

利用 cDNA-AFLP 技术分析白菜核雄性 不育两用系的表达差异

王永勤, 曹家树, 符庆功, 余小林, 叶纨芝, 向 珣

(浙江大学蔬菜研究所 杭州 310029)

摘要: 利用 cDNA-AFLP 技术, 对白菜核雄性不育两用系可育株群和不育株群分析显示: 花蕾之间基因表达存在差异, 莲座期叶片之间、开花期叶片之间和花茎之间基因表达无差异, 叶片、花茎和花蕾之间基因表达存在差异。对开花期的小蕾、中蕾和大蕾分析显示: 10 对引物中, 1 对在可育株中蕾和大蕾中扩增出 1 条特异带, 另 1 对扩增出 1 条在可育株中蕾中表达丰度高于不育株中蕾的条带, 其余 8 对未发现差异条带。对上述表达丰度有差异的基因进行 Northern 验证, 结果与之一致, 表明 cDNA-AFLP 技术可以用于植物雄性不育基因表达差异的研究。

关键词: 白菜; *Brassica campestris* L. (syn. *B. rapa* L.); 核雄性不育; cDNA-AFLP

Differential Expression Analysis of Genic Male Sterility A/B Lines by cDNA-AFLP in Chinese Cabbage-pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino)

WANG Yong-qin, CAO Jia-shu, FU Qing-gong, YU Xiao-lin, YE Wan-zhi, XIANG Xun
(Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: To determine differential expression of genic male sterility A/B lines in Chinese cabbage-pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino var. *communis* Tsen et Lee), cDNA-AFLP was analyzed, in different development stages and different tissues by using RNA fingerprinting technique. No obvious differential expressions were observed in rosette leaves, florescence leaves, and scapes. Some differential expressions were found in buds of A/B lines and among leaves, scapes and buds. Buds collected in different development stages with 10 primer combinations were analyzed. With one pair primer, a unique band between middle buds and large buds in B line was obtained; and with another one pair primer, one band reflected a higher gene-expression level in A line than that in B line was obtained. No unique bands were found with the other primer combinations. The bands reflected different gene-expression level were confirmed by Northern hybridization. All the results indicate that cDNA-AFLP is a suitable tool for study of differential expression of genic male sterility in plants.

Key words: Chinese cabbage-pak-choi; *Brassica campestris* L. (syn. *B. rapa* L.); Genic male sterility; cDNA-AFLP

RNA 指纹技术可以揭示基因调控在 RNA 水平的表现, 并进一步阐明其调控方式。Liang 等根据高等生物成熟 mRNA 带有 polyA 尾巴的特性, 用特异的锚定引物反转录后, 进行 PCR 扩增, 建立了

mRNA 差异显示技术(mRNA differential display, mRNA DD)^[1]。但该技术存在假阳性高、重复性差、3'端引物倒数第二个碱基的简并性使得某些差异条带不能被扩增等缺点。1996 年 Bachem 等发展

收稿日期: 2002-10-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670512)

作者简介: 王永勤(1968-), 男, 山西兴县人, 助理研究员, 博士, 主要从事蔬菜分子生物学及生物技术研究。曹家树为通讯作者, Tel: 0571-86971188; Fax: 0571-86971188; E-mail: jshcao@zju.edu.cn

了一种新的方法,将 AFLP 用于 mRNA 表达差异分析,即 cDNA-AFLP。cDNA-AFLP 指纹技术重复性高、假阳性低,可准确地反映基因间表达量的差异,可广泛用于植物分子生理过程的基因表达特性的研究^[2]。

白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino)为典型的异花授粉作物,具有明显的杂种优势。虽然可用自交不亲和系生产 F₁ 代种子,但由于亲本繁殖困难、自交系多代生活力下降及易受环境影响等原因,很难保证 100% 的杂交率,自交不亲和系的应用受到一定的制约。雄性不育系是白菜等十字花科植物生产一代杂种的理想系统。因此,雄性不育的选育及其应用研究倍受重视。白菜核不育两用系自 20 世纪 70 年代培育成功以来,已在生产一代杂种中发挥了重要作用^[3]。但是,对其遗传规律的认识还停留在形态学和细胞学水平,产生雄性不育的分子机理还不清楚,获得不育系还需要通过转育、选择配合力测定等一系列工作,费时、费工,限制了雄性不育系在生产上的进一步应用^[4]。因此,从分子水平研究白菜雄性不育机理具有重要的实践和理论意义。本研究采用 cDNA-AFLP 对白菜核雄性不育两用系可育株群与不育株群的不同时期、不同部位的 mRNA 的表达差异进行比较分析,为揭示芸薹属等植物雄性不育的分子机理提供证据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以浙江大学蔬菜研究所细胞与分子生物学实验室经多代测交保存的白菜核隐性雄性不育两用系(982A/B)的可育株群和不育株群为材料。2001 年 9 月 25 日播于苗床,10 月 25 日移栽于试验田,田间管理同常规。莲座期取莲座叶备用,并对调查的植株编号挂牌,直到开花期调查其育性情况。抽薹开花期,分别取叶片、小花薹、中花薹和大花薹(分级标准 0.5 mm 以下为小花薹,0.8~1.2 mm 为中花薹,1.8 mm 以上到开花前为大花薹)。在开花期对试验材料进行育性调查,可育株与不育株分别为 62 株和 70 株,经 χ^2 检验,符合 1:1 的分离比例。

TRIzol[®] 购自 LIFE TECHNOLOGIES 公司。Taq DNA 聚合酶购自上海 Promega 公司。cDNA 合成试剂盒 SMART[™] PCR cDNA Synthesis Kit 购自 Clontech 公司。Acrylamide、Bis-acrylamide 和 TEMED 购自 Promega 公司。Ammonium Persulfate 购自上海生工生物工程技术有限公司。^[32] P-

dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司。cDNA-AFLP 所用接头和引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,其序列如下:

TaqI 接头:5'-GACGATGAGTCCTGAC-3';5'-CGGTCACGGACTCAT-3'

TaqI 预扩增引物:5'-GACGATGAGTCCTGACCGA;

TaqI 选择性扩增引物:5'-GATGAGTCCTGACC-GANN(N 代表 ATCG 中任意一种,T4~T19 共 16 条引物)

AseI 接头:5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3';5'-TAGGTACGCAGTC-3';

AseI 预扩增引物:5'-CTCGTAGACTGCGTACCCTAAT-3';

AseI 选择性扩增引物:5'-GACTGCGTACC-TAATNN(A4~A19 共 16 条引物)。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

分别取不育株群和可育株群莲座期的叶片;开花期的叶片、茎、小薹、中薹和大薹为材料,用 TRIzol 抽提总 RNA,具体操作方法参照 TRIzol[®] 产品手册。cDNA 第一链和第二链的合成参照 SMART[™] PCR cDNA Synthesis Kit User Manual 方法进行。

1.3 cDNA-AFLP 方法

参照 <http://www.dpw.wau.nl/pv/index.htm> 上的 cDNA-AFLP Protocol 进行。电泳采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,1×TBE 电泳缓冲液,1 700 V 电压电泳至二甲苯青距下部边沿 10 cm 处停止电泳。

1.4 探针标记及 Northern 杂交

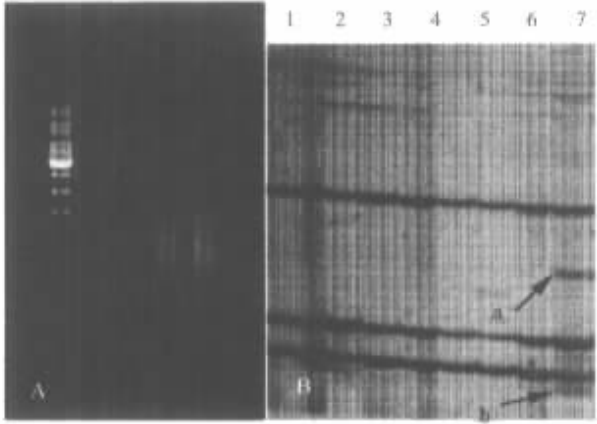
探针的标记采用宝生物工程(大连)有限公司的 Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 试剂盒,标记方法参照说明书进行。Northern 杂交参照 Sambrook 等^[5]的方法进行。预杂交和杂交温度为 60℃。

2 结果与分析

提取的总 RNA 的电泳结果表明 RNA 质量较好,符合合成 cDNA 要求。以上述 12 份总 RNA 为材料,合成 cDNA,并取其中 4 份 cDNA 进行电泳。结果表明,cDNA 大小在 500~5 000 bp 之间,说明 cDNA 合成质量较好(图 1-A)。

2.1 cDNA-AFLP 技术分析白菜两用系不同部位基因的表达差异

首先进行了 125 对引物对白菜雄性核不育两用系小薹的 cDNA-AFLP 分析,11 对引物产生 11



A :合成的 cDNA ;B :A8T10 引物组合在不同部位电泳结果。1、3、5、7 泳道分别为可育株莲座期叶片、开花期叶片、花茎、花蕾 ;2、4、6、8 分别为不育株莲座期叶片、开花期叶片、花茎、花蕾。图 B 中箭头 a 所指的带为不育株特异表达的条带 ,箭头 b 所指的带为不育株表达高于可育株的条带

A :cDNA reverse-transcribed from RNA in Chinese cabbage-pak-choi. B : Lanes 1, 3, 5 and 7 indicate rosette leaves, florescence leaves, scapes and flower buds from B line, respectively ; Lanes 2, 4, 6, and 8 indicate rosette leaves, florescence leaves, scapes and flower buds from A line, respectively ; The arrow a represents the unique band in B line. The arrow b indicates a band reflected a higher gene-expression level in A line than that in B line

图 1 白菜核雄性不育两用系莲座期叶片、开花期叶片、花茎和花蕾 cDNA-AFLP 分析

Fig. 1 cDNA-AFLP analysis on different tissues of genic male sterility A/B line in Chinese cabbage-pak-choi

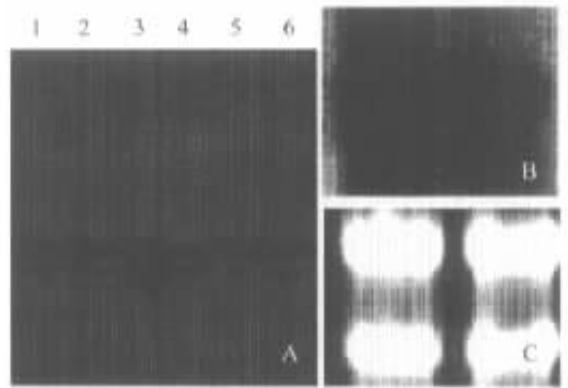
条差异条带 ,其中可育小蕾中特有的有 8 条 ,不育小蕾中特有的为 3 条。

随后 ,采用 cDNA-AFLP 分析了莲座期叶片、开花期叶片、花茎和花蕾不同部位基因的表达差异。结果表明 ,花蕾之间存在差异 ;莲座期叶片之间、开花期叶片之间和花茎之间无差异 ;叶片、花茎和花蕾之间存在差异。图 1-B 为 A8T10 引物组合在不同部位电泳结果。

2.2 可育株群与不育株群不同时期花蕾表达差异的 cDNA-AFLP 分析

用 10 对引物对可育株群和不育株群的小蕾、中蕾、大蕾进行 cDNA-AFLP 分析 ,发现有 2 对引物在开花期产生差异条带 ;其中 A15T17 引物组合在可育株群中蕾和大蕾中产生表达特异条带 ;A8T10 引物组合在可育株群中蕾中表达丰度高于不育株群 (图 2-A 图 2-B) ;其余 8 对引物未发现差异条带。

2.3 表达特异条带的 Northern 分析



A :cDNA-AFLP 聚丙烯酰胺凝胶电泳 ,其中 1、3、5 为可育株小、中、大蕾 ;2、4、6 为不育株小、中、大蕾 ;B :图 A 中 3 和 4 泳道中表达丰度差异条带的 Northern 杂交结果 ;C :用于 Northern 杂交的总 RNA 变性凝胶电泳

A : Polyacrylamide gel electrophoresis of cDNA-AFLP. Lanes 1, 3 and 5 indicate small buds, middle buds and large buds from B line, respectively ; lanes 2, 4 and 6 indicate those from A line, respectively ; B : Northern hybridization of different fragments reflected gene-expression level. (derived from lanes 3 and 4 in figure A) ; C : Denaturing gel electrophoresis of total RNAs used in Northern hybridization

图 2 白菜雄性核不育两用系可育株群与不育株群花蕾表达差异的 cDNA-AFLP 分析

Fig. 2 cDNA-AFLP analysis of different flower buds from genic male sterility (GMS) A/B line in Chinese cabbage-pak-choi

为了进一步验证利用 cDNA-AFLP 分析方法研究基因表达的可靠性 ,对 A8T10 引物组合中 ,可育中蕾表达丰度有差异的条带进行 Northern 验证。取可育株群和不育株群中蕾各 20 μ g 总 RNA 做 Northern 杂交 (图 2-C) ,其结果与 cDNA-AFLP 的结果一致 ,表明 cDNA-AFLP 技术研究植物雄性不育基因表达差异是可行的。

3 讨论

植物雄性不育是一个复杂的发育过程 ,涉及多个组织的分化和大量基因的协同表达 ,且多数花药发育所需的基因一旦发生突变 ,就会使花粉不能正常发育而导致雄性不育。本研究中白菜不育株群和可育株群只存在 1 对性状的差异 ,即育性的差异 ;生长前期育性基因未表达 ,生长性状整齐一致 ;开花期育性基因表达 ,导致育性差异。本试验的 cDNA-AFLP 分析结果充分证明了这一点。

可直接利用 cDNA-AFLP 分析技术研究基因表达特性^[6]。Bachem 利用已知表达模式的土豆贮藏蛋白 *STPATB2* 基因验证 cDNA-AFLP 技术研究基

因表达的可行性,通过 cDNA-AFLP 获得 1 个 570 bp 的 *TDF* 测序分析证实 *TDF* 序列与 *STPATB2* 基因几乎完全同源(500 bp 中 99% 以上),Northern 杂交分析表明两者有极为相似的表达模式。进一步利用 cDNA-AFLP 分析 2 个 *lox TDFs* 在块茎形成过程中表达方式,*TDF531* 先产生,其余的 *TDF* 在块茎形成启动以后再表达,在表达时间上有很大区别。在表达空间上两者均是块茎特有的,在茎尖上表达微弱,该分析结果同 Northern 杂交分析的完全一致^[2]。吴敏生等^[7]利用 cDNA-AFLP 技术对玉米强优势组合和弱优势组合及其双亲的自交系在苗期和雄穗生长锥伸长期的基因表达进行了分析。结果表明,该技术是研究基因表达的一种新方法,具有较高的重复性,不仅可以观察某一时期的基因表达,而且可以同时观察不同时期的基因表达。笔者的研究结果也表明,用该方法研究基因表达的差异是可行的。

本研究表明,一些基因在可育株群中表达;一些基因在不育株群中表达。白菜核雄性不育两用系不育株群中发生突变的基因与小孢子正常发育过程中所必需的某种物质有关,或者其间接影响小孢子发育的某种代谢,发生突变的基因的转录产物也可能正向或负向调控其它一些基因的表达。该基因的表达一旦发生突变,会造成相关基因的不表达或表达。本研究结果与江树业等^[8]在籼稻光敏核不育、凌杏元等^[9]和王学德等^[10]在水稻细胞质雄性不育的研究结果相似。

References

- [1] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by meansw of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257: 967 - 971.
- [2] Bachem C W B, Heven R S van der, Bruijn Z M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G F, De Bruijn S M. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 1996, 9: 745 - 753.
- [3] 闻凤英, 宋边玖, 王玉龙, 刘晓晖, 赵冰, 丘玉秀. 青麻叶结球白菜雄性不育系的转育. *园艺学报*, 2001, 28(2): 133 - 138.
Wen F Y, Song B J, Wang Y L, Liu X H, Zhao B, Qiu Y X. Breeding of nuclear male sterile line in qingmaye type of Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(2): 133 - 138. (in Chinese)
- [4] 曹家树, 叶统芝, 张明, 曾广文. 白菜雄性不育两用系花蕾的 mRNA 差别显示及其 cDNA 差异片段分析. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2001, 27(6): 596 - 600.
Cao J S, Ye W Z, Zhang M, Zeng G W. Differential display of flower bud mRNA of genic male sterility(GMS) A B line in Chinese cabbage-pak-choi and analysis of differential cDNA fragments. *Journal of Zhejiang University(agriculture and life sciences)*, 2001, 27(6): 596 - 600. (in Chinese)
- [5] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(Third Edition) NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 7: 42 - 45.
- [6] Kehoe D M, Volland P, Omerille S. DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci.* 1999, 4: 38 - 41.
- [7] 吴敏生, 高志环, 戴景瑞. 利用 cDNA-AFLP 技术研究玉米基因的差异表达. *作物学报*, 2001, 27(3): 339 - 342.
Wu M S, Gao Z H, Dai J R. Studies on differential gene expression of maize (*Zea mays* L.) by means of cDNA-AFLP technique. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27(3): 339 - 342. (in Chinese)
- [8] 江树业, 陈启锋, 方宣钧. 利用 cDNA-RAPD 技术分析籼稻光敏核不育基因的差异表达. *科学通报*, 1998, 43(23): 2521 - 2524.
Jiang S Y, Chen Q F, Fang X J. Differential expression analysis of photoperiod sensitive genetic male sterile indica rice by means of cDNA-RAPD technique. *Chinese Science Bulletin*, 1998, 43(23): 2521 - 2524. (in Chinese)
- [9] 凌杏元, 周培疆, 朱英国. 水稻红莲型细胞质雄性不育系与保持系 RNA 差异显示和差别片段的分析. *植物学报*, 2000, 42(3): 284 - 288.
Ling X Y, Zhou P J, Zhu Y G. Differential display of rice mtRNA in HL type cytoplasm male sterility(CMS) line and maintainer line and analysis of differential fragments. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(3): 284 - 288. (in Chinese)
- [10] 王学德, 朱英国. 水稻雄性不育和可育花药的 mRNA 差别显示和 cDNA 差别片段分析. *中国科学(C 辑)*, 1998, 28(3): 257 - 263.
Wang X D, Zhu Y G. Differential display of rice anther in sterility line and maintainer line and analysis of differential cDNA fragments. *Science in China (series C)*, 1998, 28(3): 257 - 263. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)