

干旱胁迫下黄檗幼苗 cDNA 消减文库的构建和分析

王慧梅, 王延兵, 祖元刚, 孙莲慧

东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 以干旱胁迫下的黄檗幼苗 cDNA 为 tester, 正常生长的黄檗幼苗 cDNA 为 driver, 利用抑制性消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH) 构建了干旱胁迫下黄檗幼苗的消减文库并对其进行了 EST 序列分析。从消减文库中随机挑取 20 个阳性克隆, 提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定, 显示文库克隆的重组率大于 95%, 插入片段大小大部分集中在 300~800bp 之间。随机挑取 816 个克隆进行测序, 得到 265 个基因。将其进行同源性分析, 划分为 16 类。获得了热激蛋白 70、脱水响应蛋白 (RD22)、通用胁迫蛋白、金属硫蛋白 (MTII)、晚期胚胎丰富蛋白 (LEA14) 等 44 种与干旱胁迫相关的基因, 它们涉及了植物的渗透调节、信号传递、转录调控、活性氧清除等方面。本研究为抗逆基因克隆和系统研究干旱胁迫下黄檗基因的表达奠定了重要的理论基础。

关键词: 干旱胁迫, 黄檗, 抑制性消减杂交, EST 序列分析

Construction and Analysis of Subtractive cDNA Library of *Phellodendron amurense* Under Drought Stress

Huimei Wang, Yanbing Wang, Yuangang Zu, and Lianhui Sun

Key Laboratory of Forestry Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: With cDNA from *Phellodendron amurense* seedlings treated with drought stress as tester and cDNA from this plant in normal growth as driver, we construct cDNA subtracted library using suppression subtractive hybridization (SSH). In the library, the rate of recombination was 95%, the size of inserts was 300~800 bp. Two hundred and sixty-five new genes were obtained by DNA sequencing 816 positive clones picked randomly, and partitioned to 16 classes after nucleotide Blast and BlastX homological analysis against NT, NR, SWISSPROT, KEGG database. Forty-four drought stress associated genes, such as heat shock protein cognate 70, dehydration responsive protein 22, universal stress protein, metallothionein II, late embryogenesis abundant protein, were obtained, which made 16.6% of the overall genes. These genes included osmotic regulator, signal component regulatory protein and antioxidant enzyme. The research had established a basis for cloning stress resistance genes and further studying genes expression in *P. amurense* seedlings under drought stress.

Keywords: drought stress, *Phellodendron amurense*, suppression subtractive hybridization, expressed sequence tags

生长于自然环境之中, 植物经常遇到一些不利的环境因素影响其正常生长。其中干旱是世界范围内对农业影响最大的环境制约因子之一^[1]。因此, 利

用基因工程手段提高植物对干旱的耐受性具有重大的经济潜力, 为了达到这一目的, 一个重要的研究目标是理解植物应对干旱胁迫的分子机制。干旱可

Received: May 16, 2007; Accepted: June 12, 2007

Supported by: the State Key Basic Research and Development Plan of China (No. G19990160).

Corresponding author: Yuangang Zu. Tel: +86-451-82191517; E-mail: zygorl@vip.hl.cn

国家重点基础研究发展规划项目 (No. G19990160)。

以引发植物一系列的反应, 包括基因表达的改变、代谢物(如植物激素ABA或渗透活性物质)的积累以及特定蛋白质(如亲水性蛋白、清除活性氧的功能蛋白、伴侣蛋白等)的合成^[2]。用基因工程手段提高植物对干旱耐受力的基础是阐明与干旱直接相关的功能性基因^[3]。

黄檗(*Phellodendron amuranse* Rupr.) 又名关黄柏、黄波罗, 为芸香科黄檗属, 是第三纪古热带区系的子遗植物。是东北重要的珍贵阔叶树种。从生活史看, 黄檗经历了从第三纪炎热到寒冷等一系列的气候变迁, 对自然的非生物胁迫(如高温、干旱、寒冷)有很强的适应力。通过分析黄檗在干旱条件下诱导的基因表达情况, 将可以从分子水平上对黄檗的抗干旱胁迫的机理进行阐述, 并克隆出其抗旱胁迫中起重要作用的基因, 为系统地进行黄檗耐胁迫分子机理研究奠定了基础, 也为植物基因工程提供了丰富的抗逆基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

