

文章编号: 1000- 0615(2002)01- 0538- 04

斜带石斑白细胞 cDNA 文库的构建

殷志新, 翁少萍, 叶巧真, 何建国

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 用 Tripure 试剂盒提取斜带石斑白细胞总 RNA, 反转录合成第一链 cDNA, 进行长距离 PCR, 蛋白酶 K 消化, Sfi I 酶切, 通过 CHROMASPIN- 400 柱, 回收大于 500bp 的 cDNA, 与 λ TripIEx2 载体连接, 体外包装后构建了斜带石斑白细胞的 cDNA 文库。库容 1.65×10^6 , 重组频率 82%, 扩增后滴度 7.5×10^9 pfu mL^{-1} 。插入片段长度 500~ 2300bp, 最多的是在 750~ 1000bp 范围。本文库可作为筛选斜带石斑细胞因子基因的重要资源。

关键词: 斜带石斑; 白细胞; λ TripIEx2; cDNA 文库

中图分类号: S917; Q343.1 文献标识码: A

Construction of cDNA library of *Epinephelus coioides* leukocytes

YIN Zhi-xin, WENG Shao-ping, YE Qiao-zhen, HE Jian-guo

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Total RNA of leukocytes from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* were extracted by Tripure kit. The first strand cDNA was synthesized by using MMLV reverse transcriptase. Then the cDNA were amplified by LD-PCR with SMART (四)Oligonucleotide and CDS (四)as Primers. After proteinase K digestion, Sfi I digestion, chromatography through CHROMASPIN- 400, over 500bp fragments were collected and ligated with λ TripIEx2 vector. After package in vitro, cDNA library containing 1.65×10^6 private clones was constructed, in which more than 82% clones were recombinant. After amplification, the titer of the library was 7.5×10^9 pfu mL^{-1} . The insert DNA were between 500 and 2300bp, and most of them were between 750 and 1000bp. The library can be used to screen cytokine genes of orange-spotted grouper.

Keywords: *Epinephelus coioides*; Leucocytes, λ TripIEx2, cDNA Library

构建 cDNA 文库, 随机挑选克隆, 大量测定表达序列探针(EST) 序列, 已成为筛选鉴定新基因的好方法^[1-6]。在海水鱼类方面, 通过构建和筛选 cDNA 文库, 已大大丰富了海水鱼类的基因信息。Aoki 等于 1997 年构建了弹状病毒感染的牙鲆白细胞 cDNA 文库, 筛选并克隆了 21 个与抗性或与免疫反应有关的基因, 包括干扰素调控因子(IRF)、溶菌酶、转铁蛋白、干扰素诱导的 Mx 蛋白基因^[7]。另外, 利用细菌、病毒或其它生物活性物质注射鱼后, 构建特定组织的 cDNA 文库, 与正常情况下的 cDNA 文库比较, 可筛选一些差异表达的基因。如 Yin 等 1999 年构建了 ConA 诱导及未诱导的鲤头肾 cDNA 文库, 筛选

收稿日期: 2001- 08- 02

作者简介: 殷志新(1970-), 男, 河北武邑人, 讲师, 动物学专业博士研究生。

通讯作者: 何建国(1962-), 男, 广东南海人, 教授。主要从事水生经济动物病害控制的研究。Tel: 020- 84110976; E-mail: lsbr05@

了一些 ConA 诱导后差异表达的基因^[8]。斜带石斑是重要的海水养殖品种,有必要对其进行深入的免疫学和分子生物学研究。

1 材料与方法

1.1 材料

健康斜带石斑(*Epinephelus coioides*)重约 0.5kg,取于广东大亚湾水产试验中心。Ficol-Paque PLUS 淋巴细胞分离液和 Poly I C 购自 Amersham Pharmacia 公司。总 RNA 提取试剂盒 Tripure 购自 Roche Diagnostics 公司。SMART cDNA 文库构建试剂盒和 Advantage2 cDNA PCR 试剂盒购自 Clontech 公司。MMLV 反转录酶购自 Gibco BRL 公司。包装蛋白购自 Epicentre Technologies 公司。扩增插入子所用上游引物 5'-CTC GGG AAG CGC GCC ATT GTG TTG GT-3'、下游引物 5'-ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT GGC C-3' 由上海基康生物技术公司合成。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

