

番茄长花柱品系 T431 低温胁迫下正向差减文库的 构建及 ESTs 分析

王勇 谭丽丽 燕正民 徐亚英 陈典*

(东北农业大学 园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要 本研究以番茄长花柱品系 T431 为材料利用抑制性消减杂交技术(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)构建了低温胁迫下的番茄长花柱突变体 SSH cDNA 正向差减文库,获得 398 个阳性克隆。经菌液 PCR 和 Reverse Northern Blot 杂交方法结合剔除假阳性,利用 BLAST 在 GenBank 数据库进行序列相似性比对,获得有功能的 ESTs 173 个。通过对所获得的 ESTs 序列进行功能分类发现,其中参与初级代谢、能量代谢、抗病/防御反应和信号传导等过程的基因相对较多。此外,还有一些基因参与植物体内蛋白质合成与加工、物质运输、转运调控与生殖发育等过程。

关键词 番茄; 长花柱; 正向差减文库; 低温胁迫; ESTs

中图分类号 S 641.2

文章编号 1007-4333(2010)06-0027-07

文献标志码 A

Construction of forward subtractive library under low temperature stress on the long-style line T431 of tomato and ESTs analysis

WANG Yong, TAN Li-li, YAN Zheng-min, XU Ya-ying, CHEN Dian*

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Using the long-style tomato line T431 as the experimental material, we constructed a forward subtracted library by suppressive subtractive hybridization (SSH) method. The cDNA library contained 398 positive clones, which were identified through PCR and Reverse Northern Blot. By comparing with sequences in the database of GenBank with BLASTn and BLASTx algorithm, we obtained a total of 173 functional ESTs. Functional classification of these ESTs indicates that many of them are involved in primary metabolism, energy metabolism, disease resistance/defense or signal transduction. In addition, some genes are implicated in biological processes such as protein synthesis and processing, transportation regulation, and reproductive development, etc.

Key words tomato; long-style line; forward subtractive library; low temperature stress; ESTs

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)系茄科番茄属植物,是分子生物学研究中模式植物之一。番茄为自花授粉作物,其正常花器的构造为:花药联合成筒状,雌蕊的柱头包被于花药之内或与之平齐,从而保证其接受自身花粉,完成受精作用。而长花柱型突变体的柱头凸伸于花药之外,难以接受自身花粉,因此在杂交制种时,将其作为母本,接受父本花粉,既省去人工去雄的步骤又可提高杂交种子的纯

度,可极大提高番茄制种的经济效益。

T431 为一个稳定的番茄长花柱型自交系,但它的长花柱性状与温度有关,表现为低温下的花柱生长抑制。T431 对低温的敏感时期为花芽分化期^[1],但影响其花柱发育的相关因子尚不清晰。目前,在番茄的雌蕊和雄蕊的形态建成中已鉴定和分离了多个特异基因^[2-4],Chen 等通过 QTL 分析,认为番茄中至少 5 个基因,包括 1 个花柱伸长基因、3 个雄蕊

收稿日期: 2010-03-31

基金项目: 东北农业大学创新团队基金(CX7002-4-2); 黑龙江省青年基金(QC07C46); 东北农业大学“211”人才专项基金(2004)

第一作者: 王勇,副教授,博士,主要从事蔬菜分子育种研究,E-mail:acaciawy@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈典,教授,主要从事蔬菜栽培与生理研究,E-mail:summerchen69@126.com

