

夜香树均一化全长cDNA文库的构建及EST分析

郑鸿昌^{1a,2*}, 刘涛^{1a*}, 吕恃衡^{1a}, 陈建军^{1a}, 何水林^{1b}, 潘东明^{1a**}, 陈桂信^{1a**}

(1. 福建农林大学, a. 园艺产品贮存保鲜研究所; b. 作物科学学院, 福州 350002; 2. 福建省永安市农业局, 永安 366000)

摘要: 为构建高质量的夜香树(*Cestrum nocturnum*)均一化全长cDNA文库, 以其花朵为材料, 采用DSN均一化技术与改进的SMART技术相结合, 将连接产物进行脱盐浓缩后电转化进行构建。结果表明, 未脱盐连接产物的转化效率为1 μ L连接产物有7000个菌落, 理论重组率为96%; 脱盐后, 提升为4.1 \times 10⁶个菌落, 理论重组率为98%; 蓝斑也有插入片段, 实际重组率应为100%; 插入片段大小平均为1.6 kb。随机挑取500个单克隆(含50个蓝斑)测序, 共获得464条EST, 单一序列(unigene)为426条, 占91.8%, 其中片段重叠群26个, 单基因400个, 冗余率仅为8.1%, 表明构建文库的均一化效果较好, 可满足后续功能基因的筛选和基因信息的研究。

关键词: 夜香树; 均一化 cDNA 文库; EST

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.01.006

Construction of Normalized Full-length cDNA Library and EST Analysis from *Cestrum nocturnum* L.

ZHENG Hong-chang^{1a,2*}, LIU Tao^{1a*}, LÜ Shi-heng^{1a}, CHEN Jian-jun^{1a}, HE Shui-lin^{1b}, PAN Dong-ming^{1a**}, CHEN Gui-xin^{1a**}

(1a. Institute of Storage Science and Technology of Horticultural Products; 1b. College of Crop Science, Fujian University of Agriculture and Forestry, Fuzhou 350002, China; 2. Agriculture Bureau of Yong'an City, Yong'an 366000, Fujian, China)

Abstract: In order to construct high-quality normalized full-length cDNA library of *Cestrum nocturnum* L., the library from its flowers was established successfully by combined modified SMART technology, DSN digestion with desalting of ligation product. The results showed that transformation efficiency of the ligation product without desalting was 7000 colonies per microliter, and theoretical recombination rate was 96%, whereas, the transformation efficiency increased up to 4.1 \times 10⁶ colonies per microliter, and theoretical recombination rate was 98% after the ligation product desalting. Actually, blue colonies also contained the insert fragments, and, the recombination rate was to 100%. The average size of inserts in the library was about 1.6 kb. Five hundred colonies including 50 blue colonies were randomly picked for sequencing from the library, 464 effective sequences were obtained including 426 unigenes (accounting for 91.8%), which were composed of 26 contigs and 400 single genes, redundant rate was only 8.1%. So, it was suggested that the quality of the normalized cDNA library was better than that of ordinary cDNA libraries, which could be used for further research of screening of functional genes and their related information.

Key words: *Cestrum nocturnum*; Normalized cDNA library; EST

收稿日期: 2015-04-07

接受日期: 2015-06-27

基金项目: 福建农林大学科研创新团队项目(ctxd12013)资助

This work was supported by the Science Research Innovation Team Project of Fujian University of Agriculture and Forestry (Grant No. cxtid12013).

作者简介: 郑鸿昌(1987~), 男, 硕士, 现在福建省永安市农业局工作, 从事花卉遗传育种与生物技术研究, E-mail: zhenghongchang@vip.qq.com;

刘涛(1990~), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为花卉遗传育种与生物技术研究, E-mail: Liv_s@outlook.com

* 对本文贡献等同, 并列第一作者。

** 通信作者 Corresponding authors. E-mail: pdm666@126.com; guixinchen@126.com

夜香树(*Cestrum nocturnum* L.)又叫夜香花、夜光花、木本夜香树、夜丁香, 是茄科(Solanaceae)夜香树属植物, 直立或近攀援状灌木, 高 2~3 m, 全体无毛; 枝条细长而下垂^[1]。作为一种典型的长短日照香花植物, 夜香树几近家喻户晓, 在我国南方地区栽培广泛。夜香树独特生物习性及其在药物、园林等方面的应用, 使其具有一定的研究价值。

包含特定组织或器官 mRNA 信息的 cDNA 文库是研究基因结构、功能、操纵的有力工具之一^[2]。以构建 cDNA 文库为基础的表达序列标签技术(Expressed sequence tag, EST), 其包含的信息, 如全基因组序列、转录组、蛋白质组、代谢物组等, 有助于对基因的结构及其演变、基因表达的分析、新基因的发现及功能鉴定、功能基因组等的研究^[3-4]。目前, cDNA 文库构建和 EST 分析相结合的方法已经在一些植物上得到应用, 如木奈(*Prunus salicina*)、铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)、青杆云杉(*Picea wilsonii*)、‘巴西蕉’(*Musa acuminata* L. AAA group, ‘Brazilian’)等^[5-8], 说明其在果树、花卉、作物等各类植物上具有一定的通用性, 对于后续的研究也有着深远的意义。目前对夜香树的研究, 如生理、组织培养、代谢物等^[9-12], 较少涉及分子水平, 但其对于揭示物种的特性和本质来说是必不可少的。

本研究以盛花期的夜香树花朵为材料, 将 SMART 技术与 DSN 均一化技术相结合, 构建了夜香树芳香期均一化全长 cDNA 文库, 并进行了 EST 测序和分析, 并用 Blast2 go 在线软件对测序结果进行注释和归类分析, 找出与夜香树花香和生物钟相关的基因, 为后续夜香树的分子水平研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

2010 年 9-10 月夜间 8:30-12:00 从福建农林大学旧行政楼花园中的夜香树(*Cestrum nocturnum*)植株上, 选取开花并释放浓香的花朵, 去除雌雄蕊后, 将其包于锡箔纸内并做好标记, 立即用液氮速冻, 存于 -80℃ 超低温冰箱备用。

1.2 试剂

试验所用 Creator SMART cDNA Library Construction jtsb93 639138 购自 Clontech 公司; dNTP (Cat. No. R0192) 购自 Fermentas 公司; SuperScript II (RNase H-

