

中国蛇岛蝮蛇毒腺 cDNA 文库的构建

刘淑清^① 郭春梅^① 侯志杰^① 颜 栋^② 孙明忠^{②*} 王立平^③ 王小平^③ 孙立新^③

(^① 大连医科大学生物化学与分子生物学教研室 大连 116044; ^② 大连医科大学基础医学院 大连 116044;

^③ 辽宁蛇岛老铁山自然保护区管理处 大连 116041)

摘要:为研究中国蛇岛蝮蛇 (*Gloydius shedaoensis shedaoensis*) 基因工程产品,采用 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术构建其毒腺的 cDNA 表达文库。采用 RNAiso 试剂提取毒腺总 RNA,再采用 Poly (A) Purist™ 试剂盒分离纯化 mRNA,第一链 cDNA 经反转录合成,双链 cDNA 经 LD-PCR 合成并扩增;分级分离去除小片段,收集大于 400 bp 的 cDNA 片段,与质粒载体 pDNR-LIB 连接,采用电转化法将重组质粒转入大肠杆菌感受态细胞 DH10B。构建的蛇岛蝮蛇毒腺 cDNA 文库库容量为 8×10^7 cfu/ml,大多数插入片段大于 1 000 bp,重组质粒表达率高(100%)。本研究成功构建了高质量的蛇岛蝮蛇毒腺 cDNA 文库,表达文库质量高,可用于进一步克隆和表达中国蛇岛蝮蛇蛋白活性组分基因,并对其功能进行研究。

关键词:蛇岛蝮;cDNA 文库;SMART 技术;PCR

中图分类号:Q956 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)05-136-05

Construction of a cDNA Library from the Venom Gland of Chinese *Gloydius shedaoensis shedaoensis*

LIU Shu-Qing^① GUO Chun-Mei^① HOU Zhi-Jie^① YAN Dong^② SUN Ming-Zhong^{②*}
WANG Li-Ping^③ WANG Xiao-Ping^③ SUN Li-Xin^③

(^①Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116044;

^②College of Basic Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044;

^③Administrative Division of the National Snake Island and Laotieshan Mountain Natural Conservation, Dalian 116041, China)

Abstract: A high quality cDNA library from the venom gland of Chinese *Gloydius shedaoensis shedaoensis* was constructed using SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technique. Total RNA was extracted using RNAiso reagent kit and mRNA was purified using Poly (A) Purist™ kit, respectively. Single-strand cDNA was synthesized using reverse transcription PCR and double-strand cDNA was synthesized and amplified using LD (long-distance) PCR. The cDNA fragments with the size over 400 bp were fractionated and ligated to pDNR-LIB vector. Recombined plasmids were then electrotransformed in *Escherichia coli* DH10B strains. The capacity of the constructed library was 8×10^7 cfu/ml. The size of most inserts was larger than 1 000 bp. The percentage of the selected recombinant clones was very high (100%). Thus, a cDNA library from the venom gland of *G. s. shedaoensis* has been successfully constructed. It has a high recombinant

基金项目 辽宁省自然科学基金项目 (No. 2008S077),大连科技厅项目 (No. 2008J22JH014)和辽宁省百千万人才工程项目 (No. 2008921069);

* 通讯作者, E-mail: mxs288@gmail.com;

第一作者介绍 刘淑清,博士,副教授;研究方向:生物化学及分子生物学;E-mail: lsqsmz@gmail.com.

收稿日期:2009-10-10,修回日期:2010-06-08

expression level, and can be used for cloning and expressing bioactive protein genes from *G. s. shedaoensis* and for studying their biological functions.

Key words: *Gloydus shedaoensis shedaoensis*; cDNA library; SMART technique; PCR

中国蛇岛蝮蛇 (*Gloydus shedaoensis shedaoensis*) 是我国特有蝮蛇, 属国家级保护蛇种。中国蛇岛蝮蛇蛇毒成分十分复杂^[1-5], 加之蛇毒中许多蛋白活性组分含量低于 0.5%^[2-3,6]; 而且蛇毒采集困难, 过度采集蛇毒会严重影响蛇的生存。因此, 采用传统纯化方法纯化困难, 难以得到足够量的目的蛋白组分。

我们前期采用蛋白质组学技术, 从中国蛇岛蝮蛇蛇毒中鉴定出 20 余种蛋白^[5], 获得了检出蛋白的部分氨基酸序列, 为目的蛋白基因克隆提供了信息。为探索 and 开发具有中国自主知识产权的蛇类药用基因, 进一步对中国蛇岛蝮蛇蛋白活性组分表达和功能进行研究, 加强对中国蛇岛蝮蛇的保护, 我们构建了中国蛇岛蝮蛇毒腺的 cDNA 文库, 并对文库进行了分析。

1 材料与方 法

中国蛇岛蝮蛇由辽宁蛇岛老铁山自然保护区管理处提供; Poly (A) PuristTM 试剂盒、DNA Marker、TaKaRa RNAso Reagent、载体、限制性内切酶、宿主细胞为宝生物工程(大连)公司产品; CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit 为 Clontech 公司产品。

1.1 蛇毒腺总 RNA 提取和 mRNA 分离 中国蛇岛蝮蛇排毒后 3 d, 断头取出一对毒腺, 立即置于液氮中冻存。按 TaKaRa RNAso Reagent 操作说明书提取总 RNA, 经变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 按 Poly (A) PuristTM 试剂盒操作说明从总 RNA 中提取并纯化 mRNA。

1.2 cDNA 文库的构建

1.2.1 反转录合成第一链 cDNA 按 CreatorTM SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒操作要求, 取 3 μ l mRNA, 加入 CDS III/3' PCR Primer 和 SMART IVTM-Oligonucleotide 各 1 μ l, 72 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 冰上冷却 2 min, 加入 2 μ l 5 \times First Strand

Bufers, 1 μ l 20 mmol DTT, 1 μ l 10 mmol dNTP Mix, 1 μ l PowerScriptTM Reverse Transcriptase, 42 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后在冰上终止反应, 逆转录成 cDNA 第一链。

1.2.2 LD-PCR 合成双链 cDNA 按 CreatorTM SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒操作说明, 将反应试剂和 2 μ l 第一链合成产物混合, 进行 PCR 扩增: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 68 $^{\circ}$ C 复性延伸 6 min, 30 个循环扩增双链, 取 5 μ l LD-PCR 产物进行琼脂糖凝胶(1%) 电泳检测。

1.2.3 cDNA 的纯化及分级分离 取 50 μ l 上述合成的双链 cDNA 进行蛋白酶 K 消化和 cDNA 的纯化, 沉淀加去离子水溶解。在纯化得到的 cDNA 中加入 *Sfi* I 酶切试剂, 50 $^{\circ}$ C 水浴酶切 2 h。酶切产物经 CHROMA SPIN-400 柱分级分离, 逐滴收集, 每管取 3 μ l 收集液, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测各管片段大小, 合并 cDNA 片段大于 400 bp 的收集液。

1.2.4 cDNA 片段和载体 pDNR-LIB 连接 cDNA 片段与同样经过 *Sfi* I 酶切处理的 pDNR-LIB 在 T4 DNA 连接酶作用下, 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。

1.2.5 重组质粒的电转化 将含 cDNA 的质粒载体转化感受态细胞 DH10B, 电转化条件: 1.8 kV, 200 Ω , 25 μ F, 电击后, 迅速用 0.9 ml SOC 洗出转化产物, 在 37 $^{\circ}$ C 经 225 r/min 摇菌复苏 1 h, 得到菌液在 30% 甘油中保存。

1.3 cDNA 文库的库容量测定

1.3.1 库容量测定 将 cDNA 文库涂布在含氯霉素的 LB 培养平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养; 计算每个平板上的克隆数, 库容量 = 菌落数 \times 稀释倍数 \times 转化细胞总体积 / 涂布菌体体积。

1.3.2 插入片段检测 随机挑选 16 个菌落, 接种到含氯霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 用碱裂解法提取质粒, 并用 M13 作为引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR

结果。

1.4 文库的扩增和保存 将 cDNA 文库接种于含氯霉素的 LB 培养基中,37℃ 过夜培养,菌液在 30% 甘油中 -80℃ 冻存。用碱裂解法提取质粒,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 文库完整性。

2 结果与讨论

2.1 毒腺总 RNA 高质量的总 RNA 是构建高质量 cDNA 文库的前提条件。图 1 是中国蛇岛蝮蛇毒腺总 RNA 的电泳结果,18S 和 28S 条带完整清晰,说明所获 RNA 分子质量高,适宜于 cDNA 文库的构建。

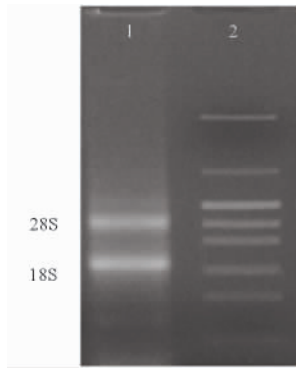


图 1 中国蛇岛蝮蛇毒腺总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose electrophoresis of the total RNA from the venom gland of *G. s. shedaoensis*

- 1. 毒腺总 RNA; 2. λ -EcoT14 I DNA 分子量标准。
- 1. The total RNA obtained from venom gland;
- 2. λ -EcoT14 I DNA marker.

毒腺位于蛇头顶毒牙后上方,每侧一个,每个毒腺平均重 25 mg^[9]。RNA 酶广泛存在,易导致 RNA 降解,而 cDNA 文库的质量取决于 mRNA 的完整性;因此,毒腺新鲜程度对 cDNA 文库质量至关重要^[7-9]。毒腺内含有大量酶类,快速剥离毒腺,彻底破碎毒腺是制备高完整性、高产 RNA 的前提。我们将快速剥离的毒腺直接置于液氮中保存,并在 24 h 内提取毒腺的总 RNA 和 mRNA,避免了 RNA 降解。

2.2 双链 cDNA 合成及分级分离 图 2 是 LD-PCR 合成产物的琼脂糖凝胶电泳(1%)结

果,在 0.2 ~ 19.0 kb 间有弥散条带,说明 cDNA 合成成功。将双链 cDNA 经 CHROMA SPIN-400 柱分级分离,使小于 400 bp 的片段与大片段分离,用所获得的较大片段建库,以提高文库质量。

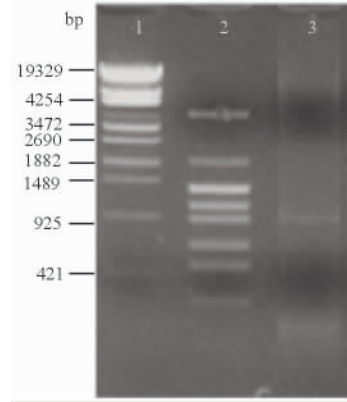


图 2 中国蛇岛蝮蛇毒腺双链 cDNA 琼脂糖电泳
Fig. 2 Agarose electrophoresis of ds cDNA of *G. s. shedaoensis* venom gland

- 1. λ -EcoT14 I DNA 分子量标准; 2. pHY DNA 分子量标准;
- 3. 双链 cDNA.
- 1. λ -EcoT14 I DNA marker; 2. pHY DNA marker;
- 3. ds-cDNA.

2.3 cDNA 文库检测 经测定,蛇岛蝮毒腺 cDNA 文库库容量为 8×10^7 cfu/ml,甘油菌 cDNA 文库库容量为 1.5×10^4 cfu/ml。随机挑选的 16 个菌落,在含氯霉素的 LB 培养基过夜培养,用碱裂解法提取质粒,并用 M13 作为引物进行 PCR 扩增,扩增结果的电泳见图 3。

cDNA 文库质量直接影响其使用价值。评价 cDNA 文库质量,主要看该文库容量和插入 cDNA 片段长度^[7-8]。低丰度 mRNA 所要求的文库克隆数为 1.7×10^5 个^[10],本研究构建的 cDNA 文库库容量为 8×10^7 cfu/ml,完全满足文库使用要求。16 个随机挑选单菌落的 PCR 结果均显示含有重组 cDNA,大多数插入片段大于 1 000 bp(图 3),表明构建文库质量较高。

2.4 文库的扩增 用碱裂解法提取扩增后文库质粒,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,弥散条带明显(图 4),片段分子量大于 1 000 bp,进一步表明构建的蛇岛蝮毒腺 cDNA 文库的完整性。

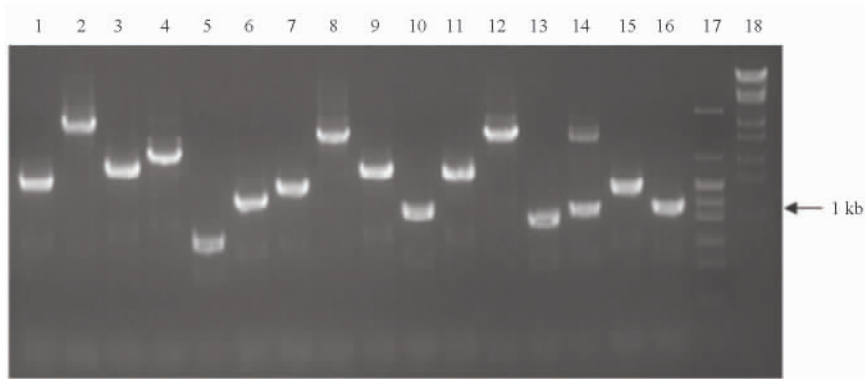


图 3 蛇岛蝮蛇毒腺 cDNA 重组子 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose electrophoresis of the PCR products of 16 recombinant clones from the original cDNA library of *G. s. shedaensis* venom gland

1 ~ 16. 重组子克隆; 17. λ -EcoT14 I DNA 分子量标准; 18. pHY DNA 分子量标准。

1 - 16. Recombinant clones; 17. λ -EcoT14 I DNA marker; 18. pHY DNA marker.

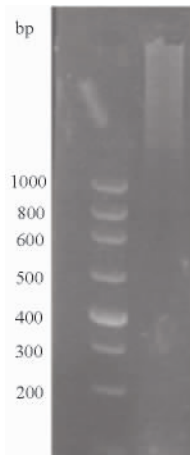


图 4 蛇岛蝮蛇毒腺 cDNA 文库重组子的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of recombinant clone from the original cDNA library of *G. s. shedaensis* venom gland

cDNA 文库的建立为深入研究中国蛇岛蝮蛇毒有效成分提供了重要的基因资源,在基因序列与蛋白之间架起一座桥梁。不仅可以用于检测许多已知基因,同时也可获得新基因,并且使进一步采用基因工程技术生产蛇毒制剂成为可能。

传统 cDNA 文库构建方法难以获得低丰度表达基因,需消耗较大量 mRNA、难合成完整的 cDNA、文库构建步骤繁琐耗时。中国蛇岛蝮蛇

为国家级保护特有蛇种,通过增加毒腺数量获得大量 mRNA 是行不通的。本研究采用 SMART^[11-12]方法,解决了以上问题,一条中国蛇岛蝮蛇的毒腺就可满足 cDNA 文库的构建。另外,SMART 方法能保证 cDNA 序列信息完整性,获得全长基因机率高;且所构建质粒文库不需体外包装,易扩增保存、筛选和利于目的基因表达。

高效的转化方法和感受态细胞也影响构建文库质量,通过实验条件摸索,我们发现电转化效率明显高于化学转化法,另外保持感受态细胞所处溶液的低离子强度对电转化的顺利进行也至关重要。

cDNA 不含内含子,可直接用于基因工程生产。中国蛇岛蝮蛇毒腺 cDNA 文库的建立,在一次性永久保存基因资源的同时,可以利用现代分子生物学及生物信息学方法来筛选和寻找活性蛋白基因;采用基因工程技术大量生产高纯度中国蛇岛蝮蛇蛇毒制剂,对避免中国蛇岛蝮蛇野生资源的破坏,有效保护这一珍稀蛇种起到积极作用。

参 考 文 献

- [1] Liu S, Sun M, Sun C, et al. A novel serine protease from the snake venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. *Toxicon*, 2008, 52(7): 760 - 768.

- [2] Liu S , Sun M , Greenaway F T. A novel plasminogen activator from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* venom (ABUSV-PA): Purification and characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 2006 , 348 (4) : 1279 - 1287.
- [3] Sun M , Liu S , Greenaway F T. Characterization of a fibrinolytic enzyme (ussurenase) from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom: Insights into the effects of Ca^{2+} on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* , 2006 , 1764 (8) : 1340 - 1348.
- [4] Sun M , Liu S , Yang F , et al. A novel phospholipase A_2 from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* venom: Purification , proteomic , functional and structural characterizations. *Biochimie* , 2009 , 91 (4) : 558 - 567.
- [5] 刘淑清 , 马驰 , 宗军卫 , 等. 双向电泳结合质谱初步分析蛇岛蝮蛇毒蛋白质组. *动物学杂志* , 2009 , 44 (4) : 70 - 77.
- [6] 余瑞铭 , 许云禄. 蛇毒纤溶酶原激活剂的研究进展. *海峡药学* , 2008 , 20 (5) : 6 - 8.
- [7] 万榕 , 宋军 , 林旭 , 等. 中华眼睛蛇毒腺 cDNA 表达文库的建立和分析. *第四军医大学学报* , 2004 , 25 (13) : 1208 - 1211.
- [8] 钟肖芬 , 卫剑文 , 赵贵军 , 等. 平颞海蛇毒腺 cDNA 表达文库的构建. *中山大学学报: 自然科学版* , 2001 , 40 (3) : 66 - 69.
- [9] 孙德军 , 杨春伟 , 赵轶卓 , 等. 岩栖蝮蛇毒腺 cDNA 文库构建、降纤酶基因克隆和序列分析. *中国生化药物杂志* , 2005 , 26 (3) : 151 - 155.
- [10] 萨姆布鲁克 J , 拉塞尔 D W : 黄培堂等译. 分子克隆实验指南 (3 版). 北京: 科学出版社 , 2002 , 857 - 916.
- [11] Zhu Y Y , Machleder E M , Chenchik A , et al. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* , 2001 , 30 (4) : 892 - 897.
- [12] Suzuki Y , Yoshilomo-Nakagawa K , Maruyama K , et al. Construction and characterization of a full length λ -enriched and a 5' end enriched cDNA library. *Gene* , 1997 , 200 (1 / 2) : 149 - 156.