

利用 cDNA-AFLP 技术分析龙眼 子叶胚基因表达差异

卢秉国^{1a}, 申艳红^{1a}, 蒋际谋², 陈晓静^{1a}, 陈伟^{1b*}, 吕柳新^{1a}

(1. 福建农林大学, a. 园艺学院; b. 生命科学学院, 福州 350002; 2. 福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013)

摘要: 分别提取‘红核子’龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.) 谢花后 35 d(早期)和 50 d(晚期)子叶胚 RNA, 建立 cDNA-AFLP 分析体系, 获得指纹图谱。对 41 个差异片段回收克隆和序列分析, 表明其中 21 个与已知功能基因具有高度同源性, 这些基因的功能主要涉及侧生器官的离轴极性、糖酵解、能量代谢、离子转运、细胞壁伸长、细胞周期调控、RNA 转录、RNA 翻译和调控、蛋白磷酸化调控和降解、信号转导等; 其余片段与已知基因的同源性较低或没有。

关键词: 龙眼; 子叶胚; RNA 提取; cDNA-AFLP

中图分类号: S667.260.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)06-0562-05

Differential Expression Analysis of Longan Cotyledon Embryo by cDNA-AFLP

LU Bing-guo^{1a}, SHEN Yan-hong^{1a}, JIANG Ji-mou², CHEN Xiao-jing^{1a}, CHEN Wei^{1b*}, LÜ Liu-xin^{1a}

(1a. College of Horticulture; 1b. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 353000, China)

Abstract: The finger map of longan (*Dimocarpus longan* Lour. ‘Honghezi’) cotyledon embryo RNA was established by cDNA-AFLP, which extracted from thirty-five-day (early) and fifty-day (late) cotyledon embryos after anthesis, respectively. There were 41 differential fragments cloned and sequence analysed, in which 21 differential expression fragments had high homology with some known genes, the function mainly involved in the abaxial polarity of lateral organ, glycolysis, energy metabolism, ion transport, cell wall elongation, cell cycle regulation, RNA transcription, RNA translation and regulation, protein phosphorylation regulation and protein degradation, signal transduction and so on. While the others had low or no homology with known genes.

Key words: Longan; Cotyledon embryo; RNA isolation; cDNA-AFLP

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 为无患子科 (Sapindaceae) 龙眼属植物, 是我国南方重要的热带亚热带木本果树。龙眼果实在国内外有广泛的市场, 深受消费者青睐。果实发育和品质与其胚胎有密切的关系, 但由于龙眼有性胚遗传背景复杂, 并且童期长^[1], 与有性胚发育相关的基因研究报道较少。

前人主要通过 mRNA 差别显示技术和蛋白质组技术来研究龙眼胚胎发育, 赖钟雄等^[2]建立了龙

眼体细胞胚胎高频率再生体系, 王风华等^[3-4]采用 mRNA 差别显示技术对龙眼体细胞胚胎发生过程中的胚性愈伤组织、球形胚、鱼雷胚、子叶胚成熟胚等阶段进行分析, 得到 3 个阳性片断, 并从胚性愈伤组织中克隆出维生素 C 过氧化物酶基因和 NADH 脱氢酶基因的部分 cDNA 序列。李燕^[5]和章希娟等^[6]采用 IEF-SDS-PAGE 双向电泳技术分离了‘立冬本’龙眼子叶胚发育不同时期的 36 个差异蛋白质, 初步鉴定了其中的 12 个蛋白质, 7 个为持

收稿日期: 2009-01-20 接受日期: 2009-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370999); 福建省自然科学基金项目(2009J01084)资助

