

# 高温胁迫下水稻灌浆初期籽粒的全长 cDNA 文库构建及其分析

贺超<sup>1</sup> 肖小军<sup>2</sup> 章智<sup>1</sup> 彭琦<sup>1</sup> 黄英金<sup>1</sup> 廖江林<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 江西农业大学/作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室/南京粮油作物协同创新中心,

江西 南昌 330045; <sup>2</sup> 江西省红壤研究所 江西 南昌 331717)

**摘要:** 为克隆水稻灌浆期耐热性相关基因的全长 cDNA 序列,本研究以水稻灌浆期耐热纯系 XN0437T 和热敏感纯系 XN0437S 为材料,于灌浆初期(扬花后第 8 天)进行  $38.0/33.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (白天/夜间) 温度处理,设 3 次高温处理重复;高温处理结束时,取耐热和热敏感纯系籽粒提取总 RNA,3 次高温处理样品的总 RNA 等量混合后,利用 SMART 技术合成 cDNA 双链,经琼脂糖凝胶电泳分离后,分 5 个区段回收大小不同的 cDNA,分别克隆到 pGEM-T Easy Vector 载体,构建了 5 个全长 cDNA 亚文库并分析了这些亚文库的质量。结果表明:5 个全长 cDNA 亚文库共获得 7 974 个阳性克隆,平均插入片段大于 1.0 kb,整个文库的全长率约为 75%;插入片段大于 0.5 kb 的亚克隆文库的滴度均大于  $4.6 \times 10^6$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>、重组率大于  $98.1\% \pm 0.79\%$ 。为获得全长 cDNA 文库克隆目的基因的全长奠定了基础。

**关键词:** 水稻; 灌浆期; 籽粒; 高温胁迫; 全长 cDNA 文库

DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2015.08.1437

水稻(*Oryza sativa* L.) 是世界上最重要的粮食作物之一,高温热害是制约水稻产量和品质的主要灾害性因素之一<sup>[1-3]</sup>。灌浆期是水稻产量与品质形成的关键时期,此时期遇高温热害,一方面造成水稻结实率和籽粒充实度下降,导致产量降低<sup>[2,4]</sup>,另一方面造成垩白面积增大,导致品质下降<sup>[4-5]</sup>。

长江中下游地区是我国水稻的主产区,2010 年 - 2012 年该地区的水稻总产量占全国总产量的 46.5% 以上<sup>[6]</sup>。该区域也是我国受气候变化潜在影响较大的主要稻区,从 1999 年开始,此区域几乎每年 7 月中下旬都会出现持续 10 d 以上的强度大、范围广的高温天气,此时正值双季早稻灌浆期,结果导致双季早稻单位面积减产、稻米品质下降,进而影响我国水稻的安全生产<sup>[7-8]</sup>。因此,加强水稻灌浆期耐热的分子机理研究,加快灌浆期耐热水稻新品种的选育,对确保我国水稻的稳产与优质具有重要意义。

分离和克隆水稻灌浆期耐热相关基因,是加快耐

热水稻优良新品种选育的重要途径。cDNA 文库的构建和筛选是克隆基因 cDNA 序列的重要方法之一<sup>[9-10]</sup>。与其它分离基因序列的方法相比,cDNA 文库获得的基因组不含内含子,且出现假阳性的概率比较低;可以便捷地获得基因序列的信息,筛选出的目的基因可直接用于该基因的表达分析<sup>[11-12]</sup>。经典 cDNA 文库克隆片段短、无效克隆多、全长率低,难以满足全长基因的功能研究需要<sup>[13]</sup>。全长 cDNA 文库是指不仅包含了完整阅读框架,而且拥有 5' 和 3' 端非编码区的 cDNA 集合;由于文库中绝大多数克隆的是基因的全长 cDNA,这不仅能大大提高基因测序和生物信息学分析的进程,还利于后期蛋白质表达及功能分析,是进行功能基因组研究的一条重要途径<sup>[14]</sup>。目前,全长 cDNA 文库构建的方法有 SMART 法<sup>[15-16]</sup>、CAPture 法<sup>[17]</sup>、Oligo-capping 法<sup>[18]</sup>、Cap-jumping 法<sup>[19]</sup> 以及 Cap-trapper 法<sup>[20]</sup> 等。其中,SMART 法是借助 Powerscript<sup>TM</sup> RT 的末端转移酶活性来实现的;当反转

