

通过 RACE 技术构建铁皮石斛叶 mRNA 的 cDNA PCR 文库

冯沛春, 崔毅慧, 张子凤, 朱乾坤, 王万军

(西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

摘要:基于 RACE 技术,以铁皮石斛叶片总 RNA 为起始材料,通过逆转录和末端转移构建出两端含有特定序列的 cDNA。然后以连接有特定序列的引物进行 cDNA 的 PCR 扩增,从而构建出 mRNA 的 cDNA PCR 文库。结果表明:cDNA PCR 文库的 PCR 效果明显高于逆转录产物的 PCR 效果,该方法构建的 cDNA PCR 文库能使 cDNA 放大 100 倍以上;以 5 pg 的总 RNA 为起始材料构建 cDNA PCR 文库仍可得到良好的 PCR 扩增效果;该研究的 cDNA PCR 文库构建方法费用较低,操作简单,为克隆微量表达的基因提供了技术基础。

关键词:cDNA PCR 文库;RACE;逆转录;PCR

中图分类号:R 931.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0085-04

逆转录 PCR (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)^[1-2] 是基因克隆和表达研究中的常用方法。但是,由于生物体内有某些基因的 mRNA 含量极少,采用常规的手法较难对其进行检测、分离等^[3]。另外,每次需要克隆新基因的 cDNA 时,都要提取 RNA 进行 RT-PCR 反应,费时费力。

cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA end, RACE)是一种基于 PCR 从低丰度的转录本中快速扩增 cDNA 的 5' 和 3' 末端的有效方法,该研究以 RACE^[4] 技术为基础,以铁皮石斛 (*Dendrobium candidum*) 总 RNA 为起始材料,通过逆转录^[5] 和末端转移^[6] 构建出两端含有特定序列的 cDNA,然后以连接有引入序列的引物进行 PCR,进而扩增生物体中 mRNA 的 cDNA 量,其 PCR 检测的灵敏度远大于 RT-PCR 方法。关于 cDNA PCR 文库,虽然已有相关的方法和试剂盒^[3],但操作繁琐,而且费用比较昂贵。因此,该研究可为微量表达基因的研究提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为铁皮石斛的叶片。

1.2 试验方法

称取铁皮石斛的新鲜叶片,通过 OMEGA 植物 RNA

提取试剂盒按试剂说明提取总 RNA。RNA 的浓度和质量通过 eppendorf 核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.1 试验流程图 该试验设计基于 RACE 技术的基本原理,整体流程见图 1,试验中用到的引物如表 1 所示。首先,以 oligo(dT)-3RAP 为引物,以 RNA 为模版逆转录合成第 1 条 cDNA 链,在 cDNA 链的 3' 端加上 oligo(dC)。以 oligo(dG)-5FAP 和 3RWP 为引物,以 5' 端加上 oligo(dC)的 cDNA 为模板进行第 1 次 PCR。然后以 5FP 和 3RNP 为引物,以第 1 次 PCR 产物为模板进行第 2 次 PCR,得到的产物即为 cDNA PCR 文库,可进行目的片段的扩增。

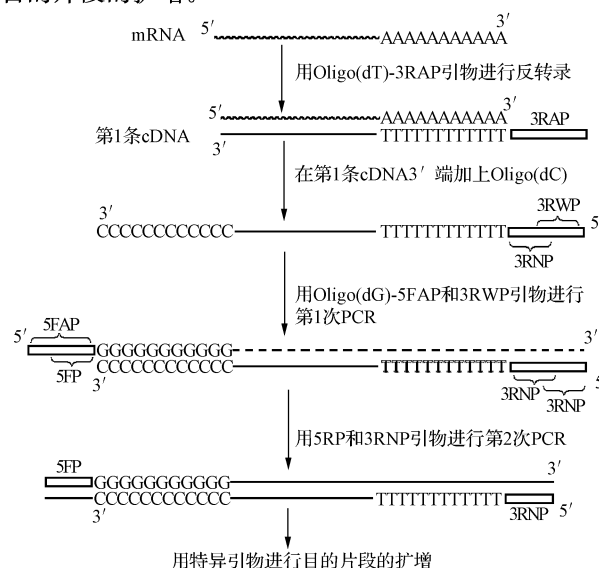


图 1 cDNA PCR 文库的构建示意图

Fig. 1 Schematic construction of cDNA PCR library

第一作者简介:冯沛春(1989-),男,硕士,研究方向为植物资源与分子生物学。E-mail:peichunfeng@163.com.

