

大白菜雄性不育花蕾均一化cDNA文库的构建及评价

李真真, 武佩琪, 程亚雄, 宋红霞, 李梅兰, 侯雷平*, 许小勇*

山西农业大学园艺学院, 山西太谷030801

摘要: 以大白菜*pol*型细胞质雄性不育系16C14花蕾为试验材料, 采用SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript)技术合成cDNA, 利用DSN (duplex-specific nuclease)对所得cDNA进行均一化处理, 之后与pDONR™/Zeo载体重组并转化DH10B大肠杆菌菌株, 构建了大白菜*pol*型雄性不育花蕾均一化cDNA文库。经检测, 文库滴度为 3.2×10^6 cfu·mL⁻¹, 库容量约为 1.28×10^7 cfu, 重组率97%, 插入片段平均大小1.2 kb左右。随机挑选100个阳性菌斑进行测序, 冗余度仅为3.7%, 文库质量较高。本研究成功构建了大白菜胞质雄性不育系花蕾均一化cDNA文库, 为进一步研究大白菜*pol*雄性不育相关分子机制奠定基础。

关键词: 大白菜; 细胞质雄性不育; *pol*型; cDNA文库; 均一化

大白菜是我国重要的经济蔬菜作物, 生产上主要利用自交不亲和系与雄性不育系进行制种, 而后者在大白菜新品种保护方面有着明显的优势。其中, 来源于甘蓝型油菜*pol*型CMS (cytoplasmic male sterile, 细胞质雄性不育)被广泛应用, 其主要是由于线粒体基因组发生重组产生新的开放阅读框*orf224*所致, 但是其诱导雄性不育发生的分子机制仍不清楚。

cDNA文库指包含有某一特定组织或细胞中全部cDNA克隆的集合体, 具有组织或细胞特异性, 可以从中快速筛选、克隆目的基因, 也可直接用于基因的表达(Kikuchi等2003)、基因互作蛋白筛选等(肖冬等2014)。因此, cDNA文库在研究植物生长发育及功能基因组方面具有特殊优势。传统cDNA文库构建过程繁琐, 方法复杂, 尤其文库中的高丰度基因会增加筛选工作量, 且某些低丰度基因易丢失。均一化cDNA文库(normalized cDNA library)可有效克服传统cDNA的上述缺点, 减少冗余转录物的拷贝从而增加低丰度转录物的拷贝(Zhang等2005)。DSN (duplex-specific enzyme)是一种热稳定双链特异性酶(Shagin等2002), 该酶能够选择性降解复性过程中双链DNA和DNA-RNA杂交体中的DNA, 对单链核酸分子几乎不起作用。利用DSN处理进行均一化文库的构建自首次在加州海兔中获得成功之后(Zhulidov等2004), 已广泛应用于多种植物, 如水稻(Reddy等2002)、玉米(崔东辉等2007)、棉花(吴东等2009)、大豆(李晨等2010)、巴西橡胶(余海洋等2010)、油菜(詹高淼2006)等。通过DSN处理, 高拷贝数基因的丰度可下降至0.4%~5.0% (张石柱等2007)。本研究计

划选取大白菜*pol*型胞质雄性不育系16C14的不育花蕾, 提取RNA, 利用DSN技术构建均一化的cDNA文库, 并对其质量分析, 为下一步雄性不育相关基因的挖掘及其作用机制研究奠定基础; 同时以文库为模板, 克隆不育相关基因*BrGRP*, 为进一步揭示其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

植物材料为大白菜(*Brassica rapa* L. *pekinensis*) 16C14, 其不育源转自*pol*型细胞质雄性不育系CMS7311, 由西北农林科技大学张鲁刚教授馈赠, 于2017年2月初播种于山西农业大学园艺学院实验站, 幼苗期经低温处理25 d后, 定植于大棚, 正常田间管理, 于盛花期收集不育株上未开花的花蕾, 液氮速冻后超低温冰箱保存以备用。

