

铁胁迫小麦根 DDRT-PCR 分析及 ABC 基因的表达差异

印莉萍¹, 刘维仲¹, 刘祥林¹, 黄勤妮¹, 柴东方¹, 邱泽生¹, 王凌诗²

(¹首都师范大学生物系, 北京 100037; ²北京教育学院, 北京 100044)

摘要:采用 DDRT-PCR 技术比较了正常供铁和缺铁胁迫下铁高效型小麦(京-411)和铁低效型小麦(三属麦-3)的基因表达差异模式。利用从 DDRT-PCR 中挑选出的 ABC 的 cDNA 片段为探针进行 Northern 杂交, 证明它的基因表达受缺铁胁迫的抑制。

关键词:小麦; 根; 铁素营养; mRNA 差别显示 PCR; 基因表达

中图分类号:S512.101 **文献标识码:**A **文章编号:**0578-1752(2001)03-0301-03

DDRT-PCR Analysis Under Iron-deficient Condition in Wheat Roots and Difference of ABC Gene Expression

YIN Li-ping¹, LIU Wei-zhong¹, LIU Xiang-lin¹,

HUANG Qin-ni¹, CHAI Dong-fang¹, QIU Ze-sheng¹, Wang Ling-shi²

(¹Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037; ²Beijing Education college, Beijing 100044)

Abstract: Expression difference of gene in iron-deficiency and iron-sufficiency were compared between iron-efficient wheat cultivar Jing-411 and iron-inefficient cultivar Sanshumai-3 by differential display reverse transcript PCR (DDRT-PCR) method. Northern blotting was carried out with the probes of ATP-binding transporter (ABC) cDNA selected from DDRT-PCR products of the cultivar Jing-411. The results demonstrated that its expression were suppressed under iron-deficiency stress.

Key words: Wheat; Roots; Iron nutrition; DDRT-PCR; Gene expression

关于禾本科植物铁营养的分子生物学研究成果绝大多数是以大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 为材料获得的^[1-3]。从分子水平研究小麦 (*Triticum aestivum* L.) 在缺铁胁迫下的适应性机理才刚刚起步。为了探明缺 Fe 胁迫下小麦基因表达的差异情况和铁高效型 (iron-efficient) 小麦与铁低效型 (iron-inefficient) 小麦差别的可能遗传背景, 并找到一些缺铁胁迫相关的 cDNA 片段, 我们选用了 mRNA 差别显示 PCR (mRNA differential display PCR) 技术 (简称 DDRT-PCR 技术)^[4,5]。这是近年来发展起来的一种用于研究诱导基因表达的有效方法^[6,7]。

1 材料与方法

1.1 小麦植株培养与处理

铁高效品种(京-411)和铁低效品种(三属麦-3)均分别设置缺 Fe 与正常供 Fe 两个培养基中处理。小麦种子消毒后, 在 20~25℃ 下发芽, 当嫩芽长到 2.5cm 左右时, 移入 pH6.0 的 1/2 浓度营养液中培养 1d, 以后采用全营养液培养, 每天 24h 通气, 每隔 1d 换一次营养液。缺 Fe 处理营养液除不供 Fe 外, 其它与正常供铁的完全相同。营养液 pH 控制在 6.1~6.5 之间, 室内生长条件为: 温度 24~29℃, 光照时间每天 14h。每天观察每个处理的生长情况并记

收稿日期: 1999-09-29

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(5982008)和国家重点基础研究发展规划项目(973 G1999011700)

作者简介: 印莉萍(1953-), 女, 浙江绍兴人, 教授, 硕士, 主要从事植物营养分子生理学、细胞及分子生物学和植物基因组学的教学和科研工作。Tel: 010-68902666; E-mail: yinlp@mail.cnu.edu.cn

