

中国对虾 6 种组织 cDNA 文库的构建

张晓军¹, 王 兵¹, 张绍萍¹, 李 云¹, 钟文慧¹, 李富花¹, 相建海^{1*}

(1 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 以中国对虾血液、眼柄、卵巢、雌虾头胸部、雄虾头胸部和三倍体对虾头胸部组织为材料, 采用异硫氰酸胍-酸酚法提取总 RNA; 用磁珠法纯化 mRNA; 用 Uni ZAP cDNA 合成试剂盒合成双链 cDNA 并进行修饰, 将 cDNA 定向连接在 Uni ZAP 载体上; 经 Gigapack GoldPackage 包装试剂盒包装成为噬菌体颗粒, 转染宿主 XL1 Blue MRF' 菌株细胞, 形成初级文库。初级文库经转染进一步扩增, 形成稳定的 cDNA 文库。6 个文库的库容在 $0.2 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^6$ 之间, 重组率都超过 90%。从各文库随机取出 6~10 个清晰的噬菌斑进行 PCR 扩增, 用琼脂糖凝胶电泳检测, 其插入片段长度为 500~2500 bp。由初步功能基因克隆获得阳性结果。多项指标表明, 所构建的对虾 cDNA 文库质量较高, 为进一步筛选目的基因、EST 测序和制作基因芯片提供了有效的工具。

关键词: 中国对虾; cDNA 文库; 功能基因

中图分类号: Q343.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-4193(2005)05-0092-04

1 引言

中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 是我国特有的海产品, 在海水养殖产业中占有重要的地位。近年来围绕海水养殖生物种质资源、新品种培育、病害和环境等关键性问题开展了大量基础性研究工作。目前对虾遗传学已经开始向基因组研究发展, 包括作图(遗传图谱和物理图谱制作)、测序(较大规模的 cDNA 片段和基因组 DNA 测序)、基因定位(荧光原位杂交)、基因识别(差异显示、RNA 干涉)、比较基因组等现代分子生物学技术都在应用和准备应用之中^[1]。

cDNA 文库是获得蛋白编码基因的基本手段, 是发现新基因和研究基因功能的基础工具。构建对虾特定部位组织 cDNA 文库, 利用克隆、测序方法, 结合差异显示、蛋白质组学、生物信息学技术, 可以从文库中筛选和克隆与对虾各项生理活动相关的重

要功能基因, 为进一步表达和利用这些基因打下基础。

中国对虾 cDNA 文库的构建工作目前仅有一篇报道, 李太武等^[2]用成虾头胸部(去头胸甲及胸部附肢)作为实验材料构建的 cDNA 文库, 获得了一定数量的克隆。为了更好地进行功能基因筛选、测序和其他基因组学研究, 我们从取材到技术路线都进行了改进, 构建了中国对虾血液、眼柄、卵巢、雌虾头胸部、雄虾头胸部和三倍体对虾头胸部 6 种组织的 cDNA 文库。

2 材料和方法

2.1 动物材料和试剂

本实验所用中国对虾为 2001 年 9~11 月于青岛市场购买的活体对虾以及在中国科学院海洋研究所水族楼培育的三倍体中国对虾。取血液、眼柄、卵巢、雌雄对虾头胸部及三倍体对虾头胸部作为实验

收稿日期: 2004-08-11; 修订日期: 2004-11-10.

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863"计划)资助项目(2002AA628030, 2003AA603440); 国家自然科学基金资助项目(30230280).

作者简介: 张晓军(1971-), 男, 辽宁省丹东市人, 博士, 从事海洋生物分子生物学研究. E-mail: xjzhang@ms.qdio.ac.cn

* 通讯作者: E-mail: jhxian@ms.qdio.ac.cn

材料.

β -巯基乙醇购自上海生工公司; 异硫氰酸胍、mRNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司; cDNA 合成试剂盒、噬菌体包装试剂盒及大肠杆菌 XL1 Blue MRF' 购自 Stratagene 公司.

2.2 实验方法

2.2.1 总 RNA 提取和 mRNA 纯化

总 RNA 提取按一步法进行^[3], 但稍微作改进. 把得到的 RNA 溶于无 RNase 的纯水中, 测 OD_{260} , OD_{280} 值并用 MOPS 琼脂糖凝胶电泳检测完整性. 按 Promega mRNA 纯化试剂盒用生物素磁珠法纯化 mRNA, 测 OD_{260} , OD_{280} 值以确定其含量和纯度, 同时进行电泳.

