



葱蝇冬滞育蛹的全长 cDNA 文库的构建*

黎万顺 冯国忠 陈斌** 何正波

(昆虫与分子生物学研究所 重庆高校生物活性物质工程研究中心 重庆高校动物生物学重点实验室 重庆 400047)

Construction of full-length cDNA library of winter-diapause pupae of the onion maggot, *Delia antiqua*.

LI Wan-Shun, FENG Guo-Zhong, CHEN Bin**, HE Zheng-Bo (Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract The onion maggot, *Delia antiqua* (Meigen), is characterized by winter-diapause and is close to *Drosophila melanogaster* in phelogenetics. This study aims to construct full-length cDNA library of winter-diapause pupae of *D. antiqua*, in order to provide a base for further screening, cloning and expression analysis of winter-diapause-specific genes. In this study, total RNA was extracted from winter-diapause pupae of *D. antiqua* using RNAiso kit. Double-stranded cDNAs were synthesized with SMART technique and digested by the enzyme *Sfi*I, and then the cDNAs were ligated into the vector pDNR-LIB. The ligation mixture was transformed into *E. coli* DH10B by eletroporation. According to the evaluation on quality, the titer of primary library was 2.4×10^7 cfu/mL. The results from random sampling of 15 clones showed that the inserted fragments ranged from 0.5 kb to 3 kb by PCR amplification, with an average size of 1 kb, and the recombination rate was 100%. These results showed that a full-length cDNA library with high quality on *D. antiqua* winter-diapause pupae was well constructed.

Key words *Delia antiqua*, winter-diapause pupae, full-length cDNA library, SMART technique

摘要 葱蝇 *Delia antiqua* (Meigen) 具有冬滞育的特性且与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 近缘。该研究目的在于构建葱蝇冬滞育蛹的全长 cDNA 文库,为进一步的冬滞育专化基因筛选、克隆、和表达分析奠定基础。利用 RNAiso 试剂盒提取葱蝇冬滞育蛹的总 RNA,采用 SMART 技术合成全长 cDNA 经 *Sfi*I 酶切消化后,将 cDNA 克隆到质粒载体 pDNR-LIB。经鉴定,原始文库的滴度为 2.4×10^7 cfu/mL。随机挑取 15 个克隆,经 PCR 快速鉴定,插入片段大小在 0.5~3 kb 之间,平均大小在 1 kb 左右,重组率达 100%。结果表明该研究获得高质量的葱蝇冬滞育蛹 cDNA 文库。

关键词 葱蝇,冬滞育蛹,全长 cDNA 文库,SMART 技术

滞育是昆虫及其近缘节肢动物在特定发育期发育停滞、不食不动、新陈代谢降低的一个生理现象。通过滞育昆虫克服超常低温、高温和干旱气候,以度过不良环境,保持种群同步发育,增大雌雄个体间的交配机率,利用季节性的资源^[1]。滞育可以发生在昆虫生命过程中的任何一个阶段,根据滞育所发生的虫态,可将其分为 4 种类型:卵滞育、幼虫滞育、蛹滞育和成虫滞育^[2]。葱蝇 *Delia antiqua* (Meigen) 属蛹滞

育。

构建全长 cDNA 文库是研究功能基因组学的基本手段之一。cDNA 文库便于克隆和大量表达,直接筛选到所需目的基因,并用于该目的

* 国家自然科学基金 (No. 30870340),重庆市自然科学基金 (No. CSTC2008BB1365) 资助和重庆市自然科学基金重点项目 (No. CSTC2008BA5030)。

**通讯作者, E-mail: c_bin@hotmail.com

收稿日期 2009-08-22, 修回日期 2009-10-09

基因的表达。另外,全长 cDNA 文库构建有助于鉴定基因组序列中外显子和内含子的边界,分析基因编码区以及基因转录和翻译的水平。例如:Chen^[3]等人构建卤虫 *Artemia franciscana* 滞育后期的 cDNA 文库,通过基因克隆进行比较基因组学的研究;Yoshiga^[4]等人通过构建家蚕 *Bombyx mori* 的 cDNA 文库,克隆出乙酰辅酶 A 脱氢酶的基因。

