

# 枣结果枝 cDNA 文库的构建与部分 ESTs 分析

孟玉平<sup>1</sup>, 曹秋芬<sup>1</sup>, 孙海峰<sup>2</sup>, 周 慧<sup>1</sup>, 张春芬<sup>1</sup>

(1. 山西省农业生物技术研究中心, 山西 太原 030031; 2. 山西大学 化学化工学院, 山西 太原 030006)

**摘要:** 用定向克隆法构建了枣 (*Ziziphus jujuba* Mill) 生长初期结果枝的部分 cDNA 文库, 获得 1 338 个阳性克隆, 有 557 个携带 cDNA 片段, 选取 469 个长度在 500 bp 以上的进行测序, 得到 390 个有用序列, 其中 281 个 ESTs 与 NCBI 中已知功能基因相似性较高 (其中重复性 ESTs 101 个), 有 68 个 ESTs 是 NCBI 中有序列注释的未知蛋白, 有 41 个 ESTs 是 NCBI 中没有的未知序列 (新基因)。将已知基因进行功能分类, 其中包含有参与基础代谢的基因 46 个, 蛋白质合成与转运基因 27 个, 光合作用基因 24 个, 细胞结构基因 22 个, 信号转导基因 19 个, 细胞生长基因 19 个, 抗病防御基因 11 个, 花发育基因 6 个, 膜运输基因 4 个, 金属转运基因 2 个。抗逆基因的表达可能与枣树本身耐寒、耐旱、耐瘠薄、耐重金属等抵抗不良环境能力强的性状有关。

**关键词:** 壶瓶枣; 结果枝; cDNA 文库; ESTs 分析

**中图分类号:** S665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)05-0102-05

## Construction and Partial ESTs Analysis of a cDNA Library for Fruit-bearing Shoot in *Ziziphus jujuba*

MENG Yu-ping<sup>1</sup>, CAO Qiu-fen<sup>1</sup>, SUN Hai-feng<sup>2</sup>, ZHOU Hui<sup>1</sup>, ZHANG Chun-fen<sup>1</sup>

(1. Agricultural Biotechnology Research Center of Shanxi Province, Taiyuan 030031, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** By using directional cloning, a cDNA Library in the fruit-bearing shoot of *Ziziphus jujuba* Mill during the early stages of flower bud differentiation was constructed. In 1 388 positive clones, 557 cDNA inserts were obtained. 469 cDNA inserts, length over 500 bp, were selected and sequenced, 390 useful inserts were obtained at last. In these useful sequences, 281 ESTs (among them there were 101 repetitive ESTs) were higher similarity with the known genes of CNBI, and 68 ESTs were unknown protein that its sequence had published, another 41 ESTs were unknown sequence (new gene). The known genes were classified by the classification way of arabidopsis thaliana genes, the result indicated that there were the basal metabolism gene 46 genes, the protein synthesis and transfer gene including 27 genes, the photosynthesis gene including 24 genes, the cytoarchitecture gene including 22 genes, the signal transduction gene including 19 genes, the auxesis gene including 19 genes, the resistance adversity gene including 11 genes, the flower development gene including 6 genes, the membrane traffic gene including 4 genes, and the metal transfer gene including 2 genes. The expression of some genes may be relation to the properties of jujube trees s high resistance to the adverse environment, for example, cold resistance, drought resistance, barrenness tolerance and heavy metal tolerance.

**Key words:** *Ziziphus jujuba* Mill HUPING; Fruit-bearing shoot; cDNA library; ESTs analysis

枣树是一种古老的果树, 属于鼠李科 (Rhamnaceae) 枣属 (*Ziziphus jujuba* Mill) 植物, 原产于我国黄河流域, 其果实鲜食、加工、药用兼具, 经济价值很高。枣树具有耐干旱、耐瘠薄、寿命长、结果早、易管

理等优点, 在我国北方的大多数地区都有栽培, 已成为农村经济产业之一。枣树与其他果树显著不同的生物学特征之一是结果枝为脱落性枝 (也叫枣吊), 结果枝每年春天发生于结果母枝 (枣股), 秋后脱落,

