

一种全长 cDNA 抑制缩减杂交方法及其水稻诱导表达基因分离的应用

张群宇, 刘耀光

(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要:以缩减杂交的原理和 SMART cDNA 合成方法为基础,开发了一种全长 cDNA 缩减杂交方法. 该方法从微量的 2 个 RNA 样品合成全长 cDNA,经 PCR 扩增和在两端连接不同的接头,通过 2 次缩减杂交获得含有高度浓缩的差异表达的全长或较大的基因片段,克隆后筛选出差异表达的基因. 以噻菌灵 (Probenazole, PBZ) 为诱导剂处理水稻,获得了 2 个上调表达和 1 个下调表达基因的较长的 cDNA 片段.

关键词:抑制缩减杂交; 基因表达; 噻菌灵

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)01-0034-04

A Full-Length cDNA Subtractive Hybridization (FLSSH) Method and Its Application in the Isolation of Inducible Expression Genes in Rice

ZHANG Qun-yu, LIU Yao-guang

(College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: cDNA suppression subtractive hybridization (SSH) has been used to analyze differential gene expression widely, but there are some shortcomings in it such as difficult mRNA preparation, difficult mRNA handling and short cDNA fragments to be obtained. A Full-length cDNA SSH (FLSSH) method based on SSH and SMART cDNA synthesis method was used to obtain differentially-expressed genes of rice treated by probenazole (PBZ). By northern blot analysis, two up-regulated and one down-regulated candidate cDNA fragments by PBZ were identified.

Key words: suppression subtractive hybridization (SSH); gene expression; probenazole (PBZ)

噻菌灵 (Probenazole, PBZ) 是一种应用广泛的广谱、高效、低毒、低残留的内吸性杀菌剂,可激活植物系统获得抗性 (Systemic acquired resistance, SAR). PBZ 激活水稻自身一系列生化反应,从而获得对稻瘟病和白叶枯病病原的抗性^[1-2]. PBZ 价格较低、残留期短,对环境的影响小,20 多年来广泛应用在水稻稻瘟病和白叶枯病的防治工作中,因此 PBZ 是一种有利用潜力的诱导剂. 本研究以 PBZ 为诱导剂处理水稻,以抑制缩减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 和 SMART cDNA 合成方法为基础^[3,4],

改良为全长 cDNA 抑制缩减杂交方法 (Full-length cDNA SSH, FLSSH),分离在处理和非处理条件下差异表达的 cDNA 克隆.

1 材料与方法

1.1 水稻总 RNA 提取

采用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取水稻的总 RNA,具体操作按说明书进行.

1.2 水稻材料的处理

水稻品种为中花 11,种子萌发后,在 24 ℃ 培养

收稿日期: 2009-03-12

作者简介: 张群宇 (1973—), 男, 副研究员, 博士; 通讯作者: 刘耀光 (1954—), 男, 研究员, 博士, E-mail: ygliu@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30470995, 30740072)

箱水培 14 d 后,分为 4 份,每份约 0.5 g 幼苗叶片.其中 3 份分别用 0.8% PBZ 处理 1、2 和 4 d,混和取样作为处理样品,另一份用 ddH₂O 处理作为对照样品.

1.3 全长 cDNA 抑制缩减杂交

抽取对照样品和处理样品总 RNA, 定量后用引物 CDSSf 进行反转录(反转录的同时加入引物 SmSf 锚定 5' 末端). 反转录酶使用 Superscript III (Invitrogen 公司), 操作按照说明书进行.

