

油菜种子萌发过程中DNA甲基化的MSAP分析

陆光远 伍晓明* 陈碧云 高桂珍 许鲲 李响枝

(农业部油料作物遗传改良重点开放实验室, 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062. * 联系人, E-mail: wuxm@oilcrops.cn)

摘要 DNA甲基化对于植物的生长发育和组织分化具有十分重要的调控作用. 用MSAP (methylation-sensitive amplified polymorphism)和HPLC两种方法分析了油菜种子萌发过程中DNA甲基化的动态变化过程, 并且比较了不同器官组织的甲基化水平差异. MSAP的分析结果表明, 油菜种子基因组中大约有15.7%的CCGG位点发生了胞嘧啶甲基化, 发生甲基化的方式以C^{5m}CGG双链甲基化为主; 种子萌发过程中同时发生甲基化和去甲基化事件, 其中去甲基化占据主导地位; 不同器官组织的甲基化水平存在一定差异, 胚根的甲基化水平最低, 下胚轴次之, 子叶最高, HPLC分析结果与此一致. 最后, 对11个甲基化多态性片段进行了序列分析, 发现基因编码区和非编码区发生DNA甲基化的频率基本相等. 由此可见, 种子萌发过程中DNA的甲基化变化是一个十分复杂的过程, 油菜可能通过甲基化和去甲基化的方式调控基因的表达, 并最终决定植株的生长发育和器官分化.

关键词 DNA 甲基化 MSAP 种子萌发 甘蓝型油菜

在真核生物中, DNA甲基化是一种常见而又十分重要的DNA修饰方式. DNA甲基化特别是胞嘧啶的甲基化(^{5m}C)具有表观遗传效应(epigenetic effect)和突变效应(mutagenic effect), 导致基因特异表达、细胞分化和染色质失活(chromatin inactivation)^[1]等. 甲基化并不改变DNA的碱基排列顺序, 但是阻断了遗传信息的传递, 从而引起形态性状的变化^[2]. DNA甲基化对于植物的发育具有十分重要的调控作用. 在植物基因的启动子区和特定的编码区, 具有表达活性基因的甲基化程度通常要低于沉默的基因^[3]. 在拟南芥的转基因植株中, DNA的去甲基化引起了表型性状的巨大变异^[4], 而且同源异型基因SUPERMAN和AGAMOUS的甲基化将使其不能正常转录, 从而引起花器官的同源异型转换^[5]. DNA甲基化与植物的春化作用也有关系. 在小麦中, 冬性近等基因系的甲基化程度大大高于春性近等基因系, 而且春化处理可以降低DNA的甲基化程度, 从而诱导或促进开花^[6]. 在拟南芥中, 春化作用与FLC基因的表达密切相关, 组蛋白的甲基化可抑制FLC基因的表达^[7]. 另外, 在番茄^[8]、玉米^[9]、水稻^[10]等植物中, 不同组织间的甲基化水平存在显著差异, 暗示甲基化在细胞分化和器官发育过程中可能起到重要作用.

油菜是世界上最主要的油料作物之一, 已经在遗传多样性、分子标记、物理图谱构建和基因分离等方面做了大量的研究工作. 另外, 在DNA的甲基化方面也有少量报道, 如检测油菜在重铬酸钾毒害下

DNA的甲基化变化情况^[11], 研究植物逆转录转座子S1Bn SINE的甲基化特点及其与转座活性的关系^[12]等. 但有关油菜生长发育与DNA甲基化相互关系方面的研究至今未见报道. 本研究利用MSAP和HPLC方法分析油菜种子萌发过程中DNA甲基化状态的动态变化过程, 以期了解DNA甲基化在油菜生长发育和器官分化中的作用提供理论依据.

1 材料与方法

() 油菜材料. 甘蓝型油菜品种为 Westar, 由国家油料作物种质中期库(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉)提供. 供试材料为当年收获的新种子.

() 发芽实验. 在直径为15 cm的培养皿中, 加2层滤纸, 用蒸馏水充分湿透, 每皿均匀播种100粒油菜种子, 设4个重复, 在20 °C的恒温箱中进行发芽. 每天检查发芽情况, 种子幼根的长度大于种子直径时为正常发芽种子. 发芽后7 d统计发芽率. 供试油菜种子的平均发芽率为98.6%, 在萌发过程中幼苗整齐一致, 长势良好, 说明新种子具有很强的生活力.

() DNA提取. DNA提取按改进的SDS法^[13]进行. 在油菜种子萌发过程的0, 1, 2, 4和8 d, 分别选取整齐一致的幼苗(或种子)提取其总DNA. 另外, 提取发芽8 d幼苗的子叶、下胚轴和胚根3个不同组织的总DNA.

