

一个水稻多逆境响应基因 *OsMsr3* 克隆与表达分析

崔延春^{1,2}, 徐孟亮¹, 李落叶¹, 王曼玲¹, 徐国云¹, 夏新界^{1*}

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 亚热带农业生态过程重点实验室, 长沙 410125;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 为深入探讨水稻对逆境的反应机理并寻找新的植物耐逆基因, 采用 Affymetrix 水稻表达芯片(含 51279 个转录本)分析了培矮 64S 全基因组在不同逆境(高温、干旱、低温)胁迫下、不同生育时期叶片和穗中的表达谱, 从中筛选出一个受多种逆境诱导表达的基因 *OsMsr3* (*Oryza sativa* L. multiple stresses responsive gene3, GenBank 登陆号为 FJ383169)。定量实时 PCR 分析结果进一步证实了此基因在逆境条件下的诱导表达模式。用 RT-PCR 方法扩增获得了包含其完整开放阅读框的 cDNA 克隆, 序列分析表明, 其 ORF 大小为 480 bp, 编码一个具有 160 个氨基酸残基的低分子量热激蛋白, 推测分子量约为 18.0 kD; *pI* 约为 6.8。对其编码的蛋白质进行分析, 发现其羧基端存在一个 HSP20 的蛋白保守结构域, 与其他植物中的低分子量热激蛋白的相似性介于 33.7% ~ 97.5%。对其可能的启动子序列分析, 发现 6 类与逆境反应有关的顺式作用元件。推测该基因在逆境反应中起着重要的作用, 进一步的研究正在进行中。

关键词: 水稻; 逆境; 基因芯片; 低分子量热激蛋白

中图分类号: Q781; S511

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)06-0574-08

Expression and Cloning of a Multiple Stress Responsive Gene (*OsMsr3*) in Rice

CUI Yan-Chun^{1,2}, XU Meng-Liang¹, LI Luo-Ye¹, WANG Man-Ling¹, XU Guo-Yun¹, XIA Xin-Jie^{1*}

(1. Key Laboratory for Agro-Ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To understand mechanism(s) underlying stress responses in rice and to discover new stress-tolerance genes, we conducted a global genome expression profiling of the *indica* cultivar Pei'ai 64S subjected to heat, drought and cold stresses. Expression profiles were obtained for leaf and panicle tissues at different development stages of plants under the stress conditions using the GeneChip Rice Genome Array (Affymetrix) representing 51279 transcripts from both *japonica* and *indica* rice plants. We identified a multiple stress responsive gene *OsMsr3* (*Oryza sativa* L. multiple stresses responsive gene3, GenBank accession: FJ383169), which was highly induced in both leaf and panicle, in response to heat, drought and cold stresses. The expression profile of *OsMsr3* obtained by the microarray analysis was further confirmed by quantitative real-time RT-PCR analysis of the gene. The two sets of data are very well matched, suggesting that *OsMsr3* is really a multiple stress responsive gene in rice. In order to study its function in stress tolerance, we cloned the cDNA of the gene through amplification by RT-PCR. Sequence analysis showed that the cDNA consists of an open reading frame of 480 bp, encoding a protein of 160 amino acid residues with M. W. $\approx$ 18.0 kD and *pI* $\approx$ 6.8. The alignment of multiple amino acid sequences revealed the existence of a conserved HSP20 sequence domain at the C-terminus. Similarity analysis showed that the rice sHSP shares 33.7% - 97.5% identities with sHSP sequences found in other plants. Analysis of the putative promoter region identified 6 matches to cis-elements related to stress responses using PlantCARE software (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Based on the results obtained, we propose that *OsMsr3* might play an important role in rice stress responses. Further study on the function of the gene is in progress.

Key words: *Oryza sativa* L.; Stress; Microarray; Small heat shock protein

收稿日期: 2008-12-02, 修回日期: 2009-01-10。

基金项目: 中国科学院“百人计划”项目(02200420062903)资助。

作者简介: 崔延春(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为作物耐逆分子生物学。

* 通讯作者: 夏新界, 研究员, 博士生导师 (Author for correspondence. E-mail: jxxia@isa.ac.cn)。

水稻是世界最重要的粮食作物之一,全世界约1/2的人口以其为主食,在我国水稻也是第一大粮食作物,但高温、干旱等逆境严重影响了其产量和品质。某些逆境蛋白的表达有利于增强水稻对高温、干旱等逆境的适应能力,因此,利用现代生物基因工程技术培育耐高温、耐旱等非生物逆境因子作物,已成为农业生产发展的必然需要。

干旱、高盐、高温等逆境因子影响之间常常是相互关联的,它们可以对细胞产生相似的胁迫伤害。植物的耐逆性是由多基因控制的数量性状,植物在遭受干旱、低温等逆境胁迫时,会引起许多相关基因的表达变化,导致一系列形态学、生理功能、生物化学以及分子上的改变,这些变化反过来又影响植物本身的生长和产量^[1]。植物参与耐逆性的功能基因可分为两大类,一类是直接参与代谢与生理变化的效应基因,它们通过控制代谢酶或蛋白的表达影响代谢与生理过程,这些酶或蛋白对维持细胞膜系统在逆境下的稳定性以及防止原生质过度脱水等有重要作用;另一类是调节基因,它们通过控制其下游许多逆境诱导基因的表达而间接影响代谢与生理过程^[2]。耐逆基因的表达调控与逆境转录因子密切相关,一些转录因子仅参与特定环境胁迫反应的调控,而另一些转录因子则能调控多种逆境胁迫反应,即转录调控网络具有特异性和交叉性^[3]。多个顺式调控元件共存及它们在植物对不同环境刺激响应中的功能也反映出转录调控网络的复杂性。同一转录因子可能会同时激活多种功能基因;而同一功能基因也可能由多个转录因子激活^[3]。

