

周鸣鸣,王 顺,汪亚玲,等. 盐碱胁迫下玉米 EST 数据库对比分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):60-62.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.016

盐碱胁迫下玉米 EST 数据库对比分析

周鸣鸣,王 顺,汪亚玲,蔡洪玉,李德全,谈 蓉,赵德兵,俞 晨,豆长明,张 洁
(南通大学农业部南方平原玉米科学观测站,江苏南通 226019)

摘要:提取了盐碱胁迫处理的玉米 YQ7-96 品系 3 叶 1 心期的叶茎混合组织总 RNA,运用 SMART 技术构建 pDNR-LIB 载体的 cDNA 文库,并随机挑选克隆进行 EST 序列的 BlastX 比对和 MIPS 归类分析。结果发现,在随机挑取的 2 个 4 000 个 cDNA 克隆测序中,95.0% 的 EST 符合分析要求(长度大于 150 bp,非 rRNA),共获得 3 217 条拥有 BlastX 注释信息的 EST 序列,盐碱胁迫的 EST 数据库归类的比例信息比较接近。其中维持正常生理活动占比分别为 50.63% (盐胁迫)和 52.79% (碱胁迫),参与细胞内运输、细胞内信号传导、细胞防御和细胞循环和 DNA 代谢过程的基因分别为 22.05% (盐胁迫)、19.03% (碱胁迫),参与能量代谢和转录相关的基因分别为 15.77% (盐胁迫)、15.36% (碱胁迫)。本研究构建的盐碱胁迫下玉米 cDNA 文库及相关基因表达分析结果,为后续研究提供了基础数据。

关键词:玉米;盐胁迫;碱胁迫;EST;生理功能

中图分类号: S513.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0060-02

玉米(*Zea mays* L.)既是重要的粮食和饲料作物,又是重要的工业原料。目前我国是玉米生产第二大国,仅次于美国,但随着玉米深加工等新兴玉米工业的兴起,市场上玉米供求的矛盾日益加剧,提高玉米的综合生产力已经成为一项紧迫的任务。玉米是对盐碱中度敏感的作物,只能在 0.3% NaCl 以下的土壤上生长,这极大地限制了玉米在盐碱滩地上的生长^[1]。据统计,目前世界上有 100 多个国家存在不同类型的盐碱地,面积达 1 亿 hm²,约占全球耕地面积的 10%;其中我国有 0.26 亿 hm² 的盐碱地^[2]。在盐碱地种植玉米会导致严重减产甚至绝产,通过土壤改良等手段解决盐碱地问题进展缓慢,迫切需要提高品种耐盐碱程度。但玉米耐盐碱种质缺乏,采用常规育种方式选育高耐盐碱玉米新品种十分困难。

盐碱土是在特定自然环境和人为活动因素综合影响下,盐类直接参与土壤形成过程,并以盐(碱)化过程为主导而形成的,具有盐化层或碱化层,其中含有大量可溶盐类,从而抑制植物正常生长的土壤。盐碱土包括盐土、碱土两大类型。盐和碱胁迫同属水分渗透胁迫,其主要的生理变化机制是一致的^[3]。本研究分析了在正常和盐、碱共胁迫下生长的玉米品系 YQ7-96 在 3 叶 1 心期(苗期 20 cm 左右)的 EST 数据库,并对其 EST 进行了初步分析,旨在找出玉米主栽高产品种分子育种基因标记探针。

收稿日期:2015-03-25

基金项目:江苏省高校自然科学研究面上项目(编号:12KJB310009);农业部南方平原玉米科学观测站开放课题基金(编号:NT201409);江苏省博士后科研资助计划(编号:1201023B);南通大学校级课题(编号:2012002);南通大学博士启动基金(编号:03080519、03080227)。

作者简介:周鸣鸣(1977—),男,江苏南通人,博士,副教授,主要从事植物分子遗传学研究。E-mail:13912293932@163.com。

通信作者:张 洁,博士,副教授,主要从事分子遗传学研究。E-mail:zmm7711@163.com。

1 材料和方法

1.1 材料

玉米品系 YQ7-96。

1.2 方法

1.2.1 玉米处理和收集 玉米种子催芽后待根长 2~3 cm 时,点种于营养盘中,Hoagland 营养液培养,置于网室。处理组在 3 叶 1 心期,每盆浇 5 L 的含 100 mmol/L 混合盐(50 mmol/L NaCl,50 mmol/L Na₂SO₄)的 Hoagland 液作为盐胁迫处理组和 25 mmol/L NaHCO₃ 及 25 mmol/L Na₂CO₃ 的 Hoagland 液(pH 值 11,水势为 -0.7 MPa)作为碱共胁迫处理。处理 7 d 后,分别采集玉米的茎叶混合组织,立即用液氮冷冻后保存于 -80 ℃ 备用。

