

红果人参叶中 cDNA 文库的构建

杨成君¹, 王军^{1,*}, 刘关君¹, 王英平²

¹东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; ²中国农业科学院特产研究所, 吉林吉林 132109

摘要: 以四年生红果人参叶片为材料, 提取叶中总 RNA 合成 cDNA, 连接到质粒载体 pDNR-LIB 上。采用电穿孔法将重组质粒转化到 DH5 α 中。经文库质量鉴定表明: 原始文库滴度为 1.008×10^6 pfu·mL⁻¹, 扩增后的文库滴度为 2.968×10^9 pfu·mL⁻¹, 重组率接近 100%, 插入片段大小在 0.5~2 kb 之间, 平均为 0.85 kb, 表明已成功构建了红果人参叶中 cDNA 文库。

关键词: 红果人参; cDNA 文库; 构建

Construction of cDNA Library from *Panax ginseng* C. A. Mey. cv. Hongguo Leaves

YANG Cheng-Jun¹, WANG Jun^{1,*}, LIU Guan-Jun¹, WANG Ying-Ping²

¹College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin, Jilin 132109, China

Abstract: The four years old *Panax ginseng* cv. Hongguo was used as experimental material, and total RNA was extracted from the leaves, cDNA was synthesized and ds cDNA fragment was ligated into the pDNR-LIB vector. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH5 α by electroporation. The library qualification evaluation showed, the titer of primary cDNA library was 1.008×10^6 pfu·mL⁻¹, the titer of amplified library was 2.968×10^9 pfu·mL⁻¹, the recombination percentage was about 100%, inserted fragment size was 0.5~2 kb, average inserted size was 0.85 kb. The *Panax ginseng* cv. Hongguo cDNA library was constructed successfully.

Key words: *Panax ginseng* cv. Hongguo; cDNA library; construction

人参为五加科人参属植物, 别名棒槌, 素有“东北三宝”之称。目前, 对人参的研究多集中在有效成分、结构、生物活性、药理和临床应用。而人参功能基因和次生代谢生物合成途径的研究相对较少, 完整的基因组和草图序列还有待于建立。cDNA 文库筛选和植物表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 等分子生物技术可应用于药用次生代谢调控机制研究以及功能基因的克隆、表达和鉴定等(黄璐琳等 2005)。构建 cDNA 文库是研究功能基因组学的基本手段之一, 目前已广泛用于研究不同发育阶段基因表达的变化、某特定发育期基因的表达情况、克隆新型细胞因子和分离新的组织特异基因等(Peterson 等 1998; Galaud 等 1999)。本文以 pDNR-LIB 为载体, 构建了四年生红果人参叶片的 cDNA 文库, 为从分子水平上研究人参的功能基因及其调控机制积累基础性资料。

材料与方法

四年生红果人参(*Panax ginseng* C. A. Mey. cv. Hongguo)采自吉林省抚松县。CreatorTM SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司。感受态细胞为大肠杆菌 Electro-cells DH5 α , DL2000 DNA 分子量购自 TaKaRa 生物技术公司; RQ1 RNase-Free DNase 购自 Promega 公司; 其他常规试剂均为国产分析纯。

提取叶片总 RNA 时, 在 1.5 mL 的离心管中加入 600 μ L 的提取缓冲液(2% SDS、0.0125 mol·L⁻¹ 四硼酸钠、100 mmol·L⁻¹ NaCl、10 mmol·L⁻¹

