

## 光暗条件下大蒜 DNA 甲基化差异的初步研究

何艳霞, 王子成\*, 曹红平, 张成婉

河南大学农业生物技术研究所, 河南开封 475001

**摘要:** 用甲基敏感扩增多态性(MSAP)技术分析光暗条件下生长的大蒜 DNA 甲基化水平差异。结果表明, 用 8 对引物组合扩增出 343 条条带, 完全一致的带型 240 条, 不一致的 103 条。在不一致的条带中, 光照条件下相同的 47 条带与黑暗条件下相同的带型有差异, 与黑暗相比光照下出现的去甲基化带 28 条, 有 56 条差异带在 2 个处理内个体间也有差异。总的趋势是光照引起大蒜 DNA 去甲基化。

**关键词:** DNA 甲基化; 甲基敏感扩增多态性; 大蒜

## Initial Study of DNA Methylation Difference of Garlic (*Allium sativum* L.) Growing in Light and Darkness

HE Yan-Xia, WANG Zi-Cheng\*, CAO Hong-Ping, ZHANG Cheng-Wan

Institute of Agricultural Biotechnology, Henan University, Kaifeng, Henan 475001, China

**Abstract:** The variation patterns of DNA methylation in Garlic (*Allium sativum* L.) genome under the condition of light and darkness was studied using MSAP technique to reveal the effect of light to the level of plant DNA methylation. Total of 343 fragments were identified by eight primer combinations and of which 240 were shared by all the samples in the two conditions. It was shown that 47 consistent fragments in light condition appeared different comparing with those in darkness. Comparing with the darkness condition, the 28 fragments appeared to be demethylated in light condition, and 56 fragments appeared to be varied among individuals in the same condition. The overall results showed that light could induce DNA demethylation in Garlic.

**Key words:** DNA methylation; methylation sensitive amplified polymorphism; garlic

DNA 甲基化在高等生物的生命活动中具有维持基因组稳定及调节生长发育等功能(Chan 等 2005)。DNA 甲基化程度与一系列的生物过程相关, 如基因组稳定、X 染色体失活、基因的转录调节和转座子元件的活性、基因沉默、基因组印迹等(Bird和Wolffe 1999; Besyor 2000; Bender 2004; Gehring 等 2004; Wassenegger 2002)。作为一种表观遗传修饰, DNA 甲基化在不改变碱基序列的基础上改变基因组的遗传信息, 是现代表观遗传学研究中的一个热点(仪治本等 2005)。

胞嘧啶甲基化参与植物基因表达调控, 进而调节植物的生长发育(Finnegan 等 2000)。植物在不同发育时期, 通过遗传或环境变化调控内源基因的表达所产生不同的发育反应, 植物 DNA 甲基化水平的变化在此种调节中起作用(Richards 1997; Kass 等 1997), 而温度和光照等环境因素都可以促使 DNA 甲基化水平发生变化(Gurmind 等 2000)。

甲基敏感扩增多态性(methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP)技术是基于扩增片段长度多态性(AFLP)技术, 以对甲基化敏感的酶 *HapII* 和 *MspI* 代替 *MseI* 作高频内切酶, 以 *EcoRI* 为低频内切酶进行 AFLP 反应。这种方法适用于检测材料 DNA 序列未发生变化情况下的 DNA 甲基化水平变化。

本文以遗传基础一致、光和暗条件下培养的大蒜为材料, 用 MSAP 技术分析大蒜胞嘧啶甲基化的变化情况, 探讨光对植物 DNA 甲基化水平的影响。

### 材料与方法

实验材料是郑州农科所赠送的大蒜(*Allium sativum* L.) 品种‘双高一号’。取 4 个大蒜头, 分

收稿 2006-11-28 修定 2007-01-15

资助 河南大学基金。

\*通讯作者(E-mail: wzc@henu.edu.cn Tel: 0378-2190699)。

别编为1号、2号、3号和4号材料,即重复4次。从每个重复的材料中,分别取10个大小基本一致的蒜瓣均分为2部分,取相同的玻璃杯(200 mL),盛装等量的自来水,用滤纸制成滤纸桥,滤纸桥中间打一小孔,以便大蒜根生长。将滤纸桥放入水杯,并接触水面,实验材料置于滤纸桥上,使其生根部分与水面接触。材料都放在23℃恒温培养室中培养,一部分于光照下培养,光照强度为 $11 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,每天光照12 h,另一部分于暗箱中遮光培养。

