

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00095

利用基因芯片技术筛选棉纤维伸长相关基因

李龙云^{1,2} 于霁雯^{1,*} 翟红红¹ 黄双领¹ 李兴丽¹ 张红卫¹ 张金发³
喻树迅^{1,*}

¹ 中国农业科学院棉花研究所 / 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南安阳 455000; ² 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100;
³ 美国新墨西哥州立大学植物与环境科学部, 美国新墨西哥州 80003

摘要: 从回交近交系(backcross inbred lines, BIL)群体中选取纤维长度差异较大的两个系 NMGA-062 (33.03 mm)和 NMGA-140 (25.87 mm), 利用 Affymetrix 棉花基因芯片, 分析其开花后 10 d (DPA, days post anthesis)棉纤维伸长相关基因表达谱。在 24 029 条转录本中, 两材料间差异表达的转录本有 7 282 条, 占总数的 30.31%; 其中差异表达倍数在 2 倍或 2 倍以上的转录本有 3 993 条, 占筛选转录本总数的 16.62%, 功能分类表明这些转录本主要包括功能预测基因(15.57%), 翻译、核糖体结构相关基因(13.54%)和翻译后修饰、蛋白质转换相关基因(9.29%) 3 大类。为了验证芯片数据的可信性, 8 个差异表达显著的基因(*Ghi.10655.1.S1_s_at*, *ACO1*, *ARF1*, *SAHH*, *TUA6*, *TUA7*, β -*tub1*, β -*tub10*)被用于实时荧光定量 PCR。两种检测手段表现出一致性。随后, 利用实时荧光定量 PCR 对 3 个与棉纤维相关基因(*ARF1*, β -*tub1*, β -*tub10*)在纤维发育不同时期(5、10、15、20 和 25 DPA)的表达模式进行了研究, 结果表明, 3 个基因在纤维伸长发育时期(10 和 15 DPA)大量表达, 推测这 3 个基因可能与棉纤维伸长有重要关系。

关键词: 基因芯片; 纤维伸长相关基因; 差异表达基因; 实时荧光定量 PCR

Identification of Fiber Length-Related Genes Using Cotton Oligonucleotide Microarrays

LI Long-Yun^{1,2}, YU Ji-Wen^{1,*}, ZHAI Hong-Hong¹, HUANG Shuang-Ling¹, LI Xing-Li¹, ZHANG Hong-Wei¹, ZHANG Jin-Fa³, and YU Shu-Xun^{1,*}

¹ Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000, China; ² College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ³ Department of Plant and Environmental Science, New Mexico State University, Las Cruces 80003, New Mexico, USA

Abstract: *Gossypium barbadense* L. is known for its superior fiber quality including long fiber and their quantitative trait loci (QTL) have been reported. However, little is known about the molecular genetic basis of fiber quality traits. The objective of the present study was to identify differentially expressed genes in the rapid fiber elongation stage (10 days post-anthesis, 10 DPA) using a comparative microarray analysis between two backcross inbred lines (BIL) with contrasting fiber lengths. The two BIL lines, NMGA-062 (33.03 mm) and NMGA-140 (25.87 mm), were selected based on a 3-year field trial in four environments. The Affymetrix Cotton GeneChip was then used to perform a transcriptome analysis of 24 029 transcripts in developing fibers (10 DPA). Among the transcripts 7 282 (30.31%) showed a significant differential expression (DE) and 3 993 (16.62%) showed 2-fold or higher levels of expression changes between the two BIL lines. Through quantitative RT-PCR analyses on different plant organs and developing fibers of 10 DPA, eight selected DE genes, including *Ghi.10655.1.S1_s_at*, *ACO1*, *ARF1*, *SAHH*, *TUA6*, *TUA7*, β -*tub1*, and β -*tub10*, all displayed similar results to theses of the microarray analysis. This indicated that the comparative microarray results were biologically reproducible. Quantitative RT-PCR analyses were also performed at five fiber development stages from 5 to 25 DPA on *ARF1*, β -*tub1*, and β -*tub10*. The results indicated that they were all highly expressed in a period of fast fiber elongation and primary cell wall synthesis (at 10–15 DPA), implicating their roles in fiber elongation. This study represents the first investigation using a microarray analysis to compare differential gene expressions between near-isogenic lines with contrasting fiber quality. It provided a list of putative candidate genes for further studies in identifying genes responsi-

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10A109, 2006AA100105)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 于霁雯, E-mail: yujw666@hotmail.com; 喻树迅, E-mail: yu@cricaas.com.cn, Tel: 0372-2562275

第一作者联系方式: E-mail: lilongyun945@yahoo.com.cn

Received(收稿日期): 2010-03-12; Accepted(接受日期): 2010-08-05.

ble for fiber traits and developing molecular markers for marker-assisted breeding.

Keywords: Affymetrix microarray; Fiber length-related genes; Differential expressed genes; Quantitative RT-PCR

