

## 细极链格孢菌蛋白激发子诱导棉苗基因表达差减文库的构建及 EST 分析

张志刚<sup>1,2,3</sup>, 邱德文<sup>2\*</sup>, 杨秀芬<sup>2</sup>, 曾洪梅<sup>2</sup>, 袁京京<sup>2</sup>, 刘 峰<sup>2</sup>, 杨晓萍<sup>3</sup>, 官春云<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学,长沙 410128;2. 中国农业科学院植物保护研究所,北京 100081;

3. 湖南省棉花科学研究所,常德 415000)

**摘要:**利用细极链格孢菌蛋白激发子粗提蛋白液诱导棉花苗期相关基因表达,以清水喷施为对照样本,进行抑制差减杂交,构建棉花苗期基因表达文库。结果显示,插入片段的大小主要集中在 200~1000 bp。随机选取 150 个克隆进行菌液 PCR 检测与测序,并将所测序列与 GenBank dbEST 库进行比对,共得到 104 个单一序列。其中,78 个 EST 与其它物种已知基因部分区域的同源性为 48.54%~100%,占总 EST 的 75%;6 条 EST 序列能在数据库中检索到同源性序列,但其功能尚不清楚,占 5.77%;10 个 EST 能在数据库中发现为推测蛋白,占 9.6%;10 个 EST 在 GenBank 中没有查到对应的同源序列,可能是新基因,占 9.6%。同时,将所得到的 104 条 EST 序列在 WEGO 网站上进行功能分类,通过 Gene ontology 确定具体 EST 的分子功能。其中,在生物途径分类中,与生理途径和细胞过程相关的 EST 最多,分别为 48 个和 45 个;在细胞组份功能分类中,与细胞相关的 EST 最多,达到 44 个;在分子功能分类中,催化功能与分子绑定相关的 EST 数量最多,分别达到了 30 个和 28 个。由此可见,细极链格孢菌蛋白激发子诱导棉苗时涉及到植物的生理生化的多条途径,受到多个基因的调控,可能包括抗病与防御蛋白、信号传导蛋白、转录因子、能量代谢相关蛋白、抗逆相关蛋白、细胞保护机制蛋白、功能未知及其它蛋白等相关蛋白。

**关键词:**细极链格孢菌蛋白激发子;棉花;抑制性差减杂交(SSH);EST

**中图分类号:**S562.035.3 **文献标识码:**A

**文章编号:**1002-7807(2007)04-0248-07

## Construction of Suppression Subtractive Hybridization Library with cDNA from Seedling Cotton Induced by Protein Elicitor from *Alternaria tenuissima* and Analysis of EST

ZHANG Zhi-gang<sup>1,2,3</sup>, QIU De-wen<sup>2\*</sup>, YANG Xiu-fen<sup>2</sup>, ZENG Hong-mei<sup>2</sup>, YUAN Jing-jing<sup>2</sup>, LIU Zheng<sup>2</sup>, YANG Xiao-ping<sup>3</sup>, GUAN Chun-yun<sup>2</sup>

(1. Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Hunan Cotton Research Institute, Changde 415000, China)

**Abstract:** The gene expression of seedling cotton induced by protein elicitor from *Alternaria tenuissima*, the construction of suppression subtractive hybridization (SSH) library with cDNA from seedling cotton, and analysis of EST were described. The results demonstrated that the insertion fragments of SSH library were ranging from 200 bp to 1 kb. 150 clones were randomly picked for PCR and sequencing. After matching the result in GenBank dbEST, 104 sequences were obtained. Of them, 78 had

收稿日期:2007-02-12

作者简介:张志刚(1976-),男,助研,在读博士,zhangzhig@126.com;\*:通讯作者

基金项目:国家 973 重点基础研究发展计划(2003CB114204),国家 863 重点基础研究发展计划(2003AA241130)

48.54%~100% similarity with known genes, which is 75% of the total EST. Six sequences have their homology with the sequences in GenBank with unknown function. 10 have no similarity with the sequences in GenBank, which might be new genes. The function of all the 104 EST was determined by classified being in WEGO and gene ontology. Most of the EST were related to physiological process and cell process, with the number of 48 and 45, respectively. 44 of them related to cell component, 30 related to catalytic activity, 28 related to binding. It is suggested that several pathways were induced when the seedling cotton was treated with protein elicitor, including resistance, cell signaling, transcription, energy metabolism, et al.

