

肇莹,肖军,杨镇,等. 转导芦苇总 DNA 耐盐变异水稻 SSH 文库的构建及部分基因特异表达[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):13-16.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.004

转导芦苇总 DNA 耐盐变异水稻 SSH 文库的构建及部分基因特异表达

肇莹,肖军,杨镇,杨涛

(辽宁省农业科学院微生物工程中心,辽宁沈阳 110161)

摘要:通过花粉管通道转导芦苇总 DNA 到水稻辽星 1 号中,以获得的 2 个耐盐变异水稻品系 H1、H2 为材料,对 6 张叶的水稻幼苗进行 0.3% 浓度的 NaCl 溶液诱导处理 24 h。提取经 NaCl 溶液诱导后的叶片 mRNA,经反转录成 cDNA,经过酶解后加接头和 2 次杂交,构建差异表达的抑制消减(SSH)cDNA 文库。以 NaCl 溶液诱导后的耐盐变异水稻 H1、H2 的 cDNA 为检测子(tester),以水稻辽星 1 号 cDNA 为驱动子(driver)。所构建的文库容量分别达到了 240、281 个,表明所构建的文库质量良好。对文库中克隆进行测序分析,在 NCBI 水稻数据库中进行 BLAST 比对,获得了 15 个没有同源性的 EST 序列,其中 9 个 EST 序列功能与植物的抗盐性有关,通过 RT-PCR 技术进一步验证了芦苇总 DNA 转导到水稻中,使水稻获得了抗盐性。

关键词:水稻;芦苇;抑制消减杂交;cDNA 文库;基因表达

中图分类号: S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0013-04

我国沿海盐渍稻区常利用盐水灌溉,过量施用肥料导致土壤盐分积累以及水稻产量下降^[1]。因此,选育耐盐的水稻新品种、充分开发利用盐碱地对于实现农业增收、保障粮食安全具有重要的意义^[2-3]。通过生物技术手段可以加速耐盐水稻品种选育进程,但是耐盐目的基因的转入由于存在基因克隆、质粒构建等一系列问题而受到限制。笔者将具有耐盐性状的芦苇总 DNA 通过花粉管通道法转导至水稻中,经过几代的人工海水筛选获得 2 个稳定耐盐的水稻品系。抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术是一种筛选、分离差异表达基因的方法^[4-5],目前已在小麦^[6]、水稻^[7-9]、马铃薯^[10]、紫秆怪柳^[11-12]、杨树^[13]等多种植物中得到广泛应用。本研究以 2 个耐盐变异水稻为材料,构建水稻抑制消减杂交文库,对阳性克隆进行测序,并结合生物信息学对测序结果进行分析,旨在为通过花粉管通道转导芦苇总 DNA 获得耐盐变异水稻提供可靠的分子生物学证据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为辽星 1 号水稻转导芦苇总 DNA 获得的 2 个耐盐变异品系后代 H1、H2,用浓度为 0.3% 的 NaCl 溶液对其进行诱导处理 24 h。将处理完的水稻倒数第 3 张叶片经液氮速冻后保存于 -80℃ 超低温冰箱备用。植物总 RNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶、超纯 dNTP (10 mmol/L) 均购自天根生

化科技(北京)有限公司;反转录酶 Superscript III 购自 Invitrogen 生物技术有限公司;pGEM-T easy 克隆试剂盒购自 Promega 公司;LA Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;琼脂糖购自西班牙;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Xygen 公司;其他生化试剂购自 Sigma 公司;引物由 Invotrigen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 叶片总 RNA 的提取与纯化 分别取浓度为 0.3% 的 NaCl 溶液诱导处理 24 h 的耐盐变异水稻 H1、H2 和对照辽星 1 号叶片 100 mg,加入液氮充分研磨成粉末,参照天根生化科技(北京)有限公司植物总 RNA 提取试剂盒操作说明提取纯化总 RNA。对纯化后的 RNA 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,观察提取物质量。分光光度计检测 RNA 样品浓度。RNA 样品浓度计算公式如下:RNA 原液浓度 (ng/μL) = $D_{260\text{ nm}}$ × 稀释倍数 × 40。根据 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值估测 RNA 质量。

