

苦瓜 BAG 基因组织特异性表达研究

彭书明 唐琳 叶杨 樊哲仁 刘彦君 陈放*

(四川大学生命科学学院, 四川成都 610064)

摘要: 实时荧光定量 RT-PCR 分析表明: 苦瓜 BAG 基因仅在心皮、雄蕊、花萼和幼果中表达, 花瓣中没有表达。心皮中表达水平远远高于其它组织, 为雄蕊的 77 倍之多; 在幼果、雄蕊和花萼中有低水平的表达。因此 BAG 基因直接参与苦瓜花和果实发育, 尤其对心皮的发育起着关键的作用。

关键词: 苦瓜; 基因表达; 实时荧光定量 RT-PCR; MADS-box 基因; BAG

中图分类号: S 642.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 05-1007-04

Studies on Tissue-specific Expression of Bitter Gourd BAG Gene

Peng Shuming, Tang Lin, Ye Yang, Fan Zheren, Liu Yanjun, and Chen Fang*

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: In this study, we adopted a sensitive and reliable quantitative real-time RT-PCR assay for measuring the BAG mRNA expression levels of *Momordica charantia* L. The results showed that the expression of BAG was only present in carpel, stamen, calyx, and young fruit but none in petal. High mRNA levels were detected in carpel and low mRNA levels in stamen, calyx and young fruit. All these data demonstrated BAG gene participates in development of flower and fruit, especially having a key role in carpel development.

Key words: *Momordica charantia* L.; Gene expression; Quantitative real-time RT-PCR; MADS-box gene; BAG

BAG 基因是从苦瓜中克隆得到的第 1 个 MADS 盒基因^[1]。MADS 盒基因存在于整个真核生物界, 在生物发育全过程中起着重要的调节作用。MADS 盒基因的命名由 *MCM1* (酵母)^[2]、*AGAMOUS* (拟南芥)^[3]、*DEFICIENS* (金鱼草)^[4, 5]和 *SRF* (人类)^[6]的首写字母组成, 它们具有共同的约 56 个氨基酸的高度保守序列, 为蛋白质结合和蛋白质相互作用的一个保守结构域^[7]。Becker 等^[8]依据进化关系, 将植物 MADS 盒基因分成 12 个族, BAG 基因属于其中 AG 族, 它们的功能主要限制在雄性或雌性生殖器官 (包括胚珠和果实)。苦瓜是雌雄同株植物, 花发育过程首先要经过一个两性期, 然后再分化成雌花或雄花^[9]。苦瓜是研究性别分化的典型材料, 在克隆得到 BAG 基因后, 作者又从苦瓜中克隆得到 2 个 MADS-box 基因 (*MCAG2* 和 *MCAG6*, GenBank 登录号分别为 DQ299943 和 DQ431247), 并采用了实时定量 RT-PCR 方法, 比较分析这 3 个 MADS-box 基因的表达模式, 目前实时荧光定量 RT-PCR 方法多用于临床病理检测, 作者尝试利用其研究 MADS 盒 BAG 基因在各组织的表达情况, 探索苦瓜花发育的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材料及 RNA 的提取

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 品种为 ‘蓝山长白’, 种植于四川大学生命科学学院试验田。*E. coli* Top 10 由本实验室保存。按照植物叶 RNA (小量) 抽提试剂盒 (华舜, 上海) 的方法, 分别

收稿日期: 2005 - 12 - 22; 修回日期: 2006 - 04 - 07

基金项目: 教育部博士点基金资助项目 (2002061088)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: cfang@263.net)

从苦瓜根、茎、叶、花蕾、花萼、心皮、花瓣、雄蕊、茎尖和幼果中提取 RNA, 采用 RNase-free DNase试剂盒除去 DNA 污染, 所得 RNA 立即反转录或 -80°C 储存备用。

1.2 RT-PCR分析

取 $11\ \mu\text{L}$ 总 RNA, 加入 $4\ \mu\text{L}$ $5\times\text{AMV}$ 缓冲液、 $2\ \mu\text{L}$ $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、 $0.5\ \mu\text{L}$ $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Oligod (T)₁₈ 引物、 $0.5\ \mu\text{L}$ RNase抑制剂和 $2\ \mu\text{L}$ AMV 反转录酶, 轻轻混匀, 冰上放置 $10\ \text{min}$, 然后 42°C 水浴 $30\ \text{min}$, 冰上放置 $2\ \text{min}$, -20°C 储存备用。

