

## 犬弓首蛔虫雄虫 cDNA 文库构建及 EST 分析

马光旭, 周琪, 魏志鹏, 王德恒, 陈昱鸣, 周荣琼\*

(西南大学 荣昌校区动物医学系, 荣昌 402460)

**摘要:** 为构建 *T. canis* 雄虫 cDNA 文库, 采用 Trizol 法提取 *T. canis* 雄虫的总 RNA, 合成 cDNA, 连接到  $\lambda$ TripEx2 载体上, 通过包装蛋白对连接产物的包装, 接种到大肠杆菌 XL-1-Blue 中进行原始文库和扩增文库的滴度测定。经质量鉴定表明: 初始文库的滴度为  $5.25 \times 10^6$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 扩增后文库的滴度为  $6.90 \times 10^9$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。文库的插入片段大小在 500~2 000 bp, 平均片段大小为 1 000 bp, 重组率为 99.47%。所有指标均显示已成功构建了 *T. canis* 雄虫的 cDNA 文库。利用该文库获得了 189 条 5' 有效表达序列标签 (EST)。对 ESTs 拼接后代表了 101 个 Unigenes, 含有 27 个 Contigs 和 74 个 Singletons。其 Unigenes 在 GenBank 中的序列号为 HO348195~HO348295。同源性分析检索到有 56 个 Unigenes 与已知基因同源, 其中具有已知或推测功能的基因有 40 个, 未知功能基因有 16 个, 未比对上的基因 45 个。未比对上的基因与 NR 数据库中的蛋白序列没有任何意义的匹配, 为研究中发现的新基因。这些结果为进一步开展犬弓首蛔虫功能基因及分子机制研究奠定了基础。

**关键词:** 犬弓首蛔虫; 雄虫; cDNA 文库; 表达序列标签 (EST)

中图分类号: S852.73

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)04-0609-06

### Construction of a cDNA Library from Male Adult *Toxocara canis* and Analysis of Expressed Sequence Tag (EST)

MA Guang-xu, ZHOU Qi, WEI Zhi-peng, WANG De-heng, CHEN Yu-ming, ZHOU Rong-qiong\*

(Department of Veterinary Medicine, Rongchang Campus, Southwest University, Chongqing 402460, China)

**Abstract:** To construction of a cDNA library for male adult *T. canis*, total RNA were extracted using Trizol reagent from Invitrogen (GIBCO BRL) according to the manufacturer's instruction. The cDNA was synthesized and the ds cDNA was ligated into the  $\lambda$ TripEx2 Vector. The ligation products were packaged with Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene). Then the mixtures were transformed into *Escherichia coli* XL-1-Blue host cell culture to determine the titers of the unamplified and amplified libraries. The library qualification evaluation showed: the titer of the primary cDNA library was  $5.25 \times 10^6$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> with a recombination rate of 99.47%, and the titer of the amplified cDNA library was  $6.90 \times 10^9$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. PCR amplification of randomly picked clones revealed that the inserted cDNA fragments ranged from 500 to 2 000 bp with an average length of 1 000 bp. The cDNA library was constructed successfully, and 189 efficient ESTs (expressed sequence tags) of 5' end were obtained from this cDNA library. Cluster analysis of these ESTs identified 101 unique sequences containing 27 Contigs and 74 Singletons. All the unique sequences were deposited under dbEST in GenBank (GenBank: HO348195-HO348295). BLASTX searches revealed that 45 Unigenes (44.55% of the total) or 88 ESTs (46.56% of the total) were novel genes that had no significant matches to any protein sequences in the public databases. The rest 56 Unigenes (55.44% of the total) or 101 ESTs (53.44% of the total) were

收稿日期: 2011-10-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31172313); 重庆市自然科学基金项目 (CSTC, 2009BB113); 西南大学博士基金 (11BSr04)

作者简介: 马光旭 (1990-), 男, 山东人, 硕士, 主要从事分子寄生虫学研究

\* 通讯作者: 周荣琼, 博士, 副教授, E-mail: rongqiongzhou@126.com

closely matched to the known genes or sequences deposited in the public databases. This work will provide a valuable resource for further research on gene function and molecule mechanism of *T. canis*.

