

利用 mRNA 差异显示技术寻找甘蓝型油菜黄籽基因

刘列钊¹, 栗茂腾², 王 灏², 林 呐¹, 谌 利¹, 孟金陵², 李加纳¹

(¹西南农业大学农学与生命科学学院, 重庆 400716; ²华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 以两组不同来源的甘蓝型黄籽油菜近等基因系为材料, 利用 mRNA 差异显示技术对 90 对随机引物和锚定引物组合进行筛选, 获得 1 个能稳定重复出现的差异 cDNA 片段。以该差异片段为探针经 Northern 杂交验证了上述结果, 推测该差异片段可能和种皮色泽差异形成有关。对该差异片段进行了克隆、测序, 并根据此序列设计了 2 个嵌套特异引物, 利用 PCR-Walking 技术延伸该差异片段, 对该延伸序列进行克隆、测序及序列同源性分析。同时对 mRNA 差异显示技术应用过程中的相关问题进行了探讨。

关键词: 甘蓝型油菜; 黄籽基因; 近等基因系; mRNA 差异显示

Studies of Yellow-seeded Gene in *Brassica napus* with mRNA Differential Display

LIU Lie-zhao¹, LI Mao-teng², WANG Hao², LIN Na¹, CHEN Li¹, MENG Jin-ling², LI Jia-na¹

(¹College of Agronomy and Life Sciences, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716; ²The National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: A repetitive and steady differential cDNA fragment was obtained by screening 90 pairs of random primers and anchor primer combination by using mRNA differential display technique in two groups of different origin NIL of yellow-seeded *Brassica napus*. Northern blotting confirmed the result by using the differential cDNA fragment as probe, and sepeculated that the differential cDNA fragment might be related to the color gene of *Brassica napus*. The differential cDNA fragment was cloned and sequenced and two nesting primers was designed to extend the fragment by PCR-Walking technique. The sequence analysis revealed that the cloned cDNA fragment might be related to the development of *Brassica napus* seed color. Some problems in mRNA differential display were discussed.

Key words: *Brassica napus*; Yellow-seeded gene; NIL; mRNA differential display

甘蓝型油菜黄籽基因的研究和利用是近年来油菜研究领域的热点, 黄籽油菜育种是油菜高效育种的主攻方向。但因黄籽基因的遗传背景复杂, 不同材料得出的结果不尽相同, 甚至完全相反。如刘后利等认为黄籽粒色可能受 2~3 对隐性基因控制^[1, 2]; 李殿荣却认为甘蓝型油菜黄籽性状由两对独立遗传的显性互补基因控制^[3, 4]。近年来, 对油菜黄籽粒色基因分子水平上的研究也主要利用各自的材料^[5-7], 所获标记与目标基因还有一定的遗传距离, 若以此为基础分离与黄籽相关的基因十分困难。另外, 黄籽材料来源不

同, 所获结果无法相互验证, 更难以借鉴和利用, 从而大大制约了黄籽基因的深入研究。为此, 本研究利用 mRNA 差异显示技术, 以期避开材料本身复杂的 DNA 背景, 找到与黄籽粒色形成有关的基因功能片段。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1995 年, 笔者所在的课题组从已自交 10 代以上、农艺性状整齐一致、黄籽度较好且来源不同的 8 个黄

收稿日期: 2003-03-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970385), 重庆市科委应用基础资助项目(410670)和国家高技术发展研究计划资助项目 (2001AA241103、2002AA207009)

作者简介: 刘列钊 (1973-), 男, 四川泸州人, 博士研究生, 主要从事油菜生物技术研究。李加纳为通讯作者, Tel: 023-68251950; E-mail: jianali2001@hotmail.com

籽品系中, 选出少量黑籽单株自交, 以后每代都与相应的黄籽品系相间种植, 选择性状整齐一致、粒色无分离的单株自交保存, 2000 年建立了 8 对关于粒色基因的近等基因系。在这些近等基因系中, 黄籽株系黄籽率达 100%, 黄籽度 80% 以上, 黑籽株系籽粒全为黑籽。本试验选用的 2 对近等基因系来源: 甘蓝型 (*B. napus*) × 芥菜型 (*B. juncea*) 组合后代, 分别记为 Ynj (黄籽材料)、Bnj (黑籽材料); 甘蓝型 (*B. napus*) × 白菜型 (*B. campestris*) 组合后代, 分别记为 Ync (黄籽材料)、Bnc (黑籽材料)。