葱蝇是一种全球性地下害虫,它广泛分布于亚洲、欧洲等地,主要危害百合科蔬菜。葱蝇具有冬滞育和夏滞育的特性,并且这 2 种滞育出现在蛹期头外翻后的同一发育期^[5];在系统发育上,葱蝇与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 近缘^[6-8],利用人工饲料能进行实验室大规模饲养^[9];因此,葱蝇是研究昆虫兼性滞育很好的实验材料,可以作为昆虫兼性滞育研究的模式种^[8,10]。

近几年,Chen 等报道了 *DaTpsin*、*Dadesat* 和 *DaTCP-1* 3 个滞育相关新基因,并对这 3 个基因以及 *HSP90*、*HSP70* 和 *Phospholipids* 等基

因做了深入研究,包括基因克隆、结构、表达、进化、功能预测等^[8,10-14]。目前关于葱蝇滞育相关基因的研究还处于起步阶段,仍有大量工作尚未完成。

本研究利用葱蝇冬滞育的特性,应用 SMART 技术,构建葱蝇冬滞育蛹全长 cDNA 文库,为冬滞育滞育基因的克隆以及功能的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

葱蝇虫蛹源由日本东京大学 Ishikawa 教授馈赠,本实验室饲养和诱导。成虫饲养条件为温度(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光周期 16L: 8D,相对湿度 50%~70%。冬滞育幼虫和蛹都饲养在(15 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,光周期 12L: 12D,相对湿度 50%~70%的条件下诱导并结束冬滞育,分别取化蛹后第 2、3、4、20、36、52、68、84、103 和 114 d 的蛹放入液氮保存(图 1)。

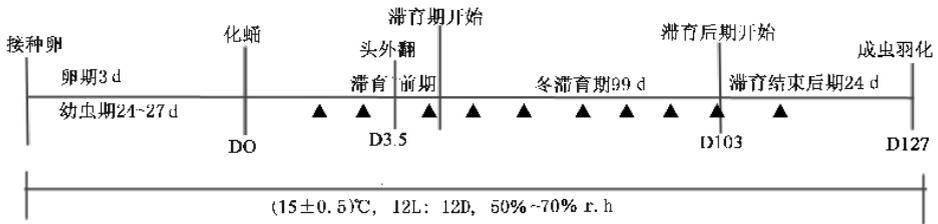


图 1 葱蝇冬滞育蛹的发育历期、滞育诱导及取样点

▲: 为取样点,分别为 D2(化蛹后的第 2 d)、D2、D3、D4、D20、D36、D52、D68、D84、D103、D114。

抽提 RNA 的 RNAiso 试剂盒购自大连宝生物公司。Creator SMART cDNA Library Construction Kit 文库构建试剂盒购自美国 Clontech 公司,感受态细胞(大肠杆菌 DH10B)购自美国 Invitrogen,苯酚/氯仿/异戊醇、氯仿/异戊醇购自 Sigma,其它生化试剂均购自国内生物公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 从液氮罐中取出准备好的上述 10 个样品,混合,在液氮中研磨至粉末状后,加 RNAiso 试剂将其覆盖,待融化后取出。

然后按 RNAiso 试剂盒操作说明提取总 RNA,提取完成后,直接用乙醇沉淀法除盐,并测定其含量及纯度。

1.2.2 cDNA 的合成 在实验前按下述方法进行第二链 PCR(LD-PCR)最佳循环数的摸索。第一链的合成:按照试剂盒操作要求,在 1 μg 葱蝇冬滞育蛹总 RNA 中,加入 SMART IV Oligonucleotide 和 CDS III/3' PCR 引物各 1 μL ,用无 RNase 水补到 5 μL 。放入 PCR 仪中 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 后取出,冰浴 2 min,再向反应液中加入 5 \times 第一链反应缓冲液 2 μL 及 DTT、dNTP

混合液和 MMLV Reverse Transcriptase 各 1 μ L , 然后在 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min , 最后置于冰上终止反应。第二链 cDNA 的合成:取 3 个 PCR 管 , 按照试剂盒操作说明书分别加入反应试剂和 2 μ L 第一链反应产物。反应条件:首先把 PCR 仪预热到 95 $^{\circ}$ C , 然后 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min , 再 95 $^{\circ}$ C 15 s , 68 $^{\circ}$ C 6 min 分别循环 15 , 18 和 20 次。反应结束后分别取 5 μ L 合成产物在 1.1 % 的 TAE 琼脂糖凝胶上检测 , 确定最佳循环数并合成文库构建 cDNA。

1.2.3 蛋白酶 K 消化 取 50 μ L 双链 cDNA , 加入 2 μ L 蛋白酶 K 混匀 , 在 PCR 仪中 45 $^{\circ}$ C 孵育 20 min , 按说明书进行苯酚/氯仿/异戊醇、氯仿/异戊醇各抽提 1 次 , 乙醇沉淀 , 80% 乙醇洗涤 , 晾干 , 最后溶于 79 μ L 水中备用。

1.2.4 Sfi I 酶切和 cDNA 片段分级分离 按照试剂盒操作说明 , 在反应管中加入 Sfi I 酶切试剂和纯化的 cDNA , 在 PCR 仪中 50 $^{\circ}$ C 酶切 2 h , 然后加入 2 μ L 1 % 二甲苯胺染料 , 混匀 , 然后用试剂盒提供的分离柱分级分离 , 共收集 16 管 , 经电泳检测 , 收集符合的样品进行沉淀。

1.2.5 双链 cDNA 与载体连接和转化 在 T4 DNA 连接酶作用下 , 双链 cDNA 与质粒载体 pDNR-LIB(经 Sfi I 酶处理过) 于 16 $^{\circ}$ C 下连接 16 h 。按试剂盒说明连接 3 个不同比例(表 1) 连接产物经电击转化入 25 μ L 感受态细胞(大肠杆菌 DH10B) 。转化后 , 加 970 μ L SOC 培养基 , 置于 37 $^{\circ}$ C 225 r/min 震荡培养 1 h 后 , 即获得 1 mL 原始文库菌液。电击转化条件为 0.1 cm 电击杯 , 1.8 kV 4.8 ms 。

表 1 3 种不同比例的连接(μ L)

成分	连接 A	连接 B	连接 C
cDNA	0.5	1.0	1.5
pDNR-LIB(经 Sfi I 酶处理过)	1.0	1.0	1.0

1.2.6 原始文库质量鉴定 取 2 μ L 原始文库菌液 , 稀释 20 倍后 , 取 1 μ L 加入 100 μ L LB 培养基中混匀 , 均匀地涂在含 30 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板上 , 每个设 2 个重复。经过夜培养后 , 随机挑取 15 个单克隆 , 利用试剂盒提供的

M13 引物 , 进行菌液 PCR 扩增。反应程序如下 94 $^{\circ}$ C 30 s , 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s , 68 $^{\circ}$ C 3 min , 30 个循环 , 最后 68 $^{\circ}$ C 5 min 。用 1.1 % 琼脂糖凝胶电泳检测 , 并计算平均插入片段的大小及文库滴度。文库的滴度公式 $\text{pf}\mu/\text{mL} = \text{长出菌落数} \times \text{稀释倍数} \times 103 / \text{稀释的菌体铺板 } \mu\text{L 数}$, 文库总库容量 = 文库滴度 \times 总体积数(mL) 。

1.2.7 原始文库的扩增 文库的扩增采用涂平板培养扩增。按试剂盒操作说明书取适量原始文库稀释菌液均匀地涂在含 30 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板上(150 mm) , 每个平板约 30 000 个克隆 , 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 18 ~ 20 h , 用含有 25 % 甘油的 LB 培养基洗脱所有的菌落 , 5 mL/板 , 将每板的洗液混合摇匀即得到了扩增文库 , 分装 , 放置 -80 $^{\circ}$ C 长期保存。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取

从琼脂糖凝胶电泳检测结果来看 , 总 RNA 完整性好 , 18 S、28 S rRNA 条带清晰(图 2) 。取适量总 RNA 样品 , 用紫外分光光度计测定样品纯度 , OD260/OD280 值为 2.12 , OD260/OD230 为 2.37 , 说明总 RNA 的纯度达到了构建文库的要求。

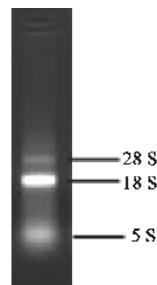


图 2 葱蝇冬滞育肾总 RNA 电泳

2.2 双链 cDNA 的合成及分级

本研究对 LD-PCR 循环数最优条件的探索表明 , 1 μ g 总 RNA 起始第一链的合成 , LD-PCR 时 , 18 个循环最佳。取 5 μ L PCR 产物进行 1.1 % 凝胶琼脂糖电泳分析 , 结果(图 3) PCR 产物的电泳条带呈弥散状条带 , 片段分布在 0.1 ~ 4

kb 之间, 条带正常而且产物的量足够, 符合建库要求。此产物经 Sfi I 完全酶切后过柱分级分离后, 根据 1.1% 脂糖凝胶电泳检测结果显示, 合并了片段大小合适的 5~8 收集管的样品, 然后经乙醇沉淀, 并重悬于 7 μ L 去离子水中(图 4)。

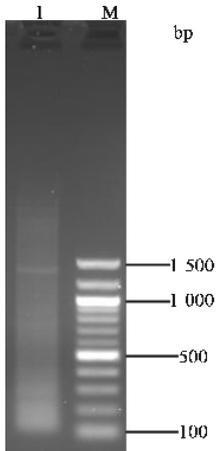


图 3 LD-PCR 产物凝胶电泳

3 讨论

3.1 RNA 对文库质量的影响

分离得到高质量的 RNA 是成功构建全长 cDNA 文库的关键。本实验所提取的 RNA 在琼脂糖凝胶电泳上表现为 28 S、18 S、5 S 3 条清晰条带。真核生物总 RNA 电泳一般具有着 3 条带, 而且 28 S 条带比 18 S 条带亮, 而本实验提取的总 RNA 电泳结果正好相反, 即 18 S 条带的亮度高于 28 S 条带的亮度, 这一结果与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、霜天蛾 *Psilogramma menephor*、美洲大蠊 *Periplaneta americana* 以及蚊虫等一些医学昆虫中提取 RNA 的结果一致^[15-17]。另外, 昆虫近缘的节肢动物及软体动物也有类似现象, 比如中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 和九孔鲍 *Haliotis diversicolor supertexta* 等都发现 18 S RNA 比 28 S RNA 条带亮^[18, 19]。这种现象的产生是由于在 rRNA 大亚基的内部存在缺口现象, 核糖体大亚基合成完成后, 在特定位点产生缺口, 使大亚基呈现大小 2 个片段,

2.3 cDNA 克隆入载体 pDNR-LIB、转化及其文库质量的检测

按照试剂盒说明书要求, 对 3 种不同连接比例的检测结果表明, 当 cDNA 和克隆载体 pDNR-LIB 的比例为 1:1 时(表 1 连接 B), 产生重组体效率最高, 将此连接作为原始文库, 并对此文库进行扩增并长期保存, 扩增后, 文库滴度为 1.0×10^{11} cfu/mL。原始文库滴度为 2.4×10^7 cfu/mL, 对此文库稀释涂平板, 随机挑取 15 个克隆, 经 PCR 扩增, 结果显示每个克隆均有插入片段, 表明 cDNA 与克隆载体的重组率达到 100%, 且 cDNA 插入片段大小在 0.5~3.0 kb 之间, 平均大小在 1 kb 左右(图 5)。以上数据表明, 此次实验构建了一个高质量的葱蝇冬滞育蛹文库, 此文库完全符合以后目的基因的筛选要求。

其中大片段与 18 S 小亚基的大小相近, 因而电泳时 18 S 条带的亮度大于 28 S 条带的亮度^[20]。本实验结果表明, 提取葱蝇冬滞育蛹的 RNA 质量较高, 适合建立全长 cDNA 文库。

3.2 全长 cDNA 对文库质量的影响

获得高质量的全长 cDNA 是文库成功构建的另一个重要因素。本研究采用 Clontech 公司的 SMART 方法。此方法设计巧妙, 提高整个实验过程中的效率, 且 LD-PCR 合成双链 cDNA, 保证了 cDNA 序列的完整性, 王淑红等^[19]在副溶血弧菌感染的九孔鲍血细胞均一化全长 cDNA 文库中大量测序也证实了这一点。本实验还对 LD-PCR 循环圈数进行了摸索, 合适的扩增不但能提高文库滴度(本实验文库滴度 2.4×10^7 cfu/mL), 还能防止过度扩增所带来的非特异性扩增的增多, 保证了文库的真实性。

