

绿色巴夫藻 cDNA 文库的构建及 EST 序列分析

牛 艳, 孔文涛, 杨 婧, 孔 健

(山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要:将绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)培养液逐种加入氨苄青霉素、硫酸庆大霉素、硫酸阿米卡星 3 种抗生素处理,经检验后无杂菌污染。以该藻种为实验材料,以 λ TriplEx2 为载体,利用 SMART 技术构建其 cDNA 文库。经测定文库滴度为 6×10^6 pfu/mL,重组率为 98%。利用 PCR 方法检测 cDNA 文库插入 DNA 片段的大小,其长度为 0.5 ~ 2 kb,表明该文库达到建库要求,可用来筛选低丰度 mRNA 的基因克隆。对 cDNA 文库中的阳性克隆进行随机 PCR 扩增,挑选插入 DNA 片段较大的克隆,进行 5' 末端单向序列测定,测序结果与 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,获得了 200 个有研究价值的 EST 序列和 cDNA 克隆,为进一步研究和开发绿色巴夫藻的功能基因奠定了基础。[中国水产科学,2006,13(6):902-907]

关键词:绿色巴夫藻;cDNA 文库;SMART 技术;序列表达标签;多不饱和脂肪酸

中图分类号:Q949.26

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2006)06-0902-06

目前,海洋微藻是研究和开发高附加值产品的重要生物材料。已从海洋微藻中提取出多种具有治疗心脑血管疾病和增强免疫功能的生物活性物质如虾青素、 β -胡萝卜素、多糖等,它们在食品加工及医药行业发挥了重要作用^[1-3]。海洋微藻中 β -胡萝卜素具有增强免疫和预防动脉硬化的功能^[4-5],胞外多糖具有免疫调节功能^[6]。

二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)等多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)是人体必需的脂肪酸,在治疗人类多种疾病等方面具有重要作用^[7]。海洋微藻 PUFA 含量丰富。虽然从微藻中提取 PUFA 的工艺简单,但是海洋微藻多为自养藻,生长缓慢,细胞得率低,对微藻的规模化培养及细胞改良方面沈继红等^[8]曾进行了大量研究。绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)为自养微藻,属金藻门、普林藻纲、巴夫藻目;林学政等^[9]测定结果表明,该藻体富含多不饱和脂肪酸,尤其 EPA 和 DHA 含量较高,是克隆脂肪酸去饱和酶基因的很好实验材料。

表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)代表着某物种或组织在某一时期表达的所有基因信息,EST 序列中基因出现的频率可用来分析基因的

丰度。近几年,EST 技术发展很快,已成为从基因文库中获取新基因信息的一种快捷有效手段。Peierra 等^[10]已从微藻 cDNA 文库的 EST 序列中,获得了 $\Delta 4$ 脂肪酸去饱和酶基因和延伸酶基因片断,在此基础上又克隆了两基因全长,并实现了基因的表达。本研究以绿色巴夫藻为实验材料,构建其 cDNA 文库,通过表达序列标签(EST)技术对其 cDNA 文库进行随机序列扩增和测序,通过与 GenBank 中已报道基因的 BLAST 同源性比对,获取了绿色巴夫藻的脂肪酸去饱和酶基因和其他功能基因的遗传信息,为克隆基因全长和进一步开发微藻的新功能基因奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 藻种 绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*):购自青岛海洋所。

1.1.2 试剂 OligotexTM Purification of poly A⁺ RNA Kit 购自 QIAGEN 公司;SMARTTM cDNA Library Construction Kit 购自 CLONTECH 公司。包装蛋白 MAXPLAXTM Lambda Packaging Extracts 购自 EPI-CENTRE 公司。其余所用试剂均购自上海生物技术

收稿日期:2005-11-22; 修订日期:2006-05-18.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370035).

