

水稻光温敏核不育基因表达产物初步研究

邢俊杰^{1,2}, 李莉¹, 李磊^{1,2}, 李强^{1,2}, 杲修杰^{1,3}, 曹孟良^{1*}

(1.国家杂交水稻工程技术研究中心, 中国湖南 长沙 410125;

2.中南大学, 中国湖南 长沙 410083; 3.国防科技大学, 中国湖南 长沙 410073

摘要: 光温敏核不育基因在杂种优势利用中具有重大价值, 了解其转录和翻译过程对解析温敏核不育机理和分离温敏核不育基因非常重要. 利用基因芯片、蛋白质组技术结合遗传分析的方法, 以不同温度条件下处理的培矮 64S 及两优培九自交后得到的 F₂ 群体为材料, 从转录水平和翻译水平上分别筛选出可能与温敏核不育基因相关的 24 个特异表达基因以及 6 个特异表达蛋白质, 并分析了这些产物的功能.

关键词: 水稻; 光温敏核不育基因; 基因芯片; 蛋白质组

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2008)02-0126-05

Expression Profiling on Photo-Thermo-Sensitive Genic Male-sterile Gene of Rice

XING Jun-jie¹, LI Li¹, LI Lei^{1,2}, LI Qiang^{1,2}, GAO Xiu-jie^{1,3}, CAO Meng-liang^{1*}

(1.China National Hybrid Rice R&D Center, Changsha 410125, Hunan, China; 2.Central South University, Changsha 410083, Hunan, China; 3.National University of Defense Technology, Changsha 410073, Hunan, China)

Abstract: The Photo-thermo-sensitive Genic Male-sterile (PTGMS) gene plays an important role in rice heterosis, and it is very important to analyze its expression for elucidating molecular basis of PTGMS and cloning the gene. By microarray and proteomic technology combined with genetic analysis, 24 genes and 6 proteins, expressed specially in PTGMS rice Peiai 64S and F₂ population when treated with different temperature, were screened. Their functions were also analyzed by informatics.

Key words: rice; Photo-thermo-sensitive Genic Male-sterile (PTGMS); gene chip; proteome

(Life Science Research, 2008, 12 (2) : 126 ~130)

光温敏核不育 (Photo-thermo-sensitive Genic Male-sterile, PTGMS) 水稻在两系杂交水稻育种中得到了广泛应用, 并取得了巨大成功^[1]. 然而, 关于光温敏核不育基础理论的研究还远远不能适应两系杂交水稻应用研究的发展, 特别是对光温敏核不育性的遗传机制和调控机理等方面了解甚少. PTGMS 基因至今尚未克隆, 表达产物尚未确定, 表达过程的信号传导更未明晰.

在克隆 PTGMS 基因的策略上, 多采用图位克隆的反向遗传学技术路线^[2,3]. 由于 PTGMS 的遗传背景复杂, 除受 1~2 对隐性核不育基因控制

外, 可能还有微效基因的作用, 并受到光、温等环境因素的影响, 这些因素都将限制 PTGMS 基因定位的准确性. 以往对光温敏核不育基因的研究, 多局限于对其差异表达 mRNA 或差异表达蛋白的分别研究, 以及具有光温敏特性的亲本或其 F₂ 代的分别研究, 这样很难准确的判定具体哪些差异表达 mRNA 或差异表达蛋白与 PTGMS 现象真正相关^[4-8]. 随着水稻功能基因组学的开展, 在分子生物学领域对光温敏核不育水稻进行了深入的研究. 从寻找基因表达产物入手, 进一步克隆 PTGMS 基因, 不仅可以拓宽克隆

收稿日期: 2007-09-18; 修回日期: 2008-01-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 973 项目 (2001CB1088)

作者简介: 邢俊杰 (1981-), 男, 山东龙口人, 中南大学博士研究生, 主要从事水稻功能基因组研究, Tel: 13874818416, 0731-2872997,

xingjunjie@hrrc.ac.cn

PTGMS 基因的技术路线, 与图位克隆技术路线相互补充和验证, 也是研究其信号传导必不可少的。

本实验以超级杂交稻组合两优培九的亲本培矮 64S 及两优培九自交后得到的 F₂ 代分离群体为材料, 利用基因芯片和蛋白质组技术, 结合遗传分析方法, 寻找在不同温度条件下, 水稻光温敏不育系培矮 64S 育性变换时期与育性相关的特异表达基因和特异表达蛋白, 以期解析或分离 PTGMS 基因。

