

# 利用有序差异显示技术克隆受稻瘟病菌诱导表达的水稻 cDNA 的研究\*

罗文永<sup>1,2)</sup> 李晓方<sup>2)</sup> 胡骏<sup>1)</sup> 刘文华<sup>1)</sup> 肖昕<sup>2)</sup> 刘良式<sup>1)</sup>\*\*

(<sup>1)</sup>中山大学植物基因工程教育部重点实验室, 广州 510275;

<sup>2)</sup>广东省农业科学院水稻研究所, 农业部水稻遗传改良重点实验室及广东省水稻育种新技术重点实验室, 广州 510640)\*\*\*

**摘要** 利用有序差异显示技术(ODD)分析受稻瘟病菌诱导表达的水稻基因,通过反式 RNA 印迹进行辅助筛选,获得了 37 个在接种稻瘟病菌后表达量增强的水稻 cDNA 克隆.采用 RNA 印迹对其中 5 个克隆在接种稻瘟病菌后的表达分析表明,这些克隆在抗病以及感病的水稻株系中都具有诱导表达的特点.根据序列同源性分析,与这些克隆序列相应的同源基因可能涉及抑制病原菌生长、清除真菌毒素、传递抗病信号以及调节宿主生理状态等几方面的功能.

**关键词** 有序差异显示技术(ODD), 水稻, 稻瘟病菌, cDNA, 克隆

学科分类号 Q943

稻瘟病是严重影响水稻生产的全球性水稻病害,目前对付该病最经济有效的办法是培育抗稻瘟病的水稻新品种.但是,由于稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)生理小种演化较快,往往导致生产上新的抗病品种在连续种植 3~5 年后出现抗病力下降甚至丧失的现象,因此,深入了解稻瘟病菌与水稻的互作关系,阐明水稻抗病机理,对水稻抗病育种以及植物抗病研究都有着十分重要的意义.

表达基因的有序差异显示技术(ordered differential display, ODD)是 1997 年 Matz 等<sup>[1]</sup>建立的用于分析差异表达基因的分子生物学技术,其原理是先利用限制性 DNA 内切酶处理 cDNA,然后加上特异性接头,再利用特异的接头锚定引物和 oligo(dT)锚定引物扩增 cDNA 的 3'端序列,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳比较扩增产物并获得差异表达的 cDNA 片段.本文利用该技术分析了受稻瘟病菌诱导表达的水稻基因,目的是了解防卫反应系统激活后基因表达的变化,为深入了解差异表达基因的功能并最终阐明水稻抗病机理打下基础.

试验结果表明,ODD 技术辅助以反式 RNA 印迹筛选,所获得的克隆具有很高的阳性率,很适合于差异表达基因的筛选.根据克隆的同源性分析,所获得的克隆可能涉及直接抑制病原菌的生长、清除真菌毒素、抗病信号转导以及调节宿主生理状

态,使之更有利于植物抵抗病原菌的侵染等方面的功能.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

水稻材料粤香占是广东省农业科学院水稻研究所育成的籼稻新品种;变异粤香占抗病株系、变异粤香占感病株系是将小粒野生稻总 DNA 导入粤香占后获得的突变体单株——变异粤香占的 T9 后代<sup>[2]</sup>.稻瘟病菌生理小种 98-247(ZB-13),由本室收集保存,粤香占、变异粤香占抗病株系、变异粤香占感病株系对该菌株的抗性水平分别为中抗、高抗和感病.

### 1.2 方法

**1.2.1 稻瘟病菌孢子喷雾接种:**播种水稻材料粤香占、变异粤香占抗病株系、变异粤香占感病株系各两份,其中一份为处理组,另一份为对照组.待幼苗长至 4~5 片叶龄时,处理组以浓度为  $1 \times 10^{10}$ ~ $2 \times 10^{10}$  pfu/L 的稻瘟病菌孢子悬液喷雾接种,对照组则以灭菌的去离子水代替孢子悬液.接种 5、

\* 国家自然科学基金资助项目(30040025)和广东省科技攻关项目(99M01503G).

\*\* 通讯联系人. \*\*\* 并列第一完成单位.

Tel: 020-84112392, Fax: 020-84036215

E-mail: ls10@zsu.edu.cn

收稿日期: 2004-01-14, 接受日期: 2004-02-05

12、24、48、72 h 后分别剪取幼叶，液氮速冻后保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

**1.2.2 抽提水稻总 RNA 与合成 cDNA:** 本试验中所有样本的总 RNA 均采用一步法抽提<sup>[3]</sup>，经紫外分光光度计对 RNA 进行定量后，用经 DEPC 处理后的去离子水将各样本 RNA 浓度调至一致。其中，对照组总 RNA 分别按材料来源，将粤香占、变异粤香占抗病株系和变异粤香占感病株系接种去离子水后各个时段幼叶等量混合后进行抽提，而处理组总 RNA 则按材料来源及接种稻瘟病菌孢子后 5、12、24、48、72 h 不同时段单独制备。

