

苧麻细胞质雄性不育系与保持系线粒体 DNA 的 ISSR 检测

侯思名¹ 段继强¹ 梁雪妮² 丁小维¹ 刘飞虎^{1,*}

云南大学¹生命科学学院, ²成人教育学院, 昆明 650091

Detection for mtDNA of Cytoplasmic Male Sterile (CMS) Line and Maintainer Line of Ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.] by ISSR

HOU Si-Ming¹, DUAN Ji-Qiang¹, LIANG Xue-Ni², DING Xiao-Wei¹, LIU Fei-Hu^{1,*}

¹College of Life Sciences, ²College of Adult Education, Yunnan University, Kunming 650091, China

摘要 采用蔗糖衬垫法提取苧麻雄性不育系与相应保持系的线粒体DNA。选用了38个ISSR引物进行ISSR-PCR扩增,在编号为ISSR-29、33、34引物中找到了苧麻不育系与相应保持系线粒体DNA之间的差异。

关键词 苧麻; 线粒体DNA提取; 蔗糖衬垫法; ISSR检测

作为最优良纤维作物之一的苧麻 [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.], 其雄性不育杂种优势利用正受到普遍重视, 而苧麻雄性不育的分子基础研究还未见报道。植物雄性不育是杂种优势利用的基础。前人的研究表明 (Kadowaki 等 1990; 李小明等 2000; Levings 和 Brown 1989; 仇艳光等 2001), 植物雄性不育与线粒体基因组密切相关, 因此研究植物雄性不育多从线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 着手。有关 mtDNA 提取与纯化的报道很多 (刘杰等 2004; 王学德 2000; 盖树鹏和孟祥栋 2000; 陈学军等 2003), 但由于各自的研究目的和选取的研究材料不同, 很难有一种通用的提取与纯化方法。苧麻组织中, 由于含有较高含量的酚类、粘状物及黄酮类等次生代谢物质, mtDNA 的提取与纯化相对较为困难。本文用蔗糖衬垫法 (sucrose-mediated sedimentation, SMS) 提取苧麻中 mtDNA, 由于苧麻材料容易氧化变褐, 所以提取过程中添加了抗氧化物质, 以求能得到较高纯度的 DNA。所提取的 mtDNA 经 ISSR-PCR 电泳扩增检测结果显示, 苧麻雄性不育系与相应保持系的 mtDNA 之间存在差异。现报道如下。

材料与amp;方法

1 实验材料

实验材料为我们前期工作中培育的苧麻 [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.] 不育系 GS14-1 (A) 和对应保持系 13-X₂ (B), 采用扦插繁殖方法培育幼

苗, 种植于云南大学植物改良与应用实验室育种基地 (昆明)。于营养生长期对植株打顶, 去除顶部的 3~5 片叶, 套上 20 cm×30 cm 的黑色布袋, 20 d 左右可采黄化苗。黄化苗用无菌水冲洗干净, 用无菌纸吸干水分, -70 °C 下保存。

2 实验试剂及主要仪器

主要试剂: MgCl₂、10×PCR 缓冲液、Taq DNA 聚合酶、蛋白水解酶 K、牛血清白蛋白 (BSA) 购自上海生物工程公司, 为 Promega 产品; DNase I 为 Sigma 公司产品; dNTPs、Tris-HCl、EDTA-Na₂、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、β-巯基乙醇购自杰辉生物技术有限公司, 为 Bebcos 分装产品; ISSR 引物由上海博亚公司合成; 其它试剂为国产分析纯。主要仪器有 Eppendorf 高速冷冻离心机、Eppendorf PCR 仪、北京六一仪器厂电泳槽、Bio-Rad 电泳仪、WD-9403F 型紫外分析仪等。

3 试剂配制

缓冲液 A: 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5), 300 mmol·L⁻¹ 蔗糖, 4 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.2% BSA, 0.05% 的半胱氨酸, 6% 的 PVP, 4% 的 β-巯基乙醇。缓冲液 B: 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5), 600 mmol·L⁻¹ 蔗糖; 6% 的 PVP。裂解液 L: 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol·L⁻¹

收稿 2005-12-12 修定 2006-05-23

资助 国家自然科学基金 (30360058)。

*通讯作者 (E-mail: plantbreed2004@yahoo.com.cn, Tel: 0871-5035256)。

EDTA, 0.2% SDS, 0.012% 蛋白酶 K。

4 mtDNA 的提取与纯化

苎麻 mtDNA 用蔗糖衬垫法提取, 参考 Scotti 等(2001)的方法, 略有改动。

5 mtDNA 的检测

溴化乙锭染色法检测 mtDNA 的浓度。对提取的 mtDNA 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 并列设置 20~200 ng 未经酶解的 λ DNA, 比较样品中 DNA 条带与 λ DNA 标准条带的亮度, 初步估测样品 DNA 的浓度。最后把 mtDNA 浓度调至 50 ng· μ L⁻¹ 待用。

