

一种获得大片段克隆的 SMART 全长 cDNA 文库构建方法^{*}

董志敏^{1, 2} 李英慧² 张宝石¹ 关荣霞² 常汝镇² 邱丽娟²

(1. 沈阳农业大学 农学院, 沈阳 110161; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程, 农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

摘要: 针对 SMART 方法中 PCR 扩增削减了大片段基因所占比例, 使文库中很难获得大片段克隆的问题, 进行了方法改进。在原始 SMART 方法的基础上, 以大豆叶片为材料, 通过琼脂糖凝胶分级分离技术, 将 PCR 扩增后合成的 ds cDNA 分成 3 个等级, 分别与载体连接、转化, 构建相应亚库, 每个亚库容量在 1.0×10^6 左右, 重组率接近 99%。改进方法所建文库的平均全长率 53.6%, 与改进前的(52.2%)相当。插入片段范围为 0.5 ~ 3.5 kb, 最大插入片段长度比改进前的提高 1.5 kb。该方法提高了 SMART 方法中大片段克隆的获得率, 为大豆功能基因组学研究提供了保障。

关键词: 改进的 SMART 法; 扩增后 cDNA 分级分离; 全长 cDNA 文库; 大片段克隆

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)03-0223-05

Chenchik 等(1996)最早提出构建全长 cDNA 文库的 SMART 方法, 即利用 PowerscriptTM RT 反转录酶的反转录、末端转移活性和内切酶 *sfi*I 的特性构建全长 cDNA 文库。该方法由于具有所需起始材料少(一般 0.5 ~ 1 μ g mRNA), 实验过程快速、简单和全长率较高等优点而应用较广^[1~3], 尤其以医学领域应用普遍^[4~6]。但与 Captrapper^[7], oligocapping^[8]等方法构建文库相比, SMART 法所建文库的插入片段相对偏小, 其主要原因是实验过程中采用的 PCR 技术不利于大片段基因的扩增, 因此合成的 cDNA 中大片段所占比例大大削减, 文库中很难得到大片段的克隆。Ruth Wellenreuther 等^[9]用分级分离扩增技术虽然可以克服大片段的削减, 但 PCR 扩增前 cDNA 的分级分离过程复杂, 技术要求高, 使 SMART 方法失去了快速、简单的优点。本文针对上述问题, 在原始 SMART 方法的基础上, 对扩增后的 cDNA 分级分离, 然后分别进行载体连接和转化构建全长文库, 以提高 SMART 文库中大片段克隆的获得率。

1 材料

1.1 植物材料

大豆品种绥农 14(*Glycine max*) 于 2005 年 5 月在中国农业科学院作物科学研究所温室种植, 取苗期幼嫩叶片, 液氮迅速冷却后, 置于 -70℃ 冰箱保存待用。

1.2 主要试剂

总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化试剂盒 RNeasy Plant kit 和 Oligotex Library Construction kit 购自 Qiagen 公司, 琼脂糖凝胶回收试剂盒 QIAquick Gel mRNA Spin column kit 购自 Qiagen 公司, cDNA 合成试剂盒 Creator SMART cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech 公司, T4 DNA ligase 购自 New England 公司, 感受态细胞 DH10B(T₁) 购自 Invitrogen 公司, Taq 酶, 蛋白酶 K 和 *Sfi*I 酶购自 Takara 生物技术公司, 细菌用胰蛋白酶、酵母提取液购自 Oxoid 公司。

^{*} 收稿日期: 2006-02-07

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(30490250)和国家“863”计划项目(2003AA207060)

