

油脂形成期棉花种子全长 cDNA 文库的构建

王德龙, 于霏雯, 喻树迅*, 翟红红, 范术丽, 宋美珍, 张金发

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南 安阳 455000)

摘要: 提取海岛棉 7124 开花后 25~35 d 胚的总 RNA, 利用 SMART 技术, 经 21 轮 LD-PCR 扩增获得全长双链 cDNA, 经 Sfi I 酶切、层析柱分离后, 收集 500 bp 以上的片段与 pDNR-Lib 载体连接并转化到感受态 DH10B 细胞, 构建了棉花种子全长 cDNA 文库。所构建的原始文库库容为 5×10^6 , 文库滴度为 1.5×10^8 cfu · mL⁻¹。在文库中随机挑取 180 个克隆进行 PCR 检测, 结果显示, 文库中插入片段长度为 0.5~2.5 kb, 将挑取的 180 个单克隆进行 EST 测序, 无空载序列, 说明文库重组率为 100%; 序列分析结果表明, 其中与油脂形成相关的 EST 有 13 条。以上数据说明构建的文库质量较高, 为进一步从文库中分离棉花脂肪酸代谢关键基因, 提高棉花含油量奠定了基础。

关键词: 棉花; 胚; 油脂; cDNA 文库; EST

中图分类号: S562.035.03 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2009)05-0351-05

The Construction of cDNA Library from Cotton Seed

WANG De-long, YU Ji-wen, YU Shu-xun*, ZHAI Hong-hong, FAN Shu-li, SONG Mei-zhen, ZHANG Jin-fa

(Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: SMART technique was used to construct the full length cDNA library of cotton seed. Total RNA was isolated from sea-island cotton embryo about 25~35 days. Full length ds-cDNA (Double-strained complement DNA) was amplified by using 21 round LD-PCR(Long-distance PCR). After Sfi I digestion and Chroma spin-400 fractionation, cDNAs (>500 bp) were ligated to pDNR-Lib vector and transformed to DH10B afterward. The total clones of the library was measured to be 5×10^6 with a titer of 1.5×10^8 cfu · mL⁻¹. The inserted fragments ranged from 0.5 kb to 2.5 kb, and the recombinant rate of the library was about 100%. 180 monoclonal were selected to sequence, and 13 EST concerned with lipid metabolism were identified. These results show that the cDNA library can be used for screening genes of fatty acid metabolism.

Ke words: cotton; embryo; lipid; cDNA library; EST

近年来,随着石油资源的日益枯竭和人们环保意识的提高,生物能源已受到世界各国的重视,生物柴油被认为是最好的石油替代品。而棉花的副产品棉子可用来生产生物柴油,利用棉子油生产生物柴油的优势有:(1)棉子油是棉花的副产品,不影响纤维的生产。(2)石化柴油的碳链长度

分布在 C15~C18,而棉子油中的脂肪酸的碳链长度 99%集中在 C16 和 C18,和柴油成分相似,而且转化率高达 95%以上^[1-2]。(3)由棉子油转化成的生物柴油中不含硫而富含氧,可使燃烧更加完全而不污染环境。

