

# 大豆花叶病毒诱导的野生大豆抑制差减文库构建及初步分析

史凤玉, 朱英波, 龙 茹, 武云鹏, 乔亚科

(河北科技师范学院 生命科技学院, 河北 昌黎 066600)

**摘 要:**以野生大豆 Bian0526 为试验材料,通过抑制性差减杂交技术(SSH)构建了大豆花叶病毒(SMV)诱导的 cDNA 差减文库。在文库中共筛选到 15 343 个阳性克隆,PCR 鉴定插入片段大部分集中在 500 ~ 800 bp 之间。利用 BLAST 在 GenBank 文库中进行序列相似性比对,获得有功能的 EST 200 个。对有功能注释的同源分析发现,其功能涉及植物的细胞自身保护和系统获得性抗性等方面,说明这些基因很可能参与到野生大豆抗大豆花叶病毒反应中。

**关键词:**野生大豆;大豆花叶病毒病;抑制差减杂交技术(SSH);cDNA 文库

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2011)06-0968-04

## Construction and Primary Analysis of a SSH Library of Wild Soybean Induced by SMV

SHI Feng-yu, ZHU Ying-bo, LONG Ru, WU Yun-peng, QIAO Ya-ke

(College of Life Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600, Hebei, China)

**Abstract:** To isolate the genes related to wild soybean resistance in Soybean Mosaic Virus (SMV), Suppression Subtractive Hybridization (SSH) was utilized to construct the different expression cDNA library using wild soybean variety Bian0526 inoculated with race 3 of SMV. From this library, a total of 15 343 positive clones were screened, and the length of most of the insert fragments was focused on 500-800 bp. ESTs similarity analysis of these unigenes was performed with the Blastx and Blastn against the non-redundance database in GenBank. The results showed that 200 functional ESTs had been gotten, and they were related to cell self-protection and system acquired resistance, etc. This indicated that these genes might be involved in resistance to SMV of wild soybean.

**Key words:** Wild soybean; Soybean Mosaic Virus; Suppression subtractive hybridization (SSH); cDNA library

大豆花叶病毒病是由大豆花叶病毒(SMV)感染引起的<sup>[1]</sup>,是危害大豆产量和品质的主要病害之一。一年生野生大豆(*Glycine soja*)作为栽培大豆(*Glycine max*)近缘祖先种,具有丰富的抗病基因及优异的可遗传性状,利用野生大豆创造新的抗大豆花叶病毒病种质,对拓宽大豆育种的遗传基础具有重要意义<sup>[2]</sup>。许多学者相继开展了我国野生大豆种质资源收集及其抗病性的研究工作,已在大豆花叶病毒病抗性资源筛选<sup>[3-4]</sup>、形态结构<sup>[5]</sup>、生理生化机制<sup>[6-7]</sup>等方面取得了明显进展,然而对大豆花叶病毒胁迫后基因的表达研究鲜有报道。

该研究旨在利用 SSH 技术构建大豆花叶病毒诱导下野生大豆 cDNA 文库,获得抗病性相关的 EST 序列,为栽培大豆遗传改良奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

抗 SMV 野生大豆材料 Bian0526 (河北科技师范学院大豆遗传育种组提供)。Trizol 购自 Invitrogen 公司, PolyATtract mRNA Isolation System Ⅲ 试剂盒购自 Promega 公司,抑制差减杂交试剂盒 (Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit) 购自 Clontech 公司, pMD18-T Vector、DNA Polymerase 和 DH5α 感受态细胞等均购自 TaKaRa 公司,其余试剂均为分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 植物材料准备 抗 SMV 野生大豆材料 Bian0526 种植于温室,出苗前温室温度控制在 24 ~

收稿日期:2011-10-11

基金项目:国家自然科学基金项目(30940050);河北省自然科学基金项目(C2006000559, C2009000868);河北省科技厅项目(06547005 D-3, 09220103D-11);河北省教育厅项目(Z2008114)。