作者简介:牛 艳(1981-),女,博士研究生,从事海洋微藻功能基因的克隆和表达研究. E-mail:niuyan@mail.sdu.edu.cn

通讯作者:孔 健. E-mail:kongjian@sdu.edu.cn

工程公司。

1.2 方法

1.2.1 绿色巴夫藻培养 按10%的接种量将指数期的藻种接种到海水液体培养基,放于18℃光照培养箱中,培养5 d。取指数生长中期的微藻培养液2 L,5 000 r/min,4℃离心10 min,收集藻体细胞。

1.2.2 无菌化方法 抗生素逐种加入法:向处于指数生长后期的藻培养液中加入氨苄青霉素钠(1 000 IU/mL),培养3 d。将经过上述处理的微藻以20%的接种量转接于加入硫酸庆大霉素(1 000 IU/mL)的F/2培养基内,培养3 d;以20%的接种量将经过上述两种处理的微藻以20%的接种量转接于加入硫酸阿米卡星(1 000 IU/mL)的F/2培养基内,培养3 d;然后转接于F/2培养基。

1.2.3 无菌化检测 将经无菌化处理的藻液取500 μL分别涂布LB、SST、脲-糖和麸皮培养基,观察是否有杂菌生长

1.2.4 绿色巴夫藻总 RNA 提取 对异硫氰酸胍抽提总 RNA 方法稍作改动^[11]。将离心得到的藻体细胞(约1.5 g)用液氮研磨成粉状,放入预冷的3 mL异硫氰酸胍和2% β-巯基乙醇中,涡旋振荡,加入3 mL 酚氯仿抽提,冰浴15 min,10 000 r/min离心15 min。取上清,加入等体积的异丙醇,-20℃沉淀2 h,10 000 r/min离心15 min,弃上清,加入1 mL 4 mol/L的LiCl洗涤,离心。将沉淀溶于1 mL 异硫氰酸胍和2% β-巯基乙醇中。加入等体积的饱和酚氯仿,抽提1次;上清液加入等体积的氯仿再次抽提。取上清液,加入1/10体积的3 mmol/L NaAc(pH5.2)和2倍体积的无水乙醇,-20℃沉淀2 h,10 000 r/min离心30 min,所得沉淀用70%乙醇洗涤2次,然后干燥,将沉淀溶于DEPC处理过的去离子水中,即得总 RNA。

1.2.5 mRNA 的分离 根据 QIAGEN 公司的 Oligotex™ Purification of poly A⁺ RNA Kit 的操作说明,将提取的总 RNA,通过 poly(T)纤维素柱进行亲和层析,获得 poly A⁺ mRNA。

1.2.6 cDNA 文库的构建 根据 SMART™ cDNA Library Construction Kit 实验指导说明构建 cDNA 文库。取3 μL mRNA(1~1.5 μg)为模板,用 CDS III/3' PCR Primer 和 SMART IV™ Oligonucleotide,逆转录合成单链 cDNA。再用5' PCR Primer 和 CDS III/-3' PCR Primer 通过引物延伸合成双链 cDNA。然后经过蛋白酶 K 消化,Sfi I 酶切,再经 Sepharose CL

-4B 柱洗脱,分离并收集大于500 bp cDNA 片段。该片段与载体 λTriplEx2 的左右臂连接后,使用 MAXPLAX™ Lambda Packaging Extracts Kit 进行体外包装,扩增后,所得噬菌体裂解液分装于0.5 mL 离心管,于-80℃保存,即为构建的绿色巴夫藻的 cDNA 文库。

1.2.7 文库的扩增和质量检测 从 cDNA 文库中取出5 μL 噬菌体裂解液,按照1:10稀释,然后取1 μL与200 μL用10 mmol/L MgSO₄重悬的过夜培养的 *E. coli* XL1-Blue 混合,37℃吸附15 min,与2 mL融化的上层琼脂混匀,倾注在37℃预热的(LB/MgSO₄)平板上,37℃培养6~10 h,根据噬菌斑个数,计算文库滴度。根据 cDNA 文库滴度,取适量噬菌体裂解液加到含有 IPTG(50 μg/mL)和 X-gal(50 μg/mL)的上层琼脂中,37℃培养8~12 h,计数平板上形成的蓝斑和白斑数目,计算噬菌体的重组率。

1.2.8 cDNA 文库插入片段的检测 随机挑取噬菌斑,溶于100 μL 1×λ稀释液(NaCl 0.1 mol/L, MgSO₄ 0.01 mol/L, Tris-HCl pH 7.5 0.035 mol/L, 明胶 0.01%)。取5 μL作为模板,使用 λTripl Ex2 Kit 提供的5'-和3'-端筛选引物进行 PCR 扩增,用1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 片段的大小,即代表 cDNA 文库中插入 DNA 片段的长度。

