

利用SMART 技术构建海带配子体cDNA 文库

胡乐琴, 陆广琴, 刘士成, 王丽丽, 毕燕会, 周志刚*

(1. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海200090; 2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海200090)

摘要 用Tizol 试剂提取海带配子体总RNA, 用SMART cDNA 文库构建试剂盒构建cDNA 文库。经测定原始文库滴度达到 1.1×10^8 Ffu/ml, 文库有500 μ l 体积, 库容量为 5.5×10^7 Ffu, 通过PCR 检测, 文库的重组率达100%, 扩增出的片段主要集中在0.8~1.8 kb, 平均插入片段长度约为1.34 kb。这些数据表明, 已获得高质量的海带cDNA 文库, 为海带基因资源保存及新基因的克隆奠定了基础。

关键词 海带; 配子体; cDNA 文库; 噬菌体

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)13-2975-02

生物物种cDNA 文库的构建, 在珍稀濒危生物资源保护、分子标记连锁图谱的探针制备、基因全长序列克隆以及功能研究等方面具有重要作用, cDNA 文库也是分子生物学最常使用的基因文库之一^[1,2]。SMART(Switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) 技术是一种较新的cDNA 文库构建方法, 避免了普通cDNA 文库构建方法中容易丢失信息等缺点, 所构建的文库能够代表原有样品中mRNA 的丰度, 保存了生物遗传信息的完整性。除用于文库构建外, 该技术还可用于基因的直接扩增与克隆, 从已知片段克隆基因的全长序列、基因芯片cDNA 探针的制备等^[3]。

海带(Laminaria japonica Aresch.) 是我国经济海藻养殖业中最重要的种类。尽管国内外学者对海带的宏观生物学已做了大量的研究工作^[4,5], 但对其微观生物学的认识尚处于起步阶段^[6-8]。通过初步筛选海带雄性配子体cDNA 抑制消减文库^[9], 已获得了一些差异表达的基因片段。为了更好地克隆这些差异表达基因的全长序列并明确它们在配子体发育过程中的功能, 笔者拟利用SMART 技术构建海带配子体的cDNA 文库。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料。 海带雌、雄性配子体无性繁殖系来自山东荣成海兴水产有限公司培育的“荣福”品种, 按已报道的方法^[10]分离、培养。

1.1.2 实验试剂。 SMARTTMcDNA 文库构建试剂盒、宿主菌 E. coli XL1-Blue MRF' 菌种、TiplEx2 载体均购自Qortech 公司, 总RNA 提取Tizol 试剂盒购自上海华舜公司, 总RNA 纯化试剂盒购自Qagen 公司, 包装蛋白购自Stratagene 公司。其他试剂均为国产或进口的分析纯。

1.2 方法

1.2.1 海带总RNA 提取、鉴定及纯化。 取海带配子体样品100 ng, 利用Tizol 法抽提褐藻RNA。取适量总RNA 样品, 用DEPC 水稀释, 用752 型紫外分光光度计分别测定样品260 和280 nm 波长的吸收光。同时取2 μ l 样品用变性琼脂糖凝胶电泳检测总RNA 的完整性。RNA 样品浓度按以下公式计

算: $[RNA] = OD_{260} \times D \times 40 \text{ ng/ml}$, D 为稀释倍数。RNA 根据 OD_{260}/OD_{280} 的比值计算。取100 μ g 总RNA 按Qagen 公司RNeasy 试剂盒操作步骤纯化, 最后用30 μ l 无RNase 的水溶解。

1.2.2 LD-PCR 法合成双链cDNA。 SMART 技术使用了长程PCR(Long distance, LD PCR) 合成双链cDNA, 有利于提高文库中全长cDNA 比例。按Qortech 的SmartTMcDNA 文库构建试剂盒的使用手册进行。取RNA 1.2 μ g, 依次加入SMART IV 寡核苷酸3' PCR 引物及dNTPs, 在反转录酶作用下合成第一链。再以1/5 体积的ss cDNA 合成ds cDNA, 依次加入dNTPs、5' PCR 引物3' PCR 引物、Advantage 2 多聚酶混合物在PCR 仪上进行扩增。经24 个循环后, 从100 μ l 中取5 μ l 经甲醛变性电泳检测, 观测ds cDNA 的分布状况。