6 ISSR-PCR 扩增

6.1 反应体系 总体积 20 μ L, 其组成为: 10 \times PCR 反应缓冲液 2.0 μ L、25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 2.0 μ L、10 mmol·L⁻¹ dNTPs 0.4 μ L、Taq DNA 聚合酶 1.2 U、2.5 μ mol·L⁻¹ 的引物 2.0 μ L、mtDNA 2 μ L, 加灭菌蒸馏水至 20 μ L, 少量石蜡油密封。

6.2 扩增程序 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s、52 $^{\circ}$ C 退火 50 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min, 保持在 4 $^{\circ}$ C。

6.3 实验中所用到的引物 ISSR-29: 5' CGCC(GA)₆ 3'; ISSR-33: 5' GGA(GTG)₄ 3'; ISSR-34: 5' CCA-(GTG)₄ 3'。

6.4 扩增产物的检测 取反应混合物 5 μ L, 上样缓冲液 3 μ L, 混匀, 点入 1.0% 的琼脂糖凝胶中, 1 \times TAE 缓冲液, DYC-33B 型电泳槽, 100 V 电压下电泳 60 min, 于紫外分析仪下观察照相。

实验结果

1 蔗糖衬垫法提取 mtDNA

mtDNA 的提取方法中, 黄化苗培养和裂解、去蛋白为常规操作。线粒体和叶绿体可以利用其沉淀系数的较大差异, 通过差速离心而得以分离。提取方法的关键是要彻底除去细胞核 DNA 对线粒体的污染, 才能获得较纯的 mtDNA。由于苎麻组织中纤维含量较高, 往往要用较强烈的机械方法才能破碎细胞。在这过程中会打碎较多的细胞核, 释放出的细胞核会污染线粒体。针对这个问题, 通常采用手工研磨或用组织搅碎器以比较温和的匀浆强度研磨, 尽量减少细胞核的破碎。通过差速离心和蔗糖密度梯度离心, 把细胞

核和线粒体分离开。在裂解线粒体前用较高浓度 (100 μ g·mL⁻¹) 的 DNaseI 处理, 除去线粒体外的核 DNA 的污染。另外, 组织破碎时也会引起叶绿体的破裂, 破碎叶绿体释放的 DNA 也可通过 DNaseI 去除, 再用酚去蛋白。

用蔗糖衬垫法提取 mtDNA, 较之 CsCl 密度梯度离心或蔗糖密度梯度离心方法提取 mtDNA 而言, 用分步的离心步骤取代了密度梯度的较难操作过程, 省时省钱, 较为可取。实验证明, 以上 mtDNA 提取方法步骤简便, 结果稳定 (图 1)。一般每 100 g 黄花苗可以得到 20~30 μ g 的 mtDNA。

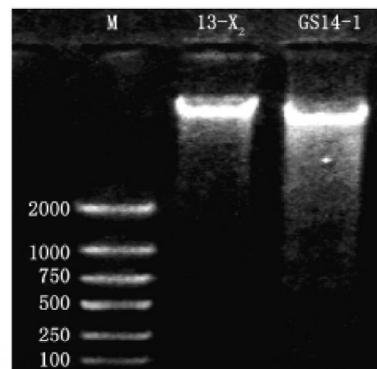


图 1 蔗糖衬垫法提取的苎麻 mtDNA

2 苎麻 mtDNA 的 ISSR-PCR 扩增

我们的实验曾用 20 个 ISSR 引物对以上苎麻两系 mtDNA 进行扩增, 只有 ISSR-29、ISSR-33 和 ISSR-34 引物的扩增表现出差异。从图 2 可以看出, 引物 ISSR-33 和 ISSR-34 扩增结果中, 保持系比不育系均多 1 条带; 而 ISSR-29 扩增结果中, 不育系比保持系多 1 条带, 反应出保持系和不育系之间 mtDNA 的差异。

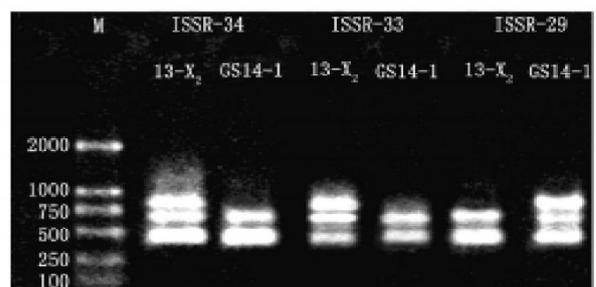


图 2 ISSR-29、33、34 对苎麻不育系和保持系 mtDNA 的扩增图谱

讨 论

苕麻组织中酚类、粘状物及黄酮类等次生代谢物质的含量较多;纤维含量也较高,研磨比一般植物更难,耗时更长。这些因素使得提取过程中材料易于褐化,提取的DNA往往呈现褐色,在用作PCR模板时难以获得满意的结果。为了防止褐化,常用的办法是在提取缓冲液中添加抗氧化剂。黄小英等(2001)在提取苕麻总DNA的过程中添加了6%的PVP和2%的 β -巯基乙醇,得到了较好的DNA。李明芳(2003)在提取荔枝DNA的过程中,向CTAB提取液中加入1%的PVP和2% β -巯基乙醇,所得基因组DNA为无色透明状,并认为,虽然PVP和 β -巯基乙醇单独作用效果不好,但如将两者结合起来使用,则能得到较好的结果。

