

王琳,孙庆玲,刘辉,等.拟南芥缺失突变体 *at14a* 的比较转录组分析[J].江苏农业科学,2016,44(4):70-74.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.018

拟南芥缺失突变体 *at14a* 的比较转录组分析

王琳,孙庆玲,刘辉,梁建生

(扬州大学生物科学与技术学院,江苏扬州 225009)

摘要:以 *at14a* 相关基因型(野生、缺失)拟南芥植株为试验材料,利用转录组学和生物信息学等方法,分析野生型(*col*)、缺失突变体(*at14a*)拟南芥差异基因表达状况,初步探讨拟南芥 AT14A 的功能。结果表明:*at14a* 在拟南芥植株根、茎、叶和花中均有表达,尤其在叶片中的表达量较高;相较于野生型,缺失突变体 *at14a* 中有 194 个差异基因,其中上调基因 122 个,下调基因 72 个;通过 GO 富集分析发现,2 种基因型植株差异基因主要参与了应答胁迫过程,这表明 *at14a* 可能通过调控 *AT5G39610*、*AT1G53240*、*AT4G32770*、*AT1G02920*、*AT1G10760* 这些逆境胁迫相关基因的表达来参与应答胁迫。差异分子主要定位于细胞核,具有绑定的分子功能。通过 pathway 分析发现,2 个基因型植株差异基因主要参与了核糖体代谢、碳水化合物代谢、光合等代谢途径。研究结果为深入研究 *at14a* 作用的分子机理奠定了基础。

关键词:AT14A;拟南芥;缺失突变体;基因芯片;转录组学

中图分类号:S188;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)04-0070-04

植物细胞壁可能与膜蛋白相互作用,其中一类膜蛋白就是与动物细胞整合素蛋白相似的类整合素蛋白。整合素是动物细胞黏附分子的重要成员,属于一类跨膜蛋白的超家族,是由 2 个跨膜糖蛋白亚基(α 、 β)通过非共价键连接而成的异二聚体,它们黏附于细胞外基质(ECM)并结合细胞骨架。整合素分子的结构特点使其成为动物细胞内外信号双向转导过程中的关键分子之一,它能介导细胞膜双向信号转导,即通过调控细胞外的信号从而调控其与细胞外配体的结合活性;同时,细胞外基质与整合素的结合诱导细胞内的信号传递过程。整合素在多种生理活动中具有重要的功能,它们调节细胞的迁移、极性、生长、分化,并与基因表达的信号转导元件相互作用^[1-3]。在植物中,整合素尚未被证实,有可能是因为植物已经将这些蛋白功能以不同于哺乳动物细胞的方式进行组合,以适应植物质膜的独特结构,并与细胞壁相互作用^[4]。自从 Schindler 等首次发现与动物整合素具有相似功能的类整合素蛋白以来,在植物中已经确定了许多类整合素蛋白^[5-6]。

Nagpal 等在 1999 年报道了在拟南芥 cDNA 库中用抗脊椎动物整合素 $\beta 1$ 亚基胞内高度保守结构域抗体作探针分离和鉴定出 1 个与整合素具有部分相似序列的 cDNA 克隆——AT14A,这为植物类整合素的存在提供了直接证据。AT14A(*At3G28300*)编码基因有 1 个 1 154 bp 的开放阅读框,只存在 1 个外显子,由 1 459 个核苷酸组成,其中 10 至 1 164 位核苷酸组成编码 385 个氨基酸的蛋白,分子量预测为 43 ku。序

列分析发现,AT14A 蛋白有 1 个小的结构域与真菌、昆虫和人类的整合素存在序列相似性,并有 1 个编码 11 个氨基酸的高度保守区,它与人类 D1 整合素胞内结构域同源性较高^[7]。笔者前期研究表明,拟南芥 AT14A 蛋白功能类似于动物中的整合素,介导了悬浮细胞细胞壁-质膜-细胞骨架连续体(WMC)的连接^[8]。然而,关于 AT14A 发挥生理功能的机制尚不清楚。

