

## 亚洲棉石系亚 1 号耐旱相关基因 SSH 文库的构建及其分析

张玲,李付广\*,刘传亮,张朝军,武芝霞

(中国农业科学院棉花研究所/农业部棉花遗传改良重点实验室,河南 安阳 455000)

**摘要:** 通过抑制性消减杂交技术成功地构建了亚洲棉石系亚 1 号耐旱相关基因 cDNA 文库。通过蓝白斑筛选、菌落 PCR 及生物信息学等分子生物学手段分析和检验了库的质量,最终筛选出阳性克隆 392 个。通过 EST 测序得到 265 个单一序列,其中 41 个为重叠群,224 个为单拷贝。生物信息学分析结果表明,该文库含有大量与耐旱相关的基因,并且涉及植物生理中多种代谢途径。

**关键词:** 亚洲棉;干旱胁迫;抑制性消减杂交

中图分类号:S562.035.3 文献标识码:A

文章编号:1002-7807(2010)02-0110-05

### Isolation and Analysis of Drought-related Gene from Cotton (*Gossypium arboreum* L.) SSH Library

ZHANG Ling, LI Fu-guang\*, LIU Chuan-liang, ZHANG Chao-jun, WU Zhi-xia

(Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China)

**Abstract:** This study constructed high quality drought-related cDNA library of cotton (*Gossypium arboreum* L.) by SSH successfully; it was checked and analyzed by Blue-white bolting, colony PCR, and bioinformatics. Finally, 392 positive clones were obtained. After cluster analysis of the ESTs sequences, 265 unigenes were obtained, including 41 contigs and 224 singlets. A large group of drought stress-induced genes were found in the cDNA library, which involved in many metabolism pathways.

**Key words:** *Gossypium arboreum* L; drought stress; SSH

干旱是限制棉花生长发育的重要环境因子之一。目前,耐旱棉花品种主要是通过常规育种方法获得,但该方法存在着周期长、工作量大、选择效率不高等问题。因此,从分子水平上阐明棉花耐旱性的物质基础及其生理功能,并通过基因工程手段培育耐旱棉花新品种(系),将是解决棉花耐旱问题的重要途径。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 供试材料

选用由中国农业科学院棉花研究所种质资源中期库提供的亚洲棉(*Gossypium arboreum* L.)石系亚 1 号为供试材料。

##### 1.2 试验方法

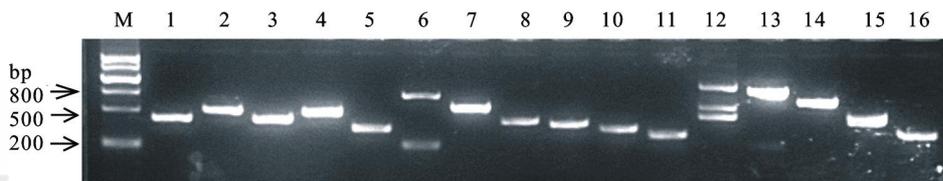
**1.2.1 材料处理。**选取 17% PEG 6000 处理的 3~6 叶期生长旺盛的整株棉花幼苗作为实验材料,同时用未处理的棉花做对照方,具体方法参照文献[1-2]。

**1.2.2 总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化。**采用改良的 CTAB 法提取分离棉花总 RNA,并利用 Oligotex™ mRNA Mini Kit 分离纯化 mRNA(QIAGEN)。

**1.2.3 抑制性消减杂交文库的构建。**抑制性消减杂交<sup>[3]</sup>参见 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) 试剂盒进行。其中正常水培棉花幼苗作为对照组材料 (Driver);17% 浓度的 PEG

6000 处理的棉花作为处理组材料(Tester)。经过 cDNA 双链合成、酶切消化、接头连接、两次差减杂交和两次选择性 PCR,使干旱处理诱导表达的 cDNA 得到富集并且均一化。然后将二次 PCR 的产物与 pMD18-T-easy Vector(TaKaRa)载体相连,并转化到大肠杆菌 DH5a 细胞中。挑取经蓝白斑筛选的白色单克隆,于含有 Amp 的 LB 培养基的 96 孔摇菌板中 37℃ 摇菌过夜,同时,菌液加入 30% 甘油于 -80℃ 保存备份。用 96 孔板中单克隆的菌液为模板,利用试剂盒中提供的巢式引物 1 和 2R 进行扩增。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测每孔 PCR 产物,将出现非特异扩增的克隆和无扩增产物的克隆予以去除,对构建的差减文库进行初步筛选。

