

草豆蔻 cDNA 文库的构建及鉴定

宋娟娟¹, 马伟², 唐源江¹, 陈忠毅¹, 廖景平^{1*}

(1. 中国科学院 华南植物园, 广州 510650; 2. 上海交通大学 生命科学学院, 上海 200030)

摘要: 以草豆蔻花序原基为材料, 构建了 cDNA 文库。原始文库滴度为 0.8×10^6 pfu/mL, 扩增后滴度为 4.23×10^{11} pfu/mL。插入片段大小在 500 bp~1.5 kb 之间, 重组率为 95.3%。以水稻 RAP1A 基因中包含 MADS-box 保守区段的序列为探针对该文库进行筛选, 获得的阳性克隆经测序及序列比对分析, 确认其中共有 10 个含 MADS-box 的阳性克隆。

关键词: 草豆蔻; cDNA 文库; MADS-box 基因; 花序原基

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)04-0551-04

Construction and identification of cDNA library of *Alpinia hainanensis* (Zingiberaceae)

SONG Juan-Juan¹, MA Wei², TANG Yuan-Jiang¹,
CHEN Zhong-Yi¹, LIAO Jing-Ping^{1*}

(1. *South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China*; 2. *Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China*)

Abstract: An inflorescences primordium cDNA library of *Alpinia hainanensis* K. Schumann was constructed. The titer of the cDNA primary library is 0.8×10^6 pfu/mL, while that of the amplified library is 4.23×10^{11} pfu/mL. The recombinant rate is about 95.3%, and the length of cDNA is between 500 bp~1.5 kb. The fragment containing the MADS-box conserved sequence of RAP1A gene of *Oryza sativa* is used as probe to screen the library. Positive clones are sequenced and the sequences are analyzed first blast within the NCBI database, then alignment with the known MADS-box gene. Ten MADS-box genes from *A. hainanensis* are identified.

Key words: *Alpinia hainanensis*; cDNA library; MADS-box gene; inflorescences primordium

在姜科植物的花器官演化过程中, 侧生钻状附属体、唇瓣的属性及其与退化雄蕊的关系问题一直是姜科植物研究中一个倍受关注的研究热点。长期以来, 多数研究者 (Rao 等, 1954; Rao, 1963; Pai, 1965; Burrt, 1972) 根据形态学及解剖学证据认为唇瓣是由两枚内轮雄蕊演化来的, 而侧生钻状附属体则代表了两枚外轮退化雄蕊, 但这个观点一直缺乏分子生物学方面的证据。

Coen 等 (1991) 以及 Bowan 等 (1991) 就花发育

的基因控制机理提出了花发育的 ABC 模型, 该模型较完善地阐述了花器官建成过程中花器官各组成部分的属性问题, 以及花发育调控基因的表达模式。为了研究姜科植物花发育的分子机理, 克隆控制花器官发育及属性的 ABC 功能基因, 并进而在分子水平上对姜科植物的花器官属性作进一步的研究, 为此开展了姜科代表植物草豆蔻 (*Alpinia hainanensis*) 的 cDNA 文库构建和 MADS-box 基因筛选的工作。

收稿日期: 2005-11-18 修回日期: 2006-07-06

基金项目: 国家科技部专项 (2001CCA00300); 中国科学院学科前沿领域项目; 国家自然科学基金 [Supported by Ministry of Science and Technology (2001CCA00300); Field Frontiers Project of the Chinese Academy of Sciences; the National Natural Science Foundation of China]

作者简介: 宋娟娟 (1975-), 女, 山东胶州人, 博士, 主要从事遗传与发育方面研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence)

1 材料和方法

1.1 材料

(1)草豆蔻不同发育时期的花序原基,采自中国科学院华南植物园姜园。(2)cDNA 合成试剂盒、包装蛋白及反转录酶等购自 Stratagene 公司;Oligotex mRNA kit 购自 Qiagen 公司;TRIZOL 试剂购自 GibcoBRL 公司。(3)含水稻(*Oryza sativa*)基因 RAP1A(AB003325)的质粒由中科院上海植物生理研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化 草豆蔻的总 RNA 抽提采用 TRIZOL 法。花序原基经液氮研磨后,参照 TRIZOL 试剂盒(美国 GIBCOBRL 公司)说明抽提总 RNA(具体方法见 <http://www.gibco-brl.com/content/sfs/manuals/15596026.pdf>),琼脂糖凝胶电泳鉴定其质量。

采用 Qiagen 公司的 Oligotex mRNA kit 从总 RNA 中分离纯化出 mRNA。并用紫外分光光度计(BECKMAN,DU640)测定 mRNA 的浓度并鉴定其质量。

