

• 药材与资源 •

草珊瑚叶片全长 cDNA 文库构建及 EST 序列分析

谢德金¹, 沈少炎², 姚 旺¹, 荣俊冬¹, 何天友², 陈礼光¹, 郑郁善^{1,2*}

1. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002

2. 福建农林大学园林学院, 福建 福州 350002

摘 要: **目的** 构建草珊瑚 *Sarcandra glabra* 叶片全长 cDNA 文库, 进一步发掘与草珊瑚代谢及抗逆相关的基因, 为草珊瑚功能基因的发现提供实验基础。 **方法** 以草珊瑚的嫩叶为实验材料, 利用 SMART 法 (即 Clontech 公司 SMARTer 试剂盒) 构建草珊瑚全长 cDNA 文库。利用 ABI3730 DNA 序列分析测序获得大量的 EST 序列, 利用生物信息分析方法对 EST 序列进行功能注释。 **结果** 构建了草珊瑚叶片的全长 cDNA 文库, 经过鉴定草珊瑚 cDNA 文库的文库滴度为 1.14×10^7 cfu/mL, 平均插入片段为 1 000 bp。利用该文库测序了 221 个单克隆, 共获得 EST 序列 177 条, 拼接出 151 个单一序列; 利用 NCBI 数据库进行同源比对分析, 共有 119 条 (79%) 与已知基因有显著的同源性, 进行 GO 功能注释, 显示其表达术语涉及了细胞生长, 信号转导, 蛋白质合成、转录, 抗逆反应以及能量代谢等。 **结论** 构建了符合要求的草珊瑚叶片全长 cDNA 文库, 并对相关 EST 序列进行了生物信息学分析, 为草珊瑚基因组学研究提供一定的参考。

关键词: 草珊瑚; 全长 cDNA; 表达序列标签 (EST); 基因注释; GO 功能注释

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)23-4235-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.020

Construction of full-length cDNA library of *Sarcandra glabra* and sequences analysis on ESTXIE De-jin¹, SHEN Shao-yan², YAO Wang¹, RONG Jun-dong¹, HE Tian-you², CHEN Li-guang¹, ZHENG Yu-shan^{1,2}

1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2. College of Landscape, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: **Objective** *Sarcandra glabra* was recognized as an important research material attributing to its high medicinal value and economic value. However, little information was known about its genomics and regulatory pathway participating in reproductive development. For the first step to understand the molecular basis and further explore genes which related to metabolism and resistance in *S. glabra*. **Methods** A SMART full-length complementary DNA library from the leaves tissue was constructed and characterized to providing the experimental basis for discovery of functional genes of *S. glabra*. The assembly expressed sequence tag (EST) data were completed by ABI3730 DNA program. A high quality full-length cDNA library was constructed successfully from *S. glabra* leaves. **Results** The titer of library was 1.14×10^7 pfu/mL and the average length of inserted fragments was 1 000 bp. A total of 221 clones were sequenced from the cDNA library and obtained 177 EST sequences. The EST sequences were assembled into 151 unigenes including 12 contigs and 119 singletons (79%). EST exhibited significant similarity with known putative functional nucleotide sequences in the GenBank database. These genes were mostly involved in cell development, signal transduction, protein synthesis, transcription, stress tolerance response, energy metabolism based on molecular function of GO annotation. **Conclusion** This report constructs a full-length-cDNA library and analyzes the bioinformatics of the related EST sequences, and then offers a reference to genomic research of *S. glabra*.

