

应用寡核苷酸芯片分析水稻花序 相关基因在花序发育中的表达谱

李援亚¹,张云孙²,杜娟³,高志勇¹,张永彪¹,王璐¹

(1. 云南大学生命科学学院生物技术系,昆明 650091; 2. 云南大学科学技术处,昆明 650091;

3. 云南省农业科学院粳稻育种中心,昆明 650205)

摘要:从 Internet、国内外文献中查询了 50 个水稻花序的相关基因,制备成水稻花序相关基因的寡核苷酸芯片。对 3 个不同生长阶段的水稻花序材料进行了表达谱检测,用 ScanArray3000 对杂交结果进行扫描,得到了不同的基因表达谱。用 ImaGene 4.0 软件对获得的表达谱进行分析,获得基因表达差异的散点图及饼图。图像分析表明,候选基因在水稻花序 3 个不同发育阶段的材料中,表达水平有显著差异。这些结果将有助于研究水稻花序的发育机理。

关键词:寡核苷酸芯片;水稻花序相关基因;基因差异表达

中图分类号:Q344

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2003)06-0695-05

Gene Expression in Rice Inflorescence Development was Monitored by Using Oligonucleotide Microarray

LI Yuan-Ya¹,ZHANG Yun-Sun²,DU Juan³,GAO Zhi-Yong¹,

ZHANG Yong-Biao¹,WANG Lu¹

(1. Department of Biology, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Department of Science and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, China;

3. Rice Research Center of Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China)

Abstract: In this paper we chose 50 rice inflorescence genes from Internet, references. Rice oligonucleotide microarray was prepared by printing the target rice inflorescence genes oligonucleotide. Expression patterns of 50 genes from rice inflorescence in three different development phase were obtained by scanning using ScanArray3000 after array hybridization. The scatter plots and scale maps of the images were acquired after the acquired gene expression patterns were analyzed by ImaGene4.0 software. The scatter plots and scale maps show that there existed a significant difference in the expression of these candidate genes in rice inflorescences with different development phase. Further analysis of those candidate gene expression patterns will be helpful to understand the developmental mechanism of rice inflorescence.

Key words: oligonucleotide arrays; rice inflorescence genes; differential expression

寡核苷酸芯片是基因芯片的一种,它通过微阵列技术,以预先设计的方式将大量核酸片段固定在

载体上,组成密集的分子排列点阵,与标记的样品进行杂交,检测杂交信号的强弱,进而获取样品分子的

收稿时期:2002-11-08;修回时期:2003-03-14

基金项目:云南省省长基金资助课题(编号:科 418)

作者简介:李援亚(1970-),女,云南昆明人,硕士,专业方向:分子遗传学。E-mail:YYLi199149@yahoo.com.cn

致谢:本文部分实验在军事医学科学院二所九室完成,特此致谢!

数目和序列信息。它可以同时研究组织、细胞在不同生长阶段、不同生理条件下成千上万个基因结构、功能以及基因表达相互作用的关系。该技术是以定量方式同时检测大量基因相对表达的强有力的新方法,是对控制发育和分化的遗传学机制的研究是一个巨大的突破,具有高度并行性、自动化、微型化的特点。与 cDNA 芯片技术不同的是,它不需要建立 cDNA 文库,其微阵列上的核酸探针序列主要为源于 Genbank、dbEST、UniGene 数据库。制备寡核苷酸芯片所用的探针一般通过计算机程序对其源 mRNA 序列进行比较筛选得到。目前,该方法已被用于基因组测序^[1]、基因点突变检测^[2]、基因表达变化监控^[3]、反义药物筛选^[4]等领域。

本实验应用寡核苷酸芯片技术研究水稻花序相关基因——MADS 框基因家族(20 个)、NAC (NAM and CUC2)基因家族(4 个)、具有锌指结构的基因(6 个)以及来自于水稻花序的 ESTs (express sequence tags)(20 个)在 3 个不同发育阶段水稻花序中的基因表达谱。

