

文章编号: 1007-4627(2011)04-0479-06

α 粒子辐照诱导拟南芥早期远程表观遗传改变研究*

徐淑艳, 李方华, 王婷, 卞坡[#], 吴跃进

(中国科学院离子束生物工程学重点实验室, 中国科学院合肥物质科学研究院

技术生物与农业工程研究所, 安徽 合肥 230031)

摘要: 由于低能离子较低的组织穿透能力, 其诱变机理一直是研究者争论的问题。近年来, 本课题组的一系列研究工作已经证明在植物中存在辐射远程(诱变)效应, 从一个新的角度解释了低能离子的诱变机理, 然而依然无法解释低能离子辐照中的许多独特生物现象, 而这些现象均具有明显的表观遗传学特性。以表观遗传学最具标志性特征的胞嘧啶甲基化为研究对象, 以 α 粒子-拟南芥根辐照实验体系作为研究平台, 检测了远程组织(器官)甲基化相关基因 *AtDML3* 的表达及特定基因片段的甲基化水平。研究证实, 在植物个体水平辐射可以诱导远程表观遗传的变化, 为进一步探索低能离子的诱变机理提供了新的思路。

关键词: 辐射诱导的远程表观遗传效应; 甲基化; *AtDML3* 基因

中图分类号: Q947.9

文献标志码: A

1 引言

20 世纪 80 年代, 低能离子辐照的诱变效应被发现。经过 20 多年的发展, 在农作物、工业微生物诱变育种方面取得了不菲的成绩, 并在国内外获得了普遍的接受和认可^[1-2]。然而, 低能离子的诱变机理一直存有争论、甚至受到质疑。其原因是低能离子能量低、穿透能力有限, 当辐射“靶”为植物种子时, 一般认为不能直接作用到胚胎内部的茎尖生长点细胞(Shoot Apical Meristem, 简称 SAM)^[3]。最初的研究主要是从低能离子与生物体作用的原初物理过程去解释低能离子的诱变机理, 相继提出了“离子通道”和“次级粒子”等理论^[4-7]。近年来, 研究人员已经开始在生物层面上研究低能离子的诱变机理: 杨根等使用质子微束辐照拟南芥胚胎的 SAM 细胞, 发现未受辐照根尖生长点(Root Apical Meristem, 简称 RAM)的发育受到了显著抑制^[8]; 使用 30 keV 的 ⁴⁰Ar⁺ 辐照完整的拟南芥种子非生长点细胞, 同样可以引起未受辐照的 SAM 和 RAM 细胞的生长发育和分化抑制^[9]; 李方华等使用 α 粒子辐照拟南芥幼苗根部, 在未受直接辐照

的地上部分也检测到同源重组频率(Homologous Recombination Frequency, 简称 HRF)的增加和 *AtRAD54* 表达水平的上调^[10-11]。以上结果证明了植物个体中辐射远程(诱变)效应的存在, 从一个新的角度解释了低能离子的诱变机理。

尽管在植物个体水平上的辐射远程遗传效应可以解释低能离子的局域性辐照和诱变效应之间的关系, 但是依然无法解释在低能离子辐照中的一些独特生物现象, 如广泛、丰富的当代突变表型和后代个体中变异性状的丢失(非孟德尔遗传模式)^[12], 辐照当代反转录转座子增加的转录和转座活性^[13], 辐照后期个体和子代中增加的基因组不稳定性等^[10, 14], 而这些现象均具有明显的表观遗传学特征。作为经典遗传学的一个重要补充, 表观遗传是指在 DNA 序列不变前提下, 对基因表达和调控进行的可遗传修饰。与 DNA 序列变异的随机性相对应, 表观遗传变化的重要特征是可以 DNA 甲基化或 SiRNA 调控, 可以同时开放(上调)或关闭(下调)等位基因的表达, 使特定性状(检测终点)发生一致性、群体性的改变。Sedelniko 等使用微束定点