1.2.3 PCR 产物经蛋白酶K 消化、SfiI 酶切及分级与沉淀。 取50 μ l(2~3 μ g) ds cDNA, 加入20 μ l 蛋白酶K 按操作手册方法处理消除残存的Tag 酶。再在其中加入10 μ l Sfi I 酶产生粘性末端。将上述ds cDNA 经过CHROMA SPIN 400 凝胶柱层析纯化, 收集大于400 bp 的cDNA 片段, 用乙醇沉淀cDNA 样品, 溶于7 μ l 超纯H₂O 中。取0.5 μ l 样品与对照cDNA, 用FR 200 紫外可见分析装置观察, 以确定样品浓度。

1.2.4 cDNA 与 Tipl Ex2 噬菌体载体的连接。 按照试剂盒操作要求分别取0.5、1.0、1.5 μ l cDNA 与1.0 μ l Tipl Ex2 噬菌体载体做3 个试连接反应, 16 h 过夜, 22 $^{\circ}$ C 下包装3 h, 每管中加225 μ l 1 \times 稀释缓冲液与12.5 μ l 氯仿, 混匀后高速离心分层, 获得原始文库。

1.2.5 体外包装反应。 3 组连接独立进行 λ -Phage 包装。使用Ggapack Gold Packaging Extract。取1.0 μ g cDNA 连接产物按要求进行包装, 最后3 管合并即已构建成海带基因cDNA 噬菌体表达文库。

1.2.6 E. coli XL1-Blue 感受态细胞的制备。 取XL1-Blue MRF' 菌种在四环素LB 平板上划线, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑单克隆, 接种于3 ml LB 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床过夜, 注意菌体生长OD₆₀₀ 不能超过1.0。离心收集细胞。用10 mmol/L MgSO₄ 轻轻重悬细胞, 立即使用。

1.2.7 滴定文库的滴度。 取1 μ l 噬菌体, 用SM 缓冲液做10 倍梯度稀释; 将各稀释度的噬菌体取1 μ l, 加入到200 μ l XL1-Blue MR' 细胞中, 37 $^{\circ}$ C 温浴25 min, 混于2~3 ml 上层琼脂, 倒LB 固体平板, 放置10 min。倒置平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。计数噬菌斑数目, 计算文库的容量大小。Ffu/ml = (噬菌斑数 \times 稀释倍数 $\times 10^3$ μ l/ml) / 铺平板用稀释库的 μ l 数。

基金项目 上海市教育委员会重点研究项目(04KA02); 国家自然科学基金项目(30471328); 上海市重点学科建设项目(Y1101)。

作者简介 胡乐琴(1966-), 女, 江西九江人, 在读博士, 助理研究员, 从事藻类生物技术研究。* 通讯作者, 博士, 博士生导师, 教授, Tel: 021-65710533, E-mail: zgzhou@shfu.edu.cn。

收稿日期 2006-04-11

1.2.8 文库的PCR鉴定。从平板上挑选20个白斑,做PCR检测。PCR引物PT:CTC CGA GAT CTG GAC GAG C;引物T7:TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG。反应体系:95 5 min,94 1 min,58 1 min,72 1 min,35个循环。72 10 min,再在4℃冰箱中保存。用1.1%琼脂糖凝胶电泳检测,计算平均插入片段的大小。

1.2.9 序列获得及测序。将大肠杆菌BM25.8接种于10 ml LB液体培养基,31℃,150 r/min摇床中培养过夜,至OD₆₀₀为1.1~1.4,加入100 μl 1 mol/L MgCl₂至终浓度为10 mmol/L;从平板上挑取分离较好的噬菌斑,接种于350 μl 1×稀释缓冲溶液中,37℃静置培养3~4 h;在1.5 ml离心管中加入200 μl细菌培养物及150 μl噬菌体液,31℃静置孵育30 min后加入400 μl LB培养液;31℃,225 r/min摇床中培养1 h,取上清液5 μl涂布于含100 μg/ml氨苄青霉素的LB平板上,于31℃培养得单菌落,用碱裂解法提取质粒DNA。将其中17个阳性克隆穿刺培养,进行全序列测定。

2 结果与分析

2.1 总RNA提取结果分析 利用Tiizol法抽提褐藻RNA,经RNA质量检测(图1),有明显的28S和18S条带,说明总RNA提取较好,降解少,分子完整。分光光度计测定,OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值为1.89,表明所提RNA纯度高,符合建库要求。

