

# 草菇 cDNA 削减文库的构建

李迅<sup>1</sup>, 邵蔚蓝<sup>1, 2</sup>

( 1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 214036 江苏 无锡 )  
( 2. 南京师范大学生命科学学院 210097 江苏 南京 )

[ 摘要 ] 介绍一种改进的利用差异杂交和定向插入构建全长 cDNA 削减文库的方法. 分别以诱导和非诱导条件培养草菇菌丝, 两者都提取总 RNA 并采用 PolyAtract mRNA Isolation System III 试剂盒快速提取 mRNA, 由 PowerScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase 将诱导菌丝提取的 mRNA 进一步逆转录成 cDNA 第一链, 用得到的 cDNA 第一链和非诱导菌丝提取的 mRNA 进行杂交, 将未杂交上的 cDNA 第一链洗脱浓缩后, 用 SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction 试剂盒构建草菇 cDNA 削减文库. 经检测, 原始文库滴度为  $2.5 \times 10^5$  pfu/mL, 重组率为 93%, 插入 cDNA 大小在 0.5 ~ 4.0 kb 之间, 文库扩增后, 文库滴度为  $1.1 \times 10^9$  pfu/mL, 并从中克隆到了若干植物纤维降解酶. 结果表明其简化了实验步骤, 而且更有利于富集所需全长基因, 是构建 cDNA 文库的一种有效改进.

[ 关键词 ] 滴度, 重组率, 差异杂交, PCR

[ 中图分类号 ] Q522, [ 文献标识码 ] A, [ 文章编号 ] 1001-4616( 2005 )04-0073-04

## Construction of cDNA Subtractive Library of *Volvariella Volvacea*

Li Xun<sup>1</sup>, Shao Weilan<sup>1, 2</sup>

( 1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology Under Ministry of Education, Southern Yangtze University, 214036, Wuxi, China )  
( 2. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China )

**Abstract** A modified method for cDNA subtractive library construction was introduced. We prepared the mycelia of *V. volvacea* under inducing conditions and no inducing conditions. Two kinds of mRNA of *V. volvacea* were extracted with PolyAtract mRNA Isolation System III Kit. The inducing mRNA was reverse-transcribed into single-strand cDNA with PowerScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase. Hybridization between the single-strand cDNA and no inducing mRNA was performed. After high stringency washing and purification and concentration, the cDNA subtractive library was constructed with SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Kit. The result revealed that the titer of cDNA subtractive library was  $2.5 \times 10^5$  pfu/mL, that the amplified cDNA subtractive library was  $1.1 \times 10^9$  pfu/mL, that the recombinant rate reached to 93%, and that the length of inserts ranged from 0.5 kb to 4.0 kb. The results showed that this new method had an efficient improvement in constructing full-length cDNA subtractive library which simplified the experimental procedures and enriched more candidate genes.

**Key words** titer, recombinant rate, subtractive hybridization, PCR

## 0 引言

草菇, 又名麻菇、杆菇等, 属真菌门, 盛产于我国南方, 具极高的营养价值, 是世界上第五大重要的经济栽培品种<sup>[1, 2]</sup>. 草菇以植物废弃物为生长基质, 拥有完整的植物纤维降解酶系, 包括纤维素酶系和半纤维素酶系. 草菇不合成有害物质, 具有高度的安全性, 对动植物无致病作用, 并能减少植物废弃物造成的环境污染. 草菇耐高温、抗污染、生物转化速度快, 可进行大规模固态培养, 有利于发展农村经济, 因此草菇具有很高的研究价值. 若能将草菇构建成为基因高效表达体系, 意义将更大, 可以使草菇利用植物纤维生产重要

收稿日期: 2005-02-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目( 30370034 ).

作者简介: 李迅, 女, 1975—, 博士研究生, 主要从事分子生物学的学习与研究. E-mail: xunlee@163.com

通讯联系人: 邵蔚蓝, 女, 1958—, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物学的教学与研究. E-mail: wslshao@jssmail.com.cn

万方数据

的生物活性蛋白包括医用蛋白、单细胞蛋白和酶等,创造高经济效益.有报道草菇的基因文库已构建<sup>[3,4]</sup>,但是没有有关 cDNA 文库构建的报道.

生物在不同的诱导条件下,产生的活性物质种类和数量都不同,其基因具有差异性的表达,本文利用诱导条件下产生的富含植物纤维降解酶系的 cDNA 与非诱导条件下产生的 mRNA 杂交,利用基因相减的方法构建一个 cDNA 削减文库,这个文库富集了植物纤维降解酶系的基因,同时减少了常规生长所需的基因.在进行差异杂交时,一般采用羟基磷灰石柱层析的方法和磁珠分离技术<sup>[5,6]</sup>,这些技术都存在操作复杂及不稳定等缺点,本文介绍了一种利用常规杂交方法实现基因的削减,同时采用 SMART 技术实现构建全长 cDNA 削减文库.