Key words: *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai; full-length cDNA library; expressed sequence tag; gene annotation; GO annotation

收稿日期: 2016-06-13

基金项目: 福建省科技重大专项资助 (2004YZ02-05); 福建省科技创新平台资助 (2008Y2001)

作者简介: 谢德金 (1988—), 男, 博士研究生, 从事药用植物栽培与利用研究。E-mail: 1075455791@qq.com

*通信作者 郑郁善 (1960—), 男, 教授, 博士生导师, 从事药用植物栽培与利用及森林培育方面研究。E-mail: zys1960@163.com

草珊瑚具有重要的药用价值和经济价值，是一种重要的植物研究材料。但是，对于草珊瑚基因组学及生长发育的调节路径的研究鲜见报道。最早对于全长 cDNA 文库的研究及应用出现在 1994 年^[1]，随着分子生物技术的发展，对于全长 cDNA 文库构建的方法越来越多，目前常用的主要有 Oligo-capping 法^[2]、Capture 法^[3]、SMART 法^[4-5]、CapSlect 法^[6]、Cap-trapper 法^[7-8]、Cap-jumping 法^[9]以及 mRNA 差减/均一化法^[10-11]等。这些全长 cDNA 文库构建的方法都是围绕真核生物的 mRNA 5'端 CAP 结构进行的。虽然全长文库构建方法越来越多，但每种构建的方法都有其缺点，致使构建全长 cDNA 文库仍然存在不小的阻碍^[12]，如 mRNA 的完整程度，建库过程中的载体连接、小片段 cDNA 的聚集、反转录等问题都会导致无法构建较高质量的 cDNA 文库^[13]。

表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 是在已构建完成的 cDNA 文库中随机挑选克隆组，并在 5'端或 3'端进行单向的测序，进而得到一段 cDNA 的序列数据，cDNA 的任何区域的序列都可以用来测定，区域的长度在 150~500 bp，EST 技术的发展极大地推进了生物基因组水平研究的速度，Adams 等^[14]运用 EST 技术分析了人脑组织进行相关方面的研究。由于 cDNA 是由 mRNA 逆转录而合成的，而 mRNA 是由 5'-UTR、3'-UTR、ORF、poly (A) 尾巴 4 个部分组成，且 mRNA 的 5'-UTR 和 3'-UTR 都具有特异性，所以一个 EST 序列可以看作是生物的组织或细胞在某个特定时期内的一个表达基因。EST 分子标记技术经常被用于遗传学图谱的构建^[15]、新基因分离和鉴定^[16]、基因表达谱的研究^[17]、比较基因组学的研究及基因芯片的制备^[18]等方面，多种应用的结合可以分析种内的遗传差异性、生物的进化联系，物种的多样性以及系统发育学。

草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 为金粟兰科 (Chloranthaceae) 草珊瑚属 *Sarcandra* Gardn. 的植物，俗名草珊瑚^[19]。草珊瑚在现代药理研究中应用广泛，研究证明草珊瑚具有抗菌、抗溃疡、消炎和镇痛、促进骨折愈合、抑制流感病毒、保肝、提高免疫力、抗肿瘤等作用^[20-22]。对于草珊瑚倍半萜类、有机酸类、香豆素类等化学成分已有较为系统、全面的研究^[23-25]。但是，对于草珊瑚基因组学的研究鲜有报道，主要是对草珊瑚遗传种质资源多

样性的研究^[26-28]。在 NCBI 数据库中检索草珊瑚相关分子信息，未得到任何核酸序列及 EST 序列，同时检索到 119 条蛋白序列以及 0 条基因组。这表明对于草珊瑚在深层次的分子克隆、代谢途径及蛋白功能方面有待于进一步探究。本研究通过选取最适宜的提取方法来制备草珊瑚总 RNA，再通过 SMART 法构建草珊瑚叶片全长 cDNA 文库及 EST 序列分析，进一步完善草珊瑚有关核酸序列、EST 数据库及有效成分生物合成的功能基因的基因资源，为更深层次的草珊瑚的分子生物理论研究以及草珊瑚药用价值的基因功能提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

材料取自福建农林大学工业原料林研究所苗圃，经福建农林大学林学院邹小兴教授鉴定为金粟兰科药材草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的全草。所用草珊瑚嫩叶用超纯水擦拭叶片后迅速置于液氮中速冻，然后贮存至 -80 °C 冰箱中备用。

