

文章编号 :1003-8701(2005)02-0010-03

野生马蔺中和抗性有关基因片段的分离与初步分析

蔡玉珍¹,刘 丽²,王中伟²,邢少辰²

(1.东南大学化学化工系,南京 210008; 2.吉林省农科院生物技术研究中心,吉林 公主岭 136100)

摘 要:野生植物是宝贵资源,在生物多样性、保护生态环境和遗传育种等众多领域具有重要意义。本研究以马蔺为材料,利用保守区域序列,设计简并引物进行 PCR 扩增,从马蔺当中分离了一些 cDNA 片段,通过比较发现,其中部分片段和抗逆性有关,此结果为今后充分利用丰富的野生植物资源奠定了基础。

关键词:野生植物;马蔺;简并引物;抗逆性

中图分类号:S58;Q78

文献标识码:A

野生植物通过长期的进化、演变,具备了抵御外界恶劣环境的能力,它们的基因组中包含了众多的优异基因,是野生植物基因资源的宝贵财富,也是转基因研究的优良基础。因此,开展野生植物优异基因的研究具有十分重要的意义。马蔺,别名马莲,属于鸢尾科,是一种适应性非常强的野生植物。尤其是它超强的抗逆性特征,如耐干旱和耐盐碱等特点,是分离抗逆性基因的优异材料。马蔺根系发达,可以入土深达 1 m 以上,须根发达,呈伞状分布,固土能力极强,在 pH8.8 的盐碱土上能正常生长^[1]。本研究利用野生马蔺的抗逆性特征,通过设计简并引物,从马蔺当中分离了一些基因片段,通过网上 BLAST 比较,发现其中部分片段和耐干旱基因有同源性,这个结果为今后获得和抗逆性有关的基因全长和转基因研究奠定了基础,并为野生资源的研究和应用提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

野生植物马蔺取于路边瘠薄的土壤中。整株(保持根系完整)用液氮冷冻后放入-80℃超低温冰箱保存备用。

1.2 引物的设计

大量的研究表明,植物在受到干旱胁迫时会产生应答因子,称为干旱应答因子(DRE),而这些蛋白的序列中有非常保守的区域称为 AP2 区。在许多植物中均存在这样的保守区域^[2]。通过比较 17 个不同植物中的耐干旱、耐盐碱基因序列,找出其保守的区域,然后根据保守区域设计简并引物,作为 PCR 扩增的 5' 端上游引物,而下游采用 16nt 的 Oligod(T)作为 3' 端的引物。设计的简并引物序列如下:

5'-ta(t/c)cgNggNgtNcgN(a/c)tgcg-3'

1.3 RNA 的提取

总 RNA 的提取采用 Promega 公司 RNA 提取试剂盒,同时结合《分子克隆实验指南》进行^[3]。提取的 RNA 用 DNase I 进行处理,去除污染。

收稿日期:2004-11-19

基金项目:国家转基因植物研究与产业化开发(J99-B-001);河北省博士基金(B2002101)

作者简介:蔡玉珍(1954-),女,江苏省南京人,东南大学化工系助理实验师,主要从事化学教学与研究。

1.4 cDNA 制备

按照 HIEROGLYPH mRNA profile kit (Beckman Coulter) 的说明书进行。本文采用 20 μL 体系。体系其中包括 2 μg 纯化的 RNA 模板 ;2 μL 的 2 μmol 下游引物 Oligod(T)₁₆ 作为逆转录合成 cDNA 第一链的引物 ;2 μL 的 250 μmol 的 dNTP ;200Unit SuperScript II 反转录酶 ;5' SuperScript II RT buffer 4.0 μL ;100 mmol 的 DTT 2 μL ,最后加水至 20 μL 。42 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min ,然后 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 50 min ,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 终止反应。作为 PCR 扩增的模板。

1.5 PCR 扩增片段的回收

扩增体系采用 40 μL ,94 $^{\circ}\text{C}$,5 min , 然后 94 $^{\circ}\text{C}$,1 min ;45 $^{\circ}\text{C}$,30 s ;72 $^{\circ}\text{C}$,1 min ;35 个循环 ,72 $^{\circ}\text{C}$,10 min。反应产物用 1% 的琼脂糖凝胶分离 ,切割目的片段后回收。

1.6 T 载体的连接、测序

T 载体是购自 Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector ,连接按照说明书进行。连接完成后 ,热激转化大肠杆菌 ,铺平板过夜。次日 ,挑单克隆进行液体培养 ,提取质粒进行测序。测序工作由上海生物工程技术服务有限公司完成。

2 结果和分析

2.1 RNA 提取

马蔺提取的总 RNA 进行琼脂糖电泳检测(图 1) ,可见 RNA 比较完整 ,没有发生降解。

2.2 利用简并引物进行 PCR 扩增

采用设计的简并引物和结合 poly (A) 尾巴的锚定引物进行 PCR 扩增 ,模板是总 RNA 逆转录的 cDNA 片段。由于上游引物是简并引物 ,所以 ,PCR 扩增的结果就是大小不同的片段。从图 2 可以看出 ,扩增产物有一个明显主带的弥散状区域。回收这些区域的片段连接到 T 载体上。