黄檗种子采于牡丹江市, 用 70%乙醇对种子表面除菌后, 4℃低温层积 2 个月, 播种在珍珠岩中, 25~30℃光照培养箱培养。大约生长 60 d 左右对黄檗幼苗进行胁迫处理, 减小加水量使其相对水含量达到 65%~70%(约 6~7 d), 未处理的作为对照。处理后, 取幼苗叶片和茎干置于液氮中速冻, -70℃保存。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 mRNA 纯化

以干旱处理的黄檗幼苗为实验组, 未处理的为对照组。取叶片和茎干, 液氮研磨后, 以总 RNA 提取试剂盒 Trizol(Invitrogen)的方法提取总 RNA, 以 Qiagen 公司的 Oligotex mRNA kit 分离纯化 mRNA。将提取得到的总 RNA 和 mRNA 溶于一定体积的无 RNase 的水中。用 GeneQuantII (Pharmacia Biotech) 检测 RNA 质量和浓度。

1.2.2 cDNA 消减文库的构建

分别以干旱处理的实验组 cDNA 为 tester, 未处理的对照组的 cDNA 为 driver。进行抑制性消减杂交, 具体操作依照 Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit User Manual 进行。将第二次 PCR 扩增后

的正向消减产物用 PCR Purification kit (Promega)纯化后, 与 pGEM-T 载体(Promega)连接, 4℃过夜。用化学转化法转化感受态细胞 TOP10(Tiagen), 根据蓝白斑检测文库克隆的重组率, 筛选出有插入片段的阳性克隆。

1.2.3 插入片段的 PCR 和酶切鉴定

随机挑取 20 个阳性克隆, 接种于 LB 液体培养基中, 37℃培养过夜, 然后提取质粒 DNA, 用 pGEM-T 载体两端测序引物 T7、SP6 作为 PCR 引物, 对插入片段进行 PCR 扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳检测其插入片段长度。利用载体插入片段两端分别有 *Nco*I 和 *Pst*I 酶切位点, 用 *Nco*I 和 *Pst*I 对提取的质粒进行酶切, 可以验证阳性克隆和插入片段的大小。

1.2.4 文库的测序与分析

随机挑选阳性克隆, 用碱裂解法提取质粒, 送北京华大生物公司测序, 测序结果在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行同源性比对, 确认为新序列后, 将序列通过 Sequin 软件提交给 Genbank 的 dbEST 数据库。

通过直系同源簇数据库(Clusters of Orthologous Groups of proteins, COGs), 把 EST 序列的编码蛋白质与所有 COGs 中的蛋白质进行比对, 以预测单个蛋白质的功能和整个新基因组中蛋白质的功能。用 Blastp (Blastx)对测序结果进行分析并归类(参数 E-value: 1e-5)根据系统进化关系把它们归入适当的 COG 家族。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物结果分析

消减杂交后先用外侧共有引物进行第一次 PCR 扩增, 然后利用巢式引物进行第二次 PCR 扩增。电泳结果(图 1)显示, 第一次 PCR 扩增后的电泳带很弱, 第二次 PCR 扩增后出现明显电泳带, 片段大部分集中在 0.2 kb~1 kb 之间, 在 600 bp 左右有明显条带, 这说明消减基因得到了富集, 黄檗干旱诱导基因得到了很好的均一化和差减。

2.2 文库的质量分析

蓝白斑检测显示干旱处理的消减文库的重组率高于 95%, 从文库中随机挑取 20 个阳性克隆提取质粒后, 利用载体两端的 T7、SP6 作为 PCR 引物, 进

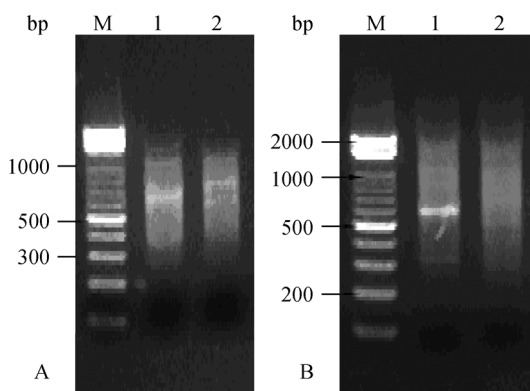


图1 消减杂交后两轮 PCR 扩增产物结果分析

Fig. 1 The result of PCR amplification

(Fig. A: the result of the primary PCR; Fig. B: the result of the secondary PCR, analyzed on a 2.0% agarose/EtBr gel. M: DNA marker; Line 1: forward-subtracted experimental cDNA; Line 2: reverse-subtracted experimental cDNA)

