

低温胁迫下 IPT 诱导水稻幼苗根中的 RNA 差别显示分析*

丁秀英¹ 张 军² 崔 霞¹ 苏宝林¹

(¹中国农业大学作物学院, 北京 100094; ²中国农业大学生物学院, 北京 100094)

提 要 本研究选用抗性相对较弱的水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种越富为实验材料, 利用 DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transcription-PCR) 技术研究了在 4~6 °C 的低温胁迫下 Isoprotolane (IPT) 诱导水稻幼苗抗性增强的部分分子机理。结果表明: 在正常生长条件下, IPT 处理对水稻秧苗根的影响与对照基本相同; 但在低温胁迫下, 两种处理的水稻幼苗根中 mRNA 存在明显差异。这些差异基因有的是在低温胁迫下由 IPT 诱导表达的; 还有一些基因是在低温胁迫下对照中没有而 IPT 处理下仍然有表达的。经二次扩增及反向 Northern 确定了 5 个差异表达的基因。

关键词 水稻; IPT; 基因表达; 差异显示

Studies on Resistance Gene Expression by IPT Inducing under Low-temperature Stress in Root of Rice Seedling

DING Xiu Ying¹ ZHANG Jun² CUI Xia¹ SU Bao-Lin¹

(¹ College of Plant, China Agricultural University, Beijing 100094; ² College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract A part of the molecular mechanism on rice seedling low-temperature stress (4~6 °C) resistance induced by Isoprotolane (IPT) was studied in weak-resistance cultivar Yuefu by Differential Display PCR (DDRT-PCR). The results indicated there is a great difference in cDNA of expressed genes between the treated and controlled rice seedling. No difference was found between the treated and controlled rice at normal condition; but expression difference of genes was found under low-temperature stress in the two different treatments. It is suggested that the special differential fragments are related to IPT induction or low-temperature stress. Five bands were proved to be differential fragments by RNA reverse northern blotting using labeled first strand cDNA as probes.

Key words Rice; IPT; Expression of gene; Differential display

Isoprotolane (IPT) 是一类含硫烷基的叉丙烯酸结构化合物, 它能使植物对病菌、害虫和低温、盐碱等逆境产生非常强的抵抗力和适应力。这种药剂的植物生长调节剂活性的研究

* 国家自然科学基金资助项目 (批准号为 39670429)

作者简介: 丁秀英, 女, 中国农业大学作物学院作物栽培学与耕作学在读博士, 主要从事植物抗逆诱导剂的机理研究; 张军, 男, 中国农业大学生物学院副教授, 博士, 主要从事植物生长调节剂及植物组织培养的研究; 苏宝林, 男, 中国农业大学作物学院作物栽培与耕作学专业教授, 博士生导师, 主要从事水稻高产栽培理论与实践及稻田生物固氮方面的研究。

致谢 中国农业大学生物学院刘淑兰教授对本论文的成稿提出许多宝贵意见和建议, 深表感谢。

收稿日期: 2000-08-29, 接受日期: 2001-03-22

Received on: 2000-08-29, Accepted on: 2001-03-22

起始于 80 年代中期的日本^[1, 2]。中国农业大学张军博士在此基础上研制出更为高效的、具有诱导抗性功能的新型农药制剂移栽灵(主要成分是 IPT), 首先用于防治水稻旱育秧立枯病, 效果十分显著, 进而推广应用到蔬菜、水果、棉花、油菜、大豆、甜菜、西瓜和花卉等多种作物上^[3]。为了迫切了解移栽灵具体的作用机制, 本实验室已经从形态和部分生理指标方面对移栽灵的主要成分 IPT 的作用机理进行了研究。研究发现: 在正常生长条件下, IPT 的作用不是十分明显。但在逆境(4~6 低温或土壤 pH 值高达 9.6)条件下, IPT 处理与对照相比差异十分明显, IPT 在逆境条件下能显著地促进水稻根系的发育, 抑制地上部的生长, 提高幼苗根系的氧化还原力和叶片的叶绿素含量, 提高和保持根系及叶片中 SOD 的活性, 降低 MDA 含量, 增强幼苗对逆境的抵抗和适应的能力^[4, 5]。本实验主要是在前期试验的基础上, 想从分子水平研究低温胁迫下 IPT 是否诱导了水稻幼苗根系中基因的表达发生差异, 这些差异各是什么。

