

大豆干旱和低温 cDNA 文库的构建与检测

杨贵春¹, 刘海龙¹, 王世发¹, 刘淑莲¹, 韦正乙², 蔡勤安², 邢少辰²

(1. 吉林省农业科学院经济植物研究所, 吉林公主岭 136105; 2. 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 吉林长春 130124)

摘要:以栽培大豆(*Glycine max*)吉林 35 为材料, 在幼苗期进行干旱、低温处理, 分离 mRNA 经逆转录合成 cDNA 后, 插入到融合表达载体中, 分别构建了干旱和低温两个融合表达文库。检测表明, 两个初始文库的滴度分别为 2.75×10^6 pfu \cdot mL⁻¹ 和 5.52×10^5 pfu \cdot mL⁻¹; 插入的 cDNA 片段长度在 0.5~2.0 kb。此文库的构建为今后分离与干旱、低温相关基因奠定了基础。

关键词: 大豆; 干旱; 低温; cDNA 文库; 酵母单杂交

中图分类号: S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)02-0001-03

Construction and Identification of cDNA Libraries of Soybean Treated by Drought and Low Temperature

YANG Gui-chun¹, LIU Hai-long¹, WANG Shi-fa¹, LIU Shu-lian¹, WEI Zheng-yi², CAI Qin-an², XING Shao-chen²

(1. Industrial Botany Institute of Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 136105; 2. Biotechnology Research Center of Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130124)

Abstract: Two kinds of mRNA were isolated from cultivated soybean variety Jilin 35 pre-treated with drought and low temperature at seedling stage, anti-transcribed into cDNA, to construct two relevant fusion expression libraries with insertion of these cDNA collection. The primary analysis showed that the titer of two initial libraries were 2.75×10^6 pfu \cdot mL⁻¹ (drought) and 5.52×10^5 pfu \cdot mL⁻¹ (low temperature). The size of mostly insertion was between 0.5 and 2.0 kb. The construction of these two libraries will be helpful for the related gene isolation in the future.

Key words: soybean; drought; low temperature; cDNA library; yeast one-hybrid

全球干旱半干旱地区约占陆地面积的 35%, 遍及世界 60 多个国家和地区, 在我国约占国土面积的 52.5%, 其危害相当于其它自然灾害之总和^[1], 而低温冷害在农业生产中则严重制约作物的种植时间和区域。由于这两个因素都属于多基因控制的数量性状, 通过传统育种手段进行遗传改良的难度很大, 生物技术手段为分离干旱、低温相关基因, 进而通过转基因方法改善植物的抗逆性提供了一个切实可行的途径。

基因分离的手段很多, 建立 cDNA 文库则是一个有效的手段。自 20 世纪 70 年代中期首例 cDNA 克隆问世以来, 构建 cDNA 文库已成为克隆基因、研究功能基因组学的基本手段之一。由于 cDNA 文库是某生物某发育时期所转录的全部 mRNA 经反转录形成的 cD-

NA 片段与某种载体连接而形成的克隆的集合, 没有内含子, 可以直接获得目的基因, 因而受到广泛重视。

中国是大豆的起源地, 已有 4 000 多年的栽培历史, 研究和利用大豆基因资源具有特殊的意义。本研究以栽培大豆为材料, 通过干旱和低温处理, 构建 cDNA 融合表达文库, 为今后分离抗逆相关基因和分子育种工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

栽培大豆(*Glycine max*)品种为吉林 35, 来自吉林省农业科学院大豆研究所; 大肠杆菌菌株 DH5 α 和酵母菌株 YM4271; 用于构建文库的试剂盒(购自 Stratagene 公司); 提取总 RNA 的 Trizol 试剂盒(购自 Invitrogen 公司); 限制性内切酶、T4 连接酶、DNA 片段回收试剂盒(均购自大连宝(TaKaRa)生物工程公司), 氨苄青霉素为国产针剂, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 大豆种子用水浸泡 24 h, 置于滤纸上 25 $^{\circ}$ C 发芽, 然后植于装有珍珠岩的纸杯中, 保持水分

