

水杨酸诱导烟草基因表达 cDNA 文库的构建及初步分析*

李文正¹, 董霞², 黄夸克², 陈学军¹

(1. 云南省烟草科学研究所, 云南 玉溪 653100; 2. 云南农业大学, 云南 昆明 650201)

摘要: 利用水杨酸 (SA) 诱导烟草抗病相关基因表达, 以此为目标样本, 以清水喷施为对照样本, 进行抑制差减杂交, 构建烟草抗病基因表达文库。结果显示, 插入片段主要集中在 200~500bp 之间。随机挑选 12 个克隆进行测序, 结果有 7 条与已知的系统获得性抗病基因同源, 1 条与病程相关蛋白 PR1a 同源, 1 条与光系统 II 的促氧蛋白一个亚基有较高同源性, 1 条与水通道蛋白基因 (aquaporin 1) 同源, 1 条与 ert13 基因有关, 1 条未找到同源序列, 是新的 cDNA 片段。

关键词: 水杨酸; cDNA 文库; 烟草

中图分类号: Q786 Q781 **文献标识码:** A

Construction of cDNA Library and Analysis of the SA-Stimulated Tobacco

LI Wen-zheng¹, DONG Xia², Huang Kua-ke², CHENG Xue-jun¹

(1. Yunnan Tobacco Research Institute, Yuxi 653100, China;

2. Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The SSH library of differently expressed cDNA was constructed, in which the tobacco with salicylic acid stimulated served as the tester, and one with water sprayed as the control. Analysis showed that most of the inserted fragments were 200~500bp. Twelve clones were selected randomly and sequenced. The BLASTN homology analysis on GenBank revealed that seven clones had homology with tobacco resistance genes, one clone was homologous with PR1a, other three were homologous with oxygen-evolving protein, aquaporin 1 and ert13 gene, only one was a new cDNA with no homologous sequence.

Key words: SA ; cDNA Library; Tobacco

虽然高等植物含有大约十万个基因, 但在某一特定发育阶段的一定类型细胞中, 只表达约 15%, 不同的发育阶段不同类型的细胞其基因表达有所不同, 同一发育阶段不同外界条件也会改变细胞的基因表达, 而基因表达的变化是调控细胞生命活动的核心机制, 比较不同细胞或不同基因型在特定外界条件下基因表达上的差异, 不仅是研究生命过程分子机制的基础, 也是分离克隆目标基因的前提。植物具有抵抗各种病害的潜在能力, 在受到病害侵染时启动一系列复杂的

防御机制来保护自己。

水杨酸 (SA) 是诱导植物对细菌、真菌、病毒等多种病害产生抗性的一种小分子酚类物质, 是植物发生系统获得性抗病反应 (SAR) 必须的一种重要的信号分子^[1]。SA 的诱导能使黄瓜和烟草产生过敏反应 (HR) 和 SAR 反应, 在侵染部位形成枯斑^[2-3], 保护植物免受病原菌的伤害。SA 能诱导植物产生并积累病程相关蛋白, 产生对真菌、细菌、病毒等多种病原菌的抗性^[4-5], 增加抗病品种的苯丙氨酸解氨酶

收稿日期: 2005-06-06, 修回日期: 2005-08-24

* 基金项目: 云南省烟草专卖局 (公司) 科技项目 (02A06、03A01)

作者简介: 李文正 (1967-), 男, 湖南永州人, 遗传学博士, 主要从事烟草遗传育种工作。

PAL、过氧化物酶 PO、多酚氧化酶 PPO 的活性^[6], 从而增强烟草的抗病性。以上抗病反应的获得是由基因表达差异所决定的, 而差异表达 cDNA 的获取是研究与此相关的基因的前提。我们利用抑制性消减杂交 (SSH) 法构建 SA 诱导的烟草及其与未诱导的烟草间的差异表达基因文库, 为克隆抗病相关基因及进一步从分子水平研究 SA 诱导的抗病反应变化规律奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料的处理

本研究采用的实验材料为漂浮育苗法培育的云烟 85 烟苗, 以 0.1%SA 诱导的烟苗为 tester, 以清水喷施处理的烟苗为 driver; 处理的烟苗分别在 24 小时、48 小时、72 小时取样, 混合后提取 RNA。

