

利用棉花寡核苷酸芯片研究红麻花药表达谱的可行性分析

金 刚^{1,2} 唐向民¹ 周 琼¹ 陈 鹏¹ 周瑞阳^{1*}

(1. 广西大学 农学院, 南宁 530005;

2. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 南宁 530001)

摘 要 利用 Agilent 棉花寡核苷酸表达谱芯片, 以 2 个同核异质的红麻材料 P3A 和 P3B 为试材, 分析了棉花表达谱芯片应用于红麻表达谱研究的可行性。结果表明: 芯片杂交扫描图像信号清晰, 信噪比较高, 整体背景较低, 各阳性质控点信号均匀一致, 空白点和阴性质控点信号低。P3A 在棉花的寡核苷酸芯片上共检测到 37 640 个表达位点, 占芯片总位点的 85.93%; P3B 在棉花的寡核苷酸芯片上共检测到 37 629 个表达位点, 占芯片总位点的 85.90%。34 290 个探针在不育系和保持系中均具有显著的杂交信号, 占总探针数 43 803 的 78.28%。表明红麻花药 cRNA 与棉花表达谱芯片上寡核苷酸探针之间的远缘杂交非常有效, 用棉花寡核苷酸芯片研究红麻的基因表达是可行的。

关键词 红麻; 棉花; 表达谱芯片; 异源杂交; 基因表达

中图分类号 S 563.5

文章编号 1007-4333(2012)04-0016-05

文献标志码 A

Feasibility of cotton oligo microarray for anther tissue gene expression study in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.)

JIN Gang^{1,2}, TANG Xiang-min¹, ZHOU Qiong¹, CHEN Peng¹, ZHOU Rui-yang^{1*}

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning 530001, China)

Abstract We explored tentatively expression patterns of two iso-nuclear alloplasmic lines in kenaf (P3A and P3B) by using a oligo microarray from cotton. The results showed that the signal of microarray hybridization was clear, and the images had a lower background and higher signal-noise ratio. Expression for 85.93% (37 640) of 43 803 probes was detected in anthers of P3A, and expression of 85.90% (37 629) of probes was observed in anthers of P3B. Of the probes on the arrays, 34 290 (78.28%) consistently hybridized to labeled cotton probe in P3A and P3B. High heterologous hybridization rate suggest that it is viable using cotton oligo microarray to investigate gene expression in kenaf. We could successfully demonstrate that heterologous microarray hybridizations allow deep insights into the transcriptome of kenaf.

Key words kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.); cotton; oligo microarray; heterologous hybridization; gene expression

利用 DNA 芯片进行基因表达分析具有高效、灵敏、高通量和平行化等特点。在过去的十几年里, 它作为一种标准的分子生物学研究工具已被广泛接受, 并应用于鉴别花药特异性表达的基因^[1-3]、逆境胁迫相关基因^[4-7] 以及探索杂种优势的分子遗传基

础等^[8]。目前, 就传统的模式动植物而言, 均开发有其自身的商业化基因芯片; 对很多非模式物种而言, 由于基因组或转录组序列信息的匮乏使其自身芯片平台的发展受到制约。而植物基因组或转录组测序工程需要投入高额的费用和巨大的人力, 因而限制

收稿日期: 2012-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(C130406); 国家麻类产业技术体系岗位专家专项资金(nycytx-19)

