DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.015
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2003

文章编号:1000-5404(2003)11-0971-03

论著

大劣按蚊成蚊 cDNA 文库的构建与质量鉴定

郝宏兴,徐文岳,段建华,况明书,黄复生 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建大劣按蚊成蚊 cDNA 文库,为进一步筛选、克隆按蚊免疫及疟原虫发育相关基因奠定基础。方法 分离大劣按蚊成蚊 mRNA,用 Stratagene 公司的 ZAP Express 文库构建试剂盒构建 cDNA 文库并鉴定其质量。结果 所建文库滴度达 2.1×10^6 pfu/ml,重组效率达98%以上,插入片段长度平均为1 kb 以上。结论 采用ZAP Express 文库构建试剂盒可以成功构建出较高质量的大劣按蚊成蚊 cDNA 文库。

关键词:大劣按蚊;cDNA 文库
中图法分类号:R342.3;R384.1;R394.2 文献标识码:A

Construction of cDNA library from adults of *Anopheles dirus*

HAO Hong-xing, XU Wen-yue, DUAN Jian-hua, KUANG Ming-shu, HUANG Fu-sheng (Department of Pathogenic Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct cDNA library from adults of *Anopheles dirus* for cloning the immune genes or related genes for malaria parasites development. Methods The mRNA of adult *Anopheles dirus* was isolated. The library was constructed by using the Zap Express vector (Stratagene) and the quality was evaluated. Results The efficiency of the library was 2.1×10^6 pfu/ml with 98% clones positive. The average length of the insert fragment was over 1 kb. Conclusion cDNA library of adult *Anopheles dirus* with high efficiency can be constructed by using the Zap Express library construction Kit (Stratagene).

Key words: cDNA library; *Anopheles dirus*

疟疾是一种严重危害人类健康和流行区国家经济、社会发展的寄生虫病,随着多抗药虫株的出现和媒介按蚊对杀虫剂产生抗性,疟疾的防治面临新的挑战。20 世纪 90 年代初,WHO/TDR 提出了"遗传改造媒介按蚊"的防治策略[1],构建按蚊 cDNA 文库并从中筛选与克隆出按蚊体体内支持或抑制疟原虫发育的相关基因是实现这一策略的前提[2]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 蚊种 大劣按蚊(*Anopheles dirus*):羽化后 3~5 d 龄成蚊,只喂糖水,该蚊种为我国南方主要的疟疾媒介之一,从海南岛采集后经驯化,常规饲养。

1.1.2 试剂盒 总 RNA、mRNA 提取分别采用 Promega 公司 RNAgents(*R*) Total RNA 分离试剂盒及 PolyATtract(*R*) mRNA 分离试剂盒;文库构建采用 Stratagene 公司 ZAP Express 高效文库构建试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 大劣按蚊成蚊 mRNA 的提取 取 3~5 d 龄雌蚊约 300 只,加入异硫氰酸胍变性液后匀浆[3],操作参照 Promega 公司 RNAgents(*R*) 总 RNA 分离试剂盒说明进行。所得 RNA 经1%琼脂糖凝胶电泳及测定 A_{260}、A_{280}分别检查其完整性和纯度。mRNA 的分离使用 Promega 公司 PolyATtract mRNA 分离试剂盒。

1.2.2 cDNA 第 1 链、第 2 链的合成 用 Stratagene 公司的 cDNA 合成试剂盒,以 5 μg mRNA 做模板;Linker-primer 序列如下:5′-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTT TTTTTTTT-3′(下划线处为 *Xho*Ⅰ 酶切位点)。该反应体系总体积为 50 μl,其中 5 μl 第 1 链反应缓冲液,3 μl 甲基化核苷酸底物,2 μl Linker-primer,1 μl RNase 抑制剂,DEPC 处理水与 polyA RNA 共 37.5 μl。轻轻混匀,室温下令引物和 mRNA 模板退火 10 min 后,向反应体系中加入 MMLV-RT(50 U/μl) 1.5 μl,混匀、放 42 ℃水浴 1 h 后加入第二链反应混合物,16 ℃孵育 2.5 h(保证温度不超过 16℃)后置于冰上。

