

水稻杂种与亲本间差异表达 cDNA 片段 S600 的分离克隆

陈学峰, 熊建华, 张义平, 华 扬, 李阳生, 朱英国*

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘 要: 采用 cDNA-AFLP 技术分离克隆了水稻杂种与亲本间差异表达基因片段 S600。Northern 杂交结果表明: 在分蘖期和始穗期, S600 在杂种和父本中表达丰度均较高, 而在母本中表达丰度相对较低。S600 在分蘖期和始穗期表达量不同, 暗示了该基因的表达还受到发育时期的调节。同源搜索结果表明 S600 片段是水稻 SBPase 的部分编码序列。为了获得完整编码序列, 以 S600 序列检索梗稻日本晴 cDNA 数据库, 获得了两个高度同源(99%)且功能未知的全长 cDNA 克隆(AK062089 和 AK065773)。序列分析表明它们均包含一个相同的 1 179 bp 的开放阅读框, 编码 392 个氨基酸组成的水稻 SBPase 前体, 其中包含有与底物结合、氧化还原调节有关的保守氨基酸残基。检索发现该基因在水稻日本晴基因组中只有单个座位。

关键词: 水稻; 杂种; SBPase; cDNA-AFLP

中图分类号: Q943; S511

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)01-0091-05

Identification and Cloning of S600 cDNA Fragment That Is Differentially Expressed in a Rice Hybrid and Its Parents

CHEN Xue-Feng, XIONG Jian-Hua, ZHANG Yi-Ping,

HUA Yang, LI Yang-Sheng, ZHU Ying-Guo*

(Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: A cDNA fragment S600 that shows differential expression pattern between a rice hybrid and its parental lines was identified by cDNA-AFLP. Northern blot results showed that the transcript level of S600 in female parent is lower than that in hybrid or male parent at both tillering and flowering stages. The transcript level in the two stages is different, indicating this gene is developmental-regulated. Homology search revealed that S600 is a part of coding sequence of rice sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase. To obtain its complete coding sequence, S600 sequence was used to BLAST against *Nipponbare* cDNA database. Two highly homologous (99% identities) and functionally unknown cDNA clones (AK062089 and AK065773) were identified. Sequence analysis showed that both of the clones contain an identical open reading frame of 1 179 bp that encodes 392 AAs SBPase precursor. The conservative amino acid residues involved in substrate binding and redox-regulation were found in the peptide. BLAST search result also indicates that SBPase gene is single locus in *Nipponbare* genome.

