

# 猪蛔虫雄虫 cDNA 文库的构建

邓 艳, 魏冬霞, 吴绍强, 林瑞庆, 宋慧群, 朱兴全\*

(华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

**摘 要:** 采用 Tripure Isolation Reagent 抽提猪蛔虫雄虫成虫的总 RNA, 用 poly(A) Purist™ 纯化试剂盒分离 mRNA。分离 mRNA 后, 用 Clontech 公司的 Creator™ SMART™ cDNA 文库构建试剂盒构建了猪蛔虫雄虫成虫的 cDNA 文库。结果获得了  $7.26 \times 10^5$  独立克隆, 重组率达 96.7%, 插入片段的平均长度约为 1 kb。猪蛔虫雄虫 cDNA 文库的成功构建为利用文库筛选雄虫差异表达基因提供了材料来源, 为研究猪蛔虫性别发育的分子机制奠定了基础。

**关键词:** 猪蛔虫; 雄虫; cDNA 文库; SMART 技术; 猪

中图分类号: S852.73; Q785

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)08-0804-05

## Construction and Characterization of a cDNA Library for Male Adult *Ascaris suum*

DENG Yan, WEI Dong-xia, WU Shao-qiang, LIN Rui-qing, SONG Hui-qun,  
ZHU Xing-quan\*

(College of Veterinary Medicine,

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The objective of the present study was to construct a cDNA library for male adult of *Ascaris suum* with SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technique using Creator™ SMART™ cDNA library construction kit. The total RNA was extracted from *A. suum* male adult using TriPure isolation reagent and mRNA was purified using Poly(A) Purist™ kit. Single-strand cDNA was synthesized using PowerScript™ reverse transcriptase, and then double-strand cDNA was synthesized and amplified by long-distance PCR (LD-PCR). The PCR products were digested by proteinase K and purified. After digestion with *Sfi* I and size fractionation using CHROMA SPIN-400™ columns, SMART cDNA was ligated to the *Sfi* I-digested, dephosphorylated pDNR-LIB vector. The ligation mixture was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  by electroporation. The constructed cDNA library contained  $7.26 \times 10^5$  independent clones. The recombination rate was 96.7%. The average cDNA insert size was 1 kb. After the library was amplified, its capacity was  $6.359 \times 10^9$  cfu/mL. A cDNA library for *A. suum* male adult was successfully constructed using SMART technology, which provides foundation for the screening and isolation of male-specific genes from *A. suum*.

**Key words:** *Ascaris suum*; male; cDNA library; SMART technique; pig

猪蛔虫 (*Ascaris suum*) 属于线虫纲 (Nematoda) 蛔科 (Ascaridae), 是寄生于猪小肠的大型线虫。猪

收稿日期: 2005-11-21

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目 (30225033); 人事部留学回国人员科技活动择优资助项目 (粤人函[2003]8 号); 广东省自然科学基金重点项目 (36835)

作者简介: 邓 艳 (1977-), 女, 江西人, 硕士生, 主要从事分子寄生虫学研究

\* 通讯作者: 朱兴全, 教授, Tel: 020-85283730; Fax: 020-85283730; E-mail: xingquanzh@scau.edu.cn

蛔虫病感染普遍,分布广泛,是给养猪业造成巨大损失的寄生虫病之一。它可导致猪的腹泻、消瘦、贫血、出血、生长不良,并易引起其它疾病的继发,对仔猪的危害尤其大,严重者可导致死亡。猪蛔虫的幼虫还能感染人,在体内移行,造成幼虫移行症<sup>[1]</sup>。目前对猪蛔虫的分子生物学研究主要集中在呼吸和代谢机制,各种酶的结构、作用和功能等方面<sup>[2]</sup>,在药物方面主要是抗蠕虫药物的研究<sup>[3,4]</sup>,对猪蛔虫的性别相关基因研究很少。但是长期过度使用药物已造成全球性的寄生虫抗药性问题、动物产品及环境中的药物残留等问题。构建猪蛔虫雄虫的 cDNA 文库,可以用于筛选、分离目的基因,寻找与性别发育有关的表达基因,进而筛选出可用于疫苗制备的保护性抗原基因。本项研究的目的是应用 SMART<sup>TM</sup> 技术构建猪蛔虫雄虫的 cDNA 文库。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

