

运用 MSAP 研究镉胁迫对拟南芥幼苗基因甲基化的影响

李照令^{1,2}, 王鹤潼¹, 陈瑞娟^{1,2}, 贾春云¹, 李晓军¹, 台培东¹, 李培军¹, 刘宛^{1*}

(1.中国科学院沈阳应用生态研究所 污染生态与环境工程重点实验室, 沈阳 110016; 2.中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:DNA 甲基化是表观遗传学的重要组成部分,并在环境胁迫响应中起重要作用。运用甲基化敏感扩增多态性(Methylation sensitive amplification polymorphism,MSAP)技术研究 0、0.5、1.5、5.0 mg·L⁻¹ Cd²⁺处理对拟南芥幼苗全基因组 DNA 甲基化水平的影响,结果表明:(1)不同浓度镉处理 19 d 后,叶片数、地上部鲜重无明显变化,但根长受到显著抑制;(2)选取 10 对引物扩增 DNA 酶切产物,所得三个镉处理造成的拟南芥基因组 MSAP%均高于对照(35%);(3)随着镉处理的增大,拟南芥基因组甲基化(M)型条带依次减少,去甲基化(D)型条带逐渐增加,并且条带亮度也有所变化;(4)将特异性条带克隆测序后发现,mRNA、假设蛋白、表达蛋白、用于编码假定蛋白的 mRNA 序列 V 型质子 ATP 酶亚组、叶绿体中光合体系 II CP47 基因、叶绿体 DNA、rRNA 重复单元、核糖体蛋白等多种序列均存在甲基化修饰现象。这些特异序列可为我们寻找镉胁迫的生物标记物及胁迫响应的机理研究提供一定的依据。

关键词:拟南芥;基因组甲基化;镉胁迫;MSAP

中图分类号:Q943.2 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)01-0028-09 doi:10.11654/jaes.2014.01.003

Studying Genomic Methylation of *Arabidopsis thaliana* Seedlings Under Cadmium Stress Using MSAP

LI Zhao-ling^{1,2}, WANG He-tong³, CHEN Rui-juan^{1,2}, JIA Chun-yun¹, LI Xiao-jun¹, TAI Pei-dong¹, LI Pei-jun¹, LIU Wan^{1*}

(1.Key Laboratory of Pollution Ecology and Environmental Engineering, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract:The DNA methylation is an important component of epigenetics and plays a significant role in the environmental stress-response. In this study, the effect of Cd²⁺ on the methylation in genome-wide DNA of *Arabidopsis* was researched under Cd stress of 0~5.0 mg·L⁻¹ Cd²⁺ using methylation-sensitive amplified polymorphism(MSAP) technique. Root growth was significantly inhibited by Cd after 19 days of incubation. However, no obvious differences were observed in leaf numbers and fresh weight among all treatments. The percentages of MSAP in *Arabidopsis* treated with Cd²⁺ were higher than that of the control(35%). Increasing Cd concentrations decreased the methylated(M)-type bands, but increased demethylated(D)-type bands. Variations in the brightness intensity of these two bands were observed. After the specific bands were cloned and sequenced, the methylation modification phenomena were found in multiple sequences such as mRNA, hypothetical protein, express protein, V-type proton ATPase enzyme subgroup, chloroplast photosystem II CP47 genes, Chloroplast DNA, rRNA repeat unit and ribosomal protein. These specific sequences could provide bases for the biomarkers of cadmium stress and stress-response mechanisms.

Keywords:*Arabidopsis thaliana*; genome methylation; cadmium stress; MSAP

随着工业化的发展和不合理的开发利用资源,越来越多的重金属在土壤中积累。最近十多年来,污水

收稿日期:2013-04-30

基金项目:国家自然科学基金项目(21347007);国家自然科学基金项目(21077113,40930739,20977095);辽宁省自然科学基金项目(201202224);国家科技重大专项(2012ZX07505-001);沈阳大学区域污染环境生态修复教育部重点实验室基金

作者简介:李照令(1988—),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事环境污染生态毒理学研究。E-mail:hbbeijibing@163.com

*通信作者:刘宛 E-mail:liuwan63@hotmail.com

灌溉、采矿等人类活动致使土壤和水中的镉含量大幅增加,并通过食物链积累危害人类健康^[1-2]。根据国土资源部统计显示,目前全国约有 4% 的耕地受到镉污染,占重金属超标土壤面积的 40%,2011 年造成粮食减产 400 多万 t, 镉对大米等农作物造成的食物安全风险状况亦不容乐观^[3]。由于镉具有潜伏期长,毒性和迁移性强等特点,故对其污染土壤的诊断与治理已引起国内外学者的广泛重视^[4-5]。高浓度的镉容易造成甲基化损伤、细胞 DNA 链断裂、碱基错配等损伤,从而

影响植物生长,危害人类健康^[6-7]。当植物处于镉胁迫等不良环境中时,通常通过DNA的甲基化和去甲基化来提高自身抗逆性^[8-9],其甲基化过程与基因组印记、转录调节基因等联系在一起可以调节植物生长发育,并在基因组防御中起重要作用^[10-12],而去甲基化过程可以影响染色体活性、胚胎生长、细胞分化和癌变等生命活动,有利于基因表达^[13-14]。

