

玉米弯孢霉叶斑病菌均一化全长 cDNA 文库构建与鉴定

刘 铜^{1,2}, 刘力行¹, 刘志诚¹, 侯巨梅², 高士刚¹, 周斐红¹, 陈 捷^{1*}

(¹上海交通大学农业与生物学院 农业部都市农业(南方)重点开放实验室, 上海 200240; ²黑龙江八一农垦大学农学院, 大庆 163319)

摘要: 利用 DSN (duplex-specific nuclease) 均一化与 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术构建玉米弯孢霉叶斑病菌菌丝的均一化全长 cDNA 文库。经检测原始文库的滴度为 1.4×10^6 pfu/ mL, 重组率为 96.9%, 插入片段平均长度大于 1.0 kb。从文库中随机挑取 192 个 cDNA 克隆测序, 获得 173 个高质量的 EST 序列, 其中有 5 个跨叠群 (conting), 168 个独立克隆, 全长 cDNA 克隆占 57%。BLASTx 分析表明, 有 18.5% EST 与 GenBank 中无任何同源性, 有 81.5% EST 与 GenBank 中报道的功能已知或未知蛋白具有相似性。

关键词: 均一化; cDNA 文库; 弯孢霉; 菌丝

Construction and characterization of a normalized full-length cDNA library of *Curvularia lunata* LIU Tong^{1,2}, LIU Li-xing¹, LIU Zhi-cheng¹, HOU Ju-mei², GAO Shi-gang¹, ZHOU Fei-hong¹, CHEN Jie¹ (¹School of Agriculture and Biology and Key Laboratory of Urban Agriculture (South) of Ministry of Agriculture, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; ²School of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: A normalized full-length cDNA library was constructed with the mycelium of *Curvularia lunata*, a causal organism of maize leaf spot, by DSN duplex-specific nuclease normalization method combined with SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technique. This library was characterized by a plaque titer of 1.4×10^6 pfu/ mL and a 96.9% recombination ratio, of which the fragment length of inserted average cDNA sequences was above 1.0 kb. The 173 high quality expressed sequence tags (EST) including 5 coting and 168 singlet was obtained from 192 cDNA clones randomly picked. Based on bioinformatics analysis, the full-length cDNA accounted for 57% of total sequences. BLASTx analysis revealed that 81.5% of the EST displayed significant homology to known or unknown genes from GenBank database.

Key words: normalized; cDNA library; *Curvularia lunata*; mycelium

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2010)03-0250-08

由新月弯孢霉 [*Curvularia lunata* (Wakker) Boed] 引起的玉米弯孢霉叶斑病已成为我国,乃至世界各国玉米生产区的一种重要性真菌病害^[1-4]。目前对该菌的致病机理国内外已有研究^[5-8]。但由于尚未开展该病菌基因组测序工作,因此给该病

菌致病相关基因的功能鉴定带来较大困难。前期基因克隆和蛋白质组学分析发现:该病菌致病相关基因种类较多,很多致病相关基因,如色素、毒素合成相关基因和一系列信号转导相关基因,由于毒素和色素合成均是通过次生代谢途径完成的,涉及到

收稿日期: 2009-09-02; 修回日期: 2010-02-24

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2006CB101901); 国家科技支撑课题(2006BAD08A06); 国家自然科学基金资助项目(30871610)

通讯作者: 陈 捷, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病理学和环境微生物工程研究; E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn

第一作者: 刘 铜(1978-), 男, 江西人, 博士生, 主要从事分子植物病理学研究; E-mail: liutongamy@sina.com。

众多调控环节和互作网络,鉴定这类物质合成和调控相关基因在致病性中的作用的的工作量相当巨大,因此在该菌基因组尚未测序的前题下,建立该病菌 cDNA 文库是提高基因鉴定效率的重要途径。由于与次生代谢有关的致病相关基因很多为低丰度表达,所以建立均一化全长 cDNA 文库将为高效筛选致病相关基因,深入开展致病性分子机理研究具有重要意义。

