

文章编号: 1004 - 7271(2005)04 - 0353 - 06

## 尼罗罗非鱼肝 cDNA 文库的构建

何学军, 李思发

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

**摘要:**用 Stratagene 技术构建了吉富品系尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, GIFT strain) 肝 cDNA 文库。首先用 TRIZOL 法提取肝总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度检测, 表明总 RNA 纯度高且完整性良好。然后分离纯化 mRNA, 合成双链 cDNA 之后, 加 EcoR I 接头、EcoR I 末端磷酸化、Xho I 消化, 并用葡聚糖凝胶柱层析分级收集 cDNA 样品, 得到 300 mg cDNA, 符合建库要求。双链 cDNA 与 Uni-ZAP XR Vector 连接后, 用 Gigapack III Gold Packaging Extract 进行体外包装得到 cDNA 文库。测得的文库滴度为  $1.25 \times 10^7$  pfu/mL, 文库噬菌体的滴度符合文库保存和筛选实验的要求。随机挑选 20 个阳性单克隆噬菌斑进行 PCR 鉴定后, 得出文库的重组率达 100%, 扩增出的片段主要集中在 0.5~2 kb 之间, 平均插入片段长度约为 1.05 kb, 结果说明本实验所构建的 cDNA 文库质量较高。取扩增文库 80  $\mu$ L 进行体外切割, 约含  $3.6 \times 10^6$  个重组子, 切割后 phagemid 量为  $2.0 \times 10^6$ , 切割效率为 79.4%。经抽提质粒获得质粒 DNA 约 1.2 mg。

**关键词:** 尼罗罗非鱼; 肝; cDNA 文库

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Construction of cDNA library from liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*

HE Xue-jun, LI Si-fa

(Key laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Hepatic cDNA library of GIFT strain Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, was constructed by Stratagene cDNA library construction kits. First, total RNA of liver was extracted by TRIZOL reagent and determined by agarose electrophoresis and UV meter. The results showed that the purity and integrity of total RNA were both good and then mRNA was isolated with a column of oligo (dT) cellulose. Second, single-strand cDNA and double-strand cDNA were synthesized from 5' mRNA using Stratagene ZAP Express cDNA Synthesis Kit, then ligating to EcoR 1 adapters, phosphorylating the EcoR 1 Ends, digesting with Xho1, size fractionating with Sepharose CL-2B gel filtration medium. Sample fractions were collected and 300 ng cDNA was obtained sufficiently to construct the library. Finally ds cDNA was ligated into Uni-ZAP XR vector and packaged into phage by Gigapack III Gold Packaging Extract. The titer of the obtained hepatic cDNA library of Nile tilapia was  $1.25 \times 10^7$  pfu/mL which

收稿日期: 2005-05-15

基金项目: 国家“十五”科技攻关子项目——尼罗罗非鱼选育(2001BA505B0513)

作者简介: 何学军(1978-), 男, 湖北孝感人, 博士研究生, 专业方向为水产动物种苗工程。Tel: 021-65710062, E-mail: hxjragon@sohu.com

com

通讯作者: 李思发(1938-), 男, 江苏镇江人, 上海水产大学首席教授, 博士生导师, 从事水产动物种质资源研究。Tel: 021-65710333, E-mail: sfl@shfu.edu.cn, Lsf 038@mail.online.sh.cn

agreed to the preservation and screening of the library. 20 positive clones were randomly selected to carry out polymerase chain reaction and the percentage of recombinant of the library was 100%. The amplified segments were between 0.5 and 2 kb and averaged at 1.05 kb. It is indicated that the quality of the cDNA library constructed in the present study was high 80  $\mu$ L amplified cDNA library was taken to excision in vitro and contained about  $3.6 \times 10^6$  recombinants. The quantity of phagemid after excision was  $2.0 \times 10^6$  and the efficiency of excision is 79.4%. About 1.2 mg plasmid DNA was obtained after plasmid extraction. The hepatic cDNA library provides basis of EST sequencing and cloning of metabolic enzymes and some growth factors, and then gives the insights into nutritional effects on enzyme gene expressions of the subsequent researches.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*; liver; cDNA library