1 材料与方法

1.1 材料的选择及处理

选用超级杂交稻组合两优培九的亲本培矮 64S (*Oryza sativa* L, 简称为 P64S), 以及两优培九自交后得到的 F₂ 代群体为材料。P64S 于长沙 5 月 23 日播种, 适期分蘖扩繁至 1 000 株, 待生长至育性敏感期 (8 月中旬)^[9], 8 月 20 日选取一半数量进行冷水灌溉处理, 水温度保持在 23 ℃ 以下, 12 d 光照 此为可育亲本, 简称 PF; 另一半仍在 大田正常种植 此为不育亲本, 简称 PS。F₂ 代群体 500 株, 仅考察育性。F₂ 代群体根据籽粒育性情况, 分成不育群体 (简称: F₂S) 和可育群体 (简称: F₂F)。育性划分标准是: 不育——套袋结实率 < 5%; 可育——套袋结实率 > 80%。所有材料在孕穗期取幼穗, 为了取材时期准确一致, 以叶枕平时期为准。按 1 g 为包装单位, 液氮速冻后贮藏于 -80 ℃ 冰箱。集团为分别取样后, 磨样后再混合, 取 1 g 用于研究。

1.2 基因芯片表达谱分析

水稻表达谱基因芯片由北京华大基因研究中心 (中科院北京基因组研究所) 制备, 分 2 张芯片, 共点制有约 60 000 条水稻寡核苷酸 (Oligo), 代表全部已知的基因和部分推测的基因。采用北京华大 RNA 提取方法提取水稻幼穗总 RNA, 每张芯片上点制的样品分为实验组和对照组, 分别用 CY-3、CY-5 作荧光标记, 杂交结果经过图像处理软件分析后, 找到差异表达基因, 然后对其

进行染色体定位和功能分析。点样仪: Spot Array 72, 点样针: Smp3; 扫描仪型号: Scan Array 2000; 图像处理软件: Gene Pix Pro 3.0。

1.3 蛋白质组分析

蛋白质组实验样品与基因芯片样品相同。采用北京华大植物蛋白提取方法提取水稻幼穗蛋白质, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[10]后, 扫描电泳图片, 寻找差异表达的蛋白点, 然后对其进行质谱分析和蛋白功能分析。蛋白电泳仪型号: Bio-rad protein IEF cell; SDS-PAGE 电泳仪型号: Ettan Dalt system; 扫描仪型号: Umax powerlock 2100xl; 质谱仪: Bruker autoflex。

2 实验结果

2.1 杂交芯片数据分析

亲本及 F₂ 代群体表达谱基因芯片都作了一个重复实验, 选取结果较好的进行数据分析。原始数据经过基因过滤, 归一化校正处理后, 计算各点的 $M = \log_2 G - \log_2 R$, G 代表绿色信号强度, R 代表红色信号强度) 均值。亲本的杂交芯片以 M 值大于 1 或者小于 -1 为差异 EST, F₂ 代群体由于杂交信号强度不同, 以 M 值大于 0.5 或者小于 -0.5 为差异表达基因。利用贝叶斯 (bayes) 方法统计差异表达基因。

2.2 差异表达基因的染色体定位

通过统计分析, 在 PS、PF 之间与 F₂S、F₂F 之间分别检测到 312、367 个差异表达基因, 其中 24 个共同差异。其中 20 个的染色体定位图 (Based on tigr rice pseudomolecular 3.0 chromosome data) 见图 1, 在各染色体上分布数量见表 1; 另外 4 个未能定位。

2.3 差异 EST 的生物信息学分析

参照北京华大的芯片 Oligo 数据库, 找到相同差异 EST 的 cDNA 序列。利用得到的基因序列, 登录 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 进行 BlastX 分析, 分析结果见表 2。

表 1 各染色体上差异表达基因的数目

Table 1 The number of discrepant expressed genes in each rice chromosome

染色体号 Chromosome	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
差异 EST 数 The number of discrepant ESTs	0	1	3	4	1	0	3	3	1	0	1	3

