DOI:10.19789/j.1004-9398.2015.06.013

Trichostatin A 能导致小麦基因组 DNA 改变及甲基化修饰

赵 峥 黄豫谦 张飞雄

(首都师范大学生命科学学院,北京 100048)

摘 要

为了研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂的作用机制,本实验以组蛋白去乙酰化酶抑制剂 Trichostatin A 处理小麦根尖,通过随机扩增多态性 DNA 标记技术(random amplified polymorphic DNA,RAPD)和双限制性内切酶酶切-随机扩增法(Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification,CRED-RA)进行探究的结果发现,与对照组相比,处理组 10 个随机引物的 RAPD 扩增条带出现 83 条多样性差异,多样性比例达到 87.4%,同时处理组 DNA 甲基化比例增加. 本研究证实 Trichostatin A 能使小麦基因组 DNA 发生改变,并出现了表观修饰,从而从分子和表观水平探讨了该抑制剂的作用机理.

关键词: Trichostatin A,随机扩增多态性 DNA 标记技术,双限制性内切酶酶切-随机扩增法,DNA 甲基化,小麦.
中图分类号:

0 引 言

核心组蛋白的翻译后修饰在染色质的结构和功能上具有重要的作用[1]. 核心组蛋白 N-末端赖氨酸残基上的乙酰化和去乙酰化处于一种动态平衡中,由乙酰化酶(HAT)和去乙酰化酶(HADC)共同控制. 组蛋白乙酰转移酶复合物参与转录激活、基因沉默、细胞周期调控、DNA 复制、修复以及染色体组装等许多重要的生理过程[2-4].

Trichostatin A(TSA)是一种异羟肟酸类化合物,是现今研究最广泛的一类 HDAC 抑制剂,其抑酶作用较强[5]. 有研究显示 TSA 可以使克隆胚胎的囊胚质量得到显著提高[6],降低骨癌细胞 HOS 的发育能力,使其凋亡[7],并对许多癌细胞具有高效的选择性杀伤作用[8]等. 在植物中,TSA 可以调控基因的表达[9,10],影响单倍体胚胎发育[11]以及有丝分裂[1]. 而该抑制剂能否引起植物基因组 DNA 发生改变以及一些表观修饰等尚不清楚.

随机扩增多态性 DNA 标记技术(random amplified polymorphic DNA,RAPD)是在 PCR 基础上建立的一种对整个未知序列的基因组进行多态性分析的分子技术. 被广泛应用于构建遗传图谱、品种鉴定、亲缘关系分析、基因定位、遗传育种[12,13]. 不同种的生物基因组 DNA 不同,经过 RAPD 得到的扩增条带也就会有差异,因而可以通过条带的差异,即多样性的条带来检测基因组 DNA 的变化. DNA 复制后修饰的一个重要方面就是某些碱基位点的甲基化[14]. 它在调控基因的表达、参与不活跃染色质(inactive-chromatin)的形成、影响染色质结构、基因组印迹(genomic imprinting)和导致 DNA 多态性上具有重要的作用[14]. 双限制性内切酶酶切-随机扩增法(Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification,CRED-RA)常被用作检测表观遗传变化的分子标记. 当序列中外部的胞嘧啶发生甲基化时,*MspI* 和 *HpaII* 都不能进行切割. 但当序列中内部胞嘧啶发生甲基化时,*MspI* 可以进行切割,而 *HpaII* 则不行. 因此可以根据两种酶酶切产物的扩增条带数量来判断基因组甲基化水平的变化.

本文用 TSA 处理培养的小麦根尖,运用 RAPD 和 CRED-RA 技术对 TSA 处理后小麦基因组 DNA 的变化和甲基化水平的改变进行了分析.

1 材料和方法

1.1 实验材料的处理及 TSA 的制备

本实验使用的是普通小麦(*Triticum aestivum* L.)品种 CB037-A,由本学院晏月明教授提供. 挑选

收稿日期: 2014-12-04

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

大小相同、籽粒饱满的种子浸泡于蒸馏水中吸水约 1 h 后,转入铺有润湿滤纸的培养皿中,于 23 ℃ 避光培养萌发. 待种子露白时,将其分别转入 0、40、80、120 μM TSA(Selleckchem 公司产品,DMSO 溶解配制) 溶液中避光处理 24 h.