**1.2.3 cDNA 的合成:** 参照 Matz 等<sup>[4]</sup>的方法进行逆转录及双链 cDNA 的合成。分别取变异粤香占抗病株系处理组接种稻瘟病菌孢子后 5、12、24、48、72 h 各时段的总 RNA，并按 2:2:2:1:1 的比例进行混合，并调整浓度至 2.5 g/L，同时将变异粤香占抗病株系对照组总 RNA 调整浓度至 2.5 g/L。分别取 2  $\mu\text{l}$  对照组及处理组总 RNA，分别加入 1  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  T-引物 (gcgagtcgaccgttttttttttt) 和 G-引物 (aagcagtggtaacaacgcagagtagcggggg)，70 $^{\circ}\text{C}$  加热 5 min 后再冰浴 5 min，按 Gibco 公司产品说明加入 200 U 逆转录酶 Superscript II RT 及其反应缓冲液，42 $^{\circ}\text{C}$  下放置 50 min，所得产物即 cDNA 第一链。取 2  $\mu\text{l}$  cDNA 第一链反应产物，分别加入 4  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  T-引物和 GE-引物 (aagcagt-ggtaacaacgcagagt)，1  $\mu\text{l}$  10 mmol/L dNTP，并按 TaKaRa 公司产品说明加入反应缓冲液及 Taq DNA 聚合酶，在 100  $\mu\text{l}$  反应体积中进行 PCR 扩增，合成双链 cDNA。扩增参数：72 $^{\circ}\text{C}$ ，30 min，94 $^{\circ}\text{C}$ ，3 min；然后 94 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s，68 $^{\circ}\text{C}$ ，6 min，18 个循环。

**1.2.4 ODD 分析:** 参照 Matz 等<sup>[1]</sup>的方法进行 ODD 分析。用限制性内切酶 *Hha* I (TaKaRa 公司) 消化双链 cDNA，然后加入接头 (长链: ctaatac-gactactatagggcagcagcggcggcccgctcagccg，短链: gctg-agcggggc) 进行连接。以连接产物为模板，用接头外侧引物 (ctaatac-gactactatagggc) 和 T-引物进行 PCR 预扩增，扩增参数：94 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s，68 $^{\circ}\text{C}$ ，6 min，15 个循环。然后以预扩增产物为模板，分别用 16 条接头锚定引物 (agcggcggcccgctcag-cgcNN，N 为 A、G、C、T 碱基中的任一种) 和 12 条 T-锚定引物 (gcgagtcgaccgtttttttttttMN，N 为 A、G、C、T 碱基中的任一种；M 为 A、G、C 碱基中的任一种) 进行 PCR 扩增，扩增循环参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s，68 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ ，2 min 25 个循

环。扩增产物经 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后，参照 Panaud 等<sup>[5]</sup>的方法进行银染显色，割下差异带，加入 20  $\mu\text{l}$  TE，98 $^{\circ}\text{C}$  保温 10 min，浸出液用于后续分析。

**1.2.5 反式 RNA 印迹验证:** 用相应的接头锚定引物和 T-引物扩增 ODD 分析中回收的差异带，并将每个扩增样品分为两等份进行电泳，电泳结束后用半干转移仪 (BioRad 公司) 按说明书的操作步骤将 DNA 分别转移至两套 Hybond N<sup>+</sup> (Amersham-Pharmacia Biotech 公司) 尼龙膜上。用于反式 RNA 印迹分析的处理组及对照组杂交探针则按以下方法进行标记：取 1.2.3 中已合成的变异粤香占抗病株系处理组及其对照组 cDNA 第一链各 2  $\mu\text{l}$ ，分别加入 1  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{mol/L}$  的 T-引物和 G-引物，加入 1  $\mu\text{l}$  dNTP (4 mmol/L dATP、dGTP 和 dTTP 以及 0.5 mmol/L dCTP)，5  $\mu\text{l}$  比活度为  $1.11 \times 10^{17}$  Bq/mol 的 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (北京亚辉公司)，总体积 50  $\mu\text{l}$ ，扩增参数：72 $^{\circ}\text{C}$ ，30 min，94 $^{\circ}\text{C}$ ，3 min，然后 94 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s，68 $^{\circ}\text{C}$ ，6 min，25 个循环。按常规方法进行杂交及放射自显影。

**1.2.6 序列测定及生物信息学分析:** 以 *E. coli* 菌株 DH5 $\alpha$  作为受体菌，参照一步法进行质粒转化<sup>[6]</sup>，将反式 RNA 印迹筛选所获得的接种稻瘟病菌孢子后上调表达的阳性 cDNA 片段，克隆到 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司) 中，委托上海 Sangon 公司进行 DNA 序列测定。将所获得的序列与 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库中的序列进行 BLAST 分析。分析时，先通过 BLAST N 获得同源的 EST 序列或基因组序列，再利用 DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp) 在线软件 CLUSTAL W 对同源的 EST 作序列一致性分析及 cDNA 的电子拼接，利用拼接后的 cDNA 序列进行 BLAST X 分析，利用在线软件 FgeneSH (www.softberry.com) 对同源的基因组序列进行基因预测，然后用预测的氨基酸序列进行 BLAST P 以及氨基酸保守序列分析。

