

荧光定量 PCR 检测淹涝胁迫下水稻 *Adh2* 基因的表达量变化*

赵 森 陈永华 陈 昊 肖国樱**

(中国科学院亚热带农业生态研究所 长沙 410125)

摘 要 采用荧光定量 PCR 方法,应用特异性引物,对淹涝胁迫下水稻叶片中低丰度表达的乙醇脱氢酶基因 *Adh2* (Alcohol dehydrogenase 2) 进行转录水平上的定量分析。实验得到一组基线平整、斜率大、指数区明显的 S 形荧光曲线。结果显示,在淹涝胁迫前期,*Adh2* 基因表达持续增加,在水淹后 8 h 表达量最大,随后下降。淹涝胁迫能诱导叶片中 *Adh2* 基因大量表达,且呈低-高-低的变化趋势。

关键词 淹涝胁迫 乙醇脱氢酶 实时荧光 PCR 基因表达

中图分类号:Q344+.13 文献标识码:A 文章编号:1671-3990(2008)02-0455-04

Dynamic analysis of *Adh2* gene of rice (*Oryza sativa* L.) under submergence stress using real-time quantitative PCR

ZHAO Sen, CHEN Yong-Hua, CHEN Hao, XIAO Guo-Ying

(Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to determine transcription levels of *Adh2* (Alcohol dehydrogenase 2) gene in submerged leaves of rice using specific primers, expressed at low abundance under normal conditions. SYBR Green real-time PCR platform was established to check low abundance genes, which gave rise to a series of S curves with flat baselines, large slopes and distinct exponential areas. The results show that *Adh2* transcription increases at the beginning of submergence and reaches the maximum level 8 hours after submergence, and then decreases. *Adh2* transcription level in rice leaves follows a low-high-low pattern under submergence.

Key words Submergence stress, Alcohol dehydrogenase, Real-time fluorescence quantitative PCR, Gene expression

(Received Dec. 22, 2006; accepted March 8, 2007)

洪涝灾害是一种常见的农业气象灾害,会对水稻生产造成严重危害^[1],每年造成的经济损失达 10 亿美元^[2]。在淹水条件下,淹水深度、时间、水温、水质的酸碱度、水的流动性和浑浊度等都会对水稻生长造成影响^[3],但最直接、最严重的因素是淹水条件造成的缺氧环境。氧气在水中的扩散速度只有在空气中的万分之一^[4]。植物体从正常供氧环境下转到低氧条件下,体内代谢途径会随之从有氧代谢向无氧代谢转变。在无氧代谢下,水稻植株会产生多种厌氧多肽,这些厌氧多肽多为参与糖磷酸化代谢的酶,包括蔗糖合成酶、葡萄糖磷酸异构酶、果糖 1,6-二磷酸醛缩酶、丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶等,其中乙醇脱氢酶几乎在所有植物中都能发现^[5]。有氧条件下 1 mol 葡萄糖经三羧酸循环产生

36 mol ATP,而在缺氧条件下 1 mol 葡萄糖只产生 2 mol ATP^[6]。在缺氧条件下,植物体需通过酒精发酵产生的能量来维持自身的能量需求,乙醇脱氢酶 (Alcohol Dehydrogenase, ADH) 是实现这个过程的关键酶。在水稻中有两个基因编码 ADH,分别为 *Adh1* 和 *Adh2*。*Adh2* 编码的酶主要在根中表达,在叶片中也有少量表达。*Adh1* 编码的酶主要在叶片、叶鞘和花粉中表达。在节中,*Adh1* 和 *Adh2* 都表达,但 *Adh1* 有较高活性。所以 *Adh* 在水稻中的表达具有组织特异性^[7]。

实时荧光 PCR 是指在常规 PCR 技术基础上,通过荧光染料或荧光标记的特异性探针,对 PCR 产物进行标记跟踪,实时监控反应过程,结合相应的软件对结果进行分析,计算待测样品初始模板量的

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX3-SW-434) 和湖南省杰出青年基金 (03JJY1004) 资助

