

# 金鱼草中央细胞中线粒体 DNA 拷贝数的定量

曾紫风, 孙欢, 郭雪, 高龙, 王丹阳\*

(西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069)

**摘要:** 为探究金鱼草(*Antirrhinum majus*)中央细胞的线粒体 DNA 拷贝数, 采用竞争型定量 PCR 技术进行了测定。结果表明, 金鱼草中央细胞的体积为 $(61570 \pm 732) \mu\text{m}^3$ , 平均携带 $(783 \pm 25)$ 个拷贝的线粒体 DNA, 并且中央细胞与卵细胞具有相似的体积/线粒体 DNA 拷贝数比值。推测金鱼草中央细胞包含如此高丰度线粒体 DNA 可能是为早期胚乳细胞的发育而储备的。

**关键词:** 中央细胞; 线粒体 DNA; 定量 PCR; 金鱼草

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.04.013

## Quantification of Mitochondrial DNA Copies in Central Cells of *Antirrhinum majus*

ZENG Zi-feng, SUN Huan, GUO Xue, GAO Long, WANG Dan-yang\*

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract:** The mitochondrial DNA (mtDNA) copies of *Antirrhinum majus* were measured by quantitative PCR method. The results showed that the mean volume of central cell of *A. majus* was  $(61570 \pm 732) \mu\text{m}^3$  with  $(783 \pm 25)$  mtDNA copies. There were similar ratio of volume to mtDNA copy between central cell and egg cell. It was presumed that the abundant mtDNA in central cell might reserve for the early development of endosperm cells.

**Key words:** Central cell; mtDNA; Quantitative PCR; *Antirrhinum majus*

线粒体 DNA 是线粒体所携带的遗传物质, 以多拷贝形式存在于细胞中。植物细胞中并非每个线粒体都拥有完整的线粒体 DNA 基因组<sup>[1-3]</sup>, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 叶肉细胞大约有 700 个线粒体<sup>[4]</sup>, 却只携带约 50 个拷贝的线粒体 DNA<sup>[1]</sup>, 即大约每 14 个线粒体才拥有 1 个完整的线粒体 DNA 基因组。这种现象不仅存在于叶肉细胞中, 也存在于卵细胞中。拟南芥卵细胞有 795 个线粒体, 却仅有 59 个拷贝的线粒体 DNA<sup>[1]</sup>。线粒体基因组存在一些与线粒体呼吸功能密切相关的基因, 因此, 单个线粒体的 DNA 不完整性提示植物细胞内频繁的线粒体融合与分裂活动可能参与了这些基因的编码产物在各个线粒体之间进行交换的事实<sup>[5]</sup>。

卵细胞与叶肉细胞具有相似线粒体 DNA 含量的现象也存在于烟草(*Nicotiana tabacum*)、金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 等物种中<sup>[1]</sup>。与动物卵细胞不同, 被子植物的卵细胞并没有携带大量为胚胎发育而储备的线粒体 DNA<sup>[6-8]</sup>, 这提示植物的卵细胞受精后需要进行线粒体 DNA 的复制以保证胚的正常发育。然而, 被子植物中也存在一些卵细胞携带大量线粒体 DNA 的物种。目前, 已知天竺葵 (*Pelargonium zonale*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 的卵细胞平均携带约 2000 个拷贝的线粒体 DNA<sup>[1,9]</sup>, 其含量是叶肉细胞的 40 倍左右。有意思的是, 物种卵细胞中的线粒体 DNA 含量与其卵细胞大小呈现相关性, 如线粒体 DNA 含量较少的拟南芥等物种的卵

收稿日期: 2015-11-04

接受日期: 2016-01-18

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31200234); 陕西省教育厅省级重点实验室科研计划项目(14JS089)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (Grant No. 31200234), and the Scientific Research Program Fund for Shannxi Province Key Laboratory (Grant No. 14JS089).