植物经非致死高温锻炼后可以产生对致死高温的耐性,其自身合成的高温响应蛋白——热激蛋白对这种耐热性的获得起了重要的作用^[4]。根据分子量的大小,热激蛋白可分为分子量约为15~28 kD的低分子量热激蛋白(sHSPs)和分子量大于30 kD的高分子量热激蛋白(HMM HSPs)^[5]。在植物中,低分子量热激蛋白是热激蛋白家族的主要成员。植物低分子量热激蛋白都是由核内基因编码的,根据序列相似性、免疫交叉反应和细胞内定位,低分子量热激蛋白被分为6类:sHSP-C I、sHSP-C II和sHSP-C III这3类低分子量热激蛋白定位于细胞质和细胞核中,其它3类分别定位在质体、内质网和线粒体中^[5];此外,Scharf等^[6]还在这6类之外发现了另外一类低分子量热激蛋白基因。有关植物低分子量热激蛋白的生物学功能尚不十分清楚。Low等^[7]和Downs等^[8]研究指出sHSPs不仅有抑制细

胞凋亡、促进细胞骨架形成等功能,还有保护电子传递链(线粒体sHSPs)和光系统II的电子传递(叶绿体sHSPs)等作用。目前关于sHSPs功能的模型认为sHSPs能与外来蛋白选择性结合,抑制其聚集,并维持其所具有的感受态,使其能在别的分子伴侣帮助下完成依赖于ATP的折叠^[9]。

迄今为止,已从拟南芥、大豆、玉米、小麦等植物中克隆了多个低分子量热激蛋白基因,并对其在逆境下的表达水平及其生理功能进行了研究^[10]。为进一步探讨水稻的耐逆反应机理及发现新的耐逆基因,从分子水平上分析水稻的耐逆机理,以解决水稻的耐逆性问题,我们采用Affymetrix基因芯片系统与含51279个水稻转录本的表达芯片(GeneChip Rice Genome Array),分析了超级稻两优培九母本培矮64S苗期、孕穗期、抽穗开花期叶片与穗中基因在高温、干旱、低温逆境胁迫下的表达水平,筛选出部分显著上调或下调的基因。本文报道的是我们从众多显著上调或下调的基因中筛选到的一个对高温、干旱、低温均有响应的基因*OsMs3*的表达与克隆,希望能对水稻耐逆性研究提供一些基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料为超级稻(*Oryza sativa* L.)两优培九母本培矮64S。栽培与管理、逆境胁迫处理以及取材与制样采用徐孟亮等^[2]的方法。

1.2 试剂

DNA Polymerase (*TaKaRa LA Taq*)、克隆载体pMD18-T连接试剂盒、限制性内切酶购于宝生物工程(大连)有限公司,dNTP、DNA Ladder Marker购于天根生化科技(北京)有限公司,PCR引物由Invitrogen公司合成,其他试剂均为分析纯。大肠杆菌感受态细胞DH10B为本实验室制备并于-80℃保存。

1.3 方法

1.3.1 总RNA提取

采用TRIzol试剂提取法,具体操作参照徐孟亮等^[2]的方法。

1.3.2 基因芯片分析

按Affymetrix基因芯片系统中国经销商上海晶泰生物技术有限公司(GeneTech Biotechnology Limited Company)提供的Affymetrix表达芯片实验操作手册(2005年版)操作。主要包括如下步骤:①总RNA的提取和纯化;②cDNA的合成和纯化;③体外转录合成cRNA和cRNA的纯化;④cRNA片段

化、配制杂交液;⑤芯片杂交;⑥洗脱芯片;⑦扫描芯片;⑧数据分析。

1.3.3 实时定量 PCR 分析

提取的总 RNA,用购于 Fermentas 公司的 DNase 处理,以去除混入的基因组 DNA(按厂家提供的方法操作)。采用 QIAGEN 公司的 SYBR Green RT-PCR One Step Kit (Cat. No. 204243) 及 Roter Gene 3000 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 产物实时荧光检测。使用 Primer Expression 3.0 软件设计实时 PCR 引物,目的基因引物为 *OsMsr3*-F: 5'-CAGCAAGACACAATACACAATG-3', *OsMsr3*-R: 5'-AAGGACGGGAAGATGCTGC-3',扩增片段长 134 bp;内参基因为 18S,其引物为 18S-F: 5'-CGTCCCTGCCCTTTGTACAC-3', 18S-R: 5'-CGAACAACCTT CACCGGATCATT-3'。PCR 以不加 RT Mix (含反转录酶)作为参照,以检测可能残留的 DNA。热循环设 48℃ 30 min 1 个循环;95℃ 10 min 1 个循环;95℃ 15 s,58℃ 40 s,72℃ 20 s,40 个循环。按相对定量法计算,目的基因相对表达量 $Rel. Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $\Delta\Delta Ct = (\text{未知样品 } \Delta Ct) - (\text{校准样品 } \Delta Ct)$,未知样品 $\Delta Ct = (\text{内参基因 } Ct) - (\text{目的基因 } Ct)$,校准样品 $\Delta Ct = (\text{参比样内参基因 } Ct) - (\text{参比样目的基因 } Ct)$ 。

