

卫晓静,王华忠,岳洁瑜. 白粉菌诱导小麦叶片全长 cDNA 文库的构建及质量评价[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):38-40.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.011

# 白粉菌诱导小麦叶片全长 cDNA 文库的构建及质量评价

卫晓静,王华忠,岳洁瑜

(天津师范大学/天津市动植物抗性重点实验室,天津 300387)

**摘要:**小麦白粉病是由小麦白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*, *Bgt*)侵染引起的小麦(*Triticum aestivum* L.)生产上的主要病害之一,克隆小麦抗白粉病相关基因并研究其生物学功能具有重要的应用价值和现实意义。以白粉菌 *Bgt* 侵染诱导的携带小麦抗白粉病基因 *Pm21*(广谱抗白粉病基因)“92R137/扬麦 158<sup>7</sup>”为材料,利用 SMART(switching mechanism at 5' end of the RNA transcript)技术构建小麦叶片全长 cDNA 文库。结果表明,所获得的原始文库滴度为  $1.08 \times 10^7$  CFU/mL,扩展文库滴度为  $3.24 \times 10^7$  CFU/mL,重组率 98%,插入片段在 0.5~2.0 kb 之间,多在 1.0 kb 左右。该文库的构建为进一步开展小麦抗白粉病相关基因的克隆及分子生物学研究奠定基础。

**关键词:**小麦白粉病;cDNA 文库;构建;质量分析

**中图分类号:** S435.121.4<sup>+</sup>6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0038-03

小麦白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Bgt*)引起的小麦白粉病是世界上小麦主产区的主要病害之一<sup>[1]</sup>。白粉菌通过侵染小麦的叶片部位,严重时侵染叶鞘、茎秆和穗部,形成覆盖整个植株的霉层,可导致叶片早枯,光合作用降低,呼吸作用加强,分蘖数减少,成穗率降低,千粒质量下降,可减产 5%~10%,重病田减产可达 20% 以上<sup>[2]</sup>。白粉菌生理小种较多,常因基因重组和突变而产生具致病力的遗传变异,导致单一抗病性品种的抗病性易丧失,因此发现与利用新的抗病基因,选育具有多个抗病基因聚合的持久抗病品种,从根本上制定有效的抗病策略,为研究白粉菌诱导的特异基因的表达提供了新途径。目前克隆抗病基因常用的方法有转座子标签法和图位克隆等方法,并已从拟南芥、烟草、玉米、水稻、小麦、番茄、亚麻等植物中克隆得到 50 多个抗病基因<sup>[3-5]</sup>。但用转座子标签法分离抗病基因受到转座子的转化效率、突变体产生后筛选的难易程度和突变体的表型是否稳定遗传等因素的限制;图位克隆法前期工作量大、耗时长,准确性高,一般只适合基因组小的物种采用。cDNA 全长文库在研究具体某类特定细胞中基因组的表达状态以及表达基因功能鉴定方面具有特殊优势,因此 cDNA 全长文库的构建和筛选是基因克隆的重要方法之一,也是目前发掘新基因和研究基因功能的基本工具<sup>[6]</sup>。Ma 等构建条锈菌诱导的小麦叶片 cDNA 文库,经 EST 分析发现 ABC 转运子、金属硫因子、泛素、质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 和氨基酸透酶等可能参与了寄主与病原菌互作过程<sup>[7]</sup>。陈玉婷等建立小麦叶锈菌与小麦非亲和互作的基因表达数据库,发现多个抗病防御基因及信号转导相关基