Cat. No. 18080-044)、DH10B 感受态细胞 (Cat. No. 12033-015)、SOC 培养基 (Cat. No. 15544-034) 购自 Invitrogen 公司; Spectra/Por 7 半透膜 (Cat. No. 132117) 购自 Spectrum Laboratories; VSWP 杂交膜 (Cat. No. VSWP02500) 购自 Millipore 公司; Trimmer Direct cDNA normalization Kit (Cat. No. EA001)、DSN (Duplex-specific Nuclease, Cat. No. EA001) 购自 Evrogen 公司; Taq DNA 聚合酶 (Cat. No. 201205) 购自 Qiagen 公司; RNase A (Cat. No. DB0473) 购自 BioBasic 公司。其他试剂均为进口或实验室制备。

1.3 方法

总 RNA 提取 取 0.1 g 花朵放入已消毒并加入液氮的研钵中, 研磨至细的粉末, 采用改良的 Trizol (Invitrogen, Cat. No. 15596-018) 法提取总 RNA。由于夜香树花朵中含有多糖, 氯仿抽提后, 按抽提液: 异丙醇: 5 mol L⁻¹ NaCl=4:3:3 混匀; 冰浴 30 min; 在 4℃ 17000×g 下离心 30 min; 去除上清, 加入 75% 乙醇 1 mL 清洗 2 次; 在 4℃ 7500×g 下离心 5 min, 去除上清, 沉淀于室温晾干; 最后用 10 μL 无 RNase 水溶解沉淀, 取 1 μL 样品进行电泳检测, 用紫外分光光度仪测定夜香树花朵总 RNA 的浓度与纯度。

逆转录反应 引物改良: 将 Creator SMARTcDNA Library Construction Kit 中 5' 端引物中 T 碱基变为 U, 其 3' 端进行磷酸化修饰, 改良后 5' 端和 3' 端逆转录引物序列分别为 5DSH1: 5'-GCCAUU-ACGGCCUAGUUACGGGGp-3', 3DSH2: 5'-GTAA-TACGACTCACTATAGGGCGTCATCTATGTCGG-GTGGGCCGAGGCGGCCT15VN-3'。逆转录改良: 将 Creator SMART cDNA Library Construction Kit 中的一步法改为两步法。第一次逆转录: 取 1~5 μg 总 RNA (约 4.3 μL), 加入 50 μmol L⁻¹ 5' 端逆转录引物 0.3 μL、50 μmol L⁻¹ 3' 端逆转录引物 0.4 μL, 混匀并离心; 在 PCR 仪上 72℃ 变性 2 min; 迅速放于冰上冷却 2 min, 离心; 依次加入: 5×Fist-strand Buffer (Clontech, Cat. No. S2315) 2 μL、0.1 mol L⁻¹ DTT (Clontech, Cat. No. S2316) 1 μL、10 mmol L⁻¹ dNTP 1 μL、200 U μL⁻¹ SuperScript II (RNase H-) 1 μL, 在 PCR 仪上 42℃ 反应 1 h, 放冰上备用。第二次逆转录: 取 50 μmol L⁻¹ 5' 端逆转录引物 0.2 μL, 补水至 5 μL, 在 PCR 仪上 72℃ 变性 2 min; 立即在冰上冷却 2 min, 离心, 将其转入第一次反应管中; 依次加入 5×Fist-strand Buffer 2 μL、0.1 mol L⁻¹ DTT 1 μL、10 mmol L⁻¹ dNTP mix 1.35 μL、100×BSA (10 mg mL⁻¹, NEB, Cat. No.

B9001S) 0.2 μL 、200 U μL^{-1} SuperScript II (RNase H-) 1.2 μL 和100 mmol L^{-1} MnCl_2 20.45 μL , 混匀, 离心; 在PCR仪上42 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h; 加入25 mmol L^{-1} NaOH 2 μL , 混匀, 在PCR仪上68 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min, 离心, 置冰上备用。

逆转录产物的纯化 将逆转录产物在0.8%无EB琼脂糖凝胶中电泳; 切取0.5~5 kb之间的胶条, 装入10K MWCO Spectra/Por 7半透膜中, 电泳1 h, 将正负极对调, 电泳45 s; 挤出胶条, 取出半透膜内的透析液, 加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, pH 6.0~7.2, Ambion, Cat. No. AM9730), 轻轻摇匀; 于4 $^{\circ}\text{C}$ 15493 $\times g$ 下离心20 min; 取上相, 加入等体积氯仿, 轻轻摇匀; 于4 $^{\circ}\text{C}$ 15493 $\times g$ 下离心20 min, 取上相; 加入0.1倍体积的3 mol L^{-1} NaAc (pH 5.2), 0.01倍体积的糖原(20 mg mL^{-1}), 摇匀; 再加入2.5倍体积的无水乙醇, 放-20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 于4 $^{\circ}\text{C}$ 16800 $\times g$ 下离心1 h, 去上清, 加入75%乙醇1 mL^{-1} 洗1次; 于4 $^{\circ}\text{C}$ 7500 $\times g$ 下离心5 min, 去上清, 沉淀室温下晾干, 用40 μL 1 \times TE (pH 8.0)溶解沉淀。

全长ds-cDNA的合成 采用改进Creator SMART cDNA Library Construction Kit的方法, 并根据Piao^[13]、Dai^[14-15]的研究结果, 将一轮LA-PCR扩增改为两轮扩增, 并设计了有利于长片段cDNA第二链扩增的引物序列。第一轮: 取10 μL 纯化的逆转录产物, 上游引物为5DSH: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCGTCATCTATGTCGGGTGGC-CATTACGGCCTAGTTACGGGp-3', 下游引物为3DSH2, 采用AdvantageTM PCR Kit的方法扩增100 μL , 分装成4管, 每管25 μL , 热启动PCR反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min; 然后95 $^{\circ}\text{C}$ 12 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 6 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 8 min, 共6个循环; 最后68 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。产物的纯化方法同上, 沉淀用55 μL 1 \times TE溶解。第二轮: 取5 μL 纯化的第一轮扩增产物, 引物为P1: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGGC-3'; 采用AdvantageTM PCR kit的方法扩增25 μL , 热启动PCR反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min; 然后95 $^{\circ}\text{C}$ 12 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 8 min, 共12~23个循环; 最后68 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。从第12个循环起, 取5 μL 电泳, 以确定合适的循环数, 然后进行大量扩增(100 μL)。产物的纯化同上, 沉淀用7 μL 无菌水溶解, 取1 μL 进行电泳检测。

全长cDNA均一化处理 对Trimmer Direct cDNA normalization Kit的方法进行改良, 将6 μL 纯化的第二轮产物、1.6 μL 10 \times HYB Buffer、0.1 mol L^{-1}

