

冷胁迫诱导、咖啡因抑制的水稻根新基因片段的分离及表达分析

殷奎德* 张兴梅 刘世强** 李乐攻***

(黑龙江八一农垦大学基因工程研究中心 密山 158308)

摘 要 利用差异显示(Differential display)及 H. Y.-Yellow 琼脂糖凝胶分离等方法,从冷胁迫和甘露醇共同处理的冷敏感水稻(Wase toitsu)根的总 RNA 中,分离出冷胁迫诱导的 cDNA 片段,经过测序和同源比较,发现它是一尚未报道的新基因片段。这一基因的表达对温度具有敏感的反应特性,4℃时表达水平明显增加,在正常温度(25℃)下,其表达水平又可快速降低。当幼苗根用 0.5mol/L 甘露醇预处理 2h 后,转入冷胁迫,其低温诱导的表达水平增加更为明显。在甘露醇预处理之前加入咖啡因处理根 1h,其表达水平明显降低,几乎与正常温度下的对照相同。据此推测,这一基因可能参与了冷胁迫或水分胁迫诱导的耐冷过程中咖啡因敏感信号的传导。

关键词 冷胁迫诱导 咖啡因抑制 水稻 差异显示

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0468-04

植物生长在复杂的环境中,常常同时感受到并非单一的逆境刺激。当植物受到某种逆境刺激时,常会获得对另一种或几种逆境胁迫的抗性。例如冷害可以提高抗冻能力,即冷适应(Cold acclimation)^[1]。拟南芥(*Arabidopsis*)研究表明,其抗冻性会因冷适应而提高^[2]。冷适应和耐冷性的研究因筛选到一些拟南芥突变体使得研究有了飞速的发展,相继克隆到几个耐冷基因^[3,4]。但耐冷机制仍需深入研究。另有研究表明渗透胁迫能够诱导水稻、玉米、番茄等的低温忍耐力^[5,6,7],最近研究表明番茄果实中热诱导的 cDNA 具有抵抗冷害的作用^[8]。各不同逆境之间这种交叉或协同作用可能存在相似或共同的反应机制,Kitagawa 等有关获得性耐冷研究的实验证据为这一机制研究提供了一些新线索^[9]。冷敏感的水稻品种经短暂的水分胁迫处理发现可以获得耐冷能力,而咖啡因敏感的 Ca²⁺ 流与这诱导过程密切相关,水分胁迫与冷胁迫所诱导的基因可能是参与这一过程的靶基因,它们的产物可能是潜在的抗冷因子。虽然已分离出许多冷胁迫和水分胁迫的诱导基因,但它们是如何定位于级联的信号传导之中,如何在感受交叉或协同刺激过程中,或者更具体地说在水分胁迫诱导的耐冷机制中行使功能,则是一

个需要解决的问题。

基于此,为了阐明水分胁迫所诱导的耐冷分子机理,本实验采用差异显示(Differential display)法,分离识别了受温度变化调节,咖啡因抑制的 cDNA,并对其表达进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 植物材料与处理

以低温敏感型的水稻品种(Wase toitsu)为材料,按照 Takahashi R 等(1994)方法准备幼苗^[5]。

冷胁迫处理:当水稻幼苗长到三叶期时,转移至 4℃处理 24h,再转移至 25℃培养 24h;甘露醇与冷胁迫处理:三叶期幼苗转移至含有 0.5mol/L 甘露醇的水溶液中,处理 2h,自来水洗涤之后转移到新鲜的 Hoagland's 培养液中,4℃处理 24h,再转移至 25℃培养 24h。咖啡因处理:将幼苗根在含 20mmol/L 咖啡因、1mmol/L EGTA 的溶液中处理 2h 之后,将甘露醇加入其中,使终浓度为 0.5mol/L,处理 2h,自来水洗涤,再按冷胁迫方式处理幼苗。以未经任何处理的样品为对照。

