水稻全生育期均一化 cDNA 文库的构建和鉴定

储昭晖 彭开蔓 张利达 周 斌 魏 君 王石平*

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 国家农作物分子技术育种中心, 武汉 430070. * 联系人, E-mail: swang@mail.hzau.edu.cn)

摘要 以优良杂交水稻的恢复系明恢 63 为材料, 构建覆盖水稻基因组的 cDNA 文库, 用于功能基因组的研究. 选择水稻全生育期过程中的 9 个时期的不同组织和病原诱导的组织分别构建了 15 个定向 cDNA 文库. 依据基因组 DNA 饱和杂交的原理, 将从 15 个独立的 cDNA 文库中提取的质粒混合, 并与固定在磁珠上具有互补性的 2 份基因组 DNA 亲和体系饱和杂交, 收集杂交组分中的质粒并重新转化大肠杆菌, 获得全生育期均一化 cDNA 文库. 该文库平均插入片段 1.4 kb, 含 62000 个克隆子. 反向 Northern 杂交显示, 该文库收集了众多表达丰度极低的基因以及特异表达的基因. 对文库中随机的 10750 个克隆进行了测序, 序列分析比较后获得 6399 条非重复的 EST(expressed sequence tag)序列, 非重复序列占 59.5%. 目前, 用该文库制作的 cDNA 芯片已被用于功能基因组的研究.

关键词 水稻 均一化 cDNA 文库 测序 DNA 芯片 全生育期

水稻是单子叶植物基因组研究中的模式生物, 具有最小的基因组, 全序列长约 466 Mb, 预测有 5 ~ 6 万个基因[1,2]. 这些基因按照高等真核生物基因的表达规律, 在不同的时期、不同的组织里表达, 有的基因甚至必须在特殊环境条件的诱导下才表达. 而且, 除了极少数的持家基因外, 多数基因的表达丰度存在巨大的差异. 20 年前, 基于 DNA-RNA 杂交的研究就已经将基因的转录水平分为高、中、低 3 类[3]. 随后的研究进一步表明, 绝大多数基因是处于中等或低表达丰度的, 在单个细胞中仅存在着 1~15 个拷贝, 而高丰度表达基因的转录产物在单个细胞中含有近 5000 个拷贝, 约占总表达量的 25%. 这种基因表达上的时空性为获得一个具有完整代表性的 cDNA 文库增加了障碍, 其表达量上的巨大差异更为大规模的研究增添了困难. 对单一组织的 cDNA 文库而言, 高拷贝基因序列的大量存在给基因的筛选和鉴定带来不必要的浪费, 尤其是在大规模的 EST 测序中. 如日本水稻基因组计划(RGP)1991 年启动的 EST 测序中, 为获得足够多的基因信息, 动用了多达 15 个独立的 cDNA 文库, 测序超过 29000 个 cDNA 克隆, 才获得近 1 万条非重复序列(unique sequence)[4,5].

均一化 cDNA 文库(normalized cDNA library)是克服基因转录水平上巨大差异的有效措施, 有利于研究基因的表达和序列分析. 同时, 全生育期多点取材可以有效克服基因表达在时间和空间上的限制. 现在, 在构建均一化的 cDNA 文库中至少有 2 种主要的观点[6,7]: 一种是基于复性动力学的原理(second-order kinetics), 高丰度的 cDNA 在退火条件下复性的速度快, 而低丰度的 cDNA 复性需要很长时间, 从而可以通过控制复性时间来降低丰度; 另一种是基于基因组 DNA 在拷贝数上具有相对均一化的性质, 通过 cDNA 与基因组 DNA 饱和杂交而降低丰度. 第一种方法的掌握对技术要求比较高, 对多数人而言需要多次摸索才能找到最适条件, 而且, 应用这种方法很难对全生育期的混合 cDNA 文库进行大规模的均一化处理. 后一种方法易于掌握, 但有研究者根据复性动力学的原理也提出了其不利的因素, 即采用基因组 DNA 饱和杂交的方法会因为低拷贝的表达基因拷贝数少而无法被杂交上[6,7].