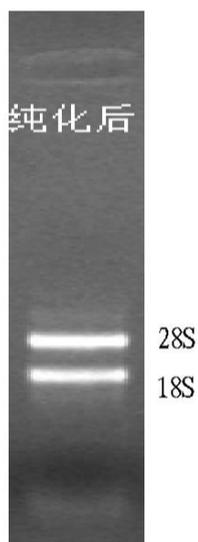


图1 纯化后总RNA电泳

2.2 LD PCR产物 经LD PCR合成的双链cDNA,取5 μl PCR产物进行琼脂糖电泳分析,结果见图2。0.1~4 kb呈弥散状条带,条带正常而且量足够,说明合成的双链cDNA是成功的,符合建库要求。

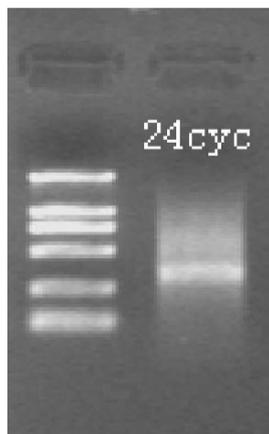


图2 24轮PCR循环后cDNA电泳

2.3 CHROMA SHIN 400 凝胶柱层析纯化cDNA 将连接上的双链ds cDNA经过凝胶柱层析,各大小片段分子在CHROMA SHIN 400凝胶中所受阻力不同,因此,分离出不同大小片段cDNA共16管。经琼脂糖凝胶电泳后(图3),留取大于400 bp的试管,将跑在溴酚蓝指示剂后的组分合在一起进行处

理,将第4~7管cDNA收集合并,沉淀纯化后用于连接。

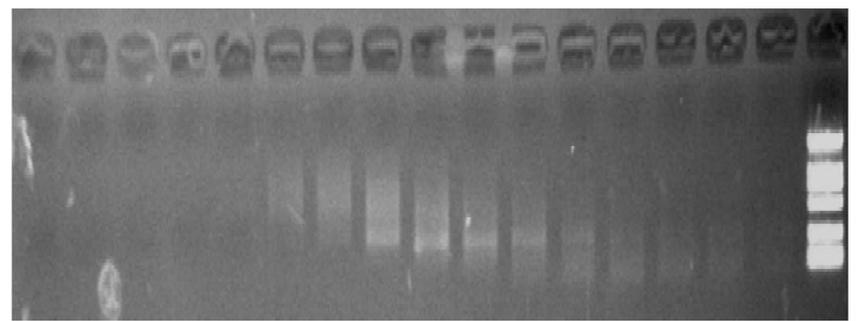


图3 CHROMA SHIN 400 凝胶层析分离cDNA电泳

2.4 cDNA样品沉淀纯化后的浓度测定 通过凝胶层析收集完样品组分之后,乙醇沉淀cDNA样品,最后重溶于7 μl dd H₂O中。取0.5 μl样品与对照cDNA比较,经FR 200紫外可见分析装置观察,样品cDNA浓度在对照DNA 75和100 ng/μl之间(图4)。若以25 ng/μl计算,共得到cDNA大约110 ng左右,因此样品cDNA的量完全符合建库的要求。

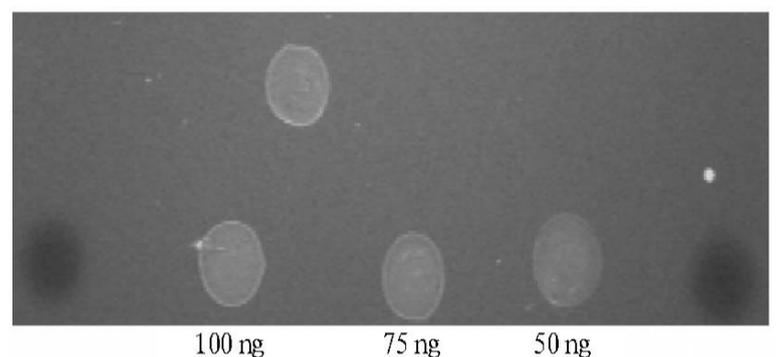


图4 cDNA纯化后的浓度检测结果

2.5 cDNA文库的构建及鉴定 双链cDNA与Sfi Vector连接包装后,测得的文库滴度为 1.1×10^8 Ffu/ml,文库有500 μl体积,因此库容量为 5.5×10^7 Ffu,文库噬菌体的滴度符合文库保存和筛选实验的要求。经体内切割后,随机挑选文库的阳性单克隆进行PCR鉴定后,推算出文库的重组率达100%,扩增出的片段主要集中在0.8~1.8 kb,经凝胶成像及分析系统(UVP公司)分析,平均插入片段长度约为1.34 kb(图5)。