1.2.2 SSH cDNA 文库的构建 采用 Invitrogen 公司 SuperScript III Transcriptase 反转录酶合成 cDNA 第 1 链。以 cDNA 第 1 链为模板合成双链 cDNA,利用 QIAGEN PCR 产物纯化试剂盒纯化双链 cDNA。采用 Rsa I 限制性内切酶对双链 cDNA 进行单酶切,酶切后用 QIAGEN PCR 产物纯化试剂盒进行纯化与浓缩,取 5 μL 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。分别以耐盐变异水稻 H1、H2 为检测子(tester),对照辽星 1 号为驱动子(driver)进行 SSH 杂交,构建耐盐变异水稻特异表达基因的正向 cDNA 文库。将 SSH-PCR 纯化产物做 TA 克隆、蓝白斑筛选,挑选白斑单菌落在 37℃ 氨苄青霉素抗性条件下培养,提取质粒以通用引物 T7 (5'-TAATACGACTCACTC TATAGGG-3')测序,得到 EST 序列。将测序得到的 EST 序列在 NCBI 水稻数据库中进行核酸 BLAST 比对。

1.2.3 RT-PCR 验证 对 SSHcDNA 文库中筛选的与水稻 cDNA 文库查找没有同源性的 EST 序列设计引物,用 Primer Premier 5 软件设计引物,由 Invotrigen 公司合成引物,采用

收稿日期:2014-09-25

基金项目:辽宁省农业攻关计划(编号:2009208001)。

作者简介:肇莹(1981—),女,辽宁沈阳人,硕士,助理研究员,从事作物遗传学、微生物学研究。E-mail:zhaoying_226@163.com。

通信作者:杨涛,博士,研究员,从事生物技术育种、微生物发酵研究。Tel:(024)31025879。

RT-PCR 技术验证耐盐变异水稻 H1、H2 差异表达基因。

2 结果与分析

2.1 耐盐变异水稻 H1、H2 叶片总 RNA 纯度、质量检测

将提取的耐盐变异水稻 H1、H2 和对照辽星 1 号(CK)总 RNA 用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。由图 1 可知,28 S、18 S 条带清晰。根据条带亮度可以判断,水稻叶片总 RNA 主要由 28 S、18 S 组成。同时谱带亮度明显,表明提取的总 RNA 未被降解,纯度较高。 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值为 1.96,大于 1.8。由此可知,提取的耐盐变异水稻 H1、H2 和对照叶片总 RNA 纯度较高、质量完整,满足进一步抑制消减杂交的要求。

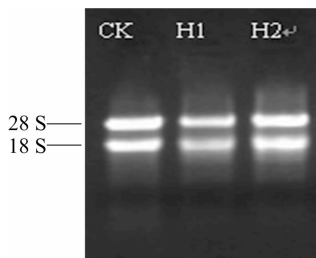
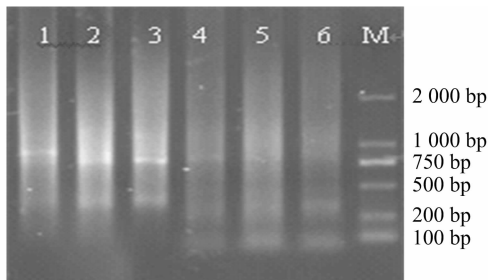


图1 水稻叶片 RNA 的电泳检测结果

2.2 双链 cDNA 合成与酶切电泳检测

1.2% 琼脂糖凝胶检测结果(图 2)显示,酶切前后条带大小发生明显变化,说明酶切效果很好。未经酶切的双链 cDNA 大小在 0.4~10.0 kb 之间呈现弥散带型,且在 750 bp 附近有比较清晰的条带,酶切后的 cDNA 大小在 0.1~2.0 kb 呈现弥散带型,且在 100、300 bp 附近有比较清晰的条带,说明酶切可以充分进行 SSH 杂交。



1—CK 酶切前;2—H1 酶切前;3—H2 酶切前;4—CK 酶切后;5—H1 酶切后;6—H2 酶切后;M—DL 2000

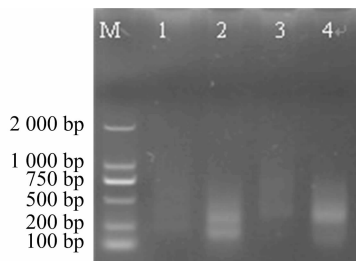
图2 酶切前后的电泳检测结果

2.3 SSH 杂交电泳结果

以 2 次杂交所得产物为模板进行 2 轮 PCR 扩增,将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶检测,耐盐变异后代 H1、H2 经第 1 次消减杂交后,对这些产物进行 PCR,结果显示:泳道 1、3 出现弥散带,并且有主带出现,虽然主带不明显,但也说明差异表达基因已经被均衡消减,达到了去除高丰度基因的目的。在第 1 次杂交混合物中加入新制备的变性 CK cDNA,结果显示,第 2 轮 PCR 后在泳道 2、4 中 150、300 bp 附近有比较清晰的条带,说明经过第 2 次抑制消减杂交后,已经富集诱导表达 cDNA 目的片段(图 3、图 4)。

