

菠菜性别差异 NUPTs 序列的克隆及分析

李书粉, 贾克利, 苏婷, 袁金红, 邓传良, 高武军

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:质体 DNA 向核基因组转移能够形成核质体 DNA,核质体 DNA 序列的插入是推动动植物基因组及染色体组演化的重要动力.但是核质体 DNA 的插入和植物性染色体起源及演化之间的关系仍不清楚.以雌雄异株植物菠菜为材料,利用基因组消减杂交技术筛选分离菠菜雌雄基因组差异的 NUPTs 序列,并进行验证和分析.结果表明,从构建的菠菜消减杂交文库中共得到 39 条长度为 75~308 bp 的雌雄差异序列,其平均长度约为 154 bp.对获得的序列进行 Blastn 同源比对发现了 12 条序列为叶绿体基因组来源序列,这些序列与菠菜叶绿体基因组相似度在 98% 以上,说明所获得的差异片段为核质体 DNA 序列.将筛选出的核质体 DNA 序列进行进一步验证后获得了两个稳定的长度分别为 146 bp 和 199 bp 的雄性偏好核质体 DNA 序列,说明所获得的两个 NUPTs 序列在菠菜雄性基因组中有更多的累积.

关键词:菠菜;核质体 DNA;雄性偏向

中图分类号:Q180.5155

文献标志码:A

1982 年, Ellis^[1] 提出“杂乱 DNA”的概念,他发现这些杂乱 DNA 在核基因组、叶绿体基因组和线粒体基因组之间可以进行移动. DNA 序列从质体或线粒体转移到细胞核中^[2-3],然后整合到核基因组中分别形成核质体 DNA (nuclear plastid DNA, NUPTs) 或核线粒体 DNA (nuclear mitochondrion DNA, NUMTs),其中, NUPTs 在核基因组中的插入在植物中普遍存在,不仅能够导致基因组的不稳定,而且和染色体的结构变异也存在一定的联系,是基因和基因组进化的重要推动力.

目前研究表明, NUPTs 在植物中往往以多拷贝形式存在,并且在染色体分布上多出现在着丝粒等异染色质位置.这些现象说明, NUPTs 在染色体组的分布具有重复序列的分布特征,可能和植物某些特殊染色体,如性染色体的起源和演化具有一定的联系.但是,目前为止仅从三种雌雄异株植物的性染色体上发现了 NUPTs 序列.2004 年, Vyskot 等^[4] 利用荧光原位杂交技术,对酸模 (*Rumex acetosa*) 和白麦瓶草 (*Silene latifolia*) 的叶绿体基因组序列进行了染色体定位.发现在酸模的 Y1 和 Y2 染色体上都存在 NUPTs 序列.而白麦瓶草基因组中的 NUPTs 仅定位于 Y 染色体的着丝粒区域^[5].2006 年, Kejnovsky 等人从白麦瓶草 Y 染色体的重组抑制区分离的一个 BAC7H5 克隆中含有叶绿体基因组的一部分,表明这些叶绿体序列已经在 Y 染色体上积累,也可能导致 Y 染色体体积的膨胀^[6].在番木瓜 X 染色体和 Y 染色体的 HSY 区域上的 NUPTs 序列进行分析发现,只有 12% 的叶绿体保守序列的积累,这表明细胞器 DNA 积累发生在 HSY 重组抑制之后^[7].这些有限的证据说明 NUPTs 序列可能和植物性染色体的起源和演化有关.但是对于 NUPTs 在植物染色体上的分布特征研究较少,尤其是在雌雄异株植物的性染色体上 NUPTs 的分布模式及其和性染色体起源和演化之间的关系仍不清楚.因此,本文以雌雄异株植物菠菜为材料,利用雌雄基因组消减杂交技术分离分析菠菜核基因组中性别差异的 NUPTs 序列并对其进行分析,为进一步分析 NUPTs 在菠菜性染色体起源及演化中的作用提供理论资料.

收稿日期:2016-10-06; **修回日期:**2016-12-20.

基金项目:国家自然科学基金项目(31470334);河南省高校科技创新团队支持计划资助(17IRTSTHN017).

