

Gateway[®] 技术构建交链孢菌 JH505 cDNA 文库

龙松华^{1,2} 张 宁¹ 邱德文^{1*} 黎定军² 黄 炜¹

(¹ 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所 北京 10081)

(² 湖南农业大学生物安全科技学院 长沙 410128)

摘 要 Gateway[®] 技术构建 cDNA 文库,利用 λ 噬菌体的位点特异性重组,避免使用限制性内酶切割 cDNA,能够解决常规方法构建 cDNA 文库的技术缺陷。首次应用 Gateway[®] 技术构建交链孢菌 cDNA 文库,经检测 cDNA 入门文库的滴度达到 1×10^7 cfu/mL,文库总容量为 9×10^7 cfu,平均插入片段为 1510bp。通过 LR 重组把入门文库转换为表达文库,表达文库的滴度为 1.58×10^6 cfu/mL,文库总容量为 6.32×10^6 cfu,平均插入片段大小为 1680bp。表达文库的构建为进一步克隆植物激活蛋白基因打下了基础。

关键词 Gateway[®] 技术, 交链孢菌, 激活蛋白, cDNA 入门文库, cDNA 表达文库

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1001-6209 (2005) 06-0963-03

Gateway[®] 技术是在 λ 噬菌体整合酶-切除酶系统基础上创建一种通过体外特异位点重组反应(即 λ -att 重组系统)^[1,2],并在该重组系统的基础上进行一系列修饰、改造,提高了这一重组系统的效率与特异性^[3]。应用 Gateway[®] 技术构建 cDNA 文库具有下列优点:在 cDNA 克隆中不必使用限制性内切酶消化再与载体进行连接反应,cDNA 嵌合体克隆出现的机率明显低于通过切割连接克隆方法构建的 cDNA 文库。重组克隆法的转化效率大约是切割连接克隆方法的 10 余倍,阳性克隆率可达到 100%,片段偏向性只有切割连接克隆方法的 1/5,克隆中插入的 cDNA 片段平均大小高于切割连接克隆方法^[4,5]。构建的 cDNA 文库具有更大灵活性,将 cDNA 片段重组到入门载体中,构建出入门文库,入门文库构建简单、克隆效率高、能够较好地保存和扩繁 cDNA 片段。通过 LR 重组能够很容易将目的基因转化到其它的表达系统中,包括哺乳动物,昆虫,酵母和大肠杆菌来进行进一步的研究,这些转换过程中不需要进行亚克隆。

据 Invitrogen 公司网站(www.invitrogen.com),至今有近百篇文章报道应用了 Gateway[®] 技术。Ohara 等^[4,5]最早从事将 Gateway[®] 技术应用于 cDNA 文库构建上的研究。美国 Invitrogen 公司于 2003 年开发的专门应用于高质量构建的 CloneMiner[™] cDNA Library Construction Kit 整合了 Gateway[®] 技术,并进行了完善,使构建 cDNA 文库简单、系统、高效。在国内,2004 年后已有使用 Gateway[®] 技术的相关报道^[6,7],但利用此技术构建真菌 cDNA 文库未见报道。

交链孢菌是一类重要的植物病原菌,引起多种世界性的植物病害。从交链孢菌 JH505 菌株中分离一类新型的蛋白,这类蛋白启动植物防卫反应,激活植物的免疫系统,提高植

物自身免疫力,通过调节植物生长代谢系统,促进植物生长,提高作物产量和产品品质。根据其作用机理将此蛋白命名为植物激活蛋白(Plant Activator Protein)^[8]。本研究通过体外特异位点重组克隆方法构建交链孢菌 cDNA 文库,以期通过免疫筛选获取植物激活蛋白基因。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 交链孢菌(*Alternaria* sp.) JH505 由本所药物工程实验室保存,大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 菌株购于北京天为时代生物技术公司。

