

· 论 著 ·

SMART 技术构建白念珠菌全长 cDNA 文库

徐 铮¹, 曹永兵¹, 高平挥¹, 张军东¹, 曹颖瑛¹, 唐 榕², 应 康^{2*}, 姜远英^{1*}

(1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433; 2. 上海联合基因集团科技研究院, 上海 200092)

[摘要] 目的: 为克隆和研究白念珠菌新耐药相关基因, 应用 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术, 快速构建高质量的白念珠菌全长 cDNA 文库。方法: 采用 TR Izol 试剂提取不同生长期、不同药物刺激的白念珠菌 SC5314 的总 RNA, 经 O ligotex 试剂盒纯化得到 mRNA。利用含 *Sfi* I B 酶切位点的 CDS III/3' PCR 引物合成 cDNA 第 1 条链, 而含 *Sfi* I A 酶切位点的 SMART 寡核苷酸作为 cDNA 第 1 条链在 mRNA 5' 端延伸出去的模板。LD-PCR 合成双链 cDNA, 经 *Sfi* I 酶切和过柱分级分离后, 与 pBSF 质粒进行连接, 随后转化大肠杆菌, 构建成全 cDNA 文库。测序验证部分插入 cDNA 的全序列, 计算全长性比例。结果: 构建好的文库中含有约 1.1×10^6 的重组子, 重组率为 97.6%, 插入 cDNA 长度为 750~3 000 bp, 且大部分在 1.5 kb 以上。测定 60 个克隆的全序列, 经生物信息学分析, 全长性比例在 50% 以上。结论: 成功构建了白念珠菌全长 cDNA 文库, 为进一步筛选、克隆白念珠菌耐药相关基因奠定了基础。

[关键词] 全长 cDNA 文库; 白念珠菌; 抗性; SMART

[中图分类号] R 379.4

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X (2004) 10-1090-04

Construction of full-length cDNA library of *Candida albicans* using SMART technology

XU Zheng¹, CAO Yong-Bing¹, GAO Ping-Hui¹, ZHANG Jun-Dong¹, CAO Ying-Ying¹, TANG Rong², YING Kang^{2*}, JIANG Yuan-Ying^{1*} (1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Institute of United Gene Holding Ltd., Shanghai 200092)

[ABSTRACT] **Objective:** To rapidly construct a full-length cDNA library of *Candida albicans* with switching mechanism at 5' end of RNA transcript (SMART) techniques, providing a base for the studying the novel multidrug resistance associated genes of *Candida albicans*. **Methods:** The total RNA was extracted from several *Candida albicans* (SC5314) samples of different growing phase and different drugs treatment by TR Izol reagent. The mRNA was subsequently separated with the O ligotex kit. The CDS III/3' PCR primer (containing *Sfi* I B site) was used in the first-strand reaction and the SMART IV Oligonucleotide (containing *Sfi* I A site) served as the short, extended template at the 5' end of the mRNA. LD-PCR generated full-length double-strand cDNA, which was digested by *Sfi* I restriction enzyme and ligated to the *Sfi* I (A & B)-digested pBSF vector. The ligated vector was then transformed by DH5 α for the final construction of the cDNA library. The entire sequences of partial inserted cDNAs were obtained and the ratio of full-length cDNA was analysed. **Results:** The constructed *Candida albicans* cDNA library consisted of 1.1×10^6 independent clones with a recombination rate of 97.6%. Exogenous inserts of the recombinants was 0.75-3 kb in length, with most of them above 1.5 kb. Sequencing results and bioinformatics analysis of 60 clones indicated that the ratio of full-length cDNA was above 50%. **Conclusion:** A high-quality full-length cDNA library of *Candida albicans* has been constructed successfully, which is essential for screening and cloning of new multidrug resistance associated genes of *Candida albicans*.

[KEY WORDS] full-length cDNA library; *Candida albicans*; drug resistance; SMART

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(10): 1090-1093]

* 白念珠菌是临床最为常见的致病真菌之一。近年来随着广谱抗生素、皮质激素和免疫抑制剂的广泛应用, 外科介入疗法的逐渐增多以及肿瘤放疗化疗的影响, 使得原来发生率很低的深部白念珠菌感染近年来有明显上升的趋势, 主要侵犯黏膜和内脏, 免疫力低下患者容易造成菌血症和侵袭性感染, 其危害性极大, 预后差, 病死率高。另一方面, 由于目前能有效地用于治疗念珠菌感染的药物较少, 且在长期治疗和重复给药过程中使白念珠菌的耐药性

