

根瘤菌 87-1-1 诱导刺槐根表皮传递细胞特异性表达的 cDNA 文库构建及序列分析

赵银娟, 孙敦平, 韩素芬, 吴小芹

(南方现代林业协同创新中心, 南京林业大学林学院, 江苏省有害生物入侵与控制重点实验室, 江苏 南京 210037)

[摘要] 探寻根瘤菌诱导刺槐后根表皮细胞分化成传递细胞的特异性表达基因及其分子机制. 采用抑制差减杂交(suppression subtraction hybridization, SSH)技术构建刺槐根系被接种根瘤菌和未被接种根瘤菌二者间的正反两个 cDNA 文库. 各挑选正反文库中 500 个克隆进行测序, 在 Blastn、Blastp、SwissProt、KEGG、COG、Interpro 以及 Gene ontology (GO) 数据库中进行比对注释. 结合生理过程对 ESTs 进行分析, 共获得 725 条非冗余序列 (uniEST), 正反向文库分别为 385 条和 340 条, 其中包括 674 个单一序列 (singlets), 51 个拼接序列 (contigs). 在 Nt 库比对中有 674 条 uniESTs 与已知基因匹配, 占比 93%; 在 Nr 库比对中有 648 条序列有匹配蛋白, 占比 89%. 有正向文库 213 个 uniESTs 和反向文库 156 个 uniESTs 能进行 Geney ontology (GO) 功能注释, 在细胞组分被注释了 270 次, 分子功能被注释了 448 次, 生物过程被注释了 484 次. uniESTs 的功能分析显示, 正向文库中多与细胞翻译后修饰、转录因子、细胞信号通路、细胞壁/细胞膜/内膜系统以及细胞骨架相关蛋白有关, 部分是结瘤相关基因. 而反向文库中与细胞生长、代谢物形成的基因相关较多, 这与根瘤菌处理刺槐后的生理过程一致. 在根瘤菌诱导的刺槐根组织文库中发现特异性基因如 MYB 类转录因子、囊泡相关膜蛋白等与传递细胞相关的基因, 结果有助于进一步研究此类传递细胞的形成分化机制.

[关键词] 根瘤菌, 刺槐, 传递细胞, SSH, 功能分析

[中图分类号] S718 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2014)04-0076-07

cDNA Library Construction and Analysis of Differentially Expressed in Roots of *Robinia pseudoacacia* Induced by *Rhizobium* 87-1-1

Zhao Yinjuan, Sun Dunping, Han Sufen, Wu Xiaoqin

(Southern China Collaborative Innovation Center of Sustainable Forestry, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of Invasion Species, Nanjing 210037, China)

Abstract: To find special genes in transfer cells of Locust which was differentiated from root epidemic cells induced by rhizobium, a forward and reverse suppression subtraction hybridization (SSH) cDNA library were constructed successfully. Using cDNA from the roots of *Robinia pseudoacacia* induced by rhizobium as the tester and cDNA from roots of Locust untreated as driver separately, suppression subtraction hybridization libraries was constructed. 500 colonies in both libraries were isolated and sequenced. Functions of ESTs were analyzed by blast in NCBI including database Nt, Nr, Swissprot, COG, Interpro and GO after removing repeat and redundancy sequences. 725 uniESTs including 385 uniESTs in forward library and 340 uniESTs in reverse library were obtained. The assembling provided a total of 51 contigs and 674 singletons by cluster analyses of the uniESTs. Nucleotide homology searched with Blastn in NCBI non-redundant nucleotide database and 674 uniESTs (93% of total uniESTs) were homologous with known genes. Protein homology searched with Blastx in NCBI non-redundant protein database and 648 uinESTs (89% of total uniESTs) were homologous with known proteins. The results of gene ontology (GO) annotation showed that 369 uinESTs were involved in biological process with 270 times, molecular function with 448 times and cell component with 484 times respectively. Among these ESTs, putative proteins were related to posttranslational modification, transcription factors, cell signals, cell wall/cell

收稿日期: 2014-03-26.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31100448)、高校博士点基金(2113204120004)、江苏省博士后基金.