责任作者:王万军(1962-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为植物资源与生物技术。E-mail:wangjunwang@home.swjtu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31271302)。

收稿日期:2014-01-20

表 1 试验用引物

Table 1 Primers used in this study

| 引物名 Primer name | 引物序列 Primer sequence |
|--------------------|--|
| Oligo(dT)-3RAP | GCTGTCAACGATACGCTACGTAAACGGCATGACAGTGTT TTTTTTTTTTTTTTTTT |
| 3RWP | GTCAACGATACGCTACGTAAACG |
| 3RNP | TACGTAAACGGCATGACAGTG |
| Oligo(dG)-5FAP | GTAATACGACTCAGTCAGTCACTGGGGGGGGGGGG |
| 5FP | TACGACTCAGTCAGTCACTG |
| DcActin FP | TAGGTATGGGTCAAAAGGATGC |
| DcActin RP | TTCAATGGGGTACTTCAAGGTTA |

1.2.2 文库的构建 以表 1 中 oligo dT-3RP 为引物,以总 RNA 为模板,用逆转录酶(Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H⁻))(Takara 公司)按试剂说明合成第 1 条 cDNA。用末端转移酶(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase)(Takara 公司)按试剂说明在第 1 条 cDNA 的 3'端加上 oligo(dC)。分别以表 1 中 oligo(dG)-5FAP 和 3RWP 为上下游引物,以 5'端加上 oligo(dC)的 cDNA 为模板进行第 1 次 PCR,反应条件为 94℃,3 min;94℃,30 s,58℃,30 s,72℃,3 min,30 个循环;72℃,5 min。然后分别以 5FP 和 3RNP (表 1)为上下游引物,以第 1 次 PCR 产物为模板进行第 2 次 PCR,反应条件为:94℃,3 min;94℃,30 s,55℃,30 s,72℃,3 min,35 个循环;72℃,5 min,得到的产物即为 cDNA PCR 文库。以上所有试验重复 3 次。为鉴定构建文库的效果,选用了铁皮石斛 *Actin* (*DcActin*)^[7] 作为参考基因,设计的上下游引物 DcActin FP 和 DcActin RP 见表 1。以构建的 cDNA PCR 文库的 cDNA 为模板,用设计的引物进行 PCR,反应条件为 94℃,3 min;94℃,30 s,55℃,30 s,72℃,1 min,30 个循环;72℃,5 min。以上所有试验重复 3 次。作为对照,该研究还以 mRNA 逆转录的第 1 条 cDNA(合成方法同上)为模板,以 DcActin FP 和 DcActin RP 为引物进行 PCR,反应条件为 94℃,3 min;94℃,30 s,55℃,30 s,72℃,1 min,30 个循环;72℃,5 min。以上 PCR 结果均用琼脂糖凝胶电泳检测。以上所有试验重复 3 次。

1.2.3 cDNA PCR 文库和逆转录产物的 PCR 效率 为比较 cDNA PCR 文库和逆转录的 PCR 效果,分别以 500、200、50、10、2 ng 铁皮石斛叶片总 RNA 为起始材料,按上述试验方法各构建了 50 μL 的 cDNA PCR 文库。同时使用等量的 RNA 材料进行逆转录,各得到 50 μL 的 cDNA 溶液。对以上反应液各取 1 μL 为模板,用 DcActin FP 和 DcActin RP 引物在相同体系(50 μL PCR 体系)、相同条件(94℃,3 min;94℃,30 s,55℃,30 s,72℃,1 min,30 个循环;72℃,5 min)下进行 PCR 反应。各取 5 μL PCR 产物进行电泳检测。

