

cDNA 微阵列技术研究干旱胁迫下星星草基因的表达

梁也男, 王玉成*, 刘桂丰, 褚延广

东北林业大学林木遗传育种实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 运用 cDNA 微阵列技术研究干旱胁迫下星星草基因的表达。制备了载有 660 条星星草单一基因的 cDNA 微阵列。分别对干旱胁迫和对照星星草的 mRNA 进行荧光标记, 并与载有星星草基因的 cDNA 微阵列进行杂交, 通过芯片的杂交信号强度分析, 共获得 22 个下调表达和 17 个上调表达的基因。BLASTX 分析表明这些基因按功能可以分为脱水保护、信号转导与调控、活性氧清除、代谢、核糖体蛋白等几大类。发现了一些与干旱胁迫相关的功能未知基因和新基因。

关键词: DNA 微阵列; 星星草; 干旱胁迫; 基因表达

Gene Expression in *Puccinellia tenuiflora* (Turcz.) Scribn. et Merr. under Drought Stress Using cDNA Microarray

LIANG Ye-Nan, WANG Yu-Cheng*, LIU Gui-Feng, CHU Yan-Guang

The Laboratory of Forest Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: The gene expression pattern in *Puccinellia tenuiflora* under drought stress was investigated using cDNA microarray. We constructed a cDNA microarray containing 660 unique genes from *P. tenuiflora*. The mRNA from drought treatment and control sample labeled with fluorescence dyestuff was used for cDNA microarray hybridization. Gene expression patterns in response to drought stress were studied through scanning and analysis of cDNA microarray. Totally 22 down-regulated genes and 17 up-regulated genes were identified under drought stress. BLASTX analysis showed that these differentially expressed genes involved in the functional groups such as dehydration protection, signal transduction and regulation, reactive oxygen species eliminated, metabolism. Among them, some function unknown genes and novel genes related to drought stress were also found. This research revealed some important pathways involved in drought-resistance in *P. tenuiflora*, and the gene expression profiles of *P. tenuiflora* after exposure to drought stress were constructed.

Key words: cDNA microarray; *Puccinellia tenuiflora*; drought stress; expression of genes

星星草为禾本科碱茅属多年生草本植物, 根系发达, 有较强的抗旱和耐碱能力。在我国东北、西北、华北均有分布, 是优良的防风固沙水土保持和盐碱地的绿化造林树种, 是抗旱研究的理想材料。另外, cDNA 微阵列技术具有高通量、快速、准确性高等优点, 一次可研究大量的基因表达, 并可细微地观察其表达特征, 由于其有高组分高通量特点而在基因表达分析领域得到广泛应用。植物抗旱和抗盐碱受多基因控制(Apse 和 Blumwald 2003; Hasegawa 等 2000), 涉及大量基因的表达。cDNA 微阵列技术是研究植物抗旱和抗盐碱的比较理想的技术。有人用 cDNA 微阵列技术研究拟南芥在脱水后再水合过程中(Oono 等 2003)以及渗透、盐、冷等胁迫下(Kreps 等 2002)的基因表达, Rabbani 等(2003)又曾以之研究冷、旱和盐胁迫下水稻基因的表达谱。本文以星

星星草作为试材, 用 cDNA 微阵列技术研究干旱胁迫前后星星草的基因差异表达, 从而为深入研究抗旱分子机制建立基础。

材料与方法

星星草[*Puccinellia tenuiflora* (Turcz.) Scribn. et Merr.]在温室中培养, 将其种子种在花盆中, 生长基质为沙和草炭土(2:1)。温室的温度控制在 24℃, 平均光强为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度在 65%~75% 之间, 每天浇水, 保证土壤水充足。以二月龄的星星草幼苗进行干旱胁迫。在上述培

收稿 2007-06-13 修定 2007-09-04

资助 国家自然科学基金面上项目(30571509)和黑龙江省攻关重点项目(GB06B303)。

* 通讯作者(E-mail: Wangyucheng1029@126.com; Tel: 0451-82191627)。

养条件下, 将栽植星星草的土壤裸露于空气中, 用变色硅胶吸附土壤中水分, 盆内土壤水分降到相对含水率 32% 左右, 以土壤水分供应充足的材料作为对照, 处理 27 h 后, 取叶及嫩茎为试材。

