

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00776

元江普通野生稻叶片 cDNA 文库的构建及部分基因片段分析

史冬燕^{1,2}, 杨明挚¹, 黄兴奇³, 陈善娜¹, 程在全³

1. 云南大学生命科学学院, 昆明 650091;
2. 山东菏泽学院生物系, 菏泽 274015;
3. 云南省农科院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650203

摘要: 首次利用 SMARTTM 技术构建了中国普通野生稻中最原始类型——元江普通野生稻生长旺盛时期叶片的 cDNA 文库。该 cDNA 文库未扩增和扩增后的滴度分别为 1.1×10^6 pfu/mL 和 3.98×10^7 pfu/mL, 重组率为 91%, 插入片段大小为 500~2 000 bp。测定的部分 cDNA 序列进行 BLAST 比较, 发现这些 cDNA 片段与日本晴栽培稻同源性很高, 达到 98% 以上。本研究为进一步分析这些 cDNA 片段的结构、功能和探讨元江普通野生稻在栽培稻演化中的地位奠定了基础。

关键词: cDNA 文库; 元江普通野生稻; 滴度

Construction and analysis of cDNA library of Yunnan Yuanjiang *O. rufupogon* leaf

SHI Dong-Yan^{1,2}, YANG Ming-Zhi¹, HUANG Xing-Qi³, CHEN Shan-Na¹, CHENG Zai-Quan³

1. School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China;
2. Biology Department of Heze College, Heze, Shansong Province 274015, China;
3. Biotechnology & Genetic Germplasm Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650203, China

Abstract: The cDNA library of Yuanjiang *Oryza rufupogon* leaf was constructed by using SMARTTM technology. The titers of the non-amplified library and the amplified library were 1.1×10^6 pfu/mL and 3.98×10^7 pfu/mL, respectively. The recombination rate was more than 91%. The DNA sequence length of the most cDNAs in the library was between 500–2 000 bp. Some cDNAs chosen by random were sequenced. After BLAST analysis of some cDNAs, their possible function were predicted. It is found that these cDNAs show 98% similarity to *Oryza sativa japonica* in the NCBI database. These provided a base for further study on the structure and function of these cDNAs and evolutionary process of Yuanjiang *Oryza rufupogon*.

Keywords: cDNA library; Yuanjiang *Oryza rufupogon*; titer

收稿日期: 2007-11-22; 修回日期: 2007-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30460019), 云南省重点基金项目(编号: 2004C0010Z)和云南省科技攻关项目(编号: 2006NG34)资助
[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30460019) and the Major Project of the Science Foundation of Yunnan Province (No.2004C0010Z), and the Science and Technology Project of Yunnan Province(No.2006NG34)]

作者简介: 史冬燕(1973-), 女, 硕士, 专业方向: 植物生理及分子生物学。E-mail: sdy88.com@eyou.com

杨明挚(1971-), 男, 博士, 研究方向: 植物生理及分子生物学。E-mail: mzh-yang99@163.com

史冬燕、杨明挚为并列第一作者

通讯作者: 程在全(1964-), 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 分子生物学。Tel: 0871-5140200; E-mail: czquan-99@163.Com

云南有 3 种不同的野生稻:普通野生稻(*Oryza rufipongon* Griff)、药用野生稻(*Oryza officinalis* Wall) 和疣粒野生稻(*Oryza meyeriana* Ball)^[1], 遗传多样性非常丰富, 是世界公认的亚洲栽培稻的演化及多样性分布中心之一, 有部分专家还认为云南是栽培水稻的起源中心之一^[2]。由于野生稻生长的环境相对恶劣, 在长期的进化过程中形成了许多栽培稻所未有的优异性状。目前已发现野生稻中有许多抗病、抗虫、抗低温、耐干旱、耐贫瘠等抗逆优良性状, 其中许多性状都是由主效基因控制; 还发现普通野生稻具有品质优良的性状如直链淀粉含量偏低和种子蛋白质含量特别高, 以及其他农艺性状如穗大粒多、植株茎秆粗壮、细胞质雄性不育, 广亲和性等^[3]。这些优异性状部分已应用于栽培稻育种中, 对提高栽培稻的产量和质量发挥了巨大的作用。