1.3.4 cDNA 克隆

从 GenBank 中搜索到 *OsMsr3* 的同源序列,应用 Vector NTI 10.3 软件分析设计该基因的 PCR 引物,上下游引物分别设有 *Sma*I 酶切位点,上游引物 *OsMsr3*-F 序列为:5'-CCCGGGCAGCAAGACACAAT-

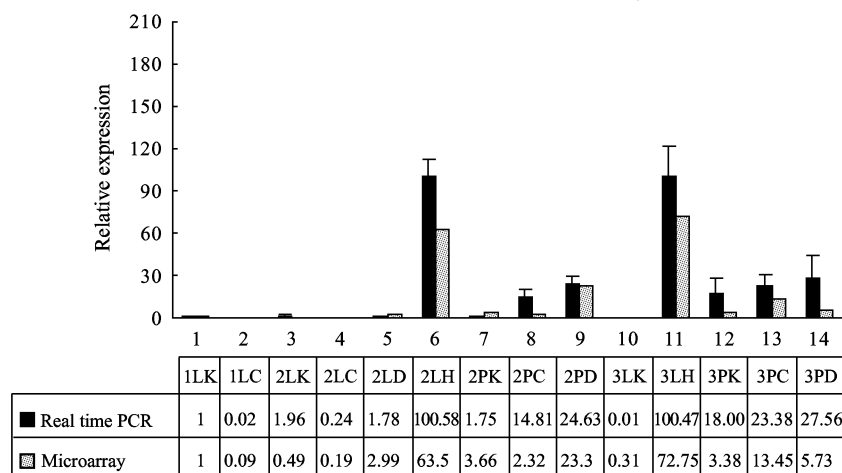
ACACAATG-3',下游引物 *OsMsr3*-R 序列为:5'-CCCGGGATCACAAACCGAAGGCTCG-3',引物由 Invitrogen 合成,以矮 64S cDNA 为模板进行 PCR 扩增;扩增程序为:95℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后在 72℃ 下延伸 10 min。回收目的片段并连接到 pMD18-T 载体,筛选含有目的片段的阳性克隆,送 Invitrogen 公司测序。

2 结果与分析

2.1 *OsMsr3* 在逆境下的表达水平分析

根据基因芯片分析结果,*OsMsr3* 是其中一个在高温与干旱条件下,在苗期、孕穗期、抽穗开花期叶片与穗中表达活性均比对照显著上调的基因,在低温条件下抽穗开花期穗中诱导表达的基因,其平均上调幅度为 33.7 倍,最高上调幅度达 72.8 倍(高温),最低上调幅度为 3.0 倍(见图 1)。在不同时期和不同组织器官中,与干旱逆境胁迫下的表达倍数变化相比,高温逆境胁迫下的表达倍数变化更明显,说明此基因对高温逆境胁迫更敏感。在抽穗开花期,低温逆境胁迫处理也使该基因在穗中的表达活性明显上调,此时期的穗可能对低温较为敏感。

为了验证芯片分析结果,采用定量实时荧光 PCR 方法对用于基因芯片分析的材料(相同逆境处理、相同发育时期、相同组织器官)*OsMsr3* 的表达水平进行了进一步的分析,所得结果与基因芯片结果基本吻合(图 1),均显示 *OsMsr3* 基因表达活性受干



1、2、3 分别代表:苗期、孕穗期、抽穗开花期;L 代表叶片;P 代表穗;K 代表对照;C 代表低温;H 代表高温;D 代表干旱。Microarray 代表基因芯片分析结果,Real-time PCR 代表实时定量 PCR 分析结果

1:Seedling; 2:Booting; 3:Heading & flowering; L:Leaf; P:Panicle; K:Control; C:Cold; H:Heat; D:Drought. Microarray represent the gene chip analysis results,Real-time PCR represent the real-time PCR analysis results

图 1 水稻矮 64S 不同生育时期与不同组织器官中 *OsMsr3* 基因在逆境下的相对表达水平

Fig. 1 Relative expression of *OsMsr3* in leaves and panicles of indica rice cultivar Pei' ai 64S at different developmental stages under the stress conditions

旱、高温逆境因子诱导而升高,同时在抽穗开花期的穗中同样受低温诱导而升高,两组数据变化趋势基本一致。两组数据的变化大小出现差异的原因可能是方法技术本身或所取植物材料的采集差异所引起的。

2.2 *OsMsr3* 基因 cDNA 的克隆

对克隆得到的 564 bp 的 cDNA 序列进行序列分析发现,该序列的编码区位于碱基的 20 ~ 499 之间,编码一个含有 160 个氨基酸残基的蛋白,预测分子量约为 18.0 kD,等电点约为 6.8。与 GenBank 公布的日本晴的相应 gDNA 片段序列 (AP008209, Range:8805034 ~ 8805600) 在 3 个位置 (69、107 ~ 109、433) 存在碱基变化,其中从 107 到 109 碱基处 *OsMsr3* 缺少 3 个连续的碱基 AGC,所编码的蛋白缺少一丝氨酸,其余两处只是单碱基的变化 (69:C 变为 T,亮氨酸变为脯氨酸;433:G 变为 C,氨基酸无变化),相似性为 99.0%;与 9311 相应的基因组 DNA (GenBank Number: AAAA02008212, Range: 284 ~ 847) 和中科院北京基因组研究所测得的培矮 64S 相应 gDNA 片段的序列完全一致。因此,我们推测这 3 个位置的碱基变化很可能是由水稻品种之间的差异造成的,并不是克隆或测序过程中碱基出错的结果。

