

利用变性高效液相色谱 (dHPLC) 进行小麦等位基因差异表达分析^{*}

韩宗福 倪中福^{**} 王晓娜 逯腊虎 姚颖垠 孙其信^{**}

中国农业大学植物遗传育种系, 农业生物技术国家重点实验室 教育部杂种优势研究与利用重点实验室,
北京市作物遗传改良重点实验室, 农业部作物基因组与遗传改良重点实验室, 北京 100193

摘要 等位基因变异是生物体基因组中普遍存在的现象, 也是物种进化和育种的重要基础. 等位基因可以通过编码区的改变或者表达来影响基因的功能, 因此研究等位基因的表达具有重要的生物学意义. 由于小麦基因组的复杂性, 造成等位基因的鉴定比较困难, 这极大地制约了小麦等位基因表达研究的开展. 利用 CAU36 和 CAU328 两个 EST-SSR 标记, 结合变性高效液相色谱 (dHPLC) 分析技术, 在 35 个小麦基因型中分别检测到 4 种和 3 种等位变异类型, 并且以抽穗期的穗下节节间为材料, 对其在 4×6 的小麦双列杂交组合杂交 F₁ 代中进行了表达分析. 结果表明, 这两个 EST-SSR 引物扩增的等位基因在多个组合中均存在显著的差异表达, 且 CAU36 标记检测到的等位基因表达变化值与部分杂交种的株高之间存在显著的相关性.

关键词 EST-SSR 等位基因 表达变异 变性高效液相色谱 小麦

等位基因是位于一对同源染色体的相同位置上而序列有差异的基因, 其变异是物种进化和育种的重要基础. 在植物上, 对一些重要的农艺性状基因 (水稻的淀粉合成酶基因 (*Oryza sativa*) 和玉米 (*Zea mays*) 的 *Dwarf8* 矮秆基因) 的等位基因变异分析已有较多报道, 并已鉴定出了多个功能优异的等位基因^[1,2]. 研究表明, 不同等位基因之间的序列差异主要表现为单核苷酸多态性及较短序列的插入或缺失^[3], 而这些变异可能会引起编码蛋白质的改变, 也可能通过影响基因的表达水平而导致基因功能发生差异^[4].

不同等位基因不仅存在序列变异, 也存在表达上的变异^[4]. 全基因组水平上的表达分析结果显示, 等位基因差异表达在人类 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中是广泛存

在的^[5-9], 并且可能与生物的抗病和抗逆性及杂种优势形成有关. 例如, 不同等位基因对于非生物逆境的响应存在明显差异, 其在抗旱过程中所起的作用可能有所不同^[4]. 又如, 在授粉早期的玉米杂合子胚中来自父本的部分等位基因就已经被激活, 并且在授粉后 15 d 的杂合子胚中, 来自两个亲本的许多等位基因存在表达差异, 这可能与胚的杂种优势有关^[10,11].

关于小麦的等位基因序列和表达变异研究也有报道, 其中对品质相关基因, 如编码麦谷蛋白、醇溶蛋白、淀粉合成酶和多酚氧化酶基因的研究最为深入, 但主要集中在基因组和蛋白质水平. 迄今为止, 在转录水平上对小麦等位基因表达的研究相对较少, 这是因为普通小麦 A、B 和 D 三个不同基因组上的部分同源基因存在很高的序列相似性. 例如, Shitsukava 等^[12] 对小麦 MADS-BOX 基因

2008-03-19 收稿, 2008-04-25 收修稿稿

^{*} 国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2007CB109000) 和国家自然科学基金 (批准号: 30671297) 资助项目

^{**} 通信作者, E-mail: wheat3392@cau.edu.cn; qxsun@cau.edu.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

WSEP 的研究发现, 其对应的 3 个部分同源基因具有相似的基因组结构和表达谱, 因此对每个位点上的等位基因表达进行研究具有一定难度.

最近, 以大规模的 cDNA 测序为基础而新开发出了一种新的标记类型, 即 EST-SSR (Expressed Sequence Tag SSR). 该标记来自表达的基因内部, 是对基因组转录区域变异的直接鉴定, 该标记已被广泛应用到植物遗传多样评价和遗传图谱构建中. 对小麦的研究结果表明, 许多 EST-SSR 标记具有非常高的特异性, 因此可以利用这些标记进行小麦等位基因表达分析.

