

无核荔枝果实形成差异表达基因 cDNA 的克隆

禩维言^{1,2}, 郑学勤^{1*}

(1. 中国热带农业科学院 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571107; 2. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530005)

摘要: 采用抑制差减杂交技术(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)分离与海南无核荔枝果实形成相关的差异表达基因的 cDNA 片段, 为克隆相关基因提供研究基础。分别以无核荔枝的有核幼果为 driver; 无核幼果为 tester, 建立差减 cDNA 文库。经 Reverse Northern Dot-Blot 筛选该文库, 共获得 61 个阳性克隆, 随机选取 17 个克隆进行测序, 共获得 10 条非重复序列, 对其中较长的 7 个序列进行同源分析, 结果表明: 有 6 个序列在荔枝中为首次报道。

关键词: 无核荔枝; 无核果实; 抑制差减杂交(SSH); Reverse Northern Dot-Blot

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)06-0597-05

Cloning the cDNA fragments of differentially expressed genes between seeded and seedless fruit of seedless litchi

XUAN Wei-yan^{1,2}, ZHENG Xue-qin^{1*}

(1. *The State Key Laboratory for Tropical Crop Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China; 2. Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China*)

Abstract: The Suppression Subtractive Hybridization(SSH) technique was used to clone the cDNA fragments of differentially expressed genes between seeded and seedless fruit in Hainan seedless Litchi. One positive differential expressing cDNA library was constructed using the cDNA of seeded fruit as driver and the cDNA of seedless fruit as tester. Sixty-one positive clones were obtained by using the Reverse Northern Dot-Blot to screen the cDNA library. Nucleotide sequences of seventeen randomly chosen positive clones were sequenced and found ten are different sequences. Subsequently sequence analysis shows that the 6 clones corresponding to their nucleotide sequences all are first reported in Litchi varieties.

Key words: seedless litchi; seedless fruit; Suppression Subtractive Hybridization(SSH); Reverse Northern Dot-Blot

海南无核荔枝是荔枝中的珍稀品种, 其无核率高达 95%, 深受广大消费者的喜爱。但其果实的无核率不够稳定, 易受开花期温度变化的影响。无核率的不稳定性严重影响了该品种的推广种植及其生产的经济效益。形态组织学研究表明, 无核荔枝无核果实的形成是由于授粉后受到低温的影响导致胚

胎败育而引起(陈健辉等, 2001; 杨应华等, 2002)。在荔枝胚胎发育研究方面, 刘成明等(2002)采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)标记方法, 对荔枝的多个品种及其焦核突变体进行了多态性分析, 得到了 2 个可能与荔枝焦核基因相关的特异 cDNA 片段。陈伟等(2001)采用双向电泳技术分离到多个与荔枝

收稿日期: 2006-01-16 修回日期: 2006-05-25

基金项目: 国家“863”计划项目资助(AA001380)[Supported by National High Technology Research and Development Program of China(AA001380)]

作者简介: 禩维言(1963-), 女, 副教授, 博士, 主要从事作物生理及植物基因工程研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zhengxxqin@126.com)

胚胎分化发育相关的特异蛋白。张以顺等(2004a, b)利用抑制消减杂交技术(SSH),从败育胚中分离到与荔枝胚败育相关的多个 cDNA 片段及 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的 cDNA 序列。作者认为, S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因在荔枝败育胚中大量表达可能在某种程度上参与了其体内乙烯合成的调控,最终导致荔枝胚胎的败育。这些研究成果为探讨荔枝胚胎发育的分子机理及基因调控提供了重要参考。

目前,从分子水平上探讨荔枝无核果实形成机理的文献报道尚不多,而且荔枝胚胎败育与无核果实的形成涉及到许多基因的表达和调控。因此,开展并克隆与无核荔枝果实发育相关基因的研究,有助于我们从分子水平上更多地了解无核荔枝果实形成和胚胎败育的调控机制,丰富果树无核果实形成的基础理论,以充分开发利用无核荔枝的特殊种质,为创新荔枝种质和培育优良荔枝新品种提供理论基础和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料:用于提取总 RNA 的无核荔枝幼果取自海南陆桥无核荔枝农场,为 5~7 年生正常挂果果树,品种为海南无核荔枝。收集花后 20 d 的幼果,迅速剥开,将有核与无核的幼果分装,放入液氮中带回实验室,置-75℃保存备用。