2001 年秋播于西南农业大学实验农场, 顺序排列, 每份材料种植 100 株。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 按 Genhunter Corporation RNA image™ Kit 序列进行设计。下游反转录引物锚定碱基为 1 个, 并在引物 5' 端引入 1 个 Hind III 酶切位点, 即 5' AAG CTT TTT TTT TTT G(C、A)3'。上游为 7 个碱基的随机引物, 且也在 5' 端引入 1 个 Hind III 酶切位点。引物由上海 Sangon 合成。

1.2.2 材料获取 2002 年 3 月标记各单株的初花期。初花 40 d 时, 各材料分别取 10 株未成熟角果的混合样。

1.2.3 总 RNA 提取 总 RNA 提取液 Trizol Reagent 购于 GIBCO-BRL 公司, RNA 提取方法参考 Trizol™ kit (公司) 说明进行。冰上剥取花后 40 d 的种子种皮, 在 0.1 g 材料中加入约 1 ml Trizol。提取的 RNA 用 DNase 处理后, 再用饱和的酚抽提 1 次, 乙醇沉淀后用 ddH₂O 进行溶解, Beckman 紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 值, 计算 RNA 浓度。用甲醛变性凝胶电泳检测, 确证其未发生降解。

1.2.4 反转录合成 cDNA 第一链 cDNA 合成参照 Genhunter Corporation RNA image™ Kit (公司) 说明进行。在 20 μl 反应体系中, 加入 2 μg 总 RNA、200U 的 MMLV 反转录酶、2 μl 25 μmol L⁻¹ 反转录引物、2 μl 10 mmol L⁻¹ dNTP、20U RNasin、1 × RT Buffer, 42℃ 反应 1 h, 反应结束后稀释 5 倍用于 PCR 分析。

1.2.5 PCR 反应 根据 Genhunter Corporation RNA image™ Kit 做适当调整, 加大 dNTP 浓度及引物用量。在 20 μl 体系中, 加入 2 μl 25 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0.4 μl 10 mmol L⁻¹ dNTP, 2.0 μl 随机引物, 1.0 μl Taq DNA 聚合酶。

PCR 反应程序为: (94℃ 30 s → 40℃ 2 min → 72℃ 30 s) × 40 个循环 → 72℃ 10 min → 4℃。PCR 产物用

1% 琼脂糖电泳检测后, 再用 5% 聚丙烯酰胺凝胶 80W 恒功率电泳 2 h, 银染检测。

1.2.6 差异 cDNA 片段的回收及重新扩增 按 Peng Liang^[8] 的方法煮沸回收差异 cDNA 片段, 作适当稀释后用上述 PCR 反应体系及扩增程序重新扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 再用 5% 聚丙烯酰胺胶电泳检测, 确保其为单一的 DNA 片段。

1.2.7 Northern 杂交分析 Northern 杂交方法参考《精编分子生物学实验指南》, [³²P] dCTP (3 000 uci mmol⁻¹) 购于美国杜邦公司, 将变性胶中甲醛浓度降低到 0.22 mol L⁻¹。从聚丙烯酰胺胶上回收的差异 cDNA 片段经重新扩增后, 用 QIAGEN Gel Extraction Kit 回收。用随机引物标记方法标记回收的 DNA 片段作为探针, 检测差异分析材料总 RNA, 洗膜时间和曝光时间由信号强弱而定。

1.2.8 差异片段的克隆及序列分析 差异片段经重新扩增、回收纯化后, 与 pMD18-T 载体 (载体 Kit 购于大连宝生物公司) 连接, 连接方法参考 pMD18-T Vector kit 说明进行。连接反应液转化 DH_{10B} 菌株, 经 Hind III 酶切和 PCR 扩增鉴定后, 摇取新鲜菌液, 寄往大连宝生物公司进行 DNA 序列测定。

