

文章编号: 1004 - 7271(2008)05 - 0535 - 04

## 缺刻缘绿藻 cDNA 文库的构建

刘士成<sup>1</sup>, 杜道海<sup>1</sup>, 张成武<sup>2</sup>, 周志刚<sup>1</sup>

(1. 上海海洋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;  
2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

**摘 要:** 缺刻缘绿藻(*Myrmecea incisa*)富含花生四烯酸(arachidonic acid, AA), 是迄今为止所知道的花生四烯酸含量最高的藻类。采用 Trizol 法提取总 RNA, 然后按照 Clontech 公司的 SMART cDNA 文库构建的方法, 构建了缺刻缘绿藻的 cDNA 文库, 测得的原始文库滴度为  $6 \times 10^6$  pfu/mL, 随机挑选文库的阳性单克隆进行 PCR 鉴定, 扩增出的片段主要集中在 0.5 ~ 1.5 kb, 平均插入片段长度约为 1 kb, 文库的重组率达 95.83%, 说明本实验所构建的 cDNA 文库质量合格。

**关键词:** 缺刻缘绿藻; cDNA 文库; 花生四烯酸

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Construction of cDNA library of a green microalga, *Myrmecea incisa*

LIU Shi-cheng<sup>1</sup>, DU Dao-hai<sup>1</sup>, ZHANG Cheng-wu<sup>2</sup>, ZHOU Zhi-gang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;  
2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** The freshwater green microalga *Myrmecea incisa* was isolated from Mt. Tateyama, Japan. It is well-known by far that this microalga is the richest source of one polyunsaturated fatty acid (PUFA), arachidonic acid (20:4 $\omega$ 6, AA). Total RNA was isolated from this alga by Trizol method, and the cDNA library of *M. incisa* was constructed using SMART cDNA Library Construction Kit, Clontech, Inc. The titer of unamplified library reached  $6 \times 10^6$  pfu/mL, and the recombination rate was about 95.83%. PCR amplification of randomly selected positive clones illustrated the inserted cDNA fragments ranged from 0.5 kb to 1.5 kb, and the average length was about 1 kb. All these results suggested that the cDNA library was successfully constructed.

**Key words:** *Myrmecea incisa*; cDNA library; arachidonic acid (AA)

缺刻缘绿藻(*Myrmecea incisa*)是一种单细胞球形绿藻, 细胞常聚集一起形成类似非定型群体的细胞团。1996年, Watanabe等<sup>[1]</sup>自日本 Tateyama 高山雪地中发现并分离到该藻后, 根据其细胞超微结构等特性, 重新定名为 *Parietochloris incisa* (Reisigl) Watanabe comb. nov., 隶属于绿藻门、Trebouxiophyceae

收稿日期: 2008-03-06

基金项目: 上海市属高校自然科学研究项目(01H04); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 刘士成(1980-), 男, 山东莱芜人, 硕士研究生, 专业方向为藻类生物技术。E-mail: biomarinecheng@126.com

通讯作者: 周志刚, Tel: 021-65710533, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn。

纲。研究发现该藻能够大量合成积累具有较高利用价值的生物活性物质——花生四烯酸(arachidonic acid, 20:4 $\omega$ 6, AA)<sup>[2-5]</sup>, 在缺氮及高密度培养条件下, 该藻的 AA 含量甚至达到藻体干重的 20%<sup>[3,6]</sup>, 因此缺刻缘绿藻有望成为 AA 的新来源。微藻的多不饱和脂肪酸合成, 也是从乙酰-CoA 开始先合成软脂酸, 然后在脂肪酸去饱和酶和碳链延长酶的共同作用下, 形成多种多样的长链多不饱和脂肪酸<sup>[7]</sup>。由于脂肪酸去饱和酶的多样性及它们对底物的专一性不同, 从而引起多不饱和脂肪酸在不同的物种中存在着不同的合成途径, 主要有  $\omega$ 3、 $\omega$ 6 等途径。通过放射性标记研究发现 AA 在缺刻缘绿藻中主要是以  $\omega$ 6 途径合成的<sup>[8-10]</sup>。为了从分子水平上探讨 AA 在缺刻缘绿藻中的合成途径与机理, 我们利用 SMART cDNA 文库构建方法, 构建了缺刻缘绿藻的 cDNA 文库。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种

缺刻缘绿藻(*Myrmecea incisa*)由南京师范大学张成武博士馈赠, 本实验室保存与培养。

### 1.2 培养基与培养条件

缺刻缘绿藻接种于 BG-11 培养基<sup>[11]</sup>, 在温度为 22 ℃、光强为 140  $\mu\text{mol}/\text{m} \cdot \text{s}$  的光照培养箱中培养至指数生长期, 收集后分成 3 份。其中一份在上述条件下, 继续培养 2 周; 另一份在温度为 8 ℃而其它为一样的条件下培养 2 周; 第三份接种于缺氮的 BG-11 培养基, 而其它为一样的条件下培养 2 周。这样的预处理是为了使构建的 cDNA 文库包含足够大的信息量。然后收集样品充分混合, 放于液氮中保存备用。

