



Gateway 技术构建结缕草低温和干旱诱导 cDNA 文库及其质量鉴定

王 舟^{1,2}, 宗俊勤¹, 郭海林¹, 刘建秀¹

(1. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014; 2. 广西梧州市产品质量监督检验所, 广西 梧州 543001)

摘要:为研究结缕草(*Zoysia japonica*)胁迫响应信号转导途径中的关键基因,揭示结缕草抗逆分子机制,建立结缕草功能基因组学研究基础平台,以经低温、干旱处理的结缕草为材料,采用 Gateway 技术构建了首个结缕草低温和干旱诱导的标准 cDNA 文库。文库质量分析表明,未扩增的原始文库滴度 1.76×10^6 pfu · mL⁻¹,库容 7.04×10^6 pfu,插入片段平均大小大于 1 kb,重组率 90%。文库质量优良,可能包含大量新基因,不仅能为结缕草功能基因组分析提供必要资源,也可为后期进行高通量 EST 测序、发掘新抗逆相关基因、制作基因芯片等研究奠定基础。

关键词:结缕草;cDNA 文库;低温胁迫;干旱胁迫;构建;Gateway 技术

中图分类号:S543+.903.4;Q945.78 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0629(2012)06-0911-07

结缕草(*Zoysia japonica*)是暖季型草坪草中最抗寒的草种,具有良好的耐旱、耐盐碱、耐践踏、耐瘠薄、抗病虫害等特性^[1-2],这决定了它拥有众多的优良性状和丰富的遗传多样性,是很好的研究植物抗性机制的草坪草。而如何有效发掘利用这些有利基因一直是研究的热点,但结缕草遗传背景复杂,通过常规的基因克隆方法获取有利基因存在许多问题,效率极低。cDNA 文库的构建是研究不同发育阶段和特定时期的基因表达、分离组织特异性基因以及克隆新型细胞因子的有利工具^[3-4]。由于 cDNA 文库是生物体在特定发育时期转录的全部 mRNA 经反转录而成的 cDNA 片段与载体连接形成的克隆的集合,故不含有内含子^[5-6]。源于这些 cDNA 片段的短的、单向测定的序列片段即为表达序列标签(Expressed Sequence Tag, EST),是一种发现新基因和研究基因表达谱的有效工具^[7-8]。通过大规模的 EST 测序分析,可以获得基因组中编码序列区的核苷酸全序列图,并可通过已知功能基因的相似性分析推测每条 EST 所代表基因的功能。自 20 世纪 70 年代中期首例 cDNA 克隆问世以来,cDNA 文库已经被广泛应用于构建遗传学图谱、分离与鉴定新基因、基因差异表达和比较基因组学、功能基因组学

等研究^[9]。目前拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[10-11]、水稻(*Oryza sativa*)^[12]、小麦(*Triticum aestivum*)^[13]、玉米(*Zea mays*)^[14]和棉花(*Gossypium hirsutum*)^[15-16]等重要植物的全长 cDNA 文库已成功构建并用于后期蛋白质表达及功能分析^[17-18]。近年来,EST 和 cDNA 文库筛选已成为一种高效率、低成本的发现未知新基因的快捷技术^[9,19-20]。特别是对非模式物种,通过 cDNA 文库筛选目的基因更具明显优势^[21]。

相对于拟南芥、水稻、小麦等植物,结缕草的分子生物学研究还属起步阶段,多集中于采用分子标记手段进行遗传分析及亲缘关系的鉴定^[22-25],而对功能基因的分离研究鲜有报道。截至目前,GenBank 中登录的来源于结缕草的核苷酸序列仅有 197 条,远远落后于其他园艺观赏植物,而 dbEST 中甚至没有结缕草 EST 的登录信息记录。在这 197 条序列中绝大部分为叶绿体相关基因,其次为线粒体相关基因、NADH 脱氢酶基因等,而对这些基因的研究多是用作分子标记为鉴定结缕草品种亲缘关系服务的。结缕草基因的分离主要是通过蛋白质纯化、N 端氨基酸序列分析以及 RACE 等方法获得,而有关结缕草 cDNA 文库方面的研究国内外尚