1.2 RNA 的提取以及 mRNA 的分离

采用 CTAB 法^[29]、CTAB-Trizol 法^[30]、Trizol 法^[31]、CTAB-LiCl 法^[32]、RNA 试剂盒法 1、RNA 试剂盒法 2 共 6 种方法来提取草珊瑚叶片中的总 RNA，通过 RNA 纯化在 1%~1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳检测完整性质量后^[33]，对符合要求的 RNA 进行 mRNA 的提取以及全长 cDNA 文库的构建。

1.3 cDNA 文库的构建及测序

对草珊瑚 mRNA 纯化和质检后，通过 SMART 法^[33]构建草珊瑚 cDNA 全长文库。采用 Clontech 公司的 In-Fusion SMARTer Directional cDNA 文库构建试剂盒 (Cat.No.634933)、第二链合成的 Advantage 2 PCR 试剂盒 kit (Cat.No.639207) 以及 TaKaRa 公司的电转感受态细胞 DH5 α ，进行全长文库的构建。电转后对原始文库进行文库质量检测，包括文库滴度的测定、重组率的测定以及插入片段检测。通过检测后 PCR 反应后，对大于 500 bp 的阳性单克隆在 ABI3730 DNA 序列分析仪上进行 EST 测序。

1.4 EST 序列数据分析

通过 DNAMAN 软件以及 Chromas 软件结合的方法，对 EST 测序得到的序列去除载体、不准确的碱基以及低质量的序列，从而获得比较准确的 EST 片段^[34]。获得 EST 片段后利用 DNASTar 软件对 EST 片段进行聚类拼接成重叠群 (contigs) 和单一序列

(singlets) 的单拷贝序列 (unique sequences), 并提交到 GenBank 数据库。

利用 NCBI 的 BLAST 程序对拼接后的单拷贝序列与核酸库 (NT) 和非冗余数据库 (NR) 进行比对, 完成 BLASTN 及 BLASTX 的同源性比对, 若 BLASTN 及 BLASTX 无法检索结果的, 再用 EST-others 数据库比对, 寻找相似性 EST 片段, 比对时设置 E 值 $>1 \times 10^{-5}$ [35]。用 BLAST2GO 软件对 EST 序列数据进行分子功能、细胞成分以及生物过程等方面的功能分类注释[36]。利用 KEGG 数据库的 KO 标签 (http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main) 获得具有 KEGG 注释的序列 KO list 并进行

BRITE 功能等级分类。

2 结果与分析

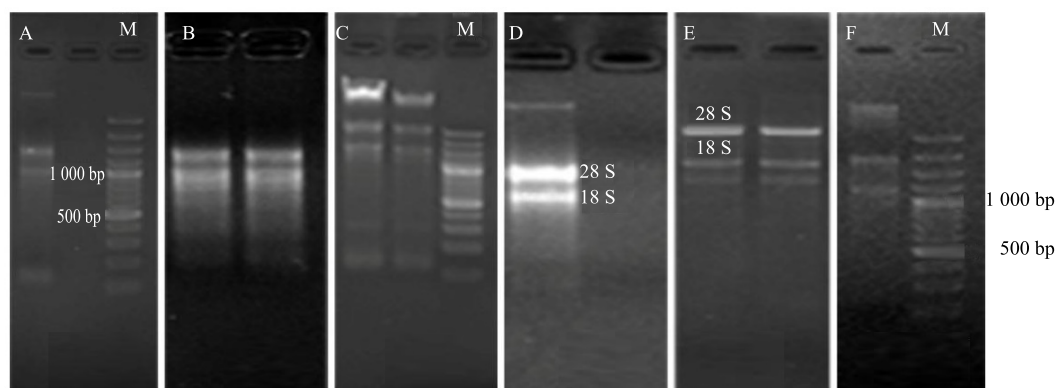
2.1 RNA 的制备

在 NanoDrop2000c 上测定 6 种不同草珊瑚 RNA 提取方法的总 RNA 在 230、260、280 nm 下的吸光度(A), 得到的 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 值及总 RNA 的浓度 (表 1), 通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性 (图 1)。总体来说, CTAB-LiCl 法和 RNA 试剂盒 1 2 种方法提取的 RNA 均符合要求, 但试剂盒法得到的总 RNA 量及成功率较低。通过多方面比较采用 CTAB-LiCl 法提取草珊瑚总 RNA 来构建 cDNA 文库。CTAB-LiCl 法有轻微 DNA 污染, 需进一步消除 DNA 的干扰。

