

宽果苾蕨适应昼夜变化 ESTs 的分离与分析

刘德团 李婉莎 胡向阳*

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 以流石滩地区植物广布种宽果苾蕨为实验材料, 应用磁珠介导的抑制消减杂交方法, 分离昼夜差异基因。随机挑选了 136 个差异 ESTs 克隆并进行测序, 测序结果使用 Blast2go 程序进行功能注释和分析。结果表明绝大部分 ESTs 功能与稳定细胞状态和抗性响应相关, 其次与物质能量代谢和信号传导相关, 宽果苾蕨适应昼夜变化过程的机制非常复杂, 本研究为进一步研究高山植物适应流石滩恶劣环境的机制奠定了基础。

关键词 差异表达; 表达序列标签; 宽果苾蕨; 抑制消减杂交

中图分类号: Q949.748.3 文献标识码: A 文章编号: 1673-5102(2012)04-0420-05

Isolation and Analysis of Differential Expressed ESTs from *Solms-laubachia eurycarpa*(Maxim.) Botsch. between Day and Night

LIU De-Tuan LI Wan-Sha HU Xiang-Yang*

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

Abstract The wide-distribution species *Solms-laubachia eurycarpa* on the scree on Baima snow mountain was used as the experimental material, and the suppression subtractive hybridization (SSH) based on magnetic beads technology was used to isolate the differential genes between day and night. After randomly sequencing 136 differential ESTs, these ESTs were further analyzed by functional annotation by Blast2go. Our results show that most ESTs are related to cellular homeostasis and stress response, followed by material and energy metabolism, and signal transduction. The process of *S-L. eurycarpa* responsive to daytime environment is very complicated, which lays a good foundation for further studying alpine plants adaptation to harsh environments of scree.

Key words differential expression; EST; *Solms-laubachia eurycarpa*; suppression subtractive hybridization(SSH)

植物一般扎根地下,不能像动物一样到处游动以躲避异常环境的损伤,所以植物必需进化出复杂的机制适应外界环境^[1]。青藏高原高山流石滩(一般海拔 4 000 m 以上)地区具有光照丰富,辐射强烈;暖季短促,冷季漫长;高寒缺氧,且多雷电、冰雹、霜冻、大风和雪灾等极端环境^[2]。长期生活在这种特殊逆境下的植物,在适应特殊环境的过程中,必定形成了一定的特殊抗性。如果能筛选出相关抗性基因,弄清该植物适应逆境的特殊分子机制,应用于分子育种,将能创造出较大的经济价值^[3]。

目前在转录水平上对植物外界非生物胁迫应答机制的研究主要集中在拟南芥、水稻等模式植物

上,以高山植物为试材的研究相对较少。宽果苾蕨为十字花科(Brassicaceae)苾蕨属(*Solms-laubachia*)植物,生长在高山流石滩、悬崖、高山草甸等海拔 3 800~4 900m 的区域^[4]。在云南、四川、西藏、青海、甘肃等地区广泛分布,在华南横断山脉地区,宽果苾蕨是一种草药,在藏区作为一种藏药^[5~6]。目前对宽果苾蕨的研究还很少,主要是形态学、系统分类学、染色体核型分析、微卫星引物筛选等方面的研究^[6~9],分子生物学方面分子机理的研究还未见报道。

为研究高山植物逆境适应的分子及生理机制,本文以白马雪山流石滩地区采集的宽果苾蕨为材料,利用磁珠介导的 SSH 方法,分离昼夜差异基

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30871704);中国科学院百人计划项目

第一作者简介:刘德团(1984—),男,硕士研究生,主要从事植物分子生物学研究。

* 通讯作者: E-mail: Huxiangyang@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2011-11-21

因 并进行 Blast2go 等信息学分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料为白马雪山采集的宽果苾蕨 (*Solms-laubachia eurycarpa* (Maxim.) Botsch.)。白马雪山位于 N28°23'13.9"E99°01'07.1", 海拔 4 484 m, 采集时间为每天 03:00 和 14:00, 样品采集后立即放入液氮瓶中。

