

芥蓝不定芽发生过程的基因表达差异分析

黄科^{1,2,3} 余小林¹ 叶纨芝¹ 向珣¹ 卢钢¹ 曹家树^{1*}

(¹浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029; ²福建农林大学农产品品质研究所, 福州 350002;

³福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福州 350013)

摘要 采用 cDNA-AFLP 技术和双向电泳技术对不同培养基上的‘中花’芥蓝(*Brassica oleracea* var. *alboglabra* cv. *Zhonghua*)下胚轴外植体愈伤组织和不定芽发生的基因表达差异进行研究和分析。结果表明: 芥蓝不定芽发生基因差异在 RNA 水平上有所体现, 特异条带主要出现在产生不定芽的外植体上, 且主要集中在 200~600 bp 之间; 芥蓝不定芽发生的基因表达差异在蛋白质水平有很大差异, 发生不定芽的外植体和不发生不定芽的外植体出现了 160 种蛋白质的差异点, 差异蛋白的 pI 值多在 5~7 之间, 在这个范围内的差异蛋白点达到了 122 个, 占差异蛋白总数的 76.25%, 差异蛋白的分子量多在 40~70 kDa 之间, 在这个范围内的差异蛋白点达到了 124 个, 占差异蛋白总数的 77.5%。

关键词 芥蓝; cDNA-AFLP; 双向电泳; 组织培养; 表达差异

植物体细胞在一定条件下可形成愈伤组织和分化出不定芽, 并通过不定芽发育成为一个完整的植株, 这一分化的全过程是受一系列基因在时空顺序上表达调控的结果, 是相应基因产物作为愈伤组织形成和不定芽发生的分子基础。尽管从理论上讲, 植物细胞具有全能性, 它包含了发育成完整植株所需的全套基因, 而且这些基因均有可能表达, 但由于高等植物中存在着复杂的基因表达调控系统, 参与调控的基因需要有序、有效地表达。因此, 促进愈伤组织形成和不定芽分化的相关基因有效地进行表达是植物再生发生现象研究的关键^[1-3]。目前尚没有有关植物愈伤组织形成和不定芽分化相关基因定位和克隆的报道^[4], 可能是采用常规的基因定位、克隆方法不能克服不同基因型植物间再生能力的差异。本研究以同一基因型材料在不同诱导条件下, 采用 cDNA-AFLP 和双向电泳技术对植物在诱导条件下产生的基因表达差异进行分析, 可以克服不同基因型间再生能力差异的障碍。

本实验以置于不同培养基上的‘中花’芥蓝(*Brassica oleracea* var. *alboglabra* cv. *Zhonghua*)下胚轴外植体为材料, 根据两种培养基上愈伤组织和不定芽发生的差异, 采用 cDNA-AFLP 和双向电泳技术对‘中花’芥蓝愈伤组织和不定芽发生的基因差异进行了研究和分析, 为进一步进行愈伤组织和不定芽形成相关基因的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

将芥蓝品种‘中花’下胚轴外植体分别接种于两种培养基: MS 培养基(不分化培养基)和 MS+0.03 mg/L NAA + 2 mg/L BAP (分化培养基)^[5]上, 培养 20 天后, 分化培养基上的外植体切口端显著膨大, 且可见突出于外植体表面的不定芽发生, 不分化培养基上的外植体切口端仅见稍有膨大, 无不定芽发生。分别取两种培养产物为材料, 用锡箔纸包好, 立即投入液氮中固定。-75 °C 保存备用。

TRIzol[®]购自 Life Technologies 公司; cDNA 合成试剂盒, SMART[™] PCR cDNA Synthesis Kit 购自 Clontech 公司; 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、尿素、过硫酸铵、TEMED、二硫苏糖醇(DTT)、pH 3~10, 24 cm IPG 预制胶条、IPG 缓冲液均购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质购自上海博亚生物技术有限公司; 碘乙酰胺购自 Bio-Rad 公司。离心管、枪头等用 DEPC 水浸泡处理, 溶解 RNA 的水用 DEPC 处理, 室温过夜, 高压灭菌处理。分装氯仿、异丙醇、DEPC-水等的玻璃器皿 200 °C 干烤 2 h。