我们的操作过程与以上做法基本相似,仅在试剂配制时分别添加了适量的抗氧化物质PVP和 β -巯基乙醇,并在第1步即液氮研磨时添加了少量具有稳定作用和抗氧化性的PVP;在第1次氯仿/异戊醇抽提后加入高盐溶液以去除多糖,这样可防止提取过程中材料氧化变褐。

苕麻组织研磨不充分时,短碎纤维类物质会悬浮于液体中,离心取沉淀时往往会带走部分沉淀,而影响DNA的得率。研磨太充分时,提取液中就会出现很多粘性成分,此时最好用至少4层纱布过滤,否则沉淀中会混有许多粘性物质,以致沉淀无法分开。在取上清液的过程中,最上面往往有一小层粘性如焦油类的物质,需要小心加以去除,否则会混入下一次沉淀。

植物细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)是mtDNA变异引起的(李传友和伏健民1998)。不育系与保持系mtDNA之间的差异主要有2类。第1种差异表现为组织结构和拷贝数的差异,如Kadowaki等(1990)发现BT型水稻不育系、保持系线粒体 $atp6$ 和 cob 基因Southern杂交带型有差异,李大东和王斌(1990)发现 $atpA$ 基因不育系和保持系拷贝数不同等。第2种差异是有

与无的关系,即某一片段是不育系或保持系所有。据Yamaguchi和Kakiuchi(1983)报道,BT型是水稻不育系所特有,而保持系则缺少共价闭合分子 B_1 (1.5 kb)与 B_2 (1.2 kb)。我们的试验结果属于第2种情况。

比较不育系和保持系的差异可以用于寻找细胞质特异位点,属于CMS性状与不育基因之间建立联系的初步性工作。但这种差异是否也会表现在mtDNA的转录和翻译水平上,是否与细胞质雄性不育有关,都待进一步研究。

参考文献

- 陈学军,陈竹君,张耀洲(2003). 榨菜线粒体DNA雄性不育相关片段克隆及序列分析. 应用与环境生物技术学报, 9(5): 513~516
- 盖树鹏,孟祥栋(2000). 简易、快速提取大葱叶绿体、线粒体DNA的方法. 农业生物技术学报, 8(3): 262~266
- 黄小英,刘瑛,赖小萍,彭学渊,赖占钧(2001). 用CTAB法提取苕麻总DNA试验. 江西农业学报, 13(4): 40~42
- 李传友,伏健民(1998). 高等植物线粒体基因组研究进展. 应用与环境生物技术学报, 4(2): 200~207
- 李大东,王斌(1990). 水稻线粒体 $atpA$ 基因的克隆及其与细胞质雄性不育的关系. 遗传, 12(4): 1~4
- 李明芳(2003). 荔枝SSR标记的研究及其部分荔枝种质的遗传多样性分析[学位论文]. 广州:华南热带农业大学
- 李小明,郑用璜,张方东,朱英国(2000). 红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体DNA的RFLP分析. 遗传, 22(4): 201~204
- 刘杰,崔成日,崔崇士,李景鹏(2004). 洋葱细胞质雄性不育系与相应保持系线粒体DNA的RAPD分析. 东北农业大学学报, 35(3): 322~324
- 仇艳光,沈银柱,黄占景,赵保存,何聪芬,秘彩莉(2001). 普通小麦T型细胞质雄性不育系及其保持系线粒体DNA的比较研究. 遗传学报, 28(2): 166~170
- 王学德(2000). 细胞质雄性不育棉花线粒体蛋白质和DNA分析. 作物学报, 26(1): 35~39
- Kadowaki K, Suzuki T, Kazama S (1990). Chimeric gene containing the 5' portion of $atp6$ is associated with cytoplasmic male-sterility of rice. Mol Gen Genet, 224: 10~16
- Levings CS, Brown GG (1989). Molecular biology of plant mitochondria. Cell, 56: 171~179
- Scotti N, Card T, Marechal-Drouard L (2001). Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue. Plant Mol Biol Rep, 19: 67a~67h
- Yamaguchi H, Kakiuchi H (1983). Electrophoretic analysis of mitochondrial DNA from normal and male-sterile cytoplasms in rice. Jpn J Genet, 58: 607~611