

水稻幼叶及幼穗 cDNA 文库的构建及初步分析^{*}

王 峰, 王金发¹

(中山大学生命科学学院 // 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 为了克隆水稻第6染色体上 S_5 位点的基因及包括广亲和基因在内的重要功能基因, 以水稻 *Oryza sativa* L. 广亲和品种 Cpslo17 为材料, 以 λ Triplex2TM 为载体利用 SMART 技术构建了幼叶和幼穗 2 种器官的 cDNA 噬菌体文库。幼叶和幼穗原始文库的克隆数目为别为 1.5×10^5 pfu 和 2.45×10^5 pfu, 插入片段的大小均在 500~3 000 bp 之间, 文库的阳性克隆子的为别比例为 97.0% 和 98.7%。此文库的建立为克隆广亲和基因和其它重要全长功能基因奠定了基础。

关键词: 水稻 *Oryza sativa* L.; 幼叶; 幼穗; 广亲和基因; cDNA 文库

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 02-0074-04

亚洲栽培稻分为籼稻 *Oryza sativa* L. ssp. indica、粳稻 *Oryza sativa* L. ssp. japonica, 它们在产量、品质和抗逆性等方面各具特色, 且其杂种 F1 具有很强的杂种优势^[1]。但籼、粳亚种间杂种优势的直接利用还存在相当困难, 主要表现在杂种结实率低、稳定性差、小穗育性低、籽粒不饱满等^[2,3]。Ikehashi 发现一些特殊的水稻品种与籼、粳稻杂交的杂种一代都能正常结实, 称之为广亲和现象^[4]。为了深入了解广亲和特性的分子机理, 开展水稻杂种不育的分子生物学基础研究, 以具有广亲和特性的优良品种 Cpslo17 为材料构建营养生长时期的幼叶和生殖生长时期的幼穗的 cDNA 文库。水稻苗期生长代谢旺盛, RNA 含量高, 各种基因表达丰富, 水稻叶片是光合作用、制造有机营养、贮藏养分的主要器官。穗是重要的生殖器官, 它和与产量相关的穗型、穗数、每穗粒数、粒重等重要性状、穗颖花分化及其形态建成、育性和胚胎发育等紧密相关。以幼叶和幼穗构建 cDNA 文库不仅可以提供构建分子标记连锁图谱的探针, 更重要的是可以用于分离全长基因进而开展基因功能研究。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 水稻 *Oryza sativa* L. 广亲和品种 Cpslo17, 种子由本室保存。幼叶取自室内种植的 10 d 苗龄水稻的嫩叶, 水稻幼穗取自在田间正常生长的正处于幼穗分化期的短于 3 cm 的幼穗。

1.1.2 试剂和酶 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 购自 CLONTECH 公司。Concert Plant RNA Reagent 购自 Invitrogen 公司。包装蛋白系统 MaxPLaxTM Lambda Packaging Extract Kit 购自 EPICENTRE 公司。焦碳酸二乙酯 (DEPC)、Taq DNA 聚合酶购自北京鼎国公司。DNA Marker、dNTP 购自 Takara 公司。DMSO 购自 Sigma 公司。其它产品为国产 AR。

1.2 方 法

1.2.1 合成 dscDNA cDNA 合成参考 Clontech 公司试剂盒的操作说明。在 0.5 mL 的离心管中加入 1 μ L (约 1 μ g) 水稻总 RNA 样品, 1 μ L SMART IV Oligonucleotide, 1 μ L CDS III β C' PCR Primer, 2 μ L ddH₂O, 混匀, 72 $^{\circ}$ C 温浴 2 min, 冰浴 2 min, 加入 2 μ L 5 $\times$ First strand Buffer, 1 μ L DTT, 1 μ L dNTP Mix (10 mmol/L), 1 μ L Powerscript Reverse Transcriptase, 混匀之后于 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 在冰上终止反应。取 2 μ L First strand cDNA 产物, 加入 80 μ L 去离子水, 10 μ L 10 $\times$ Advantage2 PCR Buffer, 2 μ L 50 $\times$ dNTP Mix, 2 μ L 5' PCR Primer, 2 μ L CDS III β ' PCR Primer, 2 μ L 50 $\times$ Advantage2 Polymerase Mix, 混匀, 短暂离心, 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 6 min, 19 个循环。取 5 μ L PCR 产物于 $w = 1.2\%$ agarose/EB 胶上电泳检查。

