

羊草叶片 cDNA 文库的构建及 部分表达序列标签的分析

王丽娟¹, 金治平¹, 王能飞², 李晓峰¹, 刘公社^{1*}

(1. 中国科学院植物研究所, 北京 100093; 2. 国家海洋局青岛海洋一所, 山东 青岛 266061)

摘要:采用 SMART 技术, 以品质优良羊草“吉生一号”叶片为材料, 构建了高质量 cDNA 文库。原始文库滴度达到 10^6 cfu/mL, 扩增文库滴度接近 10^{11} cfu/mL。随机抽样检查结果表明, 插入片段大小在 0.5~3.0 kb, 主要集中在 1 kb 左右, 其中检测到插入片段大于 1 kb 的占 70%, 最大达到 2.5 kb, 其重组率达到 98%。同时在扩增文库中检测到了羊草维生素 E 合成途径中的关键酶基因 α -生育酚环化酶(TC)及 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)的特异信号, 挑选 307 个筛选出了 285 条 EST 序列, 将得到的 117 条非重复序列与 GenBank 中已知序列比对, 获得了如 3-磷酸甘油醛脱氢酶、光系统 II 蛋白 D1、翻译起始因子蛋白、翻译延伸因子蛋白、RNase S-like protein precursor 蛋白等基因。羊草高质量的 cDNA 文库的构建为进一步从分子水平研究羊草及开发利用这一基因资源提供了条件。

关键词:羊草; 叶片; cDNA 文库; EST

中图分类号: S543⁺.903.2; Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2009)01-0065-07

* 羊草(*Leymus chinensis*)为禾本科赖草属植物, 主要以我国东北部松嫩平原及内蒙古东部为分布中心, 是欧亚大陆草原区东部草甸草原及干旱草原上的重要建群种^[1]。羊草以其生长期长, 产草量高, 营养丰富, 适口性好, 享有“牲口的细粮”的美称, 同时羊草具有很强的抗寒、抗旱、耐盐碱及耐土壤瘠薄的能力, 具有很强的生态适应性, 在生态环境保护中具有重要作用。前人对羊草的生态学^[2~7]、抗性^[8~11]及生物多样性^[12~14]等方面进行了研究。而在分子生物学的研究方面, 除中国科学院植物研究所能源中心基因筛选与分子育种实验室曾克隆过硫氧还蛋白酶基因、叶绿体核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 Rubisco 大亚基基因外^[15~18], 却鲜有报道; 尽管在 GenBank 数据库中有 1 648 个叶片及根 EST 序列, 但远不能满足对其特性相关分子水平的研究。本研究以中国特有的优质羊草品种“吉生一号”为材料, 构建高质量的 cDNA 文库, 以期对羊草这一重要资源的深入研究及开发利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

“吉生一号”羊草(王克平女士惠赠)种子种植于中国科学院植物研究所试验田, 在自然条件下生长。春季羊草返青后 2 个月, 选取生长旺盛的幼嫩叶片, 每 200 mg 1 份, 分别冻存于液氮中备用。

1.2 试剂

文库构建试剂盒 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit (Catlog #: K1053-1)购自 BD Biosciences-Clontech 公司, RNA 提取试剂 TRIZOL 购自 GIBCO 公司, 无 RNA 酶的离心管、枪头及其他常规试剂及耗材均为国产。

1.3 研究方法

1.3.1 总 RNA 的提取 取 1 份液氮中保存的羊草叶片(200 mg), 于加有液氮的研钵中迅速研磨后, 平均转移到 2 个 DEPC(diethylpyrocarbona, 焦碳酸二乙酯)处理的 1.5 mL 离心管中, 立即加入 1 mL TRIZOL 提取液, 混匀后, 后续的操作参照 TRIZOL 提取液说明书进行。用 75%乙醇洗涤后, 取 1 管 RNA, 用 DEPC 处理的水溶解,

