

休眠解除过程中牡丹花芽均一化酵母杂交文库的构建

盖树鹏 穆平 张风 董磊 郑国生

(青岛农业大学生命科学学院, 青岛 266109)

摘要:以不同低温处理的牡丹花芽为试材,采用 DSN(duplex-specific nuclease) 均一化技术结合 SMARTTM(switching mechanism at 5'end of RNA transcript) 建库技术合成 cDNA 均一化 cDNA 与 pGADT7-Rec 重组并转化酵母 AH109, 构建了冬季牡丹低温累积进程中的花芽均一化 cDNA 文库。经检测,原始文库滴度为 1.77×10^6 cfu/ml, 库容量为 2.3×10^8 。对管家基因 *18S rRNA* 均一化前后丰度检测表明,均一化程度 $> 2^6$, 随机挑取了 188 个克隆,PCR 方法测得文库重组率大于 95%, 插入片段平均长度 1200bp, 构建的文库质量较高。该文库为进一步通过酵母杂交技术筛选低温解除牡丹休眠进程中受低温调控的转录因子和互作蛋白,进而为构建低温解除休眠的基因调控网络奠定了基础。

关键词:牡丹; 休眠; 均一化 cDNA; 酵母杂交文库

Construction of a Normalized Yeast Hybridization cDNA Library during Dormancy Release in Tree Peony

GAI Shu-peng, MU Ping, ZHANG Feng, DONG Lei, ZHENG Guo-sheng

(College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract: To obtain full-length genes related to dormancy release and provide resources for tree peony genomic study, flower buds of different chilling duration were used to isolate mRNA of tree peony. A normalized full-length yeast hybridization cDNA library was then constructed by DSN (duplex-specific nuclease) normalization method in combination with SMART (switching mechanism at 5'end of RNA transcript) technique. The amplified cDNA was recombined with pGADT7-Rec and transformed to the yeast strain AH109. The titer of un-amplified cDNA library was about 1.77×10^6 cfu/ml, which contained 2.3×10^8 independent clones. The results of PCR and Tanon GIS analysis indicated that the abundance of transcripts *18S rRNA* decreased by 2^6 in normalized cDNA library compared with that in non-normalized samples. The average size of cDNA inserts was 1200 bp with a recombination rate of over 95%. These results indicated that the normalized yeast hybridization cDNA library has been successfully established with high quality, which is convenient to screen transcription factors and interaction protein regulated by chilling temperature, and finally to develop gene regulation network during dormancy release in tree peony.

Key words: Tree peony; Dormancy; Normalized cDNA; Yeast hybridization library

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.) 是原产于中国的特有名贵花卉,具有较高的观赏价值和经济价值。春节催花是牡丹产业中的重要内容,全国每年用于催花的牡丹近 200 万株,年创产值 2 亿元以上。彻底解除牡丹花芽休眠是反季节催花的

关键问题,但由于对花芽休眠解除机理的认识不足,造成生产中催花不良甚至催花失败现象时有发生,花农损失惨重,制约了牡丹产业的发展。木本植物芽休眠解除机理是国际难题,目前虽已筛选出一些休眠解除相关的基因,但仍不清楚导

收稿日期:2010-07-15 修回日期:2011-08-15

基金项目:国家自然科学基金项目(30871728, 31071828);山东省农业良种工程项目(鲁科农社字[2007]217号)

作者简介:盖树鹏,博士,副教授,硕士生导师,主要从事植物分子标记和基因克隆工作。E-mail: spgai@qau.edu.cn

通讯作者:郑国生,教授,博导。E-mail: gszheng@qau.edu.cn

致休眠解除的关键代谢过程和基因调控网络^[1-2]。本课题组针对牡丹花芽休眠解除机理进行了大量研究,分析了低温解除休眠进程中的内源激素、营养物质、膜脂过氧化等动态变化^[3-5];通过 SSH 技术筛选了 31 个休眠解除相关的基因^[6],并对受低温诱导的线粒体磷酸转移子基因 (*PsMPT*) 进行了详细研究,证明了休眠解除伴随着 ATP 浓度升高的分子机制^[7],进一步通过酵母杂交技术筛选调控 *PsMPT* 基因表达的转录因子,对于解析休眠解除的能量代谢调控具有重要意义。然而,SSH 文库筛选的基因数量有限,且多为 cDNA 片段,很难保证筛选到目的转录因子,因此,有必要构建酵母杂交文库,为解析休眠解除的基因调控网络奠定了基础。

