

应用 cDNA-AFLP 技术分离草菇冷诱导表达基因

郭丽琼^{1, 2} 林俊芳^{1, 2*} 杨丽卿² 刘瑞瑞²

(¹ 华南农业大学食品学院生物工程系, 广州 510640; ² 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘要: 采用 cDNA-AFLP 技术筛选获得了 5 个草菇冷诱导表达基因片段 VC1、VC2、VC3、VC4 和 VC5。测序结果表明, 5 个 DNA 片段大小分别为 247 bp、219 bp、172 bp、350 bp 和 171 bp。同源性 BLAST 搜索结果显示, VC1、VC2、VC3、VC4 和 VC5 片段目前都没有同源的核酸序列; VC1 片段翻译的蛋白质序列与粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的假拟蛋白具有一定的同源性, VC2 片段翻译的蛋白质序列与水稻的 AMP 脱氨酶具有一定的同源性, VC3 片段翻译的蛋白质序列与 *Danio rerio* 的糖原合酶激酶 3 具有较高的同源性, VC4 片段翻译的蛋白质序列与 *Leuconostoc mesenteroides* 的假拟蛋白具有一定的同源性, VC5 片段翻译的蛋白质序列没有搜索到同源序列。

关键词: 草菇; cDNA-AFLP; 冷诱导表达基因

中图分类号: S 646.1⁺3; Q 812 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 01-0054-06

Isolation of Cold Stress Genes through cDNA-AFLP from *Volvariella volvacea*

Guo Liqiong^{1, 2}, Lin Junfang^{1, 2*}, Yang Liqing², and Liu Ruihui²

(¹ Department of Bioengineering, College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China; ² State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Five cold stress gene fragments were isolated through cDNA-AFLP from *Volvariella volvacea* and were designated as VC1, VC2, VC3, VC4 and VC5 respectively. DNA sequence results indicated that these five DNA fragments had 247 bp, 219 bp, 172 bp, 350 bp and 171 bp respectively. BLAST search results showed that VC1, VC2, VC3, VC4 and VC5 had no significant homologous nucleotide sequences found in databases. Postulated protein sequences of VC1, VC2 were homologous with the hypothetical protein of *Neurospora crassa* and the putative AMP deaminase of *Oryza sativa*, respectively. Postulated protein sequences of VC3, VC4 were homologous with the glycogen synthase kinase three alpha in *Danio rerio* and the hypothetical protein in *Leuconostoc mesenteroides* respectively. But postulated protein sequence of VC5 had not found the significant homologous protein sequence in the databases yet.

Key words: *Volvariella volvacea*; cDNA-AFLP; Cold stress gene

草菇 (*Volvariella volvacea*) 是一种高温型的食用菌, 在 4℃ 低温条件下, 其菌丝会发生自溶而死亡, 子实体会发软甚至液化或腐烂^[1, 2]。陈明杰等的研究结果表明^[3~5], 草菇在低温胁迫下, 细胞内的可溶性蛋白组分和 RNA 组分都发生了变化, 大分子量的蛋白质和 RNA 组分减少, 小分子量的蛋白质和 RNA 组分显著增加。根据这一结果, 我们推测, 在低温胁迫下, 草菇的基因表达发生了变化, 有些基因关闭而停止表达, 另一些基因则受低温诱导而启动表达, 再有一些基因的表达水平可能增强或减弱。陈明杰等利用 mRNA 差别显示技术分离了草菇低温诱导的一些 DNA 片段, 但未见其 DNA 序列报道^[6, 7]。

cDNA-AFLP 技术^[8]具有假阳性低、特异性高、重复性好等特点, 能够在一定程度上克服常用差

收稿日期: 2004-04-21; 修回日期: 2004-06-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30060054)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: linjf@scau.edu.cn)

异显示技术如 DD/RT-PCR、cDNA-RDA、cDNA Subtractive Hybridization 等共同存在的假阳性高的问题, 因而已被广泛应用于植物、动物和微生物的差异表达基因的克隆分离和遗传作图方面^[9~12]。我们采用 cDNA-AFLP 技术克隆分离草菇冷诱导表达基因, 并对其 DNA 序列进行测序和结构分析。本文报道这一研究结果。

