

文章编号: 1001-1498(2007)04-0469-04

美洲黑杨雄性花芽全长 cDNA 文库构建

周祥明¹, 张冰玉², 苏晓华^{2*}, 王大海², 黄秦军², 张香华², 张志毅¹

(1. 北京林业大学林木花卉国家重点实验室, 北京 100083;

2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要:以美洲黑杨雄性花芽为材料, 利用 SMART 技术构建全长 cDNA 文库。该库的滴度大于 10^6 pfu · mL⁻¹, 重组率达 95%, 平均插入片段大小为 1 kb 左右, 说明所构建的文库达到了用于目的基因分离筛选和表达的建库要求, 为将来克隆与杨树花发育相关基因及研究其它树种花发育的分子机理奠定了基础。

关键词:美洲黑杨; 雄花芽; 全长 cDNA 文库

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

Construction of Full-length cDNA Library of Male Floral Buds of *Populus deltoides*

ZHOU Xiang-ming¹, ZHANG Bing-yu², SU Xiao-hua², WANG Da-hai²,
HUANG Qin-jun², ZHANG Xiang-hua², ZHANG Zhi-yi

(1. The Key Laboratory for Genetic and Breeding of Forest and Ornamental Plants, MOE Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF; Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: The full-length cDNA library of male floral buds of *Populus deltoides* Marsh was constructed through SMART (the Switch Mechanism At the 5' end of RNA Templates) technique. The titer is larger than 10^6 pfu · mL⁻¹, the percentage of recombination reaches 95%, and the average size of insert fragments is about 1 kb. These results indicate that the library is qualified for cloning and expressing target genes. The library has laid a foundation for studies on the molecular mechanism of flower development in forest trees.

Key words: *Populus deltoides*; male floral bud; full-length cDNA library

杨树 (*Populus L.*) 是我国工业用材林和生态防护林的主要树种, 我国杨树人工林占全国人工林总面积的 1/5, 是世界各国杨树人工林总面积 1.4×10^6 hm² 的 4 倍。杨木不仅是用材林中纸浆材的好原料, 也适合于胶合板材和包装箱材的加工利用^[1]。过去对杨树的研究主要集中在速生、抗性以及材质方面, 而在分子水平上对杨树的生殖生长方面的研究却相对较少, Sheppard 等^[2,3] 以毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr & Grog) 雌花芽为材料, 构建了 cD-

NA 文库, 通过拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Heynh) MADS-box 同源基因设计探针, 调取 cDNA 文库中的相应基因, 并研究其在花发育过程中的表达情况及作用; Sen 等^[4] 在美洲山杨中分离了 2 个 MADS-box 基因, 分别为 *PMAGL4* 和 *PAP1*; Shinohara^[5] 分离了编码杨树开花相关的 (*PnTFL1*) 基因; 安新民等^[6] 以毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr) 为研究材料, 通过设计兼并引物方法, 采用 PCR 扩增技术, 获得与花发育相关的 *APETALA3*、*LEAFY-like* 和 *AGAMOUS* 基

收稿日期: 2005-09-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200225)

作者简介: 周祥明 (1976—), 男, 福建人, 博士研究生。

* 通讯作者

因。以上研究均以少数与杨树开花相关基因为研究对象,而花发育是一个多基因参与的复杂的发育过程,仅克隆少数基因并对其功能进行研究很难揭示杨树花发育的分子机理。构建全长 cDNA 文库,并对文库中基因表达谱进行研究,是开展杨树花发育分子生物学研究的基础。本文以美洲黑杨 (*Populus deltoides* Marsh.) 为材料,构建了雄性花芽全长 cDNA 文库,为采用基因芯片技术研究雄性花芽中基因的表达谱以及克隆与花发育相关基因奠定了基础,为进一步研究林木花发育的分子机理提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

植物材料为中国林科院院内 15 年生雄性美洲黑杨雄花芽。取材时间为 2004 年 7 月上旬。将苞片快速剥去后,取出中间的花芽装入 Eppendorf 管中,迅速放入液氮速冻之后存放在 -70°C 冰箱,备用。