* 通讯作者 Corresponding author

家蛋白,5个为差异蛋白,并克隆上调差异蛋白黄烷酮-3-羟化酶的基因。

cDNA-AFLP (cDNA amplified fragment length polymorphism)技术是 Bachem 等^[7]在 AFLP 技术^[8]基础上发展的一种 mRNA 指纹图谱技术,在植物发育基因表达差异分析和功能基因克隆中得到广泛应用^[9-14]。本试验以‘红核子’龙眼子叶胚为材料,建立适合龙眼的 cDNA-AFLP 分析体系,弥补 mRNA 差别显示技术和蛋白质组技术缺陷,进一步分离、克隆龙眼子叶胚发育相关基因。

1 材料和方法

1.1 供试材料

‘红核子’龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour. ‘Honghezi’)采自福建农林大学校园,谢花后 35 d 和 50 d 分别采集幼果,剥离胚胎,用液氮速冻,贮于-80℃冰箱备用。

1.2 龙眼胚胎 RNA 的提取和双链 cDNA 合成

谢花后 35 d 子叶胚总 RNA 提取按照上海申能博彩生物科技有限公司 3S Total RNA Miniprep Super Kit 说明书来进行操作;谢花后 50 d 的子叶胚总 RNA 提取参照酚-SDS 的方法。

谢花后 50 d 的子叶胚总 RNA 提取参照酚-SDS 的方法。取冷冻胚胎 2.0 g,加入适量的 PVPP,液氮研磨成粉末,加入提取液 16 mL (25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 25 mmol/L EDTA, 75 mmol/L NaCl, 1% SDS, 2% β-巯基乙醇),涡旋混匀,加入等体积 Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇(体积比为 25:24:1),强力涡旋混匀。4℃ 12 000 ×g 离心 15 min,取上清;加入等体积的氯仿:异戊醇(体积比为 24:1),强力涡旋混匀,4℃ 12 000 ×g 离心 15 min。取上清,逐滴加入 1/4 体积 10 mol/L LiCl,冰上放置 1~2 h。4℃ 12 000 ×g 离心 10 min,弃上清;加入 100 μL DEPC-H₂O 溶解沉淀,加入 100 μL 4 mol/L NaCl,混匀,加入 400 μL 无水乙醇,-20℃放置 1 h。4℃ 12 000 ×g 离心 10 min,70% 乙醇洗涤 2 次,移取乙醇溶液,吹干残留乙醇,用 50 μL DEPC-H₂O 溶解沉淀,在-80℃中保存备用。

1.3 双链 cDNA 的合成

cDNA 第一链和第二链合成参照 Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 用户手册进行,双链合成的 PCR 循环分别为 15、18、21、24 和 27

个,筛选最佳循环数。

1.4 限制性酶切、加接头、预扩增和选择性扩增

取纯化后的双链 cDNA(约 100 ng) 1 μL, *Ase* I (20 U) 1 μL, Buffer (10 ×) 2 μL, ddH₂O 16 μL, 总体积 20 μL, 37℃ 下酶切 3 h; 在上述 *Ase* I 反应体系添加 Buffer (10 ×) 1 μL, BSA (100 μg mL⁻¹) 0.3 μL, *Taq* I (20 U) 1 μL, ddH₂O 7.7 μL, 总体积 30 μL, 65℃ 下酶切 3 h。

取 25 μg T1: 5'-GACGATGAGTCCTGAC-3' 和 22 μg T2: 3'-TACTCAGGACTGGC-5', 加水 100 μL; 取 2.6 μg A1: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 和 2.0 μg A2: 3'-CTGACGCATG GAT-5', 加水 100 μL, 加热至 65℃, 并冷却至室温, 分别制成 50 pmol/L *Taq* I 接头和 5 pmol/L *Ase* I 接头。

在 30 μL 酶切体系加入 *Taq* I 接头(50 pmol/L) 1 μL, *Ase* I 接头(5 pmol/L) 1 μL, T₄ Buffer (10 ×) 5 μL, T₄ Ligase 1 μL, ddH₂O 12 μL, 总体积 50 μL, 16℃ 过夜。连接产物稀释 20 倍作为预扩增模板。

