

日本对虾精巢和卵巢全长 cDNA 文库的构建^{*}

王艺磊^① 张子平^②

① 集美大学水产生物技术研究所,水产学院 厦门 361021;

② 香港城市大学生物与化学系 香港 九龙,中国)

摘要: 采用 RDP 试剂提取日本对虾精巢和卵巢的总 RNA,经 Oligotex 试剂盒纯化得到 mRNA。根据 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术,利用含 *Sfi* I B 酶切位点的 oligo(dT)引物合成 cDNA 第一条链,利用含 *Sfi* I A 酶切位点的 SMART 核苷酸作为 cDNA 第一条链在 mRNA 5' 端延伸出去的模板,采用 LDPCR 引物合成双链 cDNA,双链 cDNA 用 *Sfi* I 酶切和过柱分级分离后,与 λ TriplEx2 两臂进行连接,随后进行 λ 噬菌体体外包装反应,构建成精巢和卵巢之全长 cDNA 文库。构建好的文库中,精巢的文库含有约 1.04×10^6 的重组子,卵巢的文库含有约为 1.2×10^6 的重组子。文库扩增后,滴度分别达 7.3×10^8 (Pfu/ml) 和 9.1×10^8 (Pfu/ml),插入 cDNA 长度为 400 bp ~ 3 kb,说明两文库均具有良好的质量,为进一步筛选、克隆精巢与卵巢特异表达基因奠定了基础。

关键词: cDNA 文库;精巢;卵巢;日本对虾

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)02-09-05

The Construction of Full-length Testis and Ovary cDNA Libraries of *Marsupenaeus japonicus*

WANG Yi-Lei^① ZHANG Zi-Ping^②

① Aquaculture Biotechnology, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021;

② Department of Biology and Chemistry, City University, Kowloon Hongkong, China)

Abstract: To clone the testis and ovary specific expression genes of *Marsupenaeus japonicus*, we constructed two full-length cDNA libraries using the SMART cDNA library construction kit (Clontech). Total RNAs were isolated from tests and ovaries using RDP, a reagent made by us and modified from that used by Chomczynski and Sacchi (1987) for the simultaneous isolation of RNA, DNA, and protein. Oligotex (QIAGEN) was used to separate the mRNA of testes and ovaries from total RNA. The "anchor first-strand cDNA" containing asymmetrical *Sfi* I restriction enzyme sites (A & B) was synthesized by transcription of mRNA with the SMART technique. The LDPCR was performed using a modified oligo(dT) primer and an anchor primer as the primer set, and anchor first-strand cDNA as the template to enrich the cDNA population for full-length sequences. After digestion with *Sfi* I and size fractionation using CHROMA SPIN-400™ Columns, SMART cDNA was ligated into the *Sfi* I -digested λ TriplEx2™ Vector. The ligation mixture was packaged into lambda

* 国家自然科学基金 (No. 30070597), 福建省自然科学基金 (No. B9910028), 国家教育部骨干教师基金资助项目;

第一作者介绍 王艺磊,女,博士,教授;从事水产动物分子与细胞生物学研究;E-mail: ylwang@jmu.edu.cn.

收稿日期:2002-06-02,修回日期:2002-11-05

capsids using the Gigapack® III Gold packaging extract (Stratagene) to generate full-length testis and ovary cDNA libraries of *Marsupenaeus japonicus*. The titer of un-amplified cDNA libraries was 1.04×10^6 for the testis library and 1.2×10^6 for the ovary library. The titer of amplified cDNA libraries was 7.3×10^8 (Pfu/ml) for the testis library and 9.1×10^8 (Pfu/ml) for the ovary library respectively. The cDNA inserts sizes were between 400 bp – 3 kb. These results indicate that the quality of these cDNA libraries is good enough for further cloning of testis and ovary specific expression genes.

Key words: cDNA library; Testis; Ovary; *Marsupenaeus japonicus*

尽管对虾精巢和卵巢的结构与功能,精子和卵子的结构、发生等在细胞水平已有许多研究,但是,对虾的性别决定、性别分化相关基因迄今未见报道。然而,如同已在哺乳动物和其它动物中初步揭示的,这些基因推测是在雌雄性腺中特异表达,与性腺发育密切相关的,如 SRY 基因^[1]。基于此目的,作者拟以日本对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 为对象,构建全长 cDNA 文库,为筛选精巢与卵巢特异表达基因打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 日本对虾购自厦门五通对虾育苗场,雄虾体长 20 cm 左右,雌虾体长 25 cm 左右,解剖后取成熟的性腺。

