

温度对菘蓝基因组 DNA 甲基化的影响

杨飞¹, 徐延浩^{2*}

(1. 长江大学医学院分子生物学部, 湖北 荆州 434023;
2. 长江大学农学院长江中游湿地农业教育部工程研究中心, 湖北 荆州 434025)

[摘要] 目的: 分析高温对菘蓝基因组 DNA 甲基化模式的影响。方法: 采用甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)方法, 筛选 36 对选择性引物进行扩增。结果: 扩增共得到 1 612 条清晰的带纹, 共检测到 82 (5.1%) 个 CCGG 位点在高温胁迫后发生了甲基化状态的改变, 其中 58 (3.6%) 个位点发生了超甲基化, 24 (1.5%) 个位点发生了去甲基化。结论: 温度是调节菘蓝基因组 DNA 甲基化模式的一个重要环境因子。

[关键词] 菘蓝; DNA 甲基化; 高温; 甲基化敏感扩增多态性

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0113-04

Rapid Genome DNA Methylation Changes in *Isatis indigotica* after Exposure to Elevated Temperature

YANG Fei¹, XU Yan-hao^{2*}

(1. Department of Molecular Biology, College of Medicine, Yangtze University, Jingzhou 434023, China;
2. Engineering Research Center of the MOE for Wetland Agriculture in the Middle Reaches of the Yangtze River, College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of elevated temperature in genome cytosine methylation changes in *Isatis indigotica*. **Method:** Methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) approach and 36 pairs of selective primers combinations were used in this study. **Result:** A total of 1 612 bands were obtained. In all, 82 (5.1%) CCGG sites displayed cytosine methylation changes after exposure to elevated temperature. Among these sites, 58 (3.6%) CCGG sites had undergone hypermethylation changes and 24 (1.5%) CCGG sites undergone demethylation changes. **Conclusion:** This result provided evidence for genome-wide DNA methylation remodeling occurring immediately after exposure to elevated temperature in *I. indigotica*.

[Key words] *Isatis indigotica*; DNA methylation; high temperature; methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP)

道地药材是指经过中医临床长期优选出来的, 在特定地域, 通过特定生产过程所产的, 较其他地区

所产的同种药材品质佳、疗效好, 具有较高知名度的药材^[1]。药材道地性的科学本质是中药现代化发展的关键课题之一, 也一直是中药研究的热点^[2]。从生物学角度看, 道地药材的表型是由自身基因型与所处的环境相互作用(生境饰变)的产物^[3]。

已有很多研究表明如土壤理化状态、无机元素、温度、光照等环境生态因子对道地药材的形成起到了重要的作用^[4-9]。郭兰萍等研究发现, 道地药材苍术的形成中受到缺钾及高温胁迫^[10]。黄璐琦等提出了道地药材形成的逆境效应理论^[11]。但究竟不同的环境生态因子是如何影响中药材药效成分生

[收稿日期] 20120903(001)

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金课题(20114220120003, 20114220120005); 湖北省自然科学基金(2012FFB00104); 湖北省教育厅科研项目(Q20111307)

[第一作者] 杨飞, 博士, 讲师, 从事分子遗传学研究, Tel: 0716-8488255, E-mail: yfwhu@163.com

[通讯作者] * 徐延浩, 博士, 讲师, 从事植物遗传学研究, Tel: 0716-8066652, E-mail: xyh09@yangtzeu.edu.cn

成和积累,即不同的环境因子如何影响中药材的基因表达和网络调控,对于弄清中药材道地性形成的机制非常必要。

表观遗传(epigenetics)是指在 DNA 序列不改变的情况下,通过 DNA 甲基化、组蛋白共价修饰等机制调控基因表达。表观遗传的一个特点就是其调控具有可逆性,赋予了基因组一定的“可塑性”,是生物体对环境应答的基础,特别是在植物逆境胁迫适应性机制中,表观遗传调控机制具有重要意义^[12-13]。表观遗传是否参与了“道地药材形成的逆境效应”是一个值得探讨的问题。

板蓝根是一味广为人知的清热解毒类中药,其主要来源为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort., 每年药材消耗量在全国范围内一直居于前几位^[14-15]。环境生态因子是否引起菘蓝基因组表观遗传的变化是一个值得探索的问题。本研究利用 MSAP 技术,研究温度变化引起的菘蓝基因组 DNA 甲基化的应答,为环境生态因子参与中药材品质形成的分子基础研究提供资料和新视角。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理 菘蓝(2n = 14)种子由第二军医大学张汉明教授惠赠。用自来水将种子冲洗干净,70%乙醇消毒 30 s,0.1% HgCl₂ 处理 3 min,

