

# Gateway 技术构建菊芋块茎全长 cDNA 文库及 EST 测序分析

杨少丽\*, 秦 松\*

(中国科学院烟台海岸带研究所, 中国山东 烟台 264003)

**摘 要:** 为丰富菊芋功能基因组学研究基础平台, 以成熟期菊芋块茎为材料, 将菊芋全长 cDNA 与 Gateway 供体载体 pDONR222 重组, 构建了菊芋非剪切型全长 cDNA 文库。文库质量分析表明: 未经扩增的原始文库库容量为  $5.76 \times 10^6$  CFU, 插入片段大小主要为 1~3 000 bp, 重组率为 100% (24/24), 达到了高质量文库的标准。利用该文库进行表达序列标签(expressed sequence tag, EST)测序, 得到 2 639 条高质量的 EST 序列, 拼接后获得 1 895 条非重复的唯一表达序列(unigene)。与 NCBI 的 NR 数据库同源比对分析表明, 共有 1 533 条 unigene (80.9%)与已知基因有显著的同源性。GO 分类结果显示: 菊芋块茎表达基因在分子功能类群中, 结合和催化活性所占比例最高。此 cDNA 文库将可用于菊芋功能基因组研究、新基因筛选、高通量 EST 测序以及菊芋 cDNA 芯片的制备等。

**关键词:** 菊芋; cDNA 文库; Gateway 技术; 表达序列标签(EST); 基因注释

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2018)05-0370-05

## Construction of a cDNA Library Using Gateway Technology and Analysis of Expressed Sequence Tags (ESTs) from Jerusalem Artichoke

YANG Shao-li\*, QIN Song\*

(Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong, China)

**Abstract:** A full-length cDNA library was constructed from the tuber of Jerusalem artichoke by recombining the full-length cDNAs with the Gateway donor vector of pDONR222 for gene discovery and functional characterization. The cDNA library quality analysis showed that the capacity of original library was  $5.76 \times 10^6$  CFU. The inserted fragments were mainly in the range of 1~3 000 bp and the recombination rate was 100% (24/24). These results indicated that the cDNA library had a high quality. EST sequencing was conducted and 2 639 high-quality ESTs were obtained, and 1 895 unigenes were obtained after assembly. NCBI database (NR) homologous alignment analysis showed that a total of 1 533 unigenes (80.9%) had significant homology with known genes. GO classification showed that the proportion of binding and catalytic activity were highest among the molecular function taxon. The cDNA library can be well used for functional genomics, novel gene screening, high-through EST sequencing and the preparation of cDNA microarray of Jerusalem artichoke.

**Key words:** Jerusalem artichoke; cDNA library; Gateway technology; expressed sequence tag (EST); gene annotation

(*Life Science Research*, 2018, 22(5): 370~374)

收稿日期: 2018-05-09; 修回日期: 2018-06-14

基金项目: 烟台市科技计划项目(2015ZH067); 国家自然科学基金资助项目(41001336)

作者简介: 杨少丽(1979-), 女, 山东烟台人, 博士, 助理研究员, 主要从事海岸带生物学研究, E-mail: slyang@yic.ac.cn; 秦松(1968-), 男, 山东莱州人, 博士, 中国科学院烟台海岸带研究所研究员, 主要从事海岸带植物资源保育及利用研究, E-mail: sqin@yic.ac.cn; \* 杨少丽和秦松为本文共同通讯作者。

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)俗名洋姜、鬼子姜,是一种兼具产业化开发及生态应用价值的植物,被联合国粮农组织称为“21世纪人畜共用作物”,开发前景十分广阔。菊芋病虫害少,产量高,适应性极强,能耐旱、耐贫瘠、耐盐碱。菊芋全身都可利用,是工业(燃料乙醇)、农业(饲料)、食品、保健品等行业的重要原料<sup>[1,2]</sup>。菊芋块茎含有丰富的菊糖,具有特殊的保健作用,既可以食用,又可进行深加工,制成菊粉、低聚果糖、食品添加剂、水溶性膳食纤维等功能食品<sup>[3,4]</sup>。另外,菊芋能在滩涂、盐碱地、边际地种植,不与地争粮,同时是优良的固沙植物,具有重要的生态应用价值,目前已被用于开发中国废弃盐碱地等<sup>[5-7]</sup>。

