

光敏核不育水稻 *OsRacD* 启动子的分离及其育性相关性分析

梁卫红^{1,2} 吴乃虎^{1,*}

(¹中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080; ²河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007; * 通讯联系人, E-mail: nhwu@genetics.ac.cn)

Isolation and Analysis of Promoter of *OsRacD* from Photoperiod Sensitive Genic Male Sterile Rice

LIANG Wei hong^{1,2}, WU Nai hu^{1,*}

(¹Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; ²College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; * Corresponding author, E-mail: nhwu@genetics.ac.cn)

Abstract: Using *OsRacD* cDNA as probe to screen the genomic library of photoperiod sensitive genic male sterile rice Nongken 58S, a positive clone containing 2 kb promoter and 396 bp coding region of *OsRacD* was obtained. Compared with the promoter of *OsRacD* cloned by reverse PCR from rice variety Nongken 58N, the homology was 99.8%, and the different nucleotides were outside the predicted response elements in promoter, suggesting that the fertility difference between Nongken 58S and Nongken 58N under long day conditions was not attributed to the difference in the structure of *OsRacD* upstream regulation sequences, but to the developmental regulation of gene differential expression.

Key words: photoperiod sensitive genic male sterility; rice; genomic library; *OsRacD* gene; promoter

摘要:以水稻 *OsRacD* 的 cDNA 序列为探针筛选光敏核不育水稻农垦 58S 基因组文库, 获得了一个包含 2 kb 的 *OsRacD* 启动区和 396 bp 编码区序列的阳性克隆。与反向 PCR 克隆的水稻农垦 58N 该基因的启动区比较, 证实该基因的启动区在农垦 58S 和农垦 58N 的同源性达到 99.8%, 且在预测的调控元件上不存在碱基差异。说明农垦 58S 和农垦 58N 在长日照条件下表现出的育性差别, 并非两者在 *OsRacD* 调控序列结构上的差别所致, 而与基因表达的发育调控有关。

关键词: 光敏核不育性; 水稻; 基因组文库; *OsRacD* 基因; 启动子

中图分类号: Q943.2; S511.03

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2006)02-0216-03

光敏核不育水稻农垦 58S 是我国科学家石明松先生于 1973 年在湖北晚粳水稻品种农垦 58 大田中首次发现的一种自然突变体^[1]。它具有在长日照、高积温环境条件下水稻花粉雄性不育, 在短日照、低积温环境条件下水稻花粉雄性可育的光周期育性转换的遗传特性, 是研究光周期诱导的雄性不育机理和光周期调控基因表达特性的典型材料。在基础理论研究上, 我国科学家开展了生理学、细胞学和遗传学等方面的深入研究, 并取得了丰硕的成果^[2-5]。在深入分析了有关光敏核不育研究的基础上, 我们认为光敏核不育水稻农垦 58S 光周期育性转换不仅仅是由单基因决定的遗传性状问题, 还涉及到水稻植株对环境光温等因素作用的反应和植物自身的发育状态。因此不能简单地仅从遗传学角度考察光敏核不育现象, 还应从光温效应、光信号转导以及特异转录因子等诸多方面, 特别是基因表达的发育调控方面综合考虑。

基于以上观点, 米志勇等^[6]利用改良的 mRNA 差别显示技术, 从可育的、经短日照处理的农垦 58S 幼穗中分离到属于植物 Rho 家族的 *OsRacD* 基因。Rho 家族的成员参与调节了多种细胞生命活动, 已经明确的功能主要是调控花粉管生长^[7-9]、细胞死亡^[10]和细胞壁合成^[11-12]。作为信号通路中的“分子开关”, *Rho* 基因的转录水平的调控对于启动多种不同的信号传导途径是一个关键的环节。RT-PCR 分析证实, 该基因在可育的材料农垦 58N 和经短日照处理的农垦 58S 幼穗中表达, 而在不育的经长日照处理的农垦 58S 材

料的幼穗中不表达^[6], 暗示 *OsRacD* 基因具有受光周期调控表达的特点。由于大部分光调节基因的表达是受其上游光效应元件激发的, 因此研究 *OsRacD* 基因启动区及其光周期应答元件, 将有助于深入理解该基因在光周期育性转换过程中的信号调节功能。本研究通过构建、筛选基因组文库, 分离了 *OsRacD* 基因的启动子, 并对其进行了分析和比较, 以期解释水稻光周期育性转换机理提供线索和依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与菌株