预扩增反应体系: 连接稀释产物 20 μL, T3: 5'-GACGATGAGTCCTGACCGA-3' (100 ng μL⁻¹) 1 μL, A3: 5'-CTCGTAGACTGCGTACCTAAT-3' (100 ng μL⁻¹) 1 μL, 10 × PCR Buffer 5 μL, dNTP (2.5 mmol/μL) 4 μL, *ExTaq* (5U) 0.25 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 25 个循环。产物稀释 20 倍至 1 ng μL⁻¹, 用于选择性扩增。

选择性扩增体系: 预扩增稀释产物 2 μL, *Taq* I 选择性扩增引物 5'-GACGATGAGTCCTGACCGAN-N-3' (50 ng μL⁻¹) 1 μL, *Ase* I 选择性扩增引物 5'-GACTGCGTACCTAATNN-3' (50 ng μL⁻¹) 1 μL, 10 × PCR Buffer 2 μL, dNTP (2.5 mmol/μL) 1.6 μL, *ExTaq* (5 U) 0.1 μL, 加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 30 s, 65℃ 30 s (每个循环降低 0.7℃), 72℃ 1 min, 12 个循环; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 24 个循环。选择性扩增产物用于琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.5 电泳及银染

部分选择性扩增产物 1% 琼脂糖电泳检测扩增效果; 选择性扩增产物加上样缓冲液等体积混匀, 95℃ 变性 5 min 后立即冰浴。将 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶恒定功率 90 W 预电泳 30 min, 加 3~5 μL 冰浴变性混合液上样, 70 W 恒功率电泳至溴酚蓝第二条带接近胶底, 大约 1.5 h。分离后, 参照

张峰等^[15]的方法进行银染,染色完成后统计。

1.6 特异片段的回收

用锋利的刀片直接从硝酸银染色的聚丙烯酰胺凝胶上切下特异目的条带,取 5 μL 目的片段回收产物作为模板,采用和选择性扩增相同的反应体系和 PCR 程序进行二次扩增。1% 琼脂糖电泳检测,从琼脂糖胶上切取同目的条带大小一致的条带,利用琼脂糖胶回收试剂盒回收,并取 4 μL 回收产物同 TaKaRa 的 pMD18-T Vector 直接用于连接,连接反应体系为 10 μL (pMD18-T Vector 1 μL,回收产物 4 μL, Ligation Solution I 5 μL),16℃ 连接过夜。连接产物转化 *E.coli* DH5α。重组体经 PCR 检测或酶切鉴定后送至 Invitrogene 公司测序。

1.7 序列比较分析

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

2 结果和分析

2.1 龙眼胚胎总 RNA 提取和 cDNA 合成

测定总 RNA 样品的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值,两个样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.8~2.0 之间;将提取的 RNA 样品用琼脂糖凝胶快速电泳检测(图 1),呈双带型,28S 和 18S 的带型清晰,约为 2:1,说明 RNA 样品质量好,纯度高、完整性好,满足合成 cDNA 要求。以此 RNA 为材料进行 cDNA 合成,分别用 15、18、21、24 和 27 个 PCR 循环扩增双链 cDNA。从 cDNA 电泳(图 2)可以看出,15 和 18 个循环的扩增数量较少,21 个循环的扩增效果好,主要条带分布在 500~2 000 bp,适合于下一步实验。

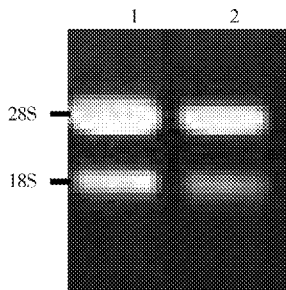


图 1 龙眼子叶胚总 RNA 电泳检测
Fig. 1 Total RNA of longan zygotic embryo
1. 谢花后 35 d 35 days after anthesis;
2. 谢花后 50 d 50 days after anthesis.

