

SMART策略构建小黑杨茎形成层全长 cDNA 文库

赵桂媛 魏志刚 刘关君 张凯旋 刘桂丰 杨传平

(东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室)

摘要:为了研究小黑杨木材形成过程中的关键基因,以2年生小黑杨茎形成层组织为试验材料提取RNA,采用SMART(RNA转录过程中的5'末端转换机制)技术合成cDNA第一链,通过LD-PCR合成双链cDNA。利用SfiI限制性酶酶切后将其连接到质粒载体pDNR-LIB上,采用电穿孔法将重组质粒转化到大肠杆菌感受态细胞DH5 α 中,构建全长cDNA文库。文库质量鉴定表明:原始文库滴度为 2.18×10^6 pfu/mL,扩增后的文库滴度为 5.46×10^9 pfu/mL,重组率为96%。插入片段长度在0.5~2.0 kb之间,平均长度为1.12 kb,表明构建的小黑杨茎形成层cDNA文库较为理想。

关键词: 小黑杨;形成层;SMART;cDNA文库

中图分类号: S792.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2010)01-0052-05

ZHAO Guiyuan, WEI Zhigang, LIU Guanjun, ZHANG Kai-xuan, LIU Gui-feng, YANG Chuan-ping
Construction of full-length cDNA library from stem cambium of *Populus simonii* \times *P. nigra* with SMART strategy. Journal of Beijing Forestry University (2010) 32(1) 52-56 [Ch, 17 ref.] Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, P. R. China

In order to investigate the key genes during wood formation, total RNA was extracted from the stem cambium tissue of two-year-old *Populus simonii* \times *P. nigra*. The first-strand cDNA was synthesized using switching mechanism at 5' end of RNA transcript (SMART) technology, and double strand cDNA was synthesized with LD-PCR. Then double strand cDNA was cut by SfiI restriction enzyme and ligated with pDNR-LIB vector. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH5 α by electroporation. The library quality was evaluated, and the results showed that the titer of primary cDNA library and amplified cDNA library were 2.18×10^6 pfu/mL and 5.46×10^9 pfu/mL, respectively, with the recombination rate of 96%. The inserted fragments were distributed from 0.5 to 2.0 kb, and its average size was 1.12 kb. These results indicate that the *P. simonii* \times *P. nigra* cDNA library is constructed successfully.

Key words: *Populus simonii* \times *P. nigra*; cambium; SMART; cDNA library

小黑杨 (*Populus simonii* \times *P. nigra*) 是小叶杨 (*P. simonii*) 与欧洲黑杨 (*P. nigra*) 的杂交种,具有抗逆性强、适应性好和生长速度快等优良特性,是黑龙江省平原地区普遍栽培的树种和纸浆材原料^[1]。造纸工业中,木质素是影响造纸工艺和纸张质量的主要因素之一,去除木质素不但会增加生产成本,而

且还会造成环境污染,因此培育木质素含量低而纤维素含量高的小黑杨新品种对于造纸工业意义重大。目前为止,对小黑杨的研究主要集中在抗虫^[1-3]、抗病^[4]和耐盐^[5-7]等转基因和组织培养^[8]等领域,有关小黑杨木材形成过程中相关基因的研究国内外尚未见报道。构建cDNA文库是研究不同

收稿日期: 2008-12-12

基金项目: 黑龙江省重点攻关课题 (GA06B301-4)、国家自然科学基金项目 (30571513)。

第一作者: 赵桂媛。主要研究方向: 林木遗传育种。电话: 0451-82190607 Email: zhaogy919@126.com 地址: 150040 哈尔滨市东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室。

责任作者: 杨传平, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 林木遗传育种。电话: 0451-82190006 Email: yangcp@nefu.edu.cn 地址: 同上。

责任作者: 魏志刚, 博士, 副教授。主要研究方向: 林木遗传育种。电话: 0451-82190607 Email: zhigangwe@163.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