1.1.2 试验试剂

试验所用FastTrack® MAG mRNA isolation Kit、CloneMiner II cDNA Library Construction Kit、BP Clonase® II enzyme mix、pDONR™/Zeo等购自ThermoFisher公司; 质粒提取试剂盒、大肠杆菌DH10B感受态等购自天根生化; DM2000 marker购自康为世纪。

收稿 2017-11-02 修定 2018-01-10

资助 国家自然科学基金(31401885)和山西省自然科学基金(201701D121101)。

* 共同通讯作者: 侯雷平(sxndhlp@126.com)、许小勇(xuxy7926@163.com)。

1.2 试验方法

1.2.1 总RNA的提取及检测

大白菜花蕾总RNA的提取参照CTAB法(Saghai-Maroo等1984)。总RNA的浓度和纯度用蛋白核酸定量测定仪检测,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.2.2 均一化cDNA文库的构建

采用FastTrack[®] MAG mRNA isolation Kit对大白菜*pol*花蕾总RNA进行分离与纯化,具体操作按照说明书进行。进一步以mRNA为模板,利用Clone-Miner II cDNA Library Construction Kit合成第一链cDNA,据试剂盒说明书继续操作合成双链dsDNA。

cDNA与attB1重组接头连接:取6 μL cDNA,加10 μL 5 \times Adapter Buffer, 4 μL attB1 Adapter (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 8 μL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 6 μL T₄ DNA Ligase (1 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 加DEPC-treated water至反应总体积为50 μL ,混匀后,16 $^{\circ}\text{C}$ 放置16~24 h。用DSN酶对加接头后的cDNA进行均一化处理。

利用BP Clonase[®] II enzyme mix完成均一化cDNA的BP重组反应,连接到载体pDONRTM/Zeo载体上,并电转化到大肠杆菌DH10B中,加入预冷的SOC培养基,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、230 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养1 h,加入甘油至终浓度20%存于-80 $^{\circ}\text{C}$,即为初级文库菌液。

1.2.3 均一化cDNA文库质量检测

取转化后细菌原液10 μL 稀释1 000倍后,从中取出50 μL 涂布LB平板/Zeocin, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜第2天计数。以 $T=N\times D/V$ (T 为滴度, N 为平板上克隆数, D 为稀释倍数, V 为涂板体积)计算文库滴度,从而计算出文库库容量。随机挑选24个单菌落,以M13F/R为引物PCR扩增插入片段,计算初级文库重组率及插入片段平均大小。PCR程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸5 min。利用1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.2.4 cDNA文库序列分析

取10 μL 原始文库菌液稀释1 000倍后,取100 μL 均匀涂布于LB (Sm 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)培养基上,倒置,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。从中随机挑选100个阳性菌落摇菌,然后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,采用DNASTar等分析软件对测序结果进行分析。

1.2.5 大白菜*BrGRP*基因的克隆及序列分析

据已发布的*BrGRP*基因序列,设计一对特异

引物(表1),以原始cDNA文库菌液为模板,利用PCR技术扩增目的基因。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。利用DNAMAN软件对*BrGRP*基因序列进行分析。

2 实验结果

2.1 总RNA提取及质量检测

以*pol*型大白菜雄性不育系16C14不育花蕾为材料,提取总RNA,经电泳检测,有28S和18S两条带,且条带完整,没有弥散,亮度之比约为2:1(图1);同时用蛋白核酸定量测定仪测定OD_{260/280}在2.03~2.05,说明所提取的总RNA的质量较好,符合文库构建的要求。

2.2 均一化cDNA文库构建

通过SMART反转录, DNS均一化处理,构建了均一化cDNA文库。经检验,文库滴度为 3.2×10^6 cfu $\cdot\text{mL}^{-1}$,文库库容量为 1.28×10^7 cfu。

表1 *BrGRP*基因克隆所用引物及序列

Table 1 The primers and their sequences in cloning the *BrGRP* gene

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>BrGRP</i> -F	AATGCTTGACACACTTATCGGT
<i>BrGRP</i> -R	TTATTTGAACCGGCAGAGTATTG