棉纤维作为重要的天然纤维,是纺织工业重要材料。随着棉纺工业技术的发展,对棉纤维长度等品质性状提出了更高的要求^[1]。棉纤维细胞由胚珠外珠被单个细胞分化而来,是高等植物中伸长最快、合成纤维素最多的模式单细胞^[2]。其分化和发育过程可分为纤维发育的起始期、伸长期、次生壁增厚期和成熟期4个时期,其中伸长期与次生壁增厚期具有相互重叠的时域。在这4个时期中,纤维细胞形态结构改变,伴随着重要生理生化过程^[3-4]。棉纤维表皮细胞突起后,即进入快速伸长期,开花后10 d是纤维发育快速伸长期,棉纤维的伸长可持续到开花后20~25 d。棉纤维细胞的伸长是一个复杂的生理过程,涉及细胞壁的松弛,液泡膨压的反作用力,膜脂、细胞壁成分和相关蛋白的生物合成及运输过程,受到许多基因的表达调控^[5]。目前,已克隆鉴定了一些纤维伸长相关基因,其中少数基因已证实对纤维细胞伸长发育起一定的调控作用^[6-8]。Li等^[9]通过cDNA微阵列分析比较了陆地棉徐州142纤维与无绒无絮突变体胚珠的基因表达情况,获得了一批棉纤维发育高表达的基因,如*GhSAHH*、*GhRDL*、*GhWBC1*等。Arpat等^[10]运用亚洲棉(*Gossypium arboretum*)开花后7~10 d的纤维cDNA文库测序所得46 603条EST序列,设计了包括14 000个单基因的寡聚核苷酸芯片,功能分析表明细胞壁结构、细胞骨架、糖类及脂类代谢相关的基因在纤维细胞快速伸长期发挥了重要的作用。在纤维伸长阶段,初生壁的合成是一个非常重要的过程。Zhao等^[11]从陆地棉中克隆到一个编码可逆性糖基化多肽的基因*GhRGPI*,在棉纤维中优势表达,推测该基因可能参与细胞壁非纤维素类的多糖合成。脂类代谢基因在棉纤维迅速伸长中也发挥了重要的作用。Gou等^[12]的研究也表明,一些与脂肪酸合成及还原有关的基因在棉纤维伸长期表达量较高,到次生壁合成期开始表达量逐渐降低,代谢谱分析结果与基因表达结果一致,纤维伸长期细胞中的脂肪酸含量明显高于次生壁合成时期的含量。细胞骨架是细胞的内部支撑,对细胞的形态建成有重要的影响。棉花中*GhPFNI*基因在纤维细胞的快速延伸阶段表达量最高,裂殖酵母细胞中过量表达该基因导致细胞长度和形态发生显著变化,暗示*GhPFNI*基

因可能在纤维细胞的极性延伸中具有功能^[13]。通过RNA干扰,降低棉花纤维细胞中肌动蛋白基因*GhACT1*的表达,可使棉纤维中肌动蛋白减少,细胞骨架组装受影响,从而影响纤维细胞的伸长^[14]。微管蛋白基因*GhTUB1*对棉纤维细胞的伸长也起了重要的作用^[15]。激素信号相关基因在纤维细胞伸长过程中同样起重要的作用。乙烯在棉纤维细胞发育过程中也发挥了重要作用。体外培养实验表明,外源乙烯促进纤维细胞的伸长,而乙烯合成的抑制剂AVG则会抑制纤维细胞的伸长^[16]。值得指出的是,以上研究绝大多数是采用陆地棉进行的。

海岛棉是与陆地棉同一起源的另一四倍体栽培种,以纤维长、强、细著称于世。然而,经过长达一百多万年的进化和分歧,这2个四倍体栽培种遗传差异加大而导致种间隔离。虽然两者杂交可产生极强的杂种一代优势,但杂种二代以后出现杂种衰败,造成优异海岛棉基因转移到陆地棉中极其困难。为了解决杂种衰败问题并回避遗传背景的影响,回交近交系成为一个重要的遗传材料。虽然已有许多关于控制纤维长度的数量性状位点(QTL)的报道,但是其分子遗传基础尚不清楚。基因芯片是大规模分析基因表达谱的有效手段,它能够同时检测几万个基因的转录水平,由此可以检测不同条件下差异表达的基因,了解这些基因的表达调控和功能^[17-18]。近年来,基因芯片已成功应用于棉花基因表达谱的分析^[19-20]。

本研究应用基因芯片比较分析两个回交近交系NMGA-062 (33.03 mm)和NMGA-140 (25.87 mm)纤维发育10 d的基因表达谱,以筛选影响纤维伸长的差异表达基因,为以后克隆及验证来自海岛棉的纤维伸长相关候选基因提供重要基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

用海岛棉Giza75与陆地棉SG747杂交,将F₁与陆地棉亲本连续回交2次,得到BC₂F₁,继续自交5次获得BC₂F₆高世代回交自交系群体,选择上半部平均长度最大的材料NMGA-062 (33.03 mm)和上半部平均长度最小的材料NMGA-140 (25.87 mm),开花当天按重复对棉铃挂牌标记,然后取开花后不同

天数(5、10、15、20 和 25 DPA)的棉铃, 从胚珠上小心剥取纤维, 直接在田间棉株上采集其他材料幼叶、花瓣和蕾。所有试验材料收获后立即投入液氮速冻, 然后置-70 °C 超低温冰箱保存。

1.2 RNA 提取

用改良的 CTAB 法提取不同发育时期的纤维(5、10、15、20 和 25 DPA)以及不同器官(叶、花、蕾)的混合样品总 RNA^[21]。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的 28S 和 18S rRNA 比例, 以评估总 RNA 的完整性。使用 BECKMAN COULTER 的 DU800 核酸/蛋白质分析仪检测 RNA 的浓度和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值。

1.3 基因芯片的筛选

美国 Affymetrix 的棉花基因组芯片是高密度的寡核苷酸基因芯片, 具有总计 23 977 个探针组, 每一探针组由 11 对特异的寡核苷酸探针组成, 涵盖了 21 854 个棉花转录本。芯片中的探针序列来源于 GenBank、dbEST 和 RefSeq, 覆盖了 *Gossypium hirsutum* UniGene 数据库(Build 2, August 2006)、*Gossypium arboretum*、*Gossypium barbadense* 以及 *Gossypium raimondii* UniGene 数据库(Build 2, September 2005) (<http://www.affymetrix.com/>)。