** 通讯作者, E-mail: xiaoguoying@isa.ac.cn

收稿日期:2006-12-22 接受日期:2007-03-08

定量分析方法。与常规 PCR 方法相比,实时荧光 PCR 有不可比拟的优越性:扩增和检测过程一步完成,简化了试验操作步骤,减小了实验误差,非常灵敏,甚至能检测到 1 个拷贝的特异性转录产物,灵敏度为 RNase 保护实验的 1 万~10 万倍、斑点杂交的 1 000 倍;检测范围广,可以跨越 7~8 个数量级^[8]。由于 *Adh2* 基因在叶片中表达量较低,所以本实验采用检测准确、灵敏的实时荧光 PCR 的方法研究其在淹涝胁迫下叶片中的表达变化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻“FR13A”(*Oryza sativa* spp. *indica*) 在 MS 培养基上发芽后移栽到长 40 cm、宽 27 cm、高 4 cm 的塑料盘中,人工气候箱中生长至 3 叶 1 心时没顶淹水处理。水为干净的井水,水温为 21 ℃,pH 值为 8.1。分别在淹水后 0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h 和 48 h 取叶片用于提取 RNA。实验所用 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自 Fermentas 公司,SYBR Premix Ex TaqTM 购自宝生物工程(大连)有限公司;引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。其他各种化学试剂均为进口或国产分析纯试剂。水为灭菌双蒸水。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取

取新鲜嫩叶约 100 mg 放入预冷的研钵中,迅速加入液氮充分研磨,收集粉末于离心管中,加入 Trizol Reagent 1 mL,4 ℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,离心后吸取上清液于新的离心管中,加入 0.25 mL 氯仿,再离心后吸取上清液,加入等体积异丙醇,离心沉淀弃上清液,用 75 % 乙醇洗涤沉淀,DNaseI 酶解可能混杂的基因组 DNA,然后用适量的 DEPC 处理过的水溶解 RNA,在紫外分光光度计上测定 RNA 的浓度和纯度,通过 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳评价 RNA 质量。

1.2.2 反转录反应

取各个样品总 RNA 2 μg 进行反转录,加入 0.5 μg·μL⁻¹ Oligo(dT) 1 μL,加入 DEPC 处理过的水补

足 12 μL,70 ℃ 保温 5 min 后,依次加入 5 × RT buffer 4 μL,20 U·μL⁻¹ RNase 抑制剂 1 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTP 2 μL,37 ℃ 保温 5 min 后加入 200 U·μL⁻¹ M-MLV 反转录酶 1 μL,反应终体积为 20 μL。42 ℃ 反应 60 min,70 ℃ 加热 10 min 中止反应。

1.2.3 荧光定量 PCR 反应

根据 GeneBank 中注册的目的基因 *Adh2* (X16297) 和内参基因 *Actin* (X16280) 序列,按照荧光定量 PCR 引物设计原则设计引物。*Adh2* 的正向引物为 5'AGTGTGGGAGAGGGTGTGAC3',反向引物为 5'GGTGAAGTGCCAACAAAGT3',预期产物长度为 216 bp;*Actin* 的正向引物为 5'TCAACCAAGGC-CAATC3',反向引物为 5'CACCATCACCAGAGTCAACA3',预期产物长度为 147 bp。

各 cDNA 样品分别以 *Adh2* 和 *Actin* 引物进行荧光定量 PCR 反应。反应在 Rotor-Gene 3000 Real Time Cycler 上进行,反应体积为 20 μL: SYBR Premix Ex TaqTM 10 μL,10 μmol·L⁻¹ 的正、反向引物各 0.4 μL,cDNA 模板 2 μL,无菌水 7.2 μL。配制混合物充分混匀后平均分配到各反应管中。反应条件: 95 ℃ 变性 10 min,以后各循环 95 ℃ 10 s,60 ℃ 25 s,40 个循环。在第一个循环之前进行荧光校正,荧光选择 FAM/SYBR。运行 71 min 后反应结束。

1.2.4 标准曲线的制定

在样品扩增的同时,以实验中不同处理的 cDNA 模板混合样进行系列稀释制作标准曲线。本实验以淹水处理后不同时间段的 cDNA 模板进行 10 倍梯度稀释,以 *Adh2* 和 *Actin* 特异引物进行扩增获得标准曲线。通过标准曲线得到 *Adh2* 和 *Actin* 的扩增效率。各样品的相对定量分析按文献[9]方法进行,其中以 0.5 h 材料为对照。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量和反应特异性检测

提取总 RNA 经分光光度计检测,OD_{260/280} 均在 1.8~2.1 之间,经 1% 琼脂糖变性凝胶电泳显示,各条带清晰,无明显降解,可用于反转录反应。从荧光定量动力学曲线来看,曲线基线平整,倾斜度比较大。