收稿 2007-04-06 修定 2007-06-19

资助 国家林业局野生动植物保护项目(010-413255)。

致谢 采集人参材料的过程中, 沈育杰先生和尤伟先生曾给予大力支持。

* 通讯作者(E-mail: junwang1966@yahoo.com.cn; Tel: 0451-82191829)。

EDTA, pH 8.0)、10%的 β -巯基乙醇。取200 mg叶片,在液氮中研磨成粉末,迅速加入其中。然后加入300 μ L Tris平衡酚和300 μ L 氯仿,震荡10 min后,于4 $^{\circ}$ C以13 000 \times g离心10 min,取上清液;再加Tris平衡酚、氯仿各300 μ L,重复抽提1次,取上清液;向其中加入600 μ L的氯仿,震荡5 min,于4 $^{\circ}$ C以13 000 \times g离心5 min,取上清液;然后加入等体积的异丙醇(预冷),混匀后,于-20 $^{\circ}$ C下沉淀20 min;再于4 $^{\circ}$ C下以13 000 \times g离心15 min,弃去上清液;加入40 μ L DEPC水,然后再加入5 μ L DNase和5 μ L RQ1 RNase-Free DNase 10 \times 反应缓冲液[400 mmol \cdot L $^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0)、100 mmol \cdot L $^{-1}$ MgSO $_4$ 和10 mmol \cdot L $^{-1}$ CaCl $_2$], 37 $^{\circ}$ C下放置30 min后,用100 μ L的DEPC水稀释,然后加入等体积的氯仿抽提1次,取上清液加入等体积的异丙醇(预冷),于-20 $^{\circ}$ C下沉淀30 min;再于4 $^{\circ}$ C下以13000 \times g离心15 min,弃去上清液,以75%的乙醇(预冷)洗涤1次,空气中干燥,用适量的DEPC水溶解沉淀,置于-70 $^{\circ}$ C下保存备用。以1.1%的琼脂糖凝胶上电泳检测RNA的纯度和是否降解,用紫外分光光度计测定含量。

合成cDNA第一链时,按照Clontech公司CreatorTM SMARTTM cDNA文库构建试剂盒说明书,在无菌的PCR管中加入下列试剂:1.1 μ L(约1 μ g)总RNA、1 μ L SMART IV寡聚核苷酸、1 μ L CDS III/3' PCR引物,加1.9 μ L去离子水至5 μ L。混匀,短暂离心,于72 $^{\circ}$ C下放置2 min,取出放置在冰上冷却2 min,再加入2 μ L 5 \times 第一链缓冲液、1 μ L DTT (20 mmol \cdot L $^{-1}$)、1 μ L dNTP (10 mmol \cdot L $^{-1}$)、1 μ L 反转录酶,反应体积共10 μ L, 42 $^{\circ}$ C下反应1 h;冰上终止第一链cDNA的合成。

LD-PCR合成ds cDNA时,于95 $^{\circ}$ C下预热PCR热循环仪;在无菌的PCR管中加入下列试剂:2 μ L cDNA第一链产物、80 μ L去离子水、10 μ L 10 \times PCR缓冲液、2 μ L 50 \times dNTP、2 μ L 5' PCR引物、2 μ L CDS III/3' PCR引物和2 μ L 50 \times DNA聚合酶,反应的总体积100 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C中预变性1 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s,68 $^{\circ}$ C延伸6 min,共23个循环;至4 $^{\circ}$ C时结束反

应。取5 μ L反应产物进行1.1%的琼脂糖电泳鉴定产物。

蛋白酶K与SfiI限制性酶消化时,取无菌的1.5 mL离心管,加入50 μ L扩增ds cDNA和2 μ L蛋白酶K (20 μ g \cdot L $^{-1}$),混匀,7 500 \times g离心2 s,置于45 $^{\circ}$ C下20 min,再以7 500 \times g离心2 s,加50 μ L去离子水及100 μ L酚、氯仿和异戊醇(25:24:1)混合液,并轻轻振荡混合1 min后,于室温下以14 000 \times g离心5 min,取上清液放到无菌的离心管中,加入100 μ L氯仿和异戊醇(24:1),轻轻混匀,再以14 000 \times g离心5 min,取上清液放到无菌的离心管中,加入10 μ L 3 mol \cdot L $^{-1}$ 醋酸钠、1.3 μ L糖原(20 μ g \cdot μ L $^{-1}$)和260 μ L 95%的乙醇,立即于室温下以14 000 \times g离心20 min。弃上清液,用100 μ L 80%乙醇洗沉淀,于空气中干燥约10 min后,加79 μ L去离子水重新溶解沉淀。

在含有79 μ L溶剂的离心管中加入下列试剂:10 μ L 10 \times 限制性内切酶缓冲液、10 μ L限制性内切酶、1 μ L 100 \times 牛血清白蛋白,反应体系共100 μ L,混匀,50 $^{\circ}$ C下放2 h,加2 μ L 1%二甲苯腈蓝,混匀。