1.2 总 RNA 的提取及 RNA 凝胶印迹分析

按 Logemann J 等(1987)方法制备总 RNA^[10]。

收稿日期 2001-12-19,修回日期 2002-04-24。

* 通讯作者。 Tel 86-467-5071005 ;E-mail :Yinkuide@sohu.com

** 工作单位 沈阳农业大学。*** 现地址 日本国秋田县立大学附属生物工程研究所。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

5 μ g 总 RNA 在 1.2% 变性甲醛琼脂糖凝胶上分离, 转移至 Hybond-N⁺ 膜上, 用随机引物法制备³²P 标记探针(参见 TaKaRa 操作手册)。采用 rapid-hybridization 缓冲液(Amersham, UK)进行预杂交和杂交。

1.3 差异显示(Differential display)

按照 TaKaRa Enzyme Set-DD 操作手册和 Liang 等(1992)的方法^[11], 改进之后进行差异显示。总 RNA 用 RNase-free DNaseI 处理, 处理时加入 RNase 抑制剂。用除去 DNase 的总 RNA(0.2 μ g)作为模板进行 RT-PCR 反应, 在 20 μ L 反应体积中合成 cDNA 第一链。T₁₂MA 和 T₁₂MC 锚定引物(Anchor primers)用于此 RT-PCR 反应系统。以第一链 cDNA 产物的 1/20 为模板, 加入 α -[³⁵S]dATP, 10 种随机引物(CMN-B40 ~ CMN-B49 TaKaRa 产品)与相关的锚定引物, 进行第二次 PCR 反应。扩增的 cDNAs 在 6% 含有 7mol/L 尿素的聚丙烯酰胺变性凝胶上电泳分离, 电泳恒压 1500V 3 ~ 4h。在 Whatman 3MM 滤纸上干燥凝胶, 放射自显影 1 周。

1.4 cDNA 带的提取, 再扩增与 H.Y-Yellow 再分离

比较凝胶和放射自显影图片的相应位置, 将合适的带以及对照样品的相关位置从凝胶中切出, 按 Differential Display KitTM操作指南提取 cDNA。原凝胶重新在 x-ray 胶片上放射自显影, 以证实是否切下所需的带。取上面所提取的 cDNA 水溶液的 1/10 为模板和先前所用引物, 加入 ExTag(TaKaRa)进行 PCR 反应, 扩增 cDNAs。在含有 H.Y-Yellow 的琼脂糖凝胶上分离筛选 PCR 产物, 每 1mL 琼脂糖中 H.Y-Yellow 为 1 单位。用 Recochip 从 H.Y-Yellow 凝胶上收集可能正确的带。

1.5 cDNA 片段的克隆

将分别收集的 cDNA PCR 产物, 克隆到 pT7Blue (T)载体中, 利用 PCR 法筛选阳性克隆。抽提质粒, 测定每个克隆的序列。选取合适的质粒, 用 *Pst*I 和 *Kpn*I 限制酶酶切获得插入片段, 收集这些片段, ³²P 标记后, 进行 RNA 凝胶印迹分析。

1.6 cDNA 序列测定和分析

利用 Applied Biosystem 373A(USA)对双链 DNA 进行测序, DNA 序列分析采用 Genetyx software(Software Development Co. Japan)。

2 结果和讨论

2.1 冷胁迫诱导的 cDNA 识辨与分离

以往的报道显示, 短时间的水分胁迫能使冷敏

感的水稻增加耐冷性, 咖啡因敏感的 Ca²⁺ 流参与了此过程。为研究这一过程的分子基础, 锁定冷胁迫或者冷胁迫加水胁迫共同诱导的基因为所要分离的靶基因。以对照(4 $^{\circ}$ C 处理的材料)和经水分胁迫后 4 $^{\circ}$ C 处理的材料, 进行多次 DDRT-PCR 实验, 研究各样品 mRNA 的差异表达。