作者简介: 董志敏(1978-), 女, 在读博士, 主要从事大豆功能基因组研究。

通讯作者: 邱丽娟, Tel: 010-62186650; E-mail: qiu lijuan @263.net。

2 方法

2.1 改进 SMART 文库的构建

2.1.1 叶片总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

用 RNeasy Plant kit 提取大豆叶片总 RNA; 用 Qiagen 公司的 Oligotex mRNA Spin column kit 提取 mRNA, 并用等体积的异丙醇和 1/3 体积的 NaAC 浓缩。总 RNA 和 mRNA 皆用甲醛凝胶电泳/EB 染色检测其质量, 并用紫外分光光度计测其浓度和纯度。

2.1.2 cDNA 的合成

取 1 μ g 大豆叶片 mRNA 作为合成 cDNA 第一链的模板, 在 CDS III/3 PCR 引物和 SMART IV 寡核苷酸引物的引导下, 通过 Powerscript 逆转录酶逆转录合成第一链 cDNA。以 2 μ l 第一链 cDNA 产物为模板, 用 CDS III/3 PCR 引物和 5 锚定引物, 在 PTC-225 型 PCR 仪上用 LD-PCR(long distance polymerase chain reaction)合成并扩增第二链 cDNA。PCR 反应条件为 72 $^{\circ}$ C 10min, 95 $^{\circ}$ C 1min; 95 $^{\circ}$ C 20sec, 68 $^{\circ}$ C 6min, 18 个循环; 4 $^{\circ}$ C 结束反应(实验中为保证合成的二链 cDNA 足够用于后续实验, 可进行 2 个反应的 LD-PCR)。扩增后, 取适量 PCR 产物在 1.1% 的琼脂糖电泳上检测 cDNA 第二链合成效果。

2.1.3 cDNA 片段的分级分离与回收

将 *Sfi*I 限制性酶消化后的 cDNA, 用 95% 的冷乙醇和 1/3 体积的 NaAC 沉淀, 用 20 μ l 水溶解后全部进行琼脂糖凝胶电泳(电压 75v, 时间 2.5 小时)。以 1kb marker 为对照, 将分离的 cDNA 切割成 0.5

~1kb、1~2kb、2~3.5kb 这三个部分, 按照 Qiagen 琼脂糖凝胶回收试剂盒分别回收。

2.1.4 回收 cDNA 的定量

首先制备 0.8% 含 EB(1/10V) 的琼脂糖胶, 倒入 90mm 的培养皿中约 10ml 左右(注意胶面均匀), 避光、室温晾干 4h 左右, 待胶面彻底干爽, 形成较强的吸附力。将若干个浓度梯度 marker 各 1 μ l 分别轻轻点在胶面上, 形成水滴状。在梯度 marker 下方随机点一个 1 μ l marker, 旁边点 1 μ l 待测 cDNA。将培养皿倒放于凝胶成像仪中, 紫外光下检测点的亮度, 通过 marker 梯度的亮度确定实验成功与否, 通过待测样与 marker 的亮度比较确定待测样的浓度。

2.1.5 cDNA 克隆入 pDNR-LIB 载体

根据 dscDNA 与 pDNR-LIB 载体连接比率在 1.0~2.0 范围内, 对三个亚库分别设置连接反应体系(表 1)。连接产物经滤膜脱盐后, 每 2 μ l 连接产物在 2.0kv, 25 μ F, 200 Ω 条件下电转化到 20 μ l 大肠杆菌 DH10B(T1) 的感受态细胞中, 转化产物接种到 970 μ l 的 LB/cm 培养基中, 于摇床上(37 $^{\circ}$ C, 225rpm)震荡 1 小时。

2.1.6 cDNA 文库质量的初步鉴定

取 1 μ l 转化产物加到 50 μ l 的 LB 培养基中, 铺 120cm LB/cm 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养过夜, 第二天, 数单克隆数, 计算未扩增文库容量。随机挑取单克隆, 进行菌液 PCR 反应, 反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 变性 3min; 32 个循环, 94 $^{\circ}$ C 1min, 52 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min; 72 $^{\circ}$ C 3min。然后用 1.1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 确定空载体克隆和插入片段大小情况。

