

破色期番茄果实均一化 cDNA 沉默文库的构建 和功能基因筛选模型的初步建立*

王晓光 马远征 王晓辉 李 玲 罗云波 朱本忠**

(中国农业大学食品科学与营养工程学院食品生物技术实验室, 北京 100083)

摘要 番茄果实的成熟是由多基因精细调控的一个过程。利用破色期番茄果实, 根据复性动力学原理在 mRNA 水平进行均一化操作使高丰度和低丰度的 mRNA 丰度接近。然后把均一化之后 mRNA 反转录得到 cDNA, 再与基因沉默载体 pTRV 重组, 最后把构建好的载体通过电转化的方法转入到 GV3101 农杆菌中, 从而建立起破色期番茄果实均一化 cDNA 沉默文库。通过番茄果实中病毒诱导基因沉默技术, 对 cDNA 沉默文库进行初步筛选, 从而确定功能基因筛选模型。在模型建立阶段, 以番茄红素合成途径相关的 *PDS* 基因作为内标基因, 在 100 个混合农杆菌样中, 成功筛选到了 *PDS* 基因。

关键词 cDNA 文库, 均一化, 功能基因, VIGS

学科分类号 Q819

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00837

番茄是一个比较重要的经济作物, 同时其拥有相对较小的基因组和充足的突变体材料, 果实具有明显的成熟阶段, 以及遗传图谱比较清晰等优势, 因此, 一直以来人们把番茄作为水果蔬菜成熟衰老和乙烯作用机理研究的模式材料^[1]。随着人类^[2]、拟南芥^[3]、水稻^[4]等基因组测序的进行和完成, 番茄基因组测序工作也开始实施, 其中我国承担了第 3 号染色体的测序任务^[5]。目前该研究已经完成了 40% 的测序工作^[6]。同时, 美国番茄表达序列标签(expressed sequence tag, EST)测序计划对番茄组织 cDNA 文库进行测序, 这些组织包含了根、叶、茎以及不同成熟时期的番茄果实等^[7], 目前已经完成了 162 621 条 EST 的测序工作, 共 31 838 个基因片段^[8]。这些项目研究为推动番茄果实成熟相关功能基因组学的研究奠定了基础。功能基因组学主要研究生物体全基因组或组织系统内所有基因的生物学功能, 从而了解生长发育过程的确切机制^[9]。目前已经发展了多种分析鉴定基因功能的方法, 其中表达序列标签^[10]、基因芯片^[11]、SAGE 技术^[12]均为高通量的核酸分析技术。病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing)技术, 是一种简单、大规模、高通量且高效的功能基因组学研究工具^[13, 14], 在多种植物中被用于植物基因的功能分析

研究^[15, 16]。

植物体内除了极少数的持家基因, 多数基因在不同的时期、不同的组织里表达丰度存在着巨大的差异, 并且有的基因甚至必须在特殊的环境条件的诱导下才表达。基因的转录水平分为高中低三类^[17], 并且绝大多数基因是处于中等或者低表达丰度的。但是高丰度的基因的转录产物在单个细胞中含有 5 000 个左右的拷贝, 约占总表达量的 25%。这就为构建一个具有完整代表性的 cDNA 文库增添了障碍, 尤其为后续的文库筛选和鉴定带来不必要的浪费。因此, 构建一个均一化的 cDNA 文库是克服转录水平差异的有效措施。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 番茄. 丽春番茄破色期果实(*L. esculentum* L. cv. Jinfen), 种植于温室(25℃/20℃, 湿度 90%, 光周期 14 h/10 h), 花后 40 天, 根据番茄果顶刚

* 国家自然科学基金资助项目(30600421, 30871741)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62737538, E-mail: cauzbz@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-06, 接受日期: 2009-03-09

刚出现红色为标准取样, 自来水清洗, 液氮速冻.

1.1.2 菌种. GV3101 农杆菌.

1.1.3 质粒. pTRV1, pTRV2.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 mRNA 纯化. 番茄果实总 RNA 采用 Trizol (Invitrogen 公司, 15596-026) 提取, 提取的 RNA 37℃ 放置 48 h, 电泳检测质量. 处理后 RNA 条带明亮、清晰、锐利, 28 S 条带是 18 S 条带亮度的 2 倍, 且 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间, 表明 RNA 质量合格, 可进行下一步操作. mRNA 纯化采用 PolyA-Tract mRNA Isolation Systems (Promega 公司, Z5210), 紫外分光光度计定量 mRNA, 使其浓度达到 1 g/L.