全长 cDNA 文库的构建、测序和功能注释是了解生物体结构和功能的一种重要方法之一,特别是对近期不能开展全基因组测序的物种,全长 cDNA 文库将成为寻找、筛选分析基因的重要手段之一^[9,10]。我们可以根据已有基因信息来设计探针筛选 cDNA 文库,快速的获得全长基因;同时也可以通过大规模的 EST 测序,经生物信息分析获得大量重要基因信息,另外对所获得的表达基因可以直接用于蛋白表达以及后续的基因功能分析,加速基因功能的研究。因此,构建病原真菌玉米弯孢霉叶斑病菌的均一化全长 cDNA 文库,将为高效开展玉米弯孢霉叶斑病菌致病相关基因的分离筛选,EST 测序和后续的基因组研究提供一个重要的平台。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病菌:玉米弯孢霉叶斑病菌强致病力菌株 CX-3 是从玉米品种连玉 3 号叶片分离的,以硅胶粒形式 -20℃ 下保存于上海交通大学农业与生物学院分子植物病理学实验室备用。

1.2 总 RNA 提取和 mRNA 的分离纯化

将 -20℃ 保存的菌株转接于 PDA 培养基活化 7 d 后,在菌落边缘用打孔器(直径 4 mm)打成菌饼,取 1 块菌饼接种于 100 mL PD 培养基中,置于 28℃,120 r/min,培养 5 d 后,用 4 层纱布过滤收集 50~100 mg 菌丝,立即投入液氮研磨成粉末,然后采用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂提取菌丝的总 RNA,用琼脂糖凝胶(1.0%)电泳观察 RNA 完整性,紫外分光光度法测定总 RNA 的浓度和纯度。

1.3 全长双链 cDNA 合成

参照 Creator SMART cDNA Construction Kit (Clontech, USA) 说明,操作合成第一条 cDNA

链。在预冷的 0.5 mL 无菌离心管中混合如下试剂:3 μ L 总 RNA 样品,1 μ L SMART IV Oligonucleotide,1 μ L CDS III/3 PCR primer,混匀混合物,在微量离心机中稍离心使混合物都集中管底,置于 72℃ 孵育 2 min,冰上冷却 2 min,稍离心使内容物都集中到管底,然后向每一个管中依次加入以下试剂:2.0 μ L 5 \times First-Strand Buffer、1.0 μ L DDT (20 mmol/L)、1.0 μ L dNTP Mix (10 mmol/L)、1.0 μ L PowerScriptTM Reverse Transcriptase,用去离子水补足 10 μ L 后混匀离心,置 42℃ 气浴中保育 1 h,将离心管置于冰上以终止第一链的合成。

采用 LD PCR(long distance PCR)扩增 cDNA 第一链以获得双链 cDNA,反应体系如下:95℃ 1 min,95℃ 15 s,68℃ 6 min;21 个循环。反应结束后,取 5 μ L 产物,以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其结果。

1.4 全长 cDNA 的均一化及均一化程度检测

使用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) 将合成的双链 cDNA 的 PCR 产物进行纯化,操作参照说明书。将纯化后的 cDNA 溶于 15 μ L 无菌水中,取 1 μ L 测定浓度,用无菌水调节浓度在 100 ng/ μ L 左右,然后根据 Trimmer-Director Kit (Evrogen, Russia) 说明进行均一化。在 0.2 mL 无菌离心管中加入下列成分:SMART-prepared ds cDNA (1 200 ng of dissolved cDNA) 12 μ L、4X Hybridization buffer 4 μ L,混匀离心,将样品分成 4 等份,每个 PCR 管中加入 2 滴矿物油,在 98℃ 温浴 2 min,然后 68℃ 温浴 5 h 后,各管加 68℃ 预热 DSN master buffer 5 μ L,再分别加经梯度稀释的 DSN (duplex-specific enzyme) 处理液,68℃ 保温 25 min 后,每管加入 10 μ L 终止液(stop solution)终止反应,然后反应液进行第一次 PCR,在灭菌的 PCR 管中加入以下组份:cDNA (DSN 处理稀释后) 1 μ L、ddH₂O 40.5 μ L、10X Advantage 2 PCR Buffer 5 μ L、50X dNTP Mix (10 mmol/L of each) 1 μ L、Evrogen PCR primer M1 1.5 μ L、50X Advantage 2 Polymerase Mix 1.0 μ L。反应条件:95℃ 1 min,95℃ 15 s,66℃ 20 s,72℃ 3 min;7 个循环。反应结束后,取 5 μ L PCR 产物,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测均一化程度。