cDNA 文库的构建是真核分子生物学研究的基本手段之一,目前已经广泛用于研究不同发育阶段基因表达的变化,某特定发育期基因表达的情况,克隆新细胞因子,分离组织特异性基因等方面。近几年来,在水生生物领域已陆续建立了斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides* Hamilton) 卵巢<sup>[1]</sup>、斜带石斑鱼白细胞<sup>[2]</sup>、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 卵巢<sup>[3]</sup>、银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 和彩鲫 (*Carassius auratus color variety*) 卵母细胞<sup>[4]</sup>、日本鬼鲉 (*Inimicus japonicus*) 毒腺<sup>[5]</sup>、赤鲴 (*Dasyatis akajei*) 尾刺<sup>[6]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 外周白细胞<sup>[7]</sup>、文昌鱼 (*Branchiostoma belchen*) 头部<sup>[8]</sup>、日本七鳃鳗 (*Lampetra japonica*) 唾液腺<sup>[9]</sup>、金钱鱼 (*Scatophagus argus*) 毒腺<sup>[10]</sup>、大鲵 (*Andrias davidianus*) 肝<sup>[11]</sup>、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 鳃<sup>[12]</sup>、中国对虾 (*Penaeus chinensis*)<sup>[13]</sup>、日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 精巢和卵巢<sup>[14]</sup>、等不同组织的 cDNA 文库,并通过测序获得了大量有研究和开发价值的新基因,但尚未见尼罗罗非鱼肝 cDNA 文库构建的报道。本研究以吉富品系尼罗罗非鱼选育 F<sub>8</sub> 幼鱼肝为出发材料,用 Stratagene 技术构建全长 cDNA 文库,为下一步 EST 序列分析及代谢关键酶基因的克隆、表达研究打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验用鱼为吉富品系尼罗罗非鱼选育 F<sub>8</sub>, 饲养于上海水产大学水产动物种质试验站温室循环养殖系统中,每日用大江牌浮性饲料(蛋白质含量为 36%)投喂 3 次,投饵率为 3%~4%,水温为(22±2)℃,水流速度约 2 L/min,溶解氧大于 5 mg/L,自然光照。实验鱼体重 200 g。活鱼运至实验室后在玻璃水族箱中暂养 24 h,水温 24℃连续充气。总 RNA 抽提试剂 TRIZOL 为 Invitrogen 公司生产,mRNA 纯化用 QIAGEN 公司 Oligotex mRNA Spin-Column Kit 试剂盒,cDNA 文库构建用 Stratagene 公司的 ZAP-cDNA Synthesis kit 试剂盒和 Uni-ZAP XR 载体。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 肝总 RNA 提取及质量检测

用 MS 222(1:12 500, g/mL)将鱼麻醉,敲击头部致死,迅速解剖取肝脏,用 DEPC 水冲洗去血,取 2 g 左右,剪成 200 mg 左右小块,分别在加有约 100  $\mu$ L TRIZOL 的 1.5 mL Eppendorf 离心管中研碎,再加入 900  $\mu$ L TRIzol,按照试剂盒说明书操作。沉淀用 DEPC 水溶解保存。取适量总 RNA 样品,用 DEPC 处理过的水稀释后,用 752 型紫外分光光度计分别测定样品在 260 nm 和 280 nm 波长的吸光度值。同时取 2  $\mu$ L 样品用变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。RNA 样品浓度按以下公式计算:[RNA] = OD<sub>260</sub> × D × 40 ng/mL,公式中 D 为稀释倍数。RNA 的纯度则根据 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值确定。

#### 1.2.2 mRNA 的分离与纯化

按照 QIAGEN 公司 Oligotex mRNA Spin-Column Kit 试剂盒的步骤进行 mRNA 的分离纯化。经过 Oligo (dT)纤维素柱纯化后,得到 mRNA。用琼脂糖凝胶电泳检测所分离、纯化的 mRNA。并测定样品 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub>,计算 mRNA 的量,准备建库。

### 1.2.3 cDNA 合成

参照 ZAP-cDNA Synthesis kit (Stratagene 公司, Cat. No. 200400) 使用手册逆转录合成 ss cDNA 和 ds cDNA。合成的 ss cDNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.4 cDNA 的修饰与分级纯化

按 ZAP-cDNA Synthesis kit 使用手册的步骤补平 cDNA 缺口。随后按步骤抽提双链 cDNA, 加 *EcoRI* 接头、*EcoRI* 末端磷酸化、*XhoI* 消化, 用 Sepharose CL-2B 凝胶柱层析, 除去已消化的接头碎片和小片段的 cDNA 分子, 收集片段大小合适的 cDNA 样品。