1.2.2 mRNA 水平均一化. 取 40 μg mRNA, 以 Oligotex (Qiagen 公司, 70022) 为引物进行反转录 (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega 公司, M1701), 反应体系为 (100 μl 总体积): mRNA 40 μl , Oligotex 10 μl , dNTP 4 μl , M-MLV 4 μl , 缓冲液 20 μl , RNasin 4 μl , 加 H_2O 至 100 μl . 42℃ 1.5 h, 反应完成后 95℃ 变性 3 min, 立刻置于冰上. 10 000 g 离心分离 Oligotex, 反转录得到的 cDNA 单链作为杂交探针. 加入 50 μl OligodA (44 μg /每 1 250 μl), 70℃ 5 min, 37℃ 10 min. 离心, 弃上清, 加入 10 μg mRNA 和 90 μl 水, 55℃ 杂交 15 min. 离心, 上清即为杂交一次的 mRNA. 沉淀加入 100 μl 水, 95℃ 变性 3 min, 立刻置于冰上, 离心分离沉淀, 即为活化后探针, 再次杂交方法如上.

1.2.3 mRNA 均一化水平验证.

取番茄内部基因作为依据, 根据 tomato expression database 分析和实验验证 (图 1), E8 (X13437) 在破色期拷贝数较多, 而 Cel3 (LEU78526) 在破色期拷贝数较低. 所以高低丰度基因分别设定为 E8 和 Cel3. E8, 上游引物: 5' GATACTAAGG-CCGGTGT 3', 下游引物: 5' TCTCCAACCTGCACTG 3'. Cel3, 上游引物: 5' ATACAGCGTCGGCAATG 3', 下游引物: 5' CAAGGTAGCCAGGAAGG 3'.

由于杂交之后 mRNA 含量降低, 反转录和 PCR 扩增的模板量都要相应增加. 取杂交前、杂交 1 次和杂交 2 次的 mRNA 反转录, mRNA 反转录加样量分别为杂交前 1 μl 和杂交 1 次、2 次各 10 μl . 反转录完成后, cDNA 采用以上引物扩增检测均一化效果, PCR 体系中 cDNA 加样量分别

为杂交前、杂交 1 次 1 μl 和杂交 2 次 10 μl . 反应体系为 (25 μl): mRNA 杂交前 1 μl /杂交 1 次 10 μl /杂交 2 次 10 μl , OligodT 2 μl , dNTP 1 μl , M-MLV 1 μl , 缓冲液 5 μl , RNasin 1 μl , 加 H_2O 至 25 μl , 42℃ 1.5 h. cDNA 模板杂交前 1 μl /杂交 1 次 1 μl /杂交 2 次 10 μl , 引物上游引物 1 μl , 下游引物 1 μl , 缓冲液 2.5 μl , dNTP 1 μl , Taq DNA 聚合酶 1 μl , 加 H_2O 至 25 μl , 33 个循环, 退火温度 52℃.

1.2.4 cDNA 文库构建. 取均一化后 mRNA 100 μl 用于文库构建, 采用 BD SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech 公司, 634902), 改用自己设计的 Oligo dT 引物和末端引物反转录得到第一链 cDNA, 再通过扩增引物进行 cDNA 扩增. 电泳检测均一化前后 cDNA 扩增的效果后, 采用 Gel Extraction Kit (Omega 公司 D2501-01) 切胶回收 500~2 000 bp 的 cDNA 片段. 对回收产物进行 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切, 用 T4 DNA Ligase (Promega 公司, M1801) 连接到 pTRV2 载体上. 最后把 pTRV2 直接转入到 GV3101 农杆菌感受态细胞中. Oligo dT 引物: 5' GCCGGATCCTCTAGAGAATTCGCT (30) nn 3'. 末端引物: 5' CACTTGGTACCGTCGACTggg 3'. 扩增引物: 上游引物 5' CACTTGGTACCGTCGACTggg 3', 下游引物 5' GCCGGATCCTCTAGAGAA-TTCG 3'.

1.2.5 文库筛选模型建立. 挑取农杆菌基因文库中 99 个农杆菌单菌落和已知含有 pTRV-*LePDS* 的农杆菌分别接种在 3 ml YEB 液体培养基 (Kan^r), 在 200 r/min, 28℃ 摇床上培养过夜. 随后, 接种 0.2 ml 过夜培养液至 5 ml 的 YEB 液体培养基 (Kan, 10 mmol/L MES, 20 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮), 28℃, 200 r/min 摇床继续培养过夜. 将上述菌液 10 个菌液一组混匀 (标明含有 pTRV-*LePDS* 的组), 在 4℃, 4 000 g 下离心 6 min 收集农杆菌细胞后, 用渗透培养液 (10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L MES, 200 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮, pH 5.6) 重新悬浮沉淀的农杆菌细胞, 调节浓度至 A_{600} 达到 1.0, 室温下放置 6 h. 以组为单位侵染番茄, 侵染方法采用离体番茄果实表皮注射, 侵染后放置条件设定为 19℃, 湿度 60% (人工气候箱). 如果有一组农杆菌侵染番茄后, 番茄表现出与设定指标相关的变化, 例如色、香、味等品质指标, 就从这组中继续筛选, 直到找到引起相关变化的基因.

