

大豆幼荚全长 cDNA 文库的构建及鉴定分析

周莹¹, 王楠¹, 尹俊琦¹, 姚丹², 马建¹, 曲静¹, 王丕武¹

(1. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘要: 构建大豆幼荚全长 cDNA 文库, 可为克隆与大豆产量相关基因, 培育高产大豆新品种奠定基础。以吉农 18 大豆幼荚突变体为材料, 提取大豆幼荚总 RNA, 反转录成单链 cDNA, LD-PCR 方法合成双链 cDNA; PCR 产物经蛋白酶 K 消化、SfiI 酶切后, 采用 CHROM SPIN-400 柱分级分离, 回收 500 bp 以上的 cDNA 组分。以 λ TriplE $\times 2$ 载体连接并进行体外包装, 构建吉农 18 大豆幼荚全长 cDNA 文库。经检测研究构建的大豆幼荚 cDNA 原始文库滴度达到 1.5×10^6 pfu \cdot mL⁻¹, 重组率达 92%。扩增的文库滴度达到 2.6×10^8 pfu \cdot mL⁻¹, 重组 cDNA 片段长度在 500 bp 以上。结果显示构建的大豆幼荚全长 cDNA 文库符合高质量文库的标准, 可用于进一步开展相关基因的克隆及分子生物学研究。

关键词: 大豆; 幼荚; 全长 cDNA 文库; SMART 技术

中图分类号: S336

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)04-0455-04

Construction and Identification of Full-length cDNA Library from Young Pod of Soybean Jinong 18

ZHOU Ying¹, WANG Nan¹, YIN Jun-qi¹, YAO Dan², MA Jian¹, QU Jing¹, WANG Pi-wu¹

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Construction of full-length cDNA library from soybean young pod could lay foundation for cloning yield related genes. The total RNA from young pod of soybean Jinong 18 was separated and then transcribed into single-strand cDNA, which was synthesized into double-strand cDNAs by LD-PCR. Double-strand cDNAs was digested by Proteinase K and SfiI, and fractionated by CHROMA SPIN-400 columns. The ds cDNAs longer than 500 bp were collected and ligated to λ TriplE $\times 2$, and then packaging reaction for recombinant bacteriophages was performed. The titer of the primary cDNA library was 1.5×10^6 pfu \cdot mL⁻¹, and the recombinant rate was 92%. The titer of amplified library was 2.6×10^8 pfu \cdot mL⁻¹ and the insert size was more than 500 bp. Results showed that library titer and recombination rate met requirements of cDNA library, which would facilitate the functional genomics research of soybean.

Key words: Soybean; Young pod; Full-length cDNA library; SMART technology

大豆是人类蛋白质的主要来源, 是重要的粮食和油料作物。大豆种子中贮藏蛋白含量远高于其他作物, 占种子干重的 40% 以上, 是人类食物和动物养殖的主要植物蛋白来源, 具有极高的经济价值^[1]。与其他农作物相比, 大豆的产量相对较低, 应用传统育种方法提高大豆产量的潜力有限, 而转基因技术在提高大豆产量方面展示了良好的前景^[2]。

全长 cDNA 文库的构建、测序和功能注释是了解生物体结构和功能的一种重要方法^[3-4]。在国外的研究中, 日本学者完成了拟南芥全长 cDNA 文库的构建、测序、作图^[5]。在大豆方面, 王跃平利用 SMART 技术, 构建了绥农 14 鼓粒期的籽粒 cDNA 文库并测定 EST 序列^[6]。程金鹏等^[7]构建了 cDNA 文库, 并通过 PCR、点杂交筛选和测序获得了一些差异表达基因, 这些基因涉及到大豆胚生长发育的

各个方面。王清连等^[8]构建了野生大豆近成熟的 cDNA 文库, 并进行了大量测序, 获得了一些有价值的基因片段和新基因。

目前已报道的全长 cDNA 文库构建方法有 Oligo-capping 法、CAPture 法、SMART 法、CAP-trapper 法等^[9-10]。其中 SMART 方法因其所需 mRNA 量少, 在反转录成 cDNA 前不需任何酶反应处理, 操作简单、快速等优点而越来越受到研究人员的青睐^[11]。因此, 现以大豆新鲜幼荚为材料, 采用 SMART 方法构建大豆全长 cDNA 文库, 为克隆及筛选相关基因, 培育高产、优质大豆新品种提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 以吉农 18 大豆四粒荚突变体为材料, 由吉林农业大学生物技术中心提供。将种子

