

毛冠鹿大脑组织全长 cDNA 文库构建

汤文文^① 张 文^① 曹祥荣^① 张锡然^{①*} 徐春茂^② 王 强^③ 胡 均^②

(^① 南京师范大学生命科学学院 南京 210097 ;

^②安徽省皖南野生动物救护中心 休宁 245400 ; ^③四川省成都动物园 成都 610081)

摘要 :运用 SMART 技术构建了毛冠鹿 (*Elaphodus cephalophus*) 大脑组织全长 cDNA 文库。提取大脑组织总 RNA ,Oligotex mRNA Kit 纯化、获得 poly(A)⁺ RNA ,以 CDS III / 3' PCR 引物进行逆转录 ,LD-PCR 扩增获得全长双链 cDNA 经 *Sfi* I 酶切及柱层析分离后 500 bp 以上的片段与载体 λTriplEx2 连接 ,体外包装得到 cDNA 文库。经鉴定原始文库滴度为 5.1×10^5 pfu/ml ,扩增后文库滴度为 1.5×10^9 pfu/ml ,重组率达到 85% 以上 ,插入片断平均长度约为 1.0 kb ,说明构建文库质量符合要求 ,可用于大脑特异表达基因的筛选。从该文库中克隆到了 *rig* 基因全长 ,包含 5' 和 3' 非编码区 ,从第 43 至 477 个核苷酸为一完整阅读框 (ORF) 此阅读框可编码一个 145 氨基酸的 *rig* 蛋白。

关键词 :毛冠鹿 ; 大脑 ; cDNA 文库 ; SMART 技术

中图分类号 : Q953 文献标识码 : A 文章编号 : 0250-3263(2006)01-53-07

Construction of the cDNA Library from Cerebrum of Tufted Deer

TANG Wen-Wen^① ZHANG Wen^① CAO Xiang-Rong^① ZHANG Xi-Ran^①
XU Chun-Mao^② WANG Qiang^③ HU Jun^②

(^① College of Life Science , Nanjing Normal University , Nanjing 210097 ;

^② Wannan First-Aid Centre of Wild Animal , Xiuning , Anhui 245400 ; ^③ Chengdu Zoo , Chengdu 610081 , China)

Abstract : The cerebrum cDNA library of Tufted Deer (*Elaphodus cephalophus*) was constructed using SMART technique. Total RNA was extracted from cerebrum tissue of Tufted Deer and poly(A)⁺ RNA was purified further by Oligotex mRNA Kit. CDS III / 3' PCR Primer was used to prime the reverse transcription. The double-strand cDNA was amplified by LD-PCR and digested by *Sfi* I . After cDNA size fraction by CHROMA SPIN-400 , fragments over 500 bp were collected and ligated with λTriplEx2 vector. After packaging *in vitro* , the full-long cDNA library of cerebrum tissue was constructed successfully. The library contains 5.1×10^5 pfu/ml clones and the amplified library has a titer of 1.5×10^9 pfu/ml in which 85% clones are recombinant and the average sizes of inserted cDNAs are about 1.0 kb. These results show that the cerebrum cDNA library is qualified for screening genes. A full-length *rig* gene with 5' and 3' untranslated regions was isolated from the cDNA library. Sequence analysis shows that this 541 bp cDNA spans an open reading frame from nucleotide 43 to 477 , encoding a 51-aminoacid *rig* protein.

Key words : *Elaphodus cephalophus* ; Cerebrum ; cDNA library ; SMART

基金项目 国家自然科学基金(No. 30370789) ,江苏省教委自然科学基金(No. 02KJD180006) ;

* 通讯作者 , E-mail : zhangxiran@njnu.edu.cn ;

第一作者介绍 汤文文 ,女 ,硕士 ,研究方向 细胞遗传与分子遗传学 , E-mail : liwener@tom.com.

