

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.01712

## 一个新的水稻逆境响应基因 *OsMsr1* 的表达与克隆

徐孟亮<sup>1,2,3</sup> 陈荣军<sup>1</sup> ROCHA Pedro<sup>1</sup> 李落叶<sup>1</sup> 王曼玲<sup>1</sup> 徐国云<sup>1</sup> 夏新界<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院亚热带农业生态研究所, 湖南长沙 410125; <sup>2</sup> 湖南师范大学生命科学院, 湖南长沙 410081; <sup>3</sup> 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 为深入了解植物的逆境反应机理和发现新的水稻耐逆基因, 采用 Affymetrix 水稻表达芯片(含 51 279 个转录本)分析了超级稻两优培九母本培矮 64S 不同生长发育时期、不同组织器官全基因组在低温、干旱、高温逆境胁迫下的表达水平, 筛选出众多表达水平显著升高与降低的基因。*OsMsr1* (*Oryza sativa* L. multiple stresses responsive gene 1, GenBank 登录号为 EU284112) 是其中一个受高温、低温与干旱诱导、在各生长发育时期与组织器官均显著上调的基因, 用实时定量 PCR 方法对其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, 因此, 此基因为一多逆境响应基因。用 RT-PCR 方法扩增获得了包含其完整 ORF (open reading frame) 的 cDNA 克隆。根据其 ORF 序列进行预测, 此基因编码一个包含 89 个氨基酸残基的小分子蛋白, 分子量约为 10 kD, pI 约为 5。搜索有关数据库, 在水稻、玉米、小麦与拟南芥中找到有高相似性的基因, 但功能未知, 也未发现相同与类似的已知功能的基因保守结构域。对其可能的启动子序列分析, 发现 5 个与逆境反应有关的顺式作用元件。因此, 我们认为该基因为一新的水稻耐逆候选基因, 进一步的研究正在进行。

**关键词:** 水稻; 逆境; 基因芯片; 实时定量 PCR; 基因克隆

## Expression and Cloning of a Novel Stress Responsive Gene (*OsMsr1*) in Rice

XU Meng-Liang<sup>1,2,3</sup>, CHEN Rong-Jun<sup>1</sup>, ROCHA Pedro<sup>1</sup>, LI Luo-Ye<sup>1</sup>, WANG Man-Ling<sup>1</sup>, XU Guo-Yun<sup>1,2</sup>, and XIA Xin-Jie<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, Hunan; <sup>2</sup> Life Science College, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan; <sup>3</sup> Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** To understand mechanism(s) underlying stress responses and discover new stress-tolerance genes in rice (*Oryza sativa* L.), we analyzed a global genome expression profiling of the *indica* cultivar Pei'ai 64S subjected to cold, drought, or heat stresses. Expression profiles were obtained for leaf and panicle tissues at seedling, booting and heading stages from plants under no stress, or cold, drought or heat stresses using the GeneChip Rice Genome Array (Affymetrix) representing 51 279 transcripts from *japonica* and *indica* rice. We identified a large number of genes highly up regulated or down regulated under the stresses. One of these genes, *OsMsr1* (*Oryza sativa* L. Multiple Stresses Responsive Gene 1, GenBank accession: EU284112), was highly induced in leaf and panicle at all the developmental stages, in response to all stresses. The expression profile of *OsMsr1* obtained by the microarray analysis was confirmed by quantitative real-time RT-PCR analysis of the gene. The two sets of data matched very well, suggesting that *OsMsr1* is a multiple stresses 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 encodes a protein of 89 amino

基金项目: 中国科学院“百人计划”项目(02200420062903)

作者简介: 徐孟亮(1964–), 男, 在职博士研究生, 研究方向: 作物耐逆分子生物学。

\*通讯作者(Corresponding author): 夏新界, 研究员, 博士生导师。E-mail: jxxia@isa.ac.cn, Tel: 0731-4619769

Received(收稿日期): 2008-03-27; Accepted(接受日期): 2008-04-16.

acid residues with M.W.  $\approx$  10 kD and pI  $\approx$  5. Searching sequence databases failed to find similarity to any gene of known function, and/or gene/protein domain. Analysis of the putative promoter region for candidate *cis*-regulatory elements using PlantCARE software (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) identified 5 matches to *cis*-elements related to stress responses. Based on the above analyses and results obtained, we propose that *OsMsr1* is a novel candidate gene involved in stress tolerance in rice. Further study on the function of the gene is in progress.

