

中国野生葡萄白粉菌诱导 cDNA 文库中 抗病基因的筛选

张军科,王 静,王跃进,张朝红,徐 炎

(西北农林科技大学 园艺学院;农业部西北园艺植物种质资源与遗传改良重点开放实验室,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】从中国野生华东葡萄白河 35-1 经白粉菌接种诱导后叶片所构建的 cDNA 文库中,筛选抗病相关基因。【方法】根据植物抗病基因保守序列 NBS 位点设计特异引物,对葡萄白粉病接种诱导后的环化 cDNA 文库进行菌落 PCR 筛选,从随机挑选的大量菌落中筛选出 82 个 PCR 阳性菌落,提取阳性菌落的质粒进一步进行 PCR 检测确认,对确认的 36 个阳性质粒插入片段进行了测序。【结果】测序结果和序列生物信息学分析结果均表明,有 3 个基因序列与 Genbank 中的已知序列有较高的同源性,其中 1 个基因序列与葡萄抗白粉病基因 (DT661587.1) 序列同源性达 99%,另外 2 个基因序列与水分胁迫下葡萄特异表达基因 (DT031657.1) 和葡萄抗皮尔斯病基因 (CF202948.1) 的同源性分别为 89% 和 96%。【结论】初步推测获得的 3 个基因均为抗性相关基因。

【关键词】 中国野生葡萄;cDNA 基因;文库筛选;抗病基因

【中图分类号】 S663.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)02-0119-05

Resistance genes screening in *Uncinular necator* induced cDNA library of Chinese wild grape

ZHANG Jun-ke, WANG Jing, WANG Yue-jin, ZHANG Chao-hong, XU Yan

(College of Horticulture, Northwest A & F University; Key Laboratory of Northwest Horticulture
Plant Germplasm and Genetic Improvement of Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This paper aimed to screen expressed resistance genes from Chinese wild grape cDNA library which was constructed from leaves induced by grape powdery mildew (*Uncinular necator*) inoculation. 【Method】 Specific oligo nucleotide primers were designed according to conservative NBS sequence of resistance genes and the universal sequence primers on vector. Colony PCR was employed to screen the circled cDNA library. 82 positive colonies were acquired by colony PCR, out of which 36 colonies were identified by plasmid PCR assay. 【Result】 Positive plasmids were sequenced and the sequence analysis result showed that 3 expressed sequence tags were highly homologous to known sequences, one was 99% homology to a registered Chinese wild grape sequence DT661587.1, the other two were 89% and 96% homology to *Vitis vinifera* water deficit response gene DT031657.1 and grape Pierce's disease resistance gene CF202948.1 respectively. 【Conclusion】 These genes are supposed to be related with grape powdery mildew resistance.

Key words: Chinese wild grape; cDNA library; library screening; resistance gene

* [收稿日期] 2007-08-30

[基金项目] 国家转基因专项(JY03-A-19-02); 国家自然科学基金项目(No. 30571280)

[作者简介] 张军科(1969—), 男, 甘肃灵台人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事果树生物技术与育种研究。
E-mail: zhangjk@nwsuaf.edu.cn.

自 1992 年 Johal 等^[1]从玉米中成功地克隆出第一个抗病 R 基因 *Hml* 至今,已相继通过定位克隆、转座子标签和同源克隆等技术,分离了 30 多个植物抗病 R 基因。尽管其来自不同的物种,针对各种不同的病原体(细菌、真菌、病毒和线虫等),但 R 基因所编码的蛋白质大多在结构上极其相似,除 *Pto* 基因外,均具有富含亮氨酸重复序列(LRR)、核苷酸结合位点(NBS)、丝氨酸-苏氨酸激酶区(STK)和亮氨酸拉链(LZ)等结构域^[2]。根据 R 基因的蛋白结构可将其分为 LRR 类、NBS 类、STK 类、LZ 类和 NBS-LRR 类共计 5 类,其中 NBS-LRR 类 R 基因克隆的最多。目前,NBS R 基因类保守域基本只出现在抗病基因当中,而 STK(PK)类和 LRR 类 R 基因的出现比较复杂。尽管这些基因 DNA 序列各不相同,但编码氨基酸的序列却非常保守,基于这些保守区域,设计简并 PCR 引物,可以扩增出许多 R 基因同源序列。抗病基因类似序列(Resistance Gene Analog, RGA)是存在于植物基因组中,与已分离出来的 30 多个抗病基因某些保守序列存在较高同源性的片段^[3]。RGA 在植物基因组中大量存在,许多研究证明,一些 RGA 与抗病基因密切连锁,甚至是抗病基因的一部分^[4]。迄今,已从大豆、马铃薯、拟南芥、玉米、小麦、水稻、大麦、生菜、番茄、柑橘等植物中扩增出 RGA^[5],以这些 RGA 为探针已鉴定了一些抗病候选基因。随着数据库中的信息日益剧增,这种基于基因组学的方法正成为研究植物抗性基因的重要手段。