作者简介:李书粉(1983-),女,河南镇平人,河南师范大学副教授,博士,主要从事植物分子遗传学研究;E-mail: lishufen83@163.com.

通信作者:高武军(1973-),男,山西芮城人,河南师范大学教授,博士,主要从事植物分子遗传学研究;E-mail: gaowujun1@163.com.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

菠菜 (*Spinacia oleracea*) 品种“日本大叶菠菜”栽培于河南师范大生命科学学院实验基地. 在菠菜开花期鉴别雌雄.

1.2 方法

1.2.1 菠菜基因组 DNA 的提取

分别取雌、雄菠菜各 10 株的叶片等量混合后按照文献[8]方法提取 DNA 组成雌雄基因池.

1.2.2 基因组消减杂交文库构建

将雄性 DNA 在 37 °C 用 *Mbo* I 进行酶切,酶切产物纯化后用做 Tester DNA (依据 Takara MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver. 4.0 纯化试剂盒说明书进行纯化). 取适量雌性基因组 DNA,置于沸水浴中煮沸 70 min,破碎成大小约为 500 bp 的具有平末端的小片段后电泳检测制成 driver DNA.

取 4 μg Tester DNA 和 200 μg 的 Driver DNA 按照 1:50 比例混合,沸水浴中煮沸 10 min. 将反应物混合在 4 mL 的 PERT 溶液(8% 的苯酚,1.25 mol/L 高氯酸钠,0.12 mol/L 磷酸氢二钠,Ph 6.8)的三角瓶中室温退火 72 h,期间振动增加 DNA 复性. 将杂交液用 0.45 μm 的有机滤膜进行抽滤,然后用氯仿:异戊醇(24:1)抽提两次,加 1/10 的醋酸钠和 2.5 倍的冰乙醇沉淀,室温 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,70% 的乙醇洗两遍,乙醇沉淀 PERT DNA. 吹干后溶于适量的无菌水中保存备用.

1.2.3 消减杂交片段的连接转化

将消减产物与载体 PUC119 连接并转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α,连接转化操作按照文献[9]方法进行. 用通用引物 M13 进行阳性克隆的检测,检测 PCR 反应条件如下:94 °C,5 min;94 °C,30 s,55 °C,45 s,72 °C,1.5 min,35 个循环;72 °C,10 min. 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测.

1.2.4 雌雄差异片段的斑点杂交及测序

分别取 1.5 μL 菌落 PCR 扩增产物逐个点在划有格子的尼龙膜上,分别以雌雄菠菜基因组 DNA 为探针进行斑点杂交. 探针的标记按照 Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2.0 和 DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit 试剂盒说明书进行. 斑点杂交程序按照文献[10]方法进行. 根据斑点杂交结果,筛选出雌雄信号差异显著的单克隆进行测序.

1.2.5 NUPTs 的鉴定及雌雄差异性验证

将测序得到的差异序列用 NCBI 中的 Blast 进行同源性搜索,筛选出与叶绿体基因组有关的序列. 采用 Primer 6 对这些序列设计引物(表 1),分别以菠菜的雌雄基因组为模板进行 PCR 扩增,验证其性别差异性. PCR 扩增是在 20 μL 体系内分别加入 200 ng 雌雄基因组模板,0.2 μL Taq 酶,1.5 μL dNTP,2.0 μL 10 × PCR buffer,0.5 μL 上下游引物(表 1)进行 PCR 扩增. 扩增反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1.5 min,20 个循环;72 °C 延伸 10 min. 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

表 1 引物序列汇总表

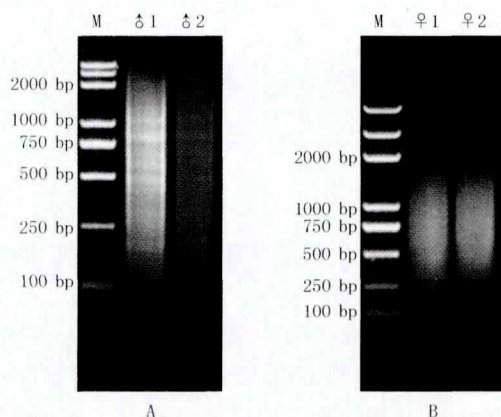
引物名称	序列	T/°C
sp5 - F	5' - CGAAGAGAAGCAAATGAAAGG	53.9
sp5 - R	5' - CTAGAGGATCTGGCATGTACA	55.8
sp8 - F	5' - TTGGTTTGACACTGCCTCAC	53.3
sp8 - R	5' - TCTTACTTCACCGCCGAGAA	55.4

