

文章编号: 1000 - 582X (2005) 11 - 0138 - 04

声波刺激对拟南芥基因表达的影响*

王伯初, 张进, 段传人, 王道红

(重庆大学 生物工程学院 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400030)

摘要: 运用银染 mRNA 逆转录差异显示 (DDRT-PCR) 技术, 初步研究了声波刺激对拟南芥差异基因表达的影响. 研究分离得到 SA3、SG2 - 1、SG2 - 2、SG7 - 1、SG7 - 2、CA2 共 6 个差异表达基因片段, 进一步运用 Northern 点杂交确定 SA3、CA2、SG7 - 1 为阳性片段, 其中 SA3 片段属于声波刺激特异表达基因, SG7 - 1 片段属于声波刺激增强表达基因, CA2 片段属于声波刺激抑制表达基因. 研究结果表明植物在基因水平对声波刺激具有响应, 为下一步探索植物响应声波应力的分子生物学调控机理奠定了基础.

关键词: 声波刺激; 拟南芥; 差异显示

中图分类号: Q68

文献标识码: A

由 Liang 等^[1]于 1992 年首次建立的 mRNA 差异显示聚合酶链式反应技术 (mRNA differential display PCR, DD-PCR) 是目前在筛选、克隆差异表达基因方面广为应用的技术. 该方法通常采用测序胶放射自显影来显示扩增条带, 虽然有敏感性高的优点, 但是易造成放射性同位素污染, 且实验周期长, 对实验条件要求也较高^[2]. 银染方法的建立, 始于 1979 年对蛋白质的染色^[3], 以后逐渐应用于核酸. 在笔者的研究中, 采用银染 mRNA 差异显示分析了声波刺激后的拟南芥, 并获得了 3 个阳性片段.

1 材料与方法

1.1 材料

将拟南芥分为声波刺激组和对照组, 声波刺激的声强为 100 dB, 频率为 1 000 Hz 对刺激组刺激 9 d, 每天刺激 60 min, 实验组接受刺激时, 对照组也拿出培养箱, 放置在与实验组条件一致的环境中.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

采用 RNeasy PlantMini 试剂盒提取刺激组和对照组的总 RNA.

1.2.2 逆转录

在本次实验中, 根据文献 [4] 合成 3 种锚定引物, oligo - d(T) 10M (M = G, A, C). 在每管刺激组和对照

组中加入 1.26 μg RNA 样品, 然后加入锚定引物, 锚定引物和样品的总体积达到 11 μL , 不足 11 μL 时加入 DEPC 处理水补足. 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 育温混合物 5 min, 在冰上冷却, 加入: 4 μL , 5 \times 逆转录缓冲液; 2 μL , 10 mmol/L 4 \times dNTP; 20 mmol/(min \cdot L), RNase 抑制剂; 加 DEPC 水定容至 19 μL . 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 育温 5 min, 加 1 μL , 2.0 \times 10⁵ mol/(min \cdot L²) 的 MMuLV 逆转录酶, 混合后在 42 $^{\circ}\text{C}$ 育温 60 min, 加热至 70 $^{\circ}\text{C}$ 并维持 10 min 停止反应, 然后于冰上冷却.

1.2.3 PCR

在 PCR 扩增中所选用的锚定引物和逆转录中的锚定引物相同, 随机引物设计为: HAP1, AAGCTTGAT-TGCC; HAP2, AAGCTTCGACTGT; HAP3, AAGCTTT-GGTCGA; HAP4, AAGCTTCTCAACG; HAP5, AAGCT-TAGTAGGC; HAP6, AAGCTTCGACCAT; HAP7, AAGCTTAACGAGG; HAP8, AAGCTTTTACCGC.

按照每个锚定引物和 8 个随机引物配对, 每个样品用 3 个锚定引物, 则共有 24 个引物对. 在 PCR 扩增中所选用的锚定引物和逆转录中的锚定引物相同.