因<sup>[8]</sup>。姜宝杰等采用 SMART(switching mechanism at 5' end of the RNA transcript)技术构建了花生受低温、干旱、各种激素、缺钙及黄曲霉等胁迫诱导的混合全长 cDNA 文库,用于花生抗逆基因的发掘<sup>[9]</sup>。本研究运用 SMART 技术构建了白粉菌诱导的小麦叶片全长 cDNA 文库,并对文库质量进行初步鉴定,为大规模表达序列标签(expressed sequence tag, EST)测序,开展基因表达谱分析,克隆和鉴定一批小麦响应白粉菌感染的功能基因奠定了分子基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试小麦材料为携带广谱抗白粉病基因 *Pm21* 的“92R137/扬麦 158<sup>7</sup>”。将小麦种子播种于盆钵中,罩以卷成筒状的透明投影胶片,上覆 3 层滤纸,防止空气中白粉菌孢子及其他杂菌落入,然后置于 25 ℃ 人工培养箱培养(光照 16 h/黑暗 8 h)。以北方地区流行的小麦白粉菌 15 号生理小种 E09 为供试菌种,白粉菌在密植盆栽的感病品种苏麦 3 号上繁殖,接种前 24 h 抖去老孢子,“92R137/扬麦 158<sup>7</sup>”苗期对该小种表现免疫(反应型为 0 级)。采用抖落法接种,用苏麦 3 号扩繁的 E09 菌种高密度抖落于第 2 张叶完全展开的供试材料上。接种后在 25 ℃ 人工培养箱中黑暗保湿,分别在接种后 3、6、12、16、24、30、36、48、72 h 剪取接种的第 2 张叶,液氮速冻, -80 ℃ 保存备用。

### 1.2 RNA 提取

取相同质量的白粉菌侵染过的及对照小麦叶片混合放入液氮预冷的研钵中,充分研磨。采用 TRIzol(Invitrogen)试剂提取总 RNA,经 NandoDrop(ND-1000)Spectrophotometer 检测浓度及纯度,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

### 1.3 cDNA 第一链和第二链合成

按照 In-Fusion SMART™(Clontech)试剂盒说明书,以 1 μg 总 RNA 为模板,以 3' In-Fusion SMARTer CDS Primer(5'-CGGGGTACGATGAGACACCA(T)20VN-3'; N=A、C、G、T, V=A、G、C)作为引物,按照 SMART 文库构建试剂盒操

收稿日期:2014-03-23

基金项目:天津市应用基础计划青年项目(编号:12JCQNJC09700);

天津师范大学科研基金(编号:52XB1105, 52XS1210)。

作者简介:卫晓静(1989—),女,山西太原人,硕士,研究方向为植物分子生物学。Tel:(022)23766823;E-mail:xiaojing19890404@126.com。

通信作者:岳洁瑜,博士,讲师,主要从事逆境植物学研究。Tel:(022)23766823;E-mail:yueshan1982@163.com。

作合成 cDNA 第一链。一链 cDNA 合成体系总体积为 10  $\mu\text{L}$ , 其中包括总 RNA 1  $\mu\text{g}$ , 寡聚核苷酸 (SMART Oligonucleotide) 1  $\mu\text{L}$ , CDS PCR 引物 1  $\mu\text{L}$ , 一链合成缓冲液 ( $5 \times$  First Strand Buffer) 2  $\mu\text{L}$ , 二硫苏糖醇 (DTT) ( $100 \text{ mmol/L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , dNTP Mix ( $10 \text{ mmol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$  和反转录酶 SMARTScribETM Reverse Transcriptase 1  $\mu\text{L}$ , 混匀后  $42^\circ\text{C}$  孵育 1.5 h,  $68^\circ\text{C}$  加热 10 min 终止第一链反应。

以 LD-PCR (long-distance PCR, LD-PCR) 法合成 cDNA 第二条链, 向 PCR 管中加入 2  $\mu\text{L}$  一链模板、10  $\mu\text{L}$  PCR 缓冲液 ( $10 \times$  Advantage 2 PCR buffer)、2  $\mu\text{L}$   $50 \times$  dNTP Mix、2  $\mu\text{L}$   $5' \times$  PCR Primer II A、2  $\mu\text{L}$  In-Fusion SMARTer PCR Primer ( $5' - \text{CGGGGTACGATGAGACACCA} - 3'$ ) 和 2  $\mu\text{L}$  聚合酶 ( $50 \times$  Advantage 2 Polymerase Mix), 双蒸水补足至 100  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:  $95^\circ\text{C}$  1 min;  $95^\circ\text{C}$  15 s,  $66^\circ\text{C}$  30 s,  $68^\circ\text{C}$  6 min, 17 个循环。取 2  $\mu\text{L}$  双链产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.4 双链 cDNA 纯化