**Keywords:** *Oryza sativa* L.; Stress; Microarray; Real-time PCR; Gene cloning

水稻生产过程中时常遭遇季节性、区域性的干旱、低温、高温等逆境胁迫,严重影响其产量与品质;此外,大量的干旱、冷土、盐碱土不适于水稻栽培。因此,研究水稻对逆境的适应机理,分离水稻的耐逆基因,培育耐逆品种,对于确保水稻稳产与高产,提高中低产田的利用效率,扩大水稻种植面积具有十分重要的意义。现已知道,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<sup>[1]</sup>,涉及许多代谢与生理过程的适应性调整<sup>[2-8]</sup>。最近用基因芯片技术对拟南芥耐寒性的研究表明有许多基因与低温锻炼及耐冻性有关<sup>[1]</sup>。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<sup>[9]</sup>,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。目前已鉴别出不少与干旱、低温及高盐等逆境相关的顺式作用元件<sup>[10-12]</sup>,同时也鉴别出许多编码与这些元件相结合的转录因子的基因,如 *DREB1A*、*DREB2A*、*MYC*、*MYB*<sup>[3,12-15]</sup>等,它们编码的转录因子可参与脱水应答元件与脱落酸诱导的基因表达<sup>[16]</sup>,在水稻中,也分离出了 5 个 *DREB* 的同源序列<sup>[12]</sup>。通过基因工程将克隆出来的耐逆功能基因(如转录因子基因)转入水稻、烟草、拟南芥等植物,可使这些植物的耐逆能力大大提高<sup>[13,17-18]</sup>。虽然在植物耐逆的分子生物学研究方面取得了不少进展,分离了一些耐逆基因,但鉴于众多基因参与逆境反应和众多耐逆基因的存在,克隆更多新的植物耐逆基因并对它们进行功能分析,无论对深入探讨植物的耐逆性机理,还是通过生物技术手段对作物的耐逆性进行遗传改良都十分重要。本研究是在分析水稻全基因组耐逆反应基因芯片数据的基础上,对筛选出的其中一个重要多逆境反应基因的表达与克隆进行报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料栽培与管理

栽培稻培矮 64S (*Oryza sativa* L.)种子经 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min, 自来水冲洗 3 遍, 25℃ 浸种 3 d, 每天换水 1 次, 37℃ 催芽 2~3 d, 分批播于中国科学院亚热带农业生态研究所网室盆中, 于 5 叶期, 一部分作为苗期试验材料; 另一部分移栽至其他盆中, 每盆栽 5 株, 继续置网室自然条件下生长发育, 常规水肥管理与病虫害防治, 作为孕穗期与抽穗开花期的试验材料。

### 1.2 逆境胁迫处理

1.2.1 干旱 倒去盆中水层, 置旱棚逐干, 当叶片开始卷曲 16 h 后取材, 对照也置旱棚, 但盆中保持水层。

1.2.2 高温 将盆中泥水温调至 45℃, 置美国 Percival 公司生产的 PGC15.5 人工气候箱 45℃ 处理 2 h 后取材, 对照置另一 PGC15.5 人工气候箱, 温度为 28℃。处理与对照均在黑暗条件下。

1.2.3 低温 将材料置 PGC15.5 人工气候箱, 苗期 4℃ 处理 12 h 后取材, 孕穗期与抽穗开花期 12℃ 处理 16 h 后取材, 对照置另一 PGC15.5 人工气候箱, 温度为 28℃。处理与对照均在黑暗条件下。