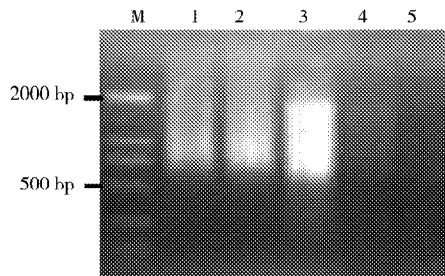


图 2 不同循环次数对双链 cDNA 合成的影响
Fig. 2 Effects of cycle times on amplification product of ds cDNA
M: TaKaRa DL 2000 Marker; 1~5: 循环次数分别为 27、24、21、18 和 15。The cycle times are 27, 24, 21, 18 and 15, respectively.

2.2 限制性酶切、接头连接、预扩增和选择性扩增

从图 3 可以看出,两个样品预扩增产物在 100~1 000 bp 之间,弥散范围较宽,且扩增信号较强,一致性较好,说明双链 cDNA 经过双酶切、加接头和预扩增效果较好,可用于选择性扩增。图 4 和图 5 分别为部分选择性扩增产物琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳,可以看出谢花后 35 d 和 50 d 的子叶胚选择性扩增条带清晰可辨,分布均匀,对应关系良好,表达差异条带较少,大部分条带扩增信号强度基本一致。

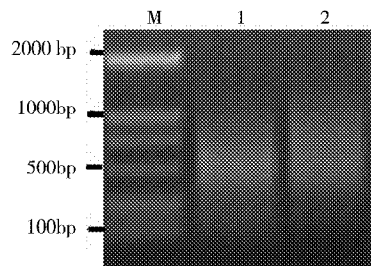


图 3 预扩增电泳图
Fig. 3 PCR products of pre-amplification
M: TaKaRa DL 2000 Marker; 1: 谢花后 35 d 35days after anthesis; 2: 谢花后 50 d 50 days after anthesis.

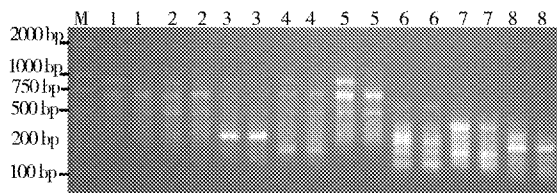


图 4 部分选择性扩增电泳图
Fig. 4 PCR products of selective amplification
M: TaKaRa DL 2000 marker; 1~8 为不同引物,左边为谢花后 35 d 胚,右边为谢花后 50 d 胚。1~8 present different primers, which left is embryo of 35 days after anthesis, and right is embryo of 50 days after anthesis.

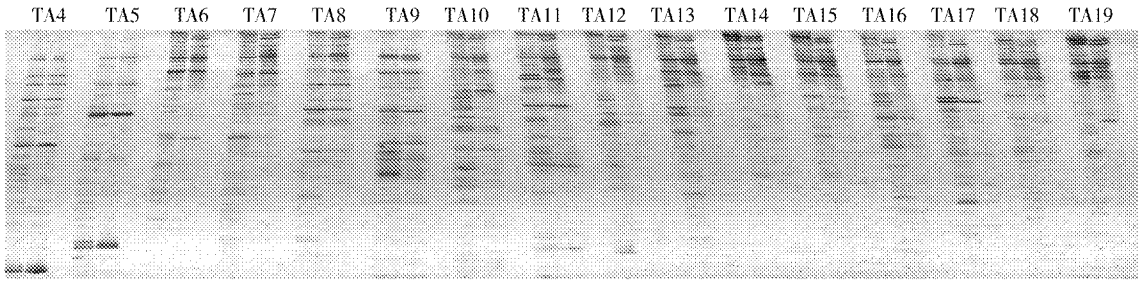


图5 选择性扩增聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 5 Polyacrylamide gel electrophoresis map of selective amplification products

TA4 ~ TA19 为不同引物, 左边为谢花后 35 d 胚, 右边为谢花后 50 d 胚。1~8 present different primers, which left is embryo of 35 days after anthesis, and right is embryo of 50 days after anthesis.

