

鸡胚成纤维细胞 cDNA 表达文库的构建

刘 伟^{1,2} 高玉龙¹ 高宏雷¹ 王笑梅^{1,3*} 许修宏²

(¹ 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 禽传染病研究室 哈尔滨 150001)

(² 东北农业大学资源与环境学院微生物系 哈尔滨 150030)

(³ 黑龙江省农业科学院 博士后科研工作站 哈尔滨 150001)

摘 要 鸡胚成纤维细胞(CEF)是研究鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)的主要细胞材料,而构建 CEF 的 cDNA 表达文库是筛选 IBDV 在 CEF 中的细胞受体,研究细胞嗜性的基础平台。采用 Gateway 技术构建 CEF 的表达文库,避免使用限制性内切酶切割 cDNA,能够解决常规方法构建 cDNA 文库的技术缺陷。该技术将 CEF 的 mRNA 分离纯化后,以 5' 端生物素标记的 Oligo(dT) primer 为引物反转录后连接 Adapter,层析柱纯化,通过 BP 重组反应构建 cDNA 入门文库,其平均滴度为 1.1×10^6 cfu/mL,文库总容量为 1.2×10^7 cfu,平均插入片段为 2243bp,重组率为 100%。通过 LR 重组反应将入门文库转换为表达文库,经测定平均滴度为 5×10^5 cfu/mL,文库总容量为 5.5×10^6 cfu,平均插入片段为 2411bp,重组率为 100%。结果表明,所构建的文库具有较高的重组率和较大的库容量,可作为较高质量的文库来研究 IBDV 的相关基因,为研究病毒受体和病毒入侵途径,进一步了解 IBDV 的致病机理奠定了基础。

关键词: 鸡胚成纤维细胞(CEF); Gateway 技术; cDNA 表达文库; 传染性法氏囊病病毒(IB DV)

中图分类号: Q78 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2007)03-0413-05

鸡传染性法氏囊病(*Infectious Bursal Disease*, IBD)是由鸡传染性法氏囊病病毒(*Infectious Bursal Disease Virus*, IBDV)引起的一种危害鸡的急性、高度接触性传染病。IBDV 主要侵染幼鸡未成熟的 B 淋巴细胞,3~6 周龄的幼鸡为易感鸡群,年龄较大的鸡具有一定抵抗力,小于 3 周龄的雏鸡感染后会产生严重的免疫抑制^[1-3],但不表现临床症状。迄今,此病在世界范围内均有报道,我国的流行情况也十分复杂,变异株和超强毒株均有报道,使养禽业承受重大经济损失。

IBDV 感染鸡体的主要靶器官是法氏囊,主要靶细胞是 B 淋巴细胞^[4]。IBDV 的超强毒株只适应鸡的 B 淋巴细胞,但其可通过鸡胚传代的方法致弱。超强毒株(vvIBDV)的致弱与细胞嗜性的改变相伴而生^[5]。致弱后的毒株可以在鸡胚成纤维细胞(CEF)上增殖。本实验室已将 vvIBDV Gx 株经过在鸡胚上传 5 代、CEF 上传 20 代获得相应的致弱疫苗株 Gt 株^[6]。Brandt 等^[8]研究表明,IBDV 超强毒株在 CEF 细胞没有受体,在其传代致弱过程中,VP2 基因的几处核苷酸改变导致其细胞嗜性的改变,然而致弱毒株与 CEF 细胞如何作用及病毒的 CEF 细胞受体还未见相关报道。

Gateway 技术是一种新的通用型克隆系统,它整合了各种克隆载体的技术平台,可加快达到最终研究目标的速度。该技术克服了其它技术常用的两种方法:酶切和连接、PCR 产品克隆等相关的制约因素。Gateway 技术基于已被详尽研究的 λ 噬菌体位点特异性重组系统,使得在不同的克隆载体之间转移 DNA 片段、保持基因定位和阅读框架及有效地取代使用限制性内切酶和连接酶进行克隆和亚克隆的方法成为可能,具有简单快速、克隆效率高、方便灵活等特点^[7]。