用引物 PSfi (引物序列见表 1) 进行 RT-PCR, *Taq* 酶使用 TaKaRa 公司的 LA *Taq* 酶, 电泳检测. 确认 RT-PCR 结果符合要求后, 取处理样品的 RT-PCR 产物约 200 ng 用限制性内切酶 *Sfi* I 酶切, 酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀. 酶切产物分为 2 管, 用 T4 连接酶连接 Ad5sf 或 Ad3sf 接头过夜, 沉淀后定量, 溶于 4 μ L TE 中 (约 20 ng/ μ L), 作为抑制缩减杂交的 Tester. 对照样品的 RT-PCR 产物 (约 5 μ g) 用限制性内切酶 *Sfi* I 酶切, 酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于 10 μ L TE 中 (约 400 ng/ μ L), 作为 Driver.

表 1 全长 cDNA 抑制缩减杂交引物序列

Tab. 1 The adaptors and primers used in FLSSH

引物	引物序列
PSfi	GTGTGAACACTGCAGAGTGGCCTAC-3'
SmSf	GTGTGAACACTGCAGAGT <u>GGCCCTACTTGGCCGGG</u> -3'
SfRNA	GAACACUGCAGAGUGGCCUACUUGGCC-3'
CDSSf4	GTGTGAACACTGCAGAGT <u>GGCCCTACATGGCCTTTTTCTTT</u> - TTTTCTTTTTTTTTTTTTT(A/G/C)-3'
Sfi-T	CGGCCGACATGGCCTTTTTCTTTT-3'
P2-1	CCCAATACGAGGTCGCCTTCATCT-3'
P2-2	GCCTTCATCTTCTTCTGAGGCCAAC-3'
Ads5	CCCAATACGAGGTCGCCTTCATCTTCTTCTGAGGCC <u>AACT</u> -3'
Ads3	CCCAATACGAGGTCGCCTTCATCTTCTTCTGAGGCC <u>AACA</u> -3'
Adsfc	3'-GAAGTAGAAGAAGACTCCGCT-5'

分别取 1 μL 加 5' 接头和 3' 接头 Tester 到 2 个 200 μL 薄壁离心管, 再分别加入 2 μL Driver 和 1 μL 4 倍的杂交缓冲液, 加入 2 滴矿物油覆盖液面. 短暂离心后, 98 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min, 转入 68 $^{\circ}\text{C}$ 空气浴进行第 1 轮缩减杂交. 1 h 后, 取 1.5 μL Driver、2 μL ddH₂O 和 1 μL 4 $\times$ 杂交缓冲液到 200 μL 薄壁离心管, 混匀后分到 2 管, 加入矿物油覆盖液面, 短暂离心后 98 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min, 分别加入到 2 个第 1 轮缩减杂交的管内, 并短暂离心. 68 $^{\circ}\text{C}$ 保温 3 min 后, 混合 2 管溶液, 迅速离心 68 $^{\circ}\text{C}$ 空气浴进行第 2 轮缩减杂交 16 h 后, 加入 200 μL 68 $^{\circ}\text{C}$ 预热 TE, 结束缩减杂交. 原理示意图见图 1.

取 2 μL 缩减杂交产物作为模板到 100 μL PCR

反应体系中,用接头特异引物 P1-1 进行第 1 轮抑制 PCR 扩增:68 ℃ 5 min; 96 ℃ 3 min; 96 ℃ 30 s, 68 ℃ 15 s, 72 ℃ 4 min, 进行 25 ~ 30 个循环;72 ℃ 10 min. 电泳检测后,取 1 μL PCR 产物作为模板到 200 μL PCR 反应体系中,用接头特异引物 P2-2 进行第 2 轮抑制 PCR 扩增:96 ℃ 3 min; 96 ℃ 30 s, 68 ℃ 15 s, 72 ℃ 4 min, 进行 10 ~ 12 个循环;72 ℃ 10 min. 电泳检测、回收并克隆到载体内,其克隆位点改造后与 5'和 3'接头的酶切位点序列相同。

挑选克隆构建缩减杂交文库:挑选阳性克隆到 96 孔培养板,双向缩减杂交产物各挑取 4 或 8 块 96 孔培养板. 液体 LB 培养基摇菌,用载体通用引物 M13 扩增插入片段,酒精沉淀溶于 10 μ L TE,转到 2 或 4 块 384 孔培养板内.

