

利用 mRNA 差异显示技术克隆辣椒抗疫病相关基因片段

王永成, 巩振辉, 李大伟

(西北农林科技大学 园艺学院 陕西 杨凌 712100)

摘要: 利用差异显示技术, 以感病对照品种 B27、中抗疫病品种 A3、高抗疫病品种 A11 为试材, 用辣椒疫霉菌诱导处理 6 叶期幼苗, 进行接种前后基因差异表达分析。采用 3 条锚定引物 5′dT₁₂A/G/C 3′和 20 条随机引物(B0301-B0320)组合, 进行反转录差异显示 PCR, 克隆并分析辣椒疫病抗性相关基因。共获得差异表达片段 7 条, 经 BLAST 检索, 发现 T₁₂C/B0312-251 (GenBank 登录号 EU280142) 与粉蓝烟草的推测编码 *ml* 基因的部分 mRNA 有 90% 的同源性; T₁₂C/B0312-248 (GenBank 登录号 EU280143) 与辣椒编码区序列 ERD15 mRNA 有 99% 的同源性; T₁₂G/B0312-339 (GenBank 登录号 EU280144) 与番茄 mRNA 序列 113946R 克隆有 92% 的同源性, 片段 T₁₂C/B0307-170, T₁₂G/B0317-374, T₁₂A/B0320-235, T₁₂A/B0320-195 未发现其与已报导的序列有同源性。该试验所得的差异片段推测为与辣椒疫病抗性相关的基因。

关键词: 辣椒疫病; 抗病基因; mRNA 差异显示

中图分类号: S 641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)12-0149-04

辣椒疫病是由辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici* L.) 所引起的卵菌性病害, 是辣椒生产中最严重的病害之一, 往往给辣椒生产带来了巨大损失。对于该病目前还没有有效的防治措施, 而选育抗疫病的品种则成为防治和减轻该病为害的有效途径^[1]。根据 Flor (1971) 基因对基因 (gene-for-gene) 假说^[2], 植物抗病基因在抗病反应中发挥着至关重要的作用, 克隆植物抗病基因, 研究其结构与功能, 一直是植物病理学与植物育种学研究的热点^[3]。我国辣椒抗疫病育种研究工作起步较晚, 经过“八五”到“十五”的国家科技攻关, 已经在辣椒疫病的资源抗性鉴定评价方法、多抗接种技术、组织病理学及毒素生物学等方面有了重要进展^[4], 但在辣椒抗疫病相关基因克隆方面国内还鲜有报道。

mRNA 差异显示 (mRNA differential display) 技术是 Liang 等^[5]发明的一种快速有效克隆差异表达基因的技术。差异表达基因发生在诸如发育、衰老和死亡等过程, 高等植物在遇到外界环境如温度、水分、盐碱等胁迫或在病原菌侵染、化学药剂、激素、创伤等的刺激下都将诱导基因的特异表达^[6]。利用 mRNA 差异显示技术, 在

基因产物未知的情况下, 可以直接鉴定和克隆差异表达基因。

该研究利用 mRNA 差异显示技术, 分离诱导表达的基因差异片段, 旨在进一步明确辣椒疫病的抗性分子机理, 为克隆全长基因及其它新的植物抗病相关基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试辣椒品种及菌种 试验所用试材辣椒感病对照品种 B27、中抗疫病品种 A3、高抗疫病品种 A11、辣椒疫霉菌 P11 均来自西北农林科技大学园艺学院辣椒课题组。

1.1.2 供试试剂 总 RNA 提取的试剂盒为博大泰克公司生产。M-MLV 反转录酶为 Promega 公司生产。Taq DNA 聚合酶为大连宝生物公司生产。用于 mRNA 差异显示的 3 种锚定引物 5′-TTTTTTTTTTT/A/G/C-3′及差异分析随机引物 B0301-B0320 均由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 在 6 叶期采用灌根接种法^[7]接种辣椒疫霉菌, 接种孢子悬浮液浓度为 2×10^5 个/mL。28℃, 90% 相对湿度条件下于光照培养箱 14 h 光照/10 h 黑暗培养。接种 0 h, 接种后 12 h, 接种后 24 h 分别采摘叶片, 按博大泰克总 RNA 提取试剂盒说明书的步骤提取辣椒叶片总 RNA。

1.2.2 cDNA 第一链合成 反转录反应体系为 25 μL: 总 RNA 2 μg, 锚定引物 2.5 μmol/L, 充分混匀, 70℃水浴 5 min, 迅速置冰上冷却。依次加入 5× Buffer 5 μL,

