

乳鼠成骨细胞酵母双杂交 cDNA 文库构建

林振 江建明 袁亮 冯瑞强 付兆宗 孟越 杨德鸿*

南方医科大学南方医院, 脊柱骨科, 广东 广州 510515

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013) 09-0930-04

摘要: **目的** 构建乳鼠成骨细胞的酵母双杂交 cDNA 文库。**方法** 用 TRIzol 法提取乳鼠成骨细胞总 RNA, 按照 SMART cDNA Library Construction Kit (CLONTECH) 说明书反转录合成双链 cDNA, Spin Column 去除短片段, 然后用同源重组的方法将双链 cDNA 和 PGADT7-*rec* 载体共转化到酵母细胞 Y187 中, 建立文库并计算文库滴度。**结果** 提取的总 RNA 的 A 260/A 280 为 1.99, 琼脂糖凝胶电泳示 28S rRNA、18S rRNA 2 条带, 且 28S 与 18S 带亮度比值约为 2。酵母文库库容为 1.68×10^7 , 重组率为 100%。插入片段 PCR 检测提示大小分布为 1.5~4.0 kb, 平均长度约为 3.0 kb。**结论** 乳鼠成骨细胞酵母双杂交 cDNA 文库构建成功。

关键词: 成骨细胞; cDNA 文库; 酵母双杂交

Construction of cDNA library of suckling mouse osteoblasts using yeast two-hybrid system

LIN Zhen, JIANG Jianming, YUAN Liang, FENG Ruiqiang, FU Zhaozong, MENG Yue, YANG Dehong. Department of Spinal Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: YANG Dehong, Email: drmyang@yahoo.com

Abstract: Objective To construct a yeast two-hybrid cDNA library from suckling mouse osteoblasts. **Methods** Total RNA of suckling mouse osteoblasts was isolated using TRIzol method. The double-strand cDNA was synthesized according to the instructions (SMART cDNA Library Construction Kit), and short clips were removed using Spin Column. Then the PGADT7-*rec* vector and the amplified double-strand cDNA were co-transfected into *Saccharomyces cerevisiae* Y187 cells using homologous recombination mediated approach. After the construction of cDNA library, the titer of the library was counted. **Results** The ratio of A260 to A280 of the extracted RNA was 1.99. Two bands (28S rRNA, 18S rRNA) exhibited in agar gel electrophoresis, and the ratio of 28S rRNA to 18S rRNA of the light density was about 2. A total of 1.68×10^7 recombinants were obtained from the cDNA library, and the percentage of recombinant was 100%. The inserted fragment size of recombinants ranged from 1.5 kb to 4.0 kb, detecting using PCR method. The average length of the inserted cDNA fragment was 3.0 kb. **Conclusion** A cDNA library of suckling mouse osteoblasts using yeast two-hybrid system has been constructed successfully.

Key words:

骨代谢主要包括骨形成和骨吸收, 即成骨过程与破骨过程, 是保持骨的平衡, 维持正常骨量的关键^[1]。成骨细胞是骨代谢中成骨过程的重要功能细胞, 近年来, 伴随着骨质疏松的发病率不断提高^[2, 3], 如何提高成骨细胞活性, 促进其成骨作用, 是当前研究的热点。

酵母双杂交技术自 1989 年提出并初步建立后, 一直是研究蛋白功能的重要手段^[4, 5]。在我国, 多

种组织的 cDNA 文库已被相继建立^[6-9], 而成骨细胞的酵母双杂交 cDNA 文库构建国内外未见报道。本研究利用 SMART 技术, 构建了乳鼠成骨细胞的酵母双杂交 cDNA 文库, 为下一步通过酵母双杂交技术, 筛选成骨细胞中促进成骨作用的蛋白及研究其在骨代谢中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

cDNA 文库构建试剂盒及酵母菌株 Y187, 酵母质粒提取试剂盒, YPDA 培养基和 SD/-Leu 营养选择性培养基购自 Clontech 公司。TRIzol 购自

基金项目: 国家自然科学基金资助(30973061)

* 通讯作者: 杨德鸿, Email: drmyang@yahoo.com

Invitrogen 公司。250 bp DNA ladder marker 购自 TaKaRa 公司。出生 2 d 乳鼠购自南方医科大学动物所。

1.2 方法

1.2.1 乳鼠成骨细胞原代培养 乳鼠断颈处死,乙醇浸泡 5 min,取下头部,无菌条件下将表面血管及筋膜去除,用 PBS 反复冲洗颅骨,直至 PBS 中没有血色,剪去硬化骨,剔掉结缔组织,把颅顶骨剪成碎块,加入 2 ml 胶原酶,37℃,消化 20 min,吹打,吸取上清。此过程重复四次。将四次取得的细胞上清离心(2000 rpm,5 min),加入全培,移入培养瓶培养,加入含 10% 胎牛血清的 α -MEM 全配 4 mL,放入 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。待原代长满,换液传代。取第 3 代细胞用于实验。