1.2.2 cDNA 的合成及 cDNA 文库的构建 草豆蔻 cDNA 文库采用 Stratagene 的 Uni-ZAP XR cDNA 构建试剂盒构建,操作按该试剂盒的使用说明进行。

1.2.3 cDNA 文库质量的测定 (a)cDNA 文库容量的测定:取 1 μ L 包装好的噬菌体液,稀释成不同的浓度,分别与培养好的大肠杆菌 XL1-blue 混合,37 $^{\circ}$ C 培养 15 min,加入 48 $^{\circ}$ C 的 NZY 上层培养基,快速混匀后立即倒入 37 $^{\circ}$ C 预热的 NZY 平板上,待平板上层培养基凝固后,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜,统计噬菌体斑数目并计算 cDNA 文库的库容量。(b)插入片段大小的检测:用牙签随机挑取噬菌斑 21 个,分别接种到 PCR 反应混合液中,以 T₃、T₇ 为引物进行克隆 PCR,扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 MADS-box 基因的筛选 (a)探针制备: MADS-Box 基因的 5'端一般都有 1 个约 180 bp 的保守区域,即 MADS-Box,它编码 1 个 DNA 结合域。本工作以水稻基因 RAP1A(AB003325)中含 MADS-Box 序列的 DNA 片段为探针来筛选 cDNA 文库,探针的标记采用随机引物标记法。(b) MADS-box 基因的筛选:文库筛选按照《分子克隆

实验指南》(黄培堂,等译,2002)所述方法进行,经 2~3 轮的嗜菌斑转膜,Southern 杂交,获得若干阳性克隆,经序列测定后,将序列于 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的数据库中做 Blast 分析,确定所得到的克隆是否是目的基因。

2 结果和讨论

2.1 草豆蔻总 RNA 与 mRNA 的抽提

草豆蔻的花序原基采用 TRIZOL 方法抽提出总 RNA,电泳分离结果表明,28sRNA 和 18sRNA 带型清晰,说明总 RNA 提取完好,未被降解。总 RNA 经 Oligotex 柱纯化后获得 mRNA,经测定其 260 nm 与 280 nm 的比值为 2.126:1,说明 mRNA 足够纯,符合建库要求。

2.2 文库质量鉴定

经文库滴度测定,原始文库的滴度为 0.8×10^6 pfu/mL,接近 cDNA 文库滴度的最佳值 1×10^6 pfu/mL,扩增后滴度为 4.23×10^{11} pfu/mL。

随机挑取 21 个噬菌斑,以 T₃、T₇ 为引物进行克隆 PCR,发现有 20 个克隆可扩增出 DNA 片段(图 1),因此该文库的重组率为 95.3%,满足文库重组率须达 80% 以上的标准。在扩增出的克隆中,有 18 个克隆的插入片段大小在 500 bp~1.5 kb 之间,符合优质 cDNA 文库插入片段平均值应达到 1.0 kb 的要求。

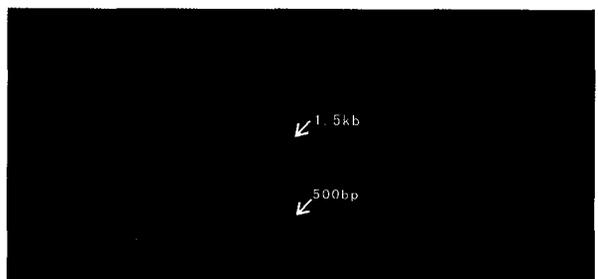


图 1 草豆蔻 cDNA 文库克隆 PCR 电泳图
Fig.1 The clone-PCR of the cDNA library of *A. hainanensis*

2.3 草豆蔻 MADS-Box 基因的筛选

除个别基因外,ABC 模型中控制花发育的基因都属于 MADS-Box 基因家族。所有植物 MADS-Box 基因的 5'端都有 1 个约 180bp 的保守区域,即 MADS-Box,它编码 1 个 DNA 结合域(Ng 等,

2001)。为检测所构建的草豆蔻 cDNA 文库的代表性,在本工作中,以水稻 MADS-Box 基因 *RAP1A* (AB0032)的包含 MADS-box 序列的片段为探针

约 160,000 个噬菌斑进行了筛选,结果表明阳性信号明显(图 2),共获得 38 个阳性克隆。

经过测序、序列分析,最终确认得到 10 个包含



图 2 草豆蔻基因 MADS-Box 序列与公认 MADS-Box 序列比较

Fig. 2 Comparison of MADS-Box region of genes of *A. hainanensis* and the consensus MADS-Box sequence

