

辣椒应答疫霉差异表达基因 cDNA 分离技术平台建立与应用

赖燕¹ 林明¹ 陈桂信¹ 徐波^{1,2},
贺俐^{1,3} 姜翠翠¹ 肖翔¹ 官德义¹ 何水林^{1*}

(1. 福建农林大学 福建 福州 350002; 2. 中国科学院 城市环境研究所 福建 厦门 361021; 3. 井冈山大学 江西 吉安 343009)

摘要: 植物在逆境胁迫下大量基因的表达往往会发生改变,最终导致对逆境的诱导抗性。剖析逆境作用下差异表达基因的功能是阐明植物抗逆分子机制的重要途径,而获得逆境作用下差异表达基因的全长 cDNA 是上述研究的基础。建立获得辣椒应答疫霉感染差异表达基因全长 cDNA 的技术平台:利用抑制性差减杂交技术构建辣椒叶片在疫霉感染下的 SSH 文库,随机挑取 150 个克隆测序,获得 24 个功能已知的序列,BLASTN 分析发现这些差异表达基因从功能上可分为能量代谢过程、信号传递、光合作用、抗逆反应等几种类型;利用 DSN(duplex-specific nuclease) 均一化技术与 SMARTTM(switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 建库技术相结合的方法,构建了辣椒全长均一化 cDNA 文库,该文库含有 1.8×10^6 个独立克隆,插入片段平均长度为 1.75 kb,重组率为 97%;基于 SSH 获得的差异表达基因序列设计特异性引物,从均一化文库中分离获得其相应的 cDNA,结果表明:所获得的差异表达基因 cDNA 片段相对应的 cDNA 阳性克隆均为全长 cDNA,所构建的 SSH 和均一化 cDNA 文库可较好地应用于辣椒应答疫霉等逆境差异表达基因全长 cDNA 的分离,为进一步开展差异表达基因的功能鉴定奠定基础。

关键词: 辣椒;抑制差减杂交;均一化 cDNA 文库;差异表达基因;分离

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)05-0997-07

Establishment of Full Length cDNA Isolation System of Differentially Expressed Genes in *Capsicum annuum* against *Phytophthora capsici* Infection and Its Application

LAI Yan¹, LIN Ming¹, CHEN Gui-xin¹, XU Bo^{1,2},
HE Li^{1,3}, JIANG Cui-cui¹, XIAO Xiang¹, GUAN De-yi¹, HE Shui-lin^{1*}

(1. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China; 3. Jinggangshan University, Ji'an 343009, China)

收稿日期: 2010-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30600391, 30971718)、福建省自然科学基金重点项目(2008J0003)、福建省自然科学基金项目(2008J0049)、福建省创新人才项目(2007F3013)、福建省科技重点项目(2008N0099)和高校博士点基金项目(20093515110004)

作者简介: 赖燕(1984—),女,博士生,主要从事植物生物技术研究, E-mail: laiyan1010@126.com。

* 通讯作者,何水林(1965—),男,博士,教授,博士生导师。1988年毕业于江西农业大学农学专业,获农学学士学位;此后分别于1991和1998年获华中农业大学农学硕士学位和福建农业大学农学博士学位。1996年10月-1998年1月在韩国庆北大学农学院留学,2008年8月-2009年1月在美国加州大学河滨分校植物与植物科学系开展合作研究。现为福建农林大学海外学院院长,主要从事蔬菜遗传改良及植物生物技术研究。主持国家自然科学基金4项,国家水稻转基因专项子课题1项,高校博士点基金1项,省自然科学基金重大项目及重点项目各1项,省自然科学基金面上项目等多项,在《Plant Cell Physiology》等国内外刊物上发表论文30多篇,主编《基因工程》1部,出版专著《植保素代谢与植物防御反应》1部,申请专利5项。E-mail: hsl324@yahoo.com.cn。