录。当培养到第 12 天时,小心剪取 1~1.5cm 长的根尖,液氮速冻后置 -70℃ 冰箱保存备用。

1.2 DDRT-PCR 方法

按参考文献[8]进行。总 RNA 提取和 Northern blotting 严格按分子克隆实验指南进行。

1.3 序列测定及同源性比较

由大连(宝)生物技术公司完成测序;由 Internet 网的 BLAST-P 完成同源性分析。

2 结果与分析

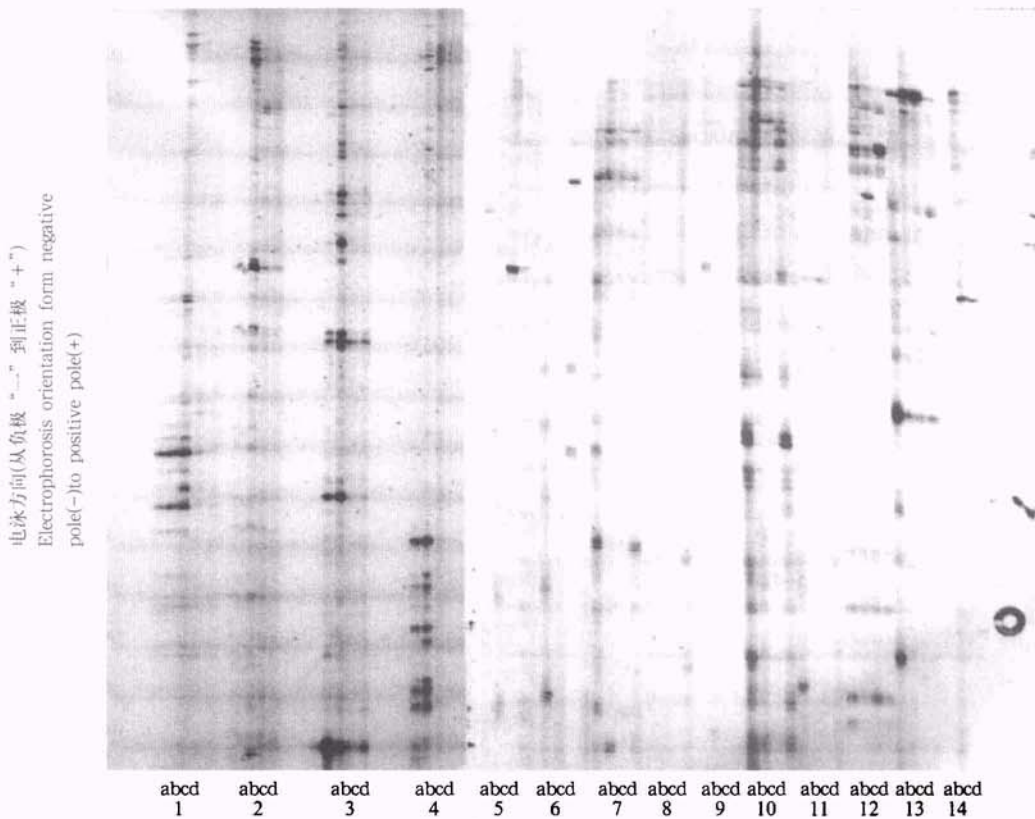
2.1 mRNA 的 DD 分析和差别 cDNA 片段的展示

我们选用了 4 种锚定引物和 4 种随机引物,引物间相互交错排列组合,共做了 64 个 DDRT-PCR 反应。每一个反应包括 4 个泳道(分别用 a,b,c,d 示出),所使用的引物对是完全一样的,只是处理不同。不同反应使用的引物对不同,按顺序编号(1~14)。每一块电泳胶最多点 10 个反应的样品(40 个电泳

孔),所以图 1 仅展示了 2 次反应的部分电泳结果。结果表明,铁高效品种(京-411)在 +Fe 和 -Fe 情况下其基因表达存在着明显差异,(图 1 每组反应的 a,b 泳道),缺铁胁迫既可诱导某些基因的表达(-Fe 表达,+Fe 不表达),又可抑制一些基因的表达(+Fe 表达,-Fe 不表达);铁低效品种(三属麦-3)在 +Fe 和 -Fe 情况下其基因表达也存在较明显差异,但少于京-411,同样也有诱导和抑制之分(图 1 每组反应的 c,d 泳道);京-411 和三属麦-3 在正常供铁情况下的基因表达有差异(差别带 33 个),说明除了品种间的基因型差异外,在吸铁机制上也存在某些差异(每组反应的 a,c 泳道);京-411 和三属麦-3 在缺铁胁迫下的基因表达也有差异(约 25 个,每组反应的 b,d 泳道)。

2.2 测序与同源性

从 DDRT-PCR 结果中选取差异较大的 cDNA 条带,进行 PCR 再扩增,扩增产物克隆至



编号 1,2,3~14 为不同引物的不同反应;每一组反应包括 4 个泳道 a,b,c,d 为不同处理。从左至右依次为 a:铁高效品种(Jing-411)+Fe 培养; b:高效品种 -Fe 培养; c:铁低效品种(Sanshumai-3)+Fe 培养; d:低效品种 -Fe 培养

No. 1,2,3~14 showed the different reaction group according to different a pair of primers. A reaction was consisted of 4 lane(a,b,c,d) including iron-efficient cultivar Jin g-411 in Fe-sufficient culture (a); iron-efficient cultivar Jing-411 in Fe-deficient culture (b); iron-inefficient cultivar Sanshumai-3 in Fe-sufficient culture (c); iron-inefficient cultivar Sanshumai-3 in Fe-deficient culture (d) from the left to the right