2 结果与分析

2.1 菠菜基因组酶切及高温破碎效率

菠菜雄性基因组 DNA 在 100 μL 体系下经过 *Mbo*I 过夜酶切后的产物电泳结果表明,酶切产物呈现均匀

弥散状(图1A),说明酶切效果良好,可以用做 Tester DNA. 雌性基因组 DNA 经过沸水浴处理 70 min 后电泳结果显示,DNA 破碎片段呈连续弥散,片段大小在 200 ~ 2000 bp 之间,主亮带出现在 500 bp 左右(图1B).



A:M为Trans 2K plus DNA Marker, ♂1和♂2为酶切后的菠菜雄性基因组DNA
B:M为Trans 2K plus DNA Marker, ♀1和♀2为高温破碎后的菠菜雌性基因组DNA

图1 菠菜雄性DNA酶切(A)及雌性DNA破碎(B)电泳图

2.2 DNA 消减文库的克隆及筛选

将消减杂交液与酶切纯化处理后的 pUC119 载体连接,转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,涂在加有氨苄青霉素的 LB 培养基平板上筛选后,挑选出共 4839 个单菌落,用通用引物 M13 进行 PCR 扩增,获得 395 个片段长度在 100 bp 及以上的单一克隆,片段大小在 100 ~ 500 之间(图 2).

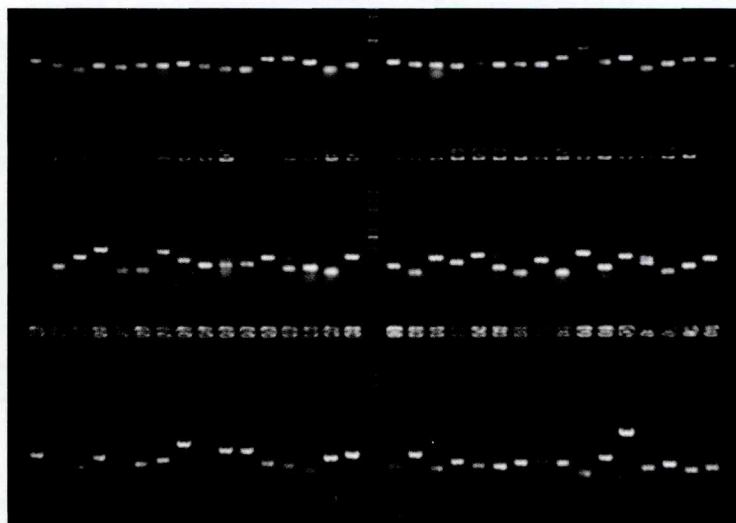


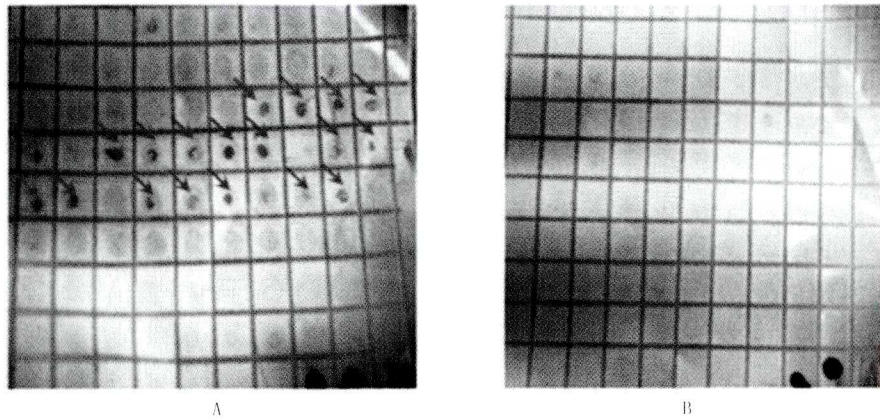
图2 部分重组质粒的PCR扩增结果(M13R和M13F为引物)

