

# ‘岩溪晚芦’ 椪柑果皮与果肉差减 cDNA 文库的构建及初步分析

叶庆亮, 江 东\*, 彭爱红

(中国农业科学院柑橘研究所, 重庆 400712)

**摘要:** 以‘岩溪晚芦’椪柑 (*Citrus reticulata* Blanco) 成熟果实果皮和果肉为材料, 采用抑制性差减杂交技术成功构建了果皮 (tester) 与果肉 (driver) 的差减 cDNA 文库。结果显示: cDNA 克隆外源插入片段大小介于 100~ 500 bp 之间。成功对 411 个克隆进行了测序, 测序结果经与 NCBI 基因库中序列进行比较, 377 个 EST 找到了同源序列, 它们分属于 126 个基因, 涉及到色素合成、能量代谢、初级代谢、次生代谢、抗逆防御、蛋白代谢、信号转导、香味形成、果皮软化 (衰老)、精油合成、抗氧化等代谢途径和生理生化过程。还有一些基因涉及到三价铁螯合物、反转录转座子 gag 蛋白、查尔酮合成、硼离子转运、儿茶酚氧位甲基转移酶等功能。功能已知且没有重复的 EST 共有 63 个, 占总数的 49.2%。有 5 个基因共 62 个克隆虽在 Blast 搜索时找到了较高的同源性序列, 但功能目前尚未明确。另有 34 个基因未搜索到同源序列, 可能为新发现的基因。

**关键词:** 柑橘; 抑制性差减杂交 (SSH); cDNA 文库; 表达序列标签; 克隆; 差异表达基因

中图分类号: S 666 Q 785 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 07-0967-08

## Construction of a Subtractive cDNA Library Between Fruit Epicarp and Pulp of Ponkan Mandarin and Primary Analyses of the Sequences

YE Qing-liang JIANG Dong\*, and PENG Aihong

(Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

**Abstract** A cDNA library was successfully constructed via suppression subtractive hybridization between fruit epicarp (experimental group tester) and pulp (control group the driver) of Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco). Results showed that most of the clones had inserting fragments which length ranged from 100 bp to 500 bp. Four hundred and eleven ESTs were successfully sequenced and searched against NCBI GenBank, the results indicated that 377 ESTs had significant similarities with known genes. All the ESTs were divided into 126 genes according to the gene annotation. These ESTs were mainly involved in pigment synthesis, energy metabolism, primary metabolism, secondary metabolism, defense against stresses, signal transduction, transcription, flavor formation, oil synthesis, peel softening, antioxidant metabolism etc. There were 63 unique ESTs which accounted for 49.2% of the total ESTs and another 34 ESTs had no matching homologous sequences found.

**Key words** citrus; suppression subtractive hybridization (SSH); cDNA library; expressed sequence tag; clone; differentially expressed genes

‘岩溪晚芦’是从福建长泰县普通椪柑 (*Citrus reticulata* Blanco) 中选出的迟熟变异优质品种, 在相同的条件下成熟期比普通椪柑迟 40~ 60 d, 果实品质优良, 耐寒性较强, 已在我国柑橘生产和育

收稿日期: 2009-01-19 修回日期: 2009-06-15

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD13B06-1-4); 科技部‘973’重大基础研究前期研究专项 (2005CCA02900 CSTC 2007BB1343); 重庆市自然科学基金项目 (SCTC2005BA1010)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: citrusg@yahoo.com.cn)

种中得到广泛利用 (钟连生等, 1994)。*‘岩溪晚芦’*在果实成熟过程中伴随着果肉品质的逐步改善, 果皮颜色由绿转黄, 由厚变薄且香味增强。通过差减杂交以明确柑橘果肉和果皮品质形成过程中基因在不同组织中的表达情况, 克隆并鉴定这些基因, 对深入了解果实品质形成的分子机理、发育和代谢的调控网络及途径具有重要意义。

近年来, 抑制性差减杂交技术已成为分离差异表达基因的重要方法 (Diatchenko et al, 1996)。目前柑橘类果树有关差减文库的构建及其分析已多见报道 (Zhong et al, 2001; Michael et al, 2003; Takehiko et al, 2003; Zhang et al, 2004; Irving et al, 2007; 高雪等, 2007), 但有关*‘岩溪晚芦’*成熟果皮组织特异表达基因的研究尚未见报道。本研究中以*‘岩溪晚芦’*成熟果实外果皮和果肉为材料, 利用抑制性差减杂交技术, 富集其外果皮的差异表达基因, 成功构建了果皮与果肉的差减 cDNA 文库, 为今后进一步的基因功能分析、全长基因克隆及基因功能研究等打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