通讯联系人: 吴小芹, 博导, 教授, 研究方向: 森林保护及森林有益微生物的研究. E-mail: xqwu@njfu.edu.cn

membrane/endomembrane system, cytoskeleton and nodulin genes in positive library, and related to growth and metabolites biosynthesis in reverse library. These results were generally consistent with physiological processes when the *Robinia pseudoacacia* were induced by rhizobium. Such as MYB transcription factor, Vesicle-associated membrane protein could be found in positive library which might be special expression in the transfer cells to aid the understanding of development of transfer cells.

Key words: Rhizobium, *Robinia pseudoacacia*, transfer cells, SSH, function analysis

根瘤菌是一类生活在土壤内的革兰氏阴性杆状细菌,能侵染豆科植物并与之进行共生结瘤固氮,是已知固氮能力最强的生物固氮体系之一,也是生物研究的热点之一^[1]. 刺槐(*Robinia pseudoacacia*)为豆科刺槐属(*Robinia*)的代表性树种,其生态适应性强,是水土保持、荒山绿化的重要造林树种. 刺槐具有生物固氮功能. 据报道每公顷刺槐林分每年有 50 kg 氮进入氮素循环,比其他树种的林分高出 1 倍^[2].

传递细胞是一类具有细胞壁内突特殊结构的细胞,在具迅速侧向运动溶质的组织中最发达,可传递代谢物质^[3-5]. 在很多组织,尤其是生殖细胞,如玉米胚乳中传递细胞被广泛报导^[6-8],1996 年韩素芬等在研究根瘤菌与刺槐的固氮体系时,用透射电镜观察到接种根瘤菌的刺槐根表皮细胞分化成了传递细胞. 这在木本植物中为首次发现^[9]. 林树燕等又对刺槐根瘤形成过程中传递细胞的超微结构、分布和可能的功能等方面进行了研究^[10-13]. 但目前关于传递细胞在根瘤菌与刺槐互作的固氮体系中可能存在的作用,以及引起此类传递细胞发育分化的分子机制并不清楚. 为此,本研究通过构建根瘤菌与刺槐互作和未接菌刺槐间的抑制差减文库(SSH),以期从中筛选出此类传递细胞中的特异性表达基因,为研究根瘤菌诱导刺槐根表皮细胞分化成传递细胞的分子机制奠定基础.

1 材料与方法

1.1 供试材料

刺槐种子(6 号家系),由山东林业科学研究所提供. 菌种,从刺槐根瘤分离获得的根瘤菌株 87-1-1. 刺槐种子经 75% 的酒精处理和 0.1 % 的升汞表面消毒后,于 70 °C ~ 80 °C 温水中浸种,待种子吸胀后移入铺有吸水滤纸的培养皿中,于 30 °C 温箱中催芽. 待胚根长至 2 cm ~ 3 cm 时浸根接菌,然后移到盛有 NF 培养液的培养瓶中,置于 25 °C 培养室中每日 14 h 光照培养. 取处理的刺槐根部作为样品,未处理的作为对照.

1.2 刺槐根组织 mRNA 的分离和提取

分别选用与根瘤菌互作 3 d 使刺槐根毛卷曲的刺槐根和未接菌刺槐根进行总 RNA 的提取. 总 RNA 的提取使用 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂盒. mRNA 的分离、纯化使用 FastTrack® MAG mRNA isolation Kit,纯化后检测 mRNA 样品的浓度及纯度. 用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,紫外分光光度计法测定 OD 值,换算其浓度和纯度.

1.3 刺槐与根瘤菌互作前后 SSH cDNA 文库的构建

1.3.1 抑制差减杂交

首先将分离、纯化后的 mRNA 进行反转录,使用 Invitrogen 公司的 SuperScript III First-Strand Synthesis System 和 SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis Kit 进行. 得到双链 cDNA,用 *Rsa* I 对双链 cDNA 进行酶切,分别以获得的 cDNA 互为 tester 和 driver,在 tester 两端加上 adapter 1 和 adapter 2R,构建双向差减文库,进行 2 次消减和 2 次 PCR 扩增,富集差异表达基因.

Adaptor 1 Sequence: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3',
3'-GGCCCGTCCA-5';

Adaptor 2R Sequence: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3',
3'-GCCGGCTCCA-5';

PCR Primer 1 Sequence: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3';

Nest PCR primer 1 Sequence: 5'-TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT-3';

Nest PCR primer 2R Sequence: 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'.