表 1 6 种方法提取的草珊瑚叶片总 RNA 样品的纯度与浓度

Table 1 Comparison on purity and yield of total RNA in *S. glabra* by six extraction methods

提取方法	材料质量/g	定容体积/ μ L	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	质量浓度/($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	RNA 总量/ μ g	RNA 产率/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
CTAB	0.10	20	2.02	1.86	293.9	5.88	58.8
CTAB-Trizol	0.10	20	1.98	1.39	403.2	8.06	80.6
Trizol	0.10	20	1.99	1.69	314.7	6.29	62.9
CTAB-LiCl	0.15	20	2.05	2.25	628.9	12.58	83.9
试剂盒法 1	0.10	20	1.97	2.28	258.3	5.17	51.7
试剂盒法 2	0.10	20	2.05	2.12	131.8	2.64	26.4



M-Marker A-CTAB 法 B-CTAB-Trizol 法 C-Trizol 法 D-CTAB-LiCl 法 E-RNA 试剂盒法 1 F-RNA 试剂盒法 2

M-Marker A-CTAB method B-CTAB-Trizol method C-Trizol method D-CTAB-LiCl method E-RNAPrep Pure Plant Kit 1 F-RNAPrep Pure Plant Kit 2

图 1 6 种不同方法提取的草珊瑚叶片总 RNA 电泳检测结果

Fig. 1 Electrophorogram of extracted total RNA from leaves of *S. glabra* by six different methods

2.2 草珊瑚全长 cDNA 文库的构建及测序

构建了以草珊瑚叶片为材料的全长 cDNA 文库, 重组率为 81.4%, 文库滴度 1.14×10^7 cfu/mL, 插入的片段大小在 500~3 000 bp, 平均为 1 000 bp, 说明构建的文库包含了相对较长的 cDNA (图 2)。随机挑取 351 个单克隆, 经 PCR 检测去除不合格的克隆, 提交共 221 个单克隆送铂尚公司测序, 共获得有效序列 177 条, 核糖核苷酸的 G+C 的总量为 41.9%, 说明

草珊瑚叶片表达基因序列 G+C 的量接近于双子叶植物拟南芥 (40.7%) 而明显低于单子叶植物水稻 (53.4%), EST 序列长度主要集中在 700~800 bp (图 3)。通过 DNASTAR 软件对 177 条序列聚类并对同一重叠群进行拼接, 共获得单一序列 (unigene) 151 条, 包含有 12 个 EST 重叠群 (contig) 及 139 条单序列 (singleton), 即非重复的唯一序列。文库的冗余度为 14.7%, 表明文库具有良好的代表性。