日益严重, 该病已成为临床治疗的一大主要难题^[1]。

为了能深入探讨白念珠菌致病和耐药的分子机

* [基金项目] 国家自然科学基金 (30200012, 30300442); 上海市基础研究重点项目 (03JC14006)。

[作者简介] 徐 铮 (1978-), 男 (汉族), 博士

E-mail: xuzhengbox@yahoo.com

* Corresponding author. E-mail: ying_kang@hotmail.com;

jiangyycn@yahoo.com.cn

制,并对白念珠菌的新基因功能展开研究,我们利用 Clontech 公司的 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术成功构建了高质量的白念珠菌全长 cDNA 文库,并对其进行了初步鉴定,为后续的表达谱芯片的制备和白念珠菌特异表达基因的筛选和克隆奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 白念珠菌国际通用株 SC5314(由美国 Georgetown University 的 Fonzi WA 教授馈赠)。TRIzol RNA 提取试剂盒 (Cat 15596-026) 购自美国 Gibco BRL 公司, mRNA 纯化试剂盒 Oligotex mRNA midi kit (Cat 70042) 购自 Qiagen 公司, SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒 (Cat k1051-1) 购自美国 Clontech 公司。

cDNA 第 1 链合成引物 CDS III/3' PCR primer: 5' ATT CTA GGC CGA GGC GGC CGA CAT G-d(T)₃₀N-₁N-3' (N = A、G、C 或 T; N-₁ = A、G 或 C), SMART IV Oligonucleotide: 5' AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG-3'。cDNA 第 2 链合成 5' PCR 引物 5' AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'。

1.2 总 RNA 的提取 菌株 SC5314 由沙堡培养基接种至 YPD 培养液中,经 3 次活化后,分成 8 份,其中 4 份用 YPD 培养液在 30、200 r/min 分别培养 8、9、12、18 h,另 4 份分别经亚最小抑菌浓度的抗真菌药物(酮康唑、氟康唑、布替萘芬、特比萘芬)在 30、200 r/min 作用 9 h,收获,冻于液氮中。取液氮冻存的 8 份经不同处理的菌株,每份 500 mg,在液氮中研磨至粉末,转至匀浆管中,分别加入 1 ml TRIzol 试剂,按试剂盒说明书操作抽提总 RNA。紫外分析测定含量,琼脂糖电泳测定纯度。

1.3 mRNA 的纯化 将不同处理的 8 份总 RNA 样品混合后,取 100 μ g 用 Oligotex mRNA 纯化试剂盒进行 mRNA 纯化。操作按试剂盒说明书进行。吸取 mRNA 10 μ l 进行紫外分析测定。

1.4 cDNA 第 1 链合成 在一灭菌 0.5 ml 离心管中分别加入以下试剂: mRNA 3 μ l, SMART IV Oligonucleotide 1.0 μ l, CDS III/3' PCR primer 1.0 μ l, 混匀 5 000 r/min 离心 10 s,置 72 $^{\circ}$ C 孵育 2 min,冰浴冷却 2 min,再次 5 000 r/min 离心 10 s 后,加入以下试剂: 5 $\times$ 第 1 链缓冲液 2.0 μ l, DTT (20 mmol/L) 1.0 μ l, dNTP Mix (10 mmol/L) 1.0 μ l, PowerScript 逆转录酶 1.0 μ l, 加去离子水补至 10

μ l, 混匀,置 42 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,然后置冰上终止反应。

1.5 cDNA 第 2 链合成 取 2 μ l cDNA 第 1 链,分别加入下列反应成分: 去离子水 80 μ l, 10 $\times$ Advantage 2 PCR 缓冲液 10 μ l, 50 $\times$ dNTP Mix 2 μ l, 5' PCR 引物 2 μ l, CDS III/3' PCR primer 2 μ l, 50 $\times$ Advantage 2 聚合酶混合物 2 μ l。轻轻混匀各组分,稍离心后置于预热的 PCR 仪上,条件为 72 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 1 min, 然后经历 22 个循环: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 6 min。循环结束后至 4 $^{\circ}$ C。取 5 μ l 样品进行 1.1% 琼脂糖电泳检测。