1.3.2 cDNA 文库的构建及阳性克隆的筛选

两次扩增产物用 Invitrogen 公司 PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit 进行纯

化,与 pMD18-T 载体连接,转化感受态细胞 DH5 α ,在 Amp 抗性平板上鉴定阳性克隆. 估算库容量,并随机挑取 24 个单克隆采用巢式 PCR 引物进行菌落 PCR 鉴定.

1.4 差异表达基因的测序及序列分析

1.4.1 序列前处理和聚类拼接

将测序后的数据进行前处理. 首先利用 cross_match 屏蔽序列中的载体序列,利用 perlchimeric_Check.pl 软件去除嵌合(chimeric)的克隆序列,用 blast 的方法去除序列中的污染序列,如大肠杆菌等. 利用软件 repeatmasker 屏蔽序列中的重复序列. 去除序列中的 polyA (软件: PolyA_Check.pl), 去除过短序列后(<100 bp)得到了干净高质量的 EST 数据集, phrap 软件进行聚类 and 拼接, 或 <http://www.phrap.org/phredphrap/phrap.html>.

1.4.2 序列分析

将所有序列在 NCBI 上进行 BLASTn 和 BLASTp/(BLASTx) 同源性比对. 通过在 NCBI Nt 数据库、Nr 数据库、SwissProt 数据库、KEGG 数据库(<http://www.expasy.org/sprot/http://www.genome.jp/kegg>)、COG 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>) 的比对,对基因功能进行分类. 同时,利用 interproscan 软件在系统(Gene ontology)下作注解(annotation)与分类(classification). [http://www.ebi.ac.uk/interpro/InterproGO\(GeneOntology\)](http://www.ebi.ac.uk/interpro/InterproGO(GeneOntology)), <http://www.geneontology.org/or> <http://www.ebi.ac.uk/GO/index.html>.

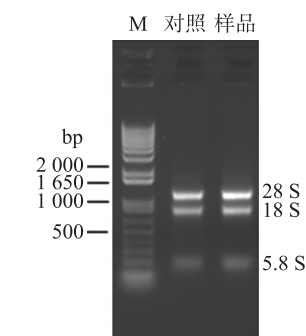
2 结果与分析

2.1 刺槐根组织总 RNA 的提取及 mRNA 的分离纯化

经纯度、浓度检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0, RNA 的质量符合试验标准,1% 琼脂糖凝胶电泳 RNA 的完整性,带形清晰,亮度比值约为 2:1,表明所提 RNA 没有被降解. 纯化的 mRNA 呈均匀弥散状,说明 mRNA 的质量较好,可以用于构建消减文库.

2.2 cDNA 酶切连接及抑制性 PCR

分离和纯化的 mRNA 利用反转录酶合成 cDNA 后用 *Rsa* I 酶切,电泳结果显示,cDNA 合成效果较好,未酶切过的 cDNA 其拖带最亮部分的范围在较大的分子量范围内(0.5 kb~3 kb). 经过 *Rsa* I 酶切后的 cDNA 片段明显减小,在 0.1 kb~2 kb 的范围内,大小分布合理,酶切较为充分(图 2). 将加上了 Adaptor 1 和 Adaptor 2R 的 Tester cDNA 连接产物及 *Rsa* I -digested Driver cDNA 分别进行两次差减杂交,将消减后与未消减的 cDNA 进行两轮 PCR 扩增,如图 3 所示,消减的 cDNA 和未消减的 cDNA 条带弥散程度差距较大,证明消减的效果较好.



对照:未处理过的刺槐根部组织;
样品:根瘤菌诱导的刺槐根部组织

图 1 总 RNA 凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA

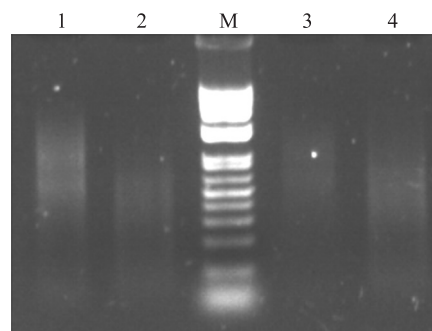


图 2 cDNA 及 *Rsa* I 酶切电泳图

1:样品 cDNA;2:样品 cDNA 酶切后;3:对照 cDNA;4:对照 cDNA 酶切后;
M:1 kb DNA 分子量标准

Fig. 2 Electrophoresis of cDNA and cDNA of *Rsa* I digested

1:Sample cDNA,2:Sample cDNA digested by *Rsa* I,3:Control cDNA,4:Control cDNA digested by *Rsa* I,M:1kb plus DNA ladder

2.3 刺槐与根瘤菌互作前后 SSH 文库的 PCR 鉴定

第二次 PCR 产物经纯化后,克隆到 pMD18-T 载体中,构建刺槐 SSH 文库. 以巢式 PCR 引物对随机挑选的 24 个克隆进行菌落 PCR 鉴定,电泳检测结果显示,插入片段呈随机分布,长度集中在 250 bp~1 000

bp 之间,平均大小为 500 bp 左右.图 4 显示部分克隆的 PCR 电泳结果.