1.2.3 cDNA 末端修饰及大小选择 cDNA 末端修饰包括:DNA Polymerse 催化的末端平滑反应;T4 DNA 连接酶催化的接头连接反应;T4 多核苷酸激酶催化的 *Eco*RI 接头 5′端磷酸化

作者简介:郝宏兴(1967—),男,山西省平定县人,博士研究生,讲师,主要从事疟疾方面的研究,发表论文 8 篇。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,电话:(023)68752244
收稿日期:2002-06-25;修回日期:2002-09-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

反应以及 *Xho* Ⅰ 酶切反应，实验操作均按试剂盒说明进行。cDNA 分级分离采用 Novagen 公司的小量树脂柱分离试剂盒。

1.2.4 cDNA 片段与载体重组及体外包装 合成的 cDNA 3 μl(约 100 ng)与预先用 *Eco*RⅠ 和 *Xho*Ⅰ 处理好的 ZAP-Express 载体在 T4DNA 连接酶(4 U/μl)作用下于 12 ℃连接过夜，反应总体积为 5 μl。(反应体系设置产品提供的阳性对照)。第 2 天，取 2 μl 连接反应用于包装，包装蛋白为 Stratagene Gigapack Gold Packaging Extract，22 ℃，2 h 完成噬菌体 DNA 的包装过程，然后加入 500 μl SM 液和 20 μl 氯仿后贮于 4 ℃。初级文库经常规稀释、感染宿主菌后铺平板测定滴度。

1.2.5 文库的扩增与贮存 将初级文库均分为 20 等份(约 5×10^4 pfu)，每份与 600 μl 宿主菌 XL1-Blue MRF′($A_{600}=0.5$)混合后于 37℃孵育 15 min，然后加入 6.5 ml NZY 顶层琼脂后铺于平板上，于 37 ℃培养 6～8 h，当噬菌斑边缘相接但直径未超过 1～2 mm 时，加入 8～10 ml SM 液，4 ℃振荡过夜。第 2 天收集 SM 上清，离心后加入 7%的二甲亚砜(DMSO)－70 ℃保存。

1.2.6 pBK-CMV 噬菌粒批量内切除 包含于 ZAP-Express 噬菌体序列内部的 pBK-CMV 噬菌粒可以在辅助噬菌体共感染宿主菌时被切除并分泌于细菌外。其反应体系为：1×10^7 pfu 的噬菌体文库与 10 倍数量的 XL1-Blue MRF′宿主菌混合，然后加入 1×10^9 pfu 的辅助噬菌体(ExAssit phage)，37 ℃、15 min 后加入 20 ml NZY 肉汤于 37 ℃摇菌 2.5 h，然后于 68 ℃、20 min 灭活宿主菌和 λ 噬菌体，再于 1 000× *g* 离心 10 min，将上清移至新管即为噬菌粒文库。取 1 μl 上清与 200 μl XLOLR 细菌混合后铺于 LB 抗生素选择平板，经过夜培养测得其滴度为 1.5×10^7 pfu/ml。

1.2.7 PCR 法测定插入片段的长度 取 10^7 pfu 的文库原液与 200 μl 的 XL1-Blue MRF′($A_{600}=0.5$)混合后于 37 ℃孵育 15 min，加入 NZY 顶层琼脂、混匀后铺板。待噬菌体长成后随机取出 10 个噬斑，分别溶于 25 μl SM 液，室温 1 h 后取其中 5 μl 做模板，99 ℃变性 5 min，以 T3 和 T7 启动子引物引导 PCR 反应，检查插入片段的长度。

2 结果

2.1 大劣按蚊成蚊总 RNA、mRNA 的得率与质量

大劣按蚊成蚊总 RNA 得率平均达 3.87 μg/mg 蚊组织，A_{260}/A_{280} 达 1.75，1%琼脂糖电泳可见 5、18、28 S rRNA 条带完整。mRNA 得率达 16 ng/mg 蚊组织；A_{260}/A_{280} 达 1.80；经 1%甲醛变性胶电泳分析所得 mRNA 为介于 500 bp 到 4 kb 以上的一片拖影。