1.2.4 电泳

采用 Bio-Rad 的电泳槽和电泳仪, 进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳. 取 3.5 μL PCR 产物与 2 μL 甲酰胺上样缓冲液混合, 置 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min, 将样品加入 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上, 恒定电压 45 V 电泳约

* 收稿日期: 2005 - 07 - 08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470431)

作者简介: 王伯初 (1962 -), 男, 江苏宜兴人, 重庆大学教授, 博士, 从事植物生物力学工程和生物制药工程研究.

3.5~4 h 加样前先将凝胶加样孔中的尿素用加样器冲干净,以利于得到高分辨率的差异显示 cDNA 片段。

1.2.5 银染

参考 Carlos^[5]和 Brant^[6]的方法对硝酸银染色方法进行改进.银染步骤:1)固定,加入 100 mL 固定溶液(10%乙醇,1%醋酸),轻轻摇动 10 min 2)漂洗,用蒸馏水洗胶 1 min 3)预处理,用 100 mL 1.5%的硝酸预处理 3 min,轻轻振荡.4)漂洗,加入蒸馏水漂洗 1 min 5)银染,用 100 mL 0.2%的 AgNO₃溶液染色 20 min 6)漂洗,用蒸馏水漂洗胶 2次,每次 15 s 7)显色,先用 100 mL 冷显色液(30 g/L Na₂CO₃, 0.2%的 37%甲醛)显色,轻轻振荡,直到溶液变黑色,再用 200 mL 冷显色液重新显色 4~7 min,直到条带显出满意的亮度后,去掉显色液.8)终止,加入 100 mL 的 5%的醋酸 5 min 停止显色,用蒸馏水洗胶.整个染色过程在 1 h 内可以完成。

1.2.6 二次 PCR 扩增

使用 Beyotime 公司 DNA 凝胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收 DNA.用回收的 cDNA 水溶液作模板进行第 2 次 PCR 扩增,引物组合和条件与第 1 次 PCR 相应的相同,然后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 Northern 杂交

将总 RNA 于 70 °C 变性 5 min,取 2 μL 点到带正电荷的尼龙膜上,自然干燥后重复点样 2 次.干燥后,于 80 °C 烘烤 2 h,固定 RNA.采用 North2South Direct HRP(horseradish peroxidase)标记检测试剂盒(Peirce, USA)进行杂交。

2 结果分析

2.1 总 RNA 样品

将提取的拟南芥总 RNA 用紫外分光光度计测定在 260 nm 和 280 nm 的 OD 值,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 2 用变性琼脂糖凝胶电泳对 RNA 完整性进行鉴定.从图 1 可以看出,RNA 基本未降解,28S RNA 带的亮度基本是 18S RNA 带的 2 倍,说明所提取的总 RNA 样品质量较高,可以满足后续 DDRT-PCR 和 Northern 杂交的实验需要。

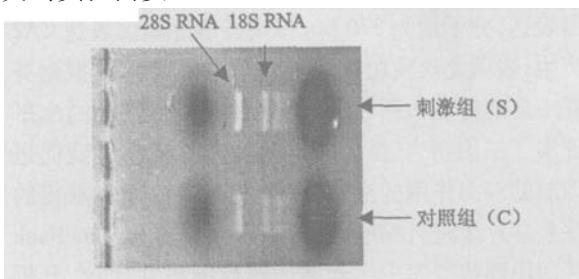


图 1 总 RNA 琼脂糖电泳

2.2 银染结果

电泳完毕后,用银染法检测不同材料基因转录水平上的差异,根据差异片段的大小和重复性结果笔者选取了 6 条条带,结果见图 2 片段 SA3 的大小为 270 bp,片段 CA2 的大小为 370 bp,片段 SG2-1 的大小为 300 bp,片段 SG2-2 的大小为 190 bp,片段 SG7-1 的大小为 580 bp,片段 SG7-2 的大小为 290 bp。