云南元江普通野生稻(Yuanjiang *Oryza. rufipongon*)是我国迄今发现分布海拔最高(750 m)的普通野生稻, 因气候生态环境独特, 其生境周围均无栽培稻种植, 被认为是原始性最好的普通野生稻, 因此在中国栽培稻的演化研究中具有重要的地位^[4]。元江普通野生稻从形态特征等方面除了具有上述其他野生稻的一些重要优良性状外, 还具有其他一些重要性状, 如:生长快, 积累生物学产量能力强, 预示着可能具有高产方面的基因; 可能还具有非常耐寒冷的基因。但是目前对元江普通野生稻的深入研究较少, 尤其是基因分析方面。为了今后更好地分离克隆、利用元江普通野生稻的有利基因或分子辅助选育, 本文采用美国 Clontech 公司的 SMARTTM 技术构建其生长旺盛期叶片 cDNA 文库, 随机挑选部分 cDNA 进行序列测定, 通过 BLAST 比较和一些生物信息学软件对这些 cDNA 基因片段的可能功能进行了预测分析。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

2007 年 6 月取原生境下生长旺盛期的元江普通野生稻幼嫩叶片, 液氮迅速冷却后, 置于 -70℃ 冰箱保存待用。

cDNA 文库构建试剂盒、宿主菌、载体均购自 Clontech 公司; mRNA 纯化试剂购自 Pharmacia 公

司; 包装蛋白购自 Epicentre Technologies 公司; 上海华舜生物工程公司的质粒快速抽提试剂盒; 其他试剂购均为国产或进口的分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

采用异硫氰酸胍法提取总 RNA^[5]。1% 的琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 完整性, 用紫外分光光度计测量 230 nm、260 nm 及 280 nm 处的 OD 值, 检测 RNA 的含量和纯度。

mRNA 的纯化按上海华舜生物工程公司的“mRNA Isolation System I”试剂盒操作, 经 1% 甲醛琼脂糖变性凝胶电泳检测分布情况。

1.2.2 LD-PCR 法合成双链 cDNA

按 Clontech 的 SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒的使用手册进行。取 1 μL mRNA (1.0 μg); 1 μL SMART IV Oligo nucleotide; 1 μL CDS III/3'-PCR Primer 及 dNTPs。在逆转录酶作用下合成第一链。在上述 cDNA 的基础上分别加入 70 μL 去离子 H₂O; 10 μL PCR 缓冲液; 2 μL 50×dNTPs; 2 μL 5' PCR 引物(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'); 2 μL CDS III/3' PCR 引物(5'-ATTCTAGAGGC-CGAGGCGGCCGACATG-d(T)₃₀N-1N-3); 2 μL 50× Advantage2 聚合酶混合液, 在 PCR 仪 (GeneAmp2400) 预热至 95℃ 后, 按下列程序进行扩增: 72℃ 10 min, 95℃ 20 s, 3 个循环; 后 95℃ 5 s, 68℃ 8 min。取 5 μL 的 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 观测双链 cDNA 的分布状况。依据使用说明用蛋白酶 K 消化双链 cDNA 中的蛋白质。

1.2.3 cDNA *sfi* I 粘性末端制备及纯化

取 79 μL cDNA, 加入 10 μL *Sfi* I 限制性内切酶, 10 μL 10×*Sfi* I 缓冲液和 100×BSA, 于 50℃ 保温 2 h, 使双链 cDNA 产生粘性末端。将上述 cDNA 经过 CHROMA SPIN-400 凝胶柱层析纯化, 收集大于 400 bp 的 cDNA 片段, 将液体混合置 -20℃ 备用。

1.2.4 连接、包装和原始 cDNA 文库构建

按照试剂盒要求分别取 0.5、1.0、1.5 μL cDNA 与 1.0 μL 载体混合, 于 16℃ 过夜进行 3 个连接反应。将上述 3 种连接产物用 EPICENTRE 公司的 MaxPlaxTM Lambda Packaging Extracts 包装蛋白于 30℃ 下进行 3 h 包装。然后加入 500 μL 噬菌体稀释