1.4 芯片杂交数据分析

将提取的 RNA 送上海晶泰生物技术有限公司进行基因芯片分析。取适量 cRNA 与芯片杂交, 用高分辨率扫描仪 GeneChip Scanner 3000 对染色后的芯片进行扫描。对每张芯片的数据先进行标准化, 即将芯片所有探针组的 Signal 从小到大排序, 去掉 2% 最大的和 2% 最小的后, 将剩下探针组的平均信号值调整到 500。然后利用 GeneChip Operating Software (GCOS), 及 MAS5 方法进行数据均一化, 综合考虑 PM 和 MM 探针的信号值来判定基因的表达情况和变化情况。

芯片分析分为单张芯片分析和比较分析两部分。首先根据检测到的杂交信号, 算出 P -value, 根据每个探针组 11 对 PM/MM 探针对信号值的一系列统计学方法计算出一个显著性 P -value, 通过 t 检验域值(取默认值 0.015)确定 P -value 的上下限。 P -value 落在 0~0.05 被视为检出(P, present), 落在 0.065~0.100 被视为未检出(A, absent), 0.050~0.065 之间的被认为处于检出与未检出的临界状态(M, marginal)。之后对两张芯片的杂交数据进行比较, 以 NMGA-140 纤维发育 10 DPA 的材料为参照, 以 NMGA-062

纤维发育 10 DPA 基因表达变化的 Signal log₂ Ratio 值确定基因的上下调关系。由于是取 2 的对数关系, 在计算表达变化倍数的时候以 2 的倍数呈现。上调 2 倍以上(UP 2 fold)的 Signal log₂ Ratio 值大于等于 1; 下调 2 倍以上(DOWN 2 fold)的 Signal log₂ Ratio 值小于等于 -1; Signal log₂ Ratio 值等于 0 的时候表明没有变化。

1.5 差异表达基因的功能预测

利用 COG 库(cluster of genes)和 COGNITOR 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>), 做差异表达基因的功能预测。

1.6 实时荧光定量 PCR 的检测

将已提取的 NMGA-062 和 NMGA-140 纤维发育 10 d 以及各个组织的 RNA 利用 Promega 公司 AMV 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。

在已注释的差异表达基因中, 挑选差异表达显著的 8 个基因(上调 5 个基因, 下调 3 个基因), 以 18S 基因为内参对照, 使用美国 Promega 公司的 GoTaq qPCR Master Mix, 进行实时荧光定量 PCR 的检测, 以验证基因芯片的分析结果。依据其芯片上探针组对应的代表序列, 委托 TaKaRa 公司设计 8 对定量 PCR 引物(表 1), 退火温度为 60 °C, 由 Invitrogen 公司合成引物。使用 Roche 的 Light Cycler480 荧光定量 PCR 仪分析结果。采用双标准曲线法分析 2 个材料间的相对表达量, $F = \text{样品 1 目的基因浓度} / \text{样品 2 看家基因浓度} / \text{样品 2 目的基因浓度} / \text{样品 2 看家基因浓度}$ 。

2 结果与分析

2.1 棉花基因组芯片的质控评估

Affymetrix 基因芯片的质控包括设计、合成和终产品的信号强度 3 个环节。在前 2 个环节中, Affymetrix 借用了 2 个相关的成熟技术的质控方法, 即寡核苷酸合成和半导体工业的技术标准。另外, 他们在芯片上设计了特殊的对照探针, 通过对对照探针进行质检就能很好地显示整张芯片的质量。信号的判断是通过杂交实验实现的, 在芯片上设计了特殊的探针进行信号的质量监控, 从而检测芯片是否能产生足够的信号。

从芯片杂交实验质控评估结果来看, NMGA-062 和 NMGA-140 各项芯片实验参数满足 Affymetrix 质量控制标准。芯片上基本没有人为的刮痕, 不存在大于芯片面积 2.5% 的痕迹; 平均杂交背景信

表 1 实时荧光定量 PCR 所用基因及其引物序列
Table 1 Gene and primers for quantitative RT-PCR analysis

探针编号 Probe Set	NCBI 登录号 Accession number	基因名称 Gene name	引物序列 Sequence	引物长度 Length (bp)
		18S	-F 5'-AACCAAACATCTCACGACAC-3' -R 5'-GCAAGACCGAAACTCAAAG-3'	20 19
<i>GhiAffx.24112.1.S1_at</i>	DW509612	<i>ARF1</i>	-F 5'-GGGATGCTGTGCTTCTTGTGT-3' -R 5'-GCTGACGAAGGGAGTGAAGG-3'	21 20
<i>Ghi.8448.1.S1_x_at</i>	AF521240	β - <i>tub1</i>	-F 5'-TAACTATGTCGGCACTTC-3' -R 5'-AATCAATTCAGCTCCTTC-3'	18 18
<i>Ghi.9969.2.S1_s_at</i>	DT557030	β - <i>tub10</i>	-F 5'-TCTCAGTCTTCCCATCACAAA-3' -R 5'-TGTC AACACCATACTACTATCC-3'	22 23
<i>Ghi.6953.1.S1_s_at</i>	DQ116442	<i>ACO1</i>	-F 5'-TGCCCCAAACCTGACCTAA-3' -R 5'-ATCCACTGACCATCCTTGAGAA-3'	19 22
<i>Gra.2198.1.A1_at</i>	CO100609	<i>SAHH</i>	-F 5'-CAGCTCCCAGATCCGTCTTC-3' -R 5'-CACCAACTAATCTCTCCCTCATCC-3'	20 24
<i>Ghi.10655.1.S1_s_at</i>	DN780602	Unknown	-F 5'-GCTTCTATCACTGCTCGTT-3' -R 5'-CCTTGCTGCCTTCAAAT-3'	19 17
<i>Gra.1759.1.S1_s_at</i>	CO087419	<i>TUA6</i>	-F 5'-GTGGATCTTGAGCCTACTGTTATTG-3' -R 5'-CGAAGTTGTTGGCAGCGTCT-3'	25 20
<i>Ghi.4663.1.A1_x_at</i>	DT051323	<i>TUA7</i>	-F 5'-CCGAGGTTAGAGGGCAGTA-3' -R 5'-GCACGAAGGCACGTTTGG-3'	20 18