果树抗病基因的分离,是深入了解果树植物抗病机理以及通过基因工程进行果树遗传改良的前提。近年来,已经出现了许多克隆基因的方法,如转座子标记技术^[6]、基因组定位和标记技术^[7]、mRNA 差异显示技术^[8]、图位克隆技术^[9]等。而构建 cDNA 文库则是克隆基因的一个十分有效的途径。通过 PCR 方法筛选 cDNA 文库已有一些报道^[10],该方法快捷、灵敏^[11],利用已知植物抗病基因所编码蛋白的保守结构域设计 PCR 引物,使人们可以从那些无法利用图位克隆或转座子标签技术分离目的基因的作物中,分离抗病基因或者 RGA。从葡萄基因组 DNA 获得 RGA 序列有很多报道^[12-13],但这些序列能否在抗病过程中表达,是否参与抗病反应尚未见相关报道。本研究从中国野生华东葡萄(*Vitis pseudoreticulata* W. T. Wang)株系白河 35-1 经白粉菌接种诱导的 cDNA 文库中,采用 PCR 技术筛选出经诱导后表达具有 NBS 结构的 RGA,获得了具

有抗白粉病作用的基因片段,以期为葡萄抗白粉病基因的应用和抗病机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

中国野生华东葡萄株系白河 35-1 经白粉菌接种诱导的 cDNA 原始文库,由本课题组 2005 年上半年采用 Clontech Smart cDNA library construction kit 试剂盒构建,为噬菌体文库,文库滴度为 3.0×10^5 pfu/mL,重组率 96.9%^[14];2005-11 进行第 1 次文库扩增,扩增文库滴度为 1.96×10^6 pfu/mL,重组率 97.3%;2006-11 进行第 2 次文库扩增,扩增文库滴度为 7.5×10^9 pfu/mL,库容为 10^6 pfu。本次筛选使用的文库为第 2 次扩增后的文库,试验使用的宿主菌 *E. coli* XL1-Blue 和 *E. coli* BM25.8 均为上述试剂盒成分。

Taq 酶购自大连 Takara 公司,质粒微量提取试剂盒(ZL-1-1-2)购自 U-gene 公司,Amp 购自上海瑞兴生物公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。测序工作由上海捷瑞生物技术公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据本课题组构建 cDNA 文库所用载体 TripEx2 及其环化质粒 pTripEx2 的序列和抗病基因 NBS 结构域的保守序列 P-loop,共设计 3 条引物:3' 端测序引物:5'-TAATACGACT-CACTATAGGG-3';5' 端测序引物:5'-TC-CGAGATCTGGACGAGC-3';NBS 序列引物:5'-GGTGGGGTTGGGAAGACAA-3',引物均由上海生工生物技术公司合成。

1.2.2 白粉菌诱导的中国野生葡萄 cDNA 文库的扩增和环化 cDNA 文库扩增使用宿主菌 *E. coli* XL-Blue 并参照文献^[15]的方法进行,cDNA 文库环化参照 Clontech Smart cDNA library kit 试剂盒使用说明书并略有改动,具体步骤如下:

(1)感受态细胞的制备。挑取工作平板上 *E. coli* BM25.8 单菌落,接种于 20 mL 不添加抗生素的 LB 液体培养基中,31 ℃、150 r/min 振荡条件下悬浮培养至 OD₆₀₀ 为 1.1~1.4,每管分装 1 mL 并添加 1 mol/L MgCl₂ 10 μL 混匀,每管 200 μL 分装待用。