第一作者简介: 王永成(1982-), 男, 陕西眉县人, 在读硕士, 主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究。

通讯作者: 巩振辉。E-mail: gzh168@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571262); “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD01A7); 教育部春晖计划资助项目(Z2005-2-71005)。

收稿日期: 2008-07-19

dNTP(10 mmol/L) 5 μ L, RNase Inhibitor 40U, M-MLV 反转录酶 200U, 加 DEPC 水补齐至 25 μ L。以未加反转录酶的为对照管。37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。反应结束后, 70 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 终止反应, 立即用于 PCR 反应或 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2.3 差异显示 PCR 扩增 差异显示反应体系 25 μ L: cDNA 第一链反应产物 2 μ L, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ L, 锚定引物 T₁₂M (M=A/G/C) 2.5 μ mol/L, 差异显示随机引物 2.5 μ mol/L, Taq 酶 1.0U, 10 \times Taq Buffer 2.5 μ L, ddH₂O 补齐体积至 25 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 45 $^{\circ}$ C, 2 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 39 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C, 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 扩增产物聚丙烯酰胺电泳、银染及差异 cDNA 回收 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析差异显示产物, 银染^[8]。差异 cDNA 片段的回收采用煮沸法^[9]。用刀片切下差异条带, 放入 0.5 mL 离心管中, 加入 20 μ L ddH₂O, 沸水浴 15 min, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2.5 二次 PCR 扩增及产物回收 取差异片段溶液 4 μ L 进行二次 PCR, 按照差异显示 PCR 体系加入其它组分, 二次扩增程序同差异显示 PCR。反应结束 1.5% 琼脂糖电泳检测结果, 凝胶回收按照鼎国 DNA 快速纯化回收试剂盒说明书进行操作。按照分子克隆的方法将回收产物与 pMD18-T 载体连接, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中进行克隆并利用菌落 PCR 检测阳性克隆。

1.2.6 序列测定和分析 将阳性克隆菌液送由上海捷瑞生物工程测序部测序。运用 NCBI 的 BLASTX 软件对测序结果进行同源序列、相似序列检索。

2 结果与分析

2.1 辣椒总 RNA 提取

RNA 的质量直接影响着后续的试验。提取的辣椒叶片总 RNA 经 1.0% 琼脂糖电泳检测, 可见 28S rRNA, 18S rRNA 两条清晰带, 带型整齐, 没有弥散, 且 28S rRNA 条带亮度为 18S rRNA 条带亮度的两倍。经分光光度计检测 230、260 nm 及 280 nm 的 OD 值: A₂₆₀/A₂₈₀ 介于 1.8~2.0 之间, A₂₆₀/A₂₃₀ 大于 2.0, 表明提取的 RNA 纯度较高, 无明显降解, 可以满足反转录的要求。

2.2 mRNA 差异显示结果

差异显示 PCR 扩增产物经 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 在接种后 12 h、24 h 的抗病品种中获得了清晰完整的多条差异带, 回收到亮度好、整齐度高的差异条带 7 条(图 1)。

2.3 差异显示结果验证

将上一步回收的差异片段进行二次 PCR 扩增, 产物经 1.5% 琼脂糖电泳检测, 得到了单一、整齐的差异条带(图 2), 片段大小和聚丙烯酰胺凝胶电泳所显示的完全一致。证明了差异条带的可靠性, 同时也表明回收产物一步操作的正确性。

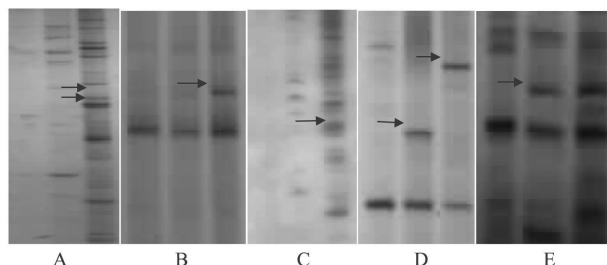


图 1 差异显示结果

注: 自左起依次为接种 0 h、12 h、24 h, 箭头指示为差异条带。

A. T₁₂C/B0312-251, T₁₂C/B0312-248; B. T₁₂G/B0312-339; C. T₁₂C/B0307-170; D. T₁₂A/B0320-235, T₁₂A/B0320-195; E. T₁₂G/B0317-374。