SMART™ cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司, Oligotex 试剂盒购自 QIAGEN 公司, 包装试剂盒 Gigapack® III Gold packaging extract 购自 Stratagene 公司。

cDNA 合成引物: SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) III 寡核苷酸: 5'-AAGCAGTGGTATCAACG-CAGACTGGCCATTATG-GCCGGG-3'; CDS III/3' PCR 引物: 5'-ATTCTA-GAGGCCGAGGCCGCGACATGT-3'。5'-PCR 引物: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'。以上引物由 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒提供。λ TriplEx2 插入子筛选引物: 5'-测序引物: 5'-CCGAGATCTGGACGAGC-3'; T₇ 启动子引物: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'。此对引物根据 Clontech 提供的载体序列自行设计,由 Invitrogen 公司合成。

1.2 mRNA 提取 按照自制的 RDP 试剂 (根

据 Chomczynski 和 Sacchi 的方法修改而成)及本实验室常规使用的的方法,提取日本对虾精巢和卵巢的总 RNA,采用 Oligotex 试剂盒 (QIAGEN) 从总 RNA 中分离纯化 mRNA。

1.3 cDNA 的合成 单链 cDNA 的合成:取 0.5 μg 纯化的精巢或卵巢的 mRNA,在 5 μl 反应体积中加入 10 μmol/L CDS III/3' PCR 引物和 10 μmol/L SMART III 寡核苷酸各 1 μl,置 MJ PCR 仪上 72℃ 2 min,冷却后,加入 Superscript™ II 逆转录酶,10 mmol/L dNTP 混合液,20 mmol/L DTT 各 1 μl 及 5× 第一链合成缓冲液 2 μl,使总反应体积达 10 μl,置 MJ PCR 仪上 42℃ 反应 1 h,逆转录合成 cDNA 第一链。双链 cDNA 的合成:取 cDNA 第一链 2 μl,加入 10 μmol/L CDS III/3' PCR 引物和 5' PCR 引物各 2 μl,加入 50× Advantage 2 聚合酶混合液和 50× dNTP 混合液各 2 μl,10× 第二链合成缓冲液 10 μl,使反应体积达 100 μl。置于 MJ PCR 仪上采用 LD-PCR 技术扩增双链 cDNA。反应参数为:95℃ 变性 20 s 之后,95℃ 变性 5 s,68℃ 复性延伸 6 min 进行 20 个循环。

1.4 cDNA 的纯化、消化和连接反应 取上述扩增的双链 cDNA 50 μl,加入 2 μl 蛋白酶 K (20 μg/μl),45℃ 20 min,将 DNA 聚合酶的活性灭活。等体积苯酚/氯仿/异戊醇,氯仿/异戊醇各抽提一次,醋酸钠、糖原和酒精共沉淀后,80% 酒精洗,风干后溶解于 79 μl 的水中,加入 10 μl Sfi I (20 U/μl),10 μl 10× Sfi I 缓冲液及 1 μl 100× BSA,使总体积达 100 μl,于 50℃ 酶切 2 h。酶切产物使用 CHROMA SPIN-400 柱进行分级分离,收集 1~16 管,每管 1 滴。分别取 3 μl 在 1.1% 琼脂糖凝胶上 150 V 电泳 10 min,收集片

段符合建库大小的前三管,混合后加入醋酸钠,糖原和酒精共沉淀后,将沉淀出的 cDNA 用 $7 \mu\text{l}$ 水溶解。cDNA 与 λ TriplEx2 的连接反应分别采用 1:0.5、1:1 和 1:2 的体积比,于 16°C 连接过夜。

1.5 λ 噬菌体体外包装反应 上述连接产物采用 lambda DNA Gigapack Gold 包装系统包装。包装反应于室温下 (22°C) 孵育 2 h, 然后加入 $500 \mu\text{l}$ 的 SM 稀释液 [100 mmol/L NaCl, 8 mmol/L MgSO_4 , 35 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.01% (w/v) gelatin] 和 $20 \mu\text{l}$ 氯仿, 混匀后离心去除氯仿, 包装反应的上清液即可储存在 4°C 冰箱。

