

茉莉酸甲酯诱导的白木香 cDNA 文库的构建及初步鉴定

徐艳红¹, 杨欣¹, 梁良¹, 高志晖¹, 张争^{1,2}, 魏建和^{1,2*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海南 万宁 571533

摘要: 目的 通过构建茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理的白木香 cDNA 文库, 为揭示伤害诱导沉香倍半萜合成的分子机制奠定基础。方法 以 MeJA 处理的白木香愈伤组织为材料, 以改造的 pGADT 为载体, 利用 SMART 技术构建白木香全长 cDNA 文库。结果 构建的文库原始滴度为 8.99×10^6 pfu/mL, 阳性克隆子的比例为 97%, 插入片段的大小在 500~3 000 bp, 平均大于 1 000 bp。结论 构建的文库无论从库容量、克隆效率, 还是全长率方面评价, 均达到了高质量文库的要求。

关键词: 白木香; 茉莉酸甲酯; cDNA 文库; 愈伤组织; 沉香

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)01-0102-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.020

Construction and primary authentication for cDNA library of *Aquilaria sinensis* incuded by methyl jasmonate

XU Yan-hong¹, YANG Xin¹, LIANG Liang¹, GAO Zhi-hui¹, ZHANG Zheng^{1,2}, WEI Jian-he^{1,2}

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Hainan Branch Institute of Medicinal Plant, Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Wanning 571533, China

Abstract: Objective To construct the cDNA library of *Aquilaria sinensis* treated with methyl jasmonate (MeJA), and to lay the foundation for revealing the molecular mechanism of damage-induced sesquiterpene synthesis of *Aquilariae Lignum Resinatum*.

Methods The full-length cDNA library was constructed by SMART technology with the MeJA-treated *A. sinensis* calli as materials and the modified pGADT as vector. **Results** The original titer of the unamplified library was 8.99×10^6 pfu/mL, the percentage of the positive recombination was 97%, and the length of inserted fragments was 500—3 000 bp with the average length of more than 1 000 bp. **Conclusion** The constructed library in this study reaches the high-quality library requirements in terms of storage capacity, recombination rate, or full-length cloning efficiency.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.; methyl jasmonate; cDNA library; callus; *Aquilariae Lignum Resinatum*

沉香 *Aquilariae Lignum Resinatum* 是我国、印度、日本及其他东南亚国家的传统名贵药材和天然香料。沉香属白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng. 是我国生产沉香的唯一正品植物来源。由于沉香的高价值, 长期以来白木香遭到掠夺式砍伐, 其原始森林已经基本破坏殆尽。因此, 白木香被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 II^[1]。

研究表明, 倍半萜类物质是沉香药材的最主要成分, 也是其精油的主要成分^[2-11]。然而, 健康的白木香树体不能产生沉香, 只有在受到伤害胁迫时才能启动倍半萜类物质的合成, 最终形成沉香^[12-15]。

为揭示伤害诱导沉香形成的分子机制, 本课题组进行了健康和受伤害白木香转录组测序。在此基础上, 分离鉴定了 3 个沉香倍半萜合酶基因。表达

收稿日期: 2013-09-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31100220, 81173481)

作者简介: 徐艳红 (1980—), 助理研究员, 博士, 研究方向为药用植物次生代谢与调控的分子机制。

Tel/Fax: (010)57833363 E-mail: yhxu@implad.ac.cn

*通信作者 魏建和 Tel/Fax: (010)57833358 E-mail: wjianh@263.net

网络出版时间: 2013-12-24 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.html>

分析显示,倍半萜合酶基因 *ASS1* 在健康的白木香愈伤组织中几乎不表达,但是经茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理或物理伤害后,其 mRNA 的表达水平显著升高^[16]。这些结果表明,倍半萜合酶基因是典型的诱导表达型基因,而且在转录水平存在重要调控。茉莉酸 (JA) 是伤信号转导途径中长途运输的重要信号分子,依赖于 JA 作为调节反应信号的防御应答也是植物次生代谢物质积累的前提^[17-18]。本研究通过构建 MeJA 处理的白木香全长 cDNA 文库,以期为后续分离鉴定相关的功能基因及揭示伤害诱导沉香倍半萜合成的分子机制奠定基础。

