

文章编号: 1674-7054(2010)02-0110-04

香蕉叶片低温胁迫下差异表达 cDNA 消减文库的构建

祁君凤¹, 冯仁军², 程 萍², 袁克华², 张丽丽², 张银东^{1,2}(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所
农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海南 海口 571101)

摘 要: 为了解析香蕉寒害的分子机理, 应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)成功构建了香蕉叶片在低温胁迫下与未处理的差异表达的 cDNA 消减文库, 并通过经蓝、白斑筛选, 克隆测序及序列分析, 以及应用半定量 PCR 技术对随机选取的 No. 28 基因片段进行表达分析等方法, 初步分析了实验所构建的 cDNA 消减文库。结果表明, 实验所构建的 cDNA 消减文库为低温胁迫特异表达的 cDNA 消减文库; 测序及序列分析的结果暗示可能有相当多的未知功能基因参与了香蕉抗寒的过程; 随机选取的 No. 28 的表达分析检测结果证实, 通过对构建的 cDNA 消减文库的全面分析, 有可能获得一批低温胁迫诱导特异表达的新基因, 尤其对其功能的深入了解, 将为全面解析香蕉寒害的分子机理、寒害过程中的信号转导打下理论基础。

关键词: 香蕉叶片; 低温胁迫; SSH 差减文库**中图分类号:** Q 786**文献标志码:** A

近年来, 科技工作者从生理、生化等角度对香蕉寒害的机理进行了大量的研究^[1-3]。适当的低温诱导可启动香蕉抗寒基因的表达, 从而促使香蕉的抗寒力得到提高。香蕉未经低温诱导直接冷处理时, 其抗寒基因未表达, 很容易造成香蕉冷伤害。香蕉在低温诱导和冷处理时与常温对照基因的表达情况不同, 因此, 研究其差异表达的基因, 对于认识香蕉的抗寒性有重要的作用。目前, 国内外关于香蕉抗寒基因方面的研究, 主要有我国康国璋等^[4]采用 mRNA 差异显示法, 经水杨酸诱导后进行冷处理的香蕉幼苗与未经处理的基因差异表达, 以及国外 Santos 分析的香蕉在低温下的表达序列标签^[5]。但关于香蕉寒害的分子生物学机理目前仍不清楚^[6-8], 而正确认识冬季寒潮造成香蕉的伤害, 深入了解香蕉寒害的分子机理, 是保证香蕉持续高产、稳产的前提^[9-10]。已有实验结果^[11-13]表明, 香蕉寒害的抗性可能是复杂的、多方面的。为系统解析香蕉寒害的分子机理, 笔者采用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)成功构建了香蕉叶片在低温胁迫下与未处理的差异表达的 cDNA 消减文库, 并对其结果进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 **植物材料** 健康巴西蕉幼苗, 由海南万钟实业有限公司种苗组培有限责任公司提供。

1.1.2 **实验试剂** mRNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司; SSH 差减试剂盒购自 CLONTECH 公司; PCR 试剂购自上海申能博彩公司; DEPC、IPTG 和 X-Gal 等购自上海生物工程公司; 其他常规生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方 法

1.2.1 **试验材料的处理** 对健康巴西蕉幼苗分别进行正常培养和人工气候箱内 4℃ 低温胁迫培养 12

收稿日期: 2010-02-27

作者简介: 祁君凤(1982-), 女, 山西神池人, 海南大学农学院 2007 级硕士研究生。

通信作者: 张银东(1965-), 男, 海南大学教授、博士生导师。

h,分别收集叶片,叶片用双蒸水清洗风干后于 -70 ℃ 低温保存备用。

1.2.2 叶片总 RNA 提取及 mRNA 分离纯化 参照文献 [12] 提供的 SDS 法,稍作改进(研磨时加少许 PVP 粉,水浴时间延长至 1 h,增加 1 次氯仿抽提)后用于提取叶片总 RNA。用 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 质量。采用 Promega 公司提供的 PolyATtract mRNA Isolation Systems III 进行 mRNA 纯化。具体操作参照试剂盒说明书进行。

1.2.3 抑制差减杂交(SSH)及 cDNA 文库的构建 以 4 ℃ 低温胁迫处理 12 h 的香蕉叶片的 cDNA 为 Tester,自然条件下生长(对照)的香蕉叶片的 cDNA 为 Driver,进行正向抑制差减杂交。抑制差减杂交和 cDNA 文库构建参照 SSH 试剂盒和 Clontech PCR-Select cDNA Subtractive Kit 提供的参考说明书进行。