2.3 斑点杂交及序列分析

为了进一步验证所获得阳性克隆的性别特异性,将 395 个符合要求的重组单克隆菌液 PCR 扩增产物点在尼龙膜上,分别与地高辛标记的菠菜雌雄基因组 DNA 的探针进行斑点杂交.共获得 46 个菠菜雄性特异阳性克隆(图 3).46 个克隆中成功测序 43 个,经 DNAMAN 软件去除测序结果中载体和引物序列,得到无冗余序列 39 条.其中最长的序列为 308 bp,最短序列为 75 bp,平均长度约为 154 bp.利用 Blastn 软件对已获得的菠菜 39 条单一特异序列结果进行相似性比对发现,其中与菠菜叶绿体基因组相似度达 98% 以上的有 12 条序列,说明这些序列属于菠菜核质体 DNA 序列.

2.4 NUPTs 的筛选与验证

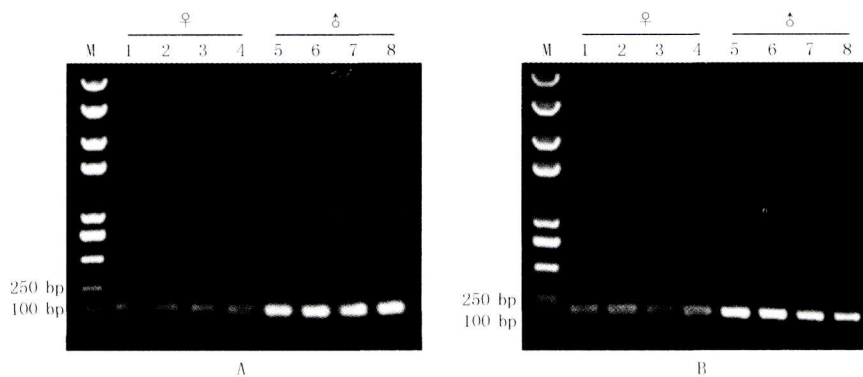
为了进一步验证所获得的 NUPTs 序列是否为性别差异序列,对这些序列分别以菠菜雌雄基因组为模板进行基因组半定量分析后发现,有两条序列在雌雄基因组的含量中有较为明显的差异. 序列长度分别为 146 bp 和 199 bp(图 4),分别命名为 sp5 和 sp8.



A: 克隆与菠菜雄性基因组DNA探针杂交;
B: 克隆与菠菜雌性基因组DNA探针杂交; 箭头所示为雄性基因组中显著富集的克隆

图3 部分消减杂交克隆产物的斑点杂交检测

将筛选出的两条与叶绿体有关的雌雄差异序列经 DNAMAN 与菠菜叶绿体基因组做相似性比对,找出差异序列 sp5 和 sp8 在菠菜叶绿体基因组中所在的位置. 结果表明,sp5 位于菠菜叶绿体基因组序列的 94 360 ~ 94 500 之间,与叶绿体的核糖体蛋白基因 rps12 有关;sp8 位于 99 430 ~ 99 620 之间,与叶绿体保守阅读框 ycf2 和 tRNA - Leu 基因有关. 分析比对结果表明,这两条序列和菠菜叶绿体基因组相似性高达 99.85%,说明这两条序列是叶绿体转移至核基因组的序列,即 NUPTs 序列.



A以sp5为引物扩增, B以sp8为引物扩增. M:Trans 2KPlus DNA Marker,
1-4为菠菜雌性基因组, 5-8为菠菜雄性基因组

图4 基因组半定量PCR扩增结果

3 讨 论

现代进化理论认为,雌雄异株植物是由雌雄同株的祖先独立进化而来^[11-12],早期的 X 和 Y 性染色体由于某种原因,其性别决定区的重组逐步被抑制^[13-14]. 这种重组抑制现象的出现加快了植物性染色体的演化过程,导致了异型性染色体的出现^[15]. 目前,对于激发性染色体的重组抑制的原因和 Y 染色体体积增大的机制还不清楚. 一些研究表明,性染色体的异染色质化可以使 XY 染色体发生重组抑制. Steinemann 等在对果蝇的 Y 染色体进行研究中发现,在果蝇 Y 染色体上大量的反转座子等重复序列的插入可能引起了 Y 染色体

