

应用 RNA 原位杂交技术研究 马尾松针叶中银松素合酶的基因表达

黄庆煌^{1,2}, 叶冰莹¹, 黄国强², 郭晋隆², 陈由强^{1,2,①}, 陈如凯²

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350007; 2. 农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 以马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 银松素合酶 (PS) 基因为模板, 体外转录合成带地高辛标记的反义 RNA 全长及特异探针, 并用这 2 个探针与马尾松针叶组织石蜡切片进行原位杂交, 研究该基因在马尾松针叶中的表达特性以及外界诱导因素对该基因表达的调节特性。结果表明, 该基因的转录表达主要集中在针叶的韧皮部; 紫外线照射和酵母提取液处理均可使该基因的转录水平明显增加。

关键词: 马尾松; 银松素合酶; RNA; 原位杂交; 石蜡切片

中图分类号: Q943; Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2006)03-0012-05

Study on pinosylvin synthase (PS) gene expression in needles of *Pinus massoniana* by RNA *in situ* hybridization HUANG Qing-huang^{1,2}, YE Bing-ying¹, HUANG Guo-qiang², GUO Jin-long², CHEN You-qiang^{1,2,①}, CHEN Ru-kai² (1. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 2. Key Laboratory of Eco-physiology & Genetics Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(3): 12-16

Abstract: Using pinosylvin synthase (PS) gene of *Pinus massoniana* Lamb. as a template, synthesize DIG-labeled antisense RNA full-length and special fragment probes by *in vitro* transcription with RNA polymerases. To study expression characteristics of PS gene within *P. massoniana* needles and regulation characteristics of outside induction factors to PS gene expression, two probes prepared were utilized to hybridize with paraffin sections of needles tissue of *P. massoniana*. The result revealed that PS gene transcripts were predominant in phloem within needles. In addition, the PS gene transcription level was obviously improved by treating with yeast extract and UV radiation.

Key words: *Pinus massoniana* Lamb.; pinosylvin synthase; RNA; *in situ* hybridization (ISH); paraffin section

马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 是中国松属 (*Pinus* L.) 植物中分布最广、数量最多的主要用材树种之一, 也是南方最重要的用材树种。自 1982 年松材线虫病 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 引起的松树萎蔫病传入中国后, 造成黑松 (*Pinus thunbergii* Parl.)、马尾松等松树大量死亡, 对松林造成严重威胁。

松树防御系统产生的银松素及银松素甲基醚是最主要的 2 种内源杀线虫物质^[1], 它们又称茈菎类化合物, 是植保素的一种。而银松素合酶 (pinosylvin synthase, PS) 是合成银松素类植物抗毒素的关键酶, 以肉桂酰辅酶 A 为底物催化合成银松素。目前, 银松素合酶基因的研究主要以松科和松叶蕨科植物为主。自 1992 年 Schanz 等^[2] 从欧洲赤松 (*Pinus*

sylvestris) 中克隆出全长的 PS 基因 (PSBBS) 以来, 国外已先后在多种植物^[2-6] 中克隆出了银松素合酶基因的 cDNA, 主要研究内容涉及银松素合酶的分离、纯化及银松素合酶基因的克隆和表达、调控等, 有些研究方法和基因资源已申请专利并加以保护。

中国植物资源丰富, 银松素合酶基因资源亟待开发和利用, 但目前国内相关研究尚属空白。作者采用 RNA 原位杂交技术 (*in situ* hybridization, ISH)

收稿日期: 2006-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371177); 福建省科学技术厅资助项目 (2005N037); 卫生部卫生教育联合攻关计划项目 (JA05225/wkj2)

作者简介: 黄庆煌 (1982-), 男, 福建莆田人, 硕士研究生, 从事植物生理学和植物分子生物学研究。

① 通讯作者 E-mail: yqchen@fjnu.edu.cn

研究了银松素合酶基因在马尾松针叶组织中的分布及表达量的差异以及外界诱导因素对该基因表达的诱导特性,对开发基于银松素合酶基因发展而兴起的松材线虫防治技术具有重要的现实意义和应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