**Key words:** *Toxocara canis*; male; cDNA library; expressed sequence tags (EST)

犬弓首蛔虫病是一种分布广泛、危害严重的人兽共患寄生虫病。据资料统计,世界各地该病的流行率为 5.5%~64.7%<sup>[1-6]</sup>。犬弓首蛔虫(*Toxocara canis*)寄生于犬的小肠,其感染性虫卵可以感染人和多种动物,小肠孵出的幼虫在非特异宿主中可引起幼虫移行症<sup>[7-8]</sup>。已经证明人(特别是儿童)感染 *T. canis* 后,会导致严重的病理综合征<sup>[9]</sup>。目前,国内外对犬弓首蛔虫病的控制仍然是药物治疗和预防,但由于寄生虫免疫机制复杂,往往使药物治疗由急性感染转为慢性带虫感染。另外,药物防治随之出现的环境污染、食品安全以及抗药性等问题引起了人们普遍的关注,迫切需要新型的防治策略来控制该病。

表达序列标签(Expressed sequence tags, EST)是组织或细胞基因组 cDNA 的部分序列,主要用于发现新基因和了解基因表达概况,是获得未知基因和发现新基因相对快速的方法<sup>[10-11]</sup>。在寄生虫研究领域,自 1992 年开始启动的血吸虫基因组研究计划拉开了大规模寄生虫基因组研究的序幕,至今已获得了大量 EST 数据,丰富了寄生虫基因组知识。这些为了解寄生虫生物学特性、耐药机理和免疫逃避机理等的研究提供重要的依据,为发现新的寄生虫病治疗药物和诊断方法、研制新的疫苗奠定基础。因此,本试验首先构建 *T. canis* 雄虫 cDNA 文库,然后随机挑取部分克隆进行 EST 测序,并对 EST 进行功能注释,以获得大量有价值的 EST 序列资源,以期对犬弓首蛔虫差异表达基因的筛选及候选疫苗分子的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*T. canis* 采自西南大学荣昌校区动物医院某患病犬,分离鉴定并保存备用。

SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit 和 Advantage<sup>TM</sup> 2 PCR Enzyme System 购自 Clontech 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; Gigapack III Gold Packaging Extract 购自 Stratagene 公司;大肠杆菌 BM25.8 由 SMART 试剂盒提供;质粒纯化试

剂盒购自 TransGen 生物技术公司;生物信息学软件包括 BLAST、BIOEDIT、DNAMAN 和 DNASTAR 等。

### 1.2 方法

1.2.1 材料的处理 将采集的 *T. canis* 雄虫置生理盐水内室温放置数小时,待其排泄物排出后,称重为 0.98 g,放置于用 DEPC 溶液预处理的冻存管, -80 ℃ 保存。

1.2.2 总 RNA 的提取及浓度的测定 采用 Invitrogen 公司生产的 Trizol 试剂提取 *T. canis* 雄虫总 RNA。将研钵用液氮预冷,加入液氮将虫体研磨成粉末,按 Trizol 说明书进行提取。使用核酸测定仪检测 *T. canis* 雄虫总 RNA 的纯度和测量 RNA 的浓度,甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 的质量。

1.2.3 *T. canis* 雄虫 cDNA 文库的构建 按照 SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit 说明书进行文库的构建。首先反转录合成 cDNA 第一链,通过 LD-PCR 扩增,合成 ds cDNA。用 Sfi I 内切酶修饰此 ds cDNA,形成两端分别带有 Sfi I A 和 Sfi I B 的黏性末端。经 CHROMA SPIN-400 柱纯化,收集 400 bp 以上的 CHROMA SPIN-400 片段,将其连接于带有 Sfi I A 和 Sfi I B 末端的 λTriplEx2 噬菌体载体,经体外包装后,以 XL1-Blue 为受体菌构建 cDNA 文库。并对原始文库和扩增文库进行滴度测定。