Tris-HCl (pH 8.0)、10 mmol L^{-1} EDTA (pH 8.0)、5 mol L^{-1} NaCl、8.4 μL 无菌水混匀, 2350 $\times g$ 离心, 分装3个PCR管中, 分别标上CK (对照)、1/4、1/2, 每管4 μL , 2350 $\times g$ 离心; 在PCR仪中98 $^{\circ}\text{C}$ 2 min和68 $^{\circ}\text{C}$ 4.5 h, 取5 μL 68 $^{\circ}\text{C}$ 预热的2 \times DSN Master Buffer、50 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH 8.0)、50 mmol L^{-1} MgCl_2 、10 mmol L^{-1} DTT加入杂接管中, 用枪轻轻吹打混匀, 迅速放回PCR仪中68 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 按CK、1/4、1/2的顺序, 分别加入1 μL 的DSN (Duplex-specific Nuclease) storage Buffer、50 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH 8.0)、1/4U DSN和1/2U DSN, 迅速用另一支枪快速吹打10下, 马上放回PCR仪中68 $^{\circ}\text{C}$ 25 min, 注意不要让管冷却, 按CK、1/4、1/2顺序, 分别加入10 μL stop solution (10 mmol L^{-1} EDTA pH 8.0), 用枪轻轻吹打混匀, 2350 $\times g$ 离心, 马上放回PCR仪中68 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 加20 μL 无菌水, 用枪轻轻吹打, 混匀, 2350 $\times g$ 离心, 放冰上备用。

全长均一化cDNA扩增 取1 μL DSN处理产物, 引物为P2: 5'-GTCATCTATGTCGGGTG-3', 扩增反应体系25 μL , 扩增程序同第二轮扩增; 从第12个循环起, CK和1/4 DSN管各取5 μL 电泳; 从第15个循环起, 每隔一定循环数, 在CK、1/4 DSN和1/2 DSN管中, 各取5 μL 电泳检测, 确定DSN处理的最适浓度和LA-PCR的最佳循环数。以最适浓度DSN处理的产物为模板, 在最佳循环数下, 扩增100 μL 全长均一化cDNA。

扩增产物纯化 取50 μL 全长均一化cDNA扩增产物, 加入2 μL 的蛋白酶K (20 μg mL^{-1}), 轻轻混匀, 离心; 在PCR仪上45 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 2350 $\times g$ 离心, 转入0.5 mL离心管中, 加入70 μL 无菌水, 混匀; 加入200 μL 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, pH 6.0~7.8), 颠倒混匀; 于25 $^{\circ}\text{C}$ 17968 $\times g$ 离心20 min; 取上相110 μL , 转入新的0.5 mL离心管中, 加入110 μL 氯仿, 上下颠倒混匀; 于25 $^{\circ}\text{C}$ 17968 $\times g$ 离心20 min; 取上相80 μL , 补水20 μL , 加入10 μL 3 mol L^{-1} NaAc (pH 5.2)和1.2 μL 糖原(20 μg μL^{-1}), 混匀, 室温下加入2.5倍无水乙醇, 混匀, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 次日在4 $^{\circ}\text{C}$ 17000 $\times g$ 下离心60 min, 去上清, 沉淀加入1000 μL 的80%乙醇洗1次; 4 $^{\circ}\text{C}$ 7500 $\times g$ 离心5 min, 去上清, 晾干沉淀, 加79 μL 无菌水溶解沉淀。

扩增产物的酶切与回收 取79 μL 纯化的全长均一化cDNA扩增产物, 转入到PCR管中, 依次加入10 μL 10 \times Buffer 2 (NEB, Cat. No. B7002S)、1 μL 100 \times BSA (10 mg mL^{-1} , NEB)和10 μL Sfi I (20 U μL^{-1} ,

NEB, Cat. No. R0123L), 混匀, 2350×g 离心, 在 PCR 仪中 50℃ 酶切 3 h。酶切产物回收方法同上。

扩增产物的连接 将纯化的酶切产物溶于 7.7 μL 无菌水, 依次加入以下成分: 1 μL 10×T4 DNA Ligase Buffer (Fermentas)、0.5 μL 含 Sfi I 定向克隆位点的 pBlueScript II (50 ng μL⁻¹, 由加拿大 Bio S & T 公司俞长河博士赠送) 和 0.8 μL T4-Ligase (5 U μL⁻¹, Fermentas, Cat. No. EL0011), 混匀, 2350×g 离心, 放入 16℃ 水浴锅温育过夜(12~16 h)。

连接产物透析脱盐 取 4 μL 连接产物到 0.025 μm VSWP 杂交膜的光面上(光面朝上, 粗面朝下), 用接种铲轻轻转移到有 50 mL 脱盐缓冲液(加拿大 Bio S & T Inc. 俞长河博士提供)的培养皿中, 让杂交膜在液面上漂浮 2 h, 再用接种铲轻轻转移到有无菌水的培养皿中, 让杂交膜在液面上漂浮 1 h, 用枪头吸取其上液滴(8~10 μL)到 1.5 mL EP 管, 再用 10 μL 无菌水洗杂交膜 1 次, 将洗液吸回 1.5 mL EP 管, 真空中等强度下浓缩 12 min, 获得 2.5~3 μL 浓缩液。

连接产物转化 取 2 μL 连接产物和 2.5 μL 脱盐浓缩液, 分别与 20 μL DH10B 感受态细胞混匀, 用电激转化枪(BioRad, Gene Pulser Xcell 617BR1 07089)进行电转化; 将转化产物转入含有 1 mL 37℃ 预热液体 SOC 培养基的 15 mL 离心管中, 于 37℃ 120 r min⁻¹ 摇 1 h; 每管加入 500 μL 50% 甘油, 混匀; 未脱盐的取 3 μL 菌液, 涂在含氨苄、IPTG、X-gal 的 LB 平板上, 脱盐的取 1 μL 稀释 100 倍, 再取 3 μL 菌液, 涂在含氨苄、IPTG、X-gal 的 LB 板上, 放入 37℃ 恒温培养 12~16 h。次日, 进行菌落计数, 计算滴度和重组率, 重组率=(菌落总数-蓝斑数)/菌落总数。剩余的菌液倒入 1.5 mL 离心管中, 用酒精干冰冻 20 min, 置 -80℃ 备用。

插入片段大小检测 从培养的 LB 平板上随机挑取 30 个菌落(含 5 个蓝斑), 进行菌落 PCR, 上下游引物分别为 M13R (5'-GGAAACAGCTATGACC-ATG-3') 和 M13F (5'-GTAAAACGACGCCAGT-3'), 反应体系 25 μL, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, RNase A (10 mg mL⁻¹) 为 0.2 μL, 热启动 PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 3 min; 然后 95℃ 12 s, 58℃ 30 s, 68℃ 3 min, 共 30 个循环; 最后 68℃ 10 min。取 5 μL PCR 产物进行电泳检测。

