

不同抗冷性水稻中编码甘油-3-磷酸转酰酶的部分 cDNA 的序列比较研究*

刘继梅¹, 陈善娜^{1**}, 鄢波², 黄兴奇², 杨明挚¹

(1 云南大学生物系, 云南 昆明 650091; 2 云南省农科院生物技术研究所, 云南 昆明 650223)

摘要: 采用 RT-PCR 技术, 以根据国外报道的几种双子叶植物的甘油-3-磷酸转酰酶的相对保守的氨基酸序列而设计的简并引物作为扩增引物, 从不同抗冷性水稻品种中均扩增到一段约 315bp 的 cDNA 片段。测序结果表明它们都是编码 GPAT 的部分 cDNA, 含有 315 个核苷酸, 编码 105 个氨基酸。比较它们之间的核苷酸及推导氨基酸序列, 发现有一定差异, 且抗冷性相差越大的品种间差异越大。抗冷性的差异可能与脯氨酸的替换有关。

关键词: 甘油-3-磷酸转酰酶 (GPAT); cDNA 序列比较; 抗冷性; 水稻

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2000)03-0317-05

Sequence Comparison of Part cDNAs Coding for Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase from Rice Strains with Different Chilling-Resistance*

LIU Ji-Mei¹, CHEN Shan-Na¹, YAN Bo², HUANG Xing-Qi², YANG Ming-Zhi¹

(1 *Biology Department, Yunnan University, Kunming 650091, China;*

2 *Institute of Biotechnology, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China*)

Abstract: Using RT-PCR technique, we obtained a fragment of cDNA about 315bp from rice strains with different chilling-resistance. In amplification reactions, the used primers are degenerated primers, which were designed according to the conserved amino acid sequences of glycerol-3-phosphate acyltransferase from several kinds of dicotyls. Sequences obtained show that the cDNAs fragments all have the parts of cDNAs coding for Glycerol-3-phosphate acyltransferase, contain 315 nucleotides and encode 105 amino acids. While the cDNAs sequences and deduced amino acids sequences from the rice strains with different chilling-resistance were different from each other. The bigger difference of chilling-resistance between strains is, the bigger differences between their cDNAs sequences and the deduced amino acids sequences are. The difference of chilling-resistance is probably related to the substitution of proline.

Key words: Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT); cDNA sequence comparison; Chilling-resistance; Rice

* 基金项目: 国家自然科学基金 (39760011) 及云南省农科院生物技术所重点实验室基金资助项目。

** 通信联系人

收稿日期: 1999-05-26, 1999-12-14 接受发表

甘油-3-磷酸转酰酶 (GPAT) 是甘油酯生物合成中的关键酶之一, 通过催化甘油-3-磷酸的 S_n-1 位的酰基化来启动甘油酯的合成。目前许多研究结果证明, GPAT 与植物的抗冷性密切相关 (Murata, 1983; Murata 等, 1992), 即耐冷性植物如拟南芥的 GPAT 优先选择不饱和脂肪酸, 而冷敏感性植物如南瓜的 GPAT 对饱和及不饱和脂肪酸的选择机会均等; 同时把抗冷植物拟南芥中的 GPAT 基因转到冷敏感的烟草中, 得到了抗冷性的烟草植株 (Wolter 等, 1992)。但是, 此酶的这种选择特异性的分子机理还是未知的。比较不同抗冷性植物的 GPAT 基因序列, 是阐明与该酶选择特异性相关的结构特征以及 GPAT 的其它结构特征和作用机理的有效途径之一。因此, 从不同植物中分离克隆更多的 GPAT 基因并进行序列比较研究是很有必要的。国外已从抗冷性植物拟南芥 (Nishida 等, 1993)、豌豆 (Weber 等, 1991)、红花 (Bella 等, 1994)、菜豆 (Fritz 等, 1995) 及冷敏感性植物南瓜 (Ishizaki 等, 1988)、黄瓜 (Johnson 等, 1992) 中分别分离克隆到了 GPAT 基因的 cDNA。但还未见从同一物种的不同抗冷性品种中分离克隆 GPAT 基因并对其进行比较研究的报道。本研究以水稻的不同抗冷性品种为材料来分离克隆 GPAT 基因并对其进行比较研究, 为阐明 GPAT 影响植物抗冷性的分子机理开创了一条新的思路, 在国内外均属首次。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻 (*Oryza sativa* L.) 种子由云南省农科院中日合作育种课题组提供。品种为抗冷性强的丽梗 2 号 (Ligeng No. 2), 抗冷性弱的合系 24 号 (Hexi No. 24), 抗冷性极弱的十和田 (Shihetian)。

cDNA 的克隆载体为 pGEM-T 系统, 转化菌株为大肠杆菌 DH5 α 。

总 RNA 的提取试剂 TrisPureTM 和 cDNA 合成试剂盒均购自 GIBCOBRL 公司, pGEM-T 载体系统、测序试剂盒及限制性内切酶均购自 Promega 公司。

