

受褐飞虱取食的水稻幼苗的抑制消减 cDNA 文库的构建及筛选

何青¹, 袁红雨^{1,2*}

(1. 武汉大学生命科学学院植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北武汉
430072; 2. 信阳师范学院生物系, 河南信阳 464000)

摘要: 采用抑制消减杂交方法, 以褐飞虱取食 32 h 的水稻幼苗及未受褐飞虱取食的水稻幼苗为作为对比材料构建了消减 cDNA 文库, 以分离水稻幼苗中褐飞虱应答基因。随机从消减 cDNA 文库中挑选 16 个白色菌落提取质粒, 进行 PCR 扩增, 发现插入片段的长度位于 100~900bp 之间。以在受褐飞虱取食的水稻幼苗中特异表达的基因(BpHi008A)为探针, 通过斑点印迹分析发现在抑制消减后的 cDNA 池中, 目的基因得到有效富集。利用反向总 RNA 斑点印迹分析和 Northern 杂交验证, 从消减 cDNA 文库中筛选到了 25 个基因受褐飞虱取食的诱导。其中有 17 个克隆与编码已知功能蛋白的基因有显著的同源性, 它们分别参与蛋白质的折叠与降解、蛋白质与蛋白质的相互作用及信号传递、脂类代谢、胁迫反应、物质运输和细胞生长等。总体上, 参与胁迫反应和衰老的基因在褐飞虱取食后表达增强。

关键词: 抑制消减杂交; 褐飞虱; 水稻

中图分类号: Q523 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)03-0237-04

The construction and screening of suppression subtractive cDNA library of rice seedlings exposed to BPH

HE Qing¹, YUAN Hong-yu^{1,2*}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Department of Biology, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

Abstract: Suppression subtractive cDNA library was constructed by using rice seedlings exposed to BPH for 32 h and control plants as materials. Sixteen white bacterial colonies were randomly picked up from subtracted cDNA library, and analyzed by PCR method. The result showed they contained 100~900 bp inserts. To analyze the efficiency of subtraction, dot blot was conducted by using BpHi008A as probe, which was expressed only in BPH-infested rice seedlings. The result demonstrated that the differential expression genes were enriched in subtracted cDNA pool. 25 BPH-responsive genes in rice were isolated from the library by reverse total RNA dot blot analysis and confirmed by Northern blot analysis. Sequence similarity searches allowed putative functions to be assigned to 17 transcripts. These genes were placed into several functional categories including cell growth photosynthesis, macromolecule degradation, signaling, and a group responding to stress or invasion of pathogens. Overall, transcripts involved in senescence and stress in plants were induced.

收稿日期: 2004-06-22 修订日期: 2004-09-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170085)

作者简介: 何青(1983-), 湖北武汉市人, 研究方向为植物分子生物学。* 通讯作者, 博士, 副教授, 主要从事植物遗传学研究。
E-mail: hongyu-yuan@263.net

Key words: suppression subtractive hybridization; brown planthopper; rice

植物在进化过程中形成了组成型和诱导型两种防卫机制来抵御植食性抗虫的为害。植物诱导型抗性是指植物体在遭受昆虫进攻后表现出来的一种抗虫特性,又分为直接防卫和间接防卫两种形式。植物体在受到昆虫为害后产生的任何干扰昆虫的取食行为,提高植物在环境中的适合度的性状都是直接防卫系统的组成部分。间接防卫是指植物体被昆虫取食后产生的某些挥发性物质引诱昆虫天敌,从而达到抵御植食性昆虫的目的。诱导抗性的产生需要复杂的信号传递。植食性昆虫取食时所产生的引发子激活植物体中的信号传递途径产生诱导型抗性(Reymond等,2000)。

