

大豆在暗诱导条件下差异表达 cDNA 文库的构建及分析

赵琳¹, 罗秋兰¹, 杨春亮², 韩英鹏¹, 李文滨¹

(1. 东北农业大学大豆研究所, 国家教育部大豆生物学重点实验室, 哈尔滨 150030; 2. 哈尔滨医科大学基础医学学院, 哈尔滨 150081)

摘要 大豆属于短日照植物, 其生长发育对光周期反应非常敏感, 这一特性严重阻碍大豆品种的适应性, 是制约大豆单产提高的关键因素。本研究的目的是在细胞分子水平上从基因差异表达的角度研究短日照光周期诱导开花和衰老过程中基因转录物丰度的变化, 从而探索大豆叶片感受日长变化诱导开花和衰老的复杂机制。利用抑制性消减杂交技术 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 成功构建了短日照诱导的大豆光周期敏感品种‘东农 L13’叶片中差异表达的 cDNA 消减文库, 从文库中一共筛选到 738 个克隆, 通过反向 Northern 杂交, 从中得到 148 个克隆并测序, 它们代表 76 个不同基因的非重复序列 ESTs。利用 BLAST 在 GenBank 数据库进行序列相似性比对, 功能分析表明这些基因与植物的转录、信号转导和细胞凋亡的调控, 解毒和防卫, 大分子降解细胞壁修饰的合成代谢等多种植物的生理生化功能相关。本研究为揭示短日照诱导大豆开花和加速衰老的作用机理提供依据。

关键词 大豆; SSH; 短日照; 光周期; 衰老

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0134-06

CONSTRUCTION AND ANALYSIS OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED CDNA LIBRARY FROM SOYBEANS INDUCED BY DARKNESS

ZHAO Lin¹, LUO Qiu-lan¹, YANG Chun-liang², HAN Ying-peng¹, LI Wen-bin¹

(1. Soybean Research Institute, Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agriculture University, Harbin, 150030, 2. The Basic Medical Science college, Harbin Medical University, Harbin, 150081)

Abstract Soybean was a shortday plant, and its growth and development was very sensitive to photoperiod response which seriously limited the adaptation of soybean variety and improvement in yield of per unit area. The aim of this study reported in this paper was to break the limitation in soybean growth areas, determining what transcripts were increased in abundance in short day treated plants compared to long day treated plants during the photoperiod inductive flowering and senescent process on the cellular and molecular level, and further to discover the complicated mechanisms of flowering induction and senescence in

收稿日期: 2007-03-09

基金项目: 重大基础研究前期研究专项项目 (2005CCA01800), 国家自然科学基金 (30400285) 资助

作者简介: 赵琳 (1980-), 女, 博士研究生, 研究方向为大豆生物技术, E-mail: zlhappy1981@yahoo.com.cn

通讯作者: 李文滨教授, 博士, 博士生导师。E-mail: wenbili@neau.edu.cn

the SD soybean leaves perceiving daylength. A cDNA subtractive library enriched for mRNAs encoding ESTs that increased in abundance during short days was constructed by suppression subtractive hybridization (SSH) from leaf tissues of soybean cultivar Dongnong L13', a photoperiod sensitive cultivar, and 738 clones were selected from the library. A total of 148 clones were obtained by Reverse Northern blotting and these were sequenced that encoded 76 unique ESTs. The ESTs were annotated by similarity to orthologs and paralogs detected with Blastn and Blastx. The proteins predicted to be encoded were inferred to be involved in diverse physiological and biochemical functions such as transcription, signal transduction, programmed cell death, protein, macromolecule degradation, detoxification and defense, cell wall modification. This research established foundation to reveal the mechanisms of short day inducing flowering and accelerating senescence.