收稿日期:2011-08-26 接受日期:2011-11-16

基金项目:江苏省特色观赏植物资源收集、开发和服务体系建设项目(BM2009905)

作者简介:王舟(1981-),男,广西南宁人,助理研究员,博士,主要从事分子生物学与分子遗传学研究。E-mail:keiffer@126.com

通信作者:刘建秀 E-mail:turfunit@yahoo.com.cn

未见报道。

为进一步获取结缕草抗逆信号转导途径中的关键基因信息,从分子水平深入挖掘和利用结缕草潜在的基因资源,完善其基因组信息,本研究以坪用价值高的优良结缕草品种 Meyer 为建库材料,经低温和干旱诱导处理,采用先进的 Gateway 技术首次成功地构建了包含结缕草抗寒、抗旱特异性表达基因的高质量 cDNA 文库,旨在为今后大规模 EST 测序、基因表达谱分析、分离克隆具有育种价值的抗逆相关基因,研究其功能及代谢途径和网络提供理论依据和技术支撑,为开展分子育种工作开辟一条新的途径。这对改善我国草坪业的自主知识产权现状具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 供试结缕草品种为美国引进的优良品种 Meyer (*Z. japonica* cv. Meyer)。对在自然条件下萌发生长 6 周的健壮植株分别进行低温和干旱处理。1) 低温处理:将材料置于 4 °C 下冷处理 5~6 h; 2) 干旱处理:将材料置于 25 °C 人工培养箱中,停止浇水 4~5 d,直至土壤出现龟裂。收集上述处理材料的叶片用液氮速冻后, -80 °C 保存备用。

1.1.2 文库载体 pCMV · SPORT6,具有 Gateway 兼容性 (Gateway Compatibility),在其多克隆位点 (Multiple Cloning Site, MCS) 的两侧翼含有 Gateway *attB1* 和 *attB2* 重组位点。

1.1.3 主要试剂 cDNA 文库构建试剂盒 (SuperScript™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning)、RNA 提取试剂 (TRIzol Reagent)、mRNA 分离试剂盒 (FastTrack 2.0 Kit)、反转录试剂盒 (SuperScript™ II First-Strand Synthesis System for RT-PCR)、DNA 分子量标记 (1 kb Plus DNA Ladder)、超纯琼脂糖 (UltraPure™ Agarose)、热启动型 DNA 聚合酶 (Platinum Taq DNA Polymerase)、dNTP 混合液 (100 mmol · L⁻¹ dNTP Set)、超纯酚:氯仿:异戊醇 [UltraPure™ Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1, 体积比)] 均购自 Invitrogen 公司,分子生物学用醋酸铵 [Ammonium acetate solution for molecular biology (7.5 mol · L⁻¹)] 购自 Sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 分别取 -80 °C 下保存的低温、干旱诱导后的两种样品各 100 mg 混合,于加有液氮的研钵中迅速研磨后,转移至 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中,立即加入 1 mL TRIzol 提取液,混匀后,后续的操作参照 TRIzol 说明书进行总 RNA 的提取。沉淀用 75% 乙醇洗涤,DEPC 处理水溶解,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和稳定性,并用紫外分光光度计测定 RNA 的纯度及含量。

1.2.2 mRNA 的分离 取大于 500 μg 的总 RNA,参照试剂盒 FastTrack 2.0 Kit 操作说明书分离和纯化 mRNA。

1.2.3 双链 cDNA 的合成 取 5 μg 的 mRNA,按照试剂盒 SuperScript™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning 使用说明进行操作,SuperScript™ II RT 酶合成 cDNA 第 1 链。随后,参照试剂盒操作程序合成 cDNA 第 2 链。