猪蛔虫雄虫采自广东省湛江市,笔者教研室保存。

Creator<sup>TM</sup> SMART<sup>TM</sup> cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司, Tripure Isolation Reagent 购自 Roche 公司, poly(A) Purist<sup>TM</sup> 纯化试剂盒购自 Amboion 公司, 宿主菌株为 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。

cDNA 合成引物: 引物均由试剂盒提供, SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) III 寡核苷酸: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG-3', CDS III/3' PCR 引物: 5'-ATTCTAGAGGC-CGAGGCGGCCGACATGd(T)<sub>30</sub>N<sub>-1</sub>N-3', 5' PCR 引物: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'。M13 测序通用引物。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 和 mRNA 的提取 取 0.8 g 猪蛔虫雄虫,在液氮中研磨至粉末状,按 Roche 公司的 Tripure Isolation Reagent 操作说明书分离总 RNA,变性琼脂糖胶检测总 RNA 的完整性,紫外分光光度计测其含量,然后按照 poly(A) Purist<sup>TM</sup> 纯化试剂盒从总 RNA 中分离 mRNA。紫外分光光度计测 mRNA 的含量。

#### 1.2.2 cDNA 的合成

1.2.2.1 cDNA 第一链的合成:按 Clontech 公司 Creator<sup>TM</sup> SMART<sup>TM</sup> cDNA 文库构建试剂盒说明

书,取 0.8  $\mu$ L (0.496  $\mu$ g) mRNA 加入 1  $\mu$ L CDS III/3' PCR Primer, 1  $\mu$ L SMARTIV 寡核苷酸,加去离子水至 5  $\mu$ L, 72  $^{\circ}$ C 2 min,取出后迅速置冰上,再加入 1  $\mu$ L Superscript<sup>TM</sup> 反转录酶, 1  $\mu$ L 10 mmol/L dNTP Mix, 1  $\mu$ L DTT, 2  $\mu$ L 5 $\times$  First-Strand Buffer, 反应体积共 10  $\mu$ L, 42  $^{\circ}$ C 反应 1 h; 取出后迅速置于冰上,合成 cDNA 第一链。

1.2.2.2 双链 cDNA 的合成:取 2  $\mu$ L cDNA 第一链产物,加入 80  $\mu$ L 去离子水、10  $\mu$ L 10 $\times$  Advantage 2 PCR Buffer、2  $\mu$ L 50 $\times$  dNTP Mix、2  $\mu$ L 5' PCR Primer、2  $\mu$ L CDS III/3' PCR Primer、2  $\mu$ L 50 $\times$  Advantage 2 Polymerase Mix, 使反应总体积 100  $\mu$ L。用 LD-PCR 扩增 cDNA 双链,反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 68  $^{\circ}$ C 延伸 6 min, 共 20 个循环。

1.2.3 cDNA 的酶切和纯化 吸取 50  $\mu$ L 扩增的 ds cDNA 到 1 个 1.5 mL 灭菌的离心管中,加入 2  $\mu$ L 蛋白酶 K (20  $\mu$ g/L), 混匀,离心。45  $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 离心。加入 50  $\mu$ L 去离子水, 100  $\mu$ L 酚: 氯仿: 异戊醇混合物, 14 000 r/min 离心 5 min。收集上层液体到另一干净的离心管中, 加入等体积的氯仿: 异戊醇, 混匀, 14 000 r/min 离心 5 min。收集上层液体到另一干净的离心管中, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠, 2.5 倍体积 95% 的室温乙醇, 室温条件下立即 14 000 r/min 离心 20 min。弃上清, 用 100  $\mu$ L 80% 乙醇洗沉淀物, 14 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 空气干燥沉淀物约 8 min, 加 79  $\mu$ L 的去离子水溶解沉淀。

在含 79  $\mu$ L cDNA 的离心管中加入下列试剂: 10  $\mu$ L 10 $\times$  Sfi I Buffer, 10  $\mu$ L Sfi I, 1  $\mu$ L 100 $\times$  BSA, 总体积 100  $\mu$ L, 充分混匀, 50  $^{\circ}$ C 酶切 2 h, 加 2  $\mu$ L 1% 二甲苯胺染料。