目前已报道的均一化 cDNA 文库多是根据第一种原理构建的, 常用策略有基于 PCR 技术利用 cDNA 多次复性[8~10], mRNA-cDNA 杂交等[11,12]. 针对各自选择的高表达靶序列, 均一化处理后文库的高丰度表达 cDNA 是处理前的 0.3% ~ 2.5%, 基本满足节约筛选的要求. 也有报道, 先构建定向的 cDNA 文库(directionally cloned cDNA library), 再通过特殊筛选重新分离出均一化的 cDNA 文库, 如 Poustka 等人[13]利用寡聚核苷酸指纹图谱法(oligonucleotide fingerprinting)均一化处理海鸥蛋的 cDNA 文库, 利用 217 条寡聚核苷酸探针从 21925 个克隆中分离出 6291 个独立的序列. Drmanac 等人[14]从婴儿脑的 cDNA 文库中也鉴定了 19726 个基因. 本研究的目的是根据基因

组 DNA 饱和杂交的基本原理构建水稻全生育期均一化 cDNA 文库, 并通过测序对文库的均一化程度进行鉴定和评估, 为大规模开展水稻功能基因组的研究奠定基础.

1 材料和方法

(ⅰ) 实验材料. 水稻品种明恢 63 经培养或种植后, 取 9 个生长时期的不同组织共 15 种材料(表 1). 其中材料 4 和 5 为 1998 年 12 月温室中取材. 其余材料为 1999 年 5 ~ 8 月中旬取材.

(ⅱ) 独立 cDNA 文库的构建. 总 RNA 采用 Trizol 试剂(Life Technologies, USA)进行分离, 用 Dynalbeads oligo(dT_{25}) (Dynal, USA)试剂盒分离 Poly $(A)^+$ RNA, cDNA 的合成和克隆根据 Superscript™ plasmid system for cDNA synthesis and plasmid cloning (Life Technologies, USA)的说明书进行, 取 10 ng 合成的 cDNA 连接到 pSPORT1 *Sal* Ⅰ-*Not* Ⅰ-Cut 载体上. 连接产物用 0.025 μm 的透析膜 (Millipore, USA)在盛有无菌超纯水的培养皿中透析 30 min 以上, 取 1/3 体积透析物和 40 μL 高效 DH10B 电转化感受态细胞(Life Technologies, USA)混合, 在 *E. coli* Pulser (BIO-RAD, USA)上电激后加入 1 mL SOC, 再转入盛有 250 mL LB 液体培养基的 500 mL 烧瓶中, 培养基中氨苄青霉素浓度为 100 μg/mL. 37℃, 300 r/min 摇动培养 1 h 后取 200 μL 涂布在含 20 μg/mL X-Gal, 0.1 mmol/L IPTG 和 100 μg/mL 的氨苄青霉素 LA 平板上, 以检测重组子的数量.

(ⅲ) 总 DNA 和质粒的提取. 采用修饰的 CTAB 法提取明恢 63 叶片总 DNA[15]. 独立文库的质粒按照修饰后的碱裂解法提取[16]. 单个 cDNA 克隆的质粒按照 Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)操作说明书提取.

(ⅳ) cDNA 克隆的测序. 测序反应用 PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)以及 T7 通用引物在 ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA)上进行.

(ⅴ) 高密度 cDNA 点阵膜的制备和 cDNA 点阵杂交. 从均一化的明恢 63 全生育期 cDNA 文库中抽提 21504 个克隆的质粒, 转入 384 孔板后, 按 Biomek 2000 自动工作站(Beckman, Fullerton, CA)操作说明设计程序, 将克隆的质粒按照 3×3 规格对称双份点在 8 cm × 12 cm 的 Hybond-N^+ 尼龙膜(Amersham, Buckinghamshire, UK)上. 每张膜上分布 384 个方格(grid), 每个方格包括 9 个点, 对称位置为相同克隆的重复, 中间位置不点克隆用作对照, 即每个方格包含 4 个 cDNA 克隆(图 1), 每张 cDNA 点阵膜共含有 384 × 4 种 cDNA 克隆. 点阵尼龙膜经固定、烘干后用于杂交检测. cDNA 点阵膜杂交的具体步骤为: 用反转录酶、Oligo-dT_{15} 以及[α-^{32}P] dCTP 分别反转录 100 μg 水稻穗和不含穗的其他组织的总 RNA, 用标记的第一链 cDNA 作探针. cDNA 点阵膜的杂交方法与 Southern 杂交类似. 将杂交后的点阵膜用 PhosphorImager SI (Molecular Dynamics, USA)系统扫描