由于甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术具有操作简单,检出率高,不需要预先知道DNA序列等优点,加之“CCGG/GGCC”位点的甲基化修饰比例能够客观反映植物基因组甲基化修饰水平^[15-17],因此该技术已经成为研究动植物基因组DNA甲基化的重要方法^[16,18-24]。MSAP技术的甲基化检测率在4.7%到45%之间^[15,17],它可以反映物种差异性,评定植物基因组胞嘧啶甲基化水平。例如,Cervera等^[25]运用MSAP技术测定了拟南芥不同生态型的甲基化水平;Haichan Yu^[26]等研究了低能量离子诱导拟南芥基因甲基化变化情况;杜亚琼等发现甘露醇^[27]和土霉素^[28]亦会对拟南芥基因甲基化造成一定影响;何艳霞^[29]等发现超低温保存也可影响拟南芥基因甲基化水平;王子成等^[30]发现随着CdCl₂浓度的增加,拟南芥甲基化程度增高,但是尚未明确指出具体的甲基化修饰位点。

由于模式植物拟南芥植株小,生长周期短,基因组小,有5对染色体,并且其基因组序列及功能已全部测出,已广泛作为植物生理、生化及分子生物学研究的模式植物,故本论文选取拟南芥为待测植物,运用MSAP技术测定不同浓度Cd处理对拟南芥全基因组甲基化的影响,并通过克隆测序寻找其甲基化位点,分析甲基化对基因表达的潜在调控机制,从而为土壤污染诊断及修复效果的质量评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 拟南芥培养

供试拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis*)种子为哥伦比亚生态型(Ecotype Columbia)。选取健康饱满的拟南芥种子,经0.1%HgCl₂消毒5 min后用灭菌水清洗干净,将种子浸泡于去离子水中,4℃春化24~72 h。三角瓶中加入100 mL M&S(Murashige and Skoog)培养液,并加入Cd溶液,使其浓度为0(CK)、0.5、1.5、5.0 mg·L⁻¹,灭菌后将大约相同数量的拟南芥种子种于三角瓶中并密封。将三角瓶置于光照培养箱中进行摇动培养,培养条件设置为:温度19~20℃,光

暗周期14 h/10 h,光强2000 lx。所有处理均重复3次。19 d后取样,用刀片分离其根、茎、叶,蒸馏水与无菌水分别清洗3次后用滤纸擦干,冷藏于-80℃冰箱中待用。Cd²⁺由CdCl₂(分析纯,纯度>99.9%)提供。

1.2 种子发芽率试验及形态指标的测定

取直径为100 mm的玻璃培养皿,底层铺一张灭菌滤纸,每个培养皿中放拟南芥种子50粒,种子消毒方法参照1.1。分别加入浓度为0、0.5、1.5、5.0 mg·L⁻¹的Cd²⁺溶液10 mL,放入4℃冰箱中打破种子休眠,每个处理重复3次。3 d后放入20℃恒温培养箱内进行光照培养。当对照种子发芽率>88%,根长度为20 mm时,试验结束。幼苗的根长小于5 mm时认定为没有发芽。

取不同Cd浓度处理19 d后的拟南芥幼苗20株,分别测定其叶片数、鲜重和根长。根长抑制率按下式计算:

$$\text{抑制率} = (1 - x/y) \times 100\%$$

式中,x为各处理组幼苗初生根平均根长,y为对照组幼苗初生根平均根长。数据结果采用SPSS软件(版本13.0)和Microsoft Excel 2007进行统计分析,表示为平均值±标准差。各处理组的比较采用最小显著差数法(LSD)进行多重比较,显著性水平设为0.05。

1.3 DNA提取

选取50~100 mg长势相当的拟南芥幼苗叶片,用改良的CTAB^[31]法提取总DNA,用蛋白-核酸含量测定仪(Eppendorf BioPhotometer plus, Germany)测定浓度和纯度,并用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 MSAP分析

MSAP分析程序参照Cervera等^[25]的方法并加以改进,以内切酶组合EcoR I + Hpa II(E+H)和EcoR I + Msp I(E+M)对基因组DNA进行双酶切(酶切药品均购自NEB,美国)。取5 μL酶切产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。吸取15 μL纯化后的酶切产物进行接头连接反应,连接产物保存于-20℃备用。实验所用接头参照Haichan Yu等的接头序列设计^[26],由大连宝生物公司合成(表1)。

预扩增及选择性扩增反应体系均为25 μL体系。预扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,选择性扩增产物于95℃变性5 min后,用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,300 V预电泳30 min,300 V电泳4 h,溴化乙锭(EB)染色后照相,进行条带统计分析。

1.5 甲基化修饰位点回收、克隆测序及比对分析

将聚丙烯酰胺凝胶中的特异性甲基化片段用刀

表 1 MSAP 分析所用接头和引物序列

Table 1 Sequence of adapters and primers used for MSAP analysis

接头和引物		序列(5'-3')	
		<i>Eco</i> RI(E)	<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I (HM)
接头	正向	CTCGTAGACTGCGTACC	GACGATGAGTCCTCGAT
	反向	AATTGGTACGCGTC	CGATCGAGACTCAT
预扩引物		E00; GACTGCGTACCAATTCA	HM00; ATGACTCTCGATCGG
		E00AA; GACTGCGTACCAATTCAA	HM00AAAT; ATGACTCTCGATCGGAAT
选扩引物		E00AG; GACTGCGTACCAATTTCAG	HM00ATC; ATGACTCTCGATCGGATC
		E00AC; GACTGCGTACCAATTCAC	HM00ACT; ATGACTCTCGATCGGACT
		E00AT; GACTGCGTACCAATTCAT	HM00TCA; ATGACTCTCGATCGGTCA
			HM00TCC; ATGACTCTCGATCGGTCC

片切下,用无菌水清洗3遍,捣碎,加入30 μL无菌水,95 °C水浴5 min,自然冷却,使DNA煮至上清液,根据所切条带的深浅将上清液稀释10~30倍。取稀释后的上清液2 μL用相应的引物再次进行选择性扩增反应,扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,将检测到的目的条带切下,用PCR纯化试剂盒回收(北京博大泰克生物基因技术),回收产物接入pMD19-T载体(TaKaRa, Japan),再转人大肠杆菌感受态细胞中,挑选出阳性单克隆进行培养、测序。序列测定委托北京华大基因进行合成。