1.2.9 文库的转化 将经 PCR 检测含有阳性克隆的噬菌体转化 *E. coli* BM25.8,在 Cre 重组酶的作用下,重组噬菌体 DNA 环化成质粒^[12],提取质粒,转化 *E. coli* DH5α,保存转化子。

1.2.10 序列测定 从 *E. coli* DH5α 中提取质粒,以载体5'-端 λTriplEx2 sequencing primer 为测序引物,采用 ABI3700 DNA Sequence DNA 自动测序仪从5'末端测定插入 DNA 基因片段。

1.2.11 序列分析 将测序结果去除载体和引物序列,分别使用 BLASTn 和 BLASTx 搜索 National Center for Biotechnology Information (NCBI)的核苷酸和蛋白质数据库,进行序列的同源性分析。

2 结果

2.1 绿色巴夫藻的无菌化藻种获得

在仅加入青霉素后进行无菌检验, LB、SST、脲-糖培养基上均有杂菌生长。该藻生长状况良好。加入硫酸庆大霉素后, SST、脲-糖培养基上已无杂菌生长, LB 培养基上仍有杂菌生长,但该藻生长出

现抑制,藻液很清。表明庆大霉素对污染绿色巴夫藻的杂菌有很好的除菌效果,但对该藻生长的抑制作用也很大。加入硫酸阿米卡星后再进行无菌化检验,发现 LB、SST、胰-糖培养基上均无杂菌生长。表明藻液中的杂菌已基本排除,在此情况下,取藻液涂布麸皮培养基未发现真菌生长,说明该藻并未受到真菌的污染。此时可将藻液连续转接几次,以消除抗生素对藻生长的抑制作用。

2.2 提取总 RNA 质量的检测及 mRNA 分离

从绿色巴夫藻中提取总 RNA 的质量直接影响到所建文库的优劣,提取的总 RNA 经分光光度计测定, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}} \approx 2.0$, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}} \approx 1.8$, 表

明提取的总 RNA 质量较好,无 DNA、蛋白质及小分子污染,提取的总 RNA 经过非变性琼脂糖凝胶电泳检测,可观察到 28S 和 18S rRNA 电泳条带完整清晰(图 1),说明在总 RNA 提取过程中没有 RNA 降解,可用于 cDNA 文库的构建。

按照 Oligotex™ Purification of poly A⁺ RNA Kit 将提取的总 RNA 经 Oligo(dT) - 纤维素柱层析,分离出 poly(A) mRNA,经非变性琼脂糖凝胶检测,结果见图 1。用 1 μL mRNA 为模板,反转录合成 cDNA 第一条链,经 PCR 扩增后,所得双链 cDNA 呈弥散状,结果见图 2。

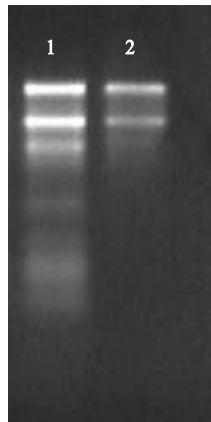


图1 mRNA 非变性琼脂糖电泳
1: 总 RNA; 2: 分离到的 mRNA

Fig. 1 mRNA on nondenaturing agarose gel
1: total RNA; 2: purified mRNA

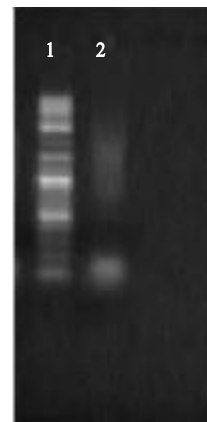


图2 双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳
1: DL-2000 Marker; 2: 双链 cDNA

Fig. 2 cDNA on agarose gel
1: DL-2000 Marker; 2: double cDNA

2.3 cDNA 文库的构建及质量检测

将具有黏性末端的 cDNA 与载体 λTriplEx2 连接,蛋白包装后转化大肠杆菌 *E. coli* XL1 - Blue。在含有 IPTG 和 X - Gal 的平板上统计噬菌斑数,结果表明所建 cDNA 文库滴度为 6×10^6 pfu/mL,经蓝斑和白斑计数,cDNA 文库的重组率达到 98%。