收稿日期: 2014-10-20 接受日期: 2015-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160272) 江西省自然科学基金项目(2010GQN0804) 江西省青年科学基金重点项目(20133ACB21004)

作者简介: 贺超,女,主要从事水稻重要基因克隆及其功能鉴定研究。E-mail: hechao7021@163.com

肖小军,男,主要从事作物遗传育种研究。E-mail: xiao850908@163.com。同为第一作者。

通讯作者: 廖江林,男,副研究员,主要从事水稻功能基因组与蛋白质组研究。E-mail: jlliao514815@163.com

录达到 mRNA 的 5'端时,该酶就能够在互补链的 3'端添加几个脱氧胞嘧啶(dC),而对于非全长 cDNA,由于反转录延伸没有达到 mRNA 的 5'端,Powerscript™ RT 酶就不能在其不完整的 3'端加上 dC;在 cDNA 第 2 链合成时,3'端携带 oligo(dG)的第 2 链引物也就不能与缺失 dC 的 ss-cDNA 结合,因而这类 cDNA 不能通过 PCR 反应合成互补链而富集,最终得到的 ds-cDNA 都是全长的<sup>[14]</sup>。

江西农业大学作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室水稻应对气候变化课题组在前期研究中采用基因差异显示技术和比较蛋白组学的方法,获得了水稻响应灌浆期高温热害的 54 个差异表达基因片段<sup>[21]</sup>和 25 个差异表达蛋白<sup>[22]</sup>;但 54 个差异表达基因片段并非基因全长,编码 25 个差异表达蛋白的 mRNA 序列也并不清楚。因此,本研究以水稻耐热纯系 XN0437T 和热敏感纯系 XN0437S 为材料,通过琼脂糖电泳分级引入 SMART 法中构建了水稻灌浆初期高温胁迫下混合籽粒的全长 cDNA 文库,旨在获得目的基因的全长序列信息,为目的基因的结构与功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以水稻灌浆期耐热纯系 XN0437T 和热敏感纯系 XN0437S 为材料。这 2 个水稻纯系源于协青早 B/N22//协青早 B 的回交重组自交系;在江西南昌作双季早稻、常规栽培条件下种植,水稻纯系 XN0437T 平均株高 81.3 cm、平均穗长 18.4 cm、平均总粒数 94.3 粒、生育期 106 d, XN0437S 平均株高 81.0 cm、平均穗长 18.1 cm、平均总粒数 95 粒、生育期 106 d; 887 个 SSR 分子标记检测显示 2 个纯系的基因组多态性为 1.8%、水稻灌浆期耐热性鉴定结果显示 2 个纯系的灌浆期耐热性籽粒充实度差异极显著<sup>[23]</sup>。

### 1.2 水稻的培育、处理与取样

水稻采用桶栽的方法培育<sup>[21-22]</sup>。稻田土壤经晒干、粉碎、过筛和搅拌均匀后等量装桶,每桶 20 kg,桶高 50 cm、内径 30 cm,离桶内土表 15 cm 层面上均匀施用 1 g 总氮含量 15%、有效磷含量 4% 和有效钾含量 6% 的水稻专用肥作为基肥,土壤经自来水浸泡 5 d 后待用。稻种播于大田 3 叶 1 心期移栽入桶,每桶环形栽植生育进程与长势基本一致的单本秧苗 10 棵;在自然条件下按照常规栽培管理方法培育至抽穗期。为确保所取样品生长发育进程基本一致,始穗期标记同

一天抽穗的主穗,扬花期标记这些主穗上同一天开花的颖花。水稻带标记颖花开花后第 8 天置于人工气候箱内进行 24 h 温度处理,高温处理温度为  $38.0/33.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (白天/夜间),常温对照处理温度为  $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (白天/夜间);高温处理和常温对照的光照时长为 14 h,相对湿度为  $80\% \pm 5\%$ ,光照强度为  $800 \sim 1250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ;设置 3 次高温处理重复。高温处理结束时,取处理与对照带标记颖花各约 2 g,锡箔纸包裹、液氮速冻保存备用。

