

红曲霉 SAGE 文库中双标签的制备研究*

熊勇华 许 杨 赖卫华

(中德联合研究院
教育部食品科学重点实验室 南昌 330047)

摘 要 研究探讨了红曲霉 SAGE 文库构建过程中总 RNA 提取、mRNA 分离纯化、cDNA 合成以及双标签(Ditags)制备方法,并通过 PCR 条件的优化获得双标签 PCR 的最佳模板稀释浓度及扩增循环数。

关键词 红曲霉 SAGE 文库 双标签

Preparation of ditags in constructing SAGE library of *Monascus Ruber*. XIONG Yong-Hua, XU Yang, LAI Wei-Hua (Sino-Germany Joint Research Institute, Nanchang 330047), *CJEA*, 2004, 12(1):19~22

Abstract In this paper, the methods of total RNA and mRNA extraction, cDNA synthesis and ditags preparation are discussed in constructing SAGE library of *Monascus Ruber*. The optimal concentration of template and the number of PCR cycles are obtained by optimizing the PCR conditions.

Key words *Monascus ruber*, SAGE library, Ditags

红曲霉(*Monascus ruber*)为典型丝状真菌,红曲药用价值近年已引起许多学者关注,尤其是红曲发酵液中诸多生物活性物质的发现,将国内外红曲研究推向新高潮。1995 年法国学者 Blanc P. J.^[1,4] 在红曲霉发酵产物中检测到 1 种对人畜有害的真菌毒素——桔霉素(Citrinin),使红曲霉产品在世界范围内应用受到限制。随后几年该课题组通过同位素标记对红曲霉产毒(桔霉素)的生化代谢途径以及桔霉素与红曲色素,Monacolin 类生理活性物质的产生关系进行深入探讨,认为桔霉素的产生与红曲霉以上次生代谢产物的代谢途径密切相关^[5,6]。本实验室以往研究亦得到同样结论,并同时发现桔霉素的产生与红曲霉培养方式及培养基组成有显著相关性。同一菌株不同条件下可能产毒或不产毒,以上结果预示红曲霉产桔霉素是其基因组固有特性,不同条件下产毒差异的形成可能与外界因素诱导基因组产生差异表达有关。通过分子生物学手段,若能获得同一菌株产毒与非产毒条件下其转录组 mRNA 的所有信息,不仅为筛选与产毒相关的连锁基因提供理论依据,且对分析红曲霉代谢过程中代谢网络的分布以及调控机制提供重要信息。基因表达的系列分析(Serial analysis of gene expression,简称 SAGE)是以转录子(cDNA)上特定区域 9~11bp 的寡核苷酸序列作为标签(tag)特异性代表该转录子,然后通过连接酶将多个标签(20~60 个)随机串联并克隆到载体中,建立 SAGE 文库^[7,1,2]。通过对全部标签的序列分析可获得基因转录的分布以及表达丰度状况(尤其可检测低丰度表达基因),从而充分了解基因转录组全貌。探讨基因组在特定时期转录水平的表达丰度以及表达差异,可为研究基因组功能提供重要信息。本研究探讨了构建红曲霉 SAGE 文库中双标签形成的实验过程及其注意事项,为建立完整的 SAGE 文库奠定理论基础。

1 试验材料与方法

供试菌株为“AS3.4384”(橙色红曲霉,*Monascus aurantiaeus*),红曲霉菌丝体的获得是将“AS3.4384”菌株接种至土豆葡萄糖培养基,于 35℃ 下 150r/min 摇床培养 66h,收获菌丝体并用 PBS 冲洗 3 次后抽滤除残留水分,-70℃ 保存备用。

菌丝体总 RNA 提取及完整性检测^[2]。采用并改进的异硫氰酸胍方法,即将变性匀浆液抽提之前,菌丝体采用液氮研磨成浆(30min 以上),异丙醇沉淀 RNA 后,RNA-free 水溶解。3 倍体积的 4mol/L NaAc 2 次沉淀 RNA,0℃ 过夜,1.3 万 r/min 离心 15min,75%乙醇洗涤沉淀 2 次,空气干燥后备用。RNA-free 水溶解,以紫外分光光度法确定总 RNA 纯度及含量,-70℃ 保存备用。