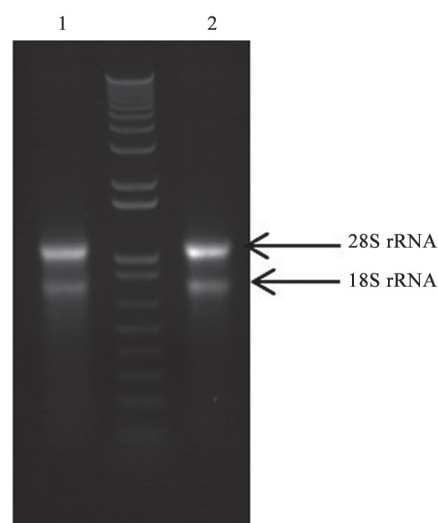


图1 大白菜雄性不育系花蕾总RNA电泳图
Fig.1 Gel analysis of total RNA of CMS flowers in Chinese cabbage

1、2均代表总RNA,二次重复。

从文库中随机挑选24个单菌落, 利用载体引物进行PCR扩增, 并用1%的琼脂糖凝胶检测, 24个阳性克隆均有插入片段, 且插入片段大小分布在0.5~5.0 kb范围内(图2), 平均大小约为1.2 kb。根据Trimmer-Direct cDNA Normalization Kit说明书, 在文库构建后随机测序100个克隆, 如果冗余率不超过5%, 即说明均一化效果很好。本研究构建的均一化文库, 从中随机挑100个单克隆测序, 冗余率仅有3.7%, 低于试验标准, 说明构建的文库均一化效果良好。

2.3 均一化cDNA文库质量检测

为进一步验证文库质量, 从构建好的cDNA文库中随机挑选1 000个阳性斑进行测序, 获得965个单克隆序列。在大白菜*Brassica Database* (<http://brassicadb.org/brad/blastPage.php>, BRAD)和NCBI数据库中对成功测序的965个单克隆序列进行比对分析, 结果表明, 20个序列片段是在BRAD或

NCBI数据库中没有同源序列的新序列; 945个序列在BRAD或NCBI数据库中的序列具较高相似性, 据比对到的基因推测功能将其分类, 具体包括蛋白质代谢、防御反应、能量代谢、转录调控、细胞壁合成与调控等9个类别。

在这些基因中, 未知或假定蛋白基因占9%。而在已知的基因功能中, 蛋白质代谢相关基因所占比例最大, 为30%; 其次为能量代谢相关基因, 占总比例的27%; 防御反应、转录调控、信号转导及转运通道相关基因所占比例分别为9%、11%、6%、5%。另外, 1%的基因参与细胞壁的合成与调节, 2%与细胞形态的维持相关, 起细胞支架作用(表2)。

2.4 大白菜*BrGRP*基因的克隆及序列分析

进一步以文库为模版, 利用特异引物PCR可直接克隆到目的基因全长cDNA。序列分析表明*BrGRP*基因完整开放阅读框(open reading frame,

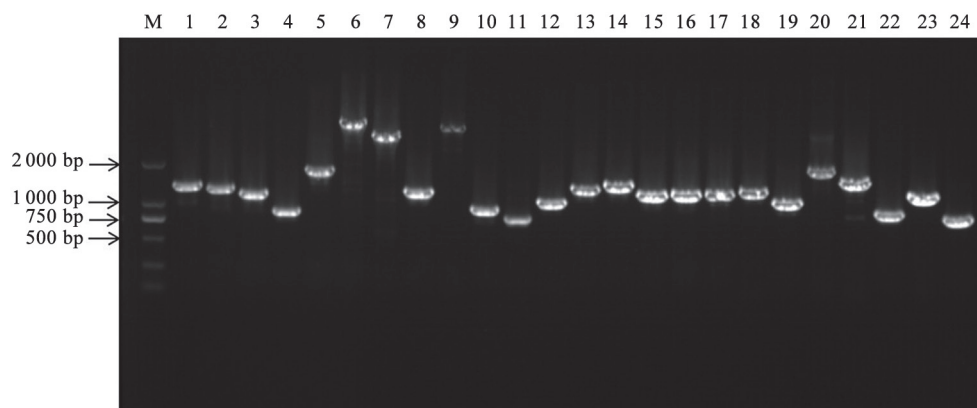


图2 大白菜花蕾cDNA文库插入片段大小检测

Fig.2 Size of the insert of the normalized cDNA library of Chinese cabbage buds

1~24为随机挑选的阳性单克隆PCR电泳产物; M为DM2000 DNA Ladder。

表2 大白菜花蕾cDNA文库测序分析所得基因的功能分类

Table 2 Functional classification of the genes obtained from sequencing analysis of cDNA library of Chinese cabbage buds