1.2.4 cDNA 的分级分离和连接 准备 16 个收集管, 标记为 1~16。按试剂盒操作要求, 用 700  $\mu$ L 缓冲液洗 CHROMA SPIN-400 柱, 待洗柱缓冲液流完, 将上面的酶切产物平稳地加到胶层, 直到产物全部渗到胶面下。加 100  $\mu$ L 缓冲液使染料层下降数毫米。放置好第 1 收集管, 加 600  $\mu$ L 缓冲液, 收集滴出液体, 每滴一管, 每管约 35  $\mu$ L。每管取 3  $\mu$ L 进行 1.1% 琼脂糖凝胶电泳, 150 V 10 min。将 cDNA 片段大于 500 bp 的第 6~9 管合并, -20  $^{\circ}$ C 乙醇沉淀过夜。14 000 r/min 离心 20 min。弃上清, 室温干燥 10 min, 加 7  $\mu$ L 去离子水溶解沉淀。

分别用 0.5、1.0  $\mu$ L cDNA 与 pDNR-LIB (0.1

$\mu\text{g}/\text{mL}$ )  $1.0\ \mu\text{L}$  (*Sfi* I 处理过的载体),  $10\times$  Ligation Buffer  $0.5\ \mu\text{L}$ , ATP (  $10\ \text{mmol}$  )  $0.5\ \mu\text{L}$ , T4 DNA Ligase  $0.5\ \mu\text{L}$ , 加灭菌三蒸水至  $5\ \mu\text{L}$  进行连接反应,  $16\ ^\circ\text{C}$  连接  $14\ \text{h}$ , 然后  $4\ ^\circ\text{C}$  连接  $8\ \text{h}$ 。

1.2.5 重组质粒的转化、重组率测定及扩增 取 2 份  $100\ \mu\text{L}$  感受态宿主菌 (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) 放置冰水浴中, 分别加入上述连接液, 轻轻混匀后迅速进行电转化反应。电场强度  $12.5\ \text{kV}/\text{cm}$ , 脉冲持续时间为  $5\ \text{ms}$ 。取出电转化杯, 将转化细胞悬液分别迅速转入含  $900\ \mu\text{L}$  SOC 培养基的离心管,  $37\ ^\circ\text{C}$  振荡培养  $1\ \text{h}$ , 转速为  $225\ \text{r}/\text{min}$ , 这样得到的培养物作为原始文库保存于  $4\ ^\circ\text{C}$  备用。取培养物稀释后涂布于含  $30\ \mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素的 LB 平板上,  $37\ ^\circ\text{C}$  培养  $18\sim 20\ \text{h}$ , 计算转化效率。随机挑取 30 个单菌落培养后, 用 M13 引物, 通过 PCR 方法鉴定 cDNA 插入片段大小, 并估计文库的重组率。根据文库滴度在 LB 琼脂板上扩增文库。扩增后的文库于  $-70\ ^\circ\text{C}$  保存。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 与 mRNA 的提取

用 Tripure Reagent 总 RNA 分离试剂盒得到总 RNA, 用紫外分光光度计测定其  $A_{260}/A_{280}$  为  $1.76$ , 28S 和 18S 电泳条带清晰, 无拖尾(图 1)。本试验紫外分析 mRNA 的  $A_{260}/A_{280}$  为  $1.99$ , 说明纯度很高, 其纯度和含量均符合 cDNA 文库合成和建库的要求。

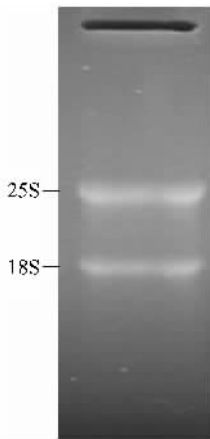
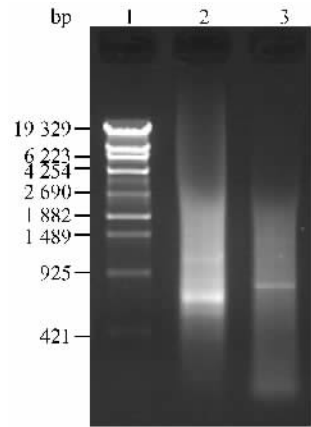


