

· 研究报告 ·

棉花叶绿体基因RNA编辑位点的测定及分析

江媛¹, 范术丽², 宋美珍², 俞嘉宁^{1*}, 喻树迅^{2*}

¹陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062

²中国农业科学院棉花研究所/农业部棉花遗传改良重点实验室, 安阳 455000

摘要 陆生植物叶绿体RNA编辑是转录后基因表达调控的一种重要方式。该文在预测棉花(*Gossypium hirsutum*)叶绿体基因RNA编辑位点的基础上, 选取中棉10 (CRR1 10)为实验材料, 采用PCR、RT-PCR及测序等方法, 确定CRR1 10的27个叶绿体蛋白编码基因共有55个编辑位点, 均是C→U的转换。与棉种柯字310(C310)的编辑位点比对后发现, CRR1 10多出 *accD-468*和*rpoC1-163*两个编辑位点, 同时缺失*psbN-10*。利用生物信息学分析这3个位点, *rpoC1-163*和*psbN-10*的编辑可能会改变各自蛋白的二级结构。对CRR1 10中55个编辑位点上游的顺式作用元件(-30--1)分析显示, 共有8组顺式作用元件的相似性达到60%或以上, 推测各组中的编辑位点可能由相同的反式作用因子来识别。

关键词 叶绿体, 顺式作用元件, 棉花, RNA编辑

江媛, 范术丽, 宋美珍, 俞嘉宁, 喻树迅 (2011). 棉花叶绿体基因RNA编辑位点的测定及分析. 植物学报 46, 386–395.

RNA编辑是一种转录后加工修饰的现象, 它通过碱基插入、缺失、替换等方式改变mRNA上携带的遗传信息。此现象最早发现在锥虫(*trypanosomatids*)线粒体中(Benne et al., 1986), 现已知它普遍存在于各种生物有机体中。依据编辑效率的不同, RNA编辑可分为完全编辑、部分编辑和沉默编辑。高等植物叶绿体RNA编辑多数是C→U的转换, 且偏向于发生在蛋白编码区密码子的第1位和第2位, 通常造成亲水性氨基酸向疏水性氨基酸的转变, 最终导致蛋白的疏水性增加(Tillich et al., 2006; Yura and Go, 2008)。目前认为叶绿体RNA编辑可以提高转录本的稳定性, 参与叶绿体基因的表达调控, 可使一个基因产生不同的蛋白产物, 扩展原有的遗传信息(Hanson et al., 1996)。其次, RNA编辑可能影响蛋白质的结构及其功能的发挥(马艳莉等, 2011)。

RNA编辑发生的分子机制一直是人们感兴趣的话题。近年来的研究认为: 反式作用因子会识别并结合到编辑位点上游的顺式作用元件上, 通过直接作用于编辑位点或吸引相应的编辑酶催化靶C发生C→U的转变。通常编辑位点上游序列对靶位点的识别很重要, 而下游序列只扮演次要角色(Bock et al., 1996)。

体内、体外的交互竞争实验和点突变实验表明, 顺式作用元件通常定位在编辑位点紧邻的上游区约30个核苷酸处(Heller et al., 2008)。而反式作用因子可能是核基因编码的PPR蛋白, 该蛋白是一大类细胞器RNA结合蛋白, 以35个氨基酸为重复单位(P基序)连续排列为主要特征(Bentolila et al., 2002; Koizuka et al., 2003; Brown et al., 2003; Lurin et al., 2004), 在RNA编辑过程中起重要作用。

本实验室已完成了对棉种柯字310(C310)叶绿体蛋白编码基因编辑位点的测定工作(另文发表)。本文通过PCR、RT-PCR和测序等方法进一步确定了中棉10(CRR1 10)叶绿体蛋白编码基因的RNA编辑位点, 并与C310的编辑位点进行了比较, 发现3个位点有差异, 同时我们还对CRR1 10所有编辑位点上游的顺式作用元件进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料CRR1 10 (*Gossypium hirsutum* L. 'CRR1 10')由中国农业科学院棉花研究所提供。棉花幼苗生

收稿日期: 2010-11-18; 接受日期: 2011-04-07

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(No.2010CB126006)和转基因生物新品种培育(No.2008ZX08005-002)

* 通讯作者。E-mail: jianingyucn@yahoo.com.cn; yu@cricaas.com.cn

长在植物培养室里(28°C, 16小时光照/8小时黑暗)。取生长约4周的棉花叶片用于DNA和RNA的提取。

1.2 方法

1.2.1 棉花叶片总DNA和总RNA的提取

取0.1 g新鲜幼嫩的棉花叶片, 置于液氮下磨成粉末。采用改良的SDS-CTAB法提取棉花基因组DNA(高文伟等, 2009)。采用改良的CTAB法提取棉花总RNA(罗明等, 2003)。在提取的DNA和RNA中分别加入20 μ L的灭菌水和DEPC处理水溶解, 置于-20°C备用。

1.2.2 总RNA中DNA的去除及cDNA合成

RNA样品用DNase I(TaKaRa)37°C处理80分钟, 去除DNA杂质, 再经氯仿抽提。cDNA的合成用1 μ g RNA作模板, 具体操作按照PrimeScriptTM RT Reagent Kit (TaKaRa)试剂盒说明书进行。

1.2.3 目的基因的扩增及测序

PCR及RT-PCR反应体系均为25 μ L, 其中2 \times Taq PCR Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol·L⁻¹)各2 μ L, DNA 0.5–1 μ L(约50 ng)/cDNA 2–3 μ L(约50 ng), 用ddH₂O补足体积。PCR/RT-PCR反应程序为: 95°C 5分钟; 95°C30秒, 52–55°C30秒, 72°C1–1.5分钟, 30个循环; 72°C延伸10分钟。扩增产物于4°C保存。

PCR及RT-PCR扩增出的目的片段经1%的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收, 纯化后送上海生工生物工程技术有限公司进行双向测序。

