

水稻着丝粒特异组蛋白 CENH3 抗体的制备与应用

薛超 张融 郭瑞 刘帅 刘晓宇 沈明晨 邓世峰 龚志云*

(扬州大学 农学院/江苏省作物遗传生理国家重点实验室培育点/江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心/教育部植物功能基因组学重点实验室, 江苏 扬州 225009; *通讯联系人, E-mail: zygong@yzu.edu.cn)

Preparation and Application of Centromere-Specific Protein CENH3 Antibody in Rice

XUE Chao, ZHANG Rong, GUO Rui, LIU Shuai, LIU Xiaoyu, SHEN Mingchen, DENG Shifeng, GONG Zhiyun*

(*Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology/Jiangsu Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops/Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; *Corresponding author, E-mail: zygong@yzu.edu.cn*)

Abstract: 【Objective】 The centromeres of eukaryotic chromosomes are essential for cell division and inheritance of genetic information. The centromere is a complex composed of centromeric proteins and DNA motifs. In particular, a centromere-specific histone 3 variant, referred to CENH3, is a key centromere-specific protein for centromeric chromatin. So the preparation of CENH3 antibody is necessary for the research of centromeric structure and function.

【Method】 We designed a short-peptide for the rabbit immune experiment and prepared CENH3 antibody in rice. ELISA and protein immunofluorescence(IF) assay were performed to detect the effectiveness and availability of CENH3 antibody. 【Result】 The effective dilution of CENH3 antibody was detected at 1:400 000. Through IF analysis, obvious signals were detected in the centromeric region of each chromosome in rice and maize. DNA associated with CENH3 was selectively immunoprecipitated in chromatin immunoprecipitation assay(ChIP). After PCR amplification and FISH(fluorescence in situ hybridization) analysis, the results showed ChIP-DNA was located in functional centromere in rice. 【Conclusion】 These results demonstrated that CENH3 antibody prepared in this study can meet the requirement of related experiments in the research of centromere, and the antibody was prepared successfully.

Key words: rice; centromere-specific histone; chromatin immune-precipitation assay; immunofluorescence

摘 要: 【目的】着丝粒是真核生物染色体的基本功能元件之一, 其功能是在细胞有丝分裂和减数分裂时期精确地调控染色体配对和分离并维持染色体的稳定。着丝粒结构是由 DNA 和蛋白质形成的一种复合体。着丝粒特异组蛋白(centromere-specific histone H3, CENH3)是功能着丝粒是否具有活性的最基本特征。所以制备 CENH3 的相关抗体是进行着丝粒结构与功能研究的前提条件之一。【方法】通过设计短肽进行兔免疫实验, 制备了水稻着丝粒特异组蛋白 CENH3 兔源抗体, 利用 ELISA 和蛋白免疫荧光(immunofluorescence, IF)等检测方法对抗体有效性进行了鉴定。【结果】ELISA 检测显示制备的 CENH3 抗体有效稀释度为 1: 40 万, 并且蛋白免疫荧光信号在水稻体细胞每条染色体的着丝粒区域均能检测到。同时, 该抗体也可以应用于玉米等其他物种。通过染色质免疫沉淀(ChIP)技术获得与 CENH3 相结合的 DNA 分子, 并进行 PCR 扩增和 FISH 定位分析, 结果显示相应的 ChIP-DNA 位于水稻功能着丝粒区域。【结论】本研究制备的水稻 CENH3 兔源抗体能满足着丝粒研究中相关实验的要求, 可进一步应用于着丝粒的结构与功能研究。

关键词: 水稻; 着丝粒特异组蛋白; 染色质免疫沉淀; 蛋白免疫荧光

中图分类号: Q786; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2017)05-0475-08

着丝粒是真核生物染色体中重要的结构与功能元件, 是由 DNA 和蛋白质组成的复合体, 是真核生物有丝分裂和减数分裂过程中染色体正常

分离和传递所必需的染色体区域^[1]。每条染色体必须拥有正常的功能着丝粒, 以维持物种染色体组成的稳定性。目前, 已在拟南芥、水稻、玉米

收稿日期: 2017-03-24; 修改稿收到日期: 2017-05-18。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(3137021); 江苏省“青蓝工程”项目。

等植物的着丝粒进行了较深入的分子生物学研究,都表明了着丝粒的功能非常保守,但真核生物各物种的着丝粒 DNA 序列却是高度变异的^[2-4]。着丝粒 DNA 序列进化速率极高,在不同物种中,组成着丝粒的 DNA 序列是没有同源性的^[5]。除芽殖酵母的着丝粒以外^[6-7],大多数生物的着丝粒均由高度重复的 DNA 序列构成,并且在这些重复序列会间或插入一些逆转座子成分,一起组成着丝粒特异 DNA 序列^[8-12]。