### 1.2.4 cDNA 克隆的 EST 测序

1.2.4.1 噬菌体文库质粒化: BM25.8 菌具有自身环化的特点,通过该菌的这个特点进行质粒化,将 λTriplEx2 噬菌体文库转化为 pTriplEx2 质粒文库。操作步骤按照说明书进行。

1.2.4.2 阳性质粒的 PCR 筛选: PCR 反应按常规方法进行,总体积为 50 μL。反应在 Biometra 循环反应仪上进行。反应参数为预变性 94 ℃ 5 min,变性 94 ℃ 40 s,退火 58 ℃ 1 min,延伸 72 ℃ 1 min,循环 30 次,72 ℃ 10 min。PCR 扩增结束后,产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,根据电泳结果,挑取阳性结果所对应的 LB/羧苄青霉素平板的菌落,接种到 3 mL LB/氨苄青霉素液体培养基中,37 ℃ 220 r·min<sup>-1</sup> 振

荡培养 12 h。

1.2.4.3 阳性质粒的抽提:质粒提取按 TransGen 的 *EasyPure Plasmid MiniPrep Kit* 试剂盒说明书进行。

1.2.4.4 EST 测序:确定含有克隆质粒的菌液用于测序,测序由南京金思瑞生物科技有限公司的 ABI3730 序列分析仪完成。所有的质粒均经过 5' 测序引物测序,只测一个反应的序列,测序引物为 5' sequence Primer (5'CTCCGAGATCTGGACGAGC 3')。

1.2.5 EST 序列分析 原始序列首先用 BI-OEDIT 软件和 DNASTAR 软件进行序列处理,同时结合 CHROMAS 软件比对克隆测序图,长度低于 150 bp 的低质量序列和信号不清楚序列均需去除。然后将上述预处理的 EST 序列和 pTriplEx2 载体序列进行比对,去除载体序列。使用 SeqMan 程序对经过上述处理的所有 EST 序列进行聚类分析,形成单拷贝序列 (Unique sequences)。这些单拷贝序列包括单一序列 (Singletons) 和重叠群 (Contigs) 2 种形式的序列。Singleton 只有 1 条 EST 序列,Contig 有 2 条或 2 条以上的 EST 序列组成。Contig 通常代表 1 个单一基因,由重叠部分的 EST 或具有同一性的 EST 拼接组成。将拼接后的单一序列和重叠群在 NCBI 上通过 BLAST 程序与非冗余数据库 (Non-redundant protein database, NR) 进行 BLAST 比对逐一对每条序列进行数据注释。注释的内容有 Singletons 和 Congtigs 所对应的基因名称,匹配序列的功能注释,匹配碱基的数目,*E*-value 和同源性分值等。*E*-value <  $10^{-5}$  的 EST 认为在生物学意义上有显著相似性,*E*-value >  $10^{-5}$  的 EST,没有发现有与之匹配序列,及其它相似性很低的序列,均认为是可能的新基因片段。

## 2 结果

### 2.1 *T. canis* 雄虫总 RNA 的提取

用 Trizol 试剂提取的 *T. canis* 雄虫总 RNA,经变性胶电泳检测,28S 和 18S 条带清晰(图 1),并且在 37 °C 作用 1 h 后基本无明显降解。表明提取的总 RNA 较完整。经测定 RNA 的纯度为  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1.92$ ,RNA 的浓度为  $760\ \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,符合文库构建要求。

### 2.2 *T. canis* 雄虫 cDNA 合成及纯化

通过 LD-PCR 合成 ds cDNA。经 1% 琼脂糖凝

胶电泳,发现条带呈弥散分布,大小在 200 ~ 4 000 bp(图 2)。

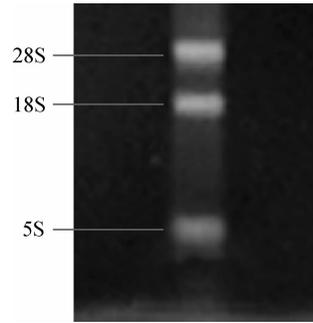
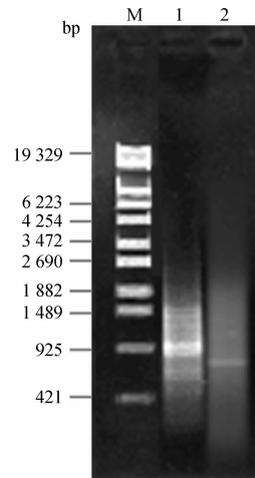