1.6 蛋白酶 K 和 Sfi I 限制性酶切消化 取扩增的双链 cDNA 产物 50 μ l, 加入 2 μ l 蛋白酶 K (20 μ g/ μ l), 45 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 5 000 r/min 离心 10 s, 加入 50 μ l 去离子水后,加入酚 氯仿 异戊醇 (25:24:1) 100 μ l, 翻转混匀 1~2 min, 14 000 r/min 离心 5 min, 收集上层液体至另一干净离心管中。加入酚 氯仿 (25:24:1) 100 μ l, 翻转混匀 1~2 min, 14 000 r/min 离心 5 min, 收集上层液体至另一干净离心管中。加入 10 μ l 醋酸钠 (3 mol/L), 1.3 μ l 糖原 (20 μ g/ μ l), 250 μ l 95% 室温乙醇。室温下立即 14 000 r/min 离心 20 min。弃去上清,用 100 μ l 80% 乙醇洗涤,空气干燥 10 min,加入 79 μ l 去离子水重悬。再分别加入以下成分进行 Sfi I 限制性酶切: 10 $\times$ Sfi I 缓冲液 10 μ l, Sfi I (A&B) 酶 10 μ l, 100 $\times$ BSA 1 μ l, 混合后置 50 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,加入 1% 二甲苯基 2 μ l, 混匀。

1.7 cDNA 分级分离 按照试剂盒操作说明书,准备 16 个 1.5 ml 离心管,标记为 1~16。摇匀 CHROMA SPN-400 柱内基质,打开顶盖,自然放干柱内贮存缓冲液,加入 Column Buffer 700 μ l 洗柱,待缓冲液流完后将 Sfi I 酶切产物约 100 μ l 平稳地加到胶层中间,直到产物全部渗到胶面下。用 100 μ l column buffer 冲洗盛 cDNA 的离心管后亦加入柱内,待自然流完后,放置好第一收集管。再加入 600 μ l column buffer,开始收集滴出的液体,每管收集 35 μ l,直至收集完毕。每管取 3 μ l 样品,100 V 电压 1.1% 琼脂糖电泳 10 min,判断并收集符合要求的 3~4 管于另一 EP 管。加入 1.6 μ l 醋酸钠 (3 mol/L), 1.6 μ l 糖原 (20 μ g/ μ l), 400 μ l 95% 乙醇 (-20 $^{\circ}$ C), 混匀后-20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。14 000 r/min 常温离心 20 min,仔细移去上清,室温干燥 10 min,加入 20 μ l 去离子水溶解沉淀。

1.8 cDNA 克隆与 pBSF 载体连接 取 0.5 ml 离心管,加入以下各试剂: cDNA 1.0 μ l, pBSF 载体 1.0 μ l, 10 $\times$ 连接缓冲液 1.0 μ l, ATP (10 mmol/L)

1.0 μ l, T₄DNA 连接酶 1.0 μ l, 去离子水 5.0 μ l, 5 000 r/min 离心 10 s 后, 16 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

1.9 重组质粒的转化和库容量的计算 取 200 μ l 感受态宿主菌(DH5 α)至灭菌的 50 ml 离心管中, 放置冰水浴融化。加入上述 1 μ l 连接液, 轻轻混匀后置于冰上 45 min。42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 90 s, 迅速放入冰上 2 min。加入 2 ml LB 培养液(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 摇床, 转速 $\leq$ 150 r/min, 复苏 45 min。3 000 r/min 离心 10 min 收菌, 用 200 μ l LB 重悬, 取 200 μ l 菌液涂布于含有 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, X-gal)和异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG)的 15 cm LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜。分别计算菌落数、蓝白斑比例和库容量。同时随机挑选 20 个重组子, 用载体自带随机引物扩增, 在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳确定插入的 cDNA 片段的大小。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化 电泳显示 28 S 和 18 S 两条带, 亮度较强, 28 S 和 18 S 亮度比约为 2:1。每份总 RNA 样品各取 2 μ l 稀释至 200 μ l, 在紫外分光光度仪下检测 D_{260} 和 D_{280} 值及 D_{260}/D_{280} 值, 8 份总 RNA 样品的 D_{260}/D_{280} 值均在 1.95~2.1 之间, 显示了较好的质量, 同时 RNA 得率也较高, 大部分在 1 mg 以上, 为 mRNA 的分离创造了条件。经 Oligotex mRNA 纯化试剂盒进行 mRNA 纯化后, 取 10 μ l 在紫外分光光度仪下检测, D_{260} 和 D_{280} 值分别为 0.052 和 0.028, 计算其未稀释前浓度为 0.017 μ g/ μ l, 总量为 3.4 μ g, 满足建库需要。

