



## 黄萎病菌诱导下陆地棉抗病品种 SSH 文库的构建

王省芬, 田海燕, 马峙英\*, 张桂寅\*, 玄兆伶, 王文生, 孙艳香  
(河北农业大学, 河北省作物种质资源重点实验室, 河北保定 071001)

**摘要:**采用抑制差减杂交技术,构建了陆地棉抗病品种冀棉 20 经黄萎病菌诱导 8 h、12 h、24 h、48 h 后的混合 SSH 文库,文库共包含 800 个阳性克隆。对质粒的酶切和巢式 PCR 结果表明,插入片段大小平均为 400 bp。随机挑选 20 个阳性克隆进行测序,利用 BLASTn 和 BLASTx 进行序列相似性分析,发现 20 条 EST 都可以找到功能已知的同源序列,其中在 BLASTn 比较结果中,功能已知的有 12 条,占全部 EST 的 60%;BLASTx 的比较结果中有 14 条功能已知,占全部 EST 的 70%。这些同源序列涉及到 10 种与抗病防御相关的基因,包括丝氨酸/苏氨酸激酶、谷胱甘肽-S-转移酶、乙醇脱氢酶、细胞色素 P450、ACC 氧化酶等。将这些序列与 GenBank dbEST 库进行比对,发现 75% 的 EST 都可以找到同源性较高的序列,它们都来自于植物在生物与非生物胁迫条件下特异表达的 cDNA 文库,这些胁迫包括病原菌诱导、低温处理、紫外线照射、热激处理、盐处理、氧胁迫、水杨酸诱导等。

**关键词:**棉花;黄萎病;SSH 文库;抗病基因

**中图分类号:**S562.032 **文献标识码:**A

**文章编号:**1002-7807(2008)01-0003-06

## SSH Library Construction of Upland Cotton Resistant Cultivar under the Stress of *Verticillium dahliae*

WANG Xing-fen, TIAN Hai-yan, MA Zhi-ying\*, ZHANG Gui-yin\*, XUAN Zhao-ling, WANG Wen-sheng, SUN Yan-xiang

(Agricultural University of Hebei, Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** cDNA library of the Upland cotton resistant cultivar, Jimian 20, was constructed using suppression subtractive hybridization (SSH) and pGEM-T Easy vector under the stress of *Verticillium dahliae* at 8h, 12h, 24h and 48h post inoculation. This SSH library included eight hundred positive clones. The insert sizes ranged from 0.2kb to 1kb, averaged 400bp, based on restriction endoenzyme digestion and nested PCR. Twenty random clones were selected and sequenced. ESTs similarity analysis via BLASTn and BLASTx showed that all of the twenty ESTs were homologous to the sequences with known functions. Twelve were as known sequences in the BLASTn, accounted for 60% of the total ESTs tested. Fourteen, i. e., 70% of the total, were as known sequences in the BLASTx. According to the classification criteria of plant gene function, these homologous sequences were related to ten kinds of disease resistance genes as those reported, including serine/threonine kinase, glutathione S-transferase, alcohol dehydrogenase, cytochrome P450, ACC oxidase, etc. Querying the GenBank dbEST, as much as 75% of these ESTs were of high homology with the cDNAs that were found

收稿日期: 2006-11-01 作者简介:王省芬(1970-),女,博士,教授;\*通讯作者,cotton@hebau.edu.cn

基金项目:国家重大基础研究前期研究专项(2004CCA01100)、国家自然科学基金(30471105)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20040086002)和河北省自然科学基金(C2004000365)

under the abiotic or biotic stresses in plants. These stress involved pathogen, low temperature, ultra-violet, heat shocking, salt stress, oxygen stress, and salicylic acid etc.