被昆虫取食时,植物产生的诱导型防卫反应与昆虫的取食方式密切相关。咀嚼式口器昆虫在取食时对植物组织产生严重伤害,因此会激活植物体内的伤信号途径(Kessler等,2002)。刺吸式口器昆虫用口针吸收植物韧皮部汁液,对组织产生的伤害较轻。植物体对这两种口器昆虫产生的诱导抗性有明显的区别(Walling,2000)。在植物-咀嚼式口器昆虫相互作用中,植二烯酸(OPDA)、茉莉酸(JA)及其甲酯(MeJA)等 octadecanoid 类信号物质发挥重要作用(Reymond等,1998)。张富铁等人(2004)通过 cDNA 微阵列分析发现,褐飞虱取食引发的水稻植株的防卫反应为 JA-非依赖型反应。

褐飞虱(brown planthopper, BPH)是水稻的主要害虫,是典型的吸收植株维管束韧皮部汁液的昆虫。褐飞虱取食会严重干扰水稻的正常生理活动,降低光合作用速率,干扰光合产物的分配(Watanabe等,2000)。水稻受褐飞虱为害后,其组织中的化学成分也会发生改变,叶绿素、可溶性蛋白的含量降低,游离的氨基酸含量升高(Rubia-Sanchez等,1999)。对褐飞虱取食敏感的水稻品系,褐飞虱的大量取食会导致植株枯萎、死亡。

为了分析水稻幼苗对褐飞虱取食的分子反应,从而进一步了解植物对刺吸式口器昆虫的诱导型防卫反应,有必要分离水稻幼苗中的褐飞虱应答基因。抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)(Diatchenko等,1996)是新近发展起来的一种杂交技术,用于分离两个 mRNA 群体之间差异表达的基因。本研究利用抑制消减杂交方法以褐飞虱取食 32 h 的水稻幼苗和对照幼苗为对比材料

构建了差异表达的 cDNA 文库,并运用反向 RNA 斑点印迹对文库进行了筛选。

1 材料与方 法

1.1 材料

在直径为 10 cm 的塑料杯内均匀播种 20 粒水稻(*Oryza sativa* L.)明恢 63 的种子。当水稻幼苗长到两叶一心时,每一幼苗上接 10 头左右 2~3 龄褐飞虱若虫,并把杯子及幼苗用通风良好的网罩罩上。接虫 32 h 剪取水稻幼苗,并立即浸泡在液氮中,用于 RNA 的提取。

1.2 总 RNA 及 mRNA 的提取

总 RNA 及 mRNA 的分离提取按照 TRIzol RNA 提取试剂(Gibco BRL)及 MESSAGEMAKER Reagent Assembly 试剂盒(Gibco BRL)说明书进行。

1.3 SSH 实验

SSH 实验采用 Clontech PCR-Select cDNA subtraction kit。基本步骤如下:①分别提取对照群体(driver)和目标群体(tester)两种幼苗的 poly(A)+RNA,并反转录成 cDNA;②用 Rsa I 把两种 cDNA 平均切成 <500 bp 的片断;③把目标群体 cDNA 均分成 2 份,分别连上不同的接头,然后再分别与变性过量的对照群体 cDNA 杂交;④杂交后,将两份样本混合,再继续与变性的对照群体 cDNA 杂交;⑤经抑制 PCR 和巢式 PCR 扩增,再将扩增产物插入 pT-Adv 载体,转化大肠杆菌 TOP10F' 获得 SSH cDNA 文库;⑥通过蓝白斑实验从 SSH cDNA 文库中筛选出含有插入片断的克隆。

1.4 差示筛选 SSH cDNA 文库

从 SSH cDNA 文库中随机挑取 960 个重组子,分别编号,抽提质粒,点印于尼龙膜上,制备两套重复拷贝膜,取目标群体或对照群体总 RNA 约 1 μ g,采用逆转录系统,以 32P-dCTP 标记探针,分别用于杂交上述两套拷贝膜。

1.5 Northern 杂交分析

取 20 μ g 总 RNA 进行变性琼脂糖电泳,以 Primer-a-Gene 随机引物标记系统(Promega),用 32P-dCTP 标记 BpHd002A 作为探针进行 Northern 杂交。