收稿日期: 2013-01-25

基金项目: 吉林省科技厅科技支撑重点项目(20090203); 吉林省科技厅科技指导计划项目(201101111)。

第一作者简介: 周莹(1987-), 女, 在读硕士, 主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。E-mail: ruanruan_34@126.com。

通讯作者: 王丕武(1958-), 男, 博士, 教授, 主要从事生物技术与作物遗传育种研究。E-mail: peiwuw@yahoo.com。

播种在试验田,在开花 10~15 d 后,待幼荚长 1.5~2.0 cm 时,取大豆幼荚,经液氮速冻后,储存于 -80℃ 超低温冰箱备用。

1.1.2 主要试剂 用于构建 cDNA 文库的 SMART™ cDNA Library Construction Kit 和用于合成 cDNA 的第二条链的 Advantage 2 PCR Kit,由 Clontech 公司提供。用于包装提取物的 MaxPlax™ Lambda Packaging Extract,购自 EPICENTRE 公司;DEPC、IPTG、X-gal、二甲苯氰、明胶和二甲基亚砷(DMSO),购自 Sigma 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 按 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取大豆幼荚总 RNA,然后用 NanoDrop (ND-1000) Spectrophotometer 测量 RNA 的含量和纯度。采用 1.1% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提总 RNA 的质量。

1.2.2 双链 cDNA 合成 按照试剂盒说明书,用 SMART IV Oligonucleotide、CDS III/PCR Primer、5 × First-Strand Buffer、SMART IV Oligonucleotide、CDS III/PCR Primer 在 PCR 循环仪中反应合成 cDNA 第一条链。运用 LD-PCR 技术在 PCR 热循环仪中合成 cDNA 的第二条链。

1.2.3 蛋白酶 K 消化和 SfiI 酶切 取稀释后的双链 cDNA,用蛋白酶 K 消化,再以 SfiI 酶切。

1.2.4 cDNA 分级分离 按试剂盒说明书要求准备好 16 个 1.5 mL 离心管及 CHROMA SPIN-400 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 700 μL 柱子缓冲液,待自然流干后,加入用二甲苯青染过色的 cDNA 样品,待自然流干后,加入 600 μL 柱子缓冲液,每管一滴进行收集。每管取 3 μL 进行电泳,150 V 电压,电泳 10 min,取符合要求的 3~4 管合于另一离心管。加入 1.4 μL 醋酸钠,1.3 μL 糖原,357 μL 95% 乙醇,混匀后 -20℃ 过夜,14 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,弃上清,室温干燥 10 min,加入 7 μL 去离子水重悬沉淀。

1.2.5 体外连接与包装 为保证目的片段的最优比率,按照 cDNA 与载体的比例,设置 3 个连接梯度反应(表 1)。

表 1 cDNA 与载体的连接反应

Table 1 Ligating reaction of cDNA and vector(μL)

成分 Components	1 号 No. 1	2 号 No. 2	3 号 No. 3
cDNA	0.5	1.0	1.5
Vector	1.0	1.0	1.0
10 × ligation buffer	0.5	0.5	0.5
ATP	0.5	0.5	0.5
T4 连接酶 T4 ligase	0.5	0.5	0.5
去离子水 ddH ₂ O	2.0	1.5	1.0
总体积 Total volume	5.0	5.0	5.0

取一管包装提取物室温下融解,向 5 μL 连接产物中加 25 μL 包装提取物,混匀,30℃ 水浴 90 min,再加入 25 μL 包装提取物,30℃ 水浴 90 min,加入 500 μL 1 × lambda 稀释缓冲液,混匀后,加入 25 μL 氯仿,混匀离心,小心吸取上清于另一个无菌的离心管中。

1.2.6 文库质量的鉴定 (1)文库滴度的检测:从 XL1-Blue 工作平板上挑取单菌落,接种于液体 LB/Mgso₄/Maltose 培养基,于 37℃,140 r·min⁻¹ 过夜培养,直至 OD₆₀₀ 值为 2.0。取 15 mL 的菌液进行离心,然后用稀释缓冲液重悬沉淀。将稀释后的菌液、包装后的基因组和顶层培养基进行混合,混匀后铺在 LB 平板上。8~16 h 后,数单克隆数,计算文库容量。

文库滴度(pfu·mL⁻¹) = (噬菌斑数 × 稀释倍数 × 10³) / 涂板的噬菌体体积(μL)

