中华蜜蜂工蜂 cDNA 文库的构建及 ESTs 测序分析*

张卫星** 郗学鹏 秦 明 王 帅
刘春蕾 王红芳 胥保华***
（山东农业大学动物科技学院，泰安 271000）

摘 要 **【目的】**为了解中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 工蜂的抗逆性，构建了中华蜜蜂工蜂的 cDNA 文库，并对文库质量进行分析。**【方法】** 本研究利用 SMART 技术构建了中华蜜蜂工蜂的全长 cDNA 文库。**【结果】**文库库容为 3.6×10^6 cfu/mL，文库重组率为 97%，插入片段长度多数分布在 1 000 bp 左右。挑取 cDNA 克隆进行 EST 测序，共进行了 306 个成功反应，软件拼接共得到 234 个单基因簇（Unigene），其中包括 207 个单拷贝（Singletons）序列及 27 个重叠群（Contigs）。使用 Blastx 将这些序列同 GenBank 等数据库进行查询、比对和注释，结果显示 141 条序列有相关同源性,其他序列没有明显的同源性，这也为我们发现新功能基因提供了可靠依据。**【结论】** 此文库的构建在中华蜜蜂功能基因的分离、克隆、筛选以及基因功能研究等方面具有重要作用。

关键词 中华蜜蜂，cDNA 文库，SMART 技术，ESTs 测序

Construction of cDNA libraries and ESTs sequencing of *Apis cerana cerana* workers

ZHANG Wei-Xing** CHI Xue-Peng QIN Ming WANG Shuai
LIU Chun-Lei WANG Hong-Fang XU Bao-Hua***
(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271000, China)

Abstract **[Objectives]** To build a cDNA library to improve understanding of how honey bee workers respond to adverse conditions and analyze the quality of the resultant library. **[Methods]** A cDNA library of *Apis cerana cerana* was constructed using the SMART technique. **[Results]** The library's capacity was 3.6×10^6 cfu/mL, the recombination rate was 97% and the average length of inserts was approximately 1 000 bp. 306 ESTs were generated by ESTs sequencing. Additionally, 234 non-repetitive sequences were formed, including 207 singletons and 27 contigs after initial assembly. Using Blastx to query, compare and annotate these sequences with those in GenBank, revealed that 141 sequences could be assigned putative functions because they were homologous to known genes. Other sequences had no obvious homology, which suggests there is potential for the discovery of new functional genes. **[Conclusion]** The construction of a cDNA library has important benefits for cloning, screening and gene function research in *Apis cerana cerana*.

Key words *Apis cerana cerana*, cDNA libraries, SMART technique, ESTs sequencing

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是东方蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius 属下最主要的亚种，简称中蜂，是我国特有的蜜蜂种质资源，饲养历史悠久，具有重要的经济价值和社会效益。与意大利蜜蜂

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（No. 31572470）；山东省农业良种工程项目“优质高产蜜蜂及蚕桑新品种培育（2014-2016）”

**第一作者 First author，E-mail：zhwx0313@sina.com
***通讯作者 Corresponding author，E-mail：bhxu@sdau.edu.cn

收稿日期 Received：2015-10-12，接受日期 Accepted：2016-02-19

Apis mellifera ligustica 相比，中华蜜蜂嗅觉灵敏善于搜集零星蜜源，抗病能力强，尤其是对西方蜜蜂危害严重的美洲幼虫腐臭病，并且具有抗寒耐热等较强的抗逆境能力（Li *et al.*，2005；苏松坤等，2005）。蜜蜂作为授粉昆虫，其授粉量约占授粉昆虫总数的 80%，无论是人工饲养还是野生存在，都为作物授粉发挥着巨大作用（Ollerton *et al.*，2011；Gill *et al.*，2012；Garibaldi *et al.*，2013）。中华蜜蜂强大的抗逆境能力，在我国一些地形复杂、气候异常、低温潮湿等恶劣环境下植物的授粉发挥着重要作用。

目前，国内外对蜜蜂分子遗传及基因结构水平上的研究鲜见报道，尤其是其在全球气候条件恶劣变化下的分子遗传水平响应研究更为鲜见。因此，本研究利用 SMART（Switching mechanism at 5′ end of the RNA transcript）技术，成功构建了中华蜜蜂工蜂全长 cDNA 文库，旨在为进一步筛选和克隆与抗逆境相关的基因以及为功能基因组学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

本试验所用的中华蜜蜂取自山东农业大学试验蜂场。在巢脾上取新出房的工蜂，迅速放于液氮中冷冻后保存于－80℃超低温冰箱中待用。载体 pUC19 购自 Promega，SMART^{TM} cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech，QIAquick PCR Purification Kit 购自 Qiagen，Advantage 2 Polymerase Mix 购自 Clontech。RNA 提取试剂（TRIzol Reargent）购自 Invitrogen，DL2000 Marker 购自 TaKaRa 试剂公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 按照 TRIzol 试剂盒使用说明书的步骤提取蜜蜂总 RNA。DNaseI 用于消除总 RNA 中可能含有的微量基因组 DNA，用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度及 OD 值。取 5 μL RNA 加上上样缓冲液，用 1%的普通琼脂糖凝胶电泳检测提取总 RNA 的质量及完整性。

1.2.2 双链 cDNA 的合成及纯化 取 1 μL（约 1 μg）总 RNA，在逆转录酶作用下反转录出 cDNA 第一链。取 2 μL 第一链产物进行 LD-PCR，合成双链 cDNA。每 50 μL 扩增的双链 cDNA 中加入 2 μL 蛋白酶 K 消化（20 μg/μL）。纯化回收 cDNA 后，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测双链 cDNA，双链 cDNA 成弥散状条带，长度主要集中在 250～4 000 bp，表明合成的双链 cDNA 较完整，质量较好，符合构建 cDNA 文库的要求（Sambrook *et al.*，1996）。

1.2.3 cDNA 与载体的重组及质粒的转化 参照 SMART^{TM} cDNA Library Construction Kit 试剂盒说明书，用 T4 DNA 连接酶将纯化的 ds cDNA 与 pUC19（50 ng/mL）载体于 4℃连接过夜。

取 200 μL 超级感受态宿主菌（DH-5α），放置冰上融化；加入上述 1 μL 连接液，轻轻混匀后冰浴 30 min；42℃水浴 90 s，迅速放入冰上，冰浴 2 min；加入 300 μL SOC 培养基（不含抗生素），置于 37℃摇床，转速 200 r/min，复苏 45 min。

1.2.4 文库库容和重组率测定 共转化产物涂布于 150 mm 培养皿上（Apr-IPTG/x-gal LB 固体培养基），37℃恒温培养箱过夜。对生长的单菌落进行计数，计算文库库量。随机挑取 24 个单菌落于 37°C，200 r/min 培养过夜，取 1 μL 菌液作为 PCR 模板，进行菌液 PCR，取 5 μL PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析插入片段大小。并用 M13F 和 M13R 通用测序引物对菌液进行测序（Sambrook *et al.*，2000；徐丽和蔡俊鹏，2004），通过蓝白斑的数量计算文库重组率（Sambrook *et al.*，1989）。菌液 PCR 反应参数：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，68℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，共 36 个循环；最后 72℃延伸 5 min。

1.2.5 文库扩增与保存 参照 Sambrook 等（1996）的方法，取 1 μL 初级文库加入 200 μL XL- Blue 菌株过夜悬浮培养液中，并于 37℃恒温培养箱中培养后涂布于 45℃保温的 LB/MgSO4 顶层培养基上，37℃培养，待长出噬菌斑后（8～10 h），取 10 mL 噬菌体缓冲液加入平板中，4℃静置 16 h 后洗脱噬菌体，收集所有噬菌体缓冲液。4℃，2 800×g 离心 5 min 除去细胞碎片，得到扩增文库。将 7%的 DMSO 加入扩增后的文库中，混合均匀，

分装成 1 mL 的小份于 1.5 mL 的 EP 管中，置于－70℃长期保存。

2　结果与分析

2.1　总 RNA 的质量

琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性（图 1）。由图 1 可知，蜜蜂只有 28S rRNA 和 18S rRNA 两条带，点样孔周围无污染，且条带清晰完整，亮度均匀，比例约为 1∶2。紫外分光光度计测定总 RNA 质量浓度为 7.69 g/L，测定其 D_{260}nm/D_{280}nm 为 1.92，D_{260}nm/D_{230}nm 为 2.4。上述结果表明，所提总 RNA 纯度及完整性非常好，蛋白质及盐类等污染较小，质量浓度达到反转录所需 RNA 浓度，符合构建 cDNA 文库的要求。