Key words: *Oryza sativa*; Hybrid; SBPase; cDNA-AFLP

杂种优势是指杂种一代在生物量、产量、存活力及适应性等一方面或多方面优于双亲的现象。杂种优势的利用已经成为提高农作物产量的重要途径。

以杂交水稻和杂交玉米为代表的农作物杂交品种的推广应用, 已经在全世界范围内取得了巨大的成就, 相比之下, 对于杂种优势机理方面的认识仍极为有

收稿日期: 2004-04-28, 修回日期: 2004-06-08。

基金项目: 国家重大基础研究项目(2001CB108805)资助。

作者简介: 陈学峰(1975-), 男, 博士研究生, 主要从事植物发育遗传学方面研究。

* 通讯作者。

限。这迫切要求加深对杂种优势机理的认识,为进一步利用杂种优势开辟新的途径。

较早时期关于杂种优势机理的研究主要集中在生理、生化水平,这些研究发现杂种一代与亲本在光合作用^[1]、线粒体代谢^[2]、酶活力^[3]等多方面存在差异。近年来,人们对杂种优势的遗传基础有了较为深入的了解,但对于解释杂种优势遗传基础的 3 种学说,即:显性学说^[4, 5]、超显性学说^[6, 7]和上位性学说^[8]仍然没有达成统一的认识。研究表明:杂种与亲本间许多基因的表达状况发生了改变^[9, 10]。最近,多种检测和分离差异表达基因方法的诞生^[11],为研究杂种优势的机理开辟了新的途径。分离与克隆杂种与亲本间差异表达的基因,对于揭示基因的生物学功能,阐明其对于农作物改良的意义,以及理解杂种优势的机理都具有重要的意义。Chen 等^[12]和 Sun 等^[13]采用差异展示的方法分别在水稻和小麦中检测到了杂种与亲本间基因表达上的差异。Xiong 等^[14]还采用了该方法对水稻叶片中的基因表达总体状况与杂种优势的关系进行了分析。然而,差异展示技术虽然快速简便,但它同时具有假阳性率高的特点,这给差异片段的筛选鉴定带来了困难,也影响结果的可靠性^[11]。cDNA-AFLP 技术自诞生以来,因为具有高通量、阳性率高的特点,已经得到了广泛应用^[11, 15]。

水稻作为主要粮食作物及单子叶模式植物近年来受到了国际社会的广泛关注。水稻基因组测序计划的完成和功能基因组项目的启动为研究其杂种优势的机理提供了前所未有的机遇。为了发掘与重要农艺经济性状有关的基因,我们采用 cDNA-AFLP 技术分离了一系列在杂种与亲本间差异表达基因片段。本文报道了其中一个 cDNA 片段(*S600*),编码水稻 Calvin 循环中重要调控酶景天庚酮糖-1,7-二磷酸酶(SBPase),并通过同源搜索从水稻全长 cDNA 数据库中获得了其全长编码序列。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

红莲优 6 号(杂种一代)、粤泰 A(母本)和 9311(父本)分批播种于武汉大学遗传所实验田中,按照常规田间管理。取分蘖期第 8 叶和始穗期剑叶为实验材料。

1.2 方法

总 RNA 提取 采用 TRIzol (Invitrogen) 试剂,按照说明书操作提取叶片总 RNA。

克隆与测序 PCR 产物采用 DNA Extraction

Kit (Fermentas) 回收后,克隆到 pGEM-T (Promega) 载体中。测序由上海中科开瑞有限公司 (Casaary Co. Ltd) 完成。

Northern 杂交 转膜、杂交采用 Sambrook 等^[16]的方法。洗膜按照以下条件:2×SSC, 1% SDS, 65℃漂洗 20 min; 1×SSC, 0.5% SDS, 65℃漂洗 20 min; 2×SSC, 1% SDS, 室温漂洗 10 min。

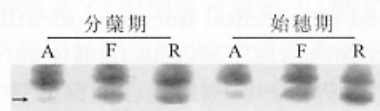
序列分析 核苷酸和氨基酸序列同源性搜索在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)和 GRAM-ENE(<http://www.gramene.org>)数据库中进行。开放阅读框预测采用 NCBI 数据库中的 ORF finder 软件。

cDNA-AFLP cDNA 合成、预扩增和扩增的程序,以及接头和引物序列均参照 Bachem^[15]的方法。

2 结果

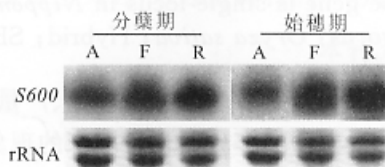
2.1 差异表达片段*S600*的识别与Northern杂交鉴定

从聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱发现,在分蘖期和始穗期,有一条带在杂种和亲本间明显存在强度上的差异(图 1),表明该片段在杂种与亲本间的表达水平不同。从 9311 中将此片段回收,并采用 Northern 杂交进行验证。杂交结果显示:在分蘖期和始穗期,*S600* 在母本中表达丰度较低,但在杂种和父本中表达丰度较高且表达水平相近(图 2),这一结果与凝胶电泳图谱上的结果是相互吻合的。Northern 杂交结果还显示了 *S600* 基因在始穗期的表达量较分蘖期稍高,说明该基因的表达可能受到不同发育



