

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00540

落叶松体细胞胚成熟阶段差异表达的基因及部分基因的表达谱分析

张蕾^{1,2}, 齐力旺¹, 韩素英³

1. 中国林业科学研究院林业研究所细胞生物学实验室, 北京 100091;

2. 国家知识产权局专利审查协作中心, 北京 100193;

3. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091

摘要: 为研究落叶松体细胞胚胎发生的分子机理, 文章以日本落叶松×华北落叶松杂种无性系胚性细胞系 Y35 体细胞胚成熟阶段培养物的 cDNA 为实验组, 继代培养阶段胚性愈伤组织的 cDNA 为对照组, 利用抑制性消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)构建了体细胞胚成熟阶段的差异表达基因文库。随机选取 800 个阳性克隆进行测序, 共获得 468 个 UniGenes, 共将其分为 19 类, 功能分析结果表明: 这些 UniGenes 可能参与代谢、转录、信号转导、转运、细胞生长分裂、细胞结构、细胞命运、蛋白质合成与降解、防御等与个体发育密切相关的生物学过程。对部分 ESTs 的表达谱进行分析, 结果表明这些 ESTs 均在落叶松体细胞胚胎发生的不同阶段特异表达。

关键词: 落叶松; 体细胞胚成熟; 差异表达基因; 抑制性消减杂交

Differentially expressed genes during *Larix* somatic embryo maturation and the expression profile of partial genes

ZHANG Lei^{1,2}, QI Li-Wang¹, HAN Su-Ying³

1. Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

2. Patent Examination Cooperation Center, State Intellectual Property Office of the People's Republic of China, Beijing 100193, China;

3. Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract: To study the molecular mechanism of *Larix* somatic embryogenesis, a differentially expressed cDNA library of *Larix* somatic embryo in the period of maturation was constructed using suppression subtractive hybridization (SSH). The cDNA from the cultures at the stage of somatic embryo maturation of embryogenic cell line Y35 of *L. leptolepis* × *L. principis-rupprechtii* was used as the tester and the cDNA from its subcultured callus was used as the driver. Eight hundreds randomly selected positive clones were sequenced, and 468 UniGenes were obtained finally. According to their function, these ESTs were classified into 19 categories and were involved in many biological process related to plant growth and development such as metabolism, transcription, signal transduction, transport facilitation, cell growth and division, cell structure, cell fate, protein synthesis or degradation, defense etc. Real-time PCR results of several ESTs showed that they were all

收稿日期: 2008-06-24; 修回日期: 2009-02-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2006AA100109 和 2008AA10Z126)、国家自然科学基金重点项目(编号: 30830086)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)(编号: 2009CB119106)资助

作者简介: 张蕾(1980-), 女, 博士研究生, 研究方向: 林木分子生物学。Tel: 010-62888881; E-mail: zhleinihao888@126.com

通讯作者: 齐力旺(1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 林木遗传育种。Tel: 010-62888445; E-mail: lwqi@caf.ac.cn

differentially expressed at the different stages during cell line Y35 somatic embryo maturation.

Keywords: *Larix*; somatic embryo maturation; differentially expressed genes; suppression subtractive hybridization

体细胞胚胎发生作为植物细胞全能性的一种表达方式,是植物尤其是针叶树种无性繁殖的重要手段,在人工种子制备、种质资源保存、大规模无性繁殖、遗传转化等诸多领域中具有极大的应用价值[1,2]。近年来,植物体细胞胚胎发生的研究取得了令人瞩目的成绩,但是,也仍然存在很多问题,许多极具应用价值的植物体胚发生困难、质量不高、发生数量低而且难以同步化,大大限制了体细胞胚胎发生技术在上述领域中的应用。尽管目前已有了一些关于植物体细胞胚胎发生的生理生化特性的研究报道,也获得了一些与体细胞胚发生相关的基因,但是其发生机理尤其是分子调控方面的研究仍然十分薄弱,不足以解决生产和科学研究中存在的问题。因此,利用已有的稳定高效的植物体细胞胚胎发生体系,深入了解体细胞胚胎发生的分子机理,了解一些关键因子和关键基因如何影响和调控植物体细胞胚胎的发生和发育,不仅对于解决体细胞胚分化过程中的瓶颈,对其发生和发育进行人为调控,也对揭示植物体细胞胚胎发生这一特定细胞分化过程的本质具有极其重大的意义。