1 材料和方法

1.1 草菇菌株及其菌丝体培养

草菇菌株 V34 购自华中农业大学菌种保藏中心。采用常规方法配制改良的马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (改良的 PDA 培养基配方: 去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 磷酸二氢钾 0.6 g, 硫酸镁 0.5 g, 琼脂 25 g, 水 1000 mL), 高压灭菌后倒于培养皿中。每一直径 9.0 cm 的培养皿灌注培养基 25 mL, 凝固后铺上一层无菌硫酸纸, 接种一块约 0.5 cm² 的草菇 V34 菌种块, 置于 28 °C 培养箱中恒温培养。

1.2 菌丝体低温处理

草菇菌丝体在 28 °C 培养箱中恒温培养 10 d 后分成 3 组, 第 1 组不作预处理立即提取总 RNA, 第 2 组在 4 °C 下处理 2 h 后提取总 RNA, 第 3 组在 4 °C 下处理 6 h 后提取总 RNA。

1.3 草菇菌丝体总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化及双链 cDNA 的合成

使用 TR lzo1 (Invitrogen 公司产品) 及其说明提取草菇菌丝体的总 RNA。称取 0.5~1.0 g 的草菇菌丝体, 在液氮中研磨至粉末, 迅速加入 5 mL TR lzo1 试剂, 拌匀后转至离心管中于室温下静置抽提 5 min。4 °C 下 12000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 转上清液于新离心管中, 加 1 mL 氯仿, 混匀后室温抽提 5 min。离心并转上清液于新离心管中, 加 2.5 mL 异丙醇室温沉淀 5 min。离心后沉淀的 RNA 用 1 mL 75% DEPC 处理的乙醇漂洗 1 次, 离心沉淀的 RNA 溶于 250 µL 的 DEPC 处理水中, 加 250 µL 的 2 × RNase-free DNase 处理混合液 (20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.04 U·µL⁻¹ RNase-free DNase), 37 °C 下温育 1 h 以消化混杂的 DNA。加 500 µL 饱和酚 氯仿 (1:1) 室温抽提 5 min, 离心取上清液, 无水乙醇沉淀, 75% DEPC 处理的乙醇漂洗, 离心沉淀即得草菇菌丝体总 RNA, 于 -80 °C 下保存备用。采用 Oligotex mRNA 纯化系统 (QIAGEN 公司产品) 及其说明从以上提取的草菇菌丝体总 RNA 中分离纯化草菇菌丝体 mRNA。采用 AMV Reverse Transcription 系统 (Promega 公司产品) 反转录合成草菇菌丝体双链 cDNA。

1.4 草菇菌丝体双链 cDNA 的酶切和接头连接

使用 *EcoR* 和 *Mse* (New England Biolabs 公司产品) 酶切草菇菌丝体双链 cDNA, 酶切产物用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 公司产品) 纯化后与 *EcoR* 和 *Mse* 接头连接。*EcoR* 接头的两条寡核苷酸序列为: 顶链 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 底链 5'-PAA TTGGTACGACGTCTAC-3'; *Mse* 接头的两条寡核苷酸序列为: 顶链 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', 底链 5'-PTACTCAGGACTCAT-3', 其中 P 为磷酸化碱基。两种接头的顶链和底链以相同浓度分别退火后即为 *EcoR* 接头和 *Mse* 接头。寡核苷酸由美国 OPERON 公司合成。

1.5 初级模板的制备和 PCR 预扩增

与两种接头连接的草菇菌丝体双链 cDNA 片段稀释 10 倍后即成为 PCR 预扩增的初级模板。PCR 预扩增的反应体系为: 1 × PCR Buffer (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.5, 50 mmol·L⁻¹ KCl, 0.1% Triton X-100, 不含 MgCl₂), 2.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 200 µmol·L⁻¹ dNTPs, 0.25 µmol·L⁻¹ *EcoR* 预扩增引物和 *Mse* 预扩增引物, 2.5 U Taq DNA Polymerase (QIAGEN 公司产品), 初级模板 5 µL, 反应总体积 50 µL。PCR 预扩增的反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 循环参数为: 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 20 次循环; 72 °C 后延伸 6 min。*EcoR* 预扩增引物的序列为: 5'-GACTGCGTACCAATTCN-3'; *Mse* 预扩增引物的序列为: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3', 其中 N 为 A、C、G、

