

利用 SMART 技术构建鸡肺酵母双杂交 cDNA 文库

赵素君^{1,2}, 王红宁^{1*}, 杨鑫¹, 张安云¹, 周英顺¹

(1. 四川大学生命科学学院, 动物疫病与食品安全四川省重点实验室, 成都 610064;

2. 四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

摘要:以 1 月龄 SPF 鸡肺为材料, 用 Trizol 方法提取总 RNA, 并用 mRNA 纯化试剂盒纯化 PolyA⁺ mRNA, 利用 SMART 技术合成双链 cDNA (ds cDNA)。合成的 ds cDNA 通过 CHROMA SPIN™ TE-400 Column 进行纯化, 纯化后的 ds cDNA 与线性 pGADT7-Rec 共转化酵母感受态细胞 AH109 中, 以同源重组的方式, 在酵母细胞内构建成鸡肺的 cDNA 文库。获得的文库容量为 3.9×10^6 cfu, 随机选取 20 个克隆进行 PCR 检测, 插入片段大小集中在 0.3 ~ 3.0 kb 之间, 平均插入片段约为 1.4 kb 左右, 文库重组率为 100%。结果表明该文库达到了高质量文库所应具备的条件, 为酵母双杂交技术筛选与 IBV-N 相互作用的宿主细胞蛋白奠定基础。

关键词: 禽传染性支气管炎病毒; 鸡肺; 酵母双杂交; cDNA 文库; SMART 技术

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2012)06-0880-04

Construction of the Yeast Two-hybrid cDNA Library of Chicken Lung with SMART Technology

ZHAO Su-jun^{1,2}, WANG Hong-ning^{1*}, YANG Xin¹, ZHANG An-yun¹, ZHOU Ying-shun¹

(1. Animal Disease Prevention and Food Safety Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Sichuan Animal Science Academy, Chengdu 610066, China)

Abstract: The mRNA of one-month-old SPF chicken lung was purified by mRNA purification kit, and double-stranded cDNA (ds cDNA) was synthesized using SMART technology. The ds cDNA purified by CHROMA SPIN™ TE-400 Column and the linearized pGADT7-Rec vector were co-transformed into competent cells of yeast strain AH109. A chicken lung yeast two-hybrid cDNA library was constructed in yeast cells by homologous recombination. The library capacity was 3.9×10^6 cfu with insert size ranging from 0.3 kb to 3.0 kb, and the average length of inserts was approximately 1.4 kb with the recombination rate of 100%. These results showed that a high-quality cDNA library of chicken lung could be constructed, which could be used for studying host cell protein interaction with the N protein of Infectious Bronchitis Virus (IBV).

Key words: IBV; chicken lung; yeast two-hybrid; cDNA library; SMART technology

禽传染性支气管炎 (Infectious Bronchitis, IB) 是由传染性支气管炎病毒 (Infectious Bronchitis Virus, IBV) 引起的一种急性、高度接触性传染病。该病的特征为病鸡打喷嚏、咳嗽以及气管啰音等, 导致生长迟缓、饲料转化率降低、产蛋数量和品质下降以及死亡率增加, 给国内外养禽业造成严重经济损失 (Kapczynski *et al.*, 2002; Cavanagh, 2007)。

自 20 世纪 70 年代中期首例 cDNA 克隆问世以来, cDNA 文库构建和筛选已成为目前发现新基因和研究基因功能的基本工具, 是基因克隆的重要方法之一。cDNA 便于克隆和大量表达, 它不像基因

组含有内含子而难于表达, 因此从 cDNA 文库中可以筛选到目的基因, 并直接用于该基因的表达, 是研究工作中最常用的基因文库。目前, 构建全长 cDNA 文库的方法主要有: Oligo-capping 法、CAPture 法、SMART 法、Cap-Select 法、Cap-jumping 法以及 Cap-trapper 法等。这些方法各具优点, 但都以真核生物 mRNA 5' 端的帽子结构为基础。其中, 以 SMART 技术应用最为广泛 (Zhu *et al.*, 2001)。SMART 技术是一种较新的 cDNA 文库构建方法, 避免了普通 cDNA 文库构建方法中信息容易丢失等缺点, 所构建的文库能够代表原有样品中 mRNA 的丰度, 保存了生物