反转录所得 cDNA 分别进行 5 倍梯度稀释 (1、1/5、1/25、1/125、1/625) 用于对照基因 18S rRNA (GenBank 序列号 AY900000) 扩增。总体积 $25\ \mu\text{L}$, 包括 $2.5\ \mu\text{L}$ $10\times\text{PCR}$ 缓冲液, $1.5\ \mu\text{L}$ MgCl_2 ($25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $2\ \mu\text{L}$ dNTPs ($2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $2\ \mu\text{L}$ cDNA, $1\ \mu\text{L}$ MC18S1 ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 5'-CTG AGA AAC GGC TAC CAC AT-3'), $1\ \mu\text{L}$ MC18S2 ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 5'-GAG CGT AGG CTT GCT TTG AG-3'), $0.2\ \mu\text{L}$ rTaq。反应条件为: 95°C 预变性 $4\ \text{min}$; 94°C 变性 $30\ \text{s}$; 55°C 退火 $30\ \text{s}$; 72°C 延伸 $60\ \text{s}$, 共 35 个循环; 72°C 延伸 $7\ \text{min}$ 。BAG 基因扩增所需模板分别进行 4 倍梯度稀释 (1、1/4、1/16、1/64、1/256)。PCR 扩增体系为 $25\ \mu\text{L}$, 包括 $2.5\ \mu\text{L}$ $10\times\text{PCR}$ 缓冲液, $1.5\ \mu\text{L}$ MgCl_2 ($25\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $2\ \mu\text{L}$ dNTPs ($2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $2\ \mu\text{L}$ cDNA, $1\ \mu\text{L}$ BAGF ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 5'-CCG TGG TCG CCT CTA TGA-3'), $1\ \mu\text{L}$ BAGR ($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 5'-CGA GAA GCC AAT GCC TGA-3'), $0.2\ \mu\text{L}$ rTaq。PCR 反应条件同 18S rRNA。PCR 产物胶回收、克隆并测序。

1.3 实时荧光定量 RT-PCR分析

cDNA 第 1 链按 ExScriptTM RTase 说明合成。将所得 cDNA 分别稀释 20 倍, -20°C 储存备用。

目的基因和内参基因标准品的制备: 将雌花蕾总 RNA 反转录成 cDNA, 利用苦瓜 18S rRNA 和 BAG 特异引物对 (MC18sA: 5'-GTT TGA TGG TAT TTG CTA CTC GG-3', MC18sB: 5'-CTG GTC GGC ATC GTT TAT GGT TG-3'; BAGORF1: 5'-TAA GGA TCC AGA GGG TGG AAG ATG GGG A-3', BAGORF2: 5'-GAC GAG CTC CTC CAA AAG TAG CTG CCA ACA-3') PCR 扩增苦瓜 18S rRNA (932 bp) 和 BAG 基因 (741 bp) 片段, 胶回收, 利用紫外分光光度计 (Puxi tu-1800, 北京) 测定回收 DNA 片段 OD₂₆₀ 值, 并换算成浓度, 10 倍梯度稀释即得标准品。