1.2.4 编辑位点及编辑效率的确定

测序结果用Seqman软件进行拼接后, 再用ClustalW在线软件对各目的基因的DNA和cDNA序列进行比对, 确定编辑位点。

RNA编辑效率的确定采用直接测序法(易平等, 2002; Sasaki et al., 2006), 即有编辑位点的序列重复测序3次, 然后直接测量测序峰值图上每个编辑位点的T峰和C峰高度, T峰高度与T+C峰总高度的比值的平均值即为该位点的编辑效率。

1.2.5 编辑位点的生物信息学分析及顺式作用元件的分析

利用TMHMM Server v.2.0(<http://genome.cbs.dtu>。

[dk/services/TMHMM/](http://services.TMHMM/))软件进行蛋白质跨膜区段预测。利用NPS@ (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)分析蛋白二级结构组成。用PDB(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)分析蛋白的三级结构。利用ClustalW软件比对编辑位点上游30个核苷酸序列的相似性。

2 结果与讨论

2.1 PCR及RT-PCR扩增目的基因

在完成棉花叶绿体RNA编辑位点预测的基础上(江媛等, 2010), 我们以CRR1 10为实验材料, 通过PCR和RT-PCR扩增获得29个预测有编辑位点的叶绿体蛋白编码基因的DNA和cDNA, 并对其进行测序。*rps2*和*ndhC*的DNA和cDNA扩增结果见图1, 其它目的基因的扩增结果未显示。

2.2 确定编辑位点

利用Seqman拼接测序结果, 再用ClustalW软件比对各基因的DNA及cDNA序列。结果显示, 扩增的29个转录本中, 有27个转录本发生编辑, 共有55个编辑位点, 且所有都是C到U的转换(表1)。编辑位点在各类基因中的分布情况不同(图2), 有23个编辑位点发生在*ndh*类基因中, 其中*ndhB*有11个完全编辑位点, *ndhD*有6个编辑位点, *ndhA*有2个, *ndhC*、*ndhE*、*ndhF*和*ndhG*各有1个编辑位点; 光合系统类基因共有10个编辑位点, 其中ATP合酶和细胞色素*b/f*复合体分别有4个和3个编辑位点, *PSI*和*PSII*分别有2个和1个编辑位点; 参与叶绿体转录和翻译类的基因有15个编辑位点, 其中RNA聚合酶基因有6个编辑位点, 核糖体蛋白基因有9个编辑位点; 另外, *accD*和*matK*各有3个位点发生编辑, *clpP*有1个编辑位点。

分析所有编辑位点, 发现有6个(占10.9%)位点发生在密码子第1位, 48个(占87.3%)位点发生在密码子第2位, 只有*petB-24*发生在密码子第3位, 是55个编辑位点中唯一的一个沉默编辑。其余54个编辑事件会造成氨基酸的转变, 其中81.8%是亲水性向疏水性转变, 18.2%是疏水性氨基酸间的转变。从编辑改变的氨基酸类型来看, 发生频率最高的是丝氨酸转变为亮氨酸, 其次为脯氨酸转变为亮氨酸, 而苏氨酸转变为亮氨酸以及精氨酸转变为色氨酸的频率较低,

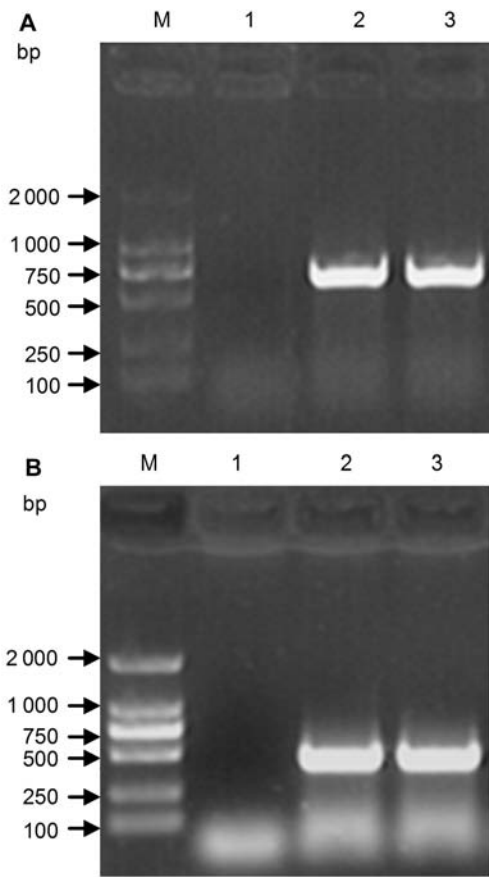


图1 CRR1 10的*rps2*和*ndhC*基因PCR及RT-PCR扩增结果
(A) *rps2*的扩增结果 M: DNA分子量标准; 1: 不加DNA和cDNA的*rps2*空白对照; 2: *rps2*的DNA扩增; 3: *rps2*的cDNA扩增;
(B) *ndhC*的扩增结果 M: DNA分子量标准; 1: 不加DNA和cDNA的*ndhC*空白对照; 2: *ndhC*的DNA扩增; 3: *ndhC*的cDNA扩增

Figure 1 Amplification of *rps2* and *ndhC* of CRR1 10 by PCR and RT-PCR

(A) Amplification of *rps2* M: DNA marker DL2000; 1: The control of *rps2*, without DNA and cDNA; 2: Amplification *rps2* from DNA; 3: Amplification *rps2* from cDNA; **(B)** Amplification of *ndhC* M: DNA marker DL2000; 1: The control of *ndhC*, without DNA and cDNA; 2: Amplification *ndhC* from DNA; 3: Amplification *ndhC* from cDNA

各有1个。上述改变将会导致编辑后疏水性氨基酸的含量增加。

2.3 CRR1 10与C310编辑位点的比较分析

比较CRR1 10和C310的编辑位点, 结果显示有52个

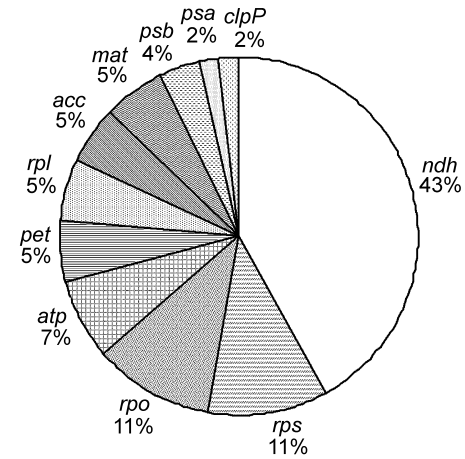


图2 棉花叶绿体RNA编辑位点在各类基因中的分布情况

Figure 2 Distribution of RNA editing sites in gene clusters in cotton chloroplast genome

