

研究报告

Research Report

黄麻幼苗 cDNA 文库的构建和质量鉴定

谢小芳[✉], 陈燕萍[✉], 吴为人[✉]

福建农林大学生命科学学院, 福州, 350002

[✉] 通讯作者: wrwu2005@yahoo.com.cn [✉] 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 75 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0075

收稿日期: 2012 年 09 月 10 日

接受日期: 2012 年 09 月 14 日

发表日期: 2012 年 12 月 22 日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012 年第 10 卷第 6 期 747-750 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

谢小芳等, 2012, 黄麻幼苗 cDNA 文库的构建和质量鉴定, 分子植物育种(online) Vol.10 No.75 pp.1549-1552 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0075)

引用格式(英文):

Xie et al., 2012, Construction and Evaluation of cDNA Library from Jute Seedlings, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.75 pp. 1549-1552 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0075)

摘要 黄麻全长 cDNA 文库的构建对开展黄麻遗传和功能研究具有重要的应用价值。以生产上的优良品种闽引一号为材料, 利用 Creator SMART cDNA Construction Kit 技术, 成功构建了黄麻苗期的全长 cDNA 文库。文库的滴度为 1.9×10^6 pfu/mL。随机挑取 86 个克隆进行菌落 PCR 鉴定, 结果显示: 插入片段的大小在 0.5~2.0 kb 之间。研究结果表明, 黄麻全长 cDNA 文库的质量较高。

关键词 黄麻; SMART 技术; cDNA 文库

Construction and Evaluation of cDNA Library from Jute Seedlings

Xie Xiaofang[✉], Chen Yanping[✉], Wu Weiren[✉]

College of life sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002, P.R. China

[✉] Corresponding author, wrwu2005@yahoo.com.cn; [✉] Authors

Abstract Construction of the full-length cDNA library of jute is significant value in genetic and function research. With a well known jute (*Corchorus capsularis* L.) cultivar Minyin no.1 as material, a full-length cDNA library was constructed using Creator SMART cDNA Construction Kit technology. This library had a capacity of 1.9×10^6 pfu/mL and the insert sizes was about 0.5~2.0 kb based on PCR analysis of 86 randomly chosen clones. The results suggest that the cDNA library of jute should have been constructed successfully.

Keywords Jute (*Corchorus capsularis* L.); cDNA library; SMART technology

研究背景

cDNA 文库是指包含某种生物的某一特定发育时期内所转录的全部 mRNA 信息的 cDNA 克隆集合。cDNA 文库在植物的遗传和功能研究中具有重要的应用价值, 可以用于筛选构建分子连锁图谱的探针, 分离重要基因, 分析基因表达信息等, 是新基因发现和功能基因组学研究的基础(蔡宁波等, 2007)。对于近期不能开展全基因组测序的物种而言, 全长 cDNA 文库更是寻找和筛选目标基因的重要手段之一。在已经克隆的众多基因中, 有许多都是通过筛选 cDNA 文库获得的(晏慧君等, 2006; 王晨等, 2010)。近年来, 众多学者已经构建了许多模式生物和重要农作物的 cDNA 文库, 通过大规模的 EST 测序, 获得了海量的数据, 促进了相关植物功能基

因组学研究的进展(Kikuchi et al., 2003; Kim et al., 2006; Seki et al., 1998; Carninci et al., 2003)。

黄麻是椴树科黄麻属中的一种草本植物, 是一种极其重要的纤维作物, 在麻纺和造纸工业中被广泛应用。黄麻在我国的栽培历史悠久, 产量丰富, 是 21 世纪极具开发潜力的作物之一(彭文芳, 2007)。目前, 黄麻的遗传研究主要集中在分类进化、种质资源, 质量性状和数量性状等传统生物学角度上, 从分子水平上来研究黄麻的报道并不多见。总体而言, 黄麻的遗传研究基础相当薄弱, 迄今为止, 黄麻尚未见完整的分子遗传图谱, 短期内也未能开展全基因组测序工作。