(2)重组率的检测:利用 X-Gal 显色原理测定重组率,通过蓝、白斑的数量计算文库重组率。

重组率(%) = [白斑数 / (白斑数 + 蓝斑数)] × 100

(3)插入片段大小的检测:以载体上已知序列为引物进行 PCR 扩增,以检查插入片段的长度。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,55℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 8 min。反应完毕后取 5 μL PCR 反应产物,进行 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测,其余样品 -20℃ 保存。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 完整性的检测

利用 RNAiso Plus 试剂盒提取大豆幼荚总 RNA,经 NanoDrop (ND-1000) Spectrophotometer 测定其在 260 及 280 nm 处的吸收值,结果显示,OD₂₆₀/D₂₈₀ 为 1.95,表明获得的 RNA 纯度较高。经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳(图 1)后,1 号和 2 号均为所提 RNA,1 号 28SrRNA 和 18SrRNA 条带清晰,亮度比接近 2:1,RNA 没有降解,比较完整,其浓度及纯度均满足构建 cDNA 文库的要求。

2.2 双链 cDNA 合成的检测

将提取的大豆幼荚总 RNA 进行逆转录后,对逆转录产物即单链 cDNA 进行 LD-PCR 获得双链 cDNA。经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测,双链 cDNA 片段长度大多集中在 500 bp 以上(图 2)。进一步表明 RNA 质量合格,降解量少,双链 cDNA 的长片段较多,可以满足构建 cDNA 文库的要求。

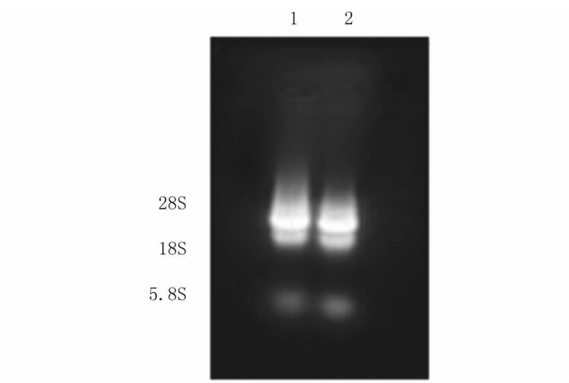
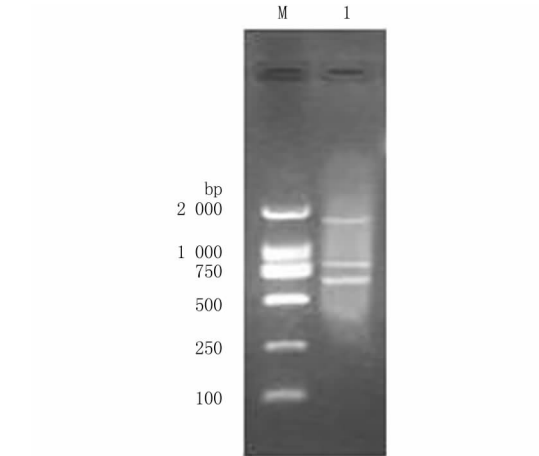


图 1 大豆幼荚总 RNA 琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 The agarose gel total RNA of tender pod from soybean

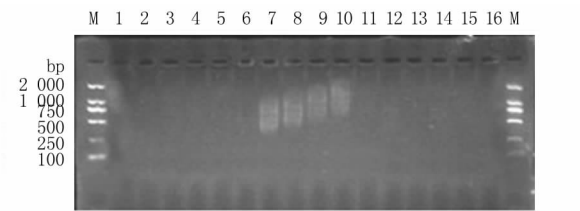


1: 为双链 cDNA; M: DL-2000 标准对照
1: ds cDNA; M: DL-2000 Marker

图 2 大豆双链 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of ds cDNA from soybean

2.3 cDNA 分级分离检测

经过柱层析分离,共收集 16 管 cDNA 片段,每管取 3 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测。从图 3 可知,1~6 管双链 cDNA 几乎没有片段,7~10 管双链 cDNA 长度大于 500 bp,从第 11 管双链 cDNA 已有小于 500 bp 的片段。收集并合并 7~10 管的 cDNA,用于连接实验。



