

葱蝇非滞育蛹的全长 cDNA 文库构建*

黎万顺,陈斌,冯国忠,李廷景

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所 重庆高校生物活性物质工程研究中心
重庆高校动物生物学重点实验室,重庆 400047)

摘要 葱蝇具有兼性滞育的特性且与果蝇近缘,是昆虫滞育分子机理和冬滞育和夏滞育专化基因比较研究的理想模式种,本研究目的在于构建葱蝇非滞育蛹的全长 cDNA 文库,为进一步的滞育专化基因筛选、克隆和表达分析奠定基础。利用 RNAiso 试剂提取葱蝇非滞育蛹的总 RNA,采用 SMART 技术合成全长 cDNA,将限制性内切酶 Sfi I 消化后的 cDNA 克隆到质粒载体 pDNR-LIB,转化入大肠杆菌(DH10B),获得原始文库。经过涂平板测定表明,原始文库的库容量为 2.3×10^7 个单克隆,随机挑取 15 个单克隆,通过 PCR 快速鉴定,插入片段大小在 0.4~1.2 kb 之间,平均大小在 0.9 kb,重组率达 100%。这些结果表明本研究所构建文库的代表性和重组片段的序列完整性达到了用于目的基因的分选筛选和克隆表达的建库要求。

关键词 葱蝇;非滞育蛹;全长 cDNA 文库;SMART 技术

中图分类号:Q966

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2010)01-0021-05

滞育(Diapause)是存在于昆虫中一种普遍的生理现象,是昆虫长期适应不良自然环境而获得的一种生存本领。昆虫进入滞育,是昆虫从环境中接受信号刺激到体内激素调节直至滞育调节的一系列的复杂生理过程,在自然情况下滞育的解除要求一定的时间和一定的条件。昆虫的滞育主要受光周期和温度的影响^[1]。短日照和低温诱导昆虫进入冬滞育,长日照和高温诱导昆虫进入夏滞育。滞育可以发生在昆虫生命过程中的任何一个阶段,根据滞育所发生的虫态,可将其分为 4 种类型:卵滞育、幼虫滞育、蛹滞育和成虫滞育^[2]。

葱蝇(*Delia antiqua*)是分布在北半球一种严重的地下害虫,主要危害百合科蔬菜,它广泛分布于亚洲、欧洲等地。葱蝇属蛹滞育,具有冬滞育和夏滞育的特性。目前利用人工饲料该害虫已经在实验室大量饲养而且蛹能够长期储存^[3,4]。在系统发育上,葱蝇与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)近缘^[5,6]。因此,葱蝇是研究昆虫兼性滞育很好的实验材料,可以作为昆虫兼性滞育研究的模式种^[7]。

构建全长 cDNA 文库是研究功能基因组学的基

本手段之一。cDNA 文库便于克隆和大量表达,直接筛选到所需的目的基因,并用于该目的基因的表达。另外,全长 cDNA 文库构建有助于鉴定基因组序列中外显子和内含子的边界,分析基因编码区以及基因转录和翻译的水平。利用 cDNA 文库可对昆虫进行比较基因组学的研究,也可研究昆虫体内重要代谢酶的组成,例如 Chen 等^[8]和 Yoshiga 等^[9]的研究。而对于葱蝇滞育基因的研究,目前相关报道不多。因此,本研究尝试应用 SMART 技术,构建了葱蝇非滞育蛹的全长 cDNA 文库,为葱蝇滞育基因的克隆以及功能的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

葱蝇由本实验室饲养。成虫饲养条件为:温度(23 ± 1)℃,相对湿度 50%~70%,全天光照处理时间与黑暗处理时间之比为时间 16:8。非滞育幼虫和蛹的饲养条件为:温度(20 ± 0.5)℃,相对湿度 50%~70%,全天光照处理时间与黑暗处理时间之比为时间 16:8。分别取化蛹后不同时间的蛹放入