() DNA甲基化的HPLC分析. HPLC分析按照

Chakrabarty 等人^[14]报道的方法进行。在 200 μL 的酶切反应体系中, 包含 20 μg 总 DNA, 5 U 核酸酶 P1 (Sigma), 10 U 碱性磷酸酶 (TaKaRa), 10 μL 10 \times 碱性磷酸酶缓冲液, 最后用酶切缓冲液 (30 mmol/L NaCH_3 , 0.1 mmol/L ZnCl_2 , pH 5.3) 补足 200 μL 。水解反应在 37 $^\circ\text{C}$ 进行 3 h, 完毕后加入 500 μL 无水乙醇终止反应, 在 10000 $\times g$ 条件下离心 15 min。上清液转移到新的离心管, 真空干燥, 所得的核苷 (nucleosides) 样品用 1 mL ddH_2O 溶解, 并用 0.2 μm 微孔滤膜过滤。HPLC 分析在 C18 色谱柱 (Waters, MA, USA) 上进行; 缓冲液为 50 mmol/L KH_2PO_4 , 8% 甲醇, pH 3.5; 流速为 0.8 mL/min; 时间为 20 min; 检测波长为 285 nm。5 mdC 的含量用以下公式计算:

$$5 \text{ mdC}(\%) = 100 \times [5\text{mdC}] / ([5\text{mdC}] + [\text{dC}])$$

式中的 [dC] 和 [5mdC] 分别是两种形式 dC 的浓度, 其数值由标准曲线计算得出。

() DNA 甲基化的 MSAP 分析。MSAP 的程序主要参照 Portis 等人^[15]报道的方法进行并稍作修改。DNA 样品分别使用 *EcoR* / *Hpa* 和 *EcoR* / *Msp* 两组限制性内切酶消化。为了减少实验误差, 酶切和连接同时进行。酶切-连接反应体系 (50 μL) 为: 500 ng 模板 DNA, 5 U *EcoR*, 10 U *Hpa* (或 *Msp* I), 2 U T4 DNA 连接酶, 5 pmol *EcoR* 接头, 50 pmol *Hpa* / *Msp* 接头, 1 \times 反应缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L MgAc, 50 mmol/L KAc, 10 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L ATP)。反应混合液在 37 $^\circ\text{C}$ 保温过夜, 然后 65 $^\circ\text{C}$ 灭活 10 min, 并用 ddH_2O 稀释 10 倍作为 PCR 扩增的底物。

取 5 μL 酶切-连接产物进行预扩增反应。所得的 PCR 产物稀释 50~100 倍后再次用于选择性扩增反应, 并进行变性凝胶电泳分离和硝酸银染色检测, 具体方法见文献^[13]。

() 差异片段的回收、克隆和测序。在 PAGE 胶板尚未干燥之前用刀片将差异片段挖下, 捣碎, 加入 20 μL ddH_2O , 然后 95 $^\circ\text{C}$ 保温 5 min, 自然冷却。从中取 2 μL 上清液为模板, 用原来的引物组合和反应条件重新做 PCR。取 10 μL 扩增产物在琼脂糖凝胶上检测, 确信扩增成功后将剩余产物与 pGEM-T 载体 (Promega) 连接, 转化大肠杆菌感受态细胞, 挑选阳性单克隆。序列测定委托北京华大中生科技发展有限公司进行。序列比对和分析在网上公共数据库 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行。

为了进一步验证甲基化所产生多态性的真实性, 我们用已经克隆的片段为探针进行 Southern 杂交分析。取不同来源的总 DNA 各 20 μg , 分别用 *EcoR* / *Hpa* 和 *EcoR* / *Msp* 两组内切酶将其完全消化, 然后在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离。预杂交、杂交和洗膜的程序按 Sharpe 等人^[16]报道的方法进行。探针制备和检测使用地高辛标记试剂盒进行 (Roche Diagnostics, Swiss)。

2 结果与分析

2.1 MSAP 分析

MSAP 技术对模板 DNA 的质量有严格的要求。油菜种子的含油量很高, 对 DNA 的提取有较大影响。为此, 首先采用改进的 SDS 法提取干种子的 DNA 做预备实验, 以便获得信号强、稳定性好的 MSAP 谱带。采用标准的 MSAP 程序, 经过必要的调整和优化, 在种子 DNA 为模板的扩增反应中获得了清晰可读、条带丰富的 MSAP 谱带, 其质量与幼苗 DNA 的扩增结果相当。我们对扩增反应进行了多次重复, 发现 MSAP 带型具有很好的稳定性, 说明 MSAP 技术可以有效地应用于油菜基因组的甲基化检测。经过引物筛选, 确定了 12 对扩增效果较好的 *EcoR* / *Hpa* - *Msp* 引物组合用于下一步分析 (表 1)。12 对引物在种子 DNA 中总共扩增出 484 条清晰的带纹, 其中 76 条片段在 *EcoR* / *Hpa* 和 *EcoR* / *Msp* 两个组合的酶切、扩增产物之间表现出多态性。由此推算, 在油菜基因组中 CCGG 位点发生胞嘧啶甲基化的比例大约是 15.7% (76/484)。