光敏核不育水稻 (*Oryza sativa* L. subsp. japonica) 农垦 58S 由湖北省农业科学院牟同敏教授惠赠。E. coli LE392, KW251 菌株购自 Promega 公司。

1.2 酶和化学试剂

噬菌体载体臂 EMBL 3 BamH ARMS、包装蛋白 Lambda DNA Packaging Extract、Primer-a Gene Labeling System 购自 Promega 公司; 限制性内切酶 *SauBA*, *BamH*, *SalI*, *EcoR* 购自 MBI 公司; T4 DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司。

收稿日期: 2005-04-20; 修改稿收到日期: 2005-07-08。

基金项目: 国家 973 计划资助项目 (2001CB1088); 国家 863 计划资助项目 (2002AA224061)。

第一作者简介: 梁卫红 (1968 -), 女, 博士, 副教授。

1.3 水稻基因组文库的构建

CTAB 法提取水稻农垦 58S 黄化苗的基因组 DNA 经小量部分酶切试验确定 DNA 浓度、*SauBA* 酶切时间、酶切温度后，放大体系，取 50 ~ 100 μg 的基因组 DNA 进行大量酶切，通过透析袋电洗脱法回收酶切产物，与噬菌体载体臂 EMBL3 *BamH* ARMS 连接，包装后，进行滴度测定。

1.4 基因组文库的筛选

以水稻低分子量 GTP 结合蛋白基因 *OsRacD* 的 cDNA 为探针，采用 ^{32}P 随机引物法标记后，筛选农垦 58S 基因组文库，筛选按照标记试剂盒 Primer a Gene Labeling System 说明书进行，直至得到单个阳性噬菌斑。

1.5 *OsRacD* 启动区的分离

提取阳性噬菌斑的 DNA，经 *Sal*、*EcoR* 和 *BamH* 内切酶酶切、转膜、杂交鉴定后，将阳性杂交条带亚克隆到 pBlueScript(SK) 载体上，测序。

1.6 *OsRacD* 基因启动子的分析

将测序结果在 GenBank 中进行同源性比较，鉴定所得阳性克隆的真实性。利用 Genetyx5.0 软件分析比较水稻农垦 58S 与农垦 58N 的 *OsRacD* 基因启动子序列的差异，并在植物启动子数据库 PlantCARE (database of plant promoters and their cis acting regulatory elements) 中进行启动子预测，通过国际互联网在植物顺式激活调控元件数据库 PLACE (data base of plant cis acting regulatory DNA elements) 网站进行植物相关顺式元件预测。

2 结果与分析

2.1 DNA 的纯度和完整性是高质量基因组文库构建的决定因素

多种基因组 DNA 提取方法比较结果显示，采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA 相对简单、快捷和有效，能最大限度地减少机械剪切力对大分子 DNA 的破坏。

为了得到合适大小 (15 ~ 23 kb) 并且两端具有与载体 *BamH* 臂互补粘末端的插入片段，我们利用 *BamH* 的同尾酶 *SauBA*，对水稻基因组 DNA 进行部分酶切。首先通过小量酶切确定 DNA 与酶用量的最佳比例，0.4% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物，结果 (图 1) 显示，部分酶切效果最好的

是第 4 泳道。按照这一比例放大体系进行 DNA 大量消化后，回收含 15 ~ 23 kb 片段的凝胶，参照 Sambrook 等^[13] 的方法用透析袋电洗脱的方法回收，经正丁醇浓缩后，电泳检测回收 DNA 的质量 (图略)。以 2 : 1 的摩尔数比连接回收的 DNA 大片段和载体臂，经包装和检测，结果显示文库滴度达到 5×10^6 pfu/mL。

2.2 探针制备和文库筛选

以 *Alu26* 酶切含有 *OsRacD* cDNA 全长的 pBS *OsRacD* 质粒，回收 725 bp 包含 *OsRacD* 完整的 3'-UTR 和 cDNA 编码区的 cDNA 片段。以放射性同位素 ^{32}P 标记的 *OsRacD* 的 cDNA 为探针，筛选水稻基因组文库。经多轮筛选，从约 5×10^5 个克隆中共得到了 3 个阳性噬菌斑。提取重组 DNA，分别用 *Sal*、*BamH* 和 *EcoR* 进行酶切，分析其酶切图谱并转膜，进一步进行 Southern 杂交鉴定。其中编号为 Sub B3 的阳性克隆酶切和杂交结果如图 2 所示，在约 4 kb 的 *BamH* 与 *EcoR* 双酶切片段中可能包含有 *OsRacD* 的基因组序列。将杂交阳性的片段回收，亚克隆至 pBlue Script 质粒载体中，进行核苷酸序列测定。核苷酸序列 (Sub-