2.3 *OsMsr3* 基因结构分析

为获得该基因的结构或可能的功能信息,将克隆得到的该基因的 cDNA 序列通过 NCBI 网站进行 Blast 同源性搜索,发现该基因与 Guan 等^[11]报道的 *OsHSP18.0* 基因的序列一致性为 98.0%。通过对基因组 3 号染色体上 *OsMsr3* 周围大约 40 kb 的碱基序列分析,在它周围也发现了其它 3 个编码 sHSP-CI 的基因,它们在基因组 3 号染色体上的排列分布 (见图 2) 与 Guan 等^[11]报道的从 *Tainung No. 67* 中得到的 4 个 sHSP-CI 基因在水稻 3 号染色体上的排列一致。

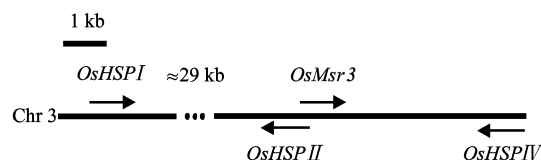


图 2 水稻 *sHSP* 基因在水稻培矮 64S 3 号染色体上的排列分布图

Fig. 2 Schematic diagrams of the arrangement of the rice *sHSP* genes on Pei'ai 64S chromosome 3

2.4 *OsMsr3* 编码的氨基酸序列相似性分析和系统进化分析

根据公布的培矮 64S 基因组 DNA 序列,对

OsMsr3 可能的启动子区域 (该基因上游大约 2 kb 的核苷酸序列) 进行在线 PlantCARE 软件分析 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),在启动子 TATA box 上游,发现了 6 类与多种逆境诱导有关的顺式作用元件 (见图 3),其中包括:8 个热诱导应答相关顺式元件 HSE (heat shock element)、1 个水杨酸应答的顺式元件 TCA-element、2 个厌氧应答的顺式元件 ARE (anaerobic response element)、2 个脱落酸应答顺式元件 ABRE (ABA-responsive element)、2 个茉莉酸应答元件 TGACG-motif (TGACG) 及 2 个光应答元件 G-box。多个顺式调控元件共存反映出该基因转录调控网络的复杂性。这些植物耐逆相关顺式作用元件的存在预示 *OsMsr3* 的启动子区域能够响应多种逆境信号,其表达可能受多种反式作用因子共同调节。

为获得 *OsMsr3* 编码的蛋白的可能功能信息,利用 EXPASY (<http://www.expasy.ch/prosite/>) 对其编码的蛋白进行蛋白结构域和功能位点预测,发现在其蛋白的第 56 ~ 145 间的 90 个氨基酸是一个 HSP20 的蛋白保守结构域。应用 VectorNTI10.3 将 *OsMsr3* 编码的蛋白序列与其它植物中已公布的 sHSP-CI 与 sHSP-CII 的蛋白的氨基酸序列分别进行比对, *OsMsr3* 编码的蛋白序列与已发表的水稻 sHSP-CI 类蛋白 AAC78393 (*OsHSP18.0*) 的氨基酸序列一致性为 97.5%,序列相似性为 98.1%,与大麦 (CAA69172)、小麦 (P12810)、玉米 (NP_001105442)、拟南芥 (NP_172220)、烟草 (AAR01526)、豇豆 (ABS72445) 以及辣椒 (AAQ19680) 中公布的 sHSP-CI 类蛋白的氨基酸序列一致性为 58.8% ~ 71.3%,序列相似性为 65.6% ~ 80.6%;与玉米 (CAA38012)、水稻 (ABA29610)、小麦 (CAA41218)、豌豆 (AAA33670) 以及拟南芥 (CAA45039) 中公布的 sHSP-CII 类蛋白的氨基酸序列一致性仅为 33.7% ~ 36.2%,序列相似性为 46.0% ~ 48.5%。通过在线 clustalw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) 对 *OsMsr3* 编码的蛋白序列及其它植物中的 sHSP-CI 和 sHSP-CII 类蛋白的氨基酸序列进行比对 (见图 4),结果发现 *OsMsr3* 在 N 端与 sHSP-CI 的相似性明显高于 sHSP-CII,而在 C 端它们都具有一个 100 个碱基左右的 alpha-crystallin-Hsps 的蛋白保守结构域。应用 DNAMAN6.03.48 构建系统进化树,结果表明 (图 5), *OsMsr3* 与 sHSP-CI 类蛋白位于同一分支上,进一步确认了 *OsMsr3* 属于 sHSP-CI 类基因。

```

-1628 ATTCAGAATAGGCTTCGACTTACGGCTGCTCTTGAAAACGCCACACTGCCGCTGGTTT-
      TCA-element ARE
-1538 -----GCTACGTACA-----CTTGACGTCGGGCTTCTTGGGCTC
      ABRE TGACG-motif
-968 CTCCTTGGGCACGGTGACGGTGAGCAG-----TGACCTCCTCCTTCTTC
      TGACG-motif
-748 AGCCCCGGCAGCTCCGCCTTGAAACAGCTGCGCC-----
      G-box ABRE
-578 GAACACGTTGCTGCGGCGGATCATCGACAT-----
      G-box
-488 ATGTTTGCTTGGTTTGC-----TAAGCTTCTAGAACTTCCAG
      ARE HSE
-368 TTTGCCCCCGCATGGGCTAGAAACCTAGTACGAGATAGCTTGGGCTAGAAAGTTTA-----
      HSE HSE
-248 ---AAGCAGGCCTAGAACATCCAGAAGACCACTTCCAATTCGGCCCAAATTAACGAA
      HSE HSE
-188 CAAACGAGAAGCTATCCGGAAGCAAACTTCCGGTAGAACCCATGGACCATCACGAACTGC
      HSE HSE HSE
-132 TATATAAATTGTGGCCACCACGCAGCG-----
      TATA-box+1
-8 CCAAAAAACAGCAAGACACAATACACAATGTCGCTGATCCGCCGAGCAACGTGTTTCGAC
      M S L I R R S N V F D
53 CCCTTCTCCCTCGACCCCTGGGACCCCTTCGACGGCTTCCCTTCGGCTCCGGCAGAAGC
  P F S L D P W D P F D G F P F G S G R S
113 AGCGGCAGCATCTTCCCGTCCTTCCCCCGGGCACCCTCCTCCGAGACCGCGGCCCTTCGCC
  S G S I F P S F P R G T S S E T A A F A
173 GGCGCGCGCATCGACTGGAAGGAGACGCCGGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCG
  G A R I D W K E T P E A H V F K A D V P
233 GGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTGGAGGTGGAGGACGGCAACGTCTCCAGATCAGC
  G L K K E E V K V E V E D G N V L Q I S
293 GGCGAGCGCAGCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACCGCGTGGAGCGCAGC
  G E R S K E Q E E K T D K W H R V E R S
353 AGCGGCAAGTTCTCCGAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGGAGCAGATCAAG
  S G K F L R R F R L P E N T K P E Q I K
413 GCGTCCATGGAGAACGGGTGCTCACCCTCACCCTGCCCAAGGAGGCCCAAGAAGCCC
  A S M E N G V L T V T V P K E E P K K P
473 GACGTCAAGTCCATCCAGGTTACCGGCTAGTAAGAACTTCGGGTGTGACATGCACGGTG
  D V K S I Q V T G ★
533 GAGAGCTTCGATTCGAGCCTTCGGTTTGTGAT