本研究首次构建了黄麻全长 cDNA 文库, 该文库将为进一步开展黄麻 EST 大规模测序、功能基因组

学研究及克隆优良性状的基因等奠定基础; 同时, 还可以从文库中筛选构建分子连锁图谱的探针, 这对于遗传研究基础薄弱的黄麻而言, 是一种快速而高效的策略。

1 结果分析

1.1 黄麻总 RNA 提取

高质量的 RNA 是 cDNA 文库构建的必要前提, 因此黄麻总 RNA 的提取质量至关重要。由 RNA 的凝胶电泳结果(图 1)可以看出: 黄麻闽引一号总 RNA 中含有 18S 和 28S 两条清晰的带, 且 28S:18S 约为 2:1, 表明本研究所提取的黄麻总 RNA 完全符合构建文库的标准。

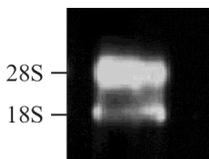


图 1 黄麻闽引一号总 RNA 电泳
Figure 1 Electrophoresis of total RNA isolated from *Corchorus olitorius* L. Minyu no.1

1.2 cDNA 合成

本研究采用 LD-PCR 扩增方法合成 ds cDNA。该方法在起始 RNA 大于 50 ng 就可以合成 ds cDNA, 对起始模版量的要求极低。根据所提取的黄麻总 RNA 含量(约 400 ng), 最终确定进行 20 个循环的扩增, 从而获得黄麻 cDNA 的第二链。电泳检测结果表明(图 2): 扩增效果良好, cDNA 大多弥散分布于 0.3~5 kb 之间, 其中, 在 1.0~2.5 kb 之间的条带最亮, 说明这个区域的 cDNA 分布最密集, 该结果表明合成的 ds cDNA 符合建库的要求。

1.3 cDNA 的分级

单滴收集分级分离的 ds cDNA, 分别编号为 1~17, 凝胶电泳检测结果(图 3)。由图 3 可以看出: 管号 8、9、10 和 11 的条带信号最强。为了构建高质量的文库, 避免回收 300 bp 以下的小片段, 本研究只收集 7、8、9 和 10 四管的 ds cDNA, 共收集 120 μ L。纯化后用于下一步的连接反应。

1.4 cDNA 文库滴度和插入片段大小鉴定

通过倍比稀释计数法鉴定文库滴度, 测定结果为 1.9×10^6 pfu/mL, 可见所建的 cDNA 文库的滴度达到了预期的要求。重组子插入片段的大小检测结果表明(图 4): 所建文库插入片段的大小大多居于 0.5~2 kb 之间, 比酶切产物的密集区(1.0~2.5 kb)略小, 该

结果可能是由于载体优先与片段较小的 cDNA 连接的缘故。然而, 对于 EST 测序或探针筛选而言, 这个长度范围是适合的。

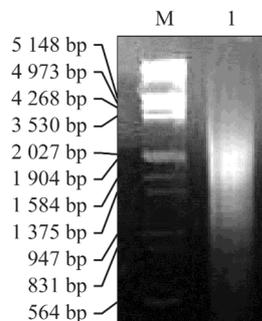


图 2 双链 cDNA
注: M: *HindIII/EcoR I* 酶切的 λ DNA; 1: 闽引一号
Figure 2 Electrophoresis of ds cDNA
Note: M: λ -*HindIII/EcoR I* digest DNA marker; 1: Minyu no.1

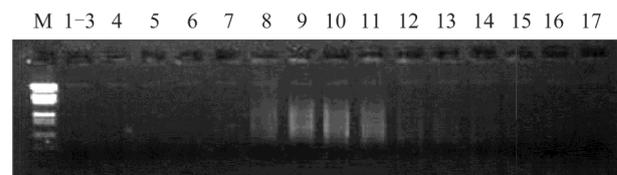


图 3 黄麻 ds cDNA 经 CHROMA SPIN-400S 柱分级分离
注: M: *HindIII/EcoR I* 酶切的 λ DNA; 1~17 为管号
Figure 3 ds cDNA of jute size fraction by CHROMASPIN400
Note: M: λ -*HindIII/EcoR I* digest DNA marker; 1~17: Tube number