目前,构建 cDNA 文库是研究生物体功能基

收稿日期: 2008-07-30

作者简介:王德龙(1983-),男,中国农业科学院硕士,wdl_21@126.com; * 通讯作者, yu@cricaas.com.cn

基金项目:国家十一五“863”计划(2006AA100105) 优质高产棉花分子品种创制

因组的主要技术手段,很多油料作物如油菜、大豆、油茶等都已经建立了 cDNA 文库^[3-5]。常规建库方法当 mRNA 较长或其 5'端存在二级结构时,反转录酶会提前终止反转录;克隆片段短,对应于 mRNA 5'端的信息会丢失,反转录效果差,不适应目前大规模,高通量、高效的功能基因组研究需要。而全长 cDNA 文库的构建可以高效,大规模获得基因序列,并且序列大多数包括 3'和 5'端的非编码区,能大幅度地加快计算机分析、蛋白质表达和功能分析的进程;尤其是对基因组庞大,近期内不能进行全基因组测序的生物体来说,更是进行基因组研究的一条重要途径^[6]。SMART 技术构建全长文库的特点是用少量总 RNA (50~1000 ng) 经 15~25 轮 LD-PCR 扩增即可获得几微克的全长双链 cDNA^[7]。该技术产生的单链 cDNA 富含 mRNA 完整的 5'非翻译区,也省略了合成接头的连接、甲基化等操作步骤,更易获得全长基因^[8-10]。因此本研究采用 SMART 技术构建了棉花油脂形成期全长文库,为以后分离和克隆棉花中与油脂合成有关的基因、提高棉子的含油量奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

采用含油量较高的海岛棉 7124,种植于安阳中国农业科学院棉花研究所实验基地。将开花后 25~35 d 发育中的种子取回并立即拨取种子中的胚置于-70℃保存。

1.2 试剂

CreatorTM SMARTTM PCR cDNA Library Construction Kit 和 AdvantageTM cDNA PCR Kit 为 Clontech Laboratories Inc. 公司产品, DH10B 电转感受态为 Invitrogen 公司产品。CTAB、LiCl、pvp 等 RNA 提取试剂购自上海生工生物技术有限公司,其它分析纯或化学纯均购自国内公司。

1.3 总 RNA 提取

总 RNA 的提取选用 CTAB 法。提取总 RNA 后取 2 μL 用 1.1% 的琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性,用紫外分光光度计测量 260 nm 及 280 nm 处的 OD 值,检测 RNA 纯度和得率。

1.4 SMART cDNA 文库构建

根据 Clontech 公司的 CreatorTM SMARTTM PCR cDNA Library Construction Kit 说明书取

1 μg 总 RNA 作为合成 cDNA 第一链的模板,在 CDS III/3'PCR 引物和 SMART IV 寡核苷酸引物的引导下,通过 PowerscriptTM RT 逆转录酶逆转录合成第一链 cDNA。以 2 μL 第一链 cDNA 产物为模板,用 CDS III/3'PCR 引物和 5'锚定引物,在 PTC-225 型 PCR 仪上用 LD-PCR 合成第二链 cDNA。PCR 反应条件为 95℃ 1 min; 95℃ 20 s, 68℃ 6 min, 21 个循环; 4℃ 结束反应。扩增后,取 2 μL PCR 产物在 1.1% 的琼脂糖电泳上检测第二链 cDNA 合成效果。将合成的双链 cDNA 用蛋白酶 K 消化, Sfi I 酶切,再用 CHROMA SPIN-400 将双链 cDNA 按分子大小分级分离,收集大于 500 bp 的双链 cDNA 与 pDNR-Lib 质粒载体的左右臂在 16℃ 连接。连接时按不同 cDNA 比值建立了三个连接体系(表 1) 以便得到较高的转化效率。用 Eppendorf 2510 电转化仪在 2.0 kV, 200 Ω, 25 ωμF 条件下将三个连接各 5 μL 重组子分别电转化到 50 μL 电转感受态细胞 DH10B, 将转化后的产物溶于 1 mL LB 培养基中,放到摇床中 37℃ 复苏 1 h, 即初步构建完成质粒文库。

表 1 三个不同 cDNA 浓度的连接

Table 1 Ligation using different ratios of cDNA to vector

反应物	连接		
	A /μL	B /μL	C /μL
cDNA	0.5	1.0	1.5
pDNR-LIB/(0.1 g · L ⁻¹)	1.0	1.0	1.0
10×Ligation Buffer	0.5	0.5	0.5
ATP/(10 μmol · L ⁻¹)	0.5	0.5	0.5
T4 DNA Ligase/(400 U · μL ⁻¹)	0.5	0.5	0.5
Deionized H ₂ O	2.0	1.5	1.0
Total volume/μL	5.0	5.0	5.0