所得序列在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行同源性检索,确定该序列位置及功能。

2 实验结果与分析

2.1 Cd 处理对拟南芥种子发芽率、幼苗地上部鲜重和根长的影响

经0.5、1.5、5.0 mg·L⁻¹ Cd²⁺处理19 d后,处理组叶片数量、大小、形状与对照组之间没有明显差异,种子发芽率变化亦不大(表2)。地上部鲜重虽有所增

表 2 Cd 胁迫对拟南芥种子发芽率、幼苗地上部鲜重和根长的影响

Table 2 Effects of Cd on seed germination rate(%), aboveground fresh weight and root length of *Arabidopsis* seedlings

Cd 浓度/ mg·L ⁻¹	幼苗 叶片数	发芽率/ %	幼苗叶片 鲜重/mg	根系	
				根长/cm	抑制率/%
0	8	93.33	21.13±1.43a	12.87±1.04a	0
0.5	8	94.67	20.73±2.20a	11.45±1.02b	11.07
1.5	8	94.00	20.36±1.69a	8.95±1.17c	30.50
5.0	8	92.67	19.82±1.67a	6.65±1.27d	48.32

注:同列数据后不同字母表示差异显著(*P*<0.05)。

Note: Data followed by different letters in the same column indicate significant differences(*P*<0.05).

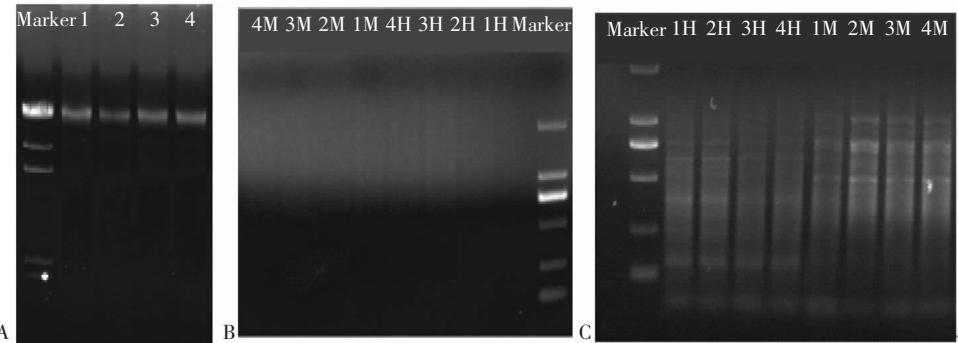
加,但处理组与对照相比差异不显著(*P*>0.05)。三个处理的拟南芥幼苗根系长度明显低于对照(*P*<0.05),并且随着Cd浓度的升高根长抑制率明显增大,分别为11.92%、29.65%和48.63%。表明Cd胁迫对幼苗根尖细胞的抑制和毒害作用具有显著的累积效应。

2.2 DNA 提取、双酶切及预扩增结果

DNA提取纯度及完整性均符合后续试验的要求(图1A)。酶切后取5 μL双酶切产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,条带均匀弥散,表明酶切结果良好,可以进行下游试验(图1B)。将5 μL预扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,条带呈均匀弥散涂抹状且大部分在100~1000 bp范围内,结果良好,可以进行下游试验(图1C)。

2.3 拟南芥基因组DNA扩增图谱及甲基化修饰水平分析

经MSAP分析,我们获得了条带清晰,重复性好,甲基化修饰位点丰富的MSAP扩增图谱。*Hpa* II和*Msp* I均能识别并切割5'-CCGG-3'序列,但是,*Hpa* II对于5'-CCGG-3'中的任何一种双链胞嘧啶全甲基化都敏感(即不能酶切含5'-m⁵CCGG-3'、5'-C^mCGG-3'、5'-m⁵C^mCGG-3'的位点),但是它能识别并切割只在单链外侧胞嘧啶上发生的半甲基化。而*Msp* I对单链或双链外侧胞嘧啶发生的甲基化均敏感(即不能酶切含5'-m⁵CCGG-3'、5'-m⁵C^mCGG-3'的位点),只能切内侧甲基化位点(即5'-C^mCGG-3'位点)。因此,本实验将MSAP检测到的带型分为四类:I型带,E+H和E+M两种酶切都有带,表明CCGG位点未发生甲基化(图2A);II型带,E+H无带,E+M有带,表明CCGG位点发生全甲基化(图2B);III型带,E+H有带,E+M无带,表明CCGG位点发生半甲基化(图2C);IV型带,E+H和E+M均无带。

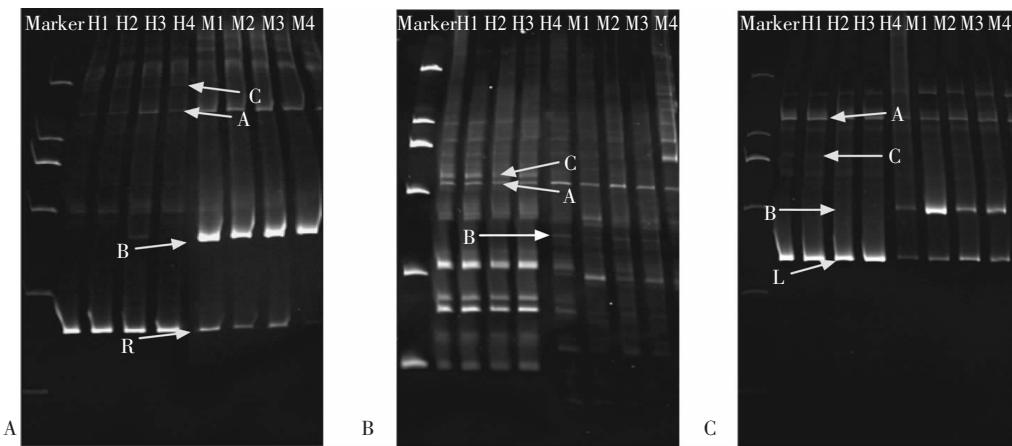


A:DNA 提取结果;B:双酶切产物检测;C:预扩增产物检测;H:*EcoR I +Hpa II* 双酶切;M:*EcoR I +Msp I* 双酶切;1:CK,2:0.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺,3:1.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺,4:5.0 mg·L⁻¹ Cd²⁺;A 图 marker 为 λ-Hind III digest DNA Marker,B,C 图 marker 为 DL2000 DNA Marker