2 结果与分析

2.1 高低丰度基因的确定

采用破色期番茄果实 cDNA PCR 扩增 *E8* 和 *Cel3* 基因, 分别在 20、25、30 和 35 循环时取样, 电泳检测。如图 1 所示, 在相同循环数, *E8* 和 *Cel3* 基因拷贝数有明显的差异。因此, 采用 *E8* 和 *Cel3* 基因作为丰度消减的指标来确定均一化的程度。

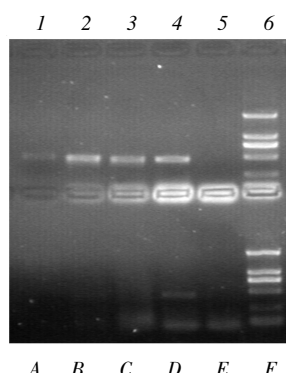


Fig. 1 RT-PCR results of transcripts of rare mRNA and abundant mRNA at different cycle times

1, 2, 3, 4: The expressions of *E8* at 20, 25, 30, 35 cycle times; A, B, C, D: The expressions of *Cel3* at 20, 25, 30, 35 cycle times; 5, E: Negative control of *E8* and *Cel3*; 6, F: DL2000 DNA marker.

2.2 总 RNA 提取和 mRNA 纯化

总 RNA 提取出来后, 37℃ 放置 4、24、48 h 之后电泳检测。如图 2 所示, 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带清楚, 28 S rRNA 是 18 S rRNA 亮度的 2 倍, 并且没有任何降解的迹象, 说明没有 Rnase 污染。提取的总 RNA 稳定性较好, 可以用于 mRNA 纯化操作。纯化后 mRNA 紫外检测, A_{260}/A_{280} 为 1.93, 说明纯度较好, 可以用于后续均一化操作。

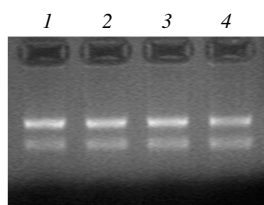


Fig. 2 Treatment of total RNA with different periods at 37℃

1: 0 h at 37℃; 2: 4 h at 37℃; 3: 24 h at 37℃; 4: 48 h at 37℃.

2.3 均一化结果

从图 3 可以看出, 杂交前高低丰度基因之间丰度存在着明显的差异。经过 2 次杂交处理, 高低丰

度基因之间丰度比较接近, 说明杂交对高丰度基因丰度的降低起到了明显的效果。然后对均一化前后的 mRNA 反转录, 得到的 cDNA 采用扩增引物扩增。没有均一化的 cDNA 扩增产物有特异性条带, 而经过均一化之后 cDNA 扩增产物是弥散的条带, 比较均匀(图 4)。这也反映出均一化程度比较好, 说明通过杂交能明显降低高丰度基因的丰度。

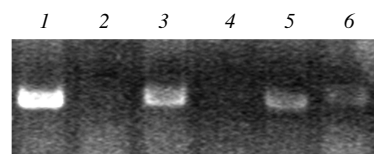


Fig. 3 Transcripts of rare mRNA and abundant mRNA before and after hybridization

1, 2: The expressions of *E8* and *Cel3* before hybridization; 3, 4: The expressions of *E8* and *Cel3* after the first hybridization; 5, 6: The expressions of *E8* and *Cel3* after the second hybridization.

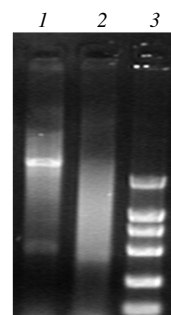


Fig. 4 The result of cDNA amplification before and after normalization

1: cDNA amplification before normalization; 2: cDNA amplification after normalization; 3: DL2000 marker.

2.4 cDNA 文库构建

反转录合成 cDNA 后采用扩增引物扩增得到弥散的 cDNA 条带(图 5), 采用胶回收 500 ~ 2 000 bp 的片段, 电泳检测成功回收目的 cDNA 片段(图 6)。用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 cDNA 片段,

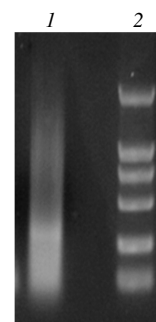


Fig. 5 cDNA amplification with amplification primers

1: cDNA; 2: DL2000 DNA marker.