A. 母本; F. 杂种一代; R. 父本。箭头所指为 *S600* 差异片段
A. Female parent; F. Hybrid; R. Male parent. The arrow indicates *S600* fragment

图 1 杂种与亲本间差异表达 cDNA 片段 *S600* 的识别
Fig. 1 Identification of *S600* cDNA fragment that is differentially expressed in a rice hybrid and its parents



A. 母本; F. 杂种一代; R. 父本
A. Female parent; F. Hybrid; R. Male parent

图 2 *S600* 片段在杂种与亲本中表达的 Northern 杂交结果

Fig. 2 Northern blot result of *S600* in a rice hybrid and its parental lines

时期的调控。同时,我们对以上两个时期各个材料的生物量进行了测定,发现 S600 基因的表达量与植株干物质重表现出一定的相关性(资料未显示)。

2.2 S600 片段的克隆测序及同源性搜索

将差异表达 cDNA 片段 S600 回收后,克隆到 pGEM-T 载体中进行测序。测序结果显示该片段大小为 600 bp,以此序列在 GenBank 数据库中进行同源性搜索,发现与小麦 SBPase cDNA^[17]具有 90.4% 的序列同源性,说明 S600 可能是水稻 SBPase 基因的部分编码序列。在水稻日本晴(Nipponbare, japonica)基因组 DNA 数据库(<http://www.gramene.org>)中检索,只发现 1 个 BAC 克隆(OSJNBa0042F21)与 S600 具有高度的序列同源性,表

明 S600 所对应的基因在水稻基因组中只有 1 个座位。为了获取 S600 的全长 cDNA,我们用 S600 序列在 Kikuchi 等^[18]公布的梗稻日本晴全长 cDNA 数据库中进行搜索,发现与 GenBank 登录号为 AK062089 和 AK065773 的两个功能未知的 cDNA 克隆高度同源(99%)。序列比较表明这两个 cDNA 克隆长度接近,重叠区序列完全相同,表明它们都是 S600 对应的全长编码序列。