收稿日期 : 2005-06-01 ,修回日期 : 2005-09-09

毛冠鹿 (*Elaphodus cephalophus*) 为鹿科 (Cervidae) 麝亚科 (Muntiacinae) 毛冠鹿属 (*Elaphodus*) 是我国重要的二类保护动物, 主要分布于我国东南和西南各省, 印度北部及缅甸也有少许分布。麝亚科动物的细胞遗传学研究一直是国内外热门课题之一。近年来国内已有关于毛冠鹿染色体多态^[1-5], 性别鉴定和进化分析^[6,7]等的研究, 但毛冠鹿的遗传学资料缺乏。随着分子生物学技术的发展, 一系列寻找新基因的方法应运而生, 其中 cDNA 文库的筛选是行之有效的克隆完整基因序列的方法, 通过构建 cDNA 文库, 能直接分离到目的基因全长。毛冠鹿 cDNA 文库的构建有利于进行特异基因的深入研究和保护该物种基因资源, 并为后续的功能基因组研究奠定基础。

rig (rat insulinoma gene) 基因最早从老鼠的胰腺 cDNA 文库中克隆到^[8], 研究认为 rig 基因是一种看家基因, 编码一种 DNA 结合蛋白, 在 S 期细胞核中积累, 是所有类型细胞生长和增殖所必须的^[9,10]。在人类基因组中, rig 基因至少有 6 个拷贝, 但表达有功能蛋白的只有 1 个。从鸟类、两栖类到哺乳动物, rig 基因编码的产物均由 145 个氨基酸残基组成, 且它们的差异很小^[9,11]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 因难产死亡的毛冠鹿大脑组织由安徽皖南野生动物救护中心提供, 运输过程在液氮中保存 12 h, 之后 -70℃ 保存 13 个月。RNA 提取试剂盒: Trizol™ 试剂, Invitrogen 公司; mRNA 纯化试剂盒: Oligotex mRNA Kit, Qiagen 公司; 文库构建试剂盒: SMART™ cDNA Library Construction Kit, Clontech 公司; 噬菌体包装试剂盒: Packagene Lambda DNA Packaging System, Promega 公司。

1.2 总 RNA 提取及 mRNA 纯化 取保存在 -70℃ 冰箱中的毛冠鹿大脑组织约 0.4 g, 按照 Trizol™ 试剂盒操作流程提取总 RNA, 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量, 紫外分光光度计测量 $A_{260/280}$ 值, 评估 RNA 纯度。Oligotex mRNA

Kit 分离 poly(A)⁺ RNA, 操作按试剂盒说明进行。

1.3 cDNA 的合成 取 3 μl (约 1 μg) 毛冠鹿大脑组织 mRNA, 加入 CDS III/3' PCR Primer 和 SMART IV™-Oligonucleotide 各 1 μl 后, 72℃ 变性 2 min, 冰上冷却 2 min, 加入 2 μl 5 × First Strand Buffer, 1 μl 20 mmol DTT, 1 μl 10 mmol dNTP Mix, 1 μl PowerScript™ Reverse Transcriptase 42℃ 孵育 1 h, 逆转录成 cDNA 第一链。取第一链产物 2 μl 加入 10 μmol/L 的 CDS III/3' PCR Primer, 5' PCR Primer 和 Advantage 2 Polymerase Mix 各 2 μl, 100 μl 反应体系, 反应条件如下: 95℃ 预变性 1 min, 95℃ 变性 20 s, 68℃ 复性延伸 6 min, 30 个循环扩增双链。取 5 μl LD-PCR 产物 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

取 50 μl LD-PCR 产物, 加入 2 μl 蛋白酶 K (20 μg/μl) 混匀, 45℃ 孵育 20 min, 加入 50 μl 去离子水, 等体积苯酚/氯仿/异戊醇 (25/24/1) 和氯仿/异戊醇 (24/1) 各抽提一次, 无水乙醇沉淀, 80% 乙醇洗涤后, 溶于 79 μl 水中, 加入 10 μl Sfi I (20 U/μl), 50℃ 酶切 2 h, 酶切产物经 CHROMA SPIN-400 柱分级分离, 逐滴收集 15 管。每管取 5 μl 经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 收集符合条件的 3 管, 糖原及醋酸钠共沉淀后, 8 μl 无菌水溶解, 存于 -20℃。

