

# 金钗石斛花芽 cDNA 表达文库的构建及鉴定

庄军平 黄胜琴 潘舒群 叶庆生\*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东广州 510631)

**摘要:** cDNA文库是分离、筛选基因的重要平台。利用 SMART<sup>TM</sup> cDNA library construction技术, 成功构建了金钗石斛花芽 cDNA表达文库。结果表明该文库的克隆数为  $3.02 \times 10^5$  pfu, 插入片段的大小在 0.5 ~ 2.5 kb范围, 插入片段的重组率接近 100%, 说明所构建的 cDNA文库质量较好。该文库的构建为克隆与金钗石斛花芽分化相关功能基因奠定了基础。

**关键词:** 金钗石斛; 花芽; cDNA表达文库

**中图分类号:** S 688.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 04-0895-03

## Construction and Identification of a cDNA Expression Library from *Dendrobium nobile*

Zhuang Junping, Huang Shengqin, Pan Shuqun, and Ye Qingsheng\*

(College of Life Science, South China Normal University, Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

**Abstract:** A cDNA expression library from the flower bud of *Dendrobium nobile* was constructed into pCDNA3.0 eukaryotical expression plasmid used SMART<sup>TM</sup> cDNA library construction protocol. The result showed that the cDNA expression library contained  $3.02 \times 10^5$  pfu, the size of the inserts ranges from 0.5 kb to 2.5 kb, and the percentage of positive clones was almost 100%. All of the above mentioned have answered for the general requirements of a cDNA library. This provides a base for cloning of important genes related to flower bud differentiation in *Dendrobium nobile*.

**Key words:** *Dendrobium nobile*; Flower bud; cDNA expression library

### 1 目的、材料与方法

金钗石斛 (*Dendrobium nobile*) 为兰科石斛属多年生附生草本植物, 常作为盆栽供室内观赏, 也是良好的切花材料, 在国际花卉市场占有重要的地位<sup>[1,2]</sup>。金钗石斛一般需春化处理才能开花<sup>[3]</sup>, 有关春化诱导花芽分化的机理, 主要限于模式植物——拟南芥等双子叶植物<sup>[4]</sup>, 而对于金钗石斛这样的单子叶植物则很少有人研究。因此, 构建金钗石斛花芽 cDNA表达文库, 对于克隆花芽分化相关基因, 进而从分子水平上研究金钗石斛花芽分化机理, 具有十分重要的理论和实际意义。

取一年生金钗石斛材料, 种植于华南师范大学兰花中心, 经 6/10 低温处理 40 d后取花芽, -80 °C 冰箱中保存以备提取总 RNA。高效表达载体质粒 pCDNA 310 购自 Invitrogen 公司; 试剂和酶 SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit 为 Clontech 公司产品; RNeasy Plant Mini Kit 为 QIAGEN 公司产品; 焦碳酸二乙酯 (DEPC), MOPS, 氨苄青霉素钠盐, TaqDNA 聚合酶, 各种限制性内切酶和 T4 DNA Ligase 均购自上海 Sangon 公司; 其它试剂为国产分析纯。总 RNA 采用 QIAGEN 公司的 RNeasy Plant Mini Kit 提取。

收稿日期: 2005 - 09 - 14; 修回日期: 2005 - 12 - 01

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (05005913); 广东省高新技术成果 (孵化) 项目 (98FF32); 广东省重大科技专项项目 (2003A2010401)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: ye-lab@scnu.edu.cn)

金钗石斛花芽 cDNA 的合成及 cDNA 文库的构建: 按 Clontech 公司 SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit 说明书操作, 进行第 1 链合成, LD-PCR cDNA 扩增, 酶切消化和柱回收 cDNA。T4 DNA Ligase 连接上述分别经 *Sfi*I 酶切处理好的 pCDNA 3102 *Sfi*I 载体和 cDNA, 连接产物高效转化 DH5 感受态细胞。转化产物则被分为两部分, 其中一部分经扩增后作为 cDNA 表达文库总库保存于 25% 甘油中, -80 冻存; 另一部分等分为 100 个亚文库, 经分别扩大培养后同样于 25% 甘油中冻存备用。

cDNA 文库克隆数的确定: 取 1  $\mu$ L ds cDNA 用于连接反应, 反应体系 10  $\mu$ L, 转化其中 1  $\mu$ L, 隔日记数平板的单菌落。取 1/100, 1/10 和 3/10 体积转化液分别涂板, 其余用于摇总库菌落, 隔日记数平板的单菌落数并计算出克隆数。