**Key words:** cotton; *Verticillium* wilt; SSH library; disease resistance gene

近些年来我国棉花生产一直受到黄萎病的影响,如何防治棉花黄萎病成为棉花生产中亟待解决的问题。利用抗病品种是一种经济、有效、环保的措施,明确抗病机制和寻找高抗黄萎病的基因对于培育抗病品种具有重要意义<sup>[1]</sup>。随着生物技术、基因组学和生物信息学的发展,目前已出现一系列基因克隆的方法,包括基于 DNA 水平上的抗病基因克隆技术和基于 mRNA 水平上的差异表达克隆技术<sup>[2]</sup>。

SSH (Suppression Subtractive Hybridization) 即抑制差减杂交是 1996 年以 mRNA 差别显示技术为基础建立起来的筛选未知差异表达基因的新技术<sup>[3]</sup>。该技术因其具有假阳性率低的突出优点已被广泛应用于差异表达基因的克隆,目前已涉及到小麦、玉米、棉花、水稻、大麦、马铃薯、拟南芥等近 20 种植物<sup>[4-6]</sup>。王转等利用 SSH 和高密度点阵膜技术研究小麦二叶幼苗期水分胁迫诱导表达基因,初步建立了小麦幼苗期水分胁迫诱导的基因表达谱<sup>[7]</sup>。朱龙付等以海岛棉品种为材料,构建了黄萎病菌侵染后 2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 的抑制差减文库,研究了海岛棉对黄萎病的抗性分子机制<sup>[8]</sup>。关于陆地棉在黄萎病菌胁迫下 SSH 文库构建的报道甚少。

本研究采用抑制差减杂交技术,构建了陆地棉抗黄萎病品种经黄萎病菌诱导后的 SSH 文库,并对文库进行分析,旨在为陆地棉抗黄萎病机制研究和抗黄萎病相关基因克隆提供基础资源和依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

供试棉花品种为陆地棉抗病品种冀棉 20,接种黄萎病菌为从 Pima90-53 中分离得到的强致病力菌系,均由河北农业大学棉花遗传育种研究室提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 棉苗培育与病菌接种。**选择发芽整齐一致的种子播种于装有蛭石的营养钵中,在培养室内培养,定期浇 Hoagland 营养液和水。待棉苗生长至 2 叶 1 心时,处理组于每钵底部接种黄萎病菌孢子悬浮液 15 mL,孢子浓度为  $10^7$  个·

$\text{mL}^{-1}$ ,对照组浇相同量的水。接种后保持温度  $25\sim 26^\circ\text{C}$ 、湿度 80% 左右以利于发病<sup>[9]</sup>。在接种后 8 h、12 h、24 h 和 48 h 分别提取根部各时段处理组及对照组总 RNA。

**1.2.2 总 RNA 提取及 mRNA 分离。**总 RNA 的提取采用 CTAB-LiCl 沉淀法<sup>[10]</sup>。mRNA 的分离依照 Promega 公司 PolyA Tract mRNA Isolation Systems 方法进行。

**1.2.3 SSH 文库构建。**以未接种黄萎病菌的 cDNA 为驱动方 (driver),病菌诱导后的 cDNA 为试验方 (tester),按照 Clontech 公司的差减试剂盒 BD PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 的说明书完成抑制差减杂交。将 SSH 得到的 cDNA 与 pGEM-T Easy Vector (天为时代) 连接,取  $3\ \mu\text{L}$  连接产物用热激法转化到大肠杆菌感受态 Top10 中,180 rpm 振荡培养 45 min。转化的菌液涂于含有 IPTG、X-gal 和 Amp 的 LB 固体培养基中, $37^\circ\text{C}$  培养 16~24 h。挑选生长良好的白色单克隆接种于含有防冻培养基的 384 孔板中, $37^\circ\text{C}$  培养 12~16 h,保存在  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中。

**1.2.4 插入片段大小检测。**随机挑取阳性克隆于  $3\sim 5\ \text{mL}$  LB 液体培养基中,180 rpm 振荡培养过夜,采用碱裂解法提取质粒,用 EcoR I 进行酶切。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小。