1.4 ds cDNA 与噬菌体臂连接及体外包装 5 μl 反应体系中, cDNA 与载体 λTriplEx2 (含有 Sfi IA 和 IB 酶切位点) 分别按体积比为 1.5:1、1:1 和 0.5:1, 各加入 0.5 μl T₄ DNA 连接酶, 16℃ 连接过夜。连接产物分别与包装蛋白 22℃ 反应 3 h, 加入 445 μl 噬菌体缓冲液和 25 μl 氯仿, 混匀, 获得毛冠鹿大脑原始 cDNA 文库。

1.5 文库的扩增及鉴定

1.5.1 原始文库滴度及重组率测定 将原始文库按 1:10、1:20 进行稀释, 转化宿主菌后铺平板, 测定文库滴度, 同时铺含有 IPTG 和 X-gal 的平板, 37℃ 培养, 计数蓝白斑, 测定重组率。

1.5.2 文库扩增及扩增后文库滴度测定 以每板 $6 \times 10^4 \sim 7 \times 10^4$ 克隆数在 150 mm 平板上铺板, 待噬菌斑生长融合后, 加入 12 ml 噬菌体

缓冲液 4℃ 过夜,形成文库裂解液,平台振荡器上 50 r/min 室温 1 h,收集文库裂解液,分装于 50 ml 离心管中,每管加入 10 ml 氯仿,振摇 2 min,离心后取上清即为扩增 cDNA 文库。每管 1 ml 分装文库,加入 DMSO 至终浓度为 7%, -70℃ 保存。

将原始文库做 1:10 000 和 1:1 000 000 稀释,转化宿主菌后铺平板,测定文库的滴度。

1.5.3 文库插入片段长度鉴定 在平板上随机挑取 50 个噬菌斑,加入到 20 μ l 噬菌体缓冲液中 4℃ 过夜,离心取上清作为模板,25 μ l 反应体系中: λ TriplEx2 插入子筛选引物各 0.6 μ l,模板 1 μ l, *rTaq* 酶(Takara 公司)0.2 μ l,反应条件如下:95℃ 预变性 4 min,95℃ 变性 40 s,58℃ 复性 50 s,72℃ 延伸 3 min,30 个循环后,72℃ 保温 7 min。取 5 μ l 产物 1.1% 凝胶电泳检测。

1.5.4 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)验证 取 1 μ l 扩增文库为模板,25 μ l 反应体系中: β_2 -MG P1、P2 (P1 5'-TGA ATT GCT ATG TGT CTG GG-3'; P2: 5'-CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT-3')各 0.3 μ l, *rTaq* 酶 0.2 μ l,反应条件如下:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 复性 40 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环扩增,取 5 μ l 产物 1.1% 凝胶电泳检测。

1.5.5 阳性克隆 cDNA 测序及其生物信息学分析 从文库平板上随机挑取噬菌斑,按试剂盒说明将阳性克隆噬菌体 λ TriplEx2 环化为 pTriplEx2,送上海生工生物工程技术服务公司测序,将获得的 cDNA 序列用序列分析软件 BLAST 与 GenBank 数据库中已知基因进行同源性比较。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 及 mRNA 质量 总 RNA 直接关系到文库质量,提取总 RNA 后经琼脂糖凝胶电泳检测,如图 1 所示 RNA 呈 18S 和 28S 两条带,无拖尾,说明总 RNA 提取效果较好。紫外分光光度计测得 $A_{260/280} = 1.82$,说明 RNA 纯度达到要求。

2.2 双链 cDNA 合成 将 mRNA 逆转录成 cDNA 第一链,LD-PCR 扩增第二条链后,5 μ l 产

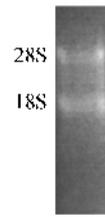


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of total Cerebrum RNA

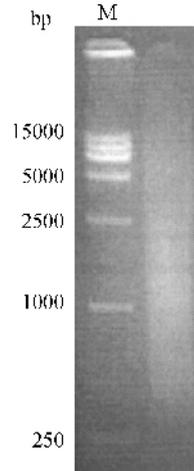


图 2 LD-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of the LD-PCR product

M: 分子标记。

M: 15 kb DNA Marker.