1.2.4 柱层析分级分离及收集 取 25 μL cDNA 与 10 μL *Sal* I 接头 (50 ng · μL⁻¹), T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜。连接产物用限制性内切酶 *Not* I 于 37 °C 酶切 3 h,产生粘性末端。酶切产物过 cDNA Size Fractionation Columns 柱 (试剂盒提供),并按试剂盒使用说明收集前 150 ng 的 cDNA 产物。

1.2.5 连接载体 依试剂盒要求取 10 μL cDNA 与 1 μL *Not* I-*Sal* I-Cut pCMV · SPORT6 载体,在 T4 DNA 连接酶作用下室温反应 3~5 h 或 4 °C 连接过夜。

1.2.6 电转化大肠杆菌 DH10B 参照试剂盒说明书,在冰上将 2 μL 连接产物和 50 μL 电转感受态细胞 DH10B 加入电转杯。TX ECM 630 电转化仪上电击条件设置为:电压 2.0 kV,电阻 200 Ω,电容 25 μF。电击后迅速向电转杯中加入冰上预冷的 SOC 培养基 1 mL。将电转物全量转移至新的 1.5 mL 离心管中,37 °C 225~250 r · min⁻¹ 振荡培养 1 h,获得原始文库。

1.2.7 文库质量评价

1) 滴度和库容量鉴定:取电转化后的原始文库原液 10 μL 稀释 1 000 倍后,从中取出 50 μL 涂布于 IPTG/X-Gal 的 LB 平板 (含 100 μg · mL⁻¹ 氨苄青霉素) 上,37 °C 培养过夜,次日统计菌落数。

$$\text{滴度}(\text{pfu} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{\text{平板上克隆数}}{\text{涂板体积}} \times \text{稀释倍数} \times 10^3;$$

$$\text{库容量}(\text{pfu}) = \text{滴度} \times \frac{\text{文库菌液总体积}}{\text{转化用连接产物体积}} \times \text{连接产物总体积}.$$

2) 插入片段大小及重组率鉴定: 从原始文库中随机挑取 50 个单克隆, 以 M13F-M13R 为引物, PCR 检测插入片段大小并估计文库重组率。95 °C 变性 5 min 裂解菌体后, 加入 PCR 反应混合物, 扩增反应条件为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析插入片段的大小。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取 RNA 的完整度与稳定性决定了 cDNA 的质量, 是构建高质量 cDNA 文库的关键。提取经低温、干旱诱导后的结缕草叶片总 RNA, 取 2 μL RNA 溶液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳结果可见两条清晰的 28S 和 18S rRNA 条带(图 1), 表明提取的总 RNA 具有良好的完整度及稳定性。紫外分光光度计检测 RNA 溶液的 OD 值, 测得 $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}} = 1.90$, 说明 RNA 纯度较好, 可以用来分离 mRNA, 为建立高质量结缕草 cDNA 文库奠定了基础。

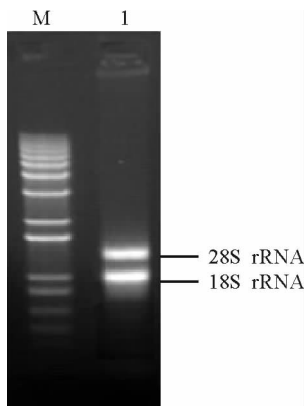


图 1 提取的结缕草总 RNA

Fig. 1 Total RNA isolated from *Zoysia japonica*

注: M 为 DNA 分子量标准; 1 为总 RNA。

Note: M, DNA ladder marker; 1, Total RNA.

2.2 mRNA 的分离与纯化 采用 FastTrack 2.0 Kit 试剂盒从总 RNA 中分离和纯化 mRNA。电泳检测显示, mRNA 呈均匀弥散状(图 2), 主要分

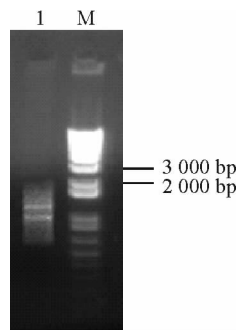


图 2 分离和纯化后的 mRNA

Fig. 2 Isolated and purified mRNA

注: 1 为 mRNA; M 为 DNA 分子量标准。

Note: 1, mRNA; M, DNA ladder marker.

