

沙田柚配子体自交不亲和花柱 消减文库的构建及分析

秦新民, 熊军, 阳晶, 万珊, 韦素玲

(广西师范大学生命科学学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 分别以沙田柚自交花柱 cDNA 为 tester, 异交花柱 cDNA 为 driver, 利用抑制性消减杂交技术构建了消减文库, 文库的重组率高于 95%, 插入片段集中在 100~500 bp 之间, 对文库部分克隆进行测序并与 GenBank 中的同源序列进行比较, 发现了一些类似于 *S1*、*S9-RNase*、激酶类等与自交不亲和相关的基因。

关键词: 沙田柚; 自交不亲和; 抑制性消减杂交; cDNA 文库

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)05-0425-05

Construction and Analysis of Suppression Subtractive Hybridization Library Related to Gametophytic Self-incompatibility in Style of *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort

QIN Xin-min, XIONG Jun, YANG Jing, WAN Shan, WEI Su-ling

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: A suppression subtractive hybridization library of *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort was constructed by using the cDNA of self-pollinated styles as the tester and cross-pollinated styles as the driver. In the constructed library, the rate of recombination was more than 95% and the size of inserts ranged from 100 bp to 500 bp. After the partial clones of the library were sequenced and compared with homologous sequences in GenBank Database, some genes related with self-incompatibility were obtained, such as *S1*, *S9-RNase* and *kinase*, etc.

Key words: *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort; Self-incompatibility; Suppression subtractive hybridization (SSH); cDNA library

植物自交不亲和性是广泛存在于显花植物的一种抑制自花受精、保持遗传多样性的遗传机制。目前普遍认为, 自交不亲和性在遗传上是受具复等位基因的 S-位点(S-Locus)控制, 并提出了“膜受体学说”^[1]和“胞内抑制剂学说”^[2]。迄今为止, 已有一些植物自交不亲和相关的 S-基因被分离克隆^[3-6]。沙田柚为广西的名优水果, 属于高度自交不亲和果树, 生产上普遍存在低产和需人工授粉, 阻碍了沙田柚生产的发展。20 世纪 90 年代以来, 对沙田柚自交不亲和性的细胞学和生化基础进行

了一些研究^[7-11], 分离纯化了沙田柚花柱特异 S-糖蛋白, 并对其生物活性及生化性质进行了研究^[12-13]。

本研究采用抑制性消减杂交技术(Suppressive subtraction hybridization, SSH)构建了沙田柚花柱自交不亲和抑制性消减文库, 对文库部分克隆并进行测序, 应用生物信息学工具对其分析, 发现了一些类似于 *S1*、*S9-RNase*、激酶类等与自交不亲和相关的基因, 为进一步克隆沙田柚花柱 S-基因及探讨自交不亲和性机理提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

沙田柚(*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort)采自广西桂林市雁山文家村果园 10 a 生结果树。TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司, PolyA Tract mRNA Isolation System Kit 购自 Promega 公司, PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 购自 Clontech 公司, QIAquick PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司, PGEM-T easy Kit 为 Promega 公司产品。

1.2 材料的处理

在盛花期进行人工自交和异交授粉(酸柚授粉), 3 d 后收集自交、异交授粉花柱, 截取自、异交花柱 1/2 部位上下 3 mm 部分(根据薛妙男等^[7]的报道, 沙田柚自交 3 d 时花粉管到达花柱的 1/2 处, 生长受阻。同时沙田柚花柱 S-蛋白基因表达主要在 1/2 花柱处的通道细胞^[10]), 立即放入液氮中保存备用。

1.3 总 RNA 的提取及 mRNA 纯化

用液氮分别研磨自、异交花柱成粉末, 按照 TRIzol Reagent 操作手册分离提取总 RNA。mRNA 的分离纯化按照 PolyA Tract mRNA Isolation System Kit 操作手册进行。