物 1.1% 凝胶电泳检测结果如图 2,双链 cDNA 大小在 0.4~15 kb 之间,符合建库要求。

2.3 酶切、过柱后的电泳鉴定 为提高克隆的效率和克隆片段的长度,双链 cDNA 经蛋白酶 K 消化及 *Sfi* I 酶切后,通过 CHROMA SPIN-400 柱分级分离,产物每管取 5 μ l 经 1.1% 凝胶电泳检测结果如图 3 所示。收集最亮的 6、7、8 管产物,醋酸钠、肝糖原和 95% 酒精共沉淀。

2.4 原始文库质量鉴定 将双链 cDNA 分级分离产物与载体 λ TriplEx2 连接,包装后获得原始文库,经检测文库滴度为 5.1×10^5 pfu/ml,经蓝白斑筛选,文库重组率达到 85% 以上。

2.5 扩增文库质量鉴定 检测得扩增后文库滴度为 1.5×10^9 pfu/ml。以噬菌体稀释液为模板, λ TriplEx2 插入子筛选引物为引物进行 PCR

扩增 结果如图 4 所示 ,插入片段大小分布在 0.5 ~ 1.6 kb 间 ,平均大小在 1.0 kb ,说明文库构

建质量良好。以文库为模板 PCR 扩增 β_2 -MG 基因 ,在 250 bp 处有目的条带(图 5)。

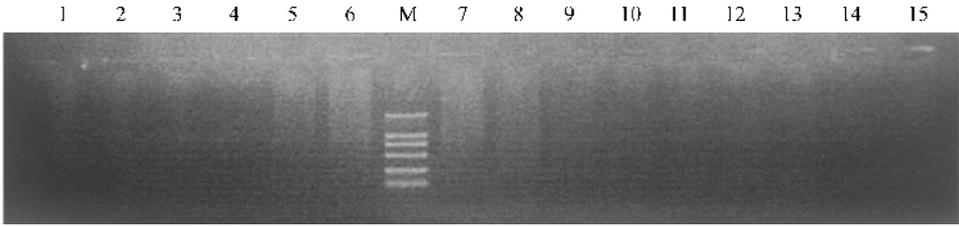


图 3 LD-PCR 产物酶切及分级分离后琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Gel electrophoresis of size-fractionation of ds cDNA after *Sfi* I digestion

M : 分子标记 ; 1 ~ 15 : 柱层析产物。

M : 2 kb Marker ; 1 - 15 : ds cDNA after size-fractionation .

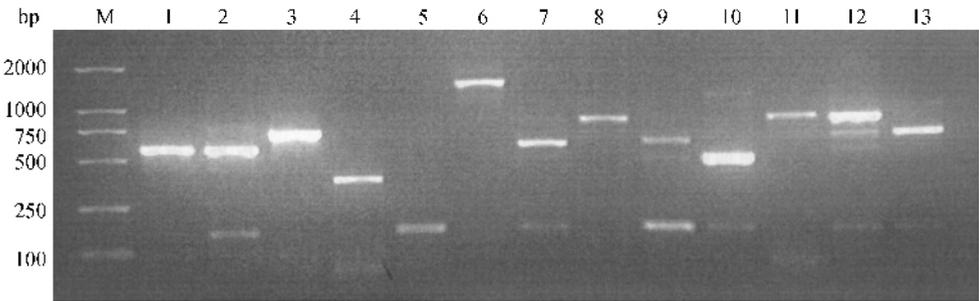


图 4 插入片段大小鉴定琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Gel electrophoresis of size-identification of the inserted ds cDNA

M : 分子标记 ; 1 ~ 13 : 插入片段。

M : 2 kb Marker ; 1 - 13 : inserted ds cDNA .

