

我国 cDNA 文库研究现状

王庆胜

(黑龙江省农业科学院佳木斯分院, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要: cDNA 文库是研究基因组学的基本手段之一, 它便于克隆和表达, 可以从筛选所需的基因, 并直接用于该基因的表达。我国 cDNA 文库研究虽然起步晚, 但发展很快, 目前已成为克隆基因、表达基因的重要途径。

关键词: cDNA; 文库; 研究现状

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)01-0003-02

Current Research of cDNA Library in China

WANG Qing-sheng

(Jiamusi Sub-academy of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: cDNA library is one of basic means to research genomics it is easy to clone and express. We can select the gene which we need and directly use to the expression of the gene. The development of cDNA library in China is fast. Now, it is an important way of gene cloning and expression.

Key words: cDNA; library; current research

cDNA 文库是指某生物某发育时期所转录的全部 mRNA 经反转录形成的 cDNA 片段与某种载体连接而形成的克隆的集合。通过构建 cDNA 表达文库不仅可以保护濒危珍稀生物资源, 而且可以提供构建分子标记连锁图谱的所用探针, 更重要的是可以用于分离全长基因进而开展基因功能研究。因此, cDNA 在研究具体某类特定细胞中基因组的表达状态及表达基因的功能鉴定方面具有特殊的优势, 从而使它在个体发育、细胞分化、细胞周期调控、细胞衰老和死亡调控等生命现象的研究中具有更为广泛的应用价值, 是研究工作中最常使用的基因文库。

1 cDNA 文库的优点和特殊用途

首先, cDNA 克隆以 mRNA 为起始材料, 这对于有些 RNA 病毒来说非常适用。因为它们的增殖并不经过 DNA 中间体。研究这样的生物有机体, cDNA 克隆是唯一可行的方法。第二, cDNA 基因文库的筛选简单易行。适当选择 mRNA 的来源, 使所构建的 cDNA 基因文库中, 某一特定序列的克隆达到很高比例, 简化了筛选特定基因序列克隆的工作量。第三, 每一个 cDNA 克隆都含有一种 mRNA 序列, 在选择中出现假阳性几

率比较低, 从阳性杂交信号选择出来的阳性克隆一般含有目的基因序列。第四, cDNA 克隆的另一用途是用于基因序列的测定, 读码框(ORF)的界定只有通过 mRNA 5' 核苷酸序列分析才能获得。第五, 由于植物基因 DNA 非常庞大, 而且含大量的重复序列, 因此无论采用电泳分离技术还是通过分子杂交, 都难以直接分离到目的基因片段。这是以染色体 DNA 为起始材料直接克隆目的基因的一个主要困难所在。这个问题可以通过 mRNA 产生的 cDNA 进行克隆而得以部分解决, cDNA 文库技术已成为这一领域重要的技术。

2 cDNA 文库的构建

cDNA 文库的构建是现代分子生物学一门重要的技术, 从 1976 年 Hofstetter 成功构建了第一个 cDNA 文库以来, 构建 cDNA 文库的技术方法经历了一个逐步发展完善的过程。初期 cDNA 文库, 由于当时技术的限制, 选用质粒载体存在着连接效率低、难以扩增和保存等缺点, 而 Young 和 Davis 重组载体为表达性文库构建和保存提供了质的飞跃。近年来, cDNA 文库构建的新方法层出不穷, 但其共同目的是使 cDNA 文库更加迅速、高效满足研究的需要。

经典 cDNA 文库构建的基本原理是用 Oligo(dT) 作逆转录引物, 或者用随机引物给所合成的 cDNA 加上适当的连接接头, 连接到适当的载体中获得文库。其基本步骤包括: RNA 的提取, 要构建一个高质量的 cDNA 文库, 获得高质量的 mRNA 是至关重要的, 所以

收稿日期: 2008-06-03

作者简介: 王庆胜(1979-), 男, 黑龙江省汤原县人, 学士, 研究, 从事土壤肥料和作物栽培研究。Tel: 0454-8351558 13351655200; E-mail: wq0451@163.com.

处理 mRNA 样品时必须仔细小心。由于 RNA 酶存在所有的生物中, 并且能抵抗诸如煮沸这样的物理环境, 因此建立一个无 RNA 酶的环境对于制备优质 RNA 很重要。在获得高质量的 mRNA 后, 用反转录酶 Oligo (dT) 引导下合成 cDNA 第 1 链, cDNA 第 2 链, 合成接头的加入, 将双链 DNA 克隆到载体中去、分析 cDNA 插入片断、扩增 cDNA 文库、对建立的 cDNA 文库进行鉴定。

3 我国研究动态

我国 cDNA 文库的研究起步较晚, 但发展很快。经过近几年的发展, 不但构建 cDNA 文库的技术方法逐渐增多, 而且已经在多种植物中构建了 cDNA 文库, 出现了许多利用 cDNA 文库技术克隆基因成功的例子。