**Key words:** protein elicitor from *Alternaria tenuissima*; cotton; suppression subtractive hybridization (SSH); EST

激发子(elicitor)是指能诱导植物产生任何防卫反应的因子,是病原菌—植物相互识别的重要信号分子<sup>[1]</sup>。由于激发子是一类对病原菌无直接毒杀作用而可诱导植物产生多重防御反应的化合物,能模拟病原菌和植物的相互作用,诱导植物产生防卫反应,开展病原菌激发子与植物相互作用关系及其机理的研究具有重要意义<sup>[2-3]</sup>。自 E-den 公司利用 *Ewinia amylovora* 中提取的 Harpin 蛋白激发子成功开发出 *Messenger*<sup>[4]</sup>,用于多种病虫害的防治以来,激发子已成为抗病性研究的热点问题。国内外已有多人从多种病原菌中分离纯化出蛋白激发子如从 *Phytophthora spp.* 和 *Pythium spp.* 中提取的 *Elicitin*<sup>[5]</sup>,从 *P. boehmeriae* 中提取的 PB90<sup>[6]</sup>等。国内报告从稻瘟病菌细胞壁及培养滤液中获得的抽提物处理水稻,对水稻苯丙烷类途径酶类和绿原酸具有诱导作用<sup>[7]</sup>。相对而言,从链格孢菌获得的纯化激发子与植物相互作用方面的研究很少。笔者所在研究室首次从多种病原真菌中分离出具有诱导植物抗病性、增强抗逆能力、促进植物生长的另一类蛋白激发子,并申请了中国发明专利(ZL011286660)。目前此类新型蛋白激发子的研究工作处于发展阶段。大量研究表明,激活蛋白激发子能诱导多种植物的抗病性,促进植物生长,提高产品品质<sup>[8-11]</sup>。

抑制性消减杂交(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)技术是一种高效的差异基因克隆技术,它不仅克服了差异显示(Differential Display, DD)技术假阳性率高和表达性差异显示分析(Representational Difference Analysis, RDA)技术消减杂交轮次较多的缺点,而且对高、低丰度的差异表达基因都可有效分离<sup>[15]</sup>,在第一轮杂交即可使稀有基因富集 1000 倍<sup>[12]</sup>,具有假

阳性率低、敏感性高、差异基因分离速度快等特点<sup>[13]</sup>。本研究旨在通过抑制消减杂交技术,获得细极链格孢菌蛋白激发子诱导棉花苗期相关基因,构建 cDNA SSH 文库。通过基因功能分类分析,初步了解细极链格孢菌蛋白激发子诱导后与植物互作中涉及基因的功能、种类、数量,推断早期互作的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试品种为转基因抗虫杂交棉湘杂棉 3 号,属陆地棉品种;细极链格孢蛋白激发子蛋白粗提液的浓度为  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,保存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中,使用前配成  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.2 样品的处理

用  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的蛋白激发子粗提液浸泡的棉花种子为处理组,用清水浸泡的棉花种子为对照组,处理 6 h;催芽 2 d 后,播种于营养钵中,每钵 2 株,以灭菌的草炭蛭石混合土为培养介质(草炭:蛭石=2:1),温度控制在  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ,相对湿度控制在 70%~75%之间,至棉花生长到子叶平展,再用  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  蛋白激发子粗提蛋白液对处理组喷雾一次,同时用清水给对照组喷雾一次,7 d 后,分别采集叶片,迅速置于液氮中,然后  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.3 RNA 的分离及提取

总 RNA 按照提取试剂盒(Invitrogen<sup>TM</sup>)方法并做一定改进后提取。mRNA 采用 Oligotex mRNA Mini Kit 试剂盒(QIAGEN 公司)方法分离纯化。检测 mRNA 样品的浓度、纯度与完整性,将 mRNA 的终浓度调至约  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.4 SSH cDNA 文库构建及筛选

