

# 中华绒螯蟹卵巢 RACE cDNA 文库的构建\*

马长艳<sup>①</sup> 周开亚<sup>①\*\*</sup> 郭豫杰<sup>①</sup> 王义权<sup>①</sup> 潘鸿春<sup>①</sup> 赵乃刚<sup>②</sup> 汪朝晖<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097;

<sup>②</sup>安徽省水产新技术研究所 合肥 230088)

**摘要:**应用抑制性差减杂交技术,已经获得了中华绒螯蟹卵巢发育过程中差异表达基因的部分 cDNA 序列。为了进一步获得基因的全长 cDNA 序列,运用 SMART 技术,成功构建了中华绒螯蟹卵巢(Ⅲ期) RACE cDNA 文库。琼脂糖凝胶电泳结果表明,文库所含全长 cDNA 的长度主要集中在 500 ~ 2 000 bp 之间,RACE PCR 结果表明,所用基因特异性引物与接头引物皆能扩增出产物,说明所构文库的质量较好,适用于 RACE 方法从中分离中华绒螯蟹卵巢发育相关基因的全长 cDNA。

**关键词:**中华绒螯蟹;卵巢;快速扩增 cDNA 末端;cDNA 文库

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2003)02-14-03

## Construction of a RACE cDNA Library of the Mitten Crab Ovary

MA Chang-Yan<sup>①</sup> ZHOU Kai-Ya<sup>①</sup> GUO Yu-Jie<sup>①</sup> WANG Yi-Quan<sup>①</sup>

PAN Hong-Chun<sup>①</sup> ZHAO Nai-Gang<sup>②</sup> WANG Zhao-Hui<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>Institute of Genetic Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097;

<sup>②</sup>Anhui Fisheries New Technology Research Institute, Hefei 230088, China)

**Abstract:** Using suppression subtractive hybridization (SSH) approach, partial cDNA sequences of the differentially expressed genes that are related to the development of the ovary of the mitten crab (*Eriocheir japonica sinensis*) were obtained. To get full-length cDNA sequences of these genes, a RACE cDNA library of the ovary during stage III was constructed successfully with SMART technique. Agarose gel electrophoresis showed that the lengths of full-length cDNAs in this library were pooled mainly between 500 and 2 000 base pairs. By RACE PCR, amplified products were obtained with all the gene-specific primers and adaptor primers. This verified that the quality of the RACE cDNA library was high and was appropriate for cloning the full-length cDNAs of these genes.

**Key words:** *Eriocheir japonica sinensis*; Ovary; Rapid amplification of cDNA ends; cDNA library

cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术自 1988 年问世以来,以其操作简单、成功率高等特点,在基因克隆研究领域,日益受到研究者的重视<sup>[1,2]</sup>。其原理是使用 Oligo (dT) 对 mRNA 进行反转录的同时,在两端加上通用接头(引物),从而可利用基因特异的引物(gene-specific primer, GSP)通过 PCR 反应快速获得目的序列的 5' 端和 3' 端<sup>[3 ~ 5]</sup>。

RACE cDNA 文库则是末端带有衔接子的双链 cDNA 分子的集合,是一种非克隆 cDNA 文库,

\* 教育部“211”工程建设项目,江苏省应用基础项目(No. BJ95109);

\*\* 通讯作者, E-mail: Kyzhouj@jlonline.com;

第一作者介绍 马长艳,女,32 岁,博士研究生,讲师;研究方向:动物分子生物学。

收稿日期:2002-07-01,修回日期:2002-12-08

它为 RACE PCR 反应提供模板。

通过抑制性差减杂交实验,作者已经获得了中华绒螯蟹卵巢发育过程中差异表达基因的部分 cDNA 序列,拟用 RACE 方法进一步获得一些基因的全长 cDNA 序列。为此运用 SMART 技术,构建了中华绒螯蟹卵巢(Ⅲ期)RACE cDNA 文库,从而为克隆中华绒螯蟹卵巢发育相关基因的全长 cDNA 奠定了基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 卵巢发育Ⅲ期的中华绒螯蟹,安徽芜湖龙湖水产养殖场提供。