基因功能分类	各类别数值/个	各类别所占比例/%
蛋白质代谢	287	30
能量代谢	258	27
防御反应	84	9
转录调控	104	11
信号转导	53	6
转运通道	44	5
细胞壁的合成与调节	13	1
细胞支架作用	15	2
未知或假定蛋白基因	87	9

ORF)为804 bp, 编码267个氨基酸(图3), 分子量为29.7 kDa, 等电点为7.3, 不存在跨膜结构域和信号肽序列(未列出)。

3 讨论

DSN依据其自身的特异性, 可以有效、快速地完成cDNA的均一化处理, 从而达到理想的均一化效果。文库的均一化效果可以从两方面进行评价, 一方面是比较均一化前后高丰度基因的丰度, 如金龟子绿僵菌均一化文库(张石柱等2007) DSN处理后的高丰度基因丰度仅为均一化前的0.4%~5.0%; 另一方面是看文库的冗余率, 如王玉荣等(2009)构建的亚洲棉全生育期均一化文库, 冗余率仅为3.49%, 远低于试验要求。本试验亦采用DSN技术, 所构建的均一化cDNA文库冗余率只有3.7%, 说明文库均一化效果较理想, 有效提高了低丰度基因的丰度, 增加了筛选到雄性不育相关基因的几率, 为后期筛选育性相关基因奠定基础。

植物富含甘氨酸蛋白(glycine-rich proteins, GRPs)是一类在组成结构上由甘氨酸高度重复序列组成

的蛋白质, 最早发现于矮牵牛(*Petunia hybrida*)和南瓜(*Cucurbita moschata*)中(Condit和Meagher 1987)。*GRP*基因大多与非生物胁迫相关, 少数基因可调控植物的生长发育。*AtRGB7*同时参与植物的干旱、渗透及冷胁迫(Kim等2008); 而*AtCSG2*基因沉默后, 拟南芥表现出早花、雄蕊数减少、胚胎发育异常等特征(Fusaro等2007); *GRP17*基因点突变会影响花粉发育和花粉的授精能力(Mayfield和Preuss 2000)。白菜*BrGRP*基因在*pol*型CMS不育和可育植株花蕾中表达存在差异, 尤其是不育株的表达量是可育株中的5倍以上(An等2014), 因此推测*BrGRP*异常表达可能与大白菜雄性不育相关。