然后用蒸馏水洗 4 次;在蒸馏水中浸泡 5 h 后,置于 24 ℃ 的恒温培养箱中黑暗条件下萌发 5 d 后选取整齐的小苗移栽至花盆。材料在 25 ℃/20 ℃(白天/晚上),光照时间 12 h 的条件下培养 30 d 后,部分材料进行高温处理,其余材料接着培养。高温处理温度为 35 ℃/24 ℃(白天/晚上),其他培养条件不变,高温处理持续 14 d。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 用 CTAB 法(2% CTAB mol·L⁻¹, 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol·L⁻¹ EDTA pH 8.0, 2.8 mol·L⁻¹ NaCl)提取基因组总 DNA。粗提的 DNA 加入 RNAase A 消化过夜,用酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)抽提后用氯仿-异戊醇(24:1)抽提 1~2 次,用无水乙醇沉淀 DNA。DNA 干燥后溶于 TE 溶液。

1.2.2 MSAP 的酶切与连接 双酶切反应体系总体积 20 μL,其中 DNA 400 ng,NEB 10x buffer 2 μL, Hpa II 20 U 或 MspI 10 U, EcoRI 10 U, 100 × BSA (10 g·L⁻¹)0.2 μL。37 ℃ 温浴 5 h, 75 ℃ 10 min 中止反应。双酶切反应体系中加入 EcoRI 接头 5 pmol, Hpa II/MspI 接头 50 pmol(表 1), T4 DNA 连接酶 1 μL(NEB), ATP 1 mmol·L⁻¹。14 ℃ 水浴 12 h, 75 ℃ 10 min 中止反应。

表 1 MSAP 分析所用接头、引物序列及选择性引物组合

接头/引物	序列(5'-3')/选择性引物组合
EcoRI 接头 I	CTCGTAGACTGCGTACC
EcoRI 接头 II	AATTGGTAGGCATAC
Hpa II/MspI 接头 I	GATCATGAGTCCCTGCT
Hpa II/MspI 接头 II	CGAGCAGGACTCATGA
预扩引物(EcoRI + 0, HpaII/MspI + 0)	
EcoRI 预扩引物	GACTGCGTACCAATTC
Hpa II/MspI 预扩引物	ATCATGAGTCCCTGCTCGG
选择性引物组合(EcoRI + 3, HpaII/MspI + 3)	
Hpa II/MspI + ATC	EcoRI + TAC, EcoRI + TAG, EcoRI + TCA, EcoRI + TCT, EcoRI + TGT, EcoRI + TGA
Hpa II/MspI + ACT	EcoRI + TAC, EcoRI + TAG, EcoRI + TCA, EcoRI + TCT, EcoRI + TGT, EcoRI + TGA
Hpa II/MspI + CTT	EcoRI + TAC, EcoRI + TAG, EcoRI + TCA, EcoRI + TCT, EcoRI + TGT, EcoRI + TGA
Hpa II/MspI + TTC	EcoRI + AAC, EcoRI + AAG, EcoRI + ACT, EcoRI + ACA, EcoRI + AGT, EcoRI + ATT
Hpa II/MspI + TAA	EcoRI + AAC, EcoRI + AAG, EcoRI + ACT, EcoRI + ACA, EcoRI + AGT, EcoRI + ATT
Hpa II/MspI + TAG	EcoRI + AAC, EcoRI + AAG, EcoRI + ACT, EcoRI + ACA, EcoRI + AGT, EcoRI + ATT

1.2.3 MSAP 的预扩增、选择性扩增和电泳 预扩增使用 50 ng(3 μL)酶切连接产物作为模板,25 μL PCR 反应体系含有 0.2 μmol·L⁻¹ EcoRI 和 Hpa II/MspI 预扩增引物(EcoRI + 0, HpaII/MspI + 0)(表 1), 1 × PCR buffer, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol·L⁻¹ dNTP, 2 U Taq 酶(Fermentas)。PCR 扩增程序为 94 ℃ 3 min; 然后 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 40 s, 72 ℃