收稿日期: 2009-05-20

基金项目: 山西省自然科学基金项目 (20051081; 2008011062-2)

作者简介: 孟玉平 (1955-), 男, 山西五台人, 副研究员, 硕士, 主要从事果树生物技术研究。

通讯作者: 曹秋芬 (1962-), 女, 山西翼城人, 博士, 研究员, 主要从事分子生物学研究。

它的生长和花芽分化同时进行,即当年花芽分化、当年开花结果,具有花芽分化快、多的特点。鉴于枣树这些优良特性,了解其花芽形成、抗逆性等有关基因的存在及其表达是十分重要的。但是,由于枣树的基因分离克隆研究起步较晚,进展较慢,到目前为止,仍未见相关报道。

近年来,随着 cDNA 文库构建技术的日益提高和普及,它已成为克隆相关性状基因的首选方法和途径,在基因操作中具有十分广泛的基础性作用,目前已广泛用于研究植物不同发育阶段或某特定发育时期基因表达的变化,克隆新型细胞因子,分离新的组织特异基因等<sup>[1-4]</sup>。由于 cDNA 是由 mRNA 反转录而来的,因此它代表特定的组织材料在特定阶段所表达的基因,排除了基因组文库中内含子序列对筛选相关性状基因的影响,使筛选相关基因的工作更加简单、直接<sup>[5,6]</sup>。本研究通过构建枣结果枝的 cDNA 文库,以期克隆分离一些特定的有用基因,为将来研究枣树成花基因、抗逆基因调控机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

试验用枣树为山西省生物技术研究中心试验园 40 年生壶瓶枣品种,于发芽期采集长度为 2 cm 的生长初期结果枝(生长与花芽分化迅速期),取回实验室后立即用液氮冷冻,迅速保存于 -70℃ 备用。

### 1.2 总 RNA 提取及 mRNA 纯化

根据改良 CTAB 方法<sup>[7]</sup>提取试样的总 RNA。真空干燥,溶于 100  $\mu$ L DEPC 处理过的超纯水中。使用 Eppendorf Biophotometen 测定 RNA 的浓度和纯度,用 1.5% 变性琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性。

根据 PolyA Tract mRNA Isolation System Z5200 mRNA Isolations 试剂盒(promega,美国)的说明,利用磁珠分离法从提取到的总 RNA 中分离纯化 mRNA。用分光光度法测定 mRNA 的浓度和纯度,并用 1.5% 变性琼脂糖凝胶检测 mRNA。

### 1.3 cDNA 文库的构建

利用 Gateway 技术的 cDNA 文库构建试剂盒,按照试剂盒说明书构建 cDNA 文库(货号: 18248-039, Invitrogen, 美国)。该试剂盒在由 mRNA 合成 cDNA 第一链时,设计有 NotI 接头引物。合成的 cDNA 双链加上 SalI 接头后,用 NotI 酶解,最后合成的 cDNA 5' 端具有 SalI 的酶切位点,3' 端具有 NotI 酶切位点。最后将合成的 cDNA 产物通过柱层析分级去除 500 bp 以下的小片段后,即为构建好的 cDNA 文库。利用 Eppendorf Biophotometen 测定 cDNA 文库

的浓度,并用 TEN 缓冲液稀释至 10 ng/ $\mu$ L,便于与载体连接。

### 1.4 cDNA 文库与质粒载体的连接、库容量及插入片段统计分析

取 1  $\mu$ L cDNA 产物与 1  $\mu$ L SalI NotI 双酶切过的载体 pSPORT1 进行连接,反应体系中加入 1  $\mu$ L 的 T4 DNA ligase,加入 5  $\times$  T4 DNA ligase Buffer 4  $\mu$ L,用灭菌水补充反应体积至 20  $\mu$ L。连接反应条件分别为:室温(25℃) 3 h;4℃ 12 h 以上;12℃ 12 h 以上。将连接产物转化至 100  $\mu$ L 的 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中各涂布两个培养皿 37℃ 培养过夜,计数不同连接反应条件下的阳性克隆(白斑)数量。cDNA 文库容量按照公式“库容量(pfu/mL) = 阳性克隆菌落数目  $\times$  稀释倍数  $\times$  1 000/连接用 cDNA 体积( $\mu$ L)”计算。