**1.2.7 RNA 印迹分析:** 分别取粤香占、变异粤香占抗病株系和变异粤香占感病株系的对照组总 RNA 以及处理组接种稻瘟病菌孢子后 5、12、24、48、72 h 各时段总 RNA，按每泳道 50  $\mu\text{g}$  总 RNA 在含甲醛的琼脂糖凝胶中进行电泳，电泳结束后转移到 Hybond Nau<sup>+</sup> 尼龙膜上。杂交探针则挑选经反式 RNA 印迹筛选以及 DNA 序列或氨基酸序列同源性分析后，分别属于不同类型的阳性克隆，同时以组成型表达的三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 基

因作为各泳道中 RNA 量的参照, 用随机引物标记试剂盒 (Amersham-Pharmacia Biotech 公司) 进行探针标记, 按常规方法进行杂交及放射自显影。

## 2 结 果

### 2.1 稻瘟病菌诱导表达的水稻基因 ODD 分析

本试验共获得 352 条接种后差异表达的 cDNA 片段 (图 1), 其中 240 条在接种后显示上调表达, 112 条为下调表达。通过反式 RNA 印迹筛选及连接转化, 共获得了 37 个接种后上调表达的 cDNA 克隆 (图 2)。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

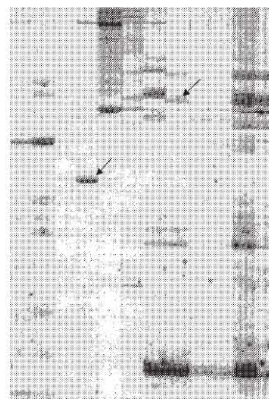


Fig. 1 ODD analysis

Every two lanes were amplified by the same pair of primers, the odd lanes were samples of control, the even lanes were samples of test. Upregulating expressed cDNAs were denoted with arrows.

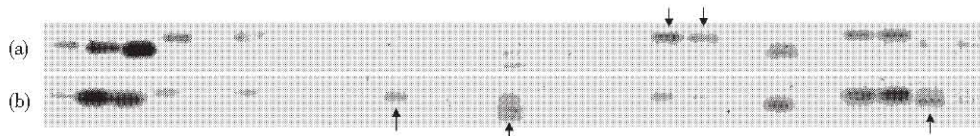


Fig. 2 Reverse Northern blot

(a) Hybridization with cDNA probes prepared from rice fungal blast resistant line non-inoculated with *M. grisea*; (b) Hybridization with cDNA probes prepared from rice fungal blast resistant line inoculated with *M. grisea*. Differentially expressed cDNA clones were denoted with arrows.

### 2.2 稻瘟病菌诱导表达的 cDNA 片段同源性分析

将经过反式 RNA 印迹筛选获得的接种稻瘟病菌后上调表达的 37 个 cDNA 克隆与 GenBank 中的序列进行同源性分析, 按分析结果可以将这些 cDNA 克隆分为三类: 第一类 cDNA 克隆与功能未知的水稻基因同源, 共有 19 个; 第二类 cDNA 克隆与逆境胁迫相关的植物基因同源, 共有 15 个; 第三类 cDNA 克隆共有 3 个, 它们的同源基因在植物发育过程中具有重要功能, 但是还不清楚这些基因与逆境胁迫的相关性。目前这些 cDNA 序列都已登录在 GenBank 中 (表 1)。

在未知功能的第一类 cDNA 克隆中, 有 4 个为新的 cDNA 序列, 6 个为未知功能序列, 8 个与 GenBank 中登录的受稻瘟病菌诱导表达的水稻 cDNA 同源, 1 个与 GenBank 中登录的受干旱诱导表达的 cDNA 同源。

在与已知的逆境胁迫相关基因同源的 15 个第二类 cDNA 克隆中, pGR 1 与拟南芥 MATE (multidrug and toxic compound extrusion) 蛋白基因家族的蛋白质产物具有 58% 的氨基酸序列同源性, 这类蛋白质可以帮助植物将有毒物质排出细胞 [7]。

pGR 3 与小麦 ferredoxin/NAPD 氧化还原酶的氨基酸序列具有 75% 的同源性, 该酶与活性氧的产生有关。活性氧可以直接抑制病原菌生长, 在植物的过敏反应中起着重要作用, 同时还作为抗病信号, 诱导其他防卫反应基因的表达 [8]。

pGR 6 与水稻的 Dna J-like 蛋白的氨基酸序列具有 77% 的同源性, Dna J 蛋白是一种分子伴侣, 已知受热休克胁迫诱导, 它可以协助蛋白质的正确折叠 [9]。

pGR 11 及 pGR 20 都与 ATP 酶基因相关。其中 pGR 11 与水稻叶绿体 ATPase I 亚基的氨基酸序列具有 73% 的同源性, pGR 20 与推测的拟南芥液泡 ATP 合成酶 F 亚基的氨基酸序列具有 86% 的同源性。在植物受到生物或非生物逆境胁迫时都可以检测到一些类型的 ATP 酶表达增强 [10, 11]。