### 1.3 取材与制样

取每个处理与对照材料 4~5 片倒 2 叶、4~5 个未抽出的幼穗或已抽出的开花穗中部, 剪碎, 用液氮磨成干粉状, 立即分装入事先装有 1.0 mL TRIzol 提取液 (Invitrogen) 的 1.5 mL 离心管, 每管约 100 mg, 以低温记号笔编号, 盖紧盖, 摇动, 使样品与 TRIzol 提取液充分混合, 以封口膜封口后置 -80℃ 保存备用。

### 1.4 总 RNA 提取

采用 TRIzol 试剂提取法。将 -80℃ 保存备用的样品取出, 解冻后, 加 200  $\mu$ L 氯仿, 振荡混匀, 4℃, 12 000 $\times$ g 离心 15 min, 小心吸出上层水相, 转入另一离心管, 加 500  $\mu$ L 异丙醇, 沉淀、离心分离出 RNA, 再经 75% 酒精洗涤, 室温微干后, 加适当体积

的 RNase-free 水, 充分溶解, 测量 RNA 浓度。

### 1.5 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操作(2005 年版)。主要包括如下步骤: (1) 总 RNA 的提取和纯化; (2) cDNA 的合成和纯化; (3) 体外转录合成 cRNA 和 cRNA 的纯化; (4) cRNA 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。

### 1.6 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 *OsMsr1*-F: 5'-GCA CGC ACA GTG TGT TGG TT-3', *OsMsr1*-R: 5'-CAC ATC CAT CTT GCT CCA CAA-3', 扩增片段长 142 bp; 内参基因为 18S, 其引物为 18S-F: 5'-CGT CCC TGC CCT TTG TAC AC-3', 18S-R: 5'-CGA ACA CTT CAC CGG ATC ATT-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  $\Delta\Delta Ct = (\text{未知样品 } \Delta Ct) - (\text{Calibrator } \Delta Ct)$ , 未知样品  $\Delta Ct = (\text{内参基因 } Ct) - (\text{目的基因 } Ct)$ ,  $\text{Calibrator } \Delta Ct = (\text{参比样内参基因 } Ct) - (\text{参比样目的基因 } Ct)$ 。

### 1.7 cDNA 克隆

从 GenBank 中搜索到 *OsMsr1* 的同源序列, 设计该基因的 PCR 引物, *OsMsr1*-F: 5'-TCT AGA GAG GCA ATG GAG GTG GA-3', *OsMsr1*-R: 5'-CAC GTG CAG CAA CCA ACA CAC TG-3', 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, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后在 72℃ 下延伸 10 min。PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 回收目的片段, 并与 pMD18-T 载体在 16 连接过夜。连接产物经热激法转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 涂含氨苄青霉素(Ampicillin)的 LB 琼脂板, 37℃ 培养 16~20 h, 挑取单克隆菌落于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 37℃、200 r min<sup>-1</sup> 振荡培养 14 h, 提取质粒, 用

PCR 与酶切鉴定阳性克隆, 送 Invitrogen 公司测序。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 引物由北京塞百盛基因技术有限公司合成, 其他试剂均为分析纯。大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  为本实验室制备并于 -80℃ 保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 *OsMsr1* 在逆境下的表达水平分析

为了研究水稻全基因组在不同生长发育时期与不同组织器官对不同逆境的响应, 发现有效的耐逆功能基因, 采用 Affymetrix 基因芯片系统与含 51 279 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矮 64S 苗期、孕穗期、抽穗开花期叶片与穗中基因在低温、高温、干旱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。*OsMsr1* 是其中一个在低温、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, 根据基因芯片分析结果, 其平均上调幅度为 21.1 倍, 最高上调幅度达 83.4 倍, 最低上调幅度也有 2.8 倍(图 1)。

