

文章编号: 1000- 0615(2005)05- 0666- 04

海带雄性配子体差异表达基因片段的克隆及筛选

史西志, 毕燕会, 周志刚

(农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要: 利用抑制消减杂交法 (suppression subtractive hybridization, SSH) 获得了海带雌、雄配子体差异表达的 cDNA 片段, 将雄配子体差异表达的 cDNA 片段克隆于 pGEM-T 载体并转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109, 构建雄配子体差异表达的 cDNA 消减文库。自 750 个阳性克隆中随机挑选 100 个进行 PCR 扩增鉴定, 电泳图谱表明插入片段大小在 200~ 1000 bp 之间。进一步经过 Southern 斑点杂交筛选后, 选取 10 个阳性克隆进行测序和序列分析, 有 7 个片段与 GenBank 数据库中已知基因序列无明显同源性, 初步判断为新的基因序列, 3 个片段与已知 *Fcp* 基因和 *Lhf* 6 基因的同源性分别达到 88% 和 98%。

关键词: 海带; 差异表达基因; 抑制消减杂交; cDNA 消减文库; 雄配子体

中图分类号: S917 文献标识码: A

Cloning and screening of differentially expressed genes from the male gametophytes of *Laminaria japonica* Aresch

SHI Xi-zhi, BI Yan-hui, ZHOU Zhi-gang

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Differentially expressed cDNAs subtracted female from male gametophytes of *Laminaria japonica* were obtained by suppression subtractive hybridization (SSH). The differentially expressed cDNAs from the male gametophytes were ligated into the pGEM-T vector and the latter was consequentially transformed into *Escherichia coli* JM109 competent cells. The subtracted cDNA libraries of male gametophytes were constructed. One hundred randomly selected clones were amplified by PCR using T7 and SP6 primers for primary screening. The length of inserted fragments assayed by PCR amplification was mostly from 200 to 1000 base pairs. Ten clones obtained after dot blot Southern hybridization were sequenced and analyzed for homology comparison using BLAST. Seven of the ten clones showed no sequence homology in the GenBank database, suggesting that they or at least some of them with longer base pairs might represent novel gene sequences. The other three clones shared 88% and 98% sequence homologies with understood *Fcp* and *Lhf*'s genes, respectively.

Key words: *Laminaria japonica*; differentially expressed genes; suppression subtractive hybridization (SSH); subtracted cDNA library; male gametophyte

Evans^[1,2] 在掌状海带 (*Laminaria digitata*) 等几个物种的雌配子体细胞中发现 2 个较小和 1 个较大的染色体, 他推测那个较大的染色体可能是这几个物种的 X 染色体。方宗熙等^[3] 认为海带 (*L. japonica*) 存在性染色体, 并推测其形态与常染色体或许没有明显差异, 这也解释了戴继勋和

方宗熙^[4] 及 Yabu 和 Yasui^[5] 仅利用细胞学方法在海带中为什么未发现大型性染色体存在的可能原因。那么海带细胞中是否存在性染色体? 我们拟通过分离和鉴定海带配子体的差异表达基因, 明确它们在染色体上的功能定位, 分析它们在后代中的遗传规律, 为探讨海带配子体性别分化的遗

收稿日期: 2004-08-16

资助项目: 国家自然科学基金 (39800105, 30471328); 上海市教育委员会重点研究项目 (04KA02); 上海水产大学校长专项基金

作者简介: 史西志 (1979-), 男, 山东淄博人, 硕士研究生, 主要从事藻类生物技术的研发

通讯作者: 周志刚, Tel: 021-65710533, E-mail: zgzhou@shfu.edu.cn

传机理提供一条可行途径。

目前筛选差异表达基因的方法有多种, 但 mRNA 差异显示 (mRNA differential display, mRNA DD) 假阳性率较高^[6]、代表性差异分析 (representational difference analysis, RDA) 无法解决低丰度 mRNA 基因的检出问题^[7], 而抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 是 Diatchenko 等^[8] 建立起来的一种比较有效地富集、鉴别不同丰度差异表达基因的方法, 可以弥补前两种方法存在的不足, 同时 SSH 方法还可以在不需要知道所研究材料的任何遗传信息情况下, 只要遗传基础相近都能够直接寻找差异表达的基因。