抑制消减杂交具体操作依照 Clontech 公司

的 PCR Select™ cDNA Subtraction Kit 进行。本实验采用一组抑制差减杂交,以蛋白激发子粗提蛋白液处理的棉花叶片 cDNA 为 tester,未经处理的对照棉花叶片 cDNA 为 driver,进行正向杂交。通过 cDNA 双链合成,Rsa I 酶消化,试验方 (tester) cDNA 片段两端特殊接头连接,通过两次杂交和两次选择性 PCR 扩增,富集差异表达基因片段。SSH 产物按 OMEGA Cycle-Pure Kit 的 PCR 产物纯化试剂盒的方法纯化,与 pMD18-T 载体连接,采用热激法,转化于 Top10 感受态细胞中 (*E. coli*),在氨苄青霉素平板上经 37℃ 过夜培养,进行阳性克隆筛选。

阳性克隆筛选:通过蓝白斑筛选,挑取白斑菌落进行振荡过夜培养,按照碱裂解法分离纯化质粒。采用巢式引物 1 (5'-TCGAGCGGCCGC-CCGGCAGGT-3') 和巢式引物 2R (5'-AGCGTGGTCGCGCCGAGGT-3') 进行 PCR,1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,重组克隆加入 50% 灭菌甘油,-80℃ 保存。

序列分析:随机挑取 150 个阳性克隆提取质粒,筛选质粒提取效果好且大于 200 bp 的片段进行测序。以 T7 为测序引物,在 ABI3730 测序仪上完成测序。产生的序列去除载体和接头序列后,用 BLASTn 和 BLASTx 软件与 Gene Bank

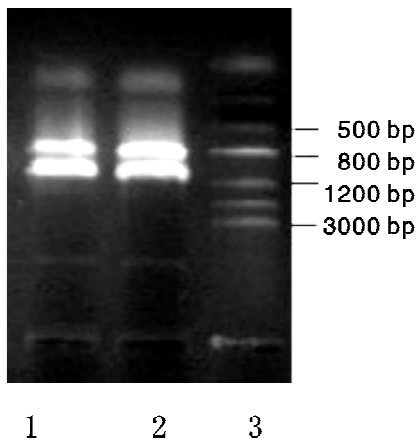
中的序列进行同源比对分析。采用 Gene ontology 方法,并参照植物基因功能分类方法对所获得消减 EST 进行功能分类。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉花总 RNA 的抽提和 SSH 文库的构建

在 RNA 抽提中,采用了改良的 Trizol 方法提取,即在多糖、多酚含量较高时利用巯基乙醇、LiCl 进一步纯化。取 2 μL 总 RNA 在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行检测,电泳结果见图 1。在 18S 与 28S 区域有明显的条带,完整性良好;用紫外分光光度计检测 tester 和 driver 棉花叶片总 RNA,二者的 OD<sub>260</sub> 与 OD<sub>280</sub> 比值都在 1.9~2.0,纯度较高,可进一步用于纯化 mRNA。

利用 Oligotex mRNA Mini Kit 从总 RNA 中提纯 mRNA 后,分别用乙醇沉淀浓缩,用紫外分光光度计检测 tester 和 driver 幼苗 mRNA,二者的 OD<sub>260</sub> 与 OD<sub>280</sub> 比值在 1.9~2.0,说明其纯度很好,可用于建库。用紫外分光光度计测 OD<sub>260</sub>, OD<sub>280</sub>,根据公式 [RNA] = OD<sub>260</sub> × 40 × 稀释倍数 / 1000 (g · L<sup>-1</sup>) 计算样品浓度,调整浓度到 0.5 g · L<sup>-1</sup>,用于 SSH 文库的构建。

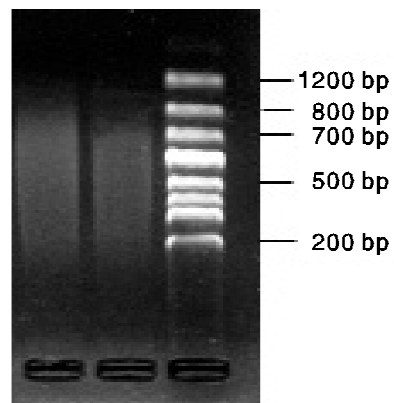


1: testerRNA;2: driverRNA;3: marker

图 1 总 RNA

Fig. 1 Total RNA

分离 mRNA 后,按照 PCR-Select™ cDNA Subtractive Kit 试剂盒说明书合成双链 cDNA,经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,cDNA 呈现为一条 500 bp 左右的 smear 状,以喷清水的 cDNA 为驱动方,以诱导材料的混合 cDNA 为实验方完成减法杂交。取第二次 PCR 扩增后的 cDNA 4 μL (图 2),将其连