发育阶段和特定发育期的基因表达、克隆新型细胞因子和分离组织特异基因的有利工具^[9-10]。构建 cDNA 文库的方法较多,其中 SMART 技术以所需起始材料少,试验过程快速、简单和全长率较高等优点而得到广泛应用^[11-12]。本文以小黑杨木材发育过程中的形成层为材料,采用 SMART 构建策略,构建小黑杨形成层组织 cDNA 文库,分离和研究小黑杨木材形成过程中的关键基因,从而为利用基因工程手段培育木质素含量低而纤维素含量高的小黑杨新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2008 年 6 月采取东北林业大学实验林场 2 年生小黑杨形成层材料。Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit 和 Advantage™ 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司,感受态细胞为大肠杆菌 Electro-competent DH5 α , RQ1 RNase-Free DNase 购自 Promega 公司,其他均为常规的国产分子生物学试剂。

1.2 方法

1.2.1 形成层材料的获得

取小黑杨茎段,剥掉树皮,用高温去除 RNase 的手术刀片迅速刮取成熟木质部表层的幼嫩组织,立刻放入无 RNase 污染的离心管中,迅速投入液氮中速冻后置于 -70℃ 低温保存。

1.2.2 改进的 SDS 法提取总 RNA

向无 RNase 的 2.0 mL 离心管中加入 800 μ L SDS 提取缓冲液 [2% SDS (质量与体积比)、0.012 5 mol/L 四硼酸钠、200 mmol/L 氯化钠、4 mol/L 尿素、50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)]、10% 的 β -巯基乙醇。取 250 mg 形成层组织,加入液氮后充分研磨。具体方法参照文献 [13]。用适量 DEPC 水溶解 RNA,置于 -70℃ 下保存备用。用 1.1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度和是否降解,用紫外分光光度计测定其含量。

1.2.3 SMART 技术构建全长 cDNA 文库

cDNA 第一链合成:向无菌的 0.2 mL PCR 管中加入 3.0 μ L (约 1.0 μ g)总 RNA、1 μ L SMART IV 寡聚核苷酸、1 μ L CDS III /3' PCR 引物,混匀,72℃ 下放置 2 min,取出放在冰上冷却 2 min,再加入 2 μ L 5 \times 第一链缓冲液、1 μ L 二硫苏糖醇 (20 mmol/L)、1 μ L dNTP (10 mmol/L)、1 μ L 反转录酶,反应体系为 10 μ L。混匀,42℃ 下反应 1 h,冰上终止反应。

LD-PCR 合成双链 cDNA:向无菌的 0.2 mL PCR 管中加入 2 μ L cDNA 第一链产物、80 μ L 去离子水、10 μ L 10 \times Advantage 2 PCR 缓冲液、2 μ L

50 \times dNTP、2 μ L 5' PCR 引物、2 μ L CDS III /3' PCR 引物和 2 μ L 50 \times Advantage 2 聚合酶,反应体系为 100 μ L。反应参数为:95℃ 1 min; 95℃ 15 s 68℃ 6 min 共 22 个循环。反应结束后取 5 μ L 反应产物用 1.1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

蛋白酶 K 消化:向无菌的 1.5 mL 离心管中加入 60 μ L 扩增的双链 cDNA 和 2 μ L 蛋白酶 K (20 μ g/ μ L),混匀,45℃ 下放置 20 min,然后加 60 μ L 去离子水及 120 μ L V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)为 25:24:1 的混合液,轻轻振荡混合 1 min,室温下 14 000 \times g 离心 5 min,将上清液移入无菌的离心管中,加入 120 μ L V(氯仿):V(异戊醇)为 24:1 的混合液,轻轻混匀,14 000 \times g 离心 5 min,将上清液移入新的无菌离心管中,加入 12 μ L 3 mol/L 乙酸钠、1.5 μ L 糖原 (20 μ g/ μ L)和 312 μ L 95%乙醇,室温下 14 000 \times g 离心 20 min,弃上清液,用 100 μ L 80%乙醇洗涤沉淀,置于空气中干燥 10 min,加入 79 μ L 去离子水重新溶解沉淀。

Sfi I 限制性酶消化:向含有 79 μ L 溶剂的离心管中加入 10 μ L 10 \times 限制性内切酶缓冲液、10 μ L 限制性内切酶、1 μ L 100 \times 牛血清白蛋白,反应体系共 100 μ L。混匀,置于 50℃ 下 2 h,加入 2 μ L 1% 的二甲苯腈蓝,混匀。

