

利用 cDNA-AFLP 技术分析老化棉花种子基因差异表达

李 驰^{1,2}, 卢新雄^{2*}, 陈晓玲², 张志娥², 林 凤^{1*}

(1. 沈阳农业大学, 沈阳 110016; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程, 农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

摘要:利用 cDNA-AFLP 技术分析老化棉花种子的基因差异表达, 根据带型可将得到的差异片段分为 5 个类型, 分别回收、克隆 7 个差异片段并利用 BLASTN 和 BLASTX 程序与网上数据库 (NCBI, National Center for Biotechnology Information) 进行同源性分析。其中一条在对照、老化 16 周、28 周种子共有的片段与欧洲板栗 (*Castanea sativa*) 核糖体蛋白 L33 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 核糖体结构组分蛋白具有同源性; 对照种子特有的一条片段与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中氧化还原酶和水稻 (*Oryza sativa*) 2-硝基丙烷双加氧酶相关蛋白具有同源性; 在老化 36 周种子特有的 4 条片段中: 1 条与水稻中被公认的三肽基酶 II 蛋白具有同源性, 而其它 3 条的同源序列功能不详; 此外, 老化 16 周种子特有的一条片段无明显同源序列。

关键词:棉花; 种子老化; cDNA-AFLP; 基因差异表达

中图分类号: S562.035.01 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2007)04-0255-06

Differential Expression Analysis of Aging Cotton Seed (*Gossypium hirsutum*) by cDNA-AFLP

LI Chi^{1,2}, LU Xin-xiong^{2*}, CHEN Xiao-ling², ZHANG Zhi-e², LIN Feng^{1*}

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110016, China; 2. National Key Facility of Crop Gene Resources and Genetic Improvement/ Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology (MOA)/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Through the cDNA-AFLP analysis of aging cotton seeds (*Gossypium hirsutum*) in four different aging degrees, all different expression fragments were divided into five types. Seven DNA fragments were isolated. By blast search results, one fragment corresponding with CK, 16 weeks aging seed and 28 weeks aging seed were homologous with *Castanea sativa* ribosomal protein L33 mRNA and *Arabidopsis thaliana* structural constituent of ribosome AT3G55750 mRNA. One fragment corresponding with CK were homologous with oxidoreductase (*Arabidopsis thaliana*) and 2-nitropropane dioxygenase-related protein-like (*Oryza sativa*). One of four fragments corresponding with 36 weeks aging seed were homologous with putative tripeptidyl peptidase II (*Oryza sativa*). one fragment corresponding with 16 weeks aging seed was found no significant homologous sequence in data base.

Key words: cotton (*Gossypium hirsutum*); seed aging; cDNA-AFLP; differential expression

目前种质保存的最主要方式是在低温种质库中保存, 但种质在低温库中的保存也存在问题, 其

中最主要的就是种子老化问题, 表现为发芽率的降低^[1-3], 在低的发芽率条件下进行繁种更新会造

成遗传结构的改变,发生遗传漂变或遗传漂移,尤其是遗传上的异质种质材料,更容易受种子老化的影响失去原有的遗传完整性^[4]。对种子老化机理的研究对于种质资源保藏具有很重要的现实意义。

cDNA-AFLP技术^[5]是一种新的研究基因表达的技术,因其具有可靠性高、重复性好、假阳性率低^[6],不需要预先知道序列信息,且所需仪器设备简单的特点,被广泛应用于生物体基因表达特性的研究。本研究以不同老化水平的棉花种子冀无538为材料,运用cDNA-AFLP技术来研究不同老化水平棉花种子在吸水48h后基因的差异表达,期望在基因表达水平上研究种子老化引起的差异表达,为种子老化机理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料及处理

以在40℃并密封包装条件下分别老化16周、28周、36周的棉花种子冀无538为材料,发芽率分别为76%、66%、58%,以未老化棉花种子冀无538作为对照,发芽率为99%。分别取不同老化程度的种子若干粒,吸水48h,取胚根突破种皮的种子(以保证是活种子)3粒,混合提取RNA进行研究。

1.2 实验方法及步骤

1.2.1 RNA的提取。应用TIANGEN BIOTECH (BEIJING)CO,LTD的总RNA提取试剂来提取RNA,操作步骤按照试剂说明书来进行操作。

1.2.2 cDNA的合成。按照TaKaRa公司的M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit介绍的方法,先以Oligo(dT)18Primer为引物,合成cDNA第一链,然后通过*E. coli* RNase H使杂合链中RNA形成单链切口,在*E. coli* DNA Polymerase I与*E. coli* DNA ligase的作用下合成cDNA第二条链。