60 s 共 23 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

预扩产物用 0.1 × TE 溶液稀 20 倍,取 1 μL 作为选择扩增的模板 DNA。选择性扩增引物对采用 EcoRI + 3 个选择性碱基和 Hpa II/MspI + 3 个选择性碱基组成(表 1)。选择性扩增 PCR 反应体系和预扩增 PCR 反应体系相同。PCR 扩增程序为 94 ℃ 60 s, 接下来 94 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 每

个循环退火温度降低 0.7 ℃,执行 12 个循环;接着在 94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s 扩增 23 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。

选择性扩增扩增产物加入等体积甲酰胺变性加样液(98% 甲酰胺, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.025% 溴酚兰和二甲苯青-FF)95 ℃ 变性 5 min,迅速至于冰上。变性的 PCR 产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶(含 7.5 mol·L⁻¹ 尿素)65 W 恒功率电泳 2 h。PAGE 胶的银染按照标准程序。

1.2.4 MSAP 数据统计 为保证结果的真实可靠,每个样本进行 2 次重复实验。重复实验从 DNA 样品双酶切开始,然后进行预扩增——选择性扩增——PAGE 胶电泳——条带统计。只选取重复实验一致性强的引物组合所扩增的条带进行统计分析。每次实验都设置无 DNA 模板的阴性对照,避免样品的污染或引物二聚体扩增而得到的假条带。仅选择 PAGE 胶中部分分辨率高的条带统计,对于顶部和底部分辨率低的条带不进行统计。按照 PAGE 胶

上同一水平位置上条带的有无进行统计,有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,获得原始“0-1”矩阵。对“0-1”矩阵进行比对,分析高温胁迫前后 DNA 甲基化状态的差异。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫下菘蓝基因组 DNA 甲基模式分析 根据 MSAP 带纹模式在高温胁迫前后的对应关系,MSAP 带纹模式可以分为两个大类。第一类是没有发生 DNA 甲基化的改变(methylation additive),这一类带纹可以进一步分为未甲基化位点、单链外侧甲基化位点和双链内侧甲基化位点 3 个类型(A1-A3)。第二类是高温胁迫前后带纹模式发生改变,即 DNA 甲基化状态发生改变(methylation non-additive),DNA 甲基化状态改变的类群又可以进一步分为发生超甲基化(hypermethylation)的位点(H1-H4)和发生去甲基化(demethylation)的位点(D1-D5),见表 2。

表 2 高温胁迫前后菘蓝 DNA 甲基化模式比较

甲基化状态	类型	MSAP 带型*				甲基化改变	
		对照(CK)		高温(HT)			
		Hpa II	MspI	Hpa II	MspI		
甲基化无变化	A1	+	+	+	+	1 070	
	A2	+	-	+	-	75	
	A3	-	+	-	+	385	
	H1	+	+	-	-	39	Hyper-
甲基化改变	H2	+	+	-	+	9	Hyper-
	H3	-	+	-	-	4	Hyper-
	H4	+	-	-	-	6	Hyper-
	D1	-	+	+	+	12	De-
	D2	+	-	+	+	3	De-
	D3	-	-	+	+	4	De-
	D4	-	-	-	+	1	De-
	D5	-	-	+	-	4	De-

注: + 为有带, - 为无带;Hpa II 代表 EcoRI-Hpa II 酶切;MspI 代表 EcoRI-MspI 酶切;Hyper-代表超甲基化;De-代表去甲基化。

36 对选择性引物组共扩增得到 1 612 条清晰的条带(表 2),其中 1 070 个 CCGG 位点未发生甲基化的修饰(A1),75 个位点发生了单链外侧甲基化(A2),385 个位点发生了双链内侧甲基化(A3),这些位点在高温胁迫前后 DNA 甲基化状态没有发生改变。

共检测到 82(5.1%) 个 CCGG 位点在高温胁迫

后发生了甲基化状态的改变,其中 58(3.6%) 个位点发生了超甲基化(H1-H4),24(1.5%) 个位点发生了去甲基化(D1-D5)(表 2)。H1 类群是发生 DNA 超甲基化改变的主要类群,占到了超甲基化改变的 67.2%。去甲基化改变的主要类群是 D1,占到了去甲基化改变的 50%。此外,共检测到 21 个 CCGG 位点发生双链内侧甲基化(H2 和 D1)的改

变,3 个 CCGG 位点发生单链外侧甲基化(D2)变化的位点。由此可见,高温胁迫能引发菘蓝基因组 DNA 甲基化模式的改变,且存在着主要的 DNA 甲基化模式的改变类型,双链内侧甲基化位点发生改变的数目要比单链外侧甲基化位点数目多。