我们利用 DDRT-PCR 技术^[6~9], 以抗性相对较弱的水稻品种越富为材料, 研究了在低温胁迫下 IPT 处理及对照幼苗根系中 mRNA 的差异表达情况, 希望从分子水平为 IPT 的诱抗机制提供一些证据, 为以后克隆这些抗性基因并将其转入其他作物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试水稻品种越富原种用 21% 的盐水选种后, 用清水冲洗干净, 25 浸泡 3 天后将水倒掉, 用湿纱布覆盖种子, 35 催芽 1 天, 选择饱满、无破损、出芽一致的种子播入分别用 40 mg/L 10% IPT 处理和对照的培养基(国际水稻研究所推荐配方)中, 培养盘表面用薄膜覆盖, 于 25 生长, 出苗后撤掉薄膜, 每天浇适量的水以防止培养基失水。在幼苗一叶一心期时用 4~6 的低温处理 3 天, 然后恢复正常生长。分别取常温下和 4~6 低温 3 天的 IPT 处理和对照的水稻幼苗根各 0.1g, 液氮中冻存备用。

1.1.2 mRNA 锚定引物的合成及随机引物 根据文献^[9]在所有锚定 mRNA 群体的 3 种 Oligo dT₁₂A/G/C 中随机选取 Oligo dT₁₂A 作为 cDNA 第一链合成和 PCR 反应的特异引物, 引物由生工公司合成。随机引物是 Operon 的十聚体随机引物 M 组 20 个。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 RNA 中 DNA 的去除 总 RNA 的提取采用一步法(Trizol 试剂为 Sangon 公司产品), 具体步骤按试剂的说明进行。实验中所用一切器皿都经过 210 烘烤、DEPC 水处理等以灭除 RNase。取约 10 μ L 的总 RNA 于 0.5 mL 的离心管中, 加入 30U 的 RNase 抑制剂(鼎国公司)、RQ1 RNase-free DNase I (Promega 公司)按 1 U/ μ g RNA 的用量加入 30 μ L 反应体系中, RQ1 RNase-free DNase I 10 倍反应缓冲液 3 μ L, 最后用 DEPC 处理的灭菌水补至总体积为 30 μ L。37 温育 30 分钟, 酚/氯仿抽提后, 乙醇沉淀总 RNA, 适量 DEPC 灭菌水溶解 RNA 沉淀, 总 RNA 的产量和纯度通过其在 260 nm、280 nm 的紫外吸收值计算得到。总 RNA 样品存于 -20 备用。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 分别以上述 4 种样品的总 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第一链。反应体系(20 μ L)包括: 2 μ g 总 RNA, 2.5 μ mol/L T₁₂A, 20 μ mol/L dNTP RNasin 30U, 逆转录酶 M-MLV 300 单位(Promega), 4 μ L M-MLV 缓冲液(5x), 用 DEPC 处理的灭菌重蒸水补至总体积为 20 μ L, 65 变性 5 分钟, 37 反应 1 小时, 95 5 分钟灭活 M-MLV。

1.2.3 cDNA 片段的 PCR 扩增 PCR 反应体系(20 μL)中包括: cDNA 第一链反应产物 2 μL , 引物 1: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ OligodT₁₂A, 引物 2: 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 十聚体随机引物, 2 μL 10 倍 PCR 反应缓冲液, 2 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, *Taq* DNA 聚合酶 1 个单位(Sangon), 用灭菌重蒸水补至总体积 20 μL , 反应混合物用 20 μL 矿物油覆盖液面后, 在 PCR 仪(中国科学院遗传学研究所)上扩增, 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 30s, 42 $^{\circ}\text{C}$, 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$, 30s, 40 个循环反应后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 5 min。