### 1.3 水稻颖花总 RNA 提取

每样品取 0.2 g 颖花,采用北京天恩泽基因科技有限公司生产的 RNAout2.0 试剂盒提取总 RNA,方法参照操作说明书。P330 型紫外分光光度计(Implen 公司,德国)测定总 RNA 浓度,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度及完整性。

### 1.4 全长 cDNA 的合成

取 3.5  $\mu\text{L}$  总 RNA 为模板,采用 Takara Clontech 公司(美国)生产的 SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit,按照操作说明书合成 cDNA 第 1 链;取 2  $\mu\text{L}$  cDNA 第 1 链,用 Takara Clontech 公司(美国)生产的 Advantage 2 PCR Kit 合成 cDNA 第 2 链并进行琼脂糖凝胶电泳检测。电泳检测合格后,将高温处理和对照水稻的全长 cDNA 等量混合,再采用琼脂糖凝胶电泳分离 cDNA、利用 Promega 公司(美国)的 Wizard Plus SV minipreps DNA Purification System 分段回收大于 4.0 kb(片段 I)、2.0~4.0 kb(片段 II)、1.5~2.0 kb(片段 III)、1.0~1.5 kb(片段 IV)和 0.5~1.0 kb(片段 V)的电泳产物,回收产物采用 Takara Clontech 公司生产的 Advantage 2 PCR Kit 进行 PCR 反应扩增 10 个循环而富集 cDNA。

### 1.5 全长 cDNA 文库的构建

将各区段 cDNA 分别与 Promega 公司(美国)生产的 pGEM-T Easy Vector 连接,连接产物转化感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ ;转化细胞涂布于含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上,挑取白色菌落,制成菌悬液;操作方法参照《分子克隆实验指南》<sup>[24]</sup>。

### 1.6 文库的质量检测

采用菌液 PCR 和 *EcoR* I 酶酶切,检测目的片段是否插入并剔除重复菌落。将 1  $\mu\text{L}$  初级文库的菌液稀释 20 倍,与 XL-Blue 感受态细胞混匀,涂布于含 IPTG 和 X-gal 的 LB/MgSO<sub>4</sub> 的平板上,37℃ 培养过夜,检测文库的滴度和重组率,重复 3 次。

### 1.7 克隆片段的测序与分析

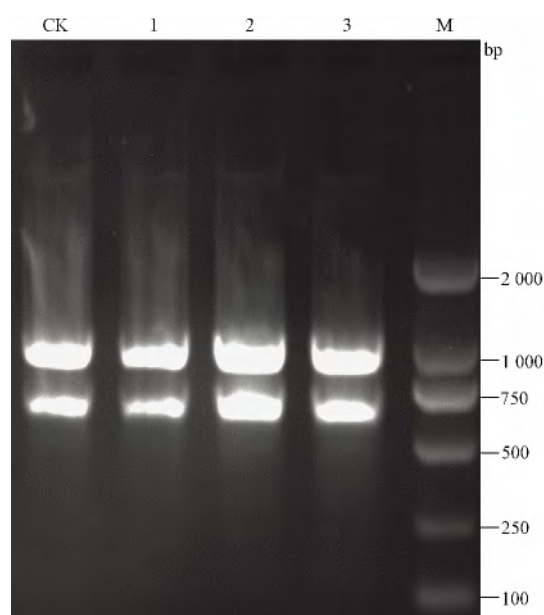
从文库中随机挑取 34 个不同大小的克隆片段进

行测序,剔除载体和连接接头后在 GenBank\_EST 数据库中比对,分析目的 cDNA 的片段大小,在 rice annotation project (RAP) 数据库和 rice genome annotation project (RGP) 数据库中与已知基因的全长比对,分析基因 5'UTR、3'UTR 结构的完整性。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 提取质量的检测结果

提取总 RNA 经紫外分光光度计检测,  $OD_{260}/OD_{280}$  值为  $1.92 \pm 0.018$ , 介于  $1.8 \sim 2.0$ ; 琼脂糖凝胶电泳显示 28S rRNA 和 18S rRNA 亮度比例约为 2:1 (图 1), 结果表明 RNA 提取质量较好, 可用于 cDNA 文库构建<sup>[25]</sup>。