与 pTRV2 载体连接, 最终把连接产物通过电转化直接转入到农杆菌 GV3101 感受态细胞, 构建成原始沉默文库. 同时随机挑取 20 个农杆菌提取质粒 PCR 验证. 如图 7 所示, 插入片段大小在 300~2 000 bp 范围内, 说明该文库有良好的质量.

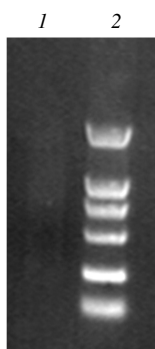


Fig. 6 Gel extraction after cDNA amplification

1: cDNA; 2: DL2000 DNA marker.

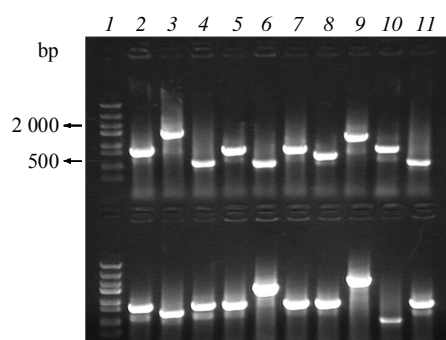


Fig. 7 PCR results of random agrobacterial vectors

1: DNA marker; 2~11: DNA fragments after PCR.

2.5 功能基因筛选

从沉默文库中随机挑取的 99 个农杆菌和已知的含有 pTRV-*LePDS* 的农杆菌一起进行初步筛选验证, 以颜色作为沉默的指标, 在其中一组观察到番茄不能正常变红, 而是转变成了黄色(图 8), 推测可能是 *PDS* 基因沉默引起的现象. 经过多次筛选, 把最终筛选得到的农杆菌提取质粒, 经过测序得知为加入的 *PDS* 基因. 由于 *PDS* 基因是番茄红素合

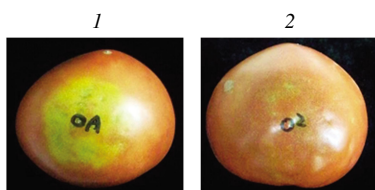


Fig. 8 Screening *PDS* which is related with pigment

1: The symptom of tomato fruit infiltrated by agrobacteria containing pTRV2-*PDS*; 2: The symptom of tomato fruit infiltrated by agrobacteria containing pTRV2.

成过程中的一个关键酶, 所以沉默了此基因, 番茄红素合成受到抑制, 果实就不能正常变红. 实时定量 PCR 结果表明, 用含有 pTRV2-*PDS* 农杆菌侵染番茄果实, *PDS* 转录水平下降到 1.61%(表 1). 通过此次对内参基因的筛选, 我们已经初步建立功能基因的筛选模型.

Table 1 The expression of *PDS* in tomato fruit silenced by pTRV-*PDS*

Gene	pTRV	pTRV- <i>PDS</i>	%
	ΔCT	ΔCT	
<i>PDS</i>	-2.12	3.84	1.61

Data of real-time PCR were analysed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method according to Livak and Schmittgen (2001)^[18] and were presented as the relative levels of gene expression.

3 讨 论

根据复性动力学原理(second-order kinetics), 高丰度的 cDNA 在退火条件下复性的速度快, 而低丰度的 cDNA 复性需要较长的时间, 因此可以通过控制复性时间来降低丰度. 本研究采用这一原理, 通过自杂交 2 次做到文库的均一化, 经检验均一化水平符合预期目标. 目前构建均一化文库多采用 Evrogen 公司的 TRIMMER 试剂盒进行均一化处理, 该方法基于独特的双链特异性核酸酶均一化技术^[19]. 该方法已经成功应用到多物种构建 cDNA 文库中, 但是成本相对较高是制约其发展的一个重要因素. 应用自杂交方法, 不仅成本低廉而且操作简单快捷, 同时保证了 cDNA 文库丰度的均一性.

由于我们的试验目的是大规模筛选功能基因, 所以选择构建 cDNA 沉默文库, 直接利用基因沉默进行功能基因筛选, 不仅避免了大规模测序, 而且对于未知基因的功能以及已知基因的未知功能都能快速准确地鉴定出来. 目前, 我们仅仅是把筛选的模型确立起来(100 个农杆菌中筛出了内参基因 *PDS*), 针对后续不同指标的设定, 还要进行大量筛选工作才能详细地把番茄基因功能网络描绘出来.