目前虽然有部分报道对菊芋 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>转运蛋白基因、金属硫蛋白基因、果糖基转移酶基因等功能基因进行了克隆分析、初步转化验证等方面的研究<sup>[8-10]</sup>,但功能基因的鉴定与研究仍然相对滞后,可利用的基因组信息较少,这在一定程度上阻碍了菊芋遗传资源的有效开发和利用。构建 cDNA 文库能够全面发掘组织、器官的新基因,是系统研究功能基因的重要方法。目前 cDNA 文库被广泛应用于大规模功能及比较基因组学、转录组学等研究,并成为生物、医学等领域克隆相关性状基因的重要方法和途径<sup>[11-13]</sup>。许多生物如欧洲油菜(*Brassica napus*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、葡萄(*Vitis vinifera*)等的 cDNA 文库已被构建,积累的表达序列标签(expressed sequence tag, EST)数据变得越来越庞大,极大地促进了相关物种功能基因组学的研究<sup>[14-16]</sup>。然而,菊芋 EST 报道尚少,在 NCBI 的 GenBank 数据库中公布的菊芋 EST 仅有 4 万余条,数量远低于玉米、水稻、葡萄等其他作物。因此,菊芋 EST 的获得,尤其是重要成熟阶段 EST,显得非常必要和迫切。

传统的 cDNA 文库构建涉及酶切和连接酶的连接步骤,而这一过程会使 cDNA 被酶切损失,也容易造成低拷贝数基因克隆的丢失。此外,建库过程需要 PCR,这会使文库 cDNA 产生偏向性。利用 Gateway 技术构建文库,通过 BP 反应就可将 cDNA 片段重组至目的载体,整个过程无需酶切、连接,克隆效率非常高,并且能够较大程度地避免低拷贝数基因克隆的丢失,可使材料中 mRNA 的原始丰度在文库中得以真实的反映<sup>[15,17]</sup>。此外,应用 Gateway 技术成功构建入门载体后,通过 LR 反应即可将目的基因迅速且定向地重组

到各种表达系统如细菌、酵母或昆虫中进行基因的表达分析<sup>[18,19]</sup>。

块茎是菊芋的可食部分,其中菊糖含量占干物质的 80%以上,具有多种保健功能,是菊粉产业的主要原料<sup>[2-4]</sup>。而且,菊芋块茎中菊粉的聚合度(DP 值)一般较低,其中 DP 值大于 10 的寡聚糖仅占 20%左右,较易实现微生物转化,是燃料乙醇的理想底物<sup>[1,2]</sup>。对菊芋块茎组织基因的转录表达特征进行全面考察将有助于了解其特定的功能体系。本研究首次通过 Gateway 技术构建菊芋块茎全长 cDNA 文库,并进一步进行 EST 序列测定分析,以期丰富菊芋的遗传信息库,为菊芋的深入研究及开发利用提供分子信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 总 RNA 的提取

新鲜菊芋块茎取自山东莱州盐碱地。将菊芋块茎用生理盐水冲洗干净并切成小块,放入研钵中加上液氮充分研磨后,加入 Trizol 提取液(Invitrogen 公司,美国)按照说明书提取总 RNA。使用分光光度计测量 RNA 浓度。RNA 产量计算如下: RNA 产量( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )= $A_{260} \times 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  RNA  $\times$  稀释因子。用溴化乙锭染色的 1%琼脂糖-甲醛凝胶电泳检测 RNA 质量。