收稿日期: 2008-11-04

基金项目: 国家植物转基因专项资助项目(J99-B-01)

第一作者简介: 杨贵春(1967-), 男, 吉林省公主岭市人, 硕士, 副研究员, 主要从事植物分子生物学和遗传育种研究。Tel: 13843454181; E-mail: yanggc@126.com。

通讯作者: 邢少辰, E-mail: xingsc64@yahoo.com.cn

和光照,待长到15 cm左右时,取出并保持根系不受损伤,清水洗净,进行如下处理:(1)干旱处理:将上述植株置于恒温箱中,25℃下处理4 h;(2)低温处理:将上述植株置于4℃冰箱中,处理4 h;处理完毕之后,整个植株用锡纸包好,液氮速冻,然后置于超低温冰箱中备用。

1.2.2 总 RNA 的提取和质量检测 提取总 RNA 的 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司,方法按照试剂盒的说明书进行。沉淀后用 DEPC 水溶解,变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性。同时用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 的吸光值,检查 RNA 的纯度。

1.2.3 cDNA 双链的合成及其融合表达文库的构建 采用磁珠法从总 RNA 中分离出 mRNA,cDNA 的合成与融合表达文库的构建采用 HybriZAP-2.1 XR library construction kit 和 HybriZAP-2.1 XR cDNA synthesis kit,Stratagene 试剂盒。具体方法参见试剂盒的用户操作指南(Catalog #235612)。

本研究选用的融合表达载体为 pAD-GAL4 phage-mid Vector(Hybrid ZAP™,Stratagene 公司),载体的图谱如图 1 所示。

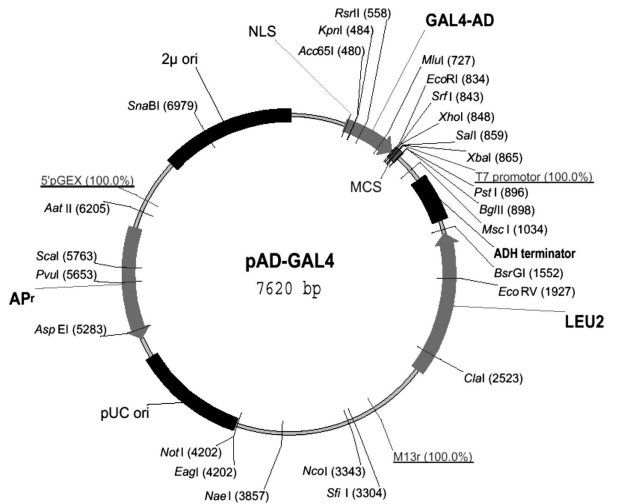


图 1 pAD-GAL4 质粒载体

1.2.4 原始文库和扩增文库滴度的测定 培养 XL1-Blue 宿主菌,用包装产物噬菌体颗粒在顶层琼脂中感染宿主菌,混匀后铺平板,37℃条件下 6~8 h 可以看到嗜菌斑,按吴晓林等^[2]方法测定文库的滴度 $P(\text{pfu} \cdot \text{mL}^{-1}) = \text{噬菌斑数} \times \text{稀释倍数} \times 10^3 / \text{噬菌体铺板体积}$ 。由于原始文库的稳定性较差,因而可以将原始文库继续感染宿主菌,扩增一次,得到更加稳定的扩增文库。在扩增文库中加 7%的二甲基亚砜(DMSO)后分装并置于-70℃超低温冰箱中保存备用。

1.2.5 cDNA 文库的质量鉴定 从干旱和低温两个原始文库随机各挑取 50 个噬菌斑,根据载体插入位点两端的序列合成引物:

Primer1:5'-AGGGATGTTTAATACCACTAC-3'

Primer2:5'-GCACAGTTGAAGTGAAGTTGC-3'

PCR 扩增,反应条件如下:

93℃ 5 min; } 1 个循环
48℃ 5 min; }
72℃ 2 min; }
93℃ 1 min; } 30 个循环
48℃ 1 min; }
72℃ 延伸 10 min