2.2 双链 cDNA 合成 电泳结果显示 cDNA smear 分布在 0.5~3 kb, 呈长瀑布条带, 说明 cDNA 合成较好。

2.3 cDNA 分级分离 琼脂糖电泳结果显示, 第 10~13 管 cDNA 浓度高, 长度与预测的白念珠菌 cDNA 长度相符, 收集此 4 管 cDNA 乙醇沉淀后重悬于去离子水。

2.4 连接、转化和库容量计算 cDNA 与 pBSF 载体相连、转化, 经蓝白斑筛选计数, 平板上共有菌落数 1 700 个, 其中蓝斑为 40 个, 其余为白斑, 重组率为 97.6%, 库容量 1.1×10^6 。

2.5 cDNA 插入长度分析 随机挑选 20 个重组子克隆以载体自带的 M13⁺/M13⁻ 进行 PCR 鉴定插

入 cDNA 的长度, 电泳可见插入片段长度分布于 750~3 000 bp 之间, 平均长度为 1.5 kb (图 1)。

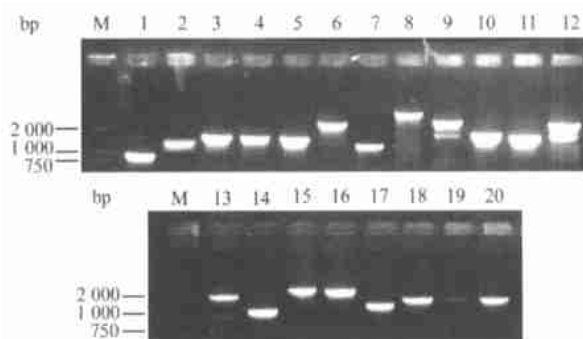


图 1 cDNA 插入长度分析

Fig 1 cDNA inserts released by PCR amplification

M: DL 2000 marker (TaKaRa); 1-20: 20 recombinant

DNA clones chosen randomly

2.6 全长 cDNA 完整性检验 对其中部分克隆分别进行 5' 和 3' 端测序, 直至测通, 获取其全序列, 经网上 Blast 比对和生物信息学分析, 在已测序的 60 个克隆中, 全长 cDNA 序列有 32 个, 占总数的 53.3%。从插入片段长度的频数分布 (图 2) 来看, 86.7% 以上的 cDNA 集中在 1.0~2.4 kb 范围内, 而 1.4~1.8 kb 的 cDNA 占到了 46.7%, 与前述文库分析结果一致。

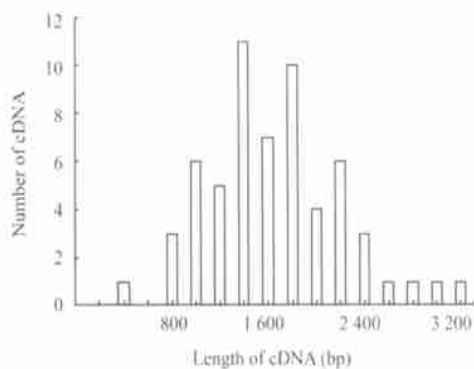


图 2 cDNA 长度频数分布

Fig 2 Frequency distribution of cDNA length

3 讨论

发现和确证新基因的功能的关键在于获取尽可能多的全长 cDNA。构建白念珠菌的全长 cDNA 文库, 可以极大地方便白念珠菌新功能基因的筛选工作, 是进一步进行白念珠菌多药耐药相关基因克隆和鉴定的重要基础。传统的 cDNA 文库构建方法^[2,3]用 Oligo (dT) 或随机引物作逆转录引物合成 cDNA, 通过酶切削平末端, 并连接到适当的载体。这种方法虽然实用、费用低廉, 但存在几处关键不足: 难以获得低丰度表达基因; 需要消耗较多量

mRNA, 有些特殊细胞和组织无法达到该量; 筛选文库复杂、耗时、工作量大, 经常出现特异性差和滴度低的问题; 最为重要的一点是, 受本身实验方法的限制, 当 mRNA 过长或其二级结构复杂时, Oligo (dT) 引物不能合成完整的 cDNA, 且在二链合成后, 传统的 cDNA 克隆过程产生的粘性末端使插入的 cDNA 比原始 mRNA 短 5~30 bp, 不易得到包括 5' 端全长基因。

