

## 罗汉果果实不同发育时期 SSH 文库的构建

唐 其<sup>1</sup>, 邱德有<sup>2</sup>, 马小军<sup>1,3\*</sup>, 莫长明<sup>3</sup>, 付 伟<sup>1</sup>

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193; 2. 中国林业科学研究院 林业研究所, 北京 100093; 3. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所广西分所, 南宁 530023)

**摘 要:** 以罗汉果授粉后 50 d 和 70 d 果实为材料, 利用抑制消减杂交技术构建了罗汉果果实不同发育时期皂苷生物合成相关基因的差减 cDNA 文库。在正向差减文库(70 d 为 tester, 50 d 果实为 driver)中随机挑选了 641 个 cDNA 阳性克隆测序, 得到 622 条有效序列, 重组率在 96% 以上。外源片段的长度分布在 101~934 bp 之间, 平均长度约 500 bp。BLASTN 结果显示: 201 个 ESTs 序列没有同源序列, 可能是新基因; 另外 421 个 ESTs 序列在核酸数据库中存在着同源序列, 其序列和已知功能(主要是能量代谢、次生代谢、转录因子、衰老及抗病性等)的蛋白有高度相似性。构建的 cDNA 文库符合 SSH 文库的质量标准, 能满足下一步的实验要求。该 SSH-cDNA 文库为研究罗汉果差异表达基因、探讨三萜皂苷生物合成的分子机理、提高罗汉果甜苷 V 的质量和产量奠定了基础。

**关键词:** 罗汉果; 甜苷 V; 抑制消减杂交; 三萜皂苷; EST

中图分类号: Q541 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2011)03-0388-05

## Construction of SSH-cDNA library from different developmental stages of *Siraitia grosvenorii*

TANG Qi<sup>1</sup>, QIU De-You<sup>2</sup>, MA Xiao-Jun<sup>1,3\*</sup>,  
MO Chang-Ming<sup>3</sup>, FU Wei<sup>1</sup>

(1. Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. The Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. Guangxi Branch Institute, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanning 530023, China)

**Abstract:** In order to reveal the differentially-expressed genes involved in triterpenoid saponin biosynthesis of *Siraitia grosvenorii*, 50 DAF(days after flowering) and 70 DAF fruits from different developmental stages were employed to construct subtractive cDNA library by suppression subtractive hybridization(SSH) in this study. Total 641 positive clones were selected randomly and sequenced from the forward-subtracted cDNA library(70 DAF as the tester and 50 DAF as the driver), and 622 high quality sequences were obtained. The rate of the recombination fraction was above 96%. The distribution of inserted fragments ranged from 101 bp and 934 bp, and the average fragment size was 500 bp. Followed by BLASTN and BLASTX for sequences dates, 201 ESTs showed no significant matches to any other sequences in NCBI nucleotide sequence database, they were probably novel genes. The other 421 ESTs carried with remarkable identity to proteins with known function in the database, which fell into several functional categories including energy and secondary metabolism, transcription factors, ripening, senescence and pathogen-resistance. Further results indicated that the cDNA library quality were conformed to SSH library standard and could be used in further

收稿日期: 2010-08-06 修回日期: 2010-11-18

基金项目: 国家自然科学基金(30560183, 30860379)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30560183, 30860379)]

作者简介: 唐其(1981-), 男, 湖南株洲人, 在读博士生, 主要从事药用植物分子生物学研究。

\* 通讯作者: 马小军, 博士, 研究员, 从事药用植物生物技术研究, (E-mail) xjma@public.bta.net.cn.

studies, also would provide reference for studying the differentially expressed genes, exploring molecular mechanism of triterpenoid saponin biosynthesis, and increasing productivity and quality of mogrosides in *S. grosvenorii*.

**Key words:** *Siraitia grosvenorii*; mogrosides V; suppression subtractive hybridization; triterpenoid saponin; Expressed sequence tags