1 材料和方法

1.1 寡核苷酸探针的设计及筛选

从 Internet、国内外文献中查询来自于水稻花序的 mRNA (www.ncbi.nlm.gov/)。通过计算机软件设计探针。到 Internet 上进行探针 Blast (www.ncbi.nlm.gov/blast)^[5]。

1.2 探针合成、纯化

1.3 探针稀释及定量

将纯化好的探针分别用点样液进行溶解,紫外测定。根据其含量,调整每种探针的浓度,加样于 96 孔板中,每种样品各加两孔。

1.4 芯片的制备及后处理

用 Pixy sys5500 点样仪将探针点印到玻片上,每孔样品重复两次。点样完成后,进行后处理,备用。

1.5 水稻花序材料的采集与处理

水稻花序材料由云南省农科院蒋志农研究员提供。材料 1:孕穗期(花序在叶鞘内,长约 8~10 cm),材料 2:抽穗中期(长约 12~15 cm,花序在叶鞘外约 4~6 cm),材料 3:抽穗期(花序长约 18~20 cm,已完全长出叶鞘)。迅速置于液氮中约 2~4 min,后放置于 -70 °C 冰箱中保存,备用。

1.6 水稻花序总 RNA 的提取与鉴定

使用 Trizol 试剂(Gibco 公司)分别提取 3 种水稻花序材料组织总 RNA,溶于无 RNA 酶的 DEPC 水中,用电泳证明总 RNA 较完整,测定 A 值之后于 -70 °C 保存。

1.7 荧光标记探针的制备

反转录 cDNA 第一链时掺入荧光素 Cy3-dUTP 或 Cy5-dUTP 制备荧光标记探针。

1.8 杂交

荧光标记探针和寡核苷酸芯片杂交,室温下清洗。

1.9 杂交结果的检测及图像分析

使用 ScanArray3000 扫描仪(GSI Lumomics)检测杂交结果,用 Image4.0(Biodiscovery, Inc)软件分析图像,根据阳性对照的表达丰度将杂交结果进行标准化,获得阵列中基因在 3 个不同的生长阶段中表达强度的 Ratio 值,找出差异表达基因。

2 结果与分析

2.1 扫描结果图

将 3 组水稻花序总 RNA 分别用 Cy3、Cy5 进行反转录标记,与花序相关基因寡核苷酸芯片杂交,然后使用 ScanArray3000 进行扫描,获得芯片杂交结果(图 1)。

2.2 基因表达谱分析图

扫描图像用 Image4.0 软件分析荧光信号的强度和比值,用材料 3 作为对照组,经阳性对照校正后得到下列分析结果图,分析结果见图 2。

2.3 3 个不同发育时期水稻花序材料基因表达谱分析图比较

在图 2 的 A 图中,材料 1 与材料 3 中的大部分候选基因表达水平存在显著差异,点的分布大部分集中在材料 3 的一侧,说明大部分候选基因在材料 1 中的表达水平较低,信号强度较弱;相比之下,大部分候选基因的表达量在材料 3 中要高于在材料 1 中;在图 2 的 D 图中,材料 2 与材料 3 中的候选基因大部分表达水平也存在显著差异;但与前面不同的是,点的分布大部分集中在材料 2 的一侧,说明大部分候选基因在材料 2 中的表达水平要高于在材料 3 中,其中有部分基因的信号强度较强。比较图 2 发现,候选基因在 3 种不同生长阶段的水稻花序材料中,其表达水平有显著差异。