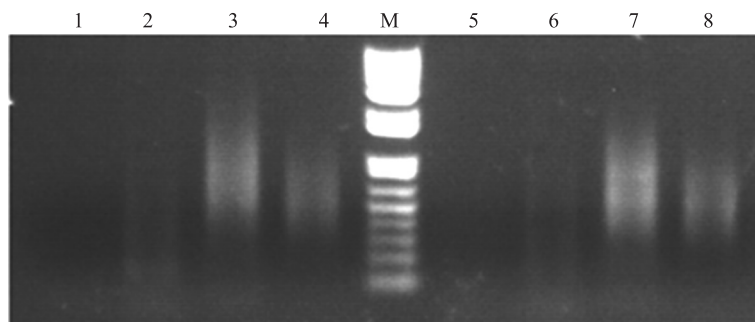


图 3 抑制消减效果的凝胶电泳图

1:正向消减后第一轮 PCR;2:正向消减后第二轮 PCR;3:正向未消减第一轮 PCR;4:正向未消减第二轮 PCR;5:反向消减后第一轮 PCR;6:反向消减后第二轮 PCR;7:反向未消减第一轮 PCR;8:反向未消减第二轮 PCR;M:1 kb DNA 分子量标准

Fig.3 Electrophoresis of cDNA after suppression subtractive

1:The first round PCR of forward suppression subtractive,2:The second round PCR of forward suppression subtractive,3:The first round PCR of forward nonsuppression subtractive cDNA,4:The second round PCR of forward nonsuppression subtractive,5:The first round PCR of reverse suppression subtractive,6:The second round PCR of reverse suppression subtractive,7:The first round PCR of reverse nonsuppression subtractive,8:The second round PCR of reverse nonsuppression subtractive,M:1 kb plus DNA ladder

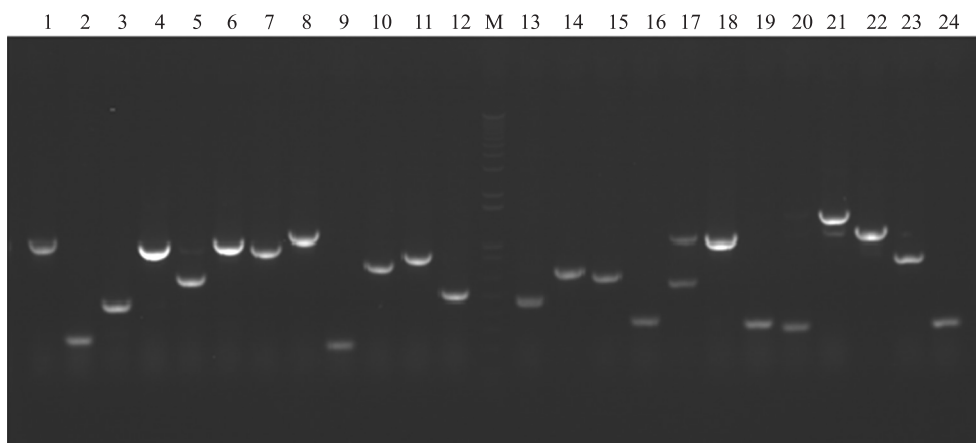


图 4 差减文库中部分克隆的菌落 PCR 检测电泳图

1-24 为随机挑选的克隆

Fig.4 Colony PCR identification of inserted fragments in subtractive cDNA

1-24 are the colonies selected randomly

2.4 EST 序列分析功能分类

在正向与反向两个差减文库中分别挑取 500 个阳性克隆进行测序,除去低质量与冗余序列后,正反向文库分别获得 491 条和 497 条高质量 ESTs 序列,所得 ESTs 核苷酸长度分布在 121 bp ~ 1 190 bp 之间,以 200 bp ~ 800 bp 居多,正向文库 ESTs 平均长度 641 bp,反向文库 ESTs 平均长度 642 bp.将得到的 ESTs 进行拼接和聚类分析共得到 725 条非冗余序列(uniEST),其中包括 674 个单一序列(singlets),51 个拼接序列(contigs),uniESTs 在正向文库中平均长度 448 bp,反向文库中平均长度 442 bp(表 1).将正向文库 361 条、反向文库 313 条共计 674 条 ESTs 序列在 Blastn、Blastp、SwissProt、KEGG、COG、Interpro 以及 Gene ontology(GO)数据库中进行比较注释,结果见表 1.