以马尾松野生幼苗(采自福州鼓山)及经酵母提取液和紫外线照射处理的幼苗为实验材料;银松素合酶基因(PS) cDNA 由本实验室克隆(1 250 bp, GenBank: DQ647828),载体 pBluescript II KS(+) (2 961 bp)为本院发育学研究室张彦定教授馈赠;大肠杆菌 *E. coli* JM109 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 实验材料的固定、包埋和制片

1.2.1.1 固定 将马尾松幼苗的根、茎和叶切成小块(长 0.3~0.5 cm),用 FAA(含 3.7% 甲醛、50% 乙醇和 5.0% 冰醋酸)固定,温和抽真空 15 min,缓慢恢复非真空(可反复操作使组织块快速下沉,固定液充分渗入),于 4℃ 固定过夜(不超过 16 h)。

1.2.1.2 包埋 梯度乙醇逐级脱水:50% 乙醇 1~2 h→60% 乙醇 1~2 h→70% 乙醇 1~2 h→85% 乙醇 1~2 h→95% 乙醇 1~2 h→无水乙醇 I 1~2 h→无水乙醇 II 1~2 h;材料透明:将组织块依次置于 V(无水乙醇):V(二甲苯)=3:1、V(无水乙醇):V(二甲苯)=1:1、V(无水乙醇):V(二甲苯)=1:3 和二甲苯中各处理 2 h,置于 V(二甲苯):V(石蜡粒)=4:1 过夜,然后用 V(二甲苯):V(石蜡粒)=1:1 60℃ 处理至少 72 h,使二甲苯全部蒸发,期间更换新蜡,最后按常规石蜡包埋程序包埋。

1.2.1.3 制片 载玻片在 1 mol·L⁻¹ HCl 中浸泡 30 min 后,用焦碳酸二乙酯(DEPC)-H₂O 和 95% 乙醇洗片,铝箔包装后置于 200℃ 烘箱中烘烤 4 h 以上,放入 0.1 mol·L⁻¹ 多聚赖氨酸(PLL)溶液(含 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0)中浸泡 30 min,室温晾干。切片厚度 10~12 μm,用 DEPC-H₂O 贴片后置于展片机上,42℃ 展片 2~5 min,45℃ 干燥过夜。

1.2.2 RNA 原位杂交

1.2.2.1 探针的制备 PS 基因全长序列(1 250

bp)和特异片段(150 bp)均正接在载体 pBluescript II KS(+)上,克隆位点为 *Sal* I/*Xba* I,两端分别有 T3 和 T7 RNA 聚合酶启动子。重组质粒转化到 *E. coli* JM109 中,经筛选得到重组菌。用小量碱法^[7]提取重组质粒,用限制性内切酶 *Sal* I 单切后纯化回收;以此为模板,用 T7 RNA 聚合酶体外转录合成反义 mRNA 探针。线性化后,经琼脂糖凝胶电泳确定其浓度及大小,配制成探针储备液,浓度为 50 ng·μL⁻¹[使用浓度为 0.1 ng·μL⁻¹(1 250 bp)或 0.5 ng·μL⁻¹(150 bp)],-80℃ 保存备用。

1.2.2.2 预处理 取出切片复温干燥至室温后经下列程序脱蜡并复水:二甲苯处理 2 次,每次 20 min;无水乙醇处理 2 次,每次 5 min;再经 95%、85%、70%、50% 和 30% 乙醇各处理 2 min 后,用 DEPC-H₂O 处理 2 次,每次 2 min;然后用 0.2 mol·L⁻¹ HCl 处理 20 min 后于 37℃ 用蛋白酶 K 消化 15 min,置于 2 mg·mL⁻¹ 甘氨酸-0.2 mol·L⁻¹ Tris 缓冲液处理 10 min 以终止蛋白酶反应,于 0.1 mol·L⁻¹ 三乙醇胺(pH 8.0)中乙酰化 10 min 后,于 2×SSC 中处理 10 min 然后经系列乙醇脱水,室温晾干。