1.2 实验方法

1.2.1 mRNA 的制备

总 RNA 使用 TIAN GEN 的植物总 RNA 提取试剂盒从材料叶片中提取, mRNA 采用天净沙的 mRNA 提取试剂盒从总 RNA 中分离, 具体方法参照试剂盒中的说明。

1.2.2 SSH 和差异表达基因的分离

以白天采集的样品为 tester, 晚上采集的样品为 driver, 利用抑制消减杂交 (SSH) 方法分离差异 cDNA; 然后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 随机挑取克隆进行 PCR 验证后送 Sangong 测序^[10]。

1.2.3 序列 blastx 比对分析

测序结果通过 Blast2go 整合的 Blastx 与 genebank 数据库中的非冗余蛋白数据库 (non-redundant) 进行比对, 参数设置为: e-value 为 10^{-3} , hits 为 20, HSP length cutoff 为 33^[11]。

1.2.4 ESTs 的功能注释和分类

比对后使用 Blast2go 进行 mapping 映射获取 GO terms, 其中 13 个没有获得 GO terms, 我们进一步使用 Interproscan 程序对蛋白结构域进行分析注释。随后从细胞成分、分子功能、生物过程 3 个方面进行功能注释和分类, 并对环境响应的基因进行了富集分析 (Fisher's exact test)^[11]。

2 结果

2.1 总 RNA 的分离

图 1 所示为宽果苾蕨总 RNA, 图中 28S 与 18S 条带比例接近 2:1, 经紫外分光光度计测定, OD_{260} / OD_{280} 值为 1.9 ~ 2.0, 表明所制备的总 RNA 质量较好, 可以进行下一步的分析。

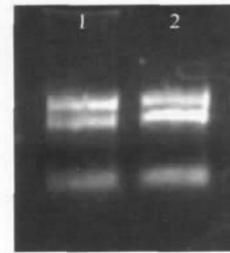


图 1 宽果苾蕨总 RNA 1. 夜晚; 2. 白天

Fig. 1 Total RNA of *S. -L. eurycarpa* 1. Night; 2. Day

2.2 差异 cDNA 的 PCR 扩增

图 2 为差异 cDNA 的 PCR 扩增产物, 分布比较均匀。图 3 为差异 cDNA 的菌液 PCR。

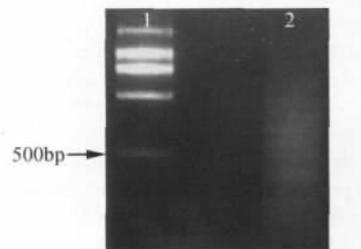


图 2 差异 cDNA 的 PCR 扩增 1. Marker; 2. 差异 cDNA

Fig. 2 PCR products of differential cDNA 1. Marker; 2. Differential cDNA

2.3 差异基因的 blastx 同源性搜索

在测出序列的 48 个 ESTs 中, 8 个没有与其具明显相似性的序列, 具体结果见表 1。

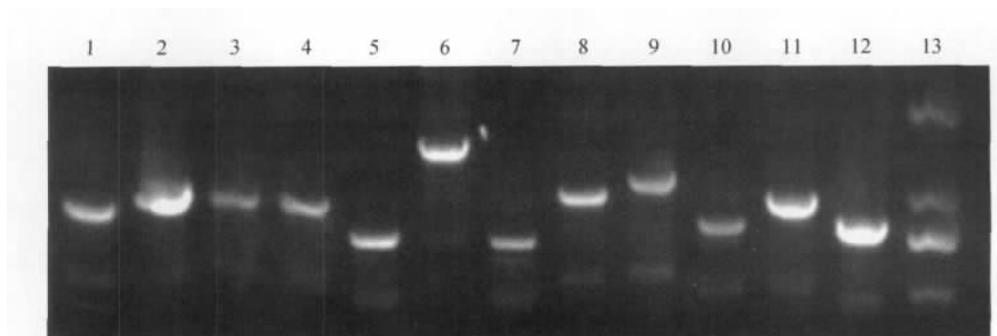


图 3 阳性克隆鉴定 1~12. cDNA 克隆的菌液 PCR 产物; 13. Marker

Fig. 3 PCR of positive clone 1-12. PCR products of cDNA clones; 13. Marker

表 1 宽果苾蓼差异表达基因的 blastx 结果

Table 1 Top blastx result of differentially expressed genes derived from *S. -L. eurycarpa*