编辑位点相同, 但其中有14个位点, 即*accD-271*、*atpI-207*、*ndhD-225*、*ndhD-437*、*ndhG-17*、*petL-2*、*rpoC1-14*、*rps14-50*、*rps14-27*、*rpl23-30*、*rpoB-184*、*matK-212*、*matK-235*和*rpoB-189*存在编辑效率的差异(图3A-C)。这14个位点中, 除了*rpoB-189*在CRR1 10中的编辑效率比C310中高以外(图3C), 其它13个位点的编辑效率则是在C310中较高。另外, CRR1 10比C310多了*accD-468*和*rpoC1-163*两个编辑位点, 而缺失*psbN-10*编辑位点(表1; 图3D, E)。

对C310所有编辑位点进行预测分析, 结果表明, *atpA-305*等19个位点的编辑可能会改变蛋白质二级结构, *ndhA-114*等7个位点的编辑可能会改变蛋白质三级结构(待发表)。本实验对CRR1 10和C310有明显差异的编辑位点, 即*accD-468*、*rpoC1-163*和*psbN-10*进行生物信息学分析, 结果显示, *accD-468*的编辑对其蛋白质的二级结构不产生影响, 而*rpoC1-163*和*psbN-10*的编辑将改变相应蛋白质的二级结构组成(图4)。 *rpoC1-163*发生编辑可导致丝氨酸向亮氨酸转变, 造成-4-+13(编辑位点记为0, 上游为负, 下游为正)的β-折叠、无规则卷曲转变为连续的α-螺旋, 同时+18-+21的α-螺旋转变为无规则卷曲, 最终导致编辑后的蛋白质α-螺旋增加(图4A)。 *psbN-10*发生丝氨酸向苯丙氨酸转变时, -4-+8的β-折叠转变为α-螺旋, +9-+10的无规则卷曲转变为β-转

表1 CRR1 10与C310的编辑位点比较

Table 1 Comparison of RNA editing sites between CRR1 10 and C310

Codon position	Conversion	C310	CRR1 10	Codon position	Conversion	C310	CRR1 10
<i>accD</i> -271	S(uCg)→L(uUg)	+	+/-	<i>ndhF</i> -97	S(uCa)→L(uUa)	+	+
<i>accD</i> -468	P(cCa)→L(cUa)	-	+	<i>ndhG</i> -17	S(uCg)→L(uUg)	+	+/-
<i>accD</i> -474	P(cCu)→L(cUu)	+	+	<i>petB</i> -24	V(guC)→V(guU)	*	*
<i>atpA</i> 305	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>petB</i> -160	R(Cgg)→W(Ugg)	+	+
<i>atpA</i> -383	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>petL</i> -2	P(cCu)→L(cUu)	+	+/-
<i>atpF</i> -31	P(cCa)→L(cUa)	+	+	<i>psaI</i> -28	S(uCu)→F(uUu)	+	+
<i>atpI</i> -207	S(uCa)→L(uUa)	+	+/-	<i>psbF</i> -26	S(uCu)→F(uUu)	+	+
<i>ndhA</i> -114	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>psbJ</i> -20	P(cCu)→L(cUu)	+	+/-
<i>ndhA</i> -189	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>psbN</i> -10	S(uCu)→F(uUu)	+/-	-
<i>ndhB</i> -50	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>rpl20</i> -103	S(uCa)→L(uUa)	+	+
<i>ndhB</i> -156	P(cCa)→L(cUa)	+	+	<i>rpl23</i> -24	S(uCu)→F(uUu)	+	+
<i>ndhB</i> -181	T(aCg)→M(aUg)	+	+	<i>rpl23</i> -30	S(uCa)→L(uUa)	+/-	+/-
<i>ndhB</i> -196	H(Cau)→Y(Uau)	+	+	<i>rpoB</i> -113	S(uCu)→F(uUu)	+/-	+/-
<i>ndhB</i> -204	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>rpoB</i> -184	S(uCa)→L(uUa)	+/-	+/-
<i>ndhB</i> -246	P(cCa)→L(cUa)	+	+	<i>rpoB</i> -189	S(uCg)→L(uUg)	+/-	+/-
<i>ndhB</i> -249	S(uCu)→F(uUu)	+	+	<i>rpoB</i> -809	S(uCa)→L(uUa)	+/-	+/-
<i>ndhB</i> -277	S(uCg)→L(uUg)	+	+	<i>rpoC1</i> -14	S(uCa)→L(uUa)	+	+/-
<i>ndhB</i> -279	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>rpoC1</i> -163	S(uCa)→L(uUa)	-	+/-
<i>ndhB</i> -419	H(Cau)→Y(Uau)	+	+	<i>rps2</i> -45	T(aCa)→I(aUa)	+	+
<i>ndhB</i> -494	P(cCa)→L(cUa)	+	+	<i>rps2</i> -83	S(uCg)→L(uUg)	+	+
<i>ndhC</i> -108	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>rps12</i> -74	S(uCa)→L(uUa)	+	+
<i>ndhD</i> -1	T(aCg)→M(aUg)	+	+	<i>rps14</i> -27	S(uCa)→L(uUa)	+	+/-
<i>ndhD</i> -128	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>rps14</i> -50	S(uCa)→L(uUa)	+	+/-
<i>ndhD</i> -225	S(uCg)→L(uUg)	+	+/-	<i>rps18</i> -74	S(uCg)→L(uUg)	+/-	+/-
<i>ndhD</i> -293	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>clpP</i> -187	H(Cau)→Y(Uau)	+	+
<i>ndhD</i> -433	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>matK</i> -153	H(Cau)→Y(Uau)	+/-	+/-
<i>ndhD</i> -437	S(uCa)→L(uUa)	+	+/-	<i>matK</i> -212	H(Cau)→Y(Uau)	+/-	+/-
<i>ndhE</i> -78	S(uCa)→L(uUa)	+	+	<i>matK</i> -235	S(uCu)→F(uUu)	+/-	+/-

