

鸭跖草 *Commelina communis* 中差异表达 cDNA 片段的克隆与分析*

廖 斌, 邓冬梅, 杨 兵, 束文圣, 栾天罡, 蓝崇钰
(中山大学生命科学学院//生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 一种新的基因克隆技术称为抑制消减杂交技术 (SSH) 用于研究生长于 2 种生态环境 (古铜矿山和正常土壤) 中鸭跖草 *Commelina communis* 的基因表达差异。分别以 Cu 矿山鸭跖草作为检测子, 非 Cu 矿山鸭跖草作为驱赶子, 建立了生长于 Cu 矿山生态环境中鸭跖草的差异表达 cDNA 文库, 此 cDNA 文库代表在 Cu 矿山鸭跖草中特异表达的 cDNA。通过反式 Northern 杂交筛选出 3 个阳性克隆进行测序。序列分析表明其中一个 cDNA 为 CaM-like 基因。进一步对此基因进行 Virtual Northern 分析, 结果初步表明此基因在生长于古铜矿山上的鸭跖草中上调表达。

关键词: 抑制消减杂交 (SSH); 鸭跖草 *Commelina communis*; 反式 Northern; Virtual Northern

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 01-0075-04

重金属 (汞、镉、铜和铝等) 污染及其治理是当前环境科学研究中的一个重点。在各种重金属污染治理方法中, 利用不仅能在较高浓度的重金属环境中生长, 且体内能超积累重金属的植物进行污染土壤的植物修复技术具有广阔应用前景^[1]。但要真正使这一技术得到广泛的应用, 要解决的关键问题是寻找生物量大的重金属超富集植物。而对于重金属超富集植物来说, 对重金属的耐性是一种重要的性状, 阐明其耐性机制无疑对进一步提高植物的耐性使之免受重金属毒害具有重要意义。目前许多学者从不同角度对植物的重金属耐性机理进行了探讨^[2,3], 并取得了有益进展, 且随着研究的深入, 人们开始越来越关注重金属胁迫的分子生物学研究, 并且认识到要想通过基因工程来培育抗性新品种, 就必须了解重金属胁迫对植物基因表达的影响。然而目前有关对植物忍耐重金属毒害的分子机理方面的研究尚不多见。鸭跖草 *Commelina communis* 是一种可以在铜矿区或铜污染土壤上正常生长的植物, 并可吸收和积累相当高浓度的 Cu。因此为了了解重金属主要是 Cu 对鸭跖草基因表达的影响, 我们利用抑制消减杂交技术 (SSH) 对生长于两种生态环境 (古铜矿山和正常土壤) 中鸭跖草间的基因表达差异进行研究, 以期获得一些在 Cu 矿山鸭跖草中特异表达的 cDNA 片段, 并试图

为从分子水平揭示鸭跖草耐铜的机理提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材 料

对铜耐性的鸭跖草植株采自湖北省黄石市大冶铜绿山铜矿渣堆; 对铜敏感的鸭跖草植株采自该矿渣堆周边无重金属污染的菜园地。采样地的基本情况见文献 [4]。

1.2 mRNA 的提取

分别取生长同期的 Cu 矿山鸭跖草和非 Cu 矿山鸭跖草嫩叶在液氮中研磨, 按酸性异硫氰酸胍一步法提取叶片的总 RNA^[5], 经紫外分光仪及变性甲醛凝胶检测后, -70℃ 保存备用^[4]。

1.3 抑制消减杂交及 PCR 产物的克隆

cDNA 的合成、*Rsa* I 消化、连接接头、第 1 次杂交、第 2 次杂交和 PCR 反应参照 SmartTM PCR cDNA Synthesis Kit 和 CLONTECH PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit (Clontech 公司) 说明进行。利用 Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 2400 和 Ex Taq 酶 (Takara 公司) 进行扩增。以矿山鸭跖草作为检测子, 非矿山鸭跖草作为驱赶子进行 2 次消减杂交, 将 2 种杂交的 PCR 产物分别克隆至 pGEM-T vector (Promega 公司) 中, 建立差异 cDNA 文库, PCR 产

* 收稿日期: 2003-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170178); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20020558044); 国家 863 资助项目 (2001AA645010-3)

作者简介: 廖斌 (1969 年生), 女, 博士研究生; **通讯联系人:** 束文圣; E-mail: ls04@zsu.edu.cn

物与 T-vector 的连接、转化参照 pGEM-T vector Kit 说明进行。

1.4 反式 Northern 杂交分析

利用 *Eco*.1 酶切进行重组克隆快速鉴定,对重组克隆的插入片段利用两端连接子上巢式引物进行 PCR 扩增。将 PCR 产物一式两份进行 Southern 转移至 Hybond-N 膜 (Sigma 公司) 上,分别以检测子和驱赶子的 cDNA 为探针,利用 TaKaRa 公司的 Oligo-labelling Kit 进行 [α - P^{32}] dCTP 探针标记,尼龙膜经紫外光交联后与标记探针进行杂交检测,放射自显影采用磷屏技术。

1.5 DNA 测序及同源序列的检索与比较

对筛选出的阳性克隆进行 DNA 序列分析后,在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 中核数据库中进行同源核苷酸检索。

1.6 Virtual Northern 分析

用于 Virtual Northern 杂交的探针为筛选出的阳性克隆,标记方法同前。分别取检测子 (Cu 矿山鸭跖草) 和驱赶子的 cDNA (非 Cu 矿山鸭跖草) 10 μ g 经 Southern 转移至 Hybond-N 膜上,尼龙膜经紫外光交联后以标记探针进行杂交检测,放射自显影采用磷屏技术。

2 结 果

2.1 消减杂交 cDNA 文库的构建

利用 Cu 矿山鸭跖草作为检测子,非 Cu 矿山鸭跖草作为驱赶子进行两次消减杂交,建立一个差异 cDNA 文库,理论上代表在 Cu 矿山鸭跖草特异表达的 cDNA。将差异表达的 cDNA 连接转化到大肠杆菌后,随机挑选部分克隆,利用 *Eco* R I 酶切对这些克隆进行快速鉴定,均含有插入片段。部分克隆的酶切检测如图 1 所示。

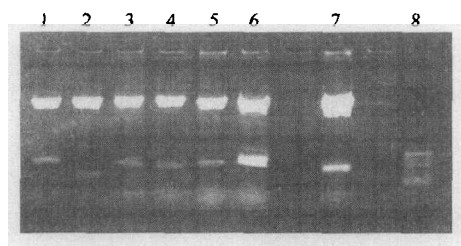


图 1 部分克隆的酶切检测

Fig.1 Digestion analysis of several clones by *Eco* R I

1-7: 部分克隆的 *Eco* R I 酶切结果;

8: Marker Φ X174/*Hae* III

2.2 反式 Northern 杂交分析

利用两端连接子上巢式引物对重组克隆进行 PCR 扩增后,将 PCR 产物一式两份经 Southern 转移

至尼龙膜上。各取检测子和驱赶子的 cDNA 进行探针标记后进行 Northern 杂交分析,得到 3 个阳性克隆,图 2 中箭头所示为其中 1 个阳性克隆。

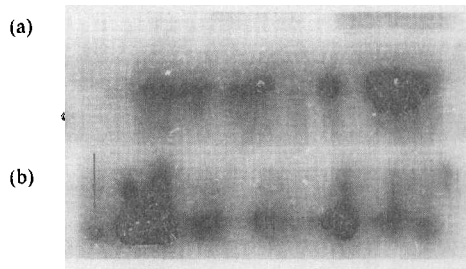


图 2 部分克隆的反式 Northern 分析

Fig.2 The analysis of reverse Northern blots

a, b 分别为驱赶子 (非 Cu 矿山鸭跖草) 和检测子 (Cu 矿山鸭跖草) 部分克隆 PCR 产物进行反式 Northern 杂交的结果 (箭头所指为阳性克隆)

2.3 测序结果

对反式 Northern 杂交分析所获得的 3 个克隆进行 cDNA 测序及其中一个克隆同源序列的查询结果如图 3 所示。cDNA 长度为 216 bp, 与核酸数据库中编号 (emb) x65016.1, 长度为 453 bp 的水稻中编码钙调蛋白 (CaM) 的 cDNA 同源性达到 88%, 此 cDNA 为 CaM-like 基因。

2.4 Virtual Northern 杂交分析

为了比较不同生态环境对鸭跖草中 CaM-like 基因表达的差异性,按材料和方法所述步骤处理后,进行 Virtual Northern 分析。图 4 所示结果表明,Cu 矿山鸭跖草和非 Cu 矿山鸭跖草中 CaM-like 基因的表达存在差异,Cu 矿山鸭跖草叶中 CaM-like 基因的表达较非 Cu 矿山鸭跖草强。

3 讨 论

受植物的生态学特性、遗传学特性等因素所决定,不同种类植物对重金属污染的忍耐性不同;同种植物的不同种群 (不同生态型) 由于其分布和生长的环境各异,长期受不同环境条件的影响,在植物的生态适应过程中,可表现出对特殊金属元素有明显的忍耐性。本研究所采用的矿山鸭跖草是生长于已废弃 3000 余年的湖北铜绿山含 Cu 量极高的古冶炼渣堆,而非矿山鸭跖草是生长于该矿渣堆周边无重金属污染的菜园地农田,土壤中的 Cu 量及植物体内 Cu 含量极低,生态调查结果表明两种鸭跖草的生态环境的主要差别在于土壤中的有效态 Cu 量^[4]。进一步研究证明矿山鸭跖草不仅对 Cu 具有强耐性,且体内能富集 Cu,非矿山鸭跖草对 Cu 敏感,体内不能富集 Cu (另文发表),因此我们直接选取矿山和非矿山鸭跖草为材料利用 SSH 技术进

```

gi|20185|emb|X65016.1|OSCALM O. sativa mRNA for calmodulin
Length = 453
Score = 202 bits (102), Expect = 1e-49
Identities = 165/186 (88%)
Strand = Plus / Plus
Query: 31 catggccgatcagctaaccgacgaccagatctccgaattcaaaggagccttctccctctt 90
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 3 catggcggatcagctcaccgacgacgagatcgccgagttcaaggaggcgttcagcctctt 62
Query: 91 cgacaaggacggcgacggttgcatcactactaaggagctcggaactgtaatcgatcact 150
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 63 cgacaaggacggcgacggttgcatcactactaaggagcttggaactgtgatcggtccct 122
Query: 151 aggtcaaaatcctactgaagctgagctacaggacatgattagcgaggttgatgctgatgg 210
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 123 tggtcagaacccaactgaggctgagctccaggacatgatcaacgaggttgatgctgatgg 182
Query: 211 caatgg 216
      |||||
Sbjct: 183 caatgg 188

```

图 3 所获得的克隆序列进行同源核苷酸序列检索结果

Fig.3 National center for biotechnology information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

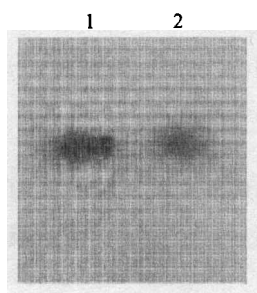


图 4 所获得的 CaM-like 基因克隆的
Virtual Northern blot 分析

Fig.4 Virtual Northern blot analysis of
CaM-like gene clone expressed in

Commelina communis grown on mined area

1: Cu 矿山鸭跖草 2: 非 Cu 矿山鸭跖草

行基因表达差异研究, 希望分离到与 Cu 抗性相关的 cDNA 片段。

SSH 是一种有效的分离两个样品间差异表达的 cDNA 片段的方法。其优点在于具有假阳性少, 重复性高, 并能对低丰度的 mRNA 进行显示, 利用此技术分离一些与逆境胁迫相关基因的研究已有报道^[6], 而采用反式 Northern 杂交方法可以一次鉴定数目较多的重组体^[7], Virtual Northern 可以初步验证所获得的阳性克隆代表了差异表达的 cDNA 片段^[8,9]。本研究获得了 3 个有意义的 cDNA 片段, 其中 1 个序列与核酸数据库中编码钙调蛋白基因序列高度同源。已有研究证明钙调蛋白与应答环境压

力有关^[10-12], 但有关钙调蛋白是否在植物忍耐重金属毒害方面起作用存在争论。如 Renato 等^[13]的研究表明钙调蛋白在玉米对铝的耐性中不起作用; 而另外一些学者认为钙调蛋白与植物细胞膜上的离子通道蛋白结合, 从而使植物表现出对重金属离子的耐性, 并增强细胞积累重金属离子的能力^[14-16]。本研究通过 Virtual Northern 技术对此 CaM-like cDNA 是否在 Cu 矿山鸭跖草叶中特异表达进行验证, 结果表明此基因在 Cu 矿山和非 Cu 矿山鸭跖草中均有表达, 但 Cu 矿山鸭跖草的杂交信号要比非 Cu 矿山鸭跖草的强 (图 4), 因此我们初步判定此基因在生长于古铜山上的鸭跖草中属于上调表达, 钙调蛋白可能在鸭跖草耐 Cu 中起作用, 但进一步的结论仍须进行 Northern 杂交检测证实。

参考文献:

- [1] WATANABE M E. Phytoremediation on the brink of commercialization [J]. Environmental Science & Technology, 1997, 31:182A-186A.
- [2] PETERSON P J. Adaptation to toxic metals//ROBB D A, PIERPOINT W S, eds. Metals and micronutrients: uptake and utilization by plants[M]. London: Academic Press, 1983: 51-69.
- [3] BAKER A J M. Metal tolerance[J]. New Phytol, 1987, 106 (Suppl.):93-111.
- [4] 束文圣, 杨开颜, 张志权, 等. 湖北铜绿山古铜矿冶炼渣植被与优势植物的重金属含量研究[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1):7-12.
- [5] CHOMCIYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA

- isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction[J]. *Anal Biochem*, 1987, 162: 732 – 735.
- [6] YEN H C E, WU S M, HUANG Y H, et al. Isolation of 3 salt-induced low-abundance cDNAs from light-grown callus of *Mesembryanthemum crystallinum* by suppression subtractive hybridization[J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, 110: 402 – 409.
- [7] OLIVER D VON S, WOLF GEROLF T, MARTIN H. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (13): 2598 – 2602.
- [8] LUKYANOV K A, MATZ M V, BBGDANOVA E A, et al. Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: An approach to in Vitro clone[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24:2194 – 2195.
- [9] WANG Z, BROWN D D. A gene expression screen[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:11505 – 11509.
- [10] FACCHINI P J, JOHNSON A G, POUPART J, DELUCA V. Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111, 687 – 797.
- [11] MAHADY G B, BEECHER C W W. Elicitor-stimulated benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in bloodroot suspension cultures is mediated by calcium [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37:415 – 419.
- [12] GONG M, CHEN N, SONG Y, et al. Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1997, 24:371 – 379.
- [13] JORGE R A, ARRUDA M P. Probing the role of camodulin in Al toxicity in maize[J]. *Phytochemistry*, 2001, 58:415 – 422.
- [14] ARAZI T, SUNKAR R, KAPLAN B, et al. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni^{2+} tolerance and Pb^{2+} hypersensitivity in transgenic plants [J]. *Plant J*, 1999, 20:171 – 182.
- [15] KOHLER C, NEUHAUS G. Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Lett*, 2000, 471: 133 – 136.
- [16] KOHLER C, MERKLE T, NERHAUS G. Characterization of a novel gene family of putative cyclic nucleotide-and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1999, 18: 97 – 104.

Identification of cDNA Fragments Differentially Expressed in *Commelina Communis* by Suppression Subtractive Hybridization

LIAO Bin, DENG Dong-mei, YANG Bing, SHU Wen-sheng, LUAN Tian-gang, LAN Chong-yu

(State Key Laboratory for Bio-Control// School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A technique combining suppression polymerase chain reaction with suppression subtractive hybridization was used to clone low-abundance transcripts that showed differential expression between *Commelina communis* grown on mined area and grown on normal soil. One differential expression cDNA library was constructed using the cDNA of plant grown on soil area as driver and the cDNAs of plant grown on mined area as tester. This cDNA library indicated the differential expressing cDNA fragments in plant grown on mined area. By reverse Northern blot, 3 positive clones were obtained. Alignment of the three sequences were blasted in Genbank. Analysis of nucleic acid of one cDNA clone revealed that it encoded calmodulin. The calmodulin-like gene was up-regulated in the leaf of plant grown on mined area by virtual northern.

Key words: suppression subtractive hybridization; *Commelina communis*; reverse Northern blot; Virtual Northern blot