变性高效液相色谱(dHPLC)是一种高通量筛选 DNA 序列变异的新技术. 该方法具有自动化、准确快速、检出率高等特点, 现已广泛应用于与人类疾病相关基因的突变分析上, 但应用在植物上的相关研究比较少. Guo 等利用 dHPLC 方法探讨了玉米 F₁ 代杂交种中两个等位基因的相对表达量, 在所研究的 15 个基因中, 有 11 个存在等位基因表达差异^[4]. 在本研究中我们利用 CAU36 和 CAU328 两个 EST-SSR 标记, 结合 dHPLC 技术, 鉴定了 35 份不同小麦品种(系)中的等位基因变异类型, 并配制了 4×6 的小麦双列杂交组合, 以抽穗期的穗下节节间为材料, 对这两个基因在杂交 F₁ 代中的等位基因表达差异进行了分析, 发现其中一个基因的等位表达变异与部分杂交种的株高之间存在显著的相关性.

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试的 35 个小麦材料包括来自我国北方的 30 份普通小麦品种(系), 1 份斯卑尔脱小麦以及 4 份穗分枝小麦(表 1). 同时, 以 6 份普通小麦(5027, 5097, 5084, 3472, 3197 和 3159)品种(系)为母本, 4 份穗分枝小麦为父本配制 4×6 的不完全双列杂交组合. 亲本及杂交 F₁ 代播种于中国农业大学昌平试验站, 抽穗期各取 20 株穗下节节间混样, 进行 EST-SSR 标记及其等位基因的表达分析.

选用以农大 3338 为母本, 以 Altgold 为父本所构建的重组近交系群体 F_{2.8} 后代 175 个株系为材料, 对 EST-SSR 标记进行染色体定位分析.

表 1 35 个小麦基因型的名称及来源

编号	名称	来源	编号	名称	来源
1	3338	中国农业大学	19	270	中国农业大学
2	2463	中国农业大学	20	3159	中国农业大学
3	6554	北京农林科学院	21	3197	中国农业大学
4	3214	中国农业大学	22	3218	中国农业大学
5	3235	中国农业大学	23	3251	中国农业大学
6	227	中国农业大学	24	3458	中国农业大学
7	101	中国农业大学	25	3472	中国农业大学
8	390	北京农学院	26	3672	中国农业大学
9	411	北京市种子中心	27	3741	中国农业大学
10	皖 38	安徽省涡阳县农业科学研究所	28	5019	中国农业大学
11	晋 72	山西农业科学院	29	5021	中国农业大学
12	豫 66	河南省豫东农作物品种展览中心	30	5029	中国农业大学
13	6036	中国农业大学	31	5084	中国农业大学
14	5027	中国农业大学	32	5097	中国农业大学
15	分 841	山西农业科学院	33	224	中国农业大学
16	普分 3	山西农业科学院	34	4185	河北石家庄市农业科学研究所
17	圆 81	山西农业科学院	35	中农 4	中国农业科学院
18	柱 1	山西农业科学院			

1.2 DNA 和 RNA 提取

取供试小麦材料的穗下节节间, 采用 CTAB 法进行 DNA 提取. RNA 提取选用 TRNzol_ 总 RNA 提取试剂(DP405-01, Tiangen). 提取的 RNA 用 RQ1 RNase-Free DNase (M6101, Promega) 进行纯化, 所有操作按照产品说明书进行.

1.3 cDNA 合成

cDNA 合成反应总体系为 20 μL (含 2 μg 总 RNA, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 50 μmol/L dNTPs, 锚定引物 50 pmol, RNase 抑制剂 20U, MMLV 反转录酶 200U), 37 °C 温育 2h, 取 1 μL 用于 PCR 反应.

1.4 利用 EST-SSR 标记进行等位基因变异筛选

实验所用的两个 EST-SSR 标记 CAU36 和 CAU328, 为本实验室根据 GenBank 中的小麦 EST 获得, 并在中国春缺体-四体系或 3338/ Altgold 重

组近交系上进行了染色体定位(结果未发表)。微卫星引物序列如下:

CAU36-L: 5'CGTTCGTCATGGTTACCTCC 3',

CAU36-R: 5'CCCTCATTGATTTATTTGT-TCC3';

CAU328-L: 5'GATATGGAGTGGAGGCAAGC 3',

CAU328-R: 5'AAGTCGATGGTGACTGAC-CC3'.