密码子中大写的字母代表发生编辑的核苷酸; +: 完全编辑位点; -: 在DNA水平上已是C, 但不发生编辑; +/-: 部分编辑位点; *: 沉默编辑

Capital letters in codon triplets indicate target nucleotides; +: Totally edited sites; -: No editing, although a C exists in DNA level; +/-: Partially edited sites; *: Silent edited sites

角, 而且该蛋白编辑后的 α -螺旋也明显增加(图4B)。另外, 利用TMHMM和PDB分别预测这3个位点编辑前后蛋白的跨膜结构和三级结构, 表明它们的编辑对各自蛋白的跨膜结构以及三级结构均不造成显著影响。

2.4 顺式作用元件的分析

目前在所有的叶绿体RNA编辑位点上游序列中, 并未发现共有的一致序列或二级结构(Hirose et al., 1999), 然而某些RNA编辑位点可依照其相似的顺式作用元件而被区分成一个组群, 同组群的位点可能会

被相同的反式作用因子识别(Chateigner-Boutin and Hanson, 2002, 2003)。比对CRR1 10的55个编辑位点的上游30个核苷酸序列, 发现有8对编辑位点, 即*ndhF*-97和*petB*-24、*atpA*-305和*atpA*-383、*psbF*-26和*rpoB*-189、*psbF*-26和*psaI*-28、*ndhF*-97和*petL*-2、*ndhD*-293和*ndhB*-279、*rpoC1*-14和*ndhD*-128以及*rpoC1*-14和*rpl23*-30, 它们上游-30--1核苷酸的序列一致性达到60%以上(图5A)。另外, Hayes等(2006)报道在编辑位点上游有3个序列S1(AUC、AAC或AUG)、S2(AUU)和S3(GA或GU)对位点的编辑很重要。在比对CRR1 10的55个编辑位点上游的30个核苷

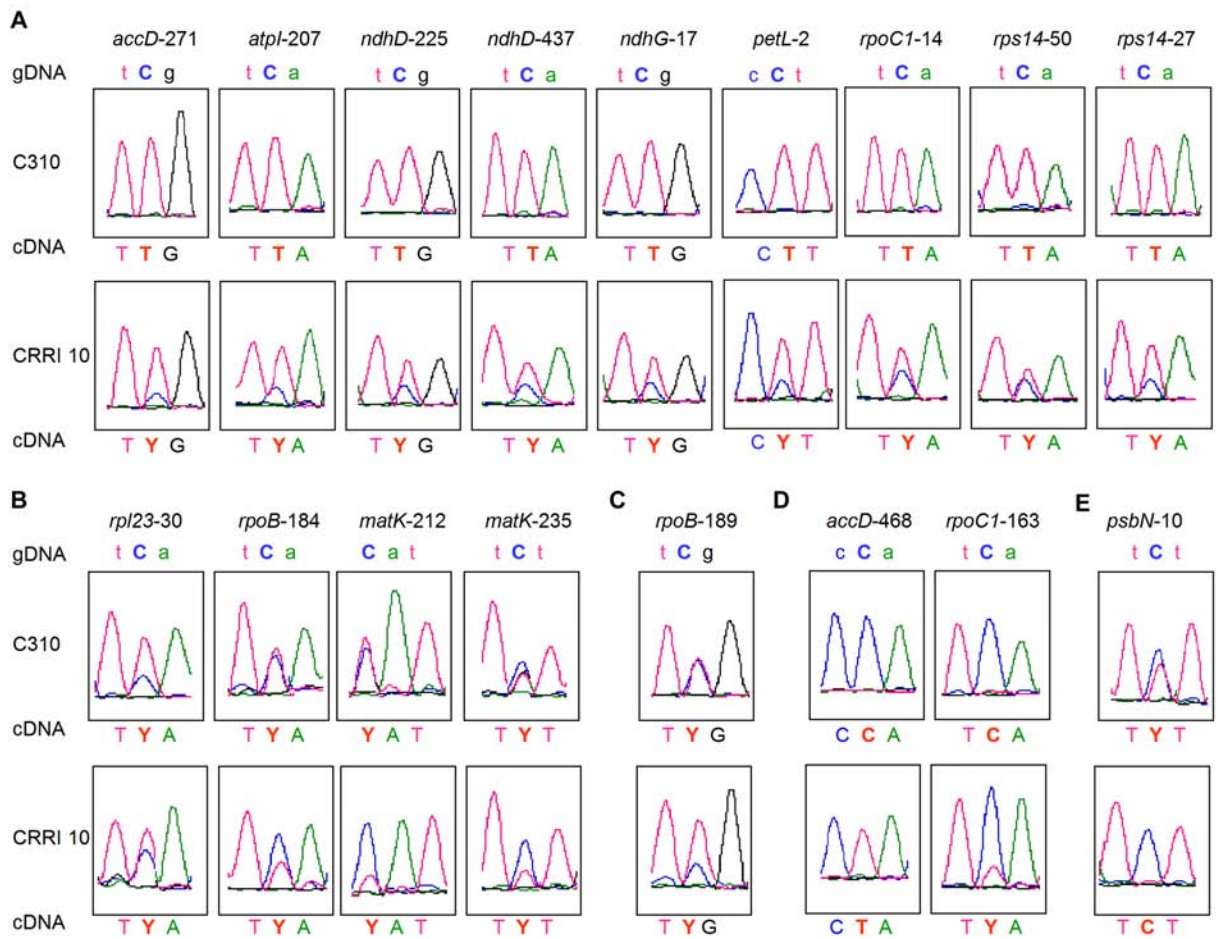


图3 CRR1 10和C310编辑位点的差异性

(A) C310中是完全编辑，而CRR1 10中是部分编辑的位点；(B) CRR1 10和C310中都是部分编辑，但在CRR1 10中效率较低的位点；(C) CRR1 10和C310中都是部分编辑，但在CRR1 10中效率较高的位点；(D) C310缺失的编辑位点；(E) CRR1 10缺失的编辑位点。DNA中的大写字母表示编辑位点；Y表示部分编辑位点。

Figure 3 Different editing sites between CRR1 10 and C310

(A) RNA editing sites with totally edited in C310 and partially edited in CRR1 10; (B) RNA editing sites with partially edited in C310 and CRR1 10, of which the editing frequency in CRR1 10 is lower than in C310; (C) RNA editing sites with partially edited in C310 and CRR1 10, of which the editing frequency in CRR1 10 is higher than in C310; (D) Editing sites absent in C310; (E) Editing site absent in CRR1 10. Capital letters in codon triplets indicate target nucleotides; Y in codon triplets indicates partial editing sites.