1.2　DNA 提取及 RAPD 分析

1.2.1　DNA 提取

切取小麦根尖,按照康为世纪公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒(CW0553) 说明书的要求提取基因组 DNA. 产物保存于 -20 ℃.

1.2.2　RAPD 分析

参考 Azimi、Masood 等人文献中的 RAPD 随机引物挑选 10 种引物,分别为 OPA-05、OPA-10、OPD-05、OPJ-01、OPK-08、OPO-05、A. z-09、S32、S126、S127,用于实验研究(引物由上海生工合成,序列见附录) . PCR 反应体系: 10 × PCR buffer (with Mg2 +) 2 μL, dNTP mix 0.2 mM,Taq 酶 1 U,10 bp 随机引物20 pmol, DNA 模板 10 ng,用 Milli Q 水补齐至 20 μL. PCR 反应程序: 94 ℃ 预变性 5 min,再以94 ℃ 变性 1 min、36 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 2 min 循环 40 次,最后以 72 ℃ 再延伸 10 min. PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,以 Bio Rad 公司的电泳成像系统检测拍照.

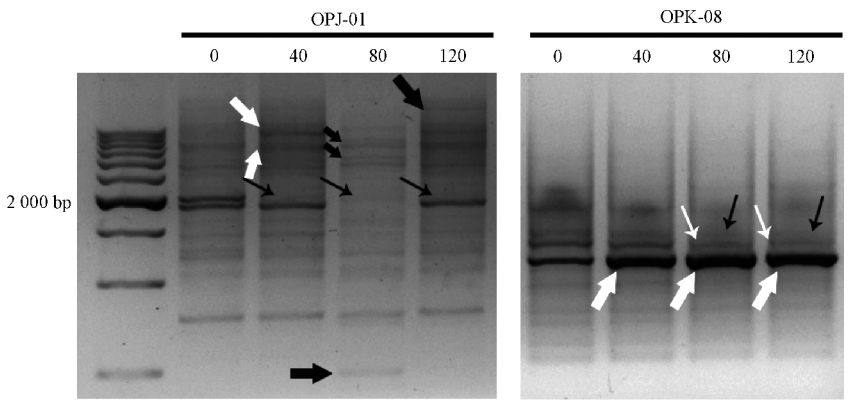
1.3　CRED-RA 分析

取 1 μg 基因组 DNA 分别用 1 μL *HpaII* 和 1 μL *MspI* 酶切(37 ℃) 1 h. 使用艾德莱公司的酶切产物纯化试剂盒(DR02) 对酶切产物进行纯化,操作按照说明书进行. PCR 反应体系: 10 × PCR buffer(with Mg2 +) 2 μL,dNTP mix 0.25 mM,Taq 酶 1 U,10 bp 随机引物 20 pmol,DNA 模板 15 ng,用 Milli Q 补齐至 20 μL. PCR 反应程序: 94 ℃ 预变性 5 min,再以 94 ℃ 变性 1 min、36 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 2 min 循环 45 次,最后以 72 ℃ 再延伸 10 min. 电泳分析方法与 1.2.2 相同.

2　结　果

2.1　TSA 对小麦根尖细胞基因组 DNA 的影响

对照及 TSA 处理的小麦根尖基因组 DNA 分别用上述引物扩增,电泳结果揭示二者在条带的数量和明暗程度上都有一定程度的差别(图 1) . 统计发现,10 种随机引物,对照组 DNA 共扩增出 95 条带,处理组条带与对照组相比有 83 个多样性条带(增加、减少、变亮或变暗的条带) ,多样性比率达到 87.4%. 而且 40 μM、80 μM、120 μM TSA 的处理组分别扩增出 23、28、32 条多样性条带,即按 TSA 的处理浓度梯度呈上升趋势(见表 2,a + b + c + d) . 其中引物 OPJ-01 的扩增产物与对照组相比多样性条带最多(见图 1) ,有 4 条增加的条带(黑色粗箭头所示) ,3 条减少的条带(黑色箭头所示) ,还有 2 条变亮的条带(白色粗箭头所示) . 引物 S32 的多样性条带也比较多,共增加了 2 个条带、减少 3 个条带,还有 1 个增亮的条带和 3 个变弱的条带. OPK-08 有 2 个消失的条带,还有 2 个条带变暗了、3 个条带变亮了(见图 1) . OPO-05 与对照相比减少了 3 个条带,但其他条带在亮暗上没有显出任何差异. S127 虽然只有 120μM 下减少 1 个条带,但其有 5 个条带变亮,7 个条带变暗. A. z-09 也是只有 2 个条带减少,但一共有 13 个条带变暗了. S126 增加了 4 个条带,减少 1 个,还有 3 个条带亮暗与对照组比有变化. OPD-08 只有 120 μM TSA 下减少了一个条带,另外还有 7 个条带变暗了. 最后 OPA-05 和 OPA-10 在数量上与对照组比较没有任何差异,只有个别几个条带在亮暗上有细微变化(见表 1、表 2) .