PCR 扩增反应体积为 20 μ L, 内含 PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs, 50 ng 微卫星引物和 50—100 ng 模板 DNA, 1U *Taq* DNA 聚合酶。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 2.5 μ L 扩增产物经 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳约 1 h 后硝酸银染色。

1.5 EST-SSR 标记等位基因的克隆和鉴定

以 CAU36 和 CAU328 为引物各检测到 4 种和 3 种等位变异类型, 按序列由小到大的顺序, 分别命名为 CAU36-A, CAU36-B, CAU36-C, CAU36-D 和 CAU328-A, CAU328-B 及 CAU328-D。对于每种等位变异类型, 选择一个品种(系)的扩增条带进行回收测序。测序结果用 CLUSTAL W 程序进行序列比对。

以 CAU36 和 CAU328 标记对应的 cDNA 序列为种子序列, 利用 BLASTN 在 GenBank 的 EST 库中搜索与之高度同源的小麦 EST 序列, 再利用 DNAMAN 软件把这些 EST 拼接在一起, 根据这些序列设计引物进行 RT-PCR。引物序列如下

CAU36-P1: 5'-ATGGAGGAGAGTGGGAGC-GTG-3',

CAU36-P2: 5'-CCCCTCATTGATTTATTT-GTTCGTT-3';

CAU328-P1: 5'-CACCACCAACAACAATCT-GAA-3',

CAU328-P2: 5'-AAGTCGATGGTGACTGA-CCC-3'.

将扩增产物连接到 PGEM-T 载体(Promega)上进行测序。通过 BLASTX 在 GenBank 中进行氨基酸同源比对, 推测 EST 序列可能代表的基因功能。

1.6 等位基因差异表达分析

以 4 \times 6 组合亲本及其杂交 F₁ 代穗下节间的 DNA 和 cDNA 为模板, 按前述条件对小麦 β -Actin (引物序列 β -Actin-L: 5'-GGAATCCATGAGAC-CACCTAC-3', β -Actin-R: 5'-GACCCAGACAAC-TCGCAAC-3'), CAU36 和 CAU328 进行 PCR 扩增, 每个反应做 3 次重复。

dHPLC 检测系统的流动相由 A 液(0.1 mol/L TEAA, 0.025% 乙腈)和 B 液(0.1 mol/L TEAA, 25% 乙腈)按设定梯度自动混合而成。进样器自动吸取 5 μ L PCR 产物注入 DNASep 柱(TRANSGENOMIC), 柱温为 50 $^{\circ}$ C。运行梯度: 时间(min)/A 缓冲液浓度/B 缓冲液浓度, 分别为 0/65%/35%, 1/60%/40%, 17/28%/72%, 每个程序运行时间为 19.5 min, 溶液流速为 0.9 mL/min, 并根据目的基因与 β -Actin 基因扩增产物峰高值计算其比值。利用两尾等方差 *t* 测验的方法进行显著性检验。

1.7 等位基因差异表达与株高的相关分析

以等位基因表达的变化值(*H* 比值-*P* 比值)为变量, 与 2004—2005 和 2005—2006 两年度杂交 F₁ 代的株高进行相关性分析(用 Microsoft Excel 软件的 CORREL 函数)。

2 结果与分析

2.1 小麦等位基因变异的鉴定和序列分析

以 35 份小麦品种(系)的 DNA 为模板, 利用 CAU36 和 CAU328 两个 EST-SSR 引物进行的 PCR 扩增结果表明, CAU36 和 CAU328 引物分别扩增出 4 和 3 条多态性带(图 1)。为了进一步确定检测到的等位变异序列信息, 对于每种多态性类型, 选择一个品种(系)的扩增条带进行测序。由图 2 可以看出, 在 CAU36 的 4 种等位变异类型中, 均存在串联重复序列(TTG), 其中 A 和 D 变异类型中的重复次数都为 13 次, 而 B 和 C 分别为 8 和 14 次。进一步分析发现, 与其他变异类型相比, D 中存在一个小片段(GGATTT)的插入。另外, 还检测到两个碱基突变位点。在 CAU328 的 3 种等位变异类型中, 也存在重复序列结构(ACT), 其中 A 和 B 变

异类型的重复次数都为 6 次, 而 C 类型为 5 次. 与 C 类型相比, A 在两个位点有小片段的缺失, 而 B 类型中仅在其中一个位点上存在缺失. 另外, 也发

现一个单碱基突变位点. 这说明, 利用 EST-SSR 标记检测的等位基因变异并不是全部由于重复次数的差异引起的.