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)是我国特有珍贵药用和甜料植物,为葫芦科多年生藤本植物,主要分布于广西北部山区。罗汉果苷的苷元类似,都含有一个葫芦烷型四环三萜(罗汉果醇)骨架,连接的糖均为葡萄糖,差异仅在 C3 和 C24 上连接的葡萄糖数目和方式不同,而形成多种罗汉果苷。不同生长日龄的罗汉果苷类会发生变化,果实发育的 30 d 前后罗汉果苷代谢变化很大,其中罗汉果甜苷 V 随生长周期增加其含量也逐渐增加。坐果 50 d 后,罗汉果甜苷 V 的含量增加较快,80 d 达最高值,而后趋于稳定(李典鹏等,2004;陈全斌等,2005)。本研究的前期结果表明,授粉后 30 d 果实的甜苷 V 含量与 50 d 差别极小,而 50 d 与 70 d 存在一个急剧跃变期,含量迅速达到高峰。因此,我们推测罗汉果甜苷 V 含量的差异很可能与皂苷生物合成相关基因呈时间性差异表达调控有关。罗汉果分子生物学研究还处于起步阶段,目前的研究主要集中在分子标记应用(周俊亚等,2006)、组织培养(郑晓峰等,2008)等方面,而罗汉果基因序列目前未见报道,基因克隆还是空白。对于罗汉果甜苷 V 的生物合成途径也不清楚。为了解罗汉果中葫芦烷型四环三萜皂苷合成的分子机理,必须首先克隆到相关的差异表达基因并进行深入的研究。

抑制性消减杂交技术(SSH)是一种有效分离差异表达基因的方法(Diatchenko 等,1996,1999)。它能富集稀少的 mRNA,有利于筛选低拷贝差异基因,可一次检出上百个差异表达基因。许多研究人员利用该技术已经从动植物的不同组织、器官以及不同的发育时期成功地分离出了众多的差异表达基因(Li 等,2006;李小红等,2006;刘阳等,2005;肖钢等,2008;李红霞等,2008;和凤美等,2010)。罗汉果皂苷的生物合成涉及大量基因的协同作用,因此,SSH 成为研究罗汉果皂苷生物合成机理的首选便捷技术。本研究以罗汉果授粉后 50 d 和 70 d 果实为材料,首次利用抑制消减杂交技术(SSH)构建了罗汉果差异表达基因 cDNA 文库,通过研究罗汉果不同生育时期甜苷 V 含量相关的差异表达基因,探讨三萜皂苷生物合成的分子机理,以期研究罗汉

果皂苷生物合成相关基因表达、差异基因筛选及目的基因的克隆提供依据。其结果有利于从分子水平深入探讨罗汉果品质形成机理,也为其他果实类药用植物品质改善研究提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料和试剂

罗汉果 F014(农院 B6)×M028(红雄 1 号)的杂交果实,取授粉 50 d 和 70 d 的果实。组培苗由桂林亦元生公司提供,2008 年 4 月下旬种植于桂林兴安罗汉果实验基地,8 月初授粉挂牌,9 月下旬和 10 月中旬取罗汉果授粉 50 d 和 70 d 的果实,取果肉迅速置于液氮速冻后放在 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

pMD19-T 载体,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,Ex Taq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司,Trizol RNA 提取液购自 Invitrogen 公司。PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, Advantage™2 PCR Kit 购自美国 Clontech 公司。Taq Mix 酶购自天根生化科技(北京)有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方 法

1.2.1 果肉总 RNA 的分离与纯化 分别取罗汉果 F014×M028 的杂交果实授粉 50 d 和 70 d 材料,加入液氮充分研磨,参照 Invitrogen 公司 Trizol RNA 提取液操作说明提取总 RNA。按照 promega 公司 DNase 消化方法进行 DNA 消化:取 1~8  $\mu$ L 总 RNA,加入 1  $\mu$ L RQ1 10×Reaction Buffer,适量 RQ2 DNase 酶(1 U/ $\mu$ g RNA),用无 RNase 酶的水补至 10  $\mu$ L。37 °C 水浴 10 min,加入 1  $\mu$ L RQ1 DNase Stop Solution 终止反应。65 °C 温浴 10 min 灭活 DNase 酶。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性,最后得到的总 RNA 于 -80 °C 保存备用。

1.2.2 SSH 与 SSH cDNA 文库的构建 按 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 的操作说明(Diatchenko 等,1999)进行 cDNA 的合成、RsaI 酶的消化和 SSH 操作。以 70 d 的果肉 RNA 为检测子(tester)、50 d 的果肉为驱动子(driver),构建罗汉果不同生育时期甜苷 V 合成条

件下特异表达基因的正向 cDNA 文库。SSH-PCR 产物与 pMD19-T 载体连接,然后转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,涂布于含有 Amp/X-gal/IPTG 的 LB 培养基上,37  $^{\circ}$ C 过夜培养,随机挑取白色克隆,利用 M13 引物检测目的片段的插入情况。

**1.2.3 序列测定和 BLAST 分析** 挑选阳性克隆送往上海生工生物技术有限公司进行测序。所获序列利用 DNAstar 软件进行剪切与拼接而得到不含载体序列的 EST。采用 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 的 BLASTN 或 BLASTX 在线序列比对工具,对所有 EST 序列进行同源性检索分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 罗汉果果肉总 RNA 质量检测

琼脂糖凝胶电泳显示,果肉总 RNA 中的 28S rRNA 与 18S rRNA 的亮度比例约为 2:1,经紫外分光光度仪检测,  $A_{260/280}$  值在 1.8~2.0 之间,  $A_{260/230}$  值大于 2.0。表明所制备的总 RNA 质量较好,达到建库要求(图 1)。

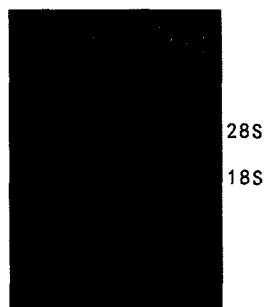


图 1 罗汉果果肉 RNA 的电泳检测  
Fig. 1 Detection of total RNA

### 2.2 第一链合成和第二链合成

取适量果肉总 RNA (2~1 000 ng) 为模板,进行第一链和第二链的合成。双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳见图 2。

### 2.3 消减杂交

合成的双链 cDNA 用 *Rsa* I 酶切并纯化酶切产物,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后,将酶切产物 1:6 稀释进行接头连接。确定接头的连接效果后进行第一次杂交和第二次杂交。以 Primer-1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') 为引物进行第一次 PCR。以 Nest PCR Primer-1 (5'-TC-

GAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3') 和 Nest PCR Primer-2R (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3') 为引物进行第二次 PCR,结果见图 3。

由图 3 可知,第二次扩增后,未消减样(泳道 1)产物条带变亮,弥散分布于 300~1 200 bp;消减样(泳道 2)条带更加集中,主要分布在 250~800 bp。这说明,通过两次消减杂交,达到了富集差异表达基因片段,扣除非特异表达基因片段的目标。从图 3 中可看到,70 d 主要以 230 bp、400 bp 和 520 bp 处的基因表达为主。

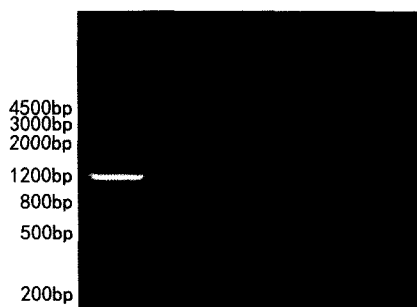


图 2 50 d 和 70 d 果实双链 cDNA 合成  
Fig. 2 Electrophoresis of ds cDNA from 50d and 70 d fruits

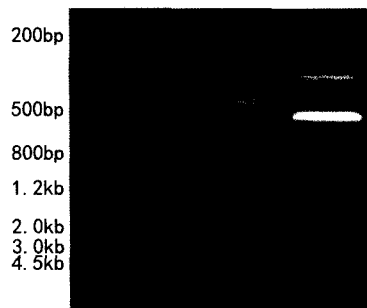


图 3 SSH 第二次 PCR 产物  
Fig. 3 Electrophoresis of the second SSH-PCR products  
1. 未消减样; 2. 消减样  
1. Unsubtracted sample; 2. Subtracted sample

### 2.4 差异表达 cDNA 文库的 PCR 产物检测

对随机挑取的克隆进行 PCR 检测,除了有多条扩增带的克隆和扩增带小于 200 bp 的克隆以外,结果 90% 以上的克隆皆能扩增出有效产物。图 4 为文库随机挑取的菌落 PCR 电泳图,其扩增片段大小为 250~900 bp,且多数在 500 bp 左右。

### 2.5 EST 测序分析

从 SSH-cDNA 文库中随机挑取 641 个单克隆进行测序,一共获得 622 个有效测序结果,其中已知

的 421 条,占全部 EST 的 67.7%, 所获 EST 中最短的 101 bp, 最长的 934 bp。在 BLASTx 比对结果基础上发现这些 EST 主要和已知功能(能量代谢、物质代谢、基因调控、衰老及抗性)的蛋白有高度相似性。在功能已知的 EST 序列中得到可能与罗汉

果甜苷 V 生物合成代谢密切相关的基因,如 glucosyltransferase, cytochrome P450 酶等。大部分已知 EST 同源于葫芦科等。未知的占 201 条,在 NCBI 上进行 BLASTN 比对没有同源序列,可能代表新基因,占全部 EST 的 33.3%。