文库测序与 EST 分析 用高压过的牙签在文库中随机挑取 500 个含插入片段的克隆, 放置于每孔装有 80 μL 15% 甘油的 frozen medium 的 384 孔板, 以 M13R 为引物, 委托上海 MAP 生物技术有限公司进行

测序。对序列(EST)进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), 运用 Phred 程序和 Cross-Match 软件去除载体序列和移码突变序列; 用 WEGO (<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego>) 进行功能分类, 计算文库的重复率和全长率。

2 结果和分析

2.1 总 RNA 提取

紫外分光光度法测得夜香树花朵总 RNA 浓度约 1.5 μg μL⁻¹, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.9, 说明其产量和纯度高、无杂质污染。图 1 可见 28S rRNA 和 18S rRNA 两条带清晰, 亮度比约为 2:1。图 2 可见逆转录产物弥散分布范围较广, 说明高丰度的 RNA 的逆转录效率较高, 弥散有出现亮带, 说明 RNA 比较完整, 没有出现降解, 能满足后续建库要求。

2.2 双链 cDNA 合成

反转录的 cDNA 第一链经 LA-PCR 扩增, 其产物呈弥散状(图 3, 4), 大小范围 500~3000 bp, 弥散分布不均匀, 高丰度的 cDNA 优先扩增, 结果使弥散中间出现亮带, 因此, 不同丰度弥散的 cDNA 均能得到有效扩增。

2.3 DSN 均一化处理

以 CK、1/4 U、1/2 U DSN 酶处理的产物为模板, 经 LA-PCR 扩增获得均一化全长 cDNA (图 5)。12 次循环时, 对照的扩增产物弥散亮度较高、分布不均, 中间有亮带, 说明 cDNA 未被均一化, 高丰度基因 cDNA 优先扩增; 1/4 U 处理的扩增产物弥散亮度低, 量少, 说明循环次数不够; 15 次循环时, 对照的扩增产物弥散亮度增强, 量增多, 向点样孔方向出现拖尾, 说明循环次数过多, 1/4 U、1/2 U 处理的扩增产物弥散亮度都增强但仍不够, 说明循环次数不够; 17 次循环时, 1/4 U 处理的扩增产物弥散亮度足够, 顶部较平, 在 0.5~3 kb 间分布均匀, 无亮带, 未出现拖尾的迹象, 说明 DSN 活性较合适, 均一化效果较好, 1/2 U 处理的扩增产物很少且弥散很弱, 说明 DSN 浓度太高。因此, 最佳 DSN 处理活性为 1/4 U, LA-PCR 扩增的最佳循环次数为 17。

2.4 电转化

取 2 μL 未脱盐连接产物进行电转化, 从 1500 μL 转化产物中取 3 μL 涂板, 长出 28 个菌落, 其中蓝斑

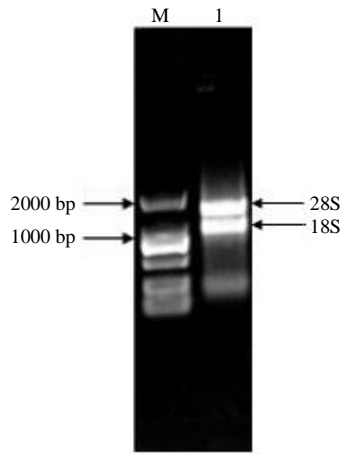


图 1 总 RNA 电泳图。M: DL2000 bp Marker。
Fig. 1 Electrophoresis of total RNA. M: DL2000 bp Marker.

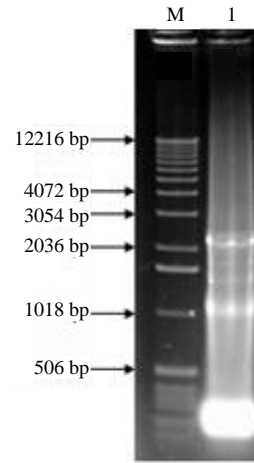


图 2 夜香树花朵逆转录电泳图。M: DL12216 bp Marker; 1: 夜香树花。

Fig. 2 Result of the reverse transcriptase. M: DL12216 bp Marker; 1: Flowers of *Cestrum nocturnum*.

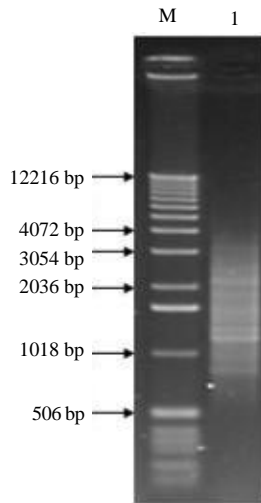


图 3 6 次循环的 LA-PCR 电泳图。M: DL12216 bp Marker。
Fig. 3 LA-PCR with 6 cycles. M: DL12216 bp Marker.

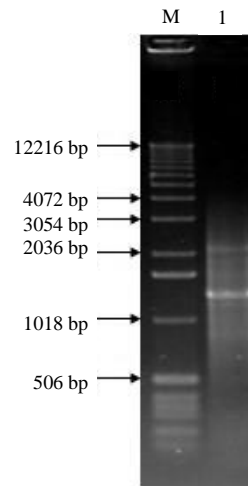


图 4 第二轮 LA-PCR 电泳图。M: DL12216 bp Marker。
Fig. 4 The second round of LA-PCR. M: DL12216 bp Marker.

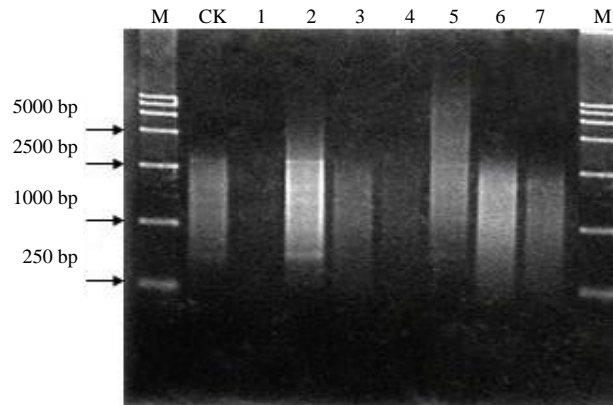


图 5 夜香树花朵均一化 cDNA 电泳检测。M: DL15000 bp Marker; CK: 对照, 12 次循环; 1: 1/4U DSN, 12 次循环; 2: 对照, 15 次循环; 3: 1/4U DSN, 15 次循环; 4: 1/2U DSN, 15 次循环; 5: 对照, 17 次循环; 6: 1/4U DSN, 17 次循环; 7: 1/2 U DSN, 17 次循环。
Fig. 5 Detection of normalized cDNA from *Cestrum nocturnum* flowers. M: DL15000 bp Marker; CK: Control, 12 cycles; 1: 1/4U DSN, 12 cycles; 2: Control, 15 cycles; 3: 1/4U DSN, 15 cycles; 4: 1/2U DSN, 15 cycles; 5: Control, 17 cycles; 6: 1/4U DSN, 17 cycles; 7: 1/2U DSN, 17 cycles.