Abstract: The expression of a vast array of genes in plants changes and the physiological and metabolic reprogramming occurs against stress, which result in the enhanced stress resistance. Functional dissection of the differentially expressed genes is an approach to elucidate stress resistance mechanism. In order to acquire the full length cDNAs of the gene differentially expressed against *Phytophthora capsici* infection for functional genomics study of pepper disease resistance, a system including suppression subtractive hybridization cDNA library, normalized cDNA library was established in this study. The suppression subtractive hybridization cDNA library was constructed from pepper leaves inoculated with *P. capsici*, a number of SSH clones were randomly selected and sequenced. The results of BLASTN showed that 24 genes had homologous sequences in the database. These functionally known genes were detected to involve in energy metabolism, signal transduction, photosynthesis and stress resistance. The normalized cDNA library enriched in full-length sequences was constructed using DSN (duplex-specific nuclease) - normalization method combined with SMARTTM (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technique. The normalized cDNA library contained 1.8×10^6 independent clones and the average cDNA insert size was 1.75 kb with a recombination rate of 97%. The specific primers were designed according to the sequences of the differential expression ESTs from the SSH, and he corresponding cDNA clones were isolated from the normalized cDNA library by a PCR-based method. All the clones isolated from the cDNA library turned out to be full length cDNAs. The results indicated that the system could be used for isolation of full length cDNAs of genes differentially expressed against stresses such as *P. capsici* infection in pepper.

Key words: *Capsicum annuum*; suppression subtractive hybridization; normalized cDNA library; differential expression; isolation

生长在特定地点和时间段的植物总是频繁地遭受到各种逆境胁迫,在逆境胁迫下植物细胞可感知逆境信号,并通过信号传递最终将信号传递到细胞核,通过转录因子调节细胞核特定基因的表达,最终产生代谢和生理水平上的调整,使植物对逆境抗性水平提高^[1-3]。植物对逆境的诱导抗性必定与特定基因表达的改变密切相关^[4]。因此,植物应答逆境的差异表达基因的功能鉴定是阐明植物抗逆机制的重要途径之一,分离获得差异表达的全长 cDNA 则是阐明差异表达基因功能的前提。

在众多的分析差异表达基因技术中,抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术是仅富集在一种组织或一种逆境胁迫下差异表达基因的有效途径,并且有灵敏度高、假阳性低、操作便捷快速的特点^[5]。通过对文库进行高通量的 EST 测序,可有效地获得特定逆境相关的大量差异表达的基因信息^[6]。由于抑制性消减杂交文库构建过程运用了限制性内切酶技术,无法通过对 SSH 文库的直接筛选获得差异表达基因的全长 cDNA,因此有必要构建全长 cDNA 文库用于分离目的基因。传统的 cDNA 文库由于基因拷贝数的巨大差异给文库筛选带来干扰和大量的重复性工作,而包括转录因子在内的参与作物抗逆过程的调节基因大部分为低丰度的稀有基因,这就要求构建的 cDNA 文库能提高发现稀有基因的效率。均一化 cDNA 文库(normalized cDNA library)能克服基因转录水平上存在的巨大差异^[7-8]。高质量的均一化 cDNA 文库中高丰度的基因和低丰度的基因出现的频率基本一致,适合大规模基因的发掘以及 EST 计划^[9-10]。

辣椒是一种重要的茄科蔬菜和工业原料作物,在我国其种植面积仅次于大白菜,但产值却最高。然而像其它茄科作物一样,辣椒的生产过程中疫病等病害发生较为频繁,轻则减产,重则绝收。培育和推广应用抗病品种是生产中解决辣椒病害问题最为经济有效的对策,而开展辣椒抗病分子机制研究则是有效开展辣椒抗病遗传改良的重要基础。本研究在构建辣椒应答疫霉侵染的 SSH 文库和均一化 cDNA 文库的基础上,根据 SSH 文库测序结果设计分离差异表达基因 cDNA 的特异性引物进行均一化 cDNA 文库筛选,建立起获得应答辣椒疫霉差异表达基因全长 cDNA 的技术平台,为进一步开展应答疫霉差异表达基因大规模的功能鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料和主要试剂