1.2 方法

采用 TrisPureTM 试剂提取水稻幼苗中的 RNA, 按照 GIBCOBRL 公司 cDNA 合成试剂盒的说明书, 以水稻 RNA 为模板, oligo (dT) 为引物, 在 Mulv 反转录酶的作用下合成 cDNA 第一链, 以此为模板进行 PCR 扩增, 引物序列是:

primer I 5' - GA [AG] CCIIT [CT] GA [CT] TA [CT] TA [CT] - 3'

primer II 5' - CAT [AG] TG [CT] TT [CT] TTI [CG] [AT] [AG] TAIAC [AG] CA-IAT - 3'

注: "I" 是脱氧次黄苷

扩增条件为: 94℃ 变性 40s, 50℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1.5min, 35 个循环后 72℃ 再延伸 7min。

扩增产物经琼脂糖胶回收纯化后, 直接克隆到 pGEM-T 载体上, 再转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 用 PCR 法筛选出转有重组质粒的菌落, 从这些菌落中提取重组质粒, 以重组质粒为模板, 按测序试剂盒 (Pharmacia, AutoReadSequencing Kit) 说明略加改动后进行测序反应, 在自动测序仪 (Pharmacia, A. L. F.TMDNA Sequencer) 上进行序列分析。

2 实验结果

2.1 不同抗冷性水稻中编码 GPAT 部分 cDNA 的 PCR 扩增及克隆

分别以水稻丽梗 2 号, 合系 24 号, 十和田的 RNA 反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 通过简并引物 PCR 技术, 均扩增到了一条约 315bp 的特异性较强的带 (图 1), 并经回收纯化后直接克隆到 pGEM-T 载体的多克隆位点区。对克隆子进行筛选鉴定后, 得到了重组有水稻丽梗 2 号, 合系 24 号, 十和田的 GPAT 基因的部分 cDNA 的克隆子, 它们分别是 GTL5, GTH8, GTS15。

2.2 不同抗冷性水稻中编码 GPAT 部分 cDNA 的序列比较

分别从克隆子 GTL5, GTH8, GTS15 中提取的重组质粒 pGTL5, pGTH8, pGTS15 为模板进行测序分析, 测序结果表明从不同抗冷性水稻中扩增到的该段 cDNA 均是编码 GPAT 基因的部分 cDNA, 含有 315 个核苷酸, 分别编码 105 个氨基酸。与国外报道的

双子叶植物中的该段 cDNA 进行比较, 其核苷酸及推导氨基酸的序列同源性均达到 70% 以上。不同抗冷性水稻之间进行比较, 发现该段 cDNA 的核苷酸及推导氨基酸序列都有一定的差异 (图 2)。

3 讨论

目前, 对 GPAT 基因影响植物抗冷性的分子机理的研究已成为国内外的一个研究热点。国外已从不同抗冷性的植物中克隆到了一些 GPAT 基因, 但是对单子叶植物中的 GPAT 基因的克隆尚未见报道。此外, 已分离到的 GPAT 基因均来自于亲缘关系较远的不同抗冷性植物, 如冷敏感的南瓜, 黄瓜与抗冷的拟南芥菜, 红花等。而本实验中选取的材料是水稻的不同抗冷性品种, 这可以避免由于物种差异较大而带来的干扰, 提高可比性。同时, 本研究对水稻 GPAT 基因的分离克隆, 还为今后进一步研究单子叶植物中的 GPAT 基因奠定了基础。

在本研究中, 我们发现抗冷性不同的 3 个品种水稻中, 该部分 GPAT 基因的核苷酸及推导氨基酸的序列都有差异 (图 2)。抗冷性强的丽梗 2 号与抗冷性弱的合系 24 号之间有 7 个核苷酸不同, 与抗冷性极弱的十和田之间有 11 个核苷酸不同。更值得注意的是它们之间的推导氨基酸序列的差异, 抗冷性相差越大的品种其推导氨基酸序列的差异越大, 即抗冷性强的丽梗 2 号与抗冷性弱的合系 24 号之间只有 1 个氨基酸差异, 而与抗冷性极弱的十和田之间有 3 个氨基酸差异。其中有两个氨基酸的差异尤其值得注意, 即丽梗 2 号氨