第一作者简介:史凤玉(1972-),女,副教授,主要从事植物病理学研究。E-mail: fyshi1972@126.com。

通讯作者:乔亚科(1964-),男,教授,从事作物资源与育种研究。E-mail: qiaoyake@126.com。

29℃,出苗后温度控制在 18~25℃,光照 16 h,待 1 对真叶展开后,用人工摩擦接种法将 SMV III 号强毒株系接种在真叶上,于网室内培育,以防止蚜虫对未接种的样本进行侵染。样品接种后,每隔 24 h 取样,连续取样 3 次,取样时每株苗剪取第 2 片三出复叶,速冻于液氮中,并于 -80℃ 低温下保存。

**1.2.2 RNA 的提取及抑制差减杂交** 总 RNA 的提取用 Trizol 试剂。mRNA 采用 PolyATtract mRNA Isolation System III 试剂盒进行抽提,并用紫外分光光度计检测 mRNA 样品的浓度和纯度。抑制差减杂交过程严格按照抑制差减杂交试剂盒(Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit)说明进行,以接种大豆花叶病毒处理为试验组,未接种处理为对照组。

**1.2.3 差减文库的构建** 依照 TaKaRa 公司 PCR 产物纯化试剂盒的程序,将差减杂交后第二轮 PCR 产物纯化,末端加 A 后与 pMD18-T 载体连接。取 10 μL 连接产物加到 100 μL DH5α 感受态细胞中,将已转化的感受态细胞涂布到含 AMP/X-gal/IPTG 的 LB 培养基上。将平板置于室温直至液体被吸收,37℃ 置培养 12~16 h,计数培养板上的蓝白斑菌落数。用已灭菌牙签挑取白色克隆,接种于含有 AMP 的 LB 培养基的 96 孔培养板上,37℃ 培养过夜。

**1.2.4 外源插入片段的检测** 用已灭菌牙签挑取 96 孔培养板上菌落于 5 mL 液体 LB 培养基(加 AMP)中,37℃ 200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养过夜后提取质粒,用引物(M13-47: 5' CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC3', M13-RV: 5' CAGGAAACAGCTATGACC3')扩增载体上的外源片段,20 μL PCR 反应体系:2 μL 10×PCR buffer, 0.8 μL dNTP (10 mmol·L<sup>-1</sup>), 0.2 μL M13-47 (10 μmol·L<sup>-1</sup>), 0.2 μL M13-RV (10 μmol·L<sup>-1</sup>), 0.2 μL Taq DNA polymerase (5 U·μL<sup>-1</sup>), 1 μL 质粒 DNA, 15.6 μL 灭菌水。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 68℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温。取 2 μL PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳,SYBR Green I 染色,紫外灯下照相,鉴定有无插入片段,并估计插入片段的大小范围。重组率计算公式为:重组率(%)=(有插入片段的反应个数/反应总数)×100。

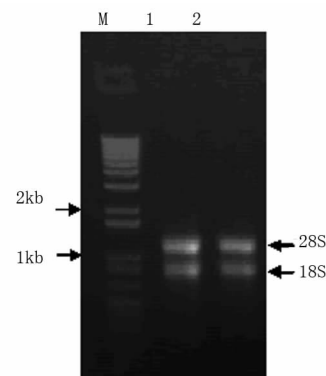
**1.2.5 EST 测序及分析** 将阳性克隆的 EST 片段

送往北京诺赛公司进行测序,测序结果用 DNASTar 软件去除载体后,与 GenBank 的蛋白数据库和核酸数据库进行 BLASTx 和 BLASTn 比对。判定标准参照水稻、拟南芥的 EST 研究,以 BLASTx 结果一致性大于 40%、分值大于 80, BLASTn 结果一致性大于 50%、分值大于 80 为依据进行筛选和功能注释。通过 BLASTx 和 BLASTn 比对后再把这些 EST 与 GenBank 的 EST 库进行 BLASTn 比较,了解该 EST 与哪些片段同源及这些片段的来源等信息。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 和 mRNA 质量检测