随机挑取白色噬菌斑 30 个,利用 PCR 技术扩增文库,检测插入 DNA 片段的大小。结果表明,插入 DNA 片段在 0.5 ~ 1.0 kb 之间,结果见图 3。

2.4 EST DNA 片段的扩增及序列分析

利用 PCR 技术从 cDNA 文库中随机扩增插入

的 DNA 片段,并对较大片段进行序列测定。所得核酸序列与 NCBI 数据库进行 BLAST 检索,获得了 200 条可用于分析的 EST 序列。经过同源性比对发现,在这 200 条 ESTs 序列中参与蛋白质合成的基因和参与能量代谢(包括光合作用和呼吸作用)的基因含量比较高,分别占 41% 和 20%,通过分析还得到一个 3' 末端完整的脱氢酶序列片断,同源性比较高的序列结果见表 1。

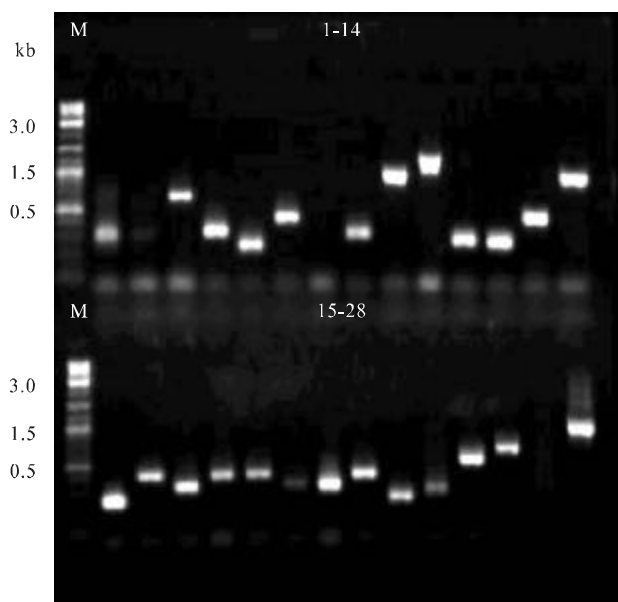


图 3 cDNA 文库插入片段的琼脂糖凝胶电泳

M:2 - log DNA Ladder; 1 ~ 28: PCR 扩增的 cDNA 克隆片段

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis for inserted DNA fragments from the cDNA library

M:2 - log DNA Ladder; 1 - 28: DNA fragments by PCR amplification

表 1 EST 与已知序列的比较结果

Tab. 1 Comparison of ESTs with Genbank

编号 No.	与同源序列 Orthologous sequence	同源性/% Identity
E1	不饱和脂肪酸脱氢酶基因 Fatty acid desaturase	89
E2	ATPase 复合酶 atpI 和 atpH 基因 atpI and atpH genes for subunit of ATPase complex	91
E3	16S 核糖体亚单位 RNA 基因 16S small subunit rRNA gene	98
E4	5.8S 核糖体 RNA 基因 5.8S rRNA gene	94
E5	18S 核糖体 RNA 基因 18S rRNA gene	94
E6	羧肽酶 A Carboxypeptidase A	88
E7	叶绿体光系统 II 12 kD 外在蛋白 Chloroplast photosystem II 12 kD extrinsic protein	75
E8	26S 蛋白酶体 AAA-ATPase 亚单位 RPT5a 26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT5a	76
E9	2 型细胞过氧化物酶 Type 2 peroxidase	51
E10	凝结因子 V Coagulation factor V	31
E11	细胞色素 b Cytochrome b	38
E12	受体表达增强蛋白 Receptor expression enhancing protein 2 variant	40

