

应用抑制差减杂交法分离水稻幼穗发育早期 特异表达的基因

刘 军 袁自强 刘建东 钱晓茵 钱 昊 杨金水*

(复旦大学生命科学学院遗传研究所, 上海 200433. * 联系人, Email: jsyang@fudan.edu.cn)

摘要 以水稻茎尖分生组织(shoot apical meristem, SAM)为对照群体, 幼穗分生组织(primary and secondary branch primordia, Pb/Sb)为目标群体, 进行抑制差减杂交. 用经过 SAM cDNA 差减的 Pb/Sb cDNA 群体构建了一个差减文库. 通过差示筛选鉴定了 40 个在 Pb/Sb 中特异表达或表达增强的候选克隆. Northern 杂交验证, 至少 40% 的候选克隆代表了在 Pb/Sb 中特异表达或表达增强的基因, 同时, 相当一部分克隆为低丰度转录本. 对 40 个 cDNA 克隆单向测序后, 与 GenBank 中同源序列进行比较, 结果表明: 2 个克隆为已知水稻基因; 11 个克隆与已知基因的同源性为 60%~90%; 另有 18 个克隆在 GenBank 中无法查到对应的同源基因, 可能代表了新基因, 或是由于序列位于变异丰富的 3' 端故而无法查到与其他物种基因的同源性. 目前为止, 已有 19 个基因在 GenBank 注册并获登录号.

关键词 抑制差减杂交技术 茎尖分生组织 幼穗分生组织

10 余年来植物花发育的分子遗传学研究进展迅速, 但主要限于拟南芥和金鱼草两种模式植物. 水稻是世界主要粮食作物之一. 我国是水稻生产大国, 水稻产量约占粮食总产量的 1/3. 作物生命活动过程中, 与产量关系最为密切的是生殖发育阶段. 水稻幼穗发育分子遗传学研究最多的是花器官形成阶段中的 MADS-box 调控基因, 对上游的枝梗原基分化和颖花原基发育阶段的研究报道很少, 而上游的发育调控事件对整个幼穗发育起着关键作用. 本实验运用抑制差减杂交技术, 研究了水稻幼穗发育早期 (第 1 次枝梗原基(Pb)和第 2 次枝梗原基(Sb)分化期)特异表达的基因.

抑制差减杂交是新近发展起来的一种差减杂交技术, 用于分离两个 mRNA 群体间差异表达的基因^[1]. 其依据的技术主要有两点: (i) 差减杂交; (ii) 抑制 PCR. 经抑制差减杂交后的 cDNA 群体不仅富集了差异表达基因(目的基因), 而且目的基因间丰度的差异经过均衡化作用已基本消除. 换言之, 差减后的 cDNA 群体为丰度一致的目的基因群体. 因此, SSH 技术克服了以往差减杂交方法“高丰度易得, 低丰度难求”的技术限制, 两个待比较的群体间差异表达的所有目的基因(高、中、低丰度)都能得到有效克隆. 在动物研究领域该技术已成功用于分离不同器官组织之间、个体不同发育阶段以及受外界因子作用而差异表达的基因^[1~4]. 本实验将 SSH 技术引入植物花发育研究领域, 以营养生长阶段的茎尖分生组织作对照, 以生殖发育早期的第 1 和第 2 次枝梗原基为目标群体, 研究在水稻幼穗发育早期特异表达的基因.

1 材料与方法

(1) 水稻材料. 品种为珍汕 97B (*Oryza Sativa* L), 购自中国水稻研究所.

(2) 取材及镜检. (i) 水稻茎尖分生组织. 水稻经浸种、催芽后播种. 在营养生长期, 取主茎和分蘖茎, 用解剖针逐层剥除外层叶鞘和幼叶, 用镊子夹取带幼叶的茎尖分生组织 (shoot apical meristem, SAM), 液氮速冻, -70℃保存. (ii) 水稻幼穗分生组织. 当田间生长的

水稻刚进入第 1 次枝梗原基分化期时开始取样. 注意株间和株内的发育同步性. 严格控制材料的发育时期, 保证所取材料处于第 1 次枝梗原基和第 2 次枝梗原基 (primary and secondary branch primordia, Pb/Sb) 分化期. 材料经液氮速冻, -70°C 保存.

(3) 热酚法抽提水稻总 RNA. 按文献[5]进行.