1个, 重组率为96%, 按每次14000个菌落转化, 推算出转化效率为7000个菌落 μL^{-1} 连接产物; 取4 μL 连接产物脱盐并电转化, 从1500 μL 转化产物中取1 μL 稀释100倍, 取3 μL 菌液涂板, 长出328个菌落, 其中蓝斑7个, 重组率为98%, 按每次 1.64×10^7 个菌落转化, 推算出转化效率为 4.1×10^6 个菌落 μL^{-1} 连接产物。可见, 脱盐处理使转化效率提高了585倍。

2.5 插入片段大小检测

菌落 PCR 验证结果见图 6, 除第 9 泳道空载外, 其余克隆均有插入片段, 大小为 0.5~3 kb, 平均为 1.6 kb 菌落 PCR 验证结果见图 6, 除第 9 泳道空载外, 其余克。同时观察到蓝斑也有插入片段的现象, 这与常规蓝白斑筛选结果相悖, 具体原因还有待研究。

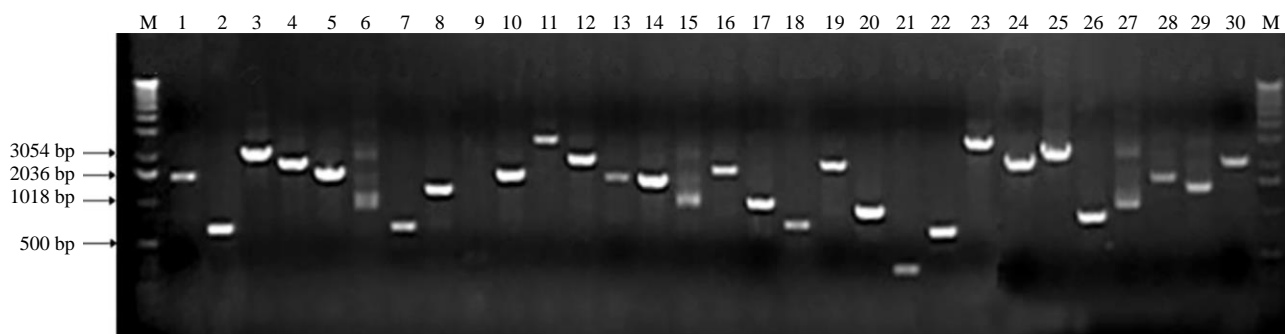


图 6 均一化全长 cDNA 文库插入片段大小检测。M: DL12216 bp Marker; 1~25: 白斑; 26~30: 蓝斑。

Fig. 6 Detection of insert size in normalized cDNA library. M: DL12216 bp Marker; 1~25: White colonies; 26~30: Blue colonies.

2.6 EST 分析与功能注释

随机挑取 500 个单克隆(含 50 个蓝斑)测序, 用 Phrap 软件拼接, 发现 36 条发生移码突变, 占 7.2%; 有效 EST 序列 464 条, 占 92.8%, 蓝斑也有 EST 插入片段。

重叠群分析结果表明, 单一序列为 426 条, 其中 26 个片段重叠群占 5.6%; 400 个单基因占 94.4%, 冗余率 8.1%; NCBI-BLAST 比对结果表明, 257 条 EST 序列有显著同源性, 且都能通读, 说明 cDNA 插入片段均为全长, 因此全长率为 60.3%; 未知 143 条, 占 33.6%。

氨基酸同源性比对结果表明, 在所测序的 ESTs 编码的氨基酸序列中, 与花香形成、生物钟相关蛋白有 27 个, 占 6.3%。与花香形成相关的蛋白包括醛/酮还原酶家族蛋白、醛糖异构酶家族蛋白、胺氧化酶、NAC、MYB 和谷氨酰半胱氨酸合成酶等, 与生物钟相关的蛋白有 CDF3 (单车自由度因子 3), 其中转录因子有 NAC、MYB 等。

将 257 条 ESTs 编码的蛋白进行 WEGO 功能分类 (图 7), 大致可分为 3 大类: (1) 细胞组成, 细胞 167 条、细胞器 116 条、细胞部分 167 条。(2) 分子功能, 催化活性 126 条、结合 108 条。(3) 生物过程, 代谢过程 145 条、细胞过程 144 条, 参与色素形成有 46 条, 占 16.3%; 外界刺激应答有 67 条, 占 26.1%; 生物调节有 49 条, 占 19.1%; 节律过程 1 条, 占 0.4%; 生殖过

程 15 条, 占 5.8%。从表 1 可知, 此次 EST 测序比对发现了一些与夜香树开花相关的结构基因和转录因子基因, 分别为花香代谢相关基因、转录因子、生物钟基因和钙离子结合基因。

3 结论和讨论

本研究构建的文库, 未脱盐连接产物的转化效率为 7000 个菌落 μL^{-1} 连接产物, 脱盐后为 4.1×10^6 个菌落 μL^{-1} 连接产物, 提高了 585 倍, 平均插入片段大小为 1.6 kb, 冗余率为 8.1%, 可用于大规模转录组测序, 从而进行更深层次的研究; 测序 500 个单克隆, 其中拼接的 426 条为有效基因, 38 条被组装成 26 个重叠群, 冗余率仅为 8.1%; 其中 257 个为已知基因, 插入片段均为全长, 占 60.3%; 143 个为未知基因, 占 33.6%。这说明 DSN 均一化处理能有效降低高丰度基因的频率, 提高低丰度基因的频率, 特别是一些稀有表达基因的频率, 这部分基因往往都是功能未知的基因, 如夜香树花香相关的转录因子 MYB, 蝴蝶兰 (*Phalaenopsis amabilis*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中已有报道^[16-17]; 生物钟相关的基因 CDF3 等, 为新基因的发现及其功能验证提供有力支持。