1~16: 双链 cDNA; M: DL-2000 标准对照
1-16: ds cDNA; M: DL-2000 Marker

图 3 分级分离 cDNA 电泳检测
Fig. 3 The agarose gel analysis of cDNA size fractionation

2.4 cDNA 文库质量鉴定

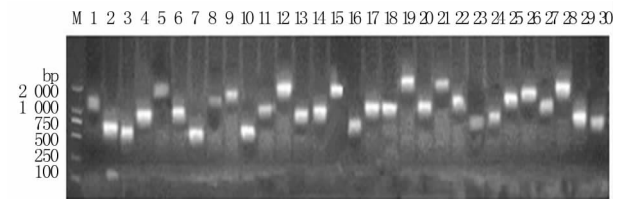
2.4.1 cDNA 克隆入 λ TriplE $\times 2$ 载体和库容量的检测 双链 cDNA 与 λ TriplE $\times 2$ 载体之间连接的摩尔数比例及连接体积均很重要。因此,将分级分离并纯化的 cDNA 与载体 λ TriplE $\times 2$ 进行连接,连接后的产物进行包装,将包装后的产物按照 1: 10, 1: 100 和 1: 1 000 稀释进行滴度测定来选择最佳的连接效率。未扩增文库滴度测试结果(表 2)表明,载体与 cDNA 的体积比为 1: 1 时连接效果最好,其它两种连接方式所产生的噬菌斑不理想。根据长出噬菌斑的数目计算,初始文库的滴度为 1.5×10^6 pfu \cdot mL $^{-1}$,扩增文库滴度为 2.6×10^8 pfu \cdot mL $^{-1}$ 。

表 2 未扩增文库滴度测试结果

稀释倍数 Dilute solution	cDNA 与载体的比例 Ratio of vector		
	0.5: 1	1: 1	1.5: 1
10^{-1}	40	不可数	20
10^{-2}	3	720	无
10^{-3}	无	90	无

2.4.2 文库重组率的检测 本研究使用的 λ TriplE $\times 2$ 载体中含有大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因,这种载体转入 lacZ 宿主菌 XLI-Blue 后,在含有 X-gal 的平板上形成蓝色噬菌斑。在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体平板上,蓝白斑筛选的结果是 cDNA 文库的重组克隆比例平均为 92%。重组率大于 80% 的 cDNA 文库即为合格的文库,所以此文库为合格的 cDNA 文库。

2.4.3 文库插入片段大小的检测 随机挑取 30 个噬菌体克隆,根据载体克隆位点两端的引物进行 PCR 鉴定,经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 4),结果显示扩增条带主要集中分布在 750~2 000 bp,其中 500~750 bp 有 9 个,750~1 000 bp 有 11 个,1 000~2 000 bp 有 10 个,平均长度 1 000 bp 左右。



1~30: 随机克隆 PCR 产物; M: DL-2000 标准对照
1-30: Random cloning product; M: DL-2000 Marker

图 4 文库中插入片段大小凝胶电泳检测
Fig. 4 The agarose gel analysis of the inserts from the cDNA library

3 结论与讨论

3.1 关于总 RNA 提取

提取高质量 RNA 是构建 cDNA 文库的关键环节。常见的 RNA 提取方法有 CTAB 法、LiCl 法、苯酚法、SDS 法、CsCl 梯度离心法、Trizol 试剂盒法、异硫氰酸肌法等,针对不同的材料选择合适的提取方法,是试验成功的关键。本研究最初采用 CTAB、LiCl、SDS 和 Trizol 试剂盒法分别提取大豆幼荚总 RNA,通过对 RNA 的纯度和浓度的综合分析,结果表明利用 Trizol Plus 试剂盒提取大豆幼荚总 RNA 的质量最理想。在提取 RNA 过程中,采集样品的时期非常重要,一定要选择幼嫩的组织,并且采下后要迅速存放于液氮中,并及时放于 -80°C 冰箱中保存,这样才能保证 RNA 样品不会被降解。最后在 RNA 提取过程中,还要特别注意 RNA 酶的灭活,在提取总 RNA 的过程中,要严格按照操作步骤和规范进行操作,做到无外源核酸的污染和杂质的掺杂,尽量保证在无菌条件下操作。