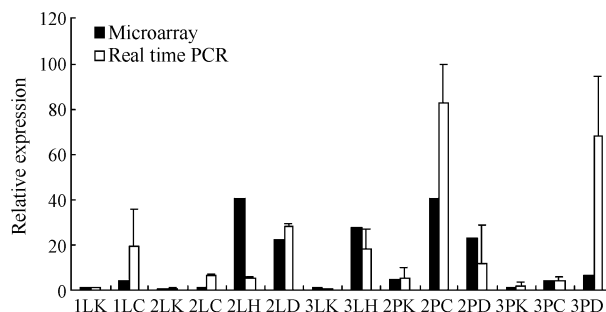


图1 水稻矮 64S 不同生育时期与不同组织器官中 *OsMsr1* 基因在逆境与顺境下的相对表达水平

Fig. 1 Relative expression of *OsMsr1* in leaves and panicles of indica rice cultivar Pei'ai 64S under the various stresses and in normal growth conditions, at different developmental stages

Microarray 代表基因芯片分析结果, Real-time PCR 代表实时 PCR 分析结果。1、2 和 3 分别代表苗期、孕穗期和抽穗开花期; 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。

1: seedling stage; 2: booting stage; 3: heading and flowering stage; L: leaf; P: panicle; K: control; C: cold; H: heat; D: drought.

为了验证这一结果, 采用实时荧光定量 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) *OsMsr1* 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 *OsMsr1* 基因表达活性受低温、干旱、高温逆境因子诱导而升高, 两组数据变化趋势一致。两组数据的变化大小出现的差异, 可能由方法技术本身或所取植物材料的采集差异所造成。

## 2.2 *OsMsr1* 基因 cDNA 的克隆

为研究 *OsMsr1* 在水稻耐逆中的作用, 克隆了其 cDNA, 以便进一步的转基因表达分析。从 GenBank 中搜索到此基因的同源 cDNA 序列, 设计基因特异性引物, 以矮 64S mRNA 为模板, 通过反转录、PCR 扩增, 然后将扩增 DNA 片段连接到 pMD18-T 克隆载体, 酶切鉴定表明 *OsMsr1* cDNA 已被成功克隆(图 2)。测序结果显示此 cDNA 含 328 个碱基, 与 GenBank 公布的 93-11 的相应基因组 DNA (gDNA) 片段(AAAA02011315.1, Range: 1 370~1 697) 的互补序列完全一致, 与日本晴的相应 cDNA 片段序列(AK070075)相差 3 个碱基, 而在 ORF 密码区只相差 2 个碱基, 相似性为 99.09%。

## 2.3 *OsMsr1* 基因结构分析

为获得有关此基因结构与可能的功能信息, 采用相关软件对此基因的序列进行了分析, 找到了其完整的 ORF (open reading frame), 长度仅为 270 bp, 推测的编码蛋白为 89 个氨基酸残基(图 3), 经核苷酸

相似性比对表明此基因没有内含子。根据其 cDNA 克隆所对应的日本晴相应基因组 DNA 序列(AACV01008183.1, Range: 1 285~955)的互补链, 对其可能的启动子区域(AACV01008183.1, Range: 3 086~1 330 的互补链)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 5 个与逆境诱导有关的顺式作用元件(图 3), 它们可能参与此基因对逆境胁迫的响应。

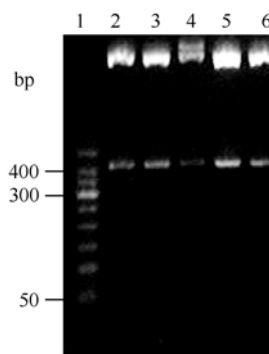


图 2 用 *EcoRI* 与 *HindIII* 双酶切 pMD18-T 阳性克隆获得包含 *OsMsr1* cDNA 的目标带

Fig. 2 Electrophoretic analysis of clones of *OsMsr1* cDNA inserts ligated to pMD18-T