2.4 TA 克隆及阳性克隆筛选

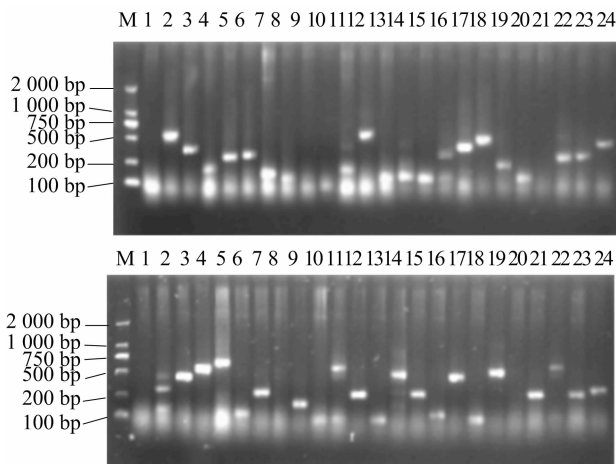
将第 2 次 PCR 扩增产物经 QIAGEN PCR 产物纯化试剂盒纯化后与 pGEM-Teasy 载体连接,转化大肠杆菌。对所构



1—H1 第 1 轮 PCR;2—H1 第 2 轮 PCR;3—H2 第 1 轮 PCR;4—H2 第 2 轮 PCR;M—DL 2 000

图3 2 次杂交后 PCR 结果电泳

建的抑制消减杂交文库进行蓝白斑点筛选并计算重组率[重组率 = 白色菌落数/(蓝色菌落数 + 白色菌落数) × 100%],结果显示,耐盐变异水稻 H1、H2 杂交文库重组率分别为 96.2%、93.2%。随机挑选的 24 个阳性克隆均能扩增出单一清晰条带。H1、H2 杂交文库插入的片段大小为 300~1 000 bp,个别插入片段大于 1 000 bp,平均插入片段大小为 400 bp。



1~24 为随机挑选的 24 个阳性克隆

图4 消减文库部分克隆的菌落 PCR

2.5 SSH 文库测序分析

对挑选的经过菌落 PCR 检测过的差异表达克隆进行测序,以 T7(ACGACTCACTATAGGGCTTTT)为引物。H1 文库得到 240 个高质量的 EST 序列,H2 文库得到 281 个高质量的 EST 序列。将测序质量合格的序列去除序列两端载体序列、接头序列后提交到 NCBI 水稻数据库中进行核酸 BLAST 比对,结果表明,H1 文库有 234 个 EST 序列在水稻 cDNA 数据库中有很高同源性,6 个 EST 序列没有同源性。H2 文库有 272 个 EST 序列在水稻 cDNA 数据库中有很高的同源性,9 个 EST 序列没有同源性。将获得的 15 个与水稻没有同源性的 EST 序列进行功能比对,其中 9 个 EST 序列与植物抗盐性有关,说明通过转导芦苇总 DNA 获得的水稻 H1、H2、辽星 1 号在基因水平上存在差异,芦苇 DNA 与抗盐相关的基因片段转导到水稻 DNA 中从而导致其耐盐性发生改变(表 1)。

