

蒋 晶,肖熙鸥,曹必好,等. 茄子青枯病诱导的 cDNA 文库构建与鉴定[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):22-24.

茄子青枯病诱导的 cDNA 文库构建与鉴定

蒋 晶,肖熙鸥,曹必好,雷建军,陈清华

(华南农业大学园艺学院,广东广州 510642)

摘要:以茄子抗青枯病自交系 E-31 为材料,在 4 叶期接种青枯病菌,48 h 后采集叶片提取 RNA,利用 Gateway 技术构建茄子 uncut 型 cDNA 文库。经检测,本研究获得的茄子叶片 cDNA 文库滴度达到 0.01 亿 CFU/mL,总库容量为 0.15 亿 CFU,平均插入片段长度在 1.2 kb 以上,重组率为 100%。说明构建的文库能达到所需要的标准,可用于分离茄子的功能基因。

关键词:uncut 型 cDNA 文库;Gateway 技术;茄子;青枯病

中图分类号:S641.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)04-0022-03

茄子(*Solanum melongena* L.)是一种在亚洲、地中海、中欧及东南欧地区广泛栽培的蔬菜作物^[1]。在高温高湿的季节,茄子易受青枯病害的侵袭,发病严重时可能造成产量和品质的大幅下降,已成为影响茄子高产的主要因素^[2]。目前,有关茄子抗青枯病的分子育种进展缓慢,茄子对青枯病的抗性分子机制仍然不清楚,若要解析这些机理,必须分离出相关抗性基因以及互作基因,并对它们进行功能鉴定,这对开展持久、广谱的茄子抗病分子育种具有重要的意义^[3]。构建一个完整的 cDNA 文库是开展分子生物学研究的基础,也是克隆新基因和研究基因功能的有效策略之一^[4-6]。未剪切 cDNA 文库构建的基本原理是采用 Invitrogen 专利的 Gateway 位点特异性重组技术,将 mRNA 转变成两头带有 *attB* 重组位点的双链 cDNA,通过定点重组,cDNA 被定向克隆到 Gateway 的供体载体,从而产生初级文库,该初级文库可以通过和各种 Gateway 目的载体进行 Gateway LR 重组,构建成为不同的表达文库^[7-9]。未剪切 cDNA 文库的全长比例和库容量等均优于标准 cDNA 文库。目前有关茄子 cDNA 文库的构建报道不多,本研究应用 Gateway 技术构建高质量的茄子未剪切型 cDNA 文库,旨在为未来分离有用的功能基因打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 本试验材料为茄子高抗自交系 E-31,由华南农业大学曹必好教授提供。

1.1.2 试剂 pDONR222,CloneMiner II cDNA Library Construction Ki, TRIzol Reagent, FastTrack MAG mRNA isolation

Kit, SuperScript III, Platinum Taq DNA Polymerase 均购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 青枯病接种 青枯病菌为生理小种 1,从田间发病植株中分离得到。青枯病菌在斜面培养基上培养,培养基为肉汁胨培养基(基本培养基成分:牛肉浸膏 3 g、蛋白胨 5~10 g、蔗糖 10 g、琼脂 17~20 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 值 7.0),在恒温 30 ℃ 下增殖培养 24 h。分离时在基本培养基上加入 0.05% 氯化三苯四氮唑(TZC),挑起白色流动性强菌落,在未加琼脂的上述培养基上进行培养。将增殖培养的病原菌菌液加无菌水稀释。用紫外分光光度计在波长 650 nm 处测定病菌浓度,将菌液浓度调制成 1 亿 CFU/mL 悬浊液。在幼苗为 4 叶期时,采用伤根-蘸根法人工接种,菌液浓度为 1 亿 CFU/mL 浸根,时间为 20 min。把幼苗定植于营养钵中,放入恒温培养箱中 30 ℃ 培养 48 h,采集叶片提取 RNA。