试剂: PolyATtract® mRNA Isolation Systems III 购自 Promega 公司, Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 和 Adavantage cDNA polymerase 购自 CLONTECH 公司, Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 购自 Roche 公司, Reverse Transcriptase XL (AMV-XL) 购自大连宝生物公司。PCR 扩增片段的回收、克隆分别采用大连宝生物公司的 TaKaRa Taq™、上海生工公司的 UNI-Q-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、pMD18-T Vector 进行。PCR 引物合成和克隆的测序分别委托北京新经科生物技术有限公司、上海生工生物工程服务有限公司进行。其它生化试剂为进口或国产的分析纯级以上试剂。

菌种: *E. coli* DH5a 由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 无核幼果与有核幼果总 RNA 的提取 采用改良一步快速热酚抽提法(卢圣栋, 1999)进行。

1.2.2 RNA 电泳检测 分别取无核幼果与有核幼果总 RNA 5 μg 进行凝胶电泳,并在紫外光下照相。

1.2.3 mRNA 的纯化 根据 Promega 公司的 PolyATtract® mRNA Isolation Systems III 说明书进行。

1.2.4 抑制差减杂交 具体操作根据 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 说明书进行。

1.2.5 差减 cDNA 文库的构建(T/A 克隆法) 从第二次 PCR 扩增后的正向差减 cDNA 群体(共 10 μL)中取 4.5 μL 与 0.5 μL 的 pMD-18 T vector 在 16℃下反应连接 3 h,将连接产物转化受体菌 *E. coli* DH5a,于 X-gal/ITPG、Amp 琼脂平板上 37℃培养过夜,挑取白色克隆,接种于盛有 800 μL LB (加 Amp)的 1.5 mL 离心管中,37℃培养过夜。加 15% 的无菌甘油,液氮速冻,-70℃保存。建立正向差减 cDNA 文库。

1.2.6 正向差减 cDNA 文库的筛选 (1)菌落 PCR 鉴定重组子阳性克隆:吸取 2 μL 各菌落的 LB 培养液分别加到灭菌的 0.2 mL PCR 管中,写好标记。准备 Nested PCR Master Mix 在一个 1.5 mL 的离心管中依次加入试剂(表 1)。涡旋混匀,稍离心。在各个装有菌液的 PCR 管中分别加入 23.0 μL Nested PCR Master Mix,混匀,稍离心,立即进行下面的热循环反应:95℃, 5 min, 35cycles; 94℃, 10sec; 68℃, 30sec; 72℃, 1.5 min, 最后 72℃延伸 10 min。每个反应管中取 5 μL PCR 产物于 1.0% agrose 凝胶中电泳检测并照相。

表 1 巢式 PCR 反应混合物
Table 1 Nested PCR master Mix

试剂 Regent	1 次反应的用量(μL) Amount per reaction	50 次反应的用量(μL) For a 50-Rxn Experiment
Sterile ddH ₂ O	16.1	805
10XPCR reaction buffer	2.5	125
25mM MgCl ₂	1.5	75
Nested PCR Primer 1(10 μM)	1.0	50
Nested PCR Primer 2R(10 μM)	1.0	50
dNTP Mix(10mM)	0.5	25
Taq DNA Polymerase(5U/μL)	0.4	20
Total volume	23	1150

(2)Reverse Northern Dot-Blot 鉴定阳性差异片段:在各菌落 PCR 样品中加入 1M NaOH 及 200mM EDTA,使其终浓度为 0.4M NaOH/10mM EDTA,在 100℃变性 10 min,将各管稍离心。将菌落 PCR 产物一式两份等量点置尼龙膜上。分别取