2.4 差异片段的克隆与序列分析

重组质粒经通用引物的菌落 PCR 鉴定, 1.0% 琼脂糖电泳检测可见清楚单一的条带, 说明回收片段已连接到载体上。保存的菌液经测序获得的 7 条 cDNA 差异片段经申请, 已成功登录 GenBank (登录号: EU280142~EU280148), 表明这些基因为未报导的新基因。经 BLAST 分析, 在 GenBank 中寻找同源性的基因序列。结果发现, T₁₂C/B0312-251 与粉蓝烟草的推测编码 *ml* 基因的部分 mRNA 有 90% 的同源性(218/241 碱基); 与茄属果实的 cDNA 克隆 FC10CF07 有 89% 的同源性(217/243 碱基)。序列同源性比对结果如图 3 所示。

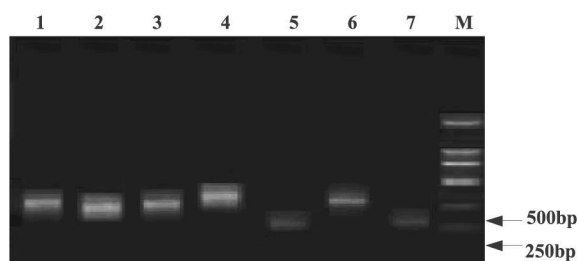


图 2 二次扩增电泳结果

T₁₂C/B0312-248 与辣椒编码区序列 ERD15 mRNA 有 99% 的同源性(244/246 碱基), 序列同源性比对结果如图 4 所示。

T₁₂G/B0312-339 与番茄 mRNA 序列 113946R 克隆有 92% 的同源性(245/265 碱基)。序列同源性比对结果如图 5 所示。

序列 T₁₂C/B0307-170, T₁₂G/B0317-374, T₁₂A/B0320-235, T₁₂A/B0320-195 未在 GenBank 中找到与其具有同源性的序列。

Nicotiana glauca partial mRNA for putative ML domain protein (ml gene) Length=701

Score = 315 bits (170), Expect = 7e-83
Identities = 218/241 (90%), Gaps = 4/241 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 9 TGCTGCCAATGCCTGGGATTCATCGAAAAACCAATGCTGAAGCTAAAACCTTATGCATGA 68
Sbjct 552 TGCTGCTAACGCCTGGGACTCGGCTATAAACCCAATGCTGAAGCCAAAACCTTATGCAGGA 493

Query 69 CAGTTGTTC-ATTCTTT-TCATCCATCATCTTCATTGTCAGAGTGTATGATCCAGGTGGA 126
Sbjct 492 CAGTTG-CCGATT-TTTGTCATCCATCATCTTCATTGTAAGAGTGTATGATCCAGGTGGA 435

Query 127 GTAAATCCAGGCAAGGCTTGTGAGTGAGAAATCACGAAATCACCGGATGCTGGGCAAGAT 186
Sbjct 434 GTAAATCCAGGCAACTCTTGTGAGTGGGAAATCACGAAATCACCGGAAGCTGGGCAAGAT 375

Query 187 GTCTCATTACAAAGGTCAATGGCCTCATGGTGGACATGAAAGAACAAATAGTTGACATCA 246
Sbjct 374 GTCTCTTTACAAAGGTTCGATGGCCTCGTGGTGGACATGGAAGAACAAATAGTTGACATCA 315

Query 247 A 247
Sbjct 314 A 314

图3 T₁₂C/B0312-251 与粉蓝烟草的推测编码 ml 基因的部分 mRNA 的同源性比较

Capsicum annuum ERD15 mRNA, complete cds Length=486

Score = 442 bits (239), Expect = 3e-121
Identities = 244/246 (99%), Gaps = 1/246 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 CTGCTTGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGGCTAACGATCTTTGCTGGCTTCTCGTGGTA 60
Sbjct 477 CTGCTGGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGGCTAACGATCTTTGCTGGCTTCTCGTGGTA 418

Query 61 CTTTGGTGTCTCGAAAGGAGATTTTGGCTTTGGCATGCTTAGTGTCTTACGAGTGCCTC 120
Sbjct 417 CTTTGGTGTCTCGAAAGGAGATTTTGGCTTTGGCATGCTTAGTGTCTTACGAGTGCCTC 358

Query 121 AGAACCTTTGGGTAAAGCCATT-ACACCAGAGTATGATGACTTGATTCTTGTGTGCTCACT 179
Sbjct 357 AGAACCTTTGGGTAAAGCCATTGACACCAGAGTATGATGACTTGATTCTTGTGTGCTCACT 298

