

利用 mRNA 荧光差异显示技术规模化筛选 棉纤维特异表达基因

孙 杰^{1 2} 李园莉¹ 汪若海² 夏桂先^{1 *}

¹(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

²(中国农业科学院棉花研究所 安阳 455112)

摘 要 以陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种 TM-1 开花后 9d、21d、27d 三个不同发育时期的棉花纤维为材料,利用 mRNA 荧光差异显示(FDD)技术,筛选到 109 个差异显示的 cDNA 片段。在此基础上,结合两轮反 Northern 杂交筛选和 Northern 杂交分析,获得了多个仅在棉花纤维细胞中特异表达或在纤维中优先表达基因的 cDNA 片段,序列测定和数据库搜索分析表明,这些 cDNA 片段中的多数还未有报道。本工作为克隆上述基因的全长 cDNA,并进一步研究它们在棉纤维发育中的功能奠定了基础。

关键词 棉花,纤维特异表达基因,荧光差异显示

中图分类号 Q781 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)01-0039-04

棉花是世界上最重要的经济作物,其主要产品棉纤维是纺织工业的主要原料。棉纤维是由胚珠表皮细胞经过分化、伸长、次生壁合成和脱水成熟等阶段发育而形成的^[1]。在这些发育过程中形成了纤维的长度、强度、细度等重要的品质性状,虽然前人已经在棉纤维发育的形态及细胞学方面进行了大量和细致的研究,但迄今为止我们对棉纤维发育机制,特别是分子机制还知之甚少。

棉纤维的发育和品质形成可能与成百个基因的表达相关,但迄今为止,数据库中仅有 30 个左右棉纤维特异或优先表达基因的的报道,而且其中大多数基因的功能尚不清楚。因此,继续分离鉴定在棉纤维不同发育时期特异表达的基因,了解他们在纤维伸长和次生壁合成等重要细胞生命活动过程中的作用,不仅有重要的理论价值,而且是人们利用遗传工程手段改良棉纤维品质的重要前提之一。

mRNA 差异显示技术(DD)是研究不同细胞、不同器官之间以及不同环境条件下基因表达差异的有效方法^[2],近年来被广泛应用于真核生物差异表达基因的规模化分离鉴定^[3,4,5],但是在技术上却存在两个明显的缺点(1)重复性差,假阳性率高(2)产

生的差异 cDNA 片段太短(300~500bp),含有的编码信息少。针对这些问题,人们进行了大量的探索,产生了一系列衍生技术,如 EDD(enhanced DD)、ODD(ordered DD)、GDD(genomic DD)、LDD(long-distance DD)和 FDD(fluorescence DD)等,使这一技术不断完善。本工作利用 FDD 技术分析了棉纤维 3 个不同发育阶段基因的表达差异,同时结合两轮反 Northern 杂交筛选^[6],快速简便地筛选到一批棉纤维优先或特异表达基因的 cDNA 片段,Northern 杂交分析验证了这些基因的差异表达。序列测定和数据库分析表明其中多个属于尚未报道的新基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用棉花材料为陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种 TM-1,由中国农业科学院棉花研究所资源室提供。棉花开花当天挂牌标记棉铃,按 6、9、12、15、18、21、24、27 DPA(开花后天数)采集棉铃,剥取籽棉,再用灭过菌的镊子小心地从胚珠上剥取纤维细胞,在液氮中速冻后保存于-80℃冰箱。

TM-1 种子经硫酸脱绒,0.1% 氯化汞灭菌

10min, 去除种壳后播种于 MS 盐培养基中, 在 28℃ ~ 30℃ 光照培养箱中培养 2 周, 分别取根、下胚轴和叶, 花直接从大田植株上采集, 上述材料在液氮中速冻后, 保存于 -80℃ 冰箱。

1.2 总 RNA 的提取

棉花根、下胚轴、叶、花和纤维细胞的总 RNA 的提取参照 John ME^[7]报道的方法。

1.3 mRNA 荧光差异显示(FDD)