1.6 cDNA 文库的容量测定、重组率测定、扩增及质量鉴定 取上述上清液 $10 \mu\text{l}$, 用 SM 稀释液做 1/5、1/10、1/15 和 1/20 梯度稀释后, 铺平板, 每个梯度做三个平行组, 以测定文库的容量。同时在涂有异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 和 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal) 的平板上铺平板, 以测定文库的重组率。以每板 3×10^4 的克隆数在 150 mm 平板上铺板, 在 37°C 培养箱培养 6~18 h, 待噬菌斑生长至将近融合时, 加入 12 ml SM 稀释液置 4°C 冷房的摇床洗脱过夜。收集洗脱液, 加入 5% 氯仿, 振荡 2 min, 离心后取上清即为扩增的 cDNA 文库。扩增的 cDNA 文库分装后加入 7% 的二甲亚砜 (DMSO) 即可储存在 -80°C 的超低温冰箱中备用。将文库做 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 稀释, 每个梯度做三个平行组, 以测定文库的梯度。随机挑取 96 个噬菌斑, 分别加入每孔具有 $200 \mu\text{l}$ SM 稀释液的酶标板中过夜, 取 $7 \mu\text{l}$ 噬菌斑稀释液, 在 $50 \mu\text{l}$ 反应体积中加入 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 λ TriplEx2 插入子筛选引物: 5' 测序引物和 T_7 启动子引物各 $1 \mu\text{l}$, Taq 聚合酶 $1 \mu\text{l}$ 。PCR 反应参数为: 95°C 变性 2 min, 95°C 变性 30 s, 60°C 复性 30 s, 72°C 延伸 4 min, 循环 35 次。扩增产物在 1% 的琼脂糖胶中电泳以确定插入的 cDNA 片段的大小。

2 结果

2.1 总 RNA 的抽提和 mRNA 的分离纯化

使用纯化的 mRNA 是获得高质量的 cDNA 文库的关键。从电泳的结果看 (图 1), 用自制的 RDP 试剂抽提的总 RNA 中, 18S、28S rRNA 条带清晰, 比例恰当。测得精巢 $A_{260}/A_{280} = 1.87$, 卵巢 $A_{260}/A_{280} = 1.79$, 说明总 RNA 的纯度达到要求。用 Oligotex 试剂盒分离纯化的 mRNA, 1% 琼脂糖电泳 (图 2) 可见一片拖影, 18S、28S 已大部分被除去, 精巢和卵巢的 A_{260}/A_{280} 的比值均大于 1.8。证明 mRNA 质量良好, 可用于构建文库。

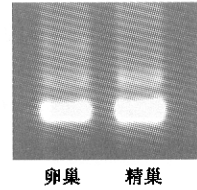


图 1 日本对虾卵巢和精巢总 RNA

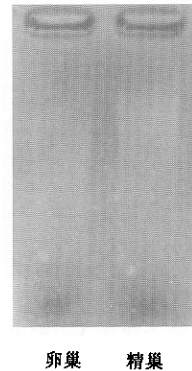


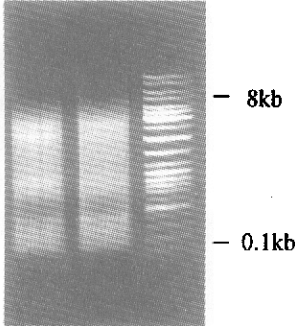
图 2 日本对虾卵巢和精巢 mRNA

2.2 DNA 的合成 采用 SMART 技术, 用 $0.5 \mu\text{g}$ 精巢或卵巢的 mRNA 反转录成单链 cDNA, 通过 LD-PCR 扩增获得双链 cDNA。取 $5 \mu\text{l}$ PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 (图 3), 分子量大小约为 $0.1 \sim 8 \text{ kb}$, 长度分布均匀, 可满足构建 cDNA 文库的要求。

2.3 DNA 分级分离柱的纯化分析 在 cDNA 分级分离过程中, cDNA 片段从第 4 管以后流出, 小片段的 DNA 从第 8 管开始出现, 因此, 收集第 4~8 管可以确保 cDNA 文库的质量。

2.4 cDNA 文库的滴度 文库构建过程中 cDNA 和载体 λ TriplEx2 连接的比例非常重要, 作

者发现 cDNA 和载体的摩尔比在 2:1 能较好地产生有效的重组体。包装后精巢可获得约为 1.04×10^6 个重组子, 卵巢可获得约为 1.2×10^6 重组子。文库扩增后, 滴度分别达 7.3×10^8 (Pfu/ml) 和 9.1×10^8 (Pfu/ml)。



卵巢 精巢 标记物

图 3 日本对虾精巢和卵巢双链(DNA)