3.2 关于文库质量检测

文库的完整性与覆盖度是构建 cDNA 文库的关键性因素,但同时还需注意组织的特异性和文库内基因的代表性^[12]。因此构建高质量的 cDNA 文库体现在两个方面,一是 cDNA 文库的代表性,可用一个量化的指标来衡量(即文库的库容量),本试验所构建的原始全长 cDNA 文库具有 1.5×10^6 pfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ 个单克隆;二是重组 cDNA 片段的大小,大多数在 500 bp 以上。在实验的过程中要避免 RNA 酶的污染,并适时检测每一步的试验结果和片段组成,以保证构建的 cDNA 文库能够真实反映大豆幼荚的基因表达情况。根据一般文库的构建指标:未扩增文库的滴度达到 1×10^6 pfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上,重组率大于 85% 即为有效文库^[13],结果显示所构建的大豆幼荚的 cDNA 文库在原始滴度、重组率和插入片段大小等方面均符合高质量文库的标准。

参考文献

[1] 马建. 大豆脂肪氧化酶基因 RNAi 表达载体的构建及表达调控的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2008:1-5. (Ma J. The construction of soybean lipoxidase RNAi gene expression vector and regulatory sequence[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2008:1-5.)

[2] 梁慧珍,余永亮,杨红旗,等. 不同环境下大豆荚粒性状的遗传与 QTL 分析[J]. 中国农业科学,2012,45(13):2568-2577. (Liang H Z, Yu Y L, Yang H Q, et al. Genetic analysis and QTL

mapping of pod-seed traits in soybean under different environments [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(13):2568-2577.)

[3] 董志敏. 大豆叶片全长 cDNA 文库的构建与鉴定[J]. 作物杂志,2006(5):1-4. (Dong Z M. Soybean blade full-length cDNA library construction and identification[J]. Crops, 2006(5):1-4.)

[4] Jia J P, Fu J J, Zheng J, et al. Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNAs from stress-induced maize (*Zea mays* L) seedlings[J]. Plant Journal, 2006, 48(5):710-727.

[5] Seki M, Naisaka M, Kaniya A, et al. Functional annotation of a full length *Arabidopsis* cDNA collection [J]. Science, 2002, 96(5565):141-145.

[6] 王跃平. 大豆绥农 14 灌浆期籽粒 cDNA 文库的构建及表达序列标签(EST)分析[D]. 海口:华南热带农业大学,2007:6-11. (Wang Y P. Construction of cDNA library of Suinong 14 in the filling-time and analysis of expressed sequence tags[D]. Haikou: China University of Tropical Agriculture, 2007:6-11.)

[7] 程金朋,陈波,徐有明,等. 不同含油量大豆成熟期胚抑制消减 cDNA 文库构建及其差异表达基因分析[J]. 中国油料作物学报,2007,29(4):365-371. (Cheng J P, Chen B, Xu Y M, et al. Construction of suppression subtractive cDNA library and analysis of differentially expressed genes during maturing period seed of high and low oil content soybean variety[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007, 29(4):365-371.)

[8] 王清连,石明旺. 野生大豆种子 cDNA 文库的构建及其球蛋白基因克隆[J]. 河南农业科学,2006(1):29-32. (Wang Q L, Shi M W. Construction of cDNA library and cloning of globulin gene from wild soybean (*Glycine soja*) seeds[J]. Henan Agricultural-Sciences, 2006(1):29-32.)

[9] 毛新国,景蕊莲,孔秀英,等. 几种全长 cDNA 文库构建方法比较[J]. 遗传,2006,28(7):865-873. (Mao X G, Jing R L, Kong X Y, et al. Comparison of methods to construct a full-length cDNA library[J]. Hereditas (Beijing), 2006, 28(7):865-873.)

[10] Maruyama K, Sugano S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides [J]. Gene, 1994, 138:171-174.

[11] 刘楠. 中国野生山葡萄抗寒基因 cDNA 文库构建及 EST 序列分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2011:6-10. (Liu N. Construction of cDNA library of Chinese wild *Vitis Amurensis* with resistance to cold-stress and analysis of expressed sequence tags [D]. Yangling: Northwest Agricultural & Forestry University, 2011:6-10.)

[12] 赵志辉,李宁. EST 序列测定时 cDNA 文库的构建和参数评估[J]. 农业生物技术学报,2003,11(4):422-425. (Zhao Z H, Li N. Construction of cDNA library and its parameter evaluating on EST sequencing[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(4):422-425.)

[13] 杨长庚,张富春,马纪. 新疆荒漠昆虫光滑鳖甲 cDNA 文库的构建及功能基因筛选[J]. 生物技术通报,2006(4):109-114. (Yang C G, Zhang F C, Ma J. Construction and analysis of cDNA library of *Anatolica polita borealis* [J]. Biotechnology Bulletin, 2006(4):109-114.)