

中国明对虾“黄海1号”血细胞和肌肉cDNA文库的构建

李吉涛,李健,陈萍,刘萍,何玉英,王清印

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所,农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室,山东 青岛 266071)

摘要: 采用SMART(Switching mechanism at 5' end of RNA transcript)技术构建了中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血细胞和肌肉组织全长cDNA文库。以中国明对虾“黄海1号”血细胞和肌肉组织为材料, Trizol法提取总RNA,磁珠法纯化mRNA后,用SMART cDNA合成试剂盒合成双链cDNA。双链cDNA经Sfi I酶切和CHROMA SPIN™-400过柱分级分离后,与λ Triplex2载体两臂进行连接,随后进行λ噬菌体体外包装反应,构建血细胞和肌肉全长cDNA文库。肌肉组织原始文库滴度为 0.77×10^6 pfu/mL,血细胞原始文库滴度为 2.36×10^6 pfu/mL; 扩增后,肌肉组织文库滴度为 3.0×10^9 pfu/mL,血细胞文库滴度为 5.6×10^9 pfu/mL,重组率均达到98%以上。从各文库随机取出10个清晰的噬菌斑进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳检测,其插入片段长度为400~2 000 bp,证明2个文库均具有较高的质量。[中国水产科学,2009,16(5): 781-785]

关键词: 中国明对虾; 血细胞; 肌肉; cDNA文库

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0781-05

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)属于甲壳纲,十足目,对虾总科,对虾科,明对虾属,是中国北方沿海特有的虾类,在海水养殖业中占有举足轻重的地位。然而随着养殖面积和养殖密度的不断增大以及生态环境的改变,中国明对虾养殖面临单产降低、品质下降、大面积死亡的现象,造成了严重的经济损失。解决这一问题的关键是培育优质、高产、抗病能力强的优良品种,改善养殖条件,提高养殖效率。中国水产科学研究院黄海水产研究所选育的中国明对虾“黄海1号”具有生长快、抗逆性强的优良特性^[1]。这一新品种的选育成功,为中国对虾养殖业的可持续发展处于困境中的中国对虾养殖的“二次创业”提供了重要的品种保障。

中国明对虾的人工选育工作已取得了一系列研究进展,包括利用RAPD、AFLP和微卫星技术分别对不同地理群体和选育群体不同家系进行遗传多样性

分析^[2-6];为进行数量性状位点(QTL)定位和标记辅助选择,采用RAPD、SSR和AFLP技术进行了中国明对虾遗传图谱的构建^[7-11];利用分子生物学的方法获得与中国明对虾生长性状相关的候选标记^[12-13]。这些研究结果为中国明对虾标记辅助育种提供了理论依据,大大加快了中国明对虾的标记辅助育种进程。而关于决定中国明对虾“黄海1号”优良经济性状的分子机制的研究尚未开展。为了深入探讨中国明对虾“黄海1号”的优良遗传特性,本研究拟构建中国明对虾“黄海1号”的血细胞和肌肉组织cDNA文库,为进一步筛选血液和肌肉特异表达基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用中国明对虾于2008年9月取自下营

收稿日期: 2009-02-25; 修订日期: 2009-05-05.

基金项目: 现代农业产业技术体系建设项目; 公益性农业行业科研专项(200803012).

作者简介: 李吉涛(1978-),男,助理研究员,主要从事对虾遗传育种研究. E-mail: lijt@ysfri.ac.cn

通讯作者: 李健(1961-),男,研究员,主要从事对虾遗传育种研究. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

良种推广基地,活体采取血液和肌肉组织,立即置于液氮中保存,以备提取RNA。

Trizol试剂购自Invitrogen公司,SMART™ cDNA文库构建试剂盒、菌株XL1-Blue和BM 25.8均购自Clontech公司,mRNA纯化试剂盒和包装试剂盒Packagene® Lambda DNA Packaging System购自Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取与mRNA纯化 总RNA提取按照Trizol说明书进行,略加改进。所得总RNA溶于无RNase水中,电泳检测其质量与完整性。采用磁珠法纯化mRNA,具体操作按照Promega公司提供的试剂盒说明书进行,同时进行电泳检测。

