肾文库^[10]、外套膜文库^[11~12]等。杂色鲍文库主要有多种细菌攻毒杂色鲍血淋巴细胞抑制性差减杂交文库^[13]、副溶血弧菌感染的肝脏和血细胞文库^[14~15] , 以及三丁基锡 (TBT) 处理的杂色鲍肝胰腺文库^[16]等。针对哈维氏弧菌这种病原的全组织文库尚未见报道。文章所用病原是笔者所在研究室从广东汕头某养殖场患肌肉萎缩症^[5]的杂色鲍体内分离得到的, 人工感染后证实了其病原致病性。通过进行形态学观察、生理生化检测及 16S rRNA 测序, 证实该致病菌为哈维氏弧菌 (相关数据待发表)。由于该病原的致病性很强, 给鲍养殖业造成了严重损害^[5~7]。笔者通过预试验摸索出感染剂量和取样时点, 并以表现出轻微症状但不足以致死的剂量对试验鲍进行了注射感染, 以期通过注射该病原诱导鲍免疫系统的防御反应, 提高免疫相关基因在文库中

的表达丰度。

构建表征性强的全长 cDNA 文库的基础是 mRNA 的质量, 因此, 高质量总 RNA 的提取非常关键。文中采用了 Trizol 试剂分别提取了肌肉和内脏团的总 RNA, 纯度及电泳带型均符合要求 (图 1)。将 2 种 RNA 等比例混合后, 可减少组织大小和 RNA 含量的差异, 使各组织中的 RNA 比例更加均衡。由图 1 的电泳结果可见, 18S rRNA 的条带比 28S rRNA 条带更清晰、明亮, 这与已报道的鲍组织 RNA 提取结果完全一致^[8,13]。研究中采用 Clontech 公司开发的 SMART 方法, LD-PCR 合成双链 cDNA, 进一步保证了 cDNA 序列的完整性^[17]。文中所建文库库容达到了 $2.5 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 超过通常要求的 $1.7 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 能够 99% 覆盖任意稀有基因^[18], 并且 PCR 检测的阳性重组率达到 100%, 各项参数均符合建库要求。此外, cDNA 文库的高冗余率一直是制约文库应用的一个瓶颈。有报道称未经均一化处理的 cDNA 文库冗余率可达 60%^[19], 经过均一化处理后一般能降到 30% 左右^[16]。该研究中利用 DSN 酶对总 cDNA 进行了均一化处理, 有效地消除了高拷贝的基因数 (图 2)、提高了稀有基因的比率, 文库冗余率降到了 14.37%, 远超出前人的研究结果, 这对今后的大规模测序和文库筛选等将十分有利。对文库中部分 Unigene 序列比对结果表明, 虽然该文库的结果可