重组率的确定: 步骤同克隆数的确定, 只是在铺板前向熔化的顶层琼脂中加入 50  $\mu$ L 100 mmol/L 的 IPTG 和 50  $\mu$ L 100 mmol/L X-gal, 根据蓝白斑计算重组率。

cDNA 文库阳性克隆的检测: 从转化平板上挑取单菌落, 接入 Amp<sup>+</sup> 的 0.5 mL LB 培养基中, 强烈震荡培养过夜。次日将检测用菌液室温离心, 10 000 r/min, 1 min, 弃上清液, 收集菌体, 加入 200  $\mu$ L STE (含 20  $\mu$ g/mL 溶菌酶) 漂洗菌体, 充分涡旋以悬浮菌体。将 EP 管置沸水中煮 10 ~ 15 min, 至出现白色絮状沉淀。10 000 r/min 室温离心 1 min。吸取上清液做为 PCR 检测样品, 以 T7 和 Sp6 为上下游引物 PCR 扩增, 确定插入片段大小。反应体系为 20  $\mu$ L: 10  $\times$  Buffer 2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 20  $\mu$ mol/L T7 和 Sp6 引物各 0.5  $\mu$ L, 2 U/ $\mu$ L Taq 酶 1  $\mu$ L, 0.5  $\mu$ L 样品; 扩增程序为: 94 变性 30 s, 55 30 s, 72 70 s, 34 个循环, 72 延伸 10 min。PCR 后于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 金钗石斛花芽总 RNA 纯度及完整性鉴定

经分光光度计测定, 提取的金钗石斛花芽总 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.86, 这表明本试验所提取的 RNA 无蛋白质污染; 所提 RNA 经 1% 甲醛变性胶电泳检测结果如图 1 所示, 可见清晰的 28S 和 18S 两条 rRNA 条带, 且 28S 的条带亮度为 18S 的两倍, 这表明所提总 RNA 完整性较好。以上两点综合表明该试验所提取 RNA 的纯度和完整性均较好, 完全可满足进一步试验的要求。

### 2.2 LD-PCR 产物的回收和鉴定

取 1  $\mu$ g 总 RNA 直接进行逆转录合成第 1 链 cDNA; 取 1  $\mu$ L 的第 1 链产物通过 LD-PCR 扩增富集第 2 链 cDNA, 留取一半 dd cDNA 于 -80 保存备用。另一半 dd cDNA 的经 *Sfi*I 酶切、过柱回收较大片段的 cDNA, 电泳检测, 结果如图 2 所示, 收集前 4 管出现 cDNA 的组分混合。将混合后的 LD-PCR 产物的电泳检测结果如图 3 所示, 可知 LD-PCR 产物的电泳结果呈现均匀的 smear 涂布, 大小在 0.1

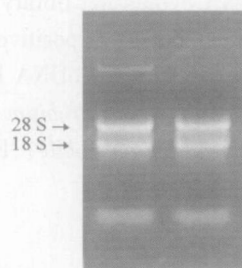


图 1 金钗石斛花芽总 RNA 的 1% 变性琼脂糖凝胶电泳图  
Fig 1 Denaturing agarose gel electrophoresis of total RNA from the flower bud of *Dendrobium nobile*



图 2 LD-PCR 产物过柱分离回收电泳图  
Fig 2 The gel electrophoresis of LD-PCR production throw CHROMASPIN 400 in 1.1% agarose

~2.5 kb 范围内, 主要集中于 500 bp 以上, 且具有两条特征性亮带。这表明所合成的 cDNA 编码蛋白分子量较分散, 金钗石斛花芽的成分多样和转录的 mRNA 较为复杂, 其中某两类成分的可能含量相对较高。

### 2.3 金钗石斛花芽 cDNA 表达文库的鉴定

据统计, 蓝白斑测得的重组率分别为 99.2%; 平板的单菌落数分别为 92、825 和 2 619 个。据此推算 7  $\mu$ L 双链 cDNA 可获得的 cDNA 表达文库滴度为:  $[(92 + 825 + 2\ 619) \times (100/41)] \times 5 \times 7 = 3.02 \times 10^5$ 。从理论上计算, 当 cDNA 文库达到  $4.6 \times 10^4 \sim 6 \times 10^5$  时, 得到目的克隆的概率为 99%, 本研究构建的文库容量为  $3.02 \times 10^5$ , 已经能够满足克隆极低丰度 cDNA 克隆的需要。

