

落叶松扦插生根过程抑制消减杂交文库构建及分析

冯健^{1,2}, 齐力旺¹, 孙晓梅¹, 韩素英³, 张守攻^{1*}

(1 中国林业科学研究院林业研究所细胞生物学实验室, 北京 100091;

2 辽宁林业科学研究院, 辽宁 沈阳 110032 3. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要:以落叶松扦插生根率存在显著差异的 2 个全同胞优良无性系茎和根为材料, 应用抑制消减杂交技术构建了扦插生根过程中 2 个差异表达 cDNA 文库, 酶切效率检测、连接效率检测、差减效率检测结果表明: 这 2 个落叶松扦插生根过程差异表达 cDNA 文库构建成功。利用 PCR 扩增和点杂交试验筛选阳性克隆, 将阳性克隆测序, 并经生物信息学分析, 最终获得 521 个 UnEST。

关键词:落叶松; 抑制消减杂交文库; 扦插

中图分类号: S791.22 文献标识码: A

Construction and Analysis of the Suppression Subtractive Hybridization Library of *Larix* Cuttings during Rooting

FENG Jian^{1,2}, QI Liwang¹, SUN Xiaomei¹, HAN Suying³, ZHANG Shou-gong¹

(1 Group of Trees Cell Biology, Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China 2 Liaoning Academy of Forestry, Shenyang 110032, Liaoning, China 3 Research Institute of Forest Ecology Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract Taking the stems and roots of two full-sib clones with significant difference in rooting rate as test materials, two differential expression cDNA libraries of *Larix* cutting during rooting were established by PCR-selectTM cDNA subtraction kit. The results of analysis of Rsa I digestion, ligation and subtraction efficiency showed that the two libraries were established successfully. The positive clones were screened by PCR and dot blots. 521 UnEST were obtained by sequencing and bioinformatics analysis.

Key words *Larix*; suppression subtractive hybridization library; cutting

落叶松 (*Larix* spp.) 是落叶松属植物, 为我国北方主要造林树种之一。扦插作为林木良种选育和优良品种扩繁的重要技术手段, 同样适用于落叶松育种工作。由于落叶松扦插生根率低, 且不同无性系间生根率存在明显差异等问题, 严重制约了落叶松的育种繁育工作。先前的研究多是从解剖学和生理学角度探讨落叶松生根问题, 如, 落叶松扦插生根的部位、内外源激素对落叶松扦插生根的影响、插穗部

位及母树年龄对扦插生根率的影响等; 从基因水平探讨落叶松扦插生根问题还未见报道^[1-5]。探讨落叶松扦插生根的分子机理, 提高落叶松扦插生根率对于落叶松遗传改良具有重要意义。为获得落叶松扦插生根过程中差异表达基因, 本实验选择了抑制消减杂交 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 技术^[6-12], 构建落叶松扦插生根过程差异表达 cDNA 文库, 并对文库进行了初步分析。

收稿日期: 2008-03-07

基金项目: 国家“863”计划“高产优质多抗林木花草分子与细胞高效育种技术及品种创制 (2006AA100109)”和国家转基因与产业化专项“优质、杂种落叶松抗旱基因工程育种研究 (J2002-B-005)”

作者简介: 冯健 (1978-), 男, 辽宁沈阳人, 博士, 主要从事林木生物技术和微生物生态学研究

* 通讯作者

1 材料与方 法

1.1 材 料

本试验所用材料均取自辽宁大孤家国营林场, 为杂种落叶松(日永 85×长 4C) 31-6 和 15-4 两个全同胞无性系, 其中无性系 31-6 的生根率 > 90%, 无性系 15-4 的生根率 < 20%。取材分 3 个时期, 分别为插穗茎段、插穗形成愈伤组织且有根原基形成、不定根生长初期。取材后迅速液氮冷冻, 带回实验室后 -70℃ 保存。在文库构建时, A 库以无性系 31-6 三个时期总 RNA 等量混合合成 cDNA 为 Tester, B 库以无性系 15-4 三个时期总 RNA 等量混合合成 cDNA 为 Testes。

1.2 试 剂

Oligotex mRNA Spin-Column Protocol(For isolation of poly^{A+} mRNA from total RNA) 购自 Qiagen 公司; Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 购自 Cbntech 公司; T-easy 载体购自 Promega 公司; DH5 α 和 Taq DNA 聚合酶购自天根生化科技(北京)有限公司。DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche 公司。其它试剂为国产分析纯试剂。