1: Marker; 2~6: 被酶切的阳性克隆。

2~6: Positive clones with the restriction enzymes *EcoRI* and *HindIII*.

```

-1756 TTGATGCAGTGTTCGCTTTGTTGCCGAAAC.....
                                LTR
-1606 TTCCAAAAAATTTTGGCCAAAAATGCCAC.....
                                HSE
-1366 GTATGTTTAATACTTCAAATGTGTGTCGCATATTTCAAA.....
                                ERE
-1046 GAACATTATCTAGTACTCGTGGGCTTGTGGCCAGTTAATCATCATCCGGTCAATG.....
                                MBS
-936 TCATGGCCCGGCGACGTACGGGACGGGCTCCACGTGTGAC.....
                                ABRE
-36  TATATTAGCT.....TGCTTGCTTTGCTTGCATAGCTTCGCCATTTCAAATCTTTG
TATA-box
26  GTTAGGAGTAGCGATCGAGAGAGGCAATGGAGGTGGAGATGGGGACGGCGAGGAGGTGGCGGCTGCGAT
                                M E V E M G H G E E V A A A M
96  GGAGGAGGAGGAGCTGCAGGGGTGGGAGACGCCGAGGAGGAGGAGTGC CGCATCCCGGTGGTGCCGCCG
E E E E L Q G W E T P R R E E G R I P V V P P
166 CAGTGCCCGGCGCGCGAGGAAGAGCCGGTGGCGCTGCGGAGCTGGGGAAGGAGCGCGGGAGCCGC
Q G P A P P R K R P V A L P E L G K E R R E P
236 CCAAGGGCGGGTACTTCCAGCCGCGGACCTCGAGTCGCTCTTCGTGCTCGCGCCGCGCGGAGGCAGGC
P K G G Y F Q P P D L E S L F V L A P P R R Q A
306 GTCCAGCTGCGGTAGTGCTGCTGCGCCAGCCTCCGTGCAGCAGCACGACAGTGTGTTGGTTGCTG
S S C A *

```

图 3 *OsMsr1* 序列、推测的编码蛋白序列及预测的启动子区域顺式作用元件

Fig. 3 Sequences of *OsMsr1*, the deduced ORF, and candidate *cis*-elements in the putative promoter region

其中 ATG 为翻译起始点, \*标示终止密码 TAG, LTR, HSE, ERE, MBS 及 ABRE 分别代表与低温、高温、乙烯、干旱及脱落酸反应有关的顺式作用元件, “...”代表省略的碱基。

The identified matches to stress related *cis*-elements and TATA box in the putative promoter region, and the putative translation initiation site (ATG) and stop codon (TAG) are highlighted and underlined. LTR, HSE, ERE, MBS, and ABRE are *cis*-elements involved in low temperature, heat stress, ethylene, drought, and ABA responses respectively. “...” represents bases without print.

根据推测的此基因编码的蛋白质氨基酸(aa)序列, 经蛋白质相似性比对, 得知其全长蛋白质与日本晴第 3 号染色体上的 Os03g0822400 基因(AK070075; Os.37217)编码的预测蛋白质(BAF13649.1, Hypothetic conserved protein) aa 序列完全一致(图 4)。其蛋白序列的第 15 位 aa 至最后第 89 位 aa 的序列与第 8 号染色体上 P0702E04.15 基因编码的预测蛋白质(BAD11646.1, FtsJ cell division protein-like) 相似性为 91.8%, 其全长序列与第 1 号染色体上的相似基因(CM000138.1, Range: 35713467-35713748) 编码的预测蛋白质(EAZ14125, Unknown protein)相似性为 52.7%; 此外, 其全长序列与玉米 Zm.82699 基因编码的预测蛋白质相似性为 60.4%, 其第 3 位 aa 至最后第 89 位 aa 的

序列与小麦 Ta.33991 基因编码的预测蛋白质相似性为 57.5%, 其全长序列与拟南芥 At.33444 (At5g02220) 基因编码的蛋白质(NP-568097, Unknown protein)相似性为 56.2% (图 4)。虽然 BAD11646.1 注解为类似的 FtsJ cell division protein (或 23S rRNA methylase), 但 *OsMsrI* 编码的蛋白质与典型的 FtsJ cell division protein 相似性只有 9.1%, 而且与 FtsJ 蛋白家族重要的保守氨基酸残基没有相似性<sup>[20]</sup>, 在水稻基因图谱上, *OsMsrI* 的对应基因(Os03g0822400)与相邻的编码 FtsJ 类似蛋白(233aa)的基因(Os03g0822300)是完全分开的, 因此, *OsMsrI* 基因不是 FtsJ cell division protein。另外, 也未能找到相同的或类似的已知功能的蛋白保守结构域。因此, *OsMsrI* 编码的蛋白质功能未知。