1 材料和仪器

材料为经 100 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理过的白木香愈伤组织,由本实验室培养处理。RNA 提取纯化试剂盒购自联川生物公司, cDNA 反转录试剂盒及文库构建试剂盒购自 Clontech 公司, PCR 引物由英俊生物公司合成; LA Taq 酶购自宝生物公司。Biometra PCR 仪 (德国 Biometra 公司), Bio-Rad PowerPac 电泳仪、Bio-Rad 凝胶成像系统 (美国伯乐公司), NanoDrop ND2000 核酸蛋白检测仪 (美国赛默飞尔公司)。

2 方法

2.1 总 RNA 提取

利用 RNA 提取纯化试剂盒 (LC Science, USA) 提取 RNA。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,分光光度计 NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, 美国) 测定 RNA 浓度。

2.2 cDNA 的合成

取 1.0 μg mRNA 为模板,反转录生成第一链 cDNA,在 0.2 mL 离心管中依次加入 1 μL poly A+RNA, 1 μL SMART VII Oligonucleotide, 1 μL CDSIII/3' PCR Primer, ddH₂O 补充体积至 5 μL 。仔细混匀,72 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 min; 冰上冷却 2 min; 向管中加入 2.0 μL 5 \times First-Strand 缓冲液, 1.0 μL DTT (20 mmol/L), 1.0 μL dNTP Mix (10 mmol/L), 1.0 μL PrimeScript Reverse Transcriptase。移液枪轻轻吸打混匀样品,短暂离心后 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h,冰上终止反应。用 LD-PCR (long-distance PCR) 方法合成 cDNA 双链 (ds-cDNA): 取 2 μL First-strand cDNA 产物,加入 80 μL 去离子水, 10 μL 10 \times Advantage2 PCR 缓冲液, 2 μL 50 \times dNTP Mix, 2 μL 5' PCR Primer, 2 μL CDSIII 3' PCR 引物, 2 μL 50 \times Advantage2 Mix, 混匀,短暂离心,扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 68

$^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min, 30 个循环。取 5 μL PCR 产物于 1% Agrose EB 胶上电泳检查。

2.3 文库的建立

取 50 μL ds-cDNA (2~3 μg) 进行蛋白酶 K 消化。用 Sfi I 酶切,再用 CHROMA SPIN-400 柱进行分级分离。收集大于 500 bp cDNA 合并为一管。用 95% 乙醇和 NaAC 沉淀后加入 150 μL 去离子水溶解。取 1.5 μL 此 cDNA 用于连接反应: 在 0.5 mL 的离心管中加入 pGADT 载体 1.0 μL , 10 \times Ligation 缓冲液 0.5 μL , ATP (10 mmol/L) 1 μL , 去离子水 4.5 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。连接产物于 65 $^{\circ}\text{C}$ 失活 10 min 后,立即冰浴 5 min 以上; 取直径为 90 mm 的一次性培养皿,加入 10 mL 1 \times TE 及 10 mL ddH₂O; 用干净镊子取出透析膜 (Millipore 公司),慢慢放入培养皿,注意光面向上,面上不能有水; 将样品加至膜上进行透析; 透析 100 min 至 120 min 后用移液枪吸出连接液至新的 0.5 mL 离心管。取 2 μL 透析后的连接液,加入到感受态细胞 TOP10 中进行电击转化。取 50 μL 电转产物,加入 20 μL IPTG,加水补足至约 200 μL ,涂布于含 100 μL X-Gal 的 LB (含 AMP) 平板上; 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜。其余电转产物加入甘油, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4 文库滴度和重组率测定

