

利用磁珠构建稻瘟菌 cDNA 文库

徐锋^{1,2}, 武晓丽², 邱德文^{2*}

(¹ 长江大学生命科学学院, 荆州 434025)

(² 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要: 本文以稻瘟菌菌丝体为材料提取 RNA, 【目的】改进张学敏等人的方法, 通过磁珠构建稻瘟菌 cDNA 文库, 并用于下一步研究稻瘟菌与水稻之间的互作关系。【方法】通过共价键连接的寡聚 oligo (dT) 磁珠纯化 mRNA, 并以磁珠上的 oligo (dT) 为引物引导第一链 cDNA 的合成, 再利用末端转移酶加尾法合成第二链 cDNA。构建过程中避免使用限制酶和连接接头。【结果】用此方法构建的文库容量为 8.9×10^7 cfu, 滴度为 8.9×10^6 cfu/mL, 随机挑取的 25 个克隆插入片段平均大小达到 1380bp。【结论】实验结果表明用改进的方法可构建高质量的 cDNA 文库, 并且方便快捷, 所用材料少, 构建时间短, 利于大规模的功能基因分析。

关键词: 稻瘟菌; cDNA 文库; 磁珠

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0806-05

稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*) 引发的稻瘟病是一种世界性的水稻病害, 其造成的水稻产量损失可高达 15% 至 80%, 甚至颗粒无收, 据测算, 由于稻瘟病的危害, 全球范围内每年减产的水稻足以养活 6000 万以上的人口^[1]。而且稻瘟病菌结构复杂, 致病性易变异, 常因病菌群体频繁发生变化, 导致水稻抗病品种很快“丧失”抗性而成为感病品种^[2]。因此研究稻瘟病菌群体结构和变异动态, 探讨引起植物抗病性丧失的原因及其机制, 从分子水平研究真菌致病机制对设计防治病害的分子药物、开发新型杀菌剂有重要意义。此外笔者所在研究室从稻瘟菌中分离纯化得到的一种新型蛋白激发子具有良好的抗病防虫、促进植物生长的效果^[3]。为了研究该蛋白激发子的作用机理并克隆其编码基因, 并进一步了解稻瘟菌与水稻的基因互作, 构建稻瘟菌 cDNA 文库是重要的基础工作。

传统的构建 cDNA 文库方法不可避免地要使用限制性内切酶, 故存在 cDNA 片段被酶切开而无法得到完整基因的风险; 同时传统 cDNA 文库构建技术还

存在着连接效率不高和 cDNA 合成产量偏低的问题^[4], 如从 mRNA 模板反转录合成 cDNA 第一链的效率只有 50%, 而最终获得双链 cDNA 的效率通常只有其中 30%。随之各种改进的方法逐渐诞生, 如 Oligo-capping 法^[5], SMART 法^[6], Cap-trapper 法^[7]等可获得全长文库, 但它们只能作为克隆文库, 不能应用于表达文库, 另外, Cap-trapper 法由于氧化剂的使用和生物素标记, 增加 RNA 降解与 5'端假阳性的出现; Gateway 技术利用重组酶很好地解决了限制性内切酶的问题^[8], 由于必须使用 invitrogen 公司带有相应重组位点特殊的载体, 所购买的试剂盒价格昂贵, 另外该法利用 RNaseH 合成 cDNA 二链, 然后连接带重组位点的 Adapter, 故需要的大量 mRNA 才能获得足够用于重组的 cDNA。笔者希望能从少量的 RNA 获得足量的 cDNA, 并希望能在后期转换成研究稻瘟菌基因组功能的酵母表达文库, 故参照张学敏^[9]的方法构建了稻瘟菌 cDNA 文库, 由于原方法不适合后期与表达载体定向连接, 此外还需要用 DNA 聚合酶分别对

基金项目: 国家“973 项目”(2003CB114204)