1.2.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离 取 1 g 组织样品,采利用 Trizol 提取样品的总 RNA。取 500 μg 提取的总 RNA,冰上融化放置,加 DEPC 水置总体积 500 μL,参照 FastTrack® MAG mRNA isolation Kit 说明书进行 mRNA 的分离纯化。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 及 mRNA 的纯度和质量。

1.2.3 cDNA 的合成 (1) cDNA 第一链的合成参照 CloneMiner 说明书进行。将 2 μg mRNA 溶于 10 μL DEPC 水中,加入 biotin-*attB2*-Oligo(dT) Primer (30 pmol) 1 μL 混匀,65 ℃ 5 min,降温到 45 ℃ 孵育 2 min,加入 5 × First Strand Buffer 4 μL,0.1 mol/L DTT 2 μL,dNTPs (10 mmol/L) 1 μL,45 ℃ 孵育 2 min;最后加入 200 U/μL SuperScript II RT 2 μL 混匀,置于 PCR 仪上反应 45 ℃ 20 min、50 ℃ 20 min、55 ℃ 20 min。(2) cDNA 第二链的合成。在上述溶液中加入 DEPC 水 91 μL,5 × Second Strand Buffer 30 μL,dNTPs (10 mmol/L) 3 μL,大肠杆菌 DNA Ligase (10 U/μL) 1 μL,大肠杆菌 DNA Polymerase I (10 U/μL) 4 μL 大肠杆菌 RNaseH (2 U/μL) 1 μL 混匀,16 ℃ 条件下反应 2 h;最后加入 T₄ DNA Polymerase 2 μL,16 ℃,反应 5 min。将获得的双链 cDNA 纯化,溶解于 DEPC 水中。

1.2.4 cDNA 与 *attB1* 重组接头连接 将下列组分加入到 6 μL 双链 cDNA 中,使得 cDNA 双链加入 *attB1* 接头:

收稿日期:2013-08-31

基金项目:国家自然科学基金(编号:30972005);广东省自然科学基金(编号:9151064201000063);广东省自然科学基金研究团队项目(编号:S2011030001410);广东省教育厅华南园艺作物种质资源利用与改良重点实验室项目(编号:KBL11008)。

作者简介:蒋 晶(1990—),女,湖南宁乡人,硕士研究生,主要从事茄子抗青枯病基因功能鉴定。E-mail:92157135@qq.com。

通信作者:曹必好,教授。Tel:(020)85280228;E-mail:caobh01@163.com。

5 × Adapter Buffer 10 μL, attB1 Adapter (1 μg/μL) 10 μL, 0.1 mol/L DTT 7 μL, T₄ DNA Ligase (1 U/μL) 5 μL, DEPC 水 12 μL 混匀后 16 °C 保温 20 h。

1.2.5 BP 重组反应及文库的构建 取 cDNA 13 μL 于 20 μL 反应体系 [pDONR222 (250 ng/μL) 2 μL, BP Clonase® II enzyme mix 5 μL] 混匀后置于 25 °C 下反应 20 h, 进行 BP 重组。利用电转化法将重组质粒转入大肠杆菌 DH10B 中。将转化的大肠杆菌置于 37 °C、225 ~ 250 r/min 摇床上培养 1 h, 加入甘油至终浓度 20% 存于 -80 °C, 即得文库菌液。

1.2.6 cDNA 文库质量鉴定

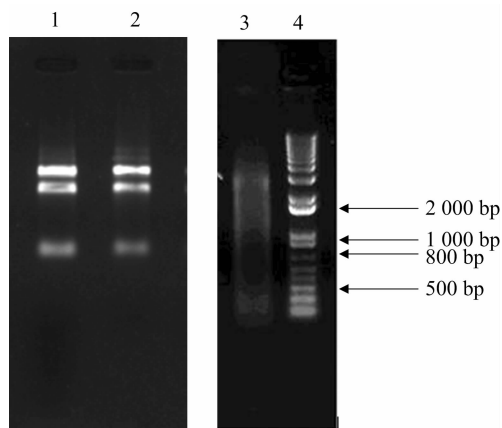
1.2.6.1 库容量的鉴定 取转化后细菌原液 10 μL 稀释 1 000 倍后, 从中取出 50 μL 涂布 LB 平板 (卡那霉素, 工作浓度是 50 μg/mL) 上, 第 2 天计数。文库菌液的单位菌落数 (CFU/mL) = 平板上的克隆数/50 μL × 1 000 倍 × 1 000 μL, 文库总菌落数 (CFU) = 文库菌液的单位菌落数 (CFU/mL) × 文库菌液总体积 (mL)。

