

菠萝果实 cDNA 文库的构建

张秀梅, 孙光明, 杜丽清, 魏长宾, 刘忠华, 谢江辉*

中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东湛江 524091

摘要: 以菠萝幼果为研究材料, 采用 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit 技术构建菠萝幼果 cDNA 文库, 其文库的库容量为 1.01×10^6 , 重组率为 92%, PCR 检测表明大多数插入片段均大于 1 000 bp。

关键词: 菠萝; 果实; cDNA 文库

Construction of the cDNA Library from Pineapple Fruit

ZHANG Xiu-Mei, SUN Guang-Ming, DU Li-Qing, WEI Chang-Bin, LIU Zhong-Hua, XIE Jiang-Hui*

South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Zhanjiang, Guangdong 524091, China

Abstract: Total RNAs were extracted from the pineapple fruit using plant total RNA extraction kit, and full-length cDNA library was constructed with SMART cDNA Library Construction Kit. The capacity of the primary library was 1.01×10^6 , in which 92% clones were recombinant and all of the inserted cDNA fragments were larger than 1 000 bp. The positive signals were detected by PCR in the amplified library. The data indicated that the cDNA Library had high quality, and provided a useful tool for cloning glucose metabolism genes and further study on the molecular mechanisms of its biosynthesis.

Key words: pineapple; fruit; cDNA library

从总体上讲, 我国菠萝果实品质差、产量低和育种落后。生产中的主要品种多是从国外引进, 在国际果品市场上难以形成自己的特色和竞争优势。选育适合中国特色的品质好、抗性强的新品种, 降低生产成本, 提高经济效益, 是我国菠萝产业化进一步发展的根本出路。而基因工程技术可能为实现这一目标提供契机。

分离和克隆基因是基因工程技术应用的基础, cDNA文库是发现新基因和研究基因功能的基础工具, 在生物学研究领域中有着较广泛的用途, 目前已发现的基因绝大部分是通过cDNA文库筛选而得到的(晏慧君等 2006)。因此, 构建菠萝果实 cDNA 基因文库, 为分离与果实品质、产量和抗性等相关的基因奠定了基础。

材料与方法

菠萝品种‘巴厘’[*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Yellow Mauritius]的幼果采自湛江南亚热带作物研究所菠萝圃。文库构建试剂盒 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit (Catlog #: 634901)是 Clontech 公司产品。感受态细胞为大肠杆菌 Electro-Cells DH5 α 、DL2000 DNA 分子量标

准和 D2215 DNase (RNase-Free) 购自 TaKaRa 生物技术公司。

RNA 提取采用天为时代的 RNAplant 植物 RNA 提取试剂, 并用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。取 1 μ L 总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统上观察结果。

文库构建采用 Clontech 公司的 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit, 按说明书上的操作。取 3.0 μ L 总 RNA 进行反转录, 合成 cDNA 第一链, 反应体系 10 μ L, 反应结束取 2.0 μ L cDNA 第一链产物进行 LD PCR 扩增, 取 5 μ L 用 1.1% TAE 琼脂糖凝胶进行电泳检测。纯化回收 cDNA, 用 *Sfi*I 于 50 $^{\circ}$ C 酶切 2 h, 产生粘性末端。酶切产物 100 μ L 与 2.0 μ L 1% 二甲苯胺过 SPIN-400 柱, 每管过柱收集 35 μ L, 取 5 μ L 用于电泳检测。双链 cDNA 片段化后, 取 1.0 μ L 连接到 pBluescript II SK 的改造载体上, 然后将含有 cDNA

收稿 2008-09-12 修定 2008-10-22

资助 “948” 项目[2006-G34(A)]、农业部行业计划(nyhyzx07-030)、中国热带农业科学院基金(Rky0439)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(200701)。

* 通讯作者(E-mail: Xiejianghui@21cn.com; Tel: 0759-2858168)。

的质粒载体转化到用 CaCl_2 法制备的感受态细胞 DH5 α 中。

文库的质量检测, 根据蓝白斑培养、筛选结果来计算文库的库容量(Lambert和Willamson 1993)和文库的重组率(苟小平等 2001; Dresselhaus 等 1994)。通过随机挑取 24 个单菌落培养, 进行菌液 PCR 鉴定, 确定插入片段的大小。文库质量检测后, 向转化细胞中加入 40% 的甘油, 混匀后放入 -80 冰箱中保存。

结果与讨论

1 菠萝总 RNA 的提取及质量鉴定

采用天为时代的 RNAp1ant 提取菠萝幼果 RNA。获得的 RNA 经紫外分光光度计检测结果为 $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}=1.749$, 分离提取的 RNA 浓度为 $0.502\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。琼脂糖电泳结果显示 18S 和 28S 条带清晰, 且 28S rRNA 的亮度高于 18S rRNA 的 2 倍多(图 1), 无拖尾现象。说明所提取的 RNA 没有

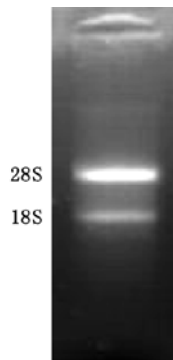


图 1 菠萝果实中总 RNA 琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Agarose gel electrophoretogram of total RNAs from pineapple

降解, RNA 分子完整性较好, 能够满足 cDNA 合成的需要。

2 双链 cDNA 合成及纯化回收

植物 mRNA 的大小一般集中分布在 0.5~4 kb, 因此反转录后的全长 cDNA 大小也应该分布在该范围内, 才能说明构建的 cDNA 包含全长的 cDNA。由图 2 可知, 合成的双链 cDNA 是一个大小分布在 0.5~4 kb 的弥散条带, 在接近 1 kb 附近有非常明亮清晰的条带, 说明 cDNA 比较完整。

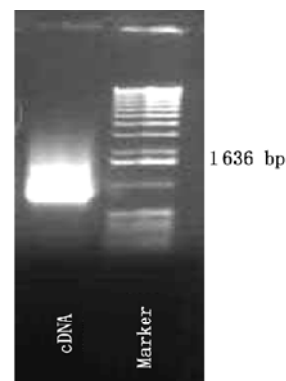


图 2 cDNA 琼脂糖凝胶电泳
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of Ds cDNAs
Marker 为 Gibco/BRL 公司的 1 kb DNA ladder.