*‘岩溪晚芦’*成熟果实于 2007 年 1 月 28 日一次性采自国家果树种质重庆柑橘圃, 于中国农业科学院柑橘研究所实验室用清水洗净, 再以灭菌过的 DEPC 处理的水反复浸洗 3 次, 擦干后迅速削外果皮至液氮中, 然后置  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存; 果肉取其汁胞立即以无水酒精脱水, 然后用液氮迅速冷冻保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 1.2 方 法

1.2.1 总 RNA 的提取 采用经典的 Phenol/SDS/LiCl 抽提法, 参考同类提取方法 (Tao et al, 2005; Valeriano et al, 2005), 通过加入适量氯化钙, 调整并精简步骤等, 对抽提方法加以改良 (叶庆亮等, 2007)。

1.2.2 mRNA 的分离和检测 采用 Oligotex mRNA Purification Kit 严格按说明书操作, 纯化 mRNA。取 mRNA 样品  $2\text{ }\mu\text{L}$ , 加入  $98\text{ }\mu\text{L}$  DEPC 水, 混匀后用 BDRAD Smart Spec<sup>TM</sup> 3000 进行扫描, 波长范围为  $200\sim 300\text{ nm}$ , 记录  $A_{230}$ 、 $A_{260}$  和  $A_{280}$ , 并计算  $A_{260}/A_{280}$  比值。按 Sambrook 等 (1989) 的方法进行非变性琼脂糖凝胶电泳, 凝胶经浓度 1.2% EB 染色后, 紫外凝胶成像系统下检测照相。

1.2.3 SSH cDNA 文库的构建 采用 PCR-SELECT<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit 进行文库构建, 严格按说明书操作, 以成熟果皮为 Tester, 以成熟果肉为 Driver, 将纯化所得 mRNA 分别反转录成双链 cDNA, 经 *Rsa*I 酶切后, 把 Tester 分成两等份, 分别连接上不同的接头, 而 Driver 则不与接头相连, 将两等份 Tester 分别与 Driver 混合, 进行第 2 轮差减杂交, 然后将第 1 轮差减杂交的产物在未经变性的情况下混合, 进行第 2 轮差减杂交。对两轮杂交后所得的差异表达序列进行抑制性 PCR 扩增后, 再以巢式引物进行第 2 轮 PCR 扩增, 所得 PCR 产物与 T 载体连接, 再将连接产物电转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 然后以 LB 培养基  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养后, 涂布在含 X-gal 和 IPTG 的 LB/Amp 琼脂培养基平板上,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 挑取白色单菌落培养扩增后, 取部分菌液以终浓度 40% 的灭菌甘油保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱, 从而构建成果皮与果肉差异表达基因的 cDNA 文库。试剂盒中接头和引物的序列如下。Adaptor 1: 5'-CTAATCGACTCACTATA GGGCTCGAGCGGCCGCCGAGGT-3'; Adaptor 2R: 5'-CTAATCGACTCACTATA GGGCAGCGTGGTTCGGCCGAGGT-3'; PCR primer 1: 5'-CTAATCGACTCACTATA GGGC-3'; G3PDH 5' primer 5'-ACCA CAGTCCATGCCATCAG-3'; G3PDH 3' primer 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'; Nested PCR primer 1: 5'-TCGAGCGGCCGCCGAGGT-3'; Nested PCR primer 2R: 5'-AGCGTGGTTCGGCCGAGGT-3'。

1.2.4 文库片段大小检测与序列分析 将菌液提取质粒进行 PCR 扩增, 再经凝胶电泳, 确定插入片段的长度。随机挑取文库中 500 个克隆送到北京三博远志公司进行测序。所得 EST 去除载体序列后,

登录 NCBI网站, 采用 BlastX 程序进行同源性比对分析。选择 NCBI非冗余蛋白质数据库 (non-redundant protein database), 所有参数设置均使用默认值, 根据提交序列长度、得分高低、配准百分比, 判定 EST 是否为已知功能基因。参照拟南芥 (Newman et al, 1994), 水稻 (Yanamoto & Sasaki 1997) 的分析标准, 得分 (score) 大于 70且序列一致性 (identity) 大于 80% 的搜索结果认为功能已知, 获取蛋白质功能注释。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 和 mRNA 的质量

所得总 RNA 质量和浓度均较高, 经凝胶电泳、EB 染色后在紫外灯下观察, 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰且完整, 无可见拖尾和污染 (图 1), 比例接近 2:1,  $A_{260}/A_{280}$  均在 1.8~2.0 之间。所得 mRNA 经电泳后效果也较明显, 可用于文库构建 (图 2)。