一般而言,调控基因表达的转录因子多为低丰度 mRNA 所编码,低丰度的 mRNA 占全部种类的 20%~40%^[8]。采用传统建库方法,常导致部分低丰度 mRNA 丢失或筛选困难。均一化 cDNA 文库 (normalized cDNA library) 又称为等量化 cDNA 文库,即某一特定组织或细胞的所有表达基因均包含其中且含量相等的 cDNA 文库,该文库增加了克隆低丰度 mRNA 的机会^[9]。DSN (duplex-specific enzyme) 是 2002 年发现的一种热稳定核酸酶^[10],该酶能够选择性降解双链 DNA 和 DNA-RNA 杂交体中的 DNA,对单链核酸分子几乎没有作用,已被成功用于全长 cDNA 的均一化文库构建^[11-13]。

牡丹基因组学研究起步较晚,目前未见均一化文库的研究报道,Shu 等^[14]构建了牡丹花芽分化过程的 cDNA 文库,测定了 2241 个 ESTs 序列,拼接后共获得了 1300 个 unigene,但至今 Genbank 中可检索到的 EST 序列仅有 2230 多个,信息量有限,限制了牡丹基因组学的发展。本研究拟利用不同休眠解除程度的牡丹花芽,通过 DSN 技术构建均一化的 cDNA,并进一步构建酵母杂交 AD (activation domain) 文库,为进一步利用酵母单杂交和双杂交技术筛选调控休眠解除相关基因表达的转录因子及克隆休眠解除相关基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

所用材料为凤丹白,取自安徽亳州(该地大面积种植凤丹白单一品种生产丹皮,长期品种内授粉,遗传组成已趋于稳定)。2009 年 10 月中

旬,挑选 4 年生、整齐一致的苗木,单株入盆。至日均温低于 10℃ 时,将植株移入 4℃ 冷库,进行低温处理。分别低温处理 0、6、12、15、18、24 d,移入温室观察花芽萌动及开花展叶情况,每处理 6 株,3 个重复。其中 3 株移入温室调查开花展叶情况^[15],用于分析花芽休眠状态,另外 3 株取样,每株取 3 个顶花芽,剥去鳞片,液氮速冻后 -80℃ 保存备用,用于提取 RNA。

OligotexTM mRNA Purification Kit (Midi) 购自 Qiagen 公司, MatechmakerTM Library Construction & Screening Kit (634445) 购自 Clontech, Duplex-Sepafu Natlax (EA003) 购自 Invitrogen, 化学试剂均为国产分析纯。

1.2 牡丹花芽 RNA 的提取、检测及纯化

称取 1g 牡丹花芽在液氮中研磨至粉末状,迅速转移至盛有 10ml 65℃ 预热的 CTAB 提取液的离心管中,65℃ 温浴 30min。加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提 2 次。取上清液加入等体积的 4mol/L LiCl, 4℃ 过夜。4℃, 10000r/min, 离心 30min, 沉淀用 70% 乙醇清洗。500μl SSSTE 溶解沉淀,氯仿:异戊醇(24:1)抽提 2 次。取上清,加入 1/10 体积 3mol/L NaAc (pH5.2) 和 2 倍体积的无水乙醇; 4℃, 13000r/min, 离心 20min, 沉淀经 70% 乙醇洗涤后,加入 400μl RNase-free ddH₂O 溶解,用蛋白核酸定量测定仪 (Spectrophotometer ND-1000 型) 测定 RNA 的纯度及浓度,1% 的琼脂糖凝胶检测其完整性。利用 OligotexTM mRNA Purification kit (Qiagen) 提取纯化 mRNA,适量的 RNase-free 水溶解使其浓度为 0.5 μg/μl。将不同处理样品 mRNA 等量混合,用于 cDNA 合成。