1.3 方 法

1.3.1 落叶松 mRNA 分离 总 RNA 提取参照 David L 等^[6]的方法并作适当修改; mRNA 分离纯化采用 Qiagen mRNA 分离试剂盒提供的方法。获得的总 RNA 和 mRNA 用 1% 琼脂糖凝胶检测质量, 同时用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀和 OD₂₈₀的值进一步检测质量, 并计算含量。

1.3.2 抑制消减杂交文库构建 获得足量 mRNA 后, 按照 Cbntech PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 操作手册获得 cDNA 片段。获得的 cDNA 片段与 T-easy 载体连接; 然后转化大肠杆菌菌株 DH5 α , 构建落叶松抑制消减杂交文库。细菌培养参考《分子克隆实验指南》^[13]的方法进行。

1.3.3 PCR 检测阳性菌落和点杂交试验 经过蓝白斑筛选后, 挑取白色菌落摇菌, 并用 PCR 扩增检测是否含有插入片段, PCR 所用引物为抑制消减杂交试剂盒所用的 Nested PCR primer 1 和 Nested PCR primer 2R, 反应体系为细菌菌液 1.0 μ L, 10×PCR 反应缓冲液 2.5 μ L, dNTP(10 mmol·L⁻¹) 1.0 μ L, Nested PCR primer 1 和 Nested PCR primer 2R 各 1.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 无菌水 18.0 μ L, 合计

25 μ L。反应循环参数为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 10 s, 68℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

Nested PCR primer 1: 5'-TCGAGCGGCCGC-CCGGGCAGGT-3'

Nested PCR primer 2R: 5'-AGCGTGGTCCGGCCGAGGT-3'

经 PCR 检测为阳性的菌落进一步进行点杂交检测, 探针为文库构建中第 2 轮 PCR 产物, 操作步骤按 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 操作手册提供的方法进行。

1.3.4 生物信息学分析 采用 NCBI 的 BLAST 软件对所测序列与 GenBank 中的非冗余数据库(non-redundant database NR) 比对。

2 结果与分 析

2.1 mRNA 分离和检测

从试验结果(图 1)看: 经 1% 琼脂糖凝胶电泳法检测, 28S 和 18S 条带清楚, 且 28S 亮度基本上是 18S 亮度的 1.5~2.0 倍; 同时, 无其它杂带。经分光光度计检测, 所有样品的 D₂₆₀/D₂₈₀ 值均为 1.8~2.1, 表明 RNA 样品含酚类物质和蛋白质等杂质少。利用 mRNA 纯化试剂盒, 分离纯化 2 个总 RNA 混合物, 获得 mRNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 呈现弥散条带, 且看不到 28S 和 18S 两条主带, 表明所获得 mRNA 质量较高, 完全符合 cDNA 合成要求。

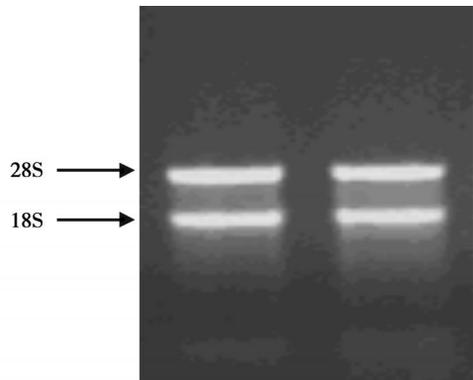
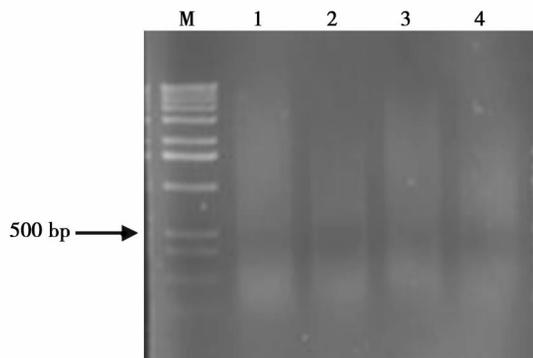