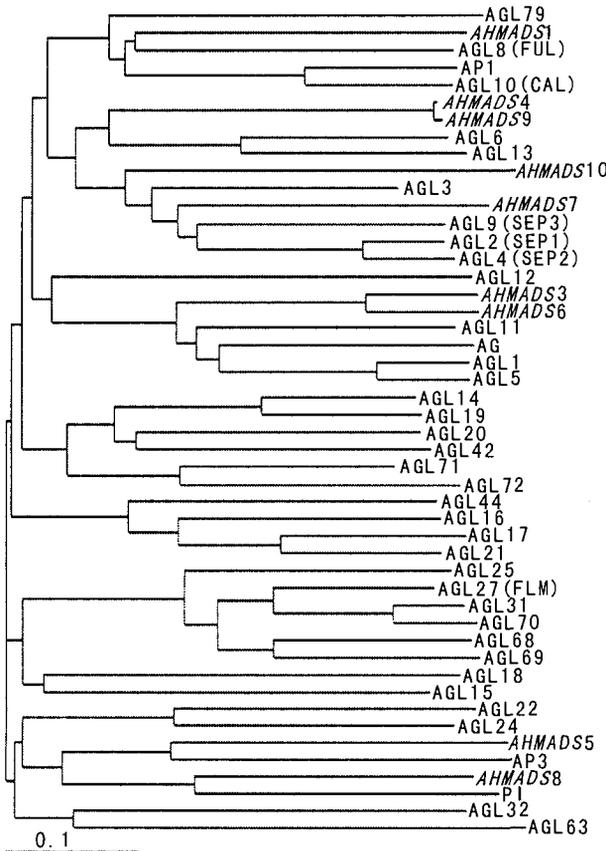


图 3 小草蔻和拟南芥中 MADS-box 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree for *Alpinia* and *Arabidopsis* MADS-box genes

下划线为小草蔻基因

Genes of *Alpinia* are underlined

MADS-box 结构的不同克隆,分别命名为 *AHMADS1*、*AHMADS2*... *AHMADS10*,这 10 个基因分别属于 A、B、C 三个功能。利用 ClustalW multiple alignment 对得到的克隆的 MADS-Box 与公认的 MADS-Box 的氨基酸序列(Theißen 等,1996)进行比较,结果显示(图 2)草豆蔻基因的 MADS-Box 序列与公认 MADS-Box 序列有很高同源性,草豆蔻的 10 个克隆的 MADS-Box 序列之间的同源性也很高。在得到的 10 个克隆中, *AHMADS5*、*AHMADS6* 以及 *AHMADS8* 已提交到 GenBank 中,其登录号分别为 AY621154、AY621155、AY621156。

为了进一步确定草豆蔻阳性克隆的进化位置及功能分类,我们用草豆蔻基因的蛋白全长序列和拟南芥的 MIKC 类 MADS-box 基因的蛋白全长序列做了系统进化树(图 3)。根据 Theißen 等(1996)对 MADS-box 基因的分类,对照我们的系统进化树,可以看出 *AHMADS1* 属于 SQUA 亚家族; *AHMADS4*、*AHMADS9*、*AHMADS10* 和 *AHMADS7* 落入 AGL2 亚家族; *AHMADS3*、*AHMADS6* 落入 AG 亚家族,而 *AHMADS5*、*AHMADS8* 分别落入 B 功能基因的两个亚家族:DEF 和 GLO 亚家族。也就是说, *AHMADS1* 属于 A 功能基因同源基因, *AHMADS4*、*AHMADS9*、*AHMADS10*、*AHMADS7*、*AHMADS3* 以及 *AHMADS6* 属于 C 功能基因, *AHMADS5* 和 *AHMADS8* 属于 B 功能基因,而 *AHMADS7* 则属于 E 功能基因。因为 *AH-*

MADS2 翻译的蛋白序列太短,没有用到系统树的制作中。

MADS-Box 基因属于低丰度的基因,我们在 160 000 个克隆中得到了 10 个不同的目的克隆,说明草豆蔻 cDNA 文库构建所选用的花序原基材料的时期较为合理,同时说明所构建的 cDNA 文库是一个比较完整、代表性较高的文库。

中国科学院上海植物生理研究所罗达研究员、冯献忠博士,中国科学院西双版纳热带植物园李庆军研究员、夏咏梅副研究员对本研究提出了宝贵意见,中国科学院上海植物生理研究所董志诚博士对实验方法及软件应用给予了指导,中国科学院华南植物园博士生邹璞及禹玉华、方坚平先生在材料的采集过程中给予了很大帮助,特此致谢!