荧光差异显示是在 Genomymx(Beckman)仪上进行, 用反转录酶 Superscript II RT(Gibco)分别从 9DPA、21DPA、27DPA 纤维总 RNA 合成 cDNA 第一链, 并以它为模板, 选用 8 对引物进行 PCR。锚定引物由 17bp 的 T7 启动子序列, 12bp 的 polyT 和两个可变碱基组成, 随机引物由 16bp 的 M13 反向序列(M13r)和 10bp 的随机序列组成, 锚定引物 5' 端标记荧光。本实验所用锚定引物为 AP3(5' T7dT₁₂GG 3') 和 AP7(5' T7dT₁₂AC 3'), 随机引物为 APR17(5' M13r-CTGCTAGGTA 3') 和 APR18(5' M13r-TGATGCTACC 3') 和 APR19(5' M13r-TTTTGGCTCC 3') 和 ARP20(5' M13r-TCGATACAGG 3'), 引物组合为 AP3/ARP17、AP3/ARP18、AP3/ARP19、AP3/ARP20、AP7/ARP17、AP7/ARP18、AP7/ARP19、AP7/ARP20。PCR 产物在高分辨率 5.6% 聚丙烯酰胺胶上电泳, 干胶后扫描并分析差异显示 cDNA 条带。

1.4 反 Northern 杂交筛选差异 cDNA 片段

将差异条带从胶上切下并溶于 30μL TE 缓冲液, 取 1μL 为模板, 用 T7、M13r 引物进行 PCR 扩增, 产物回收后溶于 50μL TE 中, 取 2μL 于装有 400μL 0.2mol/L NaOH 的 eppendorf 管中, 37℃ 温育 30min, 取 100μL 用 slot blot 仪(BIO-RAD)转移至尼龙膜上(Hybond-N⁺, Amersham), 同时制备 4 份。叶、9DPA、21DPA、27DPA 的总 RNA 分别用 Superscript II RT(Gibco)进行逆转录, 同时掺入 ³²P dCTP 制备成 cDNA 第一链探针, 分别和上述尼龙膜杂交(第一轮反 Northern)。所获差异片段克隆于 T-载体(pGEM-T Easy, Promega)上, 每个连接取 10 个克隆碱法提取质粒, 按上述方法制备 4 套膜, 用同样 4 种探针杂交(第二轮反 Northern)。

1.5 Northern 杂交

15μg 总 RNA 在 1.2% 琼脂糖甲醛变性胶上电泳, 用毛细法将 RNA 转移到尼龙膜(Hybond-N⁺, Amersham)上, 65℃ 预杂交 2h 后, 利用 Primer-a-gene Labeling System(Promga)标记试剂盒, 对阳性克隆双酶切出的 cDNA 片段进行标记, 用作 Northern 杂交探

针, Church 缓冲液杂交 16h 后洗膜、压片。

1.6 序列分析

DNA 序列由自动测序仪(上海基康生物技术有限公司)测序, 同源性比较在 NCBI Blast 上进行。

2 结果与分析

2.1 mRNA 荧光差异显示(FDD)

棉纤维发育分成起始期、延伸期、次生壁合成期和成熟期四个阶段。棉纤维细胞的伸长开始于开花当天, 12DPA 前后达到最大生长速率, 在 20 ~ 21DPA 停止延伸。次生壁合成始于 14 ~ 16DPA, 27DPA 左右次生壁的沉积速率达到最高值^[8]。因此 9DPA、21DPA 和 27DPA 是棉纤维发育具有代表性的几个时期。为了了解纤维快速伸长期和次生壁合成期基因表达的差异, 分别用 9DPA(快速伸长阶段)、21DPA(伸长停止阶段)和 27DPA(次生壁大量合成阶段)棉纤维为试验材料, 通过 FDD 方法, 对这三个不同阶段基因表达的差异进行了分析比较。如图 1 所示, 在纤维发育的这三个阶段中, 基因表达存在着明显的差异, 共发现 109 个(>400bp)差异表达条带, 其中在纤维快速伸长阶段(9DPA)表达水平高的有 66 条, 伸长停止阶段(21DPA)表达水平高的有 28 条, 次生壁大量合成阶段(27DPA)表达量高的有 15 条。