主要试剂: PolyA Tract mRNA Isolation System Kit 购自 Promega 公司, SMART cDNA Library Construction Kit 购自 BD 公司,文库包装所用的蛋白 Gigapack III Gold Packaging Extract 购自 STRATAGENE 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及质量鉴定 总 RNA 的提取采用异硫氰胍方法^[7],并用紫外分光光度法测定总 RNA 的浓度和纯度,琼脂糖凝胶 (0.8%) 电泳观察。

1.2.2 mRNA 的分离 采用 PolyA Tract mRNA Isolation System Kit (Cat #Z5310) 的试剂盒,从提取的总 RNA 中分离出 mRNA。电泳检查 mRNA 的质量。

1.2.3 cDNA 文库的构建 参照 SMART cDNA Library Construction Kit 使用说明,构建美洲黑杨雄性花芽 cDNA 文库。取 3 μL mRNA (约 1 μg),加入 1 μL SMART Oligo nucleotide ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL CDS /3' PCR Primer ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),混匀并短暂离心,按试剂盒说明合成 cDNA 第 1 链,再用 5' PCR Primer 和 CDS /3' PCR Primer 通过引物延伸合成双链 cDNA,然后经过蛋白酶 K 消化, *Sfi* 酶切,过柱分离并收集大于 500 bp 的双链 cDNA,与载体 TripIEx2 的左右臂在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下连接过夜,最后按照 Gigapack Gold Packaging Extract 的方法进行包装,

包装后,用 0.5 mL $1\times$ lambda dilution buffer 稀释文库后于 4°C 保存。

引物及寡核苷酸片段序列如下:

CDS /3' PCR Primer

5' -ATTCTA GAGGCCGA GCGGCCGACATGd
(T)₃₀N₁N-3';

SMART Oligo nucleotide

5' -AAGCA GTGGTA TCAACGCA GA GTGGCCAT-
TATGGCCGGG3';

5' PCR Primer

5' -AAGCA GTGGTA TCAACGCA GA GT-3'

1.2.4 文库的扩增及质量的检测 将包装得到的 cDNA 文库按 1/5, 1/10, 1/15, 1/20 进行稀释,然后各取 1 μL 与 0.2 mL 用 $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸镁重悬的过夜培养的 XL1-Blue 混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 15 min。再与 3 mL 上层琼脂混匀,倒在预热的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8~12 h。待噬菌体长出后,计数噬菌斑,计算 cDNA 文库滴度。根据 cDNA 文库的滴度,取适量噬菌体,用加有 IPTG ($50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 X-gal ($50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的上层琼脂铺板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8~12 h,计数平板上蓝色噬菌斑和白色噬菌斑的数目,计算重组率。将文库扩增后保存。

将噬菌体文库转化为大肠杆菌质粒文库。挑取大肠杆菌 BM 25.8 菌株单菌落,于 50 mL LB (含 $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 麦芽糖, $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2) 培养基中,31 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 OD_{600} 为 1.0。取 2.5 mL 菌液与 0.25 mL 稀释后文库混匀,31 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 30 min 后,振荡培养 20 min 使抗性基因得以表达。取 100 μL 转染后的菌液涂于含 $50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素 (Carb) 的 150 mm LB 固体平板,31 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜。用牙签随机挑取转化后在含有 Carb ($50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 抗性平板上生长的 12 个大肠杆菌单菌落,用 5' PCR Primer 和 CDS /3' PCR Primer 分别进行 PCR 扩增检测插入片段的长度。用 $1\times$ TAE 电泳缓冲液,0.8% 琼脂糖凝胶,50V 电泳,EB 染色 15 min 后在紫外灯下检查扩增的结果。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 及 mRNA 质量

RNA 质量的高低直接影响到文库的质量^[8]。提取的总 RNA 经电泳检测,观察到 18S 和 28S rRNA 两条带完整,说明基本上无 RNA 降解 (图 1); 同时经分光光度计测定 $\text{OD}_{260\ \text{nm}}/\text{OD}_{280\ \text{nm}} = 2$,

$OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}} = 1.82$,说明总 RNA 的质量较好,无 DNA、蛋白质及小分子污染。用 PolyA Tract mRNA Isolation System Kit(Cat #Z5310)分离的 mRNA 经电泳检测,呈均匀弥散状,也证明总 RNA 的质量好,无降解。

