

海水胁迫下单叶蔓荆基因差异表达的初步分析

张家福, 关洪斌, 位建业, 史源, 王卫飞

(山东大学 威海分校海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要:应用 cDNA-AFLP 技术,以单叶蔓荆为研究对象,对海水胁迫下单叶蔓荆叶片基因表达进行了分析。结果表明:通过 256 对引物组合的筛选,共分离得到 45 个差异表达的转录衍生片段(TDF),随机选取其中 10 个差异片段进行测序,并进行 Blast-x 分析。Blast-x 分析获得 5 个与已知片段知基因有较高的同源性,主要包括转录因子、与离子转运有关的蛋白、以及胁迫相关蛋白等的编码基因。并构建了单叶蔓荆在海水胁迫下的基因表达谱,从基因组水平上识别了一批受盐胁迫诱导或抑制表达、与耐盐相关的基因,这些新基因可用于耐盐的分子机理研究。

关键词:单叶蔓荆;海水胁迫;差异表达;cDNA-AFLP

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0152-03

近年来,国内利用 cDNA-AFLP 对植物基因差异性表达的研究较多,如对抗旱性、抗高温性、抗盐性等的研究。目前国内关于耐盐基因的研究主要是针对小麦的,而对于单叶蔓荆的研究还未见报道。该试验以单叶蔓荆为材料,利用 cDNA-AFLP 技术对单叶蔓荆海水胁迫

下的基因表达模式进行分析和比较,从转录水平分析单叶蔓荆耐盐碱的分子机制,为滨海盐碱地的绿化和可持续开发利用提供理论依据。并结合植物逆境生理学原理,通过提高耐盐的生理锻炼,来提高所选择品种的抗盐力,再利用 cDNA-AFLP 技术对所选品种进行基因差异表达分析,从转录水平分析所选品种的耐盐分子机制,进而寻找植物的遗传基因与个体发育中生理及生态的制约和影响关系。其中,cDNA-AFLP 是一种在转录水平研究基因表达的技术,因其具有灵敏度高,重复性好的特点,已经被广泛用于基因研究^[1-3]。

第一作者简介:张家福(1988-),男,福建厦门人,本科,现研究方向为药学。

通讯作者:关洪斌(1961-),男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为分子生物学和植物生理学教学及科研。

收稿日期:2010-05-12

[2] 北京林业大学园林系花卉教研组. 花卉学[M]. 北京:中国林业出版社. 1988:504-505.

[3] 张嵩岩,高杨,陈旸升,等. 徐长卿子叶组织培养及再生体系建立[J]. 亚热带植物科学,2009,39(1):45-48.

[4] 陈宝鑫,王晓旭,张倩怡,等. 白花紫露草的组织培养与植株再生[J]. 北方园艺,2009(6):84-86.

[5] 瞿萍梅,龙春林,程治英. 油莎豆的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2007,43(2):331.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Cyperus alternifolius* var. *striatus* Hort.

ZHOU Bo, XU Wei-qian, LI Na, XU Na, JIANG Chang-yang

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029)

Abstract: The bracts of *Cyperus alternifolius* var. *striatus* Hort. was used as materials to study on the tissue culture and rapid propagation. The results showed that the ideal medium for growing of bracts was 1/2MS+BA 0.4 mg/L+NAA 0.1 mg/L+sucrose 20~30 g/L, the ideal medium for rooting was 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+IAA 0.3~0.4 mg/L+sucrose 20 g/L, the optimum medium for root culture and differentiation was MS+IBA 0.2 mg/L+IAA 0.3 mg/L+BA 0.2 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L+sucrose 20 g/L. In the glasshouse, the tube seedlings could be easily transplanted. The botanical characters could be kept and grow vigorously.

Key words: *Cyperus alternifolius* var. *striatus* Hort.; tissue culture; rapid propagation

1 材料与方法

1.1 试验材料

在山东省威海市国际海水浴场的滩涂上,采集生长状态较好的单叶蔓荆植株;限制性内切酶 *EcoRI*、*MseI*, MMLV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒、Trizol 试剂盒、*Taq* 酶、FAST LIGATION KIT、引物、接头购自上海生物工程有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及双链 cDNA 合成 供试植物单叶蔓荆,取 3 棵扦插幼苗于塑料盆中,分别用淡水、1/3 海水进行浇灌。36 h 后分别取幼苗顶端的叶片,按照 Trizol 试剂盒说明进行总 RNA 提取。cDNA 的第 1 条链的合成按照 MMLV 第 1 条链 cDNA 合成试剂盒说明进行。第 2 链 cDNA 合成采用以下反应体系进行(所用酶均为 TakaRa 产品):10 μ L 10 \times NEB buffer 2, 5 μ L E·coli DNA Polymerase I, 1 μ L RNaseH, 3 μ L dNTP (10 mmol/L each), 20 μ L 第 1 链 cDNA 产物,补充双蒸水至 100 μ L。16 $^{\circ}$ C 反应 2.5 h 后,80 $^{\circ}$ C 15 min 灭活酶活性。反应产物经抽提、沉淀和洗涤后溶于 20 μ L TE 中,浓度调至 20 ng/mL。