1.2.2 cDNA 文库的建立 取 50 μ L dscDNA 进行蛋白酶 K 消化, *Sfi* I 酶切, 通过 CHROMASPIN 400 柱, 收集大于 500 bp 的 dDNA。取 1 μ L 此 cDNA,

* 收稿日期: 2004-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370809); 广东省自然科学基金资助项目 (990258)

作者简介: 王峰 (1979 年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 王金发; E-mail: ls19@zsu.edu.cn

加入 1 μL λ Triplex2TM 载体 (500 ng μL), 0.5 μL 10 $\times$ 连接缓冲液, 0.5 μL ATP (10 mmol L^{-1}), 0.5 μL T₄ DNA ligase, 1.5 μL 去离子水, 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。连接产物于 65 $^{\circ}\text{C}$ 失活 15 min 后与噬菌体包装蛋白进行体外包装。室温下融解包装提取物, 立即取 25 μL 加入到连接产物中, 混匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 90 min 后, 再加入 25 μL 包装提取物, 30 $^{\circ}\text{C}$ 再保温 90 min, 加入 500 μL 噬菌体稀释缓冲液, 混匀, 加入 25 μL 氯仿, 即为原始文库。

1.2.3 cDNA 文库滴度的测定 用稀释缓冲液以体积比分别为 1:5, 1:10, 1:20 的比例稀释文库, 分别取 1 μL 上述稀释物各加入 200 μL XL1 Blue 过夜培养物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 15 min, 加入 3 mL 融化的 LB/MgSO₄ 顶层琼脂, 颠倒混匀并迅速倒在已经 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 90 mm 直径的 LB/MgSO₄ 平板上, 室温中冷却 10 min, 颠倒平板, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 8~18 h 后, 计数噬菌斑并计算噬菌体滴度。

1.2.4 计算重组子的百分比 步骤同测定文库滴度, 只是在铺板前向熔化的顶层琼脂中加入 50 μL 100 mmol/L 的 IPTG 和 50 μL 100 mmol/L X gal, 根据蓝白斑计算重组率。

1.2.5 cDNA 文库质量检测 挑取单噬菌斑于 Dilution Buffer 中, 取 150 μL 该溶液与 200 μL *E. coli* BM25.8 过夜培养物混匀, 31 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 30 min; 加入 400 μL LB 液体培养基, 31 $^{\circ}\text{C}$ 下 225 r/min 培养 1 h; 从中取 10 μL 于 LB/Amp 平板上 31 $^{\circ}\text{C}$ 下培养过夜, 然后从该平板上挑取单克隆于 10 mL LB/Amp 液体培养基上, 31 $^{\circ}\text{C}$ 下 150 r/min 振荡培养过夜, 用该菌液提取质粒, 所得质粒用 3' seq (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') 和 5' seq (5'-TCCGAGATCTGGACGAGC-3') 引物 PCR 扩增, 确定插入片段大小。反应体系为 20 μL : 10 $\times$ Buffer 2 μL , 10 mmol/L dNTP 1 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 5' seq 引物 0.5 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 3' seq 引物 0.5 μL , 2 U μL Taq 酶 1 μL , 30 ng μL 模板 DNA 2 μL 。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 10 s, 33 个循环。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

经分光光度计测定, 提取出的幼叶和幼穗总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 分别为 2.01 和 2.07, 浓度分别为 1.1 和 1.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。总 RNA 的质量较好, 无 DNA、蛋白质及小分子污染。经电泳检测, 可观察到 18S 和 28S rRNA 两条带, 其中幼叶除 28S 和 18S rRNA 条带之外还有叶绿体核糖体中特有的条带。总 RNA 在提取过程中未降解 (图 1)。