斜带石斑鱼经腹腔注射 Poly I C 0.4mL,浓度为 $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。72 小时后从尾静脉抽血,抗凝后用淋巴细胞分离液分离白细胞层。取 3.7×10^7 细胞,加入 4mL Tripure 提取液,按 Tripure 说明书进行提取。纯化后测 260nm 及 280nm 吸光度及电泳,鉴定总 RNA 的浓度和纯度等。

1.2.2 合成 ds cDNA

cDNA 合成参考 Clontech 试剂盒的用户手册,合成 ds cDNA 时 PCR 的循环次数 30 次。取 5 μL PCR 产物于 1.1% 琼脂糖/溴化乙锭胶上电泳检查。

1.2.3 cDNA 文库的建立

取 50 μL ds cDNA 进行蛋白酶 K 消化, SfiI 酶切,通过 Chromaspin 400 柱,收集大于 500bp 的 cDNA。将此 cDNA 按不同的比例与同样 SfiI 酶切的 λ TriplEx2 载体连接,用噬菌体的包装蛋白进行体外包装。包装反应参考 Epicentre 公司的用户手册。

1.2.4 cDNA 文库滴度的测定

按 Clontech 公司 SMART cDNA 文库构建试剂盒说明书进行。

1.2.5 重组子的百分比

在含有 IPTG 和 X-gal 的培养基上用蓝白斑辨别。

1.2.6 文库的扩增及扩增文库的滴度测定

按常规方法扩增文库,并将扩增后的文库于 -70°C 下保存。取扩增文库 1 μL ,用 λ 噬菌体稀释液 10^6 倍稀释,再从中分别取 5 μL , 10 μL , 20 μL 和 200 μL 按方法 1.2.4 测其滴度。

1.2.7 cDNA 文库质量检测

取扩增后文库 0.5 μL 做为模板,用载体两端已知序列做引物,用 Advantage cDNA PCR 试剂盒进行 PCR,鉴定插入子大小所在的范围。PCR 结束后取 5 μL 进行琼脂糖凝胶/溴化乙锭电泳。

PCR 反应混合液: $10\times$ PCR 缓冲液 5 μL , 上游下游引物(每种 10 μM) 2 μL , $4\times$ dNTP 混合液(每种 10mM) 1 μL , cDNA 聚合酶混合物 1 μL , 水 40.5 μL 。

PCR 循环参数: 94°C , 10min; 30 次循环: 94°C , 30s; 68°C , 3min。

从测文库滴度的平板上随意挑取 8 个噬菌斑,分别接种于 200 μL λ 噬菌体稀释液;从中取 0.5 μL 做为模板,同上条件进行 PCR,并取产物进行电泳。

2 结果与讨论

2.1 结果

将提取的总 RNA 于 1.1% 琼脂糖/溴化乙锭胶中电泳(图 1)。两条 rRNA 的特征谱带清晰,亮度比

接近 1:2, 说明 RNA 完整, 没有降解。用分光光度计测得 $OD_{260nm}/OD_{280nm} \approx 1.82$, 说明 RNA 样品比较纯。将合成的 ds cDNA 于 1.1% 琼脂糖/溴化乙锭胶中电泳(图 2)。cDNA 的大小在 0.5~4kb 之间。包装产物感染受体菌 XL1-Blue 铺板计数, 三个连接反应的包装产物(每个 280 μ L)取 0.1 μ L 产生的噬斑数分别为 266, 187, 135 个。则三个包装反应产物所含的独立克隆数分别为 7.45×10^5 个, 5.24×10^5 个和 3.78×10^5 个。将三者混合, 总的独立克隆数为 1.65×10^6 个。

在上述的三个平板上加有 IPTG 和 X-gal, 分别得到的蓝斑数为 50, 31, 22 个, 计算重组率为 82%。扩增后文库滴度为 7.5×10^9 pfu \cdot mL⁻¹。用载体上已知序列为引物, 总的文库做为模板, 进行 PCR, 电泳检查(图 3), 插入子的范围在 0.5~2.3kb 之间。随意挑取的 8 个噬斑经 PCR 后, 电泳检查插入子的大小(图 4), 其中 1, 2, 3, 6 号插入子在 500~750bp 间, 4, 7, 8 号在 1000~2000bp 间, 5 号超过 2000bp。