第一作者: 金刚, 博士研究生, E-mail: jgig_1981@163.com

通讯作者: 周瑞阳, 教授, 主要从事作物种质资源创新与利用研究, E-mail: Ruiyangzhou@yahoo.com.cn

了 DNA 芯片技术在非模式植物中的应用。

基于物种的亲缘关系,探索应用近缘物种 DNA 芯片平台进行非模式植物的相关研究是值得尝试的。这种方法已应用于近缘物种的进化、物种多样性以及表达谱的研究中^[9-11]。应用 DNA 芯片进行异源杂交以研究非模式植物基因表达最成功的例子是拟南芥表达谱芯片在油菜中的应用。沈俊儒等应用拟南芥 cDNA 芯片分析了甘蓝型油菜华油杂 6 号及其亲本在花蕾中的基因表达差异;由于拟南芥与芸薹属植物共享 87% 的序列一致性,拟南芥 cDNA 芯片可以广泛应用于甘蓝型油菜及其近缘物种的基因表达分析^[12-13]。此外,还有研究表明拟南芥 cDNA 芯片可以应用于与其亲缘关系更远物种(乳浆大戟、杨树和野生燕麦)的表达谱分析^[14]。Moore 等应用番茄表达谱芯片分析了茄科植物中茄子、辣椒和西红柿参与果实成熟和发育的基因表达的差异,证实番茄表达谱芯片可广泛应用于茄科近缘物种的表达谱和比较基因组学研究^[15]。Davey 等研究结果表明,虽然芭蕉属植物的基因组序列信息相对匮乏且与水稻亲缘关系较远,但利用水稻寡核苷酸芯片以研究芭蕉属植物复杂的生物学响应不失为理想的策略^[16]。

锦葵科(Malvaceae)植物包括 3 族 16 属,棉花和红麻同属于该科木槿族。目前市场上尚无商业化的红麻表达谱芯片可以应用于该物种的表达谱研究。本研究以 Agilent 公司研发的棉花寡核苷酸表达谱芯片为平台,旨在分析将该芯片应用到与棉花同科同族的近缘物种红麻花药表达谱研究的可行性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

2 个同核异质的红麻材料 P3A 和 P3B 于 2009 年 4 月播种于广西大学农学院教学科研实习基地。在盛花期,根据花蕾大小及其处于无限花序中的空间位置分别采剥 2 个品系的单核期花药。

1.2 红麻花药总 RNA 的提取和纯化

取 50~100 mg 新鲜花药组织样品,采用 CTAB 法提取红麻花药总 RNA^[17]。总 RNA 样品经 DNAase 消化 30 min 后,过柱纯化;再用 0.8% 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度及完整性;然后使用 NanoDrop ND-1000 紫外分光光度计测定总 RNA 在 260、280 和 230 nm 处的吸光值,以计算其浓度并评估纯度。

1.3 荧光探针标记和杂交

1.3.1 cDNA/cRNA 样品合成和标记

用 One-Color Quick Amp Labeling Kit (Agilent p/n 5190-0442),对 RNA 样品进行 Cy3 荧光标记。即先用试剂盒中的 oligo(d) T-T7 引物在 MMLV-RT 作用下合成 dsDNA;再利用含有 Cy3-CTP 的 NTPs,在 T7 RNA 聚合酶的作用下进行单色荧光标记的 cRNA 的合成;随后用 RNeasy Mini Kit(Qiagen p/n 74104)对标记的 cRNA 样品进行过柱纯化。使用 Nanodrop 检测荧光标记效率。

1.3.2 芯片杂交与洗涤

在标准条件下将一定量的标记达标的 cRNA 和棉花寡核苷酸表达谱芯片(Agilent)进行杂交。杂交完毕后,对芯片洗脱。

1.3.3 芯片扫描和数据分析

使用芯片扫描仪(Agilent p/n G2565BA)扫描芯片的荧光强度,确定杂交范围,过滤背景噪音,反映基因表达的荧光信号强度值以列表形式输出。

2 结果与分析

2.1 红麻花药总 RNA 的质量检测

提取高质量的总 RNA 是进行基因芯片分析的第一步。紫外分光光度计检测及甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果表明,本研究所提取的总 RNA 完整性较好,可以用于后续的荧光探针标记(图 1)。