文库 ESTs 分析结果显示,多数序列在数据库中比对有匹配序列.另外,Getorf 软件预测显示,648 条 uniESTs 具有开放阅读框(open reading frames,ORF).选择 GO 系统对 725 个 uniESTs 进行功能注释和分类,其中正向文库 213 个 uniESTs 和反向文库 156 个 uniESTs 进行功能注释,从细胞组分、分子功能和生物过程 3 个层面确定 EST 的分子功能(图 5,图 6).正向文库 213 个 uniESTs 在细胞组分被注释了 178 次,分子功能被注释了 248 次,生物过程被注释了 272 次;反向文库 156 个 uniESTs 在细胞组分被注释了 92 次,分子功能被注释了 200 次,生物过程被注释了 212 次.

表 1 ESTs 在各数据库中的注释结果
Table 1 ESTs annotated in databases

数据库	正向文库		反向文库	
	注释数	百分比/%	注释数	百分比/%
Nt	361	93.8	313	92.1
Nr	346	89.9	302	88.8
Swissprot	246	63.9	204	60
COG	126	32.7	106	31/2
Kegg	329	85.5	282	82.9
Interpro	250	64.9	193	56.8
GO	213	55.3	156	45.9

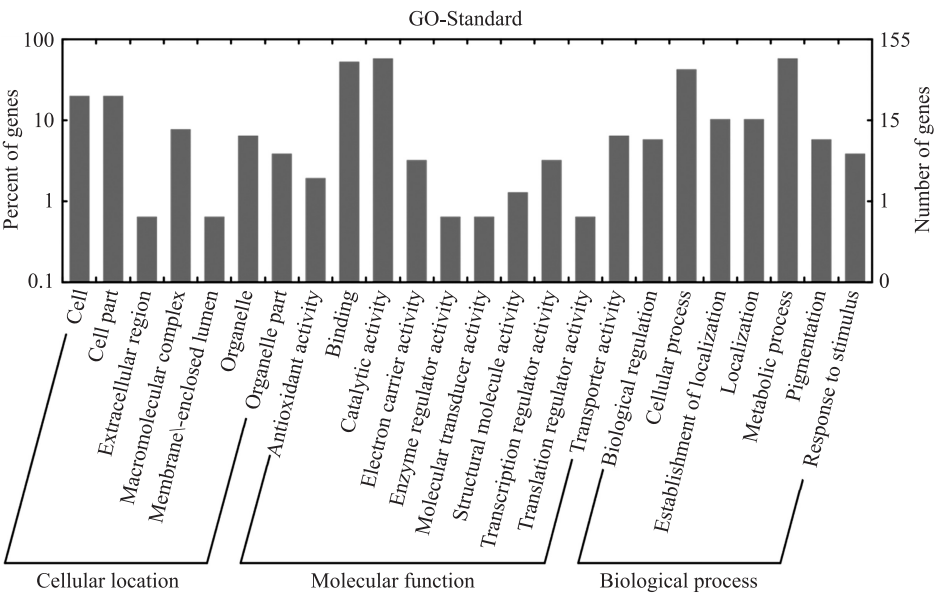


图 5 正向文库 uniESTs 功能注释和分类统计

Fig.5 Classification and annotated function of uniESTs in forward library

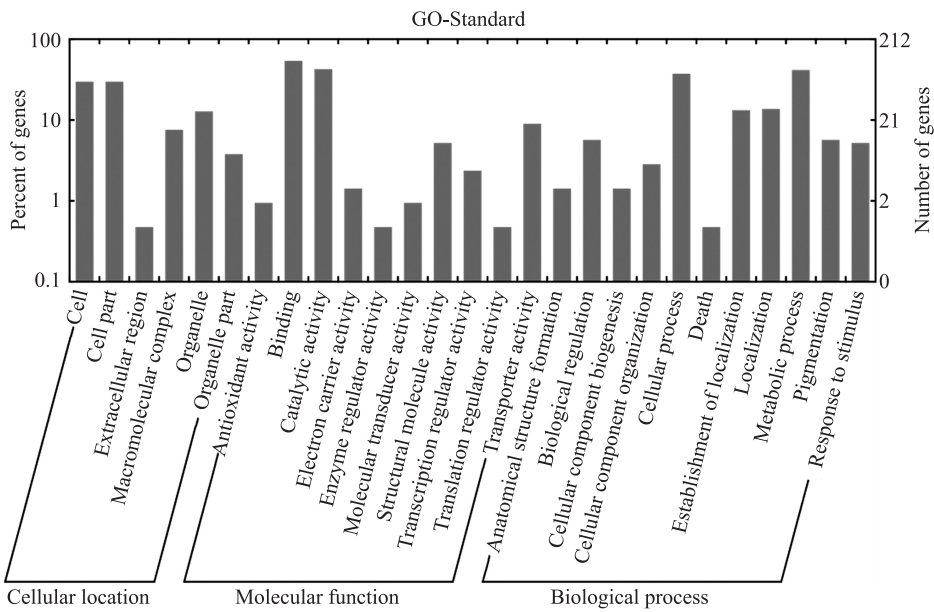


图 6 反向文库 uniESTs 功能注释和分类统计

Fig.6 Classification and annotated function of uniESTs in reverse library

对注释的功能基因分析发现,根瘤菌与刺槐互作后,刺槐根部根毛卷曲,由此构建的正向文库与其反向文库相比,所转录表达的基因有很大不同,正向文库中多与细胞翻译后修饰、转录因子、细胞信号通路、