图 1 提取马蔺的总 RNA 电泳

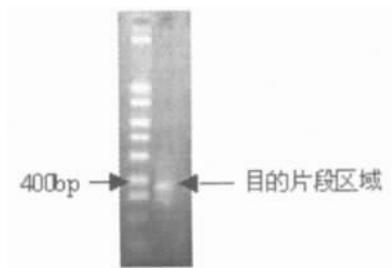


图 2 用简并引物扩增的片段

2.3 T 载体的连接、转化、质粒提取

T 载体采用 Promega 公司的 pGEM-T Esay Vector ,按照说明书操作 ,连接后热激转化大肠杆菌感受态细胞 ,铺在含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基上 ,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温过夜。通过蓝白斑筛选得到阳性克隆 ,随机挑取 30 个单克隆 ,摇菌 ,提取质粒 ,编号分别为 1~30 ,酶切鉴定 ,结果如图 3 所示。可见片段大小不同 ,集中在 300~500 bp 之间。

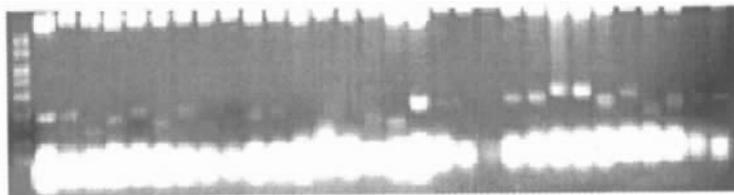


图 3 30 个克隆提取质粒后酶切结果

2.4 测序

连接到 T 载体上的所有阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序 ,然后在 GenBank 上进行同源性比较(BLAST)。结果综合成表 1。从表 1 可以看到 ,除了 6 个克隆测序失败 ,为载体序列

外,其余 24 个克隆有 8 个克隆的序列和其他抗逆性基因具有部分同源性;16 个克隆没有明显的同源性,存在是新基因片段的可能性。

表 1 不同阳性克隆测序结果汇总

BLAST 结果	部分同源	无明显同源性	载体
克隆编号	5 ;7 ;20 ;23 ;24 ;26 ;27 ;29	1 ;2 ;6 ;8 ;9 ;10 ;11 ;13 ;16 ;17 ;18 ;21 ;22 ;25 ;28 ;30	3 ;4 ;12 ;14 ;15 ;19

3 讨 论

作为一种在北方广泛分布的多年生草本植物,马蔺具有耐旱和耐盐碱等许多优良特性,主要用来进行水土保持、观赏植物和药用等。对它的研究主要集中在分类、种子发芽处理、栽培繁殖和组织解剖等常规研究^[4-8],分子生物学方面的研究基本没有报道。对于基因分离来说,有许多方法可以利用^[9-12]。本文用马蔺做材料,采用设计简并引物的方法,初步得到了一些基因片段,其中部分和抗逆性有关,但这些片段是否具有利用价值,还有待进一步研究确定。目前这些片段的杂交验证工作正在进行,如果证实和抗性有关,可以获得基因全长,再转到植物当中进行功能的鉴定。希望通过这些研究充分挖掘野生植物当中的优异基因,同时也给其他野生植物的深入研究提供一个切实可行的途径。

参考文献:

- [1] 刘德福,等. 马蔺的繁殖特性及生态地理分布的研究[J]. 内蒙古农牧学院学报,1998,19(1):1-6.
- [2] Park JM, et al. Overexpression of the Tobacco Tsi1 Gene Encoding an EREBP/AP2-Type Transcription Factor Enhances Resistance against Pathogen Attack and Osmotic Stress in Tobacco, *The Plant Cell*, 2001, 13, 1035-1046.
- [3] J.萨姆布鲁克,等. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁,黎孟枫等译. 北京:科学出版社,1986.
- [4] 徐秀梅,等. Co60- γ 射线辐照对马蔺种子萌发的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2003,27(1):25-28.
- [5] 王桂芹. 不同生态环境马蔺植物体解剖结构比较[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2002,17(2):127-129.
- [6] 张庆宏,等. 高寒盐碱地马蔺播种试验[J]. 防护林科技,2004,5:28-29.
- [7] Shimizu K, et al. Production of somatic hybrid plants between *Iris ensata* Thunb. and *I. germanica*. *Euphytica*, 1999, 107(2): 105-113.
- [8] Yabuya T, et al. New types of major anthocyanins detected in Japanese garden iris and its wild forms, *Euphytica*, 2001, 118 (3): 253-256.
- [9] 邓洪新,等. 植物基因克隆的策略和方法[J]. 西南农业学报,2001,14(3):78-82.
- [10] 赵大中,等. 运用差异显示法分离小麦春化相关 cDNA 克隆[J]. 科学通报,1998,43(9):964-968.
- [11] 邢少辰,等. 分离基因的有效手段-mRNA 差异显示技术[J]. 吉林农业科学,2004,29(2):9-12.
- [12] Matz M and Lukyanov SA. Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26(24): 5537-5543.

Primary Investigation of Stress-related DNA Fragments Obtained from Wild Plant (*Iris ensata thumb*)

CAI Yu-zhen¹, LIU Li², WANG Zhong-wei², et al.

(1. Chemistry Department, Southeast University, Nanjing 210008; 2. Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Wild plants play a very important role in many aspects such as biodiversity, environmental protection, plant genetics and breeding and so on. Wild plant of *Iris ensata thumb* was used in this study. Some stress-related cDNA fragments were isolated using designed degenerated primers according to the AP2 conservative region. The alignment showed that some fragments were drought-related and would contribute to the utilization of wild plants in the future.

Key words: Wild plant; *Iris ensata thumb*; Degenerated primer; Tolerance to stress