差减文库及均一化 cDNA 文库构建所用的辣椒品种为福建省地方辣椒品种 L11, 采辣椒疫霉侵染的 8-10 叶期的主要功能叶提取总 RNA。植物总 RNA 提取试剂盒购自北京百泰克公司; 各种工具酶、Marker 等购自大连宝生物公司; PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 和 Smart™ cDNA Library Construction Kit 购自美国 Clontech 公司; Purification of poly(A) mRNA Kit 购自德国 Macherey-Nagel 公司; Trimmer_Direct cDNA Normalization Kit 购自俄罗斯 Evrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 辣椒疫霉接种 将从福建省福清分离的辣椒疫霉菌株接种到马铃薯琼脂培养基平板上, 培养 7 d 后用 Petri 溶液培养 3 d 4 °C 条件下放置 30 min 诱发孢子囊并释放游动孢子, 配置一定浓度孢子溶液进行剪叶接种 4 d 后取样提取总 RNA。

1.2.2 总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化 参照北京百泰克公司多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明分别提取未经处理的辣椒叶片及辣椒疫霉接种的辣椒叶片总 RNA, 经 MN 公司 poly(A) mRNA 纯化试剂盒获得辣椒 mRNA, 并检测 mRNA 样品的浓度、纯度及完整性。用真空浓缩法将 mRNA 浓度调整为 1 μg/μL。

1.2.3 均一化 cDNA 文库的构建 参照 Clontech 公司 Smart™ cDNA Library Construction Kit 说明, 基于 PCR 技术合成双链 cDNA, 双链 cDNA 经胶回收, 分级沉淀后备用。双链 cDNA 的均一化参照 Evrogen 公司 Trimmer_Direct cDNA Normalization Kit 说明, 依据 DSN 法对双链 cDNA 进行均一化, 将均一化后的双链 cDNA 克隆到含 Sfi 位点的 pBlueScript II 载体上并电转化大肠杆菌 DH10B, 在含有 Amp 的 LB/X-gal/IPTG 培养基上筛选, 挑取白色克隆保存, 并计算滴度。

1.2.4 SSH 文库的构建与转化 参照 Clontech 公司 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 说明进行 SSH 文库的构建, 以未经处理的辣椒叶片作为驱动方(Driver), 以接种疫霉的辣椒叶片作为实验方(Tester)。SSH 产物纯化后与 pMD18-T 载体连接, 电转化大肠杆菌 DH10B, 在含有 Amp 的 LB/X-gal/IPTG 培养基上筛选, 挑取白色克隆保存。

1.2.5 序列测定与分析 选取适量适当长度阳性克隆, 以 M13 为测序引物, 由北京三博远志生物公司测序。将获得的 EST 序列采用 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线序列比对工具进行同源比对分析。

1.2.6 均一化 cDNA 文库的筛选 挑选 19 个通过 SSH 获得的差异表达基因的 EST 序列, 应用 PRIMER5 软件设计特异性引物, 委托上海生工公司合成。用特异性引物对文库进行 PCR 检测, 依据 Yim^[11] 等人的方法, 通过稀释文库, 基于 PCR 技术获得从文库中目的基因阳性克隆, 并以 M13 为测序引物委托上海英骏生物技术公司测序。

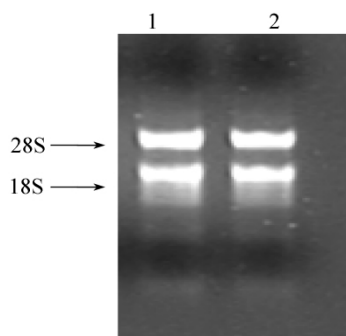
2 结果与分析

2.1 辣椒总 RNA 与 mRNA 质量检测

琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 有明显的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带, 且 2 个条带亮度比例约为 2:1(图 1), 所提取的辣椒幼苗总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 的比值介于 1.8~2.0, 说明 RNA 质量较高, 符合建库要求。经 MN 公司 poly(A) mRNA 纯化试剂盒获得辣椒 mRNA, 在琼脂糖凝胶上成弥散状, 大小约为 0.4~5 kb, A_{260}/A_{280} 的比值介于 1.8~2.0, 表明此 mRNA 的纯度较高, 达到建库标准。