作者简介: 曾紫风(1990-), 女, 硕士, 主要从事被子植物生殖生物学研究。E-mail: yituanfenhong@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wangdy@nwu.edu.cn

细胞直径约为 15~20  $\mu\text{m}$ , 而线粒体 DNA 含量丰富的天竺葵等物种的卵细胞直径大约为 40~50  $\mu\text{m}$ <sup>[1,9]</sup>。

被子植物具有特殊的双受精现象, 即除了发生卵细胞的受精外, 还发生中央细胞的受精<sup>[10]</sup>。受精的中央细胞以后将发育形成胚乳, 除了为胚的发育提供营养外, 还参与种子的发育<sup>[11]</sup>。在胚囊细胞中, 中央细胞的体积最大, 但并不清楚它是否与大体积的卵细胞一样也携带丰富的线粒体 DNA。本研究采用金鱼草这种模式植物, 分离了中央细胞并对其线粒体 DNA 拷贝数进行了定量分析, 为理解中央细胞在被子植物有性生殖过程中的功能提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

金鱼草(*Antirrhinum majus*)养殖于西北大学果园内的温室, 于试验当天上午 9-10 点采集新鲜开放的花朵, 立即进行中央细胞的分离。

### 1.2 中央细胞的分离

中央细胞的分离采用酶解结合手工分离的方法<sup>[12-13]</sup>。新鲜胚珠置于包含 1% 纤维素酶 RS (Yakult)、0.1% 果胶酶 Y-23 (Yakult)、13% 甘露醇的酶解液(pH 5.8)中, 于室温处理 2 h 左右, 期间不停震荡以利于胚珠的酶解。然后, 将胚珠置于 8% 甘露醇溶液中进行渗透压冲击。中央细胞的手工分离于倒置显微镜下进行, 首先, 用玻璃毛细管不停吹打胚珠以去除珠被及珠心组织而获得结构完整的胚囊; 其次, 用玻璃毛细管轻轻挤压胚囊的珠孔端以使中央细胞从胚囊的合点端游离释放; 最后, 将分离的中央细胞在 13% 甘露醇溶液中清洗 3 遍, 转移至 PCR 管中。

### 1.3 竞争型模板 $matR^-$ 的浓度测定

竞争型模板  $matR^-$  为本实验室保存<sup>[1]</sup>。该片段来自线粒体 DNA 上的  $matR$  基因片段, 我们将内部缺失了 113 bp、长度为 797 bp 的  $matR$  (用  $matR^-$  表示) 连接于 PMD-18T 载体 (TaKaRa) 构建形成 3489 bp 的质粒。质粒的浓度用分光光度计测量, 通过计算质粒的摩尔浓度, 可以获得质粒在单位体积内的分子个数(摩尔浓度 $\times$ 阿福加德罗常数)。

### 1.4 线粒体 DNA 拷贝数的定量

转移至 PCR 管的中央细胞在进行一轮快速冻

融处理后, 于消化液中处理 8 h 以释放模板 DNA (消化温度为 56 $^{\circ}\text{C}$ )。消化液包含 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  的蛋白酶 K (Merck), 蛋白酶 K 溶液用 0.2 $\times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液(天根)配制。平均每个中央细胞用 2  $\mu\text{L}$  消化液。

定量 PCR 主要参考竞争型定量 PCR 方法<sup>[14]</sup>。中央细胞的消化产物先于 95 $^{\circ}\text{C}$  进行 5 min 变性处理, 然后取 2  $\mu\text{L}$  消化产物为模板加入到 25  $\mu\text{L}$  的 PCR 反应液中进行第一轮 PCR 反应。PCR 反应液包含 2.5  $\mu\text{L}$  的 Taq DNA 聚合酶缓冲液、0.2  $\text{mmol L}^{-1}$  dNTPs、0.4  $\text{mmol L}^{-1}$  的 AmQAN1F/AmQAN1R 引物对、0.65 U Taq DNA 聚合酶及不同含量的竞争模板  $matR^-$ 。PCR 共进行 20 次循环: 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s。

第二轮 PCR 反应反应液包含 2.5  $\mu\text{L}$  Taq 酶缓冲液, 0.2  $\text{mmol L}^{-1}$  dNTPs, 0.4  $\text{mmol L}^{-1}$  AmQAN2F/AtQAN2R 引物对, 0.65 U Taq DNA 聚合酶和双蒸水, 以 1  $\mu\text{L}$  第一轮 PCR 反应液为模板。第二轮 PCR 共进行 22 次循环, 反应条件与第一轮 PCR 相同。

PCR 反应后进行凝胶电泳。通过计算电泳图上两 PCR 条带的灰度比值, 找出比值接近参考系数的 PCR 反应。线粒体 DNA 拷贝数的算法为: 该反应加入的竞争模板数量乘以“灰度比值比与参考系数”的比值。参考系数为当  $matR^-/matR$  的数量为 1:1 时, 两 PCR 扩增产物灰度值的比值。金鱼草的该比值为 0.66<sup>[1]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 中央细胞的分离