1.2.4 不同 RNA 起始量的 cDNA PCR 文库的 PCR 效率 为进一步探索不同 RNA 起始量的 cDNA PCR 文

库的 PCR 效率,分别以 10、2 ng 和 500、100、20、5 pg 铁皮石斛叶片总 RNA 为起始材料,按上述方法各构建了 50 μL 的 cDNA PCR 文库。然后分别取 1 μL 为模板,用 DcActin FP 和 DcActin RP 引物在相同体系(50 μL PCR 体系)、相同条件(94℃,3 min;94℃,30 s,55℃,30 s,72℃,1 min,30 个循环;72℃,5 min)下进行 PCR 反应。各取 5 μL PCR 产物进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取和 cDNA PCR 文库检测

由图 2 可知,铁皮石斛叶片的 RNA 电泳结果呈现出完整的 28S/18S 带型,表明提取的总 RNA 完整,无基因组 DNA 污染,无降解。经核酸定量仪测定总量达到 15 μg, A₂₆₀/A₂₈₀ 值为 1.95,无杂质污染,可进一步试验。为测定 cDNA PCR 文库中 cDNA 放大效果,用 1 μg 铁皮石斛叶片总 RNA 为起始材料,按照上述的试验方法构建 cDNA PCR 文库。通过核酸定量仪测定得到的 cDNA PCR 文库 cDNA 总量为 8 μg。

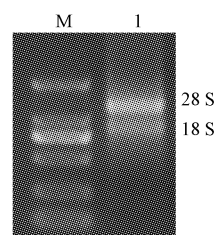


图 2 铁皮石斛叶片总 RNA 电泳图

注:M;DL 2 000 DNA marker;1:总 RNA 300 ng。

Fig. 2 The electrophoresis of *Dendrobium candidum* leaves total RNA

Note:M;DL 2 000 DNA marker;1:Total RNA 300 ng.

2.2 cDNA PCR 文库和逆转录产物的 PCR 效率

由图 3 可知,用 cDNA PCR 文库进行 PCR 反应时,5 个起始量的 PCR 结果都显示出 *DcActin* 的清晰条带。用逆转录产物进行 PCR 时,总 RNA 起始量为 500、200、50 ng 能显示出清晰条带,而总 RNA 起始量为 10、2 ng 时,无明显的 PCR 产物带。因此,cDNA PCR 文库的 PCR 效率明显高于逆转录产物。

2.3 不同 RNA 起始量的 cDNA PCR 文库的 PCR 效率

由图 4 可知,总 RNA 起始量为 10、2 ng 和 500、100 pg 的 cDNA PCR 文库经过 PCR 都扩增出了清晰的条带。在 20 pg 时亦能看到微弱条带,但在 5 pg 时已无明显的 PCR 扩增带。结果证明该研究构建的 cDNA PCR 文库能够较好地用于 PCR 反应。

3 结论与讨论

该研究基于 RACE 技术构建了 mRNA 的 cDNA PCR 文库,通过 PCR 放大了生物体内的基因表达信息。用 1 μg 的总 RNA 可以构建 8 μg 的 cDNA PCR 文库。

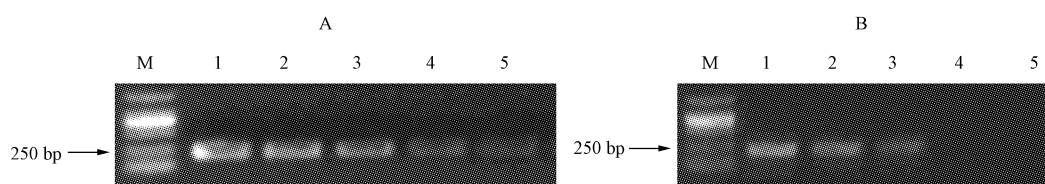


图3 cDNA PCR文库(A)和逆转录产物(B)的PCR结果

注:M;DL 2 000 DNA marker;1:总 RNA 500 ng;2:总 RNA 200 ng;3:总 RNA 50 ng;4:总 RNA 10 ng;5:总 RNA 2 ng。

Fig. 3 The PCR results of cDNA PCR library (A) and reverse transcription product (B)

Note:M;DL 2 000 DNA marker;1:Total RNA 500 ng;2:Total RNA 200 ng;3:Total RNA 50 ng;4:Total RNA 10 ng;5:Total RNA 2 ng.

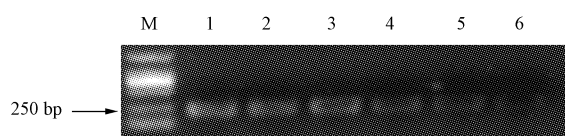


图4 不同 RNA 起始量的 cDNA PCR 文库的 PCR 结果

注:M;DL 2 000 DNA marker;1:总 RNA 10 ng;2:总 RNA 2 ng;3:总 RNA 500 pg;4:总 RNA 100 pg;5:总 RNA 20 pg;6:总 RNA 5 pg。

Fig. 4 The PCR results of cDNA PCR library from different starting amounts of RNA

Note:M;DL 2 000 DNA marker;1:Total RNA 10 ng;2:Total RNA 2 ng;3:Total RNA 500 pg;4:Total RNA 100 pg;5:Total RNA 20 pg;6:Total RNA 5 pg.

通常总 RNA 中 mRNA 的含量为 1%~5%^[8]。因此通过此方法构建的 cDNA PCR 文库可将遗传表达信息放大 100 倍以上。

该研究还比较了 cDNA PCR 文库和逆转录产物的 PCR 效率。当使用 10 ng 的总 RNA 为起始材料进行 RT-PCR 反应时没有明显的 *DcActin* 扩增带,只有 50 ng 及以上的总 RNA 才有明显的 PCR 扩增带。使用 cDNA PCR 文库进行 PCR 时,以 100 pg 总 RNA 为起始材料时仍可得到明显的 *DcActin* 扩增带。因此 cDNA PCR 文库的 PCR 效果约为 RT-PCR 效果的 100 倍以上。而且结果还表明,以 5 pg 的总 RNA 为起始材料仍可得到良好的 *DcActin* 扩增效果。

以上结果均表明,通过该研究方法构建的 cDNA PCR 文库显示出了极高的 PCR 效果和灵敏度,对于微量的 RNA 亦可得到良好的效果。另外,与已有的相关方法和试剂盒^[3]相比,该研究的 cDNA PCR 文库构建方法费用较低,操作较为简单,为克隆微量表达的基因提供了新的方法和思路。

参考文献

- [1] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts; amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988, 85(23): 8998-9002.
- [2] Noonan K E, Roninson I B. mRNA phenotyping by enzymatic amplification of randomly primed cDNA [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(21): 10366.
- [3] 李晶泉, 袁晓东, 汤敏谦. 微量 RNA 的 cDNA PCR 文库的构建 [J]. 遗传, 2001, 23(2): 147-150.
- [4] Frohman M A. RACE: rapid amplification of cDNA ends [C]. PCR protocols: A guide to methods and applications, 1990.
- [5] Hu W S, Temin H M. Retroviral recombination and reverse transcription [J]. Science, 1990, 250(4985): 1227-1233.
- [6] Bollum F J. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase [J]. The Enzymes, 1974, 10: 145-171.
- [7] Zhao P, Wang W, Sun M. Characterization and expression pattern analysis of DcNAC gene in somatic embryos of *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl [J]. Plant Cell Tiss Org, 2011, 107(1): 151-159.
- [8] Liang P, Pardee A. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display; refinements and optimization [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(14): 3269-3275.

cDNA PCR Library of mRNA From *Dendrobium candidum* Leaves Constructed Using RACE Technique

FENG Pei-chun, CUI Yi-hui, ZHANG Zi-feng, ZHU Qian-kun, WANG Wan-jun

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031)

Abstract: Based on RACE technique, total RNA from *Dendrobium candidum* leaves was subjected to reverse transcription and terminal deoxynucleotidyl transfer resulting the cDNA which contained the specific sequences in two ends. The obtained cDNA with the specific sequences was amplified using PCR with primers which matched the specific sequences

芦笋四倍体诱导、倍性鉴定及生物学特性的研究

陈春桦^{1,2}, 高建明², 刘巧莲², 陈河龙², 张世清², 易克贤^{2,3}

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南 海口 571101; 3. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101)