图 1 变性琼脂糖胶电泳鉴定 *T. canis* 雄虫总 RNA

Fig. 1 Gel electrophoresis on formaldehyde denaturalization agarose of total RNA from male adult *T. canis*



M.  $\lambda$ -EcoT 14 I digest marker; 1. *T. canis* 雄虫双链 cDNA; 2. 阳性对照(人胎盘组织 cDNA)

M. DNA marker  $\lambda$ -EcoT 14 I digest; 1. The synthesized cDNA of adult male *T. canis*; 2. Positive control (human placenta)

图 2 *T. canis* 雄虫双链 cDNA 琼脂糖胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of synthesized ds-cDNA from adult male *T. canis*

### 2.3 *T. canis* 雄虫初始 cDNA 文库滴度及扩增文库滴度测定结果

对 *T. canis* 雄虫未扩增文库进行了 4 个梯度稀释,即 1 : 5、1 : 10、1 : 15 和 1 : 20 体积比稀释,然后对每个稀释梯度铺板,进行初始文库滴度的测定,数据见表 1。

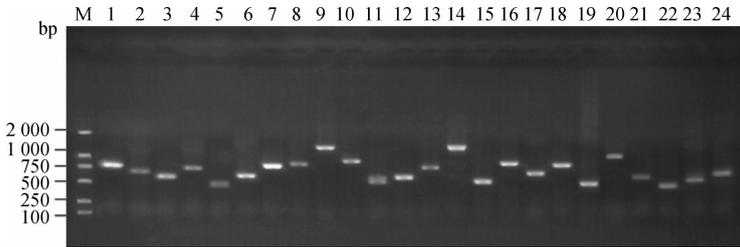
根据表 1 结果,计算出 *T. canis* 雄虫初始文库的最终滴度为  $5.25 \times 10^6$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,达到了初始文库的库容量要求。然后对文库进行扩增,其滴度为  $6.90 \times 10^9$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。

表1 *T. canis* 雄虫 cDNA 文库滴度测定Table 1 Titer determination of the cDNA library of male adult *T. canis*

稀释度 Dilution	噬菌斑个数 Plaque count	滴度/( pfu · mL <sup>-1</sup> ) Titer
1 : 5	1 260	6.3 × 10 <sup>6</sup>
1 : 10	480	4.8 × 10 <sup>6</sup>
1 : 15	350	5.3 × 10 <sup>6</sup>
1 : 20	230	4.6 × 10 <sup>6</sup>

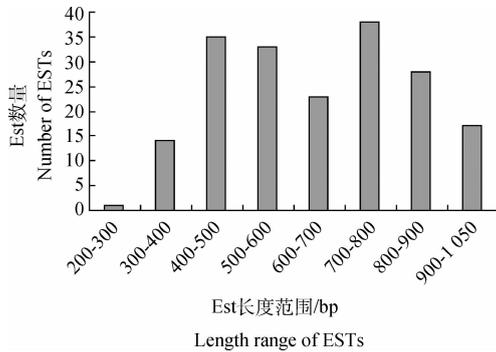
## 2.4 *T. canis* 雄虫文库的鉴定

对雄虫随机挑取的 300 个噬菌斑克隆进行 PCR



M. Trans 2K Plus DNA 相对分子质量标准; 1~24. 随机克隆的 cDNA 插入片段  
M. Trans 2K Plus DNA marker; 1-24. Clones from cDNA library

图3 随机挑取克隆的插入片段 PCR 结果

Fig. 3 The identification of inserted fragment length in adult male of *T. canis* cDNA library图4 *T. canis* 雄虫 ESTs 的分布Fig. 4 The distribution of the reading length of 189 ESTs of male adult *T. canis* ESTs