引物、dNTP、Taq 酶为宝生物工程(大连)有限公司产品, RNA 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司, 逆转录酶(Superscript II)为 Invitrogen 公司产品, Cy3/Cy5 荧光标记试剂盒为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品, 其他试剂为国产分析纯。

星星草 cDNA 文库为本实验室构建(Wang 等 2006), 从 cDNA 文库所得的样品中挑选出 660 条单一基因(unique gene)作为靶基因, 并用载体两端的 T3、T7 启动子序列作为引物对插入片段进行 PCR 扩增。用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物质量。将质检合格的 PCR 产物加入异丙醇离心沉淀后, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 0.5 g·L⁻¹ PCR 产物溶解于 3×SSC (15 mmol·L⁻¹ 柠檬酸钠、0.45 mol·L⁻¹ NaCl)溶液中, 用 Omni Grid 点样仪(Majer Precision 公司)将 660 个靶基因、8 个阴性对照基因和 8 个空白对照点样在硅烷化玻片上(上海博星公司)。点样后的玻片经水合(2 h)和室温干燥(0.5 h)后紫外交联(能量设定 65 mJ·cm⁻¹), 再分别用 0.2% SDS、水和 0.2% NaOH 溶液处理 10 min, 晾干备用。共制备 2 个相同的芯片(重复 1 次)。

作探针标记时, 于一已灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管内依次加入以下 RNase-free 的试剂(反应终体积为 50 μL): 23 μL 双蒸水、5 μL 逆转录引物、50 μg 总 RNA, 振荡混匀后, 置于 70 °C 水浴中 10 min, 取出后, 迅速置于冰上。分别加入以下试剂: 10 μL 5× 逆转录酶缓冲液、5 μL 二硫苏糖醇(DTT)、4 μL dNTP (10 mmol·L⁻¹), 然后转入暗室中加入以下试剂: 2 μL 逆转录酶、3 μL Cy5-dCTP 或 Cy3-dCTP, 用手指弹打管壁以混匀样品。将 Eppendorf 管置于 42 °C 水浴中 2 h。依次在 Eppendorf 管中加入 4 μL 标记试剂 I, 置于 65 °C 水浴中 10 min 后加入 4 μL 标记试剂 II。混匀, 合并对照组、实验组。避光, 真空抽干至 50 μL 左右。用 S-200 DNA 纯化柱(Amersham Pharmacia Biotech 公司)纯化, 以后向纯化后的含有探针的溶液中加入 8 μL 标记试剂 III, 真空抽干。

芯片杂交和洗片时, 将抽干的探针溶于 6.5 μL 杂交试剂 I 中, 再加入杂交试剂 II, 混匀。将芯片放入 95 °C 预杂交液(已于 95 °C 变性 2 min)中变性 30 s, 室温下晾干。将探针与芯片分别在 95 °C 水浴中变性 2 min 和 30 s, 将探针置于芯片上, 用盖玻片封片, 于杂交箱中(42 °C)杂交过夜 18 h。杂交结束后揭开盖玻片, 用 0.5% 洗涤液 1 冲洗玻片, 去除盖玻片, 再将玻片依次在 0.5% 洗片试剂 1+2% 洗片试剂 2、5% 洗片试剂 3 中洗涤 10 min, 最后用 0.5% 洗涤液 1 冲洗玻片, 室温下晾干。

信号扫描用 General Scanning 公司的 ScanArray 4000 扫描仪扫描芯片, 获得芯片杂交图像。用 GenePixPro3.0 软件分析扫描图, 获得每个基因点的 Cy3 和 Cy5 信号值, 数据根据以下原则进行均一化(normalization)处理: (1)该基因点的 Cy3、Cy5 信号值皆大于 200, 或者其中之一大于 800; (2)该基因点的 Cy5 信号值/Cy3 信号值的比值在 0.1~10 之间。计算每个有效基因点 Cy5 信号值/Cy3 信号值的比值, 求出其相应的自然对数值 $r = \ln(Cy5/Cy3)$, 算出全部有效基因点 r 值的平均值 R , 实验的均一化系数为 $EXP(R)$ 。将所有基因点的 Cy3 信号值乘上均一化系数, 得出调整后的 $Cy3^*$ 。为了避免弱信号对实验结果的干扰, 将所有小于 200 的 $Cy3^*$ 值以 200 取代。计算每个基因点在本次实验中的表达差异值(Ratio), $Ratio = Cy5/Cy3^*$ 。计算基因点的平均 Ratio 值为 2 次杂交 Ratio 值的平均值。2 次实验结果一致, 即都有相同的上调或下调表达趋势, 且程度相似, 其中 Ratio 值都大于 2, 说明该基因点有明显上调表达, 两次杂交的 Ratio 值都小于 0.5, 说明有明显下调表达。