相比之下,着丝粒区域另外一个重要组成成分——着丝粒特异蛋白在真核生物中则相对保守。其中,着丝粒特异组蛋白 H3(centromere-specific histone H3, CENH3)是较早发现的一种重要蛋白,存在于真核生物活性着丝粒的核小体中,是着丝粒形成的早期标志^[13-15]。第一个鉴定出的 CENH3 是人类活性着丝粒上的 CENP-A 蛋白^[16]。CENH3 是功能着丝粒染色质最基本的特征,与 CENH3 相连着丝粒染色质只包含一小部分的卫星 DNA^[17]。比如,在栽培稻第 8 染色体的着丝粒中,与 CENH3 结合的卫星 DNA(CentO)约为 750 kb,即其功能着丝粒的大小约为 750 kb。CENH3 在着丝粒染色质的识别和保持中起关键作用^[4],决定动粒组装的位置和着丝粒的活性,而且仅存在于有活性的着丝粒中^[18-23]。研究表明,在果蝇和老鼠中,当 CENH3 被破坏或者缺失时,染色体不能正常传递^[24-25]。在植物中,不同染色体着丝粒区域的 DNA 序列虽然差异很大,但是与 CENH3 结合的区域大小是一致的。如水稻中,通过 CENH3 的蛋白免疫荧光检测,12 条染色体着丝粒区域的 CENH3 信号强度是一致的^[26]。此外,在拟南芥、玉米和甘蔗等植物中也鉴定出 CENH3,几乎存在于整个细胞周期中^[15, 27-28]。虽然着丝粒的功能很保守,但不同于 H3 的保守性, CENH3 的快速进化导致不同物种之间具有一定的特异性。因此,对 CENH3 进行研究具有重要的意义。

真核生物的基因组 DNA 以染色质的形式存在。因此,研究蛋白质与 DNA 在染色质环境下的相互关系是阐明真核生物基因表达机制的基本途径。染色质免疫沉淀技术(chromatin immunoprecipitation assay, ChIP)是目前研究体内 DNA 与蛋白质相互作用的主要方法之一,其基本原理是在活细胞状态下固定蛋白质-DNA 复合物,并将其随机切断为一定长度范围内的染色质小片段,然后通过免疫学方法沉淀此复合体,特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段,通过对目的片断

的纯化与检测,从而获得蛋白质与 DNA 相互作用的信息^[29-33]。通过用 CENH3 抗体进行染色质免疫沉淀(ChIP)实验,可以确定所检测的 DNA 序列是否属于着丝粒的功能 DNA 元件,同时对于 CENH3 抗体发生免疫沉淀的染色质进行克隆与分析,可获得功能着丝粒 DNA 序列^[34]。ChIP 实验表明,拟南芥、玉米、水稻和甘蔗等植物通过卫星 DNA 和反转录转座子元件能与 CENH3 发生相互作用,说明卫星 DNA 和反转录转座子元件 CR(centromere-specific retrotransposon)是这些物种着丝粒的功能组成成分^[35]。

水稻是世界上最主要的粮食作物之一,同时也是单子叶植物的模式生物。近年来随着水稻全基因组测序的完成,对水稻各染色体组中不同染色体着丝粒的组成也进行了深入分析。其中,栽培稻的着丝粒由串联重复序列组成。重复单元为 155 bp 的 CentO。目前,定位分析水稻着丝粒的方法除了对 CentO 的荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)分析外,还可以利用 CENH3 抗体进行蛋白免疫分析。通过与水稻 CENH3 结合的蛋白免疫反应研究表明,水稻每一着丝粒结合的 CENH3 是十分相近的,说明不同染色体着丝粒功能 DNA 结合区域是特定的^[26]。目前水稻 CENH3 抗体商品化产品很少,即使有也由于其特定的使用范围,价格比较昂贵,所以相关研究中的大多数抗体由国外实验室赠送,但一般情况下获得的途径比较麻烦,因此制备 CENH3 抗体对进一步开展水稻或其他物种着丝粒的相关研究具有重要意义。

本研究对水稻着丝粒特异组蛋白 CENH3 抗体进行制备,并利用 ELISA 方法对抗体的效价进行测定,通过蛋白免疫荧光进一步验证该抗体的有效性。利用 ChIP 技术分析 CENH3 抗体,对沉淀下来的 DNA 进行 PCR 和 FISH 分析,以明确该抗体应用于水稻着丝粒研究的可能性,并且对该抗体是否能应用于其他物种进行了鉴定,为进一步利用和推广该抗体开展着丝粒相关研究奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料包括粳稻品种日本晴(*Oryza sativa japonica*, Nipponbare)、普通玉米(*Zea mays*)、小

麦(*Triticum aestivum*)和大麦(*Hordeum vulgare*)种子。

1.2 水稻 CENH3 抗体的制备

本研究中通过人工设计合成 CENH3 的相关多肽,对兔子进行 7 次免疫后,取兔子全血进行纯化。得到的抗体通过 ELISA 方法检测效价。抗体的效价为大于 NC 值 2 倍且大于 0.25 时的 OD_{450} 值,当效价大于 2 时,我们认为抗体是呈阳性的。ELISA 方法检测具体步骤如下:

取纯化的 CENH3 蛋白以浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被酶标板,每孔 200 μg ,盖上盖子放入 37℃ 温箱温育 2 h。然后取出包被和封闭好的酶标板,将封闭液甩入水池,用自来水冲洗 2 次,在毛巾上拍干 6 次。选用 HIS 抗体(用牛奶稀释,1 mg/mL HIS 抗体与牛奶的体积比为 1:8000)作为阳性对照,阴性对照为 5% 牛奶,并进行稀释(稀释度分别为 3125, 6250, 1.25 万, 2.5 万, 5 万, 10 万, 20 万, 40 万, 80 万),每孔 100 μg ,盖上盖子放入 37℃ 温箱温育 1 h 后,取出酶标板,将板内的一抗甩入水池,自来水冲洗 8 遍,拍干。将稀释好的二抗以每孔 100 μg 的量依次加入酶标板孔中,盖上盖子放入 37℃ 温箱温育 45 min。从温箱取出二抗温育好的酶标板,甩去二抗,用自来水冲洗 10 次,在吸水毛巾上拍干。将准备好的显色液按每孔 100 μg 的量依次加入酶标板孔中,盖上盖子放入温箱,15 min 后从温箱取出酶标板,将 2 mol/L 硫酸以每孔 50 μg 的量依次加入酶标板孔中终止反应,读取吸光值。