### 1.2 mRNA 的分离

使用 FastTrack 2.0 mRNA 分离试剂盒(Invitrogen 公司,美国),按照说明书对符合要求的 RNA 进行 mRNA 分离。用 1%琼脂糖凝胶电泳确认 mRNA 的质量,用紫外分光光度法测定 mRNA 浓度。

### 1.3 cDNA 文库构建

对菊芋块茎 mRNA 纯化和质检后,使用 CloneMiner II cDNA 文库构建试剂盒(Invitrogen 公司,美国)构建 cDNA 文库。合成双链 cDNA 后,加入 T<sub>4</sub> DNA 聚合酶使双链 cDNA 平末端化。向双链 cDNA 产物中加入 10  $\mu\text{L}$  5 $\times$  Adapter Buffer、10  $\mu\text{L}$  1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  attB1 接头、7  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L DTT,在 T<sub>4</sub> DNA 连接酶的作用下 16  $^{\circ}\text{C}$  孵育 16~24 h,使得在双链 cDNA 的 3'末端连接上 attB1 序列。将上述产物上样于 cDNA Size Fractionation Columns,对 cDNA 片段进行分离,收集大小主要在 500~4 000 bp 之间的双链 cDNA。将收集的双链 cDNA 与 250 ng pDONR222 质粒混合,通过 BP 重组反应连接载体。在冰上将 2  $\mu\text{L}$  重组产物和 50  $\mu\text{L}$

DH10B 感受态细胞(北京博迈德基因有限公司)混合,电击转化后加入 SOC 培养基(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),37 °C、225~250 r/min 摇床培养 1 h,获得原始文库。测定文库容量后,剩余培养物加入甘油至终浓度 20%存于-80 °C。

#### 1.4 cDNA 文库质量鉴定

取转化后的细菌原液 10  $\mu$ L,分别稀释 10、100、1 000 倍后,各取 50  $\mu$ L 涂布 SOC 琼脂平板,37 °C 过夜孵育,次日统计菌落数目。文库滴度(CFU/mL)=培养皿中单菌落数 $\times$ 稀释倍数/涂布菌液体积,原始库容量(CFU)=文库滴度(CFU/mL) $\times$ 文库体积(mL)。随机挑取 24 个单克隆,以 M13F-M13R 为引物(宝生物工程大连有限公司),通过 PCR 的方法检测插入片段大小并估计文库重组率。

#### 1.5 EST 测序及分析

随机挑取 2 800 个阳性克隆送交华大基因进行测序。获得 EST 片段后利用 Phrap 软件对 EST 片段进行组装。样本基因序列分别与 NCBI 的蛋白质库 NR 进行比对,取相似度>30%且  $E < 1E^{-5}$  的注释。基于比对 Uniprot 的结果对基因进行分子功能、细胞成分以及生物过程方面的 GO 功能分类注释。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 分离纯化

用 Trizol 试剂提取菊芋块茎总 RNA,取 2  $\mu$ L RNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳结果如图 1A 所示,28S 与 18S rRNA 条带清晰,亮度比大约为 2:1,且无其他杂带,说明提取的 RNA 未发生降解,质量良好。经分光光度法测定 RNA 的总产量约为 980  $\mu$ g,  $A_{260}/A_{280}=2.02$ ,比值接近 2,说明提取的总 RNA 基本无蛋白质污染,纯度较高,可以用来分离 mRNA。使用 FastTrack 2.0 mRNA 分离试剂盒从总 RNA 中分离和纯化 mRNA,电泳结果如图 1B 所示,mRNA 呈弥散状,且无杂带污染,表明分离的 mRNA 质量较高,为建立高质量菊芋 cDNA 文库奠定了基础。

### 2.2 菊芋 cDNA 文库的构建及质量鉴定

按照 CloneMiner II cDNA 文库构建试剂盒提供的方法构建菊芋 cDNA 文库。原始文库稀释 1 000 倍后,取 3 个平板进行涂布,每个平板涂布 50  $\mu$ L,获得每个平板的克隆平均数为 96 个,经计算得文库滴度为  $1.92 \times 10^6$  CFU/mL,库容量为  $5.76 \times 10^6$  CFU,说明 cDNA 文库的丰富度较好。采