**1.2.5 EST 片段测序和序列同源性分析。**将阳性克隆的 cDNA 插入片段送往上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序,测序结果用 DNASTar 软件去除载体后,与 GenBank 的蛋白质数据库和核酸数据库进行 BLASTx 和 BLASTn 比对。判定标准参照水稻<sup>[11]</sup>、拟南芥<sup>[12]</sup> 的 EST 研究,以 BLASTx 结果一致性大于 40%、分值大于 80, BLASTn 结果一致性大于 50%、分值大于 80 为依据进行筛选和功能注释。通过 BLASTx 和 BLASTn 对比后再把这些 EST 与 GenBank 的 EST 库进行 BLASTn 比较,了解该 EST 与哪些片段同源及这些片段的来源等信息。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA、mRNA 及 cDNA 质量分析

提取高质量的 RNA 是获得高效差减文库的

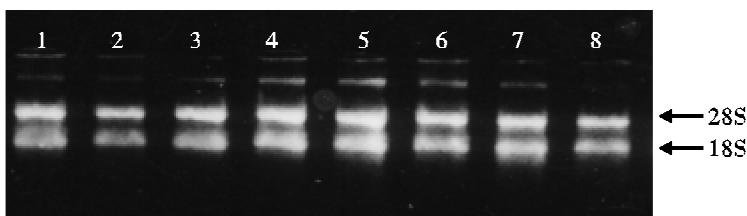
前提。用紫外分光光度计分别检测诱导后 8 h、12 h、24 h 和 48 h 所提取的处理组和对照组总 RNA, 提取的各时段总 RNA 纯度较高、浓度较大(表 1)。

用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA, 电泳结果显示 18S 和 28S 条带清楚, 说明提取的总 RNA 完整性较好(图 1), 可进一步用于分离 mRNA。

表 1 处理和对照材料总 RNA 紫外分光光度计测定结果

Table 1 RNA quality and quantity of different treatments and checks determined by UV spectrophotometer

处理	A260/A280	浓度/( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )
诱导后 8h	2.1222	2.088
8h CK	2.0983	1.837
诱导后 12h	2.1025	2.767
12h CK	2.1531	1.872
诱导后 24h	2.1349	2.301
24h CK	2.1751	1.909
诱导后 48h	2.0426	3.142
48h CK	2.1290	2.839



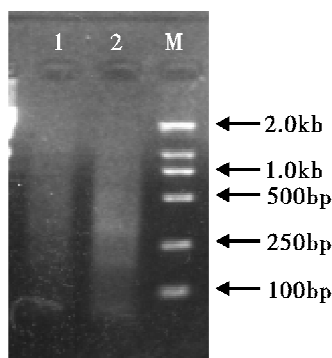
注:泳道 1~8 分别为诱导后 8 h、8 h CK、12 h、12 h CK、24 h、24 h CK、48 h 和 48 h CK 的总 RNA

图 1 不同接种时间样品及其对照总 RNA 检测

Fig. 1 Total RNA from different inoculation times and their controls

分别用紫外分光光度计检测分离的处理组和对照组 mRNA, 二者的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  值分别为 2.13 和 2.12, 说明 mRNA 纯度较好。分离的 mRNA 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, mRNA 呈均匀的弥散带, rRNA 污染很少, 片段大小约在

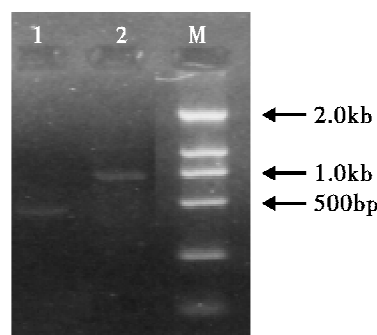
0.5~3 kb 之间。证明 mRNA 质量较好, 可以用于 SSH 文库构建。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测合成的双链 cDNA, 片段大小主要集中在 250 bp ~2 kb 之间(图 2), 符合下一步的试验要求。