注: 泳道 M: DNA marker; 泳道 CK: 常温对照; 泳道 1~3: 3 次高温处理重复。

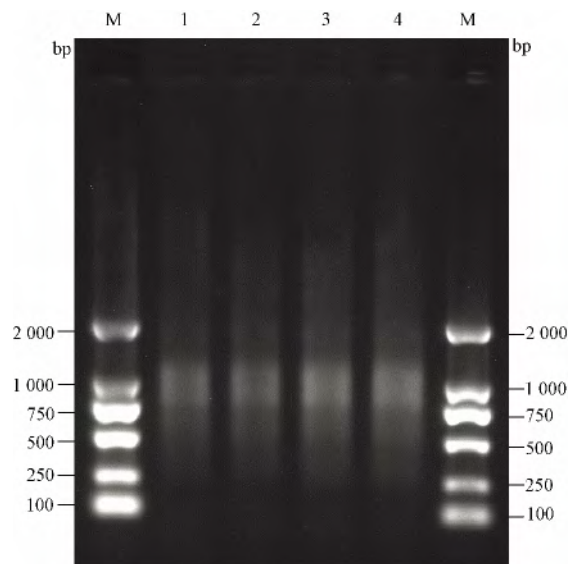
Note: Lane M: DNA marker. Lane CK: Control. Lane 1 to 3: Three replicates of high temperature treatment.

图 1 RNA 琼脂糖电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis image of agarose-starch mixed gel for total RNA

### 2.2 双链 cDNA 质量的琼脂糖电泳检测结果

mRNA 反转录后, 琼脂糖凝胶电泳条带在 2 kb 和 750 bp 附近有明显亮带, 说明在水稻籽粒灌浆过程中, 多数表达基因的大小在 2 kb ~ 750 bp 区段或该区段基因的表达丰度较高; 电泳条带在 0.5 ~ 3.0 kb 呈弥散状, 表明 cDNA 质量较好 (图 2), 符合文库构建标准<sup>[26]</sup>。



注: 泳道 M: DNA marker; 泳道 1: 高温处理 XN0437S; 泳道 2: 常温对照 XN0437S; 泳道 3: 高温处理 XN0437T; 泳道 4: 常温对照 XN0437T。

Note: Lane M: DNA marker. Lane 1: XN0437S (Treatment). Lane 2: XN0437S (Control). Lane 3: XN0437T (Treatment). Lane 4: XN0437T (Control).

图 2 cDNA 琼脂糖电泳

Fig. 2 Electrophoresis image of agarose-starch mixed gel for cDNA

### 2.3 文库质量评价

经蓝白斑筛选和克隆数统计, 文库共获得 7 974 个阳性克隆。PCR 检测结果显示, 克隆片段长度主要集中在 0.5 ~ 4.0 kb, 且多数 (65.6%) 在 1.0 kb 以上 (图 3), 各回收片段的滴度和重组率见表 1。说明文库质量较好, 满足 cDNA 文库构建要求。

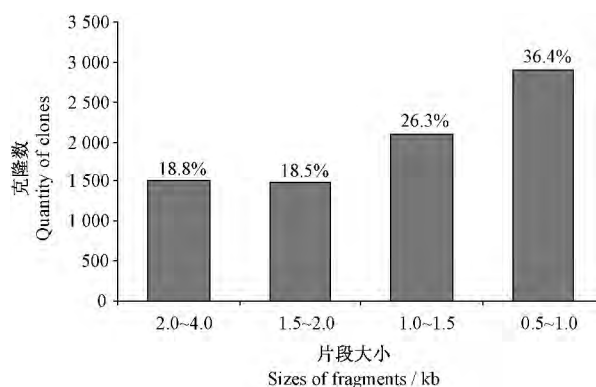


图 3 全长 cDNA 文库的克隆数分布情况

Fig. 3 Distributing condition of clone numbers for full-length cDNA library

表 1 各回收 cDNA 片段初级文库的滴度和重组率

Table 1 The titer and the recombinant rate for the elementary cDNA library of every recovered fragments

| 项目<br>Item                                                    | 片段 Fragment |                 |                 |                 |                 |
|---------------------------------------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                                               | 1           | 2               | 3               | 4               | 5               |
| 滴度<br>Titer/( $10^6 \times \text{pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 0           | 4.6 $\pm$ 0.32  | 5.1 $\pm$ 0.26  | 5.2 $\pm$ 0.18  | 5.2 $\pm$ 0.38  |
| 重组率<br>Recombinant rate/%                                     | 0           | 98.1 $\pm$ 0.79 | 99.8 $\pm$ 0.06 | 99.5 $\pm$ 0.37 | 98.9 $\pm$ 0.86 |