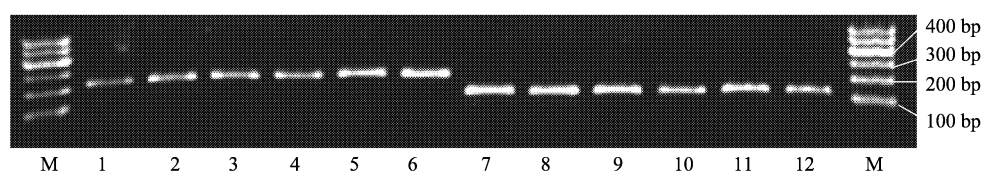


图 1 电泳检测扩增产物的特异性

Fig. 1 Amplification specificity detected by electrophoresis

M: DNA 分子量标记 DNA marker; 1~6: *Adh2* 扩增产物 Amplification products of *Adh2*; 7~12: *Actin* 扩增产物 Amplification products of *Actin*

从整个扩增曲线来看,扩增线性范围广,从第20个循环开始就能检测出。反应结束后得到一组单峰型的融解曲线,说明扩增特异性较好。凝胶电泳检测扩增产物只出现一条与目的片段大小相等的明亮条带,没有其他条带出现,同样证明特异性较好(图1)。

2.2 目的基因和内参基因的扩增效率

实验中的引物应用 Primer Premier 软件设计,具有较好的特异性,DNase I 的加入消除了基因组DNA的污染。实验得到一组质量较好的标准曲线,*Adh2* 标准曲线的斜率为-3.449,线性相关系数为0.9985,扩增效率为0.95;*Actin* 标准曲线的斜率为-3.175,线性相关系数为0.9967,扩增效率为1.07。

2.3 不同淹水时间 *Adh2* 基因表达的定量检测

采用以上建立的 SYBR Green 实时荧光定量PCR技术,对“FR13A”水稻在不同淹涝时间下 *Adh2* 基因的表达情况进行分析。结果如图2所示,在淹水条件下,*Adh2* 在4 h前表达量较低,4 h后开始大幅度升高,8 h表达量最高,随后稳定下降。*Adh2* 基因在淹涝胁迫下表达量表现出低-高-低的变化规律。

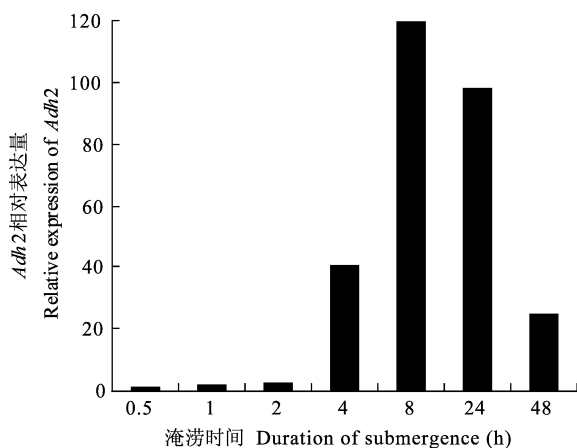


图2 不同淹涝时间下 *Adh2* 的相对表达差异

Fig. 2 Relative expression of *Adh2* under different duration of submergence

3 讨论

以前多以玉米^[10,11]为试验材料来研究缺氧条件下 *Adh* 基因的表达情况。*Adh* 在水稻、玉米两种作物中有很多相似之处,但也有不同。在水稻和玉米中都有 *Adh1* 和 *Adh2* 两个 *Adh* 基因,但不同植物中它们的表达不同。缺氧条件下,水稻叶片和根中均能检测到 ADH 活性,但玉米仅在根中大量诱导表达,叶中不表达。由于水稻多生长在低洼多水的环境中,不只是根部会面临淹水胁迫,有时整个植

物都会面临缺氧的情况。因此,推测 *Adh* 基因在水稻叶片中的表达是一种进化适应。大麦中有3种不同的 *Adh* 基因,分别为 *Adh1*、*Adh2* 和 *Adh3*,它们的多肽产物共形成6种不同的二聚体。大麦糊粉层细胞在正常供氧条件下只合成 ADH1 和少量的 ADH2,发育种子的未成熟糊粉层也有类似情况;当氧气浓度为5%时,ADH2 合成增加,ADH3 开始出现;当氧气浓度为2%和0时,3个 ADH 多肽片段合成迅速增加^[12]。

前人的研究发现,缺氧胁迫能迅速诱导 *Adh* 在水稻不同部位表达^[13],ADH 酶活性在缺氧胁迫处理96 h内一直持续增加表达^[7]。在水稻中的 *Adh1* 和 *Adh2* 分别编码两个多肽,两个多肽可以以 ADH1-ADH1、ADH1-ADH2 和 ADH2-ADH2 3种形式存在。*Adh2* 在叶中有少量表达,但对于 *Adh2* 在叶中的具体表达模式还不清楚。本研究发现在淹涝胁迫前期,水稻叶中 *Adh2* 表达持续增加,胁迫8 h表达量最高,但在24 h和48 h表达量又有所下降。“FR13A”是国际上公认的耐淹涝材料,可能特殊的代谢途径是其适应耐淹涝的原因。