1.2.4 运用菌落 PCR 技术鉴定阳性克隆 使用常规菌落 PCR 技术鉴定阳性克隆,引物为巢式引物。反应结束后,取 5 μL 反应液进行 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 部分 EST(expression sequence tag) 片段序列分析 随机挑选 25 个阳性克隆进行测序。所测序列与 Genbank (<http://www.ncbi.nlm.gov>) 中的序列进行比对,进行同源性检索和分析。

1.2.6 No. 28 EST 的差异表达分析 根据 No. 28 EST 的序列设计引物,提取未经低温处理(对照)总 RNA 及低温处理 10,18,20,22,24 h 后的总 RNA,并反转录成 cDNA,利用半定量 RT-PCR 技术检测该基因在低温处理的不同时间段的表达情况。

2 结果与分析

2.1 叶片总 RNA 提取与质量检测 提取高质量的总 RNA 是成功构建 cDNA 差减文库的关键。对提取的 RNA 进行了凝胶电泳分析,结果见图 1。紫外分光光度计的检测结果为提取的总 RNA 的 OD260/OD280 在 1.9 ~ 2.0 之间,这表明每克叶片可得到大约 400 μg 的总 RNA。从凝胶电泳分析的结果和紫外分光光度计的检测结果可见,利用改进的 SDS 法能有效地提取到香蕉叶片的总 RNA。香蕉叶片的总 RNA 经分离纯化后得 mRNA,mRNA 经紫外分光光度计检测的结果表明,mRNA 的质量能够满足实验中 cDNA 差减文库构建的需要。

2.2 香蕉叶片 cDNA 的 2 次差减杂交和抑制性 PCR 分别将低温胁迫下的叶片和对照的叶片中分离纯化的 mRNA 反转录成 cDNA,以低温胁迫处理的香蕉叶片的 cDNA 为 Tester 和对照的香蕉叶片的 cDNA 为 Driver 进行 2 次正向差减杂交和抑制性 PCR 扩增,结果见图 2。从图 2 可以看出,经抑制消减杂交后的样品 PCR 扩增出的 cDNA 片段明显少于未经 SSH 处理样品 PCR 扩增出的 cDNA 片段;经 SSH 处理后的样品 PCR 扩增产物大小主要在 200 ~ 700 bp 之间,而未经 SSH 处理的样品 PCR 扩增产物大小主要在 100 ~ 1 000 bp 之间。由此说明,样品经过 2 次消减杂交和 2 次抑制 PCR 后,检测子中的差异表达基因得到有效的富集和扩增。

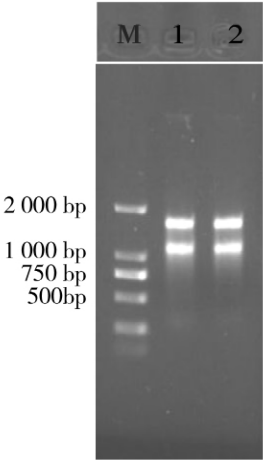


图 1 香蕉叶片的总 RNA 凝胶电泳分析结果
M. 2 000 bp DNA Marker; 1. 对照; 2. 低温胁迫

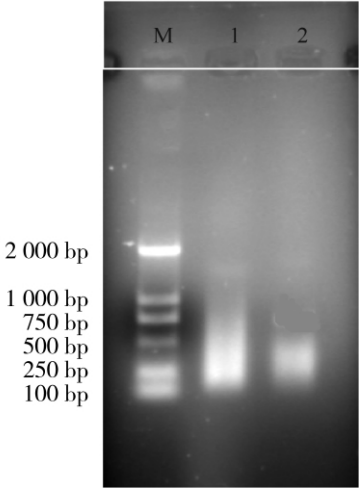


图 2 香蕉叶片 cDNA 2 次抑制差减杂交后 PCR 扩增结果
M. 2 000 bp DNA Marker; 1. 未经 SSH 处理样品的 PCR 产物;
2. 经 SSH 处理后样品的 PCR 产物