2.3 同源性检索所获得的全长 cDNA 的序列分析

采用 ORF finder 对上述两个全长 cDNA 进行了开放阅读框的识别。结果显示:它们均包含 1 个 1179 bp 的开放阅读框,编码 392 个氨基酸组成的蛋白,图3中列出了 Kikuchi 等^[18]公布的 AK062089

```
1 AAACGTACTACGAACTTGTACACTATCAAGCTCAGCAACTGCCCTCTCTTTCC 60
61 CTCGCCATTAAAGTTTCTCGTCCGGCGCGTACCCCTGCGAATTAACCTAGCTAGG 120
121 CCGGCCATTGAGACGGTGGCCGCGCCAGCTACCCCGCGGGCGCGACGCGCTGCCA 180
1 M E T V A A A S Y T R G A A T R S P 18
181 GCGTGCTGCGCCGCTTCTCGCAGTCTACAGGCCAAGGCCGTAGACGCGCG 240
19 A C C A A M S F S Q S Y R P K A A R P P 38
241 AGCACGTTCTACGGCGAGTCGCTGCGGGTTAACACGGCGAGGTGCTGCGCTGCGGAGG 300
39 S T F Y G E S L R V N T A R S L P S G R 58
301 CAGTCCAAGGCGGCGAGCCGGCGCGCTCAGCACCCGGTGCAGATCGGGGACGCCTG 360
59 Q S K A A S R A A L S T R C E I G D S L 78
361 GAGGAGTTCTTGACCAAGCGGACGCGGATAAGAACCATCAGGCTGCTCATCTGCATG 420
79 E E F L T K A T P D K N L I R L L I C M 98
421 GGGGAGGCGATGAGGACGATCTCGTTCAAGGTCAGGACGGCGTCTGCGCGCGCACCGCC 480
99 G E A M R T I S F K V R T A S C G G T A 118
481 TCGTCAAGTTCGTTTCGTTGACGAGCAGCTCGCGTTCGATATGCTCGCCGACAAGCTCTC 540
119 C V N S F G D E Q L A V D M L A D K L L 138
541 TTCGAGGCTCTGGAATCTCTCATGTCTGCAAGTATGCGTGTCCGAGGAAGTCCCGGAG 600
139 F E A L E Y S H V C K Y A C S E V P E 158
601 CTGCAAGTATGGTGAGGACGATCGATGGTGGTTTCAGTGTAGCATTGACCCCTTGAT 660
159 L Q D M G G P V D G G F S V A F P L 178
661 GGGTCCAGCATTTGACACGAACCTCACAGTTGGAACCATATTTGGTGTCTGGCCTGGT 720
179 G S I V D T N F T V G T I F G V W P G 198
721 GACAAAGTCACAGGCGTCACCGTGGAGACCAAGTTGCTGCTGCGCATGGGCATCTATGC 780
199 D K L T G V T G G D Q V A A A M G I Y G 218
781 CCTCGCACTACTTACATTATCGCTCTCAAAGATTGCTGGAACCTCATGAATTCCTTCTT 840
219 P R T T Y I I A L K D C P G T H E F L L 238
841 CTTGATGAAGGAAATGGCAGCATGTCAAGGACACCAACCATTTGGAGAGGGGAAATG 900
239 L D E G K W Q H V K D T T T I G E G K M 258
901 TTCTCTCCTGGTAACCTGAGGCTACATTTGATAATCTGAATATGACAAGCTCATCAAC 960
259 F S P G N L R A T F D N P E Y D K L I N 278
961 TACTATCAAGGAGAAGTACATTTGCGTTACACTGGAGGAATGGTTCCTGATGCAAC 1020
279 Y Y V K E K Y T L R Y T G M V P D V N 298
1021 CAGATCATAGTTAAGGAGAAGGCATCTTACCAACGTGACGTCTCCGACAGCCAAGGCC 1080
299 Q I I V K E K G I F T N V T S P T A K A 318
1081 AAGCTGAGGCTCTGTTTCGAGGTGGCGCGTGGGTTTCTTGATAGAGAAAGCCGCGGG 1140
319 L L L L F V A P L G F L I E K A G G 338
1141 TACAGCAGCGACGCAACAGTCGGTGTGGACAAGGTGATCAACAACCTCGACGAGCGG 1200
339 Y S S D G K S V L D K V I N N L D E R 358
1201 ACTCAAGTGGCCTACGGTTCCAAGAACGAGATCATCCGGTTCGAGGAGACTCTCTACGGC 1260
359 T Q V A Y G S K N E I I R F E E T L Y G 378
1261 TCGTCGAGGCTCACCGCGCGGCCACCGTGGGCGCGCCGCTAATCTTTTGTGCAACG 1320
379 S R L T A G A T V G A A A * 392
1321 CGAGCCAGTGTCTCTGCAGGCTCAAAAACGCTGAACTGCAGTCGTTTTAGACTCCCA 1380
1381 TCCTGTAATGCAGATTGGGTTGTAGTTGAAGTGGGACTTGAACTGCAAAGTTATACTCC 1440
1441 TTTTGTCAAGGT 1452
```

该全长 cDNA 序列为 Kikuchi 等^[18]测序公布结果; * 表示终止密码子(TAA);方框内的氨基酸与结合反应底物 Sed-(1, 7)-P₂ 有关;划线标记的氨基酸区域与 SBPase 酶氧化还原调节有关
Nucleotide sequence of this full-length cDNA was reported by Kikuchi et al.^[18]. The stop codon (TAA) is marked with an asterisk. The amino acid residues deduced to be involved in binding of the substrate Sed-(1, 7)-P₂ are boxed. The underlined amino acid residues indicate the regions involved in redox-regulated activation of rice SBPase

图 3 水稻 SBPase 基因全长 cDNA 及推定的氨基酸序列
Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of rice SBPase gene