* 收稿日期: 2008-01-21; 改回日期: 2008-04-14

基金项目: 国家基础研究发展规划(973 项目)课题(2007CB108905)资助。

作者简介: 王丽娟(1974-), 女, 回族, 宁夏吴忠人, 在读博士。E-mail: lijuanwang279@hotmail.com

* 通讯作者。E-mail: liugs@ibcas.ac.cn

分成 2 份,第 1 份用 Beckman Coulter DU640 紫外分光光度计测定 RNA 的纯度及含量,将第 2 份置于 37℃ 下保育 2 h 后,做非变性琼脂糖电泳,检测 RNA 的完整性和稳定性。

1.3.2 cDNA 第一链的合成与 LD-PCR(long distance PCR) 取 2 μL (约 1.0 μg)总 RNA,参照试剂盒操作程序做反转录及 LD-PCR。取 5 μL LD-PCR 产物,用 1.1%TAE 凝胶进行电泳检测。

1.3.3 cDNA 的纯化与回收 参照试剂盒操作程序,取 50 μL LD-PCR 产物,加入 2 μL 蛋白酶 K(20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),于 45℃ 保育 20 min 消化残存的 Taq 酶。纯化回收 cDNA,用 Sfi I 于 50℃ 酶切 2 h 产生粘性末端。将酶切产物过 CHROMA SPIN-400 柱,每管过柱收集物取 3 μL 电泳检测,回收 500 bp 以上的 cDNA 片段。

1.3.4 cDNA 与 pDNR-LIB 载体的连接及连接产物纯化 参照试剂盒要求分别取 0.5,1.0 和 1.5 μL cDNA 与 1 μL pDNR-LIB 载体设置 3 个连接反应,16℃ 下连接过夜。连接产物用糖原乙醇于 -70℃ 下沉淀过夜,室温下回收 DNA,溶于 5 μL DEPC 处理的水中备用。

1.3.5 大肠杆菌电击感受态制备与电击转化 参照试剂盒说明书,采用 10%甘油法制备大肠杆菌 DH5 α 电击感受态,取 25 μL 电击感受态,加入 5 μL 纯化连接产物混合均匀,转入冰预冷的 0.1 mL 电击杯中,在电击仪(EQUIBIO)中,于 2 500 V 下电击 5 ms 后,将电击产物立即转入盛有 970 μL Luria-Bertani(LB)培养基的 10 mL 离心管中,37℃,225 r/min 条件下振荡培养 1 h 获得原始文库。

1.3.6 文库质量评价 原始文库与扩增文库滴度测定参照试剂盒说明书,取 5 μL 原始文库做 10 倍梯度稀释,测定原始文库滴度。按每个 15 cm 平板 2×10^4 个独立克隆扩增原始文库。待每个平板上菌生长到汇聚时,加入 5 mL 含 10%甘油的 LB 培养基,收集所有菌落并汇聚在一起混合均匀为扩增文库。总文库分装到 1.5 mL 离心管中,保存于 -70℃。取 5 μL 总文库做梯度稀释,测定总文库滴度。

文库插入片段大小及重组率检测:从原始文库中随机挑选 50 个单菌落,接种于 0.5 mL 附加 34 mg/L 氯霉素的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养过夜。取 3 μL 培养物为模板,以 M13f-M13r 为引物,做 PCR 检测插入片段大小并估计文库重组率。扩增条件:在 95℃ 变性 10 min 裂解菌体后,加入 PCR 反应混合物,94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 1 min,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 3 min,25 个循环;72℃ 延伸 10 min。

从扩增总文库中检测目的基因:特异基因检测都采用降落 PCR(Touch down PCR),在 95℃ 变性 10 min 裂解菌体,加入 PCR 反应混合物,并按以下程序扩增:94℃ 变性 4 min;94℃ 变性 1 min,50~65℃ 退火 1 min,每循环退火温度下降 0.5℃,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;94℃ 变性 1 min,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,15 个循环;72℃ 延伸 5 min。

1.4 引物设计

根据文库载体 pDNR-LIB 序列设计检测插入片断引物 M13f-M13r,根据中国科学院植物研究所能源中心基因筛选与分子育种实验室前期工作得到的羊草维生素 E 生物合成关键酶基因 α -生育酚环化酶(TC)及 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)特异探针序列设计基因特异检测引物 Ptcf-Pter 及 Ptmtf-Ptmtr,预期产物分别为 660 和 400 bp,引物序列如下:

M13f: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTA-3'

M13r: 5'-AA CAG CTA TGA CCA TGT TC-3'