T的任一碱基。*EcoR* 和 *Mse* 的预扩增引物由美国 OPERON 公司合成。

1.6 次级模板的制备和 PCR选择扩增

PCR 预扩增产物稀释 50倍后即为 PCR 选择扩增的次级模板。PCR 选择扩增的反应体系与预扩增的反应体系相同,但扩增引物改变为 *EcoR* 和 *Mse* 选择扩增引物,扩增模板改变为次级模板。选择扩增反应采用 Touchdown PCR 进行,反应条件是:94 预变性 4 min;前 13个循环 94 变性 30 s,65 (每一循环降低 0.7) 退火 35 s,72 延伸 1 min,13次循环;后 23个循环 94 变性 30 s,56 退火 35 s,72 延伸 1 min,23次循环;随后 72 继续延伸 6 min。*EcoR* 选择扩增引物的序列为:5'-GACTGCGTACCAATTCNN (N) -3';*Mse* 选择扩增引物的序列为:5'-GATGAGTCCTGAGTA-ANN (N) -3',其中 N 为 A、C、G、T 的任一碱基,(N) 为有或无这一个碱基。*EcoR* 和 *Mse* 的选择扩增引物由美国 OPERON 公司合成。

1.7 PCR选择扩增产物的差别显示和差异条带的回收

PCR 选择扩增产物采用 1.8%的琼脂糖 (SIGMA 公司产品) 凝胶电泳和溴化乙锭染色进行差别显示。DNA 差异条带的回收采用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 公司产品) 及其说明进行。

1.8 DNA 差异条带与质粒载体的连接及其转化大肠杆菌感受态细胞

回收的 DNA 差异条带与 T-easy 载体 (Promega 公司产品) 连接后,转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞,37 培养过夜。连接反应参照 T-easy 载体试剂盒说明进行。大肠杆菌 DH5 感受态细胞的制备及其转化参照文献 [13] 进行。

1.9 转化子插入片段的酶切鉴定和 DNA 差异片段的 Northern 杂交

挑取白色单菌落,提取质粒,酶切鉴定插入片段。选取大小正确的插入片段作为探针进行 DNA 差异片段的 Northern 杂交。草菇菌丝体培养和低温处理按照上述方法进行,菌丝体总 RNA 的提取采用上述的 TRIzol 方法进行。RNA 甲醛变性凝胶电泳分离、印迹转移、尼龙膜 (Hybond-N+, Amersham 公司产品) 紫外交联 (UV CrossLinker, Stratagene 公司产品) 参照文献 [13] 进行。探针标记、预杂交、杂交、洗膜和显色采用 DIG DNA Labeling and Detection Kit (ROCHE 公司产品) 及其说明进行。

1.10 DNA 特异片段的序列测定

挑取含有插入特异片段的质粒进行 DNA 序列测定。质粒提取采用 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 公司产品) 及其说明进行。插入特异片段的 DNA 序列测定由上海联合基因公司完成。

1.11 DNA 特异片段的序列同源性搜索与相似性比对

采用美国国家生物技术信息中心 NCB 的 blastn 和 blastx 两种 BLAST 程序进行 DNA 特异片段的序列同源性搜索与相似性比对。

2 结果与分析

2.1 PCR选择扩增产物和 DNA 差异条带

共采用 16种 *EcoR* 选择扩增引物和 12种 *Mse* 选择扩增引物,进行了 196次选择扩增。扩增获得 5个 4 低温处理诱导表达的 DNA 差异条带,分别命名为 VC1, VC2, VC3, VC4和 VC5。有些选择扩增的产物为 DNA 弥散团 (图 1, , 图未全附),没有 DNA 条带出现;还有些选择扩增的产物虽有 DNA 条带,但不同处理间的 DNA 条带带型相同 (图 1, , 图未全附);只有一部分选择扩增的产物出现了不同的 DNA 带型,4 低温处理的样品选择扩增出了差异的 DNA 条带 (图 1, 、 、 , 图未全附)。