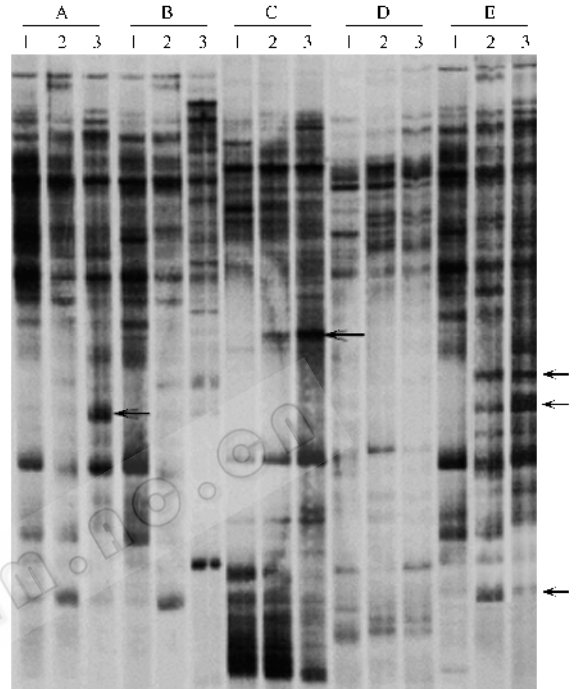


图 1 水稻根 3 种处理样品的总 RNA 差异显示

Fig.1 Differential display of total RNA from three treatments of rice root

1. Total RNA was isolated from root of wase toitsu seedlings at three-leaf stage 2. Chilling treatment at 4 $^{\circ}$ C for 24 hours 3. Treated with 0.5mol/L mannitol at 25 $^{\circ}$ C for 2 hours following by chilling treatment at 4 $^{\circ}$ C for 24 hours. Total RNA was reverse transcribed with anchored primer T₁₂MC. The arbitrary primers(CMN-B45 to CMN-B49) and the anchored primer were used for amplification step of differential display

图 1 显示了其中一个实验的部分结果, 所有样品的锚定引物(T₁₂MC)相同, 而随机引物分别为 CMN-B45 到 CMN-B49。图中显示了冷害或冷害加水胁迫所诱导的差异表达。在 T₁₂MC 和 T₁₂MA 分别与 CMN-B40 到 CMN-B49 的 20 对引物的反应中, 大约有 30 条冷害与冷害加水胁迫都可诱导的差异显示带出现, 将这些带与对照样品的相应部位从 DDRT-PCR 凝胶上分离出, 其中只有很少一部分带不能重新扩增, 大部分带在进行第 2 次 PCR 之后都能得到较为清晰的带(数据未列出)。

在普通凝胶上检测 PCR 产物, 大多出现一条带, 而对样品有时也出现相应的带, 为了除去 PCR

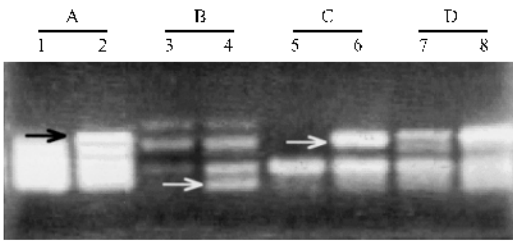


图 2 H.Y-Yellow 胶分离差异显示片段第二次扩增产物

Fig. 2 Amplified products of differential display fragments are separated with H.Y-Yellow agarose gel

Anchored primer ($T_{12}MC$) was used in all samples, arbitrary primers are: A. CNM-B44; B. CNM-B46; C. CNM-B47; D. CNM-B49 respectively. 1, 3, 5, 7. Control; 2, 4, 6, 8. 0.5 mol/L mannitol treated at 25°C for 2 hours then chilling at 4°C for 24 hours. The different fragments between 1 and 2 are indicated by arrow