pGR 23 在 GenBank 中同源序列编码的蛋白质为 ATP (GTP) 结合蛋白。具有这类特征的蛋白质广泛存在于各种生物中, 它们的功能涉及生物的生长发育以及逆境胁迫等各个方面 [12, 13]。

pGR 26 与水稻中推测的甘氨酸脱氢酶基因以及 *Avenasativa* 中的长蠕孢霉毒素结合蛋白基因分

Table 1 Homology analysis

Clone	Length /bp	Accession number	Homology	E-value
pGR 34	105	AF522003	New cDNA	
pGR 36	64	AF522005	New cDNA	
pGR 38	427	AF522007	New cDNA	
pGR 39	600	AF522008	New cDNA	
pGR 4	292	AF522009	tobacco nucleolin with unknown function (BAC02896)	9e-39
pGR 5	120	AF522018	<i>Oryza sativa</i> unknown function protein (BAA96146)	5e-21
pGR 21	178	AF521990	<i>Oryza sativa</i> unknown function protein (BAB89591)	e-171
pGR 25	209	AF521993	<i>Oryza sativa</i> unknown function cDNA (CB620666)	4e-44
pGR 40	400	AF522010	<i>Oryza sativa</i> unknown function cDNA (AU174699)	0.0
pGR 52	382	CA854290	<i>Arabidopsis thaliana</i> unknown function protein (AAM62542)	5e-23
pGR 2	202	AF521988	<i>M. grisea</i> induced <i>Oryza sativa</i> cDNA clone (B1812594)	2e-96
pGR 7	222	AF522021	<i>M. grisea</i> induced <i>Oryza sativa</i> cDNA clone (B1807772)	e-100
pGR 29	450	AF521997	<i>M. grisea</i> induced <i>Oryza sativa</i> cDNA clone (B1813106)	1e-41
pGR 30	275	AF521999	<i>M. grisea</i> induced <i>Oryza sativa</i> cDNA clone (BM419565)	e-110
pGR 35	396	AF522004	<i>M. grisea</i> induced <i>Oryza sativa</i> cDNA clone (BM422092)	5e-81
pGR 47	202	AF522016	<i>M. grisea</i> induced <i>Oryza sativa</i> cDNA clone (B1807502)	3e-65
pGR 60	255	CA854295	<i>M. grisea</i> induced <i>Oryza sativa</i> cDNA clone (B1812486)	5e-46
pGR 72	393	CA854303	<i>M. grisea</i> induced <i>Oryza sativa</i> cDNA clone (BM419804)	0.0
pGR 13	583	AF521982	Drought stress <i>Oryza sativa</i> cDNA clone (B1306285)	0.0
pGR 1	185	AF521978	<i>Arabidopsis thaliana</i> MATE efflux protein family (NP_194294)	e-113
pGR 3	114	AF521998	<i>Zea mays</i> ferredoxin/NADP oxido-reductase (CAD30025)	e-160
pGR 6	255	AF522020	<i>Oryza sativa</i> Dna J-like protein (CAC39071)	4e-19
pGR 11	447	AF521980	<i>Oryza sativa</i> ATPase I subunit protein (AAM12485)	8e-42
pGR 20	213	AF521989	<i>Arabidopsis thaliana</i> putative vacuolar ATP synthase (AAC78269)	1e-52
pGR 23	203	AF521992	<i>Oryza sativa</i> putative ATP (GTP) -binding protein (AAL58201)	e-156
pGR 26	340	AF521994	<i>Oryza sativa</i> putative glycine dehydrogenase (BAB39424)	e-124
pGR 32	269	AF522001	<i>Arabidopsis thaliana</i> probable methionine aminopeptidase (Q9SLN5)	e-149
pGR 53	168	AF521979	<i>Arabidopsis thaliana</i> ethylene-responsive protein (NP_566406)	3e-18
pGR 63	244	CA854298	<i>Oryza sativa</i> putative peptide transport protein (AAG21906)	0.0
pGR 65	225	CA854299	<i>Triticum aestivum</i> vacuolar targeting receptor bp-80 protein (AF161719)	7e-34
pGR 67	391	CA854300	<i>Arabidopsis thaliana</i> chalcone-flavonone isomerase (BAB09970)	4e-22
pGR 69	417	CA854301	<i>Oryza sativa</i> ubiquitin conjugating enzyme (BAB93371)	6e-17
pGR 14	173	AF521983	<i>Triticum aestivum</i> histone H1 (AF107023)	3e-20
pGR 54	314	CA854292	<i>Arabidopsis thaliana</i> histone H3.3 (NP_195713)	4e-37
pGR 43	415	AF522013	<i>Oryza sativa</i> Chloroplast 50 S ribosomal protein L22 (NP_039425)	6e-70
pGR 61	318	CA854296	<i>Oryza sativa</i> putative 60 S ribosomal protein L5 (P49625)	1e-12
pGR 56	422	CA854293	<i>Oryza sativa</i> WD-repeat protein RBAP1 (BAB39413)	9e-10

别具有 94% 及 90% 的同源性. 这类蛋白质是一些真菌毒素的特异性结合位点, 在感染维多利亚枯萎病的燕麦中, 病原真菌 *Cochliobolus victoriae* 分泌一种宿主特异的维多利长蠕孢霉毒素, 其作用的靶蛋白就是该酶<sup>[14]</sup>.

