

# 肉色伪角毛虫(纤毛门, 腹毛目)的 cDNA 文库构建及部分 EST 序列分析

郭文波 苗苗 纪梅梅 黄洁 高凤 付爽 陈子桂 朱明壮 王梅 宋微波

(中国海洋大学, 原生动物学研究室, 青岛 266003)

**摘要:** 以海洋腹毛类纤毛虫-肉色伪角毛虫为材料开展了 cDNA 文库的构建和部分基因表达序列标签 (EST) 的分析。其中, 利用 Smart 技术构建 cDNA 文库, 质量检测表明该文库容量为  $1 \times 10^6$  pfu/mL, 重组率为 91%, 表明所建文库能够满足后续的 EST 文库构建及从文库中分离筛选重要基因等研究工作。从该库中随机抽取了 237 个克隆进行 5'端测序, 拼接后得到 189 条非冗余基因 (UniGene), Blast X 比对分析后得到 57 条有功能注释的序列, 这些功能基因片段多为首次发现。肉色伪角毛虫 cDNA 表达文库的构建, 为进一步研究纤毛虫的功能基因等深层次工作奠定了基础。

**关键词:** 海洋纤毛虫; 肉色伪角毛虫; cDNA 文库; EST 序列; 功能注释

**中图分类号:** Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)增-0014-04

腹毛目纤毛虫为广泛见于各种生境中的一类最复杂和高等的原生动动物, 是分子生物学、真核生物遗传学以及细胞学等研究的重要实验材料, 同时在原生动物区系研究、环境保护、生态学以及水产养殖病害学研究中亦占有重要地位<sup>[1-3]</sup>。

相对其他真核生物, 人们对于纤毛虫基因组情况的研究仍较少。涉及分子水平的工作目前已成为国内外研究的新热点<sup>[4,5]</sup>。

表达序列标签 (ESTs) 代表着某物种或组织在某一时期表达的所有基因信息, EST 序列中基因出现的频率可用来分析基因的丰度。近几年, EST 技术发展很快, 已成为从基因文库中获取新基因信息的一种快捷有效手段。本工作利用海洋纤毛虫肉色伪角毛虫为材料, 完成了对其 cDNA 文库的构建和部分基因表达序列标签的分析, 以期为进一步功能基因的探讨铺就基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料、试剂

**实验材料** 肉色伪角毛虫来自作者所在实验室的细胞种库, 编号 031005。分离虫体建立克隆培

养, 以米粒为培养基于 25—30℃ 培养, 具体培养方法参见文献[1]。选取虫体密度 80—200 只/cm<sup>2</sup> 的培养皿进行 2—3d 的饥饿处理, 滴加溶菌酶 (10 mg/mL) 以除去细菌。吸取虫体悬液移入 1.5mL Eppendorf 离心管中, 2500r/min 离心 5min 富集虫体, 使虫体数目达到 10<sup>4</sup> 只/管。过滤海水清洗 2—3 次。离心后余液约 30μL, 用于下一步的 RNA 提取。

**试剂** RNAfast200 试剂盒 (飞捷生物公司); Smart<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit (Clontech 公司); PCR 相关试剂 (TaKaRa 公司)。

### 1.2 工作方法

**总 RNA 提取及检测** RNAfast 试剂盒法; 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 紫外分光光度法检测总 RNA 纯度和浓度。读取样品在 230、260、280、320nm 的光吸收值, 以 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值检测 RNA 纯度, 具体方法参照文献[6]。

**cDNA 文库构建** 方法见文献[7]。

**单链 cDNA 合成** 取 10μg 总 RNA, 加入 1μL 浓度为 10μmol/L CDSIII/3' PCR 引物和 10μmol/L SMART IV 寡核苷酸, 反应体积为 5μL, 于 72℃ 2min, 冷却后加入 1μL Superscript TMII 逆转录酶,

收稿日期: 2007-12-26; 修订日期: 2008-04-02

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划 (IRT 0542); 国家自然科学基金 (30670280) 资助