布在 1 000 bp 以上, 质量良好, 符合建库的要求。

2.3 反转录与双链 cDNA 的合成 用约 5 μg mRNA 反转录合成双链 cDNA(ds cDNA), 取 5 μL 反转录产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳结果可见, ds cDNA 呈弥散状条带, 主要分布于 1 000 bp 以上(图 3), 说明不同大小和不同丰度的 mRNA 都得到了有效的反转录和扩增, 满足建库的需要。

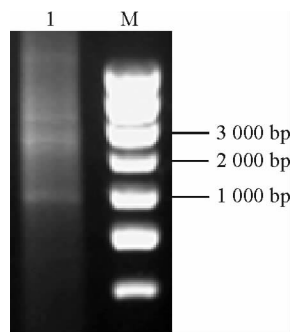


图 3 反转录合成的双链 cDNA

Fig. 3 Double-stranded cDNA synthesized by reverse transcription

注: 1 为 cDNA; M 为 DNA 分子量标准。

Note: 1, cDNA; M, DNA ladder marker.

2.4 文库质量评价

2.4.1 cDNA 原始文库的滴度和库容量鉴定 原始文库滴度可估计 cDNA 文库的克隆数, 同时还代表了 mRNA 的复杂度。将过柱收集的 cDNA 片段与质粒载体 pCMV · SPORT6 连接后, 转化到受体菌 DH10B。按照 SuperScript™ Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning 试剂盒提供的方法进行文库滴度和库容量的测定。

一个高质量的文库,其滴度应大于 1×10^6 pfu \cdot mL⁻¹,库容量应大于 5×10^6 pfu^[26],能保证低丰度基因的出现频率达到 99%^[27]。原始文库稀释 1 000 倍后,取 50 μ L 涂布,获得克隆数 88 个,经计算得到文库的滴度为 1.76×10^6 pfu \cdot mL⁻¹,库容量为 7.04×10^6 pfu。由此可见,本研究构建的结缕草低温和干旱诱导 cDNA 文库是一个较高质量的文库,足以克隆到低丰度表达的基因。

2.4.2 插入片段大小和重组率鉴定 插入片段大小

和重组率是评价 cDNA 文库质量的另外两个重要指标。从原始文库中随机挑取的单克隆 PCR 检测结果表明,文库重组率达到 90%。插入片段最大可达 2.5 kb,主要集中在大于 1 kb 的区域(图 4)。植物 cDNA 一般为 0.5~3.0 kb,大多大于或等于 1 kb^[28]。本研究构建的文库符合构建高质量文库的标准,文库中长片段所占比例较大,表明插入片段序列的完整性较好,适合以后的测序及后续筛选基因与基因功能的研究。