酸时发现，有6个位点，即 *ndhA*-114、*ndhA*-189、*rps14*-27、*rpoB*-809、*rpoC1*-14和*ndhC*-108具有上述3个序列(图5B)，推测这些元件可能与相关反式作用因子的识别及靶向有关。

2.5 讨论

RNA编辑是高等植物叶绿体转录本成熟过程中的一

种重要修饰和加工方式。已有研究表明，RNA编辑位点在进化过程中呈减少趋势，但一些重要的位点会继续保留(Fiebig et al., 2004)。本实验在CRR1 10的27个叶绿体蛋白编码基因中检测到55个编辑位点，这是截至目前所报道的叶绿体编辑位点最多的双子叶植物，表明棉花在双子叶植物中可能比较古老。对CRR1 10的55个编辑位点的分析结果表明，其具有典

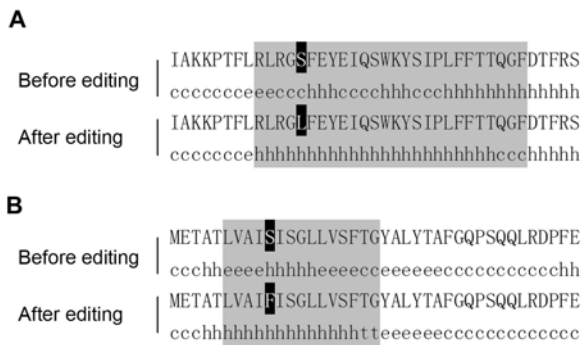


图4 编辑导致的RpoC1和PsbN局部二级结构的改变

(A) *rpoC1*-163编辑前后二级结构预测; (B) *psbN*-10编辑前后二级结构预测。灰色阴影部分表示编辑位点周围的氨基酸及其二级结构, 其中黑色阴影字母代表编辑位点。

Figure 4 Partial secondary structures changing in RpoC1 and PsbN caused by RNA editing

(A) Prediction of RpoC1 secondary structure before and after *rpoC1*-163 editing; (B) Prediction of PsbN secondary structure before and after *psbN*-10 editing. The gray shadows show the amino acids and secondary structures around editing sites, and the black shadows denote editing sites.

型的叶绿体RNA编辑的特点。另外, 55个编辑位点中的81.8%编辑后都形成疏水性氨基酸。我们推测这可能有利于蛋白质形成稳定结构, 因为疏水性残基一般包埋于蛋白质内部, 当蛋白质的结构核心中有亲水性突变时, 其结构不稳定, 严重时可导致无法折叠(De Vos et al., 2001; Loladze et al., 2002)。

叶绿体RNA编辑存在部分编辑的现象, CRR1 10和C310分别有19个和10个部分编辑位点。与已测定叶绿体RNA编辑位点的其它双子叶植物相比, 棉花中部分编辑发生的频率较高。已有研究表明, 编辑和不编辑的转录本都能翻译成蛋白质, 使得单个基因能产生2种不同的蛋白产物(Lu et al., 1996; Okuda et al., 2007; Chateigner-Boutin et al., 2008)。部分编辑可能是调控活性复合物数量的一种方式, 也可能改变复合物的特性或功能(Chateigner-Boutin and Small, 2010), 编辑和不编辑的蛋白产物可能在不同的模式下更加有效地发挥它们各自的功能(Hirose et al., 1999; Karcher and Bock, 2002)。但也有学者认为, 部分编辑可能是编辑位点处于消失过程的中间状态

(Miyata and Sugita, 2004)。棉花中较多的部分编辑位点是调控基因表达的一种方式, 还是进化过程中会消失的位点, 有待进一步的研究。近年来, 对于沉默编辑功能的认识也存在争议。Hirose等(1996)的实验结果表明, 沉默编辑与叶绿体的照光程度和发展阶段相关; Nakamura和Sugiura(2007)认为, 叶绿体基因组存在密码子的偏好性, 沉默编辑会影响蛋白质翻译的效率。但近年来也有相反的观点, 如Guzowska-Nowowiejska等(2009)认为, 沉默编辑似乎是多余的, 在今后的进化过程中会消除。*petB*-24在棉花2个亚种中都是沉默编辑, 它们保持高度的一致性, 我们推测该位点的编辑是有功能的, 可能对转录本的稳定性起作用。

比较CRR1 10和C310的编辑位点, 结果显示CRR1 10比C310多*accD*-468和*rpoC1*-163两个位点, 但缺失*psbN*-10编辑。编辑位点在棉花的2个亚种间存在差异, 表明RNA编辑是一个进化的现象, 编辑位点在种内也会快速地发生改变(Freyer et al., 1997; Corneille et al., 2000; Tsudzuki et al., 2001)。从2个棉种的性状看, CRR1 10属于早熟棉, 来源于金字棉, 其生育期比C310提早10–12天(喻树迅, 2007)。目前已有研究表明, 不编辑的蛋白质其功能明显低于编辑的蛋白质(Covello and Gray, 1990; Bock et al., 1994; Bonnard and Grienberger, 1995; Zito et al., 1997; Kozaki et al., 2001)。*rpoC1*编码RNA聚合酶78 kDa的 β' 亚基, *rpoC1*-163编辑使位点周围形成连续的 α -螺旋, 推测这种改变可能会提高RpoC1的翻译效率和稳定性, 增强RNA聚合酶的活性, 从而提高棉花发育过程中一些基因的表达量, 促进光合作用。已有研究表明, 在*rpoA*缺失编辑的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)突变体中, RpoA蛋白的翻译和稳定性受到严重的影响, 且造成光系统II(PSII)复合体的组分和核糖体大亚基的转录水平都显著下降(Chateigner-Boutin et al., 2008)。生物信息学分析结果也显示, *rpoC1*-163的编辑可能会改变该蛋白质的二级结构, 推测该位点可能是棉花叶绿体中重要的编辑位点, CRR1 10具有早熟性可能也与此有关。PsbN参与PSII复合体的合成, 但编辑后PsbN是否影响PSII的光合效率, 目前还未见相关报道。