和 25 μL 氯仿, 混匀, 离心分层, 获得原始文库。

1.2.5 文库的滴度及重组率测定

用稀释缓冲液以 10 倍、100 倍和 1 000 倍稀释文库, 分别取 1 μL 上述稀释物, 各加入 200 μL XL1-Blue 过夜培养物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 15 min, 混于 2~3 mL, 45 $^{\circ}\text{C}$ 上层琼脂, 倒 LB 固体平板, 冷却, 倒置平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。数噬菌斑数目, 计算文库的滴度。Pfu/mL=(噬菌斑数 \times 稀释倍数 $\times 10^3$)/铺板稀释噬菌体体积。

重组率计算操作步骤同文库滴度测定, 只是在上层琼脂中加入 50 μL X-gal(10 mmol/L)和 50 μL IPTG(10 mmol/L), 根据蓝白斑计算重组率。

1.2.6 文库中插入片段的大小检测

以扩增的 cDNA 文库为模板, 用试剂盒中的 5'-PCR 引物和 3'-PCR 引物及 50 \times Advantage2 聚合酶进行 PCR 扩增(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 20 个循环), 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 序列获得及测序

挑取 BM25.8 单菌接种于 10 mL LB 液体培养基中, 31 $^{\circ}\text{C}$ 下 150 r/min 振荡过夜培养, 至 OD_{600} 达 1.1~1.5, 加 100 μL 1 mol/L MgCl_2 使终浓度达 10 mmol/L; 从扩增文库的平板上挑取单个噬菌斑, 接入到 350 μL 的 1 \times λ 稀释缓冲液中, 充分混合, 在 1.5 mL 的干净离心管中加入 150 μL 噬菌体液和 200 μL 菌液混匀, 31 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 30~40 min。加 400 μL LB 培养液, 31 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 振荡培养 1 h。取 5 μL 涂于 LB/羧苄青霉素平板上, 置于 31 $^{\circ}\text{C}$ 下温育得到单菌落, 用质粒快速抽提试剂盒提取质粒 DNA, 进行序列测定^[6]。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取和 mRNA 纯化结果分析

所提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖电泳检测, 含有明显的 28 S 和 18 S 条带, 说明总 RNA 提取较好, 降解少, 分子完整。紫外检测 OD_{260}/OD_{280} 的比值为 1.8828, 含量为 6 mg/mL。表明所提取的 RNA 纯度高, 符合建库要求。从总 RNA 中纯化出 mRNA 后经 1% 琼脂糖电泳检测(图 1), 分布在 20 bp~100 kb 的范围内。

2.2 LD-PCR 产物

经 LD-PCR 合成的双链 cDNA, 取 5 μL 产物进

行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 双链 cDNA 主要分布在 500~4 000 bp 之间, 呈弥散状条带, 其中 900 bp 处有高丰度的亮带(图 2), 说明合成的双链 DNA 符合建库要求。

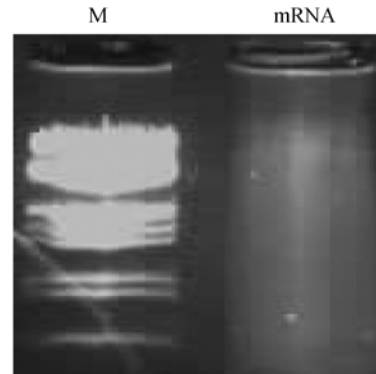


图 1 纯化的元江普通野生稻叶片 mRNA

M: λ DNA/Hind marker。

Fig. 1 The purified mRNA of leaf of Yuanjiang *O. rufipogon*

M: λ DNA/Hind marker.

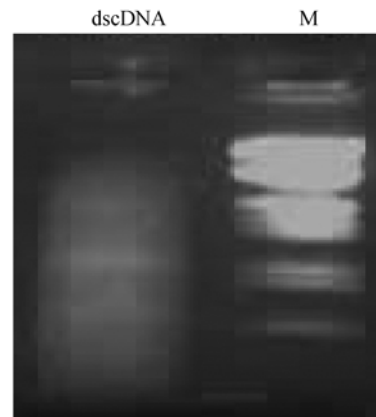


图 2 元江普通野生稻 mRNA 逆转录后合成的双链 cDNA

M: λ DNA/Hind marker。

Fig. 2 The double strand cDNA synthesis from mRNA of Yuanjiang *O. rufipogon*

M: λ DNA/Hind marker.