图 1 cDNA 差异片段的展示

Fig. 1 Display of DD-cDNA fragment

pMD 18-T 载体上并提纯质粒,用 *EcoR* I / *Hind* III 进行双酶切鉴定,分别进行测序。测序结果与同源性比较结果为 cDNA2-1 的核苷酸序列 452 bp, 38% 的氨基酸同源于 ATP-binding 转运体; cDNA2-2 的核苷酸序列 551 bp, 80% 的氨基酸同源于 dTDP-D 葡萄糖脱水酶; cDNA3-1 和 cDNA3-2 的核苷酸序列均为 384bp, 93% 的氨基酸同源于与细胞色素 C 合成有关的基因,证明两者是同一种基因。Northern 杂交结果表明,在缺铁条件下以上 3 种基因的表达均受到抑制。cDNA2-3 的核苷酸序列为 551 bp, 85% 的氨基酸同源于 α -醇溶蛋白,因为考虑它与铁胁迫无关,故没有做 Northern 杂交。cDNA7 的核苷酸序列 487 bp, 99% 的氨基酸同源于 Na^+ 通道 α -亚基; cDNA8-1 和 cDNA8-3 的核苷酸序列均为 512 bp, 与 3-methylcrotonyl-CoA 羧化酶有同源性; cDNA8-2 的核苷酸序列 557 bp, 至今没有发现有同源物存在。在有铁和缺铁条件下,后 3 种 cDNA 的 Northern 杂交结果均无差异。

2.3 ATP-binding 转运体 (ABC) cDNA 片段的 Northern 杂交

根据克隆的测序结果,以 ATP-binding 转运体的 cDNA 片段为探针,分别对从铁高效品种京-411 在正常供铁和缺铁胁迫下的根尖中提取的总 RNA 进行 Northern 杂交。结果表明, +Fe 处理的杂交信号比 -Fe 处理的杂交信号明显强(图 2),放射自显影的薄层色谱扫描分析结果也证明杂交信号的确有强弱之别。所以从杂交信号结果来说,ATP-binding 转运体的基因在缺铁胁迫下其表达被抑制了。在进行 cDNA2-1 的序列同源性分析时,数据库提示它和

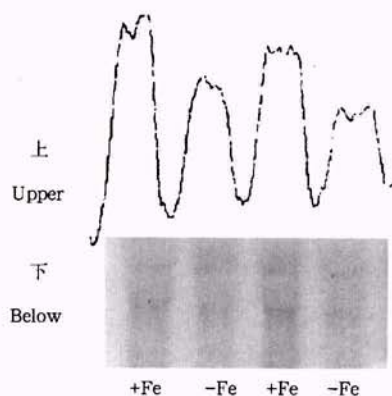


图 2 ABC 的 cDNA 片段的 Northern 杂交(下)和放射自显影的薄层扫描分析(上)

Fig. 2 Northern blotting of ABC's cDNA (below) and scanning of Autoradiography (upper)

ATP-binding 转运体家族强相似。ATP-binding transporter^[9]是有机溶质和部分重金属的转运体,属于 ATP-binding cassette (ABC) 大家族,由 Mg-ATPase 直接供能,而不是由跨膜的 H^+ 电势差功能。因为铁参与能量产生中所需要的绝大多数的氧化还原反应和电子传递,故长时期的缺铁胁迫会引起 ATP 形成的降低,而 ABC 大家族是由 ATP 直接供能的,随着可供的 ATP 的减少,其表达随之也减弱。

缺铁胁迫下被抑制表达的基因肯定还有,这方面的研究对于进一步揭示铁在植物生理活动中的作用和缺铁胁迫下植物体内的生理生化变化以及缺铁适应性机理的分子本质都是重要的。

References:

- [1] Zhang L P, Wu P, Zhu J M, et al. The expressive difference of inductive gene by aluminium in rice by differential display [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1997, 30(5): 71-74. (in Chinese)
张立平, 吴平, 祝金明, 等. 利用 DD-PCR 技术分析水稻铝诱导基因的表达差异 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(5): 71-74.
- [2] Zhao D Z, Chen M, Zhong K, et al. Isolation of cDNA clones related to vernalization in winter wheat by differential display [J]. Chinese Science Bulletin, 1998, 43: 965-968. (in Chinese)
赵大中, 陈民, 钟康, 等. 运用差异显示法分离冬小麦春化作用相关 cDNA 克隆 [J]. 科学通报, 1998, 43: 965-968.
- [3] Okumura N, Nishizawa N K, Umehara Y, et al. Iron deficiency specific cDNA (Ids1) with two homologous cysteine rich MT domains from the roots of barley [J]. J. Plant Nutrition, 1992, 15: 2157-2172.
- [4] Okumura N, Nishizawa N K, Umehara Y, et al. A dioxygenase gene (Ids2) expressed under iron deficiency conditions in the root of *Hordeum vulgare* [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 25: 705-719.
- [5] Nakanishi H, Okumura N, Umehara Y, et al. Expression of a gene specific for iron deficiency (Ids3) in the roots of *Hordeum vulgare* [J]. Plant Cell Physiol. 1993, 34: 401-410.
- [6] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257: 967-971.
- [7] Liang P, Avcrdouth L, Pardee A B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21: 3269-3275.
- [8] GENOMYX Corporation. Instruction manual of TMR-fluorescent anchored primer adaptor kit for the hieroglyphm mRNA profile kit system for differential display analysis [P]. 1997: 1-40.
- [9] Rea P A, Li Z S, Lu Y P, et al. Some vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. Annu. Rev. Plant Physiol [J]. Plant Mol. Biol. 1998, 49: 727-760.