伸长基因和1个花药闭合基因共同决定了柱头的长短^[5],但关于这些基因的详细信息并未获得。了解番茄长花柱突变体花柱发育与温度之间的相关关系,进而了解温度对该突变体花柱发育的分子调控机制,对于获得稳定的长花柱功能型番茄雄性不育系至关重要。本研究通过构建低温胁迫下的番茄长花柱突变体 SSH 文库并对所获得的 ESTs 进行比较分析,期望从中获得与 T431 花柱发育温敏相关的 ESTs,从而为进一步克隆花柱伸长相关调控基因,探讨长花柱温敏调控机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验材料为番茄长花柱突变体 T431,由东北农业大学番茄课题组提供。材料处理参考陈丽等的方法^[6]:在花芽分化期(2叶1心期)将苗移入光照培养箱进行温度处理,低温处理温度(昼/夜)为 18 °C/10 °C,以 28 °C/20 °C 为对照;将低温处理(18 °C/10 °C)的番茄 T431 定义为 E,将正常温度(28 °C/20 °C)的番茄 T431 称为 C,分别在处理 3、6 和 9 d 后取材(茎尖生长点组织),液氮速冻,将每次所取 E 和 C 分别等量混合,-70 °C 冻存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取与 mRNA 纯化

采用 Invitrogen 的 Trizol 试剂盒(Cat. No. 15596-026, USA)提取茎尖总 RNA,按说明书操作。将检测可用的 RNA 按照 Promega 公司的 PolyA Ttract mRNA Isolation 试剂盒(Cat. # Z5200, USA)进行 mRNA 纯化,产物于质量分数 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 双链 cDNA 的合成和抑制消减杂交

按 TaKaRa 公司产品 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit(Code No. D6130, JAPAN)说明书进行操作。*Rsa* I 酶切、连接接头、2 轮杂交和 2 轮 PCR 反应均参照 Clontech 公司 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit(Cat. No. 637401, USA)说明书进行。其中 E 为 tester, C 为 driver 进行消减杂交。

1.2.3 cDNA 消减文库构建

将 2 种差减杂交的第 2 次 PCR 产物均按照 Takara 公司 DNA Fragment Purification Kit(Code No. DV807A, JAPAN)进行纯化,纯化产物与

pGEM-Teasy 载体连接,并转化于 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,通过蓝白斑筛选获得 SSH cDNA 文库。

1.2.4 文库质量评价

根据蓝白斑筛选阳性克隆,保存菌种。随机挑取正向文库阳性克隆,重新活化,采用 TIANGEN 公司质粒提取试剂盒提取质粒,以菌液为模板对插入片段进行 PCR 扩增检测文库片段大小。

1.2.5 反向 Northern 杂交初步筛选差异表达

反向 Northern 杂交筛选阳性克隆,以 E 和 C 材料总 RNA 为模板,用 M-MLV Reverse transcriptase (Promega 公司, Cat. # M1701, USA)分别合成正向探针和反向探针,分别与点在尼龙膜上的正向质粒 DNA 进行 Reverse Northern Dot-Blot,经杂交、洗膜和显色后,筛选出差异性阳性克隆进行测序。

1.2.6 克隆测序和序列同源性分析

经菌液 PCR 和反向 Northern 杂交筛选出差异性阳性克隆送上海生物工程有限公司进行测序。测序后,去除载体和接头引物序列,提交 GenBank 进行核苷酸、蛋白质等序列的同源性分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 与 mRNA 检测结果

提取的番茄茎尖组织总 RNA 用紫外分光光度计检测并计算其浓度和纯度, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间,表明所提取的总 RNA 无蛋白质和 DNA 污染,纯度较好。经琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),28S 与 18S 条带荧光亮度接近 2:1, RNA 条带清晰无弥散现象,结构完整,未发生降解,表明提取的总 RNA 质量较好,符合构建文库的质量标准。将检测可用的 RNA 进行纯化,纯化后的 mRNA 呈弥散状,大小分布在 250~2 000 bp 之间(图 2)。

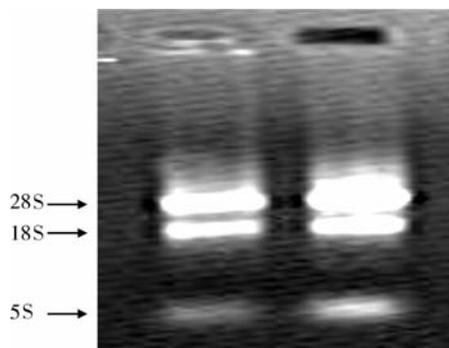
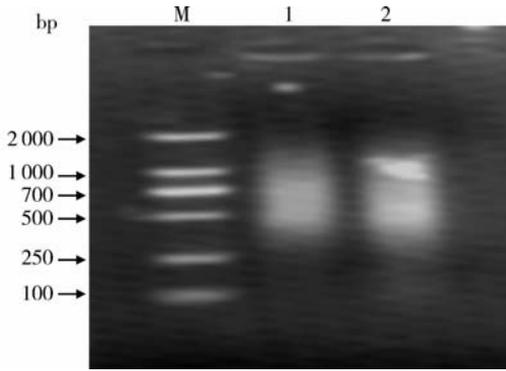