### 1.2.5 cDNA 加工定量

用酚/氯仿法抽提纯化所收集的组分中 cDNA。另配一含 EB 的琼脂糖凝胶, 倒在一 90 mm 平皿上, 凝固后将溶解的 cDNA 样品取 0.5  $\mu\text{L}$  滴在平板上, 同时滴不同浓度的对照 DNA (25 ng/ $\mu\text{L}$ , 50 ng/ $\mu\text{L}$ , 75 ng/ $\mu\text{L}$ , 100 ng/ $\mu\text{L}$ ), 以确定 cDNA 浓度。

### 1.2.6 cDNA 与 Uni-ZAP XR 载体的连接与包装

向含 cDNA 样品的管中加入 0.55  $\mu\text{L}$  10 $\times$  ligase buffer、0.55  $\mu\text{L}$  10 mM rATP (pH 7.5)、1  $\mu\text{L}$  Uni-ZAP XR 载体、0.5  $\mu\text{L}$  T4 ligase, 反应体系 5.5  $\mu\text{L}$  反应置 12  $^{\circ}\text{C}$  水浴, 过夜; 然后转至 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 再放置过夜。然后从 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出 1 份 Gigapack III Gold 包装抽提物, 与 2  $\mu\text{L}$  cDNA 连接产物混合后, 在 22  $^{\circ}\text{C}$  包装 100 min, 加入 500 MI SM buffer 和 20  $\mu\text{L}$  氯仿, 混匀后快速离心 30 s, 将上清液移至新管, 置 -4  $^{\circ}\text{C}$  保存。取 1  $\mu\text{L}$  噬菌体, 用 SM buffer 按 1:10 和 1:100 做梯度稀释将各稀释度的噬菌体 (包括原液) 各取 1  $\mu\text{L}$ , 加入到 200  $\mu\text{L}$  新制备的 XL1-Blue MR' 细胞中 ( $\text{OD}_{660} = 0.65$ ), 轻轻混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 25 min。然后将其铺在 LB 固体平板上, 倒置平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。对平板上的噬菌斑记数, 计算滴度 (噬菌斑数/噬菌体 (mL))。

### 1.2.7 cDNA 文库的鉴定与扩增

从平板上挑选 20 个白斑, 准备作 PRC 检测, 先加下列试剂: 1  $\mu\text{L}$  10 $\times$  buffer、0.5  $\mu\text{L}$  dNTP、0.5  $\mu\text{L}$  引物 T<sub>3</sub>、0.5  $\mu\text{L}$  引物 T<sub>7</sub>、7.9  $\mu\text{L}$  重蒸水、0.1  $\mu\text{L}$  Taq 酶。然后用枪尖分别挑取白色克隆, 在 PCR 反应液中轻轻搅匀。进行 PCR 反应, 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 接着 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 57  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。取 4  $\mu\text{L}$  扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 于 Syngene 凝胶成像系统中照相、分析。

### 1.2.8 文库的体外大量切割

利用 ExAssist Helper phage 对 cDNA 文库重组噬菌体进行体外切割, 将切割后形成的 phagemid 转染 *E. coli* XL0LR 菌扩增, 形成 pAD-GAL4-2.1 质粒文库, 具体操作按说明书进行。碱变性法抽提质粒 DNA。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 质量鉴定和 mRNA 的分离

经 1% 琼脂糖电泳鉴定, 可看到清晰的 28S、18S 和 5S 条带 (图 1), 28S 条带明显亮于 18S 条带, 比例大约为 2:1, 表明总 RNA 的完整性良好。总 RNA 的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  为 1.95, 表明所提 RNA 纯度高。分离纯化的 mRNA 产量为 28.4  $\mu\text{g}$ , 得率为 2.14%。纯化后所得的 mRNA 取 2  $\mu\text{g}$  反转录第一链, 经 1% 琼脂糖电泳测得, cDNA 条带主要集中在 2 kb 及以上 (图 2), 分布良好, 且无降解现象。