号值低于 50, 满足不大于 100 的标准; *Oligo B2* 探针在杂交矩阵的边缘处亮度为交替出现, 每个拐角处出现棋盘形图案, 棉基因组芯片的名称 (GeneChip Cotton) 位于芯片左上方; 杂交信号中, *BioB* 作为代表, 其检出率高于 50%, *BioC*、*BioD* 和 *cre* 的信号值均比 *BioB* 的信号强; RPT 文件 (.rpt) 所列的芯片上的内参基因中至少有一个基因, 其 3' 端的探针集合的杂交信号不超过其 5' 端探针集合的杂交信号的 3 倍。

2.2 单张芯片杂交信号的分析结果

从表 2 可以看到 NMGA-062(8479/24029) 和 NMGA-140(10447/24029) 有 1/3~1/2 的探针没有检测到信号, 杂交结果表明 NMGA-062(15170/24029) 比 NMGA-140(13198/24029) 有更多的探针能检测到信号。

表 3 表明在 NMGA-062 与 NMGA-140 中未表达的探针有 7 673 个, 表达的探针有 12 427 个; 在

NMGA-062 中表达而在 NMGA-140 中未表达的探针有 2 495 个, 在 NMGA-140 中表达而在 NMGA-062 中未表达的探针有 682 个, 加上边缘表达的探针, 可以看出 NMGA-062 的探针表达(15 550) 比 NMGA-140 (13 582) 多一些, 纤维较长的材料比纤维较短材料更容易检测到杂交信号。

2.3 两张芯片对比分析的结果

图 1 中红点代表重复样本两者均表达, 黄点代表两者均不表达, 蓝点代表其中之一表达。图中共有 8 条斜线, 平行对称分布着 2 倍、3 倍、10 倍、30 倍 Fold change lines, 它们由上至下分别为 30、10、3、2、-2、-3、-10 和 -30, 筛选出来的差异表达基因应该位于 2 和 -2 线外, 这 2 条平行线 (NMGA-062 和 NMGA-140 信号比值为 ± 2) 以内的基因表达无明显差异。在基因表达谱中可见基因分布较为分散, 偏离这 2 条线, 表明两张芯片间存在差异表达的基因。

表 2 芯片杂交结果
Table 2 Results of single array analysis

基因型 Genotype	没有检测到信号的探针数目 No. of genes without signals (A: absent)	边缘地检测到信号的探针数目 No. of genes with M (M: marginal)	检测到信号的探针数目 No. of genes with P (P: present)	总数 Total No.
NMGA-062	8479	380	15170	24029
NMGA-140	10447	384	13198	24029
Total	18926	764	28368	48058

表 3 NMGA-062 和 NMGA-140 杂交结果比较
Table 3 Comparison of single array analysis

	NMGA-062 中没有检测到信号的探针数 NMGA-062 without signals (A: absent)	NMGA-062 中边际地检测到信号的探针数 NMGA-062 with M (M: marginal)	NMGA-062 中检测到信号的探针数 NMGA-062 with P (P: present)	总数 Total
NMGA-140 中没有检测到信号的探针数 NMGA-140 without signals (A: absent)	7673(31.93%)	279(1.16%)	2495(10.38%)	10447
NMGA-140 中边际地检测到信号的探针数 NMGA-140 with M (M: marginal)	124(0.52%)	12(0.05%)	248(1.03%)	384
NMGA-140 中检测到信号的探针数 NMGA-140 with P (P: present)	682(2.84%)	89(0.37%)	12427(51.72%)	13198
总数 Total	8479	380	15170	24029

图 1 NMGA-062 与 NMGA-140 基因芯片杂交信号散点图
Fig. 1 Scatter Graph of NMGA-062 and NMGA-140

按差异显著性标准筛选出在 NMGA-062 和 NMGA-140 两个样本中差异表达的转录本 7 282 条, 占筛选转录本总数的 30.31%, 其中表达上调的转录本有 4 534 条, 表达下调的转录本有 2 748 条。其中差异表达倍数在 2 倍或 2 倍以上的转录本有 3 993 条, 占筛选转录本总数的 16.62%, 在海岛棉中表达上调倍数大于等于 2 的转录本有 2 548 条, 表达下调的转录本有 1 445 条。

2.4 差异表达基因的功能预测

利用 COG 数据库对 NMGA-062 和 NMGA-140 差异表达倍数在 2 倍或 2 倍以上转录本进行功能分类, 根据所参与的代谢过程分为 23 类(图 2)。这些差异表达的基因中功能预测基因(15.57%)和翻译、核糖体结构相关基因(13.54%), 翻译后修饰、蛋白质转换相关基因(9.29%)是 3 个主要的分类。

2.5 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

为了验证芯片数据的可靠性, 对 8 个(上调 5 个基因, 下调 3 个基因)差异表达显著的基因(Change P -value < 0.001; \log_2 Ratio > 1.5 即差异表达倍数大于 3 倍, 表 4), 进行了实时荧光定量 PCR 的检测。结果表明检测基因的表达趋势在基因芯片和实时定量 PCR 两种检测手段中表现出一致性, 说明芯片数