3.1 番茄幼苗 cDNA 文库的构建与植酸酶基因筛选

烟台大学的李明刚等^[1]采用异硫氰酸肌法从发芽 3~4 d 的番茄幼苗中提取总 RNA, 用 oligo(dT) 纤维素亲和和层析分离纯化 mRNA, 以 mRNA 为模板, oligo (dT) 为引物逆转录合成双链 cDNA, 将 cDNA 与 EcoR I 接头连接后克隆到表达载体 λgt11 的单一 EcoR I 位点, 经体外包装后感染宿主菌 Y1090 成功地构建了完整的番茄幼苗 cDNA 文库。滴度为 $3.1 \times 10^5 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 用颜色筛选法筛选重组子, 然后用植酸酶抗体做探针进行免疫筛选, 得到两个植酸酶基因的阳性克隆。

3.2 玉米叶片 cDNA 文库的构建及 Cab 基因克隆

山东农业大学刘长征等^[2], 从玉米叶片中提取总 RNA, 利用 oligo(dT) 纤维亲和层析柱从中分离出 mRNA, 然后以 oligo (dT) XbaI adaptor 作为引物, mRNA 作为模板, 合成相应的 cDNA。并定向克隆进 λGEM-4 载体, 构建出滴度为 $2 \times 10^5 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 叶片 cDNA 文库, 最后利用寡核苷酸的探针筛选到 8 个 CAB 基因的阳性克隆。

3.3 水稻 cDNA 文库的构建及巯基抑制剂 cDNA 的分离

中国科学院遗传所周光澜等^[3], 取开花两周左右的水稻种子提取总 RNA, 分离 mRNA, 进而反转录合成 cDNA 并定向插入 λgt22A 克隆载体, 经体外包装建

成水稻种子的表达型 cDNA 文库, 库容量为 $1.5 \times 10^6 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 进一步用人工合成的探针进行筛选, 选出 8 个含有完整的水稻巯基蛋白酶抑制剂编码序列的 cDNA 克隆。

3.4 应用 cDNA 文库快速构建法克隆高粱肌动蛋白基因

中国科学院遗传与发育生物学研究所的周立等^[4], 以生长一周的高粱嫩叶为材料, 利用 Pharmacia 公司的试剂盒, λgt10 为载体成功的构建 cDNA 文库, 其滴度为 $2 \times 10^6 \text{ pfu}$ 。然后以水稻 Racl cDNA 为探针, 经噬菌斑原位杂交筛选出两个阳性克隆。

3.5 玉米根 cDNA 文库中铁胁迫基因的筛选

印莉萍, 祁晓廷等^[5], 为了分离缺铁相关基因, 构建了一个滴度为 $4.5 \times 10^5 \text{ pfu} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 的 λZAP 表达型缺铁胁迫玉米根 cDNA 文库, 为了差异筛选铁胁迫 cDNA 文库, 铁正常(+)和铁缺乏(-) cDNA 探针通过随机引物 RT-PCR 从(+)和(-) mRNA 模板合成, 经原位噬菌斑杂交, 反复筛选, 最终获得 6 个克隆。

3.6 大豆在暗诱导条件下差异表达 cDNA 文库的构建

赵琳等人^[6]利用 SSH 技术成功构建了短日照诱导的大豆光周期敏感品种叶片中差异表达的 cDNA 消减文库, 从文库中一共筛选到 738 个克隆, 通过反向 Northern 杂交, 从中得到 148 个克隆并测序, 它们代表 76 个不同基因的非重复序列 ESTs。

参考文献:

- [1] 李明刚, 刘讯. 植酸酶基因表达与调控机制研究(II)一番茄幼苗 cDNA 文库的构建与植酸酶基因的筛选[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 1999 112(1): 34-41.
- [2] 刘长征. 玉米叶片 cDNA 文库的构建及 Cab 基因克隆[J]. 山东农业大学学报 1995 26(4): 447-451.
- [3] 周兆澜. 水稻 cDNA 文库的构建及巯基抑制剂 cDNA 的分离[J]. 中国科学(c 辑), 1996, 26(2): 149-155.
- [4] 周立. 应用 cDNA 文库快速构建法克隆高粱肌动蛋白基因[J]. 生物化学杂志 1997, 13(1): 7-13.
- [5] 印莉萍. 缺铁玉米根 cDNA 文库的构建及蛋白和 cDNA 差异比较[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 1999 12(4): 54-59.
- [6] 赵琳 罗秋兰, 杨春亮, 等. 大豆在暗诱导条件下差异表达 cDNA 文库的构建及分析[J]. 大豆科学 2007 26(4): 134-139.

祝 广 大 作 者 新 年 快 乐