Ptcf: 5'-GGA GTA TAG CAC ACG CCC-3'

Pter: 5'-GAA CCA GGG GCC TCC GCC-3'

Ptmtf: 5'-GAT CTA GTT TGG TCG ATG GA-3'

Ptmtr: 5'-CCT TGT ATC ATG AGA GGC AT-3'

2 结果与分析

2.1 RNA 纯度

RNA 的完整度与稳定性直接决定 cDNA 的完整度,是构建高质量 cDNA 文库的关键。采用 TRIZOL 法提取的羊草叶片总 RNA 在 37℃ 下保育 2 h 后的非变性电泳结果(图 1)显示其具有良好的完整度及稳定性,同时测得 $A_{260}/A_{280}=1.90$,表明 RNA 具有很高纯度,为建立高质量羊草 cDNA 文库奠定了基础。

2.2 反转录及 LD-PCR

由于 SMART 技术只需要微量的总 RNA (0.05~1.00 μg) 为模板进行反转录, 所产生的第一链 cDNA 量极少, 不足以直接进行后续试验, 必须经过 LD-PCR (long distance PCR) 扩增后才能获得足够量的 cDNA。以 1 μg 羊草叶片总 RNA 为模板反转录后得到 10 μL 第一链 cDNA。参照试剂盒说明, 进行 18 个循环的 LD-PCR, 获得的 cDNA 为 0.5~3.0 kb, 而且在 1~2 kb 有 2 条十分明显的丰富带(图 2), 表明已获得足够高质量的 cDNA, 符合建库的要求。

2.3 cDNA 酶切纯化连接与电击转化

通过蛋白酶 K 及 Sfi I 酶切的 cDNA 中含有大量的小于 500 bp 的小片段, 这些小片段包括未使用完的引物、引物二聚体以及小的 cDNA 片段, 这些片段必须通过 SPIN-400 柱的分级分离除去, 选取合适大小的片段进行克隆。一般通过 SPIN-400 柱分离的第 6~10 个管中的片段比较合适, 但到了第 10 管时就有较多的小于 500 bp 的片段, 第 6 管的量比较少, 但片段很大(由于 DNA 量少且在高电压下短时间电泳, 电泳图的效果多不理想, 在此未显示), 因此回收第 6~9 管产物, 用于连接克隆。电击转化的转化率很高, 但这取决于电击条件和感受态的质量。采用 pDNR-LIB 质粒作对照, 优化转化条件。在 2 500 V, 5 ms 的条件下, 0.1 μg 质粒可以获得 10^7 个转化子。在此条件下对 3 个试连接进行转化, 都得到了理想的结果。

2.4 文库质量评价

cDNA 文库的质量取决于原始文库与扩增文库的滴度、插入片断的大小及重组率、文库对目的基因的覆盖度。

2.4.1 文库滴度 质粒文库的滴度相对于噬菌体文库而言要略低一些, 但本试验中所获得的 3 个试连接及放大连接原始文库都达到 10^6 cfu/mL, 扩增文库滴度接近 10^{11} cfu/mL, 与噬菌体文库近似。如此高的滴度足以克隆到低丰度表达的基因。

2.4.2 重组率及插入片断大小检测 从原始文库中随机挑取的单克隆 PCR 检测结果表明, 文库重组率达到 98%, 插入片段最大可到 2.5 kb, 主要集中在大于 1 kb 的区域, 约占 70% 左右(图 3)。由于植物 cDNA 一般为 0.5~3.0 kb, 主要集中于 1 kb 左右, 因此本试验所获得的文库具有极高的重组率与完整度。

2.4.3 覆盖度检测 不同目的对文库覆盖度的要求各不相同, 但以能检测到目的基因的存在为标准。本试验中, 以特异探针检测到了羊草维生素 E 生物合成的关键酶基因 α -生育酚环化酶(TC)及 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)的特异信号(图 4), 表明所获得的文库具有较高的覆盖度。