在植物中基因沉默方法有很多种, 果柄注射^[20]、真空渗透^[21]是最为常用的两种方式. 但是果柄注射需要活体番茄, 这对操作和侵染后外界条件要求较高. 本着简单优化的策略, 我们采用离体番茄果实用于功能基因筛选. 真空渗透应用于离体番茄果实已经得到证实, 但是此方法精确度不是很高. 因为真空渗透需要整果处理, 对照设定就存在

个体之间的差异, 并且真空渗透需要大量的农杆菌进入番茄内部, 工作量偏大. 鉴于大规模功能基因筛选, 我们选择了离体番茄果实表皮注射法. 此方法不仅简单快捷而且准确可靠(同一个番茄上可以同时做对照和沉默处理).

参 考 文 献

- 1 Fray R G, Grierson D. Molecular genetics of tomato fruit ripening. *Trends Genet*, 1993, **9**(12): 438~443
- 2 Deloukas P, Schuler G D, Gyapay G, *et al.* A physical map of 30,000 human genes. *Science*, 1998, **282**(5389): 744~746
- 3 Lin X Y, Kaul S, Rounsley S, *et al.* Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 1999, **402**(6763): 761~768
- 4 Yu J, Hu S, Wang J, *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science*, 2002, **296**(5565): 79~92
- 5 Mueller L A, Tanksley S D, Giovannoni J J, *et al.* The tomato sequencing project, the first cornerstone of the international solanaceae project (SOL). *Comparative and Functional Genomics*, 2005, **6**(3): 153~158
- 6 About the International Tomato Sequencing Project: http://sgn.cornell.edu/help/about/tomato_sequencing.html
- 7 Van der H, Ronning C, Giovannoni J, *et al.* Deductions about the number, organization and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell*, 2002, **14**(7): 1441~1456
- 8 TIGR Tomato Gene Index Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Gene Index (LeGI): http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species= tomato
- 9 Philip H, Mark B. Functional genomics: It's all how you read it. *Science*, 1997, **278**(5338): 601~602
- 10 Fei Z J, Tang X M, Alba R M, *et al.* Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. *Plant J*, 2004, **40**(1): 47~59
- 11 Alba R, Fei Z J, Payton P, *et al.* ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J*, 2004, **39**(5): 697~714
- 12 Velculescu V E, Zhang L. Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995, **270**(5235): 484
- 13 Adam F, Norbert P. Genome-wide high-throughput screens in functional genomics. *Curr Opin Gene Develop*, 2004, **14**(5): 470~476
- 14 Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, *et al.* Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 2003, **30**(4): 296~303
- 15 Burch-Smith T M, Anderson J C, Martin G B, *et al.* Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J*, 2004, **39**(5): 734~746.
- 16 Robertson D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**(1): 495~519
- 17 Bishop J O, Morton J G, Rosbash M, *et al.* Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA. *Nature*, 1974, **25**(5463): 199~204
- 18 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, **25**(4): 402~408
- 19 Zhulidov P A, Bogdanova E A, Shcheglov A S, *et al.* Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex specific nuclease. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(3): 37
- 20 Fu D Q, Zhu B Z, Zhu H L, *et al.* Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J*, 2005, **43**(2): 299~308
- 21 Xie Y H, Zhu B Z, Yang X L, *et al.* Delay of postharvest ripening and senescence of tomato fruit through virus-induced LeACS2 gene silencing. *Postharvest Biol Tec*, 2006, **42**(1): 8~15

Construction of a Normalized cDNA Silencing Library of Tomato Fruit and Model Establishment of Screening Specific Functions of Genes*

WANG Xiao-Guang, MA Yuan-Zheng, WANG Xiao-Hui, LI Ling, LUO Yun-Bo, ZHU Ben-Zhong**

(Food Biotechnology Laboratory, College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract The ripeness of tomato is regulated by multi-genes. Transcripts of mRNA extracted from tomato at breaker stage were normalized, and cDNA with pTRV was constructed after reverse transcription. In order to construct a normalized cDNA silencing library, a novel procedure was adopted to reduce the abundant copy number and increase the rare copy number. Then the normalized cDNA was put into pTRV vector to construct a cDNA library and this cDNA library was screened with the technology of virus induced gene silencing. *PDS*, which was related about synthesis of lycopene, was used as marker gene to establish the model of screening. Among one hundred mixed agrobacteria, *PDS* was successfully screened in the first stage of model establishment.

Key words cDNA library, normalization, functional genes, VIGS

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00837

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30600421, 30871741).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62737538, E-mail: cauzbz@yahoo.com.cn

Received: December 6, 2008 Accepted: March 9, 2009