*通讯作者: Tel: +86-10-68975211; E-mail: xiaoyaoyou211@hotmail.com

作者简介: 徐锋(1978-), 男, 籍贯: 江西九江, 博士, 主要从事生化与分子生物学研究。E-mail: ziwu211@126.com

收稿日期: 2007-12-06; 修回日期: 2008-03-23

载体和片段进行部分消解,但消解程度不易控制和检测,故进行改进,改进后的方法不必使用限制性内切酶和衔接子,相比其他方法不必购买试剂盒,方便快捷,且文库质量高,可形成了一套简单易行的操作体系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体:稻瘟菌(*M. grisea*)菌株北 1-24,由中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所朱昌雄研究员惠赠。pMD18-T Vector 和 *E.coli* JM109 高效感受态细胞购于 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂:Magnetight Oligo (dT) Particle 为 Novagen 公司产品,T4 DNA 聚合酶、末端脱氧核糖核酸转移酶为 TaKaRa 公司产品,SuperScript™ III 反转录酶、Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品,RNase H 购于北京新经科生物技术公司。2×Pfu PCR MasterMix 购于北京天为时代生物技术公司。DEPC 为 Sigma 公司产品,其他常规试剂都购于北京市的各生物技术公司。

1.2 总 RNA 的提取

参照赵利辉的方法^[10]获取稻瘟菌菌丝体,-80 保存备用。液氮冷冻条件下研成粉末,按照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂盒里提供的方法提取稻瘟菌总 RNA,并测定总 RNA 的纯度、浓度和完整性。

1.3 用磁珠 PCR 法获得稻瘟菌总 cDNA

参照张学敏等人的方法^[9]进行改进,用磁珠和 PCR 方法自小量 RNA 中获得 μg 级甚至 mg 级的 cDNA。

1.3.1 cDNA 第一链合成:按照张学敏的方法,利用磁珠上的 oligo (dT) 从总 RNA 中分离 mRNA,并以其做为引物合成 cDNA 一链。

1.3.2 cDNA 第二链合成与 cDNA 的扩增: 吸附共价连接有 cDNA 的磁珠,移去反转录反应溶液,加入 50 μL T4 DNA 聚合酶反应混合物(41.5 μL 超纯水;5.0 μL 10×T4 DNA 聚合酶反应缓冲液;2.5 μL 10 mmol/L 不含 dTTP 的 dATP、dGTP、dCTP 混合物;1 μL T4 DNA 聚合酶),轻柔重悬磁珠,37 孵育 20 min。离心管在振荡器上剧烈振荡 30 s,然后 75 加热 10 min,吸附磁珠,移去缓冲液; 加入 20 μL RNaseH 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 50 mmol/L KCl; 10 mmol/L MgCl₂; 1 mmol/L DTT), 0.5 μL RNaseH,轻柔重悬磁珠,于 37 孵育 1 h,移

去 RNaseH 反应混合物。加入 50 μL 1 mmol/L EDTA,于 75 加热 5 分钟。吸附磁珠,去除 EDTA 溶液;