收稿日期: 2012-05-30 接受日期: 2012-07-30

基金项目: 国家“863”计划, “家禽重要病毒病基因工程疫苗研究和创制” (2006AA10A205)

作者简介: 赵素君 (1977 ~), 助理研究员, 博士, 从事分子遗传学研究, E-mail: zhaosujun@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: whongning@163.com

遗传信息的完整性。

自 1976 年 Hofstetter 成功构建了第一个 cDNA 文库以来, cDNA 文库的构建经历了一个逐步发展完善的过程。近年来, 国内外已建立了很多组织及细胞的 cDNA 文库, 主要集中在人、小鼠以及其他一些模式生物, 如水稻、拟南芥、果蝇、猪等, 极大地促进了功能基因组学研究。目前尚未见构建鸡肺 cDNA 文库的报道。本研究选取 IBV 易感的肺脏组织, 采用 SMART 法构建鸡肺的酵母双杂交 cDNA 文库, 为酵母双杂交技术筛选与 IBV-N 相互作用的宿主细胞蛋白提供基础材料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试材料 1 月龄 SPF 鸡购于精华生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂和试剂盒 Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; Oligotex-dT mRNA Midi Kit 购自美国 Qiagen 公司; Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits(含酵母菌株 AH109、载体 pGADT7-Rec)、Matchmaker AD LD-Insert Screening Amplimer Set、Advantage® 2 PCR Polymerase Mix、CHROMA SPIN™ TE-400 COLUMN 购自美国 Clontech 公司; 普通质粒小提试剂盒, 购自天根生化科技有限公司; 核酸 Size marker、限制性内切酶购自大连宝生物公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物

SMART III Oligo: 5'-AAGCAGTGGTATCAACG-CAGAGTGGCCATTATGGCCGGG-3'; CDS III Primer: 5'-ATTCTAGAGGCCGAGCGGCCGACATG-d(T)₃₀VN-3'。

cDNA PCR 扩增: 上游引物: 5'-TTCCACCCAAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGTGG-3'; 下游引物: 5'-GTA-TCCGATGCCCACCCTCTAGAGCCGAGCGGCCGACA-3'。

文库插入片段的鉴定引物: 上游引物: 5'-CTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAAACC-3'; 下游引物: 5'-GTGAACCTGCGGGGTTTTTTCAGTATCTACGATT-3'。

1.2 方 法

1.2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化 取新鲜肺组织, 按 Trizol Reagent 说明书提取鸡肺总 RNA, 经紫外分光光度计分析总 RNA 的浓度及纯度, 并进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测。按 Qiagen 公司的 Oligotex mRNA Midi Kit 说明书进行 mRNA 纯化, 用紫外分光光度计和甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测

分离纯化后的 mRNA 质量。

1.2.2 cDNA 的合成及纯化 合成 cDNA 第一链: 取经过 DEPC 处理过的无菌 250 μL PCR 管, 加入 1.0 μg mRNA, 1.0 μL CDS III primer (10 μM), 加水至终体积 4 μL, 轻轻混匀后短暂涡旋, 72℃ 温育 2 min 后, 立即放置冰上 2 min; 然后将 PCR 管放于室温下, 加入 5 × First-Strand Buffer 2.0 μL, DTT (20 mM) 1.0 μL, dNTP Mix (10 mM) 1.0 μL, MMLV Reverse Transcriptase 1.0 μL, 轻轻混匀后短暂涡旋, 42℃ 温育 10 min, 再加入 1.0 μL SMART III 寡聚核苷酸, 42℃ 温育 1 h, 75℃ 作用 10 min 终止反应, 冷却至室温后, 再加入 1.0 μL RNase H, 37℃ 温育 20 min。

LD-PCR 扩增双链 cDNA (double-stranded cDNA, ds cDNA): 取 2 μL 第 1 链反应混合物, 加入 70 μL H₂O、10 μL 10 × Advantage 2 PCR buffer、2.0 μL 50 × dNTP Mix、2.0 μL 5' PCR Primer、2.0 μL 3' PCR Primer、10 μL 10 × GC-Melt Solution、2.0 μL 50 × BD Advantage 2 Polymerase Mix, 终体积 100 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 10 s, 68℃ 6 min, 20 个循环; 68℃ 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

ds cDNA 的纯化: 合成的 ds cDNA 用 BD CHROMA SPIN™ TE-400 COLUMN 进行纯化分离, 去除小于 200 bp 的片段, 具体操作方法参考说明书。

