

• 药材与资源 •

半夏多倍体复合体基因组DNA甲基化状态的MSAP分析

薛梅¹, 陈成彬², 陈力², 马小军^{1*}

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100094; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要:目的 分析半夏多倍体复合体DNA甲基化状态的变化(甲基化水平和甲基化差异模式)。方法 应用甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP)技术, 采用34对引物进行选择性地扩增。结果 扩增共得到7 708条带, 其中5 636条带为甲基化多态性带在半夏7倍、8倍、9倍、10倍体植株间DNA甲基化水平变化不大。总扩增位点甲基化水平在54%~58%, 全甲基化率为24.1%~24.3%, 高倍性植株甲基化程序相应比较高。除甲基化水平稍有变化外, 半夏不同倍性株间的DNA甲基化模式也形式各异, 检测到的带型分为两大类(I和II型)。其中, 不同倍性间DNA甲基化状态保持不变的位点占52.5%, 归为I型; 少部分检测位点(占47.5%, 归为II型)的DNA甲基化模式在不同倍性间存在显著差异。结论 半夏多倍体复合体各倍性植株间存在大量的胞嘧啶甲基化变异且整体甲基化水平较高。

关键词: DNA甲基化; 半夏; 多倍体复合体; 甲基化敏感扩增多态性

中图分类号: R282.12

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)11-1713-04

DNA Methylation of polyploid complex of *Pinellia ternata* by MSAP analysisXUE Mei¹, CHEN Cheng-bin², CHEN Li², MA Xiao-jun¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: **Objective** To analyze the DNA methylation status of polyploid complex of *Pinellia ternata*. **Methods** Methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) technique was carried out to analyze the methylation status of polyploid complex of *P. ternata*. Thirty-four selective primer amplifications were used to check the status of cytosine methylation DNA samples. **Results** A total of 7 708 bands were obtained. Among them 5 636 bands, each representing a recognition site cleaved by one or both of the isoschizomers (*Hpa* I and *Msp* I), were amplified. Furthermore, methylation patterns varied among the four polyploids; heptaploid, octoploid, nonuploid, and decaploid. Total and full methylation levels in *P. ternata* were 54%–58% and 24.1%–24.3%. All types of MSAP patterns detected in the study belonged to two classes, type I and II. 52.5% of detected bands belonged to Type I; Another 47.5% were type II, which showed the methylation differences among the four polyploids. **Conclusion** The results demonstrate DNA methylation events occur in *P. ternata* and the general methylation levels are higher.

Key words: DNA methylation; *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit; polyploid complex; methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP)

表观遗传学(epigenetics)研究的是没有DNA序列变化的、可遗传的基因表达改变^[1]。进入后基因组学时代,其已成为当前分子生物学的热点领域之一。DNA甲基化是表观遗传学的重要研究内容之一,参与基因的差异表达、胚胎发育、细胞分化、染色质失活、基因组印迹、转基因沉默等多个生物学过程^[2,3]。因此,DNA甲基化的研究备受重视。检测DNA甲基化的方法有多种,其中,甲基化敏感扩增

多态性(methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP)技术操作简便、高效且敏感,已被广泛应用于多种植物基因组DNA甲基化的水平和模式分析^[4,5]。MSAP技术是Reyna-Lopez等^[6]在AFLP技术基础上建立起来的,首次被用来检测真菌的基因组DNA甲基化。该技术采用两个同裂酶,*Hpa* I和*Msp* I,这两个酶都识别和切割5'-CCGG的四核苷酸位点,但对甲基化敏感程序不同。*Hpa*

收稿日期: 2008-02-05

基金项目: 教育部博士点基金项目(20040023022)

* 通讯作者 马小军 Tel: 13877131887 E-mail: xjma@public.bta.net.cn

I 不识别双链上的胞嘧啶甲基化,但它可以对仅一条链上胞嘧啶甲基化的位点进行酶切;而 *Msp* I 可以识别单链或双链上内部胞嘧啶甲基化,但不识别外部胞嘧啶甲基化,即仅不能消化含^mCCGG或^mC^mCGG的位点^[7]。该方法是检测植物全基因组DNA甲基化状态非常有效的方法。