的异染色质化^[16]。现有的证据表明,植物的性染色体上积累有大量的包括 NUPTs 在内的重复序列,因此推测这些 NUPTs 和性别决定区的异染色质化有可能参与了早期性染色体的演化过程。在雌雄异株植物酸模的 Y 染色体上发生大面积的异染色质化并伴随 Y 染色体功能丧失的现象^[17-19],形成了两条组成型异染色质的 Y 染色体^[20]。在酸模整个 Y 染色体有几乎叶绿体基因组序列的分布,而在白麦瓶草 Y 染色体上,NUPTs 的分布主要位于着丝粒区域^[5],而该区域往往是高度异染色质化的。这些有限的证据说明 NUPTs 在植物性染色体的起源及演化中可能扮演了重要的角色,但是仍需更多更深入的研究来揭示 NUPTs 的作用机制。本研究采用消减抑制杂交并通过多种方法的验证最终获得了两条在菠菜雄性基因组中累积较多的 NUPT 序列,由于菠菜属于 XY 染色体性别决定系统,雌雄的主要差异体现在其性染色体 X 和 Y 染色体上,所以这两条序列极有可能在 Y 染色体上累积比 X 染色体上多。尽管这些推测还需要进一步的定位的实验证据,但这些序列的获得为进一步研究 NUPTs 在菠菜性染色体演化过程中的作用提供了基础资料。

参 考 文 献

- [1] Ellis J. Promiscuous DNA-chloroplast genes inside plant mitochondria[J]. Nature,1982,299:678-679.
- [2] Lewin R. No genome barriers to promiscuous DNA[J]. Science,1984,224:970-971.
- [3] Martin W, Herrmann R G. Gene transfers from organelles to the nucleus; how much, what happens, and why? [J]. Plant Physiol,1998,118:9-17.
- [4] Vyskot B, Hobza R. Gender in plants; sex chromosomes are emerging from the fog[J]. Trends Genet,2004,20:432-438.
- [5] Stefova P, Hobza R, Vyskot B, et al. Strong accumulation of chloroplast DNA in the Y chromosomes of *Rumex acetosa* and *Silenetifolia*[J]. Cytogenet Genome Res,2014,142:59-65.
- [6] Kejnovsky E, Kubat Z, Hobza R, et al. Accumulation of chloroplast DNA sequences on the Y chromosome of *Silenetifolia*[J]. Genetica,2006,128:167-175.
- [7] Robert V, Ray M. Organelle DNA accumulation in the recently evolved papaya sex chromosomes[J]. Mol Genet Genomics,2013,288(5/6):111-120.
- [8] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull,1987,19:11-15.
- [9] Li SF, Song L Y, Yin W B, et al. Isolation and functional characterization of the genes encoding $\Delta 8$ -sphingolipid desaturase from *Brassica rapa*[J]. J Genet Genomics,2012,39(1):47-59.
- [10] Deng C L, Wang N N, Li S F, et al. Isolation of differentially expressed sex genes in garden asparagus using suppression subtractive hybridization[J]. J Plant Res,2015,128:829-838.
- [11] Ming R, Bendahmane A, Renner S S, et al. Sex chromosomes in land plants[J]. Annu Rev Plant Biol,2011,62:485-514.
- [12] Bachtrog D, Kirkpatrick M, Mank J E, et al. Are all sex chromosomes created equal? [J]. Trends Genet,2011,27(9):350-357.
- [13] Peichel C L, Ross J A, Matson C K, et al. The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome[J]. Curr Biol,2004,14(16):1416-1424.
- [14] Ming R, Wang J, Moore P H, et al. Sex chromosomes in flowering plants[J]. Am J Bot,2007,94(2):141-150.
- [15] 李书粉,李莎,邓传良,等. 转座子在植物 XY 性染色体起源与演化过程中的作用[J]. 遗传,2015(2):157-164.
- [16] Steinemann M, Steinemann S. Enigma of Y chromosome degeneration; neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution[J]. Genetica,1998,102/103(1/2/3/4/5/6):409-420.
- [17] Navajas P R, Herran R, Lopez G G, et al. The evolution of reproductive systems and sex-determining mechanisms within Rumex (polygonaceae) inferred from nuclear and chloroplastidial sequence data[J]. Mol Biol Evol,2005,22(9):1929-1939.
- [18] Navajas P R, Schwarzacher T, Herran R, et al. The origin and evolution of the variability in a Y-specific satellite-DNA of *Rumex acetosa* and its relatives[J]. Gene,2006,368:61-71.
- [19] Cunado N, Navajas P R, Herran R, et al. The evolution of sex chromosomes in the genus Rumex (Polygonaceae): Identification of a new species with heteromorphic sex chromosomes[J]. Chromosome Res,2007,15(7):825-833.
- [20] Divashuk M G, Alexandrov O S, Razumova O V, et al. Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XY chromosome sex determination system[J]. PLoS One,2014,9(1):e85118.