1.5 均一化全长 cDNA 文库构建

使用上述 QIAquick 纯化试剂盒将 cDNA 产物

纯化,操作参照说明书,最终用 80 μL ddH₂O 溶解回收产物,然后再加入下列组分进行酶切:79 μL cDNA (Purified cDNA)、10 μL 10 \times Sfi I Buffer、10 μL Sfi I Enzyme (Sfi I A 和 Sfi I B)、1 μL 100 \times BSA,总体积 100 μL ,50 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 2 h,将酶切产物用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳,60 V,2 h,同时加 DL2000 plus marker,将 Marker 用 EB 染色,在紫外灯下标出 1 ~ 5 kb 区域,将酶切产物的 1 ~ 3 kb 区域切下,用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) 回收,操作见说明书。取回收后的 50 ng cDNA 与载体 pDNR-LIB 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,取 2 μL 连接产物电击转化高效感受态细胞 DH10B 中,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床,120 r/min 培养 1 h,加入 50% 体积的 50% 甘油,即为均一化全长 cDNA 文库。

1.6 文库滴度与重组率测定

按 2009 年 Wu 等^[11] 的方法,从文库中取 10 μL 菌液用培养基分别稀释到 100、1 000、10 000 倍。从中各取 100 μL 涂于含氯霉素的 LB 平板,培养 12 ~ 16 h,计算其克隆数。根据公式 $T = N \times D / V$ (T 为滴度, N 为平板上克隆数, D 为稀释倍数, V 为涂板体积) 计算文库滴度。从文库中随机挑取 200 克隆用蓝白斑筛选来检测文库的重组率。

1.7 插入片段大小鉴定

随机挑取 38 个克隆进行菌落 PCR 鉴定,取适量 PCR 薄壁管,置于冰上,每管先加入 17.3 μL 的灭菌水,用 10 μL 小枪头挑取单克隆白斑至灭菌水中,振荡混匀依次加入:10 \times buffer 2.5 μL 、MgCl₂ (25 mmol/L) 1.8 μL 、dNTP (2.5 mmol/L) 1 μL 、M¹³⁺ 引物 (10 pmol) 1 μL 、M¹³⁻ 引物 (10 pmol) 1 μL 、Taq 酶 0.4 μL ,进行 PCR 反应。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,53.6 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min,35 个循环。待 PCR 反应后,取 7 μL PCR 产物电泳,根据胶图粗略鉴定插入片段的大小。

1.8 序列测定、全长率以及生物信息学分析方法

随机挑取 192 个 cDNA 克隆,使用 96 孔板进行碱裂解法提取质粒 DNA;使用 M¹³⁺ 测序引物进行单次测序,测序委托北京华大基因技术公司完成,利用 Phred^[12] 程序进行序列碱基识别和质量判定,质量标准为 Q20。获得的 EST 序列经过去除载

体序列、大肠杆菌基因组序列的污染,并去除接头序列,其余高质量序列参加序列组装。序列组装使用 Phrap^[13,14] 程序,在 Dell 服务器上进行,组装参数为程序的默认值,拼接后得到跨叠群 (contig) 及单一序列 (singlets),与 NCBI 非冗余核酸库 (NT) 和非冗余的蛋白库 (NR) 进行同源性比较。cDNA 文库全长率按以下公式进行统计:全长 cDNA 数目 = F1 + F2 + F3。F1: 将高质量的序列与 NCBI 非冗余的蛋白库 (NR) 做同源比对 (Blastx $e < = 1e-5$),如果序列能和蛋白库中的蛋白序列的“头部” (start codon) 比对上的序列,我们定义为 F1; F2: 其 ORF 能和 NR 库比对上,但没有和 NCBI 非冗余的蛋白库 (NR) 蛋白序列头部比对上的序列,若能在其比对部分的上游找到 start codon 的序列,我们定义为 F2; F3: ORF 没有和 NCBI 非冗余的蛋白库 (NR) 比对上,但在其序列上能找到 ORF 的序列,我们定义为 F3。