1.2.2 cDNA-AFLP 分析 采用 *MseI* 和 *EcoRI* 2 种限制性内切酶对 cDNA 双酶切,酶切时间分别设 37 $^{\circ}$ C 下,3、4、6、8、10 h 5 个处理;然后用快速连接试剂盒(FAST LIGATION KIT)将 *MseI* 和 *EcoRI* 接头与酶切片断连接,16 $^{\circ}$ C 12 h。酶切连接体系加入相应的限制性酶接头进行连接 1 h。取 5 μ L 连接产物为模板,以接头引物进行预扩增,反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 1 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,25 个循环;第 1 轮 PCR 产物稀释 20 倍为模板,选择性扩增引物进行第 2 轮 PCR,反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,0.7 $^{\circ}$ C/循环,72 $^{\circ}$ C 1 min,13 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,23 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。经 2 轮扩增后,取 20 μ L 产物加入等量的甲醛上样缓冲液(90% 甲醛,10%5 \times TBE,0.25% 溴酚蓝及 0.25% 二甲苯青),95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结果银染参照《分子克隆》的方法^[4]。

1.2.3 DNA 片段的回收和克隆 从聚丙烯酰胺变性凝胶上用针尖小心挖下含目标片段的凝胶,回收 DNA 带。用 1 对通用引物:E00:5'-GAC TGC GTA CCA ATTC-3';M00:5'-GAT GAG TCC TGA GTAA-3'对回收的片段进行再次扩增,PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 1 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 45 s;72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。随机选取 15 个 TDFs 按 DNA 回收试剂盒说明书从琼脂糖凝胶中回收目的片段,回收的目的片段克隆到 PMD-18T 载体中。

1.3 序列分析

序列测定由上海 Sangon 生物工程公司在 3730 型测序仪上进行,相似性比较在 NCBI 站点(www.ncbi.nlm.nih.gov)用 BLAST 完成。

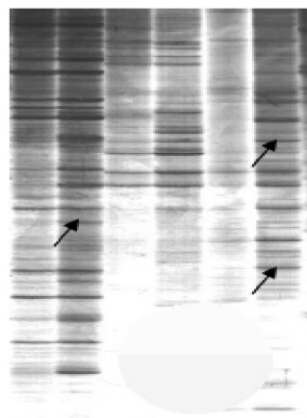


图 1 4 对引物组合扩增的 cDNA-AFLP 产物在 AGE 胶上的分离



图 2 一组选扩结果

注:每对的左边淡水处理;右边为盐水处理。箭头所示为差异表达片段。

2 结果与分析

2.1 cDNA-AFLP 结果分析

采用 256 对 *EcoRI*/*MseI* 引物组合对淡水处理和盐水处理后的单叶蔓荆幼叶表达基因进行筛选,AFLP 扩增片段大小介于 50~500 bp,每对引物组合平均可扩增出 50~70 条主带。256 对引物组合共检测到 45 条差异表达 TDF,约占总条带数的 0.5%,其中,增强表达或海水胁迫下特异性表达 TDF 32 条,抑制表达的 13 条。

2.2 差异片段功能分析

从单叶蔓荆海水胁迫特异表达的 45 条中选择重复性好的 10 个回收片段进行测序。BLAST 分析表明,拟南芥、水稻、烟草等同源性较高且比对结果中 E 值低于 1e-05 的 ESTs 视为已知基因,共有 5 个与已知片段知码基因,主要包括转录因子、与离子转运有关的蛋白、以及胁迫相关蛋白,5 个基因在数据库中未找到显著相似的序列。

表 1 cDNA 序列同源性比较结果

类型	编号	大小/bp	编码可能的蛋白	e 值
转录因子	18	189	Ste 12-类转录因子	5e-05
与胁迫有关的蛋白	121	253	抗病蛋白	6e-09
	147	177	GTP-结合蛋白	3e-17
与信号传导有关	92	446	受体类激酶	6e-09
与离子转运有关	94	381	液泡膜 ATP 合成酶	2e-38