注: 最左侧为500bp DNA ladder。图中黑色细箭头所示为减少的条带; 黑色粗箭头为增加的条带。白色箭头为亮度变暗的条带, 白色粗箭头为亮度变亮的条带。

图 1　不同浓度 TSA 处理的小麦根尖细胞基因组 DNA 以 OPJ-01 和 OPK-08 为引物的 RAPD 电泳图谱

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 不同浓度 TSA 处理的小麦与对照组的基因组 DNA 的 RAPD 条带的数目比较

TSA 浓度(μM)	0	40		80		120	
引物		a	b	a	b	a	b
OPA-05	8	0	0	0	0	0	0
OPA-10	7	0	0	0	0	0	0
OPD-08	7	0	0	0	0	1	0
OPJ-01	13	0	1	3	1	1	1
OPK-08	10	0	0	0	1	0	0
OPO-05	7	0	1	0	1	0	1
A. z-09	10	0	1	0	0	0	1
S32	12	0	0	1	3	1	0
S126	9	2	0	1	0	1	1
S127	12	0	0	0	0	0	1
总计	95						
a + b		5		11		9	

注: a 表示增加条带,b 表示减少条带.

表 2 不同浓度 TSA 处理的小麦与对照组的基因组 DNA 的 RAPD 条带的明暗比较

TSA 浓度(μM)	0	40		80		120		总计
引物		c	d	c	d	c	d	
OPA-05	8	0	1	1	0	1	1	
OPA-10	7	1	0	1	0	1	0	
OPD-08	7	0	2	0	2	0	3	
OPJ-01	13	2	0	0	0	3	0	
OPK-08	10	1	0	1	3	1	1	
OPO-05	7	0	0	0	0	0	0	
A. z-09	10	0	5	0	4	0	4	
S32	12	0	1	0	1	1	1	
S126	9	1	0	1	0	0	1	
S127	12	1	3	2	1	2	3	
总计	95							
c + d		18		17		23		58
a + b + c + d		23		28		32		83

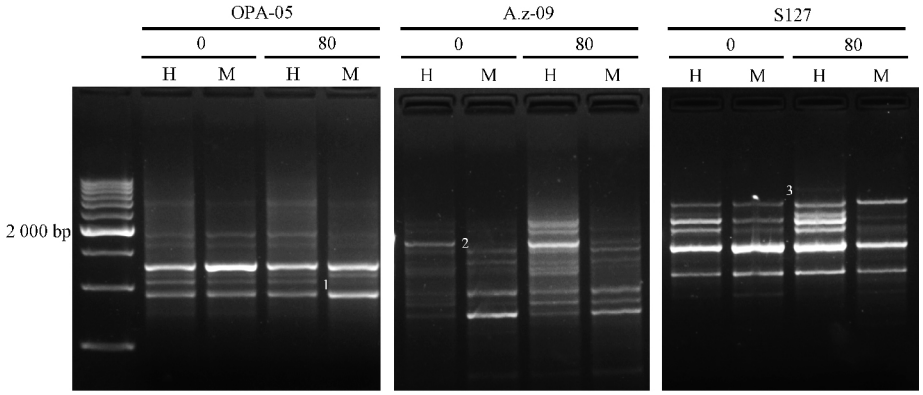
注: c 表示变亮条带,d 表示变暗条带.