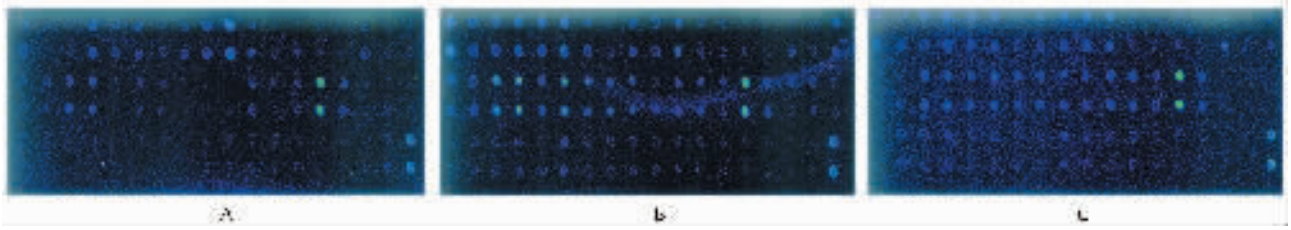


图 1 候选基因分别在花序材料 1、2 和 3 中的基因表达谱

Fig. 1 Expression patterns of 50 chosen genes in 3 kinds of rice inflorescence tissues

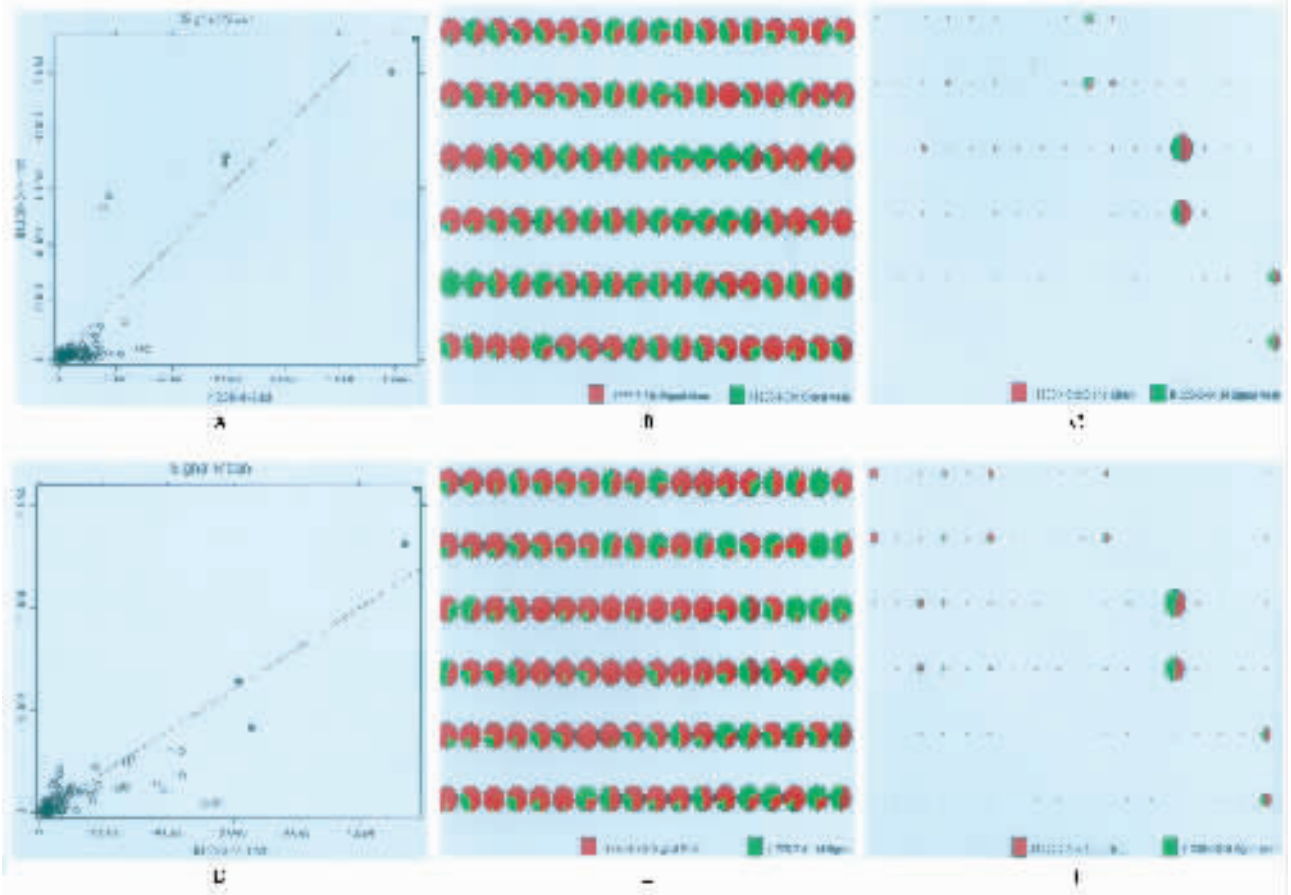


图 2 候选基因在材料 1(A、B、C)、材料 2(D、E、F)中的基因表达差异的散点图及饼图

Fig. 2 Scatter plot and Scale maps of gene expression pattern in the tissue 1(A,B,C) and tissue 2(D,E,F)

2.4 候选基因在水稻花序 3 个不同发育时期中的表达差异比较

基因显著差异表达的判定标准为:(1)Ratio $>$ 1.5 或 Ratio $<$ 0.6(两种材料荧光信号的比值);(2)两个信号值至少有一个大于 600。通过计算,得到了候选基因在材料 1 与材料 2 中显著差异表达的基因(表 1),候选基因在材料 1 与材料 3 中差异表达的基因(表 2)以及候选基因在材料 2 与材料 3 中差

异表达的基因(表 3)。

比较分析表 1、表 2 和表 3,可以发现:

(1) *OsMADS6* (A10) 基因在材料 1、材料 3 阶段表达水平显著,但其在材料 1 阶段尤为突出,几乎为特异性表达。

(2) *OsMADS1* (A1)、*MADS13* (A2)、*OsMADS3* (A3)、*FDRMADS8* (A5)、*FDRMADS6* (A6)、*AB003322* (A7)、*MADS15* (A18)、

FDRMADS5 (B1)、*AB003326* (B2)、*NAC4* (B3)、*NAC6* (B4)、*AU182426* (B15) 这些基因在材料 2 阶段表达水平高,而在其他阶段表达水平较低。

(3)*MADS17* (A11)、*NAC7* (B5)、*NAC8* (B6)、*Zinc-FC60910* (B7)、*Zinc-FE10707* (B8)、*Zinc-FR1479* (B9) 在材料 2、材料 3 阶段表达水平较高、而在材料 1 阶段较低。

(4)*Zinc-FS12569* (B11)、*Zinc-FS3574* (B12) 在材料 3 阶段表达显著,而在其他阶段表达水平较低。