鉴于中国目前养殖的海带属于自交系, 而不是纯系, 为了避免产生更多的非目的的基因片段, 确保雌、雄配子体遗传背景的基本一致, 我们取自同一棵经济性状优良的种海带所产生的游动孢子中, 分别建立了 30~50 株雌、雄性无性繁殖系。选择长势较好的雌、雄配子体无性繁殖系各一株, 运用 SSH 方法, 构建雄配子体 cDNA 消减文库, 初步筛选了雄性差异表达的基因片段, 为进一步进行雄性差异表达基因的克隆和功能鉴定奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用种海带于 1999 年采自山东荣城俚岛海兴水产有限公司养殖场, 按已报道的方法^[9] 诱导、分离并分别建立 30~50 株雌、雄性配子体无性繁殖系, 选择长势较好的雌 (RF ♀ 22)、雄 (RF ♂ 40) 配子体无性繁殖系接种于 PES 培养基^[10], 采用日光灯作为光源, 17 °C, 20~30 μmol·m⁻²·s⁻¹ 光照下, 利用 14 h/10 h (L/D) 光周期静止培养 20 d, 每天人工摇动 3~4 次。

1.2 mRNA 的分离、纯化

将刚刚收集的新鲜配子体, 按照 Trizol (GibcoBRL 公司) 试剂盒所提供的方法提取总 RNA, 利用 Oligotex mRNA 试剂盒 (Qiagen 公司) 分离纯化 mRNA。采用紫外分光光度计检测 RNA 的纯度^[11], 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的质量, 用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的纯水将 mRNA 的终浓度调至 0.5~1 μg·mL⁻¹。

1.3 抑制消减杂交与 cDNA 消减文库的构建

按 PCR-SelectTM cDNA 消减试剂盒 (Clontech 公司) 方法分别进行正向 (雄配子体为实验方, 雌配子体为驱动方) 和反向 (雌配子体为实验方, 雄配子体为驱动方) 抑制消减杂交, 将正向消减的 PCR 产物克隆入 pGEM-T 载体 (Promega 公司) 并转化至 *Escherichia coli* JM109, 构建 cDNA 消减文库。

1.4 斑点杂交筛选阳性克隆、测序及同源性分析以碱裂解法^[11] 提取质粒, 利用质粒两端差异

的引物 T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3') 和 SP6 (5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3') 进行 PCR 快速鉴定, 挑选经过 PCR 初步鉴定含有插入片段的质粒 DNA 制备 cDNA 消减文库的两份相同的尼龙膜拷贝, 将正向和反向消减杂交的第二轮 PCR 产物, 先后以 *Rsa*I (15 U, 37 °C, 1 h)、*Sma*I (10 U, 30 °C, 1 h)、*Eae*I (10 U, 37 °C, 1 h) 酶切消化, 纯化后用 DIG-Chem-Link 试剂盒 (Roche 公司) 标记后作为探针, 42 °C 杂交 16 h, 杂交后的尼龙膜于室温下用 2 × SSC, 0.1% SDS 洗两次, 每次 5 min, 然后用 0.1 × SSC, 0.1% SDS 68 °C 洗膜两次, 每次 15 min。最后将尼龙膜静置于新配制的 NBT-BCIP 溶液 (Roche 公司) 中, 室温下避光显色 4~16 h。挑选阳性克隆测序, 去除载体序列后输入 GenBank 数据库进行序列同源性分析。

2 结果与讨论

2.1 正向和反向消减 cDNA 的 PCR 产物

抑制消减杂交方法主要是通过两次消减杂交和巢式 PCR 扩增, 使目标 cDNA 片段得到均等化和有效的富集, 提高了该方法的差异性和灵敏度, 保证了低丰度 mRNA 的检出率。同时抑制消减杂交过程中利用 *Rsa*I 限制性内切酶对双链 cDNA 进行酶切, 形成 600 bp 左右的短 cDNA 片段, 提高了单个基因的代表性。最后通过巢式 PCR 进行扩增, 只有两端分别为不同接头的 cDNA 片段才能以指数形式扩增^[8], 由图 1 可以看出, 正、反向消减后的 PCR 扩增产物在电泳图谱上呈现弥散状, 并可见到几条不太明显的条带, 正向消减的 cDNA 片段大小在 200~1000 bp 之间, 主要集中在 300~700 bp 之间, 反向消减的 cDNA 片段主要集中在 200~800 bp 之间。

2.2 cDNA 消减文库的构建及筛选

通过蓝、白斑筛选, 共获得 750 个白色克隆, 随机挑选 100 个, 抽提质粒后, 利用两端差异的引物(T7、SP6) 进行 PCR 快速鉴定, 电泳图谱表明插入片段的大小在 200~ 1000 bp 之间(图 2), 与正向消减 cDNA 的 PCR 产物大小基本一致(图 1)。

