

水稻矮化突变体差异表达 cDNA 片段的克隆与分析^{*}

王永胜¹, 王 景¹, 李发强¹, 刘筱斌², 刘良式¹

(1. 中山大学基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘 要: 利用抑制性消减杂交 (Suppressive subtraction hybridization, SSH) 分离本实验室获得的一株水稻矮化突变体 *dwarf69* 与其野生型对照品系特光矮-2 (*Oryza sativa*, TGA-2 indica) 间表达有差异的 cDNA 片段. 分别以 *dwarf69* 作为驱赶子, TGA-2 为检测子, 以及以 *dwarf69* 作为检测子, TGA-2 为驱赶子建立了两个差异表达 cDNA 文库, 分别代表在 TGA-2 和 *dwarf69* 中特异表达的 cDNA. 经反式 Northern 检测这两个文库共得到 10 个阳性克隆.

关键词: 抑制性消减杂交 (SSH); 矮化突变体; 反式 Northern

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 06-0059-04

有关植物生长发育的分子基础研究常常是通过突变体的分析而得以深入的, 许多与植物生长发育相关的调节基因均是通过对突变体的研究获得的. 其中, 矮化突变体对于阐明植物茎的生长和发育的调节机制十分重要, 且在植物育种中也很重要. 曾在许多植物中分离到了矮化突变体. Motoyuki 等^[1,2] 于 1999 年分离和鉴定到第一个水稻矮化突变体的相关基因, 即从 d1 突变体中分离了 *dwarf1* 基因, 研究表明该基因即为 GTP 结合蛋白的 α -亚单位. 另外, Yutaka Sato^[3] 和 Itoh (待发表) 等亦分离了水稻 *d6* 和 *d18* 基因. 然而有关这些基因的功能特别是对下游相关基因的作用还未涉及.

本文利用 SSH 方法对本实验室分离获得的一种水稻矮化突变体 *dwarf69* 及其野生对照品系 TGA-2 间表达差异进行研究, 以期获得一些在突变体中和在野生对照品系中特异表达的 cDNA 片段, 为进一步获得全长 cDNA 及从分子水平揭示水稻节间生长和分蘖形成的过程提供线索.

1 材料和方法

1.1 水稻突变体材料

水稻矮化突变体 *dwarf69* 为本实验室利用栽培稻特光矮-2 (*Oryza sativa*, TGA-2 indica) 经

γ Co⁶⁰ 辐射诱变处理获得的, 经自交 5 代检测证实已获得稳定遗传的突变体, 该突变体表型为矮化, 一般只有正常植株高度的 1/4 ~ 1/3, 叶宽及墨绿, 结实率低. 我们选取生长 42 d 的 TGA-2 和 *dwarf69* 的节间处材料, 剥去叶鞘, 取包含顶端和侧生分生组织在内的节间组织, 液氮处理后 -70 °C 保存备用.

1.2 试 剂

CLONTECH PCR SelectTM cDNA Subtraction Kit 购自 CLONTECH 公司, mRNA Purification Kit 购自 Amersham Pharmacia 公司. M MLV Reverse Transcriptase 购自 Gibco 公司. pMD 18-T Vector 购自 Takara 公司产品. 内切酶、连接酶购自 Promega 产品, Taq 酶购自王斌公司, [α ³²P] dCTP 为北京亚辉生物工程公司产品, 尼龙膜购自 Sigma 公司. *E. coli* DH5 α 为本实验室保存. 其它试剂均为 Sigma 公司和国产分析纯产品.

1.3 mRNA 的纯化

根据文献 [4] 所述方法利用异硫氰酸胍一步法提纯两种水稻节间材料的总 RNA, 参照 mRNA Purification Kit 说明进行 mRNA 的纯化, 溶于适当体积 DEPC 处理的 H₂O 中. 经紫外分光光度计及变性甲醛凝胶检测, -70 °C 保存备用.

1.4 抑制性消减杂交及 PCR 产物的克隆

^{*} 基金项目: 教育部重点科学技术资助项目 (061C615); 广东省科技计划资助项目 (99M01503G)

收稿日期: 2001-04-02; 作者简介: 王永胜 (1970-), 男, 博士生; 通讯联系人: 刘良式.

cDNA 的合成、*Rsa* I 消化、连接接头、第 1 次杂交和第 2 次杂交及 PCR 反应均参照 CLON-TECH PCR Select™ cDNA Subtraction Kit 说明进行。利用 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 和一般的 Taq 酶扩增时, 循环参数稍作修改, 第 1 次循环数为 31, 第 2 次循环数为 17。可获得较好的结果。分别利用 *dwarf69* 作为驱赶子, TGA-2 为检测子, 以及以 TGA-2 作为驱赶子, *dwarf69* 为检测子进行两次消减杂交, 将两种杂交的 PCR 产物分别克隆至 T vector pMD 18 T 中, 建立两个差异表达 cDNA 文库, 分别代表在 TGA-2 和 *dwarf69* 特异表达的 cDNA。PCR 产物与 T vector 的连接、转化参照 pMD 18 T Vector Kit 及文献说明进行。

1.5 反式 Northern 杂交分析

重组克隆快速鉴定及对重组克隆的插入片段 PCR 扩增分别参照文献^[5]所述方法进行。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总 RNA 50 μg, 进行反转录探针标记^[6], 反应体系如下: 5× 反转录缓冲液 10 μL, 2.5 mmol/L 的 dATP、dTTP、dGTP 各 5 μL, Oligo d (T)₁₈ primer 2 μL (1 μg/μL), 加水至 42 μL, 65 °C 变性 15 min, 37 °C 10 min, 加入 1 μL 的 RNasin (40 u/μL), 5 μL 的 [α -³²P] dATP (10 μCi/μL), 2 μL 的 M-MLV Reverse Transcriptase (200 u/μL), 37 °C 反应 1 h, 75 °C 5 min 使酶失活。预杂交、杂交及洗膜和放射自显影参照文献^[9]所述方法进行。

1.6 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 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 核酸数据库[blastn]和蛋白数据库[blastx]中进行同源核苷酸和蛋白序列检索。

2 实验结果

2.1 两种消减杂交 cDNA 文库的构建

经正向和反向两种消减杂交, 即分别利用 *dwarf69* 作为驱赶子, TGA-2 为检测子, 以及以 TGA-2 作为驱赶子, *dwarf69* 作为检测子进行两次消减杂交, 建立两个差异表达 cDNA 文库, 理论上分别代表在 TGA-2 和 *dwarf69* 特异表达的 cDNA。对文库中的部分克隆快速鉴定, 95% 以

上的克隆含有插入片段。部分克隆的双酶切检测如图 1 所示。

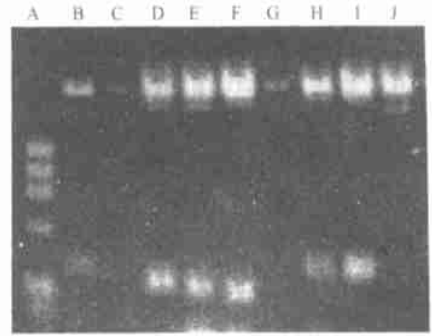


图 1 部分克隆的双酶切检测

Fig. 1 Double digestion analysis of several clones

A Marker ϕ X174/*Hae* III;

B~I 部分克隆的 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切结果;

J 载体 pMD18 T 对照

2.2 反式 Northern 杂交分析

利用两端特异的引物对重组克隆的插入片段进行 PCR 扩增, 经 Southern 转移至尼龙膜上, 各取 *dwarf69* 和 TGA-2 的总 RNA, 反转录制备探针后进行 Northern 杂交分析。在以 *dwarf69* 作为驱赶子, TGA-2 为检测子的正向差异文库中得到 3 个阳性克隆, 在以 TGA-2 作为驱赶子, *dwarf69* 作为检测子的反向差异文库中得到 7 个阳性克隆。部分克隆的反式 Northern 杂交结果如图 2 所示。

2.3 序列分析

对反式 Northern 杂交分析所获得的 10 个克隆进行序列分析, 其中来源于正向差异表达文库的克隆编号为 A1, A26 和 A160, 代表了在 TGA-2 中差异表达的 cDNA 片段。来源于反向差异文库的克隆编号为 R3, R23, R24, R67, R68, R194 和 R198, 代表了在突变体 *dwarf69* 差异表达 cDNA 片段。在这些序列中, A1 和 A160 为水稻中首次报道, A26 序列有相应的水稻基因组序列报道, 作为 cDNA 片段还是首次报道。其中 R3, R23, R24, R67, R194 和 R68 分别与蛋白质数据库中编码乙烯受体、金属硫蛋白、类固醇膜结合蛋白/黄体酮结合蛋白、异柠檬酸脱氢酶、核糖体蛋白 L37A/翻译起始因子和核糖体蛋白 S19 等植物基因序列高度同源。另外一些序列与人的或噬菌体的蛋白同源, 是一些在植物中功能未知的蛋白。

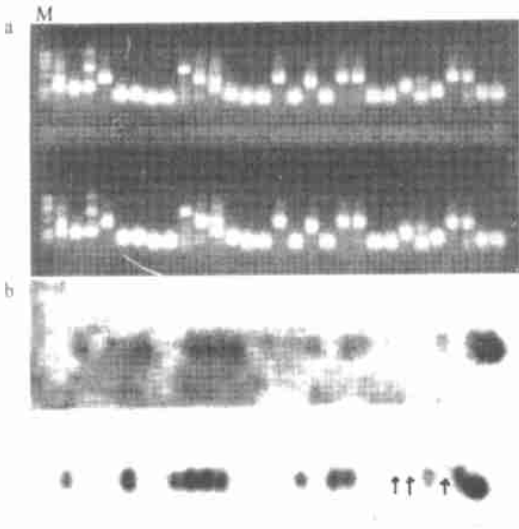


图 2 部分克隆的 PCR 检测及反式 Northern 分析

Fig. 2 Test results of PCR and the analysis of reverse Northern blots

a 部分克隆 PCR 鉴定, 其中 M 为 Marker ϕ X174/ *Hae* III, 其余为重组克隆;
b 反式 Northern 分析, 图上下部分分别为图 a 相应部分与 *dwarf69* 及 TGA-2 总 RNA 反转录产物进行反式 Northern 杂交的放射自显影结果箭头所指为阳性克隆

3 讨 论

利用突变体分析和分离一些与发育相关的基因成为研究发育生物学的重要手段. 与其它分离差异表达 cDNA 片段的方法相比, SSH 具有假阳性少、重复性高等优点, 并能对低丰度 mRNA 进行显示. 目前利用 SSH 法对植物材料特别是发育突变体研究以期分离相关的差异表达 cDNA 片段还不多见. 本研究利用 SSH 对经辐射诱变获得的一株水稻矮化突变体 *dwarf69* 及其对照 TGA-2 间的差异表达进行研究. 由于该矮化突变体节间明显缩短, 分蘖数目减少, 因而利用生长约 42 d 左右的节间材料进行研究. 此部分材料含有侧生分生组织和顶端分生组织, 以及与对照相比极度缩短的节间. 希望分离到与节间伸长、分蘖数等性状相关的 cDNA 片段. 由于此部位材料含有较多的维管组织, 与一般利用 SSH 研究的材料相比具有细胞类型多, 糖类物质含量高的特点. 在 RNA 的提纯及反式 Northern 杂交等过程中均受到一定影响. 也可能是造成所获得的阳性克隆数较少的原因. 此外, 采用反式 Northern 杂交方法, 进行一次杂交即可以鉴定数目较多

(本实验有 150 多个) 的重组体, 大大减少了工作量, 而且实验结果可靠. 根据 Oliver 等^[3] 人用反式 Northern 杂交所获得的阳性克隆进一步进行 Northern 杂交验证, 发现反式 Northern 杂交对阳性克隆鉴定的准确率达 94%, 因此, 可以初步认为本实验所得到的来源于正向差异表达文库的克隆 A1、A26 和 A160 和来源于反向差异文库的克隆 R3、23、R24、R67、R68、R194 和 R198, 分别代表了在 TGA-2 中差异表达的 cDNA 片段和在突变体 *dwarf69* 差异表达 cDNA 片段. 但是, 进一步的结论仍须进行 Northern 杂交检测证实.

对该突变体 *dwarf69* 前期的遗传学分析表明, 该突变体表型涉及一对等位基因的作用 (结果未示). 由于突变体具有与野生对照品系 TGA-2 差异极为显著的突变体表型, 如株高只有野生型的 1/4 ~ 1/3, 叶墨绿且宽, 结实率低等. 因而我们曾假设, 可能是处于上游主调节基因的突变, 造成下游许多基因的表达受到影响, 从而产生突变表型. SSH 结果显示, 两者间确实有许多基因的表达具有明显差异, 这些序列对应的基因编码的蛋白在植物体中具有重要的作用, 如其中核糖体蛋白 L37A/翻译起始因子对于蛋白的合成和细胞的生存是必须的^[7]. 乙烯受体^[8]、类固醇膜结合蛋白/黄体酮结合蛋白^[9] 均与激素的信号传导有关, 为转录因子, 可改变目标基因的表达. 金属硫蛋白与应答环境压力有关^[10]. 这些序列大部分为在突变体 *dwarf69* 中表达增加的 cDNA 片段, 说明了突变体性状的出现, 涉及了许多调控、环境应答和呼吸相关基因的改变.

参考文献:

[1] MOTOYUKI A, WU J Z, MASAHIRO Y, et al. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf1* encodes the α -subunit of GTP-binding protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 99: 10000—10289.
[2] YUKIKO F, TERUHISA K, SHIZUKA O, et al. Suppression of the heterotrimeric G protein cause abnormal morphology, including dwarfism, in rice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 99: 7575—7580.
[3] SATO Y, SENTOKU N, MIURA Y, et al. Loss of function mutations in the rice homeobox gene OSH15 affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants [J]. The EMBO J, 1999, 18(4): 992—1002.
[4] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学指南[M]. 颜子颖等译. 北京: 科学出版社, 1998.

- 125.
- [5] 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.
- [6] ZHANG H, ZHANG R, LIANG P. Differential screen of gene expression difference enriched by differential display[J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24 (12): 2454—2455.
- [7] ZHANG Y, KLEIN H L, SCHNEIDER R J. Role of Ser-53 phosphorylation in the activity of human translation initiation factor eIF-4E in mammalian and yeast cells[J]. Gene, 1995, 163(2): 283—288.
- [8] BLEECKER A B, KENDE H. Ethylene: a gaseous signal molecular in plant[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000, 16: 1—18.
- [9] KREBS C J, JARVIS E D, CHAN J, et al. A membrane associated progesterone binding protein, 25 Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(23): 12816—12821.
- [10] HSIEH H M, LIU W K, CHANG A, et al. RNA expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice[J]. Plant Mol Biol, 1996, 32(3): 526—529.

Identification of cDNA Fragments Differentially Expressed Between a Rice Mutant *dwarf69* and Wild Type TGA-2 by Suppressive Subtraction Hybridization

WANG Yong-sheng, WANG Jing, LI Fa-qiang, LIU Xiao-bin, LIU Liang-shi

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education,
Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The suppressive subtraction hybridization (SSH) technique was used to isolate the cDNA fragments, which showed differential expression between the rice mutant *dwarf69* and wild type strain, TGA-2 (*Oryza sativa*, indica). Two differential expressing cDNA libraries were constructed with the cDNAs of *dwarf69* as driver and the cDNAs of TGA-2 as tester, *vice versa*. These two cDNA libraries indicated the differential expressing cDNA fragments in TGA-2 and *dwarf69*. By reverse Northern blots, ten positive clones were obtained.

Keywords: suppressive subtraction hybridization (SSH); *dwarf* mutant; reverse Northern blots