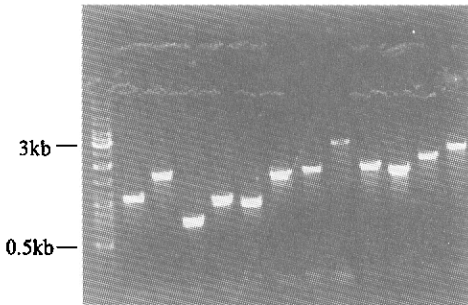


图 4 随机从卵巢 cDNA 文库中挑选的重组子的 PCR 产物

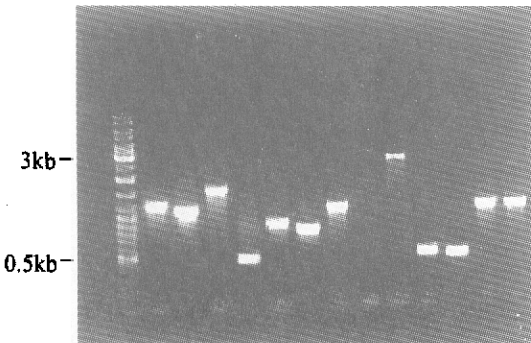


图 5 随机从精巢 cDNA 文库中挑选的重组子的 PCR 产物

2.5 cDNA 插入长度分析 随机挑选 96 个克隆, 以载体特异的 5' 测序引物和 T₇ 启动子引物进行 PCR 扩增, 插入片段大小为 400 bp ~ 3 kb

(图 4, 5), 说明两文库均具有良好的质量。

3 讨论

SMART 技术构建全长 cDNA 文库对非模型动物来说, 具有非常重要的意义和优势。因为除人类及一些模型动植物、微生物之外, 大多数生物的基因组的测序工作尚未开始。构建片段的 cDNA 文库或基因组文库无法与已知基因文库(GenBank)的序列进行比较, 无法得知片段 cDNA 序列的相关信息。全长 cDNA 的优势在于具有保守的蛋白编码区, 这样就可以从亲缘关系较近的种类中找到一些相似度, 有助于基因的鉴定和分析^[2]。对虾属非模型动物, 对其基因组的研究非常有限, 因此构建全长 cDNA 文库十分必要。

性腺特异表达基因的克隆和分析在哺乳动物包括人类有较深入的探讨^[3]。在家禽^[4]、家畜^[5]和鱼类^[6]也有一些报道。但在对虾类, 乃至整个无脊椎动物均报道极少。本研究首次构建了日本对虾精巢和卵巢全长 cDNA 文库, 将有助于从分子水平探讨对虾精巢和卵巢特异基因的表达。

文库质量的好坏主要可从两方面来衡量, 第一是文库的滴度, 本研究构建的精巢和卵巢 cDNA 文库其重组子分别为 1.04×10^6 个和 1.2×10^6 个, 已满足构建完整 cDNA 文库所需的滴度, 基本上包括了大部分稀有 mRNA 的克隆。第二是插入片段的大小, 作者所构建的 cDNA 文库插入片段分布于 0.4 ~ 3 kb, 说明该文库构建是成功的。为进一步大量筛选、克隆对虾精巢和卵巢特异表达的基因奠定了基础。作者成功地从该文库中克隆了多个在对虾精巢和卵巢表达的基因, 其中有些序列已被基因文库收录(收录号: AF494080)。

另外, 本研究所使用的 cDNA 克隆载体 λ TriplEx2 容易质粒化, 给 cDNA 测序和其它研究带来了诸多方便。

参 考 文 献

[1] Rossi P, Dolci S, Albanesi C *et al.* Direct evidence that the

- mouse sex-determining gene *Sry* is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. *Mol Reprod Dev*, 1993, **34**:369 ~ 373.
- [2] Gracey A Y, Troll J V, Somero G N. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *PNAS*, 2001, **98**(4):1 993 ~ 1 998.
- [3] 邓怿, 王金星. 哺乳动物性别决定的分子要素. 动物学杂志, 1998, **34**(5):51 ~ 55.
- [4] 刘超, 段建功, 李志成. 家禽性别控制研究进展. 西北农业学报, 2000, **9**(1):123 ~ 128.
- [5] 朱晓华, 赵万里, 王志跃. 家畜性别决定的机制及其控制的研究进展. 动物科学与动物医学, 2001, **18**(1):22 ~ 24.
- [6] 王德寿, 吴天利, 张耀光. 鱼类性别决定及其机制的研究进展. 西南师范大学学报(自然科学版), 2000, **25**(3):296 ~ 302.
- [7] Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 1993, **15**: 532 ~ 537.