

## 刺五加体细胞胚 cDNA 文库的构建

刘立琨, 李成浩\*, 李俊秀, 阎秀峰

东北林业大学生命科学学院, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

**摘要:** 以 2,4-D 处理的刺五加体细胞胚为实验材料, 提取总 RNA 并分离 mRNA 合成 cDNA, 连接到 pAP3neo Predigested 载体上。采用电穿孔法将重组质粒转化到 DH10B 中。经测定, 原始文库滴度为  $2.3 \times 10^6$  pfu·mL<sup>-1</sup>, 重组率大于 95%。插入片段的长度大部分在 0.5~2.0 kb 之间, 平均长度为 0.96 kb, 表明刺五加体细胞胚 cDNA 文库已构建成功。

**关键词:** 刺五加; 体细胞胚发生; cDNA 文库

## Construction of cDNA Library from Somatic Embryo of *Eleutherococcus senticosus* Maxim

LIU Li-Kun, LI Cheng-Hao\*, LI Jun-Xiu, YAN Xiu-Feng

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** Total RNAs were extracted from 2,4-D pretreated *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos, cDNAs were synthesized from isolated mRNAs and ligated into the pAP3neo Predigested vector. The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* DH10B by electroporation. The library qualification evaluation results showed that the titer was larger than  $2.3 \times 10^6$  pfu·mL<sup>-1</sup>, the percentage of recombination >95%, the size of most inserted fragments ranged between 0.5 kb and 2.0 kb, the average size was 0.96 kb. It indicated that *E. senticosus* somatic embryo cDNA library was constructed successfully.

**Key words:** *Eleutherococcus senticosus*; somatic embryogenesis; cDNA library

刺五加为五加科(Araliaceae)的多年生落叶灌木, 主要分布在我国东北部、俄罗斯远东地区及日本北海道等地, 是极其珍贵的药用植物。刺五加体细胞胚发生具有诱导率高、繁殖系数大和容易实现同步化发育等优点, 有望成为研究体细胞胚发生机制的又一模式植物(Choi 等 1999)。刺五加体细胞胚的研究多集中在体细胞胚发生机制(Choi 等 2001; Chakrabarty 等 2003; You 等 2006)、苗木快速繁殖(Choi 等 1999)、体细胞胚的生物反应器培养和次生代谢产物生产(Shohael 等 2007)、代谢途径的分子调控(Seo 等 2005)等方面的研究, 但刺五加体细胞胚发生过程中基因表达调控的研究还很少。本文以刺五加体细胞胚为材料, 以 pAP3neo 为载体, 用加 *EcoRI-SmaI* 接头定向克隆的方法, 构建刺五加体细胞胚 cDNA 文库, 以期采用基因芯片技术研究刺五加体细胞胚发生的表达谱以及克隆体细胞胚发生相关基因建立基础性资料。

### 材料与amp;方法

刺五加(*Eleutherococcus senticosus* Maxim)成

熟种子接种于不含植物生长调节物质的 MS 培养基上, 在 37℃ 下培养 5 d 后转到 25℃ 下培养; 诱导形成的体细胞胚继代于相同配比的 MS 培养基上培养, 筛选出次生胚发生能力高的细胞系, 并以重复体细胞胚发生的方式增殖和维持(李成浩等 2006)。将以上述方法维持近 7 年的体细胞胚转到添加 1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 的 MS 培养基上培养 5 d 后取样, 以液氮速冻, 保存于 -80℃ 冰箱中备用。PolyATtract Isolation System III 为 Promega 公司产品, cDNA Library Construction Kit 为 TaKaRa 公司产品, DL2000 DNA 分子量标准、Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自 TaKaRa 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

提取刺五加体细胞胚总 RNA 时, 在无 RNase 的 1.5 mL 离心管中加入 600 μL SDS 缓冲液[2% SDS、200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、4 mol·L<sup>-1</sup> 尿素、50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0)、10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA (pH