1.2.2.3 预杂交和杂交 每切片滴加 150 μL 预杂交缓冲液(不加探针),45℃ 避光温育 2 h;去除预杂交缓冲液,预先将探针于 70℃~90℃ 变性 5 min,立即放置于冰上。每片滴加探针杂交缓冲液 100 μL,轻轻盖上硅化的盖玻片,置入盛有 2×SSC 缓冲液的湿盒内,50℃~65℃ 过夜(12~16 h)。

1.2.2.4 杂交后处理 杂交后的切片于 2×SSC 中漂洗(15 min,杂交温度,3 次),去除盖玻片,置于含 50% 甲酰胺的 2×SSC 中漂洗(15 min,45℃,2 次)→25 μg·mL⁻¹ RNase A 消化(30 min,37℃)→2×SSC(30 min,37℃)→1×SSC(30 min,42℃)→0.1×SSC(60 min,57℃,2 次)→buffer II[用含 150 mmol·L⁻¹ NaCl 和 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5)的 buffer I 加上 0.3% Triton X-100 配制而成]中漂洗(10 min,室温,2 次)。

1.2.2.5 免疫反应 切片预封阻处理:每片加 0.5 mL 2% 的封阻溶液[100 mL buffer I 溶液中含 2 g Blocking Reagent 和 10% (V/V) 牛血清,70℃ 温育 60 min],室温下封阻 1 h;去净封阻溶液,每片滴加 0.5 mL 抗地高辛抗体溶液(Anti-DIG-AP:2% Blocking solution=1:1 000),放入湿盒中,4℃ 避光

温育过夜。

1.2.2.6 免疫后处理及显色反应 室温下用 buffer II 漂洗 4 次,每次 15 min,再将切片置于 TNMT 溶液 [含 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris - HCl (pH 9.5)、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 和 0.1% Triton X - 100] 中洗涤 10 次,前 8 次每次 1 h,第 9 次过夜,第 10 次则在 TNMT 中加入 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Levamisole (左旋咪唑),以抑制内源性碱性磷酸酶的影响,有利于降低背景。每片滴加 $200 \mu\text{L}$ BM purple (Roche) 显色液, 4°C 下于避光的湿盒中温育过夜。

1.2.2.7 封片及观察 将切片于双蒸水中快速洗涤,梯度乙醇脱水 (30%、70%、95% 和 100%),二甲苯透明,树脂封片,观察。细胞组织中有蓝紫色沉淀物为阳性反应,用 OLYMPUS BX51 显微镜拍摄。

2 结果和分析

2.1 PS 基因特异片段的比对和分析

由于 PS 基因与 CHS (查尔酮合酶) 基因具有较高的相似性,为了排除 CHS 基因表达的干扰,同时也为了研究不同长度的探针对原位杂交结果的影响,作者利用 NCBI BLAST (NCBI 比对),确定 PS 基因的特异碱基序列以制备 RNA 特异探针。比对的结果是 RID: 1134788588 - 7378 - 23095969261. BLASTQ1。通过比对,发现与 PS 基因相似性非常高的序列有 7 条,其中有 5 条同为 PS 基因,另外 2 条属于芪合酶 (STS) 类,其余与 PS 基因相似性较高的主要是 CHS (查尔酮合酶) 基因,根据比对的结果,确定将 332 bp 至 482 bp 这一段碱基序列 (长度为 150 bp) 作为模板制备特异探针。

2.2 PS 基因全长序列及特异片段探针的制备

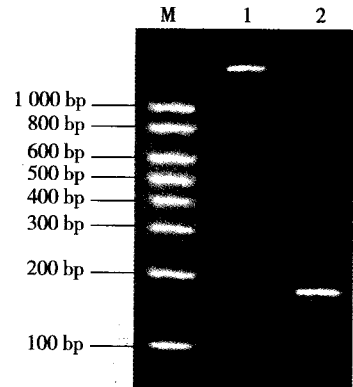
以 PS 全长序列和特异片段为模板,用 T7 RNA 聚合酶体外转录合成反义 mRNA 探针。线性化后,经琼脂糖凝胶电泳确定浓度及大小,片段大小与预期的大小一致。结果见图 1。

