

梅花鹿生茸区骨膜干细胞 cDNA 表达文库的构建

鲁晓萍^{1,2}, 赵海平², 杨福合², 邢秀梅², 李春义²

(1. 江苏科技大学 生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212018; 2 中国农业科学院 特产研究所, 吉林 吉林 132109)

中图分类号: S865.4⁺2

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2009)10-0115-03

鹿茸是雄鹿额部生长出来的尚未骨化的嫩角, 是雄鹿的第二性征, 具有较高的药用价值。鹿茸是唯一的失去后还能完全再生的器官, 它每天能生长 1~2 cm, 是生长最快的组织。鹿茸不会出现癌变特征, 可以作为很好的器官再生研究模型。搞清楚鹿茸再生机制将为动物组织器官再生提供可借鉴的理论依据。研究证实, 鹿茸的再生来源于角柄骨膜干细胞, 生茸区骨膜细胞层细胞是角柄组织发生所依赖的干细胞, 角柄中不同阶段的软骨及骨细胞都来源于这一细胞层的细胞, 生茸区骨膜干细胞在鹿茸的再生过程中具有不可替代的作用。随着分子生物学技术的发展, 不少研究者把目光放在鹿茸基因方面的研究上。试验利用分子生物学技术成功地构建了梅花鹿生茸区骨膜干细胞 cDNA 表达文库, 为下一步寻找、克隆有关鹿茸再生的新基因打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 鹿生茸区骨膜细胞, 由中国农业科学院特产研究所生物技术室取材培养。

1.1.2 主要试剂 DEPC, Sigma 公司; Trizol Reagent, Invitrogen 公司; mRNA Purification kit, Amersham 公司; Orient Express cDNA Library Construction Systems 试剂盒, (λSCREEN), Invitrogen 公司; DL-2000 Marker, TaKaRa 公司; SM [每升含 5 mol/L NaCl 20 mL, 1 mol/L MgSO₄ 10 mL, 1 mol/L Tris-HCl 50 mL (pH 值为 7.5)], 自配; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 鹿生茸区骨膜的选取 选择初角茸刚开始发育的 4 月龄左右的雄性梅花鹿, 取下鹿头带回实验室; 酒精、碘酒消毒, 刮净鹿茸生长区 (额脊突褶皱处) 及周围的鹿毛, 彻底消毒, 然后进行无菌操作; 小心去掉生茸区的皮肤, 避免伤及骨膜; 暴露骨膜, 把生茸区骨膜四周切断; 用鼠牙镊将生茸区骨膜撕下, 放入 PBS 中, 尽快进行细胞培养。鹿生茸区骨膜比身

体其他部位的骨膜厚, 很容易剥离, 所取骨膜面积大小因鹿而异, 为保证取材真实性, 取额外脊后半部分。

1.2.2 鹿生茸区骨膜细胞的培养 在无菌条件下将所取得的鹿生茸区骨膜剪碎, 用 PBS 洗 1~2 次; 然后加入 30~50 倍体积的胶原酶溶液消化一段时间, 在消化过程中注意观察消化液的混浊情况及细胞的游离情况; 当观察到细胞从组织块游离时, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞; 将收集到的细胞及未被完全消化的组织小块用无血清的 DMEM 洗 1 次, 接种到含双抗和 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液中, 放入 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养; 3~4 d 后观察细胞的贴壁情况, 此后每隔 2 d 换培养液 1 次; 待原代细胞生长到 80%~90% 时 (7~8 d) 进行细胞传代培养, 每隔 2 d 传代 1 次。如果需要保存, 则用液氮冷冻保存。

1.2.3 cDNA 表达文库的构建 (1) RNA 的提取及 mRNA 的纯化。用 Trizol Reagent 提取鹿生茸区骨膜干细胞总 RNA, 用生物素化的 oligo (dT) 亲和层析法分离、纯化鹿生茸区骨膜干细胞 mRNA, 凝胶电泳检测, 分光光度计测定 RNA 浓度, 获得 4 μg mRNA。

