

文章编号:1000 - 0615(2004)05 - 0585 - 04

研究简报 ·

正常鲤外周血白细胞 cDNA 文库的构建

卢 强, 丰培金, 李莲瑞, 付宝权, 刘明远

(中国人民解放军军需大学动物科技系, 吉林 长春 130062)

关键词:鲤;外周血白细胞;cDNA 文库

中图分类号:S917

文献标识码:A

Construction of cDNA library of peripheral blood leucocytes in normal *Cyprinus carpio* L.

LU Qiang, FENG Pei-jin, LI Lian-rui, FU Bao-quan, LIU Ming-yuan

(Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Quaternary University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: Leukocytes are key cells for the specific and nonspecific immune systems, it expresses different kinds of biodefense-related peptides and proteins including specific and nonspecific antimicrobial agents, and activators and regulators of the immune system. However, we know very little about the cellular interactions that initiate and control the adaptive immune response in fish. In order to clone and study immune-related and biodefense-related genes in carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocytes, the cDNA library of carp leucocytes was constructed. First, the carp leucocytes were isolated from the peripheral blood of normal carp, total RNA of leucocytes was extracted and from 2×10^8 leucocytes cells, and the output was 216 μ g, ODA260/280 > 1.8, mRNA was isolated with a column of oligo (dT) cellulose. Second, single-strand cDNA and double-strand cDNA were synthesized from 5 μ g mRNA using Stratagene HybriZAP-2.1 XR cDNA synthesis kit, then ligated to EcoR I adapters, size fractionating with CHROMA Spin-400 column. Finally cDNA were ligated into HybriZAP-2.1 vector and packaged *in vitro*. The obtained carp leucocyte cDNA library contains 5.79×10^6 recombinants, the percentage of vectors with inserts was 99.4% and the average inserts size were between 0.4×10^3 - 3.0×10^3 bp. After amplification, the titer of amplified library was 4.22×10^9 pfu mL^{-1} . This normal carp leucocytes cDNA library gives an ideal basis for further study of carp immune system.

Key words: *Cyprinus carpio* L.; peripheral blood leucocytes; cDNA library

随着水产养殖业的发展,与鱼病防治紧密相关的鱼类免疫机制的研究越来越显示出其重要的理论与应用价值。鱼类的免疫系统虽不及哺乳动物发达,但其外周血白细胞已具有类似 T、B 淋巴细胞的分类,是机体体液免疫和细

胞免疫的重要组成部分^[1,2],但目前人们对鱼类免疫应答调控的机制还不甚清楚,相关的白细胞免疫应答分子研究也不够深入^[2]。cDNA 文库包含了特定组织在某一时期表达的完整 mRNA 信息,是克隆相关基因并研究其生物

收稿日期:2003-07-03

资助项目:国家自然科学基金资助项目(30200210)

作者简介:卢 强(1970-),男,甘肃景泰人,博士,副教授,主要从事动物微生物学与免疫学研究。Tel: 0431 - 7998047, E-mail:

lw2512@163.com

学特性的基础。为深入研究鱼类免疫应答相关基因及其调控机制,我们利用 HybriZAP-2.1 载体成功地构建了正常鲤外周血白细胞 cDNA 文库。

1 材料与方法

1.1 试剂、试剂盒

肝素钠为 Sigma 公司产品, RPMI1640 培养液为 GIBCO BRL 公司产品, TRIZOL Reagent 为 Invitrogen 公司产品, mRNA 的分离、cDNA 合成和文库构建试剂盒购自 Stratagene 公司, CHROMA SPIN-400 柱购自 Clontech 公司。

1.2 鲤外周血白细胞的分离

体重为 500 ~ 750g 的鲤 (*Cyprinus carpio* L.), 在水温 25 的水族箱内充气饲养, 水体体积为 100L, 按正常饲养条件进行饲养。观察 7d, 证实无病后, 从尾动脉中采取外周血, 加肝素抗凝, 用等体积的 RPMI1640 培养液稀释后, 以 2:1 体积用移液器沿管壁缓缓的叠加到淋巴细胞分离液界面上, 分离液的比重调整为 1.085, 以 500g 离心 25min, 用微量移液器小心吸取中间白膜状细胞层, 然后加入 5 倍体积的 RPMI1640 培养液重悬洗涤, 再以 500g 离心 10 min, 收集细胞沉淀, 将其重悬于适量 RPMI1640 中, 用血球计数板进行计数。

1.3 总 RNA 的提取与 mRNA 的分离

利用试剂盒提取鲤外周血白细胞总 RNA, 所用白细胞数量为 2×10^8 , 具体方法按 TRIZOL Reagent 说明书操作。分离纯化 mRNA 按 Stratagene 公司的 Poly(A) Quik mRNA Isolation Kit 说明书进行。用 1% 的琼脂糖凝胶, 以 DEPC 水配制的 TAE 为缓冲液电泳检测所得 RNA 的纯度和含量^[3]。