试验进行正向和反向抑制缩减杂交,即分别以处理和对照样品为 Tester,以对照和处理样品为 Driver,以分别获得诱导剂 PBZ 诱导上调和下调的基因。

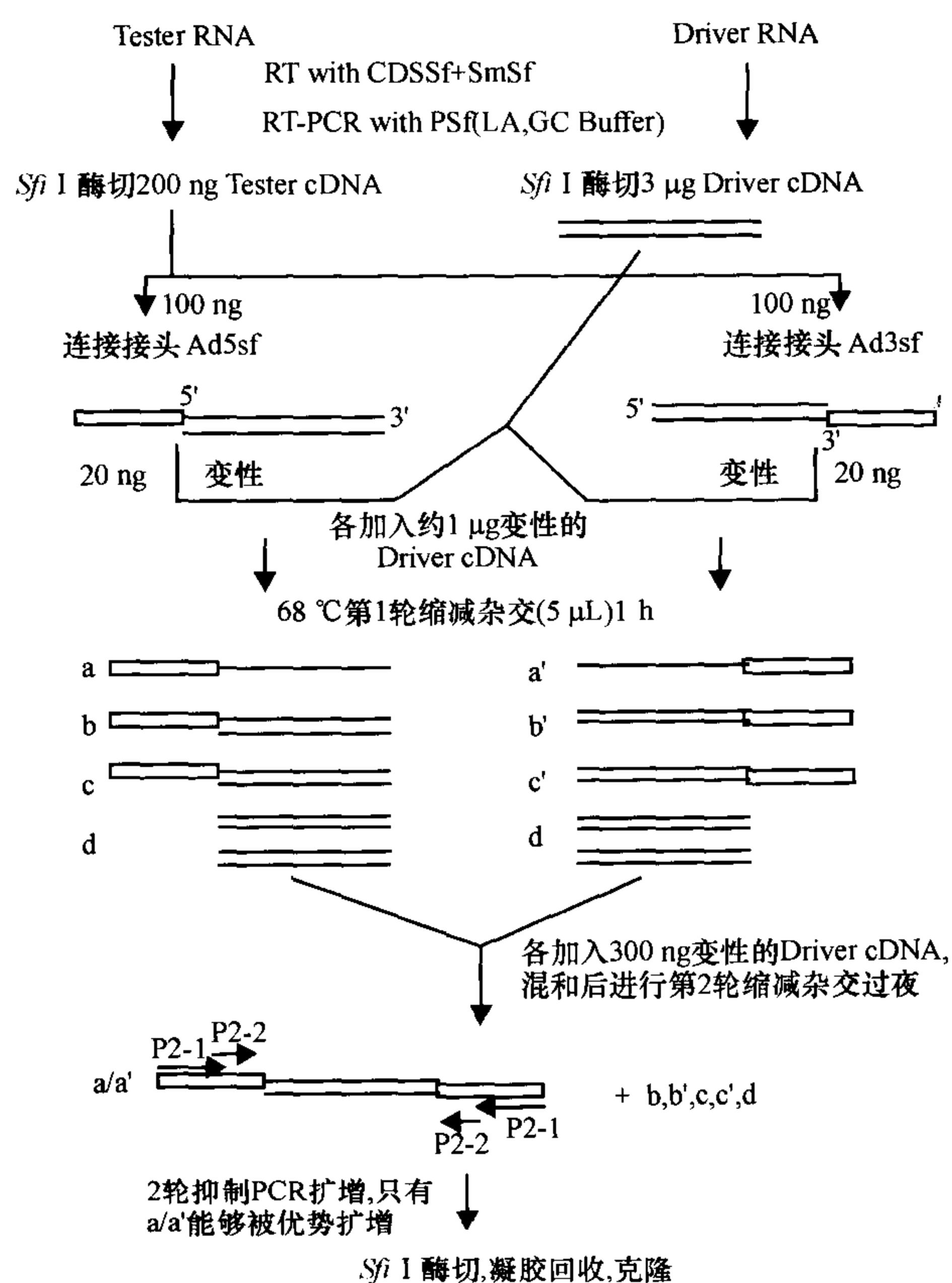


图 1 全长 cDNA 抑制缩减杂交实验操作流程示意图

Fig. 1 Overview of the full-length cDNA suppression subtractive hybridization (FLSSH) procedure