1.2.6.2 重组率和插入片段长度鉴定 随机挑取 24 个克隆进行菌落 PCR 鉴定, 在 Microtube 中配制总体积为 20 μL 的反应液 [ddH₂O 16.2 μL, 10 × PCR Buffer 2.0 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL, M13F (20 μmol/L) 0.5 μL, M13R (20 μmol/L) 0.5 μL, DNA Polymerase (5 U/μL) 0.3 μL], 放置在 Thermal Cycler PCR 仪上进行 PCR 反应, 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 保温 5 min。扩增结束后, 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。M13F: TGTAACACGACGGCAGT; M13R: CAGGAACAGCTATGACC。

2 结果与分析

2.1 RNA 及 mRNA 质量

提取的总 RNA 在琼脂糖凝胶上进行电泳, 从电泳结果中可看到 28S、18S、5S 等 3 条清晰的电泳条带 (图 1), 28S 与 18S 的亮度比接近 2 : 1, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 及 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 的值在 1.9 ~ 2.0 之间, 表明该样品总 RNA 基本上没有降解, 完整性良好, 无蛋白质和多糖的污染, 可以作为起始样品用于文库构建。mRNA 电泳结果为一片模糊的拖带 (图 1), 这是由于 mRNA 的长度不一所造成的, 且拖带最亮部分的范围在较大



1~2—总RNA; 3—mRNA; 4—marker

图1 总RNA与mRNA凝胶电泳结果

的分子量范围内 (大于 500 bp), 由此可以认定 mRNA 未出现降解, 完整性较好。

2.2 文库质量鉴定

2.2.1 总克隆数 CFU 的鉴定 LB 平板 37 °C 过夜培养, 在平板上长出 75 个单一克隆 (图 2)。根据公式得到其单位菌落数 (平板稀释度 1 : 1 000) = 75/50 μL × 1 000 × 1 000 = 0.015 亿 CFU/mL, 文库总库容量 = 0.015 亿 CFU/mL × 10 mL = 0.15 亿 CFU。

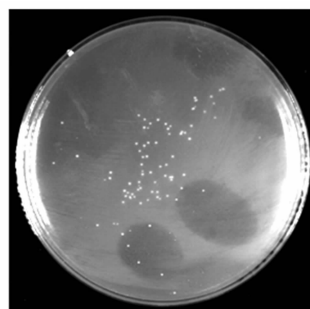
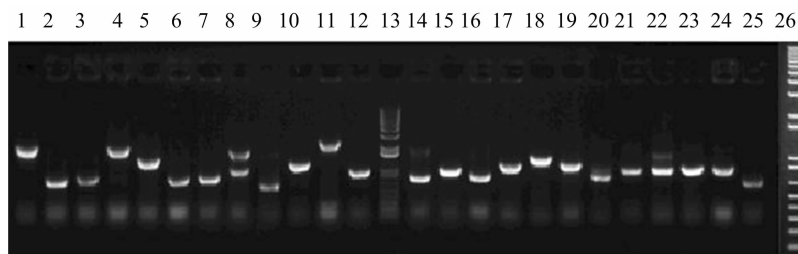


图2 平板鉴定库容量图示

2.2.2 插入片段大小及重组率鉴定 随机挑取的 24 个克隆 PCR 产物经凝胶电泳检测, 平均插入片段长度在 1.2 kb 以上, 重组率为 100% (图 3)。