以上结果表明, 本试验已经获得了高质量的羊草叶片 cDNA 文库。

2.5 EST 序列分析

随机挑选 307 个重组子提取质粒纯化后, 以 M13 为引物测序, 在去除载体序列后, 获得 285 个 ESTs, 其中部分 EST 序列已经录入 GenBank, 其序列接受号为 DY632440-DY632422、DY895774-DY895744。选取测序后长度大于 100 bp 的序列用相似性比较的分析(BLAST, basic local alignment search tool)在 NCBI(National Center for Biotechnology Information, 美国国立生物技术信息中心)中的数据库进行同源性检索, 共得到非重复序列

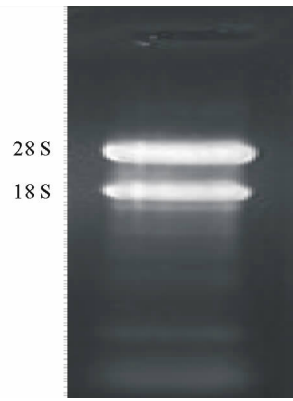


图 1 羊草叶片总 RNA

Fig. 1 Total RNA from leaves of *L. chinensis*

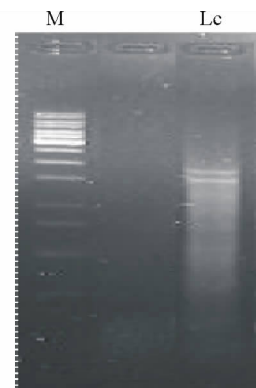


图 2 羊草叶片 cDNA LD-PCR

Fig. 2 LD-PCR cDNA on 1.1% argrose gel

M: 1 kb DNA 分子量标记; Lc: cDNA LD-PCR 产物

M: 1 kb DNA ladder; Lc: Product of cDNA LD-PCR

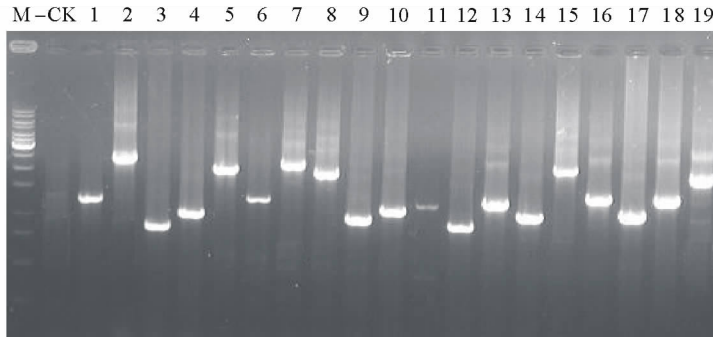


图3 文库插入片段大小及重组率检测

Fig. 3 Detection of inserts of the library and the combining rate

M: 1 kb DNA 分子量标记; -CK: 阴性对照; 1~19: 随机挑选单克隆 M: 1 kb DNA Ladder; -CK: Negative control; 1-19: Radom selected clone number of single clones

117条, 经过与NCBI数据库比对, 发现84条序列在NCBI数据库中检索到同源序列, 其中功能已知的有62条, 占73.8%, 功能未知的22条, 占26.2%。经过分析后, 将与已知基因同源的ESTs按功能分为4个大类: 第1大类为与初级代谢相关的基因, 此类中参与光合作用相关的基因, 如1,5-二磷酸核酮糖羧化酶、光合系统中心蛋白在统计结果中出现的频率最高; 第2大类为参与蛋白质合成加工、细胞结构建成等过程的基因, 如翻译延长因子、甲硫氨酸合成酶; 第3类为细胞代谢、细胞结构、细胞信号相关基因, 如3-磷酸甘油醛脱氢酶、天冬氨酸蛋白酶; 第4类为抗逆相关基因如热激蛋白、冷积累蛋白等。其分析结果见表1。