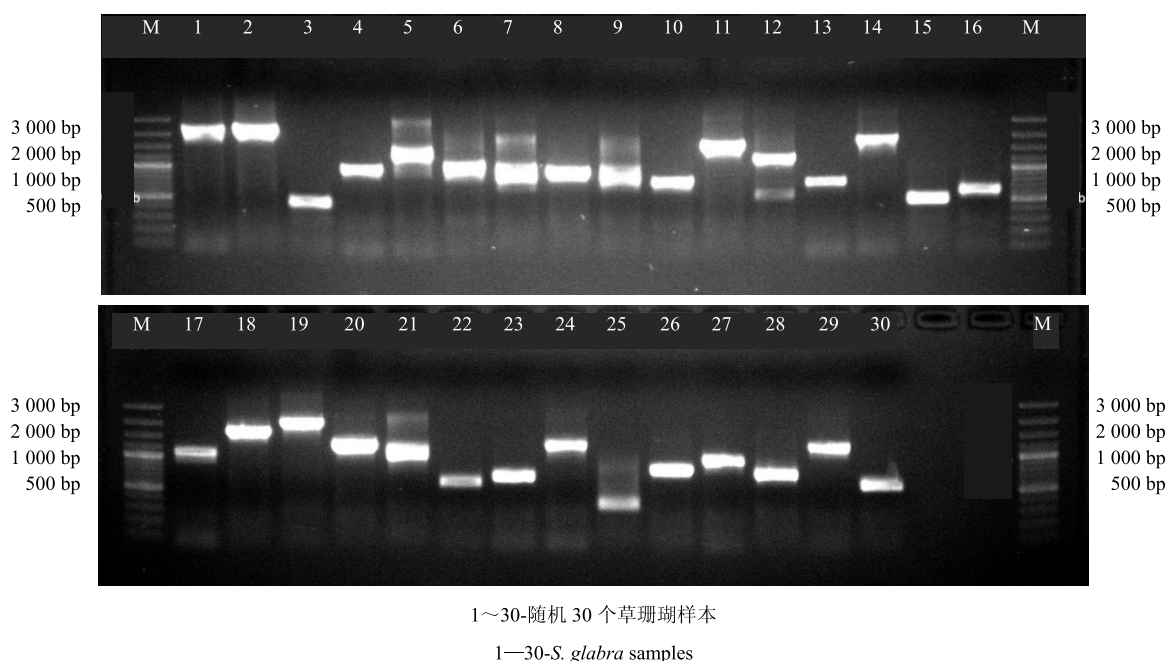


图 2 全长 cDNA 文库插入片段大小

Fig. 2 Average size of inserts fragments of cDNA library

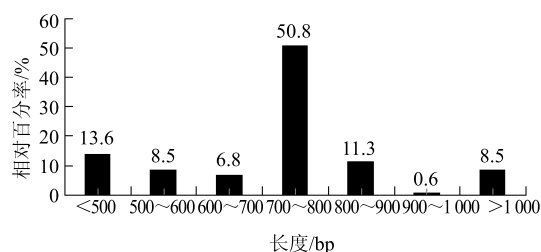


图 3 ESTs 长度分布

Fig. 3 Distribution of ESTs length

2.3 EST 序列注释及生物信息学分析

利用 NCBI 的 BLASTX 及 BLASTN 程序对拼接后的单序列与 NR 数据库进行同源性比对和基因功能注释。151 条单一序列中有 32 条 (21%) 无显著的同源性, 是新序列; 119 条 (79%) 有显著同源性, 包括 24 条已知功能的蛋白和 91 条的预测蛋白, 而未知蛋白有 4 条 (3%), 其余 21% 的 EST 为功能未知基因或新基因序列, 但是这些值只是暂定的, 已知功能 EST 序列数量必定会随着数据库中信息的增加而提高, 这也从一定程度上反映出草珊瑚的研究还有待深入。

实验共获得具有 KEGG 注释的序列 50 条, 根据 BRITE 功能等级分类得出结果: 参与代谢相关的序列为 39 条, 遗传信息加工的序列为 19 条, 参与环境信息加工的序列为 10 条, 参与细胞过程的序列有 11 条, 参与生物体系统序列有 25 条, 与人类疾病相关的序列有 32 条, 一共 126 条, 这说明获得注

释的序列参与的过程不止一个。

将上述已知的和预测的 119 条有显著同源性的单一序列在 BLAST2GO 中进行功能学的分类, 共获得了 GO 术语 415 个, 每条序列平均有 3.49 个 GO 术语且归结为 3 类, 其中生物学过程 (biological process) 185 个, GO 术语占 44.85%; 分子功能 (molecular function) 104 个 GO 术语占 25.06%; 细胞组件 (cellular component) 126 个, GO 术语占 30.36%。在这 119 个有功能注释的单一序列中, 其功能涉及细胞生长、信号转导、蛋白质合成、转录、抗逆反应以及能量代谢等 (表 2), 其中参与蛋白质合成和能量代谢的基因所占比例较高。