分别挑取白色菌落(阳性克隆)接种于 2 mL 的 LB 液体培养基中(含有 50  $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素),37℃ 振荡培养过夜。通过碱裂解法制备质粒 DNA,用 PstI 和 BamHI 双酶切质粒 DNA,1.0% 琼脂糖凝胶来检测插入 cDNA 片段的大小。按照片段长度 500 bp,500 ~ 750 bp,750 ~ 1 000 bp,1 000 ~ 1 500 bp,1 500 ~ 2 000 bp,2 000 bp 统计 cDNA 插入片段的大小分布。

### 1.5 结果枝生长早期基因表达分析

将酶切片段大于 500 bp 的 cDNA 送北京奥科进行测序,测序后的序列用 BLAST 网上分析软件与 GenBank (NCBI) 已注册的序列进行比对,分析基因功能。直接用测序后核苷酸序列比对和利用推测的氨基酸序列进行比对,以确证基因的功能,比对采用了核苷酸数据库 (Nucleotide blast) 和蛋白质数据 (Protein blast)。然后根据拟南芥基因分类方法对基因功能分类。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 和纯化 mRNA 的分析

利用 5 g 早期结果枝进行总 RNA 的提取,最后溶于 800  $\mu$ L DEPC 处理水中,测定总 RNA 浓度为 2.33  $\mu$ g/ $\mu$ L,  $A_{260/280}$ ,  $A_{260/230}$  值分别为 1.99 和 2.07。变性琼脂糖电泳结果显示(图 1-a) 28 S 和 18 S rRNA 条带清晰,表明提取的总 RNA 的完整性和纯度都非常好,可以满足 cDNA 文库构建的需要。

利用 promega 的 mRNA 纯化试剂盒对总 RNA 进行纯化,并将纯化后的 mRNA 溶于 10  $\mu$ L DEPC 处理水中,测定 OD 值 mRNA 含量为 21  $\mu$ g/mL。取 1  $\mu$ L mRNA 进行变性琼脂糖电泳,结果显示(图 1-b) mRNA 呈弥散状分布,说明所纯化的 mRNA 符合 cDNA

文库构建的要求。

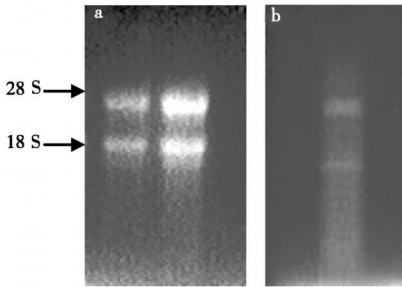


图 1 总 RNA(a) 和 mRNA (b) 琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Agrose gel electrophoreses  
of total RNA (a) and mRNA (b)

2.2 cDNA 连接反应最适条件选择、库容量、cDNA 片段大小的检测与分析

不同连接反应条件下白斑和 cDNA 插入片段的数量比例不同(表 1),试剂盒推荐的室温(25 ) 3 h 的连接条件下,cDNA 插入片段的比例较高,但是总阳性克隆数获得较少;12 连接 12 h 时,cDNA 插入片段的比例稍低,但总阳性克隆数获得较多;4 连接 12 h 的效果介于前两者之间。因此认为 12 下 12 h 的连接反应效果最佳。在库容量计算和随后的 cDNA 大小比例分析中选择了 12 连接 12 h 的反应条件。