转录组学是新兴的研究细胞表型和功能的重要手段,在研究基因结构、表达和功能上开拓了新型研究方向。转录组(transcriptome)概念最先是由 Velculescu 等在 1997 年提出的,是指某一特定生物体在特定状态下所有基因转录产物的总和,主要包括 mRNA、非编码 RNA^[9]。相对于基因组而言,转录组更具有时间性、空间性,转录组反映的是特定条件下活跃表达的基因^[10],基因芯片技术是转录组学分析的常用方法。它起源于 20 世纪 90 年代,是指高密度固定在硅片、玻片、陶瓷等固相支持介质上的生物分子微阵列,具有快速、高效、微型化、高通量、大规模、高度并行性等特点^[11]。因此,本研究通过基因芯片技术分析 AT14A 对拟南芥基因表达的影响,从而探讨 AT14A 的功能,以期类整合素的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用的植物材料是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)。*at14a* 基因位于 3 号染色体上,编号为 AT3G28300。以野生型(*Col*)、纯合突变体(*at14a*)(SALK_101761)2 种基因型拟南芥为材料。野生型拟南芥(*Col*)由加拿大大不列颠哥伦比亚大学陈金桂博士提供,后经笔者所在实验室自行繁殖保存。*at14a* 是 AT14A 的 T-DNA 插入功能缺失突变体。以不同组织的拟南芥为材料,提取总 RNA,用于 *at14a* 基因的表达分析。以生长 6 周的拟南芥叶片为材料,提取总 RNA,用于基

收稿日期:2016-01-27

基金项目:国家自然科学基金(编号:31271622);扬州大学科技创新培育基金(编号:2015CXJ065)。

作者简介:王琳(1978—),女,江苏徐州人,博士研究生,讲师,主要从事植物生理和生化研究。E-mail:wanglin@yzu.edu.cn。

通信作者:梁建生,博士,教授,主要从事植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail:jssliang@163.com。

因芯片分析。

1.2 试剂

总 RNA 提取试剂盒:RNAprep Pure Plant Kit[天根生化科技(北京)有限公司];cDNA 第 1 链合成试剂盒(Roche);RT-qPCR Mix(Bio-Rad);RNA 提取和反转录过程中所用 EP 管及枪头均为无菌级(美国 Axygen 公司);荧光定量 PCR 试剂盒:SYBR Green Supermix(美国 BIO-RAD 公司);Taq DNA 聚合酶;Thermo Scientific DreamTaq Green DNA 聚合酶。引物由上海捷瑞生物工程公司合成。

1.3 荧光定量 PCR 方法

根据植物总 RNA 提取试剂盒的说明,提取拟南芥叶片总 RNA,并参照反转录试剂盒的说明,以总 RNA 为模板,反转录为 cDNA,用于 *at14a* 的表达分析。以拟南芥数据库中的 *at14a* 基因编码序列为参照,用 Primer 5 软件设计 *at14a* 基因定量 PCR 引物。以根、茎、叶、花等组织的 cDNA 为模板,扩增拟南芥 *at14a* 基因,进行表达量分析。反应体系 20 μ L,其中上下游引物各 0.5 μ L,定量 PCR 混合液 10 μ L,模板 cDNA 1 μ L,补双蒸水至 20 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 1 min;95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s,导出数据使用 ABI 7300 自带软件进行定量分析。

1.4 基因芯片分析

1.4.1 RNA 样品制备及芯片杂交 采用 Trizol 法提取拟南芥叶片中的总 RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,并进一步采用 RNeasy Mini Spin Column 试剂盒对总 RNA 进行柱纯化,用分光光度计定量、甲醛变性胶电泳质检。采用 RNA 扩增标记方法合成带生物素标记的 cRNA,将纯化后的 cRNA 与 Agilent 公司拟南芥全基因组芯片杂交过夜,然后在芯片工作站进行芯片洗脱,采用芯片扫描仪进行扫描。这些工作均由北京博奥生物有限公司完成,每个样品重复 3 次。

1.4.2 芯片图像的采集与数据分析 采用 Feature Extraction 图像分析软件对芯片图像进行分析,将图像信号转化为数字信号。然后对信号值进行归一化处理,用 SAM(Significance Analysis of Microarrays)软件进行差异基因的分析。FDR 控制在 5% 以内,再以倍数变化大于 2 倍或小于 50% 的标准筛选差异基因。