实时荧光定量 RT-PCR: 定量 RT-PCR 采用 iCycler QTM 荧光实时多波长 PCR 检测系统 (Bio-RAD, US) 对样品 cDNA 和标准 DNA 片段模板进行扩增、检测和相对定量分析。相对定量选用 18S rRNA 作为内参基因, 反应总体积为 $25\ \mu\text{L}$, 冰上配制以下组分: $12.5\ \mu\text{L}$ $2\times\text{SYB}^{\text{R}}$ Premix Ex TaqTM、 $0.5\ \mu\text{L}$ $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC18s Rtim e1 (5'-TGC CCG TTG CTC TGA TGA TTC-3')、 $0.5\ \mu\text{L}$ $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MC18s Rtim e2 (5'-CTG CTG CCT TCC TTG GAT GTG-3')、 $2\ \mu\text{L}$ cDNA, 反应采用热启动模式: 95°C 变性 $3\ \text{min}$, 然后 40 个循环: 95°C 变性 $10\ \text{s}$; 59°C 退火 $15\ \text{s}$; 72°C 延伸 $15\ \text{s}$, 荧光采集设在每次循环的第 3 步, 最后 95°C 变性 $1\ \text{min}$, 退火至 55°C 保温 $1\ \text{min}$, 每隔 $10\ \text{s}$ 上升 0.5°C , 并检测荧光值, 绘制熔点曲线。待测基因反应体系同 18S rRNA, 反应所用的引物为: BAG Rtim e1: 5'-AGA ATA GGC TTG AAA GAG GCA TC-3' 和 BAG Rtim e2: 5'-GTG ACA GCT CCA CCT TCC ATC-3', 也采用热启动模式: 95°C 变性 $3\ \text{min}$, 然后 40 个循环: 95°C 变性 $10\ \text{s}$; 58°C 退火 $15\ \text{s}$; 72°C 延伸 $16\ \text{s}$, 每次循环第 3 步进行荧光采集, 最后 95°C 变性 $1\ \text{min}$, 退火至 55°C 保温 $1\ \text{min}$, 每隔 $10\ \text{s}$ 上升 0.5°C , 检测荧光值, 绘制熔点曲线。标准曲线分别选取拷贝数在 $1\times 10^2\sim 1\times 10^8$ 个的 18S rRNA 和 BAG 标准品为模板, 反应条件同上。标准品 DNA 设置 2 个重复, 待测样品 3 个重复。标准曲线和基因表达水平由系统自动分析, 基线由软件自动设置。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量检测 and RT-PCR 分析结果

采用分光光度法检测提取的 RNA 样品, 所提取的 RNA OD_{260/280} 均在 $1.8\sim 2.0$ 之间, OD_{260/230} 均大于 2.3, 表明所得 RNA 质量高, 可用于进一步 RT-PCR 分析。图 1 为 RT-PCR 分析 BAG 基因在苦瓜

根、茎、茎尖、叶、雌花蕾、雄花蕾和幼果间的表达模式，以苦瓜 18S *rRNA* 为对照。结果表明，*BAG* 基因在雌花蕾中高表达，在雄花蕾和幼果中可见较低的表达，在根、茎、叶和茎尖中没有检测到其表达，说明 *BAG* 基因主要参与生殖器官发育。将 RT-PCR 反应所得片段电泳检测，分别得到长为 392 bp 和 453 bp 的特异产物，片段胶回收测序证实为预期苦瓜 18S *rRNA* 基因和 *BAG* 基因片段。

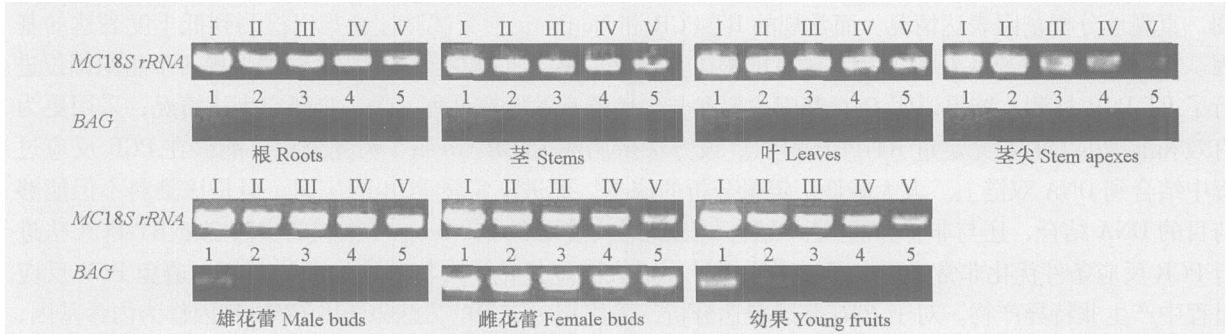


图 1 RT-PCR 分析 *BAG* 基因表达模式

18S *rRNA* 基因扩增片段长为 392 bp; I~V. cDNA 模板浓度从高到低 5 倍梯度稀释。

BAG 基因扩增片段长度为 453 bp; 1~5. cDNA 模板浓度从高到低 4 倍梯度稀释。

Fig 1 RT-PCR analysis of *BAG* expression pattern

The amplification length of 18S *rRNA* is 392 bp; I- V. Five-fold serially diluent cDNA from high to low.