由于 *Hpa* 对外部胞嘧啶的甲基化 ($\text{C}^{\text{m5}}\text{CCGG}$) 和内部胞嘧啶的甲基化 ($\text{C}^{\text{m5}}\text{CGG}$) 都敏感, 而 *Msp* 仅对外部胞嘧啶的甲基化敏感, 因此内部胞嘧啶的甲基化将导致测序胶中 *EcoR* / *Hpa* 的酶切、扩增产物无带而 *EcoR* / *Msp* 的酶切、扩增产物有带。实际上, 在以干种子 DNA 为模板检测到的 76 个多态性片段中, 确实有大量的片段 (54 个) 仅出现在 *EcoR* / *Msp* 而不出现在 *EcoR* / *Hpa* 的酶切、扩增产物中。不过, 也检测到少量片段 (22 个) 仅出现在 *EcoR* / *Hpa* 而不出现在 *EcoR* / *Msp* 的酶切、扩增产物中 (表 1)。McClelland 等人^[17]认为这是由于外部胞嘧啶发生单链甲基化的结果。由此可见, 油菜基因组 CCGG 位点发生甲基化的方式主要是以内部胞嘧啶 ($\text{C}^{\text{m5}}\text{CGG}$) 双链甲基化为主。

表1 油菜种子及幼苗的MSAP扩增结果

引物组合 ^{a)}	条带数	单态性	多态性	双链甲基	单链甲基
		位点数	位点数	化位点数 ^{b)}	化位点数 ^{b)}
HM+TAA/E+AAC	71	5	3	5	0
HM+TAA/E+ACG	49	3	5	5	3
HM+TAA/E+ACT	62	5	7	5	1
HM+TAA/E+AGT	87	7	8	5	3
HM+TCC/E+AAC	52	7	12	5	2
HM+TCC/E+ACG	28	1	2	1	0
HM+TCC/E+ACT	16	9	3	2	7
HM+TCC/E+AGT	19	5	1	5	0
HM+TTC/E+AAC	40	7	6	5	3
HM+TTC/E+ACG	37	5	1	4	1
HM+TTC/E+ACT	26	7	3	6	1
HM+TCT/E+ACT	45	6	10	6	1
总计	532	67	61	54 ^{c)}	22 ^{c)}

a) 引物的核心序列HM为5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG-3', E为5'-GACTGCGTACCAATTC-3', 后面附加的3个碱基为选择性碱基; b) 双链甲基化指C^{5m}CGG发生双链甲基化, 单链甲基化指^{5m}CCGG发生单链甲基化, 这是根据在EcoR I /Hpa II和EcoR I /Msp I两组酶切、扩增产物之间的多态性推测而来的; c) 仅在干种子DNA中的分析结果

油菜种子发芽5个不同时期(0, 1, 2, 4和8 d)的DNA样品分别用限制性内切酶组合EcoR I/Hpa II(H)和EcoR I/Msp I(M)消化, 共产生10个泳道。12对引物组合在10个泳道中总共检测到532条清晰的片段, 每条片段代表了一个或两个同裂酶切割的位点。各引物组合检测到的片段数目从16条到87条不等, 平均每对引物为44.3条(表1)。通过比较10个泳道MSAP带纹的差异, 发现带型变化主要有两种类型: () 单态性, 即带纹仅出现在H泳道而不出现在M泳道中, 或反之亦然(图1(a)和(b)); 这种类型的带纹有67条(表1), 表明种子萌发过程中CCGG位点的甲基化状态保持不变; () 多态性, 即种子萌发过程中MSAP带型发生了改变; 某些片段出现在干种子中, 但萌发后却消失了(图1(c)), 而另一些片段仅在萌发后的特定时期才能检测到(图1(d)~(f)), 这样的片段有61条(表1), 表明CCGG位点的甲基化状态在种子萌发过程中发生了改变。

61条多态性片段可以分为4组(表2, A, B, C和D), 其中出现频率最高的是A和B组。A组有25条片段, 其特点是在种子萌发前的H和M泳道都无带, 或者仅在其中一个泳道有带, 但在种子萌发后的H和M泳道中同时有带, 暗示在CCGG位点发生了完全的去甲基化。B组有28个片段, 这些片段在干种子