1.2.2 cDNA合成

(1) 单链cDNA合成 取高质量的纯化mRNA 3 μL(约50 ng),加入1 μL 10 μmol/L的SMART IV™寡核苷酸和1 μL 10 μmol/L的CDS III /3' PCR引物,总体积5 μL。置于Eppendorf PCR仪中72 ℃ 2 min,立即冰浴2 min后,加入Primescript Rtase反转录酶1 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL和20 mmol/L DTT 1 μL,5×单链缓冲液2 μL,置于PCR仪上42 ℃反应1 h,合成第一链cDNA。

(2) 双链cDNA合成 采用LD-PCR法合成第二链cDNA,总反应体系100 μL: 第一链cDNA 2 μL, 10× Advantage® 2 PCR buffer 10 μL, 5' PCR引物、CDS III /3' PCR引物、50× dNTPs和50× Advantage® 2 Polymerase Mix各2 μL,用ddH₂O补足体积至100 μL混匀离心后,置于PCR仪中。反应程序为:95 ℃预变性1 min;95 ℃ 15 s,68 ℃复性延伸6 min,26个循环。

1.2.3 cDNA的消化、分离和连接 取双链cDNA 50 μL(约2~3 μg),加入2 μL蛋白酶K,45 ℃消化20 min后,加入50 μL ddH₂O,再加入等体积酚/氯仿/异戊醇抽提,乙醇沉淀,风干后溶于79 μL ddH₂O;然后加入10× Sfi I buffer和Sfi I (20 U/μL) 各10 μL,100× BSA 1 μL,50 ℃酶切反应2 h。酶切产物使用CHROMA SPIN™-400柱进行分级分离,收集1~16管,每管1滴。每管取3 μL进行电泳检测,收集符合目的片段大小的前3管,混合后加入乙酸钠、糖原和95%乙醇进

行沉淀,7 μL ddH₂O溶解沉淀。cDNA与λ TriplEx2的体积比分别采用1:0.5、1:1和1:2,于16 ℃过夜进行连接反应。

1.2.4 cDNA的λ噬菌体体外包装 连接产物采用Packagene® Lambda DNA包装系统进行包装反应,22 ℃孵育2 h,然后加入500 μL的SM缓冲液(100 mmol/L NaCl,8 mmol/L MgSO₄,35 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,0.01% 明胶)和20 μL氯仿,混匀后离心去除氯仿,上清液即cDNA文库,储存在4 ℃冰箱。

1.2.5 cDNA文库的测定、扩增及质量鉴定 取上述上清液20 μL,用SM缓冲液做1:10、1:100和1:1 000梯度稀释后,铺平板。每个梯度做3个平行,同时在涂有异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)和5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-gal)的平皿上铺平板,测定文库容量和重组率。

以每板6×10⁴克隆数在150 mm平板上铺板,于37 ℃培养箱培养6~18 h,待噬菌斑生长至将近融合时,加入12 mL SM稀释液置4 ℃冰箱冷藏过夜。50 r/min室温振荡1 h,收集洗脱液,加入10 mL氯仿,振荡2 min,7 000 r/min离心10 min后上清即为扩增的cDNA文库。

cDNA扩增文库分装后加入7%的二甲亚砷(DMSO)即可储存于-80 ℃的超低温冰箱中备用。从原始文库铺的平板上随机挑取10个分界良好的噬菌斑,使其转导入*E. coli* BM 25.8菌株,碱裂解法提取质粒λ TriplEx2,通过PCR和酶切鉴定重组子的大小。

2 结果与分析

2.1 总RNA提取和mRNA纯化

从电泳结果可以看出,18S、28S rRNA条带清晰,说明所提取的总RNA较完整(图1)。分光光度计检测,血细胞总RNA样品的OD₂₆₀/OD₂₈₀为1.82,肌肉总RNA样品的OD₂₆₀/OD₂₈₀为1.85,说明总RNA纯度较高,高纯度mRNA是获得高质量cDNA文库的关键。将分离纯化的mRNA经琼脂糖电泳检测,可见呈smear现象(图2),纯度和大小符合理论值,可以用于构建高质量cDNA文库。