## 2.6 雄虫 EST 序列的拼接

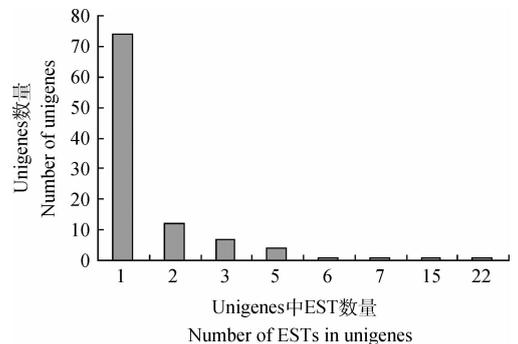
对 *T. canis* 雄虫 189 条 EST 进行聚类分析, 拼接后得到了 101 个 Unigenes, 包括 74 个 Singletons 和 27 个 Contigs(图 5)。其中有 1 个 Unigenes 由 22 条 ESTs 构成。所有的 Unigenes 在 GenBank 序列号为 HO348195-HO348295。Unigene 序列最短

鉴定(图 3), 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 发现文库的重组率达到 99.47%, 插入片段大小为 500~2 000 bp。

## 2.5 *T. canis* 雄虫 EST 序列的基本特征

对 *T. canis* 雄虫 cDNA 测序获得了 190 条 EST 序列, 其中有 1 条插入片段小于 100 bp 的低质量序列, 占总的测序克隆数的 0.53%。去除低质量的序列后, 最终获得了高质量的 *T. canis* 雄虫 ESTs 序列 189 条, 占全部测序总数的 99.47%。这 189 条 ESTs 有效序列长度跨度从 275~1 040 bp。全部有效序列总长度为 122 101 bp, 平均长度为 646.04 bp(图 4)。

的是 275 bp, 最长的是 1 040 bp。

图5 *T. canis* 雄虫 Unigenes 的特性分析Fig. 5 General characteristics of male adult *T. canis* Unigenes

## 2.7 雄虫 EST 序列的同源性检索分析

通过对 *T. canis* 雄虫 189 条 ESTs 组装成的 101 个 Unigenes 的 BLASTX 比对。发现有 56 个 Unigenes 在数据库具有较高的相似性 (BLASTX  $E$ -values <  $10^{-5}$ ), 占有 Unigenes 的 55.45%, 见

表 2。这 56 个 Unigenes 基因匹配的情况,可分为 3 类:已知基因(Known genes)有 37 个 Unigenes,占匹配基因的 66.07%;或 76 条 ESTs,占匹配 ESTs 的 75.25%;推测基因(Putative genes)有 3 个 Unigenes,占匹配基因的 0.54%;或 3 条 ESTs,占匹配 ESTs 的 0.30%;未知基因(Unknown genes)有 16

个 Unigenes,占匹配基因的 28.57%;或 22 条 ESTs,占匹配 ESTs 的 21.78%。此外的 45 个 Unigenes,占总的 44.55%,或者 88 ESTs,占总 ESTs 的 46.56%与 NR 数据库中的蛋白序列没有任何意义的匹配,是研究中发现的新基因。

表 2 *T. canis* 雄虫 EST 与 NCBI NR 蛋白数据库的 BLASTX 分析

Table 2 Summary of the EST of male adult *T. canis* BLASTX analysis against the NCBI NR protein databases

特征 Characterization	Unigene 数(%) No. of clones	Unigenes (%)	EST 数(%) No. of ESTs (%)
总 EST 和 Unigenes	101 (100.00)		189 (100.00)
Total number of Unigenes or ESTs			
已知基因 Known genes	37 (36.64)		76 (40.21)
推测基因 Putative genes	3 (2.97)		3 (1.59)
未知基因 Unknown genes	16 (15.84)		22 (11.64)
新基因 Novel genes	45 (44.55)		88 (46.56)

### 3 讨论

随着分子生物学的发展,cDNA 文库的构建方法取得了很大的进展。自 20 世纪 70 年代初第 1 例 cDNA 克隆报道以来<sup>[12]</sup>,采用构建 cDNA 文库的方法已经分离和鉴定了很多基因。经典的文库构建方法通常费时费力,会损失很多有用的信息,同时需要用不同的酶多次处理有限的样品,而且需要的起始 mRNA 量很大(一般需要 5~100  $\mu\text{g}$ )<sup>[13]</sup>,这些都极大地限制了基因克隆的速度。本试验所采用的 SMART 技术就是 cDNA 文库构建的一种好方法<sup>[14-17]</sup>。不用 ployA<sup>+</sup> mRNA,而是直接用总 RNA 获得了高质量的 cDNA 文库。该方法避免了稀有克隆在纯化 ployA<sup>+</sup> mRNA 过程中的损失,减少了脱氧核糖核酸污染和核糖核酸降解的机会。然后采用 LD-PCR 方法扩增 ds cDNA。在 PCR 过程中势必会产生一些小片段 DNA 分子,这些小的 DNA 分子是无效的重组子,在文库筛选时必定增加后期工作量。因此,试验过程中使用 CHROMA SPIN 400 凝胶柱,去除大部分小于 400 bp 的 ds cDNA,及酶切过程中留下的小片段 DNA,充分保证了文库中有较大片段的 DNA 分子,这样运用长距离 PCR 增加了获得较长片段的概率,这种方法可明显减少后期试验的工作量,对文库筛选及表达序列标签(EST)的获取具有重要意义。

EST 是单向测序所获得的序列,包括从 3' 端测序和从 5' 端测序。通常从 3' 末端测序所获得 EST

包含编码区信息较少,相对而言,从 5' 末端测序所获得的 EST 包含的信息量相对较大。因为 mRNA 3' 末端有一个 polyA 结构,靠近 polyA 处又有特异性的非编码区,测序时易导致测序质量下降,而 mRNA 5' 末端含有的信息量较大,非编码区较小,适合寻找新基因或者是研究差异表达基因,还有利于进行 EST 拼接<sup>[18]</sup>。综合考虑这些因素,本次研究所获得的 EST 都采取从 5' 末端测序。在测序过程中,高表达基因被测到的次数也多,由于采取随机测序,造成了部分 EST 序列的冗余,借助生物信息学软件处理后最终获得了 *T. canis* 雄虫的 101 条单拷贝序列。由于都是正向测序所得到的序列,所以这些序列有利于以后数据库登录的基因识别。

EST 分类与功能注释是 EST 分析工作的重要内容,其结果直接影响对基因表达情况的判断,所以选择恰当的分析方法在 EST 功能注释中就显得尤为重要。与数据库进行同源性比较是 EST 分类与功能注释的基础。查询序列的生物学功能最直接的方法就是进行 BLAST 同源搜索,这是目前序列比较最常用的工具。通常都是挑选同源性最高的蛋白质作为最有可能的 EST 编码产物。但是由于 EST 序列长度可能偏短,或者 EST 序列在读取过程中常会出现碱基缺失或插入现象等原因,常会影响到 BLASTX 的分值和结果。所以 BLASTX 分析的结果只能为确定其编码蛋白质的功能提供暂定的线索,作为分析工具,BLASTX 分析的结果并非完全正确。基因真正的功能还必须经过一系列的生化和