鸡胚成纤维细胞(CEF)是实验常用的细胞原料之一,也是研究 IBDV 的主要细胞材料,因此鸡胚成纤维细胞 cDNA 文库对研究 IBDV 具有广泛的应用价值。本试验运用 Gateway 技术成功构建了鸡胚成纤维细胞的 cDNA 表达文库,为进一步研究 IBDV 在鸡胚成纤维细胞中的病毒受体及其细胞嗜性提供了理论物质基础,同时也为研究其它适应于鸡胚成纤维细胞上生长的病毒提供可靠的试验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 SPF 鸡胚: 试验所用 SPF 鸡胚由中国农业科

基金项目: 国家 973 项目(2005CB523202)

* 通讯作者。Tel 86-451-85935047; Fax 86-451-82762510; E-mail: xmw@hvri.ac.cn

作者简介: 刘 伟(1979-)男,黑龙江牡丹江人,硕士研究生,主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。E-mail: lw-790613@126.com

收稿日期: 2006-09-13; 接受日期: 2006-10-20; 修回日期: 2007-01-25

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

1.1.2 载体与引物:载体 pDONR™ 221、pDEST™ 22 购自美国 Invitrogen 公司,所有引物由上海英俊公司合成,序列见表 1。

表 1 Oligo(dT) primer 和载体引物序列

Table 1 The sequence of Oligo(dT) primer and vector primer	
Name of primers	Sequence of primers(5'→3')
Oligo(dT) primer	Biotin-GGCGGCCGCACAACCTTTGTA CAAGAAAGCTGGG(T) ₉
Adapter	TCGTCGGGGACAACCTTTGTACAAAAAGCAGGCT CCCCTGTGAAACATGTTTTTCGTCCGAp
M13	GTCATAGCTGTTTCCTG GACCGGCAGCAAAATGTTG

1.1.3 主要试剂:TRIzol™ 总 RNA 提取试剂、FastTrank 2.0 mRNA 纯化试剂盒、SuperScript™ III 反转录酶、*E. coli* DNA Ligase、*E. coli* DNA Polymerase、*E. coli* RNase H、T4 DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、cDNA Size Fractionation Columns、BP Clonase™ Enzyme Mix、LR Clonase™ Enzyme Mix 均购自美国 Invitrogen 公司, *Bsr*G I 限制性内切酶购自纽英伦生物技术有限公司。

1.2 鸡胚成纤维细胞的制备

取 10 日龄鸡胚,按常规方法制备细胞^[9],分装至细胞瓶,37℃培养待用。

1.3 细胞总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化

将鸡胚细胞传一代后,细胞铺满瓶壁时,弃去培养液,用 TRIzol™ 提取总 RNA,用 FastTrank 2.0 mRNA 纯化试剂盒分离 mRNA,按试剂盒说明操作。纯化的 mRNA 经分光光度计检测吸光度后用于构建文库。

1.4 cDNA 第一链的合成

将 3μg mRNA 溶于 DEPC 水至 9μL,加入 1μL Oligo(dT) primer、1μL dNTPs,65℃ 5min,冷却到 45℃ 后加入 4μL 5× 第一链 Buffer、2μL 0.1mol/L DTT、1μL DEPC 水,45℃ 2min,小心加入 SuperScript™ III 反转录酶 45℃ 60min,合成 cDNA 第一链。

1.5 cDNA 第二链的合成

加入 *E. coli* DNA Ligase(10U/μL)1μL、*E. coli* DNA Polymerase(10U/μL)4μL、*E. coli* RNase H(2U/μL)1μL、10mmol/L dNTP Mix 3μL,16℃作用 2h,合成第二链。

1.6 连接 Adapter

将合成的第二链 cDNA 加入 2μL T4 DNA Ligase 产生平末端,16℃ 5min,加入 10μL 0.5mol/L EDTA pH8.0 终止反应。用 160μL 酚:氯仿:异戊醇 25:24:1 抽提,取上清加入 80μL 7.5mol/L NH₄AC、600μL

100%乙醇干冰中沉淀 10min,4℃ 14000r/min,离心 25min,70%乙醇洗一遍,用 18μL DEPC 水重悬沉淀,在沉淀中加入 attB1 Adapter 10μL、5× Adapter Buffer 10μL、0.1mol/L DTT 7μL、T4 DNA 连接酶 5μL,16℃作用 24h。

