

## 利用 mRNA 差别显示技术分离盐胁迫 下红树植物白骨壤耐盐相关 cDNA

周涵韬\* 林 鹏

(厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

**摘 要** 从福建龙海红树林自然保护区采集白骨壤的隐胎生果实,在实验室分别置于 0‰ 盐度海水和 50‰ 盐度海水进行沙培。分别取叶片,提取纯化 RNA。通过锚定引物 Oligo dT<sub>12</sub>GC 反转录和 8 个 10 核苷酸随机引物进行 PCR 扩增,经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后发现了 3 个差异 DNA 片段只在高盐培养条件的白骨壤基因组中表达,而在无盐培养条件中没有出现。这 3 个差异 cDNA 片段分别命名为 csrg1(600bp)、csrg2(550bp)、csrg3(480bp)。3 个差异 cDNA 片段的 RNA 杂交结果显示,只有 csrg1 片段存在明显差异-高盐中有杂交斑点,无盐中无杂交斑点;而其余 2 个片段在高盐和无盐条件下都没有杂交斑点出现。从而表明 csrg1 就是耐盐相关 cDNA。进一步将 csrg1 片段克隆,并进行 DNA 序列分析。全序列在 GenBank 中查询后,未发现相关同源片段。耐盐相关 cDNA 片段的获得,将为分离全长耐盐基因,搞清该基因表达调控的机理提供条件。

**关键词** 白骨壤, mRNA 差别显示, 耐盐性

**中图分类号** Q37 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0051-04

红树林是生长于热带、亚热带陆海交汇的海湾河口潮间带的盐生木本植物群落。它在维护海岸生态平衡;防风减灾、护堤保岸;环境污染监测、净化与防治等方面发挥重要的作用。白骨壤(*Avicennia marina*)属泌盐型红树植物,为全国各地广布类型,自然分布多在滩面外缘,低潮带为主,有些也分布到高潮带。在大潮时几乎全部淹没或仅露出树冠,曾被称为“海底森林”。白骨壤对盐度的适应较广,一般以 5‰~20‰ 盐度海水为多,实验室条件下 0‰ 和 50‰ 盐度海水中生长情况良好<sup>[1]</sup>。它是进行耐盐性生理研究及耐盐基因筛选的好材料。

1992 年美国学者 Liang 等<sup>[2]</sup>和 Stauss<sup>[3]</sup>等首次应用 mRNA 差别显示(Differential display mRNA by PCR, DD-PCR)技术分离和鉴定不同组织/细胞的基因表达,此后该技术便广泛应用于未知基因的分离。通过实验,我们建立起适合于红树植物的 mRNA 差别显示系统。在福建龙海红树林自然保护区采集白骨壤的隐胎生果实,在实验室分别置于 0‰ 盐度海水和 50‰ 盐度海水进行沙培。分别取叶片,提取纯化 RNA,利用所建立的 mRNA 差别显示系统,分离

和克隆耐盐相关 cDNA。白骨壤叶片中耐盐相关 cDNA 的获得,将为全长耐盐基因的获得以及从分子水平上认识和利用红树植物的耐盐性打下基础。

### 1 材料及方法

#### 1.1 材料

在白骨壤隐胎生果实成熟时(9~10 月份),到福建龙海浮宫红树林自然保护区,摘取同一母树发育良好、无病虫害及机械损伤的果实于实验室中沙培。沙粒取自厦门港沙滩,经自来水反复冲洗后晾干,并测定每次自来水净洗后的盐度,直至盐度 < 0.4‰,可认为原海沙中的盐分已清洗干净。装入 2 个花盆中,每盆定植 5 粒果实,分别加入 50‰ 盐度的海水和自来水,自然光照培养。每天用相应培养液补充散失的水分,每隔 15d 更换一次培养液。培养约 50d 用于后续 RNA 提取。结果见图 1。

#### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 的提取与纯化**采用异硫氰酸胍法<sup>[4]</sup>

**1.2.2 mRNA 逆转录反应**以 Oligo dT<sub>12</sub>GC 为引物参照《分子克隆》报道方法合成 cDNA 第一链。

收稿日期:2001-04-12;修回日期:2001-08-22;

基金项目:国家教育部高等学校博士点基金资助(No. 1999038410)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-592-5916403; Fax: 86-592-2186392; E-mail: htzhou@public.xm.fj.cn