2.2 cDNA 含量测定

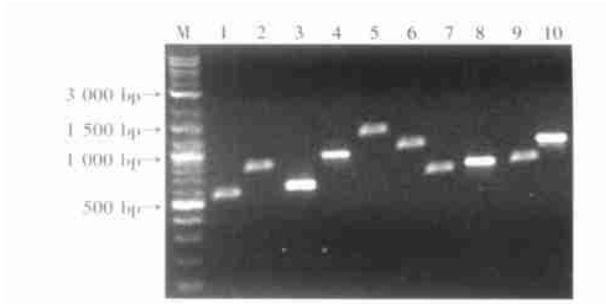
合成的 cDNA 过柱以去除小于 500 bp 的小分子、多余的 *Eco*RⅠ 接头，收集大分子流份经酚、氯仿抽提、乙醇沉淀后溶于 5 μl 无菌水中，取 0.5 μl 经溴化乙啶平板法测定 cDNA 含量约为 30 ng/μl，总得率达 150 ng。

2.3 文库的滴度与重组效率

本研究采用 Stratagene 公司的 ZAP Express 噬菌体载体，目的基因定向插入位于载体多克隆位点内的 *Eco*RⅠ 和 *Xho*Ⅰ 内切酶位点之间，该载体设计通过 α 互补形成蓝白斑筛选重组克隆。1∶10 稀释时 1 μl 噬菌体形成白斑 206 个、蓝斑 4 个，重组率达 98%以上，滴度达 2.1×10^6 pfu/ml；扩增文库滴度达 1×10^{10}～1×10^{11} pfu/ml。

2.4 插入片段的长度

以随机挑取的 10 个噬菌斑为模板，根据载体多克隆位点两端的 T3、T7 启动子序列设计引物做 PCR，扩增产物的 1%琼脂糖电泳结果显示插入片段长度为 600～2 000 bp；平均达 1 000 bp 以上，见图 1。



M: DNA marker; Lanes 1—10: Random phage plaques PCR products

图 1 随机噬菌斑 PCR 产物电泳图谱

Fig 1 PCR products of phage plaques

3 讨论

构建 cDNA 文库是系统地研究一种生物的基因结构与功能的基础，从理论上讲，研究者可以从一个合格的文库中调取任何目的基因。据报道，当一个 cDNA 文库的容量为 4.6×10^4～4.6×10^5 时，得到所需克隆的概率为 99%，从而可筛选出低丰度的 cDNA[4]。本研究构建的 cDNA 文库含 2.1×10^6 pfu/ml，经 PCR 扩增出的插入片段平均长大于 1 kb，完全达到了要求。为方便诸如目的基因扩增、测序等后续实验工作，本研究所得噬菌体文库经内切除转化为噬菌粒文库，其滴度达 1×10^7 pfu/ml。

对于表达型文库，目的 cDNA 片段 5′端编码链在载体启动子下游的正向插入是成功表达的基本条件。本研究采用定向克隆的方法使 cDNA 片段定向插入载体 ZAP Express 的 lac Z 基因下游，提高了 cDNA 的表达几率。双酶切的克隆方式也有效地限制了 DNA 分子及载体分子的自身环化，降低非重组子的产生，所得文库重组效率达 98%以上。同时，双酶切粘端克隆不同于以往的单酶切克隆方式，插入序列均为正向插入载体的 lac Z 基因下游，这样可提高抗体筛选的阳性率。

为进一步验证文库质量，我们以噬菌体或噬菌粒文库为模板，经 PCP 成功地扩增出了大劣按蚊前酚氧化酶(Pro-phenoloxidase，PPO)、前酚氧化酶活化酶(Prophenoloxidase activing enzyme，PPAE)、防御素和核

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

糖体蛋白 S7 的部分序列，为下一步从文库中调取这些按蚊免疫基因的全长奠定了基础。

参考文献：

[1] Crampton J M, Comley I, Eggleston P, *et al*. Molecular biological approaches to the study of vectors in relation to malaria control[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992, 87(Suppl 3): 43－49.

[2] Dimopoulos G, Seeley M D, Wolf A, *et al*. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle[J]. Embo J, 1998, 17(21): 6115－6123.

[3] 金冬雁，黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996. 352－355.

[4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京：高等教育出版社，1993. 247－248.