1.3 蛋白免疫荧光检测

根尖染色体制备:采集新鲜根尖,用 4% 多聚甲醛(w/v)室温固定 30~40 min,然后用 1× 磷酸盐缓冲液(8.0 g NaCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 2.9 g Na_2HPO_4 , 0.2 g KCl, 双蒸水定容至 1 L,调 pH 至 7.4)清洗 3 次,并保存在 1× 磷酸盐缓冲液中,于 4℃ 冰箱中保存备用。从磷酸盐缓冲液中取出准备好的根尖材料,取 1 mm 左右根尖于载玻片上,加 1 滴磷酸盐缓冲液,加盖玻片压片,压好的载玻片迅速放于液氮中,冷冻 1~2 min,用刀片迅速揭去盖玻片,晾干。

蛋白免疫荧光(immunofluorescence, IF)检测:向染色体制备好的载玻片上滴加 30 μL 含有 R(兔源)-CENH3 抗体的 1× TNB 溶液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5; 0.15 mol/L NaCl; 0.5% 阻断剂),盖上盖玻片,放入湿盒内于 37℃ 下保温 4 h 以上;取出后用 1× 磷酸盐缓冲液洗片 3 次,每次 5 min,加 50 μL 含有 anti-Rabbit-488 抗体(Invitrogen)的 1× TNB 溶液,放入湿盒内于 37℃ 避光保温 1 h; 1× 磷酸盐缓冲液洗片

3 次,每次 5 min,晾干后,加 10 μL 含有 DAPI 的抗褪色剂(Vector Laboratories, Inc.),盖上盖玻片,在荧光显微镜下观察拍照。

1.4 染色质免疫沉淀

1.4.1 细胞核的提取

染色体免疫共沉淀(ChIP)实验参照 Nagaki 等的实验方法^[35]并有所优化。取 8~10 d 的日本晴幼苗叶片在液氮中研磨成粉状,加等体积的抽提缓冲液 M1(4 mL 0.1 mol/L 磷酸钾, pH 7.0, 4 mL 1 mol/L NaCl, 31.25 μL β -巯基乙醇, 4.74 mL 己二醇,加 ddH₂O 至 40 mL)后放置在冰上,于摇床上缓慢摇 5 min。用灭菌后的 Miracloth(EMD Chemicals, Inc.)过滤,滤液在 2410 r/min、4℃ 下离心 10 min,去上清。加 10 mL 抽提缓冲液 M2(3 mL 0.1 mol/L 磷酸钾, pH 7.0, 3 mL 1 mol/L NaCl, 300 μL 1 mol/L 氯化镁, 23.43 μL β -巯基乙醇, 3.54 mL 己二醇, 130 μL Triton X-100, 加 ddH₂O 至 30 mL)混匀,2410 r/min、4℃ 下离心 10 min,去上清,反复操作 3 次,如沉淀中有杂质,再重复上述操作。

1.4.2 细胞破碎

先加 5 mL MNB 缓冲液(2 mL 50% 蔗糖, 0.5 mL 1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 40 μL 1 mol/L MgCl_2 , 10 μL 1 mol/L CaCl_2 , 加 ddH₂O 至 10 mL)对细胞核进行清洗,于 2410 r/min、4℃ 下离心 10 min,去上清。再加 4 mL MNB 缓冲液混匀,分装成 3 管,每管 1200 μL ,剩下的作为 input,在分装的 3 管中分别加 1.5 U 的 MNase(Sigma)对 DNA 片段进行切割,于 37℃ 水浴锅中水浴 10 min,每 2 min 摇 1 次。加 15 μL EDTA 终止反应。于 13 000 r/min、4℃ 下离心 10 min,取上清,用琼脂糖凝胶电泳检测切割结果。切割后的 DNA 片段大小约 147 kb。

1.4.3 染色体免疫共沉淀

加入特异性抗体 CENH3 及温育缓冲液[1 mL 1 mol/L NaCl, 400 μL 1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 200 μL 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0, 40 μL 0.1 mol/L PMSF, 200 μL 蛋白酶抑制剂混合物(Complete Mini),加 ddH₂O 至 20 mL],密封、8℃ 下,上下颠倒孵育过夜,然后再用 Protein A beads(GE Healthcare)密封放置在 8℃ 上下颠倒孵育 2 h。通过不同浓度的盐溶液洗去与 beads 结合的非特异性染色质,加 400 μL 42℃ 预热的洗提缓冲液(500 μL 1 mol/L NaCl, 200 μL 1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100 μL 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0, 500 μL 20% SDS, 加 ddH₂O 补足至 10 mL),于 65℃ 水浴锅水

浴 15 min, 每 5 min 摇 1 次, 于 13 000 r/min、室温下离心 5 min, 取上清, 重复上次操作, 收集合并两次上清, 然后收集并纯化沉淀下来的 ChIP-DNA。