2.3 差异条带的 BLAST 分析

对 41 个差异片段进行回收克隆和序列分析, 发现其中 21 个与已知功能基因具有高度同源性, 这些基因的功能主要涉及侧生器官的离轴极性、糖酵解、能量代谢、离子转运、细胞壁伸长、细胞周期调控、RNA 转录、RNA 翻译和调控、蛋白磷酸化调控和降解、信号转导等; 另外 20 个片段与已知基因的同源性较低或未发现同源性。*LEI* 在谢花后 35 d 的子叶胚中显著表达, 可能是控制龙眼子叶胚离轴极性基因的一部分(图 6), 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*YAB2* 基因的 mRNA 同源性为 85%。

```
TCCTTCTGCATACAACATGGTTTATCAAGGAGGA-
AATCCAAAGGATTAAGGCTAGTAATCCTGAAATC-
ACCCACAGAGAAGCTTTTAGCACAGCTGCAAAAA-
ATTGGGCACATTTTCTCACATTCATTTGGGCT-
GAAGCTGGATGGAAACAAGCAAGGAAAATTGGA-
TCACCAGGCATTTGCG (186 bp)
```

图6 *LEI* 的核苷酸序列Fig. 6 The nucleotide sequence of *LEI*

3 讨论

提取高质量、无降解的龙眼子叶胚 RNA 是技术体系建立的前提条件, 小量法提取谢花后 35 d 的胚胎, 只需要 20~50 个胚胎, 操作步骤少, 可以得到质量较好的 RNA, 是提取早期子叶胚 RNA 的合适方法。花后 50 d 胚胎的 RNA 提取时, 加入 PVPP 吸附酚类物质, 避免多酚类物质的氧化导致褐变, 同时加入 β -巯基乙醇以抑制 RNA 酶的活性, 避免 RNA 的降解, 通过这两个步骤可以得到满意的 RNA^[16]。

本试验的选择性扩增产物凝胶电泳及银染检测显示扩增条带清晰可辨、对应良好、信号强度基本一致、分布均匀的指纹图谱。从对应良好的指纹

图谱显示, 花后 35 d 与 50 d 有性胚表达基因的混合池相比较, 新出现或者消失的基因较少, 大部分都是表达量上调和下降的基因, 说明杂合的龙眼有性胚, 其胚胎发育过程中基因表达是一致的。随机挑选 7 个差异片段进行 RACE 扩增, RT-PCR 检测它们在龙眼子叶胚中表达情况, 结果表明它们在早期子叶胚和晚期子叶胚的表达量有显著差异(另文报道), 表明 cDNA-AFLP 体系可用于分析龙眼有性胚的发育。

本试验分离到 *LEI* 差异片段与拟南芥的 *YAB2* mRNA 的编码区有 85% 同源性。拟南芥 *YAB2* 基因是 *YABBY* 家族基因成员, 主要在子叶原基、叶原基、花分生组织原基、萼片原基、花瓣原基、雄蕊原基和心皮原基的离轴位置微量表达, 控制离轴细胞非对称分化的极性基因^[17-18]。根据 *LEI* 片段的核苷酸序列, 从龙眼子叶胚中分离到一系列 *YAB2* 基因(另文报道), 为揭示 *YABBY* 基因在龙眼子叶胚发育中功能奠定基础。

参考文献

- [1] Lai Z X(赖钟雄), Pan L Z(潘良镇), Chen Z G(陈振光). Establishment and maintenance of longan embryogenic cell lines [J]. J Fujian Agri Univ(福建农业大学学报), 1997, 26(2): 160-167.(in Chinese)
- [2] Lai Z X(赖钟雄), Chen Z G(陈振光). Somatic embryogenesis of high frequency from longan embryogenic calli [J]. J Fujian Agri Univ(福建农业大学学报), 1997, 26(3): 271-276.(in Chinese)
- [3] Wang F H(王风华), Lai Z X(赖钟雄), Zheng J G(郑金贵), et al. Differential gene expression in the process of somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. J Agri Biotechn(农业生物技术学报), 2005, 13(6): 703-708.(in Chinese)
- [4] Wang F H(王风华), Lai Z X(赖钟雄), Zheng J G(郑金贵), et al. Cloning of partial cDNAs of ascorbate peroxidase (Apx) and NADH dehydrogenase subunit (NAD2) from embryogenic callus of *Dimocarpus longan* Lour. [J]. Chin J Appl Environ Biol(应用与环