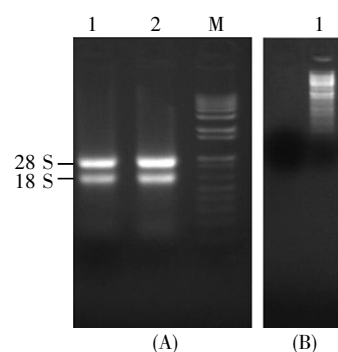


图 1 总 RNA 提取及 mRNA 分离纯化的琼脂糖凝胶电泳图

(A) 菊芋块茎总 RNA 电泳图。1, 2: 总 RNA, M: DNA 相对分子质量标准; (B) mRNA 电泳图。1: 纯化后的 mRNA。

### Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA and mRNA

(A) Electrophoresis of total RNA from Jerusalem artichoke tuber. 1, 2: Total RNA; M: DNA marker. (B) Result of mRNA electrophoresis. 1: Purified mRNA.

用菌落 PCR 的方法检测插入片段大小并估计文库重组率,结果如图 2 所示,插入片段的长度在 500~3 000 bp 之间,其中 80% 的长度为 1 000~3 000 bp,插入片段较长,达到了构建高质量文库的标准。此外,PCR 鉴定表明扩增文库的重组效率为 100% (24/24),亦达到了构建高质量文库的标准。

### 2.3 cDNA 文库测序分析

从文库中随机挑选 2 800 个阳性克隆进行 EST 测序,去除载体序列和短片段(<100 bp),拼接后得到 2 639 条高质量 EST,序列的平均长度为 507.76 bp。将这些有效序列进行组装,共得到了 337 个含一条以上 EST 的重叠群(contig)和 1 558 个单一序列(singlet),即代表了 1 895 条非重复的唯一表达序列(unigene)。其中,含 EST 数量最多的一个重叠群由 18 条 EST 拼接而成。文库的冗余度为 28.19%,表明构建的文库具有较好的代表性。

### 2.4 基因注释

NR 数据库同源比对分析表明,共有 1 533 条(80.9%)与已知基因有显著的同源性;362 条(19.1%)无显著的同源性,是新序列。在 NR 注释上的基因中,注释数目最多的前 10 个物种注释了 71% 的 unigene,其中 17% 比对上了葡萄,12% 比对上了番茄,8% 比对上了可可,7% 比对上了蓖麻,7% 比对上了毛果杨,6% 比对上了碧桃,4% 比对上了草莓属,4% 比对上了大豆,3% 比对上了黄瓜,3% 比对上了向日葵。

### 2.5 基因的 GO 功能分类分析

对 1 895 条 unigene 进行 GO 功能分类预测,

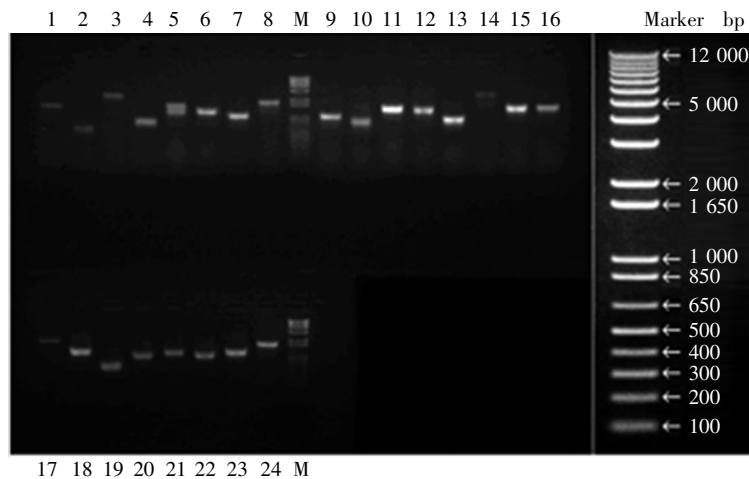


图 2 cDNA 文库插入片段大小的 PCR 检测

1~24: 随机挑取的 24 个克隆; M: DNA 相对分子质量标准。

Fig.2 PCR analysis of the insert size in the cDNA library

1~24: PCR products for clones selected randomly; M: DNA marker.