1.2 RNA 的分离

总 RNA 的提取用 QIAGEN 试剂盒 (RNeasy Plant Mini Kit), mRNA 的分离纯化用 QIAGEN 试剂盒 (Oligotex mRNA Kit), 方法步骤参考实验手册。

1.3 SSH cDNA 文库的构建

cDNA 合成用 Clontech (Palo Alto, CA, USA) 的试剂盒 (BD SMART PCR cDNA Synthesis Kit), SSH 按 Diatchenko 等 (1996) 报道的方法, 采用 PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech) 构建抑制性消减杂交文库, 杂交消减产物第二轮 PCR 产物用 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) 纯化, 与 pGEM-T Easy 载体连接, 连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中, 经 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养后, 涂在含 X-Gal 和 IPTG 的 LB/Amp 琼脂培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取白色单菌落培养扩增, 进行 PCR 反应检测是否重组。重组克隆加入 15% 的灭菌甘油, -70 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 cDNA 序列的测定及初步分析

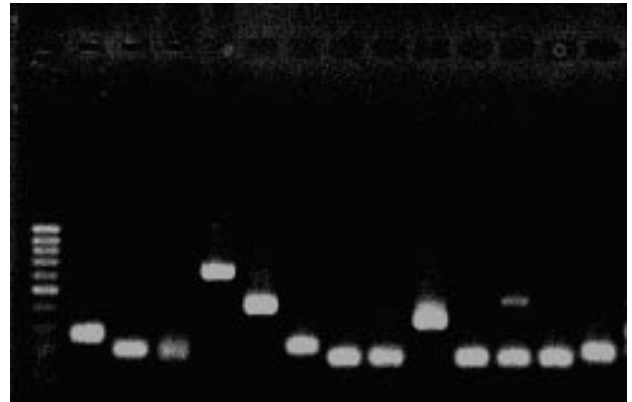
由上海博亚公司, 用 3700 测序仪, 测定插入序列的 DNA 序列。测得的序列用 SEQtool 软件去除载体序列, 再去除 PloyA 的序列, 用 GeneBank 中的 BLASTN 软件进行同源性比较。

2 结果与分析

2.1 差减 cDNA 文库的构建

运用 SSH 技术, 以 SA 诱导使抗病基因表达的烟草为 Tester, 以清水喷施为 Driver, 进行正向差减杂交, 差减得到的 cDNA 片段用 T/A 克隆法构建了一个质粒载体文库。用 Nest primer 对克隆进行 PCR 扩增, 插入片段大小主要集中在 150–500bp 之间, 重组率为

95.9% (附图)。



附图 SSH 文库插入片段大小检测

Fig Detection of inserted fraction of SSH library

2.2 差减 cDNA 克隆的单向测序及序列同源性分析

随机挑选 12 个正向差减杂交得到的阳性克隆进行测序, 将序列测定结果与 GeneBank 进行同源性比较, 共获得未重复序列 8 条, 其中与烟草系统抗病基因有关的有 8 条, 与编码 Sar8.2g 基因相关的片段 4 条, 同源性为 100%, 与 Sar8.2d 相关的 2 条, 同源性为 98% 和 99%, 与 Sar8.2k 相关的 1 条, 同源性为 98%, 另外 1 条与编码抗性基因相关蛋白 1a 基因序列的一致性为 100%; 其余序列中有 1 条与光系统 II 的促氧蛋白的 33kDa 亚基在 179bp 区段内一致性为 91%, 1 条与水通道蛋白基因 (aquaporin 1) 同源, 1 条与 ert13 基因有关, 其 284bp 片段一致性为 98%, 1 条未找到同源基因, 为未知功能的 cDNA (见附表)。

3 讨论

植物基因在不同逆境下的表达变化, 反映了相关的基因功能信息, 了解这些信息对于阐明植物的抗病机制有重要意义。Schenk 等 2000 年使用包含 2375 个拟南芥的 cDNA 微阵列, 鉴定了水杨酸诱导引起改变的基因^[7], 而烟草尚未见 SA 诱导的基因表达差异的研究。与其它研究基因表达差异的技术相比, SSH 技术具有假阳性率低, 重复性高, 能对低丰度 mRNA 进行显示等优点。目前, 利用 SSH 法对植物不同组织、不同发育阶段、不同突变材料、不同逆境状态下基因表达差异的研究日益增多^[8-10]。本研究用 SA 诱导与未处理的烟草 cDNA 进行正向差减杂交, 得到 SA 诱导的差异表达基因文库。对十二个随机挑选的克隆进行测序和 BLAST 比对, 结果表明, SA 诱导能使烟草系统获得性 (SAR) 基因表达, 病