叶绿体RNA编辑的体内、体外实验已经证明, RNA编辑具有较高的效率和正确性, 需要编辑位点

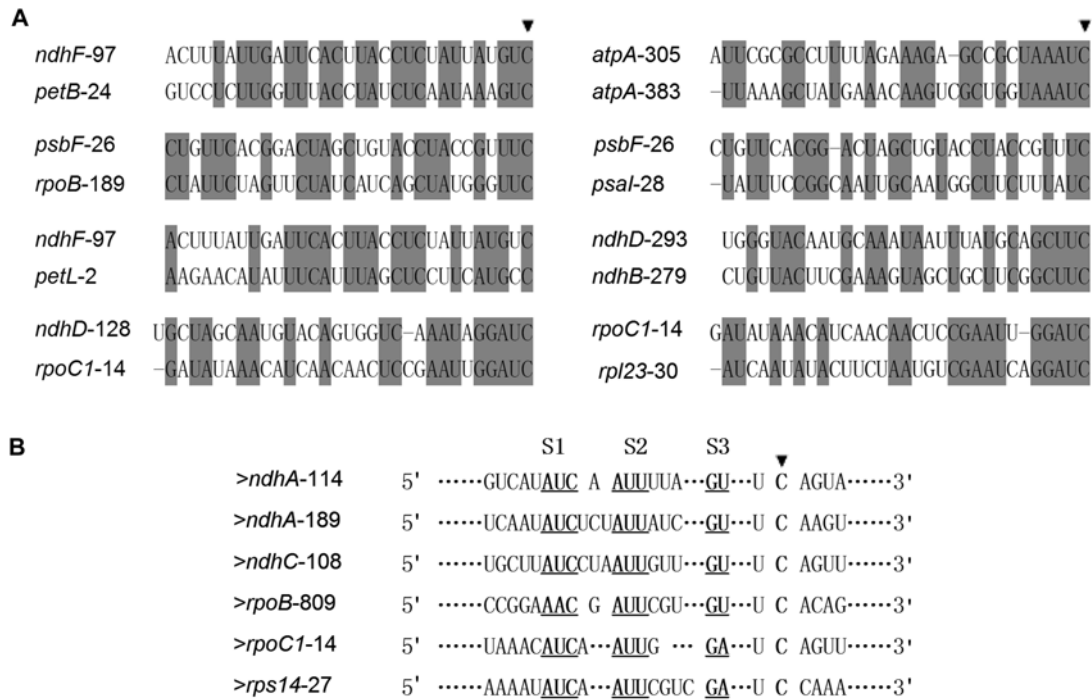


图5 CRR1 10编辑位点上游顺式作用元件的对比分析

(A) 上游的30个核苷酸序列相似性超过60%的编辑位点，阴影部分表示每组中相似的核苷酸；(B) 含有S1、S2和S3序列(下划线部分)的编辑位点的比对。箭头指示编辑位点。

Figure 5 Analysis and comparison of cis-acting elements in upstream sequences of RNA editing sites in CRR1 10

(A) Over 60% sequence identity in -30 upstream of RNA editing sites in 8 pairs, the gray shadows show the similar nucleotides in each group; (B) Alignment of editing sites containing S1, S2 and S3 sequences (underlined). The arrows indicate editing sites.

周围的顺式作用元件来维持。在烟草(*Nicotiana tabacum*)中，-11--6的GCCGUU对*psbE-72*转录本的编辑很重要(Hayes and Hanson, 2008)，-10--5的AAACA对*ndhB-156*的编辑效率影响很大(Sasaki et al., 2006)。也有研究表明，顺式作用元件的相似性达到60%的编辑位点，可以被同一个反式作用因子识别。烟草的*rpoB-667*与番茄(*Lycopersicon esculentum*)的*rps12-74*上游30个核苷酸的序列相似性约为60%；将番茄的*rps12*基因转入烟草叶绿体，烟草的*rpoB-667*的编辑效率大大降低(Karcher et al., 2008)。拟南芥线粒体*nad4-150*和*nad9-110*的-15--1的序列相似性达60%，它们可由同一个反式作用因子SLO1来识别(Sung et al., 2010)。CRR1 10的55个编辑位点中，有8组位点上游30个核苷酸的序列相似性达到60%(图5A)，推测每组内的编辑位点可能也

由相同的反式作用因子来负责编辑。在8组编辑位点中，我们发现*ndhF-97*、*psbF-26*和*rpoC1-14*三个位点存在于不同的组中。近年来，在拟南芥叶绿体RNA编辑的研究中已发现，一个编辑位点可能由多个反式作用因子识别。如*accD-265*的编辑可由反式作用因子RARE1和ECB2识别(Robbins et al., 2009; Yu et al., 2009)；*ndhF-97*的编辑可能与OTP84和ECB2相关(Hammani et al., 2009; Yu et al., 2009)。我们推测上述3个编辑位点的编辑可能也是由2个或多个不同的反式作用因子来负责识别并发生编辑。另外，CRR1 10有6个位点的上游含有S1、S2和S3序列(图5B)。Hayes等(2006)的研究结果表明，这3个序列是参与RNA编辑的反式作用因子的识别位点，改变这3个序列可能会影响各转录本的编辑效率，这些元件可能与相关反式作用因子的识别及靶向有关，但需进一步实