3 讨论

3.1 RNA 提取

草珊瑚叶片是多年生亚灌木的组织, 富含多酚、多糖及其他次级代谢产物。黄酮类为草珊瑚的主要有效成分。本实验采用 CTAB-LiCl 法提取草珊瑚叶片总 RNA, 匀浆阶段加入聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和 β -巯基乙醇从而将酚类化合物去除; LiCl 能选择性地沉淀高相对分子质量的 RNA, 可以去除大部分 DNA 的干扰, 但有时还会有轻微 DNA 污染需要进一步去除和纯化; 其他方法: 试剂盒法 1 得到的总 RNA 量及成功率较低, 不宜采用; CTAB 法提取草珊瑚叶片总 RNA 的步骤中, 没有有效去除 DNA 的步骤, 易受 DNA 的污染; Trizol 法是即用型试剂,

表 2 部分与已知功能基因同源的草珊瑚叶片 ESTs

Table 2 Some ESTs matched with known functional genes in *S. glabra* leaves

编号	推定基因	长度/bp	E 值	最大同源性/%
Contig1	磷酸合成酶 β 亚基 (草珊瑚果)	2 524	0	99
Contig2	40S 核糖体蛋白 S24-1 (芭蕉)	820	8×10^{-75}	93
Contig3	光合作用中心 II 10 道尔顿蛋白 (莲花)	731	8×10^{-56}	83
Contig5	假定蛋白 (辣椒)	1 395	1×10^{-32}	77
Contig6	40S 核糖体蛋白 S15 (油棕)	806	8×10^{-91}	96
Contig7	转录延伸因子多肽 1 亚型 X (芝麻)	700	6×10^{-56}	89
Contig8	细胞色素 b6/f 复合体亚基 V (籼型水稻组)	1 497	3×10^{-15}	89
Contig9	未知蛋白 LOC104602759 (莲花)	840	8×10^{-81}	66
Contig10	类金属硫蛋白 (西谷椰子)	512	9×10^{-27}	80
Contig12	类金属硫蛋白 2 (荷花)	797	1×10^{-17}	75
Contig17	转录因子 BTF3 同系物样亚型 X1 (莲花)	869	1×10^{-81}	89
Contig18	莲疏水蛋白 RCI2B (LOC104607190)	486	1×10^{-33}	82
Contig19	未知蛋白 LOC103995951 型 X1	614	5×10^{-27}	80
Contig20	NADH 脱氢酶的辅酶 (棉花)	733	3×10^{-71}	79
Contig21	50S 核糖体蛋白 L3 (葡萄)	1 024	7×10^{-141}	86
Contig22	组蛋白 H2B.11 (醉蝶花)	735	5×10^{-56}	100

主要成分有苯酚、8-羟基喹啉、异硫氰酸胍。苯酚既可裂解细胞,使细胞中的蛋白、核酸解聚而被释放,也可使蛋白质变性,但不能完全抑制 RNA 酶活性,可通过 8-羟基喹啉、异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇等来抑制内外源 RNA 酶。虽然 Trizol 法在提取许多动植物组织或细胞中成功应用,但是不适合对多糖、多酚类物质的提取;CTAB-Trizol 法在 CTAB 法的基础上,加入 Trizol 来去除 DNA 的污染,但容易在点样孔周围有蛋白残留,并且总 RNA 完整性不高,不适合提取草珊瑚叶片总 RNA。

3.2 cDNA 文库构建及质量评价

实验采用 Clontech 公司 SMART 法文库构建试剂盒,方法操作简便易懂。在 RNA 进行反转录时,采用草珊瑚叶片总 RNA,省去了纯化 mRNA 的步骤,并且可以避免在纯化 mRNA 过程中 RNA 的降解和低丰度基因的丢失,从而保证了反转录后 cDNA 的完整性和获得全长 cDNA 的可能性^[37]。与常见的一步反转录不同的是,用两步法完成反转录,即 72 °C 温育 3 min 的热变性处理,再加入反转录酶完成反转录过程,防止因 RNA 链过长或存在复杂的二级结构,从而使反转录酶提前终止反应,无法获得丰富的全长 cDNA。dscDNA 链的合成采用 LD-PCR 的方法,合成的双链 cDNA 经检测符合试验要求。

