

大规模筛选表达序列标签(EST)方法的改进

刘伟 邵菁 庞宏 张旻 曹荣* (南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210097)

摘要 介绍一种改进的大规模EST筛选的方法。以SMARTMcDNA Library Construction Kit所构建的毛冠鹿大脑cDNA文库为研究材料, 基于该文库噬菌体可自发转化为质粒的特点, 直接把噬菌体文库转化为质粒文库。随机选取平板中转化后的质粒cDNA文库克隆, 振荡培养后运用菌液电泳的方法代替传统的PCR筛选法, 对重组克隆进行筛选。改进的菌液电泳法可以准确鉴定出重组的质粒, 并估计出插入片段的大小。该方法能更好地保持SMARTMcDNA Library Construction Kit所构建文库的完整性, 是一种简单、高效、适用于大规模表达序列标签筛选的有效方法。

关键词 cDNA文库; 表达序列标签; 菌液电泳; 筛选

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)24-07410-02

Improvement of the Large-scale Screening Method for Expressed Sequence Tags (ESTs)

LIU Wei et al (College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210097)

Abstract The aim of the research was to introduce an improved method for large-scale screening ESTs. With cerebrum cDNA library of tufted deer constructed by SMARTMcDNA Library Construction Kit as research materials, based on characteristic of the library phage that could spontaneously translate into plasmid, the phage library was directly translated into plasmid library. Transformed plasmid cDNA library clones in flat were randomly selected. After shaking culture the bacterial liquid electrophoresis method was used to screen recombinant clones instead of traditional PCR screening method. Improved bacterial liquid electrophoresis method could identify recombinant plasmid exactly and evaluate the length of inserted fragments. This method could better keep the integrity of the library constructed by SMARTMcDNA Library Construction Kit, so, it was a simple and efficient method which was suitable for large-scale ESTs screening.

Key words cDNA library; ESTs; Bacterial liquid electrophoresis; Screening

表达序列标签(Expressed Sequence Tags, EST)是从cDNA文库中随机挑取克隆, 进行5'端和3'端单次测序获得的短的cDNA部分序列, 它代表一个完整基因的一小部分, 在数据库中其长度一般为200~700 bp。EST来源于一定环境下一个组织总mRNA所构建的cDNA文库。大规模随机选取cDNA克隆进行EST测序分析, 可以获得在某个重要生理过程或疾病中具有重要功能的新基因或候选基因, 发现同一物种中基因家族的新成员, 不同物种间相同的基因。已知基因的不同剪切模式^[1]以及基因相关的SNPs^[2-3], 因此它已成为功能基因组学研究中崭新的策略和途径。在cDNA文库克隆的大规模测序之前, 一般需对克隆中是否有插入片段进行检测。传统的煮沸法或碱裂解法^[4]提取质粒DNA, 然后用限制性内切酶进行酶切分析, 不适应于现在以噬菌体为载体构建的cDNA文库的操作。Zou等^[5]直接用菌液作为模板进行PCR检测重组质粒获得成功, 最近国内胡迎春等^[6], 刘振辉等^[7], 向太和^[8], 程旭东等^[9]也将PCR的方法应用于cDNA文库的克隆检测, 这使得克隆的检测变得更加容易、快速, 但是存在较高的假阴性, 而且PCR产物不易保存。如果用PCR产物进行克隆、测序和保存, 又增加了实验的时间和成本, 不适合大规模ESTs的筛选。笔者根据TriplEx2可以在含有Ge重组酶的E.coli BM25.8菌细胞内自发地转化为pTriplEx2的特点, 介绍一种改进的大规模ESTs筛选的方法。

1 材料与方

1.1 材料 供筛选的文库为毛冠鹿大脑cDNA文库(建库试剂盒SMARTMcDNA Library Construction Kit, Clontech), 原生质体缓冲液30 mmol/L Tris·HCl, pH值8.0, 50 mmol/L NaCl, 20%蔗糖, 5 mmol/L EDTA, pH值8.0, 50 μg/ml RNase, 50 μg/ml溶菌