本研究以日本落叶松×华北落叶松(*Larix leptolepis*×*L. principis-rupprechtii*)杂种无性系胚性细胞系 Y35 继代培养阶段的胚性愈伤组织和体细胞胚成熟阶段的培养物为实验材料,利用抑制性消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)构建了落叶松体细胞胚成熟阶段差异表达基因文库,并对部分 ESTs 的表达谱进行了分析,旨在研究落叶松体细胞胚成熟过程中差异表达的基因,也为研究植物由单细胞向整体植株发育的分子机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以本实验室保存的已建立稳定高效的体细胞胚发生体系的日本落叶松×华北落叶松杂种无性系胚性细胞系 Y35 继代培养阶段的胚性愈伤组织(ABA 诱导 0 d)为对照组(Driver),以成熟阶段 ABA 诱导

1、5、7、14、21、28、35 和 42 d 的培养物构建实验组(Tester)的混合池。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 mRNA 纯化

分别提取 9 个时期样品的总 RNA,并将成熟阶段 8 个不同时期样品的总 RNA 等量混合作为实验组总 RNA。

取实验组和对照组总 RNA 进行 mRNA 分离纯化,分离步骤参照 Qiagen 公司的 OligotexTM mRNA Purification Kit 说明书。

1.2.2 抑制性消减杂交

抑制性消减杂交根据 BD PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 说明书进行。

1.2.3 差异表达基因文库的构建

取抑制性消减杂交后正向消减 cDNA 的第二轮 PCR 扩增产物连入 pGEM-T Easy 载体,取 3 μ L 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,在涂有 IPTG/X-gal 的 LB 平板(附加 50 μ g/mL Amp)上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取白色克隆接种到附加 50 mg/L Amp 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 摇菌过夜,取 1 μ L 用于下一步的 PCR 筛选,在其余菌液中添加 20%的甘油,混匀后于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱长期保存。

1.2.4 插入片段的 PCR 鉴定

以白色克隆菌液为模板,用 BD PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 中巢式引物 Nested PCR Primer1 和 Nested PCR Primer2R 对 pGEM-T Easy 载体上的外源插入片段进行 PCR 扩增,以鉴定有无插入片段,并估计插入片段的大小。

1.2.5 文库克隆序列测定

筛选阳性克隆后,随机选取 800 个阳性克隆送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序,用 Phred-Phrap 分析软件去除序列片段上的 pGEM-T Easy 载体序列以及包含 Nested PCR Primer1 和

Nested PCR Primer2R 的接头序列, 得到每个克隆的 EST 序列信息, 再通过 Stackpack 软件将获得的序列进行拼接, 获得 Contigs 和 Singletons。使用 BLAST 软件, 在 GenBank 上的蛋白库中对获得的由 Contigs 和 Singletons 组成的 UniGenes 进行蛋白质同源性比较和功能分析, 最后根据蛋白的相似性推测 UniGenes 的功能, 并参照 FunCA 对获得的 UniGenes 进行分类。

1.2.6 部分差异表达 ESTs 的表达分析

以落叶松 18S 基因作为内参, 对编码氨基酸序列与丝裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK)、干旱诱导蛋白 LP3-3(Water Deficit Induced protein LP3-3)和热激蛋白 HSP70(Heat Shock Protein HSP70)同源的序列 EM1、EM2 和 EM3 进行定量分析。引物序列见表 1。

表 1 定量 PCR 引物

序列	引物(5'→3')
18S	F: CATGATAACTCGACGGATCG R: CTTGGATGTGGTAGCCGTTT
EM1	F: TGGCCAGTGTAATTCCTTC R: TAGGCCAATCAGGTCTCTGC
EM2	F: GTGGGAGAAGGGGGTTATGT R: CAAGAAGGGGAAGACGAGTG
EM3	F: TTTGCCAGCAGGTTATTGT R: AAAGTGGGGAGGTGTAATG

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取与 mRNA 的纯化

提取总 RNA, 并在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 结果表明提取的总 RNA 质量较好, 28S 和 18S 条带的亮度比达到了 2:1(图 1)。进一步用紫外分光光度计检测其纯度, 总 RNA OD_{260}/OD_{280} 的值均在 1.9~2.0 之间, 表明其纯度较高, 无蛋白和 DNA 污染, 可以用于 mRNA 的纯化。对总 RNA 进行定量, 然后分离纯化实验组和对照组的 mRNA, 纯化后的 mRNA 经定量后用于下一步实验。

2.2 双链 cDNA 的合成和 *Rsa* 酶切

合成 Tester 和 Driver 的双链 cDNA, 再以 *Rsa* 酶切合成的双链, 以产生平头末端, 用于后续的连接实验。将酶切前和酶切后的双链 cDNA 样品于 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 结果显示: 酶切前双链

cDNA 主要分布在 0.2~4 kb, 经 *Rsa* 酶切后, cDNA 片段主要分布在 0.5~1 kb 左右(图 2), 双链 cDNA 的质量和 *Rsa* 酶切效果均达了下一步实验的要求。

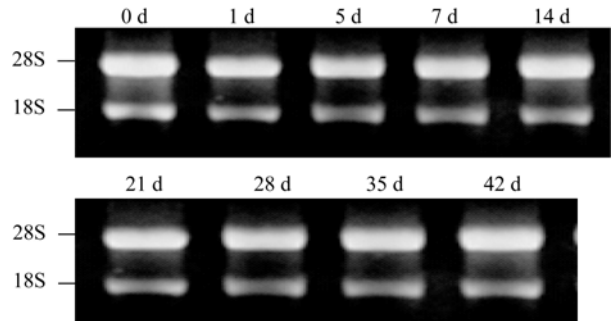


图 1 总 RNA 电泳图

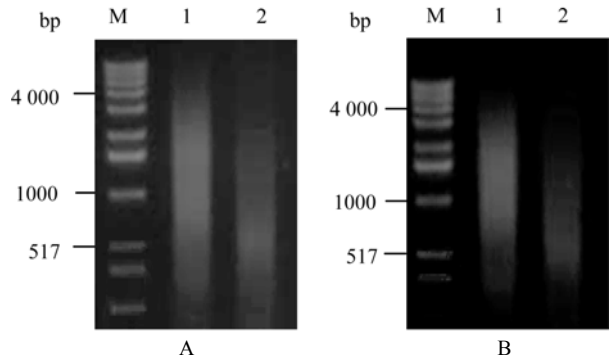


图 2 Tester 双链(A)及 Driver 双链(B)cDNA

M: 1 kb DNA Maker; 1: 酶切前的双链 cDNA; 2: 酶切后的双链 cDNA。

2.4 杂交产物的两轮 PCR 扩增

两轮杂交后, 以正向消减和正向未消减 cDNA 为模板, 进行两轮扩增。扩增结果显示: 两次 PCR 扩增产物大小均在 0.3~1 kb 之间, 其中未消减 cDNA 第二轮 PCR 扩增产物集中分布于 0.3~1 kb 之间, 与之相比, 消减后 cDNA 的第二轮 PCR 扩增产物主要集中在 0.3~0.6 kb, 且消减后的 cDNA 在第二轮 PCR 扩增后才能够看见明显的弥散谱带, 而未消减的 cDNA 在第一轮扩增后就有了明显的弥散带, 表明消减杂交取得了较为明显的消减效果(图 3)。

2.6 插入片段的 PCR 鉴定

构建消减文库后, 用巢式引物对白色克隆菌液进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 4), 插入片段长度多在 500 bp 左右, 并呈现出较强的多态性, 具有低重复率的特点, 表明经过差减后高丰度基因的均一化效果较好, 构建的文库质量较高。

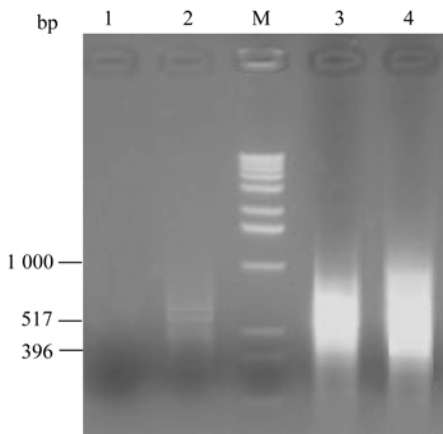


图 3 两次 PCR 扩增结果

M: 1 kb DNA ladder; 1: 正向消减 cDNA 第一轮 PCR 产物; 2: 正向未消减 cDNA 第一轮 PCR 产物; 3: 正向消减 cDNA 第二轮 PCR 产物; 4: 正向未消减 cDNA 第二轮 PCR 产物。

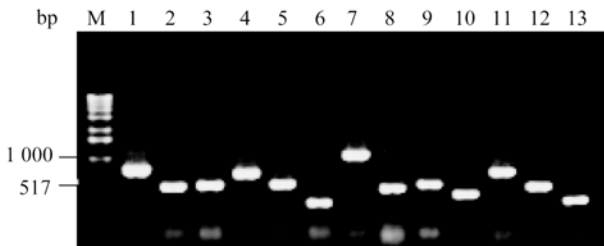


图 4 阳性克隆的 PCR 检测

M: 1kb DNA ladder; 1~23: 插入片段。

2.7 阳性克隆的 cDNA 测序与同源性分析结果

对阳性克隆进行测序后, 返回 763 个有效序列, 将所得序列进行拼接, 获得 185 个 Contigs 和 283 个 Singletons, 共 468 个 UniGenes, 序列冗余度为 38.6%。较低的冗余度进一步证明了构建的消减文库质量较高。将获得的 UniGenes 与 GenBank 中的蛋白质数据库进行比对, 获得功能已知的基因 279 个, 未找到匹配序列的功能未知的基因 159 个, 在蛋白库中能查到同源性基因, 但同源性很低, 无法确切推断其功能的基因(未分类)30 个。将全部 UniGenes 分为 19 类(图 5), 分析结果表明这些差异表达的基因广泛参与代谢、转录、信号转导、转运、细胞生长分裂、细胞结构、细胞命运、蛋白质合成和降解、核酸及蛋白质加工、发育、防御等诸多与个体发育密切相关的生物学过程。

2.8 部分差异表达 ESTs 的表达分析

对获得的编码 MAPKK、LP3-3 和 HSP70 的 EM1、EM2 和 EM3 进行定量分析, 结果如图 6。3

个基因在落叶松体细胞胚成熟阶段的总体表达量均呈现出不同程度的上调。其中 EM1 在 ABA 诱导 14~28 d 时表达量大大高于其他时期; EM2 在落叶松体细胞胚成熟阶段各个时期的表达量均高于原胚团阶段; EM3 的表达量在进入体细胞胚成熟阶段后也明显上调, 并在 ABA 诱导 1~5 d 和 28 d 时形成两个明显的高峰。

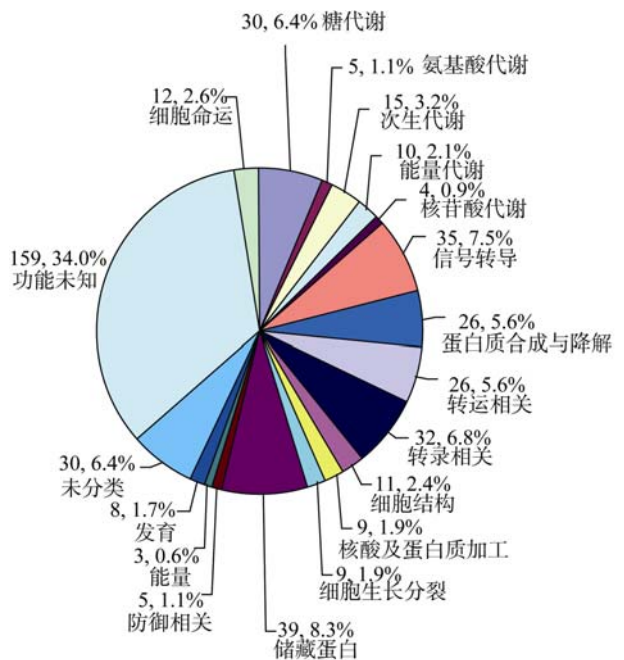


图 5 差异表达 UniGenes 的功能分类

3 讨论

在适宜的条件下, 胚性细胞中的某些细胞能够发育形成体细胞胚, 这个发育过程往往包含着细胞内特异基因的选择性表达^[3]。落叶松体细胞胚成熟阶段是体细胞胚形态建成的关键时期, 也是基因表达最为丰富的阶段, 研究这一关键时期差异表达的基因, 对于揭示体细胞胚发生的分子机理具有十分重要的意义。在已有的研究差异表达基因的方法中, SSH以其高效、灵敏的优点, 成为目前较为有效的筛选差异表达基因的方法, 尤其是在植物生长发育相关基因的研究上得到了广泛应用^[4-8]。本研究也通过 SSH技术, 成功地获得了大量的在落叶松体细胞胚成熟阶段特异表达的ESTs, 功能分析结果表明它们几乎囊括了全部的基因类型, 表明体细胞胚作为个体发育的雏形, 其发生过程涉及了与个体发育密切相关的全部生物学事件。

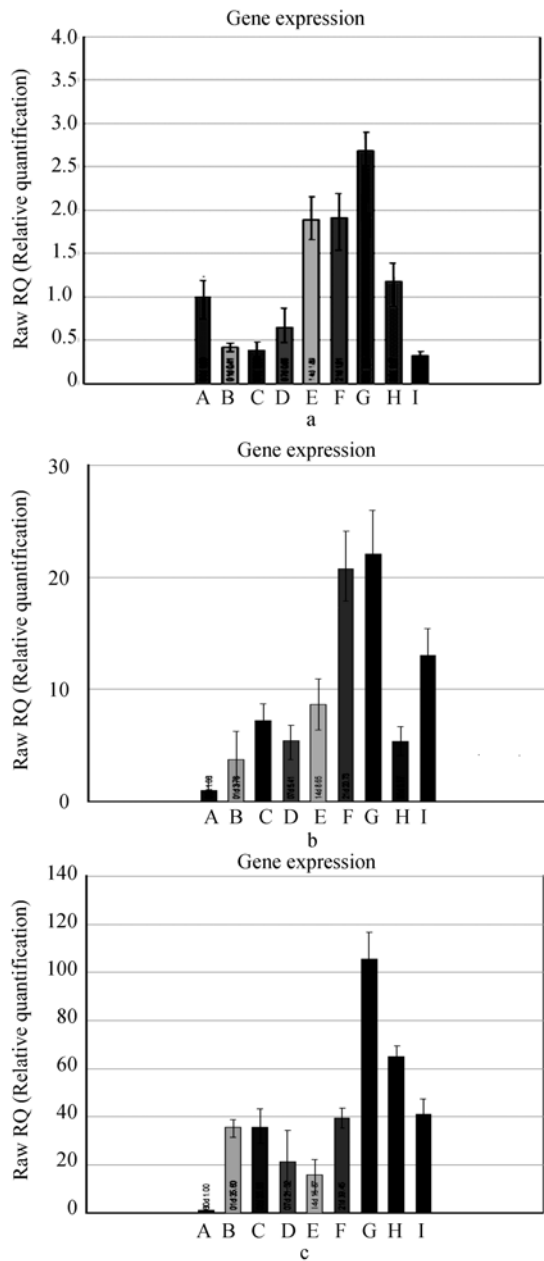


图 6 3 个差异表达 EST 的表达谱分析

a: EM1 的表达谱; b: EM2 的表达谱; c: EM3 的表达谱。A: 0 d; B: 1 d; C: 5 d; D: 7 d; E: 14 d; F: 21 d; G: 28 d; H: 35 d; I: 42 d。

有研究表明, 自然条件下胚胎发育后期主要是储藏物质的积累, 为种子能够耐受长时间的干燥储藏做准备^[9], 本研究也充分证明储藏物质的积累是落叶松体细胞胚成熟的重要过程, 在获得的功能已知的基因中, 储藏蛋白类基因比例最高, 这些储藏蛋白类基因的大量表达是储藏物质积累的基础, 为体细胞胚的萌发积聚了充足的能量。

在植物胚胎形成过程中, 调节诱导相互作用的传递信号分子非常重要。在落叶松体细胞胚成熟过程中, 也有许多信号转导类因子参与了体细胞胚的发育, 如丝裂原活化蛋白激酶激酶(Mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK)和Ras蛋白等。其中 MAPKK 能够激活 MAPK, 在 MAPK 信号转导途径中具有重要地位^[10]。已有的研究表明, MAPK 级联途径控制着细胞生长、发育、分裂、死亡等多种生理过程, 同时也参与激素(如 ABA)信号的转导^[11, 12]。Ras 蛋白也是细胞中信号转导的重要组织者, 能够激活 MAPK 通路, 是多种信号转导通路的汇合点, 在细胞增殖和分化过程中起着关键作用^[13, 14]。据此可以推断, 可能有多个信号通路参与了落叶松体细胞胚的发育, 而这些通路之间很可能会形成错综复杂的信号调节网络。

在自然条件下, 植物的合子胚处于种子中, 随种子的发育而不断成熟。种子的成熟要经历成熟干燥过程, 植物体细胞胚的成熟过程与合子胚相似, 因此也必然会受干旱胁迫的影响。在落叶松体细胞胚成熟阶段也有 LP3-3 和 LEA 蛋白等干旱诱导蛋白的表达, 它们能够保护植物细胞中的生物大分子, 维持特定细胞结构, 在胚成熟过程中保护胚细胞内大分子物质免受脱水过程造成的伤害^[15, 16]。

此外, 细胞程序性死亡对于植物体细胞胚的生长发育也至关重要, 植物的一些组织形态和器官建成也需要通过细胞程序性死亡来实现。有研究表明, 在针叶树体细胞胚胎发育过程中要发生两次程序性细胞死亡, 第一次发生在胚胎形成早期, 原胚团向早期胚发育的过渡时期, 第二次发生在早期胚向晚期胚发育的过渡时期^[17, 18]。在落叶松体细胞胚成熟阶段也有一些细胞凋亡因子表达, 如热激蛋白 Hsp70(Heat shock protein Hsp70)和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Cystatin) 等。热激蛋白 HSP 和 cystatin 能够参与并调控细胞凋亡的各个事件, 发挥抗细胞凋亡或促细胞凋亡的作用^[19, 20]。由此推断它们可能在帮助发育中的体细胞胚通过细胞程序性死亡的方式减少养分的消耗和多余细胞对体细胞胚发育的不良影响的同时, 通过介入细胞凋亡信号转导通路对细胞凋亡进行调控, 保证体细胞胚正常发育。

对氨基酸编码序列分别为 MAPKK、LP3-3 和 HSP70 的 EM1、EM2 和 EM3 的定量 PCR 分析结果

表明, 它们分别在体细胞胚成熟过程中的不同阶段特异表达, 参与不同发育时期的生命活动。在 ABA 诱导 1~5 d 时, Y35 体细胞胚的发育处于原胚团向早期单胚发育的阶段; 5~14 d 时, 处于早期单胚向中期单胚发育的阶段; 21~28 d 处于中期单胚向子叶胚发育的阶段; 35~42 d 子叶胚完全发育成熟, 并进入成熟后期。EM1 在 ABA 诱导 14~28 d 时大量表达, 推测它可能在 Y35 体细胞胚中期单胚向子叶胚的发育过程中发挥重要作用; EM2 在 Y35 体细胞胚成熟阶段上调表达, 这可能有助于发育中的体细胞胚响应 ABA 和 PEG 造成的胁迫, 以保护胚性细胞, 使其少受或不受到伤害; 而编码细胞凋亡因子 HSP70 的 EM3 在 Y35 体细胞胚成熟阶段两次表达高峰的出现时间与体细胞胚发育过程中两次程序性细胞死亡发生的时间基本一致, 推测 EM3 可能在两次程序性细胞死亡过程中起到了重要的调控作用。同时, 定量 PCR 的结果也证明了消减文库的可靠性, 为进一步研究这些基因的功能奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] McGranahan GH, Leslie CA, Uratsu SL, Dandekar AM. Improved efficiency of the walnut somatic embryo gene transfer system. *Plant Cell Rep*, 1990, 8(9): 512–516.[\[DOI\]](#)
- [2] 吕守芳, 张守攻, 齐力旺, 孙晓梅, 王建华. 体细胞胚胎发生在林木树种中的应用. *世界林业研究*, 2003, 16(6): 6–11.
- [3] 邢更生, 崔凯荣, 山仑, 王亚馥. 植物体细胞胚发生的分子基础. *遗传*, 1999, 21(1): 30–34.
- [4] Wang ML, Hsu CM, Chang LC, Wang CS, Su TH, Huang YJ, Jiang LW, Jauh GY. Gene expression profiles of cold-stored and fresh pollen to investigate pollen germination and growth. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(10): 1519–1528.[\[DOI\]](#)
- [5] Zhao YH, Wang GY, Zhang JP, Yang JB, Peng S, Gao LM, Li CY, Hu JY, Li DZ, Gao LZ. Expressed sequence tags (ESTs) and phylogenetic analysis of floral genes from a paleoherb species, *Asarum caudigerum*. *Ann Bot*, 2006, 98(1): 157–163.[\[DOI\]](#)
- [6] Gepstein S, Sabehi G, Carp M J, Hajouj T, Falah M, Neshier O, Yariv I, Dor C, Bassani M. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J*, 2003, 36(5): 629–642.
- [7] Pesquet E, Ranocha P, Legay S, Digonnet C, Barbier O, Pichon M, Goffner D. Novel markers of xylogenesis in zinnia are differentially regulated by auxin and cytokinin. *Plant Physiol*, 2005, 139(4): 1821–1839.[\[DOI\]](#)
- [8] Zeng FC, Zhang XL, Zhu LF, Tu LL, Guo XP, Nie YC. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(2): 167–183.[\[DOI\]](#)
- [9] 蒋丽, 齐兴云, 龚化勤, 刘春明. 被子植物胚胎发育的分子调控. *植物学通报*, 2007, 24(3): 389–398.
- [10] Soyano T, Ishihama R, Orikiyo K, Ishikawa M, Machida Y. NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev*, 2003, 17(8): 1055–1067.[\[DOI\]](#)
- [11] Zhang T, Liu Y, Yang T, Zhang L, Xu S, Xue L, An L. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44(5/6): 274–283.[\[DOI\]](#)
- [12] Yuhko K, Shuhei Y, Hideyuki M, Yasuaki K, Tsukahara H. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell*, 2004, 16(5): 163–117.
- [13] 康小伟. Ras 蛋白与信号传导. *生命科学*, 1996, 8(2): 24–26.
- [14] Field MC. Signalling the genome: the Ras-like small GTPase family of trypanosomatids. *Trends Parasitol*, 2005, 21(10): 447–450.[\[DOI\]](#)
- [15] Wang JT, Gould HJ, Padmanabhan V, Newton RJ. Analysis and localization of the Water-Deficit Stress-Induced gene (*lp3*). *J Plant Growth Regul*, 2003, 21(4): 469–478.[\[DOI\]](#)
- [16] Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcíarrubio A, Covarrubias AA. Highly hydrophilic proteins in prokaryote and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5668–5674.[\[DOI\]](#)
- [17] Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, Arnold SV. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J Cell Sci*, 2000, 113(24): 4399–4411.
- [18] Stasolla C, Loukanina N, Yeung EC, Thorpe TA. Progression of programmed cell death in tobacco BY-2 cells is delineated by specific changes in de novo and salvage synthesis of purine nucleotides. *Physiol Plant*, 2005, 123(4): 254–261.[\[DOI\]](#)
- [19] 秦佳, 杨金莹, 伊淑莹, 刘箭. 热激蛋白对细胞凋亡的调节作用. *生命科学*, 2007, 19(2): 159–163.
- [20] Grudkowska M, Zagdanska B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochem Pol*, 2004, 51(3): 609–624.