3 讨论

3.1 SMART技术的特点

构建高质量的cDNA文库是研究某一特定器官、组织或特定时期基因表达及克隆这些基因的有效手段之一, 目前商售cDNA文库构建试剂盒已有很多种, 其原理基本相同。但多数试剂盒都要求有大量高质量的总RNA或mRNA, 而且在操作过程中都要求进行甲基化、加接头等多步操作, 不仅繁琐而且容易使产物连续损失, 乃至降解。本试验采用BD-CLONTECH公司的SMART cDNA Library Construction Kit, 并采用SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术, 可以在反转录合成第一链cDNA时利用反转录酶的末端滑动机制所自动添加的3个C碱基, 将带有3个互补的G碱基的5-接头引物直接接上并继续反转录获得完整的第一链cDNA, 该cDNA两端都已经自动添加了接头引物, 可以直接通过LD-PCR将微量的cDNA扩增至足以进行后续操作, 同时未转录到末端提前终止的cDNA不能添加这3个碱基, 因此在LD-PCR中, 这类不完整的cDNA就得不到扩增, 从而保证LD-PCR产物都具有完整的5'末端, 为获得全长基因序列奠定了基础。对获取大量RNA比较困难的材料, 该方法具有独特的优势。尽管SMART技术高效简单, 但PCR扩增过程可能导致的失真, 仍然是个值得关注的问题。不过随着越来越多高保真的Taq酶羊草总RNA提取叶片材料的开发和利用, PCR过程中的失真问题在本方法中已被控制在可以接受的范围内。

3.2 EST序列分析

羊草总RNA提取材料为叶片除细胞质rRNA外, 还存在大量的叶绿体rRNA。在反转录过程中, 叶绿体基因与核基因一起被转录成cDNA, 这可能是所构建的cDNA文库中与光合作用及叶绿体发育相关基因大量存在

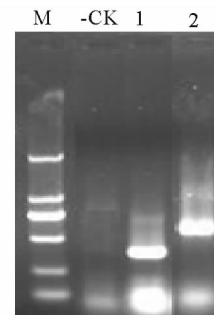


图4 文库特异基因检测

Fig. 4 Gene special detection of the library

M: 100 bp DNA 分子量标记; -CK: 阴性对照; 1: TC; 2: γ -TMT M: 100 bp DNA ladder; -CK: Negative control; 1: TC; 2: γ -TMT

表 1 部分功能基因在 GenBank 中比对结果

Table 1 Partial result for comparison of homology with function genes deposited in GenBank

编号	长度	比对结果	来源物种	期望值	数量
Contig ID	Length (bp)	Highest homology	Organism	E-value	Copies
Contig23	481	光系统 II 多肽 Photosystem II polypeptide	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	0	8
Contig18	574	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 Ribulose-1,5-bisphosphate 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基 Carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene	新麦草 <i>Psathyrostachys juncea</i> 绵毛丝盖伞 <i>Inocybe lanuginosa</i>	0	18
Contig34	421	天冬氨酸蛋白酶 Aspartic proteinase	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	9e-175	1
Contig57	472	茉莉酮酸酯诱导蛋白 Jasmonate-induced protein	大麦 <i>H. vulgare</i>	6e-114	2
Contig13	721	RNase S 样蛋白 RNase S-like protein (rsh1) gene	大麦 <i>H. vulgare</i>	9e-138	2
Contig53	584	光系统 II D1 蛋白 Photosystem II protein D1	大麦 <i>H. vulgare</i>	0	12
Contig15	434	聚泛素蛋白 Polyubiquitin	复原草 <i>Sporobolus stapfianus</i>	5e-178	1
Contig10	754	3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate	大麦 <i>H. vulgare</i>	0	2
Contig44	837	膜蛋白 Envelope membrane protein	拟斯卑尔脱山羊草 <i>Aegilops speltoides</i>	0	1
Contig42	412	网格蛋白 Clathrin assembly AP17-like protein	水稻 <i>Oryza sativa</i>	2e-164	1
Contig26	366	磷酸二酯酶 Pyrophosphatase/phosphodiesterase	大麦 <i>H. vulgare</i>	1e-153	1
Contig47	612	cp31BHv 蛋白 Cp31BHv protein	大麦 <i>H. vulgare</i>	0	1
Contig5	1 007	翻译延伸因子 1 α 亚基 Translation elongation factor 1 alpha-subunit	小麦 <i>T. aestivum</i>	0	2
Contig6	404	泛素 Ubiquitin	小麦 <i>T. aestivum</i>	6e-177	1
Contig17	912	氨基酸肽酶类蛋白 Serine carboxypeptidase	大麦 <i>H. vulgare</i>	0	1
Contig8	667	小麦谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthetase precursor	大麦 <i>H. vulgare</i>	0	2
Contig19	783	蛋氨酸合酶 2 Methionine synthase 2 enzyme	大麦 <i>H. vulgare</i>	0	1
Contig12	482	碳酸酐酶 Carbonic anhydrase	大麦 <i>H. vulgare</i>	0	1
Contig16	592	线粒体 26s 亚基 Mitochondrion rrn26 gene for rRNA large subunit (26S)	小麦 <i>T. aestivum</i>	0	2
Contig11	275	细胞色素还原酶 Cytochrome reductase	小麦 <i>T. aestivum</i>	1e-132	1
Contig28	281	丙氨酸转氨酶 Alanine aminotransferase	大麦 <i>H. vulgare</i>	5e-126	2
Contig32	438	Rubisco 活化酶 Ribulosebiphosphate carboxylase	小麦 <i>T. aestivum</i>	0	2
Contig19	740	起始因子 4F p82 亚基 Initiation factor isozyme 4F p82 subunit	小麦 <i>T. aestivum</i>	0	1
Contig42	476	冷积累蛋白 Cold acclimation protein	小麦 <i>T. aestivum</i>	2e-179	1
Contig14	266	假定的酸性磷酸酶 Putative acid phosphatase	大麦 <i>H. vulgare</i>	1e-91	1
Contig27	649	假定的纤维素合成酶亚基 Putative cellulose synthase catalytic subunit	大麦 <i>H. vulgare</i>	0	1
Contig40	535	叶绿体 NADPH 还原酶 Chloroplast NADPH-plastoquinone oxidoreductase	小麦 <i>T. aestivum</i>	0	3
Contig3	433	翻译起始因子 1A Translation initiation factor 1A	小麦 <i>T. aestivum</i>	0	1
Contig29	926	维生素 E 环化酶 Tocopherol cyclase	小麦 <i>T. aestivum</i>	0	1
Contig31	734	热激蛋白 Putative heat shock protein	水稻 <i>O. sativa</i>	2e-80	1