1.2.3 cDNA 文库的构建 采用 LiAc 的方法制备酵母感受态细胞 (Gietz *et al.*, 1992)。将制备好的双链 cDNA 与线性化的载体 pGADT7-Rec 共转化酵母 AH109 感受态细胞中构建酵母双杂交 cDNA 文库。在离心管中分别加入 ds cDNA 20 μL、线性的载体 pGADT7-Rec 6 μL、变性的 Herring Testes Carrier DNA 20 μL、600 μL 酵母感受态细胞, 混匀后加入 2.5 mL PEG/LiAc, 混匀, 30℃ 作用 45 min, 每 15 min 混合一次; 然后加入 160 μL DMSO, 混匀, 在 42℃ 水浴中作用 20 min, 每 10 min 混合 1 次; 700 g 离心 5 min, 弃去上清液, 用 3 mL YPD Plus Medium 悬浮细胞, 然后于 30℃ 振荡培养 90 min, 700 g 离心 5 min, 弃上清, 用 30 mL 0.9% 的 NaCl 悬浮细胞, 将细胞涂布于 SD/-Leu 平板, 30℃ 培养 3~6 d。将培养板 4℃ 预冷 3~4 h, 每个平板加入 5 mL 预冷的 YPD 培养基(含 25% 甘油), 收集菌液, 调整浓度至 $\geq 2 \times 10^7$ 细胞/mL, 1 mL/管分装, 置于 -80℃ 保存。

1.2.4 cDNA 文库的质量评估 转化效率的检测: 在 100 mm 的 SD/-Leu 培养平板上分别涂上 100 μL

1:10、1:100、1:1000、1:10 000 的稀释菌液,30℃ 培养 2~3 d,直到有菌落长出,依据公式计算转化效率。转化效率 = 克隆数目(cfu) × 总转化混合物体积(μL)/稀释混合物涂板体积(μL) × 稀释系数 × 转化所用质粒量(μg)。

文库滴度的检测:在 100 mm 的 SD/-Leu 培养平板上分别涂上 100 μL 1:10、1:100、1:1000、1:10 000 的稀释菌液,30℃ 培养 2~3 d,直到有菌落长出。统计菌落数(cfu),以不同稀释度测定平均滴度,从而得出文库的总容量。公式:文库的滴度 = 克隆数目 × 稀释倍数/涂板的菌液体积数。

插入片段及重组率的鉴定:从平板上随机挑选 20 个单菌落,用文库鉴定引物进行酵母菌落 PCR,通过检测 PCR 产物来分析文库中 cDNA 插入片段的大小及重组率。PCR 反应程序:94℃ 预变性 3 min;94℃ 30 s,68℃ 3 min,30 个循环;68℃ 3 min。取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 鸡肺脏组织总 RNA 提取及质量检测结果

总 RNA 的质量直接影响 polyA⁺ mRNA 及合成 cDNA 的质量。经紫外分光光度计测定,鸡肺总 RNA A₂₆₀/A₂₈₀ 值为 1.95,浓度为 0.5 μg/μL。甲醛变性胶琼脂糖电泳结果如图 1 所示:28S rRNA、18S rRNA 及 5S rRNA 特异条带清晰,28S 的浓度及亮度约是 18S 的 2 倍,符合实验要求。

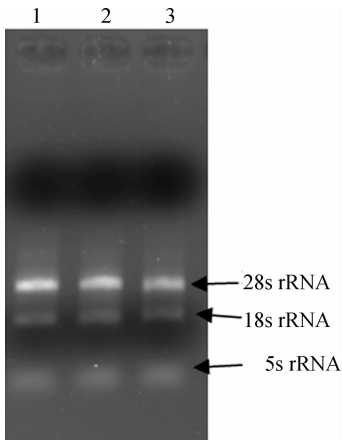


图 1 鸡肺总 RNA 电泳分析
1~3. 鸡肺总 RNA 样品

Fig. 1 Electrophoresis analysis of total RNA extracted from chicken lung
Lanes 1, 2 and 3. total RNA samples