1.6 cDNA 测序及 DNA 序列分析

采用自动法测序。用 BLAST 软件搜索数据库中的同源序列进行比较。

2 结果

2.1 消减 cDNA 文库的构建

2.1.1 水稻幼苗总 RNA 及 mRNA 的分离结果 高质量的 mRNA 是成功构建消减 cDNA 文库的先决条件。经 1.5% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析,提取的 mRNA 表现为 >0.5 Kb 慧尾状条带,主要带在 2.0 Kb 附近。mRNA 的 A260/A280 > 1.8,说明 mRNA 的质量达到了建库要求。

2.1.2 ds cDNA 的合成及酶切结果 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,cDNA 表现为 >0.5 Kb 的片状条带,酶切后的 cDNA 表现为平均大小在 0.1~2.0 Kb 之间的条带,水明 cDNA 酶切较完全。

2.1.3 两次抑制 PCR 对消减杂交产物的扩增结果

用接头序列的外侧引物对消减杂交产物进行扩增,27 个循环后见较淡的片状 PCR 产物,位于 0.7~1.5 Kb 之间。用接头内侧引物对第一轮 PCR 稀释产物进行扩增,12 个循环后,PCR 产物表现为片状,位于 0.2~1.5 Kb 之间,并存在一些隐约可见的条带。

2.1.4 消减 cDNA 文库的构建及鉴定结果 对于正向消减 cDNA 文库,取 1 mL 转化菌液涂布平板,大约有 1 300 个菌落生长,菌落清晰饱满,白色菌落占总菌落的 80% 以上,说明消减 cDNA 文库构建成功。随机挑选 16 个白色菌落提取质粒,用 T7 和 M13 Reverse 通用引物扩增插入片段,发现插入片段的长度位于 100~900 bp 之间(图版 I:①)。

2.1.5 消减效率的检测 为了检测抑制消减杂交的消减效率,我们把经过消减的 cDNA 扩增产物和未经消减的 cDNA 扩增产物按照一定的浓度梯度平行点在尼龙膜上。以在受褐飞虱取食的水稻幼苗中特异表达的基因 BpHi008(Yuan 等,2004)为探针进行斑点杂交,结果显示未经消减的 cDNA 仅出现一个微弱的信号,而经过消减的 cDNA,出现一个强的杂交信号,说明抑制消减杂交成功地富集了受褐飞虱诱导的基因序列(图版 I:②)。

2.2 消减 cDNA 文库的筛选

随机从消减库挑选 960 个含有插入片段的克隆进行进一步分析。这些克隆包含着褐飞虱取食后在

水稻幼苗中表达增强的基因,但必须采取进一步的技术手段才能够把它们筛选出来。我们将反向 RNA 斑点印迹技术应用于抑制消减杂交 cDNA 文库的初筛,再用 Northern 杂交加以验证。

在反向 RNA 斑点印迹实验中,每个克隆取 300 ng 质粒按常规方法平行点在两张正电尼龙膜上。通过逆转录系统将对照材料和处理材料的总 RNA 各 100 μ g 逆转录合成 cDNA 探针分别与上述两张膜于 65 $^{\circ}$ C 杂交过夜。通过对比每一克隆与对照材料和处理材料 cDNA 探针杂交信号的强弱进行筛选。通过 3 次重复实验,共发现 54 个克隆在 3 次实验中均显示出杂交信号的差异,即与处理材料的 cDNA 探针的杂交信号明显强于和对照材料 cDNA 探针的杂交信号(图版 I:③)。随后对筛选出的克隆进行测序,发现有 8 个克隆代表了不同种类的 rRNA 基因,在这里不再做进一步的分析。对余下的 46 个克隆进行 Northern 验证,即用 M13 reverse/T₇ 扩增它们的外源片段,再以扩增产物为探针分别与两种材料的总 RNA 进行 Northern 杂交。结果 35 个克隆显示阳性杂交信号,其中 25 个克隆与受褐飞虱胁迫材料的杂交信号明显强于和对照材料的杂交信号,部分 Northern 杂交结果见图版 I:④。通过 BLAST 软件与 GenBank 中的核苷酸序列或蛋白质序列进行同源比较。

