

香猪肌肉组织 cDNA 文库的构建 及其 EST 测序成功率的分析

王秀丽^{1,3}, 李 宁², 赵志辉², 冯继东², 赵兴波¹, 李长绿¹, 吴常信¹

(1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;

3. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 密山 158308)

摘要:以香猪背最长肌为实验材料,以 Lambda ZAP II 为载体,构建了肌肉组织的 cDNA 文库。结果表明,cDNA 文库的滴度在 3.4×10^7 pfu/ml 以上,重组率在 94% 以上,插入片段大小平均在 1.5kb 以上。同时指出,如果从 3' 端测序,多于 30 个碱基 T 的插入片段是造成 ESTs 测序成功率低的主要因素。

关键词:香猪;背最长肌;cDNA 文库;ESTs

中图分类号:S828.9

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2002)03-0263-04

Analysis of Succeed Percentage on Sequencing ESTs and Construction of Porcine Muscle cDNA library

WANG Xiu-li^{1,3}, LI Ning², ZHAO Zhi-hui², FENG Ji-dong²

ZHAO Xing-bo¹, LI Chang-lv¹, WU Chang-xin¹

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. National Laboratory for Agrobiotechnology of China Agricultural University, Beijing 100094, China;

3. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Mishan 158308, China)

Abstract: Using Longissimus Dorsi muscle as material and Lambda ZAP II as Vector, Xiang Pig Longissimus Dorsi muscle cDNA library has been constructed in our study. The results showed that the trituration of the library was 3.4×10^7 pfu/ml, the recombinant percentage was 94%, and the fragment length of inserted average cDNA were 1.5kb. The study pointed out that the more than 30 T insertion is the major factor for low percentage if sequencing the 3' end.

Key words: xiang pig; longissimus dorsi muscle; cDNA library; ESTs

肉用性状在猪的育种和生产中占有重要的经济地位,是重要的数量性状之一。肉用性状主要包括肌肉的生长发育、肌肉的品质及其与肌肉相关的生理生化功能调控方面的指标。常规的动物遗传育种原理和方法在提高肉用性状的作用等方面已失去了其原有的优势,即长期的通过表型值来估计育种值,使得性状的遗传进展越来越小。随着分子遗传学原

理和生物技术方法的发展,从分子水平上对动物的生产性能进行改良有了可能,即从控制性状的基因入手,研究肉用性状的基因成为可能,从而为动物分子育种打下基础^[1,2]。

cDNA 文库是富集了与编码序列 mRNA 互补的 DNA 文库,具有时空性和组织特异性表达等特征。从 cDNA 文库中随机挑取克隆,从 5' 或 3' 端测

收稿日期:2002-02-05;修回日期:2002-04-16

基金项目:国家重大基础研究发展规划项目 973 项目(G20000161);国家自然科学基金重点项目(39730360)资助

作者简介:王秀丽(1964-),男,黑龙江省海林市人,博士研究生,副教授,专业:动物遗传育种学

通讯作者:李 宁(1962-),男,博士,教授,博士生导师,专业:分子生物学与动物遗传育种学。E-mail:ninglbau@public3.bta.net.cn

得的 100 ~ 500bp 序列称为表达序列标签 (expressed sequence tags, ESTs)^[3,4]。从原理上说, ESTs 序列是编码序列的一部分, 因此与 EST 对应的应是全长的 cDNA, 即为特异性组织的一个基因, 深入研究这个全长 cDNA, 就能得知它的功能。所以, 高质量 cDNA 文库的构建及其 ESTs 测序就显得尤为重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 成年香猪公猪来自中国农业大学昌平实验站, 采集其背最长肌肌肉组织, 置于液氮中保存备用。

1.1.2 主要试剂 TRIzol Reagent (GIBCO BRL 公司), DEPC (SIGMA 公司), Oligotex mRNA Mini Kit (QIAGEN 公司), ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (STRATAGENE 公司), α -³²P dATP (中国同位素公司), 质粒提取试剂盒(博大公司), 常规试剂和培养基由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室按《分子克隆实验指南》配制^[5]。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取、mRNA 的分离和纯化 用 TRIzol 试剂采用一步法提取组织样品的总 RNA, 用 Oligotex mRNA Mini Kit 进行 mRNA 的分离和纯化。总 RNA 和 mRNA 跑甲醛变性凝胶电泳, 用紫外分光光度计测定总 RNA 和 mRNA 的浓度与纯度。