图 1 番茄茎尖组织总 RNA

Fig. 1 Total RNA of tomato shoot tip tissue

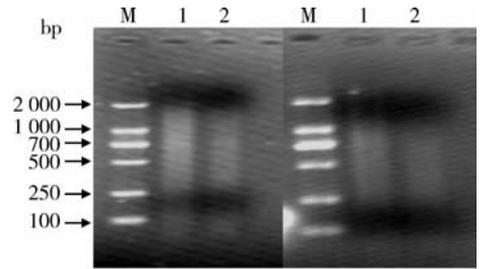


1 为 E 样品的 mRNA;2 为 C 样品的 mRNA;M 为 DL2000。

图 2 mRNA 电泳检测

Fig. 2 Detection of mRNA

接头连接和杂交操作,结果如图 3。



(a)酶切前 cDNA (b)酶切后 cDNA

1 为 E 的 cDNA,2 为 C 的 cDNA;M 为 DL 2 000。

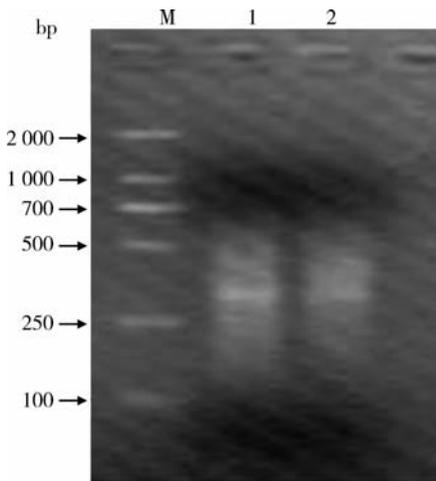
图 3 Rsa I 酶切前后 cDNA 双链对比

Fig. 3 Comparison of double stranded cDNA before and after Rsa I digestion

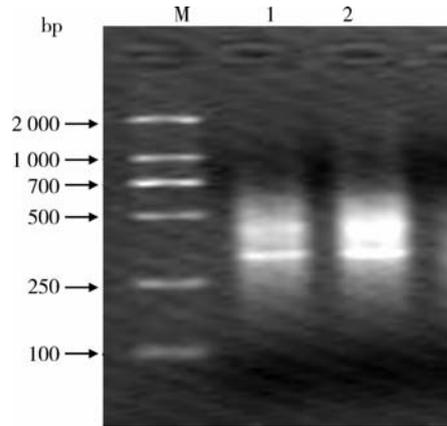
2.2 消减杂交与抑制 PCR

纯化 mRNA 后,合成双链 cDNA,经 Rsa I 酶解,酶切后 cDNA 片段主要分布在 200~1 100 bp 之间,与酶切前相比,酶切后 cDNA 片段分布范围明显缩小,说明酶切的效果较好,可以进行接下来的

将经 Rsa I 酶消化的平末端短片段连上接头,经过 2 轮杂交 2 轮 PCR 扩增后,片段主要分布在 200~700 bp 之间且在 300 和 400 bp 处有 2 条较亮的条带,符合构建 SSH 文库标准(图 4)。



(a) 第 1 次 PCR 产物



(b) 第 2 次 PCR 产物

1 为正向 PCR 产物;2 为反向 PCR 产物;M 为 DL2000。

图 4 PCR 扩增

Fig. 4 Analysis of subtracted products after PCR

2.3 SSH cDNA 文库质量评价

PCR 扩增后的 cDNA 经纯化后连接到 pGEM-Teasy 载体上,并转化 E. coli DH5α 感受态细胞中形成 SSH cDNA 文库,其中正、反向差减文库中挑取 398 和 327 个阳性克隆保存。挑取正向 SSH 文