### 2.2 凝胶柱层析纯化 cDNA

将双末端粘性化的双链 ds cDNA 经过凝胶柱层析, 各大小片段分子在 Sepharose CL-2B 凝胶中所受阻力不同, 因此, 分离出不同大小片段 cDNA 共 17 管, 而染料指示剂分子量最小, 最后流出。经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (图 3), 5~9 管为所分离出的 cDNA 片段, 片段大小依次减小, 11~17 管都为引物等小片段, 丢弃不取。先将 4~7 管收集做进一步的载体连接反应, 其中第 4 管收集的目的在于避免少量的大片段丢失, 第 8 管以后片段太小丢弃不用。



图1 尼罗罗非鱼肝总 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig.1 Electrophoresis of total RNA isolated from the liver of Nile tilapia fingerling

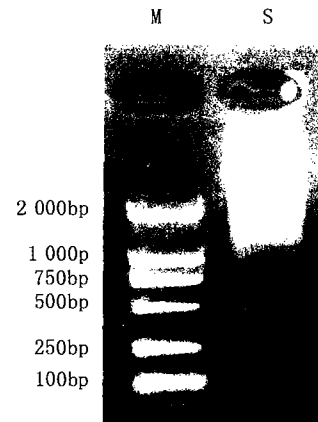


图2 mRNA 逆转录第一链 cDNA 电泳图  
Fig.2 Electrophoresis of first strand cDNA reverse translated from isolated mRNA  
M: DL2000 marker; S: sscDNA

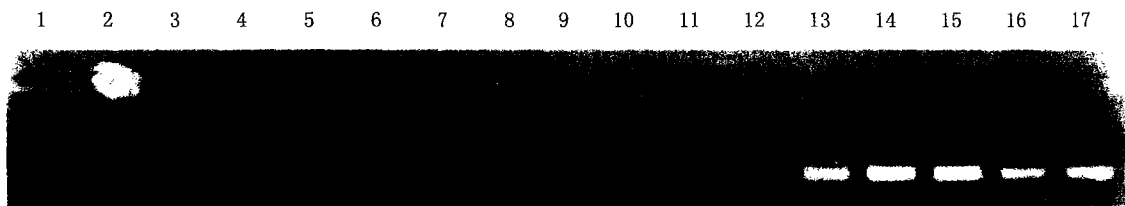


图3 Sepharose CL-2B 凝胶层析分离 cDNA 电泳图  
Fig.3 Electrophoresis of cDNA size fractionated by Sepharose CL-2B

### 2.3 cDNA 样品沉淀纯化后的浓度测定

经 FR-200 紫外可见分析装置观察, 样品 cDNA 浓度都在对照  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$  左右(图 4)。若以  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$  计算, 共得到 cDNA 大约  $300 \text{ ng}$ , 因此样品 cDNA 的量完全符合建库的要求。

### 2.4 cDNA 文库的构建及鉴定

cDNA 和 ZAP Vector 连接后, 需要经过包装蛋白的包装后才具有感染和扩增繁殖的能力。双链 cDNA 与 Uni-ZPA XR Vector 连接包装后, 测得的文库滴度为  $1.25 \times 10^7 \text{ pfu}/\text{mL}$ , 文库噬菌体的滴度符合文库保存和筛选实验的要求。随机挑选 cDNA 文库的阳性单克隆噬菌斑进行 PCR 鉴定后, 得出文库的重组率达 100%, 扩增出的片段主要集中在  $0.5 \sim 2 \text{ kb}$  之间, 经凝胶成像用分析系统分析, 平均插入片段长度约为  $1.05 \text{ kb}$ (图 5)。重组子插入片段的大小是评价文库质量重要标准, 结果说明本实验所构建的 cDNA 文库质量较高。

### 2.5 噬菌体文库的体外大量切割

取扩增文库  $80 \mu\text{L}$  进行体外切割, 约含  $3.6 \times 10^6$  个重组子, 切割后 phagemid 量为  $2.0 \times 10^6$ , 切割效率为 79.4%。经抽提质粒获得质粒 DNA 约  $1.2 \text{ mg}$ 。

