

一种适用于线粒体基因表达分析的 cDNA-RAPD 方法

易平, 万翠香, 汪莉, 朱英国

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉大学生命科学学院遗传研究所, 武汉 430072)

摘要: 由于植物线粒体 DNA 分子结构复杂, 并在与细胞核共进化的过程中形成了自己独特的表达系统, 迄今仍没有一种较好的能够对植物线粒体基因表达进行分析的方法。本文依据线粒体 RNA 的自身特点, 对已用于分析真核 mRNA 的差展方法进行了改进。采用随机六聚体引物取代 oligo(dT)_n, 从而将线粒体 RNA 及其他各类无 poly(A) 尾的 mRNA 纳入到可直接研究的范围, 发展了一种适用于线粒体基因表达分析的方法。

关键词: 线粒体; RAPD; 随机六聚体

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)03-0339-03

A RAPD Method Acceptable for the Analysis of Mitochondrial Gene Expression

YI Ping, WAN Cui-xiang, WANG Li, ZHU Ying-guo

(The Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology and Institute of Genetics, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Several techniques are available in detecting variations in gene expression between different samples, such as SSH, RACE etc. However, they can not be applied to analyze mitochondrial gene expression due to the specific characteristics of mitochondrial RNA. So some modifications were made to the conventional techniques. Here we reported a demonstration of this modified technique, taking rice mitochondria as materials. In this technique, using random hexamers to prime the RT, the resultant cDNA likely included coding regions because it was not locked to the poly (A) tail of the messenger RNA.

Key words: mitochondria; RAPD; random hexamers

线粒体具有独立于染色体之外的遗传物质, 能够进行 DNA 的复制、转录和翻译。然而线粒体基因组仅编码提供线粒体自身生物发生和各项生命功能所需的部分遗传信息, 物种的其余绝大多数遗传信息来源于核基因组。因此, 在细胞核与线粒体共进化的大背景下, 线粒体逐步具备了独立的遗传和生物化学特征, 这些特征在植物界尤为显著^[1]。植物线粒体 DNA 大小介于 200~2500kb, 较动物的线粒体 DNA 大 15~150 倍, 其存在形式多样, 结构复杂^[2]。有时同一物种的不同品种, 乃至同一物种的不同株系, 线粒体 DNA 都可能存在很大的差异。造成线粒体 DNA 结构复杂的主要

原因是分子内或分子间频繁的重组及重排^[3]。

线粒体在植物个体的整个发育过程中发挥着重要的、不可替代的作用。它不仅仅能为植物个体的各种生命活动提供能量, 还控制着植物花粉的正常发育过程^[3-5]。但由于线粒体 DNA 分子结构复杂以及其独特的表达系统, 至今仍未有一种较好的能够对植物线粒体基因表达进行分析研究的方法。

本文结合线粒体 RNA 的自身特点, 对已用于分析真核 mRNA 的差异展示方法进行了改进, 使之成为一种适用于线粒体基因表达分析的方法。

收稿日期: 2001-10-26; 修回日期: 2002-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号: 3070568)

作者简介: 易平(1974-), 女(汉), 四川人, 博士研究生, 主要从事水稻细胞质雄性不育的分子机理研究; E-mail: yyiping@263.net

通讯作者: 朱英国(1939-), 男(汉), 湖北人, 教授, 主要从事植物发育遗传学和植物雄性不育及育性恢复的分子机理等方面的研究, 博士生导师; 电话: 027 87684560, E-mail: zhuyg@public.wh.hb.cn

1 材料和方法

1.1 材料

红莲型水稻粳泰细胞质雄性不育系 A, 保持系 B 和杂种一代 F₁ (红莲一号)。

1.2 线粒体 RNA 的提取

以水稻暗室培养 10 天的黄化苗为材料, 经差速离心和蔗糖密度梯度离心, 分离并纯化无叶绿体的线粒体。线粒体提取的具体操作详见文献[6]。线粒体总 RNA 的提取使用 TRIZOL 试剂, 步骤严格按照试剂说明书进行。

1.3 线粒体总 RNA 的 DNase 处理

为防止总 RNA 中可能混杂的 DNA 分子对后续操作产生不必要的影响, 可先利用无 RNase 的 DNase 进行消化处理。DNase 购自 GIBCO 公司。反应体系为: 总线粒体 RNA 10 μg, 10×DNase 缓冲液 5 μl, DNase(1U/μl) 5 μl, 加 DEPC 处理过的 H₂O 至总体积 50 μl。37℃ 温浴 30 min 后, 加入 1/10 体积的 10×终止反应缓冲液。用水饱和酚和水饱和酚: 氯仿(24:1)和氯仿依次抽提纯化, 异丙醇沉淀, DEPC 处理 H₂O 溶解, -70℃ 保存备用。

1.4 反转录及扩增

反转录反应体积为 25 μl, 其中 RNA 5 μg, 5×M-MLV 缓冲液 5 μl, dNTP (10mmol/L) 2 μl, 随机六聚体引物 (Promega 公司) 100ng, RNasin (200U/μl) 0.2 μl, M-MLV (200U/μl) 2 μl; 步骤是: RNA 65℃ 变性 5min, 冰浴冷却 5min, 迅速加入上述各种成分, 22℃ 复性 10min, 37℃ 温浴 60min, 70℃ 变性反转录酶, 处理 15min, -20℃ 保存备用。