* 收稿日期: 2011-03-21; 修改日期: 2011-04-08

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10705029); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KJXC2-YW-N34)

作者简介: 徐淑艳(1984—), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 从事植物表观遗传学研究; E-mail: xufy777@126.com

通讯联系人: 卞坡, E-mail: bianpo@ipp.ac.cn

照射体外重建的人体三维组织,在未受直接照射的旁区组织检测到了 H2AX 磷酸化的增加和基因组 DNA 甲基化程度的降低,该研究首次证明辐射可以引起远程表观遗传学的变化^[15];随后, Koturbash 等使用 X 射线辐照小鼠的部分皮肤组织后,在远端未受直接照射部位检测到了基因组水平表观遗传的改变和 Line-1 基因 CCGG 序列甲基化的持续丢失^[16-17],证明了动物个体水平辐射诱导的远程表观遗传改变。到目前为止,植物个体水平辐射诱导的远程表观遗传变化尚未见报道。在李方华等研究中,低能离子辐照拟南芥菜种子不仅引起辐照当代(S0 代)植株 HRF 的增加,而且在子代(辐照当代植株自交产生的种子发育来的, S1 代)植株同样可以检测到的 HRF 的上升^[18]。对高等植物来说,植株由来自亲本的精子和卵细胞受精而形成的受精卵发育而来,因为精子和/或卵细胞发生突变而引起后代 HRF 群体性增加几乎是不可能的,因此 S1 代 HRF 的增加通常认为源自表观遗传的变化^[19]。该结果表明,在高等植物个体水平也可能存在辐射诱导的远程表观遗传效应,但尚缺乏直接证据。更为重要的是,研究表明,辐射诱导远程效应的本质是表观遗传学的变化,即辐射损伤在旁区组织(未受直接照射)中产生的主导效应是表观遗传学的改变,而其他效应,如诱变、基因组不稳定性、基因的表达和抑制、生长发育的变化等都是表观遗传变化的一系列下游事件^[20-21]。因此,研究植物个体水平辐射诱导的远程表观遗传学变化对进一步理解低能离子的诱变机理具有重要意义。

本文主要以前期创建的 α 粒子-拟南芥菜局部根辐照实验体系为研究平台^[10, 14, 18],以表观遗传最有标志性的 DNA 甲基化为研究对象,研究拟南芥菜局部根辐照后,远程未辐照部分甲基化相关基因 *AtDML3* 的表达水平和一些特定 DNA 片段的甲基化变化情况,证实了在植物个体水平辐射远程表观遗传学效应的存在。

2 实验材料和方法

2.1 实验材料和生长条件

(1) 实验材料。哥伦比亚生态型野生型拟南芥菜 N1092,购自诺丁汉拟南芥菜种质中心(Nottingham Arabidopsis Stock Centre, 简称 NASC); 拟南

芥菜 *AtDML3::GUS* 转基因系(Columbia 生态型),由 Dr. Teresa Roldan-Arjona(Departamento de Genetica, Universidad de Cordoba, Spain)惠赠^[22]。

(2) 生长条件。将消毒的无菌拟南芥菜种子点播在 MS 培养基上(1% 蔗糖, 0.8% 琼脂, MS 盐), 4 °C 春化 48 h 后放置于光照培养箱竖直培养,培养条件为温度(22±1)°C,光照周期,光 16 h/ 暗 8 h,光强约 100 $\mu\text{Mm}^2/\text{s}$ 。

2.2 α 粒子局部根辐照实验

(1) 辐照装置。所用辐照装置为中国科学院离子束生物工程学重点实验室 α 粒子旋转辐照装置(放射源为 ²⁴¹Am, 活性为 7.4 MBq, 平均能量为 3.3 MeV, 剂量率为 0.804 cGy/s; 辐照在特制的圆环中进行,圆环的直径大约为 45 mm,底部固定有一层 3.5 μm 的 Mylar 膜,部分 Mylar 膜使用锡箔纸覆盖(厚度约为 0.5 mm,用于屏蔽 α 粒子),仅在中央部位留有 7 mm 未被遮挡狭缝,以实现对拟南芥菜幼苗特定部位的辐照^[23]。