克隆的 cDNA 及推定的氨基酸序列。将此蛋白与小麦 SBPase^[17] 进行比较, 发现它们之间具有 93% 的氨基酸序列同源性。这说明了 AK062089 和 AK065773 克隆编码水稻 SBPase 酶。SBPase 酶由核基因编码, 蛋白前体经信号肽引导进入叶绿体后加工为成熟的酶^[19]。根据菠菜 SBPase 酶的信号肽序列, 可以推定水稻 SBPase 酶信号肽的切点位于 Cys-72 和 Glu-73 之间^[20]。在水稻 SBPase 酶序列中发现了与氧化还原调节有关的保守结构域 (CGGTAC), 其中的两个半胱氨酸残基 Cys114 和 Cys119 对于 SBPase 的活性调节至关重要^[19, 21]。此外, 在此开放阅读框中还发现了与结合底物景天庚酮糖-1,7-二磷酸 (Sed-(1,7)-P₂) 有关的氨基酸残基^[17], 见图 3。

3 讨论

本研究通过 cDNA-AFLP 所分离获得的差异表达片段 S600, 得到了 Northern 杂交结果的证实, 再次证明了 cDNA-AFLP 技术的可靠性, 它对于高通量识别与分离差异表达基因, 揭示基因组的表达谱具有重要的应用前景。S600 在杂种与父本中表达量相近, 均明显高于在母本中的表达水平。这种杂种的基因表达偏向单亲的特征在以前的研究中也发现^[12, 13]。AK062089 和 AK065773 克隆所编码的多肽与小麦 SBPase 具有高度的氨基酸序列同源性 (93%), 同时其中还包含了与底物 (景天庚酮糖-1,7-二磷酸) 结合和氧化还原调节有关的保守氨基酸残基, 充分说明了 AK062089 和 AK065773 克隆编码水稻 SBPase 酶。

SBPase 酶是 Calvin 循环中重要的调控酶, 所催化的反应位于 Calvin 循环中同化阶段和再生阶段的分支点, 对于控制该循环中的物质流向具有十分重要的作用^[19]。研究表明, 反义抑制烟草中 SBPase 基因的表达, 导致转基因植株同化率下降、生长速度变慢和碳水化合物含量减少, 并且还发现植株光合作用能力与该基因的表达水平密切相关^[22, 23]。而过量表达 SBPase 基因则可以引发转基因烟草植株光合能力增强、糖含量增加、植株体型增大及干物质重增加; 利用生物量优势明显的转基因植株和野生型植株进行杂交, 所获得的杂交后代和野生型植株相比, 表现出叶片增大、茎秆变粗、根系更加发达, 株高增加了 1.9 倍, 鲜重比野生型增加了 3 倍^[24]。这些结果暗示了 SBPase 基因对于农作物改良具有重要的应用价值。在本研究中, 发现了 SB-

Pase 基因在水稻杂种与亲本间存在差异表达, 并且其表达量与植株生物量之间有一定的相关性, 说明 SBPase 基因在水稻中可能同样具有重要的作用, 还可能与水稻杂种优势现象有一定联系。到目前为止, 在单子叶植物中还没有关于 SBPase 基因功能研究的报道。因此, 阐明 SBPase 基因在单子叶模式植物水稻中的功能、生理重要性, 以及它对于碳水化合物分配、植株生物量和产量的影响将具有十分重要的意义。通过同源搜索获得水稻 SBPase 基因全长编码序列, 为下一步研究其功能及利用该基因进行农作物改良奠定了重要基础。

致谢:感谢 C. W. Bachem 博士 (Wageningen University & Research Centre, the Netherlands) 提供了 cDNA-AFLP 具体操作手册。

参考文献:

- [1] Po H, Oishi N, Ishihara K. Heterosis in rice with reference to agronomic characters and leaf photosynthesis[J]. *Jpn J Crop Sci*, 1984, 2: 102-103.
- [2] 杨福愉, 邢菁如. 亲本黄化苗 ATP 含量与杂种优势[A]. 见: 水稻育种技术基础研究论文集[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1991. 246-250.
- [3] 梁承郎. 水稻杂种优势生理生化基础及优势预测研究进展简介[A]. 见: 水稻育种技术基础研究论文集[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1991. 211-214.
- [4] Bruce A B. The mendelian theory of heredity and augmentation of vigor [J]. *Science*, 1910, 32: 627-628.
- [5] Xiao J H, Li J M, Yuan L P, Tanksley S D. Dominance is the major genetic basis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers[J]. *Genetics*, 1995, 140: 745-754.
- [6] Shull G H. The composition of a field of maize [J]. *Am Breed Assoc*, 1908, 4: 298-301.
- [7] Stuber C W, Lincon S E, Wolff D W, Helentjaris T, Lander E S. Identification of genetic of factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers[J]. *Genetics*, 1992, 132: 823-839.
- [8] Yu S B, Li J X, Xu C G, Tan Y F, Gao Y J, Li X H, Zhang Q F, Maroof M A S. Importance of epistasis as the genetic basis in an elite rice hybrid[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9 226-9 231.
- [9] Romagnoli S, Maddaloni M, Livini C, Motto M. Relationship between gene expression and hybrid vigor in primary root tips of young maize (*Zea mays* L.) plantlets[J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 767-775.
- [10] Tsafaris S A. Molecular aspect of heterosis in plants[J]. *Physiol Plant*, 1995, 94: 362-370.
- [11] Kuhn E. From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants [J]. *Ann Bot*, 1995, 87: 139-155.

- [12] Chen N H, Yang J S, Gao Y P, Xu M L, Qing M, Ge K L. Differential display of mRNA between hybrid F₁ and its parental inbred lines [J]. *Chinese Sci Bullet*, 1996, **41**: 939-943.
- [13] Sun Q X, Ni Z F, Liu Z Y. Differential gene expression between wheat hybrids and their parental inbreds in seedling leaves[J]. *Euphytica*, 1999, **106**:117-123.
- [14] Xiong L Z, Yang G P, Xu C G, Zhang Q F, Maroof M A S. Relationships of differential gene expression in leaves with heterosis and heterozygosity in a rice diallel cross [J]. *Mol Breeding*, 1998, **4**: 129-136.
- [15] Bachem C W B, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development[J]. *Plant J*, 1996, **9**: 745-753.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [17] Raines C A, Lloyd J C, Willingham N M, Potts S, Dyer T A. cDNA and gene sequences of wheat chloroplast sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase reveal homology with fructose-1, 6-bisphosphatases[J]. *Eur J Biochem*, 1992, **205**: 1 053-1 059.
- [18] Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, Kawagashira N, *et al.* Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice [J]. *Science*, 2003, **301**:376-379.
- [19] Raines, C A, Harrison E P, Olcer H, Lloyd J C. Investigating the role of the thiol-regulated enzyme sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase in the control of photosynthesis[J]. *Physiol Plant*, 2000, **110**, 303-308.
- [20] Seuter A, Busch M, Hain R. Overexpression of the potential herbicide target sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase from *Spinacia oleracea* in transgenic tobacco[J]. *Mol Breeding*, 2002, **9**:53-61.
- [21] Dunford R P, Durrant M C, Catley M A, Dyer T A. Location of redox-active cysteines in chloroplast sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase indicates that its allosteric regulation is similar but not identical to that of fructose-1, 6-bisphosphatase[J]. *Photosynth Res*, 1998, **58**, 221-230.
- [22] Harrison E P, Willingham N M, Lloyd J C, Raines C A. Reduced sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation[J]. *Planta*, 1998, **204**:27-36.
- [23] Olcer H, Lloyd J C, Raines C A. Photosynthetic capacity is differentially affected by reductions in sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase activity during leaf development in transgenic tobacco plants[J]. *Plant Physiol*, 1998, **125**:982-985.
- [24] Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S. Overexpression of a cyanobacterial fructose-1, 6-/sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase in tobacco enhances photosynthesis and growth[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**:965-969.