* 江西省自然科学基金项目(0330040)资助

收稿日期:2002-11-28 改回日期:2003-01-30

mRNA 纯化与检测。根据 Promega 公司产品说明书,采用 1mL 磁珠,5 μ L 生物素偶合的 oligo(dT)₂₅ 分离 1mg 总 RNA 中的 mRNA,采用溴化乙锭点定量法测定 mRNA 含量。

cDNA 合成。参照 Invitrogen 公司产品说明书,5 μ g RNA-free 水溶解的 mRNA 及 2.5 μ g 5' 生物素-oligo(dT)₁₈ 引物按说明书将 mRNA 反转录成双链 cDNA。cDNA 第 2 链合成完毕后,等体积饱和酚/氯仿/异戊醇抽提,上清液采用糖原法沉淀 cDNA(200 μ L 样品加入 133 μ L 7.5mol/L NH₄OAC, 3 μ L 20mg/mL 的糖原及 777 μ L 无水乙醇),0 $^{\circ}$ C 静置 30min,于 4 $^{\circ}$ C 1.6 万 r/min 离心 30min,70% 乙醇洗涤沉淀 2 次,空气干燥后 20 μ L DNA-free 水溶解备用,取 5 μ L 电泳检测 cDNA 的完整性。

双标签制备。取 10 μ L 双链 cDNA 加入 5 μ L NlaIII(50 单位)37 $^{\circ}$ C 酶切反应 60min,之后加入等体积饱和酚/氯仿/异戊醇抽提,糖原法沉淀酶切产物,沉淀溶解于 20 μ L Tris 缓冲液中。将酶切后 cDNA 等分为 A、B 2 份,磁珠法吸附 cDNA 3' 端酶切产物。将 100ng 接头 A1 及接头 B1(接头序列见表 1)分别加入吸附有 cDNA 3' 端酶切产物的磁珠 A、B 中,于 16 $^{\circ}$ C 反应 150min 后缓冲液洗涤磁珠 3 次,加入 4 单位 Bsmf I 65 $^{\circ}$ C 酶切反应 60min,期间每隔 3~5min 摇匀磁珠 1 次,反应结束后磁架分离磁珠并弃磁珠,上清液加入等体积饱和酚/氯仿/异戊醇抽提,糖原法沉淀标签,10 μ L Tris 缓冲液溶解沉淀得 A2、B2 两溶液。加入 6 单位 Klenow 酶、25 μ mol dNTP,于 37 $^{\circ}$ C 反应 30min,上清液加入等体积饱和酚/氯仿/异戊醇抽提,糖原法沉淀标签,8 μ L Tris 缓冲液溶解 A2、B2 两沉淀,将 A2、B2 溶液加入 2 单位 T4 连接酶,于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,同时设立阴性对照。

表 1 接头 A 与 B 正、负链引物序列*

Tab. 1 The sense and unsense primer sequences of linker A and linker B

引物序列 The primer sequence
Sense linker A 5' TTT GGA TTT GCT GGT GCA GTA CAA CTA GGC TTA ATA GGG ACA TG-3'
Unsense linker A [amino mod. C7] 3'-CCT AAA CGA CCA CGT CAT GTT GAT CCG AAT TAT CCC Tphosphorylated-5'
Sense linker B 5' TTT CTG CTC GAA TTC AAG CTT CTA ACG ATG TAC GGG GAC ATG 3'
Unsense linker B [amino mod. C7] 3'-GAC GAG CTT AAG TTC GAA GAT TGC TAC ATG CCCT-phosphorylated5'

* 接头末端磷酸化效果采用自身连接反应验证。

PCR 扩增双标签。将连接产物分别按 20 倍、50 倍、100 倍和 200 倍稀释,以之为模板进行 PCR 扩增,同时设立阴性对照。上游(引物 I)和下游(引物 II)引物序列分别为 Upper primer 5' 生物素-GGA TTT GCT GGT GCA GTA CA 3'; Lower primer 5' 生物素-CTG CTC GAA TTC AAG CTT CT 3'。扩增体系为 pH 值 8.8,模板为 2%, Mg²⁺ 浓度为 6.7 μ mol/ μ L, dNTP 为 1.5 μ mol/ μ L,引物为 7ng/ μ L, Platium Taq(热启动 DNA 聚合酶)为 0.1 单位/ μ L,二甲基亚砷 0.06%。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 下 2min 1 个循环,95 $^{\circ}$ C 下 30s, 55 $^{\circ}$ C 下 1min, 70 $^{\circ}$ C 下 1min, 25~30 个循环,最后 70 $^{\circ}$ C 延伸 5min。



图 1 红曲霉总 RNA 甲醛变性电泳图谱*

Fig. 1 Total RNA of monascus ruber electrophoresis

* 泳道 1 为 10 μ g 总 RNA, 泳道 2 为 20 μ g 总 RNA。

2 结果与分析

2.1 红曲霉总 RNA 的提取

制备高质量总 RNA 对能否获得长片段 cDNA 以及足量标签序列至关重要,同时高质量 RNA 是保证 SAGE 文库中含有所有转录组完整信息的前提。红曲霉属典型丝状真菌,在液体摇床培养下菌丝体常缠结成球形,且因真菌细胞壁较厚实和坚硬,故采用常规异硫氰酸胍方法难于将细胞内 RNA 释放出来^[3]。本研究采用液氮碾磨红曲霉菌丝体可充分破碎细胞壁,且超低温环境有效抑制 RNA 酶活性。真菌生物含丰富多糖类物质,采用异硫氰酸胍方法获得的总 RNA 常混有大量多糖类物质及微量异硫氰酸胍污染,而异硫氰酸胍是 1 种蛋白质强变性剂,在后一步 mRNA 分离过程中使磁珠上亲和素蛋白变性,从而导致 mRNA 提取率下降甚至失败。本研究采用 3 倍体积 4mol/L NaAC 2 次沉淀 RNA,获得的总 RNA 经紫外分光光度法检测 230nm、260nm、280nm 3 处吸光值,测定结果为 $OD_{260nm/280nm} = 2.2$, $OD_{260nm/230nm} = 2.1$,这表明该法提取的总 RNA 无蛋白质及异硫氰酸胍污染。总 RNA 甲醛变性电泳结果(见图 1)显示 28SRNA 条带亮度约为 18SRNA 条带亮度的 2 倍,表明该法获得的总 RNA 分子完整性较好。

2.2 mRNA 分离纯化及双链 cDNA 合成

真核生物 RNA 中 mRNA 含量约占 1%~5%，且在不同发育阶段 mRNA 水平呈一动态变化过程。对微生物而言，在菌体生长发育对数期 mRNA 最丰富，但微生物次生代谢产物多产生在发酵后期，此时菌体内 mRNA 含量相对较低。本实验以 1mg 总 RNA 为材料采用磁珠法分离纯化 mRNA，通过 EB 点定量法测定 mRNA 含量结果表明，1mg 总 RNA 可收获 18 μ g mRNA，其得率为 1.8%，表明红曲霉在发酵后期 mRNA 转录仍处于较高水平。红曲霉属低等真核生物，维持生命过程中蛋白质表达的种类及蛋白质结构均比高等生物简单，转录组 cDNA 片段长度大多集中在 300~5000bp 间。本实验 cDNA 电泳(见图 2)结果显示红曲霉 cDNA 分子从 100~10kb 可见明显弥散条带，但大部分集中在 200~4500bp 间。