(2)转化。取 1.1.2(1)中分装的感受态细胞,在冰浴上分别与稀释 10、10²、10³、10⁴ 倍的中国野生葡萄 cDNA 文库 15 μL 轻柔混匀,31 ℃静置 30 min,加入 400 μL LB 液体培养基,31 ℃、150 r/min 振荡条件下培养 1 h。

(3)涂板。取 1.2.2(2)中 200 μ L 转化菌液涂布在附加 100 mg/L Amp 的 LB 固体平板上,31 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 h,至菌落直径达 1~1.5 mm。

1.2.3 中国野生葡萄环化 cDNA 文库中阳性菌落的 PCR 筛选 PCR 反应体系如下: Takara PCR mix 10 μ L,3' 测序端引物(10 mmol/L)1 μ L,NBS 引物(10 mmol/L)1 μ L,加 ddH₂O 至总体积为 20 μ L,在 200 μ L PCR 反应管中轻柔混匀。在超净工作台上用 10 μ L 无菌枪头挑取中国野生葡萄 cDNA 环化文库单菌落,加入 PCR 反应管中,作为模板,以不加模板为对照(CK1)。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 50 s,47 $^{\circ}$ C 70 s,72 $^{\circ}$ C 70 s,循环 40 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物于 14 g/L 琼脂糖凝胶中电泳检测,有条带的菌落用于下一步检测。

1.2.4 中国野生葡萄环化 cDNA 文库中阳性菌落的培养 挑取 1.2.3 中扩增有条带的单菌落加入含 Amp(100 mg/L)的 LB 液体培养基中,31 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡条件下悬浮培养 12~14 h。取少量培养液加入灭菌甘油,使其终浓度为 200 ml/L,70 $^{\circ}$ C 条件下保存备用,剩余菌液用于提取质粒及测序。

1.2.5 中国野生葡萄环化 cDNA 文库中阳性菌落质粒的 PCR 鉴定和测序 参考 U-gene 公司质粒微量提取试剂盒(ZL-1-1-2)说明书提取质粒。以提取的质粒 0.3 μ L 为模板,用 3' 端测序引物和 NBS 引物作 PCR 检测,PCR 条件同 1.2.3,以不加质粒模

板的反应管为对照(CK2)。对 PCR 检测出现条带的质粒用 5' 端测序引物和 3' 端测序引物进行测序。

2 结果与分析

2.1 白粉菌诱导的中国野生葡萄 cDNA 文库的扩增和环化结果

白粉菌诱导的中国野生葡萄原始 cDNA 文库受保存期和体积限制,不能用于文库环化和文库筛选,因此本研究首先进行了文库扩增。经扩增后,测得的文库滴度为 7.5×10^9 pfu/mL,库容为 10^6 pfu,理论上应该包含了中国野生葡萄大部分表达基因的 cDNA 克隆。经梯度稀释试验可知,要获得分离良好且菌落数量满足要求的环化 cDNA 文库,200 μ L 感受态 *E. coli* BM25.8 应与库容小于 10^4 pfu 的扩增文库混合,才可获得良好的环化 cDNA 文库。

2.2 中国野生葡萄环化 cDNA 文库中 PCR 的筛选

2.2.1 阳性菌落的 PCR 筛选 利用抗病基因的保守序列 NBS 设计 NBS 特异引物,与 3' 端测序引物进行菌落 PCR,有条带出现样品对应的菌落为阳性菌落,其质粒上插入片段中可能包含 NBS 序列。从 1 317 个菌落中筛选出 82 个阳性菌落。从扩增结果(图 1)可以看出,质粒插入片段中,NBS 引物到 3' 端测序引物的片段长度大多为 500~750 bp,少数为 300~500 bp。由于细菌基因组 DNA 的干扰,菌落 PCR 筛选的假阳性率较高,需进一步提取阳性菌落的质粒 DNA 进行鉴定。