表 1 cDNA 插入片段数量统计

Tab. 1 The statistics of inserted cDNA fragments

连接反应 Ligation	阳性克隆数 Number of positive clones	cDNA 插入片段数 Number of inserted cDNA fragments	所占百分数 Percentage	测序数 Number of sequencing
4 ,12 h	91	43	47.3	35
25 ,3 h	24	17	70.8	9
12 ,12 h	174	65	37.4	43
12 ,12 h	326	130	39.9	119
12 ,12 h	178	73	41.0	62
12 ,12 h	338	137	40.5	120
12 ,12 h	207	92	44.4	81
总计 Amount	1 338	557	41.6	469

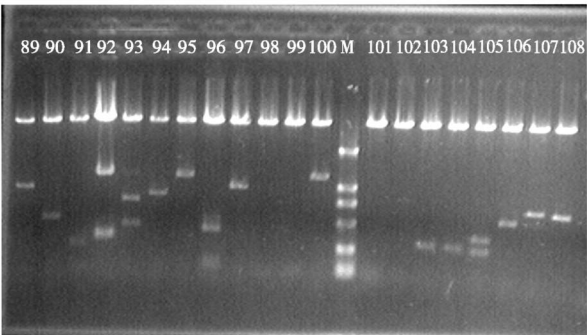
利用上述最佳连接条件重复连接反应 5 次,阳性克隆总数为 1 223 个,每个连接反应的平均阳性克隆数为 245 个,最后 cDNA 文库体积为 500 μL,根据计算公式可知 cDNA 文库容量为 1.2 ×10<sup>5</sup>。

挑取阳性克隆提取质粒 DNA,然后用 BamH / Pst 双酶切 pSPORT 1 质粒 DNA 鉴定插入片段。图 2 结果显示,条带清晰可见,能够明确判定插入片段的大小和有无,证明 cDNA 的连接插入是成功的。共进行了 7 次连接反应,获得了 1 338 个阳性克隆并全部做了酶切鉴定,得到 557 个 cDNA 插入片段。cDNA 插入片的平均比例为 41.6 %。

将 557 个 cDNA 插入片段按大小分级整理,小于 500 bp 的总计 88 个(17.1 %) ,500 ~ 750 bp 的 160 个(28.7 %) ,750 ~ 1 000 bp 的 116 个(20.8 %) ,1 000 ~ 1 500 bp 的 103 个(18.5 %) ,1 500 ~ 2 000 bp 的 58 个(10.4 %) ,2 000 bp 以上的 25 个(4.5 %)。由于对 cDNA 合成产物进行了柱层析分级处理,去除了 500 bp 以下的小片段,因此本文库中 500 bp 以上的片段占大多数,使之主要集中在 500 ~ 1 500 bp 之间。

2.3 部分 ESTs 功能分析

通过筛选 cDNA 文库,选取了 469 个 500 bp 以上的克隆进行测序,将其序列在 NCBI 中比对,共得到 390 个 ESTs,其中有 281 个 ESTs 与 NCBI 中已知功能基因相似性较高,占 72.1 %;有 68 个 ESTs 是 NCBI 中有序列注释的未知蛋白,占 17.4 %;有 41 个 ESTs 是 NCBI 中没有的未知序列(新基因),占 10.5 %。对 281 个已知功能 ESTs 进行了分类整理,其中有 101 个重复性 ESTs,参考拟南芥基因分类法进行分类(表 2),其中主要含有如下功能基因: 基础代谢:氨基酸代谢:甘氨酸羟甲基转移酶;烯脂酰 CoA 水合酶;天冬氨酸氨基转移酶;支链氨基酸转氨酶;S-腺苷蛋氨酸合成酶。糖类代谢:核酮糖-1-5-二磷酸羧化酶;果糖激酶;丙酮酸脱羧酶;苹果酸还原酶辅酶 A;磷酸丙糖异构酶;-木糖苷酶;腺苷 5 磷



M. DL2000 分子量标记;89 ~ 108. cDNA 插入片段。  
M. DL2000 molecular marker;89 - 108. cDNA insert fragments.

图 2 BamH / Pst 双酶切 pSPORT 1 质粒鉴定图谱  
Fig. 2 Identification pattern of pSPORT 1  
by BamH and Pst enzymes