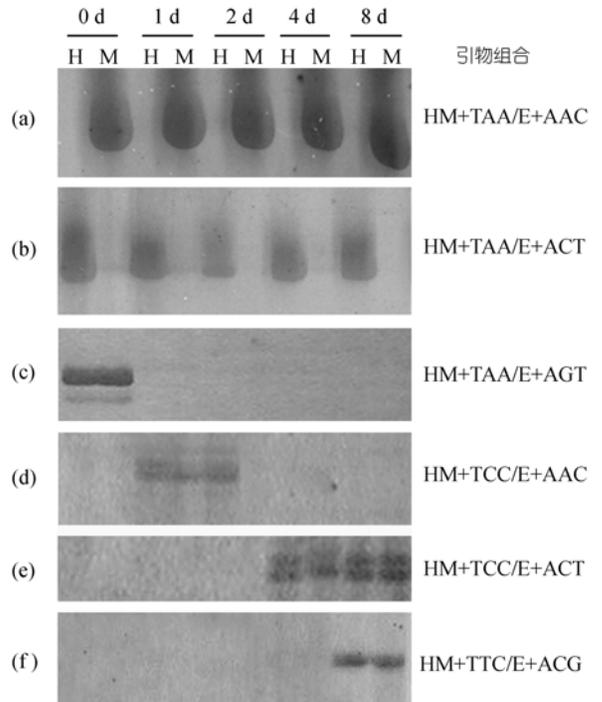


图1 油菜种子和幼苗的MSAP扩增例子
H, EcoR I/Hpa II的酶切、扩增产物; M, EcoR I/Msp I的酶切、扩增产物。(a)和(b), 萌发过程中甲基化状态保持不变; (c), 在干种子的H和M泳道有带但在萌发后消失了(表2, 带型C1); (d), 萌发后甲基化状态发生了2次变化, 即带型出现了但随后又消失了; (e)和(f), 萌生前无带但萌发后在H和M泳道都有带(表2, 带型A1)

表2 油菜种子萌发过程中甲基化状态的变化

干种子 ^{a)}		萌发种子		带型	甲基化变化情况 ^{b)}		数目
H	M	H	M		萌发前	萌发后	
-	-	+	+	A1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	22
-	+	+	+	A2	CCGG GGCC	CCGG GGCC	1
+	-	+	+	A3	CCGG GGCC	CCGG GGCC	2
-	-	-	+	B1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	10
-	-	+	-	B2	CCGG GGCC	CCGG GGCC	18
+	+	-	-	C1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	1
+	+	+	-	C2	CCGG GGCC	CCGG GGCC	1
+	+	-	+	C3	CCGG GGCC	CCGG GGCC	1
-	+	-	-	D1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	2
+	-	-	-	D2	CCGG GGCC	CCGG GGCC	3

a) H, EcoR I/Hpa II的酶切、扩增产物; M, EcoR I/Msp I的酶切、扩增产物; +, 有扩增产物; -, 无扩增产物; b) 胞嘧啶带下划线表示发生了甲基化, 下同

中由于 CCGG 位点胞嘧啶的完全甲基化而检测不到,但在萌发种子中由于甲基化程度的降低而出现在 H 或 M 泳道中. 与此相反, C 组的 3 个片段和 D 组的 5 个片段反映的是种子萌发后甲基化程度升高的情形(表 2).

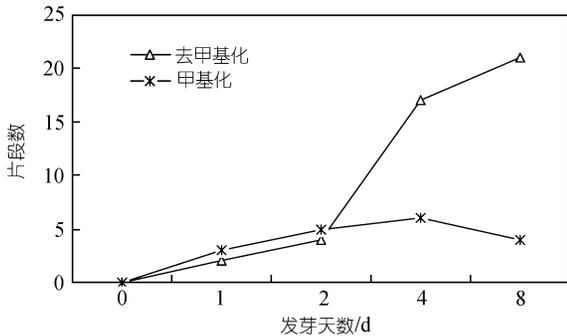


图 2 种子萌发过程中甲基化和去甲基化的变化趋势

2.2 油菜种子萌发过程中 DNA 甲基化状态的变化

在种子萌发过程中检测到多态性的 61 个 CCGG 位点中, 在种子萌发前未甲基化而萌发后却发生了甲基化的位点有 3 个(表 2, C1~C3), 在萌发前处于甲基化状态而萌发后却发生了完全去甲基化的位点有 25 个(表 2, A1~A3), 是甲基化位点总数的 8 倍. 由此可见, 油菜种子在萌发过程中同时存在 DNA 的甲基化和去甲基化现象, 但以去甲基化为主. 种子萌发过程中 DNA 的甲基化和去甲基化变化趋势见图 2. 可以看出, 在萌发过程中发生 DNA 甲基化的数目变化不大, 而发生去甲基化的数目却持续上升, 最终导致基因组净的去甲基化位点数目不断增加.