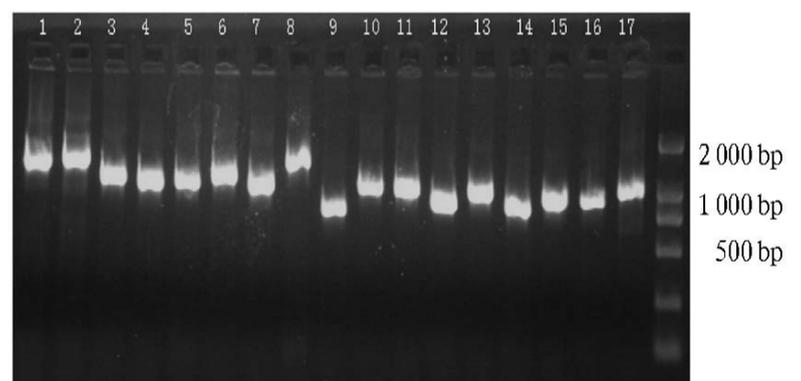


图5 从文库中随机挑选17个克隆检测cDNA插入片段的PCR产物电泳结果

评价一个文库质量的指标主要在于文库的含量和插入片段的大小。所构建的文库必须有足够的克隆数,才能保证基因组全长cDNA中的每一个序列至少有1个拷贝存在于文库中,为此,所构建的文库容量应不小于 1.7×10^5 Ffu/ml^[11],同时为保证cDNA片段的完整性,插入片的平均大小不小于1 kb。该研究构建的海带SMART cDNA文库原始文库滴度达到 1.1×10^8 Ffu/ml,插入片段集中在0.8~1.8 kb,平均为1.34 kb,符合构建文库的要求,与大部分报道的cDNA结果相似^[10,12,13]。

通常用于cDNA文库构建的载体有质粒和噬菌体,但由于质粒cDNA文库包含的cDNA克

(上接第2976页)

度的 mRNA;而噬菌体 cDNA 文库包含的 cDNA 克隆数目很多,适用于那些低丰度的 mRNA。考虑到海带某些特殊基因丰度很低,因此,该实验选择噬菌体作为文库构建的载体,以提高其被捕获的可能性。

所有以上实验数据都表明,此次实验构建了一个高质量的海带配子体 SMART cDNA 文库。

参考文献

- [1] 高健,许晓风,乌慧玲,等.特异种质烟草全长cDNA文库的构建及质量分析[J].安徽农业大学学报,2004,31(1):22-25.
- [2] 卢圣栋.现代分子生物学实验技术[M].2版.北京:中国协和医科大学出版社,1999.
- [3] 金治平,赵德修,乔传令,等.水母雪莲愈伤组织cDNA文库的构建[J].植物学通报,2004,21(1):61-65.
- [4] 方宗熙,戴继勋.单倍体在海带遗传研究中的应用[J].遗传学报,1980(7):19-25.
- [5] 戴继勋,崔竟进.海带孤雌生殖和染色体自然加倍的研究[J].海洋学

报,1992,14:105-107.

- [6] 戴继勋,欧毓麟,崔竟进,等.海带雄配子体的发育研究[J].青岛海洋大学学报,1997,27(1):41-44.
- [7] 方宗熙,欧毓麟,崔竟进,等.海带单倍体遗传育种的实验[J].中国科学,1978,21(2):226-231.
- [8] 胡远皆,周志刚.海带孢子体DNA随机扩增反应条件优化[J].上海水产大学学报,2001,10(3):193-198.
- [9] 史西志,毕燕会,周志刚.海带雄性配子体差异表达基因片段的克隆及筛选[J].水产学报,2005,29(5):666-669.
- [10] 张勇,张为民,李欣,等.石斑鱼卵巢cDNA文库构建及脂肪酸结合蛋白克隆[J].中山大学学报:自然科学版,2003,42(2):66-69.
- [11] ZHU Y Y, MACHLEDER E M, CHENCHK A, et al. Reverse transcriptase template switching: a SMART™ approach for full-length cDNA library construction[J]. Biotechniques, 2001, 30(4):892-897.
- [12] WELLENREUTHER R, SCHUPPI, 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):36-43.
- [13] ZHUMABAYEVA B, DIATCHENKO L, CHENCHK A, et al. SMART™ generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors[J]. Biotechniques, 2001, 30(1):158-163.