分级分离cDNA时,根据试剂盒操作说明书,准备Chroma SPIN-400柱和18个1.5 mL的离心管,摇匀柱内基质,打开顶盖,让柱内的贮存缓冲液流尽后加700 μ L柱缓冲液洗柱,自然流完后,轻轻把100 μ L经二甲苯腈蓝染色的cDNA加到基质表面中央。静止片刻,让样品完全吸收,用100 μ L柱缓冲液洗涤含有cDNA离心管,小心加到基质表面,自然流干后,二甲苯腈蓝渗透至柱子表面下的几毫米处。放好第一收集管,加600 μ L柱缓冲液,收集洗脱液,每管1滴。每管取3 μ L进行1.1%琼脂糖凝胶电泳(150 V) 10 min。收集符合要求的3~4管合并。向其中加入1/10体积的醋酸钠(3 mol \cdot L $^{-1}$, pH 4.8)、1.3 μ L糖原和2.5倍体积的95%乙醇(-20 $^{\circ}$ C),混匀,于-20 $^{\circ}$ C中过夜后以14 000 \times g离心20 min,弃去所有液体,于空气中干燥10 min,加7 μ L去离子水溶解沉淀(准备连接载体)。

cDNA与pDNR-LIB载体连接时,设3个连接梯度反应(表1)。反应体系为5 μ L,于16 $^{\circ}$ C下以过夜。每管加95 μ L二已基焦碳酸酯处理水、

表1 cDNA与载体连接反应的体系
Table 1 Components of reaction of ligation cDNA into vector

	μL					
	cDNA	0.1 μg·μL ⁻¹ pDNR-LIB	10× 连接缓冲液	10 mmol·L ⁻¹ ATP	T4 DNA 连接酶	去离子水
连接反应 A	0.5	1.0	0.5	0.5	0.5	2.0
连接反应 B	1.0	1.0	0.5	0.5	0.5	1.5
连接反应 C	1.5	1.0	0.5	0.5	0.5	1.0

连接缓冲液组分: 500 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH7.8)、100 mol·L⁻¹ MgCl₂、100 mol·L⁻¹ DTT、0.5 mg·mL⁻¹ 牛血清白蛋白。

1.5 μL 糖原和 280 μL 预冷的 95% 乙醇, 混匀。置于 -70 ℃ 下 2 h 后, 以 15 000×g 离心 20 min。弃去上清液, 于空气中干燥后, 用 5 μL 二甲基焦碳酸酯处理水溶解沉淀。

重组质粒转化、文库质量鉴定及其文库扩增时, 取 3 份感受态细胞大肠杆菌 Electro-cells DH5α (50 μL), 分别加入上述连接产物, 混匀后进行电转化反应。取感受态细胞和连接产物的混合液注入到冰中预冷的 0.1 cm 冲击槽内, 15 kV·cm⁻¹, 脉冲时间为 5 ms。迅速置于冰中冷却, 加入 1 mL 的 LB 培养基, 于 37 ℃ 下振荡培养 1 h (225×g), 培养物即是原始文库。取培养物的稀释液涂布于含 30 μg·μL⁻¹ 氯霉素的 LB 培养基平板上, 于 37 ℃ 中培养过夜, 第 2 天检查平板。随机挑取 18 个单菌落培养, 进行菌液 PCR 鉴定, 使用 M13 引物, 其反应体系为: 1 μL 菌液、2.5 μL 10×PCR 缓冲液、0.5 μL dNTP (10 μmol·L⁻¹)、0.5 μL 正向引物 (20 μmol·L⁻¹)、0.5 μL 反向引物 (20 μmol·L⁻¹)、19.5 μL 去离子水、0.5 μL 50×DNA 聚合酶。反应参数: 94 ℃ 30 s; 94 ℃ 30 s, 68 ℃ 2 min, 进行 25 个循环反应; 68 ℃ 6 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物进行 1.1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 确定文库重组率和插入片段的大小。原始文库不稳定, 可按照试剂盒上的说明书测定原始文库的滴度, 文库的滴度以每毫升含噬菌斑形成单位 (plaque forming unit, pfu) 的数目计算。根据滴度在 LB 琼脂板上扩增文库, 文库扩增后加 25% 的甘油置于 -80 ℃ 下保存。

实验结果

1 红果人参总 RNA 的提取

提取的总 RNA 经核酸测定仪测定其紫外吸收值, OD_{260/280} 为 1.98, 表明获得的 RNA 纯度较高,

经 1.1% 的琼脂糖凝胶电泳结果 (图 1) 显示, 28s rRNA 和 18s rRNA 条带清晰, 亮度比接近 2:1, 没有基因组 DNA, 说明总 RNA 没有降解, 比较完整, 其纯度和完整性均符合建立 cDNA 文库的要求。

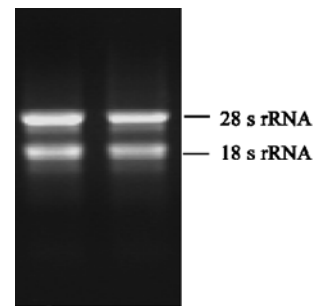


图1 红果人参叶中总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoretogram of total RNA from *P. ginseng* cv. Hongguo