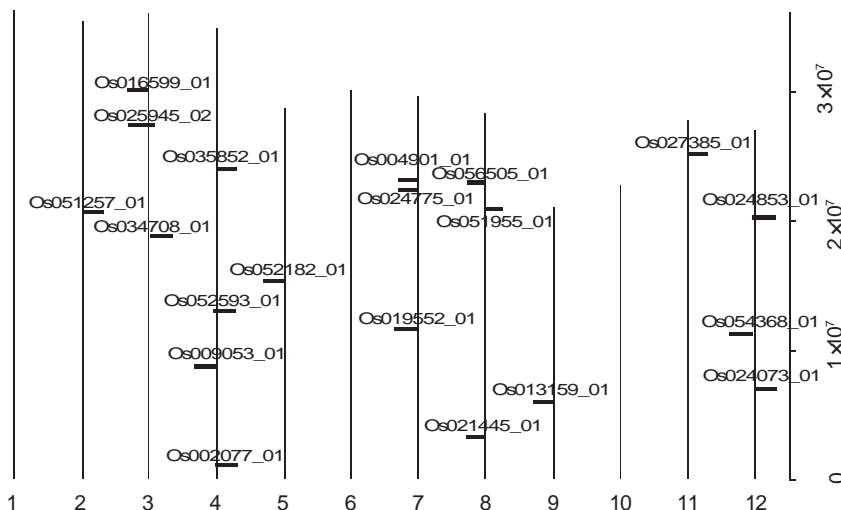


图 1 差异表达 EST 染色体定位图

Fig.1 The chromosome position of discrepant expressed genes

表 2 24 个差异表达基因的 ID、M 值及其功能

Table 2 The ID, M value, functions of the same discrepant expression genes

基因 ID Gene ID	PS-PF M 值	F ₂ S:F ₂ F M 值	基因编码蛋白的功能 The functions of proteins gene encode
Os002077_01	- 1.738	0.744	无 None
Os004901_01	1.855	0.519	无 None
Os009053_01	1.216	- 1.336	叶绿体假定蛋白 [玉米] Chloroplast hypothetical protein [Zea mays]
Os027385_01	1.554	0.562	21 kd 多肽 [日本晴] 21 kd polypeptide [Oryza sativa(japonica cultivar-group)]
Os034708_01	4.485	1.736	反转录因子 [日本晴] Putative retroelement [Oryza sativa(japonica cultivar-group)]
Os035852_01	2.589	1.426	Os035852_30.9 [日本晴] Os035852_30.9 [Oryza sativa(japonica cultivar-group)]
Os056505_01	- 1.430	- 0.732	无 None
Os058410_02	1.683	0.782	无 None
Os013159_01	1.450	1.251	叶绿素 a/b 结合蛋白 [日本晴] Putative chlorophyll a/b-binding protein [Oryza sativa(japonica Cultivar-group)]
Os016599_01	- 2.940	1.117	螺旋- 环- 螺旋 DNA 结合蛋白 [日本晴] Putative helix-loop-helix DNA-binding protein[Oryza sativa(japonica Cultivar-group)]
Os019552_01	- 1.310	- 1.410	无 None
Os021445_01	2.310	3.334	LHY 蛋白 [日本晴] Putative LHY protein [Oryza sativa(japonica cultivar-group)]
Os024073_01	1.140	- 1.262	无 None
Os024775_01	1.720	1.557	无 None
Os024853_01	1.040	- 1.081	假定蛋白 [烟草] Hypothetical protein [Nicotiana tabacum]
Os025945_02	- 1.730	1.018	透性酶 [日本晴] Putative permease [Oryza sativa(japonica cultivar-group)]
Os048092_01	1.200	- 1.179	无 None
Os051257_01	- 1.960	1.181	EL5 [日本晴] EL5 [Oryza sativa(japonica cultivar-group)]
Os051886_01	1.810	- 1.340	无 None
Os051925_01	1.180	- 0.917	无 None
Os051955_01	1.520	1.138	叶绿素 a/b 结合蛋白跨膜糖蛋白 [日本晴] Chlorophyll a/b binding protein presursor [Oryza sativa(japonica Cultivar-group)]
Os052182_01	- 1.480	1.288	无 None
Os052593_01	- 2.20	1.758	转录因子 [水稻] Transcription Factor [Oryza sativa]
Os054368_01	2.470	1.590	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 [日本晴] Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase small subunit [Oryza sativa(japonica cultivar-group)]