图 1 变性琼脂糖凝胶电泳鉴定猪蛔虫雄虫总 RNA  
Fig. 1 Analysis of total RNA of adult male *Ascaris suum* by denaturing agarose gel electrophoresis

### 2.2 cDNA 合成

利用 SMART 技术反转录的第一链产物, 通过

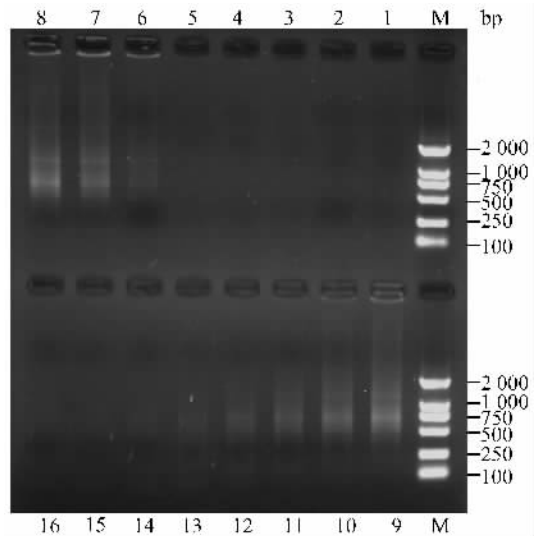
LD-PCR, 合成 ds cDNA。经  $1.1\%$  琼脂糖凝胶电泳, 条带呈弥散分布, 大小在  $200\sim 5\ 000\ \text{bp}$ (图 2)。



1.  $\lambda$ -*Eco*T 14 I digest marker; 2. 猪蛔虫雄虫双链 cDNA; 3. 阳性对照(人胎盘组织 cDNA)  
1.  $\lambda$ -*Eco*T 14 I digest marker; 2. ds cDNA of male *Ascaris suum*; 3. Positive control (human placenta cDNA)

图 2 猪蛔虫雄虫双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 2 Double strand cDNA synthesized from adult male *Ascaris suum*

cDNA 合成后经 *Sfi* I 酶切, 并经 CHROMA SPIN-400 柱对 cDNA 分级分离。电泳结果表明第 6、7、8 和 9 管洗脱物中 cDNA 的长度大于  $500\ \text{bp}$ (图 3)。

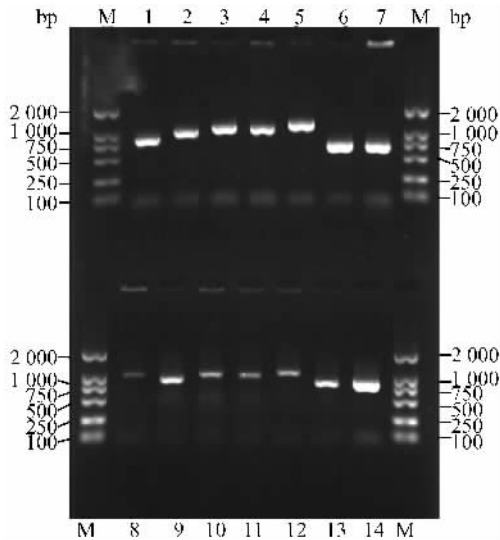


1~16. 过柱后的 ds cDNA; M. DL2000 marker  
Lines 1—16. ds cDNA fractionated through CHROMA SPIN400; M. DL2000 marker  
图 3 猪蛔虫雄虫 ds cDNA 过柱分离电泳  
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of male *Ascaris suum* ds cDNA after fractionation using CHROMA SPIN 400

## 2.3 cDNA 文库构建和鉴定

试验发现,加入 1  $\mu\text{L}$  的 cDNA 时文库的连接效率更高,滴度为  $6.86 \times 10^5$  cfu/mL,加入 0.5  $\mu\text{L}$  DNA 时的滴度为  $4.0 \times 10^4$  cfu/mL,因而我们所建文库的独立克隆数为  $7.26 \times 10^5$ 。扩增后文库的滴度达到  $6.359 \times 10^9$  cfu/mL。