结果表明有 17 个克隆与编码已知功能蛋白的基因有显著的同源性,它们分别参与蛋白质的折叠与降解、蛋白质与蛋白质的相互作用及信号传递、脂类代谢、胁迫反应、物质运输和细胞生长等。其中 BpHi008 cDNA(GenBank 登录号:AY256682)是本实验中分离出来的一个新的水稻基因,它含有一个完整的读码框(open reading frame, ORF),编码一个由 82 个氨基酸组成的多肽链。运用 FastA 程序把该多肽链的氨基酸序列与数据库中的序列进行比较,发现它与小麦的 Wirl 蛋白质家族有 ~37% 的同源性(Franck 等,1995)。在小麦中,编码该蛋白质家族的基因的表达受病原菌的诱导。与 Wirl 类似,BpHi008 蛋白也有一个亲水的 N-末端和一个疏水的 C-末端组成,并且它们的 C-末端均富含甘氨酸和脯氨酸。网上预测(网址:<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)BpHi008 蛋白镶嵌于细胞膜中,C-末端伸向细胞外,N-末端位于细胞内。有 6 个克隆与未知功能的基因有显著同源性。另有 2 个克隆在 GenBank 中没有发现其同源序列,

为新的水稻 cDNA。

3 讨论

分离植物防卫相关基因是认识植物防卫机制(逆境信息传递、代新途径等)的基础。有多种方法可以用于分离差异表达的基因,其中 1996 年建立的基于抑制 PCR 基础上的 SSH 技术受到越来越多的关注。该技术主要通过消减杂交将待比双方共同的 cDNA 进行消减,再通过抑制 PCR 技术特异地扩增在 Tester 中特异表达的 cDNA 片段,使其得到大量富集。高度特异性、高度敏感性和高效率被认为是 SSH 技术的三个突出优点。大量实验证明,SSH 非常适合研究来源密切的两个生物系统之间基因的差别表达情况,并在此基础上获得目标基因(Liu 等,2001)。

在 SSH cDNA 文库中通常含有背景克隆,即非差异性表达的转录产物(Rebrikov 等,2000),因此如何简捷、快速、高效地从 SSH 克隆中筛出差异表达的基因就是成功运用 SSH 技术的关键环节之一。通常采用斑点印迹对 SSH cDNA 文库进行初步筛选。在制备斑点印迹膜时,用 PCR 扩增 SSH 克隆中插入的外源片段,浓缩后平行点在两张膜上。所使用的探针,可以是正向和反向消减杂交 cDNA 池(Caturla 等,2002),也可以由 driver 和 tester 实验标本的总 RNA 或 mRNA 反转录而成。通过杂交筛选,可以选取差异明显的克隆进行 Northern 杂交和 RT-PCR 分析。然而,利用正向和反向消减杂交后的 cDNA 产物作为探针筛选 SSH cDNA 文库,会出现较多的假阳性结果,为进一步的验证带来困难(Rebrikov 等,2000)。本研究通过反向总 RNA 斑点印迹对 SSH cDNA 文库进行初步筛选,接着对筛选出的克隆使用 Northern 杂交加以验证。这种筛选放法优点是准确性高,但是敏感性低,因为 mRNA 丰度低的基因不易出现杂交信号。

本研究运用抑制消减杂交以褐飞虱取食 32 h 的水稻幼苗为 tester,对照幼苗为 driver 构建了 SSH cDNA 文库,利用反向总 RNA 斑点印迹筛选该文库,并对在 3 次实验中均显示出杂交信号差异的克隆再用 Northern 杂交鉴定筛选结果,最终成功地获得了 25 个受褐飞虱取食诱导的基因。对所选取的克隆进行序列测定和 BLAST 查询,共发现 17 个受褐飞虱取食调节、功能已知的基因。它们分别