2.2 mRNA 的分离纯化及质量检测结果

分离纯化后,经紫外分光光度计测定,polyA⁺ mRNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值为 2.1,浓度为 0.39 μg/μL。

甲醛变性胶琼脂糖电泳结果如图 2 所示,polyA⁺ mRNA 大小在 100~3000 nt 范围之内。结果表明,该 polyA⁺ mRNA 可用于 cDNA 的逆转录,其质量直接影响 cDNA 的合成质量。

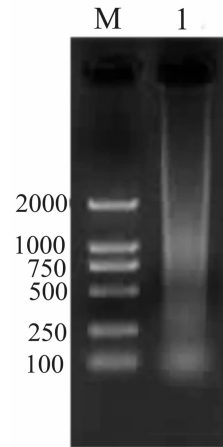


图 2 鸡肺 mRNA 电泳分析

M. DL2000 DNA Marker, 1. 鸡肺 mRNA 样品
Fig. 2 Electrophoresis analysis of chicken lung mRNA
Lane M. DL2000 DNA Marker, Lane 1. mRNA sample

2.3 合成 cDNA 的质量检测结果

合成 cDNA 的长度是保证所构建的 cDNA 文库质量的关键因素之一。1.0 μg mRNA 逆转录合成第一链 cDNA,LD-PCR 合成 ds cDNA,通过 CHROMASPIN™ TE-400 COLUMN 柱纯化,去除小于 200 bp 的 DNA 片段,ds cDNA 样品经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 3,cDNA 片段的长度分布在 0.3~3.0 kb 之间,说明合成的 cDNA 的片段长度符合构建文库的要求。

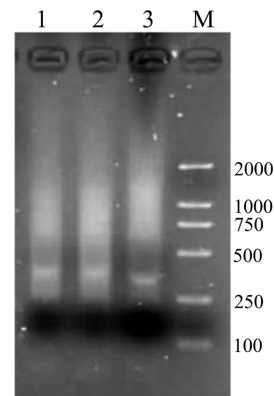


图 3 鸡肺双链 cDNA 电泳分析

1~3. 双链 cDNA 样品, M. DL2000 DNA Marker
Fig. 3 Electrophoresis analysis of ds cDNA

Lanes 1, 2 and 3. ds cDNA samples, Lane M. DL2000 DNA Marker

2.4 酵母双杂交 cDNA 文库质量评估结果

将合成的 ds cDNA 与 Sma I 线性化的载体 pGADT7-Rec 共转化酵母感受态细胞 AH109,在酵

母细胞中 cDNA 以同源重组的方式克隆到 pGADT7-Rec 中。对涂布不同稀释度的平板进行单菌落计数,经计算文库的转化率约为 1.3×10^6 cfu \cdot μg^{-1} pGADT7-Rec (标准要求 $\geq 1 \times 10^6$ transformants/3 μg pGADT7-Rec),文库滴度约为 1.3×10^5 cfu/mL,总容量为 3.9×10^6 cfu。

从 SD/-Leu 平板上随机挑取 20 个克隆进行酵母菌落 PCR,经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小

来判断文库中 cDNA 片段的插入情况,如图 4 所示,重组到 pGADT7-Rec 载体上的 cDNA 片段在 0.5 ~ 3.0 kb 之间,平均插入片段约为 1.4 kb,重组率为 100%,结果说明文库中 cDNA 片段长度适用于酵母双杂交筛选。有些菌落出现 2 个 PCR 产物,这是因为酵母细胞没有大肠杆菌的“不相容性”,同一个酵母细胞中可以含有一个以上不同的外源基因的质粒。

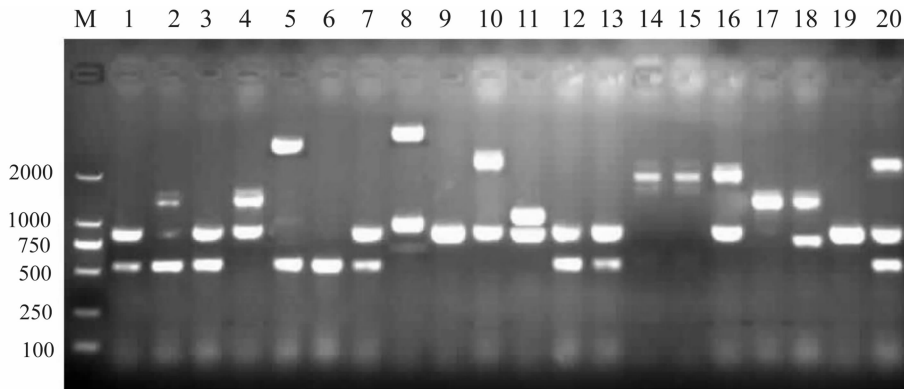


图 4 文库 cDNA 片段的酵母转化子 PCR 分析

Fig. 4 PCR analysis of the cDNA fragments in library by using transformed yeast plasmids