(4) mRNA 分离纯化. mRNA 分离纯化依 Pharmacia mRNA Purification Kit 说明书进行.

(5) 抑制差减杂交. 具体操作依 Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtractive Kit 说明书进行.

(6) 差减 cDNA 文库的构建(T/A 克隆法). 从 PCR 扩增后的正向差减 cDNA 群体(共 25 μL)中取出 3 μL , 与 1 μL pGEM-T 载体连接, 4°C 过夜. 从连接体系中取 4 μL 转化受体菌 JM109, 于 X-gal/IPTG Amp 琼脂平板上挑取白色克隆, 点种于盛有液体 LB 培养基的 96 孔板中, 培养过夜, 加 15% 甘油, 液氮速冻, -70°C 保种.

(7) 差示筛选差减 cDNA 文库. (i) 差示探针制备. 分别取正向差减杂交 cDNA (以 Pb/Sb 作 Tester, SAM 作 Driver) 和反向差减杂交 cDNA (以 SAM 为 Tester, Pb/Sb 为 Driver) 的 PCR 扩增产物 40 μL (含 400~1600 ng cDNA), PCR 产物纯化试剂盒 (购自 Boehringer Mannheim) 回收 PCR 产物. 先后用 *Rsa* I (15 U, 37°C , 1 h), *Sma* I (10 U, 1 h), *Eae* I (10 U, 37°C , 1 h) 酶切消化以充分去除 cDNA 分子两端的接头, PCR 产物纯化试剂盒回收酶切产物, 即为差示筛选备用探针. 探针标记采用随机引物 DNA 标记系统 (购自 Gibco 公司). (ii) 差示筛选. 在第 1 轮差示筛选中, 随机挑取 250 个重组子编号, 分别抽提质粒, 点印于尼龙膜上 (注: 制备 cDNA 文库的两套重复拷贝膜). 取约 200 ng 正向或反向差减 cDNA 群体标记探针, 分别用来杂交同一 cDNA 文库的两套重复拷贝膜. 在第 2 轮差示筛选中, 取初筛的 cDNA 重组子质粒, 以 pGEM-T 的一对通用引物 T7/SP6 扩增外源插入片段. 取 50 ng PCR 产物, 电泳, 转膜 (注: 制备两套重复拷贝膜). 以约 100 ng 正向或反向差减 cDNA 群体标记探针, 分别用来杂交 PCR 产物的两套重复拷贝膜. 杂交、洗膜条件参见文献[5].

(8) Northern 杂交分析. 取抽提的茎尖分生组织和幼穗分生组织总 RNA 各 30 μg , 甲醛凝胶电泳, 转膜. 随机挑取 10 个复筛的 cDNA 重组子, 用 T7/SP6 引物扩增外源插入片段, 回收各片段后, 用放射性同位素标记探针进行 Northern 杂交. 具体操作按文献[6]进行.

(9) cDNA 片段测序和 DNA 序列分析. 采用自动测序法测序. 用 BLAST 软件搜索 GenBank 中同源序列进行比较.

2 结果与讨论

2.1 水稻发育时期的鉴定与取材

选取两种发育阶段的分生组织材料: 营养生长阶段的茎尖分生组织 (SAM) 作为对照材料 (Driver, D), 生殖生长阶段的第 1 和 2 次枝梗原基 (Pb/Sb) 为待检材料 (Tester, T). 为严格控制取材的准确性和发育阶段的一致性, 除参照叶龄、生长期推算发育阶段, 还对不同发育阶段的材料进行了严格镜检. 在营养生长阶段, 剥取 SAM (带少量幼叶), 在生殖发育阶段, 剥取 Pb/Sb 材料 (带少量幼叶) (图 1).