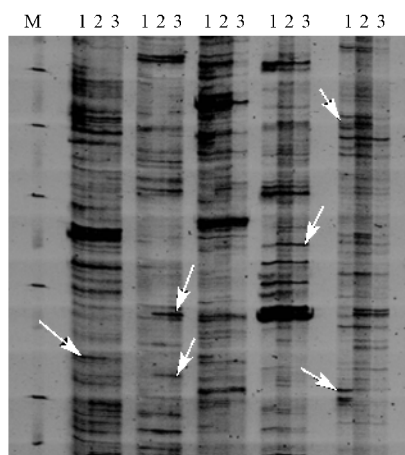


图 1 棉花纤维细胞 mRNA 荧光差异显示结果(部分)
(M 分子量标准, 1~3 9DPA、21DPA、27DPA 棉纤维细胞泳带。箭头示差异显示的条带)

Fig.1 The results of FDD-PCR for mRNA of cotton fibre cell(part)

M molecular ladder; Fiber cell age was shown in DPA. 1: 9DPA; 2: 21DPA; 3: 27DPA. Arrow show differential display fragments

2.2 差异表达基因的反 Northern 分析和克隆

为了减小对各基因独立进行 Northern 分析的工

作量,我们通过两轮反 Northern 方法,对所获 cDNA 片段所代表基因的差异表达进行了鉴定。首先,在严谨条件下分别对上述 109 个差异 cDNA 条带进行 PCR 扩增,PCR 产物回收后点在尼龙膜上(4 张)。以 TM-1 品种的叶(对照) 9DPA、21DPA 及 27DPA 纤维的 mRNA 反转录标记的 cDNA 为探针,进行第一轮反 Northern 杂交,结果筛选到 46 个差异较大的条带(图 2)。考虑到 FDD-PCR 获得的差异片段中可能包含长度相同而序列组成不同的若干条 cDNA 片段,分别把这 46 个差异片段克隆到 T-载体中,转化后各挑选 10 个重组克隆,分别提取质粒,按上述方法进行第二轮反 Northern 杂交分析,结果发现其中的 20 个克隆在纤维发育的三个阶段的杂交信号明显不同,且在以叶为对照的杂交中无信号或信号极弱。