1.4 抑制性消减杂交

以自交花柱 cDNA 为 tester, 异交花柱 cDNA 为 driver 进行抑制性消减杂交, 具体操作按照 Clontech 公司 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 进行, 即从总 RNA 中分离纯化出 mRNA 并反转录合成 cDNA, 再将 tester cDNA 用限制性内切酶 *RsaI* 酶切, 分为两份, 分别与接头 1、2R 连接, 制成 tester-1 cDNA 和 tester-2R cDNA, 16℃ 连接过夜, 然后将它们分别与 driver cDNA 进行第一次杂交, 68℃ 杂交 8 h, 再将两组第一次消减杂交体系混合, 加入过量的变性 driver 进行第二次杂交, 68℃ 杂交过夜, 杂交产物稀释后, 以第一轮 PCR 引物 Primer 1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') 及巢式 PCR 引物 nested primer 1 (5'-TCGAGCGG CCGCCCGGGCAGGT-3') 和 nested primer 2R (5'-AGCGTGGTCGCGCCGAGGT-3') 进行第一次 PCR 扩增和第二次 PCR 扩增。

以未消减杂交的 PCR 结果作对照, 将 tester-1 cDNA 和 tester-2R cDNA 混合制备成 1-C 作为未消减杂交 PCR 反应模板, 同样以引物 Primer 1 及

巢式 PCR 引物 nested primer 1 和 nested primer 2R 进行第一次 PCR 扩增和第二次 PCR 扩增。

1.5 cDNA 文库的构建

取抑制性消减杂交 cDNA 的第二次 PCR 产物(共 25 μl) 3 μl, 与 1 μl 的 pGEM-T easy Vector (50 ng) 在 4℃ 下连接过夜, 从 10 μl 连接体系中取 2 μl 用反应液转化 DH5α 感受态细胞, 于 X-gal/IPTG Amp 琼脂平板上挑取白色菌落, 接种于盛有液体 LB 培养基的 1.5 ml 的离心管中, 37℃ 培养过夜后, 加 15% 甘油, 液氮速冻, -70℃ 保存。

1.6 DNA 测序与序列分析

将所得的文库阳性克隆冻存管培养物逐个挑到含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 摇床中过夜摇菌, 然后把离心管用封口膜封好, 送上海捷瑞生物工程有限公司进行双向测序。序列经去除载体序列和引物序列后, 先通过 BLASTn 软件对基因库 (GenBank) 中的非冗余 (non-redundant) 核酸数据库进行序列相似性检索, 通过比较与已知基因的同源程度, 推测 EST 序列所代表的基因的功能。对于 BLASTn 检索不能获知所代表基因功能的 EST 序列, 通过 BLASTx 与基因库中的非冗余蛋白质数据库进行序列相似性检索, 通过与已知蛋白的同源程度比较, 推测 EST 序列可能代表的基因功能。对经上述两步都不能确定功能的 EST 序列, 再通过 BLASTn 软件与基因库中的 EST 数据库进行相似性检索确定 EST 是已公布或是本研究中新发现的 EST 序列^[14]。

2 结果和分析

2.1 总 RNA 的提取和 mRNA 的分离

紫外分光光度计检测总 RNA 在波长 230 nm、260 nm、280 nm 处的吸收值, 得出 A_{260}/A_{280} 在 1.9 ~ 2.0 之间, 说明所提取的总 RNA 纯度较高。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 总 RNA 的 28S rRNA、18S rRNA 两条带清晰锐利, 亮度比呈现 2:1 的关系(图 1), 表明 RNA 未出现降解, 完整性较好。

2.2 双链 cDNA 的合成

用起始量为 2 μg 的 mRNA 反转录成 cDNA, 取 6 μl 进行电泳检测, 以确定其质量(图 2)。从图 2 可以看出, 用于构建消减文库的 cDNA(图 2 中的 1、2)主要在 0.5 ~ 5 kb 之间呈现弥散带, 这表明 cDNA 的质量较好, 可以满足下一步实验的要求。

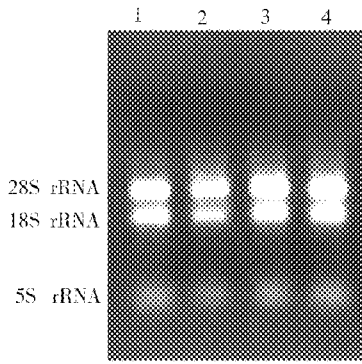


图 1 沙田柚花柱总 RNA

Fig. 1 The total RNA in styles of Shatinyu

- 1. 2. 自交花柱 Self-pollinated styles;
- 3. 4. 异交花柱 Cross-pollinated styles.

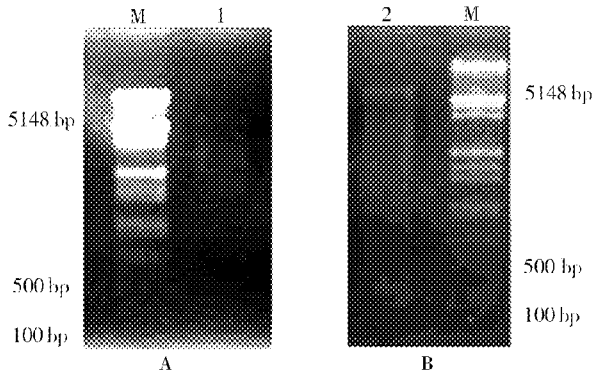


图 2 自交(A)和异交花柱(B)cDNA 电泳图

Fig. 2 The electrophoretogram of cDNA in self-pollinated (A) and cross-pollinated (B) styles

M: DNA Marker (ADNA/EcoRI + HindIII)

2.3 消减杂交后两次 PCR 结果分析

以自交花柱 cDNA 为 tester, 异交花柱 cDNA 为 driver 进行差减杂交后的产物进行 PCR 扩增, 两次 PCR 后进行电泳检测(图 3)。从图 3 可以看出,

第一次 PCR 扩增的电泳带较弱, 第二次 PCR 扩增后可看到明显的电泳带, 这说明消减基因得到了富集, 消减产物经过两轮消减杂交和两次抑制 PCR 后扩增出了弥散的条带, 说明沙田柚自、异交花柱差异表达基因得到了较好的均一化和差减。

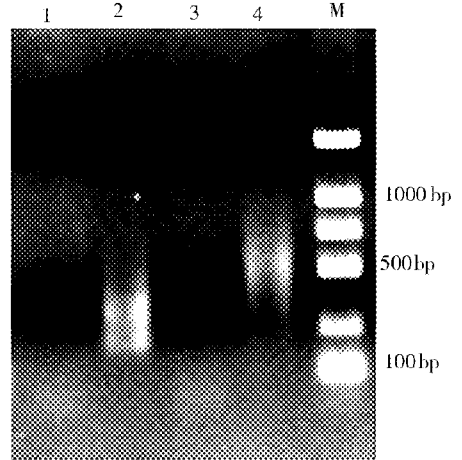


图 3 PCR 产物电泳图

Fig. 3 The electrophoretogram of PCR productin

- 1. 第一次 PCR, The first PCR;
- 2. 第二次 PCR, The second PCR;
- 3. 对照第一次 PCR, The first PCR of control;
- 4. 对照第二次 PCR, The second PCR of control.

2.4 SSH 文库的质量分析

差减文库蓝白斑检测显示其重组率高于 95%, 得到了 561 个克隆。从文库中随机挑取 80 个白色克隆使用巢式 PCR 引物 nested primer 1 和 nested primer 2R 进行菌落 PCR 并进行电泳检测(图 4, 部分结果), 可以观察到插入片段的大小分布在 100 ~ 500 bp 之间, 主要集中在 250 bp 左右, 插入片段大小与消减杂交第二次 PCR 产物(100 ~ 500 bp)相一致。