(2) 单链 cDNA 合成。以纯化的 mRNA 为模板, oligo (dT) 为引物, Methylation dNTP Mix 为底物反转录合成 cDNA 第 1 链。

(3) DNA 的合成。在 16℃ 条件下利用 DNA polymerase 和 RNase H 合成双链 cDNA。

(4) 末端平化。DNA 聚合酶补平 cDNA 末端, 与 EcoR /Hind 定向接头连接后再分别用 EcoR 和 Hind 酶切消化。

(5) 柱层析。通过柱和凝胶过滤除去多余的接头和小于 300 bp 的 cDNA 片段。

(6) 包装。回收大于 300 bp 的 cDNA 片段, 用 T₄ DNA 连接酶与载体 λSCREEN 于 16℃ 连接过夜, 然后将连接产物体外包装为具有感染性的 λ噬菌体颗粒。

(7) 文库初级库容量的测定。将 1 μL λSCREEN 重组包装产物分别用 SM 按 1×10³, 1×10⁴, 1×10⁵ 倍进行稀释; 取 100 μL 稀释的噬菌体溶液和 100 μL 过夜培养的宿主菌 *E. coli* ER1647, 37℃ 静置吸附 20 min; 加到 47℃ 左右的 3 mL 顶层琼脂糖

收稿日期: 2008-11-14

作者简介: 鲁晓萍 (1982-), 女, 硕士研究生。

通讯作者: 李春义 (1959-), 男, 研究员, 博士。

中,混合均匀后马上倒入 90 mm LB 平板上,37 °C 倒置培养过夜;统计噬菌斑数,计算文库容量,公式为:文库效价 (PFU/mL) = 噬菌斑数 × 稀释倍数 × 10。

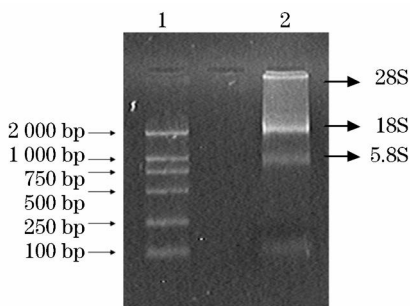
(8)文库的扩增。将 1.5×10^6 原始文库噬菌体克隆铺在 120 mm Hagar 平板上,37 °C 倒置培养至噬菌斑长满 (6~7 h);加入 10 mL SM 洗脱,4 °C 过夜,收集所有洗脱液;加入 5 μ L 氯仿抽提,收集上清液,测定文库效价;加 DMSO 至终浓度为 7%,200 μ L 每管分装后 -70 °C 保存,备用。

1.2.4 表达文库中 cDNA 片段长度的 PCR 鉴定在初级文库库容鉴定的 LB 平板上随机挑取若干个单独的噬菌斑,用 SM 洗脱,4 °C 过夜;以洗脱的噬菌斑为模板,用 λ SCREEN 载体多克隆位点两端的 1 对通用引物 (上游引物为 5' - CGAACGCCAGCACATG-GACAGC - 3';下游引物为 5' - GCTAGTATTTGCT-CAGCGG - 3') 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系:10 × PCR Buffer 5 μ L; dNTP Mix (100 mmol/L) 4 μ L;上、下游引物各 1 μ L (10 pmol/ μ L); TaqDNA 聚合酶 0.2 μ L (1.25 U);文库模板 4 μ L;去离子水 34.8 μ L。扩增参数:94 °C 3 min;94 °C 1 min;58 °C 1 min,72 °C 2 min,35 个循环;最后 72 °C 6 min。取 5 μ L 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,初步估计文库中所插入 cDNA 片段的大小。

2 结果

2.1 RNA 和 mRNA 的检测

经微量核酸蛋白检测仪测定,总 RNA 的 $OD_{260} / OD_{280} = 1.980$,浓度是 1.875 μ g/ μ L;琼脂糖凝胶电泳分析结果见图 1,紫外灯下观察 5.8S、18S、28S 条带很清晰,说明所提取的 RNA 完整无降解。