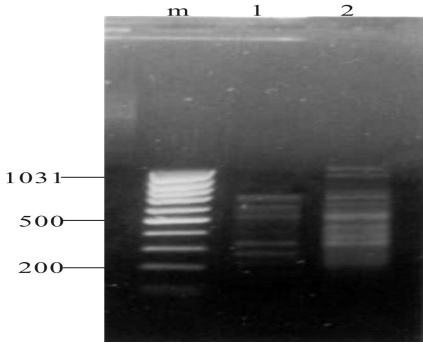


图 1 抑制消减杂交的第二次 PCR 扩增产物 (2.0%TAE 琼脂糖凝胶)

Fig. 1 Agarose electrophoresis patterns of the secondary PCR products after the subtractive hybridization
m. GeneRuler™ 100 bp DNA 分子量标准; 1. 反向消减的 PCR 扩增产物; 2. 正向消减的 PCR 扩增产物
m. molecular marker of GeneRuler™ 100 bp DNA ladder; 1. PCR products of reverse-subtracted cDNA; 2. PCR products of forward-subtracted cDNA

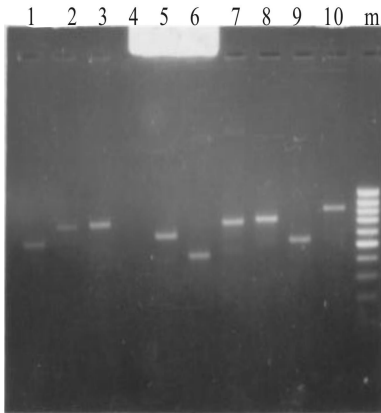


图 2 利用 PCR 扩增产物鉴定插入片段的电泳图谱

Fig. 2 Agarose electrophoresis profiles of PCR amplified products of inserted fragments

m. GeneRuler™ 100 bp DNA 分子量标准; 1~ 10. 随机挑选克隆 PCR 扩增产物
m. molecular marker of GeneRuler™ 100 bp DNA ladder; 1~ 10. amplified products of randomly selected clones

斑点杂交采用正、反向消减 cDNA 探针, 与反式 Northern 斑点杂交相比, 提高了低丰度消减 cDNA 的筛出率, 利用斑点杂交初步筛选 cDNA 文库可以大大提高 Northern 杂交分析的效

率^[12, 13], 斑点杂交选取仅与正向消减探针杂交的克隆及杂交信号明显强于反向消减探针的克隆为阳性克隆, 图 3 显示 a4、a7、a8、a9、a11、b1、b3、b5、b8、b9、b10、b11、c2、c4、c6、c8、c9、d1、d4、d5、d6、d8、d9、e3、e4、e6、e7、e8、e9、e10 等 30 个克隆可能含有雄配子体差异表达基因的 cDNA 片段。

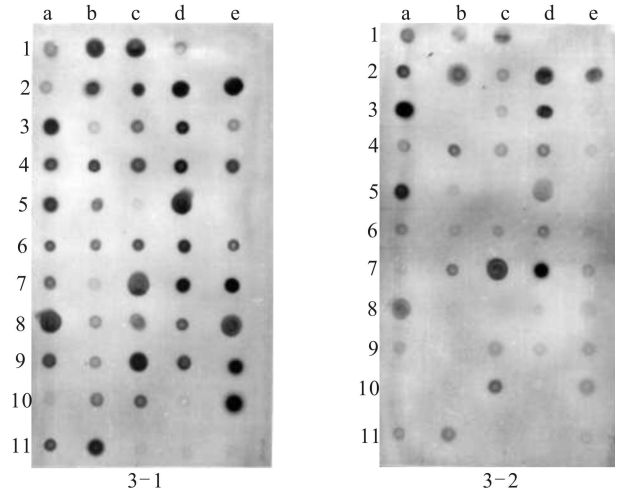


图 3 Southern 斑点杂交筛选部分结果

Fig. 3 Examples of differential screening after Southern dot-blot hybridization with forward- and reverse-subtracted cDNA probes
3- 1: 正向消减 cDNA 探针杂交; 3- 2: 反向消减 cDNA 探针杂交.
a4、a7、a8、a9、a11、b1、b3、b5、b8、b9、b10、b11、c2、c4、c6、c8、c9、d1、d4、d5、d6、d8、d9、e3、e4、e6、e7、e8、e9、e10 为阳性克隆
3- 1. forward-subtracted cDNA probes; 3- 2. reverse-subtracted cDNA probes; a4, a7, a8, a9, a11, b1, b3, b5, b8, b9, b10, b11, c2, c4, c6, c8, c9, d1, d4, d5, d6, d8, d9, e3, e4, e6, e7, e8, e9, and e10 are the positive clones