库中的阳性克隆,以菌液为模板,Nested primer-1 和 Nested primer-2R 为引物进行 PCR 扩增,电泳结果表明插入片段大部分集中在 150~700 bp 之间,与 SSH 文库预计插入片断大小一致,可用于杂交筛选和序列分析(图 5)。

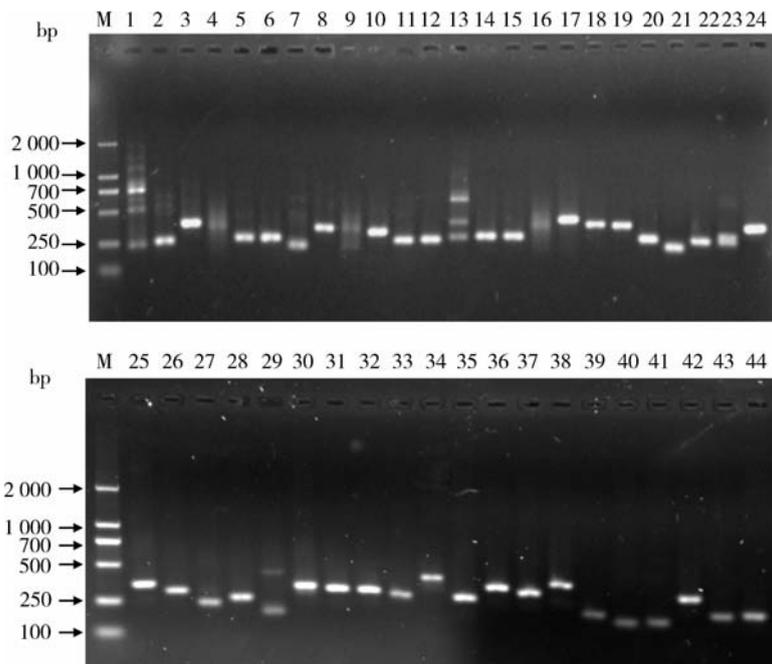
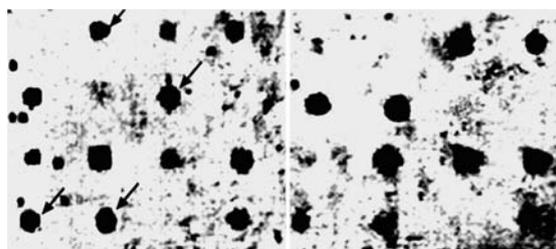


图5 插入片段 PCR 检测

Fig. 5 PCR detection of inserts from randomly picked clones

2.4 反向 Northern 杂交筛选阳性克隆

分别以 E 和 C 材料的总 RNA 进行逆转录标记后的 cDNA 作为正、反向探针,分别与点在尼龙膜上的正向质粒 DNA 进行 Reverse Northern Dot-Blot,经杂交、洗膜和显色后,挑选出在 Tester 膜和 Driver 膜中杂交信号有差异的 189 个克隆进行测序分析(图 6)。



(a)正向探针 (b)反向探针
箭头指有差异的克隆

图6 反向 Northern 杂交

Fig. 6 Reverse Northern blot

2.5 序列测定结果与分析

将所有测出的序列去除载体序列、两端的巢式引物序列和低质量序列后,共获得 173 个可利用 ESTs 序列,利用率达 91.5%;其中最短的 EST 序列为 123 bp,最长的序列为 617 bp,平均每个片段长度为 341 bp。将上述 ESTs 序列在 NCBI 中