2.3 PS 基因在马尾松针叶横切面的原位定位

原位杂交结果显示 (图版 I),不加探针的马尾松针叶横切面原位杂交对照图 (图版 I-1) 上没有任何的蓝紫色沉淀,这说明了杂交体系的严格性,也证明了其他阳性杂交信号的可靠性。使用全长序列探针的马尾松针叶横切面杂交图杂交背景明显偏高 (图版 I-2),不利于阳性信号的判断,因此,在后期

的实验中采用了特异片段探针进行原位杂交,并取得了良好的效果。

从图版 I-3 至 I-6 中可以看出,PS 基因的表达分布于马尾松针叶的韧皮部,而其他部位,如叶肉、表皮和内皮层等均没有检测到杂交信号。另外,经紫外线照射 (图版 I-4) 和酵母提取液处理 (图版 I-5, I-6) 的马尾松针叶中 PS 基因的杂交信号明显高于未经处理的马尾松针叶 (图版 I-3)。



M: RNA Marker (1 000 bp); 1: PS 全长序列反义 RNA 探针 PS full-length antisense RNA probe; 2: PS 特异片段反义 RNA 探针 PS special fragment antisense RNA probe

图 1 马尾松银松素合酶 (PS) 基因全长及特异序列反义 RNA 探针
Fig. 1 The antisense RNA probes of full-length and special fragment of pinosylvin synthase (PS) in needles of *Pinus massoniana* Lamb.

3 讨 论

在原位杂交过程中,发现 PS 基因全长序列探针 (约 1 250 bp) 的杂交背景过高,但灵敏度较好,长序列探针的组织穿透性较差,不易通过细胞壁和包围在靶核酸外面的蛋白质,因而,可以通过适当增加蛋白酶 K 的浓度及消化时间和提高杂交后洗涤的严格性来达到较好的效果;而 PS 特异片段短序列探针 (约 150 bp) 基本没有杂交背景,但灵敏度不高,杂交显色较浅。由于短探针组织穿透性较好,易于通过细胞壁和蛋白质进入细胞内与靶核酸结合,可以通过增加短探针的浓度和显色时间来弥补其缺点。因此,在后续的实验全部采用了短探针进行原位杂交实验,并取得了较好的结果。

初步分析发现,在马尾松针叶中 PS 基因的表达主要集中在韧皮部,具有组织特异性,但马尾松其他组织,如茎、根中的 PS 表达特性还有待进一步研究。

经过紫外线照射和酵母提取液处理的马尾松针叶中 PS 基因的表达量都明显高于野生马尾松,表明该基因的转录表达具有诱导性,这与 Schanz 等^[2]人的研究结论相符。Schanz 等发现,无胁迫的欧洲赤松幼苗中无 PS 出现,而在诱导 6 h 后 PS 活性增加,并在 30 h 后达到最高活性。产生这种现象可能的原因有 2 个:一是银松素是芪类化合物,属于植物次生代谢产物。酵母提取物是一种化学成分不明的复杂营养混合物,作为生物诱导子之一,通过活化苯丙烷类途径中的关键酶,如苯氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(CA4H)和对-香豆酸-CoA 连接酶(4CL)等^[9],从而刺激植物的防御系统,诱导或促进次生代谢物的积累。二是酵母提取液中有效成分是糖类化合物^[10],其中可能包含组成真菌细胞壁的特征成分——糖蛋白,它能够作为诱导子与植物细胞膜上的受体结合,通过一系列的诱导反应诱导银松素的表达和积累。

紫外线照射作为植物抗毒诱导方法之一,已广泛应用于葡萄中芪类化合物的形态和抗病机理的研究。李景明等人的研究表明,低剂量的 UV 照射对葡萄果皮中白藜芦醇具有诱导作用,明显提高了白藜芦醇的含量^[11]。而银松素也是芪类化合物,紫外线对其很可能具有相似的诱导作用。