3 讨论

本研究利用 Clontech 公司的 Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit 文库构建试剂盒构建酵母双杂交 cDNA 文库,该方法采用了 SMART™ cDNA 合成技术,SMART™ cDNA 合成所用的 Power-script™ 反转录酶比 MMLV 反转录酶合成的 cDNA 片段更长 (Gerard *et al.*, 1997),并且能在 cDNA 两端自动加上同源臂,避免了传统的连接酶连接存在的问题;该系统中 ds cDNA 合成所用的热启动 TITANIUM™ Taq DNA 聚合酶与传统聚合酶比较具有更高的保真性能 (Barnes, 1994; Kellogg *et al.*, 1994)。由于该系统是利用同源重组的方法进行 cDNA 与文库载体的连接,比传统的酶切与连接的方法大大提高了效率,而且利用此方法所获得的 cDNA 全长比例较高;同时采用 Yeastmaker™ 酵母转化系统 2,提高了酵母的转化效率,而且其独特的营养缺陷表型更易于筛选转化子。本研究采用这套系统成功地构建了鸡肺酵母双杂交 cDNA 文库,为筛选与 IBV-N 相互作用的宿主细胞蛋白提供了基础研究材料。

对 cDNA 文库质量的评价主要检测文库的代表性和重组 cDNA 片段的序列完整性两个方面。cDNA 文库的代表性是指文库中包含的重组 cDNA 分子反

映来源细胞中表达信息(即 mRNA 种类)的完整性,它是体现文库质量的最重要指标。文库的代表性好坏可用文库的库容量来衡量,它是指构建的 cDNA 文库中所包含的独立的重组子克隆数。一般达到要求的文库至少应包括 1.7×10^5 个克隆数。本试验所构建的鸡肺 cDNA 文库容量达 3.9×10^6 cfu,文库滴度约为 1.3×10^5 cfu/mL。一个质量好的 cDNA 文库,插入的 cDNA 片段 ≥ 300 bp,平均 > 1000 bp。由于质粒在酵母中的拷贝数很低,从酵母细胞中提取的质粒 DNA 直接用琼脂糖凝胶电泳检测,很难检测到结果,所以检测文库中 cDNA 插入片段的大小,要进行酵母菌落 PCR 或以质粒为模板进行 PCR,结果显示 cDNA 插入片段在 0.5 ~ 3 kb 之间,平均插入片段约为 1.4 kb,重组率为 100%。以上结果均表明该文库达到了高质量文库所应具备的条件,为下一步研究与 IBV-N 相互作用的宿主细胞蛋白及其相互作用关系奠定了基础。

4 参考文献

- Barnes WM. 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 91(6): 2216 ~ 2220.
- Cavanagh D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus [J]. Vet Res, 38(2): 281 ~ 297. (下转第 886 页)

的平均成活率最高,第 3 胎仔鼠成活率次之,第 1 胎仔鼠平均成活率最低。上述结果揭示在繁殖到第 3 胎时布氏田鼠的产仔率和成活率均表现出下降的趋势,说明本实验室布氏田鼠封闭群的繁殖性能在第 2 胎最佳,到第 3 胎时开始明显下降,应该及时更换配种雌鼠。练有文(2004)研究清洁级 KM 小鼠不同胎次的繁殖性能,发现其繁殖性能以第 2 胎最好,第 3 胎次之,从第 3 胎开始逐胎下降,与本研究在布氏田鼠封闭群中繁殖性能呈现的趋势相同。