Query 180 TGCAGATGATTGAAGAAATTCTTCAAACCTGAGCTTCCATGTTCAAATATCTTCATCAAC 239
Sbjct 297 TGCAGATGATTGAAGAAATTCTTCAAACCTGAGCTTCCATGTTCAAATATCTTCATCAAC 238

Query 240 ATCAAG 245
Sbjct 237 ATCAAG 232

图4 T₁₂C/B0312-248 与辣椒编码区序列 ERD15 mRNA 的同源性比较

Lycopersicon esculentum clone 113946R, mRNA sequence Length=1278

Score = 377 bits (204), Expect = 1e-101
Identities = 245/265 (92%), Gaps = 2/265 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 4 TTCGCAGGCATGGGCTTATCATGGGATGTTCTGTGACTGGTGTAAAGTCTACACCAGGCG 63
Sbjct 843 TTCGAAGGCATGGGCTTATCATGGGATGTTCTGTTACTGGTGTAAAGTCTACACCAGGGG 902

Query 64 ATTCACCACTACAGCTCGGTCCAAAGGCAGAGGATGTGACAAAACCTGTAAATCCATTG 123
Sbjct 903 ATTCACCACTGCAGCTTGGCCCAAAGCAGAAGATGTGACAAAACCTGTAAATCCATTG 962

Query 124 TCTTTATGTTGCGGTTCCCTTCTGGGGGCAATGGCAGCAACATACTATGTTTGGTTCCTA 183
Sbjct 963 TCTTTATGCTGCGGTTTCTTCTGGGTGCAACGGCAGCAACATACTATGTTTGGTTCCTA 1022

Query 184 TTTACATGTGGGTTAAAGACCAGGTTGTTCTGTAAGGCGAACCTCTGTGAGAGACGAGC 243
Sbjct 1023 TTTACATGTGGGTTAAAGACCAGGTTGTTCTGTAAGGCGAACCTCTGTGAGAGACCAAGC 1082

Query 244 AACTTATTAATTACTGGCTGA-CCT 267
Sbjct 1083 TACTTAATACT-ACTGGCTGATCCT 1106

图5 T₁₂C/B0312-339 与番茄 mRNA 序列 113946R 克隆的同源性比较

3 讨论

植物体内不同组织器官的细胞之间的差异,是由基因在时间和空间上的差异所引起的。根据基因对基因的假说,植物某种特定的性状一定与某种或某些基因相关联。正确选择材料是应用差异显示技术克隆基因的

关键。该试验供试的不同抗性品种是经苗期接种抗性鉴定与田间抗性鉴定验证抗感病表型明显的品种,完全符合 DDRT-PCR 筛选差异表达基因的要求。

近年来,差异显示技术广泛用于分离克隆真核生物不同细胞之间,不同器官之间以及不同环境条件下差异

表达的基因^[9]。差异显示技术在大量分离抗病基因方面具有很大的优势,可以同时比较多个样品间基因表达的差异;检测灵敏度高,所需 RNA 样品少,经 PCR 扩增后一些低丰度的 mRNA 也可以被检测出来;结合使用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,操作简单^[10-13]。该试验主要研究了存在于同一品种接种前后之间的基因差异表达。

该试验共获得差异基因片段 7 条,经序列同源性比较发现, T₁₂C/B0312-251 与编码烟草 *ml* 基因的序列有 90% 的同源性,该基因参与编码磷脂酰肌醇/磷脂酰甘油转化蛋白。抗病植物在抵抗病原物侵染过程中产生一系列形态结构和生理生化变化。如感染区域细胞壁的强化,抗微生物代谢物(如植保素)的合成,对病原物有害酶(如几丁质酶、葡聚糖酶)的合成,以及防御信号传导物质(如水杨酸、超氧化物)的产生和释放等^[14]。T₁₂C/B0312-248 与辣椒编码区序列 ERD15 mRNA 只在第 6 和第 142 位的碱基有差异,同源性高达 99%。该序列参与编码辣椒早期脱水应答蛋白。Aguirreola 等^[15]认为辣椒疫病的萎蔫症状是由于 *P. capsici* 侵染辣椒后,因皮层细胞的解体,使水的流动局限于坏死的茎部,叶部水压大幅度下降的缘故。T₁₂G/B0312-339 与番茄 mRNA 序列的一个克隆有 92% 的同源性,该序列编码向日葵属植物辅酶代谢中与泛醌/甲基萘醌类生物合成相关的 MPBQ/MSBQ 甲基化转移酶类。其它差异片段经 GenBank 序列比对,未发现高同源性的序列。