（编辑　刘洪娥）

文章编号：1000-5404(2003)11-0973-01

个案与短篇

肝血管平滑肌脂肪瘤 1 例

A case report of hepatic angiomyolipoma

徐承平，柳凤轩，阎晓初　（第三军医大学附属西南医院病理学研究所，重庆 400038）

1　临床资料

患者女，47 岁。因“体检发现右肝包块 5 月”于 2003 年 1 月入院。患者 2002 年 8 月在我院体检 B 超发现右肝包块，大小 1.3 cm×1.5 cm，当时疑为“右肝血管瘤”，未引起重视。2002 年 10 月 B 超提示包块略有增大。2002 年 12 月 B 超发现包块大小 2.2 cm×2.4 cm，CT 提示：右肝中后段块影，大小 3 cm×2 cm 低密度块影，考虑肿瘤：①肝血管瘤可能性大；②腺瘤与小肝癌待进一步除外。为明确诊断，5 d 前在 B 超引导下肝脏穿刺病理活检提示：考虑肝透明细胞癌。术中 B 超见肝内 3 cm×2 cm 实质增强回声，边界清，内部回声不均质，可见不规则片状增强回声，包块周边及内部可探及丰富的血流信号。手术见肿瘤质软，呈暗红色，与周围组织边界尚清楚。体格检查和实验室检查无特殊发现。

2　病理检查

巨检：切除部分肝组织，总体积为 4 cm×4 cm×2 cm。剖面见一肿块，大小 2 cm×2 cm×0.5 cm，质地较软，呈灰白及灰红色，未见明显坏死及包膜，但与周围正常肝组织分界清楚。镜检：送检组织于肿块处取材见瘤组织，瘤细胞以上皮样瘤细胞为主，大多呈多边形、圆形或不规则上皮样细胞形态，胞质透亮或强嗜酸性；核大，圆、卵圆或不规则形，居中或偏位，核分裂像少见。瘤细胞多以实性成片或梁索状排列，其间分布大量薄壁血窦和少量厚壁血管及灶性成熟的脂肪组织，见图 1。部分区域可见上皮样瘤细胞和梭形瘤细胞之间的移行过渡，但瘤组织与周围肝组织界限清楚且无移行改变。免疫组化：瘤细胞 CK 和 AFP 阴性，Vimentin 散在阳性，SMA 阳性，S-100 散在阳性，HMB45 强阳性，见图 2。病理诊断：右肝血管平滑肌脂肪瘤。

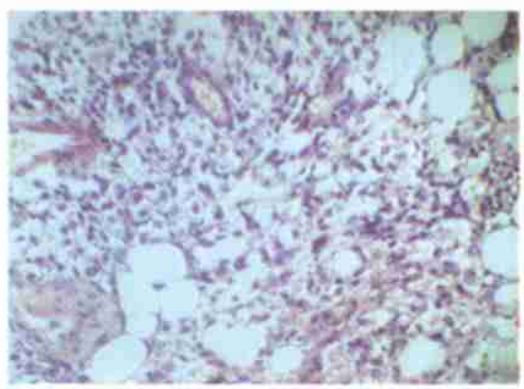


图 1　瘤组织由胞浆透亮的上皮样瘤细胞、薄壁或厚壁血管、成熟脂肪组织构成　(HE×200)

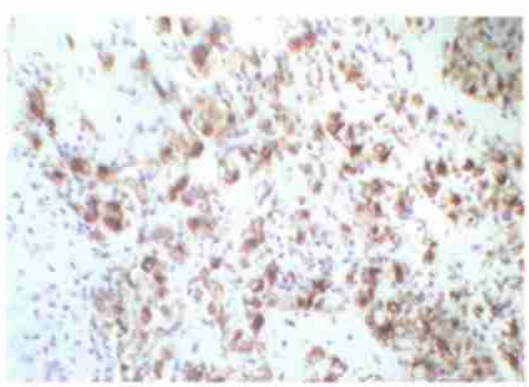


图 2　瘤细胞胞浆 **HMB45** 蛋白表达呈强阳性　(S-P×200)

作者简介：徐承平(1972－)，男，重庆市人，硕士，医师，主要从事肿瘤诱导分化和血管生成方面的研究。电话：(023)68752246

收稿日期：2003-03-08；修回日期：2003-05-08

（下转 976 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net