采用 Trizol 试剂(Promega 公司)提取星星草总 RNA, 并用 DNase (Promega 公司)消化, 去除 DNA。取 5 μg 总 RNA, 加入 2 μL 10×RT 缓冲液、1 μL RNase Inhibitor、1.5 μL Oligo(dT) (10 mmol·L⁻¹)、3 μL dNTP (10 mmol·L⁻¹)、AMV 反转录酶 2 U, 用水补足体积 20 μL 进行逆转录。反应程序为: 25 °C 5 min, 42 °C 60 min。将逆转录产物稀释 10 倍, 用作定量 RT-PCR 模板。

实时定量 RT-PCR 反应试剂盒为 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo Co., Ltd,

Osaka, Japan)。反应体系为: 2×SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μL、引物各0.3 μL (20 μmol·L⁻¹)、水 6.9 μL、模板 2.5 μL。定量 PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 12 s, 58 °C

30 s, 72 °C 40 s, 78.4 °C 读板 1 s, 45 个循环。然后在荧光定量 PCR 仪上完成 RT-PCR。用 α -Tublin (CN487692) 基因作为内参基因, 各引物序列见表 1。用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法(Livak 和 Schmittgen 2001)

表 1 荧光定量 PCR 所用引物序列
Table 1 Primer sequences of real-time PCR

引物名称	引物序列	
α -Tublin (CN487692)	5' TCATCGCCCTCATCATCTGC 3'	5' CGACTTGGCAAAGGTTTCAGC 3'
蛋白磷酸酶 2A β 调节亚基(CN487535)	5' GGTGGCAATGCATCTCGTAG 3'	5' GAGGAGCAACGGGAGTCAGC 3'
ABC 家族蛋白激酶类蛋白(CN486760)	5' GTACAACCTTTCCACCGACG 3'	5' TACACGAGATTGCTGGCTCC 3'
谷胱甘肽硫转移酶(CN487374)	5' CAACAGCGTCAAGCTCATCC 3'	5' TGCATTTCAAGCGGCACTGC 3'
酰基载体蛋白 III (CN487349)	5' GTACAGCAACAGGCACCACG 3'	5' TGCCACACTCATCGACAAGC 3'
转录因子 APFTI (CN487062)	5' GCTACTCTGCCAATAAGC 3'	5' ACCACATGCTCTGCAACACG 3'