Sequence	Sequence desc.	Length	E-value	Similarity	Score
20D-62	metallothionein 2b(<i>Noccaea caerulescens</i>)	558	9. 12E-09	70	64
20D-135	PSAO (photosystem I subunit O) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	842	3. 02E-69	93	266
20D-136	RNA polymerase beta ⁺ subunit(<i>Crucihimalaya wallichii</i>)	1065	4. 03E-78	95	296
20D-87	SocE(<i>Bacillus cereus</i> W)	1096	9. 26E-17	100	92
20D-133	hypothetical protein ARALYDRAFT_491882(<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>)	1097	1. 42E-49	93	201
20D-132	60S acidic ribosomal protein P1 (RPP1B) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	1097	5. 99E-24	98	116
20D-111	hypothetical protein(<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>)	1114	4. 55E-27	75	127
20D-120	hypothetical protein PhapfoPp091(<i>Phalaenopsis aphrodite</i> subsp. <i>formosana</i>)	1115	1. 89E-65	95	254
20D-79	hypothetical protein CLONEX_01831(<i>Clostridium nexile</i> DSM 1787)	1115	2. 12E-08	61	65
20D-74	unnamed protein product(<i>Homo sapiens</i>)	1120	3. 03E-71	100	273
20D-49	cold response protein(<i>Eutrema salsugineum</i>)	1120	8. 32E-45	78	186
20D-83	DNA-binding protein involved in either activation or repression of transcription (<i>Pichia pastoris</i> GS115)	1132	2. 13E-56	90	224
20D-72	AF263243_1SocE(<i>Myxococcus xanthus</i>)	1132	5. 12E-18	62	97
20D-65	chloramphenicol acetyltransferase(Promoter probe vector pEvoGlowRed)	1136	1. 83E-15	97	88
20D-60	Chlorophyll a - b binding protein I(<i>Sinapis alba</i>)	1144	3. 41E-102	98	376
20D-115	unnamed protein product(<i>Homo sapiens</i>)	1145	3. 11E-71	100	273
20D-68	unnamed protein product(<i>Homo sapiens</i>)	1146	3. 12E-71	100	273
20D-61	metallothionein 2b(<i>Noccaea caerulescens</i>)	1150	5. 09E-13	100	80
20D-92	unnamed protein product(<i>Homo sapiens</i>)	1162	3. 19E-71	100	273
20D-32	ribosomal protein L2(<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>)	1177	1. 34E-32	100	145
20D-23	hypothetical protein ARALYDRAFT_912116(<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>)	1178	8. 59E-56	94	222
20D-45	hypothetical protein CLONEX_01831(<i>Clostridium nexile</i> DSM 1787)	1179	4. 31E-31	100	140
20D-35	predicted protein(<i>Populus trichocarpa</i>)	1180	5. 62E-39	95	166
20D-7	unnamed protein product(<i>Homo sapiens</i>)	1180	3. 26E-71	100	273
20D-33	hypothetical protein(<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>)	1180	1. 39E-21	70	109
20D-31	hypothetical protein(<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>)	1182	7. 62E-36	96	156
20D-6	unnamed protein product(<i>Homo sapiens</i>)	1183	3. 28E-71	100	273
20D-24	hypothetical protein ARALYDRAFT_912116(<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>)	1185	8. 70E-56	94	222
20D-17	unnamed protein product(<i>Homo sapiens</i>)	1189	3. 30E-71	100	273
20D-2	unnamed protein product(<i>Homo sapiens</i>)	1192	3. 32E-71	100	273
20D-1	hypothetical protein(<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>)	1192	1. 40E-53	100	215
20D-30	hypothetical protein CLONEX_01831(<i>Clostridium nexile</i> DSM 1787)	1193	3. 35E-31	100	141
20D-25	ribosomal protein L2(<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>)	1196	1. 37E-32	100	145
20D-5	60S ribosomal protein L30(<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>)	1196	3. 26E-26	98	124
20D-4	hypothetical protein(<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>)	1202	1. 62E-41	87	175
20D-9	ribosomal protein L2(<i>Brassica napus</i>)	1204	8. 90E-56	94	222
20D-44	putative senescence-associated protein(<i>Pisum sativum</i>)	1204	2. 79E-25	89	121
20D-22	ribulose biphosphate carboxylase(<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>)	1207	3. 90E-35	92	154
20D-37	predicted protein(<i>Populus trichocarpa</i>)	1223	2. 78E-04	63	51
20D-47	hypothetical protein ECDG_04665(<i>E. coli</i> B185)	1229	1. 06E-27	68	129
20D-12	—NA—	558			
20D-134	—NA—	639			
20D-21	—NA—	701			
20D-43	—NA—	948			
20D-55	—NA—	969			
20D-127	—NA—	1018			
20D-90	—NA—	1052			
20D-16	—NA—	1309			