2.4 全长 cDNA 文库克隆的测序及比对结果

随机挑选插入片段大小不同的 34 个克隆片段测序,测序结果在数据库中的比对结果见表 2。在 GenBank\_EST 数据库中,34 个克隆均能比对上相似性的表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs);其中,插入片段大于 1 kb 的 20 个克隆中有 15 个为数据库中最长的 cDNAs(占 75%),插入片段小于 1 kb 的 14 个克隆中有 4 个为数据库中最长的 cDNAs(占 28.57%)。基因 5'UTR 和 3'UTR 结构完整性分析结果显示,除片段大小小于 1 kb 的克隆 OsP0022、OsP0031 和 OsP0034 无完整的 5'UTR 结构外,其它克隆都包含了完整的 5'UTR 和 3'UTR 结构。表明所建文库包含了水稻中绝大多数表达基因的 cDNA 序列信息。

表 2 测序克隆在 GenBank\_EST 数据库的比对结果

Table 2 Blast results on GenBank\_EST database of the cDNA clones be selected to sequencing

| 克隆<br>Clone |                 | Genbank 数据库中匹配的 EST<br>The hit ESTs from Genbank database |                 | 种属<br>Species      | 得分<br>Total score | 覆盖率<br>Query cover/% |
|-------------|-----------------|-----------------------------------------------------------|-----------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| 名称<br>Name  | 大小<br>Length/bp | 登录号<br>ID name                                            | 大小<br>Length/bp |                    |                   |                      |
| OsP0001     | 2 821           | CX109187                                                  | 1 999           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 2 874             | 55                   |
| OsP0002     | 2 728           | CX103369                                                  | 877             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 598             | 31                   |
| OsP0003     | 2 281           | CK071567                                                  | 667             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 175             | 28                   |
| OsP0004     | 2 050           | CB647563                                                  | 810             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 456             | 39                   |
| OsP0005     | 1 788           | CB661431                                                  | 867             | 粳稻 <i>Japonica</i> | 1 585             | 48                   |
| OsP0006     | 1 750           | CX109371                                                  | 1 786           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 3 101             | 98                   |
| OsP0007     | 1 699           | EC365688                                                  | 850             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 299             | 41                   |
| OsP0008     | 1 672           | EC365584                                                  | 886             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 607             | 52                   |
| OsP0009     | 1 653           | CX100179                                                  | 680             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 256             | 41                   |
| OsP0010     | 1 603           | CX102791                                                  | 1 487           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 2 357             | 83                   |
| OsP0011     | 1 489           | CT845288                                                  | 1 476           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 2 652             | 97                   |
| OsP0012     | 1 460           | CB667603                                                  | 801             | 粳稻 <i>Japonica</i> | 1 454             | 54                   |
| OsP0013     | 1 458           | CX109310                                                  | 1 762           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 2 536             | 95                   |
| OsP0014     | 1 409           | CT857395                                                  | 1 304           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 677             | 72                   |
| OsP0015     | 1 344           | CX109115                                                  | 1 405           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 2 442             | 98                   |
| OsP0016     | 1 291           | EC365584                                                  | 886             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 615             | 68                   |
| OsP0017     | 1 186           | CX099710                                                  | 970             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 716             | 70                   |
| OsP0018     | 1 153           | CX109065                                                  | 1 352           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 801             | 94                   |
| OsP0019     | 1 036           | CH158095                                                  | 700             | 粳稻 <i>Japonica</i> | 1 249             | 67                   |
| OsP0020     | 1 032           | CX103208                                                  | 1 052           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 332             | 77                   |
| OsP0021     | 794             | AA751588                                                  | 652             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 014             | 78                   |

