

史艳慧,赵吉强,陈磊,等. 芹菜不同器官、品种 *CEL I* 核酸酶提取的比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):20-23.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.005

芹菜不同器官、品种 *CEL I* 核酸酶提取的比较

史艳慧,赵吉强,陈磊,李丽霞,徐艳,张园园,郭善利,宋建成

(烟台大学生命科学学院,山东烟台 264005)

摘要:随着 TILLING 技术的发展,发挥关键作用的芹菜 *CEL I* 核酸酶也得到了越来越广泛的应用。鉴于其活性直接影响突变体检测的效果,而芹菜粗提物中 *CEL I* 核酸酶的含量和活性因提取组织及提取程序不同而有较大变化,所以本研究分析了芹菜不同器官、品种等因素对 *CEL I* 核酸酶粗提物提取量的影响,并用只含有 1 个碱基差异的 2 个目的 DNA 片段形成的杂交链为底物对其活性进行了鉴定。结果表明:芹菜不同器官和品种间的 *CEL I* 核酸酶提取量存在较大差异。不同器官的榨汁率和提取量,以茎的出汁率最高,而叶片中的提取量显著高于根和茎中的提取量;在本研究所用的 3 个品种中,以山东地方品种马家沟芹的提取量最高,山芹次之,西芹的提取量最低;*CEL I* 核酸酶的活性鉴定表明,*CEL I* 核酸酶粗提物能有效切割 DNA 双链中的错配碱基。

关键词:芹菜;品种;器官;*CEL I* 核酸酶;TILLING

中图分类号: S636.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0020-04

定向诱导基因组局部突变技术^[1] (targeting induced local lesions in genome, TILLING) 是研究功能基因组的重要技术之一,在众多反向遗传策略中最有应用前景^[2],利用 *CEL I* 核酸酶切割错配碱基在 TILLING 技术中检测突变位点时具有非常重要的作用^[3-4]。TILLING 技术中用 *CEL I* 核酸酶进行突

变位点检测的主要流程如下:(1)以 50% 致死剂量的 EMS 诱变种子^[5],产生大量点突变,并组成饱和突变群体;(2)提取突变群体单株基因组 DNA 并构建 DNA 池;(3)根据目标基因设计特异引物,以 DNA 池为模板进行目的片段的 PCR 扩增;(4)扩增产物经变性、退火,获得野生型与突变型的异源双链核酸分子后进行 *CEL I* 核酸酶酶切^[6-7];(5)电泳检测含有突变位点的阳性 DNA 池;(6)相同方法从阳性 DNA 池中筛选突变个体;(7)突变体经测序、有效突变预测和表型鉴定获得目的基因的有效突变等位基因。*CEL I* 核酸酶是从芹菜中提取的分子量约为 43 ku 的单链特异性切割酶,能特异性切割错配碱基。商业高纯度 *CEL I* 核酸酶的价格昂贵,其应用在一般科研单位或进行 TILLING 育种实践时受到较大限制。尽管国内外相关文献已经报道了此酶的提取和纯化过

收稿日期:2015-02-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:3137616);山东省自然科学基金(编号:ZR2011CM044、ZR2011CM006)。

作者简介:史艳慧(1988—),女,山东莱阳人,硕士研究生,主要从事植物分子育种研究。E-mail:1021789578@qq.com。

通信作者:宋建成,博士,教授,主要从事植物发育生物学及分子育种研究。E-mail:jcsong88@yahoo.com。

[26] 朱广廉. 植物组织培养中灭菌和无菌操作的几个问题[J]. 植物生理学通讯,1995,31(5):375-384.

[27] 王春. 医用抗生素在马铃薯组织培养中的抑菌效应研究[J]. 甘肃农业科技,2004(10):15-16.

[28] 王亦菲,陆瑞菊,周润梅,等. 彩色海芋组织培养过程中内生菌的抑制[J]. 上海农业学报,2001,17(2):82-83.

[29] 黄小荣,杨开太. 香水白掌的组织培养[J]. 广西林业科学,2001,30(1):39-40.

[30] Levin R, Stav R, Alper Y, et al. *In vitro* multiplication in liquid culture of *Syngonium* contaminated with *Bacillus* spp. and *Rathayibacter tritici*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1996,45(3):277-280.

[31] 翟建中,顾梅俏. 长春蔓组培生产中污染的防除[J]. 森林病虫害通讯,1999(4):30-32.

[32] 周俊辉,杨妙贤,李春霞,等. 在培养基中加入抗生素防止万年青茎段培养污染研究[J]. 广西植物,2005,25(3):233-235.

[33] 潘学峰,庄伟,柯师明. 青霉素 G 钠对阴生植物绿巨人愈伤组织诱导分化及试管苗生长的影响[J]. 海南大学学报:自然科学版,2000,18(4):401-405.

[34] 刘萍,李春喜,姜丽娜,等. 青霉素对小麦生理活性及产量的影响[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版,1999,27(2):82-84.

[35] 刘静,孙海伟,段祖安,等. 混合杀菌剂对植物组培污染防治试验[J]. 山东林业科技,2004(5):10-12.

[36] 李春香,高凤菊,孙献明. 壳聚糖对红掌组培污染菌的抑制作用[J]. 唐山师范学院学报,2008,30(5):44-48.

[37] 窦玥. 两种槭树的组织培养和防治组培污染的初步研究[D]. 大连:辽宁师范大学,2010.

[38] 孟庆祥. 实验室污染的防治及治理实验室污染的防治及治理[J]. 实验室科学,2009(6):161-162.

[39] 李文凯,贾晓鹰,郭海燕,等. 苍术控制植物组培环境污染的研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2003,7(2):90.

[40] 邹瑜,林贵美,韦华芳,等. 四种方法对组培室内空气消毒效果的研究[J]. 北方园艺,2009(8):117-119.

[41] 周俊辉. 植物快速繁殖技术中存在的问题与对策[J]. 仲恺农业技术学院学报,1999,12(4):64-70.

[42] Herman E B. Non-axenic plant tissue culture: possibilities and opportunities[J]. Acta Horticulturae,1990,280:233-238.

程^[6,8],但存在耗时较长、步骤繁琐等缺点。因为从芹菜中粗提的 *CEL I* 核酸酶也能有效地识别并切割错配碱基^[9],可以满足在 TILLING 突变体筛选中的要求,所以自己制备芹菜 *CEL I* 核酸酶已在国内外一些研究和育种单位得到应用。Oleykowski 等在 1998 年首先报道了从芹菜中提取 *CEL I* 核酸酶的实验技术^[6],后来很多研究人员对这种方法进行了改进^[8,10],现在形成的提取方法已经被广泛接受。但目前对影响 *CEL I* 核酸酶提取量的因素的研究还不多见。崔海瑞等报道了芹菜品种、器官、发育时期和提取液 pH 值对 *CEL I* 核酸酶提取量的影响^[11],但所采用的雪白、文图拉和泰国黄心芹 3 个品种在国内多数地区难以获取。本研究选用 3 个常见的芹菜品种西芹、山芹和马家沟芹,比较分析了不同芹菜品种、不同器官等因素对 *CEL I* 核酸酶粗提物提取量及酶活性的影响,以期对 TILLING 应用过程中的突变体筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 芹菜品种 本研究选用西芹、山芹和马家沟芹 3 个芹菜品种,供试材料的新鲜样品均从超市购得。西芹是从欧洲引进的品种,茎宽厚,纤维少,多实心。山芹茎直立,中空,细而紧,我国东北、山东等地均有分布。马家沟芹原产于山东青岛,叶茎嫩黄,茎直空心,棵大鲜嫩。

1.1.2 试验试剂 常规试剂如 Tris-HCl、PMSF、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、KCl、 β -巯基乙醇、琼脂糖、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、TEMED、过硫酸铵、溴酚蓝、考马斯亮蓝、甘氨酸、甘油、SDS、甲醇、冰乙酸等均为国产分析纯制剂。DL2000 DNA marker、DNA 聚合酶和 Protein marker (3595Q) 均购自大连宝生物公司 (TaKaRa)。

1.1.3 溶液配制 Buffer A (0.1 mol/L Tris-HCl, 100 $\mu\text{mol/L}$ PMSF, 0.5 mol/L KCl, pH 值 7.7), 50 \times TAE 缓冲液 (2 mol/L Tris, 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5.71% (V/V) 醋酸), *CEL I* 核酸酶缓冲液 (20 mmol/L HEPES, 10 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl_2 , pH 值 7.5), 标准蛋白溶液 (质量体积浓度为 0.01%), 考马斯亮蓝 G-250 溶液 (0.01% 考马斯亮蓝 G-250, 5.0% 的 90% 乙醇, 10.0% 的 85% 磷酸)。

1.2 试验方法

1.2.1 *CEL I* 核酸酶粗提液的提取 在比较不同器官的榨汁率差异及对 *CEL I* 核酸酶提取量的影响时,取新鲜山芹等量的根、茎和叶为试材,在比较低温保存对 *CEL I* 核酸酶提取量的影响时,取山芹的等量茎和叶组织,在比较不同品种对 *CEL I* 核酸酶提取量的影响时,分别取新鲜西芹、山芹和马家沟芹发育时期相近的等量幼茎为试材。将所取样品清洗干净,用吸水纸吸干表面水分,每份称取 60 g,参照 Till 等的方法^[12]进行 *CEL I* 核酸酶粗提液的提取,所有操作在 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行。将清洗干净的新鲜样品用榨汁机匀浆,纱布过滤,在收集到的汁液中分别加入 1 mol/L Tris-HCl (pH 值 7.7) 和 0.1 mol/L PMSF,使终浓度分别为 0.1 mol/L 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 。4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 600 g 离心 20 min,取上清,加入硫酸铵粉末,使其终浓度为 25%,磁力搅拌 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 g 离心 4 min,取上清,加入硫酸铵粉末,使其终浓度为 80%,磁力搅拌 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 15 000 g 离心 1.5 h,弃上清,用 1/10 初始体积的 buffer A 溶

解沉淀,将重悬液注入透析袋内 [MD25 (8 000 ~ 14 000)], 以 buffer A 为透析液 (淹没透析袋), 4 $^{\circ}\text{C}$ 下透析 10 h, 开始每小时换 1 次透析液,透析 4 h 后每 2 ~ 3 h 换 1 次透析液。收集透析袋内的样品于 EP 管,轻柔混匀,即为 *CEL I* 粗提物,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。

1.2.2 *CEL I* 核酸酶粗提物的定性和定量分析 采用 SDS-PAGE 电泳检测上述 *CEL I* 粗提物,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 4%,用考马斯亮蓝法估测 *CEL I* 核酸酶的量,配制 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准蛋白溶液和考马斯亮蓝 G-250 溶液,具体过程如下:取 7 支试管,分别配制含 0、10、20、30、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$ 的牛血清蛋白溶液各 1 mL,然后在每支试管中加入 4 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,混匀,放置 5 min 后,在 595 nm 下比色。吸取上述酶液 0.05 mL,加入蒸馏水 0.95 mL,放入试管内摇匀,加入 4 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,混匀,放置 5 min 后,在 595 nm 下比色。样品中蛋白含量 (mg/g) = $C \times V_T / V_1 \times m \times 1\,000$, 式中: C 为查标准曲线数值 (μg); V_T 为提取酶液总体积; V_1 为测定时酶液使用体积; m 为样品鲜质量 (g)。

1.2.3 *CEL I* 核酸酶切底物的准备 对 *CEL I* 核酸酶进行活性鉴定时,选用只有 1 个碱基差异 (G 或 C) 的 pEG 为模板进行 PCR 扩增,获得长度为 648 bp 的目的 DNA 片段,PCR 反应体系为 50 μL , 含有 G、C 的模板各 1 μL , 10 \times buffer 5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 2 μL , *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL , dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1 μL , 左右引物各 1 μL , 去离子水 37.6 μL 。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 进行 28 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min。PCR 扩增完毕后,在 99 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 10 min, 接着按 1 $^{\circ}\text{C/s}$ 的速度将温度下降至 70 $^{\circ}\text{C}$, 最后再以 0.3 $^{\circ}\text{C/s}$ 的速度将温度下降至 20 $^{\circ}\text{C}$ 。所得目的 PCR 产物经变性退火得到含有错配碱基的杂合双链,用作 *CEL I* 核酸酶活性鉴定时的酶切底物。

1.2.4 粗提物中 *CEL I* 核酸酶活性鉴定 以上述含有错配碱基的异质双链为底物进行 *CEL I* 核酸酶酶切。20 μL 酶切体系含有 *CEL I* 核酸酶粗提物 1 μL , *CEL I* 核酸酶缓冲液 2 μL , PCR 产物 5 μL , 去离子水 12 μL 。酶切体系在 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅温育 30 min。将酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电极缓冲液采用 1 \times TAE,在 120 V 条件下电泳 20 min,用培清 JS-680D 全自动凝胶成像分析仪拍照,以 DL2000 DNA marker 为参照确定酶切产物切割片段大小。

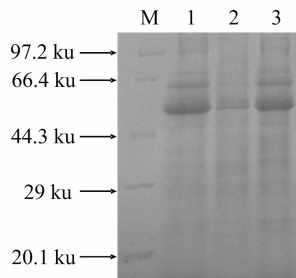
2 结果与分析

2.1 *CEL I* 核酸酶粗提物的定性和定量

通过上述试验步骤,提取的 *CEL I* 核酸酶电泳结果如图 1 所示,由于粗提的 *CEL I* 核酸酶未纯化,含有部分杂质,经 SDS-PAGE 电泳检测其主要条带在 50 ku 左右,略高于文献报道的 43 ku。

2.2 芹菜不同器官的榨汁率差异及对 *CEL I* 核酸酶提取量的影响

榨汁率是影响 *CEL I* 酶产率的重要因素,为了分析不同器官的榨汁率情况,本研究选择山芹的根、茎、叶为材料进行比较,结果如图 2 所示:茎秆的出汁率明显高于根和叶,达到



M—蛋白标记；1、2、3分别为西芹茎、山芹根、山芹茎样品

图1 *CEL* I 酶粗提物的SDS-PAGE电泳结果

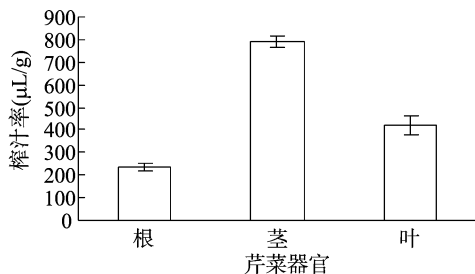


图2 芹菜不同器官的榨汁量

788.89 $\mu\text{L/g}$,是根的3倍多,叶片的出汁率则介于两者之间。

为进一步分析芹菜不同器官对 *CEL* I 核酸酶提取量的影响,选取山芹的根、茎和叶,在相同条件下进行 *CEL* I 核酸酶的提取。提取结果(图3)表明,叶片的提取量最高,达到176.06 $\mu\text{g/g}$,分别为根和茎提取量的3.09倍和5.12倍。

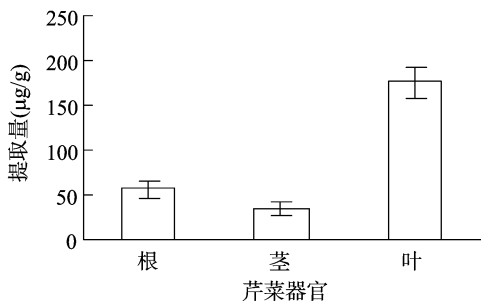


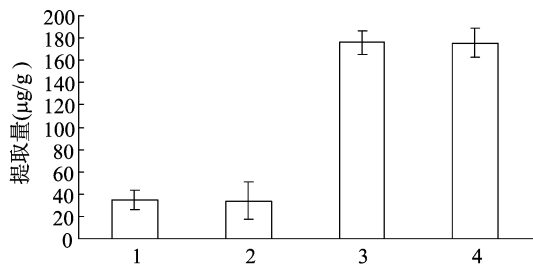
图3 不同芹菜器官对 *CEL* I 提取量的影响

2.3 芹菜低温保存对 *CEL* I 核酸酶提取量的影响

在很多情况下,采取的试验材料由于时间等原因,不能立即投入使用,要经过一定时间的储存。为了分析低温保存对 *CEL* I 核酸酶提取量的影响,本研究以山芹为试验材料,比较了新鲜植株的成熟茎秆和叶片在4℃冰箱中密封保存3d后对 *CEL* I 核酸酶提取量的影响。由图4可见,保存3d后植株茎秆和叶片的 *CEL* I 核酸酶提取量分别为33.97 $\mu\text{g/g}$ 和175.69 $\mu\text{g/g}$,与保存前新鲜茎和叶提取量(34.39 $\mu\text{g/g}$ 、176.06 $\mu\text{g/g}$)相比没有显著变化。说明短期低温保存对 *CEL* I 核酸酶的提取没有显著影响。

2.4 不同芹菜品种对 *CEL* I 核酸酶提取量的影响

选用3个不同芹菜品种的主要器官茎进行 *CEL* I 核酸酶的提取。结果表明,不同品种间 *CEL* I 核酸酶的提取效果存在明显差异,以马家沟芹为最好, *CEL* I 核酸酶粗提物达到154.07 $\mu\text{g/g}$,山芹次之,提取量为34.39 $\mu\text{g/g}$,而西芹的提取量最低,仅为25.22 $\mu\text{g/g}$ (图5)。在相同条件下,马家沟芹的



1—新鲜植株的成熟茎秆；2—4℃下冰箱密封保存3d后植株的茎秆；3—新鲜植株的成熟叶片；4—4℃下冰箱密封保存3d后植株的叶片

图4 芹菜低温保存对 *CEL* I 核酸酶提取的影响

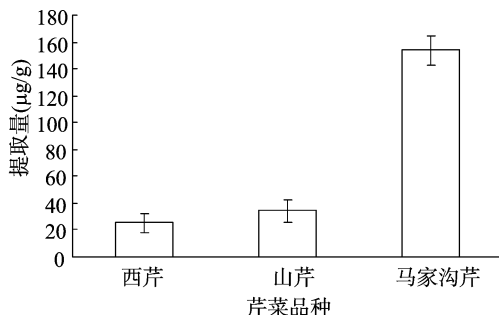
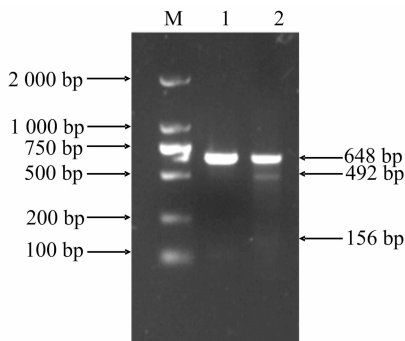


图5 不同芹菜品种对 *CEL* I 提取的影响

CEL I 核酸酶粗提物产量为西芹的6.1倍。

2.5 *CEL* I 核酸酶粗提物的活性鉴定

对 *CEL* I 核酸酶进行活性鉴定时,选用了只有1个碱基有差异(G或C)的pEG质粒为模板进行PCR扩增,获得了长度为648bp的目的DNA片段,然后经变性退火得到含有错配碱基的杂合双链,经 *CEL* I 核酸酶酶切后获得492bp和156bp 2种酶切产物,与pEG质粒错配碱基G/C的位置相符(图6)。说明该粗提物可以切割错配碱基位点,具有 *CEL* I 核酸酶活性。



M—DL2000 DNA标记；1—未经过酶切的648bp条带；2—酶切后条带

图6 *CEL* I 核酸酶粗提物的酶切效果

2.6 *CEL* I 核酸酶提取物酶切用量的优化

为确定本研究所提取的 *CEL* I 核酸酶粗提物的活性和适宜用量,在20 μL 酶切反应体系中加入1~5 μL 的 *CEL* I 核酸酶粗提物,均获得较好的酶切效果,不同加入量间未发现明显差异。说明本研究所提取 *CEL* I 核酸酶粗提物具有很高的

活性,在酶切体系中加入 1 μL 的酶粗提物即可获得较好的酶切效果。

3 讨论与结论

随着 TILLING 技术在拟南芥中的成功应用,此技术现在已经广泛应用于水稻、大麦、玉米、大豆、燕麦等多种作物中^[13-17]。这也使在 TILLING 技术中发挥重要作用且具有单链切割活性的 *CEL I* 核酸酶的需求不断增加,所以亟须建立一种简便、高效且低成本的 *CEL I* 核酸酶提取技术。本研究分析了不同品种、不同器官等因素对 *CEL I* 核酸酶提取量的影响,主要结果与韩锁义等^[2]、Oleykowski 等^[6]、Till 等^[10]的报道相似,并有较多的补充和扩展。

本研究结果显示,不同芹菜器官的榨汁率存在显著差异,茎的榨汁率高于根和叶,叶片中的提取量明显高于根和茎,新鲜样品的提取量和密封保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 3 d 材料的提取量没有明显差异,在本试验所用的 3 个品种中,马家沟芹的提取量明显高于西芹和山芹。因此,在粗提 *CEL I* 核酸酶选择材料时,尽量选择提取量高的品种和器官,提高工作效率。茎的提取量不高,但榨汁率很高,且是芹菜的主体器官。叶的提取量大,但榨汁率却不高,因此,本研究建议将茎和叶进行混合榨汁,互相补充其优缺点。

本研究获得芹菜 *CEL I* 核酸酶粗提物经 SDS-PAGE 电泳的条带略大于文献上的报道,可能与粗提物的纯化程度、实验室条件及芹菜品种的差异有关。但在本研究试验条件下,仍可以高效酶切只有 1 个碱基差异的目的片段,而且加入 1 μL 的酶粗提物即可获得较好的酶切效果,进一步证明粗提的 *CEL I* 核酸酶同样具有酶切活性。所以将粗提的 *CEL I* 核酸酶用于 TILLING 技术中,进行大批量的筛选突变体或进行功能基因组研究,可大幅度降低成本。

本研究在国内外报道的基础上进一步探讨了影响 *CEL I* 核酸酶粗提物的产量及酶活性的诸多因素,为普通实验室进行 *CEL I* 核酸酶的粗提提供了一套简便、高效、低成本的技术流程,对其在 TILLING 技术中的广泛应用具有指导意义。

参考文献:

- [1] 吴海滨,朱汝财,赵德刚. TILLING 技术的原理与方法述评[J]. 分子植物育种,2004,2(4):574-580.
- [2] 韩锁义,杨玛丽,盖钧镒,等. *CEL I* 酶的粗提取及其活性检测[J]. 遗传,2006,28(9):1112-1116.
- [3] 孙洁,崔海瑞. TILLING 技术及其应用[J]. 细胞生物学杂志,2007,29(1):41-46.
- [4] 李春寿,阮关海,张琳琳,等. TILLING 技术的原理、特点及其在点突变筛选中的应用[J]. 核农学报,2005,19(4):317-321.
- [5] 张晓勤,薛大伟,周伟辉,等. 用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变的大麦浙农大 3 号突变体的筛选和鉴定[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2011,37(2):169-174.
- [6] Oleykowski C A, Bronson Mullins C R, Godwin A K, et al. Mutation detection using a novel plant endonuclease[J]. Nucleic Acids Research,1998,26(20):4597-4602.
- [7] 潘娜,郭会君,赵世荣,等. TILLING 技术在作物突变研究中的应用现状与前景[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(4):581-587.
- [8] Yang B, Wen X, Kodali N S, et al. Purification, cloning, and characterization of the *CEL I* nuclease[J]. Biochemistry,2000,39(13):3533-3541.
- [9] Till B J, Colbert T, Tompa R, et al. High-throughput TILLING for functional genomics[J]. Methods in Molecular Biology,2003,236:205-220.
- [10] Till B J, Burtner C, Comai L, et al. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases[J]. Nucleic Acids Research,2004,32(8):2632-2641.
- [11] 崔海瑞,李春楠,孙洁,等. 几种因素对芹菜 *CEL I* 核酸酶提取的影响[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2011,37(6):591-595.
- [12] Till B J, Zerr T, Comai L, et al. A protocol for TILLING and EcoTilling in plants and animals[J]. Nature Protocols,2006,1(5):2465-2477.
- [13] Greene E A, Codomo C A, Taylor N E, et al. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*[J]. Genetics,2003,164(2):731-740.
- [14] Till B J, Cooper J, Tai T H, et al. Discovery of chemically induced mutants in rice by TILLING[J]. BMC Plant Biology,2007,7:19-30.
- [15] Suzuki T, Eiguchi M, Kumamaru T, et al. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice[J]. Molecular Genetics and Genomics,2008,279(3):213-223.
- [16] Till B J, Reynolds S H, Weil C, et al. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING[J]. BMC Plant Biology,2004,4:12-19.
- [17] Cooper J L, Till B J, Laport R G, et al. TILLING to detect induced mutations in soybean[J]. BMC Plant Biology,2008,8(1):9-18.