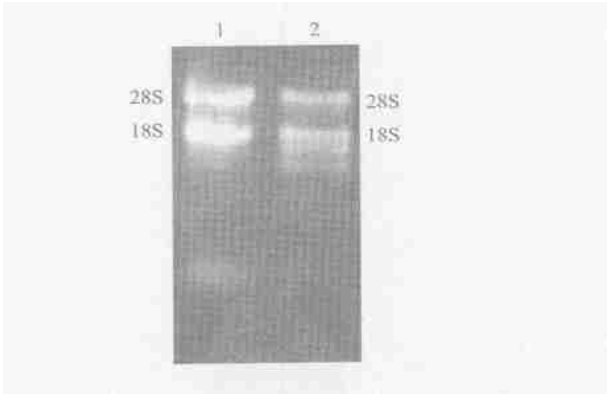


图 1 水穗总 RNA
Fig 1 Total RNA of rice
1: 幼稻总 RNA; 2: 幼叶 RNA

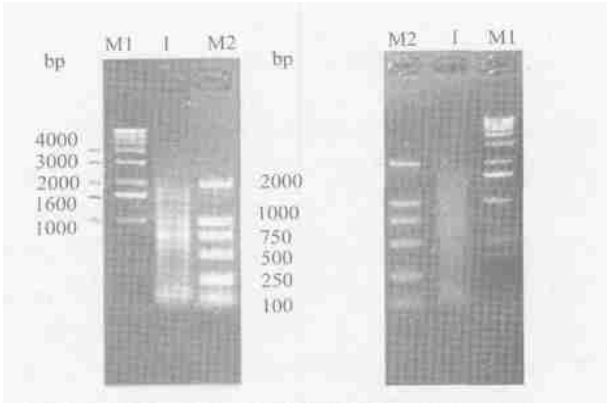


图 2 水稻幼叶和幼穗双链 cDNA 合成情况
Fig 2 The synthesized ds-cDNA of rice
young leaf and young panicle
M₁: 1 000 bp ladder DNA marker;
M₂: DL 2 000 DNA 相对分子质量标准
1: 幼叶双链 DNA; 2: 幼穗双链 cDNA

2.2 cDNA 合成及 PCR 扩增

以 1.0 μg 总 RNA 反转录合成第一链, 然后经 19 次 LD PCR 合成 ds-cDNA, 合成的双链 cDNA 电泳呈弥散状, 大小分布在 100~3 000 bp 范围内, 如图 2 所示, 这表明水稻幼叶及幼穗转录 mRNA 成分较为复杂, 其中有一些亮带可能为器官特异性的高丰度表达的基因。ds-cDNA 经 *Sfi* I 酶切消化, 过柱, 取第 6、7、8、9 管回收较大相对分子质量的 cDNA, 经过沉淀、重悬最终分别得到 7 μL ds-cDNA, 取 1 μL 幼叶 ds-cDNA 检测, 如图 3, 500 bp 以下的小片段 cDNA 基本被去除。

2.3 cDNA 文库的构建, 扩增及质量检测

取上述 ds-cDNA 1 μL 用于连接反应, 反应体积 5 μL , 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。连接反应产物在 65 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 15 min 后用 50 μL 包装蛋白包装, 加入 500 μL 噬菌体

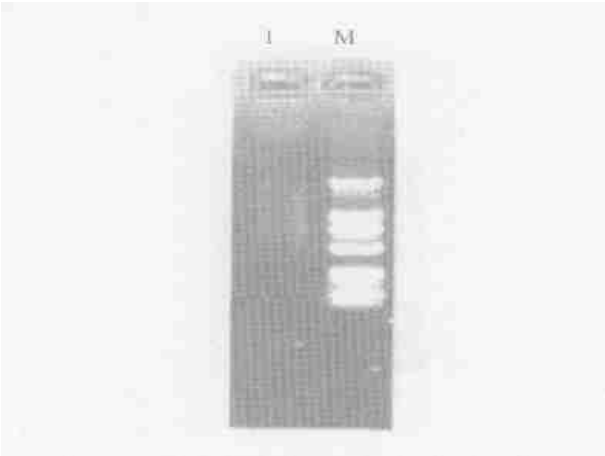


图 3 过柱分级后的幼叶双链 cDNA
Fig 3 The rice young leaf ds cDNA after distribution
M: DL 2 000 DNA 相对分子质量标准

稀释缓冲液，混匀，再加入 25 μ L 氯仿并混匀。测得幼叶和幼穗的原始文库的滴度分别为 1.5×10^5 pfu 和 2.45×10^5 pfu，蓝白斑测得的重组率分别为 97.0%和98.7%。扩增后得到幼叶和幼穗各 120 mL 的文库裂解液，文库滴度分别为 0.5×10^7 pfu/mL 和 2.8×10^7 pfu/mL，加入 DMSO 至终体积分数 7%，于-70 $^{\circ}$ C 保存。汇合后的文库裂解液用 3' seq 和 5' seq 引物 PCR 扩增结果如图 4。分别随机挑取 12 个高度分离的噬菌斑，用 3' seq 和 5' seq 引物 PCR 扩增结果如图 5，插入片段均在 500 bp 以上。

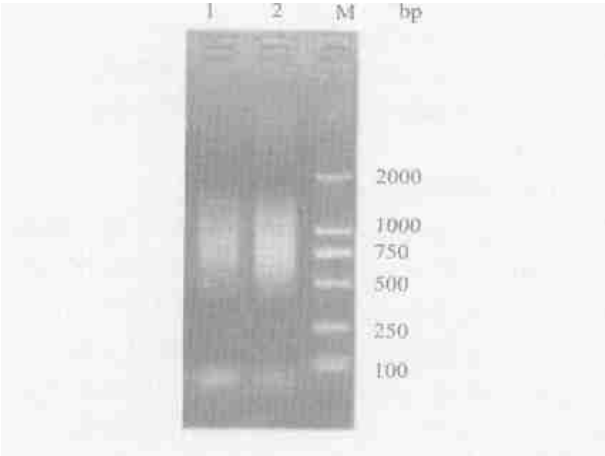


图 4 水稻幼叶和幼穗总 cDNA 文库插入片段大小分析
Fig 4 Analysis of the total cDNA library insert size of rice young leaf and young panicle
1: 幼叶总 cDNA 文库裂解 PCR 产物;
2: 幼穗总 cDNA 文库裂解 PCR 产物;
M: DL 2 000 DNA 相对分子质量标准

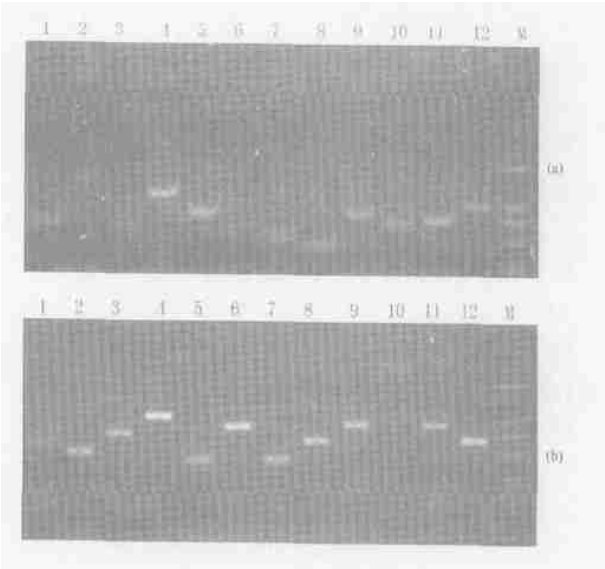


图 5 部分水稻幼叶 cDNA 克隆的插入大小分析
Fig 5 Analysis of the insert size of partial clones from rice young leaf and young panicle cDNA library
(a) 部分幼叶 cDNA 克隆 PCR 产物
(b) 部分幼穗 cDNA 克隆 PCR 产物
M: DL 2 000 DNA 相对分子质量标准

3 讨 论

与常规技术相比，SMARTTM cDNA Library Construction 技术仅需要 25 ng mRNA 样品或者 50 ng 总 RNA 样品，非常适合于如短于 3 cm 的幼穗等比较宝贵的材料。它采用专一的反转录引物通过 LD-PCR 方法扩增，再将 cDNA 过柱分离，选择性分管收集 cDNA，可以富集全长 cDNA 片段，其文库的全长 cDNA 比率相对较高，这就减少了后期文库筛选的工作量，同时，可以通过常规电泳对每一步骤进行监测，操作简便。