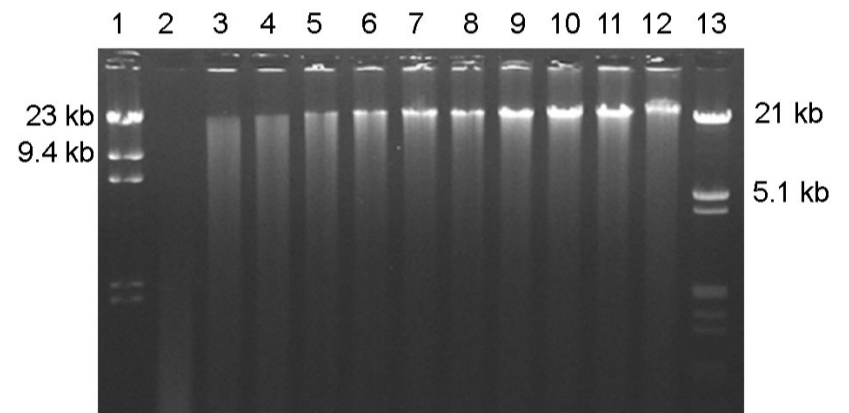


图 1 基因组 DNA 小量部分酶切产物的琼脂糖凝胶电泳检测
Fig.1 Agarose electrophoresis of small scaled partial digestion of genomic DNA .

1 - *HindI* 单酶切的 DNA 分子量标准；2 ~ 11 - 经稀释的 *SauBA* 酶切的基因组 DNA (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)；12 - 未切酶的基因组 DNA (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$)；13 - 经 *HindI* 和 *EcoRI* 双酶切的 DNA 分子量标准。

Lane 1, Lambda DNA/ *HindI* marker (0.6 μg) ; Lanes 2 to 11, Genomic DNA partial digested by *SauBA* dilutions ; Lane 12, Undigested genomic DNA control ; Lane 13, Lambda DNA/ *HindI* + *EcoRI* marker (0.6 μg) .

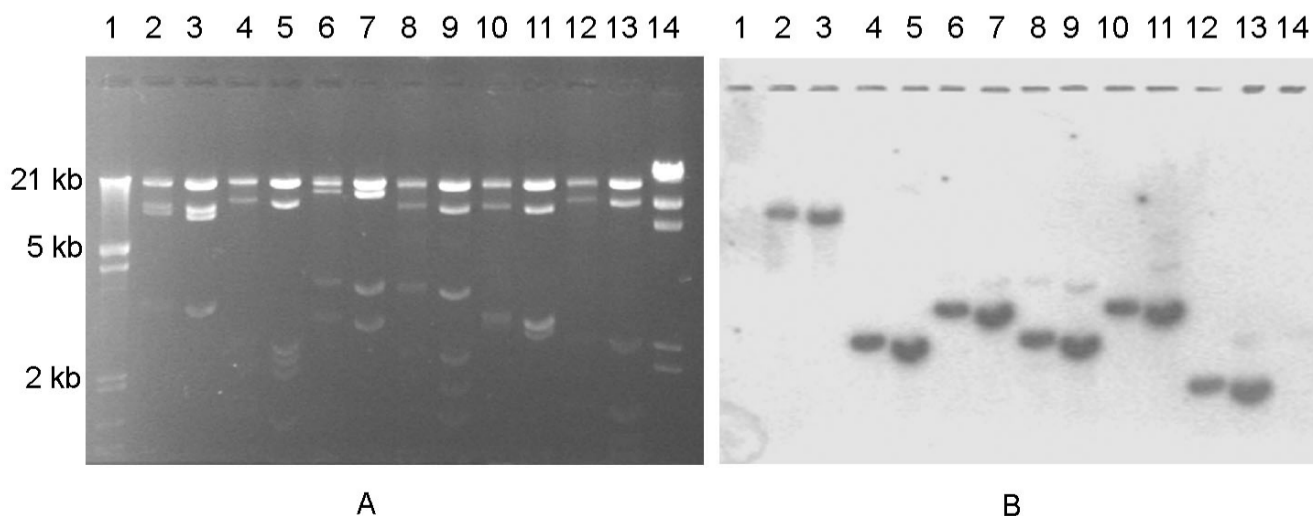


图 2 重组噬菌体 DNA (Sub B3) 酶切电泳图 (A) 及 Southern 杂交图 (B)

Fig.2 . Recombinant lambda DNA (Sub B3) analysis by endonuclease digestion (A) and Southern blotting (B) .

1 - 经 *HindI* 和 *EcoRI* 双酶切的 DNA 分子量标准；2, 3 - *SalI* 酶切；4, 5 - *EcoRI* 酶切；6, 7 - *BamHI* 酶切；8, 9 - *EcoRI* / *SalI* 酶切；10, 11 - *EcoRI* / *BamHI* 酶切；12, 13 - *SalI* / *BamHI* 酶切；14 - *HindI* 单酶切的 DNA 分子量标准。

Lane 1, Lambda DNA/ *EcoRI* + *HindI* marker ; Lanes 2 and 3, Digested by *SalI* ; Lanes 4 and 5, Digested by *EcoRI* ; Lanes 6 and 7, Digested by *BamHI* ; Lanes 8 and 9, Digested by *EcoRI* and *SalI* ; Lanes 10 and 11, Digested by *EcoRI* and *BamHI* ; Lane 12 and 13, Digested by *EcoRI* and *BamHI* ; Lane 14, Lambda DNA/ *HindI* marker .

B3)结果显示在 2450 bp 序列中,包含约 2 kb 的 *OsRacD* 的启动区和 396 bp 的 *OsRacD* 基因 5 端编码区序列。

2.3 农垦 58N 和农垦 58S *OsRacD* 基因启动区的比较

将从农垦 58S 基因组文库中筛选到的阳性克隆 Sub B3 序列与通过反向 PCR 从农垦 58N 基因组 DNA 中获得的 *OsRacD* 启动区^[14] 进行比较 结果显示农垦 58S 与农垦 58N *OsRacD* 的启动区的同源性达到 99.8%, 仅在距离翻译起始位点上游 -628 bp、-708 bp 和 -723 bp 处存在 3 个核苷酸碱基的差异,当然这种碱基的差别也有可能是由于长片段 PCR 反应过程中的误差所致,但重要的是它们都没有分布在预测的各种元件上。二级结构预测分析结果显示,这 3 个碱基的差别不会造成启动区在二级结构上的差异。这说明农垦 58S 和农垦 58N 在 *OsRacD* 基因的启动区上没有差异,两者启动区上应该可以结合相同的转录因子,调控该基因的转录。因此,农垦 58S 在长日照和短日照处理条件下所表现出的育性差异,应当不是由于基因启动区的结构差异造成的,而可能是由于农垦 58S 在长日照处理条件下,一些调控 *OsRacD* 基因的上游转录因子不表达或者丧失结合 *OsRacD* 启动区的能力引起的。

利用 PlantCARE 提供的软件,我们在 *OsRacD* 基因的 5 上游区段发现了多个已知的光应答元件的同源序列区,如: G box、I box、LAMP element 等,以及生长素应答元件 AuxRR core (GGTCcgt)、脱落酸应答顺式元件 ABRE (atcACGTgta)、水杨酸应答的顺式元件 TCA element (aAGAAgaggg)、茉莉酸应答元件 TGACG motif (TGACg) 等多种激素应答元件以及热诱导应答相关顺式元件 HSE (aAAA Aatat) 等其他一些转录激活元件,据此推测 *OsRacD* 基因的表达可能受多种元件共同调节。

3 讨论

GTP 结合蛋白是细胞内重要的信号开关分子,包括异源三聚体 GTP 结合蛋白和小 GTP 结合蛋白两类。动物细胞的研究结果显示,只有异源三聚体 GTP 结合蛋白和小 GTP 结合蛋白中的 Rho、Ras 是真正的信号分子。但是植物的异源三聚体 GTP 结合蛋白数量很少,并且对拟南芥基因组全序列的分析显示,植物没有 Ras,因而承担信号传导功能的小 GTP 结合蛋白仅有 Rho 蛋白。因此,对植物 Rho 的研究引起了广泛的关注,但是有关 *Rho* 基因启动子及其调控机制的研究还未见报道。