再用蛋白酶 K 消化和 *Sfi*I 酶切, 将酶切产物经过 SPIN-400 Column 片段化后, 电泳检测片段化结果(图 3), cDNA 片段主要就集中在第 1 到 5 管, 混合 1 到 5 管的过柱产物用于连接。

在构建 cDNA 文库过程中, 分级分离去除小于 500 bp 的 cDNA 片段很重要。如果不能有效的去除小片段, 会优先与载体连接, 使插入片段的平均长度过短, 则文库的应用价值降低。但过多的筛除

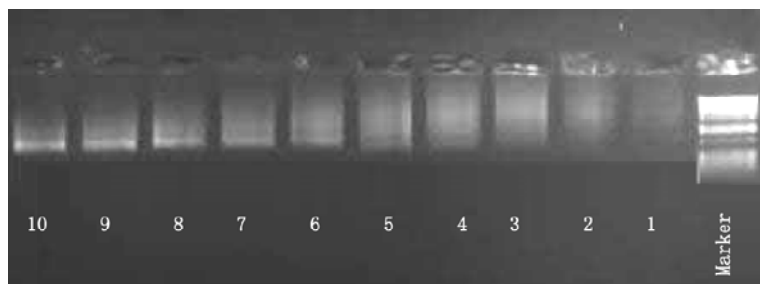


图 3 分级后 cDNA 片段琼脂糖凝胶电泳
Fig.3 Agarose gel electrophoresis of cDNA segments after fractionation
1~10: 分级后的 cDNA 片段; Marker 为 Gibco/BRL 公司的 1 kb DNA ladder.

cDNA片段,势必会造成原始文库的库容量降低,影响文库的质量。本试验合并了1~5管的cDNA样品,收到良好的效果。

3 cDNA文库的质量检测

文库的库容量、重组率及插入片段的大小是鉴定cDNA文库质量的重要指标。一般文库的库容量达到 2.07×10^5 以上为有效的文库(曹必好等

2002; 王劲等 2003)。经过初步鉴定,本研究获得的菠萝幼果中cDNA原始文库的库容量为 1.01×10^6 ,基本上能够保证从这个文库中筛选到低拷贝的基因。

从扩增文库中随机挑取24个克隆进行PCR鉴定,此文库的重组率为92%,且插入片段一般都大于1 000 bp (图4),说明构建的文库质量较高。

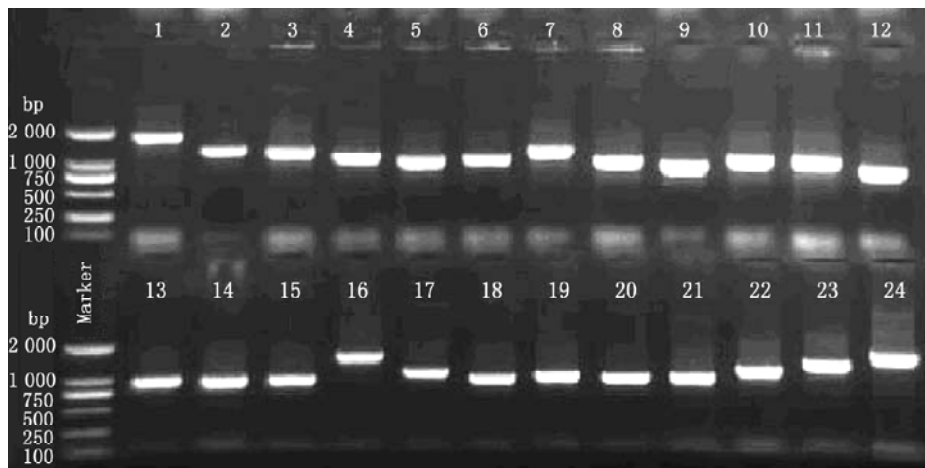


图4 cDNA文库随机插入片段的PCR检测

Fig.4 PCR analysis of randomly inserted fragments in cDNA library

Marker为TaKaRa公司的DL2000; 1~24: 插入片段。

参考文献

- 曹必好, 雷建军, 宋洪元, 宋明, 杨朝辉(2002). 结球甘蓝cDNA文库的构建和鉴定. 园艺学报, 29 (6): 579~580
 苟小平, 徐莺, 唐琳, 杨钊, 陈放(2001). 水稻精细胞的cDNA文库构建及分析. 植物学报, 43 (10): 1093~1096
 王劲, 袁旭, 李旭峰(2003). 芥蓝cDNA文库的构建及文库质量检测. 四川大学学报(自然科学版), 37 (Sup): 76~79

- 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, 2 (1): 1~6
 Dresselhaus T, Lorz H, Kranz E (1994). Representative cDNA libraries from few plant cells. Plant J, 5: 605~610
 Lambert KN, Williamson VM (1993). cDNA library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads and PCR. Nucleic Acid Res, 21 (3): 775~776