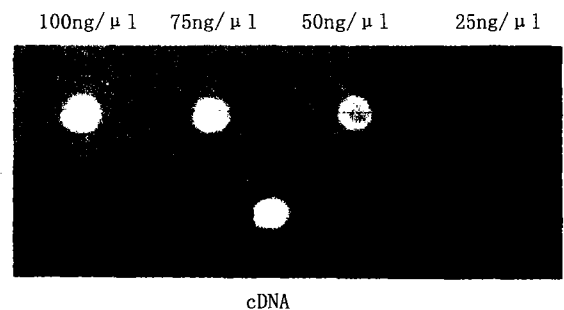


图4 cDNA 纯化后的浓度检测结果  
Fig.4 Quantitating the cDNA concentration by spot test after being purified

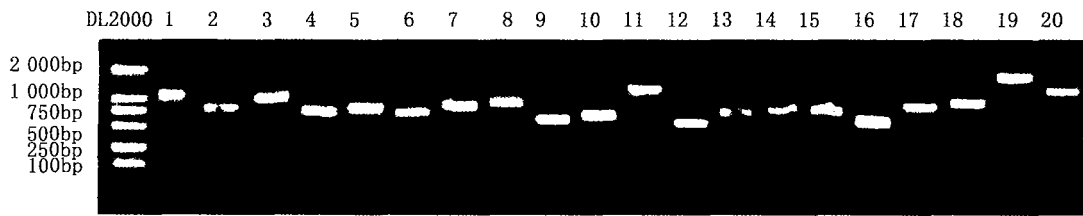


图 5 从文库中随机挑选 20 个克隆检测 cDNA 插入片段的 PCR 产物电泳结果

Fig.5 PCR analysis of the size of cDNA inserts and the percentage of vectors with inserts  
DL2000: 分子量标准; 1~20: 分别为随机挑选原始文库的不同单个噬菌斑 PCR 扩增结果

### 3 讨论

cDNA 文库的构建质量即序列信息的完整性,根本上取决于 mRNA 的完整程度。真核生物来源的 mRNA 的完整性一般以 28S 和 18S rRNA 来衡量,本研究提取的尼罗罗非鱼肝总 RNA,其 28S 和 18S rRNA 的亮度比接近于 2:1,并清晰可见,可用于构建文库。RNA 合成的 ds cDNA 分布范围在 0.5~10 kb 且主要集中在 2 kb 以上,这与其它鱼类和哺乳类动物 PolyA<sup>+</sup> RNA 的分布规律是一致的,但范围高于非哺乳动物如植物、昆虫、酵母等。其 PolyA<sup>+</sup> RNA 分布在 0.5~3 kb。评价一个文库是否有实用价值主要在于文库的含量和插入片段的大小两个方面。所构建的文库中必须有足够多的克隆数,这样才能确保基因组 cDNA 中的每一个序列至少有一个拷贝存在于重组文库中,为达到这一要求,文库的容量应不小于  $1.7 \times 10^5/\text{mL}$ <sup>[15]</sup>,同时为保证 cDNA 片段的完整性,插入片的平均大小应不小于 1 kb。我们所构建的 cDNA 文库容量为  $1.25 \times 10^7/\text{mL}$ ,插入片平均大小为 1.05 kb,符合构建文库的要求。结果与大多已报道的 cDNA 文库<sup>[1,2,7,9,11,14]</sup>结果相似,但也有少数报道插入片段在 500 bp 左右<sup>[12]</sup>,这可能与研究种类、组织、不同 mRNA 的丰度以及文库构建方法等因素有关。

构建 cDNA 文库,首先要根据目的选择合适的材料。譬如构建石斑鱼卵巢 cDNA 文库,对于研究其性腺分化发育的基因和内分泌调节具有重要的理论价值<sup>[1]</sup>,选择有毒生物如日本鬼鲉<sup>[5]</sup>、赤鲉<sup>[6]</sup>、金钱鱼<sup>[10]</sup>、海蛇 (*Lapemis hardwicki*)<sup>[16]</sup> 等的毒腺组织构建 cDNA 文库,可获得大批有研究和开发价值的基因。本研究之所以选用尼罗罗非鱼的肝为实验材料,一是因为尼罗罗非鱼具有适应性强、生长迅速、繁殖力高、食性广、抗病力强及肉味鲜美等特点,为世界性的重要养殖鱼类,也已成为我国淡水养殖的重要对象之一,而且吉富品系尼罗罗非鱼经过逐年系统选育后生长性能得到进一步改良<sup>[17-20]</sup>;二是因为肝是动物机体代谢最活跃的器官,许多营养物质的分解、合成及转运都在肝脏中进行,比如三羧酸循环、糖酵解、糖异生等,而且肝还是许多激素或生长因子的靶器官,含有许多相应的受体和结合蛋白。构建尼罗罗非鱼肝 cDNA 文库,一方面可以永久保存基因资源,另一方面可以利用功能筛选、免疫学筛选、Southern 杂交和 EST 序列测定等现代分子生物学技术寻找与生长代谢相关的功能基因,探讨选择育种的理论机制,同时为后续课题研究营养以及日粮水平对尼罗罗非鱼代谢关键酶和类胰岛素生长因子-1 (IGF-1) 基因表达的影响打下基础。