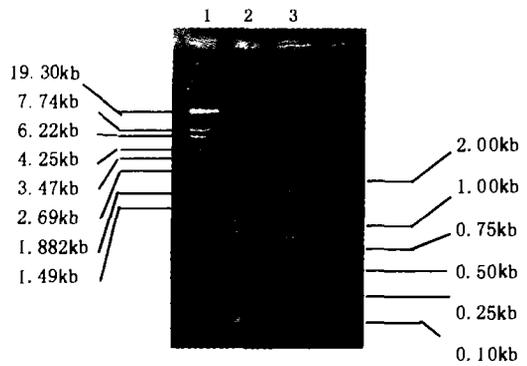


图 2 红曲霉 cDNA 琼脂糖电泳图谱*
Fig.2 cDNA of monascus ruber electrophoresis
*泳道 1 为 λ -EcoT14 I Marker, 泳道 2 为红曲霉 cDNA, 泳道 3 为 DL2000Marker.

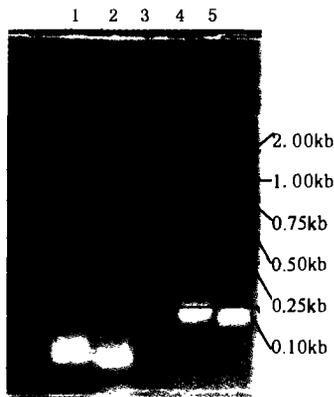


图 3 接头自身连接产物的反应电泳图谱*
Fig.3 The adaptors self-ligation electrophoresis
*泳道 1 为 Adaptor A, 泳道 2 为 Adaptor B, 泳道 3 为 DL2000 Marker, 泳道 4 为 Adaptor A 自身连接产物, 泳道 5 为 Adaptor B 自身连接产物。

2.3 Adaptor A、B 的琼脂糖电泳图谱

合成的 cDNA 经 NlaIII (该酶识别位点为 CATG 4 个碱基序列) 酶切后, 产物通过生物素磁珠分离含 polyA 尾巴的 cDNA 片段, 将此产物平均分为 2 份并分别与 Adaptor A 与 B 连接。Adaptor 能否有效与 cDNA 片段连接, 关键在于 Adaptor 酶切位点粘性末端的磷酸化效果。本实验将 lin-kerA1、A2 以及 linkerB1 和 B2 退火形成的 Adaptor A、B 通过自身连接反应, 以验证其末端的磷酸化效果, 电泳结果(见图 3)表明显示连接产物在 90bp 左右形成明显电泳条带。

2.4 双标签制备及 PCR 扩增双标签

Adaptor 与磁珠上 cDNA 连接反应后, 产物通过 BsmF I (该酶是 I 种 II S 限制性内切酶, 识别位点为 GGGAC, 切割位点距识别位点 10~14bp) 酶切, 标签序列从磁珠上释放下来。回收的标签序列采用 Klenow 大片段将粘性末端补平。将含有 Adaptor A 和 Adaptor B 的标签在连接酶作用下连接形成双标签。PCR 扩增引物依据 Adaptor 内侧序列设计, 因此只有含 Adaptor A、B 的双标签才能得到有效扩增。同时由于待扩增的片段均为 102bp, 在 PCR 放大过程中转录组不同转录子的丰度信息基本不发生改

变, 因此可有效保证转录组信息原貌。由于影响 PCR 扩增的因素较多, 双标签扩增过程中 PCR buffer 和引物浓度、dNTP 含量以及扩增循环数对有效获得目的片段, 减少非特异性扩增尤为重要。本试验在参考 Velculescu V.E. 等⁷ 方法基础上对模板稀释倍数以及扩增循环数进行研究, 电泳结果(见图 4 和图 5)表明泳道 13 中阴性对照未见任何条带, 泳道 9~12 在 102bp 位置可见明显扩增条带。当样品稀释 200 倍时扩增效率大大降低, 从泳道 2~7 可见随扩增循环数的增加而非特异性大片段产生量增多, 综合考虑扩增效率以及避免非特异性条带产生情况, 本研究选择模板稀释倍数为 100 倍, PCR 扩增循环数为 28 为最佳条件。

3 小 结

本研究根据丝状真菌细胞壁坚固厚实及多糖类物质含量丰富等特征, 在异硫氰酸胍方法基础上通过增加液氮研磨, 4mol/L NaAC 二次沉淀等



图 4 PCR 扩增双标签最佳模板稀释浓度银染图谱*
Fig.4 The optimal dilution of template in PCR implification
*泳道 13 为阴性对照, 泳道 9~12 模板稀释倍数分别为 20 倍、50 倍、100 倍和 200 倍, PCR 扩增循环数为 30, 泳道 8 为 DL2000 Marker.