2 红果人参 ds cDNA 的合成

反转录后第一链 cDNA 经过 LD-PCR 合成 ds cDNA。经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测, ds cDNA 片段条带分布在 0.2~3.0 kb (图 2)。进一步表明 RNA 质量合格, 降解量少, ds cDNA 的长片段较多, 已经符合建库要求。

3 红果人参 cDNA 的分级分离

ds cDNA 经过蛋白酶 K 消化和 *Sfi*I 酶切后, 然后在经过 Chroma SPIN-400 柱分级分离。收集片段大小不同等级的 cDNA 片段, 共收集 18 个离心管, 每管一滴。分离结束后, 每管取 3 μL 进行 1.1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳时间不要太长, 10 min 左右, 否则条带模糊, 无法辨认。电泳结果 (图 3) 表明: 1~7 管几乎没有 cDNA 片段; 从第 8 管开始出现 cDNA 弥散片段, 并且 cDNA 的片段逐渐变小; 8~11 管中的 cDNA 长片段多, 基本大

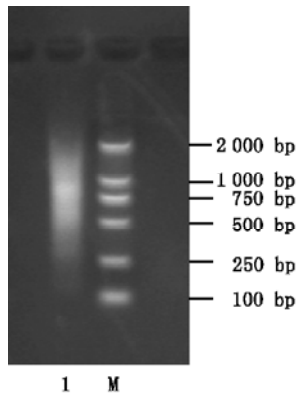


图2 红果人参叶中 ds cDNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoretogram of ds cDNA from *P. ginseng* cv. Hongguo

1 : 双链 cDNA ; M : DL2000 DNA 分子量。

于 500 bp ; 从 12 管以后开始有明显小于 500 bp 的片段, 舍去 12 管以后的 cDNA 片段, 避免过

多的小片段与载体优先连接。因此, 合并 8~11 管的 cDNA 用于连接。

4 cDNA文库的构建与文库质量的鉴定

在 3 个 cDNA 与 pDNR-LIB 载体连接反应中, 连接反应 C 效果最好, cDNA 与载体比例为 1.5:1。滴度为 1.008×10^6 pfu·mL⁻¹。对原始文库进行扩增, 扩增后的文库滴度为 2.968×10^9 pfu·mL⁻¹。

随机挑取 18 个单菌落进行 PCR 扩增鉴定, 估计文库的重组率和插入片段大小。电泳结果(图 4)显示, 插入片段大小在 0.5~2 kb, 平均长度约 0.85 kb, 没有空载体, 重组率接近 100%。

讨 论

文库的滴度、重组率及插入片段的大小是鉴定 cDNA 文库质量的指标。一般文库的滴度能达到 10^5 pfu·mL⁻¹ 以上为有效的文库(李太武等

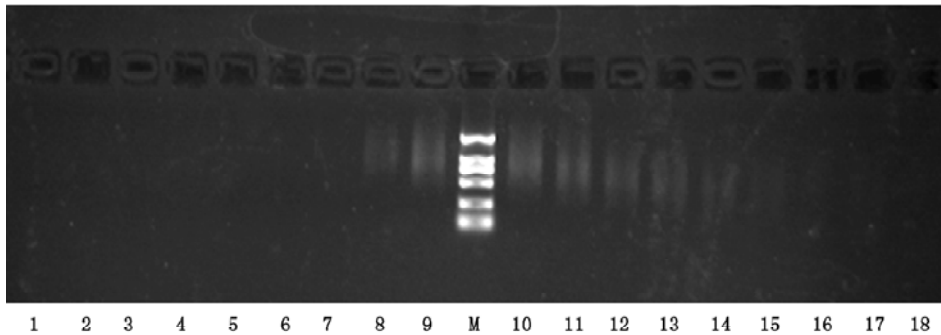


图3 红果人参叶中 ds cDNA 过柱分级分离电泳图谱

Fig.3 Agarose gel electrophoretogram of ds cDNA from *P. ginseng* cv. Hongguo after fractionation