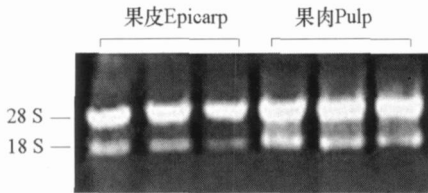


图 1 总 RNA 凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA

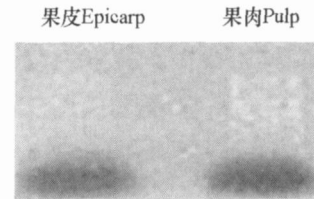


图 2 纯化后的 mRNA 凝胶电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of purified mRNA

### 2.2 cDNA 文库构建效果

2.2.1 酶切效果 取 2.5  $\mu$ L 消化的 ds cDNA 和 5  $\mu$ L *Rsa*I 消化的 cDNA 于 1  $\times$  TAE 缓冲液中, 在 1% 琼脂糖上进行电泳。结果表明, *Rsa*I 酶切后, 平均 cDNA 大小分布范围明显小于未酶切的 cDNA, 说明酶切完全, 符合试验要求。

2.2.2 连接效率 将连有 Adaptor 1 和 Adaptor 2R 的两组产物分别用不同引物扩增。对照以 Adaptor 1 连接的产物为模板, 分别以试剂盒中的 G3PDH 3' primer 和 PCR primer 1, G3PDH 3' primer 和 G3PDH 5' primer 为引物进行扩增, 共 35 个循环。从对照的 PCR 产物看, 相应片段间相差明显小于 4 倍, 连接效率大于 25% (图 3), 说明差减效率较高, 满足试验要求。

2.2.3 第 2 次 PCR 产物 将第 2 次 PCR 产物进行凝胶电泳, 结果表明, 差减的大小主要介于 0.1~0.5 kb 之间, 明显小于未差减的 (介于 0.1~1.0 kb), 说明两者大部分共有序列已被差减消除 (图 4), 背景有效地减少, 不同表达序列得到进一步富集。

2.2.4 插入片段的大小 随机挑取 100 个克隆进行质粒抽提, 再进行 PCR 扩增和凝胶电泳, 其中 96 个克隆显示存在有效产物。cDNA 克隆外源插入片段的大小绝大部分介于 0.1~0.5 bp 之间, 与 SSH 预期插入片段的大小相吻合 (图 5)。

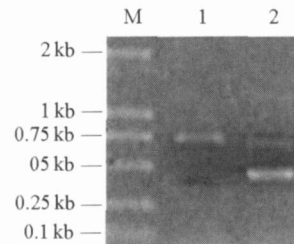


图 3 连接效率图

- 1: 对照 (G3PDH 3' primer 和 PCR primer 1-Adaptor 1);  
2: 对照 (G3PDH 3' primer 和 5' primer-Adaptor 1);  
M: DNA 分子量标准 DL2000

Fig. 3 Analysis of ligation efficiency

- 1: Control (G3PDH 3' primer and PCR primer 1-Adaptor 1);  
2: Control (G3PDH 3' primer and 5' primer-Adaptor 1);  
M: Marker DL2000.

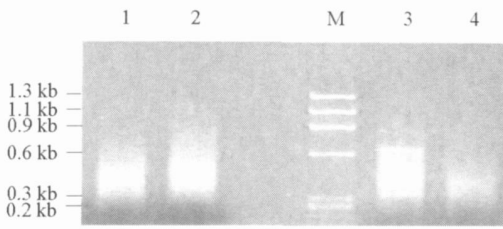


图4 第2次 PCR 结果

M:  $\phi$ X174 DNA/*Hae* III digest size marker;

1: 差减果皮; 2: 未差减果皮; 3: 未差减果肉; 4: 差减果肉。

Fig. 4 Result after the second round PCR

M:  $\phi$ X174 DNA/*Hae* III digest size marker; 1: Substracted epicarp;

2: Unstracted epicarp; 3: Unstracted pulp; 4: Substracted pulp.

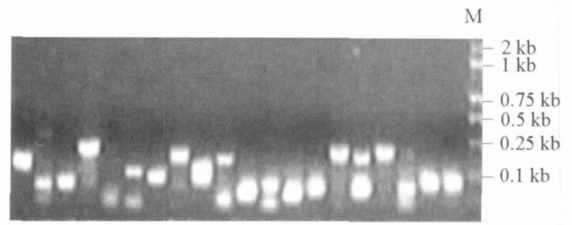


图5 质粒 PCR 结果

M: DNA 分子量标准 DL2000。

Fig. 5 PCR amplification of the plasmids

M: Marker DL2000.