前期的研究结果显示,水稻 *OsRacD* 基因可能通过调控花粉管的延伸,参与了水稻农垦 58S 的光周期育性转换过程^[15-16]。为研究该基因的表达调控机理及其与光敏核不育的关系,需要对该基因的启动子进行结构分析,进而对感兴趣的元件进行深入研究。在通过反向 PCR 技术从农垦 58N 中分离该基因的启动区的同时,我们采取可信度最高的文库筛选策略,克隆了农垦 58S 该基因的启动区。对水稻农垦 58N 和农垦 58S 中该基因启动区序列的比较分析结果说明,农垦 58S 在长日照和短日照条件下的育性差别可能是受特异性转录因子的调控所致,而非基因启动子结构差异所致。进一步的启动区的片段缺失突变和凝胶阻滞研究结果^[14] 确证了该结果,因为 *OsRacD* 基因启动子 -799 bp ~ -686 bp 和 -686 bp ~ -431 bp 的区段,具有光周期应答特性,表现

为与短日照处理的可育农垦 58S 幼穗核蛋白提取物有明显的结合条带,而与经长日照处理的不育农垦 58S 幼穗核蛋白提取物则没有结合条带,说明 *OsRacD* 基因不仅受光调控,而且该基因的表达确实和特异的转录因子的调控有关,这样的转录因子仅在可育的水稻材料中才有表达。

本研究为 *OsRacD* 的深入研究提供了重要线索和依据,明确了借助于酵母单杂交技术、经典的生物化学和分子生物学手段,进一步分离和鉴定调控 *OsRacD* 的特异性转录因子,同时通过酵母双杂交分离 *OsRacD* 互作蛋白编码基因^[17] 的思路,对研究 *OsRacD* 相关信号通路的分子机理,解释水稻农垦 58S 光敏核不育现象具有重要意义。

参考文献:

- [1] 石明松. 对光照长度敏感的隐性雄性不育水稻的发现和初步分析. 中国农业科学, 1985(2): 44-48.
- [2] Zhang Q F, Shen B Z, Dai X K, et al. Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod sensitive genic male sterility in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 8675-8679.
- [3] 董哲. 光敏核不育水稻的发育生物学研究评述. 植物学报, 1998, 40: 189-199.
- [4] 李子银, 林兴华, 谢岳峰, 张端品. 利用分子标记定位农垦 58S 的光敏核不育基因. 植物学报, 1999, 41: 731-735.
- [5] 梅明华, 陈亮, 章志宏, 等. 农垦 58S 光敏核不育基因突变位点的确定及 pms3 区间的进一步作图. 中国科学, 1999, 29: 310-315.
- [6] Mi Z Y, Wang S S, Wu N H. Isolation of *OsRacD* gene encoding a small GTP binding protein from rice. *Chin Sci Bull* 2002, 47: 1673-1679.
- [7] Lin Y, Yang Z. Inhibition of pollen tube elongation by micro injected anti Rop1 Ps antibodies suggests a crucial role for Rho type GTPases in the control of tip growth. *Plant Cell*, 1997, 9: 1647-1659.
- [8] Li H, Lin Y, Heath R M, et al. Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase dependent pathway that leads to tip localized calcium influx. *Plant Cell*, 1999, 11: 1731-1742.
- [9] Kost B, Lemichez E, Spielhofer P, et al. Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J Cell Biol*, 1999, 145: 317-330.
- [10] Kawasaki T, Henmi K, Ono E, et al. The small GTP binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10922-10926.
- [11] Delmer D P, Pear J R, Andrawis A, Stalker D M. Genes encoding small GTP binding proteins analogous to mammalian rac are preferentially expressed in developing cotton fibers. *Mol Gen Genet*, 1995, 248: 43-51.
- [12] Potikha T S, Collins C C, Johnson D I, et al. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiol*, 1999, 119: 849-858.
- [13] Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Xu Y Z, You R L, Wu N H. Structural analysis and identification of cis elements of rice *osRACD* gene. *Acta Bioch Biophys Sin*, 2004, 36: 191-198.
- [15] Ye J R, Huang M J, Wu N H. Fertility analysis of the *Arabidopsis* transformed with antisense rice *osRACD* gene. *Prog Nat Sci*, 2003, 13: 424-428.
- [16] 叶建荣, 黄美娟, 赵淑慧, 吴乃虎. *osRACD* 基因表达与光敏核不育水稻光周期育性转换的相关性. 自然科学进展, 2004, 14: 166-172.
- [17] 梁卫红, 唐朝荣, 吴乃虎. 两种水稻 GDP 解离抑制蛋白基因的分离及特征分析. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(6): 785-791.