MSAP分析以AFLP实验为基础,实验流程参照Xiong等(1999)和Cervera等(2002)的方法。模板DNA分别用*EcoRI/HpaII*和*EcoRI/MspI*进行酶切。*EcoRI/HpaII*酶切分步进行,20 mL体系含250 ng DNA, *EcoRI* 3 U, 10倍缓冲液(500 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5; 100 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 10 mmol·L<sup>-1</sup> dithiothreitol; 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl)和无菌水,于37℃下温浴2~4 h,加2倍体积无水乙醇后于-20℃下放2 h,抽干加6 mL无菌水溶解,然后加入3 U *HpaII*, 2 mL 10倍缓冲液(100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5; 100 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 10 mmol·L<sup>-1</sup> dithiothreitol),用水补足到20 mL,37℃下酶切3 h; *EcoRI/MspI*酶切体系同前,只是加入*EcoRI*和*MspI*这2种酶后同时反应,在37℃下放3 h。酶切产物分别都加上*EcoRI*接头和*HpaII-MspI*接头, *EcoRI*接头序列是5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 3'-CTGACGCATGGTTAA-5', *HpaII-MspI*接头序列是5'-GATCATGAGTCCTGCT-3', 3'-AGTACTCAGGACGAGC-5',于25℃下连接2 h;以稀释5倍的连接产物进行预扩增反应,预扩增产物稀释20倍后再进行选择扩增反应。所有的引物序列见表1,预扩增和选择性扩增程序参照邹喻莘等(2001)书中的程序,扩增产物加入1/2体积的变性缓冲液(见分子克隆第三版),放入94℃水浴3 min后立即转入0℃中,进行6%的变性聚丙烯酰胺电泳,条件为55 W, 2.5 h,最后银染显色。

## 实验结果

### 1 光暗条件下大蒜的生长性状差异

黑暗条件下生长的大蒜苗出现黄化现象(蒜

表1 实验的引物序列

Table 1 Total numbers of amplified fragments

引物	序列(5'→3')
E-A*	GACTGCGTACCAATTCA
Hpa-msp*	ATCATGAGTCCTGCTCGG
E-AAC	GACTGCGTACCAATTCAAC
E-AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
E-ACA	GACTGCGTACCAATTCACA
E-ACT	GACTGCGTACCAATTCACT
E-ACC	GACTGCGTACCAATTCACC
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG
E-AGC	GACTGCGTACCAATTCAGC
E-AGG	GACTGCGTACCAATTCAGG
Hpa-Msp-TCAA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCAA

\*为预扩增引物,其余的为选择性扩增引物。

黄),苗高而纤细;光照条件下正常生长的大蒜为绿色,蒜苗粗壮而矮一些(图略)。

### 2 DNA甲基化水平变化

光暗条件下生长的大蒜DNA分别进行MSAP分析,观察到3种带型:I型带是在*EcoRI/HpaII*和*EcoRI/MspI*这2种酶切组合中均出现的带;II型带是在*EcoRI/HpaII*酶切中出现但在*EcoRI/MspI*酶切中不出现的带;在*EcoRI/HpaII*酶切中不出现但在*EcoRI/MspI*中出现的带为III型带(图1)。用8对引物组合进行扩增,共得到343条清晰的条带,所有的带型统计见表2。在光照和黑暗2种条件下生长的样品,完全一致的条带有240条,其中最多的带型是I型带,有165条;而II型和III型带相对较少,II型带有34条,III型带有41条。样品间不一致的DNA条带共有103条,其中光照与非光照处理样品之间有差异的条带有47条。在这些差异带中,光照处理的样品与黑暗处理的相比较,去甲基化位点28个(标\*的带)。有19条带无法确定是去甲基化还是新产生的甲基化(标\*\*的带),这47条差异带在所有黑暗或光照条件下的样品都是一致的(即要么是所有光下的样品有,要么是所有暗下的样品有),由于样品的其他生长条件完全相同,因此这些差异应该与光照与否有关。其中光照条件下特有的带有25条,而黑暗条件下特有的带有5条。有56条带在处理间的差异很大,且处理内部各样品间也有差异,这些可能是样品本身差异造成的。总之,光下生

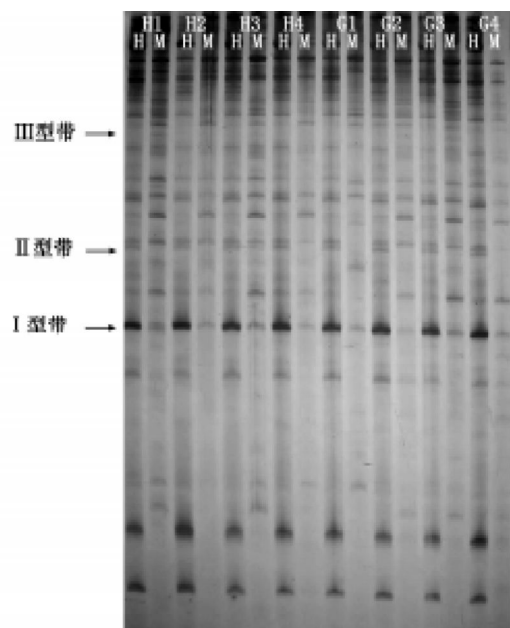


图1 模板 DNA 的 MSAP 分析

Fig.1 DNA methylation patterns using MSAP analysis

1~4 是 4 个蒜头样品。H1、H2、H3 和 H4 为黑暗下的，G1、G2、G3 和 G4 为光照的；H 和 M 分别代表样品由 *EcoRI*/*HpaI* 和 *EcoRI*/*MspI* 酶切后扩增的条带。

表2 光照和黑暗条件下样品的 MSAP 分析带型统计

Table 2 A summary of MSAP band type of the sample growing under light and darkness