1.2.9 利用 PCR-Walking 方法延伸该差异片段 根据获得的序列, 设计 2 个嵌套引物 GSP1: 5' -TAGATATGTACCAGAGTCG-3' SP2: 5' -GAC-AAAGAAGACCATGTGTCG-3'。用 BamHI、EcoRI、XbaI 酶切基因组 DNA 后, 参考 YADE (Y-Shaped Adaptor Dependant Extension)^[12] 法并作一定修改, 进行 DNA 片段的延伸。获得的延伸产物按 1.2.8 方法进行克隆、测序。将获得的 DNA 序列在 Genbank 中进行序列同源性分析。

2 结果与分析

2.1 mRNA 差别显示

在 mRNA 差别显示过程中, 所扩增的 cDNA 片段一般在 500~50 个碱基对之间, 平均每个泳道检测到 60~80 个条带。用 90 对随机引物与锚定引物组合对 2 组黄籽材料的初步筛选发现, 虽然在 1 对黄籽和黑籽近等系之间, 出现的差异片段较多, 但 2 对黄籽和黑籽近等系之间共有的差异 cDNA 片段只找到 3 个, 其中 2 个差异 cDNA 片段仅出现在黑籽材料中, 但未能重复出现。引物对 AP9: AAGCTTCATTCCG 和 P1: AAGCTTTTTTTTTTTTTTTTG 获得的差异 cDNA

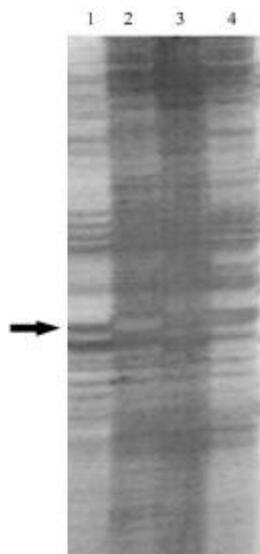
在黄籽材料中表达强度较黑籽高, 2 组黑籽材料和黄籽材料各自的表达强度基本一致, 并且该差异 cDNA 片段经多次验证都能稳定重复出现, 该片段大小约 160 bp。图 1 箭头位置表示在黄籽材料中的带型明显强于黑籽材料。

2.2 Northern 杂交

回收 PAGE 胶上来源于黄籽材料的信号强的差异 cDNA 片段作探针, 对 2 对黄籽近等基因系材料总 RNA 进行检测 (图 1)。从图 1 中可以看出, 在黑籽材料中也能检测到较弱的杂交信号, 表明出现在黄籽和黑籽材料中的差异片段序列是一致的, 这和 2.3 中的序列分析相符。另外黄籽材料中杂交信号强度明显高于黑籽, 且不同黄籽材料和不同黑籽材料的杂交信号强度基本上一致, 这与差异显示分析结果相符。由此可以推测, 甘蓝型油菜黄色种皮和黑色种皮的形成可能是某些与色素发育有关的基因表达强弱不同造成的。

2.3 差异 cDNA 序列分析

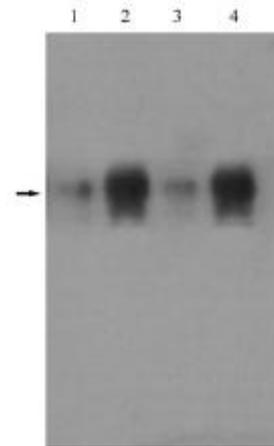
分别回收黄籽材料 (Ynj) 和黑籽材料 (Bnj) 中对应的表达强弱有别 (图 2 箭头所指位置) 的差异 cDNA 片段, 克隆到 pMD18-T 载体上测序。测序结果表明, 两者对应的差异片段序列一致, 这与 2.2 中利用来源于黄籽材料的差异片段作探针, 在黑籽中也能检测到杂交信号的结果相符。根据获得的序列, 利用 YADE 法进行 PCR-Walking。用 BamH I 酶切基因组后与 Y