图 1 总 RNA 电泳质量检测

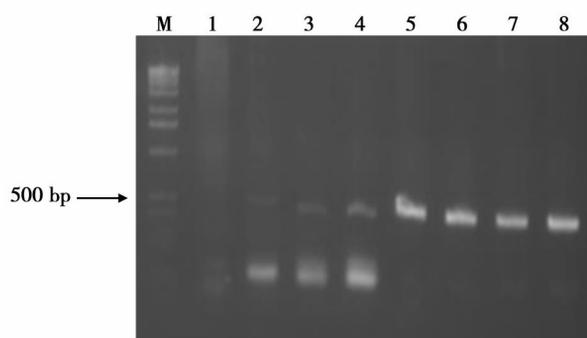
2.2 抑制消减杂交及质量分析

抑制消减杂交主要过程包括双链 cDNA 合成、RsaI 酶酶切、接头连接、2 轮杂交和 2 轮 PCR。为了监测抑制消减杂交的效果, 需要对主要过程进行检验, 以最终确定文库构建质量。主要建库过程和监控结果见图 2~5。



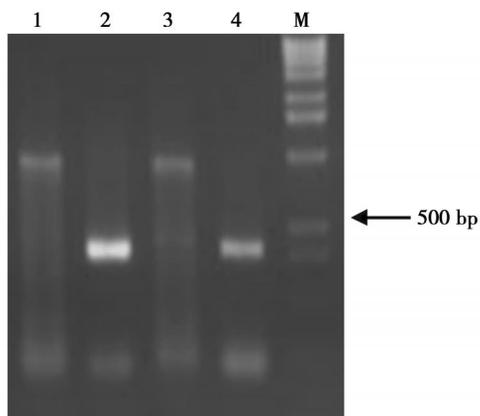
M: 1Kb DNA Ladder 1 *Rsa*I 酶酶切前落叶松无性系 31-6 双链 cDNA; 2 *Rsa*I 酶酶切后落叶松无性系 31-6 双链 cDNA; 3 *Rsa*I 酶酶切前落叶松无性系 15-4 双链 cDNA; 4 *Rsa*I 酶酶切后落叶松无性系 15-4 双链 cDNA

图 2 *Rsa*I 酶切分析



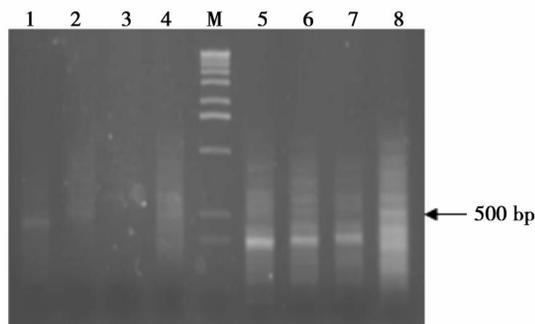
M: 1Kb DNA Ladder 1~4 以 A 库双链 cDNA 片段为模板, 18、23、28 和 33 个循环时 PCR 产物; 5~8 以正向未差减双链 cDNA 片段为模板, 18、23、28 和 33 个循环时 PCR 产物

图 5 差减效率检测



M: 1Kb DNA Ladder 1 3 以 β -actin 特异引物和接头引物为引物组扩增产物; 2、4 以一对 β -actin 特异引物为引物组扩增产物

图 3 接头连接效率检测



M: 1Kb DNA Ladder 1: 正向差减 cDNA 第 1 轮 PCR 产物; 2 正向未差减 cDNA 第 1 轮 PCR 产物; 3: 反向差减 cDNA 第 1 轮 PCR 产物; 4 反向未差减 cDNA 第 1 轮 PCR 产物; 5 正向差减 cDNA 第 2 轮 PCR 产物; 6 正向未差减 cDNA 第 2 轮 PCR 产物; 7 反向差减 cDNA 第 2 轮 PCR 产物; 8 反向未差减 cDNA 第 2 轮 PCR 产物