验证。

参考文献

- 高文伟, 陈全家, 曲延英, 麻浩, 马林, 张鹏飞 (2009). 棉花 DNA 提取及优化 SSR 反应体系的建立和应用. *新疆农业大学学报* **32**, 34–37.
- 江媛, 俞嘉宁, 姚艳玲, 宋美珍, 范术丽 (2010). 棉花叶绿体基因组的研究进展. *棉花学报* **22**, 495–500.
- 罗明, 肖月华, 侯磊, 罗小英, 李德谋, 裴炎 (2003). 棉花 LIM 结构域基因(*GhLIM1*)的克隆和表达分析. *遗传学报* **30**, 175–182.
- 马艳莉, 陈海燕, 王继刚, 俞嘉宁 (2011). 银杏叶绿体 *ndhF* RNA 编辑现象分析及 C290 位编辑对胁迫处理的响应. *植物学报* **46**, 1–10.
- 易平, 汪莉, 孙清萍, 朱英国 (2002). 红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 *atp6* 基因转录本的编辑位点研究. *生物化学与生物物理进展* **29**, 729–733.
- 喻树迅 (2007). 中国短季棉育种学. 北京: 科学出版社. pp.137–139, 428–429.
- Benne R, van den Burg J, Brakenhoff JPJ, Sloof P, van Boom JH, Tromp MC (1986). Major transcript of the frameshifted *cox II* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**, 819–826.
- Bentolila S, Alfonso AA, Hanson MR (2002). A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 10887–10892.
- Bock R, Kössel H, Maliga P (1994). Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *EMBO J* **13**, 4623–4628.
- Bock R, Hermann M, Kössel H (1996). *In vivo* dissection of *cis*-acting determinants for plastid RNA editing. *EMBO J* **15**, 5052–5059.
- Bonnard G, Grienenberger JM (1995). A gene proposed to encode a transmembrane domain of an ABC transporter is expressed in wheat mitochondria. *Mol Gen Genet* **246**, 91–99.
- Brown GG, Formanová N, Jin H, Wargachuk R, Dendy C, Patil P, Laforest M, Zhang JF, Cheung WY, Landry BS (2003). The radish *Rfo* restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J* **35**, 262–272.
- Chateigner-Boutin AL, Hanson MR (2002). Cross-competition in transgenic chloroplasts expressing single editing sites reveals shared *cis*-elements. *Mol Cell Biol* **22**, 8448–8456.
- Chateigner-Boutin AL, Hanson MR (2003). Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar *cis*-elements. *Nucleic Acids Res* **31**, 2586–2594.
- Chateigner-Boutin AL, Ramos-Vega M, Guevara-García A, Andrés C, De La Luz Gutiérrez-Nava M, Cantero A, Delannoy E, Jiménez LF, Lurin C, Small I, León P (2008). CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of *rpoA* and *clpP* chloroplast transcripts. *Plant J* **56**, 590–602.
- Chateigner-Boutin AL, Small I (2010). Plant RNA editing. *RNA Biol* **7**, 213–219.
- Corneille S, Lutz K, Maliga P (2000). Conservation of RNA editing between rice and maize plastids: are most editing events dispensable? *Mol Gen Genet* **264**, 419–424.
- Covello PS, Gray MW (1990). RNA sequence and the nature of the Cu_A-binding site in cytochrome c oxidase. *FEBS Lett* **268**, 5–7.
- De Vos S, Backmann J, Prévost M, Steyaert J, Loris R (2001). Hydrophobic core manipulations in ribonuclease T1. *Biochemistry* **40**, 10140–10149.
- Fiebig A, Stegemann S, Bock R (2004). Rapid evolution of RNA editing sites in a small non-essential plastid gene. *Nucleic Acids Res* **32**, 3615–3622.
- Freyer R, Kiefer-Meyer MC, Kössel H (1997). Occurrence of plastid RNA editing in all major lineages of land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 6285–6290.
- Guzowska-Nowowiejska M, Fiedorowicz E, Piłader W (2009). Cucumber, melon, pumpkin, and squash: are rules of editing in flowering plants chloroplast genes so well known indeed? *Gene* **434**, 1–8.
- Hammani K, Okuda K, Tanz SK, Chateigner-Boutin AL, Shikanai T, Small I (2009). A study of new Arabidopsis chloroplast RNA editing mutants reveals general features of editing factors and their target sites. *Plant Cell* **21**, 3686–3699.
- Hanson MR, Sutton CA, Lu BW (1996). Plant organelle gene expression: altered by RNA editing. *Trends Plant Sci* **1**, 57–64.
- Hayes ML, Hanson MR (2008). High conservation of a 5' element required for RNA editing of a C target in chloroplast *psbE* transcripts. *J Mol Evol* **67**, 233–245.
- Hayes ML, Reed ML, Hegeman CE, Hanson MR (2006).