1.4.4 ChIP-DNA 的引物设计与 PCR 检测

设计的引物序列: CentO 上游引物 5'-TGC GATGTTTTCTACTGGAATC-3'; CentO 下游引物 5'-AAATCATGTTTTGGCTCTTTTT-3'。

以 ChIP-DNA 作为模板, 使用 20 μ L 体系 (Sangon Biotech) 进行 PCR 扩增, 反应体系为: 1 μ L ChIP-DNA 模板, 2 μ L 10 \times 缓冲液(含 Mg^{2+}), 1.6 μ L dNTPs(2.5 mmol/L), 上下游引物各 2.5 μ L, 0.2 μ L *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L), 加超纯水补足至 20 μ L。PCR 扩增反应结束后取 10 μ L PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察电泳结果, 并拍照保存。

1.5 荧光原位杂交检测

1.5.1 根尖固定

取新鲜根尖置于 2 mmol/L 的 8-羟基喹啉中, 在 20 $^{\circ}$ C 下处理 2 h。用卡诺固定液($v_{\text{甲醇}}:v_{\text{冰醋酸}}=3:1$)清洗 3 次后再用固定液室温固定 24 h, 然后置于一 20 $^{\circ}$ C 下备用。从固定液中取出固定好的根尖, 用蒸馏水清洗 3 次。切取 2 mm 左右的白色根尖部位置于酶解液(2% 纤维素酶与 1% 果胶酶), 37 $^{\circ}$ C 下酶解 40 min。酶解完全的根尖经固定液清洗 2 次后, 用固定液再次固定 5 min 以上, 可置于一 20 $^{\circ}$ C 下冷却待用。

1.5.2 染色体制备

将充分冰冻的根尖取出, 置于一张载玻片上, 滴加适量固定液于根尖上。用镊子迅速敲碎根尖, 再在载玻片上滴加少量固定液, 在酒精灯上点燃, 使其充分燃烧, 斜置玻片晾干待用。

1.5.3 探针标记

把 1 μ g ChIP-DNA 溶于 16 μ L 双蒸水中。加入 4 μ L DIG-Nick-Translation Mix (Roche) 混匀, 离心。在 15 $^{\circ}$ C 下反应 90 min。停止反应后, 加入 1 μ L 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0) 终止反应。标记的探针 -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.5.4 FISH 检测

在制备好的载玻片上加入 70% 甲酰胺 50 μ L, 盖上盖玻片。将玻片置于 85 $^{\circ}$ C 的杂交炉中 100 s。取出置于 70% 的冰酒精中, 脱色摇床 5 min, 然后分别置于 90%、100% 酒精中脱色摇床各 2 min, 取出晾干。配置杂交液(含 ChIP-DNA 探针)置于沸水中水浴 5 min, 然后置于冰中 5 min 以上。每玻

片滴加 20 μ L 杂交液, 置于杂交盒中, 放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱过夜处理。取出后用 1 \times 磷酸缓冲液脱色摇床 3 次, 每次 5 min。FISH 信号通过抗地高辛抗体偶联罗丹明偶联物(anti-digoxigenin-Rhodamine)检测, 染色体用 DAPI 反染。Olympus BX60 镜检中获得清晰图像后, 以气冷式数码相机(CCD) (Olympus, DP80) 摄像。

2 结果与分析

2.1 CENH3 抗体的多肽合成与效价分析

根据 NCBI 的蛋白序列库得到 CENH3 的序列如下:

N'-MARTKHPAVRKSKAEPKKKLQFERSPRPSKAQRAGGGTGTSATTRSAAGTSASGTPRQQTKQRKPHRFRPGTVALREIRKFQKTTELLIPFAPFSRLVREITDFYSKDVSRWTLEALLALQEAAYEHLVDIFEVSNLCAIHAKRVTIMQKDMQLARRIGRRPW-C'。

设计近氨基端的 14 个氨基酸序列(AEPKKKLQFERSPR)进行多肽人工合成, 合成成功后利用该多肽进行兔免疫实验, 进行抗体制备。7 次免疫后提取兔血清, 进行抗体效价的 ELISA。由于 HIS 抗体分子量较小并且容易分离和纯化, 选其作为系统操作的阳性对照, 效价(即 OD_{450} 值)为 2.758; 阴性对照为 5% 牛奶, 效价为 0.075。血清抗体稀释度为 3125, 6250, 1.25 万, 2.5 万, 5 万, 10 万, 20 万, 40 万, 80 万时, 效价分别为 2.491, 2.671, 2.758, 2.665, 2.652, 2.685, 2.457, 2.034, 1.084。可见, 当血清抗体稀释度为 1:80 万时, OD_{450} 值小于 2, 该浓度下的抗体呈阴性, 抗体灵敏度较低; 在稀释度为 1:40 万以内的效价都大于 2, 抗体灵敏性较好。因此制备的血清抗体其有效的稀释度要控制在 1:40 万以内。

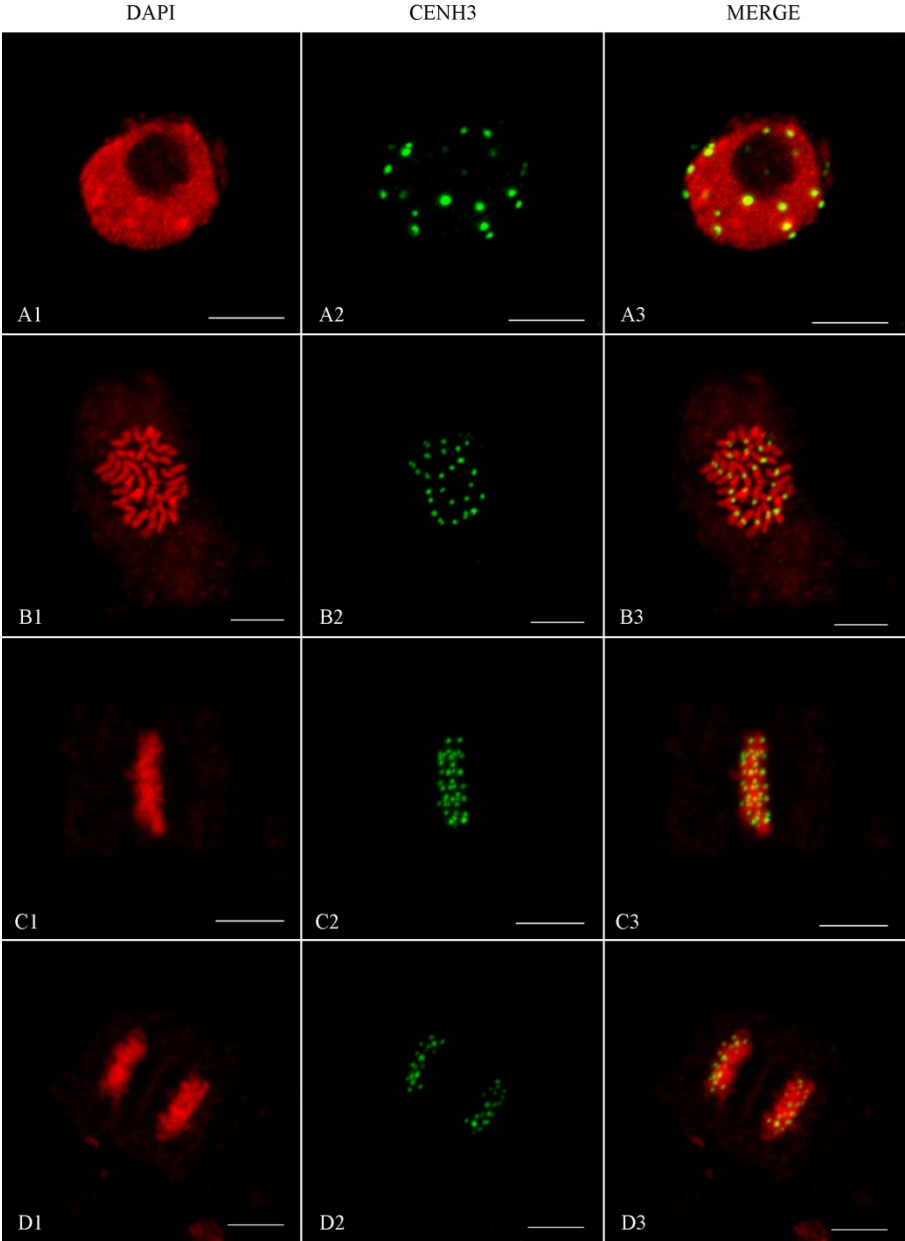
2.2 CENH3 蛋白免疫荧光分析

蛋白免疫荧光分析是检测着丝粒相关蛋白抗体是否有效的主要手段之一。通过观察信号在染色体上的位置和强弱来判断抗体的使用价值。

我们利用通过 ELISA 分析合格的 CENH3 抗体, 对水稻材料日本晴的根尖细胞进行蛋白免疫荧光检测(图 1), 其中染色体用含 DAPI 抗褪色剂反染, 如红色区域所示; 绿色信号为 CENH3 蛋白信号, 在细胞有丝分裂间期、前期、中期和后期时期信号都明显可见。在有丝分裂间期看不出着丝粒区域所在位置, 但是染色质经碱性染料

DAPI 染色, 染色较深的区域是异染色质区域(图 1-A1 中箭头所示), 染色较浅的区域是常染色质区域, 而着丝粒就位于异染色质区域。可以看出, CENH3 信号都出现在异染色质区域(图 1-A3 中箭头所示); 在有丝分裂前期(图 1-B), 染色体形态分明, 可以清晰的辨识出染色体的主缢痕, 即着丝粒区域(图 1-B1 中箭头所示), 其中, 共有 24 个 CENH3 的信号并且均位于染色体的着丝粒区

域; 有丝分裂中期(图 1-C), 染色体并排分布在赤道板上, 在中期结束后染色体将加倍, 而 CENH3 的信号也将随着着丝粒而加倍。细胞分裂后期(图 1-D), 染色体随着着丝点被拉向两级, CENH3 信号均位于子细胞的一侧(如图 1-D3 所示)。在所观察的有丝分裂的各个时期的细胞中, 均能观察到明显可见的 CENH3 的信号, 表明制备的抗体可用于蛋白免疫荧光分析。

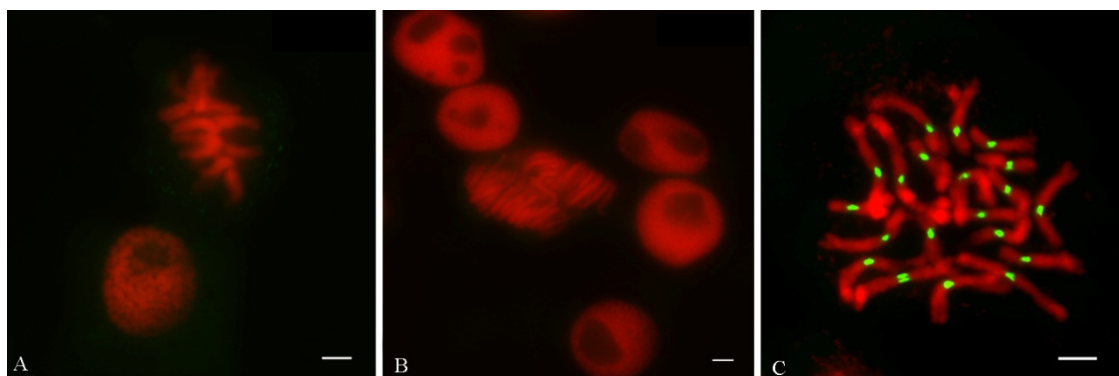


A—有丝分裂间期; B—有丝分裂前期; C—有丝分裂中期; D—有丝分裂后期; 红色表示染色体, 绿色为 CENH3 抗体。标尺为 5 μm。

A, Interphase; B, Prophase; C, Metaphase; D, Anaphase. All chromosomes are counterstained with DAPI, represented by red signals, and green signals represent CENH3. Scale bar=5 μm.

图 1 水稻日本晴根尖细胞 CENH3 抗体的蛋白免疫荧光信号检测分析

Fig. 1. Immunofluorescence analysis of CENH3 antibody in somatic root tip cells of Nipponbare.



红色表示染色体, 绿色表示 CENH3 抗体。标尺为 5 μm 。

All chromosomes are counterstained with DAPI, represented with red signals, and green signals represent CENH3. Scale bar=5 μm .

图 2 大麦(A)、小麦(B)和玉米(C)根尖细胞 CENH3 抗体的蛋白免疫荧光信号检测分析

Fig. 2. Immunofluorescence analysis of CENH3 antibody in somatic root tip cells of barley(A), wheat(B) and maize(C).

同时, 为了验证制备的 CENH3 抗体是否在其他作物上也有效, 分别对小麦、大麦和玉米的根尖染色体进行了蛋白免疫荧光检测(图 2)。在小麦和大麦的根尖染色体上并没有检测到 CENH3 信号, 但是在玉米上能够观察到明显的 CENH3 信号, 并且也位于着丝粒区域。说明本研究制备的 CENH3 抗体在玉米中的蛋白免疫荧光分析有效。

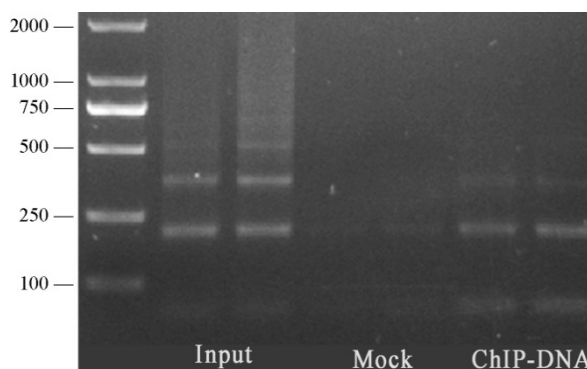
2.3 ChIP-DNA 的 PCR 分析

由于水稻着丝粒是由蛋白和 DNA 组成的复合体, 所以分析与着丝粒蛋白相结合 DNA 序列的特征是进行着丝粒功能和结构分析的重要内容之一。近年来发展的染色质免疫共沉淀(ChIP)方法是研究蛋白与 DNA 互作的主要手段。为了进一步分析本研究中所获得的着丝粒蛋白 CENH3 抗体是否能应用于相关的 ChIP 分析, 我们利用该抗体进行 ChIP-PCR 验证该 DNA 是否来源于水稻着丝粒特异 DNA 序列。

通过分别对基因组 DNA(Input), 阴性对照(Mock)和 ChIP-DNA 设置两个重复组, 以水稻着丝粒特异 DNA 序列 CentO 设计引物对进行 PCR 扩增(图 3)。以阳性对照(基因组 DNA)为模板扩增出相关条带, 由于水稻着丝粒特异 DNA 序列 CentO 是重复序列, 所以扩增出 3 个条带, 而阴性对照(Mock)几乎没有相应条带扩增出。而由 CENH3 抗体所获得的 ChIP-DNA 序列为模板可以扩增出相应条带, 并与阳性对照相吻合。说明该 ChIP-DNA 来源于水稻着丝粒特异 DNA 序列。

2.4 ChIP-DNA 的 FISH 定位分析

染色体荧光原位杂交(FISH)是验证重复序列在染色体上具体位置的重要方法之一。为了进一



Input 是水稻全基因组 DNA, 作为阳性对照; Mock 是 ChIP 过程中加入正常的兔血清沉淀下来的 DNA, 作为阴性对照。

Input, Rice genome DNA(positive control); Mock, ChIP-DNA immunoprecipitated with normal rabbit serum(negative control).

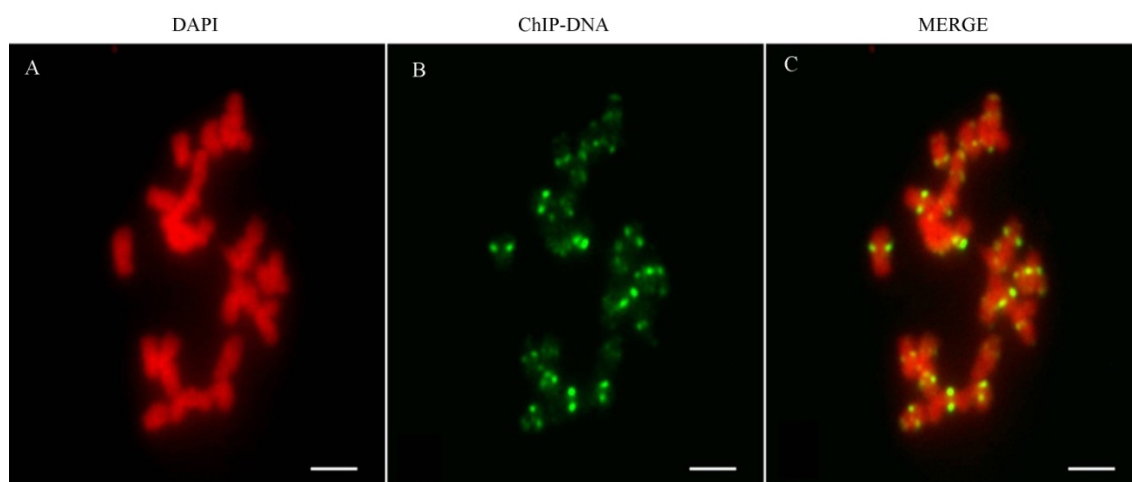
图 3 CENH3 抗体免疫沉淀 DNA 的 PCR 结果

Fig. 3. PCR results of ChIP-DNA immunoprecipitated with CENH3 antibody.

步验证 CENH3 抗体的 ChIP-DNA 是否位于着丝粒区域, 我们将 ChIP-DNA 标记成 FISH 探针, 进行荧光原位杂交。根据 FISH 的检测结果(图 4), 红色信号为染色体, 绿色信号为 ChIP-DNA 的杂交信号, 其中 ChIP-DNA 的信号位于染色体着丝粒区域, 进一步说明该 ChIP-DNA 位于水稻着丝粒区域, 是与着丝粒特异组蛋白 CENH3 特异结合的 DNA 序列。

3 讨论

本研究中制备的 CENH3 抗体, 通过效价的测定和蛋白免疫荧光检测, 都证明了 CENH3 抗体的有效性, 蛋白荧光信号存在于水稻细胞各时



红色表示染色体, 绿色表示 ChIP-DNA 的 FISH 信号, 标尺为 5 μm 。

All chromosomes are counterstained with DAPI, represented with red signals, and green signals represent ChIP-DNA. Scale bar=5 μm .

图 4 日本晴根尖细胞 ChIP-DNA 的荧光原位杂交信号检测结果

Fig. 4. FISH analysis of ChIP-DNA in somatic root tip cells of Nipponbare.

期的着丝粒上。同时, 对制备的 CENH3 抗体进行染色质免疫沉淀, 得到 ChIP-DNA, 通过 FISH 定位分析进一步证明制备的 CENH3 抗体可用于 ChIP 分析。

CENH3 是组蛋白 H3 的变体, 存在于真核生物的功能着丝粒中^[18]。近年来, 在玉米、水稻和拟南芥中都鉴别出植物的 CENH3。对于着丝粒特异组蛋白 CENH3 的定位分析重要的方法之一就是利用对应的抗体进行蛋白免疫荧光检测。目前, 可用于蛋白免疫荧光分析的抗体很多, 但是这些抗体不一定可以用到 ChIP 分析上, 这一方面和抗体的制备有关系, 另一方面是由于抗体的复杂性导致非特异性反应较多, 从而导致实验结果无法判断, 所以对于制备的抗体需要进一步的纯化。此前, 我们实验室使用的 CENH3 抗体都是购买或赠与的国外制备抗体, 获得途径繁琐或研究成本较高, 所以很有必要通过自己制备有效可用的 CENH3 抗体。本研究中, 我们制备的水稻 CENH3 抗体, 先后通过 ELISA 方法测定效价, 蛋白免疫荧光进行检测, 都证实制备的 CENH3 抗体是有效的。同时, 进一步的 ChIP 分析和 FISH 定位分析证明由该抗体所免疫共沉淀获得的 DNA 序列是属于水稻功能着丝粒区域。确定制备的 CENH3 抗体具有较好的特异性, 可应用于与着丝粒结构与功能分析的相关实验中, 对进一步解析水稻 CENH3 及着丝粒功能关系的研究提供了便利条件。另外, 该抗体还可以应用于玉米等其他物种, 为进一步推广该抗体的使用提供可能。

参考文献:

- [1] Allshire R C, Karpen G H. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: Old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 923-937.
- [2] Malik H S, Henikoff S. Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell*, 2009, 138: 1067-1082.
- [3] Henikoff S, Ahmad K, Malik H S. The centromere paradox: Stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science*, 2001, 293: 1098-1102.
- [4] Sullivan B A, Blower M D, Karpen G H. Determining centromere identity: Cyclical stories and forking paths. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 584-596.
- [5] Lefrancois P, Auerbach R K, Yellman C M, Roeder G S, Snyder M. Centromere-like regions in the budding yeast genome. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003209.
- [6] Clarke L. Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Curr Opin Genet&Dev*, 1998, 8: 212-218.
- [7] Cheeseman I M, Drubin D G, Barnes G. Simple centromere, complex kinetochore: Linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast. *J Cell Biol*, 2002, 157: 199-203.
- [8] Schueler M G, Higgins A W, Rudd M K, Gustashaw K, Willard H F. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science*, 2001, 294: 109-115.
- [9] Sun X, Le H D, Wahlstrom J M, Karpen G H. Sequence analysis of a functional Drosophila centromere. *Genome Res*, 2003, 13: 182-194.
- [10] Ananiev E V, Phillips R L, Rines H W. Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.)