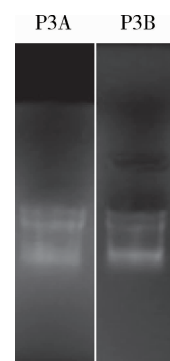
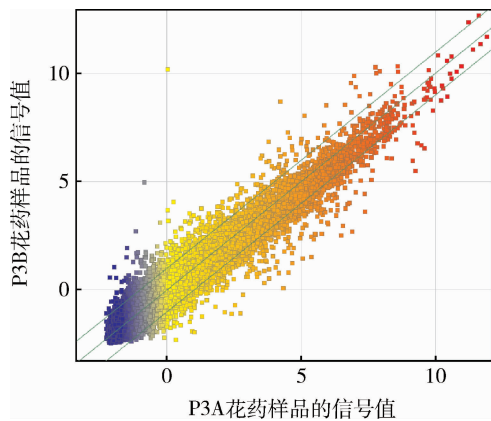


图 1 红麻花药总 RNA 的变性琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Denaturing agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from kenaf anther

2.2 异源杂交的检测

芯片杂交扫描图像信号清晰,信噪比较高,整体背景较低,各阳性质控点信号均匀一致,空白点和阴性质控点信号低。红麻 P3A 品系在棉花寡核苷酸表达谱芯片上共检测到 37 640 个表达位点,占芯片

总位点的 85.93%；而 P3B 品系在棉花表达谱芯片上共检测到 37 629 个表达位点，占芯片总位点的 85.91%。34 290 个探针在不育系和保持系中具有显著的杂交信号，占总探针数 43 803 的 78.28%，说明红麻 cRNA 与棉花表达谱芯片上寡核苷酸探针之间的异源分子杂交非常有效，利用棉花表达谱芯片研究红麻的基因表达是可行的。研究结果也说明棉花和红麻的基因具有一定的同源性。



中间两条直线范围内的点为 2 倍差异以内的探针信号点，在 2 倍差异直线以外的点是有表达差异的基因。

图 2 红麻 P3A 及 P3B 花药的基因表达散点图

Fig. 2 Scatter plots of relative gene expression in anthers between P3A and P3B

3 讨论

3.1 利用棉花表达谱芯片分析红麻花药表达谱的可行性

目前，可以应用到基因差异表达研究的技术有很多，如 cDNA-AFLP、genefishing、mRNA 差异显示技术和抑制性差减杂交等。但是，上述实验方法存在实验操作复杂和非高通量的缺点。第二代 Solexa 测序技术也可应用于植物转录组的相关研究^[18]，但其测序之后的数据处理需要耗费大量的时间和精力，而且测序相关的资金投入巨大。DNA 芯片是研究植物全基因组范围内表达谱变化的强有力的工具，它可以揭示植物发育和代谢过程中基因调控网络。与其他基因表达研究的方法相比，基因芯片技术具有其独特的优势^[19]。从工作量上看，基因芯片分析不需进行回收、克隆和测序等操作便可获知基因表达的相关信息，且能同时监测与生物功能、生长过程、生物性和非生物性抗逆反应等相关的数以万计的基因。

本研究利用 Agilent 棉花寡核苷酸表达谱芯片研究红麻花药表达谱的结果表明，芯片杂交扫描图像背景低且均一，片内信号均匀一致。各阳性质控点信号均一，阴性质控点和空白点信号低。34 290 个探针在不育系和保持系中均具有显著的杂交信号，占总探针数的 78.28%，说明红麻 cRNA 与棉花表达谱芯片上寡核苷酸探针之间的远缘杂交效率高。因此，本研究认为在红麻结构基因组和功能基因组研究相对滞后的情况下，该方法可以广泛应用到红麻表达谱的研究中。而 2 个材料转录水平上的差异可能源于胞质差异引起的细胞质效应，在一些表达位点的假阳性也需要进一步的生物学验证。

2007 年，中国农业科学院联合美国农业部启动了陆地棉基因组测序研究项目^[20]。一些研究揭示了锦葵科植物在亲缘关系上是除十字花目植物外最接近拟南芥的一类，在进化关系上它们具有广泛的共线性或同线性及微共线性的特征^[21]。作为双子叶模式植物的拟南芥已建立起完备的功能基因组学研究平台，这为全面分析其他植物的功能基因组提供了参考。在红麻结构基因组和功能基因组学研究相对滞后的情况下，结合模式植物功能基因组学的已知信息，将棉花寡核苷酸芯片应用于红麻花药表达谱的研究不失为可选之策。

