

变体“NDF-1”重心低,抗倒伏能力强,且还能减少植株因秸秆过高消耗的光合产物,有效提高油菜的经济系数^[1]。

本研究通过构建抑制性消减文库,筛选矮化突变体“NDF-1”与野生型“3529”茎段伸长初期茎尖差异表达的基因,并对部分差异表达的基因进行了初步分析,为克隆油菜矮化相关基因,探讨植物茎秆发育机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”及其野生型亲本“3529”由四川大学生命科学学院油菜课题组提供,取茎段开始伸长而尚未出现花蕾分化的茎尖部位 0.5 cm 左右迅速置于液氮中备用。

大肠杆菌 JM109 和质粒载体 pMD18-T vector 购自宝生物工程有限公司(中国大连)。T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、各种限制性内切酶和 dNTPs 等均购自 Takara 公司(日本)。poly A Tract mRNA isolation Kit 购自 Promega 公司(美国);PCR-selectTM cDNA subtraction Kit 购自 Clontech 公司(美国);E. Z. N. A cycle pure Kit 购自 Omega 公司(美国)。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 mRNA 的分离和纯化 分别取甘蓝型油菜“NDF-1”和野生型品系“3529”茎尖,加入液氮充分研磨,参照文献[2]的方法提取 RNA。按照 poly A Tract mRNA isolation systems III 使用手册分离纯化 mRNA, -70℃ 保存备用。

1.2.2 抑制性消减杂交(SSH) 分别取野生型和突变型油菜茎尖 mRNA 约 2 μ g,反转录成单链 cDNA,然后利用 PCR 方法制备双链 cDNA。所得的双链 cDNA 用限制性内切酶 *Rsa*I 37℃ 酶切 1.5h,然后用氯仿、异戊醇进行纯化。之后以矮化突变体“NDF-1”作为消减杂交的 Tester,以野生型油菜作为消减杂交的 Driver 进行消减杂交。

1.2.3 cDNA 消减文库的构建 用 E. Z. N. A cycle pure Kit 纯化消减杂交的二次 PCR 产物,重悬于 25 μ L ddH₂O 中,电泳估测 DNA 的浓度及片段大小。取适量纯化后的二次 PCR 产物与 50 ng pMD18-T 载体 16℃ 过夜连接;将连接产物转化到大肠杆菌 JM109 中,涂布于 LB/AMP/IPTG/X-Gal 平板上,37℃ 过夜培养。

1.2.4 阳性克隆的检测 随机挑取转化平板上的

白色菌落,在含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃ 摇菌过夜。以 nested primer1(5'-TCGAGCGGGCGCCCGGGCAGGT-3')和 nested primer 2R(5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3')为引物,所选白色菌落为模板,菌落 PCR 检测插入片段。

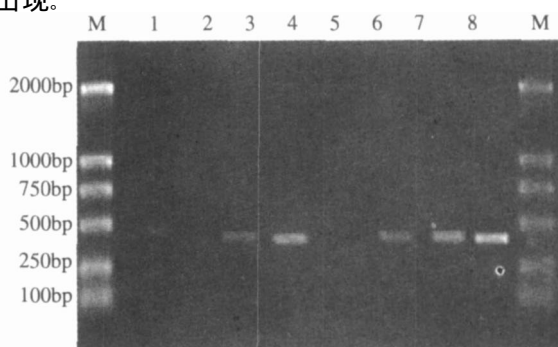
1.2.5 斑点杂交筛选差异表达的基因片段 随机挑取消减文库中 88 个阳性克隆的菌落 PCR 产物制备两张相同的杂交膜。按照 DIG DNA Labeling and Detection Kit 使用手册,以消减杂交的二次 PCR 产物做探针进行杂交。

1.2.6 阳性克隆的测序及同源性比对分析 根据斑点杂交筛选得到的阳性斑点,从 88 孔板找出对应的克隆,重新摇菌;PCR 检测为单一克隆后,送上海博亚公司测序,将测序结果在 GenBank 拟南芥的基因库中利用 BLAST 软件进行序列同源性检索分析。