图 5 PCR 扩增双标签最佳扩增循环数银染图谱*
Fig.5 The optimal numbers in PCR cycles
*泳道 1 为 DL2000 Marker, 泳道 2~7 PCR 循环数分别为 25~30。

步骤提取红曲霉总 RNA,所提取的 RNA 产率和纯度等方面均能满足构建 SAGE 文库的要求。采用 Pro-mega 公司 mRNA 分离纯化系统,从红曲霉总 RNA 中分离纯化 mRNA 其得率为 1.8%,并建立了 EB 点定量检测微量 mRNA 的方法。按 SAGE 文库构建原理,成功扩增到 102bp 红曲霉 cDNA 双标签,为红曲霉 SAGE 文库的建立奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 熊勇华,许 杨等. 基因表达的系列分析方法研究进展. 生物工程学报,2002,18(3):377~380
- 2 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 北京:科学出版社,1998
- 3 李明春,王俊琦,邢来君等. 丝状真菌深黄孢霉 RNA 的提取方法. 菌物系统,1999,18(1):108~111
- 4 Blanc P. J., Laussac J. P., Le Bar J., et al. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. International Journal of Food Microbiology, 1995, 27:201~213
- 5 Hassan Hajjaj, Alain Klæbe, Marie Oloret, et al. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65:311~314
- 6 Hassan Hajjaj, Philippe Blanc, Evelyne Groussac, et al. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus Ruber* as a function of organic acid accumulation. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27:619~625
- 7 Velculescu V. E., ZHANG L., Vogelstein B., et al. Serial analysis of gene expression. Science, 1995, 270:484~487

《中国生态农业学报》征稿启事

《中国生态农业学报》(原刊名《生态农业研究》)由中国科学院石家庄农业现代化研究所和中国生态经济学会主办,科学出版社出版,系中国科技论文统计源刊、中国科学引文数据库源刊和全国中文核心期刊,荣获第三届全国农业优秀期刊一等奖。本刊为季刊,季初月出版,国际标准大 16 开本,176 页,国际刊号:ISSN 1671-3990,国内刊号:CN 13-1315/S,国内外公开发行,国内新邮发代号:82-973,国外发行代号:Q1625,敬请广大读者订户及时在报刊发行目录北京地区栏目寻找订购本刊。本刊旨在探索与研究生态农业的理论、方法、技术创新及其研究进展等,推动学科发展,主要刊登生态学、生态经济学、农、林、牧、副、渔及资源与环境保护等领域具有创新性的研究学术论文、研究技术报告(包括理论与应用研究、农业生态工程技术与实用生物技术、生物多样性保护、湿地保护、资源优化配置与开发及其效益研究、城镇绿地生态建设、无公害农产品生产技术、农业环境污染防治技术及生态农业产业化与农业可持续发展研究等方面)、研究简报及综述、生态农业建设和生态示范区典型模式与典型经验等,欢迎国内外从事生态学、生态经济学、农林牧副渔、资源与环境保护等领域科技人员、教学和管理工作者以及基层从事生态农业建设的技术与管理人員踊跃投稿。来稿请按国家标准 GB7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》撰写。来稿请注明科研项目来源,本刊对国家自然科学基金资助项目、863 项目、973 项目、省(部)级以上重大攻关项目和国家开放实验室研究项目等论文将优先发表,凡获省(部)级以上成果奖者请注明,并提供获奖复印件及单位证明。来稿请寄:石家庄市槐中路 286 号《中国生态农业学报》编辑部;邮政编码:050021;电话:(0311)5818007;网址:WWW:http://www.sjziam.ac.cn E-mail: editor@ms.sjziam.ac.cn

本刊编辑部