1.2.3 cDNA-AFLP分析。cDNA 400 ng,10 U· μL^{-1} Mse I和EcoR I各0.5 μL ,Mse I NEB-uffer2 2 μL ,100×BSA 0.2 μL ,用ddH₂O补足至20 μL ,37℃下酶切2h,然后65℃处理20 min,加入Mse I和EcoR I人工接头(50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各1.2 μL ,T4-连接酶(400 U· μL^{-1})0.25 μL ,T4 buffer 1 μL ,用ddH₂O补足至30 μL ,20℃下连接2h,产物稀释5倍备用。稀释后产物2.0 μL ,

M₀和E₀(50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)各2.0 μL ,10×PCR buffer 2 μL ,dNTP 1.6 μL ,Taq酶(2.5 U· μL^{-1})0.24 μL ,用ddH₂O补足至20 μL ,进行预扩增。预扩增引物序列:E₀ 5'-GACTGCGTACCAATTC-3',M₀ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'。PCR反应为变性94℃ 30 s,退火56℃ 30 s,延伸72℃ 1 min,30个循环,产物稀释20倍备用。稀释后产物4.0 μL ,引物(50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)各2.0 μL ,10×PCR buffer 2 μL ,dNTP 1.8 μL ,Taq酶(2.5 U· μL^{-1})0.24 μL ,用ddH₂O补足至20 μL ,进行选择扩增。选择性扩增引物序列:EcoR I primers E₀-AAC,E₀-AAG,E₀-ACA,E₀-ACT,E₀-ACG,E₀-AGC,Mse I primers M₀-CAC,M₀-CAG,M₀-CAT,M₀-CTA,M₀-CTC,M₀-CTG。PCR反应为变性94℃ 30 s,退火65℃ 30 s并且每个循环降低0.7℃,延伸72℃ 1 min,35个循环,产物备用。

1.2.4 电泳及银染。选择性扩增产物加上样缓冲液,变性后通过6%聚丙烯酰胺变性凝胶进行电泳,分离后用硝酸银染色,染色完成后统计结果。

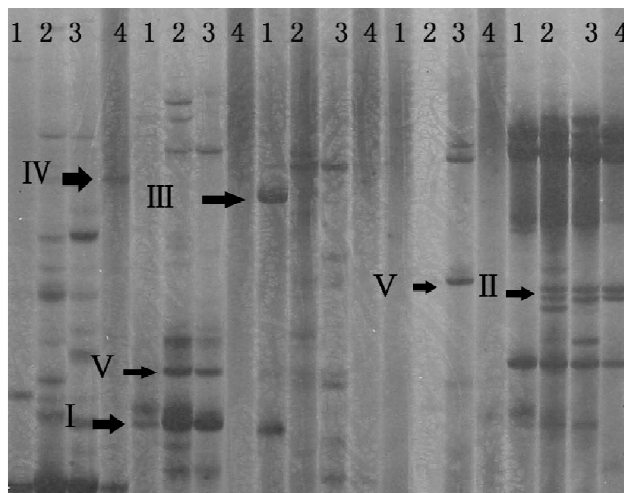
1.2.5 差异片段的回收、克隆及测序。选择明显的差异条带进行回收,回收按照TIANGEN BIOTECH (BEIJING)CO,LTD的聚丙烯酰胺凝胶DNA回收试剂盒说明书进行操作。用TIANGEN BIOTECH (BEIJING)CO,LTD的pGM-T连接试剂盒进行回收条带的克隆,所得阳性克隆由中国农业科学院开放实验室进行测序。

1.2.6 序列比较分析。对获得序列利用BLASTN和BLASTX程序与网上数据库(NCBI, National Center for Biotechnology Information)进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 不同老化程度棉花种子基因表达差异分析

通过cDNA-AFLP方法在4种不同老化程度的棉花种子样品中扩增出的差异条带主要有如下几种类型(图1)。I型为对照、老化16周、老化28周棉花种子共有而老化36周棉花种子没有的条带,这类条带代表老化程度相对低时能够表达而老化程度高时不能够表达的一类基因;II型为对照没有而老化16周、28周、36周棉花种子共有条带,这类条带代表在老化条件下才表达的基因;III型为对照特有带,这类条带代表在老化条件下受影响而不表达的基因;IV型为老化36周棉