进行基因表达量的计算。

实验结果

1 cDNA 微阵列的杂交和分析

用Agilent扫描仪(G2655AA)对杂交后的cDNA微阵列的扫描, 获得星星草 cDNA 微阵列杂交图, 通过对杂交信号强度的计算, 绘制两组

cDNA微阵列的杂交信号强度的双色荧光叠加图和散点图(图 1、2)。从图中可以看出, 杂交信号强度高, 说明芯片实验成功。

2 定量 RT-PCR 对 cDNA 微阵列结果的验证

为验证 cDNA 微阵列结果的可靠性, 我们选取了5个cDNA微阵列中差异表达的基因进行荧光定量 RT-PCR 分析, cDNA 微阵列结果与定量 RT-

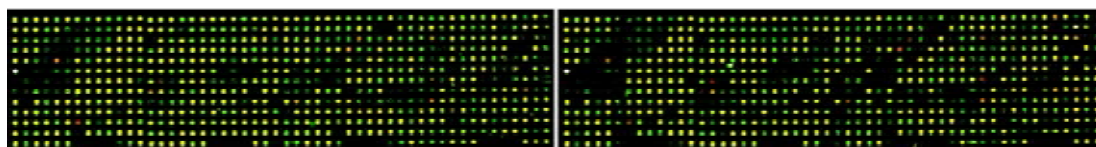


图 1 两次 cDNA 微阵列双色荧光叠加图

Fig.1 The overlay map of the two fluorescent signals on cDNA microarray

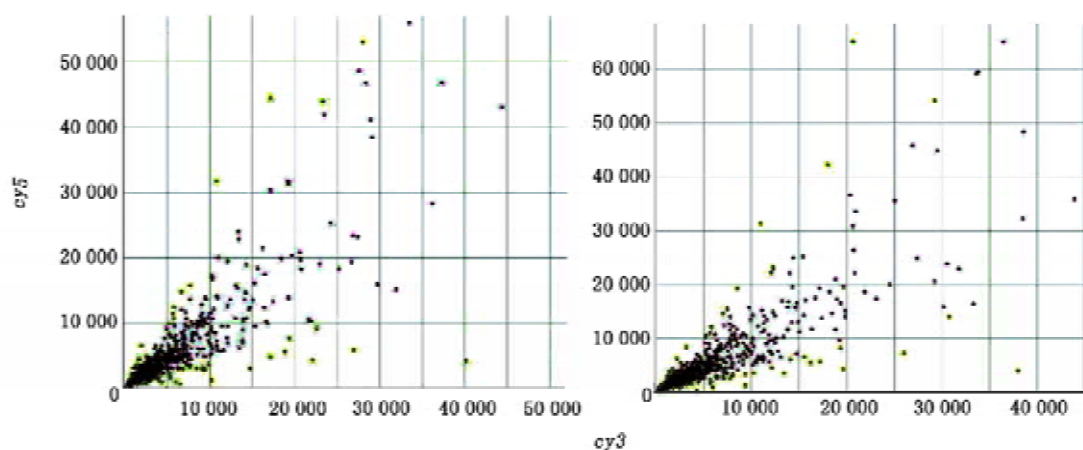


图 2 两次 cDNA 微阵列的散点图

Fig.2 The scatter plots of cDNA microarray

PCR的结果比较如图3。

从图3可见,选取的5个基因在cDNA微阵列和定量RT-PCR中表达的趋势一致,均下调表达。证明cDNA微阵列的结果可信。

3 cDNA微阵列表达谱分析

2次杂交显示,阴性对照和空白对照杂交信号均很低,计算表明2组芯片的数据相关系数(R^2)

为0.93,说明重复性好,数据结果可信。2组芯片的均一化系数分别为1.141和1.086,干旱处理前后Cy5/Cy3*的Ratio值大于2或小于0.5,且同一基因的2个重复点表达上调、下调趋势相同的基因共有39条,其中表达上调的有17条,表达下调的有22条(表2)。

讨 论

许多已知功能的基因在干旱胁迫下的差异表达明显,显示它们可能在星星草抗旱胁迫中起作用。其中, cap 结合蛋白基因(CN487518)表达量上升。一般认为,此种蛋白对RNA代谢、mRNA前体剪切及RNA的输出等均起作用,其表达量增加可能会加速干旱胁迫下星星草体内RNA的代谢过程。干旱胁迫下,ET域蛋白(CN487580)、同源异型域转录因子(HDZip, CN487669)和类MYB DNA结合蛋白(CN487484)等基因表达量明显升高。说明ET蛋白可能参与染色质结构修饰、植物胚胎与花器官的发育过程(Alvarez-Venegas 和 Avramova 2002)。HDZip 基因的表达在叶部和根部均受脱水 and ABA 的诱导(Jin 和 Martin 1999)。MYB 类转录因子基因家族在细胞次级代谢调控、抗逆反应及细胞周期调控等过程中发挥作用(Rahinowicz 等 1999)。

干旱胁迫下,一些抗逆相关基因的表达明显上升,如类甜味蛋白(TLP, CN487555)基因、病程相关蛋白(CN486869)等。这些基因都与植物抗逆相关,它们可能在星星草干旱的细胞防御系统中起作用。干旱诱导下依赖谷氨酸的天冬酰胺合成酶(CN487110)的表达量上调。一般认为此酶可调节氮元素的运输,从而维持植物体内合宜的N/C比(Romaqni 和 Dayan 2000),以保证植物的正常生长发育,其基因的上调表达说明它可能有维持或保护干旱胁迫下星星草体内的N/C比的作用。

干旱胁迫下,与抗逆相关基因如谷胱甘肽硫转移酶(GST, CN487374)表达受抑制,此种基因是植物抵御氧化胁迫的酶类(Tsuchiya 等 2004),其在植物受干旱和盐胁迫的后期受抑制而表达(Moons 2003)。在旱胁迫下,作为脂肪酸生物合成过程中催化碳链延伸的酰基载体蛋白 III 基因(Kanesaki 等 2002)表达量下降,说明干旱胁迫下

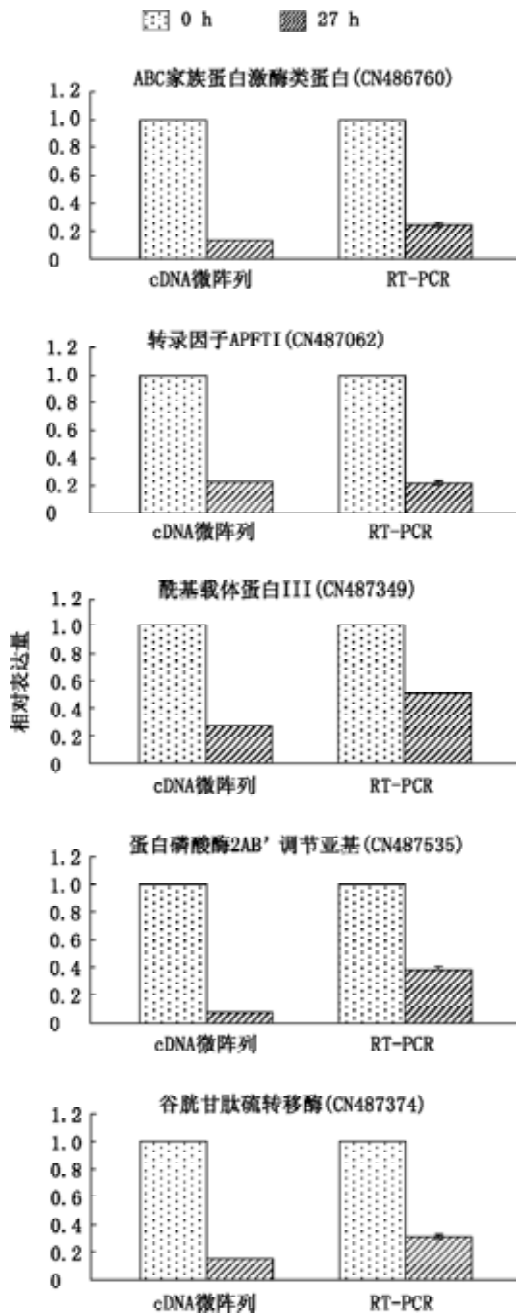


图3 cDNA微阵列结果与定量RT-PCR的结果比较
Fig.3 Comparison on cDNA microarray and RT-PCR

表2 干旱胁迫下上调或下调表达的基因

Table 2 Genes differentially regulated by drought stress

GenBank 登录号	平均 Ratio 值	BLASTX 比对结果	E 值	匹配物种
CN487535	0.080	蛋白磷酸酶 2AB' 调节亚基(B' regulatory subunit of protein phosphatase 2A)	4E-18	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486099	0.113	FMN 结合蛋白(FMN-binding)	0.75	<i>Psychromonas ingrahamii</i>
CN486760	0.134	ABC 家族蛋白激酶类蛋白(ABC1 family protein kinase-like protein)	3E-12	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487374	0.154	谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferase, putative)	1E-16	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487062	0.223	转录因子 APFTI (transcription factor APFTI)	4E-04	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486040	0.251	无匹配		
CN487349	0.269	酰基载体蛋白 III (acyl carrier protein 3)	1E-25	大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)
CN487387	0.322	假定蛋白(hypothetical protein)	5	斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)
CN487707	0.342	β -1,3-葡聚糖酶(putative β -1,3-glucanase)	4E-29	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486813	0.343	苯丙氨酸氨水解酶(phenylalanine ammonialyase)	1E-37	青藏青稞(<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>)
CN486777	0.375	无匹配		
CN487385	0.377	磷脂酸磷酸酶(phosphatidic acid phosphatase-like)	6E-17	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487028	0.379	bZIP 转录因子家族蛋白(bZIP transcription factor family protein)	0.78	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486216	0.401	无匹配		
CN487410	0.420	小核糖核蛋白 G (putative small nuclear ribonucleoprotein G)	1E-21	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486938	0.421	未知蛋白	4E-27	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487223	0.422	未知蛋白	3E-33	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486390	0.428	假定 RNA 结合蛋白(putative RNA-binding protein)	3E-04	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486073	0.431	无匹配		
CN487451	0.451	未知蛋白	3E-36	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486811	0.462	无匹配		
CN486345	0.471	OSJNBa0086P08.14	0.001	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486351	2.066	无匹配		
CN487555	2.119	类甜味蛋白(thaumatin-like protein)	3E-09	大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)
CN486894	2.162	β -内酰胺酶前体(β -lactamase precursor)	0.005	洋葱伯克霍尔德菌(<i>Burkholderia cepacia</i>)
CN486869	2.291	病程相关蛋白(pathogenesis-related protein)	4E-52	大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)