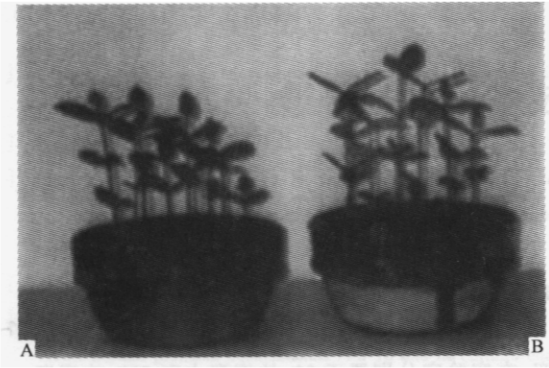


图 1 高盐及无盐条件下白骨壤果实实验室沙培

Fig.1 Sandy culture of the crypto-viviparous fruit of *Avicennia marina* in 50‰ and 0‰ salinity condition respectively

A. 50‰ salinity condition; B. 0‰ salinity condition

**1.2.3 cDNA 片段的 PCR 扩增:** 10 $\mu$ L PCR 反应混合液包括: cDNA 第一链反应产物 0.6 $\mu$ L, 引物 (Opem 公司产 10 核苷酸随机引物) 0.2 $\mu$ mol/L, 1 $\mu$ L 10 $\times$  PCR 反应缓冲液, 200 $\mu$ mol/L dNTPs, 0.5 单位 Taq DNA 聚合酶 (Promega)。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 36 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 共 40 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

**1.2.4 cDNA 扩增片段的凝胶电泳及电泳结果银染**参照《分子克隆》报道的方法。

**1.2.5 cDNA 片段的克隆**参照《分子克隆》报道的方法。

**1.2.6 RNA 杂交分析**参照《分子克隆》报道的方法进行杂交和放射自显影。

**1.2.7 DNA 序列分析**采取荧光双脱氧法, 在 ABI373 型自动测序仪上完成。由宝灵曼公司完成。

## 2 结 果

### 2.1 RNA 分离与纯化结果

异硫氰酸胍法分别提取的高盐和无盐条件培养的白骨壤叶片总 RNA 经甲醛变性凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示。

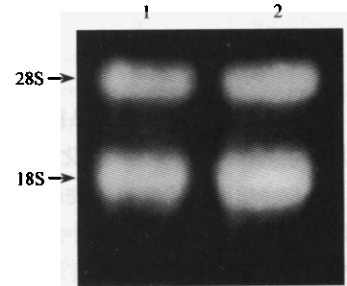


图 2 甲醛变性凝胶电泳检测高盐和无盐条件培养的白骨壤叶片总 RNA 提取结果

Fig.2 Qualification of total RNA extraction of *Avicennia marina* in 50‰ salinity condition and 0‰ salinity condition detected by formaldehyde denatured gel electrophoresis  
1. 0‰ salinity condition; 2. 50‰ salinity condition

### 2.2 白骨壤耐盐相关 cDNA 差别显示电泳结果

差别显示电泳发现 8 个引物 (OPG05, OPH19, OPH01, S58, S78, S88, S168, S198) 能扩增出清晰的 DNA 条带。其中有 3 个引物 (OPH19, S58, S88) 扩增出差异 cDNA 片段只在高盐培养条件的白骨壤基因组中表达, 而在无盐培养条件中没有出现 (图 3)。引物 OPH19 扩增出的差异片段为 600bp, 命名为 *csrg1*; 引物 S58 扩增出的差异片段为 550bp, 命名为 *csrg2*; 引物 S88 扩增出的差异片段为 480bp, 命名为 *csrg3*。