cDNA 片段分级分离:按照试剂盒说明书,准备 CHROMA SPIN-400 柱和 16 支 1.5 mL 离心管,把 16 支离心管依次标上序号,摇匀柱内基质,打开顶盖,使柱内的贮存缓冲液流尽后加入 700 μ L 柱缓冲液洗柱。自然流干后,轻轻地将 100 μ L 经二甲苯腈蓝染色的 cDNA 加到基质表面中央。静置片刻,待样品完全吸收,用 100 μ L 柱缓冲液洗涤含有 cDNA 的离心管,小心加到基质表面。自然流干后,二甲苯腈蓝渗透至柱子表面下几毫米处。放好第一收集管,加入 600 μ L 柱缓冲液,收集洗脱液,每管 1 滴。每管取 3 μ L 洗脱液用 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测,收集符合要求的 4~5 管合并。向其中加入 1/10 体积的乙酸钠 (3 mol/L pH 4.8)、1.3 μ L 糖原和 2.5 倍体积的 95%乙醇 (-20℃),混匀,-20℃ 下过夜后 14 000 \times g 离心 20 min,弃上清液,置于空气中干燥 10 min,加入 7 μ L 去离子水溶解沉淀。

cDNA 与 pDNR-LIB 载体连接:设 3 个连接梯度 (表 1)。反应体系为 5 μ L 16℃ 下过夜。取连接液、95 μ L DEPC 水、1.5 μ L 糖原和 280 μ L 预冷的 95%乙醇,加入至无菌的 1.5 mL 离心管中,混匀。-70℃ 下过夜沉淀,15 000 \times g 离心 20 min,弃上清液,置于空气中干燥,用 5 μ L DEPC 水溶解沉淀。

表 1 cDNA与载体连接反应的体系

Tab 1 Reaction systems of ligating cDNA into vector μL

成分	连接 反应 A	连接 反应 B	连接 反应 C
cDNA	0.5	1.0	1.5
pDNR ⁺ LB(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1.0	1.0	1.0
10×连接缓冲液	0.5	0.5	0.5
10 mmol/L ATP	0.5	0.5	0.5
T4 DNA 连接酶	0.5	0.5	0.5
去离子水	2.0	1.5	1.0

注:连接缓冲液组分为 500 mol/L Tris-HCl (pH7.8)、100 mol/L 氯化镁、100 mol/L 二硫苏糖醇、0.5 mg/mL 牛血清白蛋白。

重组质粒转化及其文库质量鉴定:取 50 μL 大肠杆菌感受态细胞 Electro⁻cells DH5 α , 加入上述连接产物, 混匀, 注入到预冷的 0.1 cm 电转杯中进行电转化反应。转化电压为 1 500 V, 脉冲时间为 5.2 ms。取出电转杯, 加入 1.0 mL LB 液体培养基, 将其移至 1.5 mL 离心管中, 37℃ 下振荡培养 1 h (225 r/min)。取培养物的稀释液涂布于含 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 氯霉素的 LB 培养基平板上, 37℃ 下过夜培养, 第 2 天检查平板。随机挑取 24 个单菌落培养, 使用 M13 引物进行菌液 PCR 鉴定。向无菌的 0.2 mL PCR 管中加入 2.0 μL 菌液、2.5 μL 10×Taq 缓冲液、2.0 μL dNTP (2.5 mmol/L)、0.5 μL 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.5 μL 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.3 μL Taq 聚合酶、17.2 μL 去离子水, 反应体系为 20 μL 。反应参数为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s 56℃ 30 s 72℃ 2 min, 共 30 个循环; 72℃ 7 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物进行 1.1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 确定文库重组率和插入片段的大小。

文库滴度的测定及文库扩增:取 1 μL 原始文库菌液用 LB 液体培养基稀释 10⁶ 倍, 然后取 50 和 100 μL 稀释后的菌液涂布在 LB/Cm 琼脂平板培养基上于 37℃ 下过夜培养。计算文库滴度 (plaque forming unit pfu/mL) = (菌落数 × 稀释倍数) / 受细菌的体积。原始文库不稳定, 将原始文库按每个平板产生 2×10⁴ 个以下的克隆涂布, 37℃ 下过夜培养, 收集每个平板的菌液, 此为扩增文库。将扩增后的 cDNA 文库稀释 10⁶ 倍, 取 10 μL 铺板, 计算扩增后文库滴度。文库扩增后加入 25% 的甘油置于 -70℃ 下保存。