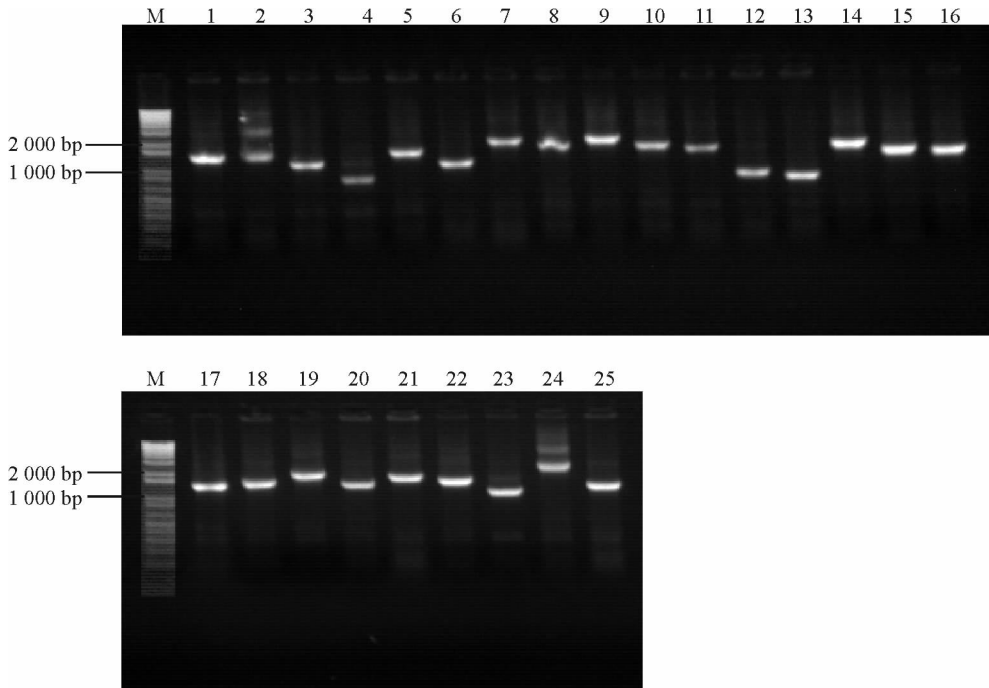


图 4 cDNA 文库插入片段大小的 PCR 检测

Fig. 4 PCR analysis of insert size in the cDNA library

注:M 为 DNA 分子量标准;1~25 为随机挑取的菌落 PCR 产物。

Note:M, DNA ladder marker; 1~25, PCR products of randomly picked clones.

3 讨论

植物基因组的研究已经由以全基因组测序为目标的基因组学转向功能基因组学,通过 cDNA 文库筛选分离全长基因和开展基因功能研究已成为功能基因组学研究的基本手段之一。cDNA 文库代表了 mRNA 的反转录副本^[29-31],高质量 cDNA 文库的构建是大规模 EST 测序的必要保证,也是有效研究基因表达的基础。cDNA 文库的质量主要反映在两个方面:一是文库的代表性,即文库中含有的 cDNA 种类的完整性。只有足够的克隆数才能保证拥有一定数量的低丰度表达的 mRNA,反映来源细胞

中所表达的全部遗传信息。其可用滴度和库容量的大小来定量衡量,滴度越大表明获得目的基因的可能性越大。二是插入 cDNA 片段的序列完整性。只有大部分克隆含有接近全长的 cDNA 插入,文库才能体现天然的、完整的遗传信息,即插入片段的大小越大,表明分离到基因全长的可能性越大。本研究对结缕草供试材料进行了低温和干旱的诱导处理,可以大幅度提高目的诱导基因的表达丰度,理论上即使是低丰度的基因也可以获得筛选。此外,从 PCR 鉴定文库质量的结果来看,cDNA 片段插入重组率高达 90%,这也为今后基因分离的效率提供了