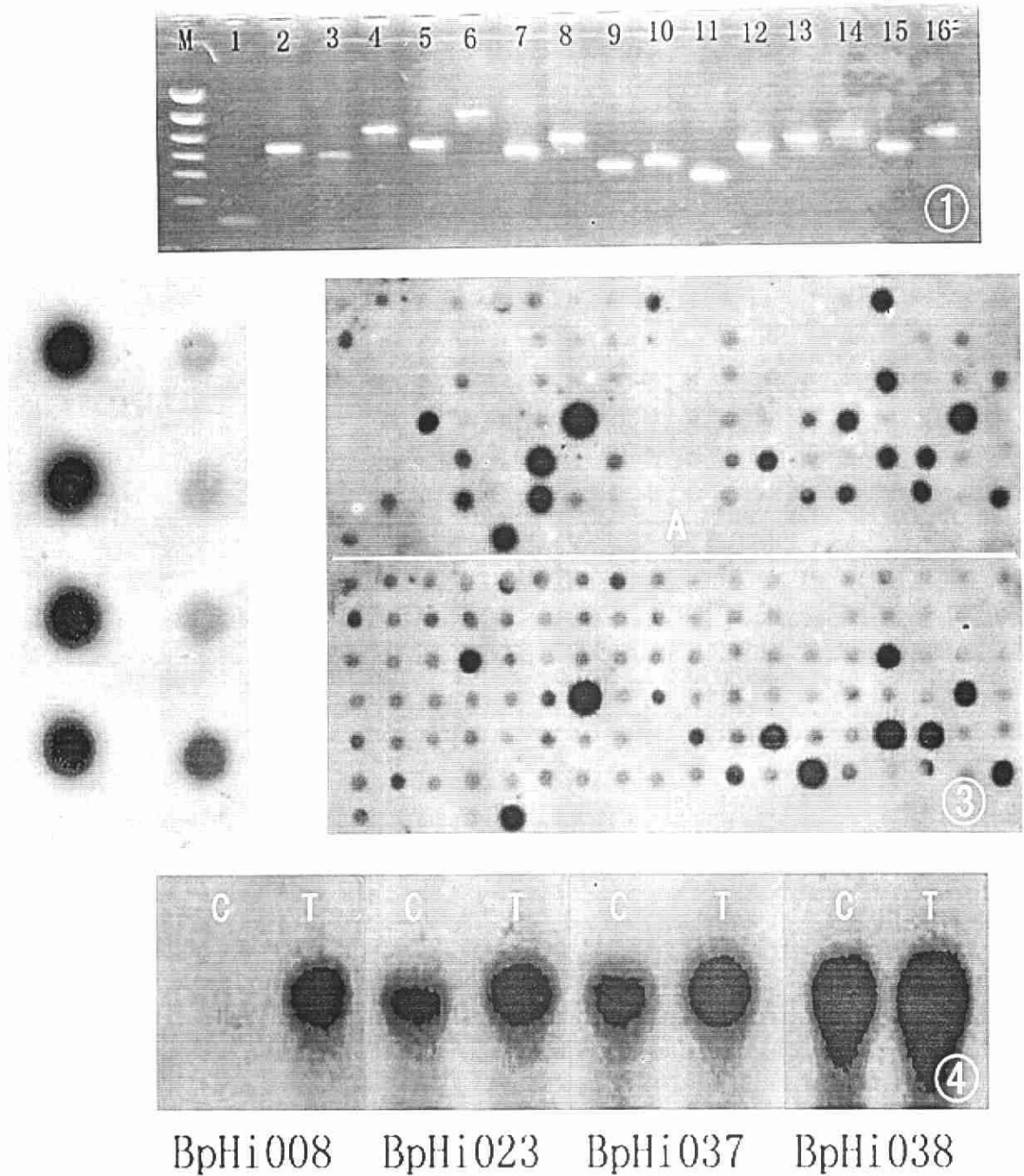
参与核苷酸合成,大分子降解,信号传递,胁迫反应和对病原菌的抗性反应。总体上,参与胁迫反应和衰老的基因在褐飞虱取食后表达增强。另外,还分离到了 6 个与未知功能的基因有显著同源性的克隆,以及 2 个新的水稻 EST。研究结果表明褐飞虱取食激活了水稻植株的衰老过程,并且调节植物一病原菌互作的信号传导通路和调节植物一昆虫相互作用的信号传导通路之间存在重叠。