1~18 : 过柱后的 ds cDNA ; M : DL2000 DNA 分子量。

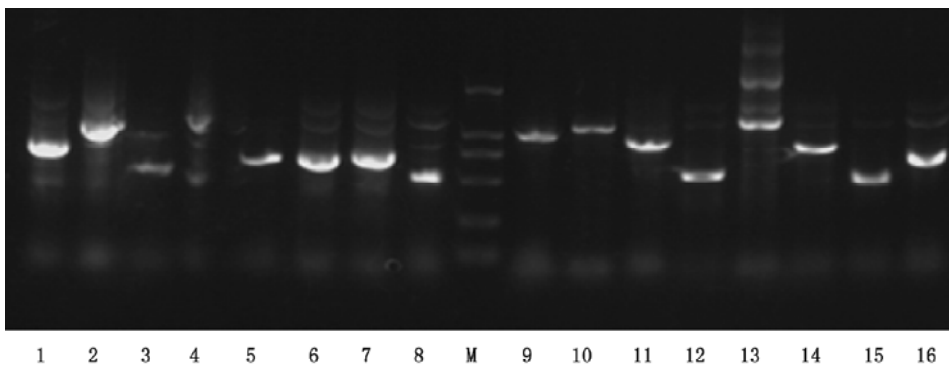


图4 红果人参 cDNA 文库插入片段的 PCR 检测

Fig.4 PCR detection of inserted size from *P. ginseng* cv. Hongguo cDNA library

1~16 : cDNA 插入片段 ; M : DL2000 DNA 分子量。

1998)。本文所获得的红果人参叶片中 cDNA 原始文库滴度为 1.008×10^6 pfu·mL⁻¹, 扩增后的文库滴度为 2.968×10^9 pfu·mL⁻¹, 文库随机抽样 PCR 检测结果表明已成功构建了人参叶片 cDNA 文库, 文库质量符合优良文库的标准(Sambrook 等 1989), 可以满足下一步的实验要求。据此认为, 用所构建的文库中筛选低丰度的目的基因在理论上是可行的。

RNA 的质量和 cDNA 的完整性和代表性是影响 cDNA 文库的重要因素。本文采用 Clontech 公司的 Creator™ SMART™ cDNA 文库构建试剂盒和 SMART 技术构建红果人参叶中 cDNA 文库。在提取高质量总 RNA 的前提下, 不经过 mRNA 的纯化过程, 直接用总 RNA 建库, 可减少 mRNA 的降解和损失, mRNA 最大限度地转化为 cDNA, 从而有效地保证 cDNA 的完整性。如果 RNA 链过长或者存在复杂的二级结构, 反转录酶往往会提前终止反转录, 不能获得足够的 cDNA 全长, 以致文库质量下降。因此, 在合成 cDNA 第一链之前应对 RNA 进行 72 2 min 的热变性处理, 并且于冰浴中 2 min 后再进行 cDNA 合成。采用 SMART 技术建库, 不需要甲基化、接头平端等烦琐操作, 建库程序简单。用 LD-PCR 对 ds cDNA 进行扩增, 低丰度的基因在文库中可以得到富集, 从而便于稀有 mRNA 的扩增和克隆, 保证文库的代表性。

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。如果小片段不能有效的去除, 会与载体优先连接, 造成插入片的平均长度过短, 则文库的应用价值降低。但过

多的筛除 cDNA 片段, 势必造成原始文库的滴度降低, 影响文库的质量。本文合并了 8~11 管的 cDNA 样品, 收到良好的效果。

文库插入片段的检测, 一般采用酶切法和 PCR 鉴定的方法(王玉成等 2004)。酶切法通过用内切酶将插入片段从载体上切下来, 电泳检测片段的大小, 这种方法需要较多的载体, 要求载体纯度高, 又费时, 优点是酶切片段直接反应插入片段的长度。PCR 鉴定法可以克服酶切法的缺点, 可一次对大量的克隆的进行鉴定, 其缺点是 PCR 产物长度略高于插入片段的长度。

参考文献

- 黄璐琳, 胡尚钦, 杨晓(2006). 药用植物生物工程研究进展 II. 分子标记、遗传转化及功能基因研究. *中草药*, 37 (5): 647~651
- 李太武, 相建海, 刘瑞玉(1998). 中国对虾 cDNA 文库的构建. *动物学报*, 44 (2): 237~238
- 王玉成, 杨传平, 刘桂丰, 姜静(2004). 紫杆柃柳 cDNA 文库构建与硫氧还蛋白基因的克隆. *分子植物育种*, 2 (5): 667~673
- Galard JP, Carriere M, Pauly N, Canut H, Chalon P, Caput D, Pont-Lezica RF (1999). Construction of two ordered cDNA libraries enriched in genes encoding plasmalemma and tonoplast proteins from a high-efficiency expression library. *Plant J*, 17 (1): 111~118
- Peterson LA, Brown MR, Carlisle AJ, Kohn EC, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Krizman DB (1998). An improved method for construction of directionally cloned cDNA libraries from microdissected cells. *Cancer Res*, 58 (23): 5326~5328
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 283~356