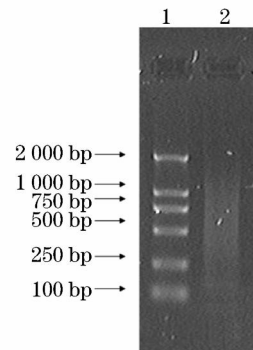
1. DL - 2 000 Marker; 2. RNA。

图 1 总 RNA 的凝胶电泳检测结果

2.2 双链 cDNA 的检测

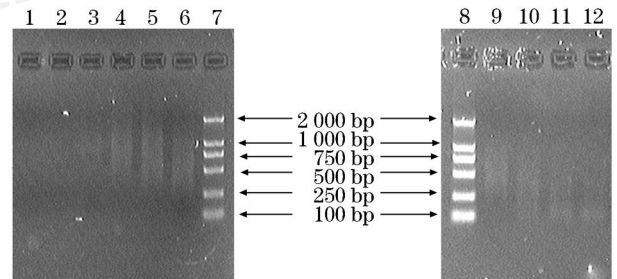
对所合成的双链 cDNA 进行琼脂糖凝胶电泳,检测结果见图 2。图 2 结果显示 cDNA 的分子多数集中在 300~1 500 bp 之间,符合建库要求。柱层析后大片段 cDNA 电泳检测结果见图 3。通过柱层析后回收的 DNA 片段的分子质量大小依次降低,其中 3,4,5 泳道的 cDNA 片段都分布在 300 bp 以上,因此试验

选取了 3,4,5 泳道所代表的 cDNA 片段。



1. DL - 2 000 Marker; 2. cDNA。

图 2 第 2 链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳结果



1,2,3,4,5,6,9,10,11,12 柱层析 cDNA 片段;7,8 DL - 2 000 Marker

图 3 分级分离后大片段 cDNA 片段的电泳检测结果

2.3 cDNA 表达文库初级库容量和库容量扩增结果

以 1×10^4 倍稀释初级文库并测定初级文库的库容量,经计数平板上长有约 150 个噬菌斑,根据文库效价计算公式得出所构建的鹿生茸区骨髓干细胞 cDNA 表达文库初级库容量约为 1.5×10^6 PFU/mL。文库效价理论上达到要求,质量较好,噬菌斑生长情况见图 4。扩增初级文库,扩增后的文库效价约为 9×10^9 PFU/mL。

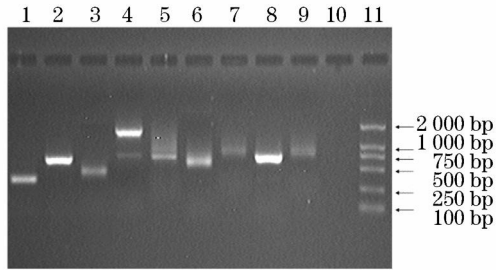


图 4 平板上噬菌斑的生长情况

2.4 PCR 检测结果

将随机挑取的噬菌斑 PCR 通过琼脂糖凝胶电泳,结果显示 cDNA 插入片段在 300~2 000 bp 之间,具体见图 5,证明所构建的表达文库中插入片段的质量较高。

3 讨论



1~10 插入文库中的随机 cDNA 片段; 11. DL - 2 000 Marker.
图 5 表达文库中 cDNA 片段长度的 PCR 鉴定结果

目前,获得新基因的手段有很多,其中 cDNA 表达文库的构建是一种较为简捷、有效的分子生物学方法。试验以鹿生茸区骨膜细胞为材料,采用 Invitrogen 公司的 Orient Express cDNA Library Construction System s (λ SCREEN) 试剂盒首次构建了梅花鹿生茸区骨膜干细胞 cDNA 表达文库。