1.2.2 mRNA 的纯化 参照文献[4]提取 RNA。采用 Fast-Track[®] 2.0 Kit (Invitrogen) 试剂盒,并按其操作说明从总 RNA 中提取 mRNA。

1.2.3 EST 文库构建 用 Creator[™] SMART cDNA Library Construction Kit(CLONTECH) 试剂盒并按操作说明进行。

1.2.3 EST 文库克隆片段长度筛选 PCR 引物 1(5'-AA-CAGCTATGACCATG-3');引物 2(5'-GTAAAACGACGGC-CAGT-3'),反应条件:96 ℃ 变性 10 min,94 ℃ 35 s,52 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,30 个循环,72 ℃ 10 min^[4]。

1.2.4 EST 序列分析与注释 同源性比较参数的得分(score)与匹配碱基数和同源性相关 EST 的组装分析按照文献[4]方法进行,用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> 和 MIPS 网站提供的各种生物信息学在线分析工具对 EST 进行在线比对。

2 结果与分析

2.1 EST 数据分析

对盐和碱胁迫 2 个 CDNA 文库各 2 000 个克隆进行了的 5'端测序。经过校正,4 000 条序列中符合要求的(测序中 N 的比例 <5%,外源长度 >150 bp,且是非线粒体,非 rRNA 序

列)共有 3 802 条 EST 序列,占总测序数量的 95.0%。符合要求的 EST 序列从文本格式转换为通用的 FASTA 格式。再利用 vector_screen 软件扫描去除有效序列载体上的序列,同时屏蔽序列上所有的 Poly(A)。“清洁”后的序列进行序列组装分析,3 802 条 EST 中有注释信息的共有 3 217 条(84.6%),无注释信息的共有 585 条(15.4%)(表 1)。

表 1 3 802 条 EST 序列的注释信息比例

类别	数目 (条)	占总测序量的百分数 (%)
注释信息 EST 序列	3 217	84.6
无注释信息 EST 序列	585	15.4
总计	3 802	100.0

2.2 BlastX 注释

2 个 EST 数据库中,已有注释信息的 3 217 条 EST 序列共产生 2 167 条被 MIPS 系统归类的信息(表 2),其中参与新

表 2 玉米 cDNA 文库细胞功能相关 EST 统计和分析

代码	分类信息	盐胁迫		碱胁迫	
		独立 EST 数目(条)	占功能 EST 百分比(%)	独立 EST 数目(条)	占功能 EST 百分比(%)
1	蛋白合成	233	22.68	259	24.90
2	新陈代谢	152	14.80	165	14.47
3	亚细胞水平定位	135	13.15	153	13.42
4	蛋白质加工(折叠、修饰和定位)	121	11.78	152	13.40
5	能量循环	110	10.71	126	11.05
6	细胞运输	65	6.33	75	6.58
7	细胞信号传递	34	3.31	36	3.15
8	转录	52	5.06	49	4.30
9	细胞循环和 DNA 代谢过程	25	2.43	30	2.63
10	细胞防御	30	2.92	27	2.37
11	无法归类	14	1.36	12	1.05
12	具有绑定和必须因子功能的蛋白	13	1.27	18	1.58
13	组织发育	21	2.04	19	1.67
14	运输相关因子	11	1.07	8	0.70
15	细胞构成组分	7	0.68	8	0.70
16	细胞分化	4	0.39	3	0.03
总计		1 027	100.0	1 140	100.0

3 讨论

植物应对盐碱胁迫是一个非常复杂的过程,包括阻止新陈代谢过程、光合速率降低、生长缓慢或停滞,提高或激发胁迫诱导基因的表达、氧化酶活性的提高、ABA 含量迅速增高、渗透调节物质和其他保护性物质的积累、抑制能量消耗途径等^[5]。在长期的进化过程中,植物能够在适应一种逆境的同时提高对其他逆境胁迫的抵抗力,此即植物的交叉适应(cross-adaption)^[6]。植物对逆境的交叉适应具有普遍性,已有研究表明,植物对逆境的适应可能存在共同的机制,盐和碱胁迫同属水分渗透胁迫,其主要的生理变化机制是与干旱胁迫存在相似的机理^[7],但抗胁迫的代谢途径和相关基因也不尽相同^[8]。玉米表达基因 EST 研究中,MGDP 曾经组织了 24 个单位和实验室,构建了不同玉米品种、株系器官组织的 24 个不同的 EST 文库,这些 EST 文库大致可分为以下几类:正常生长组织、盐胁迫、突变株和病菌侵染组织的 EST 文库,测序分析发现了大量新的表达基因([http://www. zmdb. iastate. edu/zmdb/EST/libraries. html](http://www.zmdb.iastate.edu/zmdb/EST/libraries.html))。