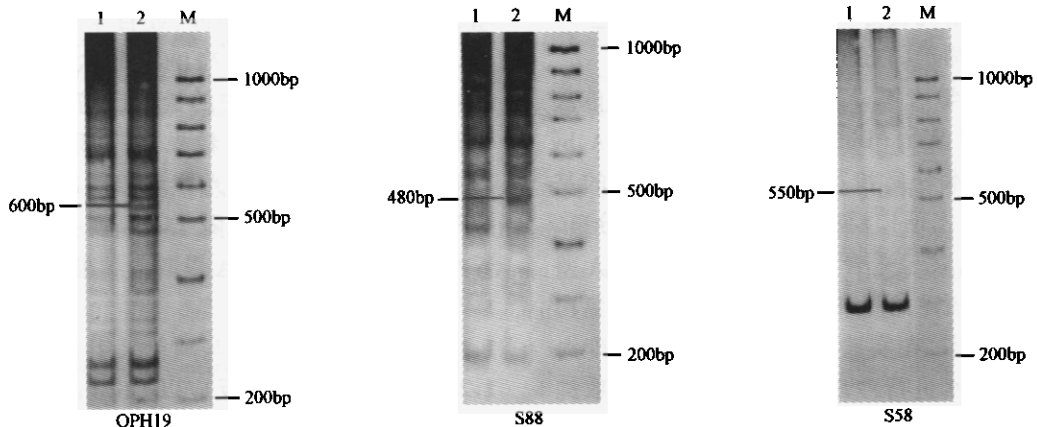


图 3 高盐和无盐条件培养的白骨壤叶片 mRNA 差别显示电泳图谱

Fig.3 mRNA differential display of *Avicennia marina* in 50‰ salinity condition and 0‰ salinity condition by 8% PAGE electrophoresis

1. 0‰ salinity condition; 2. 50‰ salinity condition; M. Marker

### 2.3 差别 cDNA 的 RNA 杂交结果

csrg2 和 csrg3 片段在与高盐和无盐条件培养白骨壤叶片 RNA 杂交图谱中均未出现杂交带,这表明它们与白骨壤的耐盐性无关,为假阳性结果。只有 csrg1 在与高盐和无盐条件培养白骨壤叶片 RNA Northern 杂交图谱中出现杂交带,结果见图 4(a)。对图 4 的结果在凝胶成像系统中作进一步扫描分析结果见图 4(b)。结果表明 csrg1 在与高盐和无盐条件培养白骨壤叶片 RNA 杂交图谱中有明显的差异。与高盐条件培养白骨壤叶片 RNA 杂交的信号强,波峰扫描值为 0.6,是白骨壤叶片在 50‰ 盐度海水培养下,盐胁迫耐盐基因大量表达的结果,与无盐条件培养白骨壤叶片 RNA 杂交的信号非常弱,波峰扫描值 < 0.1,它是白骨壤叶片在 0‰ 盐度海水培养下,没有盐胁迫,耐盐基因不表达或表达量少的结果。

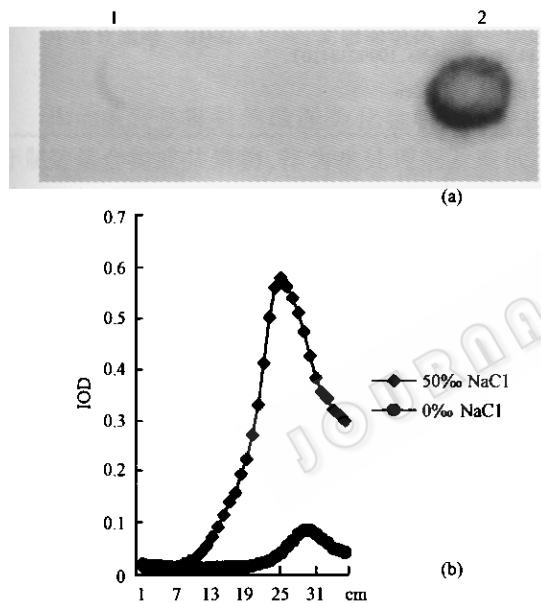


图 4 csrg1 分别与高盐和低盐条件培养白骨壤叶片 RNA 杂交图谱

Fig.4 Hybridization of csrg1 and the RNA of *Avicennia marina* in 50‰ salinity condition and 0‰ salinity condition by Northern blot  
1.0‰ salinity condition;2.50‰ salinity condition