据具有生物学意义上的可重复性, 结果是可信的。

由图 3 可以看出, 5 个上调表达的基因中, β -*tub1* 基因和 β -*tub10* 基因在 NMGA-062 和 NMGA-140 发育 10 d 的纤维和各个不同器官(叶、花、蕾)中差异表达显著, 上调表达很明显。*ARF1* 基因和 *ACO1* 基因在 NMGA-062 中纤维发育 10 DPA 的表达量高于 NMGA-140, 且 *ACO1* 基因在发育 10 d 的纤维中表达量明显高于其他部位(叶、花、蕾), 在纤维中优势表达。*SAHH* 基因在 NMGA-062 中是纤维优势表达的基因, 但在 NMGA-140 中则没有这种优势。3 个下调表达的基因中差异表达倍数较大的未知功能基因 *Ghi.10655.1.S1_s_at* 在 NMGA-062 和 NMGA-140 品种中纤维发育 10 DPA 的表达量显著高于其他部位(叶、花、蕾), 推测此未知功能基因可能与纤维发育长度有密切关系, 有待后续试验的进一步验证。*TUA6* 和 *TUA7* 基因在 NMGA-062 和 NMGA-140 中的表达趋势是一致的。*TUA6* 在纤维和蕾中的表达量较高而 *TUA7* 在纤维和花中的表达量较高。

2.6 β -*tub1*、 β -*tub10* 和 *ARF1* 基因的实时荧光定量 PCR 检测

实时荧光定量 PCR 结果表明, β -*tub1*、 β -*tub10* 和 *ARF1* 基因在 NMGA-062 和 NMGA-140 中差异表

达明显, 表明 *ARF1* 基因在 NMGA-062 和 NMGA-140 棉纤维发育起始期 5 DPA 就开始高量表达, 之后逐渐升高, 到纤维发育 10 DPA 时表达量最大, 然后表达量逐渐下降, 直至纤维发育 25 DPA 时降到最低。而且 *ARF1* 基因在纤维发育 5~10 DPA 时, NMGA-062 的表达量显著高于 NMGA-140。*β-tub1* 基因在 NMGA-062 和 NMGA-140 中的表达趋势是一致的, 即纤维发育 5 DPA 时表达量很低, 10 DPA 时开始急剧上升, 到 15 DPA 时表达量最高, 随后又

快速下降, 直到 25 DPA。*β-tub10* 基因在 NMGA-062 和 NMGA-140 中的表达趋势有所不同, 且在 NMGA-062 中纤维发育各个时期显著高调表达。*β-tub10* 基因在 NMGA-062 中纤维发育初期 5 DPA 时有较高水平的表达, 到发育 10 DPA 时表达有所下降, 然后逐渐上升至 15 DPA 时达到最高表达, 之后急剧下降至 25 DPA 时达到最低表达。而在 NMGA-140 中, 纤维发育 10 DPA 时表达量最高, 其余各个时期的表达量都很低。

图 2 差异表达基因的预测

Fig. 2 Functional groups of the significantly differentially expressed genes

表 4 基因芯片中与纤维发育相关差异表达明显的基因

Table 4 Significantly and fiber-related differentially expressed genes for qRT-PCR

探针编号 Probe Set ID	GenBank 登录号 GenBank accession number	基因名称 Gene name	log ₂ 比值 log ₂ ratio	P 值 P-value
<i>GhiAffx.24112.1.S1_at</i>	DW509612	<i>Gossypium hirsutum</i> mRNA for ADP-ribosylation factor (<i>ARF1</i> gene)	4.8	0.000020
<i>Ghi.8448.1.S1_x_at</i>	AF521240.1	Xu-142 beta-tubulin 1 (<i>β-Tub1</i>)	3.2	0.000023
<i>Ghi.9969.2.S1_s_at</i>	DT557030	Beta-tubulin 10 (<i>β-Tub10</i>)	2.7	0.000020
<i>Ghi.6953.1.S1_s_at</i>	DQ116442	<i>Gossypium hirsutum</i> ACC oxidase 1 (<i>ACO1</i>)	2.3	0.000067
<i>Gra.2198.1.A1_at</i>	CO100609	Transcribed locus, strongly similar to NP_193130.1 adenosylhomocysteinase S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase AdoHcyase (<i>SAHH</i>) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	1.9	0.000052
<i>Ghi.10655.1.S1_s_at</i>	DN780602	Transcribed locus	-4.9	0.999980
<i>Gra.1759.1.S1_s_at</i>	CO087419	<i>Gossypium hirsutum</i> alpha-tubulin (<i>TUA6</i>)	-2.5	0.999973
<i>Ghi.4663.1.A1_x_at</i>	DT051323	<i>Gossypium hirsutum</i> alpha-tubulin (<i>TUA7</i>)	-1.7	0.999980