通过挤压胚囊的珠孔端, 中央细胞从胚囊的合点端溢出(图 1: A)。分离的金鱼草中央细胞直径为 (49 $\pm$ 8)  $\mu\text{m}$  ( $n=6$ ) (图 1: B), 体积为 (61570 $\pm$ 10698)  $\mu\text{m}^3$  ( $n=6$ )。其直径与莴苣(*Lactuca sativa*)和蓝猪耳(*Torenia fournieri*)中央细胞的直径相近<sup>[13,15]</sup>。在明视场下, 由于致密细胞内容物的干扰, 无法观察到金鱼草中央细胞的极核是否发生了融合。

### 2.2 中央细胞的线粒体 DNA 数量

我们共分离了 30 个金鱼草中央细胞, 加入 60  $\mu\text{L}$  消化液以释放 DNA 模板。定量 PCR 反应时, 每个 PCR 反应液中加入 2  $\mu\text{L}$  变性的消化液作为 DNA 模板, 这对应于 1 个中央细胞所包含的线粒体 DNA 数量。在每组试验中, 我们设置了 5 个 PCR

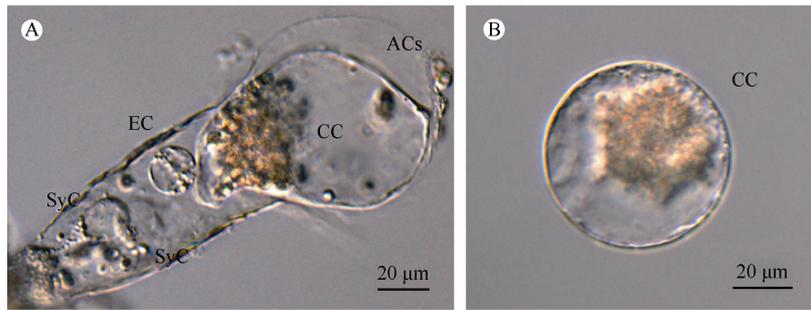


图 1 金鱼草中央细胞的分离。A: 胚囊; B: 中央细胞; SyC: 助细胞; EC: 卵细胞; CC: 中央细胞; ACs: 反足细胞。

Fig. 1 Isolation of central cell of *Antirrhinum majus*. A: Embryo sac; B: Central cell; SyC: Synergid cell; EC: Egg cell; CC: Central cell; ACs: Antipodal cell.

反应, 分别包含 200、400、600、800 及 1000 个竞争模板  $matR^-$ 。线粒体 DNA 上的  $matR$  片段与体外加入的竞争型  $matR^-$  片段将在同一 PCR 管中共扩增, 其产物大小分别为 388 bp 及 272 bp。从凝胶电泳结果可见, 随着竞争型模板  $matR^-$  数量的增加, 272 bp 的条带产量也逐渐增加, 同时 388 bp 的条带产量逐渐减少(这是因为随着  $matR^-$  的片段逐渐增加, 尽管  $matR$  的绝对数目没有改变, 但是其相对于  $matR^-$  的数目却是在减少)。这表明  $matR$  与  $matR^-$  在 PCR 扩增过程中表现出明显的竞争关系, 暗示了定量结果是可信的。通过 3 次试验, 单个金鱼草中央细胞的线粒体 DNA 数量分别为 812、771 及 767 个拷贝(图 2)。因此, 金鱼草中央细胞的线粒体 DNA 拷贝数为  $(783 \pm 25)$  个。

### 2.3 体积/线粒体 DNA 数量之比

在前期研究中, 每个金鱼草卵细胞携带  $(42.7 \pm 3.5)$  个拷贝的线粒体 DNA<sup>[1]</sup>。中央细胞的线粒体 DNA 数量是卵细胞的 18.3 倍, 同时, 中央细胞与卵细胞相比具有更大的体积。因此, 我们比较了金鱼草卵细胞与中央细胞中单个线粒体 DNA 所对应的细胞体积, 金鱼草卵细胞的体积为  $(3713 \pm 957) \mu m^3$  ( $n=5$ ), 线粒体 DNA 拷贝数为  $42.7 \pm 3.5$ , 每个拷贝的线粒体 DNA 所对应的细胞体积为  $(87.0 \pm 23.7) \mu m^3$ ; 中央细胞的体积为  $(61570 \pm 10698) \mu m^3$ , DNA 拷贝数为  $783 \pm 25$ , 每个拷贝的线粒体 DNA 所对应的细胞体积为  $(78.6 \pm 13.4) \mu m^3$  (图 3)。不难看出, 卵细胞及中央细胞的体积/线粒体 DNA 数量之比相似。

## 3 讨论

本研究通过分离金鱼草中央细胞, 并首次定量

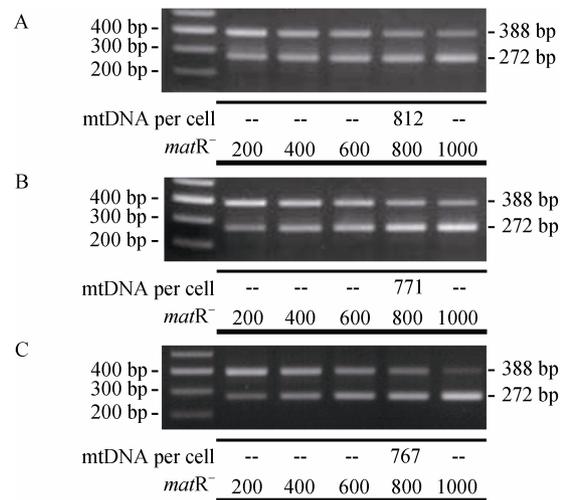


图 2 金鱼草中央细胞中的线粒体 DNA 拷贝数。A, B, C 代表 3 次实验。

Fig. 2 Number of mtDNA copies in central cell of *Antirrhinum majus*. A, B, and C represent 3 experiments.

了其线粒体 DNA 拷贝数。研究表明, 单个中央细胞携带的线粒体 DNA 拷贝数为  $783 \pm 25$ , 其含量是卵细胞的 18.3 倍; 而且中央细胞与卵细胞具有相似的体积/线粒体 DNA 数量比值, 推测金鱼草中央细胞中高丰度的线粒体 DNA 可能与其较大的细胞体积相关。另一方面, 尽管金鱼草中央细胞与天竺葵及水稻卵细胞拥有相近的细胞体积<sup>[1,9]</sup>, 但线粒体 DNA 数量却远少于这些细胞, 暗示这两类细胞增加线粒体 DNA 数量的机制可能不同。

中央细胞携带大量的线粒体 DNA 可能是为早期胚乳细胞的发育而储备的。在双受精完成后, 早期胚乳细胞呈现出快速的细胞核分裂。拟南芥双受精完成后 19 h, 尽管合子仍处于未分裂的延长时期, 但是胚乳细胞核却已进行了 3 次分裂形成 8 核的胚乳<sup>[6]</sup>, 尤其是前两次分裂在 5 h 内完成, 显示出更快的分裂速度<sup>[17]</sup>。胚乳细胞核的快速分裂需要核 DNA 的复制也能快速完成, 因而需要参与 DNA 复

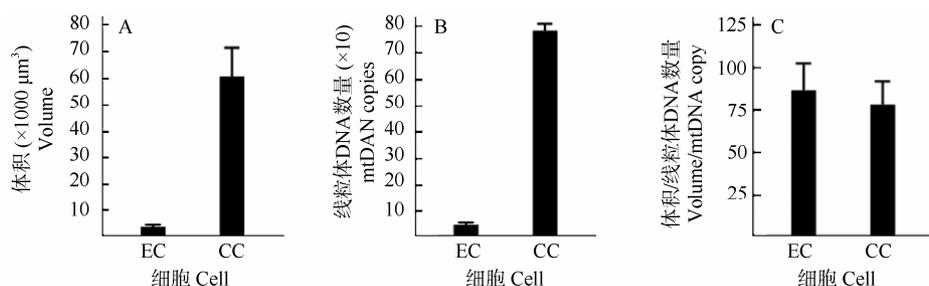


图3 中央细胞和卵细胞的体积和线粒体 DNA 数量。EC: 卵细胞; CC: 中央细胞。

Fig. 3 Volume and mtDNA copies in central cell and egg cell. EC: Egg cell; CC: Central cell.

制的各原料能被充分地供给。在正常细胞中, 细胞核 DNA 的复制总是伴随着线粒体 DNA 的复制, 而线粒体 DNA 的复制可能消耗一部分原料而不利于核 DNA 的快速复制; 在早期胚乳中, 由于大量线粒体 DNA 的存在, 从而可以使得参与 DNA 复制的各原料能被更多地提供给胚乳核而保证其快速的分裂。

## 参考文献

- [1] WANG D Y, ZHANG Q, LIU Y, et al. The levels of male gametic mitochondrial DNA are highly regulated in angiosperms with regard to mitochondrial inheritance [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(7): 2402–2416. doi: 10.1105/tpc.109.071902.
- [2] PREUTEN T, CINCU E, FUCHS J, et al. Fewer genes than organelles: Extremely low and variable gene copy numbers in mitochondria of somatic plant cells [J]. *Plant J*, 2010, 64(6): 948–959. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2010.04389.x.
- [3] CAI Q, GUO L, SHEN Z R, et al. Elevation of pollen mitochondrial DNA copy number by WHIRLY2: Altered respiration and pollen tube growth in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(1): 660–673. doi: 10.1104/pp.15.00437.
- [4] SHEAHAN M B, MCCURDY D W, ROSE R J. Mitochondria as a connected population: Ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion [J]. *Plant J*, 2005, 44(5): 744–755. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02561.x.
- [5] ARIMURA S, YAMAMOTO J, AIDA G P, et al. Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(20): 7805–7808. doi: 10.1073/pnas.0401077101.
- [6] CUMMINS J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction [J]. *Rev Reprod*, 1998, 3(3): 172–182. doi: 10.1530/ror.0.0030172.
- [7] EBERT K M, LIEM H, HECHT N B. Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo [J]. *J Reprod Fertil*, 1988, 82(1): 145–149. doi: 10.1530/jrf.0.0820145.
- [8] WAI T, AO A, ZHANG X Y, et al. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(1): 52–62. doi: 10.1095/biolreprod.109.080887.
- [9] TAKANASHI H, OHNISHI T, MOGI M, et al. Studies of mitochondrial morphology and DNA amount in the rice egg cell [J]. *Curr Genet*, 2010, 56(1): 33–41. doi: 10.1007/s00294-009-0277-3.
- [10] TIAN H Q, ZHU X Y. *Reproductive Biology of Angiosperm* [M]. Beijing: Science Press, 2012: 1–255.  
田惠桥, 朱学艺. 被子植物生殖生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2012: 1–255.
- [11] BERGER F, GRINI P E, SCHNITTGER A. Endosperm: An integrator of seed growth and development [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(6): 664–670. doi: 10.1016/j.pbi.2006.09.015.
- [12] SUN M X, YANG H Y, ZHOU C. A new method for embryo sac isolation and *in situ* fusion of egg and synergid protoplasts in *Nicotiana tabacum* [J]. *Acta Bot Sin*, 1993, 35(12): 893–900.  
孙蒙祥, 杨弘远, 周嫦. 分离烟草胚囊的新方法及诱导卵细胞与助细胞原生质体的原位融合 [J]. *植物学报*, 1993, 35(12): 893–900.
- [13] CHEN L, ZHANG Y N, QIU Y L, et al. Isolation of embryo sac cells of lettuce (*Lactuca sativa*) [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2010, 32(4): 323–327. doi: 10.3724/SP.J.1143.2010.09131.  
陈琳, 张亚楠, 邱义兰, 等. 莴苣胚囊细胞分离 [J]. *云南植物研究*, 2010, 32(4): 323–327. doi: 10.3724/SP.J.1143.2010.09131.
- [14] GILLILAND G, PERRIN S, BLANCHARD K, et al. Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(7): 2725–2729. doi: 10.1073/pnas.87.7.2725.
- [15] OKUDA S, TSUTSUI H, SHIINA K, et al. Defensin-like polypeptide LURES are pollen tube attractants secreted from synergid cells [J]. *Nature*, 2009, 458(7236): 357–361. doi: 10.1038/nature07882.
- [16] FAURE J E, ROTMAN N, FORTUNÉ P, et al. Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: Developmental stages and time course [J]. *Plant J*, 2002, 30(4): 481–488. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2002.01305.x.
- [17] MARUYAMA D, VÖLZ R, TAKEUCHI H, et al. Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism [J]. *Cell*, 2015, 161(4): 907–918. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.018.