综上所述,PS 基因的表达很有可能是组织特异性和表达诱导性这 2 种表达特性的集中体现。

参考文献:

- [1] Fliegmann J, Schroder G, Schanz S, *et al.* Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme

- activities in stressed plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18(3): 489-503.
- [2] Schanz S, Schroder G, Schroder J. Stilbene synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*)[J]. *FEBS Lett*, 1992, 313(1): 71-74.
- [3] Schwekendiek A, Pfeffer G, Kindl H. Pine stilbene synthase cDNA, a tool for probing environmental stress[J]. *FEBS Lett*, 1992, 301(1): 41-44.
- [4] Kodan A, Kuroda H, Sakai F. A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5): 3335-3339.
- [5] Raiber S, Schroder G, Schroder J. Molecular and enzymatic characterization of two stilbene synthases from Eastern white pine (*Pinus strobus*). A single Arg/His difference determines the activity and the pH dependence of the enzymes[J]. *FEBS Lett*, 1995, 361(2-3): 299-302.
- [6] Yamazaki Y, Suh DY, Sitthithaworn W, *et al.* Diverse chalcone synthase superfamily enzymes from the most primitive vascular plant, *Psilotum nudum*[J]. *Planta*, 2001, 214(1): 75-84.
- [7] 李德葆,周雪平,许建平,等. 基因工程操作技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1996. 7-10.
- [8] Schroder G, Schroder J. A single change of histidine to glutamine alters the substrate preference of a stilbene synthase[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(29): 20558-20560.
- [9] Endress R. *Plant Cell Biotechnology* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1994. 216-223.
- [10] Funk C, Gugler K, Brodelius P. Induced secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor) [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(2): 401-405.
- [11] 李景明,马丽艳,刘艳娜. 葡萄采后紫外线(UV)处理对白藜芦醇的诱导作用[J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2004(4): 16-19.