表 1 候选基因在材料 1 与材料 2 中显著差异表达的基因

Table 1 Outstanding differentially expressed genes in the tissue 1 and 2

基因符号或注册号 gene signs or accession numbers	荧光信号的比值(材料 1/材料 2) ratios of hybridization signal (tissue 1 / 2)
<i>OsMADS1</i>	0.085943
<i>MADS13</i>	0.147189
<i>OsMADS3</i>	0.118557
<i>FDRMADS8</i>	0.341011
<i>FDRMADS6</i>	0.149169
<i>AB003322</i>	0.321785
<i>OsMADS6</i>	9.397418
<i>MADS17</i>	0.134601
<i>MADS15</i>	0.215419
<i>FDRMADS5</i>	0.233923
<i>AB003326</i>	0.310222
<i>NAC4</i>	0.178408
<i>NAC6</i>	0.434951
<i>NAC7</i>	0.097029
<i>NAC8</i>	0.208138
<i>Zinc-FC60910</i>	0.235315
<i>Zinc-FE10707</i>	0.135765
<i>Zinc-FR1479</i>	0.040802
<i>AU182426</i>	0.484137

表 2 候选基因在材料 1 与材料 3 中显著差异表达的基因

Table 2 Outstanding differentially expressed genes in the tissue 1 and 3

基因符号或注册号 gene signs or accession numbers	荧光信号的比值(材料 1/材料 3) ratios of hybridization signal (tissue 1 / 3)
<i>OsMADS6</i>	3.0231
<i>MADS17</i>	0.137767
<i>NAC7</i>	0.13677
<i>NAC8</i>	0.2544
<i>Zinc-FC60910</i>	0.2668
<i>Zinc-FE10707</i>	0.2436
<i>Zinc-FR1479</i>	0.03892
<i>Zinc-FS12569</i>	0.2706
<i>Zinc-FS3574</i>	0.1558