非特异性反应带,利用 H.Y-Yellow 琼脂糖凝胶电泳,对第二次 PCR 产物进行再分离筛选(图 2)。图中分别显示了 $T_{12}MC/B44$ 、 $T_{12}MC/B46$ 、 $T_{12}MC/B47$ 、 $T_{12}MC/B49$ 的差异带,经第二次 PCR 之后,在 H.Y-Yellow 凝胶上的分离效果。以普通胶分离分子量相同的 PCR 产物分布在同一位置,处理与对照差异不大(数据未列出)。即使 DNA 产物的分子量相同,H.Y-Yellow 也能将 GC 含量不一的 DNA 产物分离。图 1 中 B、C 对照与处理样品同一分子量的单一带,分离成泳动速率不一而且分布迥异的不同带,将很难区分的 PCR 产物清晰地分离开来(如箭头所示)。这说明 H.Y-Yellow 用于分离差异显示的 PCR 产物确实有其独到的优点,为筛选差异显示的产物提供简单而有力的工具。然而这样分离的差异带并非全是真正的诱导基因,而且测序发现如此分离的片段,也可能是序列不同的片段的混合物。选择序列不同的片段分别进行 RNA 印迹分析,经多次杂交实验,从而确定一片段 ICT (Induction of chilling treatment) 为冷胁迫诱导,而且水分胁迫促进表达的 cDNA 片段 (GenBank 接受号: AB027607)。

2.2 ICT 的序列分析及基因表达调节

核酸测序显示 ICT 存在用于 DDRT-PCR 的引物 5'-末端的随机引物 (5'-CMN-B47gtagtcatatgg) 和 3'末端的锚定引物 (5'-cgaaaaaaaaa)。ICT 序列 (DD-BJ/EMBL/GenBank 接收编号: AB027607) 同源性分析表明,这一片段与已知的基因片段同源性非常低,与水稻未成熟种子 Lambda ZAP II cDNA 库 97AS2102 同源性在 90% 以上,这说明此片段是来源于水稻,其功能尚待研究的新基因片段。

RNA 印迹分析表明(图 3): ICT 受冷胁迫诱导,

当甘露醇与冷胁迫同时处理时,其表达水平最高,预先应用甘露醇处理短暂时间能够使其在冷胁迫时更易诱导表达。如果只用甘露醇处理,其表达水平与未经任何处理的对照相差无几。冷胁迫解除之后,其表达水平能快速降低恢复到正常水平。从以上结果可知,ICT 是一个冷胁迫诱导的基因,水分胁迫促进表达。

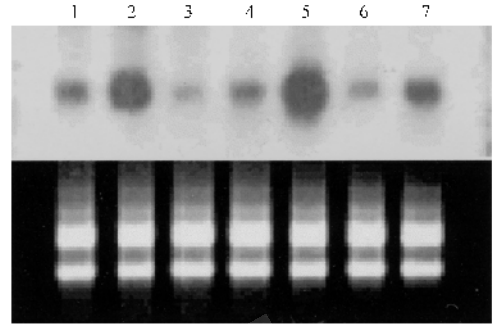


图 3 以 ICT 为探针的 RNA 印迹分析

Fig. 3 RNA blot analysis using ICT probe

Seedlings were grown to three-leaf stage for about two weeks at 25°C and treated with different conditions. 1. Control; 2. Chilling treated at 4°C for 24 hours; 3. 4°C for 24 hours then transferred to 25°C for 24 hours; 4. 0.5 mol/L mannitol in 1mmol/L EGTA (pH7.5) for 2 hours; 5. 0.5 mol/L mannitol in 1mmol/L EGTA (pH7.5) for 2 hours then chilling at 4°C for 24 hours; 6. 0.5mol/L mannitol in 1mmol/L EGTA (pH7.5) for 2 hours chilling at 4°C for 24 hours then transferred to 25°C for 24 hours; 7. Treated with 20 mmol/L caffeine in 1 mmol/L EGTA (pH7.5) for 2 hours, then added mannitol to final concentration: 0.5 mol/L, incubated at 25°C for 2 hours following chilling treated at 4°C for 24 hours. The ethidium bromide stain confirms the total RNAs amounts in all lanes

这一基因除了对温度敏感之外,如果在进行甘露醇处理之前加入 20mmol/L 咖啡因处理 2h, ICT 的冷胁迫诱导表达明显受到抑制,与同样在 4°C 下的其它样品相比有非常明显的差异,其诱导表达水平几乎不增加,而与未经冷处理的对照样品相似。即咖啡因能抑制甘露醇的协同作用,不仅如此,也有可能咖啡因能直接抑制这一基因的冷胁迫诱导过程。总之,ICT 的表达水平在温度变化的条件下能够快速增加或降低,短时间的水分胁迫对其低温诱导有协同作用, Ca^{2+} 信号的抑制剂 - 咖啡因能抑制这一诱导表达过程。