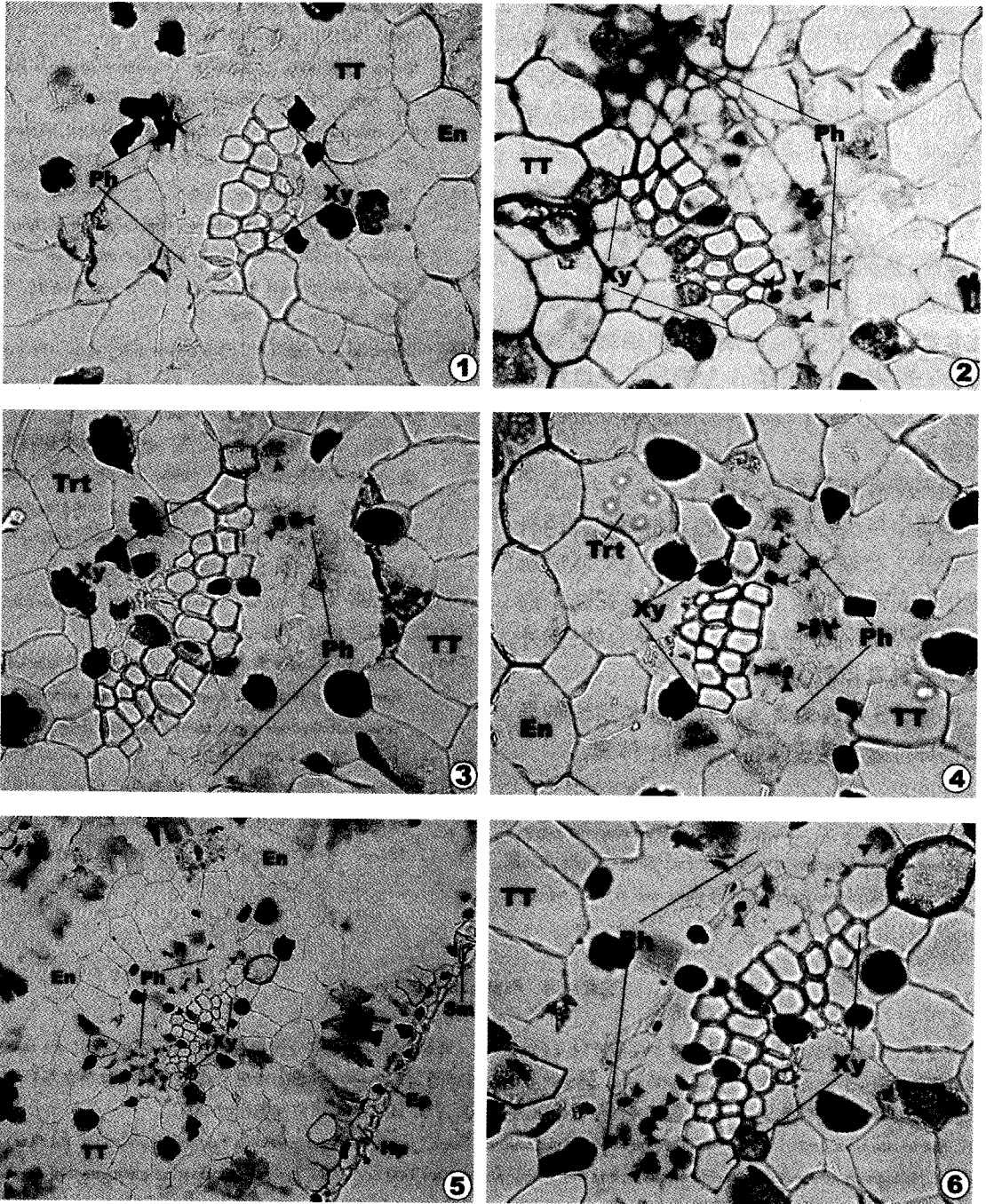
图版说明 Explanation of Plate

图版 I 1. 马尾松针叶横切面原位杂交对照图(不加探针)($\times 1\ 000$); 2. 马尾松针叶横切面全长序列探针的原位杂交图($\times 1\ 000$); 3. 马尾松针叶横切面特异片段探针的原位杂交图($\times 1\ 000$); 4. 经紫外线照射处理的马尾松针叶横切面特异片段探针的原位杂交图($\times 1\ 000$); 5. 经酵母提取液处理的马尾松针叶横切面特异片段探针的原位杂交图($\times 400$); 6. 图 5 的局部放大图($\times 1\ 000$)。

Plate I 1. The *in situ* hybridization control photograph of *Pinus massoniana* Lamb. needle transverse section (no probe added) ($\times 1\ 000$); 2. The *in situ* hybridization photograph of needle transverse section using full-length probe ($\times 1\ 000$); 3. The *in situ* hybridization photograph of needle transverse section using special fragment probe ($\times 1\ 000$); 4. The *in situ* hybridization photograph of needle transverse section treated with UV radiation using special fragment probe ($\times 1\ 000$); 5. The *in situ* hybridization photograph of needle transverse section treated with yeast extract using special fragment probe ($\times 400$); 6. Magnifying photograph of figure 5 ($\times 1\ 000$).

En: 内皮层 Endodermis; Ep: 表皮 Epidermis; Hp: 皮下层 Hypodermis; Me: 叶肉 Mesophyll; Ph: 韧皮部 Phloem; Sm: 气孔 Stoma; Trt: 转输管胞 Transfusion tracheid; TT: 转输组织 Transfusion tissue; Xy: 木质部 Xylem; 箭头指示为蓝紫色阳性着色 Arrowheads show dark purple-blue positive staining.

黄庆煌, 等: 应用 RNA 原位杂交技术研究马尾松针叶中银松素合酶的基因表达 图版 I
HUANG Qing-huang, *et al*: Study on pinosylvin synthase (PS) gene expression in needles of
Pinus massoniana by RNA *in situ* hybridization Plate I



See explanation of the end of text