行阳性克隆的 PCR 鉴定, 观察到插入片段的大小分布在 300~850 bp 范围内, 主要集中在 350~700 bp 之间(图 2), 插入片段大小符合要求。同时, 用 *Nco*I 和 *Pst*I 对提取的质粒进行酶切, 也得到了相同的结果(图 3, 部分克隆出现两条条带, 可能是由于插入片段中含有酶切位点)。

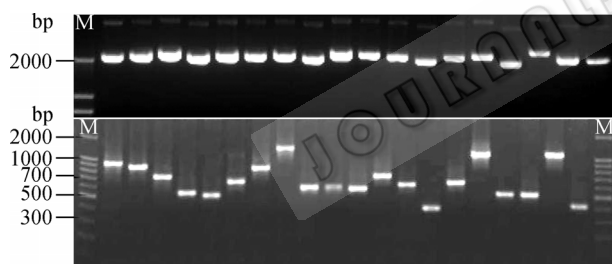


图2 阳性克隆质粒及消减文库部分克隆的 PCR 分析结果

Fig. 2 Plasmid of positive clones and the PCR result using T7/SP6 primers of pGEM-T vector to identify the foreign inserted fragments

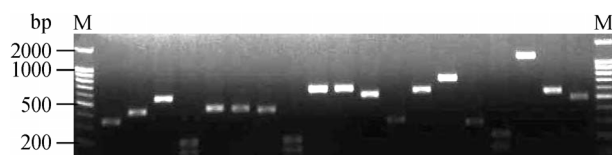


图3 消减文库部分克隆的酶切分析

Fig. 3 Identification of inserted fragments by *Nco*I and *Pst*I enzyme cut (M: DNA marker)

2.3 EST 序列的同源性分析

将所得 EST 序列进行 Blast 分析(Nucleotide Blast and BlastX Against NT, NR, SWISSPROT, KEGG)分

析。利用直系同源簇数据库(COGs)把 EST 序列的编码蛋白质与所有 COGs 中的蛋白质进行比对, 用 Blastp(Blastx) 对测序结果进行分析并归类 (E-value: $1e-5$), 将其划分为 16 类, 即碳水化合物转运和代谢(Carbohydrate transport and metabolism), 如 3-磷酸甘油酸激酶(3-phosphoglycerate kinase)、预测仅有全局功能(General function prediction only), 如衰老相关家族蛋白(senescence-associated family protein)、翻译后修饰, 蛋白质折叠和伴侣蛋白(Posttranslational modification, protein turnover, chaperones), 如泛素基因(ubiquitin)、能量产生和转化(Energy production and conversion), 如乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase)、无机离子转运和代谢(Inorganic ion transport and metabolism), 如钙离子反向转运蛋白(Ca^{2+}/H^{+} antiporter)、氨基酸转运和代谢(Amino acid transport and metabolism), 如丝氨酸/苏氨酸 2A 型蛋白磷酸酶(serine / threonine protein phosphatase 2A)、翻译, 核糖体结构和生物发生(Translation, ribosomal structure and biogenesis), 如翻译起始因子 1(Translation initiation factor 1)、细胞壁/膜/包膜的生物发生(Cell wall/membrane/envelope biogenesis), 如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(UDP-glucose 6-dehydrogenase)、未知功能(Function unknown)、胞间运输, 分泌和膜泡运输(Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport), 如前体蛋白转位酶(Preprotein translocase)、脂类转运和代谢(Lipid transport and metabolism), 如脂肪酸去饱和酶(Fatty acid desaturase)、防卫机制(Defense mechanisms)(见表 1)、复制, 再结合与修复(Replication, recombination and repair), 如超家族 DNA 和 RNA 解旋酶 (Superfamily I DNA and RNA helicases)、信号转导机制(Signal transduction mechanisms), 如膜蛋白 GTP 酶(membrane protein GTPase)、辅酶转运与代谢(Coenzyme transport and metabolism), 如 S-腺苷甲硫氨酸合成酶(S-adenosylmethionine synthetase)、转录相关(Transcription), 如 WRKY 转录因子家族(WRKY family transcription factor)。各类基因数目和所占比例见图 4。