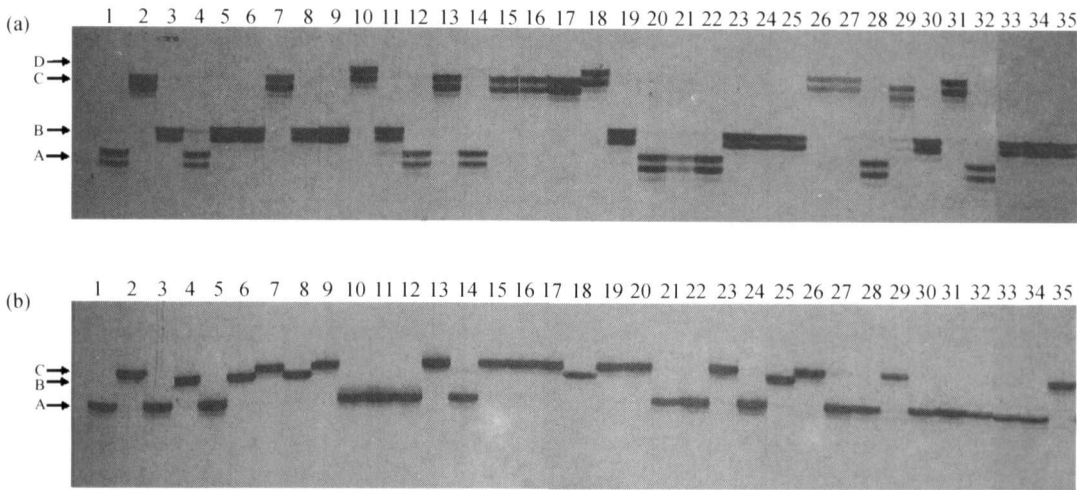


图 1 CAU36 和 CAU328 在 35 份小麦品种(系)中的等位变异分析

各泳道分别对应于表 1 中小麦品种(系)的编号.

(a) CAU36 引物共检测到 A, B, C, D 四种等位变异类型, 其中 1, 4, 12, 14, 20-22, 28 和 32 属于 A 类型; 3, 5, 6, 8, 9, 11, 19, 23-25, 30 以及 33-35 属于 B 类型; 2, 7, 13, 15-17 和 29 属于 C 类型; 10, 18, 26, 27 和 31 属于 D 类型; (b) CAU328 引物也检测到 3 种等位变异类型, 分别为 A(1, 3, 5, 10-12, 14, 21, 22, 24, 27, 28, 30-34), B(4, 6, 8, 18 和 25)和 D(2, 7, 9, 13, 15-17, 19, 20, 23, 26, 29 和 35)



图 2 利用 EST-SSR 标记检测的等位变异的序列分析

(a) CAU36 引物检测到的 4 种等位变异序列; (b) CAU328 引物检测到的 3 种等位变异序列

采用生物信息学方法, 结合 RT-PCR 分析, 我们获得了与 CAU36 和 CAU328 对应的 cDNA 序列. 在 GenBank 中进行氨基酸同源比对分析后发现, CAU36 和 CAU328 所代表的基因分别编码紫

杉醇乙酰转移酶(taxadienol acetyl transferase-like)和单链核酸蛋白(Single-stranded nucleic acid binding R3H), 分别命名为 *TaAL* (基因登录号 EU569762)和 *TaAM* (基因登录号 EU569763). 核

核苷酸比对分析结果显示, CAU36 和 CAU328 扩增片段分别位于上述两个 cDNA 序列的 3' 端不翻译区, 并且没有内含子的存在(结果未显示). 另外, 利用 CAU36 标记, 以 3338× Altgold 重组近交系群体为材料, 将 *TaAL* 基因定位在 4A 染色体长臂上,

位于标记 Xksm216 和 Xkam206 之间(结果未发表). 以中国春缺体-四体系, 将 *TaAM* 定位于 4A 染色体上(图 3). 因此, 可以利用上述两个 EST-SSR 引物进行等位基因表达分析.