本研究首次利用MSAP技术从全基因组水平上对常用中药材半夏7倍、8倍、9倍和10倍体植株的DNA甲基化水平和模式进行分析。

1 材料和方法

1.1 材料:半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit., 采自湖北潜江、安徽黟落坪、河北安国和山东莒县,栽种于中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所内。经染色体数目鉴定后,取半夏7倍、8倍、9倍和10倍体植株的幼嫩叶片迅速冻于液氮中备用,染色体数目鉴定参照陈成彬等^[8]的方法。

1.2 DNA的提取:采用修改后的CTAB方法^[9],同时提取相同培养条件下的半夏7倍、8倍、9倍和10倍体植株的总DNA,用不含DNase的RNase (Takara)处理总DNA,除去可能含有的RNA污染。用紫外分光光度计(NanoDrop)测定DNA的浓度和纯度,琼脂糖凝胶(0.8%)电泳观察其质量。总DNA存于-20℃待用。

1.3 酶切、连接及PCR扩增:将DNA分别稀释至400 ng/μL,用识别四碱基的 *Hpa* I 和 *Msp* I 同裂酶(promega)分别与识别六碱基的核酸内切酶 *EcoR* I (promega)组合对样本DNA进行双酶切,酶切反应体系为10 μL。第1个反应中,1 μL 样本DNA,1×T4连接酶缓冲液(含1 mmol ATP),*EcoR* I 和 *Hpa* I 内切酶各3 U,37℃保温过夜。第2个酶切反应的条件同第1个反应,只是内切酶组合为 *EcoR* I 和 *Msp* I。随后,在酶切片段的两端加上人工设计的

与 *EcoR* I 和 *Hpa* I /*Msp* I 酶切位点互补的人工接头(表1)。接头连接体系为20 μL,其中T4连接酶(上海生工)1.5 U,*EcoR* I 和 *Hpa* I /*Msp* I 接头各50 pmol,16℃连接过夜。应用AFLP扩增程序进行预扩增和选择性扩增。预扩增反应体系为25 μL,其中含有1×PCR缓冲液,200 mol/L dNTPs (Takara),0.5 mol/L 预扩增引物(表1),1 μL DNA连接反应混合物,1 U *Taq* DNA聚合酶(Takara)。反应条件为:94℃、30 s,56℃、1 min,72℃、1 min,21个循环,72℃延伸10 min。预扩增产物稀释20倍,供选择扩增用,选择扩增体系同上。条件为:94℃、30 s,65~56℃、30 s,72℃、1 min,13个循环,以每个循环降0.7℃进行降式PCR扩增;94℃、30 s,56℃、30 s,72℃、1 min,23个循环,72℃延伸10 min。

1.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳:取2 μL 选择扩增PCR产物与等体积的上样缓冲液混合,94℃变性10 min,冰浴2 min后,上样于6%变性聚丙烯酰胺凝胶进行垂直板电泳(DYC₂2813型号电泳仪,北京六一厂),30 W,电泳2 h后银染观察。

2 结果

2.1 MSAP分析:为研究半夏7倍、8倍、9倍和10倍体植株DNA甲基化状态发生的变化,采用MSAP技术对4个倍性半夏DNA甲基化水平和模式进行分析(图1)。实验中对DNA提取、酶切、接头连接、预扩增及选择性扩增反应、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳均进行了3次重复,以避免实验过程中的假阳性。共采用34对引物(表1)进行选择选择性扩增,结果显示MSAP带型具有很好的稳定性,并对其进行了统计,共得到7 708条带。