无核幼果 (Tester) 和有核幼果 (Driver) 总 RNA 50 μ g 用 Reverse Transcriptase XL (AMV-XL) 进行反转录, 方法参照该酶使用说明进行。用 DNA 胶回收试剂盒回收纯化 Tester 和 Driver cDNA 第一链, 方法按 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书进行。以 Tester 和 Driver cDNA 第一链为模板, 标记探针。探针的标记与预杂交、杂交及洗膜和放射性自显影均按 Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 的说明书进行。

1.2.7 DNA 测序及同源序列的比较分析 随机挑选 17 个经过 Reverse Northern Dot-Blot 筛选鉴定为阳性差异片段送上海生物工程技术有限公司测序, 所有测出的序列去除载体序列与引物序列后, 通过网络提交 NCBA 进行 BLASTN 分析。

2 结果与分析

2.1 无核幼果和有核幼果总 RNA 的提取结果

无核幼果和有核幼果总 RNA 凝胶电泳结果显示 (图 1), 28SrRNA、18SrRNA 条带明显清晰, 而且 28SrRNA 比 18SrRNA 的量, 说明所提取的幼果总 RNA 完整性较好, 适宜用于进行抑制差减杂交。



图 1 幼果总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 Total RNA GL electrophoresis in TAE buffer

1. 无核幼果总 RNA; 2. 有核幼果总 RNA.

1. Total RNA of seedless fruit; 2. Total RNA of seeded fruit.

2.2 差减 cDNA 文库的构建及克隆的初步鉴定

运用 SSH 技术, 以无核幼果作为 Tester, 有核幼果作为 Driver, 进行正向差减杂交, 差减得到的 cDNA 片段用 T/A 克隆法构建质粒载体系统文库, 得到了一个含有 381 个独立克隆的 cDNA 文库。对该文库的克隆进行菌落 PCR 扩增, 以检测其阳性与插入片段的大小。结果显示, 绝大部分克隆具有特异 cDNA 插入片段而且插入片段的大小主要集中在 100~600 bp 之间 (图 2), 与 SSH 设计预期的

插入片段大小大致相似。

2.3 Reverse Northern Dot-Blot 分析结果

将不同的克隆片段分别与 Tester 和 Driver 的反转录 cDNA 探针杂交, 经洗膜、免疫检测、压片、显影与定影后, 将无核幼果 (Tester) 与有核幼果 (Driver) 的 X-光片上的杂交信号对比分析, 找出在 Tester 中有杂交信号而在 Driver 中没有杂交信号的克隆以及在 Tester 中杂交信号强于 Driver 的克隆共有 61 个。

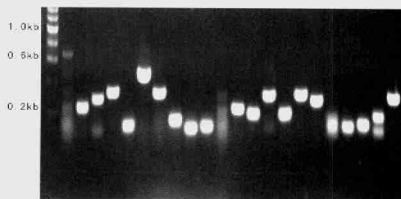


图 2 SSH 差文库菌落 PCR 鉴定阳性克隆结果

Fig. 2 Positive clones of subtracted library PCR detected

Reverse Northern Dot-Blot 检测结果表明, 有的克隆与 Tester 的 cDNA 显示杂交信号, 有的与 Driver cDNA 显示杂交信号, 有些克隆则未显示任何信号, 说明这些克隆可能来自低丰度表达的基因 (图 3)。

2.4 无核果实差异表达基因 cDNA 片段序列分析及同源比较

从 Reverse Northern Dot-Blot 鉴定的 61 个阳性克隆中随机选取 17 个克隆送上海生物工程技术有限公司测序。将序列测定结果与 GenBank 进行同源性比较, 共获得 10 条未重复序列, 各 cDNA 的核酸序列如图 4 (其中较短的 3 个 cDNA 序列未列出)。