The amplification length of *BAG* is 453 bp; 1 - 5. Four-fold serially diluent cDNA from high to low.

2.2 标准模板的获得

根据 GenBank 登录的苦瓜 18S *rRNA* 和 *BAG* 基因序列设计特异引物，PCR 扩增得到约 930 bp 和 750 bp 片段（图 2），将所得片段克隆到 pMD18-T 载体中，测序得到长为 924 bp 的苦瓜 18S *rRNA* 和 743 bp 的 MADS-box 基因 *BAG* 片段。

2.3 标准曲线分析结果

18S *rRNA* 的回归曲线方程、PCR 扩增效率和相关系数分别为： $Y = -3.409X + 35.857$ 、96.5% 和 0.997；*BAG* 分别为： $Y = -3.325X + 39.073$ 、99.9% 和 0.996。苦瓜 18S *rRNA* 和 *BAG* 标准曲线由 iCyclerQ™ 自动测出。结果表明：苦瓜 18S *rRNA* 和 *BAG* 标准曲线具有好的相关性，相关系数均大于 0.99，PCR 扩增效率高，均大于 95%，说明该试验重复性好和扩增效率高。经熔点曲线分析，MC18S *rRNA* 和 *BAG* 均只有 1 个 T_m 值，分别为 88 和 85，表明 18S *rRNA* 和 *BAG* 所用引物具有很高特异性，PCR 扩增产物均为目的片段，不含引物二聚体。

2.4 BAG 基因的相对定量

采用相对定量引入内参基因苦瓜 18S *rRNA* 来矫正试验过程中各种影响因素归一化反应起始模板量。定量 PCR 结果显示，茎尖和花瓣中没有检测到 *BAG* 基因的表达。将表达量相对最低的花萼表达水平定为“1”，按照相对定量公式 2^{-C_t} 分析得到表 1。表 1 表明：*BAG* 基因在心皮中表达水平远远高于其它组织部位，其表达量是雄蕊的 77 倍之多（表 1）；其次是幼果、雄蕊和花萼，表达水平较低，且差异不大，三者之比为 3.2 : 2.04 : 1。说明了 *BAG* 在花四轮发育中主要参与了心皮的形成。

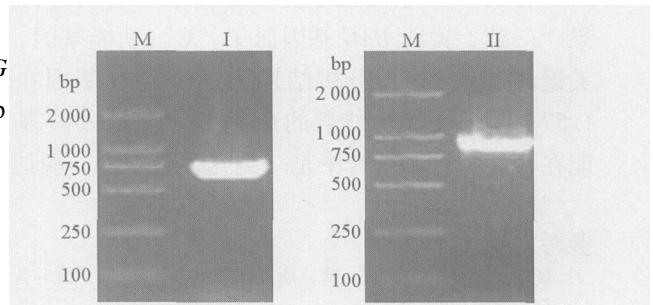


图 2 苦瓜 18S *rRNA* 和 *BAG* 片段扩增

Fig 2 Amplification fragments of bitter gourd 18S *rRNA* and *BAG*
M. DNA marker; . *BAG* (743 bp); . 18S *rRNA* (924 bp).

表 1 *BAG* 基因在苦瓜茎尖、幼果和花各部组织中表达相对拷贝数

Table 1 Relative copy numbers of *BAG* expression levels in bitter gourd

被检组织 Query tissues	18S <i>rRNA</i>	<i>BAG</i>	相对拷贝数 Relative copy number (2^{-C_t})
花萼 Calyx	15.02	28.86	1
心皮 Capel	15.21	21.75	157.59
花瓣 Petal	16.11	-	-
雄蕊 Stamen	14.59	27.4	2.04
幼果 Young fruit	16.13	28.29	3.2
茎尖 Stem apex	15.86	-	-