通过基因芯片的分析, 得到 24 个可能与育性相关的差异表达基因. *Os034708_01* 编码蛋白为 *retroelement* (又称反转录单元), 是一种散落性反复序列, 它们在染色体上到处分布, 它在基因体结构上扮演很重要的角色. 它们能够藉由中介 RNA 进行扩增, 并且移动到基因体的新位置上, 在外界压力作用下可以被激活^[11]; *Os016599_01* 编码蛋白为 *helix-loop-helix DNA-binding protein*, 它是一种可和真核生物 DNA 结合的转录调控蛋白; *Os025945_02* 编码蛋白为 *permease*, 又称载体蛋白, 是细胞膜上存在的两类主要的转运蛋白之一, 能够与特定溶质结合, 通过自身构象的变化, 将与它结合的溶质转移到膜的另一侧, 载体蛋白有的需要能量驱动, 有的则不需要能量, 以自由扩散的方式运输物质. 差异表达 EST 经过功能分析后, 发现其与光合作

用, 与 DNA 的转录以及植物的生物钟等功能有关, 这也反映了水稻育性相关基因研究的复杂性. 通过染色体定位, 发现在第 3、4、7、8、12 染色体上差异表达 EST 分布相对比较多. 前人对农垦 58S 衍生系 P/TGMS 基因的定位都集中在这几条染色体上^[12,13], 而非农垦 58S 衍生系 P/TGMS 基因较多定位在其它染色体上.

2.4 双向电泳结果

双向电泳每个样品做了 1 个重复实验. PS、PF、F₂S、F₂F 表达蛋白的双向电泳结果扫描图见图 2 每张电泳图约 2 000 个蛋白点. 通过重复实验图片比对, 在 PS、PF 的差异表达蛋白点与 F₂S、F₂F 的差异表达点之间, 找到 6 个比较明显的共同差异点, 这些差异点都是表达量的差异, 且差异变化在 PS、PF 之间与 F₂S、F₂F 之间也不相同 (即上升表达或下降表达的差异) .