OsMsrI	(1)	-----MEVEMGHGEEVAAAMEEEELQGWPTRREECRIPVVPVQCPA-PPRKRVPALP
BAF 13649.1	(1)	-----MEVEMGHGEEVAAAMEEEELQGWPTRREECRIPVVPVQCPA-PPRKRVPALP
BAD 11646.1	(1)	-----M-EEELQGWPTRREECRIPVMP-QCPA-PPRKRVPVLP
EAZ 14125	(1)	MESKAEALAAAAAAAAAASAASTGGGHACGGWETPKREECRIPATLP-CPA-APRAVPDF-
Zm. 82699	(1)	-----EMEVEHGGEMMLVEAAAADEEGWQTPKREDGRIPVVPV-CPA-PPSKRKAALM
Ta. 33991	(1)	-----VEVPMGYMTVTVAEE-QGWETPRDDGRIPALPA-CPPPPPRKKPAVEL
At. 33444	(1)	-----MEV-VERKTE----MAE---EGCTTPRSTMYRIPVASV-CPP-PPRKK-----
Consensus	(1)	-----MEVE-G---EVA--M-EEELQGWPTRREECRIPVVPVQCPA-PPRKRVP-L-
OsMsrI	(53)	ELGK---ERREPPKGGYFQPPDLESFLVAPPRRQASSCA-
BAF 13649.1	(53)	ELGK---ERREPPKGGYFQPPDLESFLVAPPRRQASSCA-
BAD 11646.1	(37)	ELGK---ERREPPKGRYFQPPDLELLFVLVPPRRQASSCV-
EAZ 14125	(61)	--GK---RRGPPKNGYFQPPDLEALFALAP-RRQASSCA-
Zm. 82699	(53)	APEAAGGSRRREDPKGGYFQPPDLESFLVAPPRAASAA--
Ta. 33991	(50)	GKAA---PRREPPKGGYFQPPDIESLFMLAPPRRHAASTGA
At. 33444	(39)	---LMVVRKRDPPRNGYFQPPDLETLF-YAQPRREA--CA-
Consensus	(44)	--G-----RREPPKGGYFQPPDLESFLVAPPRRQASSC--

图 4 *OsMsrI* 编码蛋白与其他类似蛋白的比对

Fig. 4 Alignment of the *OsMsrI* protein and other similar sequences

BAF13649.1、BAD1164.1、EAZ14125 为水稻的蛋白, Zm.82699、Ta.33991、At.33444(NP-568097.1) 为玉米、小麦与拟南芥的蛋白, 大写字母表示氨基酸, 括号中数字代表左边第一个氨基酸的序号。

BAF13649.1, EAZ14125, and BAD11646 are similar sequences in rice. Zm.82699, Ta.33991, and At.33444 (NP-568097.1) are similar protein sequences in corn, wheat, and Arabidopsis, respectively. Capital letters represent aa. Numbers in bracket represent the sites of the first aa in the left.

在进行蛋白质相似性比对时, 还在水稻中找到一个注解为 FtsJ cell division protein-like 的类似蛋白 (GenBank 登录号为 AA018459.1), 它由 403 个 aa 组

成, 其最后 68 个 aa 与 *OsMsrI* 基因编码蛋白第 22 位 aa 至 89 位 aa 完全匹配(图 5), 但经分析发现此蛋白的预测是错误的。原因是其第 1 位 aa 至 231 位 aa

MSGAGGTADFFYREAQRLGYVARSAFKLIQIQKHKLIPGA AVL DLGCAPGAWLQVACQNLGPLEKGGVIVGV DVKK  
VKVPSAHCDSDRVTVCA DVMALMKQQA RAMSPQERGF SVILSDMCPVVS GITT KDAAISCELGMRALSLAVGKMKAKD