3.3 文库质量的判断

cDNA 文库的质量具体反映在 2 个方面^[21]: 一是文库的代表性, 它是指文库中包含的重组 cDNA 分子反映来源细胞中表达信息(即 mRNA 种类)的完整性。它是体现文库质量的最重要指标。文库的代表性可用一个量化

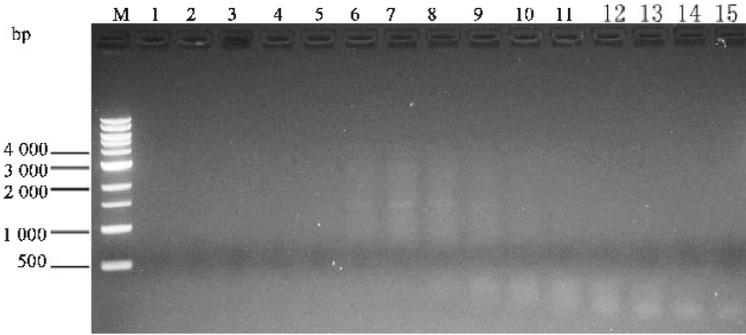


图4 cDNA 片段分级分离的琼脂糖凝胶检测结果

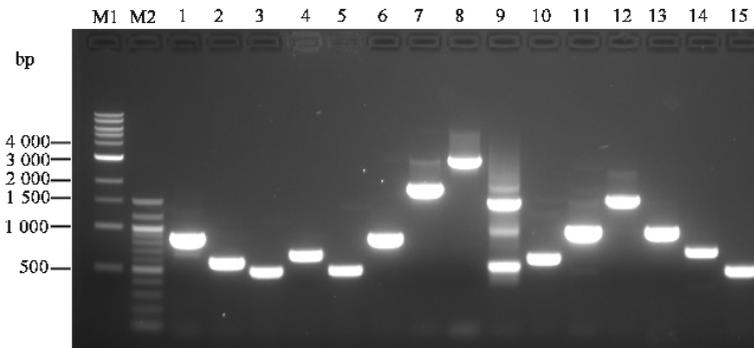


图5 随机挑选 15 个克隆 PCR 扩增结果

的指标来衡量,即文库的库容量。它是指构建的原始 cDNA 文库中所包含的独立的重组子克隆数。根据真核生物中 mRNA 的表达情况^[22],较完整的未扩增文库库容量应该有 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个重组子。本实验所构建的原始 cDNA 文库具有 2.4×10^7 个重组子,包含了葱蝇冬滞育蛹中低丰度的 mRNA。二是重组 cDNA 片段的大小,本研究构建的文库插入片断基本都在 0.5 ~ 3.0 kb 之间,说明该文库的 cDNA 片段的序列是比较完整的。但是,由于 SMART 技术本身的缺陷,不易得到大于 3 kb 片段^[23],使得本文库中大于 3 kb 片段较少,对于较长的基因还需进一步扩增才能获得全长。

本实验构建的葱蝇冬滞育蛹 cDNA 文库,利用其与非滞育文库杂交筛选滞育相关基因,为寻找与昆虫冬滞育发育相关基因提供了有效途径。目前,作者根据滞育相关基因(或蛋白)同源比对的结果以及利用抑制消减杂交的结果从构建的文库中克隆全长基因,为进一步研究

其功能,深入理解滞育形成的分子机制奠定了基础。

致 谢 感谢大连宝生物对本实验的大力支持和帮助;感谢日本东京大学 Ishikawa 教授馈赠葱蝇虫源,据此,才得以建立作者自己的实验室品系。

参 考 文 献

- 1 Denlinger D. L. Regulation of diapause. *Ann. Rev. Entomol.*, 2002, **47**: 93 ~ 122.
- 2 徐卫华. 昆虫滞育的研究进展. *昆虫学报*. 1999, **42**(1): 100 ~ 107.
- 3 Chen W. H., Ge X. M., Wang W. W., et al. A gene catalogue for post-diapause development of an anhydrobiotic arthropod *Artemia franciscana*. *BMC Genomics*, 2009, **10**: 52.
- 4 Yoshiga T., Okano K., Mita K., et al. cDNA cloning of acyl-CoA desaturase homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*. 2000, **246**(1-2) 339 ~ 345.
- 5 Nomura M., Ishikawa Y. Dynamic changes in cold hardiness, high-temperature tolerance and trehalose content in