1.2.2 乳鼠成骨细胞的总 RNA 提取 每瓶细胞加入 2ml Trizol,按 TRIzol 说明书提取总 RNA 并测浓度。

1.2.3 cDNA 第一链的合成 加入 2 ug 总 RNA,1.0 ul CDSIII/6 (oligo) 引物,去离子水补足至 4 ul,轻轻混匀,72℃ 水浴 2 min,冰浴 2 min,14000 g 离心 10 sec。然后依次按表 1 中 d-g 加入,轻轻混匀,25℃,10 min,42℃ 水浴 10 min,加入 1.0 ul SMART III-modified oligo,42℃ 孵育 1 h 后,75℃,10 min 终止第一链合成。冷却至室温,加入 1.0 ul RNase H (2units),37℃ 孵育 20 min。

1.2.4 双链 cDNA 合成 按表 2 顺序加入反应试剂,轻轻混匀,然后进行 PCR 反应,条件为 95℃,30 s,1 个循环,95℃,10 sec,68℃,6 min(a 注释:每轮延伸时间增加 6s)20 个循环,最后终止反应 68℃,5 min。取出 7 μ l 做 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 双链 cDNA (dscDNA) 的纯化 按照说明书准备纯化柱,将 dscDNA 加到胶床平面的中心。700 g 离心 5 min,纯化的 dscDNA 收集在离心管中。用乙醇沉淀 cDNA,加入 1/10 体积 3 M sodium acetate (200 μ l),2.5 倍体积冷冻乙醇(500 μ l)。-20℃ 放置 1 hr。14000 rpm 室温离心 20 min,弃上清,空气中干燥沉淀 10 min。20 μ l 去离子水重新溶解 dscDNA。

1.2.6 Y187 感受态的制备 PEG/LiAc 法制备酵母感受态。取酵母细胞菌液,在 YPDA 琼脂平板上划线,30℃ 倒置培养 3~4d。挑取一个单克隆(直径 2~3 mm),加入 3 mL YPDA 中,轻轻吹打,30℃,250 rpm 振荡孵育 8~12 h。取 5 ul 培养物加到 50 ml 的 YPDA 培养基中,30℃,250 r/min 振荡孵育 16~20

h,待 OD600 为 0.15~0.30 时,室温,700 g/min 离心 5 min。弃上清,重新悬浮沉淀于 100 ml YPDA,30℃,250 r/min 振荡孵育直至 OD600 达到 0.4~0.5(3~5 hr),将菌液分装成 2 管,室温,700 g/min 离心 5 min。弃上清,每管加 30 ml 无菌双蒸水,重新悬浮沉淀,室温,700 g/min 离心 5 min。弃上清,1.5 ml 1.1 \times TE/LiAc 溶液重新悬浮沉淀,分装在两个 1.5 ml 离心管,高速离心 15 s。弃上清,重新悬浮沉淀于 600 μ l 1.1 \times TE/LiAc 溶液。

1.2.7 同源重组及转化 取一 15 ml 离心管,预冷,加入 dscDNA(20ul)、pGADT7-Rec (0.5 μ g/ μ l,6 ul),变性鲑鱼精 DNA(20 ul),600 ul Y187 感受态酵母细胞,轻轻混匀。加入 2.5 mL PEG/LiAc 溶液,轻轻混匀,30℃ 孵育 45 min(每 15 min 混匀一次)。加入 160 ul DMSO,轻轻混匀,42℃ 水浴 20 min(每 10 min 混匀一次)。700 g/min 离心 5 min,弃上清,3 mL YPD Plus 溶液重悬沉淀,30℃ 振荡孵育 90 min。700 g/min 离心 5 min,弃上清,15 mL 0.9% NaCl 溶液重新悬浮。计算转化效率:分别取 100 μ l 稀释 10 倍和稀释 100 倍转化液,涂 SD/-Leu 100 mm 琼脂板,倒置培养 3~5 d,依据公式计算转化效率:每 ml 的克隆数目 \times 总转化混合物体积(ml),剩余转化液分涂在 100 个直径为 150 mm 的 SD/-Leu 选择性平板上。30℃ 倒置培养 3~5 d。

1.2.8 收获克隆 将酵母琼脂板放置于 4℃ 冻存 3~4 h。每个板加入 5 ml 冻存液(25% 甘油 + YPDA),使用(15~20 个)5 mm 的玻璃珠收获克隆,收集所有液体在 500ml 烧瓶中使用细胞计数器估计细胞密度,如果细胞密度 $< 2 \times 10^7$ /ml,可以通过离心,减少上清量浓缩,使细胞密度 $> 2 \times 10^7$ /ml。