真核生物中有两种类型的甲硫氨酸氨肽酶基因 (methionine aminopeptidase, MetAP) —— MetAP1、MetAP2, pGR 32 与拟南芥中可能的甲硫氨酸氨肽酶基因 1 (methionine aminopeptidase 1, MetAP1) 具有 69% 的同源性, 这类酶广泛存在于原核生物及真核生物中, 其功能是切除新合成蛋白质的起始甲硫氨酸, 而真菌毒素——烟曲霉素 (fumagillin) 可以抑制这些酶的活性<sup>[15]</sup>. 在组织培养的不同类型人类细胞中, 加入烟曲霉素可以诱导 MetAP2 的上调表达, 不过 MetAP1 的表达并不受影响<sup>[16]</sup>, 因此本试验中 pGR 32 在接种稻瘟病菌后表达上调的原因还有待进一步分析.

pGR 53 与拟南芥中乙烯应答蛋白 (ethylene-responsive protein) 的氨基酸序列具有 31% 的同源性, 并且有细菌 USP (universe stress protein) 蛋白基因家族的序列保守性. 乙烯应答蛋白是一种转录调控因子, 在受伤的马铃薯植株及线虫侵染的大豆中都可以检测到这类蛋白质的表达量迅速升高<sup>[17]</sup>. 而 USP 蛋白与细菌抵抗逆境胁迫密切相关<sup>[18]</sup>.

pGR 63 与水稻肽转运蛋白 (peptide transport protein) 基因有 89% 的氨基酸序列一致性, 具有 POT (proton-dependent oligopeptide transport) 家族氨基酸序列保守性, 这类蛋白质主要参与寡肽向细胞内的转运, 其中包括对植物有害的肽类毒植物素 (peptide phytotoxin) 的细胞内转运<sup>[19]</sup>.

pGR 65 与小麦中的液泡靶向受体蛋白 (vacuolar sorting receptor) BP-80 的氨基酸序列具有 82% 的同源性, 植物细胞中的 BP-80 与高尔基体中蛋白质的运输以及液泡中蛋白质的积累有关. Miller 等<sup>[20]</sup>通过实验证明, 一种烟草 6-KD 蛋白酶抑制剂在液泡中的积累与 BP-80 蛋白相关. 而蛋白酶抑制剂在植物抗虫过程中起着重要作用.

pGR 67 与拟南芥的查尔酮-黄酮异构酶基因具有 70% 的氨基酸序列同源性, 该酶是植物中黄酮类植保素合成的关键酶之一<sup>[21]</sup>, 而植保素具有抑制病原菌生长的功能.

pGR 69 与水稻泛醌连接酶基因具有 98% 的同源性, 该酶与细胞中蛋白质的降解相关, 目前已知这类蛋白质与植物抵抗病菌的侵染有关<sup>[22]</sup>.

此外, pGR 14 与 pGR 54 也属于第二类 cDNA 克隆, 其中 pGR 14 与普通小麦的组蛋白基因 H1 的氨基酸序列具有 79% 的同源性. 而 pGR 54, 用与它同源的 EST 序列 BI805307 进行 BLAST X 分析时发现, 它所编码的 89 个氨基酸序列与拟南芥组蛋白基因 H3.3 的氨基酸序列有 88 个完全一致. 从目前已有的研究报道来看, 组蛋白基因在 DNA 复制活跃的组织中表达量较高, 而在低温、干旱、盐胁迫及机械创伤等逆境胁迫条件下表达受阻<sup>[23]</sup>. 本试验通过 ODD 分析以及反式 RNA 印迹却检测到 pGR 14 和 pGR 54 在接种稻瘟病菌孢子后表达量上调, 其意义有待进一步分析.

属于第三种类型的 3 个 cDNA 克隆中 pGR 43、pGR 61 分别与水稻核糖体蛋白基因 L22、L5 的氨基酸序列具有 99% 及 97% 的同源性, 通常认为核糖体蛋白基因的表达特点是组成型的, 但本实验中却检测到它们在接种稻瘟病菌孢子后上调表达, 因此有待于进一步证实.

pGR 56 与水稻 RBAP1 蛋白基因具有 82% 的氨基酸序列一致性, 玉米中 RBAP 蛋白可以与组蛋白脱乙酰化酶结合, 同时也可以与乙酰化的组蛋白 H3、H4 结合. 目前已知这类基因与真核生物中染色质组装、基因的转录调控以及细胞分化等相关, 而且具有组织特异性表达的特点<sup>[24, 25]</sup>. 例如, 在玉米胚乳开始形成时, 可以检测到 RBAP 基因的高水平表达, 但目前还不清楚这类基因与逆境胁迫或植物抗病过程的相关性.