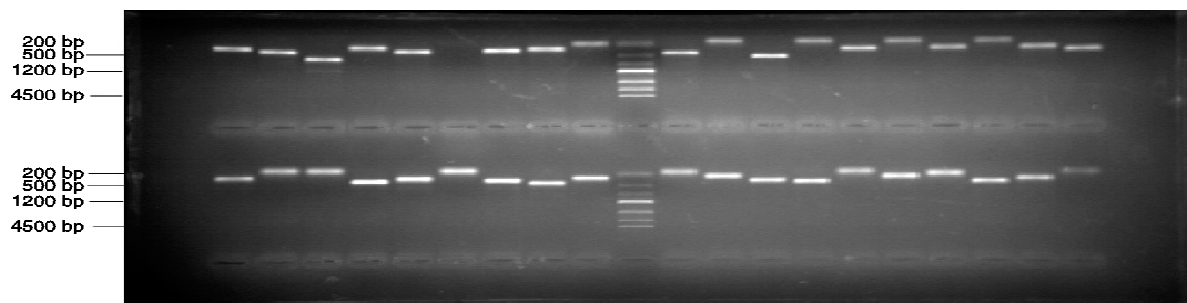
1,2:正向差减第1,2轮 PCR 扩增产物;3:marker

图 2 PCR 正向差减结果检测

Fig. 2 Analysis of subtracted products after primary and secondary PCR

接到 T/A 克隆载体上并转入大肠杆菌中形成 cDNA 文库,文库总共含有克隆 2080 个,经统计,阳性克隆比例为 85.3%,表明文库滴度较高,转化效率较好。随机挑选 150 个阳性克隆进行菌液 PCR 检测 (图 3),选用引物是 Nested PCR primer1 和 Nested PCR primer2R,均能扩增出有效产物,长度范围

在 200 bp~1 kb,多数在 500 bp 左右,与 SSH 文库 预计插入片段大小一致。



M

随机挑取克隆;M:marker

图 3 PCR 正向差减中阳性克隆 PCR 随机检测

Fig. 3 PCR analysis of some randomly picked clones from the subtracted library

### 2.2 阳性克隆的筛选及生物信息学分析

2.2.1 阳性克隆的筛选。随机挑取 150 个阳性克隆提取质粒,筛选质粒提取效果好且大于 200 bp 的片段进行测序(图 4)。测出 EST 148 个,空

载体 44 个,去除载体和不明确序列及冗余 DNA 的 cDNA 后,共获得质量较好的 EST 序列 104 条。测序结果显示 EST 片段中最短的为 208 bp,最长的 986 bp,平均长度为 422 bp。



M

随机挑取克隆;M:marker

图 4 1%琼脂糖正向差减阳性克隆的提取质粒随机检测

Fig. 4 1% agarose analysis of some randomly picked clones from the subtracted library

2.2.2 EST 分析。将序列与 GenBank dbEST 库进行比对,发现绝大多数序列在数据库中都有同源的棉属来源的 EST,证明了所得到的 EST 序列来源于棉花的真实性(部分结果列于表 1)。

应用 BLAST 软件在 GenBank 中对 104 个单一序列进行核酸和蛋白质同源性的比较和功能分析。78 个 EST 与其它物种已知基因部分区域的同源性为 48.54%~100%,占总 EST 的 75%;6 条 EST 序列能在数据库中检索到同源性序列,但其功能尚不清楚,占 5.77%;10 个 EST 能在数据库中发现为推测蛋白,占 9.6%;10 个 EST 在 GenBank 中没有查到对应的同源序列,可能是新基因或者由于序列位于变异丰富的 3'末端而无法查到与其它物种基因的同源性,占 9.6%。