### 1.3 主要试剂

SMART cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司, Trizol 试剂购自 invitrogen 公司, DL2000 Marker 购自 TaKaRa 公司, 其它试剂为进口或国产分析纯。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 总 RNA 提取及 mRNA 分离纯化

采用 Trizol 法抽提总 RNA: 取适量样品, 液氮研磨, 转入 Trizol 试剂中, 加入氯仿抽提, 离心取上清, 然后加入异丙醇离心, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 加适量无 RNA 酶水溶解 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定所抽提的 RNA 质量, 并用紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub>, 计算其浓度和纯度。

总 RNA 经过 Oligo(dT) 纤维素柱纯化后, 得到 mRNA。

#### 1.4.2 cDNA 文库的构建

用 LD-PCR(long distance polymerase chain reaction)法合成 cDNA 的第一链和第二链, 然后用 SfiI 酶切双链 cDNA 以形成大小不同的片段, 这些片段在 CHROMASPIN-400 中所受的阻力不同, 流出柱所用的时间不同。将酶切过的双链 cDNA 经过凝胶柱层析后, 回收琼脂糖凝胶电泳后的 cDNA 组分并合并, 然后用乙醇沉淀 cDNA 样品, 最后重溶于 ddH<sub>2</sub>O 中。

得到的双链 cDNA 片段和 SfiI 酶切过的载体连接, 然后将连接产物用噬菌体包装蛋白进行包装, 构建成 cDNA 文库, 4 ℃ 保存。

### 1.5 cDNA 文库质量鉴定

#### 1.5.1 滴度测定

未扩增 cDNA 用 1  $\times$  噬菌体缓冲液按照 1:10 的比例稀释, 加入 200  $\mu\text{L}$  的 XL1-Blue 受体菌, 37 ℃ 吸附 15 min, 然后加入 2 mL 的 LB/MgSO<sub>4</sub> 顶层琼脂, 快速颠倒混匀并立即倒入到预热至 37 ℃ 的 LB 琼脂平板上, 快速摇动平板使顶层琼脂分布均匀, 然后 37 ℃ 倒置培养, 每隔 2 h 检查噬菌斑生长情况。按照以下公式计算滴度:

$$\text{文库滴度 (pfu/mL)} = \frac{\text{噬菌斑数} \times \text{稀释倍数} \times 10^3}{\text{受体菌体积}}$$

### 1.5.2 文库重组率的测定

文库的重组率按照以下公式计算:

$$\text{重组子百分比(重组率, \%)} = (\text{白色菌斑数} / \text{总的菌斑数}) \times 100$$

### 1.5.3 cDNA 文库重组克隆插入片段的大小测定

随机挑选文库的阳性单克隆进行 PCR 鉴定,引物为 TriplEx 5' LD-Insert Screening Amplimer 和 TriplEx 3' LD-Insert Screening Amplimer。反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 RNA 及 mRNA 的质量

提取缺刻缘绿藻总 RNA,并且测定它们的  $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.89,通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),显示 RNA 带型完整,纯度也符合 cDNA 文库构建的要求。

藻类的 RNA 很容易受多糖的污染,所以 mRNA 需经分离纯化,才能进行下一步的实验。总 RNA 经过 Oligo(dT)纤维素柱纯化后,得到 mRNA。取 200 ng 纯化后的 mRNA 反转录第一链,然后用 RNA 酶消化,经甲醛变性电泳检测,条带在 900 bp 以上范围内呈弥散性分布(图 2),无降解现象。mRNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值为 2.1,说明 mRNA 的质量完全符合逆转录要求。

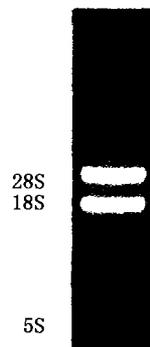


图 1 缺刻缘绿藻总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from *Myrmecia incisa* Lanes

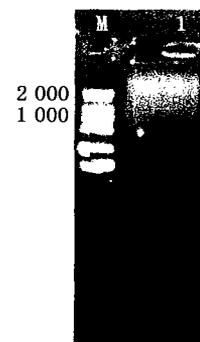


图 2 mRNA 反转录 cDNA 第一链电泳图  
Fig.2 Electrophoresis pattern of the first-strand cDNA by reverse transcription-PCR