- the onion maggot, *Delia antiqua* (Diptera: Anthonomyidae), associated with the summer and winter diapause. *Appl. Entomol. Zool.* 2001, **36**: 443 ~ 449.
- 6 Ishikawa Y., Tsukada T., Matsumoto Y. Effect of temperature and photoperiod on the larval development and diapause induction in the onion fly, *Hylemya antiqua*. *Appl. Entomol. Zool.*, 1987, **22**(4): 610 ~ 617.
- 7 Ishikawa Y., Yamashita T., Nomura M. Characteristics of summer diapause in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Physiol.*, 2000, **46**: 161 ~ 167.
- 8 Chen B., Monteiro A., Kayukawa T., et al. Molecular analysis of diapause and thermal-stress response in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Entom. Res.*, 2007, **37**(Suppl.): A19 ~ 20.
- 9 Ishikawa Y., Mochizuki A., Ikeshoji T., et al. Massrearing of the onion and seed-corn flies, *Hylemya antiqua* and *H. platura* on an artificial diet with antibiotics. *Appl. Entomol. Zool.*, 1983, **18**(1): 62 ~ 69.
- 10 Chen B., Kayukawa T., Jiang H. B. *DaTrypsin*, a novel clip-domain serine proteinase gene upregulated during winter and summer diapauses of the onion maggot, *Delia antiqua*. *Gene*, 2005, **347**: 115 ~ 123.
- 11 Chen B., Kayukawa T., Monteiro A., et al. Cloning and characterization of the *HSP70* gene, and its expression in response to diapauses and thermal stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2006, **39**(6): 749 ~ 758.
- 12 Kayukawa T., Chen B., Hoshizaki S., et al. Upregulation of a desaturase is associated with the enhancement of cold hardiness in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, **37**: 160 ~ 167.
- 13 Chen B., Kayukawa T., Monteiro A., et al. The expression of the *HSP90* gene in response to winter and summer diapauses and thermal-stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Mol. Biol.*, 2005, **14**(6): 697 ~ 702.
- 14 Kayukawa T., Chen B., Miyazaki S., et al. Expression of messenger ribonucleic acid for the t-complex polypeptide-1, a subunit of chaperonin CCT, is upregulated in association with increased cold hardiness in *Delia antiqua*. *Cell Stress Chap.*, 2005, **10**(3): 204 ~ 210.
- 15 张霞, 李国勋, 郭巍. 甜菜夜蛾肠粘蛋白 cDNA 基因分子克隆与序列分析. *中国农业科学*, 2008, **42**(11): 3898 ~ 3904.
- 16 孙秀珍, 刘昀. 霜天蛾 cDNA 表达文库的构建和初步鉴定. *西安交通大学学报*, 2005, **26**(3): 244 ~ 246 279.
- 17 刘志刚, 黄炯烈, 朱振宇 等. 美洲大蠊若虫 cDNA 表达文库的构建及初步鉴定. *中华微生物和免疫学杂志*, 2001, **21**(增刊): 4 ~ 6.
- 18 张晓军, 王兵, 张绍萍, 等. 中国对虾 6 种组织 cDNA 文库的构建. *海洋学报*, 2005, **27**(5): 92 ~ 102.
- 19 王淑红, 邹志华, 张子平, 等. 副溶血弧菌感染的九孔鲍血细胞一化全长 cDNA 文库的构建. *台湾海峡*, 2008, **8**(3): 278 ~ 285.
- 20 Cox R. A. Structure and function of prokaryotic and eukaryotic ribosomes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1977, **32**: 193 ~ 211.
- 21 Schuler G. D. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J. Mol. Med.*, 1997, **75**: 694 ~ 698.
- 22 沈倍奋. 分子文库. 北京: 科学出版社, 2001. 2 ~ 10.
- 23 Sughura Y., Carninci P., Iton M., et al. Comparative evaluation of 5-end-sequence quality of clones in CAP trapper and other full-length cDNA libraries. *Gene*, 2001, **263**(1): 93 ~ 102.