Key words Soybean; SSH; Short day; Photoperiod; Senescence

植物对昼夜相对长度的反应称为光周期现象 (photoperiodism), 本世纪初美国科学家 Garnar 和 Allar^[1] 发现光周期对开花的影响。自光周期现象发现以来, 科学家们对其表现和机制进行了大量的研究, 开花素学说的提出、光受体的发现, 以及光周期反应有关基因的分离, 都大大深化人们对光周期反应机制的认识^[2]。

大豆是光周期反应敏感的短日照植物, 在光周期反应的早期研究中被作为重要的模式植物^[1]。大豆的开花时间和成熟是农业生殖的重要性状, 控制着种子的产量和部分疾病的抗性^[3], 品种所处的纬度不同, 对日长反应也不同。短日照促进开花, 反之长日照则推迟抑制花芽生长, 这一对光周期敏感特性严重阻碍大豆品种的跨区种植, 南北不宜大幅度调种, 降低了大豆品种的适应性, 影响产量水平的有效发挥。

为了打破大豆的生长区域限制, 使大豆品种在不同的播种区域都能够正常的开花、有性生殖和种子成熟。本研究利用抑制性消减杂交 (SSH) 技术研究大豆在营养生长期、在不同日长的光周期生长状态下、转录水平上的基因表达差异, 揭示大豆叶片中短日照诱导上调表达的 ESTs 对光周期和衰老相关等生物体生命活动的分子调节机制, 进而获得光周期敏感的关键基因, 为从根本上改变大豆对光周期的敏感特性, 提高单产奠定了研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill.) L13 晚熟品种, 具有无限结荚习性, 培养于光照培养箱 25 °C 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 白光, 长日照 (LD) (16 h/8 h 光/暗) 条件下生长, 作为 SSH driver; 待第一个三出复叶展开后 (出苗后第 10d), 开始短日照 (SD) 光周期处理, (8 h/16 h 光/暗) 培养作为 SSH tester, 在处理后的第 15 d, 在黑暗/光照交替处时, 同时对两个样本取材, 剪取第三个三出复叶, 液氮速冻, -80 °C 保存用于构建抑制性消减文库。

1.2 化学试剂与药品

Trizol 试剂购自 Gibco BRL 公司; CLONTECH SMART PCR cDNA Synthesis Kit 和 CLONTECH PCR - Select™ cDNA Subtraction Kit 均购自 CLONTECH 公司; QIAquick PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 购自 Roche 公司; SYBR^(R) ExScript™ RT - PCR Kit 购自 TaKaRa 公司; 其它各种生化试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 抑制性消减杂交 cDNA 文库的构建 采用 Trizol 试剂提取大豆叶片总 RNA。依照 CLONTECH SMART PCR cDNA Synthesis Kit 说明书利用 SMART 技术将两个样本总 RNA 逆转录成为 cDNA, 并经过合适的循环次数达到最佳的扩增状况, 以确保双链 cDNA 处于对数扩增阶段。以短日照暗处理的叶片 cDNA 为 tester, 长日照的叶片 cDNA 为 Driver, 依照 CLONTECH PCR - Select™ cDNA Subtraction Kit 说明书进行抑制性消减杂交。即将 tester cDNA 用

限制性内切酶 *Rsa*I 酶切后分为两份,分别与接头 1 和接头 2R (Adaptor 1 和 Adaptor 2R) 16 ℃ 连接过夜,然后将它们分别与 *Rsa*I 酶切的 driver cDNA 进行第一次杂交,68 ℃ 杂交 8 h,再向两组第一次消减杂交体系混合物中加入过量的变性 driver cDNA 进行第 2 次杂交,68 ℃ 过夜,再进行第一次和第二次 PCR 扩增。将消减杂交的产物纯化后与 pGEM-T 载体在 4 ℃ 连接过夜,热击转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a 感受态细胞,培养于 X-gal/IPTG/Amp 琼脂平板上进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落接种于液体 LB 培养基中,37 ℃ 过夜培养后,进行菌落 PCR 鉴定,经鉴定为阳性克隆的菌落加入 15 % 甘油, - 70 ℃ 保存菌种。

1. 3. 2 反向 Northern 杂交筛选阳性克隆 依照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 程序制备地高辛标记探针,将阳性克隆 PCR 产物点阵于尼龙膜上,分别与 Tester 和 Driver 的总 RNA 进行 2 次重复杂交筛选消减文库。

1. 3. 3 DNA 测序与序列分析 将阳性克隆送至上海生工测序,序列经去除载体序列和引物序列后,将所得的 EST 利用 NCBI 的 BLAST 序列比对分析软件进行序列相似性比对分析。