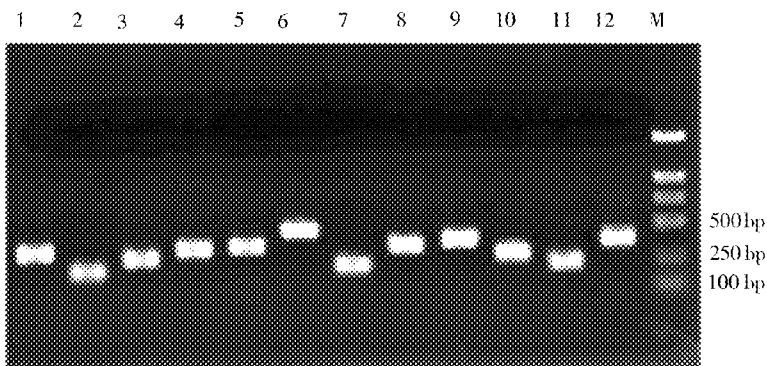


图 4 消减文库部分克隆的 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR result of partial clones from subtracted library

M: DNA Marker (DL-2000); 1 ~ 12: Different clones.

2.5 EST 序列分析

随机挑取的 80 个阳性克隆经检测后测序, 去除测序不好的 EST, 共获得质量较好的 EST 序列 67 条, 剔除重复以及去载体后少于 100 bp 的序列, 共得到差异 EST 序列 30 条, 对这些序列, 通过 BLASTx 和 BLASTn 软件对基因库(GenBank)中的非冗余数据库进行序列相似性检索, 其中 23 条通

过 BLASTx 搜索具有明确的功能对比结果(表 1)。

此外, 还有 7 条 EST 序列在 BLASTx 搜索中没有得到功能对比结果, 但通过 BLASTn 搜索, 其中 1 条与野生种三浅裂野牵牛(*Ipomoea trifida*)的自交不亲和 S-位点序列(SI)具有较高的同源性, 其相似度均为 88%, 另 1 条 EST 序列与苹果(*Malus × domestica*)的 *S9-RNase* 基因的相似度达 89%。

表 1 重组克隆插入片段测序结果 Blastx 分析

Table 1 Blastx analysis of the inserted fragment sequences of recombinant clones

GenBank 登录号 GenBank accession No.	Blastx 分析结果 Result of Blastx analysis	匹配物种 Organism	期望值 E-value	相似程度 Positives
EAZ21357.1	假定的蛋白 Hypothetical protein	水稻 <i>Oryza sativa</i>	1e-22	54/54 (100%)
AAR01752.1	推定的转录延伸因子 Putative transcription elongation factor	水稻 <i>Oryza sativa</i>	7.1	13/40 (32%)
CAB69824.1	质膜 H + ATPase Plasma membrane H + ATPase	桃 <i>Prunus persica</i>	6e-22	53/54 (98%)
BAB33421.1	推定的衰老关联蛋白 Putative senescence-associated protein	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	2e-41	78/84 (92%)
NP_001078275.1	推定的丙酮酸激酶 Putative pyruvate kinase	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	3e-40	84/89 (94%)
ABF47292.1	硒半胱氨酸转甲基酶 Selenocysteine methyltransferase	茶 <i>Camellia sinensis</i>	2e-20	59/76 (77%)
AAF23822.1	同型半胱氨酸 S-转甲基酶 Homocysteine S-methyltransferase (AtHMT-2)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-20	58/76 (76%)
BAD18907.1	rRNA 内含子编码核酸内切酶 rRNA intron-encoded endonuclease	热变形菌属 <i>Thermoproteus</i> sp. IC-062	0.13	28/63 (44%)
ZP_00731820.1	细胞壁关联水解酶 Cell wall-associated hydrolase	琥珀酸放线杆菌 <i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	1.1	19/38 (50%)
ZP_01682343.1	tRNA(尿嘧啶-5-)转甲基酶 tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> V52	4.2	19/38(50%)
ZP_01682025.1	尿嘧啶 DNA 糖基酶 Uracil-DNA glycosylase	霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i> V52	4.2	19/38 (50%)
AAV68712.1	3-β 羟类固醇脱氢酶 3-Beta hydroxysteroid dehydrogenase	洋地黄 <i>Digitalis grandiflora</i>	2e-26	62/107 (57%)
NP_189570.3	氧化还原酶 Oxidoreductase	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	2e-24	61/108 (56%)
XP_653341.1	蛋白激酶受体 Receptor protein kinase	溶组织内阿米巴 <i>Entamoeba histolytica</i>	7.2	20/72 (27%)
AAK31801.1	β 半乳糖酶 Beta-galactosidase	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	2e-39	78/78 (100%)
CAA68405.1	血红蛋白 Hemoglobin	山黄麻 <i>Trema tomentosa</i>	2e-09	29/31 (93%)
CAP19994.1	推定的氨基酸透(性)酶 Putative amino acid permease 6	香橼 <i>Citrus medica</i>	1.2	16/17 (94%)
NP_001035185.1	组织因子途径抑制剂 2 Tissue factor pathway inhibitor 2	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	5e-05	29/84 (34%)
423206 SPINT1	丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1	家鸡 <i>Gallus gallus</i>	7e-04	22/58 (37%)
0704259A	蛋白酶抑制剂 A Inhibitor A, proteinase	牛 <i>Bos taurus</i>	0.014	18/56 (32%)
KPYC_TOBAC	细胞质同工酶 Cytosolic isozyme	阳芋 <i>Solanum tuberosum</i>	2e-42	79/84 (94%)
EAV65841.1	吡哆磷酸盐生物合成蛋白 Pyridoxal phosphate biosynthetic protein	伯克氏菌 <i>Burkholderia multivorans</i>	3e-05	23/25 (92%)
Q2SXT2	DNA 修复蛋白 DNA repair protein recO	重组蛋白 O Recombination protein O	9.3	15/15 (100%)