```

ATG 为翻译起始点; ‘★’ 表示终止密码 TAG; TCA、ARE、ABRE、TGACG-motif、G-box 及 HSE 分别代表与水杨酸、厌氧、脱落酸、茉莉酸、光及高温反应有关的顺式作用元件; “-----” 代表省略的碱基

The *cis*-elements related to stresses. TATA box, and the translation initiation site (ATG) and stop codon (TAG) are highlighted and underlined. TCA, ARE, ABRE, TGACG-motif, G-box and HSE are *cis*-elements involved in salicylic acid, anaerobic, ABA, MeJA, light and heat stress responses respectively. Dashes “-----” represent bases omitted

图3 *OsMsr3* 序列、启动子区域预测的顺式作用元件及推测的编码蛋白序列

Fig. 3 Sequences of *OsMsr3*, *cis*-elements in the putative promoter region and the predicated protein

3 讨论

高温、干旱等非生物逆境都可以诱导 sHSPs 基因的表达,如 Coca 等^[12] 研究指出向日葵中水压变化能够引起 *HaHSP17.6* (*CI*) 和 *HaHSP17.9* (*CII*) 基因的表达,其 mRNA 表达水平与水分丧失程度呈正相关。Lee 等^[13] 以 *OsHSP17.3* 的 cDNA 为探针,从热激处理的水稻 Tainong67 苗期的 cDNA 文库中筛选到一个 sHSP-CI 类基因 *OsHSP18.0*, Guan 等^[11] 研究表明水稻苗期在 32℃ 条件下处理 2 h 或 41℃ 条

件下处理 5 min 就能检测到 *OsHSP18.0* 的表达,而亚砷酸盐、镉、(S)-(-)-2-羧基环丁胺、乙醇、双氧水以及铜在苗期也能诱导该基因的表达。通过蛋白比对分析, *OsMsr3* 与 *OsHSP18.0* 序列相似性达到 98.1%。在本研究中, *OsMsr3* 是在基因芯片 (Affymetrix) 分析矮 64S 水稻全基因组 (共 51279 个转录本) 表达谱中被发现,芯片及定量实时 PCR 分析均表明 *OsMsr3* 不仅仅在高温逆境胁迫下高水平诱导表达,而且在干旱与低温条件下均诱导表达。与 Lee 和 Guan 等^[11,13] 研究结果相比,本研究中的