(2) 辐照步骤。将萌发 5 d 的幼苗从 MS 培养基上转移到 Mylar 膜上,并保证根部位于辐照窗口上方,而子叶端被铝箔完全屏蔽。为了防止辐照过程中小苗水分散失,在幼苗地上部分的上方和下方各放置一层湿润的滤纸。辐照剂量为 10 Gy(约需 20.7 min),辐照完成后,在辐照幼苗的圆环中加入少量的无菌水(大约 1 mL)以便于小苗从 Mylar 膜上取下。将辐照后的拟南芥菜幼苗重新移到 MS 培养基上培养。

2.3 GUS 活性定量检测

将拟南芥菜幼苗的下胚轴和根部移去,剩余部分(真叶、子叶和部分茎)每 5 个一组放入 2.0 mL 的 eppendorf 管中,加入 1000 μL 的 4-MUG 反应液(1 mM 4-MUG, 50 mM sodium phosphate buffer, pH7.0, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, Sigma), 37 °C 水浴 30 min 后,加入 500 μL 1M 的 Na_2CO_3 溶液终止反应。每个样品 10 组,检测时每组样品取 100 μL 反应液加入 96 孔板的酶标板中,酶标仪检测荧光强度(激发光波长 365 nm,发射光波长 455 nm)^[24]。

2.4 半定量 RT-PCR(Semi-quantitative RT-PCR)

半定量 RT-PCR 的具体方法参照之前的研

究^[25]。所采用的 *AtDML3* 基因的特异性引物为 PF1: GCGATTTGGCAACCAGGTGAAACATC 和 PR1: CCCTGTCCAAAAGCAAAGT-TCAATCCG。以 tubulin 为内标, 所用引物序列 PF2: CGTGGATCACAGCAATACAGAGCC 和 PR2: CCTCTGCACTTCCACTTCGTCTTC。内标 tubulin 和 *AtDML3* 采用的循环数分别为 25 和 33。PCR 产物以 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2.5 辐照后远端组织甲基化水平检测

以哥伦比亚生态型野生型拟南芥菜 N1092 为实验材料, 采用重亚硫酸盐修饰后测序法(bisulfite sequencing)^[26]检测拟南芥菜远端未受直接辐照组织的甲基化水平。具体为:对萌发后 5 d 的拟南芥菜幼苗进行 α 粒子局部根辐照, 辐照后第 3 d 提取地上部分基因组 DNA, 使用 EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, USA) 试剂盒对基因组 DNA 进行修饰, 然后经 PCR 扩增出目的片段, 进行 T-A 克隆, 每个样本均随机至少挑选 10 个阳性克隆, 用通用引物 M13R 进行测序。之后采用 DNAssist 软件和 Kismeth 软件^[27]进行数据分析。分析的目标序列为 *Ta3*, *At5g35210* 和 *At5g01580*。*Ta3* 为转座子相关基因序列, 后两者为结构基因序列。PCR 扩增所用引物^[28]: *Ta3* 的引物为 Primer F4: GAAGTTTGTGTGTGAATYAAAGA 和 Primer R4: CTTACACCACACATTTACATCAA; *At5g35210* 的引物为 PF5: ATTGGGATGAAAT-TGAAGATT; PR5: CTAATTCCAACAAATRCAAAACAAATT; *At5g01580* 的引物为 PF6: ATGTAATGGTATTTGGGATATTATAAA 和 PR6: CCAAGTTTTRCTATTCCAAT CACTAA; PF7: GTGTAGAAAYGAATTGGA GAGGAG 和 PR7: AACATTARTTA ACTTATACARCCAAC A; PF8: AT TAGYTTAATTTATAGGA 和 PR8:CTTAATCTCATCCATTRATCTCCA。