1.5 生物信息学分析

本试验通过 TAIR Gene Ontology (GO) Annotations tool (<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>) 和 MAS(Molecular Annotation System) 系统对差异基因进行分析。

1.6 统计分析

研究中每个值的表达方式“平均值 \pm 标准误差”,不同处理之间进行了多重比较,所有数据进行了单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 *at14a* 的组织表达特性

图 1 表明,在拟南芥根、茎、叶和花各组织中,*at14a* 都有表达,尤其是叶片中的 *at14a* 基因表达量最高,根、茎中的 *at14a* 表达量最低,花中 *at14a* 表达量居于两者之间。

2.2 总 RNA 质检和芯片杂交质量检测

采用 Trizol 法提取 6 个拟南芥样本叶片的总 RNA,纯化

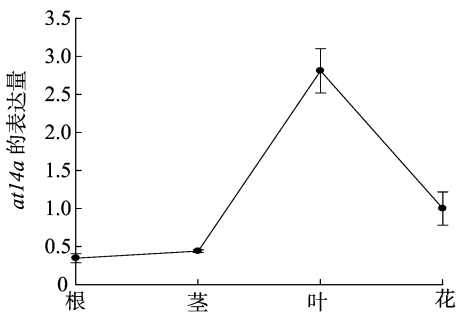


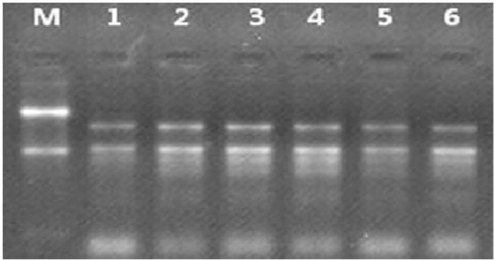
图1 *at14a* 的组织表达特性

后,紫外分光光度计测定 $D_{230\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$,计算出各 RNA 样品的浓度(表 1)。由图 2 可知,RNA 样品电泳条带清晰。总体看出,RNA 样品的纯度、总量及完整性符合 Agilent 表达谱芯片试验要求,可以继续后续芯片试验。

6 个样本纯化后 cRNA 产物分别与芯片进行杂交和扫描,芯片杂交扫描结果显示拟南芥基因组中所有基因表达的荧光原始信号强度。由图 3 可知,芯片四周边界点线均匀一致,表明芯片质量可靠。信号检测报告表明:样品各项检测参数达到质控要求,杂交控制探针等阳性对照信号、看家基因信号值正常;平均背景值与噪音值较低;阳性率数值正常。这些结果说明,本组基因芯片的质量、杂交和检测体系均无问题,芯片检测结果可靠。

表 1 总 RNA 质检报告

序号	样品名称	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	总量 (μg)
1	野生型-1	1.94	1.31	1.37	54.83
2	野生型-2	1.96	1.26	0.83	33.17
3	野生型-3	1.96	1.25	1.40	55.91
4	突变体-1	1.95	1.11	1.16	46.49
5	突变体-2	1.95	1.13	1.03	41.18
6	突变体-3	1.95	0.54	0.81	32.56



M—Hela cell control RNA; 1、2、3—野生型(col); 4、5、6—突变体*at14a*

图2 拟南芥叶片总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 不同基因型拟南芥转录组分析

通过软件对野生型(col)和缺失突变体(*at14a*)植株叶片的差异基因进行了分析。由图 4 可知,野生型与缺失突变体植株的差异基因共 194 个,其中 122 个上调,72 个下调。

2.3.1 不同基因型拟南芥差异基因的基因本体(Gene Ontology)分析 Gene Ontology 数据库旨在建立注释基因和蛋白质知识的标准词汇体系。GO 功能注释包括细胞定位(cellular