# 1 材料与方法

## 1.1 菌株和培养

草菇 V<sub>1-1</sub> 由南京师范大学何强泰先生馈赠,将草菇接种于诱导和非诱导平板上,40℃ 培养 4 d,用铲子刮取菌丝,分别投入液氮中备用.

草菇诱导培养基:0.2% CMC;0.2% xylan;0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;0.1% MgSO<sub>4</sub>;2.5 mg/L VB<sub>1</sub>;1.5% 琼脂粉,pH 7.5.草菇非诱导培养基:0.2% 葡萄糖;0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;0.1% MgSO<sub>4</sub>;2.5 mg/L VB<sub>1</sub>;1.5% 琼脂粉,pH 7.5.

## 1.2 主要试剂

试剂盒 SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit 和 Power Script<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase 购自 Clontech 公司;试剂盒 PolyATtract mRNA Isolation System III 和 Packagene Lambda DNA Packaging System 购自 Promega 公司;Probest 酶、DNA 连接酶、pMD18-T 载体、DNA Marker 和各种限制性酶购自 Takara 生物技术公司;IPTG(异丙基-β-D-半乳糖苷)、X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)购自博彩生物公司;燕麦木聚糖(xylan from oat spelt)为 Sigma 公司产品;Hybond-N+ 尼龙膜购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;纯化试剂盒 QIAquick PCR Purification Kit、质粒抽提 QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,其它试剂为国产分析纯.

1×Lambda 稀释缓冲:0.1 mol/L NaCl;10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O;35 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5);0.01% Gelatin.

其它溶液的配方参考相关文献<sup>[7]</sup>.

## 1.3 草菇总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

总 RNA 的提取采用通过改进的异硫氰酸胍强变性剂法<sup>[8]</sup>,mRNA 的纯化采用 PolyAtract mRNA Isolation System III,提取的总 RNA 和 mRNA 通过测定 A<sub>260</sub> 与 A<sub>280</sub> 值及进行 1% 变性琼脂糖凝胶电泳来确定其纯度及浓度.

## 1.4 差异杂交

### (1) 非诱导菌丝抽提的 mRNA 的变性

3~5 μg mRNA 加入 5.5 μL 乙醛,15 μL 甲酰胺和 MOPS 缓冲液,在 65℃ 保温 15 min 使其变性,放至冰上速冷,然后将 mRNA 变性样小心加至 Hybond-N+ 尼龙膜上,每次 5 μL,避免枪头接触膜,使膜风干,80℃ 烘烤 2 h,固定膜.

### (2) 经诱导的菌丝的 cDNA 第一链的合成

按 SMART<sup>TM</sup> cDNA 文库构建试剂盒说明书完成,取 0.5 μg mRNA 为模板,以 SMART IV 寡核苷酸和 CDS III/3' PCR 引物,PowerScript 逆转录酶逆转录成 cDNA 第一链.

### (3) 差异杂交

将固定有 mRNA 的尼龙膜用 100 μL 预杂交液在 42℃ 预杂交 3 h,吸出预杂交液,加入 100 μL 杂交液和 10 μL cDNA 第一链和封闭剂,将合成的 cDNA 第一链与固定于膜上的 mRNA 在 50℃ 杂交大于 6 h,用 0.1×SSC 0.1% SDS 在 68℃ 严紧型洗脱,收集洗脱液,经纯化试剂盒纯化和乙醇沉淀浓缩,使我们所需的酶的基因片段得到富集.

## 1.5 削减 cDNA 文库的构建

### (1) LD-PCR

以杂交洗脱后回收的 cDNA 片段为模板,扩增双链 cDNA,扩增完毕后,取 5  $\mu\text{L}$  进行酸凝胶电泳,与试剂盒中的对照对比,确定其大致的量。试剂盒中的对照取 1  $\mu\text{L}$ ,其他试剂都减半,扩增 15 个循环。双链 cDNA 以 *Sfi* I 限制性内切酶酶切,然后经 CHROMA SUN-400 柱分级分离,收集符合大小( $>0.5\text{ kb}$ )要求的 cDNA 片段。将经 *Sfi* I 酶切后的双链 cDNA 按一定比例与 TriplEx2(经 *Sfi* I 酶切)载体连接。