加入 20 μL 末端转移酶反应混合物(5.5 μL 超纯水;10 μL 5×TdT 反应缓冲液;12.5 μL 0.1% BSA;10 μL 10 mmol/L dATP;2 μL 末端转移酶),轻柔重悬磁珠,于 37 反应 15 min,给 cDNA 第一链加上 polyA 尾巴,然后加入 2 μL 500 mmol/L EDTA 终止反应,吸附磁珠,去除缓冲液; 混合 22 μL 超纯水,3 μL T1 引物(10 μmol/L,5'-CCTGGAAACGGATT-CGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT-3);25 μL 2×Pfu PCR MasterMix 混合重悬磁珠,30 放置 3 min,40 放置 3 min,72 放置 20 min,使引物延伸,合成 cDNA 的第二链,然后慢慢冷却至室温,吸附磁珠,去除 Pfu 聚合酶反应混合物。取 15 μL 10×Pfu PCR 反应缓冲液(含有 10 μmol/L dNTP)稀释至 150 μL,取 50 μL 稀释液轻柔重悬磁珠,70 放置 2 min 吸附磁珠,去除稀释液。重复洗涤两遍,以完全去除多余的 T1 引物。配制 Pfu 聚合酶反应混合物(50 μL 超纯水;50 μL 2×Pfu PCR MasterMix)轻柔重悬磁珠,加热至 95 2 min 以释放第二链 cDNA,在 95 下吸附磁珠,移取 Pfu 聚合酶反应混合物至另一预冷的离心管中,迅速置于冰上。保存好磁珠备用。在 Pfu 聚合酶反应混合物 II 加入 0.5 μL T2 引物(10 μmol/L,5'-TTGCATTGTACCTGCAGGCGGCCGCAATTTTTTTT-TTTTTT-3),30 放置 15 min,40 放置 15 min,72 放置 20 min,使得 T2 引物得以延伸,合成出新的 cDNA 第一链。立刻升温到 95,按照下面步骤开始循环:95℃,30 s;72 ,15 min(循环次数 20 次)。然后升温到 95 加入 3 μL amp1 引物(10 μmol/L,5'-CCTGGAAACGGATTCTGAAG-3)和 3 μL amp2(10 mmol/L,5'-TTGCATTGTACCTGCAGGC-3)引物,4 μL 10 mmol/L dNTP 混合物,保温 2 min。按照下面步骤开始循环:95 ,30 s;60 ,30 s;72 ,15 min(循环次数 15 次)。最后 72 延伸 30 min。取 5 μL 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分离,对扩增产物进行分析。如果未能看到 cDNA 弥散带,取 15 μL 扩增产物,34 μL 超纯水,3 μL amp1 引物(10 μmol/L),3 μL amp2 引物(10 μmol/L),40 μL 2×Pfu PCR MasterMix 进行 2 次扩增。再取 5 μL 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.4 文库构建

取 50 μL PCR 扩增产物通过层析离心柱(chromaspin-

100 离心柱), 收集含大片断的 cDNA, 去除引物和小 cDNA 片段。用加入 Tag PCR 反应缓冲液, dATP 和 Tag 酶 72 反应 15 min, 加入 3 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 pH4.0 乙酸钠缓冲液(3.198 g/L 无水乙酸钠, 3.52 mL 冰醋酸)到离心管中, 于 -20 放置 15 min, 13000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 75% 乙醇洗沉淀一次, 在真空干燥沉淀, 与 T 载体进行 TA 连接, 电击转化高效感受态细胞 JM109。

1.5 文库滴度检测和保存

分别以稀释浓度为 10^2 , 10^3 , 10^4 文库样品按照每块平板加入 100 μ l 菌液, 涂布于含 Amp/X-gal/IPTG 的筛选平板上, 每种稀释倍数涂板两个, 37 培养 12~16 h, 计算白色克隆数。根据公式: 文库的滴度 = 平板上克隆数 \times 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 25 个单克隆, 提取质粒, 用 amp1 和 amp2 引物进行 PCR 检测文库平均插入片段大小。

2 结果和分析

2.1 总 RNA 的提取

提取的稻瘟菌 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示(图 1), 电泳图中可看到 28S 亮度约是 18S 两倍, 5.8S 的亮度弱, 表明 RNA 完整性很好; 经紫外分光光度计测定 $OD_{260} = 0.76$, $OD_{280} = 0.39$, 总 RNA

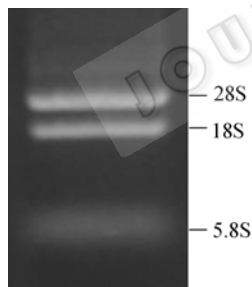


图 1 稻瘟菌总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *M. grisea* total RNA.