2.3 组织特异性的 DNA 甲基化

同时使用 MSAP 和 HPLC 两种方法分析了油菜不同器官组织的 DNA 甲基化水平. 12 对 MSAP 引物组合在胚根、下胚轴和子叶中检测到的片段数目分别是 513, 503 和 494 条. 通过比较 *EcoR* /*Hpa* 和 *EcoR* /*Msp* 酶切、扩增产物的多态性, 发现不同组织间的甲基化水平存在一定差异, 其中胚根组织的甲基化水平最低(16.8%), 下胚轴次之, 而子叶的甲基化程度最高(20.2%, 表 3). 在 HPLC 的分析结果中,

表 3 MSAP 法和 HPLC 法检测不同器官组织的甲基化水平

组织	MSAP	HPLC
胚根	16.8%	20.6%
下胚轴	19.7%	28.3%
子叶	20.2%	31.7%

甲基化程度最高的也是子叶(31.7%), 其次是下胚轴, 胚根最低(20.6%), 与 MSAP 分析结果相同(表 3).

在胚根、下胚轴和子叶 3 个不同组织间检测到多态性的片段有 39 条, 这些组织特异性甲基化的片段可以分为 15 种类型(T01~T15, 表 4), 其中 T07 类的片段数目最多, 共 12 条. 这些片段仅出现在胚根的 H 和 M 泳道中, 而在下胚轴和子叶中都没有带, 表明下胚轴和子叶组织中的 CCGG 位点发生了完全甲基化(^{5m}C^{5m}CCGG 或 ^{5m}CCGG), 而胚根则未发生甲基化.

表 4 油菜幼苗组织特异性的甲基化类型

带型	胚根		下胚轴		子叶		数目
	H	M	H	M	H	M	
T01	+	+	+	+	+	-	2
T02	+	+	+	+	-	-	4
T03	+	+	+	-	-	-	2
T04	+	+	+	-	+	-	2
T05	+	+	-	+	-	+	2
T06	+	+	-	+	-	-	3
T07	+	+	-	-	-	-	12
T08	+	-	+	-	-	-	1
T09	+	-	-	-	+	-	1
T10	-	+	-	-	+	-	1
T11	-	+	-	-	-	+	1
T12	-	-	-	-	+	+	2
T13	-	-	+	-	+	-	3
T14	-	-	-	+	-	+	2
T15	-	-	-	-	-	+	1

2.4 甲基化多态性片段的验证和序列分析

对部分甲基化多态性片段进行回收、克隆、Southern 杂交验证和测序, 以便了解甲基化片段在基因组上的分布规律. 这些片段包括干种子特异性甲基化片段(M1, M2, M3 和 M4)、萌发种子特异性甲基化片段(M5, M6, M7 和 M8)、胚根特异性甲基化片段(M9)、下胚轴特异性甲基化片段(M10)及子叶特异性甲基化片段(M11). 选取有代表性的发育时期特异性甲基化片段 M5 和组织特异性甲基化片段 M10 为探针, 与不同发育时期或不同组织的总 DNA 进行 Southern 杂交, 以验证甲基化多态性的真实性. 结果表明, M5 探针在干种子的 H 泳道中检测到的带纹较小, 而在其他 3 个泳道中检测到的片段较大(图 3(a)), 与 MSAP 的带型变化(表 2, D2 类)相吻合. 在探针 M10 的杂交结果中, 子叶、下胚轴和胚根 3 个组织的 H 泳道中都检测到分子量较大的差异片段, 而 M 泳

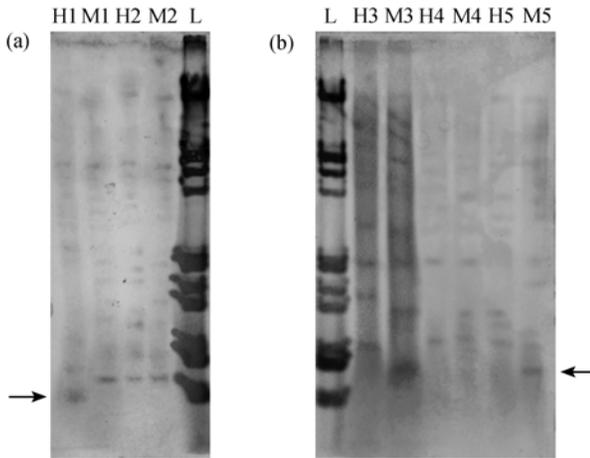


图3 Southern blot 验证 DNA 甲基化的带型

(a) 探针 M5 的杂交结果, 箭头所指为差异片段; (b) 探针 M10 的杂交结果, 箭头所指为特征片段. H, *EcoR* /*Hpa* 酶切产物; M, *EcoR* /*Msp* 酶切产物; L, 标准分子量λ/*EcoR* +*Hind* ; 1, 干种子; 2, 幼苗; 3, 子叶; 4, 下胚轴; 5, 胚根