按试剂盒说明书要求准备好 16 个 1.5 mL 离心管及 CHROMA SPIN+TE-1000 分级分离柱。将柱内基质摇匀, 消除柱内气泡, 移除底盖使柱内缓冲液流尽。加入过柱缓冲液 700  $\mu\text{L}$  使其自然流尽。将混有二甲苯氰的 cDNA 加入到柱中, 待 cDNA 渗入基质后加入过柱缓冲液 100  $\mu\text{L}$ 。待自然流尽后加入过柱缓冲液 600  $\mu\text{L}$ , 将制备好的 16 个离心管迅速放在柱下方, 每管 1 滴, 直到缓冲液流尽为止。每管取 3  $\mu\text{L}$  进行 1.1% 琼脂糖凝胶电泳, 150 V 电泳 10 min。选择符合试验要求的 3~4 管, 收集到新的离心管中, 加入 1/10 体积醋酸钠 ( $3 \text{ mol/L}$ , pH 值 4.8)、糖原 ( $20 \text{ mg/mL}$ ) 1.3  $\mu\text{L}$ 、2.5 倍体积的 95% 乙醇 ( $-20^\circ\text{C}$ ),  $-20^\circ\text{C}$  过夜, 14 000 r/min 离心 20 min, 小心移除上清后用去离子水 10  $\mu\text{L}$  重悬沉淀。

#### 1.5 cDNA 与载体的连接转化及菌落 PCR 鉴定

取 600 ng 的 cDNA 与 pSMART21FD 质粒连接, 连接产物经 QuickClean Resin 处理除去连接酶后, 电击法转化到 50  $\mu\text{L}$  大肠杆菌 HST08 中, 涂平板,  $37^\circ\text{C}$  培养过夜, 计算平板上的库容数及文库滴度。从文库中随机挑取 15 个克隆进行菌落 PCR, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取与质量检测

采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的小麦叶片总 RNA 质量, 结果 (图 1) 显示, 28S 和 18S 2 个条带均完整清晰, 亮度强弱对比适宜, 总 RNA 没有明显降解, 完整性良好。 $D_{260 \text{ nm}}/D_{280 \text{ nm}} = 1.86$ ,  $D_{260 \text{ nm}}/D_{230 \text{ nm}} = 2.02$ , 表明 RNA 的均一性较好, 纯度较高, 没有蛋白质的污染, 满足建库要求。

### 2.2 cDNA 合成结果与分析

采用 LD-PCR 法扩增获得双链 cDNA, 如图 2 显示, 双链 cDNA 的长度在 0.25~5 kb 分布, 含有中高丰度基因带, 符合植物基因 cDNA 的长度范围。

### 2.3 cDNA 片段的回收与纯化

双链 cDNA 经分级后的 15 管收集液电泳结果表明, 过柱分离的大于 0.4 kb 的 cDNA 片段主要集中于第 5~8 管中

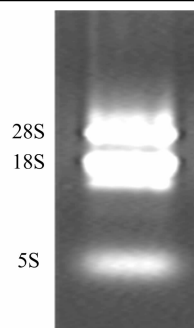
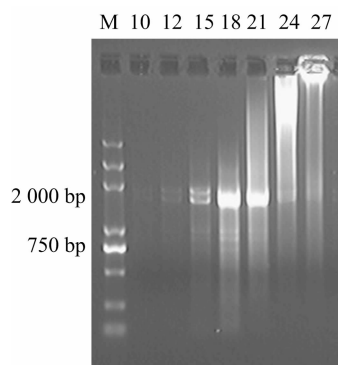