酶, -20℃分装保存), 裂解缓冲液(1×TBE, 5%蔗糖, 2% SDS, 0.04%溴酚蓝, -20℃分装保存)。

1.2 实验方法

1.2.1 噬菌体cDNA文库转化为质粒cDNA文库。复苏冻存的E.coli BM25.8细胞, 涂布5 μl冻存细胞到含有卡那和氯霉素抗生素的LB固体平板中, 37℃培养过夜。从培养过夜的E.coli BM25.8平板上挑选分离较好的单个克隆, 置于10 ml LB培养液中, 31℃振荡培养(150 r/min)至OD₆₀₀=1.1~1.4, 在10 ml含有E.coli BM25.8的培养液中加入100 μl 1 mmol/L MgCl₂(终浓度为10 mmol/L MgCl₂)。取出10 μl cDNA文库溶液置于990 μl 1×lambda稀释液中稀释, 取出10 μl稀释的cDNA文库溶液与200 μl E.coli BM25.8培养液混匀, 31℃静置30 min, 加入400 μl LB培养液, 31℃225 r/min 1 h, 取10 μl混有噬菌体的E.coli BM25.8混合液涂布到含羧苄抗生素的LB固体平板中, 31℃培养过夜。

1.2.2 菌液电泳(改进的菌落电泳^[10])筛选重组克隆。挑取单个克隆加入2 ml含有氨苄抗生素的LB培养液中, 37℃250 r/min培养过夜。吸取菌液40 μl, 12 000 r/min 1 min收菌, 倾出LB培养液, 在振荡器上把沉淀振荡起来后, 加入12 μl原生质体缓冲液。将裂解缓冲液上样于0.65%的TBE琼脂糖凝胶中, 每孔4 μl, 然后将细胞与原生质体缓冲液混合物上样于已加裂解缓冲液的凝胶中。调节电压为40 V, 电泳15 min, 使细胞充分裂解, 然后将电压调到120 V, 电泳40 min。

2 结果与分析

随机选取平板中转化后的质粒cDNA文库克隆, 振荡培养后进行鉴定。随机挑取转化后的质粒cDNA文库克隆检测的结果见图1。实验证明: 这样可以很准确地鉴定出重组的质粒, 并估计出插入片段的大小。

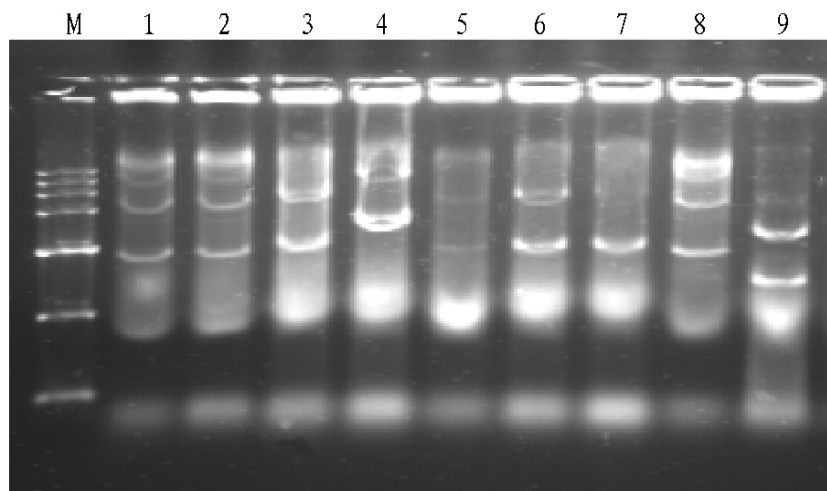
3 结论与讨论

传统的方法是噬菌体首先要通过侵染E.coli XL1-Blue进行扩增, 再挑取单个噬菌斑置于1×lambda稀释液, 4℃过

基金项目 国家自然科学基金项目(30370789); 江苏省教委自然科学基金项目(02KJD180006)。

作者简介 刘伟(1982-), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向: 细胞遗传与分子遗传。* 通讯作者, E-mail: cao63@126.com。