试验没有直接利用鹿生茸区骨膜来提取 RNA,而是用培养的原代鹿生茸区骨膜细胞来提取 RNA,其原因为:(1)鹿生茸区骨膜组织是雄性鹿性成熟前

的特殊组织,是生茸的组织基础,它的量非常少,并且鹿生茸区骨膜的取材带有明显的季节性,只能在每年的四五月份进行取材,因此它是非常珍贵的材料,如果直接利用既会耗费材料、加大研究成本,又会因季节的限制不利于研究的持续性。(2)鹿生茸区骨膜是一种坚韧的纤维组织,不利于研磨。(3)如果直接用鹿生茸区骨膜组织作为材料提取 RNA,组织块在冻融和保存过程中可能有 mRNA 的降解,同时在研磨的过程中可能会有外源 RNA 酶的污染,不能保证建库所需要的 mRNA 质量。试验直接用 Trizol 试剂裂解活细胞,不用骨膜组织作为材料,在一定程度上避免了上述问题,从根本上保证了 mRNA 的质量,提高了 mRNA 的种类和丰度,保证了 cDNA 文库具有的多样性和代表性。

试验构建的表达文库,其初级库容是为 1.5×10^6 PUF/mL,插入片段均分布在 300 bp 以上,这说明试验构建的文库符合理论要求,为下一步获得与鹿茸再生相关的新基因提供了有利条件,也为进一步研究鹿茸的发生及再生机理奠定了基础。(011)

狐狸、貉、貂发情程度检测仪的研制

苏秀平¹,李威²,杨雪峰²,王禹桥²

(1. 徐州师范大学 机电工程学院,江苏 徐州 221116; 2 中国矿业大学 机电工程学院,江苏 徐州 221116)

中图分类号: S865.1

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2009)10-0117-02

在狐狸、貉、貂人工授精技术应用过程中,准确的发情鉴定是确保母兽在发情旺期适时配种的关键之一。在丹麦、芬兰等养狐发达国家,普遍采用狐狸、貉、貂发情程度检测仪检测母兽发情程度,进而确定母兽最佳人工授精时间。在我国,也有类似仪器的应用。

1 检测仪的理论基础及现状

生物电阻抗技术是利用发情程度检测仪量化判断母兽发情程度的理论依据。该技术是利用生物组织与器官的电特性及其变化规律提取与人体生理、病理状况相关的生物医学信息的检测技术。它通常借助于置于体表的电极系统向检测对象送入 1 个微小的交流测量电流检测相应的电阻抗及其变化,然后根据不同的应用目的获取相应的病理或生理信息。这一理论同样适用于狐狸、貉、貂等野兽。我国的毛皮兽生产和科研人员也报道了北极狐发情期间阴道分泌物电阻抗值的变化规律,因此利用生物电阻抗技术

判断母兽发情程度是可行的。该技术原理是:设 R_0 、 R_1 、 C 分别为细胞外液电阻、细胞内液电阻、细胞膜电容,生物组织的电阻抗 Z 可由下式表示, $Z = R_0 / (ZC + R_1)$ 。

目前,国内研制的狐狸、貉、貂发情程度检测仪的缺点主要表现为:没有数值滤波,测量数据的可靠性不高、显示稳定性差。国外相同功能的测量仪器存在的主要缺点是:采用低档微控制器及并行数据显示,技术老化,体积大。试验所研究的狐狸、貉、貂发情程度检测仪采用的是高档微控制器、串行数据显示及高集成度元器件,经实测发现该仪器能准确测量狐狸、貉、貂等母兽发情期间阴道分泌物的电阻抗值,具有足够的精度(设计精度达 0.5%),重复性好,数据显示稳定性好,体积小,具有良好的应用价值。

2 检测仪的测量原理

检测仪包括电源电路(+9V 电池、恒压源电路和恒流源电路)、主机、控制电路、测量电路、液晶显示和夜间照明电路。恒压源电路为主机、液晶显示、恒流源电路及控制电路提供工作电源,并为主机提供 A/D 转换基准。主机由微控制器作为控制核心,该

收稿日期: 2008-10-31

作者简介: 苏秀平(1971-),女,讲师,博士。