1.2.2 cDNA 文库的构建 用高质量的 mRNA 约 5 μ g 进行反转录, 取合成的 cDNA 第一链 5 μ l 以及 cDNA 第二链 1 μ l 同时跑碱变性琼脂糖凝胶电泳, 经压片、同位素曝光后证明 cDNA 第一链和 cDNA 第二链确实已经合成且符合建库要求再继续进行后续步骤。补平 cDNA 末端并连接 *Eco*RI 接头, 再用 *Xho*I 消化。用 Sepharose CL-2B 去除小于 400bp 的片段, 回收的 cDNA 按 1 : 10 的比例连接于 Lambda ZAP II 载体, 用 Gigapack III Gold Packaging Extract 进行包装, 包装产物中加 500 μ l SM、20 μ l 氯仿和终浓度为 7% 的二甲基亚砜, 分装后存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.2.3 cDNA 文库的鉴定

1.2.3.1 cDNA 文库的鉴定 将得到的 cDNA 文库原库按 10²、10⁴、10⁵ 倍数进行稀释, 3 种浓度梯度

各取 1 μ l 与已制备好的 XL1-BLUE 感受态细胞 200 μ l 混匀, 37 $^{\circ}$ C 培养 15min, 加 NZY 顶层培养基、IPTG 和 x-gal 铺于 NZY 固体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。第二天, 计算噬菌斑数及噬菌斑蓝白斑比例, 得出噬菌体 cDNA 文库的滴度。随机挑取 12 个阳性噬菌体斑克隆, 用通用引物对 T3 和 T7 做 PCR, 鉴定 cDNA 片段的插入大小。

1.2.3.2 噬菌粒 cDNA 文库的生成和鉴定 取已鉴定的 cDNA 文库、XL1-BLUE 感受态细胞和 ExAssist helper phage 按 1 : 10 : 100 的比例混匀, 按试剂盒说明进行, 得到环化的噬菌粒 cDNA 文库, 加终浓度为 10% ~ 15% 的甘油, 分装后存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。取噬菌粒 cDNA 文库 1 μ l 与 200 μ l 已制备好的 SOLR 感受态细胞混匀, 37 $^{\circ}$ C 培养 15min, 取 200 μ l 转化反应, 加 IPTG 和 x-gal 铺于含有氨苄的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。随机挑取 12 个阳性质粒克隆, 提取的质粒用 *Eco*RI 和 *Xho*I 做双酶切以鉴定 cDNA 片段的插入大小。

1.2.4 噬菌体 cDNA 文库的扩增 按试剂盒的说明进行, 将大量扩增的噬菌体 cDNA 文库分装后存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中, 以备今后长年使用。

1.2.5 阳性质粒的提取与测序

1.2.5.1 从 1.2.3.2 步骤中随机挑取质粒, 放于含有氨苄的液体 LB 培养基中培养过夜, 用博大质粒提取试剂盒提质粒。

1.2.5.2 ESTs 的序列测定 采用 Lambda ZAP II 载体多克隆位点两侧的通用引物 T3 或 T7 作为测序引物。测序仪为 ABI PRISM377(PE 公司), 测序试剂盒为 BigDye Terminator(PE 公司)。测序反应体系为 20 μ l, 其中 Mix 3 μ l、测序引物 2 μ l(10pmol/ μ l)、测序模板 300 ~ 500ng、用灭菌水补至 20 μ l; 测序反应循环参数是 96 $^{\circ}$ C 2min, 然后 96 $^{\circ}$ C 10、50 $^{\circ}$ C 5、60 $^{\circ}$ C 4min、25 个循环; 取出反应, 加 2 μ l NaAc (pH5.2) 和 50 μ l 95% 乙醇, 冰上放置 10 ~ 20min, 12 000r/min 离心 15min, 去上清, 然后用 250 μ l 70% 乙醇洗沉淀, 去上清, 干燥。做好的测序反应可直接用 loading buffer 溶解并在 ABI377 上上样测序, 或者放于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