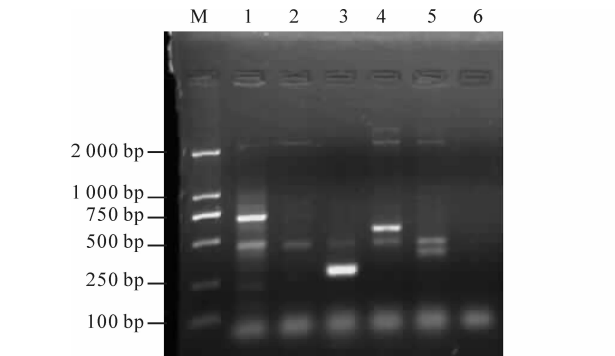


图 1 中国野生葡萄环化 cDNA 文库中部分菌落的 PCR 筛选结果

M. DL2000;1. 菌落 No. 21;2. 菌落 No. 13;3. 菌落 No. 155;4. 菌落 No. 347;5. 菌落 No. 350;6. CK1

Fig. 1 Results of circled Chinese wild grape cDNA library colony PCR

M. DL20000;1. Colony No. 21;2. Colony No. 13;3. Colony No. 155;4. Colony No. 347;5. Colony No. 350;6. CK1

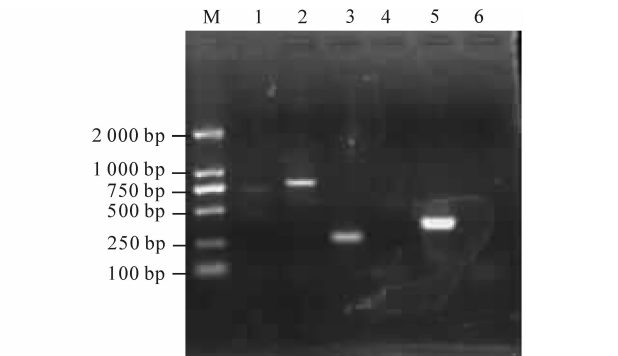


图 2 中国野生葡萄环化 cDNA 文库部分阳性菌落质粒的 PCR 鉴定结果

M. DL2000;1. 菌落 No. 21;2. 菌落 No. 143;3. 菌落 No. 155;4. 菌落 No. 347;5. 菌落 No. 350;6. CK2

Fig. 2 Results of positive clone assay by plasmid PCR in circled Chinese wild groe cDNA library

M. DL20000;1. Colony No. 21;2. Colony No. 143;3. Colony No. 155;4. Colony No. 347;5. Colony No. 350;6. CK2

2.2.2 阳性菌落的质粒鉴定 挑取阳性菌落,适当培养后提取质粒,对提取的质粒用 3' 端测序引物和

NBS 引物进行质粒 PCR 扩增验证,有条带出现样品对应的菌落为阳性菌落,其中质粒上插入片段中包含 NBS 序列。经过筛选,82 个阳性菌落中,确认 36 个菌落质粒上插入片段中可能包含 NBS 序列,菌落筛选的假阳性率高达 56%(图 2)。如果菌落 PCR 时产生的条带能在质粒 PCR 验证时重复出现,说明该片段存在于质粒上,可进行测序。部分菌落在质粒 PCR 验证时无条带出现,说明阳性菌落

TCCGAGATTTGGACGAGCTTTTTTTTTTTTTTCGGGAAGCGCCCCATTGTGTTGGTACC	60
CGGGAATTTGGCCATTACGGCCGGGCAACATAGGTCATCGAAAGGGTTTCGGAGACCCCC	120
CAAAGCCCGAAAGTCAGGATCTTTCAGAAAATGGATTCTATTGGAAGAAAGCAAAACCG	180
CATGGATAAGCTCCCACTAACCCGTCAATTTGGGATCCCCTTCGGGATTTTCCTTGGGAG	240
GTTTTGGGAAGGAATTGGAAGTAATAATTTTGATTCTTACAGATACAGAAGAAAAGGTT	300
TTTTATTGGTTCTAACGCTGTACCTATGGGGTAGGGGTAGAGGAAGGGGAAAAAACCGAA	360
GGTTTCTCATAGTACTTTTGATCGAAAAATCAATTGGGATTAATTTGTTCCCTTCGATCA	420
AAGAGAAAAGGGGTCAGATTTTTCAGGATCAAACCTATGGGACTTAAGGAATGATGAAAA	480
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	505

图 3 菌落 No. 21 质粒上插入片段的测序结果
Fig. 3 Nucleotide sequence of insert from colony No. 21