将所得 160 条 EST 序列提交 GenBank, 登录号为 EE489081~EE489240, dbEST 编号为 41213653~41213812。部分干旱诱导的基因见表 1。

表 1 干旱胁迫诱导的黄檗相关基因

Table 1 Part of drought stress related genes of *P. amurensis*

dbEST_ID	GenBank accession NO	Functional annotation	Matching orgaism	Score	E-value
41213727	EE489155	Desiccation-responsive protein 29B	<i>Arabidopsis thaliana</i>	68.6	2.00E-11
41213731	EE489159	heat shock cognate 70 kDa protein 1 (HSC70-1)	<i>Spinacia oleracea</i>	587	1.00E-164
41213734	EE489162	Wound-induced protein 1	<i>Solanum tuberosum</i>	63.2	7.00E-11
41213737	EE489165	DnaJ-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	160	8.00E-40
41213671	EE489099	early-responsive to dehydration stress ERD3 protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	135	1.00E-32
41213720	EE489148	early-responsive to dehydration stress protein (ERD4)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	97.8	2.00E-21
41213681	EE489109	DNAJ heat shock protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	216	9.00E-57
41213688	EE489116	Late embryogenesis abundant protein Lea14-A	<i>Gossypium hirsutum</i>	88.6	3.00E-18
41213693	EE489121	WRKY DNA-binding protein 33	<i>Pimpinella brachycarpa</i>	124	2.00E-27
41213710	EE489138	BURP domain-containing protein	<i>Brassica napus</i>	105	2.00E-23
41213745	EE489173	hypersensitivity-related protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	185	2.00E-47
41213767	EE489195	salt-associated protein	<i>C.sinensis</i>	420	1.00E-114
41213766	EE489194	universal stress protein (USP) family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	113	2.00E-26
41213773	EE489201	temperature stress-induced lipocalin	<i>Triticum aestivum</i>	176	7.00E-45
41213760	EE489188	dehydration-responsive protein (RD22)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	102	1.00E-22
41213794	EE489222	metallothionein 1b	<i>Populus</i>	95.6	1.00E-16
41213782	EE489210	dehydrin	<i>Citrus sinensis</i>	77.8	4.00E-11

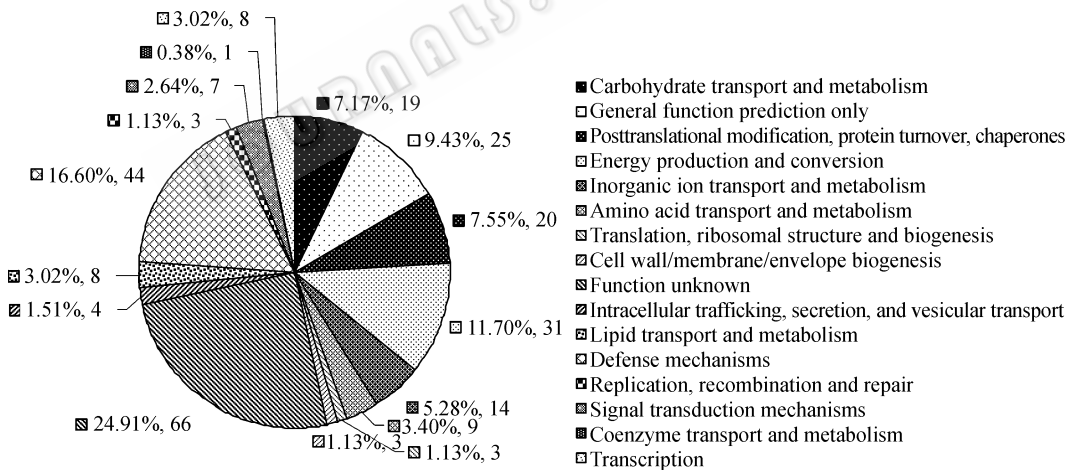


图 4 已知或假定基因的蛋白质直系同源簇功能分类

Fig. 4 Clusters of orthologous groups (COG) of proteins classification of genes with known or putative functional annotation

3 讨论

自 1996 年Diatchenko等建立了一种应用PCR方法和杂交技术相结合的方法筛选差异表达基因的技术^[4]。SSH由于具有高度敏感性、操作简便、目的序列富集程度高、丰度相对一致等突出优点,自问世以来便受到广泛关注,到目前为止已在差异基