### 2.4 抗盐相关 cDNA 的序列分析结果

对确定为抗盐相关基因的克隆片段-csrg1 进行 DNA 序列分析。DNA 序列分析采取荧光双脱氧法,在 ABI373 型自动测序仪上完成序列见图 5。

csrg1 片段的序列运用 DNA TOOLS 软件作进一步分析可知:①csrg1 片段全长为 593bp(去除引物部分);其中 AT 核苷酸对共 330 对,占 55.6%,GC 核苷酸对共 260 对;占 43.84%,N(不确定的核苷酸对)有

```
1 AAGCTTCTGA CCAAGCCAGAT CAAATGAACT TGGCTCAGTT CCAACTATCG
51 TCATGCCATC CTGTCTATAA ACATAAGCAC CTGGTGAGTA CAATACTGGC
101 AGCAAAAACCA ACATAAGCAC CAACTATAGC AGTAGCTCCG GCCCGGGCTG
151 GCTGCTGAG TGATTGTAAC TGTGGATGGA TCCTGCAGTG GGTGTGTGTC
201 ATGCATGGAT TTATTTCTCG TCTCATCTGG CGTAAGATGC AGTTGCTCTT
251 AGTTGCTCTN GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTC
301 TTTTACTTTC GGCATAAGT GTGTAACGGA AATGTTGCTT AATTACAGGA
351 GGTATTAACG GCGACACGGA AATTAGGCCA ACTCATACTA CTGGCTTAAT
401 CAGGTATATT GTCTCCATGA GTCTCATGAA GGATACATAT GCCATTAATT
451 TCCTGCATGT GGTGTGTGTC ATGCATGGAT TTAGTTCAAG TCTCAGGACT
501 CCGCAAAATTA AGTCTCAITA NTCGATTAGT CCGTTAAGTC ATGGCCATG
551 NTTGCAITCC AATGGATTGC CCCAITCGAT GTTATTCCCG GTGCCITTAAT
601 CCAATTTGTC CGACCAGTCT TCGAA
```

图 5 csrg1 片段的 DNA 序列分析结果

Fig.5 DNA sequencing of csrg1 fragment

3 对占 0.52%。②我们将所获得的耐盐相关 cDNA 序列进入 GenBank 查询,未发现相关的同源序列。这表明 csrg1 片段可能是一个新的片段,当然其功能及表达调控的规律还需做进一步的研究。

### 3 讨论

植物体内各细胞、组织、器官的基因组成与结构完全一致,不同组织器官的细胞之间的差异,是由于基因时间、空间上差异表达的结果。从分子生物学的观点来看,某种特定的性状一定与某种或某些基因相关联。林鹏等<sup>[1]</sup>的研究发现白骨壤内有较强的抗盐性与叶片的泌盐结构、叶片光合作用和蒸腾作用等的适应性变化、白骨壤体内酶及蛋白质的适应性改变等相关,而这也一定与某种或某些基因的一部分或是与抗盐基因紧密连锁,为全长基因序列的获得打下基础。植物的耐盐性无论从生理生化水平、细胞水平、分子水平等上来看,是一个植物整体反应的复杂过程。决定耐盐性的基因也非单基因可以解释,相反很多的研究表明它是一个多基因问题。我们不可能对全体基因同时研究,最好的途径是从某个或某几个基因着手,深入研究,取得一定的突破后,以点带面全面解释耐盐性问题。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] LIN Peng. *Mangrove Ecosystem in China*, Beijing, New York: Science Press, 1999
- [2] Liang Peng, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257: 967 ~ 970
- [3] Strauss M, Bauer D, Muller H *et al*. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique DDRT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21: 4272 ~ 4280
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

## Extraction of the Salt-tolerant cDNA in Mangrove *Avicennia marina* by mRNA Differential Display

ZHOU Han-Tao\* LIN Peng

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** RNAs of the leaves in *Avicennia marina*, which cultured in 50‰ and 0‰ salinity condition respectively, were isolated for mRNA differential display analysis. Screened by OligodT<sub>12</sub> GC and eight 10-oligonucleotide arbitrary primers, differential cDNA fragments-csrg1 (600bp), csrg2 (550bp), csrg3 (480bp), only appeared in the leaves of *Avicennia marina* cultured in 50‰ salinity condition. After detected by RNA dot hybridization, only csrg1 appeared the difference between the RNAs of the leaves in *Avicennia marina* cultured in 50‰ and 0‰ salinity condition respectively, and csrg1 was confirmed as the salt-tolerant cDNA. csrg1 was cloned and sequenced. After searching in Genbank, there were no similar sequences reported.

**Key words** *Avicennia marina*, mRNA differential display, salt tolerance

Received: 04-12-2001

This work was supported by Project of Chinese Ministry of Education for High School Ph. D. Point (No. 1999038410).

\* Corresponding author. Tel: 86-592-5916403; Fax: 86-592-2186392; E-mail: [htzhu@public.xm.fj.cn](mailto:htzhu@public.xm.fj.cn) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>