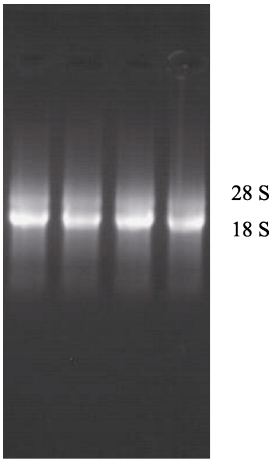

图 1　RNA 的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1　RNA agarose gel electrophoresis

2.2　双链 cDNA 的琼脂糖凝胶电泳

取 5 μL 纯化的双链 cDNA 进行 1%琼脂糖凝胶电泳。纯化的双链 cDNA 大小介于 300～4 000 bp 之间，而且在接近 1 000 bp 区域条带呈瀑布状分布，表明双链 cDNA 的分布较为完整，丰度较好，（图２）。

2.3　文库库容与多态性分析

在 Apr-IPTG/x-gal LB 固体培养基（图 3）上随机挑取 24 个阳性克隆至 1.5 mL 装有 LB 液体培养基的离心管中，在 37℃摇床上培养 2~3 h，取 1 μL 菌液做为 PCR 模板，从各管中分别取 5 μL 产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳，结果显示文库插入片段大小为 250~2 000 bp，平均插入片段长度约为 1 000 bp（图 4）。菌液送至上海生工生物工程有限公司测序。将测序结果与数据库 GenBank 中登录的基因进行同源比对和功能预测分析。

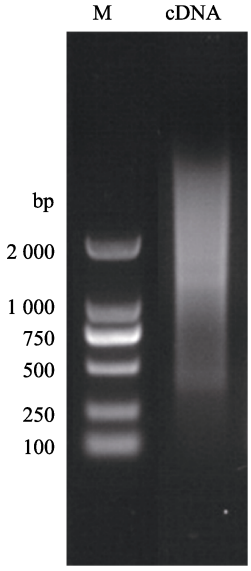

图 2　cDNA 的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 2　cDNA agarose gel electrophoresis

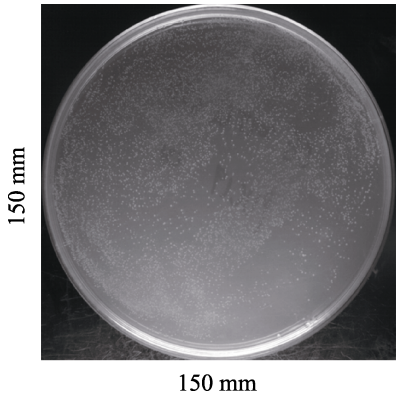

图 3　Apr-IPTG/x-gal LB 固体培养基
Fig. 3　LB solid medium of Apr-IPTG/x-gal

2.4　EST 测序结果分析

从 cDNA 文库中随机挑取 312 个阳性克隆进行测序，去除载体序列、短序列和低质量序列后共获得有效序列 306 条，有效序列大小在 381～1 933 bp 之间(图 5)，其中包括 27 个重叠群（Contigs），207 个独立基因（Singletons），共组

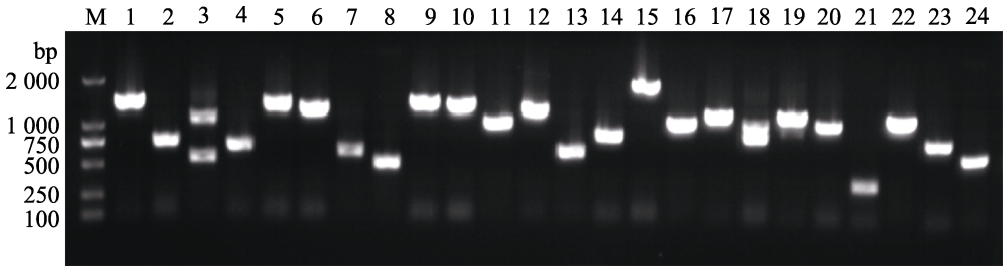

图 4　中华蜜蜂 cDNA 文库插入片段的 PCR 检测

Fig. 4　PCR analysis of the recombinant clones the cDNA library

M: DL 2000 marker；1~24：随机选取的 24 个 cDNA 克隆。

M: Marker DL 2000；1-24: Randomly selected cDNA clones.

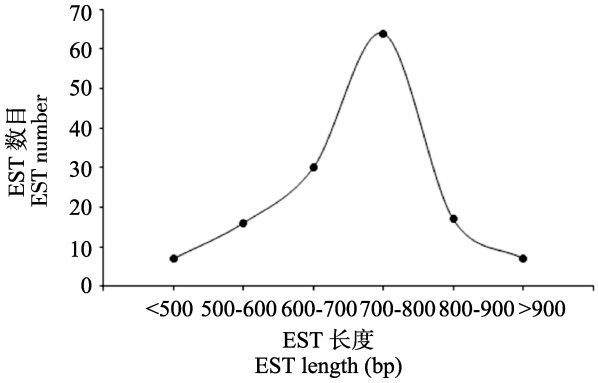

图 5　ESTs 序列长度分布

Fig. 5　The distribution of ESTs length

成 234 个 unigene。234 个 unigene 采用 Blastx 程序在 NCBI 的 nr 数据库中进行搜索，141 个 unigene 可以寻找到同源序列，同源序列大多数来自现有数据库的意大利蜜蜂、火蚁属（*Solenopsis*）、弓背蚁属（*Camponotus*）、熊蜂属（*Bombus*）、金小蜂属（*Nasonia*）以及其他属如果蝇属（*Drosophila*）和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等（图 6）。上述结果表明在现有的数据库中这些物种在进化关系上与中华蜜蜂有同源性，如意大利蜜蜂在数据库中的信息量较多，约有 59.6%来自于此，也说明中华蜜蜂与意大利蜜蜂的同源性较高。141 个 unigene 中有 106 个（45.3%）unigene 成功进行 GO 功能分类注释，值得感兴趣的是有 93 条（39.7%）unigene 序列在数据库中没找到任何匹配序列。结合数据库中大量的 ESTs 和基因组序列，推测这些无匹配序列很可能与中华蜜蜂特有

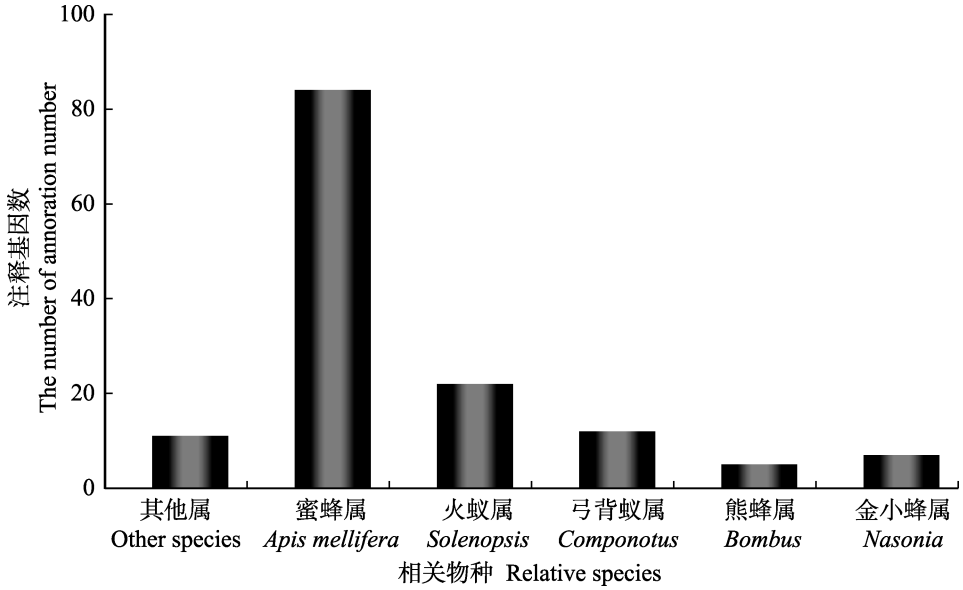

图 6　UniGene 同源序列的来源统计

Fig. 6　Statistics of homologous sequence

的抗逆性基因相关。对这些新基因的功能分析和调控机理的研究可能会有助于我们了解中华蜜蜂在抵抗恶劣环境的过程中鲜为人知的细节。

对 234 个 unigene 做 GO (Gene ontology) 分类，可归属于生物学过程 (Biological processs)、细胞组分 (Cellular component) 和分子功能 (Molecular function) 三个大类，87 个 unigene 在 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 中的分类结果如图 7。所测序列绝大部分与营养物质代谢、生理过程、酶活性有关，少数与信号传导等功能相关。