SMART cDNA 文库构建技术, 利用一种经修饰的 Oligo (dT) (CDS III/3 PCR primer) 引导一链合成反应, 并加入 SMART IV Oligo 在 mRNA 5' 末端作为短的延伸模板。当逆转录到 5' 末端时, 逆转录酶的末端转移酶活性在一链 cDNA 的 3' 末端加上一小段脱氧胞苷。SMART IV Oligo 的 3' 端含有寡核苷酸 (G) 序列与脱氧胞苷配对形成延伸模板, 逆转录酶转换模板并将 SMART IV Oligo 链转录完全。结果是合成的全长单链 cDNA 完全包含了 mRNA 的 5' 末端, 并且附加了 SMART IV Oligo 的互补链^[4~6]。只有那些 5' 末端含有 SMART 锚定序列的单链 cDNA 才能在随后的 LD-PCR 过程中进行指数扩增, 不完整的 cDNA 和从无 poly A 的 cDNA 因缺乏 SMART 锚定引物而无法被扩增。因此可消除基因组 DNA 和无 poly A 的 RNA, 并且允许用 ng 级的总 RNA 或 mRNA 构建高比例全长性文库^[7,8]。

由于存在一些具有重要功能的生长发育早期和晚期的特异表达基因, 我们选取了不同时相生长的白念珠菌, 经总 RNA 抽提和 mRNA 纯化后发现, 早期和晚期的细胞 mRNA 含量均明显偏低, 而 9 h 时正是 mRNA 转录和表达最为旺盛的时期。为了重点研究不同功能基因在药物对细胞的杀伤以及细胞对药物耐药性形成中的作用, 选取了临床常用的 4 种抗真菌药物在亚最小抑菌浓度作用于白念珠菌细胞, 经总 RNA 抽提和 mRNA 分离, 混合建库。通过以上措施使我们所构建的文库具有了更好的代表性和完整性。经鉴定 cDNA 克隆重组率为 97.6%, 文库库容量为 1.1×10^6 , 而插入片段长度分布于 750~3 000 bp 之间, 大部分在 1.5 kb 之上。测序验证部分插入 cDNA 的全序列, 经生物信息学分析, 全长性比例为 53.3%, 是一种可靠的获取全长 cDNA 的方法。

目前已知白念珠菌基因组大小约为 15.5 Mb, 其

中可编码 100 个氨基酸以上蛋白的开放阅读框架 (ORFs) 有 9 168 个, 而目前在 GenBank 上登录的具有完整编码序列的白念珠菌基因数量仅为 419 个, 因此白念珠菌的未知功能基因资源有巨大的可探索空间。白念珠菌全长 cDNA 文库的成功构建, 为后续的大规模测序和表达谱芯片的制备, 以及全长新基因的克隆和功能研究^[9~11]奠定了坚实的基础。

[参考文献]

- [1] 吴绍熙, 廖万清, 郭宁如, 等. 中国致病真菌 10 年动态流行病学研究[J]. 临床皮肤科杂志, 1999, 28(1): 1-44
- [2] Suzuki Y, Yoshitomo Nakagawa K, Maruyama K, et al. Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library[J]. *Gene*, 1997, 200(1): 149-156
- [3] Healy V. RT-PCR in cDNA library construction[J]. *Methods Mol Biol*, 2002, 193(3): 349-361.
- [4] Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching: a SMARTTM approach for full-length cDNA library construction[J]. *Bio techniques*, 2001, 30(4): 892-897.
- [5] Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A, et al. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones[J]. *BMC Genomics*, 2004, 5(1): 36-43
- [6] Zhurabayeva B, Diatchenko L, Chenchik A, et al. Use of SMARTTM-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors[J]. *Bio techniques*, 2001, 30(1): 158-163
- [7] Fu GK, Stuve LL. Improved method for the construction of full-length enriched cDNA libraries[J]. *Bio techniques*, 2003, 34(5): 954-957.
- [8] Suzuki Y, Sugano S. Construction of a full-length enriched and a 5'-end enriched cDNA library using the oligo-capping method[J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 221(2): 73-91.
- [9] Orozco I, Ortiz L, Elorza MV, et al. Cloning and characterization of PRB1, a *Candida albicans* gene encoding a putative novel endoprotease B and factors affecting its expression[J]. *Res Microbiol*, 2002, 153(9): 611-620
- [10] Roig P, Martínez JP, Gil ML, et al. Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* UB13 gene coding for a ubiquitin-hybrid protein[J]. *Yeast*, 2000, 16(15): 1413-1419
- [11] Chou H, Tam MF, Chang CY, et al. Characterization of a novel *Candida albicans* 29 kDa IgE-binding protein-purification, cDNA isolation and heterologous expression of Cand a 3[J]. *Allergy*, 2003, 58(11): 1157-1164

[收稿日期] 2004-03-17

[修回日期] 2004-05-25

[本文编辑] 尹 茶