3 实验结果

3.1 α 粒子局部根辐照引起远程 *AtDML3* 基因表达水平升高

为分析 α 粒子辐照引起的远程表观遗传变化, 以 *AtDML3::GUS* 转基因系拟南芥菜为材料, 分析了 α 粒子辐照拟南芥菜根部后, 未受照射的地上

部分 *AtDML3* 的表达情况, 局部辐照示意图如图 1。

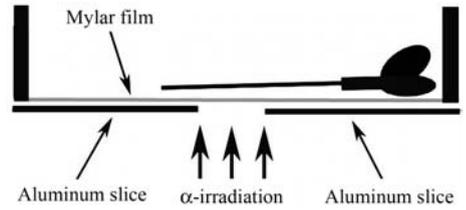


图 1 拟南芥菜根部 α 粒子局部辐照示意图

以 10 Gy 的 α 粒子辐照拟南芥菜幼苗根部, 6 d 后检测地上部分 GUS 活性(代表 *AtDML3* 基因的表达水平)表达情况。结果表明, 10 Gy α 粒子辐照后, 远程未辐照部分 *AtDML3* 基因的表达水平上调, 为对照样品 (0 Gy) 的 1.24 倍 ($P < 0.05$), 如图 2(a) 所示。

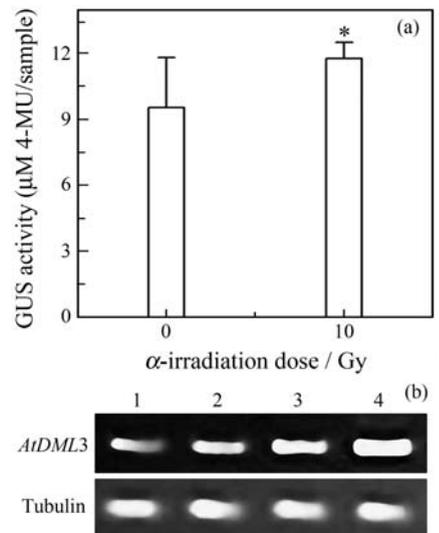


图 2 α 粒子辐照拟南芥菜根部后远程 *AtDML3* 表达水平的上调

(a) α 粒子辐照拟南芥菜根部后, 地上部分 GUS 活性定量分析; (b) RT-PCR 方法分析 *AtDML3* 转录水平, 1 号泳道为对照组转录情况, 2, 3, 4 号泳道分别为辐照后 2, 12, 24 h 的转录情况。实验数据均采用平均值 (Mean) \pm 标准偏差 (Standard Deviation, 简称 SD) 的方式表示。利用 *t* 检验进行统计学意义分析。当 $P < 0.05$ 时, 视作差异显著, 以 * 表示。

作为并行实验, 我们也使用半定量 RT-PCR 方法直接分析辐照后 *AtDML3* 基因的表达。分别于局部根辐照后 2, 12 和 24 h 提取拟南芥菜未辐照的地上部分总 mRNA, 进行 RT-PCR 扩增。与对照相比, 辐照样随着时间延长, *AtDML3* 基因的表达水平具有明显的上调趋势, 如图 2(b) 所示。

这一结果进一步说明了 α 粒子辐照拟南芥根部可以引起远程地上部位 *AtDML3* 基因表达水平的上调。

3.2 α 粒子局部根辐照引起远程甲基化水平改变

以上结果表明, α 粒子辐照拟南芥根部引起的地上部分 *AtDML3* 基因表达水平的上调。我们又通过重亚硫酸盐修饰后测序方法直接分析了逆转录转座子 *Ta3* 及结构基因序列 *At5g35210* 和 *At5g01580* 的甲基化水平和模式的改变。结果显示, 以 α 粒子对拟南芥菜的根部辐照后, 未受直接辐照的地上部分显示了不同程度的甲基化水平和模式改变, 如图 3 所示。对于逆转录转座子 *Ta3* (CG, CHG 和 CHH) 位点的甲基化水平分别由 93.33%, 57.77%, 18.16% 变为 97.00%, 53.33%,