全长均一化 cDNA 文库质量受 RNA 质量、逆转录效率、LA-PCR 扩增效率、PCR 产物分级与回收

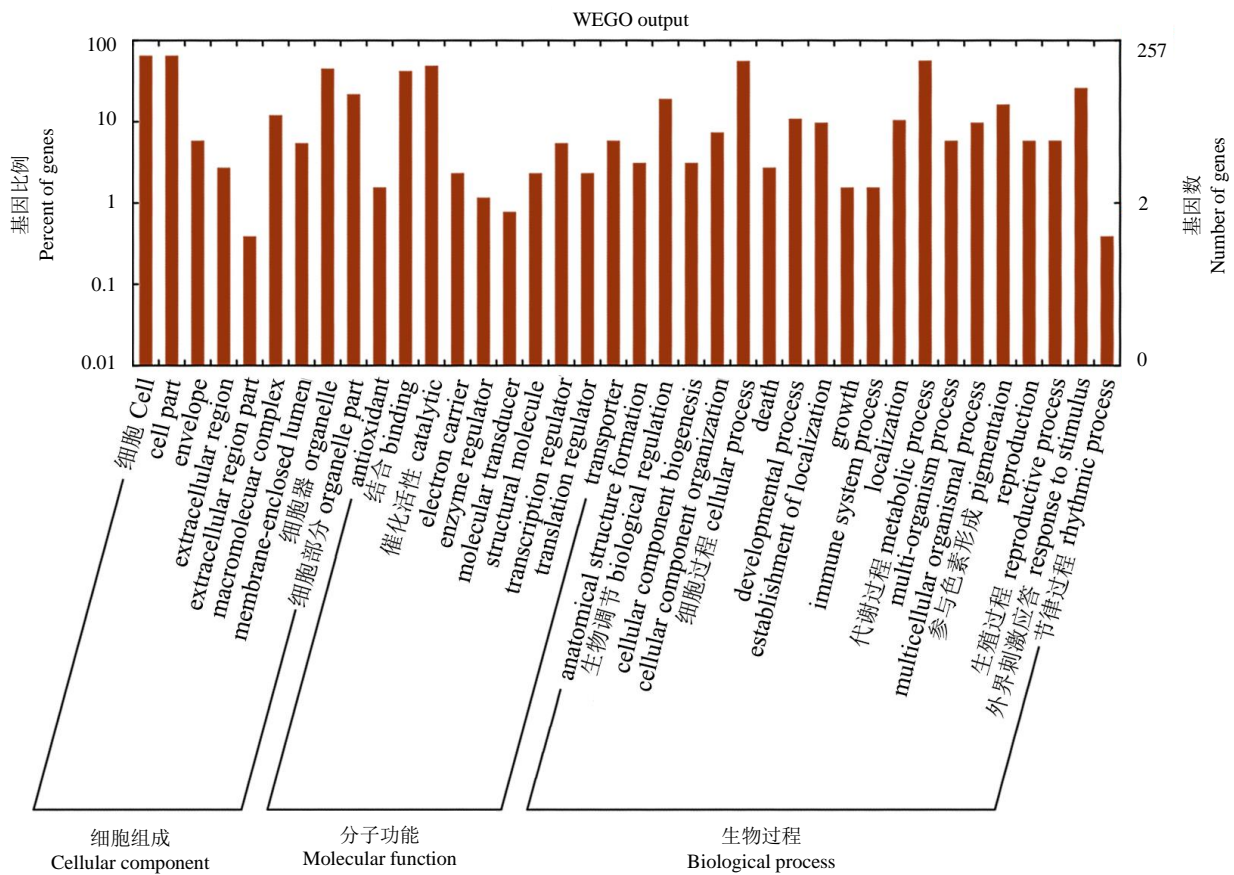


图7 Unigenes GO功能分类
Fig. 7 Gene ontology (GO) functional assignment for the unigenes

表 1 部分 EST 序列的功能注释及与 GenBank 中同源比对
Table 1 Function annotation of partial EST sequences and homologous comparison from GenBank

序号 No.	长度 (bp) Length	功能注释 Function annotation	同源性 Homology (%)	E
YLX-307	1244	1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	70	3.00E-91
YLX-43	1248	糖基转移酶家族蛋白 47 Glycosyltransferase family protein 47	68	3.00E-66
YLXIIC-M17	1173	谷氨酰半胱氨酸合成酶 γ -Glutamylcysteine synthetase	79	1.00E-121
YLX-427	1116	热休克蛋白 60 Heat shock protein 60	80	0
YLX-374	1208	赖氨酸-酮戊二酸还原酶/ Saccharopine 脱氢酶的双功能酶 Lysine-ketoglutarate reductase/Saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme	68	6.00E-37
YLXIC-D19	1031	MYB 家族转录因子 MYB family transcription factor	80	5.00E-62
YLX-38	1259	NAC2 转录因子 NAC2 transcription factor	69	2.00E-49
YLXIIC-M13	1190	钙调蛋白结合蛋白 Calmodulin-binding protein	72	1.00E-76
YLXIIC-G7	962	半胱氨酸型内肽酶 Cysteine-type endopeptidase	76	1.00E-88
YLX-93	1172	单车自由度因子 3, 转录因子 CDF3 (CYCLING DOF FACTOR 3)	77	3.00E-40
YLX-245	647	exocyst 家族蛋白亚基 ATEXO70A1 Exocyst subunit EXO70 family protein A1	78	2.00E-65
YLX-62	1220	苯甲酸合成酶 Anthranilate synthetase	72	2.00E-119
YLXIC-E1	1249	4-香豆酸辅酶 A 连接酶 4-Coumarate: Coenzyme A Ligase	76	1.00E-40
YLX-54	1231	拟南芥 NAC 结构域蛋白 42 <i>Arabidopsis</i> N-acetylcysteine regulatory domain protein 42	75	4.00E-52
YLX-253	1260	醛/酮还原酶家族蛋白 Aldo/Keto reductase family protein	71	4.00E-122

效率、DSN 酶处理、转化效率和重复率等因素的影响, 本试验均进行了改进。

总RNA质量的提升 夜香树花朵中多糖含量较高, 其理化性质与RNA相似, 提取时会和RNA共沉淀, 抑制多种酶活性^[18], 不利于后续试验。高盐法^[18]能有效去除多糖, 已成功用于侧柏(*Platycladus orientalis*)^[19]、葡萄风信子(*Muscari botryoides*)^[20]和玉米(*Zea mays*)^[21]胚乳等多糖植物和组织RNA的提取。本研究采用改进Trizol法, 在RNA异丙醇沉淀过程中加入5 mol L⁻¹ NaCl有效去除了多糖, 提取的RNA经紫外分光光度计检测, 纯度高、无污染, 能满足后续试验要求。