表 3 候选基因在材料 2 与材料 3 中显著差异表达的基因

Table 3 Outstanding differentially expressed genes in the tissue 2 and 3

基因符号或注册号 gene signs or accession number	荧光信号的比值(材料 2/材料 3) ratios of hybridization signal (tissue 2 / 3)
<i>OsMADS1</i>	6.9224
<i>FDRMADS8</i>	2.7571
<i>FDRMADS6</i>	3.5569
<i>AB003322</i>	2.3453
<i>OsMADS6</i>	0.32169
<i>MADS15</i>	3.3782
<i>AB003326</i>	4.3834
<i>NAC4</i>	3.2681
<i>NAC6</i>	2.3476
<i>Zinc-FS12569</i>	0.40339
<i>Zinc-FS3574</i>	0.4756

3 讨 论

本研究中的全部探针均来自水稻,他们是水稻 *MADS* 框基因、*NAC* (*NAM* and *CUC2*) 基因、具有锌指结构的水稻基因以及来自于水稻花序的 EST。

3.1 水稻花序 *MADS* 框基因

MADS 框基因在真核生物中普遍存在的一类转录因子,在植物、动物、真菌的信号传导和发育中起重要作用,是控制植物开花的复杂基因网络中的重要成员^[6~8]。

资料显示,水稻 *OsMADS6*、*MADS17* 属于 *AP1/AGL9* 基因家族中的 *AGL6* 亚家族,是 *ZAG3* 的同源基因,在花发育早期和后期阶段都有表达,在成熟花的浆片和心皮中检测到表达^[9]。实验发现,*OsMADS6* 在材料 1、材料 3 阶段表达水平显著,表明其在花序发育的早期和后期起作用,这和文献报道一致,但其在材料 1 阶段表达水平尤为突出,几乎为特异性表达,推测其作用更偏重于花发育的早期;*MADS17* 在材料 2、材料 3 阶段表达水平较高、而在材料 1 阶段较低,其可能不仅在水稻花序发育的早期和后期起作用,在中期也有重要作用。另外,水稻 *OsMADS1*、*MADS13*、*OsMADS3*、*FDRMADS8*、*FDRMADS6*、*AB003322*、*MADS15*、*FDRMADS5*、*AB003326* 在材料 2 阶段表达水平高,而在其他阶段表达水平较低。其中 *OsMADS1*、*MADS15* 属于 *AP1/AGL9* 基因家族,*OsMADS1* 属于 *AGL2* 亚家族,转化烟草引起植株矮化和早花,与花的诱导有关,在控制开花时间中起重要作用^[9]; *MADS15* 属 *SQUA* 亚家族,是 *ZAP1* 的同源基因,在花发育的

早期和后期阶段都有表达^[10]; *MADS13* 与玉米的 *ZAG2* 基因具有高度的同源性,在发育的胚珠中高水平表达,与胚珠和种子的发育有关^[11]; *OsMADS3* 是 *AG* 基因的同源基因,在水稻 3~4 轮花器官——雄蕊和心皮中表达,与 *AG* 基因具有相同的表达模式^[12,13];而在本实验中发现,它们在开花的中期表达水平更高,可能参与开花调控。

3.2 水稻 *NAC* 基因、锌指结构基因及 EST 在水稻花序发育中的作用

NAC 基因是植物特有的基因家族,在细菌、真菌、动物中至今还没有发现其存在。在对 *NAM* 和 *CUC2* 基因的分离和序列分析中发现,由它们编码的蛋白质在 N-端具有高度保守的氨基酸序列,这个保守的区域被称为 *NAC domain*^[14]。本研究得到的 *NAC4*、*NAC6* 这两个基因在材料 2 阶段表达水平高,而在其他阶段表达水平较低,说明其可能在水稻花序发育的中期发挥着重要作用;而 *NAC7*、*NAC8* 在材料 2、材料 3 阶段表达水平较高,在材料 1 阶段较低,其可能在花序发育的中、后期调节花序发育和分化。