17.30%, 甲基化整体水平降低了 0.96% [图 3(a)]; 对于 *At5g35210* CG 位点甲基化水平由 63.33% 降低为 61.11%, 而 CHG 和 CHH 位点非别由 0.62%, 0.78% 升高到 1.87%, 1.71%, 该基因片段甲基化整体水平则是由 6.34% 升高到 7.05% [图 3(b)]; 而对于 *At5g01580* (CG, CHG 和 CHH) 位点的甲基化水平分别由 30.00%, 1.02%, 0.79% 变为 30.33%, 0.16%, 0.47%, CG 位点甲基化水平略微升高, 而 CHG 和 CHH 位点甲基化水平均明显降低 [图 3(c)]。以上结果表明, α 粒子辐照拟南芥菜幼苗根部可以引起未受辐照的地上部位甲基化水平和模式的改变, 并且对不同性质(或功能)基因片段有不同的变化形式。

4 讨论

以前的研究表明, 辐射远程诱变效应在低能离子诱变机制中扮演了重要角色, 本研究又进一步证实植物个体中辐射远程表观遗传效应的存在。在本研究中, α 粒子对拟南芥菜根部辐照诱导了远程未辐照部分 *AtDML3* 基因表达水平明显上调。*AtDML3* 基因编码 5-甲基胞嘧啶 DNA 糖基酶, 该酶的主要功能是维持基因组相应 DNA 位点正常的甲基化并去除不正常甲基化^[22], 该基因表达的上调表明辐照后远程组织基因组的甲基化状态发生了改变。而亚硫酸盐测序的结果也显示 *Ta3*, *At5g35210* 和 *At5g01580* DNA 片段的基因组甲基化水平发生了改变。但是植物中 DNA 甲基化的建立与维持是由多个调控因子协调作用的结果, 不同的甲基转移酶类能直接作用于不同位点的胞嘧啶甲基化, 如 MET1, CMT3 和 DME 等^[29], 因此不清楚 *AtDML3* 表达水平的上调和 *Ta3*, *At5g35210* 和 *At5g01580* DNA 片段的基因组甲基化水平的改变之间是否有直接的相关性。

与动物细胞中胞嘧啶甲基化主要发生在 CG 位点不同, 高等植物甲基化具有 3 种类型, 分别是 CG, CHG 和 CHH (其中 H 代表 C, T 或 A)^[30-31]。在本研究中, *Ta3*, *At5g35210* 和 *At5g01580* DNA 片段也检测到 CHG 和 CHH 位点的甲基化水平变化。但是在这 3 个 DNA 片段中, CG 和非 CG (CHH 和 CHG) 的变化趋势并不一致。对于 *At5g01580* 片段, 在 CG 甲基化水平不变的情况下, CHG 和 CHH 位点有较明显的降低。而