将所得到的 104 条 EST 序列在 WEGO 网站上进行功能分类,通过 Gene ontology 确定具体 EST 的分子功能(图 5)。在生物途径中,与生理途径(physiological process)和细胞过程(cellular

process)相关的 EST 最多,分别为 48 个、45 个;其次是刺激反应(Response to stimulus)和发育(development)相关的 EST 分别为 12 个、9 个,涉及到生物途径调控(regulation of biological process)的只有 2 个。在细胞组分功能分类中,与细胞(Cell)相关的 EST 最多,达到 44 个,其次是蛋白组分(Protein complex)有 8 个,而包膜(Envelope)仅为 1 个;在分子功能分类中,催化功能(catalytic activity)与分子绑定(binding)相关的 EST 数量最多,分别达到了 30 个和 28 个。因此,通过细极链格孢菌蛋白激发子诱导棉苗相关基因的功能分类可以看出,在蛋白激发子诱导后细胞组份及生物代谢发生了明显的变化,许多具有绑定功能和催化功能的分子大量地表达,使细胞进程、生理代谢和刺激反应加强,细胞的组份、细胞器及细胞膜等相关基因大量地表达,而这些基因的表达与生长发育及抗性紧密相关。

表 1 部分测序克隆的 BLAST 结果  
Table 1 Features of some sequenced clones and results of BLAST search

基因编号	基因登记号	同源基因编码的片段	同源基因物种	得分	E 值	同源性
s-3	gi 33327286	多聚蛋白(E2)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	130.18	2.36E-29	100
s-9	gi 92884460	类泛素蛋白	<i>Medicago truncatula</i>	135.96	4.40E-31	84.44
s-46	gi 18397160	信号肽酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	127.1	2.14E-28	92.86
s-71	gi 556902	54-kD 信号识别颗粒特异蛋白 54-kD	<i>Lycopersicon esculentum</i>	238.04	8.11E-62	86.11
s-99	gi 16611997	过氧化物酶体定位信号 2 受体蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	441.43	1.20E-122	100
s-430	gi 73761697	CDPK 相关的蛋白激酶	<i>Gossypium hirsutum</i>	287.35	1.29E-76	100
s-143	gi 60460516	类似钙调磷酸酶 B 类蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	208.76	8.50E-53	100
s-17	gi 87162920	Peptidase S24, S26A and S26B	<i>Medicago truncatula</i>	158.3	8.24E-38	93.18
s-241	gi 32364696	ABC 转运蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	275.4	7.51E-73	87.82
s-263	gi 1843527	膜联蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	267.31	1.35E-70	99.26
s-162	gi 11994113	CND41, 类似叶绿体拟核 DNA 结合蛋白	<i>Arabidopsis thaliana</i>	166.39	3.64E-40	67.07
s-321	gi 74229679	叶绿体 Cu/ZnSOD	<i>Gossypium hirsutum</i>	201.06	1.09E-50	98
s-193	gi 121530	乙醇酸氧化酶	<i>Hyacinthus orientalis</i>	134.42	1.28E-30	98.57
s-309	gi 929813	质体蓝素 a	<i>Populus nigra</i>	196.05	5.54E-49	78.83
s-317	gi 2500115	谷胱甘肽还原酶, 叶绿体-谷胱甘肽还原酶前体	<i>Spinacia oleracea</i>	179.49	3.39E-44	87.62
s-121	gi 23193178	单功能赖氨酸-酮戊二酸盐还原酶	<i>Gossypium hirsutum</i>	488.8	7.44E-137	100
s-152	gi 74273629	赤霉素 20-氧化酶	<i>Gossypium hirsutum</i>	237.65	1.08E-61	98.33
S-172	gi 15221998	ATP 结合蛋白/ATP 依赖性解旋酶/解旋酶/核酸结合蛋白	<i>Arabidopsis thaliana</i>	283.11	3.89E-75	90.53
s-242	gi 3892051	推测为 24 kD 的 NADH 脱氢酶亚基	<i>Arabidopsis thaliana</i>	277.33	2.37E-73	92.76
s-203	gi 30421433	类黄酮 3', 5' 羟基化酶	<i>Gossypium hirsutum</i>	274.63	7.86E-73	98.53
s-305	gi 4240385	$\omega$ -3-脂肪酸脱氢酶前体	<i>Vernicia fordii</i>	105.53	6.29E-22	68.13
s-113	gi 56123232	$\beta$ -内酰胺酶	<i>Escherichia coli</i>	108.61	7.47E-23	100
s-279	gi 3559814	转酮醇酶	<i>Capiscum annum</i>	171.01	3.00E-41	80.92
s-296	gi 85719356	2-氧化硫辛酰胺脱氢酶结合位点	<i>Medicago truncatula</i>	82.42	5.72E-15	89.13
s-217	gi 50429331	UDP-D-葡萄糖 4-异构酶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	270.4	1.97E-71	93.42
s-239	gi 71727712	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	<i>Gossypium hirsutum</i>	355.91	3.36E-97	100
s-337	gi 56384257	ERE1 转录因子	<i>Gossypium hirsutum</i>	256.91	2.38E-67	100
s-411	gi 13883318	IS1560 转录因子	<i>Mycobacterium tuberculosis CDC1551</i>	268.09	7.75E-71	84.38
s-134	gi 66814620	WD40 重复蛋白 WD40	<i>Dictyostelium discoideum AX4</i>	55.84	5.65E-07	71.15
s-409	gi 37730469	乙烯应答反应元件结合蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	310.84	9.76E-84	100
s-329	gi 34538351	类似渗透蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	228.79	4.99E-59	100
s-89	gi 2811278	类伸展素蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	304.68	9.44E-82	100
s-373	gi 105923053	NBS-LRR 抗性蛋白	<i>Populus trichocarpa</i>	62	8.03E-09	54
s-339	gi 94450151	多酚氧化酶	<i>Camellia ptilophylla</i>	115.93	4.92E-25	54.66
s-246	gi 11995023	金鱼草素合成酶	<i>Antirrhinum majus</i>	139.43	4.35E-32	67.65
s-351	gi 14626935	类似富含亮氨酸抗性蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	204.14	1.32E-51	80
s-356	gi 5139335	N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I	<i>Arabidopsis thaliana</i>	77.41	3.56E-13	97.06
s-359	gi 51599105	类似 NBS 抗性蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	162.16	5.71E-39	100
s-392	gi 32401255	几丁质酶 VII 前体	<i>Gossypium hirsutum</i>	210.69	1.37E-53	98.99
s-253	gi 38194890	脂皮质蛋白	<i>Gossypium hirsutum</i>	388.65	8.04E-107	100