有 1 220 个 unigene 被注释上 GO 分类。结果如图 3 所示, 样本基因的功能在生物学过程(biological process, BP)分类中主要聚集于细胞过程和代谢过程; 在细胞成分(cellular component, CC)主要聚集于细胞和细胞部分; 在分子功能(molecular function, MF)分类中结合和催化活性占有最高比例。

### 3 讨论

cDNA 文库筛选和 EST 测序分析是一种高效率发现新基因的技术, 特别是对非模式生物, 通过 cDNA 文库进行基因表达分析及鉴定研究更具优

势<sup>[11-13]</sup>。库容量是衡量 cDNA 文库质量高低的一个重要指标, 一个好的 cDNA 文库一般至少含有  $5 \times 10^6$  个克隆<sup>[7]</sup>。我们构建的文库滴度为  $1.92 \times 10^6$  CFU/mL, 库容量为  $5.76 \times 10^6$  个克隆, 符合高质量文库的库容要求。随机挑取 24 个菌落, 经 PCR 检测显示插入片段长度在 500~3 000 bp, 其中 80% 的长度为 1 000~3 000 bp, 文库中长片段所占比例较大, 表明插入片段的完整性较好, 适合以后的测序及基因筛选。此外, PCR 鉴定表明扩增文库的重组效率为 100% (24/24), 亦达到了构建高质量文库的标准。