2 结果

2.1 菌丝总 RNA 及 mRNA 质量

琼脂糖凝胶电泳检测总 mRNA (图 1): 从图 1 可以看到 28S rRNA 和 18S rRNA 特征条带整齐清晰,而 5.8S rRNA 和其它核糖体 RNA 条带微弱难见,说明 RNA 完整性较好,基本没有 RNA 的降解;同时经紫外分光光度计测定总 RNA 浓度为 1.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $A_{260}/A_{280} = 2.0$,说明总 RNA 没有蛋白或 DNA 的污染,质量和浓度非常好,已经达到了构建全长 cDNA 文库要求。

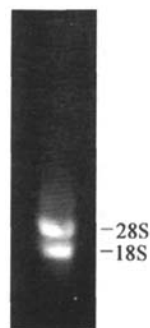


Fig. 1 Total RNA from mycelium of *Curvularia lunata*

2.2 全长双链 cDNA 合成

反转录得到第一条 cDNA 链经 LD-PCR 扩增后,取 5 μ L 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,检测结果见图 2。其结果表明双链 cDNA 片段条带集中分布在 0.1 ~ 3.0 kb 区域,并且中间有明亮的条带代表高丰度的基因,这表明所有 mRNA 得到有效的反转录,cDNA 较为完整,质量较好,符合建库要求,可以进行下一步的均一化处理。

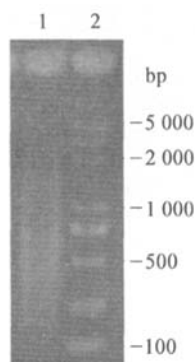


Fig. 2 The result of LD-PCR-amplified ds-cDNA
Lane 1: ds-cDNA; Lane 2: DL2000 plus marker.

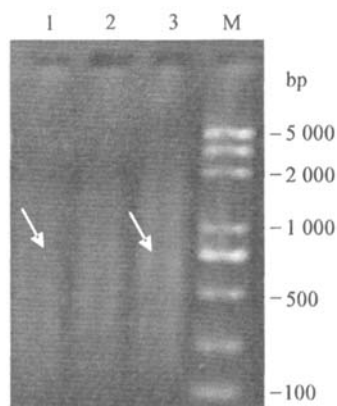


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of non-normalized and normalized amplified SMART-prepared cDNA
Lane 1 - 3: 1 \times , 1/2 \times , 0 \times concentration of DSN; Lane M: DL2000 plus marker.

2.3 均一化效果检测

经过 1 倍和 1/2 倍 DSN 处理和不同循环数 PCR 扩增后,发现经 1/2 倍 DSN 处理和 11 个循环扩增后其中间代表较亮的条带消失,呈现一条均匀的弥散条带,表明高丰度的基因丰度明显下降,其结果见图 3,这反映均一化效果良好。

2.4 文库滴度与重组率

经过公式计算显示原始文库滴度为 1.4×10^6 pfu/mL,完全能够保证从这个 cDNA 文库中筛选出所需的低拷贝基因;同时用蓝白斑筛选鉴定重组率,结果显示重组率为 96.9%,实际上重组率大于 80% 的 cDNA 文库即为合格的文库,因此文库为合格的 cDNA 文库。

2.5 插入片段大小分析

PCR 扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小结果见图 4。电泳谱带统计结果表明,2 ~ 5 kb 1 个、1 ~ 2 kb 36 个、0.5 ~ 1.0 kb 1 个,插入片段大小基本上分布在 1 ~ 2 kb 之间,去除载体序列后平均长度大于 1 kb。

2.6 序列测定、全长率以及生物信息学分析

对随机挑取的 192 个 cDNA 克隆进行核苷酸测序,结果获得了 173 个高质量 EST 序列,其中有 5 个重叠群,168 个独立克隆。对这些序列经过 Blastx(以 e 值 $\leq 1e-10$) 分析表明,有 142 个 EST 与非冗余的蛋白质库中报道的功能已知或未知蛋白具有相似性序列占 81.5%。按以上全长率统计方法共有 99 个 EST 序列被认为是全长 cDNA 克隆,占 57% 以上,这些基因大部分与小麦颖枯病菌(*Phaeosphaeria nodorum* SN15)基因组中序列相似,小部分来自小麦颖枯壳针孢菌(*Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP)和月状旋孢腔菌(*Cochliobolus lunatus*),它们主要涉及细胞的新陈代谢、细胞防御反应、胞内信号转导、基因转录调节、DNA 或 RNA 合成与损伤修复等(表 1)。另外从 99 个全长 cDNA 克隆中随机抽取 8 个克隆继续全序列测定时,分别获得了它们全长基因序列,包括完整读码框和 5' 端以及 3' 端非翻译区,这证明了构建的 cDNA 文库质量较高,可从文库有效分离全长基因,达到预期结果。