2.6 引物设计结果

选取 4 个在水稻 cDNA 数据库中没有同源性的 EST 序列与 5 个具有与抗盐性相关的基因 EST 序列设计引物(表 2)。

表 1 耐盐变异水稻 H1、H2 文库筛选的 抗盐相关基因的主要信息

登录号	注释	相似性(%)
XM_002518218.1	<i>Ricinus communis</i> Photosystem II P680 chlorophyll A, apoproteiputative, mRNA	89
NM_001156199.1	<i>Zea mays</i> ubiquitin - conjugating enzyme E2 - 17 ku (LOC100283297), mRNA	92
BT130300.1	<i>Oryza sativa</i> clone RRlibD00328 mRNA sequence	100
BT131171.1	<i>Oryza sativa</i> clone RRlibB00326 mRNA sequence	100
XM_002265287.2	PREDICTED: <i>Vitis vinifera</i> ubiquitin - conjugating enzyme E2 2 - like (LOC100242801), mRNA	81
HQ013295.1	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group clone KCS059D04 ubiquitin conjugated enzyme mRNA	100
XM_003557814.1	PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> ubiquitin - conjugating transcript variant 3 (LOC100845428), mRNA	84
AY660750.1	<i>Populus tomentosa</i> ubiquitin carrier protein mRNA, complete cds	83
XM_003580628.1	PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> ATP - dependent Clp proteaseproteolytic subunit - like (LOC100828858), mRNA	93

表 2 RT - PCR 分析所用的引物

引物	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)	产物长度 (bp)
X177	F:CGGTAGGGATATAACTAGGCGAC	59	130
	R:TTTGGAGAAGCAATTGGGAG	60	130
X137	F:AAGGTAAATTTTCGGATGACACTC	55	166
	R:TTGGATAACTCGCTGATATAGGT	59	166
X181	F:GTTCTCAGGGTATCCGACGT	59	202
	R:CGTCCTGTATTGAACTCTGC	59	202
X144	F:CCAAACAAAACCTCTCCACAA	63	163
	R:AGTAAGCGAAGCGCTAAGCC	62	163
X205	F:GATTGTGGAGCGGAGCTGGA	62	230
	R:TTCTTTACATAAGCATCAATACCTTATA	56	230
X219	F:TCTTTACATAAGCATCAATACC	52	221
	R:CCGACTAAGCCAAGGACA	56	221
D562	F:CGACTAAGCCAAGGACATGA	57	260
	R:ACCTAGCAGCAACAGCAACT	60	260
D546	F:ATCAAGCTCAGGAATTACAA	54	140
	R:GCCGACTAAGCCAAGGACAC	60	140
D23	F:ACTACCATCCTCCACTCTCACTC	56	487
	R:CCTTCTCACACATACCAACCTAA	56	487

2.7 RT - PCR 验证

从 SSH - cDNA 文库中挑选 9 个阳性克隆进行 RT - PCR 验证。提取水稻耐盐变异新品种以及对照株的 RNA 为模板,进行反转录合成 cDNA,用上述步骤中合成的特异性检测引物进行 PCR 扩增,取 10 μL PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。RT - PCR 扩增后电泳检测,部分结果如图 5 所示,X177、X137 检测引物可从水稻耐盐变异株中扩增出目的条带,对照株辽星 1 号中没有扩增出特异性条带,表明辽星 1 号变异品系成功转入了芦苇总 DNA。X181、X219、D562 检测引物在耐盐变异新品种材料中的表达量较高,条带亮度较为明显,对照株中的表达量较低,PCR 条带较暗,目的基因在植株体内表达量不是很高。D23 没有扩增出目的条带,说明阳性克隆特异性弱。X205、D546 检测引物在辽星 1 号以及耐盐变异株中均扩增出了目的片段且丰度相同,这是因为消减杂交构建文库时可能没有完全消减掉相同的片段,由此说明抑制消减杂交技术还有待改进。X144 在对照辽星 1 号中扩增出了目的条带而在水稻耐盐变异株中没有扩增出目的条带,表明这个阳性克隆是假阳性。为了验证片段的正确性,片段