2.4 ESTs 注释和分类

Blast2go 进行注释和功能分类后,如图 4 所示,这些 EST 在结构上可分为以下几类:(1) 细胞部分(29%);(2) 膜结合的细胞器(24%);(3) 细胞器(20%);(4) 非膜结合的细胞器(15%);(5) 蛋白复合物(7%);(6) 质外体(3%);(7) 蛋白-DNA 复合物(2%)。其中 29% 的基因来自于细胞

部分,其次是膜结合的细胞器部分占 24%,细胞器部分占 20%。说明这些基因绝大部分在结构上定位于细胞部分和细胞器部分。

图 5 所示,在基因功能上,这些 ESTs 聚为了 11 类,分别为:(1) 转移酶活性(31%);(2) 核酸结合(19%);(3) 核糖体结构组成(14%);(4) 离子结合(10%);(5) 氧化还原酶活性(7%);(6) 蛋白

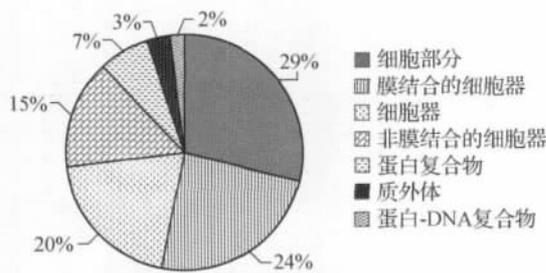


图 4 差异表达基因的细胞定位

Fig. 4 Cellular component of differential genes

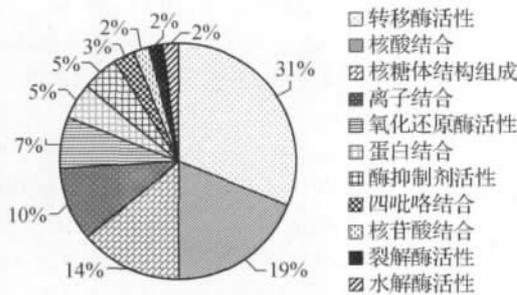


图 5 差异表达基因的分子功能

Fig. 5 Molecular function of differential genes

结合(5%); (7) 酶抑制剂活性(5%); (8) 四吡咯结合(3%); (9) 核苷酸结合(2%); (10) 裂解酶活性(2%); (11) 水解酶活性(2%)。其中,具转移酶活性的基因是最多的,占到了31%。核酸结合的基因占19%,离子结合和氧化还原酶活性相关基因分别占19%、14%,另外还包括少部分裂解酶活性和水解酶活性相关的基因。说明在基因功能上,这

些差异表达的基因主要与一些酶活性相关。

图 6 所示,这些基因参与以下几个生物学过程:(1) 细胞稳态(18%); (2) 细胞响应刺激物(15%); (3) DNA 构型改变(14%); (4) 细胞器组织(13%); (5) 异化过程(4%); (6) 有机物质代谢(4%); (7) 生物量的调节(4%); (8) 细胞成分组装(3%); (9) 大分子代谢(3%); (10) 信号通路(3%); (11) 生物合成过程(3%); (12) 其他(16%) (包括: 响应生物刺激物; 胁迫响应; 响应非生物刺激; 氧化还原; 氮复合物代谢; 响应其他有机物; DNA 组装; 细胞代谢; 细胞大分子复合物亚单位组织; 生物过程调节; 大分子复合物组织; 初级代谢)。其中,参与细胞响应刺激物的基因占15%,另外还包括其他与相应生物及非生物刺激、胁迫响应等方面的基因。说明低温差异表达的基因参与了刺激、胁迫等应答反应。