1. 3. 4 实时荧光定量 RT-PCR (Real-time RT-PCR) 进一步验证差异表达的片段

根据 6 个推测的大豆转录因子 GAMYB-binding protein (GBP)、RAV、transcription factor-related gene、zinc finger protein、NAC 和 light receptor 的 EST 片段序列和 GenBank 上登陆的大豆看家基因 actin 4 (作为内参) 分别设计引物。按照 SYBR^(R) ExScriptTM RT-PCR Kit 的程序进行荧光定量 PCR 反应。总 RNA 反转录合成 cDNA 第一链,反应体系如下:短日照和长日照的 RNA 样本 (500 ng) 各 2 μL, 5 × m-MLV 缓冲液 2 μL, dNTP Mix (10 μM) 0.5 μL; 随机引物六聚体 1 μL, m-MLV 反转录酶 0.25 μL, RNase 抑制剂 0.25 μL, 加去离子水 4 μL 至总体积 10 μL, 42 ℃ 温育 15 min, 95 ℃ 温浴 2 min 灭活反转录酶。PCR 扩增反应体系如下: cDNA 第一链 2 μL, 上、下游引物 (表 1) (10 μM) 各 0.4 μL, 2 × SYBR^(R) Premix Ex TaqTM 10 μL, 50 × ROX 对照染料 II 0.5 μL, 加去离子水 6.7 μL 至总体积 20 μL。每个样本进行 3 次重复,使用 light cycler ABI Prism 7500 SDS (Applied Biosystems, USA) 荧光定量 PCR 仪进行两步 PCR, PCR 反应条件: 95℃ 10 s; 40 个循环: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min。PCR 反应后温度从 60 ℃ 上升到 95 ℃ 绘制融解曲线以判断扩增产物的正确性,是否存在引物二聚体。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Fluorescent real-time PCR primers

EST 登陆号 EST Accession number	扩增片段大小 Amplicon size	引物序列 5'→3' Oligonucleotide sequence 5'→3'
GBP (DQ112540)	(194bp)	F: TTTGTGAAGGAGAGTAGGGAGGAG R: TTAGTAGAGGCCATACCAAGAGCA
RAV (DQ147914)	(134bp)	F: TATAGACTGCAAGCGGAGGAGTGG R: CGGCTACGGCTAGTTTCAAAAGGT
Transcription factor-related (DR010177)	(146bp)	F: TAGGGATAGAAAGAAGGGGTGGC R: TGATGGACTTGACAAATGGGGAG
Zinc finger protein (DW177091)	(191bp)	F: CTCCAACAGTGGTAGAAGAAGCAA R: AGGGAAGGAAGCTCAAAGAAGAAGA
Light receptor (DY544162)	(101bp)	F: ATGCTAGTGACGCCTTCTTGAAAT R: ACTCGAGGTATCGGTATCTGTTCC
NAC (DW585104)	(180bp)	F: CACGGTAGCACGAGACTCAAGG R: ATCGTCGTCGTCATCATCACATA
Actin4 (AF049106)	(214bp)	F: GTGTCAGCCATACTGTCCCCATTT R: GTTTCAGCTCTTGCTCGTAATCA

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的质量和消减杂交结果

大豆总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测, 18S 和 28S RNA 带型清晰可辨 (如图 1 所示), 紫外分光光度计检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.9 ~ 2.0 之间, 说明 RNA 完整性好、纯度高。

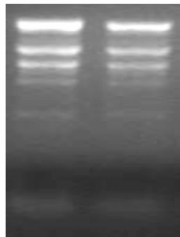
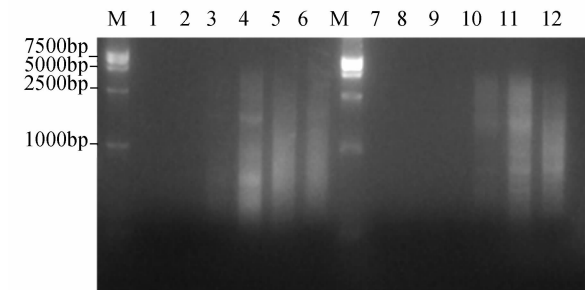


图 1 大豆叶片总 RNA 的提取
Fig. 1 Total RNA extraction from soybean leaves

2.2 SMART 技术合成 cDNA



M 为 DL15000 分子量标准;1-6 为大豆 Tester cDNA 在 15, 18,21,24,27,30 个循环时的扩增结果;7~12 为大豆 Driver cDNA 在 15, 18, 21, 24, 27, 30 个循环时的扩增结果 M: DL15000 DNA ladder; 1~6: The cDNA amplification of Tester at 15, 18, 21, 24 27 and 30 cycles; the cDNA amplification of Driver at 15, 18, 21, 24 27 and 30 cycles