2.2 均一化 cDNA 文库质量初步分析

2.2.1 文库均一化效果检测 反转录获得的双链 cDNA 经 LD-PCR 扩增后, 半透膜胶回收 800 bp 以上



1. 未经处理的辣椒叶片总 RNA; 2. 接种疫霉的辣椒叶片总 RNA。

1. Total RNA of pepper leaves; 2. Total RNA of pepper leaves inoculated with *P. capsici*.

图 1 辣椒叶片总 RNA 电泳检测

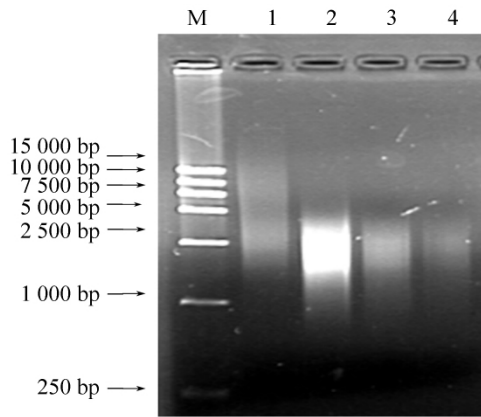
Fig. 1 Detection of total RNA from pepper

片段,由于高丰度基因的富集,回收后 dscDNA 中间有明显的亮带(图 2)。dscDNA 分别采用 0、1/4、1/2、1 倍浓度的 DSN 酶进行均一化处理后进行 PCR 扩增。从图 2 可以看出,以 1/2、1 倍浓度的 DSN 酶进行均一化处理后亮带消失,且 cDNA 分布均匀,呈弥散状,说明高丰度基因丰度明显下降,均一化效果良好,满足构建均一化 cDNA 文库的要求。

2.2.2 文库滴度及插入片段长度检测 将均一化后的双链 cDNA 经半透膜纯化后与含 Sfi 位点的 pBlueScript II 载体连接,连接产物稀释 5~6 倍后转化大肠杆菌 DH10B。经计算,均一化 cDNA 文库的滴度为 1.8×10^6 cfu/mL,经蓝白斑筛选和 PCR 验证计算文库重组率为 97%,随机挑选 20 个菌落检测插入片段大小,结果表明插入片段集中于 1~2.5 kb(图 3)。随机挑选 50 个菌落测序,序列比对分析表明共获得 49 个独立克隆,其中 39 个基因为全长基因,约占 80%。

2.3 SSH 文库检测

经 RsaI 酶切之后, dscDNA 与酶切前相比电泳迁移率变大,且分布由 400 bp~4.5 kb 降至 100 bp~1.2 kb,说明酶切完全。将连有接头 1 和接头 2 的 Tester cDNA 分别与适量的 Driver cDNA 进行 2 次消减杂交,根据接头引物进行巢式抑制 PCR,使得差异表达的基因进行指数扩增而得到富集。扩增出的 cDNA 片段大小主要集中在 100 bp~1.2 kb,与预期的结果基本一致。SSH 产物经半透膜纯化后与 pMD18-T 载体连接,连接产物稀释 5~6 倍后转化大肠杆菌 DH10B,经蓝白斑筛选获得 500 个左右阳性克隆,随机挑选 100 个克隆进行 PCR 鉴定,结果表明除少数为空质粒外,余下均有插入片段,且片段多介于 250 bp~1.2 kb(图 4),为有效重组。

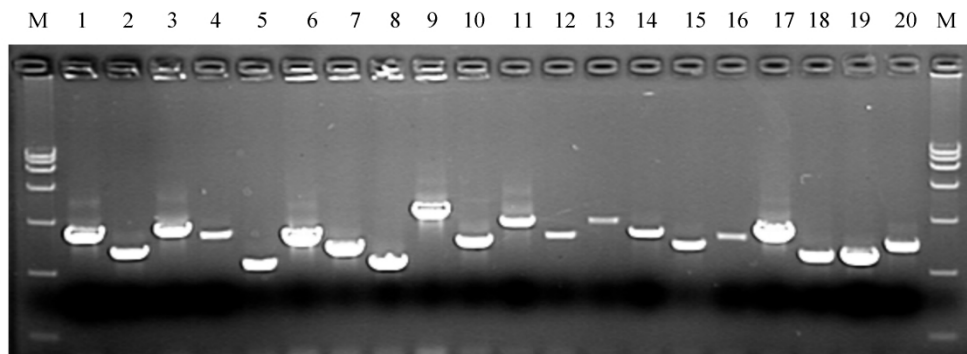


M: Marker 1-4 分别为:0、1/4、1/2、1 倍浓度的 DSN 酶处理后扩增的辣椒 cDNA。

M: Marker 1-4: normalized amplified cDNA under $0 \times, 1/4 \times, 1/2 \times, 1 \times$ concentration of DSN digested.