3 讨论

单叶蔓荆是 1 种生长在沿海沙地木本植物,自然植物群落覆盖能力很强,一旦形成群落后,具有很强的抗风、抗旱、抗盐碱能力,特别适用于沙地和碱性土壤地区

绿化。但目前对单叶蔓荆主动适应盐胁迫的分子机制尚缺乏认识,盐胁迫下会诱导多少基因的差异表达,这些基因的作用机制如何还完全不清楚。所以研究海水和淡水条件下差异表达的 cDNA,对大量筛选、克隆耐盐基因具有重要意义。

试验利用 cDNA-AFLP 技术分析单叶蔓荆海水胁迫反应相关的 cDNA 片段,通过 256 对引物组合的筛选,共分离得到 45 个差异表达的转录衍生片段(TDF),随机选取其中 10 个差异片段进行测序,并进行 Blast-x 分析,Blast-x 分析获得 5 个与已知片段编码基因有较高的同源性,主要包括转录因子、与离子转运有关的蛋白、以及胁迫相关蛋白。该试验仅将获得较好的 10 个差异基因进行克隆测序,其它的差异基因仍有待研究。植物在盐胁迫下的生理响应可概括为以下几个方面:离子区域化、渗透调节、盐胁迫信号的转导等。

3.1 离子区域化

植物的细胞质中不能含有过多的盐分,它们通过将盐分限制在液泡或区隔在其它组织器官以使代谢正常进行。将钠离子区隔化于液泡中是由 Na^+/H^+ 反向运输体完成的。试验获得的 91 号差异片段液泡膜 ATP 合成酶可能就是为这个 Na^+/H^+ 反向运输体提供能量的。

3.2 渗透调节

植物在受到盐分胁迫时,由于外界渗透压较低,不易吸收水分,容易造成细胞内的水分缺失。为了减小这种伤害,植物会主动积累一些可溶性物质,通过渗透调节来降低细胞的渗透势,从而使水分顺利地进入植物体内,保证植物生理活动的正常进行。参与细胞内渗透调节的物质有两类:外来的无机离子和细胞内合成的有机亲和物质。参与渗透调节的无机离子主要有 Na^+ 、 K^+ 和 Cl^- ,参与渗透调节的有机小分子物质有:脯氨酸、甘

油醇、甜菜碱、肌醇和山梨醇以及一些多糖分子。

3.3 盐胁迫信号的转导

一般来说,胁迫信号首先被细胞膜受体感知,然后传递至细胞中,从而启动胁迫响应基因,调节植物对胁迫的耐受。盐胁迫信号首先被细胞膜上的感受因子所感知。信号传递至细胞后可能激活多重级信号,如各种激素及活性氧等,这些信号使胞内钙离子水平瞬时增高,触发蛋白磷酸化级联反应,后作用于参与细胞防御的蛋白或调控胁迫响应基因的转录子,使胁迫响应基因表达,调节参与防御和适应胁迫条件的蛋白,使植物适应胁迫。

4 结论

以盐胁迫后的单叶蔓荆材料,利用 cDNA-AFLP 技术分离得到了与盐胁迫有关的 45 多条差异表达片段。

10 个片段被克隆测序,Blast-x 比对结果表明,与已知基因有同源性的片段有 6 条,约占测序数的 50%。

该试验为进一步研究植物耐盐的分子机制提供了基础,并对单叶蔓荆的应用前景具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 韩斌,彭建营. cDNA-AFLP 技术及其在植物基因表达研究中的应用[J]. 西北植物学报,2006,26(8):1753-1758.
- [2] 刘迪,曹秀云,兰进好. 分离差异 mRNA 技术及其应用[J]. 河北农业科学,2005,9(1):93-98.
- [3] Bachem C W B, Van der Hoeven R S, de Bruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. The Plant Journal, 1996, 9(5): 745-753.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [J]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Preliminary Analysis of Gene Expression in the Response to Seawater in the *Vitex trifolia* Linn. var. *simplicifolia* Cham

ZHANG Jia-fu, GUAN Hong-bin, WEI Jian-ye, SHI Yuan, WANG Wei-fei
(Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai, Shandong 264209)

Abstract: Gene The expression in the response to seawater in the *Vitex trifolia* Linn. var. *simplicifolia* Cham was analyzed by the technology of cDNA-AFLP. The results showed that two hundred and fifty-six primer combinations were used to investigate, forty-five differentially expressed cDNAs were found. Gene expression profiling in response to seawater and differentially expressed genes of *Vitex trifolia* Linn. var. *simplicifolia* Cham were revealed and identified via cDNA-AFLP analysis. This work begins to reveal potential molecular mechanism for salt tolerance of mangrove.

Key words: *Vitex trifolia* Linn. var. *simplicifolia* Cham; seawater stress; differential expression; cDNA-AFLP