1.5 cDNA 文库库容和滴度测定

取 0.6 μL 转化产物加到 150 μL 的 LB 培养基中,平均铺到三个 90 mm LB agar 平板上,37℃ 培养箱中培养过夜,统计克隆数,计算文库容量。根据 CreatorTM SMARTTM PCR cDNA Library Construction Kit 说明书中滴度测定方法:取 1 μL 复苏产物加到 1 mL 的 LB 液体培养基中,轻轻混匀,再从混匀后的溶液中取 1 μL 加到 50 μL LB 液体培养基中,混匀后涂到 37℃ 预热的 LB/Cm 平板上,在室温下放置 15~20 min 后将平板倒置于培养箱中 37℃ 过夜培养。文库滴度计算公式:滴度=平板克隆数×10³×10³。

1.6 cDNA 文库重组率和重组子长度测定

从文库中随机挑取 180 个单克隆进行菌液 PCR 反应,筛选引物为:M13(5'GTAAAACGACG-GCCAGT, 3' AACAGCTATGACCATG), 反应程序为:94 °C 3 min;94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 1.5 min,28 个循环。取 5 μ L 扩增后的产物用 1.1 % 的琼脂糖凝胶电泳检测,确定空载体克隆数和插入片段大小情况。

1.7 对文库进行 EST 测序

将 1.6 中随机挑取的 180 个单克隆送到北京华大公司进行 EST 测序。

2 结果分析

2.1 棉花总 RNA 提取质量

从图 1 中可以看出,总 RNA 的 28S、18S、5S 条带完整,28S 的亮度是 18S 的 2 倍。说明提取的总 RNA 比较完整。经 Beckman DU 800 核酸蛋白浓度测定仪测定,所提取的总 RNA 在 260 nm 的吸收值与 280 nm 的吸收值比值均在 1.8~2.1 之间,表明无蛋白质和其它杂质污染。RNA 总浓度为 3 g \cdot L⁻¹。总 RNA 的质量满足建库的要求,可以进行下一步实验。

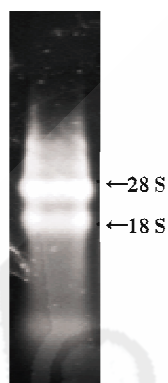
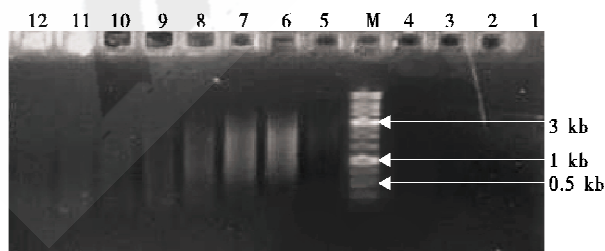


图 1 总 RNA 琼脂糖电泳检测结果

Fig. 1 Gel analysis of total RNA



M:1 kb DNA Marker P.

图 3 cDNA 分级分离电泳结果

Fig. 3 Gel analysis of cDNA classification

2.2 反转录结果鉴定

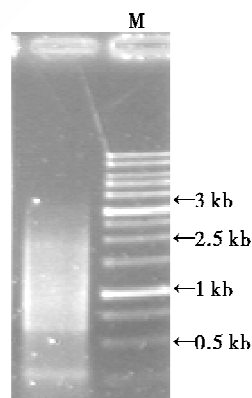
用 SMART 法进行反转录,经过 21 个循环,PCR 产物电泳结果呈现均匀的弥散带(图 2),大小分布在 500~2500 bp 之间,主要集中在 750~2000 bp 之间,符合植物双链 cDNA 长度。带的亮度代表这一时期种子中的 mRNA 的丰度差异,说明了棉花油脂形成期的 RNA 成分具有多样性和复杂性。以上数据表明合成的 cDNA 质量较高,可以进行下一步实验。

2.3 分级分离结果

图 3 为双链 cDNA 分级分离后电泳结果。其中 1、2、3、4 泳道中没有收集到片段,第 5 泳道开始出现 cDNA 片段,为确保收集到大于 500 bp 的 cDNA 片段,本实验只收集了 5、6、7 三个泳道的片段。