3.2 异源杂交的效率

与物种特异性杂交不同，异源杂交仍然是一种非标准的芯片应用方式^[22]。作为一种非标准的利用芯片研究基因表达的方法，许多因素会对异源杂交的结果产生重要影响。例如，探针和转录本的匹配度、基因芯片探针类型的选择和杂交条件的控制等^[23]。

此外，异源杂交效率依赖于探针和转录本序列的相似度^[22]。基于近缘物种芯片平台的异源杂交要求非特异性杂交率的最低化，Kane 等的研究表明，长探针的非同源杂交率低于短探针，暗示了长探针对转录本杂交的特异性更高^[24]。Walker 等也得出“基因芯片探针的长度越长，其异源杂交效率越高”这一结论^[25]。含上百个核苷酸甚至整个基因长度的 cDNA 探针可能包含了基因在进化中的保守和非保守区域，因此可以有效地进行近缘物种的异源杂交^[26-27]。然而 cDNA 探针也有一定的缺陷，比如 cDNA 文库的质量问题会导致假克隆的存在^[28]。考虑到探针长度及探针数据的更新，本研究采用了棉花寡核苷酸芯片 (4×44K) 来研究其应用于红麻

花药表达谱分析的可行性,其探针长度为 60 mers。

异源杂交过程中,芯片上的一些探针可能会与非靶基因的转录本杂交,因而必须利用定量 PCR 等技术验证异源杂交结果的真实性^[29]。进行定量 PCR 验证的关键是获得目的基因特异的 PCR 引物。但对于红麻而言,其大量基因的核苷酸序列未知,因此引物设计的问题难以解决。

本研究靠简单计算有显著杂交信号的探针数目来判断探针与靶物种基因异源杂交的效率。该评价方式未必能完全反应异源杂交的质量,因为可能存在杂交的特异性和重复性等问题。红麻与棉花在系统进化中近缘关系也不能完全反应它们直系同源基因序列的匹配度。此外,红麻结构基因组计划尚未启动,GenBank 中红麻的 EST 或 cDNA 序列也很少,本课题组暂时还不能进行棉花表达谱芯片的探针与红麻表达基因相似度的比对工作。因此,本研究只能依据被杂交的棉花芯片探针数目来判断异源杂交的效率。

本研究首次尝试将棉花寡核苷酸表达谱芯片应用于红麻花药表达谱的研究中。从结果看,该方法具有可行性。但毕竟由于棉花和红麻是 2 个不同物种,对于应用该方法全面检测红麻的基因表达带来了一定的限制。因此,研发红麻自身的表达谱芯片平台是当前急需解决的问题。

参 考 文 献

[1] Aya K, Suzuki G, Suwabe K, et al. Comprehensive network analysis of anther-expressed genes in rice by the combination of 33 laser microdissection and 143 spatiotemporal microarrays [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26162

[2] Deveshwar P, Bovill W D, Sharma R, et al. Analysis of anther transcriptomes to identify genes contributing to meiosis and male gametophyte development in rice [J]. BMC Plant Biol, 2011, 11: 78

[3] Wei L Q, Xu W Y, Deng Z Y, et al. Genome-scale analysis and comparison of gene expression profiles in developing and germinated pollen in *Oryza sativa* [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 338

[4] Lorenz W W, Alba R, Yu Y S, et al. Microarray analysis and scale-free gene networks identify candidate regulators in drought-stressed roots of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) [J]. BMC Genomics, 2011, 12: 264

[5] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance [J]. J Exp Bot, 2007, 58(2): 221-227

[6] Cohen D, Bogaet-Triboulot M B, Tisserant E, et al. Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: A meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 630