2 结果与分析

2.1 小黑杨形成层总 RNA 的质量检测

采用改进的 SDS 法提取小黑杨形成层总 RNA 后, 通过琼脂糖凝胶电泳检查其完整性 (图 1)。结果表明: 28S 和 18S 条带清晰完整, 亮度约为 2:1, 说明总 RNA 完整性较好。通过紫外分光光度计进一

步检测表明, 其 OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 为 2.03, 说明纯度较高, 没有 DNA、蛋白质和酚类物质等杂质污染。由此可见, 改进的 SDS 法提取小黑杨形成层总 RNA 的纯度和完整性均符合构建 cDNA 文库要求。

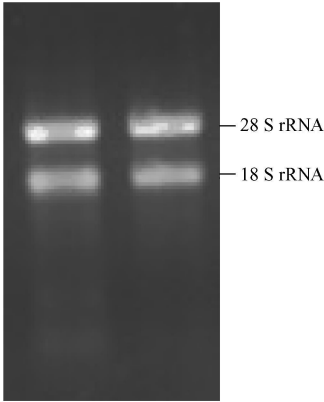


图 1 小黑杨形成层总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig 1 Agarose gel electrophoretogram of total RNA from stem cambium tissue of P. sinonii×P. nigra

2.2 小黑杨形成层双链 cDNA 的合成与检测

分别用 SMART 策略合成 cDNA 第一链和双链 cDNA 后, 用 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2)。结果表明: 双链 cDNA 片段条带分布在 0.3~2.0 kb 之间。表明合成的双链 cDNA 的长片段较多, 进一步表明 RNA 质量合格、无降解, 高质量的 cDNA 已经符合建库的要求。

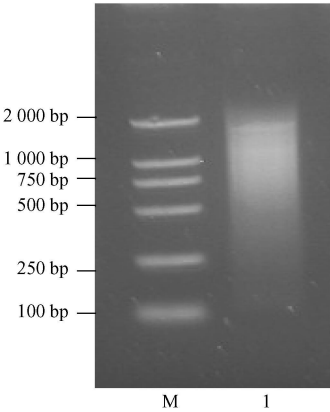
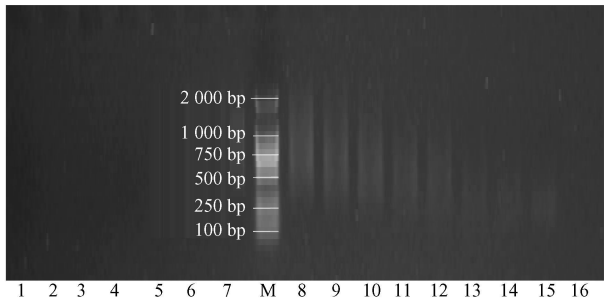


图 2 小黑杨形成层双链 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig 2 Agarose gel electrophoretogram of double strand cDNA from stem cambium tissue of P. sinonii×P. nigra

2.3 小黑杨形成层 cDNA 片段的分级分离与检测

双链 cDNA 经过蛋白酶 K 消化和 SfiI 酶切后, 再经过 CHROMA SPIN-400 柱分级分离, 收集片段大小不同等级的 cDNA 片段。分离结束后, 每管取 3 μL 进行 1.1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳结果 (图 3) 表明: 1~4 管几乎无 cDNA 片段; 从第 5 管开始出现 cDNA 弥散片段, 并且 cDNA 的片段逐渐变小;

6~10管中的 cDNA 长片段多,基本大于 500 bp 从 11管以后开始有明显小于 500 bp 的片段,舍去 11管以后的 cDNA 片段,避免过多的小片段与载体优先连接。因此,合并 6~10管的 cDNA 用于连接。

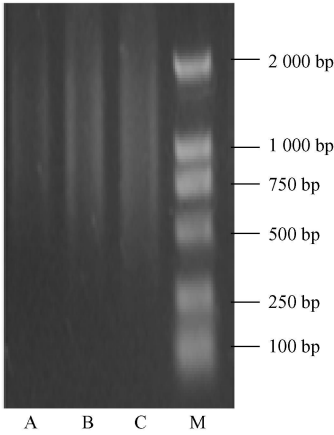


1~16. 过柱后的双链 cDNA; M. DL 2000 DNA 分子量标准
图 3 小黑杨形成层双链 cDNA 过柱分级分离电泳图谱
Fig 3 Agarose gel electrophoretogram of double strand cDNA
from stem cambium tissue of *P. sinonii* × *P. nigra*
after fractionation