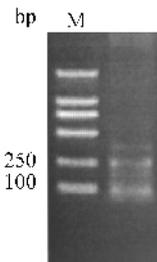


图 5 β_2 -MG 验证琼脂糖凝胶电泳

Fig. 5 Gel electrophoresis of PCR product of

β_2 -MG gene

M : 分子标记。

M : 2 kb Marker .

从构建的 cDNA 文库中克隆到具有 5'和 3'

非编码区的毛冠鹿 *rig* 基因。其核苷酸序列及推导的氨基酸序列如图 6 所示 :该 cDNA 全长 522 bp ,其 3'末端有终止信号 AATAAA ,从 43 bp 至 477 bp 为一开放阅读框 ,编码 145 个氨基酸的 *rig* 蛋白。将该基因及其蛋白质序列在 GenBank 上比对 ,结果如表 1 ,可见毛冠鹿 *rig* 基因与牛的同源性最高 ,与人次之 ,与果蝇最低。而其蛋白质序列与牛、人、猪、挪威鼠、鸡的同源性达 99% 以上 ,甚至同非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的同源性也达到了 95%。由此可以推断 ,*rig* 基因在进化过程中受到很强的选择压力 ,其核苷酸替代以沉默替代 (silent substitution) 为主 ,而很少出现氨基酸更换替代 (amino acid replacement substitution) 。

1 AATTTCGGCCATTACGGCCGGGGCTTCTGAAGAACC GGCAAG

43 ATGGCCGAAGTGAACAGAAGAAGAAGCCGACCTCCGCAAGTTCACCTACCCGGCGGTA
M A E V E Q K K K R T F R K F T Y R G V

103 GACCTCGACCAGCTGCTGGACATGCTCCTATGAGCAACTGATGCAGCTATACAGTGCGCCG
D L D Q L L D M S Y E Q L M Q L Y S A R

163 CAGCGACGGCGGCTGAACCGCGCCTGCGGAGGAAGCAGCACTCGTGTGAAGCGGCTG
Q R R R L N R G L R R K Q H S L L K R L

223 CGCAAGCCAAGAAAGATGCGCCGCCATGGAGAAGCCGAGGTCGTGAAGACGCACCTG
R K A K K D A P P M E K P E V V K T H L

283 CGCGACATGATCATTCTGCCGAGATGGTGGTAGCATGGTGGGCGTCAACGGCAAG
R D M I I L P E M V G S M V G V Y N G K

343 ACCTTCAACCAGGTGAAATCAAGCCTGAGATGATTGGCCACTACCTGGGGCAGTCTCC
T F N Q V E I K P E M I G H Y L G E F S

403 ATCACCTACAAGCCCGTAAACACGGCCGGCGGTATCGGGCTACCCATTCTCCCGC
I T Y K P V K H G R P G I G A T H S S R

463 TTCATCCCCTCAAGTAACCTGCTGGCCAATAAAAGCAGAGATTCTCTGAAAAA
F I P L K *

图 6 毛冠鹿 *rig* 基因 cDNA 全序列及推导的氨基酸序列

Fig. 6 *Rig* gene cDNA and deduced amino acid sequence cloned from Tufted Deer

星号为终止密码子 TAA, 下划线为终止信号 AATAAA。

The sequence with asterisk indicates stop codon TAA, and the sequence underlined indicates a polyadenylation signal AATAAA.