2.2.2 cDNA 的合成和片段选择

使用 Stratagene 公司的 Uni ZAP cDNA 合成试剂盒, 按照说明书对 cDNA 进行合成. 在合成 cDNA 的第一链时进行了甲基化修饰; 对消化后的 cDNA 片段通过 Sephrose-2Bspun 柱进行分级分离; 用 5% 非变性聚丙烯酰胺电泳银染检测各流份片段大小, 合并大于 400 bp 的 cDNA 于 -80°C 保存. 连接前用溴化乙锭平板法测定 cDNA 的含量.

2.2.3 cDNA 文库构建和鉴定

合成的 cDNA 与载体重组、体外包装和文库贮存按 Stratagene 公司的 Gigapack GoldPackage 包装试剂盒说明书所述进行. 为分析 cDNA 插入片段长度, 从各文库中随机取出 6~10 个清晰的噬菌斑, 溶于 80 μL SM 缓冲液, 取 1 μL 混合液, 以 T3, T7 引物进行 PCR 扩增, 用琼脂糖凝胶电泳检测.

2.2.4 功能基因的初步克隆

取 2 μL 文库噬菌体液, 用中国对虾抗菌肽 (正向为 5' ATGCGCCTCGTGCTCTGCCTG3', 反向为 5' ACAGCAACGTCCAAACCGAC3') 和 β -actin (正向为 5' AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGAC3', 反向为 5' TTCTCCATGTCTGCCAGT3') 特异性引物进行 PCR 扩增, 用琼脂糖凝胶电泳检测.

3 结果和分析

3.1 总 RNA 纯度及完整性检测

用分光光度计检测各组总 RNA 样品的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0, 用 MOPS 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 可见 18S 和 28S 两条清晰的带 (图 1), 显示 RNA 没有降解, 总 RNA 质量很高.

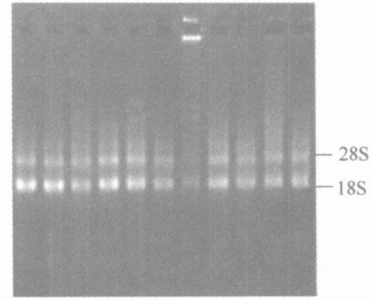


图 1 RNA 样品(血液)电泳图

3.2 mRNA 的纯化

经磁珠法分离纯化 mRNA 后, 检测各组 mRNA OD_{260}/OD_{280} 为 1.9~2.0, 用 1.0% 琼脂糖电泳检测纯度, 可见 mRNA 呈“smear”, 片段长度主要分布在 100~5000 bp (图 2).

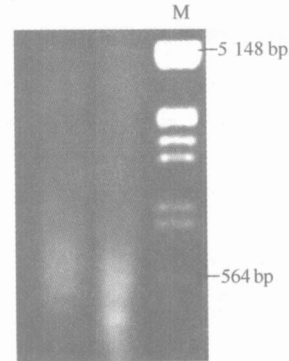


图 2 mRNA 电泳图(血液)

3.3 cDNA 片段选择

用 Sephrose-2Bspun 凝胶柱按片段大小分级分离, 取 8 μL cDNA 流份进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经银染可见大于 400 bp 的片段集中在 2~4 号流份中 (图 3), 收集该区间流份中 cDNA 用于构建文库.

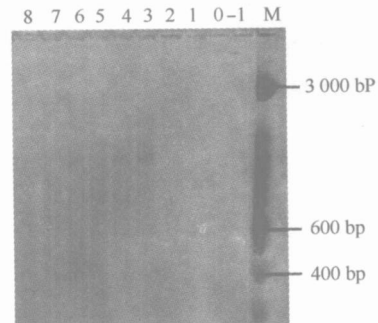


图 3 凝胶柱分离得到的各流份(血液)的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

注: 横坐标-1, 0, 1 等数字代表不同的流份

3.4 cDNA 文库的鉴定

通过 PCR 扩增, 检测所构建的 6 个 cDNA 文库插入片段长度为 500~2 500 bp, 平均为 1 000 bp 以上(图 4). 扩增后每个文库的库容分别是: 血液的 cDNA 文库为 0.78×10^6 , 眼柄的 cDNA 文库为 0.60×10^6 , 卵巢的 cDNA 文库为 0.36×10^6 , 雌虾头胸部的 cDNA 文库为 1.30×10^6 , 雄虾头胸部的 cDNA 文库为 0.20×10^6 , 三倍体对虾头胸部的 cDNA 文库为 1.2×10^6 , 基本符合理想的 cDNA 文库的要求. 包装后的 6 个 cDNA 文库经 IPTG 诱导检测重组率都超过 90%.