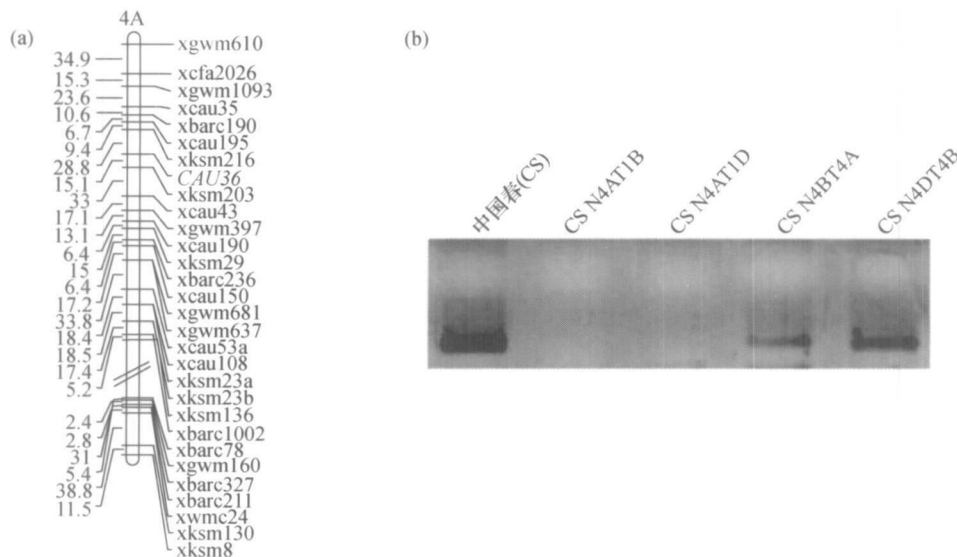


图 3 CAU36 和 CAU328 标记的染色体定位

(a) 以 3338× Altgold 重组近交系群体建立的小麦 4A 染色体上的 SSR 标记连锁图谱. CAU36 定位于 4A 染色体长臂上; (b) CAU328 引物扩增中国春第四部分同源群缺体-四体系, 电泳结果显示 CAU328 也定位于 4A 染色体上

2.2 等位基因的差异表达分析及其调控模式预测

我们以 4×6 的小麦双列杂交组合及其亲本抽穗期的穗下节节间为材料, 采用 PCR 方法, 结合变性高效液相色谱(dHPLC)技术, 对等位基因的表达水平进行分析. 为了保证表达结果的可靠性, 首先以杂种 F₁ 代的 DNA 为模板进行了分析(图 4), 发现来自两个亲本的不同等位基因的扩增产物在数量上差异不显著, 表明这两对 EST-SSR 引物在不同小麦品种(系)中是非常保守的, 可以用于等位基因表达分析.

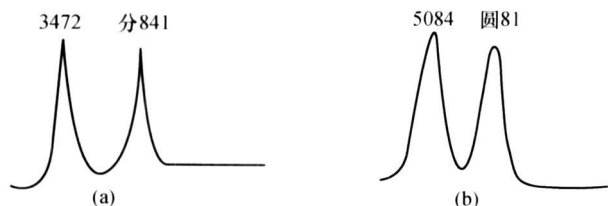


图 4 部分杂交 F₁ DNA 水平的等位基因检测结果

等位基因类型 (a) CAU36(3472/分 841); (b) CAU328(5084/圆 81)

等位基因的表达变异可以用两个参数来反映, 即 *P* 比值(亲本间等位基因表达水平之比)和 *H* 比值(杂交种中来自两个亲本等位基因表达水平之比). 以 CAU36 引物进行的表达研究结果显示, 在 13 个杂交组合中, 有 6 个 *P* 比值经 *t* 检验证实达到显著水平, 而 *H* 比值有 8 个差异显著 ($p < 0.05$) (表 2). 对 CAU328 检测结果分析发现, 在 11 个杂交组合中, 有 7 个 *P* 比值达到显著水平, 而 *H* 比值仅有 3 个达到显著水平 ($p < 0.05$), 说明在这些杂交组合中等位基因存在明显的表达差异. 进一步分析发现, *H* 比值的变化与亲本的遗传背景和所分析的基因有关, 例如分 841 与不同亲本配制的所有杂交 F₁ 代个体中用 CAU36 检测到的 *H* 比值均达到显著水平, 但是用 CAU328 检测到的 *H* 比值均未达到显著水平.

在杂交种中, 由于来自两个亲本的等位基因处于同一个细胞中, 两者背景相同, 如果 *H* 比值 $\neq 1$, 则表明等位基因的表达差异受顺式作用(*Cis*)的调