**1.2.4 生物信息学分析。**经过筛选的 392 个克隆送到北京华大基因研究中心进行测序。将去除载体和引物序列的 unique EST 在 NCBI 网站上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 Blastn 和 Blastx 进行比对和聚类分析,同时利用 GO、KEGG、COG 等相关数据库对 unique EST 进行功能分类、代谢途径及基因产物的分析。



1~16:随机挑取的单克隆进行菌落 PCR。

图 2 菌落 PCR 检测外源片段插入

Fig.2 PCR analysis of partial clones from the subtracted library

### 2.3 cDNA 文库生物信息学分析

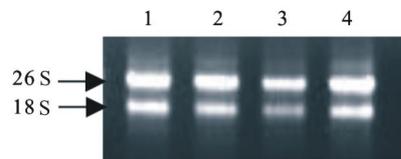
对正向文库中的 392 个阳性克隆进行测序分析,其中插入片段长度大于 100 bp 的高质量序列有 315 个。经聚类和拼接,去掉冗余序列,得到 unique EST 265 个,其中有 41 个重叠群(contigs),224 个单一序列(singlets),库的冗余度为 15.87%。

**2.3.1 COG 分析。**利用 Blast 软件在 Genbank 中对 265 个单一序列进行蛋白质直系同源簇(COG)分析发现,阈值小于( $E\text{-value} < 1e-05$ )有 61 个 ESTs。将这些 ESTs 进行功能分类,涉及氨基

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 检测

用紫外分光光度仪 DU 800 测定总 RNA 的含量,结果表明,OD260/280 的比值在 1.8~2.0 之间,说明总 RNA 纯度较高。同时,利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性(图 1),结果显示,26 S 和 18 S 条带亮度比值在 1.5~2.0 之间,说明总 RNA 的完整性较好。



1~4:总 RNA;

图 1 总 RNA 电泳检测

Fig.1 Analysis of total RNA

### 2.2 抑制性消减杂交文库的初步检测

蓝白斑检测显示文库的重组率为 95%。随机挑取正向文库中的阳性克隆进行菌落 PCR 检测(图 2)。结果显示,大部分插入片段分布在 200~800 bp 范围内,平均片段长度在 300 bp 左右,片段大小符合要求,表明差减文库构建成功。

酸、碳水化合物、核酸和脂肪等物质代谢过程,以及细胞防御自救、转录、信号转导、蛋白合成、发育和能量代谢等多种生理生化过程。说明干旱胁迫的分子应答是十分复杂的(图 3、表 1)。

**2.3.2 GO 功能分类。**将所得的 265 个 ESTs 进行 GO(Gene Ontology)功能分类,注释结果表明,(图 4)在细胞定位、分子功能、生物过程三大类中与细胞定位相关的 EST 有 70 个,其中与细胞和细胞组分功能相关的 EST 最多,分别有 21 和 22 个,占总数的 30% 和 31.43%。在 81 个与分子功能相关的 EST 中,催化功能(catalytic activity)与

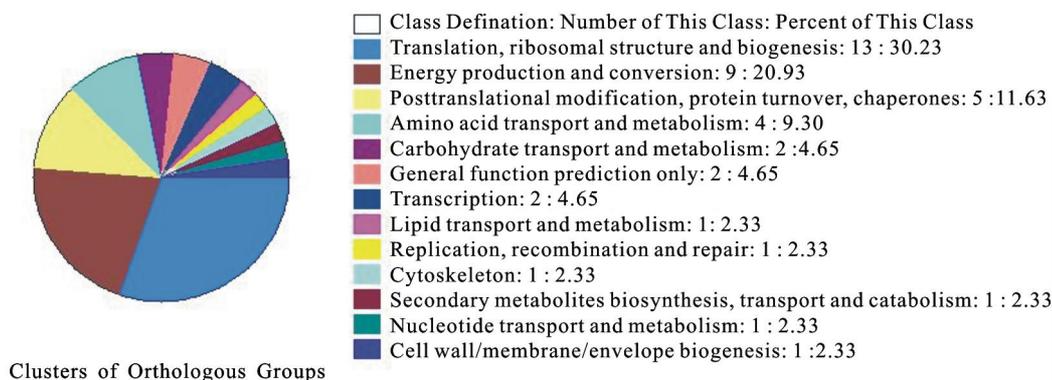


图3 棉花耐旱相关基因的功能分类图

Fig.3 Functional categories of drought-tolerant gene in cotton

表1 EST的COG分类表

Table 1 EST classification of COG

分类	EST 数量	比例 /%
氨基酸代谢	4	6.6
碳水化合物代谢	3	4.9
细胞防御与自救	3	4.9
脂肪代谢	5	8.2
能量生成与转化	9	14.8
核酸代谢	3	4.9
蛋白修饰	9	14.8
二级代谢	2	3.3
信号转导	4	6.6
DNA 加工	2	3.3
转录	7	11.47
能量	4	6.6
发育	6	9.8
总计	61	