收稿日期 2007-04-25



注:1~8 为检测的样品,9 为空白对照;M 为 Marker DL15 000。

图1 随机挑取转化后的cDNA 克隆检测的结果

夜后,以含有噬菌体的 $1 \times \lambda$ 稀释液为模板进行PCR 扩增,确定阳性克隆后,再转化成pTriplEx2 质粒。但是由于噬菌斑埋在培养基内部,挑取噬菌斑置于 $1 \times \lambda$ 稀释液中造成了模板不纯,影响后续PCR 扩增的效果,并且在这一过程中噬菌体比质粒在扩增的过程中更容易突变和重组。笔者采取的方法不经过噬菌体在 *E. coli* XL1-Blue 中扩增和挑取单个噬菌斑等繁琐操作,直接将噬菌体cDNA 文库转化为质粒cDNA 文库,这更加方便了文库的保存和后续的一些分子生物学操作。在噬菌体向质粒的转化过程中,也存在噬菌体的丢失^[9],所以cDNA 文库的稀释度要根据cDNA 文库的滴度进行,在保证筛选过程中文库信息完整性的同时,还要使平板上长出容易分辨的单一克隆,便于以后的挑取。单个克隆置于2 ml 液体LB 中培养是为了便于以后一部分保存菌种,一部分测序。如果暂时不测序,也可以直接在1.5 ml eppendorf 管中培养后直接冻存菌液。

PCR 法筛选cDNA 文库时,由于文库中插入的片段是一个较大的范围,用普通的Taq 酶,统一的反应条件,经常容易扩增出较小的片段,而不容易扩增出较长的片段,以致出现假阴性的结果,造成大片段cDNA 克隆的丢失,影响EST 筛选的结果。对于长的片段,虽然能用长链PCR 酶(如LA Taq, Takara) 进行扩增,但其不仅价格昂贵,而且扩增条件与扩增短片段也有所不同,又增加了时间。总之,对于SMART™ cDNA Library Construction Kit 构建的文库,可以采取这种方法,既更好地保持了文库的完整性,又大大简化了实验的中间步骤,而且每次可对大量样品进行检测,因而大大提高了工作效率,为大规模的EST 筛选提供了很好的方法。

参考文献

- [1] BOGUSKI MS, TOLSTOSHEV CM, BASSETT DE JR. Gene discovery in dbEST [J]. *Science*, 1994, 265: 1993-1994.
- [2] TING CAI CHENG, QING YOU XIA, JI FENG QIAN, et al. Mining single nucleotide polymorphisms from EST data of silkworm, *Bombyx mori*, inbred strain Dazao [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34: 523-530.
- [3] LEE SH, PARK EW, CHO YM, et al. Confirming single nucleotide polymorphisms from expressed sequence tag datasets derived from three cattle cDNA libraries [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39(2): 183-188.
- [4] 黄培堂译. 分子克隆试验指南 M. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [5] ZON LI, DORMAN D M, ORKINS H. The polymerase chain reaction cloning prep [J]. *Bio techniques*, 1989, 7: 696-698.
- [6] 胡迎春, 张开泰, 吴德昌, 等. PCR 快速筛选质粒cDNA 文库方法的建立 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 1996, 19(5): 310-312.
- [7] 刘振辉, 张士瑾. 检测cDNA 文库克隆中插入片段大小的简易方法 [J]. *海洋科学*, 2002, 26(11): 9.
- [8] 向太和. PCR 快速分析水稻cDNA 文库构建质量方法的简化 [J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(3): 353-354.
- [9] 程旭东, 董玲丽, 凌宏清. 基于PCR 技术筛选cDNA 和genome 文库方法的改进 [J]. *高技术通讯*, 2004(11): 32-37.
- [10] SEKAR V A. Rapid screening procedure for the identification of recombinant bacteriophage clones [J]. *Bio techniques*, 1987, 5: 11-13.