有力保证。

文库的滴度、重组率和插入片段的大小是鉴定 cDNA 文库质量的重要指标^[4,32]。滴度的高低是能否通过筛选 cDNA 文库获得目的基因的衡量依据,高库容量是文库测序获得非重复 EST 的保证^[32]。一般而言,在典型的真核生物中每时每刻表达的 mRNA 约占生物所有基因的 15%,约 1.5 万种,其中低丰度 mRNA 种类约占 30%^[33]。为使文库中出现某种低丰度的 mRNA 这一事件的发生达到给定的概率,则文库所需的独立克隆数,可以通过 Clack-Carbon 公式 $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$ (N 为实际所需克隆数, P 为要求的概率, f 为 $1/n$, n 为某一类型的稀有 mRNA 在总 mRNA 中所占的相对比例) 计算。当要求筛选到某低丰度 mRNA 的概率为 99% 时,由上述公式计算出的文库所需克隆数应不低于 1.7×10^5 pfu · mL⁻¹, 此即为有效的文库^[32]。但为满足筛选到低丰度 mRNA 的要求,一般 cDNA 文库构建要求其滴度不少于 1×10^6 pfu · mL⁻¹^[34]。构建文库过程中,片段分级分离与载体连接时,cDNA 片段大小与 cDNA 浓度对建库的影响至关重要,如不能有效去除小片段 cDNA,则其会优先与载体连接,导致文库平均插入片段过小,严重影响文库质量,但过度筛选 cDNA 片段,则会造成文库的初始滴度下降,从而丢失一些基因信息。分级分离的标准一般是回收 500 bp 以上的 cDNA 片段^[35]。针对构建文库筛选功能基因全长的目的,本研究在保证插入片段较大的同时,兼顾了文库的滴度。经检测,本研究所构建的 cDNA 原始文库滴度为 1.76×10^6 pfu · mL⁻¹,保证了文库的完整性与覆盖度,理论上包含了胁迫诱导后结缕草叶片中表达的所有基因^[32,36-37];插入片的平均大小超过 1 kb,重组率为 90%,表明序列的完整性很高,能够包含绝大多数基因表达的 cDNA 信息,保证了在通过筛选 cDNA 文库获取目的基因时稀有基因不会被遗漏^[32,36-37]。由此可见,所构建的文库达到了完整、有效并且高质量的标准,满足分离低丰度表达基因序列的要求,可用于后续筛选其中特异表达的低丰度基因、组织特异性基因表达谱分析、基因组序列的功能注释以及功能基因在转录及翻译水平上调控的分子机制等许多领域的研究。通过 EST 测序、分子杂交、扣除法等技术探明结缕草生长、发育、次生代谢和生化合成途径及对环境胁迫反应的分子机理^[38-40],不仅为后期

在分子水平上调控结缕草的生长、发育和抗逆性奠定了实验基础,还提供了技术平台和良好的前提材料。

本研究是利用 Gateway 技术构建的高质量全长 cDNA 文库,因此文库所分离的 cDNA 克隆包含了相对应的 mRNA 分子完整的序列。此文库所用的克隆载体 pCMV · SPORT6,具有 Gateway 兼容性,在其多克隆位点的双侧翼含有 Gateway 位点特异性的重组位点 (*attB1* 和 *attB2*),cDNA 克隆位点即位于多克隆位点内。因此,通过位点特异性重组就可将从文库分离到的克隆快速转化至其他 Gateway 载体,而无需经过限制性内切酶的酶解和连接酶的连接。Gateway 克隆可以方便地用于 DNA 测序、RNA 探针制备或者表达重组蛋白。此外,在文库构建的过程中第 2 链合成采用的是置换合成法,而没有采用 PCR 扩增,能够保持材料中的 mRNA 原始丰度,而不会由于 PCR 扩增效率的不同,使得原始丰度在文库中反映失真,这使一些较低拷贝数基因的克隆具有优势。同时,作为优化的文库系统及后期大规模测序结果可以应用于进一步的芯片制作。

cDNA 文库筛选和 RACE 技术是两种获得全长 cDNA 最重要的方法,其中 cDNA 文库筛选还具有高通量的特点,适合于大规模获得全长 cDNA。在此基础上分析不同基因在逆境胁迫过程中的表达,从中筛选出特异性表达的基因,进一步分析其功能,并最终研究抗逆相关基因调控网络,为育种工作奠定理论基础。与农作物(如水稻、小麦等)相比,国内外对草坪草和牧草的开发利用,特别是分子生物学相关研究,还处于起步阶段。本研究构建了低温和干旱诱导的结缕草叶片 cDNA 文库,文库中功能基因的数量、基因表达的丰度与结缕草自身抗寒、抗旱等抗逆性密切相关。目前在公共数据库中,报道结缕草 cDNA 文库尚属首次。此高质量文库的成功构建是鉴定和克隆相关重要功能基因及开展分子育种的重要平台,有助于深入了解结缕草遗传背景,揭示其抗逆性的分子机理,为进一步获得拥有自主知识产权的抗逆新品种提供了有力的保障,具有重要的应用价值。