图 4 PCR 产物分析

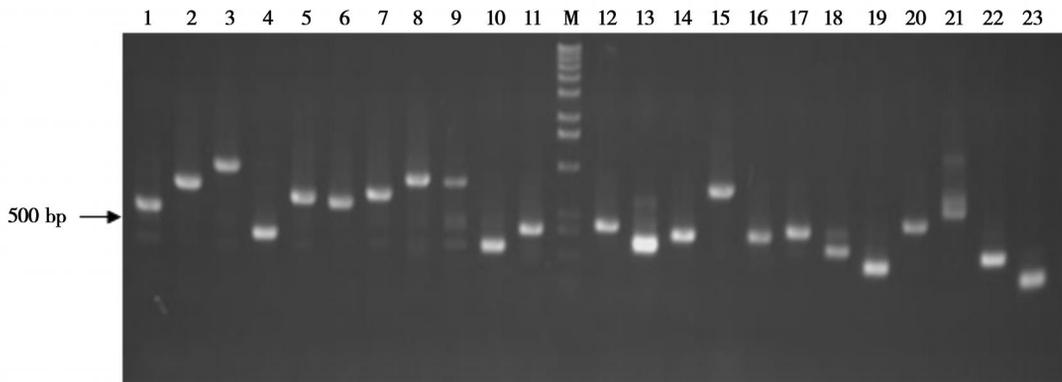
图 2 所示: 反转录后的双链 cDNA 呈现一个很好的弥散谱带, 经过 *Rsa*I 酶完全酶切后, 双链 cDNA 片段大小在 500 bp 左右, 这表明 mRNA 反转录为双链 cDNA 和 *Rsa*I 酶酶切都获得比较满意的结果。接头连接效率分析试验表明 (图 3): 以 β -actin 内部特异引物和接头引物组成的引物组扩增产物亮度是以 β -actin 2 个特异引物为引物组扩增产物亮度的 1/3 说明连接效果良好 (连接效率至少要在 25% 以上, 否则差减效率会大大降低), 完全可以进行下一步试验。2 轮 PCR 结果如图 4 第 1 轮扩增后以正向和反向差减 cDNA 为模板都不能看到明显的弥散条带, 经过第 2 轮 PCR 扩增后才可以看到明显的弥散条带, 此即 A 库 (生根率高的落叶松无性系 31-6 为 Tester) 和 B 库 (生根率低的落叶松无性系 15-4 为 Tester)。以上试验是对抑制消减杂交过程进行监控, 试验结果完全符合 SSH 技术要求。最后对所获得差异表达 cDNA 文库进行差减效率分析, 如图 5 所示, 以 A 库双链 cDNA 片段为模板的 PCR 反应, 在 18 个循环时没有可见 β -actin 特异条带, 在 23 个循环后开始出现非常弱的 β -actin 特异条带, 至 33 个循环时 β -actin 特异条带仍然很弱; 而以正向未差减双链 cDNA 片段为模板的 PCR 循环中, 第 18 个循环就可以看到清楚的 β -actin 特异条带, 且亮度非常大。此结果说明, 经过差减杂交后, A 库中持家基因 β -actin 片段已经被降低到很低的水平, 均一化效果明显。

2.3 差减 cDNA 文库的构建及鉴定

以单菌落的菌液为模板, 使用 Nested PCR primer 1 和 Nested PCR primer 2R 引物组进行 PCR 扩增, 鉴定含有差减双链 cDNA 片段插入的阳性克隆。由图 6 看出: 绝大部分单菌落可以扩增出整齐、亮度大

的单一一条带,且条带大小分布在 500 bp 左右。图中单一一条带分布不一,说明差减后的 cDNA 片段呈现

多态性和重复率低的特点,表明经过差减后高丰度基因的均一化效果很好。

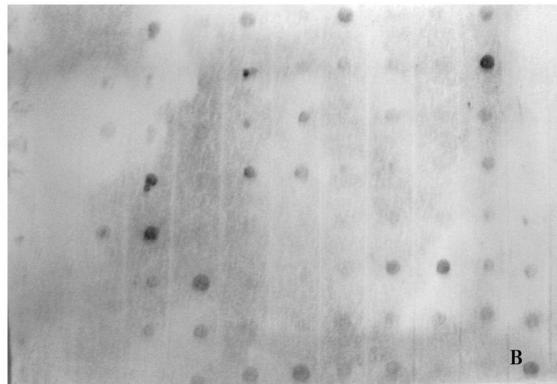


M: 1Kb DNA Ladder 1~ 23 差减文库插入片段

图 6 PCR 筛选阳性克隆

采用随机引物法标记 2 个探针,分别与 2 套 cDNA 拷贝膜杂交,选取: (1)与 A 库探针有杂交信号,与 B 库探针不能杂交; (2)与 A、B 库探针均杂交,但与 A 库探针的杂交信号高于与 B 库探针的杂交信

号 3 倍的克隆,作为特异或增强表达基因的候选克隆。从点杂交结果(图 7)看,差减文库的阳性率在 85% 以上,符合差减文库构建要求。



A 为与 A 库探针杂交结果; B 为与 B 库探针杂交结果

图 7 部分克隆斑点杂交筛选结果

2.4 差异表达 cDNA 片段的生物信息学注释和归类

为了注释所有获得序列的可能生物学功能,采用 Blastx 和 Blastn 的方法进行相似性比对分析。通过与本地化的 NCBI 的 NR 库、dbEST 库及拟南芥数据库比对,对每个 UnEST 进行最可能的功能注释, A 库中有 161 条序列, B 库中有 182 条序列与数据库中的序列具有同源性(分值 ≥ 80 , 相似性 $\geq 78\%$, 同源序列长 100 bp 以上)。所获得的 521 条序列分别属于不同的类别,具体统计情况见表 1。