的根本原因,通过对文库中部分 ESTs 进行序列测定和功能分析,对羊草叶片的基因表达情况进行初步探索。本试验所获得的 EST 中,已知功能的同源基因涉及到光合作用相关的基因如 Rubisco 基因及 PS II 的光合反应中心 D1 蛋白基因。光合作用是植物体最重要的生命活动之一,是决定作物产量最重要的因素,作物中 90% 以上的干重直接来源于光合作用。因此,光合作用效率的高低直接关系到作物的产量。Rubisco 是决定光合作用同化速率的关键酶。植物光合作用的能量转化过程是在叶绿体的类囊体上完成的,PS II 的光合反应中心 D1 蛋白作为类囊体膜上的重要色素蛋白复合物,对光合作用的完成起着至关重要的作用^[19]。已有研究表明,植物在低温、衰老、水分亏缺、重金属胁迫以及紫外线照射等条件下,可通过影响 D1 蛋白的表达及其周转,进而影响植物的光合作用^[20~23]。

翻译延伸因子 1A(elongation factor 1 alpha, EF1 α)是蛋白质合成过程中的关键因子, eEF1 α 在蛋白质合成中起主要作用,与氨酰 tRNA 和 GTP 生成三元复合物结合在核糖体 A 位点,于是植物细胞内的编码基因就开始组成型表达^[24,25]。研究表明,EF1 α 能够与新生的肽链结合,而且能够和在胞质中不能正确折叠的蛋白相互作用并加速这些蛋白的降解,EF1 α 具有类似分子伴侣的活性^[26]。EF1 α 除了参与同翻译控制有关的信号传导,还参与细胞生长、应激反应及运动性有关的信号传导。EF1 α 有 1 个小多基因家族编码,在大肠杆菌中有 2 个 EF-Tu,在人类中至少有 2 个 EF1 α ,在水稻中有 4 个基因,而在玉米(*Zea mays*)中超过 10 个基因。自交不亲和是显花植物防止自交繁殖而形成的一种机制,在许多植物上已经表明 RNase S-like protein 参与了植物的自交不亲和^[27],目前已在苹果(*Malus pumila*)、梨(*Pyrus pyrifolia*)、樱桃(*Cerasus pseudocerasus*)、杏(*Armeniaca vulgaris*)^[28,29,30]等树种上分离出了 RNase S-like protein 基因,转基因植物的研究表明,RNase S-like protein 在雌蕊识别和拒绝花粉的过程中起重要作用,参与自交不亲和提供了直接的活体证据^[31,32]。