摘要:以南方主栽品种“井岗 701”二倍体芦笋的露白种子和幼苗为试材, 研究了秋水仙素浓度、处理时间及浸泡时的转速对芦笋四倍体诱导效果的影响, 并对四倍体和二倍体芦笋的部分抗性和形态特征进行了比较。结果表明: 以 0.2% 的秋水仙素浸泡露白种子 6 h 效果最好, 四倍体诱导率最高, 为 20%, 但浸泡时的不同转速对四倍体诱导影响差异不显著; 而用 0.3% 的秋水仙素连续滴苗 4 d, 四倍体诱导率最高为 18%; 浸泡露白种子法比滴苗法诱导效果好; 四倍体植株较二倍体更加粗壮, 在抗热性和抗旱性方面也明显优于二倍体。

关键词:芦笋; 四倍体; 秋水仙素; 形态特征; 抗性

中图分类号:S 644.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0088-05

芦笋属百合科天门冬属(*Asparagus L.*)植物, 学名石刁柏(*Asparagus officinalis L.*), 英文名 asparagus, 又称龙须菜。该属约有 300 个种, 除美洲外, 全世界温带至热带地区均有分布。芦笋以嫩茎供食用, 有鲜美香甜的风味, 现代营养学分析表明, 芦笋的营养成分丰富, 含有 18 种氨基酸和锌、铜、锰、硒等微量元素, 维生素含量为一般蔬菜的 2~5 倍, 另外, 芦笋膳食纤维还能增进食欲, 具有促进消化等功能^[1-4]。王嘉彦^[5]通过临床观察证明, 芦笋糖浆中抗癌有效成分天门冬酰胺以游离态存在, 能对体内恶变的细胞形成一种生化障碍, 阻止恶变细胞营养, 从而抑制癌细胞的生长和增殖, 这证明了芦笋还具有防癌抗癌的药用功能。

与二倍体植株相比, 多倍体植株往往茎秆粗壮, 而芦笋的食用部分为嫩茎, 因此芦笋的多倍体育种具有很

大的理论和实践意义。

日本在芦笋多倍体研究中, 很早就获得了高产优质的三倍体芦笋新品种, 产生了巨大的经济效益。由美国加利福尼亚种子子公司育成的第一个紫色芦笋品种“紫色激情”是 20 世纪 90 年代初推广的一种产量高、品质优的新品种。近年来, 郑思乡等^[6]以芦笋试管苗为诱导材料, 利用秋水仙素成功诱导了四倍体芦笋, 但诱导率较低, 仅为 6%。江西省农业科学院以美国四倍体紫色芦笋“紫色激情 (Purple Passion)”的优良株系为母本, 以新西兰四倍体紫色芦笋“太平洋紫芦笋 (Pacific Purple)”的优良株系为父本, 运用常规杂交育种与组织培养技术, 选育出四倍体紫色芦笋新品种“井冈红”。山东省潍坊市农业科学院通过对引进的优良四倍体紫芦笋进行组织培养, 筛选出优良突变单株, 再利用杂交技术, 组配杂交组合 33 个。根据其生育指数选出了 8 个优良组合, 经品种比较试验, 选育出了紫芦笋新品种“潍紫 P-7”^[7-8]。

该试验以当前南方主栽品种“井岗 701”(*Asparagus officinalis* cv. ‘Jinggang 701’) 的露白种子和幼苗为诱导材料, 利用秋水仙素进行四倍体诱导, 并从形态特征和抗性方面对四倍体和二倍体芦笋植株进行比较, 以期选育出产量更高、抗性更强的芦笋新品种提供参考。

第一作者简介:陈春桦(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为芦笋多倍体育种。

责任作者:易克贤(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为热带作物抗病遗传育种及热带作物真菌病害。E-mail: yikexian@126.com。

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003074)。

收稿日期:2014-02-10

to establish cDNA PCR library. The results showed that PCR amplification of the cDNA PCR library was more efficient significantly than that of cDNA. The quantity of cDNA was magnified more than one hundred times by the constructed cDNA PCR library. By the cDNA PCR library constructed using 5 pg total RNA as material, the satisfactory PCR amplification results can be obtained. This construction method of the cDNA PCR library was time and labor saving. This method would provided the technical basis for cloning genes of low expression.

Key words: cDNA PCR library; RACE; reverse transcription; PCR