RAPD 反应体积为 25 μl, 其中 *Taq* 酶 1.0 U, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 10×缓冲液 2.5 μl, dNTP 200 μmol/L, DMSO 1 μl, 反转录产物 1 μl, 随机引物 0.5 μmol/L, PCR 程序为 94℃ 2min, 94℃ 2min, 38℃ 2min, 72℃ 1.5min, 36Cycles, 72℃ 延伸 10min, 2% 的琼脂糖胶电泳。

1.5 片段回收与 Northern 分析

利用随机引物标记法标记纯化回收后的扩增产物, 对线粒体总 RNA 进行杂交分析, Northern 杂交条件参照文献[7]。PCR 产物胶回收试剂盒和随机引物标记试剂盒分别购自 CLOTECH 公司和 ROCH 公司。

2 结果

在选用 38℃ 作为复性温度之前, 我们先对 36℃、38℃ 和 40℃ 进行了预实验。结果表明, 40℃ 无扩增产物出现, 36℃ 条件下的重复性差。而 38℃ 复性温度的扩增产物带型好, 保守性强。

运用 RAPD 方法对红莲型水稻粳泰细胞质雄性不育系 A, 保持系 B 和 F₁ 杂种的线粒体 RNA 进行了差展分析。共用 RAPD 引物 25 个, 每个引物均有扩增产物。其中揭示出差异的引物有 18 个, 占所用引物总数的 72%。这 18 个引物中有 10 个扩增出的差异条带为不育系 A 和 F₁ 杂种所特

有, 8 个引物扩增出保持系 B 特有的差异带。单个引物在每个材料中扩增出的带数为 1~3 条。通过 3 次重复 PCR 扩增检测时, 发现 22 个引物的分析结果具有很好的重复性, 且阴性对照(反应体系中无 DNA 模板)检测不到扩增产物。

图 1 是 S103 和 S351 的扩增结果。由图可知 S103 和 S351 在不育系 A 和 F₁ 杂种间的扩增条带无差异, 差异仅表现在不育系 A、F₁ 杂种与保持系 B 之间。如 S103 在保持系 B 线粒体 RNA 中扩增得到二条带, 其中一条是三个材料所共有的, 另外一条 TB 是保持系 B 所特有的。S351 扩增得到了一条不育系 A 与 F₁ 杂种特有的带——TAF, 该带在保持系 B 中缺失。以 TAF 和 TB 为探针, 与红莲型水稻不育系 A, 保持系 B 和 F₁ 杂种苗期线粒体总 RNA 进行 Northern 杂交, 结果三者均有杂交信号(图 2)。TAF 在不育系 A 和 F₁ 杂种中有二个相同的杂交信号, 其中较大的一个转录物在保持系 B 中缺失。TB 在三个材料中均有二个相同的杂交信号, 但在保持系 B 中还有一条特异的杂交带。

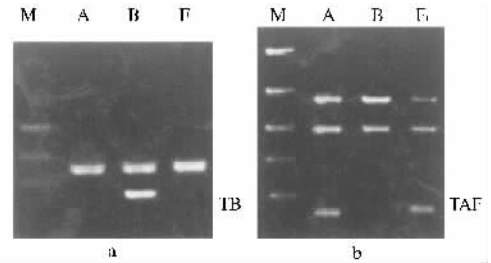


图 1 S103(a)和 S351(b)的扩增结果

Fig. 1 a and b were respectively the cDNA-RAPD profile of primers S103 and S351

DL2000 Marker(bp): 2000, 1000, 750, 500, 250, 100

A: 不育系 (sterile line), B: 保持系 (maintainer line),

F₁: 杂种一代 (hybrid)。

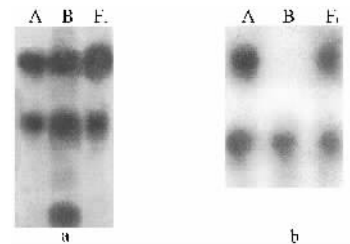


图 2 TB 的 Northern(a)和 TAF 的 Northern(b)分析结果

Fig. 2 a and b showed respectively northern analysis result of mitochondrial RNA with TB and TAF as probes