TTGGGGGAACGAGCCTTGTGAGAGAGAATTGAGAAATGGCGGAAGAGGGACAATTGTCTG	60
GTTGCCACAGTGTGGAATCGTGGAAGGAGCAATTCCAGCATGGAATAGAGTCCAAGAAAC	120
TGGTGGGGGTGGATTTCCCTGCTTCATGGTGTGGGCCATGTCGTGTCATTAGCCCCTTTT	180
TGGCAGAGCTTGCCCAAGAAGATGCCTAATGTCATATTTTTCAAGGTGGATGTGGATGAAT	240
TGGAGACTGTTGGTAAGGAGTGGGAAGTGGAGGCCATGCCAACCTTTTGTTCCTGAAAAG	300
AAGGAAACGTAGTGGACAAGGTTGTGGGTGCAAGAAGAGAAGAAATGGTGCAGAAGACAG	360
AGAAGCATGCAACTGCTTGACTTGCAATTTGGAGATATGAACCTCCCTGCAAAATGCCA	420
CATTTTTTATGGTCATTGTAACCTATGCAAGTACTTGTTCCTGTTACTTTGGGGGCCCTG	480
GGAGCCTCAGGGCTTTTTTAAGATAAGTGGTGTTCATATAAATGATAATACAATATGT	540
GTGTTATTTATGGTTGCTTTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	594

图 4 菌落 No. 350 质粒上插入片段的测序结果
Fig. 4 Nucleotide sequence of insert from colony No. 350

对筛选出的阳性质粒中插入片段的测序结果,用 Blast 软件进行相似性分析发现,测得的 36 个序列中,大多数为未知基因序列,在 Genbank 中没有与之相似性较高的序列,仅来源于菌落 No. 21、No. 143、No. 350 的序列与已知抗性基因有较高的同源性。其中菌落 No. 143 质粒上插入片段的序列与已登录葡萄抗白粉病基因(DT661587. 1)有 99%的同源性,初步推断为同一基因;菌落 No. 21 质粒上插入片段的序列与在水分胁迫下葡萄特异表达基因(DT031657. 1)的同源性高达 89%,据此推测该基因可能参与了水分胁迫下葡萄的抗性反应,其编码产物的功能与生物逆境适应性相关;菌落 No. 350 质粒上插入片段的序列与葡萄抗皮尔斯病基因(CF202948. 1)的同源性高达 96%,推测其编码产物

质粒上并无包含 NBS 序列的插入片段,初步判定为假阳性菌落。
2. 2. 3 阳性质粒的测序结果和序列分析 对前述筛选获得的 36 个质粒,用 5'端测序引物和 3'端测序引物进行测序,得到质粒载体上来源于 cDNA 文库的核苷酸序列。其中菌落 No. 21 和菌落 No. 350 质粒上的插入片段分别如图 3 和图 4 所示。

的功能可能与抗病性相关;其他菌落的序列未发现与已知抗病基因有同源性,这些基因序列与抗病性的关系有待进一步证实。

3 讨 论

以 λ 噬菌体载体系统构建的 cDNA 文库,可采用的筛选方法有限,不能对 cDNA 文库进行功能筛选。根据 λTriplEx2 噬菌体能利用重组酶自身环化成质粒 pTriplEx2 的原理^[16],通过随机挑选多个分界良好的噬菌斑转导入 *E. coli* BM25. 8 中,进而将噬菌体转化为质粒,证明是一种实现 cDNA 文库筛选的简单而有效的方法,在功能基因组学方面具有广阔的应用前景。

菌落 PCR 的一个突出缺点是假阳性较高,可能

与菌落模板有关。当菌落加样量大时易产生假阳性克隆,但在实际操作中,菌落加样量很难控制。有学者建议取 1 mL 菌液于离心管中,100 ℃水浴 5 min,1 000 r/min 离心 1 min,取上清液 0.05~2 μ L 作为模板^[17],但这种方法工作量大,不适合大量筛选。也有学者建议,对大量菌落筛选时,可先进行菌落 PCR,然后对阳性菌落进行培养再提取质粒,经酶切或者 PCR 验证^[18],本研究认为此法较适用。