表 1 毛冠鹿 *rig* 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列与其他 7 种动物 *rig* 基因同源性比较

Table 1 Homologous comparison of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of *rig* gene of Tufted Deer with the *rig* gene from other 7 species of animals

	cDNA 同源性 Homologous of cDNA (%)	GenBank 登录号 Accession number	蛋白质 同源性 Homologous of Protein (%)	GenBank 登录号 Accession number
毛冠鹿 Tufted deer	100	—	100	—
牛 Cow	97	AY911317	100	AAW82085
人 Human	92	J02984	99	AAH64908
猪 Pig	90	NM_214334	99	BAA21510
挪威鼠 Norway rat	89	M19393	99	NP_058847
鸡 Chicken	87	M33331	99	NP_990793
非洲爪蟾 African clawed frog	82	M33332	95	AAH53812
果蝇 Fruit fly	80	AF083290	79	EAL25017

3 讨论

cDNA 文库的质量从根本上取决于 mRNA 的完整性, RNA 酶在环境中广泛存在, 极易导致 RNA 的降解, 因此所取组织的新鲜度对于 cDNA 文库的质量至关重要。本研究所用的组织已在 -70°C 冰箱中保存较长时间, 可能对 RNA 的质量有一定影响。经鉴定原始文库滴度为 5.1×10^5 pfu/ml, 已达到库容量不小于 1.7×10^5 pfu/ml 的要求^[12], 插入片段大小在 1.0 kb 左右; 根据 β_2 -MG 序列设计引物, 以文库为模板进行 PCR 扩增, 出现目的条带。由此可见文库的构建是基本成功的。

传统的 cDNA 文库构建存在着如下缺点: 难以获得低丰度表达基因; 需要消耗较大量 mRNA, 难以合成完整的 cDNA; 文库构建步骤耗时、繁琐。本文库所采用的 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript)^[13, 14] 方法成功的解决了这些问题, 其基本原理为: 第一链 cDNA 合成时, 以经修饰的 oligo(dT) 引物对 mRNA 逆转录, 并通过 SMART IV-Oligo 在 mRNA 5' 端添加延伸出去的模板, 这样合成的第一条链就增加了 SMART IV-Oligo 寡核苷酸补齐序

列。此补齐序列又作为在 LD-PCR 扩增中的一个通用的启动位点,保证了 cDNA 序列信息的完整性。且本实验进行第一链合成时采用无 RNA 酶 H 活性,但仍有野生型聚合酶活性的鼠源性逆转录酶,避免了逆转录时 RNA 的降解,这样就可合成比野生型鼠源性逆转录酶更长的 cDNA 片段。在进行 LD-PCR 扩增 cDNA 第二链时,采用的 Advantage 2 Polymerase Mix 含有 TITANIUM™ Taq DNA 聚合酶(Taq DNA 聚合酶的 N 端缺失突变体)一种具校对活性的 Taq DNA 聚合酶和 Taq Start™ 抗体(用于热启动 PCR),可以有效的合成较长 cDNA 片段,避免了 PCR 产物向小分子的偏移,这对于建立 cDNA 文库是非常重要的。因此,本研究所采用的 cDNA 文库构建方法有以下优点:提高了全长 cDNA 在文库中的比例;构库只需少量 mRNA (25 ng)或总 RNA(50 ng);双链 cDNA 经 *Sfi* I (IA 和 IB)酶切后与 *Sfi* I 酶切后的载体 λ TripIEx2 连接操作简便快速,且 λ TripIEx2 载体是一种新的噬菌体载体,多克隆位点上游含两个翻译起始点,可以 3 种阅读框方式表达插入的 cDNA,充分显示其具有广泛的应用前景。利用构建的毛冠鹿大脑组织 cDNA 文库,克隆了一个具有 5'、3'非编码区并包含 polyA 尾巴结构的毛冠鹿 *rig* 基因,通过该基因的克隆,可以看出利用 SMART 技术构建的文库质量较高,易于获得基因全长,与其他建库技术相比具有很大的优越性。