随机挑取 50 个克隆, 使用 T7 和 SP6 引物, 通过 PCR 扩增鉴定阳性克隆和估计插入 cDNA 片段的大小。部分 PCR 扩增的电泳结果如图 4 所示, 显示大部分的插入片段在 500 bp 以上, cDNA 分布在 0.5 ~ 2.5 kb 之间。

从该文库构建过程中所测定的总 RNA 提取质量、mRNA 的分离效果、第 1 链和第 2 链 cDNA 的合成效果、双链 cDNA 以及在文库重组克隆数、重组率和插入片段大小等指标综合评估, 该文库的构建是成功的, 质量符合优良文库的标准<sup>[5]</sup>, 完全可满足进一步试验的要求。

金钗石斛花芽 cDNA 表达文库的成功构建, 对于克隆与花芽分化相关基因, 进而从分子水平上为研究金钗石斛花芽分化机理奠定了基础。

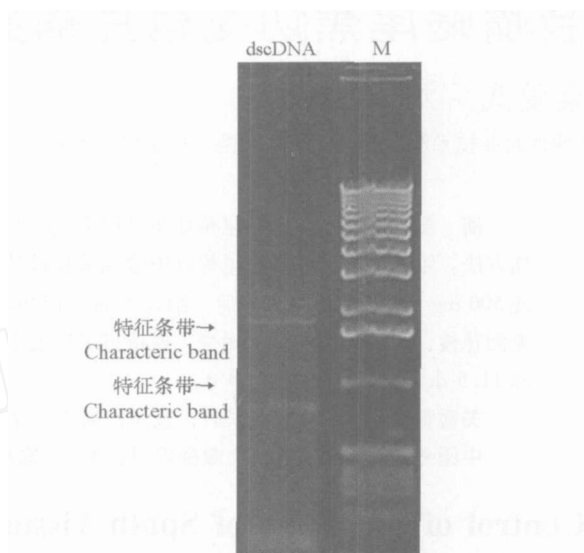


图 3 dsDNA 1.2% 琼脂糖电泳图

右侧为 DNA Marker, 左侧为 dsDNA, 两箭头所指为特异条带。

Fig 3 1.2 % agarose gel electrophoresis of the synthesized dsDNA

M: DNA Marker; dsDNA: Double strand cDNA.

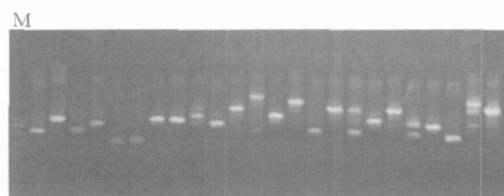


图 4 部分插入片段的 PCR 检测

Fig 4 PCR analysis of partial cDNA insert fragments

### 参考文献:

- 1 吴道圣, 王于荣, 万建华. 金钗石斛引种人工栽培试验总结报告. 浙江林业科技, 1998, 18 (1): 29 ~ 32  
Wu D S, Wang Y R, Wan J H. Report of artificial culture *Dendrobium nobile* Jour of Zhejiang For Sci & Tech, 1998, 18 (1): 29 ~ 32 (in Chinese)
- 2 宋希强, 罗毅波, 钟云芳, 张启翔. 石斛属植物生物技术研究概况. 园艺学报, 2005, 32 (4): 741 ~ 747  
Song X Q, Luo Y B, Zhong Y F, Zhang Q X. Advances in the biotechnology of *Dendrobium* orchid Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (4): 741 ~ 747 (in Chinese)
- 3 王琳, 叶庆生, 刘伟. 金钗石斛研究概况 (综述). 亚热带植物科学, 2004, 33 (2): 73 ~ 76  
Wang L, Ye Q S, Liu W. A review of advances in research on *Dendrobium nobile* Subtropical Plant Science, 2004, 33 (2): 73 ~ 76 (in Chinese)
- 4 Henderson IR, Caroline D. Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. Development, 2004, 131: 3829 ~ 3838
- 5 Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd Edition New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 283 ~ 356