2.4 cDNA 文库质量检测结果

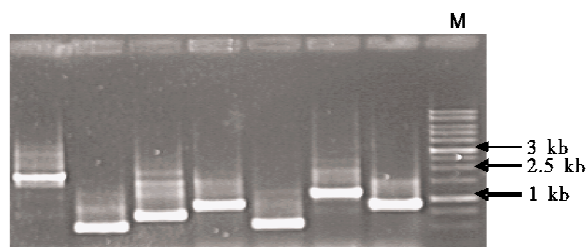
通过统计平板克隆数计算文库库容为 5×10^6 ,根据文库滴度计算公式计算本文库的滴度为 1.5×10^8 cfu \cdot mL⁻¹。随机挑取的 180 个单克隆经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测后发现没有空载。图 4 为部分片段电泳结果,插入片段主要集中在 1~2.0 kb 之间。



M:1 kb DNA Marker P.

图 2 双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳检测图

Fig. 2 Gel analysis of ds-cDNA



M:1 kb DNA Marker P.

图 4 部分克隆 PCR 检测结果

Fig. 4 PCR screening of partial clones

2.5 EST 序列分析

180 条 EST 序列中没有空载序列和载体 EST 序列,其中 Unigenes 148 个, Singlets 基因

143 个, Contigs 基因 5 个。EST 冗余度为 22.2%。在直系同源基因数据库中搜索发现有 13 条 EST 与油脂形成有关,占 7.2%,如图 5 所示。

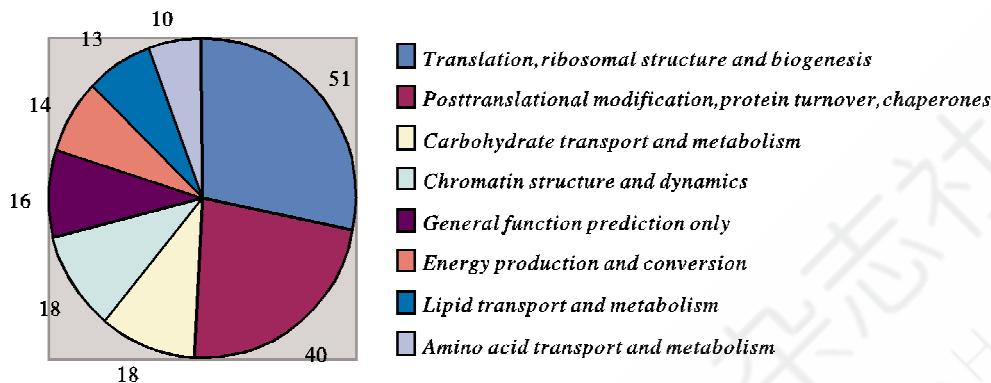


图 5 EST 序列归类

Fig. 5 Clusters of EST sequence

3 讨论

合成高质量的 cDNA 是构建表达文库的前提。这首先要求制备出高纯度、完整的 RNA,而酚类化合物被氧化后会与 RNA 不可逆地结合,导致 RNA 活性丧失以及在用苯酚、氯仿抽提时 RNA 丢失或形成不溶性复合物;多糖会形成难溶的胶状物,与 RNA 共同沉淀下来;萜类化合物会造成 RNA 的化学降解。为了防止 RNA 降解,除了尽量创造一个无 RNAase 环境条件外,还要选择一个快捷、简单的 RNA 提取方案。据此,借鉴并优化前人的 CTAB 法,获得了高质量的 RNA。分光光度计检测 OD_{260}/OD_{280} 值都在 1.8~2.1 之间,说明提取的总 RNA 的质量满足建库的要求。

cDNA 文库代表 mRNA 的反转录复本,代表某类特定细胞某一时期基因组的表达状态。因此,在 LD-PCR 过程中保证扩增的特异性和完整性是决定所得 cDNA 能否反映某一时期基因表达情况的关键。由于 PCR 反应本身的局限性,非特异性扩增的问题在所难免,只有通过控制 PCR 反应的循环数来减少这种问题对实验的干扰。而且循环数的增加使小片段的数量增多,不利于随后的大片段分离。LD-PCR 反应的循环数控制要根据 cDNA 量和大小来决定。因此,在试验过程中采取梯度循环数的方法来寻找反应的平台期,从而确定最佳循环数为 21,扩增后双链 cDNA 大小主要分布在 500~3000 bp 之间。从图 2 中可以看到 cDNA 在 500 bp 以下有一条亮带,这是因为本实验用的是总 RNA,所以反转录后可能会有