2.2 DNA 差异片段的特异性

DNA 差异片段的 Northern 杂交结果表明,采用 cDNA-AFLP 方法所获得的 DNA 差异片段只有在特定的低温处理条件下表达。DNA 差异片段 VC1、VC4、VC5 只有在低温处理 6 h 的草菇菌丝体中表

达，而低温处理 2 h 和未经低温处理的均未表达（图 2， 、 ；图未全附）；DNA 差异片段 VC2、VC3 在低温处理 2 h 和低温处理 6 h 的草菇菌丝体中表达，而对照未表达（图 2， ；图未全附）。说明本研究所获得的 DNA 差异片段是草菇低温诱导表达的特异性片段。

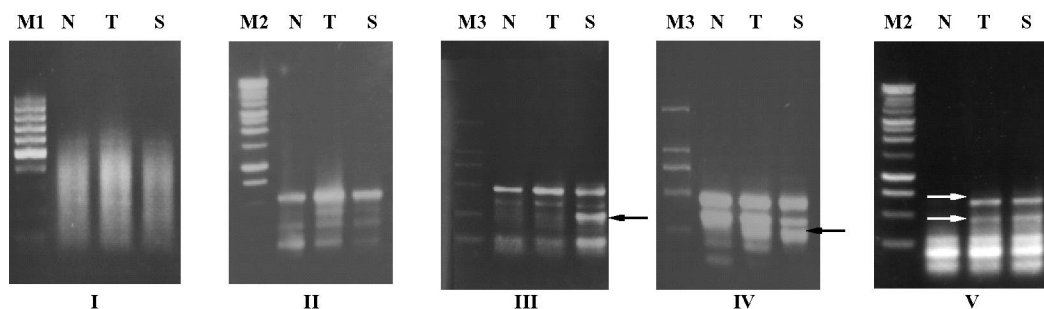


图 1 PCR 选择扩增产物电泳图

M: DNA Marker, 大小为 (bp); M1: 1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100; M2: 15000、10000、7500、5000、2500、2000、1000、750、500、250、100; M3: 2000、1000、750、500、250、100. N: 对照菌丝; T: 在 4℃ 下处理 2 h 的菌丝; S: 在 4℃ 下处理 6 h 的菌丝。 . 不同处理间的选择扩增的产物为 DNA 弥散团; . 样品选择扩增出的 DNA 条带带型相同; 、 、 . 样品选择扩增出差异的 DNA 条带。

Fig 1 Electrophoresis of PCR selective amplification products

M: DNA Marker (bp); M1: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100; M2: 15000, 10000, 7500, 5000, 2500, 2000, 1000, 750, 500, 250, 100; M3: 2000, 1000, 750, 500, 250, 100. N, T, S: results of samples from control mycelium, mycelia treated at 4℃ for two hours and six hours respectively. Selective amplification products in different treatments: . is DNA smear; . is the same DNA band type; , and are difference DNA band

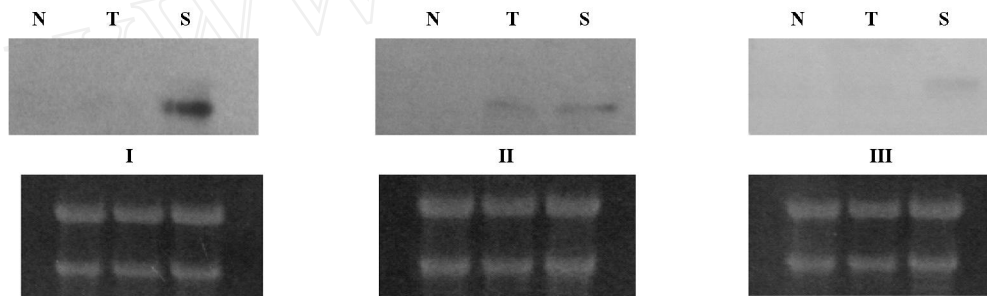


图 2 DNA 差异片段的 Northern 杂交结果

上图: Northern 杂交结果; 下图: RNA 电泳图。N: 对照菌丝; T: 4℃ 处理 2 h 的菌丝; S: 4℃ 处理 6 h 的菌丝。 . 以片段 VC1 为探针的 Northern 杂交结果; . 以片段 VC2 为探针的 Northern 杂交结果; . 以片段 VC5 为探针的 Northern 杂交结果。