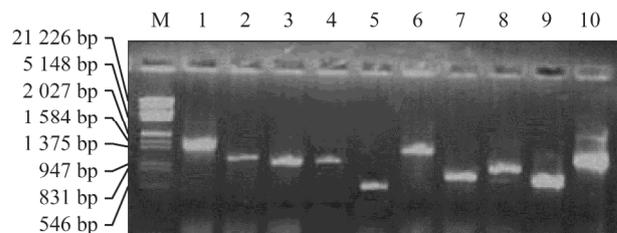


图 4 部分重组子的检测
注: M: *HindIII/EcoR I* 酶切的 λ DNA; 1~10 为插入片段 PCR 扩增的产物
Figure 4 The Detection of colonies
Note: M: λ -*HindIII/EcoR I* digest DNA marker; 1~10: The PCR product of insert size

2 讨论

在众多的 cDNA 文库构建方法中, 本研究所使用的 SMART 技术是一种较好的 cDNA 文库构建技术, 该方法利用逆转录酶 PowerscriptTMRT 的逆转录和末端转移活性及内切酶 *Sfi I* 的特性, 可以在原始材料较少的情况下(仅需 50 ng 的总 RNA), 快速、高效地构建各种生物材料的全长 cDNA 文库。该方法能够大幅提高具有完整的 5'末端克隆子在文库中

的比率, 克服了其它许多构建文库的方法中不能完整地合成完整 mRNA 的缺点, 被广泛接受和使用。然而, 欲将该技术应用于黄麻 cDNA 文库的构建, 还有几个关键的细节必须把握。首先, 在利用酚/氯仿进行抽提和乙醇沉淀的过程中, 由于 cDNA 量少, 为了避免 ds cDNA 损失过多, 研究者通常会尽可能多地吸回水相, 这种操作习惯通常使酚有痕量残留, 严重抑制随后 Sfi I 的消化。所以, 应避免过多地吸回水相。在这个操作过程中, 胶回收是较好的纯化方式。其次, 为了获得插入片段较大的高质量文库, cDNA 酶切后分级分离产物的收集至关重要。如图 3 中的第 11 号管, 虽然大多数片段长度能达到预期的要求, 但是, 由于其中可能含有小于 300 bp 的片段, 从而影响文库的质量, 故在操作中将其舍弃。

构建高质量的 cDNA 文库是开展功能基因组学研究及克隆优良性状基因的前提。库容量和插入片段大小是衡量 cDNA 文库质量的两个重要指标。在真核生物中, 要从一个 cDNA 文库筛选低丰度的 mRNA, 一般要求文库滴度达到 5×10^5 pfu/mL (刘铜等, 2010), 本研究所构建的文库滴度达 1.9×10^6 pfu/mL, 具较高的覆盖度。在文库插入片段大小方面, 一般而言, 插入片段越大, 代表文库所包含的信息越完整。本研究的插入片段在 0.5~2 kb 之间, 暗示我们所构建的文库具有一定复杂性和完整性。

本研究利用 CLONTECH 公司提供的 SMART 方法, 首次构建了高效的黄麻 cDNA 文库, 经滴度测定、插入片段的 PCR 鉴定等均符合 cDNA 文库的质量要求, 本研究为构建分子标记连锁图谱的探针筛选和进一步开展黄麻的 EST 测序分析、目的基因克隆及功能基因组学研究奠定了基础。

3 材料与方法

3.1 供试材料

植物材料为黄麻(*Corchorus olitorius* L.)品种闽引一号的种子, 由福建农林大学祁建民教授提供。

3.2 黄麻总 RNA 提取

将湿滤纸置于培养皿上, 取少量黄麻闽引一号种子均匀撒于其上, 在 25℃ 左右萌发并生长 8 d 左右。本研究按 Qiagen Plant RNeasy Kit (QIAGEN) 试剂盒提供的方法提取黄麻幼苗总 RNA, 材料用量为 180 mg 左右。由于黄麻的 RNA 产量较少, 本研究连续重复使用 QIAGEN 的柱子两次, 然后合并两管, 用紫外分光光度计测定 RNA 样品的浓度, 并