遗传学方法确认后才能赋予<sup>[19]</sup>。

本研究通过对犬弓首蛔虫的 EST 序列分析后发现,有 3 种情况存在:与已知基因高度相似的序列;较低相似性的 EST 序列;还有一些就是没有匹配的序列。已知基因为对后续基因的克隆提供了有意义的信息线索。可以对感兴趣的基因克隆其全长 cDNA,并进一步研究其功能。对于有些 EST 序列在数据库中并没有与之匹配的序列,可能是在目前的数据库中,没有同类或同种生物的基因,所以定为新基因。本次分析通过对已有的蛋白质水平和核苷酸水平的数据库进行搜索,发现 *T. canis* 雄虫有 88 条没有匹配的 EST 序列,这些序列均暂定为新基因。这种情况与目前 *T. canis* 的分子生物学水平研究比较落后的现实情况相一致,所以必须进行 *T. canis* 分子水平的研究,希望从分子水平上寻找与其发育、繁殖和代谢等有关的基因,这对检测 *T. canis* 的感染并进一步控制该病有着非常重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] SORIANO S V, PIERANGELI N B, ROCCIA I, et al. A wide diversity of zoonotic intestinal parasites infects urban and rural dogs in Neuquén, Patagonia, Argentina [J]. *Vet Parasitol*, 2010, 167: 81-85.
- [2] SOWEMIMO O A. Prevalence and intensity of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in dogs and its potential public health significance in Ile-Ife, Nigeria [J]. *J Helminthol*, 2007, 81: 433-438.
- [3] UGBOMOIKO U S, ARIZA L, HEUKELBACH J. Parasites of importance for human health in Nigerian dogs: high prevalence and limited knowledge of pet owners [J]. *BMC Vet Res*, 2008, 4: 49.
- [4] OVERGAAUW P A, VAN ZUTPHEN L, HOEK D, et al. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands [J]. *Vet Parasitol*, 2009, 163: 115-122.
- [5] ROHEN M. Endoparasitenbefall bei Fund- und Abgabehunden und -katzen in Niedersachsen und Untersuchungen zur Anthelminthikaresistenz. Doctoral Thesis [M]. University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany, 2009: 1-187.
- [6] DAI R S, LI Z Y, LI F, et al. Severe infection of adult dogs with helminths in Hunan Province, China poses significant public health concerns [J]. *Vet Parasitol*, 2009, 160: 348-350.
- [7] ALDAWEK A M, LEVKUT M, REVAJOVÁ V, et al. Larval toxocarosis in sheep: the immunohistochemical characterization of lesions in some affected organs [J]. *Vet Parasitol*, 2002, 105: 207-214.
- [8] NOBUAKI A, ISATO T, EIJI H. Cerebellar ataxia due to *Toxocara* infection in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus* [J]. *Vet Parasitol*, 2003, 113: 229-237.
- [9] DESPOMMIER D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects [J]. *Clinical Microbiol Rev*, 2003, 16: 265-272.
- [10] HATEY F, TOSSER-KLOPP G, CLOUSEARD-MARTINATO C, et al. Expressed sequenced tags for genes: a review [J]. *Genet Sel Evol*, 1998, 30: 521-541.
- [11] SEHENA M. Genome analysis with gene expression microarrays [J]. *Bioassays*, 1999, 18: 427-431.
- [12] HOFSTETTER H, SXHAMBOCK A, VAN DEN BERG J, et al. Specific excision of the inserted DNA segment from hybrid plasmids constructed by the poly(dA) and poly(dT) method [J]. *Biochim Biophys Acta*, 454 (3): 587-591.
- [13] WELLENREUTHER R, SCHUPP I, POUSTKA A, et al. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones [J]. *BMC Genomics*, 2004, 5 (1): 36.
- [14] WUBBEN M J, CALLAHAN F E, SCHEFFLER B S, et al. Transcript analysis of parasitic females of the sedentary semi-endoparasitic nematode *Rotylenchulus reniformis* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2010, 172: 31-40.
- [15] GAI Y, WANG L, SONG L, et al. The construction of a cDNA library enriched for immune genes and the analysis of 7535 ESTs from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 7: 684-694.
- [16] BRENNER E D, KATARI M S, STEVENSON D W, et al. EST analysis in Ginkgo biloba: an assessment of conserved developmental regulators and gymnosperm specific genes [J]. *BMC Genomics*, 2005, 6: 143.
- [17] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium [J]. *Nat Genet*, 2000, 25: 25-29.
- [18] MICHALEK W, WESCHKE W, PLEISSNER K P, et al. EST analysis in barley defines a unigene set comprising 4000 genes [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 97-103.
- [19] SKINNE W, KEON J, HARGREAVES J. Gene information for fungal plant pathogens from expressed sequences [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4: 381-386.