表 1 落叶松扦插生根过程差别表达 cDNA 文库所获得的 UnEST 分类

基因类别	A 库序列条数	B 库序列条数
新陈代谢	25	66
信号途径	41	33
物质运输	15	7
抗性相关	27	23
生长发育	29	20
亚细胞组成	5	4
功能未知	22	26
无比对结果	108	70
合计	272	249

3 结 论

构建一个好的差异表达 cDNA 文库对起始 mRNA 的完整性和纯度要求非常高。本试验的结果表明, 试验获得的总 RNA 含量高, 完整性好, 28S 与 18S 带型亮度比达到 2: 1。mRNA 的完整性和纯度也完全达到文库构建要求。在本文抑制消减杂交试验中, 从反转录合成 cDNA 的监控、加接头后的接头连接效率分析到差减 cDNA 片段的差减效率分析试验, 都随时监控着各个试验环节, 保证最终获得高质量的差异表达 cDNA 文库。单菌落 PCR 扩增电泳图谱呈现很好的多态性, 点杂交试验结果为阳性率在 85% 以上。这些结果直接说明获得了高质量的 A、B 差异表达 cDNA 文库。

通过生物信息学分析, 在 A 库获得的 272 条 UnEST 中, 无同源序列的 UnEST 占 39.70%, 加上功能尚未确定的序列, 占到所获得 UnEST 的 47.70%; 在有同源性的序列中, 以信号途径占的比例最大, 达到 15.07%, 其次是生长发育和抗性相关, 分别达到 10.66% 和 9.93%。这些结果表明, 在落叶松扦插生根过程中, 与生长发育和新陈代谢相关的基因大量表达, 这些基因的表达产生相应的蛋白和信号, 最终促使插穗形成不定根及不定根和侧根的生长发育。在 B 库获得的 249 条 UnEST 中, 无同源序列的 UnEST 占 28.11%, 加上功能尚未确定的序列, 占到所获得 UnEST 的 38.15%; 在有同源性的序列中, 新陈代谢类序列占的比例最大, 达到 26.51%, 其次是信号途径、抗性相关、生长发育类序列。在生根率低的落叶松无性系插穗中大量表达新陈代谢类基因, 这些基因的表达会在插穗中产生大量次生代谢物, 这些物质的产生是否影响插穗生根, 还有待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] 敖 红, 王 昆, 冯玉龙. 长白落叶松插穗的内源激素水平及其与扦插生根的关系 [J]. 植物研究, 2002, 22(2): 190-195
- [2] 杜继煜, 白 岩, 白宝璋. 植物的插条繁殖生理 [J]. 农业与技术, 2004, 24(5): 96-97
- [3] 黄卓烈, 李 明, 谭绍满, 等. 萘乙酸处理桉树插条后过氧化物酶活性及其同工酶变化与插条生根的关系研究 [J]. 植物研究, 2002, 22(3): 296-300
- [4] 刘桂丰, 杨书文, 杨春华, 等. 长白落叶松嫩枝扦插生根的解剖研究 [J]. 东北林业大学学报, 1992, 20(1): 9-13
- [5] 李小方, 汤章城, 何玉科. 不定根的形态发生与调节机制 [J]. 细胞生物学杂志, 2001, 130-136
- [6] David L, Scott JR, Clarence C, *et al*. Isolation of functional RNA from periderm tissue of potato tubers and sweet potato storage roots [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16: 3-8
- [7] Cheng S, Fockler C, Bames W M, *et al*. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(12): 5695-5699
- [8] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, *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
- [9] Duguid JR, Dinauer M C. Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(9): 2789-2792
- [10] Hara E, Kato T, Nakada S, *et al*. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)-30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(25): 7097-7104
- [11] Siebert P D, Chen Chik A, Kellogg D E, *et al*. An improved method for walking in uncloned genomic DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(6): 1087-1088
- [12] Wang Z, Brown D D. A gene expression screen [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(24): 11505-11509
- [13] 萨姆布鲁克 J 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002, 1594-1596