泳道 1: 接种材料 cDNA; 泳道 2: 对照材料 cDNA; M: DNA marker DL2000

图 2 接种和未接种对照双链 cDNA 电泳检测

Fig. 2 Ds cDNA from inoculation and non-inoculation examined on agarose gel



泳道 1: 用两个特异引物扩增; 泳道 2: 用一个特异引物和一个通用引物扩增; M: DNA marker DL2000

图 3 接头连接效率的检测

Fig. 3 The ligation efficiency analysis

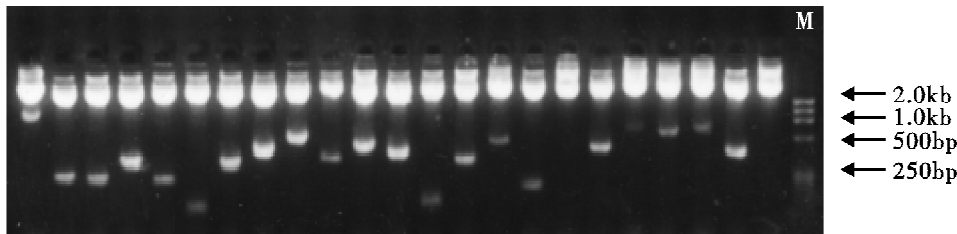
## 2.2 接头连接效率的检测

接头的连接效率直接关系到抑制差减杂交的成败,因此接头连接效率的检测是必不可少的,根据试剂盒要求,只有连接效率达到25%以上才能进行下一步试验。在本试验中,用根据棉花持家基因 actin 设计的特异引物和试剂盒提供的5'通用引物 primer1 扩增连接产物。其中 primer1 是根据两端接头的共同序列设计的,因此用两个特异引物与用一个特异引物和一个通用引物对连接产物的扩增产物量理论上应该是相同的,即接头连接效率达到100%。电泳检测结果表明,用两

个特异引物与用一个特异引物和一个通用引物扩增的产物量基本相同(图3),可见接头连接效率明显大于25%,可以进行下一步试验。

## 2.3 插入片段大小的检测

第二次 PCR 扩增的产物经过纯化后,以 T/A 克隆法构建质粒载体文库。共挑取 800 个阳性克隆,保存于-80℃冰箱中。随机挑取阳性克隆提取质粒,EcoR I 酶切后检测插入片段大小。电泳结果表明插入片段大小分布在 0.2 kb~1 kb 之间,平均插入片段大小为 400 bp(图4)。



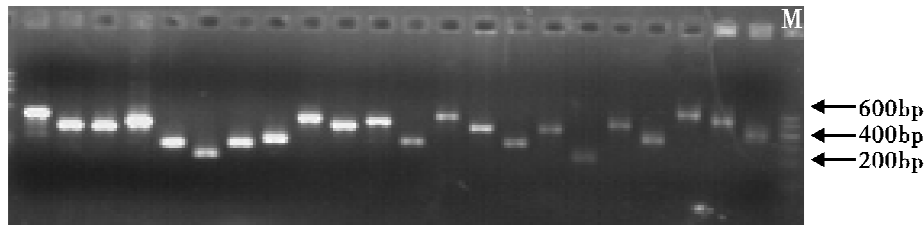
M: DNA marker DL2000

图4 酶切检测插入片段

Fig. 4 Insert size checked by *EcoR* I digestion

用接头两端的巢式引物对阳性克隆直接进行 PCR 扩增,结果随机挑选的克隆均能扩增出有效产物。插入片段最小为 200 bp,最大为 600 bp,

平均插入片段大小为 400 bp(图5)。平均插入片段大小与酶切检测结果相符。



M: DNA marker I

图5 PCR 扩增检测插入片段

Fig. 5 Insert size checked by PCR amplification

## 2.4 黄萎病菌诱导下差异表达 cDNA 片段序列分析

将所测的 20 条 EST 在 GenBank 上用 BLASTn 和 BLASTx 软件对其进行序列同源性比较,结果表明 20 条 EST 都可以找到功能已知的同源序列。其中在 BLASTn 比较结果中,功能已知的有 12 条,占全部 EST 的 60%;BLASTx 的比较结果中有 14 条功能已知,占全部 EST 的 70%。为了进一步了解功能已知 EST 有哪些涉及到抗病与防御相关基因,按照 Bevan 等的植物