总之,除了引物 OPA-05、OPA-10 外其他引物均出现了条带的增加或减少(见表 1). 同样,亮度变化的条带在所有 10 个引物中都有出现(见表 2).

2.2 TSA 对小麦根尖细胞基因组 DNA 甲基化的影响

根据 CRED-RA 技术的原理,本研究用限制性内切酶 *Msp*I 和 *Hpa*II 分别对小麦基因组 DNA 进行酶切,酶切产物扩增结果见图 2. 图中一共有三种类型的条带(1,2,3),OPA-05 扩增条带中的类型 1 条带表示在处理组中只被限制酶 *Msp*I 切割; 在对照组中则两种酶都没有进行切割,说明此处的外部甲基化转变为了内部甲基化(见图 2). 在 A. z-09 的扩增产物中,类型 2 的条带表示对照组的 *Msp*I 酶切产物减少一条条带,而处理组中两种酶都没有切割,说明在这一区域出现了外部甲基化. 最后类型 3 的条带表示 S127 的扩增产物中对照组被两种酶都能切割,而处理组中只有限制酶 *Hpa*II 没能切割. 这说明 DNA 从没有甲基化变为出现外部甲基化修饰.

由此看来,经过 TSA 处理后的小麦根尖细胞基因组 DNA 甲基化水平得到增加。



注:H为以HpaII酶切产物作为模板的扩增结果,M则为以MspI的酶切产物作为模板。

图 2 以 OPA-05、A. z-09 作为引物的 CRED-RA 电泳图谱

3 讨 论

组蛋白的去乙酰化与转录激活、DNA 甲基化等生理过程有着密切的联系. 在动物细胞中 DNA 的甲基化序列与低乙酰化是相关连的[15]. 去乙酰化作用普遍出现在转录抑制系统中[16]. 为了深入探讨组蛋白去乙酰化作用,人们采用去乙酰化酶抑制剂开展研究. 研究表明,去乙酰化酶抑制剂会诱导分化、抑制细胞增殖、导致细胞死亡[17] 等. TSA 是现今研究最广泛的一类 HDAC 抑制剂,其抑酶作用较强[5]. TSA 在动植物中都会影响调控基因的表达,但其对于植物基因组 DNA 改变及表观修饰的影响还不

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

清楚.

本文用 TSA 处理小麦种子,在发现小麦根长生长受到一定抑制的基础上,通过 RAPD 技术发现对照组基因组 DNA 共扩增出 95 个条带,三个处理组的多样性条带一共为 83 个,多样性比率达到 87.4%;仅 120μM TSA 处理组的多样性条带就有 32 个,多样性比率达到 33.7%. 三个处理组之间的多样性条带数量也随着 TSA 浓度的增加而增加. 有 8 个引物的处理组都出现了条带的增多或者减少. 这些结果都说明 TSA 对于小麦基因组 DNA 有较大的影响. 虽然 HDAC 抑制剂影响的是组蛋白的乙酰化水平,不会影响 DNA 序列,但我们推测其可能影响了某些基因的转录激活以及 DNA 的复制和修复,导致其子细胞的基因组 DNA 发生变化.

CRED-RA 是一种常用的检测 DNA 甲基化的分子标记. 从图 2 中可以看出经过 TSA 处理的小麦基因组的 DNA 甲基化水平发生了变化,其中类型 1 条带和类型 3 条带说明有外部甲基化转变为内部甲基化以及从无甲基化变为有甲基化,而条带类型 2 是增加了外部甲基化. 因此整体结果为 DNA 甲基化的增加. 由于 DNA 甲基化会导致沉默基因,抑制转录活性[18],这也就很容易解释为什么 TSA 处理使得小麦根尖细胞的生长受到抑制.

本研究首次从分子和表观水平上探讨了 TSA 的作用机制.

附录:

10 种随机引物序列

引物名称	引物序列
OPA-05	5′-AGGGGTCTTG-3′
OPA-10	5′-AGGGGTCTTG-3′
OPD-08	5′-AGGGGTCTTG-3′
OPJ-01	5′-CCCGGCATAA-3′
OPK-08	5′-CCCGGCATAA-3′
OPO-05	5′-CCCGGCATAA-3′
A. z-09	5′-CCCGGCATAA-3′
S32	5′-CCCGGCATAA-3′
S126	5′-CCCGGCATAA-3′
S127	5′-CCCGGCATAA-3′

4　结　论

本实验通过 RAPD 技术和 CRED-RA 技术探究组蛋白去乙酰化抑制剂 TSA 对小麦根尖细胞基因组 DNA 影响和甲基化的修饰,结果表明: TSA 使得小麦根尖细胞基因组 DNA 序列发生了变化,并导致 DNA 甲基化水平升高.