作者简介: 郭文波 (1981—), 男, 汉族, 山东聊城人; 博士研究生; 研究方向为原生动物学。E-mail: gw9729@hotmail.com

通讯作者: 陈子桂, E-mail: zigui@ouc.edu.cn

1  $\mu\text{L}$  浓度为 10mmol/L dNTP 混合液, 20mmol/L 的 DTT 及 5 $\times$ 第 1 链合成缓冲液 2 $\mu\text{L}$ , 使总反应体积达 10 $\mu\text{L}$ , 于 PCR 仪上 42 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h, 逆转录合成 cDNA 第 1 链。

**双链 cDNA 合成** 取 cDNA 第 1 链 2 $\mu\text{L}$ , 分别加入 2 $\mu\text{L}$  10 $\mu\text{mol/L}$  CDS III/ 3' PCR 引物和 5' PCR 引物, 加入 50 $\times$  Advantage 2 Polymerase 混合液和 50 $\times$  dNTP 混合液各 2 $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  第 2 链合成缓冲液 10 $\mu\text{L}$ , 反应体积为 100 $\mu\text{L}$ 。95 $^{\circ}\text{C}$  变性 1min, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 15s, 68 $^{\circ}\text{C}$  复性延伸 6min 进行 26 个循环以扩增双链 cDNA。

**cDNA 的纯化、消化及连接** 取 100 $\mu\text{L}$  上述双链 cDNA, 加入酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 混液抽提, 14000r/min 离心 5min, 收集上层液体, 加入氯仿: 异戊醇 (24: 1) 混匀, 14000 r/min 离心 5min, 收集上层液。加入 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠, 2.5 倍体积 95% 的乙醇, 室温下立即 14000r/min 离心 20min。去上清液, 100 $\mu\text{L}$  80% 乙醇清洗沉淀物。空气干燥沉淀物约 10min, 溶于 79 $\mu\text{L}$  去离子水中。加入 *sfI* (20U/ $\mu\text{L}$ ) 10 $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  *sfI* 缓冲液 10 $\mu\text{L}$  及 1 $\mu\text{L}$  100 $\times$  BSA 至总体积 100 $\mu\text{L}$ , 混匀后 50 $^{\circ}\text{C}$  酶切 2h。酶切产物用 Chroma spin-400 柱进行分级分离, 收集 1—11 管, 每管 35  $\mu\text{L}$ , -20 $^{\circ}\text{C}$  乙醇沉淀过夜。14000 r/min 离心 20min, 弃上清液, 室温干燥 10min, 加 100 $\mu\text{L}$  去离子水溶解沉淀。根据载体和 cDNA 的电泳定量结果连接比例, 4 $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。

**cDNA 文库的容量及插入片段测定** 上述转化细胞在含有 IPTG (20 $\mu\text{g/mL}$ )、X-gal (50 $\mu\text{g/mL}$ ) 和含氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g/mL}$ ) 的 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 培养筛选。库容量测定按照下列公式计算: 库容量 = (菌落数 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 1000)/涂布菌体体积( $\mu\text{L}$ )。蓝白斑数的统计将用于重组子百分比的计算, 计算公式: 重组子百分比 (重组率) = (白色菌斑数/总的菌数) $\times$ 100%。DNA 测序后检测 cDNA 文库重组克隆插入片段的大小。

**1.3 EST 序列分析** 去除测序反应不成功的序列; 屏蔽不属于表达基因的质象序列 (如构建文库所使用的载体序列、重复序列、污染序列以及镶嵌克隆、长度小于 100bp 的序列等)。利用软件 Invitrogen 的 Vector NTI 将获得的 237 条 ESTs 序列进行拼接。利用 DDBJ 的自动 Blast X 服务对拼接所得的 UniGene 进行功能注释, 参数为 “blastcl3-pblastX-dnr-e0.0001-b1-TT-iInput.fasta-oOutput.out”, 以 “Score  $\geq$  100, E-Value  $\leq$  0.0001” 为筛选标准。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 提取及检测

图 1 显示提取的总 RNA, 可见明显的 3 个条带, 从亮度上看, 28S rRNA 带约为 18S rRNA 带的 2 倍。紫外分光检测 RNA 浓度为 0.551 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.816, 表明 RNA 的纯度较高, 可以用于反转录。