图2 Tester 和 Driver 的 cDNA PCR 扩增结果

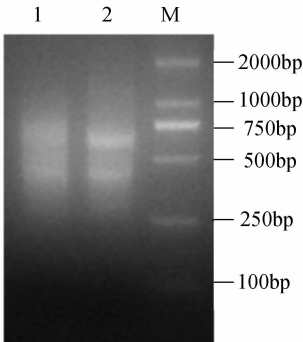
Fig.2 The results of cDNA PCR synthesis of tester and driver

对于本实验 Tester 在第 27 个循环时已显示出过量扩增,故采用 23 个循环对 cDNA 扩增; Driver 在第 30 个循环时已显示出过量扩增,故采用 26 个循环对 cDNA 扩增(图 2)。

2.3 消减杂交后两次 PCR 扩增的结果分析

经过两次杂交和两次 PCR 的过程,得到长度在

250bp~2000bp 左右的均匀 smear 状 DNA 片段,平均大小约在 500~700bp 左右(图 3)。



M:DL2000 DNA 分子量标准;1:正向差减产物第一次 PCR 产物;2:正向差减产物第二次 PCR 产物

M: DL2000 DNA Marker; 1:forward subtraction first PCR products;2:forward subtraction secondary PCR products

图3 正向差减产物的扩增结果

Fig. 3 The first and secondary PCR products of forward subtraction

2.4 PCR 扩增差减片段文库的插入片段

经 SSH 差减之后富集得到的 cDNA 片段,转化 E. coli DH5α,经过蓝白斑筛选,随机挑取 738 个克隆,PCR 扩增证实大多数克隆的插入片段长度在 400~700bp 之间,插入片段长度平均约在 500bp 左右(图 4)。



M:DL2000 DNA 分子量标准;1-20 为差减文库的插入片段

M: DL2000 DNA Marker;1-20:Inserts of the library

图4 差减文库中克隆的插入片段大小检测

Fig.4 Screening of the inserts in clones of subtractive library

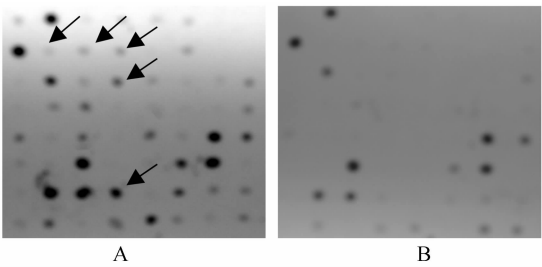
2.5 反向 Northern 斑点杂交筛选结果

对 PCR 扩增得到的插入片段进行反向 Northern 斑点杂交,选取与短日照材料 cDNAs 探针杂交信号

强于与对照材料的 cDNAs 探针至少 3 倍以上的克隆为阳性克隆,共得 148 个具有明显差异的片段,占克隆总数的 20%。图 5 为两张拷贝膜分别与短日

照材料的 cDNAs 和对照材料的 cDNAs 为探针的杂交结果筛选结果,箭头所示为差异表达克隆。

A 和 B 分别为短日照处理和未处理总 cDNA 为探针杂交的结果



A 和 B 分别为短日照处理和未处理总 cDNA 为探针杂交的结果
A: cDNAs from the short day treated plants; B cDNAs from the control plants
图 5 分别利用短日照处理和未处理的总 cDNA 为探针进行差异表达克隆的反向 Northern 杂交筛选

Fig. 5 Reverse northern dot blot screening of the short day treated SSH clones. Two duplicated membranes hybridized with the probes

2.6 EST 测序与同源性检索结果

将杂交信号具有明显差异片段所对应的克隆送至测序,获得代表不同基因的非重复序列 ESTs 76 条,经 GenBank nr(非冗余核酸数据库)Blastn 和 Blastx 检索结果显示,正向文库有 43 个片段能够找到与之同源性高的已知基因,其中 7 个功能未确定。33 个 ESTs 片段的功能无法推测(Genbank EH183310 至 EH183340, EH183416 和 DR007285),其中大多数与水杨酸或水压诱导的大豆 ESTs 相似。