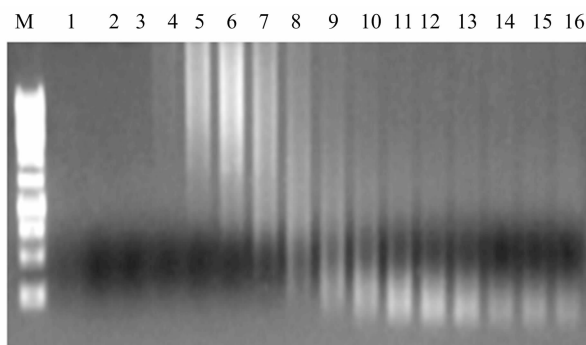
图1 小麦叶片总RNA电泳检测



M—2 000 Marker; 10~27—LD-PCR循环数

图2 小麦叶片双链 cDNA 电泳图

(图 3), 因此收集合并、纯化第 5~8 管的 cDNA, 用于连接试验。



M—DL2000; 2~15—cDNA 片段分离组编号

图3 双链cDNA经CHROMA SPIN+TE-1000 Column 分离柱进行大小分级

### 2.4 cDNA 文库的质量鉴定

原始文库滴度为  $1.08 \times 10^7$  CFU/mL, 扩增总文库滴度为  $3.24 \times 10^7$  CFU/mL, 重组率达到 98%。从原始文库中随机挑选 15 个单克隆进行 PCR 鉴定, 结果插入片段分布在 0.5~2 kb 之间 (图 4), 以上各指标均表明已获得较高质量的 cDNA 文库。

## 3 讨论

构建高质量的 cDNA 文库是高效筛选抗白粉病相关基因的前提, 而获得纯度高和完整性好的总 RNA 是构建高质量全长 cDNA 文库的关键<sup>[10-11]</sup>。本研究采用改良 TRIZOL 法提取



M—DL2000 DNA marker; 1~15—单克隆编号

图4 cDNA 文库插入片段 PCR 检测

小麦叶片 RNA, 操作简便, 减少 RNase 污染的可能性<sup>[12]</sup>。在提取 RNA 过程中, 以幼嫩的小麦叶片为试验材料, 取样后立即置于液氮中速冻, 再于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 保证了 RNA 样品不被降解。所有器具及药品均严格按照操作步骤和规范进行, 避免 RNA 酶的灭活, 并在无菌条件下操作。以往常用的 cDNA 合成方法中, 需要先从总 RNA 中纯化出 mRNA, 因此需要大量的试验材料提取高纯度的 mRNA<sup>[13]</sup>, 而本研究所采用的 SMART 技术直接利用总 RNA 来合成全长 cDNA, 起始材料用量较少, 使用  $0.05 \sim 1.00 \mu\text{g}$  的总 RNA 就可以利用 LD-PCR 技术构建双链 cDNA, 获得一个大于  $10^6$  PFU 的全长 cDNA 文库, 对于稀有材料而言具有较高的应用价值, 避免了在分离纯化时的多步操作所造成的 mRNA 的降解<sup>[14-15]</sup>。通过 LD-PCR 方法, 还避免了当 mRNA 内部存在二级结构或 mRNA 长度过长时不能反转录完全的现象发生。LD-PCR 合成的双链 cDNA 通过分级分离后, 过滤掉了较小的 cDNA 片段和酶切反应后 DNA 片段的残留物, 不仅保证了大片段 cDNA 的富集, 还减少了后期筛选的工作量。

传统 cDNA 文库存在克隆片段短等缺点, 而全长 cDNA 文库能提供完整的 mRNA 信息, 且只需通过 1 次阳性筛选, 即可获得基因的全长序列, 可最大程度地缩短获取全长基因所花费的时间<sup>[16]</sup>。文库的完整性与覆盖度是构建 cDNA 文库的关键性因素, 构建高质量的 cDNA 文库体现在 2 个方面: 代表性和滴度。cDNA 文库的代表性可用一个量化的指标——文库的库容量来衡量<sup>[17]</sup>。但是合成双链 cDNA 的 LD-PCR 易使高丰度表达基因和短片段 cDNA 优先扩增, 大片段 (大于 3 kb) 及低丰度表达基因易于丢失, 从而影响文库的代表性。LD-PCR 的这种偏向性可通过减少循环数加以克服, 但循环不足会降低文库的滴度, 使稀有 cDNA 的比例降低, 从而降低文库的质量。因此, 成功构建 SMART 文库的关键因素之一是选出合适的 LD-PCR 循环数, SMART 试剂盒操作说明书 (Clontech 公司) 中推荐的循环数是 18~20, 本研究运用递增循环数的方法将 LD-PCR 的循环数确定为 17, 既兼顾了文库的代表性, 又兼顾了文库滴度, 尽可能将循环数的负面影响降到最低程度。此外, cDNA 的量与载体的比例不仅影响连接效率, 还关系到插入片段的大小和文库的代表性, 在相同条件下, 与大片段 cDNA 相比, 小片段 cDNA 优先与载体连接, 因此在保证文库滴度和代表性的前提下, 减小 cDNA 与载体的连接比例, 据此, 设定了 2:1、2.25:1、2.5:1 这 3 种连接比例, 其中二者比例为 2:1 时获得最多的阳性克隆。就一般文库而言, 未扩增文库滴度大于  $1 \times 10^6$  PFU/mL, 重组率高于 85% 即为有效文库<sup>[18-19]</sup>, 本研究所