2.2 不同倍性半夏植株DNA甲基化水平:7倍、8倍、9倍和10倍4个倍性半夏的DNA分别用甲基化

表1 MSAP分析的接头和引物序列

Table 1 Sequence of adapters and primers used for MSAP analysis

	<i>EcoR</i> I (E)5'-3'	<i>Hpa</i> I / <i>Msp</i> I (H/M)5'-3'
接头1	GACGATGAGTCTAGAA	CTCGTAGACTGCGTACC
接头2	CGTTCTAGACTCATC	AATTGGTACGCAGTC
预扩增引物	GACTGCGTACCAATTTC(E00)	GATGAGTCTAGAACGG(H/M00)
选择扩增引物	GACTGCGTACCAATTCTC(E10)	GATGAGTCTAGAACGGTA(H/M23)
	GACTGCGTACCAATTCAAC(E32)	GATGAGTCTAGAACGGTC(H/M24)
	GACTGCGTACCAATTCAACA(E35)	GATGAGTCTAGAACGGTAT(H/M82)
	GACTGCGTACCAATTCAACT(E38)	GATGAGTCTAGAACGGTCA(H/M83)
	GACTGCGTACCAATTCAGC(E40)	GATGAGTCTAGAACGGTCT(H/M86)
		GATGAGTCTAGAACGGTGT(H/M90)
		GATGAGTCTAGAACGGTG(H/M25)

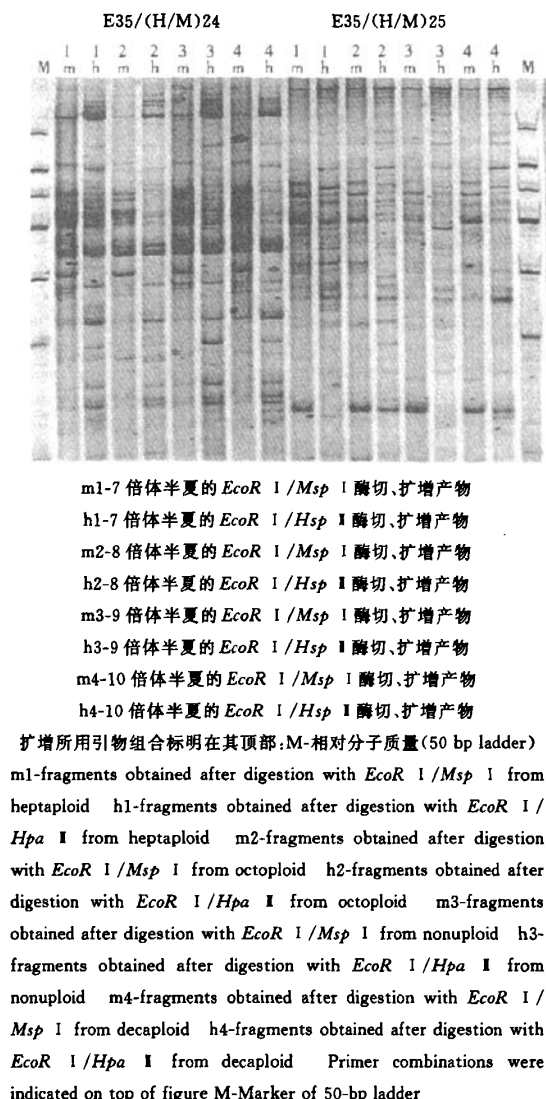


图1 MSAP 分析不同倍性半夏 DNA 甲基化电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of methylation on polyploid complex of *P. ternata* by MSAP analysis

敏感性不同的限制性内切酶组合 *EcoR* I / *Hpa* I (H) 和 *EcoR* I / *Msp* I (M) 消化、连接、预扩增后, 采用不同的引物组合进行选择扩增。考虑到所用凝胶的有效分离范围和条带的可重复性, 试验中只对大小位于 100~500 bp 的片段进行了统计, 每个泳道中检测到的条带数目从 15~50 条不等。总的甲基化扩增片段数(包括全甲基化和只有一条链甲基化的半甲基化)分别为 1 072、1 060、1 132、1 118, 总扩增位点的甲基化水平(总甲基化片段数/总扩增片段数)分别为 56.1%、54.4%、58.1%、58.2%, 而其中全甲基化(双链都为 5'-C¹⁸CGG-3')的带数分别为 460、471、469、468, 全甲基化率(全甲基化带数/总扩