收稿日期: 2006-05-24 接受日期: 2006-10-24

国家自然科学基金(No.30671426)和浙江省重大科技项目(No.2005C12019-02)资助

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

表1 *Ase* I 接头和引物序列

接头和引物名称	接头和引物序列
A1	5'-GCGTAGACTGCGTACC-3'
A2	5'-TAGGTACGCGAGTC-3'
A3	5'-CTCGTAGACTGCGTACCTAAT-3
A4	5'-GACTGCGTACCTAATGG-3'
A5	5'-GACTGCGTACCTAATGA-3'
A6	5'-GACTGCGTACCTAATGT-3'
A7	5'-GACTGCGTACCTAATGC-3'

表2 *Taq* I 接头和引物序列

接头和引物名称	接头和引物序列
T1	5'-GACGATGAGTCTCGAC-3'
T2	5'-CGGTCCAGGACTCAT-3'
T3	5'-GACGATGAGTCTCGACCGA-3'
T4	5'-GATGAGTCCAGACCGAGG-3'
T5	5'-GATGAGTCCAGACCGAGA-3'
T6	5'-GATGAGTCCAGACCGAGT-3'
T7	5'-GATGAGTCCAGACCGAGC-3'
T8	5'-GATGAGTCCAGACCGAAG-3'
T9	5'-GATGAGTCCAGACCGAAA-3'
T10	5'-GATGAGTCCAGACCGAAT-3'
T11	5'-GATGAGTCCAGACCGAAC-3'
T12	5'-GATGAGTCCAGACCGATG-3'
T13	5'-GATGAGTCCAGACCGATA-3'
T14	5'-GATGAGTCCAGACCGAAT-3'
T15	5'-GATGAGTCCAGACCGATC-3'

cDNA-AFLP 的引物和接头(表1和表2)由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 RNA 的分离及 cDNA-AFLP 技术

RNA 的分离参照 TRIzol® 的说明书进行。用 DEPC 水溶解, -75 °C 保存备用。用 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 合成双链 cDNA, cDNA-AFLP 分析参照王永勤等^[6]的方法进行。

1.3 蛋白质的提取及双向电泳技术

1.3.1 蛋白质提取 液氮研磨新鲜样品组织至粉状, 取 1 g, 转入加有 Tris 平衡酚和提取液(0.1 mol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 0.4% β 巯基乙醇, 0.9 mol/L 蔗糖)的离心管中搅拌 30 min, 4 °C 5 000 g 离心 10 min。取酚相, 于酚相中加入 0.1 mol/L 醋酸铵沉淀蛋白质, 涡旋后 -20 °C 培育至少 1 h。20 000 g, 4 °C 离心 20 min, 收集蛋白质沉淀。0.1 mol/L 醋酸铵洗沉淀两次, 80% 丙酮洗两次, 70% 乙醇洗一次。沉淀在 37 °C 下放置 15 min 以干燥沉淀, -20 °C 贮藏。用 1 ml IEF 抽提溶液(9.6 mol/L 尿素, 2% CHAPS, 2% Triton X-100, 50 mmol/L DTT, 0.5% pH 3~10 IPG 缓冲液)悬浮沉淀, 搅拌培育样品 1 h。

1.3.2 双向电泳 IPG 胶条电泳槽中加入 IPG 胶

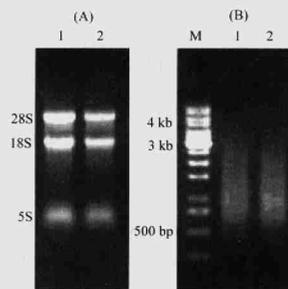


图1 不同培养基上‘中花’芥蓝培养产物 RNA 提取和 cDNA 合成

A: 1 和 2 分别为不分化培养基和分化培养基培养产物 RNA 电泳结果; B: 1 和 2 分别为不分化培养基和分化培养基培养产物 cDNA 电泳结果; M 为 marker。