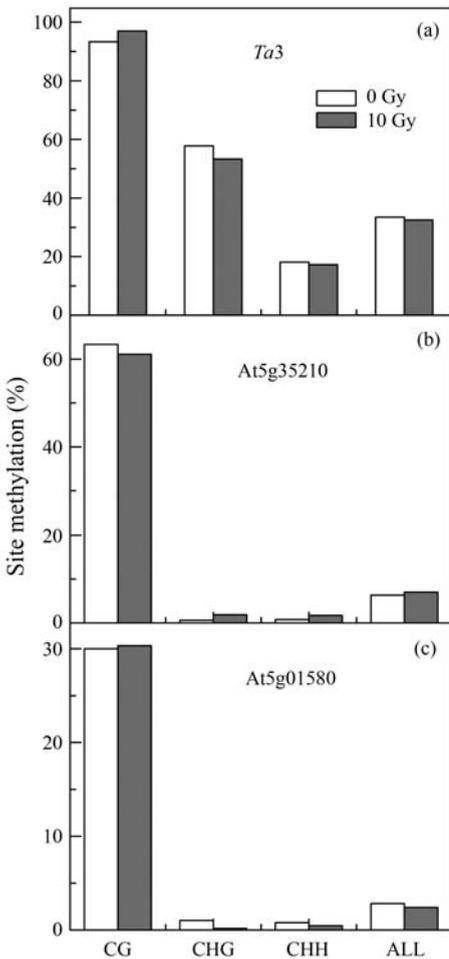


图 3 重亚硫酸盐测序法检测逆转录转座子 *Ta3* (a) 和结构基因序列 *At5g35210* (b) 和 *At5g01580* (c) 甲基化变化情况

对于 *Ta3* 和 *At5g35210* 片段, CG 和非 CG 位点有相反的变化趋势。在植物中, CG, CHG 和 CHH 位点的甲基化有不同的生物途径调控。它们变化趋势的不一致也表明局部辐射对远程组织不同的甲基化途径有不同程度的影响。

总的来说, 本研究证实了在植物个体中辐射远程表观遗传效应的存在, 但是辐照通过何种方式诱导远程表观机制的改变, 以及表观机制如何介入植物辐射远程生物效应都还不清楚, 也是下一步的研究目标。

参考文献 (References):

- [1] Yu Zengliang. Introduction to Ion Beam Biotechnology. Hefei, Anhui Science and Technology Press, 1998 (in Chinese). (余增亮. 离子束生物技术引论. 合肥: 安徽科技出版社, 1998.)
- [2] Yu Zengliang. An Introduction of Ion Beam Biotechnology. New York: Springer Press, 2006.
- [3] Bian Po, Zhang Yanfeng, Wu Jian, *et al.* Journal of Zhengzhou University, 2001, **33**: 45 (in Chinese). (卞坡, 张艳峰, 吴健, 等. 郑州大学学报, 2001, **33**: 45.)
- [4] Han Jianwei, Yu Zengliang. Acta Biophysica Sinica, 1998, **14**: 757 (in Chinese). (韩建伟, 余增亮. 生物物理学报, 1998, **14**: 757.)
- [5] Bian Po, Huo Yuping, Qin Guangyong, *et al.* Acta Biophysica Sinica, 1999, **15**: 551 (in Chinese). (卞坡, 霍裕平, 秦广雍, 等. 生物物理学报, 1999, **15**: 551.)
- [6] Wei Zengquan, Xie Hongmei, Han Guangwu, *et al.* Nucl Instr and Meth, 1995, **B95**: 371.
- [7] Wei Zengquan, Xie Hongmei, Han Guangwu, *et al.* Nucl Instr and Meth, 1998, **B134**: 191.
- [8] Yang Gen, Wu Lijun, Chen Lianyun, *et al.* Radiation Research, 2007, **167**: 298.
- [9] Yang Gen, Mei Tao, Yuan Han, *et al.* Radiation Research, 2008, **170**: 372.
- [10] Liu Ping, Li Fanghua, Xu Min, *et al.* Nuclear Physics Review, 2008, **25**(2): 191 (in Chinese). (刘萍, 李方华, 徐敏, 等. 原子核物理评论, 2008, **25**(2): 191.)
- [11] Li Fanghua, Liu Ping, Wang Ting, *et al.* Radiation Research, 2010, **174**: 228.
- [12] Wang Weidong. Study on the Dose Effects of Wheat after Implantation and Wheat Protein Genetic Characters of the Offspring Via Ion Beam[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2004(9) (in Chinese). (王卫东. 离子注入小麦诱变剂量效应及转化后代遗传特性研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2004(9).)
- [13] Ya Huiyuan, Gu Yunhong, Jiao Zhen, *et al.* Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2007, **33**: 507.
- [14] Li Fanghua, Liu Ping, Wang Ting, *et al.* Radiation Research, 2010, **174**: 228.
- [15] Sedelnikova O A, Nakamura A. Cancer Research, 2007, **67**: 4295.
- [16] Koturbash I, Rugo R E, Hendricks C A. Oncogene, 2006, **25**: 4267.
- [17] Koturbash I, Boyko A, Rodriguez-Juarez R. Carcinogenesis, 2007, **28**: 1831.
- [18] Li Fanghua, Wang Ting, Xu Shuyan, *et al.* International Journal of Radiation Biology (in press).
- [19] Molinier J, Ries G, Zipfel C, *et al.* Nature, 2006, **442**: 1046.
- [20] Kovalchuk I, Baulch J E. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2008, **49**: 16.
- [21] Boyko A, Kovalchuk I. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2008, **49**: 61.
- [22] Ortega-Galisteo A P, Morales-Ruiz T, Ariza R R, *et al.* Plant Molecular Biology, 2008, **67**: 671.
- [23] Wang Ting, Li Fanghua, Xu Shuyan, *et al.* Nuclear Physics Review, 2010, **27**(4): 488 (in Chinese). (王婷, 李方华, 徐淑艳, 等. 原子核物理评论, 2010, **27**(4): 488.)
- [24] Weigel D, Glazebrook J. Arabidopsis: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, 249-252.
- [25] Yu Hong, Chen Xi, Hong Yuanyuan, *et al.* Plant Cell, 2008, **20**: 1134.
- [26] Grunau C, Clark S J, Rosenthal A. Nucleic Acids Research, 2001, **29**(13): e65.
- [27] Gruntman E, Qi Y J, Slotkin R K, *et al.* BMC Bioinformatics, 2008, **9**: 371.
- [28] Miura A, Nakamura M, Inagaki S, *et al.* The EMBO Journal, 2009, **28**: 1078.
- [29] He X J, Chen T P, Zhu J K. Cell Research, 2011, **21**: 442.
- [30] Cokus S J, Feng S H, Zhang X Y, *et al.* Nature, 2008, **452**(7283): 215.
- [31] Gruenbaum Y, Naveh-Manly T, Cedar H, *et al.* Nature, 1981, **292**: 860.