- [17] WU Chaohui, LI Minjie, HU Chao, et al. Clinical significance of serum miR-223, miR-25 and miR-375 in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(3): 1257-1266.
- [18] 李迎迎, 刘志广, 王丽, 等. 血清 miRNAs 作为食管鳞癌新的生物标志物[J]. *遗传*, 2015, 37(4): 315-320.
- [19] ABRUZZO P M, GHEZZO A, BOLOTTA A, et al. Perspective Biological Markers for Autism Spectrum Disorders: Advantages of the Use of Receiver Operating Characteristic Curves in Evaluating Marker Sensitivity and Specificity[J]. *Disease Markers*, 2015, 2015: 329607.

Predictive Value of Serum miR - 25 , miR - 223 , and miR - 373 as Promising Biomarkers in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Qin Jianping^{1,2}, Tao Juan³, Li Yingying¹, Chang Weidong¹, Wang Li¹, Zhao Xiru¹, Wang Linsong¹

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. King Clinical Laboratorial Centre, Zhengzhou 450000, China;

3. School of Life Science and Technology, Sanquan Medical College, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China)

Abstract: It is to investigate the feasibility of serum miRNA as a diagnostic marker. The relative expression of miR - 25, miR - 223 and miR - 373 were detected in serum among health control, esophageal squamous cell carcinoma patients before and after 7 days of surgery and in esophageal squamous cell carcinoma and adjacent tissues by qRT - PCR with stem - loop primer. The experiment results showed that the relative expression of three kinds of serum miRNAs were higher at preoperative esophageal squamous cell cancer patients than health control and the patients at 7 days after surgery. AUC were 0.794, 0.839 and 0.873 among three miRNA, respectively. At the same time the levels of three miRNAs were higher in cancerous tissue than in adjacent tissues. Therefore the three miRNAs in serum mainly come from tissues and higher expression of three serum miRNAs resulted from esophageal cancer tissues. These results suggested that miR - 25, miR - 223, and miR373 have great potential to be as candidate of diagnostic markers.

Keywords: esophageal squamous cell carcinomas; serum; miRNA; diagnostic markers

(上接第 60 页)

Cloning and Analysis of Sex-biased NUPTs in Spinach

Li Shufen, Jia Keli, Su Ting, Yuan Jinhong, Deng Chuanliang, Gao Wujun

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The transfer of plastid DNA into nuclear genome leads to the formation of nuclear plastid DNA (NUPT). The insertion of NUPTs is an important force to drive the evolution of genome and chromosomes both in animals and in plants. However, it is still unclear about the relationship between the insertion of NUPTs and plant sex chromosome origin and evolution. In this study, sex different NUPT sequences were screened and isolated using genome subtractive hybridization technique, and further validation and analysis were also conducted. A total of 39 valid sequences with the length between 75 bp and 308 bp (average of 154 bp) were obtained from the spinach subtractive hybridization library. Blastn searching revealed that 12 sequences were related to chloroplast DNA, showing over 98% similarity with spinach chloroplast DNA. The results indicated that these 12 sequences were NUPTs in spinach genome. Finally, two stable male-biased NUPTs with size of 146 bp and 199 bp were obtained by further genomic semi-quantitative PCR validation, demonstrating that these two NUPTs accumulated more in spinach male genome than in female genome.

Keywords: Spinaciaoleracea; nuclear plastid DNA; male-biased