1.4 cDNA 的合成与分级纯化

cDNA 的合成按 Stratagene 公司提供的 HybriZAP-2.1 XR cDNA Synthesis Kit 说明书进行。双链 cDNA 合成处理后, 用 CHROMA SPIN-400 柱离心层析, 除去已消化的接头碎片和小片段的 cDNA 分子。

1.5 cDNA 与载体的连接与包装

将 100ng cDNA 与 1 μ g HybriZAP-2.1 载体在 12 过夜连接, 反应总体积为 5 μ L, 然后从 -70 取出 1 份 Gigapack III Gold 包装抽提物, 混合后, 在 22 包装 2h, 5 μ L 连接反应采用 2 份包装抽提物分 2 次包装, 每份加入 0.5mL SM buffer 和 20 μ L 氯仿, 混匀后快速离心 30s, 将上清液移至新管。取 1 μ L 作梯度稀释后, 与 200 μ L 的 *E. coli* XL1-Blue MRF cell (OD₆₀₀ = 0.5) 在 37 孵育 15min, 然后将其铺在 NZY 平板上, 测定文库的容量。

1.6 cDNA 文库的鉴定与扩增

HybriZAP-2.1 载体不能通过蓝白斑筛选鉴定重组率, 以试剂盒说明书提供的 5'AD 和 3'AD 序列为引物, 通过 PCR 扩增单个噬菌斑检测插入外源 cDNA 片段的大小, 并确定重组率。扩增片段 > 237bp 说明有外源片段插入, 从

原始包装物滴度测定平板上随机挑取 456 个噬菌斑进行 PCR 扩增。原始文库的扩增、保存和滴度测定按说明书进行。

1.7 HybriZAP-2.1 噬菌体文库的体外大量切割

利用 Exassist Helper phage 对 cDNA 文库重组噬菌体进行体外切割, 将切割后形成的 phagemid 转染 *E. coli* XL0LR 菌扩增, 形成 pAD-GAL4-2.1 质粒文库, 具体操作按说明书进行。碱变性法抽提质粒 DNA^[3]。

2 结果

2.1 鲤外周血白细胞的分离

通过调整淋巴细胞分离液的比重, 实验获得高纯度的鲤外周血白细胞, 能够满足文库构建的需要, 经血球计数板计数, 用于总 RNA 提取的细胞数为 2×10^8 。

2.2 鲤外周血白细胞总 RNA 的提取和 mRNA 的分离

总 RNA 产量为 216 μ g, 吸光度 A_{260/280} > 1.8, 表明所提 RNA 未有降解, 纯度高。图 1 为电泳图, 可看到清晰的 28s、18s、和 5s 条带。分离纯化的 mRNA 的产量为 6.75 μ g, 收率为 3.12%, 其吸光度 A_{260/280} > 1.85, 图 2 为 mRNA 电泳结果, 用于 cDNA 合成的 mRNA 为 5 μ g。

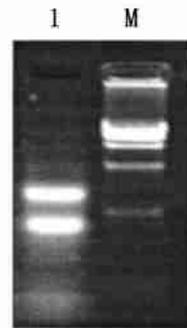


图 1 总 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA isolated

from the normal carp PBL

I: 总 RNA; M: DL15000 分子量标准

Lane 1: total RNAs; M: DL15000 marker

2.3 cDNA 文库的质量鉴定

经不同稀释度包装物转染 *E. coli* XL1-Blue MRF cell, 进行滴度测定, 计算噬斑数, 按公式库容量 = 噬斑数 \times 稀释倍数 \times 包装反应总体积, 计算文库容量为 5.79×10^6 个重组子, 经 PCR 鉴定 cDNA 插入片段大小介于 $0.4 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^3$ bp, 图 3 为部分 PCR 实验的结果, 312 个克隆插入片段统计结果见表 1, 以 PCR 扩增片段 < 237bp 为空载体计算文库重组率为 99.4%。经扩增后文库滴度为 4.22×10^9 pfu. mL⁻¹。

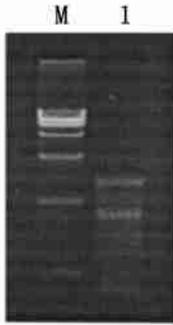


图 2 mRNA 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of isolated mRNA

M:DL15000 分子量标准;1:mRNA

M:DL15000 marker; Lane 1:mRNA isolated

2.4 HybriZAP-2.1 噬菌体文库的体外大量切割

取扩增文库 85 μ L 进行体外切割,约含 3.6×10^8 个重组子,切割后 phagemid 量为 2.0×10^8 ,切割效率为 79.4%。经抽提质粒获得质粒 DNA 约 1.5mg。

3 讨论

获得足够数量、纯度高的鱼类白细胞是鱼类免疫研究的基本条件,国外学者^[4,5]在上世纪 80 年代就开始从事鱼类淋巴细胞的分离研究,本实验研究显示比重为 1.085 淋巴细胞分离液可有效地分离鱼类外周血白细胞。对分离层中的细胞进行镜检,发现淋巴细胞约占 75%~95%,另有 5%~25%为单核细胞,这与有关报道相一致^[6]。镜检白细胞纯度高,血球计数板计数结果白细胞密度也能够满足 cDNA 文库构建的需要。