2 结果与分析

2.1 削减效率的检测

根据甘蓝型油菜 *Psb* 基因序列的 *Rsa*I 的酶切位点设计 1 对引物(上游:5'-ACCTTATTGACGCAACTTCCG-3';下游:5'-ACCAGAGATTCCTAGAGGCATACC-3'),PCR 扩增消减前后的 Tester cDNA。结果显示(图 1),*Psb* 基因在野生型和矮化突变体植株中均表达;SSH 后经 PCR 扩增,未消减产物中第 18 个循环即检测到 *Psb* 产物,而消减产物中要多 5~10 个循环后才有 *Psb* 产物出现。



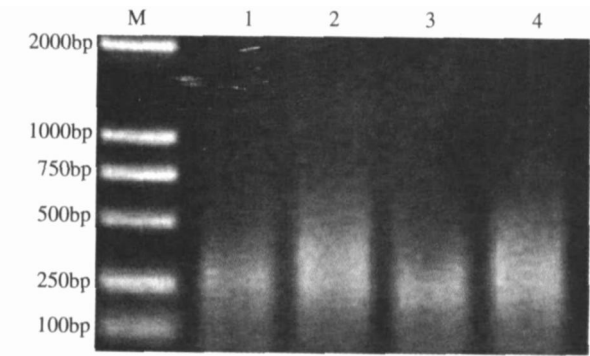
M. Marker; 1~4 道和 5~8 道分别为消减产物和未消减产物的二轮 PCR 产物;1,5 道:18 个循环;2,6 道:23 个循环;3,7 道:28 个循环;4,8 道:33 个循环

图 1 PCR 扩增 *Psb* 片段判断消减效率

2.2 消减 cDNA 文库的构建

以甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”为 Tester,野生型亲本“3529”为 Driver 进行消减为反向消

减;反之,为正向消减。抑制性消减杂交后经两轮 PCR 扩增结果如图 2 所示。消减得到的 cDNA 群体用 T/A 克隆法来构建消减文库。



M. DNA Maker (DL2000); 1. 正向消减 PCR 产物; 2. 正向未消减 PCR 产物; 3. 反向消减 PCR 产物; 4. 反向未消减 PCR 产物

图 2 “3529”和“NDF-1”抑制性消减杂交后经两轮 PCR 扩增结果

经两轮 PCR 富集,消减后的 cDNA 群体与未消减的 cDNA 群体比较,可以看到消减后 cDNA 的范围有所变化,一些条带出现,而另一些条带消失。这可能是由于两次杂交扣除了 Tester 与 Driver 中共同表达的基因,同时消除了基因丰度之间的差异,使一些低丰度的差异表达基因得以显现。

2.3 消减文库阳性克隆的检测

图 3 为反向消减文库的菌落 PCR 检测的部分电泳检测结果。从图 3 可见,插入片段的大小不等,范围在 100 ~ 500 bp 之间。随机挑取的 200 个白色菌落有 124 个菌落为阳性克隆,其中 6 个克隆中含有两个插入片段,可被视为无效克隆,有效重组率为 58 %。

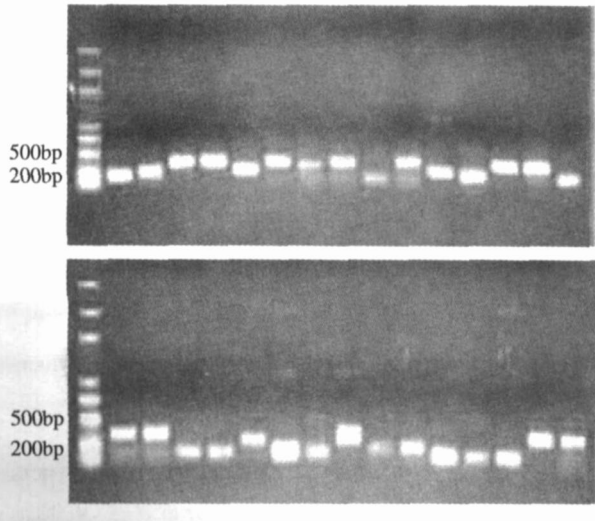
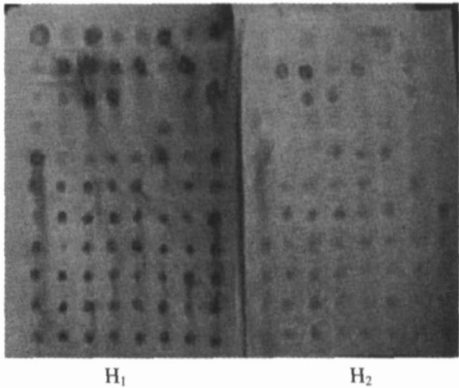