3 讨论

SSH 是 Diatchenko 等于 1996 年建立的一种应用 PCR 方法的消减杂交技术^[15], 与其他差异显示技术相比, 具有敏感性高、周期短、假阳性少、重复性好等突出优点, 可使低丰度的 mRNA 得以高于

1 000 倍的富集, 可被转录成 cDNA, 特别适合于遗传背景差异不大的材料, 该技术问世以来, 在植物基因克隆上得到了广泛的应用, 目前已有成功报道^[16-19]。虽然该技术的主要缺陷是在建库过程中得到的仅是 EST, 但这些基因片段可通过末端快

速扩增(Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 或者 EST 电子拼接技术得到基因的全长^[20]。虽然 SSH 中两次 driver cDNA 均过量,可能会掩盖 tester cDNA 中某些有表达差别的 cDNA 而丢失一些差异较小的基因,但 SSH 在分离差异表达基因中不需已知基因序列信息且具有上述的优点,可以认为 SSH 是高通量分离沙田柚配子体自交不亲和相关基因的首选技术。运用该技术,可以有效分离出差异表达基因,为从整体水平研究基因的差异表达,进行大规模、高通量的基因功能研究提供有效的技术支持。

本研究所得的 67 条 EST 序列中 23 条具有明确的功能比对结果(表 1),根据功能分类,它们大部分与催化功能相关,如丙酮酸激酶、转甲基酶、水解酶、氧化还原酶等,还有一些与酶活性调节功能相关,如丝氨酸蛋白酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、组织因子抑制剂等,另一些与信号传递相关,如蛋白激酶受体等。此外,无功能比对结果的 7 条 ESTs,通过 BLASTn 搜索,其中 2 条与 S1、S9-RNase 相似度分别达到了 88% 和 89%,且二者均与自交不亲和 S 基因相关,这 2 条 ESTs 极有可能是决定沙田柚配子体自交不亲和的 S 基因。这意味着决定沙田柚配子体自交不亲和的有可能不仅仅是 S 等位基因,也许是一些影响因子综合作用的结果。当然,这些基因是否是决定沙田柚自交不亲和的基因,需要进行 EST 序列全长 cDNA 克隆与进一步的功能验证。