- 境学报), 2005, 11(1): 45–48. (in Chinese)
- [5] Li Y (李燕). Analysis of proteins during different embryo development stages of longan [D]. Fuzhou: Fujian Agricultural Forestry University, 2006: 1–50. (in Chinese)
- [6] Zhang X J (章希娟), Xu H C (许鸿川), You X R (游向荣), et al. Cloning and sequence analysis of *F3H* gene cDNA from longan embryo [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2008, 35(11): 1581–1586. (in Chinese)
- [7] Bachem C W B, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, et al. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA finger-printing based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development [J]. Plant J, 1996, 9(5): 745–753.
- [8] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucl Acids Res, 1995, 23: 4407–4414.
- [9] Zhou Z Q (周志钦). Analysis of differentially expressed genes from dormancy to sprouting of potato tubers [J]. J SW Agri Univ (西南农业大学学报), 2001, 23(3): 213–215. (in Chinese)
- [10] Lou P (娄平), Wang X W (王晓武), Guusje B, et al. Gene expression associated with dominant male sterility in cabbage is revealed by cDNA — Amplified fragment length polymorphism analysis [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2003, 30(6): 668–672. (in Chinese)
- [11] Xiao Y H (肖月华), Luo M (罗明), Wei Y T (韦宇拓), et al. cDNA-AFLP analysis of gene expression in cotton ovule at fiber initiation stage [J]. J Agri Biotechn (农业生物技术学报), 2003, 11(1): 20–24. (in Chinese)
- [12] Wang Y Q (王永勤), Yu X L (余小林), Cao J S (曹家树). Isolation and characterization of *BcMF3*, a gene expressed only in maintainer line in chinese cabbage-pak-choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino var. *communis* Tsen et Lee) [J]. Acta Genet Sin (遗传学报), 2004, 31(11): 1302–1308. (in Chinese)
- [13] Sun Y D (孙涌栋), Zhang X G (张兴国), Hou R X (侯瑞贤), et al. Identification of expanding-related genes from young fruit of cucumber after pollination [J]. J Plant Physiol Mol Biol (植物生理与分子生物学学报), 2005, 31(4): 403–408. (in Chinese)
- [14] Sun B J (孙保娟), Cao J S (曹家树), Huang X S (黄细松), et al. cDNA-AFLP analysis on genes associated with vernalization *in vitro* in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2006, 33(6): 1341–1344. (in Chinese)
- [15] Zhang F (张峰), Song W Q (宋文芹), Li L (李凌), et al. Isolation of the DNA marker linked to the cabbage black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) resistance using AFLP-silver staining method [J]. Acta Sci Nat Univ Nankai (南开大学学报: 自然科学版), 1999, 13(3): 177–181. (in Chinese)
- [16] Li Y X (黎云祥), Chen L (陈利). Isolation of total RNA from dry seeds of *Davidia involucre* [J]. J SW China Norm Univ (Nat Sci) (西南师范大学学报: 自然科学版), 2003, 28(1): 108–111. (in Chinese)
- [17] Siegfried K R, Eshed Y, Baum S F, et al. Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis* [J]. Development, 1999, 126: 4117–4128.
- [18] Engstrom E M, Izhaki A, Bowman J L. Promoter bashing, microRNAs, and knox genes: New insights, regulators, and targets-of-regulation in the establishment of lateral organ polarity in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2004, 135: 685–694.