类型	带型		条带数
	黑暗	光照	
2 种条件处理均有相同的条带	I	I	165
	II	II	34
	III	III	41
2 种处理间条带有差异，但处理内条带相同	II	I	6*
	—	I	13*
	—	II	8**
	—	III	4**
	III	I	3**
	II	I	2**
	III	II	2**
2 种处理间和处理内均有差异的条带	III	I	9*
			56

I、II 和 III 为 3 种 MSAP 带型。“—”表示无任何带型；\* 为去甲基化的条带；\*\* 为无法确定是去甲基化还是新产生的甲基化的条带。

长的样品甲基化敏感酶的切割位点增多，即光对大蒜 DNA 有脱甲基化作用。

## 讨 论

*HpaII* 和 *MspI* 是一组同裂酶，二者均识别并切割 5' CCGG 3' 序列，但是 *HpaII* 不能切割任何 1 个或 2 个均甲基化的序列，即 *HpaII* 对 5' CmCGG3'、5' mCCGG3' 和 5' mCmCGG3' 都不表现出活性，但若只是单链发生甲基化，则能识别切割。*MspI* 对内部胞嘧啶的甲基化是不敏感的，但对外部胞嘧啶的甲基化敏感，也就是说 *MspI* 可以切割 5' CmCGG3' 但不能切割 5' mCCGG3'。如果在同一位点上，I 型带变成 II 型、III 型带或无任何带，则说明在原来的 5' CCGG3' 序列至少有 1 个胞嘧啶发生了甲基化，反之则是去甲基化。但用这种方法分析 DNA 甲基化水平的变化存在一个不能克服的弊端，即不能区分非甲基化的 5' CCGG3' 序列与单链的胞嘧啶甲基化序列。

本文结果显示，光下生长的样品其电泳条带较多，这种结果似乎也说明光对 DNA 去甲基化有效应。有人认为 DNA 甲基化水平的变化是为了适应生存环境而变化的一种自我修饰(Cervera 等 2002)。大蒜在是否受光照的条件下，DNA 甲基化发生 13.7% 的变异，这种变异是否与某些基因表达相关？植物 DNA 甲基化水平在植物的不同组织及不同生长时期都会有差异，这在番茄、玉米和水稻中已有过报道(陆光远等 2005)，本文的材料来源单一，用于提取 DNA 的叶片都处在同一生长期，这可减少实验误差。在我们的实验中有 56 条差异带存在于样品个体间，推测可能是由于个体本身的营养差异造成的。

DNA 甲基化信息在植物的生长发育过程中起着关键的调控作用。表型观察表明，光下的样品生长较茁壮，暗下的蒜苗黄化且较细长，这种性状是否是甲基化信息变化的结果？抑或是性状改变导致甲基化信息遗传的改变？对此需进一步研究。至于光暗条件下特有的 DNA 甲基化差异条带回收和序列测定及差异 DNA 序列的功能分析，是我们下一步的工作。此外，植物对光信号的接受涉及到一系列信号转导过程，这些信号究竟如何调节 DNA 的甲基化，也有待深入研究。

## 参考文献

陆光远, 伍晓明, 陈碧云, 高桂珍, 许鲲, 李响枝 (2005). 油菜种子萌

- 发过程中 DNA 甲基化的 MSAP 分析. 科学通报, 50 (24): 2750~2756
- 仪治本, 孙毅, 牛天堂, 梁小红, 刘龙龙, 闫敏, 赵威军 (2005). 玉米杂交种及其亲本基因组 DNA 胞嘧啶甲基化水平研究. 西北植物学报, 25 (12): 2420~2425
- 邹喻苹, 葛颂, 王晓东 (2001). 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 108~118
- Bird AP, Wolffe AP (1999). Methylation-induced repression—Belts, braces, and chromatin. Cell, 99: 451~454
- Bestor TH (2000). The DNA methyltransferases of mammals. Human Mol Genet, 9 (16): 2395~2402
- Bender J (2004). DNA methylation and epigenetics. Annu Rev Plant Biol, 55: 41~68
- Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Nat Rev Genet, 6 (5): 351~360
- Cervera MT, Ruiz-García L, Martínez-Zapater JM (2002). Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. Mol Genet Genom, 268: 543~552
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000). DNA methylation, a key regulation of plant development and other processes. Curr Opin Genet Dev, 10: 217~223
- Gehring M, Choi Y, Fischer RL (2004). Imprinting and see development. Plant Cell, 16 (Suppl): S203~S213
- Gurmind ST, Jacintha M, Chendanda CC, David MR (2000). Effect of light quality and 5-azacytidine on genomic methylation and stem elongation in two ecotypes of *Stellaria longipes*. Physiol Plant, 109: 313~321
- Kass SU, Pruss D, Wolffe AP (1997). How does DNA methylation repress transcription? Trends Genet, 13: 444~449
- Richards EJ (1997). DNA methylation and plant development. Trends Genet, 13 (8): 319~322
- Wassenegger M (2002). RNA-directed DNA methylation. Plant Mol Biol, 43: 203~220
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai-Maroo MA (1999). Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Mol Gen Genet, 261 (3): 439~446