图 3 反向消减文库部分克隆菌落 PCR 电泳图谱

2.4 消减文库的筛选

随机挑取反向消减文库的 PCR 阳性转化子 88 个进行斑点杂交筛选,比较不同杂交膜上杂交信号的强弱,共筛选到 30 个阳性克隆,即在矮秆突变体“NDF-1”中特异性表达或表达量增加的基因。杂交结果见图 4(仅为部分克隆杂交结果),阳性克隆与反向消减杂交产物探针杂交的信号要比与正向消减杂交产物探针杂交的信号强的多。为了避免斑点杂交高背景,假阳性高的缺点,所有克隆都进行了 2 次筛选。



H₁, H₂ 分别代表反向和正向探针与反向消减文库中 88 个阳性克隆的菌落 PCR 产物的斑点杂交

图 4 斑点杂交结果

2.5 测序及序列比较分析

将通过斑点杂交筛选的 30 个阳性克隆送上海博亚生物工程公司进行测序。测序结果(送测克隆中 23 个有测序结果)到 GenBank 进行 BLASTn 比对,其中 18 个有比较明确的比对结果。8 个克隆涉及到第二信使、转录因子、激素代谢、蛋白质降解及转运等多个方面,另外有 10 个克隆功能未知(表 1)。

| 表 1 差异表达基因同源比较结果 | |
|------------------|---------|
| 基因功能 | 相关的基因个数 |
| 第二信使 | 1 |
| 转录因子 | 1 |
| 激素代谢 | 1 |
| 蛋白质降解 | 4 |
| 蛋白质转运 | 1 |
| 其他 | 6 |
| 未知功能蛋白 | 4 |

注:“其他”为未能明确分类的基因

2.6 部分差异表达基因功能分析

对其中有明确比对结果,斑点杂交显示仅在矮化突变体中表达或表达量明显增加的 3 个克隆(C10、G6和 M8)进行功能分析。

C10 与拟南芥泛素连接酶同源,与核苷酸同源

性达 92%，与推测的蛋白质同源性高达 97%。泛素连接酶通过参与 ATP 依赖的泛素-蛋白酶体途径降解真核细胞内大部分的蛋白质。泛素-蛋白酶体途径能选择性地降解细胞内变性、变构或错误翻译的蛋白以及各种调节蛋白等，因而在胚胎发育、激素响应、昼夜节律、花的同源异形性(homeosis)、光形态建成、细胞分化、衰老和病原防御等许多细胞内基本生理过程中起重要作用。该途径在包括生长素、赤霉素在内的调控植株高矮性状的植物激素的信号转导过程中发挥着重要作用。Sasaki 等的研究表明，GA 的信号传导过程中有泛素-蛋白酶体降解的发生^[3]，通过降解 GA 应答的负调控因子，解除抑制状态，允许 GA 相关基因的表达，植株进行正常的生长和发育^[4]。

G6 与拟南芥几丁质酶的核苷酸及推测的蛋白质同源性分别为 86% 和 84%。几丁质酶广泛存在于高等植物，主要分布于植物的茎、叶、种子及愈伤组织中^[5,6]。植物几丁质酶在植物的生长与发育过程中具有重要作用。Ruiqin Zhong 的研究证明，在拟南芥 *elpl* 几丁质酶相关基因突变体中，该基因仅在突变体胚轴和根部表达，胚轴和根的长度明显变短，直径明显变粗^[7]，这些情况表明，此基因很可能对植物的矮化有一定影响。

M8 与拟南芥生长素应答因子(ARF)的核苷酸同源性达 92%，与推测的蛋白质的相似性更是高达 98%。生长素是促进植物细胞伸长和分裂的主要激素，ARF 能与在初期或早期生长素诱导基因的启动子中发现的生长素反应元件结合^[8]，并且可能与 Aux/IAA 蛋白一起参与调控早期生长素诱导基因的转录^[9]，是激活还是抑制基因转录依赖于 ARF 本身^[10]，从而影响植物的生长发育。

3 讨论

基因的差异表达(或选择性表达)在很大程度上决定着生物体的各项生命活动，并使生物体表现出形形色色的差异。就油菜矮化性状突变而言，它的产生，必然涉及与野生型众多基因的差异表达。如能获取两者之间基因差异表达的信息，将对揭示油菜矮化性状突变的分子机理具有重要的作用。

本实验以矮化突变的甘蓝型油菜茎尖为 Test er，野生型茎尖为 Driver，通过抑制消减杂交构建了 SSH cDNA 文库，利用反向消减 cDNA 库斑点印迹筛选该文库，并对在实验中显示出杂交信号差异的克隆进行序列测定和 BLAST 查询。与本实验室李

小艳所构建的突变体幼叶消减文库^[11]相比，在已测序的克隆中还未发现完全一样的基因片段，两个文库的进一步分析工作正在进行中。在本研究所得的 23 个阳性克隆序列中 18 个可以比对出较为明确的结果，其中 8 个克隆功能涉及到第二信使、转录因子、激素代谢、蛋白质降解等多个方面，但这些基因是否真正具有矮化相关功能还需深入研究。而对于 10 个未知功能基因，有的序列较短，无法仅通过 GenBank 中 BLASTn 比对就确认为新基因，所以需要进一步验证；有的需经过 Northern 杂交来验证它们的差异性，如果得到确定，可以进一步研究它们编码的蛋白质的结构和功能。

参考文献:

- [1] Wang M L, Zhao Y, Chen F, *et al.* Inheritance and potentials of a mutated dwarfing gene *ndfl* in Brassica napus [J]. Plant Breeding, 2004, 123(5): 449-454.
- [2] Clark M S. Plant Molecular Biology—A Laboratory Manual [M]. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1997: 122-124.
- [3] Sasaki A, Itoh H, Makoto Matsuoka, *et al.* Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F box mutant [J]. Science, 2003, 299: 1896-1898.
- [4] Sun T P. Gibberellin signal transduction [J]. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3: 374-380.
- [5] 陈崇顺, 徐风彩, 李明启. 21 科 41 种(变种)植物叶片几丁质酶系的研究 [J]. 植物资源与环境学报, 1993, 2(4): 28-33.
- [6] Flach J, Pilet PE, Jolles P. What's new in chitinase research [J]. Experientia, 1992, 48(8): 701-716.
- [7] Ruiqin Zhong, Stanley J. Kays, *et al.* Mutation of a chitinase like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene [J]. The Plant Cell, 2002, 14: 165-179.
- [8] Guilfoyle T J. Aux/IAA proteins and auxin signal transduction [J]. Trends Plant Sci, 1998, 3: 205-207.
- [9] Salbach G, Natura G, Luein W, *et al.* The a subunit of a heterotrimeric G protein from tobacco, NtGPa1, function in K⁺ channel regulation in mesophyll cells [J]. J Exp Bot, 1999, 50: 53-61.
- [10] Shiv B Tiwari, Gretchen Hagen, Tom Guilfoyle. The Roles of Auxin Response Factor Domains in Auxin Responsive Transcription [J]. Plant Cell, 2003, 15: 533-543.
- [11] 李小艳, 赵云, 周云涛, 等. 甘蓝型油菜矮化突变体抑制消减 cDNA 文库的构建及初步分析 [J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(4): 396-402.