在反转录过程中以加入的 Oligo (dT) 的起始引物,3'末端带 Oligo (dG) 的 SMART 引物,逆转录酶及总 RNA 为主要合成物质。合成得到的所有 cDNA 单链的一端有含 Oligo(dT)的起始引物序列,另一端有已知的 SMART 引物序列,这样合成第二链后不仅可以利用通用引物进行扩增,而且得到的 cDNA 能够代表原有样品中 mRNA 的丰度,接下来也可以应用于直接扩增基因、构建 cDNA 文库、RACE 技术及应用于芯片检测的 cDNA 探针技术。

通过实验得出影响文库质量的关键因素第二链合成的最佳起始浓度、最佳循环数、cDNA 片段与载体的最佳连接比例等。对于文库质量的评价方面,通过滴度检测、重组率、PCR 片段检测 3 方面来确定。文库滴度检测能反映文库的完整性、覆盖度;重组率能通过蓝白斑的比例间接确定重组片段的导入情况,有一定的误差存在;PCR 片段检测能准确直观地判断重组片段的大小。本实验没有扩增出大于 3 kb 以上的大片段,这是因为 PCR 程序的选择性不利于大片段基因的扩增,是 SMART 法的一个缺陷,针对这一问题后来有了相对的改进方法:(1)将 PCR 扩增的循环数由 18 减到 3 的 Little-cycle SMART 技术^[38];(2)Super SMART 技术;(3)以及为了获取大于 3 kb 的基因片段的 Large-size SMART 技术^[5]。

生物信息学处理能够为药用植物高通量测序产生的大量生物数据进行资源整合、分析和利用,从而构建中药数据库,从中挑取与中药有效成分产生有关的基因、蛋白质进行研究。用传统的 EST 方法获取转录组数据,与基因组 NCBI dbEST 数据库通过 BLAST 软件进行序列比对找出同源序列,与 Blast2GO、KEGG 数据库比对进行基因功能注释和代谢通路分析。随着高通量测序的发展, RNA-seq 在检测基因表达和转录组研究方面显示出优越的特性,其中丹参、红豆杉、甘草等药用模式植物转录组已经测序并发表,对研究次生代谢物生物合成的途径解析和关键基因的挖掘具有促进作用。今后对草珊瑚的各组织也可以通过 RNA-seq 技术探索控制草珊瑚中次生代谢物黄酮类与香豆素类的异嗟皮甙生物合成的具体途径和关键基因。