Ca 是信号传导的第二信使,已证明它启动了冷积累和获得性耐冷过程的反应机制^[9,12],在拟南芥中人们分离出 KIN 基因,钙调素的拮抗剂 W7 能阻止其表达,同时也能阻止冷积累的部分过程。由此人们推测 KIN 基因介导了冷积累的逆境信号^[12], ICT 基因具有同样类似的性质,钙离子的抑制剂咖

啡因能抑制其表达,而已有的药理学证据表明,咖啡因同时也抑制了获得性耐冷反应^[9]。因此,我们有理由推测,ICT 参与了冷胁迫或者获得性耐冷反应中 Ca 信号的传导,这一 cDNA 片段的分离为进一步研究冷胁迫或获得性耐冷机制提供了一些线索。ICT 是否受其它钙信号拮抗剂或抑制剂的抑制,如何在细胞中定位或具体行使功能,则需进一步研究,我们期待 ICT 成为研究逆境信号传导的一个可利用的工具。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Guy C L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, **41**: 187 ~ 223
- [2] Zhu J K, Xiong L. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum*, 2001, **112**: 152 ~ 166
- [3] Warren G, Mckown R, Marin A. Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol*, 1996, **111**: 1011 ~ 1019
- [4] Xin Z, Browse J. Eskimol mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 7799 ~ 7804
- [5] Takahashi R, Joshee N, Kitagawa Y. Induction of chilling resistance by water stress, and cDNA sequence analysis and expression of water stress regulated genes in rice. *Plant Mol Bio*, 1994, **26**: 339 ~ 352
- [6] Wilson JM. The mechanism of chill and drought hardening of *Phaseolus vulgaris* leaves. *New Phytol*, 1976, **76**: 257 ~ 270
- [7] Irigoyen J J, Perez de Juan J, Sanchez-Diaz. Drought enhances chilling tolerance in a chilling-sensitive maize (*Zea mays* L.) variety. *New Phytol*, 1996, **134**: 53 ~ 59
- [8] Kadyrzhanova D K, Vlachonasis K E, Ververidis P *et al.* Molecular cloning of a novel heat induced chilling tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display. *Plant Mol Biol*, 1998, **36**: 885 ~ 895
- [9] Kitagawa Y, Yoshizaki K. Water stress-induced chilling tolerance in rice; putative relationship between chilling tolerance and Ca²⁺ flux. *Plant Sci*, 1998, **137**: 73 ~ 85
- [10] Logemann J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem*, 1987, **163**: 16 ~ 20
- [11] Liang P, Pardee A. B. Differential display of eukaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257**: 967 ~ 971
- [12] Tahtiharju S, Sangwan V, Monroy A F, Dhindsa R S, Borg M. The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. *Planta*, 1997, **203**: 442 ~ 447

Isolation, Expression Analysis of a Chilling Induced cDNA from Rice Root with Differential Display: An Evidence Role for Caffeine-sensitive Calcium Signal

YIN Kui-De* ZHANG Xing-Mei LIU Shi-Qiang LI Le-Gong

(Central Study of Gene Engineering, Heilongjiang August First Reclamation

Agriculture University, Mishan 158308, China)

Abstract Chilling-sensitive rice varieties acquire chilling tolerance when their roots are exposed to water stress for short time. Caffeine-sensitive calcium signal was involved in this procedure. By using total RNA differential display, a chilling induced cDNA (ICT: induction of chilling treatment) was isolated from roots of chilling-sensitive rice variety. It was determined that it is a novel cDNA by homology searching. The transcript level of ict mRNA is up-regulated under chilling stress, it is decreased to low level when the samples were transferred to standard culture conditions. Pre-treated with mannitol for two hours is beneficial to inducing ICT level of expression. This chilling induction was inhibited by caffeine, suggesting that it may play a putative role in signal transduction of caffeine-sensitive calcium.

Key words induction of chilling stress, inhibition of caffeine, rice, differential display