Fig 2 Northern blot analysis of differential DNA fragments

Upper Fig: Northern Blotting; Bottom Fig: RNA loading amount control. N, T, S: results of samples from control mycelium, mycelia treated at 4℃ for two hours and six hours respectively. . Northern Blotting with VC1 probe; . Northern Blotting with VC2 probe; . Northern Blotting with VC5 probe

2.3 DNA 特异片段的碱基序列

将 VC1、VC2、VC3、VC4、VC5 DNA 特异片段的 DNA 序列测定结果列于表 1。DNA 特异片段长度分别为 247、219、172、350 和 171 bp，其 GC 含量分别为 52.23%、48.40%、50.00%、51.71% 和 43.86%。

2.4 DNA 特异片段的序列同源性

blastn 和 blastx 两种 BLAST 程序进行的 DNA 特异片段序列同源性搜索结果列于表 2。5 个 DNA 片段都没有发现同源的核苷酸序列。VC1、VC2、VC3、VC4 片段翻译的蛋白质序列分别与粗糙脉孢菌

(*Neurospora crassa*) 的假拟蛋白、水稻的 AMP 脱氨酶、*Danio rerio* 的糖原合酶激酶 3、*Leuconostoc mesenteroides* 的假拟蛋白有一定的同源性。VC5 翻译的蛋白质序列没有搜索到同源序列。

表 1 DNA 特异片段的碱基序列及其 GC 含量

Table 1 Nucleotide sequences and their GC content of DNA fragments

DNA 片段 DNA fragments	核酸序列 Nucleotide sequence	片段大小 Length (bp)	GC 含量 GC content (%)
VC1	ACA TGCC TA TGGTCTGTGA TGGGGTTACGGA TGCAA TTTC TTTC AA TA TG TCA TCCTCCGCA GA GGAA GCGCGCCTACCA TTACGAA TGTGCA GTGCGGGAA GTGACGGA CGCCGA TCCTTC AA GGA TTCTTGGGGGCGA TGTTCAGTCTGGA GA TGGA GTGCTACGTGACCAACTTCCTTG ATGGTGTTC TAA GAA TAACG GTTTC TAA TCCACCTGTGCA GGCAACGCCA GCACA GGGGT	247	52.23
VC2	GCTGA GAA CGGTAACTGGGA TGGGCC TTGGCCA TGGCCCTGGAA TA TTTGCACCTCA TTCTG GGGGCA TCTTCA TTACTTGA GGTA TC TCCTCCCTGAACA TTTTTCCTGGCCTGTCCA GGTGT TGGGTCCCTTCTTAC TA TTCCCGGA GTGTCA CCACTCAACA GGA GAA GTA GAA TCGGTAA TAAAA GTTGGA TCA GAA TCGGGTA TTTCGTCA	219	48.40
VC3	TTGGTA TTA TCGTCA TTTA GGT TTTCCGACCA CGCACGGCCCCGGA GGCAA TTGACCTCGTGT CAAA GTTA TTGGA GTA TACGCTTCTGCTCTGTCTTA GCGCGA TA GA GCGCA TGA TTCA TCCGT TCTTTGACGAA TTGCGGGCCGAA GGC GCAA GAA TGCCAAA TGGTAA	172	50.00
VC4	ACTTGGA GA TGTTGGCTGACCCCA GA GGGTGTGTGCA CCA GTCA TCCACGTCTTCAACGA TCG GTACGCCCGACGACCTCCCGA GCAA TA TGA TA TAA TTACGAA GGTCGACTGCTTCGGTCC ACGCCCGA TCCACTGCGCGA TA CACCTTACAA TACGA GGAAGCGAA GCTCGTAA TGCTTT TCCCGA TCA GAACGA GTTACTTGCCGAA TCGGTGTGCGCTTACCTTAC TCCGTGGGGCTTTTG TGAA GCCCGCACCGCA TA TTCCGCCAA TA TCGGTACA TTCA GAACAA TACTA GGA GGGGCA AGA GTA GA TAGGA GGGTAA GA TCA TAA GA TAGTCCACC	350	51.71
VC5	ATCGACTGA TCTAGGGCGA TGTCTCTTTGCTGA TGTCGA TGA ACTCAAAA TTTTGTGA TTCTT TGGGTTA GGTA TGA TGA ACTCA TCCCA GTGA GCAA GCGAACA GGA TTGTTGCCCGA GAAAT AGCGCA GGTTA TTCAA GGCAACAAAA TCGGTGGA CAACTTGGTT	171	43.86