表 1 cDNA 第一链合成体系

Table 1 The synthesis system of cDNA first strand.

| 反应体系组成 | 体积 |
|-------------------------------|-------------|
| a. total RNA | 2.0 μ g |
| b. CDSIII/6 (oligo)Primer | 1.0 μ l |
| c. Deionized H ₂ O | 1~2 μ l |
| d. primed RNA sample | 2.0 μ l |
| e. 5X First-Strand Buffer | 2.0 μ l |
| f. DTT | 1.0 μ l |
| g. dNTP Mix | 1.0 μ l |
| h. SMARTMMLV RTase | 1.0 μ l |
| i. SMART III-modified oligo | 1.0 μ l |
| j. RNaseH | 1.0 μ l |

1.2.9 文库质量鉴定 取文库冻存液按 1:100、1:10000 稀释,分别涂 100 ul 稀释液至 100 mm SD/-Leu 平板,30℃ 倒置培养 3~5 d,计数平板菌落。计

算文库滴度:克隆数目(cfu)/稀释混合物涂板体积×稀释系数=cfu/ml。随机挑取 16 个克隆,使用酵母质粒提取试剂盒提取质粒 DNA,用插入片段检测引物做 PCR 反应,验证插入片段。有外源片段插入者为重组子,按照重组子的数量,计算重组率。

表 2 LD-PCR 合成体系

Table 2 The synthesis system of LD-PCR

| 反应体系组成 | 体积(μl) |
|-------------------------------|--------|
| a. First-StrandcDNA | 2.0 |
| b. Deionized H ₂ O | 70 |
| c. 10X PCR Buffer | 10 |
| d. 50X dNTP Mix | 2.0 |
| e. 5' PCR Primer | 2.0 |
| f. 3' PCR Primer | 2.0 |
| g. 10X Melting Solution | 10 |
| h. 50XPolymeraseMix | 2.0 |

2 结果

2.1 乳鼠成骨细胞总 RNA 的鉴定

所提总 RNA A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.99,表明所提 RNA 纯度高;琼脂糖凝胶电泳示:28S 与 18S 条明显的带,28S 与 18S 带浓度及亮度比值约为 2,总 RNA 的浓度为 780ng/ul,表明总 RNA 的完整性较好,降解较少,因此 RNA 质量较优可用于后续研究(图 1)。

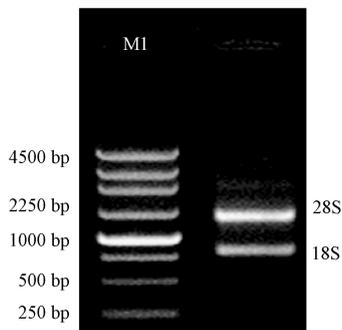


图 1 总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis result of total RNA

M1:5000bp DNA ladder marker

2.2 dsDNA 的鉴定

反转录产物进行长距离 PCR,其产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,乳鼠成骨细胞 cDNA 片段呈长瀑布状,主要分布范围为 500 ~ 4500bp(图 2)。乳鼠成骨细胞 cDNA 经过短片段 cDNA 去除,其大小集中在 500 ~ 4500bp,主要集中为 1500 ~ 4500bp(图 3),弥散范围更加集中。

2.3 菌落 PCR 鉴定 cDNA 文库

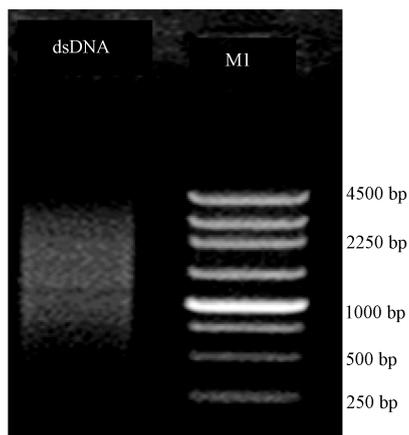


图 2 双链 cDNA 电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis result of dsDNA

M1:5000bp DNA ladder marker

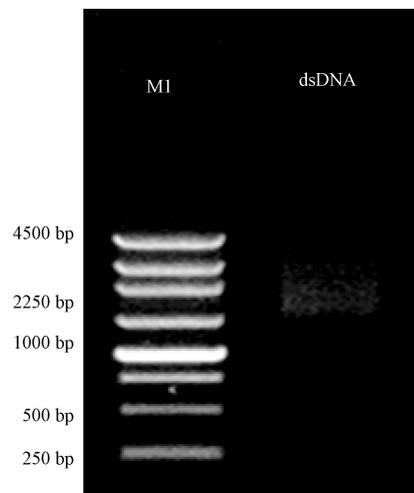


图 3 纯化双链 cDNA 电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis result of dsDNA after purification