1.7 纯化

由于 cDNA 纯化柱可以阻止小片段的 DNA,如残留的 Adapters 和小的 cDNA(500bp),将第二链连上 Adapter 后,放入 cDNA 纯化柱过滤纯化,只收集 600μL 以前的过滤液进行平板印迹试验(PSA)来估算 cDNA 的产量。

1.8 BP 重组反应、转化构建入门文库

混合纯化后的 75~100ng cDNA、BP Clonase™ Enzyme Mix 与 pDONR™ 221 载体,进行 BP 重组反应。采用电转化法将重组反应产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。37℃、200r/min 培养 1h,加入等体积的冷冻培养基(含 40%甘油的 SOC 培养基),-70℃保存,即为构建的 cDNA 入门文库。

1.9 入门文库的鉴定

从文库中取出 100μL cDNA 样品用 SOC 培养基系列稀释 10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍。从中各取 100μL,分别涂含 5% Kanamycin 的 LB 平板,每种稀释度涂两个板,37℃条件 12~16h 后进行计数,计算文库滴度,从而得出文库的总容量。从平板上随机挑选 24 个克隆,提取质粒,用限制性内切酶 *Bsr*G I 进行酶切消化,1%琼脂糖凝胶电泳分析插入片段大小和阳性克隆重组率。根据载体 pDONR™ 221 设计引物 M13(表 1)扩增插入片段,验证插入片段的准确性。

1.10 序列测定及分析

随机挑选 9 个入门文库克隆进行序列测定。

1.11 表达文库的构建及鉴定

取 1.1×10^6 cfu 接种到 50mL 含 5% Kanamycin 的 LB 中,37℃、260r/min 培养到 OD_{600} 大约为 1,提取质粒,稀释定量到 25ng/μL。混合 2μL 文库质粒、3μL pDEST™ 22 载体、2μL LR Clonase™ Enzyme Mix 和 3μL TE Buffer,25℃条件下 16~20h,进行 LR 重组反应。将重组产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,转化方法与文库鉴定同入门文库。

2 结果

2.1 提取的鸡胚成纤维细胞总 RNA 和纯化的 mRNA 的质量分析

提取的细胞总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳,结

果可见 28S 和 18S 核糖体 RNA 条带清晰 (图 1) 。分离纯化的 mRNA 呈涂布状分布 , 与预期结果相符。经分光光度计测定总 RNA 和 mRNA 的 A_{260}/A_{280} 分别为 1.93 和 1.96 , 说明纯度较高。

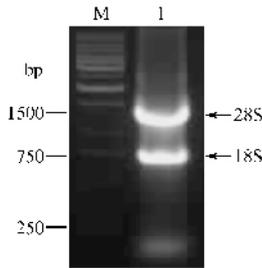


图 1 鸡胚成纤维细胞总 RNA 电泳图

Fig.1 Total RNA isolated from chicken embryo fibroblast. M. Marker 1kb DNA Ladder ; 1. Total RNA

2.2 cDNA 的鉴定

将合成的双链 cDNA 经过柱层析 , 分离不同大小片段 cDNA 共 20 管 , 经平板印迹试验测定 cDNA 产量 (图 2) , 留取 600 μ L 以前的 cDNA , 其双链 cDNA 产量的计算结果见表 2。

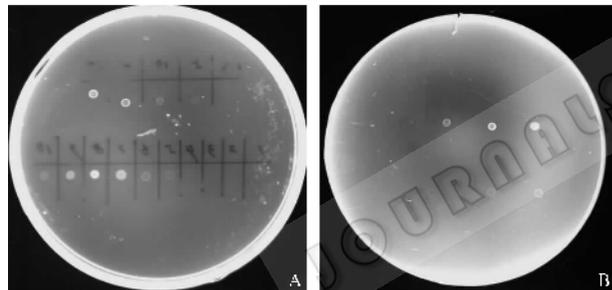


图 2 平板印迹实验 (PSA) 估算双链 cDNA 图

Fig.2 The yield of cDNA calculated by PSA. The above row in left plate : pExp7-tet control DNA is 50ng/ μ L , 25ng/ μ L , 10ng/ μ L , 5ng/ μ L , 1ng/ μ L from left to right. The lower row in plate : separated into 10 pipes collected cDNA before 600 μ L. The above row in right plate : pExp7-tet control DNA is 1ng/ μ L , 5ng/ μ L , 10ng/ μ L , 25ng/ μ L from left to right. The lower row in the plate : the collected 6 ~ 8 cDNA are calculated by diluted 1:5 , 1:10 , 1:20.