表 1 Unigene 序列比对结果
Tab. 1 Blast result of unigenes

unigene ID	长度 /nt	相似度 /%	E 值 E Value	NCBI 检索号 NCBI accession No.	注释 notes	原序列 origin
1_A01	491	80	1.00E-49	ABW23182. 1	ribosomal protein rp127a	沙蠋属 <i>Arenicola marina</i>
2_C04	519	80	3.00E-21	AAB09424. 1	mitochondrial trifunctional protein beta subunit	-
2_C09	509	80	3.00E-61	ABW23163. 1	ribosomal protein rp17a	沙蠋属 <i>A. marina</i>
2_G01	494	80	2.00E-14	EDL85083. 1	cathepsin Z, isoform CRA_a	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>
1_A04	501	81	2.00E-34	AAB51325. 1	C2f	人 <i>Homo sapiens</i>
1_G03	496	81	5.00E-32	pdb 1E4U	Chain A, N-terminal ring finger domain of human not-4	人 <i>H. sapiens</i>
1_G05	497	81	4.00E-45	XP_967271. 1	PREDICTED: similar to CG9172 CG9172-PA	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>
2_B07	513	81	1.00E-59	ABO26639. 1	transgelin	皱纹盘鲍 <i>H. discus discus</i>
1_C03	509	82	8.00E-49	XP_783725. 1	outer arm dynein LC3	紫海胆 <i>Anthocidaris crassispina</i>
2_A02	496	82	3.00E-11	AAA61824. 1	anti-proliferative protein	-
2_A08	505	82	8.00E-59	ACJ65685. 1	LIM protein	皱纹盘鲍 <i>H. discus discus</i>
2_F10	506	83	7.00E-29	EEA73605. 1	hypothetical protein BRAFLDRAFT_69314	文昌鱼 <i>Branchiostoma floridae</i>
2_E05	419	84	9.00E-57	ABE72932. 1	zona pellucida domain A	皱纹盘鲍 <i>H. discus hannai</i>
2_G08	505	84	9.00E-47	ABO26647. 1	ATP synthase, H + transporting, mitochondrial F1 complex, o subunit	皱纹盘鲍 <i>H. discus discus</i>
2_H06	501	84	1.00E-72	BAD15288. 1	78kDa glucose regulated protein	牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>
1_F03	513	87	4.00E-61	ABU43069. 1	60S ribosomal protein L15	杂色鲍 <i>H. diversicolor</i>
1_F09	499	89	2.00E-34	P41384. 1	Full = cyclin-dependent kinases regulatory subunit	欧洲帽贝 <i>Patella vulgata</i>
2_F09	508	89	4.00E-76	XP_001653666. 1	arp2/3 complex 20 kd subunit	埃及斑蚊 <i>Aedes aegypti</i>
1_B01	496	90	7.00E-18	BAB32124. 1	unnamed protein product	小鼠 <i>Mus musculus</i>
1_H10	486	90	2.00E-77	BAE16013. 1	ribosomal protein S5	牡蛎 <i>C. gigas</i>
2_G02	463	92	3.00E-60	ACH56913. 1	26S proteasome regulatory complex ATPase RPT2	带纳 <i>Simulium vittatum</i>
1_C10	500	94	2.00E-56	AAM94275. 1	ribosomal protein S20	栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>
Contig5	496	96	1.00E-71	ABO26685. 1	ribosomal protein l17	皱纹盘鲍 <i>H. discus discus</i>
1_A10	455	96	2.00E-62	ABO26685. 1	ribosomal protein l17	皱纹盘鲍 <i>H. discus discus</i>
1_B10	496	96	1.00E-71	ABO26685. 1	ribosomal protein l17	皱纹盘鲍 <i>H. discus discus</i>
Contig2	497	97	5.00E-72	NP_001119640. 2	calmodulin	豌豆蚜 <i>Acyrthosiphon pisum</i>
Contig3	503	97	8.00E-43	ABY87377. 1	unknown protein 9	杂色鲍 <i>H. diversicolor</i>
1_A05	503	97	8.00E-43	ABY87377. 1	unknown protein 9	杂色鲍 <i>H. diversicolor</i>
1_D05	509	97	8.00E-62	XP_001634403. 1	predicted protein	星状海葵 <i>Nematostella vectensis</i>
1_G07	496	97	2.00E-56	ABY87378. 1	predicted protein 2	杂色鲍 <i>H. diversicolor</i>
1_H07	497	97	5.00E-72	NP_001119640. 2	calmodulin	豌豆蚜 <i>A. pisum</i>
2_D07	488	97	1.00E-65	AAF26741. 1	chlorophyll a/b binding protein precursor	乳浆大戟 <i>Euphorbia esula</i>
1_F06	503	98	9.00E-47	ABY87346. 1	unknown protein	杂色鲍 <i>H. diversicolor</i>
1_H09	488	98	1.00E-71	ABO26682. 1	ribosomal protein S14	皱纹盘鲍 <i>H. discus discus</i>
2_F01	500	98	9.00E-84	ABO26671. 1	26S protease regulatory subunit 6B	皱纹盘鲍 <i>H. discus discus</i>
1_E06	509	99	7.00E-87	ABO26645. 1	proteasome alpha type 2	皱纹盘鲍 <i>H. discus discus</i>
2_A12	467	99	6.00E-62	ABV08873. 1	actin depolymerisation factor/cofilin	杂色鲍 <i>H. diversicolor</i>
1_H02	384	100	4.00E-41	ABY87377. 1	unknown protein 9	杂色鲍 <i>H. diversicolor</i>
2_C10	507	100	8.00E-41	AAP85231. 1	tropomyosin 1	耳鲍 <i>H. asinina</i>

靠,但149条Unigene中只有1/4左右的序列获得了相似性较高的比对结果,提示鲍等软体动物的基因信息资源还十分缺乏,分子生物学的研究基础还相对薄弱、亟待加强。通过测序,该研究发现了钙调蛋白(calmodulin)、组织蛋白酶(cathepsin)、蛋白酶(protease)、蛋白酶体(proteasome)等免疫相关基因。在全部获得注释结果的Unigene序列中,免疫相关基因的比例达到了15.4% (6/39),高于其他鲍cDNA文库的报道^[10,16]。但由于该研究的测序规模较小,尚未发现新的基因序列,要获得更多的免疫相关基因信息还需进一步扩大测序规模。

综上所述,该研究建立了哈维氏弧菌感染的杂色鲍全组织cDNA文库,该文库各项指标符合要求,质量较好,对后续的免疫基因鉴定与功能研究、文库筛选、微卫星标记(EST-SSR)开发以及哈维氏弧菌的致病机理和防病、抗病相关研究等都将具有重要意义。目前,大规模测序已经展开,期待通过该方法大量获得鲍基因序列,并对可能的免疫功能基因开展深入的研究。

参考文献:

- [1] WANG J Y, GUO Z X, FENG J, et al. Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong province, China [J]. *J Shellfish Res*, 2004, 23 (4): 1163–1168.
- [2] 徐力文,廖昌容,王瑞旋,等.氟苯尼考对杂色鲍腮孢病的实验药效研究[J].南方水产,2005,1(2):31–34.
- [3] 刘广锋,徐力文,黄建荣,等.杂色鲍养殖环境中致病性弧菌分布调查[J].南方水产,2005,1(3):60–64.
- [4] 王江勇,王瑞旋,刘广锋,等.杂色鲍幼苗大规模死亡与细菌数量的关系[J].南方水产,2005,1(1):57–61.
- [5] 孙秀秀,苏友禄,冯娟,等.杂色鲍肌肉萎缩症的组织病理学研究[J].安徽农业科学,2009,37(3):1098–1101.
- [6] TOMOO S, SAHOKO I, YOUHEI F, et al. Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection [J]. *Microbes Environ*, 2007, 22 (3): 300–308.
- [7] MARIE-AGNES T, NELLY L, SYLVAIN H, et al. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25 (6): 800–808.
- [8] 刘晓,高其康,张国范.不同壳色皱纹盘鲍杂交家系J1RhF1全长cDNA文库的构建[J].水产科学,2004,28(1):23–28.
- [9] 刘晓,赵敏,高其康,等.皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)胚胎RNA分离和cDNA文库构建[J].海洋与湖沼,2006,37(4):355–360.
- [10] 郑明刚,孙修勤,张进兴.皱纹盘鲍肝和肾cDNA文库的构建及免疫相关基因的初步分析[J].高技术通讯,2007,17(3):319–324.
- [11] 刘晶,张文兵,麦康森,等.皱纹盘鲍外套膜耐维生素E缺乏消减cDNA文库的构建[J].中国水产科学,2007,14(3):383–389.
- [12] 李静,张文兵,麦康森,等.皱纹盘鲍外套膜cDNA表达文库的构建[J].中国海洋大学学报,2008,38(5):744–748.
- [13] 任洪林,徐丹丹,乔琨,等.细菌攻毒杂色鲍血淋巴细胞抑制性差减杂交文库构建及巨噬细胞表达蛋白cDNA的克隆与差异表达[J].遗传,2008,30(8):1043–1050.
- [14] 王艺磊,张子平,戴军,等.副溶血弧菌感染12 h和24 h杂色鲍肝脏全长cDNA文库的构建[J].中国水产科学,2004,11(3):190–195.
- [15] 王淑红,邹志华,张子平,等.副溶血弧菌感染的九孔鲍血细胞均一化全长cDNA文库的构建[J].台湾海峡,2008,27(3):278–285.
- [16] JIA Xiwei, ZHANG Ziping, WANG Guodong, et al. Expressed sequence tag analysis for identification and characterization of genes related to Tributyltin (TBT) exposure in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. *Comp Biochem Phys D*, 2009, 4(4): 255–262.
- [17] WELLERREUTHER R, SCHUPP I. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones [J]. *BMC Genomics*, 2004, 36 (5): 1–8.
- [18] 萨姆布鲁克,拉塞尔.分子克隆实验指南[M].3版.北京:科学出版社,2003:863–864.
- [19] OKUBO K, HORI N, MATOBA R, et al. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression [J]. *Nat Genet*, 1992, 2 (2): 173–179.