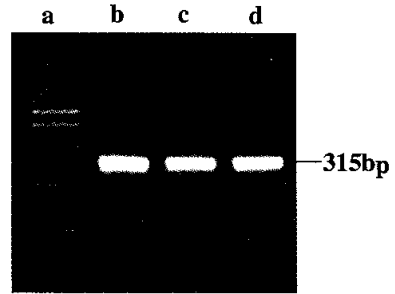


图 1 不同抗冷性水稻中编码 GPAT 部分 cDNA 的 PCR 扩增
a. pBR322/MspDNA 标准分子; b. 丽梗 2 号 GPAT 基因部分 cDNA 的 PCR 扩增; c. 合系 24 号 GPAT 基因部分 cDNA 的 PCR 扩增; d. 十和田 GPAT 基因部分 cDNA 的 PCR 扩增;

Fig 1 PCR amplification of part GPAT genes from rice strains with different chilling-resistance a. pBR322/Msp DNA marker; b. PCR amplification of part GPAT gene from Ligeng No. 2; c. PCR amplification of part GPAT gene from Hexi No. 24; d. PCR amplification of part GPAT gene from Shihetian;

a	GAG	CCG	TTC	GAC	TAC	TAC	ATG	TTT	GGT	CAG	AAC	TAC	ATT	AGG	CCC	CTT	GTA	GAC	54
b	+++	+++	++T	++T	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
c	+++	+++	++T	++T	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
d	E	P	F	D	Y	Y	M	F	G	Q	N	Y	I	R	P	L	V	D	18
e	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	TAT	AGA	AAT	TCA	TAT	GTT	GGT	AAT	ATA	TCC	AAT	TTC	CAA	GAC	ATG	GAA	CAG	AAG	108
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	Y	R	N	S	Y	V	G	N	I	S	I	F	Q	D	M	E	Q	K	36
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	CTC	CAA	CAG	GGC	CAT	AAT	GTT	GTT	CTG	ATG	TCT	AAC	CAT	CAG	ACA	GAA	GCA	GAT	162
	+++	+++	+++	+++	+++	++A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++C
	+++	+++	+++	++G	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++C+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	L	Q	Q	G	H	N	V	V	L	M	S	N	H	Q	T	E	A	D	54
	+	+	+	+	+	K	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P	+	+	+	+	+	
	CCA	GCA	ATC	ATT	GCT	TTG	CTG	CTT	GAA	AGA	AGC	AAC	CCA	TGG	ATC	AGC	GAA	AAC	216
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	P	A	I	I	A	L	L	L	E	R	S	N	P	W	I	S	E	N	72
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	ATA	GTT	TAT	GTT	GCT	GGT	GAT	AGG	GTT	GTT	ACA	GAT	CCT	CTC	TGC	AAG	CCA	TTT	270
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++G+	++T	+++	++T	+++	+++	+++
	I	V	Y	V	A	G	D	R	V	V	T	D	P	L	C	K	P	F	90
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	G	S	+	+	+	+	
	AGT	ATG	GGA	AGA	AAC	CTC	ATC	TGC	GTC	TAT	TCC	AAA	AAA	CAT	ATG				315
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++C	+++	++G	+++	++C	+++				
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++T	+++	++C	+++	++G	+++	++C	+++					
	S	M	G	R	N	L	I	C	V	Y	S	K	K	H	M				105
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

图2 不同抗冷性水稻的部分 GPAT 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列 a. 丽梗 2 号部分 GPAT 基因的 cDNA 序列;

b. 合系 24 号部分 GPAT 基因的 cDNA 序列; b. 十和田部分 GPAT 基因的 cDNA 序列; d. 丽梗 2 号部分 GPAT 基因的推导氨基酸序列; e. 合系 24 号部分 GPAT 基因的推导氨基酸序列; f. 十和田部分 GPAT 基因的推导氨基酸序列。" + " 表示未变化的核苷酸或氨基酸; 下划线的氨基酸序列为设计简并引物的氨基酸序列。

Fig 2 cDNA sequences and deduced amino acid sequences of part GPAT genes from rice strains with different chilling - resistance

a. cDNA sequence of part GPAT gene from Ligeng No. 2; b. cDNA sequence of part GPAT gene from Hexi No. 24; c. cDNA sequence of part GPAT gene from Shihetian; d. Deduced amino acid sequence of part GPAT gene from Ligeng No. 2; e. Deduced amino acid sequence of part GPAT gene from Hexi NO. 24; f. Deduced amino acid sequence of part GPAT gene from Shihetian. " + " indicates the unchanged nucleotide or amino acid; The amino acid sequences used to design degenerating primers are underlined.