硫酸酐还原酶;UDP-葡萄糖转移酶;乙二醛酶;5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶;-葡萄糖苷酶;葡糖基转移酶。脂类代谢:催化磷酸甘油磷酸脂酶。光合作用:乙酰辅酶 A 氧化酶;NAD-苹果酸脱氢酶;谷氨酰氨合成酶;光捕获蛋白;铁氧还原蛋白前体;核酮糖-1-5-二磷酸羧化酶;光合系统 I 的 mRNA;叶绿体 a/b 结合蛋白。信号转导:溴区 RNA 结合蛋白;查尔酮合酶;EIN3;几丁质酶;钙调蛋白;转录因子;抗沉默因子;蛋白激酶;赤霉素诱导蛋白;钙/氢交换基因;乙烯应答小 GTP 结合蛋白。膜运输:脂体转运蛋白前体;质体蛋白 mRNA;水孔蛋白;亲环蛋白。金属转运:金属硫蛋白;粪卟啉原氧化酶。抗逆防御:脯氨酸脱氢酶;FK506-FK 结合蛋白;甲硫氨酸氧化硫还原酶;热休克蛋白;低温驯化效应蛋白;甘油-3-磷酸酰基转移酶;羧酸酯酶;富含羟脯氨酸糖蛋白;硫酸乙酰肝素;过氧化物酶;逆境诱导蛋白;抗氧化蛋白;多聚泛肽;泛素。花发育:FT;LEAFY (LFY);APETALA1 (AP1);果胶脂裂解酶;早期烟草花粉囊基因;假设的花粉特异性 LIM 结构域蛋白。蛋白合成与转运:腺嘌呤核苷酸转运子;吡哆醇生物合成蛋白;锚蛋白类似蛋白;组蛋白;分子伴侣/伴侣家族;ATP 结合/蛋白激酶;免疫球蛋白;蛋白酶体;核糖体蛋白;核糖体蛋白类似蛋白;核糖体 RNA 基因;cullin 1B;多嘧啶序列结合蛋白;翻译延伸因子;ATP 依赖的解旋酶;输入蛋白。细胞结构:肌动蛋白;线粒体 F1 ATP 合酶;富含脯氨酸的蛋白;纤维蛋白;果胶脂酶;线粒体载体类似蛋白;染色质装配因子;抑制蛋白;DNA 损伤结合;内质网蛋白。细胞生长:细胞周期蛋白;泛素蛋白连接酶;泛素伸展蛋白;苹果菌素;生长素结合蛋白;富含脯氨酸蛋白;老化相关蛋白;赤霉素;伸展蛋白;TGF-beta;黄质环氧化酶。

表 2 枣结果枝 cDNA 文库中已知基因的功能分类

基因功能 Functionality genes	基因数量/个 Number of gene	所占百分数/% Percentage
基础代谢 Basal metabolism	46	25.0
蛋白合成与转运 Protein synthesis and transfer	27	12.2
光合作用 Photosynthesis	24	11.7
细胞结构 Cytoarchitecture	22	11.7
信号转导 Signal transduction	19	10.6
细胞生长 Auxesis	19	10.0
抗病防御 Resistance adversity	11	10.0
花发育 Flower development	6	3.3
膜运输 Membrane traffic	4	3.3
金属转运 Metal transfer	2	2.2
合计 Total	180	100.0

2.4 基因表达频率和抗性基因

基因所包含的 ESTs 数目代表了其表达丰度。在文库中,有 28 个基因含有 2 个以上 ESTs ,重复表达量达 101 个 ESTs ,表达量最多的基因含有 15 个 ESTs。其中表达丰度较高的核糖体蛋白 (Ribosomal protein) 含有 15 个 ESTs ,扩展蛋白 (Expansin protein) 含有 12 个 ESTs ,富含脯氨酸的蛋白 (Proline-rich protein) 含有 6 个 ESTs ,叶绿素 a/b 结合蛋白 (Chlorophyll a/b binding protein) 含有 6 个 ESTs ,生长素结合蛋白 (Auxin-binding protein) 含有 5 个 ESTs ,FKBP 肽基脯氨酸异构酶 (Peptidylprolyl isomerase FKBP)、过氧化物酶 (Ascorbate peroxidase)、支链氨基酸转胺酶类似蛋白 (Branched-chain amino acid aminotransferase-like protein)、果胶酯酶 (Pectin esterase) 各含有 4 个 ESTs ,肌动蛋白 (Actin)、金属硫蛋白 (Metallothionein)、水孔蛋白 (Plasma membrane intrinsic protein) 各含有 3 个 ESTs ,还有花芽分化、细胞生长等 16 个基因各含有 2 个 ESTs。