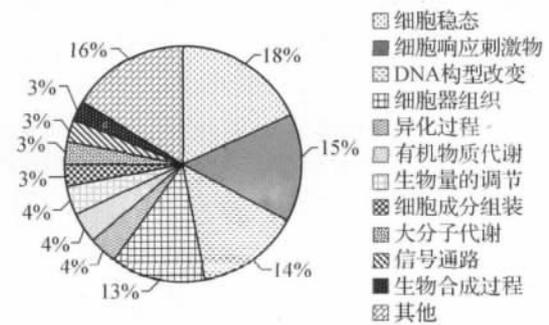


图 6 差异表达基因参与的生物过程

Fig. 6 Biology process of differential genes

表 2 环境响应基因的 fishier's 精确检验

Table 2 Fishier's exact test of genes responsive to environment

Name	FDR	P-value	#Test	#Ref	#notAnnotTest	#notAnnotRef	Over/Under
response to light stimulus	0.001 0	0.000 3	3	0	0	24	over
response to radiation	0.001 0	0.000 3	3	0	0	24	over
response to red or far red light	0.001 0	0.000 3	3	0	0	24	over
response to stimulus	0.001 0	0.000 3	3	0	0	24	over
response to abiotic stimulus	0.001 0	0.000 3	3	0	0	24	over
chloroplast envelope	0.007 0	0.003 4	3	2	0	22	over
organelle envelope	0.007 0	0.003 4	3	2	0	22	over
plastid envelope	0.007 0	0.003 4	3	2	0	22	over
envelope	0.007 0	0.003 4	3	2	0	22	over
plastid part	0.010 1	0.006 8	3	3	0	21	over
chloroplast part	0.010 1	0.006 8	3	3	0	21	over
response to blue light	0.021 4	0.008 5	2	0	1	24	over
response to cold	0.021 4	0.008 5	2	0	1	24	over
extracellular region	0.021 4	0.008 5	2	0	1	24	over
response to red light	0.021 4	0.008 5	2	0	1	24	over
response to far red light	0.021 4	0.008 5	2	0	1	24	over
apoplast	0.021 4	0.008 5	2	0	1	24	over
response to temperature stimulus	0.021 4	0.008 5	2	0	1	24	over
response to stress	0.021 4	0.008 5	2	0	1	24	over
protein binding	0.021 4	0.008 5	2	0	1	24	over

2.5 Fisher's exact test 检验

对非生物刺激响应的基因(20D-22、20D-49、20D-60)进行了富集分析,结果见表2。

3 讨论

SSH技术是一种快速、有效地分离差异表达基因的方法,运用SSH进行一轮差减杂交,可富集稀有序列1000倍以上^[12],使某些低丰度表达的mRNA有望被检出。Stein等的研究表明,SSH的阳性率达94%,与mRNA差异显示技术、cDNA-AFLP相比,SSH可同时分离出几十到上百个差异表达基因^[13]。

高的RNA质量和适当比例的Target mRNA和Driver mRNA对SSH的结果至关重要,所以本实验选择了用试剂盒进行总RNA的提取和mRNA的分离,考虑到高山植物一般多糖多酚含量比较高,我们选用了高盐高pH值的缓冲液提取总RNA。

Blastx比对结果中,8个没有获得明显相似性的序列,其可能为与已知蛋白相似性比较低,也可能不含编码序列,或者属于新的蛋白而在数据库中未有与之相似的序列。金属硫蛋白(metallothionein 2b, 20D-61、20D-62)基因表达具有可诱导性,金属离子、高光、高盐、干旱、臭氧、紫外照射等环境因素对植物金属硫蛋白基因表达均有影响^[14]。