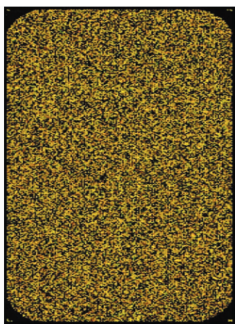


图3 样品 cDNA 与芯片杂交的扫描结果

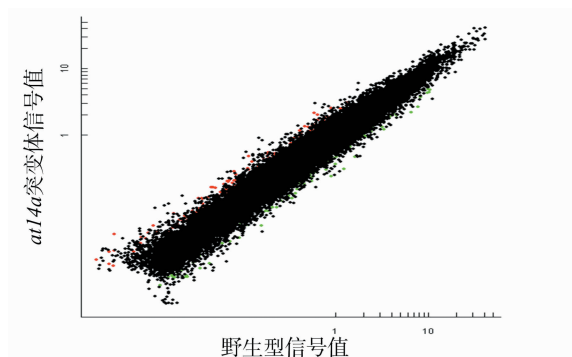


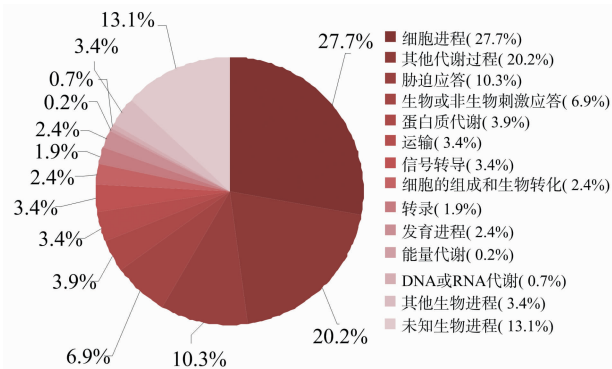
图4 2 种基因型拟南芥差异基因散点结果

component)、分子功能(molecular function)、生物学过程(biological processes),3 者紧密联系,共同描述基因的特征。细胞定位是指基因产物在细胞中的位置;分子功能描述基因或基因产物的分子生物学活性和功能;生物学过程通常由多种分子功能有序组成。通过 Gene Ontology 分析,有助于更好地了解拟南芥 *at14a* 缺失后,植株基因表达的变化规律。由图5 - A 可知,2 个基因型植株叶片差异基因参与的生物过程多种多样,如细胞代谢、应答胁迫、运输、信号转导、转录等,应答胁迫是其中比较重要的过程。这从转录水平上说明,定位于质膜的 *at14a* 作为细胞壁 - 质膜 - 细胞骨架连续体的中间分子,可能在拟南芥响应胁迫过程中起关键作用。由图 5 - B 可知,2 个基因型植株叶片差异基因主要定位于细胞核,分布比例高达 20.35%,其次是细胞质、细胞内、叶绿体等部位。这为 *at14a* 定位于质膜,并参与细胞壁的组成提供了组织基础。由图 5 - C 可知,2 个基因型植株叶片差异基因主要具有结合功能,还有转移酶活性、激酶活性、水解酶活性等功能。这表明 *at14a* 具有和其他基因相互作用的分子基础。

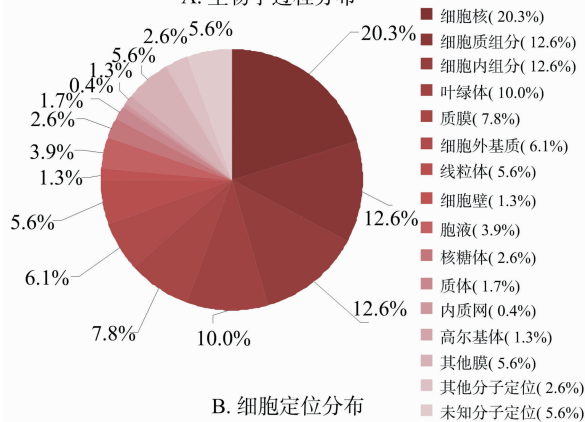
2.3.2 不同基因型拟南芥差异基因的 Pathway 分析 日本京都基因和基因组百科全书(KEGG)是生物系统学的数据库,它整合了细胞功能、生物体特性知识,描述了分子间相互作用。由图 6 可知,2 种基因型植株叶片差异基因参与的代谢途径多种多样,如核糖体代谢、淀粉与蔗糖代谢、氨基糖代谢、与细胞色素 P450 相关的异源性代谢、叶绿素叶啉环代谢、乙醛酸代谢、色氨酸代谢、光合代谢等。这些结果表明,*at14a* 可能参与这些代谢途径的调控。

3 讨论与结论

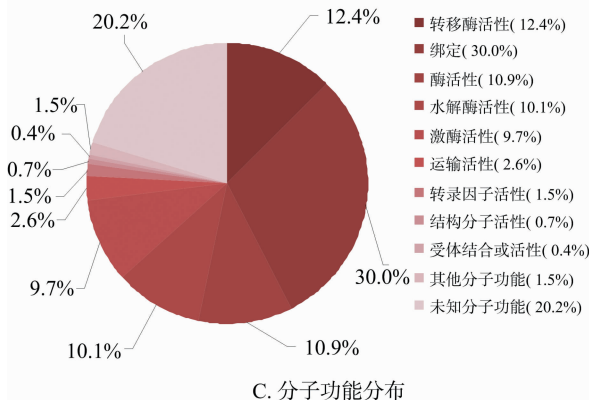
叶片在植物光合作用、蒸腾作用、水和营养物质的吸收等



A. 生物学过程分布



B. 细胞定位分布



C. 分子功能分布

图5 2个基因型植株差异基因的 GO 注释分析

过程中发挥重要作用,从而影响整个植物的生长和发育。因此,叶片组织的转录组学研究在植物转录组学的研究中具有举足轻重的作用。*at14a* 在叶片中表达较高,这为它在生物进程中发挥功能提供了组织基础。

近期的研究表明,AT14A 是 WMC 连续体中必不可少的核心分子,可以作为植物细胞壁和细胞骨架之间的连接载体,与动物整合素一样,在控制极性和形态中起重要作用。它参与了细胞质膜与细胞壁间的黏附,并参与了渗透胁迫诱导的质 - 壁分离过程^[8]。越来越多的证据表明,在植物细胞中 WMC 连续体对胁迫起重要的调控作用,但是它通过膜蛋白介导的分子机制还不清楚。相关研究表明,植物类整合素参与了霉菌毒素的渗透作用、机械刺激应答、细胞壁黏附等^[12]。笔者的研究也发现,2 个基因型植株差异基因主要参与了应答胁迫过程。

AT5G39610(ATNAC2)是编码NAC结构域的转录因子。

张彦妮,李兆婷,张艳波,等.毛百合试管鳞茎形成和膨大的培养优化[J].江苏农业科学,2016,44(4):74-78.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.019

毛百合试管鳞茎形成和膨大的培养优化

张彦妮¹,李兆婷¹,张艳波¹,汪海洋²

(1.东北林业大学园林学院,黑龙江哈尔滨 150040; 2.内蒙古自治区翁牛特旗林业局,内蒙古赤峰 024500)

摘要:以毛百合(*Lilium dauricum*)试管苗为材料,研究不同浓度活性炭、激素种类、水杨酸、蔗糖等对试管鳞茎形成和膨大的影响,同时比较鳞茎大小对移栽成活率的影响。结果表明,NAA、IBA、多效唑对试管鳞茎形成和膨大都有影响,蔗糖对鳞茎膨大有影响;1.0 g/L 活性炭对鳞茎的形成及膨大效果最好,所结鳞茎直径增大 2.50 倍,鳞茎球形指数 1.40,鳞茎鲜质量 828.2 mg,结球率达 100%,平均新增鳞茎 4.40 个;水杨酸对鳞茎膨大效果不明显;鳞茎越大(≥ 8 mm),移栽成活率越高(96%),长势越好。

关键词:毛百合;试管鳞茎;植物激素;膨大

中图分类号: Q943.1;S682.2+65.04+3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0074-05