2 结果与分析

2.1 cDNA 文库的构建与鉴定

2.1.1 cDNA 文库的构建 肌肉组织的总 RNA

和 mRNA 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳见图 1。从图 1 可以看出总 RNA 的 28S 几乎为 18S 的 2 倍, mRNA 从 200bp 至 10kb 以上的范围呈 smear 分布, 表明 mRNA 比较完整, 没有被降解。采用 OligodT18 引物反转录合成 cDNA, 合成的 cDNA 第一链和 cDNA 第二链经同位素暴光、压片后证实其合成反应是成功的。其 X 胶片图在此省略。

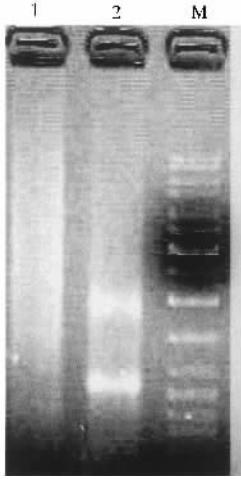


图 1 总 RNA 和 mRNA 电泳图

1:mRNA;2:总 RNA;M:1kb ladder

Fig. 1 The electrophoresis result of total RNA and mRNA

1:mRNA;2:total RNA;M:1kb ladder.

cDNA 第一链和 cDNA 第二链琼脂糖凝胶电泳见图 2。从图 2 可以看出 cDNA 绝大部分分布在 500bp 至 8kb 之间。

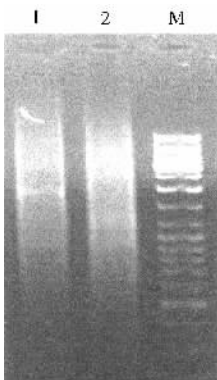


图 2 cDNA 第一链和第二链电泳图

1:cDNA 第一链;2:cDNA 第二链;M:1kb ladder.

Fig. 2 The electrophoresis result of the first and the second cDNA strand

1:the first strand cDNA;2:the second strand cDNA.

2.1.2 cDNA 文库的鉴定 肌肉组织 cDNA 文库的阳性单克隆噬菌斑 PCR 电泳图见图 3。环化的噬菌粒 cDNA 文库的阳性单克隆质粒的 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切琼脂糖凝胶电泳见图 4。

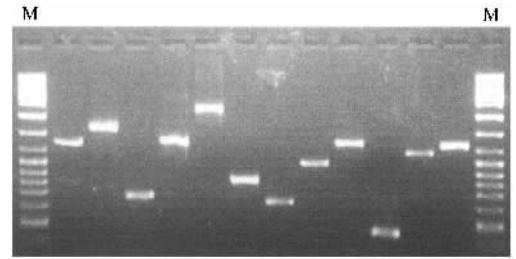


图 3 噬菌体 PCR 电泳图

M:1kb ladder

Fig. 3 The PCR electrophoresis of phage

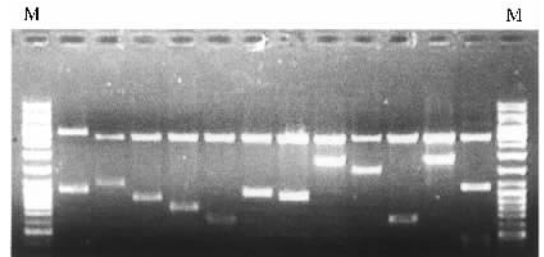


图 4 质粒的 *EcoRI* 和 *XhoI* 的双酶切结果

Fig. 4 The digestion of plasmid single clone with *EcoRI* and *XhoI*

2.1.3 肌肉组织 cDNA 文库的质量 肌肉组织 cDNA 文库的滴度在 3.4×10^7 pfu/ml 以上, 重组率在 94% 以上, 插入片段大小平均在 1.5kb 以上。

2.2 ESTs 的测序

2.2.1 阳性质粒模板的提取 本实验共提取了 171 个质粒用于测序, 部分质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳见图 5。从图 5 可见, 随机的 8 个阳性质粒克隆主要在标准的空质粒 3zf 后面, 说明有外源片段的插入。

2.2.2 ESTs 的测序统计结果 本实验共提取了 171 个阳性质粒, 用 T7 引物从 3' 端测序, 测了 107 个, 成功了 80 个, 成功率为 74.76%, ESTs 的平均长度为 552bp。用 T3 引物从 5' 端测序, 测了 64 个, 成功了 58 个, 成功率为 90.63%, ESTs 的平均长度为 568bp。