与抗逆性相关的基因主要有水孔蛋白,金属硫蛋白,低温驯化效应蛋白,热休克蛋白,脯氨酸脱氢酶,FK506-FK 结合蛋白,甲硫氨酸氧化硫还原酶,甘油-3-磷酸酰基转移酶,羧酸酯酶,富含羟脯氨酸糖蛋白,硫酸乙酰肝素,过氧化物酶,逆境诱导蛋白,抗氧化蛋白,多聚泛肽,泛素,几丁质酶,钙调蛋白等。对部分重要基因已命名并在 GenBank 注册,如花发育基因 *ZjAP 1* (EU916199),泛素延伸蛋白基因 *ZjUBQ* (EU916200),组蛋白基因 *ZjH 3* (EU916201),延伸因子蛋白基因 *ZjEF 1* (EU916202),亲环素蛋白基因 *ZjCyP* (EU916023),肌动蛋白基因 *ZjAT 1* (EU251882),扩展蛋白基因 *ZjEXP 1* (FJ449891) 和 *ZjEXP 2* (FJ449892)。许多有用基因需进一步研究,特别是一些新基因值得深入研究。

3 讨论

cDNA 质量是影响插入片段长度、cDNA 文库库容量等的关键因素,而 cDNA 质量直接受 mRNA 质量影响。完整的、高纯度的 mRNA 是合成高质量 cDNA 的保证。但是由于 RNA 的不稳定性和 RNase 的高度稳定及广泛存在的特点,使 RNA 的提取工作比较困难<sup>[10,11]</sup>。本试验是取枣树早春刚萌发的结果枝提取总 RNA,其多糖含量高,用常规方法很难提取出高纯度的 RNA,我们采用改进 CTAB 方法<sup>[7]</sup>,保证了 RNA 的质量。但整个操作过程要求很严格,稍有操作不当就会导致试验结果不理想。

cDNA 文库的质量主要反映在文库的代表性和

重组 cDNA 片段的序列完整性两个方面。重组 cDNA 片段的完整性是反映 cDNA 文库质量的一个重要因素。本研究是利用 Gateway<sup>®</sup> 技术构建的含有相对高比率的全长 cDNA 的文库,由此文库所分离的 cDNA 克隆包含了相对应的 mRNA 分子完整的序列。此外,此文库所用的克隆载体 pSPORT1 含有 Gateway 位点特异性的重组位点 (attB1 和 attB2) 侧翼即为多克隆位点, cDNA 克隆位点即位于多克隆位点内。因此,通过位点特异性的重组就可以将从文库分离到的克隆快速转化至其他的 Gateway 载体,而不需要限制性内切酶酶解和连接酶。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。

在本研究 cDNA 文库中功能基因的数量、基因表达的丰度与植物生长发育阶段的特征是相一致的。取样期正是枣结果枝生长初期,也是花芽分化旺盛时期,生命活动旺盛,蛋白质的合成和转运最为活跃,细胞生长旺盛,不但需要大量的物质和能量代谢,还需要信号转导、膜运输等基因的参与。所以其表达的基因涉及细胞生长发育、生理代谢<sup>[12]</sup>、蛋白质合成、信号转导、抗病防御等几乎所有功能方面,而蛋白质合成与转运基因、基础代谢基因、细胞生长基因、光合基因表达量较多。此外,茶儿酮合成酶,组蛋白 H2, EBF1, HUA ENHANCER 2 等与花发育有关,特别是 *FT*, *LFY*, *API* 等基因与花芽分化密切相关<sup>[13]</sup>,这是花芽形成旺盛的特征之一。