CN487579	2.415	Yip 互作因子(putative Yip1 interacting factor)	1E-25	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486880	2.452	表达蛋白(expressed protein)	6E-31	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487580	2.550	含 SET 结构域蛋白(SET domain-containing protein)	4E-63	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487516	2.581	P0504D03.19	1E-30	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487518	2.606	cap 结合蛋白(cap-binding protein CBP20)	3E-04	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487139	2.697	无匹配		
CN487012	2.773	无匹配		
CN487669	2.801	同源异型域转录因子(homeodomain leucine zipper protein)	3E-16	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487484	2.809	MYB DNA 结合蛋白(MYB-like DNA-binding protein)	0.004	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN486617	2.935	CG33249-PA	1	黑腹果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)
CN487110	3.153	依赖谷氨酸天冬酰胺合成酶(glutamine-dependent asparagine synthetase)	4E-64	小麦(<i>Triticum aestivum</i>)
CN487492	3.248	鞘氨醇激酶(putative sphingosine kinase)	2E-22	水稻(<i>Oryza sativa</i>)
CN487139	3.541	富含甘氨酸蛋白(glycine rich protein)	0.006	大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)

星星草体内的脂肪酸合成受抑。干旱胁迫下, 蛋白磷酸酶 2A (CN487535) 的表达也受到抑制, 这显示干旱胁迫下星星草体内DNA损伤修复有可能增强, 因而抗旱能力增大。

参考文献

- Alvarez-Venegas R, Avramova Z (2002). SET-domain proteins of the Su(var)3-9, E(z) and Trithorax families. *Gene*, 285 (1~2): 25~37
- Apse MP, Blumwald E (2003). Engineering salt tolerance in plants. *Curr Opin Biotechnol*, 13 (2): 146~150
- Dozier C, Bonyadi M, Baricault L, Tonasso L, Darbon JM (2004). Regulation of Chk2 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 2A via its B' regulatory subunit. *Biol Cell*, 96 (7): 509~517
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51: 463~499
- Jin H, Martin C (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol*, 41: 577~585
- Kanesaki Y, Suzuki I, Allakhverdiev SI, Mikami K, Murata N (2002). Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun*, 290 (1): 339~348
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol*, 130 (4): 2129~2141
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25: 402~408
- Moons A (2003). *Osgstu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Lett*, 553 (3): 427~432
- Oono Y, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K (2003). Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J*, 34 (6): 868~887
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol*, 133 (4): 1755~1767
- Rahinowicz PD, Beaun EL, Wolfe AD, Bowen B, Grotewold E (1999). Maize *R2R3 Myb* genes: sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics*, 153: 427~444
- Romaqni JG, Dayan FE (2000). Measuring asparagine synthetase activity in crude plant extracts. *J Agr Food Chem*, 48 (5): 1692~1696
- Tsuchiya T, Takesawa T, Kanzaki H, Nakamura I (2004). Genomic structure and differential expression of two tandem-arranged *GSTZ* genes in rice. *Gene*, 23 (335): 141~149
- Wang YC, Yang CP, Liu GF, Jiang J, Wu JH (2006). Generation and analysis of expressed sequence tags from a cDNA library of *Tamarix androssowii*. *Plant Sci*, 170: 28~36