2.2.5 阳性克隆的蛋白质功能分析 随机挑选文库中 500个克隆进行测序, 成功测出 411个序列, 其中最长为 868 bp 最短为 67 bp 绝大部分则集中于 100~ 500 bp之间, 与 PCR检测结果相一致。经与 NCBI基因库中序列进行比较, 有 377个 EST 序列找到了同源序列, 它们分属于 126个基因, 其中编码一种假想未知蛋白的基因出现频率最高, 达 31次, 占总数的 8.22%; 编码一种未命名蛋白的基因出现频率达 28次, 占总数的 7.43%; 编码假想叶绿体 RF1的基因出现频率达 25次, 占总数的 6.63%; 5个基因出现频率在 10~ 20之间; 55个基因出现频率在 2~ 10之间, 其中大部分集中在 2~ 5之间; 功能已知且没有重复的 EST 有 63个, 占总数的 49.2%。有 5个基因共 62个克隆虽在 Blast 搜索时找到了较高的同源性序列, 但功能目前尚未明确, 有待于进一步深入分析。另有 34个基因未搜索到同源序列, 可能为新发现的基因。

经初步分析, 这些具有较高同源性的 EST 分别涉及到与色素合成、能量代谢、初级代谢、次生代谢、抗逆防御、蛋白代谢、信号转导、香味形成、果皮软化、精油合成、抗氧化代谢等代谢途径和生理生化过程。还有一些基因涉及到反转录转座子 gag 蛋白、查尔酮合成、硼离子转运、儿茶酚氧位甲基转移酶等功能 (表 1)。

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

Table 1 The result of the EST's blast

样品号 Na	相关蛋白 Related protein	一致性 % Identity	频率 Frequency	样品号 Na	相关蛋白 Related protein	一致性 % Identity	频率 Frequency
EA18	Hypothetical protein conserved	87 (72/82)*	31	E67	NADP- isocitrate dehydrogenase	81 (79/98)	1
EA67	Unnamed protein product	86 (173/199)	28	EA192	WUSCHEL-like protein	83 (64/77)	1
E02	Hypothetical chloroplast RF1	93 (82/88)	25	E0325	Sec7 domain-containing protein	100 (143/143)	1
E0340	d-limonene synthase	89 (227/255)	18	EA17	Zeta-carotene desaturase precursor	85 (145/170)	1
EA297	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K	98 (123/125)	15	EA42	UDP-glucose-flavonoid-3-O-glucosyl transferase	80 (69/86)	1
EA95	Reverse transcriptase	84 (174/207)	12	EA129	Capsanthin/capsorubin synthase	95 (114/120)	1
EB19	Photosystem II protein D1	88 (94/107)	12	E54	Terpene synthase	87 (205/236)	1
EA16	Maturase K	86 (81/94)	11	EB43	Sucrose transporter 2	89 (99/111)	1
E0332	RNA polymerase beta subunit	100 (121/121)	9	EA294	Unnamed protein product	85 (89/105)	1
EB31	Ribosomal protein S8	100 (78/78)	7	E0326	Soluble epoxide hydrolase	87 (106/122)	1
EA7	Sucrose-phosphate synthase 1 (UDP-glucose)	85 (97/114)	5	E0376	Samatic embryogenesis receptor kinase1	100 (67/67)	1
EB13	Carotenoid cleavage dioxygenase 4a	97 (100/103)	5	EA169	WD-repeat protein HUSSY-07 putative	94 (222/237)	1
EA96	Zeaxanthin epoxidase	96 (134/140)	4	EB21	Fruktokinase	97 (223/229)	1
E0375	PSI reaction center subunit III	88 (226/257)	4	EA103	DNA repair protein RecO	94 (271/288)	1
E0321	Actin gene	89 (64/72)	4	EA299	Pyruvate decarboxylase	84 (67/80)	1