增片段数)分别为 24.1%、24.2%、24.2%、24.3% (表 2)。

表 2 4 个倍性半夏 DNA 甲基化水平

Table 2 Methylation levels of four polyploids from *P. ternata*

样品	甲基化总带数	总甲基化率/%	全甲基化带数	全甲基化率/%
7 倍体半夏	1 072	56.1	460	24.1
8 倍体半夏	1 060	54.4	471	24.2
9 倍体半夏	1 132	58.1	469	24.2
10 倍体半夏	1 118	58.2	468	24.3

5 636 个甲基化位点所呈现出的分布模式可分为两大类(I 和 II), I 型为单态性位点, 它们在不同倍性半夏中带型模式相同不表现多态性; II 型为多态性位点, 在不同倍性半夏中带型有差异, 显示多态性条带。I 型主要有两种模式, I-1 型为全甲基化类型, *Hpa* I 不能识别并切割, 而 *Msp* I 能识别并切割, 从而产生(1,0,1,0,1,0,1,0)的模式(将甲基化敏感限制性内切酶不能识别并切割, 最终没有扩增产物的记为“0”, 而能被酶识别并切割, 在泳道中有扩增带出现的记为“1”)。反之, I-2 为半甲基化类型, *Hpa* I 能识别并切割, 而 *Msp* I 都不能切割的位点, 产生(0,1,0,1,0,1,0,1)的模式。具备这两种带型的共有 2 960 条, 显示在半夏各多倍体间有 52.5% 的甲基化位点的状态保持不变。II 型占 47.5%, 模式比较复杂, 主要体现在不同倍性之间相同位点的甲基化状态不同, 包括去甲基化、单链¹⁸CCGG 或¹⁸C¹⁸CGG 与¹⁸CCGG 之间的转换。

3 讨论

本研究结果显示半夏基因组总甲基化水平为 54.4%~58.2%, 这只是对基因组中部分同裂酶识别位点(CCGG)的胞嘧啶进行了检测, 而这些胞嘧啶也只是基因组中的一小部分胞嘧啶, 所揭示的甲基化水平只反映了 CG 或部分 CCG 核苷酸序列中的甲基化程度, 在植物中, 甲基化也会发生在 CAG、CTG 序列中^[7]; 因而半夏整个基因组中胞嘧啶的甲基化率应高于本实验的检出结果。7、8、9、10 倍 4 个倍性半夏的甲基化水平差异不大, 差异主要体现在甲基化模式上。在较高倍性中并没有过多的超甲基化位点出现, 甲基化程度增加和减少同时并存, 甚至甲基化状态的减少多于增加, 例如: 8 倍体总甲基化水平略低于 7 倍体, 总甲基化水平最低。在已研究的高等植物中, 胞嘧啶发生甲基化的比例因植物种类而异, 从 4.6%~30% 不等^[10,11], 而且 90% 以上的甲基化作用都是发生在 DNA 的 CpG 双碱基序列处。

半夏的甲基化水平在50%以上,这可能与半夏的高倍性有直接关联。因为当几个基因组综合到一个核中,会发生超量表达的浪费现象,为减少这种过量的基因表达,多倍体半夏中许多结构基因可能发生了遗传二倍化,即多倍体中基因的表达水平被减少到与其二倍体祖先相近或相同。这种遗传二倍化是通过两种途径之一来实现的:基因沉默或基因剂量补偿。而迅速发生的可遗传胞嘧啶甲基化增加变异可能是遗传二倍化的一种有效途径^[12]。而不同倍性半夏间的甲基化程度差别不大(54.4% ~ 58.2%),提示半夏多倍化过程中还存在其他表观遗传作用途径,比如:组蛋白修饰、染色质重改构等,这些表观遗传所控制的基因程序化表达的结果就是保证多倍体植物能够正常生长发育。