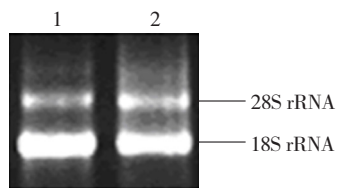


图1 中国明对虾血细胞和肌肉总RNA电泳图
1: 血细胞总RNA; 2: 肌肉总RNA

Fig. 1 Total RNA isolated from hemocytes and muscle of *Fenneropenaeus chinensis*

1: total RNA from hemocyte; 2: total RNA from muscle

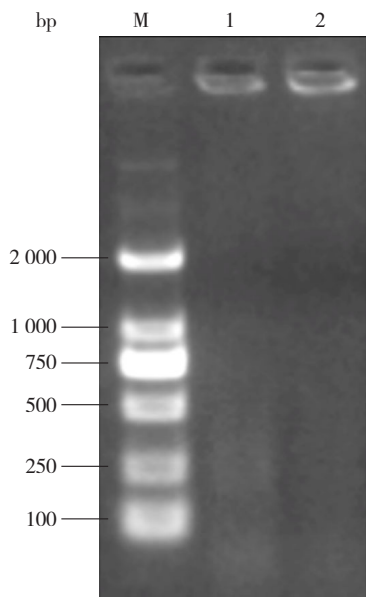


图2 中国明对虾血细胞和肌肉mRNA电泳图
M: DL 2 000 分子量标准; 1: 血细胞mRNA; 2: 肌肉mRNA

Fig. 2 mRNA from hemocytes and muscle of *Fenneropenaeus chinensis*

M: DL 2 000 marker; 1: mRNA from hemocyte; 2: mRNA from muscle

2.2 cDNA的合成和分离

采用SMART技术,用50 ng 血细胞或肌肉 mRNA 反转录成单链 cDNA,通过 LD-PCR 扩增获得双链 cDNA,取 5 μL PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,分子量均匀分布于 0.1 ~ 10 kb 范围内(图3),满足 cDNA 文库的构建要求。

cDNA 片段用 CHROMA SPIN™-400 分离柱分级分离,取 3 μL 分离产物进行电泳,发现 cDNA 片段从第 5 管后出现,收集第 5 ~ 8 管即可确保 cDNA 片段大于 400 bp,可以用于构建 cDNA 文库。

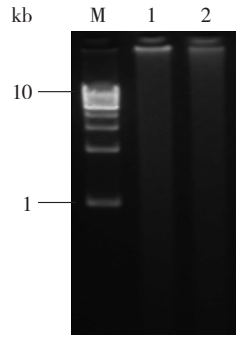


图3 中国明对虾血细胞和肌肉双链 cDNA 电泳图

M: 1 kb 分子量标准; 1: 血细胞双链 cDNA; 2: 肌肉双链 cDNA

Fig. 3 Synthesis of double-strand cDNA from hemocytes and muscle of *Fenneropenaeus chinensis*

M: 1 kb marker; 1,2: double-strand cDNA from hemocytes and muscle

2.3 cDNA文库的构建与鉴定

将收集的 cDNA 片段与 λTriplEx2 载体重组,体外包装和文库贮存按 Promega 公司的 Packagene® Lambda DNA 包装系统说明书进行。发现 cDNA 和载体的物质的量比在 1 : 1 时能产生有效的重组体。包装后血细胞 cDNA 文库滴度为 2.36×10^6 pfu/mL,肌肉文库滴度为 0.77×10^6 pfu/mL;文库扩增后,血细胞文库滴度为 5.6×10^9 pfu/mL,肌肉文库滴度为 3.0×10^9 pfu/mL,经 IPTG 诱导检测,重组率均达到 98 % 以上。从各原始文库随机取出 10 个清晰的噬菌斑进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测,其插入片段长度为 400 ~ 2 000 bp (图4、5)。证明两文库质量较好。

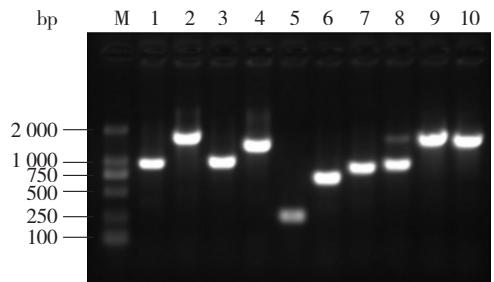


图4 中国明对虾血细胞 cDNA 文库噬菌斑的 PCR 扩增产物电泳图

M: DL 2 000 分子量标准; 1-10 代表来自原始文库的 10 个克隆的 PCR 产物.