控; 如果 H 比值=1, 则不存在 *Cis* 的作用, 此时如果 P 比值 \neq 1, 则基因的表达受反式作用 (*Trans*) 调控; 如果 H 比值 \neq 1 且 P 比值 \neq 1, 则基因的差异表达受 *Cis* 和 *Trans* 的共同作用^[8]. 依据 P 比值和 H 比值的 关系, 可以把等位基因的调控模式分为几类: (i) 无变异型 (Conserved) (等位基因不存在表达差异, 即: P 比值=1 且 H 比值=1); (ii) 顺式作用调控 (P 比值 \neq 1, H 比值 \neq 1, P 比值= H 比值); (iii) 反式作用调控 (P 比值 \neq 1, H 比值=1); (iv) *Cis*+*Trans* (P 比值 \neq 1, H 比值 \neq 1, P 比值 $>$ H 比值)^[13]; (v) *Cis* \times *Trans* (H 比值 \neq 1, P 比值 $<$ H 比值). 依据上述标准, 对 CAU36 和 CAU328 检测到的等位基因调控模式进行分类 (表 2 和 3). 就 CAU36 来看, 在 13 个杂交组合中, 属于无变异型, *Cis*, *Trans* 和 *Cis* \times *Trans* 调控模式的数目分别为 3, 1, 2 和 7. 没有发现 *Cis*+*Trans* 类型. 在所研究的 11 个杂交组合中, CAU328 有 3 种表达调控模式, 即 Conserved (2 个), *Trans* (5 个) 和 *Cis* \times *Trans* (4 个).

表 2 不同杂交组合中 CAU36 标记检测的等位基因表达比值及其调控模式

	P 比值 ^{a)}	H 比值 ^{b)}	调控模式
5027/ 普分 3	1. 191	1. 240	无变异型
5027/ 圆 81	0. 911	1. 289 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>
3472/ 分 841	0. 995	1. 760 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>
3472/ 普分 3	1. 330 *	1. 395 *	<i>Cis</i>
3472/ 圆 81	0. 941	2. 093 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>
3472/ 柱 1	0. 919	1. 115	无变异型
3197/ 分 841	0. 762 *	1. 298 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>
3197/ 普分 3	0. 883	1. 254	无变异型
3197/ 圆 81	0. 746 *	1. 277 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>
3197/ 柱 1	0. 610 *	1. 117	<i>Trans</i>
5097/ 分 841	0. 803	1. 239 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>
5097/ 柱 1	0. 682 *	1. 065	<i>Trans</i>
3159/ 分 841	0. 879	1. 265 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>

* 差异达到显著水平, $p < 0.05$

a) P 比值: 母本等位基因与父本等位基因表达量之比; b) H 比值: 杂交 F_1 中, 来源于母本的等位基因与来源于父本等位基因表达量之比

表 3 不同杂交组合中 CAU328 标记检测的等位基因表达比值及其调控模式

	P 比值 ^{a)}	H 比值 ^{b)}	调控模式
5027/ 普分 3	0. 601 *	0. 842	<i>Trans</i>
5027/ 圆 81	1. 061	0. 936	无变异型
5027/ 柱 1	1. 140	1. 100	无变异型
3197/ 分 841	1. 637 *	0. 950	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>
3197/ 普分 3	1. 029	0. 678 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>
3197/ 圆 81	1. 816 *	0. 941	<i>Trans</i>
3197/ 柱 1	1. 952 *	1. 119	<i>Trans</i>
5097/ 分 841	1. 299 *	0. 887	<i>Trans</i>
5097/ 柱 1	1. 549 *	1. 083	<i>Trans</i>
5084/ 圆 81	0. 820	0. 692 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>
5084/ 普分 3	0. 464 *	1. 777 *	<i>Cis</i> \times <i>Trans</i>

* 差异达到显著水平, $p < 0.05$

a) P 比值: 母本等位基因与父本等位基因表达量之比; b) H 比值: 杂交 F_1 中, 来源于母本的等位基因与来源于父本等位基因表达量之比

2.3 等位基因差异表达与杂交 F_1 株高之间的关系

对 2004—2005 和 2005—2006 年度本实验所用的 4×6 的小麦双列杂交组合的农艺性状进行了分析, 发现不同杂交 F_1 代植株在株高性状上存在明显的差异 (结果未发表). 许多研究表明, 穗下节对小麦株高贡献最大^[14, 15]. 因此, 为了进一步探讨这些等位基因差异表达与株高之间的关系, 我们将等位基因表达变化值与杂交 F_1 的株高进行了相关分析. 结果发现, 利用 CAU36 和 CAU328 检测到的等位基因表达变化值与相应杂交 F_1 株高之间的相关系数都未达到显著水平 (表 4). 而以分 841 为父本配制的 4 个杂交 F_1 代个体 (3472/分 841, 3197/分 842, 5097/分 841 和 3159/分 841) 用 CAU36 检测到的 H 比值均达到显著水平, 我们将这些 F_1 中等位基因的表达变化值与其株高进行相关分析发现, 在两个年度均达到显著水平 ($p < 0.01$), 与两年的株高平均值也存在显著的相关关系 ($p < 0.01$) (表 4), 说明这些等位基因的表达变异可能与株高的生长发育有关.