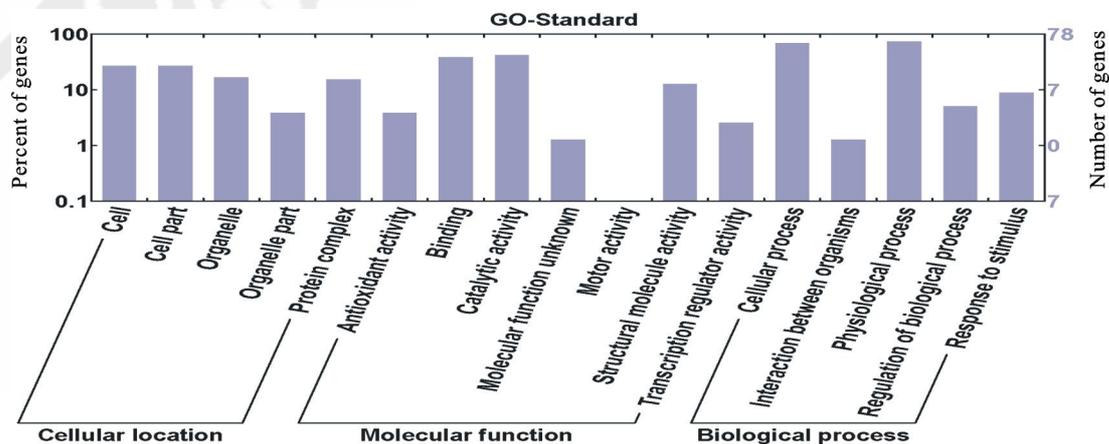


图4 棉花耐旱相关基因的GO分类

Fig.4 GO classification of cotton Drought-tolerant genes

分子绑定(binding)中的 EST 数目为 33 和 30 个。而在生物过程 (biological process) 中的 114 个 EST 中,与生理途径 (physiological process) 和细胞过程 (cellular process) 相关的 EST 最多,分别为 58 个、54 个;其次是刺激反应 (response to stimulus) 和发育相关的 EST 分别为 7 个、4 个,涉及到生物途径调控 (regulation of biological process) 的只有 1 个。因此,通过干旱胁迫后表达的棉花耐旱相关基因功能分类可以看出,棉花的耐旱反应主要表现在棉花自身代谢调节和细胞结构方面的变化,而且这些基因的表达与生长发育以及应激反应密切相关。

**2.3.3 KEGG 代谢途径的分析。**利用 KEGG 数据库将差异表达 EST 进行了植物生化过程如代谢、膜转运、信号传递、细胞周期以及同系保守的子途径等的归类。其中有 26 条 EST 注释到对应的代谢途径中并得到相应的代谢注释图谱,为进一步定位基因提供了可靠的研究依据。

### 3 讨论

植物在分子水平上的干旱胁迫反应是一个非常复杂的过程,涉及了多种代谢途径和大量基因<sup>[4-5]</sup>。目前,抑制消减杂交技术已成功应用于水稻、玉米等植物耐旱基因的研究中<sup>[6-9]</sup>,但在棉花耐旱性的研究中还未见相关报道。为研究棉花耐旱机制、发掘耐旱相关基因<sup>[10-14]</sup>,本文采用 SSH 技术构建了亚洲棉石系亚 1 号耐旱相关基因 cDNA 文库。经过生物信息分析表明,该库包含大量的耐旱相关 EST,并且涉及了植物生理生化过程中的多种代谢途径。同时,本库中还包括了多条未知功能的 EST,这些基因的功能同样值得进一步研究。与以往的植物差减 cDNA 文库<sup>[15-16]</sup>相比,在本次文库的生物信息学研究中,还对非冗余 EST 进行了 KEGG 分析,并得到了多条 EST 的代谢相关途径的注释图谱,为进一步详细研究棉花耐旱相关基因的发生机制与基因定位<sup>[17-18]</sup>提供了有利的证据。

同时,由于抑制消减杂交技术存在一定的假阳性问题,所以需要经过反向 Northern、RT-PCR 等技术进一步验证差异表达基因。由于时间问题,本试验尚未进行深入研究,有待以后完善。