浓度为 9.12 μ g/ μ L, OD_{260}/OD_{280} 值为 1.949 说明无 DNA、蛋白质等污染, RNA 纯度较高, 可用于 cDNA 的合成。

2.2 cDNA 合成与纯化

最后合成双链 cDNA 经琼脂糖电泳分析(图 2), 双链 cDNA 在凝胶上呈弥散状分布, 主要弥散 0.5 kb 至 2.0 kb 之间, 弥散最上端超过 3 kb, 表明总 cDNA 质量较好, 可用于文库的构建。

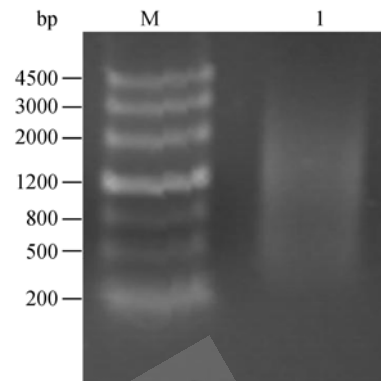


图 2 反转录扩增获得总 cDNA

Fig. 2 Amplification total cDNA by reverse transcription. M. Marker III; 1. Total cDNA.

2.3 cDNA 文库滴度与重组效率

将双链 cDNA 过柱, 除去小片段和多余的引物后, 末端加 A 后, 与 T 载体连接转化, 计数平板上生长的白色菌落数, 并计算文库总容量为 8.9×10^7 cfu, 滴度为 8.9×10^6 cfu/mL, 阳性克隆率为 98.3%。随机挑取的 25 个克隆, 均为阳性克隆, 插入片段都大于 800 bp, 超过 2 kb 的有 2 个, 1200 bp 与 2 kb 之间有 15 个, 测序后计算平均插入片段长度约为 1380 bp。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) 插入片段的平均长度不能低于 1.0 kb; (3) 文库重组率不能低于 90%^[11]。由此可见, 所构建的稻瘟菌文库是一个高质量的 cDNA 文库。

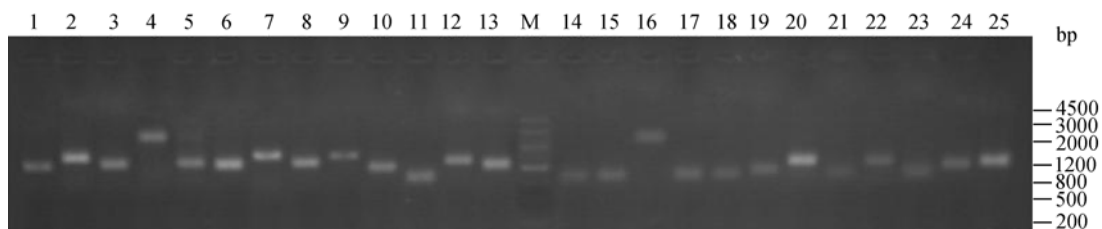


图 3 稻瘟菌 cDNA 文库插入片段的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR analysis of inserts from cDNA library of *M. grisea*. M. Marker ; 1-25. PCR amplification of recombinants.

3 讨论

在研究生物体系时,经常不能得到足量的起始材料。由于常规的 cDNA 文库构建需要微量量级的 mRNA^[12],所以一般情况下很难从少量材料中直接获得 cDNA 克隆。此外大多数构建 cDNA 文库的方法均需要应用多步的体外酶学反应,多轮的纯化或沉淀步骤,以去除引物或变更反应缓冲液,导致材料的严重丢失,并限制了最终文库的质量。本文所采用的方法合成 cDNA 所用的酶和试剂与传统方法完全相同,不同的是 cDNA 的合成和修饰直接在固相支持物磁珠上完成,直接从总 RNA 中合成出 cDNA,而不必洗再纯化洗脱 mRNA。通过共价键连接着寡聚 oligo (dT) 的磁珠纯化出 mRNA,并用这段寡聚 oligo (dT) 序列为引物引导第一链 cDNA 的合成,这样合成的第一链 cDNA 也通过共价键连接在磁珠上^[13]。这时只需将反应管置于磁性支架上,此时管内的磁珠吸附于一侧管壁,即可简便而迅速的实现酶和缓冲液的更换,而且能最大限度地减少操作中 cDNA 的丢失,也减少了其它物质污染之忧。相比借助生物素等方法如 Cap-trapper 法,用此法合成的 cDNA 不易随清洗等步骤丢失,可用于构建高质量的文库,并且构建的文库适合大多数的研究目的。

合成 cDNA 第二链时,本文采用的是末端转移酶加尾法,这样避免购买昂贵的第二链合成试剂盒,通过同聚尾引入接头,并以接头为引物,直接合成 cDNA 二链,相比用 RNaseH、DNA 聚合酶与连接酶合成的 cDNA 二链,基因片段更为连续完整,同时避免连接衔接子,方法更加简单,也容易产生优质文库。

本文在张学敏等人的方法上进行了改进,采用了两种 T₁₅-引物,目的是在 cDNA 的两端引入不同的序列,方便直接从 cDNA 上扩增 5 和 3 端序列,而不要专门进行 5 RACE 和 3 RACE。另外通过限制性酶切或 T4DNA 聚合酶单链化,定向连接到表达载体上,减少对表达文库容量的要求。为减少 T1 引物对后期 T2 引物的污染,需要在合成二链后,通过多次洗涤磁珠,尽可能完全除去多余的 T1 引物。通过 T1 和 T2 引物为 cDNA 两端引入已知序列,这些步骤类似 3'RACE,在较低温度时,T₁₅-引物中的 (dT)₁₅ 可与 polyA 尾退火结合,引导新链的合成。建议在加尾的时候,可以进一步改进,尝试不加 polyA 尾,换成 polyC 或 polyG 尾,这样在 cDNA 第二链(对应 mRNA 序列)的 5'端是寡聚 G 或 C,而 3'端是 polyA 尾,这

样更容易在 cDNA 两端引入不同的已知序列,也不会出现两种引物的交叉污染。

张学敏等人的方法用 T4DNA 聚合酶处理 *EcoR*I 酶切过的载体和 cDNA 片段,分别消解两端的 TT 和 AA,再进行连接。但因为各公司的 T4DNA 聚合酶不同,需要摸索合适消解的时间,消解不足或过分消解,都无法形成正确的拼接,故本文也没有按照原方法而是直接采用 T-A 连接的方式与 T 载体连接,节省时间,提高连接效率。

用本文合成扩增 cDNA 相比其他方法要注意一些额外的细节,首先要注意磁珠的结合能力有限,100 μg 的磁珠对应的 RNA 总量不宜超过 200 ng。可根据需要按比例放大磁珠的用量,但不易缩小,因为磁珠本身会对移液器吸嘴和反应管等产生一些非特异性的吸附。其次合成 cDNA 一链后,磁珠上未杂交的 oligo (dT) 需要利用 T4 DNA 聚合酶的外切活性去除,因为未结合的 oligo dT 可以同样被加尾并被扩增。另外所有涉及 PCR 构建的 cDNA 文库其长度都会发生偏移,本方法也可能存在同样的问题,进行尽量少的循环数量可减少这种偏移。目前,还没有一种能完善满足任何需要的 cDNA 文库构建方法,最佳的策略是根据研究材料和研究问题的特点,结合自己的实际情况,选择合适的方法,构建出满足研究要求的 cDNA 文库。