本研究利用 Gateway 技术构建菊芋块茎 cD-

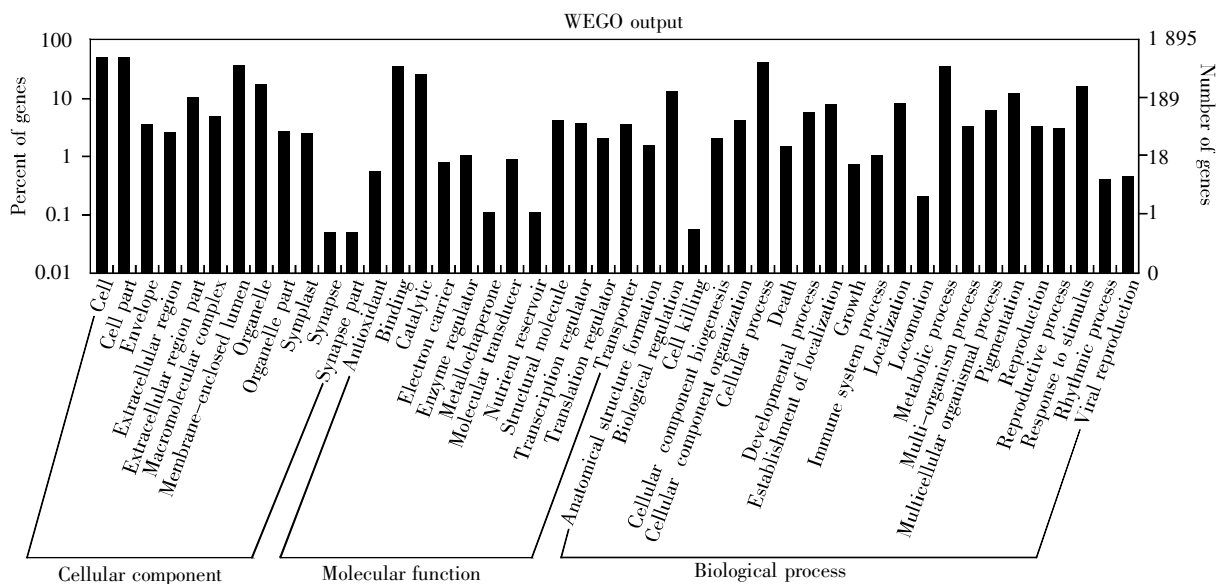


图 3 Level 2 水平 GO 注释上的基因分布

Fig.3 Gene distribution of level 2 GO annotation

NA 文库。cDNA 合成采用 SuperScript III 逆转录酶,降低 Rnase H 活性,提高低丰度基因合成率。文库构建全程无酶切,保证 cDNA 完整性,避免普通酶切连接方式建库中 cDNA 出现酶切受损的情况。此外,在文库构建过程中第 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 mRNA 的原始丰度,这使一些较低拷贝数基因的克隆具有优势,这也为今后基因分离的效率提供了有力保障。此文库所用的克隆载体 pDONR222 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),可以迅速方便而且定向地重组到任何 Gateway 化的表达载体上,在后期的研究中便于形成各种表达文库用以进行基因的表达分析。

EST 序列初步分析结果显示,共有 1 533 条 unigene (80.9%)与 NR 数据库已知基因有显著的同源性,但其中预测蛋白质和未知蛋白质占比较多,许多基因的功能信息没有明确的注释。在 NR 注释中,注释数目最多的前 10 个物种注释了 71%的 unigene,包括葡萄(17%)、向日葵(3%)等,仅有约 1%的 unigene 比对上了菊芋。测序获得的 EST 序列在数量上并不与菊芋序列同源性最多,这是因为没有数量足够大的菊芋 EST 与基因数据库可供参考,而菊芋块茎组织基因的鉴定与研究工作也相对更为滞后,使得测得的菊芋块茎 cDNA 文库中大部分 EST 没有对应的菊芋所表达基因序列相匹配。通过 Blastx 比对,我们发现了很多与营养及信号转导相关的基因,这可能包含了一些菊芋组织特异表达的基因序列,对这些基因进行深入研究,必将有助于推动菊芋功能基因组学的发展。

Gene Ontology 数据库(<http://www.geneontology.org>)是将全世界所有与基因有关的研究结果进行分类汇总的综合数据库,通过 GO 分类图可以大致了解基因产物的分类情况,有助于理解基因背后所代表的生物学意义<sup>[20]</sup>。GO 分析结果表明:菊芋块茎表达基因主要包括细胞成分、分子功能和生物学过程 3 个类群。在细胞成分类群中,细胞和细胞部分所占比例最高;在分子功能类群中,结合和催化活性所占比例最高;而在生物学过程类群中,以细胞过程和代谢过程最突出。同时分析结果显示,有 30%~40%的序列无分子功能、生物学过程和细胞成分,有待进一步挖掘。

本研究构建的菊芋块茎 cDNA 文库符合高质

量文库的标准,可能包含大量新基因,为菊芋新功能基因发掘、功能基因组分析、基因芯片制作等研究奠定了基础。此外,菊芋 EST 报道尚少,本研究为充实菊芋 EST 数据库提供了基础数据。