### (2) DNA 与 $\lambda$ 噬菌体载体连接、体外包装、感染和文库滴度的测定

将酶切后的双链 cDNA 按一定比例与  $\lambda$ TriplEx2(经 *Sfi* I 酶切)载体在 16 $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。用噬菌体包装试剂盒包装连接产物成为噬菌体颗粒(按照 Packagene Lambda DNA Packaging System 试剂盒说明书操作)。用 1  $\times$  Lambda 稀释缓冲液进行梯度稀释包装液后,取 1  $\mu\text{L}$  噬菌体包装液与 200  $\mu\text{L}$  XL1-Blue 重悬液混合,37 $^{\circ}\text{C}$  保温 10~15 min,加 2 mL 现配的预热至 45 $^{\circ}\text{C}$  的融解的 LB/MgSO<sub>4</sub> 顶层琼脂,迅速混合后,倒入预热至 37 $^{\circ}\text{C}$  的 LB/MgSO<sub>4</sub> 平板中铺平板,37 $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 6~18 h。计数噬菌斑,得出噬菌体 cDNA 文库的滴度(pfu/mL),同时进行蓝白筛选以检测文库的重组率。

削减文库滴度(pfu/mL) = (噬菌斑数  $\times$  稀释倍数  $\times 10^3\text{ }\mu\text{L/mL}$ ) /  $C_{\text{涂布平板的稀释噬菌体液的}\mu\text{L数}}$

### (3) cDNA 削减 $\lambda$ 噬菌体文库的扩增及扩增文库滴度的确定

将三个连接包装物混合,约有 1500  $\mu\text{L}$  ( $3.75 \times 10^5$  pfu) 进行文库扩增,同样按照文库滴度的测定方法进行扩增文库滴度的测定,梯度稀释至  $10^{-5}$ ,涂布 10  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。第二天计算噬菌斑数,得出噬菌体 cDNA 文库的滴度。从扩增文库中随机挑取 12 个阳性噬菌体斑克隆,用试剂盒中通用引物 5'PCR 和 3'PCR 引物做 PCR 来扩增插入片段,反应产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,鉴定 cDNA 片段的插入大小。

### (4) 全长 cDNA 文库的检验

由于网上已有若干草菇纤维素酶和半纤维素酶基因序列已知,所以直接设计引物,以得到的 cDNA 削减  $\lambda$  噬菌体文库液为模板,进行 PCR 电泳检测并将 PCR 产物从胶回收纯化后,与 TA 载体 pMD18-T 连接,电转化大肠杆菌 JM109,涂布蓝白平板,倒置 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。挑取白色菌落,培养后抽提质粒,酶切验证有大小正确的插入子后,进行 DNA 测序。

## 2 结果

### 2.1 草菇总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

以改进抽提方法对非诱导培养和诱导培养的草菇菌丝进行 RNA 抽提, $A_{260}/A_{280}$  分别为 2.034 和 2.035,浓度分别为 57.36  $\mu\text{g/mL}$  和 48.68  $\mu\text{g/mL}$ ,各取 10  $\mu\text{L}$  用变性琼脂糖凝胶来检验 RNA 的完整性,条带亮度比例大约为 1.5~2.5:1(见图 1)。根据所得的结果显示,这样获得的 RNA 样品纯度高,完整性好,满足下一步的 mRNA 的提取需要。各取 1 mg 总 RNA 抽提草菇菌丝的 mRNA, $A_{260}/A_{280}$  分别为 1.222 和 2.035,浓度分别为 9.48  $\mu\text{g/mL}$  和 29.44  $\mu\text{g/mL}$ ,基本也满足后继的 cDNA 合成实验的需要。

### 2.2 差异杂交

非诱导培养草菇菌丝所提 mRNA 取约 3  $\mu\text{g}$ ,进行变性和固定,而诱导培养草菇菌丝所提 mRNA 取 1  $\mu\text{g}$  进行 cDNA 第一链合成,取一半 cDNA 第一链样品与固定的 mRNA 杂交,将杂交液和洗脱液纯化,得到约 0.4  $\mu\text{g}$ 。

### 2.3 草菇 cDNA 文库的构建

取纯化液 20  $\mu\text{L}$  (约 0.08  $\mu\text{g}$ ) 作模板,45 个循环,进行 LD-PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,合成的双链 cDNA 片段大小在 0.3~6.0 kb 之间(图 2)。经测定原始文库滴度为  $2.5 \times 10^5$  pfu/mL,重组率为 93%。原始文库经扩增后,测定文库滴度为  $1.1 \times 10^9$  pfu/mL。随机挑取 12 个克隆经 PCR 鉴定 cDNA 插入片段大小,插入 cDNA 大小在 0.5~4.0 kb 之间(图 3)。