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 与 mRNA 的质量检测

提取的总 RNA,用变性凝胶电泳检测(见图 2),可以看见 28 s 和 18 s 条带,而且 28 s 的亮度约为 18 s 的 2 倍,证明 RNA 完整性较好,没有降解。紫外分光光度计检测总 RNA 的吸光值,发现在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值之比分别为 1.98 和 2.10,说明纯度较好,没有污染。采用磁珠法从总 RNA 中分离 mRNA,逆转录合成 cDNA 第一链过程中加入 ³²P 同位素标记,X 光片显示合成的 cDNA 长度在 0.5 kb 以上,呈弥散状态,说明 mRNA 质量较好,可用于构建 cDNA 文库。

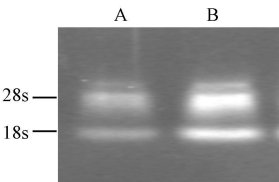


图 2 总 RNA 在甲醛变性凝胶上电泳分析

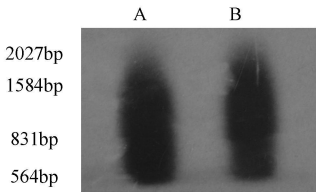


图 3 cDNA 第一链合成检测

2.2 文库滴度

用包装产物感染 XL1-Blue 菌,并将感染后的菌液进行稀释后,进行文库滴度测定。计算出两个原始文库的滴度分别为: A 库(干旱): $2.75 \times 10^6 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; B 库(低温): $5.52 \times 10^5 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

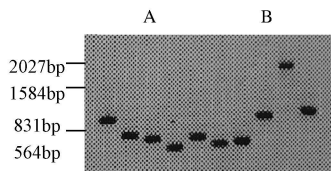
由此可见,这两个文库的滴度可以满足分离低丰度 cDNA 的要求。为了得到稳定的文库,重新用噬菌体感染 XL1-Blue 寄主菌,当菌斑直径小于 1~2 mm 时,用 SM buffer 收集平板上的菌体,稀释后再次涂板,测定扩增文库的滴度,结果干旱(A 库)和低温(B 库)文库的滴度分别为: A 库(干旱): $2.24 \times 10^9 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; B 库(低温): $1.7 \times 10^8 \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

一般来说,扩增文库的滴度在 $10^8 \sim 10^{11} \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,可见这两个文库的滴度符合要求。

2.3 文库插入片段长度分析

从干旱和低温两个原始文库中各随机挑取 50 个噬菌斑,用上述引物进行 PCR 检测,检查文库中插入的 cDNA 片段长度,图 4 仅为 PCR 扩增的部分结果。可以看出,插入 cDNA 片段的长度在 0.5~2.0 kb,说

明插入片段的长度较大, 而且从整个扩增的结果看, 每个反应均可以得到 PCR 产物, 说明插入重组的效率非常高。



A: 干旱处理文库; B: 低温处理文库

图 4 cDNA 文库插入片段长度的 PCR 分析

从上述结果可知, 构建的两个 cDNA 文库的质量是比较高的, 完全可以满足后续分离目的基因的要求。

3 讨论

3.1 关于 cDNA 文库的质量

cDNA 文库的质量有两个主要指标, 一是文库的代表性, 可用库容量来衡量, 即整个文库的容量是否能够将所有的信息包括进来, 具体表现在滴度的大小上, 滴度越大表明获得目的基因的可能性越大。一般来说, 文库滴度能达到 10^5 pfu \cdot mL⁻¹ 以上即为有效文库^[3]; 二是插入 cDNA 片段序列完整性, 即插入片段的长度越长, 表明分离到基因全长的可能性越大。本研究对大豆材料进行了干旱和低温处理, 可以大幅度提高目的基因的表达量, 理论上即使是低丰度的基因也可以筛选出来。此外, 从 PCR 扩增的结果看, cDNA 片段插入重组的比率非常高, 也为今后基因分离的效率提供了有力保证。