Fig. 4 Identification of cDNA library from hemocytes of *Fenneropenaeus chinensis*

M: DL 2 000 marker; 1-10: PCR products of 10 clones from primary cDNA library

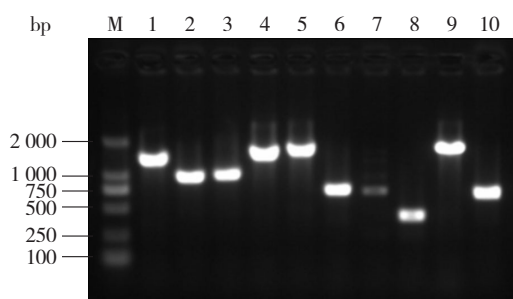


图5 中国明对虾肌肉cDNA文库噬菌斑的PCR
扩增产物电泳图

M: DL 2 000 分子量标准; 1-10 代表来自原始文库的10个克隆
的PCR产物

Fig. 5 Identification of cDNA library from muscle
of *Fenneropenaeus chinensis*

M: DL 2 000 marker; 1-10: PCR products of 10 clones from
primary cDNA library

3 讨论

构建cDNA文库并从中筛选目的基因是一种十分有效的寻找新基因的手段,因为cDNA文库是众多cDNA序列的集合,直接编码氨基酸,因此包含了大量基因资源和信息,这使得基因的寻找更容易、快捷,并且使功能新基因的克隆更有效。评价一个cDNA文库主要考虑3个因素:①要有足够的克隆数,能够包含目的序列,特别是低丰度mRNA;②小片段cDNA(<500 bp)插入的克隆数较少;③由近于全长的mRNA拷贝cDNA插入组成,以便能获得全长基因。SMART技术为获得全长cDNA提供了技术保障。本研究采用SMART技术成功构建了中国明对虾“黄海1号”血细胞和肌肉cDNA文库,原始文库滴度分别为 2.36×10^6 pfu/mL、 0.77×10^6 pfu/mL,重组率达到98%以上;扩增后文库的滴度分别达 5.6×10^9 pfu/mL、 3.0×10^9 pfu/mL,大大超过了cDNA文库构建的基本要求。cDNA文库的插入片段长度分布于400~2 000 bp,说明两文库的质量较高,为进一步筛选、克隆新基因提供了重要资源。目前,作者已成功从肌肉文库中克隆了肌钙蛋白I基因cDNA全长,已被GenBank收录(登录号FJ609301)。

随着对虾育种工作的深入,与对虾经济性状相

关的重要基因的筛选、克隆与功能分析已经成为研究热点之一。cDNA文库是当前发现新基因和研究基因功能的基本工具,因此构建对虾特定组织的cDNA文库,可以从中筛选和克隆与对虾各项生理活动相关的功能基因,为进一步进行基因功能验证以及应用奠定基础。关于中国明对虾cDNA文库的构建工作已有一些报道,李太武等^[14]用中国明对虾成虾头胸部(去头胸甲及胸部附肢)作为实验材料,构建了cDNA文库,并获得了一定数量的克隆。张晓军等^[15]构建了中国明对虾6种组织(血液、眼柄、卵巢、雌虾头胸部、雄虾头胸部和三倍体对虾头胸部组织)的cDNA文库。王维新等^[16]构建了中国明对虾鳃细胞全长cDNA文库。本研究以人工选育的中国明对虾“黄海1号”为材料,构建了血细胞和肌肉的全长cDNA文库,为有效保存种质资源和后续功能基因的开发奠定了重要基础。

参考文献:

- [1] 李健,刘萍,何玉英,等. 中国对虾快速生长新品种“黄海1号”的人工选育[J]. 水产学报,2005,29(1): 1-5.
- [2] 孟宪红,马春燕,刘萍,等. 黄渤海中国对虾6个地理群的遗传结构及其遗传分化[J]. 高技术通讯,2004,4: 97-102.
- [3] 何玉英,刘萍,李健,等. 中国对虾人工选育群体第一代和第六代遗传结构分析[J]. 中国水产科学,2004,11(6): 572-575.
- [4] 张天时,刘萍,李健,等. 用微卫星DNA技术对中国对虾人工选育群体遗传多样性的研究[J]. 水产学报,2005,29(1): 6-12.
- [5] Liu P, Meng X H, Kong J, et al. Polymorphic analysis of microsatellite DNA in wild populations of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J]. Aquacult Res,2006,37(6): 556-562.
- [6] 岳志芹,王伟继,孔杰,等. 用AFLP方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异[J]. 水产学报,2005,29(1): 13-19.
- [7] 孙昭宁,刘萍,李健,等. RAPD和SSR两种标记构建的中国对虾遗传连锁图谱[J]. 动物学研究,2006,27(3): 317-324.
- [8] 王伟继,孔杰,董世瑞,等. 中国明对虾AFLP分子标记遗传连锁图谱的构建[J]. 动物学报,2006,52(3): 575-584.
- [9] 岳志芹,王伟继,孔杰,等. AFLP分子标记构建中国对虾遗传连锁图谱的初步研究[J]. 高技术通讯,2004,5: 88-93.
- [10] Li Z X, Li J, Wang Q Y, et al. AFLP-based genetic linkage map of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Aquaculture,2006,261:

- 463–472.
- [11] 李健,刘萍,王清印,等. 中国对虾遗传连锁图谱的构建[J]. 水产学报,2008,32(2): 161–173.
- [12] 刘萍,何玉英,孙昭宁,等. 中国对虾生长性状相关遗传标记的筛选与克隆[J]. 海洋水产研究,2007,28(2): 1–6.
- [13] 何玉英,刘萍,李健,等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)与生长性状相关SCAR标记的筛选[J]. 海洋与湖沼,2007,38(1): 42–48.
- [14] 李太武,相建海,刘瑞玉. 中国对虾cDNA文库的构建[J]. 动物学报,1998,44(2): 237–238.
- [15] 张晓军,王兵,张绍萍,等. 中国对虾6种组织cDNA文库的构建[J]. 海洋学报,2005,27(5): 92–95.
- [16] 王维新,史成银,黄捷. 中国明对虾鳃细胞全长cDNA文库的构建[J]. 2004,25(5): 6–11.

Construction of cDNA libraries from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No. 1”

LI Ji-tao, LI Jian, CHEN Ping, LIU Ping, HE Yu-ying, WANG Qing-yin

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: cDNA libraries provide useful resources for functional genomic research. In order to discover and understand the molecular mechanism of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.1”. Two cDNA libraries from hemacyte and muscle were constructed using the technique of switching mechanism at 5' end of RNA transcript (SMART). Total RNA were extracted and mRNA were separated and purified. After digested with restriction enzyme *Sfi* I and fractionated with CHROMA SPINTM-400 columns, cDNA fragments longer than 400 bp were collected and ligated into the *Sfi* I -digested λ TriplEx2TM vector. The ligation mixture was packaged into lambda capsids using the Packagene[®] Lambda DNA Packaging extract (Promega) to generate full-length hemacyte and muscle libraries of *Fenneropenaeus chinensis*. The titers of un-amplified libraries were 0.77×10^6 pfu/mL for the muscle library and 2.36×10^6 pfu/mL for the hemacyte library, and the titers of amplified libraries were 3.0×10^9 pfu/mL for the muscle library and 5.6×10^9 pfu/mL for the hemacyte library. In order to detect quality of these libraries, inserted fragments were amplified with sequencing primers. The sizes of the inserted fragments ranged from 400 bp to 2 000 bp. Quality of these cDNA libraries is good enough for further cloning of hemacyte and muscle specific expression genes in hemacyte and muscle. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(5): 781–785]

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; hemacyte; muscle; cDNA library

Corresponding author: LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn