

· 特邀专家方法 ·

生物发光成像无损伤研究植物生物钟的方法

于英俊^{1,2}, 徐航^{1,2}, 王雷^{1,2*}

¹中国科学院植物研究所, 植物分子生理学重点实验室, 北京 100093; ²中国科学院大学, 北京 100049

摘要 植物生物钟系统是植物为了适应地球自转进化出的以约24小时为周期的分子系统, 通过感知并整合外界周期性变化的环境信号进而协调细胞内相应基因的表达和能量状态, 赋予植物对生存环境的适应性并参与调控多个植物生长发育过程。目前, 越来越多的研究聚焦于解析植物生物钟的分子机制, 基于此也衍生出很多研究生物钟表型的方法。该文在总结已有生物钟检测方法的基础上, 重点介绍生物钟表型实验中最常用且比较稳定可靠的实验方法, 以期生物钟的表型研究尤其是生物钟机制研究提供技术支持与借鉴。

关键词 生物钟, 表型分析, FFT-NLLS, BRASS

于英俊, 徐航, 王雷 (2020). 生物发光成像无损伤研究植物生物钟的方法. 植物学报 55, 177–181.

地球自转引起光照和温度等诸多环境因子昼夜周期变化。为了更好地应对变化的环境信号, 生物体进化出内源性生物钟系统来协调环境变化与自身生长发育。不同物种中生物钟系统关键组分虽有明显差异, 但均包含一些共同特征: (1) 具有内源性, 在持续光照或恒定温度条件下仍能维持近24小时的节律性; (2) 具有可驯化性, 如改变光周期, 生物钟可被重新设定来适应新的生存环境; (3) 具有温度补偿现象, 即在一定温度范围内, 生物钟系统仍能维持周期基本稳定(不被改变) (谢启光和徐小冬, 2015)。植物生物钟参与调控植物多种生命活动, 如激素信号 (Covington and Harmer, 2007)、叶片衰老 (Zhang et al., 2018, 2019)、下胚轴伸长 (Niwa et al., 2009)、根发育 (Li et al., 2019)、生长代谢 (Müller et al., 2014)、开花过程 (Doyle et al., 2002)、光合作用 (Dodd et al., 2005) 以及对生物和非生物胁迫的响应 (Sanchez et al., 2011; Ronald and Davis, 2017), 在植物正常生长发育过程中起着非常重要的作用 (魏华等, 2018)。

对生物节律科学性观测始于1729年, 法国天文学家 de Mairan 观测到在持续黑暗条件下植物的叶片运动仍能维持正常光-暗循环条件下的节律 (Mclung,

2006)。生物钟节律主要由周期、振幅和相位3个参数决定。目前, 已研发出多种植物生物节律检测方法, 主要包括损伤和非损伤检测法。使用这些方法通过追踪生物钟关键基因的节律性表达变化, 可精确计算出植物生物钟的上述参数。现对几种常用方法进行简述。

(1) Time-course RT-qPCR 检测时间维度基因表达节律性。检测某一基因转录本在时间维度上的表达变化可以采用 Time-course RT-qPCR, 可根据实验需要选择将植物材料先培养在 12L/12D (12小时光照/12小时黑暗)、LD (长日照) 和 SD (短日照) 光周期下驯化, 然后在 DD (持续黑暗) 或 LL (持续光照) 条件下每 2–4 小时取材 1 次, 连续取材 2 天或以上, 再利用 RT-qPCR 检测连续时间段内该基因的表达模式。该方法的优点在于可在不含有报告基因的任何植物材料中进行, 免去了遗传杂交获得含生物钟报告基因材料的繁琐步骤。缺点是耗时费力, 取材时间精度受限, 而且损伤检测过程中的取材或实验操作等会造成误差。

(2) 叶片运动活体监测与分析方法。分析植物生物钟节律也可通过测量植物生理上的节律变化进行, 如叶片位置 (Edwards and Millar, 2007)、下胚轴伸长 (Dowson-Day and Millar, 1999)、花序伸长 (Agosti et

收稿日期: 2019-12-13; 接受日期: 2020-01-23

基金项目: 国家自然科学基金 (No.31770287)