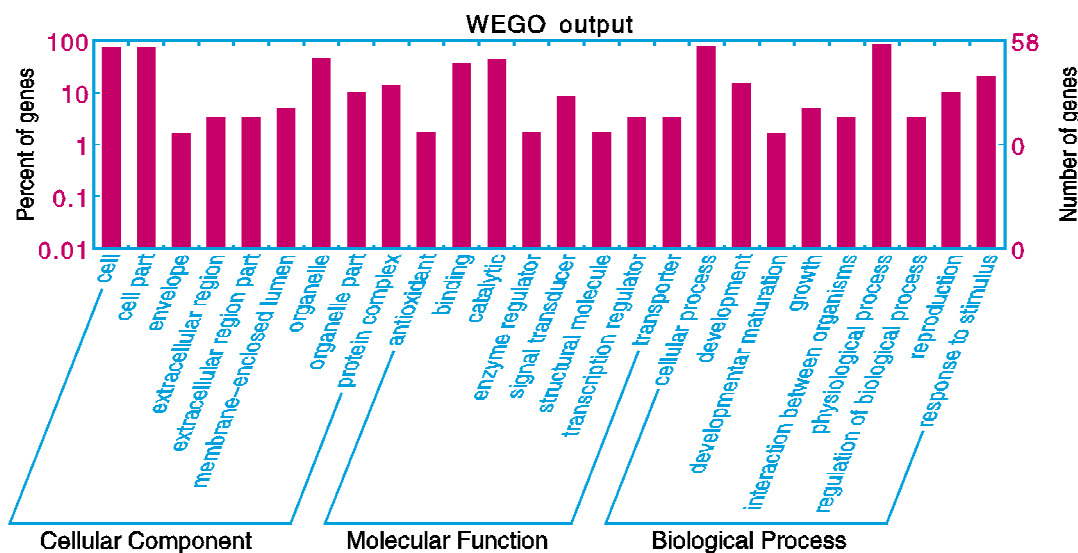


图 5 部分 SSH 筛选 EST 的功能分类分析

Fig. 5 The classification analysis of some EST function

为进一步了解功能已知 EST 所涉及的代谢反应,按照 Bevan 等<sup>[14]</sup>的植物基因功能分类标准,所获得的 EST 所编码的蛋白主要分为:蛋白质加工、修饰与储藏(4 个),信号传导相关蛋白(11 个),转录相关蛋白(10 个),抗病与防御相关蛋白(15 个),抗逆相关蛋白(8 个),转运相关蛋白(5 个),初级/次级代谢相关蛋白(12 个),能量代谢相关蛋白(9 个),功能未知及其它蛋白(30 个)。结合 WEGO 分析结果,可以推断细极链格孢菌蛋白激发子诱导棉苗时涉及到植物的生理生化的多条途径,受到多个基因的调控。而且这些基因编码的产物功能又可以大致分为两类。第一类是功能蛋白类,在细胞内可直接发挥保护功能,如光合作用相关酶类、脂质转移蛋白、蛋白酶类等。研究表明,在诱导时,植物体内可产生各种蛋白质维持机体的正常生长发育,如 chloroplast Cu/Zn-SOD、质体蓝素 a 蛋白、乙醇酸氧化酶等在维持正常的光合作用过程中发挥重要作用,说明了棉苗在诱导条件下为正常的生长发育提供了足够物质与能量;类伸展蛋白在细胞壁代谢中通过增加角质层厚度来减少水分散失;谷胱甘肽还原酶(GR)是植物体内一种黄素蛋白氧化还原酶,是植物细胞抗氧化酶系统中重要的一员,推测它在细极链格孢菌蛋白激发子诱导过程中有清除活性氧的作用;文库中膜联蛋白(Annexins)作为一个内在膜蛋白,和钙离子通道很相似。第二类是调控蛋白类,在诱导反应的信号转导或基因表达中起调节作用,间接起保护作用,如转录因子、蛋白激酶等。研究表明,EREB1、IS1560、乙烯应答反应元件结

合蛋白等转录因子起传递信号和调控基因表达的作用,CDPK 是植物体内主要的  $Ca^{2+}$  调节蛋白激酶,可能是对  $Ca^{2+}$  浓度升高、引发下游信号事件进行解码的潜在传感器,从而发出钙信号以传递所感受到的刺激信号,棉株 CaM 水平明显升高,这说明了  $Ca^{2+}$ -CaM 