参考文献:

黄培堂,王嘉玺,朱厚照,等(译). 2002. 分子克隆实验指南

[M]. 第 3 版. 北京:科学出版社:224—233

- Burr B L. 1972. General introduction to papers on Zingiberaceae [J]. *Notes Roy Bot Gard Edinburgh*, **31**:155—165
- Bowan J L, Smyth D R, Meyerowitz EM. 1991. Genetic interaction among floral homeotic genes of *Arabidopsis* [J]. *Development*, **112**:1—20
- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorl: genetic interactions controlling flower development [J]. *Nature*, **353**:31—37
- Ng M, Yanofsky M F. 2001. Function and evolution of the plant MADS-Box gene family [J]. *Nature*, **2**:186—195
- Pai R M. 1965. The floral anatomy of *Elettaria cardamomum* Maton. A reinvestigation [J]. *New Phytol*, **64**:187—204
- Rao V S. 1963. The epigynous glands of Zingiberaceae [J]. *New Phytol*, **62**:342—349
- Rao V S, Karnik H, Gupte K. 1954. The floral anatomy of some Scitamineae I [J]. *J Indian Bot Soci*, **33**:118—147
- Theißen G, Kim J T, Saedler H. 1996. Classification and phylogeny of the MADS-Box multigene family suggest defined roles of MADS-Box gene subfamily in the morphological evolution of eukaryotes [J]. *J Mol Evol*, **43**:484—516

(上接第 575 页 Continue from page 575)

Syst, **5**:1—24

- Bretschneider E M D. 1898. History of European Botanical Discoveries in China [M]. Petersburg: Press of Imperial Russian Academy of Sciences, 1—167
- Castri di E. 1989. History of biological invasions with special emphasis on the old world [M]//Drake J A, Mooney H A, Castri di F (eds). John Wiley, Chichester: Biological invasions; a global perspective, UK, 1—30
- Crosby A W. 1986. Ecological imperialism; the biological expansion of Europe [M]. New York, USA: Cambridge University Press, 900—1 900
- Daehler C D. 1998. The taxonomic distribution of invasive angiosperm plants, ecological insights and comparison to agricultural weeds [J]. *Biol Conserv*, **84**:167—180
- Daehler C D, Carino D A. 2000. Predicting invasive plants: prospects for a general screening system based on current regional models [J]. *Biol Invas*, **2**:93—102
- Dunn S T, Tutcher W J. 1912. Flora of Kwangtung and Hongkong (China) Kew Bull [M]. London: Misc Inf Additional Series X His Majesty's Stationery Office,
- Guo QF (郭勤峰). 2002. Perspectives on trans-pacific biological invasion (跨太平洋生物入侵研究展望) [J]. *Acta Phytocol Sin* (植物生态学报), **26**(6):724—730
- He WQ (贺握权), Huang ZL (黄忠良). 2004. Dynamics and impacts of invasion by nonnative plant species to Dinghushan Nature Reserve (外来植物种对鼎湖山自然保护区的入侵以及影响) [J]. *Guangdong Fore Sci Tech* (广东林业科技), **20**(3):42—45
- Ng Sai-Chit (吴世捷), Richard Corlett (高力行). 2002. The bad biodiversity; alien plant species in Hong Kong (不受欢迎的生物

多样性:香港的外来植物种) [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **10**(1):109—118

- Pysek P, Prach K, Rejmanek M, et al. 1995. Plant Invasions General Aspects and Special Problems [M]. SPB Academic, 1—263
- Qi SY (齐淑艳), Xu WD (徐文锋). 2006. Study on types composition and distribution characteristics of alien invasive plants in Liaoning (辽宁外来入侵植物种类组成与分布特征的研究) [J]. *J Liaoning Fore Sci Tech* (辽宁林业科技), **3**:11—15
- Rejmanek M. 1995. What makes a species invasive [M]//Pysek P, Prach K, Rejmanek, M (eds). SPB Academic: Plant Invasions General Aspects and Special Problems; 3—13
- Shan JL (单家林), Yang FC (杨逢春), Zheng XQ (郑学勤). 2006. Exotic plants in Hainan Province (海南岛的外来植物) [J]. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), **35**(3):39—44
- Usher M B, Kruger F J, Macdonald I A W, et al. 1988. The ecology of biological invasions into nature reserves; an introduction [J]. *Biol Conserv*, **44**:1—8
- Williams D G, Baruch Z. 2000. African grass invasion in the Americas; ecosystem consequences and the role of ecophysiology [J]. *Bio Invas*, **2**:123—140
- Xie Y, Li Z, Gregg W P, et al. 2001. Invasive species in China—an overview [J]. *Biodiversity and Conservation*, **10**:1 317—1 341
- Xu CD (徐成东), Lu SG (陆树刚). 2006. The invasive plants in Yunnan (云南的外来入侵植物) [J]. *Guihaia* (广西植物), **26**(3):227—234
- Yan YH (严岳鸿), Xing FW (邢福武). 2004. The exotic plants in Shenzhen (深圳外来植物) [J]. *Guihaia* (广西植物), **24**(3):232—238