根据 LB 平板上的菌斑数计算文库滴度和重组率。

$$\text{滴度} = \text{菌斑数} \times \text{稀释倍数} \times 10^3$$

$$\text{重组率} = \text{白斑数} / (\text{白斑数} + \text{蓝斑数})$$

2.5 cDNA 插入片段大小鉴定

根据多克隆位点两侧的序列设计引物,上游引物为 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'; 下游引物为 3'-AGATGGTGCACGATGC ACAG-5'。随机挑取 18 个菌斑进行菌液 PCR 鉴定。

2.6 文库的扩增及基因克隆

取 25 μL 原始文库按照试剂盒说明扩增文库并计算滴度,加 DMSO 至终质量分数为 7%,分装后液氮速冻,保存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 。同时以扩增文库为模板,用白木香 3 个转录因子基因 *AsMYB4*、*AsWRKY4* 和 *AsMYC2* 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列设计引物进行 PCR 扩增。引物序列分别为 WRKY4-f: 5'-ATGGCCTCCTCTTATAGCAGCTTAG-3'; WRKY4-r: 5'-TCACTGTTTGTGTTGTACAACAACTACG-3'; MYB4-f: 5'-ATGGCAAGAACGCC-

TGTTTG-3'; MYB4-r: 5'-TTACGC AAACAGAGA-GTGGTAGGG-3'; MYC2-f: 5'-ATGACCGATTAC-AGGCTCCCG-3'; MYC2-r: 5'-TTACCTTGCATCC-CCCCTTTG-3'。50 μL 反应体系中含正、反向引物及模板各 2 μL、LA Tag (5 U/μL) 1 μL, 10×LA 缓冲液 5 μL, dNTP mix (2.5 mmol/L) 8 μL, ddH₂O 30 μL。PCR 反应程序是 94 °C 5 min; 94 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经电泳检测回收后与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌后挑阳性克隆送金唯智生物技术公司测序。

3 结果与分析

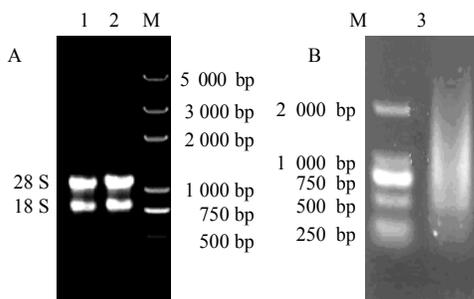
3.1 总 RNA 提取

取适量经过研磨的样品, 提取总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1-A。结果表明 28 S 和 18 S 条带带型整齐, 且 28 S 条带明显亮于 18 S 条带, 没有发生降解。用紫外分光光度计测定样品的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值为 1.92, 说明总 RNA 完整性很好, 样品纯度高, 可以用于下游 mRNA 提取。取 0.5 μL 分离的 mRNA 电泳检测, 在 500~2 500 bp 可见明显

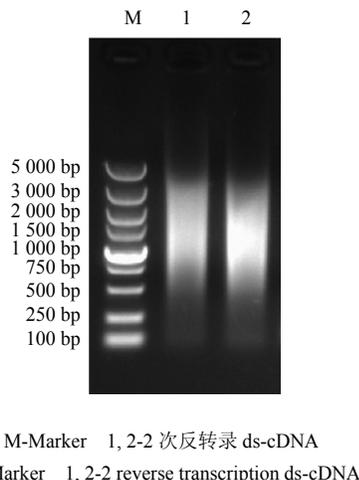
的弥散条带 (图 1-B), 说明分离的 mRNA 质量较高, 符合建库要求。

3.2 单、双链 cDNA 合成

用 1.0 μg mRNA 进行逆转录, 合成 cDNA 第一链, 再经 LD-PCR 扩增合成双链 cDNA (ds-cDNA)。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 显示成一条弥散带, 其相对分子质量主要是集中在 500~5 000 bp (图 2), 表明合成的 ds-cDNA 是比较完整的。