1.2.4 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 PCR 扩增产物 3.5 μL , 加上样缓冲液 2 μL , 混匀, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 分钟, 在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 电泳缓冲液为 1 \times TBE, 35W 恒功率电泳将近 5 小时。电泳结束后对凝胶进行银染。

按照 N lum 等^[10]的方法进行银染。略作修改后的银染步骤如下:

(1) 10% 冰乙酸固定 30 min 以上, 充分振荡至染料完全褪色(也可以过夜), 用去离子水洗 3 次(2 min/次)。

(2) 染色 30 min (染色液: 2g AgNO₃, 3mL 37% 甲醛, 2L ddH₂O)。为了染色均匀, 将胶板放入染色液之初要剧烈晃动胶板 3~5 分钟, 然后每隔 5~8 分钟晃动胶板一次。30 分钟后将胶板转移到去离子水中, 去离子水洗 2~3 秒立即取出。

(3) 显色(显色液: 16L 752g Na₂CO₃ 10H₂O + 2L 水, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 临用前加入 10 mg/mL Na₂S₂O₃ 5H₂O 400 μL , 3 mL 37% 甲醛): 先用 2L 显色液显色, 待第一批条带出现, 换至另 2L 显色液中, 至理想效果。显色溶液在 10 $^{\circ}\text{C}$ 左右效果最好。

(4) 在固定液中终止显色 2~5 分钟, 再用去离子水洗 2 次(2 min/次)。室温下自然晾干。观察 PCR 产物的差异情况。

1.2.5 差异片段的回收及再扩增 观察带型分布, 照相后, 用干净的手术刀片从凝胶上切下差异带, 放入干净的管中, 用枪头捣碎胶, 加无菌双蒸水 40 μL , 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 分钟, 离心, 取上清液 4 μL 进行二次 PCR 扩增, 扩增条件不变, 0.8% 琼脂糖电泳检测。用 DNA 快速纯化/回收试剂盒(鼎国生物)回收 PCR 产物。

1.2.6 差异片断的反向 Northern 杂交鉴定

1.2.6.1 点膜: 各取 50 ng 回收的 PCR 产物, 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 冰上冷却, 用点样器将样品点到四套尼龙膜上, 120 $^{\circ}\text{C}$ 烤膜 30 分。

1.2.6.2 探针制备、杂交以及免疫检测: 参照 Roche 公司 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 的说明进行。

2 结果与分析

2.1 水稻品种越富在不同处理下的生长差异

本实验选用的水稻品种越富是一个在北京地区推广、品质特优但抗寒性和抗病性都比较差的品种, IPT 处理和对照下该品种幼苗的地上部和地下部的生长表现出一定的差异(图 1): 用 IPT 处理对幼苗表现为促下控上, 地上部较对照矮一些, 但地下部根系却比较发达, 与对照相比, IPT 处理后幼苗根粗、壮而且比较白, 这种差异在低温胁迫后表现尤甚。

2.2 水稻幼苗根中总 RNA 的抽提及其中 DNA 的去除

用 1% 甲醛变性凝胶(加溴化乙锭至终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)电泳鉴定 RNA 的完整性(图 2), 其浓度根据 OD₂₆₀ 估算。平均为 0.48 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 左右的 RNA; 其纯度根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 估算:

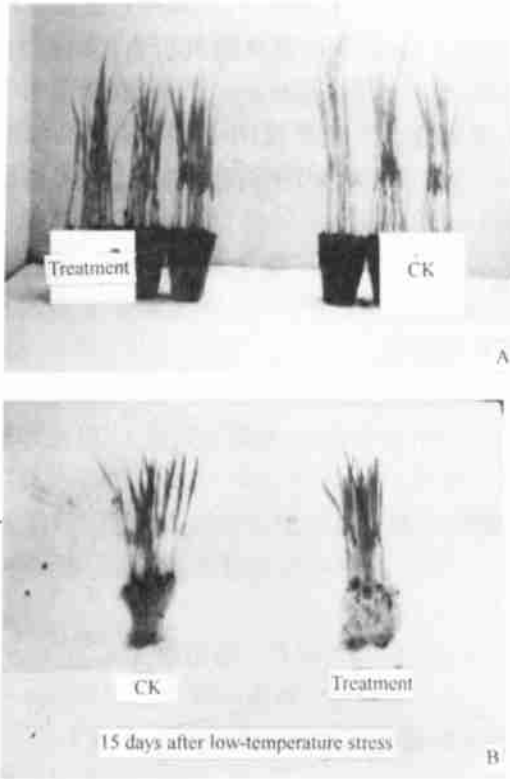


图1 10% IPT 处理和对照水稻幼苗的生长差异

Fig 1 Growth difference of rice seedling in 10% IPT-treated and control

- A. 未经低温胁迫的处理和对照幼苗;
- B. 低温胁迫后 15 天的处理和对照幼苗

- A. Treatment and control without low-temperature stress;
- B. Treatment and control 15 days after low-temperature stress

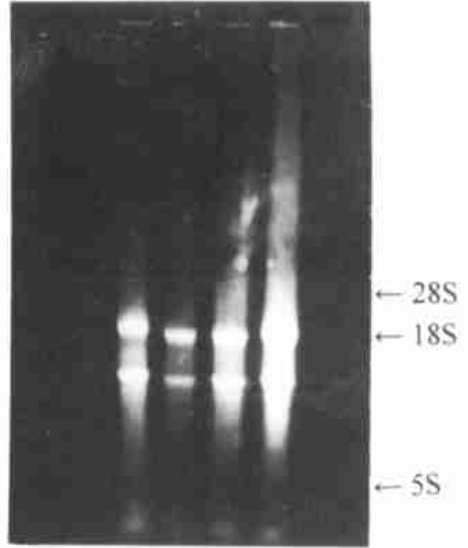


图2 一步法提取水稻幼苗根系总 RNA 的甲醛琼脂糖凝胶电泳

Fig 2 A agarose (1%) formaldehyde gel of total RNA isolated from root of rice seedling using one-step method

其 OD_{260}/OD_{280} 均达到 Trizol 试剂所能达到的比值, 表明纯度良好。由于在提取的 RNA 中不可避免含有痕量的 DNA 杂质, 它们的存在会严重影响差异显示的效果, 增加假阳性的比率, 所以在进行差异显示前要消化 RNA 样品中的 DNA 杂质, 我们采用传统的方法, 对 DNA 进行消化后, 用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提, 用 3M

NaAc (pH 5.2) 与无水乙醇 RNA 沉淀后, 适量 DEPC 灭菌水溶解后, 检测 RNA 的完整性、浓度和纯度, 均与消化 DNA 前的情况基本类似。

2.3 不同处理根中基因表达的差异展示

差异显示部分结果如图 3 所示, 可以发现这些差异分为以下几种类型: 1) 在低温胁迫下仅由 IPT 诱导表达 (图 3a); 2) 正常条件下两种处理均有表达, 在低温胁迫下对照无表达, 而 IPT 处理仍然保持其表达 (图 3b); 3) 在低温胁迫下, IPT 抑制某些基因表达 (图 3c); 4) 在低温胁迫下 IPT 处理使某些基因表达量强于对照 (图 3d)。

2.4 反向 Northern 印迹分析

鉴定工作在差异展示研究中非常重要, 通常是将每个差异片段分别标记后进行 RNA 印迹以排除假阳性, 工作量大、难度大、成本高。为了快速鉴定阳性克隆, 我们用地高辛标记好的 cDNA 作探针对差异片段进行斑点杂交, 颜色反应 16 小时后, 通过比较杂交信号的有无和强弱, 确定了 5 个差异表达的基因 (图 4)。