本研究结果表明,运用 PCR 筛选环化 cDNA 文库是可行和可靠的,而且具有快速、简便易行的特点。本研究成功地应用 NBS 引物和载体测序引物,从中国野生葡萄环化的 cDNA 文库中,筛选出了具有抗病 R 基因特征的序列,并通过序列同源性分析,初步证明 3 个基因片段与葡萄抗性存在相关性。这也是首次从植物 cDNA 文库中筛选出 RGA 序列的报道。说明中国野生葡萄的一些 RGA 序列在白粉菌接种诱导后,能够启动转录并参与抗病反应,这一研究结果为植物 RGA 序列参与抗性反应提供了新的证据。通过本研究方法筛选出的基因片段,均可以作为葡萄抗白粉病候选基因片段。在获得抗病相关基因片段后,关键是对其进行后续的功能验证与分析。这些基因片段可以作为探针与中国野生葡萄进行 Northern 杂交,或通过定量 PCR 比较该基因在接种病菌前后的表达情况,验证其是否参与了葡萄的抗白粉病机制,其相关研究尚在进行中。

【参考文献】

- [1] Johal G S, Briggs S P. Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize [J]. Science, 1992, 258(5084): 985-987.
- [2] Hulbert S H, Webb C A, Smith S M, et al. Resistance gene complexes: evolution and utilization [J]. Annual Review of Phytopathology, 2001, 39: 285-312.
- [3] 易图永, 谢丙炎, 张宝玺, 等. 植物抗病基因同源序列及其在抗病基因克隆与定位中的应用[J]. 生物技术通报, 2002(2): 16-20.
- Yi T Y, Xie B Y, Zhang B X, et al. Application of plant resistance gene analogs in cloning and mapping resistance genes [J]. Biotechnology Bulletin, 2002(2): 16-20. (in Chinese)
- [4] 秦跟基, 陈佩度, 顾红雅, 等. 根据 R 基因保守区分离小麦 R 基因类似序列[J]. 植物学报, 2003, 45(3): 340-345.
- Qing G J, Chen P D, Gu H Y, et al. Isolation of resistance gene analogs from wheat based on conserved domains of resistance genes [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2003, 45(3): 340-345. (in Chinese)
- [5] Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Plant disease resistance genes [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1997, 48: 575-607.
- [6] Searles L L, Jøkerst R S, Bingham P M, et al. Molecular cloning of sequences from a drosophila RNA polymerase II locus by P element transposon tagging [J]. Cell, 1982, 31(3): 585-592.
- [7] Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes [J]. Science, 1993, 259(5079): 946-951.
- [8] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257(5072): 967-971.
- [9] Song W Y, Wang G L, Chen L L, et al. A receptor kinase 2 like protein encoded by the rice disease resistance gene [J]. Science, 1995, 270(5243): 1804-1806.
- [10] Amaravadi L, King M W. A rapid and efficient non-radioactive method for screening recombinant DNA libraries [J]. Biotechniques, 1994, 16(1): 98-103.
- [11] Carl W D, Gabriela S D. PCR primer: A laboratory manual [M]. Woodbury, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
- [12] Donald T M, Pellerone A, Adam-Blondon F. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 610-618.
- [13] Gaspero G D, Cipriani G. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine [J]. Mol Gen Genomics, 2003, 269: 612-623.
- [14] 徐炎. 中国原产华东葡萄抗白粉病基因 cDNA 文库构建及其 EST 序列分析[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- Xu Y. Construction of cDNA library of *Vitis pseudoreticulata* native to China inoculated with *Uncinula necator* and analysis of its EST sequences [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2006. (in Chinese)
- [15] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Short protocols in molecular biology [M]. 5th ed. Trenton New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2002.
- [16] 朱靖, 杨娜娜, 李浩, 等. λ 噬菌体 cDNA 文库向质粒 cDNA 文库转化的研究[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(1): 27-28.
- Zhu J, Yang N N, Li H, et al. A research on the transformation from λ phage library to plasmid library [J]. Acta Ecologicae Animalis Domastici, 2006, 27(1): 27-28. (in Chinese)
- [17] 毛伟华. 菌落 PCR 产物直接测序方法的建立及在水稻基因测序中的应用[J]. 中国水稻科学, 2005, 19(5): 463-466.
- Mao W H. Establishment of direct sequencing method with colony PCR products and its application in rice gene sequencing [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2005, 19(5): 463-466. (in Chinese)
- [18] 陈书霞, 王晓武, 房玉林. 单菌落 PCR 法直接快速鉴定重组克隆[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 52-56.
- Chen S X, Wang X W, Fang Y L. Rapid characterization of recombination clone by PCR screening of individual bacterial colonies [J]. Microbiology, 2006, 33(3): 52-56. (in Chinese)