1. Bnj; 2. Ynj; 3. Bnc; 4. Ync

图 1 Northern 杂交分析结果

Fig. 1 The results of Northern blotting



1. Bnj; 2. Ynj; 3. Bnc; 4. Ync

图 2 mRNA 差异显示分析结果

Fig. 2 The results of mRNA differential display

形接头连接、扩增获得的产物特异性高, 而其它 2 种酶切、连接扩增不理想。将扩增特异性好的产物回收、克隆及测序, 结果如图 3 所示, 在序列分析时可找到 P1、AP9、GSP1 和 GSP2 引物序列。序列同源性分析未能发现该差异 cDNA 片段与已知功能序列具有较好的同源性, 但发现该片段部分序列和拟南芥种子发育 EST 库中一未知功能的 EST 序列具有很高的相似性, 达到 99%。

3 讨论

3.1 甘蓝型黄籽油菜具种皮薄、油菜籽中纤维素与色素含量低、油分与蛋白质含量高 (一般含油量比同类型黑籽油菜高 1.5~5 个百分点)^[13]、油品清澈透明、籽饼饲料质优蛋白高等优点, 大大提高了油菜的经济价值。虽然在白菜型、芥菜型油菜中, 有不少品种黄色性状比较稳定, 但在甘蓝型油菜中黄籽基因资源贫乏。为此, 利用白菜型和芥菜型油菜的黄籽基因就成为了一种重要选择。本试验在材料选择上, 考虑到不同来源对黄籽基因研究的影响, 选用了甘蓝型×白菜型与甘蓝型×芥菜型两种组合后代进行分析。取材时间选择开花后 40 d, 即种皮色泽形成的高峰期^[15]。以种皮为对象, 针对组织特异性转录产物来进行研究, 以最大限度减少其它不相关性状的影响。

目前, 对于甘蓝型黄籽油菜种皮色泽形成机理的研究已有不少报道, 但大多仍局限于生理水平上, 且

```

ATTTCGGTAGGATCCCGCAGAACGAGGCCAGGATCCTGGCCGTCCAAGACGCGTATCAATTGTGAACTTTTGAGTTT
TCTCTCCCTCTCATCACCTCCCCTTCTTATATGATTGAATACGCTTACATTGAATAGCACACAAAGTAATAAAAAAACA
CATGATAGAGATGATTAGGTTTACAGTATTATCATTTCTTTGTTGTTTTCTTCTTATTTCGCTTGCAATGAGTCTTCGGCTA
AGACTGCTAAGTATGATAAGTCAGATGAGTCGGACGAAAACGACGATCTCGCCGCTGTACCGTCATGTTGTGGGTTTTTC
ATCGCCTCTTCTGATCAAGAAAGATCAATGGAAACCAATCTTCGCGAACAAAGTTCGGACAGATCTCAACCGTTCAAATC
GGCGATGGATGCGGGCGGGATGGGCCCTTACAAAATACATTCCATAACGCTGGAACCAAACGCGCTTATGCTCCCTCTTCT
TCTTCATTCCGACATGGTCTTCTTTGTGACTCTGGTACATACTATAAATCTGCTTCAGTGTATGATTTCAGGGTCCGGAT
Primer AP9 site  Primer GSP2 site  Primer GSP1 site
CATAGACTTTGACACCTAAATTTTTAAGAAGTAATGTATAGTTTTTTTTCTGAAAACCAAGTAATTTATATAGTTATCGTTT
ACCAAAAAAAAAAAAAA
Primer P1 site

```

图 3 差异 cDNA 片段拼接后的序列 (阴影部分为延伸序列)

Fig.3 The sequence of differential cDNA (The shadow part is the walking sequence)