本研究构建的均一化cDNA表达文库滴度为 3.2×10^6 cfu·mL⁻¹, 覆盖度较好; 文库平均插入片段约1.2 kb, 序列完整性较高。该文库的冗余率为3.7%, 比较低, 说明均一化效果良好。同时克隆了基因*BrGRP*, 获得完整ORF序列并对其进行信息学分析。以上数据表明本研究构建的大白菜*pol*型胞质雄性不育系花蕾均一化cDNA文库质量较高, 为雄性不育相关基因筛选等后续试验奠定了良好基础。

```

1   ATGCTTGACACACTTATCGGTGGGCACGGGCACGGGGTCGGCCACAAGGATCACATAAGC
1   M L D T L I G G H G H G V G H K D H I S
61  AGTGGTTACGGCTTCGAGGGGCACAATGAGTTTGTGTCTCATGAGGACTCAGAAAGGAGC
21  S G Y G F E G H N E F V S H E D S E R S
121 CACTTCGATCGTCAATCCCCTACGACCACCAATGAGGGCTACCGGCTAACCACGGCCGT
41  H F D R Q S R Y D H Q M R L P A N H G R
181 CCACCCATGGCTCGCATGCCTCCCTGTGATGAAGAAGAGTCAGACGATGATGAGTTCATT
61  P P M A R M P P C D E E E S D D D E F I
241 AAGAGAAGCCGTAGCCACCACACTACTGTGTGCGCATCACCAACAGAAACCCCATATG
81  K R S R S H H T T V L P H H Q Q K P H M
301 AACTTCATGCCCCACCTCCGTTGTCTCAGCCTCACCACAACGGAAAGATGGGTAATGGA
101 N F M P P P P L S Q P H H N G K M G N G
361 TGGCAGGGAAGGCATGAAGATGGATACCATGGCGGGCAGGGATGCAGCAGCACGGTGGT
121 W Q G R H E D G Y H G G H G M Q Q H G G
421 CACGGCATGCAGCAGCATGGTGGGCATGGGATGCCAAATCACGGTGGGCACGGGATGCAG
141 H G M Q Q H G Y D H G M P N H G G H G M Q
481 CAGCATGGTGGGCACGGAATGCAGCACCACGATGGGCACGGGATGCAGCACCACGATGGG
161 Q H G G H G M Q H H D G H G M Q H H D G
541 CACGGTGGGCATGGTATGCAGCAGCACGTGGCGCACGGGATGCAGCACCACGATGTGCAC
181 H G G H G M Q Q H V A H G M Q H H D V H
601 GGTATGCAGCAGCACGGGGCGCACGGGATGAAGCACCAGGACAGGCTTATGGGTCCTCAG
201 G M Q Q H G A H G M K H Q D R L M G P Q
661 ATTCCACCACATCATGTCTACATGAACCCCAACCATGGAAGTGGCAGTGGCCGTACAGTA
221 I P P H H V Y M N P N H G S G S G R T V
721 ATGGTGAAGGCTTCGGAGAAGTGGCGAATGAGCAAGAGCACCGGGCGGCCACCACAAGGAA
241 M V K A S E N W R M S K S T G G H H K E
781 GGGTGGGGGAGTAAGGGACTCTAA
261 G W G S K G L *

```

图3 大白菜*BrGRP*基因的ORF序列及推导的氨基酸序列

Fig.3 ORF sequence and deduced amino acid sequence of *BrGRP* from Chinese cabbage

参考文献(References)