### 2.3 ODD 阳性克隆的 RNA 印迹分析

分别选择属于第一类未知功能的 cDNA 克隆 pGR 13 和 pGR 40, 以及属于第二类与逆境胁迫相关的 cDNA 克隆 pGR 53、pGR 54 和 pGR 67, 进行接种稻瘟病菌后的 RNA 印迹分析, 结果发现, 这些克隆在接种后均有表达变化 (图 3).

其中, 第一类 cDNA 克隆中, pGR 13 在高抗材料中接种稻瘟病菌后 12 h 及 72 h 出现两个表达增强的高峰, 在感病材料中的表达变化很小, 而在中抗材料粤香占中, 该基因在接种前就具有较高的表达水平, 在接种后 5 h、48 h 表达分别受到抑制, 而在 12 ~ 24 h 以及 72 h 时表达强度恢复到接种前水平甚至略高. 不过用 GAPDH 作为内部参照杂交时发现, 在中抗材料粤香占中, 接种前以及接种后 72 h 两组的总 RNA 含量本身似乎偏高, 影响了结果的分析.

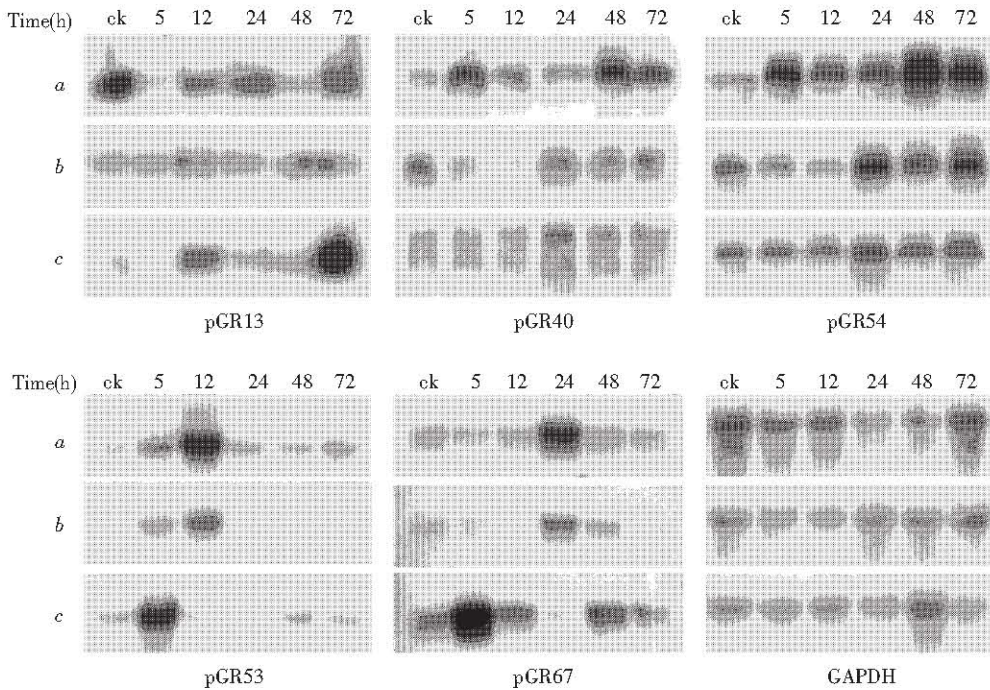
pGR 40 在中抗材料接种稻瘟病菌后 5 h 表达

量出现增强, 随后略有降低, 到接种后 48 ~ 72 h 时达到最强. 有趣的是 pGR 40 的转录物在抗病材料中似乎出现多种 RNA 分子形态, 但从 GAPDH 的杂交结果来看, RNA 样品并未出现明显的降解.

属于第二种类型的 cDNA 克隆中, pGR 54, 在抗病与感病材料中的表现相似, 接种稻瘟病菌后 24 h 表达量出现增强, 并且持续到接种后 72 h, 而在中抗稻瘟病的粤香占中, 在接种后 5 h 就出现了表达量的升高, 随后略有降低, 到接种后 48 ~ 72 h 时达到最强.

pGR 53 在高抗材料中, 接种稻瘟病菌后 5 h 即可检测到表达量的上升, 而在中抗及感病材料中, pGR 53 的表达增强出现在接种后 12 h, 该克隆表达的时间先后与材料的抗病性具有正相关的特点.

而 pGR 67 在接种稻瘟病菌孢子后 5 h, 高抗材料中的表达达到最强, 在中抗以及感病材料中, 该克隆在接种后 24 h 表达量才达到最强, 因此, 该克隆的表达时间先后也与材料的抗病性呈现出正相关的关系.