1、2、3、4 分别为对照、老化 16 周、28 周、36 周棉花种子样品；I、II、III、IV、V 分别指示五种不同的带型。

图 1 不同老化程度棉花种子 cDNA-AFLP 差异表达图谱

Fig. 1 Expression fragments of different aging degree cotton seeds by cDNA-AFLP

花种子特有条带,这类条带代表只有在老化程度相对很高的条件下才表达的基因;V 型为老化 16 周、28 周棉花种子各自具有或者共有条带,这类条带的出现很可能意味着种子老化的过程并不是单一因素或单一基因造成的,而是由很多基因参与,其中一些基因只在一定老化程度范围内起作用(比如老化 16 周特有条带可能代表在老化初期表达的一类基因)。在这 5 种条带类型中,I 型、III 型、V 型条带数量比较多,而 II 型、IV 型条带数量很少。

2.2 差异条带的 BLAST 分析

利用 BLASTN 和 BLASTX 程序与网上数据库进行同源性比较,对 7 条差异片段进行对比和分析,结果见表 1。

3 结论与讨论

自 Bachem 等开发了 cDNA-AFLP 技术以来,此项技术就被广泛的应用于基因差异表达的分析以及特殊功能基因的筛选。田曾元^[7]利用 cDNA-AFLP 技术分析了玉米杂种与亲本之间灌浆期功能叶基因的差异表达,分析了不同条带类型同杂种优势的关系;郭丽琼等^[8]利用 cDNA-AFLP 技术分离了 5 个草菇冷诱导表达基因的片段;李凌等^[9]利用 cDNA-AFLP 技术得出了一条花椰菜中白花株系特有片段;Dellagi 等^[10]利用 cDNA-AFLP 方法分离了不同环境条件下植物病原基因表达的不同序列;Kojima 等^[11]利用 cDNA-AFLP 技术克隆了小麦控制麦穗形态和脱粒性状的 Q 基因;Van 等^[12]利用 cDNA-AFLP 技

术分离了寄生虫侵染拟南芥相互作用诱导的一些基因片段;Qin 等^[13]分离了几个线虫侵染土豆过程中特异表达的基因片段。

本研究尝试将 cDNA-AFLP 技术应用于棉花种子老化的基因差异表达的研究,试图找出与棉花种子老化有关的基因,结果证明是可行的。在研究中,以不同老化程度的棉花种子为材料,通过 cDNA-AFLP 技术扩增出很多与棉花种子老化相关的差异片段,大致分为五种类型(I、II、III、IV、V),其中 I 型、III 型条带的出现可以推测为棉花种子老化现象的出现是由于一些基因的表达受到抑制,造成其功能或对应的蛋白质的功能下降而引发了老化现象;II 型、IV 型条带的出现可以推测为棉花种子老化现象的出现是由于一些平时不易表达的基因的特异表达,其产物抑制种子活力,造成种子老化现象的产生,或者是一些老化的标志性产物;而 V 型条带的出现可能意味着整个老化的过程并不是由于单一基因的变化所引起的,有可能是多个基因相互作用的结果,这些基因的表达与老化程度相关联,很可能是一连串在老化条件下连续表达的基因中间的一环。

利用 BLASTN 和 BLASTX 程序将 7 条差异片段与网上数据库进行同源性比较,其中 5 号片段(III 型)与氧化还原酶同源性最高,推测在老化过程中其表达受到抑制,造成氧化还原能力下降,这与老化过程中质膜过氧化现象一致^[14-16];1 号片段(I 型)与核糖体蛋白同源性最高,而此蛋白又与伤害胁迫有关,推测与抗胁迫相关,在老化过程中受抑制,造成种子活力下降;另外 5 条片段其