信号系统可能在细极链格孢菌蛋白激发子诱导过程中发挥了重要作用;乙烯应答元件结合因子在植物的生长、发育、抗病、抗胁迫以及次生代谢等方面起着非常重要的作用;文库中的防御蛋白包含了多酚氧化酶相关蛋白、金鱼草素合成酶相关蛋白、类似 NBS 抗性蛋白、NBS-LRR 抗性蛋白等多种抗性蛋白,推测在细极链格孢菌蛋白激发子诱导下棉花细胞中多种防御蛋白的产生充分说明了它对诱导的交叉适应性,即当蛋白激发子诱导时,棉花可能通过这些基因的表达量的变化,在增强抗病能力的同时其它抵抗能力也相应提高。因此,棉苗受到细极链格孢菌蛋白激发子诱导时,可能首先调控发挥信号传导作用的基因过量表达,通过其产物将信号不断传递放大,从而使棉株迅速感知外界并作出应答——初级代谢、次级代谢、能量代谢的全面升级,即棉株将各种代谢途径调节到一个新的水平。由此可见,细极链格孢菌蛋白激发子能够诱导棉花幼苗一系列的基因在转录水平上发生变化,这些基因的产物多数对诱导的细胞具有直接或间接的保护作用,有的是在诱导反应信号传导或基因表达中起调节作用。通过分析,初步建立了棉花幼苗细极链格孢菌蛋白激发子诱导表达基因的表达谱。

### 3 讨论

SSH法可以相对富集在处理前后表达上有差异的基因,因此在植物的抗病反应、逆境处理、不同的发育阶段的基因表达差异分析上有很好的理论应用前景。有关SSH文库构建的应用,在玉米和小麦等植物上已有报道<sup>[15-17]</sup>。本实验所构建的细极链格孢菌蛋白激发子诱导陆地棉相关的SSH文库在国内外还是首次报道。该研究对进一步研究蛋白激发子与植物的互作机理具有重要的指导意义。从SSH文库中筛选到了2080个重组克隆,对其中部分克隆进行了测序,获得了104个EST序列,其中78个EST与其它物种已知基因部分区域的同源率为48.54%~100%,占总EST的75%;10个EST在GenBank中没有查到对应的同源序列,可能是新基因或者由于序列位于变异丰富的3'末端而无法查到与其它物种基因的同源性,占9.6%。同时,在WEGO网站上进行功能分类结果表明,在生物途径中,与生理途径和细胞过程相关的EST最多,分别为48个、45个;在细胞组份功能分类中,与细胞(Cell)相关的EST最多,达到44个;在分子功能分类中,催化功能(catalytic activity)与分子绑定(binding)相关的EST数量最多,分别达到了30个、28个。