表 2 DNA 特异片段的序列同源性

Table 2 Sequence homology of specific DNA fragments

DNA 片段 DNA fragments	核酸数据库搜索 Blastn	核酸 - 蛋白质数据库搜索 Blastx
VC1	没有搜索到同源序列 No significant homology found	假拟蛋白 (粗糙脉孢菌) Hypothetical protein (<i>Neurospora crassa</i>) 同源率 Identities = 30/79 (37%) 相似率 Positives = 47/79 (59%)
VC2	没有搜索到同源序列 No significant homology found	AMP 脱氨酶 (水稻) Putative AMP deaminase [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] 同源率 Identities = 22/70 (31%) 相似率 Positives = 31/70 (44%)
VC3	没有搜索到同源序列 No significant homology found	糖原合酶激酶 3 Glycogen synthase kinase 3 (<i>Danio rerio</i>) 同源率 Identities = 34/50 (68%) 相似率 Positives = 38/50 (76%)
VC4	没有搜索到同源序列 No significant homology found	假拟蛋白 Hypothetical protein (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i> ATCC8293) 同源率 Identities = 22/64 (34%) 相似率 Positives = 33/64 (51%)
VC5	没有搜索到同源序列 No significant homology found	没有搜索到同源序列 No significant homology found

3 讨论

Northern 杂交结果证明, 本研究克隆分离的 5 个 DNA 差异片段均是草菇菌丝体低温诱导表达的特异片段, 这说明 cDNA-AFLP 技术克隆分离差异表达基因具有特异性强、重复性高的特点。与前人的研究报道相一致^[10, 14, 15]。Money 等采用该技术, 比较了不同批次合成的 cDNA 经过 10 种不同的 *Mse* 选择引物扩增所产生的条带, 结果是不同批次的选择扩增结果完全一致^[14]。Habu 等用同一矮牵牛植株上的不同花芽的 RNA 进行 cDNA-AFLP 重复试验, 14 个差异条带在不同批次试验中的重复率达 100%^[15]。Fukuda 等的研究结果也证明, cDNA-AFLP 技术的特异性和重复性高于 95%^[10]。

本研究克隆分离的 5 个 DNA 特异片段的大小为 171 ~ 350 bp 之间, 片段偏短。其原因可能有二: 一是本研究所采用的 cDNA-AFLP 技术中进行 cDNA 酶切的酶为典型的 *EcoR* 和 *Mse* 两种酶, 这样经过两种酶切成的 cDNA 模板片段可能较短; 二是草菇基因组较小 (约为 25 Mb), 而本研究在进行选择扩增时所使用的引物至少包含有两个选择性核苷酸。

本研究克隆分离的 5 个 DNA 特异片段都没有搜索到同源的核酸序列。但它们翻译的蛋白质序列分别与一些生物的假拟蛋白、-1, 3 葡聚糖合酶、AMP 脱氨酶、糖原合酶激酶 3、转位酶序列具有较高或一定的同源性, 这可能意味着草菇细胞中的这些蛋白或酶与低温胁迫应答有关。

参考文献:

- 1 张树庭. 草菇. 香港: 香港中文大学出版社, 1975. 143 ~ 147
Zhang S T. Straw mushroom. Hong Kong: The Press of the Chinese University of Hong Kong, 1975. 143 ~ 147 (in Chinese)
- 2 Chang S T. The biology and cultivation of edible fungi. New York: Academic Press, 1978. 573 ~ 605
- 3 陈明杰, 汪昭月, 贺冬梅, 潘迎捷. 低温影响草菇蛋白质组分变化的研究. 食用菌学报, 1995, 2 (4): 28 ~ 31
Chen M J, Wang Z Y, He D M, Pan Y J. A study of *V. voluacea* protein composition change after low temperature treatment. Acta Edulis Fungi, 1995, 2 (4): 28 ~ 31 (in Chinese)
- 4 陈明杰, 谭琦, 汪昭月, 冯志勇, 贺冬梅, 关斯民, 潘迎捷. 低温引起草菇菌丝体 RNA 变化的研究. 食用菌学报, 1997, 4 (2): 16 ~ 18
Chen M J, Tan Q, Wang Z Y, Feng Z Y, He D M, Guan S M, Pan Y J. Analysis of the low temperature effect on the change of *V. voluacea* mycelium RNA. Acta Edulis Fungi, 1997, 4 (2): 16 ~ 18 (in Chinese)
- 5 陈明杰, 谭琦, 汪昭月, 冯志勇, 贺冬梅, 关斯民, 严培兰, 潘迎捷. 草菇菌丝体 mRNA 在低温下变化的研究. 农业生物技术学报, 1997, 5 (2): 185 ~ 187
Chen M J, Tan Q, Wang Z Y, Feng Z Y, He D M, Guan S M, Yan P L, Pan Y J. Analyze the cDNA composition change of *V. voluacea* in low temperature stress. Journal of Agricultural Biotechnology, 1997, 5 (2): 185 ~ 187 (in Chinese)
- 6 陈明杰, 谭琦, 严培兰, 凌霞芬, 潘迎捷. 草菇低温诱导基因的分离. 菌物系统, 1998, 17 (4): 327 ~ 330
Chen M J, Tan Q, Yan P L, Ling X F, Pan Y J. Cold shock gene isolation in *Vohariella voluacea*. Mycosystema, 1998, 17 (4): 327 ~ 330 (in Chinese)
- 7 陈明杰, 谭琦, 曹晖, 王南, 黄为一, 潘迎捷. mRNA 差别显示技术分离草菇低温诱导基因. 菌物系统, 2001, 20 (3): 342 ~ 346
Chen M J, Tan Q, Cao H, Wang N, Huang W Y, Pan Y J. Isolation of cold induced gene from *Vohariella voluacea* by mRNA differential display. Mycosystema, 2001, 20 (3): 342 ~ 346 (in Chinese)
- 8 Bachem C W, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. The Plant Journal, 1996, 9 (5): 745 ~ 753
- 9 Campalans A, Pages M, Messegue R. Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*P. nussus amygdalus*). Tree Physiology, 2001, 21 (10): 633 ~ 643
- 10 Fukuda T, Kido A, Kajino K, Tsutsumi M, Miyauchi Y, Tsujiuchi T, Konishi Y, Hino O. Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP method. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 261 (1): 35 ~ 40
- 11 Dellagi A, Birch P R, Heilbrunn J, Lyon G D, Toth I K. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. Microbiology, 2000, 146 (Pt 1): 165 ~ 171
- 12 Brugmans B, Fernandez del Carmen A, Bachem C W, van Os H, van Eck H J, Visser R G. A novel method for the construction of genome wide transcriptome maps. The Plant Journal, 2002, 31 (2): 211 ~ 222
- 13 J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992. 49 ~ 56
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning-an experimental guidance. 2nd ed. Jin D Y, Li M F. Beijing: Scientific Press, 1992, 49 ~ 56 (in Chinese)
- 14 Money T, Reader A, Qu L J, Dunford R P, Moore G. AFLP-based mRNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 1996, 24: 2616 ~ 2617
- 15 Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, Iida S. Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4 bp sequence. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 234: 516 ~ 521