参考文献:

- Caturla M, Chaparro C, Schroyers K, *et al.* 2002. Suppression subtractive hybridization to enrich low-abundance and submergence-enhanced transcripts of adventitious root primordial of *Sesbania rostrata*[J]. *Plant Science*, **162**: 915-921.
- Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, *et al.* 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci*, **93**: 6 025-6 030.
- Frank S, Dudler R. 1995. Nucleotide sequence(Genbank/EMBL/DBJ accession number X87686) of a wheat cDNA encoding a putative pathogen-inducible protein homologous to PWIR1[J]. *Plant Physiol*, **109**: 338.
- Liu J, Liu JD, Yuan ZQ, *et al.* 2001. Isolation and identification of genes expressed differentially in rice inflorescence meristem with suppression subtractive hybridization [J]. *Chinese Sci Bull*, **46**: 98-101.
- Kessler A, Baldwin IT. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis [J]. *Annu Rev Plant Biol*, **53**: 299-328.
- Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, *et al.* 2000. Mirror orientation selection(MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization[J]. *Nucleic Acids Res*, **28**, e90.
- Reymond P, Farmer EE. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression [J]. *Curr Opin Plant Biol*, **1**: 404-411.
- Reymond P, Weber H, Damond M, *et al.* 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, **12**: 707-720.
- Walling LL. 2000. The myriad plant responses to herbivores [J]. *J Plant Growth Regul*, **19**: 195-216.
- Yuan YH, Chen XP, Zhu LL, *et al.* 2004. Isolation and characterization of a novel rice gene encoding a putative insect-inducible protein homologous to wheat Wir1 [J]. *J Plant Physiol*, **161**: 79-85.
- Zhang FT, Zhu LL, He GC. 2004. Differential gene expression in response to brown planthopper feeding in rice [J]. *J Plant Physiol*, **161**: 53-62.

何青,等:受褐飞虱取食的水稻幼苗的抑制消减 cDNA 文库的构建及筛选
 YUAN Hong-yu, *et al.*: The construction and screening of suppression subtractive
 cDNA library of rice seedlings exposed to BPH

图版 I
 Plate I



①抑制消减杂交文库插入片段长度分析,图中数字代表随机挑选的克隆号,“M”代表分子量标准,从上到下依次为:1 543,994,697,515,377,237 bp; ②差减效率分析,左列的4个杂交信号代表差减后的cDNA与BpHi008的杂交结果,右列的4个杂交信号代表差减前的cDNA与BpHi008的杂交结果。cDNA浓度由上至下分别为0.5 μg,1.0 μg,1.5 μg和2.0 μg; ③反向斑点印迹筛选正向SSH cDNA文库,(A)以来自褐飞虱取食材料中的cDNA为探针,(B)以对照组织中的cDNA为探针; ④Northern杂交验证,图中“C”代表从对照材料中提取的RNA,“T”代表从受褐飞虱取食32 h的材料中提取的RNA。

①Insert-length analysis of clones selected randomly from suppression subtractive library, numbers in the figure represent clone number selected randomly from the library. “M” in the figure represents marker standards. From up to bottom, the bands are equal to 1 543, 994, 697, 515, 377 and 237 bp respectively; ②Dot blot analysis of rice seedling cDNA population after (left row) and before (right row) SSH, the membrane was hybridized with BpHi008; ③Screening forward SSH cDNA library by using reverse dot blot technique, (A) using cDNA probe from rice seedling infested by BPH, (B) using cDNA probe from control material; ④Northern verification, “C” represents RNA from the control material, “T” represents that from material exposed to BPH for 32 h.