构建的原始全长 cDNA 文库为  $1.08 \times 10^7$  CFU/mL 个单克隆, 插入 cDNA 片段大多数在 500 bp 以上, 符合高质量文库的标准, 为筛选和研究小麦响应白粉菌侵染的关键基因奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Hückelhoven R, Panstruga R. Cell biology of the plant – powdery mildew interaction[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14(6): 738–746.
- [2] 李欣龙. 小麦白粉菌 cDNA 文库构建、ESTs 分析及 Avra-10-like 基因的表达研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012: 1–7.
- [3] 程宇, 蔺瑞明, 欧阳宏雨, 等. 小麦条锈菌诱导性小麦 cDNA 文库的构建及其质量评价[J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 184–187.
- [4] Zhou W Z, Zhang Y M, Lu J Y, et al. Construction and evaluation of normalized cDNA libraries enriched with full-length sequences for rapid discovery of new genes from sisal (*Agave sisalana* Perr.) different developmental stages[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(10): 13150–13168.
- [5] Lu C F, Wallis J G, Browse J. An analysis of expressed sequence tags of developing castor endosperm using a full-length cDNA library[J]. BMC Plant Biology, 2007, 7: 42–51.
- [6] 姜宝杰, 陈华, 张冲, 等. 环境胁迫诱导的花生全长 cDNA 文库的构建及序列分析[J]. 核农学报, 2013, 27(5): 545–551.
- [7] Ma J B, Huang X L, Wang X J, et al. Identification of expressed genes during compatible interaction between stripe rust (*Puccinia striiformis*) and wheat using a cDNA library[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 586–597.
- [8] 陈玉婷, 陈云芳, 李淑凤, 等. 小麦叶锈菌与 TcLr19 非亲和互作 cDNA 文库的 EST 分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(24): 5037–5045.
- [9] 徐碧玉, 苏伟, 张建斌, 等. 香蕉果实 SMART cDNA 文库的构建及利用 PCR 方法筛选香蕉 *Actin2* 基因[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(5): 375–380.
- [10] 周莹, 王楠, 尹俊琦, 等. 大豆幼荚全长 cDNA 文库的构建及鉴定分析[J]. 大豆科学, 2013, 32(4): 455–458.
- [11] 赵爽, 董棚, 马腾. 滇重楼全长 cDNA 文库的构建及初步分析[J]. 中药材, 2014, 37(1): 22–25.
- [12] 贺洋, 岳洁瑜, 王华忠. 利用表达分析和基因沉默方法研究硫代硫酸硫转移酶基因 *TaTST* 与小麦抗白粉病反应的关系[J]. 作物学报, 2012, 38(2): 231–239.
- [13] Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction[J]. BioTechniques, 2001, 30(4): 892–897.
- [14] 王楠, 周莹, 姚丹, 等. 春大豆花芽 cDNA 文库的构建及质量分析[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(1): 73–78.
- [15] 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.
- [16] 平军娇, 张珍, 蔡振锋, 等. 千里光全长 cDNA 文库的构建及分析[J]. 中草药, 2012, 43(3): 557–561.
- [17] 李国林. 莲 cDNA 文库的构建及胁迫相关基因的克隆与功能分析[D]. 武汉: 武汉大学, 2010: 40–43.
- [18] Sambrook J, Russell D E. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005: 919.
- [19] 魏利斌, 苗红梅, 张体德, 等. 芝麻全长 cDNA 文库的构建及序列分析[J]. 分子植物育种, 2013, 11(5): 617–623.