**Fig. 3 Northern blot**

a: rice cultivar Yuexiangzhan moderately resistant to *M. grisea*; b: Bianyiyuexiangzhan susceptible line which susceptible to *M. grisea*; c: Bianyiyuexiangzhan resistant line which highly resistant to *M. grisea*.

### 3 讨 论

本文采用 ODD 技术并且辅助以反式 RNA 印迹, 筛选受稻瘟病菌诱导表达的水稻 cDNA 片段, 共获得了 37 个克隆, 其中 4 个克隆为新发现的水稻 cDNA, 13 个克隆与 GenBank 数据库中未知基因功能的 cDNA 同源, 它们有可能是稻瘟病菌诱导表达的一些新基因, 其中有趣的是 pGR 40 在抗病材料中比中抗以及感病材料显示出有更多类型的转录产物. 这些未知功能基因与植株的抗病表型有何联系我们将作进一步的研究.

其他与已知基因同源的 cDNA 克隆中多数属于

与逆境胁迫相关的基因, 少数与具有重要功能但与逆境胁迫的关系还未知的基因同源. 由于 pGR53、pGR67 在抗病材料、中抗稻瘟病材料以及感病材料接种稻瘟病菌后上调表达的时间先后与材料的抗病水平表现出明显的正相关, 说明它们可能在植物的抗病过程中扮演着重要的角色. 参考克隆片段的同源性分析结果推测, pGR 3、pGR 67 可能与直接抑制病原菌的生长相关, pGR 1 起到清除真菌毒素, 减轻病害程度的作用, pGR 3、pGR 53 可能分别作为一种抗病信号或传递抗病信号, 激活其他的防卫反应基因的表达, 而其他克隆可能参与调节宿主的生理状态, 使之更适合于植物抵抗病原菌的

侵染。

从试验技术方面来看, ODD 技术需要的 RNA 量少, 可以同时比较多个样本, 而且还可以用来分析不同样本间只有表达量差异的基因。与 DDRT-PCR 相比<sup>[26]</sup>, 由于 ODD 技术采用接头锚定引物替代了 DDRT-PCR 技术中的随机引物, 因此 PCR 扩增的稳定性较好, 所筛出的克隆阳性率较高。而与 cDNA-AFLP 技术相比<sup>[27]</sup>, 由于 ODD 技术只要求所检测的每种 cDNA 含有一个相同的限制性内切酶识别位点, 因此, 漏检 cDNA 的风险比 cDNA-AFLP 相对较低。

但该技术也有 DDRT-PCR 以及 cDNA-AFLP 技术一样的不足——所获得的 cDNA 片段较短, 直接用来分析相应的同源蛋白质序列时往往较为困难。不过, 随着水稻基因组序列测定及数据库中大量 EST 序列的积累, 可以通过电子克隆的方式对数据库中的 EST 进行基因拼接或利用同源的基因组序列进行基因预测, 因而大大弥补了该技术的不足。

由于反式 RNA 印迹检测的敏感性受到目标基因在探针混合物中丰度的影响, 本研究中大约有 50% 的克隆没有杂交信号, 可能与相应基因的表达量低有关。另外, 本试验用于 ODD 以及反式 RNA 印迹分析的总 RNA 是接种后各时段的混合物, 可能会使样本中一部分诱导表达的转录物被稀释而产生假阴性结果。因此, 该技术可进一步优化, 如制备用于探针标记的 cDNA 时, 可采用 mRNA 替代总 RNA 以提高目标基因的丰度, 同时, 单独使用接种后各时间段的 RNA 样品进行 ODD 分析以及反式 RNA 印迹筛选, 都有可能进一步提高试验效率, 获得更多的阳性克隆。

材料方面, 本试验采用了遗传背景相近、但分别具有不同的稻瘟病抗性水平的三个水稻材料, RNA 印迹分析结果表明, 该材料体系可以有效地区别候选克隆的表达类型, 从而有利于挑选克隆用于下一步基因功能分析与验证。

### 参 考 文 献

- 1 Matz M, Usman N, Shagin D, *et al.* Ordered differential display: a simple method for systematic comparison of gene expression profiles. *Nucleic Acid Res*, 1997, **25** (12): 2541 ~ 2542
- 2 林红, 范芝兰, 尹艳, 等. 野生稻全 DNA 快速导入栽培稻获得新株系研究. 见: 中国农学会, 等. 21 世纪水稻遗传育种展望——水稻遗传育种国际学术讨论会文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. 233 ~ 238
- Lin H, Fan Z, Ying Y, *et al.* Two transgenic rice plants produced by simplify processes uptake wild rice DNA into rice. In: China Association of Agricultural Science Societies, *et al.* Prospects of