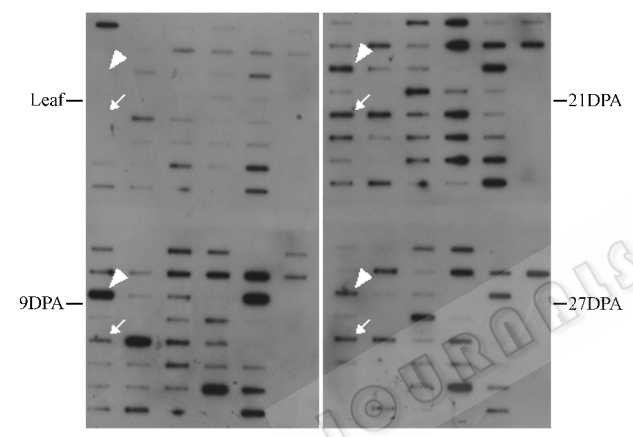


图 2 反 Northern 杂交结果

Fig.2 The results for Reverse Northern

Big arrow :E6 gen(control);Small arrow :cDNA clones of differential expression

2.3 Northern 杂交鉴定及差异表达 cDNA 克隆的 Blast 分析

为了验证上述差异表达 cDNA 克隆的基因差异表达,对部分基因的表达特征进行了 Northern 杂交分析。如图 3 所示,这些基因在棉花纤维发育的不同时期的表达有明显的差异,与反 Northern 杂交结果基本一致。例如,克隆 No. 29-1 主要在 12DPA 和 18DPA 的纤维中表达,且在 18DPA 纤维表达量特别大,这一时期恰好是初生壁与次生壁合成转换时期,推测该基因的表达可能与纤维次生壁的合成有关;克隆 No. 26-1 为纤维特异表达,在纤维发育早期表达量较高,然后随着纤维细胞的发育逐渐下降,推测该基因的表达与纤维细胞的伸长相关。序列测定和同源性比较表明,多数差异表达 cDNA 片段所代表

的为尚无报道的新基因。目前,我们正在进行 cDNA 文库筛选,以得到这些基因的全长 cDNA,并将对其在纤维发育中的功能进行深入探讨。

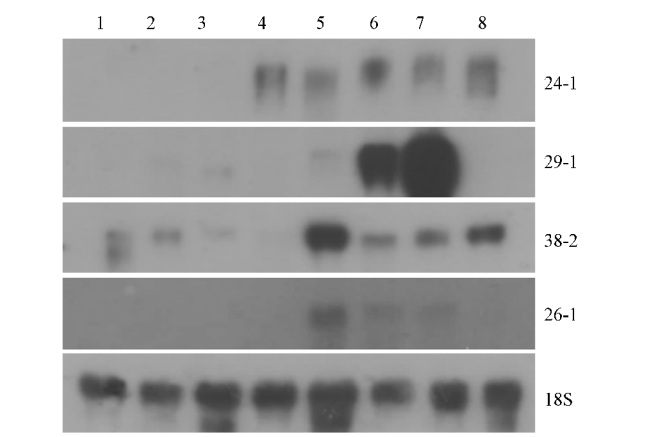


图 3 部分阳性克隆基因表达特征的 Northern 分析

Fig.3 Northern blot analysis of some positive clones from different tissues

1 roots ;2 hypocotyle ;3 leaves ;4 flowers. Fiber cell age was shown in DPA ;Lane 5 ~ 8 :6 ,12 ,18 ,24DPA fiber cell , respectively. The 18S rRNA was used as the RNA loading control

3 讨 论

利用基因工程方法来提高纤维品质是当前棉花育种领域的主攻方向之一,这一方法的关键是要获得控制纤维品质的重要功能基因。由于纤维伸长阶段的发育决定纤维的长度性状,而次生壁合成阶段的发育与纤维的强度和细度品质密切相关,因此,分离鉴定在这些发育阶段特异表达的基因,是获得控制纤维长度和强度等品质性状功能基因的重要途径。

近年来,一些研究者通过对棉花纤维 cDNA 文库的差别筛选、减法杂交和 mRNA 差异显示等方法,获得了一些在纤维发育不同阶段差异表达的基因^[9~14]。美国 Monsanto 公司的 John 实验室对其中的几个基因,分别用 antisense 方法进行了功能鉴定,但发现其表达水平的改变与纤维品质性状没有明显的相关性^[9]。因此,他们认为纤维品质可能受到另外一些尚未分离鉴定的棉花基因的控制。

为了继续寻找在棉纤维发育和品质形成中起重要作用的功能基因,本文利用 mRNA 荧光差异显示技术,结合两轮反 Northern 杂交筛选,对纤维伸长期和次生壁合成期的差异表达基因进行了规模化分离鉴定,获得了多个在棉花纤维细胞快速伸长阶段或次生壁大量合成阶段特异或优先表达基因的 cDNA 片段,并通过 Northern 杂交对其基因表达特征进行