Putterill 等人分离了拟南芥的 *CONSTANS* (*CO*) 基因,该基因参与受环境影响的条件下开花的调节,*CO* 蛋白含有两个与 *GATA-1* 类相似的锌指结构,在水稻中也有类似于 *GATA-1* 类的锌指结构^[15]。本实验中的锌指结构基因 *Zinc-FC60910*、*Zinc-FE10707*、*Zinc-FR1479* 在材料 2、材料 3 阶段表达水平较高、而在材料 1 阶段表达水平较低,可能这 3 个锌指结构基因的主要作用是调节花序在中、后期的发育和分化。

在选取的 20 个 EST 作为研究对象中,只检测出序列号为 *AU182426* 的基因表达水平较为显著,在材料 2 阶段表达水平高,在材料 1 和材料 3 阶段表达水平较低,其作用也可能是在水稻花序发育的中期调节花序发育。其他 EST 未能检测出来基因表达水平的变化,可能是由于它们都不在所选材料的发育时期表达或是其基因表达水平极微,其机理尚须进一步的研究。

本研究对 50 个来自于水稻花序的基因和 EST 进行不同发育阶段的表达谱分析,为研究水稻基因功能奠定了初步的基础,而进一步研究其功能有待于对 EST 基因全长的获得及更多不同生长时期基因表达谱的建立。同时,芯片得到的结果,还需用 Northern 分析进一步验证。

参 考 文 献 (References):

- [1] Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang X C, Stern D, Winkler J, Lockhart D J, Morris M S, Fodor S P A. Accessing genetic information with high-density DNA arrays [J]. *Science*, 1996, 274(5287): 610~614.
- [2] Ahrendt S A, Halachmi S, Chow J T, Wu L, Halachmi N, Yang S C, Wehange S, Jen J, Sidransky D. Rapid sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(13): 7382~7387.
- [3] Lee C K, Klopp R G, Weindrich R, Prolla T A. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction [J]. *Science*, 1999, 285(5432): 1390~1393.
- [4] Milner N, Mir K U, Southern E N. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotides arrays [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(6): 537~541.
- [5] Altschul, Stephen F, Thomas L M, Alejandro A S, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb M, David J L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389~3402.
- [6] Shore P, Sharrocks A D. The MADS-box family of transcription factors [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 229: 1~13.
- [7] Sommer Z S, Huijser P, Nacken W, Saedler H, Sommer H. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus* [J]. *Science*, 1990, 250: 931~936.
- [8] Theissen G, Kim J T, Saedler H. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes [J]. *J Mol Evol*, 1996, 43: 484~516.
- [9] Chung Y Y, Kim S R, Finkel D, Yanofsky M F, An G. An early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS-box Gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 657~665.
- [10] Moon H Y, Jung J Y, Kang H G, An G. Identification of a rice *APETALA3* homologue by yeast two-hybrid screening [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 40: 167~177.
- [11] Lopez Dee Z P, Wittich P, Pe M E, Rigola D, Del Buono I, Grola M S, Kater M M, Colombo L. *OsMADS13*, a novel Molecular Cell expressed during ovule development [J]. *Dev Genet*, 1999, 25: 237~244.
- [12] Kang H G, Jeon J S, Lee S, An G. Identification of class B and class C floral organ identity genes from rice [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 38 (6): 1021~1029.
- [13] Kang H G, Noh Y S, Chung Y Y, Costa M A, An K, An G. Phenotypic alterations of petal and sepal by ectopic expression of a rice MADS-box gene in tobacco [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 1~10.
- [14] Kikuchi K, Tanaka M U, Yoshida K T, Nagato Y, Matsusoka M, Hirano H Y. Molecular analysis of the *NAC* gene family in rice [J]. *Mol Gen Genet*, 2000, 262: 1047~1051.
- [15] Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors [J]. *Cell*, 1995, 80: 847~857.