参　考　文　献

[1] Li Y, Butenko Y, Grafi G. Histone deacetylation is required for progression through mitosis in tobacco cells [J]. The Plant Journal, 2005, 41(3): 346 – 352.

[2] Mai A, Rotili D, Tarantino D, et al. Identification of 4-hydroxyquinolines inhibitors of p300/CBP histone acetyltransferases [J]. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2009, 19(4): 1132 – 1135.

[3] Kikuchi H, Nakayama T. GCN5 and BCR signalling collaborate to induce pre-mature B cell apoptosis through depletion of ICAD and IAP2 and activation of caspase activities [J]. Gene, 2008, 419(1): 48 – 55.

[4] Tan Y M, Huang W Y, Yu N F. [Structure-activity relationships of histone deacetylase inhibitors] [J]. Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica, 2009, 44(10): 1072 – 1083.

[5] Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, et al. Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357 [J]. Journal of hepatology, 2005, 42(2): 210 – 217.

[6] Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer [J]. Biology of Reproduction, 2006, 74(6): 1083 – 1089.

[7] Roh M S, Kim C W, Park B S, et al. Mechanism of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induced apoptosis in human osteosarcoma cells [J]. Apoptosis, 2004, 9(5): 583 – 589.

[8] 舒广文, 宋建国. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制 [J]. 生命的化学, 2012, 31(6): 765 – 771.

[9] Tian L, Chen Z J. Blocking histone deacetylation in Arabidopsis induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(1): 200 – 205.

[10] Hu Y, Zhang L, Zhao L, et al. Trichostatin A selectively suppresses the cold-induced transcription of the ZmDREB1 gene in maize [J]. PloS one, 2011, 6(7): e22132.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[11] Li H, Soriano M, Cordewener J, et al. The Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Promotes Totipotency in the Male Gametophyte [J]. The Plant Cell Online, 2014, 26(1): 195 - 209.
[12] 邢秀芹. RAPD 技术的应用 [J]. 食品科技, 2010 (12): 314 - 316.
[13] Wang B, Sun B. Improvements of RAPD technique and its applications on wheat genetics and breeding research [J]. Journal of agricultural biotechnology, 1996, 5(3): 227 - 233.
[14] 张才喜,李载龙,陈大明. CRED-RA-检测 DNA 甲基化的新方法 [J]. 生物技术, 1997,7 (3):35 - 36.
[15] Tazi J, Bird A. Alternative chromatin structure at CpG islands [J]. Cell, 1990, 60(6): 909 - 920.
[16] Hui Ng H, Bird A. Histone deacetylases: silencers for hire [J]. Trends in biochemical sciences, 2000, 25(3): 121 - 126.
[17] Cress W D, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer [J]. Journal of cellular physiology, 2000, 184(1): 1 - 16.
[18] Messerschmidt D M, Knowles B B, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos [J]. Genes & development, 2014, 28(8): 812 - 828.

Trichostatin A Can Induce Wheat Genomic DNA Change and Methylation Modification

Zhao Zheng Huang Yuqian Zhang Feixiong

(College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048)

Abstract

In this paper, wheat (Triticum aestivum L.) seeds was treated with Trichostatin A, a specific inhibitor of histone deacetylase. It was shown by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) with 10 random primers that here were 83 polymorphic bands in the treating groups compared to the controls. The polymorphic ratio reached 87.4%. Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification (CRED-RA) analysis indicated that DNA methylation increased in treatment groups. Our results demonstrate that Trichostatin A can not only change the wheat genomic DNA, but also increase the epigenetic modification and provide direct evidence on the mechanism of Trichostatin A function from molecular and epigenetic levels.

Key words: Trichostatin A, random amplified polymorphic DNA markers, coupled restriction enzyme digestion-random amplification, DNA methylation, wheat.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net