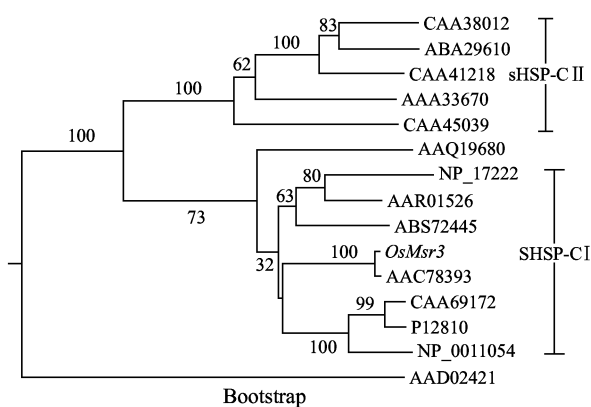
OsmSr3	-----MSLI-----RRSN-VFDPFSLDPW-DPFDGFPFGSG-RSSGSIFPSFPRGTSSETAAAFAGARIDWKE	59
AAC78393	-----MSLI-----RRSN-VFDPFSLDLW-DPFDGFPFGSGRSSGTIFPSFPRGTSSETAAAFAGARIDWKE	60
CAA69172	-----MSIV-----RRSN-AFDPF-ADLWADPFDT-----FRSIVPAFS-G-NSETAAAFANARVDWKE	49
P12810	-----MSIV-----RRSN-VFDPF-ADLWADPFDT-----FRSIVPAIS-GGSSETAAAFANARVDWKE	50
NP_001105442	-----MSLV-----RRSN-VFDPFSMDLW-DPFDTM-----FRSIVPSAT-STNSETAAAFASARIDWKE	51
NP_172220	-----MSLIPSF FGNRRSNSIFDPPFSLDVW-DPFK-----ELQFPSS---LSGETSAITNARVDWKE	54
AAR01526	-----LGFP GS--NSGETSAFANTRV DWKE	23
ABS72445	-----MSLIPSF FG TGRRTN-VDFPFSLDVW-DPFET-----ALSFPRSE--VSSETAAIANTRIDWKE	55
AAQ19680	-----MSMIPSFFG-GRRSN-IFDPVSLDLW-DPFE G FP-----ISSTIANTP-SSARETSAFPNARIDWKE	58
CAA38012	MDAVMFGL-----ETPLMAALQHLLDVPDG DAGAGGD----NKTGSGGSATR TYVRDARAMAATPADVKE	61
ABA29610	MESAMFGL-----ETPLMTALQHLLDIPDGE GGAAG-----KQGATGGPTRAYVRDARAMAATPADVKD	59
CAA41218	MAGMV FGL-----DAPMMAALQHLLDIPDGEAEPPP-----EKQGPTRAYVRDARAMAATPADVKE	56
AAA33670	-----MDL-----DSPLFN TLHHIMDLTD DTT EKNL-----NAPR TYVRDAKAMAATPADVKE	49
CAA45039	-----MDLG-----RFPI ISILEDMLEVPE DHNN EKT-----RNNPSRVYMRDAKAMAATPADVIE	51
	: : * . : *	:
OsmSr3	TPEAHVF KADVPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSK----EQEEKTDKWHRVERSSGKF LRRFRLPENTKP E	128
AAC78393	TPE-HVFKADVPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSK----EQEEKTDKWHRVERSSGKF LRRFRLPENTKP E	128
CAA69172	TPEAHVF KADLPGVKKEEVKVEVEDGNVLVVSGERTK----EKEDKNDKWHRVERSSGKF VRRFRLPEDAKVE	118
P12810	TPEAHVF KV DLPGVKKEEVKVEVEDGNVLVVSGERSR----EKEDKNDKWHRVERSSGKF VRRFRLPEDAKVE	119
NP_001105442	TPEAHVF KADLPGVKKEEVKVEVEDGNVLVISGQRSR----EKEDKDDKWHRVERSSGQF IRRFRLPD DAKVD	120
NP_172220	TAEAHVF KADLPGMKKKEEVKVEIEDDSVLKISGERHV----EKEEKQDTWHRVERSSGQF SRKFKL PENVKMD	123
AAR01526	TPEAHVF KADLPGLKKEEVKVEIEDDRVLQISGERNV----EKEDKNDTWHRVERSSGKF MR RFRLPENAKMD	92
ABS72445	TPEAHVF KADLPGLKKEEVKVEIEEG RVLQISGQRTK----EKEDKNDKWHRVERSSGSFLRRFRLPENAKVN	124
AAQ19680	TPQAHI FKVDVPGIKREEVKVQE EGRI LQITGERSR----EQEEKNDQWHRMERSSGKF LRRFRLPENTKM G	127
CAA38012	LPGAYA FVVDMPGLGTDIRVQVEDERVLVVSGERRR----EEREDDAKYLRMERRMGKF MRKFVLPDNADV D	130
ABA29610	LPGAYA FVVDMPGLKSSDIKVQVEEERLLVISGERRRG GEEEEESCKYL RMERRMGKF MRKFVLPDNADV D	132
CAA41218	LPGAYA FVVDMPGLGSDIKVQVEDERVLVISGERRR----EEKED-AKYLRMERRMGKLMRK FVLPENADME	125
AAA33670	HPNSYVFMVMPGVKSGDIKVQVEDENVLLISGERKR----EEEKEGVKYL KMERRIGKLMRK FVLPENANIE	118
CAA45039	HPNAYA FVVDMPGIKDEIKVQVENDNLVVSGERQR--ENKENEGVKYVMERRMGKF MRKFQLPENADLD	121
	. : * *.** : ::*: *: * : ** :	:
OsmSr3	QIKASMENGVLTVTPK--EEP KKPD VKSIQVTG	160
AAC78393	QIKASMENGVLTVTPK--EEP KKPD VKSIQVTG	160
CAA69172	EVKAGLENGVLTVTPK--TEVKK PEVKAI EISG	150
P12810	EVKAGLENGVLTVTPK--AEVKK PEVKAI EISG	151
NP_001105442	QVKAGLENGVLTVTPK--AEEKK PEVKAI EISG	152
NP_172220	QVKASMENGVLTVTPKVE-EAKKKAQVKSIDISG	157
AAR01526	QVKAAMENGVLTVTPK--EEVKK PDVKSIDISG	124
ABS72445	EVKAAMENGVLTVTPK--EEVKK PDVKPVQITG	156
AAQ19680	EIKAAMENGVLTVTPK--EEEKR SEVKAI DISG	159
CAA38012	KVA AVC RDGVLTVTVEKL P PEPKKPKT IEVKVA-	164
ABA29610	KISA VC QDGVLT VTVEKL P PEPKKPKT IEVKVA-	166
CAA41218	KISP-CRDGVLTVTVDKL P PEPKKPKT IQVQVA-	157
AAA33670	AISAISQDGVLT VT TVNKLP P PEPKKPKT IQVQVA-	152
CAA45039	KISA VCHDGVLT VT TVQKL P PEPKKPKT IQVQ----	153
	: : ***. *** *	* : . : :