2.3 抑制性差减 cDNA 文库的构建及 PCR 检测 回收抑制消减杂交后富集和扩增的差异表达基因片段,与 T-载体连接,转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α ,取 200 μ L 转化菌液涂布平板,共得到 142 个白色菌落组成的 cDNA 差减文库克隆(见图 3)。巢式引物通过菌落 PCR 的检测结果表明,有 135 个克隆含有差异表达 cDNA 插入片段,有 7 个为假阳性克隆,阳性克隆 cDNA 插入片段的 PCR 分析结果(部分结果见图 4)表明,95% 以上的阳性克隆 cDNA 插入片段的大小在 200 ~ 700 bp 之间,这与 4 碱基内切酶 *Rsa* I (平均 44 = 256 个碱基有 1 个酶切位点)酶切 cDNA 的理论值相符。

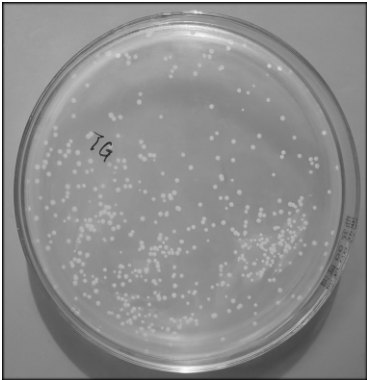


图 3 cDNA 差减文库克隆

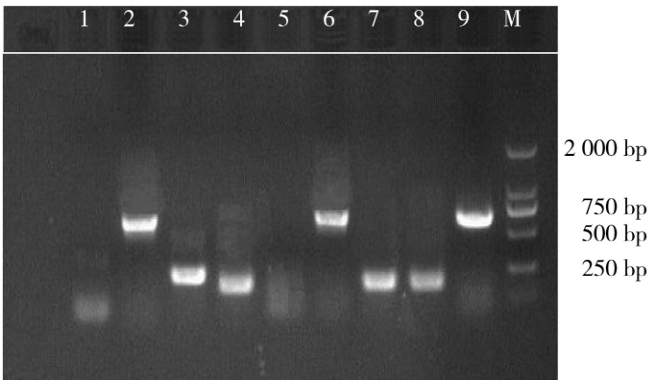


图 4 随机挑选部分阳性克隆菌液的 PCR 分析结果

2.4 EST 片段的测序和同源性分析 随机挑选含有 200 ~ 1 000 bp 插入片段的 20 个阳性克隆进行测序,并通过 Genbank(<http://www.ncbi.nlm.gov>) 中的序列比对分析,8 个 EST(expression sequence tag, 表达序列标签) 属于无任何序列线索的未知序列,4 个属于未知功能的推测蛋白基因,2 个属于未知功能的蛋白基因,3 个与已知功能基因具有较高的同源性,其他为重复序列。表 1 结果表明,抗寒相关的 EST 表达谱(包括同源基因)涉及多种生物,基因功能涉及细胞自身保护、信号传导、系统获得抗性、蛋白质合成、呼吸作用等。至于香蕉寒害差异表达基因的功能还需进一步深入研究和验证。

表 1 低温胁迫下香蕉叶片部分差异表达基因 EST 的同源性分析

克隆编号	同源基因产物名称	来 源	同源基因编号
8	Ampicillin resistance protein	Oryza sativa indica Goup	EU880444
12	Unknown protein	Solanum lycopersicom	BT014160
28	Zinc-finger protein	Sorghum bicdor	XM-002450668
54	ubiquitin extension protein	picea sitchensis	EF667121
89	Unknown protein	zea mays	BT064219
105	No significant similarity found		

2.5 No.28 EST 的差异表达分析 利用半定量 RT-PCR 技术对所获得的表达模式进行了分析。结果表明,在低温胁迫处理后 10 ~ 24 h 范围内随处理时间的增加而表达量增强,自然条件下生长的香蕉叶片中没有检测到该基因的表达。由此说明,该基因是低温胁迫的特异表达基因;同时也证实,构建的 cDNA 文库确为低温胁迫下的差减表达文库。

3 讨 论

为系统认识香蕉寒害分子机理,构建了低温胁迫下香蕉叶片的抑制性 cDNA 消减文库。对随机选取的 20 个克隆进行测序及序列分析的结果表明,大部分基因序列属于未知序列或未知功能蛋白序列,只有少量的 EST 可以在模式植物中找到高度同源的对应基因,这暗示,可能有相当多的未知功能基因参与了香蕉抗寒的过程。随机选取的 No.28 EST 的检测