表 2 柱层析后去除 < 500bp 片段后的双链 cDNA 经 PSA 估算的产量

Table 2 Amount of ds-cDNA without the size-fractionation (< 500) estimated by Plate Spotting Assay

No.	Fraction volume / μ L	Amount of cDNA /ng	c (cDNA) (ng/ μ L)
6	58	58	1
7	42	126	3
8	53	159	3
9	50	150	3
10	52	156	3

2.3 文库滴度的测定

根据公式 : 平均滴度 (cfu/mL) = 平均克隆数 \times 稀释倍数 / 涂板体积 , 算出入门文库平均滴度 = 1.1×10^6 (cfu/mL) , 文库总容量为 1.2×10^7 cfu , 表达文库平均滴度 = 5×10^5 (cfu/mL) , 文库总容量为 5.5×10^6 cfu。

2.4 cDNA 入门文库与表达文库的质量鉴定

载体 pDONRTM221 经 *Bsr*G I 酶切后有 3 条标准条带 , 分别为 2.5kb、1.4kb 和 790bp (图 3) 。插入片段的克隆经 *Bsr*G I 酶切后在 2.5kb 处与空载体重合 , 其它插入片段成不均匀分布 , 且大小都不一样 , 与空载体没有重合的条带。载体 pDESTTM22 经 *Bsr*G I 酶切后有 4 条标准条带 , 分别为 6.1kb、1.4kb、1.1kb 和 380bp (图 4) 。插入片段的克隆经 *Bsr*G I 酶切后在 6.1kb 和 1.1kb 处与空载体重合 , 其它插入片段成不均匀分布 , 且大小都不一样 , 与空载体没有重合的条带 , 说明插入的片段都是阳性。平均插入片段入门文库为 2243bp、表达文库为 2411bp , 23 个克隆的插入片段均与载体片段不一样 , 重组率为 100%。经 PCR 扩增后的结果 (图略) 与酶切结果条带相符 , 验证了文库的准确性。

2.5 序列测定及生物信息学分析

从入门文库中随机挑取 9 个克隆 , 对其插入的 cDNA 片段进行测序 , 并于 GenBank 数据库进行核苷

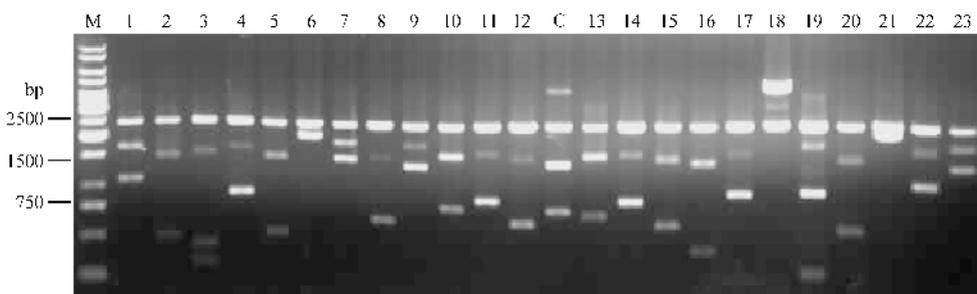


图 3 入门文库经 *Bsr*G I 酶切图

Fig.3 Analysis of size-fractionated cDNA inserted the pDONRTM221 vector. M. 1kb DNA Ladder ; 1 ~ 23. The 23 recombinants digested by *Bsr*G I enzyme respectively ; C. result of the pDONRTM221 vector digested by *Bsr*G I enzyme.