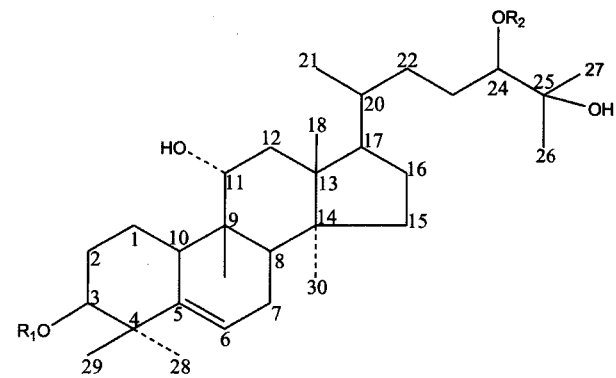
图 4 70 d 正向消减文库部分克隆的菌落 PCR 检测  
Fig. 4 PCR identification of inserted fragments in 70 d forward SSH-cDNA library

### 3 结论与讨论

罗汉果甜苷 V 的母核—罗汉果醇的苷元的生物合成是先经异戊二烯途径,经 2,3-氧化鲨烯环化酶作用,使 2,3-氧化鲨烯先环化形成葫芦烷四环三萜类骨架,该骨架经细胞色素 P450 依赖性单加氧酶、糖基转移酶及其他酶类介导进行如氧化、置换及糖基化等化学修饰,最终形成不同三萜类苷元及糖苷终产物。然而,由于三萜类皂苷分子本身的复杂性,加之缺乏生化途径研究的代谢中间体,人们迄今对三萜类皂苷的生物合成途径仍缺乏深入了解,通过调节三萜骨架合成关键酶基因来调控三萜皂苷的生物合成难度较大(Haralampidis 等, 2002)。罗汉果苷的苷元类似,都含有罗汉果醇骨架,连接的糖均为葡萄糖,差异仅在 C3 和 C24 上连接的葡萄糖数目和方式不同,而形成多种罗汉果苷(图 5)。未成熟果实主要含有苦味成分苷 IIE, III, IV, 而成熟果实中以苷 V 为主(李典鹏等, 2006)。

在本研究中,罗汉果甜苷 V 在授粉后 50 d 与 70 d 之间呈急剧跃变的现象,在此阶段大量低糖苷转化为高糖苷,而低糖苷向高糖苷的转化可能只是单一的转葡萄糖基反应。因此推测,此阶段可能存在特异的葡萄糖基转移酶起到这种作用。在以 70 d 果实为 tester, 50 d 果实为 driver 构建的正向 SSH 文库中筛选到了甜苷 V 生物合成途径中下游基因,如 P450 酶和糖基转移酶。通过对糖基转移酶的进

一步研究如 RACE 技术克隆其全长、原核表达或通过罗汉果转基因鉴定其基因功能等,对于提高罗汉果中甜苷 V 的含量具有重要的指导意义。



	R1	R2
苷 IIE	-Glc	-Glc
苷 III	-Glc	-Glc-Glc
苷 IV	-Glc-Glc	-Glc-Glc
苷 V	-Glc-Glc	-Glc-Glc -Glc-Glc
苷 VI	-Glc-Glc -Glc-Glc	-Glc-Glc -Glc-Glc

图 5 不同的罗汉果苷结构式  
Fig. 5 Structure of mogrosides in *Siraitia grosvenorii*

SSH 的核心技术是抑制性 PCR (suppression PCR), 它是一种将检测子 (tester) cDNA 单链标准化步骤和消减杂交步骤结合为一体的技术, 其中标准化步骤均等了检测子中的 cDNA 单链丰度, 而消减杂交步骤去除了检测子和驱赶子 (driver) 之间的共同序列, 使检测子和驱赶子之间不同的序列得到扩增, 显著增加了获得低丰度表达差异 cDNA 的概

率(楼士林等,2002)。SSH 对实验起始材料要求较多,需要 5~10  $\mu\text{g}$  的 mRNA,如果 mRNA 量不够,那么低丰度的差异表达基因的 cDNA 很可能会检测不到。本研究没有纯化和分离 mRNA,而是用总 RNA 直接进行反转录。采用 SMART cDNA 合成技术来弥补 SSH 对样品需求量大的缺点。从本次实验所建成的文库质量来看,用 SSH kit 反转录总 RNA,可以成功的构建罗汉果的抑制消减 cDNA 文库。