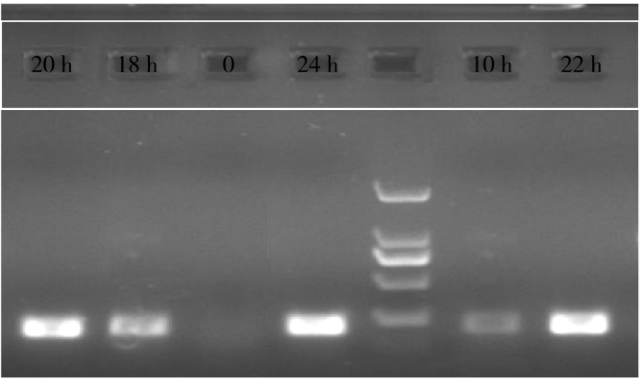


图 5 低温处理不同时间的 No.28 EST 基因表达

结果证实,该基因为低温胁迫特异表达基因,并在一定的范围内随低温胁迫时间的增加而表达量增强,这表明通过对构建的抑制性 cDNA 消减文库的全面分析,有可能获得一批低温胁迫诱导特异表达的新基因,尤其对其功能的深入了解,将为全面解析香蕉寒害的分子机理、寒害过程中的信号转导打下理论基础。

参考文献:

- [1] 五泽槐,梁立峰. 香蕉冷害过程叶片抗坏血酸含量及过氧化氢活性的变化 [J]. 华南农业大学学报,1994,15(3): 71 - 76.
- [2] 吕庆芳,丰峰,张秀枝,等. 香蕉叶片组织细胞结构特性与抗寒性的关系 [J]. 湛江海洋大学学报,2000,20(2): 48 - 51.
- [3] 何若鞅,王光洁. 植物寒冷驯化的机理 [J]. 植物生理生化进展,1987(5): 17 - 29.
- [4] 康国章,孙谷畴,王正询. 水杨酸在植物抗环境胁迫中的作用 [J]. 广西植物,2004,24(2): 178 - 183.
- [5] SANTOS C M, MARTINS N F, HORBERG H M, *et al.* Analysis of expressed sequence tags from *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*, var. *Calcutta 4* (AA) leaves submitted to temperature stresses [J]. *TheorAppl Genet*, 2005, 110(8): 1517 - 1522.
- [6] 黄日升. 香蕉寒害研究进展 [J]. 果树学报,2006,23(3): 448 - 453.
- [7] 沈征言,李木湘. 低温锻炼对番茄幼苗抗寒性的影响 [J]. 北京农业大学学报,1983,9(2): 45 - 49.
- [8] 吴楚,王政权. 脱落酸及其类似物与植物抗寒性之间的关系 [J]. 植物生理学通讯,2000,36(6): 562 - 567.
- [9] BRIAN FOWLER D, ISLAIN BRETON G H, ALLEN E L, *et al.* Photoperiod and temperature interaction regulate low temperature induced gene expression in barley [J]. *Plant Physiol*, 2001(127): 1676 - 1681.
- [10] MARIANA L M, LILIANA B. A rice membrane bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1442 - 1449.
- [11] 雷朝云. 低温霜冻对香蕉生产的危害及生产建议 [J]. 热带作物科技, 1992(6): 67 - 70.
- [12] 王尉,梁国鲁,谢江辉. 香蕉不同组织中总 RNA 提取方法的研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2007, 32(1): 62 - 67.
- [13] 刘长全. 香蕉寒害研究进展 [J]. 果树学报, 2006, 23(3): 448 - 453.

Construction of cDNA Subtractive Library of Banana Leaf under Low Temperature Stress

QI Jun-feng¹, FENG Ren-jun², CHENG Ping², YUAN Ke-hua², ZHANG Li-li², ZHANG Yin-dong^{1,2}

(1. Agricultural College, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Haikou 571101, China)

Abstract: To elucidate the molecular mechanism of cold damage to banana, suppression subtractive hybridization (SSH) library was successfully constructed under low temperature stress and the natural growth conditions. The library was analyzed by the blue & white spot screening, cloning, sequencing and semi-qPCR for No. 28, and the results indicated that there may be some unknown gene involving the anti-cold of banana except No. 28, and it is very possible to obtain more specific express gene under low temperature stress.

Key words: banana leaf; low temperature stress; SSH subtractive library