参考文献

[1] 王舟,宗俊勤,宣继萍,等. 结缕草肌动蛋白基因全长

- cDNA 的克隆及序列分析[J]. 草业学报, 2010, 19(6): 154-163.
- [2] 胡利珍, 关贤交, 杨知建, 等. 野生结缕草坪用性状的综合评价[J]. 草业科学, 2010, 27(10): 23-26.
- [3] Galaud J P, Carrière M, Pauly N, *et al.* Construction of two ordered cDNA libraries enriched in genes encoding plasmalemma and tonoplast proteins from a high-efficiency expression library[J]. The Plant Journal, 1999, 17: 111-118.
- [4] 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): 52-56.
- [5] Gubler U, Hoffman B J. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries[J]. Gene, 1983, 25: 263-269.
- [6] Miller J, Stagljar I. Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins[J]. Methods in Molecular Biology, 2004, 261: 247-262.
- [7] Wang Y C, Chu Y G, Liu G F, *et al.* Identification of expressed sequence tags in an alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) cDNA library[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164: 78-89.
- [8] 杨满业, 王丽焕, 叶焯辉, 等. 干旱胁迫下赖草抑制性消减文库的构建与分析[J]. 草业科学, 2011, 28(7): 1320-1325.
- [9] Wiemann S, Mehrle A, Bechtel S, *et al.* cDNAs for functional genomics and proteomics; the German Consortium [J]. Comptes Rendus Biologies, 2003, 326: 1003-1009.
- [10] Seki M, Carninci P, Nishiyama Y, *et al.* High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper[J]. The Plant Journal, 1998, 15: 707-720.
- [11] Seki M, Narusaka M, Kamiya A, *et al.* Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection [J]. Science, 2002, 296: 141-145.
- [12] Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, *et al.* Collection, mapping, and annotation of over 28 000 cDNA clones from japonica rice[J]. Science, 2003, 301: 376-379.
- [13] Ogiwara Y, Mochida K, Kawaura K, *et al.* Construction of a full-length cDNA library from young spikelets of hexaploid wheat and its characterization by large-scale sequencing of expressed sequence tags[J]. Genes and Genetic Systems, 2004, 79: 227-232.
- [14] Jia J P, Fu J J, Zheng J, *et al.* Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNAs from stress-induced maize (*Zea mays* L.) seedlings [J]. The Plant Journal, 2006, 48: 710-727.
- [15] Haigler C H, Zhang D, Wilkerson C G. Biotechnological improvement of cotton fibre maturity[J]. Physiology Plantarum, 2005, 124: 285-294.
- [16] Udall J, Swanson J, Haller K, *et al.* A global assembly of cotton ESTs [J]. Genome Research, 2006, 16: 441-450.
- [17] Qi J L, Zhang W J, Liu S H, *et al.* Expression analysis of light-regulated genes isolated from a full-length-enriched cDNA library of *Onosma paniculatum* cell cultures [J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165: 1474-1482.
- [18] Haas B J, Volfovsky N, Town C D, *et al.* Full-length messenger RNA sequences greatly improve genome annotation [J]. Genome Biology, 2002, 3(6): research0029. 1-research0029. 12.
- [19] 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 Research, 2000, 10: 1617-1630.
- [20] Wellenreuther R, Schupp I, The German cDNA Consortium, *et al.* SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones[J]. BMC Genomics, 2004, 5: 36.
- [21] 李冬花, 姚丽娟, 余有本, 等. 特异茶树种质紫阳 1 号 cDNA 文库构建及 ESTs 初步分析[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 36(3): 347-350.
- [22] 郭海林, 郑轶琦, 陈宣, 等. 结缕草属植物种间关系和遗传多样性的 SRAP 标记分析[J]. 草业学报, 2009, 18(5): 201-210.
- [23] 陈宣, 郭海林, 薛丹丹, 等. 结缕草属植物耐盐性 SRAP 分子标记研究[J]. 草业学报, 2009, 18(2): 66-75.
- [24] 陈宣, 薛丹丹, 郭海林, 等. 结缕草属植物 RAPD 反应体系的优化[J]. 草地学报, 2009, 17(2): 181-186.
- [25] 薛丹丹, 郭海林, 郑轶琦, 等. 结缕草属植物杂交后代杂种真实性鉴定——SRAP 分子标记[J]. 草业学报, 2009, 18(1): 72-79.
- [26] 刘志伟, 张智俊, 韩国民, 等. 毛竹笋全长 cDNA 文库构建[J]. 生物技术通报, 2010(2): 98-101.
- [27] 张翹, 戴国飞, 刘军立, 等. 盐胁迫下杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) cDNA 文库的构建与新表达序列标签 (EST) 的获取、分析[J]. 武汉大学学报(理学版), 2009, 55(3): 348-353.
- [28] 王丽娟, 金治平, 王能飞, 等. 羊草叶片 cDNA 文库的