条电泳液后, 将 IPG 胶条放入电泳槽中, 滴加覆盖液, 泡胀 12 h 以上。泡胀后进行等电聚焦电泳, 等电聚焦电泳按 1 000 V 1 h, 4 000 V 1 h, 8 000 V 10 h 的条件进行聚焦。等电聚焦电泳后, IPG 胶条在平衡液 a、b 中各平衡 15 min。IPG 胶条平衡后, 将胶条置于 12.5% SDS 凝胶上, 用 0.5% 琼脂糖封住顶部, 按 15 W 6 h 参数进行电泳。电泳结束后银染染色。

2 结果

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

本实验分别提取了不同培养基上的‘中花’芥蓝培养产物总 RNA, 每份样品各取 30 个外植体, 磨碎后取样品 0.1 g 左右提取总 RNA, 作为 cDNA 合成的材料。2 份总 RNA 提取及检测结果表明总 RNA 质量较好, 适于 cDNA 合成(图 1A)。合成的 cDNA 大小主要分布在 0.5~4 kb 之间, 表明 cDNA 合成质量较好(图 1B)。

2.2 cDNA-AFLP 技术对芥蓝不定芽发生基因差异的分析

本实验进行了 48 对引物对芥蓝不定芽发生基因差异的 cDNA-AFLP 分析, 9 对引物产生 13 条差异条带, 其中产生不定芽的培养产物特有的差异条带为 12 条, 不产生不定芽的培养产物特有的为 1 条。从 cDNA-AFLP 分析结果(图 2)可以看出, 芥蓝不定芽发生基因差异在 RNA 水平上有所体现。特异条带主要出现在产生不定芽的培养产物上, 且主要集中在 200~600 bp 之间。

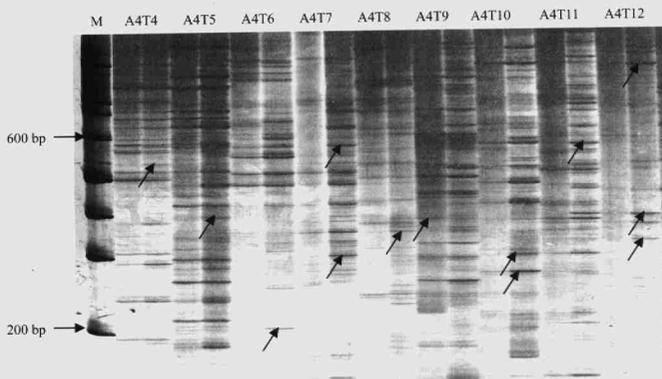


图2 不同培养基上‘中花’芥蓝下胚轴外植体不定芽发生基因表达差异的cDNA-AFLP分析
M为marker; 每一对引物组合按顺序分别为不分化培养基材料和分化培养基材料。箭头所指为差异条带。

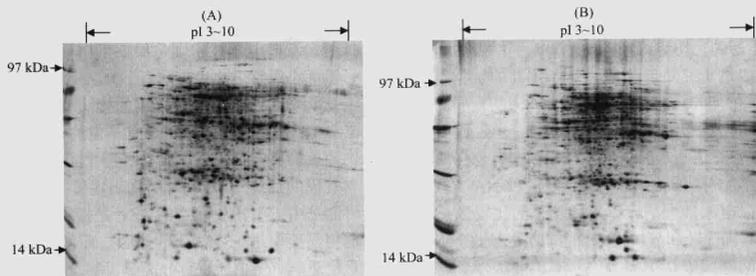


图3 蛋白质双向电泳结果

A: 不分化培养基上培养产物蛋白质双向电泳结果。B: 分化培养基上培养产物蛋白质双向电泳结果。

2.3 蛋白质提取及双向电泳技术参数优化

本实验分别提取了不同培养基上的‘中花’芥蓝培养产物蛋白质, 每份样品各取30个外植体, 磨样后取样品1g左右, 提取蛋白质, 作为双向电泳的材料。以牛血清白蛋白(BSA)制备了蛋白质含量的标准曲线, 2份蛋白质样品含量均在2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 左右。