利用抑制差减杂交所获得的片段,须经过Northern杂交或反Northern杂交来进一步去除掉假阳性。但由于放射性实验室还在建设中,受条件限制本试验没有进行,测序获得的EST序列仍需进一步的鉴定以去除假阳性。

选用细极链格孢菌蛋白激发子粗提蛋白液处理棉花作为tester组,对照作为driver组,进行正向杂交,得到的结果是上调表达基因。这些差异基因是因为蛋白激发子直接引起其表达量增加,还是引发其中某些基因表达增加后再引发其它基因表达增加尚需进一步深入探讨,需要进一步利用转基因、基因敲除或RNAi等方法,来揭示这些变化规律。

#### 参考文献:

[1] 李云锋,王振中,贾显禄. 稻瘟病菌66 kDa糖蛋白激发子的纯化及性质研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 127-132.

[2] 范军,彭友良. 水稻悬浮细胞中稻瘟菌激发子诱导性受体类似激酶cDNA的克隆及特征分析[J]. 植物病理学报, 1999, 29(3): 235-241.

[3] ARASE S, Katsuka M, Itoi S. Some observations on hyphal growth and host responses in leaf sheath of rice cultivars inoculated with *Pyricularia fungi*[J].

Ann Phytopathol Soc Jpn, 1983, 49: 698-703.

[4] WEI Z M, Laby R J, Zumoff C H, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*[J]. Science, 1992, 257(5066): 85-88.

[5] RICCI P, Bonnet P, Huet J C. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco[J]. J Eur Biochem, 1989, 183: 555-563.

[6] WANG Y C, Hu D W, Zhang Z G. Purification and immunocytolocalization of a novel *Phytophthora boehmeriae* protein inducing the hypersensitive response and systemic acquired resistance in tobacco and Chinese cabbage[J]. Physiol & Mol Plant Pathol, 2003, 63: 223-232.

[7] BI Y M, Ouyang G C. Induction effects of elicitor from *Pyricularia oryzae* on enzymes of phenylpropane pathway and chlorogenic acid[J]. Plant Physiol Commun, 1990, 29(3): 10-20.

[8] 邱德文. 微生物蛋白农药研究进展[J]. 中国生物防治, 2004, 20(2): 91-94.

[9] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质: 中国, CN1344727A[P]. 2002.

[10] 邱德文, 杨秀芬, 刘峥, 等. 植物交链孢菌蛋白激发子对白菜生长和品质的影响[J]. 中国生物防治, 2005, 21(增刊): 183-186.

[11] 邱德文, 杨秀芬, 刘峥, 等. 植物交链孢菌蛋白激发子对烟草抗病促生和品质的影响[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(6): 33-36.

[12] XU D Q, ZHANG Y B, XIONG Y Z. Construction of forward and reverse subtracted cDNA libraries between muscle tissue of meishan and landrace pigs[J]. Acta Genetica Sinica, 2003, 30(7): 668-672.

[13] DIATCHENKO L, Lau Y F, Campbell A P. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6025-6030.

[14] BEVAN M, Bancroft I, Bent E, et al. Analysis of 1.9 MB of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 1998, 391: 485-488.

[15] 王转, 臧庆伟, 郭志爱. 小麦幼苗期水分胁迫所诱导基因表达谱的初步分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(7): 842-849.

[16] 骆蒙, 孔秀英, 刘越. 小麦抗病基因表达谱中的文库构建与筛选方法研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(9): 814-819.

[17] 李华盛, 范术丽, 沈法富. 从棉花 ESTs 数据库中筛选微卫星标记的初步研究[J]. 棉花学报, 2005, 17(4): 211-216. ●