M1:5000bp DNA ladder marker

文库转化效率为 3.27×10^7 ,滴度为 1.68×10^7 cfu/mL,重组率为 100%。根据载体插入位点两端的序列设计引物进行菌落 PCR 鉴定,取 16 个 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,插入片段大小分布为 1.5 ~ 4.0 kb,平均长度约为 2.5 kb(图 4)。

3 讨论

本实验使用 SMART 技术构建乳鼠成骨细胞酵母双杂交 cDNA 文库。SMART 技术的基本原理为:将线性质粒 pGADT7-Rec 和含有质粒两端相同序列的 cDNA 一起共转化酵母细胞,两者在酵母细胞中发生同源重组,形成完整的环状文库质粒,然后在相



图4 PCR电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products
M1 :5000bp DNA ladder marker

应的营养缺陷培养基中筛选,从而获得文库质粒^[10]。

SMART技术在构建cDNA文库时有众多优点:首先,SMART方法省去了诸多繁杂的实验步骤,节省了时间,简化了建库过程。其次,以微量的总RNA作为模板,不需要先进行mRNA的分离纯化,从而减少mRNA在分离纯化时的所导致的mRNA的降解。并且SMART技术获得的cDNA全长比例较高,cDNA文库质量更好^[11]。

高质量的mRNA是构建一个高质量的酵母双杂交cDNA文库的关键,而mRNA的完整、均一、不被降解是衡量其质量的标准。本研究采用TRIzol试剂提取总RNA,浓度为780 ng/ul,总RNA A260/A280 = 1.99,表明所提RNA纯度较高,电泳结果还显示,28S和18S条带清晰、且28S的亮度为18S的2倍,提示RNA无降解,质量合格。同时,为了保证文库的质量,本实验用纯化柱的方法去掉多余的杂质和小片段的cDNA,这样不仅可减少必须筛选的重组子的数目,同时还可增加文库中全长目的mRNA的数量。为检验本实验构建的cDNA表达文库的质量,我们随机挑选16个克隆进行PCR扩增,结果显示所有克隆子均有插入片段,平均插入片段的长度约为3.0 kb,为进一步筛选出全长目的基因提供了保证。另外,文库滴度约为 1.68×10^7 cfu/mL,重组率为100%,符合建库标准。

目前在国内尚未见构建乳鼠成骨细胞酵母双杂交cDNA文库的报道。此文库的建立可以直接应用于成骨细胞的分子生物学研究。同时,也为通过酵

母双杂交技术,筛选影响成骨细胞功能的蛋白,进而研究影响其作用的机制。本文库有关酵母双杂交的筛选工作正在进行中。

【参 考 文 献】

- [1] Wang Yongping, Ou Yang, Yuanming, et al. Research progress of regulation of osteoblast differentiation and proliferation [J]. 2011;31,1465-1469.
- [2] Dawson-Hughes B, Looker AC, Tosteson AN, et al. The potential impact of new National Osteoporosis Foundation guidance on treatment patterns [J]. Osteoporos Int, 2010, 21 (1):41-52.
- [3] Dempster DW. Osteoporosis and the burden of osteoporosis-related fractures [J]. Am J Manag Care, 2011, 17 Suppl 6: S164-S169.
- [4] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. Nature, 1989, 340 (6230):245-246.
- [5] Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, et al. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88 (21):9578-9582.
- [6] Peng SL, Quan Y, Pan XM. Construction and screening of cDNA library of osteosarcoma cells [J]. 2007;27,1912-1917.
- [7] Tu YY, Xu RX, Yang ZL. Rapid construction and identification of full-length cDNA library of human glioma tissues [J]. 2003; 23,916-920.
- [8] Jin Xifeng, Pan Zhiha, Chen Xiang. Construction and characterization of yeast two-hybrid cDNA library of hydroxycamptothecin-resistant human colon cancer cell line SW1116/HCPT in yeast cells [J]. 2007;15,500-504.
- [9] Li Jingqi, Liu Li, Ln Lixia. Construction of Yeast Two Hybrid cDNA Library of Human Brain through Homologous Recombination [J]. 2006;27.
- [10] Ma Y P, Ruan Q, Ji Y H, et al. Novel transcripts of human cytomegalovirus clinical strain found by cDNA library screening [J]. Genet Mol Res, 2011, 10 (2):566-575.
- [11] 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.

(收稿日期:2013-03-08)

乳鼠成骨细胞酵母双杂交cDNA文库构建

作者: 林振, 江建明, 袁亮, 冯瑞强, 付兆宗, 孟越, 杨德鸿, LIN Zhen, JIANG Jianming, YUAN Liang, FENG Ruiqiang, FU Zhaozong, MENG Yue, YANG Dehong

作者单位: 南方医科大学南方医院, 脊柱骨科, 广东, 广州, 510515

刊名: 中国骨质疏松杂志 

英文刊名: CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS

年, 卷(期): 2013, 19(9)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201309008.aspx