

$^{60}\text{Co}\gamma$ 辐照对小麦反转录转座子 WIS2-1A 表达活性的影响

赵慧茹¹, 押辉远², 谷运红¹, 焦 湔^{1*}, 秦广雍¹

(1. 河南省离子束生物工程重点实验室, 郑州大学 物理工程学院, 河南 郑州 450052;

2. 洛阳师范学院 生命科学系, 河南 洛阳 471022)

摘要: 研究了不同剂量 $^{60}\text{Co}\gamma$ 辐照小麦种子后, 种胚在萌动的不同阶段反转录转座子 WIS2-1A 的表达活性, 分析了 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线对 WIS2-1A 表达的时间效应和剂量效应。结果表明, WIS2-1A 的表达活性随培养时间的延长而降低; 种子培养时间不同, 对于 $^{60}\text{Co}\gamma$ 辐照剂量有不同的敏感性, 相对于其他培养时间和剂量, 在种子培养 45h 受到 100 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 辐照的时候更能有效激活反转录转座子 WIS2-1A 的表达。

关键词: 小麦; WIS2-1A; $^{60}\text{Co}\gamma$ 辐照; 表达活性; 时间效应; 剂量效应

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)03-0020-03

Effect of $^{60}\text{Co}\gamma$ Irradiation on the Expression Activity of Retrotransposon WIS2-1A

ZHAO Hui-ru¹, YA Hui-yuan², GU Yun-hong¹, JIAO Zhen^{1*}, QIN Guang-yong¹

(1. Henan Province Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2. Life Science College, Luoyang Normal University, Luoyang 471022, China)

Abstract: The paper studied the transcription activity of retrotransposon WIS2-1A at different developmental stages of seeds when treated with different doses of $^{60}\text{Co}\gamma$ irradiation. The time and dose effect of $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray on the transcription of WIS2-1A were analyzed. The results showed that the transcription activity of WIS2-1A decreased with the prolonged incubation time of seeds. The sensitivity of seeds to $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray dose was different at different incubation time. The seeds after 45 hour of incubation had the highest expression activity of Retrotransposon WIS2-1A when they were irradiated with 100 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray.

Key words: Wheat; WIS2-1A; $^{60}\text{Co}\gamma$ irradiation; Transcription activity; Time effect; Dose effect

反转录转座子是真核生物界最重要的组成元件之一, 广泛存在于高等植物, 其大小占玉米整个基因组的 50% ~ 80%, 水稻的 17%, 普通小麦中达到 90% 以上^[1]。它通过 RNA 为中介进行转座, 每转座一次拷贝数就增加一份, 极大影响了基因组的大小、结构、功能和进化。小麦中反转录转座子可分为

7 个家族(Family1 ~ 7), 它们多数都处在不活动状态, 在生物或非生物胁迫下会有转座现象发生。WIS2-1A 是小麦中发现的第 1 个反转录转座子, 在小麦中广泛分布, 是 Family 6 的代表^[2]。WIS2-1A 在每个六倍体小麦基因组中约有 200 个拷贝, 在新合成六倍体小麦中具有较高活性并能稳定表达, 当

收稿日期: 2008-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(10505018)

作者简介: 赵慧茹(1979-), 女, 河南郑州人, 在读博士研究生, 研究方向: 离子束与生物相互作用。

通讯作者: 焦 湔(1976-), 女, 河南新乡人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事离子束生物工程研究。

它处于活跃状态时, 2 个长末端重复序列 LTRs 能激活侧翼基因的转录形成已知基因的有义或反义转录物造成相应基因的表达或沉默^[3]。近来还发现反转录转座子的活动或沉默与组氨酸和 DNA 甲基化的突变形有关^[4]。

⁶⁰Co γ 射线是一种高能量、长射程的诱变源, 很早就作为主要的诱变因子应用于植物辐射育种。早在 20 世纪 90 年代, 高明尉、陈秋方等^[5,6] 分别用 ⁶⁰Co γ 射线处理小麦和水稻愈伤组织, 从中发现了多种染色体倍性突变, 得到了早熟、矮秆等有益变异, 并从再生植株群体中选育出具有高产、早熟、抗病等优良性状的新品种。近年来, 国内 ⁶⁰Co γ 射线主要应用于提高产量、植株矮化、早熟和抗病等作物改良方面, 国际上主要关注于癌症相关的基因调控研究^[7], 至今缺乏和变异紧密相关的反转录转座子与诱变源 ⁶⁰Co γ 射线的直接关系的报道。

本研究首次采用不同剂量 ⁶⁰Co γ 射线辐照小麦种子, 研究种胚在萌动的不同阶段反转录转座子 WIS2-1A 的表达活性, 旨在更深入地了解反转录转座子对 ⁶⁰Co γ 射线的辐射敏感性, 掌握 WIS2-1A 的表达规律, 为诱变育种提供新的方法和思路。