* 收稿日期 2009-08-22

资助项目 国家自然科学基金(No. 30870340);重庆市自然科学基金(No. CSTC2008BB1365);重庆市自然科学基金重点项目(No. CSTC2008BA5030)

作者简介 黎万顺,男,硕士研究生,研究方向为昆虫生化与分子生物学,通讯作者 陈斌, E-mail: c_bin@hotmail.com

液氮中保存(图1)。



图1 葱蝇非滞育蛹的发育历期和取样点

Fig.1 Developmental durations, non-diapause inductions and sampling point of onion maggot

RNA 抽提 RNAiso 试剂盒购自大连宝生物公司。Creator SMART cDNA Library Construction Kit 文库构建试剂盒购自美国 Clontech 公司,感受态细胞(大肠杆菌 DH10B)购自美国 Invitrogen 公司,苯酚/氯仿/异戊醇、氯仿/异戊醇购自 Sigma 公司,其它生化试剂购自国内生物公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 从液氮罐中取出准备好的采自上述 8 个时间点的样品,在液氮中研磨至粉末状后,加 RNAiso 试剂覆盖,待融化后取出。然后按 RNAiso 试剂盒操作说明提取总 RNA,提取完成后,测定总 RNA 的含量及纯度。

1.2.2 单链和双链 cDNA 的合成 在实验前按下述方法进行第二链合成 PCR(LD-PCR)最佳循环数的探索。单链的合成:按照试剂盒操作要求,在 1 μg 葱蝇非滞育蛹总 RNA 中,加入 SMRTART IV Oligonucleotide 和 CDSIII/3' PCR 引物各 1 μL ,然后用无 RNase 水补到 5 μL 。放入 PCR 仪中 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 min 后,取出放置于冰上 2 min,再向反应液中加入 5 \times 第一链反应缓冲液 2 μL 及 DTT、dNTP 混合液和 MMLV Reverse Transcriptase 各 1 μL 后,于 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,最后置于冰浴中终止反应。双链 cDNA 的合成:取 3 个 PCR 管,按照试剂盒操作说明书分别加入反应试剂和 2 μL 第一链反应产物,反应条件为:首先把 PCR 仪预热到 95 $^{\circ}\text{C}$,在此温度下预变性 1 min;其次在 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s 和 68 $^{\circ}\text{C}$ 、6 min 两种环境下分别循环 15、18 和 20 次。反应结束后分别取 5 μL 合成产物在 1.1% 的 TAE 琼脂糖凝胶上检测。确定最佳循环数并合成文库构建 cDNA。

1.2.3 蛋白酶 K 消化 取 50 μL 双链 cDNA,加入 2 μL 蛋白酶 K,混匀,在 PCR 仪中 45 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。按说明书进行苯酚/氯仿/异戊醇、氯仿/异戊醇各抽提 1 次,乙醇沉淀;用 80% 乙醇洗涤沉淀,晾干后,溶于 79 μL 去离子水中。

1.2.4 Sfi I 酶切和 cDNA 片段分级分离 按照试剂盒操作说明,在反应管中加入 Sfi I 酶切试剂和纯化的 cDNA,在 PCR 仪中 50 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 2 h,然后加入 2 μL 1% 二甲苯胺染料,混匀,然后用试剂盒提供的分离柱分级分离,共收集 16 管,经电泳检测后,收集符合的样品进行沉淀。

1.2.5 双链 cDNA 与载体连接和转化 在 T4 DNA 连接酶作用下,双链 cDNA 与质粒载体 pDNR-LIB(经 Sfi I 酶处理过)的连接反应采用 3 个连接,体积比分别为 1:0.5、1:1 和 1:2,于 16 $^{\circ}\text{C}$ 下连接 16 h。连接产物经电击转化入 25 μL 感受态细胞(大肠杆菌 DH10B),电击转化条件为 0.1 cm 电击杯 1.8 kV 4.8 ms。转化后,加 LB 培养基 970 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 225 r/min 震荡培养 1 h 后,即获得 1 mL 原始文库菌液。