道中仅在子叶和胚根中检测到小分子量的差异片段, 同样印证了 MSAP 的检测结果(表 4, T11 类), 即下胚轴的 CCGG 位点中两个胞嘧啶发生了完全甲基化, *Msp* I 没有活性, 不能产生小分子量的特征片段(图 3(b)).

对克隆的 11 个片段进行了序列测定和同源性搜

索, 结果发现这些片段的分子量都较小(26~174 bp), 而且其中仅有一个片段(M8)的内部包含有同裂酶 *Hpa* /*Msp* 的识别位点(CCGG), 说明所检测到的差异片段主要是由于胞嘧啶缺乏甲基化, 同裂酶依然能够切割所产生的. 在 11 个测序片段中, 与基因编码区高度同源的有 6 个, 与假基因同源的有 1 个, 与非编码区同源的有 4 个, 表明基因编码区和非编码区中 CCGG 位点发生甲基化的概率基本相等(表 5).

3 讨论

检测植物基因组中胞嘧啶甲基化主要有两类方法. 第一类是检测基因组中全部胞嘧啶的甲基化程度, 比如HPLC法, 其原理是用核酸酶将总DNA降解为单个核苷酸后再用HPLC方法定量分析, 从而能够从总体上测定出基因组中胞嘧啶的甲基化程度 [18]. 第二类是检测特定DNA序列的甲基化程度, 比如MSAP法. MSAP是由AFLP改进而来的, 其原理是用甲基化敏感的同裂酶*Hpa* 和*Msp* 代替高频内切酶*Mse* , 每个DNA样品分别用*EcoR* /*Hpa* 和*EcoR* /*Msp* 两组内切酶同时消化, 加上特定的接头, 经选择性PCR扩增, 然后在PAGE凝胶上加电泳检测 [19]. 由于*Hpa* 和*Msp* 的识别序列相同(5'-

表 5 组织和发育时期特异性甲基化片段的序列分析

片段名称	片段大小/bp	谱带类型 ^{b)}	序列同源性
M1	152	B1	CP000116 ^{c)} (196587-196614) ^{d)} <i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259. 硫氧还蛋白家族
M2	44	B1	XM_505961 (3072-3095) <i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB99, YALI0F27753g mRNA
M3	80	B1	AF219992 (6124-6143) <i>Mus musculus</i> aquaporin-4 (<i>Aqp4</i>) gene, 外含子 A, B, 0, X, 1 和 2 及部分 cds
M4	106	A1	BX883044 (34213-34232) <i>Rattus norvegicus</i> 第 20 号染色体, 主要组织相容性复合物
M5	115	D2	AP006444 (78681-78745) <i>Brassica napus</i> 线粒体 DNA. NADH 亚基 1
M6	109	D2	CR734755 (381-403) <i>Tetraodon nigroviridis</i> 全长 cDNA
M7	26	D2	AF428287 (395-415) <i>Arabidopsis</i> AT3g30390/T6J22_16 mRNA, 全部 cds.
M8 ^{a)}	45	D1	AL162651 (58918-58948) <i>Arabidopsis</i> DNA, 第 3 号染色体, BAC F26K9 克隆.
M9	174	T13	AJ430548 (197-310) <i>Brassica napus</i> 转座子 14G32-20, RT 反转录酶假基因
M10	144	T11	AY606857 (104-126) <i>Mus musculus</i> M46, 动脉粥样硬化相关 DNA 甲基化多态片段, 染色体组序列.
M11	115	T08	AL049711 (59220-59275) <i>Arabidopsis</i> DNA, 第 3 号染色体, BAC F4F15 克隆

a) 该片段内部存在一个 CCGG 识别位点; b) 谱带类型说明见表 2 和表 4; c) 序列登陆号; d) 括号内数据为序列同源区

CCGG-3'), 但对甲基化的敏感程度不同, 即 *Hpa* 不能切割双链甲基化的^{5m}CCGG, C^{5m}CGG和^{5m}C^{5m}CGG, 但能切割单链甲基化的序列, 而 *Msp* 能切割 C^{5m}CGG但不能切割^{5m}CCGG序列^[17], 因此CCGG发生甲基化后将导致 *EcoR* /*Hpa* 和 *EcoR* /*Msp* 的酶切、扩增产物产生多态性(表 6)。反之, 通过比较电泳谱带的差异, 可以推测出CCGG的甲基化情况。