毛冠鹿染色体的多态主要在于性染色体多态,性连锁基因研究可用于鉴定性染色体并深入研究染色体进化的分子机制。脑组织中基因表达高度复杂,很多基因与性别发生相关,Grazia P Nicchia 等^[15]发现性连锁基因 AQP9 (Aquaporin-9)在脑、睾丸、肝脏中特异表达;杨泉胜等^[16]克隆定位了在脑中高度表达的性连锁基因 *BEX1*(cerebrum expressed X-linked 1);杨居祥等^[17]发现在精子发生中差异表达的基因 *RSD5* 在脑组织中也有较高表达;罗阳等^[18]利用辐射杂种细胞系技术发现在脑中也有与人类生殖相关的新基因 *HBRP*(human BSP-related

protein)的表达。可见脑组织是研究性连锁基因的良好材料。我们构建毛冠鹿大脑组织 cDNA 文库,一方面保存了毛冠鹿这一珍稀物种的基因资源;另一方面可以通过基因筛选、Southern 杂交、FISH 等现代分子生物学的技术研究毛冠鹿性别有关的基因,进而深入研究染色体进化。

参 考 文 献

- [1] 张锡然,王建华,陈玉泽.毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*)体细胞的染色体研究.动物学研究,1983,2(1):89~93.
- [2] 张锡然,王建华,陈玉泽.毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*)肺细胞株的建立及其生物学特性研究.动物学研究,1984,3(1):71~76.
- [3] 王宗仁,全国强.毛冠鹿染色体组型.动物学研究,1984,3(1):78.
- [4] 束峰珏,张锡然.毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*)一种新核型及 C 带分析.南京师大学报(自然科学版),1998,21(4):80.
- [5] 束峰珏,张锡然,曹祥荣等.毛冠鹿 B 染色体多态及遗传机制探讨.遗传,1999,21(6):23~26.
- [6] 蒋华云,曹祥荣,张锡然等.毛冠鹿 *ZFY*、*ZFX* 基因片段的克隆与性别鉴定.遗传,2004,26(4):465~468.
- [7] 戴君勇,曹祥荣,石磊等.鹿亚科动物钾离子通道基因片段及其内含子序列的克隆与进化分析.遗传,2005,27(1):95~100.
- [8] Takasawa S, Yamamoto H, Terazono K, et al. Novel gene activated in rat insulinomas. *Diabetes*, 1986, 35(10):178~180.
- [9] Chiyoko Inoue, Kiyoto Shiga, Shin Takasawa, et al. Isolation and characterization of the human homologue of *rig* and its pseudogenes: the functional gene has features characteristic of housekeeping genes. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, 87:3594~3598.
- [10] Inoue C, Igarashi K, Kitagawa M, et al. Expression of the insulinoma gene *rig* during liver regeneration and in primary cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 150(3):302~308.
- [11] Takasawa S, Tohgo A, Unno M, et al. Structural determination of *Saccharomyces cerevisiae rig* gene and identification of its product as ribosomal protein S21. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 166(3):501~507.
- [12] 黄培堂等译.分子克隆实验指南.北京:科学出版社,2002:863.
- [13] Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-

- length cDNA library construction. *Biotechniques* 2001 **30**(4): 892 ~ 897.
- [14] Yutaka Suzuki ,Kiyomi Yoshitomo-Nakagawa ,Kazuo Maruyama ,*et al.*.Constructi on and characterization of a full-length enriched and a 5' end enriched cDNA library. *Gene* ,1997 **200** :149 ~ 156.
- [15] Grazia P Nicchiaa ,Antonio Frigeria ,Beatrice Nicob ,*et al.* . Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel :evidence for sex-linked differences in liver. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* ,2001 **49** :1 547 ~ 1 556.
- [16] 杨泉胜 ,夏放 ,吴海等 .脑表达的 X 连锁基因的克隆、染色体定位和初步功能研究 .复旦学报(自然科学版) , 2002 **39**(6) :613 ~ 616.
- [17] 杨居祥 ,张晓东 ,宗书东等 .大鼠睾丸精子发生中差异表达基因 *RSD5* 的克隆与表达分析 .基础医学与临床 , 2001 **21**(2) :118 ~ 121.
- [18] 罗阳 ,于秉治 .人类生殖相关新基因的定位和组织表达 .遗传 2003 **25**(6) :633 ~ 636.