收稿 2008-05-05 修定 2008-06-26

资助 国家自然科学基金(30671701)。

\* 通讯作者(E-mail: chli0@163.com; Tel: 0451-82190607)。

8.0)、10%的 $\beta$ -巯基乙醇。取200 mg体细胞胚,于液氮中研磨成粉末,迅速加入这一反应体系中。然后加入300  $\mu$ L Tris平衡酚和300  $\mu$ L 氯仿,震荡15 min后,于4  $^{\circ}$ C下以13 000 $\times$ g离心15 min,取出放在冰上冷却1 min;取上清液,再加Tris平衡酚、氯仿各350  $\mu$ L,重复抽提1次;取上清液,向其中加入700  $\mu$ L 氯仿,震荡5 min,于4  $^{\circ}$ C下以13 000 $\times$ g离心5 min;取上清液,然后加入1/2体积的75%乙醇与1/2体积的8 mol $\cdot$ L $^{-1}$  LiCl,混匀后,于-20  $^{\circ}$ C下沉淀30 min;再于4  $^{\circ}$ C下以13 000 $\times$ g离心20 min,弃去上清液;用75%的乙醇(预冷)洗涤2次,空气中干燥后,用适量的DEPC水溶解沉淀,置于-80  $^{\circ}$ C下保存备用。以1.1%的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性,用紫外分光光度计法鉴定和测定RNA的纯度和含量。

用Promega公司的PolyAtract Isolation System III分离纯化mRNA;在得到的mRNA中加入1/10体积的3 mol $\cdot$ L $^{-1}$  NaAc与等体积的异丙醇混匀,-20  $^{\circ}$ C中沉淀过夜;次日以15 000 $\times$ g离心30 min,出现的白色沉淀用70%和100%乙醇分别洗一次后,溶于8  $\mu$ L无RNase水中。

按照TaKaRa cDNA Library Construction Kit说明书,在无菌的PCR管中,加入5  $\mu$ g刺五加mRNA,再加入无RNase水使总体积达到10.8  $\mu$ L,在新的管中依次加入4  $\mu$ L 5 $\times$ 第一链合成缓冲液、1.2  $\mu$ L第一链dNTP Mix、1  $\mu$ L RNase抑制剂、2  $\mu$ L Oligo(dT) $_{18}$ 锚定引物,将冰浴的mRNA溶液加入上述反应液中,加入1  $\mu$ L M-MLV反转录酶,轻轻混匀后于42  $^{\circ}$ C中反应2 h。在第一链cDNA合成液中依次加入30  $\mu$ L 5 $\times$ 第二链合成缓冲液、4.5  $\mu$ L第二链dNTP Mix、87.5  $\mu$ L RNase-free H $_2$ O、2  $\mu$ L *E. coli* RNase H、2  $\mu$ L *E. coli* DNA聚合酶I,合成cDNA第二链。

用T4聚合酶将双链cDNA末端平滑化,与Adaptor连接,在合成的双链两端加上EcoRI-SmaI接头,NotI酶切,将酶切产物经过自旋柱去除400 bp以下的短链cDNA。

载体连接及文库构建时,将已纯化的分别带有EcoRI和NotI粘性末端的cDNA与100 ng EcoRI-NotI酶切载体pAP3neo进行连接,12  $^{\circ}$ C下过夜反应。用电转化法将连接产物导入*E. coli* DH10B,构成原始文库。转化电压为1 500 V。

原始文库滴度测定时,取10  $\mu$ L原始文库菌液用SOC液体培养基连续稀释10、10 $^2$ 、10 $^3$ 倍,然后各取10  $\mu$ L涂布在LB/Amp琼脂平板培养基上,37  $^{\circ}$ C下过夜培养。计算文库滴度(pfu $\cdot$ mL $^{-1}$ )=(菌落数 $\times$ 稀释倍数)/受体菌的体积。

将原始文库按每个平板产生5 $\times$ 10 $^4$ 个以下的克隆涂布,37  $^{\circ}$ C中过夜培养,收集每个平板的菌液,此为扩增文库。将扩增后的cDNA文库稀释10 $^5$ ,取10  $\mu$ L铺板,计算扩增后文库滴度。文库扩增后加25%甘油置于-80  $^{\circ}$ C下保存。

cDNA文库插入片段的检测时,从LB/Amp琼脂平板上任意挑选14个单菌落,使用试剂盒中的T7、T3引物进行PCR反应,1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定插入片段的大小。