2 结果与分析

2.1 全长 cDNA 的合成

抽取对照样品和 PBZ 处理样品总 RNA, 定量后用引物 CDSSf4 进行反转录 (反转录的同时加入

Smart 引物 SmSf 锚定 5' 末端). 用引物 PSfi 进行 RT-PCR, 电泳检测. 图 2 中的 RT-PCR 产物的 cDNA 片段长度主要分布在 1~4 kb 范围, 说明合成的 cDNA 的长度较为完整.



1: 处理样品; 2: 对照样品; 3: DNA Marker λ -Hind III

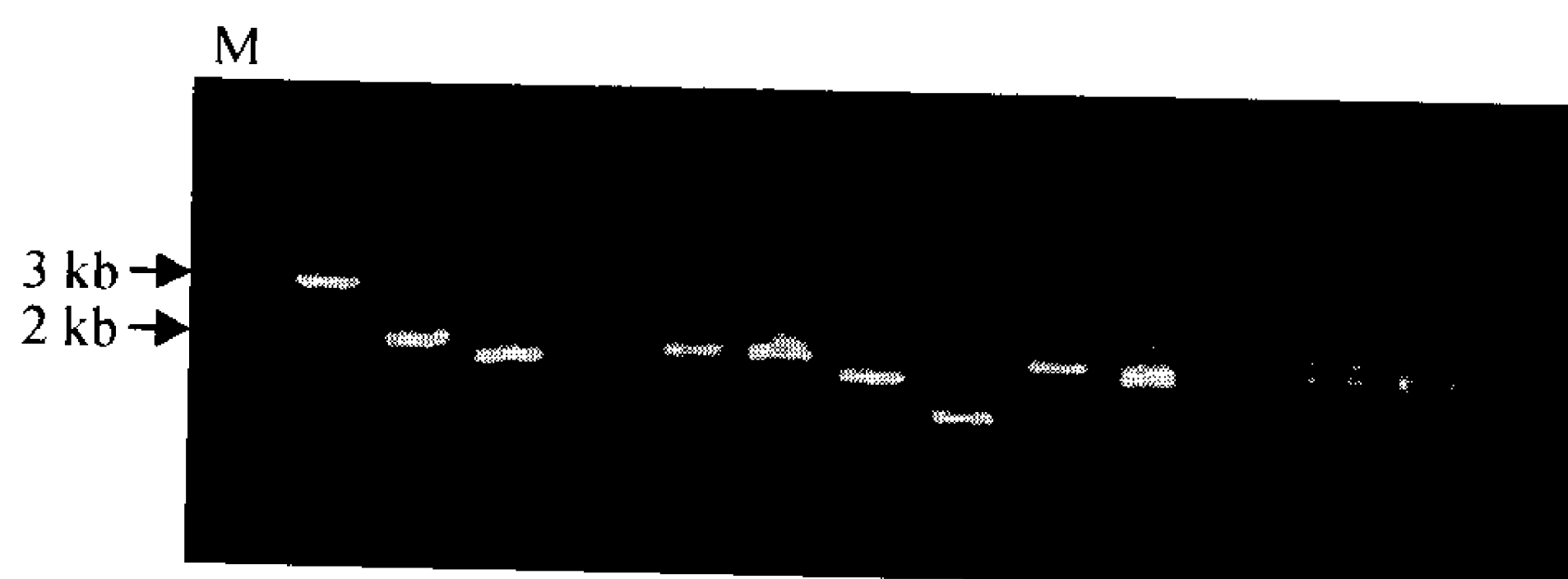
图 2 全长 cDNA 的 RT-PCR 电泳图

Fig. 2 Full-length cDNA obtained by RT-PCR

2.2 cDNA 抑制缩减杂交

本试验进行了正向和反向抑制缩减杂交, 即分别以处理和对照样品为 Tester, 以对照和处理样品为 Driver, 以分别获得诱导剂 PBZ 诱导水稻表达水平上调和下调的基因.