3.2 繁殖竞争对配种的影响

本研究发现以雄雌配比为 2:2 或 3:2 的方式配种时,同窝的雄性布氏田鼠间出现嗅闻和追打的情况,甚至出现咬伤致死的现象,此现象在引入雌性合笼繁殖前未出现。我们认为这是在有多个雄性存在时,雄性之间为了交配权而进行同性竞争的结果,这种竞争保证高序位雄鼠对繁殖权利的控制。另一方面,在以雄雌配比 2:2 或 3:2 的方式配种后,同窝的雌性布氏田鼠出现追打雄性甚至咬伤致死雄性的现象,此现象在以雄雌配比为 1:1 或 1:2 的方式繁殖时未出现。推测在雄性配偶为 2 个以上时,雌性布氏田鼠对雄性存在严格的选择,倾向于选择高序位雄鼠。该选择的机制以及对种群的影响还有待进一步研究。陈国康和施大钊(2003)在研究野生布氏田鼠实验室种群的繁殖行为时也报道了类似的情况。

3.3 最优繁殖配比方式

本实验发现以不同雄雌的配比进行繁殖对实验室饲养布氏田鼠的产仔数、成活率、胎间隔等繁殖性能指标有显著影响。使用 1♂:1♀ 的配比方法进行繁殖,产仔率最高,但同时时间段内产仔量少于 1♂:2♀ 的配比方式,且不能最有效地利用空间资源。而采

用多雄多雌的混交繁殖,不仅不能达到提高繁殖性能的目的,反而使繁殖率和仔鼠的成活率均显著降低。因此上述实验结果揭示以 1♂:2♀ 的配比方式进行繁殖既可以提高布氏田鼠种群的产仔数和仔鼠的成活率,又可以提高饲养空间的利用率,是适宜应用在这个布氏田鼠封闭群的繁育方式。目前以 1♂:2♀ 的配比方式进行繁育的哺乳动物比较普遍,SPF 级 NIH 小鼠的研究(符路娣,2006)、豪猪繁殖性能的研究(姜卫星等,2010),以及布氏田鼠近缘种金黄地鼠繁殖的研究(张水田等,2007)都证明这种雄雌配比的繁殖方式有利于种群的快速扩大。

4 参考文献

- 陈国康,施大钊. 2003. 不同社群序位布氏田鼠的繁殖行为[J]. 兽类学报, 23(3): 220~224.
- 符路娣. 2006. 不同的对比对 SPF 级 NIH 小鼠繁殖性能的影响[J]. 中兽医学杂志, (4): 36~37.
- 姜卫星,李伟,唐松元,等. 2010. 不同母公对比对提高豪猪繁殖性能的影响[J]. 经济动物学报, 14(2): 84~86.
- 练有文. 2004. 清洁级 KM 小鼠不同胎次繁殖性能观察分析[J]. 动物科学与动物医学, 21(2): 28~29.
- 梁虹,潘思丹,施海霞,等. 2009. 布氏田鼠封闭群建立及繁殖特性研究[J]. 中国卫生检验杂志, (12): 2767~2769.
- 潘思丹,施海霞,宋铭晶. 2011. SPF 级布氏田鼠的繁殖及生长发育性能测定[J]. 中国卫生检验杂志, 21(1): 92~94.
- 宛新荣,王梦军,王广,等. 2002. 布氏田鼠标志种群的繁殖参数[J]. 兽类学报, 22(2): 81~86.
- 张俭,黄星群,刘建军. 2006. BALB/c 小鼠繁殖性能的观察及分析[J]. 四川动物, 25(1): 179~181.
- 张水田,罗素兰,曾德明,等. 2007. 地鼠繁殖方式的改进与规模化生产[J]. 四川动物, 26(1): 188~190.

(上接第 883 页)

- Gietz D, St Jean A, Woods RA, *et al.* 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 20(6): 1425.
- Gerard GF, Fox DK, Nathan M, *et al.* 1997. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA[J]. *Mol Biotechnol*, 8(1): 61~77.
- Kapczynski DR, Sellers HS, Rowland GN, *et al.* 2002. Detection of in ovo-inoculated infectious bronchitis virus by immunohistochemistry and

in situ hybridization with a riboprobe in epithelial cells of the lung and cloacal bursa[J]. *Avian Dis*, 46(3): 679~685.

- Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, *et al.* 1994. TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase[J]. *Biotechniques*, 16(6): 1134~1137.
- Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, *et al.* 2001. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction[J]. *Biotechniques*, 30(4): 892~897.