#### 参考文献(References):

- [1] Li L L, Li L, Wang Y P, *et al.* Biorefinery products from the inulin-containing crop Jerusalem artichoke[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(4): 471-477.
- [2] 张琳, 安载学, 张维东, 等. 菊芋的生物学特性与开发潜力研究进展[J]. *现代农业科技*(Zhang Lin, An Zai-xue, Zhang Weidong, *et al.* Research advance on biological characteristics and development potential of *Helianthus tuberosus* L.[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*), 2015, 13: 87-88.
- [3] Bach V, Kidmose U, Thybo A K, *et al.* Sensory quality and appropriateness of raw and boiled Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(5): 1211-1218.
- [4] Takeuchi J, Nagashima T. Preparation of dried chips from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers and analysis of their functional properties[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(3): 922-926.
- [5] 胡涛, 刘泽鑫, 张晓. 改良东部滨海盐碱地的优良作物—菊芋[J]. *农村经济与科技*(Hu Tao, Liu Ze-xin, Zhang Xiao. Fine crop improving the quality of the eastern coastal saline land-Jerusalem artichoke[J]. *Rural Economy and Science-Technology*), 2017, 28(11): 62-63.
- [6] Long X H, Chi J H, Liu L, *et al.* Effect of seawater stress on physiological and biochemical responses of five Jerusalem artichoke ecotypes[J]. *Pedosphere*, 2009, 19(2): 208-216.
- [7] Xue Y F, Liu Z P. Antioxidant enzymes and physiological characteristics in two Jerusalem artichoke cultivars under salt stress[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2008, 55(6): 776-781.
- [8] Jung W Y, Lee S S, Kim C W, *et al.* RNA-seq analysis and *de novo* transcriptome assembly of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* Linne)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111982.
- [9] Li Q, Tang Z, Hu Y B, *et al.* Functional analyses of a putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene isolated from salt tolerant *Helianthus tuberosus*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(8): 5097-5108.
- [10] 杨世鹏, 刘宝龙, 王丽慧, 等. 菊芋果聚糖: 果聚糖 1-果糖基转移酶 1-FFT 基因的克隆及表达分析[J]. *分子植物育种*(Yang Shi-peng, Liu Bao-long, Wang Li-hui, *et al.* Cloning and expression analysis of fructan: fructan 1-fructosyl-transferase 1-FFT gene in Jerusalem artichoke[J]. *Molecular Plant Breeding*), 2016, 14(2): 337-343.
- [11] 甘玲, 梅宏远, 杨滨宇. 荣昌猪唾液腺全长 cDNA 文库的构建及 ESTs 分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*(Gan Ling, Mei Hong-yuan, Yang Bin-yu. Construction of full-length cDNA library and analysis of expressed sequence tags (ESTs) of salivary glands of Rongchang pig[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*), 2017, 45(3): 17-23.

(下转第 383 页)

- [15] 甄玉洁, 尹钰, 徐漪, 等. *MTHFR* 和 *CBS* 甲基化水平与哈萨克族食管癌的相关性研究[J]. 新疆医科大学学报(Zhen Yujie, Yin Yu, Xu Yi, *et al.* The relationship of methylation level of *MTHFR* and *CBS* with Kazakh esophageal cancer[J]. Journal of Xinjiang Medical University), 2017, 40(4): 535–539.
- [16] 涂小煌, 黄少雄, 李文生, 等. 胱硫醚- $\beta$ -合酶基因启动子区 CpG 岛甲基化水平与结直肠癌患者临床病理特征的关系[J]. 中华肿瘤杂志(Tu Xiao-huang, Huang Shao-xiong, Li Wen-sheng, *et al.* Correlation of methylation of CpG island in *cystathionine beta synthase* promoter and clinicopathological features in colorectal cancer[J]. Chinese Journal of Oncology), 2013, 35(5): 351–355.
- [17] 降文兰, 曹占良, 王玮. Hcy 和 CBS 表达量与脑卒中关系的临床研究[J]. 中国现代医学杂志(Jiang Wen-lan, Cao Zhan-liang, Wang Wei. Clinical study of the relationship between stroke and the expression level of Hcy and CBS[J]. China Journal of Modern Medicine), 2014, 24(23): 55–58.
- [18] Cacciapuoti F. Hyper-homocysteinemia: a novel risk factor or a powerful marker for cardiovascular diseases? Pathogenetic and therapeutical uncertainties[J]. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 2011, 32(1): 82–88.
- [19] 吴凯, 马胜超, 孙炜炜, 等. 在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠和人脐静脉平滑肌细胞中同型半胱氨酸对 B1 和 Alu 重复序列甲基化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志(Wu Kai, Ma Sheng-chao, Sun Wei-wei, *et al.* Effect of homocysteine on the methylation status of B1 and Alu repetitive sequences in ApoE<sup>-/-</sup> mice and human vascular smooth muscle cells[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis), 2013, 21(9): 785–790.
- [20] Lin R T, Hsi E, Lin H F, *et al.* LINE-1 methylation is associated with an increased risk of ischemic stroke in men[J]. Current Neurovascular Research, 2014, 11(1): 4–9.
- [21] Vitvitsky V, Prudova A, Stabler S, *et al.* Testosterone regulation of renal cystathionine beta-synthase: implications for sex-dependent differences in plasma homocysteine levels[J]. American Journal of Physiology–Renal Physiology, 2007, 293(2): 594–600.
- [22] Manteuffel-Cymborowska M, Chmurzynska W, Grzelakowska-Sztabert B. Tissue-specific effects of testosterone on S-adenosylmethionine formation and utilization in the mouse[J]. Biochimica et Biophysica Acta–General Subjects, 1992, 1116(2): 166–172.
- [23] 黄少芬, 陈丽芳, 胡峥, 等. 深圳市南山区高血压患者同型半胱氨酸流行状况及影响因素分析[J]. 遵义医学院学报(Huang Shao-fen, Chen Li-fang, Hu Zheng, *et al.* The analysis of the epidemic status and risk factors of hyperhomocysteinemia in 5935 hypertensive patients in Shenzhen City[J]. Journal of Zunyi Medical University), 2015, 38(5): 541–548.