同源系列功能不详或是无显著同源序列。以上结果揭示种子老化机理,筛选与种子老化相关基因是可行的。果表明将此项技术应用于种子老化的相关研究,

表 1 BLAST 结果

Table 1 The results of BLAST search

序号	DNA 序列	片段特征	分析方法	同源性	E 值	功能
1	TGATGAGTCCTGAGTAAC ACCAAGGAGGAAGTAGC TTGGTATGCTGGCAAGCG TATGGCTTATATCTACAA GGCCAAAGTGAAGAAGAA TGGCTCACACTATCGCTG CATTTGGGGAAAAGTTAC TAGACCTCATGGTAAACAG TGGGGTTGTTCTGTCTAA GTTCAAGTCTAACCTTCC CCGAAATCAATGGGAG ATAGAGTCAGAGTCTTC ATGTACCCAGCAATAT ATGAGTAGTGTAGATCGA CGACCCGAGTGGCACTC TACCTTCTCACTTTTGTT TTTATGAACTTAGTCAA GATTTTGTGTGCTTTGA ATCAGTCATTTTGTCTC TTTAGGATGGTGAAATA TAAGACTTATTTATCTTT ACATATTTCTATCAAGG GTTTTCCACCTATTTTCT CCTTGAATTGGTACGCA GTCA (425 bp)	为对照、老 化 16 周、老 化 28 周种 子共有条带	BLASTN	与欧洲板栗核糖体 蛋白 L33 mRNA 同源性为 86% gi:13430185	2E-40	在分析欧洲 板栗在栗树 枯萎菌感染 下 mRNA 的差异表达 时分离得到
				与拟南芥核糖体 AT3G55750 mR- NA 的结构成分同 源性为 85% gi:30694313	9E-33	
			BLASTX	欧洲板栗核糖体 蛋白质 L33 同源性 为 93% gi:13430186	2E-34	
				与 5 种核糖体结 构组分蛋白同源性 为 91% gi:15222276	1E-33	
2	TGACTGCGTACCAATTCA GGGGTTGACAAAGCTGC GTTGTGATATACTTATAT CCACGCCACTTCGCTTGA GTTTCAGCTATCAAGAAAA GGAAACTTGATTTGAGCA GGTTTGGCACTTATAATT GTCTTTATGGATACAATT AGTTTCTCATCTTAGATT GTAGAGAGACCAATAGG ATGAGTATGTAGTTACTC AGGACTCATCA(207 bp)	为老化 16 周种子特有	BLASTN	无显著同源序列	/	/
			BLASTX	无显著同源蛋白质	/	/

序号	DNA 序列	片段特征	分析方法	同源性	E 值	功能
3	TGATGAGTCCTGAGTAA CATGTTGGAGCCTGGTA ACATCTCAAGAGCTATT TGTGGAGATCAAATAGG CACCTTAGTTGACCAGT CAGGAAGGATCACATAA AACTAGGAGGATGAAATG GTAGCAGAGCTCCAGGA CATGCCGATACTCTGGG GGGACGTCCTGAATTGGT ACGCAGTCA(180 bp)	为老化 36 周种子特有	BLASTN	与玉蜀黍 PCC074981 mRNA 序列同源性 为 98% gi:21211374	3E-67	不详
			BLASTX	与水稻 (<i>Oryza sa- tiva</i>) 的 OSJNBa 0042I15.5 蛋白同 源性为 87% gi:70664002	3E-08	不详
4	AAGGTATCCTGATCTTG TTCAGGGTGCCAAACAGG AAACAAAGCTTCTCTGACGC TAGAAGTGATCTAGCAAC TATAAGCAAAGGGTGACTC ACCATCAAGGGTACTTAC TTTCTGATCAATGGATAT TCCATGCAGCACAAATCT CAAAATCAACACAGGTA GGTTCATGGCTAGCAAAT TCCACTAGACCAGAACT GGGCTATGGACAACTCC AAAGTTACTCAGGACTC ATCA(230 bp)	老化 36 周 种子特有	BLASTN	与水稻 (<i>Oryza sati- va</i>) 的 cDNA 克隆 J033131G16 的全 长插入序列同源性 为 88% gi:32988724	9E-53	是日产水稻 中 28000 个 全长 cDNA 克隆中的一 个,功能不详
			BLASTX	与水稻 (<i>Oryza sa- tiva</i>) 中被公认的三 肽基酶 II 同源性为 76% gi:50251357	2E-25	
5	TGACTGCGTACCAATT CAGGGTTTTGAGTATGG AATTGTTCAAGGACCT TTGGGACCGGATATTGC TGGTCCGGAGCTAGTTG CTGCTGTTGCAAACGCT GGTGGACTTGGCCTTCT TAGAGCTCCTGATTGGG AATCACCAAGATTATGTGA AAGAGTTGATAAGGAAG ACTCGGAAGTTACTCAG GACTCATCA(195 bp)	对照种子特 有	BLASTN	无显著同源序列	/	/
			BLASTX	与拟南芥中氧化还 原酶同源性为 82% [gi:30697982] 与水稻 (<i>Oryza sa- tiva</i>) 2-硝基丙烷双 加氧酶相关蛋白同 源性为 71% gi:50947021	1E-11	4E-09
6	TGACTGCGTACCAATTC ACCGAACAAAGGGTGG GCATCCGACCAGTTTGT CTTAGCAGACCCGGTTT GTCTTAGCATGAATAGG TGGGGTTTCATACAACC CGCCACACATGGCCACA GGTCTCTCCAGTATAT GAAGGTTTCCATTGCATA CCTTGTGTCTCATATTGT ATGTTCTAATTGCTGAGT CACTTTTGTTACTCAGGA CTCATCA (215 bp)	老化 36 周 种子特有	BLASTN	与玉蜀黍属 CL11797_1 mRNA 序列同源性为 87% gi:21213310	5E-11	不详
			BLASTX	无显著同源蛋白质	/	/