3.2 应用 cDNA 文库分离新基因

已有的研究表明, 植物在受到干旱和低温胁迫的情况下, 相关基因的表达受一种转录因子的调控, 这种转录因子包括一个核心的顺式作用元件 DRE (dehydration responsive element) 序列, 它是一个 9 bp 的核酸序

列 (TACCGA CAT), 其中 5 bp 的核心序列 (CCGAC) 称为 CRT (c-repeat), 它一般位于低温、干旱、高盐等逆境相关基因的启动子当中^[4]。因此, 分离这类转录调控因子对研究逆境分子机理就非常重要, 本文库采用的载体就是基于这个目的而构建的。我们已经得到了含有 4 个 DRE 重复序列的报告子, 共转化感受态的酵母菌, 就可以利用酵母单杂交技术筛选文库当中含有 DRE 元件的转录调控因子。目前, 该技术已经被广泛用于多个植物中^[5-8]。我们利用此技术对两个文库进行了初步筛选, 得到了 4 个阳性克隆, 初步的测序分析表明, 分别与 UDP-葡萄糖脱氢酶、茁长素抑制蛋白和花芽分化有关, 此结果为下一步分离全长基因和功能验证奠定了基础。

参考文献:

[1] 雨水资源及其利用[DB/OL]. <http://www.gnqx.gov.cn/qxfw/jszy.asp>

[2] 吴晓林, 琦祖. 现代分子生物学实验技术[M]. 2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 319-328.

[3] 李太武. 中国对虾 cDNA 文库的构建[J]. 动物学报, 1998, 44(2): 237.

[4] LIU Qiang, Kasuga Mie, Sakuma Yoh, et al. Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression Respectively, in Arabidopsis The Plant [J]. Cell, 1998, (10): 1391-1406.

[5] 姚泉洪, 邢彦彦, 王宗阳, 等. 以酵母单杂交体系克隆水稻 RAPB 基因 cDNA 及其序列测定[J]. 中国科学(C 辑), 1999, 29(4): 389-396.

[6] 谢永丽, 王自章, 刘强, 等. 草坪草狗牙根中抗逆基因 BeDREB 的克隆及功能鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(4): 521-527.

[7] 韩素英, 张守攻, 汪泉, 等. 构建脱水反应元件(DRE)报告子用于小叶杨 DRE 转录因子的克隆[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(3): 446-450.

[8] QIN Feng, LI Jie, ZHANG Gui-you, et al. Isolation and Structural Analysis of DRE-Binding Transcription Factor From Maize (zea mays L.) [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(3): 331-339.

中央一号文件 28 条推进农村改革发展之一

2009 年农业农村工作的总体要求是: 全面贯彻党的十七大、十七届三中全会和中央经济工作会议精神, 高举中国特色社会主义伟大旗帜, 以邓小平理论和“三个代表”重要思想为指导, 深入贯彻落实科学发展观, 把保持农业农村经济平稳较快发展作为首要任务, 围绕稳粮、增收、强基础、重民生, 进一步强化惠农政策, 增强科技支撑, 加大投入力度, 优化产业结构, 推进改革创新, 千方百计保证国家粮食安全和主要农产品有效供给, 千方百计促进农民收入持续增长, 为经济社会又好又快发展继续提供有力保障。

一、加大对农业的支持保护力度

- 1. 进一步增加农业农村投入。扩大内需、实施积极财政政策, 要把“三农”作为投入重点。
- 2. 较大幅度增加农业补贴。2009 年要在上年较大幅度增加补贴的基础上, 进一步增加补贴资金。增加对种粮农民直接补贴。
- 3. 保持农产品价格合理水平。密切跟踪国内外农产品市场变化, 适时加强政府调控, 灵活运用多种手段, 努力避免农产品价格下行, 防止谷贱伤农, 保障农业经营收入稳定增长。
- 4. 增强农村金融服务能力。抓紧制定鼓励县域内银行业金融机构新吸收的存款主要用于当地发放贷款的实施办法, 建立独立考核机制。