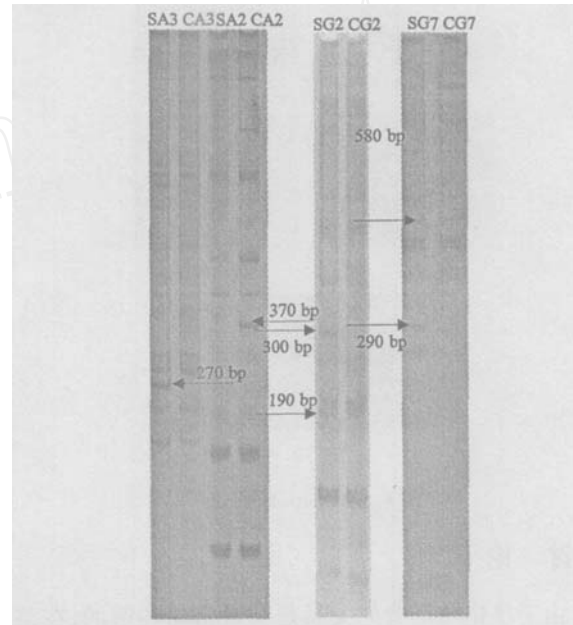


图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

2.3 二次扩增结果

1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 3,由图 3 可见从变性聚丙烯酰胺凝胶上回收的差异片段中除 SG2-2 片段重扩增后没有出现条带外,其余的均为单一扩增带.将 SG2-2 片段的重扩增产物稀释 100 倍后,再重新扩增后电泳,在琼脂糖胶上仍然不显示条带.将 SG2-2 片段作为假阳性,予以丢弃。

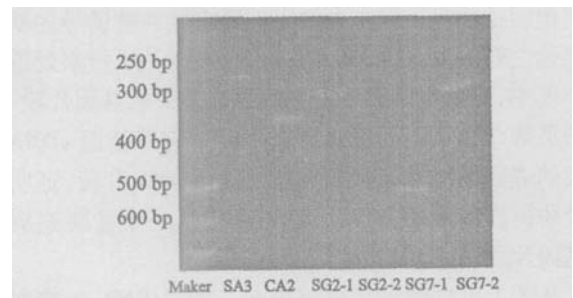


图 3 差异条带二次 PCR 电泳图

2.4 Northern 点杂交

用 SA3, CA2, SG2-1, SG7-1, SG7-2 这些片段重扩增纯化后的 cDNA 做探针,和提取到的对照组与刺激组的总 RNA 进行杂交,以检测其是否与声波刺激

有关.采用 Northern点杂交的方式检测剩下的 5 个差异片段的真阳性,如图 4. SG2 - 1 在声波刺激组和对照组中表达水平相当,片段 SG7 - 2 在声波刺激组和对照组中都不表达,这 2 个片段均属于假阳性. SA3、CA2、SG7 - 1 3 个属于阳性片段,片段 SA3 和 SG7 - 1 来源于刺激组,CA2 片段是来源于对照组中.