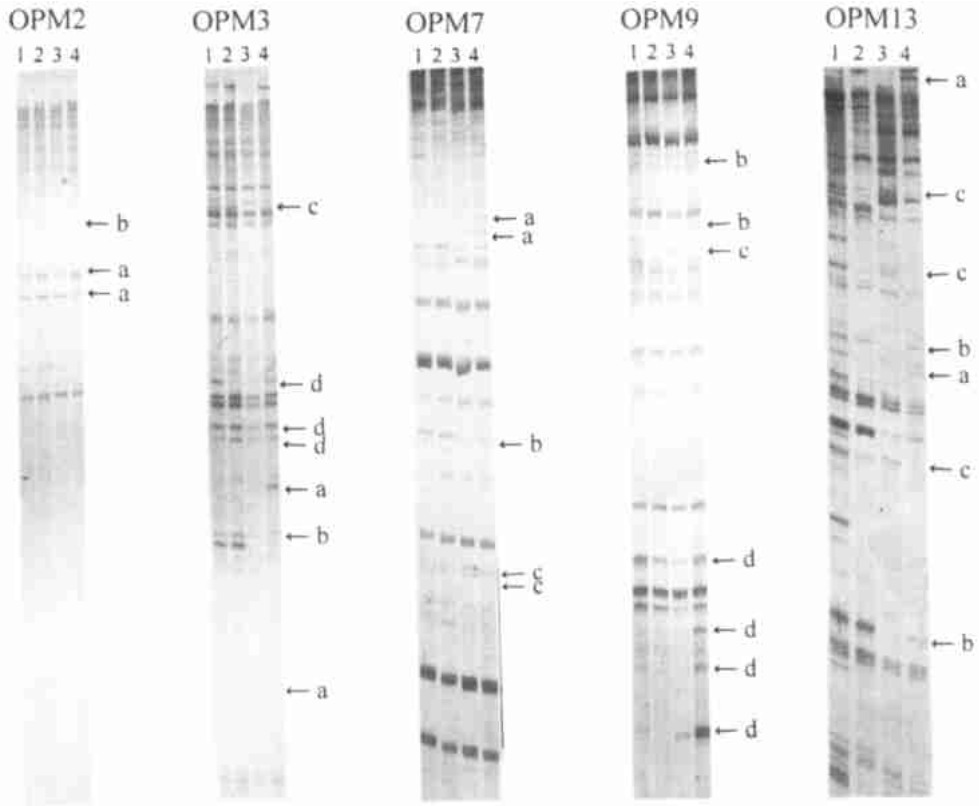


图3 不同处理下水稻幼苗根中基因表达的差异展示

Fig 3 Expressive difference of gene in root of rice seedling by different treatment

- 1. 未经低温胁迫的对照; 2 未经低温胁迫的 IPT 处理; 3 4~6 低温胁迫的对照; 4 4~6 低温胁迫的 IPT 处理
- OPM 2, OPM 3, OPM 7, OPM 9, OPM 13 分别为十聚体随机引物
- 1. Control without low-temperature stress; 2 IPT-treated without low-temperature stress;
- 3. Control with 4~6 stress; 4 IPT-treated with 4~6 stress
- OPM 2, OPM 3, OPM 7, OPM 9, OPM 13 is 10mer random primer
- 箭头所示为差异表达的基因 Index is differential gene
- a. 在低温胁迫下仅由 IPT 诱导表达; b. 在正常条件下两种处理均表达, 低温后对照无表达, IPT 处理仍保持其表达; c. 在低温胁迫下, IPT 抑制其表达; d. 低温胁迫下, IPT 处理的表达量强于对照。
- a. Special gene induced by IPT under low-temperature stress; b. Special gene remained by IPT under low-temperature stress; c. Special gene inhibited by IPT under low-temperature stress;
- d. Special gene enhanced by IPT under low-temperature stress

3 讨论

植物在长期的进化过程中会形成比较完善的自身防御和适应机制, 但是, 在过度的品种选育和保护栽培的条件下, 这些机制或者丧失、或者钝化、或者休眠, 总之, 植物的抗逆性和适应性在逐步降低。在生产实践和科学研究中发现, 通过物理的、化学的、生物的逆境因子可以诱导植物潜在的抗逆性发挥出来^[5]。研究证实 IPT 具有诱导水稻秧苗抗逆性增强的作用。