3 讨论

本文报道了一种可用于对植物线粒体基因表达进行分

析的差异展示技术,该方法较传统的方法有如下一些优点:首先考虑到线粒体 RNA 的自身特点,即 3'端没有 poly(A)尾,采用随机六聚体取代 oligo(dT)_n,从而将线粒体 RNA 及其他各类无 poly(A)尾的 mRNA 纳入到可直接研究的范围,而这些领域是传统方法所无法涉及的。同时该方法对真核生物中 3'端有 poly(A)尾的 mRNA 同样适用。其次,以随机六聚体为引物还可以揭示更多的编码信息。这一方面是由于它扩大了可研究的 RNA 类型,包括 mRNA、rRNA 等;另一方面是由于它不会局限于转录物的某一部分。传统的差异展示方法,如 DD-RT^[8]和 RACE^[9]等仅能分析 mRNA 的 3'端或 5'端的遗传信息,而位于转录物中部的更多的编码信息却得不到揭示。第三,该方法操作简单、方便省时,样品需要量少。这些特点正是目前出现的几种差别显示新技术的主要不足之处。如 cDNA-RDA^[10]及 SSH^[11]方法,二者不仅对样品的需要量大,而且对样品的要求高,即样品之间的差异不能太大。由于获取大量的线粒体 RNA,特别是花药线粒体 RNA 的难度较大,因此本文报道的方法具有一定的实际运用价值,便于对不同时期线粒体基因的表达情况进行研究。

目前大多数学者对植物线粒体的研究是从 DNA 水平入手,利用 RFLP^[12]、AFLP^[13]等分子生物学技术来揭示其差异,极少涉及线粒体 RNA 水平的变化。虽然已有一位研究者^[14]报道了利用改进的 AFLP 方法对线粒体 RNA 进行了研究。但该方法的第一步是利用 T4 RNA 连接酶在线粒体 RNA 的 3'末端加上一段人工合成的单链尾,而 T4 RNA 连接酶本身的连接效率并不高,且易受多种外界因素的干扰。所以这一步实际上已经影响到后续的操作及最终结果。本文中使用的随机六聚体进行反转录的方法,已经是一种成熟的技术,也是 cDNA 文库构建中常常用到的方法。

S351 和 S510 分别在不育系 A、保持系 B 和 F₁ 杂种线粒体中得到了特异片段 TAF 和 TB。由于不育系 A 与保持系 B 属同核异质材料,即二者拥有相同的细胞核,但胞质来源不同;而不育系 A 与 F₁ 杂种则具有相同的胞质和不同的核背景。所以 TAF 和 TB 实际上是不同胞质各自所特有的。Northern 分析证实了这一点,同时也证实了该方法的可靠性。Northern 杂交结果还表明,TAF 及 TB 在线粒体总 RNA 中是以多个转录本的形式存在。这种转录情况在线粒体基因转录中很常见,可能是由线粒体基因本身存在多个转录起始和终止位点以及多个 RNA 加工位点引起的^[15~17]。

生物个体正常的发育过程离不开细胞核与细胞质的协调互作,离不开基因的选择性表达。因此发展新的可用于线粒体基因表达分析的技术对于深入理解基因的时空表达,阐明发育生物学的一些重要理论问题具有重要意义。

参 考 文 献 (References):

[1] Mackenzie S, McIntosh L. Higher plant mitochondria [J].

Plant Cell, 1999, 11: 571~586.

- [2] Narayanan K K, Senthikamer P, Sridhar V V. Organization of the mitochondrial *cob2* pseudogene in different lines of rice [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 1087~1099.
- [3] Hanson M R. Plant mitochondria mutations and male sterility [J]. Annu Rev Genet, 1991, 25: 461~86.
- [4] Kempken F, Pring DR. Male sterility in higher plants—fundamentals and application [J]. Prog Bot, 1998, 60: 140~166.
- [5] Schnable P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration [J]. Trends in Plant Science, 1998, 31: 75~180.
- [6] Mignouna H, Vermin S S, Briquet M. Mitochondrial DNA modifications associated with cytoplasmic male sterility in rice [J]. Thero Appl Genet, 1987, 74: 666~669.
- [7] Thomas P S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77: 5201~5205.
- [8] Liang P, Pardee A B. Recent advances in differential display [J]. Curr Opin Immunol, 1995, 7: 274~280.
- [9] Liu X, Gorovsky M A. Mapping the 5' and 3' ends of *Tetrahymena thermophila* mRNA using RNA ligase mediated amplification of cDNA and (RLM-RACE) [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21: 4954~4960.
- [10] Hubank M and Schatz D G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA [J]. Nucleic Acid Research, 1994, 22: 5640~5648.
- [11] Diatchenko L, Chris L Y-F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6925~6930.
- [12] 李小明, 郑用琏, 张方东, 等. 红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 DNA 的 RFLP 分析 [J]. 遗传, 2000, 22: 201~204.
- [13] 凌杏元, 周培疆, 关和新, 等. 运用 AFLP 技术筛选分离野败型水稻 mtDNA 中与雄性不育相关的片段 [J]. 遗传, 1999, 21: 33~36.
- [14] 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 mtRNA 差异显示和差别片段的分析 [J]. 植物学报, 2000, 42: 284~288.
- [15] Wise R P, Gobeiman-Werner D P, Dill C L, et al. Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm Maize [J]. The Journal of Heredity, 1999, 90: 380~385.
- [16] Hanson M R, Wilson R K, Bentolila S, et al. Mitochondrial gene organization and expression in *Petunia* male fertile and sterile plants [J]. The Journal of Heredity, 1999, 90: 362~368.
- [17] Lupold D S, Angelina G F, Caoile S, et al. Genomic context influences the activity of maize mitochondrial *cox2* promoters [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 11670~1168.