表 1 构建明恢 63 全生育期均一化 cDNA 文库的组织材料

组织	生长时期	材料栽培方法	起始重组子数目(×10^4)
愈伤组织细胞	诱导后 20 d	组织培养室	20
1 ~ 2 cm 芽	发芽后一周	实验室培养箱	170
黄化苗	三叶期	实验室培养箱	200
整株(包括根)	三叶期	温室盆栽	300
整株(包括根)	五叶期	温室盆栽	250
叶 a)	五~七叶期	温室盆栽	60
剑叶	孕穗期	田间种植	5
叶片 b)	孕穗期	田间种植	120
整株	枝梗期	田间种植	150
整株	抽穗期	田间种植	200
穗子	开花期	田间种植	10
穗子	灌浆期	田间种植	50
茎	开花期	田间种植	2
花粉	开花期	田间种植	100
幼穗(2 ~ 5 cm)	孕穗期	田间种植	50

a) 水稻稻瘟病菌株 F1814 喷雾接种 5 d 后取样的材料. b) 剪口接种水稻白叶枯病菌株 PXO61, 5 d 后取接种剪口以下约 3 cm 范围内的材料

成像，杂交信号分析和差异表达倍数计算用软件 ArrayGauge Version 1.0(Fuji Film Co LTD，日本)进行.

A B C
D D
C B A

图 1 cDNA 点阵膜上每方格的克隆排列方式

2 结果

2.1 独立 cDNA 文库的构建

按照前述方法，跟踪明恢 63 的生长时期，我们选取了具有代表全生育期过程的 9 个时期，采取整株水稻或特定时期的特异组织构建了 12 个独立的 cDNA 文库. 同时，在幼苗期对明恢 63 接种了稻瘟病菌株 F1814，在孕穗期接种白叶枯病菌株 PXO61 进行病原胁迫，分别取样构建了 2 个 cDNA 文库. 另外，还构建了水稻愈伤组织的 cDNA 文库. 15 个文库的重组子检测表明，除茎、剑叶和开花期穗子的文库克隆子数目较少外，其他文库重组子克隆数目在 20×10^4 ~ 300×10^4 之间(表 1).

2.2 均一化体系的建立和混合 cDNA 文库的均一化

从每个独立 cDNA 文库中取 10 μg 质粒进行等量混合. 按照最终均一化文库的平均插入片段大小 1.4 kb，载体大小 3 kb 和转化前双链 cDNA 约 3 ng 用量的估计，10 μg 质粒相当于将其中单拷贝 cDNA 扩增了约 1000 倍，有效保证了低拷贝基因在后续的与基因组 DNA 均一化体系中能充分饱和杂交.

按照图 2 所示的程序构建固定的基因组 DNA 亲和体系. 每 100 μg 明恢 63 总 DNA 分别用 100 单位的 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ完全消化，苯酚、氯仿抽提纯化后用 Klenow Fragment 补平末端，在补平体系中用 C-14 生物素 dUTP (Clontech，美国) 代替 dTTP 进行 DNA 标记(标记体系为：DNA 酶切产物 100 μL，0.2 mmol/L dCTP，dATP，dGTP 各 12 μL，0.4 mmol/L C-14 生物素 dUTP 7 μL，2U/μL Klenow Fragment 5 μL，37℃反应 30 min). 标记好的 DNA 用乙醇沉淀后继续采用与起始酶切相互补的限制性内切酶进行消化(如前次使用的酶为 *Eco*RⅠ，则这次使用 *Bam*HⅠ进行消化)，防止标记的双链 DNA 在变性和收集处理后复性. 用乙醇沉淀处理好的组分. 同时(Dynabeads M-280, Dynal，美国)按照产品使用说明清洗磁珠，并重悬于 800 μL 1×结合及清洗缓冲液(2 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)，1 mmol/L EDTA)中. 将上述 2 种不同限制性内切酶处理的 DNA 在 95℃下放置 10 min，变性后立即放置冰浴并立即加入 400 μL 1×结合及清洗缓冲液，取洗好的 400 μL 磁珠加入其中，充分混合后置于 1.5 mL 离心管中并绑缚于杂交炉内，42℃下 60 r/min 轻摇过夜. 杂交完后用磁座收集磁珠，吸去离心管内的液体并清洗数次，即构建成固定的基因组 DNA 亲和体系.