本实验采用了30 V泡胀12 h; 1000 V, 1 h; 4000 V, 1 h; 8000 V, 10 h的等电聚焦参数, 采用了两步平衡的方法, 每块胶15 W恒功率电泳。经过以上电泳参数优化, 本实验取得了理想的实验结果(图3)。

2.4 双向电泳技术对芥蓝不定芽发生基因差异的分析

双向电泳结果用IMAGE Master V2003分析, 以芥蓝下胚轴在分化培养基上的双向电泳结果为参考

胶, 结果表明, 芥蓝不定芽发生的基因表达差异在蛋白质水平上有所体现。‘中花’芥蓝不定芽发生的相关基因在蛋白质水平上表现出很大的差异, 发生不定芽的外植体和不发生不定芽的外植体出现了160种蛋白质的差异点。从分析结果还可以看出, 差异蛋白的pI值多在5~7之间, 在这个范围内的差异蛋白点达到了122个, 占差异蛋白总数的76.25%, 差异蛋白的分子量多在40~70 kDa之间, 在这个范围内的差异蛋白点达到了124个, 占差异蛋白总数的77.5%。

3 讨论

真核生物中, 从个体的生长、发育、衰老、死亡, 到组织的分化、凋亡以及细胞对各种生物、理化因子的应答, 本质上都涉及基因的选择性表达。

高等生物大约有 30 万个不同的基因,但在生物体内任意细胞中只有 10% 的基因得以表达,而这些基因的表达是按事件和空间顺序有序地进行着,这种表达的方式即为基因的差异表达。其包括新出现的基因的表达与表达量有差异的基因的表达。生物体表现出的各种特性,主要是由于基因的差异表达引起的。由于基因的差异表达的变化是调控细胞生命活动过程的核心机制,通过比较同一类细胞在不同生理条件下或在不同生长发育阶段的基因表达差异,可为分析生命活动过程提供重要信息。

有研究表明,植物愈伤组织细胞的发生过程中包含着细胞内特异基因的选择性表达。愈伤组织细胞发生是按严格时空顺序进行的一系列核质之间和细胞之间相互作用的结果,不同时期有不同的一组基因起作用。植物愈伤组织细胞发生过程中,愈伤组织细胞的起始分化是关键,其后的不定芽形成发育的信息贮存于愈伤细胞中,外界因子促使这些信息按一定的时空顺序选择性地表达,最终形成完整的植株。因此,早期的愈伤组织细胞中特异基因的表达和蛋白质的形成是研究的重点^[1,3,7-9]。不定芽的发生是植物再生过程的重要过程,是植物再生能力的重要衡量标准。但植物愈伤组织形成、不定芽发生过程受哪些基因的调控,这些基因与诱导条件存在有怎样的关联目前尚不能有明确的理论支持^[4,10]。cDNA-AFLP 技术和双向电泳技术是近年发展起来的比较成熟的用于差异基因筛选和分析技术,能同时处理多个不同来源样品间基因表达的差异^[11,12]。

本实验通过 cDNA-AFLP 技术对芥蓝不定芽发生过程的 RNA 差异表达进行了初步的研究,发现分化细胞与不分化细胞在 RNA 水平上有很大的差异,并且这些差异片段多集中在 200~600 bp 之间,说明在芥蓝不定芽形成过程中,不分化细胞与分化细胞受到了不同外源条件的调控,从而引起了芥蓝发生愈伤组织和形成不定芽的差异。这种差异的形成可能是由于各自的培养基组成不同,调节了芥蓝外植体内基因表达的差异,产生了不同的基因调控类型,导致了芥蓝分化情况的不同。我们可以由此推测,通过促进愈伤组织细胞相关基因的表达,促进芥蓝的愈伤组织形成,诱导了不定芽的发生,提高芥蓝外植体的再生能力。由此,我们可以在愈伤组织形成和不定芽

