

高盐胁迫下的草原龙胆基因表达分析

王继刚¹, 张 坤², 李葵花¹, 冯国军³, 李玉花¹

(1. 东北林业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 西南林学院 学报编辑部, 云南 昆明 650224 3. 哈尔滨市农业科学院 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘 要: 为了更好的理解植物对盐胁迫的反应的分子机理, 结合差减抑制杂交技术和基因芯片的方法, 研究了草原龙胆对于高盐胁迫响应重要性和新基因。先利用草原龙胆 50[#] 叶片进行盐处理和非盐处理, 并以此构建抑制差减文库。从此文库中选取部分克隆构建了草原龙胆基因芯片, 进行了芯片分析, 研究了高盐处理对非处理条件下的基因表达变化。在 3 h 的高盐胁迫下, 基因芯片分析显示有 36 个单一基因有差异表达, 大多数基因未见报道。这些基因的存在表明盐胁迫导致了草原龙胆复杂的胁迫响应。

关键词: 草原龙胆; 芯片; 抑制差减杂交; 盐胁迫

中图分类号: S 567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)11-0139-04

草原龙胆 (*Eustoma Grandiflorum*) 属龙胆科植物, 原产北美洲, 具有一定的抗盐碱能力, 是国际流行的切花种类^[1]。目前, 对草原龙胆基因的研究主要集中在花发育的方面, 对其作抗性进行的相关研究还未见报道。鉴于其优良的经济价值和一定的抗盐碱能力, 以及与模式植物拟南芥、水稻等植物亲缘关系较远的特点, 利用其研究盐抗性机理、分离盐抗性相关基因可以作为盐抗性研究的一个新出发点。

植物的盐抗性是一个多基因控制的复杂性状。在盐胁迫条件下, 植物通过膜以及细胞内的感受器感应离子以及脱水胁迫, 并通过次级信号因子 (如 Ca^{2+} , 活性氧) 调控转录因子的表达, 精调 Na^+ 通道及 Na^+ 的区隔化, 从而调整 Na^+/K^+ 的平衡; 合成 LEA 蛋白和渗透调节物质等以维持细胞渗透平衡; 同时, 启动 ROS 清除系统以控制细胞内的氧化胁迫。通过基因芯片研究水稻、拟南芥、番茄等在盐胁迫条件下基因表达变化, 发现上调表达的基因涉及到转录因子、解毒系统基因、离子均一化基因、电子传递系统基因、蛋白酶抑制剂等细胞代谢的很多方面^[2-4]。

基因芯片技术目前已经成为大规模研究植物胁迫基因表达的重要手段, 可以同时检测数千至数万基因的表达情况, 并且在植物胁迫的研究中已经有大量的应用^[2-3]。而抑制差减杂交技术可以有效的获得差异表达

基因片段的文库^[6], 将基因芯片技术和抑制差减杂交技术相结合, 通过芯片杂交分析检测差异基因的表达情况已经成为植物抗性基因研究的一个有效途径^[4,7]。为了研究草原龙胆的抗性机制, 寻找草原龙胆抗性新基因, 制作了抑制差减杂交文库, 并利用此文库制作了基因芯片, 进行了 NaCl 胁迫下的基因差异表达研究。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用草原龙胆 50[#] 品种 (400 mM NaCl 条件下培养可以开花结实, 600 mM NaCl 条件下培养 1 个月后枯死, 数据未列出), 在日光温室中正常培养 20 周龄。以 400 mM 的 NaCl 处理植株 1、3、6 h, 分离叶片 mRNA, 反转录作为试验方 (tester); 以清水处理的叶片为对照, 分离叶片 mRNA, 反转录做为驱动方 (driver), 制作草原龙胆 NaCl 盐处理抑制差减文库, 并以此文库制作基因芯片。用于芯片杂交的植株培养条件同上, 植株以 600 mM NaCl 处理植株以及清水处理 3 h, 提取叶片 mRNA。

1.2 方法

所有总 RNA 利用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen 公司) 提取, poly (A)⁺ RNA 利用 mRNA 纯化试剂盒 (Amersham 公司) 纯化。

抑制差减文库连接到载体 pGEM[®]-T (Promega 公司) 上, 转化大肠杆菌 JM109 (Takara 公司), 提取质粒后以利用 MegaBace-500 测序仪 (Amersham 公司) 测序, 去除冗余序列后获得获得 658 条单一序列, 进行 PCR 扩增, 产物交由北京博奥生物芯片公司制作 cDNA 芯片, 其中每个单一序列点样重复 3 次。序列比对采用 GenBank 的 BLASTN, 参数默认。

用于芯片杂交的 mRNA 采用 3DNA Array 900[™] Expression Array Detection Kit (Genisphere 公司) 反转录

第一作者简介: 王继刚 (1974), 男, 在读博士, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: 2003wangjigang@163.com.

通讯作者: 李玉花 E-mail: lyhshen@126.com.

基金项目: “948” 资助项目 (2005-4-35); 黑龙江省“十一五” 公关课题资助项目 (GB06B112-5)。

收稿日期: 2008-06-18

标记 Cy3 和 Cy5 染料, 荧光信号使用 ScanArray4000 芯片扫描仪捕获, 获得的荧光图像号用 ScanArray 软件进行分析。将高背景值以及灰尘污染的杂交点信号以芯片杂交信号平均值代替, 以保证芯片荧光信号值的可信度。共杂交了 6 张芯片, 其中 5 张芯片用盐处理的 RNA 标记 Cy5, 对照用 Cy3 标记; 另一张芯片为反标, Cy3 标记盐处理 RNA, Cy5 标记对照。分别取每张芯片杂交点和背景的中位值, 利用 R 语言的 limma 数据包^[8]进行了数据分析。

2 结果与分析

对 6 张芯片的未均一化数据做 MA 图, 发现第 5 张芯片数据异常(图 1), 影响数据校正, 故舍弃不用。

从而, 共 5 张芯片进行了数据均一化以及差异分析, 其中一张芯片反标。芯片内的均一化方法采用了

printtiploess^[9] 方法, 背景校正采用了 minimum 方法。芯片间的校正采用 quantile 方法^[10]。经过贝叶斯分析, 获得了差异表达基因。由于每个基因在每个片子上进行了 3 次重复, 有些差异表达的基因在 3 个点上的表现不完全一样, 因而选取其中表达一致的 2 个点的 M 均值作为这个基因的表达变化倍数。

当 M 取 ± 1 时, 获得的表达变化 2 倍的基因数目只有 10 个, 而脱氢抗坏血酸还原酶基因(DHAR)以及丝氨酸/色氨酸蛋白激酶(serine/ threonine protein kinase)等一些在胁迫状态下基因表达变化比较明显的(P450、DHAR 等)一些基因没有出现。因此, 取 $M = \pm 0.6$, 既基因表达变化大于等于 1.52 倍, 获得了 36 个差异表达杂交点, 其中 18 条序列表达上调 18 条基因序列表达下调(图 2)。