- Rice Genetics and Breeding for the 21st Century——Paper Collection of International Rice Genetics and Breeding Symposium. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 1999. 233 ~ 238
- 3 Puissant C, Houdebine L M. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques*, 1990, **8** (2): 148 ~ 149
- 4 Matz M, Shagin D, Bogdanova E, *et al.* Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (6): 1558 ~ 1560
- 5 Panaou O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, **252** (5): 597 ~ 607
- 6 Chung C T, Niemela S L, Miller R H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (7): 2172 ~ 2175
- 7 Diener A C, Gaxiola R A, Fink G R. Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxin. *Plant Cell*, 2001, **13** (7): 1625 ~ 1637
- 8 Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, **48**: 251 ~ 275
- 9 Motohashi K, Watanabe Y, Yohda M, *et al.* Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaKJ-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (13): 7184 ~ 7189
- 10 Hamilton C A, Good A G, Taylor G J. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by Aluminum in an Aluminum-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiol*, 2001, **125** (4): 2068 ~ 2077
- 11 Schaller A, Oecking C. Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell*, 1999, **11** (2): 263 ~ 272
- 12 Jasinski M, Ducos E, Martinoia E, *et al.* The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, **131** (3): 1169 ~ 1177
- 13 Bisehoff F, Molendijk A, Rajendrakumar C S, *et al.* GTP-binding proteins in plants. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55** (2): 233 ~ 256
- 14 Navarre DA, Wolpert T J. Inhibition of the glycine decarboxylase multienzyme complex by the host-selective toxin victorin. *Plant Cell*, 1995, **7** (4): 463 ~ 471
- 15 Lowther W T, McMillen D A, Orville A M, *et al.* The anti-angiogenic agent fumagillin covalently modifies a conserved active-site histidine in the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (21): 12153 ~ 12157
- 16 Wang J, Lou P, Henkin J. Selective inhibition of endothelial cell proliferation by fumagillin is not due to differential expression of methionine aminopeptidases. *J Cell Biochem*, 2000, **77** (3): 465 ~ 473
- 17 Ohme-Takagi M, Suzuki K, Shinshi H. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol*, 2000, **41** (11): 1187 ~ 1192
- 18 Gustavsson N, Diez A, Nystrom T. The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and cooperate in the defense against DNA damage. *Mol Microbiol*, 2002, **43** (1): 107 ~ 117
- 19 Stacey G, Koh S, Granger C, *et al.* Peptide transport in plants. *Trends in Plant Science*, 2002, **7** (6): 257 ~ 263
- 20 Miller E A, Lee M C, Anderson M A. Identification and characterization of a prevacuolar compartment in stigmas of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell*, 1999, **11** (8): 1499 ~ 1508

- 21 Dixon R A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 2001, **411** (6839): 843 ~ 847
- 22 Devoto A, Muskett P R, Shirasu K. Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, **6** (4): 307 ~ 311
- 23 Steward N, Kusano T, Sano H. Expression of *ZmMET1*, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (17): 3250 ~ 3259
- 24 Rossi V, Varotto S, Locatelli S, *et al.* The maize WD-repeat gene *ZmRbAp1* encodes a member of the MSI/RbAp sub-family and is differentially expressed during endosperm development. *Mol Genet Genomics*, 2001, **265** (4): 576 ~ 584
- 25 Rossi V, Locatelli S, Lanzaova C, *et al.* A maize histone deacetylase and retinoblastoma-related protein physically interact and cooperate in repressing gene transcription. *Plant Mol Biol*, 2003, **51** (3): 401 ~ 413
- 26 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (5072): 967 ~ 971
- 27 Durrant W E, Rowland O, Piedras P, *et al.* cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression gene expression profiles. *Plant Cell*, 2000, **12** (6): 963 ~ 977

## Application of Ordered Differential Display to Isolate Rice cDNAs Induced by *Magnaporthe grisea* \*

LUO Wen-Yong<sup>1,2)</sup>, LI Xiao-Fang<sup>2)</sup>, HU Jun<sup>1)</sup>, LIU Wen-Hua<sup>1)</sup>, XIAO Xin<sup>2)</sup>, LIU Liang-Shi<sup>1)</sup>\*\*

<sup>(1)</sup> The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

<sup>(2)</sup> The Key Laboratory of Rice Genetic Improvement of Ministry of Agriculture and Guangdong Key Laboratory of New Technology in Rice Breeding, Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China) \*\*\*

**Abstract** Ordered differential display (ODD) was used to clone differentially expressed genes in rice induced by *Magnaporthe grisea*. Of 37 cDNA clones initially identified by reverse Northern blot, 5 clones were chosen as probes for further Northern test. The result showed that all of these 5 clones were expressed both in highly, moderately resistant and susceptible rice lines in a pathogen inducible manner. According to the homology analysis, these clones were suggested to be involved in plant defense response by: (1) inhibiting growth of fungus and even causing its death; (2) excluding toxic compounds delivered by fungus; (3) priming signal transduction; (4) and/or regulating metabolic activities in agreement with plant defense.

**Key words** ODD, *Oryza sativa*, *Magnaporthe grisea*, cDNA gene

\* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30040025) and Scientific Technology Research Fund of Guangdong Province (99M01503G).

\*\* Corresponding author. \*\*\* Both institutes contributed equally to this work.

Tel: 86-20-84112392, Fax: 86-20-84036215, E-mail: ls10@zsu.edu.cn

Received: January 14, 2004 Accepted: February 5, 2004