由于差异显示技术存在假阳性高的缺陷,这些片段的可靠性还有待于 Northern 验证,确定差异片段的功能,需要首先对差异条带进行克隆、测序和同源性分析,与 GenBank 中的已知基因或蛋白进行结构和功能上的比较,对其中高同源性的片段获得基因全长,最后通过

转基因或功能互补实验确定该基因的功能,对其编码产物进行分析对比,这样能对它们在抗病中所起的作用有一个更全面、更合理的认识。

参考文献

- [1] 杜晓华, 巩振辉, 李大伟. 辣椒抗疫病的遗传与育种[J]. 西北农业学报, 2005, 14(1): 30-36.
- [2] Florh. Current status of the gene-for-gene concept[J]. Annu. Rev. Phytopathol., 1971, 9: 275-296.
- [3] 张谦, 林善枝, 林元震, 等. 树木抗病基因研究进展[J]. 西北植物学报, 2005, 25(9): 1921-1930.
- [4] 张琪, 刘志敏, 肖日新. 辣椒抗疫病育种研究进展[J]. 辣椒杂志, 2005(4): 10-12.
- [5] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257: 967-971.
- [6] 易图永. 辣椒抗疫病相关基因的分析及 QTL 定位[D], 2003: 6.
- [7] 易图永, 张宝玺, 谢丙炎, 等. 辣椒疫病三种接种方法的比较[J]. 中国蔬菜, 2003(2): 16-18.
- [8] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1991, 196: 80-83.
- [9] 陈永华, 严钦泉, 余建蒲. mRNA 差异显示技术的研究进展[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 9-12.
- [10] 刘永军, 景建洲, 贾敬芬, 等. 用 mRNA 差异显示技术分离盐胁迫下小麦耐盐相关 cDNA[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2006, 36(1): 89-91.
- [11] 于晓英, 卢向阳, 陈永华, 等. 瓜叶菊热胁迫下的基因差异表达[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(3): 359-463.
- [12] 黄浩, 柳李旺, 龚义勤, 等. 萝卜总 RNA 提取与 mRNA 差异显示技术[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(4): 483-486.
- [13] Strauss M, Bauer D, Muller H. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique DDRT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21: 4271-4280.
- [14] 贾建航, 王斌. 植物抗病基因克隆研究[J]. 生物技术进展, 2000, 20(1): 21-26.
- [15] Aguirreola J, Irigoyen J, Sanchezdiaz M, et al. Physiological alterations in pepper during wilt induced by *Phytophthora capsici* and soil water deficit[J]. Plant pathol., 1995, 44: 587-596.

Cloning of the Genes Resistant to *Phytophthora Capsici* in Pepper(*Capsicum annuum* L.) by mRNA Differential Display Technique

WANG Yong-cheng, GONG Zhen-hui, LI Da-wei

(College of Horticulture Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling Shanxi 712100, China)

Abstract: We extracted total RNA from the leaves of cv. B27(susceptible variety), cv. A3(medium-resistant variety) and cv. A11(high-resistant variety) in pepper after inoculated with *Phytophthora capsici* at six-leaf stage, and analyzed the different genes expression after inoculation by DDRT-PCR. Using 3' anchor primers (5' dT₁₂A/G/C 3') and 20 arbitrary primers(B0301-B0320)at DDRT-PCR, Cloning of the Genes Resistant to *Phytophthora capsici* in Pepper. Finally we gained seven different expression gene fragments. The BLAST results showed that T₁₂C/B0312-251(GenBank accession No.EU280142) was homologous to *Nicotiana glauca* partial mRNA for putative ML domain protein (*ml* gene) at 90%. T₁₂C/B0312-248(GenBank accession No. EU280143) was homologous to *Capsicum annuum* ERD15 mRNA, complete cds at 99%. T₁₂G/B0312-339(GenBank accession No. EU280144) was homologous to *Lycopersicon esculentum* clone 113946R mRNA sequence at 92%. T₁₂C/B0307-170, T₁₂G/B0317-374, T₁₂A/B0320-235, T₁₂A/B0320-195 was lowly homologous to known genes. These fragments we gained from the experiment are proposed to be disease-resistant genes.

Key words: *Phytophthora blight*; Resistant gene; mRNA differential display