续表 1

样品号 No	相关蛋白 Related protein	一致性 % Identity	频率 Frequency	样品号 No	相关蛋白 Related protein	一致性 % Identity	频率 Frequency
EA9	Phosphoenolpyruvate carboxylase	89(188/211)	4	EA125	Basic cellulase	92(100/109)	1
E0371	Malate dehydrogenase	92(255/278)	4	EA154	Putative thioredoxin H protein	89(77/87)	1
EE12	Gammaterpinene synthase	84(55/65)	4	EA296	Putative thermostable pectinesterase	83(57/68)	1
EB12	Cinnamate 4-hydroxylase CYP73	81(117/144)	4	E0316	Putative sterol esterification protein	87(149/171)	1
EB22	Acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase <sup>β</sup> subunit	100 (312/312)	4	EB3	Putative myb family transcription factor	84(58/69)	1
EA177	Attachment protein receptor mRNA	84(318/380)	3	EA14	PREDICTED: similar to surface antigen	100(102/102)	1
EA160	Minaculin-like protein 3	86(115/134)	3	EE1	Putative 40S ribosomal protein S7	100(212/212)	1
EB32	Fe(III)-chelate reductase	82(147/179)	3	E225	Phytene desaturase	87(78/90)	1
E0311	Cytochrome P450	88(273/310)	3	E0304	Plastidic ATP/ADP transporter	89(98/102)	1
EB42	Conserved hypothetical protein putative	94(138/146)	3	EA158	Uracil phosphoribosyl transferase like protein	100(278/278)	1
EB7	ADH transcription factor	81(96/119)	3	EB5	Phenylalanine-ammonia lyase	85(210/247)	1
EA6	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3	83(74/89)	3	EA266	Pentatricopeptide (PPR) repeat- containing protein	100(98/98)	1
E132	Amylase mRNA synthetase	86(45/52)	3	EA198	Non-phototropic hypocotyl 13	100(152/152)	1
E0369	MYC2	86(337/392)	3	EA40	NHX1	86(147/171)	1
EB18	Vacuolar-processing enzyme precursor	84(127/151)	2	EB44	PREDICTED: similar to KIAA0550 protein	93(88/95)	1
EA202	Sucrose synthase	87(99/113)	2	EA295	NADH dehydrogenase subunit 9	100(77/77)	1
EA102	RNA-directed DNA polymerase	98(68/69)	2	EA132	Monoterpene synthase	96(258/269)	1
E190	Retrotansposon gag protein	100(212/212)	2	EA151	Lipid-transfer protein	86(311/366)	1
EA213	Putative senescence-associated protein	100(98/98)	2	E0302	Maltose/maltodextrin transport system	99(266/267)	1
E68	Putative reverse transcriptase	100(116/116)	2	EA245	LigA	89(100/112)	1
E0305	ATP synthase CF1 beta subunit	100(86/86)	2	EA304	LEAFY	88(141/160)	1
EA90	Putative gag-pol polyprotein	93(65/70)	2	EA204	Isoflavone reductase-like protein	80(100/125)	1
EA69	Acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase	95(247/261)	2	EA165	HECT domain and RCC1-like domain protein	95(138/145)	1
EA269	Polyprotein 1	100(98/98)	2	E07	Integrase	100(58/58)	1
E0345	Polygalacturonase-inhibiting protein	83(44/53)	2	EB39	Guanylyl cyclase	96(126/131)	1
EA229	Pectinesterase	98(123/124)	2	EA80	Gag-pol polyprotein putative	100(134/134)	1
EA274	O-methyltransferase	81(100/123)	2	EA59	Ethylene-induced esterase	80(88/110)	1
EA88	NAC domain protein	86(116/135)	2	E0372	Cytosolic phosphoglucomutase	81(98/121)	1
EB46	MYB60-like protein	86(67/78)	2	EB40	Cytochrome b6	82(108/125)	1
EA46	Mitogen-activated protein kinase	88(85/96)	2	EA199	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	98(265/267)	1
EA189	Major facilitator superfamily (MFS_1) transporter	99(258/261)	2	EA243	Twins arginine translocation pathway signal	96(154/160)	1
EA138	MADS-box protein	86(340/388)	2	EA8	Calcium-dependent protein kinase	96(98/102)	1
EA48	Lycopene epsilon-cyclase	86(121/140)	2	EA254	Binding	100(86/86)	1
EA271	Lipoxygenase	80(67/84)	2	EA128	Beta-fructofuranosidase	92(129/140)	1
EA86	Flavonol synthase/flavanone 3- hydroxylase	97(99/102)	2	EA51	Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase al	82(89/108)	1
EA215	Flavonoid 1-2 rhamnosyltransferase	100(88/88)	2	EA210	AML1	89(256/288)	1
EB48	Extensin-like protein	87(79/91)	2	E0314	AF426451_1 cytochrome P450	86(137/159)	1
EB47	Expansin	89(58/63)	2	EA66	AF369930_2 polypolyprotein	80(55/69)	1
EB35	Envelope membrane protein	100(145/145)	2	EA89	Acidic class II chitinase	88(356/405)	1
EA43	Dehydrin	91(146/157)	2	EA164	ACC oxidase	90(213/235)	1
EB34	Cytochrome c heme attachment protein	90(178/190)	2	EA247	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 4L	97(386/399)	1
EA206	Citrus sucrose transporter 1	90(90/100)	2	E0310	Putative reverse transcriptase	100(256/256)	1
EA250	Cell wall invertase	87(84/97)	2	E0319	Putative gag-pol polyprotein	89(59/66)	1
EA31	Boron transporter	88(45/51)	2	EA171	Phenylalanine-ammonia lyase	87(87/100)	1
EA30	ATP synthase CF0 subunit I	89(116/130)	2	E63	Vacuolar citrate/H <sup>+</sup> symporter	87(188/216)	1
EA53	Alpha-glucan water dikinase chromoplast	85(78/91)	2	E0373	Conserved hypothetical protein putative	100(138/138)	1
EB37	Allene oxide synthase	85(55/65)	2	E04	Hypothetical protein MAL7P1_142	100(66/66)	1
EB15	Acidic cellulase	92(324/357)	2	E0312	Boron transporter	86(76/88)	1

\* 括号内: 相同序列长度/序列总长度。\* The content within the brackets is The length of similar sequences/Total sequence length.