了验证,序列分析表明这些基因多数为未报道的新基因。这些基因的分离鉴定为研究棉纤维发育的分子机理增添了新的试验依据。

目前,我们正在从 cDNA 文库中筛选其全长 cDNA,将通过 RNAi 和过量表达技术进一步探讨这些基因的细胞内功能,并从中寻找与纤维伸长和次生壁合成密切相关的重要功能基因。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Basra AS, Malik CP. Development of the cotton fibre. *Int Rev Cytol*, 1984, **89**: 65 – 113
- [2] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of chain reaction. *Science*, 1992, **257**(5072): 967 – 970
- [3] Wikinson JQ, Lanahan MB, Conner TW *et al.* Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Mol Biol*, 1995, **27**(6): 1097 – 1108
- [4] Benito EP, Prins T, van Kan JAL. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Mol Biol*, 1996, **32**(5): 947 – 957
- [5] Rippmann JF, Michalowski CB, Nelson DE *et al.* Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. *Plant Mol Biol*, 1997, **33**(6): 701 – 799
- [6] Li ZY(李子银), Chen SY(陈受宜). Rapid screening and classification of positive cDNA clones Generated by differential display. *High Technology Letter* (高技术通讯), 1999, **9**(8): 44 – 48
- [7] John ME, Crow LJ. Gene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibre : Cloning of the mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(13): 5769 – 5773
- [8] Wilkins TA. Bioengineering fiber quality : Molecular determinants of fiber length and strength. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences*, 1996, pp. 1679 – 1680
- [9] John ME. Structural characterization of genes corresponding to cotton fiber mRNA, E6 : reduced E6 protein in transgenic plants by anti-sense gene. *Plant Mol Biol*, 1996, **30**(2): 297 – 306
- [10] Rinehart JA, Petersen MW, John ME. Tissue-specific and developmental regulation of cotton gene FbL2A. *Plant Physiol*, 1996, **112**(3): 1331 – 1334
- [11] Orford SJ, Timmis JN. Specific expression of an expansin gene during elongation of cotton fibres. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1398**(3): 342 – 346
- [12] Ping Song, Randy D. Allen. Identification of a cotton fiber-specific acyl carrier protein cDNA by differential display. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1351**(3): 305 – 312
- [13] Zhao GR, Liu JY. Isolation of a cotton RGP gene : a homolog of reversibly glycosylated polypeptide highly expressed during fiber development. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1574**(3): 370 – 374
- [14] Li YL(李园莉), Sun J(孙杰), Li CH(李春红) *et al.* Specific expression of a β -tubulin gene (*GhTub1*) in developing cotton fibers. *Science in China (series C)* (中国科学 C 辑), 2002, **33**(5): 385 – 391

Identification of Genes that are Specifically/preferentially Expressed in Developing Cotton Fibers by mRNA Fluorescence Differential Display (FDD)

SUN Jie^{1, 2} LI Yuan-Li¹ WANG Ruo-Hai² XIA Gui-Xian^{1*}

¹(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

²(Institute of Cotton, Chinese of Agricultural Sciences, Anyang 455112, China)

Abstract Fluorescence differential display (FDD) technique was used to identify genes that are specifically or preferentially expressed in different developmental stages of cotton fiber cells. One hundred and nine differentially displayed cDNA fragments were isolated using 9, 21 and 27 DPA (days postanthesis) fibers as experimental materials. By a combination of two rounds of reverse Northern hybridization and Northern blot analyses, a number of such cDNA fragments were proved to represent fiber-specific/preferential genes. Sequencing determination and database searching indicated that most of these genes are novel. This work is an important step towards cloning the full-length cDNAs and characterizing the cellular functions of aforementioned genes in fiber development.

Key words cotton, fiber-specific expression genes, fluorescence differential display (FDD)

Received : 06-02-2003

This work was supported by Grant from the state 863 High Technology R & D Project of China (No. 2001AA222052).

* Corresponding author. Tel : 86-10-62633629 ; Fax : 86-10-62540939 ; E-mail : guixianx@yahoo.com