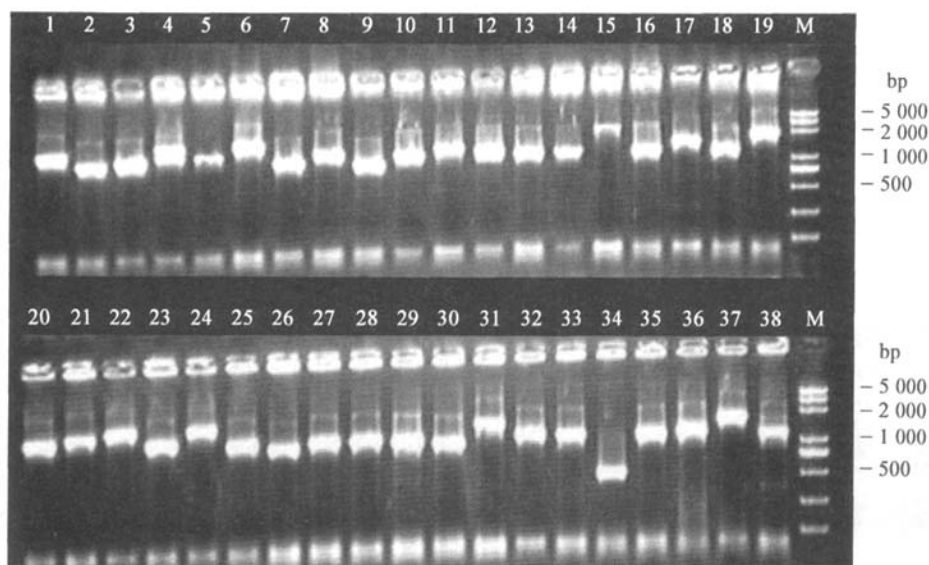


Fig. 4 Average size of inserts of full-length cDNA library of *Curvularia lunata*

Lane 1–38: PCR production of cDNA clones randomly picked from library; Lane M: Marker.

3 讨论

3.1 菌丝可作为构建理想文库的材料

在构建均一化全长 cDNA 文库中我们采用的始发材料是培养 5 d 后的菌丝,因为这时期的菌丝处于生长活跃期,菌丝在离体的条件已经产生了细胞壁降解酶、黑色素、毒素等相关致病因子^[5,6,15],以这时期菌丝构建的 cDNA 文库将会包含产生这些致病因子所有基因的集合,并且在后续的随机测序中也发现了参与这些因子合成的基因,例如 CL108 克隆编码蛋白与 Bml 蛋白具有 100% 同源性,而 Bml 主要参与了玉米弯孢霉叶斑病菌的黑色素合成^[16]。这些表明了以这时期的菌丝为材料构建的 cDNA 文库将有利于寻找、筛选与致病因子合成基因以及次生代谢过程的相关功能基因,为进一步研究该菌的致病机理提供重要素材。

3.2 构建均一化全长 cDNA 文库的优点

构建均一化全长 cDNA 文库具有以下几个方面的优点:(1)它可以根据已知部分 cDNA 序列为探针获取大部分基因的全长序列,同时可以直接连接到表达载体上表达出蛋白,进行后续相关研究。

然而传统方法构建的 cDNA 文库只能获得部分 cDNA 序列不是全长的,再想获取它的全长序列时需要进一步做 5'端和 3'端 RACE,使实验既复杂难做又耗资多。(2)采用均一化技术克服基因转录水平的差异,可以大大降低高丰度基因转录水平,提高了对低丰度基因筛选。传统方法构建的 cDNA 文库由于存在着大量高丰度基因,给文库的筛选和分析带来障碍,同时也增加了实验成本。(3)可以用于遗传图谱的制作和进行大规模的原位杂交,作为优化的文库系统还可以用于大规模的测序或芯片制作等研究^[11]。