表 6 同裂酶 *Hpa* 和 *Msp* 的甲基化敏感性及限制性谱带

甲基化状态	内切酶的消化性		限制性带型	
	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>	H	M
CCGG GGCC	有活性	有活性	+	+
C ^{5m} CGG GG ^{5m} CC	无活性	有活性	-	+
^{5m} CCGG GGCC	有活性	无活性	+	-
^{5m} C ^{5m} CGG GG ^{5m} C ^{5m} C	无活性	无活性	-	-

我们同时使用MSAP和HPLC两种方法分析了油菜基因组中胞嘧啶的甲基化情况。在MSAP的检测结果中, 油菜幼苗 3 个器官组织的甲基化水平存在较大差异, 其中子叶的甲基化水平最高, 下胚轴次之, 胚根最低, 变化范围在 16.8%~20.2%之间。HPLC的检测结果与MSAP一致, 3 个组织器官的甲基化水平在 20.6%~31.7%之间。因此, MSAP的分析结果是可靠的, 但其检测结果比HPLC偏低。MSAP技术已经应用于真菌^[19]、水稻^[20]、拟南芥^[21]和辣椒^[15]等物种的基因组DNA甲基化研究中, 而且在水稻中DNA甲基化产生的多态性得到了Southern杂交的验证^[20], 在拟南芥中通过序列测定和比较分析证明了MSAP检测结果的有效性和可靠性^[21]。MSAP的优点是技术简单, 无需大型仪器, 成本低, 效率高, 而且分析结果直接与基因序列联系起来, 为研究基因表达与DNA甲基化的相互关系提供了一个十分有效的方法。不过, MSAP在应用中也有明显的局限性: () 由于使用了 4%~6%的测序胶, 该方法只能有效检测分子量在 50~1500 bp范围内的片段^[22], 分子量过大或过小都无法显示; () 由于使用了同裂酶*Hpa* 和*Msp*, 该方法只能检测基因组中CCGG序列的甲基化情况, 而CCGG序列仅仅是基因组中的很小一部分(1/256)^[20]; () 由于所使用同裂酶的分辨能力有限, 只能检测CCGG位点中的部分甲基化情况, 对于某些甲基化情况是无法识别和检测的, 造成检测结果偏低^[20]。

本研究的目的是之一了解油菜种子在萌发过程中DNA甲基化的变化规律。MSAP研究发现, 在油菜种子的基因组中大约有 15.7%的CCGG位点发生了胞嘧啶甲基化, 这一结果与水稻剑叶组织 16.3%的甲基化水平十分接近^[20], 但与拟南芥幼苗组织 35%~43%的甲基化水平差异较大^[21]。这种不同物种间DNA甲基化水平的差异, 一方面可能与检测方法(如引物数目、扩增条件、电泳时间和显带方法等)和实验材料(如种子、幼苗和成熟叶片等)有关, 另一方面可能是遗传控制的结果。在拟南芥中已有研究报道证实, 染色体NOR区的甲基化水平变异是受到普通遗传因子和表观遗传因子共同控制的^[23]。

一个十分有趣的现象是在油菜种子萌发过程中同时检测到甲基化和去甲基化事件, 而且去甲基化事件占据绝对主导地位。前人的研究资料表明, 植物在发育过程中, 胞嘧啶的甲基化对基因具有重要的表达调控作用^[24], 在基因的内部或邻近区域发生甲基化可以抑制这些基因的表达, 而去甲基化后又可以激活基因的表达^[25]。因此, 对于这些基因而言, 去甲基化似乎是基因表达的必须步骤。油菜种子萌发过程中检测到大量的去甲基化事件, 是与种子萌发后启动了大量基因的表达相一致的。在种子萌发过程中同时还观察到少量的甲基化事件, 暗示部分基因正在关闭。这似乎表明, 植物通过DNA甲基化和去甲基化的方式实现基因的有序表达。

我们的另外一个目的是比较油菜不同器官组织DNA甲基化水平的差异。研究发现在油菜萌发 8 d的幼苗中, 胚根的甲基化水平最低, 下胚轴次之, 而子叶的甲基化水平最高。在其他的物种中也报道过不同器官组织中甲基化水平存在巨大差异的现象。在西红柿中, 种子的甲基化水平比成熟叶片高, 而成熟叶片比幼苗高^[8]。与此相似, 水稻中幼苗的甲基化程度比剑叶高^[20]。根据目前已知的知识, 这种不同组织间的甲基化水平差异是理所当然的, 因为甲基化是植物在发育和分化过程中控制基因表达的一种调控机制^[3], 尽管还不清楚甲基化调控基因表达的具体过程。