#### 参考文献:

- [1] 张勇,张为民,李欣,等.石斑鱼卵巢 cDNA 文库构建及脂肪酸结合蛋白克隆[J].中山大学学报(自然科学版),2003,42(2):66-69.
- [2] 殷志新,翁少萍,叶巧真,等.斜带石斑白细胞 cDNA 文库的构建[J].水产学报,2001,25(6):538-541.
- [3] 马长艳,周开亚,郭豫杰,等.中华绒螯蟹卵巢差减 cDNA 文库的构建[J].动物学研究,2003,24(1):53-56.
- [4] 樊连春,谢京,汪洋,等.银鲫与彩鲫卵母细胞 cDNA 文库构建及周期蛋白 A<sub>1</sub> 的 cDNA 克隆[J].水生生物学报,2000,24(6):573-581.

- [5] 姜孝玉,徐洪斌,陈慧萍,等.日本鬼鲉毒腺 cDNA 表达文库的构建和初步分析[J].生物化学与生物物理进展,2002,29(3):424 - 427.
- [6] 涂洪斌,卫剑文,姜孝玉,等.赤鲋尾刺 cDNA 文库的构建[J].药学报,2001,36(12):906 - 909.
- [7] 卢强,丰培金,李莲瑞,等.正常鲤外周血白细胞 cDNA 文库的构建[J].水产学报,2004,28(5):585 - 588.
- [8] 方永强,中庆祥,翁幼竹,等.文昌鱼头部 cDNA 文库的构建[J].台湾海峡,2003,22(2):131 - 135.
- [9] 李旭霞,逢越,肖蓉,等.日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)唾液腺 cDNA 文库的构建[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),2004,27(1):73 - 75.
- [10] 陈慧萍,姜孝玉,涂鸿斌,等.金线鱼毒腺 cDNA 表达文库的构建及 EST 序列分析[J].中国生物化学与分子生物学报,2004,20(2):166 - 170.
- [11] 杨芳,贺智敏,詹显全,等.大鲵肝脏组织定向 cDNA 文库的构建及鉴定[J].动物学报,2004,50(3):475 - 478.
- [12] 王维新,史成银,黄健.中国明对虾鳃细胞全长 cDNA 文库的构建[J].海洋水产研究,2004,25(5):6 - 11.
- [13] 李太武,黄晓,周荣家.中国对虾 cDNA 文库的构建[J].动物学报,1998,44(2):23 - 24.
- [14] 王艺磊,张子平.日本对虾精巢和卵巢全长 cDNA 文库的构建[J].动物学杂志,2003,38(2):9 - 13.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd edition)[M]. Ney York: Clod Spring Harbor Laboratory Press, 1989.399.
- [16] 钟肖芬,卫剑文,赵责军,等.平鲐海蛇毒腺 cDNA 表达文库的构建[J].中山大学学报(自然科学版),2001,40(3):66 - 69.
- [17] 李思发,李晨虹,李家乐,等.尼罗罗非鱼选育三代效果评价[J].上海水产大学学报,2001,10(4):289 - 292.
- [18] Li S F, He X J, Han F J, *et al.* Third-fifth generation selective evaluation of GIFT strain Nile tilapia[C]. Beijing, World Auqculture, 2000. 410.
- [19] 赵金良,李思发,何学军,等.吉富品系尼罗罗非鱼选育  $F_6$  评估[J].上海水产大学学报,2003,12(3):201 - 204.
- [20] 胡国成,李思发,何学军,等.吉富品系尼罗罗非鱼选育  $F_5 \sim F_8$  生长改良效果[J].上海水产大学学报,2005,14(3):327 - 331.