2.7 基因功能分析

功能分析表明这些大豆 ESTs 参与合成和分解代谢以及发育的调控。在其他种属中已有许多报道,同系物参与暗诱导引起的衰老或光周期反应。调节类蛋白占总数的 15%,包括转录、信号转导和细胞凋亡;压力反应也占总数的较大一部分 9% 包括解毒和防卫反应,它们与 GenBank 已知基因的同源性比较得到的有关功能信息见表 2;其它还包括参与大分子降解的酶类如蛋白和核酸的降解、细胞壁修饰的合成代谢、糖和脂合成的初级代谢以及次级代谢。

2.8 候选 cDNA 片段差异表达检测分析结果

从已测序的 76 个克隆中选取 6 个转录因子 ESTs 片段,定量 PCR 验证反向 Northern 筛选阳性的片段,表 1 结果表明这 6 个推测编码调节类蛋白的 ESTs 在短日

照条件下与长日照条件相比表达呈 4 – 9 倍的上调,均为阳性的差异表达片断(如图 6 所示)。

表 2 部分短日诱导 ESTs 与 GenBank 已知基因同源性比较结果

Table 2 The partial results of ESTs induced by short days similarity analysis from comparing with the function identified genes in GenBank			
克隆分类 Clone class	推测功能 Potential function	Genbank 登录号 Genbank accession number	克隆功能 Putative function of clone
调节类	转录	DQ112540	GAMYB – binding protein
		DQ147914	DNA binding protein RAV
		DR010177	Transcription factor – related (enhancer of polycomb – like protein)
		DW177091	Putative zinc finger protein
		DW585104	NAC domain protein NAC2 (NAC2)
信号转导		DY544162	Light receptor (Putative blue receptor phototropin or PHY3)
		DY544165	Mitogen – activated protein kinase kinase (MAPKK)
		DR007280	Protein kinase
		DW585119	Protein phosphatase type 2C (PP2C) protein
		DW585107	SARI (SYNAPTOBREVIN – RELATED PROTEIN 1)
细胞凋亡	解毒	DW585115	Putative pirin – like protein
		DR007287	Glutathione peroxidase 1 (GSHPX)
		DR007286	Putative gamma – glutamyltransferase (γ – GT)
		DY544163	4 – Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD)
		DY544170	Homogentisate phytylprenyltransferase (Hpt1)
防卫反应		DW585111	NADH dehydrogenase
		DW585113	Catalase
		DY544167	MLO protein homolog 1

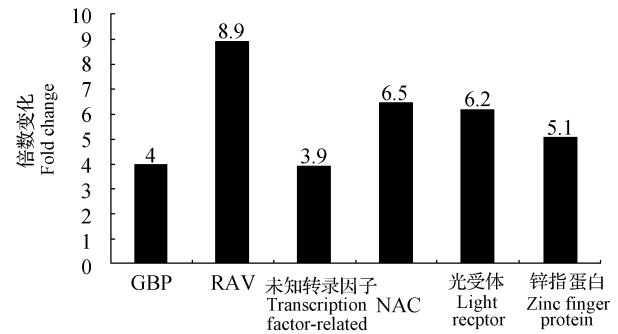


图 6 实时定量 RT – PCR 验证 6 个推测编码调节类蛋白的 ESTs 在短日照条件下表达上调
Fig. 6 Verification of changes in mRNA abundances among six ESTs predicted to encode regulatory proteins in SD versus LD leaves with real time RT – PCR

3 讨论

植物感受光的器官是叶片,并通过信号传导影响生殖生长,必然牵涉叶片中很多基因的互作。所以本试验应用抑制性消减杂交(SSH)技术,首次构建了暗诱导大豆叶片的差异表达的 cDNA 消减文库,在此基础上发现了 76 个与暗诱导相关的差异表达基因,揭示了有关参与机体暗适应下蛋白质的上调表达的信息,为进一步分离暗处理产生差异表达基因奠定了基础。通过比较分析,暗诱导的差异表达基因可分为 10 类:调节、大分子降解、光合成、代谢、压力反应、运输、蛋白合成、细胞壁修饰、未知功能和未进行分类的 ESTs。