随机挑取的单菌落用 M13 引物做 PCR 扩增,插入片段在 1 kb 左右(图 4),其中有 1 个空载体,据此计算出文库的重组率达到 96.67%。



1~14. cDNA 插入片段;M. DL2000 marker

Lines 1—14. cDNA inserts; M. DL2000 marker

图 4 代表性重组菌落插入片段的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from representative clones from cDNA library of male *Ascaris suum*

## 3 讨论

### 3.1 cDNA 文库构建及 SMART 技术

cDNA 文库的构建和分析是分子生物学的基本方法之一。cDNA 文库往往富集了特定时期、特异组织表达的基因,并去除了内含子,便于在不同的载体系统中表达,便于进行基因测序和氨基酸序列推测,以及研究发育过程中基因表达的时空特异性。它是发现新基因和研究基因功能的基础工具。

自 20 世纪 70 年代初首例 cDNA 克隆问世以来<sup>[5]</sup>,已经用构建和筛选 cDNA 文库的方法克隆了很多基因。传统的方法是在合成 cDNA 的双链后在两端连上接头,利用已知的接头序列再进行扩增,或者是利用末端转移酶在双链 cDNA 的 3' 末端加上一连串的 G 或 C(或者 A/T),再通过补齐黏末

端,利用已知的两头序列进行扩增。但是这些方法通常非常费力,需要多次用不同的酶处理有限的样品,因此会损失很多有用的信息。而且这些方法需要的起始 mRNA 量很大(通常要 5~100  $\mu\text{g}$ )<sup>[6]</sup>。

随着分子生物学的发展,cDNA 文库的构建方法取得了很大的进展。本试验采用 Clontech 公司的 SMART 技术,利用逆转录酶内源的末端转移酶活性,通过 LD-PCR 得到高质量、高产量的 cDNA 文库,更重要的是得到的 cDNA 能够代表原有样品中的 mRNA 的丰度。它需要的起始 mRNA 量很少,只需要 0.025~1  $\mu\text{g}$  mRNA<sup>[7]</sup>。在做表达文库时,如果 cDNA 的两端是同一个酶切位点,由于 cDNA 可能按两个不同的方向接入载体,反向接入载体的那些 cDNA 不能正确表达,因而有 50% 丢失的可能性。然而用两个不同的连接物又会涉及双酶切以及双酶切是否完全的问题,影响产率。本研究构建的文库采用 SMART 技术,合成两端分别带有 SMART 引物和 CDS 引物的 cDNA,经过扩增后用 *Sfi*I 单酶切,得到两端黏端不同的 cDNA,这样就可以定向插入特定的载体中,不会浪费 50% 的信息。

它的原理实际上非常简单:逆转录酶以 mRNA 为模板合成 cDNA,在到达 mRNA 的 5' 末端时碰到真核 mRNA 特有的“帽子结构”时,会发生模板转移,以 SMART 引物作为延伸模板继续延伸 cDNA 单链直到引物的末端,这样得到的所有 cDNA 单链的一端有含 Oligo(dT) 的起始引物序列,另一端有已知的 SMART 引物序列,合成第二链后可以利用通用引物进行 LD-PCR<sup>[8]</sup>。LD-PCR 通过调整 DNA 聚合酶,优化反应条件等方法,来扩增长片段 DNA。Cheng 等早在 1994 年利用该方法从人类基因组中扩增出长达 22 kb 的球蛋白基因簇<sup>[9]</sup>,Barnes 也在  $\lambda$  抗菌素中扩增出 1 个 35 kb 的基因<sup>[10]</sup>。

本研究构建的文库还有一个突出的优点就是它的载体系统,该质粒载体便于操作,不需要中间载体,也不用重复亚克隆,可以直接进行功能表达筛选。不受载体和酶切位点的限制,而且速度快,重组效率高达 90%。