3.3 文库的评价

评价一个高质量的均一化全长 cDNA 文库具体反映在 3 个方面:一是文库的原始滴度,它代表着一个文库的库容量,是用一个量化的指标来衡量。在真核生物每时每刻表达的 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%,要使低丰度的 mRNA 从一个 cDNA 文库被筛选到一般滴度需要达到 5×10^5 ,本试验所构建的初始滴度为 1.4×10^6 pfu/mL,保证了文库的完整性与覆盖度。二是插入片段的大小及

Table 1 EST matched against the know or unknown proteins in the non-redundant protein database based on Blastx($E \leq 1e-10$)

Uniseq ID	Size (bp)	No. of EST	EST matched against the know or unknown proteins	Source species	E-value
Cell structure and development					
CL1	608	1	RING-14 protein	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	9e-39
CL9	571	1	Endoplasmic reticulum and nuclear membrane protein Np14	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	4e-61
CL62	600	1	50S ribosomal protein L6	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	2e-82
CL79	571	1	T-complex protein 1 subunit epsilon	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	2e-96
CL92	195	123	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	<i>Danio rerio</i>	3e-27
CL121	595	1	Autophagy related lipase Atg15	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	4e-20
CL140	607	1	Integral membrane protein	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	7e-90
CL181	471	2	SDA1 family protein	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	1e-33
CL183	615	2	Vacuolar morphogenesis protein AvaB	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	1e-71
CL187	531	1	Ankyrin repeat and protein kinase domain containing protein 1	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-85
CL60	177	102	Splicing factor 3B subunit 1	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	5e-26
Metabolism					
CL10	598	1	Esterase/lipase/thioesterase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	1e-79
CL27	569	1	Phosphoglucomutase-2	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	4e-52
CL31	606	16	Dihydrolipoyl dehydrogenase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	1e-105
CL34	563	3	GTP cyclohydrolase II	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-99
CL39	591	4	C-5 sterol desaturase desaturase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-89
CL47	544	19	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	8e-99
CL61	559	1	Guanylate kinase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-59
CL70	365	13	Polysaccharide deacetylase family protein	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	6e-64
CL108	466	88	Hydroxynaphthalene reductase	<i>Cochliobolus lunatus</i>	1e-57
CL117	580	1	NADPH dehydrogenase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-72
CL119	464	2	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	2e-84
CL128	556	1	Ethanolaminephosphotransferase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	1e-91
CL141	561	2	Orotate phosphoribosyltransferase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	1e-87

Table 1 EST matched against the know or unknown proteins in the non-redundant protein database based on Blastx ($E \leq 1e-10$) (continued)

Uniseq ID	Size (bp)	No. of EST	EST matched against the know or unknown proteins	Source species	E-value
CL144	596	1	Dihydroceramidase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	2e-93
CL152	601	24	Dihydrolipoamide succinyltransferase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	1e-87
CL162	629	2	Histone acetyltransferase ESA1	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	8e-94
CL163	532	2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	1e-27
CL165	498	1	Glycerol:H + symporter (Gup1)	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	9e-76
CL177	380	2	Copper methylamine oxidase precursor	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	4e-62
Signaling molecular and regulation factor					
CL55	484	2	26S proteasome regulatory subunit rpn2	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-78
CL59	619	2	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-35
CL82	485	1	F-box domain containing protein	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-63
CL161	538	1	GTPase Ras2p	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-67
CL167	558	2	WD repeat containing protein 44	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	2e-95
DNA, RNA and protein synthesis					
CL13	314	2	ATP-dependent RNA helicase SUB2	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	5e-52
CL22	571	1	Transcription elongation factor spt6	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	5e-86
CL81	572	1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-4	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-18
CL89	598	2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	8e-99
CL129	618	2	DNA polymerase alpha 70 kDa subunit	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	5e-98
CL157	538	1	DNA-directed RNA polymerase II 19 kDa polypeptide	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	8e-53
CL168	529	22	ATP-dependent RNA helicase eIF4A	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	2e-54
CL192	497	2	DNA primase large subunit	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	3e-62
Cell defense response					
CL8	570	20	Hsp70 family protein	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	1e-104
CL186	490	2	Bli-3 protein	<i>P. tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	2e-65
Others			Hypothetical protein or unknown		