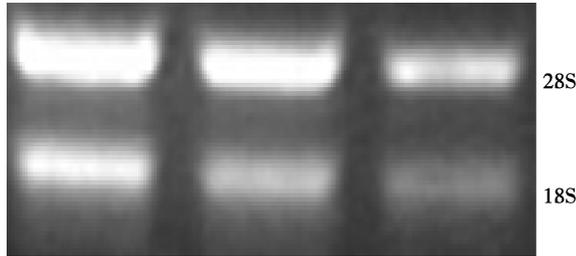


图 1 不同浓度总 RNA 电泳图

2.2 mRNA 反转录成双链 cDNA

用约 $1\ \mu\text{g}$ mRNA 反转录合成第 1 条链,经引物延伸 3 次循环合成的双链 cDNA 电泳呈弥散状,弥散范围重点分布在 $0.5\ \text{kb} \sim 1.5\ \text{kb}$ (图 2),其弥散程度与分离的 mRNA 相似,说明反转录过程中,未有 mRNA 降解,反转录比较成功,双链 cDNA 质量满足建库要求。

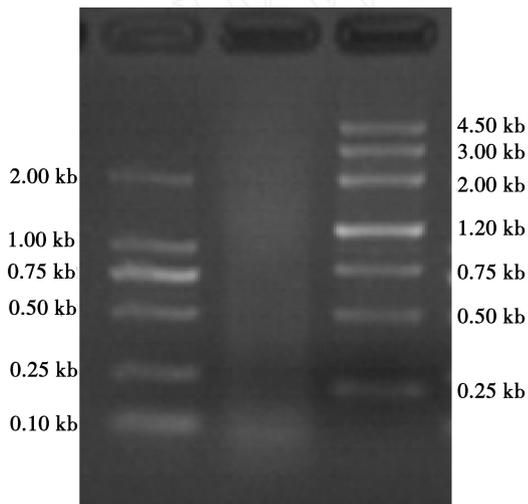


图 2 mRNA 反转录成双链 cDNA 电泳图

2.3 美洲黑杨雄性花芽 cDNA 文库的滴度检测

经检测美洲黑杨雄性花芽 cDNA 文库的滴度为 $6.8 \times 10^6\ \text{pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,文库扩增后的滴度为 $7 \times 10^{12}\ \text{pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。扩增后的文库于 -70°C 保存冰箱。经过蓝白斑计数,文库的重组率达到 95%。

2.4 噬菌体文库转化成大肠杆菌质粒文库及 PCR 检测

为后续实验工作的方便,把噬菌体文库转化成大肠杆菌质粒文库。通过随机挑选 4 500 个大肠杆

菌单菌落进行 PCR 扩增检测,PCR 扩增产物片段长度范围为 $0.5 \sim 2.5\ \text{kb}$,平均长度为 $1\ \text{kb}$ 。图 3 为 12 个大肠杆菌 PCR 扩增结果,其中第 8 个泳道的 PCR 产物为 $200\ \text{bp}$,根据试剂盒提供的载体序列说明,判断该产物是一个空载体,未插入目的片段;其余 PCR 产物均大于 $500\ \text{bp}$,说明已插入大小不同的目的片段。

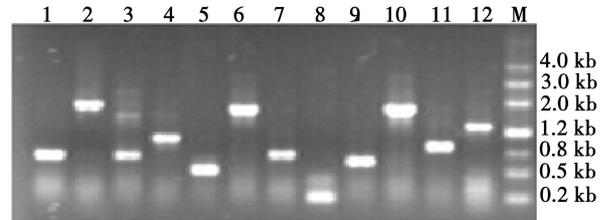


图 3 随机挑选 12 个大肠杆菌进行 PCR 检测 (M:Marker)
1~12 为不同的单菌落

3 讨论

(1)构建 cDNA 的步骤大致包括细胞总 RNA 的提取,mRNA 的分离,cDNA 第 1 链的合成,cDNA 第 2 链的合成,cDNA 的克隆^[9~12]。在这些步骤中,mRNA 质量是影响 cDNA 文库的关键因素,因此必须要保证 mRNA 纯度高且无降解。本实验采用异硫氰胍方法提取的总 RNA 无蛋白和其它杂质污染,琼脂糖凝胶电泳显示 28S 和 18S 2 条带清晰,且亮度比值为 2:1 以上,无扩散现象,说明其纯度和完整性高,完全符合建库的要求。通过总 RNA 分离得到的 mRNA 电泳图中,观察到 mRNA 成弥散状态,重点分布在 $0.5 \sim 1.5\ \text{kb}$,也说明 mRNA 的纯度和完整性高,完全符合建库的要求。