与 GenBank 核酸序列同源比较结果见表 2。

3 讨论

在植物的生长发育过程中, 基因按时间和空间顺序有序地进行表达。在植物生长发育的各个阶段, 基因的表达是不相同的。通过比较同一类细胞或组织在不同生长发育阶段的基因表达差异, 对了解植物生长发育过程的基因调控机制及发现发育相关基因有很大帮助。利用 SSH 技术成功地分离植物发育过程中差异表达基因已有成功的报道 (Kim 等 1999a, b; 刘军等, 2000; Hinderhofer 等, 2001; 骆

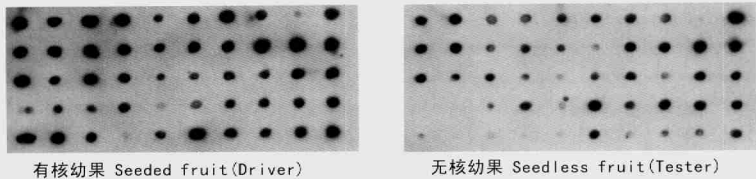


图3 Reverse Northern Dot-Blot 部分结果
Fig. 3 Partial results of Reverse Northern Dot-Blot

76, 5'-ACAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTATATGACTCAACATTGAAAGTTGAGAAAAACAATA
TTTAAAGGTGTGATATGGTCGGTCATTATTGTAGATCCGCCATCAAAGATTATCAGGCTTCCCTTTAAAAAATCTTCAAT
GTGTAGTAACCTGGATTATTCATAACAATCTATCAGAATGTCATACCTCCTTAGTCGCTCTTCTCTGCTACACATAA
ATAACTATTGCTAAAGCCAGATGGATATGGAAATTCGGTGTCACTCCATCTCTTCCATTTGACGTCATCAGTAATCTCAG
CTGACTTTCTTCAATTGCTGTGAAGCAATATCTTCTCAAGATAACCTATACTAAGATAGTTGGCAGTAAACCTGTGCTGA
GTTAATGGTAGGGCTGATCTTGAAGGAACCCGTACACCAC-3'

307, 5'-TGACCATTATACAAAAGGTACGCCGTCACCGCCTGGCGGCTCCGACTGCTTGTAGGCTCCGATTTTCAGGATCTGT
TTCACCTCCCTTGCAGGCTGCTTTCACTTTCCCTCAGGTAAGTTTCACTATCGGTCGTAGAGGAGTACTTAGGCTTGGAG
GGTGGTCCCCCATGTTACAGCAGGATTTACAGTGTCCCGCCTACTCGGCTCTTGTCTGTTGTAGACTACGGGCTTCCAC
CCTATGCCCCACTTCCAGATGCTTGCATGTTTATTTCACAAGGC-3'

306, 5'-ACTTGCATTGTCTCAATACCTCAGTGTATCTCCAACATGGCAACACAGTGCATTTGGCAAGTAATCCACGGCAACCCA
ATTGCCATCTTCCACATGAAAGCCAGGAACATCTGGGGACGAGTATGGTGAGTGACACATGTTCAGCTGTGAGCTTCAAC
TCCAAGGCCAGTTGAGGCTGTGGCGTGGTGATACATGTTTATTTCATAGTTCTATCGCTCACCCTCACTCAAGTGGGA
CTCCAAA

187, 5'-ACAAAGTCTCCACTCTCTAGCCTTCTCATTTTCATGCTTTCAGCTTGTGAAGATGGAAGTAAATCCGGGCTACAAA
CAATGTTATGGGTTCATCAAAGACGGTTGATCTGGCATACCAAGGAGTGGGATTTGGCACCATCCAGCTATTACGTTCTCT
CTTCCCCATCATGGTATTCCTTAGTTC-3'

179, 5'-AGCGTGTTCGGCGCGAGGTATGACCGGAGCTCGTCTTGGCGTAAACGCCAAAGAGAATCAGGGAAGTAGGCGCGG
CAGAAGTCCGGCTCGTGTGTAGTAAAGTGCAGATCGGCTGGTTTTCCAGAGCGGCGAATCTTCGGGGTATCTTCGAA
AAGG-3'