表 4 各杂交组合中等位基因表达的变化值与株高的相关系数

	2004—2005 年	2005—2006 年	两年度平均值
1	0.115	-0.036	0.038
2	0.098	0.533	0.355
3	0.968 **	0.937 **	0.970 **

** 差异达到极显著水平, $p < 0.01$

1. CAU36 标记检测的等位基因表达变化值与株高的相关系数;
2. CAU328 标记检测的等位基因表达变化值与株高的相关系数;
3. CAU36 标记检测的以分 841 为共同父本的 4 个杂交组合 (3472/ 分 841, 3197/ 分 841, 5097/ 分 841 和 3159/ 分 841) 等位基因表达变化值与株高的相关系数

3 讨论

迄今为止, 对基因组水平的等位基因变异研究已有大量报道, 并且开发出了多种等位基因表达检测方法, 如单链构象多态性 (SSCP)、焦磷酸测序、变性高效液相色谱和基因芯片等。由于普通小麦的多倍体遗传特点, 导致研究小麦的等位基因表达具有很大的难度。Bottley 等^[16] 采用 SSCP 技术对 236 个小麦单拷贝基因进行了研究, 并认为利用该方法可以检测基因表达的有无, 但很难量化分析。目前已知, 1.34% 的小麦 EST 具有 SSR 重复序列, 由此已经开发出了大量 EST-SSR 标记, 并且其中许多仅能扩增出单一条带。例如, Gao 等^[17] 对 88 个新开发的小麦 EST-SSR 标记进行了定位分析, 发现仅有 10 个被定位到多个位点上, 其余 78 个位于单一染色体位点上。本实验利用 EST-SSR 标记, 结合 dHPLC 方法, 成功分析了多个小麦杂交组合中等位基因的相对表达水平, 并与 DNA 扩增结果进行了比较, 证明可以利用 EST-SSR 开展小麦等位基因表达研究, 这也为更有效地利用 EST-SSR 标记提供了一个新的利用途径和思路。由于普通小麦为异源六倍体, 所以该物种中的大部分基因具有 3 个部分同源的拷贝, 但是在基因组结构上具有很高的相似性, 对每个位点上的等位基因表达进行研究具有一定难度。因此, 本实验中仅选择扩增单一位点的引物进行了等位基因表达变异研究。为进一步明确普通小麦中 3 个位点上等位基因的表达差异, 可以在所有基因序列获得的基础上, 找出每个等位基因的特异引物或者酶切位点, 采用 RT-PCR 或酶切扩增产物多态性位点 (CAPS)^[18] 方法, 结合

dHPLC 技术, 对等位基因的表达进行精确的定量分析。在实验过程中, 我们也发现 dHPLC 方法存在一些局限性, 例如对检测的 DNA 片段长度具有较高的要求, 以 100—300 bp 为最佳; 而且对仅存在单碱基突变的等位变异分析有一定难度。

由于等位基因表达的复杂性, 导致对于其差异表达的调控机制认识仍非常有限。研究表明, 基因表达受顺式作用元件和反式作用因子的影响, 其中顺式作用元件主要有启动子和增强子等, 而反式作用因子主要有 RNA 聚合酶及各类转录因子。通过等位基因的差异表达分析, 可以推测出其表达的调控模式。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和人类医学的研究表明, 反式作用因子在基因差异表达中起更重要的作用^[19-21]。Wittkopp 等^[8] 对果蝇种间等位基因的表达差异进行分析后认为, 顺式和反式调控都有重要贡献。以上研究都以较少的实验材料为研究对象, 对多个基因的等位表达变异进行分析, 因此没有涉及多个不同遗传背景。本实验我们以多个杂交 F₁ 代个体及其亲本为材料进行了研究。结果发现, 在 CAU36 的检测结果中, 有 9 个组合中存在等位基因表达差异, 占所鉴定组合总数 (13 个) 的 69.2%, 其中 7 个为 *Cis* × *Trans* 模式。CAU328 的研究结果显示, 也有 9 个组合存在等位基因表达差异, 占组合总数的 81.8%, 其中 5 个为 *Trans* 模式, 4 个为 *Cis* × *Trans* 模式。因此, 顺式作用元件和反式作用因子对小麦等位基因的表达调控也是普遍存在的, 这与果蝇上的研究结果类似, 但是调控模式与所研究基因及小麦材料类型有关, 这也说明小麦中等位基因表达及其调控是极其复杂的。