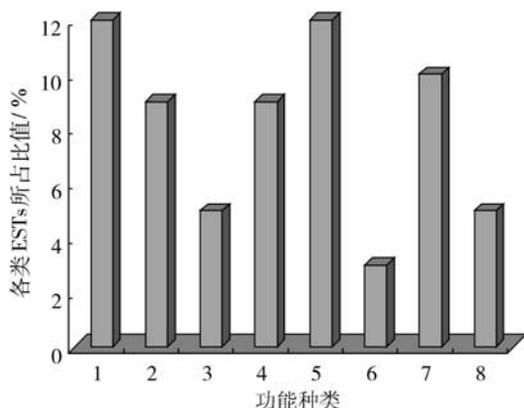
BLAST 数据库中分析后发现:有 140 条 ESTs 序列具有编码蛋白质的功能,占全部分析 ESTs 序列的 80.9%,其余 33 条 ESTs 序列与已知蛋白质同源性较低或找不到任何同源序列。在 140 条具有编码蛋白质功能的 ESTs 序列中 104 条序列的功能已知,36 条与推测、假想或功能未知的蛋白质具有很高的同源性。

通过分析发现,这些序列都来源于生物与非生物胁迫的 cDNA 文库,而且部分 ESTs 同时和多种胁迫条件下的 ESTs 有同源性。为了进一步了解所获得的 EST 序列功能,对这些差异片段进行了功能分类,发现这些序列基因参与植物体内的各种代谢反应。其中,初级代谢相关基因 12 种,约占 8.5%;能量代谢相关基因 9 种,约占 6.4%;信号传导相关基因 12 种,约占 8.5%;抗病与防御相关基因 10 种,约占 7.1%。此外还有一些基因参与植物体内蛋白质合成与加工、物质运输、转运调控与生殖发育等过程(表 1,图 7)。

表 1 列出了部分已知基因的名称和序列号,通过分析可以看出番茄长花柱突变体在低温敏感时期,其体内多种代谢途径和生理生化反应发生了改变,涉及的基因种类多,代谢途径复杂(图 7)。在低温胁迫下,信号传导基因表达,启动抗病与防御体系,加强能量代谢与物质代谢,调控看家基因的表达。

表 1 部分 cDNA 序列 Blast 分析
Table 1 Blast analysis of some cDNA

序列号	长度/bp	Blast 功能分析结果	E 值	一致性
光合作用				
A247	290	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxy lase/oxygenase small subunit	3e-147	289/290(99%)
A305	385	Chloroplast protein	2e-31	232/286(81%)
A297	567	RuBP carboxylase small subunit	1e-142	474/484(98%)
A125	496	Carbonic anhydrase	1e-25	75/125(60%)
A223	123	Chlorophyll a/b-binding protein	1e-53	121/123(98%)
A37	255	Photosystem I protein	5e-52	120/123(97%)
A146	351	Light-harvesting complex I protein	6e-21	80/91(87%)
蛋白质相关基因				
A258	418	S-adenosylmethionine decarboxylase	6e-47	118/124(95%)
A44	308	Ribosomal protein L7	2e-94	257/289(88%)
A92	526	Ribosome-associated protein	5e-143	357/395(90%)
A40	305	60S ribosomal protein L31	1e-62	236/285(82%)
A53	189	Eukaryotic translation initiation factor	2e-93	189/189(100%)
A116	568	Ubiquitin-related protein	4e-71	391/434(99%)
A251	143	Ubiquitin-conjugating enzyme	1e-64	141/143(98%)
A68	473	Ubiquitin carboxyl- teratinal hydrolase	7e-59	46/60(76%)
信号传导				
A73	188	Extracellular Ca ²⁺ sensing receptor	4e-55	157/175(89%)
A163	404	Calmodulin-binding protein	2e-48	247/277(89%)
A84	609	Putative calcium binding EF-hand protein Calcium-dependent protein kinase	1e-63	495/538(92%)
A134	274	Putative 7-transmembrane G-protein coupled receptor mRNA	3e-112	254/268(94%)
转运调控				
A227	315	Glutaredoxin (GRX1)	2e-144	300/309(97%)
A278	357	Translational controlled tumor protein	8e-66	147/151(97%)
A34	256	Ubiquitin carrier protein	4e-71	220/255(86%)
A142	264	Transcriptional coactivator multiprotein	2e-134	263/263(100%)
A5	251	Histone	4e-46	190/231(82%)
A90	289	Actin-depolymering factor	7e-49	193/233(82%)
A193	526	Dehydroascorbate reductase (DHAR)	9e-61	131/131(100%)
抗病与防御				
A39	197	Salt responsive protein	1e-85	189/197(95%)
A299	252	Wound-inducible proteinase inhibitor I	2e-68	218/252(86%)
A72	132	Heat stress protein	1e-53	128/133(96%)
A4	258	Heat shock protein 70 ku	1e-96	201/204(98%)
其他				
A184	281	Mary storys protein(Capsicum annum)	4e-80	181/189(95%)
A248	598	Arabidopsis thaliana cDNA from Hormone treated Callus of strain	3e-37	384/469(82%)
A276	496	Arabidopsis thaliana cDNA from Flowers and buds of strain	6e-34	305/376(81%)



1, 初级代谢; 2, 能量代谢; 3, 蛋白质合成; 4, 转运相关; 5, 信号传导; 6, 蛋白质加工、储藏、修饰; 7, 抗病与防御; 8, 次生代谢。

图7 SSH cDNA文库ESTs功能分类

Fig. 7 Functional classification analysis of ESTs in the SSH cDNA library

3 讨论

番茄长花柱品系 T431 的花柱伸长长度受温度控制, 在正常温度下, 花柱伸长于花药之外, 表现为不育, 但在低温胁迫下, 则花柱伸长明显受阻, 表现为可育。其花柱发育的温敏时期为花芽分化期^[6], 在本研究中我们取花芽分化期的 T431 茎尖作为试材, 通过对正向差减文库的分析发现:

1) 信号传导类基因明显增加 番茄长花柱突变体在遭受低温胁迫后, 首先调控发挥信号传导作用的基因过量表达, 本研究发现信号传导相关基因 12 种, 其中 Ca^{2+} 类蛋白和乙烯合成相关酶类大量增加。 Ca^{2+} 在雄性不育中具有重要的作用, 它还作为第二信使参与低温胁迫下植物的成花过程^[7], 不同类型的雄性不育, 其花粉败育的方式不同, Ca^{2+} 的分布与作用也不同^[8-9], 而降解酶类、乙烯等在拟南芥的诱导防卫反应的信号传导中起到了很重要的作用^[10-11], 本研究中 Ca^{2+} 和乙烯合成相关酶类的大量捕捉, 显示了二者作为传导信号启动了 T431 对低温逆境的反应进程。

2) 系统防御类基因增多 在植物与环境相互作用的过程中, 植物体内会通过各种代谢途径产生相应抵抗不良环境的物质。因此, 植物在接受外界胁迫信号(干旱, 冷害, 盐渍, 病原菌等)后, 就会产生防卫反应。在所获得的 ESTs 中存在很多非生物胁迫诱导蛋白如干旱诱导蛋白、低温诱导蛋白、冷诱导蛋白、热休克蛋白等^[12], 它们在植物抗性方面发挥

着重要的作用^[13]。在 10 个抗病防御序列里约有一半的基因来源于非生物胁迫的 cDNA 文库。这一结果暗示了生物机体对外界的胁迫反应可能存在着某些共同的机制。它们将各种代谢途径调节到一个新的水平, 合成出比正常环境条件下更多、更复杂的产物足以抵抗逆境或防御病害。

3) 涉及泛素降解途径的基因明显较多 在植物遭受低温胁迫后, 蛋白质、氨基酸便承担起能量供应的任务。此外还有多个与蛋白质合成相关的核糖体蛋白, 其中部分核糖体蛋白基因属于看家基因, 有研究证明低温等逆境条件会诱导泛素蛋白与核糖体蛋白合成^[14-15], 因此, 推测本试验中核糖体蛋白基因的出现可能与长花柱突变体番茄受低温敏感温度的影响有关。

4) 转运调控基因的捕捉 在所构建的 cDNA 文库中存在着已经报道的参与表达调控的基因包括谷氧还蛋白、组蛋白、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和肌动蛋白解聚因子(ADF)等多个基因。其中 ADF 与花粉粒发育和萌发有关^[16], 组蛋白与基因的转录调控有关^[17], 而 DHAR 则与细胞内活性氧自由基有关^[18], 它们在植物抵御外界不良环境的过程中都起到了非常重要的作用, 在本研究中这几种类型的转运表达调控因子在番茄 ESTs 文库中都具有较高的表达频率, 但其具体功能还需进一步确定。

抑制差减文库可用于捕捉植物不同生长阶段或不同生境条件下差别表达的基因, 但该方法存在假阳性高和工作量大的缺点。本研究中虽然通过文库构建得到了一些差异表达的表达式序列(EST), 但对于这些 ESTs, 可以结合反向文库的结果进行选择, 进而进行全长基因的克隆, 并结合转基因技术及 RNAi 技术进行基因功能的分析与验证, 以确定调控 T431 花柱发育的温敏相关基因, 这也是下一步工作的主要方向。

参 考 文 献

- [1] 陈丽. 番茄长花柱突变体低温敏感时期及相关生理指标的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008: 20-32
- [2] Baldet P, Hernould M, Laporte F, et al. The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants [J]. J Exp Bot, 2006, 57: 961-70
- [3] Weyman P D, Pan Z, Feng Q, et al. A circadian rhythm-regulated tomato gene is induced by Arachidonic acid

- and *Phytophthora infestans* infection [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140: 235-48
- [4] McNeil K J, Smith A G. An anther-specific cysteine-rich protein of tomato localized to the tapetum and microspores[J]. *J Plant Physiol*, 2005, 162: 457-64
- [5] Chen K Y, Tanksley S D. High-resolution mapping and functional analysis of se2. 1: a major stigma exertion quantitative trait locus associated with the evolution from allogamy to autogamy in the genus *Lycopersicon* [J]. *Genetics*, 2004, 168: 1563-1573
- [6] 陈丽, 谭丽丽, 王勇. 番茄温敏型功能雄性不育生理机制的初步研究[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(1): 31-35
- [7] 李宪利, 袁志友, 高东升. 高等植物成花分子机理研究现状及展望[J]. *西北植物学报*, 2002, 22(1): 173-183
- [8] 孟祥红, 王建波, 利容千. 光周期对光敏胞质不育小麦花药发育过程中 Ca^{2+} 分布的影响[J]. *植物学报*, 2000, 42: 15-22
- [9] 李新国, 张建霞, 孙中海. Ca^{2+} 信号系统对低温下柑橘膜脂过氧化和抗氧化酶的影响[J]. *广西植物*, 2007, 27(4): 643-648
- [10] Brader G, Tas E, Palva E T. Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora* [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 849-60
- [11] 陈银华, 黄伟, 王海. ACC 氧化酶基因研究进展[J]. *海南大学学报自然科学版*, 2006, 24(2): 194-200
- [12] 阮松林, 童建新, 赵杭莘. 植物响应逆境胁迫蛋白质组学研究进展[J]. *杭州农业科技*, 2007, 2: 15-18
- [13] 廖海, 杜林方, 周嘉裕. 植物中蛋白类蛋白酶抑制剂的研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2002, 14(1): 80-84
- [14] 许传俊, 李玲. 泛素/26S 蛋白酶体途径与植物的生长发育[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(3): 0635-0643
- [15] 王冀姝, 杨曦, 李荣. 核糖体蛋白 L6/Taxreb107 的核定位信号的分析[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(1): 144-148.
- [16] Krizek B A, Fletcher J C. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide [J]. *Nature*, 2005, 6: 688-698
- [17] 曹双河, 刘冬成, 郭小丽, 等. 小麦光温敏核雄性不育基因的初步定位[J]. *遗传学报*, 2004, 31: 293-298
- [18] 张燕子, 马锋旺, 张军科, 等. 苹果脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)基因 cDNA 片段的克隆及序列分析[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2007, 35(1): 179-183