- centromeric regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 13073-13078.
- [11] Kamm A, Galasso I, Schmidt T, Heslop-Harrison J S. Analysis of a repetitive DNA family from *Arabidopsis arenosa* and relationships between *Arabidopsis* species. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 853-862.
- [12] Cheng Z, Dong F, Langdon T, Ouyang S, Buell C R, Gu M, Blattner F R, Jiang J. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. *Plant Cell*, 2002, 14: 1691-1704.
- [13] Yoda K, Ando S, Morishita S, Houmura K, Hashimoto K, Takeyasu K, Okazaki T. Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7266-7271.
- [14] Cleveland D W, Mao Y, Sullivan K F. Centromeres and kinetochores: From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, 2003, 112: 407-421.
- [15] Talbert P B, Masuelli R, Tyagi A P, Comai L, Henikoff S. Centromeric localization and adaptive evolution of an *Arabidopsis* histone H3 variant. *Plant Cell*, 2002, 14: 1053-1066.
- [16] Earnshaw W C, Rothfield N. Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma*, 1985, 91: 313-321.
- [17] Jin W, Melo J R, Nagaki K, Talbert P B, Henikoff S, Dawe R K, Jiang J. Maize centromeres: Organization and functional adaptation in the genetic background of oat. *Plant Cell*, 2004, 16: 571-581.
- [18] Nagaki K, Terada K, Wakimoto M, Kashiwara K, Murata M. Centromere targeting of alien CENH3s in *Arabidopsis* and tobacco cells. *Chrom Res*, 2010, 18: 203-211.
- [19] Kurumizaka H, Horikoshi N, Tachiwana H, Kagawa W. Current progress on structural studies of nucleosomes containing histone H3 variants. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, 23: 109-115.
- [20] Palmer D K, O'Day K, Wener M H, Andrews B S, Margolis R L. A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol*, 1987, 104: 805-815.
- [21] Bui M, Dimitriadis E K, Hoischen C, An E, Quenet D, Giebe S, Nita-Lazar A, Diekmann S, Dalal Y. Cell-cycle-dependent structural transitions in the human CENP-A nucleosome in vivo. *Cell*, 2012, 150: 317-326.
- [22] Malvezzi F, Litos G, Schleiffer A, Heuck A, Mechtler K, Clausen T, Westermann S. A structural basis for kinetochore recruitment of the Ndc80 complex via two distinct centromere receptors. *EMBO J*, 2013, 32: 409-423.
- [23] Hori T, Shang W H, Takeuchi K, Fukagawa T. The CCAN recruits CENP-A to the centromere and forms the structural core for kinetochore assembly. *J Cell Biol*, 2013, 200: 45-60.
- [24] Blower M D, Karpen G H. The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 730-739.
- [25] Howman E V, Fowler K J, Newson A J, Redward S, MacDonald A C, Kalitsis P, Choo K H. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1148-1153.
- [26] Nagaki K, Cheng Z, Ouyang S, Talbert P B, Kim M, Jones K M, Henikoff S, Buell C R, Jiang J. Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat Genet*, 2004, 36: 138-145.
- [27] Zhong C X, Marshall J B, Topp C, Mroczek R, Kato A, Nagaki K, Birchler J A, Jiang J, Dawe R K. Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. *Plant Cell*, 2002, 14: 2825-2836.
- [28] Nagaki K, Murata M. Characterization of CENH3 and centromere-associated DNA sequences in sugarcane. *Chrom Res*, 2005, 13: 195-203.
- [29] van Lente F, Jackson J F, Weintraub H. Identification of specific crosslinked histones after treatment of chromatin with formaldehyde. *Cell*, 1975, 5: 45-50.
- [30] Jackson V. Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent. *Cell*, 1978, 15: 945-954.
- [31] Jackson V, Chalkley R. A new method for the isolation of replicative chromatin: selective deposition of histone on both new and old DNA. *Cell*, 1981, 23: 121-134.
- [32] Jackson V, Chalkley R. Use of whole-cell fixation to visualize replicating and maturing simian virus 40: Identification of new viral gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 6081-6085.
- [33] Solomon M J, Varshavsky A. Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: A probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 6470-6474.
- [34] Lee H R, Zhang W, Langdon T, Jin W, Yan H, Cheng Z, Jiang J. Chromatin immunoprecipitation cloning reveals rapid evolutionary patterns of centromeric DNA in *Oryza* species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11793-11798.
- [35] Nagaki K, Talbert P B, Zhong C X, Dawe R K, Henikoff S, Jiang J. Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres. *Genetics*, 2003, 163: 1221-1225.