特别值得关注的是该 cDNA 文库中一些与各种逆境生理相关的基因,如谷胱甘肽过氧化物酶、细胞质抗坏血酸盐过氧化物酶、甲硫氨酸过氧化物还原酶、半胱氨酸蛋白酶、细胞色素氧化酶、羧酸酯酶等都与植物的抗氧化作用有关。冷应答蛋白和富含脯氨酸的细胞壁蛋白与环境冷或干旱刺激相关。胁迫诱导蛋白、几丁质结合蛋白、受翻译控制的肿瘤蛋白、淀粉酶抑制剂、Bowman-Birk 型蛋白酶抑制剂和抗沉默因子等与植物的抗病性有关。粪卟啉原氧化酶和金属硫蛋白与重金属结合相关。热休克蛋白、低温驯化效应蛋白、泛素逆境诱导蛋白、抗氧化蛋白、分子伴侣等,在植物适应逆境活动中起到了重要的作用。抗性基因的表达可能与枣树本身抗寒、抗旱,抗逆性强有密切关系。此外,花发育基因 *ZjAP1*、*ZjFT* 的表达与正值开花期有关<sup>[14]</sup>。本研究结果对于今后挖掘和研究枣树抗逆性基因具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] Galaud J P, Carriere M, Pauly N, *et al.* Construction of two ordered cDNA libraries enriched in genes encoding plastid and tonoplast proteins from a high efficiency expression library[J]. *Plant J*, 1999, 17(1): 111 - 118.
- [2] Peterson L A, Brown M R, Carlisle A J, *et al.* An improved method for construction of directionally cloned cDNA libraries from microdissected cells[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5326 - 5328.
- [3] Hawkins V, Doll D, Bumgarner R, *et al.* PEDB: the Prostate Expression Database[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 204 - 208.
- [4] Diatchenko L, Lau Y C, Campbeu A P, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6025 - 6030.
- [5] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 (第二版) [M]. 北京: 科学技术出版社, 2002: 43 - 170.
- [6] 杨成君, 王 军. cDNA 文库的构建策略及其应用[J]. *生物技术通报*, 2007(1): 5 - 9.
- [7] 曹秋芬, 孟玉平, 孙 毅, 等. 苹果属植物总 RNA 有效、快速提取方法[J]. *农业生物技术学报*, 2003(4): 428 - 429.
- [8] Hai-feng Sun, Yur-ping Meng, Qiu-fen Cao, *et al.* Molecular Cloning and Expression Analysis of a SQUA/ API Homologue from Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2008, DOI: 10. 1007/ s11105 - 009 - 0093 - 4.
- [9] Hai-feng Sun, Yur-ping Meng, Gui-mei Cui, *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies on the development of fruit bearing shoots in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. *Molecular Biology Reporter*, 2009, DOI 10. 1007/ s11033 - 008 - 9433 - y.
- [10] 陈 亮, 赵丽萍, 高其康. 茶树新梢 cDNA 文库的构建和 ESTs 测序成功率初步分析[J]. *茶叶科学*, 2004, 24(1): 18 - 22.
- [11] CAO Qiu Fen, Masato WADA, Meng Yur Ping, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of zinc finger protein gene in apple[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(9): 1091 - 1099.
- [12] 许志茹, 李玉花. '津田' 茺菁消减 cDNA 文库的构建及分析[J]. *园艺学报*, 2006, 33(4): 866 - 868.
- [13] 曹秋芬, 和田雅人, 孟玉平, 等. 苹果 *LEAFY* 同源基因的 cDNA 克隆和表达分析[J]. *园艺学报*, 2003(3): 267 - 71.
- [14] 孟玉平, 曹秋芬, 周 慧, 等. 农杆菌介导 *FT* 基因转化嘎拉苹果的研究[J]. *华北农学报*, 2008, 23(6): 41 - 45.