用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和相对浓度。

3.3 黄麻 cDNA 文库的构建

参照 SMART III 操作手册, 取 1 μg 的黄麻总 RNA 逆转录成 cDNA 的第一条链(sscDNA)。取 2 μL 第一链的 cDNA 为模板, 经 LD-PCR 扩增合成黄麻的 ds cDNA。扩增的程序为: 95℃ 1 min; (95℃ 5 s; 68℃ 5 min) × 20 cycle。在 1% 凝胶上电泳检测结果。将经过蛋白酶 K 消化和 Sfi I 酶切后的黄麻 ds cDNA, 用试剂盒提供的 CHROMA SPIN-400 柱对黄麻 ds cDNA 的酶切产物进行分级分离(单滴收集), 电泳检测并回收大于 0.5 kb 的部分, 使用乙醇作进一步沉淀和干燥处理后, 溶于 7 μL SDW 中备用。取 1 μL cDNA 与 λTriplEx2 载体置于 16℃ 下连接反应过夜。连接产物使用 Promega 公司提供的 Packagene Lambda DNA Packaging System 进行包装, 然后加入 500 μL SM buffer 和 20 μL 氯仿至包装结束后的产物中, 混匀并离心, 沉淀细胞破碎物。在试管的上清中已含有 phage, 即为初级文库。为了后续研究方便, 在初级文库中加氯仿和 DMSO 后分装, 每管为 5 μL, 置于 -70℃ 中保存。

3.4 黄麻 cDNA 文库滴度与插入片段大小的测定

本研究采用倍比稀释计数法来鉴定文库滴度, 取 5 μL 初级文库经 $1 \times \lambda$ 稀释 Buffer 稀释(10 倍, 100 倍和 1 000 倍)后; 各取 10 μL 菌液用于文库滴度测定。按照试剂盒说明书的方法, 将经过鉴定的 λ TriplEx2 阳性克隆转化成 pTriplEx2 质粒克隆(宿主菌为 E. coli BM25.8 菌株)。文库插入片段大小的鉴定采用 5' 和 3' 测序引物对克隆进行 PCR 扩增的方法进行。分别挑取 86 个克隆于 86 个(含 5 μL H₂O) 1.5 mL Eppendorf 管中, 于沸水中煮 5 min 后作为 PCR 扩增的模板, 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

作者贡献

吴为人和谢小芳是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 吴为人是项目的构思和负责人, 指导实验设计和论文修改; 谢小芳是实验研究的执行人, 完成试验和结果分析及论文写作工作; 陈燕萍参与实验材料的准备及文献收集和整理工作; 全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由福建省自然科学基金项目(2012J01076)资助, 在此表示感谢。