图 1 斜带石斑白细胞总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 Total RNA of leukocytes from orange-spotted grouper on 1.1% agarose

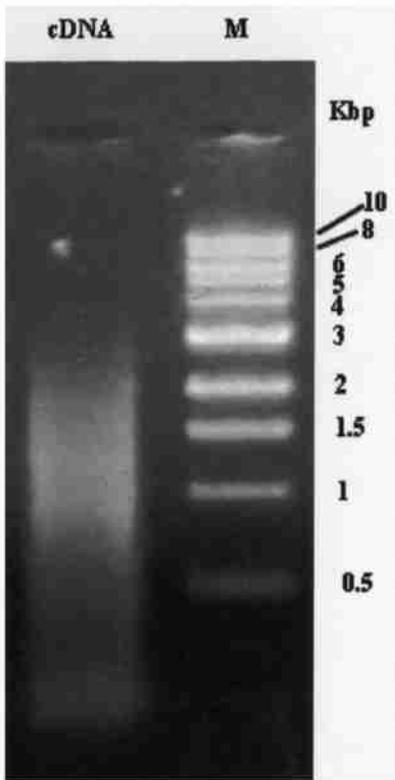


图 2 斜带石斑白细胞 cDNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 1% agarose gel electrophoresis of cDNA from leukocytes of orange-spotted grouper
M: 1kb marker

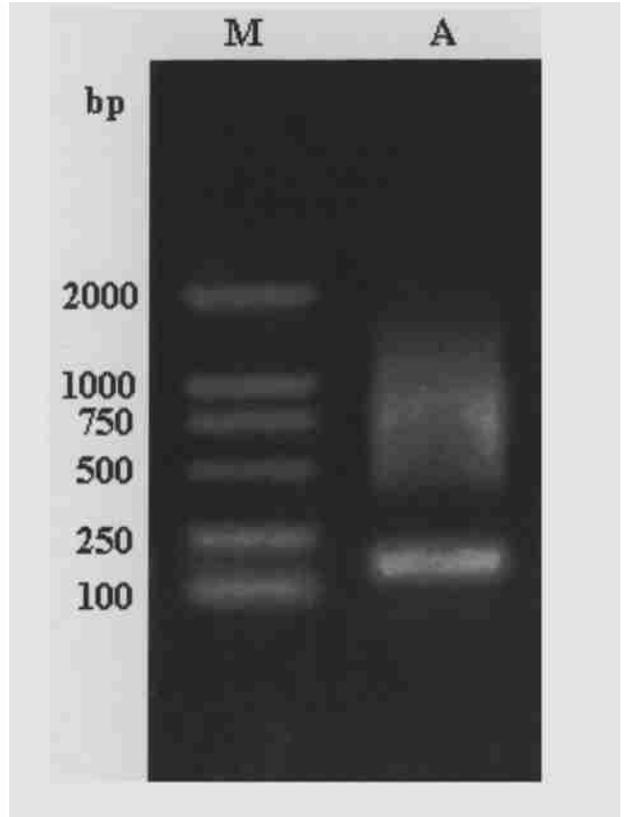


图 3 PCR 检测 cDNA 文库插入子范围的凝胶电泳

Fig. 3 1% agarose gel electrophoresis of PCR inset screening of cDNA library M: DL2000 marker A: PCR product of cDNA library