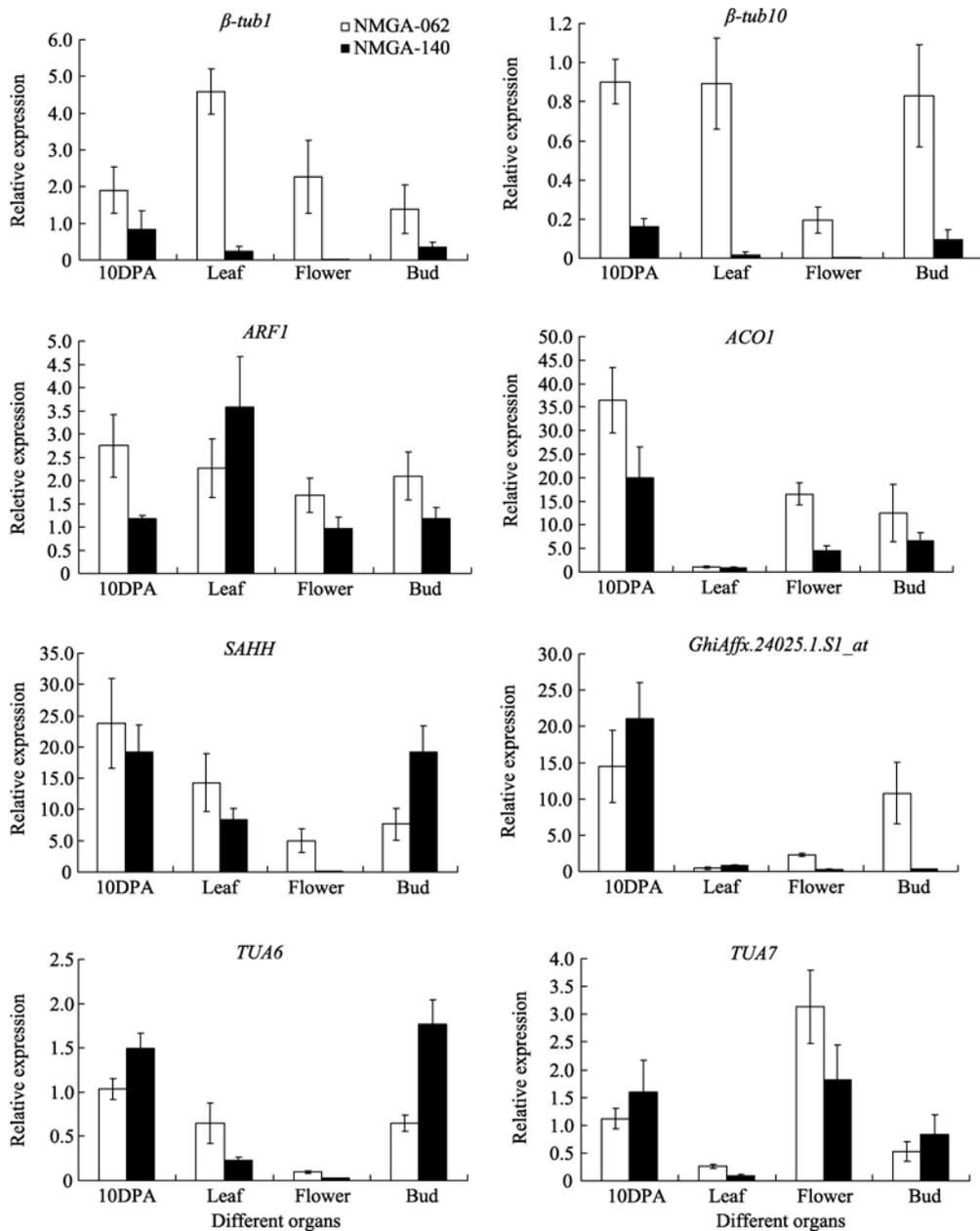


图 3 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证结果

Fig. 3 Differential gene expression for fiber-related genes in fiber and other organs of NMGA-062 and NMGA-140

3 讨论

对基因芯片结果的准确性,不同的报道具有很大的差异。这些差异可能源自不同生物学实验手段本身的局限性,或者由于不同实验室所掌握的技术水平参差不齐^[22-23]。本研究从筛选到的显著差异表达基因中选取 8 个基因序列设计引物进行基因实时荧光定量 PCR 表达分析,以验证基因芯片数据分析

的准确性和可靠性。结果表明,8 个待检测基因在 NMGA-062 和 NMGA-140 基因芯片和实时定量 PCR 两种检测手段中表现出高度的一致性(吻合率达 100%)。基因芯片和实时荧光定量 PCR 技术都是基因表达分析的关键技术,本实验中基因芯片的分析结果得到实时荧光定量 PCR 检测技术的确认,是利用基因芯片实验筛选显著差异表达基因的前提和基础,也表明本研究及其数据的可靠性和准确性。

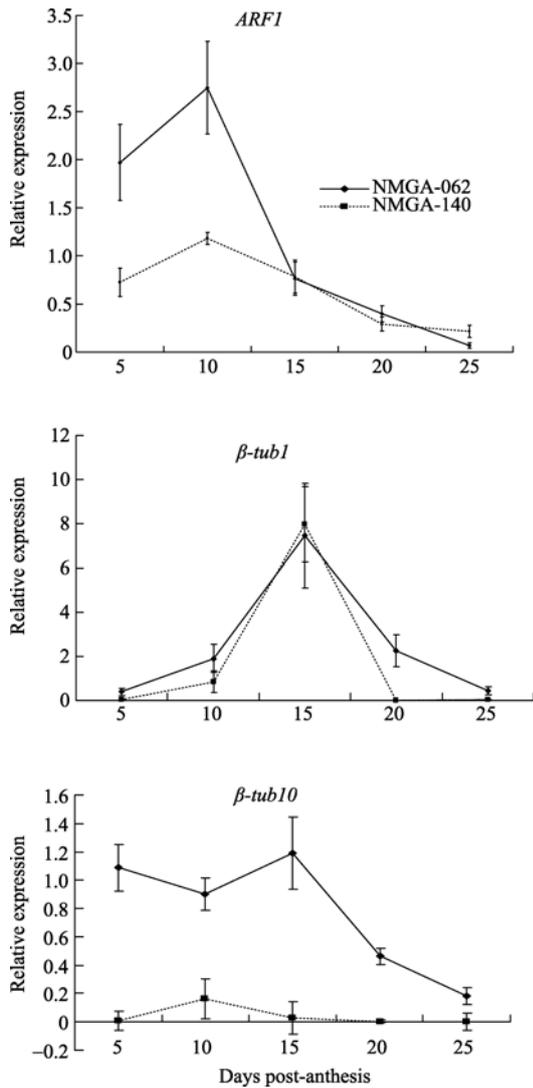


图 4 β -tub1、 β -tub10 和 *ARF1* 基因的实时荧光定量 PCR 检测结果

Fig. 4 Differential gene expression for *ARF1* and β -tubs in different fiber development stages of NMGA-062 and NMGA-140