观点不一致。有学者认为多酚氧化酶催化产物——简单型或聚合型苯醌类物质——黑色素，可能决定油菜籽种皮色泽^[14]。也有学者认为黄籽材料在种子发育后期，酪氨酸酶活性较黑籽材料低几倍，从而导致黄籽材料色素类物质积累降低^[15]。本试验通过 mRNA 差异显示技术在分子转录水平上对甘蓝型黄籽油菜种皮进行分析，Northern 杂交加以验证，发现在 2 对黄黑籽近等基因系中，黄籽材料中都有上调表达的基因存在，推测其可能和黄籽与黑籽种皮色泽差异的形成有关。黄籽材料和黑籽材料种皮色泽差异是色素多少之别，而不是绝对的有无，这表明两者在种皮色泽形成过程中存在不同表达强度的基因，但对于该方面的研究报道不多，而且植物色素的形成本身就比较复杂。有研究表明，和色素形成有关的类黄酮结构基因存在多种调控因子，研究发现在拟南芥种皮色素合成中存在有调节类黄酮合成负调控因子。另外对模式植物金鱼草、矮牵牛及拟南芥中与色素相关的花青素研究表明，其合成的调控机制非常复杂，涉及 20 多个位点并和环境、发育时期及组织部位有关^[18]。所以要彻底弄清楚“黄籽基因”，还需要进行大量的研究工作。

序列同源性分析发现，该片段部分序列和拟南芥种子发育过程中的一 EST 序列具有较高的相似性，达到 99%。拟南芥和油菜的亲缘关系比较近，两者同属十字花科。对拟南芥和油菜 EST 克隆的比较分析表明，两种植物基因组中 86% 的编码序列是保守的，并且拟南芥的一些基因在油菜中有相似的功能^[16-17]。

3.2 差异显示技术除了可对基因表达与否进行研究

外，还可对基因表达上调和下调进行研究^[19-20]，但由于该技术在 PCR 中使用了随机引物，所以应注意对假阳性的排除。在本试验中选取 2 组不同来源的材料互相验证，而且设置水作为空白对照、进行 2~3 次重复，并经 Northern 杂交加以检验，提高了结果的可信度。差别显示中 DNA 的去除特别重要，因为 DNA 污染是假阳性出现的一个重要原因，所以试验中在反转录合成 cDNA 第一链时引入 1 个未加反转录酶的空白对照组检测是否有 DNA 污染。因为在差别显示技术中上游引物为随机引物，所以不可避免地会出现假阳性，如在本研究中初步筛选虽获得 3 个共有的差异片段，但经多次重复和 Northern 杂交检验后只获得 1 个差异片段。在引物设计上参考 Liang^[8]所设计的第三代引物，反转录引物只用 1 个锚定碱基，这样可以大大减少工作量，且在引物 5' 端引入 1 个 Hind III 酶切位点，使上游引物由 7 个随机碱基和 1 个 6 碱基的 Hind III 酶切位点组成，可以检测到更多的位点并提高扩增效率。对于 PCR 反应体系的优化，则以增加扩增效率为目的。由于本试验采用银染方法检测，检测效率比同位素低，所以必须获得高产量的扩增产物。因此，在试验中加大了 PCR 反应体系中 dNTP 及上、下游引物的用量。为克服由此出现的引物二聚体干扰，在每组试验中均设置空白对照。Mg²⁺是 PCR 反应的 1 个关键因素，它关系到 Taq DNA 聚合酶活性高低、稳定性及扩增产物的重复性。在本试验中由于体系扩增的需要，故适度增加 Mg²⁺用量到 2.5 mmol L⁻¹，得到了很好的扩增效率和较好的重复性。