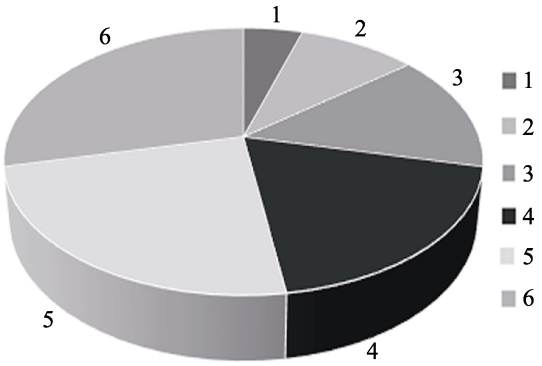

图 7　ESTs 依照功能分类

Fig. 7　Distribution of ESTs by functional classes

1：2 条与核苷酸代谢相关 (2.3%)；2：4 条与氨基酸代谢相关 (4.6%)；3：7 条与细胞信号转导相关 (8%)；4：20 条与糖类代谢相关 (23%)；5：22 条与氧化磷酸化相关 (25.3%)；6：32 条与细胞结构与运动相关 (36.8%)。

1: 2 for nucleotide metabolism (2.3%); 2: 4 for amino acid metabolism (4.6%); 3: 7 for cell receproр signaling pathway (8%); 4: 20 for sugar metabolism (23%); 5: 22 for Oxidative phosphorylation (25%); 6: 32 for cell structure and motility (36.8%).

3　讨论

SMART 技术构建 cDNA 文库，其基本原理是利用 PowerScript 逆转录酶内源的末端转移酶活性来得到全长 cDNA，可以直接利用总 RNA 来合成 cDNA (Chenchik *et al.*，1998)，并且起始材料用量较少，只需要 50~1 000 ng 总 RNA 就可以得到高品质的 cDNA 文库，对于稀有材料而言具有较高的应用价值 (毛新国等，2006；刘卫辉和窦科峰，2008)，步骤少，操作简单，不再需要额外的酶反应。另外，该技术在双链 cDNA 引物 5′端引入了 *Sfi* I A 和 *Sfi* I B 位点，因此只需对目的 cDNA 片段进行单酶切，就可以定向插入特定的载体中 (王家保等，2009)。cDNA 通过纯化后，保证了大片段 cDNA 的富集，还减少了后期筛选的工作量 (Wellenreu *et al.*，2006)。最后，该技术建库的操作方法简单可行，且每一步结果都可以通过琼脂糖凝胶电泳检测，便于及时发现和解决问题。

高质量的 RNA 是构建 cDNA 文库的基础和前提。本试验总 RNA 质量浓度为 7.69 mg/L，$OD_{260}nm/_{280}nm$ 为 1.92，说明总 RNA 质量浓度、纯度均满足构建文库的要求。纯化后的 ds cDNA 片段大小介于 250～4 000 bp 之间，1 000 bp 左右区域呈瀑布状分布的条带，表明双链 cDNA 的丰度较高，可用于 cDNA 文库的构建。cDNA 文库的库容量，重组率及插入片段的大小是衡量文库是否合格的重要指标 (晏慧君等，2002；赵亚华，2004)。为了可以筛选到低丰度的 mRNA，一般的库容量要求不低于 1×10^6 cfu/mL (卢圣栋，2001)。由结果可知我们构建的中华蜜蜂工蜂的 cDNA 文库库容为 3.6×10^6 cfu/mL，文库重组率为 97%，插入片段长度介于 400～2 000 bp 之间，主要集中在 1 000 bp 左右。这些结果表明我们成功地构建了中华蜜蜂工蜂的 cDNA 文库，为下一步从文库中筛选新的功能基因奠定了基础。

后期的工作主要是对 EST 序列进行生物信息学分析，预测与基因组信息相关的核酸、蛋白质的空间结构及其功能，这是功能基因组研究不可缺少的部分 (Maeda *et al.*，1997；Ryo *et al.*，1998)；重要功能基因的克隆，利用 RACE (Rapid-amplification of cDNA ends，RACE) 技术克隆参与中华蜜蜂抗逆性相关的重要功能基因的全长 cDNA 或全基因；应用 RNA 干扰 (RNA interference，RNAi) 技术分析验证基因功能 (Fire *et al.*，1998；Tamura *et al.*，2000)。

参考文献 (References)

Chenchik A, Zhu YY, Dlatchenkd L, 1998. Generation and use of high-quality cDNA from small amout of total RNA by SMAR

TPCR//Sieber PD, Larrick JW (eds.). RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis. Natick, MA: Eaton Publishing. 305–319.