毛百合(*Lilium dauricum*)为百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生球根类花卉,产于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古和河北等地,朝鲜、日本、蒙古和俄罗斯也有分布,其花色艳丽、姿态优雅,是一种代表和谐美好、吉祥高贵的观赏花卉^[1];同时又是一种名贵的中草药,鳞茎治脓肿、骨折、烧伤及冻伤等,地上部分新鲜时局部应用,可促进外伤愈合,有收敛作用,花可治肺病^[2]。毛百合是一种珍贵的野生资源,具有极高的观赏、食用和药用价值,花期 6—7 月,抗寒性极强^[3],是很好的逆境基因资源库。目前,学者对毛百合的种子萌发^[4]、繁殖生物学^[5]、染色体^[6]、核型分析^[7]、再生体系的建立^[8]、切花保鲜^[9]、栽培^[10]进行了研究。东北林业大学花卉研究所于 1994 年利用“940703”科学卫星搭载毛百合的种子后,发现卫星搭载可以提高毛百合种子的萌发率,可使毛百合鳞茎大小及质量产生一定变异^[11]。纪莹等利用栽培品种布鲁拉诺与毛百合进行种间杂交后,通过测定杂交后代相关生理生化指标,发现杂交后代抗寒性有所提高^[12]。鳞茎作为毛百合繁殖和药用的一个重要部位,如何短时间内使其鳞茎增大、鳞茎增大受到哪些因素的影响仍值得探讨。目前,还未发现添加不同附加物促进毛百合鳞茎膨大的相关研究。一般在组织培养过程中,试管结球时间较长,形成的鳞茎直径较小,制约了其繁殖及生产。因此,有必要寻找能缩短结球时间

和促进试管鳞茎增大的方法。本试验以毛百合组培苗为试验材料,探讨活性炭(activated carbon,AC)、 α -萘乙酸(NAA)、3-吲哚丁酸(indole butyric acid,IBA)、蔗糖、水杨酸(salicylic acid,SA)、多效唑(PP₃₃₃)对毛百合试管鳞茎形成和膨大的影响,探索添加不同附加物对试管鳞茎移栽成活率及生长状况的影响,以期找到最适附加物及其浓度,加速鳞茎的生长和发育,为毛百合的育种、离体快繁及园林应用等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以毛百合(*Lilium dauricum*)的无菌苗为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 小鳞茎的获得 将通过增殖培养获得的毛百合不定芽分割成单芽(高约 4 mm),转接到 MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA(根据预试验获得的培养基配方)继代培养基上壮苗,直到每个单芽基部小鳞茎直径长至 0.3~0.4 cm 时,剪去上部叶片接种于培养基上。

1.2.2 鳞茎膨大培养基设计与培养条件 以 MS 为基础培养基,培养基设计方案分为 2 种,一种方案为附加 0.5 mg/L 6-BA,设置 NAA 浓度为 0、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L,IBA 浓度为 0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L。另一种方案为附加 0.5 mg/L 6-BA、0.5 mg/L NAA,设置添加物活性炭(0、0.2、0.5、1.0、2.0 g/L)、蔗糖(0、15、30、60、90、120 g/L)、水杨酸(0、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0 mg/L)、多效唑(0、5、10、20、40 mg/L)浓度。每个处理接种 30 个外植体。除特殊说明外,所有培养基均附加 7.8 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖,pH 值 5.8~6.0。培养基在 121 ℃高压灭菌锅中灭菌 20 min。组培

收稿日期:2015-03-09

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(编号:DL12CA17、DL12CA11)。

作者简介:张彦妮(1974—),女,山西大同人,博士,副教授,主要从事园林花卉的繁殖栽培及育种研究。E-mail:zhangyanni808@126.com。

The Plant Cell,2005,17(12):3451-3469.

[15] Nakaminami K, Matsui A, Nakagami H A, et al. Analysis of differential expression patterns of mRNA and protein during cold-acclimation and de-acclimation in *Arabidopsis* [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2014, 13(12):3602-3611.

[16] Kouno T, Ezaki B. Multiple regulation of *Arabidopsis AtGST11* gene

expression by four transcription factors under abiotic stresses [J]. Physiologia Plantarum, 2013, 148(1):97-104.

[17] Yano R, Nakamura M, Yoneyama T, et al. Starch-related α -glucan/water dikinase is involved in the cold-induced development of freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2005, 138(2):837-846.