表 1 cDNA 插入片段大小与重组率统计结果

Tab. 1 Percentage of vectors with various size cDNA inserts

片段大小 size of inserts	>2kb	1~2kb	0.75~1kb	0.5~0.75kb	0.25~0.5kb	<0.25kb
克隆数量 number of clones	72	170	46	21	1	2
百分率 (%) percentage	23.07	54.5	14.7	6.73	0.32	0.64



图 3 PCR 鉴定文库插入片段大小和重组率图谱,1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 PCR analysis of the size of cDNA inserts and the percentage of vectors with inserts

1:DL2000 分子量标准;2-24:分别为随机挑选原始文库的不同单个噬菌斑 PCR 扩增结果

Lane 1:DL2000 marker; Lane 2-24:various clones picked randomly from the primary cDNA library

采用分子克隆技术,构建 cDNA 文库,然后用适当的方法从中筛选目的基因,是获取新基因的重要手段,cDNA 文库也是分离已知基因和揭示一些特定因素对基因表达影响的基础。目前,鱼类分子免疫学研究相对薄弱,也是国内外相关领域的研究热点,国外已有鱼类外周血白细胞 cDNA 文库^[7,8]、头肾白细胞和巨噬细胞 cDNA 文库^[9,10]构建和一些细胞因子基因、抗原受体基因、及一些鱼类补体基因筛选和克隆的报道,但不够系统,国内尚未见鱼类白细胞 cDNA 文库构建的报道。为探讨鱼类免疫的信号传导、分子免疫机制,我们以国内重要的淡水养殖鱼类鲤为研究对象,构建了其外周血白细胞 cDNA 文库。一般来

说,原始文库的库容量大于 10^6 数量级基本可以包含该组织表达的完整 mRNA 信息,我们构建的鲤外周血白细胞 cDNA 文库库容量为 5.79×10^6 ,经鉴定其重组率 99.4%,插入片段大小也非常理想,说明得到的文库是高质量的,完全可以用于下一步的研究。

在 cDNA 文库构建中,载体的选择有多种,噬菌体载体是公认的文库构建经典载体,有着其它载体无可比拟的优点。随着分子克隆技术的不断发展,适应不同目的的商品化的噬菌体载体层出不穷,HybriZAP-2.1 噬菌体载体是 Stratagene 公司的产品,它可以利用酵母双杂交技术筛选与特定蛋白相互作用的蛋白分子,通过筛选体外大量切割

后的质粒文库,可以得到编码该蛋白分子的 cDNA 克隆。本实验获得的 HybriZAP2.1 噬菌体 cDNA 文库和切割后的 pAD-GAL4-2.1 质粒文库为下一步筛选鱼类免疫应答相关基因和研究免疫应答的信号传递奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Li YN, Chen QZ, Shao JZ, *et al.* Advances in research of fish immunology[J]. *Zoological Research*, 1995,16(1):83 - 94. [李亚南, 陈全震, 邵健忠, 等. 鱼类免疫学研究进展[J]. 动物学研究, 1995,16(1):83 - 94.]
- [2] Chen HQ, Lu CP. Characteristic of fish immunology by the view of comparative immunology[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1994,29(4):56 - 60. [陈怀青, 陆承平. 从比较免疫学看鱼类的免疫特性[J]. 动物学杂志, 1994,29(4):56 - 60.]
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual* 2nd ed[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 116 - 122.
- [4] Chen Q Z, Li Y N, Shao J Z, *et al.* The separation of lymphocyte from peripheral blood of fish[J]. *J Fish Sci China*, 1999, 6(4): 10 - 12. [陈全震, 李亚南, 邵健忠, 等. 鱼类外周血淋巴细胞的分离技术[J]. 中国水产科学, 1999,6(4):10 - 12.]
- [5] Sakai D K. Separation of lymphocytes from the peripheral blood of rainbow trout goldfish[J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1981, 47(10): 1281 - 1288.
- [6] Blaxhall P C. The separation and cultivation of fish lymphocytes [J]. *Fish Immunology*, 1985, 245 - 260.
- [7] Ikuo Hirono, Bor-Hye Nam, Tomofumi Kurobe, *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 4423 - 4427.
- [8] Lee E Y, Park H H, Kim Y T, *et al.* Cloning and sequence analysis of the interleukin - 8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Gene*, 2001, 274(1 - 2): 237 - 243.
- [9] Saeij J P, Stet R J, Groeneveld A, *et al.* Molecular and functional characterization of a fish inducible-type nitric oxide synthase[J]. *Immunogenetics*, 2000, 51(4 - 5): 339 - 346.
- [10] Yin Z, He J Y, Gong Z, *et al.* Identification of differentially expressed genes in Con A-activated carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocytes[J]. *Comp Biochem Physiol & Biochem Mol Biol*, 1999,124(1): 41 - 50.