A:DNA extraction results;B:detection of double digestion product;C:detection of pre-amplification;H: digested with *EcoR I + Hpa II* ; M: digested with *EcoR I + Msp I* ; 1:CK, 2:0.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺, 3:1.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺, 4:5.0 mg·L⁻¹ Cd²⁺; marker of picture A is λ-Hind III digest DNA Marker, marker of picture B and C is DL2000 DNA Marker

图 1 1.5%琼脂糖检测对照及各处理的 DNA 提取结果、双酶切产物和预扩增产物

Figure 1 Profile of DNA extraction results, double restriction enzyme digestion and preselective products between control and treatments with 1.5% agarose gel electrophoresis



H:*EcoR I +Hpa II* 双酶切;M:*EcoR I +Msp I* 双酶切;Marker:DL2000 DNA Marker;1:CK,2:0.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺,3:1.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺,4:5.0 mg·L⁻¹ Cd²⁺
H: digested with *EcoR I +Hpa II* ; M: digested with *EcoR I + Msp I* ; Marker: DL2000 DNA Marker; 1:CK, 2:0.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺, 3:1.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺, 4:5.0 mg·L⁻¹ Cd²⁺

图 2 对照与处理拟南芥基因组 DNA 的 MSAP 扩增图谱

Figure 2 Profiles of MSAP in *Arabidopsis thaliana* DNA between control and treatments

从 *EcoR I* 选扩引物与 *Hpa II* 和 *Msp I* 选扩引物配对的 20 对引物中挑选出 10 对条带图谱清晰、多态性高、重复性好的引物。共产生 1062 条清晰可辨的 DNA 条带,平均每对引物扩增获得 106.2 条条带。甲基化位点 474 条,比例为 44.63%,其中半甲基化位点共 308 条,占 29.00%;全甲基化位点 166 条,占 15.63%(表 3)。全甲基化比例比半甲基化比例少了 13.37%,说明拟南芥基因组 CCGG 位点单链外侧的胞嘧啶甲基化程度比双链内侧胞嘧啶甲基化程度高。

不同浓度 Cd 处理引起的拟南芥幼苗基因组 DNA 总甲基化率,即 MSAP 比例分别为 35.00%(CK)、52.65%、47.37%、44.65%。3 个处理的总甲基化程度随

着处理浓度的升高而降低,但均高于对照,说明镉处理使拟南芥总甲基化比例升高。各处理的全甲基化率均高于对照,分别为 15.00%(CK)、15.51%、16.17%、15.87%,说明拟南芥基因组 CCGG 位点双链内侧胞嘧啶甲基化程度增大,增大趋势为先上升后降低。半甲基化率分别为 20.00%(CK)、37.14%、31.20%、8.78%,说明拟南芥基因组 CCGG 位点单链外侧的胞嘧啶甲基化程度增加,且与处理浓度呈负相关关系。

2.4 Cd 处理引起拟南芥幼苗的甲基化带型变化

在本实验中,甲基化敏感性扩增共出现 15 种带型变化(表 4),总体分为单态性变化和多态性变化。单态性变化即处理组与对照之间有相同的带型(N

表3 不同浓度Cd处理对拟南芥幼苗基因组DNA甲基化水平的影响

Table 3 Effects of different Cd concentrations on genomic DNA methylation levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings

Cd ²⁺ 浓度/ mg·L ⁻¹	带型							
	未甲基化(I)	全甲基化(II)	比例/%	半甲基化(III)	比例/%	总扩增条带数(N)	总甲基化条带数	MSAP/%
0	182	42	15.00	56	20.00	280	98	35.00
0.5	116	38	15.51	91	37.14	245	129	52.65
1.5	140	43	16.17	83	31.20	266	126	47.37
5.0	150	43	15.87	78	28.78	271	121	44.65
合计	588	166	15.63	308	29.00	1062	474	44.63

注:总扩增条带数(N)=I+II+III;总甲基化条带数=II+III;总甲基化率(MSAP比例)=(II+III)/N;全甲基化率=II/N;半甲基化率=III/N。

Note: Total amplified bands(N)= I + II + III ; Total methylated bands= II + III ; Methylated bands ratio=(II + III) / N ; Fully methylated loci ratio= II / N ; Half methylated loci ratio= III / N .