电泳检测, 回收并克隆到载体内, 构建缩减杂交文库. 随机挑取部分克隆, 用载体通用引物 M13 扩增检测插入子的大小和插入率 (图 3). 图 3 显示插入子的大小主要集中在 2 kb 附近, 且插入率较高.



M: DNA Marker; 其余泳道为缩减杂交产物克隆结果

图 3 缩减杂交产物克隆的 PCR 检测

Fig. 3 Screening of the cDNA clones of FLSSH by PCR

2.3 抑制缩减杂交克隆的初步筛选

将 384 孔培养板内的 PCR 产物转印到尼龙膜上, 每张膜上转印 2 个重复. 固定后分别以对照和处理样品的总 cDNA 为探针进行 Southern 杂交, 初步筛选在对照和处理样品间有表达差异的基因克隆.

根据杂交信号的强弱初步选取表达差异的基因克隆, 在以处理样品为 Tester 的缩减杂交文库内, 有 12 个基因克隆表达有较明显差异; 在以对照样品为 Tester 的缩减杂交文库中, 有 5 个基因克隆表达有较明显差异.

为了确认差异表达基因克隆, 将缩减杂交前和缩减杂交后的总 cDNA 产物电泳转印到尼龙膜, 以

差异表达基因克隆为探针进行 Southern 杂交. 杂交结果表明, 正调控基因 3G8 在处理样品中表达水平较高, 在以处理样品总 cDNA 为 Tester 的正向抑制缩减杂交过程中逐步得到富集, 而在反向抑制缩减杂交中没有得到富集, 也说明缩减杂交的效果较好 (图 4).

其他 16 个基因克隆以同样方法进行筛选, 最终得到 5 个正向调控的候选基因克隆和 3 个反向调控的候选基因克隆.