1.2.6 原始文库质量鉴定 取 2 μL 原始文库菌液,稀释 20 倍后,取 1 μL 加入 100 μL 培养基中混匀,均匀地涂在含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 平板上,设 1 个重复。经过夜培养后,随机挑取 15 个克隆,进行菌液 PCR 反应,PCR 引物为试剂盒提供 M13 引物。反应首先在 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 条件下进行;然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 和 68 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min 交替进行,共 30 个循环;最后在 68 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min。用 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测,计算平均插入片段的大小及文库滴度。有关计算公式为:文库滴度 = 长出菌落个数 \times 稀释倍数 $\times 10^3$ / 稀释的菌体铺板体积,其中文库滴度单位为个单克隆/mL,稀释的菌体铺板体积单位为 μL ;文库总库容量 = 文库滴度 \times 总体积数,其中文库总库容量单位为个菌单克隆,总体积数单位为 mL。

1.2.7 原始文库的扩增 文库的扩增采用涂平板培养扩增。按试剂盒操作说明书取适量原始文库稀释菌液均匀地涂在含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 平板上(150 mm),每个平板约 30 000 个克隆,37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 18~20 h,用含有 25% 甘油的 LB 培养基洗脱所有的菌落,每板 5 mL,将每板的洗液混合摇匀即得到了扩增文库,分装,放置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2 结果分析

2.1 总 RNA 提取

用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。从电泳的结果(图 2,其中 M 为 1 kb 的 DNA marker,1 为样品 RNA)看,用 RNAiso 试剂抽提的总 RNA 中,18S、28S rRNA 条带清晰,比例恰当,取适量总 RNA 样品,用紫外分光光度计测定样品纯度,其中 OD260/OD280 值为 2.13,OD260/OD230 为 2.41,说

明总 RNA 的纯度达到了建库要求。

2.2 双链 cDNA 的合成及分级

本研究对 LD-PCR 的条件摸索表明,1 μg 总 RNA 起始第一链的合成,LD-PCR 时,18 个循环最佳。取 5 μL PCR 产物进行 1.1% 凝胶琼脂糖电泳分析,结果如图 3 所示(其中 M 为 1 kb 的 DNA marker,1 为样品 cDNA)。PCR 产物的电泳条带呈弥散状条带,片段分布在 0.1~4 kb 之间,亮带清晰、条带正常而且产物的量足够,符合建库要求。此产物用经 Sfi I 完全酶切后过柱分级分离,根据 1.1% 脂糖凝胶电泳检测结果合并片段大小合适的 8~10 收集管中的样品,然后经乙醇沉淀,重悬于 7 μL 去离子水中(图 4,其中 M 为 1 kb DNA marker,1~17 分别为 1~17 管 cDNA 片段)。

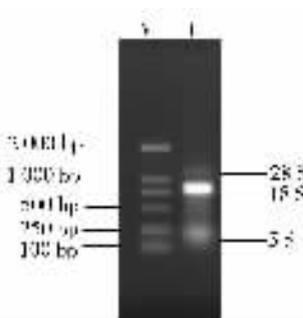


图 2 样品总 RNA 凝胶电泳图

Fig.2 The agarose electroporesis of total RNA extracted from sampling

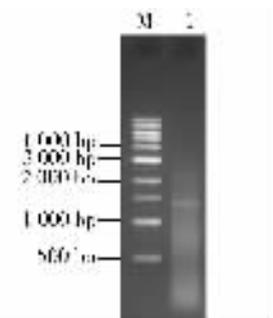


图 3 LD-PCR 产物凝胶电泳图

Fig.3 The agarose electroporesis of LD-PCR products

2.3 cDNA 克隆入载体 pDNR-LIB、转化及其文库质量的检测

根据试剂盒说明书要求,将 cDNA 和克隆载体 pDNR-LIB 用 3 种不同的比例连接后,对 3 种不同比例的连接检测结果表明,当 cDNA 和克隆载体 pDN-