右侧的数字代表每行最后一个氨基酸的序号。进行比对的 sHSP-CI 类基因包括: *OsMsr3*、AAC78393、CAA69172、P12810、NP_001105442、NP_172220、AAR01526、ABS72445、AAQ19680。sHSP-CII 类基因包括: CAA38012、ABA29610、CAA41218、AAA33670 和 CAA45039。通过在线的 Clustalw2 对这些氨基酸序列进行比对分析。‘*’代表高度保守的氨基酸残基; ‘:’代表保守性极高的位点; ‘.’代表保守性略低的残基位点; ‘ ’代表序列间无一致性位点

The numbers on the right indicated the positions of amino acids. The class I sHSP genes compared are *OsMsr3*, AAC78393, CAA69172, P12810, NP_001105442, NP_172220, AAR01526, ABS72445, AAQ19680. The class II genes compared include CAA38012, ABA29610, CAA41218, AAA33670 and CAA45039. The protein sequences were aligned by using clustalw2 online (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Consensus keys shown are: ‘*’ for single, fully conserved residue; ‘:’ for conservation of strong groups; ‘.’ for conservation of weak groups; ‘ ’ for no consensus

图4 *OsMsr3* 编码的蛋白质序列与其它植物低分子量热激蛋白基因编码的蛋白质序列的比对分析

Fig. 4 The alignment of the deduced protein sequences of *OsMs3* with other sHSP proteins in plants



系统发育树分析是基于 15 个低分子量热激蛋白的氨基酸比对结果,其中水稻 LEA 蛋白序列作为组外对照。分支上的数值表示 Bootstrap 值。

The analysis was based on the alignment of 15 individual sHSP sequences, with the rice LEA protein sequence (AADO2421) as an out-group for comparison. The numbers above the branch represent bootstrap values (out of 1000).

图 5 *OsMsr3* 与其它植物低分子量热激蛋白的系统发育树分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of the *OsMsr3* and sHSPs from other plants

OsMsr3 不但在苗期的叶片中受高温胁迫诱导其表达升高,在孕穗期、抽穗开花期的叶片与穗中同样受高温诱导表达升高,且在高温诱导的孕穗期、抽穗开花期的叶片中其表达达到顶峰,同时在苗期、孕穗期、抽穗开花期的叶片与穗中还受干旱诱导表达升高,此外,在抽穗开花期的穗中低温也能诱导其表达升高。这种多逆境诱导的机制尚不十分清楚,可能是不同逆境因子激活了细胞内相似的细胞信号传递途径和胞内响应^[14],如热激蛋白的产生等。

干旱、高温、低温等非生物逆境是植物生长发育过程中的主要限制因素。在长期的进化过程中,植物本身也形成了一系列逆境应答机制。植物能根据外界环境的变化调控特定基因的表达,以适应多种逆境胁迫。真核生物基因表达调控中的转录水平的调控受顺式作用元件和转录因子协调作用,是表达调控的关键环节^[14]。植物基因启动子中包含多种重要的顺式作用元件,在转录水平上参与调控下游相应基因表达,从而使植物能够适应外界环境胁迫^[15]。热激蛋白基因的表达在热激胁迫下主要由热激转录因子(HsF)激活,而它的结合效率又受到热激转录元件(HSE)的调控,至少具有两个 HSE 元件(5'-nGAAnnTTCn-3')才能有效的调控热激转录因子^[16]。对 *OsMsr3* 上游可能的启动子区进行预测分析,在其上游 -132 到 -472 间除了发现 8 个 HSE 元件外,在其上游我们还发现了一个 TCA-element、

两个 ARE 元件、两个 ABRE 元件、两个 TGACG-motif 及两个 G-box,这些顺式调控元件的共存表明该基因可能受多种转录因子共同调控,这种调控模式可能与该基因受多逆境诱导有关。*OsMsr3* 可能的启动子区有 8 个 HSE 元件,足够保证其高温热激条件下高水平表达。至于 *OsMsr3* 这种受多逆境因子诱导的分子机制,及在不同发育时期植物器官的不同表达模式是否与其特有功能相联系,更值得深入研究和探讨。