基因功能分类标准<sup>[13]</sup>,将 EST 的 BLASTn 和 BLASTx 比较结果分类,所测的 20 条 EST 的同源序列共涉及到抗病与防御相关基因 10 种(表2),包括丝氨酸/苏氨酸激酶、谷胱甘肽-S-转移酶、乙醇脱氢酶、细胞色素 P450、ACC 氧化酶等,另外还涉及到初级代谢基因 1 种、蛋白质合成基因 1 种、功能未确定基因 1 种。

将所测的 20 条 EST 与 GenBank 的 dbEST 库中序列比较,发现其中有 75% 可以找到同源序列,而且这些序列都来源于生物与非生物胁迫的

cDNA 文库。这些胁迫包括病原菌诱导、低温处理、紫外线照射、热激处理、盐处理、氧胁迫、水杨酸诱导等,而且部分 EST 同时和多种胁迫条件下的 EST 有同源性。

表 2 抗病相关基因

Table 2 The genes related with disease resistance

样品序列号	同源的抗病相关基因	抗病反应中的作用
1	bZIP transcription factor(亮氨酸拉链转录因子)	病原菌感染过程中被优先诱导,对植物防御反应相关基因表达有特殊作用
A21, B9	Serine/threonine kinase(丝氨酸/苏氨酸激酶)	R 基因介导的信号传导途径
4	Glutathione S-transferase(谷胱甘肽-S 转移酶)	SAR 诱导防卫蛋白
13	Alcohol dehydrogenase(乙醇脱氢酶)	HR 体系表达基因
3, D12	Cytochrome P450(细胞色素 P450)	SAR 诱导防卫蛋白
7	Caffeic acid O-methyltransferase(咖啡酸 O-甲基转移酶)	异黄酮类植物保卫素合成途径
8	Peroxidase(过氧化物酶)	HR 体系表达基因
10	Disease resistance-responsive family protein (抗病反应相关基因家族蛋白)	抗病反应蛋白
16	ACC oxidase(ACC 氧化酶)	细胞保护机制
14	Wound-inducible P450 hydroxylase(创伤诱导的 P450 羟化酶)	SAR 诱导防卫蛋白

### 3 讨论

差减文库构建采用基因表达丰度均一化与抑制 PCR 技术,使得低丰度的目标基因也可被获得,有效富集了目的基因,而使非目的基因的扩增得到抑制,用该方法构建的文库目标基因占有较大的比例,假阳性率大大降低。骆蒙等证明 SSH cDNA 文库在富集差异表达基因等方面较普通 cDNA 文库具有明显的优越性<sup>[14]</sup>。本研究对随机挑选的 20 个阳性克隆进行测序,得到的 EST 的同源序列涉及到 10 种已经报道过的参与植物抗病与防御反应的基因,说明所构建的文库对于富集差异表达相关基因的优势是比较明显的。

所获得的 EST 中,已知功能的同源基因涉及到多种抗病防御反应的代谢物质及信号传导途径,如 B9 号序列和 A21 号序列与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶同源。目前在植物中发现的受体蛋白激酶主要是丝氨酸/苏氨酸激酶,该激酶是一大类特异地催化蛋白质丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化的激酶家族,参与多种信号传导过程,是一种胞内蛋白质,具有抗病信号传导功能<sup>[15-16]</sup>。18 号序列和大豆在水杨酸(SA)诱导下的一条 EST 有较高同源性。近年来,有大量的证据表明,SA 在激活某些双子叶植物的防御反应中起重要作用<sup>[17-18]</sup>。10