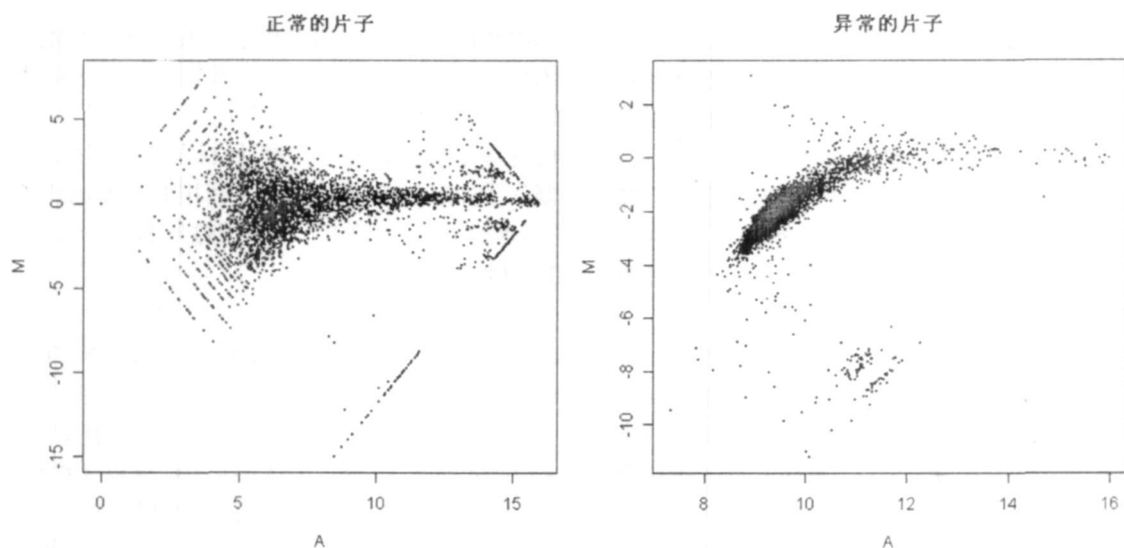


图 1 正常的和异常的杂交芯片散点图

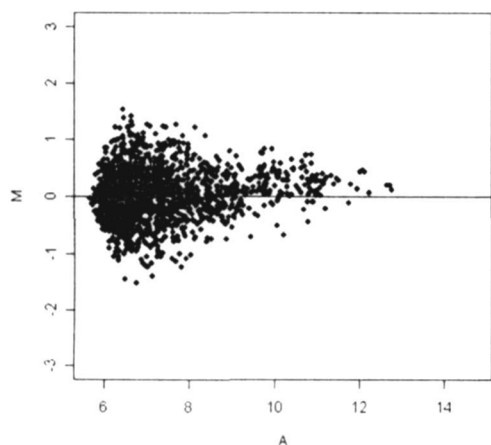


图 2 包括质量监控点的基因芯片 MA 图

上调的基因包括: 8 条无源性序列, 3 条未知功能序列, 冷诱导的多域半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白基因^[11] 3 条, 涉及光合作用的 P450 基因 1 条, 有丝分裂的纺锤体检查点蛋白基因 1 条, 活性氧解毒系统底物基因 1 条, 转录因子 DevH 基因^[12] 1 条。

下调的基因包括: 10 条无源性序列, 4 条未知序列, 锌指蛋白基因^[13] 1 条, 活性氧解毒系统基因脱氢抗坏血酸还原酶基因 1 条, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[14] 基因 1 条, 推测蛋白基因序列 1 条。

3 讨论

现获得了草原龙胆盐胁迫下差异表达的基因 36 条, 但是未知基因有 18 条, 占表达有差异基因的 50%。如此高比例的未知差异表达基因的出现, 推测可能是草

原龙胆与目前核酸序列数据库中的物种(如水稻、拟南芥等)同源性比较远造成,也可能是由于草原龙胆的抗盐机理与目前的已经登录核酸序列的物种的机理有差异造成。

表 1 草原龙胆氯化钠胁迫条件下表达有差异的基因序列

编号	同源基因登录号	功能描述	E 值	M 值
C15	无	无	无	1.1647
2B12	AF321870.1	细胞色素 P450	1E-53	1.1605
F2	NM_113502.2	有丝分裂纺锤体检查点蛋白	1E-14	1.1185
F13	AF242565.1	DNA 结合蛋白 DevH 基因	4E-02	1.0515
2B19	无	无	无	0.9765
2E4	EF488921.1	NADH dehydrogenase 底物 5	2E-13	0.9725
B24	无	无	无	0.9532
2H7	AJ630120.2	含 C2 域蛋白	2E-08	0.8762
P1	无	无	无	0.8730
2D21	无	无	无	0.8622
2C6	AC101775.10	小鼠染色体 19	2E-04	0.8125
N9	AB223039.1	多域半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白	4E-07	0.7817
N19	AB223039.1	多域半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白	2E-17	0.7632
2F9	无	无	无	0.7442
A2	无	无	无	0.6845
2F6	AB223039.1	多域半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白	3E-10	0.6415
K18	无	无	无	0.6362
K19	AK253112.1	大麦 cDNA 克隆	2E-05	0.6292
J9	EF183253.1	拟南芥 mRNA 序列	5E-15	-0.6127
K8	EF182747.1	crustin 基因	4E-09	-0.6317
O15	无	无	无	-0.6587
M24	DQ244252.1	玉米 mRNA 序列	6E-10	-0.6742
2H11	无	无	无	-0.6790
2B6	AK251242.1	大麦 cDNA 克隆	1E-36	-0.7130
O3	AB231868.1	锌指蛋白	9E-02	-0.7442
B19	无	无	无	-0.7450
B7	AY206984.1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	5E-11	-0.7587
2C5	DQ090998.1	脱氢抗坏血酸还原酶	4E-60	-0.8420
K20	无	无	无	-0.8505
G3	无	无	无	-0.8882
P21	无	无	无	-0.9175
K3	NM_001102769.1	推测蛋白	8E-08	-0.9667
K17	无	无	无	-0.9765
J6	无	无	无	-1.0277
2H23	无	无	无	-1.0882
I10	无	无	无	-1.3330

获得的上调基因中,有 3 个多域半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白基因序列与登录号为 AB223039.1 基因一致,说明此 3 条序列可能为同一基因的不同部分。一条基因序列在此芯片上 3 个不同序列表达情况均相同,也说明了此芯片杂交一定的可靠性。

上调表达的 P450 基因表达与其他研究者在拟南芥盐胁迫条件下的研究结果一致^[15],说明盐胁迫条件下光合系统表达加强。有丝分裂纺锤体检查点蛋白上调表达说明在盐胁迫条件下,为减少变异的发生,细胞的复制受到了更加严格的调控。NADH dehydrogenase 底物 5 基因的上调表达也增加了活性氧解毒系统解毒能力。上调表达的多域半胱氨酸蛋白酶抑制蛋白与冬小麦在干旱处理条件下表达情况一致^[11]。

锌指蛋白和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶是两种转录因子,一般情况下,在受到胁迫短时间内迅速大量表