1 材料和方法

1.1 材料

2007 年 6 月初从温县收获冬小麦国审小偃 81 (2003016), 单株脱粒, 从中挑选大小一致的麦粒作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 辐照 挑选 300 粒种子, 每 100 粒种子装入一个透明塑料袋, 在河南省科学院同位素研究所接受不同剂量 ⁶⁰Co γ 射线的辐照, 辐照活度为 7.4×10^{15} Bq, 辐照剂量分别为 100 Gy、300 Gy 和 500 Gy。以没有接受辐照的种子为对照。

1.2.2 RNA 提取和 cDNA 第 1 链合成 对照及处理的种子都在培养箱中进行 25℃ 的暗培养, 分别在培养的第 30 小时, 45 小时和 60 小时取材。为尽量消除个体间差异, 在每个时间点切 15 粒种胚, 用 Trizol 法 (invitrogen) 提取总 RNA。1.0 mg 总 RNA 作为模板, 随机引物为 pd(N)₉, 按照 TaKaRa 公司的 M-MLV (RNaseH-) 使用说明反转录合成 cDNA 第 1 链, 同时做不加反转录酶的对照确保没有基因组 DNA 的污染。

1.2.3 实时定量 PCR 和基因表达分析 根据 WIS2-1A (GenBank 号: X63184) 及 18s rRNA (Gen-

Bank 号: AY049040) 基因的保守区段设计特异性引物, cDNA 第 1 链产物稀释 5 倍作为模板, 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ kit (TaKaRa) 的试验说明, 在 Applied Biosystems 7500 (U. S. A.) 中进行实时定量 PCR 反应。反应过程: 95℃ 10s 预热, 紧接着 95℃ 5s, 60℃ 34s, 40 个循环, 每个样本的目标基因 WIS2-1A 和内对照基因 18s rRNA 都要做 3 个重复。每一个反应结束后为确保引物特异性和有效性要进行一个溶解曲线的分析。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算出反转录转座子 WIS2-1A 基因的相对表达量, 在图中用 log₁₀ (relative quantification) 表示。用 ANOVA 方法对相对基因表达量进行统计学分析, P < 0.05 表示显著水平, P < 0.01 表示极显著水平。

2 结果与分析

2.1 ⁶⁰Co γ 射线对 WIS2-1A 表达的时间效应

图 1 是没有经过照射的种子在 30h、45h 和 60h WIS2-1A 的基因表达情况, 分别以不同处理下 30h 的表达量作为基准, 可以清楚看到在 45h WIS2-1A 的表达量显著下降。随着种子培养时间的延长, 到 60h, WIS2-1A 的表达量继续下降。经过剂量分别为 100Gy、300Gy ⁶⁰Co γ 射线照射的种子, WIS2-1A 的表达和没有照射的种子一样随着培养时间的延长, 45h 和 60h 的表达量都比 30h 有明显下降 (图 1B、C)。而经过 500 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射后, WIS2-1A 的表达在 45h 的时候比基准 30h 的表达量明显提高, 到 60h 又大幅下降 (图 1D)。以上结果表明, WIS2-1A 的表达活性随着种子培养时间的延长而下降, 100 Gy 与 300 Gy ⁶⁰Co γ 辐射无法改变这种下降趋势, 接受较大剂量 500 Gy 照射后, 能在一定的延长时间内比如 45h 提高表达活性, 随着时间进一步延长, 到 60h, WIS2-1A 的活性进一步被抑制而无法被激活。

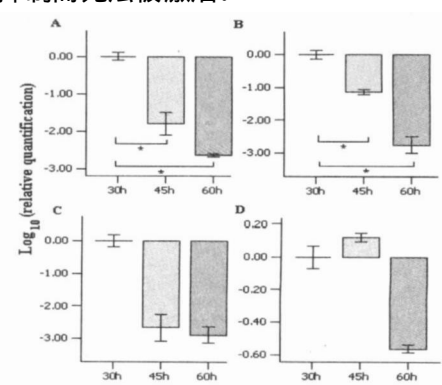


图 1 ⁶⁰Co γ 射线对 WIS2-1A 表达的时间效应

2.2 ⁶⁰Coγ 射线对 WIS2-1A 表达的剂量效应

分别以 30h、45 h 和 60h 未经过⁶⁰Coγ 射线辐照的种胚中 WIS2-1A 表达量为基准, 经过剂量分别为 100 Gy、300 Gy 和 500 Gy ⁶⁰Coγ 射线照射后 WIS2-1A 的表达变化情况表明, 30 h 与 60 h 的变化趋势基本一致, 在 300 Gy ⁶⁰Coγ 照射后, WIS2-1A 的表达略有增加, 100 Gy 与 500 Gy ⁶⁰Coγ 射线都抑制 WIS2-1A 的表达。45 h 时, 100 Gy ⁶⁰Coγ 射线刺激 WIS2-1A 的表达有较显著地提高, 随着辐射剂量增加 WIS2-1A 表达活性受到较大抑制。总体来看, 在培养的不同时间, 经过不同剂量⁶⁰Coγ 射线处理的种胚中 WIS2-1A 的表达没有规律性, 种子培养时间不同, 对于⁶⁰Coγ 辐照剂量有不同的敏感性, 相对于其他培养时间和剂量, 在种子培养 45 h 的时候似乎更能有效激活反转录转座子 WIS2-1A 的表达。