R-LIB 的比例为 0.5:1 时,产生重组体效率最高,将此连接作为原始文库,即原始文库滴度为 2.3×10^7 个单克隆/mL,对此文库进行扩增并长期保存。对此文库稀释涂平板,随机挑取 15 个克隆,经 PCR 扩增,结果显示每个克隆均有插入片段,表明 cDNA 与克隆载体的重组率达到 100%,且 cDNA 插入片段大小在 0.4~1.2 kb 之间,平均大小在 900 bp 左右(图 5,其中 M1 为 1 kb DNA marker,M2 为 100 bp ladder,1~15 分别为从文库随机选取的克隆)。以上数据表明,本实验构建了一个高质量的葱蝇夏滞育蛹文库,此文库能够用于以后目的基因的筛选。

3 讨论

3.1 RNA 对文库质量的影响

要成功构建全长 cDNA 文库,首要问题是分离得到高质量的 RNA。本实验所提取的 RNA,在琼脂糖凝胶电泳上表现为 28S、18S、5S 共 3 条清晰条带。真核生物总 RNA 电泳一般具有着 3 条带,而且 28S 条带比 18S 条带亮,而本实验提取的总 RNA 电泳结果正好相反,即 18S 条带的亮度高于 28S 条带的亮度,这一结果与甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* (Hübner)),霜天蛾 (*Psilogramma menephorum*),美洲大蠊 (*Periplaneta americana*)以及蚊虫等一些医学昆虫中提取 RNA 的结果是一致的^[10-12]。另外,昆虫近缘的节肢动物及软体动物也有类似现象,比如中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)和九孔鲍 (*Haliotisdiversicolor supertexta*)都发现 18S RNA 比 28S RNA 条带亮^[13-14]。这种现象的产生是由于在 rRNA 大亚基的内部存在缺口现象,核糖体大亚基合成完成后,在特定位点产生缺口,使大亚基呈现大小两个片段,其中大片段与 18S 小亚基的大小相近,因而电泳时 18S 条带的亮度大于 28S 条带的亮度^[15]。本实验的结果表明提取葱蝇非滞育蛹的 RNA 质量较高,适合全长 cDNA 文库的构建。