[7] Ashraf A, Schnell J, Miki B. Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor *ABF3* [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 69

[8] Wei G, Tao Y, Liu G, et al. A transcriptomic analysis of superhybrid rice *LYP9* and its parents [J]. PNAS, 2009, 106(19): 7695-7701

[9] Rise M L, von Schalburg K R, Brown G D, et al. Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics [J]. Genome Res, 2004, 14(3): 478-490

[10] Brodsky L I, Jacob-Hirsch J, Avivi A, et al. Evolutionary regulation of the blind subterranean mole rat, *Spalax*, revealed by genome-wide gene expression [J]. PNAS, 2005, 102(47): 17047-17052

[11] Bar-Or C, Czosnek H, Koltai H. Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity [J]. Trends Genet, 2007, 23(4): 200-207

[12] 沈俊儒, 吴建勇, 张剑, 等. 甘蓝型油菜华油杂 6 号及其亲本的基因差异表达研究 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(1): 23-28

[13] Fu S X, Cheng H, Qi C. Microarray analysis of gene expression in seeds of *Brassica napus* planted in Nanjing (altitude: 8.9 m), Xining (altitude: 2261.2 m) and Lhasa (altitude: 3658 m) with different oil content [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(8): 2375-2386

[14] Horvath D P, Schaffer R, West M, et al. *Arabidopsis* microarrays identify conserved and differentially expressed genes involved in shoot growth and development from distantly related plant species [J]. Plant J, 2003, 34(1): 125-134

[15] Moore S, Payton P, Wright M, et al. Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the Solanaceae [J]. J Exp Bot, 2005, 56(421): 2885-2895

[16] Davey M W, Graham N S, Vanholme B, et al. Heterologous oligonucleotide microarrays for transcriptomics in a non-model species; a proof-of-concept study of drought stress in *Musa* [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 436

[17] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees [J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 113-116

[18] 't Hoen P A, Ariyurek Y, Thygesen H H, et al. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(21): e141

[19] Draghici S, Khatri P, Eklund A C, et al. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements [J].

- Trends Genet, 2006, 22(2): 101-109
- [20] Chen Z J, Scheffler B E, Dennis E, et al. Toward sequencing cotton (*Gossypium*) genomes[J]. Plant Physiol, 2007, 145(4): 1303-1310
- [21] Rong J, Bowers J E, Schulze S R, et al. Comparative genomics of *Gossypium* and *Arabidopsis*: Unraveling the consequences of both ancient and recent polyploidy[J]. Genome Res, 2005, 15(9): 1198-1210
- [22] Bar-Or C, Bar-Eyal M, Gal T Z, et al. Derivation of species-specific hybridization-like knowledge out of cross-species hybridization results[J]. BMC Genomics, 2006, 7: 110
- [23] Evertsz E M, AU-Yong J, Ruvolo M V, et al. Hybridization cross-reactivity within homologous gene families on glass cDNA microarrays[J]. Biotechniques, 2001, 31(5): 1182-1192
- [24] Kane M D, Jatkoec T A, Stumpf C R, et al. Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(22): 4552-4557
- [25] Walker S J, Wang Y, Grant K A, et al. Long versus short oligonucleotide microarrays for the study of gene expression in nonhuman primates[J]. J Neurosci Methods, 2006, 152(1-2): 179-189
- [26] Rise M L, von Schalburg K R, Brown G D, et al. Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: Data mining and interspecific hybridization characteristics[J]. Genome Res, 2004, 14(3): 478-490
- [27] Renn S C, Aubin-Horth N, Horfmann H A, et al. Biologically meaningful expression profiling across species using heterologous hybridization to a cDNA microarray[J]. BMC Genomics, 2004, 5(1): 42
- [28] Halgren R G, Fielden M R, Fong C J, et al. Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(2): 582-588
- [29] Ji W, Zhou W, Greqq K, et al. A method for cross-species gene expression analysis with high-density oligonucleotide arrays[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(11): e93

责任编辑: 袁文业