参考文献

- [1] Maruyama K, Sugano S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides [J]. *Gene*, 1994, 138(1/2): 171-174.
- [2] Suzuki Y, Sugano S. Construction of full-length-enriched cDNA libraries. The oligo-capping method [J]. *Methods Mol Biol*, 2001, 175(5): 143-153.
- [3] Zhumabayeva B, Chenchik A, Siebert P D. RecA-mediated affinity capture: a method for full-length cDNA cloning [J]. *Biol Techn*, 1999, 27(4): 834-840.
- [4] Dai Z, Wang B, Liu Y, *et al*. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(4): 3698.
- [5] 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): 1-8.
- [6] Schmidt W M, Mueller M W. CapSelect: a highly sensitive method for 5'CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs [J]. *Nucl Acids Res*, 1999, 27(21): e31.
- [7] Yuichi S, Piero C Masayoshi I, *et al*. Comparative evaluation of 5'-end-sequence quality of clones in CAP trapper and other full-length-cDNA libraries [J]. *Gene*, 2001, 263(1): 93-102.
- [8] Carninci P, Kvam C, Kitamura A, *et al*. High-efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper [J]. *Genomics*, 1996, 37(3): 327-336.
- [9] Efimov V A, Chakhmakhcheva O G, Archdeacon J, *et al*. Detection of the 5'-cap structure of messenger RNAs with the use of the cap-jumping approach [J]. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(22): 4751-4759.
- [10] Zhang Z X, Zhang F D, Tang W H, *et al*. Construction and characterization of normalized cDNA library of maize inbred MO17 from multiple tissues and developmental stages [J]. *Mol Biol*, 2005, 39(2): 177-184.
- [11] Zhulidov P A, Bogdanova E A, Shcheglov A S, *et al*. A method for the preparation of normalized cDNA libraries enriched with full-length sequences [J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2005, 31(2): 170-177.
- [12] 董志敏, 张宝石, 关荣霞, 等. 全长 cDNA 文库的构建方法 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 51-55.
- [13] 赵光耀. 小麦全长 cDNA 文库构建、测序与分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [14] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, *et al*. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project [J]. *Science*, 1991, 252(5013): 1651-1656.
- [15] 张利达, 唐克轩. 植物 EST-SSR 标记开发及其应用 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3): 534-541.
- [16] 崔永兰. 石蒜属植物 cDNA 文库构建与表达序列标签 (EST) 分析 [D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- [17] 李伍举. 基因表达谱的生物信息学 [J]. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(1): 73-76.
- [18] 陈全求, 詹先进, 蓝家样, 等. EST 分子标记在基因组学中应用的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(3): 59-63.
- [19] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (二十卷第一分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [20] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [21] Cao H J, Tan R R, He R R, *et al*. *Sarcandra glabra* extract reduces the susceptibility and severity of influenza in restraint-stressed mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 236539.
- [22] Li Y, Zhang D M, Li J B, *et al*. Hepatoprotective sesquiterpene glycosides from *Sarcandra glabra* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(4): 616-620.
- [23] 胡晓茹. 草珊瑚的化学成分研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [24] 邹小燕. 草珊瑚化学成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [25] 邵佳. 草珊瑚总黄酮提取纯化及药理作用研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.
- [26] 魏艺聪, 林培玲, 陈莹, 等. 采用 ISSR 标记分析草珊瑚的 DNA 指纹图谱与其品质相关性 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1620-1624.
- [27] 唐美琼, 韦荣昌, 姚绍嫦, 等. 广西草珊瑚种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1398-1402.
- [28] Xu Y, Wei G Y, Zhou Y, *et al*. A set of novel microsatellite

- markers developed for a traditional Chinese medicinal plant, *Sarcandra glabra* (Chloranthaceae) [J]. *J Genet*, 2014, 93(2): e86-e88.
- [29] Jamalnasir H, Wagiran A, Shaharuddin N A, *et al*. Isolation of high quality RNA from plant rich in flavonoids, *Melastoma decemfidum* Roxb ex. Jack [J]. *Austr J Crop Sci*, 2013, 7(7): 911-916.
- [30] 赵 锦, 刘中成, 代 丽, 等. 枣不同器官和组织 RNA 提取方法的研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 111-117.
- [31] King L C, Tsang W H, Lee J T Y. Simple modifications to standard TRIzol[®] protocol allow high-yield RNA extraction from cells on resorbable materials [J]. *J Biomater Nanobiotechnol*, 2011, 2(1): 41-48.
- [32] 宋 蓓, 赵 锦, 刘孟军, 等. 改良 CTAB-LiCl 法提取枣总 RNA 体系的建立 [J]. 中国农学通报, 2007, 7(23): 79-83.
- [33] Zhang D L, Hu C G, Ouyang Y D, *et al*. Construction of a full-length cDNA library and analysis of expressed sequence tags from inflorescence of apomictic sabaigrass (*Eulaliopsis binata*) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30(1): 46-54.
- [34] Gordon D, Abanjian C, Green P. Consed: A graphical tool for sequence finishing [J]. *Genome Res*, 1998, 8: 195-202.
- [35] 龚达平, 解敏敏, 孙玉合. 烟草叶片全长 cDNA 文库构建及 EST 序列分析 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1696-1702.
- [36] Conesa A, Gotz S, García-Gómez J M, *et al*. BLAST2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [37] 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.
- [38] Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, *et al*. Reverse transcriptase template switching: A SMART approach for full-length cDNA library construction [J]. *Biotechniques*, 2001, 30(4): 892-897.