1.3 全长 cDNA 合成

利用 MatechmakerTM Library Construction & Screening Kit 中的 cDNA 合成组分合成双链 cDNA,参照试剂盒说明书操作。合成的双链 cDNA 经蛋白酶 K 消化、酚/氯仿抽提及乙醇沉淀后加 25μl 去离子水溶解。

1.4 cDNA 均一化及均一化测定

利用 Duplex-Sepafu Natlax 试剂盒进行 cDNA 均一化。8μl ds cDNA (约 1μg) 加入 8μl 2 × Hybridization buffer 平均分成 4 份,98℃ 放置 2min 后,迅速转移到 68℃ 水浴锅中 5h。将 1μl DSN storage buffer 和 1μl DSN 酶混匀,标记为 1/2 DSN; 3μl DSN storage buffer 和 1μl DSN 酶混匀,标记为 1/4 DSN; 直接取 1μl DSN storage buffer,标记为 control。取 4 个 PCR 管加入: 4μl 杂交后的 cDNA、5μl 2 × DSN master buffer (68℃ 预热) 和

1 μl DSN solution(分别为 DSN、1/2DSN、1/4DSN、control) ,68 $^{\circ}\text{C}$ 反应 25min 后,加入 10 μl 2 \times DSN stop buffer 室温放置 5min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

DSN 消化后 cDNA 经 2 次 PCR 放大后,用 CHROMA SPINTMTE-400 柱纯化。第 1 次 PCR 放大产物取 5 μl 以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。选择最佳均一化扩增产物进行第 2 次放大。

取等量(约 1ng) 均一化前后 cDNA(1/4DSN 和 control) 作为模板,以 *18S rRNA* 管家基因进行 PCR,在 10、16、22、28 个循环后各取 5 μl 扩增产物,琼脂糖电泳检测。用 Tanon GIS 软件分析扩增产物灰度,分析均一化程度。

1.5 cDNA 文库构建

准备酵母的感受态细胞 AH109。在一个无菌预冷的 15ml 离心管加入 20 μl 均一化的 ds cDNA、6 μl pGADT7-Rec(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、20 μl 变性的 Herring Tests Carrier DNA,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5min,立即冰浴。加 600 μl 感受态细胞到 DNA 中,涡旋震荡。30 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45min,加入 160 μl DMSO 混合,42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20min。700 \times g 离心 5min,弃上清液,用 3ml YPD Plus 液体培养基重新悬浮,30 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 90min。700 \times g 离心 5min,弃上清液,用 30ml NaCl(0.9%) 溶液重新悬浮。在 SD/-Leu 平板上选择转化子。

按照 1:100、1:1000 和 1:10000 稀释悬浮液,每平板上铺 100 μl 。30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养直到克隆出现(大约 2~3d),计算滴度。 $T = N \times D/V$ (T 为滴度, N 为平板上克隆数, D 为稀释倍数, V 为涂板体积)。

1.6 插入片段检测

随机挑取 188 个克隆,以 PCR 扩增插入片段(5' PCR Primer 5'-TTCCACCCAAGCAGTGGTATCAA CG-CAGAGTGG-3'; 3'-PCR Primer 5'-GTATCGATGCCAC-CCTCTAGAGGCCGAGCGGCCGACA-3') 计算文库重组率及插入片段大小。

2 结果与分析

2.1 不同低温处理凤丹白的开花展叶情况

不经低温处理的凤丹白花芽不能萌动,4 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理 6d 以上的植株移入温室后花芽都有萌动,但萌动率差异较大。低温处理 18d 和 24d,花芽有很高的萌动率,达到 96.1% 和 97.9%,成花率达到 86.3% 和 87.5%,两处理间萌动率和成花率差异不显著($\alpha = 0.01$)。可见,4 $^{\circ}\text{C}$ 低温处