表4 不同浓度Cd处理后拟南芥幼苗基因组DNA甲基化带型的变化

Tables 4 Changes in the genomic DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* seedling treated with different Cd concentrations

酶切				甲基化状态变化		带型	带型数		
对照		处理		对照	处理		0.5 mg·L ⁻¹ (Cd ²⁺)	1.5 mg·L ⁻¹ (Cd ²⁺)	5.0 mg·L ⁻¹ (Cd ²⁺)
H	M	H	M						
1	1	1	0	CCGG GGCC	CCGG GGCC <u>CC</u> <u>CC</u>	M1	34	24	20
1	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	M2	1	1	0
1	1	0	0	CCGG GGCC	CCGG <u>GG</u> <u>GG</u>	M3	0	0	2
1	0	0	0	CCGG GGCC <u>CC</u> <u>CC</u>	CCGG GGCC	M4	5	2	1
0	1	0	0	CCGG GGCC	CCGG <u>GG</u> <u>GG</u>	M5	11	4	3
小计							51	31	26
0	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	D1	0	1	1
1	0	1	1	CCGG GGCC <u>CC</u> <u>CC</u>	CCGG GGCC	D2	3	3	5
0	0	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	D3	0	1	1
0	0	0	1	CCGG GGCC	CCGG <u>GG</u> <u>GG</u>	D4	5	7	7
0	0	1	0	CCGG GGCC	CCGG GGCC <u>CC</u> <u>CC</u>	D5	7	7	7
小计							15	19	21
1	0	0	1	CCGG GGCC <u>CC</u> <u>CC</u>	CCGG GGCC	U1	0	0	0
0	1	1	0	CCGG GGCC	CCGG GGCC <u>CC</u> <u>CC</u>	U2	1	0	0
小计							1	0	0
多态性带型总计							67	50	47
1	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	N1	55	64	67
1	0	1	0	CCGG GGCC <u>CC</u> <u>CC</u>	CCGG GGCC <u>CC</u> <u>CC</u>	N2	48	51	50
0	1	0	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	N3	26	30	32
单态性带型总计							129	145	149
条带总计							196	195	196

注:H和M分别代表Hpa II/EcoR I 和 Msp I/EcoR I 酶切. 1:有带;0:无带;C和CC均表示甲基化的胞嘧啶。

Note:H represented digestion with Hpa II/EcoR I ,M represented digestion with Msp I/EcoR I . 1:Presence of band;0:Absence of band;C and CC represented methylated cytosine.

型,N1未发生甲基化;N2半甲基化;N3全甲基化),表明拟南芥经Cd处理后,其基因组DNA的CCGG位点甲基化状态没有改变。多态性变化即指处理组与对照组带型不同,表明拟南芥经Cd处理后其CCGG位点的甲基化状态发生了改变,主要有:

(1) 甲基化型(Methylated)——M型,包括M1、M2、M3、M4、M5,表明拟南芥经Cd处理后CCGG位点甲基化程度增加,其中,M1(1,1→1,0)、M2(1,1→0,1)、M3(1,1→0,0)为重新甲基化,即处理组在对照组未发生甲基化的基础上增加了甲基化;M4(1,0→0,0)、M5(0,1→0,0)为超甲基化,即处理组在对照组已经发生了甲基化的基础上又增加了甲基化程度。

(2)去甲基化型(Demethylated)——D型,包括D1、D2、D3、D4、D5,表明拟南芥经过Cd处理后CCGG位点甲基化程度减少,其甲基化状态与M型相反。

(3)不定类型(Uncertain)——U型,包括U1和U2,指处理组与对照组的甲基化差异程度无法确定^[32]。

从表4和图3中可以看出,多态性条带中以甲基化(M)型居多,说明Cd处理使拟南芥基因组DNA的CCGG位点发生了大量的甲基化修饰。三个处理造成的拟南芥基因组甲基化型条带依次降低,分别为51、31、26条;去甲基化(D)型条带虽依次增多,但仍低于甲基化型,分别为15、19、21条;多态性条带依次为67、50、47条,且甲基化条带变化趋势大于去甲基化型变化趋势。这表明随着Cd浓度升高,拟南芥基因组去甲基化位点呈逐渐增多的趋势。

2.5 DNA甲基化位点序列分析

对部分拟南芥基因组甲基化修饰位点进行回收、

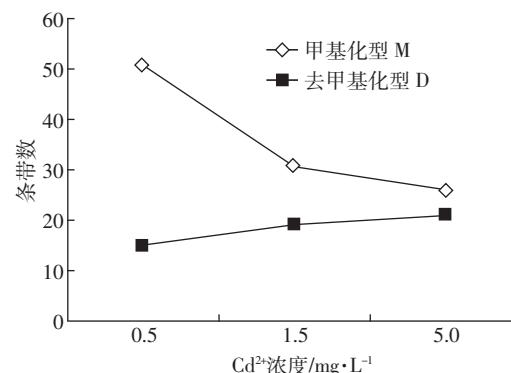


图3 镉处理引起的拟南芥幼苗基因组DNA甲基化和去甲基化的变化趋势

Figure 3 Changes of genomic DNA methylation and demethylation in *Arabidopsis* seedlings treated by Cd

克隆测序后,成功分离了8条甲基化修饰的基因序列,以匹配的同源序列功能注释进行划分,发现拟南芥基因组中包括mRNA、假设蛋白、表达蛋白、用于编码假定蛋白的mRNA序列V型质子AT酶亚组、叶绿体中光合体系ⅡCP47基因、叶绿体DNA、rRNA重复单元、核糖体蛋白等多种类型的DNA序列均存在DNA甲基化修饰现象(表5)。

3 讨论

本实验每个处理随机挑选20株拟南芥幼苗测定其生理指标,以消除拟南芥种间的遗传多态性,结果显示拟南芥叶片大小及数量无明显变化,而根长抑制率随镉浓度增大而显著升高(表2)。许多学者如Herbette等^[33]均证实镉在根部的积累显著高于叶片部位,类似的结果也在单存海^[34]、孙梨宗^[35]、韩艳萍^[36]等