参考文献

Cai N.B., Huang X.W., and Zhuang W.J., 2007, Construction

- and identification of a full-length cDNA library from peanut seeds, *Huasheng Xuebao (Journal of Peanut Science)*, 36(2): 1-5 (蔡宁波, 黄湘文, 庄伟建, 2007, 花生种子全长cDNA文库的构建和鉴定, *花生学报*, 36(2): 1-5)
- Carninci P., Waki K., Shiraki T., Konno H., Shibata K., Itoh M., Aizawa K., Arakawa T., Ishii Y., Sasaki D., Bono H., Kondo S., Sugahara Y., Saito R., Osato N., Fukuda S., Sato K., Watahiki A., Hirozane-Kishikawa T., Nakamura M., Shibata Y., Yasunishi A., Kikuchi N., Yoshiki A., Kusakabe M., Gustincich S., Beisel K., Pavan W., Aidinis V., Nakagawara A., Held W.A., Iwata H., Kono T., Nakauchi H., Lyons P., Wells C., Hume D.A., Fagiolini M., Hensch T.K., Brinkmeier M., Camper S., Hirota J., Mombaerts P., Muramatsu M., Okazaki Y., Kawai J., and Hayashizaki Y., 2003, Targeting a complex transcriptome: the construction of the mouse full-length cDNA encyclopedia, *Genome Res.*, 13: 1273-1289 <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1119703> PMID:12819125 PMCID:403712
- Kikuchi S., Satoh K., Nagata T., Kawagashira N., Doi K., Kishimoto N., Yazaki J., Ishikawa M., Yamada H., Ooka H., Hotta I., Kojima K., Namiki T., Ohneda E., Yahagi W., Suzuki K., Li C.J., Ohtsuki K., Shishiki T., Otomo Y., Murakami K., Iida Y., Sugano S., Fujimura T., Suzuki Y., Tsunoda Y., Kurosaki T., Kodama T., Masuda H., Kobayashi M., Xie Q., Lu M., Narikawa R., Sugiyama A., Mizuno K., Yokomizo S., Niikura J., Ikeda R., Ishibiki J., Kawamata M., Yoshimura A., Miura J., Kusumegi T., Oka M., Ryu R., Ueda M., Matsubara K., Kawai J., Carninci P., Adachi J., Aizawa K., Arakawa T., Fukuda S., Hara A., Hashizume W., Hayatsu N., Imotani K., Ishii Y., Itoh M., Kagawa I., Kondo S., Konno H., Miyazaki A., Osato N., Ota Y., Saito R., Sasaki D., Sato K., Shibata K., Shinagawa A., Shiraki T., Yoshino M., Hayashizaki Y., and Yasunishi A., 2003, Collection, mapping, and annotation of over 28000 cDNA clones from Japonica rice, *Science*, 301(5631): 376-379 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1081288> PMID:12869764
- Kim T.H., Kim N.S., Lim D., Lee K.T., Oh J.H., Park H.S., Jang G.W., Kim H.Y., Jeon M., Choi B.H., Lee H.Y., Chung H.Y., and Kim H., 2006, Generation and Analysis of large-scale expressed sequence tags (ESTs) from a full-length enriched cDNA library of porcine backfat tissue, *BMC Genomics*, 7(1): 36-40 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-7-36> PMID:16504160 PMCID:1444929
- Liu T., Liu L.X., Liu Z.C., Hou J.M., Gao S.G., Zhou F.H., and Chen J., 2010, Construction and characterization of a normalized full-length cDNA library of *Curvularia lunata*, *Zhiwu Bingli Xuebao (Acta Phytopathologica Sinica)*, 40(3): 250-257 (刘铜, 刘力行, 刘志诚, 侯巨梅, 高士刚, 周斐红, 陈捷, 2010, 玉米弯孢霉叶斑病菌均一化全长cDNA文库构建与鉴定, *植物病理学报*, 40(3): 250-257)
- Peng W.F., 2007, Jute fiber's properties and weaving product's development, *Shandong Fanzhi Keji (Shandong Textile Science & Technology)*, 2: 44-46 (彭文芳, 2007, 黄麻纤维的性能及服用织物开发前景, *山东纺织科技*, 2: 44-46)
- Seki M., Carninci P., Nishiyama Y., Hayashizaki Y., and Shinozaki K., 1998, High-efficiency cloning of Arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper, *Plant J.*, 15(5): 707-720 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00237.x> PMID:9778851
- Wang C., Liu H., Fang J.G., Song C.N., Cao X., Yang G., and Zhang Z., 2010, Cloning and expression analysis of APETALA2 gene from grapevine (*Vitis vinifera*) based on EST database, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 27(2): 207-212 (王晨, 刘洪, 房经贵, 宋长年, 曹雪, 杨光, 章镇, 2010, 基于EST数据库的葡萄APETALA2基因cDNA克隆及其表达分析, *果树学报*, 27(2): 207-212)
- Yan H.J., Huang X.Q., and Cheng Z.Q., 2006, Advances of the studies on construction strategy and analysis of cDNA library, *Yunnan Nongye Daxue Xuebao (Journal of Yunnan Agricultural University)*, 21(1): 1-6 (晏慧君, 黄兴奇, 程在全, 2006, cDNA文库构建策略及其分析研究进展, *云南农业大学学报*, 21(1): 1-6)