理 18d,花芽休眠已解除,本试验设置的处理可以代表低温解除凤丹白花芽休眠的进程。

2.2 RNA 抽提、纯化及质检

取 1 μl RNA 样品进行凝胶电泳检测,结果表明,用 CTAB 法提取的 RNA,28S、18S 和 5S rRNA 带型清晰,28S 和 18S rRNA 亮度比值约为 2:1,说明提取的总 RNA 无降解现象。且两条带之间无弥散现象。蛋白核酸定量测定仪测量 A260 和 A280 的吸光度,A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间,RNA 的产量为 200~250 $\mu\text{g}/\text{g}$ 材料,说明用此法提取的 RNA 样品产量较高,受多糖、多酚类、蛋白质物质污染程度小,纯度较高。

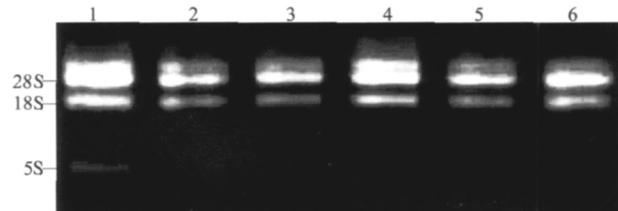


图 1 提取不同时期凤丹白花芽总 RNA

Fig.1 Total RNA extracted from tree peony cultivar Fengdanbai

1-6: 低温处理 0、6、12、15、18 和 24d 样品

1-6: samples 0, 6, 12, 15, 18 and 24d following chilling treatment

2.3 cDNA 合成检测

利用 LD-PCR 进行 cDNA 的双链合成,用 1% 琼脂糖凝胶检测,合成的 cDNA 在 150~2000bp 之间有较强的荧光背景。纯化后的 dsDNA 进行均一化,均一化后进行 1 次 LD-PCR 放大,结果显示以 1/4 DSN 均一化效果最好,以此为模板进行 2 次 PCR 放大。

2.4 均一化效率验证

经 DSN 处理和 2 次扩增后,ds cDNA 中代表高丰度基因的亮带消失,呈现均匀的弥散条带,且其大小范围没有明显的变化,表明高丰度基因的丰度明显下降(图 2)。以 1/4 DSN 和 control 为模板,对 *18S rRNA* 管家基因进行 PCR 扩增。从图 3 可以看出,16 循环时,均一化 cDNA 未检测到扩增产物(图 3 泳道 3),而未均一化 cDNA 可清晰地看到荧光背景(图 3 泳道 4);22 和 28 循环的均一化产物荧光亮度明显低于未均一化 cDNA(图 3 5~8 泳道)。产物经电泳后用 Tanon GIS 软件分析灰度,显示本文库均一化后比非均一化的丰度下降 2^6 倍以上。

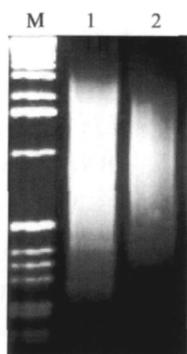


图2 均一化前后电泳图谱
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of non-normalized and normalized cDNA

M: 1kb ladder (Gibco-BRL). 1: 未均一化 cDNA; 2: 均一化 cDNA
M: 1kb ladder (Gibco-BRL). 1: un-normalized cDNA;
2: normalized cDNA

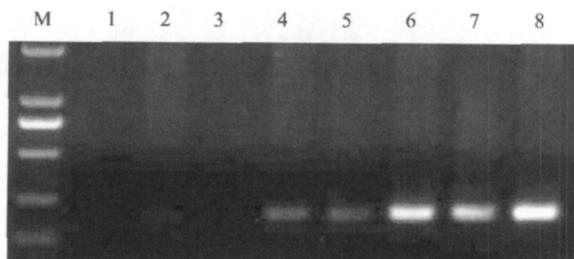


图3 18S rRNA 基因均一化检测
Fig. 3 Detection of 18S rRNA abundance by normalization

M: DL2000 ladder; 1、3、5 和 7: 均一化 cDNA;
2、4、6 和 8: 未均一化 cDNA;
1 和 2: 10 循环; 3 和 4: 16 循环; 5 和 6: 22 循环; 7 和 8: 28 循环
M: DL2000 ladder; 1, 3, 5, and 7: normalized cDNA;
2, 4, 6, and 8: un-normalized cDNA;
1 and 2: 10 cycles; 3 and 4: 16 cycles;
5 and 6: 22 cycles; 7 and 8: 28 cycles