2.2 差减 cDNA 文库构建及筛选

运用 SSH 技术, 以 Pb/Sb 为 Tester, SAM 为 Driver, 进行正向差减杂交, 差减得到的 cDNA

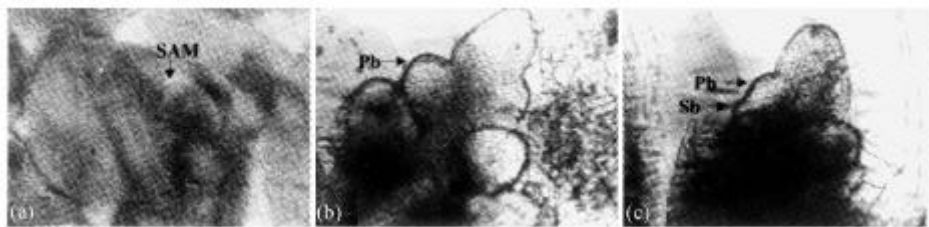


图 1 水稻不同发育时期镜检图
(a) 茎尖分生组织分化期, (b) 第 1 次枝梗原基分化期, (c) 第 2 次枝梗原基分化期. SAM 示茎尖生长点, Pb 示第 1 次枝梗原基, Sb 示第 2 次枝梗原基

群体用 T/A 克隆法构建质粒载体文库, 得到了含 500 个独立克隆的差减 cDNA 文库. 采用正向/反向差减杂交后的 cDNA 群体标记探针, 对随机挑取的 250 个重组质粒进行差示筛选. 选取仅与正向差减 cDNA 探针(H)杂交的克隆, 以及与 H 杂交信号明显强于反向差减 cDNA 探针(J)的克隆(图 2 中箭头所示), 共计 75 个, 占筛选总数的 30%. 与 H 和 J 杂交信号强弱相近的克隆可视为背景克隆, 与 H 或 J 均无杂交信号的克隆可能代表了极低丰度的 cDNA, 或是假阳性重组

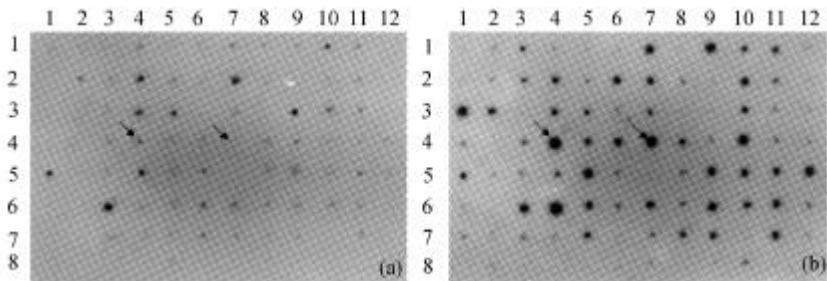


图 2 第 1 轮差示筛选
(a)与(b)分别为质粒样品的两套重复拷贝与 J 和 H 探针杂交的结果

子.

鉴于点杂交易出现一定程度的假阳性杂交信号, 带来较高的背景干扰. 对初筛的 75 个克隆子进行了复筛. 以 pGEM-T 载体两端的一对通用引物 T7/SP6 扩增了 75 个克隆的外源插入片段. PCR 产物凝胶电泳图显示(图 3(a)), cDNA 克隆外源插入片段的大小介于 400~1 500 bp 之间, 平均大小在 600 bp 左右, 与 SSH 设计预期的插入片段大小吻合^[1]. 以 H 和 J 探针分别与 PCR 产物杂交(图 3(b)和(c)), 挑取仅与 H 探针杂交, 或与 H 杂交信号明显强于 J 探针的克隆, 共计 40 个, 占筛选克隆总数的 16%, 即 cDNA 差减文库中约 16%的克隆代表了在 Pb/Sb 中特异表达或表达增强的基因.

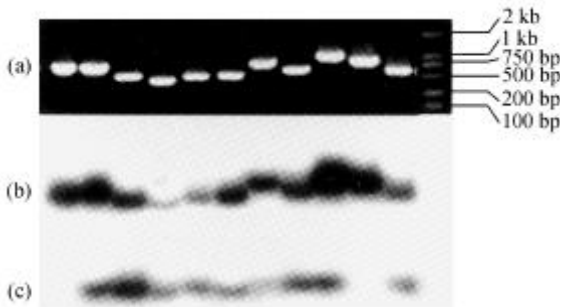


图 3 第 2 轮差示筛选杂交结果
(a) PCR 扩增 cDNA 克隆外源插入片段凝胶电泳图, (b)与(c)为 cDNA 克隆插入片段的两套重复拷贝分别与 H 和 J 探针杂交的结果

2.3 Northern 杂交分析

为进一步验证复筛的 40 个克隆是否真正代表着在 Pb/Sb 中特异表达的基因(与 SAM 比较而言), 随机挑取了 10 个克隆, T7/Sp6 扩增外源插入片段, 各片段分别与 SAM 和 Pb/Sb 总 RNA 进行 Northern 杂交(图 4).