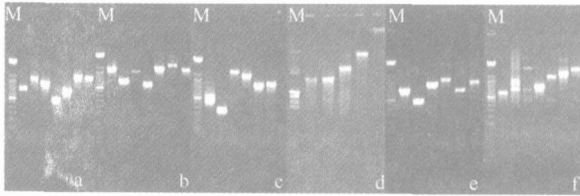


图 4 中国对虾 cDNA 文库噬菌斑的 PCR 扩增检测
a 血液文库, b 眼柄文库, c 卵巢文库, d 雌虾头胸部文库,
e 雄虾头胸部文库, f 三倍体对虾头胸部文库, M 表示 100 bp
ladder DNA marker

3.5 功能基因的初步克隆

用抗菌肽和 β -actin 特异性引物对文库进行 PCR 扩增如图 5. 电泳显示中国对虾抗菌肽基因在血液文库中的表达, 片段大小与用 cDNA 为模板的 PCR 结果一样; β -actin 基因在文库中都扩增出 1 000 bp 左右的片段, 长度有少许差异, 推测可能是在中国对虾中不只一种 β -actin 基因存在, 这有待进一步实验研究.

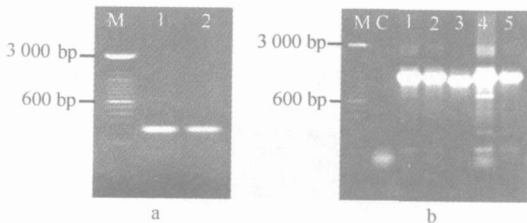


图 5 抗菌肽(a)和 β -actin(b)基因的初步扩增
a 1, 2 为血液文库, b 1 为血液文库, 2 为眼柄文库, 3 为卵巢文库,
4 为雄虾头胸部文库, 5 为三倍体头胸部文库, C 为空白对照

4 讨论

4.1 总 RNA 提取

对虾 RNA 提取一直比较困难, 这可能是由于现有的 RNA 提取试剂和操作步骤主要是用于哺乳

动物的, 把它照搬到无脊椎动物时往往不能达到理想的效果. 对虾的 28S RNA 普遍比 18S RNA 的亮度低, 并且对 28S RNA 长度比哺乳动物的小等问题一直没有得到很好解释. 一些对虾组织(特别是头胸部材料)黏多糖含量较大, 需要多次抽提, 并且 RNA 容易降解, 这给实验操作带来很大困难. 为了抑制 RNA 酶, 我们在实验中使用 β -巯基乙醇的浓度从 1% 增加到 2%~3%; 为了消除多糖的影响, 我们在提取头胸部材料时, 使用了硼酸缓冲液^[4]提取的 RNA 质量较好. 总体来说, 对虾血液中 RNA 的质量要好于其他材料.

4.2 cDNA 合成和修饰

在合成 cDNA 第一链时, 实验中使用的是甲基化的核苷酸混合物, 这样合成的 cDNA 除了带有 *Xho*I 酶切位点的 Linker-primer 部分外都被甲基化, 从而保护了 cDNA 不被下一步加入的 *Xho*I 从内部降解. 合成 cDNA 的第一条链加上 *Eco*R I 接头后用 *Xho*I 酶进行消化, 得到具有 3'-*Eco*R I 黏性末端和 5'-*Xho*I 黏性末端的 cDNA 片段. 可以保证 cDNA 定向插入到 *Un+*ZAPXR 载体中. 使用 Sephrose-2BSpun 柱处理合成后的 cDNA, 收集大于 400 bp 的 cDNA 片段, 除去了多余的 *Eco*R I 接头和小片段以保证文库中 cDNA 的长度, 减少后期基因筛选的工作量. 在检测收集片段大小时, 我们根据本实验室条件采用聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染技术, 没有使用试剂盒中所述的放射性同位素的方法, 同样得到了很好的效果.