* 通讯作者。E-mail: wanglei@ibcas.ac.cn

al., 1997)和叶片气孔开合(Somers et al., 1998)。例如,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)幼苗,支撑叶片的叶柄正面和背面细胞伸长的反相振荡会导致叶片(尤其是幼叶)高度在白天降低,而在夜间升高(Uehlein and Kaldenhoff, 2008)。根据图像之间叶片位置的差异可测定叶片运动的节律。其原理基于在持续的一段时间里收集连续的幼苗图像,并测量每个图像中初生叶片的垂直位置。该方法最初是手动收集和测量一系列图像,后来Edwards和Millar (2007)在拟南芥中开发了自动化系统,该系统使用1组CCD相机定时捕获幼苗图像并使用图像分析软件进行测量分析。该方法优点在于非损伤检测,且易于观察,无须事先对植物进行遗传操作。此后,基于上述原理人们还开发出了几种类似系统,可实现多次拍摄多株幼苗(Yanovsky et al., 2000; Salomé et al., 2002; Muller and Jimenezomez, 2016)。

(3) 植物活体生物发光方法。利用生物钟关键基因的启动子驱动荧光素酶(luciferase, LUC)表达,结合生物发光实时采集检测系统,是目前植物生物钟研究最可靠且最重要的方法,具有非损伤性、时间精度高且数据采集和分析全自动化等优点。该方法最早使用CAB2 (*CHLOROPHYLLA/B BINDING PROTEIN 2*)基因启动子融合LUC基因作为报告基因,实验结果显示CAB2pro:LUC的荧光强度与CAB2自身转录本的表达几乎一致,并可进行连续检测(Millar et al., 1995)。随后,又出现使用CCR2 (*COLD CIRCADIAN RHYTHM RNA BINDING 2*) (Más et al., 2003)、CCA1 (*CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1*)以及TOC1 (*TIME OF CAB EXPRESSION 1*)等基因启动子驱动LUC基因表达来检测生物钟表型(Alabadi et al., 2001; Doyle et al., 2002)。目前,根据选取材料的不同,又可细分为原生质体方法、细胞培养方法和整株植物方法。原生质体方法可用来研究突变后可能导致植株致死的关键基因的生物钟表型,也可对由于基因功能冗余而表现出单个基因表型微弱甚至观察不到表型的基因家族进行研究。此外,还可结合amiRNA (artificial microRNA)技术在拟南芥原生质体中降低内源靶基因或者基因家族的表达水平,同时瞬时共转报告基因来快速确定基因的功能(Wang et al., 2013)。具体操作可参照Kim和Somers (2010)的方法。细胞培养方法目前应用较少。Naka-

michi等(2004)建立了拟南芥营养缺陷型培养细胞系T87,并且通过农杆菌介导的DNA转化方法构建了带有CCA1pro:LUC以及PRRspro: LUC (*PSEUDO-RESPONSE REGULATORspro: LUC*)的转基因细胞系。他们将这些细胞系的抗性愈伤组织样细胞转移至装有新鲜CIM琼脂培养基的玻璃瓶中,驯化培养3天后进行生物发光检测,结果显示与完整植株的生物钟表型一致。该方法为生物钟表型的快速检测提供了新思路。本文主要对利用整株植物的生物发光监测和生物钟表型计算方法进行详细阐述,旨在为生物钟表型研究提供参考。此外,也可为基于水稻(*Oryza sativa*)愈伤组织以及大豆(*Glycine max*)发根系统的生物发光成像研究植物生物钟提供借鉴。

1 实验材料

实验材料为含CCA1pro:LUC报告基因的Col-0野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)幼苗。

2 试剂及其配方

试剂包括MS培养基(Murashige & Skoog medium)、75%乙醇、10% NaClO、荧光素(luciferin)和0.01% Triton X-100。

- MS培养基: 4.33 g MS培养基粉末与30 g蔗糖溶于蒸馏水中,调pH至5.8,定容至1 L,按照每升加7 g的量将Agar加入培养基中,121°C高压灭菌15分钟。
- 75%乙醇: 将75 mL无水乙醇加入蒸馏水定容至100 mL。
- 10% NaClO: 将100 mL NaClO溶于蒸馏水定容至1 L,再按照0.1%的比例加入Triton X-100。
- 荧光素: 荧光素粉末5 g,分子量为318.42 g·mol⁻¹,用31.4 mL无菌水溶解,配成0.5 mol·L⁻¹ Luciferin母液,在超净工作台上用0.45 μm滤膜过滤,分装后低温避光保存。工作配方: 1 mL无菌蒸馏水+40 μL 0.5 mol·L⁻¹ Luciferin+1 μL 0.01% Triton X-100。

3 仪器设备

仪器包括光照培养箱、化学发光成像仪和CCD相机(Princeton Instruments, LN/1300-EB/1)。

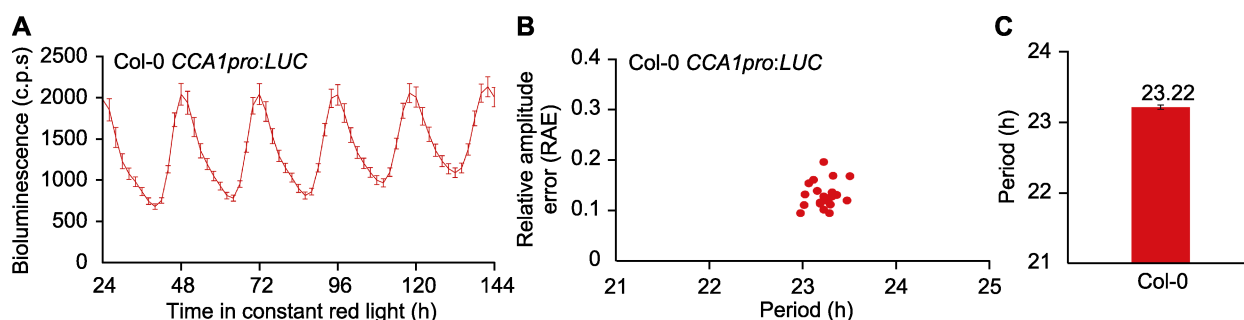


图1 Col-0野生型拟南芥CCA1pro:LUC在持续红光条件下的生物节律分析

(A) 携带有CCA1pro:LUC报告基因的Col-0野生型拟南芥在持续红光条件下, 从LL24到LL144时间范围内生物发光的荧光节律(c.p.s代表每株植物每秒钟采集到的光子数)。(B) 野生型拟南芥生物钟周期的散点图, X轴表示生物钟周期, Y轴表示相对振幅误差; 根据结果显示每株幼苗周期较为集中, 相对一致, 而且相对振幅误差低于0.5, 结果可靠(一般认为当RAE值大于0.5时, 节律的振荡强度偏低, 不适于计算生物钟周期)。(C) 野生型拟南芥生物钟周期的柱状图; 根据结果显示周期长度在持续红光下为23.22小时。计算方法: FFT-NLLS。数据为21株幼苗的平均值±标准误。

Figure 1 Circadian phenotype analysis of Col-0 wild type *Arabidopsis thaliana* CCA1pro:LUC under continuous red light (A) Trace plot of bioluminescence in Col-0 wild type *Arabidopsis thaliana* with CCA1pro:LUC reporter under continuous red light conditions, from LL24 to LL144 (the abbreviation of c.p.s represents the counts of photons per seedling). (B) Scatter plot of circadian period (x-axis) and relative amplitude error (RAE) (y-axis) of Col-0; According to the results, the periods are more concentrated and relatively consistent, and the relative amplitude errors are all lower than 0.5, which indicates that the result is reliable (generally, when the RAE is greater than 0.5, the circadian oscillation intensity is relatively low, which is not suitable for calculating the period). (C) Estimated circadian period of CCA1pro:LUC in Col-0; According to the calculation, circadian period length of Col-0 is 23.22 hours under continuous red light. Calculation was performed using FFT-NLLS method. Data are presented as means±SE ($n=21$).

4 实验程序

4.1 拟南芥幼苗培养

用于植物活体荧光实验的拟南芥幼苗培养方法如下。

- (1) 种子消毒 分装携带有CCA1pro:LUC报告基因的拟南芥Col-0野生型或其它需测试材料到1.5 mL离心管中, 75%乙醇消毒2分钟, 10% NaClO消毒10分钟, 于超净工作台上用无菌蒸馏水清洗种子3–5遍。
- (2) 点种 将消毒好的拟南芥种子点种于含3%蔗糖的MS培养基上, 每粒种子尽量分开。
- (3) 幼苗培养 将点好的种子放于4°C冰箱中整齐化2–4天, 随后转移至12小时光照/12小时黑暗、22°C恒温光照培养箱中生长8天。
- (4) 移苗 提前准备好9 cm×9 cm方皿的MS培养基(含3%蔗糖), 在超净工作台上将培养好的拟南芥幼苗转移至方皿中, 按照7株×7株的间距摆放幼苗, 之后向幼苗滴加配制好的荧光素(工作配方), 在化学发光成像仪中预检测, 确保所拍摄幼苗至少20株(以上过程均需无菌操作)。然后放回到12小时光照/12小时

黑暗、22°C恒温光照培养箱中。次日灯开后1小时内开始生物发光图像的延时采集, 一般每隔2小时采集1次, 连续采集7天。

4.2 拟南芥植株活体荧光实验

按照CCD相机可拍摄范围将培养皿放置于恒温持续光照(根据实验要求也可选择持续黑暗)培养箱中, 当CCD相机工作温度在-80°C以下时开始采集生物发光信号。使用MetaMorph图像分析软件进行图像的实时采集, 设置实验参数每隔2小时采集1次荧光值, 每次采集时间为10–20分钟。荧光信号采集时需要确保绝对黑暗条件。此外, 每次开始荧光信号采集之前需先黑暗3–5分钟, 以消除植物体内自发荧光对实际荧光信号值的干扰。

4.3 生物钟表型分析

- (1) 数据导出 待荧光信息采集完毕, 利用MetaMorph软件测量并导出每株拟南芥幼苗的连续荧光强度值。具体测量方法可参考MetaMorph软件使用说明。

后期数据分析时,为排除初始光周期的影响,一般只采用24–144小时的数据,而不采用第1个24小时内的数据。

(2) 数据分析处理 对获得的数据使用BRASS (Biological Rhythms Analysis Software System)软件(从<http://millar.bio.ed.ac.uk/PEBrown/BRASS/BrassPage.htm>网站下载)及FFT-NLLS (Fast Fourier Transform Non-Linear Least Square)算法进一步分析生物钟表型;也可通过BioDare网站(<https://biodare2.ed.ac.uk/>) (通过该网站可进行数据共享、数据处理以及数据分析,且共有包含FFT-NLLS算法在内的6种生物钟数据分析算法,具体可参照Zielinski等(2014)的方法)在线分析。获得的数据包可抽取总体及各个单株的生物钟周期、振幅和相位等信息。一般BRASS计算及作图选取时间窗口为24–144,也可根据需要进行调整和观察荧光数值曲线进行调整,代表性结果如图1A–C。

5 注意事项

- (1) 荧光素母液需要放置于–20°C避光保存,荧光素工作液现配现用,且需避光。
- (2) CCD相机荧光信息采集需在黑暗条件下进行,切勿打开培养箱箱体。
- (3) 全程需确保无菌操作,染菌会导致生物节律结果不准确。

参考文献

- 魏华, 王岩, 刘宝辉, 王雷 (2018). 植物生物钟及其调控生长发育的研究进展. *植物学报* **53**, 456–467.
- 谢启光, 徐小冬 (2015). 植物生物钟与关键农艺性状调控. *生命科学* **27**, 1336–1344.
- Agosti RD, Jouve L, Greppin H (1997). Computer-assisted measurements of plant growth with linear variable differential transformer (LVDT) sensors. *Arch Sci* **50**, 233–244.
- Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay SA (2001). Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**, 880–883.
- Covington MF, Harmer SL (2007). The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* **5**, e222.
- Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AAR (2005). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* **309**, 630–633.
- Dowson-Day MJ, Millar AJ (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J* **17**, 63–71.
- Doyle MR, Davis SJ, Bastow RM, McWatters HG, Kozma-Bognár L, Nagy F, Millar AJ, Amasino RM (2002). The *ELF4* gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **419**, 74–77.
- Edwards KD, Millar AJ (2007). Analysis of circadian leaf movement rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol Biol* **362**, 103–113.
- Kim J, Somers DE (2010). Rapid assessment of gene function in the circadian clock using artificial microRNA in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* **154**, 611–621.
- Li B, Wang Y, Zhang YY, Tian WW, Chong K, Jang JC, Wang L (2019). PRR5, 7 and 9 positively modulate TOR signaling-mediated root cell proliferation by repressing *TANDEM ZINC FINGER 1* in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **47**, 5001–5015.
- Más P, Alabadi D, Yanovsky MJ, Oyama T, Kay SA (2003). Dual role of *TOC1* in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 223–236.
- McClung CR (2006). Plant circadian rhythms. *Plant Cell* **18**, 792–803.
- Millar AJ, Carre IA, Strayer CA, Chua NH, Kay SA (1995). Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* **267**, 1161–1163.
- Müller LM, von Korff M, Davis SJ (2014). Connections between circadian clocks and carbon metabolism reveal species-specific effects on growth control. *J Exp Bot* **65**, 2915–2923.
- Muller NA, Jimenez-Gomez JM (2016). Analysis of circadian leaf movements. In: Duque P, ed. *Environmental Responses in Plants. Methods in Molecular Biology*, Vol. 1398. New York: Humana Press. pp. 71–79.
- Nakamichi N, Ito S, Oyama T, Yamashino T, Kondo T, Mizuno T (2004). Characterization of plant circadian rhythms by employing *Arabidopsis* cultured cells with bioluminescence reporters. *Plant Cell Physiol* **45**, 57–67.
- Niwa Y, Yamashino T, Mizuno T (2009). The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **50**, 838–854.
- Ronald J, Davis SJ (2017). Making the clock tick: the transcriptional landscape of the plant circadian clock. *F1000-*

Res 6, 951.

Salomé PA, Michael TP, Kearns EV, Fett-Neto AG, Sharrock RA, McClung CR (2002). The *out of phase 1* mutant defines a role for PHYB in circadian phase control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 1674–1685.

Sanchez A, Shin J, Davis SJ (2011). Abiotic stress and the plant circadian clock. *Plant Signal Behav* **6**, 223–231.

Somers DE, Webb AA, Pearson M, Kay SA (1998). The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**, 485–494.

Uehlein N, Kaldenhoff R (2008). Aquaporins and plant leaf movements. *Ann Bot* **101**, 1–4.

Wang L, Kim J, Somers DE (2013). Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian

transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 761–766.

Yanovsky MJ, Izaguirre M, Wagmaister JA, Gatz C, Jackson SD, Thomas B, Casal JJ (2000). Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *Plant J* **23**, 223–232.

Zhang YY, Bo CP, Wang L (2019). Novel crosstalks between circadian clock and jasmonic acid pathway finely coordinate the tradeoff among plant growth, senescence and defense. *Int J Mol Sci* **20**, 5254.

Zhang YY, Wang Y, Wei H, Li N, Tian WW, Chong K, Wang L (2018). Circadian evening complex represses jasmonate-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **11**, 326–337.

Zielinski T, Moore AM, Troup E, Halliday KJ, Millar AJ (2014). Strengths and limitations of period estimation methods for circadian data. *PLoS One* **9**, e96462.

A Non-invasive Method for Measuring and Analyzing Circadian Phenotype in Living Plants

Yingjun Yu^{1,2}, Hang Xu^{1,2}, Lei Wang^{1,2*}

¹Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract The plant circadian clock is a time-keeping molecular system, with a cycle of ~ 24 h. It was evolved to adapt to the diel rhythmic environmental cues generated by the self-rotation of the Earth. In addition to the time-keeping function, the circadian clock also regulates a plethora of plant growth and development processes by synchronizing the endogenous energy and metabolomic status. By sensing and integrating the dynamics of external environmental cues, circadian clock can coordinate gene expression at multiple levels, thus to increase the fitness of plants. Recently, there is an increasingly demand for measuring and assessing circadian phenotype for many non-circadian research field. Here, we summarized the currently available methods for detecting circadian rhythm, and show one most commonly used standard procedure for evaluating circadian phenotype in plants, which may help to provide the applicable technical assistance for the study of the circadian clock.

Key words circadian clock, phenotype analysis, FFT-NLLS, BRASS

Yu YJ, Xu H, Wang L (2020). A non-invasive method for measuring and analyzing circadian phenotype in living plants. *Chin Bull Bot* **55**, 177–181.

* Author for correspondence. E-mail: wanglei@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 孙冬花)