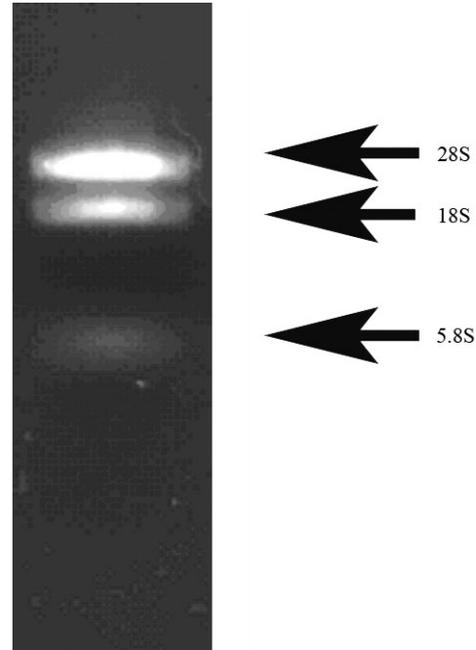


图 1 肉色伪角毛虫总 RNA

Fig. 1 Total RNA of *Pseudokeronopsis carnea*

### 2.2 cDNA 合成与分级

**cDNA 合成** 扩增后 cDNA 的电泳结果 (图 2), 合成的双链 cDNA 从 100bp 到 5000bp 成弥散状分布, 最密集部分集中在 500—2500bp 之间, 较亮的明显条带为加入辅助沉淀作用的酵母 tRNA。

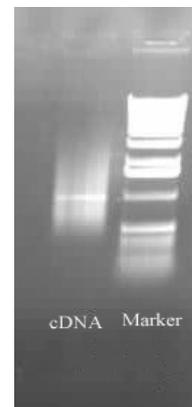


图 2 PCR 扩增后的 cDNA

Fig. 2 PCR amplified cDNA

**cDNA 的分级** 本工作利用 Chroma spin-400 柱对 cDNA 进行分级 (图 3)。在电泳图中 2—6 号管在 400bp 以下无明显的弥散带, 而 7—11 号管在 400bp 以下有较为清楚的弥散条带。合并 2—6 号管溶液。在插入片段检测中, 没有发现低于 400bp 的重组子 (图 4), 表明分级成功。

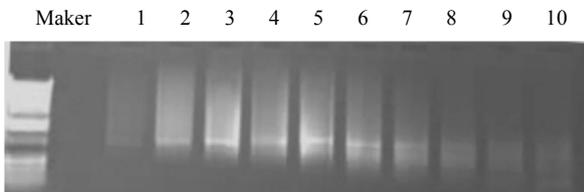


图 3 双链 cDNA 大小分级

Fig. 3 Size fractionation of ds cDNA

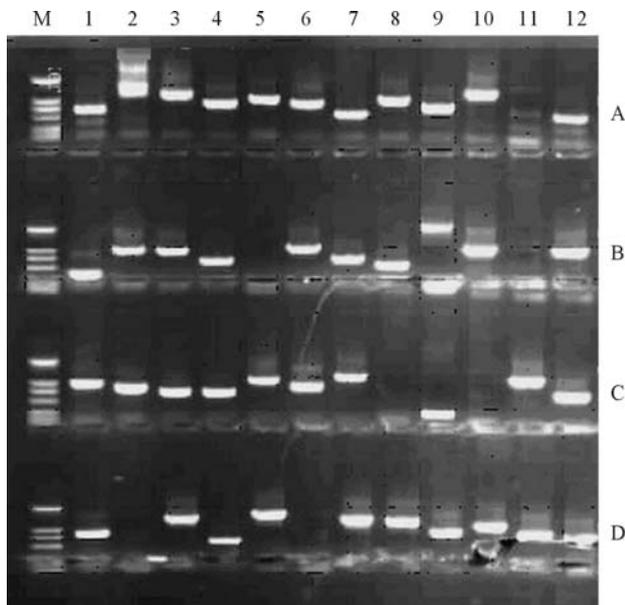


图 4 肉色伪角毛虫 cDNA 文库重组子 PCR 扩增检测

Fig. 4 Analysis of inserted DNA fragments by PCR from the cDNA library of *P. carnea*