2.5 文库库容和插入片段分析

采用划区的形式将平板平分成 8 个分区, 取其中的一个区进行计数, 从而进一步得出 8 个分区的转化子总数。未经扩增的文库滴度达到 1.77×10^6 cfu/ml, 库容量为 2.3×10^8 。随机检测了 188 个克隆插入片段大小, 其中 180 个克隆 (95.7%) 检测到了大于 200bp 的扩增产物 (CHROMA SPINTMTE-400 柱纯化大于 200bp 的 cDNA), 说明 ds cDNA 已经插入 pGADT7-Rec 质粒中, 文库重组率超过 95%。插入片段大小分布范围为 0~5000bp, 平均长度为 1200bp (图 4)。

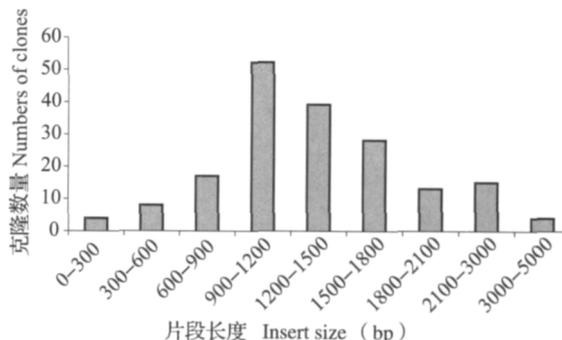


图4 凤丹白花芽均一化文库插入片段长度的分布图

Fig. 4 Insert size distribution of single clone from normalized cDNA library of flower buds from tree peony cultivar Fengdanbai

3 讨论

构建 cDNA 文库是分子生物学研究的重要技术, 对新基因发掘起着非常重要的作用。均一化文库增加了克隆低丰度 mRNA 的机会。日本水稻基因组计划 (RGP) 启动的 EST 测序中, 为获得足够多的基因信息, 动用了多达 15 个独立的 cDNA 文库, 测序超过 29000 个 cDNA 克隆, 才获得近 10000 条非重复序列^[16-17]。Ko^[18] 构建了第一个均一化 cDNA 文库, 此后均一化文库的构建方法有了许多改进和创新。DSN 酶发现之前, 主要利用两种方法进行 cDNA 文库均一化, 一种是基于复性动力学原理^[19-20], 另一种是基于与基因组 DNA 饱和杂交的技术^[21-22]。DSN 技术利用 DSN 酶选择性降解双链 DNA 和 DNA-RNA 杂交体中的 DNA 特性, 降低高丰度 cDNA 浓度, 通过 PCR 扩增提高低丰度 cDNA 浓度。该方法操作步骤简单, 所需起始材料少, 均一化效果好, 具有较好的应用前景。

均一化全长 cDNA 文库质量主要从库容量、插入片段的大小和均一化效果等方面进行。本研究构建的酵母杂交文库的滴度为 1.7×10^6 cfu/ml, 保证了文库的完整性与覆盖度^[23]; 文库插入片段的平均长度达 1200bp, 具有较高的序列完整性。利用均一化的 cDNA 进行了 454 测序, 经生物信息学统计分析, 共计获得 reads 数目为 625342 条, 平均长度为 358.1bp, 经拼接后得到的 contig 数目为 23652 条, 其中大于 300bp 的 Unigene 数目为 15284 条, 说明构建酵母杂交文库的均一化 cDNA 信息量丰富, 从侧面证明了构建的文库具有较高的质量。本研究建立的牡丹均一化文库构建技术, 对其他物种均一化文库的构建具有很好的借鉴意义, 所构建的牡丹花芽酵