本研究首次利用 SSH 技术对罗汉果果实进行测序研究,最终获得了许多基因的表达序列标签。由于目前罗汉果的基因研究还是空白,所以 EST 中已知基因主要比对上那些基因信息比较清晰的物种,比如葡萄、拟南芥、西葫芦等物种。而未知基因比例高达 33.3%,这些未知基因可能代表了罗汉果果实发育和三萜皂苷生物合成相关的新基因。这些 EST 将为进一步大批量筛选、利用 RACE 技术克隆罗汉果皂苷生物合成途径中的关键酶基因,绘制差异基因表达谱,最终阐明罗汉果甜苷 V 生物合成机制提供了重要的前提条件。

#### 参考文献:

- 楼士林,杨盛昌,龙敏南,等. 2002. 基因工程[M]. 北京:科学出版社:230
- Chen QB(陈全斌),Yi XH(义祥辉),Yu LJ(余丽娟),*et al.*. 2005. Study on the variation of mogrosin V and flavone glycosides in *Siraitia grosvenorii* fresh-fruits in different growth periods(不同生长周期的罗汉果鲜果中甜苷V和总黄酮含量变化规律研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),**25**(3):274-277
- 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]. *Proceedings Nat Academy Sci(USA)*,**93**(12):6 025-6 030
- Diatchenko L, Lukyanow S, Lau YF,*et al.*. 1999. Suppression subtractive hybridization; a versatile method for identifying differentially expressed genes[J]. *Methods Enzymol*,**303**:349-380
- He FM(和风美),Zhu YP(朱永平),Yang XH(杨晓红). 2010. Construction of subtractive cDNA Library of genes involved in saponin biosynthesis from different age Sanchi root(不同年龄三七根皂苷合成相关基因的差减 cDNA 文库构建)[J]. *Mol Plant Breeding*(分子植物育种),**8**(1):145-150
- Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE. 2002. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants[J]. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*,**75**:31-49
- Li DP(李典鹏),Chen YY(陈月圆),Pan ZH(潘争红),*et al.*. 2004. Study on variation of mogrol glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* in different growing ages(不同生长日龄罗汉果苷类成分变化研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),**24**(6):546-549
- Li DP, Tsuyoshi Ikeda, Huang YL,*et al.*. 2007. Seasonal variation of mogrosins in Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) fruits[J]. *J Nat Med*,**61**(3):307-312
- Li HX(李红霞),Zhang LY(张龙雨),Zhang GS(张改生),*et al.*. 2008. Construction on cDNA library from fertility-related genes of male sterile wheat with *Aegilops kotschy* Cytoplasm by SSH (黏类小麦育性相关基因 SSH 文库的构建)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报),**34**(6):975-971
- Li RJ, Wang HZ, Mao H,*et al.*. 2006. Identification of differentially expressed genes in seeds of two near-isogenic *Brassica napus* lines with different oil content[J]. *Planta*,**224**(4):952-962
- Li XY(李小艳),Zhao Y(赵云),Zhou YT(周云涛),*et al.*. 2006. Construction and primary analysis of suppression subtractive library of dwarf mutant 'NDF-1' in *Brassica napus* (甘蓝型油菜矮化突变体抑制消减 cDNA 文库的构建及初步分析)[J]. *Chin J Oil Crop Sci*(中国油料作物学报),**28**(4):396-402
- Liu Y(刘阳),Wang ML(王茂林),Qiu F(邱峰),*et al.*. 2005. The construction of the suppression subtractive library of the *Brassica napus* Mutant Cr3529(甘蓝型油菜突变体 Cr3529 抑制性消减文库的构建)[J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Edi*(四川大学学报·自然科学版),**42**(5):1 029-1 032
- Qi XY(戚向阳),Chen WJ(陈维军),Zhang LQ(张俐勤),*et al.*. 2006. Study on the inhibitory effects of natural sweetener mogrosins on radical and lipid peroxidation(罗汉果皂苷清除自由基及抗脂质过氧化作用的研究)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学),**39**(2):382-388
- Xiao G(肖钢),Zhang XY(张秀英),Zhang ZQ(张振乾),*et al.*. 2008. Construction of subtractive library for differentially-expressed genes at different developmental stages in *Brassica napus* (甘蓝型油菜种子不同发育期基因差异表达 cDNA 文库构建)[J]. *J Hunan Agric Univ: Nat Sci Edi*(湖南农业大学学报·自然科学版),**34**(5):513-518
- Zhene XF(郑晓峰),Huang G(黄刚). 2008. Tissue culture and rapid propagation of *Momordica grosvenorii* seedlings(罗汉果种苗组织培养与快繁技术)[J]. *Seed*(种子),**27**(4):102-104
- Zhou JY(周俊亚),Tang SQ(唐绍清). 2006. Genetic diversity of cultivated Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) Revealed by RAPD Markers(栽培罗汉果遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种),**4**(1):71-78