逆转录反应效率的提升 通过将逆转录引物进行改良, 提升了逆转录酶的识别效率; 反转录过程通过改良 SMART 技术, 使用两步法进行逆转录反应, 使得第一轮未反应完全的模板完成逆转录, 未达到帽子端的 cDNA 继续向帽子端延伸, 提升了全长 cDNA 的比率; Mn²⁺能提高末端转移酶的活性^[22], 第二轮逆转录反应中加入的 MnCl₂, 可以使逆转录酶作用效率更高; BSA 可以保护逆转录酶, 阻止一些物质与酶的作用, 从而保持酶的活性, 减少使用量^[23]。这一改进大大提高了全长 cDNA 第一链的比例。

LA-PCR扩增效率的提升 LA-PCR扩增片段的大小和扩增效率的高低主要取决于引物设计。Piao等^[13]和Dai等^[15]采用接头介导的LA-PCR法扩增长片段cDNA, 并从动力学角度分析引物长短和接头种类对PCR扩增片段大小的影响。Piao等^[13]报道, 在LL-SceI接头中, 长引物(SceI-L): 5'-GTC-ATCTATGTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATCC-3'只能扩增小片段; 短引物(SceI-S): 5'-GTCATCT-ATGTCGGGTG-3'只能扩增大片段; 在LL-Ceu I接头中, 长引物(Ceu I-L): 5'-GTGTAATCTATAACGGTCCTA-AGGTAGCGAC-3'和短引物(Ceu I-S): 5'-GTGTAACTATAACGGTCCTA-3'的扩增结果与LL-Sce I接头的扩增结果相同, 不过扩增片段小于LL-Sce I接头引物。Dai等^[14-15]采用相似的方法筛选接头引物, 认为P1 (5'-GTAATACGACTCACTATAGG-3')有利于长片段cDNA的扩增。但二者的研究都存在问题: Piao等所用的接头, 其酶切位点在植物基因中极少, 且两种酶的酶切效率低下; Dai所用的接头, 其酶切位点在植物基因中虽存在, 但会在克隆中损失部分基因, 接头与双链cDNA的连接效率低下, 大大影响文库构建的效率。Piao等^[13]更换了接头中

的酶切位点, 但扩增结果未变, 说明接头引物扩增效率与接头中的酶切位点无关。

本试验将Dai等的P1引物、Piao等的SceI-S (P2)、Sfi I A位点串联起来构成6次循环的5'端长引物; 将Dai等的P1引物、Piao等的SceI-S (P2)、Sfi I B位点、Oligo(dT)串联起来构成6次循环的3'端长引物; 通过LA-PCR扩增, 将接头序列引入双链cDNA两端, 克服了接头连接效率低下的问题; 最后利用Dai等^[15]的P1引物进行LA-PCR, 既有效扩增了长片段cDNA, 抑制了假阳性片段的扩增, 又保证了cDNA的扩增长度, 满足了定向克隆的需求, 使得cDNA全长序列的比例得到提高。

PCR产物的处理 通过琼脂糖凝胶电泳、凝胶回收, 可有效去除PCR产物中的酶、离子、dNTP, 控制cDNA片段的大小, 使获得的产物纯度更高; 通过半透膜回收能高效获得目的cDNA分子, 避免了使用试剂盒中葡聚糖柱分离造成的长片段cDNA分子损失问题, 提高了回收效果且保证了克隆效率。

均一化全长cDNA的获得 得到全长cDNA后, 通过先杂交后消化, 降解了双链cDNA, 增加了低丰度cDNA分子的比例, 使得高丰度和低丰度cDNA分子的比例降低, 从而使所有基因的频率都达到一个平均水平; 以DSN处理的产物为模板, 以Piao等^[13]的Sce I-S (P2)为引物, 通过抑制LA-PCR扩增长片段的cDNA分子, 确保扩增产物呈现均匀弥散且没有亮带。此外, 这样处理还避免测序中出现重复克隆。

转化效率的提升 研究表明, 连接产物中的T4 DNA连接酶、离子和其它有机化合物会显著降低电转化效率, 但具体原因还没有定论。包其郁等^[24]将pUC18质粒分别用水和1×T4 DNA连接酶缓冲液溶解, 然后进行电转化, 结果以水为溶剂的比以1×T4 DNA连接酶缓冲液为溶剂的转化效率要高10~100倍以上; 王福利等^[25]以未灭活的和灭活处理的连接产物分别进行电转化, 结果前者的转化效率为4.4×10⁶, 后者为4.8×10⁷, 相差10倍。因此推测, 连接产物中T4 DNA连接酶的活性是导致电转化效率低的主要原因。

本试验通过对连接产物进行脱盐处理、增加转化产物的培养体积等, 使得转化效率得到大幅提高。脱盐处理后, 电转化效率比未脱盐的提高了585倍之多; 使用选择性杂交膜在脱盐缓冲液中长时间透析, 有效去除连接产物中的离子和T4 DNA连接酶, 纯化了产物; 低温真空浓缩能够获得纯净的重组质

粒DNA分子, 大幅提高转化效率。此外, 本试验还采用15 mL离心管代替传统的1.5 mL离心管摇菌, 能够提供足够氧气, 促进已转化大肠杆菌的生长, 进而提高转化效率。