Putative FtsJ coded by gene Os03g0822300

SDCIAILEKFQSSTEPDPDEDGILRRGGS LVIK FLENE DIPFGFKCKEKF KVSLLRPKATR SSSREIFMVCEGRGFSVAPR  
WHPLSHGPATYGTGSTCHAAHSLVELRTVGLQREAPKCSDLKAQAQPA AFVRIPRGASLPATRNAAGLHSTLLVASLLHITTH  
RGGTHFYISLVSGWETPRREECRIPVVPVQCPAPPRKRVPALPELGKERREPPKGGYFQPPDLESFLVAPPRRQASSCA

Part sequence of amino acids coded by gene Os03g0822400

图 5 预测的水稻蛋白 AA018459.1 的氨基酸序列

Fig. 5 Amino acids sequence of deduced rice protein AA018459.1

带下划线并加粗的部分为两个不同基因编码的氨基酸序列, 它们之间的氨基酸是根据两基因间的几段非翻译序列推译而来。The highlighted and underlined capital letters represent amino acids coded by two different genes, and the amino acids sequence between them was deduced falsely from a few no translation sequences.

正好与 Os03g0822300 编码的 FtsJ 类似蛋白第 1 位 aa 至 231 位 aa 完全匹配, 而其第 335 位 aa 至 403 位 aa 则为另一基因 Os03g0822400 编码的一段 aa 序列, 中间区第 232 位 aa 至 334 位 aa 是根据两基因间几段非翻译序列预测而来(图 5)。

### 3 讨论

植物在逆境顺应(stress acclimation)过程中, 许多基因的表达会发生改变, 由此导致体内一些生物化学与生物物理过程的适应性调整, 如膜组分的改变, 可溶性蛋白的增加, 糖分与脯氨酸的积累等, 因而, 耐逆性增强<sup>[2-8,19]</sup>, 部分逆境反应基因往往就是耐逆功能基因, 参与植物的耐逆适应过程。本文报道的 *OsMsr1* 基因是在不同发育时期、不同组织器官对高温、低温、干旱均有响应而显著上调的基因, 而且, 短时间高温处理便会大幅上调(用基因芯片与实时定量 PCR 两种分析方法所得上调倍数进行平均, 孕穗期、抽穗开花期叶片高温处理 2 h 分别上调 48.3 与 37.1 倍)。已有研究指出, 对逆境最先作出反应的是一些编码转录因子的基因, 逆境处理 15 min 便可检测到它们的变化, 而在 2 h 左右达到高峰, 如编码 CBF/DREB 的基因, 其后是这些基因对其下游一些效应基因的调控<sup>[19]</sup>。鉴于 *OsMsr1* 对多种逆境均有响应及短时高温便能诱导其大量表达的特点, 加上在其可能的启动子区域找到一些与逆境相关联的顺式作用元件, 根据其 ORF 序列预测的蛋白质又很小, 因此我们将其作为一个重要的候选耐逆功能基因(可能为编码转录因子的基因)进行研究。需要说明的一点是因条件限制, 虽未能在每一发育时期、每一组织器官进行每一种逆境处理来对 *OsMsr1* 基因的表达进行芯片分析, 而代之以每一发育时期选择叶或(和)穗进行 1~3 种逆境处理来分析, 但这并不影响获得该基因在不同发育时期、不同组织器官对不同逆境响应的整体认识, 进一步的详细表达分析可通过实时定量 PCR 方法来实现。

### 4 结论

在超级稻两优培九母本培矮 64S 中发现一个在不同生育时期、不同组织器官对低温、干旱、高温均有响应而表达水平显著上调的耐逆候选基因 *OsMsr1*, GenBank 登录号为 EU284112。获得了包含此基因完整 ORF 的 cDNA 克隆, 大小为 328 bp, 无内含子。其 ORF 长为 270 bp, G+C 含量为 74.4%, 此