1、2-白木香总 RNA 3-白木香 mRNA M-Marker
1, 2-total RNA of *A. sinensis* 3-mRNA of *A. sinensis* M-Marker
图 1 白木香总 RNA (A) 和 mRNA (B) 的电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis patterns of total RNA (A) and mRNA (B) of *A. sinensis*



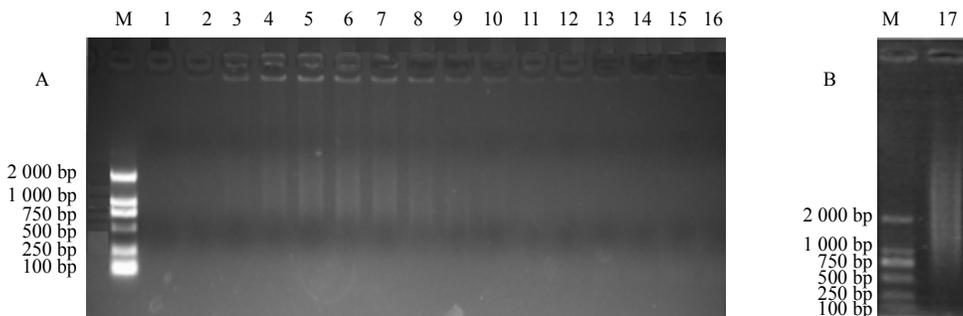
M-Marker 1, 2-2 次反转录 ds-cDNA
M-Marker 1, 2-2 reverse transcription ds-cDNA
图 2 双链 DNA 电泳图谱
Fig. 2 Electrophoresis of ds cDNA

3.3 sfi I 酶切及分级分离

双链产物经 sfi I 酶切后, 用试剂盒里所提供的 CHROMA SPIN-400 柱进行片段大小分级分离, 经过琼脂糖凝胶电泳检测 (图 3-A)。合并第 3~10 管的样品, 经沉淀浓缩后加 150 μL 去离子水溶解, 取 5 μL 电泳检测 (图 3-B), 得到的 ds-cDNA 供连接转化用。

3.4 文库的构建及质量检测

将连接产物透析后, 电击转化至感受态细胞



1~16 为依次收集的 16 管 ds-cDNA 样品 17-用于连接反应的 ds-cDNA
1-16 ds-cDNA samples collected in order 17-ds-cDNA used for coupled reaction
图 3 分离得到白木香愈伤组织 (A) 和供连接转化 (B) 的 ds-cDNA 片段
Fig. 3 ds-cDNA fragments of *A. sinensis* calli (A) and for connecting transformation (B)

TOP10 中, 取 50 μL 涂布于含 IPTG、X-Gal 和 AMP 的 LB 平板上。37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 16~18 h。统计菌斑数量, 计算原始文库的滴度为 8.99×10^6 pfu/mL, 重组率为 97%。随机挑取 18 个菌斑进行菌液 PCR 检测, 扩增的条带大都在 500~3 000 bp, 平均大于 1 000 bp (图 4)。检测结果表明, 所构建的文库质量较高。

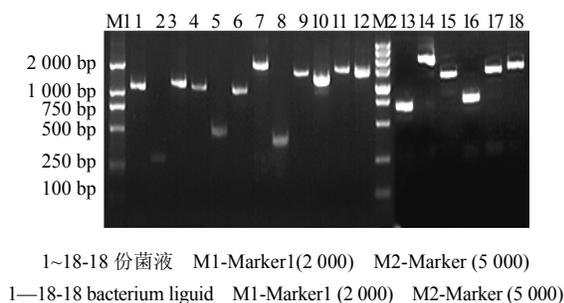
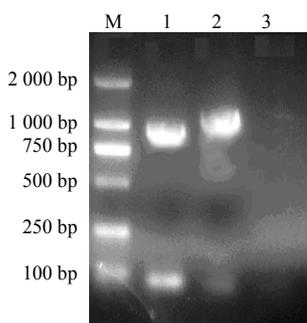