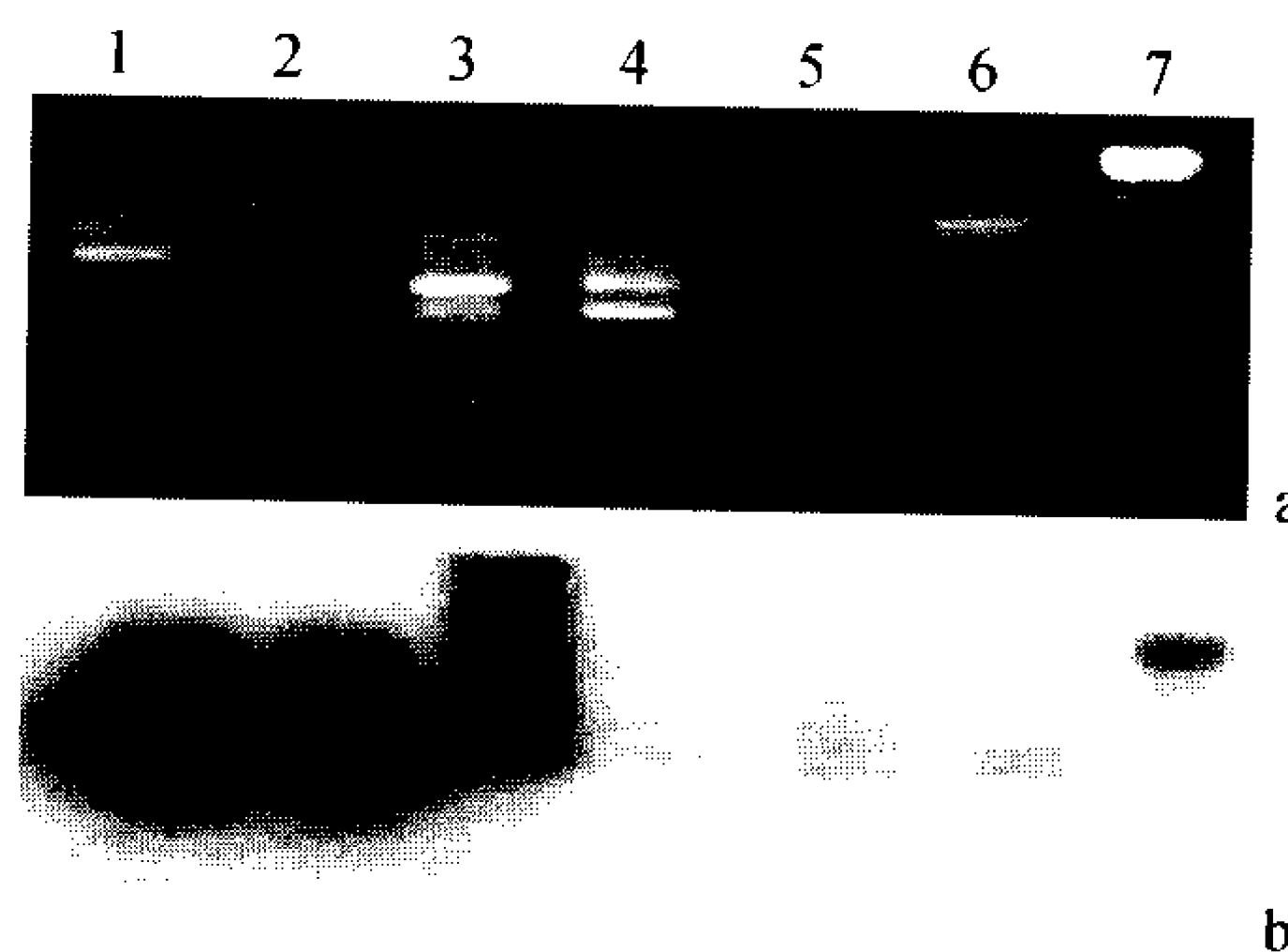


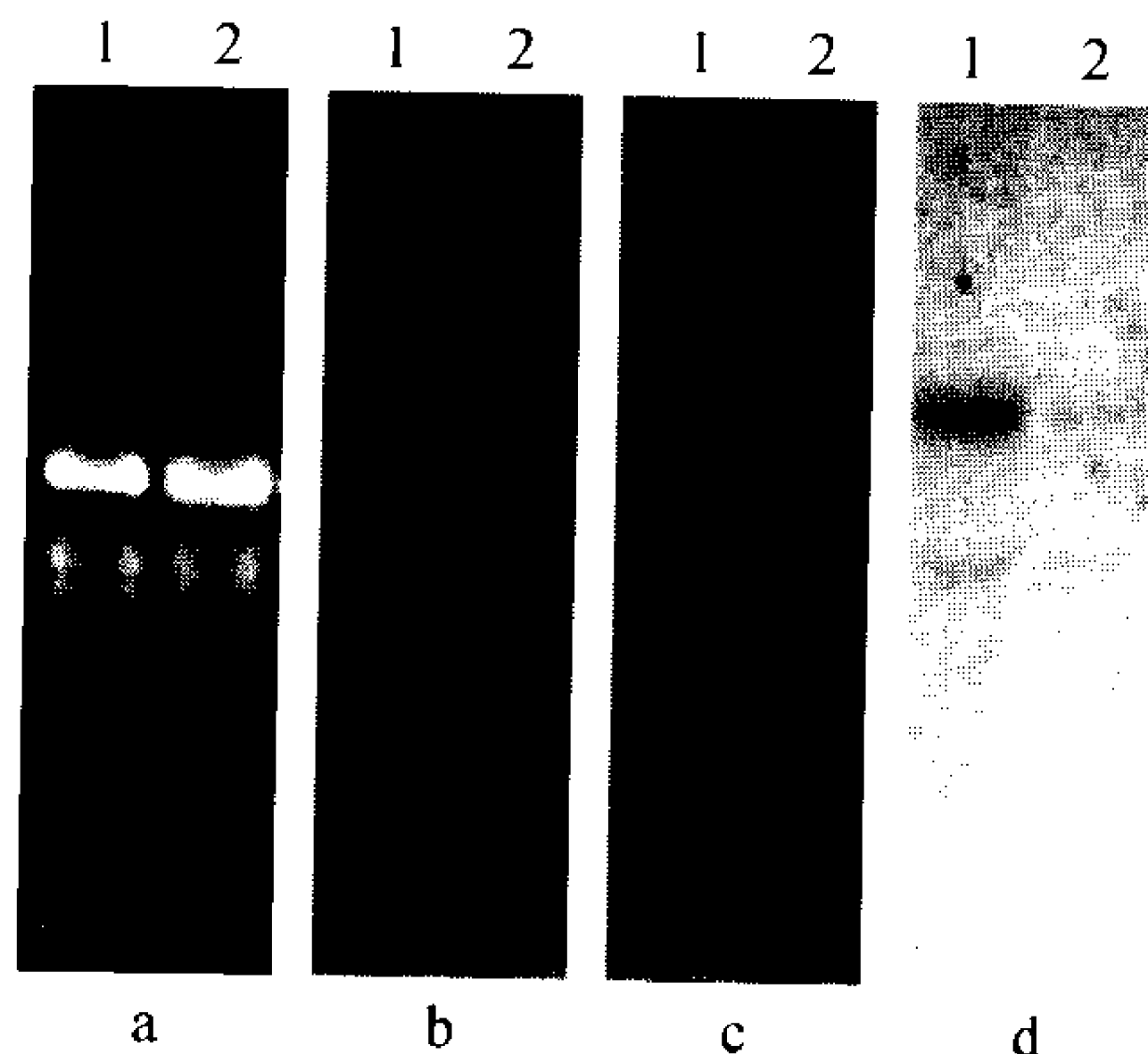
图 a 泳道 1 和 2 为以处理样品为 Tester 的正向缩减杂交第 1 轮和第 2 轮缩减杂交后的 PCR 扩增产物, 泳道 3 和 4 为处理样品和对照样品的未经缩减杂交的 cDNA, 泳道 5 和 6 为以对照样品为 Tester 的反向缩减杂交第 1 轮和第 2 轮缩减杂交后 PCR 产物, 泳道 7 为 λ -Hind III; 图 b 是图 a cDNA 的以差异表达基因克隆 3G8 为探针的 Southern 杂交, 该图杂交结果显示差异表达克隆 3G8 经缩减杂交获得浓缩

图 4 差异表达克隆 3G8 的初步筛选

Fig. 4 Enrichment of the 3G8 mRNA by FLSSH, a differentially expressed gene between Tester and Driver

2.4 候选基因克隆受 PBZ 诱导表达调控的确认

为了确认获得的 8 个候选基因克隆受 PBZ 诱导表达变化, 以及表达的本底和变化的范围, 提取对照样品和 PBZ 处理样品的总 RNA 电泳转膜, 以该基因片段为探针, 进行 Northern 杂交检测 (图 5). 结果表明获得的差异克隆在 PBZ 处理和对照样品间的表达水平都有较大的差异.