基因编码一个包含 89 个氨基酸残基的小分子蛋白, 分子量约为 10 kD, 等电点约为 5。在水稻、玉米、小麦与拟南芥中找到有高相似性的基因, 但功能未知, 也未发现相同与类似的已知功能的基因保守结构域。在此基因可能的启动子区域发现 5 个与逆境反应有关的顺式作用元件。

### References

- [1] Hannah M A, Heyer A G, Hinch D K. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 2005, 1: 179–196
- [2] Browse J, Xin Z. Temperature sensing and cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 241–246
- [3] Fowler S, Thomashow M F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, 2002, 14: 1675–1690
- [4] Griffith M, Yaish M W F. Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. *Trends Plant Sci*, 2004, 9: 398–405
- [5] Seki M, Kamei A, Shinozaki K. Molecular responses to drought, salinity, and frost: Common and different paths for plant protection. *Curr Opin Biotech*, 2003, 14: 194–199
- [6] Thomashow M F. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 571–599
- [7] Xin Z, Browse J. Cold comfort farm: The acclimation of plant to freezing temperatures. *Plant Cell Environ*, 2000, 23: 893–902
- [8] Zhang J X, Klueva N Y, Wang Z, Wu R, Ho T H D, Nguyen H T. Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2000, 36: 108–114
- [9] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee B H, Hong X, Agarwal M, Zhu J K. ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Gene Dev*, 2003, 17: 1043–1054
- [10] Wang H, Datla R, Georges F, Loewen M, Cutler A. Promoters from kin1 and cor6.6, two homologous *Arabidopsis thaliana* genes: Transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA, osmoticum and dehydration. *Plant Mol Biol*, 1995, 28: 615–617
- [11] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10, 1391–1406

- [12] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet E G, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi S K. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-, and cold-responsive gene expression. *Plant J*, 2003, 33: 751–763
- [13] Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi A K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 6309–6314
- [14] Vannini C, Locatelli F, Coraggio I. Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increase chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J*, 2004, 37: 115–127
- [15] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel *cis*-acting-element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, 6: 251–264
- [16] Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 1997, 9: 1859–1868
- [17] Babu R C, Zhang J X, Blum A, David Ho, Wu R, Nguyen H T. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci*, 2004, 66: 855–862
- [18] 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. *Plant Physiol*, 2005, 138: 341–351
- [19] Buskirk H A V, Thomashow M F. Arabidopsis transcription factors regulating cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 2006, 126: 72–80
- [20] Bügl H, Fauman E B, Staker B L, Zheng F, Kushner S R, Saper M A, Bardwell J C, Jakob U. RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell*, 2000, 6: 349–360

## 欢迎订阅 2009 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的全国性学术期刊，前身可追溯到 1919 年 1 月中华农学会创办的《中华农学会丛刊》。主要刊登农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、生态、种质资源、谷物化学、贮藏加工以及与农作物有关的生物技术、生物数学、生物物理、农业气象等领域以第一手资料撰写的学术论文、研究报告、简报以及专题综述、评述等。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》从 1999 年起连续 10 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助，2006—2008 年连续 3 年获“中国科协精品科技期刊工程项目（B 类）”资助。从 2002 年起连续 6 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2005 年获“第三届国家期刊奖提名奖”。据北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览（2008 年版）》登载，《作物学报》被列在“农学、农作物类核心期刊表”的首位。《作物学报》为月刊，2009 年 192 页/期，定价：50 元/册，全年 600 元。可通过全国各地邮局订阅，刊号：ISSN 0496-3490，CN 11-1809/S，邮发代号：82-336。也可向编辑部直接订购。

编辑部地址：北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农科院作物所 《作物学报》编辑部（邮编 100081）

联系电话：010-82108548；传真：010-82105793；E-mail：xbzw@chinajournal.net.cn

网址：<http://www.chinacrops.org/zwxw/>（向读者免费提供最新录用、下期、当期及过刊全文，有在线投稿、在线审稿、在线查询等功能。）