虽然获得的 EST 不多,但 EST 测序结果表明,包括了核糖体组成蛋白、与初级代谢产物相关的酶类、参与蛋白质合成加工、细胞结构建成等过程的蛋白、与生物或非生物胁迫相关的蛋白如热激蛋白、冷积累蛋白,与信号传导相关的蛋白以及构成细胞结构建成或细胞代谢等相关的蛋白等。这些种类的蛋白参与到羊草的物质与能量代谢中,与羊草基础生理反应紧密相关。羊草是以我国为分布中心的重要牧草资源,同时由于羊草的耐寒、耐旱、耐盐碱、耐贫瘠等特性,也是重要的抗性基因资源库。本试验构建了高质量的羊草叶片 cDNA 文库,不仅为克隆羊草重要基因奠定了基础,还为进一步研究及开发利用这一基因资源库提供了条件。虽然获得了部分的测序结果所指代的信息不够全面,但是通过这些有限的信息可以粗略地了解羊草叶片基因的种类及表达丰度,这为更全面、详尽地了解羊草中基因表达模式,进一步挖掘羊草的特有基因资源奠定基础。

参考文献:

- [1] 祝延成. 羊草生物生态学[M]. 长春:吉林科学技术出版社,2004.
- [2] 潘庆民,白永飞,韩兴国,等. 羊草根茎贮藏碳水化合物及对氮素添加的响应[J]. 植物生态学报,2004,28(1): 53-58.
- [3] Wang R Z, Earle A R. Effects of grazing on a *Leymus chinensis* grassland on the Songnen plain of north-eastern China[J]. Journal of Arid Environments, 1997, 36: 307-318.
- [4] Xu Z Z, Zhou G S. Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*[J]. Planta, 2006, 224: 1080-1090.
- [5] 池宏康,周广胜,许振柱,等. 草地植被盖度的近距离遥感测定[J]. 草业学报,2007,16(2): 105-110.
- [6] 颜宏,赵伟,尹尚军,等. 羊草对不同盐碱胁迫的生理响应[J]. 草业学报,2006,15(6): 49-55.
- [7] 赵慧颖. 内蒙古东北部天然牧草生物量与气候条件的定量关系[J]. 草业科学,2007,(3): 8-11.
- [8] 周婵,杨允菲. 松嫩平原两个生态型羊草实验种群对盐碱胁迫的生理响应[J]. 应用生态学报,2003,14(11):1842-1846.
- [9] 侯建华,云锦凤,张东晖. 羊草与灰色赖草及其杂交种的耐盐生理特性比较[J]. 草业学报,2005,14(1): 73-77.
- [10] 张鹤山,张德罡,刘晓静,等. 灰色关联度分析法对不同处理下草坪质量的综合评判[J]. 草业科学,2007,(11): 73-76.
- [11] 陈秀蓉,马静芳,杨成德,等. 长芒草锈病对牧草生物量和品质的影响[J]. 草业学报,2008,17(2): 43-47.
- [12] 刘杰,刘公社. 聚乙二醇处理对羊草种子萌发及活性氧代谢的影响[J]. 草业学报,2002,11(1):59-64.
- [13] 刘杰,朱至清,刘公社,等. 羊草种质基因组 DNA 的 AFLP 多态性研究[J]. 植物学报(英文版),2002,44(7):845-851.
- [14] 汪恩华,刘杰,刘公社,等. 形态与分子标记用于羊草种质鉴定与遗传评估的研究[J]. 草业学报,2002, 11(4):68-75.
- [15] Zhang W D, Liu G S, Chen S Y. Molecular cloning, characteristics, expression and enzyme activity of a thioredoxin in mature pollens of *Leymus chinensis*[J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(12):1192-1198.
- [16] 郝亚琦,刘公社,王丽娟,等. 羊草光合作用相关基因的克隆与分析[J]. 西北植物学报,2007,27(5):898-902.
- [17] 舒庆艳,徐凤侠,金治平,等. mRNA 差异显示技术分离羊草基因体外培养过程中特定基因及特性分析[J]. 草业学报,2007,16(5):113-120.
- [18] Liang Y, Diao Y R, Liu G S. AFLP variations within and among natural populations of *Leymus chinensis* in the northeast of China[J]. Acta Pratacul Turae Sinica, 2007,16(2): 124-134.
- [19] Kyle D J, Ohad I, Artzen C J. Membrane protein damage and repair: Selective loss of a Quinine—protein function in chloro-