表 1 3 个亚库的连接反应体系

Table 1 Ligation reaction of three cDNA sub-library

试剂名称	dscDNA	dscDNA	dscDNA
	(10ng/ μ L, 2kb~3.5kb)	(20ng/ μ L, 1kb~2kb)	(12ng/ μ L, 500bp~1.0kb)
dscDNA (μ L)	13	10	13
pDNR-LIB 载体(100ng/ μ L)	1	1	1
10x ligase buffer (μ L)	2	3	2
ATP (10mM) (μ L)	2	3	2
T4 DNA ligase (10unit/ μ L) (μ L)	2	3	2
ddH ₂ O (μ L)	0	10	0
总体积(μ L)	20	30	20

2.2 原始 SMART cDNA 文库的构建

按照 Creator SMART cDNA cDNA Library Construction Kit 构建原始 SMART cDNA 文库, 作

为改进 SMART 方法的对照。实验所用的 mRNA 及反转录和 LD-PCR 扩增的产物与改进 SMART 方法相同。将 *Sfi*I 限制性酶消化后的 cDNA, 用试

剂盒中提供的 CHROMASPIN - 400 柱去除小于 500bp 的片段, 沉淀回收 cDNA, 然后进行连接和转化, 其过程也与改进 SMART 方法相同。

2.3 测序和序列分析

随机挑取阳性克隆于 96 孔深孔培养板中培养过夜, 按常规碱裂解法提取质粒, 利用 ABI 3730 XL DNA analyzer 进行测序。将高质量序列提交到 GenBank 中比对, 然后根据双子叶植物 Kozak 序列的结构特征和 5' 端非编码区长度对目的序列进行完整性分析^[10-15]。

3 结果与分析

3.1 改进 SMART 法合成的 dscDNA 的分布

扩增后的 dscDNA 用 1.1% 的琼脂糖凝胶进行分级分离(图 1), 可以看出, dscDNA 的分布以 1.0kb 为中心向两端弥散, 在 0.5 kb 以下和 2kb 以上 dscDNA 的量明显降低, 最大片段的 dscDNA 可以达到 10kb, 但大于 3.5 kb 的 dscDNA 所占比例与整体相比相差甚远。根据 dscDNA 片段大小的分布特点, 将 dscDNA 分成片段范围分别为 0.5 ~ 1.0 kb, 1.0 ~ 2.0kb 和 2.0 ~ 3.5kb 三个等级。

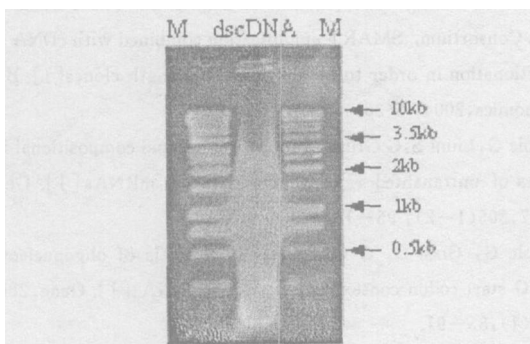


图 1 dscDNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of dscDNA

3.2 改进 SMART cDNA 文库的建成及与原始 SMART cDNA 文库的比较

将琼脂糖凝胶分级分离扩增后的三个等级 dscDNA 分别与载体连接并电转化到感受态大肠杆菌中, 成功地构建了 SMART 全长文库。扩增前, 3 个亚库文库容量分别为 1.2×10^6 pfu, 0.8×10^6 pfu, 0.5×10^6 pfu。菌液 PCR 检测结果(图 2)发现, 每个亚库随机检测的 10 个克隆皆有 PCR 扩增产物, 3 个亚库的重组率接近 99%, 1 ~ 10 号克隆的 PCR 扩增产物片段大小在 0.5 ~ 1.0kb 间, 11 ~ 20 号克隆的 PCR 扩增产物片段大小在 1.0kb ~ 2.0kb 间, 21 ~ 30 号克隆的 PCR 扩增产物片段大小在 2.0kb ~