致谢: 本研究工作得到了西南农业大学农业部蚕桑学重点实验室的支持和帮助。

References

- [1] 刘后利. 甘蓝型黄籽油菜的遗传研究. 作物学报, 1992, 18(4): 241-249.
Liu H L. The genetic research of yellow-seeded *Brassica napus*. *Acta Agronomica Sinica*, 1992, 18(4): 241-249. (in Chinese)
- [2] 刘后利. 甘蓝型黄籽油菜的发现及其遗传行为初步研究. 遗传学报, 1979, 6(1): 54-57.
Liu H L. The discovery of yellow-seeded *Brassica napus* and genetic preliminary research. *Acta Genetica Sinica*, 1979, 6 (1): 54-57. (in Chinese)
- [3] 李殿荣. 甘蓝型黄籽杂交油菜选育技术. ZL94119114.1.
Li D R. The breeding technology of hybrid yellow-seeded *Brassica napus*. ZL94119114.1. (in Chinese)
- [4] Li D R. Hybrid seed production in rapeseed. In: Amarjit S. *Basra Heterosis and Hybrid seed Production in Agronomic Crops*. New York: Food Products Press, 1999: 217-260.
- [5] Chen B Y, Jorgensen R B, Cheng B F, Heneen W K. Identification and chromosomal assignment of RAPD markers linked with a gene for seed color in a *Brassica Campestris-alboglra* addition line. *Hereditas*, 1997, 126:133-138.
- [6] Van Deynze A E, Landry B S. The identification of restriction fragment length polymorphisms linked to seed color genes in *Brassica napus*. *Genomics*, 1995, 38:542-543.
- [7] Negi M S, Devic M, Delsenly M, Lakshmikumaran M. Identification of AFLP fragments linked to seed coadt colour in *Brassica juncea* and conversinon to a SCAR marker for rapid selection. *Theoretical and Application Genetics*, 2000, 101:146-152.
- [8] Peng L, Rrthur B, Pardee. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain Reaction. *Science*, 1992, 257(5072):967-971.
- [9] He Z H, Dong H T, Chen S J, Wu Y L, Li D B. Isolation and cloning of a novel rice defense responsive genes to *Magnaporthe grisea*. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1997, 23(4):394.
- [10] He Z H, Dong H T, Chen S J. Molecular cloning of differentially expressed novel rice genes induced by *Magnarorthe grisea*. *Chinese Science Bulletin*, 1997, 42(20):1 748-1 749.
- [11] Yamazaki M, Zhi Z G, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Tanaka Y, Kusum I T, Aaito K. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *Journal of Biology Chemistry*, 1999, 274(11):7 405-7 411.
- [12] 肖月华, 罗明, 方为国, 罗克明, 侯磊, 罗小英, 裴炎. 利用 YADE 法进行棉花基因组 PCR 步行. 遗传学报, 2002, 29(1): 62-66.
Xiao Y H, Luo M, Fang W G, Luo K M, Hou L, Luo X Y, Pei Y. The Gossypium genome DNA PCR-Walking using YADE. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(1): 62-66.(in Chinese).
- [13] Tringman G R, McGregor D I, Pawlowski S H. Chemical and morphological characteristics associate with seedcoat colour in rapeseed. In: *6 Proceeding of 4th International Rapeseed Conference*. Giessen West Germany. 1974: 99-108.
- [14] 王汉中, 刘后利. 油菜皮壳中多酚氧化酶活性的组织化学鉴定及其与粒色关系. 中国油料, 1991, 13(1): 30-32.
Wang H Z, Liu H L. Histochemical identification of PPO activity in seed coat and its relationship with seed color of rapeseed. *Oil Crop of China*, 1991, 13 (1): 30-32. (in Chinese)
- [15] 叶小利, 李加纳, 唐章林, 梁颖, 谯利. 甘蓝型油菜种皮色泽及相关性状的研究. 作物学报, 2001, 27(5): 550-556.
Ye X L, Li J N, Tang Z L, Liang Y, Chen L. Study on seed color and related characters of *Brassica napus*. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27(5): 550-556.(in chinese)
- [16] Gale M D, Devos K. Plant comparison genetics after 10 years. *Science-Wasington*, 1998, 182(5389): 655-659.
- [17] Sillito D, Parkin I A P, Mayerhofer R, Lydiat D J, Good A G. *Arabidopsis thaliana*: a source of candidate disease-resistance genes for *Brassica napus*. *Genome*, 2000, 43:452-460.
- [18] Jones C S, Davis H V, Taylor M A. Profiling of changes in gene expression during raspberry(*Rubus idacus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques. *Planta*, 2000, 211: 708-714.
- [19] Kleber-Janke T, Krupinska K. Isolation of Cdna clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field condition. *Planta*, 1997, 203: 332-340.

(责任编辑 曲来娥)