母杂交文库对于研究低温解除牡丹花芽休眠的基因调控网络、花芽发育的基因调控网络都具有重要意义。

参考文献

- [1] Hedley P E, Joanne R, Russell J R, et al. Candidate genes associated with bud dormancy release in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 202
- [2] Or E. Grape bud dormancy release—the molecular aspect [M]. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed.). Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology, German: Springer Science (2nd edn.), 2009, 1–29
- [3] 郑国生, 盖树鹏, 盖伟玲. 低温解除牡丹芽休眠进程中内源激素的变化[J]. 林业科学, 2009, 45(2): 48–52
- [4] 刘波, 郑国生, 闫志佩, 等. 低温处理对牡丹春节催花及营养物质变化的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(9): 1635–1639
- [5] 罗玉荣, 马云飞, 郑国生, 等. 低温解除牡丹休眠过程中花芽细胞的膜脂过氧化研究[J]. 合肥学院学报, 2008, 18(2): 78–81
- [6] Huang X, Xue T T, Dai S L, et al. Genes associated with the release of dormant buds in tree peonies (*Paeonia suffruticosa*) [J]. Acta Physi Planta, 2008, 30(6): 797–806
- [7] Huang X, Zhu W, Dai S L, et al. The involvement of mitochondrial phosphate transporter in accelerating bud dormancy release during chilling treatment of tree peonies (*Paeonia suffruticosa*) [J]. Planta, 2008, 228: 545–552
- [8] Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, et al. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes [J]. Genome Res, 2000, 10: 1617–1630
- [9] Zhang Z X, Zhang F D, Tang W H, et al. Construction and characterization of normalized cDNA Library of maize inbred M017 from multiple tissues and developmental stages [J]. Mol Biol, 2005, 39: 198–206
- [10] Shagin D A, Rebrikov D V, Kozhemyako V B, et al. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas [J]. Genome Res, 2002, 12: 1935–1942
- [11] Zhulidov P A, Bogdanova E A, Shcheglov A S, et al. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease [J]. Nucl Acids Res, 2004, 32: e37
- [12] 张石柱, 王中康, 彭国雄, 等. 利用 DSN 和 SMART™ 技术构建金龟子绿僵菌产孢时期均一化全长 cDNA 文库 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 884–887
- [13] 吴东, 刘俊杰, 喻树迅, 等. 中棉所 36 均一化全长 cDNA 文库的构建与鉴定 [J]. 作物学报, 2009, 35(4): 602–607
- [14] Shu Q Y, Wischnitzki E, Liu Z A, et al. Functional annotation of expressed sequence tags as a tool to understand the molecular mechanism controlling flower bud development in tree peony [J]. Physiol Planta, 2009, 135: 436–449
- [15] 王宗正, 韩莉, 孔兰静. 低温处理对牡丹开花和展叶的影响 [J]. 园艺学报, 1996, 23(3): 307–308
- [16] Yamamoto K, Sasaki T. Large-scale EST sequencing in rice [J]. Plant Mol Biol, 1997, 35: 135–144
- [17] Sasaki T. The rice genome project in Japan [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95: 2027–2028
- [18] Ko M S H. An equalized cDNA library by the reassociation of short double-stranded cDNA [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 5705–5711
- [19] Patanjali S R, Parimoo S, Weissman S M. Construction of a uniform-abundance (normalized) cDNA library [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1991, 88: 1943–1947
- [20] Soares M B, Bonaldo M E, Su L. Construction and characterization of a normalized cDNA library [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1994, 91: 9228–9232
- [21] Sasaki Y F, Ayusawa D, Oishi M. Construction of a normalized cDNA library by introduction of a semi-solid mRNA-cDNA hybridization system [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 987–992
- [22] Tanaka T, Ogiwara A, Uehiyama I. Construction of a normalized directionally cloned cDNA library from adult heart and analysis of 3040 clones by partial sequencing [J]. Genomics, 1996, 35: 231–235
- [23] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 338–339