3 讨论

绿色巴夫藻藻体含有大量多糖成分,对提取 RNA 带来不利影响。本实验在参照提取真核生物总 RNA 方法的基础上进行了改良,即用异丙醇沉淀 RNA 后,使用了 4 mol/L LiCl 洗涤沉淀,以去除 RNA 中的多糖成分,结果得到了纯度较高具有明显 28S 和 18S rRNA 特征的电泳带,证明了在提取过程中没有 RNA 降解。从图 1 中看出,在 18S rRNA 片段的下方还有一条较明显的 rRNA 带,经过反复实验,都没能除去,但没有发现对建立 cDNA 文库带来负面影响,这种现象在其他海洋微藻中是否存在,还需要进一步证明。

采用 SMART 技术构建的 cDNA 文库,从文库滴度、重组率、插入片段大小的检测结果来看,以 99% 的概率得到低丰度基因的克隆为标准,所要求文库的滴度应为 1.7×10^5 pfu/mL,而本研究构建的 cDNA 文库的滴度为 6×10^6 pfu/mL,重组率为 98%,达到构建文库要求,可以用来筛选低丰度的基因克隆。

利用 SMART™ cDNA Library Construction Kit 提供的宿主菌 *E. coli* BM25.8 为双重 λ 溶源菌株,当重组噬菌体的线性 DNA 进入 *E. coli* BM25.8 后,在宿主菌编码的 Cre 重组酶作用下,将线性 λ 噬菌体载体 DNA 环化成质粒形式^[12],在从 *E. coli* BM25.8 中提取质粒 DNA 进行序列测定,但是提取的质粒 DNA 伴有染色体和质粒蛋白复合物的污染,不能直接用来测序。因此,本实验将提取的质粒再次转化到 *E. coli* DH5 α 中,以得到纯度较高的质粒 DNA。

通过对绿色巴夫藻 cDNA 文库的 EST 序列测定及同源性比对,得到了一些有研究价值的基因序列。如,ATP 复合酶亚单位的 *atpA*、*atpI* 和 *atpH* 基因片段,羧肽酶和细胞色素、氧化还原蛋白、凝集因子 V 以及核糖体不同亚基的部分基因序列,还有一些功能尚未确定的核酸序列等,这些基因片段在海洋微藻中尚未见报道,有望成为新的有应用价值的功能基因。近年来,对海洋微藻及其代谢产物进行了大量的应用和开发研究,从分子水平上对其功能基因的研究报道较少^[13-14],微藻中基本的基因操作元件还有待开发,本实验获得的这些基因序列对进一步开发微藻的生物资源提供了很好的参考。目前,植物叶绿体表达外源基因成为研究热点,ATP 酶亚单位的强启动子可以作为叶绿体表达的必要元件,为

植物转基因指出一条新的方向,通过对 *atpA* 等基因片段的继续研究,有望得到其启动子并用于植物转基因的研究。海洋微藻中含有的大量不饱和脂肪酸是在脂肪酸去饱和酶和延伸酶的作用下生成,脂肪酸去饱和反应是个氧化反应,需要 2 个电子和 1 分子氧。蓝藻和叶绿体中,每个去饱和酶都是以铁氧还原蛋白为电子供体,但在植物细胞质中,则以 1 个由细胞色素 b5 和 NADH2 细胞色素 b5 氧化还原酶组成的系统作为电子供体^[15]。本研究获得了 1 个细胞色素 b5 的 cDNA 片段,说明绿色巴夫藻的脂肪酸去饱和酶基因更接近于植物;还获得了一个 3' 末端完整的不饱和脂肪酸脱氢酶基因序列,都为克隆脂肪酸去饱和酶基因打下了基础。

EST 技术被认为是一种从基因文库中快速获得基因信息的有效手段,但是由于基因表达丰度的差异,从文库中获取基因的信息就不同,本实验结果表明,EST 技术更适合于高丰度基因的筛选,对于低丰度基因,需要进行大量的测序工作。

参考文献:

- [1] Pulz U, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(6): 635-648.
- [2] Yim J H, Lee H J. Axenic culture of *Gyrodinium impudicum* strain KG03, a marine red-tide microalga that produces exopolysaccharide[J]. *J Microbiol*, 2004, 42(4): 305-314.
- [3] Barbosa M J, Zijffers J W, Nisworo A, et al. Optimization of biomass, vitamins, and carotenoid yield on light energy in a flat-panel reactor using the A-stat technique[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(2): 233-242.
- [4] 王春波, 蓝孝贞, 苏冬梅, 等. 盐藻 β -胡萝卜素的免疫药理研究 I 对非特异性免疫和体液免疫的影响[J]. *中国海洋药物*, 1997, 16(3): 9-13.
- [5] 王春波, 蓝孝贞, 张鲁平, 等. 盐藻 β -胡萝卜素对实验性动脉粥样硬化预防作用的研究[J]. *中国海洋药物*, 1998, (1): 7-12.
- [6] 刘宇峰, 张成武, 沈海雁, 等. 嗜盐隐杆藻胞外多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. *中国海洋药物*, 1998, (2): 10-13.
- [7] 蒋汉明, 张凤珍, 翟静, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸与人类健康[J]. *预防医学论坛*, 2005, (1): 65-69.
- [8] 沈继红, 林学政, 刘发义, 等. 细胞融合法构建 EPA 和 DHA 高产异养藻株的研究[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(2): 63-67.
- [9] 林学政, 李光友. 11 种微藻脂类和 EPA/DHA 组成的研究[J]. *黄渤海海洋*, 2000, 18(2): 36-40.
- [10] Peiera S L, Leonard A E, Huang Y S, et al. Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega-3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid[J]. *Biochem J*, 2004, 384: 357-366.

- [11] 徐 杰,李明启. 异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取 RNA 时某些操作技术的改进[J]. 植物生理学通讯,1996,32(3):206-208.
- [12] Palazzolo M J, Hamilton B A, Ding D L, et al. Phage lambda cDNA cloning vectors for subtractive hybridization, fusion-protein synthesis and Cre-loxP automatic plasmid subcloning[J]. Gene, 1990,1:25-36.
- [13] 魏 东,张学成. 微藻脂肪酸去饱和酶及其基因表达的生态调控研究新进展[J]. 海洋科学,2000,24(8):42-47.
- [14] Alonso D L, Castillo C I S, Grima E M, et al. First insights into improvement of eicosapentaenoic acid content in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) by induced mutagenesis[J]. J Phycol, 1996,32:339-345.
- [15] Los D A, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases[J]. Biochim Biophys Acta, 1998,1394(1):3-15.

cDNA library construction and EST analysis of *Pavlova viridis*

NIU Yan, KONG Wen-tao, YANG Jing, KONG Jian

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100 China)

Abstract: *Pavlova viridis* is rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which represents an attractive production system for PUFAs such as EPA and DHA, and has been considered to be a useful source for cloning fatty acid desaturase genes. In this study, total RNA was extracted from *Pavlova viridis* cells in the middle of the exponential phase using acid guanidinium thiocyanate. Poly + A RNA was isolated and purified by Oligotex Suspension. The mRNA template was reversely transcriptionized to a single strand cDNA with modified Oligo(dT) primer using SMART (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) technology. Synthesized ds-cDNA was ligated with vector λ Triplex2. The recombinant vectors were packaged *in vitro*. The titer of the unamplified constructed cDNA library was 6×10^6 pfu/mL and recombination rate was 98%. The length of the inserted DNA fragment was between 500 bp and 1.5 kb. All of these suggest that the library can be suitable for screening low abundant mRNA for cDNA clones. The library was subsequently amplified.

The presence of insert was checked by PCR using universal primers and clones containing cDNA longer than 500 bp were selected for sequencing. 200 ESTs were obtained by sequencing from the 5' end of the cDNA clones. Then the ESTs were compared with sequences in the GenBank data of NCBI using Blast. Partial sequence of some functional genes was identified, including *atpI* and *atpH* genes for subunit of ATPase complex, rRNA gene, carboxypeptidase A, cytochrome b, chloroplast photosystem II 12 kD extrinsic protein and so on. The results provide the basis for further study of *Pavlova viridis* gene expression. Further studies on those genes and large scale sequencing of the library may be helpful to elucidate and understand the function of those proteins at molecular level. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6):902-907]

Key words: *Pavlova viridis*; cDNA library; SMART technique; expressed sequence tags; polyunsaturated fatty acid

Corresponding author: KONG Jian. E-mail: kongjian@sdu.edu.cn