取固定在磁珠上的单链基因组 DNA 约 5 μg 于 1.5 mL 离心管中，加入 400 μL 杂交液(100 μg/μL 鲑精 DNA，6 × SSC，0.1% SDS，1 × Denhart's)，在 65℃悬浮预杂交 6 h. 将待平衡处理的各文库取 10 μg 质粒等量混合，100℃，10 min 变性后用 400 μL 杂交液稀释，并加入到预杂交好的体系中，65℃杂交至少 20 h. 杂交结束后，立即将 1.5 mL 离心管放在磁座上将磁珠吸附分离，并小心吸尽剩余的液体. 再向磁珠中加入 800 μL 清洗缓冲液(2 × SSC，1% SDS)，重悬磁珠并于 65℃保持 15 min，然后放在磁座上进行磁珠分离. 重复清洗 3 次后，向试管中加入 50 μL 去离子无菌水，重悬使磁珠充分打散，然后在 72℃保持 10 min，分离磁珠后将液体部分用枪头小心移到一个新的离心管中. 为增加洗脱量，往磁珠中再加入 50 μL 去离子无菌水重复洗脱一次，将 2 次回收物混合并用乙醇沉淀回收，最后溶于 30 μL 水中. 取 1 μL 质粒用水稀释至 100 μL，在 DU640 分光光度计(BECKMAN，美国)上测定质粒浓度. 用每 50 ng 质粒电转化 100 μL 感受态细胞，转化产物在涂有 LacZ 的 LA 固体选择培养基上 37℃倒置培养，将长成的单个白色克隆接种保存. 具体保存方法参见文献[17].

2.3 全生育期均一化文库的质量检测

(ⅰ) 文库容量、插入片段大小. 随机挑取 62000 个重组克隆子保存于 384 孔板内用于后续研究. 用 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切策略随机检测了 96 个克隆，重组子插入片段大小范围为 0.5 ~ 8.0 kb，平均插入片段 1.4 kb.

(ⅱ) 克隆子重复概率的检测. 由于用于构建文库的载体为双酶切的 pSPORT1 质粒，因此重组子中的 cDNA 理论上均为定向插入. 用根据 T7 启动子

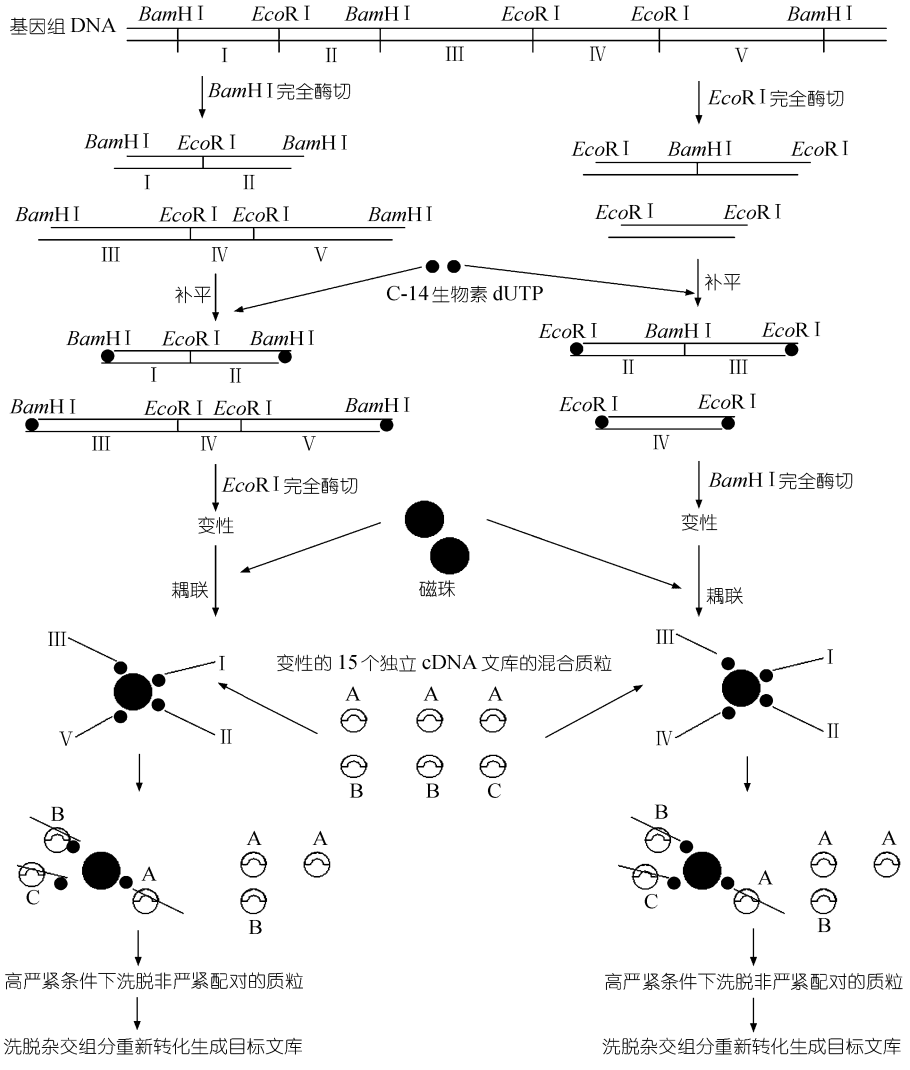

图 2 基因组 DNA 扣除体系和均一化 cDNA 文库构建流程图示

Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ用来标记 DNA 片段的种类; A, B, C 代表 3 种表达丰度的 cDNA 的质粒类型. 双酶切策略可以使耦联到磁珠上的基因组 DNA 成单链覆盖基因组, 酶切先后的差异空缺可以通过互补组分的设计来完善

设计的引物对近 12000 个 cDNA 克隆进行 5′末端随机测序, 得到 10750 条大于 100 bp 的有效序列. 用 Sequencher™ 4.1.2 软件(Gene Codes Corporation, 美国)对这些序列进行分析, 以 2 条序列中至少有 50 bp 重叠和重叠区段 DNA 的同源性大于 85%即为同一序列的判断条件, 获得 6399 条非重复 EST 序列, 单一序列占 59.5%. 在这 10750 条序列中, 86%的序列重复次数小于 3, 约 11%的序列重复次数在 3 ~ 20 之间, 仅 6 条序列的重复次数在 20 以上(表 2). 用 BLAST 方法[18]分析这 6 条高拷贝序列, 发现其中 4 条序列可能分别编码果糖二磷酸醛缩酶, α-淀粉酶同工酶Ⅲ, 抗坏血酸盐过氧化物酶和叶绿体蛋白质(CP12), 另外 2 条序列与核苷酸数据库中的 EST 序列有很高的同源性, 但基因产物尚不清楚(表 2). 同时, 文库中用来衡量平衡效果的组成型表达基因(如肌动蛋白(actin)基因和核糖体蛋白(ribosomal protein)基因的各类亚基等)的水平都已经下降到 10 个拷贝以下, 表明文库的均一化效果显著.

(ⅲ) 基因覆盖度和全生育期特性的评估. 由于该文库集中了 15 个独立文库的内容, 理论上具有更大的基因覆盖度, 即基因的种类多且低表达丰度的基因含量多. 同时, 全生育期文库应该具有不丢失起

始基因信息的特点，即取材中特定时期表达的基因在该文库中应该存在. 为此，我们选取了穗子的 RNA 和除穗之外其他组织的混合 RNA 作探针，分别与一对cDNA点阵尼龙膜杂交，检测文库的覆盖度和包含度(图 3). 杂交结果显示，少数克隆杂交信号很强，可能为穗子或其他组织内组成型表达丰度高的部分基

表 2 文库中的高拷贝克隆

克隆	重复次数	BLAST 分析		
		同源序列(基因登录号)	分值	*E* 值
EI#04-I11	69	果糖二磷酸醛缩酶(BF430811)	973	0.0
EI#07-A12	66	未知功能(BE230606)	737	0.0
EI#03-A07	58	α淀粉酶同工酶Ⅲ((JC7138))	470	1×10^{-131}
EI#02-D15	47	抗坏血酸盐过氧化酶(T03595)	718	0.0
EI#01-H06	40	一种叶绿体蛋白(CP12)(AP002881)	597	1×10^{-168}
BI#76-F13	28	未知功能(AP003280)	975	0.0

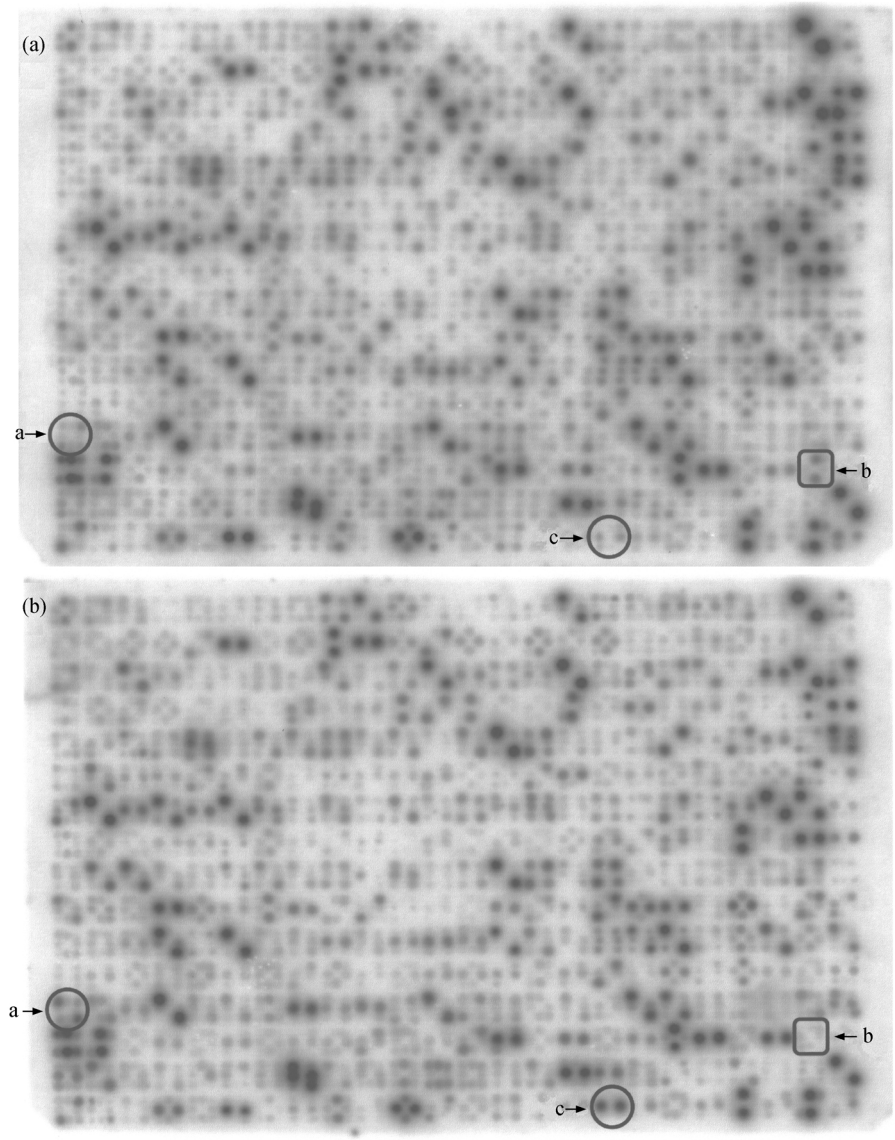

图 3 cDNA 点阵杂交

(a)和(b) 分别用来自穗和穗以外其他组织的总 RNA 标记探针杂交. 箭头所指每一个方格在对称点位置均以双点形式排列有相同的 cDNA 克隆. 箭头 a 和 c 所指的是穗中不表达而其他组织中表达的 cDNA 克隆，箭头 b 所指的是穗中特异表达的 cDNA 克隆

因; 绝大多数 cDNA 克隆杂交信号很弱, 这些基因可能属于穗子或其他组织内中表达丰度低的组分. 杂交结果同时显示, 杂交信号很强的克隆数所占比例明显低于 25%, 也就是说, 文库中原来表达丰度高的那部分基因在cDNA文库中克隆数目上已经减少, 表明该文库的均一化效果显著. 同时, 将 2 张杂交膜的信号整合分析发现, 很多信号存在差异的位点, 这些位点实质上体现的是差异表达的基因, 它们杂交信号上的差异代表着其在 2 种 RNA 组分中数量, 也即该基因在组织器官上存在的表达差异性. 如图 3 中基因 a 和 c 在穗中不表达而在穗以外的其他混合组织中表达; 而基因 b 在穗中表达水平较高, 在对应的混合组织中不表达, 因此应是穗中特异表达的基因. 这些差异表达基因的存在表明文库包含各取样生育期过程中特异表达的基因, 充分体现了全生育期文库的特点.