电泳检测总 RNA,可见明显 28 S 和 18 S 的 2 条带,如图 1 所示,泳道 1 为接种处理总 RNA 条带,泳道 2 为未接种处理总 RNA 条带。其中 28S rRNA 和 18S rRNA 亮度比值接近 2:1,表明所提取的 RNA 未出现降解;经核酸蛋白检测仪检测, A260/280 值为 1.9。使用 Oligotex mRNA Kits (Qiagen) 分离纯化后的 mRNA 为大于 0.5 kb 的清晰弥散状条带(图 2)。以上结果表明所制备 RNA 和 mRNA 质量和浓度均符合建库的要求。



M: 1 kb DNA marker; 1: 接种处理的总 RNA; 2: 未接种处理的总 RNA

M: 1 kb DNA marker; 1: Total RNA of inoculated treatment; 2: Total RNA of non-inoculated treatment

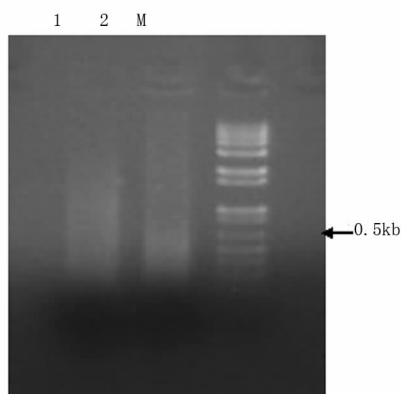
图 1 总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA examination on agarose gel

### 2.2 差减文库质量检测

实验方(Tester) cDNA 经 2 轮差减后富集的差异表达基因再经 2 次 PCR 扩增,纯化后与 pMD18-T 载体连接,再经热激转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中。经蓝白斑筛选检测显示文库的重组率为 95%,测得库滴度为  $1 \times 10^5$  cfu·mL<sup>-1</sup>,筛得阳性克隆 15 343 个。随机挑选阳性克隆进行 PCR 扩散,

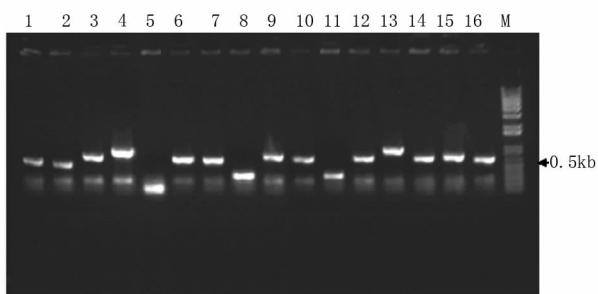
均能扩增出有效产物,插入片段大部分集中在 500 ~800 bp 之间(图 3)。



M: 1 kb DNA marker; 1: 接种处理的 mRNA; 2. 未接种处理的 mRNA  
M: 1 kb DNA marker; 1. mRNA of inoculated treatment; 2. mRNA of non-inoculated treatment

图 2 mRNA 电泳检测

Fig. 2 mRNA examination on agarose gel



M: 1 kb DNA marker; 1 ~ 16: 重组质粒的 PCR 鉴定产物  
M: 1 kb DNA marker; 1 ~ 16: PCR products of the recombinant plasmid identification

图 3 SSH 文库重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmids from SSH library

