

利用 mRNA 差别显示技术分析枸杞体 细胞胚发生早期基因的差别表达^①

崔凯荣^② 邢更生 秦琳 王亚馥^③

(兰州大学干旱农业生态国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要 本研究选用枸杞体细胞胚发生体系中的继代愈伤组织(对照)、胚性愈伤组织和早期胚体为实验材料, 提取细胞总 RNA, 在 12 种锚定真核生物 mRNA 3'末端的 OligodT12VN 中, 随机选用 OligodT12GA 为引物合成了以上三种材料的 cDNA 第一链, 以此 cDNA 为模板, 用随机引物进行 PCR 扩增, 选择差别表达的片段。我们选用了 OPA、OPH、OPK 和 OPB 四组的 60 个随机引物对所得的 cDNA 进行了 PCR 扩增, 得到了三个在体细胞胚发生早期组织中基因特异表达的片段。结果表明, 在体细胞胚发生早期有胚胎发生特异性基因的表达, 而且这种特异表达的基因在继代愈伤组织中没有表达, 说明植物的体细胞胚发生过程就是细胞内基因差别表达的结果。

关键词 mRNA, 基因差别表达, PCR, 体细胞胚发生, 枸杞

中图分类号: Q37

Differential Expression of the Gene in Early Somatic Embryogenesis of *Lycium barbarum* L. by modified mRNA Differential Display

CUI Kairong XING Gengsheng QIN Lin WANG Yafu

(The State Key Laboratory of Arid Agroecology of Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract Embryogenic calli and early embryo can be obtained from both auxin and auxin-free medium. The analysis of differential gene expression in early somatic embryogenesis has been hindered by above-mentioned material. The modifications of the recently described mRNA differential display method were reported and differential gene expression in early somatic embryogenesis was analyzed. We have obtained three differential bands of cDNA in early somatic embryogenesis. The results indicate that gene expression has temporal and spatial order in early somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. Plant somatic embryogenesis is the results of differential gene expression in cell.

Key words: mRNA, differential gene expression, PCR, somatic embryogenesis, *Lycium barbarum* L.

植物体细胞胚的发生与发育的关键时期是胚性细胞的起始分化, 它不仅决定了以后的发育途径, 而且决定了体细胞胚发生的频率。尽管体细胞分化为胚性细胞是受细胞内外各种因子所调控^(1,2), 但最重要的因子是受特定的基因所控制, 是相应基因产物作为胚性细胞形成的分子基础。

mRNA 差别显示技术是哈佛医学院的 Peng Liang⁽⁸⁾ 和 Strauss⁽⁹⁾ 于 1992 年发展的一种用于分离和克隆哺乳动物正常与异常细胞之间差异表达基因的 PCR 方法。近年来许多学者对这一技术进行了改进, Sokolov 等

①国家自然科学基金(39770375)和甘肃省自然科学基金的项目; 本工作在兰州大学完成。

②目前在中国科学院兰州沙漠研究所做博士后研究工作, 兰州 730000。

③通讯联系人。

利用他们改进的技术成功地鉴别和克隆了人体几种组织中差别表达的基因^[10], 他们的技术简单易行、重复性好、差异片段的回收方便。为此, 本项研究利用这一方法, 采用本室已建立的名贵药用植物枸杞体细胞胚发生体系, 研究体细胞胚发生早期基因差别表达的规律, 为胚胎发生和细胞分化等重大理论问题的研究提供重要信息。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

宁夏枸杞 (*Lycium barbarum*L.) 种子经常规消毒后, 接种在无激素的 MS 培养基上, 取无菌苗的叶片为外植体, 在 MS+0.2mg/L 2, 4-D 培养基上诱导脱分化产生愈伤组织, 将该愈伤组织在 MS+0.2mg/L 2, 4-D 培养基上继代 4~5 次后转入 MS 无激素培养基上, 绝大多数愈伤组织可再分化形成体细胞胚。我们分别取继代愈伤组织、胚性愈伤组织和早期胚体为实验材料。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 1g 左右的实验材料在液氮中研磨, 悬于 4mol/L 的异硫氰酸胍溶液中, 经酸性苯酚和氯仿抽提后, 用异丙醇沉淀总 RNA, RNA 沉淀经 70% 的乙醇洗 1~2 次, 稍微晾干, 最后 RNA 溶解在适量的 DEPC 处理的水中, 存于 -70℃ 备用。总 RNA 的产量及纯度通过紫外比色计算得知。总 RNA 的完整性通过含 3.3% 甲醛的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测得知。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 分别以上述三种样品的总 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第一链。反应体系 (20 μ l) 包括: 10 μ g 总 RNA, 2.5 μ mol/L OligodT12GA, 25 μ mol/L dNTPs, 4 μ l 反转录酶缓冲液 (5 \times), M-MLV 反转录酶 300 单位, 反应条件为 37℃, 1h。用碱性琼脂糖凝胶电泳检测所得 cDNA 第一链的效果。

1.2.3 cDNA 片段的 PCR 扩增 10 μ l PCR 反应混合液包括: cDNA 第一链反应产物 0.6 μ l, 引物 1、引物 2 (均为 Opern 公司的十聚体核苷酸随机引物) 各 0.2 μ mol/L, 1 μ l 10 \times PCR 反应缓冲液, 200 μ mol/L dNTPs, 1 个单位的 Taq DNA 聚合酶 (华美公司), 反应混合物用毛细管封好, 在 PCR 仪 (美国 ATC100Z 型) 上扩增; 扩增条件 92℃ 1s, 40℃ 7s, 70℃ 1min, 40 个循环反应后, 72℃ 补平 4min。

1.2.4 cDNA 扩增片段的琼脂糖凝胶电泳分析 取 PCR 扩增混合物 10 μ l, 在 1.8% 的琼脂糖凝胶 (含 2 μ g EB) 上点样, 电泳, 电泳条件为 TBE 电泳缓冲液、电压 50V, 至溴酚指示剂到达前沿为止, 在紫外检测仪上对凝胶进行观察和摄影。

2 结 果

2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

我们采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿法抽提总 RNA, 抽提完成后, RNA 样品经稀释在紫外 / 可见分光光度计 (DW2000, 美国) 测定它的 OD₂₆₀, OD₂₃₀ 和 OD₂₈₀, 结果每个样品的 OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 均在 1.8~2.0, OD₂₆₀ / OD₂₃₀ 均在 2.0 以上, 这表明所提取的 RNA 无蛋白质、苯酚和异硫氰酸胍的污染, 利用 OD₂₆₀ 的值算出样品的 RNA 含量。取一定量的 RNA 在含有 3.3% 甲醛的 1.0% 琼脂糖凝胶上进行 RNA 变性电泳, 结果表明 RNA 样品没有降解。总 RNA 用 Boehringer Mannheim 公司的 OligodT12GA 和 M-MLV 反转录酶进行反转录, 得到相应的 cDNA 第一链, 为了防止模板 RNA 的降解, 在反转录时加入 RNA 酶抑制剂 RNasin, 所得的 cDNA 第一链经碱性琼脂糖凝胶电泳检测, 表明 cDNA 第一链的合成完全正常。

2.2 cDNA 第一链的 PCR 扩增和差异片段的筛选

以 OligodT12GA 作为锚定 3' 末端 mRNA 的引物, 分别合成了继代愈伤组织、胚性愈伤组织和早期胚体的 cDNA 第一链。然后选取 Opern 公司的十聚体核苷酸随机引物对进行 PCR 扩增, 用了 OPA、OPH、OPK、OPB 等 60 来个随机引物, PCR 扩增结果显示大部分随机引物对扩增出的三个样品的带型完全相同 (图 1), 经大量扩增后, 筛选出了在三个样品间转录水平不同的 cDNA 条带, 共 3 个 (图 2~4), 这 3 个条带在胚性愈伤组织和早期胚体中有扩增, 而在继代愈伤组织中均无扩增条带出现。扩增出差异条带的随机引物对分别为: A16

(5'-AGCCAGCGAA-3') 和 H11 (5'-CTTCCGCAGT-3'), K10 (5'-GTGCAACGTG-3') 和 K19 (5'-CACAGGCGGA-3'), K04 (5'-CCGCCCAAAC-3') 和 K13 (5'-GGTTGTACAC-3')。为了证明实验的可靠性, 我们除重复 3 次实验外, 还用了没有经反转录的总 RNA 样品作模板, 用同样的引物对进行 PCR 扩增, 结果所有的引物对均无扩增条带出现, 因此证明所提取的总 RNA 中无 DNA 的污染, 实验所扩增出的条带完全是经反转录后所得 cDNA 的扩增条带。

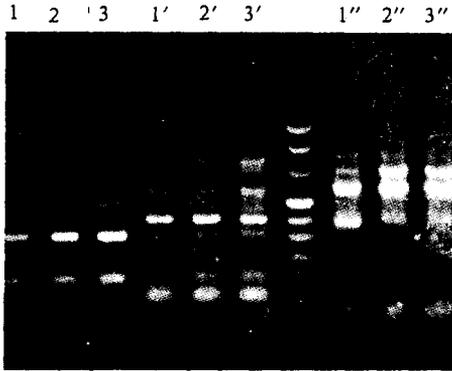


图 1 每组引物扩增出的三个样品的 cDNA 片段带型完全相同
1. 继代愈伤组织; 2. 胚性愈伤组织; 3. 早期胚体。

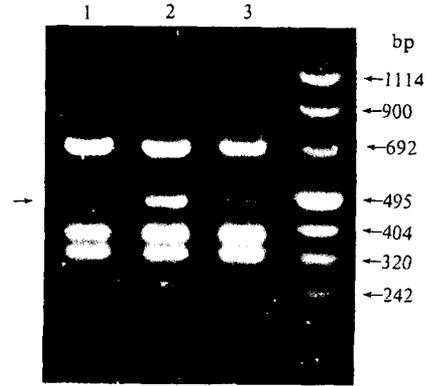


图 2 用 OPK10 和 OPK19 引物对扩增样品所得的差异 cDNA 片段

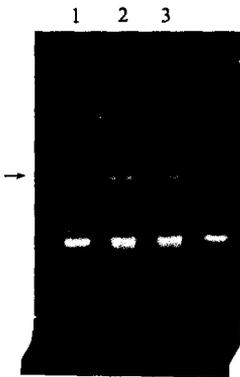


图 3 用 OPK04 和 OPK13 引物对扩增样品所得的差异 cDNA 片段

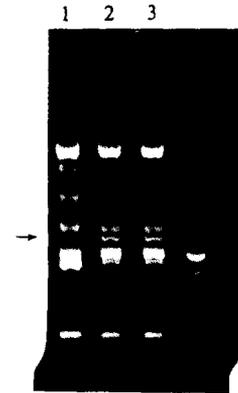


图 4 用 OPA16 和 OPH11 引物对扩增样品所得的差异 cDNA 片段

3 讨 论

3.1 所用实验技术的特点

实验中我们选用总 RNA 作为反转录的模板, 效果很好; 已有实验表明⁽¹¹⁾, 总 RNA 或纯化的 mRNA 作模板的差别显示结果基本一致, 用 Oligo(dT)法纯化的 mRNA 含有少量的 Oligo(dT)片段, 反而增加了差异表达的背景, 因此在众多的实验中均应用总 RNA 作为模板。

我们所采用的检测 mRNA 差别表达的方法是在 Sokolov 等⁽¹⁰⁾所建立技术的基础上进行的, 他们利用此方法成功地鉴别和克隆了人体几种组织中差别表达的基因。该方法简单易行、重复性好, 而且能迅速地在 mRNA 水平上研究基因的差别表达。与 Peng Liang⁽⁸⁾和 Strauss⁽⁹⁾发展的技术相比较有两个显著特点: (1) DDRT-PCR 技术实验时间较长, 所检测的 cDNA 片段仅 100-600bp; 而我们用的方法可检测出大于 3000bp 的 cDNA 片段; (2) DDRT-PCR 技术用 6% 的测序聚丙烯酰胺凝胶电泳, 扩增时要加入同位素, 还要做放射自显

影, 因此实验周期长、成本高、易造成同位素污染, 实验的限制因素较多, 而且用自显影胶片去对照凝胶切下差异片段, 差异片段又很短, 且片段与片段间连接得很紧, 这样就不能保证准确地切下差异片段; 而我们用的方法, 扩增时不用加入同位素, 扩增结果是在琼脂糖凝胶上进行检测, 实验设备和操作均很简便, 可准确、容易地回收差异片段, 省时、成本低、无污染, 在一般实验室就可进行实验, 限制因素少。

我们利用 mRNA 差别显示技术分析了枸杞体细胞胚发生早期基因表达的特性, 选用了 Opern 公司的 60 多种十聚核苷酸随机引物进行 PCR 扩增, 总共获得 1000 多条扩增条带, 其中找出差异条带 3 个, 对所选的引物来说, 3 条差异带的比例合适, 根据我们所用的实验材料, 绝大多数的 cDNA 条带应是一致的, 少数有差异的 cDNA 片段反映了不同材料中基因表达的差异。

3.2 体细胞胚发生早期基因差别表达的特点

植物的形态建成主要是在种子萌发以后发生的, 但是成熟植株的整体框架 (overall architecture) 在胚胎发生时期已经建立⁽¹²⁾, 迄今为止, 尚未鉴定几个胚胎发生早期特异表达的基因, 主要是因为胚和周围母体组织的质量比例的技术难题和缺乏鉴定有关基因的分子及细胞标记⁽³⁾。而植物体细胞胚的实验结果^(4~7)为了解胚胎发生早期的分子及细胞变化提供了重要信息。植物体细胞胚的发生过程实质上就是脱分化的体细胞再分化的过程, 其关键时期是胚性细胞的起始分化, 因此研究体细胞胚发生早期基因的差别表达对胚胎发生和细胞分化分子机理的探讨具有重要意义。

本项研究结果表明, 在枸杞的体细胞胚发生早期基因的表达具时空顺序性, 在胚性愈伤组织和早期胚体中有特异基因的表达, 这种在体细胞胚发生早期特异表达的基因在继代愈伤组织中没有表达, 因此它是胚胎发生相关性基因, 这种基因的表达对胚胎发生具诱导和促进作用, 这进一步说明植物体细胞胚发生过程就是细胞内基因差别表达的结果, 在外界条件, 如激素等刺激下, 植物体细胞中的与胚胎发生的启动有关、控制胚胎发生、促进细胞分化的基因进行表达, 其结果是产生相应的胚性细胞所特有的蛋白质, 这些蛋白质可作为结构蛋白、贮藏蛋白, 更重要的是作为酶或基因调控因子起作用, 促进体细胞转化为胚性细胞, 进入胚胎发生过程。

参 考 文 献

- 1 崔凯荣, 王晓哲, 王亚馥等. 植物体细胞胚发生研究的某些现状. 植物学通报, 1993, 10(3): 14~20
- 2 王亚馥, 崔凯荣, 陈克明等. 小麦组织培养中体细胞胚胎发生的细胞胚胎学及淀粉消长动态的研究. 实验生物学报, 1993, 26(3): 259~267
- 3 Baumlein H, Wobus U, Pustell J. The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. Nucleic Acids Research, 1986, 14: 2707~2720
- 4 Corre F, Henry Y, Rode A, Hartmann C. Em gene expression during somatic embryogenesis in the monocot *Triticum aestivum* L. Plant Science, 1996, 117: 139~149
- 5 Dong J Z, Dunstan D I. Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce [*Picea glauca* (moench) voss]. Planta, 1996, 199: 459~466
- 6 Holk A, Kaldenhoff R, Richter G. Regulation of an embryogenic carrot gene (DC2.15) and identification of its active promoter sites. Plant Molecular Biology, 1996, 31: 1153~1161
- 7 Kiyosue T, Shinozaki K. Cloning of a carrot cDNA for a member of the family of ADP-ribosylation factors (ARFs) and characterization of the binding of nucleotides by its product after expression in *e-coli*. Plant Cell Physiol, 1995, 36: 849~856
- 8 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 1992, 257: 967~971
- 9 Strauss M, Bauer D, Muller H. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique DDRT-PCR. Nucleic Acids Research, 1993, 21: 4272~4280
- 10 Sokolov B P, Prockop D J. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 4009~4015
- 11 Zimmermann J W, Schultz R M. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: Use of mRNA differential display. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91: 5456~5460
- 12 West M A L, Harada J J. *LEAEY COTYLEDON1* is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 1994, 6: 1731~1745