本实验结果表明,不同倍性多倍体半夏之间存在大量的胞嘧啶甲基化变异。但由于至今未发现半夏的二倍体,还不能确定与二倍体祖先相比,多倍体半夏形成过程中胞嘧啶甲基化变异的水平以及这些基因组变异是否具有随机性和稳定性。异源多倍体物种的一个重要特性是基因分化,即基因在剂量上的重复使得部分复等位基因可以分化成具有不同功能的新基因。这些伴随异源多倍体物种形成所迅速产生的表观遗传变异无疑可作为自然选择及适应性进化的原材料,进而有助于多倍体物种在进化上的成功,这也许就是半夏多倍体复合体具有如此广泛分布区这一生态优势的主要原因。本研究结果为半夏多倍体复合体的地理分布演化趋势研究奠定了一

定的理论基础。

参考文献:

- [1] Jablonka E, Lamb M J. The changing concept of epigenetics [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 981: 82-96.
- [2] Rossi V, Motto M, Pellegrini L. Analysis of the methylation pattern of the maize Opaque-2 (O2) promoter and *in vitro* binding studies indicate that the O2 B-Zip protein and other end osperm factors can bind to methylated target sequences [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 13758-13771.
- [3] Gonzalgo M L, Jones P A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation [J]. *Mutat Res*, 1997, 386: 107-118.
- [4] Xiong L Z, Xu C G, Maroof M A S. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation sensitive amplification polymorphism technique [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 439-446.
- [5] 仪治本, 孙 毅, 牛天堂, 等. 高粱基因组 DNA 胞嘧啶甲基化在杂交种和亲本间差异研究 [J]. 作物学报, 2005, 9 (31): 1138-1143.
- [6] ReynaLopez G E, Simpson J, RuizHerres J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms [J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 253: 703-710.
- [7] McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 3640-3659.
- [8] 陈成彬, 马小军, 陈 力, 等. 半夏多倍体复合体及其细胞地理学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (17): 1405-1408.
- [9] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4231-4235.
- [10] Leutwiler L S, Hough-Evans B R, Meyerowitz E M. The DNA of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Gen Genet*, 1984, 194: 15-23.
- [11] 特怀曼 R M. 高级分子生物学要义 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [12] 刘 宝, 胡 波, 董玉柱, 等. 多倍体小麦物种形成可诱发稳定遗传的胞嘧啶甲基化变异 [J]. 自然科学进展, 2000, 10 (8): 710-715.

何首乌 cDNA 文库的构建及分析

谭雪梅¹, 申彦晶², 严 萍², 郑传进², 赵树进^{1*}

(1. 广州军区广州总医院, 广东 广州 510010; 2. 华南理工大学, 广东 广州 510640)

摘 要:目的 为进行药用植物次生代谢产物的生物合成基因调控研究, 构建了三年生何首乌叶 cDNA 文库。方法 以何首乌成熟叶片为材料提取其总 RNA; 纯化出 mRNA; 反转录合成双链 cDNA; 钝化 cDNA 末端; 连接上 *EcoR* I 接头; 经 *Xho* I 酶切后, 使用 Sepharose CL-2B 凝胶介质过滤, 收集 400 bp 以上的片段与 Uni-ZAP XR 载体连接, 经包装蛋白包装成 cDNA 文库。Uni-ZAP XR 载体可以在辅助噬菌体 ExAssist helper phage 的共感染下, 快速释放出 pBluescript SK-噬菌粒, 经转染 *E. coli* SOLR 后, 铺于氨苄青霉素抗性平板, 分别利用 PCR 和双酶切的方法鉴定插入片段的大小。结果 测定该初始文库的滴度为 1.07×10^6 pfu/mL, 含有 5.4×10^5 个重组子, 插入片断长度为 0.5~2.0 kb; 扩增文库的重组子为 4.25×10^{11} 个, 重组率为 98.5%。结论 经检测所构建的文库库容量满足基因筛选要求, 为进行中药材相关功能基因调控研究奠定基础。

收稿日期: 2008-01-20

基金项目: 广东省科技厅重点项目资助 (63108)

作者简介: 谭雪梅 (1982-), 女, 广东省江门市人, 在读研究生, 研究方向为生物制药。E-mail: txm1021@126.com

* 通讯作者 赵树进 E-mail: gzszjshs@pub.guangzhou.gd.cn