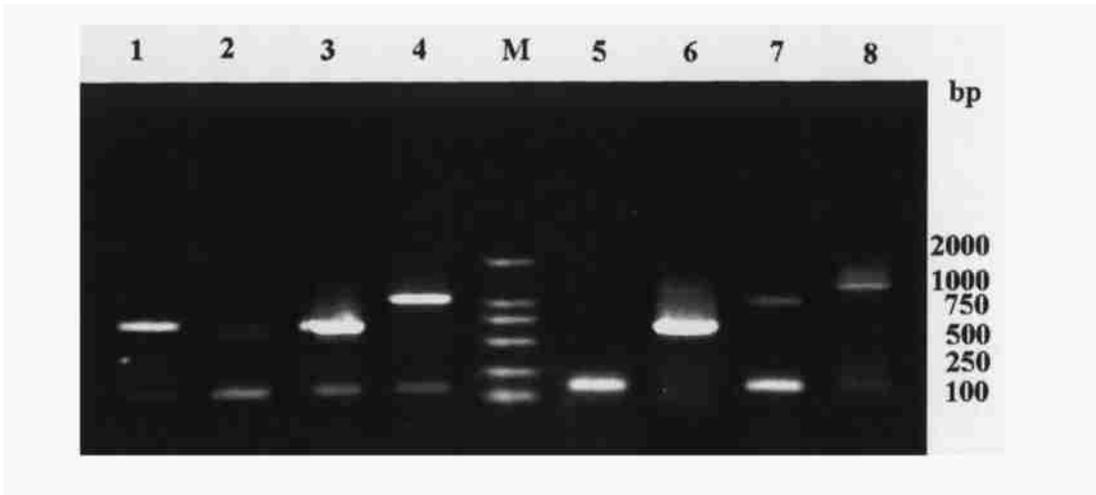


图4 文库中随意挑选的克隆 cDNA 插入片段的 PCR 产物电泳

Fig. 4 1% agarose gel electrophoresis of PCR product of cDNA clones picked from cDNA library

M: 2000DL marker 1- 8: PCR product

2.2 讨论

在 cDNA 文库的构建中,利用 SMART 技术可以合成全长的具有完整 5' 端的 cDNA 第一条链。用常规方法进行反转录,当用 Oligo(dT) 作为引物引导较长 mRNA 的反转录,或 mRNA 的二级结构较多时,反转录酶会提前终止反转录。在使用自身引导法或置换合成法合成第二条链时,对应于 mRNA 5' 端的信息会丢失。这些因素使得我们无法获得全长 cDNA。利用 SMART 寡核苷酸在反转录中作为 mRNA 5' 端延伸出的模板合成对应的一段序列,再用 5' PCR Primer 和 CDS 3' PCR Primer 进行引物延伸,就能合成完整的双链 cDNA。由于引导第二链合成的效率有所提高,故可产生含有相对高比率的全长 cDNA 分子的文库。也省略了合成接头的连接、甲基化等操作步骤。

我国的海水养殖业已取得举世瞩目的成就,产量跃居世界第一,但也存在不少问题。种苗、病害和养殖环境三大问题已成为制约因素。培育优良品种和研制保护性能好的疫苗已成为重要的课题。这就要求对养殖种类进行深入的免疫学和分子生物学的研究。石斑鱼的人工育苗和成鱼养殖经济效益十分明显,具有广阔的市场前景。作者构建的斜带石斑的白细胞的 cDNA 文库,经测定,插入序列在 500~2300 bp 之间,为研究其细胞因子特别是干扰素相关因子提供了良好的资源。

参考文献:

- [1] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and the human genome project[J]. Science, 1991, 252: 1651- 1656.
- [2] Adams M D, Kerlavage A R, Fields C, et al. 3400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain[J]. Nature Genetics, 1993, 4: 256- 267.
- [3] Adams M D, Soares M B, Kerlavage A R, et al. Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library[J]. Nature Genetics, 1993, 4: 373- 380.
- [4] Davies R W, Roberts A B, Morris A J, et al. A enhanced access to rare brain cDNAs by prescreening libraries: 207 new mouse brain ESTs[J]. Genomics, 1994, 24: 456- 463.
- [5] Hwang D M, Fung Y W, Wang R X, et al. Analysis of expressed sequence tags from a fetal human heart cDNA library[J]. Genomics, 1995, 30: 293- 298.
- [6] Wolfsberg T G, Landsman D A. A comparison of expressed sequence tags (ESTs) to human genomic sequences[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 1626- 1632.
- [7] Nam B H, Yamamoto E, Hirono I, et al. A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with Hirame rhabdovirus[J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24: 13- 24.
- [8] Yin Z, He J Y, Gong Z, et al. Identification of differentially expressed genes in Con A-activated carp (*Cyprinus carpio* L.) leukocytes[J]. Comp Biochem Physiol(B), 1999, 124(1): 41- 50.