注:F 为正向引物,R 为反向引物。

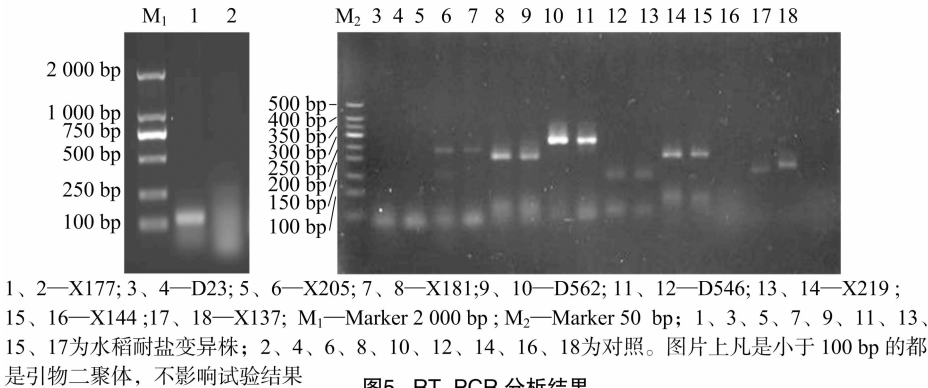


图 5 RT - PCR 分析结果

进行 RT - PCR 扩增后的 PCR 产物再次进行测序,将所得的序列与之前的序列进行比对,发现均属于相同的片段。

3 结论与讨论

通过花粉管通道将外源 DNA 导入整体植物是一种简单易行的生物技术,目前已被广大作物育种工作者用于作物的基因转移^[14]。此技术不但在小麦、棉花、水稻上得以利用,而且在大豆^[15]、花生、烟草、白菜、茄子^[16]、黄瓜等作物上都进行了供体 DNA 的转移。花粉管通道转基因技术初期阶段是以总 DNA 为外源基因供体,虽能引起后代发生变异,但对外

源 DNA 进入胚囊、卵细胞或受精卵以及核基因组或细胞质基因组的行,带有标记基因的质粒或目的基因导入后整合机理,以及引起特定而广泛变异的机制和转化后的表达与调节等问题缺乏理论认识,致使国内外一些学者对其可靠性提出了质疑。自从花粉管通道转基因技术问世,最普遍的疑问是认为变异植株来自种子混杂、异花授粉或自然突变。本研究首次利用 SSH 技术对水稻通过花粉管通道技术转导芦苇总 DNA 获得的变异后代 H1、H2 进行测序研究,最终获得了许多非来源于水稻的表达序列标签。未知基因比例高达 30.0%、34.5%,这些未知基因可能来源于供体芦苇 DNA 片

段与水稻合成相关的新基因。这些 EST 为最终阐明通过花粉管通道转导芦苇总 DNA 获得耐盐变异后代机制提供了直接可靠的分子生物学证据。

3.1 RNA 样本的制备

构建一个高质量的全长 cDNA 的前提是能提取到结构完整、纯度高的总 RNA, 否则就不能保证所构建的文库涵盖 90% 以上的基因。RNA 提取的过程中, 应该创造一个无 RNaseA 的环境, 防止 RNA 降解, 并且选择一种既简单又快捷的提取 RNA 的方法。本研究获得的总 RNA 质量完整, 纯度较高, 为构建高质量的耐盐变异后代 H1、H2 的 cDNA 文库奠定了良好的基础。

3.2 对 SSH 各个环节进行实时监控

本试验抑制消减杂交过程中, 由反转录合成 cDNA 及 *Rsa* I 酶切的检测, 到加接头后的接头连接效率分析直到进行消减 cDNA 片段的消减效率分析, 都要对各个试验环节进行随时监控, 以保证最终能得到高质量的差异表达 cDNA 文库。接头连接效率同整个试验效果直接相关, 接头连接后, 要进行接头连接效率检测。

3.3 阳性克隆的鉴定

菌斑培养的方法是抗生素、蓝白斑筛选, 一般情况下, 使用抗生素筛选则空载体不能成活。蓝白斑筛选可以判断目标片断是否插入到载体中, 白斑或者浅蓝斑表示该菌落质粒中已经含有目标片断。为了能够更准确地判断该克隆是否是水稻诱导后特异表达的基因(正交库)或者诱导后不表达或者表达量减少的基因(反交库), 应当进一步进行菌落 PCR 鉴定, 对目标基因的特异性进行验证。

3.4 EST 序列的分析

RT-PCR 把以 RNA 当作模板的 cDNA 合成同 PCR 结合在一起, 是一种快速灵敏的分析基因表达的方法, 主要应用于对表达信息进行检测, 除此之外还可以用来检测基因表达的差异, 相比于其他包括 RNase 保护分析、Northern 印迹、原位杂交以及 S1 核酸酶分析在内的 RNA 分析技术更加灵敏, 更加便于操作。本试验利用 RT-PCR 差异片段进行扩增, 可以有效避免 DNA 扩增过程所带来的内含子的影响, 从而可以更高效、快速地验证差异片段的正确性。