实时PCR是一种定量准确的方法,但其准确性受多种因素影响:引物和靶序列的结合能力、扩增产物的长度、G+C含量、模板含量、DNA聚合酶、反应液成分的变化、不同样品间DNA聚合酶抑制物的存在情况、循环扩增仪上不同位置的温差差异等。为了减少以上因素对实验造成的误差,作者经多次实验摸索,总结出应注意以下几方面:加样器应经常校准,并使用与加样器匹配的加样头;使用灭菌的干净加样头,加样时应缓慢、靠近管底加,尽可能用加样机器人以减少实验误差;尽量缩短加样时间,整个加样过程在低温环境中进行。

实时荧光定量PCR越来越广泛的应用于医学、检验检疫、军事、农业、基础研究等各领域^[14-18]。本研究利用荧光定量PCR分析方法,研究了淹涝胁迫下低丰度表达基因 *Adh2* 的表达变化规律,为下一步研究其他低丰度表达基因提供了经验和技术基础。

参考文献

- [1] Mohanty H. K., Mallik S., Grover A. Prospects of improving flooding tolerance in lowland rice varieties by conventional breeding and genetic engineering[J]. Current Science, 2000,78(2):132-137
- [2] Xu K., Xu X., Fukao T., et al. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice[J]. Nature, 2006,442:705-708

- [3] Ram P. C. , Singh B. B. , Singh A. K. , *et al.* Submergence tolerance in rainfed lowland rice: physiology basis and prospects for cultivar improvement through marker-aided breeding[J]. *Field Crops Research*, 2002, 76: 131–152
- [4] Jackson M. B. , Colmer T. D. Response and adaptation by plants to flooding stress[J]. *Annals of Botany*, 2005, 96: 501–505
- [5] Drew M. C. , Cobb B. G. , Johnson J. R. , *et al.* Metabolic acclimation of root tips to oxygen deficiency[J]. *Annals of Botany*, 1994, 74: 281–286
- [6] Rudy D. , Guy de B. , Elizabeth S. D. , *et al.* Regulation of the *Arabidopsis Adh* gene and other environmental stresses[J]. *Annals of Botany*, 1994, 74: 301–308
- [7] Xie Y. , Wu R. Rice alcohol dehydrogenase genes: anaerobic induction, organ specific expression and characterization of cDNA clones[J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 13: 53–68
- [8] Wong M. L. , Medrano J. F. Real-time PCR for mRNA quantification[J]. *Biotechniques*, 2005, 39(1): 1–11
- [9] Michael W. P. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: 2002–2007
- [10] Andrews D. , Cobb B. G. , Johnson J. R. , *et al.* Hypoxic and anoxic induction of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of seedlings of *Zea mays*; *Adh* transcripts and enzyme activity[J]. *Plant Physiology*, 1993, 101: 407–414
- [11] Gerlach W. L. , Pryor A. J. , Dennis E. S. , *et al.* cDNA cloning and induction of the alcohol dehydrogenase gene (*Adh1*) of maize[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79: 2981–2985
- [12] Andrew D. H. , John V. J. , John A. Z. Regulated expression of three alcohol dehydrogenase genes in barley aleurone layers[J]. *Plant Physiology*, 1984, 75: 573–581
- [13] Ricard B. , Mocquot B. , Fournier A. , *et al.* Expression of alcohol dehydrogenase in rice embryos under anoxia[J]. *Plant Molecular Biology*, 1986, 7: 321–329
- [14] 廖晓兰, 朱水芳, 赵文军, 等. 柑橘黄龙病病原 16S rDNA 克隆、测序及实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(1): 80–85
- [15] 陈颖, 徐宝梁, 苏宁. 实时荧光定量 PCR 技术检测转基因大豆方法的建立[J]. *食品与发酵工业*, 2003, 29(8): 65–69
- [16] 张晓红, 叶铁真, 胡斌, 等. 人类 *ermap* 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *中国实验血液学杂志*, 2005, 13(1): 154–157
- [17] David J. I. , Sandra B. , Stephanie M. , *et al.* Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants[J]. *Biotechniques*, 2001, 31(1): 132–140
- [18] Ulrich L. , Hans K. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies[J]. *Methods*, 2001, 25: 409–418