### 2.3 文库质量检测

通过实验, 发现加入 1 $\mu$ L 的 cDNA 时文库的连接效率最高。本实验利用此比例构建了海洋纤毛虫 *Pseudokeronopsis carnea* 的 cDNA 文库, 滴度为  $1 \times 10^6$  cfu/mL。用 M13 通用测序引物对挑取的 96 个单菌落进行 PCR 扩增, 大多数插入片段在 500bp 以上。其中有 7 个空载体, 据此计算出文库的重组率为 91%。

### 2.4 EST 序列分析

选取 cDNA 片段在 500bp 以上的克隆, 随机

测定 237 个序列, 经 Blast X 分析表明包括结构蛋白基因、代谢相关基因等。表 1 给出了部分 EST 序列的 Blast X 结果。

表 1 肉色伪角毛虫文库部分 EST 序列的 Blast X 分析

Tab. 1 Blast X analysis of partial cDNA clones from the cDNA

library of <i>Pseudokeronopsis carnea</i>			
编号	Blast x	Ac. No.	Score (>100)
YB001-2F	核糖体蛋白	XP_001026661	120
YB001-4E	固醇转移家族蛋白	XP_001025305	122
YB002-8F	热激蛋白-90	AAY67878	161
YB004-2F	Beta-微管蛋白	AAM43918	313
YB005-12G	泛素	AAF00920	300
OY1_4_5_4	铜锌超氧化物歧化酶	AAA40996	171
OY1_4_5_6	肽链内切酶	XP_566887	167
OY1_4_5_13	苏氨酸脱氢酶	Q17FE0	194
OY1_4_5_36	半胱氨酸蛋白酶基因 p48h-17	NP_563855	210
OY1_4_5_60	细胞色素 450	O04892	100
OY1_4_5_79	Ras 基因家族相关蛋白	Q6ZKZ4	250
OY1_4_5_82	20S 蛋白酶体 $\alpha$ 亚基 B	NP_178042	176
OY1_4_5_91	60S 核糖体蛋白 L17 (L23)	P37380	155
M_OY_21	真核释放因子	AAT39331	405
M_OY_71	泛素结合酶变体	Q9XZE7	194
M_OY_80	14-3-3 蛋白	Q49I52	287
M_OY_93	延伸因子 1-	Q9ZSW2	428

在进行聚类分析时设定了较高的匹配条件, 即要求 2 条序列匹配部分大于 42bp 并达到 99% 以上的相似性。在该条件下, 237 条 ESTs 序列可以聚类成 189 条非冗余序列 (UniGene)。其中 15 条重叠群 (Contig) 分别由 63 条 ESTs 产生; 剩余 174 条单拷贝序列 (Singleton) 不与其他任何序列匹配, 冗余率为 20%。通过 Blast X 分析, 在所有非冗余序列 (UniGene) 中, 在 DDBJ 的“UniProt + PRF + PDB”数据库中发现同源序列的 UniGene 有 57 条, 占有 UniGene 总数的 30.1%; 其中发现同源序列的 Contig 有 14 条, 占 Contig 总数的 73.7%, 有同源序列的 Singleton 43 条, 占总数的 24.7%。

## 3 讨论

纤毛虫属单细胞真核生物, 可以独自地执行高等动物所具备的各种生理功能, 加上生命周期短、取材和培养方便、细胞结构复杂, 因而在许多生物学研究领域中被视作理想的实验材料。本工作建立了海洋纤毛虫肉色伪角毛虫的 cDNA 文库, 期望筛选出相关的功能基因, 以开展与个体发育、细胞分化、细胞衰老与死亡调控等生命现象相关的工作。

完整的、高纯度的RNA提取,是工作开展的第一步,也是构建高质量cDNA文库的保证。大型腹毛目纤毛虫所含大、小核的数量远高于其他类群<sup>[8]</sup>,因其细胞质内富含RNA酶,用TRIzol一步裂解法提取时易导致RNA降解,且容易被基因组DNA污染。在本工作中,我们采用了RNA快速提取试剂盒来提取培养到一定密度虫体的总RNA。电泳结果显示有2条清晰的条带(分别为28S与18S核糖体RNA,亮度比约为2:1),说明所提取的RNA无降解,完整性良好。