## 2.3 SMV 诱导野生大豆差异表达基因分析

随机选取 2 500 个克隆进行测序,获得高质量的 EST 2 170 个,占总数的 86.8%,低质量 EST 330 个,占总数的 13.2%。将 EST 测序结果在 GenBank 上用 BLASTn 和 BLASTx 软件对其进行序列同源性比较,结果表明其中有 200 条 EST 都可以找到功能已知的同源序列。其中在 BLASTn 比较结果中,功能已知的有 120 条,占全部 EST 的 60%;BLASTx 的比较结果中有 140 条功能已知,占全部 EST 的 70%。为了进一步了解功能已知 EST 有哪些涉及与抗病和防御相关基因,按照 Bevan 等<sup>[8]</sup>的植物基因功能分类标准,将 EST 的 BLASTn 和 BLASTx 比较结果分类,所测的 200 条 EST 的同源序列共涉及到抗病与防御相关基因 6 种,包括丝氨酸/苏氨酸激酶、谷胱甘肽-S-转移酶、乙醇脱氢酶、细胞色素 P450、ACC 氧化酶等(表 1)。另外试验中所获得 EST WGS62 和 WGS135 的同源序列分别为糖酵解途径中甘油醛磷酸脱氢酶基因和蛋白质合成相关基因延伸因子,EST WGS128 为功能未确定基因,其基因功能验证还需进一步深入研究。

## 3 讨 论

该研究构建了野生大豆花叶病毒病致病过程的抑制差减杂交 cDNA 文库,这对于研究野生大豆和栽培大豆等其它植物致病过程的分子机理具有重要价值。

表 1 SSH 文库中部分 ESTs BLAST 结果

Table 1 BLAST result of some ESTs in SSH library

克隆编号 Sample No.	同源序列 Homologous sequence	主要功能 Related function
WGS15	Cytochrome P450(细胞色素 P450)	SAR 诱导防卫蛋白
WGS101	Peroxidase(过氧化物酶)	HR 体系表达基因
WGS36	ACC oxidase (ACC 氧化酶)	细胞保护机制
WGS219	Alcohol dehydrogenase(乙醇脱氢酶)	HR 体系表达基因
WGS208	Glutathione S-transferase(谷胱甘肽-S-转移酶)	SAR 诱导防卫蛋白
WGS117	Serine/threonine kinase(丝氨酸/苏氨酸激酶)	R 基因介导的信号传导途径

文库的滴度达到  $1 \times 10^5$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,可以满足 EST 研究要求。所构建的 SSH cDNA 文库,平均的测序长度为 659 bp,符合质量要求。从分析结果看出,空载体和载体后重叠序列很少,可利用的序列达 86.8%,说明所构建的 SSH cDNA 文库质量较好,为进一步开展相关研究奠定重要基础。通过对比

分析,发现大豆花叶病毒胁迫下野生大豆表达发生显著变化的基因,这些基因涉及信号传导、细胞自身保护和系统获得抗性等。如 WGS117 号序列与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶同源,而在植物中已发现的受体蛋白激酶主要是丝氨酸/苏氨酸激酶,此激酶是一大类特异地催化蛋白质丝氨酸和苏氨酸残

基磷酸化的激酶家族,参与多种信号传导过程,是一种胞内蛋白质,具有抗病信号传导功能<sup>[9-12]</sup>。同时,WGS15号序列与细胞色素 P450 同源,此酶属于一类具有混合功能的血红素氧化还原酶类,在植物中细胞色素 P450 参与了苯丙氨酸代谢途径,其催化的代谢途径可产生一些重要的次生代谢物如黄酮类、香豆素、生物碱及萜类化合物等,使植物抵抗病虫害及逆境胁迫<sup>[13-14]</sup>。这说明野生大豆对外界环境胁迫的防御机制是不同途径、不同水平交叉重叠组成的。鉴于野生大豆抗 SMV 机制的复杂性,在 EST 分析过程中也发现存在一定比例的功能未知序列,很可能这些功能未知 EST 序列含有大量与抗病反应有关的信息。

抗病机制的研究不仅仅是抗病过程的识别和抗病基因的开启,更要注重抗病过程一系列基因的表达以及抗病信号的传导及级联反应,这将在基因水平上有助于对抗病机制的深入理解。因而,对于大豆花叶病毒胁迫下野生大豆抗病机制的研究,还需对 SSH 文库进行大规模的测序,进一步分离差异表达基因,系统获得野生大豆应答 SMV 胁迫的差异表达基因,并结合 RT-PCR 分析进一步从基因表达水平、基因功能等方面深入地分析这些 EST 基因在野生大豆抗 SMV 过程中的作用。