达^[13-14]。试验中下调表达的原因可能是由于取材的时间是在胁迫 3 h,因而表达下降,具体的盐胁迫表达情况需要通过进一步时间序列试验验证。脱氢抗坏血酸还原酶基因是一个比较重要的活性氧解毒系统基因^[16],盐胁迫其在不同的细胞器之间,甚至在同一细胞器的不同部位表达情况也不一致,甚至相反^[17]。试验中的脱氢抗坏血酸还原酶基因需要进一步的获得基因全长,进行细胞定位,才能解释其下调表达,这也是下一步将要进行的试验计划。

现以构建的盐胁迫差减抑制文库制作的基因芯片研究了在高盐胁迫条件下草原龙胆的盐抗性基因表达情况,获得了表达差异盐胁迫的相关基因,为草原龙胆盐抗性机理的研究奠定了一定基础。部分已经获得基因注释的序列和一些未获得注释的基因序列需要进一步通过试验验证其功能。

参考文献

- [1] 大川清. 花專科育種と栽培 Eustoma[M]. 东京: 诚文堂新光社, 1995.
- [2] Rabbani A M, Maniyama K, Abe H, Met al. Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscic Acid Application Using dDNA Microarray and RNA Gel- Blot Analyses[J]. Plant Physiology, 2003, 133: 1755-1767.
- [3] Taji T, Seki M, Satou M, et al. Comparative Genomics in Salt Tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-Related Halophyte Salt Cress Using Arabidopsis Microarray[J]. Plant Physiology, 2004, 135: 1697-1709.
- [4] Ouyang B, Yang T, Li H, et al. Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(3): 507-520.
- [5] 赵宝存, 赵芳, 葛荣朝, 等. 利用基因芯片研究小麦耐盐突变体盐胁迫条件下基因的表达图谱[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2355-2360.
- [6] 夏卓盛, 吴跃明, 李新伟, 等. 紫花苜蓿铝胁迫抑制消减文库的构建和初步分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 805-809.
- [7] Yang G P, Ross D T, Kuang W W, et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(6): 1517-1523.
- [8] Smyth G K, Speed T P. Normalization of cDNA microarray data[J]. Methods, 2003, 31: 265-273.
- [9] Yang Y H, Dudoit S, Luu P, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(4): 15.
- [10] Yang Y H, Thorne N P. Normalization for two-color cDNA microarray data[J]. Science and Statistics, 2003, 40: 403-418.
- [11] Christova P D, Christov N K, Imai R. A cold-inducible multidomain cystatin of winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale*[J]. Planta, 2006, 223: 1207-1218.
- [12] Hebbar B P, Curtis E S. Characterization of devH, a Gene Encoding a Putative DNA Binding Protein Required for Heterocyst Function in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(12): 3572-3581.
- [13] Aruga J, Kamiya A, Takahashi H, et al. A wide-range phylogenetic analysis of Zic proteins: Implications for correlations between protein structure conservation and body plan complexity[J]. Genomics, 2006, 87(6): 783-792.
- [14] Gu Z, Wang J, Huang J et al. Cloning and characterization of a novel rice gene family encoding putative dual-specificity protein kinases involved in plant responses to abiotic and biotic stresses[J]. Plant Science, 2005, 169: 470-477.
- [15] Krepis J A, Wu Y J, Chang H S, et al. Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress[J]. Plant Physiology, 2002, 130: 2129-2141.
- [16] Blokhina O, Virokainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review[J]. Annals of Botany, 2003, 91: 179-194.
- [17] Valentina M, Guy M, Tal M, Volokita M. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*[J]. J. Exp. Bot, 2004, 55: 1105-1113.

Gene Expression of *Eustoma Grandiflorum* under High Salinity Stress

WANG Ji-gang¹, ZANG Kun², Li Kui-hua¹, FENG Guo-jun³, LI Yu-hua¹

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 2. Editorial Department of Academic Journal, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224 China; 3. Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070, China)

Abstract: To understand the molecular basis of plant responses to salt stress better, suppression subtractive hybridization (SSH) and microarray approaches were combined to identify the potential important or novel genes of *Eustoma grandiflorum* involved responses to severe salt stress. First, SSH libraries were constructed for the leave tissue of cultivated *Eustoma grandiflorum* 50[#] to compare salt treatment and non-treatment plants. Then a subset of clones from these SSH libraries were used to construct a *Eustoma grandiflorum* cDNA array and microarray analysis was carried out to verify the gene expression changes of this set of clones upon a high concentration of salt treatment compared to the corresponding non-treatment controls. A total of 36 non-redundant genes that were differentially expressed upon 3 h of severe salt stress were identified from microarray analysis; most of these genes have not previously been reported. The diversity of these genes indicated that salt stress resulted in a complex response in *Eustoma grandiflorum*.

Key words: *Eustoma Grandiflorum*; Microarray; Suppression subtractive hybridization; Salt stress