以玉米杂交种及其亲本自交系的叶片、胚和胚乳等不同组织器官为材料研究发现, 杂交种中的等位基因存在广泛的表达变异, 并认为这可能与玉米杂种优势形成有关^[10, 11, 22, 23]。实验中我们对株高进行了观察, 发现其中在抽穗期的穗下节节间中存在显著的等位表达变异, 并且其中一个基因的等位基因表达变异与部分杂交 F₁ 代株高之间存在显著的相关关系, 说明不仅基因表达总量的改变与杂种优势形成有关, 在杂交种遗传背景下, 等位基因的差异表达也可能与杂种优势形成有关。目前的结果仅是一种现象, 进一步的研究重点应是获得不同等位

基因的全长序列,明确等位表达变异产生的原因及生物学功能,进而分析其在小麦株高杂种优势形成过程中的作用.

参 考 文 献

- 1 Isshiki M, Morino K, Nakajima M, et al. A naturally occurring functional allele of the rice *waxy* locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant Journal*, 1998, 15: 133—138
- 2 Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, et al. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, 2001, 28: 286—289
- 3 Fu H, Dooner HK. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2002, 99: 9573—9578
- 4 Guo M, Rupe MA, Zinselmeier C, et al. Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *Plant Cell*, 2004, 16: 1707—1716
- 5 Lo HS, Wang Z, Hu Y, et al. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Research*, 2003, 13: 1855—1862
- 6 Yan H, Yuan W, Velculescu VE, et al. Allelic variation in human gene expression. *Science*, 2002, 297: 1143
- 7 Cowles CR, Hirschhorn JN, Altshuler D, et al. Detection of regulatory variation in mouse genes. *Nature Genetics*, 2002, 32: 432—437
- 8 Wittkopp PJ, Haerum BK, Clark AG, et al. Evolutionary changes in *cis* and *trans* gene regulation. *Nature*, 2004, 430: 85—88
- 9 Kiekens R, Vercauteren A, Moerkerke B, et al. Genome-wide screening for *cis*-regulatory variation using a classical diallel crossing scheme. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: 3677—3686
- 10 Meyer S, Pospisil H, Scholten S, et al. Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63: 381—391
- 11 Springer NM, Stuper RM. Allele-specific expression patterns reveal biases and embryo-specific parent-of-origin effects in hybrid maize. *Plant Cell*, 2007, 19: 2391—2402
- 12 Shitsukava N, Tahira C, Kassai K, et al. Genetic and epigenetic alteration among three homoeologous genes of a class E MADS Box gene in hexaploid wheat. *Plant Cell*, 2007, 19: 1723—1737
- 13 Landry CR, Wittkopp PJ, Taubes CH, et al. Compensatory *cis-trans* evolution and the dysregulation of gene expression in interspecific hybrids of *Drosophila*. *Genetics*, 2005, 171: 1813—1822
- 14 吴利民, 倪中福, 王章奎, 等. 小麦杂种及其亲本苗期叶片家族基因差异表达及其与杂种优势关系的初步研究. *遗传学报*, 2001, 28(3): 256—266
- 15 Zhang Y, Ni Z, Yao Y, et al. Gibberellins and heterosis of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genetics*, 2007, 8: 40
- 16 Bottley A, Xia GM, Koebner MD, et al. Homoeologous gene silencing in hexaploid wheat. *Plant Journal*, 2006, 47: 897—906
- 17 Gao LF, Jing RL, Huo NX, et al. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(7): 1392—1400
- 18 Sherman JD, Yan L, Talbert L, et al. A PCR marker for growth habit in common wheat based on allelic variation at the *VRN-A1* gene. *Crop Science*, 2004, 44(5): 1832—1838
- 19 Brem RB, Yvert G, Clinton R, et al. Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science*, 2002, 296: 752—755
- 20 Morley M, Molony CM, Weber TM, et al. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature*, 2004, 430: 743—747
- 21 Pastinen T, Hudson TJ. *Cis*-acting regulatory variation in the human genome. *Science*, 2004, 306: 647—650
- 22 Stupar RM, Springer NM. *Cis*-transcriptional variation in maize inbred lines B73 and Mo17 leads to additive expression patterns in the F1 hybrid. *Genetics*, 2006, 173: 2199—2210
- 23 Stupar RM, Hermanson PJ, Springer NM, et al. Nonadditive expression and parent-of-origin effects identified by microarray and allele-specific expression profiling of maize endosperm. *Plant Physiology*, 2007, 145: 411—425