### 3 讨论

本试验中发现差减效率的高低直接关系到能否得到差异表达基因,其中最关键的是 Tester cDNA 与人工接头连接,其效率高低直接影响差减杂交的成败,这与 Diatchenko等(1996)的报道相一致。

‘岩溪晚芦’果皮果胶含量高,常规方法无法提取到满意的总 RNA,在加入提取液后再加入适量氯化钙可除去果胶,获得了高纯度的 RNA。

本研究中,酶切后的产物核苷酸片段明显减小,得到了与预期大小相符的产物,加上连接效果好,最终获得了大量的重组子,经检测,cDNA 插入大小介于 100~500 bp 之间,符合预期要求。文库构建过程中,由于经过了酶切,易造成同一基因发生频率(丰度或表达水平)高估的假象,并且一些高丰度表达的基因也会在文库中出现很多拷贝,须进行 reverse northern 验证。

本研究中,利用岩溪晚芦外果皮为 Tester 岩溪晚芦果肉为 Driver 差减结果富集的是外果皮中的特异表达基因,即可能是与外果皮组织发育相关的基因。对 411 个克隆成功进行了测序,结果经与 NCBI 基因库中序列进行比较,有 377 个 EST 序列找到了同源序列,分属 126 个基因,涉及众多重要功能。

根据同源性分析结果发现,有两个基因高频率(31 次和 28 次)出现,说明其在成熟的外果皮组织中的表达水平明显高于果肉组织中,可能具有某种重要的生物学功能。

一般在柑橘果实外果皮表皮细胞中富含叶绿体,本研究中差减杂交获得的几个高丰度表达的基因,均与叶绿体编码的基因有关。其中编码假想叶绿体 RF1 因子的基因出现频率达 25 次,在外果皮组织中的表达水平较高,RF1 是叶绿体形成的必需因子,促进叶绿素合成(Reiko et al, 2007)。编码 NADH-质体醌氧化还原酶亚基 K (NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K) 的基因出现频率为 15 次,NADH 和质体醌在叶绿体光合电子传递链中起传递电子和质子的作用,为光合作用所必需;编码光合系统 II 蛋白 (photosystem II protein) 的基因出现 12 次,叶绿体光系统 PS II 起裂解水释放氧和传递电子的作用,是光合作用必不可少的(潘瑞焱等, 2004);另外,编码成熟酶 K (maturase K) 的基因出现频率达 11 次,成熟酶 K 基因位于叶绿体 tmK 基因的内含子中,编码一种成熟酶,此酶参与剪切 RNA 转录体中 II 型内含子(Soltis et al, 1996)。此外,定位于叶绿体细胞器中的基因还有编码细胞色素 P450 (cytochrome P450)、光合系统 I 反应中心亚基 III (PSI reaction center subunit III),光合系统 II 蛋白 D1 (photosystem II protein D1)、蔗糖磷酸化合成酶 1 (Sucrose-phosphate synthase 1) (姜东等, 2000),磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase) (Peter & Udq, 2004)、乙酰辅酶 A 羧化酶羧基转移酶  $\beta$  亚基 (acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase beta subunit) (Thelen & Ohlrogge, 2002; Ken-ichi et al, 2004) 等基因。上述基因的高丰度表达均清楚地显示这些基因与叶绿体光合途径的基因有关。通过差减杂交富集到的这些高丰度表达的基因或可间接证实叶绿体在外果皮细胞中分布更多,而在果肉汁胞中则缺乏,也说明本试验差减效率比较高。

另外,与柑橘果皮油胞中柠檬烯合成途径有关的基因,如编码右旋柠檬烯 (D-limonene) 合成酶基因也得到高丰度表达,在总测序结果中出现频率达 18 次。右旋柠檬烯为单萜烯,大量存在于柑橘精油中,尤其在橘皮的油胞中广泛存在,是重要的次生代谢物质,也是成熟柑橘果皮中香味的重要组分(汤建国等, 2004)。右旋柠檬烯合成酶基因在温州蜜柑果皮早期发育阶段起着重要的调控作用(Shimada et al, 2004, 2005)。本结果表明,在柑橘成熟的外果皮中该基因仍然高丰度表达,而在果肉则不存在,这可能与果皮香味产生的有着重要联系(Endo et al, 2008)。