获得全长 cDNA 的关键是得到完整、未被降解的总 RNA。提取总 RNA 的实验中应该注意所有用于 RNA 操作的溶液、器皿都应该用 $\varphi = 0.1\%$ DEPC 过夜处理再高温灭菌，整个实验动作要迅速，时间尽量缩短。另外在 cDNA 的合成过程中，控制 LD PCR 的循环次数对 cDNA 的合成大小以及基因在文库中拷贝数分布很重要，适当的循环次数可以防止低拷贝数的基因丢失，同时也可以防止高拷贝的基因过分放大。LD PCR 的循环次数应该严格参照说明书中提到的 RNA 起始量。

自 20 世纪 90 年代以来，随着水稻基因组大规模测序的完成^[5,9]，以 cDNA 文库为基础利用图位克隆、电子克隆、表型克隆等不同方法已经克隆了越来越多的基因，例如 RWC1 基因^[7]，HMGB1 基

因^[8]等。广亲和基因定位于第 6 染色体的 S5 座位^[4]，王宏斌等以与广亲和位点紧密连锁的分子标记 BAC23D12 的 R 末端为探针，从 Cps17 的 cosmid 基因组文库中筛选得到一个阳性克隆 R2I19^[9]，对该克隆的 2 个 TAC 亚克隆进行初步生物信息学分析显示其中可能含有与水稻育性相关的基因。目前我们已经通过 RT-PCR 得到 S₅ 座位一些基因如酰肽水解酶基因、泛酸激酶基因和磷酸转运子基因的部分片断，下一步期望通过分子杂交从此两个文库中筛选出目的克隆。本文库的建立为最终克隆广亲和基因以及其他全长功能基因奠定了基础。

参考文献：

[1] 杨守仁, 沈锡英, 顾慰莲. 籼粳杂交育种研究[J]. 作物学报, 1982(2): 97—102.
[2] 袁隆平. 杂交水稻的育种战略设想[J]. 杂交水稻, 1987 (1): 1—3.
[3] 王建军, 徐云碧, 申宗坦. 利用籼粳杂种一代若干问题

的探讨[J]. 中国农业科学, 1991, 24(1): 27—33.
[4] IKEHASHI H, ARAKI H. Genetics of F1 sterility in remote crosses of rice. Rice Genetics. Proceeding of the international rice genetics symposium [J]. IRRI, 1986 119—130.
[5] GOFF S A, RICKE D, LAN T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp japonica) [J]. Science, 2002, 296(5): 92—100.
[6] YU J, HU S N, WANG J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp indica) [J]. Science, 2002, 296(5): 79—92.
[7] LI L G, LI S F, TAO Y, et al. Molecular cloning of a novel water channel from rice; its products expression in *Xenopus oocytes* and involvement in chilling tolerance [J]. Plant Science, 2000 (154): 43—51.
[8] WU Q, ZHANG W S, PWEE K H, et al. Cloning and characterization of rice HMGB1 gene[J]. Gene, 2003(312): 103—109.
[9] 王宏斌, 刘兵, 易厚富, 等. 水稻 S₅ 区候选克隆 R2I19 的筛选及序列信息学分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(6): 78—82.

Construction and Characterization of Young Leaf and Young Panicle cDNA Libraries from Rice (*Oryza sativa* L.)

WANG Feng, WANG Jin fa

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education //School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: In order to clone genes which is located in S₅ locus of chromosome 6 and some genes with important function including wide compatibility gene, using λTriplex2TM as vector, we constructed two cDNA libraries from two organs by SMART technology including young leaf and young panicle of a wide compatibility variety of rice (*Oryza sativa* L.), Cps17. The total clone number of unamplified young leaf and young panicle cDNA library was about 1.5×10⁵ pfu and 2.45×10⁵ pfu, respectively, and the percentage of positive clones was about 97.0% and 98.7%. The length of insertion fragment was from 500~3 000 bp. This provides a base for further study on the wide compatibility gene and the full length cloning of important genes. Several cautions were also discussed.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); young leaf; young panicle; wide compatibility gene; cDNA library