非生物逆境,如干旱、高盐、高温、化学有毒物以及氧化逆境都会对农业生产产生严重的威胁,是引起全世界作物减产的主要因素^[14]。植物在逆境适应过程中,许多基因的表达会发生改变,由此导致形态学、生理功能、生物化学以及分子上的改变,这些变化反过来又影响植物本身的生长和产量^[1]。水稻是重要的粮食作物,近年来,受温室效应的影响,全球气温持续增高,我国南方也时常遭遇高温、干旱的天气,造成水稻严重减产,使我国的粮食生产面临严峻的挑战。利用现代生物基因工程技术将克隆出来的耐逆功能基因转入水稻,可使这些植物的耐逆能力大大提高,Oh 等^[17]将拟南芥中的 *CBF3* 基因转入水稻中,结果转基因水稻的耐旱和耐盐性得到明显提高;Murakami 等^[18]曾在水稻品种“Hoshinoyume”中过量表达 *sHSP17.7*,结果转基因植株对高温和 UV-B 的忍耐能力得到明显提高。本研究选取超级稻两优培九的母本培矮 64S 为实验材料,采用 Affymetrix 水稻表达芯片分析了其不同生长发育时期、不同组织器官全基因组在高温、干旱、低温逆境胁迫下的表达水平,*OsMsr3* 是从中筛选到的一个受高温、干旱诱导、在各生长发育时期与组织器官均显著上调的基因,且在开花穗中也受低温诱导。根据其表达特性、编码的蛋白质及启动子区域的结构特点,我们将其作为一个重要的水稻耐逆候选功能基因。目前,该基因的表达载体已经构建完成,通过转化水稻和拟南芥植物对其功能的分析正在进行中。

致谢:感谢中科院北京基因组研究所于军研究员为我们提供 sHSPs 基因在水稻培矮 64S 3 号染色体位点上周围大约 30 kb 的序列信息。

参考文献:

- [1] Wang W X, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations [J]. *Acta Hort*, 2001, 560: 285-292.
- [2] 徐孟亮, 陈荣军, Pedro R, 李落叶, 王曼玲, 徐国云, 夏新界. —

- 一个新的水稻逆境响应基因 *OsMsrl* 的表达与克隆[J]. 作物学报, 2008, 34 (10): 1712 - 1718.
- [3] 王计平, 史华平, 毛雪, 李润植. 转录因子网络与植物对环境胁迫的响应[J]. 应用生态学报, 2006, 17(9): 1740 - 1746.
- [4] Wang D, Luthe D S. Heat sensitivity in a bentgrass variant. Failure to accumulate a chloroplast heat shock protein isoform implicated in heat tolerance[J]. *Plant Physiol*, 2003, 133: 319 - 327.
- [5] Chang P F, Jinn T L, Huang W K, Chen Y, Chang H M, Wang C W. Induction of a cDNA clone from rice encoding a class II small heat shock protein by heat stress, mechanical injury, and salicylic acid[J]. *Plant Science*, 2007, 172: 64 - 75.
- [6] Scharf K D, Siddique M, Vierling E. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystalline domains (α -crystallins) [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6: 225 - 237.
- [7] Low D, Brandle K, Nover L, Forreiter C. Cytosolic heat-stress proteins *HSP17.7* class I and *HSP17.3* class II of tomato act as molecular chaperones *in vivo* [J]. *Planta*, 2000, 211 (4): 575 - 582.
- [8] Downs C A, Heckathorn S A. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants[J]. *FEBS Lett*, 1998, 430(3): 246 - 250.
- [9] Waters E R, Lee G J, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants[J]. *J Exp Bot*, 1996, 47 (296): 325 - 338.
- [10] Sun W N, Montagu M V, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1577: 1 - 9.
- [11] Guan J C, Jinn T L, Yeh C H, Feng S P, Chen Y M, Lin C Y. Characterization of the genomic structures and selective expression profiles of nine class I small heat shock protein genes clustered on two chromosomes in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 56: 795 - 809.
- [12] Coca M A, Almoguera C, Thomas T L, Jordano J. Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analysis of a water-stress inducible and developmentally activated sunflower promoter [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31(4): 863 - 876.
- [13] Lee Y L, Chang P F, Yeh K W, Jinn T L, Kung C C, Lin W C, Chen Y M, Lin C Y. Cloning and characterization of a cDNA encoding an 18.0-kDa class-I low-molecular-weight heat-shock protein from rice[J]. *Gene*, 1995, 165: 223 - 227.
- [14] Wang W X, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance[J]. *Planta*, 2003, 218: 1 - 14.
- [15] 聂丽娜, 夏兰琴, 徐兆师, 高东尧, 李琳, 于卓, 陈明, 李连城, 马有志. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(3): 385 - 391.
- [16] Schoffl F, Prandl R, Reindl A. Regulation of the heat-shock response[J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1135 - 1141.
- [17] Oh S J, Song S I, Kim Y S, Jang H J, Kim S Y, Kim M, Kim Y K, Nahm B H, Kim J K. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth[J]. *Plant Physiol*, 2005, 138: 341 - 351.
- [18] Murakami T, Matsuba S, Funatsuki H, Kawaguchi K, Saruyama H, Tanida M, Sato Y. Over-expression of a small heat shock protein, *shHSP17.7*, confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants[J]. *Molecular Breeding*, 2004, 13: 165 - 175.