2.3 文库的构建及鉴定

双链 cDNA 经连接包装后, 测得的原始文库滴度为 1.10×10^6 pfu/mL; 扩增后的 cDNA 文库滴度为 3.98×10^7 pfu/mL, 重组率为 91%, 文库滴度符合文库保存和筛选实验的要求。通过 PCR 法快速检测, 扩增后文库中插入片段大小主要分布在 400~2 000 bp 之间, 也有大于 2 000 bp 的插入片段存在(图 3)。

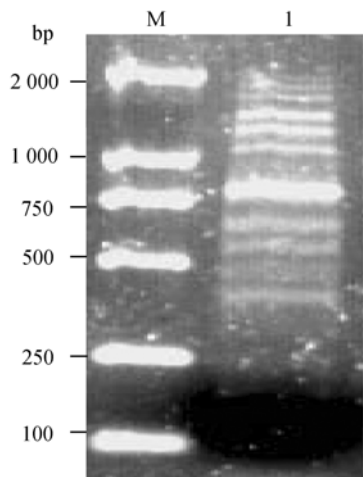


图 3 元江普通野生稻 cDNA 文库中插入片段大小 PCR 快速检测

Fig.3 Rapid testing of recombination fragments size by PCR of Yuanjiang *O. rufupongon* cDNA library

M: DL2000 marker.

2.4 文库中基因的 cDNA 序列分析

在测定的 115 个cDNA中, 排除b冗余重复序列, 一共有 90 个有效基因的cDNA序列。分别与基因组数据库(NCBI)进行比较, 发现多数cDNA序列与栽培稻(*O. sativa japonica*)中参与光合作用、能量代谢、氨基酸合成和抗逆等过程有关的基因高度同源(表 1)。如 : 光系统 10 kDa蛋白和 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶是光合作用中的重要组分; 核酮糖-5-磷酸-3-差向异构酶和丙糖磷酸异构酶在碳水化合物代谢中担负重要角色; 参与氨基酸合成中的GTP连接蛋白typA; 参与脂肪酸 氧化的烯酰COA水合酶; 另有硫氧还蛋白还原酶, 是一种与NADPH电子传递功能相关的黄素蛋白, 其主要功能是还原小分子蛋白质硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)^[7,8]。元江普通野生稻的这些cDNA片段具体的结构和功能还待进一步预测探究。

表 1 所得材料的部分 cDNA 片段与栽培稻之间序列比较

Table1 The comparision of sequence between some cDNA fragments ofma and *Oryza sativa*

cDNA 片段编号*	功 能	比 值	相同性
Number of accession	Function	Score(bits)	Identities
R3	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	1 245	631/632(99%)
R184	光系统 10 kDa 蛋白 Photosystem II 10 kDa protein	983	496/496(100%)
R51	NADPH-硫氧还蛋白还原酶 NADPH-thioredoxin reductase	1 197	627/632(99%)
R62	锌指 POZ 域蛋白 inc finger POZ domain protein	835	428/429(99%)
R79	丙糖磷酸异构酶 Triosephosphate isomerase	797	417/422(98%)
R101	核酮糖-5-磷酸-3-差向异构酶 Ribulose-5-phosphate- 3-epimerase	993	501/501(100%)
R85	GTP 连接蛋白 typA GTP-binding protein typA	1 057	539/541(99%)
R87	叶绿素合成酶 Chlorophyll synthase	928	468/468(100%)
R106	组蛋白乙酰转移酶 Histone acetyltransferase	938	473/473(100%)
R108	烯酰 COA 水合酶 Enoyl-COA-hydratase	967	494/496(99%)
R144	褐飞虱诱导的抵御蛋白 1(Bi1) Brown planthopper-induced resistance protein 1	1 055	541/544(99%)
R177	丙氨酸转氨酶 Alanine aminotransferase	684	345/345(100%)

*: 为实验中材料样本标号。

*: Material samples in this experiment.