参考文献

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 67(1) [M]. Beijing: Science Press, 2005: 149–150.
中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第 67 卷第 1 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 149–150.
- [2] THANH T, CHI V T Q, ABDULLAH M P, et al. Construction of cDNA library and preliminary analysis of expressed sequence tags from green microalga *Ankistrodesmus convolutus* Corda [J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(1): 177–182. doi: 10.1007/s11033-010-0092-4.
- [3] RAVEH E, COHEN S, LEVANON D, et al. Dynamic expression of *Runx1* in skin affects hair structure [J]. Mech Dev, 2006, 123(11): 842–850. doi:10.1016/j.mod.2006.08.002.
- [4] TABATA S. Impact of genomics approaches on plant genetics and physiology [J]. J Plant Res, 2002, 115(4): 271–275. doi: 10.1007/s10265-002-0036-8.
- [5] JIANG C C, CHEN G X, PAN D M, et al. Construction and ESTs analysis of a normalized full-length cDNA library of brown *Prunus salicina* [J]. Chin J Trop Crops, 2013, 34(2): 292–296.
姜翠翠, 陈桂信, 潘东明, 等. 棕褐变果实均一化全长cDNA文库的构建及部分ESTs序列分析 [J]. 热带作物学报, 2013, 34(2): 292–296.
- [6] JIANG M, WANG J, WEN G S, et al. Construction and sequence analysis of a normalized full-length cDNA library of *Dendrobium officinale* [J]. Chin J Chin Mat Med, 2013, 38(4): 504–510. doi: 10.4268/cjcm20130408.
蒋敏, 王江, 文国松, 等. 铁皮石斛均一化全长cDNA文库的构建与序列分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 504–510. doi: 10.4268/cjcm20130408.
- [7] ZHANG D, LIU Y J, LI C J, et al. Construction of normalized cDNA library and analysis of corresponding EST sequences in *Picea wilsonii* [J]. Biotechn Bull, 2012(6): 71–76.
张盾, 刘亚静, 李长江, 等. 青杆均一化cDNA文库构建及EST序列分析 [J]. 生物技术通报, 2012(6): 71–76.
- [8] WANG Z, YIN X M, WANG J B, et al. Construction and characterization of normalized full-length cDNA library of banana roots [J]. Acta Hort Sin, 2011, 38(9): 1667–1674.
王卓, 殷晓敏, 王家保, 等. 香蕉根系均一化全长cDNA文库的构建和鉴定 [J]. 园艺学报, 2011, 38(9): 1667–1674.
- [9] FREGONEZI J N, FERNANDES T, TOREZAN J M D, et al. Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA [J]. Genet Mol Biol, 2006, 29(1): 97–104. doi: 10.1590/S1415-47572006000100019.
- [10] RASHEED K A. Improving an *in vitro* propagation protocol for *Cestrum nocturnum* L [J]. Acta Agrobot, 2013, 66(2): 35–44.
- [11] ZHAO S Y, HUANG Z H, YE H H, et al. Experimental study on K562 cell apoptosis induced by steroid saponins extracted from the flowers of *Cestrum nocturnum* Linn. [J]. Chin Trad Pat Med, 2013, 35(3): 445–449.
赵世元, 黄之虎, 叶海洪, 等. 夜香树花甾体皂苷诱导 K562 细胞凋亡机制研究 [J]. 中成药, 2013, 35(3): 445–449.
- [12] NONG Z X, ZHAO S Y, HUANG Z H, et al. Effects of nocturnoside B from *Cestrum nocturnum* on doxorubicin-induced myocardial injury in rats [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 2013, 19(18): 251–255. doi: 10.11653/syfy2013180251.
农智新, 赵世元, 黄之虎, 等. 夜香树提取物 nocturnoside B 对大鼠心肌损伤的保护作用及体外抗肿瘤作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 251–255. doi: 10.11653/syfy2013180251.
- [13] PIAOY L, KO N T, LIM M K, et al. Construction of long-transcript enriched cDNA libraries from submicrogram amounts of total RNAs by universal PCR amplification method [J]. Genome Res, 2001, 11(9): 1553–1558. doi: 10.1101/gr.185501.
- [14] DAI Z M, ZHU X J, CHEN Q, et al. PCR-suppression effect: Kinetic analysis and application to representative or long-molecule biased PCR-based amplification of complex samples [J]. J Biotechn, 2007, 128(3): 435–443. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.10.018.
- [15] DAI Z M, ZHU X J, YANG W J. Full-length normalization subtractive hybridization: A novel method for generating differentially expressed cDNAs [J]. Mol Biotechn, 2009, 43(3): 257–263. doi: 10.1007/s12033-009-9198-0.
- [16] ZHUANG Y Z. Study of MYB transcription factors involved in fragrance biosynthesis in *Phalaenopsis orchids* [D]. Taiwan: National Cheng Kung University, 1997: 9–15.
庄育祯. 参与蝴蝶兰香味合成之MYB转录因子研究 [D]. 台南: 台湾成功大学, 1997: 9–15.
- [17] BEN Z M M, NEGRE-ZAKHAROV F, MASCI T, et al. Interlinking showy traits: Co-engineering of scent and colour biosynthesis in flowers [J]. Plant Biotechn J, 2008, 6(4): 403–415. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00329.x.
- [18] FANG G, HAMMAR S, GRUMET R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA [J]. Biotechniques, 1992, 13(1): 52–54,56.
- [19] WANG S H, XU Q, XU X, et al. Extraction of total RNA from the

- leaves of *Platycladus orientalis* rich in polysaccharides and polyphenol [J]. *J Jilin Agri Univ*, 2012, 34(1): 76–80,89.
- 王暑辉, 徐倩, 徐筱, 等. 富含多糖多酚的侧柏叶片总RNA提取方法 [J]. *吉林农业大学学报*, 2012, 34(1): 76–80,89.
- [20] GUO C Y, WANG Y J, LIU Y L, et al. Research of total RNA extraction methods from polysaccharide-riched petals of common grape hyacinth [J]. *Acta Agri Boreali-Occid Sin*, 2007, 16(3): 188–191. doi: 10.3969/j.issn.1004–1389.2007.03.046.
- 郭翠英, 王跃进, 刘雅丽, 等. 富含多糖葡萄风信子花瓣总RNA提取方法研究 [J]. *西北农业学报*, 2007, 16(3): 188–191. doi: 10.3969/j.issn.1004–1389.2007.03.046.
- [21] ZHU J, WANG M, JIA Z W, et al. An effective method for extracting total RNA from young ears of maize [J]. *Chin Bull Bot*, 2007, 24(5): 624–628. doi: 10.3969/j.issn.1674–3466.2007.05.010.
- 朱昀, 王猛, 贾志伟, 等. 一种从富含多糖的玉米幼穗中提取RNA的方法 [J]. *植物学通报*, 2007, 24(5): 624–628. doi: 10.3969/j.issn.1674–3466.2007.05.010.
- [22] EL-DEIRY W S, DOWNEY K M, SO A G. Molecular mechanisms of manganese mutagenesis [J]. *PNAS*, 1984, 81(23): 7378–7382.
- [23] Kreader C A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or *T4* gene 32 protein [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(3): 1102–1106.
- [24] ZHANG X N, XIAO Y, HUANG Y, et al. Discussion on factors affecting electro transformation efficiency of *E. coli* [J]. *China J Mod Med*, 2008, 18(4): 466–468. doi: 10.3969/j.issn.1005–8982.2008.04.023.
- 张晓楠, 肖玉, 黄勇, 等. 影响大肠杆菌电转化效率因素的探讨 [J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(4): 466–468. doi: 10.3969/j.issn.1005–8982.2008.04.023.
- [25] WANG F L, ZHAO A Z, HAN Y H, et al. Effects of T4 DNA ligase on the electroporation [J]. *China J Mod Med*, 2011, 21(17): 1974–1976.
- 王福利, 赵爱志, 韩月恒, 等. T4 DNA 连接酶对电转化效率的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(17): 1974–1976.