图 4 PCR 产物的电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis patterns of PCR products

3.5 文库的扩增及 *AsMYB4*, *AsWRKY4* 和 *AsMYC2* 基因的克隆

为了长期保存文库, 将部分原始文库进行了扩增, 得到滴度为 1.96×10^{10} pfu/mL 的扩增文库。为了进一步验证文库的质量, 选取 JA 介导的植物次生代谢途径中 3 类重要的转录因子 MYB、MYC 及 WRKY^[17] 为目标基因, 以文库质粒为模板, 分别对 *AsMYB4*、*AsWRKY4* 和 *AsMYC2* 3 个转录因子基因的 ORF 进行 PCR 扩增。结果 (图 5) 显示, *AsMYB4* 和 *AsWRKY4* 分别得到了 990 bp 和 1 155 bp 的目的片段, 并测序验证了其正确性, 而 *AsMYC2* 没有扩增到目的片段, 该基因是前期用 RACE 方法得到的, ORF 长 2 022 bp。该验证结果说明文库包含了大部



M-Marker 1~3-*AsMYB4*、*AsWRKY4* 和 *AsMYC2* PCR 产物
M-Marker 1—3- PCR products of *AsMYB4*, *AsWRKY4*, and *AsMYC2*

图 5 *AsMYB4*、*AsWRKY4* 和 *AsMYC2* PCR 产物电泳图谱
Fig. 5 Electrophoresis patterns of PCR products of *AsMYB4*, *AsWRKY4*, and *AsMYC2* genes

分 1 000 bp 左右的序列片段, 符合后续实验的要求, 但对于较大的基因不能完整扩增。文库构建过程中, 分级分离的 cDNA 片段与载体连接是不同长度的目的片段与固定长度的载体片段连接, 一般较短的片段优先与载体连接, 较长片段的连接效率相对低一些, 从而导致部分较长的目的片段基因信息丢失。

4 讨论

构建全长 cDNA 文库是高通量获得基因全长 cDNA、开展基因功能研究的重要手段。近年来, 全长 cDNA 文库在生物学的各个领域都得到了广泛应用。在白木香遗传背景并不清楚的情况下, 本课题组开展了 cDNA 文库构建工作。建库时首先考虑的是如何取材的问题。已有的研究表明, 倍半萜类物质是沉香药材的主要成分之一, 研究沉香倍半萜的生物合成和调控是揭示沉香形成分子机制的基础。前期实验结果表明, 倍半萜合酶基因是典型的伤害诱导表达的基因, 在健康组织中几乎检测不到其表达, 但经 MeJA 诱导后, 其转录水平的表达急剧升高, 倍半萜类物质的量也显著升高^[16]。大量研究表明, JA 作为植物次生代谢中的重要诱导子, 通过调控转录因子, 开启一系列合成基因的协调表达, 从而在转录水平影响植物的次生代谢^[18-19]。本研究以 MeJA 处理的白木香愈伤组织为材料, 保证了文库含有伤害胁迫响应的功能基因和调控基因的可能性, 为后续继续鉴定相关功能基因及揭示伤害诱导沉香倍半萜合成的分子机制奠定了基础。

文库构建过程中很多关键技术会影响到文库的质量, 包括 RNA 的提取、cDNA 的合成、分级分离、与载体的连接及转化等步骤。前期, 本课题组试图用伤害处理的三年生白木香树茎段为材料, 但由于多糖和酚类物质对 RNA 提取的干扰, 一直不能得到高质量的 cDNA (包括浓度和长度), 最终以愈伤组织代替木材, 提取了高质量的 RNA。在后续的连接和转化过程中, 本课题组设置不同的连接体系, 通过透析和电击转化等方法, 最终成功构建了该文库。通常, 一个理想的 cDNA 文库滴度应大于 1×10^6 pfu/mL, 重组率不应低于 80%, 插入片段不低于 1 000 bp。本课题组所构建的文库滴度为 8.99×10^6 pfu/mL, 重组率为 97%, 插入片段的大小在 500~3 000 bp, 平均大于 1 000 bp, 达到了高质量 cDNA 文库的要求。为了检验文库的质量, 选择受 MeJA 诱导的全长分别为 990 bp 和 1 155 bp 的