序号	DNA 序列	片段特征	分析方法	同源性	E 值	功能
7	GACTGCGTACCAATTCAC ACATACTACGAAACCGAC TGCTAACCAGCAATTTTTTA CATAAGGAAGAGTTGTC CACCAGTAAAGAAGTGC TAGAATTTTTTACACAAG GAAGAGCTGCCCAGCA GTCAAAAATCCAGCCGAT TTGCCTGTTACTACTATC CTCCTGAGATGCTGACG GCTACCTTCGCAGAGC TGCACTGCCCGGTGCTT GGGACCTTGAGTCCCA TGTCGATCCGTTGTTAC TCAGGACTCATCA (252 bp)	老化 36 周 种子特有	BLASTN BLASTX	与玉蜀黍属 CL10277_1 mRNA 序列同源性 95% gi:21214126 无显著同源蛋白质	5E-101 /	不详 /

参考文献:

- [1] SPECHT C E, Keller E R J, Freytag U, et al. Survey of seed germinability after long-term storage in the Gatersleben genebank [J]. Plant Genetic Resources Newsletter, 1997(111): 64-68.
- [2] SPECHT C E, Keller E R J, Freytag U, et al. Survey of seed germinability after long-term storage in the Gatersleben genebank (part 2) [J]. Plant Genetic Resources Newsletter, 1998(115): 39-43.
- [3] 卢新雄, 崔聪淑, 陈晓玲, 等. 国家种质库部分作物种子生活力监测结果与分析 [J]. 植物遗传资源科学, 2001, 2(2): 1-5.
- [4] IBPGR. Annual Report 1989 [M]. Rome: IBPGR, 1990: 26.
- [5] BACHEM C W B, Hoeven R S, 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 [J]. The Plant Journal, 1996, 9(5): 745-753.
- [6] MONEY T, Reader S, Li J Q. AFLP-based mRNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24(13): 2616-2617.
- [7] 田曾元, 戴景瑞. 利用 cDNA-AFLP 技术分析玉米灌浆期功能叶基因差异表达与杂种优势 [J]. 科学通报, 2002, 47(18): 1412-1416.
- [8] 郭丽琼, 林俊芳, 杨丽卿, 等. 应用 cDNA-AFLP 技术分离草菇冷诱导表达基因 [J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 54-59.
- [9] 李凌, 宋文芹, 毛英伟, 等. 用 cDNA-AFLP 银染技术研究花椰菜花色相关的基因 [J]. 南开大学学报 (自然科学), 2000, 33(4): 33-36.
- [10] DELLAGI A, Birch P R J, Heilbronn J. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora* [J]. Microbiology, 2000(146): 165-171.
- [11] KOJIMA T, Habu Y, Iida S. Direct isolation of differentially expressed genes from a specific chromosome region of common wheat; application of the amplified fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting (AMF) method in combination with a deletion line of wheat [J]. Mol Gen Genet, 2000(263): 635-641.
- [12] VAN DER BIEZEN E A, Juwana H, Parker J E. cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(8): 895-898.
- [13] QIN L, Overmars H, Helder J. An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato Cyst Nematode *Globodera rostochiensis* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(8): 830-836.
- [14] 朱世东, 张志伟. 蔬菜种子老化与膜脂过氧化作用 [J]. 园艺学报, 1995, 22(4): 394-396.
- [15] ANURADHA G, Ajay K G, Inder S S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds [J]. Journal of Plant Physiol, 2003(160): 1093-1100.
- [16] NARAYANA U M, Murthy, Prakash P K, et al. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek; lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(384): 1057-1067. ●