2.4 cDNA 文库质量的鉴定

在 3 个 cDNA 与 pDNR-LIB 载体连接反应中,根据弥散条带的亮度及分布长度范围来看,体系 C 连接效果最佳。cDNA 与载体比例为 1.5:1 (图 4)。将菌液稀释后测定原始文库滴度为 2.18×10^6

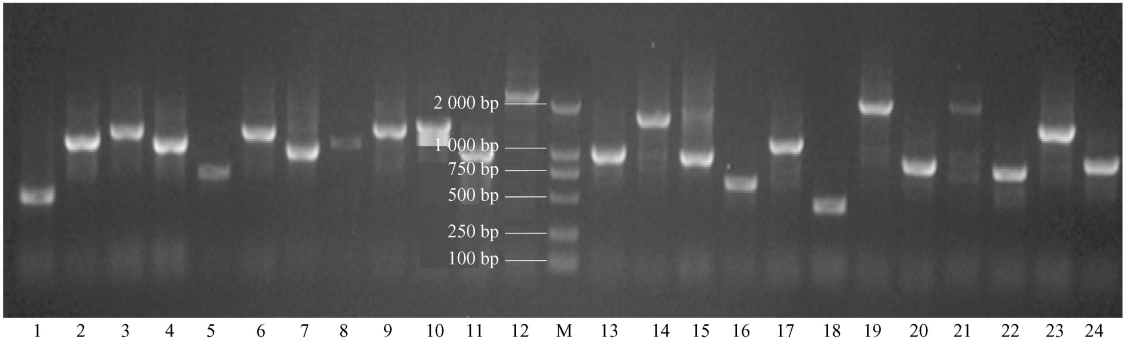
pfu/mL。扩增后的文库滴度为 5.46×10^9 pfu/mL。随机挑取 24 个单菌落进行 PCR 扩增鉴定,估计文库的重组率和插入片段大小。电泳结果 (图 5) 显示,插入片段大小在 0.5~2.0 kb 之间,平均长度约 1.12 kb 重组率为 96%。



A. 连接反应 A; B. 连接反应 B; C. 连接反应 C;
M. DL 2000 DNA 分子量标准

图 4 3 个连接反应体系的电泳检测图谱

Fig 4 Agarose gel electrophoretogram of three
ligation reaction systems



1~24. cDNA 插入片段; M. DL 2000 DNA 分子量标准
图 5 小黑杨形成层 cDNA 文库插入片段的 PCR 检测
Fig 5 PCR detection of inserted size from stem cambium tissue of *P. sinonii* × *P. nigra*

3 结论与讨论

高质量的 RNA 是构建文库的重要环节。由于常规的 SDS 法不适合提取次生物质含量高的木本植物 RNA,因此本文对传统的 SDS 法进行改进,如在 SDS 提取缓冲液中加入四硼酸钠和尿素、增加材料在提取液中的振荡时间和提高提取液中 β -巯基乙醇的含量等措施,克服小黑杨中多酚化合物、木素和纤维含量高等因素对 RNA 提取的干扰,成功提取出纯度和完整性均符合要求的形成层总 RNA。在 RNA 反转录时,采用总 RNA 不仅省去了纯化 mRNA 的复杂步骤,又可避免在 mRNA 纯化过程中低丰度 mRNA 的损耗和 RNA 的降解,从而保证了

反转录的 cDNA 完整性和最大限度获得全长 cDNA。如果 RNA 链过长或者存在复杂的二级结构,反转录酶往往会提前终止反转录,不能获得足够的全长 cDNA,所以在合成 cDNA 第一链之前,对 RNA 进行 72°C 2 min 的热变性处理,并且于冰浴中 2 min 后再进行 cDNA 合成。双链 cDNA 的合成一般采用 LD-PCR 和 Primer Extension 等方法。LD-PCR 方法具有起始 RNA 用量少的优点,仅需要 50 ng 总 RNA 或者 25 ng polyA + RNA,而 Primer Extension 法需要 1 μ L polyA + RNA,并且还需要纯化 mRNA 的复杂步骤,采用 LD-PCR 这个方案对于研究者有限的获得 RNA 起始材料是理想的。本试验采用 LD-PCR 法合成的双链 cDNA,经检测其质量也完全符合要求。