表 2( 续)

| 克隆<br>Clone    |                 | Genbank 数据库中匹配的 EST<br>The hit ESTs from Genbank database |                 | 种属<br>Species      | 得分<br>Total score | 覆盖率<br>Query cover/% |
|----------------|-----------------|-----------------------------------------------------------|-----------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| 名称<br>Name     | 大小<br>Length/bp | 登录号<br>ID name                                            | 大小<br>Length/bp |                    |                   |                      |
| <i>OsP0022</i> | 770             | CX109151                                                  | 1 304           | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 330             | 95                   |
| <i>OsP0023</i> | 751             | CB097085                                                  | 700             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 175             | 92                   |
| <i>OsP0024</i> | 716             | CA762864                                                  | 711             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 262             | 99                   |
| <i>OsP0025</i> | 672             | CA762863                                                  | 698             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 195             | 98                   |
| <i>OsP0026</i> | 671             | CA762865                                                  | 690             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 173             | 99                   |
| <i>OsP0027</i> | 646             | CA762871                                                  | 676             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 125             | 100                  |
| <i>OsP0028</i> | 636             | CA762871                                                  | 676             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 103             | 97                   |
| <i>OsP0029</i> | 609             | CB097150                                                  | 640             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 107             | 99                   |
| <i>OsP0030</i> | 602             | CA759535                                                  | 629             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 1 086             | 99                   |
| <i>OsP0031</i> | 594             | CA762871                                                  | 676             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 992               | 94                   |
| <i>OsP0032</i> | 556             | CA764055                                                  | 530             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 926               | 95                   |
| <i>OsP0033</i> | 503             | CI231887                                                  | 527             | 粳稻 <i>Japonica</i> | 854               | 92                   |
| <i>OsP0034</i> | 437             | CA759535                                                  | 629             | 籼稻 <i>Indica</i>   | 784               | 98                   |

### 3 讨论

江西农业大学作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室水稻应对气候变化课题组通过基因差异显示分析和蛋白质组学研究,获得了水稻响应灌浆期高温热害的 54 个差异表达基因片段<sup>[21]</sup>和 25 个差异表达蛋白质<sup>[22]</sup>,但是获得的这些 cDNA 仅为基因的部分序列或仅仅已知编码蛋白的基因。为了克隆这些基因的全长、验证其功能,本研究采用 SMART PCR cDNA Synthesis Kit 合成全长 cDNA、通过琼脂糖凝胶电泳分段回收片段大小不同的 cDNA 构建水稻灌浆初期高温胁迫和常温对照条件下的混合籽粒的全长 cDNA 文库,文库共获得 7 974 个阳性克隆,约 75% 的克隆的平均插入片段大于 1.0 kb。

文库的滴度、重组率、插入片段大小是鉴定文库质量的重要指标。一般认为,一个良好文库的质量标准,重组率需大于 90%,插入片段不小于 0.3 kb<sup>[27]</sup>;文库的滴度一般达到  $10^5$  pfu · mL<sup>-1</sup> 以上即为有效文库,但为满足筛选到低丰度 mRNA 的要求,一般要求其滴度不少于  $1 \times 10^6$  pfu · mL<sup>-1</sup><sup>[28]</sup>。陈华等<sup>[26]</sup>采用 SMART 技术构建了不同发育时期花生胚混合全长 cDNA 文库,文库的滴度为  $3.5 \times 10^6$  pfu · mL<sup>-1</sup>,重组率 95.8%,插入片段长度在 0.5 ~ 2.0 kb,平均长度超过 1.0 kb。姜宝杰等<sup>[9]</sup>采用 SMART 技术构建了花生在

多种环境胁迫诱导下混合的全长 cDNA 文库,文库的滴度为  $3.5 \times 10^6$  pfu · mL<sup>-1</sup>,重组率 95.8%,插入片段长度在 0.5 ~ 2.0 kb。本研究所建亚文库的重组率均大于 98.1% ± 0.79%,插入片段大小主要分布在 0.5 ~ 4.0 kb,平均插入片段大于 1.0 kb;文库的滴度均大于  $4.6 \times 10^6$  pfu · mL<sup>-1</sup>;说明文库的插入片段完整性好、全长 cDNA 的比例高,可能归因于 SMART 技术相对成熟,通过分段回收 cDNA 并分别建立亚克隆文库,在 ds-cDNA 富集过程中通过降低 PCR 反应循环数而减少了非特异性 ds-cDNA。本研究构建的全长文库可为目的基因的筛选和全长基因的克隆奠定良好的研究基础。