## 实验结果

### 1 刺五加体细胞胚中RNA的提取

SDS试剂提取总RNA,经核酸测定仪测定其紫外吸收值,OD $_{260}$ /OD $_{280}$ 为2.06,说明RNA质量较好。琼脂糖凝胶电泳显示28S和18S条带清晰,无扩散,比例接近2:1说明RNA完整,可以用于构建文库(图1)。

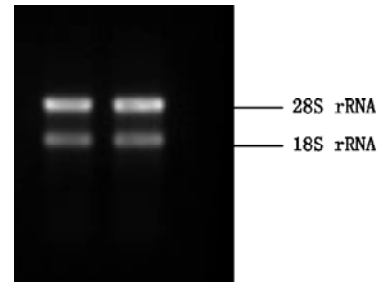


图1 刺五加体细胞胚总RNA的琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig.1 Agarose gel electrophoretogram of total RNAs from somatic embryos of *E. senticosus*

### 2 mRNA的分离纯化

采用Promega公司的PolyAtract Isolation System III分离纯化mRNA,得到的mRNA在1%琼脂糖凝胶中电泳,扩散区带在0.5~2.0 kb之间,且18S和28S rRNA处的2条特征带变得模糊,说明分离得到的mRNA质量较好(图2)。

### 3 cDNA的合成和分析

cDNA第一链和第二链合成后,在1%琼脂糖

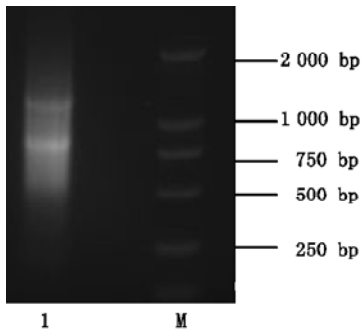


图2 总RNA中分离纯化的mRNA琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig.2 Agarose gel electrophoretogram of mRNAs isolated from total RNAs  
1: mRNA; M: DL2000 DNA 分子量标准。

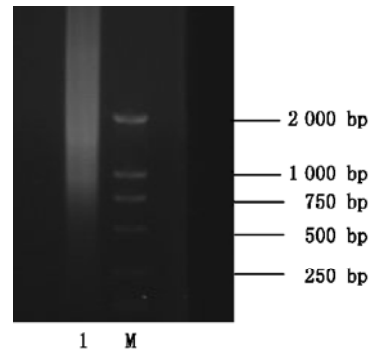


图3 刺五加体细胞胚 ds cDNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱  
Fig.3 Agarose gel electrophoretogram of ds cDNAs from somatic embryos of *E. senticosus*  
1: ds cDNA; M: DL2000 DNA 分子量标准。

凝胶上电泳, 结果显示合成的cDNA最大长度大于2.0 kb, 表明合成的cDNA质量较高(图3)。

#### 4 cDNA文库的质量鉴定

将菌液稀释后测定文库中原始滴度的结果显示, 原始文库滴度为  $2.3 \times 10^6$  pfu·mL<sup>-1</sup>。扩增后的

cDNA文库稀释  $10^5$ , 取出 10 μL 涂平板, 计算扩增后的滴度为  $5.1 \times 10^9$  pfu·mL<sup>-1</sup>。从LB/Amp琼脂平板上任意挑选14个单菌落检测插入片段的大小, 电泳结果显示插入的片段大部分在0.5~2.0 kb之间, 平均长度为0.96 kb (图4)。