### 2.4 全长 cDNA 文库的检验

通过 PCR 扩增,得到全长的葡聚糖酶、葡萄糖苷酶和木聚糖酶基因序列,采用序列分析软件 DAN-万方数据

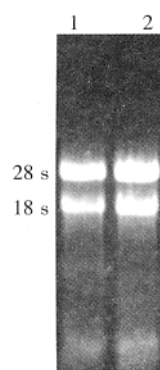


图 1 改进法抽提的 RNA 的电泳图

MAN、BLAST 与 NCBI 的数据库中已知基因进行同源性比较、分析。结果显示,和公布的序列比对,发现葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶与公布序列同源性分别达到 99.5% 和 99.8%,差异基本上是由于菌株不同造成的,得到的序列阅读框(ORF)完整。

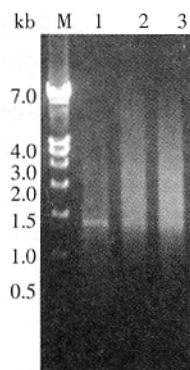


图 2 草菇双链 cDNA 1% 琼脂糖凝胶电泳

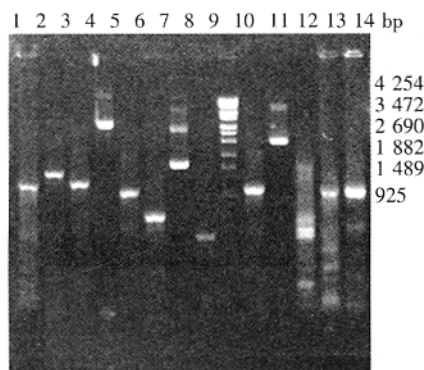


图 3 随机克隆 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

### 3 讨论

cDNA 文库的质量主要反映在文库的代表性和重组 cDNA 片段的序列完整性两个方面。文库的代表性可用库容量来衡量。本研究采用差异杂交和 SMART 技术成功构建的草菇 cDNA 削减文库,原始文库含有  $2.5 \times 10^5$  pfu/mL 个重组克隆,重组率达到 93% 以上,文库扩增后滴度达到  $1.1 \times 10^9$  pfu/mL,约为一般文库库容的 25%,达到了缩小文库库容的基本要求。随机挑取 12 个克隆,用 PCR 鉴定 cDNA 插入片段大小在 0.5 ~ 4.0 kb 之间,因此文库的代表性满足文库筛选的要求。

重组 cDNA 片段的完整性是反映 cDNA 文库质量的另一重要因素。本研究采用 SMART(Switting Mechanism at 5' end of RNA Transcript)技术,经 LD-PCR(long-distance PCR)合成双链 cDNA。其主要优点在于:首先,提高了 cDNA 文库中所含全长 cDNA 的比例;其次,由于 LD-PCR 在合成 cDNA 中体现出来的优越性,只需极少量的 mRNA(25 ng)或总 RNA(50 ng)就能构建 cDNA 文库;第三,合成的双链 cDNA 经 *Sfi* I(A 和 IB)酶切,连接到  $\lambda$ Triplex2 载体的左右臂,从而实现 cDNA 的简便、快速的定向克隆。同时在文库中克隆到完整的草菇纤维素酶和半纤维素酶基因,进一步验证了文库的序列完整性,也证实了文库具有完备的诱导酶系基因。总之,这是一种改进的利用差异杂交和定向插入构建全长 cDNA 削减文库的方法,有利于富集所需基因,可以减少大量的筛选工作,是构建 cDNA 文库的一种有效改进。

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Cai Y J, Buswell J A, Chang S T. Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea* [ J ]. Mycol Res, 1994, 98( 6 ): 1019—1024.
- [ 2 ] Cai Y J, Chapman S J, Buswell J A, et al. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and  $\beta$ -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom[ J ]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65( 2 ): 553—559.
- [ 3 ] Jia J, Dyer P S, Buswell J A, et al. Cloning of the cbhI and cbhII genes involved in cellulose utilization by the straw mushroom *Volvariella volvacea*[ J ]. Mol Gen Genet, 1999, 261( 6 ): 985—993.
- [ 4 ] 李南羿,姚占芳,陈明杰. 草菇噬菌体基因文库的构建[ J ]. 食用菌学报, 2001, 8( 2 ): 15—18.
- [ 5 ] Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, et al. Normalization and subtraction of cap-trapper selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes[ J ]. Genome Res, 2000, 10( 10 ): 1617—1630.
- [ 6 ] 孟祥文,李璞. 构建消减文库的方法与策略[ J ]. 国外医学遗传学分册, 1994, 17( 3 ): 131—134.
- [ 7 ] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆:实验指南[ M ]. 3 版. 北京:科学出版社, 2002.
- [ 8 ] 李迅,裴建军,邵蔚蓝. 担子菌草菇总 RNA 的快速抽提方法[ J ]. 微生物学通报, 2004, 31( 4 ): 81—84.

[ 责任编辑:孙德泉 ]