采用 cDNA 单酶切 (SfiI 酶切),可在第一、二链引物的 5'端同时引入 SfiI (A)和 SfiI (B)位点,而不需甲基化、接头平端等烦琐操作就可进行定向克隆,因此本文采用 SfiI 酶对 cDNA 进行酶切。片段分级分离与载体连接时,cDNA 片段长度与 cDNA 浓度对建库的影响至关重要,如果不除去小片段的 cDNA,则其会优先与载体连接,导致文库插入片段过短,但筛除过多的 cDNA 片段,造成文库滴度下降,分级分离的标准一般是回收 400 bp 以上的 cDNA 片段^[14-16]。准确测定 cDNA 浓度,控制其与载体的比例,连接才能取得理想的效果,本文采用第 3 个连接梯度,收到了良好的效果。

文库的滴度、重组率及插入片段的大小是鉴定 cDNA 文库的重要指标^[17]。本项研究获得的小黑杨 cDNA 文库原始滴度为 2.18×10^6 pfu/mL 扩增后滴度为 5.46×10^9 pfu/mL 插入片段平均长度为 1.12 kb 重组率接近 100%,这表明文库完全合格,能够满足克隆木材形成相关基因和筛选其中低丰度表达基因的要求。

参 考 文 献

[1] 姜静,常玉广,董京祥,等. 小黑杨转双价抗虫基因的研究 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(6): 669-672.

[2] 常玉广,刘桂丰,姜静,等. 小黑杨抗虫基因的遗传转化 [J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(6): 30-31.

[3] LIN T, WANG Z Y, LIU K Y . Transformation of spider neurotoxin gene with prospective insecticidal properties into hybrid poplar *Populus simonii* × *P. nigra* [J]. Acta Entomologica Sinica, 2006, 49 (4): 593-598.

[4] 王占斌,张福丽,王志英,等. 小黑杨转抗真菌病基因的初步研究 [J]. 林业科技, 2006, 31(6): 22-24.

[5] 刘桂丰,杨传平,蔡智军,等. 转 betA 基因小黑杨的耐盐性分析及优良转基因株系的选择 [J]. 林业科学, 2006, 42 (7): 33-36.

[6] 白爽,宋启平,刘桂丰,等. 转 betA 基因的小黑杨花粉植株耐盐性分析 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(1): 41-44.

[7] 姜静,王雷,詹立平,等. 小黑杨花药培养植株转化胆碱氧化酶基因提高耐盐性 [J]. 植物学通报, 2006, 25(1): 80-84.

[8] QU G Z, LIU G F, WANG Y C, et al. Efficient tissue culture and agrobacterium-mediated transformation of haploid poplar derived from anthers [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2007, 54(4): 559-563.

[9] PETERSON L A, BROWN M R, CARLISLE A J, et al. An improved method for construction of directionally cloned cDNA libraries from microdissected cells [J]. Cancer Res, 1998, 58 (23): 5326-5328.

[10] GALAUD J P, CARRIERE M, PAULY N, et al. Construction of two ordered cDNA libraries enriched in genes encoding plasmalemma and tonoplast proteins from a high-efficiency expression library [J]. Plant J, 1999, 7(1): 111-118.

[11] ZHU Y Y, MACHLEDER E M, CHENCH K A, et al. Reverse transcriptase template switching: A SMART approach for full-length cDNA library construction [J]. BioTechniques, 2001, 30 (4): 892-897.

[12] LU J B, LIU T B, YU X Y, et al. Representative appressorium stage cDNA library of *Magnaporthe grisea* [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2005, 6(2): 132-136.

[13] 杨成君,王军,刘关君,等. 红果人参叶中 cDNA 文库的构建 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 664-668.

[14] 龙松华,陈信波,邓欣,等. SMART 技术构建亚麻韧皮部全长 cDNA 文库 [J]. 中国麻业科学, 2008, 30(3): 128-130.

[15] 张震,王教瑜,杜新法,等. 稻曲病菌 cDNA 文库的构建 [J]. 植物病理学报, 2008, 38(5): 462-467.

[16] 付杨,高翔,敖曼,等. 花瓣总 RNA 的提取和 cDNA 文库的构建 [J]. 东北师大学报, 2008, 40(3): 118-121.

[17] SAMBROOK J, MANIATIS T, FRISTCH E F. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 283-356.

(责任编辑 董晓燕)