### 参考文献:

- [1] 张雪妍,李付广. PEG 胁迫方法评价棉花幼苗耐旱性研究[J]. 棉花学报, 2007, 19 (3): 205-209.  
ZHANG Xue-yan, Li Fu-guang. Evaluation to the drought tolerance of cotton by PEG water-stress[J]. Cotton Science, 2007, 19 (3): 205-209.
- [2] ZHENG Jun, Liu Yun-jun, Wang Guo-ying, et al. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA microarray[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55: 807-823.
- [3] DIATCHENKO L, Chrislau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probe [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025-6030.
- [4] ADAMS K L, Wendel J F. Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton[J]. Boil J Linn Soc, 2004, 82: 573-581.
- [5] BARTELS D, Nelson D E. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics [J]. Plant Cell Environ, 1994, 17: 659-667.
- [6] ZHANG Jin-zhi, Li Zhi-min, Li Mei, et al. Identification of early-flower-related ESTs in an early-flowering mutant of trifoliolate orange by suppression subtractive hybridization and microarray analysis[J]. Tree Physiology, 2008, 28: 1449-1457.
- [7] 路运才,石云素,宋燕春,等.玉米苗期水分胁迫下相关基因差异表达研究[J]. 玉米科学, 2006(3): 278-282.  
LU Yun-cai, Shi Yun-su, Song Yan-chun, et al. Isolation and analysis of water stress induced gene-specific fragments from maize seedling[J]. Journal of Maize Sciences, 2006(3): 278-282.
- [8] JIANG Xiao-cheng, Guo Xin-hong, Pan Xiao-ling, et al. Construction and differential screening of a cDNA library specific to osmotic stress of *Haloxylon ammodendron* seedlings[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004(5): 527-532.
- [9] 蔡应繁,莫剑川,曾 宇,等.抑制性消减杂交方法克隆棉属突变材料腺体发育相关的 cDNA[J]. 北京林业大学学报, 2003(3): 6-10.  
CAI Ying-fan, Mo Jian-chuan, Zeng Yu, et al. Cloning of cDNAs associated with the development of pigment gland of *Gossypium* by suppression subtractive hybridization[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2003(3): 6-10.
- [10] 李永山,张 凯,谢光兰,等.陆地棉品种根系特性与耐旱性关系的研究[J]. 棉花学报, 2000, 12(2): 85-86.  
LI Yong-shan, Zhang Kai, Xie Guang-lan, et al. Studies on relationships between root characters and drought tolerance in upland cotton [J]. Cotton Science, 2000, 12(2): 85-86.
- [11] TEZARA W, Mitchell V J, Lawlor D W, et al. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and

- ATP [J]. Nature, 1999, 401: 914-917.
- [12] SOTIRIOS A K, Michael L. Isolation and characterization of drought-related trehalose-6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton [J]. Planta, 2006, 223: 329-339.
- [13] SEKI M, Sakurai T. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray [J]. Plant, 2002, 31: 279-292.
- [14] NEPOMUCENO A L, Stewart J M. Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol[J]. Environ Exp Bot, 1998, 40: 29-41.
- [15] 王省芬,田海燕,马峙英,等.黄萎病菌诱导下陆地棉抗病品种 SSH 文库的构建[J].棉花学报,2008,20(1):3-8.  
WANG Xing-fen, Tian Hai-yan, Ma Zhi-ying, et al. SSH library construction of upland cotton resistant cultivar under the stress of *Verticillium dahliae* [J]. Cotton Science, 2008, 20 (1): 3-8.
- [16] 张志刚,邱德文,杨秀芬,等.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[J].棉花学报,2007, 19(4):248-254.
- ZHANG Zhi-gang, Qiu De-wen, Yang Xiu-fen, et al. Construction of suppression subtractive hybridization library with cDNA from seeding cotton induced by protein elicitor from *Alternaria tenuissima* and analysis of EST[J]. Cotton Science, 2007, 19 (4): 248-254.
- [17] 栾明宝,郭香墨,张永山,等.利用陆地棉置换系进行海岛棉主要性状基因的染色体定位[J].棉花学报,2008,20(1):70-72.  
LUAN Ming-bao, Guo Xing-mo, Zhang Yong-shan, et al. Gene location of main traits in specific chromosome or chromosome arms of *G. barbadense* by using chromosome substitution lines [J]. Cotton Science, 2008, 20 (1): 70-72.
- [18] 喻树迅,袁有禄.数量性状遗传研究的新进展[J].棉花学报, 2002, 14(3):180-184.  
YU Shu-xun, Yuan Yong-lu. New progress of genetic study on quantitative traits[J]. Cotton Science, 2002, 14 (3): 180-184.