一些小片段被扩增。一般认为,非哺乳动物如植物、昆虫、酵母等的 PolyA⁺ RNA 分布在 0.15~3.0 kb 之间。另外,不同组织 mRNA 的丰度变化也具有时空表达的特异性,这也会反应在 cDNA 分布范围上。因此,在这个范围内的 cDNA 还是比较完整的。

参考文献:

- [1] 杨伟华,许红霞,王延芹.应用棉子油生产生物柴油的可行性分析[J].中国棉花,2007,34(1):42-44.
YANG Wei-hua, Xu Hong-xia, Wang Yan-qin. Analyses of the possibility to produce biodiesel by using cottonseed oil [J]. China Cotton, 2007, 34 (1): 42-44.
- [2] NI Wan-chao, Yang Yu-wen, Zhang Bao-long. Cottonseed oil as promising biodiesel in future[J]. Cotton Science, 2008, 20 (S1): 62.
- [3] 董海滨,管荣展.双低油菜华双 3 号幼苗全长 cDNA 文库的构建[J].南京农业大学学报,2005,28(3): 123-125.
DONG Hai-bin, Guan Rong-zhan. Construction of seedling cDNA library of canola variety Huashuang 3 in *Brassica napus*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2005, 28(3): 123-125.
- [4] 王跃平,李英慧,陈雄庭,等.绥农 14 鼓粒期子粒 cDNA 文库构建及初步分析[J].中国油料作物学报, 2008, 30(1): 40-45.
WANG Yue-ping, Li Ying-hui, Chen Xiong-ting, et al. Construction and characterization of the filling stage's seed cDNA library from Suinong14[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(1): 40-45.

- [5] 胡芳名,谭晓风,石明旺.油茶种子 cDNA 文库的构建[J].中南林学院学报,2004,24(5):3-6.
HU Fang-ming, Tan Xiao-feng, Shi Ming-wang. Construction of the cDNA Library of *Camellia oleifera* Seeds[J]. Journal of Central South Forestry University, 2004, 24(5):3-6.
- [6] 左开井,吴菲,唐克轩,等.海岛棉品种根部黄萎病菌诱导表达全长 cDNA 文库的构建[J].棉花学报,2002,14(5):291-294.
ZUO Kai-jing, Wu Fei, Tang Ke-xuan, et al. Root full-length cDNA library construction of seaisland cotton variety 7124 induced by *Verticillium dahliae* Kleb[J]. Cotton Science, 2002, 14(5):291-294.
- [7] 傅作申,程远国,张玉静,等.用长距 PCR 法构建恶性疟原虫全长 cDNA 表达文库[J].热带医学杂志,2002,2(3):225-229.
FU Zuo-shen, Cheng Yuan-guo, Zhang Yu-jing. Construction of *Plasmodium falciparum* cDNA expression library using LD-PCR[J]. Journal of Tropical Medicine, 2002, 2(3):225-229.
- [8] LIU Wen-hua, Wang Yi-liang, Chen Hui-ping, et al. The construction of cDNA expression library from the tentacles of *Sagartia rosea* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2002, 18(6):749-753.
- [9] SHENG Jian-ji, Lu Ying-chun, Feng Jian-xun. Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(10):2534-2543.
- [10] CHENCHIK A, Moqadam F, Siebert P. A new method for full-length cDNA cloning by PCR [M] // Krieg P A. A laboratory guide to RNA isolation, analysis and synthesis [M]. N. Y.: Wiley-Liss, Inc., 1996:273-321. ●

中國棉
China Cotton Magazine