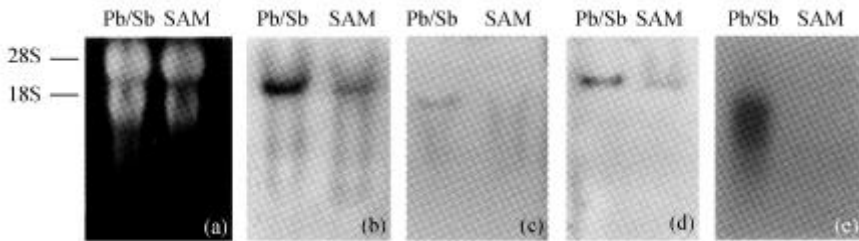


图 4 Northern 杂交

(a) Pb/Sb 和 SAM 总 RNA(30 µg)凝胶电泳图; (b)~(e) 4 个 cDNA 克隆的 Northern 杂交结果

在随机挑取的 10 个克隆中, 4 个克隆显示阳性杂交信号, 其中(c)和(e)仅显示出与 Pb/Sb 杂交的信号, 与 SAM 无杂交信号, 代表在 Pb/Sb 中特异表达的基因, 克隆(b)和(d)与 Pb/Sb 杂交信号明显强于 SAM, 代表在 Pb/Sb 中增强表达的基因. 其余 6 个克隆与 Pb/Sb 和 SAM 的杂交均无阳性信号(图略), 推测可能的原因是该部分克隆的表达丰度低, 以至无法用 Northern 杂交检出. 从以上结果得出初步结论: 至少 40%的候选克隆代表在 Pb/Sb 和 SAM 间差异表达的基因. 同时, 相当一部分的 cDNA 代表着低丰度的转录本. 这亦为 X 射线片曝光所需的时间(3 天~2 周)及后来测序与序列分析结果基本证实.

从已发表的 SSH 研究报道来看^[1, 3, 4], 其 Northern 杂交验证的阳性率从 10%~90%不等, 一方面可能是研究对象不同而致的系统差异, 另一方面低丰度基因容易造成 Northern 杂交信号的熄灭现象. 此外, 文献中的 Northern 杂交均选用 2 µg 以上 mRNA 作模板进行, 较之总 RNA, mRNA 显然更有利于低丰度基因杂交信号的检出. 但本实验受材料来源量的限制, 取材部位为微小的分生组织区域, 难以得到充足的材料来分离足够量的 mRNA 进行 Northern 杂交. 如何找到一个行之有效的办法对所得克隆在低表达水平上予以检验, 是一个待解决的问题.

2.4 cDNA 单向测序与序列分析

对 40 个 cDNA 克隆单向测序并与 GenBank 中同源序列进行了比较. 除 4 个 cDNA 克隆外源插入子太短不便分析外, 其余 36 个 cDNA 克隆代表了 31 个不同的基因(表 1), 仅 6 个克隆为重复检出的同一基因——rFKBP, 即差减库中约 80%的克隆代表着不同的基因. 表明 cDNA 差减群体内部, 很少重复拷贝, 不同基因间丰度的差异得到了很好的均衡. 31 个 cDNA 克隆中两个为已知水稻基因(水稻丙酮酸正磷酸双激酶基因和微管蛋白 α -1 链基因), 11 个与其他物种基因氨基酸序列同源性达 60%~90%(比较的氨基酸长度在 100 个以上), 剩下的 18 个 cDNA 从 GenBank 中查不到任何对应的同源序列, 特称为 rhp (rice hypothetical)基因. 分析可能有两种情况: (i) 代表了新基因; (ii) 克隆的 cDNA 序列位于基因变异丰富的 3' 端故而无法查到与其他物种基因的同源性. 序列同源比较的结果显示大部分 cDNA 序列为水稻中首

次克隆, 目前已有 19 个 cDNA 序列在 GenBank 登记注册(表 1).