调节类蛋白中转录因子大豆 GAMYB-binding protein 与大麦的 HvGBP 高度同源,可能类似于大麦的 HvGBP 通过与 HvGAMYB 蛋白结合参与 GA 信号转导途径^[4];GmRAV 含有 AP2/ERF 和 B3 结构域,AP2/EREBP 家族参与植物生长和发育(包括花发育、激素信号转导和细胞分化)以及生物和非生物压力反应^[5]。因此推测被短日照强烈诱导表达的 GmRAV 在光周期控制大豆开花中起着重要的作用。GmNAC 在短日下上调 6.5 倍,与大豆 NAC2 mRNA 3' 端有 99% 的同源性,NAC 在芽端和花分生组织发育、叶子衰老以及生物和非生物压力反应等方面起着重要的作用^[6]。

细胞凋亡(PCD)参与许多调节途径,最终选择性的移除对生物体非必要的或有害的细胞。信号转导因子 Pirin 参与细胞凋亡(PCD)的衰老过程,在西红柿衰老后期阶段的叶片中,Le-pirin mRNA 丰度也最高^[7]。调节蛋白和调节酶的磷酸化和去磷酸化能将细胞外短日环境信号传递到细胞内部,蛋白激酶和蛋白磷酸化酶催化可逆蛋白的磷酸化从而调节许多生物过程。激酶-信号级联途径中分裂原激活蛋白激酶激酶(MAPKK)参与蛋白磷酸化的修饰;蛋白磷酸化酶 2C (PP2C)是真核不同信号转导过程中的调节剂,通过信号转导介导植物抵抗环境压力反应。

由于暗诱导会引起植物细胞内反应性氧化物水平(reactive oxidant species ROS)升高,从而引起细胞基因损伤和/或诱导细胞凋亡。介导压力反应的解毒和防卫基因的表达水平在暗诱导衰老过程中上起到抵抗氧化压力和防止衰老的至关重要的保护作用,使细胞免于过早死亡。抗氧化剂 GSHPX, γ -GT, Hpt1, HPDD, NADH 脱氢酶和过氧化氢酶在衰

老中起到解毒的作用^[8,9]。MLO 蛋白具有防卫功能受枯萎、创伤、除草剂和叶片衰老的诱导,保护细胞防止死亡^[10]。

综上所述,试验获得的短日诱导特异表达或优势表达的 cDNAs,主要是与发育调控、信号传导、细胞凋亡防卫等有关的 cDNAs,涉及具有保守结构域的调控因子、受体蛋白激酶、抗氧化酶类以及某些未知确切功能的一系列新基因,为进一步揭示暗诱导促进开花和衰老的分子机制以及代谢调控的关系提供了重要有益信息。

参 考 文 献

- [1] Garner WW, Allard HA. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants [J]. Journal of Agricultural Research, 1920, 18: 553-606.
- [2] Ma H. To be or not to be, a flower-control of floral meristem identity [J]. Trends in genetics, 1998, 14: 26-32.
- [3] Njiti VN, Lightfoot DA. Genetic analysis infers *Dt* loci underlie resistance to SDS caused by fusarium virguliforme in indeterminate soybeans [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2006, 41: 83-89.
- [4] Fiona JW, Frank G, Barry JP et al. A Mak-like kinase is a repressor of GAMYB in barley aleurone [J]. The Plant Journal, 2003, 33: 707-717.
- [5] Staci N-W, Beth AK. DNA binding properties of the Arabidopsis floral development protein AINTEGUMENTA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28: 4076-4082.
- [6] Sang-Keun O, Sanghyeob L, Seung HY et al. Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens [J]. Planta, 2005, 222: 876-87.
- [7] Orzaez D, de Jong AJ, Woltering EJA. A tomato homologue of the human protein PIRIN is induced during programmed cell death [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 46: 459-468.
- [8] Woo HR, Kim JH, Nam HG et al. The delayed leaf senescence mutants of Arabidopsis, ore1, ore3, and ore9 are tolerant to oxidative stress [J]. Plant Cell Physiology, 2004, 45: 923-932.
- [9] Vicky B-W, Tania P, Elizabeth H, et al. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis [J]. The Plant Journal, 2005, 42: 567-585.
- [10] Pietro P, Zhou F, Casais C, et al. The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli [J]. Plant Physiology, 2002, 129: 1076-1085.