本差减杂交还高效富集了一些与色素有关的基因,如编码类胡萝卜素双加氧裂解酶 4a (carotenoid cleavage dioxygenase 4a) (由淑贞和杨洪强, 2008)、玉米黄质环氧化酶 (zeaxanthin epoxidase) (冯娟等, 2005)、9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶 3 (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3) (杨锦芬

等, 2007)、转录激活因子 (MYC2) (刘仕芸, 2007) 等基因, 也在柑橘外果皮中高丰度表达。

本试验通过差减杂交法筛选出了岩溪晚芦外果皮特异表达基因, 深入研究这些基因对于了解果皮在成熟时期的生理生化变化具有重要意义。下一步将对筛选出的差异表达基因, 如与色素相关的基因和柠檬烯代谢有关的基因, 采用实时定量 PCR 和 Northern 法进一步验证, 并进行全长基因的克隆及其表达和功能分析。

## References

- Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chen Chik A, Moqadam F, Huang B, Lulyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Siebert P D. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci* 1993: 6025–6030.
- Endo T, Shimada T, Fujii H, Nishikawa F, Sugiyama A, Nakano M. 2008. CFT Co-expression system for rapid analysis of transgenic *Citrus* flowers and fruit// The International Society of Citriculture. 11th international citrus congress program and abstracts. Wuhar: The Chinese Society of Citriculture: 162–163.
- Feng Juan, Yang Zu-jun, Zhou Jian-ping, Liu Cheng, Bai Li-li, Ren Zheng-long. 2005. Cloning and sequence analysis of zeaxanthin epoxidase gene (ZEP) isolated from *Triticum aestivum* L. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* 18 (5): 603–607. (in Chinese)
- 冯娟, 杨足君, 周建平, 刘成, 白丽丽, 任正龙. 2005. 小麦玉米黄质环氧化酶 (ZEP) cDNA 的克隆及序列分析. *西南农业学报*, 18 (5): 603–607.
- Gao Xue, Li Zheng-guo, Fan Jin, Yang Ying-wu. 2007. Construction and preliminary analysis of subtractive library for peel pitting of 'Fengjie' navel orange fruit. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 33 (1): 71–76. (in Chinese)
- 高雪, 李正国, 樊晶, 杨迎伍. 2007. 奉节脐橙果皮褐变差减文库的构建及初步分析. *植物生理与分子生物学学报*, 33 (1): 71–76.
- Irving J Berger, Juliana Freitas-Astua, Marcelo S Reis, Maria Lu sa P N, Targon Marcos A Machado. 2007. In silico prediction of gene expression patterns in *Citrus flavedo*. *Genetics and Molecular Biology*, 30 (3 Supplement): 752–760.
- Jiang Dong, Li Yong-geng, Yu Zhen-wen, Xu Yu-m in, Yu Song-lie. 2000. Study on photosynthate supplying capability of flag leaf of high yielded winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Sciences* 26 (1): 51–55. (in Chinese)
- 姜东, 李永庚, 于振文, 许玉敏, 余松烈. 2000. 高产冬小麦旗叶光合产物供应能力的研究. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 26 (1): 51–55.
- Ken-ichi Kuchta, Yuk a Tsuchiya, Yasuhide Okamoto, Manabu Harada, Masao Yanada, Masahiro Ishiura. 2004. Construction of unmodified oligonucleotide-based microarrays in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: Screening of the candidates for circularly expressed genes. *Genes & Genetic Systems* 79 (6): 319–329.
- Liu Shi-yun. 2007. Cloning and analysis for candidate anthocyanin transcriptional activator genes of potato [M. D. Dissertation]. Dazhou South China University of Tropical Agriculture. (in Chinese)
- 刘仕芸. 2007. 马铃薯花青素候选转录激活基因的克隆与分析 [硕士论文]. 儋州: 华南热带农业大学.
- Michael Bauscher, Robert Shatters, Jose Chaparro, Dang Phat, Wayne Hunter, Randall Niedz. 2003. An expressed sequence tag (EST) set from *Citrus sinensis* L. Osbeck whole seedlings and the implications of further perennial source investigations. *Plant Science* 165 (2): 415–422.
- Newman T, Brujin F J D, Green P, Keegstra K, Kende H, McIntosh L, Ohlrogge J, Rakhele N, Somerville S, Thomashow M, Retzel E, Somerville C. 1994. Genes galore: A summary of methods for accessing results from large scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiology* 106 (4): 1241–1255.
- Pan Ru-chi, Wang Xiao-jing, Li Ning-hui. 2004. *Plant physiology*. The fifth edition. Beijing: Higher Education Press: 50–78. (in Chinese)
- 潘瑞琦, 王小菁, 李娘辉. 2004. *植物生理学*. 第5版. 北京: 高等教育出版社: 50–78.
- Peter Westhoff, Udo Gowik. 2004. Evolution of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase: Genes and proteins. A case study with the genus *Ficaria*. *Annals of Botany*, 93: 13–23.
- Reiko M obhashi, Takanori Yanazaki, Fumiyoshi M youga, Takuya Ito, Koichi Ito, Masakazu Satou, Masatomo Kobayashi, Noriko Nagata, Shigeo Yoshida, Akitomo Nagashima, Kan Tanaka, Seiji Takahashi, Kazuo Shinozaki. 2007. Chloroplast ribosome release factor 1 (AtpRF1) is essential for chloroplast development. *Plant Molecular Biology*, 5 (64): 481–497.
- Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Press Cold Spring Harbor