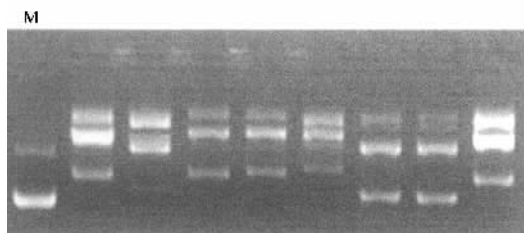


图 5 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

M: 标准质粒 3zf

Fig. 5 The electrophoresis of plasmid DNA

M: the standard plasmid-3zf

3 讨 论

3.1 cDNA 文库的构建与鉴定

总 RNA 提取和 mRNA 的分离纯化是 cDNA 合成和建库过程中首要的最为关键的一步。这一步做的好能够保证将来建成的文库质量。做的不好,就可能使将来建成的文库不能含盖 90% 以上的基因,插入的片段平均大小可能在 1.0kb 以下^[5,6,7]。这样就对后续实验有很大的影响。本研究采用 OligodT18 为反转录合成引物,是为了后续实验如做 ESTs 表达谱等研究时,能代表 3' 端的特征序列。另外,本实验从 5' 端部分测序是为了研究 mRNA 5' 端的特征结构,为获得 cDNA 全长打下基础。本实验的结果表明,香猪肌肉组织 cDNA 文库是符合要求的。有关 cDNA 文库的构建与鉴定以及 ESTs 的分析,作者在相关文章中分别重点探讨(另文发表)。

3.2 ESTs 的测序

在人类基因组计划和动植物基因组计划进行的同时,科学家启动了相应的 ESTs 计划。所谓 ESTs 就是从 cDNA 文库中随机挑取阳性克隆,从 5' 或 3' 端测得的 100~500bp 的序列。ESTs 代表 mRNA 的部分序列。大规模的 ESTs 测序就需要既保

证质量,又要降低测序成本。为了提高测序的成功率,应从以下几个方面加以注意:(1)cDNA 文库要符合要求;(2)模板 DNA 提取的是否干净,有没有 RNA 的污染;(3)在做测序反应时,是否严格按说明进行操作;(4)测序仪的选择及测序胶的配制。ABI 377 和 MAGE BACE 等不同厂家、不同型号的测序仪对测序模板的要求不一样;(5)待测序列的碱基结构。如果所测序列含有较长的同一碱基,则测序仪很难读准所测的序列,准确性显著下降。本实验不成功的样品的 polyT 绝大多数多于 30 个连续的碱基 T。因此,在 cDNA 文库的构建中,如何使 OligodT18 与 mRNA 的 3' 端最近的 polyA 结合是今后要研究的一个主要方面。另一方面,在 cDNA 文库的构建前,去除 mRNA 3' 端的 polyA 也是本实验室今后建库过程中重点要解决的问题。解决了这个问题,才能提高大规模 ESTs 测序的成功率。

参 考 文 献 (References):

- [1] 李 宁. 动物基因组计划及其对动物育种的影响[J]. 遗传, 1997, 19(增刊): 7~10.
- [2] Davoli R, Zambonelli P, Bigi D, *et al.* Analysis of expressed sequence tags of porcine skeletal muscle[J]. *Gene*, 1999, 233: 181~188.
- [3] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, *et al.* Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project[J]. *Science*, 1991, 225: 1651~1656.
- [4] Eickhoff H, Schuchhardt J, Ivanov I, *et al.* Tissue gene expression analysis using arrayed normalized cDNA library[J]. *Genome Res*, 2000, 10(8): 1230~1240.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 等著(金冬雁等译). 分子克隆实验指南[M]. (第二版), 北京: 科学出版社, 1996.
- [6] 赵志辉, 李 宁, 刘兆良, 等. 鸡下丘脑 cDNA 文库的构建及部分 ESTs 序列初步分析[J]. 遗传学报, 2001, 28(4): 301~305.
- [7] 祝 骥, 马文丽, 李 凌, 等. 一种限制性 cDNA 文库的构建[J]. 遗传, 2002, 24(2): 174~176.