Fire A, Xu AQ, Montgomery MK, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806–811.

Garibaldi LA, Steffan-Dewenter I, Winfree R, Aizen MA, Bommarco R, 2013. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, 339(6127): 1608–1611.

Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE, 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422): 105–108.

Li JH, Zhang CX, Shen LR, Tang ZH, Cheng JA, 2005. Expression and regulation of phospholipase A2 in venom gland of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. A*rchives of Insect Biochemistry and Physiology*, 60 (1): 1–12.

Liu WH, Dou KF, 2008. Development of SMART technology and its application. *China Biotechnology*, 28(6): 129–132. [刘卫辉, 窦科峰, 2008. SMART 技术及其应用进展. 中国生物工程杂志, 28(6): 129–132.]

Lu SHD, 2001. Modern Molecular Biological Techniques. Peking Union Medical College Press, 2ed. 319. [卢圣栋, 2001. 现代分子生物学实验技术. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社. 319.]

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, 1997. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*, 190: 227–235.

Mao XG, Jing XL, Kong XY, 2006. Comparison of methods to construct a full-length cdna library. *Hereditas*, 28 (7): 865–873. [毛新国, 景蕊莲, 孔秀英, 2006. 几种全长 cDNA 文库构建方法比较. 遗传, 28(7): 865–873.]

Ollerton J, Winfree R, Tarrant S, 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Wiley Online Library*, 120 (3): 321–326.

Ryo A, Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Yamamoto N, Yamamoto M, 1998. Amethod foranalyzing the qualitative and quantitative aspectsofgene expression: a transcriptional profilerevealed forhela cells. *Nucleic Acids Research*, 26 (11): 2586–2592.

Sambrook J, Frish EF, Maniatis T, 1989. A Laboratory Manual. 2ed. Molecular Cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1231.

Sambrook J, Frish EF, Maniatis T, 1996. Molecular Cloning. 2ed. Beijing: Science Press.399–448.[Sambrook J, Frish E F, Maniatis T, 1996. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社. 399–448.]

Sambrook J, Russell DW, 2000. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 95–96.

Su SK, Chen SL, Zhong BX, Zheng HQ, 2005. Cloning and Sequence Analysis of Cdna Encoding *mrjp3* of *Apis cerana cerana. Scientia Agricultura Sinica*, 38 (3): 612–618. [苏松坤, 陈盛禄, 钟伯雄, 郑火青, 2005. 中华蜜蜂 mrjp3 基因 cDNA 的克隆及序列分析. 中国农业科学, 38 (3): 612–618.]

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Kômoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC , Couble P, 2000. Germline transformation of the silk-worm *Bombyx mori* using a piggyBac transposon- derived vector. *Nat. Biotechnol*., 18 (1):81–84.

Wang JB, Xu BY, Jin ZQ, Feng C, 2009. Constructing cDNA library of litchi pericarp using SMART technology. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 30 (8): 1109–1112. [王家保, 徐碧玉, 金志强, 冯超, 2009. 利用 SMART 技术构建荔枝果皮 cDNA 文库. 热带作物学报, 30 (8): 1109–1112.]

Wellenreu TR, Schupp I, Poustk AA, 2004. The Germ an cDNA Consortum1 SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones1 BMC. *Genomics*, 5(36): 1–8.

Xu L, Cai JP, 2004. Establishment of colony pcr method and its comparison with conventional PCR method. *Journal of South China University of Technology* (*Natural Science Edition*), 32(5); 51–55. [徐丽, 蔡俊鹏, 2004. 菌落 PCR 方法的建立及其与常规 PCR 方法的比较. 华南理工大学学报: 自然科学, 32(5): 51–55.]

Yan HJ, Huang XQ, Cheng ZQ, 2002. Advances of the studies on construction strategy and analysis of cDNA library. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 21 (1): 1–6. [晏慧君, 黄兴奇, 程在全, 2002. cDNA 文库构建策略及其分析研究进展. 云南农大学报, 21 (1): 1–6.]

Zhao YH, 2004. Molecular Biology Tutorial. Beijing: Academic Press. 22–25. [赵亚华, 2004. 分子生物学教程. 北京:科学出版社. 22–25.]