号序列与花生抗病反应相关基因家族在氨基酸水平上具有相同的保守结构域,它们都含有一个 dirigent 的植物抗病反应结构域。这些基因在维管束特异表达,受病原菌诱导后表达量迅速增强,生物信息学预测该基因编码的产物可能是定位于细胞膜上的一个信号传导因子,与病原菌诱导后维管束增强加厚有关。朱龙付等<sup>[18]</sup>从黄萎病菌诱导的海岛棉抗病反应的 SSH 文库中分离得到与拟南芥抗病反应相关基因家族,说明含有 dirigent 植物抗病反应结构域的抗病反应基因家族在棉花黄萎病抗性反应中发挥了重要的作用。

通过对本试验中的基因表达分析可以看出,一些信号传导类、转录因子类、次生代谢类以及细胞结构类基因在多种植物材料和多种胁迫诱导中均有表达,说明植物对于外界环境胁迫的基础防御机制的一致性。实践和生理研究也表明,作物具有整体抗逆性,在各种抗逆性中有共同的生理机制<sup>[19-20]</sup>。目前,本实验室正在对其它克隆进行测序,以发掘更多的与抗病反应相关的 EST,对有价值的基因片段获得全长,进一步验证其功能。

#### 参考文献:

[1]张桂寅. 棉花黄萎病抗性表现及其基因表达的研究

- [D]. 河北农业大学, 2005.
- [2] 韦淑亚. 甘蓝型油菜菌核病抗性相关基因 cDNA 文库构建及评价[D]. 华中农业大学, 2004.
- [3] DIATACHENKO L, Lau Y F C, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:6025-6030.
- [4] 李广存, 金黎平, 谢开云, 等. 抑制差减杂交及其在植物基因分离方面的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(9):26-32.
- [5] 王省芬, 马峙英, 张桂寅, 等. SSR 和 AFLP 技术鉴定棉花遗传资源的比较研究[J]. 棉花学报, 2006, 18(6):391-393.
- [6] 王省芬, 马骏, 马峙英, 等. 高纤维强力棉花种质系苏远 7235BAC 文库的构建[J]. 棉花学报, 2006, 18(4):200-203.
- [7] 王转, 臧庆伟, 郭志爱, 等. 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(8):842-849.
- [8] 朱龙付, 涂礼莉, 张献龙, 等. 黄萎病菌诱导的海岛棉抗病反应的 SSH 文库构建及分析[J]. 遗传学报, 2005, 32(5):528-532.
- [9] 王省芬, 马峙英. 一种新的棉花黄萎病抗性鉴定方法[J]. 棉花学报, 2002, 14(4):231-233.
- [10] 窦道龙, 王冰山, 唐益雄, 等. 棉花高质量总 RNA 提取的一种有效方法[J]. 作物学报, 2003, 29(3):478-479.
- [11] YAMMANOTO K, Sasaki T. Large-scale EST sequencing in rice [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35:135-144.
- [12] HOFTE H, Desprez, Amselen J, et al. An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 1993, 4(6):1051-1061.
- [13] BEAVN M, Bancroft I, Bent E, et al. Analysis of 1.9MB of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 1998, 391:485-488.
- [14] 骆蒙, 孔秀英, 刘越, 等. 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, 9(9):814-819.
- [15] SONG Wen-yuan, Wang Guo-lian, Chen Li-li, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21 [J]. Science, 1995, 270(5243):1804-1806.
- [16] 杨郁文, 倪万潮, 张保龙, 等. 陆地棉一个丝氨酸/苏氨酸激酶蛋白基因的克隆与表达分析[J]. 棉花学报, 2006, 18(3):140-144.
- [17] RASMUSSEN J B, Hammerschmidt R, Zook M N. Systemic induction of salicylic acid cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae pv. syringae* [J]. Plant Physiol, 1991, 97:1342-1347.
- [18] ANTONIW J F, White R F. The effects of asoirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco [J]. Phytopathol Z, 1980, 98:331-341.
- [19] 张正斌, 山仑. 作物抗逆性共同机理研究进展[J]. 作物杂志, 1997, (4):10-12.
- [20] 张正斌. 植物对环境胁迫的整体抗逆性若干问题探讨[J]. 西北农业学报, 2000, 9(3):112-116. ●