2.3 阳性克隆测序及同源性分析

从斑点杂交筛选得到的阳性克隆中随机挑选 10 个克隆进行序列测定, 其中 18、G8 为相同的 cDNA 片段, 其他分别为不同的 cDNA 片段。测序得到的 cDNA 序列去除载体序列后输入 GenBank 数据库进行同源性搜索, 结果见表 1。7 个 cDNA 片段与已知基因序列无明显同源性, 初步判断为新的基因序列, 有 3 个 cDNA 片段 BA079- 1、BA079- 10、D11 分别与已知的 *Fcp* 基因、*Fcp* 基因、*Lhf6* 基因有较高的同源性。Pascal 等^[14]报道褐藻的捕光色素- 蛋白复合物不仅具有光能的吸收、传递、光保护及对各种环境的适应等作用外, 还具有其他例如光磷酸化的作用。De Martino 等^[15]通过对 *Laminaria saccharina* 的 LHCFs 基因克隆研究, 认为该基因在配子体或孢

子体发育的差异阶段可能优先转录, 并认为 LHCFs 基因不仅仅具有光调控的功能。通过对海带雌、雄配子体差异表达基因的初步研究, 我们推测 LHCFs 基因在海带雌、雄配子体的生长发育及

配子的形成过程中可能起着不同的作用。目前, 我们正在进行 LHCFs 基因片段全长序列的克隆, 并将进一步探讨其功能。

表 1 海带雄性配子体 cDNA 消减文库中 10 个阳性克隆的测序和同源性比较

Tab. 1 Sequencing and homology search of selected positive clones from the subtracted cDNA library of *Laminaria japonica* male gametophytes

克隆编号 clone code	cDNA 片段长度 (bp) cDNA length	GenBank 搜索结果 results after GenBank BLAST search
16	165	未知 unknown
18	396	未知 unknown
BA079- 1	369	墨角藻黄素- 叶绿素 <i>a/c</i> 结合蛋白 (88% 同源) fucoxanthin chlorophyll <i>a/c</i> binding protein (88%)
B7	377	未知 unknown
2	435	未知 unknown
BA079- 10	281	墨角藻黄素- 叶绿素 <i>a/c</i> 结合蛋白 (88% 同源) fucoxanthin chlorophyll <i>a/c</i> binding protein (88%)
E12	357	未知 unknown
D11	271	捕光蛋白 <i>lhcf</i> 6 (98% 同源) light harvesting protein <i>lhcf</i> 6 (98%)
G8	396	未知 unknown
A10	499	未知 unknown

参考文献:

- [1] Evans L V. A large chromosome in the *Laminarian nucleus* [J]. Nature, 1963, 198: 215.
- [2] Evans L V. Cytological studies in the Laminariales [J]. Ann Bot, 1965, 29: 541- 572.
- [3] 方宗熙, 欧毓麟, 崔竞进, 等. 海带单倍体遗传育种的实验 [J]. 中国科学, 1978, 21: 226- 231.
- [4] 戴继勋, 方宗熙. 海带的染色体 [J]. 遗传学报, 1977, 4: 325 - 328.
- [5] Yabu H, Yasui H. Chromosome number in four species of *Laminaria* (Phaeophyta) [J]. Jan J Phycol, 1991, 39: 185 - 187.
- [6] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257: 967- 970.
- [7] Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes [J]. Science, 1993, 59: 946- 951.
- [8] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025- 6030.
- [9] 周志刚, 吴超元. 海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导 [J]. 生物工程学报, 1998, 14: 108- 111.
- [10] Starr R C, Zeikus J A. UTEX- The culture collection of algae at the University of Texas at Austin [J]. J Phycol, 1993, 29: 1- 106.
- [11] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed) [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001, 7: 4- 7. 8.
- [12] Lukyanov K A, Matz M V, Bogdanova E A, et al. Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: an approach to *in vitro* cloning [J]. Nucl Acids Res, 1996, 24: 2194- 2195.
- [13] Wang Z, Brown D D. A gene expression screen [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 11505- 11509.
- [14] Pascal A A, Caron L, Rousseau B, et al. Resonance Raman spectroscopy of a light-harvesting protein from the brown alga *Laminaria saccharina* [J]. Biochemistry, 1998, 37: 2450- 2457.
- [15] De Martino A, Douady D, Quinet-Szely U, et al. The light harvesting antenna of brown algae highly homologous proteins encoded by a multigene family [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 5540- 5549.