由于海洋纤毛虫目前无法做到类似于四膜虫的无菌培养,因此在现有实验条件下,很难获得 $10^6$ 以上级别的细胞数量。我们对RNA纯化后获得的mRNA产量仍达不到常规cDNA文库所要求的 $5\mu\text{g}$  mRNA。但根据贾锡伟等<sup>[7]</sup>和毛新国等<sup>[9]</sup>的观点,SMART<sup>TM</sup> cDNA文库最低要求产量为25ng mRNA,因此这一方法已经适用于微量生物组织的cDNA文库构建。

#### 参考文献:

- [1] Song W B, Xu K D, Shi X L, *et al.* Progress in protozoology [M]. Qingdao: Qingdao Ocean University Press. 1999, 77—154 [宋微波, 徐奎栋, 施心路, 等. 原生动物学专论. 青岛: 青岛海洋大学出版社. 1999, 77—154]
- [2] Hu X Z and Song W B. On morphology of the marine hypotrichous ciliate, *Holosticha diademata* (Ciliophora, Hypotrichida), with comparison of its related species [J]. *J. Ocean Univ. Qingdao*, 1999, **29**: 469—473 [胡晓钟, 宋微波. 海洋腹毛目纤毛虫—束状全列虫的形态学以及与相近种的比较. 青岛海洋大学学报, 1999, **29**: 469—473]
- [3] Meng L, Feng W S and Shen Y F. Morphological studies on the Wuhan population of Colpoda *Maupasi Enriquez* (Ciliophora, Colpodea) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**: 896—900 [孟良, 冯伟松, 沈韞芬. 莫氏肾形虫武汉种群的形态学及表膜下纤毛系研究. 水生生物学报, 2007, **31**: 896—900]
- [4] Keller A M and Cohen J. An indexed genomic library for *Paramecium* complementation cloning [J]. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2000, **47**: 1—10
- [5] Bhattacharya D and Katz L A. Frontiers in genomics: insights into protist evolutionary biology [J]. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2005, **52**: 19—21
- [6] Sambrook J, Fitch E F and Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed [M]. Beijing: Science Press. 1992 [萨姆布鲁克 J, 弗里克 E F, 曼尼阿蒂斯 T (金冬雁, 黎孟枫译). 分子克隆实验指南, 第二版. 北京: 科学出版社. 1992]
- [7] Jia X W, Wang Y L, Zhang Z P, *et al.* cDNA library construction of testis and ovary of *Scylla serrata* with SMART technique [J]. *J. Xiamen Univ. (Nat. Sci.)*, 2004, **43**: 547—550 [贾锡伟, 王艺磊, 张子平, 等. 利用 SMART 技术构建锯缘青蟹精巢和卵巢的 cDNA 文库. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, **43**: 547—550]
- [8] Prescott M. The DNA of ciliated protozoa [J]. *Microbiol. Rev.*, 1994, **58**: 233—267
- [9] Mao X G, Jia J Z. Comparison of methods to construct a full length cDNA library [J]. *Hereditas*, 2006, **28**: 865—873 [毛新国, 贾继增. 几种全长 cDNA 文库构建方法比较. 遗传, 2006, **28**: 865—873]

## CONSTRUCTION OF CDNA LIBRARY AND ANALYSIS OF ESTS OF MARINE CILIATE *PSEUDOKERONOPSIS CARNEA* (PROTOZOA, CILIOPHORA, HYPOTRICHIDA)

GUO Wen-Bo, MIAO Miao, JI Mei-Mei, HUANG Jie, GAO Feng, FU Shuang, CHEN Zi-Gui,  
ZHU Ming-Zhuang, WANG Mei and SONG Wei-Bo

(Laboratory of Protozoology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract:** The cDNA library of a marine hypotrichous ciliate, *Pseudokeronopsis carnea*, was constructed using the SMART construction kit, from which totally 237 expressed sequence tags (ESTs) were randomly selected for analyses. The capacity of the library was  $1 \times 10^6$  pfu/mL, in which more than 90% clones are recombinant. 189 unabridged cDNA sequences lacking X or N were made homology comparison using the Blast X search; 57 of which were nearly identical to known genes in the NCBI database. These data show that the full length cDNA library of *P. carnea* constructed using the Smart technique is of reasonably good quality for the further studies.

**Key words:** Marine ciliate; Hypotrichida; *Pseudokeronopsis carnea*; cDNA library; ESTs