细胞壁/细胞膜/内膜系统以及细胞骨架相关蛋白有关,有一些是结瘤相关基因.而反向文库中与细胞生长、代谢物形成的基因有关较多,特别值得注意的是,在正向文库中,大豆结瘤蛋白被注释了很多次,这与根瘤菌诱导刺槐后,根毛卷曲等与固氮结瘤的生理过程是一致的.而 MYB 等转录因子也被注释了很多次(表 2),这说明刺槐被根瘤菌诱导后根表皮细胞产生传递细胞的分化过程中,很多转录调控的行为发挥了很大的作用.另外,一些囊泡相关膜蛋白、液泡膜内在蛋白等与内膜相关蛋白也在正向文库中被分离出,由此说明文库构建是成功的.

3 讨论

根瘤菌与豆科植物间的共生固氮机理一直以来都是生物学领域研究的热点,尽管在其分子机理方面也研究较多.然而,根瘤菌诱导刺槐后,不仅能引起结瘤等的生理过程发生,最初表现为根毛的卷曲,还能引发根表皮细胞发育分化成传递细胞^[9].而这类传递细胞发生的分子机制研究未见报道.

本试验在上述基础上,成功构建了刺槐与根瘤菌互作前后根组织的双向抑制差减文库(SSH).ESTs 序列的功能分析显示,正向文库中多与细胞翻译后修饰、转录因子、细胞信号通路、细胞壁/细胞膜/内膜系统、细胞骨架相关蛋白及结瘤素基因有关.而反向文库中较多与细胞生长、代谢物形成的基因有关.大豆结瘤素基因在正向文库中出现而没有在反向文库中被分离到,说明根瘤菌诱导刺槐引起了刺槐结瘤方面的基因表达,这一生理过程与我们观察到根毛的卷曲是一致的.前期的试验证明,在此同时,一定伴随传递细胞的发生,因此,本文构建的文库有助于了解刺槐受根瘤菌诱导后,根表皮细胞中控制传递细胞分化的特异性基因表达的关键因素,对研究传递细胞的分子发生过程具有很好的参考价值.

在传递细胞中,目前研究得较为多的是玉米胚乳细胞中的传递细胞,其中 MRP-1 被鉴定为玉米胚乳细胞分化出的传递细胞中的特异性转录因子,它对形成和维持细胞壁内突等特征性传递细胞结构具有重要作用.Elisa Gomez 等研究表明,MRP-1 是 MYB 家族中的一员,该基因在种子萌发第 3 d 及在整个分化期和维持传递细胞的壁内突结构过程中均有表达;且 MRP-1 还调控了传递细胞的特异性基因如 BETL-1、BETL-3、BETL-9 等的转录和表达,因此,MRP-1 被认为是此类传递细胞中的关键因子^[14-17].而本文构建的差减文库中,MYB 转录因子的功能被多次注释,这也提示这类基因在根瘤菌与刺槐互作后的这类传递细胞中起到了很大的作用,为后期进一步研究提供了很好的佐证和 EST 序列.