137, 5'-AGGTCATCCAGAGATCGACTAGCAGCTGCGTGCAGGCCTTGCAGGCTTGTGGCGATCAGAAGTGGTAGTGGCA
CGCTGTAAAGAGACTTGACTCAATTTGCAGCATGTTACAGGCACAGACCACAGCTCAAGTACATGATGC-3'

172, 5'-AACTTGACTCCAGGCAACAACAACATGTAGATGGAAGAGTGAATACAAAATCTGGCTGATGCTGTAAGATCATAATAC
ACTTAGCACTCATGGGACTTTGGAGTCAAGGACATGTA AAAAGCAGCTGAAAGATAAGTTTGACCATTACAGTAATGGCAG
GGCTCATCTT-3'

图4 阳性克隆序列
Fig. 4 Sequences of positive clones

表2 GenBank 核酸序列同源比较结果

Table 2 Results of differential expressed sequences homology analysis to sequences in GenBank

序列编号 No.	长度 Length (bp)	同源性分析 Homology analysis	物种 Species	百分比 Percentage	分值 Score
76	451	无显著相关的同源序列			
307	296	23S rRNA gene	<i>B. diminita</i>	285/296 (96%)	500
306	254	无显著相关的同源序列	—		
187	192	无显著相关的同源序列	—		
179	167	无显著相关的同源序列	—		
137	152	无显著相关的同源序列	—		
172	171	无显著相关的同源序列	—		

蒙等, 2002a, b; Gao 等, 2003; 赵小兰等, 2005)。

本研究在对差减 cDNA 文库筛选后, 随机选择 17 个阳性克隆测序, 然后将 cDNA 序列与 GenBank

中核苷酸数据库进行同源性分析。结果表明, 10 个不同的序列中, 一个 cDNA 与 *B. diminita* 的 23S rRNA 基因具有较高的同源性, 6 个 cDNA 均未发现有显著相关的同源序列, 其余 3 个 cDNA 由于序列比较短未做同源分析。从 GenBank 中查不到任何对应同源序列的克隆, 其原因可能有两种情况: 一是代表了新基因; 二是可能克隆的 cDNA 序列位于基因变异丰富的 3' 端而无法查到与其它物种基因的同源性。

通过本研究得到了 6 个有意义的与海南无核荔枝果实发育相关的差异表达 cDNA 序列, 这些序列均为荔枝中首次报道。至于这些序列是不是新基因以及其功能如何, 还有待进一步研究。

参考文献:

刘军, 袁自強, 刘健东, 等. 2000. 应用抑制差减杂交分离

- 水稻幼穗发育早期特异表达的基因[J]. 科学通报, 45(13): 1 392—1 397.
- 骆 蒙, 孔秀英, 霍纳新, 等. 2002a. 基于抑制差减杂交方法的小麦抗白粉病相关基因表达谱[J]. 科学通报, 47(16): 1 237—1 241.
- J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 2002. 黄培堂, 等(译). 分子克隆实验指南(上册)[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社: 548.
- Chen W(陈 伟), Lu LX(吕柳新), Huang CM(黄春梅), et al. 2001. Studies on 'Wuye' litchi specific proteins in the embryo development('乌叶'荔枝胚胎发育过程特异蛋白的变化)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 28(6): 504—508.
- Chen JH(陈健辉), Yang JH(杨俊慧), Pan KQ(潘坤清). 2001. Study on developmental process of aril in seedless-litchi(无核荔枝假种皮发育过程的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 21(4): 362—366.
- Gao P, Wang GY, Zhao HJ, et al. 2003. Isolation and identification of submergence-induced genes in maize (*Zea mays*) seedlings by suppression subtractive hybridization[J]. *Acta Bot Sin*, 45(4): 479—483.
- Hinderhofer K, Zentgraf U. 2001. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence[J]. *Planta*, 213: 469—473.
- Kim JY, Chung YS, Ok SH, et al. 1999. Characterization of the full-length sequences of phospholipase A2 induced during flower development[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1 489: 389—392.
- Kim JY, Chung YS, Paek KH, et al. 1999. Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization[J]. *Molecular Cell*, 9: 392—397.
- Liu CM(刘成明), Mei MT(梅曼彤). 2002. Identification of stenospermocarpy mutants of litchi by RAPD(利用 RAPD 分析鉴别荔枝的焦核突变体)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 29(1): 57—59.
- Luo M(骆 蒙), Kong XY(孔秀英), Huo NX(霍纳新), et al. 2002b. ESTs analysis of resistance to powdery mildew in wheat at primary infected stage(小麦抗白粉病侵染初期的表达序列标签分析)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 29(6): 525—530.
- Yang YH(杨应华), Li L(李 蕾), Yu DN(余诞年). 2002. Research on the seed abortion and fruit development in a seedless litchi strain(温敏无核荔枝的种子败育和果实发育)[J]. *J Hainan Normal Univ(Nat Sci)*(海南师范学院学报(自然科学版)), 15(2): 71—74.
- Zhao XL(赵小兰), Su XH(苏晓华), Tian CW(田传卫), et al. 2005. Analysis of genes of *Rosa multiflora* 'Inermis4' expressed in response to *Agrobacterium tumefaciens* infection(根癌农杆菌胁迫下多花蔷薇的基因表达分析)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 38(7): 1 425—1 430.
- Zhang YS(张以顺), Xiang X(向 旭), Fu JR(傅家瑞), et al. 2004a. Cloning and sequencing of cDNA fragments differentially expressed between aborted and normal development embryo in litchi(荔枝胚败育差异表达基因 cDNA 片段的克隆及序列分析)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 31(1): 25—28.
- Zhang YS(张以顺), Xiang X(向 旭), Fu JR(傅家瑞), et al. 2004b. Full-length amplifying and sequencing of S-adenosylmethionine synthetase gene in litchi aborted-embryo of "GuiWei"(荔枝败育胚 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的全长扩增和序列分析)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 31(2): 160—164.

(上接第 630 页 Continue from page 630)

植体叶片愈伤组织诱导、继代及再分化培养条件探究, 得到以下结论: 愈伤组织诱导和继代最佳培养基为 MS+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L, 在仅含 BA 的 MS 培养基上, 愈伤组织分化大量健壮不定芽, 1/2MS+0.5 mg/L IBA 培养基有利不定芽生根。

在诱导叶片愈伤组织实验中发现, 较高浓度的生长素有利于愈伤组织诱导。许多研究表明 2,4-D 对外植体脱分化启动效果最好, 我们也有相同的结论, 但许多文献报道, 连续使用易使愈伤组织褐化。本试验结果表明, 将诱导分化的长柄双花木愈伤组织接种在含 2,4-D 培养基上继代培养, 愈伤组织增殖率最高, 增殖的愈伤组织每 20 天继代一次可避免褐化现象。

长柄双花木外植体在添加 NAA 培养基中极易诱导分化出愈伤组织, 不利于愈伤组织分化, 推测与长柄双花木外植体本身内源 NAA 含量高有关, 因

此在不定芽增殖和诱导不定根时应避免使用 NAA。在离体再生培养过程中, 不定芽和再生植株生长非常缓慢, 今后还需探索各种培养条件以促进长柄双花木再生植株生长。

参考文献:

- 傅立国. 1992. 中国植物红皮书——稀有濒危植物(第 1 册)[M]. 北京: 科学出版社: 324—32.
- Li GY(李根有), Chen ZH(陈征海), Qiu YD(邱瑶德). 2002. Quantitative distribution and forestry features of *Disanthus cercidifolius* in Zhejiang(浙江省长柄双花木数量分布与林学特性)[J]. *J Zhejiang Fore Coll*(浙江林学院学报), 19(1): 20—23.
- Xiao YA(肖宜安), He P(何 平), Deng HP(邓洪平), et al. 2002. Numerical analysis of population morphological differentiation of *Disanthus cercidifolius* Maxim. var. *longipes* in Jinggangshan(井冈山长柄双花木形态分异的数量分析)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), 20(5): 365—370.