本实验室在前期的研究中发现^[6]: 在正常生长条件下, 用 IPT 处理水稻幼苗后与对照相

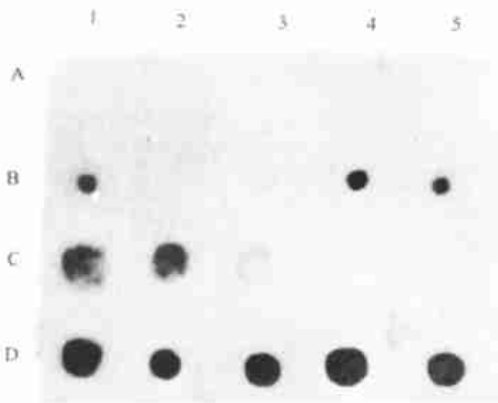


图4 反向Northern印迹鉴定差异表达的基因

Fig. 4 Reverse Northern Blotting of differential display gene

A. 以未低温3天的对照cDNA为探针; B. 以未低温3天的处理cDNA为探针; C. 以低温3天的对照cDNA为探针; D. 以低温3天的处理cDNA为探针
1~5: 50 ng 二次扩增cDNA片段

- A. Hybridized with cDNA probe prepared from control without low-temperature stress;
B. Hybridized with cDNA probe prepared from treatment without low-temperature stress;
C. Hybridized with cDNA probe prepared from control with low-temperature stress;
D. Hybridized with cDNA probe prepared from treatment with low-temperature stress
1~5: 50 ng of PCR products

因的表达量有很大的增强(见图4)。对这些有意义的片段进行克隆、测序,进而确定它们可能的功能,有利于进一步从理论上阐明IPT诱导水稻秧苗抗逆性增强的作用机理,这些工作正在进行中。

参 考 文 献

- Ohtsuka T, H Saka *Japanese Journal of Crop Science*, 1989, 58: 311~ 315
- Ohtsuka T, H Saka *Chemical Regulation of Plants*, 1991, 26: 25~ 35
- 刘志伟 植物抗逆诱导研究获重大突破 科技日报, 2000-12-2(5206)
- 张军, 苏宝林 水稻旱育秧立枯病及其防治, 理论和实践 北京: 中国农业大学, 1996
- 崔露 IPT诱导水稻幼苗抗逆性的生理机理研究 北京: 中国农业大学, 2000
- Liang Peng, A B Paradee *Science*, 1992, 257(14): 967~ 971
- Liang P, Averboukh, A B Paradee *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(14): 3269~ 3275
- Bauer David, Heiko Muller, Jens Reich, et al *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(18): 4272~ 4280
- Liang Peng, Wein in Zhu, Xiaoying Zhang, et al *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(25): 5763~ 5764
- N lum H, H Beier, H J Gross *Electrophoresis*, 1987, 8: 93~ 99
- 张红心, 王伟中, 夏凯等 作物学报, 2000, 26(5): 599~ 604

比虽然也有一定的差异,然而这种差别不是很明显, IPT只是在一定程度上使植株的素质更好,但它的作用只处于辅助位置;在逆境条件下(如低温、盐碱等),用IPT处理水稻幼苗后与对照相比,二者的区别就十分的突出,而且逆境强度越大, IPT的作用发挥得越好(见图1)。张红心等^[11]的研究表明, IPT对稻苗根系的生长有显著的促进作用,同时也影响根中部分内源激素的含量和某些酶的活性。

从遗传学的角度来讲,任何形态和生理上的变化都是由基因的表达与否来决定的。本试验得到的结果与前期生理试验的结果基本吻合。由图3可以说明以下两点:第一,在正常生长条件下IPT的作用不是很显著(见图中泳道1和2);第二, IPT对水稻幼苗的作用在低温胁迫下比较明显,而且是多方面的:尤其是在低温胁迫下,它可以特异地诱导某些基因的表达,可以使某些基因在逆境胁迫下表达增强,我们推测这些基因可能与抗性有关,另外,它也可以抑制另一些基因的表达。

杂交试验结果进一步证明,在常温下IPT就能诱导某些基因的表达;在低温胁迫后, IPT处理不仅诱导基因的表达而且使基