其全长率,本研究所构建的文库插入片段平均长度在 1.0 kb 以上,通过小规模测序分析表明全长基因比例超过 57%,这样保证了高比例全长 cDNA 的获得。三是均一化效果,本研究主要采用 DSN 均一化法处理,DSN 能够选择性降解双链 DNA 和 DNA-RNA 杂交体中的 DNA,高丰度的基因在形成双链速度快,其降解速度也快,而低丰度的基因在形成双链速度慢,其降解速度也慢,从而使所在表达的基因的拷贝数能够达到均一化的目的。本试验的均一化效果,主要采用两个方面进行判断,一是把均一化后 cDNA 进行电泳分析,从图片上可以直观地看到均一化之后主带消失,在 0.1 ~ 3.0 kb 区域有均匀的条带分布;二是从 EST 测序结果分析其序列的冗余度只有 3.45%,说明均一化的效果比较理想^[6]。从以上几个方面可以看出,本研究成功构建了一个高质量的玉米弯孢霉叶斑病菌菌丝均一化全 cDNA 文库,为大规模的 EST 测序及其筛选,从中发掘新的致病相关基因,并为开展玉米弯孢霉叶斑病菌功能基因组学研究提供了技术平台。

参考文献

- [1] Dai F C, Gao W D, Wu R J, *et al.* A noticeable corn disease: *Curvularia* leaf spot (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 1995, 25: 330.
- [2] Dai F C, Wang X M, Zhu Z D, *et al.* *Curvularia* leaf spot of maize: pathogens and varietal resistance (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 1998, 2: 123-129.
- [3] Li J T, Fu J F, Yan X R, *et al.* Analysis of temporal dynamics of *Curvularia* leaf spot of maize (*Curvularia lunata*) epidemic and yield loss (in Chinese) [J]. *Journal of Shenyang Agriculture University* (沈阳农业大学学报), 2006, 6: 835-839.
- [4] Macri F, Lenna P. Leaf corn blight incited by *Curvularia lunata* (Wakk.) Boed [J]. *Journal of Plant Pathology*, 1974, 10: 27-35.
- [5] Feng J, Gao Z G, Xue C S, *et al.* The pathogenesis of the cell-degrading enzymes produced by *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. *Rain Fed Crops* (杂粮作物) 2002, 22: 164-166.
- [6] Wang X F, Xie C S, Xu S F, *et al.* Research on melanin characters and its effect on pathogenicity of *Curvularia lunata* in maize (in Chinese) [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences* (安徽农业科学), 2007, 35(21): 6476-6478.
- [7] Macri F, Vianello A. Isolation and partial characterization of phytotoxins from *Curvularia lunata* (Wakk.) Boed [J]. *Physiology Plant Pathology*, 1976, 8: 325-331.
- [8] Liu T, Liu L X, Jiang X, *et al.* A new furanoid toxin produced by *Curvularia lunata*, the causal agent of maize *Curvularia* leaf spot [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2009, 31: 22-27.
- [9] Wang Y R, Zhang X Y, Liu C L, *et al.* Construction and characterization of normalized full-length cDNA library of Asian cotton (*Gossypium arboreum* L.) in the whole-life cycle (in Chinese) [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2009, 42(4): 1158-1164.
- [10] Zhao G Y, Kong X Y, Jia J Z. Full-length cDNA libraries construction from *Ae. tauschii* root and shoot and EST annotation and comparative analysis (in Chinese) [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2007, 40(7): 1331-1336.
- [11] Wu D, Liu J J, Yu S X, *et al.* Establishment and identification of a normalized full-length cDNA library of CCRI 36 (in Chinese) [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2009, 35(4): 602-607.
- [12] Ewing B, Hillier L, Wendl M, *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment [J]. *Genome Research*, 1998, 8: 175-185.
- [13] Laboratory of Phil Green. <http://www.phrap.org/>.
- [14] Gordon D, Abanjian C, Green P. *Consed*: A graphical tool for sequence finishing [J]. *Genome Research*, 1998, 8: 195-202.
- [15] Tang S G, Zuang J H, Gao Z G, *et al.* Factors affecting toxin production of *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science* (安徽农业科学), 2007, 35(1): 1-3.
- [16] Xu S F, Chen J, Liu L X, *et al.* Proteomics associated with virulence differentiation of *Curvularia lunata* in maize in China [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(4): 487-496.

责任编辑:于金枝