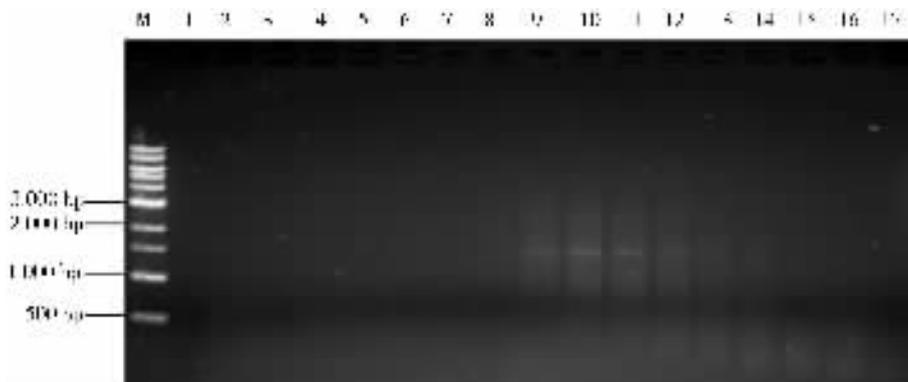


图 4 cDNA 片段分级分离的琼脂糖凝胶检测结果

Fig.4 Electrophoretic analysis of ds-cDNA after size fractionation

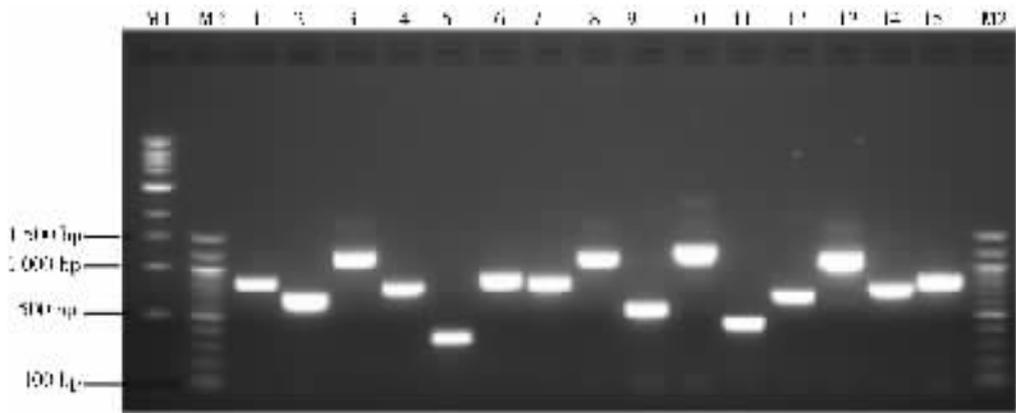


图 5 从文库中随机挑选 15 个克隆 PCR 结果电泳图

Fig. 5 The PCR production of cDNA clones randomly picked from cDNA library

3.2 全长 cDNA 对文库的影响

获得全长 cDNA 是文库构建的另一个关键。本研究采用 Clontech 的 SMART 方法。该方法设计巧妙,提高了整个实验过程中的效率,且 LD-PCR 合成双链 cDNA,保证了 cDNA 序列的完整性。王淑红^[14]等在对副溶血弧菌感染的九孔鲍血细胞均一化全长 cDNA 文库中大量测序的研究中也证实了这一点。本次试验还对 LD-PCR 循环圈数进行了摸索,合适的扩增不但能提高文库滴度(例如本研究构建的 cDNA 文库滴度就比较高),还能防止过渡扩增所带来的非特异性扩增的增多,从而保证了文库的真实性。

3.3 文库质量的判断

cDNA 文库的质量具体反映在两个方面^[16]:一是文库的代表性,可用一个量化的指标来衡量,即文库的库容量。本实验所构建的原始 cDNA 文库具有 2.3×10^7 个单克隆,包含了葱蝇冬滞育蛹中低丰度的 mRNA。二是重组 cDNA 片段的大小。本研究所构建的文库插入片段基本都在 0.5 kb 以上,平均长度约为 0.9 kb,保障了高比例全长 cDNA 的获得,是一个高质量的文库,适合于目的基因的筛选。

本研究除构建了葱蝇非滞育蛹 cDNA 文库外,同时还构建了葱蝇夏滞育蛹和冬滞育蛹的 cDNA 文库。利用文库进行消减杂交(非滞育蛹与冬滞育蛹,非滞育蛹与夏滞育蛹),并从构建的文库中克隆全长基因,这为进一步研究其功能,深入理解滞育的分子机理奠定了基础。

致谢:感谢大连宝生物公司对实验的大力支持和帮助。

参考文献:

[1] Denlinger D L. Regulation of diapause[J]. Ann Rev Ento-

mol 2002 47 93-122.