1.1.2 主要试剂 TRIzol Reagent, CloneMiner[™] cDNA Library Construction Kit, Micro-FastTrack 2.0 mRNA Isolation Kit, LR Clonase[™] Enzyme Mix 购于 Invitrogen 公司。限制性内切酶 BsrG I 购于 NEB 公司。质粒提取试剂盒购于北京天为时代生物技术公司。

1.2 总 RNA 提取和纯化

将交链孢菌接种 PDA 液体培养基,28℃、200r/min,培养 60h,抽滤,取 0.5g 样品液氮研磨,立即加入 5mL TRIzol Reagent,混匀,分装到 4 个 DEPC 处理的 1.5mL 离心管中,以下步骤按照 TRIzol Reagent 说明书进行。每管用 50 μ L DEPC 处理的水溶解 RNA。通过紫外分光光度计和甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度、浓度和完整性。取 1mg 总 RNA 用 Micro-FastTrack 2.0 mRNA Isolation Kit 参照试剂盒说明书进行 mRNA 纯化,检测 mRNA 质量。

1.3 cDNA 合成和片段分级

取纯化的 mRNA 5 μ g,加入 SuperScript[™] II 等试剂反转录

基金项目 国家“973 项目”(2003CB114204)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62139620 E-mail: dewenqiu@hotmail.com

作者简介 龙松华(1979-),男,湖南怀化人,硕士研究生,从事植物激活蛋白基因克隆方面的研究。E-mail: longsonghua79452@sohu.com

收稿日期 2005-04-05,修回日期 2005-06-20

合成一链,加入 *E. coli* DNA Ligase、*E. coli* DNA Polymerase I、*E. coli* RNase H 等试剂,合成第二链 cDNA,连接 attB₁ 接头。cDNA 片段分级 采用色谱柱法,试剂盒提供的色谱柱每个含有 1mL Sephacryl S-500 HR 树脂,按照说明书操作,检测 cDNA 纯度与浓度。

1.4 BP 连接、转化和入门文库的构建

取分级后 cDNA 合适大小片段 150ng 左右用 BP Clonase™ Enzyme Mix 与 pDONR™222 载体进行 BP 连接反应。采用电击转化法转入大肠杆菌 DH10B 感受态细胞。37℃、200r/min 培养 1h,加入冷冻培养基(含 40% 甘油的 SOC 培养基),液氮速冻,−70℃ 下保存,即为构建的 cDNA 入门文库。

1.5 入门文库滴度和质量检测

从文库中取 100μL 菌液用 SOC 培养基稀释到 100 倍、1000 倍和 10000 倍。从中各取 100μL 涂含 Kanamycin 的 LB 平板(直径 9cm),每种稀释倍数涂板两个。培养 12~16h,计算其克隆数。根据公式 文库的滴度 = 平板上克隆数 × 稀释倍数 / 涂板体积,计算出文库滴度,从而得出文库的总容量。

随机挑取 24 个单克隆,提取质粒,限制性内切酶 BsrG I 消化,电泳检测;并根据载体设计引物, M13 上游:5'-GTAAAACGACGGCCAG-3', M13 下游:5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'扩增插入片段。检测入门文库阳性克隆率及平均插入片段大小。

1.6 表达文库的构建及文库质量评价

将入门文库 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cfu 接种到 50mL 含有 Kanamycin 的 LB 培养基中,培养至 OD₅₅₀ 为 1.0,提取质粒,取 300ng,在 LR Clonase™ Enzyme Mix 作用下与 Gateway 载体 pDEST-17 进行 LR 重组,重组载体转化大肠杆菌 BL21 菌株,构建表达文库。文库质量评价方法除抗生素用 Ampicillin 代替 Kanamycin 外其它同初始文库。

2 结果

2.1 总 RNA 提取和 RNA 纯化

总 RNA 样品经分光光度计检测,OD_{260/280} 为 1.946,浓度为 13.18 μg/μL,总共得到 200μL。经甲醛变性凝胶电泳检测,28S rRNA 亮度与宽度大致为 18S rRNA 两倍,5S rRNA 的亮度较弱,说明总 RNA 样品完整且纯度较高。1mg 总 RNA 样品经 mRNA 纯化后,分光光度计检测,OD_{260/280} 为 2.19,浓度为 0.93μg/μL,共得到 10μL。

2.2 cDNA 合成及片段分级

合成 cDNA 第一链、二链后进行片段分级,收集 22 管片段分级样品,经含荧光染料 Goldview 琼脂糖平板检测各管 cDNA 样品浓度,从第 3 管到第 22 管样品浓度均大于 5ng/μL,从 14 管起,片段较小,可能含有 attB 接头,为得到合适大小 cDNA 片段,并尽可能包含更多的片段,合并第 3 管到第 13 管的样品,乙醇沉淀 cDNA,用 4.5μL TE 缓冲液重悬 cDNA 沉淀,分光光度计检测,OD_{260/280} 为 1.86,共得到 350ng 样品。

2.3 入门文库构建及质量评价

经检测,入门文库的滴度为 1×10^7 cfu/mL,文库总容量

为 9×10^7 cfu。随机提取 24 个克隆质粒,经 BsrG I 消化和 PCR 扩增后电泳检测结果(图 1-A、B)表明,检测阳性克隆率为 100%,平均插入片段大小为 1510bp。按照 CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit 要求,一个高质量的 cDNA 文库,其滴度应大于 1×10^6 cfu/mL,文库总容量大于 5×10^6 cfu,阳性克隆率大于 95%,平均插入 cDNA 片段大于或等于 1500bp。因此,构建的入门文库是一个高质量的 cDNA 文库。

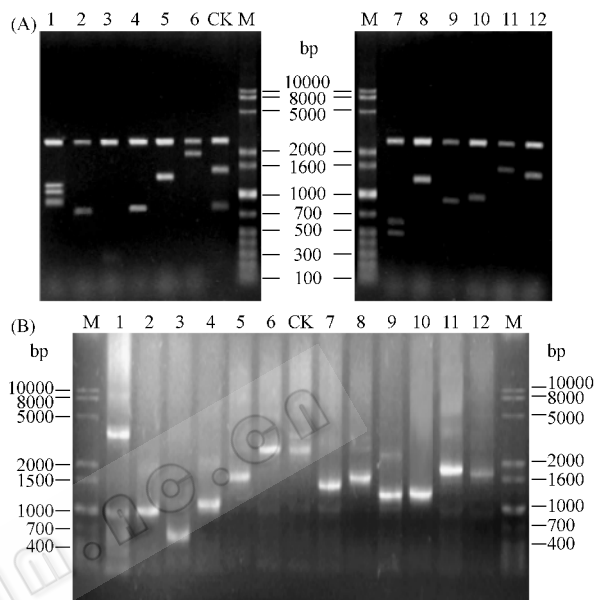


图 1 入门文库质量检测

Fig. 1 Qualifying the entry library

A: Restriction analysis of recombinant plasmids digested with BsrG I;

B: PCR products.

M. Marker; CK. pDONR™222; 1~12. Recombinant plasmids.

2.4 表达文库构建及质量评价

经检测,表达文库的滴度为 1.58×10^6 cfu/mL,文库总容量为 6.32×10^6 cfu。随机提取 24 个克隆质粒,经 BsrG I 消化后电泳结果表明(图 2),检测阳性克隆率为 100%,平均插入片段大小为 1680bp。结果表明,构建的表达文库也是一个质

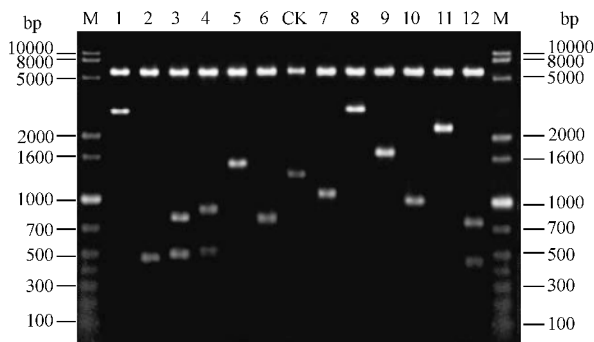


图 2 表达文库克隆的质粒限制性内切酶 BsrG I 消化电泳图谱

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmids from Expression library

M. Marker; CK. pDONR™222 digested with BsrG I; 1~12.

Recombinant plasmids digested with BsrG I.

量较高的 cDNA 文库。

3 讨论

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。经过初步检测分析,本实验所构建的交链孢菌 cDNA 入门文库与表达文库均是高质量的 cDNA 文库:(1)文库的克隆效率高,入门文库总容量达到 9×10^7 cfu,表达文库达到 6×10^6 cfu;(2)阳性克隆率高,入门文库与表达文库的阳性克隆率均为 100%;(3)插入 cDNA 片段绝大多数在 1kb 以上,入门文库平均插入片段大小为 1510bp,表达文库为 1680bp。另外,文库构建操作方法简单化、系统化,通过一周时间构建入门文库后,就可以不必经过繁琐亚克隆操作直接进入其它系统,构建的文库可用于进一步研究。

以交链孢菌 JH505 为材料,应用 Gateway® 技术构建的高质量 cDNA 文库,为物激活蛋白的基因克隆与表达奠定基础,有助于促进蛋白农药生物合成和提高蛋白农药的生物活性研究的开展。另一方面,也为交链孢菌相关分子学及遗传背景研究提供了研究材料。

参 考 文 献

- [1] Walhout A J, Sordella R, Lu X, *et al.* Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science*, 2000, **287**:116–122.
- [2] Hartley J L, Temple G F, Brasch M A, *et al.* DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res*, 2000, **10**:1788–1795.
- [3] Bushman W, Thompson J, Vargas L, *et al.* Control of directionality in Lambda site specific recombination. *Science*, 1985, **230**:906–911.
- [4] Ohara O, Temple G. Directional cDNA library construction assisted by the in vitro recombination reaction. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**:1–8.
- [5] Ohara O, Nagase T, Mitsui G, *et al.* Characterization of size-fractionated cDNA libraries generated by the in vitro recombination-assisted method. *DNA Research*, 2002, **9**:47–57.
- [6] 梅文倩,宋文强,潘 怡,等.利用 Gateway 克隆技术大规模克隆拟南芥转录因子.分子植物育种,2004,2(3):358–364.
- [7] 陈其军,安 瑞,周海梦,等.使用与 Gateway 技术兼容的 T 载体获得入门克隆.生物化学与生物物理进展,2004,31(10):951–954.
- [8] 邱德文.微生物蛋白农药研究进展.生物防治,2004,20(2):91–94.

Construction of a cDNA library of *Alternaria* sp. strain JH505 using Gateway technology

LONG Song-hua^{1,2} ZHANG Ning¹ QIU De-wen^{1*} LI Ding-jun² HUANG Wei¹

(¹ Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(² College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: A cDNA library was constructed based on the Gateway® system that is a method to construct a high-quality cDNA library without the use of restriction enzyme for cloning. This is the first report that the Gateway® system is used to construct a cDNA library for *Alternaria* sp.. The entry cDNA library was constructed in this report has a high titer of 1×10^7 cfu/mL and contain a total clones of 9×10^7 cfu, with an average inserts size of about 1510bp. In order to screen for a gene encoding the plant activator protein from library using an antiserum, the entry cDNA library was transferred into Gateway® destination vector to create an expression library. The expression library show a high titer of 1.58×10^6 cfu/mL and contains a total clones of 6.32×10^6 cfu, with an average inserts size of 1680bp.

Key words: Gateway® method, *Alternaria* sp., Plant activator protein, cDNA entry library, cDNA expression library