## 参考文献

- [1] 胡吉成,谢淑仪. 野生大豆病毒病的初步鉴定[J]. 植物病理学报,1984,14(2):122-123. (Hu J C, Xie S Y. Preliminary identification of wild soybean (*Glycine Soja*) virus diseases[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1984, 14(2):122-123.)
- [2] 孙永吉,刘玉芝,胡吉成,等. 野生大豆抗花叶病毒病研究[J]. 大豆科学,1991,10(3):212-216. (Sun Y J, Liu Y Z, Hu J C, et al. A study on resistance of the wild soybeans to soybean mosaic virus (SMV) [J]. Soybean Science, 1991, 10(3):212-216.)
- [3] 来永才,林红,方万程,等. 大豆优异资源筛选、评价及利用的研究[J]. 中国农学通报,2005,21(6):379-382. (Lai Y C, Lin H, Fang W C, et al. Research that the excellent resource of wild soybean screen appraise and utilization in Heilongjiang [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(6):379-382.)
- [4] 史凤玉,朱英波,龙茹,等. 野生大豆抗大豆花叶病毒病评价、聚类及性状间相关分析[J]. 大豆科学,2010,29(6):976-981. (Shi F Y, Zhu Y B, Long R, et al. Evaluation, cluster analysis for *Glycine soja* resistant to soybean mosaic virus (SMV) and correlation analysis between characters [J]. Soybean Science, 2010, 29(6):976-981.)
- [5] 史凤玉,朱英波,李海潮,等. 野生大豆叶片形态结构与抗病病毒病关系的研究[J]. 大豆科学,2008,27(2):52-60. (Shi F Y, Zhu Y B, Li H C, et al. Relationships between SMV resistance and morphological structures in wild soybean [J]. Soybean Science, 2008, 27(2):52-60.)
- [6] 史凤玉,朱英波,龙茹,等. 河北东部沿海地区野生大豆病毒病抗性几种酶活性的关系[J]. 植物病理学报,2008,38(4):382-387. (Shi F Y, Zhu Y B, Long R, et al. Relationships between soybean mosaic virus (SMV) resistance and several enzyme activities from wild soybean in the eastern coastal region of Hebei province [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2008, 38(4):382-387.)
- [7] 李开盛,曹越平. 野生大豆抗花叶病毒病生化机制的研究[J]. 大豆科学,2011,30(2):254-258. (Li K S, Cao Y P. Biochemical mechanism of resistance to SMV in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Soybean Science, 2011, 30(2):254-258.)
- [8] Bevan M, Bancroft I, Bent E, et al. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 1998, 391:485-488.
- [9] Song W Y, Wang G L, Chen L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21* [J]. Science, 1995, 270(5243):1804-1806.
- [10] Hofte H, Desprez T, Amselen J, et al. An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 1993, 4(6):1051-1061.
- [11] Borch J, Bych K, Roepstorff P, et al. Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 protein and the plant plasma membrane  $H^+$ -ATPase [J]. Biochemical Society Transactions, 2002, 30(4):411-415.
- [12] 杨郁文,倪万潮,张保龙,等. 陆地棉一个丝氨酸/苏氨酸激酶蛋白基因的克隆与表达分析[J]. 棉花学报,2006,18(3):140-144. (Yang Y W, Ni W C, Zhang B L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a serine/threonine protein kinase gene in upland cotton [J]. Cotton Science, 2006, 18(3):140-144.)
- [13] Schuler M A, Daniele W R. Functional genomics of P450s [J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54:627-629.
- [14] 张萍,潘惠新,黄敏仁,等. 杨四瘦蚜诱导的美洲黑杨抑制消减文库的构建及分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2009, 33(2):5-8. (Zhang P, Pang H X, Huang M Y, et al. Construction and analysis of *Populus deltoids* SSH cDNA library induced by *Tetra lobulifera* (Keifer) [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2009, 33(2):5-8.)