### 2.2 双链 cDNA 的合成、纯化及浓度测定

合成的双链 cDNA 用 *Sfi*I 酶切,然后经过凝胶柱层析,共得到 16 管片段大小不同的双链 cDNA。经琼脂糖凝胶电泳后(图 3),将跑在溴酚蓝指示剂后的组分,即第 5~11 管 cDNA(一般来说,此间的 cDNA 片段长度大于 400 bp)收集合并,用无水乙醇沉淀 cDNA 样品,最后重溶于 7  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中。一般认为,建库所需的 cDNA 量应大于 100 ng。经 FR-200 紫外可见分析,取 0.5  $\mu$ L 样品与对照 cDNA 比较,样品 cDNA 浓度介于对照 DNA 25 ng/ $\mu$ L 和 50 ng/ $\mu$ L 之间(图 4)。若以 25 ng/ $\mu$ L 计算,共得到 cDNA 大约 160 ng 左右,因此样品 cDNA 的量完全符合建库的要求。



图 3 双链 cDNA 电泳图  
Fig.3 Electrophoresis pattern of the double-strand cDNA

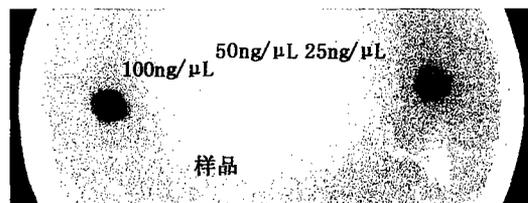


图 4 cDNA 纯化后的浓度检测  
Fig.4 Detection of the purified cDNA concentration

### 2.3 文库质量鉴定

测得的原始文库滴度为  $6 \times 10^6$  pfu/mL, 利用噬菌斑数推算出文库的重组率达 95.83%。随机挑选文库的阳性单克隆进行 PCR 鉴定, 扩增出的片段主要集中在 0.5 ~ 1.5 kb, 平均插入片段长度约为 1 kb (图 5)。

文库的滴度、重组率及插入片段的大小是鉴定 cDNA 文库质量的重要指标。一般来说, 文库的滴度达到  $10^5$  pfu/mL 以上, 重组率达到 80% 就说明所构建的文库质量是合格的<sup>[12]</sup>, 即为有效的文库。我们构建的缺刻缘绿藻 cDNA 文库滴度为  $6 \times 10^6$  pfu/mL, 文库的重组率为 95.83%, 完全符合这一要求。随机挑选文库的阳性单克隆进行 PCR 鉴定, 扩增出的片段主要集中在 0.5 ~ 1.5 kb, 平均插入片段长度约为 1 kb。说明所构建的缺刻缘绿藻的 cDNA 文库是完整的、有效的、高质量的, 为今后在分子水平研究 AA 的合成机理奠定了基础。



图 5 cDNA 插入片段的 PCR 产物电泳结果  
Fig. 5 Electrophoresis pattern of amplified products of insert cDNA by bacterial colony PCR

### 参考文献:

- [1] Watanabe S, Hirabayashi S, Boussiba S, *et al.* *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. *Phycol Res*, 1996, 44: 107 - 108.
- [2] 蒋汉明, 高坤山. 氮源及其浓度对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响[J]. *水生生物学报*, 2004, 28(2): 545 - 551.
- [3] Khozin G I, Bigogno C, Shrestha P, *et al.* Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae) [J]. *J Phycol*, 2002, 38: 991 - 994.
- [4] Khozin G I, Cohen Z, Pimenta L, *et al.* Feeding with arachidonic acid-rich triacylglycerols from the microalga *Parietochloris incisa* improved recovery of guppies from infection with *Tetrahyena* sp. [J]. *Aquaculture*, 2006, 255: 142 - 150.
- [5] Cheng W Z, Cohen Z, Khozin G W, *et al.* Characterization of growth and arachidonic acid production of *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). [J]. *J Appl Phycol*, 2002, 14: 453 - 460.
- [6] Bigogno C, Khozin G I, Cohen Z. Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae, chlorophyta) [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60: 135 - 143.
- [7] 魏东, 张学成. 微藻脂肪酸去饱和酶及其基因表达的生态调控研究新进展. [J]. *海洋科学*, 2000, 24(8): 42 - 46.
- [8] Bigogno C, Khozin G I, Boussiba S, *et al.* Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60: 497 - 503.
- [9] Khozin G I, Shrestha P, Cohen Z. Mobilization of arachidonoyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa* [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2005, 1738: 63 - 71.
- [10] Bigogno C, Khozin G I, Adlerstein D, *et al.* Biosynthesis of arachidonic acid in the oleaginous microalga *Parietochloris incisa* (Chlorophyceae): Radiolabeling studies [J]. *Lipids*, 2002, 37: 209 - 216.
- [11] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria [J]. *J Gen Microbiol*, 1979, 111: 1 - 61.
- [12] 王昆, 王颖, 鲍永利, 等. 人参叶 cDNA 文库构建中的问题与对策 [J]. *人参研究*, 2005, 17(4): 2 - 4.