3 讨 论

云南元江野生稻由于具有较好的原始性和一些优良性状,是研究水稻进化及抗逆基因分离的极好研究材料,对其基因资源的保护是进一步研究和利用的重要基础。最近的调查显示元江县的普通野生稻日渐萎缩,濒临灭绝,而构建cDNA文库是研究、保存和分离功能基因的良好手段^[9]。本文构建的元江普通野生稻 cDNA 文库,是在分子水平上对此重要资源的一项保护措施。文库构建中使用了 Clontech 公司的一项新技术 SMARTM,即只有完整的 mRNA 链才能够转变为双链 cDNA,因此保证了文库中的插入片段均为完整的基因序列,避免需要同时筛选多个克隆,同时测序后,再依据序列拼接才可能获得一个完整的基因。此文库经检测属于较高质量的 cDNA 文库,这为进一步研究元江普通野生稻的功能基因提供了有利条件。

对所得 cDNA 序列的功能预测结果表明,此 cDNA 文库中包含了参与植物生理过程的许多重要功能基因,尤其是抗逆和光合作用方面的基因(因为元江普通野生稻的抗逆和高光合作用特性是非常突出的),如在二氧化碳的羧化阶段中起关键作用的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶;在光合作用过程中被证实对电子传递起重要作用的硫氧还蛋白还原酶;还有与抗逆性方面有关的锌指 POZ 域蛋白和褐飞虱诱导的抵御蛋白 1(Bi1),这些 cDNA 序列更具有深入研究的价值和发掘,以便用于改良栽培稻。因此本研究的发现对今后揭示元江普通野生稻一些重要功能基因的分子机制,具有重要作用。

参考文献(References):

- [1] National Exploring Group of Wild Rices. Investigation of resource of wild rice in China. *Acta Agric Sin*, 1984, 6: 3-10.
全国野生稻资源考察协作组. 全国野生稻资源的普查与考察. *中国农业科学*, 1984, (6): 3-10.
- [2] CHENG Zai-Quan, HUANG Xing-Qi, QIAN Jun, ZHANG Yi-Zheng, WU Cheng-Jun, WANG Dan-Qing, TANG Zhi-Min, WANG Ling-Xian, ZHOU Ying. Characteristics and discovery of the newly found natural live material of *Oryza officinalis* at edge of extinction in Yunnan. *Acta Botanica Yunnanica*, 2004, 26(3): 267-274.
程在全, 黄兴奇, 钱君, 张义正, 吴成军, 王丹青, 唐志敏, 王玲仙, 周英. 珍稀濒危植物——云南药用野生稻自然生态群的新发现及其特性. *云南植物研究*, 2004, 26(3): 267-274
- [3] PANG Han-Hua. Main features and use of germplasm resources in *O. rufipogon*. *Seed*, 1998, 95(3): 31-32.
庞汉华. 普通野生稻优异种质资源主要特点与利用展望. *种子*, 1998, 95(3): 31-32.
- [4] YUAN Ping-Rong, LU Yi-Xuan, HUANG Xi-Wei. Study on the differentiation of *O. rufipogon* of YuanJiang in YUNNAN. *Journal of Beijing Agricultural University*, 1995, 21(2): 133-137.
袁平荣, 卢义宣, 黄西威. 云南元江普通野生稻分化的研究. *北京农业大学学报*, 1995, 21(2): 133-137.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯(金冬雁, 黎孟枫译). *分子克隆实验指南*(第二版). 北京: 科学出版社, 1989.
- [6] ZHANG Yang, ZHANG Liang, ZHAO Qiong. An Introduction to Bioinformatics. Beijing: Higher Education Press, 2001, 87-177.
钟扬, 张亮, 赵琼. *简明生物信息学*. 北京: 高等教育出版社, 2001, 87-177.
- [7] Schürmann P, Jacquot JP. Plant thioredoxin systems revisited. *Annu Plant Mol Biol*, 2000, (51): 371-400.
- [8] ZHENG Qiong, MA Xu-Jun, YANG Chuan-Ping. Functional roles of thioredoxin (Trx). *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4 (6): 78-82.
郑琼, 马旭俊, 杨传平. 硫氧还蛋白(Trx)的研究进展. *分子植物育种*, 2006, 4 (6): 78-82.
- [9] YAN Hui-Jun, HUANG Xing-Qi, CHENG Zai-Quan. Advances of the studies on construction strategy and analysis of cDNA library. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2006, 21(1): 1-6.
晏慧君, 黄兴奇, 程在全. cDNA文库构建策略及其分析研究进展. *云南农业大学学报*, 2006, 21(1): 1-6.