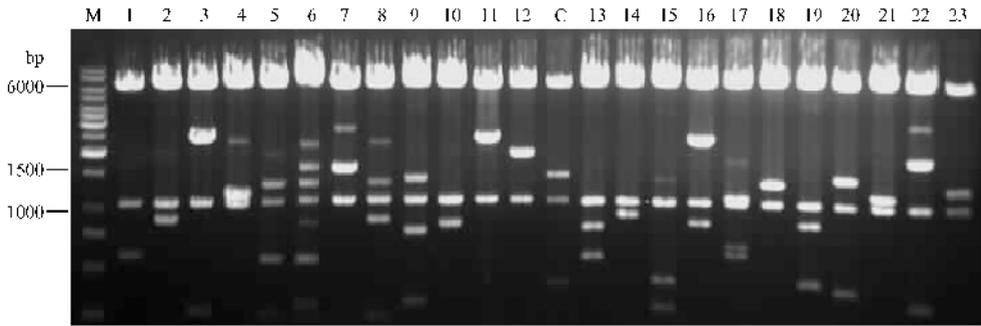


图4 表达文库经 *BsrGI* 酶切图

Fig.4 Analysis of size-fractionated cDNA inserted the pDEST™22 vector. M. 1kb DNA Ladder ;1~23. The 23 recombinants digested by *BsrGI* enzyme respectively ; C. result of the pDEST™22 vector digested by *BsrGI* enzyme.

酸同源性比较 结果显示 9 个克隆中有 7 个与编码原鸡 (*Gallus gallus*) 相关基因有较高的同源性, 另外 2 个为未知基因。

3 讨论

通过运用 Gateway 技术将目的基因克隆到载体, 不需要使用限制性内切酶和连接酶, 大大减轻了实验操作的复杂性, 并且由于 3' 端用生物素标记, 接头只能连接在 5' 端, 大大提高了连接效率。重组时 DNA 片段的阅读框和方向保持不变, 因而为新的克隆测序、表达提供了便利条件。本试验所构建的文库运用了 Invitrogen 公司的入门克隆载体 pDONR™221^[10], 通过重组反应, 可以将该入门文库方便的转移到原核、真核、酵母、昆虫、酵母双杂交等表达系统^[11~13], 为文库的下一步表达、筛选提供了方便。

高质量的 cDNA 文库应满足如下条件 (1) 文库总容量不低于 1.7×10^5 cfu (2) 插入片的平均长度不能低于 1.0kb (3) 文库重组率不能低于 90%。本试验所构建的鸡胚成纤维细胞表达文库, 其平均滴度为 5×10^5 cfu/mL, 文库总容量为 5.5×10^6 cfu, 平均插入片段为 2411bp, 重组率为 100%, 均达到了构建一个高质量的文库所应具备的条件^[14,15], 完全可以满足下一步的研究应用。

采用分子克隆技术构建不同组织的 cDNA 文库, 然后用已知基因从中筛选分离目的基因, 是获取新基因的重要手段。cDNA 分子不含内含子序列和调控序列, 且与蛋白质的氨基酸序列具有对应性, 因此构建 cDNA 文库是筛选新基因、分离已知基因、揭示某些因素对基因表达影响的基础, 尤其是目前正蓬勃发展起来的酵母双杂交技术更离不开 cDNA 文库这一基础平台^[16]。由于鸡胚成纤维细胞是研

究传染性法氏囊病病毒的主要试验用细胞, 而到目前为止还未见有关鸡胚成纤维细胞文库构建的报道, 本试验所构建的鸡胚成纤维细胞表达文库, 为研究鸡传染性法氏囊病病毒的相关基因以及从分子水平研究激活蛋白提供了基础, 为通过酵母双杂交来筛选病毒在鸡胚成纤维细胞中的病毒受体提供了材料基础, 并在此基础上, 研究病毒受体与病毒的相互作用, 揭示病毒入侵途径, 进一步阐明鸡传染性法氏囊病病毒的致病机理奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Kelemen MK, Forgach J, Ivan V. et al. Pathological and immunological study of an *in ovo* complex vaccine against infectious bursal disease. *Acta Vet Hung*, 2000, **48**(4): 443-454.
- [2] Nagarajan MM, Kibenge FS. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. *Can J Vet Res*, 1997, **61**(2): 81-88.
- [3] Montgomery RA, Dallman MJ. Semi-quantitative polymerase chain reaction analysis of cytokine and cytokine receptor gene expression during thymic ontogeny. *Cytokine*, 1997, **9**(10): 717-726.
- [4] Gonzalez D, Rodriguez JF, Abaitua F. Intracellular interference of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 2005, 79: 4437-4441.
- [5] Muller H, Islam MR, Raue R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Vet Microbiology*, 2003, **97**(1-2): 153-165.
- [6] Wang XM, Fu CY, Gao HL, et al. Pathogenic antigenic and molecular characterization of the very virulent strain (Gx) of infectious Bursal disease virus isolated in China. *Agricultural Sciences in China*, 2003, **2**(5): 566-572.
- [7] Bushman W, Thompson J, Vargas L, et al. Control of directionality in Lambda site specific recombination. *Science*, 1985, **230**(4728): 906-911.
- [8] Brandt M, Yao K, Liu M, et al. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 2001, **75**(24): 11974-11982.
- [9] Mundt E, Vakharia VN. Synthetic transcripts of double-stranded Bimavirus genome are infectious. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,