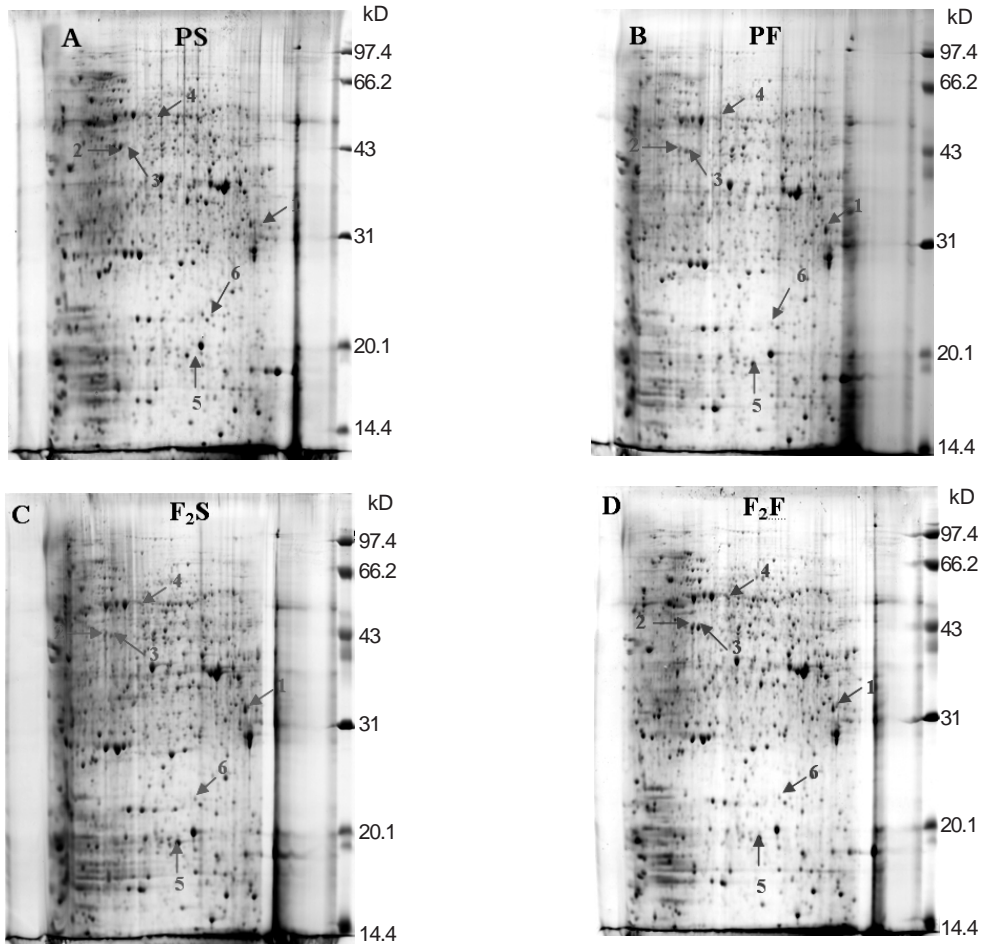


图 2 样品蛋白的双向电泳结果
A、B、C、D 分别为 PS、PF、F₂S、F₂F 的双向电泳图, 图中点 1~6 分别代表共同的差异表达蛋白点, 右边为蛋白 Marker.

Fig.2 The 2-D electrophoresis figures of the sample protein
A, B, C, D stand for the 2-D electrophoresis figure of PS, PF, F₂S, F₂F, respectively; 1~6 in the figure stand for 6 same discrepant proteins; maker is in the right side of the figure.

2.5 质谱及蛋白功能分析

用质谱仪将蛋白多肽成分转变成离子信号, 经过校正去除干扰峰以及角蛋白污染峰等, 并依据质量/电荷之比 (mass/charge, m/z) 对该多肽进行分析. 进入 www.matrixscience.com, 在 mascot 的 Peptide Mass Fingerprint 中进行寻找差异蛋白的同源蛋白, 发现 6 个共同差异蛋白点. 经过分析后, 其中第 1~4 蛋白点功能依次为腺苷酸激酶 (Adenylate Kinase)、肌动蛋白 (Actin)、肌动蛋白 (Actin) 和尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 UDP-glucose pyrophosphorylase, 第 5、6 蛋白点功能未知.

蛋白点 1 为腺核苷激活酶, 是在运输过程中起作用的一类酶. 可以控制细胞孔道的开启, 并不需要耗能, 但却需要 ATP 及 AMP 分子的参与, 控制很多细胞膜内外物质的进出; 蛋白点 2、3 为肌动蛋白, 在植物细胞运动中担负重要作用. 阎隆飞教授用免疫化学法证明, 肌动蛋白与肌球蛋白均定位于花粉管的微丝中, 而且花粉管的顶端生长来源于胞质流动, 肌动球蛋白的凝胶化在胞质流动中起着重要作用, 还观察到百合花粉管中的细胞器运动也靠肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用. 另外, 其研究还发现在植物发育过程中肌动蛋白基因的表达有明显的器官特异性, 在花粉中的表达量比根、茎、叶中高得多^[14], 这表明其在花粉育性变化过程中可能起重要作用; 蛋白点 4 为尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶, 是参与葡萄糖合成尿苷二磷酸葡萄糖 UDPG 过程的一种酶, 它可能在碳水化合物的代谢过程中发挥一定的作用.

3 讨论

由于光温敏核不育现象的复杂性, 给其研究工作带来一定的难度. 在实验设计和操作过程中, 主要采取以下措施: 首先是在实验设计上采用功能基因组技术结合遗传分析的方法, 基因芯片和蛋白组技术保证了高通量信息的获得^[15,16], 再经过亲本与 F₂ 代间的遗传比较分析, 以保证信息获得的准确性; 其次是实验材料的水温处理严格按照实验要求控制, 以保证实验材料育性的分离; 所有实验材料均单株分蘖扩繁, 保证遗传基础一致; 取适时幼穗后, 马上液氮速冻后, 于 -80℃ 保存.