1: 对照样品; 2: 处理样品; a: 总 RNA 电泳图;

b~d 分别为克隆 3G8、1E7、2G3 的 Northern 杂交结果

图 5 候选基因克隆的诱导表达分析

Fig. 5 Expression analysis of the candidate clones when induced by PBZ

3 结论

全长 cDNA 抑制缩减杂交技术是在 SSH 技术和 SMART cDNA 合成方法的基础上进行改良的方法. 与 SSH 相比具有以下优点:仅需要较少的试验材料,通过 RT-PCR 方法获得足够的 cDNA(用单一引物 P_{sf} 扩增,避免 RT-PCR 时的偏态扩增),不需要纯化 mRNA 就可以进行缩减杂交;不选用 4 碱基限制性内切酶,得到的差异表达克隆也较长,甚至全长 cDNA.

在本研究获得的缩减杂交文库中,插入子的长度在 1~4 kb 范围内,主要集中在 1.5 kb 附近,说明该方法可以获得较长的差异 cDNA 克隆. 但本研究获得的差异克隆 3G8 和 2G3 测序结果表明其长度分别为 1.6 和 2.7 kb,通过 NCBI 网站 Blast 分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)和 RGP 网站基因(<http://rgp.dna.affrc.go.jp/Analysis.html>)预测长度分别为 2.3 和 3.1 kb,说明可以得到较长片段的 cDNA 克隆. 该方法对于快速获得目的基因全长片段有较好的效果,尤其以没有进行全基因组测序的物种作为试验材料时,可以减少 5'-RACE 或 3'-RACE^[5] 的试验过程. 但研究结果未获得完整的 cDNA,这与 SMART cDNA 合成方法的特性有关,因为反转录酶在合成过程中,不能区分 mRNA 末端是断裂片段的末端,还是全长 mRNA 的末端,所以非全长的 cD-

NA 片段也会出现在缩减杂交文库内. 为了减少非全长 cDNA 克隆,需要在实验材料和 cDNA 合成 2 个步骤严格控制,尽可能得到全长 cDNA 再进行缩减杂交.

参考文献:

- [1] WATANABE T, SEKIZAWA Y, SHIMURA M, et al. Effects of probenazole (Oryzmate) on rice plants with reference to controlling rice blast [J]. J Pesticide Sci, 1979, 4:53-59.
- [2] SHIMURA M, IWATA M, TASHIRO N, et al. Anti-conidial germination factors induced in the presence of probenazole and properties of four active substances [J]. Agric Biol Chem, 1981, 45:1431-1435.
- [3] DIATCHEBKO L, LAU Y, CAMPBELL A, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12):6025-6030.
- [4] HARTUNG F, PUCHTA H. Molecular characterization of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(7):1548-1554.
- [5] FROHMAN M A, DUSH M K, MARTIN G R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. Proc Natl Acad Sci, 1988, 85:8998-9002.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 33 页)

- [15] 刘琼光,杨艳. 番茄品种抗性与青枯菌和土壤微生物关系的研究 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 2006, 19(3): 31-34.
- [16] COOK R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens [J]. Ann Rev Phytopathol 1993, 31:53-80.
- [17] KLOEPPER J W, RYU C M, ZHANG S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. [J]. Phytopathology, 2004, 94(11):1259-1266.
- [18] HAAS D, DEFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by *Fluorescent pseudomonas* [J]. Nature Rev Microbiol, 2005, 3:1-13.
- [19] CHANG W T, CHEN Y C, JAO C L. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes [J]. Bioresource Technology,

2007, 98(6):1224-1230.

- [20] OUOBA L I, DIAWARA B, JESPERSEN L, et al. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean for Soumbala production [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(4):963-970.
- [21] KAMENSKY M, OVADIS M, CHET I, et al. Chernin soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* disease [J]. Soil Biol Biochem, 2003, 35:323-331.
- [22] 马迎新,刘晓光,高克祥,等. 根际细菌 *Serratia plymuthica* HRO-C48 的生防作用初探 [J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(1):49-53.

【责任编辑 周志红】