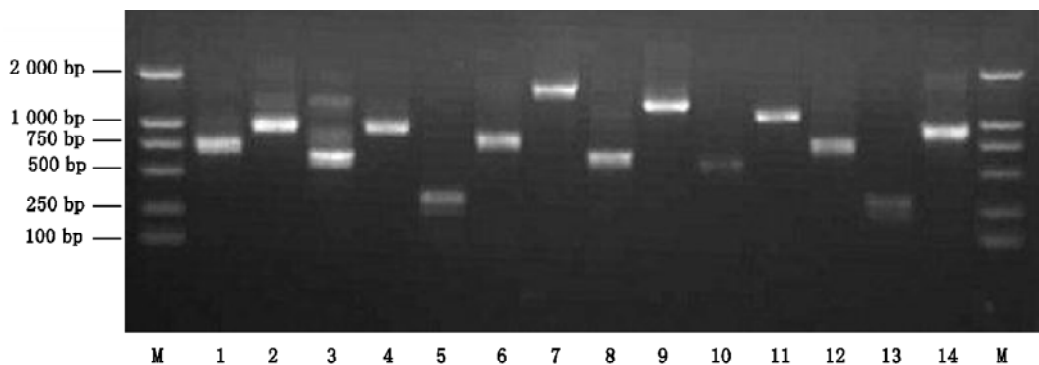


图4 刺五加体细胞胚 cDNA 文库插入片段的PCR检测  
Fig.4 PCR detection of inserted fragments size from somatic embryos of *E. senticosus* cDNA library  
1~14: cDNA 插入片段; M: DL2000 DNA 分子量标准。

### 讨 论

文库的滴度、重组率及插入片段的大小是鉴定cDNA文库的重要指标(杨成君等2007)。本文所获得的刺五加体细胞胚cDNA文库原始滴度为  $2.3 \times 10^6$  pfu·mL<sup>-1</sup>, 扩增后的文库滴度为  $5.1 \times 10^9$  pfu·mL<sup>-1</sup>, 插入片段平均长度为0.96 kb, 重组率大于95%。这些数据说明此文库能够满足构建完整文库的要求。

提取纯度高、完整性好的RNA是构建高质量cDNA文库的前提。本文曾使用传统的CTAB、

SDS、Trizol法提取刺五加RNA, 但效果都不理想, 表现为RNA提取的量少、易褐化、沉淀难溶于水(资料未列出)。这可能与上述方法大多适用于草本植物有关, 而刺五加在组成成分和结构特点上不同于草本植物, 具有更为坚硬的细胞壁, 含有更多的多糖和多酚化合物等物质。本文中, 采用改进的SDS法可以得到高质量的RNA, 表现在: (1)材料在提取液中经过强烈的震荡; (2)适当增加提取液中β-巯基乙醇的含量; (3)可用LiCl代替乙醇沉淀RNA。

采用 TaKaRa 公司的 cDNA Library Construction Kit 构建 cDNA 文库时, 通常在合成 cDNA 第一链前, 将 RNA 溶液在 65 °C 下加热 5 min, 然后冰中急冷 5 min, 认为这样能够缓解二级结构的影响。但是这种加热处理容易导致 RNA 降解而降低文库质量。本文构建刺五加体细胞胚 cDNA 文库时, 未对 RNA 进行 65 °C 热变性处理, 直接用于 cDNA 第一链的合成, 反转录效果良好。

总之, 刺五加体细胞胚 cDNA 文库的建立, 为深入研究刺五加体细胞胚发生机制、体细胞胚诱导过程中胚性细胞形成的特异机制以及体细胞胚诱导过程中的基因表达等问题可能都有意义。

#### 参考文献

- 李成浩, 杨传平, 刘桂丰, 牛遇达, 赵波, 韩君(2006). 不添加植物激素的刺五加培养方法. 中国发明专利申请号: CN200610009783.5
- 杨成君, 王军, 刘关君, 王英平(2007). 红果人参叶中 cDNA 文库的构建. 植物生理学通讯, 43: 664~668
- Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY (2003). Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). Plant Sci, 165: 61~68
- Choi YE, Katsumi M, Sano H (2001). Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. Plant Sci, 160: 1183~1190
- Choi YE, Kim JW, Yoon ES (1999). High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. Ann Bot, 83: 309~314
- Seo JW, Jeong JH, Shin CG, Lo SC, Han SS, Yu KW, Harada E, Han JY, Choi YE (2005). Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation. Phytochemistry, 66: 869~877
- Shohael AM, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2007). Glutathione metabolism and antioxidant responses during *Eleutherococcus senticosus* somatic embryo development in a bioreactor. Plant Cell Tiss Org Cult, 89: 121~129
- You XL, Yi JS, Choi YE (2006). Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. Protoplasma, 227: 105~112