### 4 结论

本研究采用 SMART 技术构建了高温胁迫下水稻灌浆初期籽粒的全长 cDNA 文库。在 SMART 技术的常规操作基础上,通过分段回收 cDNA 并分别建立亚克隆文库;在 ds-cDNA 富集过程中,通过降低 PCR 反应循环数而减少了非特异性 ds-cDNA;从而提高了文库全长率、降低了错配 ds-cDNA 的比例,获得了高比例全长 cDNA 文库,为进一步克隆目的基因全长奠定基础。

## 参考文献:

- [1] Jagadish S V, Craufurd P Q, Wheeler T R. High temperature stress and spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(7): 1627–1635
- [2] Lin C J, Li C Y, Lin S K, Yang F H, Huang J J, Liu Y H, Lur H S. Influence of high temperature during grain filling on the accumulation of storage proteins and grain quality in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(19): 10545–10552
- [3] Peng S, Huang J, Sheehy J E, Laza R C, Visperas R M, Zhong X, Centeno G S, Khush G S, Cassman K G. Rice yields decline with higher night temperature from global warming [J]. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(27): 9971–9975
- [4] 滕中华, 智丽, 宗学凤, 王三根, 何光华. 高温胁迫对水稻灌浆结实期叶绿素荧光、抗活性氧活力和稻米品质的影响 [J]. 作物学报, 2008, 34(9): 1662–1666
- [5] 李健陵, 林育炯, 张晓艳, 杜尧东, 王华, 吴丽姬, 胡飞. 抽穗期和乳熟期高温对水稻剑叶理化特性以及产量和品质的影响 [J]. 农业现代化研究, 2013, 34(1): 109–113
- [6] 刘书通. 长江中下游地区水稻生产能力分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2014
- [7] 张倩, 赵艳霞, 王春乙. 长江中下游地区高温热害对水稻的影响 [J]. 灾害学, 2011, 26(4): 57–62
- [8] 谭江, 李小湘, 潘孝武, 黎用朝. 水稻灌浆期耐热性研究进展 [J]. 杂交水稻, 2012, 27(5): 15–19
- [9] 姜宝杰, 陈华, 张冲, 邓烨, 蔡铁成, 石新国, 庄伟建. 环境胁迫诱导的花生全长 cDNA 文库的构建及序列分析 [J]. 核农学报, 2013, 27(5): 545–551
- [10] 朱利军, 长孙东亭, 罗素兰. 全长 cDNA 文库构建方法及应用研究 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2009, 27(2): 185–190
- [11] Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, Sugahara Y, Shibata K, Itoh M, Konno H, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes [J]. Genome Research, 2000, 10(10): 1617–1630
- [12] 郑玲, 张玉芹, 张传云, 刘国栋, 王芙蓉, 张军. 棉花 *GhBI-1* 基因全长 cDNA 的克隆与表达分析 [J]. 核农学报, 2011, 25(1): 20–25
- [13] 谢卡斌, 张建伟, 向勇, 冯旗, 韩斌, 储昭晖, 王石平, 张启发, 熊立仲. 10828 条籼稻全长 cDNA 的分离和注释 [J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2005, 35(1): 6–12
- [14] 毛新国, 景蕊莲, 孔秀英, 赵光耀, 贾继增. 几种全长 cDNA 文库构建方法比较 [J]. 遗传, 2006, 28(7): 865–873
- [15] 陈华, 邓烨, 张冲, 蔡铁城, 熊发前, 唐荣华, 周双彪, 庄伟建. 花生茎全长 cDNA 文库的构建与分析 [J]. 核农学报, 2014, 28(10): 1765–1772
- [16] Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, Li R, Siebert P D. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction [J]. Biotechniques, 2001, 30(4): 892–897
- [17] Edery I, Chu L L, Sonenberg N, Pelletier J. An efficient strategy to isolate full-length cDNAs based on an mRNA cap retention procedure (CAPture) [J]. Molecular and Cellular Biology, 1995, 15(6): 3363–3371
- [18] Suzuki Y, Sugano S. Construction of a full-length enriched and a 5′-end enriched cDNA library using the oligo-capping method [J]. Methods in Molecular Biology, 2003, 221: 73–91
- [19] Efimov V A, Chakhmakcheva O G, Archdeacon J, Fernandez J M, Fedorkin O N, Dorokhov Y L, Atabekov J G. Detection of the 5′-cap structure of messenger RNAs with the use of the cap-jumping approach [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(22): 4751–4759
- [20] Carninci P, Kvam C, Kitamura A, Ohsumi T, Okazaki Y, Itoh M, Kamiya M, Shibata K, Sasaki N, Izawa M, Muramatsu M, Hayashizaki Y, Schneider C. High-efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper [J]. Genomics, 1996, 37(3): 327–336
- [21] Liao J L, Zhang H Y, Liu J B, Zhong P A, Huang Y J. Identification of candidate genes related to rice grain weight under high-temperature stress [J]. Plant Science, 2012, 196: 32–43
- [22] Liao J L, Zhou H W, Zhang H Y, Zhong P A, Huang Y J. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the early milky stage of rice grains during high temperature stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(2): 655–671
- [23] Liao J L, Zhang H Y, Shao X L, Zhong P A, Huang Y J. Identification for heat tolerance in backcross recombinant lines and screening of backcross introgression lines with heat tolerance at milky stage in rice [J]. Rice Science, 2011, 18(4): 279–286
- [24] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. 第三版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2007: 901–917
- [25] 谢胜松, 李新云, 苏立杰, 顾婷, 赵书红. 一种简易快速鉴定动物组织总 RNA 质量的方法 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(2): 282–287
- [26] 陈华, 邓烨, 张冲, 蔡铁成, 郑奕雄, 庄伟建. 不同发育时期花生胚混合全长 cDNA 文库的构建与分析 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(11): 2272–2280
- [27] 杨丽萍, 杨慧荣, 张勇, 刘云, 黄海, 刘晓春, 蒙子宁, 黄俊海, 林浩然. 中国大鲵脑 cDNA 文库构建及促甲状腺激素  $\beta$  亚基基因 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. 水产学报, 2008, 32(4): 507–516
- [28] 郑善清, 段瑞军, 郭建春. 盐生植物海马齿盐胁迫全长 cDNA 文库的构建与分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(1): 155–159