氨基酸序列中的第 85 个氨基酸是脯氨酸 (Pro)，在十和田氨基酸序列相应的位置是丝氨酸 (Ser)；十和田氨基酸序列中第 49 个氨基酸是脯氨酸 (Pro)，在丽梗 2 号氨基酸序列相应的位置是组氨酸 (His)。脯氨酸 (Pro) 是一种亚氨基酸，具有特殊的立体化学结构，在蛋白质高级结构的形成过程中具有重要的作用。在蛋白质的折叠过程中，Pro 易形成 β -转角，从而强烈的影响蛋白质的高级结构。国外已有报道 (Schalk 等, 1999) 在植物 P450 (CYP73A1) 基因中的第 448 位的脯氨酸被其他氨基酸替换后，该基因所表达的蛋白就失去了原有的催化活性，同时其表达水平大大降低。我国学者 (杨明挚等, 1999) 分析比较了抗冷的黑子南瓜和冷敏感的南瓜之间 GPAT 基因的 cDNA 序列及推导氨基酸序列，也发现有一定的差异，如南瓜中的第 101 个氨基酸为丝氨酸 (Ser) 而在黑子南瓜中是脯氨酸 (Pro)。我们克隆的 3 个不同抗冷性水稻的部分 GPAT 基因，共有 105 个氨基酸，而抗冷性强的丽梗 2 号与抗冷性弱的十和田之间就有两个 Pro 发生变化，这一发现为我们进一步研究 GPAT 基因影响植物抗冷性的分子机理提供了新的线索，我们正准备从不同抗冷性的水稻中分离克隆完整的 GPAT 基因，通过定点突变法来进行深入的研究。

致谢：我们在此对提出宝贵意见的不知名的审稿人表示衷心的感谢，同时谢谢云南省农科院中日合作育种课题组蒋志农，刘吉新先生提供水稻种子。

〔参考文献〕

- 杨明挚, 陈善娜, 鄢波, 等, 1999. 黑籽南瓜甘油-3-磷酸酰基转移基因的克隆及系列分析 [J]. 云南植物研究, **21** (2): 139 ~ 143
- Bhella RS, Mackenzie SL, 1994. Nucleotide sequence of a cDNA from *Carthamus tinctorius* encoding a glycerol-3-phosphate acyltransferase [J]. *Plant Physiol*, **106**: 1713 ~ 1714
- Fritz M, Heinz E, Wolter F P, 1995. Cloning and sequence of a full-length cDNA coding for snglycerol-3-phosphate acyltransferase from *Phaseolus vulgaris* [J]. *Plant Physiol*, **107**: 1039 ~ 1040
- Ishizaki O, Nishida I, Agata K, et al, 1988. Cloning and nucleotide sequence of cDNA for the plastid glycerol-3-phosphate acyltransferase from squash [J]. *FEBS Lett*, **238**: 424 ~ 430
- Johnson T C, Schneider J C, Somerville C, 1992. Nucleotide sequence of acyl-acyl carrier protein: glycerol-3-phosphate acyltransferase from cucumber [J]. *Plant Physiol*, **99**: 771 ~ 772
- Murata N, 1983. Molecular species composition of phosphatidyl-glycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants [J]. *Plant Cell Physiol*, **23**: 1071 ~ 1079
- Murata N, Ishizaki - Nishizawa O, Higashi S, et al, 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants [J]. *Nature*, **356**: 710 ~ 713
- Nidhida I, Tasaka Y, Shiraiishi H, et al, 1993. The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, **21**: 267 ~ 277
- Schalk M, Nedelkina S, Schoch G, et al, 1999. Role of unusual amino acid residues in the proximal and distal heme regions of a plant P450, CYP73A1 [J]. *Biochemistry*, **58**: 6095 ~ 6105
- Weber S, Wolter F P, Buck F, et al, 1991. Purification and cDNA sequencing of an oleate-selective acyl-ACP: sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea chloroplasts [J]. *Plant Mol Biol*, **17**: 1067 ~ 1076
- Wolter F P, Schmidt R, Heinz E, 1992. Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids [J]. *EMBO J*, **11**: 4685 ~ 4692