附表 差减 cDNA 与 GeneBank BLASTN 同源性比较结果

Table Result of homology comparison sequences of SSH cDNA library by BLASTN on Gene Bank

克隆编号	插入片段 (bp)	同源性比较结果
B95	131	与核酸数据库中编号 gb U64810.1 的 <i>Nicotiana tabacum</i> Sar8.2g gene 在长度为 131bp 区域内, 同源性为 100%。
B98	131	同上
B101	131	同上
B104	131	同上
B96	116	与核酸数据库中编号 emb AJ001416.1 的 <i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for aquaporin 1, 在长度为 116bp 的区段, 同源性为 100%。
B97	353	与核酸数据库中编号 gb M97361.1 的 <i>Nicotiana tabacum</i> protein SAR8.2d which responds to agents that induce systemic acquired resistance mRNA, 在长度为 345bp 的区段, 同源性为 98%。
B102	353	与核酸数据库中编号 gb M97361.1 的 <i>Nicotiana tabacum</i> protein SAR8.2d which responds to agents that induce systemic acquired resistance mRNA, 在长度为 345bp 的区段, 同源性为 99%
B100	161	核酸数据库中编号 gb U64814.1 的 <i>Nicotiana tabacum</i> Sar8.2k gene, 长度为 161bp 的区段, 同源性为 98%
B103	288	与核酸数据库中编号 gb AY491538.1 的 <i>Nicotiana tabacum</i> voucher Et27 ERT13 (ert13) mRNA 长度为 284bp 上, 同源性为 98%
B105	121	与核酸数据库中编号 emb X12485.1 Tobacco mRNA fragment for pathogenesis-related protein PR1a 在 121bp 区域内, 同源性达 100%
B119	104	在核酸数据库中未找到同源基因
B41	210	与核酸数据库中编号 emb X17578.1 STPPOEC <i>S.tuberosum</i> mRNA for a 33kDa precursor protein of the oxygen-evolving complex 在长度为 179bp 的区域, 同源性为 91%

程相关蛋白基因表达。研究得到有关的克隆片段, 以此设计探针与烟草不同发育时期、不同器官经 SA 诱导的 RNA 进行杂交实验, 研究其抗病反应的分子机理。与烟草不同品种经 SA 诱导的 RNA 进行杂交实验, 确定品种对病害的反应能力, 为烟草育种提供分子水平的理论依据。另外, 对未知序列进一步采用 RACE

或原位杂交, 可以得到全长基因, 为寻找与抗病反应相关的新的基因提供前提条件。

致谢: 特别致谢实验过程中给予指导的史宪伟、胡凝珠、余迪求老师, 实验中还得到胡玉珠、王春艳、周忠静的帮助, 在此致谢!

参考文献

- [1] Dempsey DA, Shah J, Klessig DF. Salicylic acid and disease resistance in plants [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1999, 18 : 547-575.
- [2] Metraus J P, Signer H. Increase in salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance [J]. *Science*, 1990, 250 (4983) : 1004-1006.
- [3] Malamy J, Henning J, Klessig D F. Temperature-dependent of salicylic acid and its conjugate during the resistance response to tobacco mosaic virus infection [J]. *Plant cell*, 1992, 4 (2) : 359-366.
- [4] Uknes S, Winter AM, Delaney T, et al. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* [J]. *MPMI*, 1993, 6 : 692-698.
- [5] Klessig DF, Malary J. The salicylic acid signal in plants [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26 : 1439-1458.
- [6] 刘凤权, 王金生. 水杨酸对水稻防卫反应酶系的系统诱导 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38 (2) : 121-123.
- [7] Schenk PM, Kazan K, Wklson I, et al. Coordinated Plant Defense Responses in *Arabidopsis* Revealed by Microarray Analysis [J]. *Proc Acad Sci USA*, 2000, 97 : 11655-11660.
- [8] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization : A method for generation differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 : 6025-6030.
- [9] Tian Z D, Liu J and 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 (7) : 597-605.
- [10] 曾日中, 段翠芳, 黎瑜, 等. 茉莉酸刺激的橡胶树胶乳 cDNA 消减文库的构建及其序列分析 [J]. *热带作物学报*, 2003, 24 (3) : 1-6.