本研究挑选的 7 个已知基因, 在生殖器官和营养器官的定量验证结果显示差异表达明显, 但均非纤维中特异或优势表达的基因。一个未知功能基因 *Ghi.10655.1.S1_s_at* 的实时荧光定量结果表明其可能是纤维特异基因。本实验中 *ACO1* 在伸长时期 (10DPA) 高表达, Shi 等^[16]报道乙烯在纤维细胞的伸长过程中起关键作用。编码 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶 1-3 (*ACO1-3*) 的基因是乙烯生物合成的关键基因, 它在纤维伸长期大量表达。此外, 乙烯释放总量与 *ACO* 基因表达量以及胚珠培养中纤维的生长速度是一致的。*SAHH* 在棉花生长和棉纤维发育中的作用还不明确^[24], Li 等^[9]通过 cDNA 微阵列技术分

离到一个 *SAHH* 基因, 该基因在棉纤维细胞中高表达。本实验在芯片比对下调的结果中找到一个来源于拟南芥中 *SAHH* 基因, 其在 NMGA-062 和 NMGA-140 中均有表达, 但表达量没有明显差别。

微管(microtubule)是真核细胞中几种主要的细胞质骨架纤丝之一, 它的主要结构成分是微管蛋白(tubulin)。在棉纤维细胞中, 迄今已经识别出 9 种 α -tubulin 和 7 种 β -tubulin 蛋白^[25]。由本实验结果可以看出, 这 4 个 *tublin* 基因均不是纤维优势表达的基因。这个结果符合 *tubulin* 作为构成细胞骨架的基因家族, 在棉纤维及其他不同组织部位中组成型表达, 其在纤维结构形态建成中起非常重要的作用。本研究的 2 个 α -tubulin 基因可能与纤维发育密切相关, 有待后续试验进一步验证。2 个 β -tubulin 基因在纤维发育不同时期的实时荧光定量 PCR 结果显示其在纤维快速伸长期(5~15 DPA)大量表达, 且在上半部平均长度较大的材料 NMGA-062 中的表达量显著高于上半部平均长度较小的材料 NMGA-140, 这 2 个 β -tublin 基因的表达量与纤维长度发育呈正相关, 表明其在纤维发育过程中的重要作用。前人的研究结果也指出 β -tublin 基因在细胞快速伸长和初生壁合成中的重要作用^[26-27]。ADP-ribosylationfactor (*ARF*) 是 GTP 结合蛋白, 属于小 G 蛋白超家族中的 *ARF* 亚家族成员, 在高尔基体小囊泡形成以及细胞信号传导中起重要作用^[28]。本文所研究的 *ARF1* 基因与任茂智等^[29]从陆地棉中克隆的 *ARF* 基因的表达是一致的, 研究表明该基因不仅在纤维中表达, 而且在棉花的蕾、花和铃壳中优势表达, 参与对整个生殖器官分化和发育的调控。本研究还发现 *ARF1* 基因在纤维发育起始期 5 DPA 和快速伸长期 10 DPA 时大量表达, 推测这个基因可能对纤维细胞的伸长发育有着重要的调控作用, 但关于 *ARF1* 基因在棉纤维伸长发育中的具体功能有待进一步研究证明。这些差异表达的基因与纤维伸长发育有关, 值得进一步的研究。

4 结论

通过实时荧光定量 PCR 技术验证了一些差异表达显著的基因, 并发现 *ARF1*、 β -tub1、 β -tub10 在纤维伸长发育时期(10 DPA 和 15 DPA)大量表达。为以后克隆及功能验证纤维伸长相关基因提供了重要参考。

References

- [1] Xiang S-K(项时康), Yu N(余楠), Hu Y-C(胡育昌), Tang S-R(唐淑荣), Xiong Z-W(熊宗伟), Yang W-H(杨伟华). Discussion on the current situation of cotton quality in China. *Acta Gossypii Sin* (棉花学报), 1999, 11(1): 1–10 (in Chinese with English abstract)
- [2] Ferguson D L, Turley R B. Comparison of protein profiles during cotton *Gossypium hirsutum* L. fiber cell development with partial sequences of two proteins. *Agric Food Chem*, 1996, 44: 4022–4027
- [3] Schubert A M, Benedict C R. Cotton fiber development kinetics of cell elongation and secondary wall thickening. *Crop Sci*, 1973: 704–709
- [4] Kim H J, Triplett B A. Cotton fiber growth in planta and *in vitro*. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1361–1366
- [5] Basra A S, Malik C P. Development of the cotton fiber. *Int Rev Cytol*, 1984, 89: 65–113
- [6] Shang-Guan X-X(上官小霞), Wang L-J(王凌健), Li Y-E(李燕娥), Liang Y-S(梁运生). Progress in studies on molecular mechanism of cotton fiber development and quality improvement. *Cotton Sci* (棉花学报), 2008, 20(1): 62–69 (in Chinese with English abstract)
- [7] Luo D(罗达). Latest advances in mechanisms of cotton fiber development from China. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2006, 4(3): 1–3 (in Chinese with English abstract)
- [8] Zhang H(张辉), Tang W-K(汤文开), Tan X(谭新), Gong L-L(龚路路), Li X-B(李学宝). Progresses in the study of gene regulation of cotton fiber development. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2007, 24(2): 127–133 (in Chinese with English abstract)
- [9] Li C H, Zhu Y Q, Meng Y L, Wang J W, Xu K X, Zhang T Z, Chen X Y. Isolation of genes preferentially expressed in cotton fibers by cDNA filter array and RT-PCR. *Plant Sci*, 2002, 163: 1113–1120
- [10] Arpat A, Waugh M, Sullivan J P, Gonzales M, Frisch D, Main D, Wood T, Leslie A, Wing R, Wilkins T. Functional genomics of cell elongation in developing cotton fibers. *Plant Mol Biol*, 2004, 54: 911–929
- [11] Zhao G R, Liu J Y. Isolation of a cotton RGP gene: a homolog of reversibly glycosylated polypeptide highly expressed during fiber development. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1574: 370–374
- [12] Gou J Y, Wang L J, Chen S P, Hu W L, Chen X Y. Gene expression and metabolite profiles of cotton fiber during cell elongation and secondary cell wall synthesis. *Cell Res*, 2007, 17: 422–434
- [13] Wang H Y, Yu Y, Chen Z L, Xia G X. Functional characterization of *Gossypium hirsutum* profilin 1 gene (*GhPEN1*) in tobacco suspension cells. Characterization of *in vivo* functions of a cotton profilin gene. *Planta*, 2005, 222: 594–603
- [14] Li X B, Fan X P, Wang X L, Cai L, Yang W C. The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. *Plant Cell*, 2005, 17: 859–875
- [15] Li X B, Cai L, Cheng N H, Liu J W. Molecular characterization of the cotton *GhTUB1* gene that is preferentially expressed in fiber. *Plant Physiol*, 2002, 130: 666–674
- [16] Shi Y H, Zhu S W, Mao X Z, Feng J X, Qin Y M, Zhang L, Cheng J, Wei L P, Wang Z Y, Zhu Y X. Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation. *Plant Cell*, 2006, 18: 651–664
- [17] Ouyang B, Yang T, Li H X, Zhang L, Zhang Y Y, Zhang J H, Fei Z J, Ye Z B. Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. *J Exp Bot*, 2007, 1: 1–14
- [18] Yin H Y, Zhao Y C, Zhang Y, Zhang H W, Xu L Z, Zou Z, Yang W P, Cheng J, Zhou Y X. Genome-wide analysis of the expression profile of *Saccharomyces cerevisiae* in response to treatment with the plant isoflavone, wightone, as a potential antifungal agent. *Biotechnol Lett*, 2006, 28: 99–105
- [19] Chaudhary B, Hovav R, Rapp R, Verma N, Udall J A, Wendel J F. Global analysis of gene expression in cotton fibers from wild and domesticated *Gossypium barbadense*. *Evol Dev*, 2008, 10: 567–582
- [20] Hovav R, Udall J A, Hovav E, Rapp R, Flagel L, Wendel J F. A majority of cotton genes are expressed in single-celled fiber. *Planta*, 2008: 319–329
- [21] Jiang J-X(蒋建雄), Zhang T-Z(张天真). Extraction of total RNA in cotton organs with CTAB-acidic phenolic method. *Cotton Sci* (棉花学报), 2003, 15(3): 166–167 (in Chinese with English abstract)
- [22] Wang H-S(王洪水), Hou X-S(侯相山). Research progress of gene chip technology. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2007, 35(8): 2241–2243 (in Chinese with English abstract)
- [23] Udall J A, Flagel L E, Cheung F, Woodward A W, Hovav R, Rapp R A, Swanson J M, Lee J J, Gingle A R, Nettleton D, Town C D, Chen Z J, Wendel J F. Spotted cotton oligonucleotide microarrays for gene expression analysis. *BMC Genomics*, 2007, 8: 1471–2164
- [24] She Y-B(余义斌), Zhu Y-C(朱一超), Zhang T-Z(张天真), Guo W-Z(郭旺珍). Cloning, expression, and mapping of *S*-adenosyl-

- L*-homocysteine hydrolase (GhSAHH) cDNA in cotton. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(6): 958–964 (in Chinese with English abstract)
- [25] Dixon D C, Seagull R W, Triplett B A. Changes in the accumulation of α - and β -tubulin isotypes during cotton fiber development. *Plant Physiol*, 1994: 1347–1353
- [26] Li Y L, Sun J, Li C H, Zhu Y Q, Xia G X. Preferential expression of a beta-tubulin gene in developing cotton fibers. *Cotton Sci*, 2002, 14 (suppl): 43
- [27] Ji S J, Lu Y C, Li J, Wei G, Liang X J, Zhu Y X. A-beta-tubulin-like cDNA expressed specifically in elongating cotton fibers induces longitudinal growth of fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296: 1245–1250
- [28] Yang Z B. Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*, 2002, 14(suppl): 375–388
- [29] Ren M-Z(任茂智), Chen Q-J(陈全家), Zhang R(张锐), Guo S-D(郭三堆). The structural characteristics, alternative splicing and genetic expression analysis of ADP-ribosylation 1 factor1 (*arf1*) in cotton. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2004, 31(8): 850–857 (in Chinese with English abstract)

科学出版社生物分社新书推介

《生物工程下游技术实验手册》

“十一五”国家重点图书出版规划项目

应用生物技术大系

柯德森 主编

2010年11月出版

定价: ¥ 38.00

ISBN978-7-03-029425-8

开本: B5

营销分类: 生物科学

装帧: 平装

本书较系统地介绍了生物工程下游技术领域所涉及的主要技术手段的原理、操作方法和操作规范。主要包括细胞破碎与固液分离技术、膜分离技术、层析技术和电泳技术以及相关领域常见的仪器设备及其操作方法。在此基础上介绍了 22 项生物工程下游常规实验和 4 项综合性实验。本书实验项目主要为适应高等院校生物工程、生物技术及食品卫生专业本科实践教学的需要而选择和设计, 同时也适用于相关学科的职业技术教育。本书还可供相关专业的研究生及科研人员查阅参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇 电话: 010-64031535 E-mail: zhouwenyu@mail.sciencep.com

网上订购: <http://shop.sciencepress.cn>

联系科学出版中心生物分社: 010-64012501 <http://www.lifescience.com.cn> E-mail: lifescience@mail.sciencep.com

更多精彩图书请登陆网站, 欢迎致电索要书目