图 2 均一化 cDNA 电泳图(Marker 为 15 000 bp Marker)

Fig.2 Gel analysis of normalization



M: Marker 1-20: 插入片段 PCR 扩增

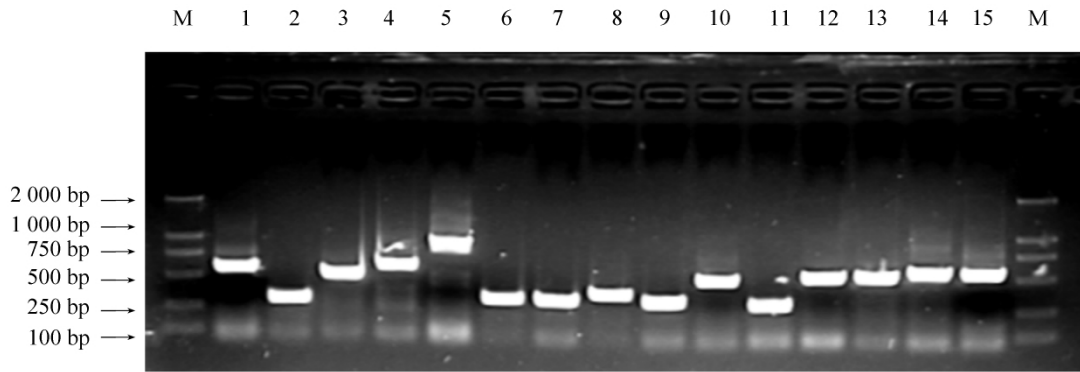
M: Marker 1-20: The PCR production of cDNA clones randomly picked from library.

图 3 均一化 cDNA 文库插入片段大小检测

Fig.3 Average size of inserts of normalized cDNA library

2.4 SSH 文库克隆测序及分析

随机挑选 150 个经 PCR 检测含有插入片段的抑制消减文库克隆,送交北京三博远志生物公司测序。对获得的 EST 进行分析,得到 146 个有效测序结果,经比对去除重复序列后,共获得 47 条独立的 EST 序列。其中功能已知的有 24 个(表 1),经推测这批基因编码的蛋白可能参与的生物学过程主要为能量代谢过程(核酮糖磷酸羧化酶、亚铁螯合酶等)、信号传递(富亮氨酸跨膜蛋白类蛋白、小 GTP 结合蛋白、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、NAC、WRKY 类转录因子等)、光合作用(如叶绿素 a/b 结合蛋白、磷酸核酮糖激酶前体等)及防御反应相关基因(类亲环蛋白、抗菌蛋白等)。



M: Marker 1 - 15: 差减文库部分插入片段 PCR 检测。

M: Marker 1 - 15: PCR identification of inserted fragments randomly picked from SSH - cDNA library.

图 4 抑制消减文库插入片段大小检测

Fig. 4 Average size of inserts of SSH - cDNA library

表 1 差减文库中随机测序的 EST 与 GenBank 中同源性最高基因的同源性比较

Tab. 1 Sequence identity of differentially expressed ESTs from SSH with the most similar genes from GenBank