参 考 文 献

- [1] 陈晓东. 水稻稻瘟病发病规律和病害症状的鉴别. 农技服务 (*Serves of Agricultural Technology*), 2007, 24(1): 37-39.
- [2] Wei SP, Wang Y, Liu YG. Construction and Evaluation of a TAC Library of *Magnaporthe grisea*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 1: 57-62.
- [3] 徐锋, 杨勇, 邱德文, 等. 稻瘟菌激活蛋白对植物生长及其生理活性的影响. 华北农学报(*Acta Agriculturae Boreali*), 2006, 21 (5): 1-5.
- [4] 李碧荣. 国内 cDNA 文库及 cDNA 克隆的研究概况. 中国生物工程杂志(*China Biotechnology*), 1992, 12(4): 53-58.
- [5] Suzuki Y, Sugano S. Construction of a full-length enriched and a 5'-end enriched cDNA library using the oligo-capping method. *Methods Mol Biol*, 2003, 221(1): 73-91.
- [6] Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching: A SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, 2001, 30(4): 892-897.
- [7] Camincip P, Kvam C, Kitamura A, et al. High efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper. *Genomics*, 1996, 37(3): 327-336.
- [8] 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(*Molecular Plant Breeding*), 2004, 2 (3): 358-364.

- [9] 张学敏, 王宜强. 靶向新基因的分子克隆策略 - 理论与方法. 北京: 军事医学科学出版社, 1999, 162-168.
- [10] 赵利辉, 邱德文, 刘峥, 等. 植物激活蛋白对水稻抗性相关基因转录水平的影响. 中国农业科学(Scientia Agricultura Sinica), 2005, 38(7): 1358-1363.
- [11] 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): 475-4781.
- [12] Gasser CS, Budelier KA, Smith AG, et al. Isolation of tissue-specific cDNAs from tomato pistils. *Plant cell*, 1989, 1(3): 15-24.
- [13] Raineri I, Moroni C, Senn HP. Improved efficiency for single-sided PCR by creating a reusable pool of first-strand cDNA coupled to a solid phase. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(5): 4-10.

Construction of cDNA library of *Magnaporthe grisea* with magnetic bead

Feng Xu^{1,2}, Xiaoli Wu², Dewen Qiu^{2*}

(¹College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

(²Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: [Objective] We constructed cDNA library of *Magnaporthe grisea*. The good quality cDNA library could facilitate finding proteinaceous elicitors of *M. grisea*, and elucidating the mechanisms of the *M. grisea*-rice interaction. [Methods] The Oligo(dT) combined with the magnetic bead was used to extract mRNA from total RNA of *Magnaporthe grisea* and as primers to synthesize the first-strand cDNA. Terminal transferase introduced PolyA into 3'terminal of the first cDNA strand, then the PolyA was used for amplifying the second-strand cDNA. Restriction enzyme and adapter were avoided in this research, which could solve technical limitation of the traditional method. Because all reactions were done in one centrifuge tube, this process could reduce the risk of cDNA loss and cross-contamination. The primers designed in this research could clone the amplified cDNAs into expression vector in a desirable orientation. [Results] The cDNA library constructed had a high titer of 8.9×10^6 cfu/mL, and contained a total clones of 8.9×10^7 cfu, with an average inserts size of about 1380 bp. [Conclusion] Constructing cDNA library with magnetic bead was a highly efficient method using only small amount of experimental materials within a short period.

Keywords: *Magnaporthe grisea*; cDNA Library; magnetic bead

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB114204)

*Corresponding author. Tel: +86-10-68975211; E-mail: xiaoyaoyou211@hotmail.com

Received: 6 December 2007/ Revised: 23 March 2008

代谢组学手册

原作者: John Lindon, 导读专家: 许国旺

978-7-03-020777-7 ¥128.00 2008年3月1日出版



“基因组学反映了什么是可以发生的, 转录组学反映的是将要发生的, 蛋白质组学指出了赖以发生的, 只有代谢组学才真正反映业已发生的。

“《代谢组学手册》是一本集基本理论和实际应用于一体的极有价值的代谢组学学科专著, 书中对学科的发展现状、面临问题、应用前景、未来趋势和学科本身的价值都作了客观、科学的描述。”

——许国旺

本书从以下三个方面对国际代谢组学研究进行描述:

一、代谢组学分析技术及原理; 二、代谢组学中的数据和处理; 三、代谢组学的应用实例

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目