(2)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 1 条链。用常规方法进行反转录,一般难以获得全长的 cDNA,尤其是 mRNA 5' 端的信息会丢失。利用 SMART Oligo 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。一般认为,非哺乳动物如植物、昆虫、酵母等的 PolyA⁺ RNA 分布在 $0.5 \sim 3.0\ \text{kb}$ 之间,由其合成的 ds cDNA 的分布范围也相应减少。对随机挑选的 4 500 个大肠杆菌单菌落进行 PCR 扩增检测,PCR 扩增产物片段长度范围为 $0.5 \sim 2.5\ \text{kb}$,说明库内的 cDNA 序列具有完整性,这为今后以该文库进行与开花相关基因的筛选和克隆奠定了基础。

(3)文库的滴度、重组率及插入片段的大小是鉴定 cDNA 文库质量的重要指标。根据公式： $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - 1/n)$ (N 为实际所需克隆数, P 为要求的概率 (一般为 99%), n 为某一种类型的稀有 mRNA 在总 mRNA 中所占的比例), 当要求克隆到某低丰度 mRNA 的概率为 99% 时, 文库的克隆数不应低于 1.7×10^5 个。本研究采用 Clontech 公司开发的 SMART 方法, 用长距离 PCR (LD-PCR) 合成双链 cDNA, 在扩增引物中引入了植物基因中稀少的 Sfi 酶切位点, PCR 产物不需经过加接头、甲基化等操作步骤可直接进行酶切、连接载体, 经过引物延伸后, 低丰度 cDNA 的量也得到扩增, 从而保证 cDNA 序列的完整性。本文库的总克隆数为 6.8×10^6 个, 远大于 1.7×10^5 个, 已满足构建表征性完整的文库的要求, 包括了大部分稀有 mRNA 的克隆, 说明文库完整有效, 获得具有较高代表性的 cDNA 文库, 因此从本文库筛选出低丰度目的基因是完全可行的。

美洲黑杨高质量全长 cDNA 文库的成功构建, 不仅为研究由多基因参与的复杂的其它树种花发育过程奠定了坚实的分子生物学基础, 而且与杨树开花相关关键基因的克隆也为培育不育的转基因林木的研究具有重要意义。目前, 作者已从库中克隆了数个与花发育相关的基因, 并制作了与花发育相关的表达谱芯片, 相关的后续实验正在进行中, 有关结果另文报告。

参考文献:

- [1] 苏晓华, 张绮纹, 郑先武, 等. 美洲黑杨 (*Populus deltoides* Marsh.) × (*P. cathayana* Rehd.) 分子连锁图谱的构建 [J]. 林业科学, 1998, 34 (6): 29 ~ 37
- [2] Sheppard L A. *PTD*: a *Populus trichocarpa* gene with homology to floral homeotic transcription factors [D]. Oregon: Oregon State University, Corvallis, OR, 1997
- [3] Sheppard L A, Brunner A M, Krutovskii K V, et al. A *DEFICIENS* homolog from the dioecious tree black cottonwood is expressed in both female and male floral meristems of the two-whorled, unisexual flowers [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 627 ~ 639
- [4] Sen B. Molecular characterization and functional analysis of *MADS* Box family genes from dioecious Aspen [D]. Michigan: Michigan Technological University, 1999
- [5] Shinohara K. Growth control of woody plants through genetic engineering [J]. *The International Forestry Review*, 2005, 7 (5): 49
- [6] 安新民. 毛白杨开花关键基因的分离及其功能分析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2004
- [7] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天. 植物基因与分子操作 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1995
- [8] 袁旭, 王劲, 李旭峰. 利用 SMART 技术构建白菜型油菜 cDNA 文库 [J]. *四川大学学报*, 2000, 37 (增刊): 72 ~ 75
- [9] 沈倍奋. 分子文库 [M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [10] 冯斌, 谢先芝. 基因工程技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000
- [11] 张士瑾, 范晓, 马军英. 海洋生物技术原理和应用 [M]. 北京: 海洋出版社, 1998
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南 (第 2 版) [M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992