### 3.2 mRNA 质量

要构建一个高质量的 cDNA 文库,获得高质量的 mRNA 是至关重要的。衡量 mRNA 的质量高低的标准主要有两个:一是看总 RNA 有无降解,在糖

凝胶电泳上表现为 28S 与 18S 条带是否清晰,二是看 RNA 有无污染,提取的 RNA 于紫外分光光度计检测  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.90~2.1 时, RNA 质量较纯。若  $A_{260}/A_{280}$  值低,说明有较多的蛋白质污染。我们提取的总 RNA 在琼脂糖凝胶电泳上 28S 与 18S 条带清晰,其中 28S:18S 约为 2:1,分离的 mRNA 经核酸蛋白测定仪检测  $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.99,说明提取的 RNA 质量很好。

### 3.3 cDNA 文库质量鉴定

根据美国 Clontech 公司关于良好基因文库的质量标准:原始文库的重组子数目为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^8$ ,重组率大于 90%,插入 cDNA 片段不小于 0.3 kb,平均大于 1 kb;我们构建的 cDNA 文库的重组子数目为  $7.26 \times 10^5$ ,文库的重组率达到 96.7%,插入的片段大于 0.5 kb,达到了文库构建的要求。在构建文库的过程中,感受态细胞的制备是很关键的一个步骤。为了获得最大的转化效率,笔者选择了电穿孔转化。制备的感受态细胞采用 18℃ 低温培养,转化效率比 37℃ 培养的细胞提高一个数量级<sup>[11]</sup>。在 OD<sub>600</sub> 达到 0.6 时制备的感受态细胞转化效率最好。保持 DNA 终质量浓度为 1 μg/mL 不变,电场强度在 12.5~15 kV/cm,脉冲持续时间为 4~5 ms,其转化效率可达到峰值,而电场强度继续升高时,脉冲持续时间延长,转化效率反而下降<sup>[12,13]</sup>。在本次试验中,当 DNA 和载体的体积比为 1:1 时,能得到最大的转化效率。

本试验在国内首次成功地构建了猪蛔虫雄虫成虫的 cDNA 文库,为今后利用文库筛选差异表达基因提供了材料来源,为进一步研究猪蛔虫性别发育的分子机制奠定了基础。

### 参考文献:

[1] Maruyama H, Nawa Y, Noda S, *et al.* An outbreak of visceral larva migrans due to *Ascaris suum* in Kyushu, Japan [J]. *Lancet*, 1996, 347: 1766~1767.  
 [2] 张 志, 赵宏坤. 猪蛔虫研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2001, 37(5): 36~38.  
 [3] Martin R J, Murray I, Rodertson A P, *et al.* Anthel-

mintics and ion-channels: after a puncture, use a patch [J]. *Int J Parasitol*, 1998, 28(6): 849~862.

- [4] Ho N F, Geary T G, Barsuhn C L, *et al.* Mechanistic studies in the transcuticular delivery of antiparasitic drugs. II: *Ex vivo/in vitro* correlation of solute transport by *Ascaris suum* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 52(1): 1~13.  
 [5] Hofstetter H, Sxhambock A, Van Den Berg J, *et al.* Specific excision of the inserted DNA segment from hybrid plasmids constructed by the poly(dA) and poly(dT) method [J]. *Biochim Biophys Acta*, 454(3): 587~591.  
 [6] Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A, *et al.* SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones[J]. *BMC Genomics*, 2004, 5 (1) :36.  
 [7] Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, *et al.* Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction[J]. *Biotechniques*, 2001, 30 (4) : 892~897.  
 [8] Zhao Z, Huang X, Li N, *et al.* Direct cloning of cell differential expression genes with full-length by a new strategy based on the multiple rounds of 'long distance' polymerase chain reaction and magnetic beads mediated subtraction[J]. *J Biotechnol*, 1999, 73: 35~41.  
 [9] Cheng S, Fochler C, Barnes W M. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91 (12): 5695~5699.  
 [10] Barnes W M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from A bacteriophage templates[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(6) : 2216~2220.  
 [11] 韩 峰, 褚 艳, 于文功. 低温培养对大肠杆菌转化效率的影响[J]. *高技术通讯*, 2003, 9: 30~34.  
 [12] 戴建新, 周凤鹃, 孙树汉. 电穿孔法转化大肠杆菌的影响因素[J]. *第二军医大学学报*, 1999, 20(5): 340.  
 [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002. 857~916.