参考文献

- [1] Haring V, Gray J E, McClure B A, et al. Self-incompatibility as a model of cell-cell recognition in plants [J]. *Science*, 1990, 250: 937-941.
- [2] Kao T H, Huang S. Gametophytic self-incompatibility a mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction [J]. *Plant Physiol*, 1994, 105: 461-466.
- [3] Castillo C, Takasaki T, Saito T, et al. Cloning of the S8-RNase (S8-allele) of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. *Plant Biotechnol*, 2002, 19(1): 1-6.
- [4] Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F, et al. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 931-941.
- [5] Tao R, Yamane H, Sassa H, et al. Identification of stylar RNase associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Pyrus dulcis*) [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38: 304-311.
- [6] Broothaerts W, Janssens G A, Proost P, et al. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 499-511.
- [7] Xue M N(薛妙男), Chen T T(陈腾士), Yang X H(杨小华). Observations on self and cross-compatibility in Shatinyu [J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*, 1995, 22(2): 127-132.(in Chinese)
- [8] Li N(李楠), Zhang X H(张杏辉), Xie M N(薛妙男), et al. Studies on structure of stigma of Shatinyu and the ways of pollen tube enter the stigma [J]. *J Guangxi Norm Univ (Nat Sci)(广西师范大学学报: 自然科学版)*, 1995, 13(4): 58-63.(in Chinese)
- [9] Chen T T(陈腾士), Yang X H(杨小华), Xue M N(薛妙男). Effects of the stylar proteins on the pollen tube growth of Shatinyu [J]. *Guibaia(广西植物)*, 1998, 18(2): 160-164.(in Chinese)
- [10] Xue M N(薛妙男), Li N(李楠), Zhang X H(张杏辉), et al. The time and space relations on the glycoprotein forming from self-incompatibility style of Shatinyu [J]. *Guibaia(广西植物)*, 2000, 20(2): 164-167.(in Chinese)
- [11] Xue M N(薛妙男), Li Y P(李义平), Zhang X H(张杏辉), et al. Immunogold localization of S1-RNase in the self pollination style of *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort [J]. *J Guangxi Norm Univ (Nat Sci)(广西师范大学学报: 自然科学版)* 2000, 18(1): 81-84.(in Chinese)
- [12] Yang J H(杨继华), Li H Y(李红艳), Xue M N(薛妙男). The purification and identification of S-glycoprotein in the style of *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort [J]. *J Guangxi Norm Univ (Nat Sci)(广西师范大学学报: 自然科学版)*, 2000, 18(4): 66-70.(in Chinese)
- [13] Yang J H(杨继华), Rao G R(饶桂荣), Xue M N(薛妙男). Purification and amino-terminal sequencing of style S-glycoproteins in *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort [J]. *J Guangxi Norm Univ (Nat Sci)(广西师范大学学报: 自然科学版)*, 2001, 19(1): 72-79.(in Chinese)
- [14] Tang H(汤华), Zheng Y L(郑用琏), He L Y(贺立源), et al. Isolation of maize genes related to aluminum tolerance [J]. *J Plant Physiol Mol Biol(植物生理与分子生物学学报)*, 2005, 31(5): 507-514.(in Chinese)
- [15] Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93: 6025-6030.
- [16] Zhang J P, Liu T S, Fu J J, et al. Construction and application of EST library from *Setaria itadica* in response to dehydration stress [J]. *Genomics*, 2007, 90: 121-131.
- [17] Rizzo M, Bernardi R, Salvini M, et al. Identification of differentially expressed genes induced by ozone stress in sensitive and tolerant poplar hybrids [J]. *J Plant Physiol*, 2007, 164: 945-949.
- [18] Zinser C, Seidlitz H K, Welzl G, et al. Transcriptional profiling of summer wheat, grown under different realistic UV-B irradiation regimes [J]. *J Plant Physiol*, 2007, 164: 913-922.
- [19] Verica J A, Maximova S N, Strem M D, et al. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 23: 404-413.
- [20] Yang X M(杨锡明), Gao L(高磊), Luan J(栾静). Proceeding and methods to get full-length cDNA [J]. *J Mod Lab Med(现代检验医学杂志)*, 2005, 20(3): 80-83.(in Chinese)