**1.2 主要试剂** RNA 提取试剂盒(Trizol Reagent, Gibco); cDNA 文库构建试剂盒(SMART™ cDNA Library Construction Kit, Clontech); Super-Script™ II RNase H-Reverse Transcriptase (Life Technologies)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 组织总 RNA 的提取** 取液氮保存的Ⅲ期卵巢组织(300 ~ 400 mg)用 Trizol 试剂提取总 RNA。具体操作按说明书进行。总 RNA 提取后,溶于无 RNase 的水中,经琼脂糖凝胶电泳及紫外荧光光度计测定其 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 鉴定质量后,保存于 -70℃ 冰箱备用。

**1.3.2 RACE cDNA 文库的构建** 实验操作基本按 SMART™ cDNA Library Construction Kit 说明书进行。

取 3 μl 总 RNA 样品约 0.5 μg, 加到 0.2 ml 的反应管中,按说明书加入相应试剂及引物,反转录合成第一链 cDNA; 采用 LD-PCR(long distance PCR)技术合成第二链 cDNA, 反应在 Gene Amp 2400 PCR 仪上进行,22 个循环结束后取 5 μl 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.3 文库质量的鉴定** 依据抑制性差减杂交实验获得的差减片段的序列,用 Gene Runner 软件设计 5'RACE 和 3'RACE 引物。引物序列如下:P<sub>359-5</sub> 5'ATT TCA TAG GGC GCT GTG GAG 3'; P<sub>386-5</sub> 5'GTT GTA GAA GTG GCC GCA G 3'; P<sub>386-3</sub> 5'CAA CGC CAC GGA TGA CTT CAC C 3', 引物由上海生物工程公司合成。另外还应用本

室宋霞博士设计的一对扩增 actin 基因部分序列的引物,序列如下: actin-1 5' GTA TCA TCA CCA ACT GGG A 3'; actin-2 5' CGC TCA GTC ATG ATG TTC A 3'。

PCR 反应体系: 10 × PCR buffer 3.0 μl, 接头引物和基因特异性引物(5 mmol/L)各 1.0 μl, dNTP Mix(2 mmol/L) 2.0 μl, Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L) 1.8 μl, Taq 酶 0.2 μl, 模板 1.0 μl(RACE cDNA 文库稀释 100 倍), H<sub>2</sub>O 20.0 μl。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 然后进行下列 30 个循环: 95℃ 30 s; 60℃ 30 s; 72℃ 1 min; 最后 72℃ 延伸 7 min。

## 2 结果与分析

**2.1 总 RNA 的提取** 总 RNA 提取后,用紫外荧光光度计测定其 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub>。结果 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.76, 电泳条带以 28S rRNA 和 18S rRNA 为主(图 1), 表明所提 RNA 纯度较高, 完整性较好, 可用于 RACE cDNA 文库的构建。

**2.2 RACE cDNA 文库的构建** 琼脂糖凝胶电泳结果(图 2)显示, 构建的 RACE cDNA 文库中, cDNA 群体电泳结果呈弥散状, 且主要的 cDNA 条带分布在 500 ~ 2 000 bp 的分子量范围。

**2.3 文库质量的鉴定** 5'RACE 和 3'RACE PCR 及 actin 基因部分序列的扩增结果表明, 以所构库中的双链 cDNA 为模板, 皆能扩增出产物(图 3)。

## 3 讨 论

从已知表达序列标签(expression sequence tag, EST)获取其全长 cDNA, 目前常用的方法有 cDNA 文库筛选、RACE PCR、电子克隆等。其中, cDNA 文库筛选是经典的方法, 但存在操作

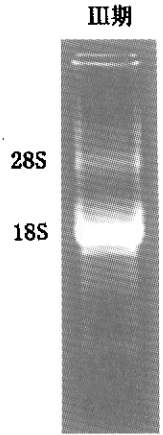


图 1 中华绒螯蟹卵巢组织总 RNA 电泳图

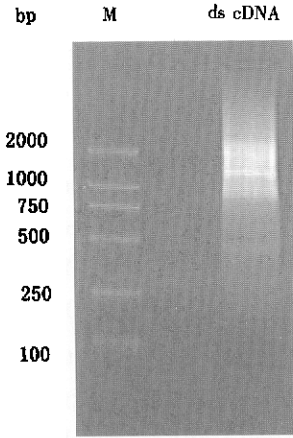


图2 双链 cDNA 电泳图  
M: DNA 标记; ds cDNA: 双链 cDNA

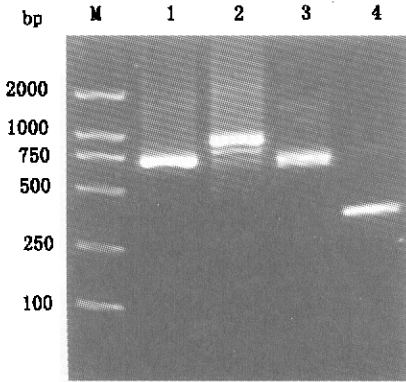


图3 RACE PCR 产物及 actin 基因部分序列  
扩增结果电泳图

M: DNA 标记; 1, 2. 分别为引物 P<sub>359-5</sub> 和 P<sub>386-5</sub>  
5'RACE 产物; 3 为引物 P<sub>386-3</sub> 的 3'RACE 产物;  
4. 引物 actin-1 和 actin-2 的扩增产物

繁琐且工作量大, 实验周期长等缺点。电子克隆则是近年随着生物信息学的发展而建立起来的新兴技术, 但该法要求有足够的同源 EST 进行拼接, 且拼接时易发生错误。RACE PCR 技术则避免了以上两种技术的缺点, 而成为目前基因克隆研究中较为常用的技术。

RACE cDNA 文库的质量应从库容量及所含片段是否是全长 cDNA 两个方面来评价。本实验所构文库的双链 cDNA 大小主要集中在 500 ~ 2 000 bp 之间, 且 500 bp 以下和 2 000 bp 以上皆有较弱的拖尾(图 2), 说明不同大小及不同丰度的 mRNA 都得到了有效的反转录及扩

增; 另外, RACE PCR 及 actin 基因部分序列 PCR 结果(图 3)表明, 所用引物皆能扩增出产物, 尤其是 5'RACE PCR 的成功, 初步说明所构文库质量较好。

中华绒螯蟹卵巢(Ⅲ期) RACE cDNA 文库构建的技术特点: (1) 在反转录合成 cDNA 第一链时, 所用材料是总 RNA, 而不是 mRNA, 避免了因 mRNA 纯化过程中低丰度 mRNA 的丢失, 从而保证了所构库的库容量较大; (2) 由于采用 Clontech 公司的 SMART 技术\*, 保证了所构文库中含有的主要是全长双链 cDNA; (3) 在第二链 cDNA 的合成时, 采用了 L-D PCR 技术, 使得低丰度表达序列在文库中得到富集; (4) 双链 cDNA 较为稳定, 便于文库的保存和使用。

总之, 运用 SMART 技术, 作者成功构建了中华绒螯蟹卵巢(Ⅲ期) RACE cDNA 文库, 从而为用 RACE 方法克隆中华绒螯蟹卵巢发育相关基因的全长 cDNA 奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Frohman M A, Dush M K, Martin G R, *et al.* Rapid production of full-length cDNAs from rare amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 8 998 ~ 9 002.

[2] Schaefer B C. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem*, 1995, **227**: 255 ~ 273.

[3] Borson N D, Sato W L, Drewes L R. A lock-docking oligo (dT) primer for 5' and 3'RACE PCR. *PCR Methods Applic*, 1992, **2**: 144 ~ 148.

[4] Fehr C, Fickov M, Hienke C, *et al.* Rapid cloning of cDNA ends polymerase chain reaction of G-protein-coupled receptor kinase 6: an improved method to determine 5'- and 3'-cDNA ends. *Brain Res Protoc*, 1999, **3**(3): 242 ~ 251.

[5] Zhang Y, Frohman M A. Using rapid amplification of cDNA ends (RACE) to obtain full-length cDNAs. *Methods Mol Biol*, 1997, **69**: 61 ~ 87.

\* SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual. Clontech Laboratories, Inc. 1998. 4 ~ 7.