Induction of Early Long-range Epigenetic Changes by α -irradiation in *Arabidopsis thaliana* Plants^{*}

XU Shu-yan, LI Fang-hua, WANG Ting, BIAN Po[#], WU Yue-jin

(Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Institute of Technical Biology and Agricultural Engineering, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: Along the way, the mutagenic mechanism of low-energy ions irradiation is a debatable issue. Recently, the existence of radiation induced long-range (mutagenic) effects *in vivo* in plants has been performed in a series of studies of our group, which account for the mutagenesis of low-energy ions irradiation in a new perspective. However, numerous distinct biology phenomena remain to be addressed, which bear obvious characteristics to epigenetic. In the present study, using the expression of methylation-related *AtDML3* gene and methylation level of specific gene segments as end points, the methylation of cytosine, the most important feature of epigenetic, was investigated. It was shown that, in *A. thaliana*, root-localized α -irradiation could induce epigenetic changes in aerial parts which avoided the direct irradiation. The radiation induced long-range epigenetic changes were confirmed in this study, which supplied innovative ideas for the further investigation of the mutagenetic mechanism of low-energy ions irradiation.

Key words: radiation-induced long-range epigenetic effect; methylation; *AtDML3* gene

* Received date: 21 Mar. 2011; Revised date: 1 Apr. 2011

* Foundation item: National Natureal Science Foundation of China(10705029); Key Innovation Project of Chinese Academy of Sciences (KJ CX2-YW-N34)

Corresponding author: Bian Po, E-mail: bianpo@ipp.ac.cn