表 1 31 个 cDNA 克隆

简 称	全 称
rARF1	生长素反应因子 1 基因(AF140228)
rHD-Zip	水稻 <i>HD-Zip</i> 基因(AF139210)
rFKBP	亲免素同源基因(AF140495)
rP450	细胞色素 P450 基因(AF140486)
rORCP	受体复合物蛋白基因(AF140487)
rCECAP	依赖 Ca^{2+} 的叶绿体外膜 ATP 酶基因(AF140499)
rCPCT	胆碱酯磷酸胞苷转移酶基因(AF140496)
-	水稻 k1aa0078 同源基因(AF140489)
-	核糖体蛋白基因(AF140494)
-	微管蛋白 α -1 链基因
-	早期结瘤素基因
-	木糖异构酶基因(AF140230)
-	丙酮酸正磷酸双激酶基因
rhp01~rhp18 ^{a)}	水稻 EST 序列 (1~18)

a) EST 序列 GenBank 登录号: rhp01(AF140490), rhp05(AF139211), rhp09(AF140497), rhp11(AF140485), rhp12(AF140498), rhp13(AF140491), rhp14(AF140500), rhp15 (AF140493), rhp16 (AF140492)

实验分离克隆到几个重要基因的 cDNA 序列, 如转录因子 rARF1 与拟南芥的 ARF1, ETT 和 MP 高度同源, ARF1 是目前惟一确证同生长素信号转导有关的转录因子^[7], MP 在拟南芥胚和微管组织模式建成中起重要作用^[8], ETT 则在花发育和花器官形态建成中发挥作用^[9]. 从本实验结果来看, 生长素和 ARF 类转录因子在植物幼穗形态建成中可能扮演了某种角色; rHD-Zip 与拟南芥 *HD-Zip* 基因近 C 端氨基酸序列的同源性高达 70%~80% (图略), *HD-Zip* 属同源异型基因家族, 编码产物含有一段高度保守的同源异型盒域和紧随其后的亮氨酸拉链域, 此类转录因子为植物界所独有, 推测参与植物对环境因子作出反应^[10]; 其他如细胞色素 P450 基因、亲免素同源基因、丙酮酸正磷酸双激酶基因、依赖 Ca^{2+} 的叶绿体外膜 ATP 酶基因、结瘤素基因、微管蛋白 α -1 链基因等等, 在不同文献中报道分别涉及基因表达调控、信号传导、物质能量代谢、细胞分裂等等细胞生命活动进程. 据此推测: 水稻从营养生长转为生殖生长涉及大量的基因表达调控事件, 不仅有重要的转录因子活跃其中, 而且存在丰富的信号传导和物质、能量代谢.

本实验对 SSH 在植物研究领域的应用进行了尝试, 将 SSH 用于分离水稻幼穗发育早期特异表达的基因, 获得初步的成功. 当两个待比较的 mRNA 群体间差异表达基因数量较为丰富时, SSH 方法优势明显, 一次可以克隆到多个不同丰度的差异表达基因; 但当两个待比较的 mRNA 群体间差异不大时, 所建 cDNA 差减库中可能含有大量的背景克隆, 给真正差异基因的分离带来较大干扰. 在植物领域, SSH 特别适合于研究发育阶段转型前后, 个体内不同器官之间, 以及受环境因子影响较大的差异表达基因的克隆. 一方面, 这些待比较群体间存在丰富的差异表达基因, 另一方面, 往往有一些低丰度的调控因子参与其中, 更能体现 SSH 分离低丰度差异基因的优势. 此外, 对植物组织而言, 由于其 RNA 分离较动物组织困难, 尤其是老熟的植物组织不易分离到高质量的 mRNA, 所以应尽量选取幼嫩组织用作研究对象.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号: 39770047).

参 考 文 献

- 1 Diatchenko L, Chris Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025~6030
- 2 Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, et al. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(4): 1116~1123
- 3 Gurskaya N G, Diatchenko L, Chenchik A, et al. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Analytical Biochemistry*, 1996, 240: 90~97
- 4 Von Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high through put screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(13): 2598~2602
- 5 Sacco de Vries, Harry H, Ton B. Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*, 1988, B6: 1~13
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 362~371
- 7 Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 1997, 276: 1865~1868
- 8 Christian S H, Thomas B. The Arabidopsis gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J*, 1998, 17(5): 1405~1411
- 9 Allen S, Jennifer L N, Andy M, et al. *ETTIN* patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development*, 1997, 124: 4481~4491
- 10 Chan R L, Gago G M, Palena C M, et al. Homeoboxes in plant development. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1442(1): 1~19

(1999-11-19 收稿, 2000-03-09 收修改稿)