同时,传递细胞的一个主要功能即对营养物质的快速传输^[18],这一现象可通过转运酶的上调得以表达.在本文构建的文库中,还分离到多个糖转运蛋白,有助于进一步探索传递细胞的功能.同时,文库中还有很多 ESTs 虽然在 BLASTn 上找到匹配序列,但功能未知,这些基因或许是传递细胞形成的特异性基因序列.因此,对这些基因的研究将有助于进一步从分子水平了解传递细胞的形成和分化.

[参考文献]

- [1] Azhar A Z, Elke S, Christian R R, et al. Homoserine lactones influence the reaction of plants to rhizobia[J]. *Int J Mol Sci*, 2013(14):17 122-17 146.
- [2] 凯莱斯台舍. 刺槐[M]. 王世绩,张敦伦,译. 北京:中国科学技术出版社,1993.
- [3] Gunning B E S, Pate J S. "Transfer cell" plant cells with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutions—their occurrence, structure and development[J]. *Protoplasma*, 1969, 68:107-133.
- [4] Gunning B E S, Pate J S. Cells with wall ingrowth (transfer cells) in the placenta of ferns[J]. *Planta*, 1969, 87:271-274.
- [5] Gunning B E S. Transfer cells and roles in transport of solutes in plant[J]. *Sci Prog*, 1977, 64:539-568.
- [6] Kang B H, Xiong Y Q, Donna S W, et al. Miniature1-encoded cell wall invertase is essential for assembly and function of wall-in-growth in the maize endosperm transfer cell[J]. *Plant Physiology*, 2009, 151:1 366-1 376.
- [7] Jose' F G M, Mauro D P, Anna G, et al. Empty pericarp 4 encodes a mitochondrion-targeted pentatricopeptide repeat protein necessary for seed development and plant growth in maize[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19:196-210.
- [8] Stefan H, Ruth S, Norbert S, et al. Differential vascularization of nematode-induced feeding sites[J]. *PNAS*, 2008, 105(34): 12 617-12 622.
- [9] 韩素芬,黄金生,甘习华,等. 刺槐根瘤发生的超微结构研究[J]. *南京林业大学学报:自然科学版*, 1996, 20(4):17

-20.

- [10] 韩素芬,甘习华,黄金生. 接种根瘤后刺槐根表皮形态和超微结构的变化[J]. 林业科学,1998,34(4):109-110.
- [11] 林树燕,韩素芬. 刺槐根瘤形成过程中根外层传递细胞的功能[J]. 林业科技开发,2003,17(5):20-21.
- [12] 吴均章,韩素芬. 塑料半薄切片法观察豆科植物根表面传递细胞[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2003,27(2):65-68.
- [13] 吴均章,韩素芬,甘习华. 根瘤菌诱导紫云英根表面传递细胞的观察[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2004,28(1):81-83.
- [14] Cristina B, Joaquín R, Carmen G M, et al. The Promoter of ZmMRP-1, a maize transfer cell-specific transcriptional activator, is induced at solute exchange surfaces and responds to transport demands[J]. Planta, 2009, 229: 235-247.
- [15] Elisa G, Joaquín R, Yan G, et al. Establishment of cereal endosperm expression domains: identification and properties of a maize transfer cell-specific transcription factor, ZmMRP[J]. The Plant Cell, 2002, 14: 599-610.
- [16] Nadja B, Claus F, Salome P, et al. A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator[J]. The EMBO Journal, 1994, 22: 5 383-5 392.
- [17] Gregorio H, Serena V, Francesco S, et al. Molecular characterization of BETI, a gene expressed in the endosperm transfer cells of maize[J]. The Plant Cell, 1995, 7: 747-757.
- [18] Offler C E, McCurdy D W, Patrick J W, et al. Transfer cells: cells specialized for a special purpose[J]. Annu Rev Plant Biol, 2003, 54: 431-454.

[责任编辑:黄 敏]