表5 拟南芥基因组DNA甲基化修饰位点的序列及比对结果

Table 5 Sequence analysis of the methylated sites in *Arabidopsis thaliana*

引物	限制性内切酶图谱	长度/bp	同源序列	一致性/%	E值
E00AG/HM00ACT	E+M fragment, CK	316	<i>Arabidopsis thaliana</i> At2g16590/F1P15.3 mRNA sequence	100	1e-163
E00AT/HM00ACT	E+H fragment, Cd1.5	362	<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 2 BAC F23H14 genomic sequence, complete sequence	99	0.0
E00AC/HM00TCC	Weak E+H fragment, Cd5.0	122	<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome I BAC F12K8 genomic sequence, complete sequence	100	4e-56
E00AA/HM00ATC	Weak E+H/Weak E+M fragment, CK	362	<i>Arabidopsis thaliana</i> mRNA for hypothetical protein, complete cds, clone: RAFL22-85-G17	99	0.0
E00AA/HM00ATC	Weak E+H fragment, Cd5.0	145	<i>Arabidopsis thaliana</i> photosystem II CP47 protein(psbB) gene, partial cds; PsbT(psbT) and PsbN(psbN) genes, complete cds; and PsbH(psbH) gene, partial cds; chloroplast genes for chloroplast products	100	8e-69
E00AA/HM00ATC	E+H/ Weak E+M fragment, CK	363	<i>Arabidopsis thaliana</i> rRNA repeat unit, most frequent IGR type	99	0.0
E00AA/HM00ATC	E+H/ Weak E+M fragment, Cd5.0	162	<i>Arabidopsis thaliana</i> chloroplast DNA, complete genome, ecotype: Columbia	100	3e-78
E00AG/HM00AAT	E+M fragment, Cd0.5	185	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> ribosomal protein S11, mRNA	98	1e-85

的实验中得到证实。这是由于镉从培养液等外部环境进入到植物中,大部分积累在根部,破坏根部细胞核仁,抑制硝酸还原酶及质子泵的活性,使生物大分子构相改变,从而干扰细胞正常代谢造成的^[37]。

从分子水平上讲,本实验利用一系列的随机引物进行 PCR 扩增,检测区域几乎覆盖了整个基因组,共得到 1062 条条带。对照组甲基化条带占该组总条带的 35%(表 3),这与 Cervera 等^[25]研究中哥伦比亚生态型的甲基化程度相近(为 36.2%),但与黑麦(51.72%)^[38]、小麦(41.56%~44.83%)^[39]、银杏(44%)^[20]、脐橙(4.7%~15.0%)^[24]等植物的基因组 DNA 甲基化检出率不同,进一步说明不同物种在基因修饰方面有较大差异^[30]。我们还发现三个镉处理的拟南芥 DNA 甲基化水平均高于对照,该现象在豌豆、小麦、水稻等植物中也得到证实^[40~41],镉还可引起泥鳅基因甲基化升高^[42],说明镉胁迫确实有显著增加植物基因组甲基化水平的效应。有学者认为,这是由于镉引起拟南芥体内的过氧化胁迫而产生大量甲基自由基,甲基自由基直接攻击 DNA 中的胞嘧啶造成了 MSAP 比例的提高^[34,43]。进一步分析得到不同浓度镉胁迫下半甲基化条带多于全甲基化条带,其原因是虽然 *Hpa* II 对 CCGG 位点胞嘧啶甲基化的敏感性低于 *Msp* I^[44],但是 *Msp* I 扩增出的片段低于 100 bp,电泳条件无法显示,类似的结果也在 Cervera 等的研究中被证实^[25]。

植物中 DNA 甲基化的主要作用为调控基因表达和维持基因组稳定性等。基因组甲基化可抑制基因表达,因此对不同浓度镉处理造成的拟南芥甲基化变异模式分析表明,三个镉处理中甲基化(M 型)位点均高于去甲基化(D 型)位点(表 4,图 3),使拟南芥生长受到抑制^[28]。但是在高浓度的镉胁迫处理下,拟南芥通过自身调节,去除基因中甲基基团,使某些抗逆性基因得以表达,从而减少镉造成的伤害^[45~46],所以随着镉处理浓度的增大基因组 M 型位点减少,D 型位点增多。镉胁迫下,拟南芥细胞中的甲基化酶、抗氧化酶和非酶抗氧化系统通过甲基化或去甲基化过程启动,清除细胞内镉诱导产生的活性氧,降低氧化压力,从而减轻镉对植物的毒害^[47],如 S. Herbette 等的研究发现植物可以通过增加相关基因的转录来激活硫同化途径从而应对镉胁迫^[48],所以本次试验中除了条带的增加和缺失外,部分条带的亮度也发生了变化,有的逐渐减弱(图 2R),有的逐渐增强(图 2L)。

我们将这些特异性甲基化修饰位点进行克隆测序,发现 mRNA、假设蛋白、表达蛋白、用于编码假定

蛋白的 mRNA 序列 V 型质子 ATP 酶亚组、叶绿体中光合体系Ⅱ CP47 基因、叶绿体 DNA、rRNA 重复单元、核糖体蛋白等均存在甲基化修饰现象。其他学者还发现基因组中编码转座子的序列、散在重复序列、鸟枪序列、ATP 合成酶/蛋白激酶等存在较高水平的 DNA 甲基化^[20,40,49]。DNA 甲基化修饰改变了 DNA 构象,影响染色质的结构及 DNA 与蛋白质的相互作用,从而调节基因表达^[50],因此这些基因组序列可能参与细胞内重要生理功能来响应外界胁迫^[20,38]。

4 结论

DNA 甲基化是最早发现的基因修饰途径之一,对生物生长发育调节有重要作用。本实验通过对镉胁迫下的拟南芥幼苗形态和分子指标进行分析,发现随着镉浓度的增大,拟南芥根长抑制率升高;基因组 DNA 甲基化比例逐渐降低,但均高于对照;基因组去甲基化位点增多。我们可以利用这些变化趋势,并结合特异甲基化序列的测序结果分析,寻找可以作为指示镉胁迫的生物标记物,以对镉污染进行早期预警和评价,为污染土壤的诊断及修复效果的质量评价提供科学依据,并为植物适应逆境胁迫的分子机理研究提供一些研究基础。