3 讨论

实时荧光定量 RT-PCR 技术常常用于对基因 mRNA 的表达水平进行分析, 可以绝对定量或相对定量, 结果非常可靠^[10,11], 具有可比性和重复性。可以对低丰度基因表达情况进行研究, 将试验结果作图, 直观地分析基因表达情况。而常规的 RT-PCR 和 Northern 杂交试验往往难以检测到低丰度表达的基因。本研究首先对苦瓜 *BAG* 基因在苦瓜的根、茎、叶、茎尖、雌花蕾、雄花蕾和幼果等 7 个组织部位进行了 RT-PCR 检测, 结果说明 *BAG* 基因主要参与生殖器官的发育过程。进一步研究表达情况, 采用更为有效和准确的实时荧光定量 RT-PCR 方法。该方法所用的 SYBR Green I 荧光染料, 能够在 PCR 反应过程中结合到 DNA 双链上。大大降低了定量分析的成本, 促进了定量 PCR 的应用。但是该染料不但能够与目的 DNA 结合, 还与非特异的 DNA 结合, 因此对其使用 SYBR Green I 染料的实时定量 RT-PCR 法进行 PCR 反应条件优化非常重要。通过引物设计、退火温度优化、产物的熔点曲线分析, 避免 PCR 反应过程中产生非特异产物。对于 *BAG* 基因表达分析, 采用相对定量的方法以 18S rRNA 基因作为内参基因, 校正由于样品处理、RT-PCR 过程中不同的逆转录效率和 QPCR 反应体系中 cDNA 加入量的差异, 归一化加入反应体系中 cDNA 模板的初始浓度, 使得所有样品目的基因表达水平的比较在相同的水平上进行, 从而准确分析 *BAG* 基因在苦瓜中的表达模式。

在花发育的“ABC”^[12]模型中, “C”功能基因决定花的第 3、4 轮结构, 即雄蕊和心皮。定量 PCR 分析 *BAG* 基因在心皮和雄蕊中均有表达, 心皮远远高于雄蕊, 这与早期对 *BAG* 基因分析的结果^[1]一致, 说明 *BAG* 基因属于“C”功能基因, 与苦瓜雄蕊和心皮发育相关, 尤其对心皮发育起着关键的作用。定量分析结果还显示 *BAG* 基因在幼果和花萼中也有表达, 在幼果中的表达是雄蕊的 1.57 倍, 花萼的为雄蕊的 0.49 倍, 因此 *BAG* 基因还可能参与了花萼的发育和后期幼果的发育, 也可能在花萼和幼果发育中是一类冗余的基因, 表达但并不起作用。

参考文献:

- 1 杨满业, 赵茂俊, 徐 莺, 唐 琳, 白 洁, 陈 放. 苦瓜 MADS 盒基因的克隆和表达研究. 北京林业大学学报, 2004, 26 (4): 30~34
Yang M Y, Zhao M J, Xu Y, Tang L, Bai J, Chen F. Cloning and expression of a MADS box gene from bitter melon (*Momordica charantia* L.). Journal of Beijing Forestry University, 2004, 26 (4): 30~34 (in Chinese)
- 2 Passmore S, Maine G T, Elble R, Christ C, Tye B K. Saccharomyces cerevisiae protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MAT a cells. Journal of Molecular Biology, 1988, 204 (3): 593~606
- 3 Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, Drews G N, Feldmann K A, Meyerowitz E M. The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. Nature, 1990, 346 (6279): 35~39
- 4 Sommer H, Beltran J P, Huijser P, Pape H, Lonig W E, Saedler H, Schwarz-Sommer Z. DEFICIENS, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. EMBO Journal, 1990, 9 (3): 605~613
- 5 Schwarz-Sommer Z, Hue I, Huijser P, Flor P J, Hansen R, Tetens F, Lonig W E, Saedler H, Sommer H. Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. EMBO Journal, 1992, 11 (1): 251~263
- 6 Norman C, Runswick M, Pollock R, Treisman R. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-Fos serum response element. Cell, 1988, 55 (6): 989~1003
- 7 Shore P, Sharrocks A D. The MADS-box family of transcription factor. European Journal of Biochemistry, 1995, 229 (1): 1~13
- 8 Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29 (3): 464~489
- 9 Wang Q M, Zeng G W. Studies on expression of sex differentiation program in *Momordica charantia* L. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2002, 28 (3): 243~248
- 10 Ficko T, Cemek P. Real-time quantitative PCR assay for analysis of platelet glycoprotein IIIa gene expression. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2005, 62 (3): 241~250
- 11 Tichopad A, Pfaffl M W, Didier A. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR. Molecular and Cellular Probes, 2003, 17 (1): 5~10
- 12 Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature, 1991, 353 (6339): 31~37