- 构建及部分表达序列标签的分析[J]. 草业学报, 2009, 18(1): 65-71.
- [29] Li F, Jin Z, Qu W, *et al.* Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44: 455-461.
- [30] Tan W, Chen Y, Zhang L, *et al.* Construction and characterization of a cDNA library from liver tissue of Chinese banna minipig inbred line[J]. *Transplantation Proceedings*, 2006, 38: 2264-2266.
- [31] Tian B, Lin Z B, Ding Y, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA encoding Ran binding protein from wheat[J]. *DNA Sequence: The Journal of Mapping, Sequencing and Analysis*, 2006, 17: 136-142.
- [32] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 857-914.
- [33] Ramani B, Reeck T, Debez A, *et al.* *Aster tripolium* L. and *Sesuvium portulacastrum* L.: Two halophytes, two strategies to survive in saline habitats[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44: 395-408.
- [34] Clarke L, Carbon J. A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome[J]. *Cell*, 1976, 9: 91-99.
- [35] 张震, 王教瑜, 杜新法, 等. 稻曲病菌 cDNA 文库的构建[J]. 植物病理学报, 2008, 38(5): 462-467.
- [36] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 338-339.
- [37] 吴东, 刘俊杰, 喻树迅, 等. 中棉所 36 均一化全长 cDNA 文库的构建与鉴定[J]. 作物学报, 2009, 35(4): 602-607.
- [38] Sterky F, Regan S, Karlsson J, *et al.* Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: Analysis of 5,692 expressed sequence tags[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1998, 95: 13330-13335.
- [39] Lange B M, Wildung M R, Stauber E J, *et al.* Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2000, 97: 2934-2939.
- [40] Sugui J A, Deising H B. Isolation of infection-specific sequence tags expressed during early stages of maize anthracnose disease development[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2002, 3: 197-203.

Construction and identification of a cold- and drought-induced cDNA library from zoysiagrass using Gateway technology

WANG Zhou^{1,2}, ZONG Jun-qin¹, GUO Hai-lin¹, LIU Jian-xiu¹

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province & Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Wuzhou Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Wuzhou 543001, China)

Abstract: The first cDNA library was constructed using Gateway technology from zoysiagrass (*Zoysia japonica*) subjected to cold-and drought-stress treatments. Quality assessment showed that the titer of unamplified library was 1.76×10^6 pfu \cdot mL⁻¹ and the capacity was 7.04×10^6 pfu. The average insert size was larger than 1 kb with the recombination efficiency of 90%. It was suggested that the cDNA library was successfully generated in high quality; most likely containing lots of novel genes. The library may provide an essential resource for future functional genomic analysis of zoysiagrass and could be an effective tool for further studies on high-throughput EST sequencing, for example, new stress-responsive genes screening, gene chips preparing.

Key words: *Zoysia japonica*; cDNA library; cold stress; drought stress; construction; Gateway technology