参考文献:

- [1] 王芸,张建辉,赵晓军.污灌农田土壤镉污染状况及分布特征研究[J].中国环境监测,2007,23(5):71~74.
WANG Yun, ZHANG Jian-hui, ZHAO Xiao-jun. The study of the pollution situation and distribution characteristics of cadmium in farmland soil irrigated by waste water[J]. Environmental Monitoring in China, 2007, 23(5):71~74.
- [2] 刘宛,郑乐,李培军,等.镉胁迫对大麦幼苗基因组 DNA 多态性影响[J].农业环境科学学报,2006,25(1):19~24.
LIU Wan, ZHENG Le, LI Pei-jun, et al. Effects of cadmium stress on DNA polymorphism of genome in Barley seedlings[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2006, 25(1):19~24.
- [3] EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to cadmium as undesirable substance in normal feed[J]. The EFSA Journal, 2001, 225:1~27.
- [4] 蒋汉明,李书启,韩希凤,等.镉对植物生长的影响及植物耐镉机理研究进展[J].广东微量元素科学,2012,19(5):1~6.
JIANG Han-ming, LI Shu-qi, HAN Xi-feng, et al. The impact of cadmium on plant growth and mechanism of plant resistance to cadmium[J]. Guangdong Trace Elements Science, 2012, 19(5):1~6.
- [5] Marsha C B, Jennifer R F, Rence C H. DNA strand breakage in freshwater Mussels(*Anodonta Grandis*) exposed to lead in the laboratory and field[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1996, 15(5):802~808.

- [6] Li F, Ni L, Yuan J, Daniel S G. Cultivation practices affect heavy metal migration between soil and *Vicia faba*(broad bean)[J]. *Chemosphere*, 2010, 80(11):1393–1398.
- [7] 刘宛,李培军,周启星,等.环境污染条件下生物体内DNA损伤的生物标记物研究进展[J].应用与环境生物学报,2005,11(2):251–255.
LIU Wan, LI Pei-jun, ZHOU Qi-xing, et al. Research advances of biomarker of DNA damage in organisms under environmental pollution [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2005, 11 (2):251–255.
- [8] Long L, Lin X, Zhai J, et al. Heritable alteration in DNA methylation pattern occurred specifically at mobile elements in rice plants following hydrostatic pressurization[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340(2):369–376.
- [9] Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, et al. DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(7):681–691.
- [10] Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E. DNA methylation, a key regulation of plant development and other processes[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2000, 10:217–223.
- [11] Guimil S, Dunand C. Patterning of *Arabidopsis* epidermal cells:Epigenetic factors regulate the complex epidermal cell fate pathway [J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11:601–609.
- [12] 王宇,潘兴,卜宁,等.逆境胁迫对水稻DNA甲基化水平的影响[J].生物技术通报,2011,12:1–5.
WANG Yu, PAN Xing, BO Ning. Level of DNA methylation related to stress in rice[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 12:1–5.
- [13] Goncalo M L, Jones P A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation[J]. *Mutation Research*, 1997, 386:107–118.
- [14] Zilberman D. The evolving functions of DNA methylation[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(5):554–559.
- [15] Reyna-López G E, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1997, 253:703–710.
- [16] Ruiz-García L, Cervera M T, Martínez-Zapater J M. DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development[J]. *Planta*, 2005, 222:301–306.
- [17] Salmon A, Ainouche M L, Wendel J F. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina(Poaceae)*[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14:1163–1175.
- [18] Zhang M S, Yan H Y, Zhao N, et al. Endosperm-specific hypo methylation, and meiotic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) inter-strain hybrids[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115:195–207.
- [19] Monteuius O, Doulbeau S, Verdeil J L. DNA methylation in different origin clonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype[J]. *Trees*, 2008, 22:779–784.
- [20] 李际红,邢世岩,王聪聪,等.银杏基因组DNA甲基化修饰位点的MSAP分析[J].园艺学报,2011,38(8):1429–1436.
LI Ji-hong, XING Shi-yan, WANG cong-cong, et al. Analysis on genomic DNA methylation modification of *Ginkgo biloba* by methylation-sensitive amplification polymorphism[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(8):1429–1436.
- [21] 苗绪红,苏冠男,胡宝全,等.慢性肾功能衰竭大鼠肾皮质基因组DNA表观遗传学变化的MSAP分析[J].南开大学学报(自然科学版),2011,44(4):8–14.
MIAO Xu-hong, SU Guan-nan, HU Bao-quan, et al. Chronic renal failure rat renal cortex genomic DNA epigenetic changes in MSAP analysis[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2011, 44(4):8–14.
- [22] Tan M P. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48(1):21–26.
- [23] 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,2005,31(9):1138–1143.
YI Zhi-ben, SUN Yi, NIU Tian-tang, et al. Patterns of DNA cytosine methylation between hybrids and their parents in *Sorghum genome*[J]. *Agronomica Sinica*, 2005, 31(9):1138–1143.
- [24] 洪柳,邓秀新.应用MSAP技术对脐橙品种进行DNA甲基化分析[J].中国农业科学,2005,38(11):2301–2307.
HONG Liu, DENG Xiu-xin. Analysis of DNA methylation in navel oranges based on MSAP marker[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38 (11):2301–2307.
- [25] Cervera M T, Ruiz-García L, Martínez-Zapater J M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(4):543–552.
- [26] Yu H, Zhao J, Xu J, et al. Detection of changes in DNA methylation induced by low-energy ion implantation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Radiation Research Society*, 2011, 175(5):599–609.
- [27] 杜亚琼,王子成.甘露醇对拟南芥基因组DNA甲基化的影响[J].植物学报,2011,46(3):285–292.
DU Ya-qiong, WANG Zi-cheng. Methylation-sensitive amplified polymorphism analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* under mannitol treatment[J]. *Bulletin of Botany*, 2011, 46(3):285–292.
- [28] 杜亚琼,王子成,李霞.土霉素胁迫下拟南芥基因组DNA甲基化的MSAP分析[J].生态学报,2011,31(10):2846–2853.
DU Ya-qiong, WANG Zi-cheng, LI Xia. MSAP analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* under oxytetracycline stress[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(10):2846–2853.
- [29] 何艳霞,王子成.拟南芥幼苗超低温保存后DNA甲基化的遗传变异[J].植物学报,2009,44(3):317–322.
HE Yan-xia, WANG Zi-cheng. Variation of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* seedlings after the cryopreservation[J]. *Bulletin of Botany*, 2009, 44(3):317–322.
- [30] 王子成,马洪霞,何艳霞.重金属镉对拟南芥DNA甲基化的影响[J].植物生理学通讯,2009,45(2):115–118.
WANG Zi-cheng, MA Hong-xia, HE Yan-xia. Effects of cadmium on *Arabidopsis thaliana* DNA methylation[J]. *Plant Physiology Communications*, 2009, 45(2):115–118.