3 讨论

目前,对道地药材遗传多样性^[16]、分子鉴定、居群遗传分化及进化遗传学的研究表明道地药材与种内其他非道地药材遗传本质区别主要表现为居群内基因型频率的改变,在个体水平表现为微效多基因控制的数量遗传性状^[3]。同时,以丹参为模型,研究了道地药材形成过程中遗传与环境因子的相互作用^[17],对道地药材形成分子机制进行了部分阐明。但这些研究都没有考虑到药材形成过程中的表观遗传机制。

DNA 甲基化修饰是调控基因表达的一种重要方式。研究发现,各种环境胁迫都能导致植物基因组发生 DNA 甲基化模式、组蛋白共价修饰的改变,调节一些基因的转录,从而增强其逆境胁迫下的适应性^[12-13,18-19]。本研究发现高温能引起菘蓝基因组 DNA 甲基化模式的改变,这暗示环境生态因子可能会通过表观遗传调控机制调节中药材基因的表达,从而对其品质的形成产生影响。同时,菘蓝基因组 DNA 甲基化模式的变化到底引起了哪些基因转录改变是需要进一步研究的问题。

本研究虽然在揭示了逆境胁迫下菘蓝基因组表观遗传的部分变化,但这些是实验室的结果。只有深入比较道地与非道地产区板蓝根药材的表观遗传组的差异及其与品质的关联性,结合代谢组学^[20]等结果才能明确表观遗传修饰是否参与了道地药材形成的逆境效应理论。

[参考文献]

[1] 肖小河,陈士林,黄璐琦,等.中国道地药材研究 20 年概论[J].中国中药杂志,2009,34(5):519.
[2] 肖培根,王永炎.加速中药研究的创新步伐[J].中国中药杂志,2010,35(16):2047.
[3] 黄璐琦,郭兰萍,胡娟,等.道地药材形成的分子机制及其遗传基础[J].中国中药杂志,2008,33(20):2303.
[4] 曾燕,郭兰萍,杨光,等.环境生态因子对药用植物皂苷成分的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(17):309.
[5] 程若敏,梁晓乐,陈少容,等.药用银花环境因子特性研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2011,17

(3):232.
[6] 谷巍,巢建国,刘训红,等.安徽道地药材牡丹皮高效毛细管电泳指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):58.
[7] 邵林,郭庆梅,冉蓉,等.济南.山东不同栽培品种金银花 HPLC 指纹图谱的比较[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):117.
[8] 赵曼茜,吕金嵘,郭兰萍,等.土壤无机元素对黄芩无机元素及黄芩苷含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):103.
[9] 王甫成,时维静.不同采收年限亳白芍中芍药苷含量的变化[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):51.
[10] 郭兰萍,黄璐琦,阎洪,等.基于地理信息系统的苍术道地药材气候生态特征研究[J].中国中药杂志,2005,30(8):565.
[11] 黄璐琦,郭兰萍.环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成[J].中国中药杂志,2007,32(4):277.
[12] Boyko A, Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress response[J]. Environ Mole Mutage, 2008, 49(1): 61.
[13] Chinnusamy V, Zhu J K. Epigenetic regulation of stress responses in plants[J]. Curr Opin Plant Biol, 2009, 12(2): 133.
[14] 杨飞,李立家.菘蓝 rDNA 及端粒多色荧光原位杂交分析[J].中草药,2011,42(5):972.
[15] 刘盛,谢华,乔传卓.板蓝根药材道地性初步研究总结[J].中药材,2001,24(5):319.
[16] 李贝宁,南博,刘春生,等.道地产区甘草遗传多样性的 ISSR 分析[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):90.
[17] Yang Y, Hou S, Cui G, et al. Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Molecular Biol Rep, 2010, 37(1): 507.
[18] Yang F, Zhang L, Li J, et al. Trichostatin A and 5-azacytidine both cause an increase in global histone H4 acetylation and a decrease in global DNA and H3K9 methylation during mitosis in maize [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10(1): 178.
[19] Tsuji H, Saika H, Tsutsumi N, et al. Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice[J]. Plant Cell Physi, 2006, 47(7): 995.
[20] 苏桃,陆兔林,毛春芹,等.代谢组学与中医药现代化研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):247.

[责任编辑 邹晓翠]