13, 26—marker; 1~12、14~25—随机挑取的克隆PCR产物

图3 插入片段重组率鉴定图示

按照 CloneMiner cDNA Library Construction Kit 的要求, 一个高质量文库的滴度应大于 0.01 亿 CFU/mL, 文库总容量大于 500 万 CFU, 阳性克隆率大于 95%, 平均插入片段大于或等于 1.5 kb。由此可见, 本研究构建的茄子叶片 cDNA 文库是一个质量较高的文库。

3 结论与讨论

植物组织中的 RNA 含量较低, 且离体植物组织的 RNA 降解速度很快。RNA 提取是分子生物学的基本技术之一, 其困难首先是 RNA 非常容易降解而 RNase 又无处不在, 并且非

常稳定;其次是组织中的次生物质如酚类、多糖等也会影响 RNA 的质量^[10-11]。

在本试验中 cDNA 的分级分离是一个不可忽视的环节。用凝胶柱除去已消化的接头碎片和小片段的 cDNA 分子,收集片段大小合适的 cDNA 样品。这样保证了文库中 cDNA 具有较大的分子,对筛选有重要意义,可明显减少后期筛选的工作量。

未剪切 cDNA 文库构建的基本原理是采用 Invitrogen 专利的 Gateway 位点特异性重组技术,其优点在于无需使用限制性内切酶和连接酶,基本克服了常规 cDNA 文库构建方法中存在的被限制性内切酶切开而无法得到完整的基因序列,以及连接效率不高的缺陷^[12]。一个高质量 cDNA 文库的关键就是要保证文库的完整性与覆盖度^[13]。本试验所构建的茄子 cDNA 文库,插入片段绝大多数在 1.2 kb 以上,文库总容量达到 0.15 亿 CFU,重组率达到 100%,而一般的普通的 cDNA 文库滴度只需要 0.01 亿 CFU/mL,重组率达到 80% 以上,插入片段的大小达到 500 bp 以上的标准,由此可见,本研究所构建的 cDNA 是高质量的 cDNA 文库。

cDNA 便于克隆和大量表达,它不像基因组含有内含子而难以表达,因此,可以从 cDNA 文库中筛选到所需要的目的基因,并且可直接用于该目的基因的表达^[14]。cDNA 文库构建目前已广泛应用于不同发育阶段基因表达的变化、某特定发育期基因表达的分子机制、克隆新型细胞因子、分离新的组织特异基因等方面的研究^[15-21]。随着 cDNA 文库构建技术的日益提高和普及,cDNA 文库已成为克隆相关基因的一种首选方法,在基因操作过程中具有十分广泛的基础性作用,近年来,构建 cDNA 文库已在植物抗病虫、抗逆境分子机理等研究领域广泛应用^[22-26]。

参考文献:

- [1] 李植良,黎振兴,黄智文,等. 我国茄子生产和育种现状及今后育种研究对策[J]. 广东农业科学,2006(1):24-26.
- [2] 魏小伞,曹必好,雷建军,等. 茄子抗病育种研究进展[J]. 中国蔬菜,2010(10):1-8.
- [3] 封林林,屈冬玉,金黎平,等. 茄子抗青枯病研究进展[J]. 中国蔬菜,2000(5):47-50.
- [4] 晏慧君,黄兴奇,程在全. cDNA 文库构建策略及其分析研究进展[J]. 云南农业大学学报,2006,21(1):1-6.
- [5] Wang H L, Tao J J, He L G, et al. cDNA cloning and expression analysis of a *Poncirus trifoliata* CBF gene[J]. Biologia Plantarum, 2009, 53(4):625-630.
- [6] Li Wei, Zhu SongLin, Li Na, et al. Characteristics of nucleotides and amino acids in cDNA sequence of xyloglucan endotransglycosylase cloned from *Anthocephalus chinensis*[J]. Forestry Studies in China, 2011, 13(1):45-51.
- [7] 王 舟,宗俊勤,郭海林,等. Gateway 技术构建结缕草低温和干旱诱导 cDNA 文库及其质量鉴定[J]. 草业科学,2012,29(6):911-917.
- [8] 张玉平,王顺清,王彩霞,等. Gateway 非放射标记法构建小鼠破骨细胞前体细胞 cDNA 文库[J]. 中国组织工程研究,2012,16(2):215-219.
- [9] 邱爱连,刘林林,蔡汉阳,等. Gateway 技术构建酵母双杂分析用辣椒 cDNA 文库[J]. 江西农业大学学报,2010,32(4):791-796.
- [10] 李 宏,王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报,1999(1):36-39.
- [11] 李大力. 一种从富含次生物质的植物中提取 RNA 的方法[J]. 南京理工大学学报,2001,25(5):547-549.
- [12] Atanassov I I, Atanassov I I, Etchells J P, et al. A simple, flexible and efficient PCR - fusion/gateway cloning procedure for gene fusion, site - directed mutagenesis, short sequence insertion and domain deletions and swaps[J]. Plant Methods, 2009, 5:14.
- [13] 刘志伟,张智俊,韩国民,等. 毛竹笋全长 cDNA 文库构建[J]. 生物技术通报,2010(2):98-101.
- [14] 杨成君,王 军. cDNA 文库的构建策略及其应用[J]. 生物技术通报,2007(1):5-9.
- [15] Reid K E, Holliday J A, Yuen M, et al. Sequencing of sitka spruce (*Picea sitchensis*) cDNA libraries constructed from autumn buds and foliage reveals autumn - specific spruce transcripts[J]. Tree Genetics & Genomes, 2013, 9(3):683-691.
- [16] Wang XiuHong, Bai JianRong, Liu HuiMing, et al. Overexpression of a maize transcription factor ZmPHR1 improves shoot inorganic phosphate content and growth of *Arabidopsis* under low - phosphate conditions[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31(3):665-677.
- [17] Flores - Monterroso A, Canales J, de la Torre F, et al. Identification of genes differentially expressed in ectomycorrhizal roots during the *Pinus pinaster* - *Laccaria bicolor* interaction[J]. Planta, 2013, 237(6):1637-1650.
- [18] Ma HongShuang. XIA xin - lil, YIN wei - lun. construction of a cDNA - AFLP reaction system of populus euphratica for abiotic stress studies[J]. For Stud, 2011, 13(2):104-111.
- [19] Ryu S Y, Hong J S, Rhee S J, et al. Brief report: genome sequence and construction of an infectious cDNA clone of ribgrass mosaic virus from Chinese cabbage in Korea[J]. Virus Genes, 2012, 44(2):345-348.
- [20] 马志虎,孙国胜,张昌伟,等. SMARTer 技术构建辣椒黄绿苗突变体叶片全长 cDNA 文库[J]. 江苏农业学报,2013,29(2):389-393.
- [21] Othman R, Chong H L, Choo T S, et al. Threeb - galactosidase cDNA clones related to fruit ripening in papaya (*Carica papaya*) [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33:2301-2310.
- [22] Grasso S, Lico C, Imperatori F, et al. A plant derived multifunctional tool for nanobiotechnology based on tomato bushy stunt virus[J]. Transgenic Research, 2013, 22(3):519-535.
- [23] Kim D Y, Hong M J, Jang J H, et al. cDNA - AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in brachypodium distachyon[J]. Genes & Genomics, 2012, 34(5):475-484.
- [24] 陈 杨,余林生,申洁琼,等. 具有不同抗螨特性的东方蜜蜂 cDNA 文库构建和 CSP3 基因 CDs 序列分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):21-24.
- [25] 任晓娟,刘彦慧,李建娜,等. 小麦 NBS - LRR 类抗病基因同源 cDNA 序列的克隆与表达分析[J]. 河北农业大学学报,2013,36(2):69-74,79.
- [26] Ling Peng, Wang Meinan, Chen Xianming, et al. Construction and characterization of a full - length cDNA library for the wheat stripe rust pathogen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) [J]. BMC Genomics, 2007, 8:145.