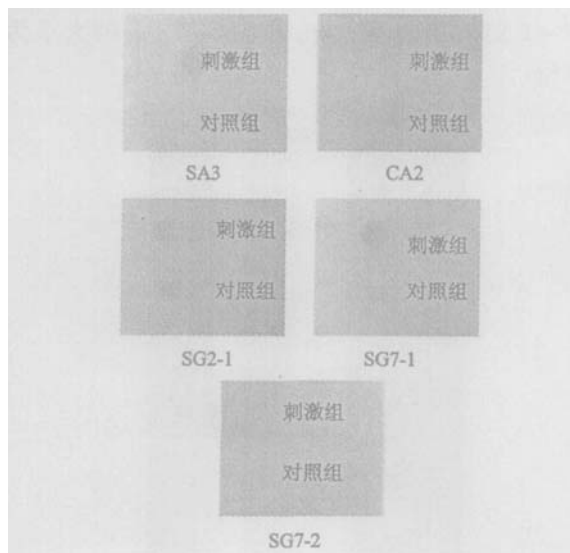


图 4 Northern点杂交

3 讨论

由于植物与环境的关系是非常密切和谐的,在某一特定环境因素的长期影响下,植物形成了适应于该环境的形态、内部结构和生理特征.除了必须的生存条件对植物的生长发育起作用外,植物不可避免地要受到自然的或人为施加的影响,如水、盐、干旱、电磁场、化学物质等,在植物生理上,表现为植物对外界胁迫的一种适应性和抗逆性;从根本上,则是植物基因在转录水平上差异性表达的结果.近年来,差异显示技术已被大量地应用于分离植物差异表达基因的研究中.为了阐明植物对外界应力的表型适应性和被诱导的基因表达之间的关系,Khaled Masmoudi等^[7]从盐水处理过小麦中,分离克隆到一条与盐胁迫有关的基因片段.王振英等^[8]分析了黑麦盐胁迫条件下应答基因 cDNA 片段的表达特性,得到 3 个差异表达 cDNA 片段,证明与盐胁迫直接有关,其中 SB00 可能是一个盐胁迫应答基因片段.

从图 1 可以看出刺激组拟南芥的总 RNA 条带亮度明显高于对照组的亮度,并且紫外分光光度计测定的刺激组的 RNA 含量较对照组的高,这表明经过声波刺激后拟南芥 RNA 含量有较大的提高.王秀娟对菊花进行实验也得到同样的结果^[9],她发现经过声波刺激菊花幼苗后, RNA 和可溶性蛋白均有较大的提高.这

个过程有可能是发生了外界条件所诱发的不遗传变异,在声波刺激下使有关应力响应基因开启,转录相应的 mRNA 并翻译出蛋白质. Braam^[10-11]用 Northern 分析也指出,植物受刺激 10 min 后 mRNA 含量明显升高,但在受刺激后 1~3 h 又基本恢复到原来水平. Braam 认为这是细胞内部调节系统活动的结果,因而不是不遗传变异,是植物对外界环境的一种适应性.

图 2 的结果表明,在不同引物对之间,在扩增的 cDNA 条带数和信号强度两方面均有所差异.一般每对引物对扩增出 20~30 条条带,其分子量绝大部分分布在 100 以上.不同引物对扩增的 cDNA 片段差异性不同.有的引物对除了扩增条带强弱有所差异外,其余条带数几乎没有差别,说明 mRNA 的种类相同.在检测到的差异片段中,在刺激组中获得 5 个,为 SA3、SG2 - 1、SG2 - 2、SG7 - 1、SG7 - 2;在对照组中获得 1 个,为 CA2 由此可见,拟南芥在声波刺激后基因表达方面存在差异:某些片段只在声波刺激过的拟南芥中显现,某些只是在对照组中出现,还有些片段在两组中明亮程度不同.这说明,拟南芥经过声波刺激处理后,可能诱导了一些新基因的开启,也可能抑制了一些基因的表达.

由图 3 可见采用银染方法从变性聚丙烯酰胺凝胶上回收的差异片段的效率较高.除去 SG7 - 2 片段重扩增后没有出现条带外,其余的均为单一扩增带,达到了 2 次扩增的目的.由于从胶上切取的 1 条差异条带往往包含迁移率一样的几个 cDNA 片段,并且 PCR 扩增也会造成假阳性,也就是说从胶上得到的差异条带假阳性较高,因此需要对差异条带进行鉴定.