- [10] Clepet C , Le Clainche I , Caboche M . Improved full-length cDNA production based on RNA tagging by T4 DNA ligase . *Nucleic Acids Res* , 2004 , **32** (1) :6.
- [11] Bracken CP , Whitelaw ML , Peet DJ , *et al.* Activity of hypoxia-inducible factor 2alpha is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator . *J Biol Chem* , 2005 , **280** (14) :14240 - 14251.
- [12] Poon E , Howman EV , Newey SE , *et al.* Association of syncoilin and desmin : linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex . *J Biol Chem* , 2002 , **277** :433 - 3439.
- [13] Gilmore PM , McCabe N , Quinn J E , *et al.* BRCA1 interacts with and is required for paclitaxel-induced activation of mitogen-activated protein kinase . *Cancer Res* , 2004 , **64** (12) :4148 - 4154.
- [14] Sambrook J , Russell DW . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . New York : Cold Spring Harbour Laboratory Press , 2001 , 11 . 857 - 11 . 889.
- [15] Yang F , He ZM , Zhan XQ , *et al.* Construction and identification of directional cDNA library from Chinese giant salamander *Andrias davidianus* liver . *Acta Zool Sin* , 2004 , **50** (3) :475 - 478.
- [16] Carninci P , Shibata Y , Hayatsu N , *et al.* Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes . *Genome Res* , 2000 , **10** (10) :1617 - 1630.

Construction of chicken embryo fibroblasts cDNA expression library

LIU Wei^{1,2} , GAO Yu-long¹ , GAO Hong-lei¹ , WANG Xiao-mei^{1,3*} , XU Xiu-hong²

(¹ Division of Avian Infectious Diseases , National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology , Harbin Veterinary Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Harbin 150001 , China)

(² North-east Agriculture University , Harbin 150030 , China)

(³ Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences , Post-Doctorate Scientific Mobile Station , Harbin 150030 , China)

Abstract : Chicken embryo fibroblast (CEF) is a primary cellular material to research the infectious bursal disease virus (IBDV) . Constructing the cDNA expression library of CEF is the foundation to research cell tropism and find cell receptors of IBDV from CEF . In order to achieve that purpose , a high-quality cDNA expression library of CEF was constructed by Gateway technology , which could avoid using the restriction enzyme for cloning to solve technical limitation of routine method . The mRNA was extracted from chicken embryonic fibroblast . Moreover , single-strand cDNA and double-strand cDNA were synthesized by using biotin-conjugated Oligo (dT) primer in turn . The double-strand cDNA was ligated Adapter and then purified by the cDNA Size Fractionation Columns . After BP recombination reaction , a cDNA entry library was constructed with a titer of 1×10^6 cfu/mL , total clones of 1.2×10^7 cfu and an average insertion size of about 2243bp . After LR recombination reaction , the cDNA entry library was transformed into expression library which took on a titer of 5×10^5 cfu/mL , total clones of 5.5×10^6 cfu and an average insertion size of about 2411bp . The results indicate that the constructed cDNA expression library performs a remarkable high value in both recombination rate and library coverage . As a result , the cDNA expression library , with its good quality , may facilitate to identify the receptors associated with the resistance against IBDV in chicken embryonic fibroblast and to cast new light on the mechanism of cellular tropism . Moreover , it may also provide data of chicken embryonic fibroblast in transcription level and may be helpful to study its biological functions .

Keywords : Chicken embryo fibroblast (CEF) ; Gateway technology ; cDNA expression library ; Infectious bursal disease virus (IBDV)