- plast membranes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81: 4070-4074.
- [20] Bate N J, Straus N A, Thompson J E. Expression of chloroplast photosynthesis genes during leaf senescence[J]. Plant Physiology, 1990, 80: 217-225.
- [21] He J X, Wang J, Liang H G. Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves[J]. Plant Physiology, 1995, 93: 771-777.
- [22] Hao L M, Liang H G, Wang Z L, *et al.* Effects of water stress and rewatering on turnover and gene expression of photosystem II reaction center polypeptide D1 in *Zea mays*[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1999, 26: 375-378.
- [23] Lütz D, Steiger A, Godd D. Influence of air pollutants and nutrient deficiency on D1 protein content and photosynthesis in young spruce trees[J]. Plant Physiology, 1992, 85: 611-617.
- [24] Bassell G J, Powers C M, Taneja K L, *et al.* Single mRNAs visualized by ultrastructural in situ hybridization are principally localized at actin filament intersections in fibroblasts[J]. The Journal of Cell Biology, 1994, 126(4):863.
- [25] Liu G, Tang J, Edmonds B T, *et al.* F-actin sequesters elongation factor 1alpha from interaction with aminoacyl-tRNA in a pH-dependent reaction[J]. The Journal of Cell Biology, 1996, 135(4):953.
- [26] Hotokezaka Y, Tobben U, Hotokezaka H, *et al.* Interaction of the eukaryotic elongation factor 1A with newly synthesized polypeptides[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(21):18545.
- [27] Bredemeijer G M M, Blass J. S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1981, 59: 185-190.
- [28] Broothaerts W L M, Janssens G A, Proost P, *et al.* cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27: 499-511.
- [29] Norioka N, Norilka S, Ohnishi Y, *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding s-allele-specific stylar RNases in a self-incompatibility cultivar and self-incompatibility mutant of Japanese pear[J]. Journal of Biochemistry, 1996, 120: 335-345.
- [30] Tao R, Yamane H, Murayama, *et al.* Molecular typing of s-alleles through identification characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1999, 124: 224-233.
- [31] Lee H S, Huang S, Kao T. S protein control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata* [J]. Nature, 1994, 367: 560-563.
- [32] Murfett J, Atherton T L, Beiquan M, *et al.* S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes s-allele-specific pollen rejection[J]. Nature, 1994, 367:563-566.

Construction of a cDNA library of the leaf of *Leymus chinensis* and analysis of partial expressed sequence tags

WANG Li-juan¹, JIN Zhi-ping¹, WANG Neng-fei², LI Xiao-feng¹, LIU Gong-she¹

(1. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 2. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: Total RNA of *Leymus chinensis* ("Jishengyihao") leaves was isolated by TRIZOL reagent and a cDNA library was constructed using SMART technology. The primary library had a high titer of 10^6 cfu/mL, in which 98% of the clones were recombinant and the insert cDNAs were from 0.5 kb to 3.0 kb. The amplified library had a titer of 10^{11} cfu/mL. The positive signals of TC and γ -TMT gene were detected by PCR of the amplified library. High quality sequences were shown by 307 of the cDNA clones. In the cDNA library, 117 clones were non-redundant, and BLAST led to the identification of several putative genes (e. g. glyceraldehyde-3-phosphate, RNase S-like protein precursor, translation elongation factor 1, translation initiation factor 1A, chloroplast psbA gene for D1 protein). This high quality cDNA library provides a useful tool for further study of the molecular mechanisms of the secondary metabolism of vitamin E and of gene expression in *L. chinensis*.

Key words: *Leymus chinensis*; leaf; cDNA library; EST