因的分离方面得到广泛应用^[5-7]。随着包括人类基因组计划在内的越来越多的生物基因组测序的完成,以及生物芯片技术的成熟, SSH技术和基因芯片技术的结合将促进差异基因的大规模快速筛选,为从整体水平研究基因的差异表达情况,进行大规模、高通量的基因功能研究提供了有效的技术支持^[8,9]。

植物对干旱的响应是植物体内一个复杂的过程,

主要包括干旱信号的感应, 信号转导, 进而引起转录因子以及功能性基因的表达。植物主要通过气孔关闭、渗透性物质积累、活性氧清除以及对膜和蛋白结构的保护等一系列反应作为对干旱的耐受响应^[10,11]。本研究所得的 265 个 EST 序列涉及到黄槿对干旱胁迫响应机制的各个方面, 其中防卫机制相关的基因占到总数的 16.6%, 表明黄槿在干旱的条件下通过表达相关的抗旱基因以响应外界逆境信号。其中有 66 个比对不出较为明确的结果为功能未知基因, 这些基因的表达是否是黄槿对干旱胁迫的反应还需要进一步研究。

迄今为止, 已在植物中发现了几百种胁迫诱导基因, 在功能已确定的基因之中, 除了防卫功能基因外, 很大部分可归类为代谢基因和调控基因, 如蛋白激酶和转录因子^[12]。转录因子可以通过调节下游干旱胁迫相关基因的表达, 目前为止, 已有很多利用转录激活因子或抑制因子来提高植物抗旱性的报道^[13]。文库中涉及到如锌指蛋白(Zinc-finger protein)、WRKY 转录因子(WRKY DNA-binding protein)等, 这为用基因工程手段利用编码转录因子和信号因子研究植物抗旱提供了新的基因和研究思路。

综上所述, 利用 SSH 技术构建黄槿幼苗在干旱胁迫下差异表达基因文库, 并通过 EST 技术研究干旱胁迫过程中所有干旱相关基因的表达情况, 从总体上阐述植物抗旱机制已成为可行性的方法。抗旱基因的研究不仅仅是干旱信号的识别和抗旱基因的开启, 更涉及到抗旱过程中一系列基因的表达和干旱信号的传导和级联反应, 这将在基因水平上有助于我们对抗旱机制的深入理解。

REFERENCES

- [1] Boyer JS. Plant productivity and environment. *Science*, 1982, **218**: 443–448.
- [2] Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 2004, **161**(11): 1189–1202.
- [3] Chaves MM, Oliveira MM. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 2004, **55**(407): 2365–2384.
- [4] Diatchenko L, Lau YC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(12): 6025–6030.
- [5] Wang Y, Chu Y, Liu G, Wang M, Jiang J, Hou Y, Qu G, Yang C. Identification of expressed sequence tags in an alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) cDNA library. *Journal of Plant Physiology*, 2007, **164**(1): 78–89.
- [6] Wong Y, Ho C, Nguyen PD, Teo S, Harikrishna JA, Rahim RA, Wong M. Isolation of salinity tolerant genes from the mangrove plant, *Bruguiera cylindrica* by using suppression subtractive hybridization (SSH) and bacterial functional screening. *Aquatic Botany*, 2007, **86**(2): 117–122.
- [7] Wu J, Shen J, Mao X, Liu K, Wei L, Liu P, Yang G. Isolation and analysis of differentially expressed genes in dominant genic male sterility (DGMS) *Brassica napus* L. using subtractive PCR and cDNA microarray. *Plant Science*, 2007, **172**(2): 204–211.
- [8] Cho SK, Jung KW, Jeung JU, Kang KH, Shim KS, You MK, Yoo KS, Ok SH, Shin JS. Analysis of differentially expressed transcripts from planthopper-infested wild rice (*Oryza minuta*). *Plant Cell Reports*, 2005, **24**(1): 59–67.
- [9] Auburn RP, Kreil DP, Meadows LA, Fischer B, Matilla SS, Russel S. Robotic spotting of cDNA and oligonucleotide microarray. *Trends in Biotechnology*, 2005, **23**(7): 374–379.
- [10] Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Shinozaki KY, Shinozaki K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current opinion in biotechnology*, 2006, **17**(2): 113–122.
- [11] Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Review in Plant Sciences*, 2005, **24**(1): 23–58.
- [12] Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, **16**(2): 123–132.
- [13] Zhang JZ, Creelman RA, Zhu JK. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant physiology*, 2004, **135**(2): 615–621.