- Shimada T, Endo T, Fujii H, Omura M. 2005 Isolation and characterization of a new d-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* Marc. *Sci Horti* 105: 507–512
- Shimada T, Endo T, Fujii H, Hara M, Ueda T, Kita M, Omura M. 2004 Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. *Plant Sci* 166: 49–58.
- Soltis D E, Kuzoff R K, Conti E, Gornall R, Ferguson K. 1996. *maK* and *rbcL* gene sequence data indicate that *Saxifraga* (Saxifragaceae) is polyphyletic. *Am J Bot* 83: 371.
- Tang Jian-guo, Wang Qi-an, Shan Yang. 2004. Ultrasonic extraction of hesperidin from orange peel. *Fine Chemicals* 21 (3): 171–173 (in Chinese)
- 汤建国, 汪秋安, 单杨. 2004 从柑橘皮中超声提取橙皮甙. *精细化工*, 21 (3): 171–173.
- Takeko Shimada, Masayuki Kita, Tomoko Endo, Hiroshi Fujii, Takanori Ueda, Takaya Moriguchi, Mitsuo Omura. 2003. Expressed sequence tags of ovary tissue cDNA library in *Citrus unshiu* Marc. *Plant Science* 165 (1): 167–168
- Tao Nengguo, Cheng Yunjiang, Xu Juan, Deng Xuxin. 2005. An effective protocol for the isolation of RNA from the pulp of ripening *Citrus fruits*. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 305a–305f
- Thelen J J, Ohlhogge J B. 2002. Both antisense and sense expression of b6H carboxyl carrier protein isoform 2 inactivates the plastid acetyl-coenzyme A carboxylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 32: 419–431
- Valeriano DalCin, Marcello Danesin, Fabio Massino, Rizzi. 2005. RNA extraction from plant tissues: The use of calcium to precipitate contaminating pectin sugars. *Molecular Biotechnology* 31: 113–119
- Yang Jin-fen, Guo Zhen-fei, Yang Jing. 2007. Cloning and characteristics of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (*SgNCED1*) from *Stylosanthes guianensis*. *Acta Prataculturae Sinica* 16 (3): 21–28. (in Chinese)
- 杨锦芬, 郭振飞, 杨静. 2007. 桂花草 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶基因 (*SgNCED1*) 克隆及表达分析. *草业学报*, 16 (3): 21–28
- Yamanoto K, Sasaki T. 1997. Large-scale EST sequence in rice. *Plant Molecular Biology*, (35): 135–144
- Ye Qing-liang, Peng A-hong, Cao Li, Jiang Dong, Zhong Guang-yan. 2007. An effective and general protocol for the isolation of total RNA from the tissues of citrus trees. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* 29 (5): 732–735, 739. (in Chinese)
- 叶庆亮, 彭爱红, 曹立, 江东, 钟广炎. 2007. 柑橘类果树组织总 RNA 优异且通用的提取方法. *江西农业大学学报*, 29 (5): 732–735, 739
- You Shu-zhen, Yang Hong-qiang. 2008. Carotenoid cleavage dioxygenases and their physiological function. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* 3: 630–637. (in Chinese)
- 由淑贞, 杨洪强. 2008. 类胡萝卜素裂解双加氧酶及其生理功能. *西北植物学报*, 3: 630–637
- Zhang Yong, Zhang Weimin, Li Hong, Zhu Tian-yang, Tian Jing, Li Xin, Lin Hao-ran. 2004. cDNA cloning and differential mRNA expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 92 (1–2): 39–50
- Zhong G Y, Goren R, Riv J, Sisler E C, Holland D. 2001. Characterization of an ethylene-induced esterase gene isolated from *Citrus sinensis* by competitive hybridization. *Physiol Plant* 113: 267–274
- 钟连生, 陈高棠, 叶水兴, 叶水龙, 叶金章. 1994. 晚熟椪柑——岩溪晚芦的选育. *中国南方果树*, 23 (4): 14–15.