- [2] 徐卫华. 昆虫滞育的研究进展[J]. 昆虫学报, 1999, 42(1): 100-107.
- [3] Ishikawa Y, Mochizuki A, Ikeshoji T, et al. Platura (Diptera: anthomyiidae) on an artificial diet with antibiotics[J]. Appl Entomol Zool, 1983, 18: 62-69.
- [4] 陈斌, 黎万顺, 冯国忠, 等. 葱蝇的实验室饲养, 生物学特性及滞育诱导[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2010, 待出版.
- [5] Ishikawa Y, Tsukada Y, et al. Effect of temperature and photoperiod on the larval development and diapause induction in the onion fly, *Hylemya antiqua* meigen (Diptera: anthomyiidae) [J]. Appl Entomol Zool, 1987, 22: 610-617.
- [6] Ishikawa Y, Yamashita T, Nomura M, et al. Characteristics of summer diapause in the onion maggot, *Delia antiqua* (Diptera: anthomyiidae) [J]. Insect Physiol 2000, 46: 161-167.
- [7] Chen B, Ishikawa Y, Kayukawa T, et al. DaTrypsin, a novel clip-domain serine proteinase gene upregulated during winter and summer diapauses of the onion maggot, *Delia antiqua* [J]. Gene 2000, 5347: 115-123.
- [8] Chen W H, Ge X M, Wang W W, et al. A gene catalogue for post-diapause development of an anhydrobiotic arthropod *Artemia franciscana* [J]. BMC Genomics 2009, 10: 52.
- [9] Yoshiga T, Okano K, Mita K, et al. cDNA cloning of acyl-CoA desaturase homologs in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Gene 2000, 246(1/2): 339-345.
- [10] 张霞, 李国勋, 郭巍. 甜菜夜蛾肠粘蛋白 cDNA 基因的分子克隆与序列分析[J]. 中国农业科学 2008, 42(11): 3898-3904.
- [11] 孙秀珍, 刘昀. 霜天蛾 cDNA 表达文库的构建和初步鉴定[J]. 西安交通大学学报 2005, 26(3): 244-246, 279.
- [12] 刘志刚, 黄炯烈, 朱振宇, 等. 美洲大蠊若虫 cDNA 表达文库的构建及初步鉴定[J]. 中华微生物和免疫学杂志 2001, 21: 4-6.
- [13] 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) : 92-102.

- [14] 王淑红, 邹志华, 张子平, 等. 副溶血弧菌感染的九孔鲍血细胞均一化全长 cDNA 文库的构建[J]. 台湾海峡, 2008, 8(3) : 278-285.

- [15] Cox R A. Structure and function of prokaryotic and eukar-

yotic ribosomes[J]. Prog Biophys Mol Biol, 1977, 32 : 193-211.

- [16] Schuler G D. Pieces of the puzzle : expressed sequence tags and the catalog of human genes[J]. J Mol Med, 1997, 75 : 694-698.

Construction of Full-length cDNA Library of Non-diapause Pupae of the Onion Maggot , *Delia antiqua*

LI Wan-shun , CHEN Bin , FENG Guo-zhong , LI Ting-jing

(Institute of Entomology and Molecular Biology , Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances , Chongqing Key Laboratory of Animal Biology , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 , China)

Abstract : The onion maggot , *Delia antiqua* , has the characteristics of summer- and winter-diapause and is close to *Drosophila melanogaster* in phlogenetics. It is an ideal model species for the studies of the molecular mechanism of insect diapause and the comparison with winter- and summer-diapause-specific genes. The study aims at constructing full-length cDNA library of summer-diapause pupae of the onion maggot *Delia antiqua* , in order to provide a base for further screening , cloning and expression analysis of diapause-specific genes. In this study , total RNA is extracted from non-diapause pupae of onion maggot *D. antiqua* using RNAsiso. Double-stranded cDNAs are synthesized with SMART technique and digested by Sfi I and then the cDNAs are ligated with the vector pDNR-LIB. The ligation mixture is transformed into *E. coli* DH10B by eletroporation. According to the evaluation of quality , the capacity of primary library is 2.3×10^7 cfu/mL. The results from random picking 15 clones show that the inserted fragments ranging from 0.4 to 1.2 kb by PCR amplification , with an average size of 0.9 kb , and the recombination rate is 100 % . These results show that a full-length cDNA library with high quality on *Delia antiqua* non-diapause pupae is well constructed. This indicates that the library is of high quality for cloning target genes and expressing target proteins.

Key words : *Delia antiqua* ; winter-diapause pupae ; full-length cDNA library ; SMART technique

(责任编辑 方 兴)