经过 Northern 点杂交检测后,得到 SA3、CA2、SG7 - 1 3 个阳性片段. SA3 片段属于基因的特异表达,SG7 - 1 片段属于基因的优势表达,分子量分别为 270 bp、580 bp.笔者认为 SA3 和 SG7 - 1 片段的产生,表明了声波刺激对拟南芥的生长起到了促进作用. Braam^[12]等人在研究 TCH 基因时,也认为接触、风、黑暗、温度变化等非相关的刺激均对 TCH 的表达产生正调控作用. CA2 片段是拟南芥受到声波刺激后的敏感基因表达,分子量为 370 bp.拟南芥敏感基因表达 CA2 的产生,表明此次实验采用的声波加载模式对拟南芥还有一定的抑制作用.实验结果在分子生物学的水平上证实了王伯初^[13]提出的声波刺激对植物起到促进和抑制的双向作用的推论.在后续研究中,将对获得的阳性差异片段进行测序,获得基因序列后与 GeneBank 等基因序列数据库中已知基因进行同源性比较,分析研究其结构和功能.

参考文献:

- [1] LANG P, PARDEE A B. Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction[J]. Science, 1992, 257(14): 967 - 971.
- [2] MATZM V, LUKYANOV S A. Different Strategies of Differential Display: Areas of Application [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(24): 5 537 - 5 543.
- [3] SWITZER R C, MERRILL C R, SHIFFRIN S. A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels [J]. Anal biochem, 1979, 98: 231 - 237.
- [4] LANG P, ZHU W, ZHANG X, et al. Differential Display Using One-base Anchored Oligo-dT Primers [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 5 763 - 5 764.
- [5] CARLOS J S, EMMANUEL D N, ANDREW F G. Rapid Silver Staining and Recovery of PCR Products Separated on Polyacrylamide Gels [J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914 - 921.
- [6] BRANT J B, GUSTAVO C A, PETER M G. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels[J]. Anal Biochem, 1991, 196: 80 - 85.
- [7] MASMOUDI K, BRNIF, HASSARIA, et al. Isolation and Characterization of a Differentially Expressed Sequence Tag from *Triticum Durum* Salt-stressed Roots[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39(11): 971 - 979.
- [8] 王振英, 郑坚瑜. 用 mRNA 差异显示方法分析黑麦盐胁迫下应答基因 cDNA 片段的表达特性 [J]. 作物学报, 2001, 27(6): 851 - 856.
- [9] WANG XUJUAN, WANGBOCHU, JIAYI, et al. The Effects of Sound Stimulation on Protective Enzyme Activities and Peroxidase Isoenzymes[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 27(1): 59 - 63.
- [10] BRAAM J, DAVIS W. Rain, Wind and Touch Induced Expression of Calmodulin and Related Gene in Arabidopsis[J]. Cell, 1990, 60: 357 - 364.
- [11] BRAMM J. Regulated Expression of the Calmodulin-related TCHs in Cultured Arabidopsis Cells Induction by Calcium and Heat Shock [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 3 213 - 3 216.
- [12] BRAAM J, SISIRUNKM, DIANA H. Regulation and Functions of the Arabidopsis TCH Genes [J]. Planta, 1997, 203: 35 - 43.
- [13] WANGBOCHU, AKD YOSHIKOSHI, AKD SAKANISHI. Carrot Cell Growth Response in a Stimulated Ultrasonic Environment [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1998, 12: 89 - 95.

Primary Study on Sound Effecting the Gene Expressions of *Arabidopsis thaliana*

WANG Bo-chu, ZHANG Jin, DUAN Chuan-ren, WANG Dao-hong
(Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering Under the State Ministry of Education,
College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: The differential expressions of *Arabidopsis thaliana* seedlings under sound stimulation are studied primarily by applying mRNA reverse transcription differential display PCR (DDRT-PCR) with silver staining. To identify the truth of the differentially expressed cDNA fragments, Northern dot is performed. Among six differential expression gene fragments (SA3, SG2-1, SG2-2, SG7-1, SG7-2 and CA2) acquired, SA3, CA2 and SG7-1 are found to be positive fragments. SA3 is differentially expressed and SG7-1 is advantaged expressed, while CA2 is restrained by the sound wave. The results imply that plant has response to sound stimulation at gene level.

Key words: sound stimulation; *Arabidopsis thaliana*; differential display

(编辑 李胜春)