形成比较困难的植物上,通过调节相关基因表达,有利于愈伤组织形成和不定芽的发生,从而提高植物的再生能力,为解决生产上的实际问题提供基础理论依据。但是,调控基因表达的因素以及调控的方式有待于进一步的研究。

对基因表达的鉴定分为两个水平:一是在转录水平上对特异 mRNA 的鉴定,主要方法有 Northern 杂交、mRNA 差别显示等,二是在翻译水平上对特异蛋白的鉴定,主要方法有蛋白质的双向电泳等。本实验利用双向电泳技术对芥蓝不同分化形式的外植体进行了蛋白质水平上的分析,发现两种形式的外植体在蛋白质水平上存在有差异,进一步证实了基因表达存在有差异的结果。但是基因表达差异结果是否产生的是我们所检测到的蛋白质差异?这些蛋白质差异是否决定了不定芽的形成,还有待于进一步的深入研究。

cDNA-AFLP 技术是将酶切后的 cDNA 经 PCR 扩增后,接上特定接头,然后用特定引物再进行选择性扩增。双向电泳技术则是根据蛋白质的等电点和分子量大小进行分离。在进行 cDNA-AFLP 分析时,由于受酶切是否充分、所采用的接头和引物数量等因素影响,差异片段的数量会有一定的差异,特别是引物数量的影响很大。本实验选用了 48 对引物进行差异片段的筛选,只有 9 对引物出现了 13 条差异片段,可能是由于引物数量太少,或者是接头和引物序列的选用需要更进一步优化。而双向电泳技术是直接对所有蛋白质进行分离分析的,所以在双向电泳结果中出现了 160 种差异蛋白质点。

参考文献 (References)

- [1] 崔凯荣等. *实验生物学报*, 1998, 31: 195
- [2] 黄绍兴等. *植物学通报*, 1995, 12: 1
- [3] 王亚馥等. *核农学报*, 1991, 5: 55
- [4] Hewezi T et al. *Plant Cell Tiss Org Cul*, 2003, 73: 81
- [5] 黄科等. *细胞生物学杂志*, 2004, 26: 313
- [6] 王永勤等. *中国农业科学*, 2003, 38: 557
- [7] Giroux MJ et al. *Plant Physiol*, 1994, 106: 713
- [8] Stirn S et al. *Plant Cell Rep*, 1987, 6: 50
- [9] Sung ZR et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 3683
- [10] Stable P et al. *Plant Physiol*, 1990, 92: 1174
- [11] 赵肃清等. *生物技术通报*, 2005, 5: 43
- [12] 王青山等. *吉林农业科学*, 2005, 30: 29

Differential Gene Expression Analysis of Chinese Kale during Regeneration by cDNA-AFLP and 2-D Electrophoresis

Ke Huang^{1,2,3}, Xiao-Lin Yu¹, Wan-Zhi Ye¹, Xun Xiang¹, Gang Lu¹, Jia-Shu Cao^{1*}

(¹Institute of Vegetable Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²Institute of Agricultural Product Quality, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ³Institute of Vegetable Sciences, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract The differential expression of Chinese kale during regeneration has been analyzed by cDNA-AFLP and 2-D electrophoresis. The results indicated that the differential gene expression of Chinese kale adventitious bud occurred at RNA level, the differential band appeared in explants with adventitious bud occurring mainly in 200–600 bp; and the differential gene expression also occurred at protein level, 160 differential proteins have been observed, among which 122 (76.25% of total differential proteins) proteins' pI were 5–7. Of the total differential proteins, 124 (77.5% of total differential proteins) proteins' MW distributed at 40–70 kDa.

Key words Chinese kale; *Brassica oleracea* var. *alboglabra*; cDNA-AFLP; 2-D electrophoresis; adventitious bud; differential expression

Received: May 24, 2006 Accepted: October 24, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671426) and Key Program of Sciences and Technology of Zhejiang Province (No.2005C12019-02)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn