

研究报告

发育特异基因及其在RNA水平上的表达

金 振 华

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

宋 仁 美

(伯克利加利福尼亚大学遗传学系, 美国)

从 λ 噬菌体gt11的cDNA表达文库筛选到7个胡萝卜体细胞发育特异的基因克隆,并对它们进行了纯化、分离噬菌体DNA,限制酶消化,琼脂糖凝胶电泳鉴定,以及将cDNA插入片段再克隆到pIBI或p^{UC18}质粒等处理。然后,通过Southern blot分析,证明克隆16,22,50及60等为新的cDNA基因。此外,又通过Northern blot分析测定了这些基因的组织特异性表达及时序表达。结果表明,克隆22是一种受发育调节,与胡萝卜体细胞胚胎形成密切相关的基因。

关键词 cDNA基因克隆; 体细胞胚胎形成; 发育特异; 基因表达

Steward等关于植物细胞胚胎形成的最初报道^[1],以及后来的大量研究表明,培养的胡萝卜细胞是了解植物发育过程中有关基因活动、生理生化变化、形态建成及相互关系的良好体系^[2-4]。

就多数具有全能性的植物细胞而言,胚胎形成至少涉及胚胎命运的诱发(Induction of the embryogenic fate),胚胎形成程序的表达(Expression of the embryogenic program)并形成多细胞形态两个方面^[5],前一过程主要是细胞内外因素对基因存在状态的影响。后一过程则涉及基因产物和由此引起的生化和形态学的复杂变化。从分子生物学观点看,上述过程均受控于基因。因此,分离和鉴别受发育调节的特异基因是了解基因本身的结构和功能,追踪发育过程中特异基因活动及调控的必要前提。

本文报道初筛cDNA基因克隆的纯化、再克隆(Subclone)、遗传转化、转化体的鉴定,以及通过Northern blot分

析鉴定发育特异的、cDNA基因的组织特异性和在RNA水平上的时序表达,并对其中的某些现象进行了讨论。

材 料 和 方 法

(一) 植物材料

本实验采用下述胡萝卜细胞系: HA^[6]源自栽培的胡萝卜(*Daucus carota* var. *juwarot*)。CA即WOOIC^[6]源自野生胡萝卜(*Daucus carota*, Queen Anne's Lace)。

(二) 方法

1. 培养条件: B₀培养基(Gamborg)^[7]补加1mg/L 2,4D(2,4-二氯苯氧乙酸)用来维持HA细胞培养物的生长。Murashige和Skoog培养基^[8]连同0.1mg/L 2,4D用来维持CA细胞培养物的生长。以

本文于1988年11月11日收到。

本文系作者于1986—1988年在美国伯克利加利福尼亚大学遗传学系完成的部分工作。

8×10^5 细胞/ml密度的CA或HA细胞进行深层振荡培养, 10日龄的培养物作为产生体细胞胚胎的起始材料。如果要用CA或HA的培养细胞制备总体RNA (total RNA)或Poly(A)⁺RNA, 先用500 μ m尼龙网过滤培养液, 收集细胞, 并用不含2,4D的培养液, 经低速离心洗涤沉淀细胞一次。然后将其重新悬浮在没有2,4D的培养液中, 悬浮密度因细胞系而异, HA为 $1-2 \times 10^5$ 细胞/ml, CA为 2×10^4 细胞/ml, 在25 $^{\circ}$ C振荡培养到所需日龄。通过纱布真空吸滤收集到的培养物立即用液氮冰冻, 贮藏在-70 $^{\circ}$ C冷柜备用。

叶、根、叶柄和花均取自温室栽培的成熟植株 (*D. carota* var. *juwarot*)。全部组织样品均用液氮立即冰冻并于-70 $^{\circ}$ C贮藏备用。

2. 总体RNA的制备及Poly(A)⁺RNA的分离: 如欲制备总体RNA, 约取1g冰冻组织 (如分离Poly(A)⁺RNA用20g冰冻组织) 置研钵内, 在不时添加液氮的情况下将其研磨成粉末状, 用二倍于冰冻组织(重量体积比)的缓冲液抽提(0.1mol/L Tris-HCl pH9, 0.5% SDS, 及10mmol/L EDTA), 以及三倍于冰冻组织的水饱和酚溶液抽提, 在8000rpm条件下离心5min, 收集水相, 用等体积的缓冲液重新抽提有机相一次, 合并两次的水相, 然后分别用水饱和的酚溶液、酚和氯仿的混合液(1:1=v:v)抽提两次, 用氯仿抽提一次, 最后加1/10体积的4mol/L醋酸钠和二倍体积的乙醇置-20 $^{\circ}$ C沉淀过夜, 并于4 $^{\circ}$ C, 12000rpm离心30min, 取得总体RNA沉淀物, 将其溶于TE缓冲液中。如欲得到Poly(A)⁺RNA, 可将上一步骤所得的总体RNA置通风柜风干(约20min), 加入5ml 2mol/L LiCl使沉淀中的DNA溶解。在10000rpm条件下离心

30min再次沉淀RNA, 将其溶于含10mmol/L的Tris-HCl pH7.4和0.05% SDS的缓冲液中, 用Oligo-dT层析柱按文献[9]步骤分步分离Poly(A)⁺RNA。

3. Southern blot分析: 取1 μ g纯化的重组质粒DNA, 经EcoRI消化后, 加样于1%琼脂糖凝胶进行电泳。电泳毕, 用溴化乙锭将DNA染色, 然后用透明塑料薄膜覆盖在电泳凝胶上, 在紫外光衬托下描印下各克隆样品载体质粒及插入片段的相应位置(保留此膜作为鉴定Southern blot结果的依据), 然后按文献[10]所述步骤将其吸印到硝化纤维素滤膜上。

4. Northern blot分析: 分别取经变性处理的5 μ g Poly(A)⁺RNA(或20 μ g总体RNA)加到含1.2%琼脂糖的甲醛变性的凝胶样品穴内, 电泳, 然后按文献[10]步骤将其吸印到硝化纤维素滤膜上。

5. 探针DNA的制备及放射性标记: 将整合在 λ 噬菌体gt11的cDNA插入片段^[4]再克隆到质粒pIBI或pUC¹⁸中, 以此为材料, 按缺口翻译步骤^[10]得到³²P-标记的探针。滤膜杂交及洗涤按文献[4]方法进行。

6. 胡萝卜cDNA文库的构建和基因文库的筛选: 均按文献[11]。

结 果

(一) cDNA基因的再克隆及鉴定

以免疫吸附后的抗血清作为探针, 从 λ gt11表达文库初筛得到22个克隆, 并鉴别出8、49、59和66四个在胡萝卜体细胞胚胎形成过程中受发育调节的cDNA基因之后^[12], 本实验室又对其他7个克隆进行了噬菌斑纯化、扩增、制备噬菌体DNA、用限制酶EcoRI消化、琼脂糖胶电泳鉴

别等分析步骤。

为了能长期保存和随时取得大量的 cDNA 基因, 以及制备 cDNA 基因的反义 RNA (antisense RNA) 从反向遗传学途径了解分离到的特定基因, 把含有插入片段的全部噬菌体 DNA 继续采取 EcoR I 消化、T4 连接酶连接等步骤, 把 cDNA 片段由噬菌体载体再克隆到质粒 pIBI 或 p^{UC18}。然后将这些质粒转化大肠杆菌 JM101 并取得相应的转化体 (见图版 I-1)。由图看出除转化体 22 的 cDNA 被再克隆到质粒 p^{UC18} (2.7kb) 外, 其余的都被再克隆到 pIBI (4.2kb) 中。它们的 cDNA 插入片段的分子量分别为: 16 = 1.95kb、22 = 0.6kb、22A (22A1 = 2.1kb、22A2 = 0.5kb, 同一克隆包含两个分子量不同的插入片段)、50 = 0.9kb、60 = 0.38kb 以及 100 = 0.5kb。 (测定的数值系据另外分子量测定结果, 未在此文发表)。

(二) 相互杂交 (Southern blot 分析)

为了确定所分离的克隆是属于新的 cDNA 基因或者与前已报道的^[12] 8、59、49 和 66 克隆相同, 本实验室采用 Southern blot 分析技术进行了相互杂交测定。图版 I-2 表明, 以克隆 100 或 49 作为杂交探针时, 分别在克隆 49 和 100 的转移样品插入片段部位出现杂交信号。同样, 以克隆 22A2 和 60 作为探针时, 在克隆 60 和 22A2 转移样品的插入片段部位出现杂交信号。结果表明, 在 6 个新分离的 cDNA 基因克隆中, 只有 50、60、16 和 22 及 22A1 为独立的、新的 cDNA 基因 (见图版 I-2)。

(三) cDNA 基因的组织特异性表达及 mRNA 分子量

通过 Northern blot 分析, 测定了这些基因在 RNA 水平上的稳定表达。首先, 我们比较了分别来源于 HA 及 CA 细胞系愈

伤组织和胚胎组织间基因产物的总量 (据激光扫描密度仪测定)。结果表明 (图版 I-3 左侧), 克隆 16 相对 HA 细胞系愈伤组织 mRNA 的杂交水平高于与体细胞胚胎 mRNA 的杂交水平, 而与 CA 细胞系愈伤组织和胚胎组织 mRNA 的杂交水平无明显差别。克隆 50 相对 HA 及 CA 细胞系而言, 均显示对愈伤组织 mRNA 有稍高的杂交水平。克隆 60 相对两种细胞系的愈伤组织、胚胎组织 mRNA 显示基本相同的杂交水平。

图版 I-3 右侧表示克隆 16、50 和 60 的相应基因能在根、叶、叶柄各成熟组织中表达, 但其表达水平各异, 如克隆 16 在叶、根中, 克隆 50 在叶柄和根中, 克隆 60 在叶柄中有较明显的表达。

以克隆 22 相应基因为探针与体细胞胚胎 mRNA (CA 细胞系) 的杂交水平明显高于与愈伤组织 mRNA 的杂交水平, 而且, 与花、叶、叶柄和根的 mRNA 没有任何杂交反应, 说明该克隆是一种和胚胎形成密切相关, 有高度表达特异性的基因。

克隆 16 和 50 倾向于对愈伤组织有较强的表达, 而且都能在根组织中表达。事实上, 四个克隆代表四种不同的基因, 因为它们不能相互杂交, 而且 RNA 分子量各不相同, 分别为 16 = 3.5kb, 50 = 0.98kb, 60 = 0.8kb 以及 22 = 1.6kb (未发表资料)。

(四) 克隆 16、22 相应基因的时序表达

为了进一步验证有关 cDNA 基因的组织特异性并揭示基因表达水平与胚胎形成过程中各形态发生阶段之间的关系, 分别以克隆 16 和 22 相应基因作为探针, 与 HA 细胞系不同培养日龄的体细胞胚胎 mRNA 和愈伤组织 mRNA 进行了杂交。结果表明: (1) 克隆 16 相应基因在不同日龄愈伤组织中的表达状况为第一天表达水平较

高, 此后, 一直到第11天均维持基本稳定。(2) 克隆16相应基因在不同日龄胚胎组织细胞中的表达情况是第5、6日表达水平最高, 而1—4日以及9—15日表达水平相当。(3) 克隆16相应基因在胚胎组织和愈伤组织中的表达水平并无明显差别(图版I-4)。

克隆22相应基因在1—3日龄的愈伤组织中没有表达, 第5天后有微弱的表达, 第9日的相对表达水平稍高。但是, 在不同日龄的胚胎组织中则都能表达, 前5日表达水平低, 第5日表达水平明显升高并持续到第15日。上述结果显示了该克隆相应基因在胚胎组织中优先表达的特性。

讨 论

根据对16、22、50和60四个新的DNA基因的组织特异性表达、时序表达⁶及RNA分子量测定的资料, 就这些基因与体细胞胚胎形成之间的关系而言, 可以分成(1)没有明显的组织特异性, 如克隆16、50和60相应基因。(2)有明显的组织特异性, 能在胚胎组织细胞中优先表达, 如克隆22相应基因, 这样两种不同的表达模式。现分别讨论如下:

克隆16相应基因在HA细胞系愈伤组织中的表达水平高于在胚胎组织中的表达水平, 显示了它在愈伤组织中优先表达的

特性, 但是它在CA细胞系胚胎和愈伤组织细胞中的表达水平基本一致。因此, 仅就已有的资料看尚不足以对该基因表达的组织特异性作出确切的判断。为此, 我们进行了能反映全过程情况的时序表达测定。图版I-4的时序表达图谱指出: 克隆16相应基因在1—11日龄的愈伤组织细胞, 和1—15日龄, 包括胚胎形成三个形态时期的胚胎组织细胞中均能表达, 而且表达水平相近。该结果表明克隆16相应基因在愈伤组织和胚胎组织之间没有明显的组织特异性。

此外, 它能在诸如叶和根等成熟组织细胞中明显表达, 进一步支持了克隆16相应基因无明显组织特异性的判断。克隆16和50相应基因的表达模式有类似之处。

克隆22是一种能优先在体细胞形成的胚胎中表达, 与心形期胚胎形成密切相关, 具有明显的组织特异性表达特性的基因。因为, 第一, 它在CA细胞系胚胎组织细胞中的表达水平较在愈伤组织中的高三倍以上。其次, 它的表达有高度组织特异性, 只在胚胎组织或具有形成胚胎潜能的愈伤组织中表达, 而在根、花、叶及叶柄诸成熟组织中都不表达。第三, 时序表达图谱指出, 该基因只在5日龄愈伤组织中开始表达而且低于在胚胎组织中的水平。就其在胚胎组织中的时序表达状况而言, 其5日龄胚胎组织细胞的表达水平开始升高并持续到第15日。

参 考 文 献

- [1] Steward, F.C. et al.: *Am. J. Bot.*, 45:693—703, 1958.
- [2] Sung, Z. R. et al.: *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2:3—14, 1984.
- [3] Sung, Z.R.: *Plant Genetics*, Eds. Freeling, M. Alan. R. Liss, Inc. New York, pp.115—128, 1985.
- [4] Jung, H.C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:1906—1910, 1987.
- [5] Smith, G. J. et al.: *In Vitro.*, 17:315—321, 1981.
- [6] Sung, Z. R. et al.: *J. Planta*, 147:236—240, 1979.
- [7] Gamborg, O. I. et al.: *Exp. Cell Res.*, 50:151—158, 1986.
- [8] Murashige, T. et al.: *Physiol. Plant*, 15:473—479, 1962.

- [9] Aviv, H. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69:1408—1412, 1972.
[10] Maniatis, T. et al.; *Mol. Cloning*, Cold Spring Harbor Lab. pp.382—400, 1982.
[11] Liu, L-S. et al.; *Somatic Embryogenesis*, Eds. Terzi, M., et al., Roma-Italy, pp.70—76, 1985.
[12] Chumpol, B. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:6399—6403, 1988.
[13] Ecker, J. R. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:5372—5376, 1986.

DEVELOPMENT-SPECIFIC GENES AND THEIR EXPRESSION AT THE RNA LEVEL

Jin Zhenhua

(*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing*)

Z. Renee Sung

(*Departments of Genetics and Pathology, University of California, Berkeley, USA*)

A total of seven clones of development-specific genes were screened from the cDNA expression library of lambda gtl1 constructed from carrot somatic embryos. The purification of plaques, isolation of DNA from the phages, digestion of the clone's DNA with certain restriction enzyme, identification of the inserts on agarose gel by electrophoresis, and subcloning of cDNA inserts from lambda gtl1 into plasmid pIB1 or pUC18 were performed, respectively.

Date of cross hybridization by Southern blot analysis indicated that clones 16, 22, 50 and 60 are new cDNA genes. In addition, the new cDNA gene's tissue-specific expression on variety of organs in the carrot plant, such as flower, petiole, leaf and root as well as time-course expression in callus and embryo cells of different culture periods were determined. The results suggest that the corresponding gene for clone 22 is a specific gene regulated by development and closely related to carrot somatic embryogenesis.

Key words

cDNA gene clone; somatic embryogenesis; development-specific; gene expression



1. cDNA插入片段的鉴别，插入片段的大小为0.5—2.1kb MW为分子量标志 (kb)
cDNA inserts in transformants. The inserts size range markers (in kb) is shown in the left panel
2. 相互杂交，“+”表示出现杂交信号
Cross hybridization. The cross means apperances of hybridization signal
3. cDNA基因的组织特异性表达
Tissue-specific expression of cDNA genes
4. 克隆16及22在HA细胞系培养物中的时序表达
Time course expression of cDNA gene 16 and 22 in HA cell line