对得到的差异表达基因和差异表达蛋白进行综合分析后, 很遗憾没有发现功能相同或相似的. 光温敏核不育现象是一种十分复杂的生物学现象, 其作用过程可能贯穿整个水稻生育期, 只

是对育性转换时期而没有从水稻全生育期进行分析, 这会造成很多信息的遗漏. 本文提供了一种新的研究思路, 为光温敏核不育基因在分子水平上的研究积累了一些的经验和数据, 为进一步的研究奠定了基础.

参考文献 (References):

- [1] 石明松, 邓景扬. 湖北光周期敏感核不育的发现、鉴定及其利用途径[J]. 遗传学报 SHI M S, DENG J Y. The foundation, identification and application of the photoperiod-sensitive genetic sterility in Hubei[J]. Genetic Journal, 1986, 13(2): 107-112.
- [2] 江树业, 陈启锋, 方宜钧. 与水稻光敏核不育性相关的 cDNA 片段的鉴定和染色体定位[J]. 科学通报 JIANG S Y, CHEN Q F, FANG X J. The identification and chromosome position of cDNA fragments pertinent to the rice photoperiod-sensitive genetic sterility[J]. Science Journal, 1999, 44(9): 2084-2088.
- [3] 陈亮, 梅明华, 徐才国. 鉴定与水稻光敏核不育基因 pms3 连锁的 AFLP-RFLP 标记[J]. 厦门大学学报 (自然科学版) (CHEN L, MEI M H, XU C G. Identification of AFLP-RFLP makers linked to the photoperiod-sensitive male sterile gene pms3 in rice[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2000, 39(4): 421-425.
- [4] 康健, 陈凡, 吴乃虎. 光敏核不育水稻育性相关基因 cDNA 片段的分离[J]. 科学通报 KANG J, CHEN F, WU N H. The separation of cDNA fragment pertinent to the fertility in the photo-sensitive genetic sterile rice[J]. Science Journal, 1998, 43(19): 2078-2082.
- [5] 关和新, 景润春, 何予卿. 水稻不育系和保持系不同发育时期花药 mRNA 差异显示[J]. 中国水稻科学 GUAN H X, JING R C, HE Y Q. Differential display analysis of anther mRNA of rice sterile lines and maintain lines in different development stage[J]. China Rice Science, 1998, 12(4): 215-218.
- [6] 王台, 董哲. 光敏核不育稻的特异叶绿体蛋白质[J]. 植物学报 (WANG T, TONG Z. The special chloroplast proteins in photo-sensitive genetic sterile rice[J]. Plant Journal, 1992, 34: 426-431.
- [7] 白书农, 谭克辉. 湖北光敏核不育水稻农垦 58S 的 60 kD 叶蛋白功能与特征的讨论[J]. 植物学报 BAI S N, TAN K H. The discussion about the function and character of 60 kD leaf protein in hubei photo-sensitive genetic sterile rice nongken 58S[J]. Plant Journal, 1997, 39: 189-192.
- [8] KOH H J, SON Y H, HEU M H, et al. Molecular mapping of a new genetic male sterility gene causing chalky endosperm in rice (*Oryza sativa*) [J]. Euphittica, 1999, 106: 57-62.
- [9] 袁隆平. 杂交水稻学[M]. 北京: 中国农业出版社 YUAN L P. Hybrid Rice[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002. 408-409.
- [10] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学技术出版社 (GUO Y J. The Protein Electrophoresis Experiment Technology [M]. Beijing: Science Technology Press, 1999.
- [11] LIU B, WENDEL J F. Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants[J]. Genome, 2000, 43: 874-880.
- [12] XIAOBANG S. Genetics of photo-period sensitive genetic male sterility of Nongken 58S (*Oryza sativa* L.) [J]. Chinese J Rice Sci, 1992, 6(4): 5-14.
- [13] SOMERVILLE C, SOMERVILLE S. Plant functional genomics [J]. Science, 1999, 285: 383-385.
- [14] 阎隆飞. 从花粉肌动蛋白到作物雄性不育[J]. 科学通报 (YAN L F. From pollen actin to crop female sterility [J]. Science Journal, 1999, 44(23): 2471-2475.
- [15] BOUCHEZ D, HOFTE H. Functional genomics in plants[J]. Plant Physiol, 1998, 118: 725-732.
- [16] DANIEL C, CHAMRA D, G KOERTING E, et al. Interpretation of mass spectrometry data for high-throughput proteomics[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 376: 1014-1022.