- [31] Huang J, Ge X, Sun M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA[J]. *Biotechnique*, 2000, 28(3):432–434.
- [32] Yanli Lu, Tingzhao Rong, Moju Cao. Analysis of DNA methylation in different maize tissues[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, 35: 41–48.
- [33] Herbette S, Taconnat L, Hugouevieux V, et al. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots[J]. *Biochimie*, 2006, 88(11):1751–1765.
- [34] 单存海, 钟 鸣, 刘 宛, 等. 镉胁迫对拟南芥 MLH1 基因启动子甲基化的影响[J]. 植物生理学报, 2011, 47(3):298–304.
- SHAN Cun-hai, ZHONG Ming, LIU Wan, et al. Effects of cadmium stress on MLH1 promoter methylation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(3):298–304.
- [35] 孙梨宗, 刘 宛, 马珊珊, 等. 镉诱导拟南芥幼苗 DNA 损伤[J]. 生态学杂志, 2012, 31(9):2337–2343.
- SUN Li-zong, LIU Wan, MA Shan-shan, et al. Cadmium induced DNA damage of *Arabidopsis* seedlings[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(9):2337–2343.
- [36] 韩艳萍, 刘 宛, 李艳芝, 等. 镉胁迫对拟南芥幼苗形态生理和错配修复相关基因表达的影响研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(6):1246–1252.
- HAN Yan-ping, LIU Wan, LI Yan-zhi, et al. Effects of cadmium stress on morphological, physiological indexes and mismatch repair related genes expression of *Arabidopsis* seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(6):1246–1252.
- [37] 张 军, 杜文圣. 植物对重金属镉的耐受机制[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(1):1–8.
- ZHANG Jun, SHU Wen-sheng. The tolerant mechanism of plant to heavy metal cadmium[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(1):1–8.
- [38] 张 勇, 邓科君, 张 锐, 等. 黑麦基因组 DNA 甲基化修饰位点的 MSAP 分析[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(4):559–564.
- ZHANG Yong, DENG Ke-jun, ZHANG Tao, et al. Analysis on genomic DNA methylation modification of rye by methylation-sensitive amplification polymorphism[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2009, 29(4):559–564.
- [39] Zhang Y, Liu Z, Liu C, et al. Analysis of DNA methylation variation in wheat genetic background after alien chromatin introduction based on methylation-sensitive amplification polymorphism[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2008, 53:58–69.
- [40] Labra M, Ghiani A, Citterio S, et al. Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips[J]. *plant Biology*, 2002, 4:694–699.
- [41] Ge C L, Yang X Y, Liu X N, et al. Effect of heavy metal on the DNA methylation level in rice and wheat[J]. *Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, 28(5):363–368.
- [42] 王丙莲, 张迎梅, 谭玉凤, 等. 镉铅对泥鳅 DNA 甲基化水平的影响[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(2):78–80.
- WANG Bing-lian, ZHANG Ying-mei, TAN Yu-feng, et al. Influence of cadmium and lead on the DNA methylation level of loach *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Journal of Toxicology*, 2006, (2):78–80.
- [43] Hix S, Augusto O. DNA methylation by tert-butyl hydroperoxide–iron (II): A role for the transition metal ion in the production of DNA base adducts[J]. *Chem Biol Interact*, 1999, 118:141–149.
- [44] Vongs A, Kakutano T, Martienssen R A, et al. *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants[J]. *Science*, 1993, 260:1926–1928.
- [45] 傅业全, 何宝霞, 刘晓瑛, 等. DNA 甲基化与重金属中毒[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(2):139–142.
- FU Ye-quan, HE Bao-xia, LIU Xiao-ying, et al. DNA methylation and heavy metal poisoning[J]. *Journal of Toxicology*, 2007, 21(2):139–142.
- [46] Poirier L A, Vlasova T A. The prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110:793–795.
- [47] Cho U H, Sohn J Y. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and lipid peroxidation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Plant Biology*, 2004, 47(3):262–269.
- [48] Herbette S, Taconnat L, Hugouevieux V. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots[J]. *Biochimie*, 2006, 88:1751–1765.
- [49] Zilberman D, Gehring M, Tran R K, et al. Genome wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39:61–69.
- [50] En Li. The mojo of methylation[J]. *Nature Genetics*, 1999, 23(1):5–6.