## Full-length cDNA Library Construction and Analysis of Rice Panicle at Early Milky Stage Under High Temperature Stress

HE Chao<sup>1</sup> XIAO Xiaojun<sup>2</sup> ZHANG Zhi<sup>1</sup> PENG Qi<sup>1</sup> HUANG Yingjin<sup>1</sup> LIAO Jianglin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Crop Physiology , Ecology and Genetic Breeding Ministry of Education /

Collaborative Innovation Center of Grain and Oil Crops in South China / Jiangxi Agricultural University ,

Nanchang , Jiangxi 330045; <sup>2</sup>The Red Soil Research Institute of Jiangxi Province , Nanchang , Jiangxi 331717)

**Abstract:** A full-length cDNA library was constructed to clone the full-length sequence of the genes related to heat tolerance during rice grain filling stage using the heat-tolerant line XN0437T and the heat-sensitive line XN0437S as plant materials. Two rice lines were treated by  $38.0/33.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  ( day/night) high temperature at early milky stage ( on the 8<sup>th</sup> day after flowering) with three replicates. Total RNAs were extracted respectively from the grains and then mixed equally. Double strand cDNA of the mixed RNAs was synthesized by SMART PCR cDNA Kit produced by Takara Clontech Co. , Ltd. , then the synthesized cDNAs were separated through agarose gel electrophoresis , collected according to fragment size and ligated to pGEM-T Easy vector respectively to construct full-length cDNA sub-clone libraries. To identify the quality of the library , the insert fragments length of the clones , library titer and recombinant rate were determined and analyzed , and the full-length rate of library was analyzed by random cloning sequencing , besides that , the sequences from the library was further blasted in GenBank database. The results showed that , 7 974 positive clones were included in the library , the average size of the inserted fragment of the clones were longer than 1.0 kb , the rate of full-length gene in the whole library was about 75% , the titer of sub-clone libraries which the size of insert fragments were more than 0.5 kb was more than  $4.6 \times 10^6$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> , and the recombinant rate of these sub-clone libraries was more than  $98.1\% \pm 0.79\%$  . The constructed full-length cDNA library supported a foundation for the full-length cloning of the object genes.

**Keywords:** rice , early grain-filling stage , grain , high temperature stress , full-length cDNA library construct