4.3 文库构建

在实验中用 *T*₄ 多核苷酸激酶对 *Eco*R I 接头的 5' 端进行磷酸化, 最大限度地减小双链 DNA 相互连接的比例; 采用双酶切的克隆方式也有效地限制了 DNA 分子及载体分子的自身环化, 降低非重组子的产生, 这些都提高了重组克隆的效率. 按 Clare 的报道^[5], 若要求以 99% 的概率得到某一低丰度的克隆, 所要求的库容为 1.7×10^5 , 本实验中中国对虾 6 种 cDNA 文库容量都在 10^5 以上, 适合于一些低拷贝基因的筛选.

4.4 中国对虾 cDNA 文库构建的意义

构建 cDNA 文库是一项基础而重要的工作, 我们构建不同组织的 cDNA 文库的主要目的是将其用于不同功能基因的筛选和研究. 选择血液材料建库有利于克隆参与免疫、抗病相关的基因; 选择卵巢组织可以克隆到大量有关生殖调控、卵巢发育等相

关的基因. 眼柄中的 X 器官——鼻窦复合体是甲壳动物内分泌调控中心, 构建的眼柄 cDNA 文库有助于内分泌相关基因的研究; 头胸部包括对虾的大部分组织和器官, 可以认为头胸部 cDNA 文库是全虾文库. 总之, 利用这 6 种 cDNA 文库基本可以筛选和克隆绝大部分调控生长、发育等重要生理活动的功能基因. 下一步通过遗传重组、转基因等技术途径, 对功能基因进行综合利用研究, 进行与生产性状

和生物活性相关的特殊功能基因的定位、分离及表达调控研究, 建立外源基因高效表达系统, 在此基础上培育优质高产抗逆的养殖新品种.

目前已经从雌虾头胸部、血液、眼柄和卵巢 4 个文库中共测出 16 860 个 EST 序列, 用 RACE 方法从这些文库中扩增全长功能基因数十个, 进一步的基因克隆、EST 测序及制作基因芯片工作正在进行中.

参考文献:

- [1] 相建海. 海水养殖生物病害发生与控制[M]. 北京: 海洋出版社, 2001. 104—108.
- [2] 李太武, 相建海, 刘瑞玉. 中国对虾 cDNA 文库的构建[J]. 动物学报, 1998, 144(2): 237—238.
- [3] CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156—159.
- [4] 李 宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报, 1999, 15(1): 36—39.
- [5] CLARE L, CARDON J. A colony bank containing sythetic ColE, hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome[J]. Cell, 1976, 9(1): 91—95.

Construction of cDNA libraries from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

ZHANG Xiao-jun¹, WANG Bing¹, ZHANG Shao-ping¹, LI Yun¹, ZHONG Wen-hui¹,
LI Fu-hua¹, XIANG Jian-hai¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Six cDNA libraries of blood, eyestalks, ovary and cephalothorax of female, male, triploid Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) were constructed using the cDNA synthesis and ZAP express kit (Stratagene). Total RNA was extracted with guanidine thiocyanate/phenol/chloroform. Synthesized cDNA was ligated with the *EcoR* I adapter and phosphorylated. After *EcoR* I adapters were digested and eliminated with Sephrose-2B spun column, the cDNA fragments that had more than 400 bp were collected and ligated with the ZAP express vector. And then the ligated cDNAs were packed and incubated with XL blue MRF'. The content of each library is 0.78×10^6 (blood), 0.60×10^6 (eyestalks), 0.36×10^6 (ovary), 1.3×10^6 (female), 0.20×10^6 (male) and 1.2×10^6 (triploid), respectively. In order to detect the quality of these libraries, the inserted fragments were amplified with the T3 and T7 primers. The size of the inserted fragments was 500~2500 bp. Moreover, antimicrobial peptide and β -actin genes were cloned from the libraries. All these results indicate that high quality cDNA libraries were obtained. These cDNA libraries provide a very powerful tool to find new functional genes, analyze ESTs, and prepare gene chips and so on.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; cDNA library; functional gene