克隆编号 No. of clone	推定基因 Putative gene	E 值 E - value	最大同源性 / % Maximal sequence identity
Y01	nac2 - like protien	1e - 130	45
Y13	chloroplast clpsubunit of peptidase complex	1e - 12	80
Y17	methionine synthase	1e - 110	96
Y30	phosphoribulokinase precursor	1e - 147	92
Y26	WRKY transcription factor	7e - 124	92
Y31	light harvesting chlorophyll ab - binding protein	1e - 115	98
Y32	40s ribosomal protein s11	1e - 64	97
Y35	AP2 domain - containing transcription factor family protein	7e - 42	45
Y39	cis - zeatin o - glucosyltransferase	1e - 15	73
Y79	pstvd rna - bidingvirp1	1e - 75	72
Y61	ribosomal protein 132	1e - 63	94
Y67	leucine - rich repeat transmembrane protein	1e - 78	61
Y75	60s ribosomal protein 17	1e - 41	97
Y76	NAC domain protein	1e - 92	90
Y84	small GTP - binding protein	2e - 116	76
Y97	ankyrin repeat - containing protein , putative	5e - 55	87
Y104	ribulose biphosphate carboxylase	1e - 92	95
Y121	serine/threonine protein kinase	5e - 115	98
Y124	ferrochelatae	2e - 112	99
Y129	Pre - mRNA - splicing factor , putative	3e - 124	98
Y134	putative zinc finger protein	1e - 123	99
Y138	ATP - dependent RNA helicase eIF4A , putative	1e - 167	96
Y141	probable ATP - dependent RNA helicase DDX49	3e - 116	87
Y149	cyclophilin - like protein	1e - 104	98

2.5 均一化 cDNA 文库的筛选

根据 SSH 文库阳性克隆的随机测序结果,选择 NAC、WRKY、小 G 蛋白 Rop、乙烯应答因子(ethylene responsive factor)、磷酸激酶(serine/threonine protein kinase)等可能参与植物细胞应答逆境信号传递、蛋白质代谢或植物防御反应基因的 EST 序列设计特异性引物。利用这些引物筛选均一化 cDNA 文库,分别获得其相应的 cDNA 阳性克隆,对获得的阳性克隆进行测序鉴定,经 BLAST 比对和生物信息学分析表明,所筛选的 19 个阳性克隆均为推定全长 cDNA,且与初始的 EST 序列保持一致(资料未列出)。

3 讨论

分离获得在逆境下差异表达的全长 cDNA 是开展差异表达基因功能研究、剖析植物适应逆境分子机制的前提。本研究为了分离获得辣椒应答疫霉侵染的差异表达基因的全长 cDNA 用于后续开展辣椒应答逆境的功能基因组学研究,采取了差减文库与均一化文库构建与筛选相结合的技术策略,建立了较好的分离辣椒应答疫霉差异表达基因全长 cDNA 的技术平台。

SSH 技术采用两次差减杂交和两次抑制性 PCR,大大提高了检出差异基因的阳性率,具有高度的灵敏性,在反应中将丰度不同的单链 cDNA 含量均一化,保证能够检测出低丰度 cDNA,加上速度快、效率高的优点,使得该技术广泛应用于分离差异表达基因。mRNA 的质量和含量决定了抑制消减文库的质量和完整性,在从总 RNA 中分离 mRNA 时采取增加洗脱体积结合真空冷冻浓缩 mRNA 相结合的措施,有利于提高 mRNA 的得率和检出低丰度基因的效率;消减杂交时样品量小,对温度的要求较高,须严格控制实验条件(本研究选用热盖效果好的 PCR 仪进行杂交试验,严格控制 2 次杂交加样时的温度);PCR 扩增也是影响差减文库质量的重要的环节,本研究使用的循环数尽量少,尽可能降低低丰度基因丢失的风险。