- An H, Yang ZH, Yi B, et al (2014). Comparative transcript profiling of the fertile and sterile flower buds of *pol* CMS in *B. napus*. BMC Genomics, 15: 258
- Condit CM, Meagher RB (1987). Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. Mol Cell Biol, 7 (12): 4273–4279
- Cui DH, Zhang DF, Jia GQ, et al (2007). Construction and identification of a normalized maize ear cDNA library of hybrid Yuyu22. Maize Sci J, 15 (4): 6–8 (in Chinese with English abstract) [崔东辉, 张登峰, 贾冠清等(2007). 强优势玉米杂交种雌穗均一化cDNA文库的构建与鉴定. 玉米科学, 15 (4): 6–8]
- Fusaro AF, Bocca SN, Ramos RL, et al (2007). *AtGRP2*, a cold-induced nucleo-cytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development. Planta, 225 (6): 1339–1351
- Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, et al (2003). Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from *japonica* rice. Science, 301 (5631): 376–379
- Kim JS, Jung HJ, Lee HJ, et al (2008). Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 55 (3): 455–466
- Li C, Yan YH, Zhou XA, et al (2010). Construction of a full-length cDNA library of soybean seeds at different developmental stages. Sci Agr Sin, 43 (3): 462–467 (in Chinese with English abstract) [李晨, 闫晓红, 周新安等(2010). 大豆种子不同发育时期全长均一化cDNA文库的构建. 中国农业科学, 43 (3): 462–467]
- Mayfield JA, Preuss D (2000). Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. Nat Cell Biol, 2 (2): 128–130
- Reddy AR, Ramakrishna W, Sekhar AC, et al (2002). Novel genes are enriched in normalized cDNA libraries from drought-stressed seedlings of rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Nagina 22). Genome, 45 (1): 204–211
- Saghai-Marouf MA, Soliman K, Jorgensen RA, et al (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc Natl Acad Sci USA, 81 (24): 8014–8018
- Shagin DA, Rebrikov DV, Kozhemyako VB, et al (2002). A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas. Genome Res, 12 (12): 1935–1942
- Xiao D, Xu XX, Guan JW, et al (2014). Identification of the interactive proteins of AtSARK. Plant Physiol J, 50 (6): 772–778 (in Chinese with English abstract) [肖冬, 徐欣欣, 管婧雯等(2014). AtSARK互作蛋白的筛选与鉴定. 植物生理学报, 50 (6): 772–778]
- Wang YR, Zhang XY, Liu CL, et al (2009). Construction and characterization of normalized full-length cDNA library of Asian cotton (*Gossypium arboreum* L.) in the whole-life cycle. Sci Agr Sin, 42 (4): 1158–1164 (in Chinese with English abstract) [王玉荣, 张雪妍, 刘传亮等(2009). 亚洲棉(*Gossypium arboreum* L.)全生育期均一化全长cDNA文库的构建和鉴定. 中国农业科学, 42 (4): 1158–1164]
- Wu D, Liu JJ, Yu SX, et al (2009). Establishment and identification of a normalized full-length cDNA library of CCR1 36. Acta Agr Sin, 35 (4): 602–607 (in Chinese with English abstract) [吴东, 刘俊杰, 喻树迅等(2009). 中棉所36均一化全长cDNA文库的构建与鉴定. 作物学报, 35 (4): 602–607]
- Yu HY, Zhang Y, Wang M, et al (2016). Construction of a normalized yeast two-hybrid cDNA library of the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). Plant Physiol J, 52 (3): 312–316 (in Chinese with English abstract) [余海洋, 张宇, 王萌等(2016). 巴西橡胶树胶乳均一化酵母双杂交cDNA文库构建. 植物生理学报, 52 (3): 312–316]
- Zhan GM (2006). Construction of cDNA subtractive library and homogenization library of *Brassica napus* (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [詹高淼(2006). 甘蓝型油菜cDNA差减文库和均一化文库的构建(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Zhang SZ, Wang ZK, Peng GX, et al (2007). Construction of a normalized full-length cDNA library of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* in the sporulation stage by DSN and SMARTTM. Agr Biotech, 15 (5): 884–887 (in Chinese with English abstract) [张石柱, 王中康, 彭国雄等(2007). 利用 DSN 和 SMARTTM 技术构建金龟子绿僵菌产孢时期均一化全长 cDNA 文库. 农业生物技术学报, 15 (5): 884–887]
- Zhang ZX, Zhang FD, Tang WH, et al (2005). Construction and characterization of normalized cDNA library of maize inbred M017 from multiple tissues and developmental stages. Mol Biol, 39 (2): 198–206
- Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, et al (2004). Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. Nucl Acids Res, 32 (3): e37

Construction and evaluation of flower bud normalized cDNA library of male sterile of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. *pekinensis*)

LI Zhen-Zhen, WU Pei-Qi, CHENG Ya-Xiong, SONG Hong-Xia, LI Mei-Lan, HOU Lei-Ping*, XU Xiao-Yong*

College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

Abstract: To obtain normalized cDNA library of Chinese cabbage buds with *pol* cytoplasmic male sterile, the library was constructed by DSN (duplex-specific nuclease) normalization method in combination with SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technology. Then the purified cDNA was recombined with pDONRTM/Zeo vector and transformed into *E. coli* DH10B. The titer of the library was about 3.2×10^6 cfu·mL⁻¹, the total CFU was about 1.28×10^7 cfu, and the average size of the inserted fragments was about 1.2 kb with a recombinant about 97%. The redundancy of the library which tested by 100 randomly sequenced clones was only 3.7%. These results indicated that this normalized cDNA library had been successfully established with high quality, which laid the foundation for further research on the molecular mechanism of *pol* male sterility of Chinese cabbage.

Key words: Chinese cabbage; cytoplasmic male sterility; *pol* type; cDNA library; normalization

Received 2017-11-02 Accepted 2018-01-10

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31401885) and Natural Science Foundation of Shanxi Province (201701D121101).

*Co-corresponding authors: Hou LP (sxndhlp@126.com), Xu XY (xuxy7926@163.com).