## (上接第 374 页)

- [12] 林能锋, 曾红. 水滴伪康纤虫全长 cDNA 文库的构建及 EST 分析[J]. 福建农业学报(Lin Neng-feng, Zeng Hong. Full-length cDNA library and EST analysis on *Pesudocohnilembus persalinus*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences), 2017, 32(9): 921–925.
- [13] Sasaki K, Mitsuda N, Nashima K, *et al.* Generation of expressed sequence tags for discovery of genes responsible for floral traits of *Chrysanthemum morifolium* by next-generation sequencing technology[J]. BioMed Central Genomics, 2017, 18: 683.
- [14] Alexandrov N N, Brover V V, Freidin S, *et al.* Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(1–2): 179–194.
- [15] 彭晓珏, 刘榕, 阳菁, 等. Gateway 技术构建盐和干旱胁迫下水稻根系混合 cDNA 文库及其质量鉴定[J]. 应用与环境生物学报(Peng Xiao-jue, Liu Rong, Yang Jing, *et al.* Construction and identification of a mixed cDNA library of rice roots under salt and drought stress using Gateway technology[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology), 2014, 20(2): 291–294.
- [16] Tillett R L, Ergül A, Albion R L, *et al.* Identification of tissue-specific, abiotic stress-responsive gene expression patterns in wine grape (*Vitis vinifera* L.) based on curation and mining of large-scale EST data sets[J]. BioMed Central Plant Biology, 2011, 11: 86.
- [17] 王舟, 宗俊勤, 郭海林, 等. Gateway 技术构建结缕草低温和干旱诱导 cDNA 文库及其质量鉴定[J]. 草业科学(Wang Zhou, Zong Jun-qin, Guo Hai-lin, *et al.* Construction and identification of a cold-and drought-induced cDNA library from zoysisgrass using Gateway technology[J]. Pratacultural Science), 2012, 29(6): 911–917.
- [18] 李晨, 沈海涛, 张煜星, 等. 利用 Gateway 技术构建天山雪莲 cDNA 表达文库[J]. 石河子大学学报(自然科学版)(Li Chen, Shen Hai-tao, Zhang Yu-xing, *et al.* Construction of a cDNA library of *Saussurea Involucrata* Kar. et Kir using Gateway technology[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science)), 2010, 28(5): 534–536.
- [19] Salim L, Feger C, Busso D. Construction of a compatible Gateway-based co-expression vector set for expressing multiprotein complexes in *E. coli*[J]. Analytical Biochemistry, 2016, 512: 110–113.
- [20] Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez J M, *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. Bioinformatics, 2005, 21(18): 3674–3676.