由于抑制性消减杂交文库构建过程运用了限制性内切酶技术,文库中的 cDNA 被消化为片段,要获得候选基因全长 cDNA 可以利用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)或通过构建全长 cDNA 文库来实现。RACE 技术是基于 PCR 技术的,由已知 cDNA 片段扩增从而获得完整的 cDNA3' 和 cDNA5' 末端的快速方法,但在操作过程中容易发生非特异扩增导致错误克隆,尤其不适用于对丰度低且长度较长基因的克隆。构建全长 cDNA 文库是功能基因组时代大规模获得候选基因全长 cDNA 的有效策略,课题组前期以当前公认较好的全长率较高的 SmartTM cDNA 文库构建试剂盒构建 cDNA 文库,所获得的全长 cDNA 所占的比例并不高,不能满足获得全长 cDNA 克隆的需要。本研究采用 DSN 均一化技术与 SmartTM 建库技术^[11]相结合,在此基础上对 mRNA 反转录及后续步骤进行改进,取得了较好的效果。具体改进的地方有:在 RT-PCR 前将 RNA 进行预变性打开二级结构后并迅速冷却用于反转录,采用更有利于长片段的扩增的两步法逆转录代替试剂盒中的反转录过程^[12],提高了文库的全长率;所有反转录及 PCR 扩增过程均采用热启动 PCR 法,防止了非特异性扩增,提高了目的片段的扩增效率;利用简易的半透膜胶回收法代替了试剂盒提供的葡聚糖柱分离法,更加直观地对文库进行了分级;分级后的 cDNA 用 2.5 倍体积的无水乙醇、3 mol/L 的 NaAc(pH 5.2) 并加入糖原(20 mg/mL) 进行沉淀,保证了 cDNA 的回收效率。cDNA 与载体的连接效率以及连接产物转化 DH10B 感受态细胞的效率高低直接决定了 cDNA 文库的滴度及文库的质量,本研究选用了半透膜对连接反应前的 cDNA 进行了纯化,提高了连接的效率。降低连接产物的盐浓度也可以有效提高转化效率,本研究对连接产物进行稀释,使转化效率提高了 4~5 倍。

根据 SSH 筛选到的差异表达 cDNA 片段所设计的引物筛选均一化的辣椒 cDNA 文库,1 人在一周时间内可获得 7 个以上的差异表达基因的全长 cDNA。表明本研究所建立的技术平台可用于辣椒应答逆境差异表达基因的全长 cDNA 的大规模分离,所分离的全长 cDNA 可进一步利用 Gateway 等高通量过表达或 VIGS(Virus induced gene silence)的载体构建系统构建系列载体,同时开展后续的功能基因组学研究。

参考文献:

[1] Baena-Gonzalez E, Rolland J M, Thevelein, et al. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy

- signalling [J]. *Nature* 2007 448(7156): 938 – 942.
- [2] Baena – Gonzalez E , Sheen J. Convergent energy and stress signaling [J]. *Trends Plant Sci* 2008 13(9): 474 – 482.
- [3] Weltmeier F , Rahmani F , Ehlert A , et al. Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development [J]. *Plant Mol Biol* 2009 69(1 – 2): 107 – 119.
- [4] Bonaventure G , Gfeller A , Rodriguez V M , et al. The *fou2* gain-of-function allele and the wild-type allele of two pore Channel 1 contribute to different extents or by different mechanisms to defense gene expression in Arabidopsis [J]. *Plant Cell Physiol* 2007 48(12): 1775 – 1789.
- [5] Rebrikov D V , Britanova O V , Gurskaya N G , et al. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization [J]. *Nucleic Acids Res* 2000 28(20): E90.
- [6] Faivre – Rampant O , Cardle L , Marshall D , et al. Changes in gene expression during meristem activation processes in *Solanum tuberosum* with a focus on the regulation of an auxin response factor gene [J]. *J Exp Bot* 2004 55(397): 613 – 622.
- [7] Shukla L I , Chinnusamy V , Sunkar R. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2008 , 1779(11): 743 – 748.
- [8] 储昭晖 , 彭开蔓. 水稻全生育期均一化 cDNA 文库的构建和鉴定 [J]. *科学通报* 2002 47(21): 1656 – 1662.
- [9] 李小庆 , 景志忠. 抑制性消减杂交技术的应用 [J]. *生物技术通报* , 2009 , 9: 46 – 50.
- [10] Kim M , Kim S , Ki B D. Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization [J]. *Mol Cells* 2001 11(2): 213 – 219.
- [11] Yim Y S , Moak P , Sanchez-Villeda H , et al. A BAC pooling strategy combined with PCR – based screenings in a large , highly repetitive genome enables integration of the maize genetic and physical maps [J]. *BMC Genomics* 2007 8: 47.
- [12] Jones L R , Zandomeni R O , Weber E L. A long distance RT – PCR able to amplify the *Pestivirus genome* [J]. *J Virol Methods* , 2006 , 134(1 – 2): 197 – 204.