GO功能注释是使用Blast2go程序进行的,Blast2go整合了blastx、mapping、annotation、interproscan、go slim、combined graph、enrichment analysis等功能,菜单界面、操作简便、已被广泛用于多种植物ESTs研究^[15-16]。

本研究得到的胁迫差异基因,如温度响应、非生物刺激物响应、环境压力响应、辐射或光刺激响应,经过Fisher精确检验后发现,它们都是上调富集表达的,可能对提高宽果苾蕨白天恶劣环境的耐受性起关键作用。本实验还分离出较多参与细胞稳态、物质代谢、信号传导等相关的ESTs,说明宽果苾蕨在高山恶劣的环境中,通过多种生物学过程及复杂的调控机制而适应各种胁迫环境。

总之,本研究所取得的结果为日后进一步对宽果苾蕨等高山植物适应机理的研究奠定了基础,下一步将对获得的基因进行功能鉴定,从分子生物学角度揭开宽果苾蕨抗逆能力的奥秘。

致谢 感谢陈家辉博士对本标本的鉴定。

参 考 文 献

1. Smeets M, Pasterkamp G, Dpv D K. Methods in molecular cardiology: suppression subtraction hybridisation [J]. Netherlands Heart Journal 2003, 11(6): 260-266.
2. 张国胜, 李希来, 李林, 等. 青南高寒草甸秃斑地形成的气象条件分析 [J]. 中国草地, 1998(6): 12-16, 24.
3. 黄继红, 谭敦炎. 雪莲的研究进展 [J]. 新疆农业大学学报 2002, 25(2): 8-13.
4. Yue J, Feldheim K, Sun H, et al. Ten microsatellite loci from *Solms-laubachia eurycarpa* (Brassicaceae) [J]. Molecular Ecology Resources 2008, 8(5): 1023-1025.
5. Al-Shehbaz I A, Yang G. A revision of *Solms-laubachia* (Brassicaceae) [J]. Harvard Papers in Botany 2001(5): 371-381.
6. Zhou T Y, Lu L L, Yang G, et al. Brassicaceae [M]. // Wu Z Y, Raven P H, et al. Beijing: Science Press and St Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden Press 2011.
7. Yue J P, Al-Shehbaz I A, Sun H, et al. Cytological studies of five Chinese species of *Solms-laubachia* (Brassicaceae) [J]. Harvard Papers in Botany 2003(7): 473-479.
8. Yue J P, Sun H, Al-Shehbaz I A, et al. Support for an expanded *Solms-laubachia* (Brassicaceae): evidence from sequences of chloroplast and nuclear genes [J]. Annals of the Missouri Botanical Garden 2006(93): 402-411.
9. Yue J P, Feldheim K A, Sun H. Ten microsatellite loci from *Solms-laubachia eurycarpa* (Brassicaceae) [J]. Molecular Ecology 2008, 17(14): 3337-3351.
10. Lönnborg A, Sharma P, Stougaard P. Construction of subtractive cDNA library using magnetic beads and PCR [J]. Genome Research 1995, 4(4): 168.
11. Conesa A, Götz S, García-Gómez J M, et al. Blast2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. Bioinformatics, 2005, 21(18): 3674-3676.
12. 苏红英, 张鹏飞. 抑制性消减杂交技术研究进展 [J]. 福建医科大学学报 2004, 38(3): 354-357.
13. Stein O D V, Hofmann W G T. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes [J]. Nucleic acids research 1997, 25(13): 2598-2602.
14. 全先庆, 张洪涛, 单雷, 等. 植物金属硫蛋白及其重金属解毒机制研究进展 [J]. 遗传 2006, 28(3): 375-382.
15. Nishiuchi S, Fujihara K, Liu S, et al. Analysis of expressed sequence tags from a NaHCO₃-treated alkali-tolerant plant, *Chloris virgata* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(4): 247-255.
16. 刘德团, 李婉莎, 查宏光, 等. 拟稷斗菜昼夜差异表达ESTs的分离与分析 [J]. 植物研究 2001, 31(4): 414-421.