- Sequence elements critical for efficient RNA editing of a tobacco chloroplast transcript *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Res* **34**, 3742–3754.
- Heller WP, Hayes ML, Hanson MR** (2008). Cross-competition in editing of chloroplast RNA transcripts *in vitro* implicates sharing of trans-factors between different C targets. *J Biol Chem* **283**, 7314–7319.
- Hirose T, Fan H, Suzuki JY, Wakasugi T, Tsudzuki T, Kössel H, Sugiura M** (1996). Occurrence of silent RNA editing in chloroplasts: its species specificity and the influence of environmental and developmental conditions. *Plant Mol Biol* **30**, 667–672.
- Hirose T, Kusumegi T, Tsudzuki T, Sugiura M** (1999). RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast polymerase activity. *Mol Gen Genet* **262**, 462–467.
- Karcher D, Bock R** (2002). The amino acid sequence of a plastid protein is developmentally regulated by RNA editing. *J Biol Chem* **277**, 5570–5574.
- Karcher D, Kahlau S, Bock R** (2008). Faithful editing of a tomato-specific mRNA editing site in transgenic tobacco chloroplasts. *RNA* **14**, 217–224.
- Koizuka N, Imai R, Fujimoto H, Hayakawa T, Kimura Y, Kohno-Murase J, Sakai T, Kawasaki S, Imamura J** (2003). Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosenia radish. *Plant J* **34**, 407–415.
- Kozaki A, Mayumi K, Sasaki Y** (2001). Thiol-disulfide exchange between nuclear-encoded and chloroplast-encoded subunits of pea acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **276**, 39919–39925.
- Loladze VV, Ermolenko DN, Makhatadze GI** (2002). Thermodynamic consequences of burial of polar and non-polar amino acid residues in the protein interior. *J Mol Biol* **320**, 343–357.
- Lu B, Wilson RK, Phreaner CG, Mulligan RM, Hanson MR** (1996). Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial *rps12* gene. *Mol Cell Biol* **16**, 1543–1549.
- Lurin C, Andrés C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyère C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L, Small I** (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**, 2089–2103.
- Miyata YK, Sugita M** (2004). Tissue- and stage-specific RNA editing of *rps14* transcripts in moss (*Physcomitrella patens*) chloroplasts. *Plant Physiol* **161**, 113–115.
- Nakamura M, Sugiura M** (2007). Translation efficiencies of synonymous codons are not always correlated with codon usage in tobacco chloroplasts. *Plant J* **49**, 128–134.
- Okuda K, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T** (2007). Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 8178–8183.
- Robbins JC, Heller WP, Hanson MR** (2009). A comparative genomics approach identifies a PPR-DYW protein that is essential for C-to-U editing of the Arabidopsis chloroplast *accD* transcript. *RNA* **15**, 1142–1153.
- Sasaki T, Yukawa Y, Wakasugi T, Yamada K, Sugiura M** (2006). A simple *in vitro* RNA editing assay for chloroplast transcripts using fluorescent dideoxynucleotides: distinct types of sequence elements required for editing of *ndh* transcripts. *Plant J* **47**, 802–810.
- Sung TY, Tseng CC, Hsieh MH** (2010). The SLO1 PPR protein is required for RNA editing at multiple sites with similar upstream sequences in Arabidopsis mitochondria. *Plant J* **63**, 499–511.
- Tillich M, Lehwark P, Morton BR, Maier UG** (2006). The evolution of chloroplast RNA editing. *Mol Biol Evol* **23**, 1912–1921.
- Tsudzuki T, Wakasugi T, Sugiura M** (2001). Comparative analysis of RNA editing sites in higher plants chloroplasts. *J Mol Evol* **53**, 327–332.
- Yu QB, Jiang Y, Chong K, Yang ZN** (2009). AtECB2, a pentatricopeptide repeat protein, is required for chloroplast transcript *accD* RNA editing and early chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **59**, 1011–1023.
- Yura K, Go M** (2008). Correlation between amino acid residues converted by RNA editing and functional residues in protein three-dimensional structures in plant organelles. *BMC Plant Biol* **8**, 79.
- Zito F, Kuras R, Choquet Y, Kössel H, Wollman FA** (1997). Mutations of cytochrome *b6* in *Chlamydomonas reinhardtii* disclose the functional significance for a proline to leucine conversion by *petB* editing in maize and tobacco. *Plant Mol Biol* **33**, 79–86.

Identification and Analysis of RNA Editing Sites in Chloroplast Transcripts of *Gossypium hirsutum*

Yuan Jiang¹, Shuli Fan², Meizhen Song², Jianing Yu^{1*}, Shuxun Yu^{2*}

¹College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; ²Key Laboratory of Cotton Genetics Improvement, Ministry of Agriculture/Cotton Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000, China

Abstract RNA editing is one of the post-transcriptional modification processes in which the bases of a RNA molecule are altered by the addition, deletion and alteration of nucleotides. In most higher plants, RNA editing mainly occurs in mitochondria and plastids and converts from C to U, very rarely from U to C. We investigated RNA editing sites in chloroplasts of *Gossypium hirsutum* 'CRR1 10' by PCR, RT-PCR and sequence alignment. We identified 55 editing sites in 27 protein-coding genes all of which were C-to-U conversion. By comparing editing sites between CRR1 10 and Coker310FR, CRR1 10 had two novel editing sites, *accD*-468 and *rpoC1*-163, whereas site *psbN*-10 was absent. Bioinformatics analysis of the 3 sites revealed that *rpoC1*-163 and *psbN*-10 editing might affect the secondary structure of the corresponding protein. Comparison among upstream regions (-30 to -1) of the 55 editing sites of CRR1 10 revealed that 8 pairs share more than 60% sequence similarity suggesting that the sites in each pair may be recognized by the same trans-acting factors.

Key words chloroplast, *cis*-elements, cotton, RNA editing

Jiang Y, Fan SL, Song MZ, Yu JN, Yu SX (2011). Identification and analysis of RNA editing sites in chloroplast transcripts of *Gossypium hirsutum*. *Chin Bull Bot* **46**, 386–395.

* Author for correspondence. E-mail: jianingyucn@yahoo.com.cn; yu@cricaas.com.cn

(责任编辑: 白羽红)

2011年系统与进化植物学研讨会暨第十届青年研讨会

2011年系统与进化植物学研讨会暨第十届青年研讨会定于2011年10月26–31日在春城昆明召开。本次会议由中国植物学会系统与进化植物学专业委员会和云南省植物学会联合主办,系统与进化植物学国家重点实验室和中国科学院生物多样性与生物地理学重点实验室联合承办,中国科学院昆明植物研究所、中国科学院昆明分院协办。本次会议主题是“后植物志时代的系统与进化植物学”,主要围绕以下几个方面进行研讨:(1)植物分类、标本馆和数据库;(2)植物生命之树重建;(3)生物地理学和气候环境变迁;(4)物种形成和适应性进化;(5)分子和基因组进化及进化发育生物学;(6)植物DNA条形码;(7)生物多样性。会议由大会报告、分组报告、墙报展讲等组成。会议论文征集截止日期为2011年9月25日,会议将出版论文集并遴选优秀论文在《植物分类与资源学报》发表。欢迎植物学相关领域的专家、学者及研究生踊跃参加本次会议。

联系方式

地址: 云南省昆明市蓝黑路132号中国科学院昆明植物研究所

邮编: 650204

电话(传真): 0871-5223388

E-mail: chunnayao@mail.kib.ac.cn

网址: <http://sebc.kib.ac.cn>