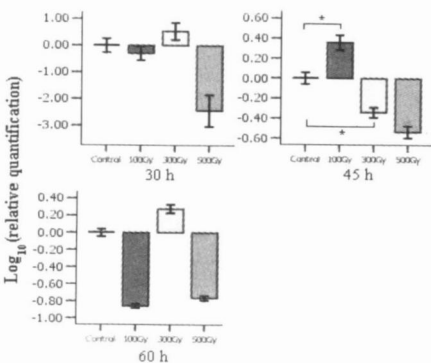


图 2 ⁶⁰Coγ 射线对 WIS2-1A 表达的剂量效应

3 讨论

⁶⁰Coγ 辐射通过线性能量传递能够引起 DNA 的改变, 但目前的研究主要停留在细胞学水平, 用于直接产生突变体或者观察生物体内代谢物质的改变, 很少见⁶⁰Coγ 射线与特定基因或者蛋白关系的报道。反转录转座子的自主复制并转座插入到基因组内的特性很容易引起遗传重组, 造成整个基因组的不稳定, 严重情况下可导致植株突变和死亡。本试验用 RT-PCR 的方法研究了不同剂量⁶⁰Coγ 射线处理的小麦种胚中 WIS2-1A 的表达情况, 发现 WIS2-1A 的表达活性随着种子培养时间延长而下降, 100 Gy 与 300 Gy ⁶⁰Coγ 辐射无法改变这种下降趋势, 较大剂量 500 Gy ⁶⁰Coγ 能在一定的延长时间内比如 45 h 内刺激 WIS2-1A 的表达有一定程度的增加, 60 h 表达又受到抑制。唐益苗等^[8]的研究表明: 小麦

中一个属于 family 4 的反转录转座子受到胁迫后 24 h 的表达量最高, 48 h 恢复原来的表达水平, 这与本试验结果一致。因此, 在较短的时间内反转录转座子的活性较高, 受到外界胁迫的情况下也更容易被激活。

本试验结果表明, WIS2-1A 在小麦种胚中有持续低水平的表达, ⁶⁰Coγ 辐照能够刺激表达增加或抑制表达。种子培养时间不同, 对于⁶⁰Coγ 辐照剂量有不同的敏感性, 在种子培养 30h 和 60h 时, WIS2-1A 的表达对 300 Gy ⁶⁰Coγ 辐照较敏感; 45 h 时, 在 100 Gy ⁶⁰Coγ 刺激下, WIS2-1A 的相对表达量达到最大值, 因此, 在培养 45 h、100 Gy ⁶⁰Coγ 辐射的条件下, 更能有效激活反转录转座子 WIS2-1A 的表达。

参考文献:

[1] McCarthy E M, Liu J, Gao L, *et al.* Long terminal repeat retro-transposons of *Oryza sativa*[J]. *Genome Biology*, 2002(3): 1—11.

[2] Matsuoka Y, Tsunewaki K. Wheat retrotransposon families identified by reverse transcriptase domain analysis[J]. *Mol Biol Evol*, 1996, 13: 1384—1392.

[3] Kashkush K, Feldman M, Levy A A. Transcriptional activation of retrotransposon alters the expression of adjacent genes in wheat[J]. *Nat Genet*, 2003, 33: 102—106.

[4] Ding Y, Wang X, Su L. SDG714, a histone H3K9 methyltransferase, is involved in Tos17 DNA methylation and transposition in rice[J]. *Plant Cell*, 2007, 19: 9—22.

[5] 高明尉, 成雄鹰. 小麦体细胞无性系变异新品种核组 8 号的选育与表现[J]. *浙江农业科学*, 1992(6): 261—263.

[6] 陈秋方, 王彩莲. 水稻花药培养辐照处理诱发突变育种研究[J]. *浙江农业学报*, 1996, 8(4): 202—207.

[7] Kim E M, Yang H S, Kang S W. Amplification of the γ-irradiation-induced cell death pathway by reactive oxygen species in human U937 cells[J]. *Cell Signal*, 2008, 20: 916—924.

[8] 唐益苗, 马有志, 李连城, 等. 小麦反转录转座子家族鉴定及其转录活性分析[J]. *科学通报*, 2005, 50(6): 546—551.