(ⅳ) 低转录水平基因在均一化文库中存在的调查. 基于基因组饱和杂交的方法可能对低转录水平基因造成丢失, 本研究对此进行了初步的分析. 有 3 个因素造成对具体的低转录水平的基因难以界定: 一是基因的表达具有时空性, 表达量的高低也具有了相应的特征; 二是基因的表达受到环境因素的调控, 表达量的高低也就具有环境依赖性; 三是有些基因只是在特定的材料中表达. 因此, 我们所选用的探针主要参照 Northern 杂交和 RT-PCR 的结果, 筛选了 15 个在正常条件下低转录水平的基因. 其中 12 个来自抗病相关基因的序列, 其在未经病原菌胁迫或茉莉酸等诱导的条件下表达量低[19], EMBL 核苷酸数据库登录号为: BF889434, BF889435, BF889437, BF889438, BF889446, BF889447, BF889455, BF889459, BF889466, BF889468, BF889474 和 BF889476. 另外 3 个通过其他途径从明恢 63 中分离的特异表达克隆, 2 个与抗病相关, 1 个为剑叶中特异表达且表达量低(尚未发表). 用 BLAST 分析方法以此 15 条序列检索来自该文库的 10750 条序列, 除 BF889434, BF889466 和 BF889474 等 3 条序列未检索到同源序列外, 其他 12 条序列都检索到同源序列(E 值范围为 0.0 ~ 1×10^{-74}); 其中 9 条在该文库中检索到 1 条同源序列, BF889435 和 BF889437 分别检索到 2 条同源序列, BF889438 检索到 3 条同源序列. 低表达丰度基因可检索率为 80%, 本室鉴定的 3 个特异表达克隆, 都能在均一化之后的文库中检索到. 同时, 由于 10750 序列之中仅包含了 6399 条单一序列, 相当于水稻全部基因的 10%[19], 已经测序的部分也仅相当于文库的 1/6, 所以目前所得到的基因可检索率为 80%并非该文库最终的结果. 但是这一数据表明, 低表达基因的信息可以很好地保留在均一化处理后的文库之中.

3 讨论

3.1 cDNA 文库的均一化策略

Weissman[6]早就提出了可以通过基因组 DNA 饱和杂交的原理将 cDNA 文库进行均一化的理论. 但该理论一直以来都被认为不能应用于实际. 其主要限制因素是难于提供足量的极低表达丰度的 cDNA 用于饱和杂交, 从而可能会造成部分基因的丢失. 未检索到有关构建全生育期均一化 cDNA 文库的报道. 本文采用这种方法主要基于全生育期文库, 更主要是为了构建适用于大规模的基因发掘和证实的工具. 实验操作中通过先构建独立的 cDNA 文库, 然后利用 cDNA 文库质粒自身的复制而相对提高起始转录量, 在相同的饱和杂交体系中相当于提高了低表达丰度基因的绝对数量. 对于极低表达丰度的基因而言, 虽然相对于固定的基因组 DNA 亲和体系仍不足以饱和杂交. 但从本研究大规模测序的结果可以看出, 单一序列已经占了 59.5%, 满足均一化的要求, 所构建的全生育期文库适合大规模的测序. 同时, 本实验是从大规模进行 EST 测序的角度来设计的, 目的是构建一个应用于 DNA 芯片技术进行功能基因组研究的基因资源圃(gene pool). 从这个角度出发, 我们认为选用基于基因组 DNA 饱和杂交的均一化策略来构建具有非常明显的优点, 即技术上限制因素少、系统稳定性强、扣除效果严谨. 同时, 本研究构建的均一化的全生育期 cDNA 文库在技术体系上进行了 2 种改进, 提高了文库的代表性: 一是通过构建独立的 cDNA 文库, 相对于直接混合起始材料而言提高了文库的容量, 最大可能的包含了全部的表达基因, 也相对提高了低表达丰度基因尤其是极低表达丰度基因的含量; 二是通过采用 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ 2 个亲和体系互补操作, 加大了固定于磁珠的基因组 DNA 亲和体系对水稻全基因组的覆盖度, 从而相对增加文库中完整基因的代表性, 提高了文库的质量. 相对于水稻基因组计划的 EST 测序而言, 均一化处理后的文库用来测序可以更多的节约测序成本.

3.2 对均一化文库的优化

因为本研究涉及的取材时间间隔较长, 为防止

RNA 在长期保存过程中发生降解, 实验中采用了即时取样、即时构建的原则, 以保存文库的混合质粒和转化产物的双保险方式来集中均一化所定的 15 个独立文库. 在用试剂盒进行操作的全过程中, 一般从取样到文库质粒保存都控制在 2 个星期以内. 这种处理方式, 最大限度地避免了材料因素对最终均一化文库的质量影响.

根据基因组 DNA 扣除杂交的原理, 表达序列丰度的均一化主要受表达基因在 DNA 水平上的拷贝数及其同源的基因家族成员数目的影响. 而本研究测序发现的叶绿体基因 cDNA 在文库中存在较高的拷贝, 如表 2 中的果糖二磷酸醛缩酶和 CP12(一种核编码的叶绿体基因)等, 检索结果显示其属于叶绿体基因或与叶绿体 DNA 高度同源. 为降低这些基因在文库中的比例, 我们认为可以采用大片段文库中常用的高分子量 DNA 分离的方法制作磁珠固定的 DNA 饱和杂交体系, 可以更好地降低核基因组以外的影响.

3.3 全生育期均一化文库的应用

均一化 cDNA 文库在经济上具有广泛的应用空间, 可以节约大量实验成本. 另外, 它是优良的探针资源, 可以用于基因遗传图谱的制作和进行大规模的原位杂交[20]; 作为优化的文库系统它可以用于大规模测序或 DNA 芯片制作等研究. 明恢 63 作为中国杂交水稻研究中多个优良杂交组合中的恢复系, 具有很多优良的农艺性状. 本研究所构建的均一化明恢 63 全生育期文库克服了水稻基因表达时空性对单一文库的限制, 有利于用来研究基因的时空表达模式和开展功能基因组的研究. 另外, 该文库也为阐明明恢 63 优良农艺性状的基因调控机理奠定了基础. 本室已通过利用该文库制作的 cDNA 芯片初步鉴定出一批与抗病、抗旱、土壤氮和磷高效利用以及杂种优势相关的基因(尚未发表).

致谢 均一化文库的构建承蒙美国孟山都公司前高级研究员阮一骏博士的帮助和指导. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30070396)和国家重点基础研究发展规划(批准号: G2000016202)资助项目.

参 考 文 献

1 Arumuganathan K, Earle E D. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol Rep, 1991, 9: 208 ~ 219
2 Yu J, Hu S N, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryzae sativa* L ssp *Indica*). Science, 2002, 296: 79 ~ 92
3 Bishop J O, Morton J G, Rosbash M, et al. Three aboundance classes in Hela cell messenger RNA. Nature, 1974, 25: 199 ~ 204
4 Sasaki T. The rice genome project in Japan. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2027 ~ 2028
5 Yamamoto K, Sasaki T. Large-scale EST sequencing in rice. Plant Mol Biol, 1997, 35: 135 ~ 144
6 Weissman S M. Molecular genetic techniques for mapping the human genome. Mol Biol Med, 1987, 4: 133 ~ 143
7 Bonaldo M F, Lennon G, Soares M B. Normalization and subtraction: Two approaches to facilitate gene discovery. Genome Res, 1996, 6: 791 ~ 806
8 Minoru S H K. An 'equalized cDNA library' by the reassociation of short double-stranded cDNAs. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 5705 ~ 5711
9 Patanjali S R, Parimoo S, Weissman S M. Construction of a uniform-abundance (normalized) cDNA library. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 1943 ~ 1947
10 Soares M B, Bonaldo M F, Su L, et al. Construction and characterization of a normalized cDNA library. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 9228 ~ 9232
11 Sasaki Y F, Ayusawa D, Oishi M. Construction of a normalized cDNA library by introduction of a semi-solid mRNA-cDNA hybridization system. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 987 ~ 992
12 Tanaka T, Ogiwara A, Uchiyama I, et al. Construction of a normalized directionally cloned cDNA library from adult heart and analysis of 3040 clones by partial sequencing. Genomics, 1996, 35: 231 ~ 235
13 Poustka A J, Herwig R, Krause A, et al. Toward the gene catalogue of sea urchin development: The construction and analysis of an unfertilized egg cDNA library highly normalized by oligonucleotide fingerprinting. Genomics, 1999, 59: 122 ~ 133
14 Drmanac S, Stavropoulos N A, Labat I, et al. Gene-represening cDNA clusters defined by hybridization of 57,419 clones from infant brain libraries with short oligonucleotide probes. Genomics, 1996, 37: 29 ~ 40
15 Zhang Q, Saghai Maroof M A, Lu T Y, et al. Genetic diversity and differentiation of *indica* and *japonica* rice detected by RFLP analysis. Theor Appl Genet, 1992, 83: 495 ~ 499
16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
17 Peng K M, Zhang H B, Zhang Q F. A BAC library constructed to the rice cultivar "Minghui 63" for cloning genes of agronomic importance. Acta Bot Sin, 1998, 40: 1108 ~ 1114
18 Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3389 ~ 3402
19 Xiong L Z, Lee M W, Qi M, et al. Identification of defense related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. Mol Plant-Microbe Interact, 2001, 14: 685 ~ 692
20 Komiya T, Tanigawa Y, Hirohashi S. A large-scale *in situ* hybridization system using an equalized cDNA library. Analytical Biochemistry, 1997, 254: 23 ~ 30

(2002-04-01 收稿, 2002-06-26 收修改稿)