3.5kb 间。与原始方法所构建 SMART 文库的菌液 PCR 检测结果(图 3)相比, 原始方法构建的文库插入片段大小主要在 0.5 ~ 2.0kb 范围内, 30 个克隆中未发现一个大于 2.0 kb 的, 而改进的方法插入片段大小在 0.5 ~ 3.5kb 范围内, 很容易得到大于 2kb 的克隆。

为评价全长 cDNA 在文库中所占的比例, 从文库中随机挑选克隆测序进行完整性分析, 改进 SMART 方法的三个亚库中分别获得 96 条高质量的序列, 原始 SMART 文库中获得 300 条高质量的序列。最终统计结果表明, 改进 SMART 方法的三个亚库全长表现为, 0.5 ~ 1.0kb 亚库 45 个全长序列, 1.0 ~ 2.0kb 亚库 59 个全长序列, 2.0 ~ 3.5kb 亚库 50 个全长序列, 全长率分别为 46.8%, 62.3%, 51.9%, 平均全长率为 53.6%。而原始方法所建文库 300 条高质量的序列中共获得 156 条全长序列, 全长率为 52.2%。其中, 0.5 ~ 1.0kb 128 条, 全长序列 58 条, 全长率 45.3%; 1.0 ~ 2.0kb 162 条, 全长序列 92 条, 全长率 56.7%; 2.0 ~ 3.5kb 10 条, 全长序列 6 条, 全长率 60.0%, 该范围内的序列较少, 其全长率可能缺乏代表性。总的来看, 利用改进 SMART 方法所建文库的全长率与原始 SMART 方

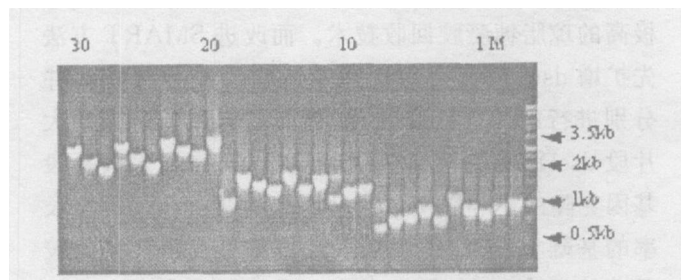


图 2 改进 SMART 文库菌液 PCR 检测结果

(M: 1 kb. marker 1 ~ 10, 11 ~ 20 和 20 ~ 30 分别为 0.5 ~ 1.0kb, 1.0 ~ 2.0kb 和 2.0 ~ 3.5kb 亚库的克隆)

Fig 2 PCR analysis directly on colonies in improved SMART Library (M: 1kb marker; 1 ~ 10, 11 ~ 20 and 20 ~ 30 clones from respectively 0.5 ~ 1.0kb, 1.0 ~ 2.0kb and 2.0 ~ 3.5kb sublibrary)

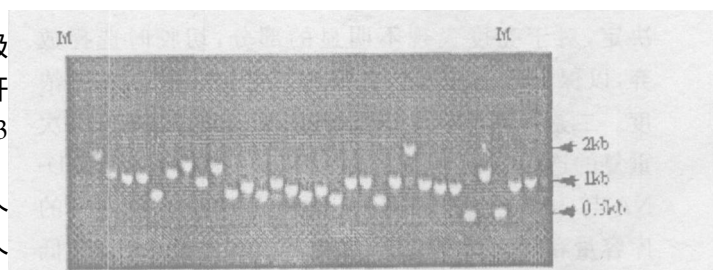


图 3 原始 SMART 文库菌液 PCR 检测结果

(M: 1 kb marker)

Fig 3 PCR analysis directly on colonies in original SMART library (M: 1kb marker)

法所建文库的全长率相当,这一结果与 Ruth Wellenreuther 等构建的分级分离扩增 SMART 文库的全长率(46%~59%)^[9]也较接近。

4 结论与讨论

改进 SMART 方法所建全长文库插入片段长度范围在 0.5~3.5kb 间,最大插入片段长度比改进前提高了 1.5kb;而全长率与原始 SMART 方法和 Ruth Wellenreuther 等构建的分级分离扩增 SMART 文库^[9]的全长率相当。说明改进 SMART 方法在保证全长率的情况下,提高了 SMART 方法中文库插入片段的长度,为大片克隆的获得提供了保障。

从构建文库的实验过程来看,改进 SMART 方法要比 Ruth Wellenreuther 等构建的分级分离后再扩增的 SMART 文库^[9]显得更简单、快捷、易操作。Ruth Wellenreuther 等采用的方法^[9]需要经过两种连续的琼脂糖凝胶电泳,电泳时间需要 16 个小时左右,操作相对复杂,所需时间长,并且回收不同片段大小的凝胶片段时,由于分级前 dsCDNA 只经过 3 个循环的扩增,凝胶中 dsCDNA 的量特别低,要求极高的琼脂糖凝胶回收技术。而改进 SMART 方法先扩增 dscDNA,再用普通琼脂糖凝胶分级分离并分别进行载体连接和转化,提高了与载体连接的大片段 dscDNA 的量,间接削弱了 PCR 扩增对大片段基因克隆的不利影响。这种简单的改进在保证全长率的基础上,使文库中插入片段的长度得到了比较显著的提高,这在很大程度上提高了文库中表达基因的代表性,有利于大量基因的鉴定与发掘。

为了保证所建文库的质量,改进方法与原始方法相比有二个值得注意的问题:一是在切胶时,将 dscDNA 的下限设为 0.5kb,以保证全长率;对于上限的设定需要根据紫外灯下 dscDNA 所显示的亮度决定,对于亮度表现不明显的部分,切胶时选择放弃,以保证较高的回收效率和回收后 dscDNA 的浓度。二是严格控制用于连接的 dscDNA 的量。多次重复的连接梯度实验表明,100ng~200ng 的 dscDNA 与 100ng 的 pDNR-LIB 载体连接所建文库的库容量和代表性最佳。如果 dscDNA 偏少,会降低亚库的容量;如果 dscDNA 偏多,不仅降低亚库文库

的容量,而且会导致亚库中小片段克隆偏多,影响文库表达基因的代表性。

参 考 文 献

- 1 傅作申,程远国,张玉静,等.用长距 PCR 法构建恶性疟原虫全长 cDNA 表达文库[J].热带医学杂志,2002,2(3):225-229.
- 2 高健,许晓风,乌慧玲,等.特异种质烟草全长 cDNA 文库的构建及质量分析[J].安徽农业大学学报,2004,31(1):22-25.
- 3 Liu W H, Wang Y L, Chen H P et al. The construction of cDNA expression library from the tentacles of sagartia rosea[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2002, 18(6): 749-753.
- 4 涂艳阳,徐如祥,杨志林,等.人脑瘤组织全长 cDNA 文库的构建[J].第一军医大学学报,2003,23(9):916-920.
- 5 Gou D M, Chow L M, Chen N Q et al. Construction and characterization of a cDNA library from 4 week old human embryo[J]. Gene, 2001, 278(1-2): 141-147.
- 6 王艺磊,张子平.日本对虾精巢和卵巢全长 cDNA 文库的构建[J].动物学杂志,2003,38(2):9-13.
- 7 Seki M, Carninci P, Y Nishiyama et al. High efficiency cloning of Arabidopsis full length cDNA by biotinylated CAP trapper[J]. The Plant Journal, 1998, 15(5): 707-720.
- 8 Maruyama K, Sugano. Oligo capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides[J]. Gene, 1994, 138(1-2): 171-174.
- 9 Wellenreuther R, Schupp I, A Poustka et al. The German cDNA Consortium. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full length clones[J]. BMC Genomics, 2004, 5(36): 1-8.
- 10 Pesole G, Liuni S, Grillo et al. Structural and compositional features of untranslated regions of eukaryotic mRNAs[J]. Gene, 1997, 205(1-2): 95-102.
- 11 Pesole G, Gissi C, Grillo et al. Analysis of oligonucleotide AUG start codon context in eukaryotic mRNAs[J]. Gene, 2000, 261(1): 85-91.
- 12 Pesole G, Mignone F, Gissi et al. Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions[J]. Gene, 2001, 276(1-2): 73-81.
- 13 Mignone F, Gissi C, Liuni et al. Untranslated region of mRNAs[J]. Genome Bio, 2002, 3(3): REVIEW S0004.
- 14 Kozak M. Recognition AUG and alternative initiator codons augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6[J]. EMBO J, 1997, 16(9): 2482-2492.
- 15 Kochetov A V, Symk O A, I B Rogozin et al. Context organization of mRNA 5'-untranslated regions of higher plants[J]. Mol Biol (Mosk), 2002, 36(4): 649-656.

A IMPROVED SMART METHOD TO CONSTRUCTION FULL LENGTH cDNA LIBRARY FOR LARGE CLONES

Dong Zhimin^{1, 2} Li Yinghui² Zhang Baoshi¹ Guan Rongxia² Chang Ruzhen² Qiu Lijuan²

(1. *College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161;*
2. *National Key Facility of Crop Gene Resources and Genetic Improvement,
Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology (MOA) / Institute of Crop
Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

Abstract It is difficult to obtain large clones among the SMART library due to PCR amplification impairing the proportion of large clones. According to this, SMART method was improved based on the primary SMART method. The soybean leaves cDNAs were separated into three parts based on the size distribution of amplified cDNA by agarose gel size fractionation. Each of three parts was ligated respectively to vector and transformed to Ecoli. The sub library contain about 1.0×10^6 clones. The recombination ratio was nearly 99% and full length ratio was 53.6% which was correspondence with that of primary SMART library. The inserts size ranged between 0.5kb to 3.5kb and the size of largest inserts was about 1.5kb larger than that of primary SMART method. The improved SMART method increased obviously the large clone proportion among the library which was in favor of soybean functional genomics research.

Key words Improved SMART; Amplified cDNA size fractionation; Full length cDNA library; Large clones

欢迎订阅 2007 年《中国组织工程研究与临床康复》杂志

经新出报刊[2006]288号批准,《中国临床康复》更名为《中国组织工程研究与临床康复》,变更后国内统一连续出版物号为 CN11-5516/R。

更名后的《中国组织工程研究与临床康复》2007年出版53期:每月第1周出版:种子细胞研究(全年12期);每月第2周出版:组织构建研究(全年12期);每月第3周出版:生物材料研究(全年12期);每月第4周出版:临床应用研究(全年12期);每月第5周出版:康复工程研究(全年5期)。

本刊诚邀组织工程及其相关领域各类资金资助课题论文,博士后、博士、硕士优秀答辩论文,上述项目的开题综述类稿件!诚邀院士指导项目论文,“长江学者”课题论文,国际合作项目课题论文以及前瞻性、多中心、开放式课题的论文!诚邀新、老作者以及中、英文体例投稿,尤其欢迎中医药方面的相关研究论文及其学术探讨!

本刊“绿色特快通道”承诺修回稿件3个月内出版,一般稿件修回后6个月出版。设有咨询电邮:szb100@zglckf.com。国内订阅邮发代号:8-584;本社订阅:辽宁省沈阳1200邮政信箱;邮编:110004;咨询电话:024-23389106,024-23384352;传真:024-23381085;E-mail:kf23385083@sina.com kf22838105@sina.com;网址:www.zglckf.com