如同其他植物一样,玉米可能遭受的逆境多种多样,且常

陈代谢、蛋白质合成加工和亚细胞水平定位的基因所占比例最高,分别达到 50.63%(盐胁迫)和 52.79%(碱胁迫),这 3 类基因表达的蛋白为维持正常生理活动所必需;细胞内运输、细胞内信号传导、细胞防御、细胞循环和 DNA 代谢过程的基因所占比例也较高,分别为 22.05%(盐胁迫)、19.03%(碱胁迫)。这部分基因的高丰度表达可能与玉米抗逆反应有关,同时也表明植物抗逆反应涉及到复杂的信号转导;参与能量代谢和转录相关的基因比例分别为 15.77%(盐胁迫)、15.36%(碱胁迫)。参与细胞发育、细胞分化和细胞构成组分相关的基因含量相对最低,2 个 EST 数据库各项均不超过 2.1%;1.36%(盐胁迫)和 1.05%(碱胁迫)的虽有同源的蛋白,但是无法归于以上的各类。另外,盐和碱胁迫的 EST 数据库除了在蛋白合成和蛋白质加工(折叠、修饰和定位)2 项上占比差异较大,总体上被 MIPS 系统归类的比例信息是比较接近的。

常是多因子的综合作用,其中干旱和盐碱是影响玉米产量和品质最大的非生物逆境胁迫因子。玉米在苗期的耐盐碱性很重要,因为植株苗期的生长情况影响其最终的产量。本试验是在借鉴前人耐盐碱性鉴定方法的基础上对玉米耐盐碱性鉴定的方法进行研究。在玉米对盐碱胁迫最敏感的 3 叶 1 心期进行盐碱胁迫处理 7 d。因此,本研究构建的是对盐碱敏感的生长关键时期 3 叶 1 心期混合组织的表达基因的 EST 数据库,测序分析部分 EST 的信息表明该文库中包含有大量(所分析 EST 中的 52.00%)未知功能基因的 EST。由于该文库是盐和碱胁迫处理下的玉米混合组织的表达基因 EST 文库,包括了在玉米耐受盐碱关键的生长时期,在盐和碱胁迫生长条件下的所有特异表达基因,将会对公共数据库中现存的玉米 EST 数据起到补充作用。

在本试验过程中,玉米盐碱处理浓度是获得相关基因表达的重要因素,因此耐盐碱性浓度的确定是构建耐盐碱性 CDNA 文库的关键。目前,国内外对玉米耐盐碱性鉴定还没有形成统一的、权威的耐盐碱鉴定浓度,大部分的研究者是根据自身的鉴定方法、处理溶液选取不同的鉴定浓度,而且在操作过程中的误差或人为因素都有可能造成鉴定浓度的不同。

王 平,赵巧巧,黄 鹰. 丙酮醛降解酶基因的克隆与高效表达[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):62-65.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.017

丙酮醛降解酶基因的克隆与高效表达

王 平¹,赵巧巧^{1,2},黄 鹰¹

(1. 南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210046;2. 邹平第一中学,山东滨州 256200)

摘要:由于丙酮醛降解酶(methylglyoxal degradation enzyme, MD)是生物体内代谢丙酮醛的一种关键酶,实现 MD 的高效表达对调控丙酮醛的代谢途径具有重要意义。所以根据 *Schizosaccharomyces pombe* GeneDB 中 MD 的基因序列 (SPAC22E12.03C) 设计引物,以粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) cDNA 文库为模板通过 PCR 扩增技术得到目标基因,目的片段全长 576 bp。将 SPAC22E12.03C 连接到 pET-28a(+) 上,得到重组质粒 pET-28a(+)-SPAC22E12.03C,并在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中实现表达。同时,对其目的蛋白的表达条件进行了优化,获得最佳表达条件:诱导温度 37 ℃,诱导起始菌体 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.5~0.6,诱导剂 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L。这为研究粟酒裂殖酵母体内丙酮醛的降解途径打下了坚实基础。