我们还对不同组织和不同发育时期发生特异性甲基化的部分片段进行了序列分析。同源性搜索结果表明, 11 个甲基化多态性片段中大约一半的片段与基因编码区同源, 另一半与非编码区同源, 即基因编码区和非编码区的CCGG序列发生甲基化的频率

相等,这一结果与Cervera等人在拟南芥中的研究结果相似^[21]。通过序列比对和数据检索,我们初步获得了一些可能与油菜种子发育和器官分化有关的基因片段,这些结果为进一步研究油菜生长发育与特异基因表达调控的关系奠定了基础。

致谢 感谢张银波、李俊在片段克隆和 Southern 杂交方面所提供的帮助。本工作为国家自然科学基金(批准号:30170585)、湖北省自然科学基金(批准号:2004ABA123)和农业部油料作物遗传改良重点实验室开放基金(批准号:200402)的资助项目。

参 考 文 献

- 1 Gonzalgo M L, Jones P A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res*, 1997, 386(2): 107~118[DOI]
- 2 Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 1987, 238(4824): 163~170
- 3 Finnegan E J, Brettell R I S, Dennis E S. The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. In: Jost J P, Saluz H P, eds. *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Basel: Birkhauser, 1993. 218~261
- 4 Ronemus M J, Galbiati M, Tchnor C, et al. Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science*, 1996, 273(5275): 654~657
- 5 Jacobsen S E, Sakai H, Finnegan E J, et al. Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2000, 10(4): 179~186[DOI]
- 6 Sherman J D, Talbert L E. Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat. *Genome*, 2002, 45(2): 253~60[DOI]
- 7 Bastow R, Mylne J S, Lister C, et al. Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature*, 2004, 427(6970): 164~167[DOI]
- 8 Messeguer R, Ganai M W, Steffens J C, et al. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Mol Biol*, 1991, 16(5): 753~770[DOI]
- 9 Lund G, Messing J, Viotti A. Endosperm specific demethylation and activation of specific alleles of alpha-tubulin genes of *Zea mays*. *Mol Gen Genet*, 1995, 246(6): 716~722[DOI]
- 10 Dhar M S, Pethe V V, Gupta V S, et al. Predominance and tissue specificity of adenine methylation in rice. *Theor Appl Genet*, 1990, 80(3): 402~408
- 11 Labra M, Grassi F, Imazio S, et al. Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. *Chemosphere*, 2004, 54(8): 1049~1058[DOI]
- 12 Goubely C, Arnaud P, Tatout C, et al. S1 SINE retroposons are methylated at symmetrical and non-symmetrical positions in *Brassica napus*: identification of a preferred target site for asymmetrical methylation. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(2): 243~255[DOI]
- 13 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 一种简便的应用于油菜的 AFLP 银染技术. *华中农业大学学报*, 2001, 20(5): 413~415
- 14 Chakrabarty D, Yu K W, Paek K Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Sci*, 2003, 165(1): 61~68[DOI]
- 15 Portis E, Acquadro A, Comino C, et al. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annum* L) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci*, 2004, 166(1): 169~178[DOI]
- 16 Sharpe A G, Parkin I A G, Keith D J, et al. Frequent nonreciprocal translocations in the amphidiploid genome of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome*, 1995, 38(6): 1112~1121
- 17 McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(17): 3640~3659
- 18 Palmgren G, Mattson O, Okkels F T. Employment of hydrolytic enzymes in the study of the levels of DNA methylation. *Biochem Biophys Acta*, 1990, 1049(3): 293~297
- 19 Reyna-Lopez G E, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism. *Mol Gene Genet*, 1997, 253(6): 703~710[DOI]
- 20 Xiong L Z, Xu C G, Saghai M A, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by methylation sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 439~446[DOI]
- 21 Cervera M T, Ruin-Garcia L, Martinez-Zapater J M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol Genet Genomics*, 2002, 268(4): 543~552[DOI]
- 22 Xu M L, Li X Q, Korban S S. AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant Mol Biol Rep*, 2000, 18(4): 321~330
- 23 Riddle N C, Richards E J. The control of natural variation in cytosine methylation in *Arabidopsis*. *Genetics*, 2002, 162(1): 355~363
- 24 Siroky J, Ruffini-Castiglione M, Vyskot B. DNA methylation pattern of *Melandrium album* chromosomes. *Chromosome Res*, 1998, 6(6): 441~446[DOI]
- 25 Grunau C, Renault E, Rosenthal A, et al. MethyDB-a public database for DNA methylation data. *Nucleic Acid Res*, 2001, 29(1): 270~274[DOI]

(2005-07-26 收稿, 2005-10-31 收修改稿)