AsMYB4 和 *AsWRKY4* 为目标基因^[16], 以文库质粒为模板成功扩增其 ORF, 说明文库的全长率也基本可以满足后续实验的需要。综上所述, 本研究所构建的白木香 cDNA 文库无论从库容量, 还是克隆效率、全长率方面评价, 均达到了高质量文库的要求。

参考文献

- [1] CITES. Amendments to Appendix I and II of CITES [C]. Thailand, 2004.
- [2] Hashimoto K, Nakahara S, Inoue T, *et al.* A new chromone from agarwood and pyrolysis products of chromone derivatives [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(11): 5088-5091.
- [3] 曾孝杰, 王国才, 吴霞, 等. 山沉香化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(13): 1721-1725.
- [4] Ishihara M, Tsuneya T, Uneyama K. Fragrant sesquiterpenes from agarwood [J]. *Phytochemistry*, 1993, 33: 1147-1155.
- [5] Yagura T, Ito M, Kiuchi F, *et al.* Four new 2-(2-phenylethyl) chromone derivatives from withered wood of *Aquilaria sinensis* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2003, 51: 560-564.
- [6] Kumeta Y, Ito M. Characterization of δ -guaiene synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154: 1998-2000.
- [7] 奥·乌力吉, 王青虎, 王秀兰, 等. 山沉香中 3 个新木脂素的提取与结构解析 [J]. *中草药*, 2013, 44(7): 790-793.
- [8] Chen H Q, Yang Y, Xue J, *et al.* Comparison of composition and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees [J]. *Molecules*, 2011, 16: 4884-4896.
- [9] Chen H Q, Wei J H, Yang J S, *et al.* Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. *Chem Biodivers*, 2012, 9(2): 236-250.
- [10] Chen H Q, Yang Y, Xue J, *et al.* Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees [J]. *Molecules*, 2011, 16: 4884-4896.
- [11] Xu Y L, Yang X, Wei J H, *et al.* Cloning and expression analysis on 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase from *Aquilaria sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(3): 182-188.
- [12] Itoh T, Tabata Y, Widjaja E, *et al.* Structure and artificial induction of aloe wood [J]. *IAWA J*, 2002, 23(4): 466-467.
- [13] Pojanagaroon S, Kaewrak C. Mechanical methods to stimulate aloe wood formation in *Aquilaria crassna* Pierre ex H. Lec. (Kritsana) trees [J]. *ISHS Acta Horticult*, 2005, 676: 161-166.
- [14] Persoon G A. Growing 'the wood of the gods': agarwood production in southeast Asia. Smallholder tree growing for rural development and environmental service [J]. *Adv Agroforest*, 2008, 5: 245-262.
- [15] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 白木香结香机制研究进展及防御反应诱导结香假说 [J]. *中草药*, 2010, 41(1): 156-159.
- [16] Xu Y H, Zhang Z, Wang M X, *et al.* Identification of genes related to agarwood formation: transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. *BMC Genom*, 2013, 14: 227.
- [17] Li L, Li C, Lee G I, *et al.* Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 6416-6421.
- [18] Geyter N D, Gholami A, Goormachtig S, *et al.* transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism [J]. *Trends plant Sci*, 2012, 17(6): 349-359.
- [19] Vom Endt D, Soarese S M, Kijne J W, *et al.* Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-hook DNA-binding proteins [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1680-1689.