关键词: 粟酒裂殖酵母;丙酮醛降解酶;丙酮醛;基因克隆;基因表达

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0062-04

丙酮醛(methylglyoxal)是在糖酵解、脂质和氨基酸代谢过程中产生的一种对生物体有毒害作用的代谢物^[1-2],性质活跃,属于 α -酮基醛类,由糖酵解的中间产物丙糖磷酸化裂解生成,或由丙酮和氨基丙酮代谢生成^[3]。其醛基可与蛋白

质的氨基基团之间发生非酶性糖基化反应(又称 Maillard 反应)^[4]形成一系列具有高度活性和高度异质性的终产物,从而导致蛋白功能的修改和缺陷,Ward 等研究证实,丙酮醛能通过细胞内颗粒释放而加强应激反应^[5],并进一步诱导细胞的应激反应,包括胞吞、细胞因子释放和细胞凋亡^[6]等,丙酮醛在生物体内过度累积会导致细胞死亡;此外,丙酮醛与生物体的很多病变有关,如慢性糖尿病^[7-8]、结肠癌和乳腺癌等。因此,丙酮醛在生物体内的累积量必须受到严格的控制,丙酮醛降解酶是代谢丙酮醛的一种关键酶,于是对丙酮醛降解酶的研究显得尤为重要。

收稿日期:2015-03-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31070703)。

作者简介:王 平(1990—),女,河南南阳人,硕士研究生,从事粟酒裂殖酵母分子机理研究。E-mail:350479708@qq.com。

通信作者:黄 鹰,教授,从事微生物生物化学与分子生物学研究。E-mail:paula_wong@163.com。

所以,本试验中对耐盐碱性鉴定浓度的筛选是很必要的。本研究最终确定的玉米苗期盐性处理浓度为 100 mmol/L,确定的玉米苗期碱处理浓度为 35 mmol/L;刘芳等研究表明 250 mmol/L NaCl 是玉米苗期耐盐性筛选的理想浓度^[9],崔美燕的研究表明 25 mmol/L Na_2CO_3 可以作为玉米苗期耐碱性鉴定的理想浓度^[10]。本试验中使用的耐盐碱胁迫浓度与其他人的研究存在一定差异,并使用较重的胁迫参数,这样更有利于获得相关的 EST 表达。此外,研究人员曾采用苗情评价的方法对玉米自交系幼苗进行耐盐碱性鉴定,根据盐或碱胁迫处理 7 d 后苗情观察来评价玉米材料的耐盐碱性,非常直观、简单^[10-11]。本试验中也是收集 7 d 的玉米混合组织作为抽提 RNA 的材料。

本研究提取处理玉米品系 YQ7-96 的 3 叶 1 心期的茎叶混合组织的总 RNA,运用 SMART 技术构建 pDNR-LIB 载体的 cDNA 文库,在成功构建了盐和碱胁迫的玉米 cDNA 文库的基础上,对产生的 EST 进行了测序和分析归类,筛选出细胞功能相关 EST,为后续研究提供了基础数据。

参考文献:

[1] 江香梅,黄敏仁,王明庥. 植物抗盐碱、耐干旱基因工程研究进展

[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2001,25(5):57-62.

[2] 王 宁. 不同玉米品种苗期对盐胁迫的生物学响应及耐性机制研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2009.

[3] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681.

[4] 张 洁,焦岳宏,陆海峰,等. 玉米混合组织的 EST 文库的构建和部分 EST 序列的分析[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(3): 243-248.

[5] Barrels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2005, 24: 23-58.

[6] 王翠亭,沈银柱,黄占景. 高等植物中的逆激蛋白及交叉适应综述[J]. 保定师专学报, 1999, 12(4): 34-37.

[7] 彭立新,李德全,束怀瑞. 植物在渗透胁迫下的渗透调节作用[J]. 天津农业科学, 2002(8): 38-43.

[8] Morgan M J. Osmoregulation and water stress in higher plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 1984, 35: 299-391.

[9] 刘 芳,付 艳,高树仁,等. 玉米幼苗的盐胁迫反应及玉米耐盐性的鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(6): 22-26.

[10] 崔美燕. 玉米苗期耐碱种质资源评价及盐碱条件下部分性状遗传分析[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2009.

[11] 付 艳,高树仁,王振华. 玉米种质苗期耐盐性的评价[J]. 玉米科学, 2009, 17(1): 36-39, 50.