3.5 EST 序列的分析

泛肽(ubiquitin)是存在于真核细胞中含有 76 个氨基酸残基的高度保守序列的小肽。泛肽途径是真核细胞选择性降解蛋白质的 1 种级联反应途径, 不但能降解变性的、异常的或短命的蛋白, 还能降解植物色素、内膜蛋白、细胞周期蛋白等天然蛋白、转录因子, 因而在转录水平的调节、蛋白的降解、蛋白稳定状态的调节、程序性细胞死亡、细胞周期的控制等过程中有重要作用。泛素类蛋白被各种胁迫所诱导而表达且该家族成员对胁迫反应是相互独立的。菜豆泛肽基因能响应高温、水杨酸、病毒侵染等胁迫, 表明菜豆的泛肽水解途径在清除胁迫条件下累积的损伤蛋白和介导植物的抗逆性具有重要作用。本研究所获 EST 序列(登录号: NM_001156199.1)与玉米泛素结合酶、EST 序列(登录号: XM_002265287.2)的同源性较高。盐胁迫对光反应的影响主要是对光系统 I (PS I)、光系统 II (PS II) 以及电子传递的影响, 通常认为 PS II 是光抑制的原初位点及主要作用部位。PS II 能介导非循

环电子传递, 而且是进行水光解放氧的部位, 在光合作用响应环境胁迫中起着极为关键的作用。本研究所得到的 EST 序列(登录号: XM_002518218.1)与蓖麻 PS II 叶绿素 a P680 假定蛋白的同源性较高。有学者认为, 逆境胁迫下蛋白水解酶活性上升清除因胁迫而产生的畸变蛋白(aberrant proteins)有关。研究表明, 大麦根系蛋白水解酶活性在盐胁迫处理下下降, 这可能是由于形成了具有蛋白酶抑制剂作用的盐适应蛋白, 在盐胁迫条件下维持根系中较高的蛋白质含量。本研究所获 EST 序列(登录号: XM_003580628.1)与二穗短柄草的 ATP 依赖的 Clp 蛋白水解酶的同源性较高。

参考文献:

- [1] 李继开. 水稻抗盐育种前途光明[J]. 盐碱地利用, 1992(3): 10-12.
- [2] 李廷轩. 保护地土壤次生盐渍化的研究进展[J]. 西南农业学报, 2001, 14(增刊1): 103-107.
- [3] 黄 易, 张玉龙. 保护地生产条件下的土壤退化问题及其防治对策[J]. 土壤通报, 2004, 35(2): 212-216.
- [4] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [5] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, et al. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes[J]. Methods in Enzymology, 1999, 303: 349-380.
- [6] 王 转, 臧庆伟, 郭志爱, 等. 小麦幼苗期水分胁迫所诱导基因表达谱的初步分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(8): 842-849.
- [7] 米丽萍, 卫 春, 黄俊生, 等. 水稻凋亡基因 rPDCD5 的克隆和表达分析[J]. 遗传, 2004, 26(6): 893-897.
- [8] Xia M, Wang S F, Wang X B, et al. Identification of phosphorus starvation inducible genes in rice by suppression subtractive hybridization[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45: 736-741.
- [9] 袁红雨, 祝莉莉, 唐 明, 等. 利用抑制消减杂交分离受褐飞虱取食下调的水稻基因[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(3): 305-310.
- [10] Tian Z D, Liu J, Xie C H. Isolation of resistance related genes to phytophthora infestans with suppression subtractive hybridization in the R-gene-free potato[J]. Acta Genetica Sinica, 2003, 30: 597-605.
- [11] 杨传平, 王玉成, 刘桂丰, 等. 应用 SSH 技术研究 NaHCO₃ 胁迫下柞柳基因的表达[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 926-933.
- [12] 刘桂丰, 侯英杰, 王玉成, 等. 干旱胁迫下刚毛柞柳消减文库的构建及分析[J]. 植物研究, 2005, 25(1): 69-73.
- [13] 孙洪波, 王国英, 孙振元, 等. 应用抑制差减杂交法分离粗枝大叶黄杨幼苗的冷诱导表达基因[J]. 中国农业科学, 2005, 38(1): 135-139.
- [14] Hess D. Attempts to transfer kanamycin resistance of bacterial origin in *Petunia hybrida* using pollen as vectors[J]. Biochem Pflanzen, 1981, 111: 76: 322-328.
- [15] 雷勃钧. 导入外源总 DNA 获得大豆早熟新品系[J]. 作物学报, 1996, 22(2): 173-177.
- [16] 林栖凤, 邓用川, 黄 薇, 等. 红树 DNA 导入茄子获得耐盐性后代的研究[J]. 生物工程进展, 2001, 21(5): 40-44.